

О.Н. ЯКОВЕНКО¹, С.В. КРЕТИНИН¹,
Е.М. КАБАЧЕВСКАЯ², Г.В. ЛЯХНОВИЧ²,
Д.И. ВОЛОТОВСКИЙ², В.С. КРАВЕЦ²

¹ Институт биоорганической химии и нефтехимии
НАН Украины
ул. Мурманская, 1, г. Киев, 02094, Украина
yon@bpci.kiev.ua

² Институт биофизики и клеточной инженерии
НАН Беларуси
ул. Академическая, 27, г. Минск, 220072, Беларусь
lmbc@biobel.bas-net.by

РОЛЬ ФОСФОЛИПАЗЫ С В РЕГУЛЯЦИИ РАБОТЫ УСТЬИЧНОГО АППАРАТА АБСЦИЗОВОЙ КИСЛОТОЙ

Ключевые слова: *Pisum sativum L.*, абсцизовая кислота, фосфолипаза С, неомицин

Среди защитных реакций, предотвращающих повреждение растительного организма неблагоприятными условиями окружающей среды, особого внимания заслуживает тонкая регуляция активности устьичного аппарата, обеспечивающая поддержание баланса расходования воды в результате транспирации и поступления необходимого для фотосинтеза CO_2 . Замыкающие клетки способны точно регулировать размер устьичного отверстия в ответ на влияние широкого спектра экзогенных и эндогенных факторов, таких как свет [2], концентрация CO_2 [35], действие фитогормонов [1], в том числе абсцизовой кислоты (АБК) [2], а также активных форм кислорода [26]. Однако вопрос о том, как растения дифференцируют эти сигналы для коррекции размера устьиц в соответствии с ними, до сих пор мало изучен.

АБК вызывает замыкание устьиц и способствует удержанию их в закрытом состоянии, что защищает растения от значительных потерь влаги в условиях водного дефицита. Связывание АБК с трансмембранным рецептором активирует цепь реакций, приводящих к быстрым изменениям работы ионных каналов и последующей регуляции экспрессии генов. Неотъемлемым компонентом сигнального каскада АБК выступает фосфатидилинозитолспецифичная фосфолипаза С (ФИ-ФЛС), гидролизующая фосфатидилинозитол 4,5 бифосфат (ФИ(4,5) F_2) с образованием сигнальных молекул: 1,4,5-инозитолтрифосфата (ИФ₃) и диацилглицерола (ДАГ) [5, 13]. Активация ФИ-ФЛС играет важную роль в широком спектре физиологических процессов, обеспечивающих адаптацию растительного организма к стрессовым факторам окружающей среды, таким как засоление [6], переохлаждение [32] и засуха [7, 31]. Ранее мы показали изменения метаболизма фосфоинозитидов под воздействием холодового стресса, который вызывал резкое повышение

© О.Н. ЯКОВЕНКО, С.В. КРЕТИНИН, Е.М. КАБАЧЕВСКАЯ, Г.В. ЛЯХНОВИЧ,
Д.И. ВОЛОТОВСКИЙ, В.С. КРАВЕЦ, 2008

количества ИФ₃ сопровождающееся уменьшением концентрации ФИ(4,5)Ф₂ и его предшественника — фосфатидилинозитол — 4 — монофосфата [3, 4]. Известно, что ФИ-ФЛС вовлекается в процессы регуляции активности устьичных клеток АБК [5, 19]. Однако определить роль этого фермента и составить целостную картину участия его продуктов в сигнальной сети АБК до сих пор не удаётся. Для изучения роли ФИ-ФЛС в регуляции движения устьиц был использован неомицин, способный связываться с субстратом ФИ-ФЛС — ФИ(4,5)Ф₂ и прерывать сигнал, опосредованный этим ферментом.

Материалы и методы исследований

Исследования устьичных движений проводили на 10—15-дневных растениях *Pisum sativum* L.

Активирование закрывания устьиц АБК. Эпидермис с абаксиальной поверхности полностью сформированных листьев, выдержанный 1 час на свету в растворе, приготовленном на 10 мМ Трис рН 6,15 и содержащем 10 мМ КСl, без СО₂, переносили в свежий раствор того же состава с добавлением 10 мкМ АБК и/или 1 мМ неомицина.

Ингибирование открывания устьиц АБК. Эпидермис выдерживали 2 часа в темноте в растворе без СО₂, приготовленном на 10 мМ Трис рН 6,15, содержащем 10 мМ КСl, после чего переносили на свет в свежем растворе того же состава с 10 мкМ АБК и/или 1 мМ неомицина.

Измерение ширины устьичной апертуры проводили на 2-й, 3-й и 4-й часы воздействия. Исследовали также активирование закрывания и ингибирование открывания устьиц при предварительной обработке в течение 30 мин. АБК (10 мкМ) или 1 мМ неомицина (Трис рН 6,15, 10 мМ КСl, без СО₂) на втором часу воздействия АБК и света.

Размер устьичной апертуры измеряли с помощью окулярного винтового микрометра МОВ-1-16х, установленного на световой микроскоп Granum R 40. Объектив × 100, окуляр × 16.

Результаты исследований и их обсуждение

Изучать роль ФЛС как *in vivo*, так и *in vitro* достаточно сложно: уровень ФИ(4,5)Ф₂ в организме высших растений очень низок, а зарегистрировать присутствие ИФ₃ с помощью тонкослойной хроматографии практически не удаётся [29]. Большинство исследований сигналинга ФЛС основано на использовании ингибиторов этого фермента. Так, ФИ-ФЛС-специфичный ингибитор U-73122 блокирует повышение концентрации ионов внутриклеточного кальция и препятствует АБК-индуцированному закрытию устьиц [30]. С помощью аминокликозида неомицина, который связывается с субстратом ФЛС — ФИ(4,5)Ф₂, при исследовании роли ФЛС в адаптации растений гороха к действию теплового стресса было установлено вызванное этим веществом угнетение активности ФЛС и снижение термотолерантности растений [20]. В лаборатории Т. Муника неомицин использовали в качестве ингиби-

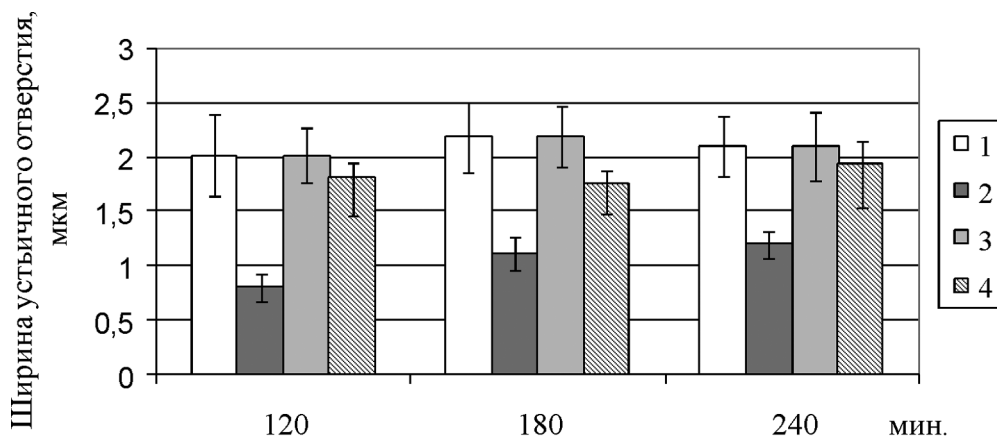


Рис. 1. Изменения ширины устьичной щели абаксиального эпидермиса растений *Pisum sativum* L. абсцизовой кислотой на 120, 180 и 240 минутах воздействия. Тут и на рисунках 2–4: 1 — контроль (10 мМ Трис pH 6,15; 10 мМ KCl); 2 — АБК (АБК 10 мкМ; Трис 10 мМ, pH 6,15; KCl 10 мМ); 3 — неомицин (неомицин 1 мМ; Трис 10 мМ, pH 6,15; KCl 10 мМ); 4 — АБК + неомицин (АБК 10 мкМ; неомицин 1 мМ; Трис 10 мМ, pH 6,15; 10 мМ KCl)

Fig. 1. Stomata width (mkm) of abaxial epidermal strips of *Pisum sativum* L. plants changing after 120, 180 and 240 minutes of ABA treatment. Here and on the figures 2–4: 1 — control (10 mM Tris pH 6,15; 10 m M KCl); 2 — ABA (ABA 10 μ M; 10 mM Tris pH 6,15; 10 mM KCl); 3 — neomycin (neomycin 1 mM; 10 mM Tris pH 6,15; 10 mM KCl); 4 — ABA + neomycin (ABA 10 μ M; neomycin 1 mM; 10 mM Tris pH 6,15; 10 mM KCl)

тора ФЛС для исключения её участия в регуляции реорганизации микротубулина фосфолипазой Д [9]. Во время изучения ФЛД и ФЛС было показано, что неомицин вызывает угнетение образования диацилглицерола в листьях пшеницы [33].

Для исследования регуляции движения устьиц АБК эпидермис с абаксиальной поверхности листьев гороха помещали в раствор, содержащий 10 мкМ АБК. Через 2 часа воздействия АБК наблюдалось уменьшение устьичного отверстия на 47 %. Эффект сохранялся в дальнейшем: размер устьичных пор в течение 3-х и 4-х часов воздействия фитогормона составлял 67 и 60 % от уровня контроля (рис. 1). При активации открывания устьиц под воздействием света устьичные отверстия эпидермиса, обработанного АБК, были меньше контрольных на 26, 43 и 38 % на 2-й, 3-й и 4-й часы действия АБК соответственно (рис. 2). В ходе исследований влияния 1 мМ неомицина на способность АБК вызывать закрывание (рис. 1) и тормозить открывание устьиц под воздействием света (рис. 2) мы показали, что в обоих случаях размер устьичного отверстия был достоверно выше, чем под воздействием только АБК, практически достигая уровня контроля.

Движение устьиц под воздействием АБК в значительной мере регулируется с помощью увеличения уровня Ca^{2+} в цитозоле вследствие активации Ca^{2+} -каналов на плазматической мембране и мембране тонопласта [26]. Цитозольный Ca^{2+} является одним из ключевых интермедиаторов, увеличение

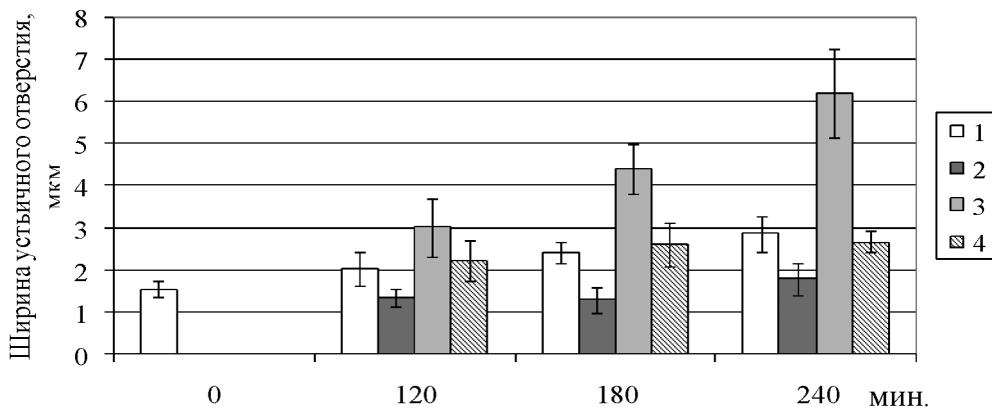


Рис. 2. Угнетение свет-индуцированного открывания устьиц абсцизовой кислотой (10 мкМ) в течение 120, 180 и 240 минут воздействия фитогормона

Fig. 2. Inhibition of the light-induced stomata opening by ABA (10 μ M) after 120, 180 and 240 minutes of treatment

концентрации которого инициирует выход анионов из клетки и деполяризацию мембраны, что ингибирует каналы, по которым K^+ поступает внутрь клетки, и активирует каналы, высвобождающие этот ион наружу [34]. Участие фосфоинозитид-специфической ФЛС в сигнальных каскадах АБК устьичных клеток заключается, возможно, в мобилизации ионов Ca^{2+} [6]. В АБК-индуцированном открытии устьиц участвует продукт ФИ-ФЛС — инозитолтрифосфат, который вызывает высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо [30]. Так показано индукцию образования ИФ₃ абсцизовой кислотой при активации ФЛС в клетках листьев *Arabidopsis thaliana* L. [36]. U-73122 угнетает повышение концентрации ионов внутриклеточного кальция и блокирует вызванное АБК закрытие устьиц [30]. Ранее мы установили *in vivo*, что АБК вызывает резкое увеличение количества ИФ₃ в листьях кукурузы, сопровождающееся уменьшением ФИ(4,5)Ф₂, что свидетельствует об активации ФЛС. Также мы показали образование ФИ(4,5)Ф₂ из ФИ(4)Ф [15, 16]. Эти факты свидетельствуют об активации ФЛС уже в первые минуты действия АБК и участии данного фермента на очень ранних этапах этого сигнального каскада.

Другой продукт активности ФИ-ФЛС, ДАГ, может фосфорилироваться с образованием липидного сигнального мессенджера — фосфатидной кислоты (ФК) [27]. В протопласте замыкающих клеток под воздействием АБК активируется фосфолипаза Д, что также приводит к повышению уровня фосфатидной кислоты. ФЛС и ФЛД могут действовать параллельно и источником ФК может быть как активность ФЛД, так и диацилглицеролкиназы [17]. Таким образом, повышение уровня ФК является следствием активации ФЛД и фосфорилирования продукта активности ФЛС — диацилглицерола. Участие ФЛС в образовании ФК было доказано с помощью неомицина [10].

Однако оказалось также, что на 3-м и 4-м часу действия неомицин увеличивает ширину устьичной щели, в то время как влияния на уже открытые

устыца практически не наблюдается (рисунки 1, 2). Таким образом, на данном этапе мы можем сделать вывод о влиянии неомидина (значит, и участия ФЛС) на трансдукцию сигнала АБК только во время процесса ингибирования этим гормоном открывания устьиц. Ранее высказывалось предположение о том, что ФЛС участвует главным образом в сигнальных каскадах АБК, удерживающих устьица в закрытом состоянии [13]. С помощью трансгенных растений, обладающих низким уровнем ФЛС в клетках устьиц, было показано, что этот фермент участвует в сигнальных каскадах, связанных с угнетением открывания устьиц абсцизовой кислотой, но не в реакциях, отвечающих за закрытие устьиц [14]. С другой стороны, в клетках *Vicia faba* L., экспрессирующих белок, способный связывать субстрат и продукт ФЛС, наблюдается частичная потеря способности устьиц к закрытию под воздействием АБК [24]. Причиной таких расхождений может быть специфичность каскада в зависимости от вида растений, а также существование различных изоформ ФИ-ФЛС или отличия между краткосрочным действием ингибитора и долгосрочным эффектом генетических манипуляций.

Для того чтобы выяснить, нарушает ли неомидин передачу сигнала АБК или он действует по параллельному пути, повреждая другие механизмы регуляции движения устьиц, мы использовали предварительную обработку неомидином и АБК в течении 30 мин. и исследовали изменения регуляции движения устьиц после 2 часов воздействия АБК. При 30-ти минутной обработке неомидином, предшествующей воздействию АБК, было показано ослабление влияния фитогормона как на процессы закрывания устьиц, так и удержания их в закрытом состоянии (рисунки 3, 5). В то же время на клетки устьиц эпидермиса, предварительно обработанного АБК в течение 30 мин., введение неомидина практически не влияло (рисунки 4, 6). Эти данные свидетельствуют о нарушении неомидином передачи сигнала АБК, что подтверждает участие ФЛС в каскадах АБК, обеспечивающих как процессы закрытия устьиц, так и удержания их в закрытом состоянии. Экспрессия генов ФЛС происходит во время дегидратации, солевого и низкотемпературного стрессов [11, 12]. Ранее было показано, что гиперосмотический стресс вызывает быстрое кратковременное повышение уровня ИФ₃ в результате активации ФИ-ФЛС в культуре клеток *Arabidopsis thaliana* [31]. Существует мнение, что активация ФЛС и увеличение уровня ИФ₃ необходимы для усиления первичного ответа и максимальной экспрессии генов под воздействием АБК [13, 28].

В клетках животных ФИ(4,5)Ф₂ является сигнальной молекулой, участвующей в регуляции концентрации ионов К⁺[18]. Возможно, что и в устьичных клетках ФИ(4,5)Ф₂ выполняет подобную роль. Осмотический стресс приводит к быстрому усилению синтеза ФИ(4,5)Ф₂ в растениях *Arabidopsis thaliana* [8], которое сопровождается увеличением уровня транскрипции фосфатидилинозитолкиназы, синтезирующей ФИ(4,5)Ф₂ [23]. ФИ(4,5)Ф₂ также является важной сигнальной молекулой, участвующей в различных процессах, таких как рост пыльцевых трубок [25], ответ на солевой и осмо-

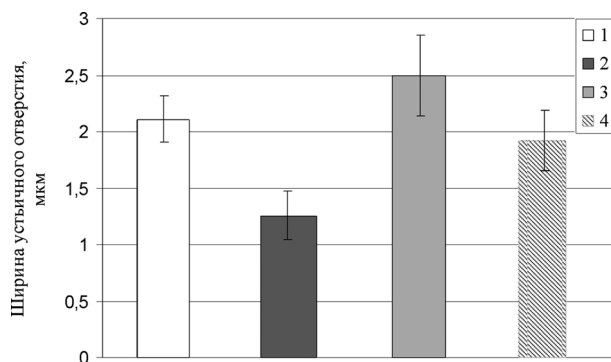


Рис. 3. Изменения ширины устьичного отверстия под воздействием АБК и/или неомицина (2 часа) в условиях предварительной обработки неомицином (1 мМ, 30 мин.)

Fig. 3. Stomata width (mkm) changing under ABA (10 mM, 2 hours) or/and neomycin (1 mM, 2 hours) treatment after 30 minutes of neomycin pretreatment (1 mM, 30 min.)

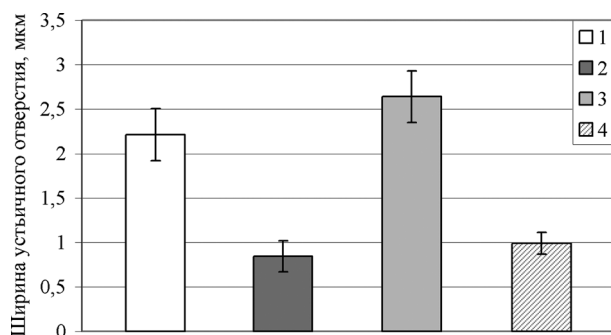


Рис. 4. Изменения ширины устьичного отверстия под воздействием АБК и/или неомицина (2 часа) в условиях предварительной обработки АБК (10 мкМ, 30 мин.)

Fig. 4. Stomata width (mkm) changing under ABA (10 mM, 2 hours) or/and neomycin (1 mM, 2 hours) treatment after 30 minutes of ABA pretreatment (10 mM, 30 min.)

тический стрессы [8], везикулярный транспорт [22], реорганизация актина и регуляция активности ионных каналов [20]. АБК активирует Ca^{2+} -зависимый поток вакуолярных ионов через каналы, которые поддерживаются в закрытом состоянии при взаимодействии с актином [21]. Белок, связывающий $FI(4,5)P_2$, ингибирует индуцированное светом открывание устьиц, вызывая снижение уровня свободного $FI(4,5)P_2$ и уменьшение образования FI_3 и FK фосфолипазами С и Д, что в конечном итоге приводит к остановке вызванного АБК процесса закрывания устьиц [19].

Таким образом, на основании полученных нами результатов и анализа литературных данных можно утверждать, что FI - FLC является неотъемлемым компонентом сигнального каскада АБК, поскольку она участвует как в синтезе важнейших молекулярных посредников IF_3 и $ДАГ$ — предшественника фосфатидной кислоты, так и регуляции количества $FI(4,5)P_2$, регулируя состояние мембранных каналов устьичных клеток. При этом активация

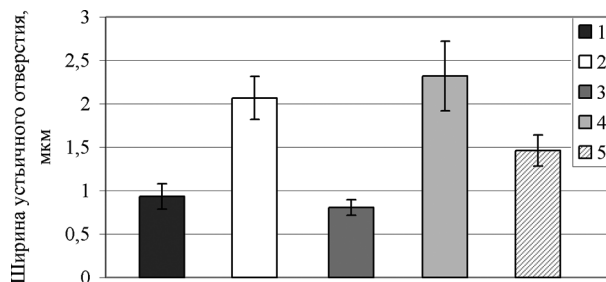


Рис. 5. Угнетение свет-индуцированного открывания устьиц абсцизовой кислотой (10 мкМ, 2 часа) при предварительной обработке неомицином (1 мМ, 30 мин.). Тут и на рис. 6: 1 — закрытие устьиц при отсутствии света; 2 — ширина устьичной апертуры после 2 часов освещения (10 мМ Трис pH 6,15; 10 мМ KCl); 3 — освещение 2 часа; АБК 10 мкМ; Трис 10 мМ, pH 6,15; KCl 10 мМ; 4 — освещение 2 часа; неомицин 1 мМ; Трис 10 мМ, pH 6,15; KCl 10 мМ); 5 — освещение 2 часа; АБК 10 мкМ; неомицин 1 мМ; Трис 10 мМ, pH 6,15; 10 мМ KCl

Fig. 5. Inhibition of the light-induced stomata opening by ABA (10 mM), after 30 minutes of neomycin pretreatment (1 mM). Here on the fig. 6: 1 — dark, closed stomata (10 mM Tris pH 6,15; 10 mM KCl); 2 — stomata width (mkm) after 2 hours of lighting (10 mM Tris pH 6,15; 10 mM KCl); 3 — lighting, 2 hours; ABA 10 μ M; 10 mM Tris pH 6,15; 10 mM KCl, 4 — lighting, 2 hours; neomycin 1 mM; 10 mM Tris pH 6,15; 10 mM KCl, 5 — lighting, 2 hours; ABA 10 μ M; neomycin 1 mM; 10 mM Tris pH 6,15; 10 mM KCl

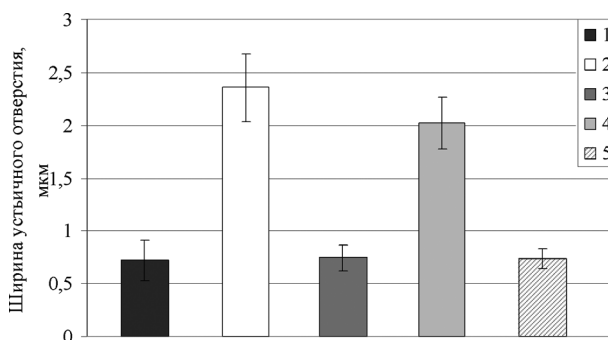


Рис. 6. Ингибирование свет-индуцированного открывания устьиц абсцизовой кислотой (10 мкМ, 2 часа) при обработке в течение 30 мин. АБК

Fig. 6. Inhibition of the light-induced stomata opening by ABA (10 μ M) after 30 minutes of ABA pretreatment (1 μ M)

ция ФЛС уже на ранних этапах действия АБК свидетельствует о её роли в формировании первичных адаптационных реакций растительного организма, включающих регуляцию движения устьиц в ответ на воздействие АБК.

Работа выполнена при поддержке Фонда фундаментальных исследований Украины № Ф10/24-2005, Ф14.4/253-2007 и Беларускаго республіканскаго фонда фундаментальных исследований № Б05К-108.

1. Ситник К.М., Мусатенко Л.І., Васюк В.А. та ін. Гормональний комплекс рослин і грибів. — К.: Ін-т ботан. ім. М.Г. Холодного НАН України, Академперіодика, 2003. — 186 с.
2. Assmann S.M., Shimazaki K. The multisensory guard cell. Stomatal response to blue light and abscisic acid // *Plant Physiol.* — 1999. — **119**. — P. 809—815.
3. Bucolova T.P., Volovik N.V., Kravets V. Phosphatidylinositols changes in winter wheat in response to cold shock // Fifth International Plants Cold Hardiness Seminar, Oregon, USA, 5—8 Aug. 1996. — P. 42.
4. Bucolova T.P., Volovik N.V., Kravets V.S. A possible role of phosphatidylinositols in transduction of temperature signal in winter // *Biol. plant.* — 1994. — **36**. — P. 45.
5. Burnette R.N., Gunesekeera B.M., Gillaspay G.E. An Arabidopsis inositol 5-phosphatase gain-of-function alters abscisic acid signaling // *Plant Physiol.* — 2003. — **132**. — P. 1011—1019.
6. Cousson A. Two calcium mobilizing pathways implicated within abscisic acid-induced stomatal closing in *Arabidopsis thaliana* // *Biologia Plantarum.* — 2007. — **51**, № 2. — P. 285—291.
7. Das S., Hussain A., Bock C. et al. Cloning of *Brassica napus* phospholipase C2 (BnPLC2), phosphatidylinositol 3-kinase (BnVPS34) and phosphatidylinositol synthase1 (BnPtdIns S1) — comparative analysis of the effect of abiotic stresses on the expression of phosphatidylinositol signal transduction — related genes in *B. napus* // *Planta.* — 2005. — **220**. — P. 777—784.
8. Dewald D.B., Torabinejad J., Jones C.A. 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**. — P. 759—769.
9. Dhonukshe P., Laxalt A. M., Goedhart J. et al. Phospholipase D Activation Correlates with Microtubule Reorganization in Living Plant Cells // *The Plant Cell.* — November 2003. — **15**. — P. 2666—2679.
10. Hartog M., Verhoef N., Munnik T. Nod factor and elicitors activate different phospholipid signaling pathways in suspension-cultured alfalfa cells // *Plant Physiol.* — 2003. — **132**. — P. 311—317.
11. Hirayama T., Mitsukawa N., Shibata D., Shinozaki K. AtPLC2, a gene encoding phosphoinositide-specific phospholipase C, is constitutively expressed in vegetative and floral tissues in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Mol. Biol.* — 1997. — **34**. — P. 175—180.
12. 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. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1995. — **92**. — P. 3903—3907.
13. Hunt L., Mills L.N., Pical C. et al. Phospholipase C is required for the control of stomatal aperture by ABA // *Plant J.* — 2003. — **34**, № 1. — P. 47—55.
14. Hunt L., Otterhag L., Lee J. C. et al. Gene-specific expression and calcium activation of *Arabidopsis thaliana* phospholipase C isoforms // *New Phytologist.* — 2004. — **162**. — P. 643—654.
15. Iakovenko O. M., Kretynin S.V., Kravets V.S. The effects in vivo of abscisic acid on phospholipases C activity of maize leaves // FESP XV Congress Federation of European Societies of Plant Biology 17—21 July, 2006, Lyon (France) — P. HOR01-032.
16. Iakovenko O.M., Kretynin S.V., Kabachevskaya E.M. et al. Role of phospholipase C in ABA signal transduction // 2nd International Symposium Plant Growth Substances: Intracellular Hormonal Signaling and Applying in Agriculture, 8—12 October, 2007, Kyiv (Ukraine). — P. 84.
17. Jacob T., Ritchie S., Assmann S.M. and Gilroy S. Abscisic acid signal transduction in guard cells is mediated by phospholipase D activity // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1999. — **96**. — P. 12192—12197.
18. Kobrinsky E., Mirshahi T., Zhang H. et al. Receptor-mediated hydrolysis of plasma membrane messenger PIP₂ leads to K⁺-current desensitization // *Nat. Cell Biol.* — 2000. — **2**, № 8. — P. 507—514.
19. Lee Y., Kim Y.-W., Jeon B.W. et al. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate is important for stomatal opening // *Plant J.* — 2007. — **5**, № 5. — P. 803—816.

20. Liu H.T., Huang W.D., Pan Q.H. et al. Contributions of PIP₂-specific-phospholipase C and free salicylic acid to heat acclimation-induced thermotolerance in pea leaves // *Plant Physiol.* — 2006. — **163**, № 4. — P. 405–416.
21. MacRobbie Enid A.C., Kurup S. Signalling mechanisms in the regulation of vacuolar ion release in guard cells // *New Phytologist.* — 2007. — **175**. — P. 630–640.
22. Martin T.F. PI(4,5)P₂ regulation of surface membrane traffic // *Curr. Opin. Cell Biol.* — 2001. — **13**. — P. 493–499.
23. Mikami K., Katagiri T., Iuchi S. et al. A gene encoding phosphatidylinositol- 4-phosphate 5-kinase is induced by water stress and abscisic acid in *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.* — 1998. — **15**. — P. 563–568.
24. Mills L.N., Hunt L., Leckie C.P. et al. The effects of manipulating phospholipase C on guard cell ABA-signalling // *Journ. of Exp. Biology.* — 2004. — **55**. — P. 199–204.
25. Monteiro D., Liu Q., Lisboa S. et al. Phosphoinositides and phosphatidic acid regulate pollen tube growth and reorientation through modulation of [Ca²⁺]_c and membrane secretion // *J. Exp. Bot.* — 2005. — **56**. — P. 1665–1674.
26. Pei Z.M., Murata Y., Benning G. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells // *Nature.* — 2000. — **406**. — P. 731–734.
27. Ruelland E., Cantrel C., Gawer M. Activation of phospholipases C and D is an early response to a cold exposure in *Arabidopsis* suspension cell. // *Plant Physiol.* — 2002. — **130**. — P. 999–1007.
28. Sanchez J.P., Chua N.H. *Arabidopsis* PLC1 is required for secondary responses to abscisic acid signals // *Plant Cell.* — 2001. — **13**. — P. 1143–1154.
29. Smolenska-Sym G., Kacperska A. Inositol 1,4,5-trisphosphate formation in leaves of winter oilseed rape plants in response to freezing, tissue water potential and abscisic acid // *Plant Physiol.* — 1996. — **96**. — P. 692–698.
30. Staxen I., Pical C., Montgomery L.T. et al. Abscisic acid induces phosphoinositide-specific phospholipase C-dependent oscillations in guard cell cytosolic free calcium // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1999. — **96**. — P. 1779–1784.
31. Takahashi S., Katagiri T., Hirayama T. et al. 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**. — P. 214–222.
32. Vergnolle C., Vaultier M.N., Taconnat L. et al. The cold-induced early activation of phospholipases C and D pathways determines the response of two distinct clusters of genes in *Arabidopsis* suspension cell // *Plant Physiol.* — 2005. — **139**. — P. 1217–1233.
33. Wang H.Y., Xu Y.N. Phosphatidylglycerol degradation is one crucial reason for the decrease of its concentration in wheat leaves under phosphate deprivation stress // *Plant Growth Regul.* — 2006. — **49**. — P. 105–112.
34. Ward J.M., Schroeder J.I. Calcium-activated K⁺ channels and calcium induced calcium release by slow vacuolar ion channels in guard cell vacuoles implicated in the control of stomatal closure // *Plant Cell.* — 1994. — **6**. — P. 669–683.
35. Webb A.R., McAinsh M.R., Mansfield T.A., Hetherington A.M. Carbondioxide induces increases in guard cell cytosolic free calcium // *Plant Journal.* — 1996. — **9**. — P. 287–304.
36. Xiong L., Lee B., Ishitani M. et al. *FIERY1* encoding an inositol polyphosphate 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in *Arabidopsis* // *Genes & development.* — 2001. — **15**. — P. 1971–1984.

Рекомендує в печать
Л.И. Мусатенко

Поступила 26.06.2008

О.М. Яковенко¹, С.В. Кретинін¹, Є.М. Кабачевська², Г.В. Ляхнович²,
Д.І. Волотовський², В.С. Кравець¹

¹ Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, м. Київ

² Інститут біофізики та клітинної інженерії НАН Беларусі, м. Мінськ

РОЛЬ ФОСФОЛІПАЗИ С У РЕГУЛЯЦІЇ РОБОТИ ПРОДИХОВОГО АПАРАТУ АБСЦИЗОВОЮ КИСЛОТОЮ

Для дослідження ролі ФІ-ФЛС в АБК-сигналізації продихових клітин епідермісу листків гороху використовували неоміцин, інгібітор ФІ-ФЛС. АБК спричинює закриття відкритих продихів і пригнічує їх відкривання, індуковане світлом. Розмір продихів епідермісу, обробленого АБК разом з неоміцином, збільшувався до рівня контролю. Екзогенне додавання неоміцину призводить до відкриття продихів, припиняє закривання продихів АБК, порушує здатність АБК пригнічувати відкривання продихів за дії світла. Попередня обробка неоміцином порушувала чутливість продихів до сигналу АБК. Крім того, епідерміс, попередньо оброблений АБК, втрачав чутливість до дії неоміцину. Ці результати підтверджують висновок щодо участі ФІ-ФЛС у клітинних реакціях, відповідальних за АБК-індуковане закривання продихів та у подіях, пов'язаних з інгібуванням відкриття продихів АБК.

Ключові слова: *Pisum sativum L., абсцизова кислота, фосфоліпаза С, неоміцин.*

О.М. Iakovenko¹, S.V. Kretynin¹, E.M. Kabachevskaya², G.V. Lyakhnovich²,
D.I. Volotovskii², V.S. Kravets¹

¹ Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry,
National Academy of Science of Ukraine, Kyiv

² Institute of Biophysics and Cell Engineering,
National Academy of Sciences of Belarus, Minsk

ROLE OF PHOSPHOLIPASE C IN ABA REGULATION OF STOMATA FUNCTION

We used neomycin, a PI-PLC inhibitor, to investigate the contribution of PI-PLC to ABA signaling in guard cell of epidermal pea leaves strips. ABA promotes closing of open stomata and inhibits the light-induced opening of closed stomata. The aperture size of stomata epidermal peels treated with ABA combined with neomycin was increased compared to the control level. Exogenously added neomycin induced stomata opening, reduced stomata closing by ABA, and inhibited ABA ability to suppress stomata opening. Pretreatment by neomycin impair increased stomata sensitiveness to the ABA signal. Furthermore, guard cells of epidermis treated by ABA were not sensitive to neomycin. The above-mentioned results may indicate that PI-PLC plays a role in the signaling events associated with the inhibition of stomata opening by ABA and cellular reactions that are responsible for ABA-induced stomata closure.

Key words: *Pisum sativum, phospholipase C, abscisic acid, neomycin.*