

高等植物褪黑素的合成和代谢研究进展

王蕊, 杨小龙, 须晖*, 李天来

沈阳农业大学园艺学院, 设施园艺省部共建教育部重点实验室, 辽宁省设施园艺重点实验室, 沈阳110866

摘要: 褪黑素是生物进化过程中一种保守的小分子物质, 不仅在动物和人体中具有重要的作用, 在植物中也具有广泛的生理功能。阐明植物褪黑素的合成代谢途径有助于理解褪黑素的动态积累和作用机理。在植物细胞中色氨酸经过TDC、T5H、SNAT、ASMT四种酶催化形成褪黑素, 在M2H作用下褪黑素分解产生2-羟基褪黑素, 合成和分解之间的平衡决定了植物组织中褪黑素的含量。本文简要介绍了植物褪黑素的发现, 重点综述了植物褪黑素的合成和代谢途径以及在植物中的积累。

关键词: 褪黑素; 合成; 代谢; 2-羟基褪黑素; 抗逆

褪黑素(melatonin, 简称MT)又称松果体素, 因其能使某些鱼、爬行动物、两栖动物的皮肤颜色变浅而被命名为“褪黑素”, 是一种生命必需的吲哚胺类物质, 分子式为 $C_{13}N_2H_{16}O_2$, 熔点为 $116.5\sim 118^\circ\text{C}$, 分子量为232.27 Da, 化学名称为*N*-乙酰基-5-甲氧基色胺(*N*-acetyl-5-methoxytryptamine), 其结构中的*N*-乙酰基和5-甲氧基官能团既决定了自身高亲脂性和亲水性, 也决定了与受体结合的特异性(Arno和Hernández-Ruiz 2015)。1958年, 耶鲁大学皮肤专家Lerner从牛的松果体组织匀浆中首次提取出褪黑素并鉴定了其化学结构(Lerner等1958, 1959)。褪黑素最初被认为是一种只存在于人和动物中的信号物质, 作为自由基清除剂和抗氧化剂保护有机体免受环境和内在的氧化胁迫, 在人体中褪黑素具有增强免疫力、延缓衰老、调节昼夜节律等作用(Chu等1964; Jan等2009; Tan等1993; Hardeland等2012; Carrillo-Vico等2013; Reiter等2013, 2005)。作为广谱的生理调节剂, 褪黑素存在于绝大多数生物有机体中, 包括原始的单细胞生物、微生物和藻类以及脊椎动物和植物等。

Jackson (1969)观察了动物褪黑素对非洲百合细胞有丝分裂的影响, 随后, 对褪黑素在光合自养生物鞭毛藻类的作用进行了研究, 这鼓舞了人们对自养生物褪黑素作用的探索。Tan等(1993)发现褪黑素是一种潜在的自由基清除剂和抗氧化剂, 而细胞和组织的抗氧化保护作用在许多生物中是高度保守的, 从进化的角度推测植物中很有可能含有褪黑素。Van Tassel等(1993)以摘要的形式报告了在日本牵牛花中发现了褪黑素, 但是直到1995年两个研究组才分别独立的以全文形式报道了在植物(烟草、水稻、玉米、小麦、番茄、黄

瓜、香蕉等)中检测到褪黑素(Dubbels等1995; Hattori等1995)。Dubbels等(1995)利用气相色谱-质谱联用(GC-MS)技术证实了番茄、香蕉、黄瓜和烟草的叶片组织中都含有褪黑素, 但是相同材料中褪黑素含量差别很大; Hattori等(1995)利用放射免疫(RIA)技术测定了双子叶和单子叶12个家族中的24个可食用植物褪黑素的含量, 所检测的植物中都含有褪黑素。这两项几乎同时发表的成果开启了植物褪黑素研究的大门, 之后, 科研人员利用RIA、高效液相色谱(HPLC)、液相色谱-质谱联用(LC-MS)、GC-MS、酶联免疫(ELISA)和亲和层析(IAC)等方法几乎在所有被测试植物的根、茎、叶、果实及种子中检测出褪黑素。

近些年国内外在植物褪黑素的研究上取得了丰硕的成果, 揭示了褪黑素在植物中广泛而特殊的生物学功能。由于具有与生长素类似的结构和功能、可以在组织内自由移动、直接清除自由基、对光照敏感等特性, 褪黑素被认为是一种新的植物生长调节剂和生物刺激剂(Hernández-Ruiz等2004; Kim等2016)。关于植物褪黑素生理作用方面已有多篇综述(姜超强和祖朝龙2015; Arno和Hernández-Ruiz 2014; Zhang等2015), 褪黑素能够调节种子发芽、根系生长、开花、叶片衰老、果实成熟等生育过程(Pelagio-Flores等2012; Park和Back 2012; 刘梦昕2015; Kolář等2003), 还能通过缓解重金属、盐碱离子、紫外辐射、低温、干旱等环境胁迫以及病菌、害虫等生物胁迫对高等植物

收稿 2016-02-24 修定 2016-04-21

资助 国家自然科学基金项目(31000921)和教育部留学回国启动基金([2011]1568)。

* 通讯作者(E-mail: xuhuaiaa@126.com)。

的损伤, 赋予植物抵抗不良环境的能力, 不仅帮助植物生存还有利于植物繁荣(Lei等2004; Park等2013a, c; Wei等2015; Liu等2015; Arnao和Hernández-Ruiz 2007; Wang等2012, 2013; Reiter等2015)。植物褪黑素的研究是一个新的、富有吸引力的领域, 也是植物生理学的一个重要补充。目前越来越多的植物学家和农业科学家开始关注植物褪黑素, 一些先进的生物技术如转录组、蛋白质组、代谢组学的应用使植物褪黑素的研究越来越深入, 发表的相关论文数量迅速提高。阐明合成和代谢途径有助于理解植物褪黑素的动态积累和多种生理功能。本文结合近年来国内外有关植物褪黑素的研究进展, 对植物褪黑素的合成和代谢途径以及积累的调节进行了综述。

1 高等植物褪黑素的合成

动物褪黑素的合成和分泌途径已经被研究的很清楚, 在植物中的合成规律及作用研究起步较晚, 近几年有关植物褪黑素合成途径的报道越来越多。20世纪50年代就已经从水果和蔬菜中检测出褪黑素的合成前体物质5-羟色胺。利用¹⁴C标记的色氨酸体外供给贯叶连翘、金丝桃、水葫芦等,

发现动物体内褪黑素合成过程的中间产物在这些植物中均检测出了放射性, 植物中褪黑素的合成也经历了与动物相似的路径, 合成的前体物质均为色氨酸(Van Tassel和O'Neill 2001; Facchini等2000; Murch等2000), 但植物褪黑素的合成要比动物中灵活的多, 植物自身可以合成褪黑素的前体色氨酸, 而动物中的色氨酸只能从食物中获取(Tan等2015)。在过去的5年中植物褪黑素合成途径的研究取得重要的突破, 与植物褪黑素合成相关的基因相继被发现并且均已得到克隆, 其合成位点也得到了证明。由色氨酸生成褪黑素需要经过4个连续的酶促反应, 这4个酶分别为色氨酸脱羧酶(tryptophan decarboxylase, TDC, EC 4.1.1.28)、色胺-5-羟化酶(tryptamine 5-hydroxylase, T5H, EC 1.1.1.13)、5-羟色胺-*N*-乙酰基转移酶(serotonin *N*-acetyltransferase, SNAT, EC 2.3.1.87)、*N*-乙酰基-5-羟色胺-甲基转移酶(*N*-acetylserotonin methyltransferase, ASMT, EC 2.1.1.4), 此外咖啡酸-*O*-甲基转移酶(caffeic acid *O*-methyltransferase, COMT, EC 2.1.1.68)在催化褪黑素合成的后两步反应中也起着重要作用(图1)。TDC、T5H主要催化色氨酸产

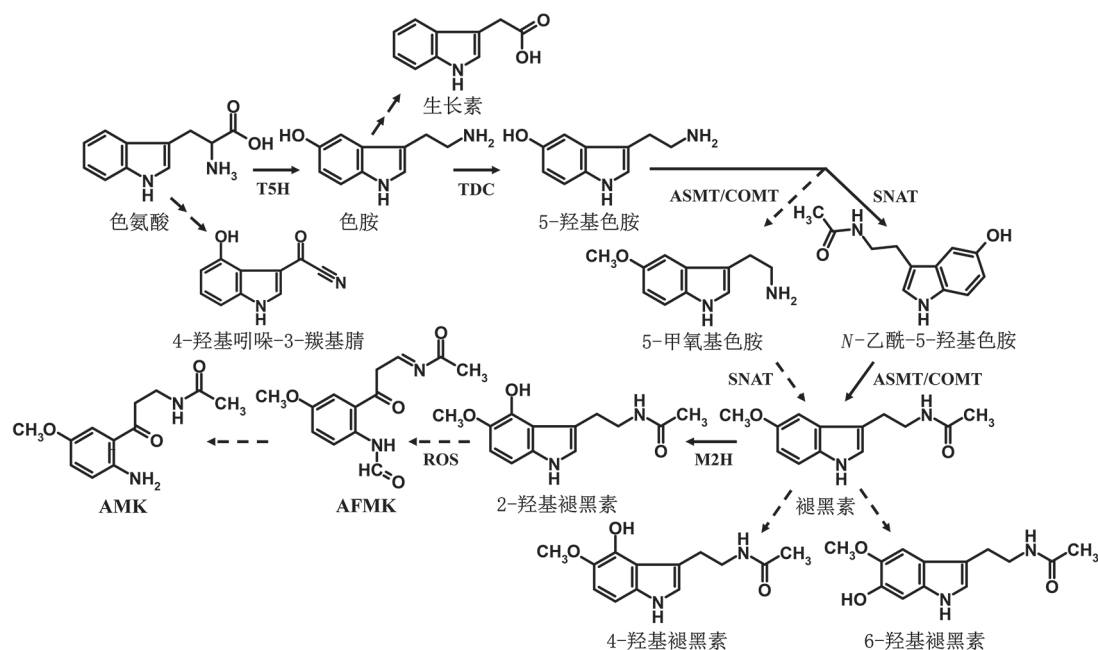


图1 高等植物褪黑素的合成和代谢途径

Fig.1 Biosynthesis and metabolism pathway of melatonin in higher plant

参考Tan等(2015)、Byeon等(2015d)、Rajniak等(2015)文献修改。图中虚线箭头表示未经证实的途径, 实线箭头表示已经证实的途径, 双实线箭头表示多步反应。

生血清素, SNAT、ASMT主要催化血清素形成褪黑素, T5H、SNAT由单拷贝基因编码, TDC、ASMT由至少三拷贝的小基因家族编码, 4种酶基因的过表达或抑制分析表明TDC和SNAT可能是植物褪黑素合成的限速酶(Fujiwara等2010; Kang等2013, 2009, 2007a, b, 2011; Kanjanaphachaoat等2012)。

1.1 TDC

褪黑素合成的第一步酶促反应产物是色胺, 而不是5-羟基色氨酸, 第二步反应则是色胺-5-羟化酶催化色胺形成5-羟基色胺, 这与动物中褪黑素合成的前两步截然相反, 这在植物血清素的合成研究中就已得到阐明(De Luca等1989; Schröder等1999; Murch等2000), TDC属于芳香族-L-氨基酸脱羧酶, 高度特异的催化色氨酸转化为色胺(Kang 2007a), 在催化色氨酸时该酶具有较高的活性, 在较高的温度(45°C)和pH (7.5~8.5)下酶活最高, 并认为TDC可能是褪黑素合成过程中的第一个限速酶(Kang等2008)。Park等(2009)在辣椒上克隆了2个TDC基因, 发现在响应病菌侵染和乙烯诱导时, *PepTDC1*的表达被显著加强, 而*PepTDC2*的表达量依然较低, *PepTDC1* mRNA和TDC酶的活性主要在未成熟的绿色果实中检测到, 而成熟的红色果实中未发现, 且这种诱导与色胺、血清素及其衍生物相关。在衰老过程中水稻叶片血清素积累显著提高, 而这种积累和TDC活性相关。过表达TDC的水稻叶片积累较高水平的血清素, 并延迟了水稻叶片的衰老; 进一步通过RNA干扰(RNAi)技术抑制TDC的表达发现血清素的含量降低且衰老加速, 这些结果也证实了在血清素积累过程中TDC酶起着限速的作用(Kang等2009)。虽然TDC过表达具有延迟衰老、抵抗病菌的作用, 但在另一项研究中发现通过插入包含TDC-1、TDC-3的T-DNA和过表达TDC-1和TDC-3提高血清素和血清素二聚体积累的同时导致水稻发育不良、生育力降低并呈现暗棕色的表型(Kanjanaphachaoat等2012)。Zhao等(2013)发现在樱桃果实发育过程中TDC基因的表达与褪黑素的积累相一致, 在短期的昼夜变化中TDC的表达量也与褪黑素积累量正相关。Byeon等(2014d)过表达了水稻3个TDC同源基因, TDC3转基因水稻种子中褪黑素含量与野生型

相比提高了31倍, 并表现出在种子中特异积累的现象, 褪黑素合成中间产物包括5-羟基色氨酸、色胺、血清素的含量提高的同时其他相关的mRNA没有提高, 表明褪黑素的积累主要是由TDC3基因决定的。这些结果表明, 对TDC基因的遗传改良更宜用于提高植物特定组织中褪黑素的含量。

1.2 T5H

色胺-5-羟化酶是褪黑素合成的第二个酶, 催化色胺转化为5-羟色胺(serotonin)。Kang等(2007b)在水稻中首次研究了T5H的酶活特性, 发现T5H是一种可溶性酶, 在根中活性最高, 这种高活性与根中高血清素含量相关, T5H的酶活被色氨酸、5-羟色氨酸、色胺等多种褪黑素合成的中间物质所抑制, 而且这种现象在随后的研究中也得到了证实。Fujiwara等(2010)发现水稻中*s1*基因通过编码一个具有T5H活性的P450单加氧酶CYP71P1, 催化色胺转化为血清素, 稻瘟病菌感染能够促进该基因的表达。T5H的过表达和抑制表达对褪黑素合成的影响与其他褪黑素合成酶表现出不一致的趋势。在衰老过程中缺失T5H活性的水稻突变体诱导色胺和N-乙酰色胺的合成, N-乙酰色胺抑制了褪黑素的合成, 并且外源处理N-乙酰色胺完全阻止了褪黑素的合成(Park等2012)。进一步的研究表明, 在水稻中过表达T5H降低了褪黑素、色胺和血清素的含量, 而抑制T5H的表达却提高褪黑素、色胺的含量, 这与TDC1的提高密切相关, 但在受到氧化胁迫时, 抑制表达的植株中褪黑素含量高于对照和过表达植株。这一过程中色胺可能起着重要的信号作用(Park等2013b)。到目前为止, 对植物褪黑素合成过程中的T5H的相关研究还很少, T5H的活性易受褪黑素合成中间产物的抑制, 且过表达该基因没有显著提高褪黑素的含量, 表明T5H不是植物褪黑素合成的限速酶。

1.3 SNAT

将莱茵衣藻的芳烷基胺-N-乙酰转移酶基因*CrAANAT*转入番茄'Micro-Tom'基因组中, 番茄的褪黑素含量显著提高(Okazaki等2009); 将人的SNAT基因转入水稻, 转基因后代褪黑素含量得到提高, 也提高了叶绿素含量并表现出对低温胁迫的抗性(Kang等2010); 将羊的OaSNAT基因转入水稻, 褪黑素含量得到提高并促进了根系生长, 其T₃

后代植株表现出较强的抗除草剂诱导的氧化胁迫,而转入的基因被定位在细胞质中(Park和Back 2012; Park等2013f; Byeon等2014a)。然而,至今仍未有直接的证据表明植物中存在AANAT活性或拥有AANAT类似物,高等植物中也没有克隆到相应基因,但是在水稻和裸子植物厚皮刺果松中克隆到了另外一个基因SNAT,这个基因编码的SNAT能够代替AANAT催化5-羟色胺形成N-乙酰基-5-羟色胺(Kang等2013; Park等2014)。Lee等(2014)在拟南芥中克隆到了*AtSNAT*,发现SNAT在催化5-甲氧基色胺转化为褪黑素的过程中也具有较高的活性,而*AtCOMT*具有甲基化5-羟色胺转化为5-甲氧基色胺的活性,这表明5-羟色胺既可以被SNAT催化为N-乙酰-5-羟色胺,也可以被COMT催化为5-甲氧基色胺,然后再分别被COMT和SNAT催化为褪黑素。植物中的SNAT与动物几乎完全不同,动物中的SNAT起源于革兰氏阳性细菌,被定位于线粒体中,而植物SNAT被认为起源于蓝藻细菌,定位于叶绿体中(Lee等2015; Kang等2013; Byeon等2013; Lei等2013; Park等2014),植物SNAT更耐高温,在95°C下仍能起作用(Byeon等2014c)。在SNAT基因失活的拟南芥突变体植株中褪黑素含量降低了50%,水杨酸的含量也显著降低,强烈抑制了病菌防御蛋白PR1和PR2的活性,表现出对番茄假丁香单胞杆菌DC3000更敏感。胁迫条件下SNAT的表达被显著上调,褪黑素的含量也随之升高,这些结果表明SNAT很可能是植物褪黑素合成的一个限速酶(Lee等2015);在叶绿体和细胞质中过表达SNAT基因提高了SNAT酶活但是没有提高褪黑素的含量,这是因为植物褪黑素的合成过程受多种因子的影响,SNAT在调节褪黑素积累平衡的过程中可能发挥更重要的作用(Byeon等2015b)。

1.4 ASMT

褪黑素合成的最后一步由ASMT催化,该酶和动物褪黑素合成途径的最后一个酶HIOMT高度同源。Kang等(2011)首次在水稻中克隆了ASMT,该酶属于O-甲基转移酶OMT家族,通过将水稻OMT的cDNA与大肠杆菌重组,表达了与小麦COMT同源的18个cDNA,发现只有AK072740基因具有合成褪黑素的能力,进一步研究表明ASMT的表达可以被衰老和一些胁迫因素所诱导。转AANAT和HIOMT的

烟草褪黑素含量也得到提高并缓解了UVB对DNA的伤害(Zhang等2012)。Park等(2013c)首次在大肠杆菌中纯化了水稻的OsASMT并进行了酶动力学分析,发现黑暗上调了褪黑素的含量,这种上调与OsASMT的表达相一致。随后对ASMT基因家族的ASMT1(AK072740)、ASMT2(AK069308)、ASMT3(AAL34945)进行了功能分析,这3个基因的表达均受脱落酸和茉莉酸甲酯的诱导,但是所有ASMT的催化活性均较低,因此认为这些酶不适宜通过基因工程来提高植物褪黑素的含量(Park等2013a)。Zuo等(2014)克隆了苹果ASMT的基因MzASMT1(KJ123721),在拟南芥中的过表达使褪黑素的含量提高了2~4倍,同时也降低了ROS的产生,该基因的表达与苹果和拟南芥的抗旱性有关。苹果中ASMT氨基酸与水稻的一致性为39.7%,在拟南芥中ASMT基因At4g35160与水稻ASMT基因的一致性为31%(Byeon等2016)。一些研究表明,在拟南芥中使N-乙酰-5-羟基色胺甲基化产生褪黑素的过程中,COMT的催化活性远远高于ASMT,而COMT敲除突变体显著降低了褪黑素的含量(Byeon等2014b);COMT可催化的底物更多,并且发现血清素可以通过SNAT催化产生N-乙酰-5-羟基色胺、通过COMT催化为5-甲基色胺,然后再分别被COMT和SNAT催化生成褪黑素(Lee等2014)。Byeon等(2015a)首次在水稻中评估了COMT的ASMT活性,发现拟南芥中COMT表现出较强的ASMT活性,过表达COMT提高了褪黑素含量,而抑制COMT的表达显著降低了褪黑素的含量。因此催化产生褪黑素的后两步过程仍需要进一步的研究来证明。

1.5 合成场所

褪黑素是一种既具有亲水性又具有亲脂性的小分子物质,很容易在组织细胞间转移,并且植物褪黑素的积累受环境因素影响较大,这为研究其合成部位带来了很大的困难。Tan等(2013)认为植物中线粒体和叶绿体是褪黑素的合成场所,并且在大多有机体中褪黑素从线粒体和叶绿体中合成并转移到其他组织或器官中发挥作用。线粒体是氧化磷酸化合成ATP的场所,叶绿体是光合作用进行的场所,同时他们也是产生自由基和氧化胁迫的最主要部位,这些自由基的快速产生能对蛋白

质、膜、核酸等造成伤害, 为了避免遭受这种损伤, 植物需要强烈的保护作用来维持正常的生理功能(Bergamini等2004; Lenaz 2012)。褪黑素能高效的清除自由基, 从进化的角度来说褪黑素在线粒体和叶绿体中产生是可以解释的。在动物中褪黑素的合成和代谢主要在线粒体中进行, 合成过程的限速酶AANAT、高水平的褪黑素、作用受体MT1、代谢产物AFMK以及催化该步反应的属于细胞色素P450蛋白超家族(cytochrome P450 proteins, CYP)的酶均在线粒体中被发现(Tan等2015, 2013)。

褪黑素在植物中的主要功能是作为保护氧化胁迫的第一道防线, 但在植物中褪黑素的含量高于动物, 这很可能与植物中含有线粒体和叶绿体两个褪黑素合成场所而动物中只有线粒体有关。免疫组织化学定位发现衰老水稻叶片中TDC和血清素主要位于维管束薄壁细胞中(Kang等2009)。在水稻叶绿体和细胞质中过表达羊的SNAT, 提高了酶的活性, 但是褪黑素的含量没有提高(Byeon等2015b)。裸子植物厚皮刺果松的PtSNAT和拟南芥AtSNAT都被定位在叶绿体中, AtCOMT定位在细胞质中(Park等2014; Lee等2014)。植物褪黑素合成第一个酶TDC定位在细胞质中, 第二个酶定位在内质网上, 因此推测植物褪黑素的合成与细胞质、内质网和叶绿体三个细胞成分有关, 由于缺少N端叶绿素转运蛋白, 条斑紫菜SNAT位于细胞质中(Byeon等2015c)。利用激光共聚焦显微镜观察到水稻合成酶ASMT位于细胞质而SNAT位于叶绿体中(Byeon等2014c)。将苹果砧木ASMT基因在烟草叶片中瞬时表达也发现ASMT位于细胞质中(Zuo等2014)。在植物中线粒体和叶绿体都涉及褪黑素的合成, 正常情况下叶绿体是植物产生褪黑素的主要场所, 如果正常的过程被阻断, 例如T5H转录被抑制, 褪黑素的主要合成部位由叶绿体转为线粒体(Tan等2015; Park等2013b)。

2 高等植物褪黑素的代谢

植物褪黑素合成途径中的几个基因均已被克隆, 但是代谢途径的相关研究却鲜有报道, 其代谢机制仍然很不清楚。在动物中, 褪黑素通过酶促反应、假酶反应以及与自由基的级联互作等非酶促反应分解产生多种代谢物, 包括2-羟基褪黑素、

4-羟基褪黑素、6-羟基褪黑素、7-羟基褪黑素、环3-羟基褪黑素、N-乙酰基血清素、5-甲氧基色胺(5-MT)、N₁-乙酰基-N₂-甲酰基-5-甲氧基犬尿酰胺(AFMK)、N₁-乙酰基-5-甲氧基犬尿酰胺(AMK)等, 其中6-羟基褪黑素被认为是动物褪黑素的最主要的代谢物并进行了大量的研究(Tan等2007b, 2015; Hardeland 2015)。Tan等(2007a)首次证实水葫芦中褪黑素的代谢物AFMK具有较高的抗氧化作用, 并且发现强光下AFMK和MT含量较高, 认为这可能与植物的光合作用或光保护有关。

2.1 酶促反应

具有催化褪黑素形成AFMK的吲哚胺-2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)在水稻中被证实并转化到番茄中, 该基因在番茄中表达并降低了褪黑素的含量, 表明IDO可能涉及植物褪黑素的降解(Okazaki等2010)。许多植物激素以及次级代谢物都是通过CYP和2-酮戊二酸依赖性双加氧酶(2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, 2-ODD)的羟基化作用被进一步分解, 依据褪黑素保守的合成基因和相对较低的含量, 植物褪黑素很有可能像其他次级代谢物质一样在植物中通过羟基化作用被快速分解(Park等2013d; Bugg 2003)。在水稻中大约有300个P450和100个2-ODD基因(Nelson等2004; Kawai等2014), Byeon和Back(2015)通过在大肠杆菌中异位表达35个水稻2-ODD基因以及蛋白质的纯化分析, 表明2-ODD11、2-ODD19、2-ODD21、2-ODD33四种基因编码的蛋白质能使褪黑素代谢产生2-羟基褪黑素。6-羟基褪黑素和4-羟基褪黑素都不是由2-ODD蛋白合成的, 这也表明2-羟基褪黑素途径可能是植物褪黑素分解的主要途径。在这项研究中催化褪黑素分解形成2-羟基褪黑素的酶基因M2H首次在水稻中克隆, 这些基因属于2-ODD基因家族而不属于P450。水稻幼苗根中2-羟基褪黑素的含量高于芽, 并且与其他基因相比在根中只有2-ODD21显著表达, 这与根中M2H的高活性相一致, 此外2-ODD21广泛存在于植物中, 表明2-ODD21似乎是主要的M2H基因。这些结果有利地支持了褪黑素在植物中分解产生2-羟基褪黑素这一推论(图1)。但是在芽中即使没有2-ODD21的mRNA表达也能产生2-羟基褪黑素, 这表明其他2-ODD基因也可能参与

到2-羟基褪黑素的形成。2-羟基褪黑素不仅可以由褪黑素的羟化反应产生,也能被紫外辐射所诱导,这说明2-羟基褪黑素在植物中也可能起着抗氧化作用,但这一推论有待进一步证明。

编码M2H基因的克隆以及2-羟基褪黑素的检测推进了植物褪黑素代谢的研究步伐。Byeon等(2015e)进一步研究了来自16个家族的24个植物品种内源褪黑素和2-羟基褪黑素的含量,发现大部分植物褪黑素含量不足 $1 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$,而2-羟基褪黑素含量高达 $6.2 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$,这与先前报道的褪黑素相关酶动力学相一致。同时也发现水稻幼苗中褪黑素的代谢产物主要是2-羟基褪黑素(99%),其次是4-羟基褪黑素(0.05%),而6-羟基褪黑素没有检测到。通过酶动力学分析发现M2H的催化效率比褪黑素合成酶SNAT、ASMT高很多,这表明植物褪黑素的代谢速度很快,也在一定程度上解释了植物褪黑素相对较低的含量和积累的快速变化。Kołodziejczyk等(2015)在黄瓜和玉米种子中均检测到2-羟基褪黑素,也检测到了环-3-羟基褪黑素的存在,但是他们的形成方式仍然未知。2-羟基褪黑素被认为是AFMK的中间产物,因此先前报道水葫芦中发现的AFMK可能来源于2-羟基褪黑素。分解褪黑素产生2-羟基褪黑素的4种M2H蛋白质定位在水稻的细胞质和叶绿体中,且2-羟基褪黑素也是一种诱导防御基因表达的信号分子,其生物活性是褪黑素的50% (Byeon等2015d)。

2.2 非酶反应

在动物中褪黑素具有多样的代谢途径且其丰富的代谢物都已得到证实,除了酶促反应外褪黑素及其代谢物还能通过假酶反应或者与多种自由基相互作用发生一系列级联反应被逐步分解,并高效的清除自由基保护有机体免受氧化胁迫,这一过程被认为是褪黑素与其他传统抗氧化剂不同的新特性(Hardeland等2009; Hardeland 2015; Posmyk和Janas 2009; Tan等2000)。通过与自由基的级联反应,一个褪黑素可以清除10个ROS,并且其抗氧化能力高于抗坏血酸、生育酚、谷胱甘肽等抗氧化剂(Tan等2002, 2015; Gitto等2001)。非酶促羟化现象存在于所有生物中,且通过该反应产生的环-3-羟基褪黑素在植物中也被检测到(Kołodziejczyk等2015),在进化上保守的褪黑素在植物中很可能通

过与自由基的级联互作而发生非酶促分解。Byeon等(2015d)认为褪黑素首先被M2H催化降解为2-羟基褪黑素,随后可能与动物中一样通过与自由基的级联反应进一步分解为AFMK,但相关研究还很少。在没有阐明植物褪黑素代谢途径之前,无法真正的理解植物褪黑素的动态积累规律和作用机理,因此植物褪黑素的代谢途径有待进一步证实。

3 植物组织中褪黑素的积累

褪黑素不仅具有很强的营养和药用价值,对自身也有广泛的生理作用,因此褪黑素在植物组织中的适量积累十分重要。不同的植物、不同组织、不同生长时期和生长环境下植物褪黑素的含量不同,早期报道的植物褪黑素含量变化幅度较大,这既与不同的提取、测定方法有关,也与褪黑素积累的快速变化有关(表1)。植物既可以合成褪黑素,也可以从周围环境中吸收。在动物中褪黑素对光照敏感,表现出明显的昼夜节律,但在植物中褪黑素受光信号的调节复杂得多。许多研究表明逆境能上调褪黑素的含量,而这与植物体内褪黑素合成与代谢之间的平衡关系密切。

3.1 不同植物组织、不同发育时期褪黑素的积累

褪黑素与植物的生长发育关系密切,植物的不同生长阶段不同组织中褪黑素含量差异很大(Hernández-Ruiz等2004, 2005; Pelagio-Flores等2012)。樱桃果实中富含褪黑素,但是不同品种之间含量差异很大,樱桃果实在胚胎发育、内果皮木质化阶段褪黑素含量最高(González-Gómez等2009; Zhao等2013);在番茄中褪黑素含量随着果实的成熟、完熟和后熟呈升高趋势;葡萄成熟过程中褪黑素的浓度变化范围也很大,在 $100 \sim 200 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 之间;这些结果表明褪黑素与果实发育过程密切相关(Van等2001; Murch等2010)。在桑叶的顶端褪黑素含量最高,其次是幼嫩的叶片,老叶中褪黑素含量最少(Pothinuch和Tongchitpakdee 2011)。在种子中往往含有较高水平的褪黑素,这有利于缓解后期产生氧化胁迫造成的损伤(Iriti等2006; Manchester等2000)。Korkmaz等(2014)发现辣椒在苗期褪黑素含量较高,随后逐渐降低,在成熟的种子中含量最高,叶、根、果实中褪黑素的含量随着不同发育阶段而不同,表现出调节辣椒发育的作用。褪黑素在水稻花序中的含量是旗叶中的6

表1 部分食用植物和中草药褪黑素的含量

Table 1 Melatonin content of some edible plants and Chinese herbal medicine

	植物	器官	检测方法	干重含量/ng·g ⁻¹ (DW)	鲜重含量/ng·g ⁻¹ (FW)	参考文献
粮食作物	玉米	种子	HPLC-FD	96.5		王金英等2009
	水稻	种子	HPLC-FD	16.0		王金英等2009
	燕麦	种子	HPLC-FD	98.7		王金英等2009
	绿豆	种子	HPLC-FD	302		王金英等2009
蔬菜	番茄	果实	UHPLC-MS/MS		7.5~250	Riga等2014
	辣椒	果实	UHPLC-MS/MS		31~93	Riga等2014
	芥菜	种子	HPLC-EC	129~189		Manchester等2000
	黄瓜	果实	RIA/LC-MS		0.005	Dubbels等1995
	洋葱	球茎	RIA/HPLC		0.03	Hattori等1995
	大白菜	叶片	RIA/HPLC		0.113	Hattori等1995
	萝卜	根	LC-MS/MS		3.46	Byeon等2015e
	菠菜	叶片	LC-MS/MS		0.457	Byeon等2015e
	生菜	叶片	LC-MS/MS		0.036	Byeon等2015e
	果树	苹果	果实	HPLC-FD		14~42
香蕉		果实	RIA/LC-MS		0.002	Dubbels等1995
草莓		果实	LC-MS		1.4~11.3	Stürtz等2011
菠萝		果实	RIA/HPLC		0.04	Hattori等1995
葡萄		果皮	UHPLC-MS/MS	120~160		Gomez等2012
中草药	芦荟	叶片	HPLC-UV	46.6		赵建芬等2015
	黄芩	叶片	HPLC		0.5~1.6	刘伟华等2003
	黄连	全株	HPLC-FD/MS	1008		Chen等2003
	青蒿	全株	HPLC-FD/MS	84		Chen等2003
	益母草	全株	HPLC-FD/MS	169		Chen等2003
	五味子	全株	HPLC-FD/MS	86		Chen等2003
	枸杞	叶片	HPLC-UV	1.235		赵建芬等2015

倍(Park等2013e), 而乌拉尔甘草根部组织中含量最高, 并且随着生长发育而不断提高(Afreen等2006)。芦荟花中的褪黑素含量均普遍高于同种的芦荟叶, 为同种叶含量的3~6倍, 且不同品种的芦荟褪黑素含量也差异较大(王英娟等2008)。

3.2 植物褪黑素的积累与光照有关

褪黑素对光照敏感, 在人体和动物中褪黑素的合成呈现昼夜节律性, 在植物中似乎表现出了相似的现象。一些研究表明暗期植物褪黑素得到积累: 在光照期间红叶藜中几乎检测不到褪黑素, 而在暗期含量上升, 且于黑暗4~6 h时达到高峰, 这与动物体中褪黑素的昼夜合成节律非常相似(Wolf等2001; Kolář等1997, 2002); 黄芩在夜间褪黑素的积累量大约是白天的3倍(刘伟华等2003); 黎明前水葫芦中的褪黑素得到积累, 这可能与褪黑素淬灭光合作用过程中产生的ROS从而保护光合色素有关(Tan等2007b)。而许多研究却表现出相反的结果: 李超(2014)研究表明, 树冠外围苹果果皮褪

黑素含量高于内膛果, 东南向苹果果皮高于西北向, 未套袋果的果肉和果皮中褪黑素含量显著高于套袋果, 而摘袋后果皮中的褪黑素浓度明显增加, 较套袋果皮高出近10倍; Byeon等(2012)将衰老的离体水稻叶片暴露在连续光照下, 褪黑素及其合成中间产物色胺、5-羟基色胺、*N*-乙酰-5-羟基色胺的含量显著高于处于黑暗中的叶片。在遮阴条件下大部分番茄褪黑素含量得到提高, 而大部分辣椒的褪黑素含量却呈现降低的趋势(Riga等2014)。番茄和牵牛花植株的器官中褪黑素含量并未表现昼夜节律性; 芦荟和贯叶连翘中褪黑素的含量也不存在昼夜差异(Van Tassel等2001); 而樱桃果实中褪黑素的含量在昼夜24 h表现出两个高峰的节律(Zhao等2013)。此外光质对褪黑素含量也有很大的影响, 红光下生长的乌拉尔甘草褪黑素含量显著高于蓝光和白光处理; 短期(3 d)强UVC辐射下植株根部褪黑素含量高于长期(15 d)弱UVC辐射, 表明褪黑素的积累与UVC的辐射总量

有关(Afreen等2006)。这些结果表明植物褪黑素积累的变化与光信号密切相关,但不同植物可能差异很大,褪黑素受光信号的影响以及是否参与调节光周期现象仍有待进一步的研究。

3.3 逆境加强植物褪黑素的积累

几乎所有的胁迫因素都能诱导植物褪黑素的积累,褪黑素含量的升高反过来又能缓解氧化胁迫对植物造成的伤害,这种现象在植物中已被广泛证实。室外生长的番茄各组织中褪黑素含量均较高,其叶片中褪黑素含量高达 $142.5 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$,而室内生长的番茄叶片褪黑素含量只有 $15\sim 20 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$,这种差异主要是由室外各种变化的不利环境条件引起的(Arnao和Hernández 2013a)。根部NaCl、ZnSO₄和H₂O₂胁迫显著提高了大麦根和羽扇豆褪黑素的含量(Arnao和Hernández 2013b, 2009);高温和强光诱导产生的MDA直接与上调褪黑素的合成相关(Zhao等2013);暴露在紫外光下的植株褪黑素含量更高,这被认为是褪黑素清除紫外光辐射诱导产生的自由基和光保护作用(Afreen等2006)。Mukherjee等(2014)研究表明NaCl胁迫提高了向日葵根部和子叶5-羟基色胺和褪黑素的含量,并显著提高了褪黑素合成酶HIOMT的活性。合成褪黑素的最后一个关键酶ASMT在叶片衰老和各种逆境(包括重金属、盐、干旱、除草剂等)下被显著诱导表达,高温和黑暗也能增强SNAT和ASMT的酶活性而使褪黑素的合成增加(Byeon和Back 2014),4°C低温胁迫显著诱导了拟南芥内源褪黑素的积累(Shi和Chan 2014),干旱诱导了苹果*MzASMT1*的表达,提高了褪黑素的含量(Zuo等2014)。Byeon等(2015d)发现褪黑素的合成没有被植物激素IAA、JA3、ABA、JA、SA及乙烯所诱导,ABA轻微降低了褪黑素的含量,而重金属镉显著诱导了水稻褪黑素的积累,其次是除草剂氟丙嘧草酯,而重金属铅对褪黑素含量没有影响。

3.4 合成和代谢之间的平衡决定植物褪黑素的积累

植物褪黑素的积累既受自身遗传特性的影响也受外界环境的诱导。从色氨酸到褪黑素至少需要经过4种酶的催化,这4种酶的表达水平对于促进褪黑素的合成具有重要的作用。SNAT和ASMT的催化活性极低,而褪黑素的代谢酶M2H具有很强的活性,使代谢比合成更高效,褪黑素被快速代

谢为2-羟基褪黑素,使正常条件下植物褪黑素的含量保持在极低的水平,从而调节植物的生长发育,2-羟基褪黑素的含量远高于褪黑素并且比褪黑素更稳定(Byeon等2014c, 2015e)。而一些富含褪黑素的植物很可能改变了褪黑素的合成途径,这涉及COMT的作用(Lee等2014; Byeon等2015a)。此外,褪黑素及其代谢物还能与氧化胁迫产生的自由基互作发生级联反应而分解,逆境胁迫下褪黑素含量的提高是植物清除自由基的一种重要保护机制,因此植物褪黑素的积累十分复杂(Byeon等2015e; Tan等2007b, 2000)。稳定状态的褪黑素是由合成和降解共同决定的,当植物被镉胁迫诱导时,除了SNAT在褪黑素诱导时被抑制外,其他3种合成酶以及降解酶M2H均被促进,同时提高了褪黑素的积累量,这表明植物细胞中褪黑素的积累精确地被合成和分解所共同调控(Byeon等2015d)。组织中高含量的褪黑素赋予植物较高的营养价值和抗逆性,在特定条件下合成和代谢之间的动态平衡使植物褪黑素的积累维持在一定范围的水平,这对植物具有重要的生理意义。

4 总结与展望

在植物褪黑素研究的20年(1995~2015年)间,早期大多集中于含量的检测,但由于多样而重要的生理学功能,褪黑素很快在中草药、园艺植物以及农作物的研究上受到越来越多的关注。本文主要综述了近些年植物褪黑素的合成与代谢途径方面的研究,而植物褪黑素多样的生物学功能方面的研究也已经取得许多重要的进展。作为一种保守的小分子化合物,褪黑素在多种植物的不同组织中检测到,其含量在不同植物、不同组织及不同环境下差别较大;褪黑素由色氨酸经过4步酶促反应合成,合成场所为线粒体和叶绿体,褪黑素合成相关基因均被证实并在拟南芥、水稻等植物中得到克隆,而关于植物褪黑素的代谢研究相对较少,目前只有2-羟基褪黑素被证实是植物褪黑素的主要代谢产物;褪黑素的合成和代谢灵活而复杂,在植物中的积累由合成和代谢之间的平衡决定,受内在遗传特性和外部环境因素的影响变化较大。

虽然植物褪黑素的研究取得了较大进展,但是相比于生长素、脱落酸、乙烯、多胺、油菜素内酯等植物激素仍然存在很多需要阐明的问题,

结合已有的研究对其总结如下: (1)植物褪黑素的相关研究主要在模式植物拟南芥和水稻中进行,在其他植物中的研究相对较少,因此扩大研究对象的范围对于许多生理过程的深入探索和解释十分必要; (2)褪黑素含量的快速变化与多种生理状态相关,阐明其合成和分解机制对于研究植物褪黑素的功能具有重要意义,但是目前只有少数几个研究组进行这方面的研究,其合成与代谢途径仍然不够清楚; (3)相比于植物褪黑素的合成,其代谢过程要复杂得多,可能包括酶促降解、假酶反应降解和自由基互作降解等多种代谢途径,在严重的胁迫条件下与自由基互作可能是褪黑素降解的主要途径,但在植物中的这些代谢过程仍需要证实; (4)褪黑素具有广泛的生理作用,但是相比于其他激素其深入的分子机理以及调控网络仍然未知; (5)褪黑素合成代谢过程中的一系列中间产物如2-羟基褪黑素在植物中同样具有重要的生理作用,在响应某种生理变化时这些代谢物相互之间的关系有待阐明; (6)褪黑素具有直接清除自由基的能力,但是在发挥其他功能时的作用受体以及信号传导途径仍未知,是否和动物中利用MT1和MT2作为受体仍需进一步的研究; (7)褪黑素对光照敏感,在动、植物中似乎均有一定的昼夜节律,但是褪黑素对光信号(光强、光质、光向、光周期)介导的植物光形态建成与光合作用的响应及是否参与调节植物光周期等都需要进一步的研究; (8)外源褪黑素在农作物生产中的应用以及通过现代育种手段提高内源褪黑素的含量从而提高作物抗逆性将是未来利用褪黑素提高作物产量、改善产品品质的重点研究领域。

参考文献

- Afreen F, Zobayed SMA, Kozai T (2006). Melatonin in *Glycyrrhiza uralensis*: response of plant roots to spectral quality of light and UV-B radiation. *J Pineal Res*, 41 (2): 108–115
- Arnao MB, Hernández-Ruiz J (2007). Melatonin promotes adventitious- and lateral root regeneration in etiolated hypocotyls of *Lupinus albus* L. *J Pineal Res*, 42 (2): 147–152
- Arnao MB, Hernández-Ruiz J (2009). Chemical stress by different agents affects the melatonin content of barley roots. *J Pineal Res*, 46 (3): 295–299
- Arnao MB, Hernández-Ruiz J (2013a). Growth conditions influence the melatonin content of tomato plants. *Food Chem*, 138 (2): 1212–1214
- Arnao MB, Hernández-Ruiz J (2013b). Growth conditions determine different melatonin levels in *Lupinus albus* L. *J Pineal Res*, 55 (2): 149–155
- Arnao MB, Hernández-Ruiz J (2014). Melatonin: plant growth regulator and/or biostimulator during stress? *Trends Plant Sci*, 19 (12): 789–797
- Arnao MB, Hernández-Ruiz J (2015). Functions of melatonin in plants: a review. *J Pineal Res*, 59 (2): 133–150
- Bergamini CM, Gambetti S, Dondi A, Cervellati C (2004). Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Curr Pharm Design*, 10 (14): 1611–1626
- Bugg TDH (2003). Dioxygenase enzymes: catalytic mechanisms and chemical models. *Tetrahedron*, 59 (36): 7075–7101
- Byeon Y, Back K (2014). Melatonin synthesis in rice seedlings *in vivo* is enhanced at high temperatures and under dark conditions due to increased serotonin *N*-acetyltransferase and *N*-acetylserotonin methyltransferase activities. *J Pineal Res*, 56 (2): 189–195
- Byeon Y, Back K (2015). Molecular cloning of melatonin 2-hydroxylase responsible for 2-hydroxymelatonin production in rice (*Oryza sativa*). *J Pineal Res*, 58 (3): 343–351
- Byeon Y, Choi GH, Lee HY, Back K (2015a). Melatonin biosynthesis requires *N*-acetylserotonin methyltransferase activity of caffeic acid *O*-methyltransferase in rice. *J Exp Bot*, 66: 6917–6925
- Byeon Y, Lee HJ, Lee HY, Back K (2016). Cloning and functional characterization of the *Arabidopsis* *N*-acetylserotonin *O*-methyltransferase responsible for melatonin synthesis. *J Pineal Res*, 60 (1): 65–73
- Byeon Y, Lee HY, Back K (2015b). Chloroplastic and cytoplasmic overexpression of sheep serotonin *N*-acetyltransferase in transgenic rice plants is associated with low melatonin production despite high enzyme activity. *J Pineal Res*, 58 (4): 461–469
- Byeon Y, Lee HY, Choi DW, Back K (2015c). Chloroplast-encoded serotonin *N*-acetyltransferase in the red alga *Pyropia yezoensis*: gene transition to the nucleus from chloroplasts. *J Exp Bot*, 66 (3): 709–717
- Byeon Y, Lee HY, Hwang OJ, Lee HJ, Lee K, Back K (2015d). Coordinated regulation of melatonin synthesis and degradation genes in rice leaves in response to cadmium treatment. *J Pineal Res*, 58 (4): 470–478
- Byeon Y, Lee HY, Lee K, Back K (2014a). A rice chloroplast transit peptide sequence does not alter the cytoplasmic localization of sheep serotonin *N*-acetyltransferase expressed in transgenic rice plants. *J Pineal Res*, 57 (2): 147–154
- Byeon Y, Lee HY, Lee K, Back K (2014b). Caffeic acid *O*-methyltransferase is involved in the synthesis of melatonin by methylating *N*-acetylserotonin in *Arabidopsis*. *J Pineal Res*, 57 (2): 219–227
- Byeon Y, Lee HY, Lee K, Park S, Back K (2014c). Cellular localization and kinetics of the rice melatonin biosynthetic enzymes SNAT and ASMT. *J Pineal Res*, 56 (1): 107–114
- Byeon Y, Lee K, Park YI, Park S, Back K (2013). Molecular cloning and functional analysis of serotonin *N*-acetyltransferase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Pineal Res*, 55 (4): 371–376
- Byeon Y, Park S, Kim YS, Park DH, Lee S, Back K (2012). Light-reg-

- ulated melatonin biosynthesis in rice during the senescence process in detached leaves. *J Pineal Res*, 53 (1): 107–111
- Byeon Y, Park S, Lee HY, Kim YS, Back K (2014d). Elevated production of melatonin in transgenic rice seeds expressing rice tryptophan decarboxylase. *J Pineal Res*, 56 (3): 275–282
- Byeon Y, Tan DX, Reiter RJ, Back K (2015e). Predominance of 2-hydroxymelatonin over melatonin in plants. *J Pineal Res*, 59 (4): 448–454
- Carillo-Vico A, Lardone PJ, Álvarez-Sánchez N, Rodríguez-Rodríguez A, Guerrero JM (2013). Melatonin: buffering the immune system. *Int J Mol Sci*, 14 (4): 8638–8683
- Chu EW, Wurtman RJ, Axelrod J (1964). An inhibitory effect of melatonin on the estrous phase of the estrous cycle of the rodent. *Endocrinology*, 75 (2): 238–242
- Chen GF, Huo YS, Tan DX, Liang Z, Zhang WB, Zhang YK (2003). Melatonin in Chinese medicinal herbs. *Life Sci*, 73 (1): 19–26
- De Luca V, Marineau C, Brisson N (1989). Molecular cloning and analysis of cDNA encoding a plant tryptophan decarboxylase: comparison with animal dopa decarboxylases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86 (8): 2582–2586
- Dubbels R, Reiter RJ, Klenke E, Goebel A, Schnakenberg E, Ehlers C, Schiwara HW, Schloot W (1995). Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Pineal Res*, 18 (1): 28–31
- Facchini PJ, Huber-Allanach KL, Tari LW (2000). Plant aromatic L-amino acid decarboxylases: evolution, biochemistry, regulation, and metabolic engineering applications. *Phytochemistry*, 54 (2): 121–138
- Fujiwara T, Maisonneuve S, Isshiki M, Mizutani M, Chen L, Wong HL, Kawasaki T, Shimamoto K (2010). Sekiguchi lesion gene encodes a cytochrome P450 monooxygenase that catalyzes conversion of tryptamine to serotonin in rice. *J Biol Chem*, 285 (15): 11308–11313
- Gitto E, Tan DX, Reiter RJ, Karbownik M, Manchester LC, Cuzzocrea S, Fulia F, Barberi I (2001). Individual and synergistic antioxidative actions of melatonin: studies with vitamin E, vitamin C, glutathione and desferrioxamine (desferoxamine) in rat liver homogenates. *J Pharm Pharmacol*, 53 (10): 1393–1401
- Gomez FJV, Raba J, Cerutti S, Silva MF (2012). Monitoring melatonin and its isomer in *Vitis vinifera* cv. Malbec by UHPLC-MS/MS from grape to bottle. *J Pineal Res*, 52 (3): 349–355
- González-Gómez D, Lozano M, Fernández-León MF, Ayuso MC, Bernalte MJ, Rodríguez AB (2009). Detection and quantification of melatonin and serotonin in eight sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.). *Eur Food Res Technol*, 229 (2): 223–229
- Hardeband R (2015). Melatonin in plants and other phototrophs: advances and gaps concerning the diversity of functions. *J Exp Bot*, 66 (3): 627–646
- Hardeband R, Madrid JA, Tan DX, Reiter RJ (2012). Melatonin, the circadian multioscillator system and health: the need for detailed analyses of peripheral melatonin signaling. *J Pineal Res*, 52 (2): 139–166
- Hardeband R, Tan D X, Reiter RJ (2009). Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: the resurrection of an almost forgotten class of biogenic amines. *J Pineal Res*, 47 (2): 109–126
- Hattori A, Migitaka H, Iigo M, Itoh M, Yamamoto K, Ohtani-Kaneko R, Hara M, Suzuki T, Reiter RJ (1995). Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. *Biochem Mol Biol Int*, 35 (3): 627–634
- Hernández-Ruiz J, Cano A, Arnao MB (2004). Melatonin: a growth-stimulating compound present in lupin tissues. *Planta*, 220 (1): 140–144
- Hernández-Ruiz J, Cano A, Arnao MB (2005). Melatonin acts as a growth-stimulating compound in some monocot species. *J Pineal Res*, 39 (2): 137–142
- Iriti M, Rossoni M, Faoro F (2006). Melatonin content in grape: myth or panacea? *J Sci Food Agr*, 86 (10): 1432–1438
- Jackson WT (1969). Regulation of mitosis. II. Interaction of isopropyl *N*-phenyl-carbamate and melatonin. *J Cell Sci*, 5 (3): 745–755
- Jan JE, Reiter RJ, Wasdell MB, Bax M (2009). The role of the thalamus in sleep, pineal melatonin production, and circadian rhythm sleep disorders. *J Pineal Res*, 46 (1): 1–7
- Jiang CQ, Zu CL (2015). Advances in melatonin and its roles in abiotic stress resistance in plants. *Biotechnol Bull*, 31 (4): 47–55 (in Chinese with English abstract) [姜超强, 祖朝龙(2015). 褪黑素与植物抗逆性研究进展. *生物技术通报*, 31 (4): 47–55]
- Kang K, Kang S, Lee K, Park M, Back K (2008). Enzymatic features of serotonin biosynthetic enzymes and serotonin biosynthesis in plants. *Plant Signal Behav*, 3 (6): 389–390
- Kang K, Kim YS, Park S, Back K (2009). Senescence-induced serotonin biosynthesis and its role in delaying senescence in rice leaves. *Plant Physiol*, 150 (3): 1380–1393
- Kang K, Kong K, Park S, Natsagdorj U, Kim YS, Back K (2011). Molecular cloning of a plant *N*-acetylserotonin methyltransferase and its expression characteristics in rice. *J Pineal Res*, 50: 304–309
- Kang K, Lee K, Park S, Byeon Y, Back K (2013). Molecular cloning of rice serotonin *N*-acetyltransferase, the penultimate gene in plant melatonin biosynthesis. *J Pineal Res*, 55 (1): 7–13
- Kang K, Lee K, Park S, Kim YS, Back K (2010). Enhanced production of melatonin by ectopic overexpression of human serotonin *N*-acetyltransferase plays a role in cold resistance in transgenic rice seedlings. *J Pineal Res*, 49 (2): 176–182
- Kang S, Kang K, Lee K, Back K (2007a). Characterization of rice tryptophan decarboxylases and their direct involvement in serotonin biosynthesis in transgenic rice. *Planta*, 227 (1): 263–272
- Kang S, Kang K, Lee K, Back K (2007b). Characterization of tryptamine 5-hydroxylase and serotonin synthesis in rice plants. *Plant Cell Rep*, 26 (11): 2009–2015
- Kanjanaphachao P, Wei BY, Lo SF, Wang IW, Wang CS, Yu SM, Yen ML, Chiu SH, Chen LJ (2012). Serotonin accumulation in transgenic rice by over-expressing tryptophan decarboxylase results in a dark brown phenotype and stunted growth. *Plant Mol Biol*, 78 (6): 525–543
- Kawai Y, Ono E, Mizutani M (2014). Evolution and diversity of the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase superfamily in plants. *Plant J*, 78 (2): 328–343

- Kim M, Seo H, Park C, Park WJ (2016). Examination of the auxin hypothesis of phyto-melatonin action in classical auxin assay systems in maize. *J Plant Physiol*, 190: 67–71
- Kolář J, Johnson CH, Macháček I (2002). Presence and possible role of melatonin in a short-day flowering plant, *Chenopodium rubrum*. In: Olcese J (ed). *Melatonin after Four Decades*. US: Springer, 391–393
- Kolář J, Johnson CH, Macháček I (2003). Exogenously applied melatonin (*N*-acetyl-5-methoxytryptamine) affects flowering of the short-day plant *Chenopodium rubrum*. *Physiol Plant*, 118 (4): 605–612
- Kolář J, Macháček I, Eder J, Prinsen E, Van Dongen W, Van Onckelen H, Illnerová H (1997). Melatonin: occurrence and daily rhythm in *Chenopodium rubrum*. *Phytochemistry*, 44 (8): 1407–1413
- Kołodziejczyk I, Bałabusta M, Szewczyk R, Posmyk MM (2015). The levels of melatonin and its metabolites in conditioned corn (*Zea mays* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.) seeds during storage. *Acta Physiol Plant*, 37 (6): 1–11
- Korkmaz A, Değer Ö, Cuci Y (2014). Profiling the melatonin content in organs of the pepper plant during different growth stages. *Sci Hortic*, 172: 242–247
- Lee HY, Byeon Y, Lee K, Lee HJ, Back K (2014). Cloning of *Arabidopsis* serotonin *N*-acetyltransferase and its role with caffeic acid *O*-methyltransferase in the biosynthesis of melatonin *in vitro* despite their different subcellular localizations. *J Pineal Res*, 57 (4): 418–426
- Lee HY, Byeon Y, Tan DX, Reiter RJ, Back K (2015). *Arabidopsis* serotonin *N*-acetyltransferase knockout mutant plants exhibit decreased melatonin and salicylic acid levels resulting in susceptibility to an avirulent pathogen. *J Pineal Res*, 58: 291–299
- Lei Q, Wang L, Tan DX, Zhao Y, Zheng XD, Chen H, Li QT, Kong J (2013). Identification of genes for melatonin synthetic enzymes in ‘Red Fuji’ apple (*Malus domestica* Borkh. cv. Red) and their expression and melatonin production during fruit development. *J Pineal Res*, 55 (4): 443–451
- Lei XY, Zhu RY, Zhang GY, Dai YR (2004). Attenuation of cold-induced apoptosis by exogenous melatonin in carrot suspension cells: the possible involvement of polyamines. *J Pineal Res*, 36 (2): 126–131
- Lenaz G (2012). Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology. In: Scatena R, Bottoni P, Giardina B (eds). *Advances in Mitochondrial Medicine, Advances in Experimental Medicine and Biology 942*. Netherlands: Springer, 93–136
- Lerner AB, Case JD, Heinzelman RV (1959). Structure of melatonin I. *J Am Chem Soc*, 81 (22): 6084–6085
- Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc*, 80 (10): 2587
- Li C (2014). Effects of light and fruit development period on apple endogenous melatonin content (Master's thesis). Yangling: Northwest A&F University (in Chinese with English abstract) [李超(2014). 光照及果实发育期对苹果果实内源褪黑素含量的影响(硕士学位论文). 杨凌: 西北农林科技大学]
- Liu MX (2015). Regulatory function of exogenous melatonin on flowering time in *Arabidopsis thaliana* (Master's thesis). Xi'an: Northwest University (in Chinese with English abstract) [刘梦昕(2015). 外源褪黑素对拟南芥开花时间的调节作用(硕士学位论文). 西安: 西北大学]
- Liu N, Jin ZY, Wang SS, Gong B, Wen D, Wang XF, Wei M, Shi QH (2015). Sodic alkaline stress mitigation with exogenous melatonin involves reactive oxygen metabolism and ion homeostasis in tomato. *Sci Hortic*, 181: 18–25
- Liu WH, Zhang GY, Dai RR (2003). Detection and quantification of melatonin in leaves, flowers and seeds of baikal skullcap (*Scutellaria baicalensis*) by HPLC. *Chin Bull Bot*, 20 (1): 75–79 (in Chinese with English abstract) [刘伟华, 张贵友, 戴尧仁(2003). HPLC法测定黄芩叶、花、种子中褪黑素的含量. 植物学通报, 20 (1): 75–79]
- Manchester LC, Tan DX, Reiter RJ, Park W, Monis K, Qi W (2000). High levels of melatonin in the seeds of edible plants: possible function in germ tissue protection. *Life Sci*, 67 (25): 3023–3029
- Mukherjee S, David A, Yadav S, Baluška F, Bhatla SC (2014). Salt stress-induced seedling growth inhibition coincides with differential distribution of serotonin and melatonin in sunflower seedling roots and cotyledons. *Physiol Plant*, 152 (4): 714–728
- Murch SJ, Hall BA, Le CH, Saxena PK (2010). Changes in the levels of indoleamine phytochemicals during véraison and ripening of wine grapes. *J Pineal Res*, 49 (1): 95–100
- Murch SJ, KrishnaRaj S, Saxena PK (2000). Tryptophan is a precursor for melatonin and serotonin biosynthesis in *in vitro* regenerated St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv. Anthos) plants. *Plant Cell Rep*, 19 (7): 698–704
- Nelson DR, Schuler MA, Paquette SM, Werck-Reichhart D, Bak S (2004). Comparative genomics of rice and *Arabidopsis*. Analysis of 727 cytochrome P450 genes and pseudogenes from a monocot and a dicot. *Plant Physiol*, 135 (2): 756–772
- Okazaki M, Higuchi K, Aouini A, Ezura H (2010). Lowering intercellular melatonin levels by transgenic analysis of indoleamine 2,3-dioxygenase from rice in tomato plants. *J Pineal Res*, 49 (3): 239–247
- Okazaki M, Higuchi K, Hanawa Y, Shiraiwa Y, Ezura H (2009). Cloning and characterization of a *Chlamydomonas reinhardtii* cDNA arylalkylamine *N*-acetyltransferase and its use in the genetic engineering of melatonin content in the Micro-Tom tomato. *J Pineal Res*, 46 (4): 373–382
- Park S, Back K (2012). Melatonin promotes seminal root elongation and root growth in transgenic rice after germination. *J Pineal Res*, 53 (4): 385–389
- Park S, Byeon Y, Back K (2013a). Functional analyses of three ASMT gene family members in rice plants. *J Pineal Res*, 55 (4): 409–415
- Park S, Byeon Y, Back K (2013b). Transcriptional suppression of tryptamine 5-hydroxylase, a terminal serotonin biosynthetic gene, induces melatonin biosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.). *J Pineal Res*, 55 (2): 131–137
- Park S, Byeon Y, Kim YS, Back K (2013c). Kinetic analysis of purified recombinant rice *N*-acetylserotonin methyltransferase and

- peak melatonin production in etiolated rice shoots. *J Pineal Res*, 54 (2): 139–144
- Park S, Byeon Y, Lee HY, Kim YS, Ahn T, Back K (2014). Cloning and characterization of a serotonin *N*-acetyltransferase from a gymnosperm, loblolly pine (*Pinus taeda*). *J Pineal Res*, 57 (3): 348–355
- Park S, Kang K, Lee K, Choi D, Kim YS, Back K (2009). Induction of serotonin biosynthesis is uncoupled from the coordinated induction of tryptophan biosynthesis in pepper fruits (*Capsicum annuum*) upon pathogen infection. *Planta*, 230 (6): 1197–1206
- Park S, Kim YS, Rupasinghe SG, Schuler MA, Back K (2013d). Rice P450 reductases differentially affect P450-mediated metabolism in bacterial expression systems. *Bioproc Biosyst Eng*, 36 (3): 325–331
- Park S, Le TNN, Byeon Y, Kim YS, Back K (2013e). Transient induction of melatonin biosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) during the reproductive stage. *J Pineal Res*, 55 (1): 40–45
- Park S, Lee DE, Jang H, Byeon Y, Kim YS, Back K (2013f). Melatonin-rich transgenic rice plants exhibit resistance to herbicide-induced oxidative stress. *J Pineal Res*, 54 (3): 258–263
- Park S, Lee K, Kim YS, Back K (2012). Tryptamine 5-hydroxylase-deficient Sekiguchi rice induces synthesis of 5-hydroxytryptophan and *N*-acetyltryptamine but decreases melatonin biosynthesis during senescence process of detached leaves. *J Pineal Res*, 52 (2): 211–216
- Pelagio-Flores R, Muñoz-Parra E, Ortiz-Castro R, López-Bucio J (2012). Melatonin regulates *Arabidopsis* root system architecture likely acting independently of auxin signaling. *J Pineal Res*, 53 (3): 279–288
- Posmyk MM, Janas KM (2009). Melatonin in plants. *Acta Physiol Plant*, 31 (1): 1–11
- Pothinuch P, Tongchitpakdee S (2011). Melatonin contents in mulberry (*Morus* spp.) leaves: effects of sample preparation, cultivar, leaf age and tea processing. *Food Chem*, 128 (2): 415–419
- Rajniak J, Barco B, Clay NK, Sattely ES (2015). A new cyanogenic metabolite in *Arabidopsis* required for inducible pathogen defence. *Nature*, 525: 376–395
- Reiter RJ, Manchester LC, Tan DX (2005). Melatonin in walnuts: influence on levels of melatonin and total antioxidant capacity of blood. *Nutrition*, 21 (9): 920–924
- Reiter RJ, Tan DX, Rosales-Corral S, C Manchester L (2013). The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives. *Mini Rev Med Chem*, 13 (3): 373–384
- Reiter RJ, Tan DX, Zhou Z, Cruz MHC, Fuentes-Broto L, Galano A (2015). Phytomelatonin: assisting plants to survive and thrive. *Molecules*, 20 (4): 7396–7437
- Riga P, Medina S, García-Flores LA, Gil-Izquierdo Á (2014). Melatonin content of pepper and tomato fruits: effects of cultivar and solar radiation. *Food Chem*, 156: 347–352
- Schröder P, Abele C, Gohr P, Stuhlfauth-Roisch U, Grosse W (1999). Latest on enzymology of serotonin biosynthesis in walnut seeds. In: Huether G, Kochen W, Simat TJ, Steinhart H (eds). *Tryptophan, Serotonin, and Melatonin*. US: Springer, 637–644
- Shi H, Chan Z (2014). The cysteine2/histidine2-type transcription factor *ZINC FINGER OF ARABIDOPSIS THALIANA 6*-activated *C-REPEAT-BINDING FACTOR* pathway is essential for melatonin-mediated freezing stress resistance in *Arabidopsis*. *J Pineal Res*, 57 (2): 185–191
- Stürtz M, Cerezo AB, Cantos-Villar E, Garcia-Parrilla MC (2011). Determination of the melatonin content of different varieties of tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) and strawberries (*Fragaria ananassa*). *Food Chem*, 127 (3): 1329–1334
- Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ (1993). Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J*, 1 (4): 57–60
- Tan DX, Manchester LC, Di Mascio P, Martinez GR, Prado FM, Reiter RJ (2007a). Novel rhythms of *N*¹-acetyl-*N*²-formyl-5-methoxykynuramine and its precursor melatonin in water hyacinth: importance for phytoremediation. *FASEB J*, 21 (8): 1724–1729
- Tan DX, Manchester LC, Esteban-Zubero E, Zhou Z, Reiter RJ (2015). Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: synthesis and metabolism. *Molecules*, 20 (10): 18886–18906
- Tan DX, Manchester LC, Liu X, Rosales-Corral SA, Acuna-Castroviejo D, Reiter RJ (2013). Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: a hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes. *J Pineal Res*, 54 (2): 127–138
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Limson J, Weintraub ST, Qi W (2000). Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. *Free Radical Biol Med*, 29 (11): 1177–1185
- Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ (2007b). One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res*, 42 (1): 28–42
- Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Allegra MC, Hardeland R (2002). Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem*, 2 (2): 181–197
- Van Tassel DL, Li J, O'Neill SD (1993). Melatonin: identification of a potential dark signal in plants (Abstract). *Plant Physiol*, 102 (Suppl 1): 117
- Van Tassel DL, O'Neill SD (2001). Putative regulatory molecules in plants: evaluating melatonin. *J Pineal Res*, 31 (1): 1–7
- Van Tassel DL, Roberts N, Lewy A, O'Neill SD (2001). Melatonin in plant organs. *J Pineal Res*, 31 (1): 8–15
- Wang JY, Jiang C, Li SK, Zheng JG (2009). Study on analysis method of melatonin and melatonin content in corn and rice seeds. *Chin Agric Bull*, 25 (17): 20–24 (in Chinese with English abstract) [王金英, 江川, 李书柯, 郑金贵(2009). 褪黑素测定方法及玉米、水稻种子中褪黑素含量的分析研究. *中国农学通报*, 25 (17): 20–24]
- Wang P, Sun X, Li C, Wei ZW, Liang D, Ma FW (2013). Long-term exogenous application of melatonin delays drought-induced leaf senescence in apple. *J Pineal Res*, 54 (3): 292–302
- Wang P, Yin LH, Liang D, Li C, Ma FW, Yue ZY (2012). Delayed

- senescence of apple leaves by exogenous melatonin treatment: toward regulating the ascorbate–glutathione cycle. *J Pineal Res*, 53 (1): 11–20
- Wang YJ, Bu HY, Jia JF, Suo ZR (2008). RP-HPLC analysis of melatonin content in different aloe tissues. *Food Sci*, 29 (6): 350–352 (in Chinese with English abstract) [王英娟, 步怀宇, 贾敬芬, 索志荣(2008). RP-HPLC法测定不同芦荟中褪黑激素含量. *食品科学*, 29 (6): 350–352]
- Wei W, Li QT, Chu YN, Reiter RJ, Yu XM, Zhu DH, Zhang WK, Ma B, Lin Q, Zhang JS, Chen SY (2015). Melatonin enhances plant growth and abiotic stress tolerance in soybean plants. *J Exp Bot*, 66 (3): 695–707
- Wolf K, Kolář J, Witters E, van Dongen W, van Onckelen H, Macháčeková I (2001). Daily profile of melatonin levels in *Che-nopodium rubrum* L. depends on photoperiod. *J Plant Physiol*, 158 (11): 1491–1493
- Zhang L, Jia J, Xu Y, Wang Y, Hao J, Li T (2012). Production of transgenic *Nicotiana sylvestris* plants expressing melatonin syn-thetase genes and their effect on UV-B-induced DNA damage. *In Vitro Cell Dev—Plant*, 48 (3): 275–282
- Zhang N, Sun QQ, Zhang HJ, Cao YY, Weeda S, Ren SX, Guo YD (2015). Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants. *J Exp Bot*, 66 (3): 647–656
- Zhao JF, Yang HG, Li JY (2015). Detection and quantification of melatonin from *Aloe vera*, medlar leaves and mulberry leaves by HPLC-UV. *Food Ind*, 36 (2): 266–270 (in Chinese with English abstract) [赵建芬, 杨海贵, 李静仪(2015). HPLC-UV法检测芦荟、枸杞叶和桑叶中的褪黑素. *食品工业*, 36 (2): 266–270]
- Zhao Y, Tan DX, Lei Q, Chen H, Wang L, Li QT, Gao YN, Kong J (2013). Melatonin and its potential biological functions in the fruits of sweet cherry. *J Pineal Res*, 55 (1): 79–88
- Zuo BX, Zheng XD, He PL, Wang L, Lei Q, Feng C, Zhou JZ, Li QT, Han ZH, Kong J (2014). Overexpression of *MzASMT* improves melatonin production and enhances drought tolerance in trans-genic *Arabidopsis thaliana* plants. *J Pineal Res*, 57: 408–417

Research progress of melatonin biosynthesis and metabolism in higher plants

WANG Rui, YANG Xiao-Long, XU Hui*, LI Tian-Lai

Key Laboratory of Protected Horticulture of Liaoning Province, Key Laboratory of Protected Horticulture of Education Ministry and Liaoning Province, College of Horticulture, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110866, China

Abstract: Melatonin is a conservative small molecule in the process of biological evolution which not only plays an important role in animals and human body, but also has extensive physiological function in plants. Tryptophan turns into melatonin with the catalytic action of four synthetizes: TDC, T5H, SNAT and ASMT. Melatonin can have resolved into 2-hydroxymelatonin by M2H in plant cell. The content of melatonin in plants is impacted by internal genetic characteristics and external environment factors. This paper presents the research progress of melatonin synthesis and metabolic pathways, and accumulation in plants.

Key words: melatonin; biosynthesis; metabolism; 2-hydroxymelatonin; stress resistance

Received 2016-02-24 Accepted 2016-04-21

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31000921) and Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, Ministry of Education of China (Grant No. [2011]1568).

*Corresponding author (E-mail: xuhuaia@126.com).