

Молекулярные и генетические подходы к исследованию роли фосфолипазы D клеток растений

В. С. Кравец, Я. С. Колесников, С. В. Кретинин, Е. М. Кабачевская¹,
Г. В. Ляхнович¹, О. М. Бондаренко, И. Д. Волотовский¹, В. П. Кухарь

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины
Ул. Мурманская 1, Киев, Украина, 02094

¹Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси
Ул. Академическая, 27, Минск, Беларусь, 220072

kravets@bpci.kiev.ua

Обзор посвящен анализу работ в области исследования роли фосфолипазы D в регуляции метаболизма клеток растений. Анализ работ, проведенных с использованием молекулярных и генетических подходов, позволяет судить о ФЛД как о важном компоненте сигнальных систем ряда гормонов и стрессов.

Ключевые слова: фосфолипаза D, фосфатидная кислота, трансгенные растения.

Одним из интенсивно развивающихся направлений современной биологии является познание природы внутриклеточной сигнализации и ее роли в регуляции метаболизма клеток. Результаты исследований сигнальных систем клеток растений свидетельствуют о том, что фосфолипиды (ФЛ) – это не только структурные компоненты мембран, но и предшественники вторичных посредников внутриклеточной сигнализации. Многие стрессы и ряд фитогормонов вызывают резкое повышение содержания в клетках растений фосфатидной кислоты (ФК), что является доказательством активации фосфолипаз, в частности фосфолипазы D (ФЛД, ЕС 3.1.4.4). ФЛД – фермент, широко распространенный в царстве растений и животных, который гидролизует структурные ФЛ по концевой фос-

фодиэфирной связи с образованием ФК и свободных функциональных групп [1]. С первичными спиртами ФЛД катализирует также реакцию трансэтерификации с образованием фосфатидилспиртов (в частности фосфатидилбутанола) [2] – соединений, успешно используемых при изучении активности ФЛД *in vivo*. У *Arabidopsis thaliana* клонированы 12 генов различных изоферментов ФЛД – ФЛД (3), (2), (3), , и (2) [3]. В геноме риса закодированы 17 генов этого фермента – ФЛД (8), (2), (3), , (2) и [4]. Активность ФЛД впервые зарегистрирована в 1947 году в экстрактах корней моркови как фермент, гидролизующий лецитин (фосфатидилхолин) в смесях ФЛ [5]. Впоследствии ФЛД обнаружили в клетках животных, грибов и бактерий [6].

В настоящее время внимание ученых сконцентрировано на изучении механизмов участия ФЛД в

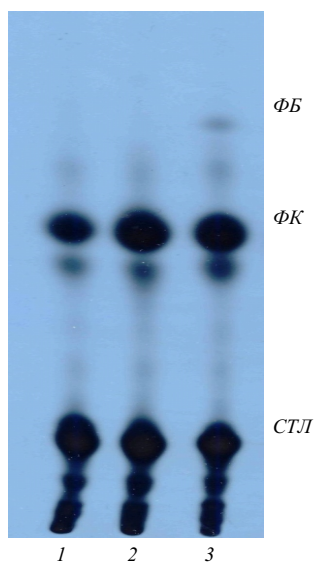


Рис. 1. Радиоавтограф фосфолипидов тканей амаранта. Влияние БАП (10 мин) *in vivo* на синтез фосфатидилбутанола ФЛД: 1 – контроль; 2 – 1-бутанол; 3 – БАП + 1-бутанол (ФБ – фосфатидилбутанол; ФК – фосфатидная кислота; СТЛ – структурные фосфолипиды)

сигнальных каскадах клеток в процессе регуляции метаболизма клеток животных и растений [7]. ФЛД играет важную роль во многих физиологических процессах, таких как прорастание, рост, старение растений и созревание плодов, а также в реакциях на действие стрессов и фитогормонов [8, 9].

При исследовании структуры генов и белков ФЛД с этим ферментом производят разнообразные генетические манипуляции, что является важным этапом на пути к установлению его роли и функций в клетках и растительном организме в целом. Анализ роста и развития дефицитных по ФЛД линий растений, а также мутантов со встроенной в гены ФЛД Т-ДНК дает возможность определить значение различных изоферментов ФЛД в регуляции метаболизма в ответ на действие многих гормонов и стрессов. Конструирование трансгенных растений с одновременным нокаутом генов нескольких изоферментов ФЛД позволяет получить фенотип, более выраженный по сравнению с таковым у мутантов с нокаутом отдельно взятого гена, и обнаружить ранее не установленную функцию ФЛД.

Использование методов генетической инженерии в изучении роли ФЛД в реализации биологического действия цитокининов и абсцизовой кислоты. Важное место в исследовании регу-

ляции метаболизма клеток занимает изучение молекулярных механизмов передачи гормональных сигналов, в том числе влияние цитокининов [10–15]. Для выяснения возможных путей действия фитогормонов широко применяют специфические биотесты. В семядолях этиолированных проростков амаранта (*Amaranthus caudatus* L.) экзогенно введенный цитокинин 6-бензиламинопурин (БАП) обуславливает быстрое накопление красного пигмента амарантина, на чем и основан специфический, чувствительный и надежный биотест на действие этого фитогормона [11, 12]. Вещества – ингибиторы передачи внутриклеточных сигналов, снижающие уровень биосинтеза амарантина, используют для выяснения механизмов действия цитокининов в клетках. Обработка растений первичными спиртами (в частности 1-бутанолом), ингибиторами образования ФК, катализируемого ФЛД, приводит к снижению уровня биосинтеза пигмента раньше, чем блокаторами транскрипции. Более того, первичные спирты (в отличие от вторичных) блокируют накопление транскриптов гена первичного ответа на цитокинины [11–13]. В клетках барвинка стимулирующий эффект цитокининов на транскрипцию генов первичного ответа также выражено подавляется первичными спиртами. Однако добавление их совместно с ФК вызывает восстановление индукции цитокининами транскрипции гена первичного ответа на цитокинины [14]. Анализ содержания ФЛ в колеоптилях кукурузы свидетельствует о том, что обработка проростков БАП в течение 30 мин трехкратно повышает уровни концентрации ФК, продуктов реакции гидролиза, катализированной ФЛД, и снижает количество субстрата данного фермента фосфатидилэтаноламина [15]. Нами показано, что ФЛД причастна к сигнальному каскаду цитокининов в клетках растений [12, 13]. Введение в ткани амаранта БАП совместно с 1-бутанолом индуцирует синтез фосфатидилбутанола, осуществляемый ФЛД (рис. 1). Дальнейшие исследования с использованием трансгенных растений позволят выявить изофермент ФЛД, играющий важную роль в сигнальном каскаде цитокининов.

Абсцизовая кислота (АБК) – фитогормон, опосредующий реакцию метаболизма растений на дей-

ствии водного дефицита [16]. ФЛД принадлежит ключевая роль в индукции замыкания устьиц, обусловленного АБК. Устьица при нокауте и нокауте *ФЛД 1* у *Arabidopsis* не закрываются под влиянием этого фитогормона; введение ФК приводит к их замыканию [16]. Искусственное усиление экспрессии гена *ФЛД 1* повышает чувствительность устьиц к АБК [16]. У нокаутированных по гену *ФЛД 1* растений *Arabidopsis* не обнаружено возрастания уровней ФК и фосфатидилбутанола в результате гидролиза фосфатидилхолина, стимулированного АБК [16]. Анализ ФК, сформированных под влиянием АБК при нокауте *ФЛД 1*, свидетельствует о том, что в клетках листьев в ответ на данный фитогормон ФЛД 1 обуславливает быстрое повышение уровней содержания различных типов фосфатидных кислот [17]. Протеинфосфатаза АВП1 является негативным регулятором трансдукции сигнала АБК, блокирующим экспрессию чувствительных к этому фитогормону генов в ядре клеток. АБК стимулирует связывание АВП1 с плазматической мембраной и угнетение активности этого фермента. Последнее обеспечивается ФК. У нокаутированных по гену *ФЛД 1* растений *Arabidopsis* ФК не связывается с протеинфосфатазой АВП1 и транслокация АВП1 к плазматическим мембранам не обнаруживается – в результате происходит накопление данного белка в ядрах клеток [16]. Таким образом, АБК стимулирует ФЛД 1, активируя тем самым биосинтез ФК, которые связываются и ингибируют АВП1, что, в свою очередь, индуцирует экспрессию генов ответа на АБК. Обнаружено, что мутант *флд 1* нечувствителен к АБК в процессе активации замыкания устьиц и угнетения их открывания. Однако у двойного нокаутированного мутанта (по генам ФЛД и АВП1) *флд 1abi1* АБК не ингибирует открывания устьичной щели, но стимулирует ее закрывание. Это объясняется снятием ингибиторного эффекта АВП1 на замыкание устьиц, стимулированное АБК. Исходя из вышеизложенного, при нокауте генов *АВП1* и *ФЛД 1* активирован сигнальный каскад закрывания устьиц, но ингибирован механизм угнетения их открывания [16, 18].

ФЛД 1 связывается с -субъединицей гетеротримерного G-белка (GPA1) [19, 20]. Для трансген-

ных растений *Arabidopsis* с мутациями в генах *флд 1* и *gpa1* характерна усиленная потеря воды в листьях. Значительно ослабленная чувствительность к действию АБК в процессах индукции замыкания и блокирования открывания устьичных щелей зарегистрирована у двойного мутанта *флд 1gpa1* по аналогии с фенотипом растений *флд 1* [18]. Растения, в которых экспрессируется ФЛД, не способная к связыванию -субъединицы гетеротримерного G-белка (*ФЛД 1_{K564A}*), более восприимчивы к угнетению открывания устьичной щели, стимулированному АБК, по сравнению с растениями дикого типа. Однако для растений *ФЛД 1_{K564A}* характерна нормальная чувствительность к АБК в процессе стимуляции замыкания устьиц. Такие результаты указывают на то, что ослабление взаимодействия ФЛД 1 с GPA1, приводящее к их активации [20], обуславливает усиление реакции на абсцизовую кислоту процесса угнетения открывания устьиц, не влияя на замыкание устьичной щели, индуцированное АБК. У растений с нокаутом гена -субъединицы гетеротримерного G-белка (*gpa1*) и двойных мутантов *флд 1gpa1* обнаружено исключительно стимулирование замыкания устьиц при введении ФК. Этот фосфолипид блокирует открывание устьиц у *флд 1*-растений в отличие от мутантов *gpa1* и *флд 1gpa1* [18].

Таким образом, при отсутствии -субъединицы гетеротримерного G-белка ФЛД не способна реализовать эффект АБК на блокаду закрывания устьиц. Следовательно, ФЛД 1 и ФК в механизмах регуляции динамики устьиц функционируют перед GPA1 и АВП1. Активация ФЛД в ответ на действие АБК приводит к формированию вторичных посредников сигнальных каскадов. Нокаут гена *ФЛД 1* препятствует накоплению активных форм кислорода (пероксида водорода) и оксида азота, обусловленному АБК в клетках устьиц. Активность НАДФН-оксидазы, катализирующая формирование пероксида водорода в ответ на действие АБК, угнетается у этих трансгенных растений. Пероксид водорода и донор оксида азота, введенные извне, стимулируют замыкание устьиц как у трансгенных растений, так и у растений дикого типа [17]. Эти результаты свидетельствуют о том, что АБК, активируя ФЛД 1, вызывает образование фосфатидных

кислот. Они, в свою очередь, опосредуют активацию сигнального каскада гетеротримерных G-белков, что блокирует открывание устьиц, а также угнетают протеинфосфатазу AB11 и стимулируют аккумуляцию пероксида водорода и оксида азота, приводя к закрыванию устьиц.

Экспрессия генетической конструкции, содержащей антисмысловую последовательность гена *ФЛД 1* риса, нивелирует состояние покоя семян, обусловленное АБК. Анализ экспрессии генов ответа на АБК у этих трансгенных растений выявил, что *ФЛД 1* является стимулятором передачи сигнала АБК. Это проявляется в активации экспрессии *SAPK8* и *SAPK10*, а также в снижении уровней транскриптов индукторов прорастания GAMyb и -амилазы. Такой механизм, как предполагают, способствует угнетению прорастания семян [4]. Гиббереллины стимулируют выход семян из состояния покоя, иными словами, играют роль антагонистов АБК в этом процессе. Растения риса, дефектные по гену *ФЛД 1*, характеризуются усиленной чувствительностью к гиббереллинам [4]. АБК угнетает деление клеток [21] и активирует старение органов [14]. У мутантов *Arabidopsis*, нокаутированных по генам *ФЛД 1* и *ФЛД 4*, в отличие от мутантов по *ФЛД 1* и *ФЛД 1* нивелируется негативный эффект АБК на экспрессию гена *Ku*. Продукт этого гена играет позитивную роль в процессах восстановления и репликации ДНК [22]. Экспрессия антисмысловой конструкции *ФЛД 1* тормозит старение листьев, индуцированное АБК [23].

Мутанты по генам фосфолипазы D в анализе механизмов действия этилена и ауксина на метаболизм клеток растений. Этилену принадлежит ключевая роль в реакциях растений на действие стрессов [24], а также в индукции созревания плодов [25]. В листьях растений *Arabidopsis*, в которых экспрессируется антисмысловая конструкция гена *ФЛД 1*, зарегистрировано торможение старения [23]. Эти мутанты обладают активностью ФЛД и ФЛД растений дикого типа. Последний факт свидетельствует о том, что отсутствие функционирующего гена *ФЛД* не компенсируется в данном случае наличием ФЛД и ФЛД в клетках. Таким образом, именно ФЛД 1 определяет реализацию действия этилена на старение листьев. С другой стороны,

экспрессия антисмысловой конструкции гена *ФЛД 1* у помидоров обуславливает задержку выделения этилена и торможение процесса созревания плодов [26].

Ауксины регулируют развитие сосудов, гравитропизм корней, а также деление и рост клеток [27]. Растения, дефицитные по гену *ФЛД 2*, менее чувствительны к ауксину и характеризуются угнетенным гравитропизмом корней и зависимым от ауксина ростом гипокотилей, тогда как при искусственно усиленной экспрессии гена указанного изофермента зарегистрирован прямо противоположный фенотип, что свидетельствует о позитивной роли *ФЛД 2* в реакциях метаболизма растений на действие ауксина. Уровень экспрессии генов раннего ответа на ауксин и активность чувствительного промотора *DR5-GUS* снижаются у нокаутированных или дефицитных по *ФЛД 2* растений, усиливаясь при искусственном повышении экспрессии *ФЛД 2*. Это подтверждает роль ФЛД 2 в реализации действия ауксина в клетках растений [28]. Транспорт внутриклеточных везикул, наполненных ауксином, блокируется у дефицитных по *ФЛД 2* растений, но стимулируется в случае искусственного усиления экспрессии гена *ФЛД 2* [28]. Белок PIN2 участвует в полярном транспорте ауксина – является переносчиком фитогормона, а также имеет большое значение в регуляции гравитропизма корней [29]. Циклический поток везикул, содержащих PIN2, в клетках блокируется у дефицитных по *ФЛД 2* растений, но усиливается в корнях с искусственным усилением экспрессии гена данного изофермента. Однако генетические манипуляции с *ФЛД 2* не влияют на полярную локализацию PIN2 [28]. Поскольку нокаут гена *ФЛД 2* лишь частично ослабляет реакцию клеток на ауксин (в отличие от выраженной потери чувствительности у мутантов трансдукции сигнала этого фитогормона), ФЛД 2 может косвенно влиять на сигнализацию ауксина за счет регуляции его транспорта у растений [28]. В апексах корней ФЛД 2 играет ключевую роль как модулятор транспорта этого фитогормона. Транслокация ауксина угнетается на 40 % у мутантов *ФЛД 2*, но усиливается на 30 % при искусственном повышении уровня экспрессии гена *ФЛД 2* [30].

Генетические манипуляции с фосфолипазой D в исследованиях механизмов действия оксидативного стресса и ранения тканей. Аккумуляция активных форм кислорода в клетках происходит в ответ на действие различных биотических и абиотических стрессов [31]. Экспрессия антисмысловой конструкции гена *ФЛД 1 Arabidopsis* блокирует формирование супероксидных радикалов, обусловленное НАДФН-оксидазой, тогда как экзогенно введенные ФК стимулируют эту реакцию в листьях указанных растений [32]. С другой стороны, протопласты и листья растений, нокаутированных по гену *ФЛД*, характеризуются повышенной чувствительностью к пероксиду водорода. Повышение уровня ФК и фосфатидилбутанола, а также активность 49 кДа МАП-киназ под влиянием пероксида водорода угнетаются у растений, нокаутированных по *ФЛД*. Более того, жизнеспособность растений в условиях ультрафиолетового излучения, стимулирующего образование пероксида водорода, резко снижается при нокауте гена *ФЛД* [33].

Таким образом, изоферменты ФЛД участвуют в реакциях на действие активных форм кислорода: ФЛД 1 стимулирует их образование, тогда как ФЛД обеспечивает реакцию метаболизма в ответ на влияние этих веществ.

Ранение растений как стрессовый фактор вызывает у *Arabidopsis* с экспрессией антисмысловой конструкции гена *ФЛД 1* угнетение формирования ФК, жасмоновой кислоты, экспрессию гена липоксигеназы *LOX2* [34].

Более того, локальное накопление ФК и повышение активности ФЛД в клетках листьев, разрушенных вследствие ранения, полностью элиминируются у двойных нокаутированных мутантов *ФЛД 1/ФЛД*. Нокаут генов *ФЛД 1* и *ФЛД* свидетельствует о существенной роли этих изоферментов в аккумуляции ФК в клетках растений, обусловленной ранением. Однако экспрессия гена *LOX2*, уровни жасмоновой кислоты и ее предшественников, а также активность МАП-киназ не изменяются у двойных мутантов *ФЛД 1/ФЛД* [35], что не подтверждает значения этих изоферментов для вышеуказанных защитных реакций метаболизма клеток растений на ранение.

Изоформы фосфолипазы D, участвующие в реализации сигнализации при биотических стрессах. Чувствительность и стойкость растений к определенным патогенам зависят от способности к их распознаванию [36]. Роль ФЛД в механизмах взаимодействия растений с патогенами изучали у помидоров с нокадаун гена *ФЛД 1*. Установлено, что в ответ на действие элиситора ксиланазы указанный изофермент является негативным регулятором формирования активных форм кислорода, но позитивным регулятором экспрессии гена -D-ксилозидазы – фермента, участвующего в перестройках клеточной стенки растений [37]. Однако в отсутствие инфекции нокадаун гена *ФЛД 1* риза определяет активацию защитных реакций растений – аккумуляцию активных форм кислорода и индукцию экспрессии генов защитного ответа (PR-1, PR-4, -глюканаз, хитиназ, сходного с травмином белка, факторов транскрипции семейств WRKY и ERF). У этих трансгенных растений зафиксирована гибель клеток, характерная для реакции гиперчувствительности, а также биосинтез фитоалексинов и повышение стойкости к патогенам – грибам *Pyricularia grisea* и бактериям *Xanthomonas oryzae* [38]. Такие данные свидетельствуют о роли ФЛД 1 как негативного регулятора защитных реакций и стойкости растений в нормальных условиях роста, и позитивного – в условиях действия патогенов.

Анализ реакции метаболизма клеток на холодовой стресс на примере трансгенных по генам фосфолипазы D растений арабидопсиса. У растений, экспрессирующих антисмысловую конструкцию гена *ФЛД 1*, обнаружено вдвое ослабленное формирование ФК, обусловленное замораживанием, что характерно также для расщепления фосфатидилхолина. Зафиксировано повышение устойчивости к замораживанию у растений, дефицитных по *ФЛД 1* [39].

Изофермент ФЛД, связанный с плазматическими мембранами, наоборот, способствует повышению стойкости *Arabidopsis* к действию замораживания. Нокаут гена данного изофермента ФЛД резко снижает стойкость растений к холоду, тогда как искусственное усиление экспрессии гена *ФЛД* повышает морозостойкость растений [40]. ФЛД в отличие от ФЛД 1 не способствует массовому рас-

щеплению липидов мембран, а вызывает формирование ФК, выполняющей сигнальную функцию в адаптации метаболизма клеток к низким температурам. Нокаутированные по гену *ФЛД* растения растут и развиваются в нормальных условиях без видимых изменений [40, 41]. С другой стороны, такие трансгенные растения более чувствительны к действию оксидативного стресса [33].

ФЛД 1 играет ключевую роль в процессе гидролиза фосфатидилглицерола пластид, а ФЛД выполняет функцию негативного регулятора расщепления липидов пластид и аккумуляции ФК в данных условиях [42]. ФЛД являются модуляторами экспрессии генов адаптации растений к холоду. Искусственная экспрессия антисмысловой конструкции *ФЛД 1* приводит к повышению устойчивости к замораживанию как у акклиматизированных, так и неакклиматизированных растений *Arabidopsis*. У неакклиматизированных растений, дефицитных по *ФЛД 1*, не выявлена активация экспрессии генов физиологического ответа на низкие температуры – *COR47* и *COR78*. Однако в условиях акклиматизации к действию низких температур и особенно к замораживанию у дефицитных по *ФЛД*

1 растений обнаружена усиленная экспрессия генов *COR47* и *COR78*, а также повышение уровня осмолитов [43]. При этом в условиях низких температур нокаут *ФЛД* не изменяет экспрессии генов *COR*, обеспечивающих устойчивость к замораживанию. ФЛД также формирует ФК, ослабляющую повреждения клеток, вызванные оксидативным стрессом при низких температурах.

Роль ФЛД в механизмах регуляции метаболизма клеток растений на действие теплового шока на сегодня описана слабо. Повышение температуры внешней среды до 40 °C приводит к быстрому возрастанию уровней ФК в культурах клеток табака, проростках *Arabidopsis* и листьях риса. Это частично обусловлено активацией фосфолипазы D – количество фосфатидилбутанола резко увеличивается на ранних этапах действия теплового шока [44]. Вышеизложенное свидетельствует о значении ФЛД для трансдукции сигнала этого стресса в клетках растений. Однако изоферменты ФЛД, активирующиеся под воздействием теплового шока, остаются неизвестными.

Липидная сигнализация при осмотическом стрессе. Нокаут гена *ФЛД 1 Arabidopsis* усиливает чувствительность растений к действию засухи. В условиях стресса обнаружены изменения экспрессии различных генов, кодирующих ферменты метаболизма и трансдукции сигналов фитогормонов [45]. Нокаут гена или экспрессия антисмысловой конструкции *ФЛД 1* у *Arabidopsis* приводит к угнетению чувствительности растений к абсцизовой кислоте, ослаблению закрывания устьиц и повышению уровня потери воды в результате транспирации [15, 16, 23]. Вместе с тем искусственно усиленная экспрессия гена *ФЛД 1* повышает восприимчивость растений к действию АБК [15, 16]. ФЛД 1 играет позитивную роль в индукции замыкания устьичной щели в ответ на АБК и в снижении уровня потери воды растениями за счет транспирации [16, 18].

Согласно результатам анализа фенотипа нокаутированных мутантов, *ФЛД 1* является модулятором различных реакций растений на действие засухи. Этот изофермент играет роль стимулятора замыкания устьиц на начальных этапах названного стресса [46]. С другой стороны, нокаут или искусственное усиление экспрессии гена *ФЛД 3* не влияет на уровень транспирации [47], что свидетельствует против возможности участия этого изофермента ФЛД в регуляции динамики устьичной щели в ответ на действие абсцизовой кислоты. Более того, биосинтез данного фитогормона не изменяется у растений, нокаутированных по *ФЛД 3* [47]. АБК играет роль позитивного регулятора гидротропизма корней растений. Нокаут гена *ФЛД 2* нарушает и предотвращает гидротропизм корней у *Arabidopsis*. Засуха и абсцизовая кислота, аккумуляция которой обусловлена этим стрессом, стимулируют активность промотора *ФЛД 2* в корневом чехлике и блокируют гравитропизм корней [48]. В отличие от мутантов по гену *ФЛД 1* у трансгенных растений *Arabidopsis* с антисмысловой конструкцией *ФЛД* уровень аккумуляции ФК и фосфатидилбутанола в условиях дегидратации снижается, что демонстрирует важность ФЛД для формирования ФК при указанном стрессе. Однако как у растений дикого типа, так и у растений с геном *ФЛД* в антисмысловой ориентации не зарегистрированы выра-

женные изменения фенотипа и в нормальных условиях, и при дегидратации [41]. С другой стороны, нокаут гена *ФЛД* у *Arabidopsis* повышает чувствительность растений к солевому стрессу [49]. Следовательно, ФЛД 1 и ФЛД играют каждый свою роль в процессе передачи информации в клетках об условиях водного потенциала внешней среды. Совместный же нокаут генов *ФЛД 1* и *ФЛД* вызывает снижение стойкости роста корней к солевому и гиперосмотическому стрессам. Двойные мутанты *Arabidopsis ФЛД 1/ФЛД* характеризуются более выраженной чувствительностью к солевому стрессу по сравнению с мутантами по генам каждого из этих изоферментов ФЛД. Нокаут гена *ФЛД 1* или *ФЛД* частично понижает уровень накопления ФК, стимулированного солевым стрессом, тогда как при одновременном нокауте обоих генов аккумуляция ФК составляет лишь треть по сравнению с растениями дикого типа [49]. Окончательное формирование фосфатидилбутанола и ФК обнаружено в условиях солевого стресса и дегидратации у двойных мутантов [49], что свидетельствует в пользу участия других изоферментов ФЛД (предположительно ФЛД 3 [47]) в реализации действия данных стрессов на растения. Более того, изофермент ФЛД 1 также может участвовать в реакциях клеток растений на действие осмотического стресса, поскольку для риса, дефицитного по гену данного фермента, характерна повышенная чувствительность к высоким концентрациям солей [4].

Кардинально иная роль в регуляции роста растений в условиях гиперосмотического стресса принадлежит ФЛД 3. Для *Arabidopsis*, нокаутированного по *ФЛД 3*, характерна усиленная экспрессия генов ответа на абсцизовую кислоту и повышенная чувствительность к действию солевого стресса и дегидратации, тогда как искусственное возрастание уровня экспрессии гена названного изофермента усиливает стойкость растений к данным стрессам. При нокауте гена этого изофермента рост корней сильнее угнетается под влиянием АБК в отличие от растений дикого типа. Искусственно усиленная экспрессия *ФЛД 3* в условиях солевого стресса приводит к увеличению количества боковых корней, ускорению прорастания семян, роста проростков и корней. Рост таких трансгенных рас-

тений более выражен по сравнению с диким типом при длительном солевом стрессе [47]. Искусственные изменения экспрессии *ФЛД 3* в условиях солевого стресса и водного дефицита соответственно отражаются на уровнях ФК и экспрессии генов (*TOR* и *AGC2*), продукты которых являются модуляторами процессов роста в ответ на поступление питательных веществ и действие стрессов. Изменяется также состояние фосфорилирования белка рибосомной протеинкиназы S6K [47]. Следовательно, *ФЛД 1* и *ФЛД 3* участвуют в модуляции реакции растений на действие осмотического стресса благодаря различным механизмам: ФЛД 1 опосредует действие абсцизовой кислоты на динамику устьичной щели для снижения уровня потери воды растениями, тогда как ФЛД 3 обуславливает рост корней в ответ на действие солевого стресса и засухи, чтобы увеличить поверхность всасывания воды.

Анализ фенотипа растений при нокауте и искусственно усиленной экспрессии гена *ФЛД* свидетельствует о том, что ФЛД стимулирует рост корней *Arabidopsis* в условиях гиперосмотического стресса, индуцированного водным дефицитом и высокими концентрациями солей. Вместе с тем ФЛД может принадлежать ключевая роль в механизмах восприятия растениями состояния обеспеченности питательными веществами, в первую очередь, минеральным азотом [50].

Участие ФЛД в регуляции различных этапов онтогенеза растений. ФК, продукт активности ФЛД, является центральным посредником для биосинтеза фосфолипидов [51]. Высокая температура и влажность, а также длительное хранение ускоряют вызревание семян. Однако нокаут или нокадаун гена *ФЛД 1 Arabidopsis* стимулирует их прорастание, блокирует уменьшение количества ненасыщенных жирных кислот и снижает уровень аккумуляции перекисных форм липидов, повышая качество семян. Проростки таких трансгенных растений быстрее растут и имеют более длинные корни и крупные листья. Нокадаун *ФЛД 1* приводит также к тому, что семена растений теряют способность к вызреванию по сравнению с нокаутированными по гену данного изофермента, что проявляется в возрастании их жизнеспособности [52, 53]. С другой стороны, искусственное нарушение формирования

функционального белка ФЛД благоприятствует вызреванию семян и увеличивает их способность к прорастанию [52].

Слабо исследована роль ФЛД в регуляции репродуктивного процесса у растений. Искусственно усиленная экспрессия гена *ФЛД 1* у *Arabidopsis* не влияет на формирование цветков. У растений с экспрессией антисмысловой конструкции этого гена не обнаружены различия в количестве семян и стручков по сравнению с диким типом [23]. Цветки растений, экспрессирующих антисмысловую конструкцию гена *ФЛД 1*, содержат лишь 10 % активности ФЛД дикого типа, что свидетельствует в пользу самодостаточности активности других изоферментов ФЛД для поддержания нормального развития вышеуказанных репродуктивных органов. Эти растения характеризуются активностью ФЛД и ФЛД. Однако отсутствие у них достоверных изменений формирования семян [23] указывает на непрямую роль ФЛД 1 к репродукции растений. С другой стороны, согласно исследованиям фенотипа нокаутированных растений, ФЛД 1 участвует в формировании базового уровня ФК в цветках, цветоножках, семенах, но не в стручках *Arabidopsis* [53]. Растения с искусственно усиленной экспрессией *ФЛД 3* отличаются ранним формированием цветков, семян и увеличенным количеством стручков исключительно в условиях умеренной засухи в отличие от растений дикого типа. Прямо противоположный фенотип обнаружен при нокауте гена *ФЛД 3*. Экспрессия генов, кодирующих факторы индукции формирования цветков (TSF, BFT), усиливается при искусственном увеличении уровня экспрессии *ФЛД 3* в условиях водного дефицита, однако уменьшается у нокаутированных по *ФЛД 3* растений. В нормальных условиях экспрессия исключительно гена *TSF* снижается при нокауте *ФЛД 3* по сравнению с растениями дикого типа [47].

Показано, что ФЛД 1 принимает участие в регуляции морфогенеза корневых волосков. Искусственное усиление экспрессии гена *ФЛД 1* обуславливает формирование и увеличение ветвления эктопических корневых волосков. Экспрессия антисмысловой конструкции *ФЛД 1* приводит к нарушению локализации, роста и развития корневых

волосков, не влияя на их закладку. Предполагается, что ФЛД 1 регулирует рост и развитие корней, модулируя процессы транспорта мембран, в частности экзоцитоз [54]. Другие данные получены при нокауте генов *ФЛД*. Локализация корневых волосков достоверно не изменяется у нокаутированных по генам *ФЛД 1* и *ФЛД 2* растений, тогда как исключительно слабые изменения указанного фенотипа обнаружены на апексах корней в условиях низкого содержания минерального фосфора [55]. Одной из вероятных причин различий в результатах этих исследований могут быть условия экспериментов: в первом случае использовали систему индуцированной репрессии гена *ФЛД 1* [54], а в другом – нокаут [55]. Возможно, что блокада ФЛД 1 экспрессией антисмысловой конструкции соответствующего гена не является специфичной для ФЛД 1 – другие изоферменты ФЛД могут при этом также репрессироваться.

Вторая причина отличий в результатах состоит в том, что для закладки и роста корневых волосков необходим определенный порог уровней белка ФЛД 1, тогда как экспрессия антисмысловой конструкции данного гена может лишь частично нивелировать эти параметры в клетках. Однако ФЛД могут иметь значение для регуляции роста корней в ответ на стрессовые условия внешней среды. Рост первичных корней в условиях низких концентраций минерального фосфора в среде инкубации у растений *Arabidopsis*, одновременно нокаутированных по *ФЛД 1* и *ФЛД 2*, угнетается по сравнению с растениями дикого типа или с нокаутированными по одному из генов *ФЛД*. При этом рост боковых корней усиливается у двойных мутантов, а локализация формирования корневых волосков не меняется. Нокаут *ФЛД 2* снижает уровень аккумуляции ФК в корнях в условиях недостатка минерального фосфора [55]. Морфология меристемы корней при низком содержании фосфора резко нарушается у растений, нокаутированных по гену *ФЛД 2*, что отражается на росте первичных корней и корневых волосков [56].

С другой стороны, рост корней при нокауте генов *ФЛД 1* и *ФЛД Arabidopsis* достоверно не изменяется [49], ФЛД 1 может участвовать в формировании базового уровня ФК в корнях *Arabidopsis*

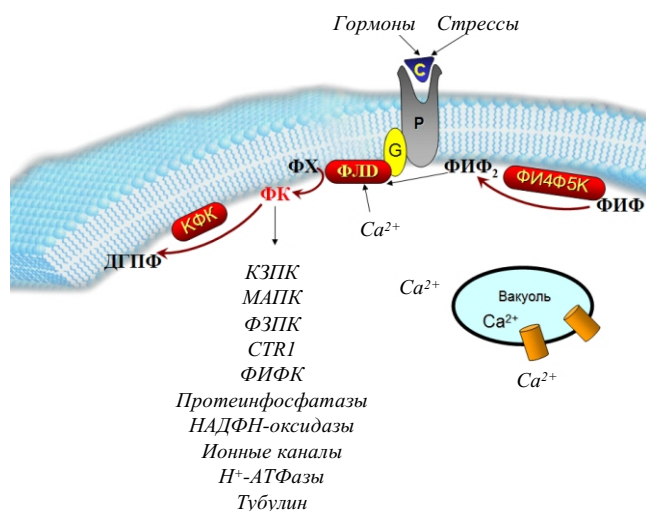


Рис. 2. Функционирование фосфолипазы D (ФЛД) в сигнальных каскадах клеток растений: ДГПФ – диацилглицеролпирофосфат; КЗПК – кальций-зависимые протеинкиназы; КФК – киназы фосфатидной кислоты; МАПК – митоген-активируемые протеинкиназы; Р – рецептор; С – стимул; СТР1 – сходная с Raf серин/треониновая протеинкиназа (негативный регулятор сигнализации этилена); ФЗПК – фосфоинозитид-зависимые протеинкиназы; ФИФК – киназа фосфатидилинозитолфосфата; ФИФ – фосфатидилинозитолмонофосфат; ФИФ₂ – фосфатидилинозитолбисфосфат; ФИ4Ф5К – фосфатидилинозитол-4-фосфат-5-киназа; ФК – фосфатидная кислота; ФХ – фосфатидилхолин; G – гетеротримерный G-белок

[53]. Таким образом, ФЛД 1 и ФЛД 2 одновременно выполняют ключевую роль в регуляции роста корней в ответ на условия недостатка минерального фосфора.

ФЛД является стимулятором роста боковых корней и накопления биомассы у растений [50]. Боковые корни при искусственно усиленной экспрессии гена *ФЛД* растут быстрее по сравнению с растениями дикого типа, тогда как нокаут *ФЛД* тормозит рост корней. Количество и рост клеток повышаются при искусственно усиленной экспрессии гена *ФЛД*. Площадь поверхности листовой пластинки, рост клеток листьев, количество листьев и их клеток, а также число семян возрастают у этих трансгенных растений, но снижаются при нокауте гена *ФЛД*. Проростки растений растут быстрее при искусственно усиленной экспрессии гена *ФЛД*, но медленнее – у нокаутированных по сравнению с растениями дикого типа. Уровни содержа-

ния ФК повышаются в листьях и корнях при суперэкспрессии гена данного изофермента, уменьшаясь у нокаутированных растений [50].

Нарушение целостности мембран является одной из главных причин индукции процессов старения [57]. Листья растений, в которых экспрессируется антисмысловая конструкция гена *ФЛД 1*, характеризуются ослаблением признаков старения, обусловленного абсцизовой кислотой и этиленом в отличие от растений дикого типа [23]. АБК и этилен играют важную роль в реакциях растений на действие стрессов – последние увеличивают биосинтез этих фитогормонов [58, 59]. Следовательно, осуществляемый ФЛД 1 катаболизм липидов мембран может быть результатом реакции на стрессы, а не причиной природного старения.

Роль ФЛД в процессах роста и созревания плодов может проявляться в регуляции метаболизма их клеток [60]. Плоды помидоров, в которых экспрессируется антисмысловая конструкция гена *ФЛД 1*, меньше по размерам в сравнении с таковыми у растений дикого типа, они дольше хранятся, более твердые и отличаются задержанным климактерическим выделением этилена [26].

Таким образом, различные изоферменты ФЛД участвуют в регуляции роста и развития растений.

Выводы. Результаты исследований последних лет с использованием трансгенных растений значительно углубили представления о механизмах реализации сигналов в клетке, индуцированных ФЛД (рис. 2). Широкий спектр изоферментов ФЛД у растений обеспечивает формирование различных типов фосфатидных кислот в определенных органах и клетках в процессе их развития при действии стимулов внешней среды. Это обеспечивает разнообразие функций ФК у растений, являющейся вторичным посредником сигнальных каскадов, модулирующим активность ключевых ферментов в ответ на действие стрессов (осмотического, холодового, оксидативного) и фитогормонов (АБК, ауксинов, цитокининов и этилена). Вместе с тем незначительный прогресс достигнут в понимании взаимодействия ФЛС и ФЛД, роли диацилглицеролкиназы в синтезе ФК. Важен также анализ природы взаимодействия ФК с мишенями сигнальных систем, успех в выяснении которого возможен с помощью

создания биосенсора для выявления ФК, сочетающего в себе специфический фактор связывания ФК и флуоресцентный белок. Применение такого биосенсора позволило бы получить информацию о компонентах сигнальных систем липидной природы и их роли в процессе координации интенсивности и направленности метаболизма клеток, реализации генетических программ роста и развития растений.

Работа поддержана грантами НАН Украины (2.1.10.32-10), ГФФИ Украины (№ Ф29.4/019) и ГФФИ Беларуси (Б09К-061).

V. S. Kravets, Ya. S. Kolesnikov, S. V. Kretynin,
E. M. Kabachevskaya, G. V. Liahnovitch, O. M. Bondarenko,
I. D. Volotovskiy, V. P. Kukhar

Molecular and genetics approaches for investigation of phospholipase D role in plant cells

Summary

The review is devoted to the analysis of publications concerning the role of phospholipase D (PLD) in regulation of metabolism in plant cells. Analysis of molecular and genetic studies suggest that PLD is an important component of various hormonal and stress signaling pathways.

Keywords: phospholipase D, phosphatidic acid, transgenic plants.

В. С. Кравець, Я. С. Колесников, С. В. Кретинін,
О. М. Кабачевська, Г. В. Ляхнович, О. М. Бондаренко,
І. Д. Волотовський, В. П. Кухар

Молекулярні і генетичні підходи до вивчення ролі фосфоліпази D клітин рослин

Резюме

Огляд присвячено аналізу робіт у площині дослідження ролі фосфоліпази D в регуляції метаболізму клітин рослин. Аналіз робіт, виконаних з використанням молекулярних та генетичних підходів, свідчить на користь ФЛД як важливого компонента сигнальних систем низки гормонів і стресів.

Ключові слова: фосфоліпаза D, фосфатидна кислота, трансгенні рослини.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pappan K., Austin-Brown S., Chapman K. D., Wang X. Substrate selectives and lipid modulation of plant phospholipase D, - , and - // Arch. Biochem. Biophys.–1998.–**353**, N 1.–P. 131–140.
2. Oblozinsky M., Ulbrich-Hofmann R., Bezakova L. Head group specificity of phospholipase D isoenzymes from poppy seedlings (*Papaver somniferum* L.) // Biotechnol. Lett.–2005.–**27**, N 3.–P. 181–185.
3. Elias M., Potocky M., Cyrckova F., Zarsky V. V. Molecular diversity of phospholipase D in angiosperms // BMC Genomics.–2002.–**3**, N 1.–P. 2.
4. Li G., Lin F., Xue H.-W. Genome-wide analysis of the phospholipase D family in *Oryza sativa* and functional characterization of PLDv1 in seed germination // Cell Res.–2007.–**17**, N 10.–P. 881–894.
5. Hanahan D. J., Chaikoff I. L. A new phospholipid-splitting enzyme specific for the ester linkage between the nitrogenous base and the phosphoric acid grouping // J. Biol. Chem.–1947.–**169**, N 1.–P. 699–705.
6. Liscovitch M., Czarny M., Flucci G., Tang X. Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family // Biochem. J.–2000.–**345**, N 3.–P. 401–415.
7. Wang X., Devaiah S.P., Zhang W., Welti R. Signaling functions of phosphatidic acid // Progr. Lipid Res.–2006.–**45**, N 3.–P. 250–278.
8. Wang X. Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses // Plant Physiol.–2005.–**139**, N 2.–P. 566–573.
9. Bargmann B. O., Munnik T. The role of phospholipase D in plant stress responses // Curr. Opin. Plant Biol.–2006.–**9**, N 5.–P. 515–522.
10. Romanov G. A. How do cytokinins affect the cell? // Rus. J. Plant Physiol.–2009.–**56**.–P. 268–290.
11. Romanov G. A., Kieber J. J., Schmölling T. A rapid cytokinin response assay in *Arabidopsis* indicates a role for phospholipase D in cytokinin signaling // FEBS Lett.–2002.–**515**, N 1–3.–P. 39–43.
12. Kravets V. S., Kretinin S. V., Kolesnikov Ya. S., Getman I. A., Romanov G. A. Cytokinins evoke rapid activation of phospholipase D insensitive plant tissues // Dokl. Biokhim. Biophys.–2009.–**28**, N 5.–P. 1–4.
13. Kravets V. S., Kolesnikov Ya. S., Kretynin S. V., Getman I. A., Romanov G. A. Rapid activation of specific phospholipase(s) D by cytokinin in *Amaranthus* assay system // Physiol. Plantar.–2010.–**138**.–P. 249–255.
14. Amini A., Glevarec G., Andreu F., Reverdiau P., Rideau M., Creche J. Effects of phosphatidic acid on cytokinin signal transduction in periwinkle cells // J. Plant Growth Regul.–2008.–**27**, N 4.–P. 394–399.
15. Tarasova O. V., Medvedev S. S. Influence of benzylamino-purine on fatty acid composition and ratio of phospholipids from maize coleoptiles and roots (in Russian) // Vestn. S.-Petersb. Univ.–2008.–**3**, N 2.–P. 85–90.
16. Zhang W., Qin C., Zhao J., Wang X. Phospholipids D 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.–2004.–**101**, N 25.–P. 9508–9513.
17. Zhang Y., Zhu H., Zhang Q., Li M., Yan M., Wang R., Wang L., Welti R., Zhang W., Wang X. Phospholipase D 1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in *Arabidopsis* // Plant Cell.–2009.–**21**, N 8.–P. 2357–2377.
18. Mishra G., Zhang W., Deng F., Zhao J., Wang X. A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in *Arabidopsis* // Science.–2006.–**312**, N 5771.–P. 264–266.
19. Lein W., Saalbach G. Cloning and direct G-protein regulation of phospholipase D from tobacco // Biochim. Biophys. Acta.–2001.–**1530**, N 2–3.–P. 172–183.
20. Zhao J., Wang X. *Arabidopsis* phospholipase D 1 interacts with the heterotrimeric G-protein -subunit through a motif analogous to the DRY motif in G-protein-coupled receptors // J. Biol. Chem.–2004.–**279**, N 3.–P. 1794–1800.

21. Mahajan A., Sharma S. Antagonistic effect of polyamines on ABA-induced suppression of mitosis in *Allium cera* L. // *Ind. J. Exp. Biol.*—2009.—**47**, N 2.—P. 136–139.
22. Liu P. F., Chang W. C., Wang Y. K., Chang H. Y., Pan R. L. Signaling pathways mediating the suppression of *Arabidopsis thaliana* Ku gene expression by abscisic acid // *Biochim. Biophys. Acta.*—2008.—**1779**, N 3.—P. 164–174.
23. Fan L., Zheng S., Wang X. Antisense suppression of phospholipase D retards abscisic acid- and ethylene- promoted senescence of postharvest *Arabidopsis* leaves // *Plant Cell.*—1997.—**9**, N 12.—P. 2183–2196.
24. Chen H., Xue L., Chintamanani S., Germain H., Lin H., Cui H., Cai R., Zuo J., Tang X., Li X., Guo H., Zhou J. M. ETHYLENE INSENSITIVE3 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 repress SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT2 expression to negatively regulate plant innate immunity in *Arabidopsis* // *The Plant Cell.*—2009.—**21**, N 8.—P. 2527–2540.
25. Bapat V. A., Trivedi P. K., Ghosh A., Sane V. A., Ganapathi T. R., Nath P. Ripening of fleshy fruit: molecular insight and the role of ethylene // *Biotechnol. Adv.*—2010.—**28**, N 1.—P. 94–107.
26. Pinhero R. G., Almquist K. C., Novotna Z., Raliyath G. Developmental regulation of phospholipase D in tomato fruits // *Plant Physiol. and Biochem.*—2003.—**41**, N 3.—P. 223–240.
27. Woodward A. W., Bartel B. Auxin: regulation, action, and interaction // *Ann. Bot. (Lond.)*—2005.—**95**, N 1.—P. 707–735.
28. Li G., Xue H.-W. *Arabidopsis* PLDz2 regulates vesicle trafficking and is required for auxin response // *The Plant Cell.*—2007.—**19**, N 1.—P. 281–295.
29. Abas L., Benjamins R., Malenica N., Paciorek T., Wisniewska J., Jeanette C., Moulinier-Anzola J. C., Sieberer T., Friml J., Luschnig C. Intracellular trafficking and proteolysis of the *Arabidopsis* auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism // *Nat. Cell Biol.*—2006.—**8**, N 3.—P. 249–256.
30. Mancuso S., Marras A., Muguai S., Schlicht M., Zarsky V., Li G., Song L., Xue H. W., Baluska F. Phospholipase D 2 drives vesicular secretion of auxin for its polar cell-cell transport in the transition zone of the root apex // *Plant Signal. and Behavior.*—2007.—**2**, N 4.—P. 240–244.
31. Apel K., Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction // *Annu. Rev. Plant Biol.*—2004.—**55**.—P. 373–399.
32. Sang Y., Cui D., Wang X. Phospholipase D and phosphatidic acid mediated generation of superoxide in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.*—2001.—**126**, N 4.—P. 1449–1458.
33. Zhang W., Wang C., Qin C., Wood T., Olafsdottir G., Welti R., Wang X. The oleate-stimulated phospholipase D, PLD, and phosphatidic acid decrease H₂O₂-induced cell death in *Arabidopsis* // *The Plant Cell.*—2003.—**15**, N 10.—P. 2285–2295.
34. Wang C., Zien C. A., Aftillhill M., Welti R., Hildebrand D. F., Wang X. Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in *Arabidopsis* // *The Plant Cell.*—2000.—**12**, N 11.—P. 2237–2246.
35. Bargmann B. O., Lazalt A. M., Riet B., Testerink C., Merquiol E., Mosblech A., Reyes A. L., Pieterse C. M., Haring M. A., Heilmann I., Bartels D., Munnik T. Reassessing the role of phospholipase D in the *Arabidopsis* wounding response // *Plant Cell Environ.*—2009.—**32**, N 7.—P. 837–850.
36. Nimchuk Z., Eulgem T., Holt B. F., Dangl J. L. Recognition and response in the plant immune system // *Annu. Rev. Genet.*—2003.—**37**.—P. 579–609.
37. Bargmann B. O. R., Laxalt A. M., ter Riet B., Schouten E., van Leeuwen W., Dekker H. L., de Koster C. G., Haring M. A., Munnik T. LePLD 1 activation and relocalization in suspension-cultured tomato cells treated with xylanase // *The Plant J.*—2006.—**45**, N 3.—P. 358–368.
38. Yamaguchi T., Kuroda M., Yamakawa H., Ashizawa T., Hirayae K., Kurimoto L., Shinya T., Shibuya N. Suppression of a phospholipase D gene, *OsPLD 1*, activates defense responses and increases disease resistance in rice // *Plant Physiol.*—2009.—**150**, N 1.—P. 308–319.
39. Welti R., Li W., Li M., Sang Y., Biesiada H., Zhou H.-E., Rajashekar C. B., Williams T. D., Wang X. Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase D in freezing-induced lipid changes in *Arabidopsis* // *J. Biol. Chem.*—2002.—**277**, N 35.—P. 31994–32002.
40. Li W., Li M., Zhang W., Welti R., Wang X. The plasma membrane-bound phospholipase D enhances freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* // *Nat. Biotechnol.*—2004.—**22**, N 4.—P. 427–433.
41. Katagiri T., Takahashi S., Shonizaki K. Involvement of a novel *Arabidopsis* phospholipase D, AtPLD, in dehydration-inducible accumulation of phosphatidic acid in stress signaling // *Plant J.*—2001.—**26**, N 6.—P. 595–605.
42. Li W., Wang R., Li M., Li L., Wang C., Welti R., Wang X. Differential degradation of extraplastidic and plastidic lipids during freezing and post-freezing recovery in *Arabidopsis thaliana* // *J. Biol. Chem.*—2008.—**283**, N 1.—P. 461–468.
43. Rajashekar C. B., Zhou H.-E., Zhanga Y., Li W., Wang X. Suppression of phospholipase D 1 induces freezing tolerance in *Arabidopsis*: Response of cold-responsive genes and osmolyte accumulation // *J. Plant Physiol.*—2006.—**163**, N 9.—P. 916–926.
44. Mishkind M., Vermeer J. E. M., Darwish E., Munnik T. Heat stress activates phospholipase D and triggers PIP₂ accumulation at the plasma membrane and nucleus // *The Plant J.*—2009.—**60**, N 1.—P. 10–21.
45. Mane S. P., Vasquez-Robinet C., Sioson A. A., Heath L. S., Grene R. Early PLD-mediated events in response to progressive drought stress in *Arabidopsis*: a transcriptome analysis // *J. Exp. Bot.*—2007.—**58**, N 2.—P. 241–252.
46. Hong Y., Zheng S., Wang X. Dual functions of phospholipase D 1 in plant response to drought // *Mol. Plant.*—2008.—**1**, N 2.—P. 262–269.
47. Hong Y., Pan X., Welti R., Wang X. Phospholipase D 3 is involved in the hyperosmotic response in *Arabidopsis* // *The Plant Cell.*—2008.—**20**, N 3.—P. 803–816.
48. Taniguchi Y. Y., Taniguchi M., Tsuge T., Oka A., Aoyama T. Involvement of *Arabidopsis thaliana* phospholipase D 2 in root hydrotropism through the suppression of root gravitropism // *Planta.*—2010.—**231**, N 2.—P. 491–497.
49. Bargmann B. O. R., Laxalt A. M., ter Riet B., van Schooten B., Merquiol E., Testerink C., Haring M. A., Bartels D., Munnik T. Multiple PLDs required for high salinity and water deficit tolerance in plants // *Plant Cell Physiol.*—2009.—**50**, N 1.—P. 78–89.
50. Hong Y., Devaiah D. P., Thamasandra B. N., Bahn S. C., Li M., Welti R., Wang X. Phospholipase D and phosphatidic acid enhance *Arabidopsis* nitrogen signaling and growth // *Plant J.*—2009.—**58**, N 3.—P. 376–387.
51. Schmid K. M., Ohlrogge J. B. Chapter 4. Lipid metabolism in plants // *New Compr. Biochem.*—2002.—**36**, N 1.—P. 93–126.
52. Devaiah S. P., Pan X., Hong Y., Roth M., Welti R., Wang X. Enhancing seed quality and viability by suppressing phos-

- pholipase D in *Arabidopsis* // *The Plant J.*—2007.—**50**, N 6. — P. 950–957.
53. Devaiah S. P., Roth M. R., Baughman E., Li M., Tamura P., Jeannotte R., Welti R., Wang X. Quantitative profiling of polar glycerolipid species from organs of wild-type *Arabidopsis* and a PHOSPHOLIPASE D 1 knockout mutant // *Phytochemistry.*—2006.—**67**, N 17.—P. 1907–1924.
54. Ohashi Y., Oka A., Rodrigues-Pousada R., Possenti M., Ruberti I., Morelli G., Aoyama T. Modulation of phospholipids signaling by GLABRA in root-hair pattern formation // *Science.*—2003.—**300**, N 5624.—P. 1427–1430.
55. Li M., Qin C., Welti R., Wang X. Double knockouts of phospholipase D 1 and 2 in *Arabidopsis* affect root elongation during phosphate-limited growth, but do not affect root hair patterning // *Plant Physiol.*—2006.—**140**, N 2.—P. 761–770.
56. Cruz-Ramirez A., Oropeza-Aburto A., Razo-Hernandez F., Ramirez-Chavez E., Herrera-Estrella L. Phospholipase D 2 plays an important role in extraplastidic galactolipid biosynthesis and phosphate recycling in *Arabidopsis* roots // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2006.—**103**, N 17.—P. 6765–6770.
57. Bouvier-Nave P., Berna A., Noiriel A., Compagnon V., Carls-son A.S., Banas A., Stymne S., Schaller H. Involvement of the phospholipid sterol acyltransferase1 in plant sterol homeostasis and leaf senescence // *Plant Physiol.*—2010.—**152**, N 1.—P. 107–119.
58. Ikegami K., Okamoto M., Seo M., Koshiba T. Activation of abscisic acid biosynthesis in the leaves of *Arabidopsis thaliana* in response to water deficit // *J. Plant Res.*—2009.—**122**, N 2.—P. 235–243.
59. Hershkovitz V., Friedman H., Goldschmidt E. E., Feygenberg O., Pesis E. Induction of ethylene in avocado fruit in response to chilling stress on tree // *J. Plant Physiol.*—2009.—**166**, N 17.—P. 1852–1855.
60. Yuan H., Chen L., Paliyath G., Sullivan A., Murr D. P. Characterization of microsomal and mitochondrial phospholipase D activities and cloning of a phospholipase D alpha cDNA from strawberry fruits // *Plant Physiol. and Biochem.*—2005.—**43**, N 6.—P. 535–547.

УДК 577.175.14; 577.125.53
Поступила в редакцию 11.01.10