

植物中褪黑素的研究进展

赵 燕^{1,2,3}, 王东华¹, 赵曦阳²

(1 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 北京 100081; 2 林木遗传育种国家重点实验室, 东北林业大学, 哈尔滨 150040; 3 中国科学院过程工程研究所, 北京 100190)

摘 要: 植物褪黑素自 20 世纪 90 年代被发现以来, 初期的研究多为测定方法, 而后褪黑素生理功能的研究成为热点。植物中褪黑素含量的测定方法有放射免疫测定(RIA)、高效液相色谱(HPLC)、气相色谱(GC)、高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)和气相色谱-质谱(GC-MS)等, 而高效液相色谱与荧光检测器(HPLC-FD)和电化学检测器(HPLC-EC)联用是植物中褪黑素定量研究的较常用方法。褪黑素含量因植物种类、器官不同而异, 并以繁殖器官种子 and 花中较高。褪黑素在植物中具有调节光周期、促进植物种子萌发及生根、提高植物抵御外界环境压力如重金属、紫外辐射、温度变化等功能, 而这些生理功能的作用机制、合成位点等尚待进一步研究。该文对国内外近年来有关褪黑素在植物中的检测方法、生物合成途径及生理功能等几个方面的研究进展进行综述, 并提出今后的研究方向。

关键词: 褪黑素; 植物; 生理功能; 检测; 综述

中图分类号: Q946 **文献标志码:** A

Recent Advance on the Melatonin in Plant

ZHAO Yan^{1,2,3}, WANG Donghua¹, ZHAO Xiyang²

(1 Institute of Quality Standard & Testing Technology for Agro-Products, Key Laboratory of Agro-product Quality and Safety, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 2 State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Northeast Forestry University, Harebin 150040, China; 3 Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

Abstract: Melatonin was firstly found in plants in 1990s. In recent years, the related research on it attracted the attention of many scholars. There were many studies focusing on the content detection method of melatonin in plant, and the physiological function of melatonin in plant was also reported recently. Various methods of melatonin determination were employed for plant samples. The analysis methods included RIA, HPLC, GC, HPLC-MS and GC-MS. Among several methods, HPLC-FD and HPLC-ECD were commonly used to quantify melatonin in plants. The content of melatonin varied in different plant species and organs. Higher content of melatonin was found in seeds and flowers. Nowadays, melatonin was shown to act as a plant growth regulator that directs the differentiation of plant cells, tissues, and organs. It also appears to protect plants against environmental stress from heavy metals, UV radiation, and temperature change. However, the mechanism of its function in plants and the exact synthetic site need to be further investigated. The present paper reviewed some aspects of melatonin in plant; detection, biological synthesis and physiological functions. The potential subjects of melatonin in plant were also proposed.

Key words: melatonin; plant; physiological function; detection; review

收稿日期: 2013-08-22; 修改稿收到日期: 2013-11-29

基金项目: 林木遗传育种国家重点实验室(东北林业大学)开放基金项目(201204)

作者简介: 赵 燕(1982-), 女, 助理研究员, 主要研究方向为农产品质量安全。E-mail: zhaoyan01@caas.cn

褪黑素是在动物体内广泛存在的一种小分子的神经内分泌激素,主要由松果体分泌。解剖学家于公元三世纪在大脑半球之间的丘脑上方发现了体积很小的松果体,然而一直以来并不了解其确切的功能。1917年人们才从牛松果体中提取出一种能使蛙皮肤黑色素发生凝集反应而褪色变白的物质,直到1958年,Lerner等经过多年努力,从牛的松果体中提取出这一种物质并鉴定其化学结构,命名为Melatonin,它的发现不但使松果体研究进入新的时期,而且奠定了褪黑素研究的基石。后来的研究发现,褪黑素作为一种广谱的生理调节剂,存在于绝大多数生物有机体中,从单细胞的藻类到高等植物,从鱼类、鸟类、哺乳动物到灵长类的人^[1]。由于褪黑素一直被认为是动物所专有,植物中褪黑素的研究近年来才引起人们的关注,自20世纪90年代开始,人们陆续在许多高等植物中也发现了褪黑素的存在^[2],包括大多数食用植物、部分菊科植物、药用植物以及一些植物种子中也发现了褪黑素的存在,其中药用植物中褪黑素的含量较高^[3]。众所周知,褪黑素因其独特的抗氧化和抗衰老的功能受到广泛重视。本文对褪黑素的检测方法和含量、在植物中的生物合成途径及其主要生理作用等方面进行综述。

1 褪黑素的化学和生物性质

褪黑素的化学名称为N-乙酰-5-甲氧基色胺,属于吲哚类化合物,分子式为 $C_{13}H_{16}N_2O_2$,分子量为232.27,结构如图1所示。褪黑素是高亲脂性和部分亲水性的化合物,能与羟自由基和过氧自由基发生反应。

褪黑素普遍存在于生物体内,由原始的单细胞生物到脊椎动物都发现了褪黑素的存在,脊椎动物体内的褪黑素是由松果体分泌的,近年来的研究表明,褪黑素也存在于无松果体的无脊椎动物体内。此外,食用植物(苹果、萝卜、水稻等)和药用植物(黄芩、金丝桃、当归等)也都发现了褪黑素的存在^[4],微

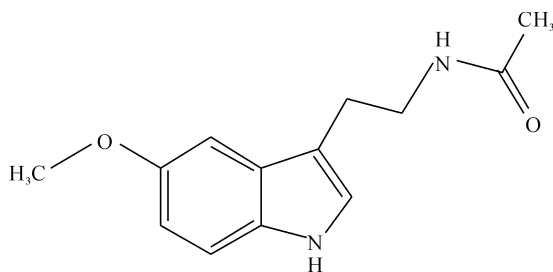


图1 褪黑素的化学结构

Fig. 1 The chemical structure of melatonin

生物和藻类中也有褪黑素及类似物^[5],这些研究都证明了褪黑素普遍存在于动植物和微生物中,在生物进化中是一类保守的小分子物质。

2 植物中褪黑素的检测方法及其在植物中的含量

2.1 植物中褪黑素的检测方法

由于进行光合作用的生物体内会快速形成如过氧化氢和氧自由基这样的氧化物,在提取过程中会破坏褪黑素;并且植物中会有大量的次生代谢物质干扰褪黑素在植物中的分离和纯化,因此植物中的褪黑素不像单细胞生物和动物中那样容易被精确测定。

在植物中对褪黑素进行检测包括提取和测定2个步骤,一些文献采用的提取试剂比较简单,如乙醇^[6]、10%的 Na_2CO_3 ^[7]、磷酸盐缓冲液^[8]等。但是Poeggeler等指出,由于生物体内存在的一些化学成分(铁离子,氧化还原活性的生物分子等)会导致褪黑素发生光氧化反应和自由基介导的氧化反应,从而破坏褪黑素,他们推荐使用0.4 mol/L的 $HClO_4$ 进行蛋白沉淀(消除蛋白酶对褪黑素的降解),提取过程中需要加入抗氧化剂保护褪黑素,并且提取的过程尽可能在弱光或暗处进行,以避免光氧化降解褪黑素^[9]。因此,在以后的褪黑素提取实验中,科学家多采取在提取试剂中添加 $HClO_4$ 、螯合剂EDTA和抗氧化剂^[10-11]的方法。微波提取作为一种新型的提取方式,也应用在谷物中褪黑素的提取,该方法具有重复性强、提取时间短(10 min)、操作简便等优点^[12],但在其他植物中的提取应用仍需要进一步实验确定。

植物中褪黑素的测定方法有放射免疫测定(RIA)、高效液相色谱(HPLC)、气相色谱(GC)、高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)和气相色谱-质谱(GC-MS)等方法^[13-17]。放射免疫测定方法是动物中褪黑素检测的常用方法,具有较强的灵敏度和较高的检测效率,但是在植物中进行褪黑素的测定时,一些干扰物质如次生代谢物质会使测定结果偏高,所以RIA方法在植物中并不适用。高效液相色谱与荧光检测器(HPLC-FD)或电化学检测器(HPLC-ECD)联用是植物中褪黑素定量研究的较常用方法^[18-19],根据材料的不同,以及对精确度和特异性的要求不同,而采用不同的方法。如刘伟华等^[20]应用高效液相色谱-荧光检测系统测定黄芩新鲜叶片、花和种子中褪黑素含量;Chen等^[21]应用HPLC-FD

测定了 100 多种干燥后的中药植物中的褪黑素含量。但是荧光检测器的灵敏度不如电化学检测器的灵敏度高,而电化学检测器的选择性差,对于与褪黑素结构相似的物质很难区分开^[22]。质谱可以大大提高褪黑素检测的准确度和灵敏度,具有高灵敏度和检测特异性的 HPLC-MS 可以作为检测褪黑素含量的精确手段。植物中的褪黑素可以直接通过 HPLC-MS 方法进行测定或将其转化为挥发性物质来通过 GC-MS 测定。这两种方法在动物的褪黑素检测中都可以用来准确定量,在植物的褪黑素测定中,GC-MS 方法应用在牵牛花和西红柿的内源褪黑素含量的测定^[23],HPLC-MS 也应用于若干植物内源褪黑素的定量定性测定研究中^[21]。高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)也应用于植物中褪黑素的测定^[24-25]。与 HPLC-MS 相比,串联质谱具有更高的特异性和准确性。由于褪黑素测定方法的多样性及植物来源的差异,导致一些测定结果并不准确^[26],一是因为提取的过程导致褪黑素的损失,二是由于褪黑素是一种在植物体内极其不稳定的小分子物质,因此测定结果很可能低于真实值。在实际的研究和操作中,常常两种或两种以上的方法共同使用来确保测定的准确性^[26-27],造成了实验工作量的增大。因此,探索一种简单方便而又具有较高灵敏度和较高回收率的植物褪黑素测定方法非常必要。

2.2 褪黑素在植物中的含量

有资料表明,有些植物中的褪黑素含量甚至高于动物,通常药用植物的褪黑素含量比普通植物的

高^[15-18,28]。在藻类和超过 20 个属的单子叶和双子叶植物中都有发现褪黑素的报道^[17-18,29-32],而在土豆和烟草叶中几乎没有检测到褪黑素,因此二者可以作为研究褪黑素的对照植物。已经报道含有褪黑素的植物主要是中草药和食用植物,含量最低的为 0.5 pg/g,最高的为 3.7 μg/g,相对于中草药植物,日常食用的蔬菜水果中褪黑素含量较少,而油料作物的种子中含量较高,接近 200 ng/g。褪黑素在植物的根、茎、叶、花、果实和种子中均有分布(表 1)。褪黑素含量在不同属的植物中不同,在相同属的不同种植物中也不一样。Manchester 等^[6]推测不同植物的褪黑素含量的差异是由于在植物的生长发育过程中不同的环境对其的影响造成的。通过对 108 种中国传统的中草药中褪黑素含量进行测定发现,64 种植物的褪黑素含量超过 10 ng/g 干重,34 个植物的褪黑素含量超过 100 ng/g 干重,10 个植物的褪黑素含量超过 1 000 ng/g 干重^[21],值得关注的是,褪黑素含量较高的植物多具有延迟衰老和抗氧化的作用。不同的器官其含量也有较大差异^[2,33-34]。在不同的植物器官中,繁殖器官种子和花中的褪黑素含量较高,种子中褪黑素的含量范围在 2~200 ng/g 干重^[11,35]。种子作为繁殖器官,很容易受到外界的氧化损伤,但是种子中的抗氧化酶活很低,而褪黑素具有抗氧化的能力,作为一种抗氧化物质褪黑素可以保护种子免受外界环境(紫外线、干旱、低温和环境污染等)的伤害,因此种子中高含量的褪黑素可以保证植物顺利繁殖^[36]。

表 1 褪黑素在植物中的含量和测定方法总结

Table 1 Conclusion of the content and analysis methods of melatonin in plants

植物种类与器官 Species of plant and organ	褪黑素含量 Content of melatonin	测定方法 Analysis method	文献来源 Reference
烟草,叶片 Tobacco, leaf	40~100 pg/g 鲜重 40~100 pg/g fresh weight	RIA, GC-MS	[2]
15 种食用植物,种子 15 species of edible plants, seeds	2~190 ng/g 干重 2~190 ng/g dry weight	RIA; HPLC-ECD	[6]
108 种中药植物的各个器官 108 species of Chinese medicinal herbs	10~3 800 ng/g 干重 10~3 800 ng/g dry weight	HPLC-FD, LC-MS/MS	[21]
牵牛花,芽;西红柿,果实 Morning glory, shoots; tomato, fruit	12~17 pg/g 鲜重 12~17 pg/g fresh weight	GC-MS, RIA	[23]
樱桃,果实 Cherry, fruit	2~13 ng/g 鲜重 2~13 ng/g fresh weight	HPLC-ECD	[31]
24 种单子叶和双子叶植物,可食用部分 24 monocot and dicot species, edible parts	10~5 300 pg/g 鲜重 10~5 300 pg/g fresh weight	RIA, HPLC-FD	[33]
红苕,芽 Chenopodium rubrum, shoot	250 pg/g 鲜重 250 pg/g fresh weight	LC-MS/MS, RIA	[43]
羽扇豆,胚轴 Lupin, hypocotyl	9~28 ng/g 鲜重 9~28 ng/g fresh weight	HPLC-ECD, LC-MS/MS	[50]
金丝桃,花 St. John's wort, flowers	4 000 nmol/g 鲜重 4 000 nmol/g fresh weight	HPLC-ECD, LC-MS/MS, RIA	[56]

3 褪黑素的生物合成途径

由于褪黑素分子具有亲水和亲脂的双重性质,可以自由出入细胞,导致对其在植物中具体的合成器官及合成位点目前尚不明确^[37]。关于褪黑素在植物中的合成途径最早是由 Murch 等在对金丝桃的研究中发现的^[24,38-39],用 C¹⁴ 标记的色氨酸在体外对金丝桃的植物幼体进行供给时,发现代谢产物包括吲哚乙酸、色胺、5-羟色氨酸和 5-羟色胺,其中 5-羟色氨酸和 5-羟色胺在脊椎动物中是褪黑素的前体,这项结果显示高等植物中褪黑素的合成途径可能与脊椎动物是相同的。而根据 Schroder 的报道,色氨酸首先被色氨酸脱羧酶催化形成色胺,色胺再被羟化酶催化形成 5-羟色胺,色胺也是植物中重要激素吲哚乙酸的前体,色胺也可以形成吲哚乙酸,从而与 5-羟色胺的合成形成了竞争关系^[10],因此吲哚乙酸与褪黑素和 5-羟色胺的合成直接相关(图 2)。2013 年, Tan 等^[40]提出了植物中褪黑素合成位点是线粒体和叶绿体的假设,该假设提出的基础是基于植物中线粒体和叶绿体是产生活性氧的器官,因此这两个器官需要抵御强大的氧化压力和自由基,而褪黑素是一种抗氧化剂,能够有力地清除自由基,并且有相关文献指出线粒体和叶绿体可以合成和代谢褪黑素,褪黑素合成的关键酶也在线粒体中发现。

4 褪黑素在植物中的生理作用(图 3)

4.1 对植物昼夜节律和光周期的调节作用

动物中的褪黑素研究表明,血液中褪黑素浓度呈昼夜节律性变化,血清中褪黑素的波动表现为夜晚达到峰值而白天降低到谷值,这种规律性波动与环境的光照条件密切相关,表明褪黑素具有调节动物的昼夜周期规律的作用^[22,35,41-42]。在植物中褪黑素的含量同样有昼夜变化,在短日照植物红黍中,在

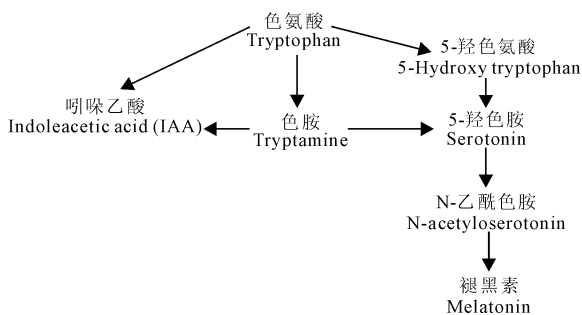


图 2 褪黑素在植物中生物合成途径

Fig. 2 The synthesis pathway of melatonin in plant

不同的光周期下(光/暗分别为 16 h/8 h、12 h/12 h、8 h/16 h),褪黑素的含量在光期开始前的 4~6 h 达到最大值,随后下降很快,在暗期结束时降至最低^[43],暗中褪黑素的含量达到最大,表明褪黑素在植物体内具有与动物类似的昼夜节律性。

褪黑素还对植物开花具有调节作用,但是褪黑素不是对开花的时间有影响而是对开花的幅度有影响^[44-45]。Kolar 等将 100 和 500 $\mu\text{mol/L}$ 的褪黑素施加在红黍上,发现红黍的开花率显著下降,但是只有在光期或暗周期的前一半时间内的褪黑素处理才能有效地抑制开花作用,表明褪黑素可能影响开花信号的早期传递^[44],褪黑素作为一种黑暗的信号分子通过叶中的光受体传导到顶端分生组织,进而诱导植物的成花过程^[22],但是对褪黑素影响开花的作用机制目前尚不清楚。

4.2 对植物生长发育的调节作用

4.2.1 促进植物生根 在植物中褪黑素具有与吲哚乙酸(IAA)相似的生理功能^[22,46-47]。在药用植物金丝桃的外植体进行再生培养时,褪黑素可以促进不定根的形成^[39];此外,褪黑素可以促进羽扇豆的下胚轴伸长^[48]。Arnao 等将生长 6 d 的羽扇豆的小苗切去主根,然后将胚轴浸泡在 0.001、0.01、0.1、1、10 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 的褪黑素和吲哚乙酸溶液中 8 d,暗培养 8 d 后记录生根数和根长,结果显示,低浓度可以促进不定根和侧根的形成,高浓度则起抑制作用;且在羽扇豆组织中内源的褪黑素和吲哚乙酸具有相似的浓度分布^[49],在羽扇豆胚轴中,褪黑素含量自顶部至底部逐渐下降,生长快的部位比生长慢的部位含量高^[48,50],可能因为褪黑素与吲哚乙酸具有相似的结构,所以它可能结合在吲哚乙酸受体上行使相应功能。该课题组还在单子叶大麦、燕麦、牧草中发现褪黑素也具有类似生长素的作用^[46],并且二者的内源含量水平相近,推测二者可能协同促进植物的生长发育。Chen 等报道,0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的外源褪黑素可以促进芥菜不定根的生长,而若褪黑素浓度过高达到 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,不定根的生长受到抑制,并且褪黑素促进生根的作用只在幼苗中发现,而对于年龄较老的植株,其作用并不明显;外加 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 褪黑素时还发现内源吲哚乙酸的含量也得到了提高^[51]。另外,甘草根中的内源褪黑素含量最高,并且随着甘草的生长发育其褪黑素含量也逐渐提高,生长 6 个月的植株其内源褪黑素含量是 3 个月植株的 4 倍^[52],说明褪黑素对植物的生长发育起到促进作用。Virginia 等对樱桃体外芽尖诱导

生根的实验发现,低浓度褪黑素可以促进不定根生成,而过高浓度褪黑素则抑制生根^[53]。因此,褪黑素促进植物生根的作用与其施加浓度密切相关,主要作用方式是以提高内源吲哚乙酸的含量为主。

4.2.2 提高种子萌发率 褪黑素在种子萌发中的作用首先是由 Posmyk 等在 2008 年发现的,将红球甘蓝的种子进行水引发(Hydropriming)处理时添加 1、10、100 $\mu\text{mol/L}$ 的褪黑素时,对照(无水引发处理)的种子萌发率为 71.7%,只进行水引发处理的红球甘蓝的种子萌发率为 80.8%,而添加 1 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 褪黑素的水引发处理的种子萌发率达到 88.3%和 87.5%,而若褪黑素浓度达到 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,种子萌发率为 73.8%^[54];Posmyk 等用水引发和渗透引发(Osmopriming)处理黄瓜种子时,添加褪黑素(25~100 $\mu\text{mol/L}$)可以显著提高种子萌发率,在低温条件下(10 $^{\circ}\text{C}$ 和 15 $^{\circ}\text{C}$)应用渗透引发和褪黑素二者结合处理黄瓜种子,可以将种子萌发率分别由对照的 4%和 30%提高到 83%和 98%^[55],萌发率大大提高,作者推测是由于亲水和亲脂的两亲的特性,褪黑素很容易进入种子内部,并且褪黑素具有抗氧化能力,因此可以保护种子内的脂类抵抗氧化伤害,从而提高了其活力和萌发率。

4.2.3 对植物繁殖的调节作用 2002 年 Murch 等首先报道了在药用植物金丝桃的小孢子发育过程中,花中的褪黑素含量逐渐升高,在单核小孢子时期含量达到最大随后下降^[56]。2009 年 Murch 等发现,在曼陀罗花芽发育的早期褪黑素含量最高,而随着花芽的成熟褪黑素含量逐渐降低;在曼陀罗果实发育过程中,花期的前 10 d 褪黑素含量保持了稳定的高含量^[57]。同年,Okazaki 和 Ezura 也在西红柿的繁殖过程对不同器官中(叶片、根、花、果实和种子)褪黑素的含量进行测定^[11],采集的叶片样本长度从 20~70 mm,结果在 20 mm 长的叶片中褪黑素含量最高(6.0 ng/g 鲜重),随着叶片发育到 50 mm 长时褪黑素含量降至 2.2 ng/g 鲜重,叶片长度达到 70 mm 时,褪黑素含量微升至 3.3 ng/g 鲜重;而随着果实颜色由橘红色成熟至红色的过程,褪黑素在西红柿果实的含量由 1.5 ng/g 鲜重上升至 2.8 ng/g 鲜重。因此,植物内源褪黑素的含量变化可能会影响花的发育,对植物的繁殖有一定的作用,起到类似开关的作用,引导植物由有性向无性生殖转换。

4.3 褪黑素在植物中的抗氧化作用

褪黑素吲哚环 5 位上的甲氧基和侧链上的 N-乙酰基是褪黑素清除活性氧(ROS)的必需基

团^[5,23]。褪黑素主要通过提供电子来清除 ROS,失去电子后褪黑素本身变成了毒性很低的吲哚阳离子,后者进一步清除 ROS,转变成 N1-乙酰-N2-甲酰-5-甲氧犬脲酰胺(AFMK),AFMK 比褪黑素具有更强的抗氧化作用,两者协同作用,进一步增强了褪黑素对 ROS 的清除作用^[57-58]。

褪黑素还可通过其受体影响细胞及组织内的一些氧化和抗氧化酶类,如能增强超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-P)等活性,达到清除自由基的作用^[59-60]。褪黑素是目前已知的抗氧化作用最强的内源性自由基清除剂,其清除自由基能力是维他命 E 的 2 倍,谷胱甘肽的 4 倍^[61-64]。褪黑素能够使绿藻免受 H_2O_2 引起的氧化伤害^[65],可以使植物抵御由于干旱^[58,66]、低温^[55]、重金属^[54]、紫外线辐射^[52]等逆境造成的胁迫,有效防止其细胞结构和生物大分子受到氧化损害。一些生长在高海拔地区的植物,生长环境极其恶劣,但是这些植物体内往往含有较高含量的褪黑素就是一个很好的例证。

4.3.1 提高植物抗冷害能力 褪黑素可以提高植物抵抗冷害的能力^[67-69]。如褪黑素可以明显提高低温胁迫下烟草悬浮细胞的存活率,该功能主要是通过提高烟草细胞的精胺脱羧酶的活力,调节多胺的合成来提高抵御冷害的能力^[70]。用浓度为 43 和 86 nmol/L 褪黑素在 26 $^{\circ}\text{C}$ 处理胡萝卜悬浮细胞 5 d 后再转入 2 $^{\circ}\text{C}$ ~3 $^{\circ}\text{C}$ 的低温条件下 7 d 后,与未经褪黑素处理的对照组相比,细胞的死亡率大大降低,褪黑素处理可显著减少由冷害诱导的细胞死亡,并且在褪黑素处理后细胞内源的多胺(腐胺和亚精胺)含量提高,这些多胺的水平与植物抵抗逆境的能力有关,从而缓和了由冷害造成的细胞死亡^[71]。将不同生长时期的曼陀罗的花芽置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 的低温逆境下培养 3 d,其内源的褪黑素和前体 5-羟色胺的含量均比对照高^[57]。通过基因工程的手段使褪黑素合成过程的限速步骤的关键酶(5-羟色胺 N-乙酰转移酶)在水稻中得到过表达,检测发现植物内源的褪黑素含量提高,并且该转基因系水稻在冷逆境下具有比对照高的叶绿素含量^[72]。将大花红景天愈伤组织在含褪黑素的培养基中预处理后,进行冷冻保存后的成活率显著高于未经处理的组织^[69]。褪黑素可以增强农作物对冷害的抵抗能力,因此褪黑素在农业生产方面也有一定的应用前景。

4.3.2 光保护作用 光合作用过程会产生大量的自由基和活性氧,如过氧化氢和单线氧,Tan 等将水

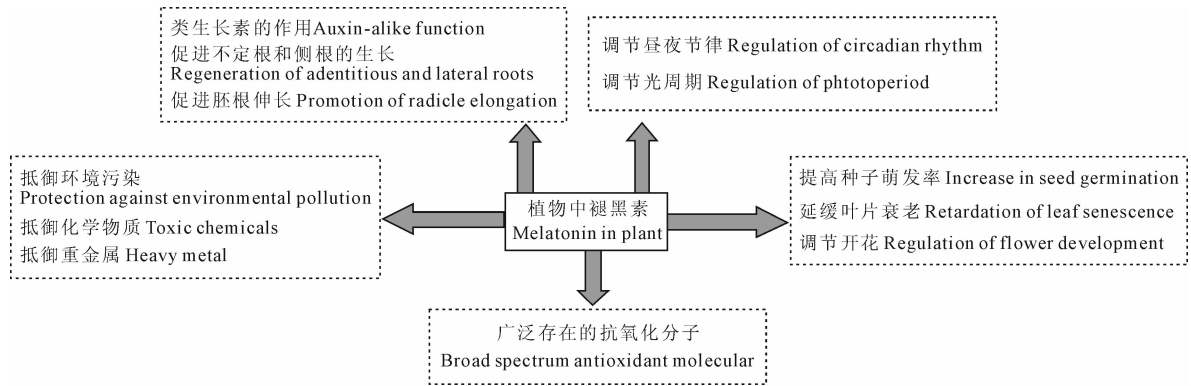


图 3 褪黑素在植物中的作用

Fig. 3 The functions of melatonin in plants

葫芦分别置于太阳光($10\ 000\sim 15\ 000\ \mu\text{W}/\text{cm}^2$)和人工光($400\sim 450\ \mu\text{W}/\text{cm}^2$)下时发现褪黑素及其前体 AFMK 的含量在太阳光下远高于人工光下的含量,表明了光刺激了褪黑素的合成,从而使植物抵御光伤害,并且褪黑素的含量在光周期结束时达到最大,也推测是由于经过光照一个白天后,褪黑素的积累达到最大,从而保护植物抵御光合作用过程产生的自由基的伤害^[73]。

紫外辐射会引起植物细胞膜脂过氧化,产生过量自由基,造成植物伤害,而褪黑素在藻类和高等植物中具有抵御紫外线伤害的能力^[74-75],保护光合作用系统,提高叶绿素含量的功能^[76]。将甘草的根置于紫外线下 3 d,其内源褪黑素含量是白光对照的 4~5 倍^[52],表明褪黑素可以保护植物来抵抗紫外线产生的氧化伤害;加入一定浓度的外源褪黑素可减缓紫外线辐射对绿豆的氧化胁迫^[77],降低植物体内膜脂的过氧化,减少丙二醛的产生,能一定程度上防护紫外辐射引起氧化胁迫对绿豆的伤害。

4.3.3 抵抗化学物质的污染 褪黑素可以保护植物抵抗化学物质和重金属离子的伤害^[78-79]。化学物质氯化钠、硫酸锌和过氧化氢诱导了大麦内源褪黑素含量的大幅度上升,褪黑素含量是未经化学物质处理的对照的 6 倍,表明内源褪黑素可以作为抗氧化剂抵抗化学物质的伤害^[80];许多文献中报道了褪黑素抵抗重金属对植物的伤害。如 Tan 等发现,将褪黑素加入土壤中可以使豆类植物抵御重金属铜离子的伤害,大大提高了植物的成活率^[78];Posmyk 等也发现,褪黑素可以减弱硫酸铜对甘蓝种子、黄瓜种子和玉米种子萌发的伤害作用,使得种子在重金属铜离子存在的条件下仍然能够正常萌发,种苗得以生长^[54,81-82]。对于褪黑素保护植物抵抗化学物质的伤害机制,研究者发现,化学物质引起了植物细胞膜

脂过氧化、DNA 的复制和细胞分裂,而褪黑素处理的植物可以避免上述伤害产生。Tan 等^[64]还发现了褪黑素之外,其生物合成的前体 AFMK 也具有抗氧化作用,当水葫芦受到外界污染时,褪黑素和 AFMK 的含量均大幅上升,因此推测褪黑素的抗氧化作用是与前体或代谢物质协调作用而产生的。对于褪黑素是如何缓解高盐压力对植物的伤害作用,Li 等认为一方面褪黑素是通过直接清除过氧化氢或提高抗氧化酶的活性,另一方面,他们通过实验证明,在高盐环境下,褪黑素调节了离子通道相关基因的表达,使得达到离子的动态平衡进而提高了植物对高盐压力的抵抗力^[83]。

4.4 褪黑素在植物中的其他生理功能

褪黑素除了对植物生长发育起调节作用及抗氧化作用外,最新的研究表明褪黑素还具有其他重要作用,如抗衰老、抗疾病等作用。

叶面施加褪黑素可以缓解高温对黄瓜植株的伤害^[84],与未施加褪黑素的对照黄瓜苗相比,经过在叶片施加褪黑素后,在高温压力下,褪黑素可以显著降低叶片超氧阴离子自由基的产生速率及过氧化氢的含量,同时降低细胞膜的渗透性和丙二醛的含量,从而缓解高温对植株的破坏作用。广藿香种子对光热非常敏感,将其在褪黑素溶液中引发 2 d 后,广藿香种子的发芽率由 2.5% 提高至 52%,表明褪黑素可以提高植物在多重环境压力下的抵抗力^[85]。褪黑素可以延迟苹果叶片的衰老,将 10 mmol/L 的褪黑素施加于苹果叶片上时减缓了暗环境诱导的凋亡,实验表明,褪黑素延缓了正常的叶绿素降低速度及抑制了能够调控叶绿素降解基因的转录水平,另外褪黑素处理组具有较高含量的抗坏血酸及谷胱甘肽,因此褪黑素对植物凋亡的抑制作用同时通过 mRNA 水平和蛋白质水平上进行了调控^[86-87]。

此外,有学者发现褪黑素能够提高植物抵御干旱的能力,通过在黄瓜种子萌发及生根阶段添加褪黑素可以抑制由聚乙二醇造成的干旱环境,褪黑素能够提高种苗的光合作用速率及保护渗透压力下叶绿体的形态,逆转了干旱胁迫的影响^[88]。

最新的研究表明,褪黑素除了在植物生长发育及自然逆境下发挥作用外,还可以提高植物抵御疾病的能力。Yin 等发现,施加褪黑素可以使苹果抵御苹果褐斑病的侵染,主要是通过提高植物抗氧化酶活力并保持内源过氧化氢处于稳定状态,从而提高了对疾病的抗性。由于褪黑素对人和动物具有安全性,所以与传统农药相比,褪黑素不失为一个理想的植物保护剂^[89]。

5 展 望

尽管在许多植物中都发现了褪黑素的存在,但是在植物界对褪黑素的了解还是非常少。当前科学

家对其的了解仅仅是褪黑素是在植物中广泛存在的分子,不同植物的含量不同,在植物不同的器官其含量也存在差异,但是还有很多方面我们并不确定:(1)褪黑素在植物中确切的生物合成途径;(2)褪黑素在植物中具体的合成位点;(3)褪黑素除了作为生长调节剂和抗氧化剂外是否还具有其他的功能;(4)褪黑素在植物中的生理作用的作用机制,这些都有待将来的研究者为我们揭开。

褪黑素在动物中的功能包括清除自由基、增强免疫力、抑制衰老等作用,其生理和药理功能的多样性得到了国内外学者的普遍重视,美国食品药品监督管理局(FDA)认可褪黑素作为普通膳食补充剂,中国卫生部则先后批准 20 余种含褪黑素的产品作为改善睡眠的保健食品,全世界至今已经有数百万人长期服用,因此今后可以通过基因工程的手段来提高植物中的褪黑素含量来为人类健康服务。

参考文献:

- [1] TILDEN A R, BECKER M A, AMMA L L, *et al.* Melatonin production in an aerobic photosynthetic bacterium: an evolutionarily early association with darkness[J]. *Journal of Pineal Research*, 1997, 22: 102—106.
- [2] 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: 28—31.
- [3] MURCH S J, SIMMONS C B, SAXENA P K. Melatonin in feverfew and other medicinal plants[J]. *Lancet*, 1997, 350: 1 598—1 599.
- [4] VANTASSEL D L, ONEILL S D. Quantification of melatonin in plant extracts[J]. *Plant Physiology*, 1996, 111: 708—708.
- [5] TAN D X, MANCHESTER L C, HARDELAND R, *et al.* Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin[J]. *Journal of Pineal Research*, 2003, 34: 75—78.
- [6] MANCHESTER L C, TAN D X, REITER R J, *et al.* High levels of melatonin in the seeds of edible plants—possible function in germ tissue protection[J]. *Life Sciences*, 2000, 67: 3 023—3 029.
- [7] REITER R J, TAN D X, MANCHESTER L C, *et al.* Melatonin in edible plants (phytomelatonin): identification, concentrations, bioavailability and proposed functions[J]. *World Review of Nutrition Dietetics*, 2007, 97: 211—230.
- [8] BURKHARDT S, TAN D X, MANCHESTER L C, *et al.* Detection and quantification of the antioxidant melatonin in montmorency and balaton tart cherries (*Prunus cerasus*) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49: 4 898—4 902.
- [9] POEGGELER B, HARDELAND R. Detection and quantification of melatonin in a dinoflagellate, gonyaulax-polyedra—solutions to the problem of methoxyindole destruction in non-vertebrate material[J]. *Journal of Pineal Research*, 1994, 17: 1—10.
- [10] POSMYK M M, JANAS K M. Melatonin in plants[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2009, 31: 1—11.
- [11] OKAZAKI M, EZURA H. Profiling of melatonin in the model tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Micro-Tom[J]. *Journal of Pineal Research*, 2009, 46: 338—343.
- [12] SETYANINGSIH W, PALMA M, BARROSO CG. A new microwave-assisted extraction method for melatonin determination in rice grains[J]. *Journal of Cereal Science*, 2012, 56(2): 340—346.
- [13] PAPE C, LUNING K. Quantification of melatonin in phototrophic organisms[J]. *Journal of Pineal Research*, 2006, 41: 157—165.
- [14] CAO J, MURCH S J, O'BRIEN R, *et al.* Rapid method for accurate analysis of melatonin, serotonin and auxin in plant samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1 134: 333—337.
- [15] IRITI M, ROSSONI M, FAORO F. Melatonin content in grape: myth or panacea[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2006, 86: 1 432—1 438.
- [16] MURCH S J, SAXENA P K. A melatonin-rich germplasm line of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) [J]. *Journal of Pineal*

- Research*, 2006, 41: 284—287.
- [17] GARCIA-PARRILLA M C, CANTOS E, *et al.* Analysis of melatonin in foods[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2009, 22: 177—183.
- [18] ARNAO M B, HERNANDEZ-RUIZ J. Assessment of different sample processing procedures applied to the determination of melatonin in plants[J]. *Phytochemical Analysis*, 2009, 20: 14—18.
- [19] EGOSHI K, OKA T. Determination of melatonin in boiled rice by HPLC[J]. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 2012, 59(3): 161—165.
- [20] LIU W H(刘伟华), ZHANG G Y(张贵友), DAI Y R(戴尧仁). Detection and quantification of melatonin in leaves, flowers and seeds of Baikal Skullcap (*Scutellaria baicalensis*) by HPLC[J]. *Chinese Bulletin of Botany*(植物学通报), 2003, 20: 75—79(in Chinese).
- [21] CHEN G F, HUO Y S, TAN D X, *et al.* Melatonin in Chinese medicinal herbs[J]. *Life Sciences*, 2003, 73: 19—26.
- [22] KOLAR J, MACHACKOVA I. Melatonin in higher plants: occurrence and possible functions[J]. *Journal of Pineal Research*, 2005, 39: 333—341.
- [23] VAN TASSEL D L, ROBERTS N, LEWY A, *et al.* Melatonin in plant organs[J]. *Journal of Pineal Research*, 2001, 31: 8—15.
- [24] MURCH S J, KRISHNARAJ S, SAXENA P K. Tryptophan is a precursor for melatonin and serotonin biosynthesis in *in vitro* regenerated St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv. Anthos) plants[J]. *Plant Cell Reports*, 2000, 19: 698—704.
- [25] VICENTE GOMEZ FJ, GATICA HERNANDEZ I, DANTE MARTINEZ L, *et al.* Analytical tools for elucidating the biological role of melatonin in plants by LC-MS/MS[J]. *Electrophoresis*, 2013, 34(12): 1 749—1 756.
- [26] RAMAKRISHNA A, GIRIDHAR P, SANKAR KU, *et al.* Melatonin and serotonin profiles in beans of *Coffea* species[J]. *Journal of Pineal Research*, 2012, 52(4): 470—476.
- [27] RAMAKRISHNA A, GIRIDHAR P, SANKAR KU, *et al.* Endogenous profiles of indoleamines; serotonin and melatonin in different tissues of *Coffea canephora* P ex Fr. as analyzed by HPLC and LC-MS-ESI[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2012, 34(1): 393—396.
- [28] DE LA PUERTA C, CARRASCOSA-SALMORAL MP, GARCIA-LUNA PP, *et al.* Melatonin is a phytochemical in olive oil[J]. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, 2007, 104: 609—612.
- [29] IRITI M, VARONI E M, VITALINI S. Melatonin in traditional Mediterranean diets[J]. *Journal of Pineal Research*, 2010, 49: 101—105.
- [30] STAGE P W, SOMBRA L L, MESSINA G, *et al.* Determination of melatonin in wine and plant extracts by capillary electrochromatography with immobilized carboxylic multi-walled carbon nanotubes as stationary phase[J]. *Electrophoresis*, 2010, 31: 2 242—2 248.
- [31] GONZALEZ-GOMEZ D, LOZANO M, FERNANDEZ-LEON M F, *et al.* Detection and quantification of melatonin and serotonin in eight Sweet Cherry cultivars (*Prunus avium* L.)[J]. *European Food Research and Technology*, 2009, 229: 223—229.
- [32] IRITI M. Melatonin in grape, not just a myth, maybe a panacea[J]. *Journal of Pineal Research*, 2009, 46: 353—353.
- [33] 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: 627—634.
- [34] PÖEGGELER B, BALZER I, HARDELAND R, *et al.* Pineal hormone melatonin oscillates also in the dinoflagellate gonyaulax-polyedra [J]. *Naturwissenschaften*, 1991, 78: 268—269.
- [35] MURCH S J, SAXENA P K. Melatonin: a potential regulator of plant growth and development[J]. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-plant*, 2002, 38: 531—536.
- [36] CANIATO R, FILIPPINI R, PIOVAN A, *et al.* Melatonin in plants[M]//ALLEGRI G, COSTA CVL, RAGAZZI E. Develop. Tryp. Serot. Metab, 2003: 593—597.
- [37] ARNAO M B, HERNANDEZ-RUIZ J. Melatonin in plants, more studies are necessary[J]. *Plant Signaling and Behavior*, 2007, 2: 381—382.
- [38] JONES M P A, CAO J, OBRIEN R, *et al.* The mode of action of thidiazuron; auxins, indoleamines, and ion channels in the regeneration of *Echinacea purpurea* L. [J]. *Plant Cell Reports*, 2007, 26: 1 481—1 490.
- [39] MURCH S J, CAMPBELL S S B, SAXENA P K. The role of serotonin and melatonin in plant morphogenesis; regulation of auxin-induced root organogenesis *in vitro*-cultured explants of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.)[J]. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-plant*, 2001, 37: 786—793.
- [40] TAN DX, MANCHESTER LC, LIU X, *et al.* Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis; a hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes[J]. *Journal of Pineal Research*, 2013, 54(2): 127—138.
- [41] LOWDEN A, AKERSTEDT T, WIBOM R. Suppression of sleepiness and melatonin by bright light exposure during breaks in night work [J]. *Journal of Sleep Research*, 2004, 13: 37—43.
- [42] POTOCKI L, GLAZE D, TAN D X, PARK S S, *et al.* Circadian rhythm abnormalities of melatonin in Smith-Magenis syndrome[J]. *Journal of medical Genetics*, 2000, 37: 428—433.
- [43] WOLF K, KOLAR J, WITTERS E, VAN DONGEN W, *et al.* Daily profile of melatonin levels in *Chenopodium rubrum* L depends on photoperiod[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2001, 158: 1 491—1 493.
- [44] KOLAR J, JOHNSON C H, MACHACKOVA I. Exogenously applied melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) affects flowering of the short-day plant *Chenopodium rubrum*[J]. *Physiologia Plantarum*, 2003, 118: 605—612.

- [45] MACHACKOVA I, KREKULE J. Sixty-five years of searching for the signals that trigger flowering. Russ[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2002, 49: 451–459.
- [46] HERNANDEZ-RUIZ J, CANO A, ARNAO M B. Melatonin act as a growth-stimulating compound in some monocot species[J]. *Journal of Pineal Research*, 2005, 39: 137–142.
- [47] PELAGIO FLORES R, MUNOZ PARRA E, ORTIZ CASTRO R, et al. Melatonin regulates *Arabidopsis* root system architecture likely acting independently of auxin signaling[J]. *Journal of Pineal Research*, 2012, 53(3): 279–288.
- [48] HERNANDEZ-RUIZ J, ARNAO M B. Melatonin stimulates the expansion of etiolated lupin cotyledons[J]. *Plant Growth Regulation*, 2008, 55: 29–34.
- [49] ARNAO M B, HERNANDEZ-RUIZ J. Melatonin promotes adventitious- and lateral root regeneration in etiolated hypocotyls of *Lupinus albus* L. [J]. *Journal of Pineal Research*, 2007, 42: 147–152.
- [50] HERNANDEZ-RUIZ J, CANO A, et al. Melatonin: a growth-stimulating compound present in lupin tissues[J]. *Planta*, 2004, 220: 140–144.
- [51] CHEN Q, QI W B, REITER R J, et al. Exogenously applied melatonin stimulates root growth and raises endogenous indoleacetic acid in roots of etiolated seedlings of *Brassica juncea* [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2009, 166: 324–328.
- [52] AFREEN F, ZOBAYED S M A, 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.
- [53] SARROPOULOU VN, THERIOS IN, DIMASSI-THERIOU KN. Melatonin promotes adventitious root regeneration in in vitro shoot tip explants of the commercial sweet cherry rootstocks CAB-6P (*Prunus cerasus* L.), Gisela 6 (*P. cerasus* P. *canescens*), and MxM 60 (*P. avium* P. *mahaleb*) [J]. *Journal of Pineal Research*, 2012, 52(1): 38–46.
- [54] POSMYK M M, KURAN H, MARCINIAK K, et al. Presowing seed treatment with melatonin protects red cabbage seedlings against toxic copper ion concentrations[J]. *Journal of Pineal Research*, 2008, 45: 24–31.
- [55] POSMYK M M, BALABUSTA M, WIECZOREK M, et al. Melatonin applied to cucumber (*Cucumis sativus* L.) seeds improves germination during chilling stress[J]. *Journal of Pineal Research*, 2009, 46: 214–223.
- [56] MURCH S J, SAXENA P K. Mammalian neurohormones: potential significance in reproductive physiology of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) [J]. *Naturwissenschaften*, 2002, 89: 555–560.
- [57] MURCH S J, ALAN A R, CAO J, Saxena P K. Melatonin and serotonin in flowers and fruits of *Datura metel* L. [J]. *Journal of Pineal Research*, 2009, 47: 277–283.
- [58] ZHANG N, ZHAO B, ZHANG HJ, et al. Melatonin promotes water-stress tolerance, lateral root formation, and seed germination in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. *Journal of Pineal Research*, 2013, 54(1): 15–23.
- [59] DAKSHAYANI K B, SUBRAMANIAN P, MANIVASAGAM T, et al. Melatonin modulates the oxidant-antioxidant imbalance during Nitrosodimethylamine induced hepatocarcinogenesis in rats [J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2005, 8: 316–321.
- [60] PARK S, LEE DE, JANG H, et al. Melatonin-rich transgenic rice plants exhibit resistance to herbicide-induced oxidative stress [J]. *Journal of Pineal Research*, 2013, 54(3): 258–263.
- [61] ESCAMES G, GUERRERO J M, REITER R J, et al. Melatonin and vitamin E limit nitric oxide-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates [J]. *Neuroscience Letters*, 1997, 230: 147–150.
- [62] KUKNER A S, KUKNER A, NAZIROGLU M, et al. Protective effects of intraperitoneal vitamin C, aprotinin and melatonin administration on retinal edema during experimental uveitis in the guinea pig [J]. *Cell Biochemistry and Function*, 2004, 22: 299–305.
- [63] REITER R J, TAN D X. Melatonin-an antioxidant in edible plants. In: Das DK, Ursini F, editors [J]. *Alcohol Wine Health Disease*, 2002, 341–344.
- [64] PAREDES S D, KORKMAZ A, MANCHESTER L C, et al. Phytomelatonin: a review [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60: 57–69.
- [65] BALZER I, HARDELAND R. Melatonin in algae and higher plants-possible new roles as a phytohormone and antioxidant [J]. *Botanica Acta*, 1996, 109: 180–183.
- [66] WANG P, SUN X, LI C, et al. Long-term exogenous application of melatonin delays drought-induced leaf senescence in apple [J]. *Journal of Pineal Research*, 2013, 54(3): 292–302.
- [67] SZAFRANSKA K, GUMOLA I, JANAS K M. Does exogenous melatonin change the sensitivity of *Vigna radiata* seedlings to low temperature [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2005, 27: 95–96.
- [68] SZAFRANSKA K, GLINSKA S, JANAS K M. Ameliorative effect of melatonin on meristematic cells of chilled and re-warmed *Vigna radiata* roots [J]. *Biologia Plantarum*, 2013, 57(1): 91–96.
- [69] ZHAO Y, QI L W, WANG W M, et al. Melatonin improves the survival of cryopreserved callus of *Rhodiola crenulata* [J]. *Journal of Pineal Research*, 2011, 50(1): 83–88.
- [70] ZHANG G Y (张贵友), LI P (李萍), DAI Y R (戴尧仁). Arginine decarboxylase activity is increased in tobacco (*Nicotiana tabacum*) suspension cells by exogenous melatonin during cold stress [J]. *Chinese Bulletin of Botany (植物学通报)*, 2005, 22: 555–559 (in Chinese).
- [71] LEI X Y, ZHU R Y, ZHANG G Y, et al. Attenuation of cold-induced apoptosis by exogenous melatonin in carrot suspension cells; the

- possible involvement of polyamines[J]. *Journal of Pineal Research*, 2004, 36: 126—131.
- [72] KANG K, LEE K, PARK S, *et al.* Enhanced production of melatonin by ectopic overexpression of human serotonin N-acetyltransferase plays a role in cold resistance in transgenic rice seedlings[J]. *Journal of Pineal Research*, 2010, 49: 176—182.
- [73] TAN D X, MANCHESTER L C, HELTON P, Reiter R J. Phyto-remediative capacity of plants enriched with melatonin[J]. *Plant Signaling Behavior*, 2007, 2: 514—516.
- [74] PAPE C. Melatonin in marine macroalgae. Development and validation of quantitative determinations by HPLC and enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *Berichte zur Polar- und Meeresforschung*, 2004, 473: 7—103.
- [75] HARDELAND R. New actions of melatonin and their relevance to biometeorology[J]. *International Journal of Biometeorology*, 1997, 41: 47—57.
- [76] LAZAR D, MURCH S J, BELBY M J, *et al.* Exogenous melatonin affects photosynthesis in characeae *Chara australis*[J]. *Plant Signaling and Behavior*, 2013, 8(3): 23279.
- [77] WANG Y L(王英利), WANG Y J(王英娟), HAO J G(郝建国), *et al.* Defend effects of melatonin on mung bean under UV-B irradiation [J]. *Acta Photonica Sinica*(光子学报), 2009, 38: 2 629—2 633(in Chinese).
- [78] TAN D X, MANCHESTER L C, HELTON P, *et al.* Phyto-remediative capacity of plants enriched with melatonin[J]. *Plant Signaling Behavior*, 2007, 2: 514—516.
- [79] CHEN Q, QI W, LI M, *et al.* Melatonin in plants: content, method and function[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2008, 14: 126—131.
- [80] ARNAO M B, HERNANDEZ-RUIZ J. Chemical stress by different agents affects the melatonin content of barley roots[J]. *Journal of Pineal Research*, 2009, 46: 295—299.
- [81] JANAS K M, CIUPINSKA E, POSMYK M M. Melatonin applied by hydropriming as a biostimulator improving sweet corn (*Zea mays* L.) seedling growth in abiotic stress conditions[C]//2009 International Symposium on Environmental Science and Technology: Progress in Environmental Science and Technology. Beijing: Chinese Society for Environmental Sciences, 2009: 383—388.
- [82] POSMYK M M, BALABUSTA M, *et al.* Melatonin applied by osmopriming as a biostimulator improving cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedling growth at abiotic stress conditions[C]//2009 International Symposium on Environmental Science and Technology: Progress in Environmental Science and Technology. Beijing: Chinese Society for Environmental Sciences, 2009: 362—369.
- [83] LI C, WANG P, WEI Z, *et al.* The mitigation effects of exogenous melatonin on salinity-induced stress in *Malus hupehensis*[J]. *Journal of Pineal Research*, 2012, 53: 298—306.
- [84] XU X D(徐向东), SUN Y(孙 艳), SUN B(孙 波), *et al.* Effects of exogenous melatonin on active oxygen metabolism of cucumber seedlings under high temperature stress[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2010, 21(5): 1 295—1 300(in Chinese).
- [85] TIRYAKI I, KELES H. Reversal of the inhibitory effect of light and high temperature on germination of *Phacelia tanacetifolia* seeds by melatonin[J]. *Journal of Pineal Research*, 2012, 52: 332—339.
- [86] WANG P, YIN L, LIANG D, *et al.* Delayed senescence of apple leaves by exogenous melatonin treatment: toward regulating the ascorbate-glutathione cycle[J]. *Journal of Pineal Research*, 2012, 53: 11—20.
- [87] WANG P, SUN X, CHANG C, *et al.* Delay in leaf senescence of *Malus hupehensis* by long-term melatonin application is associated with its regulation of metabolic status and protein degradation[J]. *Journal of Pineal Research*, 2013, 55: 424—434.
- [88] ZHANG N, ZHAO B, ZHANG H J, *et al.* Melatonin promotes water-stress tolerance, lateral root formation, and seed germination in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. *Journal of Pineal Research*, 2013, 54: 15—23.
- [89] YIN L, WANG P, LI M, *et al.* Exogenous melatonin improves *Malus* resistance to Marssonina apple blotch[J]. *Journal of Pineal Research*, 2013, 54: 426—434.