

# 内源抗坏血酸对水稻种子萌发及幼苗生长的影响

张启雷, 刘强, 高辉, 陆俐娜, 彭长连\*

(广东省植物发育生物工程重点实验室, 华南师范大学生命科学学院, 广州 510631)

**摘要:** 为了解内源抗坏血酸在水稻(*Oryza sativa*)种子中的作用, 以野生型品种‘中花 11’ (ZH-11)、抗坏血酸合成关键酶 *GLDH* 基因的上调(超表达)株系 GO-2 及下调(干涉)株系 GI-2 为材料, 研究了抗坏血酸含量对其种子萌发和幼苗生长的影响。结果表明, GO-2 株系的种子萌发率比野生型 ZH-11 高 6%, 比干涉型 GI-2 高 60%。外源添加 1 mmol L<sup>-1</sup> 抗坏血酸后, 干涉型 GI-2 萌发率提高了 22%, GO-2 及 ZH-11 则没有明显增加。GO-2 株系在幼苗的根长、株高、分蘖数和鲜重等指标上均高于 ZH-11 和 GI-2。实时荧光定量测定结果表明, GO-2 株系叶片的 *GLDH* 基因表达量显著上调, 而 GI-2 株系则显著下调。这说明抗坏血酸有助于维持水稻种子活力和促进水稻种子发芽和幼苗生长。

**关键词:** 抗坏血酸; *GLDH* 基因; 水稻; 种子萌发; 幼苗生长

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2016.03.005

## Effects of Endogenous Ascorbic Acid on Seed Germination and Seedling Growth of Rice

ZHANG Qi-lei, LIU Qiang, GAO Hui, LU Li-na, PENG Chang-lian\*

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, School of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

**Abstract:** The aim was to understand the function of endogenous ascorbic acid in rice (*Oryza sativa*) seeds. The homozygote transgenic lines GO-2 with the up-regulated *GLDH* (the key enzyme that catalyzes the final step of Asc biosynthesis in plants gene) and GI-2 with the down-regulated *GLDH* had been established from the cultivar ‘Zhonghua 11’ (ZH-11). The effect of endogenous ascorbic acid on seed germination and seedling growth of rice was studied among ZH-11, GO-2 and GI-2. The results showed that the germination rate of GO-2 was 6% and 60% higher than that of wild type (ZH-11), and GI-2, respectively. After treatment with 1 mmol L<sup>-1</sup> exogenous ascorbic acid, the germination rate of GI-2 increased by 22%, but no significant effect was observed in that of GO-2 and the wild type (ZH-11). The root length, plant height, tiller number and fresh weight of seedling in GO-2 were higher than those in ZH-11 or GI-2. The expression of *GLDH* gene in GO-2 leaves was higher than that in ZH-11 or GI-2, too. So, these indicate ascorbic acid plays an important role in maintaining seed vigor and improving germination and seedling growth of rice.

**Key words:** Ascorbic acid; *GLDH* gene; *Oryza sativa*; Seed germination; Seedling growth

抗坏血酸在植物体内具有非常广泛的作用, 在细胞水平上它能促进线粒体的呼吸作用和叶绿体的光

合磷酸化作用<sup>[1]</sup>, 在个体水平它能促进植物的种子萌发及幼苗生长, 改善受精作用和提高作物的产量<sup>[2]</sup>。

收稿日期: 2015-11-10 接受日期: 2015-12-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31270287, 31570398); 广东省自然科学基金重点项目(2015A030311023)资助

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31270287, 31570398), and the Key Program of Natural Science Foundation of Guangdong Province (Grant No. 2015A030311023).

作者简介: 张启雷(1990~), 男, 硕士研究生, 研究方向: 植物生理生态。E-mail: dalei45666@163.com

\* 通信作者 Corresponding author. E-mail: pengchl@scib.ac.cn

作为个体生长的开始, 种子萌发是一个非常复杂而有序的生理过程和形态发生过程, 涉及很多代谢途径, 而影响种子萌发的因素有很多, 包括光照、温度、重金属和 CO<sub>2</sub> 等。如何提高种子活力和萌发率是农业生产上面临的重要问题, 前人已开展了一系列的探索工作<sup>[3]</sup>。近年来, 随着分子生物学技术发展, 已开始借助分子生物学研究手段探究种子萌发机理和调控种子萌发过程<sup>[4-5]</sup>。据报道, 外源添加抗坏血酸可以改善植物种子萌发及幼苗生长状况<sup>[6]</sup>, 这种改善作用可能与抗氰呼吸有关<sup>[7]</sup>。

L-半乳糖途径是抗坏血酸(AsA)合成的重要途径, 其中的 L-半乳糖酸-1,4-内酯脱氢酶(GLDH)是该途径的限速酶。通过分子生物学技术手段, 水稻(*Oryza sativa*)的 L-半乳糖酸-1,4-内酯脱氢酶基因(*GLDH*)上调和下调株系已经成功构建<sup>[8]</sup>。由于 *GLDH* 基因的表达发生变化, 水稻中的抗坏血酸含量与野生型具有显著差异。本研究拟通过测定不同株系的种子萌发率和发芽过程中抗坏血酸含量的变化, 观察不同株系幼苗生长状况, 并统计分蘖数, 研究了抗坏血酸与种子萌发及幼苗生长之间的关系, 为探究抗坏血酸对种子萌发作用机理的研究提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料

水稻(*Oryza sativa*)粳稻品种‘中花 11’ (ZH-11)和在 ZH-11 遗传背景下构建的 *GLDH* 基因超表达株系 GO-2 和干涉株系 GI-2。水稻种子由华南农业大学彭新湘教授实验室提供。

### 1.2 种子萌发

将种子置于 5% (V/V)次氯酸钠溶液中消毒 15~20 min, 然后用超纯水冲洗 3~4 次至无次氯酸钠气味残留, 再置于超纯水中浸泡 12 h 后, 放入烧杯于水浴锅中隔水恒温 36℃ 萌发。

### 1.3 育苗

将萌发 3~4 d 的水稻种子均匀地播种在泡制好的拟南芥土中, 盖上一层保鲜膜保湿, 放置在人工气候培养箱中培养, 控制白天温度 33℃, 晚上 28℃, 日周期 12 h, 湿度 80%。待子叶长出土面后去除保鲜膜, 继续培养, 期间适当浇水。待幼苗长至 15 cm

左右, 移苗于实验田或培养盆中进一步培养。

### 1.4 萌发率的测定

挑选 3 个株系饱满的种子各 100 粒, 将挑选的种子经过消毒、冲洗、浸泡之后, 置于铺好湿滤纸的培养皿中, 加盖双层湿润滤纸, 设置 4 个重复。将培养皿置于培养箱培养, 3 d 后统计萌发率。萌发率 GR=(发芽种子数/供试种子总数)×100%。

### 1.5 抗坏血酸含量的测定

3 种水稻种子进行萌发处理, 3 d 后取发芽一致及未发芽的种子各 25 粒。参照 Gillespie 等<sup>[9]</sup>的方法。称取 0.1 g 种子, 用 1 mL 预冷的 6%三氯乙酸充分研磨、震荡混匀, 4℃、16300×g 离心 10 min, 取上清液加入 2 mL 反应体系中, 37℃水浴 1 h, 用分光光度计检测 525 nm 的吸光值, 每次测定重复 3 次。

### 1.6 幼苗株高及根长的测量

将萌发后的种子播种在拟南芥土中, 放于人工培养箱培养, 10 d 后测量各株系的株高。将萌发的种子放于装有沙子的试管中, 用木村培养液浇灌, 将试管置于人工气候箱培养。5 d 后流水冲去试管内沙子, 取出幼苗测量各株系根长。

### 1.7 分蘖及鲜重的统计

将水稻移栽于水稻培养盆中, 以 3×3 形式共计移栽 9 株水稻, 设置 8 盆水稻作为重复。将移栽好的水稻置于楼顶温室中培养, 30 d 后观察并统计水稻各株系分蘖数。将长势一致的各株系水稻幼苗移栽于试验田, 试验田常规水肥管理, 于移栽后 30 d 统计各株系鲜重情况。

### 1.8 基因的表达

取移栽后 30 d 的水稻叶片进行基因表达量的测定, *GLDH* 引物分别为 *GLDH*-F: 5'-CGGCGGCATCA-TTCAGGTT-3', *GLDH*-R: 5'-AAGCCCACAGCGAG-CAAGATA-3', 内参引物为 *OsUBQ*-F: 5'-CCAGGA-CAAGATGATCTGCC-3', *OsUBQ*-R: 5'-AAGAAGCT-GAAGCATCCAGC-3'。用 7500 Real Time PCR System 进行 PCR 扩增, 结果分析按照 Kenneth 等<sup>[10]</sup>的方法。

### 1.9 数据分析

采用 Excel 2010 进行数据处理, SPSS 19.0 软件

进行单因素方差分析和 LSD 检验, 用 SigmaPlot12.5 绘图。

## 2 结果和分析

### 2.1 种子的萌发

超表达株系 GO-2 和野生型株系 ZH-11 的种子在催芽后第 2 天开始大量萌发, 而干涉型株系 GI-2 只有少量萌发(图 1: A)。在第 3 天时 GO-2 和 ZH-11

的根与芽显著长于 GI-2 (图 1: B), GO-2 和 ZH-11 萌发率均显著高于 GI-2, GO-2 与 ZH-11 萌发率则没有显著差异(图 1: C)。

未发芽种子的还原型抗坏血酸及总抗坏血酸含量均很低, 但 GO-2 和 ZH-11 的显著高于 GI-2 (图 2: B)。催芽后第 3 天 3 个株系已经发芽的种子中总抗坏血酸含量无显著差异, 但还原型抗坏血酸含量存在差异: GO-2 显著高于 GI-2, 而 ZH-11 与 GO-2 和 GI-2 均差异显著(图 2: A)。

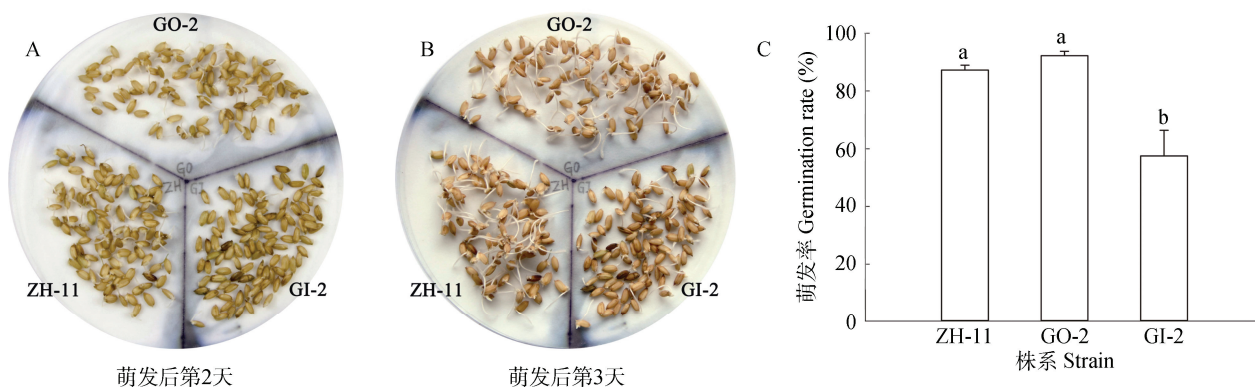


图 1 种子表型和萌发率。柱上不同英文字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。下图同。

Fig. 1 Phenotypic and germination rate of seeds. Different letters above column indicate significant difference at 0.05 level. The same is following Figures.

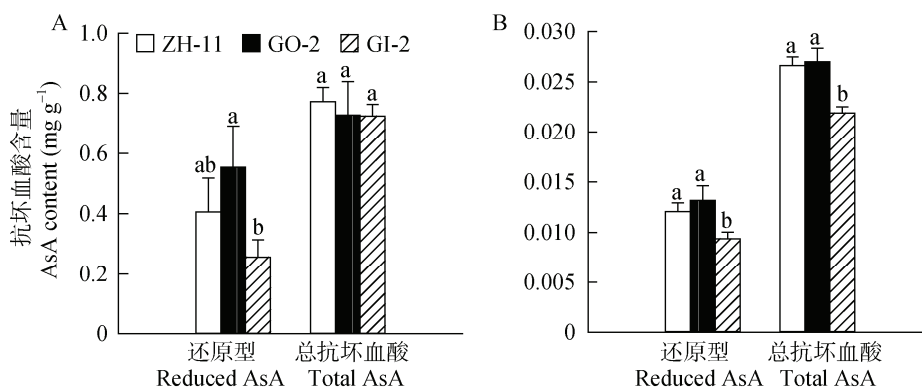


图 2 种子抗坏血酸含量。A: 发芽种子; B: 未发芽种子。

Fig. 2 Ascorbic acid content in seeds. A: Germination seed; B: Ungermination seed.

以蒸馏水作对照, 用  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  抗坏血酸溶液浸泡 3 种株系水稻的种子 12 h 后, GO-2 和 ZH-11 的萌发率没有明显的增加, 但 GI-2 发芽率略有升高(图 3)。

### 2.2.3 种株系水稻幼苗的生长状况

萌发 10 d 后, 干涉型株系 GI-2 幼苗非常瘦小, 超表达型株系 GO-2 幼苗比较粗壮, 野生型株系

ZH-11 幼苗生长状况居两者之间(图 4: A)。GO-2 种子萌发速度快, 出芽迅速、齐整, 幼苗生长速度快, 其株高显著高于野生型及干涉型植株。干涉型株系萌发速度慢, 出芽不齐, 幼苗生长速度缓慢, 株高显著低于野生型及超表达型植株(图 4: B)。从根长结果(图 4: C)可知: GO-2 和 ZH-11 根长均明显长于 GI-2, GO-2 根长短于 ZH-11, 但两者间无显著差异。

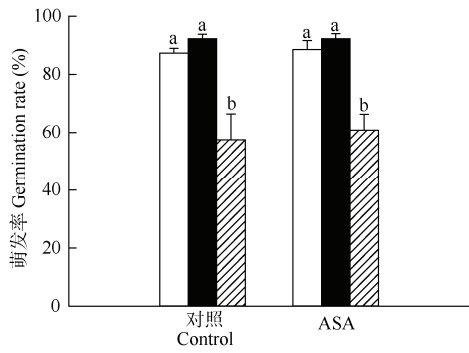


图 3 外源抗坏血酸处理后种子发芽率的变化

Fig. 3 Changes in germination rate treated by 1 mmol L<sup>-1</sup> ascorbic acid

### 2.3 幼苗移栽后生长状况

水稻秧苗移栽 30 d 后, GO-2 的分蘖数显著高于 ZH-11 和 GI-2 (图 5: B)。ZH-11 与 GO-2 的生长状况明显好于 GI-2 (图 5: A), ZH-11 与 GO-2 茎秆粗壮, 生长旺盛, 分蘖较多, 叶片较绿, 株高明显高于 GI-2, 而 GI-2 植株矮小, 分蘖数少, 叶片发黄, 生长状况很差, 部分秧苗黄化后死亡。秧苗株高和鲜重均表现为超表达型株系 GO-2>野生型株系 ZH-11>干涉型株系 GI-2, 且他们之间的差异均显著(图 5: C, D)。

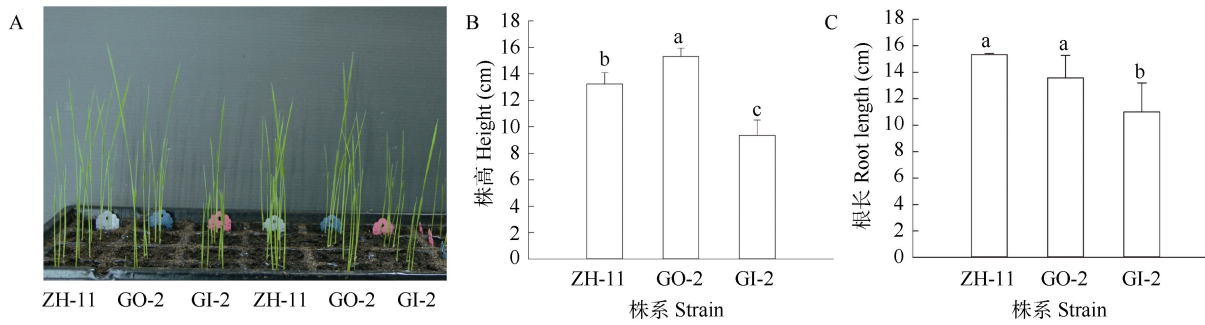


图 4 10 d 幼苗的生长状况和株高及 5 d 幼苗的根长

Fig. 4 Growth and height of 10-day seedlings and root length of 5-day seedlings

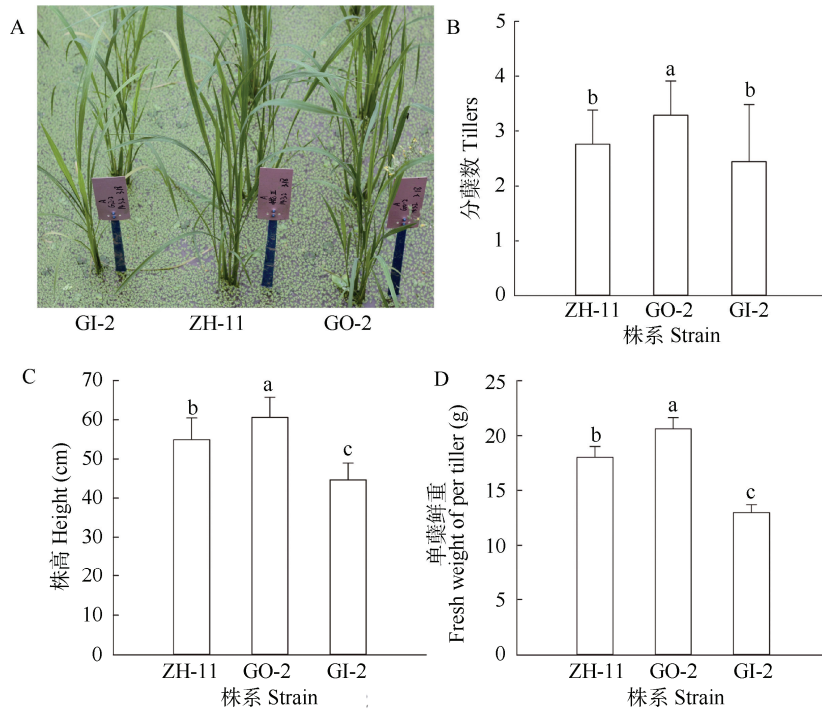


图 5 移栽 30 d 后水稻秧苗的表型、分蘖数、株高及鲜重

Fig. 5 Phenotypic, tiller number, height and fresh weight of rice seedlings transplanted after 30 days



## 2.4 秧苗叶片 *GLDH* 基因的表达

水稻移栽实验田 30 d 后, ZH-11 与 GO-2 的生长状况在表型上明显好于 GI-2 (图 5: A), 叶片的 *GLDH* 基因表达量也是 GO-2 显著高于 ZH-11 和 GI-2, 而 ZH-11 又高于 GI-2 (图 6), 这表明 3 个株系水稻的不同抗坏血酸含量是由于 *GLDH* 基因表达量的差异导致的。

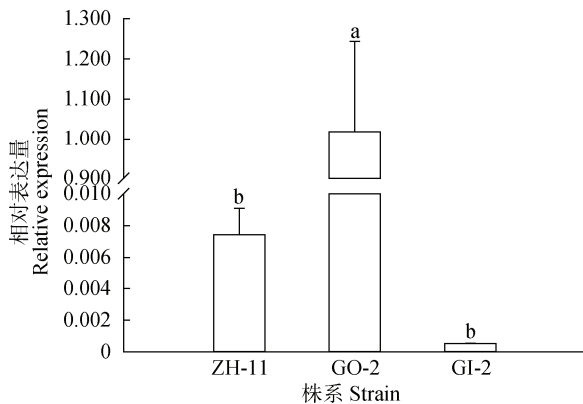


图 6 移栽 30 d 后水稻叶片 *GLDH* 基因的相对表达量

Fig. 6 Relative expression of *GLDH* gene in rice leaves transplanted after 30 days

## 3 讨论

L-半乳糖-1,4-内酯脱氢酶(*GLDH*)是抗坏血酸(AsA)生物合成途径最后一步的关键酶<sup>[11]</sup>, *GLDH* 活性在调节抗坏血酸含量过程中起重要作用<sup>[12]</sup>。种子萌发是高等植物生长发育的起点, 是植物生命史的关键阶段<sup>[13]</sup>。外源抗坏血酸处理能够提高植物种子的萌发率<sup>[14-16]</sup>, 这可能与抗坏血酸增强种子的呼吸作用有关。本研究中超表达株系的发芽率显著高于野生型株系和干涉型株系(图 1), 这与前人报道通过外源施加抗坏血酸的结果一致<sup>[2]</sup>。外源抗坏血酸对种子萌发的影响与其浓度有关, 用  $0.5 \text{ mmol L}^{-1}$  抗坏血酸处理黄芩(*Scutellaria baicalensis*)种子, 促进萌发的作用最明显, 浓度过高的促进效果反而不佳<sup>[17]</sup>。在水稻种子萌发过程中, 随着外源抗坏血酸浓度的增加种子的呼吸作用增强, 抗坏血酸浓度为  $0.01\%$  时最好, 浓度过高会抑制种子的活力<sup>[2]</sup>。本研究用  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  外源抗坏血酸处理 3 个株系水稻种子后, GI-2 株系的发芽率提升了 22% (图 3), 而超表达型株系和野生型株系的发芽率没有明显增加, 表明维持一定水平的抗坏血酸含量是保障水稻种

子正常萌发的基础, 抗坏血酸在种子萌发过程中起着非常重要的作用。种子在储存过程中会不断地衰老, 种子在老化过程中内部会发生一系列的变化, 包括膜脂被氧化和破坏、核酸损伤、酶活性降低、有毒物质的积累等, 最终导致种子活力下降<sup>[18]</sup>。而抗坏血酸是一种抗氧化物质, 能够清除细胞中的活性氧, 而且植物中的抗坏血酸含量与抗逆性呈正相关, 提高抗坏血酸含量或促进氧化态抗坏血酸的还原都能提高植物的抗逆性<sup>[19]</sup>。植物通过合成还原型抗坏血酸来增加总抗坏血酸的含量, 同时也提高了还原型抗坏血酸的比例<sup>[19-20]</sup>。本研究结果还表明, 水稻发芽种子的还原型抗坏血酸含量与种子萌发率呈正相关(图 1, 2)。另一方面, 抗坏血酸能够促进细胞周期的进行, 使感受态细胞由 G1 期进入 S 期, 进而加快细胞的分裂<sup>[19]</sup>。因此, 在一定范围内提高抗坏血酸含量有利于增强种子活力, 提升种子萌发率。

在细胞分裂、分化及伸长的过程中, 抗坏血酸可作为多种酶的辅助因子起到促进的作用<sup>[20]</sup>。在本研究中, GO-2 株系是通过超表达方法提高 *GLDH* 基因表达量, 高的 *GLDH* 表达量(图 6)提高了 *GLDH* 活性和抗坏血酸的合成量。有研究表明, 高抗坏血酸含量能增强细胞的生长能力<sup>[21]</sup>, 因此 GO-2 株系表现出分蘖多、幼苗植株较高等特征(图 5)。相反, 由于 *GLDH* 表达量低(图 6)导致抗坏血酸合成量下降, 干涉型株系 GI-2 表现出幼苗矮小、分蘖少等特征。抗坏血酸参与具有调节细胞周期进程功能的富羟脯氨酸糖蛋白的脯氨酸羟化作用, 它可以促使处于分裂期的感受态细胞由 G1 期进入 S 期, 使不活动中心细胞数量减少。当拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)突变体细胞中抗坏血酸含量较低时, 蛋白质的脯氨酸羟化作用会受到抑制, 进而使细胞分裂进程受阻<sup>[19]</sup>, 细胞生长受到抑制, 导致嫩枝生长速率降低<sup>[22]</sup>。在 *GLDH* 干涉型的烟草(*Nicotiana tabacum*)中, 抗坏血酸含量降低 24%~27%, 则不利于细胞的分化和生长<sup>[23]</sup>。因此, 水稻幼苗抗坏血酸的不足, 可能影响其细胞的分裂与伸长, 导致其生长与分蘖受到明显抑制。除本研究报道 GI-2 株系种子发芽率和幼苗生长状况较差外, Liu 等<sup>[24]</sup>还报道, 与野生型相比, GI-2 株系的开花时间延迟、开花数及结实率明显降低。

综上所述, *GLDH* 超表达株系 GO-2 在种子萌发及幼苗生长上都优于野生型株系 ZH-11 和干涉型株系 GI-2。内源抗坏血酸的增加有利于水稻的生长, 为提高水稻产量打下了良好基础。在农业生产

上, 可以选育抗坏血酸含量高的水稻品种, 这既可以提高种子的萌发率, 也能使幼苗生长得更好。

**致谢** 感谢华南农业大学彭新湘教授提供水稻种子。

## 参考文献

- [1] MAPSON L W. Metabolism of ascorbic acid in plants: Part I. Function [J]. *Annu Rev Plant Physiol*, 1958, 9(1): 119–150. doi: 10.1146/annurev.pp.09.060158.001003.
- [2] SHANG R G, WANG B Y. Effect of L-ascorbic acid on the germination of the old Maca (*Lepidium meyenii* Walp.) seeds [J]. *Seed*, 2013, 32(11): 38–41. doi: 10.3969/j.issn.1001-4705.2013.11.011.  
尚瑞广, 王兵益. 抗坏血酸对玛咖陈种子萌发的影响 [J]. *种子*, 2013, 32(11): 38–41. doi: 10.3969/j.issn.1001-4705.2013.11.011.
- [3] HUANG Z Y, OSBORNE D J. Endo-glycanhydrolases activities in *Artemisia sphaerocephala* (Asteraceae) mucilaginous achene germination process [J]. *Acta Bot Sin*, 2002, 44(6): 753–756.
- [4] LEON-KLOOSTERZIEL K M, van DE BUNT G A, ZEEVAART J A D, et al. *Arabidopsis* mutants with a reduced seed dormancy [J]. *Plant Physiol*, 1996, 110(1): 233–240. doi: 10.1104/pp.110.1.233.
- [5] RAGHAVAN V. Induction of vivipary in *Arabidopsis* by silique culture: implications for seed dormancy and germination [J]. *Amer J Bot*, 2002, 89(5): 766–776. doi: 10.3732/ajb.89.5.766.
- [6] FAN M H, ZHANG Y X, SHI G, et al. Effects of exogenous ascorbic acid on seed germination and growth of *Brassica napus* under seawater stress [J]. *Chin J Oil Crop Sci*, 2009, 31(1): 34–38. doi: 10.3321/j.issn:1007-9084.2009.01.007.  
范美华, 张义鑫, 石戈, 等. 外源抗坏血酸对油菜种子在海水胁迫下萌发生长的影响 [J]. *中国油料作物学报*, 2009, 31(1): 34–38. doi: 10.3321/j.issn:1007-9084.2009.01.007.
- [7] KE D S, SUN G C, WANG A G, et al. Relationship between ascorbic acid and germination of seeds [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2003, 9(5): 497–500. doi: 10.3321/j.issn:1006-687X.2003.05.012.  
柯德森, 孙谷畴, 王爱国, 等. 抗坏血酸与种子萌发的关系 [J]. *应用与环境生物学报*, 2003, 9(5): 497–500. doi: 10.3321/j.issn:1006-687X.2003.05.012.
- [8] YU L, LIU Y H, PENG X X. Cloning, prokaryotic expression of rice L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase gene and preparation of anti-GLDH antibodies [J]. *J Hunan Agri Univ (Nat Sci)*, 2010, 36(4): 381–384,429. doi: 10.3724/SP.J.1238.2010.00381.  
俞乐, 刘拥海, 彭新湘. 水稻 L-半乳糖内酯脱氢酶基因的克隆和原核表达及抗体的制备 [J]. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 2010, 36(4): 381–384,429. doi: 10.3724/SP.J.1238.2010.00381.
- [9] GILLESPIE K M, AINSWORTH E A. Measurement of reduced, oxidized and total ascorbate content in plants [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(4): 871–874. doi: 10.1038/nprot.2007.101.
- [10] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- [11] WHEELER G L, JONES M A, SMIRNOFF N. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants [J]. *Nature*, 1998, 393(6683): 365–369. doi: 10.1038/30728.
- [12] CONKLIN P L. Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants [J]. *Plant Cell Environ*, 2001, 24(4): 383–394. doi: 10.1046/j.1365-3040.2001.00686.x.
- [13] YAN Q Z. *Seed Science* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2001: 91–118.  
颜启传. *种子学* [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 91–118.
- [14] SHEN Y H, XU Z J, LI W H, et al. Effects of vitamin C soaking on germination of alfalfa seeds under different salinity stress [J]. *Seed*, 2009, 28(7): 42–44. doi: 10.3969/j.issn.1001-4705.2009.07.013.  
申玉华, 徐振军, 李文辉, 等. 维生素 C 浸种对盐胁迫下紫花苜蓿种子发芽特性的影响 [J]. *种子*, 2009, 28(7): 42–44. doi: 10.3969/j.issn.1001-4705.2009.07.013.
- [15] YANG P, LUO Q X, ZHANG K K, et al. Effects of exogenous vitamin on germination of cucumber seed in salt stress [J]. *J Changjiang Veget*, 2010(7): 41–42. doi: 10.3865/j.issn.1001-3547.2010.07.024.  
杨萍, 罗庆熙, 张珂珂, 等. 外源维生素对盐胁迫下黄瓜种子萌发及幼苗生长的影响 [J]. *长江蔬菜*, 2010(7): 41–42. doi: 10.3865/j.issn.1001-3547.2010.07.024.
- [16] KHAN A, IQBAL I, SHAH A, et al. Alleviation of adverse effects of salt stress in *Brassica (Brassica campestris)* by pre-sowing seed treatment with ascorbic acid [J]. *Amer-Euras J Agri Environ Sci*, 2010, 7(5): 557–560.
- [17] JIANG X W, LI H Q, WANG J H. Physiological response of *Scutellaria baicalensis* seed germination and seedling to exogenous ascorbic acid under salt stress [J]. *Plant Physiol J*, 2015, 51(2): 166–170. doi: 10.13592/j.cnki.ppj.2014.0501.  
江绪文, 李贺勤, 王建华. 盐胁迫下黄芩种子萌发及幼苗对外源抗坏血酸的生理响应 [J]. *植物生理学报*, 2015, 51(2): 166–170. doi: 10.13592/j.cnki.ppj.2014.0501.
- [18] DONG X H, SONG M. Reasons of seed inferior change and its prevention and restoration [J]. *China Seed Ind*, 2002(1): 39–40. doi: 10.3969/j.issn.1671-895X.2002.01.025.  
董新红, 宋明. 种子劣变的原因及其防止与修复 [J]. *中国种业*, 2002(1): 39–40. doi: 10.3969/j.issn.1671-895X.2002.01.025.

- [19] GALLIE D R. Increasing vitamin C content in plant foods to improve their nutritional value: Successes and challenges [J]. *Nutrients*, 2013, 5(9): 3424–3446. doi: 10.3390/nu5093424.
- [20] GALLIE D R. The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth [J]. *J Exp Bot*, 2013, 64(2): 433–443. doi: 10.1093/jxb/ers330.
- [21] MÜLLER-MOULÉ P, CONKLIN P L, NIYOGI K K. Ascorbate deficiency can limit violaxanthin de-epoxidase activity *in vivo* [J]. *Plant Physiol*, 2002, 128(3): 970–977. doi: 10.1104/pp.010924.
- [22] SMIRNOFF N. The function and metabolism of ascorbic acid in plant [J]. *Ann Bot*, 1996, 78(6): 661–669. doi: 10.1006/anbo.1996.0175.
- [23] TOKUNAGA T, MIYAHARA K, TABATA K, et al. Generation and properties of ascorbic acid-overproducing transgenic tobacco cells expressing sense RNA for L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase [J]. *Planta*, 2005, 220(6): 854–863. doi: 10.1007/s00425-004-1406-3.
- [24] 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 Physiol*, 2001, 127(2): 426–435. doi: 10.1104/pp.010141.
- [25] TABATA K, OBA K, SUZUKI K, et al. Generation and properties of ascorbic acid-deficient transgenic tobacco cells expressing antisense RNA for L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase [J]. *Plant J*, 2001, 27(2): 139–148. doi: 10.1046/j.1365-313x.2001.01074.x.
- [26] LIU Y H, YU L, WANG R Z. Level of ascorbic acid in transgenic rice for L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase overexpressing or suppressed is associated with plant growth and seed set [J]. *Acta Physiol Plant*, 2011, 33(4): 1353–1363. doi: 10.1007/s11738-010-0669-5.