



甜樱桃‘佐藤锦’果实生长发育过程 AsA 含量及其相关酶活性的变化

夏 惠¹, 林 玲², 高 帆², 倪知游², 高丽扬², 吕秀兰¹, 梁 东^{1*}

(1 四川农业大学 果蔬研究所, 成都 611130; 2 四川农业大学 园艺学院, 成都 611130)

摘 要:以黄肉甜樱桃品种‘佐藤锦’为材料, 测定了其果实生长发育过程中抗坏血酸(AsA)和谷胱甘肽(GSH)的含量变化, 及其相关代谢酶 L-半乳糖脱氢酶(GalDH)、L-半乳糖-1-4-内酯酶(GalLDH)、单脱氢抗坏血酸还原酶(MDHAR)、脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)、谷胱甘肽还原酶(GR)和过氧化物酶(APX)的活性变化, 分析它们在果实生长发育过程中对 AsA 积累所起的作用。结果表明: (1) ‘佐藤锦’果实生长发育过程中总抗坏血酸(T-AsA)、还原型抗坏血酸(AsA)、脱氢抗坏血酸(DHA)、氧化型谷胱甘肽(GSSG)含量均在花后 0 d 最高, 随后持续下降, 而总谷胱甘肽(T-GSH)和还原型谷胱甘肽(GSH)含量先升后降。 (2) 随着果实生长发育, AsA 和 DHA 的单果积累量均持续增加, 且在果实第二次快速生长期增幅最大; 各相关代谢酶活性在甜樱桃果实生长发育过程中呈现出不同的变化趋势, 其中 GalLDH、MDHAR 和 DHAR 的活性变化同 AsA 含量变化趋势基本一致。 (3) 相关性分析发现, GalLDH、MDHAR 和 DHAR 的活性与 AsA 含量呈极显著正相关关系, 说明它们是影响甜樱桃果实 AsA 含量的关键酶。

关键词: 甜樱桃; 果实; 抗坏血酸; 代谢酶活性

中图分类号: Q945.6⁺4 **文献标志码:** A

Changes of AsA Content and Related Enzyme Activities in Sweet Cherry ‘Satonishiki’ Fruit during Development

XIA Hui¹, LIN Ling², GAO Fan², NI Zhiyou², GAO Liyang², LÜ Xiulan¹, LIANG Dong^{1*}

(1 Institute of Pomology and Olericulture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; 2 College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: In this paper, the contents of ascorbic acid (AsA), glutathione (GSH), and related enzyme activities of L-galactose dehydrogenase (GalDH), L-galactono-1-4-lactone dehydrogenase (GalLDH), monodehydroascorbate reductase (MDHAR), dehydroascorbate reductase (DHAR), glutathione reductase (GR) and ascorbic acid peroxidase (APX) were investigated during the fruit development in sweet cherry ‘Satonishiki’. The results showed that: (1) the contents of total AsA, AsA, DHA and GSSG was the highest at the 0 day after anthesis (DAA), and then decreased persistently. However, the contents of total GSH and GSH was first increased and then decreased. (2) The accumulation of AsA and GSH increased during the whole growth process of sweet cherry fruit, especially during the second rapid growth period of fruit development. Different enzymes involved in metabolism of AsA showed different patterns

收稿日期: 2016-06-01; 修改稿收到日期: 2016-10-24

基金项目: 四川省教育厅重点项目(16ZAA0024); 四川农业大学学科建设双支计划(2015 年)

作者简介: 夏 惠(1978—), 女, 博士, 副研究员, 主要从事果实品质调控研究。E-mail: susanxia_2001@163.com

* 通信作者: 梁 东, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事果实品质调控研究。E-mail: liangeast@sina.com

during the development of sweet cherry fruit, but the changes of GalLDH, MDHAR and DHAR activities were similar to that of AsA. (3) The correlation analysis showed that they had a significantly positive correlation with the content of AsA, which indicated that they may be the key enzymes of AsA accumulation in sweet cherry fruit.

Key words: sweet cherry; fruit; ascorbic acid; enzyme activity

抗坏血酸(ascorbic acid, AsA)又名维生素 C (Vc),是植物代谢过程中合成的小分子物质,在植物体内起着重要作用,是重要的抗氧化剂、酶的辅因子、电子供体,影响植物种子发芽^[1]、根系生长发育^[2]、开花^[3]、成熟和衰老^[4]等,并在维持光合作用、保护光合器官中起重要作用^[5]。在人体上,AsA 能作为抗氧化剂消除活性氧对组织细胞的损伤^[6],参与神经递质、胶原质和脂类的代谢^[7],促进人体对锌和铁的吸收^[8]。AsA 是人类正常生长发育所必需的化合物,但人类不能直接合成,因而只能从其它物质中获取,蔬菜及水果则成为人类摄取 AsA 的主要来源,AsA 含量的高低更成为衡量果蔬品质高低的重要指标之一。

植物 AsA 的积累是一个动态变化的结果,它在不断合成的同时又在不断地被氧化,氧化的产物可再生为 AsA,也可进一步分解代谢。AsA 的合成存在多种途径,其中 L-半乳糖途径是高等植物中首先发现的合成途径,也是 AsA 合成的主要途径^[9]。这一途径中 D-葡萄糖经一系列反应生成 L-半乳糖,通过 L-半乳糖脱氢酶(L-galactose dehydrogenase, GalDH)和 L-半乳糖-1-4-内酯酶(L-galactono-1-4-lactone dehydrogenase, GalLDH)完成两步脱氢反应,最终合成 AsA。而 AsA 的再生途径主要依赖于 AsA-GSH 的循环,该途径中抗坏血酸过氧化物酶(ascorbic acid peroxidase, APX)以 AsA 为电子供体清除活性氧,同时 AsA 被氧化成单脱氢抗坏血酸(monodehydroascorbate, MDHA),MDHA 极不稳定,一部分可通过单脱氢抗坏血酸还原酶(monodehydroascorbate reductase, MDHAR)还原成 AsA,另一部分则可通过非酶歧化反应生成等量的 AsA 和脱氢抗坏血酸(dehydroascorbate, DHA),DHA 可被脱氢抗坏血酸还原酶(dehydroascorbate reductase, DHAR)还原为 AsA,也可被进一步分解,DHA 还原为 AsA 的过程会将谷胱甘肽(glutathione, GSH)氧化为氧化型谷胱甘肽,又被谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)还原成 GSH,最终完成循环,提高 AsA 的积累量。

甜樱桃属蔷薇科(Rosaceae)李属(*Prunus* L.)

樱亚属(*Cerasus*)植物,是人类重要的 Vc 来源。然而,目前对甜樱桃果实 AsA 的研究仅仅涉及到不同品种含量的测定和比较,对甜樱桃果实发育期 AsA 积累特性的研究鲜有报道。‘佐藤锦’果肉为黄色,果皮带红晕,是四川主要的黄肉甜樱桃品种。本试验以甜樱桃品种‘佐藤锦’为材料,研究其果实发育过程中 AsA、GSH 的含量及合成与再生途径相关酶的活性变化,分析它们在果实生长发育过程中对 AsA 积累所起的作用,为通过生物技术或相应栽培技术手段来提高甜樱桃果实 AsA 含量提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试材及取样

供试材料‘佐藤锦’果实采自四川雅安市汉源县九襄镇甜樱桃示范园,树龄 5~8 年,管理条件一致。采样时间为 2015 年 3~6 月,3 月 27 日,全树 70% 以上的花瓣已脱落记为花后第 0 天,每 10 d 采 1 次样,以单株为试验单元,重复 3 次,每次在同一时间(晴朗天气上午 9:00 开始)从固定单株的不同部位均匀采集样品,每次采样果实至少 30 个,总重量不得低于 300 g,计数和称重后,样品切片混匀(从第 30 天起在果实表面用刀片垂直切取去核),立即用液氮速冻,分装保存于-80 °C 冰箱备用。

1.2 AsA、GSH 含量测定

AsA 含量测定参考 Kampfenkel 等的方法^[10],测 525 nm 处的吸光值,分别计算 AsA 含量和 T-AsA 含量,DHA 含量为 T-AsA 与 AsA 的差值。AsA 积累量为 AsA 含量与果实单果重之积。GSH 含量测定参考 Griffith 的方法^[11],测定 412 nm 处二硫双对硝基苯甲酸的还原量,计算 T-GSH 和 GSSG 的含量。GSH 含量为 T-GSH 含量与 GSSG 含量的差值。GSH 积累量为 GSH 含量与果实单果重之积。

1.3 GalDH 及 GalLDH 活性测定

GalDH 活性参考 Gatzek 等的方法^[12],测定 340 nm 下 NADH 的生成量,定义 1 min 内还原 1 μmol NAD^+ 或生成 1 μmol NADH 为 1 个酶活力单位(U)。GalLDH 活性测定参考 Oba 等的方法^[13],25 °C 下测定 550 nm 处还原态细胞色素 C

(Cyt C)的生成,并定义 1 min 内氧化 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 半乳糖或生成 2 μmol 还原态 Cyt C 为 1 个酶活力单位(U)。

1.4 MDHAR、DHAR、GR 和 APX 活性测定

(1) APX、MDHAR、DHAR 和 GR 酶液的提取:称取 3.0 g 果实,在含 0.1 mmol · L⁻¹ EDTA、0.3% Triton X-100 和 4%(W/V) PVP-40 的磷酸缓冲液(50 mmol · L⁻¹, pH7.5)中研磨成匀浆,定容至 8 mL,于 16 000 ×g、2 ℃离心 15 min,上清液即为酶液。(2) 各种酶活性测定:MDHAR 和 DHAR 活性参考 Ma 和 Cheng 的方法^[14],测定 265 nm 处吸光值变化;GR 活性参考 Ma 和 Cheng 的方法^[14],测定 340 nm 处吸光值的变化;APX 活性参考 Nakano 和 Asada 的方法^[15],测定 290 nm 处吸光值的变化。(3) 酶活性单位定义:氧化 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ AsA 为 1 单位(U) APX 酶活性;氧化 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ NADH 为 1 单位(U)MDHAR 酶活性;还原 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ DHA 为 1 单位(U)DHAR 酶活性;氧化 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ NADPH 为 1 单位(U)GR 酶活性。

1.5 数据处理

试验数据处理采用 Sigma Plot10.0 和 SPSS17 数据处理系统。

2 结果与分析

2.1 甜樱桃果实生长发育过程中 AsA 含量与积累量的变化

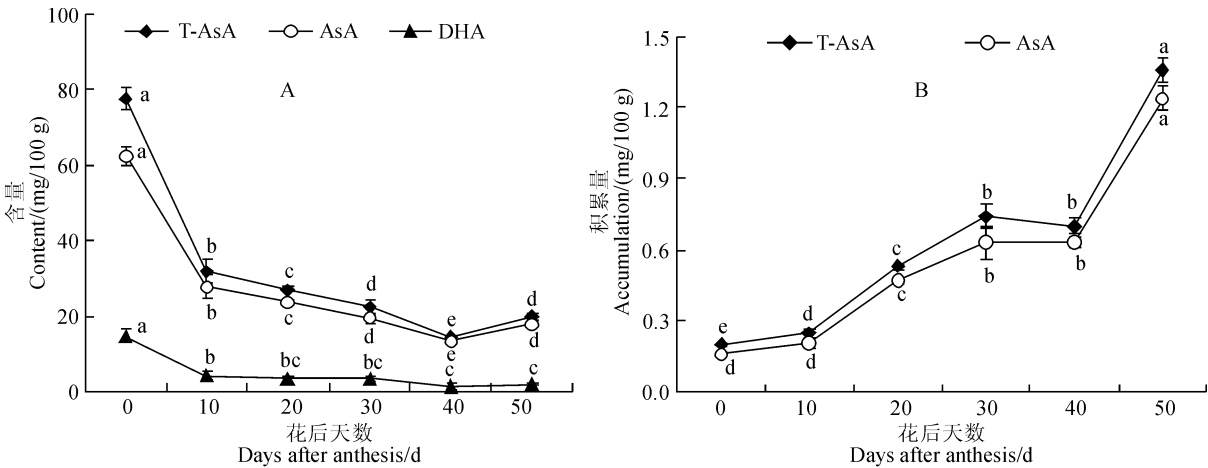
在‘佐藤锦’果实生长发育过程中,甜樱桃果实

中抗坏血酸主要以还原态的 AsA 形式存在,脱氢抗坏血酸(DHA)不足总抗坏血酸含量(T-AsA)的 1/4,且均随生育期表现出下降的趋势(图 1,A)。其中,甜樱桃果实中 T-AsA 和 AsA 含量随生育期的变化趋势基本一致,均在盛花后 0 d 含量最高,在花后 10 d 时分别迅速大幅减少至 0 d 的 59.0%和 55.4%;之后处于缓慢下降期,果实转色后即花后 40 d T-AsA 和 AsA 含量又略有上升;到果实完全成熟时,果实内 T-AsA、AsA 和 DHA 含量分别为花后 0 d 的 25.1%、28.8%和 12.5%。

同时,甜樱桃果实中 AsA 的积累也发生在整个果实生长发育时期,且 T-AsA 和 AsA 积累量的变化趋势相同(图 1,B)。其中,果实的快速生长发育期也是 AsA 积累的高峰期,花后 30 d(第 I 快速生长期)AsA 积累量为花后 10 d 的 3.00 倍,花后 50 d(第 II 快速生长期)AsA 积累量为花后 40 d 的 2.00 倍。‘佐藤锦’甜樱桃果实成熟时 AsA 的积累量达到了每个鲜果 1.24 mg。以上结果说明甜樱桃果实中 T-AsA 和 ASA 含量在子房期最高,随着果实生长发育而下降;而单果抗坏血酸含量则随着果实的生长发育而持续积累。

2.2 甜樱桃果实生长发育过程中 GSH 含量与积累量的变化

‘佐藤锦’果实生长发育过程中,果实 T-GSH 含量从花后 0~20 d 缓慢上升,20~30 d 快速降低,之后波动不大;GSH 含量在花后 0 d 最低,到花后 20 d 时迅速上升到最高值,为花后 0 d 的 3.31 倍,之后 GSH 含量减小,在花后 30 d 后其含量无显著



同一指标内不同字母表示发育时期在 0.05 水平存在显著性差异;下同

图 1 ‘佐藤锦’果实生长发育过程中 AsA 含量和积累水平变化

The different normal letters within the same character indicate significant difference between growth stages at 0.05 level; The same as below

Fig.1 Changes of AsA content and accumulation during fruit growth of ‘Satonishiki’

变化;而氧化型谷胱甘肽(GSSG)含量在花后 0 d 时最高,之后持续减小,直到果实成熟时 GSSG 含量略有升高(图 2,A)。同时,‘佐藤锦’果实 T-GSH 和 GSH 的积累发生在整个生长发育时期(图 2,B),其中的 T-GSH 积累主要发生在花后 0~20 d 及 40~50 d,到果实完全成熟时的积累量为子房时期的 20 倍;果实 GSH 的积累主要发生在花后 0~20 d 和 30~50 d 之间,果实完全成熟时最终 GSH 的积累量为花后 0 d 的 64.25 倍。可见,甜樱桃果实中 T-GSH 和 GSH 含量在果实生长发育期呈反‘S’变化,均在花后 10~20 d 达到最高值,在果实生长中后期含量明显下降;而 T-GSH 和 GSH 在单果中的积累量在整个果实生长过程持续积累。

2.3 甜樱桃果实生长发育过程中 AsA 及 GSH 氧化还原能力变化

AsA/DHA、GSH/GSSG 的大小代表了 AsA 和 GSH 氧化还原程度的高低。由图 3 可知,‘佐藤锦’甜樱桃果实 AsA/DHA 及 GSH/GSSG 比值在

第 I 迅速生长发育期(花后 30 d)缓慢增高,而在花后 30~40 d 果实缓慢生长发育期迅速增高,但到果实第 II 迅速生长发育期(花后 50 d)时 AsA/DHA 迅速降低,而 GSH/GSSG 的仅稍有所降低。另外,在甜樱桃果实生长发育过程中 AsA/DHA 始终明显高于 GSH/GSSG。可见,‘佐藤锦’甜樱桃果实生长发育过程中 AsA、GSH 氧化还原程度表现出升高的趋势,并在花后 30~40 d 升高最快,且 AsA 比 GSH 表现更明显。

2.4 甜樱桃果实生长发育过程中 AsA 关键合成酶活性的变化

GalDH 和 GalLDH 是植物 AsA 合成 L-半乳糖途径中最后两步反应的脱氢酶。如图 4 所示,‘佐藤锦’甜樱桃果实单位鲜重下 GalDH 活性变化幅度较大,其先在果实生长发育初期迅速增强,并于花后 10 d 时活性达到最高值,为 0 d 的 1.6 倍;之后,其活性迅速大幅度下降,花后 30 d 后变动不大。而同期 GalLDH 活性在花后 0 d 最高,并在 0~10 d 快速

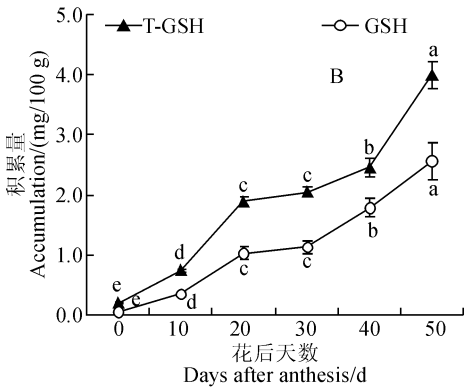
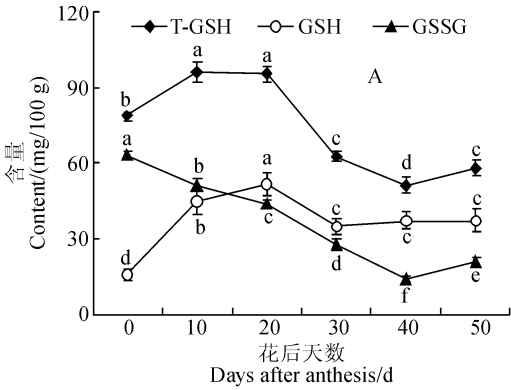


图 2 ‘佐藤锦’果实生长发育过程中 GSH 含量和积累水平变化
Fig. 2 Changes of GSH content and accumulation during fruit growth of ‘Satonishiki’

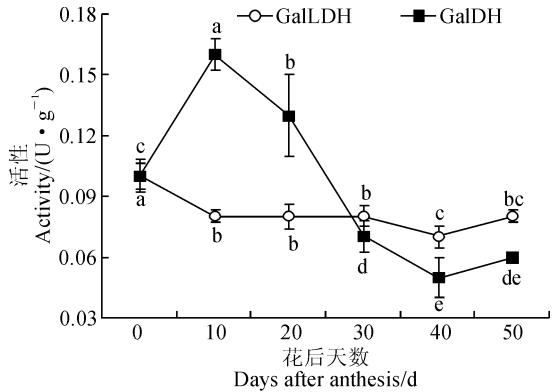
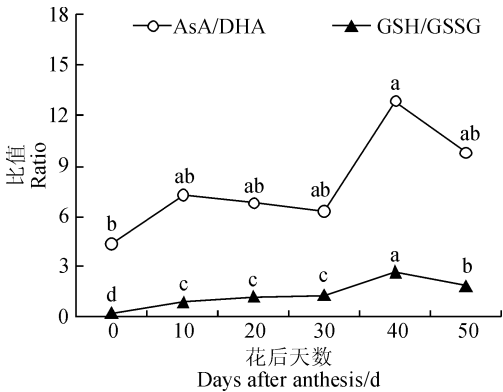


图 3 ‘佐藤锦’果实生长发育过程中 AsA、GSH 氧化还原状态比值的变化
Fig. 3 Changes of AsA/DHA ratio and GSH/GSSG ratio during fruit growth of ‘Satonishiki’

图 4 ‘佐藤锦’果实生长发育过程中 AsA 关键合成酶活性的变化
Fig. 4 Enzyme activities involved in AsA biosynthesis during fruit growth of ‘Satonishiki’

显著下降,但在花后 10 d 以后至果实完全成熟均无显著变化。因此,可以推测 GalLDH 是 AsA 合成途径中的限速酶,直接影响果实中 AsA 含量。

2.5 甜樱桃果实生长发育过程中 MDHAR、DHAR、GR 和 APX 活性的变化

AsA 在 APX 的作用下被氧化生成 MDHA,最终生成 DHA,而 MDHA 和 DHA 又可分别被 MDHAR、DHAR 催化使 AsA 得以再生。图 5 显示,APX 活性在‘佐藤锦’甜樱桃果实生长发育过程中变化幅度较大并维持在很高水平,其先在果实第 I 迅速生长发育期持续上升,于花后 30 d 活性达到最大值,此时为 0 d 的 2.94 倍,之后 10 d 内迅速下降至接近 0 d 水平,最终在花后 50 d 时活性显著低于子房时期(0 d)。同时,果实中 MDHAR 和 DHAR 的活性变化趋势基本一致,而且变化幅度较大,它们在花后 0 d 活性最高,随后 10 d 内急速显著下降,花后 10 d 时活性分别比花后 0 d 下降了 72.04%和 68%;之后,2 种酶活性随生育期波动降低,但变化幅度较小,维持在较低水平;在果实发育过程中,MDHAR 活性在花后前 20 d 稍高于 DHAR 活性,之后较明显低于 DHAR 活性。另外,

果实中 GR 活性在甜樱桃果实迅速生长发育期无显著变化,而在果实第II迅速生长发育期和生长发育停滞期活性迅速显著降低。以上结果说明在甜樱桃果实生长发育过程中 AsA-GSH 循环系统中 MDHAR、DHAR 和 GR 的活性呈现出高-低-高-低-高的复杂变化趋势,而 APX 活性比前三者高出 2 倍以上,且变化趋势也与前 3 个酶完全不同,呈单峰形变化。

2.6 甜樱桃果实生长发育过程中 AsA 积累相关指标的相关性分析

通过相关性分析(表 1),结果表明‘佐藤锦’果实生长发育过程中 T-AsA、AsA 和 DHA 含量与 GalLDH、MDHAR 和 DHAR 活性都呈极显著正相关,相关系数均达到 0.92 以上。与 GSSG 含量显著正相关。而 T-GSH 的含量则与 GalDH 活性呈极显著正相关,GSSG 含量与 MDHAR 酶活性呈显著正相关,GSH/GSSG 比值与 MDHAR 和 GR 活性呈显著负相关。结果表明,抗坏血酸合成途径中的 GalLDH 酶活性和 AsA-GSH 循环途径中的 MDHAR 和 DHAR 酶活性对甜樱桃果实 ASA 含量起了关键作用;而果实中 T-GSH 含量依赖于 GalDH 活性。

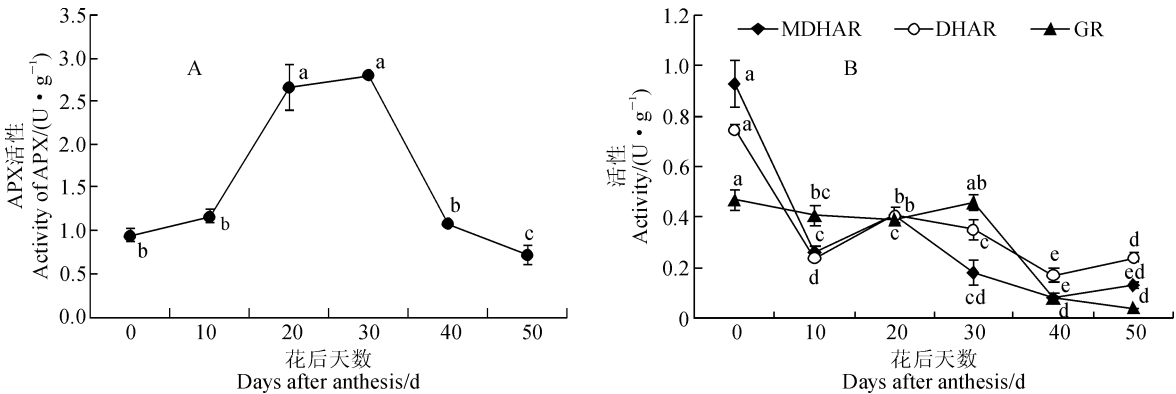


图 5 ‘佐藤锦’果实生长发育过程中 APX 及 AsA-GSH 循环酶活性的变化

Fig. 5 Activities of APX and enzymes involved in AsA-GSH recycle during fruit growth of ‘Satonishiki’

表 1 ‘佐藤锦’果实生长发育过程中 AsA 代谢相关指标的相关性

Table 1 Relation coefficient of related indicators involved in AsA metabolism during fruit growth of ‘Satonishiki’

指标 Indicator	GalLD	GalDH	MDHAR	DHAR	GR	APX
T-AsA	0.958**	0.3002	0.971**	0.930**	0.569	-0.252
AsA	0.959**	0.322	0.970**	0.925**	0.570	-0.259
DHA	0.953**	0.241	0.998**	0.942**	0.573	-0.221
T-GSH	0.341	0.975**	0.446	0.326	0.664	0.251
GSH	-0.716	0.360	-0.626	-0.673	-0.160	0.419
GSSG	0.806	0.761	0.854*	0.763	0.778	-0.013
GSH/GSSG	-0.866*	-0.645	-0.811*	-0.795	-0.842*	-0.114

注: * 表示显著水平 0.05,而 ** 表示显著水平 0.01
Note, * denotes signification at 0.05, while ** denote signification at 0.01

3 讨 论

3.1 甜樱桃果实发育过程中 AsA 的积累特征

AsA 是植物生长发育所必需的物质,其代谢分为合成和降解两个方向,当合成速率大于降解速率时 AsA 就积累。本研究表明,‘佐藤锦’甜樱桃果实单位鲜果重 AsA 含量在花后 0 d 的子房期最高,然后迅速下降。这可能是由于果实细胞处于快速生长发育期,AsA 参与了细胞分裂引起的^[16];也可能是随着细胞的膨大,果实水分加重对 AsA 起到了稀释的作用,水分稀释被认为是导致植物果实发育期 AsA 浓度降低的直接原因^[17]。另外,本研究从花后 40 d 起果实中 AsA 含量开始缓慢上升,推测可能与甜樱桃花色苷的合成有关^[18],AsA 的抗氧化作用有利于花色苷保持稳定状态。

AsA 的积累发生在‘佐藤锦’果实生长发育的整个时期,尤其是快速生长发育期。这与苹果^[19]、桃^[20]、西印度樱桃^[21]果实 AsA 的积累趋势类似;但与此不同的是草莓^[22]、番茄^[23]等 AsA 的积累主要发生在果实生长发育后期,而猕猴桃^[24]、黑加仑^[25]果实则在幼果时期大量积累 AsA。

3.2 甜樱桃果实生长发育过程中 AsA 的合成特征

GalDH 是以半乳糖为底物的脱氢酶,GalLDH 是以半乳糖醛酸内酯为底物的脱氢酶,它们催化合成 AsA 的 L-半乳糖途径中最后两步反应。本研究‘佐藤锦’甜樱桃果实生长发育过程中 GalDH 活性呈先升后降,最后稳定的变化趋势;而 GalLDH 活性在花后 0 d 最高,10 d 以后保持不变。同时,进一步相关性分析表明 GalLDH 活性与 AsA 含量水平

极显著正相关,而 GalDH 活性与 AsA 的含量相关性不显著。因此,推测 GalLDH 可能在甜樱桃果实 AsA 合成过程中起更关键的作用。

3.3 果实生长发育过程中 AsA 的再生

AsA-GSH 循环影响着细胞内 AsA 的再生和积累水平。GSH 含量越高,DHA 还原为 AsA 的可能性越低,AsA 的积累则越少;相反,GSSG 含量越高,AsA 越有可能被积累。本试验中 GSH 与 AsA 水平及 DHAR 活性的相关性不显著,GSH/GSSG 比值低于 AsA/DHA 比值,催化 GSSG 还原为 GSH 的 GR 活性在甜樱桃果实生长发育后期降低,且与 GSH/GSSG 显著负相关,这说明 GSH 水平对 AsA 的代谢活动参与程度不高,对甜樱桃果实生长发育过程中 AsA 的积累不起关键作用。

另外,本研究中甜樱桃果实 APX 活性明显高于其它酶活性,可有效防止活性氧对细胞的毒害。MDHAR 和 DHAR 的活性变化趋势一致,在花后 0 d 的子房时期最高,之后活性降低,与 AsA 的含量变化趋势基本一致。果实生长发育前 20 d MDHAR 活性高于 DHAR 活性,之后 DHAR 活性高于 MDHAR 活性,说明 AsA 含量的高低主要取决于 MDHAR 和 DHAR 的活性。物种不同,AsA 的再生过程中起关键作用的酶则不同,草莓^[22,26]、蓝莓^[27]、番茄^[28-29]、苹果^[19]等果实中 MDHAR 在对 AsA 的循环上起更主要的作用,但对刺梨^[17]果实的研究却发现 DHAR 的反应活性和表达水平均高于 MDHAR,至于甜樱桃果实 MDHAR 和 DHAR 哪个对 AsA 的积累起更关键的作用,还需进一步的研究。

参考文献:

- [1] YE N, ZHU G, LIU Y, *et al.* Ascorbic acid and reactive oxygen species are involved in the inhibition of seed germination by abscisic acid in rice seeds[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, **63**(5): 1 809-1 822.
- [2] BARTH C, GOUZD Z A, STEELE H P, *et al.* A mutation in GDP-mannose pyrophosphorylase causes conditional hypersensitivity to ammonium, resulting in Arabidopsis root growth inhibition, altered ammonium metabolism, and hormone homeostasis[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2010, **61**(2): 379-394.
- [3] KOTCHONI S O, LARRIMORE K E, MUKHERJEE M, *et al.* Alterations in the endogenous ascorbic acid content affect flowering time in Arabidopsis[J]. *Plant Physiology*, 2009, **149**(2): 803-815.
- [4] 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**(1): 11-20.
- [5] IVANOV B N. Role of ascorbic acid in photosynthesis[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2014, **79**: 282-289.
- [6] MANDL J, SZARKA A, BANHEGYI G. Vitamin C: update on physiology and pharmacology[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2009, **157**(7): 1 097-1 110.
- [7] KOJO S. Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress[J]. *Curr Med Chem*, 2004, **11**: 1 041-1 064.
- [8] FROSSARD E, BUCHER M, MACHLER F, *et al.* Potential

- for increasing the content and bioavailability of Fe, Zn and Ca in plants for human nutrition[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, **80**: 861-879.
- [9] WHEELER G L, JONES M A, SMIRNOFF N. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants[J]. *Nature*, 1998, **393**(6 683): 365-369.
- [10] KAMPFENKEL K, VAN MONTAGU M, INZE D. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue[J]. *Analytical Biochemistry*, 1995, **225**: 165-167.
- [11] GRIFFITH O W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine[J]. *Analytical Biochemistry*, 1980, **106**: 207-212.
- [12] GATZEK S, WHEELER G L, SMIRNOFF N. Antisense suppression of L-galactose dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* provides evidence for its role in ascorbate synthesis and reveals light modulated L-galactose synthesis[J]. *The Plant Journal*, 2002, **30**: 541-553.
- [13] OBA K, ISHIKAWA S, NISHIKAWA M, *et al.* Purification and properties of L-galactono-gama-lactone dehydrogenase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis, from sweet potato roots [J]. *Journal of Biochemistry*, 1995, **117**: 120-124.
- [14] MA F, CHENG L. The sun-exposed peel of apple fruit has higher xanthophyll cycle-dependent thermal dissipation and antioxidants of the ascorbate-glutathione pathway than the shade peel[J]. *Plant Science*, 2003, **165**: 819-827.
- [15] NAKANO Y, ASADA K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in Spinach chloroplasts[J]. *Plant Cell Physiology*, 1981, **22**: 867-880.
- [16] VELJOVIC-JOVANOVIC S D, PIGNOCCHI C, NOCTOR G, *et al.* Low ascorbic acid in the vtc-1 mutant of *Arabidopsis* is associated with decreased growth and intracellular redistribution of the antioxidant system[J]. *Plant Physiology*, 2001, **127**(2): 426-435.
- [17] HUANG M, XU Q, DENG X. L-Ascorbic acid metabolism during fruit development in an ascorbate-rich fruit crop chestnut rose (*Rosa roxburghii* Tratt) [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2014, **171**: 1 205-1 216.
- [18] PAGE M, SULTANA N, PASZKIEWICZ K, *et al.* The influence of ascorbate on anthocyanin accumulation during high light acclimation in *Arabidopsis thaliana*: further evidence for redox control of anthocyanin synthesis[J]. *Plant Cell and Environment*, 2012, **35**(2): 388-404.
- [19] LI M, CHEN X, WANG P, *et al.* Ascorbic acid accumulation and expression of genes involved in its biosynthesis and recycling in developing apple fruit[J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2011, **136**(4): 231-238.
- [20] TSUYOSHI I, YUSUKE B, SHINGO T, *et al.* L-Ascorbate biosynthesis in peach: cloning of six L-galactose pathway-related genes and their expression during peach fruit development[J]. *Plant Physiology*, 2009, **136**: 139-149.
- [21] BADEJO A A, JEONG S T, GOTO-YAMAMOTO N, *et al.* Cloning and expression of GDP-D-mannose pyrophosphorylase gene and ascorbic acid content of acerola (*Malpighia glabra* L.) fruit at ripening stages[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2007, **45**(9): 665-672.
- [22] AGIUS F, ARNAYA I, BOTELLA M A, *et al.* Functional analysis of homologous and heterologous promoters in strawberry fruits using transient expression[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, **56**(409): 37-46.
- [23] IOANNIDI E, KALAMAKI M S, ENGINEER C, *et al.* Expression profiling of ascorbic acid-related genes during tomato fruit development and ripening and in response to stress conditions[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, **60**(2): 663-678.
- [24] LI M, MA F, LIANG D, *et al.* Ascorbate biosynthesis during early fruit development is the main reason for its accumulation in kiwi[J]. *PLoS One*, 2010, **5**(12): e14281.
- [25] HANCOCK R D, WALKER PG, PONT S D A, *et al.* L-Ascorbic acid accumulation in fruit of *Ribes nigrum* occurs by in situ biosynthesis via the L-galactose pathway[J]. *Functional Plant Biology*, 2007, **34**(12): 1 080-1 091.
- [26] CRUZ-RUS E, AMAYA I, SANCHEZ-SEVILLA J F, *et al.* Regulation of L-ascorbic acid content in strawberry fruits [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, **62**(12): 4 191-4 201.
- [27] LIU F, WANG L, GU L, *et al.* Higher transcription levels in ascorbic acid biosynthetic and recycling genes were associated with higher ascorbic acid accumulation in blueberry[J]. *Food Chemistry*, 2015, **188**: 399-405.
- [28] STEVENS R, PAGE D, GOUBLE B, *et al.* Tomato fruit ascorbic acid content is linked with monodehydroascorbate reductase activity and tolerance to chilling stress[J]. *Plant Cell and Environment*, 2008, **31**: 1 086-1 096.
- [29] BERMUDEZ L, URIAS U, MILSTEIN D, *et al.* Candidate gene survey of quantitative trait loci affecting chemical composition in tomato fruit[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, **59**: 2 875-2 890.

(编辑:裴阿卫)