

专题介绍

## 高等植物中维生素 C 的功能、合成及代谢研究进展<sup>①</sup>

<sup>1,2</sup> 安华明 <sup>1</sup> 陈力耕<sup>②</sup> <sup>2</sup> 樊卫国 <sup>1</sup> 胡西琴

<sup>1</sup>(浙江大学园艺系 杭州 310029) <sup>2</sup>(贵州大学园艺系 贵阳 550025)

**摘要** 植物体内合成的维生素C在植物抗氧化和自由基清除、光合作用和光保护、细胞生长和分裂以及一些重要次生代谢物和乙烯的合成等方面具有非常重要的生理功能。维生素C的生物合成途径及其代谢调控的基因工程研究最近取得了突破。

**关键词** 维生素C, 生理功能, 生物合成, 代谢

## Advances in Research on Function, Biosynthesis and Metabolism of Ascorbic Acid in Higher Plants

<sup>1,2</sup>AN Hua-Ming <sup>1</sup>CHEN Li-Geng<sup>②</sup> <sup>2</sup>FAN Wei-Guo <sup>1</sup>HU Xi-Qin

<sup>1</sup>(Department of Horticulture, Zhejiang University, Hangzhou 310029)

<sup>2</sup>(Department of Horticulture, Guizhou University, Guiyang 550025)

**Abstract** It is becoming increasingly clear that vitamin C (L-ascorbic acid, AsA) is of crucial importance in such processes as ROS detoxification, photosynthesis and photoprotection, cell division and growth. AsA is also a cofactor for some deoxygenase type enzymes involved in the synthesis of a number of other secondary metabolites and ethylene. A major breakthrough in plant AsA biosynthesis and metabolic engineering has been made recently.

**Key words** Vitamin C, Physiological function, Biosynthesis, Metabolism

维生素C又名抗坏血酸(L-ascorbic acid, AsA),是植物和大多数动物体内合成的一类含量丰富的己糖内酯化合物。植物中AsA的重要性不仅在于它为不能正常合成AsA的少数动物(包括人类)提供丰富的维生素C源;而且近年来的研究发现,AsA对于植物自身的抗氧化作用、光合保护以及调节生长发育等都具有非常重要的生理功能。同时有关AsA生物合成及其调控的研究最近也取得了非常重要的进展。

### 1 AsA在植物体内的生理功能

所有绿色植物都能合成AsA,从而为人类提供了丰富而方便的维生素C源。AsA也是植物体自身代谢过程中必不可少的物质,在植物的抗氧化作用、光合作用以及生长代谢等方面

①贵州省自然科学基金资助课题(黔科合计字(2003)3019)。

②通讯作者。Author for correspondence. E-mail: anhuaming@hotmail.com

收稿日期:2003-06-04 接受日期:2003-09-04 责任编辑:崔郁英

具有非常重要的生理功能。

### 1.1 AsA 在植物体的抗氧化系统中起着重要的作用

AsA 可以直接清除植物体内因氧代谢、光合作用及环境胁迫等产生的活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 如单线态氧(singlet oxygen,  $^1\text{O}_2$ )、超氧阴离子(superoxide,  $\text{O}_2^-$ )及羟基自由基(hydroxyl radical,  $\cdot\text{OH}$ ) (Padh, 1990)等。其次, AsA 能维持另一重要抗氧化剂维生素 E 的还原态(Lieblier *et al.*, 1986), 并通过抗坏血酸 - 谷胱甘肽循环(AsA-GSH cycle)间接清除  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Asada, 1992), 从而保护植物有机体及其正常代谢免于氧化胁迫(oxidative stress)造成的伤害。AsA 还可能在植物逆境反应中起着信号分子的作用(Karpinski *et al.*, 1997)。Conklin 等(1996)从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)获得的突变体 *vtc1* 由于缺乏合成足够 AsA 的能力(约为野生型的 25%)而对  $\text{O}_3$  异常敏感, 外施 AsA 则可提高其抗性。

### 1.2 AsA 在光合作用和光保护中起重要作用

叶绿体中有高浓度的 AsA 而缺乏过氧化氢酶, PS I 中氧的光还原所形成的过氧化氢可以通过抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)清除(Yabuta *et al.*, 2002); 同时 AsA 氧化产物单脱氢抗坏血酸(MDHA)可作为 PS I 的直接电子受体(Miyake and Asada, 1992; Smirnoff, 2000)。而且, AsA 也是紫黄质脱环氧酶(de-epoxidase)的辅因子, 该酶是叶黄素循环(xanthophyll cycle)中的重要酶类, 对于消耗过剩光能和保护光合作用的正常进行具有重要意义(Eskling *et al.*, 1997; Patricia *et al.*, 2002)。

### 1.3 AsA 在细胞壁代谢和细胞膨大中的作用

AsA 和 AsA 氧化酶(ascorbate oxidase, AO)与细胞膨大和分裂都有着密切的联系 (Kato and Esaka, 1999)。AO 主要存在于植物的细胞壁中, 特别是在快速生长的细胞内有更高的表达活性; AO 氧化 AsA 所形成的 MDHA 可通过质膜上的细胞色素 b 还原, 该过程有电子的跨膜运输从而促进细胞生长(Smirnoff, 1996)。此外, AsA 可作为脯氨酸和赖氨酸羟化酶的辅基, 催化羟脯氨酸和羟赖氨酸的合成(Padh, 1990), 而富含羟脯氨酸的糖蛋白(HRGPs)是胞壁的结构蛋白。胞壁内的 AsA 和脱氢抗坏血酸(DHA)能够影响胞壁蛋白和多糖的交联(cross-linking)从而导致胞壁的疏松; DHA 还能转变为胞壁草酸盐, 由于该盐可以通过结合  $\text{Ca}^{2+}$  形成结晶从而间接调节胞壁  $\text{Ca}^{2+}$  的水平(Lin and Varner, 1991)。同时, AsA 和  $\text{H}_2\text{O}_2$  的平衡能够控制木质素单体的聚合作用从而调节胞壁的木质化(lignification)过程(Davey *et al.*, 2000)。

### 1.4 AsA 对细胞分裂的影响

AsA 介导细胞分裂的作用在动物和植物细胞中都会观察到, 但其直接证据还很少。外源 AsA 能促进洋葱(*Allium cepa* L.)根系分生组织和中柱鞘细胞从 G1 期到 S 期的分裂并使不活动中心细胞数量大大减少(Innocenti *et al.*, 1990; Citterio *et al.*, 1994), 不活动中心细胞比周围的分生组织细胞含有更高的 AO mRNA(Kerk and Feldman, 1995)。Potters 等(2000)对烟草悬浮培养细胞的研究表明, AsA 和 DHA 可对细胞分裂进程产生重要影响。石蒜碱(lycorine, AsA 的抑制剂)处理则抑制细胞的分裂, 重新补充 AsA, 细胞分裂得以恢复(Arrigoni, 1994)。对拟南芥突变体(Veljovic-Jovanovic *et al.*, 2001)和转基因烟草(*Nicotiana tabacum* L.)细胞(Tabata *et al.*, 2001)的研究发现, 内源 AsA 的降低可导致植株嫩枝生长速率降低和细胞的分裂和生长受抑制。

除此之外, AsA 作为 ACC 氧化酶的辅基从而参与乙烯合成, 并且其分解产物可能是某些植物如葡萄中酒石酸的重要来源 (Smirnoff, 1996)。

## 2 高等植物中AsA的合成途径

### 2.1 碳链倒位途径 (inversion pathway)

这是 Isherwood 等(1954)最早提出的类似于动物途径的高等植物 AsA 生物合成途径。该途径认为,植物由 D-半乳糖经 D-半乳糖醛酸(甲酯)和 L-半乳糖内酯(L-galactono-1,4-lactone, L-GalL)等重要中间物质,最终形成 AsA,其间发生了类似动物的碳链倒位(inversion)(图 1 ①)(Isherwood *et al.*,1954)。支持该途径的证据主要集中在:植物体内确实存在天然 L-GalL,并可通过半乳糖内酯脱氢酶(GalLDH, EC 1.3.2.3)氧化生成 AsA,同时,D-半乳糖醛酸(甲酯)也可作为 AsA 合成的底物(Mapson and Isherwood,1956)。但随后的放射性示踪实验显示,植物合成 AsA 的过程并未发生碳链的倒位(Loewus,1963)。虽然有强有力的证据显示 L-GalL 是植物合成 AsA 的底物,但 D-半乳糖醛酸并不是植物合成 AsA 的主要物质(Loewus, 1999; Conklin, 2001)。

### 2.2 邻酮醛糖途径 (osone pathway)

为了符合放射性示踪实验结果,Loewus 等(1990)提出了另外一条非倒位途径(图 1 ②)。该途径中,D-葡萄糖首先在 C<sub>2</sub> 位上被氧化生成 D-葡萄糖醛酮,后者在 C<sub>5</sub> 位经表异构酶催化形成 L-山梨糖醛酮,并进一步在山梨糖醛酮脱氢酶作用下被氧化为 AsA。此途径虽然没有碳骨架的倒位,但至今还没有明确的实验证据支持这一途径,因为至今尚未发现催化前两步反应的酶(Pallanca and Smirnoff,1999)。Conklin 等(2000)对拟南芥 AsA 缺乏的突变体 *vtc1* 的研究表明,增加 D-葡萄糖醛酮和 L-山梨糖醛酮并不能导致 AsA 的积累;L-山梨糖醛酮也未能明显增加拟南芥悬浮细胞内源 AsA 含量(Davey *et al.*, 1999)。有人在豌豆(*Pisum sativum* L.)上的研究也表明,D-葡萄糖醛酮和 L-山梨糖醛酮并不是植物合成 AsA 的直接前体或主要底物(Pallanca and Smirnoff,1999)。

### 2.3 L-半乳糖途径 (L-galactose pathway)

Wheeler 等(1998)提出的这一新途径综合了过去似乎相互矛盾的看法,使高等植物 AsA 的生物合成问题逐渐明朗。该途径以 D-甘露糖-6-磷酸和 L-半乳糖和 L-GalL 等作为主要中间物质,既符合放射性示踪实验结果,又避免了以前争议较大的“碳链倒位”,还把 L-GalL 等重要物质纳入其中(图 1 ③)。支持该途径的证据主要有:(1)当用 [<sup>14</sup>C]甘露糖喂饲拟南芥叶片时,4 h 后就有约 10% 被标记的 <sup>14</sup>C 在 AsA 中被检测到;对 *Cucurbita pepo* 根系的研究也得出相同的结果;(2)在豌豆胚提取物中加入 [<sup>14</sup>C]GDP-甘露糖可以形成 [<sup>14</sup>C]L-GalL,并可进一步生成 AsA;(3)用 L-半乳糖和 L-半乳糖内酯喂饲拟南芥叶片和豌豆苗可以相同的效率增加 AsA 的含量,同时 GDP-甘露糖可通过 GDP-D-甘露糖-3,5-表异构酶的作用形成 L-半乳糖;(4)该途径中所涉及的酶多数已被检测、纯化或克隆(Ôba *et al.*,1995; Smirnoff *et al.*, 2001);(5)特别是对从拟南芥获得的 AsA 缺失突变体的相关研究也证实了这一途径(Conklin *et al.*,1997;1999)。

该途径把 AsA 的生物合成融入植物碳水化合物的主要代谢过程,并与多糖合成和蛋白质的糖基化(glycosylation)之间建立联系,已被公认为是高等植物合成 AsA 的主要途径(Davey *et al.*,2000; Conklin, 2001)。

### 2.4 可能的交替途径:糖醛酸转变途径 (conversion of uronic acids)

虽然放射性示踪实验结果已经证明植物不能通过碳链倒位途径合成 AsA,但最近对拟南芥

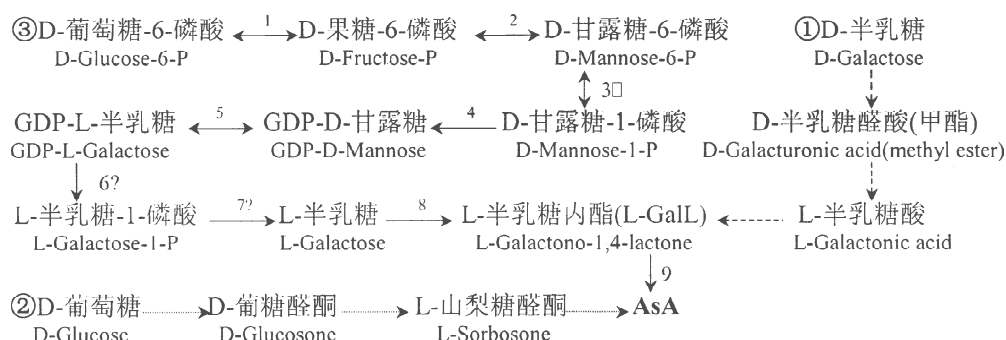


图1 高等植物中 AsA 合成的 3 种可能途径

L-半乳糖途径(③)所涉及的酶：1.己糖磷酸异构酶；2.磷酸甘露糖异构酶；3.磷酸甘露糖变位酶；4.GDP-D-甘露糖焦磷酸化酶；5.GDP-D-甘露糖-3,5-表异构酶；8.L-半乳糖脱氢酶；9.L-半乳糖内酯脱氢酶

Fig.1 Proposed biosynthetic pathways of AsA in higher plants (Loewus,1999)

Relates to enzyme of L-Galactose wals: 1. Hexose phosphate isomerase; 2. Phosphomannose isomerase; 3. Phosphomannose mutase; 4. GDP-D-mannose pyrophosphorylase; 5. GDP-D-mannose-3,5-epimerase; 8. L-galactose dehydrogenase; 9. L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase

悬浮培养细胞的研究发现，除 L-半乳糖和 L-半乳糖内酯外，D-半乳糖醛酸甲酯、L-古洛糖内酯、D-葡萄糖醛酸甲酯和 D-葡萄糖醛酸内酯等也能提高细胞内 AsA 水平(Davey *et al.*, 1999)。然而这 4 种物质并不包含于 L-半乳糖途径之中。特别是对于 L-古洛糖内酯及其氧化酶的研究，使人们相信植物可能还存在另外的 AsA 合成途径，因为 L-古洛糖内酯原本是动物合成 AsA 途径中的重要中间物质（在古洛糖内酯氧化酶作用下生成 AsA），但最近在植物中也被检测到(Davey *et al.*,1999)；而且，当 Jian 和 Nessler(2000)把从鼠肝脏细胞克隆的古洛糖内酯氧化酶基因导入烟草和莴苣(*Lactuca sativa* L.)中时，转基因植株 AsA 的含量比对照提高了 7 倍。

但是，要清楚地阐明糖醛酸转变途径的过程、生理作用以及与 L-半乳糖途径之间的关系为时尚早，它可能是植物在特殊环境条件下于特定组织中合成 AsA 的途径。比如，D-葡萄糖醛酸和 D-半乳糖醛酸都是植物非纤维细胞壁多糖的重要组成部分，当植物在衰老、果实成熟或软化、花粉成熟以及细胞生长膨大等过程中发生胞壁分解时，糖醛酸转变成 AsA 可能作为碳补救机制的一部分(Davey *et al.*, 2000)。

### 3 AsA在植物细胞内的代谢

#### 3.1 植物细胞内 AsA 的运输

催化 L-半乳糖途径最后一步的 GalLDH 是一个线粒体酶，定位于线粒体内膜，至今还没有在细胞其他部分检测到该酶活性(Mutsada *et al.*,1995; Siendones *et al.*, 1999)。但 AsA 在叶绿体、质体及液泡等其他亚细胞区域内却具有很高的含量(如叶绿体通常含 20~50 mmol·L<sup>-1</sup>) (Foyer and Lelandais,1996)。这表明，AsA 在线粒体内合成后进行了跨膜运输，而且这一过程可能需要载体的介导。事实上，从对菠菜(*Spinacia oleracea* L.)、豌豆和大豆(*Glycine max* (L.) Merr.)等植物中纯化的叶绿体和原生质膜小泡进行的研究表明，AsA 的吸收或运输是一个载体介导的需能过程，跨膜运输则通过易化扩散(facilitated diffusion)的方式，运输的主要形态

是 DHA。大麦(*Hordeum vulgare* L.)和豌豆叶绿体对 AsA 和 DHA 的吸收呈现出饱和现象,也预示该过程可能是由质子电化学势驱动的载体介导过程(Rautenkrantz *et al.*,1994; Horemans *et al.*,1998)。但是,目前对于植物细胞原生质膜上到底是否存在专门的 AsA 或 DHA 运载体及其与其他运载体蛋白的关系仍不清楚。

抗坏血酸-谷胱甘肽循环(AsA-GSH cycle)中没有一个酶存在于原生质膜之外(Davey *et al.*, 2000),这表明植物细胞有其他的途径来维持 AsA/DHA 的氧化还原态。除了上述的 DHA 载体外,也有证据表明,来源于胞质 AsA 的电子跨膜运输至质外体是通过与原生质膜相偶联的细胞色素 b(Cytb)实现的(Horemans *et al.*, 1994)。此跨膜运输过程被认为与质膜 ATP 酶活性的促进和细胞的生长有关。

除胞内运输外,AsA 也可能进行胞间运输,因为有研究表明,用放射性标记的 AsA 饲喂根系,能够在植物的其他部分检测到(Mozafar and Oertli,1993)。Kellist 等(2001)的研究表明,叶内 AsA 和 DHA 都能从外质体运向共质体;Franceschi 和 Tarlyn(2002)也证明 AsA 能通过韧皮部进行长距离运输。

### 3.2 AsA 在植物体内的氧化还原过程

作为植物细胞内重要的自由基清除剂,AsA 是通过参与一系列的氧化还原反应而发挥其抗氧化剂的功能(图 2)。首先,由于光合作用、光呼吸或其他氧化胁迫而产生的  $H_2O_2$  可以通过 APX 的作用伴随 AsA 氧化为 MDHA 而得以还原;后者既可在 MDHA 还原酶(MDHAR)的作用下还原为 AsA,也可发生非酶歧化反应(none-enzymatic disproportionation)生成 DHA (Smirnoff, 2000)。而 DHA 通过抗坏血酸-谷胱甘肽循环还原成 AsA 并最终使  $H_2O_2$  得以清除

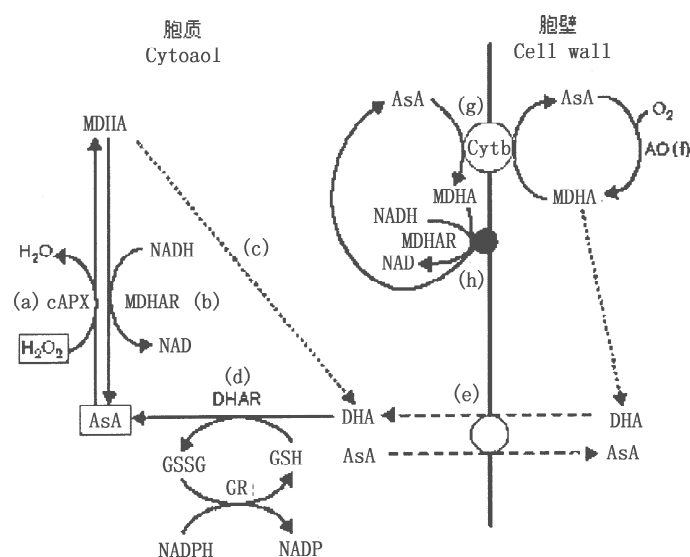


图 2 植物胞内 AsA 的运输和氧化还原

a. 胞质 AsA 过氧化物酶; b. h. 单脱氢 AsA 还原酶; c. 歧化反应; d. 脱氢 AsA 还原酶; e. 易化扩散; f. AsA 氧化酶; g. Cytb 系统

Fig.2 Redox reactions and transport of AsA in plant cell (Smirnoff, 2000)  
a. cAPX; b and h. MDHAR; c. Disproportionation; d. DHAR; e. Facilitated diffusion; f. AO; g. Cytb

(Noctor and Foyer,1998),其中, DHA 还原酶(DHAR)和谷胱甘肽还原酶(GR)参与了该循环过程。胞壁内的 AsA 是通过质膜运载体以易化扩散方式与 DHA 交换而来的,并在 AO 作用下被氧化为 MDHA,由此产生的 MDHA 可能被质膜 Cytb 系统还原;而胞质 AsA 氧化所产生的 MDHA 或者被定位于质膜内侧的 MDHAR 还原为 AsA,或者进入胞质内的抗坏血酸-谷胱甘肽循环(Horemans *et al.*, 1998)。

### 3.3 植物体内 AsA 的分解

AsA 碳架分解将导致草酸和酒石酸的形成,除此之外,人们对其在植物体内的

分解代谢过程了解甚少。早期对酒石酸积累植物 *Pelargonium crispum* 的研究表明, 1- $[^{14}\text{C}]$ -AsA 发生  $\text{C}_2/\text{C}_3$  断裂时就产生草酸和苏氨酸, 后者进一步氧化为酒石酸。葡萄属植物的情况又有所不同, 酒石酸的形成源于  $\text{C}_4/\text{C}_5$  断裂, 并且该分解过程可能是此类植物酒石酸积累的主要途径; 而在其他植物中, AsA 分解产生的草酸并非其草酸积累的主要来源 (Davey *et al.*, 2000)。

除此之外, 对植物草酸合成相关酶及该过程在 AsA 代谢中的具体作用仍不清楚。只是在当草酸被其氧化酶氧化时所产生的  $\text{H}_2\text{O}_2$  增加了对细胞的氧化胁迫, 从而加强了 AsA 的转换代谢; 在草酸积累的植物中, AsA 的分解可能还起着其他作用 (Davey *et al.*, 2000)。

DHA 在生理 pH 下并不稳定, 易自发或酶催化生成不具生理作用的 2,3-二酮古洛糖酸 (2,3-DKG)。研究认为, 动物细胞内 DHA 可以通过非氧化磷酸戊糖途径经 2,3-DKG 而得以循环再生。虽然植物组织内类似的再生途径未经证实, 但已知所有必要的转换酶在植物细胞质和叶绿体基质中都是存在的 (Schnarrenberger *et al.*, 1995)。当细胞处于氧化胁迫时, 该循环可为积累的 DHA 提供一条通过葡糖异生 (gluconeogenesis) 而重新用于 AsA 生物合成的途径 (Davey *et al.*, 2000)。

#### 4 影响 AsA 积累的因素及调控措施

理论上, 凡影响 AsA 的生物合成和分解代谢的因素都将最终影响植物体内 AsA 的积累; 而欲通过对相关酶表达水平及活性的调节来实现对植物 AsA 积累水平的调控, 是人们的努力方向。

##### 4.1 影响因素

对豌豆植株合成 AsA 特点研究发现, 外施 AsA 显著地抑制  $^{14}\text{C}$ -葡萄糖向  $^{14}\text{C}$ -AsA 的转化, 这说明 AsA 的合成受到反馈抑制 (Pallanca and Smirnoff, 2000); 由于 D-甘露糖的浓度并不影响 AsA 的水平, 说明反馈调节点可能在于 GDP-D-甘露糖至 L-半乳糖之间 (Wheeler *et al.*, 1998; Davey *et al.*, 1999)。同时, 因为 GDP-D-甘露糖和 GDP-L-半乳糖是胞壁多糖合成和蛋白质糖基化的前体物 (Davey *et al.*, 2000), 因此可能与 AsA 合成之间发生潜在的竞争。

不同植物种类及植物不同组织具有不同的 AsA 含量, 甚至相差达数十倍 (Davey *et al.*, 2000), 说明 AsA 库的大小由遗传决定并具组织特异性。但在特定组织中, 某些外部因素也会对 AsA 积累产生一定影响。植物叶内 AsA 的含量与光照有着密切的关系, 高光照有利于 AsA 的积累, 这与光照改善碳水化合物库有关 (Mishra *et al.*, 1995; Smirnoff, 2000)。然而, 这并不是惟一原因, 更重要的是光对于催化 AsA 合成的关键酶 GalLDH 的活性具有重要作用, 较高的光强下 GalLDH 的活性提高从而使 AsA 的合成增加 (Smirnoff, 2000)。而在根尖分生组织, 由于生长素的积累促进了 AsA 氧化酶的活性, 从而降低了 AsA 水平 (Kerk *et al.*, 2000)。此外, 对南瓜的研究表明, 缺硼导致 AsA 的迅速减少; 缺硼造成的根系生长受抑制也可以通过外施 AsA 得到部分恢复 (Lukaszewski and Blevins, 1996)。

##### 4.2 调控措施

目前惟一已知的 AsA 生物合成抑制剂是石蒜碱, 早期的研究认为低浓度 ( $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的石蒜碱就能产生极强的抑制作用, 对 *Vicia faba*、玉米 (*Zea mays* L.) 及甘薯 (*Ipomoea batatas* Lam.) 的研究表明, 其机制是石蒜碱抑制了 GalLDH 的活性 (Arrigoni *et al.*, 1997; Imai *et al.*, 1998)。然

而在另一些植物中, AsA 的合成对石蒜碱并不敏感, 其原因曾被认为是 DHA 还原酶(DHAR) 活性不同而导致的 AsA 再生能力有差异(De Gara *et al.*, 1994); 但 Otergaard 等(1997) 从花椰菜(*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.) 纯化的 GalLDH 研究表明, 即使将石蒜碱的浓度提高到  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , GalLDH 活性仍未受抑。这是否说明不同植物 GalLDH 蛋白可能存在结构上的差异, 或者只是由于不同的实验方法导致的不同实验结果仍有待深入研究。

此外, 利用基因工程对植物 AsA 积累水平进行调控也取得了一定的进展, 尤其是对 GalLDH 的研究, 迄今其 cDNA 克隆已从甘薯(Imai *et al.*, 1998)、花椰菜(Otergaard *et al.*, 1997) 及烟草(Yabuta *et al.*, 2000) 等植物中得到; 该基因在烟草细胞中的反义表达明显抑制 AsA 的合成(Tabata *et al.*, 2001)。同时, Keller 等(1999) 对马铃薯(*Solanum tuberosum* L.) GDP-D-甘露糖焦磷酸化酶基因进行反义抑制, 降低了转基因植株体内 AsA 水平。Jain 和 Nessler (2000) 在烟草和莴苣中导入古洛糖内酯氧化酶基因, 显著提高了 AsA 含量。

Chen 等(2003) 从小麦(*Triticum aestivum* L.) 中克隆的 DHAR 的 cDNA 导入烟草和玉米植株, 结果 AsA 水平提高了 2~4 倍。这表明, 不仅调控 AsA 合成过程而且调控其循环代谢过程也能对植株 AsA 积累产生重要影响。

## 5 结束语

最近几年对 AsA 在植物中的功能及代谢有了深入的研究, 特别是 AsA 生物合成新途径的提出, 澄清了过去的争议并为将来的研究奠定了重要基础; 同时有关 AsA 缺失突变体的研究已经并将继续为我们更加全面地认识 AsA 提供重要信息。在此基础上, 以提高植物中 AsA 含量为目的的相关基因工程研究也有望为改善作物的营养品质和对逆境的抗性开辟新的途径。

尽管如此, 有关 AsA 在植物细胞分裂、环境适应性和生长发育过程中的作用, 以及 AsA 在植物体内的运输机制, 植物合成 AsA 的多条途径在不同植物种类及不同发育时期的地位及它们之间的相互关系, 特别是某些高 AsA 含量植物中 AsA 的合成和代谢机制、及其遗传调控等方面仍需深入研究。

## 参 考 文 献

- Arrigoni O, 1994. Ascorbate system in plant development. *J Bioenerg Biomembr*, **26**: 407~419
- Arrigoni O, De Gara L, Paciolla C, Evidente A, De Pinto M, Liso R, 1997. Lycorine: a powerful inhibitor of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase activity. *J Plant Physiol*, **150**: 362~364
- Asada K, 1992. Ascorbate peroxidase-a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant*, **85**: 235~241
- Chen Z, Young T E, Ling J, Chang S C, Gallie D R, 2003. Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**: 3525~3530
- Citterio S, Sgorbati S, Scippa S, Sparvoli E, 1994. Ascorbic acid effect on the onset of cell proliferation in pea root. *Physiol Plant*, **92**: 601~607
- Conklin P L, Williams E H, Last R L, 1996. Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**: 9970~9974
- Conklin P L, Pallanca J E, Last R L, Smirnov N, 1997. L-Ascorbic acid metabolism in the ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant *vtcl*. *Plant Physiol*, **115**: 1277~1285
- Conklin P L, Norris S R, Wheeler G L, Williams E H, Smirnov N, Last R L, 1999. Genetic evidence for the role of GDP-mannose in plant ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**: 4198~4203

- Conklin P L, Saracco S A, Norris S R, Last R L, 2000. Identification of ascorbic acid-deficient *Arabidopsis thaliana* mutants. *Genetics*, **154**: 847~856
- Conklin P L, 2001. Recent advance in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. *Plant Cell Environ*, **24**: 383~394
- Davey M W, Gilot C, Persiau G, Ostergaard J, Han Y, Bauw G C, Van Montagu M C, 1999. Ascorbate biosynthesis in *Arabidopsis* cell suspension culture. *Plant Physiol*, **121**: 535~543
- Davey M W, van Montagu M, Inze D, Sanmartin M, Kanellis A, Smirnoff N, Benzie I J J, Strain J J, Favell D, Fletcher J, 2000. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *J Sci Food Agr*, **80**: 825~860
- De Gara L, Paciolla C, Tommasi F, Liso R, Arrigoni O, 1994. 'In vivo' inhibition of galactono-1,4-lactone conversion to ascorbate by lycorine. *J Plant Physiol*, **144**: 649~653
- Eskling M, Arvidsson P O, Akerlund H E, 1997. The xanthophylls cycle, its regulation and components. *Physiol Plant*, **100**: 806~816
- Foyer C H, Lelandais M, 1996. A comparison of the relative rates of transport of ascorbate and glucose across the thylakoid, chloroplast and plasmalemma membranes of pea leaf mesophyll cells. *J Plant Physiol*, **148**: 391~398
- Franceschi V R, Tarlyn N M, 2002. L-ascorbic acid is accumulated in source leaf phloem and transported to sink tissues in plants. *Plant Physiol*, **130**: 649~656
- Horemans N, Asarda H, Caubergs R J, 1994. The role of ascorbate free radical as an electron acceptor to cytochrome *b*-mediated transplasma membrane electron transport in higher plant. *Plant Physiol*, **104**: 1455~1458
- Horemans N, Asarda H, Caubergs R J, 1998. Carrier mediated uptake of dehydroascorbate into higher plant plasma membrane vesicles shows trans-stimulation. *FEBS Lett*, **421**: 41~44
- Imai T, Karita S, Shiratori G, Hattori M, Nunome T, Oba K, Hirai M, 1998. L-Galactono-1,4-lactone dehydrogenase from sweet potato: purification and cDNA sequence analysis. *Plant Cell Physiol*, **39**: 1350~1358
- Innocenti A M, Bitonti M B, Arrigoni O, Liso R, 1990. The size of the quiescent center in roots of *Allium cepa* L. growth with ascorbic acid. *New Phytol*, **114**: 507~509
- Isherwood F A, Chen Y T, Mapson L W, 1954. Synthesis of L-ascorbic acid in plants and animals. *Biochem J*, **56**: 1~21
- Jain A K, Nessler C L, 2000. Metabolic engineering of an alternative pathway for ascorbic acid biosynthesis in plants. *Mol Breed*, **6**: 73~78
- Karpinski S, Escobar C, Karpinska B, Creissen G, Nullenax P M, 1997. Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in *Arabidopsis* during excess light stress. *Plant Cell*, **9**: 627~640
- Kato N, Esaka M, 1999. Changes in ascorbate oxidase gene expression and ascorbate levels in cell division and cell elongation in tobacco cells. *Physiol Plant*, **105**: 321~329
- Kerk N M, Jiang K, Feldman L J, 2000. Auxin metabolism in the root apical meristem. *Plant Physiol*, **122**: 925~932
- Kerk N M, Feldman L J, 1995. A biochemical model for the initiation and maintenance of the quiescent center: implications for organisation of root meristems. *Development*, **121**: 2825~2833
- Keller R, Springer F, Renz A, Kossmann J, 1999. Antisense inhibition of the GDP-mannose pyrophosphorylase reduces the ascorbate content in transgenic plants leading to developmental changes during senescence. *Plant J*, **19**: 131~141
- Kollist H, Moldau H, Oksanen E, Vapaavuori E, 2001. Ascorbate transport from the apoplast to the symplast in intact leaves. *Physiol Plant*, **113**: 377~383
- Lin L S, Varner J E, 1991. Expression of ascorbic acid oxidase in zucchini squash (*Cucurbita pepo* L.). *Plant Physiol*, **96**: 159~165
- Liebler D C, Kling D S, Reed D J, 1986. Antioxidants protection of phospholipid bilayer by  $\alpha$ -tocopherol. Control of

- $\alpha$ -tocopherol status and lipid peroxidation by ascorbic acid and glutathione. *J Biol Chem*, **261**: 12114~12119
- Loewus F A, 1963. Tracer studies on ascorbic acid formation in plants. *Phytochemistry*, **2**:109~128
- Loewus F A, 1999. Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants and of analogs of ascorbic acid in fungi. *Phytochemistry*, **52**:193~210
- Loewus M W, Bedgar D L, Saito K, Loewus F A, 1990. Conversion of L-sorbose to L-ascorbic acid by a NADP-dependent dehydrogenase in bean and spinach leaf. *Plant Physiol*, **94**:1492~1495
- Lukaszewski K M, Blevins D G, 1996. Root growth inhibition in boron-deficient or aluminum-stressed squash may be a result of impaired ascorbate metabolism. *Plant Physiol*, **112**:1135~1140
- Mapson L W, Isherwood F A, 1956. Biological synthesis of ascorbic acid: the conversion of derivatives of D-galacturonic acid into L-ascorbic acid by plant extracts. *Biochem J*, **64**:151~157
- Mishra N P, Fatma T, Singhal G S, 1995. Development of antioxidative defense system of wheat seedlings in response to high light. *Physiol Plant*, **95**: 77~82
- Miyake C, Asada K, 1992. Thylakoid bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product, monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant Cell Physiol*, **33**: 541~553
- Mozafar A, Oertli J J, 1993. Vitamine C(ascorbic acid): uptake and metabolism by soybean. *J Plant Physiol*, **141**: 316~321
- Mutsaers M, Ishikawa T, Takeda T, Shigeoka S, 1995. Subcellular localization and properties of L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase in spinach leaves. *Biosci Biotechnol Biochem*, **59**: 1983~1984
- Müller-Moule P, Conklin P L, Niyogi K K, 2002. Ascorbate deficiency can limit violaxanthin de-epoxidase activity *in vivo*. *Plant Physiol*, **128**:970~977
- Noctor G, Foyer C H, 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **49**: 249~279
- Ostergaard J, Persian G, Davey M W, Bauw G, van Montagu M, 1997. Isolation of a cDNA coding for L-galactono- $\gamma$ -lactone dehydrogenase, an enzyme involved in the biosynthesis of ascorbic acid in plants. *J Biol Chem*, **272**: 30009~30016
- Oba K, Ishikawa S, Nishikawa M, Mizuno H, Yamamoto T, 1995. Purification and properties of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis, from sweet potato roots. *J Biochem*, **117**: 120~124
- Padh H, 1990. Cellular functions of ascorbic acid. *Biochem Cell Biol*, **68**:1166~1173
- Pallanca J E, Smirnoff N, 1999. Ascorbic acid metabolism in pea seedlings. A comparison of D-glucosone, L-sorbose, and L-galactono-1,4-lactone as ascorbate precursors. *Plant Physiol*, **120**:453~461
- Pallanca J E, Smirnoff N, 2000. The control of ascorbic acid synthesis and turnover in pea seedlings. *J Exp Bot*, **51**: 669~674
- Potters G, Horemans N, Caubergs R J, Asard H, 2000. Ascorbate and dehydroascorbate influence cell cycle progression in a tobacco cell suspension. *Plant Physiol*, **124**: 17~20
- Rautenkrantz A A F, Li L, Machler F, Martinon E, Oertli J J, 1994. Transport of ascorbic and dehydroascorbic acids across protoplast and vacuole membranes isolated from barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Gerbel) leaves. *Plant Physiol*, **106**:187~193
- Schnarrenberger C, Flechner A, Martin W, 1995. Enzymatic evidence for a complete oxidative pentose phosphate pathway in chloroplasts and incomplete pathway in the cytosol of spinach leaves. *Plant Physiol*, **108**:609~614
- Smirnoff N, 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Ann Bot*, **78**: 661~669
- Smirnoff N, 2000. Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Phil Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci*, **355**: 1455~1464

- Smirnoff N, Conklin P L, Loewus F A, 2001. Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. *Annu Rev Plant Mol Biol Plant Physiol*, **52**: 437~445
- Siendones E, Gonzalez-Reyes J A, Santos-Ocana C, Navas P, Cordoba F, 1999. Biosynthesis of ascorbic acid in kidney bean; L-galactono- $\gamma$ -lactone dehydrogenase is an intrinsic protein located at the mitochondrial inner membrane. *Plant Physiol*, **120**: 907~912
- Tabata K, Oba K, Suzuki K, Esaka M, 2001. Generation and properties of ascorbic acid-deficient transgenic tobacco cells expressing antisense RNA for L-galactono-1,4 -lactone dehydrogenase. *Plant J*, **27**: 139~148
- Veljovic-Jovanovic S D, Pignocchi C, Noctor G, Foyer C H, 2001. Low ascorbic acid in the *vtc1* mutant of *Arabidopsis* is associated with decreased growth and intracellular redistribution of the antioxidant system. *Plant Physiol*, **127**: 426~435
- Wheeler G L, Jones M A, Smirnoff N, 1998. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*, **393**: 365~369
- Yabuta Y, Motoki T, Yoshimura K, Takeda T, Zshikawa T, Shigeoka S, 2002. Thylakoid membrane-bound ascorbate peroxidase is a limiting factor of antioxidative systems under photo-oxidative stress. *Plant J*, **32**: 915~925
- Yabuta Y, Yoshimura K, Takeda T, Shigeoka S, 2000. Molecular characterization of tobacco mitochondrial L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase and its expression in *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol*, **41**: 666~675

## 第七届国际植物抗寒会议概况

(北京林业大学生物科学与技术学院 100083, 卢存福 E-mail:lucunfu@bjfu.edu.cn)

低温寒害是农林业生产中一种严重的自然灾害,世界每年因此造成的损失十分巨大,据统计达 2 000 亿美元。查明植物抗寒性形成的生理机制及其遗传因素,不仅在理论上具有重要的科学意义,在解决生产实际问题上也具有广泛的应用价值。国际植物抗寒会议(International Plant Cold Hardiness Seminar)由美国明尼苏达大学李本湘教授和日本北海道大学酒井昭教授发起,是世界上研究植物抗寒性的科学家进行学术交流和切磋的盛会。1977年在明尼苏达召开第一届会议;之后,1981年在日本札幌召开第二届会议;1986年在中国上海召开第三届会议;1991年在瑞典乌普萨拉召开了第四届会议;1996在美国Corvallis召开的是第五届会议;2001年在芬兰赫尔辛基召开了第六届会议;第七届会议于2004年7月10-15日在日本札幌北海道大学召开。向本届大会赞助、捐款的单位有日本科学促进会,北海道地区国立农业研究中心,北海道大学农学院,日本电子公司,日本植物科学基金会等18个单位。来自美国、英国、日本、德国、法国、加拿大、芬兰、挪威、瑞典、波兰、西班牙和中国等12个国家的99名代表参加了本届学术会议。从本届会议的大会报告和提交的论文来看,植物抗寒领域的研究主要集中在以下6个方面:1.信号转导和基因调节;2.基因组学和代谢组学;3.低温抗性的遗传学和遗传应用;4.低温驯化的生理生化;5.木本植物低温适应的机理;6.冰冻伤害和低温驯化的膜生物学。上述6个方面也是本届会议的大会报告主题。信号转导和基因调节,基因组学和代谢组学,已成为本领域的研究热点。新技术和新方法及时应用到了植物抗寒性研究领域,如美国、加拿大和德国科学家合作,已经用代谢组学的技术研究低温锻炼后拟南芥代谢物的变化,以新的视角探讨植物抗寒性形成的机理。美国科学家Thomashow领导的研究小组,已经用基因芯片技术在拟南芥筛选克隆新的抗寒基因。在历时5天的会议中共有32篇论文进行了大会报告;同时,还有61篇论文以墙报的形式进行了展示。与会科学家进行了广泛的学术交流和讨论,会议开得既严肃、认真,又气氛热烈,获得了圆满成功。总结本次会议,可以看到,在过去的几年里,在植物抗寒性研究领域取得了快速的和重要的进展。科学家们开始理解植物感知低温信号的机制,鉴定参与低温驯化的基因,以及这些基因调节表达的调控机制;甚至通过基因转化成功地使植物抗寒性得以提高。而植物抗寒性基本机理的进一步深入揭示,很可能对科学的进步及人类的幸福和地球上其他生命的生存意义重大。大会组委会建议并经全体与会科学家表决,全会决定下届国际植物抗寒会议于加拿大Saskatoon召开。