

植物磷脂酶 D 基因表达与衰老的关系

李丽^{1,2}, 游向荣^{1,2}, 孙健^{1,2*}, 彭宏祥³, 李昌宝¹, 何全光¹, 张娥珍¹,
廖芬¹, 李志春¹

(1. 广西农业科学院农产品加工研究所, 南宁 530007; 2. 广西作物遗传改良重点开放实验室, 南宁 530007; 3. 广西农业科学院园艺研究所, 南宁 530007)

摘要: 磷脂酶 D (PLD) 是一种重要的磷脂水解酶, 在植物细胞中普遍存在。磷脂酶 D 能激活许多重要的细胞生理功能, 包括调控细胞膜的重建、跨膜信号传导及细胞内调控、细胞骨架组装、防御反应以及种子萌发和植物的衰老等。对磷脂酶 D 的基本特性、磷脂酶 D 基因特异性表达模式及其活性抑制与植物衰老的关系进行了综述, 并探讨和展望了今后植物磷脂酶 D 基因的研究方向。

关键词: 磷脂酶 D; 基因表达; 脂质信号传导; 细胞衰老

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2012.01.018

Relationship between Gene Differential Expression of Phospholipase D and Senescence of Plants

LI Li^{1,2}, YOU Xiang-rong^{1,2}, SUN Jian^{1,2*}, PENG Hong-xiang³, LI Chang-bao¹, HE Quan-guang¹,
ZHANG E-zhen¹, LIAO Fen¹, LI Zhi-chun¹

(1. Institute of Agro-food Science & Technology, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China; 2. Guangxi Crop Genetic Improvement Laboratory, Nanning 530007, China; 3. Horticultural Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China)

Abstract: Phospholipase D (PLD) is an important phospholipid hydrolase prevalently existing in plant cells. PLD plays an important role in regulation of many critical cellular functions, including regulation of cell membrane reconstruction, cellular signal transduction, intracellular regulation, cellular backbone formation, defense responses, seed germination and plant senescence, etc. The basic characteristic of PLD, differential expression pattern of *PLD* gene and senescence-related physiological and biochemical processes involving PLD were comprehensively reviewed. The relationship between PLD activity inhibition and senescence was discussed, as well as the research direction of *PLD* gene in the future was prospected.

Key words: Phospholipase D; Gene expression; Lipid signal transduction; Cell senescence

磷脂酶 D (Phospholipase D, PLD), 即磷脂酰胆碱磷脂水解酶 (EC3.1.4.4), 是指催化磷酸二酯键水解和碱基交换的一类酶。PLD 在植物组织 (根、茎、叶、种子等) 中普遍存在, 在成熟初期的种子和萌发

初期的幼苗中的含量更丰富^[1-2]。早在 1947 年, Hanahan 和 Chaikoff 报道了胡萝卜 (*Daucus carota*) 和白菜 (*Brassica campestris*) 叶的提取物中具有 PLD 活性^[3], 它具有宽广的底物特异性, 但由于其多型

收稿日期: 2011-03-31 接受日期: 2011-08-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31000927; 31160407); 国家荔枝产业技术体系项目 (nycyt-32-05); 广西科学研究与技术开发计划课题 (桂科攻 10100009-2); 广西自然科学基金项目 (2010GXNSFC013010; 2011GXNSFB018049); 广西农科院基本科研业务专项基金 (桂农科 2011Y24) 资助

作者简介: 李丽 (1983 ~), 女, 硕士, 主要从事农产品贮藏与加工研究, email: lili@gxaas.net

* 通讯作者 Corresponding author, email: jiansun@yahoo.cn

性和不稳定性致使在此后很长一段时间没有得到充分的利用。直到 1978 年才报道其也存在于动物和微生物(细菌、真菌)中^[4],并证明 PLD 对细胞活动具有重要的调控作用^[5]。1994 年,Kansas 州立大学的王学敏教授从萌发的蓖麻 (*Ricinus communis*)种子的子叶中获得了有活性的 PLD,并利用反转录技术获得 cDNA,经转化和表达实验证明其为磷脂酶 D 基因(PLD)^[6]。至今已从白菜、胡萝卜、菠菜(*Spinacia oleracea*)、甜菜(*Beta vulgaris*)、甘蓝(*Brassica oleracea* var. *capitata*)、花椰菜(*B. oleracea* var. *botrytis*)、花生(*Arachis hypogaea*)、绿豆(*Phaseolus radiatus*)、蚕豆(*Vicia faba*)等中提取了 PLD^[7-12]。

PLD 是一类重要的跨膜信号转导酶,研究表明 PLD 的作用不仅在于通过水解细胞膜中的磷脂而影响膜的结构、功能和稳定性,而且在信号转导、激素作用的发挥、细胞骨架组装、胞内蛋白激酶和肌动蛋白的有序化、细胞分裂的发生、穿膜运输、分泌作用、防御反应以及种子萌发和细胞衰老等过程中起重要作用^[13]。PLD 水解磷脂产物还可作为第二信使,参与信号传递过程,触发细胞内与抗性有关的“程序化反应”,如抗逆性和抗病性等。所以,PLD 是一类既具有水解作用又具有信息传递作用的双重作用酶。

在自然衰老、机械损伤、冷害、干旱、高盐、营养不良、病虫害等逆境条件下,植物中的 PLD 活性增加,使磷脂降解、膜通透性发生改变,造成植物伤害甚至死亡^[14]。如果能在一定程度内抑制 PLD 的活性,则能改变植物对逆境的反应,有助于细胞膜结构的保持和细胞内区域化结构的完整,减少伤害。本文深入探讨了 PLD 催化的磷脂代谢途径与特性、PLD 基因差异表达特征、PLD 活性抑制与衰老的关系,为阐明通过调控磷脂酶 D 基因差异表达与酶活性来延缓植物衰老的可能机制提供参考。

1 磷脂酶 D 特性

磷脂酶是催化磷脂水解第一步的关键酶,根据水解磷脂的部位不同可以把磷脂酶分为 5 类(图 1),即磷脂酶 A₁(PLA₁)、磷脂酶 A₂(PLA₂)、磷脂酶 B(PLB)、磷脂酶 C(PLC)和磷脂酶 D(PLD)^[15]。PLD 为细胞膜脂质水解酶,底物可为多种磷脂和磷脂衍生物,对构成磷脂的碱基部分没有绝对的特异性要求。PLD 主要底物为磷脂酰胆碱(phosphatidyl-

choline,PC),可催化 PC 生成磷脂酸(phosphatidic acid,PA)和胆碱,而 PA 又在磷脂酸磷酸酶(phosphatidate phosphatase,PAP)或特异性的 PLA₂的作用下生成三磷酸肌醇(inositol trisphosphate,IP₃)、二酰基甘油(diacylglycer,DAG)和溶血磷脂酸(lysophosphatidic acid,LPA)^[16]。PLD 催化的这条生化通路被认为是细胞信号传导的重要环节^[17]。除水解作用以外,在特定条件下,PLD 还可催化各种含羟基的化合物结合到磷脂的碱基上,形成新的磷脂,这称为 PLD 的磷脂转移特性,通常也称碱基交换反应^[18],利用这一特性可对磷脂进行改性,制备高纯度的单一磷脂和稀有磷脂。

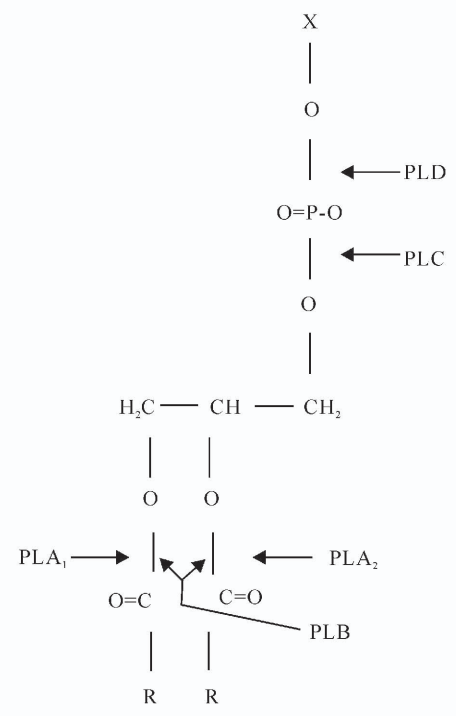


图 1 不同磷脂酶水解结构磷脂的部位^[16]
Fig. 1 Sites of hydrolytic cleavage of phospholipids by PLA₁, PLA₂, PLB, PLC and PLD^[16]

PLD 与细胞信号传导密切相关,其水解磷脂产物 IP₃、DAG、PA 等都是胞内第二信使,它们通过引起胞内 Ca²⁺ 和蛋白激酶的变化,从而引发一系列级联反应,进而影响细胞的结构和生理功能,该过程称为磷脂酰肌醇信号传导途径(图 2)^[19]。在这一途径中,PLD 可以通过一种或几种功能影响细胞活动,包括产生信使、与细胞的重要成分相互作用、改变离子流量、改变脂质组成和细胞膜的物理性质以及促进脂质的降解等^[20]。

植物对各种胁迫环境产生响应,信号转导与特

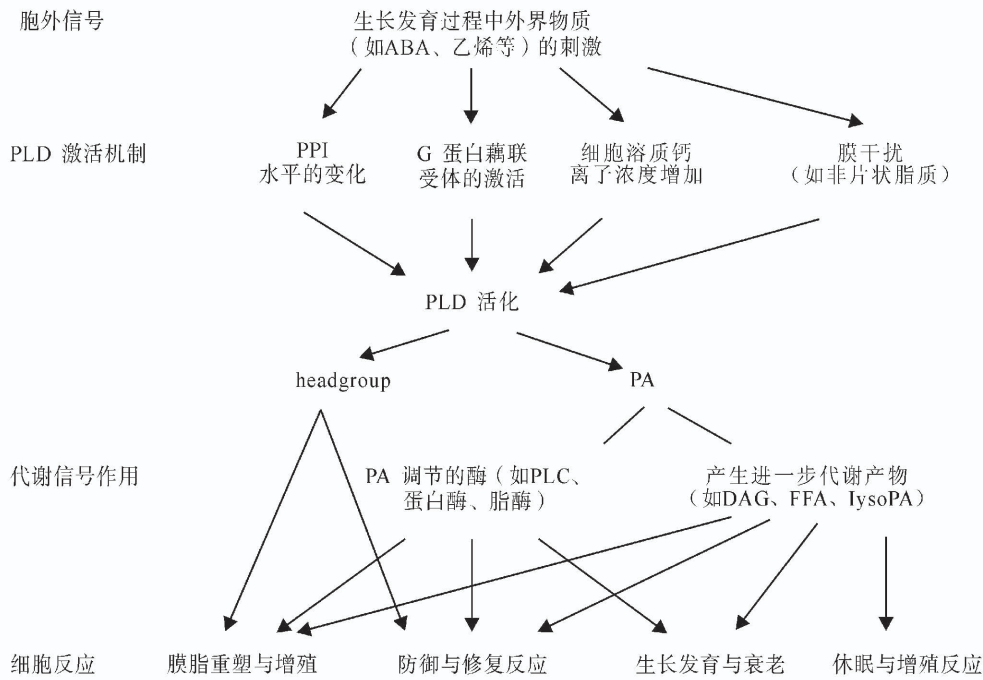


图 2 植物 PLD 的活化机理及 PLD 在植物代谢和信号传导中的作用^[20]

Fig. 2 Activation mechanism of plant PLD and its fuction in plant mechanism and signal transduction^[20]

异性磷脂酶的激活有关^[21]。近年来的研究表明,磷脂酶几乎在植物所有的生命阶段及对环境的应答中起着重要的作用^[22-23]。高等植物中由 PLD 起始的磷脂代谢途径如下:PLD 分解磷脂形成 PA;而 PA 不稳定可直接进入磷脂再生循环,参与膜的构建;PA 在磷脂酸磷酸酯酶作用下形成 DAG,DAG 作为第二信使而参与到细胞内的信号传导过程;此外 DAG 在非特异性酯酰基水解酶作用下也可释放出游离的脂肪酸,其中不饱和游离脂肪酸又可被脂氧合酶氧化,生成过氧化物和游离自由基,这些氧化产物会导致细胞膜完整性及功能的丧失,从而毒害细胞的膜系统,引起细胞死亡并最终导致植物器官组织的衰老。另外,PLD 在不同植物、器官、组织和细胞类型中表现出特异性,胞外不同胁迫引起的细胞信号转导过程也有差异。有研究表明,植物中不同 PLD 具有独特的生物化学特性,不同 PLD 在不同胁迫启动的特定细胞过程中执行独特的细胞信号转导功能^[24]。

2 磷脂酶 D 基因差异表达特性

磷脂酶 D 基因是个多基因家族^[15]。迄今为止,已有大量植物 PLD 基因家族的成员被克隆和确定,仅拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中就已经确认了 12 个基因(GenBank 登录号:U36381、U84568、

AF027408、D73411、AB031047 等),还有水稻(*Oryza sativa*)(AF411833、AB001919、AF411221)、玉米(*Zea mays*)(D73410)、豇豆(*Vigna unguiculata*)(U92656)、甘蓝 (AF090445、U85482)、蓖麻 (L33686)、烟草 (*Nicotiana tabacum*)(284822)和番茄(*Lycopersicon esculentum*) (AF201661、AF154425、AY013255) 等^[25-27]。根据基因编码的 PLD 序列、域结构、生化特性以及克隆的 cDNA,PLD 基因可分成 5 类^[28],即 *PLD* α 、*PLD* β 、*PLD* γ 、*PLD* δ 和 *PLD* ζ (图 3),其中 *PLD* α 类具有最多的家庭成员,植物中的 *PLD* 基因多属于此类^[29]。植物 PLD 的总体域结构相似,只是不同类型间在某些单元上有重要差异。*PLD* α 、*PLD* β 和 *PLD* γ 的基本结构单元相似,只是大小、长度、编码区等有所不同,它们都含有两个 H $\times$ K $\times$ $\times$ $\times$ D 基序(motifs),分别称为 HKD₁ 和 HKD₂,其中 H 为组氨酸,K 为赖氨酸,D 为天冬氨酸,HKD₁ 和 HKD₂ 相距约 320 个氨基酸^[4]。HKD 基序为 PLD 酶的标志(鉴别)序列,是催化水解的活性部位(图 4)。

作为多基因家族的 *PLD*,具有多分子的异质性,其家族成员的序列保守性相对较低,*PLD* α 与 *PLD* β 、*PLD* γ 间的同源性仅为 30% ~ 50%,说明编码的 PLD 蛋白虽然属于同功酶,但其蛋白序列和结构可能存在较大差别^[31]。序列分析比对表明,

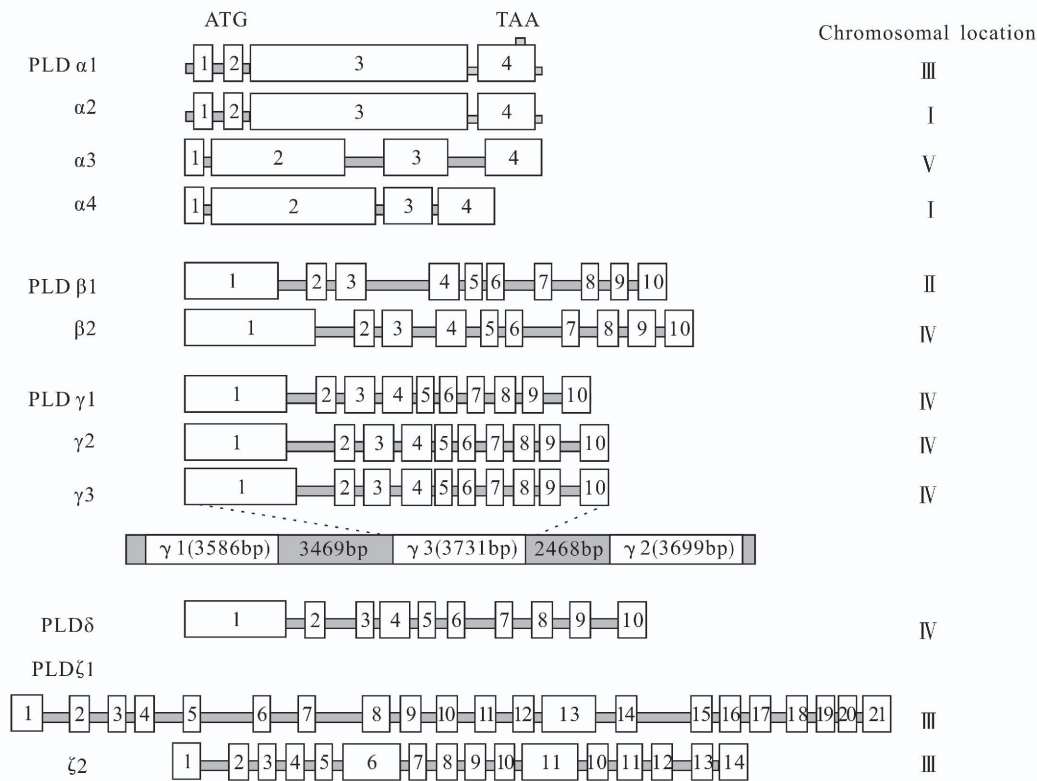


图 3 拟南芥的 *PLD* 基因结构及组成^[30]

Fig. 3 *PLD* gene structures and genomic organization of *Arabidopsis*^[30]

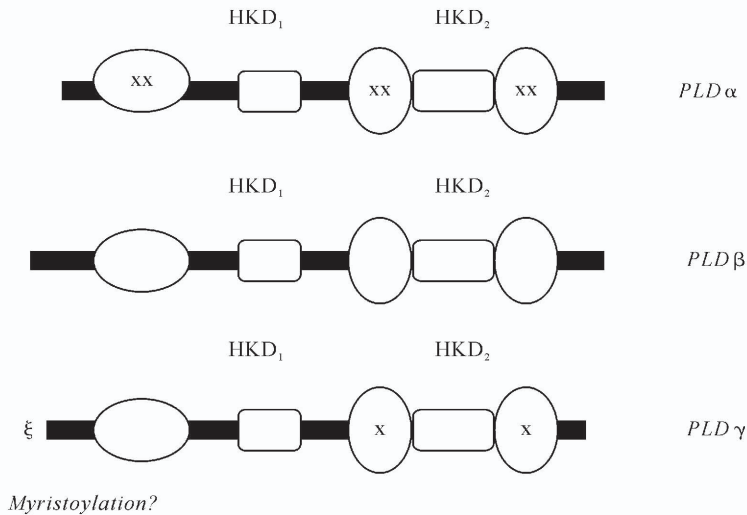


图 4 *PLD* 的基因结构^[4]

Fig. 4 Structure of *PLD* gene^[4]

蓖麻、水稻、玉米、甘蓝、豇豆、烟草、番茄及拟南芥的 *PLD* α 编码的氨基酸序列的一致性可达 73% ~ 90%, 其中水稻和玉米 *PLD* 蛋白的一致性可达 90%, 且均由 812 个氨基酸组成^[32]。拟南芥的 *PLD* α 蛋白与 *PLD* β 、*PLD* γ 蛋白的一致性分别仅有

40% 和 60%, 而拟南芥 *PLD* β 和 *PLD* γ 则有 66% 的一致性和 81% 的相似性^[29]。

PLD 可能在植物发育及衰老过程中分别起着不同的作用。研究表明, *PLD* α 在代谢活动旺盛的器官如花、幼果和根中的活性要高于干种子和成熟

叶片,而 PLD β 和 PLD γ 在衰老叶片中的活性要远高于其它器官^[33-34]。拟南芥的 PLD δ 与质膜紧密相连,并在老叶、茎、花及根中具有相对高的表达活性^[34]。这表明,不同的 PLD 具有不同的细胞分布模式和不同的组织表达活性。在 PLD 家族全长 cDNA 克隆的基础上,检测家族成员在植物发育和衰老过程中的转录和翻译水平上的特异性表达,可以确定在各生理阶段起关键作用的 PLD 成员及其表达差异特征。

3 磷脂酶 D 活性抑制与衰老的关系

作为植物磷脂酶家族中的重要成员,PLD 活性直接影响着细胞膜的重建和衰老、跨膜信号传导及细胞内调控等许多生理过程。早期的研究证实,在果实发育和成熟阶段膜代谢与 PLD 活性密切相关,PLD 在番茄果实发育和成熟过程中起重要作用^[35]。在康乃馨(*Dianthus caryophyllus*)花瓣、豌豆(*Pisum sativum*)子叶、甘蓝叶片、花椰菜花芽及老化的黄瓜(*Cucumis sativus*)、洋葱(*Allium cepa*)种子中 PLD 活性增强和 PA 的形成^[36-38]。

有关 PLD 与植物果实组织衰老的关系研究表明,果实在衰老和软化过程中,受遗传因子和外界因素的影响,某些靶酶(如磷脂酶)被激活,产生第二信使如钙离子及磷脂酸等^[39],从而促进膜脂降解,引发膜脂过氧化,破坏膜结构,导致细胞衰老^[40-44]。Jandus 等的研究表明,PLD 参与了膜磷脂的降解,引起膜完整性丧失,最终导致果实成熟衰老^[45],同时他们还认为除 PLD 外,还存在其他因子或其他磷脂酶类共同参与调节果实的自然衰老进程。Ryu 等也报道 PLD 是植物衰老过程中引起细胞膜破坏的关键酶,发生于衰老过程的初期,随着衰老程度增加 PLD 的表达增加^[46]。调控 PLD 活性有助于细胞膜结构的保持和细胞内区域化结构的完整,从而有助于保持呼吸跃变型水果的采后品质,延缓果实组织衰老^[30]。

磷脂酶抑制剂可以通过阻断第二信使的产生来抑制细胞表达相应功能或效应,从而调节 PLD 的活性。目前 PLD 抑制剂主要有正丁醇(*n*-butanol)、仲丁醇(2-butanol)、溶血磷脂酰乙醇胺(lysophosphatidylethanolamine, LPE)、2,3-二磷酸甘油酸(2,3-diphosphoglycerate, 2,3-DPG)、Wortmannin、沙丁胺醇(salbutamol)或色甘酸钠(sodium cromoglycate)等^[47]。此外,从真菌 *Natrassia mangiferase* 中提取分离得到

结构相似的化合物 Sch 49210 和 Sch 53514(图 5),它们对 PLD 也有较强抑制作用,其中 Sch 53514 的抑制效果更强^[48]。

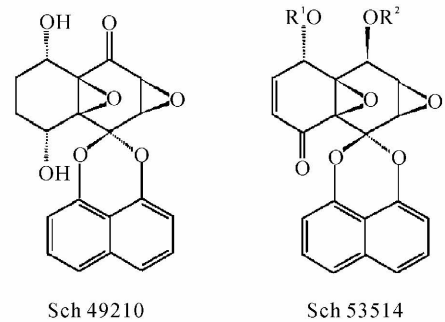


图 5 真菌 *Natrassia mangiferase* 中提取分离的磷脂酶 D 抑制剂^[48]

Fig. 5 PLD inhibitor extracted from *Natrassia mangiferase*^[48]

正丁醇是一种转磷脂酰反应的底物,被认为是 PLD 的特异性抑制剂^[47]。在短链伯醇(如正丁醇)存在情况下,PLD 优先催化 PC 与短链伯醇发生转磷脂酰基反应产生稳定的磷脂酰醇和水,许多研究就是利用此反应来抑制 PLD 的生理功能。研究表明,正丁醇和仲丁醇能不同程度地抑制烟草寄生疫霉分泌的蛋白激发子 ParA₁ 诱导的过敏细胞死亡,并且正丁醇的抑制效果比仲丁醇更好,二者的抑制效果具有浓度依赖效应,此外 PLD 抑制剂能部分抑制 ParA₁ 诱导的烟草悬浮细胞中过氧化氢和多酚的积累^[49]。正丁醇优先于水作为 PLD 的催化底物,通过转移磷脂酰反应生成磷脂酰丁醇,PA 合成受阻,出现了各种生理上的抑制或变化^[35]。Wortmannin 是 1957 年从 *Penicillium wortmannii* 中分离的类固醇代谢物,属于绿胶霉素家族,最早被认为是 PLD 的抑制剂,它作为 PLD 的上游抑制剂能抑制上游磷脂酰肌醇-3-激酶(PBK)的信号传导途径^[50]。2,3-DPG 是 PLD 的竞争性抑制剂,它们的作用机理不同,产生的结果可以互补^[51]。卢韵碧等比较了 1% 正丁醇,10 mmol/L 2,3-DPG 和 300 mmol/L Wortmannin 对 PLD 活性的影响,结果表明它们均能明显抑制 PLD 活性,且 2,3-DPG 的抑制作用最强^[52]。溶血磷脂衍生物,尤其溶血磷脂酰乙醇胺和溶血磷脂酰肌醇(lysophosphatidylinositol, LPI),可以降低草莓(*Fragaria ananassa*)果实呼吸而延长贮藏期,保持果实硬度,降低叶片组织的呼吸而保持外观,延迟衰老,并且可以通过抑制乙烯生成和膜脂降解而保护膜的完整性^[53]。

4 展望

PLD 在植物的整个生命过程中起重要作用,近年的研究重点为其跨膜信号转导功能,着重探讨了其在植物生长、发育、衰老以及环境胁迫过程中的调节作用。但由于膜磷脂代谢途径的复杂性,PLD 在调节特性、底物选择上的差异性,细胞内信号途径的多样性以及 PLD 基因表达的调控和酶功能作用机理的多重性,对 PLD 的研究仍然存在一些需要解决的问题。

研究表明不同的 PLD 有不同的功能,PLD 基因的表达在不同植物、同一植物不同细胞类型以及不同胞外信号间均具有特异性。对 PLD 的多型性鉴定、PLD 家族成员的纯化与生化功能、PLD 家族成员差异表达与组织细胞或生长阶段的相关性等方面的研究十分必要。如胁迫危害下磷脂酶 D 活性的增加,究竟是磷脂酶 D 家族的哪个成员起作用及如何起作用的。很多研究表明 PLD 同功酶 PLD α 和 PLD δ 对冻害胁迫表现出不同的响应,PLD δ 正调控冻害胁迫,而 PLD α 则在抗冻反应中起负调节作用,不同 PLD 对冷害和冻害的反应机理还有待于深入的研究。

早期对 PLD 功能的研究仅涉及到衰老、老化和胁迫伤害期间磷脂降解途径中 PLD 活性的变化,而关于 PLD 在细胞中催化和调控膜脂降解时信号转导的作用机制还不清楚。随着对 PLD 研究的深入,可望在 PLD 的功能方面和参与的信号转导方面取得更多可喜的成果。PLD 在烟草、拟南芥等模式植物中的研究相对比较成熟,但在其他植物上的研究比较少,而且主要也是磷脂酶本身的功能及作用机理等,没有真正在农业生产中应用。与其它酶的生产和应用相比还存在很大差距。

随着研究的逐渐深入,采用分子生物学、遗传操作、结构分析、基因组分析等先进技术手段,可以进一步深入研究 PLD 在细胞信号转导、激素作用的发挥、细胞防御反应、脂质代谢、胁迫伤害与衰老等方面的调控机制。PLD 基因是一个多功能基因,在植物育种上的应用潜力很大。首先,PLD 基因是植物本身所具有的基因,在整合和遗传等方面不存在或很少有异源基因出现;另外,利用它的多功能性,采用转基因技术、基因敲除技术等手段,在转化后代中可根据人们的需要,用不同的方法加以筛选,与常规育种结合起来可选育出抗病、抗寒、抗旱

或抗盐等单个性状或兼具多个性状的种质(或品种)来,以便在生产上推广应用。其次,应用分子生物学手段分析 PLD 家族成员在植物生长发育、衰老死亡过程中的作用,确定与植物不同生理阶段密切相关的关键 PLD 基因家族成员。如在对膜劣变相关 PLD 基因全长 cDNA 克隆的基础上,采用基因工程技术研究植物衰老与 PLD 基因特异性表达的关系,并通过活性抑制剂等外源信号/条件对其表达进行调控,从而达到调控植物衰老的目的,可为延缓水果、蔬菜、花卉等植物的衰老以及为抑制植物组织褐变提供新的思路。最后,前期对 PLD 的研究对植物育种、抗胁迫危害等方面开拓了良好的前景,在今后的工作中将现代分子生物学方法和基因工程技术等先进技术与传统方法相结合,对 PLD 实际应用的可行性进行研究,通过调控磷脂酶 D 的基因表达与活性,使其应用于农作物抗旱性、抗冻性以及果蔬储存等农业生产中,这将对 PLD 用于生产实践具有重大深远的意义,必将产生巨大的经济效益和社会效益。

参考文献

- [1] Wang X M. Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses [J]. *Plant Physiol*, 2005, 139(2): 566–573.
- [2] Wang T(王涛), Mei X R(梅旭荣), Zhong X L(钟秀丽), et al. Phospholipase D δ mediates the process of cold acclimation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Chin Bull Bot(植物学报)*, 2010, 45(5): 541–547.(in Chinese)
- [3] Hanahan D J, Chaicoff I L. A new phosphorus-containing lipids of the carrot [J]. *J Biol Chem*, 1947, 168(2): 233–240.
- [4] Heller M. Phospholipase D [J]. *Adv Lipid Res*, 1978, 16(4): 267–326.
- [5] Colley W C, Sung T, Roll R, et al. Phospholipase D2: A distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization [J]. *Curr Biol*, 1997, 7(3): 191–201.
- [6] Wang X, Xu L, Zheng L. Cloning and phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase D from castor bean [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(32): 20312–20317.
- [7] Lanteri M L, Laxalt A M, Lamattina L. Nitric oxide triggers phosphatidic acid accumulation via phospholipase D during auxin-induced adventitious root formation in cucumber [J]. *Plant Physiol*, 2008, 147(1): 188–198.
- [8] Yuan H Y, Chen L G, Paliyath G, et al. Characterization of microsomal and mitochondrial phospholipase D activities and cloning of a phospholipase D α cDNA from strawberry fruits [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2005, 43(6): 535–547.
- [9] Nakazawa Y, Sato H, Uchino M, et al. Purification, characterization

- and cloning of phospholipase D from peanut seeds [J]. *Protein J*, 2006, 25(3): 212–223.
- [10] Whitaker B D, Smith D L, Green K C. Cloning, characterization and functional expression of a phospholipase D α cDNA from tomato fruit [J]. *Physiol Plant*, 2001, 112(1): 87–94.
- [11] Su W J, Michael A F. Phospholipase D [M]// *Handbook of Cell Signaling*. New York: Academic Press, 2010: 1167–1176.
- [12] Wan S B, Wang W, Wen P F, et al. Cloning of phospholipase D from grape berry and its expression under heat acclimation [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2007, 40(4): 595–603.
- [13] Frank W, Munnik T, Kerkmann K, et al. Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* [J]. *Plant Cell*, 2000, 12(1): 111–124.
- [14] Marek O, Lydia B, Johanna M, et al. The transphosphatidylation potential of a membrane-bound phospholipase D from poppy seedlings [J]. *Phytochemistry*, 2011, 72(2/3): 160–165.
- [15] David G R. Plant Phospholipase D [M]. *Plant Cell Monographs*. Berlin: Springer, 2010: 39–62.
- [16] Li M Y, Hong Y Y, Wang X M. Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling in plants [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1791(9): 927–935.
- [17] Zhang W H, Yu L J, Zhang Y Y, et al. Phospholipase D in the signaling networks of plant response to abscisic acid and reactive oxygen species [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1736(1): 1–9.
- [18] Pinhero R G, Almquist K C, Novotna Z, et al. Developmental regulation of phospholipase D in tomato fruits [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2003, 41(3): 223–240.
- [19] Munnik T, van Himbergen J A J, ter Riet B, et al. Detailed analysis of the turn-over of polyphosphoinositides and phosphatidic acid upon activation of phospholipase C and D in *Chlamydomonas* cells treated with non-permeabilizing concentrations of mastoparan [J]. *Planta*, 1998, 207(1): 133–145.
- [20] Pappan K, Wang X M. Molecular and biochemical properties and physiological roles of plant phospholipase D [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1439(2): 151–166.
- [21] Munnik T, Musgrave A. Phospholipid signaling in plants: Holding on to phospholipases D [J]. *Sci STKE*, 2001, 111(12): 42–45.
- [22] Bargmann B O R, Munnik T. The role of phospholipase D in plant stress responses [J]. *Cur Opin Plant Biol*, 2006, 9(5): 515–522.
- [23] Hafsi C, Russo M A, Sgherri C, et al. Implication of phospholipase D in response of *Hordeum vulgare* root to short-term potassium deprivation [J]. *J Plant Physiol*, 2009, 166(5): 499–506.
- [24] Zhang C(张充), Jiang J Z(蒋继志), Liao X R(廖祥儒), et al. Phospholipase D in plants [J]. *Plant Physiol Commun(植物生理学通讯)*, 2005, 41(5): 691–697. (in Chinese)
- [25] Ali Y B, Carrière F, Abousalham A. High-level constitutive expression in *Pichia pastoris* and one-step purification of phospholipase D from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) [J]. *Protein Exp Puri*, 2007, 51(2): 162–169.
- [26] Tiwari K, Paliyath G. Cloning, expression and functional characterization of the C2 domain from tomato phospholipase D α [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2011, 49(1): 18–32.
- [27] Kim D U, Roh T Y, Lee J, et al. Molecular cloning and functional expression of a phospholipase D from cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1437(3): 409–414.
- [28] Forhman M A, Sung T C, Morris A J. Mammalian phospholipase D structure and regulation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1439(2): 175–186.
- [29] Wang X M. Plant phospholipases [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2001, 52(1): 211–231.
- [30] Qin C B, Wang X M. The *Arabidopsis* phospholipase D family: Characterization of a calcium-independent and phosphatidylcholine-selective PLD ζ 1 with distinct regulatory domains [J]. *Plant Physiol*, 2002, 128(3): 1057–1068.
- [31] Pappan K, Austin-Brown S, Chapman K D, et al. Substrate selectivities and lipidmodulation of plant phospholipase D α , - β , - γ [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1998, 353(1): 131–140.
- [32] Pappan K, Qin W, Dyer J H, et al. Molecular cloning and functional analysis of polyphosphoinositide-dependent phospholipase D, PLD β from *Arabidopsis* [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(18): 7055–7061.
- [33] Wang X M. Phospholipase D in hormonal and stress signaling [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5(5): 408–414.
- [34] Katagiri T, Takahashi S, Shinozaki K. Involvement of a novel *Arabidopsis* phospholipase D, AtPLD- δ , in dehydration-inducible accumulation of phosphatidic acid in stress signalling [J]. *Plant J*, 2001, 26(6): 595–605.
- [35] Todd J F, Paliyath G, Thompson J E. Effect of chilling on the activities of lipid degrading enzymes in tomato fruit microsomal membranes [J]. *Plant Physiol Biochem*, 1992, 30(7): 517–522.
- [36] Paliyath G, Lynch D V, Thompson J E. Regulation of membrane phospholipids catabolism in senescing carnation flowers [J]. *Physiol Plant*, 1987, 71(4): 503–511.
- [37] Deschene A, Paliyath G, Lougheed E C, et al. Membrane deterioration during postharvest senescence of broccoli florets: Modulation by temperature and controlled atmosphere storage [J]. *Postharv Biol Technol*, 1991, 1(1): 19–31.
- [38] McCormac D J, Todd J F, Paliyath G, et al. Modulation of bilayer fluidity affects lipid catabolism in microsomal membranes of tomato fruits [J]. *Plant Physiol Biochem*, 1993, 31(1): 1–8.
- [39] Duan X W, Liu T, Zhang D D, et al. Effect of pure oxygen atmosphere on antioxidant enzyme and antioxidant activity of harvested *Litchi* fruit during storage [J]. *Food Res Int*, 2011, 44(7): 1905–1911.
- [40] Gao H Y(郇海燕), Song L L(宋丽丽), Zhou Y J(周拥军), et al. Effects of hypobaric storage on quality and flesh leatheriness

- of cold-stored loquat fruit [J]. Trans CSAE(农业工程学报), 2008, 24(6): 245–249.(in Chinese)
- [41] Liu H, Song L L, You Y L, et al. Cold storage duration affects *Litchi* fruit quality, membrane permeability, enzyme activities and energy charge during shelf time at ambient temperature [J]. Postharv Biol Techn, 2011, 60(1): 24–30.
- [42] Qu H X(屈红霞), Jiang Y M(蒋跃明), Li Y B(李月标), et al. Respiration characteristics and quality changes of wampee fruits during storage [J]. Subtrop Plant Sci(亚热带植物科学), 2003, 32(3): 16–20.(in Chinese)
- [43] Gatto M A, Ippolito A, Linsalata V, et al. Activity of extracts from wild edible herbs against postharvest fungal diseases of fruit and vegetables [J]. Postharv Biol Techn, 2011, 61(1): 72–82.
- [44] Yang Z F(杨震峰), Zhu K H(朱克花), Chen W(陈伟), et al. Effect of ozone treatment on browning of Huanghua pear [J]. Food Sci(食品科学), 2010, 31(18): 401–404.(in Chinese)
- [45] Jandus J, Valentova O, Kas J, et al. Phospholipase D during tomato fruit ripening [J]. Plant Physiol Biochem, 1997, 35(2): 123–128.
- [46] Ryu S B, Karlsson B H, Özgen M, et al. Inhibition of phospholipase D by lysophosphatidylethanolamine: A lipid-derived senescence retardant [J]. Proc Natl Acad Sci, 1997, 94(23): 12717–12721.
- [47] Zhang H(张辉), Li Y H(李英华), Cao S S(曹彬彬), et al. Effect of phospholipase D inhibitor treatment on postharvest quality of strawberry fruits [J]. Chin Agri Sci Bull(中国农学通报), 2008, 24(5): 228–231.(in Chinese)
- [48] Gomez-Cambronero J, Keire P. Phospholipase D: A novel major player in signal transduction [J]. Cell Sig, 1998, 10(6): 387–397.
- [49] Wei F F(魏芳芳), Wang L(王蕾), Liang Y C(梁元存), et al. Effect of phospholipase D on induction of cell death, hydrogen peroxide and scopoletin accumulation in tobacco cells treated with ParA1 [J]. Chin J Biochem Mol Biol(中国生物化学与分子生物学报), 2010, 26(10): 949–954.(in Chinese)
- [50] Lennartz M R. Phospholipases and phagocytosis: The role of phospholipid derived second messengers in phagocytosis [J]. Int J Biochem Cell Biol, 1999, 31(3/4): 415–430.
- [51] Kanaho Y, Nakai Y, Katoh M, et al. The phosphatase inhibitor 2, 3-diphosphoglycerate interferes with phospholipase D activation in rabbit peritoneal neutrophils [J]. J Biol Chem, 1993, 268(17): 12492–12497.
- [52] Lu Y B(卢韵碧), Jiang B(江波), Zhou H L(周汉良). Effects of salbutamol and sodium cromoglicate on phospholipase D activity during the degranulation of rat peritoneal mast cell [J]. Chin J Pharmac Toxicol(中国药理学与毒理学杂志), 2001, 15(5): 366–371.(in Chinese)
- [53] Wang Y(王寅), Zhu Z M(朱再明), Liu Y(刘彦). Recent advances in phospholipase inhibitors [J]. Proc Chem(化学进展), 1998, 10(3): 296–304.(in Chinese)