

## 综述

## 植物PLC-DGK/PA途径介导的渗透胁迫应答反应

贾晓玮<sup>#</sup> 贾羊羊<sup>#</sup> 司旭阳 潘延云<sup>\*</sup>

(河北农业大学生命科学院, 河北省植物生理与分子病理学重点实验室, 保定 071000)

**摘要** 肌醇磷脂依赖的磷脂酶C(PLC)是经典肌醇磷脂信号系统的重要组成部分,它分解二磷酸磷脂酰肌醇分子(PIP<sub>2</sub>)产生双信使IP<sub>3</sub>和DAG分子。动物细胞中DAG激活蛋白激酶C(PKC)参与调节多种细胞功能。植物基因组中缺乏PKC的同源序列, DAG被二酰甘油激酶(DGK)进一步磷酸化形成磷脂酸(PA),形成新的植物特有的第二信使分子。酶蛋白PLC和DGK及其作用的底物和产物形成植物特色的信号途径,该信号途径在植物对非生物和生物胁迫的反应中发挥重要作用。该文从蛋白信号分子的表达特征和脂质信号分子的含量变化等两个方面综述了植物特色的肌醇信号途径PLC-DGK/PA在应答渗透胁迫反应中的作用。除了PLC-DG活性外, PA也可由磷脂酶D(PLD)产生。该文还对两种途径产生的PA进行了讨论。

**关键词** 肌醇磷脂依赖的磷脂酶C; 二酰甘油激酶; 磷脂酸; 渗透胁迫

## Plant PLC-DGK/PA Pathway Mediated Osmotic Stress Response

Jia Xiaowei<sup>#</sup>, Jia Yangyang<sup>#</sup>, Si Xuyang, Pan Yanyun<sup>\*</sup>(Key Laboratory of Hebei Province for Plant Physiology and Molecular Pathology,  
College of Life, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China)

**Abstract** Phosphoinositide (PI)-specific phospholipase C (PLC) is one of the important component of the canonical PI signaling system. Stimulation activates PLC, which hydrolyses phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) into two second messengers: inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) and diacylglycerol (DAG). DAG activated protein kinase C (PKC) by which regulate a wide variety of cellular functions in animals. Plant genomes lack homologues of the PKC. Instead, plants utilize the phosphatidic acid (PA), phosphorylation products of DAG by diacylglycerol kinase (DGK), as a new plant-specific second messengers. These enzymes and their reaction substrates and products play important and multifaceted roles in plant response to abiotic and biotic stresses. In this paper, we reviewed the role of plant PLC-DGK/PA pathway in response to osmotic stress based on the expression characteristics of PLC and DGK and the changes of lipid signal molecules. In addition to PLC-DG activity, PA can also be produced by phospholipase D (PLD), and the actions of common and distinguishable among the different pathways will also be discussed.

**Keywords** PLC; DGK; PA; osmotic stress

收稿日期: 2018-04-18 接受日期: 2018-05-28

河北省自然科学基金项目(批准号: 2017204095)和河北省高等学校科学技术研究项目(批准号: ZD2017039)资助的课题

<sup>#</sup>共同第一作者<sup>\*</sup>通讯作者。Tel: 0312-7528275, E-mail: pyycell@163.com

Received: April 18, 2018 Accepted: May 28, 2018

This work was supported by the Hebei Province Natural Science Foundation of China (Grant No.2017204095) and Hebei Provincial College of Science and Technology Research Project (Grant No.ZD2017039)

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel: +86-312-7528275, E-mail: pyycell@163.com

网络出版时间: 2018-08-27 16:28:35

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180827.1628.004.html>

肌醇磷脂依赖的磷脂酶C(phosphatidylinositol-specific phospholipase C, PLC)是肌醇磷脂信号系统的关键酶之一。肌醇磷脂(phosphoinositides, PIs)是构成细胞膜脂质组分中的一种甘油磷脂类,虽仅占细胞膜脂质组分的1%,却有着广泛的信号传导功能。PIs头部肌醇环5个碳上的-OH分别可以被不同的肌醇磷酸激酶磷酸化,形成不同数目和组合的磷脂酰肌醇分子(polyphosphoinositide, PPIs)。其中4,5-二磷酸肌醇磷脂(phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP2)可以被PLC水解生成二酰甘油(diacylglycerol, DAG)和三磷酸肌醇(inositol 1,4,5-trisphosphate, IP3)两个信号分子,IP3启动胞内钙库形成Ca<sup>2+</sup>信号, DAG进一步激活蛋白激酶C(protein kinase C, PKC), Ca<sup>2+</sup>和PKC引起一系列效应酶活性的变化,成为动物细胞中经典的双信使途径<sup>[1]</sup>。随着研究深入,人们发现,其他-OH位点被磷酸化的各种PPIs分子和IP3衍生的各种多磷酸肌醇分子(inositolpolyphosphate, IPPs)也具有信号分子的功能,这些分子和催化其产生的各种激酶、磷酸酶等共同形成了复杂、精细的肌醇磷脂信号系统,在介导胞外信号的跨膜转导、调节动物的生长发育中发挥着重要的作用。对该系统的阐释被誉为是胞内信号系统研究史上的一个里程碑<sup>[1-2]</sup>。

植物磷脂酰肌醇系统与动物模型相比有很大的不同。第一,植物细胞中的PIP2含量极低,PLC可能更多的以含量更高的4-磷酸磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol 4-bisphosphate, PIP)为底物;第二,

植物基因组中缺乏与IP3受体,即Ca<sup>2+</sup>通道基因同源的序列,而PLC水解产物IP2/3依然能够影响细胞内的Ca<sup>2+</sup>水平,推测是通过IP6(IP2/3进一步磷酸化的产物)为媒介的,但其作用机制还不清楚,而IP2/3衍生的多种IPPs分子可能都具有多样化的信号功能;第三,植物基因组中缺乏与PKC基因同源的序列,PLC另一个水解产物DAG被二酰甘油激酶(diacylglycerol kinase, DGK)磷酸化成磷脂酸(phosphatidic acid, PA)发挥功能,PA成为植物特有的重要的第二信使<sup>[3-6]</sup>。有人认为,植物细胞中,催化PIP形成DAG最终形成PA的三个酶PI4K、PLC和DGK,它们彼此之间作用偶联,组成了植物特色的肌醇磷脂系统里重要的信号途径之一,即PI4K-PLC-DGK途径(图1)<sup>[6-8]</sup>。

植物的固着生长使它不得不对众多的生物和非生物刺激,其中以盐、干旱、冷、热等造成的渗透刺激是植物生长的主要限制因素<sup>[9-11]</sup>。膜脂信号分子通过介入到不同的细胞过程如离子通道运输、氧化胁迫途径、ABA途径以及囊泡运动和细胞骨架运动等,参与到植物对渗透胁迫的应答反应中<sup>[9-10]</sup>。基于磷脂的信号除了肌醇磷脂依赖的PLC信号途径外,还有以水解结构磷脂[如磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)和磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)]的磷脂酶D(phospholipase, PLD)、磷脂酶A2(phospholipase, PLA2)以及肌醇磷脂3-磷酸激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)等为核心的传导途径<sup>[6,11]</sup>,它们都可以被渗透压力激活,但是哪个组合被激活有可能与胁

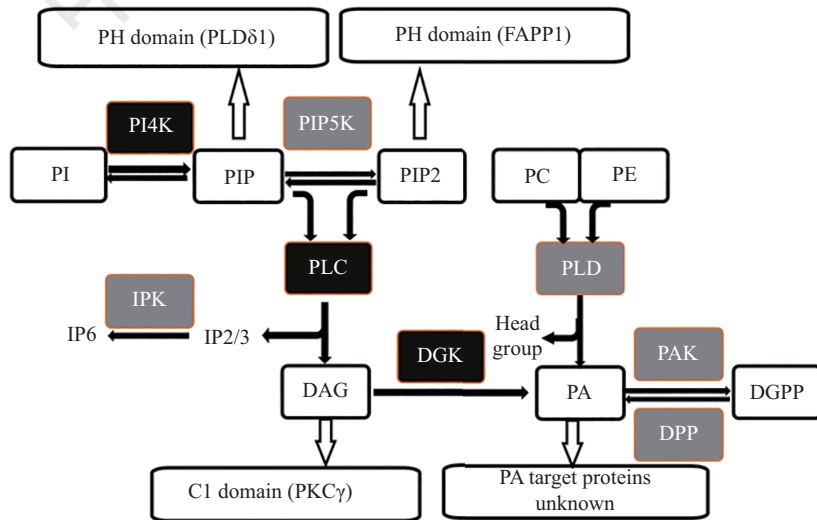
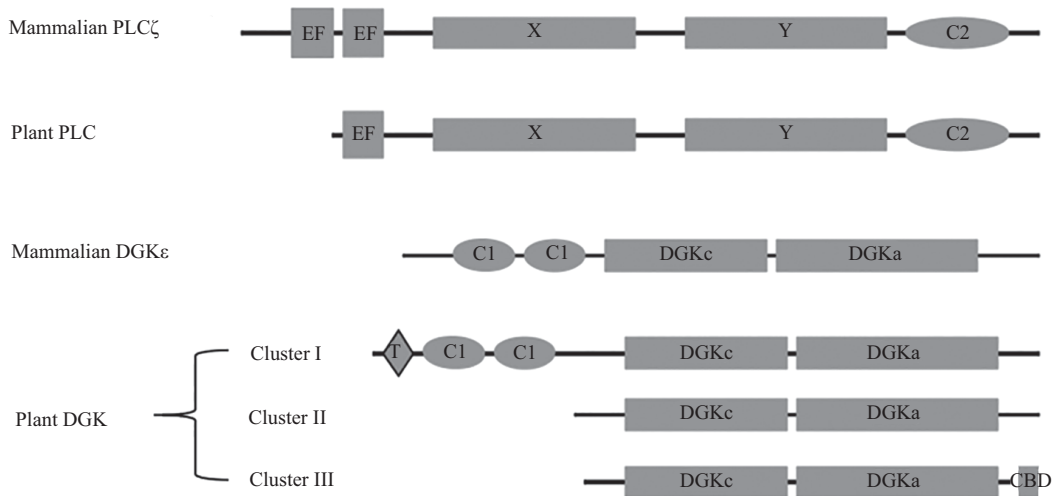


图1 植物肌醇磷脂信号系统中的PI4K-PLC-DGK途径(根据参考文献[6-8]修改)

Fig.1 Plant PI4K-PLC-DGK pathway of phosphoinositides signal system (modified from references [6-8])



EF: EF手型结构, 钙离子结合结构域; X和Y结构域构成PLC的催化中心; C2: 钙离子及脂质分子结合结构域; C1: 细胞膜脂质分子(如DAG)结合结构域; DGKc: 二酰甘油激酶催化域; DGKa: 二酰甘油激酶附属域; T: 推测的跨膜结构域; CBD: 钙调蛋白结合结构域。

EF: EF hand,  $\text{Ca}^{2+}$ /lipid binding membrane targeting; X and Y, catalytic site and PIP<sub>2</sub> binding; C2:  $\text{Ca}^{2+}$ /lipid binding membrane targeting; C1: lipid, such as DAG binding membrane targeting; DGKc: catalytic domain of DGK; DGKa: accessory domain of DGK; T: putative transmembrane domain; CBD:  $\text{Ca}^{2+}$  binding domain.

图2 植物PLC和DGK的蛋白结构域及其作用(根据参考文献[1,2,5,41]修改)

Fig.2 PLC and DGK domain structures and potential functions in plants (modified from references [1,2,5,41])

迫强度的大小有关<sup>[6-12]</sup>。本文综述了PLC-DGK/PA途径调节植物应答渗透胁迫反应的研究进展。

## 1 PLC及其底物与产物应答渗透胁迫的特征

### 1.1 PLC在渗透胁迫中表达活性的变化

动物PLC的研究始于20世纪50年代末,至80年代末期人们对它的功能和作用的分子机制有了深刻的认识<sup>[1-2]</sup>。第一个植物PLC的cDNA于1995年在拟南芥中被克隆<sup>[13]</sup>,随后人们在燕麦、大豆、马铃薯、烟草、绿豆、百合、矮牵牛、水稻、玉米、小麦及番茄等多个物种中也相继获得PLC基因序列<sup>[14-22]</sup>。动物PLC根据结构域特征划分为 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\eta$ 和 $\zeta$ 等6种亚型<sup>[1-2]</sup>,目前克隆到的植物PLC结构均与动物细胞中最简单的PLC $\zeta$ 亚型相似<sup>[5]</sup>(图2)。植物中虽然只发现了这一种亚型,但是每个物种中的PLC基因都是以多成员的家族形成存在,不同的成员可能参与了不同的生长发育过程或者应答了不同的环境刺激<sup>[20-21]</sup>。

PLC在植物中有基础的表达活性,但更多情况下是被诱导表达。多种生物和非生物胁迫等均能导致其表达变化<sup>[21]</sup>。高盐等渗透胁迫时,PLC表达量和活性被迅速诱导<sup>[21-22]</sup>,表达量的改变也改变了植物对胁迫环境的耐受性。拟南芥中*AtPLCs*家族有

9个成员,表达水平较低的*AtPLC1/3/4/5*等成员,在盐、干旱、冷及ABA处理下分别上调了2~5倍<sup>[21-23]</sup>。*AtPLC4*的基因缺失表达突变体*plc4*的幼苗表现出对盐胁迫的不敏感性,过表达的转基因幼苗表现出盐敏感性表型,显示*AtPLC4*负调节拟南芥幼苗的耐盐性<sup>[24]</sup>。*AtPLC3*参与了根发育、种子发芽和气孔开放的过程,其过表达植株的根系结构及种子萌发并没受到影响,但增加了植物对干旱的耐受性<sup>[25]</sup>。水稻基因组中有四种PLC,*OsPLC1/2/3*在盐和干旱刺激下表达上调,*OsPLC4*显著下调<sup>[18]</sup>,其中,*OsPLC1*在盐胁迫环境中上调最高,敲除*OsPLC1*基因的植株在含高浓度盐的水培环境中生长8天后,存活率仅30%多,野生型水稻为70%,而*OsPLC1*转基因超表达体则100%存活<sup>[26]</sup>。玉米*ZmPLC*基因在高盐、脱水、冷或低渗胁迫条件下上调,过表达*ZmPLC1*的转基因玉米耐旱性明显提高<sup>[27]</sup>。过表达*BnPLC2*的油菜,不仅提高了抗旱性,并且多种基因受到调控,激素分布的模式也发生了改变<sup>[28]</sup>。另外,在渗透胁迫中表达增强的还有小麦*TaPLC1/2*<sup>[19]</sup>、绿豆三种PLC中的*VrPLC3*<sup>[16,29]</sup>和马铃薯的*StPLC*<sup>[14]</sup>。其中,马铃薯的3个*StPLCs*成员中,*StPLC1*的基础表达水平最高,*StPLC2*最低,而干旱下*StPLC1*表达量降低,*StPLC2*表达量激增<sup>[14]</sup>。

PLC被激活后,水解PIP、PIP<sub>2</sub>形成DAG和IPPs

分子, 而这四类分子本身也是信号分子, 介导植物对胁迫产生应答反应。

## 1.2 PLC相关膜脂分子在胁迫下的含量变化及信号功能

PLC定位于质膜上, 或在胁迫下从细胞质募集到质膜, 水解包括PIP、PIP<sub>2</sub>甚至PI等底物<sup>[26]</sup>。利用原核表达系统获得的不同物种的PLC重组蛋白, 均能水解这些肌醇磷脂。如拟南芥AtPLC1-GST融合蛋白的酶活性受Ca<sup>2+</sup>调控, 低浓度下以PIP<sub>2</sub>为底物, 而高浓度的Ca<sup>2+</sup>下优先以PI为底物<sup>[13]</sup>, 大豆和番茄的PLC融合蛋白对PIP和PIP<sub>2</sub>都显示出较高的水解活性<sup>[14,20]</sup>, 而OsPLC1水解PIP的效率高于对PIP<sub>2</sub>的水解<sup>[26]</sup>。

研究膜脂分子的分布及含量的有效方法之一是利用生物传感器技术, 即选取与特异膜脂分子结合的核酸序列构建与GFP等报告基因融合的表达载体, 遗传转化到目标材料中, 荧光标记的区域和强度即显示了膜脂分子的分布和含量。PH(pleckstrin homology)结构域可分成不同的种类, 不同的PH可与不同的膜脂分子结合, 来自动物PLC $\delta$ 1的PH结构域可与PIP<sub>2</sub>特异结合, 而来自动物FAPP1接头蛋白的PH结构域可与PIP特异结合<sup>[30]</sup>(图1)。另外, <sup>32</sup>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>标记结合薄层色谱法可以检测各种膜脂分子的浓度<sup>[26]</sup>。

借助生物传感器的研究显示, 盐与干旱等渗透胁迫激活的PLC, 对PIP和PIP<sub>2</sub>两种底物的作用是不一致的, PIP浓度下降, PIP<sub>2</sub>含量往往不降反而升高。例如: 在水培的拟南芥<sup>[31]</sup>和拟南芥T87培养细胞<sup>[32]</sup>的培养液中, 施加氯化钠后, 几秒内IP<sub>3</sub>就上升, 随后PIP<sub>2</sub>也出现上升, 上升速度较IP<sub>3</sub>慢; van Leeuwen等<sup>[33]</sup>利用烟草细胞(BY-2)和拟南芥幼苗的研究也发现, 施加PLC的抑制剂U73122或盐刺激后, PIP<sub>2</sub>瞬时积累到细胞膜上; 检测用<sup>32</sup>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>标记的水稻叶片膜脂分子发现, 原本非常少量的PIP<sub>2</sub>在盐胁迫刺激下30分钟内浓度迅速增加了4倍<sup>[34]</sup>。总之, 植物PIP<sub>2</sub>含量少到难以检测到, 但渗透胁迫可使其增加4~20倍<sup>[31-34]</sup>。研究者认为, PIP<sub>2</sub>受渗透胁迫后含量升高, 其中较小的一部分用于被PLC分解形成IP<sub>3</sub>发挥作用, 而大部分可能被用于与IP<sub>3</sub>信号传导事件不同的其他作用途径。目前已确认PIP<sub>2</sub>既是PLC的底物, 也可以作为信号分子独立行使功能, 是一种普遍的渗透胁迫反应的应答分子<sup>[9]</sup>。虽然, 目前尚不清楚PIP<sub>2</sub>直接调控的蛋白是什么, 但是知道了增加

的PIP<sub>2</sub>可能通过以下的细胞过程调控植物的应答反应: (1)参与调控离子通道, 通过抑制阴离子通道活性而调节气孔的开放<sup>[33]</sup>; (2)参与网格蛋白包被囊泡的组成(在高渗处理的洋葱表皮细胞中检测到PIP<sub>2</sub>与网格蛋白的共表达定位)<sup>[35]</sup>; (3)参与微管的重组, 调节高渗下质壁分离的原生质体的体积<sup>[36]</sup>等。

植物细胞中PIP高度富集于质膜, 这与其他真核细胞中PIP<sub>2</sub>含量较高的特点显著不同, 已经成为植物质膜的关键标志<sup>[3,6]</sup>, 如水稻幼苗中PIP的浓度是PIP<sub>2</sub>的28倍<sup>[26]</sup>。很多实验证实, PIP是植物PLC主要的水解底物, 如检测导入YFP-PH(FAPP1)的烟草BY-2细胞和幼苗, 都发现渗透胁迫造成了PIP从质膜上瞬时消失<sup>[33]</sup>。<sup>32</sup>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>标记的野生型拟南芥和AtPLC3过表达体中, 干旱刺激后PIP<sub>2</sub>都显著增高, PIP则显著下降, PA也上升<sup>[25]</sup>。PLC水解PIP, 形成了DAG和IP<sub>2</sub>信使分子, 但是, PIP分子除了被分解成信号分子外, 自身也承担着重要的传递信号的功能。Simon等<sup>[37]</sup>最近的研究认为, PIP在质膜上的大量积累, 形成膜表面电荷特征, 具有控制PINOID(生长素运输调控蛋白)和MAKR(膜相关激酶调节蛋白)家族多种蛋白的质膜定位与功能实施的作用, 参与对植物生长发育和应答胁迫的调控过程。

PLC水解产物DAG, 是仍滞留在膜上的膜脂类分子。植物细胞膜系统中DAG含量很低, 利用DAG生物传感器YFP-C1(PKC $\gamma$ )检测烟草BY-2细胞或拟南芥幼苗, 只能在胞质溶胶中检测到少量的荧光标记, 但渗透刺激后则出现在膜上, 意味着DAG也行使信号的功能<sup>[33,38]</sup>。在小麦中获得了一个DAG结合蛋白, 为TaCHP, 该蛋白是富含三种氨基酸(Cys、His和Pro)的锌指蛋白, 具有三个不同的C1结构域, 定位于细胞质膜和细胞核, 也作为转录因子发挥作用。TaCHP以ABA依赖性和非依赖性两种方式参与植物应答盐胁迫的反应, 通过提高清除ROS能力来赋予植物耐盐性, 被认为在磷脂-ROS-盐响应性信号传导途径中起到交联作用<sup>[39]</sup>。

## 1.3 IP<sub>6</sub>信号分子的作用

除了生成DAG, PLC水解PIP和PIP<sub>2</sub>后还生成水溶性的IP<sub>2</sub>、IP<sub>3</sub>, 这两个分子进一步磷酸化形成IP<sub>6</sub>。IP<sub>6</sub>在植物中有多种生成途径以及生物学功能, 它可以作为渗透调节物参与植物对渗透胁迫的应答。但是由PLC途径产生的IP<sub>6</sub>是作为信号分子发挥作用, 可以引发Ca<sup>2+</sup>信号的产生、激活F-box相关信号传导

途径、调节基因表达等, 这些也是植物应答渗透胁迫的重要措施之一<sup>[3-7]</sup>。例如: 盐处理的拟南芥幼苗中会有脯氨酸积累, 但在施加了U73122的盐处理的幼苗中, 脯氨酸含量并未升高, 同时脯氨酸生物合成的关键酶吡咯啉-5-羧酸合成酶(P5CS)的转录水平降低, 分析认为, IP<sub>3</sub>或其衍生物IP<sub>6</sub>对盐胁迫时脯氨酸的积累是必需的<sup>[40]</sup>; 水稻*OsPLC1*的研究显示, 胁迫诱导的Ca<sup>2+</sup>信号依赖*OsPLC1*, 并且PLC介导的Ca<sup>2+</sup>信号传导对于控制叶片中的Na<sup>+</sup>积累是必需的, 进而建立植物整体的耐盐性<sup>[26]</sup>; 前述*AtPLC4*负调节拟南芥幼苗的耐盐性研究中, 使用水母发光蛋白作为*plc4*突变体和*AtPLC4* OE幼苗中的Ca<sup>2+</sup>指示剂, 显示*AtPLC4*正向调节盐诱导的Ca<sup>2+</sup>增加, EGTA螯合掉Ca<sup>2+</sup>能够部分挽回*AtPLC4* OE幼苗的盐敏感表型。在*plc4*突变体和*AtPLC4* OE幼苗中, 应答盐胁迫的基因*RD29B*、*MYB15*和*ZAT10*的转录分别被相反的激活或抑制, 显示了*AtPLC4*对这些基因的调控作用<sup>[24]</sup>。

## 2 DGK与PA应答渗透胁迫的特征

### 2.1 DGK表达活性的变化及其产生的PA

DAG之所以含量低是因为它很容易被DGK磷酸化形成PA。DGKs是独特而保守的脂类激酶家族, 动物细胞中有10个不同的DGKs家族, 归为5个不同的类型<sup>[41]</sup>。植物中首先在烟草<sup>[42]</sup>和小麦<sup>[43]</sup>中检测出DGK活性, 随后分别在拟南芥、番茄、玉米、水稻和苹果等物种中获得了编码DGK的基因序列<sup>[44-50]</sup>。根据结构及系统发育, 植物DGK被分成3个簇, 其中结构最复杂的簇I与动物细胞中最简单的DGK $\epsilon$ 型结构相似<sup>[41]</sup>(图2)。3个簇中都有成员被检测出激酶活性<sup>[44-50]</sup>。

DGKs与PLC相似, 基因的表达也受胁迫诱导。每种植物中的DGKs基因都有多种亚型, 而不同亚型对渗透胁迫的应答也有各自的时空效应<sup>[41,51]</sup>。冷胁迫下拟南芥幼苗的转录组数据显示, 大约3 h时*AtDGK1*被先诱导, 并持续较长时间, 而同属于簇I的*AtDGK2*在胁迫晚期(24 h)被诱导, 表明两个结构相似的DGK分别受到调节并在冷应答中具有不同的功能<sup>[51]</sup>; 玉米的3个*ZmDGKs*基因在受到干旱、冷刺激下表达均升高<sup>[47]</sup>; 在苹果中获得8个DGK基因序列, qRT-PCR分析其中6个成员的表达情况发现, 干旱、盐以及ABA对其都有诱导作用, 其中*MdDGK2*

和*MdDGK7*分别被干旱和盐胁迫诱导后, 相对表达提高了约20倍<sup>[49]</sup>。DGK可以通过调节相关基因的表达使得植物应答盐胁迫的刺激, 如CIPK是与钙调磷酸酶B样蛋白相互作用的蛋白激酶, 水稻*OsCIPK15*的过表达能够提高幼苗的耐盐性<sup>[52]</sup>, 盐胁迫下, *OsCIPK15*被诱导表达, 表达量提高20倍, 但是利用RNAi方法获得的沉默*OsDGKs*的水稻中, 该基因表达只被诱导了10倍, 暗示了OsDGK调控OsCIPK15基因的表达<sup>[48]</sup>。

DGKs被激活后总是伴随PA的产生。PA是结构最为简单的甘油磷脂分子, 头部基团仅由磷酸构成。PA在细胞中具有双重作用, 一个是作为磷脂生物合成的中间体, 另一个就是作为信号分子起作用。作为信号分子的PA在细胞中含量极微, 但其变化的幅度对于植物来说至关重要<sup>[41]</sup>。从拟南芥、水稻、烟草和番茄到藻类细胞, 盐胁迫后数秒至数分钟内即可产生DGK水解的PA, 通常还伴随着PIP<sub>2</sub>水平的增加<sup>[41-42,46,48,53]</sup>, 用甘露醇和PEG模拟的干旱也可以检测到由DGK催化生成的PA<sup>[54]</sup>。现已确认, DGK对植物响应渗透胁迫的调节是通过第二信使PA介导的, 但是PA做信使分子, 生成渠道除了PLC-DGK途径外, 还有一条PLD途径<sup>[5-6,41,55]</sup>(图1)。

### 2.2 PLD水解作用产生的PA

PLD对磷脂分子水解的部位是靠近头部基团一侧的磷酸二酯键, 通常以含量较多的结构磷脂PC和PE为底物, 水解下头部基团, 直接获得PA分子<sup>[5,41,56-57]</sup>(图1)。需要说明的是, PLC-DGK途径产生的PA与PLD产生的PA分子因烃链的差异(长度及不饱和键数)具有不同的分子属性, 而烃链也参与了PA与结合蛋白的相互作用, 所以两条途径产生的PA作用机制也不尽相同<sup>[5,41,57]</sup>。研究中可以用以下方法区分两条途径产生的PA: 第一, PLD的转磷脂酰基反应, 该反应是指在伯醇分子(如1-丁醇)存在的情况下, 该分子成为PLD最适合的底物, 在PLD的作用下生成磷脂酰丁醇, 从而使得PA的生成受到抑制, 所以磷脂酰醇的形成已被用作PLD活性的指标, 丁醇(或乙醇)也被用做抑制PLD/PA产生的抑制剂; 第二, “差异标记法”, 当组织或细胞用<sup>32</sup>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>预标记时, <sup>32</sup>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>很快能标记到ATP上, 所以使用<sup>32</sup>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-ATP进行磷酸化形成的PIP、PIP<sub>2</sub>和PA很快被标记, 而结构磷脂PE、PI、PG等也被标记, 但要慢得多。前者达到同位素平衡需要几分钟, 而后者需要6天<sup>[41,55-57]</sup>, 所

以Arisz等<sup>[41,56]</sup>将DGK产生的PA形容为快速反应, 而PLD产生的PA为慢速反应; 第三, 还可以根据烃链的结构, 即长度和双键的数目来区分PA分子来源于哪种甘油磷脂的水解<sup>[41]</sup>。另外, 利用基因敲除突变体等遗传学方法也可以判断不同来源的PA。

大量研究证明, PLD/PA也广泛参与了植物对渗透胁迫的应答反应<sup>[41,54-58]</sup>。PA信号分子的重要作用让人们意识到, 除了PLD, DGK是在应答生物和非生物胁迫反应中的第二个产生PA的中心<sup>[41]</sup>。PA通过与之结合的蛋白传递信号, 现在已经发现了一些与PA结合的蛋白质靶标, 但参与这些相互作用的PA分子是否来自PLD或DGK仍有待阐明<sup>[6,41,58]</sup>。仅以植物应答渗透胁迫的生理过程而言, 两者虽然都参与了调节活动, 但作用方式却显著不同。下面仅综述渗透胁迫中目前所了解的两种途径之间的差异与联系。

### 2.3 PLC-DGK/PA与PLD/PA对渗透胁迫的应答

首先, 两条途径在相同的胁迫下均能够起作用, 但应答的时空特征不一致, 形成两条途径或独立、或平行发挥作用的模式。对于盐胁迫刺激, 两条途径对胁迫程度的感知是不一样的。例如: 以水稻叶片为材料的研究显示, 盐处理后PA与PIP2都迅速增加, 却未检测出PLD/PA的活性<sup>[34]</sup>; 但在盐芥中, 甘露醇诱导的脯氨酸积累被PLC抑制剂U73122适度抑制, 而它被PLD的抑制剂1-丁醇强烈抑制<sup>[59]</sup>。用一种模拟盐生植物的盐生梭菌进行检测发现, 在无刺激和中度盐胁迫(200 mmol/L NaCl)情况下, PLCs负向控制脯氨酸积累, 而PLD在无胁迫时对脯氨酸的积累没有作用, 但是在严重胁迫(400 mmol/L NaCl或400 mmol/L甘露醇)下正调控脯氨酸积累<sup>[60]</sup>。植物应答低温胁迫的生理过程也受到这两条途径的调控, 不同物种中都检测到PLD、PLC或DGK各基因家族中的成员在低温处理后表达发生变化<sup>[45,56,61-62]</sup>。拟南芥悬浮培养细胞受0 °C以上的冷胁迫刺激后迅速产生PA, 在前10分钟, DGK作用占优势, 催化产生的PA占总量的80%, 而后期PLD活性占主导地位<sup>[63]</sup>。导致结冰的冻结损伤也触发大量PA的形成, 主要是通过PLD活性。Li等<sup>[64]</sup>提供的数据显示, 敲除*PLDδ*基因的拟南芥对冷冻更敏感, 过表达则增加了其冷冻耐受性。这些数据显示, PLC-DGK/PA途径较PLD/PA途径应答速度快, 对程度低的胁迫刺激敏感; 而在较强胁迫刺激时主要由PLD/PA发挥作用。

其次, PA下游的效应物也不尽相同。Vergnolle等<sup>[62]</sup>研究了拟南芥悬浮细胞对冷应激反应的转录组, 并使用PLC和PLD的抑制剂来检测两条途径的关系发现, 通过PLC调控的58个基因和通过PLD调控的87个基因中, 只有9个基因是两条途径的共同下游组分。在冷诱导的基因中, 有7个既被PLC激活又被PLD激活, 只有1个基因被两者共同抑制。这些结果支持这样的想法, 即PLC和PLD虽然都通过PA传递信号, 但不同的PA是在两个不同的传导途径的下游, 导致植物产生不同的冷应答反应<sup>[62-63]</sup>。

PA的分子靶标的鉴定是澄清PA信号功能的关键。已有文献报道, PA结合多种蛋白质, 包括转录因子、蛋白激酶、脂质激酶、蛋白质磷酸酶和涉及囊泡运输和细胞骨架重排的蛋白质<sup>[41,58]</sup>。如乙烯信号的负调控因子蛋白激酶CTR1<sup>[65]</sup>和ABA途径负调控因子ABI1<sup>[66]</sup>, 都被PA招募并抑制; 来自PLD的PA, 可以与微管相关蛋白MAP65-1相互作用, 增强微管的聚合性, 从而提高了植物的耐盐性<sup>[67]</sup>。其他与PA有亲和力的蛋白还有SnRK2(被渗透胁迫激活的SNF相关的蛋白激酶2)<sup>[54]</sup>等。但是, 目前较清楚的是, ABI1、MAP65-1结合的是PLD/PA, SnRK2是在PLC-DGK/途径中被鉴定出的, 其他蛋白结合的PA来自哪种途径, 还没有更多的证据。目前关于PA的结合域还不清楚, 人们提出“静电/氢键开关机制”用于解释PA与效应蛋白的结合机制<sup>[54,58]</sup>。还有人根据渗透胁迫下经常出现的PA与PIP2均升高的现象, 推测PA可能与PIP2共同起作用以募集蛋白质形成复合物或局部改变膜特性以产生生物学效应<sup>[58]</sup>。因此, 两种途径的功能上的差别, 还需要从PA入手, 获得更多的数据才能进行辨别。另外, 两条途径间应该存在着协调作用。在与PLD/PA结合并且活性受其影响的蛋白中, 有一个是拟南芥的PIP5K1<sup>[68]</sup>, 该酶催化PIP形成PIP2, 暗示PLD途径对PLC途径组分的调节; 还有一些PLD亚型会被PIP2激活<sup>[69]</sup>, 显示PLC途径的信号分子参与了PLD途径。综上, 两条途径间既有可能平行起作用, 也可能彼此交叉。

做为第二信使分子, PA也会在完成使命后, 被PAK催化形成二酰甘油焦磷酸(DGPP)(图1)<sup>[3,6]</sup>。DGPP是一种新发现的磷脂, 其形成一方面减弱了PA水平, 另一方面DGPP分子也具有传递信号的作用, 也被认为是植物的第二信使, 在植物受到渗透胁迫时, 该分子的浓度常常伴随着PIP2和PA一起升高<sup>[11,26,32,41]</sup>。

### 3 总结与展望

磷脂是细胞膜的组成部分,也是产生细胞信号分子的丰富来源。人们对磷脂信号的研究由来已久,但近期才逐渐将磷脂尤其是PI信号系统与植物生物学的中心问题结合起来。各种磷脂酶在植物生长、发育以及对非生物和生物刺激的反应中起着不同但都很重要的作用,但对其作用机制的研究尚未深入。PIs信号系统是十分精细又极其复杂的,研究显示,细胞中肌醇磷脂PIs的组成是相对稳定的,这种PIs稳态对发育和应激反应是十分重要的<sup>[4-9,41,58]</sup>。近年提出的PI4K-PLC-DGK途径,作用结果可能主要影响了PIs的稳态<sup>[6-8]</sup>。研究认为,PI4K-PLC-DGK途径的基础活性维持着未受刺激细胞的静息稳定状态,一旦细胞受到胁迫,PI4K、PLC和DGK活性会发生变化,进而改变PI、PIP、PIP<sub>2</sub>、DAG和PA等信号分子的含量甚至定位。而“胁迫”条件下的信号传导途径,也并不是简单在基础条件下发挥作用的途径中对各组分“逆转”或是相反的“增强”<sup>[6-8]</sup>。所以对PIs信号系统作用机制的解析还有很长的路要走。越来越多的研究已经开始整合基因操作、精细的膜脂分子的分析、分子相互作用以及细胞和生理分析来确定包括PLC的各种磷脂酶及其衍生分子的功能。对磷脂酶的深入分析在认识植物生长和应答胁迫刺激的生理机制方面有着重要的意义。

#### 参考文献 (References)

- Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793(6): 933-40.
- Paolol GD, Camilli PD. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 2006; 443(7112): 651-7.
- Munnik T, Testerink C. Plant phospholipid signaling: “in a nutshell”. *J Lipid Res* 2009; 50: S260-5.
- Boss WF, Im IJ. Phosphoinositide signaling. *Annu Rev Plant Biol* 2012; 63: 409-29.
- Meijer HJ, Munnik T. Phospholipid-based signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* 2003; 54: 265-306.
- Heilmann M, Heilmann I. Plant phosphoinositides-complex networks controlling growth and adaptation. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1851(6): 759-69.
- Ruelland E, Pokotylo I, Djafi N, Cantrel C, Repellin A, Zachowski A. Salicylic acid modulates levels of phosphoinositide dependent-phospholipase C substrates and products to remodel the *Arabidopsis* suspension cell transcriptome. *Front Plant Sci* 2014; 5: 608.
- Kalachova T, Kravets V, Zachowski A, Ruelland E. Importance of phosphoinositide-dependent signaling pathways in the control of gene expression in resting cells and in response to phytohormones. *Plant Signal Behav* 2015; 10(5): e1019983.
- Munnik T, Vermeer J E. Osmotic stress-induced phosphoinositide and inositol phosphate signalling in plants. *Plant Cell Environ* 2010; 33(4): 655-69.
- Arisz SA, Munnik T. The salt stress-induced LPA response in *Chlamydomonas* is produced via PLA<sub>2</sub> hydrolysis of DGK-generated phosphatidic acid. *J Lipid Res* 2011; 52(11): 2012-20.
- Meijer HJ, van Himbergen JA, Musgrave A, Munnik T. Acclimation to salt modifies the activation of several osmotic stress-activated lipid signalling pathways in *Chlamydomonas*. *Phytochemistry* 2017; 135: 64-72.
- Xue HW, Chen X, Me Y. Function and regulation of phospholipid signalling in plants. *Biochem J* 2009; 421: 145-56.
- Hirayama T, Ohto C, Mizoguchi T, Shinozaki K. A gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C is induced by dehydration and salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(9): 3903-7.
- Shi J, Gonzales RA, Bhattacharyya MK. Characterization of a plasma membrane-associated phosphoinositide-specific phospholipase C from soybean. *Plant J* 1995; 8(3): 381-390.
- Kopka J, Pical C, Gray JE, Müller-Röber B. Molecular and enzymatic characterization of three phosphoinositide-specific phospholipase C isoforms from potato. *Plant Physiol* 1998; 116(1): 239-250.
- Kim YJ, Kim JE, Lee JH, Lee MH, Jung HW, Bahk YY, *et al.* The Vr-PLC3 gene encodes a putative plasma membrane-localized phosphoinositide-specific phospholipase C whose expression is induced by abiotic stress in mung bean (*Vigna radiata* L.). *FEBS Lett* 2004; 556(1/2/3): 127-36.
- Pan YY, Wang X, Ma LG, Sun DY. Characterization of phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) from *Lilium daviddi* pollen. *Plant Cell Physiol* 2005; 46(10): 1657-65.
- Singh A, Kanwar P, Pandey A, Tyagi AK, Sopory SK, Kapoor S, *et al.* Comprehensive genomic analysis and expression profiling of phospholipase C gene family during abiotic stresses and development in rice. *PLoS One* 2013; 8(4): e62494.
- Zhang K, Jin C, Wu L, Hou M, Dou S, Pan Y. Expression analysis of a stress-related phosphoinositide-specific phospholipase C gene in wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLoS One* 2014; 9(8): e105061.
- Abd-El-Halim A, Vossen J, van Zeijl A, Dezhsetan S, Testerink C, Seidl M, *et al.* Biochemical characterization of the tomato phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) family and its role in plant immunity. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1861(9): 1365-78.
- Lin WH, Rui YE, Hui MA, Xu ZH, Xui HW. DNA chip-based expression profile analysis indicates involvement of the phosphatidylinositol signaling pathway in multiple plant responses to hormone and abiotic treatments. *Cell Res* 2004; 14(1): 34-45.
- Zhai S, Sui Z, Yang A, Zhang J. Characterization of a novel phosphoinositide-specific phospholipase C from *Zea mays* and its expression in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett* 2005; 27(11): 799-804.
- Tasma IM, Brendel V, Whitham SA and Bhattacharyya MK. Expression and evolution of the phosphoinositidespecific phospholipase C gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant*

- Physiol Biochem 2008; 46(7): 627-37.
- 24 Xia K, Wang B, Zhang J, Li Y, Yang H, Ren D. Arabidopsis phosphoinositide-specific phospholipase C 4 negatively regulates seedling salt tolerance. *Plant Cell Environ* 2017; 40(8): 1317-31.
- 25 Zhang Q, van Wijk R, Shahbaz M, Roels W, Schooten BV, Vermeer JEM, *et al.* Arabidopsis phospholipase C3 is involved in lateral root initiation and ABA responses in seed germination and stomatal closure. *Plant Cell Physiol* 2018; 59(3): 469-86.
- 26 Li L, Wang F, Yan P, Jing W, Zhang C, Kudla J, *et al.* A phosphoinositide-specific phospholipase C pathway elicits stress-induced Ca<sup>2+</sup> signals and confers salt tolerance to rice. *New Phytol* 2017; 214(3): 1172-87.
- 27 Wang CR, Yang AF, Yue GD, Gao Q, Yin HY, Zhang JR. Enhanced expression of phospholipase C 1 (ZmPLC1) improves drought tolerance in transgenic maize. *Planta* 2008; 227(5): 1127-40.
- 28 Georges F, Das S, Ray H, Bock C, Nokhrina K, Kolla VA, *et al.* Over-expression of *Brassica napus* phosphatidylinositol-phospholipase C2 in canola induces significant changes in gene expression and phytohormone distribution patterns, enhances drought tolerance and promotes early flowering and maturation. *Plant Cell Environ* 2009; 32(12): 1664-81.
- 29 Gnanaraj M, Udhayakumar N, Rajiv GR, Manoharan K. Isolation and gene expression analysis of phospholipase C in response to abiotic stresses from *Vigna radiata* (L) Wilczek. *Indian J Exp Biol* 2015; 53(6): 335-41.
- 30 Munnik T, Nielsen E. Green light for polyphosphoinositide signals in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2011; 14(5): 489-97.
- 31 DeWald DB, Torabinejad J, Jones CA, Shope JC, Cangelosi AR, Thompson JE, *et al.* Rapid accumulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate correlates with calcium mobilization in salt-stressed *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2001; 126(2): 759-69.
- 32 Takahashi S, Katagiri T, Hirayama T, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K. Hyperosmotic stress induces a rapid and transient increase in inositol 1,4,5-trisphosphate independent of abscisic acid in *Arabidopsis* cell culture. *Plant Cell Physiol* 2001; 42(2): 214-22.
- 33 van Leeuwen W, Vermeer JE, Gadella TW Jr, Munnik T. Visualization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the plasma membrane of suspension-cultured tobacco BY-2 cells and whole *Arabidopsis* seedlings. *Plant J* 2007; 52(6): 1014-26.
- 34 Darwish E, Testerink C, Khalil M, El-Shihy O, Munnik T. Phospholipid signaling responses in salt-stressed rice leaves. *Plant Cell Physiol* 2009; 50(5): 986-97.
- 35 König S, Ischebeck T, Lerche J, Stenzel I and Heilmann I. Salt-stress-induced association of phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate with clathrin-coated vesicles in plants. *Biochem J* 2008; 415(3): 387-99.
- 36 Komis G, Galatis B, Quader H, Galanopoulou D, Apostolakis P. Phospholipase C signaling involvement in microtubule assembly and activation of the mechanism regulating protoplast volume in plasmolyzed root cells of *Triticum turgidum*. *New Phytol* 2008; 178(2): 267-82.
- 37 Simon ML, Platre MP, Marquès-Bueno MM, Armengot L, Stanislas T, Bayle V, *et al.* A PtdIns(4)P-driven electrostatic field controls cell membrane identity and signalling in plants. *Nat Plants* 2016; 2: 16089.
- 38 Vermeer JEM, van Wijk R, Goedhart J, Geldner N, Chory J, Gadella TW, *et al.* *In vivo* imaging of diacylglycerol at the cytoplasmic leaflet of plant membranes. *Plant Cell Physiol* 2017; 58(7): 1196-207.
- 39 Zhao X, Wang M, Quan T, Xia G. The role of TaCHP in salt stress responsive pathways. *Plant Signal Behav* 2012; 7(1): 71-4.
- 40 Parre E, Ghars MA, Leprince AS, Thiery L, Lefebvre D, Bordenave M, *et al.* Calcium signaling via phospholipase C is essential for proline accumulation upon ionic but not nonionic hyperosmotic stresses in arabidopsis. *Plant Physiol* 2007; 144: 503-12.
- 41 Arisz SA, Testerink C, Munnik T. Plant PA signaling via diacylglycerol kinase. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1791(9): 869-75.
- 42 Kamada Y, and Muto S. Ca<sup>2+</sup> regulation of phosphatidylinositol turnover in the plasma membrane of tobacco suspension culture cells. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1093(1): 72-9.
- 43 Lundberg GA and Sommarin M. Diacylglycerol kinase in plasma membranes from wheat. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1123(2): 177-83.
- 44 Katagiri T, Mizoguchi T and Shinozaki K. Molecular cloning of a cDNA encoding diacylglycerol kinase (DGK) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 1996; 30(3): 647-53.
- 45 Gómez-Merino FC, Brearley CA, Ornatowska M, Abdel-Halim ME, Zanol MI, Mueller-Roeber B. AtDGK2, a novel diacylglycerol kinase from *Arabidopsis thaliana*, phosphorylates 1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycerol and 1,2-dioleoyl-sn-glycerol and exhibits cold-inducible gene expression. *J Biol Chem* 2004; 279(9): 8230-41.
- 46 Vaultier MN, Cantrel C, Guerbet F, Boutté Y, Vergnolle C, Cipek D, *et al.* The hydrophobic segment of *Arabidopsis thaliana* cluster I diacylglycerol kinases is sufficient to target the proteins to cell membranes. *FEBS Lett* 2008; 582(12): 1743-8.
- 47 Snedden W, Blumwald W. Alternative splicing of a novel diacylglycerol kinase in tomato leads to a calmodulin-binding isoform. *Plant J* 2000; 24(3): 317-26.
- 48 Sui Z, Niu L, Yue G, Yang A, Zhang J. Cloning and expression analysis of some genes involved in the phosphoinositide and phospholipid signaling pathways from maize (*Zea mays* L.). *Gene* 2008; 426(1/2): 47-56.
- 49 Ge H, Chen C, Jing W, Zhang Q, Wang H, Wang R, Zhang W. The rice diacylglycerol kinase family: functional analysis using transient RNA interference. *Front Plant Sci* 2012; 3: 60.
- 50 Li Y, Tan Y, Shao Y, Li M, Ma F. Comprehensive genomic analysis and expression profiling of diacylglycerol kinase gene family in *Malus prunifolia* (Willd.) Borkh. *Gene* 2015; 561(2): 225-34.
- 51 Escobar-Sepúlveda HF, Trejo-Téllez LI, Pérez-Rodríguez P, Hidalgo-Contreras JV, Gómez-Merino FC. Diacylglycerol kinases are widespread in higher plants and display inducible gene expression in response to beneficial elements, metal, and metalloids ions. *Front Plant Sci* 2017; 8: 129.
- 52 Lee BH, Henderson DA, Zhu K. The Arabidopsis cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *Plant Cell* 2005; 17(11): 3155-75.
- 53 Xiang Y, Huang Y and Xiong L. Characterization of stress responsive CIPK genes in rice for stress tolerance improvement.



- Plant Physiol 2007; 144(3): 1416-28.
- 54 Munnik T, Meijer HJ, Ter Riet B, Hirt H, Frank W, Bartels D, *et al.* Hyperosmotic stress stimulates phospholipase D activity and elevates the levels of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant J* 2000; 22(2): 147-54.
- 55 Testerink C, Dekker HL, Lim ZY, Johns MK, Holmes AB, Koster CG, *et al.* Isolation and identification of phosphatidic acid targets from plants. *Plant J* 2004; 39(4): 527-36.
- 56 Arisz SA, Valianpour F, van Gennip AH, Munnik T. Substrate preference of stress-activated phospholipase D in *Chlamydomonas* and its contribution to PA formation. *Plant J* 2003; 34(5): 595-604.
- 57 Hong Y, Zhang W, Wang X. Phospholipase D and phosphatidic acid signalling in plant response to drought and salinity. *Plant Cell Environ* 2010; 33(4): 627-35.
- 58 Hong Y, Zhao J, Guo L, Kim SC, Deng X, Wang G, *et al.* Plant phospholipases D and C and their diverse functions in stress responses. *Prog Lipid Res* 2016; 62: 55-74.
- 59 Hong Y, Pan X, Welti R, Wang X. Phospholipase Dα3 is involved in the hyperosmotic response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2008; 20(3): 803-16.
- 60 Ghars MA, Richard L, Lefebvre-De Vos D, Leprince AS, Parre E, Bordenave M, *et al.* Phospholipases C and D modulate proline accumulation in *Thellungiella halophila/salsuginea* differently according to the severity of salt or hyperosmotic stress. *Plant Cell Physiol* 2012; 53(1): 183-92.
- 61 Ruelland E, Cantrel C, Gawer M, Kader JC, Zachowski A. Activation of phospholipases C and D is an early response to a cold exposure in *Arabidopsis* suspension cells. *Plant Physiol* 2002; 130(2): 999-1007.
- 62 Vergnolle C, Vaultier MN, Taconnat L, Renou JP, Kader JC, Zachowski A, *et al.* The cold-induced early activation of phospholipase C and D pathways determines the response of two distinct clusters of genes in *Arabidopsis* cell suspensions. *Plant Physiol* 2005; 139(3): 1217-33.
- 63 Arisz SA, van Wijk R, Roels W, Zhu JK, Haring MA, Munnik T. Rapid phosphatidic acid accumulation in response to low temperature stress in *Arabidopsis* is generated through diacylglycerol kinase. *Front Plant Sci* 2013; 4(1): 1.
- 64 Li W, Li M, Zhang W, Welti R, Wang X. The plasma membrane-bound phospholipase Dδ enhances freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol* 2004; 22(4): 427-33.
- 65 Testerink C, Larsen PB, van der Does D, van Himbergen JA, Munnik T. Phosphatidic acid binds to and inhibits the activity of *Arabidopsis* CTR1. *J Exp Bot* 2007; 58(14): 3905-14.
- 66 Zhang W, Qin C, Zhao J, Wang X. Phospholipase D alpha 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(25): 9508-13.
- 67 Zhang Q, Lin F, Mao T, Nie J, Yan M, Yuan M, *et al.* Phosphatidic acid regulates microtubule organization by interacting with MAP65-1 in response to salt stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2012; 24(11): 4555-76.
- 68 Im YJ, Davis AJ, Perera IY, Johannes E, Allen NS, Boss WF. The N-terminal membrane occupation and recognition nexus domain of *Arabidopsis* phosphatidylinositol phosphate kinase 1 regulates enzyme activity. *J Biol Chem* 2007; 282(8): 5443-52.
- 69 Hong Y, Devaiah SP, Bahn SC, Thamasandra BN, Li M, Welti R, *et al.* Phospholipase Dε and phosphatidic acid enhance *Arabidopsis nitrogen* signaling and growth. *Plant J* 2009; 58(3): 376-87.