

# 褪黑素诱导小豆抗锈病机理的初步研究

郭博铖<sup>#</sup>, 柯希望<sup>#</sup>, 高尚雨, 于昕卉, 孙启明, 左豫虎<sup>\*</sup>

(黑龙江八一农垦大学农学院, 大庆 163319)

**摘要** 为明确外源褪黑素诱导小豆抗锈性的作用及机理,以感病小豆品种‘宝清红’为材料,采用叶面喷施不同浓度褪黑素激发处理小豆真叶,而后对真叶挑战接种锈菌夏孢子,结果表明,低浓度(11.61 mg/L)褪黑素可显著提升小豆对锈病的抗性。夏孢子萌发试验表明,褪黑素对夏孢子萌发及芽管生长无显著抑制作用,表明褪黑素无抑菌活性。进一步的基因表达分析发现,与对照相比,褪黑素激发诱导了水杨酸(SA)通路关键基因 *NPR1* 于接种后 24 h 显著上调表达,且病程相关蛋白 PR1、几丁质酶(CHI)、 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶(GLU)及 PR5 均于接种后 24~120 h 被显著诱导表达,说明褪黑素可能通过诱导 *NPR1* 表达,进而激活下游 PR 蛋白的高水平应答,使感锈病小豆品种获得对锈病的抗性。

**关键词** 小豆; 小豆锈病; 褪黑素; 诱导抗性

中图分类号: S 435.21 文献标识码: A DOI: 10.16688/j.zwbh.2018521

## A preliminary study on the mechanisms of melatonin-induced rust resistance of adzuki bean

GUO Bocheng<sup>#</sup>, KE Xiwang<sup>#</sup>, GAO Shangyu, YU Xinhui, SUN Qiming, ZUO Yuhu<sup>\*</sup>

(College of Agronomy, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

**Abstract** To understand the role and mechanism of exogenous melatonin in inducing rust (*Uromyces vignae*) resistance of adzuki bean (*Vigna angularis*), the leaves of the susceptible cultivar ‘Baoqinghong’ (BQH) were inoculated with urediniospores after treated with different concentrations of melatonin. The results showed that low concentration (11.61 mg/L) of melatonin could significantly induce rust resistance of the susceptible cultivar BQH. Additionally, urediniospore germination test showed that melatonin had no effect on the urediniospore germination. Subsequently, gene expression analysis of the key gene of salicylic acid (SA) pathway *NPR1*, compared with mock treatments, showed a significant up-regulation at 24 h post inoculation (hpi) pretreated with melatonin. Meanwhile, the expression level of pathogenesis-related proteins, including PR1, chitinase (CHI),  $\beta$ -1,3-glucanase (GLU) and PR5 were all induced at 24 to 120 hpi, indicating that melatonin-induced adzuki bean resistance against rust infection was closely related to *NPR1* induction and the subsequent pathogenesis-related protein activation.

**Key words** *Vigna angularis*; adzuki bean rust; melatonin; induced resistance

20 世纪 50 年代褪黑素(N-乙酰-5-甲氧基色胺)首次在牛的松果体中被分离鉴定<sup>[1]</sup>,并在动物体内表现出多效性的功能<sup>[2-6]</sup>。1995 年,Hattori 和 Dubbels 等首次在植物体内发现了褪黑素<sup>[7-8]</sup>。近 10 年来,在褪黑素提高植物抵抗逆境胁迫方面的研究取得了重要进展,如褪黑素在抗重金属<sup>[9-10]</sup>、抗紫外辐射<sup>[11-12]</sup>、抗低温冻害<sup>[13-14]</sup>、抗旱<sup>[15-16]</sup>和耐盐碱<sup>[17-18]</sup>

等非生物胁迫上发挥重要作用。此外,研究表明褪黑素也具有增强植物抵抗生物胁迫的能力。Yin 等<sup>[19]</sup>发现根施褪黑素可以显著提高冬红果对苹果褐斑病的抗性。Zhang 等<sup>[20]</sup>施用外源褪黑素显著减弱了致病疫霉 *Phytophthora infestans* 对马铃薯的危害。Lee 等<sup>[21]</sup>观察发现,褪黑素可触发拟南芥和烟草对 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*)

收稿日期: 2018-12-19 修订日期: 2018-12-28

基金项目: 黑龙江省大学生创新创业训练计划项目(201710223019);国家自然科学基金(31501629);黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划(UNPYSC2016201,UNPYSC2017113);黑龙江省农垦总局科技计划项目(HNK125B-08-08A);黑龙江八一农垦大学三纵三横团队支持计划(TDJH201801);杂粮特色学科项目

\* 通信作者 E-mail: zuoyuhu@163.com  
# 为并列第一作者

DC3000 侵染的防御反应。

有关褪黑素诱导植物抗性机理的研究发现,拟南芥 *npr1* 突变体经褪黑素处理后, *PR1*、*PDF1.2* 和 *GST1* 基因均没有被诱导表达, *mpk6* 突变体中,受褪黑素诱导表达的防御基因均被显著抑制,推测褪黑素诱导植物抗性主要通过水杨酸(SA)信号通路,也可能与乙烯(ET)信号通路相关<sup>[21]</sup>。Carr 等研究表明, *NPR1* 是 SA 信号通路的关键参与者之一,在植物防卫反应中发挥重要作用<sup>[22]</sup>。Dong 研究发现 *NPR1* 蛋白的激活可调控植物细胞核内病程相关蛋白(*PR*)基因的表达,合成系列病原物抗性相关因子而使植物表现抗性<sup>[23]</sup>,与此同时, Durrant 和 Dong 等综合分析了前人的研究发现, *PR* 基因在局部和全部组织中的大量表达是植物获得抗性的重要特征<sup>[24]</sup>。有关褪黑素在小豆 *Vigna angularis* 上的应用研究较少,柯希望等<sup>[25]</sup>研究发现,0.2 mg/L 褪黑素可推迟小豆叶片的衰老进程,其作用机制可能是维持了叶片的叶绿素含量及光系统 II 的完整性。然而,有关褪黑素诱导小豆对锈病抗性及其机理的研究至今仍未见报道。

由豇豆单胞锈菌 *Uromyces vignae* 引起的小豆锈病是影响小豆产量和品质的主要病害之一<sup>[26]</sup>,在我国各小豆种植区常有发生。合理利用品种抗性是防治作物锈病最为经济有效的措施之一。因此,本研究采用不同浓度褪黑素激发处理小豆真叶,并于处理后挑战接种锈菌夏孢子,明确诱导小豆产生抗锈性的最适褪黑素浓度,在此基础上分析褪黑素激发处理并接种后,小豆 *NPR1*、*PR1*、几丁质酶(*CHI*)、 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶(*GLU*)及 *PR5* 等防卫反应相关基因在病菌侵染不同阶段的表达情况,初步了解褪黑素诱导小豆抗锈病的作用及其可能的分子机理,为小豆锈病可持续控制策略的制定提供新思路。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

供试感病小豆品种‘宝清红’由黑龙江八一农垦大学植物免疫研究室保存。

供试菌株:豇豆单胞锈菌单夏孢子分离物 ZXL01,由黑龙江八一农垦大学植物免疫研究室保存。

供试药剂:褪黑素(薄层色谱 TLC,  $\geq 98\%$ )购自美国 Sigma 公司。在弱光条件下,称取 2 322.70 mg

褪黑素,先用少量无水乙醇充分溶解后,再用无菌水定容,配制成浓度为 2 322.70 mg/L 的母液备用。

### 1.2 小豆播种与培养

选取籽粒饱满、均匀一致的小豆种子在 25℃ 恒温箱内进行催芽,待种子萌动后播种于直径 18 cm 的营养钵内,每盆播种 9 粒。播种后置于 16 h 光照(25℃): 8 h 黑暗(20℃)的温室条件下培养,待真叶展开度为 80%~100% 时进行试验处理。

### 1.3 褪黑素诱导小豆抗锈性的适宜浓度筛选

用无菌水将褪黑素母液分别稀释成浓度为 11.61、23.22 及 46.45 mg/L 的溶液,均匀喷施于小豆真叶上进行激发处理,使其表面润湿且水滴不滴落,以喷施无菌水为对照。处理后的小豆幼苗置于保湿桶中在温室条件下黑暗保湿 12 h,随后移出,置于 16 h 光照(25℃): 8 h 黑暗(20℃)的温室中继续培养。于褪黑素激发处理 48 h 后,参考郑素娇等<sup>[26]</sup>的方法,将浓度为  $1 \times 10^5$  个/mL 的豇豆单胞锈菌夏孢子悬浮液喷施于激发处理的真叶上进行挑战接种,接种后置于(20±2)℃ 的黑暗条件下保湿培养 24 h,随后将植株置于 16 h 光照(25℃): 8 h 黑暗(20℃)的温室中继续培养。挑战接种后 10 d,调查各处理小豆真叶的发病情况,参照 Stavelly<sup>[27]</sup> 的 7 级分级标准:0 级,每 1.5 cm<sup>2</sup> 夏孢子堆 0 个;1 级,每 1.5 cm<sup>2</sup> 夏孢子堆 1~5 个;2 级,每 1.5 cm<sup>2</sup> 夏孢子堆 6~10 个;3 级,每 1.5 cm<sup>2</sup> 夏孢子堆 11~20 个;4 级,每 1.5 cm<sup>2</sup> 夏孢子堆 21~39 个;5 级,每 1.5 cm<sup>2</sup> 夏孢子堆 40~60 个;6 级,每 1.5 cm<sup>2</sup> 夏孢子堆 >60 个,分别记录各处理发病程度,计算病情指数及诱导抗性的效果,明确褪黑素诱导小豆抗锈性的适宜浓度。

诱抗效果=(对照组病情指数-处理组病情指数)/对照组病情指数×100%。

### 1.4 褪黑素对豇豆单胞锈菌夏孢子萌发的影响

利用 1.3 试验筛选所得的适宜浓度褪黑素溶液配制锈菌夏孢子悬浮液,使用振荡器充分混匀,调整孢悬液浓度为  $1 \times 10^5$  个/mL。参考韩冬等<sup>[28]</sup>的水琼脂平板法略加改动,吸取 200  $\mu$ L 孢悬液滴于 1.5% 的水琼脂平板上,涂布均匀后,用无菌手术刀片切取面积约为 1.0 cm<sup>2</sup> 的琼脂块置于灭菌载玻片上,为保持湿度,在培养皿内预先铺好润湿的滤纸,并放入两根玻璃弯管,将载玻片倒置于玻璃弯管上,盖好皿盖,置于(20±2)℃ 条件下避光保湿培养,以灭菌水配制的孢悬液为对照,6 h 后统计夏孢子萌发率,观

察芽管生长情况,明确褪黑素对夏孢子萌发及芽管生长的影响。每处理统计 300 个孢子的萌发情况,试验重复 3 次。

### 1.5 褪黑素处理对小豆 *PR1*、*CHI*、*GLU*、*PR5* 以及 *NPR1* 基因表达的影响

利用 1.3 试验筛选所得的适宜浓度褪黑素,对小豆真叶用褪黑素进行激发处理,以无菌水激发处理为对照,激发处理后 48 h 进行豇豆单胞锈菌夏孢子挑战接种。于挑战接种后 0、12、24、48、120 h 和

192 h 后收集接种叶片,样品用液氮速冻后  $-80^{\circ}\text{C}$  保存备用。采用 TRIzol(Invitrogen, Carlsbad, CA)法提取样品总 RNA,参考 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa) 的说明合成 cDNA。参考 Chi 等<sup>[29]</sup>的方法,以小豆肌动蛋白基因(*VaActin*)为内参,利用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术分析小豆 *PR1*、*CHI*、*GLU*、*PR5* 及 *NPR1* 在褪黑素诱导条件下响应锈病菌侵染的表达模式。所用引物见表 1,由 Thermo Fisher Scientific(北京)合成。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences used for qRT-PCR analysis

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	
	正向 Forward (5'-3')	反向 Reverse (5'-3')
<i>Actin</i>	CTAAGGCTAATCGTGAGAA	CGTAAATAGGAACCGTGT
<i>PR1</i>	TAGGAAGGTGCATGCCAAATA	TAGCCTTCAACGAGCTTCAC
<i>CHI</i>	TTCTTCGGTCAAACCTTCTC	TTGGTCTCGTCCGTAAT
<i>GLU</i>	GCAACTCTACCCACCAA	CAAGGCGTAATCAAGACC
<i>PR5</i>	AATGGCACTGGGAAGTGTAG	CACTGCGCAAGCAATAAC
<i>NPR1</i>	CTGGTCTCTGTCATCAAACCTC	GTCTTCATAAGGGCTCCATTC

### 1.6 数据处理

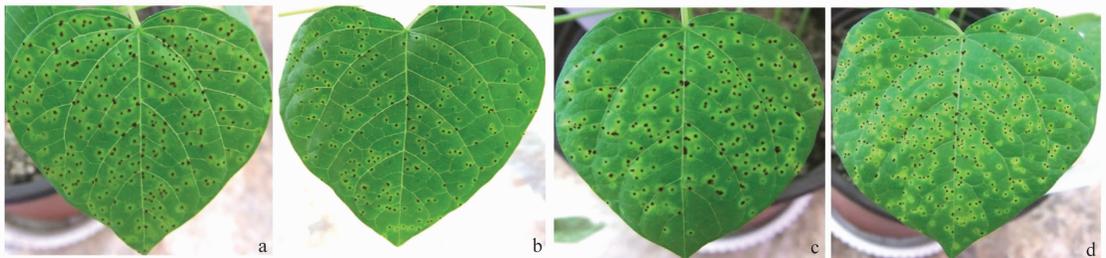
采用 SPSS v 21.0 软件进行统计分析,所得数据均用平均值±标准误差表示,用 Duncan 氏新复极差法比较差异显著性( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 褪黑素诱导小豆抗锈性的适宜浓度筛选

为明确诱导小豆产生抗锈性的适宜褪黑素浓

度,本研究分别采用 0、11.61、23.22 及 46.45 mg/L 的褪黑素激发处理小豆真叶,并于处理 48 h 后接种锈菌夏孢子,结果表明,对照处理在接种 10 d 后发病严重(图 1a),叶片表面附着密集的夏孢子堆,23.22 mg/L(图 1c)、46.45 mg/L(图 1d)褪黑素处理叶片的发病情况与对照相比差异不显著,而 11.61 mg/L 褪黑素处理叶片表面夏孢子堆密度明显减少(图 1b)。



a: CK; b: 11.61 mg/L 褪黑素; c: 23.22 mg/L 褪黑素; d: 46.45 mg/L 褪黑素  
a: CK; b: 11.61 mg/L melatonin; c: 23.22 mg/L melatonin; d: 46.45 mg/L melatonin

图 1 不同浓度褪黑素处理并接种锈菌后 10 d 小豆叶片的发病情况

Fig. 1 Disease symptoms of the adzuki bean leaves at 10 d post inoculation with rust fungus pretreated with different concentrations of melatonin

统计不同处理叶片夏孢子堆数量并计算病情指数后发现,11.61 mg/L 褪黑素处理显著降低了叶片的病情指数,与对照相比,病情指数下降了 31.94%,而 23.22 mg/L 和 46.45 mg/L 褪黑素处理叶片病情指数分别下降了 12.96%和 11.11%,但其病情指

数与对照相比差异不显著(表 2)。上述结果表明,低浓度褪黑素可显著提高小豆对锈病的抗性。

### 2.2 褪黑素对夏孢子萌发的影响

夏孢子萌发试验表明,锈菌夏孢子在 11.61 mg/L 的褪黑素溶液中萌发率为 80.67%,芽管生长正常,

对照处理夏孢子的萌发率为 81.33%，二者差异不显著，表明 11.61 mg/L 褪黑素对豇豆单胞锈菌夏孢

子的萌发及芽管生长无直接影响。上述结果说明，11.61 mg/L 褪黑素对豇豆单胞锈菌无抑菌活性。

表 2 不同浓度褪黑素激发处理对小豆锈病病情指数的影响<sup>1)</sup>

Table 2 The disease indices of adzuki bean with different concentrations of melatonin treatments

诱导物 Inducer	浓度/mg · L <sup>-1</sup> Concentration	孢子堆数/个 No. of uredia	病情指数 Disease index	诱导抗病效果/% Induced resistance effect
褪黑素 Melatonin	11.61	(13.6±3.6)b	(61.25±1.76)b	31.94
	22.32	(22.1±1.2)a	(78.33±11.78)ab	12.97
	46.45	(22.3±2.5)a	(80.00±4.04)ab	11.11
CK	0	(26.1±2.6)a	(90.00±4.71)a	—

1) 表中数据为平均值±标准差。同列数据不同字母代表差异显著(P<0.05)。下同。

Data in the table are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference (P<0.05). The same below.

### 2.3 褪黑素处理对小豆防卫相关基因表达的影响

为了解褪黑素诱导小豆抗锈性可能的分子机理，本研究分析了褪黑素激发处理后，病菌侵染不同阶段小豆防卫相关基因的表达情况。试验结果表明，经褪黑素激发处理，NPR1 的相对表达量在挑战接种后 24 h 达到峰值(图 2)，比对照高 18.87 倍，随后开始下降，至接种后 192 h 又缓慢回升。而未经褪黑素处理的对照中，NPR1 仅在病菌侵染后期(192 h)显著上调表达，但其响应病菌侵染的时间明显滞后，响应水平也显著低于褪黑素处理。

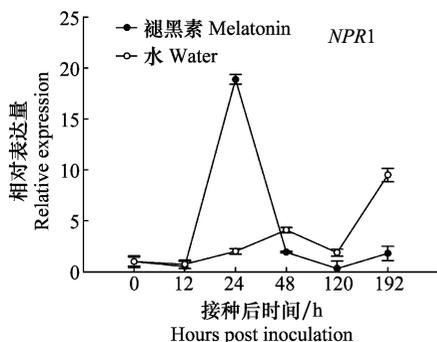


图 2 褪黑素处理并接种后不同时间小豆 NPR1 基因的表达分析

Fig. 2 Expression analysis of NPR1 in adzuki bean at different time points after inoculation pretreated with melatonin

对病程相关蛋白基因 PR1 的表达分析发现(图 3a)，对照处理中，PR1 的表达水平在接种后 12 h 开始缓慢升高，24 h 达到峰值后开始下降，而褪黑素激发处理后，PR1 的表达从 12 h 开始升高，至 48 h 达到峰值，120 h 后虽有所下降，但与对照相比仍处于较高的表达水平。与 PR1 表达趋势类似，几丁质酶(CHI)基因和 β-1,3-葡聚糖酶(GLU)基因在褪黑素处理条件下(图 3 b 和 c)，于接种后 12 h 开始上调表达，至 24 h 或 48 h 后达到峰值，并维持在较高水

平，而对照处理中 CHI 和 GLU 虽也有类似的表达趋势，但其强度显著低于褪黑素激发处理。

PR5 表达水平则在对照和褪黑素处理条件下的表达趋势基本一致(图 3 d)，均在接种后 48 h 达到峰值，且水处理对照在 12 h 和 24 h 的表达水平略高于褪黑素处理，表明 PR5 的表达主要受病原菌侵染的诱导，外源褪黑素也在一定程度上可以提高 PR5 的相对表达量。上述结果表明，褪黑素激发处理后小豆 NPR1 基因在病菌侵染早期即被显著诱导，从而激活下游 PR 蛋白的高水平应答，进而提高了感病小豆品种对锈病的抗性。

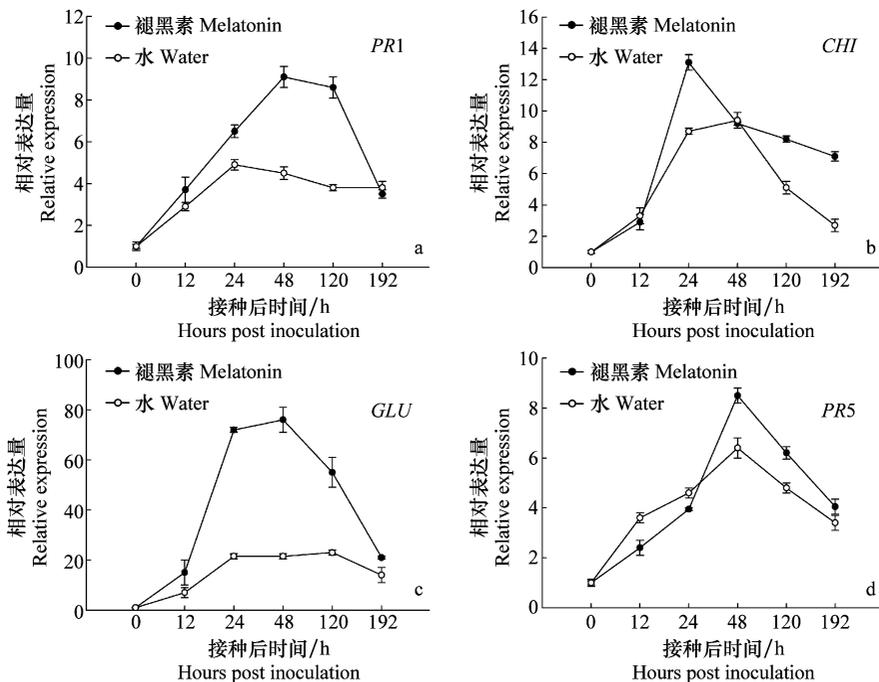
### 3 讨论

本研究结果表明，低浓度褪黑素(11.61 mg/L)可显著诱导感病小豆品种对锈病产生抗性。进一步对 NPR1、PR1、CHI、GLU 及 PR5 基因的表达分析发现，褪黑素显著诱导了 NPR1 及 PR 蛋白在病菌侵染不同阶段的高水平应答，推测褪黑素诱导小豆产生抗性可能与 SA 信号通路密切相关。

大量研究发现，外源褪黑素的作用效果与施用浓度密切相关，如低浓度可促进植物生根，但在樱桃组织培养中高浓度褪黑素可抑制生长<sup>[30]</sup>。Afreeen 等、Zhang 等发现，不同种植物对褪黑素的敏感性存在较大差异，且高浓度和低浓度褪黑素可能存在完全不同的作用机制<sup>[31-32]</sup>。本研究发现，低浓度褪黑素(11.61 mg/L)具备明显的诱导小豆对锈病的抗性效应，但随浓度升高其诱导抗性效果反而下降。本研究结果与 Yin 等<sup>[19]</sup>的研究发现类似，Yin 等根施褪黑素诱导苹果对褐斑病抗性的最佳浓度为 23.22 mg/L，当浓度增加至 116.1 mg/L 时诱导抗性的效果同样出现了下降趋势，表明褪黑素作为植

物抗性诱导分子时,其浓度及不同植物的敏感性会显著影响其作用效果。在拟南芥与 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* strain DC3000 (*Pst* DC3000) 交互研究中发现,2.33 mg/L 褪黑素提升拟南芥对

*Pst* DC3000 的抗性效果最为显著<sup>[21]</sup>,而在香蕉与 *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* 的交互研究中发现,23.22 mg/L 褪黑素可显著提高香蕉根系对病原菌的抗性<sup>[33]</sup>。



a: 接种后不同时间PR1的表达分析; b: 接种后不同时间CHI的表达分析; c: 接种后不同时间GLU的表达分析; d: 接种后不同时间PR5的表达分析  
a: Expression analysis of PR1 at different time points after inoculation; b: Expression analysis of CHI at different time points after inoculation; c: Expression analysis of GLU at different time points after inoculation; d: Expression analysis of PR5 at different time points after inoculation

图3 褪黑素处理并接种后不同时间小豆叶片病程相关蛋白的表达分析

Fig. 3 Expression analysis of pathogenesis-related proteins in adzuki bean leaves at different time points after inoculation pretreated with melatonin

也有研究表明,褪黑素除具备诱导植物产生抗性的作用外,还表现抗菌活性。Zhang等<sup>[20]</sup>的研究发现,褪黑素在一定浓度下可显著影响致病疫霉 *P. infestans* 的菌丝生长、细胞超微结构,以及病菌对逆境和药剂的敏感性。此外,不同浓度褪黑素对常见的植物病原真菌,如 *Alternaria* spp.、*Botrytis* spp. 以及 *Fusarium* spp. 等均表现抑菌活性<sup>[33]</sup>。而本研究表明,褪黑素对锈菌夏孢子萌发及芽管生长没有显著的抑制作用,表明褪黑素对小豆锈病菌不具抑菌活性。

作为植物保护性分子,褪黑素可显著改变植物体内SA含量以及诱导SA受体蛋白NPR1的核定位,提高NO产量及增加细胞壁厚度,进而提高植物对病原物的抗性<sup>[19,21,34-40]</sup>。Lee等<sup>[21,28]</sup>的研究表明,在拟南芥和烟草中,多个受SA和ET信号通路激活的PR蛋白在褪黑素处理时同样被诱导表达,此外,可被褪黑素诱导表达的PR基因在 *npr1*、*ein2* 和 *mpk6* 的拟南芥突变体中则完全或部分被抑制,

表明褪黑素诱导植物PR基因的表达可能依赖于SA和ET信号通路<sup>[21]</sup>。本研究发现,经褪黑素处理并接种锈菌后,NPR1于接种后24h显著上调达到峰值,随后开始下降,PR基因的表达分析发现,褪黑素处理显著诱导了PR1、CHI、GLU及PR5等基因在接种后24h开始上调表达,除GLU外,其余PR基因均在48h表达量达到峰值。韩冬关于锈菌夏孢子在感病品种‘宝清红’上的侵染过程研究表明,接种后6~12h,病菌可在气孔上方形成附着胞,接种后24h产生气孔下囊,至接种后48h形成吸器<sup>[41]</sup>。上述结果表明,褪黑素处理诱导NPR1基因在病菌入侵阶段的显著上调,以及下游PR基因在病菌定殖及扩展阶段的高水平应答,是褪黑素显著提高感病小豆品种对锈病抗性的重要因素。

综上所述,褪黑素在较低浓度下可显著诱导感病小豆品种对锈病产生抗性,其诱导小豆产生抗性的机制可能依赖于SA信号通路的激活。

## 参考文献

- [1] LERNER A B, CASE J D, TAKAHASHI Y, et al. Isolation of melatonin, the pineal factor that lightens melanocytes [J]. Journal of the American Chemical Society, 1958, 80(10): 2587.
- [2] TAN D X, HARDELAND R, MANCHESTER L C, et al. Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical [J]. Journal of Pineal Research, 2003, 34 (4): 249 - 259.
- [3] REITER R J, TAN D X, FUENTESBROTO L. Melatonin: A multitasking molecule [M]//LUCIANO M. Progress in Brain Research. Elsevier, 2010:127 - 151.
- [4] REITER R J, TAN D X, GALANO A. Melatonin: exceeding expectations [J]. Physiology, 2014, 29 (5): 325 - 333.
- [5] ZAWILSKA J B, SKENE D J, ARENDT J. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms [J]. Pharmacological Reports, 2009, 61 (3): 383 - 410.
- [6] JAN J E, REITER R J, WASDELL M B, et al. The role of the thalamus in sleep, pineal melatonin production, and circadian rhythm sleep disorders [J]. Journal of Pineal Research, 2009, 46 (1): 1 - 7.
- [7] HATTORI A, MIGITAKA H, IIGO M, et al. Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates [J]. International Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 1995, 35 (3): 627 - 634.
- [8] DUBBELS R, REITER R J, KLENKE E, et al. Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Pineal Research, 1995, 18 (1): 28 - 31.
- [9] HASAN M K, AHAMMED G J, YIN L, et al. Melatonin mitigates cadmium phytotoxicity through modulation of phytochelatins biosynthesis, vacuolar sequestration, and antioxidant potential in *Solanum lycopersicum* L. [J/OL]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 601.
- [10] TAN Dunxian, MANCHESTER L C, HELTON P, et al. Phytoremediative capacity of plants enriched with melatonin [J]. Plant Signaling & Behavior, 2014, 2: 514 - 516.
- [11] ZHANG Laijun, JIA Jingfen, XU Yao, et al. Production of transgenic *Nicotiana sylvestris* plants expressing melatonin synthetase genes and their effect on UV-B-induced DNA damage [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2012, 48(3): 275 - 282.
- [12] SIMOPOULOS A P, TAN D X, MANCHESTER L C, et al. Purslane: a plant source of omega-3 fatty acids and melatonin [J]. Journal of Pineal Research, 2010, 39 (3): 331 - 332.
- [13] TURK H, ERDAL S, GENISEL M, et al. The regulatory effect of melatonin on physiological, biochemical and molecular parameters in cold-stressed wheat seedlings [J]. Plant Growth Regulation, 2014, 74 (2): 139 - 152.
- [14] BAJWA V S, SHUKLA M R, SHERIF S M, et al. Role of melatonin in alleviating cold stress in *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Pineal Research, 2014, 56 (3): 238 - 245.
- [15] MENG Jiangfei, XU Tengfei, WANG Zhizhen, et al. The ameliorative effects of exogenous melatonin on grape cuttings under water-deficient stress: antioxidant metabolites, leaf anatomy, and chloroplast morphology [J]. Journal of Pineal Research, 2014, 57 (2): 200 - 212.
- [16] LI Chao, TAN Dunxian, LIANG Dong, et al. Melatonin mediates the regulation of ABA metabolism, free-radical scavenging, and stomatal behaviour in two *Malus* species under drought stress [J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66 (3): 669 - 680.
- [17] ZHANG Haijun, ZHANG Na, YANG Rongchao, et al. Melatonin promotes seed germination under high salinity by regulating antioxidant systems, ABA and GA 4 interaction in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. Journal of Pineal Research, 2014, 57 (3): 269 - 279.
- [18] LI Chao, WANG Ping, WEI Zhiwei, et al. The mitigation effects of exogenous melatonin on salinity-induced stress in *Malus hupehensis* [J]. Journal of Pineal Research, 2012, 53 (3): 298 - 306.
- [19] YIN Lihua, WANG Ping, LI Mingjun, et al. Exogenous melatonin improves *Malus* resistance to Marssonina apple blotch [J]. Journal of Pineal Research, 2013, 54 (4): 426 - 434.
- [20] ZHANG Shumin, ZHENG Xianzhe, REITER R J, et al. Melatonin attenuates potato late blight by disrupting cell growth, stress tolerance, fungicide susceptibility and homeostasis of gene expression in *Phytophthora infestans* [J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1993.
- [21] LEE H, BYEON Y, BACK K. Melatonin as a signal molecule triggering defense response against pathogen attack in *Arabidopsis* and tobacco [J]. Journal of Pineal Research, 2014, 57(3): 262 - 268.
- [22] CARR J, LEWSEY M G, PALUKAITIS P. Signaling in induced resistance [M]. Advances in Virus Research, 2010:57 - 121.
- [23] DONG Xinnian. NPR1, all things considered [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2004, 7 (5): 547 - 552.
- [24] DURRANT W, DONG Xinnian. Systemic acquired resistance [J]. Annual Review of Phytopathology, 2004, 42:185 - 209.
- [25] 柯希望, 徐鹏, 殷丽华, 等. 褪黑素延缓红小豆叶片衰老的作用研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2015, 27(5): 52 - 55.
- [26] 郑素娇, 柯希望, 殷丽华, 等. 黑龙江省一株红小豆锈病菌原菌鉴定[J]. 微生物学报, 2015, 55(4): 425 - 432.
- [27] STAVELY J. The modified Cobb scale for estimating bean rust intensity [J]. Bean Improvement Cooperative. Annual Report (USA), 1985(28): 31 - 32.
- [28] 韩冬, 张洪臣, 柯希望, 等. 红小豆锈病菌夏孢子萌发条件研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2017, 29(4): 11 - 15.

- [8] 宋兆欣,王秋霞,郭美霞,等. 二甲基二硫作为土壤熏蒸剂的效果评价[J]. 农药,2008,47(6):454-456.
- [9] 郭衍银,王秀峰,朱艳红,等. 生姜癞皮病的发生危害及病原初步鉴定[J]. 植物保护,2004,30(1):61-62.
- [10] 胡启山. 生姜癞皮病的发生与防治[J]. 蔬菜,2010(5):23.
- [11] HAN Dawei, YAN Dongdong, CAO Aocheng, et al. Degradation of dimethyl disulphide in soil with or without biochar amendment [J]. Pest Management Science, 2017, 73(9): 1830-1836.
- [12] 杨桂生,宋长春,万忠梅,等. 三江平原小叶章湿地土壤微生物活性特征研究[J]. 环境科学学报,2010,30(8):1715-1721.
- [13] 刘维志. 植物病原线虫学[M]. 北京:中国农业出版社,2000:373.
- [14] KOMADA H. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil [J]. Review of Plant Protection Research, 1975, 8: 114-125.
- [15] MASAGO H, YOSHIKAWA M, FUKADA M, et al. Selective inhibition of *Pythium* spp. on a medium for direct isolation of *Phytophthora* spp. from soils and plants [J]. Phytopathology, 1977, 67: 425-428.
- [16] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 第3版. 北京:中国农业出版社,2000.
- [17] REN Zongjie, LI Yuan, FANG Wensheng, et al. Evaluation of allyl isothiocyanate as a soil fumigant against soil-borne diseases in commercial tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) production in China [J]. Pest Management Science, 2018, 74(9): 2146-2155.
- [18] 颜冬冬,王秋霞,郭美霞,等. 4种熏蒸剂对土壤氮素转化的影响[J]. 中国生态农业学报,2010,18(5):934-938.
- [19] MAO Liangang, YAN Dongdong, WANG Qiuxia, et al. Evaluation of the combination of dimethyl disulfide and dazomet as an efficient methyl bromide alternative for cucumber production in China [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2014, 62(21): 4864-4869.
- [20] 颜冬冬,王秋霞,郭美霞,等. 氯化苦熏蒸处理对土壤氮矿化和硝化作用的影响[J]. 湖北农业科学,2010,49(2):323-326.
- [21] 赵恒策,魏霞,贺燕,等. 冻融对河北省深州市盐碱地土壤理化性质的影响[J]. 水土保持学报,2018,32(5):78-83.
- [22] 熊毅,李庆远. 中国土壤[M]. 第2版. 北京:科学出版社,1987.
- [23] REES H W, CHOW T L, ZEBARTH B J, et al. Effects of supplemental poultry manure applications on soil erosion and runoff water quality from a loam soil under potato production in northwestern New Brunswick [J]. Canadian Journal of Soil Science, 2015, 91(91): 49-65.
- (责任编辑:田喆)
- ~~~~~
- (上接 150 页)
- [29] CHI Chao, SHEN Yongqiang, YIN Lihua, et al. Selection and validation of reference genes for gene expression analysis in *Vigna angularis* using quantitative real-time RT-PCR [J/OL]. PLoS ONE, 2016, 11 (12): e0168479.
- [30] SARROPOULOU V, DIMASSI-THERIOU K, THERIOS I, et al. Melatonin enhances root regeneration, photosynthetic pigments, biomass, total carbohydrates and proline content in the cherry rootstock PHL-C (*Prunus avium* × *Prunus cerasus*) [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2012, 61:162-168.
- [31] AFREEN F, ZOBAYED SMA, KOZAI T. Melatonin in *Glycyrrhiza uralensis*: response of plant roots to spectral quality of light and UV-B radiation [J]. Journal of Pineal Research, 2006, 41:108-115.
- [32] ZHANG Na, SUN Qianqian, ZHANG Haijun, et al. Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants [J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66:647-656.
- [33] ARNAO M B, HERNANDEZ-RUIZ J. Functions of melatonin in plants: a review [J]. Journal of Pineal Research, 2015, 59: 133-150.
- [34] LEE H Y, BYEON Y, TAN D X, et al. *Arabidopsis* serotonin N-acetyltransferase knockout mutant plants exhibit decreased melatonin and salicylic acid levels resulting in susceptibility to an avirulent pathogen [J]. Journal of Pineal Research, 2015, 58: 291-299.
- [35] QIAN Yongqiang, TAN Dunxian, REITER R J, et al. Comparative metabolomic analysis highlights the involvement of sugars and glycerol in melatonin mediated innate immunity against bacterial pathogen in *Arabidopsis* [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 15815.
- [36] SHI Haitao, CHEN Yinhua, TAN Dunxian, et al. Melatonin induces nitric oxide and the potential mechanisms relate to innate immunity against bacterial pathogen infection in *Arabidopsis* [J]. Journal of Pineal Research, 2015, 59: 102.
- [37] SHI Haitao, WEI Yunxie, HE Chaozu, et al. Melatonin-induced CBF/DREB1s are essential for diurnal change of disease resistance and CCA1 expression in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2016, 100:150-155.
- [38] ZHAO Hongbo, XU Lingfei, SU Tao, et al. Melatonin regulates carbohydrate metabolism and defenses against *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 infection in *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Pineal Research, 2015, 59: 109-119.
- [39] LEE H, BACK K. Mitogen-activated protein kinase pathways are required for melatonin-mediated defense responses in plants [J]. Journal of Pineal Research, 2016, 60: 327-335.
- [40] WEI Yunxie, HU Wei, WANG Qiannan, et al. Identification, transcriptional and functional analysis of heat-shock protein 90s in banana (*Musa acuminata* L.) highlight their novel role in melatonin-mediated plant response to Fusarium wilt [J]. Journal of Pineal Research, 2017, 62:e12347.
- [41] 韩冬. 抗锈病红小豆品种筛选及抗病机理研究[D]. 大庆:黑龙江八一农垦大学农学院,2017.
- (责任编辑:田喆)