

磷脂酶D在ABA调控气孔运动中的作用

王俊斌^{1,2}, 丁博¹, 李欣¹, 吴天文¹, 陈小强¹, 谢晓东^{1,*}

天津农学院¹天津-布里斯托环境变化对农作物影响研究中心,²基础科学学院, 天津300384

摘要: 气孔由植物叶片表面一对保卫细胞包围而成, 控制植物光合作用所需CO₂的摄取和蒸腾作用水分的散失。脱落酸(abscisic acid, ABA)通过诱导气孔关闭减少植物水分散失。研究表明, 磷脂酶D (phospholipase D, PLD)及其产物磷脂酸(phosphatidic acid, PA)参与ABA调节的气孔运动信号转导过程。本文主要综述在保卫细胞ABA信号途径中, PLD α 1/PA与G蛋白、蛋白磷酸酶2C、活性氧等信号组分的相互作用, 以及PLD δ 在气孔运动中的作用。

关键词: 磷脂酶D; 气孔运动; 脱落酸; 磷脂酸; 逆境

气孔由植物器官表面成对的保卫细胞包围而成, 是植物与外界进行气体和水分交换的通道。气孔开闭控制着光合作用所需CO₂的摄取和蒸腾作用水分的散失, 与植物逆境应答和生长发育等生物学过程密切相关。保卫细胞具有非常灵敏的感受外界和内部信号变化的能力, 环境胁迫、病菌侵染、激素等刺激都可被植物感知, 迅速启动保卫细胞信号转导过程, 通过改变膨压快速调节气孔处于最适宜的开闭状态, 从而最大限度地优化植物对CO₂的吸收和减少因蒸腾导致的水分散失(Schroeder等2001; Hetherington和Woodward 2003)。深入研究气孔运动信号转导途径及其调控机理对于认识植物适应环境的机制有重要的理论意义, 对于增强农作物抗逆性、提高产量和品质也有重要的实践意义(Hetherington和Woodward 2003)。作为一种抗逆信号分子, 脱落酸(abscisic acid, ABA)调节气孔运动的信号转导机制已受到广泛深入的研究, 其基本过程是: ABA与保卫细胞膜上受体结合, 负调控蛋白磷酸酶2C (protein phosphatase 2C, PP2C)活性, 从而解除PP2C对下游蛋白激酶的抑制, 启动一系列包含磷酸化、转录调节和转录后蛋白修饰等环节的下游级联反应, 激活或抑制膜上离子通道, 改变保卫细胞膨压, 实现对气孔运动的调节。许多第二信使参与和介导了保卫细胞ABA信号传导途径, 包括磷脂酶D (phospholipase D, PLD)、GTP结合蛋白(G蛋白)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)、Ca²⁺、一氧化氮(nitric oxide, NO)等(Kim等2010; Merilo等2015; Munemasa等2015)。本文主要介绍PLD及其产物磷脂酸(phosphatidic acid, PA)在保卫细胞ABA信号途径中的作用及其机理。

1 PLD概况

PLD (EC 3.1.4.4)是植物中存在的一类重要的磷脂水解酶及信号转导酶, 通过水解磷脂, 产生PA和一个极性头部, 参与植物多种生理响应过程(Wang 2005; Wang等2014b)。1947年, Hanahan和Chaikoff首次在胡萝卜根和白菜叶中发现了PLD, 但直到1994年有活性的植物PLD基因被分离克隆成功后(Wang等1994), 人们才对其进行了较为深入细致的研究。迄今, 人们已从不同植物中克隆鉴定了多个PLD基因, 表明其属于多基因家族, 具有多分子异质性(Zhang等2010; 王俊斌等2013, 2015)。拟南芥中已经确认了12个PLD基因, 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)六类(Wang 2005; Wang等2006)。PLD基因的cDNA序列高度保守, 所有PLD基因都包括2个H×K×××D基序, 即HKD1和HKD2, 两基序间隔约320个氨基酸。H、K、D分别为His (组氨酸)、Lys (赖氨酸)和Asp (天冬氨酸)。HKD基序是PLD的标志序列, 也是催化水解的活性部位(Wang 2000)。除PLD ζ 外的植物PLD都含有C2结构域, C2域是一个Ca²⁺与磷脂结合的折叠域。PLD ζ 是一类特殊的PLD, 其结构中不含C2域, 却有PX和PH结构域(Qin和Wang 2002)。大量研究表明PLD能够响应干旱、高盐、低温冷害和ABA等信号而被激活, 在植物抵抗逆境胁迫中发挥重要作用(Hong等2010; Zhang等2010, 2014; Wang等2014a;

收稿 2016-04-06 修定 2016-06-08

资助 天津市高等学校科技发展基金项目(20130606)、天津市自然科学基金(14JCYBJC30600)、天津市131创新型人才团队和天津市学科领军人才计划。

* 通讯作者(E-mail: xiex@tjau.edu.cn)。

Yu等2015)。PLD的作用机理可以总结为以下几个方面(Welti等2002; Hong等2010): 改变膜脂组成, 影响细胞膜稳定性; 直接与功能蛋白相互作用; 和PA一起作为重要的第二信使参与细胞信号转导过程。PLDs在底物选择特异性、亚细胞定位和基因时空表达特性等方面均有明显差异, 暗示不同PLD的生理功能的多样性(Wang 2005)。不同的PLD在特定的细胞信号转导过程中执行独特的功能, 由于一种PLD缺失所引起的表型变化, 不能被其他PLD取代(Li等2004; Zhang等2010)。例如, PLD α 1、PLD α 3和PLD δ 参与植物响应高盐、干旱和低温等渗透胁迫, PLD ϵ 参与植物应答营养缺失和渗透胁迫, PLD ζ 则参与植物根毛发育(Hong等2010; Zhang等2014)。植物在各种逆境胁迫条件下能够迅速做出响应, 许多情况下信号转导与特异性的PLD的激活相关。目前研究证据表明, 参与ABA介导气孔运动的主要是PLD α 1和PLD δ 。

2 PLD α 1/PA参与ABA调控的气孔运动

PLD α 是植物中最普遍的一种PLD, 以磷脂酰胆碱为首选底物。其中, PLD α 1是植物组织中含最高的一种PLD (Zhang等2010)。关于PLD及PA在气孔运动中的作用机制, 主要证据来自PLD α 1参与ABA调节气孔运动的研究。PLD α 1响应ABA信号后活性迅速升高(Jacob等1999; Sang等2001b; Zhang等2004), 比如, 经ABA处理后的蚕豆保卫细胞中PA水平瞬时增加2.5倍(Jacob等1999)。用PA处理保卫细胞抑制K⁺_{in}通道, 可诱导气孔关闭并抑制气孔开放。PLD催化磷脂水解生成PA的选择性抑制剂正丁醇能部分抑制ABA诱导的气孔关闭(Jacob等1999)。PLD α 1基因缺失或反义抑制突变体对ABA不敏感, ABA处理后PA含量无明显升高, 气孔关闭现象不明显, 外加PA可以促进气孔关闭(Sang等2001b; Zhang等2004; Mishra等2006)。这些现象提示, 在保卫细胞中ABA可激活PLD产生PA, PA再进一步与下游的细胞反应发生联系, 诱导气孔关闭。表明PLD α 1/PA在ABA调节气孔运动信号途径中起正调控作用。

气孔是植物蒸腾失水的主要通道。烟草和拟南芥PLD α 1缺失突变体比野生型的蒸腾失水率高, ABA处理不能显著降低失水率; 相反, 过表达PLD α 1提高了烟草对ABA诱导气孔关闭的敏感性,

减少蒸腾失水率。多项抗旱生理指标测定表明PLD α 1基因缺失型植株的抗旱性低于野生型植株(Sang等2001b; Zhang等2004)。干旱条件下, 反义抑制PLD α 1导致多个基因表达发生变化, 进而影响基因转录、信号转导、代谢和激素响应等生理过程(Mane等2007)。在油菜保卫细胞特异表达拟南芥PLD α 1降低了胁迫条件下油菜气孔开度及水分损失(Lu等2013)。这些结果表明, PLD α 1基因参与ABA诱导气孔关闭的信号转导途径, PLD α 1基因被抑制后植物气孔不能响应ABA或逆境及时关闭, 蒸腾失水速率加大, 导致PLD α 1基因缺失型植株抗旱性降低。

2.1 PLD α 1/PA与蛋白磷酸酶相互作用

在拟南芥中, ABII (ABA-insensitive 1)基因编码一个PP2C, ABII缺失导致植株对ABA敏感性增加, 说明PP2C是ABA信号途径的负调控因子(Gosti等1999)。Zhang等(2004)发现PLD α 1/PA通过和ABII结合并将其固定在细胞膜周围, 减少了ABII从细胞质到细胞核的转运, 抑制了ABII激活转录因子ATHB6 (Zhang等2004)。体外重组实验也证明PA和ABII结合并抑制其磷酸酶活性, 进而抑制了ABII对ABA信号途径的负调控作用(Mishra等2006)。突变分析证明ABII结构中N端第73位精氨酸对于PA-ABII结合至关重要(Zhang等2004)。进一步实验中, 将正常ABII (ABII_{WT})基因和突变ABII (ABII_{R73A})基因转入拟南芥ABII敲除突变体(*abil-KO*)。ABII_{WT}和*abil-KO*植株能够正常响应ABA信号, 而携带ABII_{R73A}转基因的*abil-KO*植株对ABA诱导的气孔关闭不敏感, 但能正常响应ABA抑制气孔开放。实验证明精氨酸突变直接导致PA与靶蛋白ABII分离, 失去抑制效果, 但并未影响ABII磷酸酶的活性(Mishra等2006)。这一系列遗传和生理证据表明PA-ABII结合对于ABA诱导的气孔关闭是很重要的, 但并不影响ABA抑制气孔开放。

另一种磷酸酶, 蛋白磷酸酶1 (protein phosphatase 1, PP1)是蓝光诱导气孔开放信号途径中的正调控因子。实验证明PA能直接抑制蚕豆PP1的磷酸酶活性, 同时抑制质子泵和质膜ATP酶活性, 从而抑制蓝光诱导的气孔开放, 促进气孔关闭(Takemiya和Shimazaki 2010)。

结合上述两个方面的研究表明PLD α 1通过分

别与ABI1和G α 相互作用的分支途径调控ABA介导的气孔运动(Mishra等2006)。即ABA诱导气孔关闭是通过ABA激活PLD α 1, 水解产生PA, 后者结合ABI1并抑制其活性来实现的; 而ABA抑制气孔打开则是通过PA介导G-蛋白来实现的(Zhang等2004; Zhao和Wang 2004; Mishra等2006)。

2.2 PLD α 1/PA与ROS的产生

研究证明PLD还与ROS的产生有密切关系。植物细胞质膜NADPH氧化酶基因家族又被命名为呼吸爆发氧化酶同源基因(respiratory burst oxidase homologs, Rboh), 是植物中产生ROS的关键酶, 通过催化产生超氧阴离子进而产生H₂O₂ (Torres等2002)。已有的研究证明NADPH氧化酶途径产生的H₂O₂作为ABA的下游信号参与ABA诱导的气孔运动(Torres等2002; Bright等2006)。在拟南芥中PLD α 1通过介导ABA激活保卫细胞原生质体Rboh活性参与ABA诱导的H₂O₂产生和气孔关闭。在ABA作用下, 保卫细胞PLD α 1被激活, 产生的PA结合RbohD蛋白N端的4个精氨酸位点(149, 150, 156, 157)并激活酶活性, 催化产生ROS, 促进气孔关闭(Zhang等2009)。PLD α 1缺失突变导致ABA诱导Rboh活性升高和ROS的产生受到抑制, 气孔关闭受阻, 外施PA可以重新激活Rboh活性和ROS的产生(Sang等2001a; Zhang等2009)。这些结果说明在拟南芥中ABA可以激活PLD的活性产生PA, PA又可以进一步通过激活Rboh活性产生H₂O₂从而促进气孔关闭。因而, PA-Rboh相互作用对ABA介导的ROS产生和气孔关闭是很重要的, 进一步表明PLD/PA是保卫细胞ABA信号途径的重要调节因子。*AtrbohD*突变后不能与PA结合, 导致PA诱导的ROS含量升高和气孔关闭受到影响, 同时, ABA诱导的ROS产生和气孔关闭受阻。

水杨酸也可激活PLD产生PA并能增加NADPH氧化酶活性。而PLD和NADPH氧化酶的抑制剂能破坏水杨酸诱导的气孔关闭。说明脂类代谢和ROS产生是保卫细胞水杨酸信号途径的重要过程(Kalachova等2013)。除了NADPH氧化酶外, 铜氨氧化酶(CuAO; EC 1.4.3.6)是ABA诱导的气孔关闭途径中另一个催化产生H₂O₂的关键酶, 但CuAO和PLD在ABA诱导的气孔关闭途径中是相互独立的(Qu等2014)。

PA-ABI1互作影响ROS诱导的气孔关闭, 但并不影响ROS的产生, 反过来, PA-ABI1结合受到破坏并不影响ABA诱导ROS产生, 但抑制ABA或H₂O₂诱导气孔关闭。这表明ROS在ABA信号途径中位于PA-ABI1的上游(Zhang等2009)。

2.3 PLD α 1/PA与G蛋白相互作用

反义抑制或敲除PLD α 1导致ABA诱导的气孔关闭受到抑制, 表明PLD α 1参与气孔对ABA响应。进一步对ABA调控气孔运动的机理进行研究, 发现PLD/PA与G蛋白存在相互作用。*GPA1* (G protein α subunit 1)是拟南芥中编码异三聚体G蛋白G α 亚基的基因, PLD α 1和GPA1都是ABA信号通路的正调节因子。*GPA1*基因与PLD α 1基因的缺失突变体在响应ABA和缺水胁迫时具有相似的表型, 如气孔运动失调, 失水加剧(Sang等2001b; Wang等2001), 暗示PLD α 1和G α 在ABA信号途径中可能存在相互作用。分子和生化证据显示PLD α 1通过一个DRY结构域与G α -GDP结合, 结果导致PLD α 1活性受到抑制, 但同时激活了GTP酶活性, 促进GDP转化为GTP。GTP与G α 的结合又促使PLD α 1与G α 分离, 因此恢复了PLD α 1的活性。因此, PLD α 1和G α 的结合与解体形成了一个循环决定PLD α 1和G蛋白的活性(Zhao和Wang 2004)。比如, 破坏PLD α 1-GPA1相互作用解除了PLD α 1和GPA1受到的抑制(Coursol等2003; Mishra等2006)。释放和激活GPA1抑制内向K⁺通道, 因此促进ABA抑制气孔开放(Pei等1997; Coursol等2003), 但并不影响ABA诱导气孔关闭; 而激活PLD α 1则促进ABA诱导气孔关闭(Mishra等2006)。这些结果表明, PLD/PA与G α 的相互作用, 主要参与ABA抑制气孔开放这一信号转导过程。

3 PLD δ 调控气孔运动

近年来, 另一个PLD, 即PLD δ 参与气孔运动及相关逆境胁迫过程受到研究者的关注。PLD δ 主要以磷脂酰乙醇胺为底物, 水解产生PA。研究表明PLD δ 可被油酸激活而且其在衰老组织中表达量高于幼嫩组织(Wang和Wang 2001)。在高盐及脱水等逆境条件下, PLD δ 表达量都会增加(Katagiri等2001)。

在植物响应外界刺激过程中, PLD α 1促进ROS产生而PLD δ 介导植物对ROS的响应(Zhang等

2003; Guo等2012a)。虽然 $pld\delta$ 受ABA诱导产生 H_2O_2 和野生型没有明显差别,但ABA或 H_2O_2 诱导 $pld\delta$ 气孔关闭受到破坏(Distéfano等2012)。只敲除 $PLD\alpha1$ 而不敲除 $PLD\delta$,破坏了ROS的产生及其介导的气孔关闭,说明在ABA诱导气孔关闭信号途径中, $PLD\alpha1$ 位于ROS上游, $PLD\delta$ 位于ROS下游(Guo等2012a)。ROS还促进下游 $PLD\delta$ 和3-磷酸甘油醛脱氢酶相互作用催化糖酵解途径中3-磷酸甘油醛转化为1,3-二磷酸甘油酸。这些互作将植物响应胁迫过程中脂类代谢、能量代谢和生长发育直接联系起来(Guo等2012a)。

ABA诱导气孔关闭过程中, $pld\alpha1pld\delta$ 双突变体保卫细胞中ROS和NO积累及胞质碱化过程受阻。PLD抑制剂正丁醇导致ABA诱导的 $pld\alpha1$ 或 $pld\delta$ 突变体气孔关闭均受到抑制。这些结果说明 $PLD\alpha1$ 和 $PLD\delta$ 在保卫细胞ABA信号途径中发挥协同而不完全重叠的作用(Uraji等2012)。

4 PLD/PA与其他信号组分的相互作用

除了和以上信号组分相互作用参与ABA信号途径之外,PLD/PA信号还引起胁迫诱导的细胞骨架动态变化,通过解聚微管,调节ABA诱导的气孔关闭及植物对渗透胁迫的响应(Pleskot等2013; Jiang等2014)。鞘氨醇激酶(sphingosine kinase, SPHK)是与 $PLD\alpha1$ 作用的另一个重要蛋白, $PLD\alpha1$ 和PA位于SPHK下游(Guo等2012b)。PA可以与SPHK结合并刺激其激酶活性,作用于GPA1的上游(Guo等2011)。PA还能激活 H^+ -ATP酶、蛋白激酶C和丝裂原活化蛋白激酶等蛋白酶的活性(Zhang等2003),共同在ABA诱导气孔关闭信号途径中发挥作用。其他信号组分比如小G蛋白、 Ca^{2+} 、NO和钙依赖的蛋白激酶也可以和PLD/PA一起调节植物气孔运动来应对渗透胁迫(Ogasawara等2008; Zhang等2009)。

5 结语

由以上综述可知,ABA通过其特异受体激活SPHK,进一步促进 $PLD\alpha1$ 产生PA。反过来,PA也可以刺激增加SPHK活性。PA抑制蛋白磷酸酶(ABI1)活性但可以激活NADPH氧化酶产生ROS,共同促进 Ca^{2+} 浓度增加,诱导气孔关闭。另一方面,PA通过调控G蛋白活性抑制气孔打开。 $PLD\delta$ 位于ROS下游介导植物响应ROS关闭气孔(图1)。

抑制 $PLD\alpha1$ 增加植物水分散失,对干旱胁迫更加敏感。另一方面,烟草中过表达 $PLD\alpha1$ 促进气孔

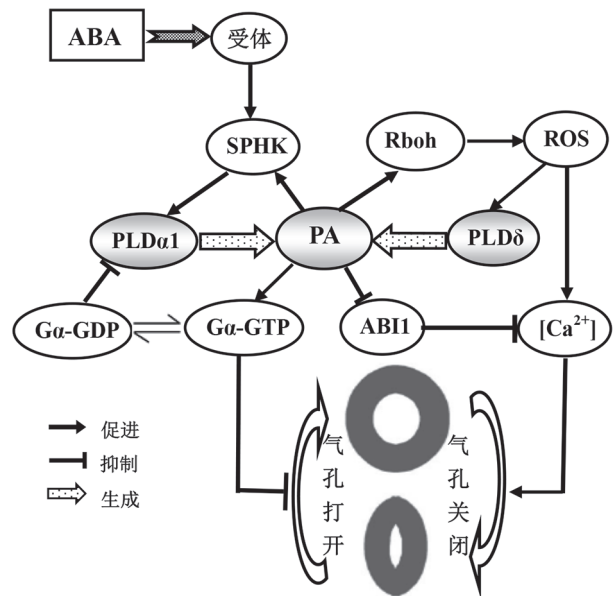


图1 PLD/PA在ABA介导的气孔信号途径中的作用模型

Fig.1 Proposed model for the role of PLD/PA in ABA-mediated stomatal signaling pathway

该模型并不代表完整的ABA信号途径,仅限于本文中提到的信号组分。

关闭,减少干旱胁迫早期水分散失(Sang等2001b)。然而,随着干旱胁迫持续,由于较高的 $PLD\alpha1$ 活性加剧脂类水解,进一步引起膜降解,导致过表达 $PLD\alpha1$ 的植物受到更大伤害(Hong等2008)。因此, $PLD\alpha1$ 的作用是一把“双刃剑”,低水平下增加 $PLD\alpha1$ 会激活细胞下游信号转导过程,但持续高水平 $PLD\alpha1$ 也会导致脂类降解,破坏细胞膜及其他细胞响应。不过,保卫细胞特异表达 $PLD\alpha1$ 减少油菜在干旱和高盐胁迫下水分散失,提高了生物量积累和种子产量(Lu等2013)。这表明 $PLD\alpha1$ 可以作为一个有应用价值的基因促进作物遗传改良。

目前,对于PLD参与ABA调控气孔运动的信号转导机制已有较深入的了解,但仍有许多问题亟待解决。比如,在ABA信号途径中,PLD的上游调控因子及其调节机制是怎样的?此外,PLD的更多下游信号组分也有待进一步鉴定。未来,随着分子生物学和遗传学研究的深入发展,PLD介导的信号机制也会逐步清晰。

参考文献

- Bright J, Desikan R, Hancock JT, Weir IS, Neill SJ (2006). ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H_2O_2 synthesis. *Plant J*, 45: 113–122

- Coursol S, Fan LM, Stuff HL, Spiegel S, Gilroy A, Assmann SM (2003). Sphingolipid signaling in *Arabidopsis* guard cells involves heterotrimeric G proteins. *Nature*, 423: 651–654
- Distéfano AM, Scuffi D, Garcia-Mata C, Lamattina L, Laxalt AM (2012). Phospholipase D δ is involved in nitric oxide-induced stomatal closure. *Planta*, 236: 1899–1907
- Gosti F, Beaudoin N, Serizet C, Webb AAR, Vartanian N, Giraudat J (1999). ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 11: 1897–1909
- Guo L, Devaiah SP, Narasimhan R, Pan X, Zhang Y, Zhang W, Wang X (2012a). Cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases interact with phospholipase D δ to transduce hydrogen peroxide signals in the *Arabidopsis* response to stress. *Plant Cell*, 24: 2200–2212
- Guo L, Mishra G, Markham JE, Li M, Tawfall A, Welti R, Wang X (2012b). Connections between sphingosine kinase and phospholipase D in the abscisic acid signaling pathway in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 287: 8286–8296
- Guo L, Mishra G, Taylor K, Wang X (2011). Phosphatidic acid binds and stimulates *Arabidopsis* sphingosine kinases. *J Biol Chem*, 286: 13336–13345
- Hanahan DJ, Chaikoff IL (1947). The phosphorus-containing lipids of the carrot. *J Biol Chem*, 168: 233–240
- Hetherington AM, Woodward FI (2003). The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature*, 424: 901–908
- Hong Y, Zhang W, Wang X (2010). Phospholipase D and phosphatidic acid signalling in plant response to drought and salinity. *Plant Cell Environ*, 33: 627–635
- Hong Y, Zheng S, Wang X (2008). Dual functions of phospholipase D α 1 in plant response to drought. *Mol Plant*, 1: 262–269
- Jacob T, Ritchie S, Assmann SM, Gilroy S (1999). Abscisic acid signal transduction in guard cells is mediated by phospholipase D activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 12192–12197
- Jiang Y, Wu K, Lin F, Qu Y, Liu X, Zhang Q (2014). Phosphatidic acid integrates calcium signaling and microtubule dynamics into regulating ABA-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Planta*, 239: 565–575
- Kalachova T, Iakovenko O, Kretinin S, Kravets V (2013). Involvement of phospholipase D and NADPH-oxidase in salicylic acid signaling cascade. *Plant Physiol Biochem*, 66: 127–133
- Katagiri T, Takahashi S, Shinozaki K (2001). Involvement of a novel *Arabidopsis* phospholipase D, AtPLD δ , in dehydration-inducible accumulation of phosphatidic acid in stress signaling. *Plant J*, 26: 595–605
- Kim TH, Böhmer M, Hu H, Nishimura N, Schroeder JI (2010). Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annu Rev Plant Biol*, 61: 561–591
- Li W, Li M, Zhang W, Welti R, Wang X (2004). The plasma membrane-bound phospholipase D δ enhances freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol*, 22: 427–433
- Lu S, Bahn SC, Qu G, Qin H, Hong Y, Xu Q, Zhou Y, Hong Y, Wang X (2013). Increased expression of phospholipase D α 1 in guard cells decreases water loss with improved seed production in *Brassica napus*. *Plant Biotechnol J*, 11: 380–389
- Mane SP, Vasquez-Robinet C, Sioson AA, Heath LS, Grene R (2007). Early PLD α 1-mediated events in response to progressive drought stress in *Arabidopsis*: a transcriptome analysis. *J Exp Bot*, 58: 241–252
- Merilo E, Jalakas P, Kollist H, Brosché M (2015). The role of ABA recycling and transporter proteins in rapid stomatal responses to reduced air humidity, elevated CO₂ and exogenous ABA. *Mol Plant*, 8: 657–659
- Mishra G, Zhang W, Deng F, Wang X (2006). A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in *Arabidopsis*. *Science*, 312: 264–266
- Munemasa S, Hauser F, Park J, Waadt R, Brandt B, Schroeder JI (2015). Mechanisms of abscisic acid-mediated control of stomatal aperture. *Curr Opin Plant Biol*, 28: 154–162
- Ogasawara Y, Kaya H, Hiraoka G, Yumoto F, Kimur S, Kadota Y, Hishinuma H, Senzaki E, Yamagoe S, Nagata K, et al (2008). Synergistic activation of the *Arabidopsis* NADPH oxidase AtrbohD by Ca²⁺ and phosphorylation. *J Biol Chem*, 283: 8885–8892
- Pei Z, Kuchitsu K, Ward JM, Schwarz M, Schroeder JI (1997). Differential abscisic acid regulation of guard cell slow anion channels in *Arabidopsis* wild-type and *abi1* and *abi2* mutants. *Plant Cell*, 9: 409–423
- Pleskot R, Li J, Žárský V, Potocký M, Staiger CJ (2013). Regulation of cytoskeletal dynamics by phospholipase D and phosphatidic acid. *Trends Plant Sci*, 18: 496–504
- 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
- Qu Y, An Z, Zhuang B, Jing W, Zhang Q, Zhang W (2014). Copper amine oxidase and phospholipase D act independently in abscisic acid (ABA)-induced stomatal closure in *Vicia faba* and *Arabidopsis*. *J Plant Res*, 127: 533–544
- Sang Y, Cui D, Wang X (2001a). Phospholipase D and phosphatidic acid-mediated generation of superoxide in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 126: 1449–1458
- Sang Y, Zheng S, Li W, Huang B, Wang X (2001b). Regulation of plant water loss by manipulating the expression of phospholipase D α . *Plant J*, 28: 135–144
- Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM, Waner D (2001). Guard cell signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 52: 627–658
- Takemiya A, Shimazaki K (2010). Phosphatidic acid inhibits blue light-induced stomatal opening via inhibition of protein phosphatase 1. *Plant Physiol*, 153: 1555–1562
- Torres MA, Dangel JL, Jones JDG (2002). *Arabidopsis* gp91^{phox} homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 517–522
- Uraji M, Katagiri T, Okuma E, Ye W, Hossain MA, Masuda C, Miura A, Nakamura Y, Mori II, Shinozaki K, Murata Y (2012). Cooperative function of PLD δ and PLD α 1 in abscisic acid-induced

- stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 159: 450–460
- 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 J, Ding B, Guo Y, Li M, Chen S, Huang G, Xie X (2014a). Overexpression of a wheat phospholipase D gene, *TaPLDa*, enhances tolerance to drought and osmotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 240: 103–115
- Wang JB, Ding B, Li M, Chen SJ, Li X, Zhang WG, Peng SB, Xie XD (2015). Cloning and expression analysis of phospholipase *Dδ* gene from wheat. *J Triti Crops*, 35 (7): 888–895 (in Chinese with English abstract). [王俊斌, 丁博, 李明, 陈帅君, 李欣, 张卫国, 彭四八, 谢晓东(2015). 小麦磷脂酶*Dδ*基因的克隆及表达分析. 麦类作物学报, 35 (7): 888–895]
- Wang JB, Li M, Ding B, Bao SG, Wang R, Xie XD (2013). Cloning and sequence bioinformatics analysis of phospholipase *Da* gene from wheat. *Acta Agric Boreali-Sin*, 28 (1): 117–122 (in Chinese with English abstract). [王俊斌, 李明, 丁博, 包曙光, 王锐, 谢晓东(2013). 小麦磷脂酶*Da*的基因克隆及其编码序列的生物信息学分析. 华北农学报, 28 (1): 117–122]
- Wang X (2000). Multiple forms of phospholipase D in plants: the gene family, catalytic and regulatory properties, and cellular functions. *Prog Lipid Res*, 9: 109–149
- Wang X (2005). Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses. *Plant Physiol*, 139: 566–573
- Wang X, Devaiah SP, Zhang W, Welti R (2006). Signaling functions of phosphatidic acid. *Prog Lipid Res*, 45: 250–278
- Wang X, Su Y, Liu Y, Kim SC, Fanella B (2014b). Phosphatidic acid as lipid messenger and growth regulators in plants. In: Wang X (ed). *Phospholipases in Plant Signaling*. Berlin: Springer Heidelberg, 69–92
- Wang X, Ullah H, Jones AM, Assmann SM (2001). G protein regulation of ion channels and abscisic signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Science*, 292: 2070–2072
- Wang X, Xu L, Zheng L (1994). Cloning and expression of phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase D from *Ricinus communis* L. *J Biol Chem*, 269: 20312–20317
- Welti R, Li W, Li M, Sang Y, Biesiada H, Zhou HE, Rajashekar CB, Williams TD, Wang X (2002). Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase *Da* in freezing induced lipid changes in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 277: 31994–32002
- Yu H, Yong T, Li H, Liu Y, Zhou S, Fu F, Li W (2015). Overexpression of a phospholipase *Da* gene from *Ammopiptanthus nanus* enhances salt tolerance of phospholipase *Da1*-deficient *Arabidopsis* mutant. *Planta*, 242: 1495–1509
- Zhang Q, Qu Y, Jing W, Li L, Zhang W (2014). Phospholipase Ds in plant response to hyperosmotic stresses. In Wang X (ed). *Phospholipases in Plant Signaling*. Berlin: Springer-Verlag, 121–134
- Zhang W, Qin C, Zhao J, Wang X (2004). Phospholipase *Da1*-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 9508–9513
- Zhang W, Wan X, Hong Y, Li W, Wang X (2010). Plant phospholipase D. In: Munnik T (ed). *Lipid Signaling in Plants*. Berlin: Springer-Verlag, 39–62
- Zhang W, Wang C, Qin C, Wood T, Olafsdottir G, Welti R, Wang X (2003). The oleate-stimulated phospholipase D, PLD δ , and phosphatidic acid decrease H₂O₂-induced cell death in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15: 2285–2295
- Zhang Y, Zhu H, Zhang Q, Li M, Yan M, Wang R, Wang L, Welti R, Zhang W, Wang X (2009). Phospholipase *Da1* and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21: 2357–2377
- Zhao J, Wang X (2004). *Arabidopsis* phospholipase *Da1* interacts with the heterotrimeric G-protein α -subunit through a motif analogous to the DRY motif in G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem*, 279: 1794–1800

Roles of phospholipase D in ABA-regulated stomatal movement

WANG Jun-Bin^{1,2}, DING Bo¹, LI Xin¹, WU Tian-Wen¹, CHEN Xiao-Qiang¹, XIE Xiao-Dong^{1,*}

¹Tianjin-Bristol Research Center for the Effects of the Environment Change on Crops, ²College of Basic Sciences, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China

Abstract: Guard cells form stomatal pores in the leaf epidermis, which enable plants to balance CO₂ uptake for photosynthesis and water loss via transpiration. Abscisic acid (ABA) has been extensively studied because of the clear role of ABA in stomatal closing to limit water loss through transpiration. Phospholipase D (PLD) and its lipid product phosphatidic acid (PA) have been implicated in mediating ABA-regulated stomatal signal transduction. In this review, we focus on our current understanding of a connection between PLD and PA with G protein, protein phosphatase 2C and reactive oxygen species in regulating the ABA response in guard cells. Also, the role of PLDδ in ABA-regulated stomatal movement is summarized.

Key words: phospholipase D; stomatal movement; abscisic acid; phosphatidic acid; stress

Received 2016-04-06 Accepted 2016-06-08

This work was supported by Higher School Science and Technology Program of Tianjin (Grant No. 20130606), Natural Science Foundation of Tianjin (Grant No. 14JCYBJC30600), 131 Innovation Talents Group of Tianjin, and Discipline Leading Talents Scheme of Tianjin.

*Corresponding author (E-mail: xiex@tjau.edu.cn).