

磷脂酶D对拟南芥抗冻性的影响

赵鹏^{1,2},王道龙¹

(¹中国农业科学院农业资源与农业区划研究所,北京 100081;²中山火炬职业技术学院,广东中山 528436)

摘要:为了探索磷脂酶D(*PLD*)在调控植物抗冻性中的作用,进一步揭示植物抗冻机理和磷脂低温信号转导机制的研究。笔者应用人工气候霜箱,对*PLDγ1*、*PLDγ3*基因分别被敲除的拟南芥突变体及野生型材料,进行低温驯化和冻害胁迫处理。试验发现,这2个基因的敲除型无论是经过还是未经过低温驯化冻害处理的离子渗漏率都与相同处理野生型拟南芥的离子渗漏率无显著差异。试验结果表明,*PLDγ1*和*PLDγ3*这2个基因既未参与组成型调控植物的抗冻性,也未参与低温信号转导过程。

关键词:磷脂酶D;拟南芥;低温驯化;信号转导

中图分类号:Q494

文献标志码:A

论文编号:2010-2573

Study on the Effect of *Phospholipase D* on the Freezing Tolerance of *Arabidopsis thaliana*

Zhao Peng^{1,2}, Wang Daolong¹

(¹*Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, CAAS, Beijing 100081;*

²*Zhongshan Torch Polytechnic, Zhongshan Guangdong 528436*)

Abstract: The experiment was purposely to research the effect of phospholipase D on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*, reveal the mechanism of plants freezing tolerance and phospholipid signal transduction. *Arabidopsis thaliana* mutant *PLDγ1* or *PLDγ3* was deficient and wild-type was used as materials. The two mutants and wild-type were cold acclimated and freezing stressed using a climate chamber. There were no significant differences between the ion leakage of the mutants and wild-type whether cold acclimation freeze or non-acclimation freeze. The results showed that *PLDγ1* and *PLDγ3* neither mediate regulation of constitutive freezing tolerance nor low temperature signaling.

Key words: phospholipase D; *Arabidopsis thaliana*; cold acclimation; signal transduction

0 引言

磷脂酶D(*phospholipase D*, *PLD*)是水解细胞膜中磷脂的第一步关键酶之一,影响膜的结构、功能和稳定性。同时近年来试验发现,各种环境刺激,包括低温、水分胁迫、病原菌激发和激素刺激均会迅速激活*PLD*^[1-4],表明*PLD*在跨膜信号转导作用中也扮演着重要角色。对*PLD*在低温逆境中的磷脂水解和信号转导双重功能作用的研究,为探索提高植物抗冻性新途径和

新方法做了有益尝试。

植物中*PLD*基因家族包括多个基因^[5],仅拟南芥中就有12个*PLD*基因被鉴定,根据基因的结构和它们编码的*PLD*的序列相似性、域结构、生化特性以及cDNA克隆的顺序^[6],可分成6种类型:*PLDα(3)*,*PLDβ(2)*,*PLDγ(3)*,*PLDδ*,*PLDε*和*PLDζ(2)*^[7]。

*PLDs*不同的结构和生物化学性质的差异决定各具独特的细胞功能^[4]。目前,人们通过遗传操作成功

基金项目:国家自然科学基金项目“细胞膜磷脂水解酶在植物低温驯化过程中的作用与机理”(30771701)。

第一作者简介:赵鹏,男,1980年出生,硕士,研究方向:农业减灾。通信地址:528436 广东省中山市火炬开发区 中山火炬职业技术学院组织人事宣传处, Tel: 0760-88291181, E-mail: zzpp_517@163.com。

通讯作者:王道龙,男,1956年出生,河南驻马店人,研究员,主要从事农业资源开发利用与管理、区域发展与规划、农业生态环境保护和可持续农业的研究工作。先后主持完成多项国家“863”项目、国家科技支撑项目、国家重大基础性公益性项目、国家自然科学基金项目、部委项目和国际合作项目等,获省部级科技奖10余项。主编或副主编出版著作10余部,在国家级刊物上发表论文50余篇。通信地址:100081 北京海淀区中关村南大街12号 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, Tel: 010-82108691, E-mail: wangdl@mail.caas.net.cn。

收稿日期:2010-09-03, **修回日期:**2011-01-09。

地筛选到了拟南芥 *PLDs* 的基因反义突变体以及基因敲除突变体,使得不同类型的 *PLD* 基因在逆境胁迫、激素反应、防御反应等方面的重要功能不断被揭示。目前,对于 *PLDα* 信号转导作用的研究较多,如 Sang 等^[8] 试验发现拟南芥的抗旱能力低于野生型,而 *PLDα* 缺失株拟南芥的抗霜力却比野生型明显的高^[9],当用同样浓度 ABA 处理野生型和转反义 *PLDα* 基因的拟南芥离体叶片,转基因植株的叶片出现明显地衰老延迟^[10]。而对 *PLDγ* 的研究报道相对较少,刘斌等^[11] 将 *PLDγ* 反义基因转入三倍体毛白杨后,发现转化株毛白杨的耐盐碱能力明显提高。因此,本研究通过对 *PLDγ* 1 和 *PLDγ* 3 基因被敲除的拟南芥突变体和野生型进行低温驯化和冻害处理,研究各 *PLDs* 在低温驯化过程中对拟南芥抗冻性作用的影响,以期找到提高植物抗冻性的新途径。

1 材料与方法

1.1 试验时间、地点

试验于 2007—2008 年在中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所试验站内进行。

1.2 试验材料

试验材料为 *PLDγ*1 和 *PLDγ*3 基因被敲除的拟南芥突变体及其哥伦比亚野生型拟南芥(由美国密苏里大学的王学敏教授惠赠)。

1.3 试验方法

1.3.1 植物材料的培养 选取拟南芥种子播种在培养皿中,2 周后移栽至盆内,置于培养箱中,生长条件为白天 23℃、光照 12 h,光照强度 24000 lx,湿度 80%,黑夜 19℃,黑暗 12 h,湿度 65%。

1.3.2 低温驯化与冻害胁迫处理 利用 PU-4K 型人工气候霜箱(日本 ESPEC 公司)对拟南芥进行低温驯化

和冻害胁迫处理。低温驯化处理方法:将长至 35 天左右未开花的拟南芥,放置入 4℃ 的人工气候霜箱中保持 3 天。冻害胁迫处理按照模拟自然降温的方式进行程序设置,即先从室内温度迅速降至 4℃(设定时间为 0.5 h),再以 3℃/h 的速度降至 -2℃,保持 3 h,保持期间喷适量水,防止材料出现过冷却状态,之后以 2℃/h 的速率降至 -20℃,在降至预定的处理温度下取出处理材料。取出冻害处理的材料后,先放置于 4℃ 冰箱中解冻 24 h,之后再放置于人工气候培养箱中,正常生长条件培养 7 天,在 7 天时对处理后材料的冻害情况进行观察和拍照。

1.3.3 离子渗漏率的测定 参照 Welti 等^[9] 测定离子渗漏率的方法。将低温冻害处理后的植株置于 4℃ 下解冻 24 h,之后取每个处理温度下(处理温度分别为 -10℃、-12℃、-14℃、-16℃ 和 -18℃)的材料叶片各 3 枚,放置于去离子水中,在 23℃ 水浴下轻微振荡 1 h,测定初电导值;之后在 100℃ 下煮沸 10 min,冷却至 23℃ 测定总电导值。离子渗漏率 = 初电导值/总电导值。离子渗漏率越高,表示植株的受冻害程度越严重,离子渗漏率越低,则反之。

2 结果与分析

2.1 *PLDγ*1 基因未参与组成型调控植物的抗冻性和低温信号转导过程

*PLDγ*1 基因敲除型和野生型拟南芥在未经低温驯化,直接进行相应温度的冻害处理,处理完成后进行正常生长培养 7 天,对比两者叶片的伤害程度,可以发现两者受害程度基本一致(如图 1 所示);同时,对经过不同温度冻害处理并在 4℃ 下解冻 24 h 后的植株,测定其离子渗漏率,通过 SPSS 软件分析发现两者的离子渗漏率差异不显著(见图 2)。由此可推断,在未经低温



图 1 *PLDγ*1 基因敲除型与野生型未低温驯化后的冻害处理比较

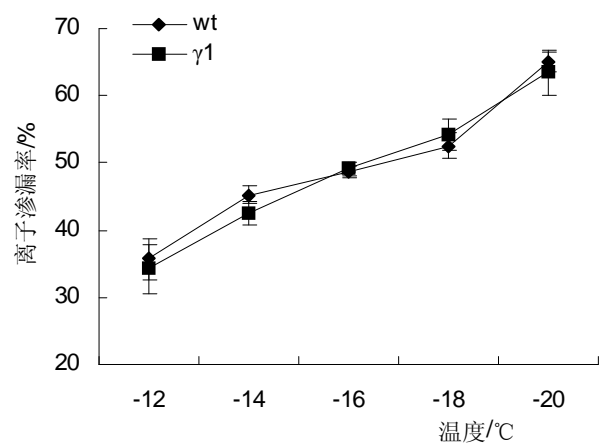


图 2 *PLDγ*1 基因敲除型与野生型未低温驯化后的离子渗漏率比较

驯化条件下,两者抗冻性表现基本一致,即表明 *PLDγ1* 基因没有调控植物组成型的抗冻性。

同时,对经过低温驯化后的 *PLDγ1* 基因敲除型和野生型拟南芥进行冻害胁迫处理,相应温度下处理完成后进行正常生长培养7天,对比两者叶片的伤害程度,可以发现两者受害程度无明显差别,如图3所示;而两者经低温驯化后,按 Welti 等测定离子渗漏率的方法,分析数据发现两者的离子渗漏率差异不显著(见图4)。由此表明,两者经过低温驯化后抗冻性没有显著差异,即说明 *PLDγ1* 基因没有参与低温驯化后植株抗冻性提高的过程。



图3 *PLDγ1* 基因敲除型和野生型低温驯化后的冻害处理比较



图5 *PLDγ3* 基因敲除型与野生型未低温驯化后的冻害处理比较

2.2 *PLDγ3* 基因未参与组成型调控植物的抗冻性和低温信号转导过程

PLDγ3 基因敲除型和野生型拟南芥未经低温驯化而直接进行相应低温的冻害处理,处理完成后经过解冻和正常生长培养,观察两者表型,发现两者受害程度表现较为一致,没有显著差别(如图5所示);同时,对两者不同低温处理后的离子渗漏率测定,根据统计软件分析发现两者离子渗漏率差异不显著(见图6)。

同时,对 *PLDγ3* 基因敲除型和野生型拟南芥进行3天低温驯化后的冻害胁迫处理,发现两者 *PLDγ3* 基因敲除型和野生型拟南芥抗冻性差异不大(见图7),

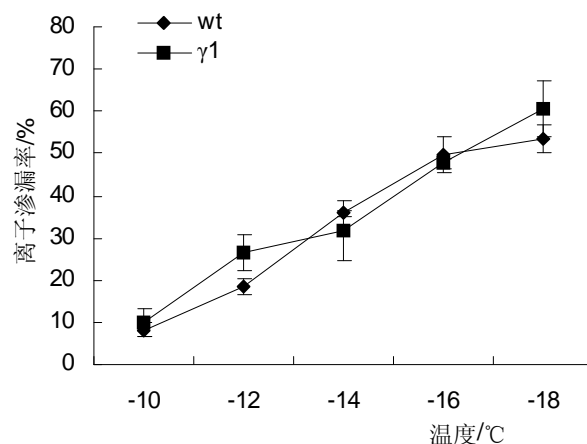


图4 *PLDγ1* 基因敲除型与野生型低温驯化后的离子渗漏率比较

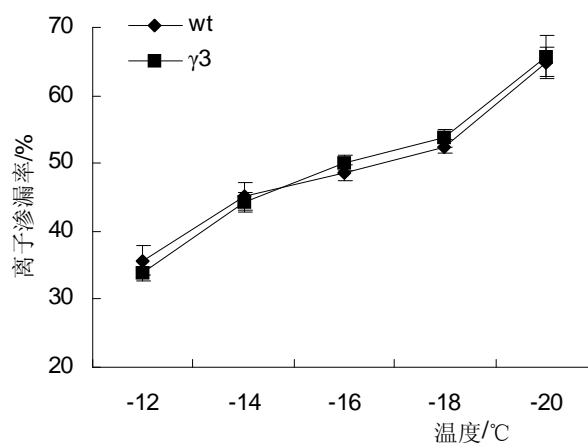


图6 *PLDγ3* 基因敲除型与野生型未低温驯化后的离子渗漏率比较



图7 *PLDγ3*基因敲除型和野生型低温驯化后的冻害处理比较

离子渗漏率差异也不显著(见图8),说明 *PLDγ3* 基因不参与低温信号转导过程。

3 结论

(1) *PLDγ1* 基因敲除型和野生型拟南芥在均未经低温驯化直接进行冻害处理后,通过观察和离子渗漏率比较发现,两者的抗冻性表现没有显著差异,表明 *PLDγ1* 基因没有参与调控植物组成型的抗冻性。而对 *PLDγ1* 基因敲除型和野生型拟南芥在经过3天低温驯化后再冻害处理,无论是表型观察还是离子渗漏率分析,也都差异不显著,说明 *PLDγ1* 基因也没有参与调控植株的低温驯化过程。

(2)同结论1的结果类似, *PLDγ3* 基因敲除型和野生型拟南芥植株无论是未经低温驯化的冻害处理,还是经过低温驯化后的低温冻害处理,两者的冻害症状表现和离子渗漏率差异比较都不明显,说明 *PLDγ3* 基因没有参与组成型抗冻性的调控,也没有参与低温驯化过程的调控。

4 讨论

研究发现 *PLDs* 是一种重要的膜磷脂水解酶,而膜脂的稳定性直接影响着植物的抗冻性。例如 Welte 等的试验发现 *PLDα* 基因被反义抑制后拟南芥植株的抗霜力较野生型明显地高。进一步的机理研究发现,霜冻处理后, *PLDα* 基因抑制型与野生型的膜脂组成变化不同, *PLDα* 基因抑制型的膜脂中 PC 含量的减少幅度仅是野生型的一半, PA 的增加幅度也仅是野生型的一半。PC 是对膜脂双分子层起稳定作用的磷脂,而 PA 的积累则促进低温胁迫下六角形 II 相位(haxgonal

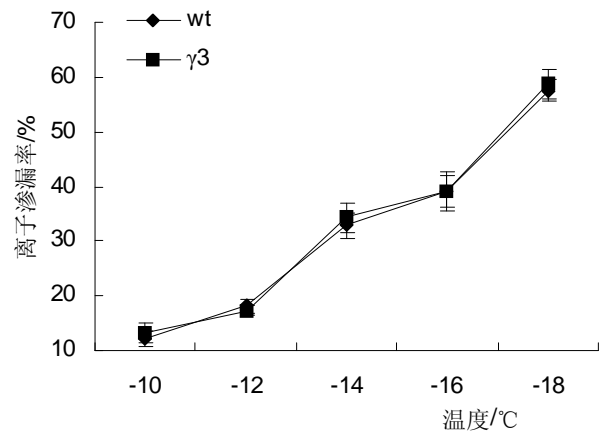


图8 *PLDγ3*基因敲除型与野生型低温驯化后的离子渗漏率比较

II phase)的形成。膜脂组成的变化导致 *PLDα* 基因抑制型的抗霜力比野生型要强。而本试验发现,对 *PLDγ1* 和 *PLDγ3* 基因敲除型直接低温冻害处理后,均与野生型拟南芥的离子渗漏率无明显差异,表明 *PLDγ1* 和 *PLDγ3* 对膜磷脂水解的特异性不如 *PLDα*, 也就说明 *PLDγ1* 和 *PLDγ3* 基因没有参与组成型调控植物抗冻性的过程。

PLDs 基因参与低温信号转导作用,也可使植物经过低温驯化后抗冻性发生较大变化,如 Li 等^[12-13] 研究发现,经过低温驯化后 *PLDδ* 缺失型的抗冻性较野生型要弱,而 *PLDδ* 超表达基因型的抗冻性比野生型要增强,同时超表达植株不经低温驯化无法达到经过低温驯化后野生型的耐冻性,表明 *PLDδ* 参与低温驯化过程的信号转导作用,接着分析发现 *PLDδ* 的改变没有影响冷调控基因 *COR47* 或者 *COR78* 的表达,说明 *PLDδ* 可能是和其他冷诱导过程共同作用的结果,包括冷调节基因的表达、渗透调节物质和膜脂组成变化等。而 *PLDγ1* 和 *PLDγ3* 基因缺失型植株低温驯化后与野生型的抗冻性相比,没有显著差异,表明 *PLDγ1* 和 *PLDγ3* 这2个基因没有参与低温信号转导作用。

PLD 家族生物化学性质的独特性源于 *PLD* 结构的多样性。例如植物中不同 *PLD* 的 C2 域和 PIP₂ 结合单元存在极大差异,使得不同 *PLD* 的激活对 Ca²⁺ 和 PIP₂ 的需求不同。Qin 等^[14] 研究发现, *PLDα* 在以单独一种磷脂作为底物的离体实验中需要毫摩尔水平的 Ca²⁺ 激活,而 *PLDγ* 则需要 Ca²⁺ 和 PIP₂ 协同激活,在微摩尔的 Ca²⁺ 水平下最活跃。Katagiri 等^[15] 发现对于 *PLDδ*

则依赖油酸激活,其他不饱和脂肪酸即亚油酸和亚麻酸的激活程度差一些,而饱和脂肪酸如硬脂酸和棕榈酸则没有激活作用。

参考文献

- [1] Ryu SB, Wang X. Activation of phospholipase D and the possible mechanism of activation in wound-induced lipid hydrolysis in castor bean leaves[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1996,1303:243-250.
- [2] Fan L, Zhang S, Wang X. Antisense suppression of phospholipase D α retards abscisic acid- and ethylene-promoted senescence of postharvest *Arabidopsis* leaves[J]. *Plant Cell*, 1997,9:2916-2919.
- [3] Lee S, Suh S, Kim S, et al. Systemic elevation of phosphatidic acid and lysophospholipid levels in wounded plants[J]. *Plant J*, 1997,12:547-556.
- [4] Wang X. The role of phospholipase D in signal transduction cascade [J]. *Plant Physiol*, 1999,121:456-462.
- [5] Liscovitch M, Czarny M, Fiucci G, et al. Phospholipase D molecular and cell biology of a novel gene family[J]. *Biochem J*, 2000,345: 401-415.
- [6] Wang X. Phospholipase D in hormonal and stress signaling. *Curr Opin*[J]. *Plant Biol*, 2002,5,408-414.
- [7] Qin C, Wang X. The *Arabidopsis* phospholipase D family. Characterization of a calcium-independent and phosphatidylcholine-selective PLD with distinct regulatory domains [J]. *Plant Physiol*, 2002,128:1057-1068.
- [8] Sang Y.M., Zheng S.Q., Li W.Q., et al. Regulation of plant water loss by manipulating the expression of phospholipase D α [J]. *Plant J*. 2001,28(2):135-144.
- [9] Welti R, Li WQ, Li MY, et al. Profiling membrane lipids in plant stress responses: Role of phospholipase D α in freezing-induced lipid changes in *Arabidopsis*[J]. *J Biol Chem*, 2002,277(35):31994-32002.
- [10] Fan L, Zheng S, Wang X M. Antisense suppression of phospholipase D α retards abscisic acid- and ethylene-promoted senescence of postharvest *Arabidopsis* leaves[J]. *The Plant Cell*, 1997,9:2183-2196.
- [11] 刘斌,李红双,王其会,等.反义磷脂酶 D γ 基因转化毛白杨的研究[J]. *遗传*, 2002,24(1):40-44.
- [12] Li WQ, Li MY, Zhang WH, et al. The plasma membrane-bound phospholipase D δ enhances freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Nat Biotechnol*, 2004,22(4):427-433.
- [13] Zhang, W. et al. Phospholipase D δ and phosphatidic acid decrease H₂O₂-induced cell death in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2003,15, 2285-2295.
- [14] Qin W, Pappan K., Wang X. Molecular heterogeneity of phospholipase D(PLD): cloning of PLD γ and regulation of plant PLD $\alpha\beta\gamma$ by polyphosphoinositides and calcium[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272:28267-28273.
- [15] Katagiri T, et al. Molecular cloning of a cDNA encoding diacylglycerol kinase (DGK) in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Mol Biol*, 1996,30:647-653.