

褪黑素调节烟草丁香假单胞菌抗性的功能研究

蔡楠¹, 马文娜¹, 肖林¹, 张佳蓉^{1,2}, 宋中邦³, 陈奇^{1*}

(1 昆明理工大学 生命科学与技术学院, 昆明 650500; 2 云南现代职业技术学院, 云南楚雄 675000; 3 云南省烟草农业科学研究院, 昆明 650021)

摘要: 为分析褪黑素(*N*-乙酰-5-甲氧基色胺)在植物先天免疫中的功能及调控机理, 研究以病原菌丁香假单胞杆菌(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, *Pst* DC3000)—烟草互作系统为模型, 检测了病原菌侵染对烟草褪黑素相关基因表达的影响, 并探讨了褪黑素对植物叶片病原菌生长以及气孔开度和活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)含量的影响以及调控机理。结果表明: (1) *Pst* DC3000 处理提高了烟草褪黑素合成(*NtSNAT1*)和受体(*NtPMTR1*)基因表达, 且外源褪黑素处理降低了叶片中的病原菌含量。(2) 与野生型植物相比, 过表达大豆 *GmSNAT1* 基因显著提高了转基因烟草中内源褪黑素含量和 *NtPMTR1* 的表达, 且转基因烟草叶片中的 *Pst* DC3000 菌落数显著下降。(3) 外源褪黑素和细菌鞭毛蛋白多肽 flg22 处理诱导了野生型和转基因烟草保卫细胞中 ROS 产生和气孔关闭, 且转基因植物对褪黑素和 flg22 诱导的气孔关闭和 ROS 产生比野生型烟草更加敏感。综上所述, 研究表明褪黑素可能通过受体 *NtPMTR1* 介导的信号途径促进保卫细胞 ROS 产生, 诱导气孔关闭, 从而降低病原菌 *Pst* DC3000 的入侵。

关键词: 植物褪黑素; ROS; 气孔免疫; 病原菌抗性; 烟草

中图分类号: S572; S436.8

文献标志码: A

Functional Analysis of Melatonin in the Regulation of Tobacco Plants Resistance to *Pseudomonas syringae*

CAI Nan¹, MA Wenna¹, XIAO Lin¹, ZHANG Jiarong^{1,2}, SONG Zhongbang³, CHEN Qi^{1*}

(1 Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China; 2 Yunnan Modern Vocational and Technical College, Chuxiong, Yunnan 675000, China; 3 Yunnan Academy of Tobacco Agricultural Science, Kunming 650021, China)

Abstract: To analyze the function and regulatory mechanism of melatonin (*N*-acetyl-5-methoxytryptamine) in plant innate immunity, this study used the interaction between the pathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) and tobacco as a model system. The study examined the influence of pathogen invasion on the expression of tobacco genes related to melatonin and analyzed the effects and regulatory mechanisms of melatonin on pathogen growth, stomatal aperture, and ROS (reactive oxygen species) content in plant leaves. The results showed that: (1) *Pst* DC3000 treatment increased the expression of tobacco melatonin biosynthesis (*NtSNAT1*) and receptor (*NtPMTR1*) genes, and exogenous melatonin treatment reduced the bacterial contents in plant leaves. (2) Overexpression of the soybean *GmSNAT1* significantly increased the endogenous melatonin concentrations and expression of *NtPMTR1* in

收稿日期: 2022-12-16; 修改稿收到日期: 2023-03-29

基金项目: 云南省杰出青年基金项目(202201AV070008); 云南省重点项目(202101AS070027)

作者简介: 蔡楠(1997—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事植物褪黑素信号研究。E-mail: 2444072839@qq.com

* 通信作者: 陈奇, 教授, 博士生导师, 主要从事植物激素信号和环境应答研究。E-mail: chenq0321@kust.edu.cn

transgenic tobacco plants *GmSNAT1-OE2* and *GmSNAT1-OE5*, and the *Pst* DC3000 bacteria growth number was significantly decreased. (3) Exogenous melatonin and bacterial flagellin peptide flg22 treatments induced the production of ROS and stomatal closure in both wild-type and transgenic tobacco guard cells, and the transgenic plants were more sensitive to melatonin- and flg22-induced stomatal closure and ROS production than the wild-type plants. Taken together, this study found that melatonin could reduce the bacteria invasion, which may probably be associated with promoting ROS production in guard cells and inducing stomatal closure via NtPMTR1-mediated signaling pathway.

Key words: melatonin; ROS; stomatal immunity; pathogen resistance; tobacco

植物生长会遭受多种病害的影响,严重危及作物产量和粮食安全^[1]。植物在长期与病原菌抗争过程中,进化了复杂而高效的先天免疫系统来应答外部病原体的入侵。植物具有两层先天免疫系统^[2],包括模式识别受体(pattern-recognition receptors, PRRs)介导的模式触发免疫(pattern-triggered immunity, PTI)和胞内核苷酸结合域富亮氨酸重复受体(nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing receptors, NLRs)介导的效应触发免疫(effector-triggered immunity, ETI)。植物先天免疫是通过细胞表面的 PRRs 感知病原体和微生物相关分子模式(pathogen-associated molecular pattern/metabolism-associated molecular patterns, PAMP/MAMPs)后启动^[3-4]。丁香假单胞杆菌番茄致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, *Pst* DC3000)是一种宿主广泛的革兰氏阴性菌,也是研究植物-微生物互作和植物先天免疫的模式菌。*Pst* DC3000 侵染和细菌鞭毛蛋白衍生多肽(flgl22)处理下,植物通过调节气孔关闭以防御病原菌入侵和增强植物对病原菌抗性,这种主动防御现象称为气孔免疫或气孔防御^[5-6]。由受体样蛋白(receptor like protein, RLP)和受体激酶(receptor like kinase, RLK)组成的细胞表面免疫受体负责感知微生物侵染,细胞内免疫受体 NLR 特异性感知传递到细胞内的免疫信号以激活胞内病原体效应蛋白,触发免疫信号激活下游免疫反应,如诱导气孔免疫和叶肉免疫以抵御病原菌入侵和抑制病原菌增殖。

褪黑素于 1958 年在牛松果体中发现^[7],在脊椎动物中具有调节昼夜节律、睡眠和免疫等作用^[8]。动物首个褪黑素受体(melatonin receptor 1, MT1)于 1994 年从非洲爪蟾中被克隆出来^[9]。迄今为止,在哺乳动物中共报道了 3 种褪黑素受体,包括 MT1 (Mell1a)、MT2 (Mell1b)和 MT3 (ML2)^[10]。MT1 和 MT2 属于 G 蛋白偶联受体(G protein coupled receptor, GPCR)超家族成员^[11],对褪黑素具有高亲

和力;而 MT3 对褪黑素的亲和力较低,属于醌还原酶家族^[12]。

1995 年,几个独立实验室在维管植物中检测到褪黑素^[13-15],其主要由起始物色氨酸通过 4 个连续的酶促反应催化合成,分别是色氨酸脱羧酶(TDC)、色胺-5-羟化酶(T5H)、5-羟色胺-*N*-乙酰基转移酶(SNAT)和 *N*-乙酰基-5-羟色胺-甲基转移酶(ASMT)等。色氨酸经色胺-5-羟化酶转化为 5-羟色氨酸,5-羟色胺经过色氨酸脱羧酶作用后转变为血清素。5-羟色胺-*N*-乙酰基转移酶进一步将血清素催化生成乙酰血清素,最后由 *N*-乙酰基-5-羟色胺-甲基转移酶将其合成为褪黑素^[16-17]。与动物类似,植物褪黑素信号被一个潜在的具有 7 次跨膜结构的植物褪黑素受体 1(phytomelatonin receptor 1, PMTR1)识别感知,通过激活 G 蛋白/NADPH 氧化酶介导的 ROS 爆发或通过 MAPK 信号途径诱导气孔关闭和气孔免疫^[18-19]。

有关研究表明,褪黑素在植物生长发育以及生物和非生物胁迫应答中起重要调节作用^[20]。在拟南芥中过表达苜蓿 *SNAT1* 基因增强了转基因植物对镉胁迫的抗性^[21],且大豆 *GmSNAT1* 和拟南芥 *AtSNAT1* 基因的上调表达参与植物对铝胁迫的抗性^[22-23]。在葡萄中,异源过表达 *VvSNAT2* 基因,内源褪黑素含量上升,且转基因植物对白粉病抗性增强^[24]。外源褪黑素处理能保护水稻免受稻瘟病菌引起的水稻细菌叶片条纹的影响^[25],以及降低三七圆斑病、黑斑病等感病率^[26]。拟南芥 *snat1* 突变体内源褪黑素含量较低,且对丁香假单胞菌 *Pst* DC3000 的敏感性升高;棉花中 *GhSNAT1* 的沉默降低了对大丽花黄萎病的抗性,而外源性褪黑素处理可恢复对病原菌的抗性。Yang 等^[26]最近在三七和拟南芥中的研究发现,褪黑素通过受体 PMTR1 调控 ROS 爆发和 MAPK 信号途径诱导的气孔关闭是阻止病原菌入侵的主要方式,且免疫受体复合体 FLS2(flagellin sensing 2)和 BAK1[brassinosteroid insensitive 1(BRI1)associated kinase receptor 1]介

导的 flg22 诱导气孔免疫也依赖于 PMTR1。

为深入理解褪黑素在植物免疫反应中的功能,本研究以烟草为材料,构建了转基因烟草 *GmSNAT1-OE2* 和 *GmSNAT1-OE5*,通过对 *Pst* DC3000 处理后的病原菌含量测定、气孔敏感性分析等手段,探究内源和外源褪黑素调控植物抗病的机理,为植物褪黑素信号和功能提出新认识。

1 材料和方法

1.1 植物材料培养

研究供试材料为烟草(*Nicotiana tabacum* cv. *xathi*),过表达 *GmSNAT1* 的转基因烟草由张佳蓉转化获得^[27]。将野生型(WT)和 T₃ 代 *GmSNAT1* 过表达植物种子(*GmSNAT1-OE2* 和 *GmSNAT1-OE5*)用去离子水浸泡过夜后播种在基质中(蛭石:珍珠岩:营养土=3:1:1),置于光照培养箱在 12 h 光[100 μmol/(m²·s),28 ℃]/12 h 黑暗(28 ℃)的条件下培养 3~4 周用于病原菌侵染、RT-PCR、气孔开度、保卫细胞 ROS 含量和叶片褪黑素含量等分析。

1.2 RNA 提取和 RT-qPCR 分析

取 0.1 g 叶片于液氮中研磨,使用 Trizol 试剂(Takala)提取叶片总 RNA,使用 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser(Takara)反转录为 cDNA,用 SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒(Takara)和 CFX96(BIO-RAD,美国)荧光定量 PCR 仪检测相关基因表达水平。用 Primer5 软件设计引物,RT-qPCR 所用引物见表 1。采用 2^{-ΔΔC_T} 方法计算相对基因表达水平^[28]。

表 1 RT-qPCR 引物序列

Table 1 Primers for RT-qPCR analysis

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'→3')
<i>NtActin</i> -F	CTGAGGTCCTTTTCCAACCA
<i>NtActin</i> -R	TACCCGGGAACATGGTAGAG
<i>NtPMTR1</i> -F	ACAGACCTTTCTTATCTCAACACT
<i>NtPMTR1</i> -R	TGAGGCCATATACTCCGGTT
<i>NtSNAT1</i> -F	TATCCACTTCTCCGTTACTGC
<i>NtSNAT1</i> -R	TTGCAGGGAAATGGCAATGG
<i>GmSNAT1</i> -F	TGTCCTAGTTGATCCAGGCTACCAG
<i>GmSNAT1</i> -R	TGCCAATGTCCCTTTGCAGAAGAGG

1.3 植物内源褪黑素含量测定

植物褪黑素的提取和含量检测参考 Li 等^[29]的方法进行。取 1 月龄烟草叶片 300 mg,液氮研磨后

加入 3 mL 甲醇(75%),室温下 1 500 r/min 涡旋 30 min,超声 3 次后(每次 5 min)在 13 000 g 和 4 ℃条件下离心 15 min。取上清 3 mL,使用氮吹仪(RayKol EVA Mini,睿科)干燥后加入 200 μL 30% 乙酸乙酯复溶,涡旋 5 min(1 500 r/min),超声 3 min 后在 13 000 g 和 4 ℃条件下离心,取上清并加入 3 ng/g 的褪黑素-d4(sc-207849,SantaCruz Biotechnology),0.45 μm 滤膜过滤后使用超高效液相色谱仪(Waters Acquity UPLC,Milford,MA,USA)和三重四极杆串联质谱仪(Waters,Xevo TQ-MS)检测内源褪黑素含量。

1.4 气孔开度检测

将 1 月龄烟草植株叶片撕下的表皮置于表皮缓冲液(50 mmol/L KCl,0.1 mmol/L CaCl₂,10 mmol/L MES-KOH,pH=6.15)中,光照[100 μmol/(m²·s)]孵育 3 h,使气孔完全打开,然后添加 10 μmol/L 褪黑素或 5 μmol/L flg22(由北京中科亚光生物科技有限公司合成)处理 2 h,在显微镜(Olympus BX60)下观察气孔开度,测量气孔的长度和宽度,并计算宽度/长度比以衡量气孔开度^[18]。

1.5 激光共聚焦荧光显微镜分析

撕取 1 月龄烟草叶片下表皮条置于缓冲液(50 mmol/L KCl,0.1 mmol/L CaCl₂,10 mmol/L MES-KOH,pH=6.15)中光照 3 h[100 μmol/(m²·s)],然后加入 10 μmol/L 褪黑素或 5 μmol/L flg22 处理 2 h,随后将表皮条转移到含有 25 μmol/L 的 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸(H2DCF-DA,一种 ROS 荧光探针,Sigma-Aldrich)的表皮缓冲中,在黑暗中孵育 30 min。采用激光扫描共聚焦显微镜(NIKON TI-E-A1R)观察保卫细胞中 H2DCF-DA 荧光(波长设置:ex=488 nm,em=535 nm),使用 ImageJ 软件分析相对荧光强度。

1.6 Pst DC3000 侵染实验

取-80 ℃保存的 *Pst* DC3000 菌种在含有 1.5% 琼脂(W/V)和 50 mg/mL 利福平的 King's B(KB,20 g/L 蛋白胨,10 mL/L 甘油,1.5 g/L K₂HPO₄,1.5 g/L MgSO₄·7H₂O)固体培养基上划线培养后,挑取单菌落于含有 50 mg/mL 利福平的 KB 液体培养基中,28 ℃培养 2 d。离心收集菌体,使用 10 mmol/L 的 MgCl₂ 溶液(含 0.02% V/V Silwet L-77)稀释菌体至 OD₆₀₀=0.2 备用。取生长 3~4 周长势一致的烟草,使用 10 μmol/L 褪黑素或 1/10000(V/V)DMSO 溶液(溶剂对照处理)喷施烟草叶片 2 h 后,使用 *Pst* DC3000(OD₆₀₀=0.2)喷施

植物叶片,直到叶片完全湿润。使用 75%(V/V)乙醇表面消毒处理第 0 天(0 d)和第 3 天(3 d)叶片,用直径为 0.7 cm 的打孔器取样。打孔叶片使用 10 mmol/L MgCl₂ 研磨,梯度稀释后涂布于含 50 mg/mL 利福平的 KB 培养基上(1.5% W/V 琼脂),28 ℃ 培养箱中培养 2 d 后统计菌落数。

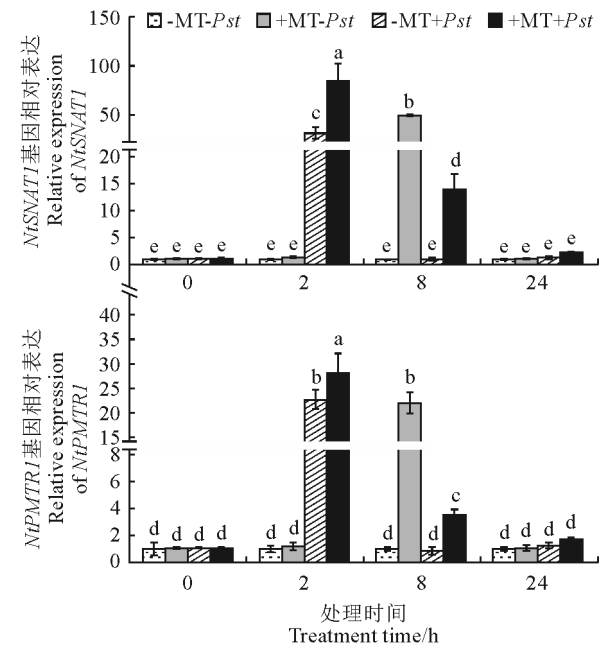
1.7 数据分析

试验数据采用 Excel-2015 进行处理和分析,用 GraphPad prism 软件进行作图和显著性分析,不同字母表示 $P<0.05$ 的显著性差异。

2 结果与分析

2.1 Pst DC3000 侵染增加烟草褪黑素合成基因 NtSNAT1 和潜在受体 NtPMTR1 的表达

通过检测 *NtSNAT1* 和 *NtPMTR1* 基因表达衡量内源褪黑素信号对 *Pst* DC3000 侵染的响应。与对照(-MT-*Pst*)相比,*Pst* DC3000(+MT+*Pst*)处理 2 h 后 *NtSNAT1* 和 *NtPMTR1* 表达水平分别显著提高了 84.6 倍和 28.2 倍,然而处理 8 h 和 24 h 后却显著下降至对照水平(图 1)。



数据为平均值±SE(n=3),不同字母表示差异显著($P<0.05$)。下同。

图 1 褪黑素和 *Pst* DC3000 对烟草叶片 *NtSNAT1* 和 *NtPMTR1* 基因表达的影响
Data are presented as means ± SE (n = 3). Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$). The same as below.
Fig. 1 Effects of melatonin and *Pst* DC3000 on the expression of *NtSNAT1* and *NtPMTR1* in tobacco leaves

褪黑素(+MT-*Pst*)处理 8 h 诱导了 *Nt-SNAT1* 和 *NtPMTR1* 表达,且进一步促进了 *Pst* DC3000(+MT+*Pst*)处理 4 h 和 8 h 对这两个基因表达的诱导(图 1)。

由此可见,*Pst* DC3000 侵染能够快速诱导内源褪黑素信号。

2.2 外源褪黑素降低烟草叶片中 Pst DC3000 含量

为研究褪黑素在病原菌入侵中的功能,外源褪黑素预处理 2 h 后叶片喷施 *Pst* DC3000,分析叶片中病原菌菌落形成单位(colony forming units, CFU)以衡量叶片病原菌含量^[30-34]。与对照组(-MT)相比,褪黑素(+MT)预处理后,烟草叶片上的病原菌菌落数显著降低了 88%(图 2)。

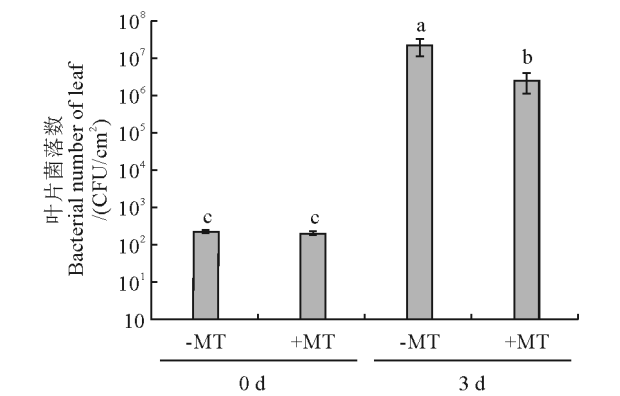


图 2 褪黑素对烟草叶片 *Pst* DC3000 含量的影响
Fig. 2 Effects of melatonin on the *Pst* DC3000 contents in tobacco leaves

2.3 过表达 GmSANT1 基因增加转基因烟草内源褪黑素含量

与野生型相比较,*GmSNAT1-OE2* 和 *GmSNAT1-OE5* 转基因烟草叶片中 *GmSNAT1* 的基因表达显著提高,且内源褪黑素含量分别显著提高了 3.2 和 3.5 倍,*NtPMTR1* 的表达水平也提高了约 6 倍(图 3)。

2.4 过表达 GmSANT1 基因提高转基因烟草对 Pst DC3000 的抗性

本研究随后使用 *GmSNAT1* 转基因烟草为材料,探讨内源褪黑素信号在植物应答病原菌入侵中的功能。

与对照相比(-MT),外源褪黑素(+MT)预处理 2 h 后,野生型和转基因烟草叶片中的 *Pst* DC3000 菌落数均显著下降(图 4)。

在有褪黑素预处理情况下,*GmSNAT1-OE2* 和 *GmSNAT1-OE5* 叶片中的菌落数均显著低于野生型植物。由此可见,外源和内源褪黑素均显著降低病原菌入侵。

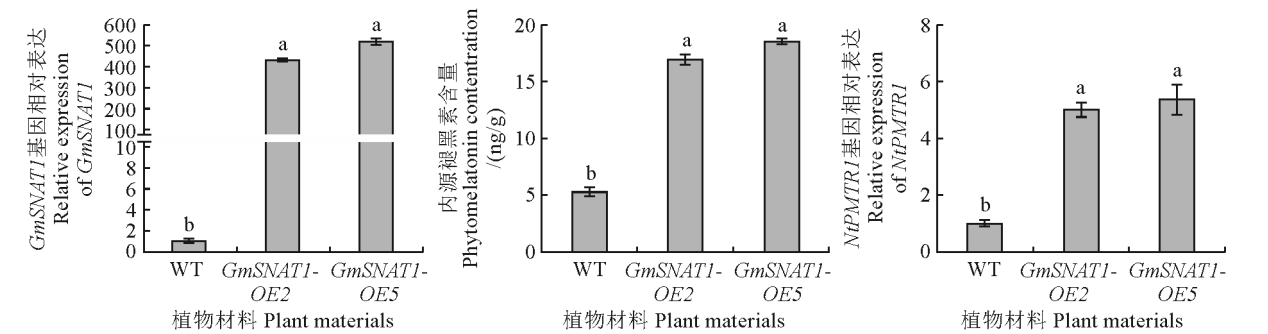


图 3 过表达 *GmSANT1* 基因增加内源褪黑素合成与潜在受体 *NtPMTR1* 基因表达

Fig. 3 Overexpression of *GmSANT1* increases endogenous phytomelatonin in synthesis and expression of the putative phytomelatonin receptor *NtPMTR1*

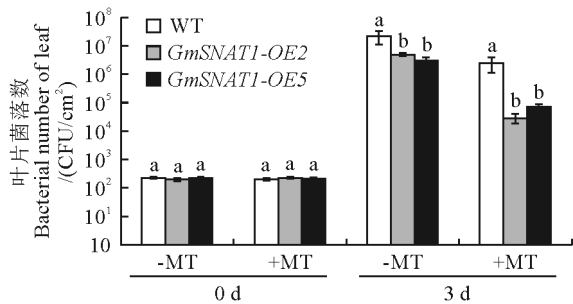


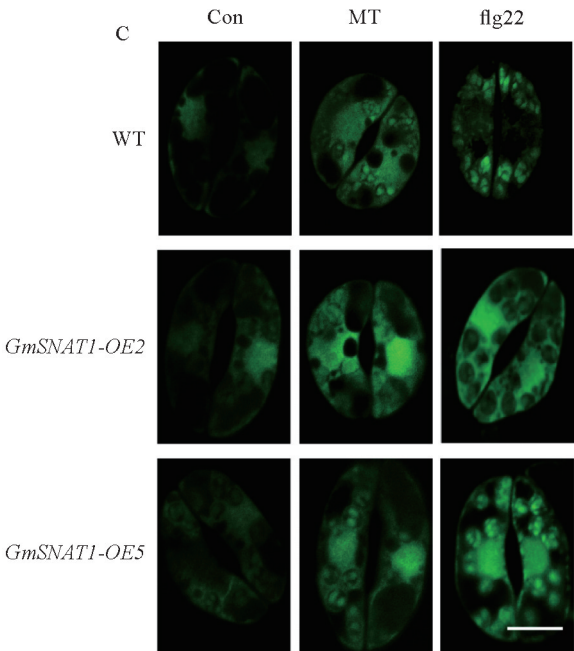
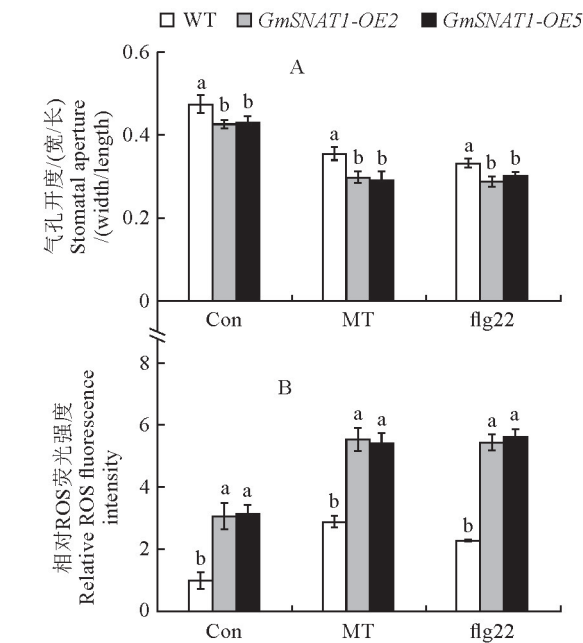
图 4 褪黑素对野生型(WT)和 *GmSANT1* 转基因烟草 (*GmSANT1*-OE2 和 *GmSANT1*-OE5) 叶片 *Pst* DC3000 含量的影响

Fig. 4 Effects of melatonin on the *Pst* DC3000 content in leaves of wild type (WT) and *GmSANT1*-overexpressing (*GmSANT1*-OE2 and *GmSANT1*-OE5) tobacco plants

2.5 *GmSANT1* 转基因烟草对褪黑素和 flg22 诱导气孔关闭的敏感性增加

气孔是病原菌入侵植物叶片的主要通道,且褪黑素通过诱导保卫细胞 ROS 产生和气孔关闭以阻止病原菌入侵^[19]。

对气孔开度和 ROS 含量的分析结果表明,褪黑素和细菌鞭毛蛋白多肽 flg22 均能够诱导野生型 (WT) 和转基因植物 (*GmSANT1*-OE2 和 *GmSANT1*-OE5) 气孔关闭和 ROS 产生。褪黑素和 flg22 处理 2 h 后, *GmSANT1*-OE2 和 *GmSANT1*-OE5 气孔开度是 WT 植物的 90%, 而 ROS 相对荧光强度提高了约 2 倍(图 5)。



A. 褪黑素和 flg22 对气孔开度的影响; B. 相对 ROS 荧光强度; C. 保卫细胞中活性氧荧光图(Bar=10 μ m)。

图 5 褪黑素和 flg22 对气孔开度和保卫细胞 ROS 含量的影响

A. Effects of melatonin and flg22 on stomatal opening based on fluorescence map of reactive oxygen species in guard cells; B. Fluorescence intensity relative to ROS; C. Fluorescence map of reactive oxygen species in guard cells.

Fig. 5 Effects of melatonin and flg22 on stomatal aperture and ROS production

3 讨论

褪黑素是生物体普遍存在的信号分子。在人体中,褪黑素主要具有调节昼夜节律、睡眠、生殖和免疫等生理功能。与之类似的是,褪黑素也调控了植物种子萌发、开花、气孔节律关闭等^[35]。此外,褪黑素在提高植物抗病能力中也起到重要作用,如外源褪黑素可以有效抑制茄根根核菌的活性,增强苹果树对褐斑病的抗性^[36],减轻草莓真菌感染^[37]。在拟南芥中,荧光假单胞菌 *Pst* DC3000 可迅速提高植物内源褪黑素含量,且外源施加褪黑素诱导了水杨酸和 NO 等防御信号和抗病基因表达^[38]。与拟南芥 Col-0 相比,褪黑素合成关键基因 *sna1* 突变体中的内源褪黑素含量及其对病原菌抗性均显著下降^[39]。本研究发现外源喷施褪黑素和内源褪黑素含量提高的 *GmSANT1* 转基因烟草叶片中的 *Pst* DC3000 菌落数均显著下降,表明褪黑素在抵御病原菌入侵中起重要作用,且褪黑素在动植物免疫应答中的功能可能是保守的。

气孔不仅是植物叶片吸收 CO₂ 进行光合作用的主要通道,也是病原菌入侵的主要途径^[40]。油菜黄单胞菌(bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae*)^[41]、葡萄生单轴霜霉菌(Oomycete *Plasmopara viticola*)^[42] 和柄锈菌属(fungus *Puccinia*)^[43-44]等均通过气孔进入植物叶片。植物质膜定位的模式识别受体可识别病原体相关的分子模(pathogen-associated molecular patterns,PAMP),诱导 ROS 产生和气孔关闭,从而“关闭”病原菌入侵的“大门”^[5-6]。在三七(*Panax notoginseng*)中,

Yang 等^[19]的研究发现外源褪黑素主要通过诱导气孔关闭以降低病原菌入侵。在拟南芥中的进一步研究发现^[19,26],褪黑素通过 PMTR1 激活异源三聚体 GTP 结合蛋白 G_i 亚基(GPA1)或 MAPK 信号途径调节拟南芥气孔免疫,且免疫受体复合体 FLS2(flagellin sensing 2)和 BAK1[brassinosteroid insensitive 1(BRI1)associated kinase receptor 1]介导的 flg22 诱导气孔免疫也依赖于 PMTR1。在烟草中,Kong 等^[45]克隆了 PMTR1 同源基因 *TrP47363* 和 *TrP13076*,且褪黑素及其类似物 5-甲氧基色胺和 5-甲氧基吲哚诱导的气孔关闭、*PR1a* 基因表达和水杨酸累积均依赖于 TrP47363 和 TrP13076。在本研究中,我们发现褪黑素诱导了烟草保卫细胞 ROS 的爆发和气孔关闭。与野生型植物相比,内源褪黑素含量提高的 *GmSNAT1*-OE2 和 *Gm-SNAT1*-OE5 转基因烟草中潜在褪黑素受体 *Nt-PMTR1* 的表达水平显著提高,且它们对褪黑素和 flg22 诱导的气孔关闭和 ROS 产生的敏感性也显著增加。由此可见,褪黑素主要通过诱导气孔关闭以阻止病原菌的入侵。

综上所述,本研究发现病原菌 *Pst* DC3000 能迅速诱导烟草叶片褪黑素信号相关基因表达(*Nt-SNAT1* 和 *NtPMTR1*),且外源喷施褪黑素通过诱导保卫细胞 ROS 产生和气孔关闭以阻止病原菌入侵。在烟草中过量表达 *GmSNAT1* 显著提高了转基因烟草中内源褪黑素合成及受体基因 *NtPMTR1* 的表达,从而提高植物的气孔免疫和对病原菌入侵的抗性。

参考文献:

[1] FISHER M C, HENK D A, BRIGGS C J, *et al.* Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health[J]. *Nature*, 2012, **484**(7 393): 186-194.

[2] JONES J D G, DANGL J L. The plant immune system[J]. *Nature*, 2006, **444**(7 117): 323-329.

[3] BITTEL P, ROBATZEK S. Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, **10**(4): 335-341.

[4] MENG X Z, ZHANG S Q. MAPK cascades in plant disease resistance signaling[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2013, **51**: 245-266.

[5] MELOTTO M, UNDERWOOD W, KOCZAN J, *et al.* Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion[J]. *Cell*, 2006, **126**(5): 969-980.

[6] MELOTTO M, ZHANG L, OBLESSUC P R, *et al.* Stomatal defense a decade later[J]. *Plant Physiology*, 2017, **174**(2): 561-571.

[7] LERNER A B, CASE J D, Takahashi Y, *et al.* Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1958, **80**(10): 2 587.

[8] PANDIPERUMAL S R, TRAKHT I, SRINIVASAN V, *et al.* Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways[J]. *Progress in Neurobiology*, 2008, **85**(3): 335-353.

[9] EBISAWA T, KARNE S, LERNER M R, *et al.* Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, **91**(13): 6 133-6 137.

[10] DUBOCOVICH M L, DELAGRANGE P, KRAUSE D N, *et al.* International union of basic and clinical pharmacology. LXXV. nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors[J]. *Pharmacological Reviews*, 2010, **62**(3): 343-380.

[11] REPPERT S M, WEAVER D R, EBISAWA T, *et al.* Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses[J]. *Neuron*, 1994, **13**(5): 1 177-1 185.

[12] NOSJEAN O, FERRO M, COGE F, *et al.* Identification of the melatonin-binding Site MT3 as the quinone reductase 2[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, **275**(40): 31 311-31 317.

[13] 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.

[14] 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]. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1995, **35**(3): 627-634.

[15] TASSEL D V, ROBERTS N, O'NEILL S. Melatonin from higher plants: isolation and identification of *N*-acetyl-5-methoxytryptamine[J]. *Plant Physiology*, 1995, **108**: 101.

[16] ZHANG N, SUN Q Q, ZHANG H J, *et al.* Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, **66**(3): 647-656.

[17] 赵 燕, 王东华, 赵曦阳. 植物中褪黑素的研究进展[J]. 西北植物学报, 2014, **34**(1): 196-205.

 ZHAO Y, WANG D H, ZHAO X Y. Recent advance on the melatonin in plant[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2014, **34**(1): 196-205.

[18] WEI J, LI D X, ZHANG J R, *et al.* Phytomelatonin receptor PMTR1-mediated signaling regulates stomatal closure in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Pineal Research*, 2018, **65**(2): e12500.

[19] YANG Q, LI J B, MA W N, *et al.* Melatonin increases leaf disease resistance and saponin biosynthesis in *Panax notogiseng* [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2021, **263**: 153 466.

[20] 孙子荀, 倪照君, 高志红, 等. 外源褪黑素提高草莓黑斑病抗性的效果和作用机制初探[J]. 西北植物学报, 2020, **40**(10): 1 679-1 687.

 SUN Z X, NI Z J, GAO Z H, *et al.* Effect and mechanism of exogenous melatonin on improvement of black rot disease resistance in strawberry[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2020, **40**(10): 1 679-1 687.

[21] GU Q, CHEN Z P, YU X L, *et al.* Melatonin confers plant tolerance against cadmium stress via the decrease of cadmium accumulation and reestablishment of microRNA-mediated redox homeostasis[J]. *Plant Science*, 2017, **261**: 28-37.

[22] ZHANG J R, WEI J, LI D X, *et al.* The role of the plasma membrane H⁺-ATPase in plant responses to aluminum toxicity[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, **8**: 1 757.

[23] ZHANG J R, LI D X, WEI J, *et al.* Melatonin alleviates aluminum-induced root growth inhibition by interfering with nitric oxide production in *Arabidopsis* [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2019, **161**: 157-165.

[24] 于小萌, 徐碧玉, 刘菊华, 等. 香蕉 MaCAM 基因克隆及表达分析[J]. 西北植物学报, 2012, **32**(7): 1 316-1 321.

 YU X M, XU B Y, LIU J H, *et al.* Cloning and expression analysis of MaCAM in banana[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2012, **32**(7): 1 316-1 321.

[25] CHEN L, WANG M R, LI J W, *et al.* Exogenous application of melatonin improves eradication of apple stem grooving virus from the infected in vitro shoots by shoot tip culture [J]. *Plant Pathology*, 2019, **68**: 997-1 006.

[26] YANG Q, PENG Z P, MA W N, *et al.* Melatonin functions in priming of stomatal immunity in *Panax notoginseng* and *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiology*, 2021, **87**(4): 2 837-2 851.

[27] 张佳蓉. 褪黑素参与拟南芥和大豆抗铝胁迫调控的机理研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2018.

[28] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method[J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402-408.

[29] LI D X, WEI J, PENG Z P, *et al.* Daily rhythms of phyto-melatonin signaling modulate diurnal stomatal closure via regulating reactive oxygen species dynamics in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Pineal Research*, 2020, **68**(3): e12640.

[30] 方瀚墨, 胡璋健, 马巧梅, 等. 番茄 SlβCA3 在防御丁香假单胞菌番茄致病变种中的功能[J]. 中国农业科学, 2022, **55**(14): 2 740-2 751.

 FANG H M, HU Z J, MA Q M, *et al.* Function of SlβCA3 in plant defense against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2022, **55**(14): 2 740-2 751.

[31] WANG L, LIU W, WANG Y J. Heterologous expression of Chinese wild grapevine VqERFs in *Arabidopsis thaliana* enhance resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 and to *Botrytis cinerea*[J]. *Trends in Plant Science*, 2020, **293**: 110 421.

[32] WANG M N, ZHU Y X, HAN R, *et al.* Expression of *Vitis amurensis* VaERF20 in *Arabidopsis thaliana* improves resistance to *Botrytis cinerea* and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, **19**(3): 696.

[33] WANG Y Q, WANG D J, WANG F, *et al.* Expression of the grape *VaSTS19* gene in *Arabidopsis* improves resistance to powdery mildew and *Botrytis cinerea* but increases susceptibility to *Pseudomonas syringe* pv. *tomato* DC3000[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, **18**(9): 2 000.

[34] 刘俊杰, 贾晓晨, 赵小明, 等. SPINDLY 在壳寡糖诱导拟南芥抗丁香假单胞菌中的功能[J]. 西北植物学报, 2020, **40**(5): 766-772.

LIU J J, JIA X C, ZHAO X M, *et al.* Function of SPINDLY in chitosan oligosaccharide induced resistance to pst DC3000 in *Arabidopsis*[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2020, **40**(5): 766-772.

[35] LI X M, RENGEL Z, CHEN Q. Phytomelatonin prevents bacterial invasion during nightttime[J]. *Trends in Plant Science*, 2022, **27**(4): 331-334.

[36] YIN L H, WANG P, LI M J, *et al.* Exogenous melatonin improves *Malus* resistance to *Marssonina* apple blotch[J]. *Journal of Pineal Research*, 2013, **54**(4): 426-434.

[37] AGHDAM M S, FARD J R. Melatonin treatment attenuates postharvest decay and maintains nutritional quality of strawberry fruits (*Fragaria* × *anannasa* cv. *selva*) by enhancing GABA shunt activity[J]. *Food Chemistry*, 2017, **221**: 1 650-1 657.

[38] SHI H T, CHEN Y H, TAN D X, *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**(1): 102-108.

[39] 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**(3): 291-299.

[40] QI J S, SONG C P, WANG B S, *et al.* Reactive oxygen species signaling and stomatal movement in plant responses to drought stress and pathogen attack[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2018, **60**(9): 805-826.

[41] HUGOUVIEUX V, BARBER C E, DANIELS M J. Entry of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* into hydathodes of *Arabidopsis thaliana* leaves: A system for studying early infection events in bacterial pathogenesis[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1998, **11**(6): 537-543.

[42] ALLÈGRE M, DAIRE X, HÉLOIR M C, *et al.* Stomatal deregulation in *Plasmopara viticola*-infected grapevine leaves [J]. *New Phytologist*, 2007, **173**(4): 832-840.

[43] SHAFIEI R, HANG C, KANG J G, *et al.* Identification of loci controlling non-host disease resistance in *Arabidopsis* against the leaf rust pathogen *Puccinia triticina*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2007, **8**(6): 773-784.

[44] GRIMMER M K, JOHN FOULKES M, PAVELEY N D. Foliar pathogenesis and plant water relations: A review[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, **63**(12): 4 321-4 331.

[45] KONG M M, SHENG T, LIANG J, *et al.* Melatonin and its homologs induce immune responses via receptors trP47363-trP13076 in *Nicotiana benthamiana* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, **12**: 691 835.

(编辑: 韦青侠)