

褪黑素壳聚糖微粒防止褪黑素降解并有效提高其抗旱功能

周彬¹, 于小晶^{1*}, 张民^{1*}, 田虹雨¹, 董晶晶¹, 郭蕾², 张天骄¹

[1 山东农业大学资源与环境学院/土肥高效利用国家工程研究中心, 山东泰安 271018;

2 山东农业大学经济管理学院(商学院), 山东泰安 271018]

摘要:【目的】褪黑素可提高作物抗旱性, 但容易降解。本研究试图开发具有缓释和抵御光降解能力的褪黑素壳聚糖微粒, 并对其抗旱性进行评价。【方法】利用壳聚糖与三聚磷酸钠和果胶所产生的静电引力, 使三者之间产生交联形成包裹褪黑素的杂化微粒, 从而实现褪黑素的缓释和保活。确定投入褪黑素质量为 5 mg 时制备的褪黑素壳聚糖微粒作为试验材料 (MP-MT)。利用扫描电子显微镜 (SEM) 和傅立叶变换红外光谱 (FTIR), 对褪黑素壳聚糖微粒 (MP-MT) 表面形貌及官能团特性进行表征。采用超高效液相色谱技术, 探究 MP-MT 对褪黑素的缓释性能和抵抗光降解的性能。以两叶一心的小麦幼苗为试材, 进行灌根试验。将基质最大持水量的 80% 设为正常对照 (CK1), 基质最大持水量的 40% 设为干旱对照 (CK2); 在干旱胁迫下, 设施用 1.0 g/L 褪黑素 (MT1.0)、壳聚糖微粒 (MP) 和含褪黑素 0.5、1.0、1.5 g/L 的褪黑素壳聚糖微粒 (MP-MT0.5、MP-MT1.0、MP-MT1.5), 共 7 个处理。在处理第 8 天, 取样分析小麦幼苗株高、干重、鲜重、叶片 SPAD 值、根系生长、抗氧化酶活性及丙二醛含量。【结果】当褪黑素投入量为 5 mg 时 MP-MT 对褪黑素的包封率最稳定, 为 52.14%, 之后的相关试验均以该比例制备的褪黑素壳聚糖微粒 (MP-MT) 作为试验材料。通过 SEM 照片发现, MP-MT 微粒粒径相较于壳聚糖微粒增加且表面变粗糙。MP-MT 微粒 FTIR 结果同时检测出现了壳聚糖、褪黑素等组分的特征峰, 表明褪黑素在微粒中存在。模拟释放试验结果表明, MP-MT 在 pH 5.0 和 pH 7.0 磷酸缓冲溶液下 36 h 的释放率分别为 65.43%、50.13%。模拟光降解试验表明, 可见光照射 4 h 时 MP-MT 中褪黑素的光降解率较普通 MT 降低了 143.37%。小麦幼苗干旱胁迫试验结果表明, 与 MT1.0 处理相比, 3 个 MP-MT 处理的小麦幼苗干重增加 4.50%~22.73%, 根系长度增加 15.92%~32.56%, 过氧化酶活性提高 19.56%~20.34%, 丙二醛含量降低 9.77%~12.30% ($P<0.05$)。【结论】壳聚糖/三聚磷酸钠/果胶的褪黑素封装体系可以实现褪黑素的缓释和保活, 显著提高干旱胁迫下小麦幼苗 SPAD 值, 促进根系发育, 提高抗氧化酶活性, 从而提高小麦幼苗抗旱性。

关键词: 褪黑素; 壳聚糖; 缓释封装; 光降解; 抗旱

Melatonin chitosan microparticles decrease degradation and increase drought resistance properties of melatonin

ZHOU Bin¹, YU Xiao-jing^{1*}, ZHANG Min^{1*}, TIAN Hong-yu¹, DONG Jing-jing¹, GUO Lei², ZHANG Tian-jiao¹

(1 College of Resources and Environment, Shandong Agricultural University/National Engineering Research Center for Efficient Utilization of Soil and Fertilizer Resources, Tai'an, Shandong 271018, China; 2 School of Economics and Management, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: 【Objectives】Melatonin is capable of increasing drought tolerance of crops but it is easily degraded when exposed to environment. We tried to protect melatonin from degradation by coating it with chitosan, and tested the drought resistance property of the prepared melatonin chitosan particles (MP-MT). 【Methods】The MP-MTs were prepared by cross-linking chitosan, sodium tripolyphosphate, and pectin through electrostatic gravitational force to form hybridized particles first, then melatonin was encapsulated into the particles in a certain

收稿日期: 2021-11-15 接受日期: 2022-03-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (41977019); 山东省重大科技创新工程项目 (2019JZZY010723) 国家重点研发计划课题 (2017YFD0200706)。

联系方式: 周彬 E-mail: binnnnzhou@163.com

* 通信作者 于小晶 E-mail: family19930428yxj@163.com; 张民 E-mail: minzhang-2002@163.com

mass ratio. The optimum addition rate of melatonin was 5 mg of MP-MTs. The surface morphology and functional groups of MP-MT were characterized by scanning electron microscopy (SEM) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The release rate of melatonin was tested by dissolving MT-MPs in pH 5.0 and pH 7.0 phosphate buffer solutions. The photodegradation of melatonin was tested by exposing MP-MT to sunlight. A drought resistance pot experiment was conducted using wheat seedlings with two leaves and one shoot as test materials. The drought stress was kept at 40% of maximum substrate water holding capacity, and 1.0 g/L melatonin solution (MT1.0), chitosan (MP), and 0.5, 1.0, and 1.5 g/L of MT-MP were used as treatments. The growth of plants and roots, leaf SPAD value, antioxidant enzyme activity, and malondialdehyde content of wheat seedlings were investigated on the 8th day after treatment. **【 Results 】** The SEMs showed that the MP-MT particles had a rougher surface than melatonin. FTIR results revealed the presence of characteristic peaks of chitosan and melatonin in MP-MT. The release rate of MP-MT was 65.43% and 50.13% at pH 5.0 and pH 7.0 in phosphate buffer solution for 36 h, respectively. The photodegradation rate of melatonin in MP-MTs was 143.37% lower than normal melatonin after 4 h of light exposure. Chitosan did not show any effect on wheat seedlings growth. Further, compared with MT1.0 treatment, the dry weight of wheat seedlings treated with three MP-MT treatments increased by 4.50%–22.73%, the root length increased by 15.92%–32.56%, the activity of peroxidase increased by 19.56%–20.34%, and the content of malondialdehyde decreased by 9.77%–12.30% ($P<0.05$). **【 Conclusions 】** The encapsulation of melatonin with chitosan/sodium tripolyphosphate/pectin particles decreases the degradation of melatonin through slow release and retention of melatonin, and thus significantly increases the drought resistance effect of melatonin. Encapsulation also elicited the same drought resistance property with melatonin at lower application rate, making it suitable for practical application in agriculture.

Key words: melatonin; chitosan; slow release; encapsulation; photodegradation; drought tolerance

小麦 (*Triticum aestivum* L.) 是我国第二大粮食作物, 其产量的高低直接影响人民生活水平和国家粮食安全。华北地区作为我国冬小麦重要产区之一, 该区域水资源量仅占全国水资源总量的 6%, 人均水资源占有量大大低于全国平均水平^[1-2]。干旱在冬小麦苗期出现频繁, 且易导致小麦植株生理伤害, 导致产量减少 45% 以上, 严重威胁粮食安全^[3]。干旱通过降低植物体内相对含水量、叶片水势, 抑制细胞生长和增殖, 引起光合色素含量下降, 造成细胞损伤, 严重时甚至会导致植物死亡^[4]。为了减轻干旱胁迫对作物造成的损伤, 可通过适量添加生物刺激素来诱导植物的分子和生理防御机制, 达到促生保收的效果, 这也成为保障我国粮食安全的重要途径之一^[5]。

褪黑素又名 N-乙酰-5-甲氧基色胺 (N-acetyl-5-methoxytryptamine), 是一种动植物内源性抗氧化剂和自由基清除剂^[6]。有研究表明, 外源施加褪黑素是提高植物抗逆性的有效手段^[7-8]。Sharma 等^[9]研究发现, 褪黑素通过调控抗氧化防御的关键基因提高抗旱性。然而, 由于褪黑素存在易氧化、光敏感等问题, 导致外源添加褪黑素时需要在黑暗条件下高频

次施用, 这严重限制了褪黑素在农业上的推广应用^[10]。

通过合理的封装技术控制褪黑素的释放是防止褪黑素失效, 且实现其在农业中应用的有效手段^[11]。传统农药封装技术主要是微胶囊技术, 基于水相和油相互不相容, 从而使得壁材能够在芯材表面凝聚形成微胶囊, 保护芯材实现缓释提高利用率^[12]。由于褪黑素直接作用于植物, 且溶于乙醇等与水互溶的溶剂, 其通过水油体系封装较为困难。壳聚糖 (CS) 是一种聚阳离子电解质多糖, 具有生物相容性、可生物降解特性^[13]。三聚磷酸钠 (TPP) 是一类水溶性线状聚磷酸盐。当 CS 与带相反电荷的 TPP 作用时, 通过 CS 的氨基和 TPP 的磷酸基团之间的静电吸引作用从而产生微粒负载药品^[14]。研究表明, 壳聚糖/三聚磷酸钠微粒负载氟乐灵能够实现其缓释并减少环境毒性^[14]。果胶是存在于植物细胞壁中的一种多糖, 带负电荷且易被植物吸收。有研究表明, 壳聚糖/三聚磷酸钠/果胶纳米粒子负载百草枯可以有效提升百草枯的活性, 降低其光降解速率和提高其利用效率^[15]。本研究尝试采用壳聚糖、果胶及三聚磷酸钠, 开发具有缓释和抵御光降解能力的褪黑素壳聚糖微粒并进行表征评价。本研究的目的在于: 1) 明

确褪黑素壳聚糖微粒的制备原理及形态特征; 2) 褪黑素壳聚糖微粒抵抗光降解能力的评价; 3) 施用褪黑素壳聚糖微粒对小麦苗期抗旱性的影响。这项技术能为功能物质提供一种低成本、高效的保活缓释手段, 为功能物质在农业生产中大面积推广应用提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

壳聚糖 (CS, 脱乙酰度, 90%~95%)、褪黑素 (MT)、三聚磷酸钠 (TPP)、果胶 ($\geq 74.0\%$)、乙酸、甲醇购自上海源叶生物科技有限公司; 透析袋 (3500 Da) 购自北京瑞达恒辉科技发展有限公司; $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜购自上海必泰生物科技有限公司; 小麦 (济麦 22) 购自山东登海种业股份有限公司。

供试基质来源于丹麦品氏托普公司, 主要以优质泥炭藓为原料, 基本理化性质为有机质 $434\ \text{g/kg}$ 、 NO_3^--N $296\ \text{mg/kg}$ 、 NH_4^+-N $84.1\ \text{mg/kg}$ 、有效磷 $99.2\ \text{mg/kg}$ 、速效钾 $1169\ \text{mg/kg}$ 、最大持水量为 66.67% 。育苗采用梯形方盒, 上口边长 $10\ \text{cm}$ 、高 $8\ \text{cm}$ 、底面边长 $7\ \text{cm}$ 。

1.2 试验设计

1.2.1 褪黑素壳聚糖微粒的制备 微粒的制备方法 (图 1) 在 Rashidipour 等^[15]的离子凝胶化技术基础上进行了一些参数的优化和调整: 称取 $0.1\ \text{g}$ 壳聚糖粉末, 溶解在 $100\ \text{mL}$ 的 0.2% (V/V) 醋酸溶液中, 磁力搅拌 $12\ \text{h}$ 至完全溶解。同时制备质量分数为 0.1% 的

三聚磷酸钠水溶液和质量分数为 0.08% 的果胶溶液。为了去除不溶性或聚集的物质, 三种溶液均通过 $0.45\ \mu\text{m}$ 的滤膜过滤。不含褪黑素壳聚糖微粒的制备: 在磁力搅拌下缓慢的将 $5\ \text{mL}$ TPP 溶液和 $2\ \text{mL}$ 果胶溶液滴加到 $20\ \text{mL}$ 壳聚糖溶液中, 60°C 下搅拌 $30\ \text{min}$, 在 4°C , $10000\ \text{g}$ 离心 $20\ \text{min}$ 后弃掉上清液, 将沉淀冷冻干燥 $12\ \text{h}$, 得到不含褪黑素的壳聚糖微粒 (MP)。含褪黑素的壳聚糖微粒的制备: 先将 0.1 、 0.3 、 0.5 、 $1.0\ \text{mL}$ 的褪黑素甲醇溶液 ($10\ \text{mg/mL}$) 分别与 $20\ \text{mL}$ 壳聚糖溶液混合, 再按照上述步骤添加 $5\ \text{mL}$ TPP 和 $2\ \text{mL}$ 果胶, 制得褪黑素添加量为 1 、 3 、 5 、 $10\ \text{mg}$ 的褪黑素壳聚糖微粒。在 4°C , $10000\ \text{g}$ 离心 $20\ \text{min}$, 后弃掉上清液, 沉淀用蒸馏水洗涤 3 次, 保证去除未负载的褪黑素。经 $12\ \text{h}$ 冷冻干燥后获得粉末样品, 密封避光下储存。

1.2.2 小麦干旱胁迫试验 供试品种为济麦 22, 所用基质以优质泥炭藓为主要原料, 所用 MP-MT 为褪黑素添加量为 $5\ \text{mg}$ 的褪黑素壳聚糖微粒。试验采用基质培养方法, 以基质最大持水量的 80% 为正常供水对照 (CK1), 40% 为干旱胁迫对照 (CK2), 在干旱条件下, 设施用 $1.0\ \text{g/L}$ 普通褪黑素溶液 (MT1.0), 壳聚糖微粒溶液 (MP), 以及含褪黑素 0.5 、 1.0 、 $1.5\ \text{g/L}$ (MP-MT0.5、MP-MT1.0、MP-MT1.5, 即每 $1\ \text{L}$ 溶液中添加 5 、 10 、 $15\ \text{g}$ 褪黑素壳聚糖微粒溶液制成) 共 7 个处理, 各处理重复 4 次。选取颗粒饱满的小麦种子进行消毒灭菌处理 (经 75% 乙醇浸泡 $30\ \text{s}$, 20% 的 NaClO 溶液浸泡 $15\ \text{min}$), 用蒸馏水清洗干净, 浸种催芽后选取萌发水平一致的种子, 均匀点播于方

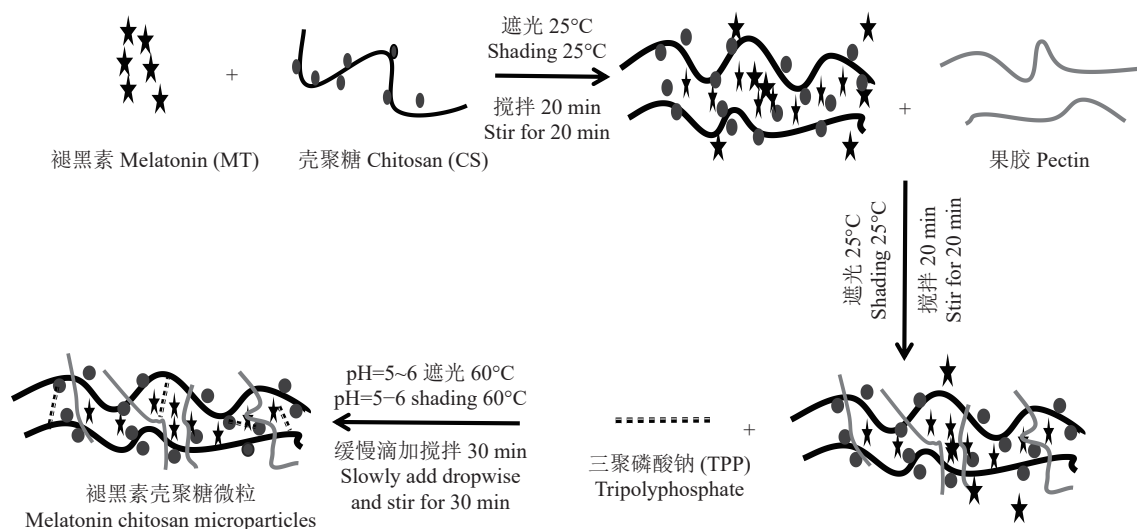


图 1 褪黑素壳聚糖微粒制备原理示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the preparation principle of melatonin chitosan microparticles

盒中, 每盆 10 粒, 种子上部用 0.5 cm 厚蛭石覆盖, 蛭石表面喷洒 20 mL 蒸馏水, 在 25℃ 下, 14 h 光照/10 h 黑暗, 光强 6000 lx 进行培养, 称重法每天补充水分, 培养至两叶一心后每盆保留 5 株健壮且生长水平一致的小麦幼苗。进行试验处理, 每天使用称重法补充水分, 连续处理 8 天。干旱胁迫后第 1 天和第 5 天, 分别用 20 mL 相应浓度的褪黑素壳聚糖水溶液进行灌根, 对照处理以等量蒸馏水浇灌, 第 8 天收获。

1.3 测定项目与方法

1.3.1 包封率测试 将制备完成的微粒悬浮液放入 50 mL 离心管中, 以 10000 g, 4℃ 离心 20 min。取上清液, 测量未包覆的褪黑素。通过超高效液相色谱测量残留在滤液中的褪黑素量间接计算包封率。将未负载褪黑素的壳聚糖微粒滤液作为空白对照。以含有已知浓度的褪黑素溶液做校准曲线。

包封率 (%) = $100 \times (1 - \text{残留褪黑素量} / \text{褪黑素总量})$ ^[15]

1.3.2 形态观察 为了观察褪黑素壳聚糖微粒个体形貌, 减少冷冻干燥对微观形貌的影响, 对褪黑素壳聚糖悬浮液滴进行 SEM 扫描。将褪黑素壳聚糖微粒悬浮液滴加到硅片并在室温下干燥, 进行喷金处理, 然后使用扫描电子显微镜 (SEM) 进行形态观察。仪器采用日本日立公司的 SU8020 型扫描电子显微镜。

1.3.3 红外光谱测试 将褪黑素壳聚糖微粒、褪黑素、壳聚糖、三聚磷酸钠、果胶分别同溴化钾粉末混合压片, 将制好的薄片置于傅里叶红外光光谱仪中测定红外光谱。仪器采用美国 Nicolet 公司的 Nexus 型红外光谱仪, 扫描次数为 32, 分辨率为 2 cm⁻¹, 扫描范围为 4000~400 cm⁻¹。

1.3.4 缓释性能测试和释放动力学分析 褪黑素壳聚糖微粒在不同 pH 条件下的释放行为测试: 将 10 mg 褪黑素壳聚糖微粒和空白壳聚糖微粒放置在 3500 Da 透析袋中, 分别放置于 pH 5.0 和 pH 7.0 的 100 mL 磷酸缓冲溶液中。室温下, 以预定时间 2、4、6、8、10、12、24、36 h 为时间点间隔取 1 mL 样品。使用超高效液相色谱仪分析所收集样品中褪黑素的量。每个样品 3 次重复。

Ritger-Peppas 模型^[16]现在常被用于描述骨架片的药物释放规律, 数学表达式如下:

$$M_t/M_\infty = -kt^n$$

式中: M_t 为微粒释放出来的褪黑素质量, M_∞ 为微粒中褪黑素的总质量, M_t/M_∞ 是药物累积释放率, k 是释药速率常数, t 为释放时间, n 是扩散释放指数。

当 $n \leq 0.43$ 时, 药物以 Fick 扩散 (浓度梯度越大, 扩散通量越大) 为主; 当 $0.43 < n < 0.85$ 时, 药物以非 Fick 扩散为主, 即药物扩散与骨架溶蚀作用并存的释药机制; 当 $n \geq 0.85$ 时, 属于溶胀控制过程。

1.3.5 光降解率测试 褪黑素壳聚糖微粒和褪黑素纯物质换算成 10 mg/L 的浓度添加到水溶液中。用 4 W 的 LED 灯管模拟可见光照射溶液, 溶液与灯之间的距离为 50 cm, 分别在照射 1、2、3、4 h 的时间间隔破坏性取样。之后将 10 mL 溶液加入离心管中, 并以 10000 ×g 的离心力, 4℃ 下离心 20 min。测定上清液中褪黑素浓度。每个样品重复 3 次。

1.3.6 小麦幼苗生理指标测定 分别测定每个处理小麦幼苗株高、鲜重、干重、SPAD、根系长度、根表面积、根体积、根直径、抗氧化酶 (超氧化物歧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶) 活性和丙二醛含量。植株叶片 SPAD 值采用日本 Minolta 公司生产的 SPAD-502 叶绿素仪测定; 采用万深 LA-S 根系扫描仪进行根系扫描, 测量根系长度、根表面积、根体积、根直径。抗氧化酶活性的测定: 取小麦幼苗叶片样品加入磷酸缓冲液冰浴研磨, 低温离心后取上清液进行酶活性测定; 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性测定采用氮蓝四唑 (nitro-blue tetrazolium, NBT) 法; 过氧化物酶 (peroxidase, POD) 活性测定采用愈创木酚法; 过氧化氢酶 (catalase, CAT) 活性测定采用紫外吸收法^[17]。丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量测定采用硫代巴比妥酸法^[17]。

1.4 数据处理分析

ANOVA 方差分析及 Duncan 差异显著性检验通过 Excel 2016 和 IBM SPSS 软件完成; 采用 Excel 2016 软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 褪黑素壳聚糖微粒的包封率

经过前期试验研究, CS、果胶、TPP 浓度分别为 0.1%、0.08% 和 0.1%, 添加量分别为 20、2 和 5 mL 的条件下制备的褪黑素壳聚糖微粒的包封率是最佳的。在最适配比条件下分别测定了投入质量为 1、3、5、10 mg 褪黑素的包封率。褪黑素添加量在 1、3 和 5 mg 时包封率并无显著差异, 添加量为 10 mg 时包封率显著降低。其中褪黑素添加量为 1 mg 时包封率不稳定, 在 21.8%~67.4% 波动较大。投入褪黑素质量为 5 mg 时制备的褪黑素壳聚糖微粒 (MP-MT) 包封率最高且较为稳定 (图 2), 平均包封率达 52.14%,

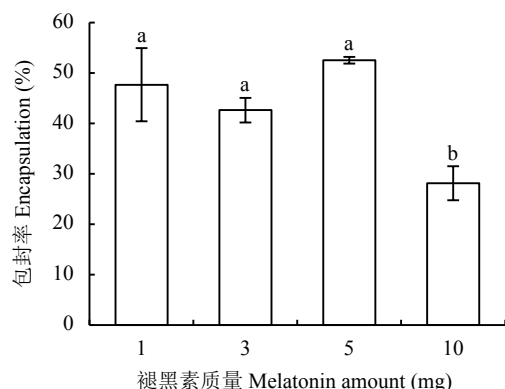


图2 不同褪黑素投入量下褪黑素壳聚糖微粒的封装率
Fig. 2 The encapsulation efficiency of composite particles with different melatonin amount

因此随后试验所用微粒均采用该比例进行制备。

2.2 褪黑素壳聚糖微粒表面形貌

图3为壳聚糖微粒(A、C)和褪黑素添加量为5 mg时制备的褪黑素壳聚糖微粒(B、D)在光学显微镜放大400倍(A、B)下的表现形貌和扫描电镜(C、D)下的微观形貌。400倍显微镜下壳聚糖微粒颗粒粒径较小,颗粒之间无团聚和黏连现象(图3A);图3B中形成的颗粒粒径较大,呈分散分布。扫描电镜显微照片图3C和D均能清楚观察到有颗粒物存在,基底为壳聚糖。图3C显示均匀的颗粒堆积,粒径较小;图3D显示大量的粒径较大颗粒,表面粗糙。这可能是由于添加褪黑素后褪黑素充斥于颗粒内部,从而导致颗粒粒径增大。

2.3 褪黑素壳聚糖微粒化学结构

对褪黑素壳聚糖微粒进行了红外光谱(FTIR)分

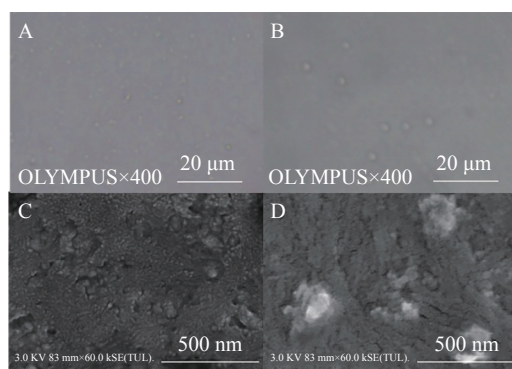


图3 壳聚糖微粒扫描电镜图
Fig. 3 Electron scanning images of chitosan particle structure

注:图A和图C为不含褪黑素;图B和图D为含褪黑素。
Notes: Figure A and C are chitosan particles without melatonin; Figure B and D are chitosan particles with melatonin.

析,同时与MT、MP、CS、TPP、果胶FTIR光谱进行了比较(图4)。壳聚糖(CS)在3458、1658、1076 cm^{-1} 处的特征吸收峰分别归属于N—H拉伸振动峰、氧桥伸缩振动峰、碳氧伸缩震动吸收峰。TPP在1218 cm^{-1} 处有P—O拉伸振动峰,果胶在1638 cm^{-1} 处有COO-对称吸收峰。褪黑素(MT)的N—H拉伸振动, N—H弯曲振动和C—O—C拉伸振动分别是3301、1626和1213 cm^{-1} 的吸收峰。在MP-MT的光谱中,观察到CS与TPP交联后,CS中3524 cm^{-1} 处的峰移至较低波数3454 cm^{-1} ,在1537 cm^{-1} 处出现了一个新峰(酰胺II),这可能是由于CS的-NH₂基团与TPP磷酸基团之间存在静电相互作用造成的。通过MT-MP与MP对比,发现MP-MT中拥有与MT相关的N—H弯曲振动和C—O—C拉伸振动峰,这能表明MP-MT中含有MT相关组分。

2.4 褪黑素壳聚糖微粒的缓释特性和动力学拟合

从室温下MP-MT在pH 5.0或pH 7.0的磷酸缓冲溶液中的释放曲线(图5)可以看出,MP-MT呈现双相释放模式,初始阶段为快速释放,褪黑素在4 h内释放率达到44.83% (pH 5.0)和27.6% (pH 7.0),此后表现为缓慢释放,最终在36 h内释放率达到65.43% (pH 5.0)和50.13% (pH 7.0)。初始阶段的爆发

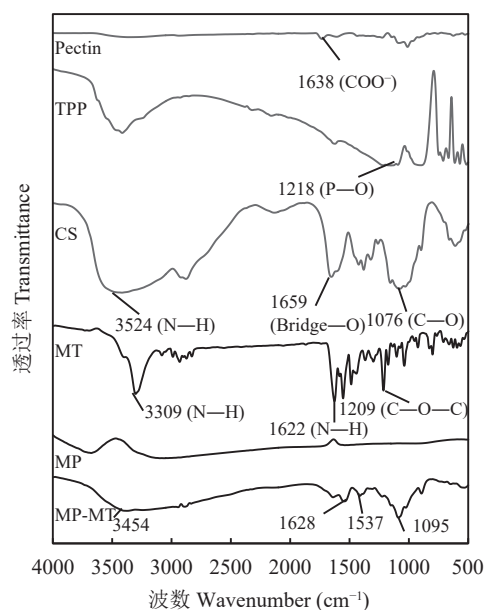


图4 褪黑素壳聚糖(MP-MT)、空载壳聚糖微粒(MP)、褪黑素(MT)、壳聚糖(CS)、三聚磷酸钠(TPP)和果胶(Pectin)的红外光谱

Fig. 4 Infrared spectra of melatonin chitosan (MP-MT), chitosan microparticles (MP), melatonin (MT), chitosan (CS), sodium tripolyphosphate (TPP), and pectin (Pectin)

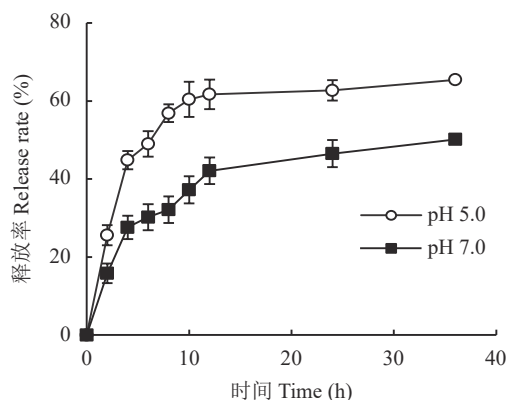


图5 褪黑素壳聚糖微粒在磷酸缓冲溶液中的释放速率
Fig. 5 Release rate of melatonin chitosan in phosphate buffer solution

释放是由于吸附在 MT-MP 表层的褪黑素释放, 而后期的缓释是由于壳聚糖微粒内部褪黑素缓慢释放。与 pH7.0 下相比, pH5.0 下累积释放率升高。可见, 褪黑素壳聚糖微粒可以有效延长褪黑素的释放时间, 且 MP-MT 在酸性条件下会加快褪黑素的释放。

使用 Ritger-Peppas 数学模型对释放数据进行拟合, MP-MT 在 pH 5.0 的磷酸缓冲溶液中的释放指数和线性相关系数 (R^2) 分别为 0.138 和 0.86, MP-MT 在 pH 7.0 的磷酸缓冲溶液中的释放指数和线性相关系数 (R^2) 分别为 0.228 和 0.90 (图 6)。两者的释放指数都小于 0.45, 这表示褪黑素在微粒中的释放行为主要以扩散控制为主。

2.5 褪黑素壳聚糖微粒的光降解性能

由褪黑素 (MT) 和褪黑素壳聚糖微粒 (MP-MT) 水溶液在光照射下褪黑素的降解率 (图 7) 可知, MT 在 1 h 时的降解率为 11.47%, 4 h 时的降解

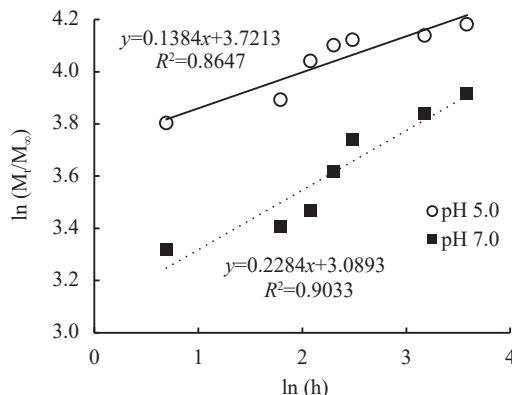


图6 Ritger-Peppas 数学模型拟合的褪黑素壳聚糖微粒中褪黑素随时间的释放率

Fig. 6 Melatonin release rate of melatonin chitosan with time fitted by Ritger-Peppas model

率为 23.68%; MP-MT 在 1 h 时褪黑素降解率为 5.33%, 在 4 h 时降解率仅为 9.73%, 相较于 MT 降解率降低了 58.91%。这表明褪黑素负载在壳聚糖微粒后可有效降低褪黑素的降解, 延长其持效时间。

2.6 干旱条件下褪黑素壳聚糖微粒对小麦幼苗的生长状况和生理指标的影响

由表 1 可知, 干旱对照 (CK2) 比正常对照 (CK1) 小麦幼苗株高、干重分别显著降低了 25.72%、28.58%。与 CK2 相比, MP 对小麦株高、生物量及 SPAD 值均无显著影响, MT 和 3 个 MP-MT 处理有不同程度的增加, MT1.0 处理和 MP-MT0.5 处理可以有效的提高小麦叶片的 SPAD 值 14.47% 和 23.56%。与 MT1.0 相比, MP-MT1.0 显著增加了小麦株高, 3 个 MP-MT 处理的小麦幼苗干重增加 4.50%~22.73%, 3 个 MP-MT 处理均提高了 SPAD 值。以上结果表明, MT-MP 提高小麦幼苗抗旱性的效果好于 MT。

干旱胁迫显著影响了小麦的根系发育情况 (表 2)。MP 处理除根系体积外, 其他指标与 CK2 处理无显著差异, 而 MT1.0、MP-MT0.5、MP-MT1.0 和 MP-MT1.5 处理的根长和根表面积则分别较 CK2 处理增加 18.71%、37.75%、57.40%、40.65% 和 22.94%、25.59%、38.61% 和 17.82% (表 2)。与 MT1.0 处理相比, 3 个 MP-MT 处理根系长度增加 15.92%~32.56%, 增加幅度以 MP-MT1.0 最大。

过氧化物酶是植物体内活性氧清除系统的主要成分之一, 能够缓解植物因干旱引起的氧化损伤。干旱条件会导致小麦叶片的 SOD、POD、CAT 活性下降 (表 3), 而 MT 和 MP-MT 处理的小麦叶片 SOD、POD、CAT 活性均较 CK2 处理出现明显上

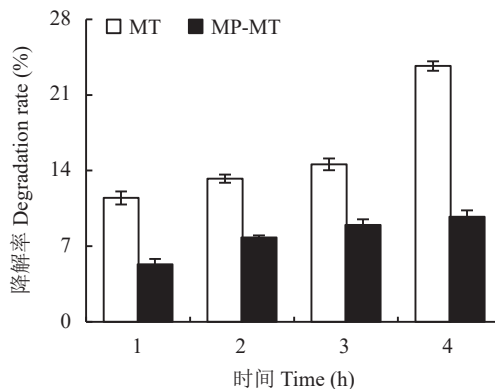


图7 可见光下壳聚糖微粒负载褪黑素 (MP-MT) 和褪黑素 (MT) 随时间的降解率

Fig. 7 Degradation rate of melatonin with (MP-MT) and without chitosan microparticles (MT) under visible light

表 1 干旱胁迫下不同处理小麦株高、鲜重、干重和叶片 SPAD 值

Table 1 Plant height, fresh weight, dry weight and leaf SPAD value of wheat with different treatments under drought stress

处理 Treatment	株高 Plant height (cm)	鲜重 Fresh weight (g/pot)	干重 Dry weight (g/pot)	SPAD值 SPAD value
CK1	27.7 a	1.86 a	0.28 a	37.10 a
CK2	20.6 b	1.34 b	0.20 c	28.3 c
MP	22.1 b	1.43 b	0.22 c	31.2 bc
MT1.0	21.2 b	1.59 ab	0.22 bc	32.4 bc
MP-MT0.5	23.8 b	1.84 a	0.27 a	34.9 ab
MP-MT1.0	24.2 a	1.85 a	0.26 ab	35.2 ab
MP-MT1.5	23.1 b	1.59 a	0.23 bc	33.4 ab

注：同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。
Note: Values followed by different lowercase letters in the same column indicate significant difference among treatments ($P<0.05$).

表 2 干旱胁迫下不同处理小麦根系生长情况

Table 2 Root growth of wheat with different treatments under drought stress

处理 Treatment	根长 Root length (cm)	表面积 Surface area (cm ²)	体积 Root volume (cm ³)	直径 Root diameter (mm)
CK1	321.8 ab	45.6 a	1.06 a	0.49 a
CK2	243.4 d	31.6 c	0.72 c	0.43 b
MP	258.6 cd	31.2 c	0.85 b	0.42 b
MT1.0	288.9 c	38.9 b	0.86 ab	0.42 b
MP-MT0.5	335.2 ab	39.7 ab	0.97 a	0.40 b
MP-MT1.0	383.0 a	43.9 a	0.91 ab	0.40 b
MP-MT1.5	342.3 ab	37.3 b	0.83 b	0.37 b

注：同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。
Note: Values followed by different lowercase letters in the same column indicate significant difference among treatments ($P<0.05$).

升。其中，与 MT1.0 处理相比，3 个 MP-MT 处理的过氧化酶活性提高了 19.56%~20.34%。丙二醛 (MDA) 含量可以在一定程度上反映植物遭受干旱胁迫伤害的程度。MP-MT0.5、MP-MT1.0 和 MP-MT1.5 处理比 CK2 处理小麦叶片的 MDA 含量分别显著降低 28.16%、27.80% 和 26.12%。与 MT1.0 处理相比，3 个 MP-MT 处理的小麦幼苗 MDA 含量降低 9.77%~12.30%。MP-MT0.5 与 MP-MT1.0、MP-MT1.5 处理之间 POD、CAT 活性和 MDA 含量无显著性差异。综合以上结果可知，干旱条件下，MT1.0

表 3 干旱胁迫下不同处理小麦抗氧化酶活性和丙二醛含量

Table 3 Antioxidant activity and malondialdehyde content with different treatments under drought stress

处理 Treatment	SOD 活性 SOD activity (U/g)	POD 活性 POD activity [U/(g·min)]	CAT 活性 CAT activity [U/(g·min)]	MDA 含量 MDA content (nmol/g)
CK1	69.77 a	42.47 a	24.67 d	4.21 e
CK2	62.60 c	32.26 c	24.19 d	6.25 a
MP	62.30 c	32.17 c	23.00 d	5.38 b
MT1.0	67.87 b	36.55 b	26.35 c	5.12 c
MP-MT0.5	71.33 a	42.27 a	29.23 ab	4.49 d
MP-MT1.0	71.37 a	43.70 a	29.97 a	4.51 d
MP-MT1.5	69.03 b	43.97 a	28.10 ab	4.62 d

注：同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。
Note: Values followed by different lowercase letters in the same column indicate significant difference among treatments ($P<0.05$).

处理能够增强小麦抗旱能力，而 MT-MP 处理较 MT1.0 处理进一步显著提升小麦幼苗的抗旱能力，且 MP-MT0.5 处理所需褪黑素施加量更少。

3 讨论

通过壳聚糖/三聚磷酸钠/果胶与褪黑素的杂化成粒可以实现褪黑素缓释保活。超高效液相色谱法测定，装载的 MP-MT 的封装效率为 52.23%，与壳聚糖/卵磷脂载药体系相比包封率升高，这可能是体系中添加果胶的原因。果胶作为一种新的负电荷组分和易被吸收的植物分子，能够增强壳聚糖与三聚磷酸钠的交联反应，由此可能会获得更优的封装效果和更高的利用效率^[18]。与褪黑素多孔淀粉封装系统相比，包封率虽无显著差异，但是壳聚糖/三聚磷酸钠/果胶的杂化包裹褪黑素会使其混合更为均匀，而且封装材料相比多孔淀粉等更为廉价易得，更加适用于农业生产^[19]。相比壳聚糖/三聚磷酸钠制备的纳米颗粒，壳聚糖/三聚磷酸钠/果胶装载褪黑素的微粒粒径具有明显的增加，这可能与添加果胶有关，果胶是具有粘性的溶液会导致微粒的聚集变大。

褪黑素壳聚糖微粒是一种扩散控制的缓慢释放系统，表现为前期的爆发释放和后期的缓慢释放，这种延迟释放可以有效的增加植物对褪黑素的利用效率。前期快速释放使植物的胁迫状况可以及时得到缓解，后期缓慢释放使植物持续处于褪黑素分子的刺激作用下。在 36 h 时 MP-MT 的累计释放率为 65.43%，对比卵磷脂/壳聚糖/褪黑素纳米颗粒 4 h 释

放 70%, 缓释期明显增加。这主要与微粒的粒径相对较大有关, 有研究表明微粒的粒径增加会增强缓释性能^[20]。而且微粒成分中含有果胶, 果胶与水接触后会迅速形成粘性溶液和凝胶, 通过渗透作用调节膨胀程度, 增加交联密度, 调节释放速率^[21]。有研究表明植物在逆境胁迫条件下, 会通过分泌质子、有机酸等来抵抗逆境胁迫, 从而导致局部根系 pH 的降低, MP-MT 在酸性条件下加快释放, 有利于褪黑素释放快速缓解植物的胁迫状况^[22]。酸性条件下 MP-MT 释放加速, 主要与壳聚糖特性有关, 弱酸条件下壳聚糖的氨基被质子化, 破坏了壳聚糖分子间氢键作用, 二级结构被破坏, 使得褪黑素的溶出增加, 释放加快^[23]。本研究中发现壳聚糖封装系统还能有效的降低褪黑素的光降解作用。褪黑素的光降解可能是由于在光照和氧气存在的条件下, 吲哚环生成过氧化物中间体, 然后迅速成为稳定的产物 N1-乙酰基-N2-甲酰-5-甲氧基犬尿氨酸 (AFMK) 所造成的。MP-MT 光降解下降可能与壳聚糖外壳减少了褪黑素与光和氧的直接接触有关^[10, 24]。

在干旱胁迫条件下, 相比 CK2 处理, MT1.0 处理和 MP-MT0.5 处理可以有效提高小麦叶片的 SPAD 值 14.47% 和 23.56%, 这可能与褪黑素参与调节光合作用相关的蛋白质有关。研究表明, 褪黑素下调部分与叶绿素降解有关的蛋白或酶, 如衰老脱水相关蛋白、 α -淀粉酶, 从而减少叶绿素的降解, 维持叶绿体功能^[25]。本试验中褪黑素壳聚糖微粒通过缓释褪黑素来提高干旱胁迫下叶绿素相关酶的表达, 减少叶绿素降解, 从而保证光合作用的正常进行。

促进根系发育, 是减少干旱胁迫造成的不良影响的重要手段。在许多植物中, 褪黑素已被证明能促进根的生长。在甜樱桃砧木的试验中, 发现低浓度的褪黑素对砧木的根数和根长有自生反应^[26]; Zhou 等^[27]研究发现, mDREB1 在转基因植物中可以调节褪黑素的合成, 增加褪黑素的含量, 从而减轻干旱胁迫对根系发育的抑制作用。在本研究中, 通过对植株根系形态的对比分析, 结果表明, MT1.0、MP-MT0.5 处理分别显著促进根长和根表面积增长 18.71%、37.75% 和 22.94%、25.59%, 使其拥有更丰富的根去获取水分, 从而抵御干旱胁迫, 这与王华美等^[28]的研究结果是一致的。褪黑素微粒在提高干重、SPAD 值和根系发育方面的效用较 MT 更加明显, 原因可能在于褪黑素在壳聚糖封装体系中降低光降解速率并缓慢释放, 使得植物能够在干旱胁迫条件下, 外源褪黑素浓度保持在有效范围之内, 增

强植物抗旱性。

干旱胁迫时, 植物叶绿体和线粒体中积累大量自由基, 破坏植物的正常代谢, 导致作物减产^[29]。Ali 等^[30]研究发现, 干旱胁迫累积大量活性氧 (ROS), 导致植物细胞损伤产生 MDA, 抑制植物生长发育。施加褪黑素可以诱导干旱胁迫下植株抗氧化能力的提高, 增强对细胞膜的保护作用。本研究中 MP-MT0.5 处理显著增强了干旱胁迫下小麦 SOD、POD、CAT 的活性, 增强清除 ROS 的能力。这可能是因为外源褪黑素可以诱导内源一氧化氮的产生, 从而下调 miR398 表达以激活 ROS 清除酶活性, 促进相关基因的表达并最终清除细胞内 ROS^[31]。且 MT1.0 和 MP-MT0.5 处理显著降低了叶片 MDA 含量, 其中 MP-MT0.5 降低效果更为明显, 显著减少了 28.16%。这可能与褪黑素提高了抗氧化酶活性和调节 C-重复序列结合因子 (CBFs) 等逆境反应基因的表达有关^[32]。本研究 MP-MT 处理在提升小麦幼苗抗旱性上明显优于 MT 处理, 这主要是因为壳聚糖/三聚磷酸钠/果胶封装体系提高了褪黑素的利用率。另外本试验在不限制黑暗条件下施用且减少施用频次的情况下提高了小麦幼苗的抗旱能力, 这可能与褪黑素壳聚糖微粒对褪黑素的缓慢持续释放和光降解速率降低有关。

4 结论

壳聚糖/三聚磷酸钠/果胶体系能够有效包封褪黑素, 在褪黑素加入量 5 mg 时, 包封率达到 52.14%; 褪黑素壳聚糖微粒具有缓释性能, 符合 Ritger-Peppas 释放机理 Fick 扩散; 光降解试验表明, 褪黑素壳聚糖微粒可有效降低褪黑素的光降解速率; 小麦干旱胁迫试验表明, 褪黑素壳聚糖微粒在降低褪黑素的使用量情况下, 提高小麦幼苗 SPAD 值, 促进根系发育, 增强抗氧化酶活性, 从而缓解干旱损伤, 提高小麦幼苗抗旱能力。

参 考 文 献:

- [1] 张光辉, 刘中培, 费宇红, 等. 华北平原区域水资源特征与作物布局结构适应性研究[J]. 地球学报, 2010, 31(1): 17–22.
Zhang G H, Liu Z P, Fei Y H, *et al.* The relationship between the distribution of irrigated crops and the supply capability of regional water resources in North China Plain[J]. *Acta Geoscientica Sinica*, 2010, 31(1): 17–22.
- [2] 黄峰, 杜太生, 王素芬, 等. 华北地区农业水资源现状和未来保障研究[J]. 中国工程科学, 2019, 21(5): 28–37.
Huang F, Du T S, Wang S F, *et al.* Current situation and future security of agricultural water resources in North China[J]. *Strategic*

- Study of CAE, 2019, 21(5): 28–37.
- [3] Fahad S, Bajwa A A, Nazir U, *et al.* Crop production under drought and heat stress: Plant responses and management options[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1147.
- [4] 赵燕昊, 曹跃芬, 孙威怡, 等. 小麦抗旱研究进展[J]. *植物生理学报*, 2016, 52(12): 1795–1803.
- Zhao Y H, Cao Y F, Sun W Y, *et al.* Research progress of wheat drought resistance[J]. *Plant Physiology Journal*, 2016, 52(12): 1795–1803.
- [5] 贾春花, 张林琳, 张民, 等. 小肽螯合铁缓解樱桃萝卜苗期高温胁迫的生理机制[J]. *植物营养与肥料学报*, 2019, 25(8): 1393–1400.
- Jia C H, Zhang L L, Zhang M, *et al.* Physiological mechanism of mitigation of high temperature stress by peptide-chelated iron application in cherry radish seedling[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2019, 25(8): 1393–1400.
- [6] Kerchev P, Meer T, Sujeeth N, *et al.* Molecular priming as an approach to induce tolerance against abiotic and oxidative stresses in crop plants[J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 40: 107503.
- [7] 雷新慧, 万晨茜, 陶金才, 等. 褪黑素与2, 4-表油菜素内酯浸种对盐胁迫下荞麦发芽与幼苗生长的促进效应[J]. *作物学报*, 2022, 48(5): 1210–1221.
- Lei X H, Wan C X, Tao J C, *et al.* Effects of soaking seeds with MT and EBR on germination and seedling growth in buckwheat under salt stress[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2022, 48(5): 1210–1221.
- [8] 李红叶, 翟秀珍, 张少聪, 等. 外源褪黑素对干旱胁迫小麦发芽及幼苗生理特性的影响[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2021, 49(6): 75–84.
- Li H Y, Zhai X Z, Zhang S C, *et al.* Effect of exogenous melatonin on seed germination and leaf physiological characteristic of wheat seedling under drought stress[J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2021, 49(6): 75–84.
- [9] Sharma A, Wang J, Xu D, *et al.* Melatonin regulates the functional components of photosynthesis, antioxidant system, gene expression, and metabolic pathways to induce drought resistance in grafted *Carya cathayensis* plants[J]. *The Science of the Total Environment*, 2020, 713: 136675.
- [10] Andrisano V, Bertucci C, Battaglia A, *et al.* Photostability of drugs: Photodegradation of melatonin and its determination in commercial formulations[J]. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 2000, 23(1): 15–23.
- [11] Yu X, Wen T, Cao P, *et al.* Alginate-chitosan coated layered double hydroxide nanocomposites for enhanced oral vaccine delivery[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2019, 556: 258–265.
- [12] 刘淑强, 靖逸凡, 杨雅茹, 等. 自修复双层微胶囊的制备及其在玄武岩织物上的应用[J]. *纺织学报*, 2021, 42(4): 127–131.
- Liu S Q, Jing Y F, Yang Y R, *et al.* Preparation of self-healing double-layer microcapsules and its application for basalt fabrics[J]. *Journal of Textile Research*, 2021, 42(4): 127–131.
- [13] Grillo R, Pereira A, Nishisaka C S, *et al.* Chitosan/tripolyphosphate nanoparticles loaded with paraquat herbicide: An environmentally safer alternative for weed control[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2014, 278(15): 163–171.
- [14] 李世奎, 李琳, 赵娜娜, 等. 两性性氟乐灵/羧甲基壳聚糖载药纳米粒子的制备及缓释性能[J]. *农药*, 2018, 57(8): 564–567.
- Li S K, Li L, Zhao N N, *et al.* The preparation and sustained-release performance of novel amphiphilic trifluralin/carboxymethyl chitosan self-assembled nanoparticles[J]. *Agrochemicals*, 2018, 57(8): 564–567.
- [15] Rashidipour M, Maleki A, Kordi S, *et al.* Pectin/chitosan/tripolyphosphate nanoparticles: Efficient carriers for reducing soil sorption, cytotoxicity and mutagenicity of paraquat and enhancement of its herbicide activity[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(20): 5736–5745.
- [16] 程敬丽, 张家栋, 梁敏敏, 等. 吡丙醚乙基纤维素微胶囊的制备及其性能研究[J]. *农药*, 2021, 60(12): 882–886.
- Cheng J L, Zhang J D, Liang M M, *et al.* Preparation and characterization of pyriproxyfen-ethyl cellulose microcapsule[J]. *Agrochemicals*, 2021, 60(12): 882–886.
- [17] 崔丹丹, 杨锦, 耿银银, 等. 海藻肥对菜心抗旱性的影响及其机理探究[J]. *植物营养与肥料学报*, 2021, 27(7): 1185–1197.
- Cui D D, Yang J, Geng Y Y, *et al.* Effect and mechanism of seaweed fertilizer increasing the drought stress resistance of flowering Chinese cabbage[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2021, 27(7): 1185–1197.
- [18] Correa V, Martins J A, Souza T, *et al.* Melatonin loaded lecithin-chitosan nanoparticles improved the wound healing in diabetic rats[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 162: 1465–1475.
- [19] Li Y Y, Zhao X H, Wang L L, *et al.* Preparation, characterization and in vitro evaluation of melatonin-loaded porous starch for enhanced bioavailability[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 202: 125–133.
- [20] Luo J, Huang X P, Jing T F, *et al.* Analysis of particle size regulating the insecticidal efficacy of phoxim polyurethane microcapsules on leaves[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2018, 6(12): 17194–17203.
- [21] Macleod G S, Collett J H, Fell J T. The potential use of mixed films of pectin, chitosan and HPMC for bimodal drug release[J]. *Journal of Controlled Release*, 1999, 58(3): 303–310.
- [22] 贾彦博, 杨肖娥, 刘建祥. 植物根系对养分缺乏和毒害的适应及其与养分吸收效率的关系[J]. *土壤通报*, 2005, 36(4): 610–616.
- Jia Y B, Yang X E, Liu J X. Adaptation of plant roots to nutrient deficiency and toxicity and its relationship with nutrient absorption efficiency[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2005, 36(4): 610–616.
- [23] da Silva S B, Amorim M M, Fonte P, *et al.* Natural extracts into chitosan nanocarriers for rosmarinic acid drug delivery[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2015, 53(5): 642–652.
- [24] 臧玮娜, 张德闪, 李海港, 等. 褪黑素调控根系生长和根际互作的机制研究进展[J]. *植物营养与肥料学报*, 2019, 25(4): 671–682.
- Zang Y N, Zhang D S, Li H G, *et al.* Progress in mechanism of melatonin regulation of root growth and rhizosphere interactions[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2019, 25(4): 671–682.
- [25] Wang P, Sun X, Xie Y, *et al.* Melatonin regulates proteomic changes

- during leaf senescence in *Malus hupehensis*[J]. *Journal of Pineal Research*, 2014, 57: 291–307.
- [26] Sarropoulou V N, Therios I N, Dimassi-Theriou K N. Melatonin promotes adventitious root regeneration in vitro shoot tip explants of the commercial sweet cherry rootstocks CAB-6P (*Prunus cerasus* L.), Gisela 6 (*P. cerasus* x *P. canescens*), and Mx M 60 (*P. avium* x *P. mahaleb*)[J]. *Journal of Pineal Research*, 2012, 52(1): 38–46.
- [27] Zhou Y, Chen M, Guo J, *et al.* Overexpression of soybean DREB1 enhances drought stress tolerance of transgenic wheat in the field[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2020, 71(6): 1842–1857.
- [28] 王华美, 任春元, 金喜军, 等. 外源褪黑素对高氮下大豆氮代谢及生长发育的影响[J]. 中国油料作物学报, 2021, 43(5): 872–882.
- Wang H M, Ren C Y, Jin X J, *et al.* Effects of exogenous melatonin on nitrogen metabolism and growth of soybean under high nitrogen[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2021, 43(5): 872–882.
- [29] 曹林, 吴玉环, 章艺, 等. 外源水杨酸对铝胁迫下菊芋光合特性及耐铝性的影响[J]. 水土保持学报, 2015, 29(4): 260–266.
- Cao L, Wu Y H, Zhang Y, *et al.* Effect of exogenous salicylic acid on photosynthetic characteristics and aluminum tolerance of *Helianthus tuberosus* under aluminum stress[J]. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2015, 29(4): 260–266.
- [30] Ali E F, El-Shehawi A M, Ibrahim O, *et al.* A vital role of chitosan nanoparticles in improvisation the drought stress tolerance in *Catharanthus roseus* (L.) through biochemical and gene expression modulation[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 161(6): 166–175.
- [31] Zhao G, Zhao Y Y, Yu X Y, *et al.* Nitric oxide is required for melatonin-enhanced tolerance against salinity stress in rapeseed (*Brassica napus* L.) seedlings[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(7): 1912.
- [32] Shi H T, Qian Y Q, Tan D X, *et al.* Melatonin induces the transcripts of CBF/DREB1s and their involvement in both abiotic and biotic stresses in *Arabidopsis*[J]. *Journal of Pineal Research*, 2015, 59(3): 334–342.