

УДК: 611.018.11:581.43:582.542.11:581.526.52

## ДІЯ АДАПТОГЕННИХ ПРЕПАРАТІВ НА АКТИВНІСТЬ ВАКУОЛЯРНИХ ПРОТОННИХ НАСОСІВ У КЛІТИНАХ КОРЕНІВ КУКУРУДЗИ В УМОВАХ СОЛЬОВОГО СТРЕСУ

Ж. І. РИБЧЕНКО, Т. О. ПАЛЛАДІНА

*Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, Київ;  
e-mail: zhanna\_bio@ukr.net; tatiana\_palladina@ukr.net*

*Досліджено участь двох електрогенних  $H^+$ -насосів, механізми яких репрезентовано  $H^+$ -АТР-азою V-типу та  $H^+$ -пірофосфатазою ( $H^+$ -PP<sub>n</sub>-азою), у створенні електрохімічного потенціалу на вакуолярній мембрані (тонопласті) рослинних клітин в умовах сольового стресу та за дії адаптогенних препаратів Метіур та Івін. Гідролітичну і транспортувальну активність цих ензимів визначали на препаратах тонопласта, ізольованих із коренів проростків кукурудзи, експонованих у присутності 0,1 М NaCl протягом 1 або 10 діб.*

*У контрольному варіанті транспортувальна активність  $H^+$ -PP<sub>n</sub>-ази є набагато вищою, ніж  $H^+$ -АТР-ази, хоча й дещо знижується з віком проростків. Це свідчить про перевагу внеску  $H^+$ -насоса, репрезентованого  $H^+$ -PP<sub>n</sub>-азою, у створенні мембранного потенціалу на тонопласті. Сольова експозиція проростків призводить до зниження як активності  $H^+$ -АТР-ази, так і  $H^+$ -PP<sub>n</sub>-ази, тоді як транспортувальна активність  $H^+$ -АТР-ази, навпаки, посилюється, супроводжуючись послабленням гідролітичної. Обробка насіння препаратами, переважно Метіуром, призводить до зростання транспортувальної активності  $H^+$ -АТР-ази, особливо в умовах сольової експозиції, посилюючись із подовженням її терміну, тоді як транспортувальна активність  $H^+$ -PP<sub>n</sub>-ази не зазнає істотних змін. Одержані результати доводять провідну роль  $H^+$ -насоса тонопласта, репрезентованого  $H^+$ -АТР-азою, у відповіді рослинних клітин в умовах сольового стресу, а також його вірогідну участь у механізмі адаптогенної дії синтетичних препаратів.*

*Ключові слова: засолення, транспортувальна та гідролітична активність  $H^+$ -АТР-ази,  $H^+$ -PP<sub>n</sub>-ази, тонопласт, Метіур, Івін.*

**Д**ослідження мінерального живлення рослин належить до головних напрямів фітобіології, в якому останнім часом велику увагу приділяють негативному впливу іонів, зокрема важких металів і натрію.

Адаптація до стресів, спричинених іонами, на рівні цілого організму полягає в обмеженні надходження їх в молоді тканини, а на клітинному — здійснюється шляхом неприпущення їх накопичення в цитоплазмі. Тому з'ясування механізмів активного видалення іонів до позаклітинного та вакуолярного простору є не лише цікавим для фундаментальної науки, але й необхідним для створення способів посилення стійкості рослин до іонних стресів.

Засолене середовище для рослин є одним із найсильніших стресорних чинників, що порушує іонний баланс, супроводжуючись токсичним впливом натрію як головного катіона в солях, що засолюють ґрунти.

Протилежне ставлення тваринних і рослинних організмів до  $Na^+$  зумовлене при-

родою іонних насосів, які функціонують у плазматичних мембранах клітин. У перших електрохімічний потенціал створюється електрогенним  $Na^+$ -насосом, репрезентованим  $Na^+$ , $K^+$ -АТР-азою E1-, E2-типу, а у других — електрогенним  $H^+$ -насосом, репрезентованим  $H^+$ -АТР-азою (3.6.3.6) також E1-, E2-типу. Тому  $Na^+$  для тварин є життєво необхідним елементом, тоді як для рослин непотрібним, а у разі підвищення його концентрації — токсичним іоном [1].  $Na^+$  потрапляє в корені пасивно, долаючи плазмалемі епідермальних клітин каналами для калію, чим перешкоджає надходженню останнього. Низька концентрація  $Na^+$  в цитоплазмі підтримується шляхом його активного видалення крізь плазматичну мембрану (плазмалемі) і вакуолярну мембрану (тонопласт) за допомогою вторинноактивних  $Na^+$ / $H^+$ -антипортерів, які споживають енергію потенціалів, створених первинноактивними  $H^+$ -насосами.

Електрохімічний потенціал на тонопласті, де на відміну від плазмалемі переважає хімічна

компонента, створюється двома  $H^+$ -насосами, механізми яких репрезентовані «архаїчними» ензимами —  $H^+$ -АТР-азою вакуолярного (V) типу (3.6.3.14) та  $H^+$ -пірофосфатазою ( $H^+$ -PP<sub>n</sub>-азою) (3.2.6.1.1), котра збереглася лише в рослинних організмах [1]. У вакуолярній  $H^+$ -АТР-азі є два домени — периферійний гідролітичний домен (V1), що складається з 8 субодиниць, і мембранний транспортний (V<sub>0</sub>) із 6 субодиниць.  $H^+$ -PP<sub>n</sub>-аза — гідрофобний протеїн з однієї субодиниці, що 14–17 разів перетинає вакуолярну мембрану [1, 3].

Досі немає одностайної думки щодо ролі кожного з цих ензимів в адаптаційних процесах, оскільки одні автори надають перевагу  $H^+$ -АТР-азі [4, 5], а інші —  $H^+$ -PP<sub>n</sub>-азі [6, 7]. Існують відомості про зменшення вмісту їхніх протеїнів у коренях проростків огірка, експонованих у присутності важких металів [7].

Радикальним способом посилення солестійкості рослин вважається вбудова генів, які кодують у галофітів протеїни потужніших  $Na^+/H^+$  антипортерів та їхньої регуляторної системи [8]. Якщо раніше уникали торкатися генів електрогенних  $H^+$ -насосів, то останнім часом перенесення гену вакуолярної  $H^+$ -PP<sub>n</sub>-ази вважають новою стратегією біоінженерії [6, 8].

Проте створення солестійких трансгенних форм залишається економічно доцільним лише для головних агрокультур, причому безпечність їх остаточно не доведено. Тому актуальним залишається простіший, хоча й нерадикальний спосіб посилення стійкості будь-яких видів рослин до умов засолення та інших стресорних факторів за допомогою біологічно активних препаратів природного та синтетичного походження. Шляхом скринінгу для подальшої роботи нами було обрано українські препарати Метіур (6-метил-2-меркапто-4-гідроксипіримідин) та Івін (N-оксид-2,4-диметилпіридин), які попередньо були тестовані як регулятори росту рослин стимулюючої дії. Випробування їх у присутності NaCl, проведене нами в лабораторних, вегетаційних і польових дослідах на рослинах кукурудзи, яка є найбільш солечутливим злаком, виявило наявність адаптогенної дії в обох препаратах. Проте солепротекторна спроможність безпечнішого Метіуру (ЛД<sub>50</sub>, 4,0 г/кг маси тіла тварини) зберігається протягом усього життєвого циклу рослин, тоді як для Івіну (ЛД<sub>50</sub> — 1,8 г/кг маси тіла тварини) вона обмежується лише періодом їх вегетативного росту. Це дозволило нам рекомендувати Метіур для вирощування кукурудзи з метою

одержання врожаю зерна на засолених ґрунтах [9]. У подальшому нами було також з'ясовано залежність адаптогенної дії Метіуру від його молекулярної структури [10].

Попередні дослідження біохімічних механізмів антидепресантної дії зазначених препаратів показали їхню здатність, особливо Метіуру, послаблювати в тканинах процеси пероксидного окислення [11], а також підтримувати осмотичну компоненту клітинного гомеостазу, що порушуються також в умовах стресу, спричиненого різними чинниками [12]. Проте в утворенні сольового стресу головну роль відіграє порушення іонної компоненти клітинного гомеостазу, до якого зазвичай додається токсичний ефект  $Na^+$ . Тому цей іон активно видаляється із цитоплазми вторинноактивними  $Na/H$ -антипортерами, які енергетично залежать від  $H^+$ -насосів плазматичної і вакуолярної мембран. Нами показано, що сольовий стрес, зумовлений присутністю  $Na^+$ , порушує ліпідну компоненту мембран, тоді як адаптогенні препарати, особливо Метіур, нормалізують їх фосфоліпідний склад [13].

Застосування обох препаратів, зокрема Метіуру, посилювало роботу  $H^+$ -насосів, репрезентованих  $H^+$ -АТР-азами в плазматичній і особливо у вакуолярній мембрані [14]. Оскільки в останній функціонує також другий  $H^+$ -насос, метою нашої роботи стало з'ясування впливу умов засолення та адаптогенних препаратів на співвідношення їх роботи.

Через те, що стан сольового стресу зумовлюється переважно порушенням іонної компоненти та токсичністю  $Na^+$ , метою наступних експериментів стало з'ясування впливу препаратів Метіур та Івін на функціонування  $H^+$ -насосів тонопласта, які енергетично забезпечують функціонування вторинно-активних механізмів, зокрема  $Na^+/H^+$ , що видаляє натрій до вакуолярного простору.

### Матеріали і методи

Об'єктом досліджень слугували проростки кукурудзи *Zea mays* L. (гібрид «Десна СВ»), які вирощували у водній культурі на поживному середовищі Хогленда при 25 °С та освітленні 50 Вт/м<sup>2</sup>. У 7-денному віці їх переносили на свіже середовище, яке містило 0,1 М NaCl, що є критичною концентрацією для цього злаку, і експонували до 10 діб.

Препарати Метіур та Івін застосовували шляхом замочування насіння в їх водних розчинах (10<sup>-7</sup> М) протягом доби перед пророщуванням.

Мембрани одержували з коренів без поділу їх на окремі тканини.

Фракцію тонопласта ізолювали шляхом центрифугування в ступінчатому градієнті сахарози методом Poole et al. [15] на ультрацентрифузі Optima tm L-90K Beckman Coulter.

Чистоту одержаних фракцій визначали за активністю маркерних ензимів. Вміст вакуолярних мембран – за чутливістю гідролізу АТР до нітрату, а плазматичних – до ванадату як інгібітора відповідної  $H^+$ -АТР-ази [16]. Частку орієнтованих назовні везикул визначали за впливом тритону X-100 в інкубаційному середовищі на гідроліз АТР [17], а їхню цілісність додатково контролювали за допомогою електронної мікроскопії. Гідролітичну активність ензимів визначали за накопиченням  $P_n$  методом Лоурі і Лопеса [18] на спектрофотометрі СФ-2000 при 600 нм в нмоль  $P_n$ /хв-мг протеїну.

Транспортну активність  $H^+$ -АТР-аз визначали флуоресцентним методом із використанням акридин-оранжевого зонда [19], на спектрофлуориметрі Shimadzu RF 1501 при збудженні 325 нм, емісії 538 нм та ширині щілини 10 нм, у  $\Delta\%F$ /хв-мг протеїну. Транспортну активність  $H^+$ -PP<sub>n</sub>-аз визначали флуоресцентним методом із використанням квінакрину [18] на спектрофлуориметрі Shimadzu RF 1501 при збудженні 420 нм, емісії 497 нм та ширині щілини 10 нм, представляючи у  $\Delta\%F$ /хв-мг протеїну.

Кількість протеїну в мембранних препаратах визначали методом Бредфорд, використовуючи альбумін крові людини для побудови калібрувального графіка.

Застосовані реактиви вітчизняного виробництва мали кваліфікацію «хч» та «чда», кумасі яскраво-блакитний, G -250, NADPH, цитохром c та MES – виробництва Fluka (Швейцарія), а решта – Sigma (США).

Всі досліди здійснювали в шести біологічних і трьох аналітичних повтореннях, вірогідність одержаних даних визначали за *t*-критерієм Стьюдента.

### Результати та обговорення

Мембранні препарати були репрезентовані однаковими за розміром замкненими везикулами, 70% яких мали обернену назовні орієнтацію. Вміст тонопласта у фракції дорівнює не менше 80%, тоді як плазмалеми не перевищує 10%, а домішки мембран мітохондрій та апарату Гольджі становлять  $\approx 5\%$  для кожного. Таким чином, застосовані мембранні препарати репрезентували властивості саме тонопласта.

Визначення активності  $H^+$ -АТР-ази та  $H^+$ -PP<sub>n</sub>-ази в препаратах тонопласта в контрольному варіанті продемонструвало велику перевагу внеску другого ензиму у створенні мембранного потенціалу (табл. 1, А, Б), що також відмічалось іншими авторами [5, 20]. У 7-денних проростків транспортувальна активність  $H^+$ -PP<sub>n</sub>-ази в 16 разів перевищує активність  $H^+$ -АТР-ази, тоді як гідролітична є вищою лише в 4,5 рази. Це співвідношення значно змінюється з віком проростків: у 17-денних транспортувальна активність  $H^+$ -АТР-ази зростає в 2,2 рази, а  $H^+$ -PP<sub>n</sub>-ази зменшується на 20%. За той же час гідролітична активність  $H^+$ -АТР-ази не змінюється, а  $H^+$ -PP<sub>n</sub>-ази зростає вдвічі (табл. 2, А, Б). Слід зауважити,

Таблиця 1. Вплив терміну сольової експозиції на функціонування  $H^+$ -АТР-ази тонопласта в клітинах коренів проростків кукурудзи

Варіант	Термін експозиції			
	1 доба		10 діб	
		%		%
А. Транспортувальна активність ( $\Delta\%F$ /хв-мг протеїну)				
Контроль	3,4 ± 1,0	100	7,5 ± 1,0	100
NaCl	8,7 ± 1,5 <sup>#</sup>	256	7,6 ± 0,7	101
Б. Гідролітична активність (нмоль $P_n$ /хв-мг протеїну)				
Контроль	53,0 ± 2,0	100	52,5 ± 3,0	100
NaCl	22,0 ± 2,0 <sup>#</sup>	42	78,2 ± 3,0 <sup>*</sup>	149

Тут і в табл. 2–6:  $M \pm m$ ;  $n = 6$ ,  $P < 0,05$ , <sup>#</sup> вірогідно відносно контролю без сольової експозиції; <sup>\*</sup> вірогідно відносно контролю в умовах сольової експозиції

Таблиця 2. Вплив терміну сольової експозиції на функціонування  $H^+$ -PP<sub>n</sub>-ази тонопласта в клітинах коренів проростків кукурудзи

Варіант	Термін експозиції			
	1 доба		10 діб	
		%		%
А. Транспортувальна активність ( $H^+$ Δ%F/хв-мг протеїну)				
Контроль	54,9 ± 1,0	100	43,8 ± 1,0	100
NaCl	44,5 ± 0,3 <sup>#</sup>	81	39,0 ± 0,5 <sup>#</sup>	89
Б. Гідролітична активність (нмоль P <sub>n</sub> /хв-мг протеїну)				
Контроль	129,1 ± 5,0	100	239,2 ± 4,0	100
NaCl	112,0 ± 6,0 <sup>#</sup>	87	111,2 ± 5,0 <sup>#</sup>	46

що енергія макроергічних зв'язків в їхніх субстратах витрачається не лише на здійснення транспортування іонів, але і на процеси синтезу сполук, необхідних для життєдіяльності клітин.

Присутність NaCl в живильному середовищі спричинює посилення транспортувальної активності  $H^+$ -АТР-ази в 2,5 раза, тоді як гідролітична майже такою самою мірою зазнає падіння. Подовження сольової експозиції до 10 діб знижує активність обох ензимів, проте вона залишається вищою щодо контролю приблизно на 40% (табл. 1, А, Б). Продемонстровані нами протилежні зміни транспортувальної і гідролітичної активності цих ензимів збігаються з відомостями про падіння гідролітичної активності  $H^+$ -PP<sub>n</sub>-ази в умовах засолення в галофіта *Saueda salsa* [8]. Проте у дослідях на проростках огірка було показано, що їх експозиція в присутності NaCl посилювала активність  $H^+$ -АТР-ази та  $H^+$ -PP<sub>n</sub>-ази, тоді як у  $H^+$ -PP<sub>n</sub>-ази активація транспорту  $H^+$  супроводжується посиленням гідролізу АТР [21]. Посилення транспортувальної функції  $H^+$ -АТР-ази в умовах короткочасної сольової експозиції можна вважати за прояв адаптаційної реакції рослинного організму на клітинному рівні.

У наших дослідях  $H^+$ -PP<sub>n</sub>-аза тонопласта, навпаки, реагувала на присутність NaCl у живильному середовищі деяким послабленням транспортувальної і гідролітичної активності, причому гальмування останньої посилюється з подовженням сольової експозиції (табл. 2, А, Б).

Одержані результати свідчать, що  $H^+$ -АТР-аза тонопласта, попри її значно слабшу активність порівняно з  $H^+$ -PP<sub>n</sub>-азою, відіграє провідну роль у відповіді на умови засолення

та, ймовірно, інші стресорні фактори, зокрема іони важких металів [22].

Обробка насіння біоактивними препаратами спричинює сильне зростання транспортувальної активності  $H^+$ -АТР-ази в тонопласті клітин коренів 8-добових проростків, яке за застосування Метіуру перевищує значення в контролі у 2,5 раза, а з Івіном є дещо слабшим, скорочуючись в обох випадках у 17 добових проростків у 1,5 раза. У той же час обидва препарати однаковою мірою послаблювали гідролітичну активність цього ензиму у 8-добових і 17-добових проростків. (табл. 3, А, Б).

Стимулювальний вплив препаратів на транспортувальну активність  $H^+$ -АТР-ази в тонопласті проростків, експонованих на розчині NaCl протягом доби, зростає порівняно з їх дією на безсольовому контролі, тоді як у разі сольової експозиції він у цей період маскується однаково спрямованим ефектом обох факторів (табл. 4, А, Б). Посилення транспортувальної активності під впливом препаратів, особливо Метіуру, стає помітним за 10-добової сольової експозиції проростків, коли вичерпується власна адаптаційна спроможність рослинного організму. Знайдене нами посилення транспортувальної активності  $H^+$ -АТР-ази тонопласта в умовах сольової експозиції під впливом адаптогенних препаратів узгоджується з відомостями щодо активації їх роботи у везикулах солестійких ліній картоплі [23].

Застосування препаратів практично не впливає на транспортувальну активність  $H^+$ -PP<sub>n</sub>-ази у 8-добових проростків, тоді як гідролітична активність зменшується з їх віком у варіанті з Метіуром (табл. 5, А, Б).

Таблиця 3. Вплив адаптогенних препаратів на функціонування  $H^+$ -АТФ-ази тонопласта в клітинах коренів проростків кукурудзи

Препарат	Вік проростків			
	8 діб	% відносно контролю	17 діб	% відносно контролю
А. Транспортувальна активність ( $\Delta\%F$ /хв·мг протеїну)				
Контроль	3,4 ± 1,0	100	7,5 ± 1,0	100
Метіур	8,3 ± 0,7 <sup>#,*</sup>	249	10,7 ± 0,3 <sup>#,*</sup>	142
Івін	7,2 ± 1,2 <sup>#,*</sup>	216	11,2 ± 0,2 <sup>#,*</sup>	149
Б. Гідролітична активність (нмоль $P_n$ /хв·мг протеїну)				
Контроль	53,0 ± 2,0	100	52,5 ± 3,0	100
Метіур	46,0 ± 9,0*	87	46,7 ± 2,0 <sup>#,*</sup>	89
Івін	47,0 ± 3,0*	89	46,6 ± 2,0 <sup>#,*</sup>	89

Таблиця 4. Вплив адаптогенних препаратів на функціонування  $H^+$ -АТФ-ази тонопласта в клітинах коренів, експонованих у присутності 0,1 М NaCl

Препарат	Термін експозиції проростків			
	1 доба	% відносно контролю	10 діб	% відносно контролю
А. Транспортувальна активність ( $\Delta\%F$ /хв·мг протеїну)				
Контроль	8,7 ± 1,5 <sup>#</sup>	100	7,6 ± 0,7	100
Метіур	9,2 ± 2,0 <sup>#,*</sup>	106	10,9 ± 1,0 <sup>#,*</sup>	143
Івін	8,7 ± 0,9 <sup>#,*</sup>	100	10,6 ± 0,4 <sup>#,*</sup>	139
Б. Гідролітична активність (нмоль $P_n$ /хв·мг протеїну)				
Контроль	22,0 ± 2,0 <sup>#</sup>	100	78,2 ± 3,0 <sup>#</sup>	100
Метіур	35,0 ± 2,0 <sup>#,*</sup>	159	45,0 ± 2,0*	57
Івін	29,0 ± 2,0 <sup>#</sup>	132	45,0 ± 3,0*	57

Таблиця 5. Вплив адаптогенних препаратів на функціонування  $H^+$ -PP<sub>n</sub>-ази в клітинах коренів проростків кукурудзи

Препарат	Вік проростків			
	8 діб	% відносно контролю	17 діб	% відносно контролю
А. Транспортувальна активність $H^+$ -PP <sub>n</sub> -ази ( $\Delta\%F$ /хв·мг протеїну)				
Контроль	54,9 ± 1,0	100	43,8 ± 1,0	100
Метіур	55,9 ± 1,0	102	48,2 ± 0,7 <sup>#</sup>	110
Івін	54,4 ± 0,5 <sup>#</sup>	100	44,6 ± 1,0	102
Б. Гідролітична активність $H^+$ -PP <sub>n</sub> -ази (нмоль $P_n$ /хв·мг протеїну)				
Контроль	129,1 ± 5,0	100	239,2 ± 4,0	100
Метіур	119,4 ± 10,0	92	94,8 ± 3,0 <sup>#</sup>	40
Івін	134,2 ± 8,0	104	200,8 ± 4,0 <sup>#</sup>	84

Таблиця 6. Вплив адаптогенних препаратів на функціонування  $H^+$ -PP<sub>n</sub>-ази в клітинах коренів кукурудзи, експонованих у присутності 0,1 NaCl

Препарат	Термін експозиції проростків			
	1 доба	% відносно контролю	10 діб	% відносно контролю
А. Транспортувальна активність $H^+$ -PP <sub>n</sub> -ази ( $\Delta\%F$ /хв-мг протеїну)				
Контроль	44,5 ± 0,3 <sup>#</sup>	100	39,0 ± 0,5 <sup>#</sup>	100
Метиур	53,0 ± 0,2*	119	45,7 ± 1,0*	117
Івін	44,5 ± 1,0 <sup>#</sup>	100	42,9 ± 2,0	110
Б. Гідролітична активність $H^+$ -АТР-ази (нмоль P <sub>n</sub> /хв-мг протеїну)				
Контроль	112,0 ± 6,0 <sup>#</sup>	100	111,2 ± 5,0 <sup>#</sup>	100
Метиур	122,4 ± 4,0	109	98,7 ± 7,0 <sup>#</sup>	89
Івін	119,2 ± 5,0	106	110,3 ± 1,0 <sup>#,*</sup>	99

В умовах сольової експозиції лише Метиур збільшує транспортувальну активність цього ензиму за обох термінів сольової експозиції, тоді як обидва препарати зумовлюють скорочення гідролітичної активності за її подовження (табл. 6, А, Б).

Одержані результати дозволяють дійти висновку, що адаптогенний ефект застосованих біоактивних препаратів є сильнішим у Метиуру і значною мірою пов'язаний з активацією транспортувальної функції первинних  $H^+$ -насосів тонопласта, особливо репрезентованого  $H^+$ -АТР-азою. Внаслідок цього збільшується електропостачання  $Na^+/H^+$ -антипортеру, який безпосередньо здійснює видалення  $Na^+$  до вакуолярного простору. Вплив адаптогенних препаратів на його активність та регуляторну систему буде з'ясовано в наших подальших дослідженнях.

#### ДЕЙСТВИЕ АДАПТОГЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА АКТИВНОСТЬ ВАКУОЛЯРНЫХ ПРОТОННЫХ НАСОСОВ КЛЕТКИ КОРНЕЙ КУКУРУДЫ В УСЛОВИЯХ ЗАСОЛЕНИЯ

Ж. И. Рыбченко, Т. А. Палладина

Институт ботаники им. Н. Г. Холодного  
НАН Украины, Киев;  
e-mail: zhanna\_bio@ukr.net,  
tatiana\_palladina@ukr.net

Исследовано роль двух электрогенных  $H^+$ -насосов, механизмы которых представлены АТР-азою V-типа и  $H^+$ -пирофосфатазою ( $H^+$ -PP<sub>n</sub>-азою) в создании электрохимического по-

тенциала на вакуолярной мембране (тонопласте) растительных клеток в условиях солевого стресса и при действии адаптогенных препаратов Метиур и Ивин. Гидролитическую и транспортную активность этих ферментов определяли в препаратах тонопласта, изолированных из корней проростков кукурузы, экспонированных 1 или 10 суток в 0,1 М NaCl.

В контрольном варианте транспортная активность  $H^+$ -PP<sub>n</sub>-азы намного выше, чем  $H^+$ -АТР-азы, хотя и несколько снижается с возрастом проростков. Это свидетельствует о преобладании  $H^+$ -насоса, представленного  $H^+$ -PP<sub>n</sub>-азою, в создании мембранного потенциала на тонопласте. Солевая экспозиция проростков вызывает снижение как активности  $H^+$ -АТР-азы, так и  $H^+$ -PP<sub>n</sub>-азы, тогда как транспортная активность  $H^+$ -АТР-азы, наоборот, усиливается при снижении гидролитической. Обработка семян препаратами, особенно Метиуром, вызывает увеличение транспортной активности  $H^+$ -АТР-азы в условиях солевой экспозиции, усиливаясь с увеличением ее продолжительности, тогда как транспортная активность  $H^+$ -PP<sub>n</sub>-азы существенно не изменяется. Полученные результаты демонстрируют главную роль  $H^+$ -насоса тонопласта, представленного  $H^+$ -АТР-азою, при ответе растительной клетки в условиях солевого стресса, а также его возможное участие в адаптогенном действии синтетических препаратов.

Ключевые слова: засоление, транспортная и гидролитическая активность  $H^+$ -АТР-азы,  $H^+$ -PP<sub>n</sub>-аза, тонопласт, Метиур, Ивин.

**THE ACTION OF ADAPTOGENIC PREPARATIONS ON VACUOLAR PROTON PUMPS ACTIVITY IN CORN ROOT CELLS UNDER SALT STRESS CONDITIONS**

Zh. I. Ribchenko, T. A. Palladina

Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: zhanna\_bio@ukr.net,  
tatiana\_palladina@ukr.net

**S u m m a r y**

The function of two electrogenic H<sup>+</sup>-pumps in plant vacuolar membrane (tonoplast) and their response to the salt stress conditions and adaptogenic preparations have been studied. Experiments were carried out on tonoplast fraction isolated from the roots of corn seedlings grown in water culture which were exposed at 7-day age in the presence of 0.1 M NaCl during 1 or 10 days. The role of every H<sup>+</sup>-pump in potential generation was elucidated by assaying transport and hydrolytic activity of enzymes - V-type H<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-pyrophosphatase represented their mechanisms. It was found in the control variant that transport activity H<sup>+</sup>-PPase exceeded considerably H<sup>+</sup>-ATPase one in the tonoplast from 7-day seedlings. However this situation was changed in 18-day seedlings by H<sup>+</sup>-ATPase transport activity increasing with age whereas its hydrolytic one was decreased. Both NaCl expositions caused the progressive decrease of transport and hydrolytic activity of H<sup>+</sup>-PPase whereas H<sup>+</sup>-ATPase responded to this factor by increasing transport activity, while its hydrolytic one fell. Bioactive preparations Methyure and Ivine (10<sup>-7</sup> M) used by seed soaking caused a further increase of H<sup>+</sup>-ATPase transport activity especially in the presence of NaCl whereas H<sup>+</sup>-PPase one was not changed. Methyure effect in these experiments was more pronounced. Obtained results demonstrated participation of tonoplast H<sup>+</sup>-pumps in plant adaptation to NaCl which can be realized by amplification of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> antiporter energization. An important role of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in growth and adaptation processes in plants has been proved.

**Key words:** transport and hydrolytic activities of H<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-PPase, tonoplast, Methyure, Ivine.

1. Gaxiola R. A., Palmgren M. G., Schumacher K. // FEBS Lett. – 2007. – **581**. – P. 2204–2214.
2. Serrano A., Perez-Castineira J. R. Baltscheffsky M., Baltscheffsky H. // IUBMB Life. – 2007. – **59** (2). – P. 76–83.

3. Cipriano D. J., Wang Y., Bond S. et al. // Biochim. Biophys. Acta. – 2008. – **1777**. – P. 599–604.
4. Kluge C., Lahr J., Hanitzsch et al. // J. Bioenerg Biomembr. – 2003. – **35**. – P. 377–387.
5. Krebs M., Beyhi D., Gorlich E. et al. // PNAS. – 2010. – **107**, N 7. – P. 3251–3256.
6. Park S., Li J., Pittman J. K. et al. // Ibid. – 2005. – **102**, N 52. – P. 18830–18835.
7. Kabala K., Janicka-Russak M., Klobus G. J. // Plant Physiol. – 2010. – **167**. – P. 1328–1335.
8. Gao F., Gao Q., Duan X. G. et al. // J. Exp. Bot. – 2006. – **57**, N 12. – P. 3259–3270.
9. Пат. 26531 UA, 51 МПК (2006), А01С 1/00 Спосіб посилення солестійкості кукурудзи для її вирощування на засоленних ґрунтах. / Палладіна Т. О., Куриленко І. М., Чижикова Т. О. – Опубл. 25.09.2007, Бюл. № 15.
10. Палладіна Т. О., Рибченко Ж. І., Контурська О. О. // Біотехнологія. – 2012. – **5**, № 1. – С. 115–120.
11. Куриленко І. М., Палладіна Т. О. // Укр. біохім. журн. – 2001. – **73**, № 6. – С. 56–60.
12. Чижикова О. А., Палладіна Т. О. // Там само. – 2006. – **78**, № 1. – С. 124–129.
13. Контурська О. О., Палладіна Т. О. // Вісник Харківського національного аграрного університету, серія Біологія. – 2007. – **2** (11). – С. 64–68.
14. Рибченко Ж. І., Палладіна Т. О. // Укр. біохім. журн. – 2011. – **83**, № 6. – С. 63–68.
15. Poole R. J., Briskin D. P., Kratky Z., Johnstone R. M. // Plant Physiol. – 1984. – **74**. – P. 594–556.
16. Briskin D. R. // Meth. Enzymology. – 1987. – **148**. – P. 546.
17. Larsson C., Sommarin M., Widell S. // Ibid. – 1994. – **228**. – P. 451–469.
18. Lowry O. H., Lopez J. A. // J. Biol. Chem. – 1946. – **162**. – P. 120–133.
19. Ward J., Sze H. // Meth. Plant Cell Biol. – 1995. – **42**. – P. 1148–1156.
20. Facancho A. R., Meis L. // Plant Physiol. – 1998. – **116**. – P. 1487–1495.
21. Kabala K., Klobus G. // J. Plant Physiol. – 2008. – **165**. – P. 1830–1837.
22. Janicka-Russak M., Kabala K., Burzyneki M., Klobus G. // J. Exp. Bot. – 2008. – **59**, N 13. – P. 3721–3728.
23. Queiros F., Fontes N., Silva P. et al. // Ibid. – 2009. – **60**, N 4. – P. 1363–1374.

Отримано 13.02.2012