

L-АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА КАК АНТИОКСИДАНТ И СИГНАЛЬНО-РЕГУЛЯТОРНЫЙ АГЕНТ В КЛЕТКАХ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

М. А. ВОЙТЕХОВИЧ¹⁾, В. А. КУЧИНСКАЯ¹⁾,
И. Ю. НОВОСЕЛЬСКИЙ¹⁾, П. В. ГРИУСЕВИЧ¹⁾, В. В. САМОХИНА¹⁾,
В. С. МАЦКЕВИЧ¹⁾, А. И. СОКОЛИК¹⁾, В. В. ДЕМИДЧИК¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Приведен обзор данных о роли аскорбиновой кислоты в качестве важнейшего антиоксиданта и регулятора физиологических процессов у растений. Биосинтез аскорбата у растений идет по нескольким уникальным для них путям, имеется система его транспорта через мембраны. Участие аскорбата в антиоксидантной защите главным образом сводится к его роли в цикле Фойер – Холливела – Асады, детоксицирующем перекись водорода во всех внутриклеточных компартментах, кроме клеточной стенки. Некоторые работы последних лет указывают на прямое участие в транспорте аскорбат-аниона ионных каналов. Появились данные о ранее неизвестных функциях аскорбата, таких как поглощение и метаболизм железа, а также генерация редокс-сигналов. Прооксидантная роль аскорбата пока изучена слабо, однако ряд исследователей считают, что он способен участвовать в синтезе наиболее реакционно-активной формы кислорода – гидроксильного радикала как в норме, так и в патологии. К наиболее важным темам будущих работ можно отнести детализацию функций L-аскорбиновой кислоты в качестве восстановителя железа при поглощении данного металла корнями растений, а также роль аскорбата в индукции Ca^{2+} -сигналов, участвующих в регуляции стрессовых и гормональных ответов.

Ключевые слова: L-аскорбиновая кислота; высшие растения; *Arabidopsis thaliana* (L.); антиоксидантная и прооксидантная роль; Ca^{2+} -сигналы; сигнально-регуляторный агент; гидроксильный радикал.

Образец цитирования:

Войтехович МА, Кучинская ВА, Новосельский ИЮ, Гриусевич ПВ, Самохина ВВ, Мацкевич ВС, Соколик АИ, Демидчик ВВ. L-Аскорбиновая кислота как антиоксидант и сигнально-регуляторный агент в клетках высших растений. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2018;2:27–38.

For citation:

Vaitsiakhovich MA, Kuchinskaya VA, Navaselsky IYu, Hryvusevich PV, Samokhina VV, Mackievic VS, Sokolik AI, Demidchik VV. L-Ascorbic acid as an important antioxidant and signal-regulatory agent in the cells of higher plants. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2018;2:27–38 (in Russ.).

Авторы:

Мария Аркадьевна Войтехович – аспирантка кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.

Виктория Александровна Кучинская – студентка биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.

Илья Юрьевич Новосельский – студент биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.

Полина Вацлавовна Гриусевич – магистрант кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.

Вероника Валерьевна Самохина – аспирантка кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – А. И. Соколик.

Вера Сергеевна Мацкевич – аспирантка кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.

Анатолий Иосифович Соколик – кандидат биологических наук; заведующий научно-исследовательской лабораторией физиологии и биотехнологии растений, доцент кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений, заместитель декана по научно-исследовательской работе биологического факультета.

Вадим Викторович Демидчик – доктор биологических наук, доцент; заведующий кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Authors:

Maryia A. Vaitsiakhovich, postgraduate student at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology. makovitskayama@gmail.com

Victoria A. Kuchinskaya, student at the faculty of biology. kuchinskayava@gmail.com

Ilya Yu. Navaselsky, student at the faculty of biology. ilya.novoselskiy.y@gmail.com

Palina V. Hryvusevich, master's degree student at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology. polinachikun@gmail.com

Veranika V. Samokhina, postgraduate student at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology. veronika.bukhovets@gmail.com

Viera S. Mackievic, postgraduate student at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology. v.mackievic@gmail.com

Anatoly I. Sokolik, PhD (biology); head of the research laboratory of plant physiology and biotechnology, associate professor at the department of plant cell biology and bioengineering, deputy dean for research and development, faculty of biology. sokolik@bsu.by

Vadim V. Demidchik, doctor of science (biology), docent; head of the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology. dzemidchik@bsu.by

L-ASCORBIC ACID AS AN IMPORTANT ANTIOXIDANT AND SIGNAL-REGULATORY AGENT IN THE CELLS OF HIGHER PLANTS

M. A. VAITSIAKHOVICH^a, V. A. KUCHINSKAYA^a,
I. Yu. NAVASELSKY^a, P. V. HRYVUSEVICH^a, V. V. SAMOKHINA^a,
V. S. MACKIEVIC^a, A. I. SOKOLIK^a, V. V. DEMIDCHIK^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: M. A. Vaitsiakhovich (makovitskayama@gmail.com)

This work provides an overview of data regarding ascorbic acid as an essential antioxidant and regulating agent in physiological processes in plants. The biosynthesis of ascorbate in plants occurs via several pathways; it also has its specific systems for membrane transport. The participation of ascorbate in the antioxidative defence mainly comes down to its role in the Foyer – Halliwell – Asada cycle, which is used to neutralize hydrogen peroxide within all intracellular compartments (with the exception of the cell wall). Some recent papers point to the direct involvement of ion channels in the transportation of ascorbate anions. There is evidence of ascorbate's previously unexplored functionality, such as absorption and metabolism of iron, as well as regeneration of redox-signals. The pro-oxidant aspect of ascorbate has not yet been studied in-depth; however, some researchers consider it to be capable of taking part in the synthesis of hydroxyl radicals within both normal and stress conditions. Some of the potential areas of research for the future works pertaining to this topic could include the further specification of ascorbic acid's ability to serve as a reducing agent for iron upon its uptake by the roots, as well as its role in the induction of Ca²⁺-signals, which participate in the regulation of stress and hormonal responses.

Key words: L-ascorbic acid; higher plants; *Arabidopsis thaliana* (L.); antioxidant and prooxidant role; Ca²⁺-signals; signal-regulatory agent; hydroxyl radical.

Введение

L-Аскорбиновая кислота, или аскорбат (АК), является ключевым антиоксидантом, кофактором редокс-ферментов и предшественником биосинтеза некоторых важных метаболитов [1; 2]. Человек полностью зависит от АК, поступающего с пищей, так как не может синтезировать его ввиду отсутствия гулонолактоноксидазы. Эволюционно уровень L-аскорбиновой кислоты увеличивался от эукариотических водорослей и мхов (0,1–1,0 ммоль/л) до высших растений (3–45 ммоль/л), предположительно приобретая роль центрального антиоксиданта клетки в аэробных условиях существования [3].

Исследования физиологических функций L-аскорбиновой кислоты классически сфокусированы на роли этого соединения как антиоксиданта [4]. Накоплено большое количество данных о позитивном влиянии АК на показатели урожая и стрессоустойчивость растений вследствие его антиоксидантных свойств. Общепринятым механизмом, при помощи которого АК может контролировать физиологические процессы, считается его воздействие на уровень H₂O₂ и других активных форм кислорода (АФК), участвующих в клеточном редокс-метаболизме и патофизиологических окислительных процессах. АК через изменение уровня АФК влияет на сигнальные пути ряда важнейших модуляторов стресс-сигналов и фитогормонов (которые стимулируют продукцию АФК), в частности абсцизовой кислоты, этилена, жасмоновой кислоты, салицилата и гиббереллинов [5–8]. Потенциально АК, представленный в растительной клетке в достаточно высоких концентрациях, может иметь собственные системы распознавания (например, на плазматической мембране), напрямую запускающие сигнальные процессы. Однако роль АК как самостоятельного индуктора сигнальных реакций на плазматической мембране и эндомембранах растительной клетки остается малоизученной. В настоящем обзоре приводятся современные данные о биосинтезе, транспорте, распределении, биохимических превращениях и физиологических функциях АК в организме растения, а также рассматривается гипотеза о возможной роли данного вещества в качестве независимого сигнально-регуляторного агента в многоклеточных растительных системах.

Биосинтез L-аскорбиновой кислоты

Синтезировать L-аскорбиновую кислоту способны большинство групп эукариотических организмов. Прокариоты в норме не обладают такой способностью. Дрожжи и многие другие грибы синтезируют аналог АК из арабинозы – D-эритрозоаскорбиновую кислоту, в биосинтезе которой участвует дегидрогеназа арабинозы и оксидаза арабино-1,4-лактона [9]. Многие беспозвоночные и рыбы не синтезируют

аскорбиновую кислоту. Тем не менее к ее синтезу способны большинство позвоночных (амфибии, рептилии, птицы, млекопитающие). Однако среди последних имеются исключения – приматы, морские свинки и человек, которые утратили способность синтезировать АК в процессе эволюции [10]. Место локализации биосинтеза L-аскорбиновой кислоты варьирует среди царств. У животных она синтезируется в печени, а на клеточном уровне ее производство завершается в эндоплазматическом ретикулуме. У растений синтез АК заканчивается в митохондриях, в дыхательной электротранспортной цепи комплекса I. Неизвестно, что повлияло на такое распределение, но существуют предположения о том, что АК был напрямую интегрирован в функционирование растительных митохондрий [4].

У животных присутствует только один путь синтеза АК – глюкуроновый. Он начинается с преобразования ферментами D-глюкозы до образования УДФ-D-глюкуроновой кислоты через посредников в виде D-глюкозо-6-фосфата, D-глюкозо-1-фосфата и УДФ-D-глюкозы [11]. От УДФ-D-глюкозы с помощью глюкуроно-1-фосфат-уридилтрансферазы и глюкурокиназы удаляется УДФ. Полученная в результате этого D-глюкуроновая кислота претерпевает инверсию углеродного скелета, восстанавливаясь до L-гулоната. При этом альдегидная группа при C1 глюкуроната в молекуле образовавшегося гулоната становится гидроксиметилевой, располагаясь при C6. После взаимодействия с альдонолактолазой L-гулонат превращается в лактоновую форму – L-гулоно-1,4-лактон. Завершающей реакцией пути является его окисление L-гулоно-1,4-лактонооксидазой до L-аскорбиновой кислоты. Именно из-за мутаций в гене, кодирующем этот фермент, человек не способен синтезировать АК [5]. У животных синтез аскорбиновой кислоты может происходить также по пути, в котором интермедиатом является D-галактуроновая кислота (рис. 1) [10].

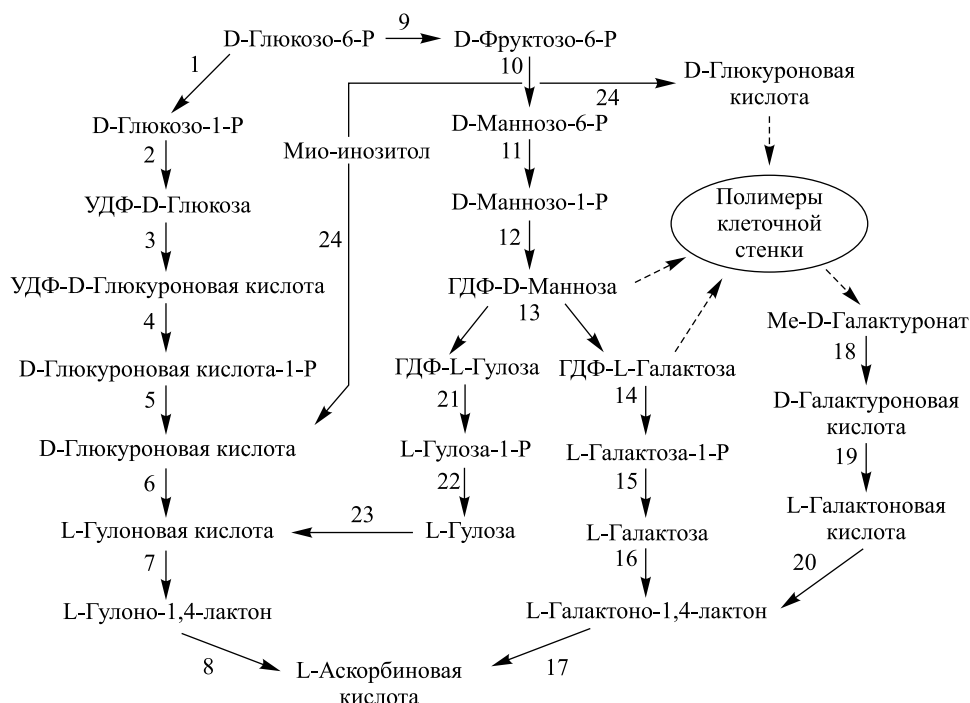


Рис. 1. Пути биосинтеза L-аскорбиновой кислоты у животных (реакции 1–8) и растений (реакции 9–24).

Ферменты: 1 – фосфоглюкомутаза; 2 – УДФ-глюкозопирофосфорилаза; 3 – УДФ-глюкозодегидрогеназа;

4 – глюкуроно-1-фосфат-уридилтрансфераза; 5 – глюкуронокиназа; 6 – глюкуронатредуктаза;

7 – альдонолактоназа; 8 – гулоно-1,4-лактондегидрогеназа; 9 – глюкозо-6-фосфатизомераза;

10 – маннозо-6-фосфатизомераза; 11 – маннозофосфатмутаза; 12 – ГДФ-маннозопирофосфорилаза;

ГДФ-маннозо-3',5'-эпимераза; 14 – фосфодиэстераза; 15 – сахарная фосфатаза; 16 – L-галактозодегидрог

-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа; 18 – метилэстераза; 19 – D-галактуронатредуктаза; 20 – альдонолак

21 – фосфодиэстераза; 22 – сахарная фосфатаза; 23 – L-гулозодегидрогеназа; 24 – мио-инозитолоксигеназа

Fig. 1 Biosynthetic pathways of L-ascorbic acid in animals (reactions 1–8) and plants (reactions 9–24)

Fig. 1. Biosynthetic pathways of E-ascorbic acid in animals (reactions 1-8) and plants (reactions 9-24). Enzymes catalyzing the numbered reactions are: 1 - phosphoglucumutase; 2 - UDP-glucose pyrophosphorylase;

Enzymes catalyzing the numbered reactions are: 1 – phosphoglucomutase; 2 – UDP-glucose pyrophosphorylase; 3 – UDP-glucose dehydrogenase; 4 – glucuronate-1-phosphate uridylyltransferase; 5 – glucurono kinase.

3 - G6P-glucose dehydrogenase; 4 - glucuronate-1-phosphate uridylyltransferase; 5 - glucuronate kinase; 6 - glucuronate reductase; 7 - aldono-lactonase; 8 - gulono-1,4-lactone dehydrogenase.

9 – glucose-6-phosphate isomerase; 10 – mannose-6-phosphate isomerase; 11 – phosphomannomutase;

GDP-mannose pyrophosphorylase (mannose-1-phosphate guanylyltransferase); 13 = GDP-mannose-30 50-epim

15 = sugar phosphatase: 16 = L-galactose dehydrogenase: 17 = L-galactono-1,4-lactone dehydratase

18 = methyl esterase: 19 = D-galacturonate reductase: 20 = aldono-lactonase: 21 = phosphodiesterase:

22 – sugar phosphatase: 23 – L-gulose dehydrogenase: 24 – myo-inositol oxygenase

22 sugar phosphatase, 23 L-galactose dehydrogenase, 24 myo-inositol oxygenase

В отличие от единственного пути синтеза L-аскорбиновой кислоты у животных растения синтезируют АК как минимум двумя путями [1; 12]. Первый и основной – внутриклеточный путь Смирнова – Уилера (предложен в 1998 г.), локализованный в цитоплазме и митохондриях [1]. Этот путь начинается не от УДФ-D-глюкуроната, как у животных, а от образования ГДФ-D-маннозы с помощью поэтапного ферментативного превращения D-глюкозы. Следующим шагом является образование ГДФ-L-галактозы из-за 3'-5'-эпимеризации ГДФ-D-маннозы. Удалением из нее ГДФ получается L-галактоза. Путь завершается взаимодействием последней с L-галактозодегидрогеназой, которая расположена на внешней стороне внутренней мембраны митохондрий, и образованием L-галактоно-1,4-лактона, окисляемого до L-аскорбата L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназой [6].

Во втором пути биосинтеза АК задействована D-глюкуроновая кислота, получаемая из разложения пектинов и полимеров клеточной стенки [12; 13]. Она преобразуется в эфир – метилгалактуронат, который превращается в L-галактонат через две реакции, катализируемые метилэстеразой и D-галактуронатредуктазой. Из него посредством альдонолактоназы получается L-галактоно-1,4-лактон, который, как и в пути Смирнова – Уилера, окисляется до L-аскорбиновой кислоты [7]. Важно отметить, что D-глюкуронат, используемый в этом пути, также может быть получен из мио-инозитола путем взаимодействия с мио-инозитолоксигеназой [8].

У растений описан еще один предложенный путь биосинтеза АК, своего рода «ответвление» от пути Смирнова – Уилера, достигающееся 5'-эпимеризацией ГДФ-D-маннозы в ГДФ-L-гулозу ГДФ-маннозо-3',5'-эпимеразой, с последующим образованием L-гулозы в результате реакций, катализируемых фосфодиэстеразой и сахарной фосфатазой [14]. Образованная L-гулоза затем конвертируется в L-гулонат L-гулозодегидрогеназой, после чего АК синтезируется теми же реакциями, что и в глюкуроновом пути животных [7].

Для синтеза АК используется только 1 % запасов глюкозы [6]. Если считать началом пути синтеза D-1-маннозу, то на выходе получаются 1 НАДН и восстановленный цитохром, а для работы ферментов требуется всего лишь 1 ГТФ [6]. Учитывая малые энергетические затраты на синтез, низкую токсичность и небольшие размеры молекулы АК, можно объяснить ее высокую концентрацию в клетках [3].

Различия в пути биосинтеза АК животных и растений показывают, насколько сильно эти два царства удалились друг от друга в процессе эволюции. Несовпадения можно проследить, начиная с первичных субстратов (D-глюкозо-1-фосфат у животных и D-фруктозо-6-фосфат у растений) и заканчивая локализацией образования АК (эндоплазматический ретикулум у животных и митохондрии у растений). В биосинтезе АК растений не участвуют уроновые кислоты и не происходит инверсии углеродного скелета, как у животных [8]. Однако не все элементы путей различны. Например, во всех путях последним этапом синтеза является окисление альдоно-1,4-лактона до L-аскорбиновой кислоты с вовлечением в процесс дегидрогеназы [15]. Помимо этого, как животными, так и растениями для получения D-глюкуроновой кислоты может использоваться мио-инозитол [8].

Содержание L-аскорбиновой кислоты в различных органах, тканях и клеточных компартментах

В растениях L-аскорбиновая кислота находится в нескольких состояниях – окисленном, восстановленном и в виде нестабильных радикалов, а также в свободном и связанном [16]. АК содержится во всех типах растительных тканей, но практически отсутствует в сухих семенах. Это может быть вызвано недостатком воды во время фазы десикации семян в процессе их созревания, что, в свою очередь, прекращает работу аскорбат-глутатионного цикла и регенерацию АК [1]. Во внеклеточном пространстве содержание АК в 5–10 раз меньше, чем внутри клетки [4]. АК пересекает клеточные мембраны с помощью специальных транспортеров и может накапливаться в разных отделах клетки. В клетках фотосинтезирующих тканей он в наибольших количествах содержится в хлоропластах и цитоплазме, где его концентрация составляет 25–50 ммоль/л [17]. В митохондриях эта концентрация ниже. Самые обедненные аскорбиновой кислотой отделы клетки – вакуоль и клеточная стенка. В них содержание данной кислоты обычно составляет 0,1–0,5 ммоль/л. Количественные показатели содержания АК в корне изучены меньше, но известно, что его уровень выше в молодых корнях [18].

В цитоплазме и органеллах преобладает восстановленная форма аскорбиновой кислоты (80–90 % от общей суммы), а в вакуолях и клеточных стенках – окисленная форма, дегидроаскорбат (ДАК) [10]. Восстановление АК из ДАК происходит за счет фермента дегидроаскорбатредуктазы (ДАКР). Отсутствие данного фермента в апопласте означает, что как только АК выходит из клетки, он подвергается окислению до ДАК. Таким образом, ДАК является преобладающей формой в апопласте, а при переносе ее обратно в цитоплазму вновь восстанавливается до L-аскорбиновой кислоты [4].

Антиоксидантные и прооксидантные свойства L-аскорбиновой кислоты

У растений антиоксидантные свойства АК связаны с целым рядом процессов, но наиболее важным и широко признанным является передача электронов в цикле Фойер – Холливела – Асады, также известном как аскорбат-глутатионовый цикл [2; 19; 20] (рис. 2). Цикл Фойер – Холливела активен внутри клетки, где он участвует в детоксикации супероксидного анионного радикала ($O_2^{\cdot -}$), который генерируется в результате «утечки» электронов на триплетный кислород (O_2) в фотосинтетической, митохондриальной, пероксисомальной и, возможно, других электронтранспортных цепях. Аскорбат-пероксидаза использует два электрона от двух молекул АК для восстановления H_2O_2 до H_2O . Эта реакция приводит к формированию моногидроаскорбат-анионного радикала, который также известен как аскорбильный радикал ($Asc^{\cdot -}$). Последний достаточно стабилен и постепенно претерпевает ферментативное или неферментативное восстановление с использованием электронов восстановленного глутатиона, другой молекулы $Asc^{\cdot -}$ или некоторых восстанавливающих агентов. Дисмутация $Asc^{\cdot -}$ приводит к формированию и накоплению ДАК, который может быть восстановлен и заново использован растением. Аскорбат-пероксидаза – обильный фермент хлоропластов, митохондрий, пероксисом, она также представлена в цитоплазме и апопласте, обеспечивает АК-зависимый контроль уровня H_2O_2 и редокс-контроль уровня АК [21].

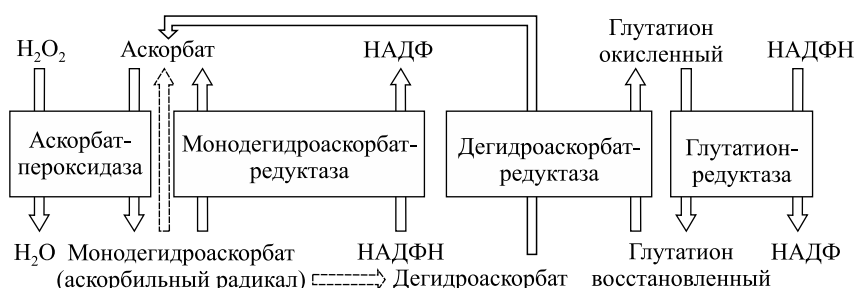


Рис. 2. Цикл Фойер – Холливела – Асады или аскорбат-глутатионовый цикл (пунктирная стрелка указывает на неферментативные реакции)

Fig. 2. Foyer – Halliwel – Asada cycle also known as ascorbate-glutathione cycle (dotted arrow indicates non-enzymatic reactions)

АК является важным для процессов регенерации α -токоферола (витамина Е) в фотосинтетических мембранах и участвует как кофактор фермента виолаксантиндеэпоксидазы, вовлеченного в защиту фотосинтетического аппарата от избыточного освещения, обеспечиваемую ксантофилловым циклом [1; 3].

В водных растворах при физиологических значениях pH L-аскорбиновая кислота представлена в виде одновалентного АК-аниона, который легко отдает электроны окисленным молекулам и выступает «скавенджером» (связывающим агентом) АФК [22]. Например, АК способен напрямую реагировать с большинством важнейших АФК, таких как супероксидный анионный радикал ($O_2^{\cdot -}$), гидроксильный радикал ($HO^{\cdot}$) и синглетный кислород, а также с окисленными производными липидов [22; 23]. Более того, АК выступает в роли важнейшего восстанавливающего агента для железа, меди и, возможно, других металлов с переходной валентностью как внутри клетки, так, вероятно, и снаружи. Восстановленные переходные металлы могут вступать в реакцию с H_2O_2 и вновь окисляться, при этом продуцируя АФК: $Fe^{3+} + K \rightarrow Fe^{2+} + MDAK$; $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\cdot}$; $Cu^{2+} + АК \rightarrow Cu^{+} + MDAK$; $Cu^{+} + H_2O_2 \rightarrow Cu^{2+} + OH^- + OH^{\cdot}$. Эта функция АК имеет прооксидантное значение, так как Cu^{+} и Fe^{2+} являются катализаторами продукции $HO^{\cdot}$, представляющего собой наиболее мощный окислитель среди всех АФК [22; 24; 25]. Некоторые другие антиоксиданты, к примеру глутатион, НАДФН, соли мочевой кислоты и т. д., *in vitro* демонстрируют похожий эффект в присутствии переходных металлов, однако они имеют меньшее сродство. Это может указывать на то, что если АК способен проявлять прооксидантные свойства в живых системах, то на это способны и другие вещества антиоксидантной природы [22]. Таким образом, АК может участвовать в синтезе $HO^{\cdot}$ в присутствии переходных металлов и накапливающегося при стрессе или ростовой реакции H_2O_2 [24; 26–29]. $HO^{\cdot}$ играет важную роль при растяжении клеток и стрессовых ответах [30–32]. Возможно и то, что аскорбиновая кислота, катализирующая синтез $HO^{\cdot}$, способна индуцировать гибель клеток, в особенности в корне, который, вероятно, имеет меньшую антиоксидантную активность апопласта по сравнению с листом [33]. Прооксидантные свойства АК в растениях изучены недостаточно, в то время как его роль в качестве антиоксиданта привлекает внимание многочисленных исследователей и освещена в большом количестве современных обзоров и монографий [2; 22; 34].

Другие функции L-аскорбиновой кислоты

Помимо основной антиоксидантной функции известны другие роли АК в растениях. У некоторых растений он является субстратом для синтеза оксалата и тартрата [1]. АК задействован в делении растительных клеток и может участвовать в регуляции клеточного цикла во время интерфазы, в частности в фазах G1 и S [23]. АК участвует в процессах цветения растений. Показано, что снабжение растений предшественником L-аскорбиновой кислоты, L-галактоно-1,4-лактоном, приводит к задержке цветения по сравнению с таковым у контрольных растений, а дефектные по синтезу АК мутанты *Arabidopsis thaliana* зацветают раньше, чем растения дикого типа. Предполагают, что АК регулирует экспрессию генов и метаболический процесс цветения [23]. Также для АК известна роль в регуляции старения листьев. При его высокой концентрации отмирание листьев наступает позже, чем в листьях с низкой концентрацией. Данный механизм включает в себя реакцию нейтрализации аскорбатом АФК, регулирующих экспрессию генов старения, в комбинации с эффектом, который оказывает АК на синтез фитогормонов старения, таких как этилен [23]. АК может вступать в химические реакции с образованием продуктов, обладающих другими химическими свойствами. Например, при его взаимодействии с индол-3-карбинолом образуется аскорбинген – высокоактивное соединение, характерное в основном для представителей рода *Brassica*, которое участвует в образовании защитных тканей и защите растений от УФ-излучения и патогенов [35].

АК способен контролировать процессы развития растений посредством регуляции уровня биосинтеза фитогормонов [36]. Ряд авторов отмечают положительную корреляцию между высокой активностью АК-оксидазы в клеточной стенке и скоростью роста [12; 37], а также между уровнем синтеза АК и развитой архитектурой корня [38]. В то же время обработка экзогенным АК может приводить в определенных условиях к снижению ростовой активности растений [33]. АК действует как кофактор пролилгидроксилазы, которая гидроксилирует остатки пролина в гидроксипролинобогатых гликопротеинах клеточной стенки, что требуется для растяжения клетки [1]. Однако роль данной реакции АК для ростовых процессов пока не подтверждена экспериментально. АК может влиять на рост посредством стимуляции продукции $\text{HO}^{\bullet}$ при АК-зависимом восстановлении переходных металлов, связанных в клеточной стенке, в частности меди и железа [24; 28; 38–40]. Это может приводить к активации входа Ca^{2+} , индукции АФК- Ca^{2+} хаба (посредством НАДФН-оксидазы), что необходимо для устойчивой генерации АФК и входа Ca^{2+} , стимулирующих экзоцитоз и, таким образом, обеспечивающих включение новых компонентов плазматической мембраны и увеличение клетки в размерах [25; 30]. Несомненно, экзогенный АК также может дополнительно стимулировать фентонзависимое расщепление полимеров клеточной стенки для ее ослабления при растяжении протоплазмы во время роста [31].

Вовлечение АК в регуляцию физиологических процессов у растений при помощи цитоплазматического кальция и АФК

Контроль физиологических процессов при помощи цитоплазматического кальция и АФК имеет центральное значение для выживания и достижения высокой продуктивности у высших растений. Жизнь последних, привязанных к одному месту обитания, принципиально отличается от способа существования животных. Растение преодолевает неблагоприятные внешние влияния (засуха, засоление, резкое изменение температуры), не имея возможности физически избежать их. Поэтому у растений эволюционно выработалась намного более высокая фенотипическая пластичность, чем у животных, а также сформировалась уникальная по возможностям и широте восприятия внешних стимулов сигнальная система [41]. Данная система передает информацию о практически любых изменениях окружающей среды на уровень клетки, ее метаболической активности и экспрессии генов при помощи вторичных посредников. Цитоплазматический Ca^{2+} и АФК являются важнейшими вторичными посредниками между средой и растительной клеткой [42]. Изменение уровня Ca^{2+} в цитоплазме участвует в кодировании внешних сигналов (первичных посредников), переводя их на уровень специфического физиологического ответа. Специфичность возникающей в цитоплазме Ca^{2+} -волны (ее пространственно-временные параметры) не только обеспечивает запуск реакций на конкретные стрессоры или фитогормоны, но и определяет особенности роста и развития растений [43]. Обнаружено, что Ca^{2+} и АФК могут участвовать как в физиологических процессах, связанных со стрессом, так и в процессах роста, развития и дифференцировки клеток и тканей, в гравитропизме, запрограммированной клеточной гибели, дальнем транспорте веществ, активности фотосинтетического аппарата, систем поглощения минеральных элементов и воды [44]. Выявлено 7 классов специализированных Ca^{2+} -связывающих белков (вместе около 500 генов), функционирующих как одно-, двух- и трехкомпонентные системы, ответственные за трансдукцию Ca^{2+} -сигнала в цитоплазме [25].

Между повышением уровня Ca^{2+} в цитоплазме и генерацией АФК при стрессе и в ходе растяжения клетки во время роста существует тесная взаимосвязь. Известно, что Ca^{2+} -проницаемые катионные каналы активируются внеклеточными АФК, в частности гидроксильными радикалами и пероксидом водорода [28; 30; 44; 45]. В то же время вход Ca^{2+} в цитоплазму через катионные каналы приводит к активации НАДФН-оксидаз – ключевых ферментов синтеза АФК ($\text{O}_2^{\cdot-}$) – в ответ на стрессовые и ростовые стимулы в результате реакции с Ca^{2+} -связывающим EF-мотивом данных ферментов на цитоплазматической стороне [46; 47]. В настоящее время идентифицированы конкретные пары НАДФН-оксидаза / катионный канал (семейств CNGC и GLR), участвующие в формировании своего рода усилителя Ca^{2+} - и АФК-сигналов – АФК- Ca^{2+} хаба [25]. АК – необходимый компонент генерации $\text{HO}^{\cdot}$ в цикле Хабера – Вайса, протекающем в апопласте [26]. В этом случае он выступает восстановителем переходных металлов (главным образом Cu^{+2+} , Fe^{2+3+}), передающих электрон на кислород в H_2O_2 с образованием $\text{HO}^{\cdot}$ [22]. Таким образом, сигнальная роль выделяющегося при стрессе АК практически неизбежна. Гипотетически выделение АК может вызывать синтез $\text{HO}^{\cdot}$ и активацию Ca^{2+} -проницаемых каналов. Это объясняет универсальность реакций АФК- Ca^{2+} хаба практически для любых стрессоров и ростовых стимулов. С использованием эквиринной люминометрии и техники пэтч-кламп была показана закономерность сигнально-регуляторного влияния L-аскорбиновой кислоты на уровень активности Ca^{2+} в цитоплазме клеток высших растений (рис. 3) [48].

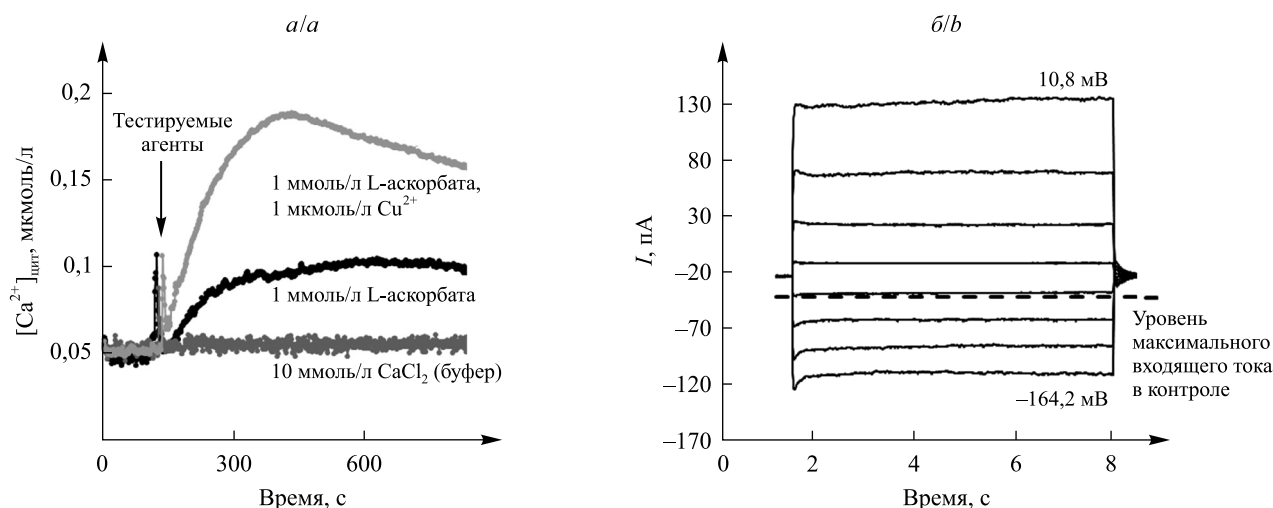


Рис. 3. Данные люминометрических и электрофизиологических тестов, демонстрирующие воздействие L-аскорбиновой кислоты на систему Ca^{2+} -сигнализации и выходящий поток АК из клеток корня *Arabidopsis thaliana* L.: а – типичные кривые временного хода увеличения цитоплазматической активности ионов кальция ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$) в ответ на введение в наружный раствор 10 ммоль/л CaCl_2 (контрольные условия), 1 ммоль/л L-аскорбиновой кислоты (визуализация типичного эффекта аскорбата) и смеси, генерирующей гидроксильные радикалы (1 ммоль/л L-аскорбата, 1 мкмоль/л CuCl_2). Использовались стандартная Ca^{2+} -эквиринная люминометрия и растения, конститутивно экспрессирующие экворин. Базовый раствор во всех опытах содержал 10 ммоль/л CaCl_2 , pH 6,0 (2 ммоль/л трис, 4 ммоль/л мес); б – типичное семейство токовых кривых, полученных в условиях доминирования выходящего потока АК-аниона. Использовалась стандартная методика пэтч-кламп. Пунктирной линией обозначен уровень максимально входящего (негативного) тока в контроле. Раствор пэтч-кламп пипетки содержал: 40 ммоль/л NaOH, 40 ммоль/л L-Asc, 10 ммоль/л NaCl, 0,75 Bapta, 0,3 ммоль/л CaCl_2 , 10 ммоль/л трис. Наружный раствор имел следующий состав: 20 ммоль/л CaCl_2 , 0,1 ммоль/л NaCl, 1 ммоль/л трис, 2 ммоль/л мес. Произведена коррекция значений фиксируемого напряжения с использованием JPCalc. Шаг фиксируемого напряжения 20 мВ. Потенциал фиксации 90 мВ

Fig. 3. The data of luminometric and electrophysiological tests demonstrating the effect of L-ascorbic acid on the Ca^{2+} signaling system and the efflux of ascorbate from the root cells of *Arabidopsis thaliana* L.: а – typical $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ transients induced by 10 mmol/L CaCl_2 (control), 1 mmol/L L-ascorbic acid (typical effect of ascorbate) and mixture generating hydroxyl radicals (1 mmol/L L-ascorbate, 1 $\mu\text{mol/L}$ CuCl_2). The standard Ca^{2+} -aequorin luminometry was used with plants constitutively expressing apoaequorin. The bathing solution contained 10 mmol/L CaCl_2 , pH 6.0 adjusted by 2 mmol/L Tris, 4 mmol/L Mes; б – typical Asc⁻ efflux currents through the plasma membrane of the protoplasts isolated from the *Arabidopsis thaliana* root epidermis. The standard patch-clamp techniques were used. The dashed line indicates the level of the maximum inward (negative) current in control conditions. The standard bathing solution comprised 20 mmol/L CaCl_2 , 0.1 mmol/L NaCl, 1 mmol/L Tris, 2 mmol/L Mes. The pipette solutions (PSs) included 40 mmol/L NaOH, 40 mmol/L L-Asc, 10 mmol/L NaCl, 0.75 Bapta, 0.3 mmol/L CaCl_2 , 10 mmol/L Tris. Holding voltages were corrected by the JPCalc command in Clampex 10.6. The step of the fixed voltage was 20 mV. The fixation potential was 90 mV

Установлено, что АК индуцирует рост активности цитоплазматического Ca^{2+} в результате гидроксил-зависимой активации Ca^{2+} -проницаемых катионных каналов. Эти эффекты блокировались антиоксидантами, антагонистами Ca^{2+} -каналов и хелатированием внеклеточных ионов меди и железа. Показано, что введение в среду ионов переходных металлов усиливает АК-индуцируемые Ca^{2+} -пики. Известно, что апопласт представляет собой один из наиболее обильных по содержанию пулов Cu^{+2+} и $\text{Fe}^{2+/3+}$ в растительной клетке [49; 50]. Данные металлы связываются с элементами клеточной стенки, такими как пектин, гемицеллюлоза и лигнин [27; 34; 51]. Обычно активность свободных Cu^{+2+} и $\text{Fe}^{2+/3+}$ в апопласте низка, однако их каталитическая активность (которая даже может усиливаться в органических комплексах) достаточно высока и может возражать под действием абиотических стрессов, например во время засухи [52–54]. Это указывает на важность синтеза гидроксильных радикалов и особую роль переходных металлов в АК-зависимой сигнализации (рис. 4). Были также зарегистрированы выходящие трансмембранные токи АК-аниона, которые ответственны за выброс АК в стрессовых и других физиологических реакциях. Это согласуется с предположением, согласно которому АК является восстановителем переходных металлов в клеточной стенке и, выходя в апопласт при стрессе, способен повышать их активность. Высвобождение АК из клеток может быть опосредовано анионными каналами. Отрицательные значения мембранного потенциала на плазматической мембране ризодермальных клеток составляют от -120 до -160 мВ [55; 56]. Это создает движущую силу для массивного наружу-направленного потока Ascor^- по градиенту его электрохимического потенциала через анионные каналы плазматической мембраны. Анионные каналы растений представлены тремя основными классами, кодируемыми генами, – ALMT (ALuminum-activated Malate Transporters), CLC (ChLoride Channel) и SLAC (SLOW Anion Channel associated) [57]. Среди перечисленных анионных каналов только ALMT обладают способностью к проведению выходящего потока крупных органических анионов с быстрой кинетикой активации в корне. Данные каналы уникальны для растений, так как схожих генов не обнаружено в геномах животных, грибов или бактерий [57].

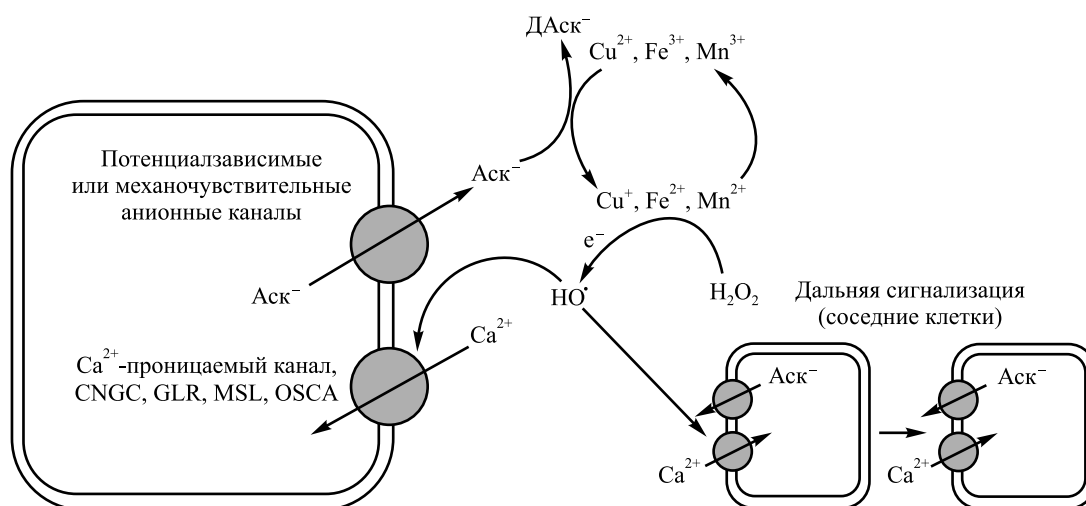


Рис. 4. Схема АК-индуцированной Ca^{2+} -сигнализации в растительных тканях

Fig. 4. Scheme of the ascorbate- Ca^{2+} signaling in plant tissues

Выводы

В данном обзоре аскорбиновая кислота рассматривается как жизненно важный метаболит, необходимый для регуляции основных физиолого-биохимических процессов в растениях. Биосинтез АК у растений идет по нескольким уникальным для них путям, имеется система транспорта АК через мембраны. Некоторые современные работы указывают на вовлечение в транспорт АК анионных каналов, т. е. системы, отличающейся максимальной скоростью переноса через мембрану. Накопленные литературные данные свидетельствуют о том, что L-аскорбиновая кислота – многофункциональное соединение, участвующее в регуляции уровня АФК, окислительно-восстановительных реакциях, фотосинтезе, прорастании семян, цветении, поддержании стабильности мембран, запрограммированной клеточной гибели и т. д. В последние годы появились данные о ранее неизвестных функциях АК, таких как поглощение и метаболизм железа, а также генерация редокс-сигналов. Прооксидантная роль АК мало изучена, однако ряд исследователей считают, что он способен участвовать в синтезе наиболее реакционно-активной АФК – гидроксильного радикала как в норме, так и в патологии. Гидроксил может оказывать «позитивное» влияние

на организм, например при реализации программ роста и развития, участвовать в активации полярного входа Ca^{2+} и размягчении клеточной стенки, необходимых для роста клетки растяжением. В то же время «негативное» воздействие АК-зависимого синтеза гидроксила, вызывающего гибель клеток и отмирание тканей, наблюдается при чрезмерной продукции супероксидного радикала, избытке переходных металлов, а также мощных стрессовых воздействиях.

Ввиду неполной изученности влияния АК на физиологические процессы в растениях его дальнейшее исследование представляется весьма актуальным. К наиболее важным вопросам будущих исследований можно отнести детализацию функций АК в качестве восстановителя железа при поглощении данного металла корнями растений, а также роль АК в индукции Ca^{2+} -сигналов, участвующих в регуляции стрессовых и гормональных ответов.

Библиографические ссылки

1. Smirnoff N, Wheeler GL. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2000;19:267–290. DOI: 10.1080/10409230008984166.
2. Foyer CH, Noctor G. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology*. 2011;155(1):2–18. DOI: 10.1104/pp.110.167569.
3. Gest N, Gautier H, Stevens R. Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule? *Journal of Experimental Botany*. 2013;64(1):33–53. DOI: 10.1093/jxb/ers297.
4. Smirnoff N. Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. *Free Radical Biology and Medicine*. 2018. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.033.
5. Linster CL, Van Schaftingen E. Vitamin C: Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *FEBS Journal*. 2007;274(1):1–22. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2006.05607.x.
6. Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*. 1998;393:5. DOI: 10.1038/30728.
7. Akram NA, Shafiq F, Ashraf M. Ascorbic acid—a potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*. 2017;8:613. DOI: 10.3389/fpls.2017.00613.
8. Valpuesta V, Botella MA. Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: new pathways for an old antioxidant. *Trends in Plant Science*. 2004;9(12):573–577. DOI: 10.1016/j.tplants.2004.10.002.
9. Davey MW, Montagu MV, Inzé D, Sanmartin M, Kanellis A, Smirnoff N, et al. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000;80(7):825–860. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<825::AID-JSFA598>3.0.CO;2-6.
10. Шарова ЕИ. *Антиоксиданты растений*. Санкт-Петербург: Издательство Санкт-Петербургского государственного университета; 2016.
11. Smirnoff N. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany*. 1996;78(6):661–669. DOI: 10.1006/anbo.1996.0175.
12. Gallie DR. L-ascorbic acid: a multifunctional molecule supporting plant growth and development. *Scientifica (Cairo)*. 2013;2013:1–24. DOI: 10.1155/2013/795964.
13. Loewus FA, Kelly S. The metabolism of D-galacturonic acid and its methyl ester in the detached ripening strawberry. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1961;95:483–493.
14. Wolucka BA, Van Montagu M. GDP-Mannose 30,50-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the novo biosynthesis of vitamin C in plants. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(48):47483–47490. DOI: 10.1074/jbc.M309135200.
15. Wheeler G, Ishikawa T, Pornsaksit V, Smirnoff N. Evolution of alternative biosynthetic pathways for vitamin C following plastid acquisition in photosynthetic eukaryotes. *Evolutionary Biology, Plant Biology*. 2015;4. DOI: 10.7554/eLife.06369.
16. Чупахина ГН. *Система аскорбиновой кислоты растений*. Калининград: Калининградский государственный университет; 1997.
17. Zechmann B, Stumpe M, Mauch F. Immunocytochemical determination of the subcellular distribution of ascorbate in plants. *Planta*. 2011;233(1):1–12. DOI: 10.1007/s00425-010-1275-x.
18. Tedone L, Hancock RD, Alberino S, Haupt S, Viola R. Long-distance transport of L-ascorbic acid in potato. *BMC Plant Biology*. 2004. DOI: 10.1186/1471-2229-4-16.
19. Foyer CH, Halliwell B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*. 1976;133(1):21–25. DOI: 10.1007/BF00386001.
20. Foyer CH, Halliwell B. Purification and properties of dehydroascorbate reductase from spinach leaves. *Phytochemistry*. 1977;16(9):1347–1350. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)88779-8.
21. Ozyigit II, Filiz E, Vatansever R, Kurtoglu KY, Koc I, Öztürk MX, et al. Identification and comparative analysis of H_2O_2 -scavenging enzymes (ascorbate peroxidase and glutathione peroxidase) in selected plants employing bioinformatics approaches. *Front Plant Science*. 2016;22(7):301. DOI: 10.3389/fpls.2016.00301.
22. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine. Fifth edition*. [Oxford]: Oxford University Press Science; 2015;4. p.155–199.
23. Zhang Y. Biological role of ascorbate in plants. In: *Ascorbic acid in plants. Springer Briefs in Plant Science*. New York: Springer; 2013. p.7–33. DOI: 10.1007/978-1-4614-4127-4_7.
24. Demidchik V. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*. 2015. Vol. 109. P. 212228. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2014.06.021.
25. Demidchik V, Shabala S. Mechanisms of cytosolic calcium elevation in plants: the role of ion channels, calcium extrusion systems and NADPH oxidase-mediated «ROS- Ca^{2+} Hub». *Functional Plant Biology*. 2018;45:9–27. DOI: 10.1071/FP16420.
26. Fry SC. Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *The Biochemical Journal*. 1998;332:507–515.

27. Fry SC, Miller JG, Dumville JC. A proposed role for copper ions in cell wall loosening. *Plant and Soil*. 2002;247(1):57–67. DOI: 10.1023/A:1021140022082.
28. Demidchik V, Shabala SN, Coutts KB, Tester MA, Davies JM. Free oxygen radicals regulate plasma membrane Ca^{2+} - and K^{+} -permeable channels in plant root cells. *Journal of Cell Science*. 2003;116:81–88.
29. Cosgrove DJ. Catalysts of plant cell wall loosening. *F1000 Faculty Reviews*. 2016;5:119. DOI: 10.12688/f1000research.7180.1.
30. Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, Mylona P, Miedema H, Torres MA, et al. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*. 2003;422:442–446. DOI: 10.1038/nature01485.
31. Müller K, Linkies A, Vreeburg RA, Fry SC, Krieger-Liszka A, Leubner-Metzger G. *In vivo* cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress seed germination and elongation growth. *Plant Physiology*. 2009;150:1855–1865. DOI: 10.1104/pp.109.139204.
32. Richards SL, Wilkins KA, Swarbreck SM, Anderson AA, Habib N, Smith AG, et al. The hydroxyl radical in plants: from seed to seed. *Journal of Experimental Botany*. 2015;66:37–46. DOI: 10.1093/jxb/eru398.
33. Qian HF, Peng XF, Han X, Ren J, Zhan KY, Zhu M. The stress factor, exogenous ascorbic acid, affects plant growth and the antioxidant system in *Arabidopsis thaliana*. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2014;61(4):467–475. DOI: 10.1134/S1021443714040141.
34. Wertz J-L, Deleu M, Coppée S, Richel A. Hemicelluloses and lignin in biorefineries. *Green Chemistry and Chemical Engineering*. Boca Raton: CRC Press; 2017.
35. Wagner AE, Rimbach G. Ascorbigen: chemistry, occurrence, and biologic properties. *Clinics in Dermatology*. 2009;27(2):217–224. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2008.01.012.
36. Pastori GM, Kiddle G, Antoniwi J, Bernard S, Veljovic-Jovanovic S, Verrier PJ, et al. Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *The Plant Cell*. 2003;15(4):939–951. DOI: 10.1105/tpc.010538.
37. Arrigoni O. Ascorbate system in plant development. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 1994;26(4):407–419. DOI: 10.1007/BF00762782.
38. Olmos E, Kiddle G, Pellny T, Kumar S, Foyer C. Modulation of plant morphology, root architecture, and cell structure by low vitamin C in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*. 2006;57:1645–1655. DOI: 10.1093/jxb/erl010.
39. Herschbach C, Scheerer U, Rennenberg H. Redox states of glutathione and ascorbate in root tips of poplar (*Populus tremula* × *P. alba*) depend on phloem transport from the shoot to the roots. *Journal of Experimental Botany*. 2010;61:1065–1074. DOI: 10.1093/jxb/erp371.
40. Demidchik V. Reactive oxygen species and oxidative stress in plants. In: Shabala S. *Plant Stress Physiology*. Hobart: University of Tasmania; 2012. p.24–58. DOI: 10.1079/9781845939953.0024.
41. Demidchik V. *Plant Stress Physiology. Chapter 3*. Oxford: CABI; 2017. DOI: 10.1079/9781780647296.0000.
42. Steinhorst L, Kudla J. Calcium and reactive oxygen species rule the waves of signaling. *Plant Physiology*. 2013;163:471–485. DOI: 10.1104/pp.113.222950.
43. Demidchik V, Maathuis FJM. *Ion Channels and Plant Stress Responses*. Heidelberg: Springer; 2010.
44. Demidchik V, Maathuis FJM. Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytologist*. 2007;175:387–405. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2007.02128.x.
45. Demidchik V, Sokolik A, Yurin V. The effect of Cu^{2+} on ion transport systems of the plant cell plasmalemma. *Plant Physiology*. 1997;114:1313–1325.
46. Demidchik V, Shang Z, Shin R, Thompson E, Rubio L, Laohavisit A, et al. Plant extracellular ATP signaling by plasma membrane NADPH oxidase and Ca^{2+} channels. *Plant Journal*. 2009;58:903–913. DOI: 10.1111/j.1365-3113.2009.03830.x.
47. Rounds CM, Bezanilla M. Growth mechanisms in tip-growing plant cells. *Annual Review of Plant Biology*. 2013;64:243–265. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050312-120150.
48. Makavitskaya M, Svistunenko D, Navaselsky I, Hryvusevich P, Mackievic V, Rabadanova C, et al. Novel roles of ascorbate in plants: induction of cytosolic Ca^{2+} signals and efflux from cells via anion channels. *Journal of Experimental Botany*. 2018;69(14):3477–3489. DOI: 10.1093/jxb/ery056.
49. Sattelmacher B. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytologist*. 2001;149:167–192. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2001.00034.x.
50. Printz B, Lutts S, Hausman J-F, Sergeant K. Copper trafficking in plants and its implication on cell wall dynamics. *Frontiers in Plant Science*. 2016;7:601. DOI: 10.3389/fpls.2016.00601.
51. Fry SC. Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New Phytologist*. 2004;161:641–675. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2004.00980.x.
52. Becana M, Klucas RV. Transition metals in legume root nodules: iron-dependent free radical production increases during nodule senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992;89(19):8958–8962. PMID: 11607326.
53. Moran JF, Becana M, Iturbe-Ormaetxe I, Frechilla S, Klucas RV, Aparicio-Tejo P. Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta*. 1994;194(3):346–352. DOI: 10.1007/BF00197534.
54. Moran JF, Klucas RV, Grayer RJ, Abian J, Becana M. Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: pro-oxidant and antioxidant properties. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 1997;22:861–870.
55. Demidchik V, Bowen HC, Maathuis FJ, Shabala SN, Tester MA, White PJ, et al. *Arabidopsis thaliana* root nonselective cation channels mediate calcium uptake and are involved in growth. *The Plant Journal*. 2002;32:799–808.
56. Demidchik V. Characterisation of root plasma membrane Ca^{2+} -permeable cation channels: techniques and basic concepts. In: Volkov AG. *Plant Electrophysiology*. Heidelberg: Springer; 2012. p.339–370.
57. Kollist H, Jossier M, Laanemets K, Thomine S. Anion channels in plant cells. *The FEBS Journal*. 2011;278:4277–4292. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08370.x.

References

1. Smirnoff N, Wheeler GL. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2000;19:267–290. DOI: 10.1080/10409230008984166.
2. Foyer CH, Noctor G. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology*. 2011;155(1):2–18. DOI: 10.1104/pp.110.167569.

3. Gest N, Gautier H, Stevens R. Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule? *Journal of Experimental Botany*. 2013;64(1):33–53. DOI: 10.1093/jxb/ers297.
4. Smirnoff N. Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. *Free Radical Biology and Medicine*. 2018. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.033.
5. Linster CL, Van Schaftingen E. Vitamin C: Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *FEBS Journal*. 2007;274(1):1–22. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2006.05607.x.
6. Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*. 1998;393:5. DOI: 10.1038/30728.
7. Akram NA, Shafiq F, Ashraf M. Ascorbic acid-a potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*. 2017;8:613. DOI: 10.3389/fpls.2017.00613.
8. Valpuesta V, Botella MA. Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: new pathways for an old antioxidant. *Trends in Plant Science*. 2004;9(12):573–577. DOI: 10.1016/j.tplants.2004.10.002.
9. Davey MW, Montagu MV, Inzé D, Sanmartin M, Kanellis A, Smirnoff N, et al. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000;80(7):825–860. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<825::AID-JSFA598>3.0.CO;2-6.
10. Sharova EI. *Antioksidanty rastenii*. Saint Petersburg: Publishing Saint Petersburg State University; 2016 (in Russ.).
11. Smirnoff N. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany*. 1996;78(6):661–669. DOI: 10.1006/anbo.1996.0175.
12. Gallie DR. L-ascorbic acid: a multifunctional molecule supporting plant growth and development. *Scientifica (Cairo)*. 2013; 2013:1–24. DOI: 10.1155/2013/795964.
13. Loewus FA, Kelly S. The metabolism of D-galacturonic acid and its methyl ester in the detached ripening strawberry. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1961;95:483–493.
14. Wolucka BA, Van Montagu M. GDP-Mannose 30,50-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the novo biosynthesis of vitamin C in plants. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(48):47483–47490. DOI: 10.1074/jbc.M309135200.
15. Wheeler G, Ishikawa T, Pornsaksit V, Smirnoff N. Evolution of alternative biosynthetic pathways for vitamin C following plastid acquisition in photosynthetic eukaryotes. *Evolutionary Biology, Plant Biology*. 2015;4. DOI: 10.7554/eLife.06369.
16. Chupakhin GN. *Sistema askorbinovoi kisloty rastenii*. Kaliningrad: Kaliningrad State University; 1997 (in Russ.).
17. Zechmann B, Stumpe M, Mauch F. Immunocytochemical determination of the subcellular distribution of ascorbate in plants. *Planta*. 2011;233(1):1–12. DOI: 10.1007/s00425-010-1275-x.
18. Tedone L, Hancock RD, Alberino S, Haupt S, Viola R. Long-distance transport of L-ascorbic acid in potato. *BMC Plant Biology*. 2004. DOI: 10.1186/1471-2229-4-16.
19. Foyer CH, Halliwell B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*. 1976;133(1):21–25. DOI: 10.1007/BF00386001.
20. Foyer CH, Halliwell B. Purification and properties of dehydroascorbate reductase from spinach leaves. *Phytochemistry*. 1977; 16(9):1347–1350. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)88779-8.
21. Ozyigit II, Filiz E, Vatansever R, Kurtoglu KY, Koc I, Öztürk MX, et al. Identification and comparative analysis of H₂O₂-scavenging enzymes (ascorbate peroxidase and glutathione peroxidase) in selected plants employing bioinformatics approaches. *Front Plant Science*. 2016;22(7):301. DOI: 10.3389/fpls.2016.00301.
22. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine. Fifth edition*. [Oxford]: Oxford University Press Science; 2015;4. p.155–199.
23. Zhang Y. Biological role of ascorbate in plants. In: *Ascorbic acid in plants. Springer Briefs in Plant Science*. New York: Springer; 2013. p.7–33. DOI: 10.1007/978-1-4614-4127-4_7.
24. Demidchik V. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*. 2015. Vol. 109. P. 212228. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2014.06.021.
25. Demidchik V, Shabala S. Mechanisms of cytosolic calcium elevation in plants: the role of ion channels, calcium extrusion systems and NADPH oxidase-mediated «ROS-Ca²⁺ Hub». *Functional Plant Biology*. 2018;45:9–27. DOI: 10.1071/FP16420.
26. Fry SC. Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *The Biochemical Journal*. 1998;332:507–515.
27. Fry SC, Miller JG, Dumville JC. A proposed role for copper ions in cell wall loosening. *Plant and Soil*. 2002;247(1):57–67. DOI: 10.1023/A:1021140022082.
28. Demidchik V, Shabala SN, Coutts KB, Tester MA, Davies JM. Free oxygen radicals regulate plasma membrane Ca²⁺- and K⁺-permeable channels in plant root cells. *Journal of Cell Science*. 2003;116:81–88.
29. Cosgrove DJ. Catalysts of plant cell wall loosening. *F1000 Faculty Reviews*. 2016;5:119. DOI: 10.12688/f1000research.7180.1.
30. Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, Mylona P, Miedema H, Torres MA, et al. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*. 2003;422:442–446. DOI: 10.1038/nature01485.
31. Müller K, Linkies A, Vreeburg RA, Fry SC, Krieger-Liszczay A, Leubner-Metzger G. *In vivo* cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress seed germination and elongation growth. *Plant Physiology*. 2009;150:1855–1865. DOI: 10.1104/pp.109.139204.
32. Richards SL, Wilkins KA, Swarbreck SM, Anderson AA, Habib N, Smith AG, et al. The hydroxyl radical in plants: from seed to seed. *Journal of Experimental Botany*. 2015;66:37–46. DOI: 10.1093/jxb/eru398.
33. Qian HF, Peng XF, Han X, Ren J, Zhan KY, Zhu M. The stress factor, exogenous ascorbic acid, affects plant growth and the antioxidant system in *Arabidopsis thaliana*. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2014;61(4):467–475. DOI: 10.1134/S1021443714040141.
34. Wertz J-L, Deleu M, Coppée S, Richel A. Hemicelluloses and lignin in biorefineries. *Green Chemistry and Chemical Engineering*. Boca Raton: CRC Press; 2017.
35. Wagner AE, Rimbach G. Ascorbigen: chemistry, occurrence, and biologic properties. *Clinics in Dermatology*. 2009;27(2): 217–224. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2008.01.012.
36. Pastori GM, Kiddle G, Antoniow J, Bernard S, Veljovic-Jovanovic S, Verrier PJ, et al. Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *The Plant Cell*. 2003;15(4):939–951. DOI: 10.1105/tpc.010538.
37. Arrigoni O. Ascorbate system in plant development. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 1994;26(4):407–419. DOI: 10.1007/BF00762782.

38. Olmos E, Kiddle G, Pellny T, Kumar S, Foyer C. Modulation of plant morphology, root architecture, and cell structure by low vitamin C in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*. 2006;57:1645–1655. DOI: 10.1093/jxb/erl010.
39. Herschbach C, Scheerer U, Rennenberg H. Redox states of glutathione and ascorbate in root tips of poplar (*Populus tremula* × *P. alba*) depend on phloem transport from the shoot to the roots. *Journal of Experimental Botany*. 2010;61:1065–1074. DOI: 10.1093/jxb/erp371.
40. Demidchik V. Reactive oxygen species and oxidative stress in plants. In: Shabala S. *Plant Stress Physiology*. Hobart: University of Tasmania; 2012. p.24–58. DOI: 10.1079/9781845939953.0024.
41. Demidchik V. *Plant Stress Physiology. Chapter 3*. Oxford: CABI; 2017. DOI: 10.1079/9781780647296.0000.
42. Steinhorst L, Kudla J. Calcium and reactive oxygen species rule the waves of signaling. *Plant Physiology*. 2013;163:471–485. DOI: 10.1104/pp.113.222950.
43. Demidchik V, Maathuis FJM. *Ion Channels and Plant Stress Responses*. Heidelberg: Springer; 2010.
44. Demidchik V, Maathuis FJM. Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytologist*. 2007;175:387–405. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2007.02128.x.
45. Demidchik V, Sokolik A, Yurin V. The effect of Cu^{2+} on ion transport systems of the plant cell plasmalemma. *Plant Physiology*. 1997;114:1313–1325.
46. Demidchik V, Shang Z, Shin R, Thompson E, Rubio L, Laohavisit A, et al. Plant extracellular ATP signaling by plasma membrane NADPH oxidase and Ca^{2+} channels. *Plant Journal*. 2009;58:903–913. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2009.03830.x.
47. Rounds CM, Bezanilla M. Growth mechanisms in tip-growing plant cells. *Annual Review of Plant Biology*. 2013;64:243–265. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050312-120150.
48. Makavitskaya M, Svistunenko D, Navaselsky I, Hryvusevich P, Mackievic V, Rabadanova C, et al. Novel roles of ascorbate in plants: induction of cytosolic Ca^{2+} signals and efflux from cells via anion channels. *Journal of Experimental Botany*. 2018;69(14):3477–3489. DOI: 10.1093/jxb/ery056.
49. Sattelmacher B. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytologist*. 2001;149:167–192. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2001.00034.x.
50. Printz B, Lutts S, Hausman J-F, Sergeant K. Copper trafficking in plants and its implication on cell wall dynamics. *Frontiers in Plant Science*. 2016;7:601. DOI: 10.3389/fpls.2016.00601.
51. Fry SC. Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New Phytologist*. 2004;161:641–675. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2004.00980.x.
52. Becana M, Klucas RV. Transition metals in legume root nodules: iron-dependent free radical production increases during nodule senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992;89(19):8958–8962. PMID: 11607326.
53. Moran JF, Becana M, Iturbe-Ormaetxe I, Frechilla S, Klucas RV, Aparicio-Tejo P. Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta*. 1994;194(3):346–352. DOI: 10.1007/BF00197534.
54. Moran JF, Klucas RV, Grayer RJ, Abian J, Becana M. Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: pro-oxidant and antioxidant properties. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 1997;22:861–870.
55. Demidchik V, Bowen HC, Maathuis FJ, Shabala SN, Tester MA, White PJ, et al. *Arabidopsis thaliana* root nonselective cation channels mediate calcium uptake and are involved in growth. *The Plant Journal*. 2002;32:799–808.
56. Demidchik V. Characterisation of root plasma membrane Ca^{2+} -permeable cation channels: techniques and basic concepts. In: Volkov AG. *Plant Electrophysiology*. Heidelberg: Springer; 2012. p.339–370.
57. Kollist H, Jossier M, Laanemets K, Thomine S. Anion channels in plant cells. *The FEBS Journal*. 2011;278:4277–4292. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08370.x.

Статья поступила в редколлегию 14.05.2018.
Received by editorial board 14.05.2018.