

PLD 1 介导 ABA 调控的拟南芥主根伸长 并参与根毛生长

李 婧, 章文华

(南京农业大学生命科学学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 探讨了磷脂酶 D 1 (PLD 1) 在 ABA 抑制拟南芥主根伸长过程中的作用。PLD 1 基因突变体 *pld 1* 主根伸长受 ABA 抑制小于野生型 (WT); 根系 PLD 1 活性在 ABA 处理下升高; 拟南芥根细胞原生质体中活性氧 (ROS) 含量在 ABA 处理下升高, 但是 *pld 1* 升高小于 WT; 根系 NADPH 氧化酶活性在 ABA 处理下升高, *pld 1* 升高小于 WT, 外源加入 $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ PA (磷脂酸, PLD 水解产物) 后, 前者活性显著升高; 外源加入 H_2O_2 可诱导 WT 和 *pld 1* 主根伸长都受到抑制, 且二者差异不明显。结果表明, PLD 1 产生的 PA 通过激活 NADPH 氧化酶产生 ROS 介导 ABA 调控的拟南芥主根伸长过程。此外, 初步探讨了 PLD 1 在拟南芥根毛尖端生长中的作用: *pld 1* 突变体根毛长度小于 WT, 根毛尖端 ROS 和 Ca^{2+} 浓度低于 WT。

关键词: 拟南芥; ABA; 根; PLD 1; PA; ROS; Ca^{2+} ; 根毛

中图分类号: Q 945

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700 (2009) 04-309-08

PLD 1 Modulated ABA-Mediated Main Root Elongation and Regulated Tip Growth of Root Hair in *Arabidopsis*

LI Jing, ZHANG Wen-Hua*

(College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The role of PLD 1 in ABA inhibition of main root elongation in *Arabidopsis* was studied. When the seedlings were treated with ABA, elongation of main root of wild-type (WT) was inhibited more obviously than that of *pld 1*. In main root protoplasts, the activity of both PLD 1 and NADPH oxidase increased under ABA treatment, and the NADPH oxidase activity increased much more in WT than in *pld 1*. When $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ PA was added into the growth medium, the NADPH oxidase activity increased in *pld 1* protoplasts. The concentration of ROS in *Arabidopsis* root protoplasts increased more quickly in WT than in *pld 1* after ABA addition. When H_2O_2 was added into the culture medium, main root elongation was inhibited in both genotypes. All these results suggested that, PA produced by PLD 1 acted as a regulator in ABA-mediated root elongation in *Arabidopsis* via NADPH oxidase-produced ROS. In addition, root hair of *pld 1* was shorter than that of WT. On the tip of root hair, *pld 1* had lower concentration of ROS and Ca^{2+} than WT.

Key words: *Arabidopsis*; ABA; Root; PLD 1; PA; ROS; Ca^{2+} ; Root hair

植物根系既是植物吸收矿质养分和水分的
重要器官, 又在植物感知外界逆境胁迫的过程中
发挥重要作用。

植物激素脱落酸 (abscisic acid, ABA) 是一

种重要的根源逆境信号, 调控植物生长发育, 介
导植物对多种生物及非生物胁迫的反应 (Smet
等, 2006; Chen 等, 2006)。ABA 对植物根系发育
的调控已有报道。ABA 处理诱导拟南芥野生型

通讯作者: Author for correspondence; E-mail: whzhang@njau.edu.cn

收稿日期: 2009-04-02, 2009-04-07 接受发表

作者简介: 李婧, 女, 在读硕士研究生, 主要从事植物逆境生理学研究。

根细胞原生质体中活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 含量升高, 而拟南芥根细胞中 ROS 的主要来源 NADPH 氧化酶 D 和 F 亚基缺失的双突变体 *atrbohD F* 幼苗主根的伸长不受 ABA 的抑制, 推测 ROS 很可能是 ABA 调控拟南芥根发育信号链中的一个重要组分 (Bai 等, 2007; Gapper and Dolan, 2006; Kwak 等, 2003), 但是 ROS 的上游调节分子还不清楚。

PLD (phospholipase D) 水解磷脂产生磷脂酸 (phosphatidic acid, PA) 和一个自由头部, 参与各种植物生长、发育和逆境响应等细胞过程。PLD 是一个多基因家族的酶, 可以划分为 6 类, 12 种基因, 其中 PLD 1 是构成 PLD 活性的最主要成员 (Morris 等, 1996)。前人的研究证实, PLD 1 及其产物 PA 在拟南芥保卫细胞 ABA 信号转导途径中起着重要作用 (Wang, 2002)。此外, Sang 等 (2001a) 的研究表明, PLD 1 及其产物 PA 通过激活 NADPH 氧化酶介导了植物中 ROS 的产生, 反义抑制 PLD 植物中, ROS 含量低于野生型植物, 而加入外源 PA 则促进了反义抑制 PLD 植物中 ROS 的产生。本研究以拟南芥野生型 WT 和突变体 *pld 1* 为材料, 探讨在 ABA 调控的植物根发育中, PLD 1 的作用及信号转导过程。

根毛的尖端生长需要尖端富集的 ROS 和 Ca^{2+} (Fell and Hepler, 1997)。根毛尖端 ROS 的主要来源是 NADPH 氧化酶, ROS 激活根毛尖端质膜超极化钙离子通道 (hyperpolarization-activated cation channel, HACC), 从而形成并维持尖端富集的 Ca^{2+} (Foreman 等, 2003)。PLD 影响根毛尖端生长的机制是复杂的, 目前对其机理还不甚清楚。其中一种可能的机制就是 PLD 产生的 PA 介导了根毛尖端 ROS 的产生。本文初步描述了在 PLD 1 缺失时拟南芥根毛发育的情况。

1 材料与方法

1.1 材料的培养和处理

1.1.1 主根的培养 所用材料为拟南芥 Columbia 生态型野生型 (WT) 和 T-DNA 插入 *PLD 1* 缺失突变体 (*pld 1*) (Zhang 等, 2004)。拟南芥种子消毒 (75% 乙醇浸泡 2 min, 灭菌水冲洗 2 次, 再用 2% NaClO 浸泡 10 min, 灭菌水冲洗 5 次) 后, 播种于 MS 固体培养基, 置于 4℃ 下春化 48 h, 垂

直置放于培养室 (25℃, 12 h 光照) 培养。

在进行不同处理时, 拟南芥种子消毒后播种于 1/4 MS 培养基, 垂直置放于培养室培养 5 天后移栽到不同处理的 1/4 MS 培养基上, 继续垂直放置在光照培养室培养。

在 ABA 与根生长关系的实验中, ABA 浓度梯度为 10, 30, 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$; 在 ROS 与根生长关系的实验中, 外源 ROS 浓度梯度为 0.1, 0.5, 1, 1.5 mmol L^{-1} ; 培养基中外源施加 PA 浓度为 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 。

1.1.2 根毛的培养 根毛培养液参照 Zhu 等 (2006) 的配方, 加入 0.8% (W/V) 琼脂配成固体培养基。种子消毒、播种和幼苗培养同 1.1.1 所述。

1.2 测定方法

1.2.1 主根伸长的测定 用记号笔标记移栽到新的培养基上的幼苗根尖, 生长 7 天后, 以标记点为起点, 测量主根伸长量。实验设 4 个重复, 每皿 6 株苗。

1.2.2 PLD 1 活性测定 将培养 2 周的拟南芥野生型和 *pld 1* 植株切取根部, 浸泡在含有 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ABA 的 MS 培养液中一定时间, 提取总蛋白, 参照 Fan 等 (1997) 的方法采用 ^3H 标记的 PC 测定 PLD 1 活性, 设 3 个重复。

1.2.3 根原生质体 ROS 含量测定 以 2', 7'-di-chlorofluorescein diacetate ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$) (Simontacchi 等, 1993) 作为胞内 ROS 的荧光探针。参照 Demidchik and Tester (2002) 的方法提取根细胞原生质体, 用含有 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ 的 WI (含 10 mmol L^{-1} KCl, 10 mmol L^{-1} CaCl_2 , 2 mmol L^{-1} MgCl_2 , 2 mmol L^{-1} MES [2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid], pH 值用 Tris 调至 5.6, 渗透压用甘露醇调至 290 ~ 300 mOsm) 孵育 30 min, 用激光共聚焦显微镜 (laser scanning confocal microscope, LSCM) (Leica, TCS-SP2) 检测根细胞原生质体内 ROS 含量的变化。LSCM 的工作条件为: $E_x = 488 \text{ nm}$, $E_m = 535 \text{ nm}$, 激光功率 3%。荧光强度用 Leica confocal software (version 2.5) 测定。实验重复 3 次, 每次随机拍 10 ~ 20 个原生质体。

1.2.4 NADPH 氧化酶活性测定 提取拟南芥根细胞原生质体, 用 $\text{HO}_2^{\cdot} \text{O}_2^{\cdot}$ 特异性染料 XTT 测定 NADPH 氧化酶产生的 $\text{HO}_2^{\cdot} \text{O}_2^{\cdot}$, 从而表示 NADPH 氧化酶的活性。离心分离原生质体用于蛋白测定。结果换算成 $\text{OD}_{470} \text{ mg protein}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Amanda 等, 1998)。

1.2.5 根毛长度和密度的测量 将生长有幼苗的培养皿置于体式镜 (MZFL, Leica Microsystem, wetzlar, Germany) 载物台上, 对距根尖第二和第三毫米处根上的根毛进行拍照, 每个处理重复 3 次, 每个重复 15 棵苗。利用软件 Motic Images plus 2.0 (China Group co. LTD.) 计数根毛数目, 分析根毛长度 (Zhu 等, 2006)。

1.2.6 根毛 ROS 和 Ca^{2+} 荧光染料的染色 根毛 ROS 荧光染料的染色: 将在培养基表面生长 7 天的拟南芥幼根轻轻取下, 悬浮在含有 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 2', 7'-di-chlorofluores-

cin diacetate ($H_2DCF\text{-}DA$) 的根毛培养液中 5 min, 用 10 mmol L^{-1} MES-Tris, pH 5.5 的缓冲液冲洗 3 次后测定。用激光共聚焦显微镜 (laser scan confocal microscope, LSCM) 检测根毛细胞中 DCF 荧光强度的变化。LSCM 工作条件同 1.2.3。

根毛 Ca^{2+} 荧光染料的染色: 将在培养基表面生长的拟南芥幼根苗轻轻取下, 悬浮在染色液 ($10\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ Fluo-3 AM, 10 mmol L^{-1} MES-Tris, pH 5.8) 中, 在 4 °C 下染色 2 小时。用 10 mmol L^{-1} MES-Tris, pH 5.5 的缓冲液洗 3 次, 在室温下放置 2 小时后测定。

1.2.7 ROS 和 Ca^{2+} 浓度的激光共聚焦测定 激光共聚焦显微镜设置同 1.2.3, 荧光强度用 Leica confocal software (version 2.5) 测定。实验重复 3 次, 每个重复拍 10 根根毛。

1.3 数据统计

图表用 Excel 软件绘制, 方差用 SPSS 10.0 (SPASS, Chicago, USA) 计算。

2 观察结果

2.1 PLD 1 介导 ABA 调控的拟南芥主根伸长

2.1.1 ABA 处理对野生型拟南芥根系 PLD 1 活性的影响 图 1 的结果表明, *pld 1* 突变体中 PLD 1 活性很低, 几乎无法测出, 表明该突变体

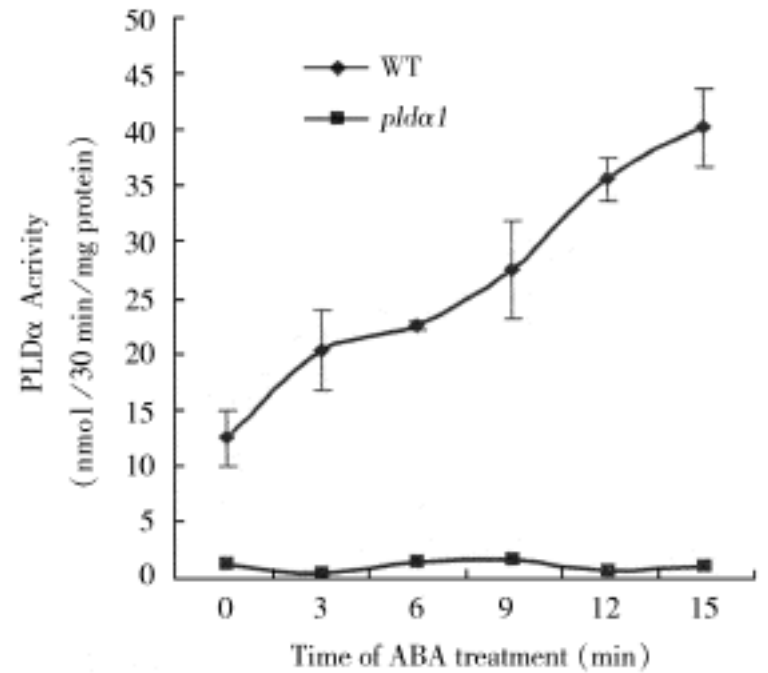


图 1 ABA 处理引起拟南芥野生型根系 PLD 1 活性上升

Fig. 1 *Arabidopsis* root PLD 1 activity increased under ABA treatment

中 *pld 1* 基因已经敲除。而 ABA 处理野生型拟南芥根系引起根系 PLD 1 活性大幅度上升。

2.1.2 ABA 和 PA 处理对拟南芥野生型 (WT) 和 *pld 1* 主根伸长的影响 从图 2 中我们可以看到在 ABA 处理下, *pld 1* 和 WT 主根伸长均受到抑制。野生型主根伸长量降为对照的 26.9%,

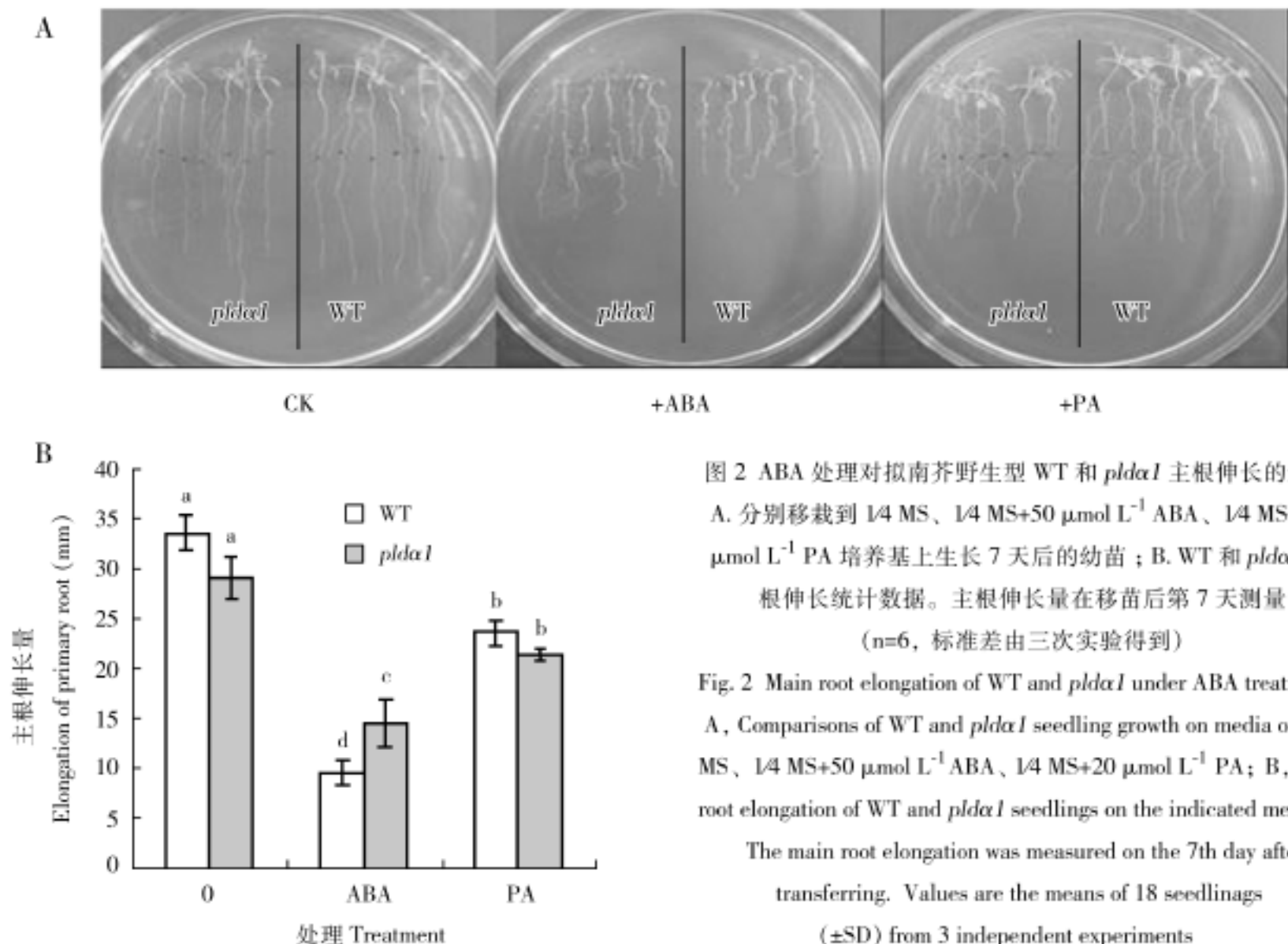


图 2 ABA 处理对拟南芥野生型 WT 和 *pldα1* 主根伸长的影响 A. 分别移栽到 1/4 MS、1/4 MS+50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ABA、1/4 MS+20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ PA 培养基上生长 7 天后的幼苗; B. WT 和 *pldα1* 主根伸长统计数据。主根伸长量在移苗后第 7 天测量 (n=6, 标准差由三次实验得到)

Fig. 2 Main root elongation of WT and *pldα1* under ABA treatment A, Comparisons of WT and *pldα1* seedling growth on media of 1/4 MS, 1/4 MS+50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ABA, 1/4 MS+20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ PA; B, Main root elongation of WT and *pldα1* seedlings on the indicated medium. The main root elongation was measured on the 7th day after transferring. Values are the means of 18 seedlings (\pm SD) from 3 independent experiments

pld 1 突变体主根伸长量则降为对照的 48.3%。相比之下,野生型主根伸长所受的抑制要大于 *pld 1* 突变体。

当加入外源 PA 时,野生型和 *pld 1* 突变体主根伸长都受到抑制,分别降为对照的 70.3% 和 73.5%,二者差异不显著。

2.1.3 ABA 处理下拟南芥根细胞 ROS 含量

提取拟南芥根原生质体,用 $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ABA 处理后细胞内 ROS 含量在前两分钟没有表现出明显的差异,随着处理时间的增加,野生型根细胞原生质体中 ROS 含量大幅度升高, *pld 1* 突变体上升幅度远远小于突变体 (图 3: A)。统计结果 (图 3: B) 也表明, *PLD 1* 的缺失影响了 ABA 处理下拟南芥根细胞中 ROS 的产生。

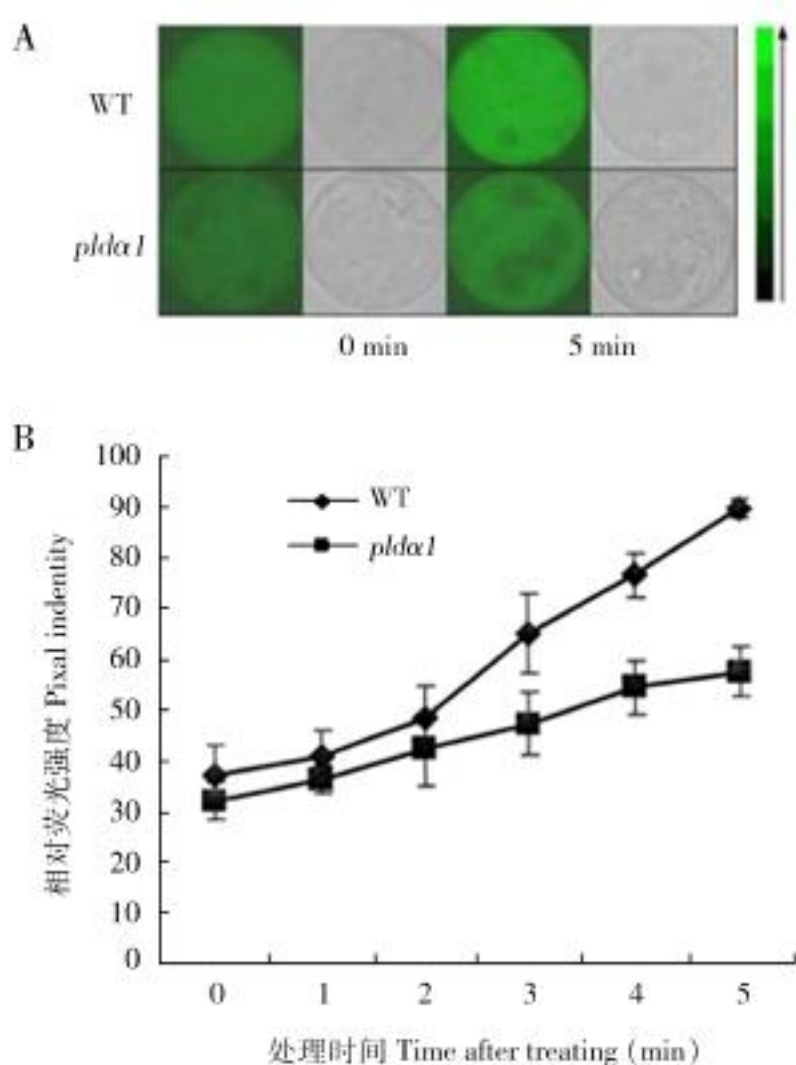


图 3 ABA 处理下拟南芥根细胞 ROS 含量

A. $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ABA 处理 $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ 孵育的根原生质体细胞 LSCM 扫描荧光图; B. 荧光强度平均数据统计图。

($n = 18$, 标准差由 3 次实验得到)

Fig. 3 Concentration of ROS in *Arabidopsis* root cell protoplast under ABA treatment

A, Root protoplasts of WT and *pld 1* loaded with $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ in the presence of $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ABA; B, Average fluorescence intensity in protoplasts. (Values are the means of 18 seedlings (\pm SD) from 3 independent experiments)

2.1.4 ABA 处理对拟南芥根细胞原生质体 NADPH 氧化酶活性的影响 如图 4 所示, ABA 处理下,野生型根细胞原生质体中 NADPH 氧化酶活性明显上升为对照的 146%,而 *pld 1* 上升为对照的 115%。相比之下,野生型根细胞中 NADPH 氧化酶活性上升比 *pld 1* 剧烈。而对 *pld 1* 根细胞原生质体添加外源 PA 后 NADPH 氧化酶活性上升至对照的 137%,野生型则上升为对照的 113%。

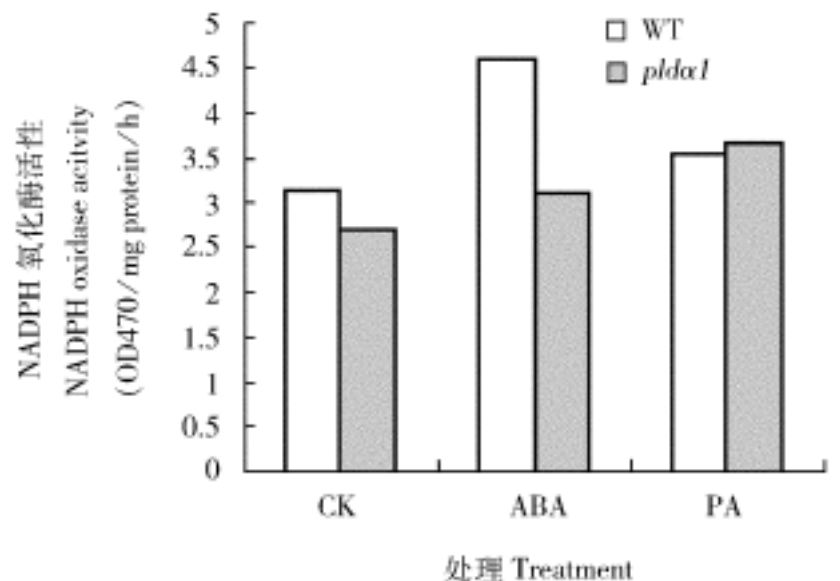


图 4 外源施加 ABA 及 PA 对拟南芥 WT 和 *pld 1* 根细胞原生质体 NADPH 氧化酶活性的影响

Fig. 4 NADPH oxidase activity of both WT and *pld 1* root protoplast under ABA treatment

2.1.5 外源施加 H_2O_2 对拟南芥野生型和 *pld 1* 主根伸长的影响 从图 5 可以看出,在外源施加 H_2O_2 时,野生型和 *pld 1* 主根伸长都呈现下降的趋势,具有浓度依赖性,且二者之间并无显著差异。

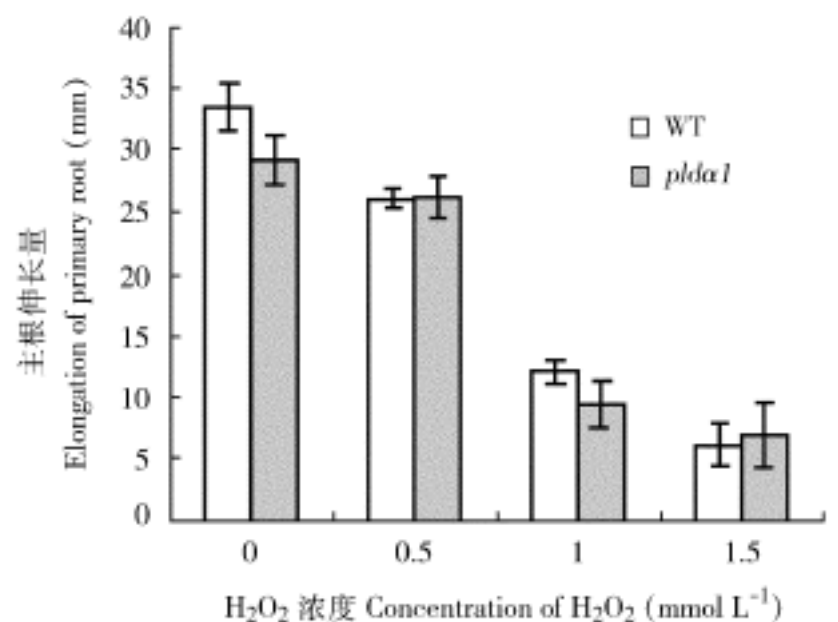


图 5 外源施加 H_2O_2 对拟南芥野生型和 *pld 1* 主根伸长的影响

Fig. 5 Main root elongation of WT and *pld 1* under ROS treatment

2.2 PLD 1 调控拟南芥根毛生长

2.2.1 PLD 1 缺失对根毛生长的影响 从图 6 可以看出, 在 PLD 1 缺失的情况下, 拟南芥根毛的长度显著小于野生型, 但是对根毛密度没有明显的影响。

2.2.2 PLD 1 缺失对拟南芥根毛尖端 ROS 含量的影响 图 7 的结果和统计显示, 当 PLD 1 缺失时, 根毛尖端 ROS 含量显著低于野生型。这个结果和 2.1.3 的结果有一定的一致性。

2.2.3 PLD 1 缺失对拟南芥根毛尖端 Ca^{2+} 含量的影响 图 8 的结果和统计结果表明, *pld 1* 根毛尖端 Ca^{2+} 含量显著低于野生型。

3 讨论

PLD 是植物中一种重要的信号转导酶, 响应多种外界环境刺激, 例如机械损伤 (Wang 等, 2000)、低温 (Li 等, 2004)、高渗 (Frank 等, 2000; Sang 等, 2001b)、ABA (Munnik, 2001) 和病原微生物 (Young 等, 1996) 等。PLD 1 是 PLD 家族中响应 ABA 信号最重要的成员, 可以通过多种途径响应 ABA 信号。PLD 1 的产物 PA 与在 ABA

诱导气孔关闭过程中起负调节作用的磷酸酶 ABI1 结合, 将其锚定在膜上, 从而抑制了 ABI1 对 ABA 信号的负调节功能 (Zhang 等, 2004)。PA 还可以与三聚体 G 蛋白的 β 亚基结合从而介导 ABA 抑制气孔打开的过程 (Girish 等, 2006)。在本研究中, 我们发现, PLD 1 通过一条新的途径介导了 ABA 在拟南芥根部的信号转导过程。

ABA 处理引起拟南芥根系 PLD 1 活性上升, 这与前人在拟南芥叶片和燕麦糊粉层中的结果是一致的 (Ritchie and Gilroy, 1998; Sang 等, 2001a)。这表明, PLD 1 响应 ABA 信号, PLD 1 及其产物很可能也参与了根细胞中的 ABA 信号转导。生理实验的结果证实了这个推断。ABA 处理下, *pld 1* 突变体主根伸长受抑制的程度显著小于野生型。这就说明, *PLD 1* 的缺失影响了拟南芥主根伸长对 ABA 作用的敏感性。而当外源加入 PLD 1 产物 PA 时, 野生型和 *pld 1* 突变体主根伸长都受到抑制, 侧根数均增加 (数据未列出), 并且没有显著的差异。对比这两个结果我们发现, 外源加入 PA 部分模拟了 ABA 处理的效果, 说明 PA 介导了 ABA 抑制主根伸长的信号转导通路。

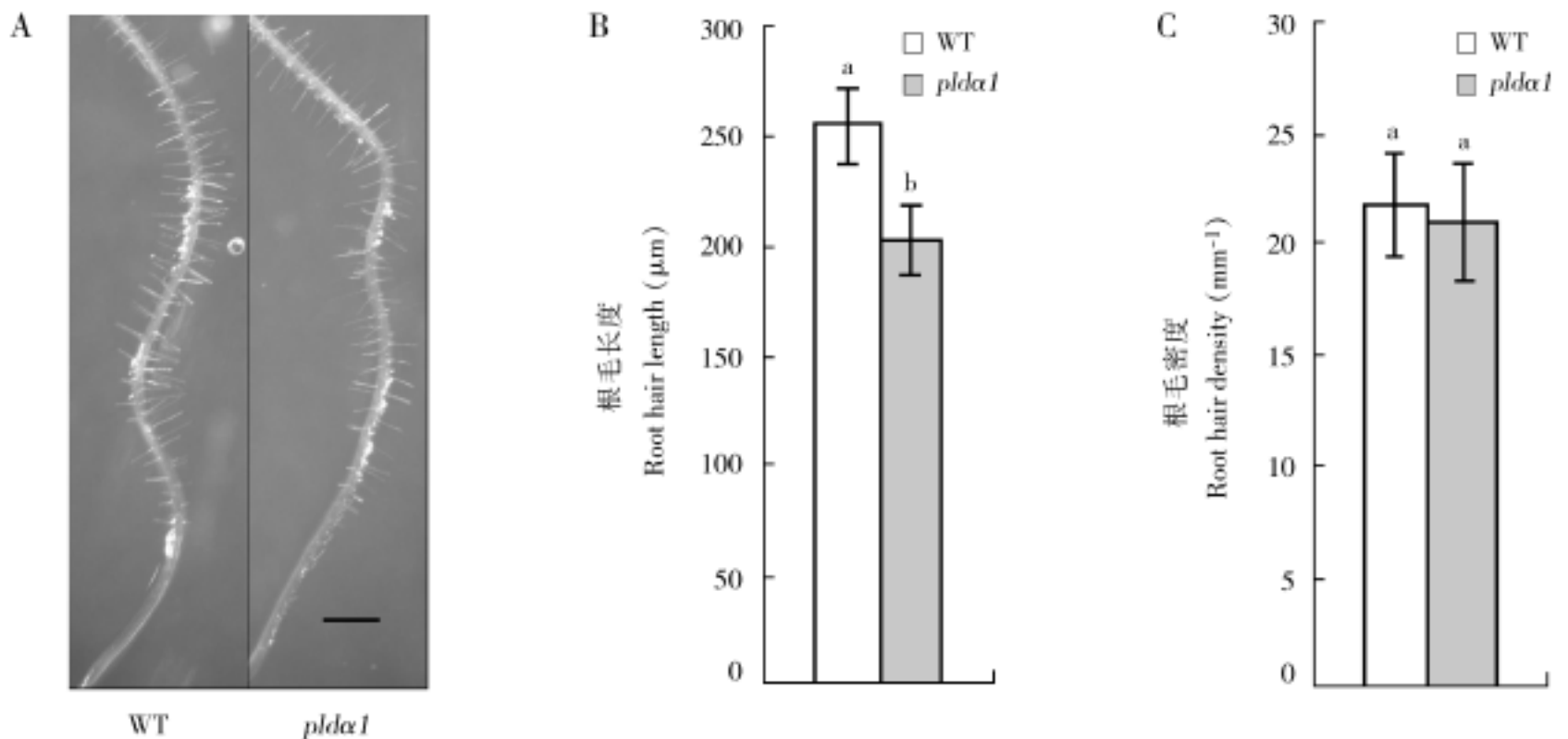


图 6 野生型和 *pld 1* 根毛长度和密度的比较

A. 野生型和 *pld 1* 的根毛图片 (bar = 0.5 mm); B. 根毛长度统计数据 (n = 18, 标准差由 3 次实验得到);

C. 根毛密度统计数据 (n = 18, 标准差由 3 次实验得到)

Fig. 6 Comparison of root hair length and density between WT and *pld 1*

A, Photographs showing root hair of WT and *pld 1* (bar = 0.5 mm); B, Root hair length. (Values are the means of 18 seedlings (± SD)

from 3 independent experiments; C, Root hair density (Values are the means of 18 seedlings (± SD) from 3 independent experiments)

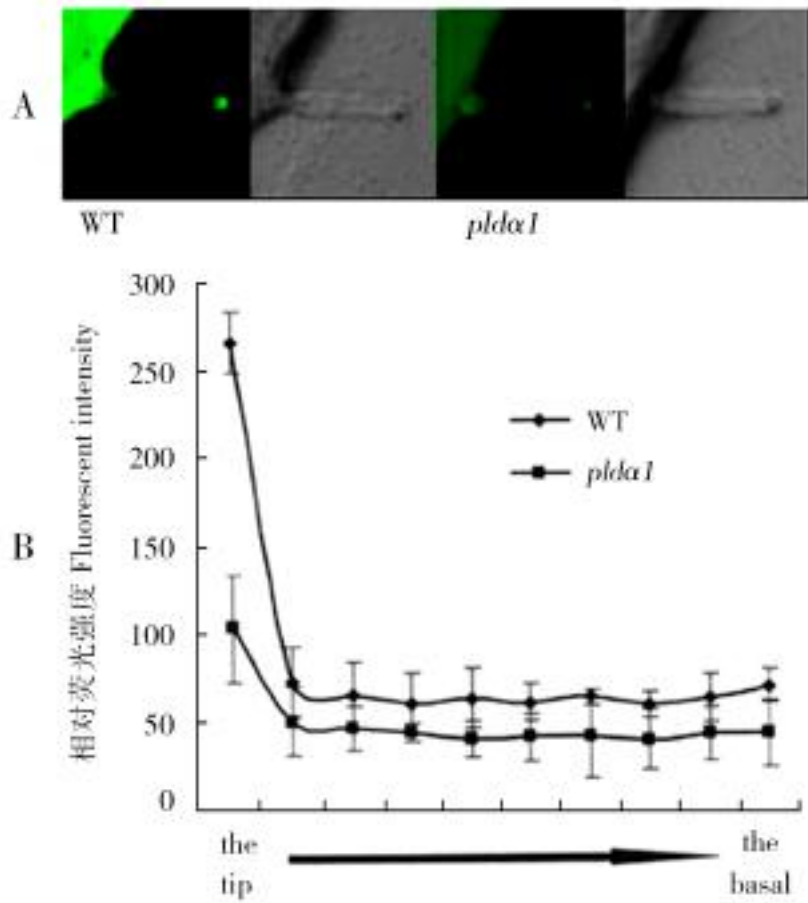


图7 A. H₂DCF-DA 染色的野生型和根毛尖端 LSCM 扫描荧光图; B. 荧光强度平均数据统计图

Fig. 7 A, CLSM imaging of root hair from WT and *pld 1* stained with H₂DCF-DA; B, Average fluorescence intensity in protoplasts (n = 18, (± SD) from 3 independent experiments)

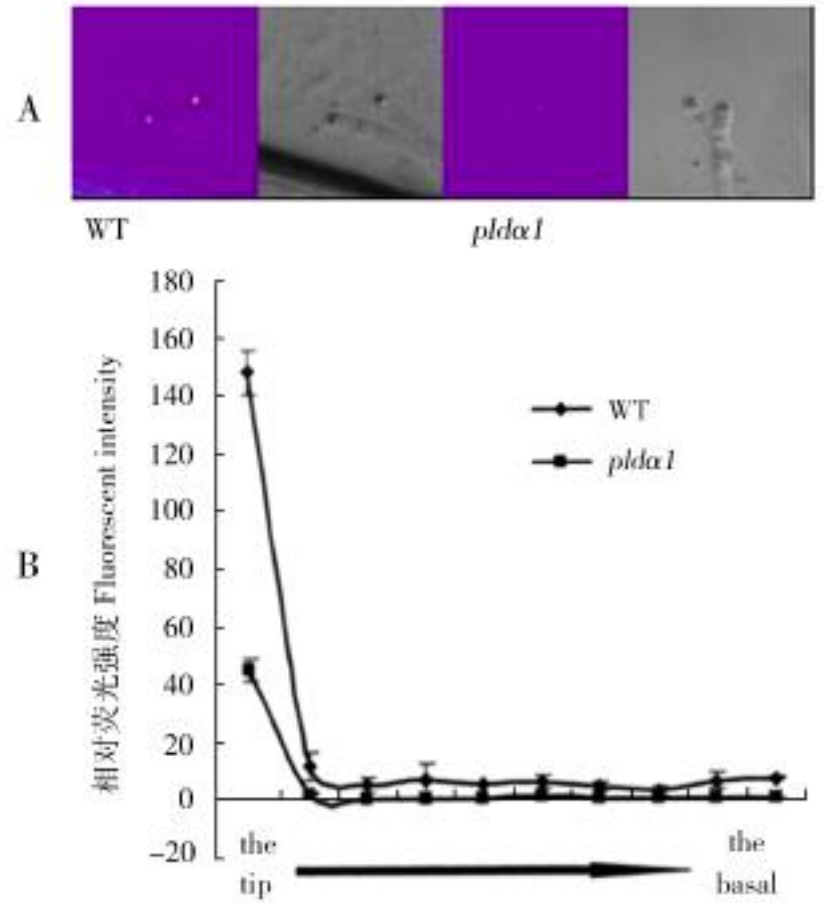


图8 A. Fluo-3 染色的野生型和 *pld 1* 根毛尖端 LSCM 扫描荧光图; B. 荧光强度平均数据 (n = 18)

Fig. 8 A, CLSM imaging of root hair from WT and *pld 1* stained with Fluo-3; B, Average fluorescence intensity in protoplasts (n = 18, (± SD) from 3 independent experiments)

ROS 作为第二信使作用于 ABA 信号的早期阶段, 介导 ABA 诱导气孔保卫细胞关闭的信号转导途径 (Pei 等, 2000)。同时, ROS 也是 ABA 抑制拟南芥主根伸长的重要信号分子 (Bai 等, 2007; Gapper and Dolan, 2006; Kwak 等, 2003)。我们测定了 ABA 处理下野生型和 *pld 1* 突变体根细胞原生质体中 ROS 的含量, 结果发现, 在对照条件下, *pld 1* 突变体根细胞原生质体中 ROS 的含量低于野生型, 而 ABA 处理下, 野生型根细胞原生质体 ROS 含量大幅度快速上升, 而 *pld 1* 则上升缓慢, 且上升幅度远低于野生型。这个结果表明, 在 ABA 处理中, 细胞内 ROS 含量的提高依赖于 PLD 1 的作用, PLD 1 作用于 ROS 的上游。但是, 在 ABA 处理中, *pld 1* 突变体根细胞原生质体中 ROS 仍有少量上升, 我们推测, 在 ABA 处理下, 很可能有其它 ROS 来源, 或者有其他不依赖于 PLD 1 作用的信号通路激活了 NADPH 氧化酶, 在 ABA 信号转导中起作用。

PLD 1 是如何参与 ABA 诱导的 ROS 产生的? 植物中的 ROS 可以由多条途径产生。除了电子传递过程中产生的 ROS 外, ROS 还可以由质膜

上的 NADPH 氧化酶, 细胞壁中的过氧化物酶、胺氧化酶、草酸氧化酶途径产生 (Grant and Loake, 2000; Mittler, 2002; Neill 等, 2002; Vranová 等, 2002)。在 ABA 处理的拟南芥根细胞中导致 ROS 浓度上升的过程中, ROS 的来源主要是 NADPH 氧化酶 AtrbohD 和 AtrbohF 两个亚基 (Kwak 等, 2003; Torres and Dangel, 2005)。对 NADPH 氧化酶活性的测定结果表明, ABA 处理拟南芥根系可以诱导 NADPH 氧化酶活性升高, PLD 1 参与了 ABA 诱导的 NADPH 氧化酶活性的升高。而外源加入 PA 显著提高了野生型和 *pld 1* 突变体 NADPH 氧化酶活性。而 PLD 1 的产物 PA 正是激活 NADPH 氧化酶的作用因子 (Sang 等, 2001a)。此外, 外源 PA 激活 NADPH 氧化酶的作用在 *pld 1* 突变体中体现得比在野生型中更为明显。这个结果和 Sang 等 (2001a) 的结果是一致的, 说明细胞内源 PA 对诱导 NADPH 氧化酶活性上升更有效, 所以外源施加 PA 未能更高程度地激活 NADPH 氧化酶。在 *pld 1* 突变体中, NADPH 氧化酶活性仍有少量上升, 推测在拟南芥根系中, ABA 处理引起 NADPH 氧化酶活性上升可能还

有其它不依赖于 PLD 1 的次要因素。

NADPH 氧化酶作用于 NADPH 产生超氧阴离子, 超氧阴离子经过 SOD 的歧化作用产生 H_2O_2 , H_2O_2 是植物体内 ROS 的主要形式 (Gapper and Dolan, 2006)。为了研究 PLD 1 是否参与了 ROS 下游的信号转导过程, 我们对野生型和 *pld 1* 突变体的幼苗加入了外源 H_2O_2 。结果表明, H_2O_2 在培养基中的施加使得野生型和 *pld 1* 突变体主根伸长均受到抑制, 二者之间差异不明显, 且具有浓度依赖性。这就说明, ROS 浓度的升高可以抑制拟南芥主根伸长; 在 ABA 抑制拟南芥主根伸长的信号转导途径中, 虽然 ROS 产生依赖于 PLD 1 的产物 PA 激活 NADPH 氧化酶, 但是它的作用不依赖于 PA, 是处在 PA 下游的信号分子。

综上所述, ABA 处理抑制拟南芥主根伸长存在这样一条依赖 PLD 1 的途径: 外源 ABA 处理诱导 PLD 1 活性上升, 水解磷脂产生 PA, PA 通过激活 NADPH 氧化酶活性使得细胞内 ROS 含量大幅度增加, 进而引发下游信号转导机制, 从而抑制了主根的伸长。此外, 我们从图 1 中还可以看到, ABA 处理下, *pld 1* 突变体的主根伸长仍然受到了强烈的抑制。这一结果与前人的研究有差异。Zhang 等 (2004) 在以气孔为模型进行的研究中, ABA 不能诱导 *pld 1* 突变体气孔关闭。我们推测, 在 ABA 调控拟南芥主根伸长的信号转导过程中, 有可能存在着不依赖于 PLD 1 的信号途径。

在对野生型和 *pld 1* 突变体根毛长度的描述中, PLD 1 的缺失显著抑制了拟南芥根毛的尖端生长, 但是对根毛密度没有明显的影响。Martin 等 (2003) 的研究表明, 当施加 1-BuOH 抑制 PLD 活性时, 花粉管停止萌发和尖端生长, 若外源施加 PA, 则可以逆转这种现象, 且外源施加的 PA 进入花粉管后集中在尖端区域。同样的, 当对根毛外源施加 1-BuOH 时, 根毛的发生和伸长完全停止 (Ohashi 等, 2003)。这些结果证实, 在根毛的生长过程中, PLD 的产物 PA 和细胞的尖端生长有着密不可分的联系。

PLD 是怎样调控根毛的尖端生长还不清楚。一种可能的途径就是通过调节根毛尖端 ROS 的产生及作用来调节根毛尖端生长。

根毛中 ROS 的来源主要是 NADPH 氧化酶

(Foreman 等, 2003), 而如前文所述, PLD 1 的产物 PA 可以激活 NADPH 氧化酶, 从而介导 ROS 的产生。此外, 在细胞程序性死亡 (programmed cell death, PCD) 中, PA 是 Rho 相关的小 G 蛋白 GTPase2 (ROP2) 的一个非常重要的调节因子, 直接参与了 ROP2 诱导的 ROS 产生 (Park 等, 2004)。在根毛中, ROP2 调节根毛膨胀部位, 确定生长点, 是根毛产生和进行尖端生长一个重要的调控因子 (Jones 等, 2002)。

我们利用激光共聚焦显微镜检测了 *pld 1* 突变体根毛尖端 ROS 的浓度, 结果证实, PLD 1 的缺失导致了根毛尖端富集 ROS 浓度的降低, 这个结果和 *pld 1* 突变体根细胞原生质体中 ROS 含量低于野生型是一致的, 说明 PLD 1 不仅在根细胞中对 ROS 的产生发挥着积极的作用, 在根毛尖端也存在同样的机制。随后对根毛尖端 Ca^{2+} 浓度的测定表明, *pld 1* 突变体根毛尖端 Ca^{2+} 浓度显著低于野生型。因此, 我们推测, PLD 1 通过介导根毛尖端 ROS 的产生, 进而影响尖端 Ca^{2+} 浓度来调控根毛的生长。

综上所述, PLD 1 参与了 ABA 调控的拟南芥主根伸长, PLD 1 的缺失影响了根毛尖端 ROS、 Ca^{2+} 的积累和根毛的生长。

【参 考 文 献】

- Amanda JA, David IG, Mark WS, 1998 . Use of a new tetrazolium-based assay to study the production of superoxide radicals by tobacco cell cultures challenged with avirulent zoospores of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* [J] . *Plant Physiology*, 117: 491—499
- Bai L, Zhou Y, Zhang XR *et al.*, 2007 . Hydrogen peroxide modulates abscisic acid signaling in root growth and development in *Arabidopsis* [J] . *Chinese Science Bulletin*, 52: 1142—1145
- Chen CW, Yang YW, Lur HS *et al.*, 2006 . A novel function of abscisic acid in the regulation of rice (*Oryza sativa* L.) root growth and development [J] . *Plant Cell Physiology*, 47: 1—13
- Demidchik V, Tester M, 2002 . Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from *Arabidopsis* roots [J] . *Plant Physiology*, 128: 379—387
- Fan L, Zheng S, Wang X, 1997 . Antisense suppression of phospholipase D retards abscisic acid and ethylene-promoted senescence of postharvest *Arabidopsis* Leaves [J] . *The Plant Cell*, 9: 2183—2196
- Felle HH, Hepler PK, 1997 . The cytosolic Ca^{2+} concentration gradient of *Sinapis alba* root hairs as revealed by Ca^{2+} -selective microelectrode tests and fura-dextran ratio imaging [J] . *Plant Physiology*, 114:

39—45

- Foreman J, Vadim D, John H. F. Bothwell *et al.*, 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth [J]. *Nature*, 422: 442—445
- Frank W, Munnik T, Kerkman K *et al.*, 2000. Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrect ion plant *Craterostigma plantagineum* [J]. *The Plant Cell*, 12: 111—124
- Gapper C, Dolan L, 2006. Control of plant development by reactive oxygen species [J]. *Plant Physiology*, 141: 341—345
- Girish M, Zhang W, Fan D *et al.*, 2006. A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in *Arabidopsis* [J]. *Science*, 312: 264—266
- Grant JJ, Loake GJ, 2000. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance [J]. *Plant Physiology*, 124: 21—29
- Jones MA, Shen J, Fu Y *et al.*, 2002. The *Arabidopsis* Rop2 GTPase is a positive regulator of both root hair initiation and tip growth [J]. *The Plant Cell*, 14: 763—776
- Kwak JM, Mori IC, Pei ZM *et al.*, 2003. NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis* [J]. *EMBO Journal*, 22: 2623—2633
- Li W, Li M, Zhang W *et al.*, 2004. The plasma membrane-bound phospholipase D enhances freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nature Biotechnology*, 22: 427—433
- Martin P, Marek E, Bronislava P *et al.*, 2003. Phosphatidic acid produced by phospholipase D is required for tobacco pollen tube growth [J]. *Planta*, 217: 122—130
- Mittler R, 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance [J]. *Trends in Plant Science*, 7: 405—410
- Morris AJ, Engebrecht J, Frohman MA, 1996. Structure and regulation of phospholipase D [J]. *Trends in Pharmacological Science*, 17: 182—185
- Munnik T, 2001. Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger [J]. *Trends in Plant Science*, 6: 227—233
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A *et al.*, 2002. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants [J]. *Journal of Experimental Botany*, 372: 1237—1247
- Ohashi Y, Oka A, Rodrigues-Pousada R *et al.*, 2003. Modulation of phospholipid signaling by *GLABRA2* in root-hair pattern formation [J]. *Science*, 300: 1427—1430
- Park J, Gu Y, Lee Y *et al.*, 2004. Phosphatidic acid induces leaf cell death in *Arabidopsis* by activating the rho-related small G protein GTPase-mediated pathway of reactive oxygen species generation [J]. *Plant Physiology*, 134: 129—136
- Pei Z, Murata Y, Benning G, 2000. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells [J]. *Nature*, 406: 731—734
- Ritchie S, Gilroy S, 1998. Abscisic acid signal transduction in the barley aleurone is mediated by phospholipase D activity [J]. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 95: 2697—2702
- Sang Y, Cui D, Wang X, 2001a. Phospholipase D and phosphatidic acid-mediated generation of superoxide in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 126: 1449—1458
- Sang Y, Zheng S, Li W *et al.*, 2001b. Regulation of plant water loss by manipulating the expression of phospholipase D [J]. *The Plant Journal*, 28: 135—144
- Simontacchi M, Caro A, Fraga CG *et al.*, 1993. Oxidative stress affects tocopherol content in soybean embryonic axes upon imbibition and germination [J]. *Plant Physiology*, 103: 949—953
- Smet ID, Zhang HM, Inze D *et al.*, 2006. A novel role for abscisic acid emerges from underground [J]. *Trends in Plant Science*, 11: 434—439
- Torres MA, Dangl JL, 2005. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 8: 397—403
- Vranová E, Inzé D, van Breusegem FV, 2002. Signal transduction during oxidative stress [J]. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1227—1236
- Wang C, Zien CA, Afithhile M *et al.*, 2000. Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 12: 2237—2246
- Wang X, 2002. Phospholipase D in hormonal and stress signaling [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 408—414
- Young S, Wang XM, Leach JE, 1996. Changes in the plasma membrane distribution of rice phospholipase D during resistant interactions with *Xanthomonas oryzae pv oryzae* [J]. *The Plant Cell*, 8: 1079—1090
- Zhang W, Qin C, Zhao J *et al.*, 2004. Phospholipase D α 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling [J]. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 101: 9508—9513
- Zhu C, Gan L, Shen Z *et al.*, 2006. Interactions between jasmonates and ethylene in the regulation of root hair development in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 57 (6): 1299—1308