

棉花中5-羟色胺含量的时空动态及其对棉铃虫生长发育的影响

孙佩瑶 滕东 吕贝贝 张航 张永军*

(中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家实验室, 北京 100193)

摘要: 为明确棉花中5-羟色胺含量的时空动态及其对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 生长发育的影响, 采用高效液相色谱方法检测不同棉花品种(系)中5-羟色胺含量的时空动态, 并以添加外源5-羟色胺的人工饲料饲喂棉铃虫, 分析5-羟色胺对其生长发育的影响。结果表明, 不同棉花品种(系)叶片中5-羟色胺的含量为5.0~20.8 $\mu\text{g/g}$, 其中蕾期与花期棉株叶片中5-羟色胺的含量均高于苗期与铃期棉株叶片, 除个别品种(系)外差异均达显著水平。饲喂添加外源5-羟色胺的人工饲料可导致棉铃虫化蛹提前、发育历期缩短以及蛹重增加。10 $\mu\text{g/g}$ 和100 $\mu\text{g/g}$ 的5-羟色胺对棉铃虫幼虫的死亡率或没有影响或降低死亡率, 但是极高浓度(500 $\mu\text{g/g}$ 和1 000 $\mu\text{g/g}$)的5-羟色胺能够提高棉铃虫幼虫的死亡率。表明常规棉花蕾期与花期较高含量的5-羟色胺可能有利于棉铃虫的生长发育, 在抗虫品种(系)培育中可将低5-羟色胺含量作为抗虫种质资源的参考指标。

关键词: 棉花; 5-羟色胺; 时空动态; 抗性

Temporal and spatial dynamics of 5-hydroxytryptamine content in cotton and its effects on the growth and development of cotton bollworm *Helicoverpa armigera*

Sun Peiyao Teng Dong Lü Beibei Zhang Hang Zhang Yongjun*

(State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: In order to clarify the temporal and spatial dynamics of 5-hydroxytryptamine (5-HT) content in cotton and its effects on the growth and development of cotton bollworm *Helicoverpa armigera*, a high performance liquid chromatography (HPLC) method was established for detecting 5-HT in cotton. Based on the HPLC method, the temporal and spatial dynamics of 5-HT content in different varieties (lines) of cotton were determined. In addition, exogenous 5-HT was added to artificial diets to feed larvae of cotton bollworm, and its effect on the growth and development of this insect was investigated. The results showed that the content of 5-HT in cotton leaves ranged from 5.0 $\mu\text{g/g}$ to 20.8 $\mu\text{g/g}$, and the contents during budding stage and flowering stage were significant higher than those during seedling and boll-setting stages. Addition of exogenous 5-HT resulted in earlier pupation of the cotton bollworm, shortened development period and increased pupal weight. The 5-HT at 10 $\mu\text{g/g}$ and 100 $\mu\text{g/g}$ did not affect or reduce the mortality of cotton bollworm larvae, but extremely high concentrations of 5-HT (500 $\mu\text{g/g}$ and 1 000 $\mu\text{g/g}$) increased the mortality of cotton bollworm larvae. The study indicated that the higher content of 5-HT at the budding and flowering stage of conventional cotton might be beneficial to the growth and development of cotton bollworm. In the breeding of insect-resistant varieties

(lines), lower 5-HT content can be used as a reference index for insect-resistant germplasm resources.

Key words: cotton; 5-hydroxytryptamine; temporal and spatial dynamics; insect resistance

5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)又名血清素,广泛存在于动植物体内。在哺乳动物体内,5-羟色胺能够调控多种生理行为,特别是对情绪有调节作用,在医学领域多用于治疗抑郁症、失眠等精神类疾病(Akula et al., 2011; Pelagio-Flores et al., 2011)。特别是5-羟色胺在昆虫行为调控与免疫反应中发挥着重要作用(Zhang & Gaudry, 2016)。如5-羟色胺能够降低昆虫的取食量,与其他激素协同促进部分昆虫卵的成熟发育或输卵管的收缩,甚至影响昆虫表型分化以及对性信息素的反应(熊佳新等, 2019)。1954年,5-羟色胺首次在刺毛豇豆 *Mucuna pruriens* 中被鉴定到(Bowden et al., 1954),目前,已在37科90多种植物中鉴定到该物质(Erland et al., 2016)。但是,在棉花中尚未见有关该物质的报道。

植物中的5-羟色胺不仅参与植物生长发育、开花、果实成熟及种子形成(Peleg & Blumwald, 2011),而且在植物防御反应中也发挥着重要作用(Iven et al., 2012; Dubouzet et al., 2013)。5-羟色胺的前体物质是分支酸,分支酸在邻氨基苯甲酸合酶、色氨酸合成酶、色氨酸脱羧酶和色胺5-羟化酶等的作用下生成5-羟色胺。同时,分支酸也是重要植物激素水杨酸的前体物质,5-羟色胺与水杨酸的生物合成存在负调控关系。水稻中CYP71A1具有色胺5-羟化酶活性,可直接催化5-羟色胺的生成(Fujiwara et al., 2010)。添加外源5-羟色胺能够增强植物抗病性,如5-羟色胺处理水稻能够抑制稻瘟病菌 *Magnaporthe grisea* 和水稻胡麻斑病菌 *Bipolaris oryzae* 的生长(Ishihara et al., 2008; Fujiwara et al., 2010)。最近的研究表明,野生型水稻被褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 取食能够诱导CYP71A1基因上调表达,导致5-羟色胺含量增加,而CYP71A1基因敲除突变体中不能产生5-羟色胺,对褐飞虱具有更强的抗性。另外,人工饲料中添加外源5-羟色胺有利于褐飞虱和二化螟 *Chilo suppressalis* 的生长发育,表明降低水稻5-羟色胺的含量可增强植物抗虫性(Lu et al., 2018)。

棉花是重要的经济作物,在生长过程中常遭受多种害虫为害。当前,棉花植株体内是否存在5-羟色胺尚不明确,其对棉花害虫的作用也鲜有报道。本研究通过建立棉花5-羟色胺的高效液相色谱检测方法,分析棉花植株中5-羟色胺含量的时空动态,并

在人工饲料中添加外源5-羟色胺研究其对棉铃虫生长发育的影响,以期为棉花抗虫种质鉴定提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料

供试棉花:GK-19、万丰201、奥棉618、奥瑞金002、中植棉2号、冀棉668、夏早2号、08生试5号、百士特1号F1、新陆早17号、亚洲棉、冀棉616以及新陆中29共13个棉花品种(系)的种子由河南科林种业有限公司提供,种植于中国农业科学院植物保护研究所新乡科研中试基地,1个试验小区播种1个棉花品种(系),小区大小为30 m×20 m,小区随机排列,每个品种(系)3次重复。生长期不施用任何农药,不打顶,不摘边心,其他为常规农事管理。

供试昆虫:棉铃虫为1996年采自河南省新乡市棉田的96S敏感系棉铃虫,用人工饲料于温度(27±2)℃、光周期14 L:10 D、相对湿度(75±10)%条件下饲养至今,未接触过任何杀虫剂(梁革梅等, 1999)。

试剂和仪器:99% 5-羟色胺,德国Sigma公司;99.9% 三氟乙酸,百灵威(中国)公司;色谱级甲醇,美国Thermo Fisher公司。L1200系列高效液相色谱仪、ZORBAX SB C18色谱分析柱(4.6 mm×250 mm, 填充物粒径5 μm),美国Agilent公司;5804R冷冻离心机,德国Eppendorf公司;MD 200干式氮吹仪,杭州奥盛有限公司;24孔培养板,美国Corning公司。

1.2 方法

1.2.1 棉花中5-羟色胺高效液相色谱检测方法的建立

称取5-羟色胺标准品10 mg于容量瓶中,用50%甲醇溶液配制成1 mg/mL的标准品溶液,梯度稀释至0.1、1.0、10、50和100 μg/mL,将该5个浓度的5-羟色胺标准品连续进样,根据所得峰面积响应值及对应浓度求得线性回归方程。色谱条件:C18色谱柱,流动相为甲醇:0.3%三氟乙酸水溶液(体积比1:9),柱温45℃,流速0.5 mL/min,进样量10 μL,检测波长280 nm。

采用外标法进行定量分析。同一天内3个浓度(1、10、100 μg/mL)连续进样3针测定日内差精密度,3个浓度连续3 d进样1针以测定日间差精密度。将样品测得的峰面积响应值 y_i 代入回归方程求得

5-羟色胺浓度 x_1 ,向该样品中加入浓度为 x_3 的5-羟色胺标准品,测得其峰面积响应值 y_2 ,并求得5-羟色胺浓度 x_2 ,计算得到该样品的回收率。回收率= $(x_2-x_1)/x_3 \times 100\%$ 。

1.2.2 棉花样品前处理及5-羟色胺含量测定

分别取不同品种(系)棉花苗期、蕾期、花期和铃期的第3片叶,每个小区随机采取10~15株的棉花叶片,3个小区重复取样。将不同生育期不同品种(系)棉花叶片迅速用液氮冷冻并研磨成粉分装于15 mL离心管中,置于 -80°C 冰箱保存备用。称取1 g冻干粉置于15 mL离心管中,加入5 mL甲醇,室温下振荡2 h,以5 000 g离心10 min,取上清液并用0.45 μm 有机滤膜过滤,转移至新的离心管中在氮吹仪内浓缩烘干,加入50%甲醇溶液1 mL进行再溶解,用0.22 μm 滤膜过滤后进样。采用高效液相色谱法测定棉花组织样品中的5-羟色胺含量,色谱分析条件和测定方法同1.2.1。

1.2.3 5-羟色胺对棉铃虫生长发育的影响测定

称取5-羟色胺标准品并用甲醇溶解,加入人工饲料中充分混匀,饲料中5-羟色胺浓度分别为10、100、500和1 000 $\mu\text{g/g}$,以饲料中添加等量甲醇作为

对照。每个浓度处理3次重复,每个重复33头。初期使用24孔培养板饲养棉铃虫初孵幼虫,待棉铃虫幼虫长至3龄时将其转移到直径4 cm、高3 cm的小型养虫盒中单头饲喂。每天记录棉铃虫体重、发育历期以及死亡情况,以细针触动虫体无反应者判断为死亡,并计算化蛹率、蛹重和死亡率。

1.3 数据分析

试验数据用SPSS 23软件进行处理,用one-way ANOVA进行方差分析,并采用Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 棉花中5-羟色胺高效液相色谱检测方法的建立

2.1.1 标准曲线及线性分析

5-羟色胺标准品在17.7 min出峰,且5个浓度0.1、1.0、10、50和100 $\mu\text{g/mL}$ 间有良好的线性关系(图1-A),线性回归方程为 $y=12.536x-4.3$, $r=0.999$,其中 x 为5-羟色胺标准品浓度, y 为峰面积响应值。另外,棉花样品在17.7 min也出现相同峰形(图1-B),表明该方法可有效测定棉花中5-羟色胺的含量。

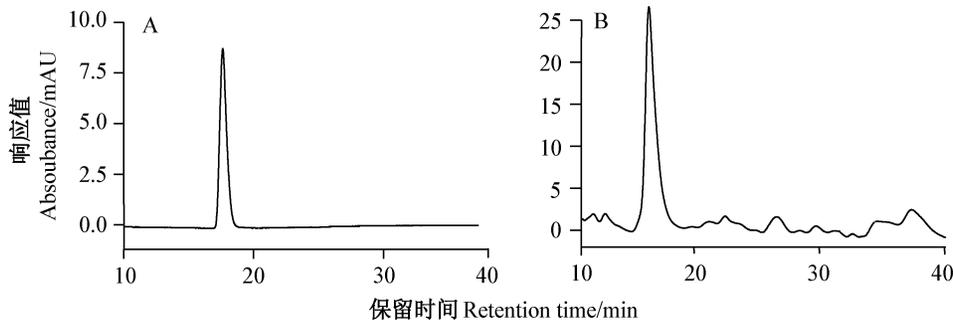


图1 5-羟色胺标准品(A)与棉花样品中5-羟色胺(B)的高效液相色谱图

Fig. 1 The high performance liquid chromatogram analysis of authentic 5-hydroxytryptamine (A) and 5-hydroxytryptamine in cotton samples (B)

2.1.2 精密度测试及样品回收率

5-羟色胺日内精密度和日间精密度符合生物样品的检测标准,相对标准偏差低于2.76%(表1)。该

方法中,5-羟色胺的回收率在95.49%~101.99%之间,符合生物样品回收率的要求范围(表2)。表明所建高效液相色谱检测方法可靠。

表1 5-羟色胺的精密度测试结果

Table1 Precision analysis of 5-hydroxytryptamine

分析物 Analyte	含量 Content/ ($\mu\text{g/mL}$)	日内精密度 Intraday difference			日间精密度 Day difference		
		平均峰面积 Average peak area	标准偏差 Standard deviation	相对标准偏差 Relative standard deviation/%	平均峰面积 Average peak area	标准偏差 Standard deviation	相对标准偏差 Relative standard deviation/%
5-羟色胺	1	9.80	0.10	1.02	9.60	0.26	2.76
5-hydroxytryptamine	10	117.13	1.50	1.28	115.56	2.45	2.12
	100	1 252.97	11.94	0.95	1 250.77	3.02	0.24

2.2 棉花不同生长期叶片中5-羟色胺的含量

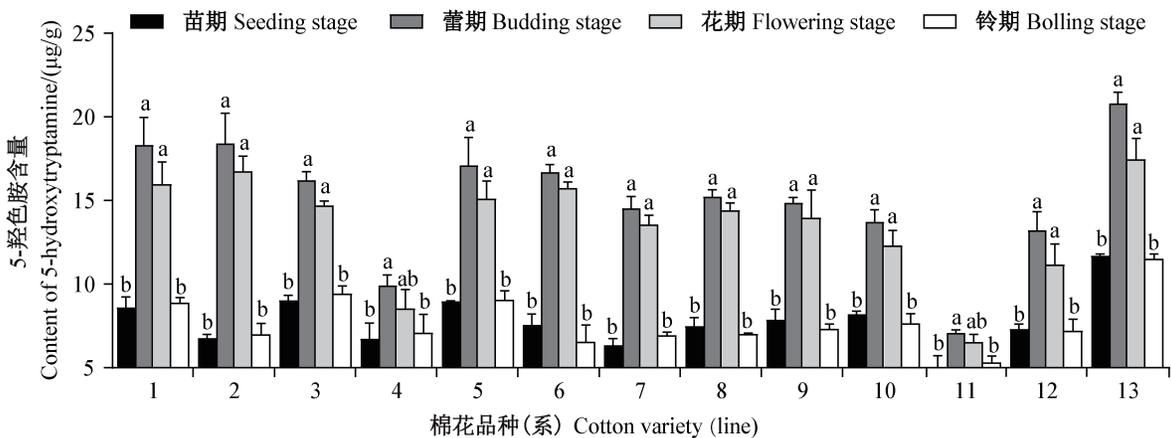
不同品种(系)棉花不同生长期(苗期、蕾期、花期和铃期)叶片中的5-羟色胺含量存在显著差异($P < 0.05$)。所测棉花品种(系)中的002(奥瑞金)和亚洲棉蕾期叶片中的5-羟色胺含量显著高于苗期及铃期叶片,花期叶片中的5-羟色胺含量也高于苗期及铃期叶片,但差异不显著,其余品种(系)蕾期和花期叶

片中的5-羟色胺含量均显著高于苗期及铃期叶片,蕾期叶片中的5-羟色胺含量均略高于花期叶片,但两者差异不显著。其中,新陆中29号蕾期叶片中的5-羟色胺含量最高,达20.8 $\mu\text{g/g}$,为苗期叶片中5-羟色胺含量的1.78倍;万丰201蕾期叶片中的5-羟色胺含量次之,为18.4 $\mu\text{g/g}$,是苗期叶片中5-羟色胺含量的2.72倍(图2)。

表2 5-羟色胺的回收率

Table 2 Recovery rate of 5-hydroxytryptamine

分析物 Analyte	标品加入量 Standard addition/ $(\mu\text{g/mL})$	5-羟色胺含量 5-hydroxytryptamine content/ $(\mu\text{g/mL})$	实际含量 Actual content/ $(\mu\text{g/mL})$	回收率 Recovery/ $\%$	相对标准偏差 Relative standard deviation / $\%$	平均相对标准偏差 Average relative standard deviation/ $\%$
5-羟色胺 5-hydroxytryptamine	1	1.77	2.76	99.63	2.20	1.56
			2.79	101.87		
			2.74	97.48		
	10		11.32	95.49	1.09	
			11.45	96.87		
			11.52	97.56		
			101.82	100.06		
	100		101.05	99.28	1.39	
			103.76	101.99		



1: GK-19; 2: 万丰201; 3: 奥棉618; 4: 002(奥瑞金); 5: 中植棉2号; 6: 冀棉668; 7: 夏早2号; 8: 08生试5号; 9: 百士特1号F1; 10: 新陆早17号; 11: 亚洲棉; 12: 冀棉616; 13: 新陆中29。1: GK-19; 2: Wanfeng 201; 3: Aomian 618; 4: 002 (Aoruijin); 5: Zhongzhimian 2; 6: Jimian 668; 7: Xiaozao 2; 8: 08 Shengshi 5; 9: Baishite 1 F1; 10: Xinluzao 17; 11: Yazhoumian; 12: Jimian 616; 13: Xinluzhong 29.

图2 不同棉花品种(系)不同发育时期叶片中5-羟色胺的含量

Fig. 2 The contents of 5-hydroxytryptamine in leaves of different cotton varieties at different developmental stages

图中数据为平均数 \pm 标准差。不同字母表示同一品种(系)不同生长期处理之间经Duncan氏新复极差法检验差异显著($P < 0.05$)。Data are mean \pm SD. Different letters indicate significant difference among developmental stages in the same variety (line) by Duncan's new multiple range test ($P < 0.05$).

2.3 添加外源5-羟色胺对棉铃虫生长发育的影响

对照组棉铃虫化蛹高峰集中在第17天,而经10、100 $\mu\text{g/g}$ 的5-羟色胺处理后,棉铃虫化蛹高峰提

前至第15天(图3-A),表明饲料中添加外源5-羟色胺能够导致棉铃虫蛹期提前。对照组棉铃虫的蛹重平均为189.47 mg,而10、100和1 000 $\mu\text{g/g}$ 的5-羟色

胺处理后,棉铃虫的蛹重平均分别为245.07、233.37和233.52 mg,均显著高于对照组(图3-B),表明饲料中添加外源5-羟色胺能够导致棉铃虫蛹重显著增加。10 $\mu\text{g/g}$ 的5-羟色胺处理对棉铃虫幼虫的死亡

率没有影响,100 $\mu\text{g/g}$ 的5-羟色胺处理能够降低棉铃虫的死亡率,但极高含量(500、1 000 $\mu\text{g/g}$)的5-羟色胺处理则导致棉铃虫幼虫的死亡率显著增加(图3-C)。

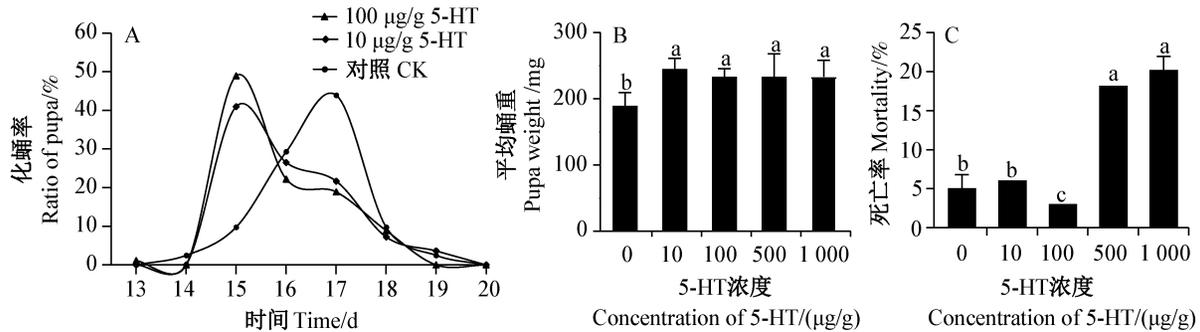


图3 外源5-羟色胺(5-HT)对棉铃虫生长发育的影响

Fig. 3 Effects of exogenous 5-hydroxytryptamine (5-HT) on the growth and development of cotton bollworm

图中数据为平均数 \pm 标准差。不同小写字母表示不同浓度处理之间经Duncan氏新复极差法检验差异显著($P<0.05$)。Data are mean \pm SD. Different letters indicate significant difference among different concentration treatments by Duncan's new multiple range test ($P<0.05$).

3 讨论

5-羟色胺在抗氧化、抗衰老以及响应生物与非生物胁迫的防御反应中发挥着重要作用,而且其还是重要的植物生长调节剂——褪黑素的前体物质。正常情况下,植物中5-羟色胺的含量较低,且其稳定性易受温度、pH、金属离子等因素影响(Huang & Mazza, 2011)。本研究在试验过程中发现,棉花样品处理后应立即进样,避免样品中有效成分发生反应或降解而出现沉淀物等堵塞检测仪器,影响检测结果。由于棉花中成分较为复杂,本试验建立的5-羟色胺高效液相色谱检测方法降低了流动相的流速,以使目标物质清晰地分离出来;同时省略了C18小柱富集的步骤,降低了预处理成本和时间,而且使用0.3%三氟乙酸和甲醇作为流动相,基线更加平滑稳定,目的峰分离效果更好。生物或非生物因子胁迫能够诱导植物体内5-羟色胺含量增多积累。例如,白花曼陀罗 *Datura metel* 幼嫩花蕾中的5-羟色胺含量最高,可能是由于幼嫩组织对于冷胁迫等环境因子更加敏感而导致5-羟色胺的积累(Murch et al., 2009)。水稻被褐飞虱和二化螟取食后,植株内5-羟色胺生物合成的相关基因会被诱导表达,其含量会增多积累(Ishihara et al., 2008; Lu et al., 2018)。本研究发现不同品种(系)棉花叶片中5-羟色胺的含量在不同生长期存在显著差异,大部分棉花品种(系)蕾期与花期叶片中5-羟色胺的含量显著高于苗期与

铃期叶片中的。5-羟色胺含量在棉花蕾期及花期叶片中的增多一方面可能与棉花的生长发育密切相关,另一方面也可能与该时期田间植食性昆虫频发为害有关,如绿盲蝽 *Apolygus lucorum* 会在棉花蕾期大量迁入棉田为害(Pan et al., 2015; 2021)。本课题组在棉花抗虫品种(系)的田间鉴定中也发现棉花叶片中5-羟色胺的含量与田间绿盲蝽发生动态有一定相关性(未发表数据)。

本研究中,5-羟色胺处理后棉铃虫的蛹重显著高于对照,处理组的化蛹高峰较对照组有所提前,且100 $\mu\text{g/g}$ 的5-羟色胺处理能够降低棉铃虫的死亡率,说明5-羟色胺的摄入有利于棉铃虫的生长发育。Lu et al. (2018)研究发现在人工饲料中添加5-羟色胺能够增加褐飞虱的存活率以及二化螟的体重,这与本研究结果一致。因此,在培育抗虫品种(系)的过程中可将低5-羟色胺含量作为抗虫种质资源的参考指标。但是,极高浓度的5-羟色胺,如500 $\mu\text{g/g}$ 与1 000 $\mu\text{g/g}$ 处理会导致棉铃虫幼虫死亡率显著升高,可能是由于高浓度的5-羟色胺造成了棉铃虫幼虫生理紊乱,增加了棉铃虫幼虫的死亡率。

参考文献 (References)

- Akula R, Giridhar P, Ravishankar GA. 2011. Phytoserotonin. *Plant Signaling & Behavior*, 6(6): 800-809
- Bowden K, Brown BG, Batty JE. 1954. 5-Hydroxytryptamine: its oc-

- currence in cowhage. *Nature*, 174(4437): 925–926
- Dubouzet JG, Matsuda F, Ishihara A, Miyagawa H, Wakasa K. 2013. Production of indole alkaloids by metabolic engineering of the tryptophan pathway in rice. *Plant Biotechnology Journal*, 11(9): 1103–1111
- Erland LAE, Turi CE, Saxena PK. 2016. Serotonin: an ancient molecule and an important regulator of plant processes. *Biotechnology Advances*, 34(8): 1347–1361
- Fujiwara T, Maisonneuve S, Isshiki M, Mizutani M, Chen LT, Wong HL, Kawasaki T, Shimamoto K. 2010. Sekiguchi lesion gene encodes a cytochrome P450 monooxygenase that catalyzes conversion of tryptamine to serotonin in rice. *Journal of Biological Chemistry*, 285(15): 11308–11313
- Huang X, Mazza G. 2011. Application of LC and LC-MS to the analysis of melatonin and serotonin in edible plants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(4): 269–284
- Ishihara A, Hashimoto Y, Tanaka C, Dubouzet JG, Nakao T, Matsuda F, Nishioka T, Miyagawa H, Wakasa K. 2008. The tryptophan pathway is involved in the defense responses of rice against pathogenic infection via serotonin production. *The Plant Journal*, 54(3): 481–495
- Iven T, König S, Singh S, Braus-Stromeyer SA, Bischoff M, Tietze LF, Braus GH, Lipka V, Feussner I, Dröge-Laser W. 2012. Transcriptional activation and production of tryptophan-derived secondary metabolites in *Arabidopsis* roots contributes to the defense against the fungal vascular pathogen *Verticillium longisporum*. *Molecular Plant*, 5(6): 1389–1402
- Liang GM, Tan WJ, Guo YY. 1999. Improvement of artificial rearing technique of *Helicoverpa armigera*. *Plant Protection*, 25(2): 15 (in Chinese) [梁革梅, 谭维嘉, 郭予元. 1999. 人工饲养棉铃虫技术的改进. *植物保护*, 25(2): 15]
- Lu HP, Luo T, Fu HW, Wang L, Tan YY, Huang JZ, Wang Q, Ye GY, Gatehouse AMR, Lou YG, et al. 2018. Resistance of rice to insect pests mediated by suppression of serotonin biosynthesis. *Nature Plants*, 4(6): 338–344
- Murch SJ, Alan AR, Cao J, Saxena PK. 2009. Melatonin and serotonin in flowers and fruits of *Datura metel* L. *Journal of Pineal Research*, 47(3): 277–283
- Pan HS, Lu YH, Xiu CL, Geng HH, Cai XM, Sun XL, Zhang YJ, Williams L III, Wyckhuys KAG, Wu KM. 2015. Volatile fragrances associated with flowers mediate host plant alternation of a polyphagous mirid bug. *Scientific Reports*, 5: 14805
- Pan HS, Xiu CL, Williams L III, Lu YH. 2021. Plant volatiles modulate seasonal dynamics between hosts of the polyphagous mirid bug *Apolygus lucorum*. *Journal of Chemical Ecology*, 47(1): 87–98
- Pelagio-Flores R, Ortíz-Castro R, Méndez-Bravo A, Macías-Rodríguez L, López-Bucio J. 2011. Serotonin, a tryptophan-derived signal conserved in plants and animals, regulates root system architecture probably acting as a natural auxin inhibitor in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 52(3): 490–508
- Peleg Z, Blumwald E. 2011. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(3): 290–295
- Xiong JX, Ji BZ, Liu SW, Wang Y. 2019. The role of 5-HT in feeding, reproduction and polyphenism of the insects. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 31(1): 9–17 (in Chinese) [熊佳新, 嵇保中, 刘曙雯, 王怡. 2019. 5-羟色胺对昆虫取食、生殖和非遗传多型的调控. *生命科学*, 31(1): 9–17]
- Zhang XN, Gaudry Q. 2016. Functional integration of a serotonergic neuron in the *Drosophila* antennal lobe. *eLife*, 5: e16836

(责任编辑:李美娟)