



特约综述 Invited Review

植物体内叶酸的生理功能、生物合成与代谢调控

周家怡, 严武平, 程建峰*, 王梦醒, 张芳

江西农业大学农学院, 蔬菜高质高效栽培及利用江西省重点实验室, 南昌330045

*通信作者(chjfkarl@163.com; jfcheng@jxau.edu.cn)

摘要: 作为一种水溶性维生素的“叶酸”(维生素B₉)是所有生物体单碳代谢的必要辅助因子, 对动植物生长发育具有重要作用。人体并不能自主合成叶酸, 只能借助食物摄入来满足自身对它的需求; 常因主食中的叶酸含量较低造成人体普遍缺乏, 导致一系列生理代谢疾病(如巨幼红细胞性贫血、胎儿神经管畸形、动脉粥样硬化、抑郁症、癌症)的发生。近期在解析植物叶酸代谢途径关键基因功能、揭示叶酸代谢与其他代谢途径互作关系等方面取得一定进展。本文系统归纳总结了植物体内叶酸含量差异、生理功能、生物合成、运输与分解回补及代谢调控等方面的研究成果, 并对未来深入探究植物叶酸代谢分子机制、培育高叶酸含量作物品种及优化植物性食物叶酸营养品质等相关研究方向进行展望, 以期改善人类叶酸营养状况提供更多科学依据与技术支持。

关键词: 植物; 叶酸; 生理功能; 生物合成; 代谢调控; 生物强化

Physiological function, biosynthesis and metabolic regulation of folates in plants

ZHOU Jiayi, YAN Wuping, CHENG Jianfeng*, WANG Mengxing, ZHANG Fang

College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Jiangxi Province Key Laboratory of Vegetable Cultivation and Utilization, Nanchang 330045, China

*Corresponding author (chjfkarl@163.com; jfcheng@jxau.edu.cn)

Abstract: Folate (vitamin B₉), a water-soluble vitamin that the human body must obtain from food and cannot synthesize, is an essential cofactor for one-carbon metabolism in all organisms and plays a crucial role in the growth and development of plants and animals. Due to the relatively low folate content in staple foods, there is a common deficiency of folate in the human body, which shall cause the occurrence of a series of physiological and metabolic diseases (such as megaloblastic anemia, fetal neural tube defects, atherosclerosis, depression, and cancer). Recent researches have made the certain progress in analyzing the key genes functions and metabolic pathway of folate in the plant and revealing the interaction relationships between folate metabolism and other metabolic pathways. This review systematically summarized the research achievements in aspects such as the differences of folate content, physiological functions, biosynthesis, transportation, decomposition and replenishment, and metabolic regulation in plants. It also

收稿 2025-01-21 修定 2025-06-02

资助 国家重点研发计划(2023YFD2301300)、国家自然科学基金(31801272)和江西省农业核心关键技术攻关专项(JXNK202309)。

looked forward to the relevant research directions in the future, including in-depth exploration of plant folate molecular metabolism, cultivation of crop varieties with high folate content and optimization of the folate nutritional quality of plant-based foods; which shall provide the more scientific basis and technical support for improving the human folate nutritional status.

Key words: plant; folates; physiological function; biosynthesis; metabolism regulation; biofortification

叶酸(folate)化学名为蝶酰谷氨酸(pteroylglutamic acid, PGA), 是一种水溶性维生素, 又名维生素B₉, 因在绿叶中含量十分丰富而得名。叶酸是一个通用术语, 包括叶酸及其衍生物, 由喋啶(pterin)、对氨基苯甲酸(4-aminobenzoic acid, pABA)和1个或多个谷氨酸(glutamic acid, Glu)结合而成, 具有蝶酰谷氨酸骨架(Pertiwi等2022) (图1)。在亚细胞水平上, 叶酸以四氢叶酸(tetrahydrofolate, THF)或二氢叶酸(dihydrofolate, DHF)及其衍生物的形式存在, 衍生物通过N5和/或N10位的一个碳取代基(甲酰基、甲基、亚甲基、次甲基和甲氨基)和 γ -谷氨酰部分的长度来区分(Luo等2017a) (表1)。谷物、蔬菜、水果、面包、牛奶和肉制品中的主要叶酸形式为5-甲基四氢叶酸(5-methylene tetrahydrofolate, 5-M-THF), 也是人体中的主要叶酸(Jha等2020)。叶酸在细菌、真菌和植物中能从头合成, 但在脊椎动物(包括人类)中缺乏, 完全依赖饮食来提供, 尤其是植物性食物。遗憾的是, 大多数主食作物的叶酸含量相对较低, 造成叶酸缺乏频发, 导致各种发育缺陷(如神经管缺陷)和疾病(如巨幼细胞贫血、心血管疾病、痴呆、肿瘤及神经退行性疾病等)的

发生; 对孕妇而言, 叶酸摄入不足还会降低婴儿体重, 增加婴儿患唇腭裂、心脏病和神经管畸形等疾病的风险, 甚至导致自发性流产(Luo等2017a)。

叶酸是所有生物体新陈代谢中不可缺少的成分, 在一碳(C1)转移反应中充当供体和受体, 参与许多重要生物分子的形成及DNA甲基化反应(Menezo等2022)。甲基化是一种重要的生化机制, 叶酸参与的甲基化尤为重要, 是生命传递的核心, 对调节配子体的发生和胚胎持续发育至关重要(Menezo等2022)。在细胞质中, 具有不同氧化还原状态的一碳取代形式叶酸参与单碳代谢, 是嘌呤和胸苷酸从头合成及同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)甲基化为甲硫氨酸(methionine, Met)所必需的。近些年来, 大量研究表明, 植物体内的叶酸具有丰富的生物学功能, 几乎参与了植物生命活动的各个方面, 是维持植物正常生理代谢必不可少的重要物质, 在光呼吸、氮代谢、叶绿素和木质素的生物合成、逆境胁迫、基因表达的表现遗传调控和免疫等过程中发挥着至关重要的作用(Shohag等2020)。任何对植物叶酸代谢的干扰都会导致严重的生长抑制, 降低生产力和抗逆性, 如5-甲酰基四氢叶酸环

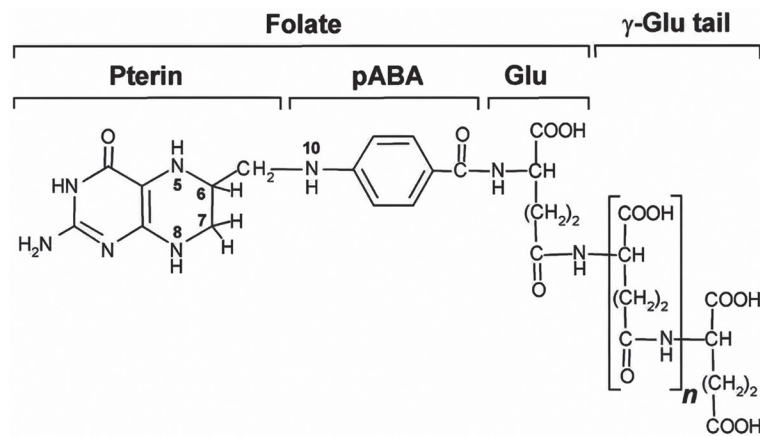


图1 叶酸的基本化学结构

Fig. 1 The basic structure of folate

表1 叶酸衍生物的名称
Table 1 Names of folate derivatives

N5	N10	种类
H	H	四氢叶酸
CH ₃	H	5-甲基四氢叶酸
CHO	H	5-甲酰基四氢叶酸
CH=NH	H	5-氮甲基四氢叶酸
H	CHO	10-甲酰基四氢叶酸
-CH ₂ -	-CH ₂ -	5,10-亚基四氢叶酸
=CH-	=CH-	5,10-次甲基四氢叶酸

连接酶(5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase, 5FCL)的突变导致拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)生长减少和开花延迟(Goyer和Navarre 2007), 叶酸还通过影响生长素的分布来塑造植物的根结构(Li等2023)。叶酸作为一种在生物体内广泛参与关键代谢过程的物质, 不仅与植物生理息息相关, 在微生物代谢、动物营养等多个领域, 同样发挥着不可或缺的作用。微生物依靠叶酸完成细胞分裂与代谢调控(Cao等2025), 动物则借助叶酸维持胚胎发育与免疫功能(Pertiwi等2022)。植物是人类膳食中叶酸的重要来源, 而植物体内叶酸的合成调控机制尚未完全明晰。虽然已知部分基因参与叶酸合成, 但这些基因在不同植物物种及同一植物不同生长阶段的表达调控机制还亟待深入研究。此外, 外界环境因素, 诸如光照强度、土壤肥力、温度变化等, 对植物叶酸合成与积累的影响规律, 同样缺乏系统性研究。同时, 如何通过基因编辑或栽培技术, 有效提升植物的叶酸含量, 以开发富含叶酸的功能性作物, 目前仍缺乏切实可行的策略。基于现有研究成果, 深入剖析这些局限性和研究领域空白, 可以明晰叶酸研究的拓展方向, 弥补植物领域叶酸研究的不足, 不仅能够深化对叶酸合成与代谢机制的理解, 为优化作物品质提供理论依据, 还能进一步拓展叶酸在食品营养与健康领域的应用, 为临床实践和公共健康政策的制定提供更全面、科学的依据。

1 植物体内叶酸含量的差异

1.1 植物体内叶酸含量的物种差异

不同植物体内的总叶酸含量各不相同(表2)。

表2显示, 谷物中, 叶酸含量较高的是小米(*Setaria italica*), 其次为玉米(*Zea mays*)、小麦(*Triticum aestivum*)和水稻(*Oryza sativa*)的糙米, 水稻精米、大麦(*Hordeum vulgare*)和燕麦(*Avena sativa*)相对较低; 蔬菜中, 马铃薯(*Solanum tuberosum*)相对较高, 单位鲜重白菜(*Brassica rapa*)、生菜(*Lactuca sativa*)和菠菜(*Spinacia oleracea*)间的叶酸含量差异处于相对较小的范围, 而番茄(*Solanum lycopersicum*)相对较低。豆类中, 以豇豆(*Vigna unguiculata*)为最高, 其次为大豆(*Glycine max*)和野生小扁豆(*Dunbaria villosa*), 豌豆(*Pisum sativum*)和芸豆(*Phaseolus vulgaris*)较低; 水果中, 单位鲜重的猕猴桃(*Actinidia chinensis*)叶酸含量高于草莓(*Fragaria × ananassa*), 草莓又高于香蕉(*Musa paradisiaca*), 橘子(*Citrus reticulata*)和苹果(*Malus pumila*)叶酸含量较低。谷物和豆类中的主要叶酸形式为5-甲基四氢叶酸(5-methylene tetrahydrofolate, 5-M-THF)和5-甲酰基四氢叶酸(5-formyltetrahydrofolate, 5-F-THF) (Edelmann等2013); 水果和蔬菜中的主要叶酸形式是5-M-THF、5-F-THF和THF。从差异倍数(最大值/最小值)来看(表2), 不同玉米籽粒间的最大(13.56), 其次为小米(11.00)、马铃薯(10.64)、大豆(10.63)、糙米(8.38)、精米(7.54)和草莓(7.50), 这意味着这些植物不同品种间的叶酸含量基因型差异较大。优良的基因型资源可培育高叶酸含量的植物新品种提供可能性的亲本。

1.2 植物体内叶酸含量的时空差异

1.2.1 器官/组织

尽管植物的各类器官或组织能够自主合成叶酸, 但叶酸在植物各部位并非均匀分布。其鲜叶的叶酸含量比其他组织更高, 而纯化的线粒体叶酸含量(以蛋白质含量为基础)比叶绿体中的含量高约100倍(Gambonnet等2001)。叶酸衍生物在亚细胞间的分布也不均匀, 线粒体是叶酸重新合成的实际位置, 比其他亚细胞区室含量更高(40%), 而细胞质中含30%, 质体和液泡中含30%。叶酸在籽粒不同部位的分布也不一致, 更多地集中在外层(果皮、种皮、糊粉层和胚芽) (Edelmann等2013), 如小麦胚中的叶酸为2.8 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 胚乳中的叶酸为0.26 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 糊粉层中的叶酸为5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; 大麦麸

表2 不同植物及部位的叶酸含量差异

Table 2 The differences of folate content in different plants and parts

植物种类	物种	样本数	取样部位	测定方法	叶酸含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	差异倍数	文献来源	
谷物	大麦	5	籽粒	高效液相色谱法	0.56~0.77 (DW)	1.37	Edelmann等2013	
	燕麦	5	籽粒	微生物法	0.44~0.74 (DW)	1.67	Edelmann等2012	
	小麦	2	籽粒	微生物法	1.02~1.12 (DW)	1.09	Giordano等2016	
		13	籽粒(白)	高效液相色谱法	0.35~0.59 (DW)	1.69	田鹏等2024	
		10	籽粒(红)	高效液相色谱法	0.38~0.50 (DW)	1.31	田鹏等2024	
		7	籽粒(蓝)	高效液相色谱法	0.61~0.67 (DW)	1.10	田鹏等2024	
		12	籽粒(紫)	高效液相色谱法	0.57~0.67 (DW)	1.18	田鹏等2024	
		小米	245	籽粒	荧光法	1.60~1.90 (DW)	1.18	Shao和Wang 2014
	水稻	78	糙米	微生物法	0.13~1.11 (DW)	8.38	Dong等2014	
		78	精米	微生物法	0.10~0.78 (DW)	7.54	Dong等2014	
	玉米	6	籽粒	液相色谱-串联质谱法	0.67~1.52 (FW)	2.27	Islam等2021	
		190	籽粒	高效液相色谱法	0.21~2.83 (FW)	13.56	邹成林等2024	
	蔬菜	马铃薯	67	块茎	微生物法	0.52~1.37 (FW)	2.64	Goyer和Navarre 2007
250			块茎	微生物法	0.22~2.34 (FW)	10.64	Robinson等2015	
番茄		125	绿果实	液相色谱-串联质谱法	0.13~0.71 (FW)	5.46	Upadhyaya等2017	
		125	红果实	液相色谱-串联质谱法	0.14~0.46 (FW)	3.29	Upadhyaya等2017	
白菜		74	地上部分	超高效液相色谱法	0.53~1.67 (FW)	3.20	Shohag等2020	
生菜		5	地上部分	液相色谱-串联质谱法	0.30~1.98 (FW)	6.30	Johansson等2007	
菠菜		67	地上部分	液相色谱法	0.54~1.73 (FW)	3.20	Shohag等2011	
豆类		豌豆	85	豆荚	超高效液相色谱-串联质谱法	0.14~0.55 (DW)	3.93	Jha等2020
		芸豆	1	豆荚	稳定同位素稀释测定法	0.14 (FW)	—	Rychlik等2007
		大豆	1 047	种子	高效液相色谱-串联质谱法	0.65~6.91 (FW)	10.63	Agyenim-Boateng等2022
	豇豆	50	种子	微生物测定法	1.77~7.81 (DW)	4.41	Nascimento等2022	
野生小扁豆	6	种子	超高效液相色谱-串联质谱法	1.95~4.97 (DW)	2.50	Zhang等2019		
水果	猕猴桃	15	果肉	高效液相色谱法	0.24~1.22 (FW)	5.10	Zhang等2020	
	草莓	9	果肉	微生物测定法	0.13~0.96 (FW)	7.50	Tulipani等2008	
	苹果	1	果肉	高效液相色谱-串联质谱法	0.36 (FW)	—	Martin等2010	
	橘子	1	果肉	高效液相色谱-串联质谱法	0.31 (FW)	—	叶晓利等2020	
	香蕉	1	果肉	高效液相色谱-串联质谱法	0.56 (FW)	—	叶晓利等2020	

DW: 干重; FW: 鲜重。

皮部分叶酸含量(约1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)约为内核的10倍 (Edelmann等2013)。

1.2.2 生长发育阶段

叶酸在DNA和蛋白质的合成和成熟过程中作为辅助因子发挥着至关重要的作用,因此正常组织和器官的生长发育在生理上需要高浓度的叶酸。植物器官的发育是促使高水平叶酸合成的一个因素,在器官分化过程中,叶酸在高度分裂的组织和

光合叶片中优先合成,这与高水平的6-羟甲基-7,8-二氢喋啶焦磷酸激酶-二氢喋啶合成酶(6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase-dihydropteroate synthase, HPPK-DHPS) mRNA和蛋白质有关(Jabrin等2003)。

叶酸含量和形式会随着植物生长发育进程而变。青梅(*Vatica mangachapoi*)中的总叶酸主要随生长发育过程和成熟度而增加,且叶酸主要由

5-M-THF组成(Fyfe等2022); 玉米品种在授粉35 d后, ‘DAN3130’的5-F-THF水平急剧增加, 5-M-THF保持不变, 导致总叶酸增加; 而‘JI63’的5-M-THF水平显著下降, 5-F-THF稳定, 导致总叶酸含量降低(Lian等2022)。翅豆(*Psophocarpus tetrago-nolobus*)中主要的叶酸种类是5-M-THF, 5-M-THF-Glu₅是主要的聚谷氨酸叶酸衍生物; 随着成熟度提高, 总叶酸水平增加了约4倍; 其豆荚的 γ -谷氨酰部分链长随着生长而增加, 从早期的5-M-THF-Glu₁转变到后期的5-M-THF-Glu₅和5-M-THF-Glu₆ (Luo等2017b)。

2 叶酸在植物中的生理功能

2.1 偶联甲硫氨酸循环

叶酸在植物中的功能多数与提供甲基有关, 而叶酸循环与甲硫氨酸循环共同负责产生甲基, 调节与甲基化相关的所有过程(图2)。叶酸是植物体内

各种代谢反应中的一碳载体物质, 参与单碳单位的生成、相互转化和转运, 其甲基化形式即5-M-THF参与甲硫氨酸循环, 进而参与到蛋白质、DNA和各类代谢物质的甲基化过程(Menezo等2022)。10-甲酰基四氢叶酸(10-F-THF)的甲酰基被并入细胞质中嘌呤环的C2和C8中, 用于在线粒体中合成甲酰化的甲硫酰基-tRNA; 5,10-亚甲基四氢叶酸(5,10-methylenetetrahydrofolate, 5,10-CH₂-THF)的单碳部分将尿苷酸转化为胸腺苷酸所需, 而5-M-THF携带的单碳需要将Hcy再甲基化为Met。

叶酸循环起始于双功能酶DHFR-TS, 其N端的DHFR亚基利用NADPH将DHF还原为THF, 此为叶酸循环首个瓶颈步骤(Saravana等2020)。随后, 经丝氨酸羟甲基转移酶(serine hydroxymethyltransferase, SHMT)和亚甲基四氢叶酸脱氢酶(methylenetetrahydrofolate dehydrogenase, MTHFD)合成THF

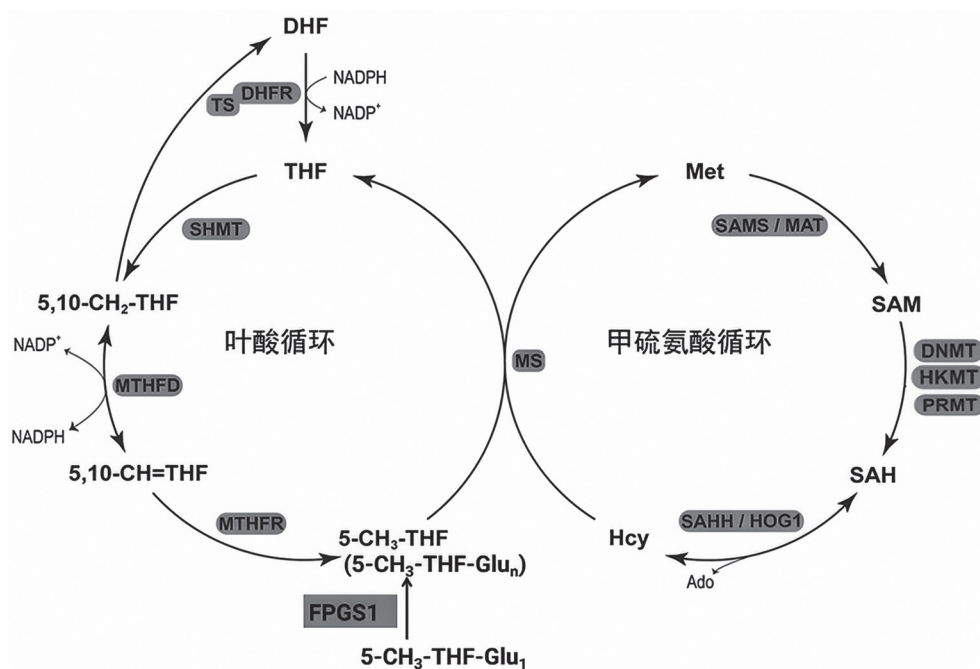


图2 叶酸循环与甲硫氨酸循环的关系

Fig. 2 Relationship between folate cycle and methionine cycle

灰底字为循环所需要的酶。Ado: 腺苷; DHFR-TS: 二氢叶酸还原酶胸苷酸合酶; DNMT: DNA甲基转移酶; FPGS: 多聚谷氨酸合成酶; Hcy: 同型半胱氨酸; HMT: 组蛋白甲基转移酶; HOG1: 同源沉默基因1; Met: 甲硫氨酸; MTHFD: 亚甲基四氢叶酸脱氢酶; MTHFR: 亚甲基四氢叶酸还原酶; MS: 甲硫氨酸合成酶; PRMT: 精氨酸甲基化转移酶; SAH: 腺苷同型半胱氨酸; SAM: S-腺苷甲硫氨酸; SAHH/HOG1: S-腺苷同型半胱氨酸水解酶; SAMS: 腺苷甲硫氨酸合成酶; SHMT: 丝氨酸羟甲基转移酶。参考Saravana等(2020), 略有改动。

衍生甲基(5,10-CH₂-THF),并由亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)将其还原为5-M-THF。MTHFR在叶酸介导单碳代谢(folate-mediated one-carbon metabolism, FOCM)中起核心作用。同时,多聚谷氨酸合成酶(folylpolyglutamyl synthetase, FPGS)催化叶酸及衍生物添加谷氨酸,产物同样转化为5-M-THF。5-M-THF的甲基被甲硫氨酸合成酶(methionine synthase, MS)转移至Hcy生成Met,后者在腺苷甲硫氨酸合成酶(*S*-adenosyl-L-methionine synthetase, SAMS)作用下转变为腺苷甲硫氨酸(adenosylmethionine, SAM)。SAM为DNA、组蛋白等提供甲基后转变为*S*-腺苷同型半胱氨酸(SAH)。SAH经*S*-腺苷同型半胱氨酸水解酶(*S*-adenosyl-homocysteine hydrolase, SAHH)催化生成Hcy, Hcy再度接受5-M-THF的甲基,使循环持续运转。

2.2 参与光呼吸

光呼吸(photorespiration)是广泛存在于植物中的一种原始而基本的内源性代谢途径,涉及叶绿体、过氧化物酶体和线粒体三个细胞器,是利用甘

氨酸合成丝氨酸的过程。光呼吸途径也可能通过耗散多余能量而获益,并对细胞内ATP和NADPH的比例平衡具有重要意义。叶酸参与的光呼吸循环是一种特殊的途径(图3),在C₃植物的绿叶中发生的速率非常高。甘氨酸脱羧酶(glycine decarboxylase, GDC)和丝氨酸羟甲基转移酶(serine hydroxymethyltransferase, SHMT)依赖THF作为辅酶,在光呼吸途径中负责甘氨酸向丝氨酸的转化,且叶酸分子的谷氨酸尾越长,其对应酶的活性越强,是所有生物体中叶酸介导的单碳代谢的主要切入点(Akhtar等2010)。在线粒体中GDC催化甘氨酸和THF生成5,10-CH₂-THF,同时释放CO₂和NH₄⁺,该反应的通量特别高,其中的CO₂可被Rubisco重新固定,经C₃循环同化,NH₄⁺通过谷氨酰胺合成酶/谷氨酸合成酶(glutamine synthetase, GS/glutamate synthetase, GOGAT)系统在叶绿体中固定(Saeheng等2024)。在拟南芥中,双敲除突变体(敲除*purU*)的光呼吸表型完全由5-F-THF的积累和随后对GDC/SHMT复合物的抑制引起,5-甲酰基取代的衍生物被认为是最稳定的叶酸衍生物,不直接参与任何

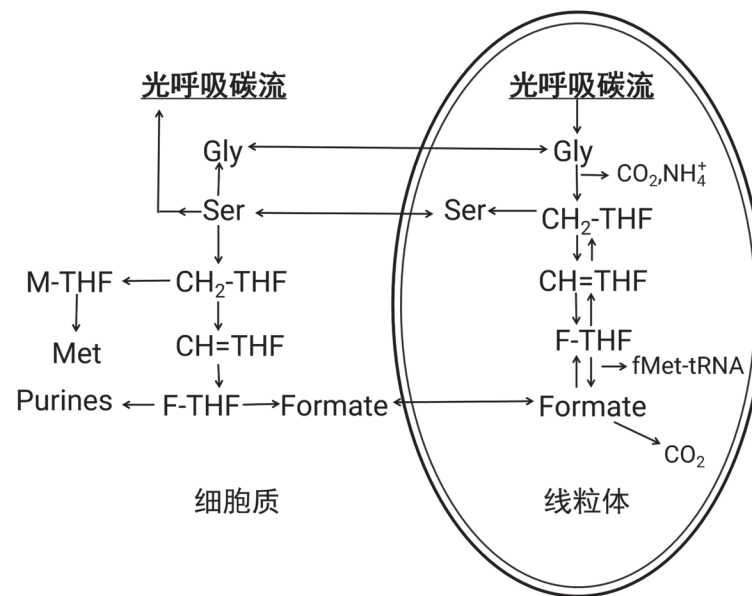


图3 C₃植物中叶酸依赖反应和光呼吸碳的流动

Fig. 3 Folate-dependent reaction and the photorespiratory carbon flow in C₃ plants

CH₂-THF: 亚甲基四氢叶酸; CH=THF: 次甲基四氢叶酸; M-THF: 甲基四氢叶酸; F-THF: 甲酰基四氢叶酸; Formate: 甲酸盐; Gly: 甘氨酸; Met: 甲硫氨酸; Purines: 嘌呤; Ser: 丝氨酸。参考Cossins (2000), 略有修改。

一碳代谢途径,可能是一种贮存形式,或可能是通过抑制线粒体SHMT来调节光呼吸过程的一个方面(Akhtar等2010)。有研究发现,叶酸多聚谷氨酰化可消除拟南芥线粒体SHMT中活性对酶浓度的依赖,即在较高的酶浓度($>0.4 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$)时,单戊酰化叶酸底物的存在导致催化活性增加,但在五戊酰化叶酸底物中未增加(Wei等2013)。

2.3 影响氮代谢

植物的营养元素代谢与维生素合成之间存在着复杂而精密的调控网络。科研人员发现叶酸与氮代谢存在双向影响。

一方面,氮元素的供应状态显著影响叶酸的稳定性。氮参与谷氨酰胺代谢过程,当植物缺氮时,谷氨酰胺和天冬酰胺合成减少,导致叶酸聚谷氨酸残基数降低,叶酸氧化分解加剧,难以形成稳定的叶酸衍生物。另一方面,叶酸代谢对氮代谢也具有重要的调控作用。叶酸聚谷氨酸合成酶基因(DHFS-FPGS Homolog C, *DFC*)可催化线粒体中谷氨酸残基与THF的结合。Jiang等(2013)研究发现,*DFC*功能丧失的突变体中,氮同化受到严重干扰,参与叶酸生物合成和氮代谢的多个基因转录水平发生变化。该突变体氮代谢的改变可能源于光呼吸缺陷,其表型可以被高 CO_2 浓度适度恢复。

在低氮环境和缺失*DFC*的背景下,相关研究进一步验证了叶酸代谢与氮代谢的密切联系。陈金凤等(2014)发现,过表达叶酰聚谷氨酸合成酶基因(DHFS-FPGS Homolog B, *DFB*)的拟南芥*DFC*突变体中,主根长恢复至野生型的65%~131%,5-F-THF含量增加至野生型的90%~116%,表明低氮下的*DFB*在一定程度上能弥补*DFC*的缺失。Meng等(2014)在叶酸聚谷氨酸合成酶基因T-DNA插入的突变体*AtDFB-3*中发现,低氮降低了突变体中亚硝酸盐还原酶(NiR)和GS活性,进而影响氮的还原和同化;同时,在低氮下外源施加5-F-THF能改善线粒体叶酸聚谷氨酸合成酶突变体的短下胚轴表型。易尘等(2020)的研究表明,对水稻幼苗根部喷施5-F-THF ($200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)能显著促进幼苗在低氮下的生长发育,不仅使幼苗体内的GOGAT活性增加,同时其基因的转录水平也上调。

此外,新技术的应用也为揭示叶酸与氮代谢

的互作机制提供了新视角。Li等(2021)合成了包含与光亲和标签偶联的5-甲酰四氢叶酸探针(5-F-THF-Dayne),通过拟南芥亲和蛋白质组学研究发现,叶酸可与氮代谢相关的谷氨酰胺合成酶蛋白相互作用,5-F-THF在氮代谢中竞争性抑制拟南芥胞质谷氨酰胺合成酶(*AtGLN1*)的活性。Wang等(2023)通过结构方程模型证实,施氮能通过影响植物对氮和钾的积累,间接提升籽粒叶酸含量。

2.4 参与叶绿素合成

叶绿素的生物合成是自然界中主要的生物合成途径之一(Webb和Smith 2009)。叶绿素的合成需要一个甲基化步骤,将Mg-原卟啉IX转化为Mg-原卟啉IX单甲基酯,这是一种由Mg-原卟啉IX甲基转移酶(magnesium protoporphyrin IX methyltransferase, ChlM)催化的反应,而叶酸是多个参与甲基化的酶的辅助因子,这也导致了叶酸的含量可能会间接影响叶绿素合成(图4)。在光合叶片中,叶酸的合成和积累也很高(Cossins 2000)。黄化叶片的叶酸含量通常比绿叶少,光照能增强HPPK/DHPS mRNA的表达,从而提高叶酸含量(Jabrin等2003)。

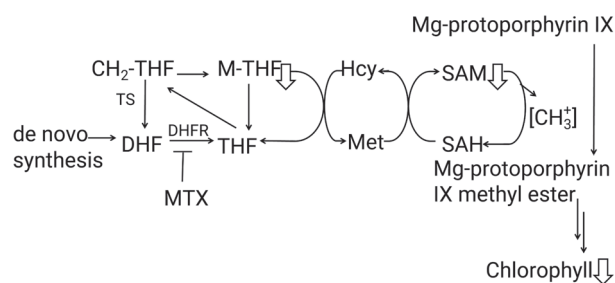


图4 去黄化豌豆幼苗中叶酸、C1代谢与叶绿素生物合成的关系

Fig. 4 The relationship between folate, C1 metabolism and chlorophyll biosynthesis in de-etiolated pea seedlings

CH₂-THF: 亚甲基四氢叶酸; M-THF: 甲基四氢叶酸; THF: 四氢叶酸; DHF: 二氢叶酸; TS: 胸苷酸合成酶; MTX: DHFR的抑制剂; Chlorophyll: 叶绿素; DHFR: 二氢叶酸还原酶; Hcy: 同型半胱氨酸; Met: 甲硫氨酸; Mg-protoporphyrin IX: 镁原卟啉IX; Mg-protoporphyrin IX methyl ester: 镁原卟啉IX甲酯; SAH: 腺苷同型半胱氨酸; SAM: S-腺苷甲硫氨酸; “T”表示抑制,“↓”表示下降。参考Webb和Smith(2009),略有修改。

ChlM活性是甲基循环和叶绿素合成间的桥梁,因为它需要底物S-腺苷型甲硫氨酸(AdoMet) (Van Wilder等2009)。AdoMet是甲基供体,而S-腺苷型同型半胱氨酸(AdoHcy)是所有转甲基化反应的产物,AdoMet/AdoHcy比值通常被称为甲基化指数,Ado-Hcy浓度的增加使甲基化指数下降。由于80%的Met参与了AdoMet的合成和周转,MTX (DHFR的抑制剂)处理后的5-M-THF浓度受严重影响,进而影响Met的合成。ChlM活性随着AdoHcy浓度的增加而迅速下降,叶绿素合成速率的降低与ChlM活性的降低密切相关(Van Wilder等2009)。在烟草中,*Nitab4.5_0008674g0010*基因编码一种参与叶酸生物合成的二氢蝶呤醛缩酶(dihydroneopterin aldolase, DHNA),其表达量与叶绿素含量呈显著正相关,可能是调控黄叶突变体变黄的关键基因(Pan等2024)。另外,外喷叶酸将抑制叶绿素降解酶基因表达来维持叶绿素的水平,从而提高植物体内的叶绿素含量(Zhao等2024b)。

2.5 影响木质素合成

叶酸通过调控单碳代谢来影响木质素的合成(Adeyanju等2021)。木质素聚合物的G和S亚基是由SAM作为甲基供体,咖啡酸-O-甲基转移酶(cafeic acid O-methyltransferase, COMT)和咖啡酰辅A氧甲基转移酶(caffeoyl-coenzyme A-O-methyltransferase, CCoAOMT)利用SAM形成松柏醇和辛纳酚的甲氧基;而FPGS在SAM的生物合成中,是将谷氨酸添加到THF中,形成一个短的聚谷氨酸尾;在拟南芥中,*FPGS1*突变体中木质素生物合成途径的有些基因表达被下调。Adeyanju等(2021)发现,编码*bmr19*的基因实际上为*FPGS*基因,该基因与玉米*Bm4* (Phytosome v.12)氨基酸序列高度相似;*bmr19*突变的高粱*BTx623*衍生物中,其木质素含量显著低于野生型;酵母互补实验表明,玉米*bm4*基因在*FPGS*缺陷型酵母中的表达能挽救酵母突变表型,证明了*bm4*编码功能性FPGS。

2.6 参与逆境胁迫

植物胁迫响应包括大量代谢过程的调节,叶酸也参与其中,可以预测叶酸生物合成和代谢在各种胁迫下会受到严格而精细的调节,许多研究证实了叶酸在植物抗逆的重要作用。通过病毒诱导的

基因沉默干扰玉米幼苗中的质子偶联叶酸转运蛋白(proton coupled folate transporter protein, PCFT)的基因*ZmMFS1-62*和*ZmMFS1-173*,主要破坏根部的叶酸稳态,并降低对干旱和盐胁迫的耐受性(Hou等2024),这表明维持叶酸的正常转运和稳态对植物抵御胁迫至关重要。

当超过最佳的活性氧(reactive oxygen species, ROS)种类和活性氮(reactive nitrogen species, RNS)种类水平时会导致氧化应激,从而改变细胞的氧化还原状态。NADPH被用于还原最重要的ROS清除剂谷胱甘肽(glutathione disulfide, GSSG)。通过MTHFD催化将5,10-CH₂-THF转化为5,10-CH=THF,促进NADPH的生产。DHFR-TS是一种双功能酶,在过表达*DHFR-TS3*的植株中,MTHFD活性降低导致还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)循环效率降低从而容易受到氧化胁迫的影响(Gorelova等2017)。羟基脲(HU)会抑制ROS解毒酶而引起氧化应激,而过表达*DHFR-TS3*植物引起对HU的超敏反应,这是因为DHFR活性和叶酸丰度降低导致高ROS积累而造成氧化损伤,即叶酸代谢在HU胁迫中发挥了重要作用(Gorelova等2017)。植物对环境胁迫的响应部分通过表观遗传修饰来实现(如DNA低甲基化)。甲硫氨酸合酶(methionine synthase) METS1是叶酸途径和植物免疫之间的纽带;其过表达抑制植物免疫力,并伴随着全基因组DNA甲基化的增加,这表明在基因组水平施加甲基化压力会损害植物免疫力(González和Vera 2019)。从代谢途径关键酶的角度来看,HPPK/DHPS是叶酸代谢途径的关键酶。cytHPPK/DHPS仅在发育的种子中表达,而盐胁迫可诱导拟南芥幼苗中cytHPPK/DHPS转录水平升高,但胁迫并未造成叶片中叶酸含量的显著差异,这说明cytHPPK/DHPS可能在拟南芥幼苗的非生物胁迫响应中发挥着某种直接或间接作用,而非通过增加叶酸含量来提高抗胁迫能力(Storozhenko等2007)。

叶酸也与其他物质协同调节植物胁迫响应。植物球蛋白(brassica napus phytoglobin, Pgb)是一种含血红素的蛋白质,可改善植物对胁迫的响应。过表达*BnPgb1*减轻了植物的典型渍水症状,包括ROS积累和根尖分生组织恶化,这些效应与抗氧化

系统的激活和叶酸的转录诱导有关(El-Khateeb等2023)。一氧化氮(NO)是植物中具有多种生物学功能的信号分子,参与植物对生物和非生物胁迫的响应。在动物体内,NO是由一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)合成的;在拟南芥中, *OtNOS* 能有效地利用THF作为辅因子,调节NO的产生,以缓解植物对非生物胁迫的影响(Foresi等2015)。

此外,很多研究表明外施叶酸能提高植物对非生物胁迫的耐受性。叶面喷施叶酸上调了植物中过氧化氢酶、超氧化物歧化酶和抗坏血酸过氧化物酶的活性以提高植物抗旱性(Khan等2022)。Alsamadany等(2022)研究发现,外施叶酸可使编码质膜 Na^+/H^+ 交换蛋白(salt overly sensitive, SOS1)、液泡膜定位的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白(tonoplast Na^+/H^+ antiporter, NHX1)和多功能渗透保护蛋白(Osmotin)的基因表达显著上调。用适量的叶酸处理种子还能降低不同盐浓度下大麦分生组织细胞染色体畸变频率(Özmen和Tabur 2020)。

2.7 影响基因表达的表现遗传调控

表观遗传在生物的生长发育、逆境胁迫及基因组稳定性等方面发挥重要作用。细胞内调节导致的表观遗传变化通常发生在核基质中,在染色质区域引入的翻译后的修饰(post-translational modifications, PTMs)构成了细胞的一些主要的表观遗传特征。在植物中,DNA甲基化发生在CG、CHG和CHH(H=A、C或T)的背景下。每个序列上的DNA甲基化都由特定的DNMTs建立和维持。所有的DNMT酶都有一个基本的共同催化机制,它使用SAM作为甲基供体,而它的合成通过叶酸与Met循环建立。

用叶酸合成前体pABA的类似物和竞争性拮抗剂(SMZ)处理的植物DNA甲基化和组蛋白H3(Lys9)二甲基化(histone H3 lysine 9 methylation, H3-K9me2)水平显著降低,这证明了叶酸在甲基化过程中的作用(Zhang等2012)。DNA甲基化与H3K9me2标记高度相关。研究发现*FPGS1*突变体对染色质沉默的影响与DNA甲基化和H3K9me2水平降低相关,重要的是通过补充5-F-THF可修复DNA甲基化、H3K9me2和染色质沉默;*FPGS1*突变体导致SAH和Hcy上调,从而减少甲基供体SAM的产生来抑制

DNA甲基化(Zhou等2013)。MTHFD的活性降低会使植物更容易遭受氧化胁迫,其亚形态突变体*MTHFD1-1*会扰乱叶酸代谢和细胞氧化还原状态,并导致DNA甲基化缺失(Gorelova等2017)。

3 植物体内叶酸的生物合成、运输与分解回补

3.1 植物体内叶酸的生物合成

高等植物中叶酸的生物合成和代谢已研究了近20年。喋啶和pABA的穿梭主要决定了植物的从头合成(Hanson和Gregory 2011)。叶酸的从头合成通常发生在植物和微生物中,具有相同的步骤,并被认为是生物体中是相当保守的。在叶酸的生物合成中,首先在细胞质和质体中分别产生喋啶和pABA,随后在线粒体中浓缩、谷氨酰化和还原形成四氢叶酸的单/聚谷氨酸形式(图5)(Hanson和Gregory 2011)。

叶酸的合成是通过喋啶的产生,在细胞质中启动并在线粒体中完成的。细胞质中,GTP在GTP环化水解酶1(GTP cyclohydrolase 1, GCHI)作用下合成喋啶类复合物,GCHI是合成途径流量控制的关键(Hossain等2004)。在质体中,氨基苯甲酸(pABA)在氨基脱氧分支酸合酶(aminodeoxychorismate synthase, ADCS)和氨基脱氧分支酸裂解酶(aminodeoxychorismate lyase, ADCL)催化下生成,pABA阴离子可依pH在亚细胞室间自发分布,高水平pABA及其衍生物会反馈抑制ADCS和ADCL(Hanson和Gregory 2011)。

随后,pABA与线粒体中的胞质喋啶连接生成二氢喋酸。喋啶前体6-羟甲基二氢喋啶(hydroxymethyl dihydropterin, HMDHP)进入线粒体可能是载体介导的,但在植物中载体待鉴定,其先后与HPPK、DHPS作用,并与pABA缩合生成二氢喋酸(dihydroptanoic acid, DHP),DHPS结构域受DHP等反馈抑制。接着,DHFS和DHFR依次作用,生成单谷氨酸四氢叶酸,植物和人类的DHFR叶酸结合结构域基本结构相似(Samanta等2014)。之后,在ATP参与下,叶酸在叶酸聚谷氨酸合成酶(FPGS)催化下聚谷氨酰化,聚谷氨酰化利于叶酸在细胞和亚细胞区室保留,FPGS在拟南芥中由三个基因

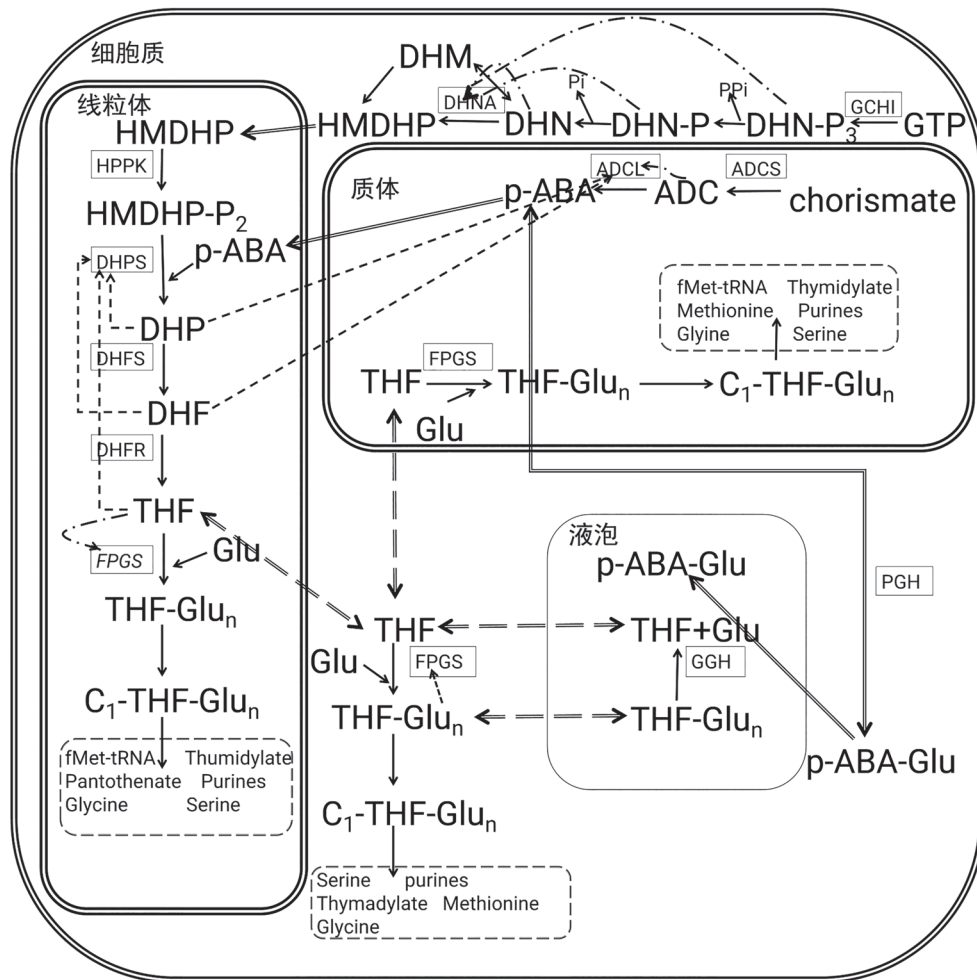


图5 叶酸的生物合成途径

Fig. 5 Folate biosynthesis pathway

短划单虚线代表酶被随后的叶酸生物合成中间体反馈抑制, 长短交替虚线代表促进, 双实线代表前体运输, 双虚线代表叶酸潜在运输途径, 虚线方框内代表C1产物。ADC: 氨基脱氧分支酸; ADCS: 氨基脱氧分支酸合酶; ADCL: 氨基脱氧分支酸连接酶; DHN: 二氢新喋啶; DHN-P3: 二氢新喋啶三磷酸; DHN-P: 二氢新喋啶一磷酸; DHNA: 二氢新喋啶醛缩酶; DHFS: 二氢叶酸合成酶; DHFR: 二氢叶酸还原酶; DHP: 二氢喋酸; DHPS: 二氢喋酸合成酶; DHM: 二氢单喋啶; FPGS: 多聚谷氨酸合成酶; GCHI: GTP环化水解酶1; GGH: γ -谷氨酰基水解酶; GTP: 鸟苷三磷酸; HMDHP: 6-羟甲基二氢喋啶; HMDHP-P₂: 6-羟甲基二氢喋啶焦磷酸; HPPK: HMDHP焦磷酸激酶; pABA: 对氨基苯甲酸; PGH: 对氨基苯甲酰基谷氨酸水解酶; THF-Glu_n: 四氢叶酸聚谷氨酸酯。参考Hanson和Gregory (2011), 略有修改。

FPGS1、*FPGS2*和*FPGS3*控制, 它们分别编码质体、线粒体和胞质亚型; 聚谷氨酰化程度由*FPGS*和 γ -谷氨酰基水解酶(γ -glutamyl hydrolase, *GGH*)相对活性决定(Akhtar等2010), 其产生的聚谷氨酰化叶酸存在于细胞质、线粒体和质体, 参与一碳代谢。

3.2 植物体内叶酸的运输

叶酸在植物细胞中的分布表明了维生素在细胞

器和细胞质之间有复杂运输(Bedhomme等2005)。叶酸只在线粒体中产生, 参与THF与聚谷氨酸合成的所有酶都存在于线粒体中, THF不能在细胞内自由扩散, 而THF可以分别运输到细胞质和质体中, 并通过叶酸聚谷氨酸合成酶(*FPGS*)在不同细胞器中的作用实现聚谷氨酰化, 这意味着线粒体包膜中存在叶酸转运体。植物具有哺乳动物多药耐药蛋

白(MRPs)的同源物,介导叶酸从细胞外排,叶酸生物合成受损的突变体可以通过外源叶酸的应用而恢复,进一步表明存在叶酸及其前体的细胞器间穿梭(Klaus等2005)。哺乳动物线粒体吸收叶酸是由一种独特的转运体介导的,而叶酸输入到叶绿体应该有其他替代途径,M-THF的转运可能归因于第二种叶绿体叶酸转运体(Hossain等2004)。目前,定位在叶绿体膜上的叶酸转运体(如叶酸转运体*AtFOLT1*)是真核特异性线粒体载体家族的成员,而另一种类型的叶酸转运体可能是从蓝藻或锥虫的祖先进化而来的(Weber和Fischer 2007)。

有研究者在蓝藻(Cyanobacteria)和植物中检测到了利什曼原虫叶酸转运体的同源物(Klaus等2005),蓝藻蛋白(聚囊藻*slr0642*)在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中表达时赋予了运输叶酸和叶酸类似物的能力。将一种pABA营养缺陷型大肠杆菌突变体与聚囊菌基因*slr0642*及其最接近的拟南芥同源基因*At2g32040*互补发现,这两种蛋白质都能运输叶酸的单氨酰基形式(Klaus等2005)。拟南芥中的*At2g32040*蛋白有一个预测的叶绿体转运肽,消融该蛋白导致叶绿体总叶酸增加23%,5-M-THF比例下降34%,这意味着*At2g32040*作用于5-F-THF、叶酸和抗叶酸盐时没有明显的高度特异性,因此可以推测它能运输质体中发现的任何叶酸的单氨酰基形式(Klaus等2005)。

拟南芥蛋白*AtFOLT1* (*A. thaliana* folate transporter)是哺乳动物细胞中线粒体叶酸转运体(mitochondrial folate transporter, MFTs)最接近的同源物(Bedhomme等2005)。*PSS30*编码叶酸转运蛋白*AtFOLT1*,该蛋白之前定位于叶绿体并参与叶酸从细胞质到质体的转运(Kambakam等2021)。*At5g66830* (*AtFOLT1*)编码的蛋白质是拟南芥中大型线粒体载体家族(mitochondrial carrier family, MCF)的成员(Bedhomme等2005),*At5g66380*的失活既不影响叶绿体叶酸库,也不影响植物生长,这表明存在一种替代的质体转运体,说明一个载体的缺失可以通过另一个载体来补偿(Gorelova等2017)。

豌豆叶片和甜菜(*Beta vulgaris*)储藏根的液泡是叶酸的重要细胞内储存位点,而*AtMRP1*不仅介导叶酸的单谷氨酸形式运输,还能转运其他类似

物。在*AtMRP1*插入突变体中,植物对甲氨蝶呤的敏感性显著增强,表现为生长迟缓和液泡内抗叶酸物质隔离能力下降(Raichaudhuri等2009)。通过离体实验进一步发现,突变体原生质体的液泡在含甲氨蝶呤培养基中积累的放射性标记叶酸减少了50%,且纯化的液泡膜囊泡对叶酸的MgATP依赖性摄取能力仅为野生型的40%(Raichaudhuri等2009),故植物体内叶酸的器官间平衡可能通过液泡储存动态调控与膜转运蛋白的协同作用实现(Raichaudhuri等2009)。拟南芥液泡膜定位的ABC(ATP-binding cassette)转运蛋白*AtABCC4*通过将过量的叶酸转运至液泡来调节细胞质中叶酸的浓度,这说明ABCC转运蛋白对叶酸的贮存也很重要(Yan等2021)。

值得注意的是,有研究表明烟酰胺介导Fe从韧皮部向库器官的卸载过程,而非直接参与长距离运输,这种机制可能与叶酸的器官特异性分配存在相似性。在缺乏烟酰胺条件下,Fe会在韧皮部异常积累,这提示植物可能采用类似的调控策略来管理不同金属元素和维生素的运输路径(Schuler等2012)。还有研究发现叶酸在维管植物组织中存在,证实了聚谷氨酸形式的叶酸在组织间的运输及其在维管系统中的潜在利用(Garza-Aguilar等2024)。

3.3 分解与回收

由于产生的叶酸在植物中会快速降解,揭示植物叶酸的稳定和分解机制非常重要(Gorelova等2017)。众多研究表明,叶酸分解产物展现出一种独特的化学行为,即它们能够较为容易地转化为叶酸前体。这一转化过程涉及到一系列精细的化学反应,其背后的分子机制与叶酸的结构特性以及所处的微环境密切相关(图6-A)。较低的温度、中性至碱性pH和抗氧化剂将稳定THF并延缓其氧化降解,从而形成其他未取代的叶酸,这种非酶切割被认为是所有生物体中叶酸分解的主要途径。叶酸对切割的易感性各不相同,THF和DHF最易受攻击,而5-F-THF和10-F-THF最不易受攻击。对于THF和DHF,分解反应中形成的第一个蝶酮分别是四氢和二氢蝶酮-6-醛,进一步氧化可将四氢转化为二氢形式,并同时转化为完全氧化的芳香形式蝶酮-6-醛;额外的氧化作用将喋啶-6-醛转化为喋

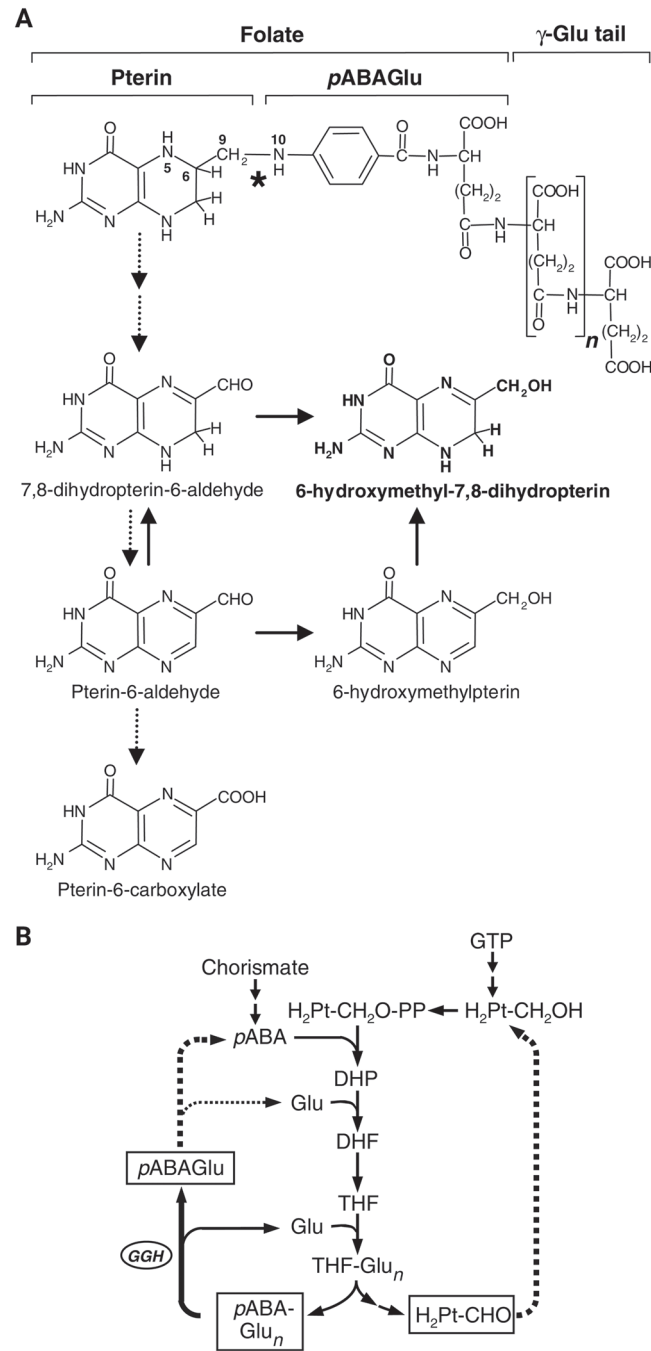


图6 叶酸的分解和潜在的回收反应

Fig. 6 Folate breakdown and potential salvage reactions

A: 叶酸之间的关系(所示为THF)及其分解产物。氧化C9裂解的N10键(黑色星号)产生喋啶加pABA-Glu或pABA-Glu_n。对于THF, 喋啶是5,6,7,8-四氢喋啶-6-醛, 容易氧化为7,8-二氢喋啶-6-醛(也直接形成通过DHF的氧化裂解)。7,8-二氢喋啶-6-醛可进一步氧化为喋啶-6-醛和喋啶-6-羧酸盐, 或还原为叶酸合成中间体6-羟甲基-7,8-二氢喋啶(加粗黑色)。喋啶-6-醛也可能转化为6-羟甲基-7,8-二氢喋啶(通过还原为7,8-二氢喋啶-6-醛, 或还原侧链得到6-羟甲基喋啶)。6-羧酸盐喋啶似乎无法恢复。虚线箭头代表化学氧化; 实线箭头代表酶还原。B: 与叶酸生物合成相关的叶酸回收反应(外框粗箭头)。虚线箭头表示在微生物中已知而在植物中是假设的反应。H₂Pt-CHO: 二氢喋啶-6-醛; H₂Pt-CH₂OH: 羟甲基-7,8-二氢喋啶; -PP: 焦磷酸盐; DHP: 二氢喋啶。参考Orsomando等(2006), 略有修改。

啉-6-羧酸盐,可能还有其他最终产物。植物的叶酸分解率为每天10%,高于哺乳动物系统,植物中异常高的叶酸分解率意味着存在一种活跃的切割过程(Hanson和Gregory 2011)。已经报道了哺乳动物铁蛋白在体外和体内促进叶酸裂解;此外,参与某些铁硫簇的合成或修复的叶酸依赖性COG-0354蛋白的作用可能涉及叶酸的氧化分解(Waller等2010)。对哺乳动物的研究表明,叶酸通过非酶过程自发氧化产生残基,这些残基通过尿液排出;而在植物中,分解产物可能不会被排泄,而是在特定的区域中、在新的合成途径中被循环利用(Gorelova等2017)。

叶酸的高降解率是自然发生的,但对总叶酸池的影响不大。对pABA-Glu和喋啉产物进行定量分析,发现它们在拟南芥的叶片中没有积累,证明在植物中存在叶酸的回收途径(Orsomando等2006)。一些细菌、植物和原生生物可能会进行叶酸回补(图6-B),其中叶酸分解产生的喋啉和pABA-Glu片段被回收用于叶酸合成(Akhtar等2010)。通过GGH去除聚谷氨酰尾部产生的pABA-Glu聚谷氨酰盐是良好的底物。GGH完全是完全位于液泡中的,这意味着pABA-Glu多谷氨酰盐存在液泡膜转运系统(Akhtar等2010);pABA-Glu被水解产生pABA和谷氨酸,然后这些游离的pABA和谷氨酸又可以被重新用于叶酸的合成。在植物中,不存在通过喋啉还原酶将完全氧化的喋啉还原到二氢形式(用于叶酸合成)和四氢形式(用作芳香羟化酶和其他喋啉依赖性酶的辅因子)。

4 植物体内叶酸代谢的调控

叶酸缺乏是全球性问题,但在亚洲、非洲和拉丁美洲国家更为普遍,影响了20多亿人(Jha等2020)。叶酸缺乏症在中国也很普遍,尤其是在中国北部,因为新鲜绿叶蔬菜的消费有限,出生缺陷率从4.2%~10.6%不等(Luo等2017a)。缺乏叶酸可能会破坏动物的生理功能,导致生长抑制,扰乱单碳代谢,从而导致神经系统疾病、抑郁症以及癌症等的发生。目前人们正在采取“补充叶酸药丸”、“工业食品叶酸强化”、“植物叶酸生物强化”和“改变饮食习惯的教育”等策略来解决叶酸缺乏症,但更安全、高

效和可持续的策略应是对植物体内的叶酸含量进行代谢调控,实现植物的叶酸生物强化。

4.1 基因工程

叶酸强化可以从“增强叶酸的合成与回补”、“减少叶酸合成的反馈抑制”和“增强叶酸的稳定性”三个方面入手。在过去的几十年里,人们在不同的植物平台上进行了不同的叶酸生物强化工作(表3)。最早在拟南芥(Hanson和Gregory 2011)和番茄(Díaz de la Garza等2007)中成功进行了生物强化,其叶酸分别提高了4倍和2倍(表3)。通过对喋啉和pABA分支的工程改造证实了植物叶酸生物强化策略,该方法已应用于水稻、马铃薯、小麦和玉米等作物以增加叶酸的积累(表3)。转基因植物中喋啉水平的大幅增加证实了GCHI在促进叶酸生物合成中的关键作用,但这种策略中叶酸水平提高有限,可能是存在着喋啉前体的大量积累,pABA库耗尽抑制了叶酸进一步增加(Hossain等2004),而当转基因植物施加pABA时会导致额外的叶酸增加。在植物中,几个叶酸生物合成基因受到发育调控(Lian等2022)。为了提高主要植物叶酸库丰度和稳定性,除了大胆采用几种方法相组合外,还应考虑到所采用的生物强化策略并非对所有植物都同样有效(Blancquaert等2015)。

4.2 生理生化调控

增强叶酸含量的策略主要集中在增加叶酸前体的积累上,许多研究者通过不同的方法来提高叶酸的整体水平,以改善作物品质(Hanson和Gregory 2011)。例如,在水培菠菜中添加苯丙氨酸和谷氨酸后,样品的总叶酸含量分别比对照组显著增加了1.8倍和1.4倍,这显示了化学激发子在促进叶酸合成方面的有效性(Watanabe等2017)。García-Salinas等(2016)研究发现,对试验中的跃变型果实进行乙烯处理能够影响5-M-THF的积累,且这种影响与乙烯的生物合成过程如甲硫氨酸循环相关。经乙烯处理的成熟番茄和香蕉的叶酸含量分别增加了24%和51%,而木瓜(*Pseudocarya sinensis*)的叶酸含量则减少了26%,鳄梨(*Persea americana*)没有变化,这表明乙烯处理对不同物种的叶酸积累有显著的差异。

水杨酸作为另一种增强剂,已被证实能提高

表3 改造植物体内叶酸含量的基因工程
Table 3 Genetic engineering for modification of folate content in plants

方法	目标基因	基因来源	目标作物	叶酸改变量/倍	文献来源
单基因过表达	<i>MmGCHI</i>	小鼠	番茄	2	Díaz de la Garza等2007
	<i>EcGCHI</i>	大肠杆菌	拟南芥	2~4	Hossain等2004
	<i>GgGCHI</i>	鸡	生菜	2.1~8.5	Nunes等2009
	<i>EcGCHI</i>	大肠杆菌	玉米	1	Naqvi等2009
	<i>AtGCHI</i>	拟南芥	大豆	3	Ramírez Rivera等2016
	<i>AtGCHI</i>	拟南芥	水稻	3.3~3.7	Dong等2014
	<i>AtADCS</i>	拟南芥	水稻	1.5~1.8	Dong等2014
	<i>HPPK/DHPS</i>	小麦	水稻	1.2~2	Gillies等2008
	<i>EcDHNA</i>	大肠杆菌	烟草	2.5	Pandey等2017
	<i>EcDHFS</i>	大肠杆菌	拟南芥	显著提高	Liang等2006
	<i>LtPTR1</i>	利什曼原虫	烟草	1.15	鹿晔等2012
	<i>SiADCL</i>	谷子	拟南芥	1.14~1.84	Zhao等2024a
	<i>SiFBP</i>	谷子	拟南芥	显著提高	Hou等2022b
	联合基因过表达	<i>AtGCHI+AtADCS</i>	拟南芥	水稻	100
<i>AtGCHI+AtADCS</i>		拟南芥	番茄	25	Díaz等2007
<i>GmGCHI+GmADCS</i>		大豆	玉米	4.2	Liang等2019
<i>GmGCHI+GmADCS</i>		大豆	小麦	2.3	Liang等2019
<i>Atpsy+AtGCHI</i>		大肠杆菌	罗曼生菜	1.85	Fu等2012
<i>AtFPGS+OsHPPK/DHPS</i>		拟南芥、水稻	马铃薯	12	Lepeleire等2018
<i>AtGCHI/AtADCS/AtFPGS/FBP</i>		拟南芥、牛奶	水稻	150	Blancquaert等2015
<i>OsGCHI+OsADCS</i>		水稻	水稻	37.9	Lai等2025
基因敲除		<i>AtGGH1^{RNAi}+AtGGH2-1</i>	拟南芥	拟南芥	1.34
	<i>SiGFT1+SiGFT2</i>	谷子	谷子	4	Pang等2024
基因抑制	<i>5-FCL</i>	拟南芥	拟南芥	2.0	Goyer和Navarre 2007

At: 拟南芥; *Ec*: 大肠杆菌; *Gg*: 鸡; *Gm*: 大豆; *Lt*: 利什曼原虫; *Mm*: 小鼠; *Os*: 水稻。

多种植物的叶酸含量及其相关基因的表达水平。外源水杨酸可诱导谷子(*Setaria italica*)穗中叶酸的积累(Hou等2022a); 在对香菜进行0.25 mmol·L⁻¹水杨酸处理24 h后, 叶酸及其衍生物的含量比对照组显著提高了2~6倍; 同时, 水杨酸显著下调编码催化叶酸前体合成的酶基因*AtADCS*的表达, 而上调其他合成酶基因*AtGCHII*的表达(Puthusseri等2018); 在没有*AtADCS*上调的情况下, 单独过表达*AtGCHII*可能不会导致更高的叶酸含量(Díaz等2007), 提示了水杨酸在叶酸合成调控中的复杂作用。研究还发现, 经过水杨酸处理后, 叶酸结合蛋白(folate-binding protein, FBP)的含量显著增加, 使叶酸在植物体内具有更高的稳定性(Puthusseri等2018)。此外, 施加茉莉酸甲酯、水杨酸和脱落酸等激素后, 香菜叶片中的叶酸含量也显著增强, 并

在采后贮藏过程中保持了其稳定性(Puthusseri等2018)。

在大豆愈伤组织研究中, 添加1.5 mg·L⁻¹的2,4-D和0.1 mg·L⁻¹的KT后, 适当调整IAA浓度可以显著增加总叶酸含量, 且在最佳条件下, 培养物中最大叶酸含量达到0.324 μg·g⁻¹ (Akitha等2018), 这表明培养基成分的精确调控对于提升叶酸合成具有重要作用。此外, 促生根际细菌通过各种应激激素诱导的途径也可能进一步促进叶酸的积累(Sonbarse等2020)。综上所述, 通过化学激发子、激素处理及适当的培养条件, 显著提高作物中叶酸的含量, 可为改善作物营养品质提供新策略。

4.3 其他因素

叶酸含量受气候、土壤条件、贮存环境和加工方式等影响, Kolton等(2022)已专门论述过, 在此

不多加赘述。如低温胁迫上调叶酸合成途径中相关通路基因的表达,并提升叶酸合成相关酶的表达量,从而增加叶酸积累;高温胁迫下,由于*ZmADCS*编码的酶和下游甲基化反应的调节,5-M-THF保持不变(Xiang等2020)。稻米贮存和烹饪导致的叶酸损失分别为23%和48.3%(Dong等2014)。Islam等(2021)发现糯玉米在25°C贮藏5 h后平均保留率为83%;甜玉米在4°C贮藏3 h后的保留率为77%;20°C贮藏14 h后降至71%;煮玉米的叶酸平均减少45%,而蒸煮和微波加热的损失较小,分别为12%和15%。近期研究发现,不同粒色的小麦中,蓝粒和紫粒小麦总叶酸含量显著高于红粒和白粒,但红粒和白粒间及蓝粒与紫粒间总叶酸含量无明显差异(田鹏等2024)。叶酸代谢还需要微量元素作为酶辅因子,如硒(Se)和锌(Zn),而它们在天然土壤中的含量往往不足,使得人们越来越有兴趣寻找新的策略来同时增加植物中天然叶酸和微量元素的含量。

5 展望

世界上绝大部分人都缺乏叶酸。无论是发达国家还是发展中国家,叶酸缺乏症已成为全球面临的重大挑战和公共健康问题,世界卫生组织明确提出了每日叶酸推荐摄入量400 μg (Lyon等2020)。据不完全统计,全球由叶酸缺乏而引起的贫血高达30%,仅次于缺铁而导致的贫血,我国约20%的人叶酸摄入量不足,尤其是北方和西北部地区叶酸摄入量严重不足(Luo 2017a);在国务院办公厅印发的《国民营养计划(2017—2030年)》中已将控制孕妇的叶酸缺乏率列入重大行动及主要目标。前人研究表明,人工合成叶酸用于强化药丸和食品不仅成本高,难推广,还存在诸多副作用。出于安全考虑,欧盟多国已拒绝强制添加叶酸强化剂,转向食用内源性高叶酸食品,植物叶酸成为人类摄取叶酸的最佳来源。目前,围绕植物体内叶酸的研究虽然取得了一些成果,但仍有很多问题亟待人们去探究和揭示,比较迫在眉睫的有以下几个方面:

第一,当前在植物叶酸研究领域,多数研究聚焦于植物最终收获部位的叶酸含量。为系统剖析

不同植物品种生长发育过程中组织、器官叶酸含量差异,以及全生育期的累积动态变化,可借助高效液相色谱串联质谱技术,对植物不同部位、不同生长阶段的叶酸含量进行精准定量分析。同时,运用高通量测序技术,对不同植物品种叶酸代谢相关基因的表达模式进行全面研究。这些研究策略的实施,有助于填补当前研究的空白,为植物叶酸研究积累丰富的物种数据,进而助力叶酸资源植物实现高产、高效、高值利用。

第二,植物体内叶酸形式多样,以5-M-THF与5-F-THF为主,前者生理活性最高,后者稳定性更强,但5-F-THF在植物中的作用机制尚不明确。为揭示多种形式的叶酸在植物各部位、各生长阶段及不同环境下,如何发挥特定功能调控生长发育,它们之间的动态平衡如何构建与调控,以及哪些功能最为关键,可采用代谢组学结合基因编辑技术。通过对叶酸代谢突变体的代谢谱分析,明确不同形式叶酸的代谢流向;利用基因编辑技术,敲除或过表达特定叶酸代谢基因,观察植物表型及叶酸代谢变化,从而深入解析叶酸功能调控机制。

第三,叶酸在植物体内的运输,是重要的生理过程。目前,对其运输的研究多局限于细胞内,细胞、组织和器官间的叶酸运输研究几乎空白。在动物体内已鉴定出叶酸转运体,但在绝大多数植物体内仍有待发现与鉴定。为深入探究植物叶酸转运蛋白的结构、分布与功能,一方面可利用放射性同位素标记技术,追踪叶酸在植物组织和器官间的运输路径;另一方面,借助酵母异源表达系统,对候选转运蛋白进行功能验证。这些研究不仅是揭示叶酸运输机制的关键,更是提高叶酸在细胞内稳定供应和高效利用的重要途径,是未来植物叶酸研究的最迫切、最基础和最深层问题。

第四,除了合成代谢结构基因,植物叶酸在转录、翻译和代谢等层面的调控机制近乎空白,这严重限制了对其功能的全面理解,也阻碍了提升植物叶酸含量的进程。未来,需借助多组学技术与分子生物学手段,通过整合转录组学、蛋白质组学和代谢组学数据,构建叶酸生物合成及代谢调控网络。同时,利用染色质免疫沉淀测序技术,鉴定叶酸代谢基因的转录调控元件,挖掘关键调控因子,

为叶酸生物强化提供基因资源。

第五,植物体内的天然叶酸可被人体直接吸收,是人类获取叶酸的来源。通过生物强化提高植物叶酸含量,为解决叶酸缺乏问题的新选择。但目前植物叶酸生物强化手段单一,缺乏系统性。因此,可整合遗传改良、环境调控、栽培管理等多环节的研究,利用基因工程技术将外源叶酸合成基因导入植物,结合环境调控和栽培管理措施,如合理施肥、调控光照和温度等,最大限度提升植物的叶酸含量。

参考文献(References)

- Adeyanju AO, Sattler SE, Rich PJ, et al (2021). Sorghum *Brown midrib19 (Bmr19)* gene links lignin biosynthesis to folate metabolism. *Genes*, 12 (5): 660–677
- Agyenim-Boateng KG, Zhang SR, Islam MS, et al (2022). Profiling of naturally occurring folates in a diverse soybean germplasm by HPLC-MS/MS. *Food Chem*, 384: 132520
- Akhtar TA, Orsomando G, Mehrshahi P, et al (2010). A central role for gamma-glutamyl hydrolases in plant folate homeostasis. *Plant J*, 64 (2): 256–266
- Akitha DM, Kumar SS, Giridhar P (2018). High yield production of folates from soybean callus cultures in response to elicitors. *3 Biotech*, 8: 80
- Alsamadany H, Mansour H, Elkelish A, et al (2022). Folic acid confers tolerance against salt stress-induced oxidative damages in snap beans through regulation growth, metabolites, antioxidant machinery and gene expression. *Plants*, 11: 1459
- Bedhomme M, Hoffmann M, McCarthy EA, et al (2005). Folate metabolism in plants: an *Arabidopsis* homolog of the mammalian mitochondrial folate transporter mediates folate import into chloroplasts. *J Biol Chem*, 280 (41): 34823–34831
- Blancaert D, Van Daele J, Strobbe S, et al (2015). Improving folate (vitamin B₉) stability in biofortified rice through metabolic engineering. *Nat Biotechnol*, 33 (10): 1076–1078
- Cao JJ, Liu Z, Xiao BT, et al (2025). Effects of folate biosynthesis defects in *Lactiplantibacillus plantarum*. *Microbiol Res*, 292: 128014
- Chen JF, Meng HY, Zhang CY, et al (2014). Effects of the overexpression of folylpolyglutamate synthase to folate mutant influences responses in low nitrogen stress. *Guizhou Agric Sci*, 42 (5): 7–11 (in Chinese with English abstract) [陈金凤, 孟红岩, 张春义等(2014). 过表达叶酰聚谷氨酸合成酶对低氮胁迫下叶酸突变体的影响. *贵州农业科学*, 42 (5): 7–11]
- Cossins EA (2000). The fascinating world of folate and one-carbon metabolism. *Can J Bot*, 78 (6): 691–708
- Díaz de la Garza RI, Gregory JF III, Hanson AD (2007). Folate biofortification of tomato fruit. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104 (10): 4218–4222
- Dong W, Cheng ZJ, Lei CL, et al (2014). Overexpression of folate biosynthesis genes in rice (*Oryza sativa* L.) and evaluation of their impact on seed folate content. *Plant Food Hum Nutr*, 69: 379–385
- Edelmann M, Kariluoto S, Nyström L, et al (2012). Folate in oats and its milling fractions. *Food Chem*, 135 (3): 1938–1947
- Edelmann M, Kariluoto S, Nyström L, et al (2013). Folate in barley grain and fractions. *J Cereal Sci*, 58 (1): 37–44
- El-Khateeb EA, Youssef MS, Mira MM, et al (2023). Interplay between the *Brassica napus* phytoalbumin (*BnPgl1*), folic acid, and antioxidant responses enhances plant tolerance to waterlogging. *Plant Sci*, 334: 111775
- Foresi N, Mayta ML, Lodeyro AF, et al (2015). Expression of the tetrahydrofolate-dependent nitric oxide synthase from the green alga *Ostreococcus tauri* increases tolerance to abiotic stresses and influences stomatal development in *Arabidopsis*. *Plant J*, 82 (5): 806–821
- Fu XQ, Guo XB, You LJ, et al (2012). Co-transformation of *Atp5g* and *folE* genes elevated carotenoids and folic acid contents in romaine lettuce. *J Shanghai Jiaotong Univ Agr Sci*, 30 (6): 22–31
- Fyfe S, Hong H, Schirra HJ, et al (2022). Folate vitamers in the Australian green plum: through growth and ripening and across locations. *Front Nutr*, 9: 1006393
- Gambonnet B, Jabrin S, Ravel S, et al (2001). Folate distribution during higher plant development. *J Sci Food Agric*, 81 (9): 835–841
- García-Salinas C, Ramos-Parra PA, Díaz de la Garza RI (2016). Ethylene treatment induces changes in folate profiles in climacteric fruit during postharvest ripening. *Postharvest Biol Tec*, 118: 43–50
- Garza-Aguilar SM, Ramos-Parra PA, Urrea-López R, et al (2024). Folate biosynthesis is boosted in legume nodules. *Plant Cell Environ*, doi: 10.1111/pce.15294
- Gillies SA, McIntosh SR, Henry RJ (2008). A transgenic cereal crop with enhanced folate: rice expressing wheat HPPK/DHPS. In: Sopade PA, Mahasukhonthachai K, Liu Y, et al (eds). *Cereals 2008: Proceedings of 58th Australian Cereal Chemistry Conference*. Surfers Paradise, Queensland, Australia
- Giordano D, Reyneri A, Blandino M (2016). Folate distribution in barley (*Hordeum vulgare* L.), common wheat

- (*Triticum aestivum* L.) and durum wheat (*Triticum turgidum durum* Desf.) pearled fractions. *J Sci Food Agric*, 96 (5): 1709–1715
- González B, Vera P (2019). Folate metabolism interferes with plant immunity through 1C methionine synthase-directed genome-wide DNA methylation enhancement. *Mol Plant*, 12 (9): 1227–1242
- Gorelova V, Ambach L, Rébeillé F, et al (2017). Foliates in plants: research advances and progress in crop biofortification. *Front Chem*, 5: 21
- Goyer A, Navarre DA (2007). Determination of folate concentrations in diverse potato germplasm using a trienzyme extraction and a microbiological assay. *J Agric Food Chem*, 55 (9): 3523–3528
- Hanson AD, Gregory JF III (2011). Folate biosynthesis, turnover, and transport in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 62: 105–125
- Hossain T, Rosenberg I, Selhub J, et al (2004). Enhancement of folates in plants through metabolic engineering. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101 (14): 5158–5163
- Hou SY, Men YH, Zhang YJ, et al (2022a). Role of miRNAs in regulation of SA-mediated upregulation of genes involved in folate and methionine metabolism in foxtail millet. *Front Plant Sci*, 13: 1023764
- Hou SY, Zhang YJ, Zhao B, et al (2022b). Heterologous expression of *SiFBP*, a folate-binding protein from foxtail millet, confers increased folate content and altered amino acid profiles with nutritional potential to *Arabidopsis*. *J Agric Food Chem*, 70 (20): 6272–6284
- Hou XW, Lu ZW, Yu TF, et al (2024). Two maize homologs of mammalian proton-coupled folate transporter, *ZmMFS_1-62* and *ZmMFS_1-73*, are essential to salt and drought tolerance. *Plant Physiol Biochem*, 210: 108623
- Islam MS, Liu JA, Jiang L, et al (2021). Folate content in fresh corn: effects of harvest time, storage and cooking methods. *J Food Compost Anal*, 103: 104123
- Jabrin S, Ravanel S, Gambonnet B, et al (2003). One-carbon metabolism in plants. Regulation of tetrahydrofolate synthesis during germination and seedling development. *Plant Physiol*, 131 (3): 1431–1439
- Jha AB, Gali KK, Zhang H (2020). Folate profile diversity and associated SNPs using genome wide association study in pea. *Euphytica*, 216: 18
- Jiang L, Liu YY, Sun H, et al (2013). The mitochondrial folyl-polyglutamate synthetase gene is required for nitrogen utilization during early seedling development in *Arabidopsis*. *Plant physiol*, 161 (2): 971–989
- Johansson M, Jägerstad M, Frølich W (2007). Foliates in lettuce: a pilot study. *Scand J Nutr*, 51 (1): 22–30
- Kambakam S, Ngaki MN, Sahu BB, et al (2021). *Arabidopsis* non-host resistance *PSS30* gene enhances broad-spectrum disease resistance in the soybean cultivar Williams 82. *Plant J*, 107 (5): 1432–1446
- Khan MT, Ahmed S, Sardar R, et al (2022). Impression of foliar-applied folic acid on coriander (*Coriandrum sativum*) to regulate aerial growth, biochemical activity, and essential oil profiling under drought stress. *Front Plant Sci*, 13: 1005710
- Klaus SM, Kunji ER, Bozzo GG, et al (2005). Higher plant plastids and Cyanobacteria have folate carriers related to those of trypanosomatids. *J Biol Chem*, 280 (46): 38457–38463
- Kohton A, Długosz-Grochowska O, Wojciechowska R, et al (2022). Biosynthesis regulation of folates and phenols in plants. *Sci Hortic*, 291: 110561
- Lai CK, Hu SK, Jiao GA, et al (2025). Enhancing folate content in japonica rice through co-expression of *OsADCS* and *OsGTPCHI indica* alleles. *Rice Sci*, 32 (3): 353–366
- Lepeleire DJ, Strobbe S, Verstraete J, et al (2018). Folate biofortification of potato by tuber-specific expression of four folate biosynthesis genes. *Mol Plant*, 11 (1): 175–188
- Li W, Liang Q, Mishra RC, et al (2021). The 5-formyl-tetrahydrofolate proteome links folates with C/N metabolism and reveals feedback regulation of folate biosynthesis. *Plant Cell*, 33 (10): 3367–3385
- Li Y, Luo JY, Chen R, et al (2023). Folate shapes plant root architecture by affecting auxin distribution. *Plant J*, 113 (5): 969–985
- Lian T, Wang XX, Li S, et al (2022). Comparative transcriptome analysis reveals mechanisms of folate accumulation in maize grains. *Int J Mol Sci*, 23 (5): 1708
- Liang QJ, Wang K, Liu XN, et al (2019). Improved folate accumulation in genetically modified maize and wheat. *J Exp Bot*, 70 (5): 1539–1551
- Liang YH, Bovy AG, Fang YL (2006). Elevation of the folate content of *Arabidopsis* plants by heterologous expression of the bacterial gene encoding dihydropteroate synthase. *Crop J*, 32 (2): 164–168
- Lu Y, Liu XN, Jiang L, et al (2012). Overexpression of pterin reductase gene *PTR1* enhances folate biosynthesis in plants. *J Agric Sci Technol*, 14 (5): 49–56 (in Chinese with English abstract) [鹿晔, 刘晓宁, 姜凌等(2012). 过表达蝶呤还原酶*PTR1*基因促进植物叶酸合成的研究. *中国农业科技导报*, 14 (5): 49–56]
- Luo SY, Duan HY, Zou YC, et al (2017a). High pressure processing and post-high pressure storage induce the change of polyglutamyl folate and total folate from different legumes. *J Food Sci Technol*, 54: 3521–3531
- Luo SY, Duan HY, Zou YC, et al (2017b). Quantification of total folate, folate species and polyglutamyl folate dis-

- tribution in winged beans [*Psophocarus tetragonolobus* (L) DC] from different cultivars and growth stages by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Nutr Sci Vitaminol*, 63 (1): 69–80
- Lyon P, Strippoli V, Fang B, et al (2020). B vitamins and one-carbon metabolism: implications in human health and disease. *Nutrients*, 12 (9): 2867
- Martin H, Comeskey D, Simpson RM, et al (2010). Quantification of folate in fruits and vegetables: a fluorescence-based homogeneous assay. *Anal Biochem*, 402 (2): 137–145
- Menezes Y, Elder K, Clement A, et al (2022). Folic acid, folic acid, 5 methyl tetrahydrofolate supplementation for mutations that affect epigenesis through the folate and one-carbon cycles. *Biomolecules*, 12 (2): 197
- Meng HY, Jiang L, Xu BS, et al (2014). *Arabidopsis* plastidial folylpolyglutamate synthetase is required for seed reserve accumulation and seedling establishment in darkness. *PLOS One*, 9 (7): e101905
- Naqvi S, Zhu CF, Farre G, et al (2009). Transgenic multivitamin corn through biofortification of endosperm with three vitamins representing three distinct metabolic pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106 (19): 7762–7767
- Nascimento CP, Cipriano TM, Aragão FJL (2022). Natural variation of folate content in cowpea (*Vigna unguiculata*) germplasm and its correlation with the expression of the GTP cyclohydrolase I coding gene. *J Food Compos Anal*, 107: 104357
- Nunes AC, Kalkmann DC, Aragao FJ (2009). Folate biofortification of lettuce by expression of a codon optimized chicken GTP cyclohydrolase I gene. *Transgenic Res*, 18 (5): 661–667
- Orsomando G, Bozzo GG, Díaz de la Garza RI, et al (2006). Evidence for folate-salvage reactions in plants. *Plant J*, 46 (3): 426–435
- Özmen S, Tabur S (2020). Functions of folic acid (vitamin B₉) against cytotoxic effects of salt stress in *Hordeum vulgare* L. *Pak J Bot*, 52 (1): 17–22
- Pan QH, Jia RL, Pi K, et al (2024). Revealing the key role of the folate synthesis regulatory gene *DHNA* in tobacco leaf yellowing based on BSA-seq, RNA-seq, and proteomic sequencing. *BMC Plant Biol*, 24: 1211–1222
- Pandey DK, Kumar A, Rathore JS, et al (2017). Recombinant overexpression of dihydroneopterin aldolase catalyst potentially regulates folate-biofortification. *J Basic Microb*, 57 (6): 517–524
- Pang JZ, Zhang W, Zhang YY, et al (2024). Nullification of GFTs fortifies bioactive folates in foxtail millet. *J Integr Plant Biol*, 66 (8): 1540–1543
- Pertiwi H, Nur Mahendra MY, Kamaludeen J (2022). Folic acid: sources, chemistry, absorption, metabolism, beneficial effects on poultry performance and health. *Vet Med Int*, (1): 2163756
- Puthusseri B, Divya P, Veeresh L, et al (2018). Evaluation of folate-binding proteins and stability of folates in plant foliages. *Food Chem*, 242: 555–559
- Raichaudhuri A, Peng M, Naponelli V, et al (2009). Plant vacuolar ATP-binding cassette transporters that translocate folates and antifolates *in vitro* and contribute to antifolate tolerance *in vivo*. *J Biol Chem*, 284 (13): 8449–8460
- Ramírez Rivera NG, García-Salinas C, Aragão FJL, et al (2016). Metabolic engineering of folate and its precursors in Mexican common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Biotechnol J*, 14 (10): 2021–2032
- Robinson BR, Sathuvalli V, Bamberg J, et al (2015). Exploring folate diversity in wild and primitive potatoes for modern crop improvement. *Genes*, 6 (4): 1300–1314
- Rychlik M, Englert K, Kapfer S, et al (2007). Folate contents of legumes determined by optimized enzyme treatment and stable isotope dilution assays. *J Food Compos Anal*, 20 (5): 411–419
- Saeheng S, Bailes C, Bao H, et al (2024). Formate-tetrahydrofolate ligase: supplying the cytosolic one-carbon network in roots with one-carbon units originating from glycolate. *Plant J*, 119 (5): 24642483
- Samanta A, Datta AK, Datta SJ (2014). Study on folate binding domain of dihydrofolate reductase in different plant species and human beings. *Bioinformation*, 10 (2): 101–104
- Saravana KRM, Wang YB, Zhang XP, et al (2020). Redox components: key regulators of epigenetic modifications in plants. *Int J Mol Sci*, 21 (4): 1419
- Schuler M, Rellán-Álvarez R, Fink-Straube C, et al (2012). Nicotianamine functions in the phloem-based transport of iron to sink organs, in pollen development and pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 24 (6): 2380–2400
- Shao LH, Wang L (2014). Analysis of folic acid contents in main grain crops, fruits and vegetables. *J Food Sci*, 35 (24): 290–294
- Shohag MJ, Wei YY, Yu N, et al (2011). Natural variation of folate content and composition in spinach (*Spinacia oleracea*) germplasm. *Scand J Nutr*, 59 (23): 12520–12526
- Shohag MJ, Wei YY, Zhang J, et al (2020). Genetic and physiological regulation of folate in pak choi (*Brassica rapa* subsp. *chinensis*) germplasm. *J Exp Bot*, 71 (16): 4914–4929
- Sonbarse PP, Kiran K, Sharma P, et al (2020). Biochemical and molecular insights of PGPR application for the augmentation of carotenoids, tocopherols, and folate in the

- foliage of *Moringa oleifera*. *Phytochemistry*, 179: 112506
- Storozhenko S, De Brouwer V, Volckaert M, et al (2007). Folate fortification of rice by metabolic engineering. *Nat Biotechnol*, 25 (11): 1277–1279
- Tian P, Song J, Li X, et al (2024). Analysis of folate content and its derivatives in grains of wheat with different grain colors. *J Agric Sci Technol*, 26 (11): 56–65 (in Chinese with English abstract) [田鹏, 宋洁, 李霞等(2024). 不同粒色小麦籽粒中叶酸及衍生物含量分析. *中国农业科技导报*, 26 (11): 56–65]
- Tulipani S, Mezzetti B, Capocasa F, et al (2008). Antioxidants, phenolic compounds, and nutritional quality of different strawberry genotypes. *J Agric Food Chem*, 56 (3): 696–704
- Upadhyaya P, Tyagi K, Sarma S, et al (2017). Natural variation in folate levels among tomato (*Solanum lycopersicum*) accessions. *Food Chem*, 217: 610–619
- Van Wilder V, De Brouwer V, Loizeau K, et al (2009). C1 metabolism and chlorophyll synthesis: the Mg-protoporphyrin IX methyltransferase activity is dependent on the folate status. *New Phytol*, 182 (1): 137–145
- Waller JC, Alvarez S, Naponelli V, et al (2010). A role for tetrahydrofolates in the metabolism of iron-sulfur clusters in all domains of life. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107 (23): 10412–10417
- Wang Y, Wang JS, Dong EW, et al (2023). Foxtail millet [*Setaria italica* (L.) P. Beauv.] grown under nitrogen deficiency exhibits a lower folate contents. *Front Nutr*, 10: 1035739
- Watanabe S, Ohtani Y, Tatsukami Y, et al (2017). Folate biofortification in hydroponically cultivated spinach by the addition of phenylalanine. *J Agric Food Chem.*, 65 (23): 4605–4610
- Webb ME, Smith AG (2009). Chlorophyll and folate: intimate link revealed by drug treatment. *New Phytol*, 182 (1): 3–5
- Weber AP, Fischer K (2007). Making the connections – the crucial role of metabolite transporters at the interface between chloroplast and cytosol. *FEBS Lett*, 581 (12): 2215–2222
- Wei ZY, Sun KH, Sandoval FJ, et al (2013). Folate polyglutamylation eliminates dependence of activity on enzyme concentration in mitochondrial serine hydroxymethyltransferases from *Arabidopsis thaliana*. *Arch Biochem Biophys*, 36 (1): 87–96
- Xiang N, Hu J, Wen T, et al (2020). Effects of temperature stress on the accumulation of ascorbic acid and folates in sweet corn (*Zea mays* L.) seedlings. *J Sci Food Agr*, 100 (4): 1694–1701
- Yan L, Zhang JH, Chen HY, et al (2021). Genome-wide analysis of ATP-binding cassette transporter provides insight to genes related to bioactive metabolite transportation in *Salvia miltiorrhiza*. *BMC Genomics*, 22 (1): 315
- Ye XL, Kang WK, Li QL (2020). Determination of folic acid and its stability in fruits by HPLC-MS/MS. *Food Ind*, 41: 311–315 (in Chinese with English abstract) [叶晓利, 康文怀, 李巧玲(2020). 高效液相色谱-串联质谱法测定水果中叶酸及其稳定性. *食品工业*, 41: 311–315]
- Yi C, Zhang CY, Liang QJ (2020). Exogenous 5-formyltetrahydrofolate improves rice seedlings growth under limiting nitrogen condition. *J Agric Sci Technol*, 22 (4): 33–43 (in Chinese with English abstract) [易尘, 张春义, 梁秋菊(2020). 5-甲酰四氢叶酸促进水稻幼苗在低氮条件下生长发育的研究. *中国农业科技导报*, 22 (4): 33–43]
- Zhang H, Jha AB, De Silva D, et al (2019). Improved folate monoglutamate extraction and application to folate quantification from wild lentil seeds by ultra-performance liquid chromatography-selective reaction monitoring mass spectrometry. *J Chromatogr B*, 1121: 39–47
- Zhang H, Zhao Q, Lan T, et al (2020). Comparative analysis of physicochemical characteristics, nutritional and functional components and antioxidant capacity of fifteen kiwifruit (*Actinidia*) cultivars-comparative analysis of fifteen kiwifruit (*Actinidia*) cultivars. *Foods*, 9: 1267
- Zhang HM, Deng XY, Miki D, et al (2012). Sulfamethazine suppresses epigenetic silencing in *Arabidopsis* by impairing folate synthesis. *Plant Cell*, 24: 1230–1241
- Zhao Y, Hao JY, Men YH, et al (2024a). Over-expression of *SiADCLI* in *Arabidopsis* modulates folate and amino acid metabolism to impact on flowering time. *Plant Physiol Biochem*, 217: 109253
- Zhao Y, Shi J, Feng B, et al (2024b). Multi-omic analysis of the extension of broccoli quality during storage by folic acid. *J Adv Res*, 59: 65–78
- Zhou HR, Zhang FF, Ma ZY, et al (2013). Folate polyglutamylation is involved in chromatin silencing by maintaining global DNA methylation and histone H3K9 dimethylation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 25 (7): 2545–2559
- Zou CL, Huang KJ, Mo RX, et al (2024). Analysis and evaluation of folic acid, vitamin E, and zinc content of 190 fresh maize inbred lines in Guangxi area. *Jiangsu Agric Sci*, 52 (16): 134–140 (in Chinese) [邹成林, 黄开健, 莫润秀等(2024). 190份广西鲜食玉米自交系叶酸、维生素E、锌含量分析与评价. *江苏农业科学*, 52 (16): 134–140]