

水稻磷脂酶D ζ 2在响应磷饥饿胁迫过程中的作用

姚腾, 孙林啸, 吕玮鑫, 洪月云*

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉430070

摘要: 通过分子遗传突变分析水稻(*Oryza sativa*)磷脂酶D ζ 2 (PLD ζ 2)在应答磷饥饿过程中的作用, 结果表明水稻PLD ζ 2被磷饥饿胁迫显著诱导, 其缺失突变导致植株在低磷条件下生长受阻, 根生长显著低于野生型; 在严重缺磷条件下, 突变体 *pld ζ 2-1* 根长仅为野生型的58%, 其根系体积仅为野生型的40%, 突变体植株地上部生长也明显受到抑制。在磷饥饿胁迫条件下, 突变体 *pld ζ 2-1* 体内PLD ζ 2催化磷脂酰胆碱(PC)产生磷脂酸(PA)的活性明显低于野生型, 并使糖脂合成相关基因如磷脂酸磷酸水解酶1 (PAH1)和单半乳糖二酰甘油合酶2 (MGD2)的基因表达量显著下调, 表明水稻PLD ζ 2在磷饥饿胁迫下对根生长具有正调控作用。

关键词: 磷脂酶D ζ 2; 磷饥饿; 脂质代谢; 植物生长

The Role of Phospholipase D ζ 2 in Response to Phosphate Starvation in Rice

YAO Teng, SUN Lin-Xiao, LÜ Wei-Xin, HONG Yue-Yun*

National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract: In this study, the role of phospholipase D ζ 2 (PLD ζ 2) in response to phosphate starvation was analyzed through genetic mutation of PLD ζ 2 gene in rice (*Oryza sativa*). The result shows that the transcript level of rice PLD ζ 2 was largely induced by phosphate starvation. Loss of PLD ζ 2 resulted in growth inhibition; the root length of the *pld ζ 2-1* mutant was 58% of wild type (WT), and root volume of the *pld ζ 2-1* mutant was 40% of WT under phosphate starvation condition. PLD ζ 2 activity of the *pld ζ 2-1* mutant was less than that of WT when plants were grown under phosphate starvation condition. The transcript levels of genes, such as phosphatidic acid phosphohydrolase 1 (PAH1) and monogalactosyldiacylglycerol synthase 2 (MGD2) genes involved in galactolipid synthesis, were significantly reduced in the *pld ζ 2-1* mutant compared with WT in response to phosphate starvation. The results suggest that rice PLD ζ 2 plays a positive role in growth regulation under phosphate starvation condition.

Key words: phospholipase D ζ 2; phosphate starvation; lipid metabolism; plant growth

磷是植物生长发育的必需元素, 在细胞内磷主要分布于膜脂、核酸和磷酸化蛋白分子中, 磷也是细胞化学能储藏和转化腺嘌呤核苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 的主要成分, 参与了植物生长发育的各种代谢过程。土壤中可溶性磷仅占总磷的1%~5% (主要形式是H₂PO₄⁻和HPO₄²⁻), 且易随地表水流失, 绝大部分磷(95%~99%)在土壤中形成不溶复合物, 难于被植物吸收利用(McDowell和Condon 2000)。因此, 土壤中可利用磷不能满足植物生长发育所需, 必须依靠人工施用磷肥来提高作物产量。由于磷在土壤中移动缓慢, 作物对磷肥的利用率比氮肥更低, 我国仅为10%~15%, 在三大主要养分(氮、磷、钾)中利用率最低。目前我国大部分地区农田施肥量已经超过了土地的承受能力, 造成了土壤板结和退化。过

度施用磷肥还引起江河湖泊的富营养化、重金属元素的累积、农业成本的提高和资源的浪费(丁广大等2013; Al-Faiyz等2007), 严重阻碍了农业和环境的可持续发展。磷矿是不可再生资源, 如何提高磷肥利用率、在保障作物稳产高产的同时降低磷的消耗是当务之急。

磷脂酶D (phospholipase D, PLD)通过水解磷脂而产生磷脂酸(phosphatidic acid, PA)和亲水基团, 从而导致膜组分的重组, 以及由PA作为第二信使介导的信号转导过程(Testerink和Munnik 2005; Wang等2006)。磷脂酶广泛存在于不同植物的各

收稿 2015-07-28 修定 2015-09-11

资助 国家自然科学基金(30971852)。

* 通讯作者(E-mail: hongyy@mail.hzau.edu.cn; Tel: 027-87280545)。

种组织包括叶片、根、茎、花和种子等器官中。随着分子生物学和生物化学实验技术手段的发展,以及基因组序列信息的完善,植物PLD的研究取得了很大的进展。目前对模式植物拟南芥PLD进行了较为系统的研究,表明植物PLD广泛参与各种生物过程包括植物生长发育、逆境胁迫、衰老过程、激素响应、营养饥饿、细胞骨架重塑等方面,具有显著的生物学效应(Wang等2006; Zhang等2012)。

动物PLD包括PLD1和PLD2两个成员,植物PLD比动物复杂和多样,拟南芥基因组含有12个基因,依据其基因结构、序列相似性、结构域、生化特性,拟南芥PLD可分为PLD α (1、2、3)、PLD β (1、2)、PLD γ (1、2、3)、PLD δ 、PLD ϵ 及PLD ζ (1、2)。所有PLD基因含有2个HXKXXXD模体,即HKD1和HKD2,两模体间隔约320个氨基酸。HKD模体是PLD特有的保守序列,是催化水解磷脂的活性关键位点(Wang 2004)。根据结构域特征,PLD可分为2大类: C2-PLDs和PH/PX-PLDs。C2结构域属于钙离子依赖性的底物结合结构域,而PX结构域可与磷酸肌醇(phosphoinositides)及SH3结构域结合,该结构域与信号转导过程中的蛋白膜定位及蛋白复合体装配有关(Cheever等2001; Hiroaki等2001), PH结构域由约120氨基酸组成,与信号转导、细胞骨架等相关。动物PLD仅含PH/PX-PLDs,植物则包含C2-PLDs和PH/PX-PLDs。C2-PLDs包括PLD α s、PLD β s、PLD γ s、PLD δ 和PLD ϵ ; PH/PX-PLDs包括PLD ζ 1和PLD ζ 2 (Wang 2004)。不同PLD具有不同的生化特性,PLD α 1体外活性要求较高浓度($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 级) Ca^{2+} ,偏好磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC) (Pappan等1997), PLD β/γ 的活性要求较低浓度($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 级) Ca^{2+} (Zheng等2000), PLD δ 则要求油酸作为激活因子,且偏好磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)作为底物(Wang和Wang 2001), PLD ζ 的活性不要求 Ca^{2+} (Qin和Wang 2002), PLD ϵ 则在PLD α 1的活性条件下活性最强(Hong等2009)。由此可见,植物不同的PLD的活性调控机制各不相同,也说明PLD功能的多样性和异质性及分子调控机制的复杂性。植物在受到各种环境胁迫时可激活PLD,促发信号分子磷脂酸PA的产生,将外界环境信号传递到植物体内。

膜磷脂分子中的磷占细胞总磷的30%以上,是细胞中的磷库。研究表明在低磷胁迫下, PLD ζ 通过水解磷脂产生PA,继而在PA磷酸水解酶(phosphatidic acid phosphohydrolase, PAH)的催化下,将膜磷脂分子的磷酸基团分解出来供其他关键代谢所需,而水解的磷脂则由糖脂如单半乳糖二酰甘油(monogalactosyldiacylglycerol, MGDG)和双半乳糖二酰甘油(digalactosyldiacylglycerol, DGDG)所替代,维持膜系统的完整性(Li等2006; Cruz-Ramírez等2006; Nakamura等2009)。在拟南芥中,将PLD ζ 1和PLD ζ 2的双突变体置于磷饥饿条件下生长,其主根伸长受到明显抑制(Li等2006)。PLD ζ 2缺失突变导致植株在磷饥饿条件下的磷脂转化为糖脂过程受阻,其突变体根尖细胞排列紊乱(Cruz-Ramírez等2006)。尽管植物PLD广泛参与各种生物过程,但目前我们对植物PLD的了解绝大部分基于双子叶模式植物拟南芥的研究结果。单子叶模式植物水稻基因组含有17个PLD基因,其结构和种类比拟南芥更为复杂多样,其中含有PLD ζ 1和PLD ζ 2 (Li等2007)。为研究水稻PLD ζ 生物学功能,本研究分离了水稻PLD ζ 2基因突变体,初步分析了水稻PLD ζ 2在磷饥饿胁迫反应过程中的作用。

材料与方法

1 实验材料及种植处理

本实验所用水稻(*Oryza sativa* L.)为粳稻品种‘Dongjin’ (DJ)和‘中花11’ (ZH11)作为T-DNA插入突变体材料。将水稻种子浸种、催芽后,播种于土壤中生长2周。将突变体与共分离野生型长势一致的幼苗移植于含不同磷浓度(正常供磷 $180 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、中度磷饥饿 $45 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、严重磷饥饿 $1.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的水稻专用水培液中进行磷饥饿胁迫处理,每周更换一次水培液,定期观察植株长势,测量根长、株高等性状,比较分析野生型和突变体生长差异的显著性。而水稻PLD基因响应严重磷饥饿胁迫的表达谱分析条件为磷浓度 $9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2 植物DNA提取及突变体分离鉴定

植物基因组DNA提取采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法,选取植株叶片或根组织,在研钵中研磨成匀浆后加入合适体积的CTAB溶液($2\% \text{CTAB}$, $100 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{Tris-HCl}$, pH 8, $20 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

EDTA, 1.4 mol·L⁻¹ NaCl, 0.5% β -巯基乙醇), 提取DNA。突变体 $pld\zeta 2-1$ 鉴定用T-DNA侧翼序列引物2717-3 (DJ) 5'-ACGCTGAACTTGTGGCCGTT-3'配合 $PLD\zeta 2$ 正向引物5'-ATTTGGAACACCGTCAAAGC-3'和反向引物5'-TCAAATTGAAGG-GAGCATCC-3'; 而另一突变体 $pld\zeta 2-2$ 鉴定采用T-DNA侧翼序列引物NTLB5 (ZH11) 5'-AATC-CAGATCCCCGAATTA-3'配合 $PLD\zeta 2$ 正向引物5'-AATGCTGCTTAGTGTCCC-3'和反向引物5'-TACTGATTGGTGGCTGTG-3', 通过PCR鉴定T-DNA的插入及其插入纯合突变体。PCR反应条件如下: 94 °C 预变性4 min; 然后94 °C 变性30 s, 55~60 °C 退火30 s, 72 °C 延伸, 30~35个循环; 最后72 °C 延伸10 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离后用凝胶扫描仪检测。

3 RNA提取及反转录PCR

植物总RNA利用TransZol提取: 取植物相关组织速冻于液氮中并研磨成粉末, 加入适量TransZol, 混匀后置室温下孵育5 min, 加入适量氯仿混匀后室温孵育3 min, 4 °C 下离心(12 000×g) 15 min, 上清水相转置于新离心管中, 加适量异丙醇后室温孵育10 min; 4 °C 离心(12 000×g) 10 min, 去上清保留沉淀, 用75%乙醇(焦碳酸二乙酯处理水配制)洗净沉淀物, 室温晾干后将沉淀物溶于50~100 μ L RNA溶解液中。所提取的RNA经DNase I去除DNA后作为模板, 通过TranScript First-strand cDNA合成试剂盒(TransGen Biotech)反转录合成cDNA第一链, 所合成的cDNA存于-80 °C 备用。

4 基因表达量分析

以内参基因 β -actin表达量为参考, 将合成的cDNA浓度调整一致并作为模板, 利用目标基因的特异性引物进行合适循环数的PCR扩增目标片段, 所得产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离和凝胶成像系统检测目标条带的强弱, 半定量分析基因表达。实时定量分析先以 β -actin作为内参将cDNA浓度调一致, 然后以cDNA为模板进行实时定量PCR分析, 实时PCR反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 45个循环。

5 $PLD\zeta 2$ 活性分析

取水稻野生型和相应突变体叶片速冻于液氮中, 取回实验室后研磨成粉末, 加入缓冲液A (50

mmol·L⁻¹ Tri-HCl、10 mmol·L⁻¹ KCl、1 mmol·L⁻¹ EDTA、2 mmol·L⁻¹ DTT、0.5 mmol·L⁻¹ 苯甲基磺酰氟, pH 7.5) 研磨成匀浆, 在4 °C 于10 000×g离心10 min, 所得上清蛋白用于 $PLD\zeta 2$ 活性分析。反应体系为100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl、80 mmol·L⁻¹ KCl及0.4 mmol·L⁻¹ 脂质(PC:PE:磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸=0.2:3.5:0.3, V/V/V) (pH 7) 作为底物(Qin和Wang 2002), 反应总体积200 μ L。于30 °C 条件下反应40 min, 然后加入300 μ L 氯仿-甲醇混和溶液(1:2, V/V) 终止反应。吸取下层液相转至新的离心管中, 氮气吹干后定容于30 μ L 氯仿中。然后将此反应物点到TLC薄层层析板分离不同脂质。TLC展层剂为氯仿:甲醇:氨:水=65:39:4:4 (V/V/V/V), 分离的脂质通过碘蒸气显色。

实验结果

1 植物PLD同源蛋白分析

水稻基因组含有17个 PLD 成员, 经亲缘关系进化树分析, 结合前人的研究(Li等2007; Yamaguchi等2009), 将水稻 PLD 分为 $PLD\alpha$ (1~7)、 $PLD\beta$ (1、2)、 $PLD\delta$ (1~3)、 $PLD\zeta$ (1、2)、 $PLD\kappa$ 及 $PLD\phi$ 。其中 $PLD\alpha$ (1~7)、 $PLD\beta$ (1、2)、 $PLD\delta$ (1~3) 及 $PLD\kappa$ 均含有C2结构域, 属于C2- $PLDs$, 而 $PLD\zeta$ (1、2) 含有PH/PX结构域, 与动物 $PLDs$ 类似, 属于PH/PX- $PLDs$ 。此外, 水稻 $PLD\phi$ 的N端不含C2或PH/PX结构域, 但含有一个信号肽, 称为SP- PLD (Li等2007)。不同植物种类如拟南芥、水稻、玉米、大豆、高粱、短柄草、胡杨及芜菁等基因组均含有 $PLD\zeta$ 基因, 在不同物种间较为保守, 大都含有 $PLD\zeta 1$ 和 $PLD\zeta 2$ (图1)。

2 水稻 PLD 家族基因在低磷胁迫下的表达谱分析

PLD 通过水解磷脂产生信号分子PA, 且导致生物膜系统的重组。研究发现拟南芥 $PLD\zeta$ 在磷饥饿胁迫下参与磷脂与半乳糖脂转化过程。水稻 PLD 是否参与磷饥饿响应过程尚未清楚。为此, 本研究首先通过半定量反转录PCR (semi-quantitative RT-PCR) 分析水稻17个 PLD 基因在磷饥饿条件下的表达谱。结果表明, 在水稻分蘖期间, $PLD\zeta 2$ 在磷供给正常条件下(磷浓度180 μ mol·L⁻¹) 的表达量极低, 但在磷饥饿胁迫条件下, $PLD\zeta 2$ 快速被诱导, 其表达量明显提高, 特别是在磷严重缺乏条件下

(磷浓度为 $9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 为正常供给的5%), 水稻根组织中的 $PLD\zeta 2$ 显著被诱导(图2), 暗示了 $PLD\zeta 2$ 可能参与水稻磷饥饿胁迫反应过程。此外, 水稻 $PLD\alpha 3$ 、 $PLD\alpha 6$ 、 $PLD\alpha 7$ 、 $PLD\beta 2$ 、 $PLD\delta 1$ 和 $PLD\kappa$ 也明显受磷饥饿胁迫所诱导, 而其余相关基因如 $PLD\alpha 1$ 、 $PLD\alpha 2$ 、 $PLD\alpha 4$ 、 $PLD\alpha 5$ 、 $PLD\zeta 1$ 、 $PLD\beta 1$ 、 $PLD\delta 2$ 、 $PLD\delta 3$ 、 $PLD\epsilon$ 及 $PLD\phi$ 表达量受磷饥饿胁迫的影响较小或不明显。

3 水稻磷脂酶基因 $PLD\zeta 2$ 突变体分离和鉴定

水稻基因组含有2个 $PLD\zeta$ 基因, 包括 $PLD\zeta 1$ 和 $PLD\zeta 2$, $PLD\zeta 2$ 基因共有18个外显子和17个内含子。为分析水稻 $PLD\zeta 2$ 的生物学功能, 本研究首先搜索水稻突变体库, 分别从DJ和ZH11背景材料中

获得了2个独立的T-DNA插入 $PLD\zeta 2$ 突变体种子。其中DJ背景突变体 $pld\zeta 2-1$ 的T-DNA位于 $PLD\zeta 2$ 基因的第6个内含子中, 而ZH11背景突变体 $pld\zeta 2-2$ 的T-DNA位于第13个外显子中(图3-A)。通过基因序列特异引物和T-DNA侧翼序列引物进行PCR鉴定, 分离、筛选得到了2个独立的 $PLD\zeta 2$ 纯合突变体株系(图3-B、C)。为进一步分析突变体是否为完全剔除突变体, 通过提取植物体内mRNA, 并经过RT-PCR合成第一链cDNA, 再以第一链cDNA为模板进行RT-PCR分别检测2个 $PLD\zeta 2$ 突变体株系中的mRNA表达情况。结果发现T-DNA的插入导致2个突变体 $pld\zeta 2-1$ 和 $pld\zeta 2-2$ 体内 $PLD\zeta 2$ mRNA表达完全缺失, 系完全剔除突变体(图3-D、E)。

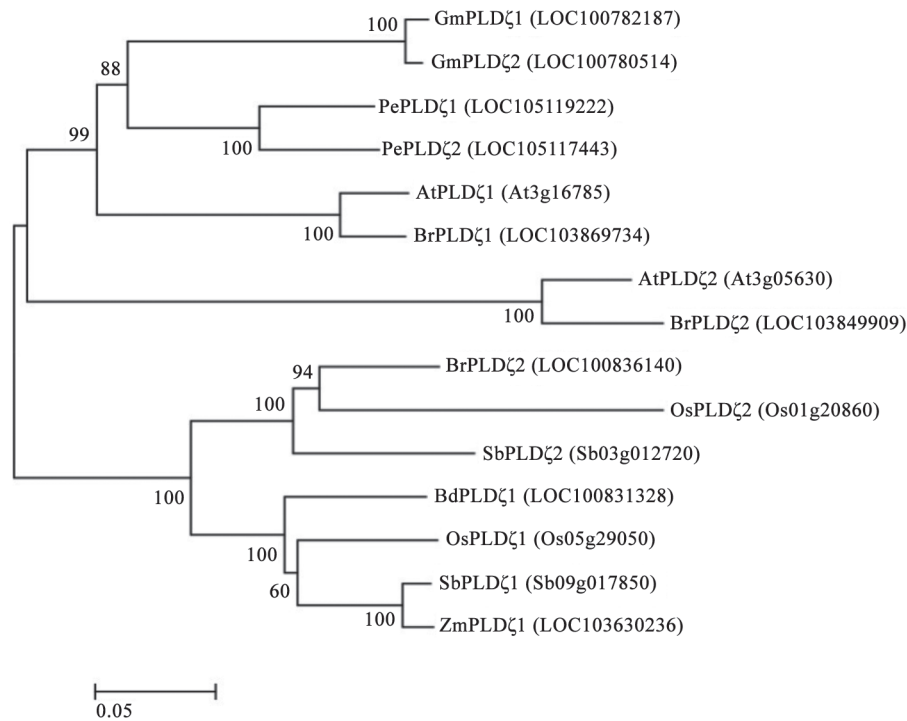


图1 不同植物 $PLD\zeta$ s亲缘进化关系分析

Fig.1 Phylogenetic analysis of $PLD\zeta$ s in different plant species

蛋白名称前缀: At, 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*); Os, 水稻(*Oryza sativa*); Br, 芜菁(*Brassica rapa*); Sb, 高粱(*Sorghum bicolor*); Zm, 玉米(*Zea mays*); Gm, 大豆(*Glycine max*); Bd, 短柄草(*Brachypodium distachyon*); Pe, 胡杨(*Populus euphratica*)。

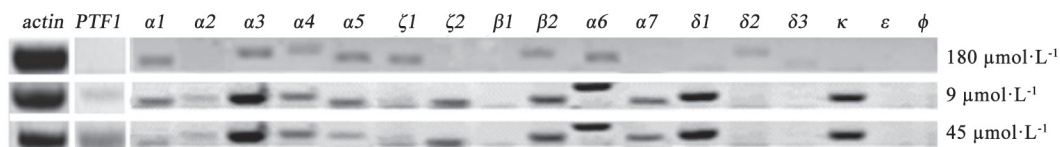


图2 水稻 PLD 基因在磷饥饿条件下的表达谱

Fig.2 The expression pattern of rice PLD in response to phosphate starvation

4 PLD ζ 2在水稻应答磷饥饿胁迫中的作用

为进一步分析水稻PLD ζ 2在磷饥饿胁迫中的作用,本研究对PLD ζ 2剔除突变体 $pld\zeta 2-1$ 进行磷饥饿胁迫处理,以野生型作为对照,将不同基因型的四叶苗期植株移植于含不同磷浓度(正常供磷 $180 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、中度磷饥饿 $45 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、严重磷饥饿 $1.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的水稻专用液体培养基中,观察植株外观形态如根表型的变化。在正常供磷条件下, $pld\zeta 2-1$ 突变体根长略低于野生型;在磷饥饿条件下,PLD ζ 2缺失突变导致植株根生长受阻,特别在

严重缺磷条件下的效应更明显(图4-A、B、D、E),经过32 d的磷饥饿胁迫, $pld\zeta 2-1$ 突变体根长仅为其野生型的58%,为极显著差异,单株根系体积仅为其野生型的40%左右。在中度磷饥饿条件下, $pld\zeta 2-1$ 突变体根长也略短于野生型(图4-D)。为进一步确认PLD ζ 2在磷饥饿条件下的作用,本研究分析了ZH11背景的另一突变体 $pld\zeta 2-2$ 对磷饥饿胁迫的反应,结果发现 $pld\zeta 2-2$ 在严重磷饥饿胁迫条件下的根生长也明显受阻,其根长度也明显短于野生型(图4-A、B、E)。此外,PLD ζ 2缺失也导致植

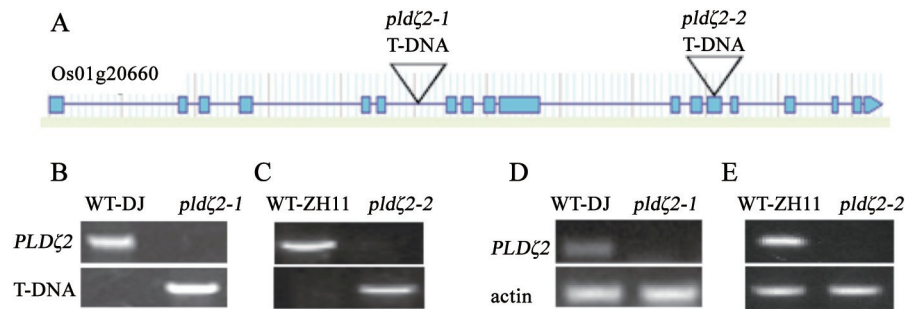


图3 水稻PLD ζ 2突变体的分离鉴定及表达分析

Fig.3 Isolation of rice PLD ζ 2 mutants by PCR and the expression level of PLD ζ 2 by semi-quantitative RT-PCR

A: T-DNA插入PLD ζ 2位点; B和C: T-DNA插入纯合突变体 $pld\zeta 2-1$ 及 $pld\zeta 2-2$ 的PCR鉴定; D和E: 纯合突变体 $pld\zeta 2-1$ 及 $pld\zeta 2-2$ 的表达量分析。

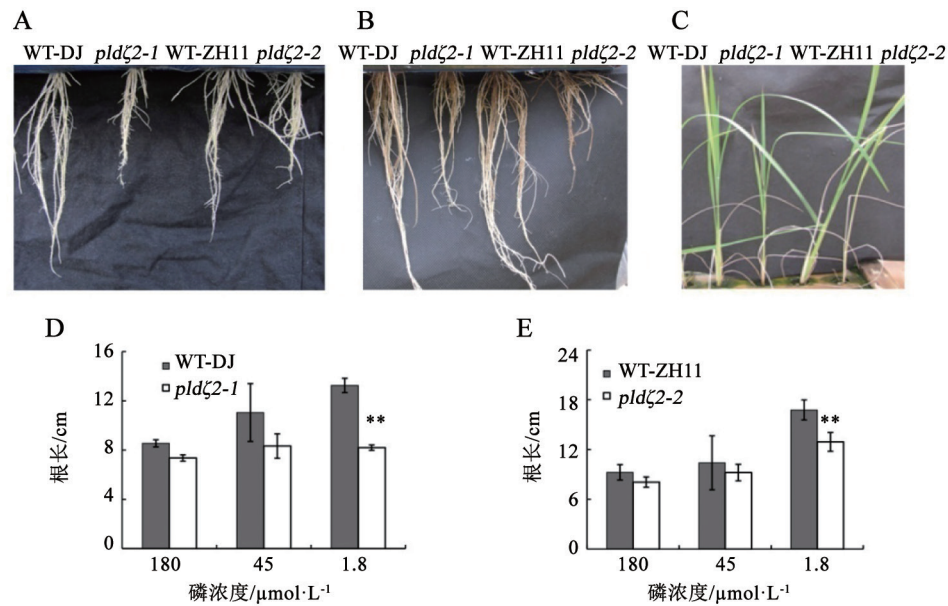


图4 水稻PLD ζ 2在磷饥饿条件下对植株生长的影响

Fig.4 The effect of rice PLD ζ 2 on plant growth under phosphate starvation

A和B: 水稻植株在严重磷饥饿条件下生长32 d (A)和60 d (B)的根状况; C: 植株在严重磷饥饿条件下生长32 d的地上部状况; D和E: 植株不同品种在不同磷浓度条件下的根长。

株茎秆变细小, 株高较野生型矮小(图4-C)。这些结果表明水稻PLD ζ 2在应答磷饥饿胁迫过程中正调控植株生长。

5 磷饥饿条件下PLD ζ 2缺失导致PA形成降低及糖脂合成相关基因表达下调

PLD ζ 2缺失导致植物在磷饥饿条件下根系生长受阻, 表明PLD ζ 2在磷饥饿胁迫下调控植株生长中的重要性。为分析PLD ζ 2是否通过催化磷脂形成PA, 本研究通过提取突变体和野生型叶片蛋白, 在PLD ζ 活性反应条件下分析PLD ζ 2活性, 结果发现, 在正常生长条件下突变体和野生型叶片中的PLD ζ 2活性均较低, 但在磷饥饿胁迫条件下野生型叶片中的PLD ζ 2活性显著被诱导, 其产物PA明显高于正常条件, 而*pld ζ 2-1*突变体叶片中的PLD ζ 2酶活性极低, 几乎难以检测到其产物PA(图5-A)。说明PLD ζ 2在磷饥饿胁迫条件下对PA的形成具有明显效应。为进一步分析PLD ζ 2缺失是否影响磷脂向糖脂转化途径相关基因的表达, 本研究分析了*pld ζ 2*突变体与野生型WT植株在应答磷饥饿胁迫过程中磷脂酸磷酸水解酶1(phosphatidic acid phosphohydrolase 1, PAH1)和单半乳糖二酰甘油合酶2(monogalactosyldiacylglycerol synthase 2, MGD2)的基因表达量的变化。结果表明, 在正常供磷条件下, *pld ζ 2-1*突变体中的PAH1和MGD2表达水平均显著高于野生型, 而在磷饥饿($1.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)条件下, 突变体中的PAH1和MDG2表达水平均极显著

低于野生型(图5-B、C), 表明磷饥饿条件下PLD ζ 2缺失导致糖脂合成酶相关基因表达的显著下调, 说明由PLD ζ 2调控的磷脂水解与糖脂合成紧密相关。

讨 论

植物在长期的进化过程中形成了节磷机制, 在应答磷饥饿胁迫过程中, 植物通过重新分配磷在细胞中的分布, 使储存性的磷转化为活性磷, 提高磷在关键代谢中的作用, 增强磷再循环利用。磷脂是细胞膜的骨架成分, 也是细胞中存储磷的重要形式(Wang等2006; Carini等2015)。研究表明细胞膜脂重组是植物响应环境磷饥饿胁迫的一种适应方式(Nakamura 2013)。在缺磷条件下, 植物通过调整膜磷脂向糖脂转化主要存在2条途径, 一是由PLD ζ 催化磷脂产生PA, 进而由PAH催化PA的去磷酸化, 使磷酸基团从膜脂分子中释放出来供其他关键代谢所需, 而由PA转化的二酰甘油(DAG)则进一步形成糖脂如MGDG及DGDG, 以填补缺失的磷脂而维持磷饥饿条件下细胞膜的完整性(Li等2006; Cruz-Ramírez等2006; Nakamura等2009)。另一途径是通过非特异性磷脂酶C(non-specific phospholipase C, NPC)的激活催化PC而形成游离的磷酸基团及DAG, 为磷的有效利用和糖脂的形成提供底物(Misson等2005; Morcuende等2007; Nakamura等2005)。PLD ζ 含有PH/PX结构域,

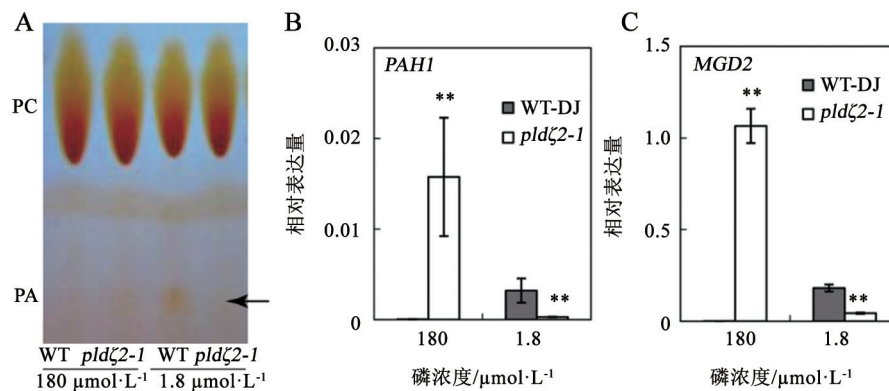


图5 磷饥饿胁迫下*pld ζ 2-1*突变体的PLD ζ 2活性明显降低及其糖脂合成相关基因表达下调

Fig.5 Reduced PLD ζ 2 activity and transcript levels of genes involved in galactolipid synthesis in the *pld ζ 2-1* mutant under phosphate starvation

A: 从WT-DJ和*pld ζ 2-1*突变体叶片中提取蛋白, 在PLD ζ 活性条件下分析PLD ζ 2的活性; B和C: 通过实时定量PCR分析正常供磷和磷饥饿胁迫下PAH1和MGD2的表达量。箭头指向表示PA。

与动物PLD结构较为类似, 其利用PC作为底物且其活性不依赖于钙离子(Qin和Wang 2002)。水稻、拟南芥均含有2个PLD ζ 2基因, 其中PLD ζ 2表达可明显被磷饥饿胁迫所诱导。相比之下, 水稻PLD ζ 1表达则对磷饥饿胁迫信号响应不明显, 暗示了2个PLD ζ s在磷饥饿胁迫过程中的差异性。通过基因缺失突变进一步分析发现PLD ζ 2在磷饥饿胁迫中对植物生长起正调控作用, 其缺失导致磷饥饿下的植株根系生长明显受阻, 而PLD ζ 1的缺失突变则对根生长影响较小, 表明PLD ζ 2在磷饥饿胁迫反应中的重要性。先前的研究表明拟南芥PLD ζ 1与PLD ζ 2共同参与磷饥饿胁迫的调控过程, *pld ζ 1/pld ζ 2*双突变体根生长受阻, 而PLD ζ 单突变体对根长影响不明显(Li等2006)。此外, 拟南芥PLD ζ 2缺失突变不影响植株地上部生长, 而水稻PLD ζ 2缺失可导致植株地上部生长受抑制。这些结果表明水稻与拟南芥PLD ζ 2具有功能的保守性, 又有其独特性。

研究表明PA参与感知环境营养信号而调控植株生长(Hong等2009)。本研究分析发现PLD ζ 2缺失导致其催化PC产生PA的活性明显低于野生型, 说明PLD ζ 2可能通过其产物PA调控根生长。同时PLD ζ 2缺失也导致植株体内在磷饥饿条件下的糖脂合成通路相关基因PAH1和MGD2表达的显著下调, 表明PLD ζ 2缺失也可能影响了糖脂合成。这些结果暗示了水稻PLD ζ 2参与磷饥饿下植株生长的调控具有双重效应: PA介导的信号转导以及磷脂和糖脂转化的代谢调控。近期研究表明PAH作用于PLD ζ 2下游共同参与磷饥饿胁迫下磷脂和糖脂的转化过程, 源自于PLD ζ 2活性的PA经PAH进一步催化形成DAG, 为糖脂合成提供底物。拟南芥PAH的缺失突变也导致植株在磷饥饿胁迫下生长受阻, 磷脂向糖脂转化过程受阻遏(Nakamura等2009)。后续研究将进一步分析PLD ζ 2在磷饥饿下对脂质代谢的影响, 及其与糖脂合成通路相关酶的协同性和互作关系。此外, 除PLD ζ 2外, 水稻其他PLD基因表达也受磷饥饿胁迫的诱导, 其是否也参与磷饥饿响应过程有待进一步分析。

参考文献

丁广大, 陈水森, 石磊, 蔡红梅, 叶祥盛(2013). 植物耐低磷胁迫的遗传调控机理研究进展. 植物营养与肥料学报, 19 (3): 733~744
Al-Faiyz YS, El-Garawany MM, Assubaie FN, Al-Eed MA (2007).

Impact of phosphate fertilizer on cadmium accumulation in soil and vegetable crops. Bull Environ Contam Toxicol, 78: 358~362
Carini P, Van Mooy BAS, Thrash JC, White A, Zhao Y, Campbell EO, Fredricks HF, Giovannoni SJ (2015). Sar11 lipid renovation in response to phosphate starvation. Proc Natl Acad Sci USA, 112 (25): 7767~7772
Cheever ML, Sato TK, de Beer T, Kutateladze TG, Emr SD, Overduin M (2001). Phox domain interaction with PtdIns(3)P targets the Vam7 t-SNARE to vacuole membranes. Nat Cell Biol, 3: 613~618
Cruz-Ramírez A, Oropeza-Aburto A, Razo-Hernández F, Ramírez-Chávez E, Herrera-Estrella L (2006). Phospholipase DZ2 plays an important role in extraplastidic galactolipid biosynthesis and phosphate recycling in *Arabidopsis* roots. Proc Natl Acad Sci USA, 103 (17): 6765~6770
Hiroaki H, Ago T, Ito T, Sumimoto H, Kohda D (2001). Solution structure of the PX domain, a target of the SH3 domain. Nat Struct Biol, 8 (6): 526~530
Hong Y, Devaiah SP, Bahn SC, Thamasandra BN, Li M, Welti R, Wang X (2009). Phospholipase D ϵ and phosphatidic acid enhance *Arabidopsis* nitrogen signaling and growth. Plant J, 58: 376~387
Li G, Lin F, Xue HW (2007). Genome-wide analysis of the phospholipase D family in *Oryza sativa* and functional characterization of PLD β 1 in seed germination. Cell Res, 17: 881~894
Li M, Qin C, Welti R, Wang X (2006). Double knockouts of phospholipases D ζ 1 and D ζ 2 in *Arabidopsis* affect root elongation during phosphate-limited growth but do not affect root hair patterning. Plant Physiol, 40: 761~770
McDowell RW, Condron LM (2000). Chemical nature and potential mobility of phosphorus in fertilized grassland soils. Nutr Cycl Agroecosys, 57: 225~233
Misson J, Raghothama KG, Jain A, Jouhet J, Block MA, Bligny R, Ortet P, Creff A, Somerville S, Rolland N et al (2005). A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. Proc Natl Acad Sci USA, 102 (33): 11934~11939
Morcuende R, Bari R, Gibon Y, Zheng W, Pant BD, Bläsing O, Usadel B, Czechowski T, Udvardi MK, Stitt M et al (2007). Genome wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of *Arabidopsis* in response to phosphorus. Plant Cell Environ, 30: 85~112
Nakamura Y (2013). Phosphate starvation and membrane lipid remodeling in seed plants. Prog Lipid Res, 52: 43~50
Nakamura Y, Awai K, Masuda T, Yoshioka Y, Takamiya K, Ohta H (2005). A novel phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C induced by phosphate starvation in *Arabidopsis*. J Biol Chem, 280 (9): 7469~7476
Nakamura Y, Koizumi R, Shui G, Shimojima M, Wenk MR, Ito T, Ohta H (2009). *Arabidopsis* lipins mediate eukaryotic pathway of lipid metabolism and cope critically with phosphate starvation. Proc Natl Acad Sci USA, 106 (49): 20978~20983
Pappan K, Zheng S, Wang X (1997). Identification and characterization of a novel plant phospholipase D that requires polyphospho-

- inositides and submicromolar calcium for activity in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 272 (11): 7048~7054
- Qin C, Wang X (2002). The *Arabidopsis* phospholipase D family. Characterization of a calcium-independent and phosphatidylcholine-selective PLD ζ 1 with distinct regulatory domains. *Plant Physiol*, 128: 1057~1068
- Testerink C, Munnik T (2005). Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants. *Trends Plant Sci*, 10: 368~375
- Wang C, Wang X (2001). A novel phospholipase D of *Arabidopsis* that is activated by oleic acid and associated with the plasma membrane. *Plant Physiol*, 127: 1102~1112
- Wang X (2004). Lipid signaling. *Curr Opin Plant Biol*, 7: 329~336
- Wang X, Devaiah SP, Zhang W, Welti R (2006). Signaling functions of phosphatidic acid. *Prog Lipid Res*, 45: 250~278
- Yamaguchi T, Kuroda M, Yamakawa H, Ashizawa T, Hirayae K, Kurimoto L, Shinya T, Shibuya N (2009). Suppression of a phospholipase D gene, *OsPLD β 1*, activates defense responses and increases disease resistance in rice. *Plant Physiol*, 150: 308~319
- Zhang Q, Lin F, Mao T, Nie J, Yan M, Yuan M, Zhang W (2012). Phosphatidic acid regulates microtubule organization by interacting with MAP65-1 in response to salt stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 24: 4555~4576
- Zheng L, Krishnamoorthi R, Zolkiewski M, Wang X (2000). Distinct Ca²⁺ binding properties of novel C2 domains of plant phospholipase D α and β . *J Biol Chem*, 275: 19700~19706