

ЕЛЕКТРОННО-ЦИТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ Н⁺-АТФАЗИ В КОРЕНЯХ КУКУРУДЗИ

ОЛЕНА М. НЕДУХА *, ЄЛИЗАВЕТА Л. КОРДЮМ, ГАЛИНА В. ШЕВЧЕНКО, ЮЛІЯ В. ОВЧАРЕНКО

Анотація. Представлені результати електронно-цитохімічного дослідження локалізації Mg²⁺-активованої Н⁺-АТФази в клітинах кори дистальної зони розтягу (ДЗР) коренів 21-ти добових рослин кукурудзи (сорти 'Переяславський' та 'Достаток'), що зростали за різних умов вологості ґрунту (70% та 20%). Електронно-цитохімічним методом доведено участь Н⁺-АТФази в адаптації проростків кукурудзи до росту в умовах зниженої вологості ґрунту. Виявлено перерозподіл активності Н⁺-АТФази в мембранах клітин коренів ДЗР рослин кукурудзи, що зростали при 20% вологості ґрунту, у порівнянні із такими у рослин, що зростали при 70% вологості. Ми припускаємо, що виявлені нами відмінності в зниженні площі продуктів цитохімічної реакції на плазмалемі та збільшенні їхнього вмісту на тонопласті вакуолей у клітинах кори коренів за умов посухи сприяють підвищенню тургору клітин, оптимізації їх фізіологічного стану та адаптації рослин до зниження вологості.

Ключові слова: *Zea mays*, електронно-цитохімічна мікроскопія, корені, посуха ґрунту, локалізація Н⁺-АТФази

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, вул. Терещенківська, 2, м. Київ, 01601, Україна;
* o.nedukha@hotmail.com

Вступ

Н⁺-АТФаза рослинних клітин є Mg²⁺-залежною і К⁺-стимулюючою, відіграє важливу роль в біоенергетиці та регуляції росту клітин (ПОЛЕВОЙ 1986; PALMGREN & HARPER 1999; MARSOMME & BOURTY 2000). Цей фермент відноситься до АТФаз Р-типу (тобто фосфорилуються при каталітичному розщепленні АТФ), і виявляється на цитоплазматичній мембрані, тонопласті та ендомембранах рослинних клітин (DEPTA *et al.* 1991; ROBINSON *et al.* 1996a, 1996b). За рахунок енергії гідролізу АТФ Mg²⁺-залежна Н⁺-АТФаза переносить протони із цитоплазми в апопласт чи у вакуоль, створюючи електрхімічний градієнт іонів водню, який є складовою мембранного потенціалу клітини й забезпечує транспорт речовин через цитоплазматичну мембрану, тонопласт чи ендомембрани. Тому цей фермент є одним із головних компонентів протонної сигнальної системи, яка бере участь в адаптивній реакції відповіді клітин на дію різноманітних екзогенних та ендогенних факторів (SERRANO 1989; PALMGREN

& HARPER 1999). Одним із важливих фізіологічних процесів, в яких бере участь Н⁺-АТФаза плазмалемі, є ріст рослинної клітини розтягом, що активується ауксином (ПОЛЕВОЙ 1986; RAYLE 1973; LUTHEN & WOTTEGER 1990; HAGER 2003; HAGER *et al.* 1991). Активність Н⁺-АТФази створює умови для росту клітин – збільшення швидкості розтягу клітинної оболонки, а також створення градієнту осмотичних речовин для їхнього входження в клітину (SERRANO 1989). У 2009 р. Є. Рудашевська зі співавторами (Рудашевская *и др.* 2009) показали прямий зв'язок росту клітин епікотилів проростків кукурудзи з активністю Н⁺-АТФази. Можна припустити наявність прямої залежності інтенсивності росту і клітин коренів саме від активності та локалізації цього ферменту.

Дистальна зона розтягу (ДЗР) коренів є зручною моделлю для таких досліджень, тому що клітини цієї зони є найбільш чутливі до дії ендо- та екзогенних факторів, які можуть впливати на початкові етапи росту клітин розтягом, від якого залежить не тільки ріст кореневої системи, але й ріст надземних органів (ISHIKAWA & EVANS 1993, 1995).

Табл. 1. Нумерація проростків кукурудзи, що зростали за різних умов вологозабезпечення.

Tab. 1. Numeration of maize seedlings grown under conditions of different moisture.

Номер експерименту	Сорт кукурудзи	Вік рослини	Відносна вологість ґрунту (%); тривалість росту, доби	Дія посухи: відносна вологість ґрунту (%); тривалість росту, доби
1	‘Достаток’	21 доба	70% – 21 доба	Посуха відсутня
2	‘Переяславський’	21 доба	70% – 21 доба	Посуха відсутня
3	‘Достаток’	21 доба	70% – 11 діб	20% – 10 діб
4	‘Переяславський’	21 доба	70% – 11 діб	20% – 10 діб

Тому метою нашої роботи було порівняльне дослідження субклітинної локалізації Н⁺-АТФази в клітинах кори дистальної зони розтягу коренів проростків кукурудзи, які зростали за різних умов водозабезпечення.

Матеріали і методи досліджень

Умови вирощування рослин. Зернівки *Zea mays* L. (сорт ‘Переяславський’ та посухостійкі ‘Достаток’) попередньо замочували на три доби на фільтрувальному папері у темряві. Субстратом для вирощування рослин було обрано пісок, визначено його повну вологоємність та розраховано необхідну кількість води при відносній вологості піску 70% (контроль) та 20% (експеримент) за стандартною методикою (Сказкин *и др.* 1953). В контрольних та експериментальних дослідах використовували однаковий за складом пісок. У ємності для вирощування (відро, 5 л) вставляли трубку для поливу та дренажну систему. Рослини зростали у природних умовах під прозорим тентом із 16 годинним світловим днем. Зернівки висаджували у 6 ємностей – 3 контрольні та 3 експериментальні, по 25-28 у кожній. На початок експерименту вологість субстрату була 70% у всіх ємностях. Моніторинг вологості ґрунту проводили через день. Контрольні зразки продовжували поливати та підтримували вологість на рівні 70% протягом 21 доби. Експериментальні зразки не поливали, починаючи із другої доби. Протягом перших 11 діб експерименту вологість ґрунту поступово знижувалась до

20%. Таку 20-ти відсоткову вологість ґрунту підтримували впродовж 10 наступних діб. Середня температура повітря під час досліду (04-25.06.2015 року) становила $23,5 \pm 3,2$ °C; середня вологість повітря – $45,2 \pm 11,7$ %, повторність дослідів – триразова. Загальна тривалість вирощування рослин – 21 доба.

Електронно-цитохімічне дослідження Н⁺-АТФази. Об’єкт дослідження – клітини другого та третього зовнішніх шарів кори дистальної зони коренів 21-добових рослин кукурудзи, що зростали за умов 70% та 20% вологості ґрунту. Для цитохімічного дослідження Mg²⁺-залежної Н⁺-АТФази використовували електронно-цитохімічний метод Вахштейна-Мейселя в модифікації Н. Беліцер (BELITZER *et al.* 1982). Відрізки апексів коренів довжиною біля 4-6 мм (2 мм апексу та 2 мм зони меристеми і початку зони дистального розтягу) фіксували у суміші 3% глютаральдегіду з 1,5% параформальдегідом на 0,5 М какодилатному буфері, рН 7,2 протягом двох годин при 0 °C. Матеріал промивали в ідентичному буфері 30 хв. та тричі в 25 мМ трис-малеатному буфері протягом 90 хв. при 0 °C. Потім матеріал інкубували при 37 °C протягом 30 хв. у середовищі, яке містило 2 мМ АТФ, 2 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, 2 мМ Рb(NO₃)₂ та 25 мМ трис-малеатного буферу. Пізніше промивали буфером та дофіксували 1% розчином OsO₄ на какодилатному буфері протягом ночі, обезводжували в серії спиртів та ацетону зростаючої концентрації, заливали у суміш епоксидних смол епон/аралдит за загальноприйнятим в електронній

мікроскопії протоколом. Контрольний варіант інкубували в середовищі без АТФ, іонів Mg²⁺ та K⁺. Для цитохімічних досліджень брали по три корені із трьох рослин контрольних, що зростали при 70% вологості ґрунту, та по три корені із трьох рослин, що зростали за умов зниженої вологості (20%). Ультратонкі зрізи, отримані на ультратомі МТ-XL, не контрастували. Вивчення локалізації Н⁺-АТФази проводили на трансмісійному електронному мікроскопі JEM 1200EX. Кількісну оцінку електронно-щільного продукту реакції, що маркував локалізацію Н⁺-АТФази, проводили із використанням комп'ютерної програми ImageJ, яка дозволяє диференціювати інтенсивність осаду цитохімічної реакції на мембранах та кількість пікселів у цьому осаді при порівнянні із оточуючим фоном на негативах. Для цього використовували негативи із однаковим збільшенням ($\times 10000$). Порогові значення електронної щільності вибирали мануально при кожній кількісній оцінці. Для уникнення помилки (при вимірі фону) виміри проводили в кожній точці по кілька разів, та здійснювали середню оцінку. На Рис. 3 та 4 наведені середні значення площі електронно-щільного осаду в умовних одиницях ($\times 10^3$ пікселів). Кількість проаналізованих негативів у кожному варіанті становила не менше 10.

Результати та їх обговорення

За виглядом 21-добові рослини кукурудзи, що зростали за різних умов вологості ґрунту (70% та 20%) не відрізнялися: рослини мали 3-4 листки та розвинену мичкувату кореневу систему. Чотири варіанти рослин кукурудзи, які зростали в різних умовах водопостачання ґрунту (Табл. 1), були використані для електронно-мікроскопічних дослідів.

Електронно-цитохімічний аналіз локалізації Н⁺-АТФази на мембранах клітин кори ДЗР коренів проростків кукурудзи проводили за наявності в клітинах електронно-щільного продукту цитохімічної ферментативної реакції – осаду свинцю з

неорганічним фосфатом. У контрольному варіанті при використанні інкубаційного середовища, яке не містило АТФ, чи іонів K та Mg, електронно-щільний осад продукту реакції не виявлявся.

ДЗР коренів кукурудзи, що зростали за умови 70% вологості ґрунту. В клітинах кори ДЗР коренів двох сортів кукурудзи, що зростали за умов нормального вологого забезпечення, локалізація Н⁺-АТФази на плазмалемі мала гетерогенний характер: у частини клітин (зовнішнього шару кори) плазмалема характеризувалась наявністю великих скупчень електронно щільних продуктів реакції неправильної форми та розміром від 100 до 200 нм (Рис. 1 А), тоді як у більш внутрішніх шарах кори продукт реакції на плазмалемі виявлявся у вигляді дрібних скупчень чи поодиноких гранул (≈ 10 нм) преципітату (Рис. 1 Б-В), або ж продукт реакції не виявлявся (Рис. 1 Г, нижня клітина). Преципітат у вигляді дрібних гранул, які формували майже щільний тонкий шар, виявлено на тонопласті центральних вакуоль більшості досліджуваних клітин (Рис. 1 Г, Д). Тонопласт невеликих вакуоль (діаметром до 1 мкм) практично не містив гранул преципітату (Рис. 1 А), в той же час тонопласт вакуоль більших розмірів (> 1 мкм) містив продукт реакції у вигляді окремих великих (Рис. 1 Е) або дрібних гранул. Необхідно відмітити наявність преципітату в ядрі (Рис. 1 Б) та зрідка у везикулярних структурах.

ДЗР коренів проростків кукурудзи за умови посухи (зниженого волого забезпечення). У клітинах ДЗР коренів проростків кукурудзи двох сортів, що зростали 10 діб за умов 20% вологості ґрунту (Табл. 1), локалізація електронно-щільного продукту цитохімічної реакції на Н⁺-АТФази виявлена як на плазмалемі, так і на тонопласті. Проте інтенсивність цитохімічної реакції змінилася у клітинах кори коренів обох сортів кукурудзи у порівнянні із відповідними зразками, що зростали при 70% вологості ґрунту. Це виражалося у зниженні щільності

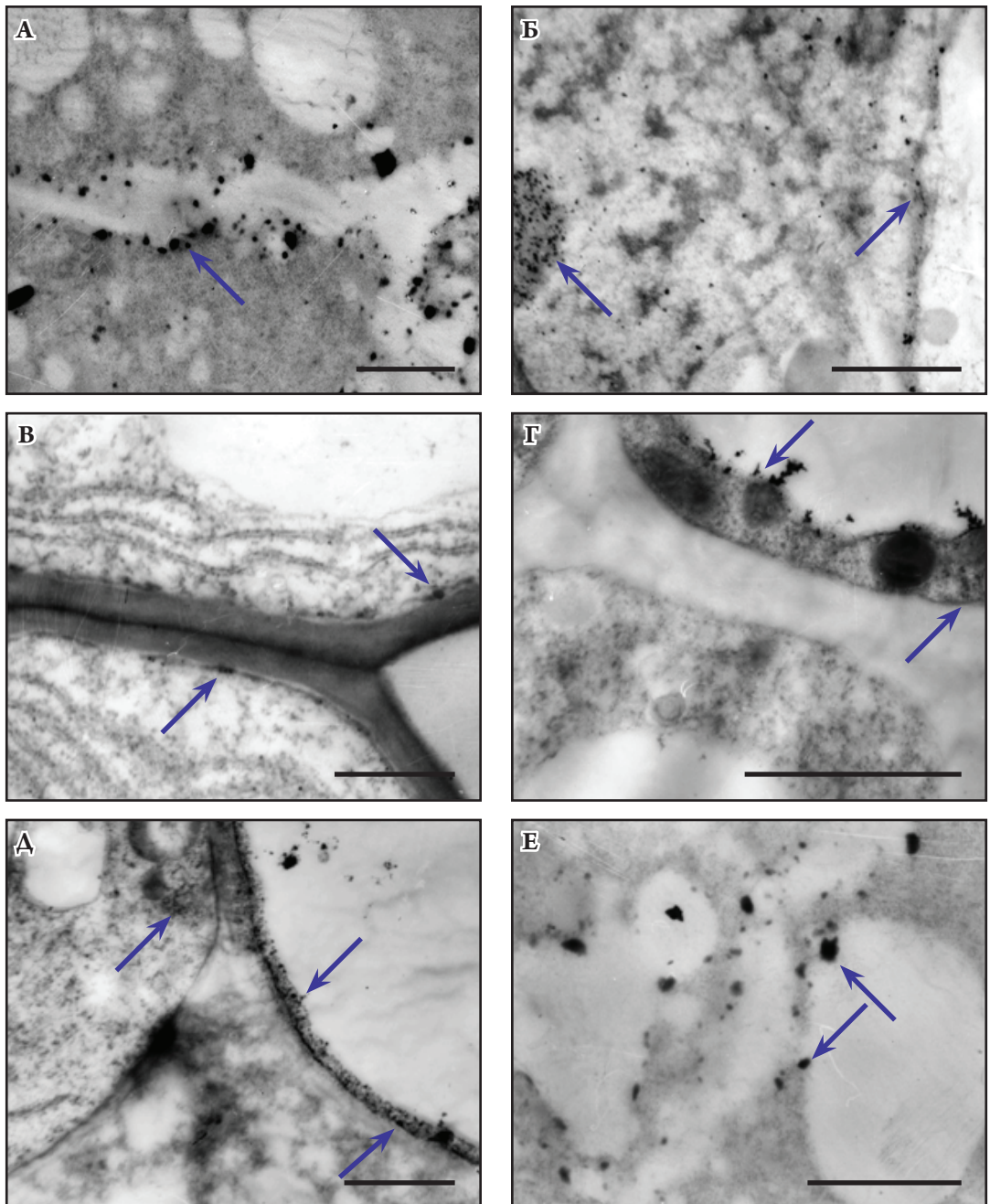


Рис. 1. Локалізація H^+ -АТФази у клітинах кори коренів рослин кукурудзи, що зростали за умов 70% вологості ґрунту: **А-В** – сорт 'Переяславський'; **Г-Е** – сорт 'Достаток'. **Стрілками** вказано електронно-щільний продукт цитохімічної реакції H^+ -АТФазної активності. Реперна мітка = 1 мкм.

Fig. 1. The localization of H^+ -ATPase in cortex cells of maize plant that was grown at 70% soil moisture: **A-B** – cv. 'Perejaslavsky'; **Г-Е** – cv. 'Dostatok'. An electron dense precipitate of H^+ -ATPase activity is indicated by **arrows**. Bar = 1 μ m.

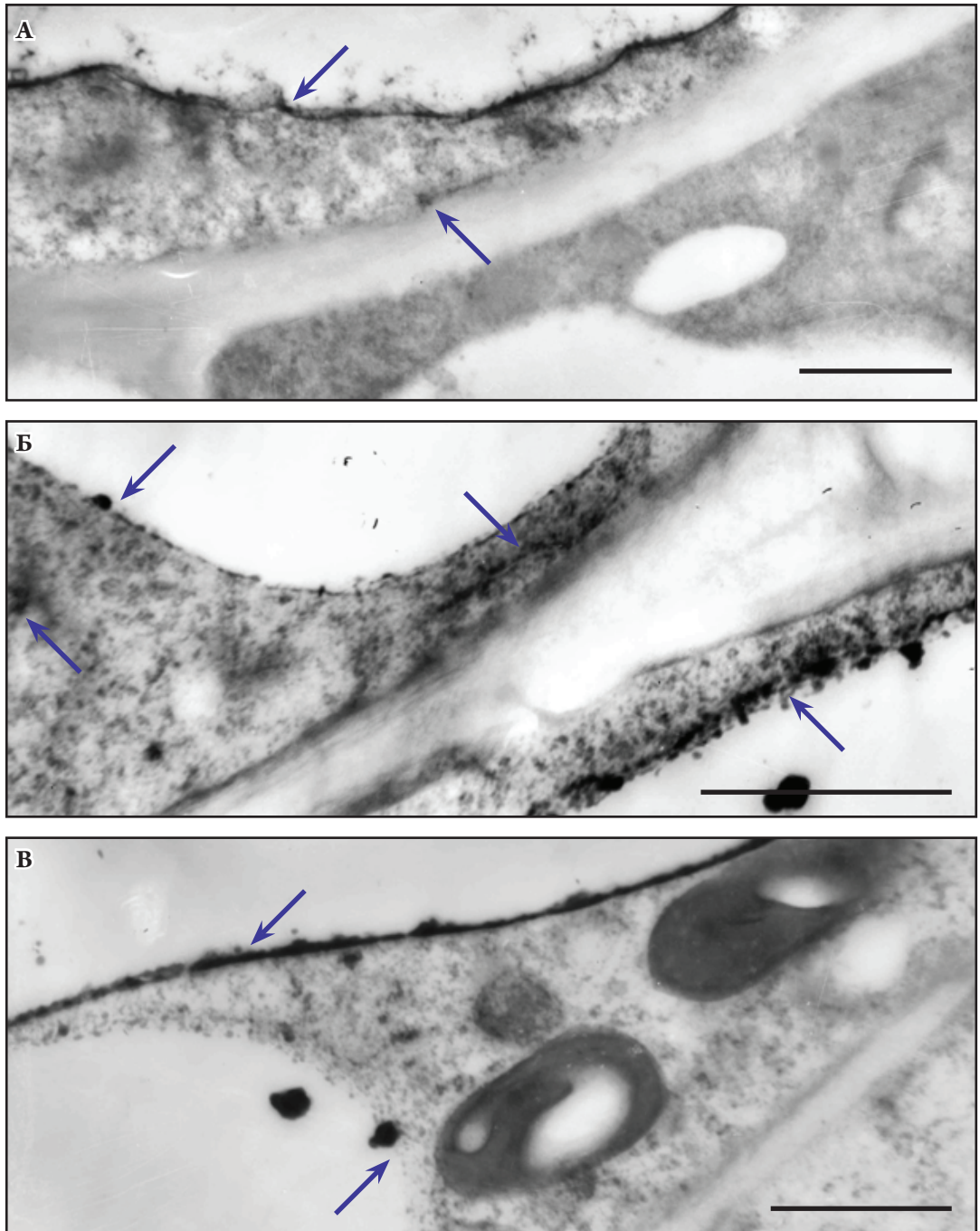


Рис. 2. Локалізація H^+ -АТФази у клітинах кори коренів рослин кукурудзи, що зростали за умов 20% вологості ґрунту: А, Б – сорт 'Переяславський'; В – сорт 'Достаток'. Стрілками вказано електронно-щільний продукт цитохімічної реакції H^+ -АТФазної активності. Реперна мітка = 1 мкм.

Fig. 2. The localization of H^+ -ATPase in cortex cells of maize plant that was grown at 20% soil moisture: А, Б – cv. 'Perejaslavsky'; В – cv. 'Dostatok'. An electron dense precipitate of H^+ -ATPase activity is indicated by **arrows**. Bar = 1 μ m.

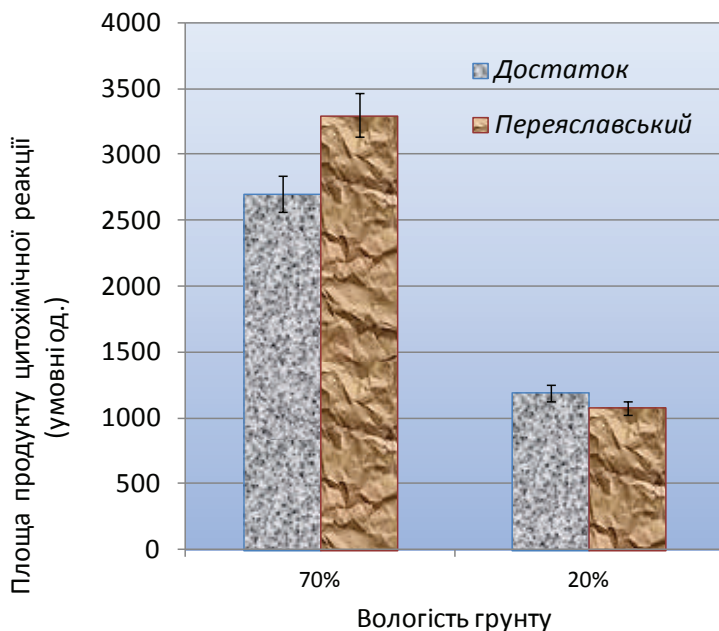


Рис. 3. Зміна площі електронно-щільного продукту цитохімічної реакції H^+ -АТФазної активності на плазмалемі клітин кори ДЗР коренів двох сортів ('Переяславський' та 'Достаток') кукурудзи за умов зниження вологості ґрунту. Площа продукту реакції, на яку припадає 100 пікселів, подана у відносних одиницях Дані отримані із використанням програми Image J.

Fig. 3. The change of area of electron dense products of cytochemical reaction shown of H^+ -ATPase activity on plasma membrane in cortex cells of DEZ of maize roots (cv. 'Perejaslavsky' and cv. 'Dostatok'), that grown under decrease of soil moisture. The area occupied by reaction product presents by the relative units amount, on which 100 pixels are the share. The data are received by using of ImageJ software.

продукту реакції на плазмалемі (Рис. 2 А, Б) та збільшенні щільності продукту реакції на тонопласті більшості досліджуваних клітин (Рис. 2 А-В). Продукт цитохімічної реакції вкривав мембрану вакуолі майже суцільним електронно-щільним осадам, тоді як на плазмалемі продукти реакції виявлялися зрідка, у вигляді поодиноких гранул. Преципітат реакції також виявлено у везикулярних структурах (Рис. 2 Б).

Кількісний аналіз. Кількісний аналіз, із використанням програми Image J, площі продуктів цитохімічної реакції – електронно-щільних зон, що маркували локалізацію H^+ -АТФази, у досліджуваних клітинах кори ДЗР двох сортів кукурудзи показав достовірні зміни за умов зниження вологості ґрунту. За мов посухи площа продукту реакції на плазмалемі у клітинах кори коренів рослин

сортів 'Достаток' зменшилася в 2,37 рази, а у сорту 'Переяславський' – втричі (Рис. 3). Тоді як на тонопласті клітин кори коренів рослин сорту 'Достаток' площа продукту реакції на H^+ -АТФази збільшилася втричі, а у сорту 'Переяславський' – в 2,4 рази, у порівнянні із площами продукту реакції у клітин коренів, що зростали за умов 70% вологості ґрунту (Рис. 4).

Таким чином, електронно цитохімічне субклітинне дослідження локалізації H^+ -АТФази у клітинах зовнішніх шарів кори ДЗР коренів кукурудзи із використанням класичного методу Вахштейна-Мейселя в модифікації Н. Беліцер (BELITSER *et al.* 1982) показало наявність типових електронно щільних гранул свинцю $Pb(NO_3)_2$, які, реагуючи із неорганічним фосфатом, формували нерозчинний, як у воді, так і розчинниках (спирті та ацетоні), преципітат

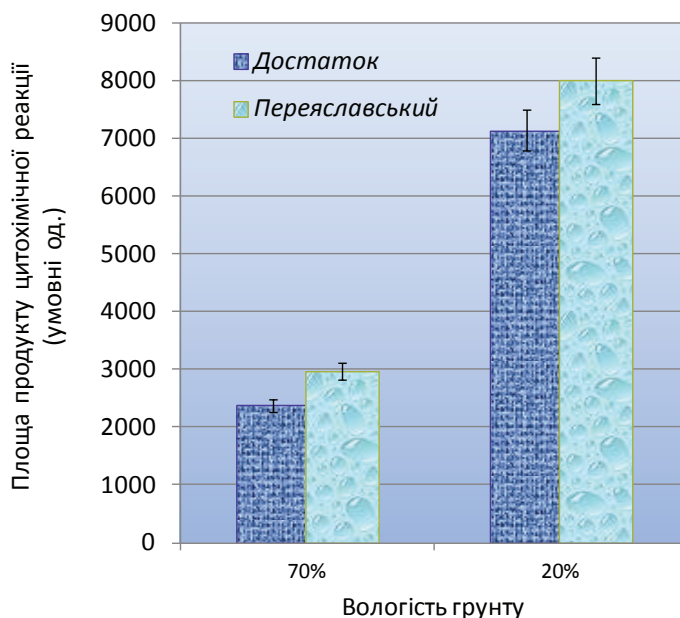


Рис. 4. Зміна площі електронно-щільного продукту цитохімічної реакції Н⁺-АТФазної активності на тонопласті клітин ДЗР коренів двох сортів ('Переяславський' та 'Достаток') кукурудзи за умов зниження вологості ґрунту. Площа продукту реакції, на яку припадає 100 пікселів, подана у відносних одиницях. Дані отримані із використанням програми ImageJ.

Fig. 4. The change of area of electron dense products of cytochemical reaction shown of Н⁺-АТФазе activity on tonoplast in cortex cells of DEZ of maize roots (cv. 'Perejaslavsky' and cv. 'Dostatok'), that grown under decrease of soil moisture. The area occupied by reaction product presents by the relative units amount, on which 100 pixels are the share. The data are received by using of ImageJ software.

розміром від 10 до 200 нм. Використання даної моделі (клітин кори дистальної зони розтягу коренів) для дослідження локалізації Н⁺-АТФази є досить вдалим. Так як клітини ДЗР розміщуються між зоною меристеми та зоною швидкого росту клітин розтягом, і за даними літератури вже не діляться, а починають ріст повільним розтягом (ISHIKAWA & EVANS 1993, 1995). Саме на таких клітинах кори ми виявили, що на тонопласті невеликих вакуоль менше 1 мкм в діаметрі продукт реакції відсутній, він починає виявлятися на тонопласті лише у вакуолях, які починають збільшуватися (>1 мкм) та на тонопласті великих центральних вакуоль.

Відомо, що Н⁺-АТФаза бере участь в транспорті осмотичних речовин за умов наявності відповідного градієнту (SERRANO 1989). Враховуючи отримані

нами дані та вище зазначені дані літератури, можна висунути припущення, що Н⁺-АТФаза тонопласту клітин кори ДЗР коренів кукурудзи активувалася лише при підвищенні градієнту осмотичних речовин між цитозолом та вакуолями, які збільшували свій розмір починаючи від 1 мкм.

Наявність преципітату на цитоплазматичній мембрані більшості досліджуваних клітин ДЗР коренів рослин, що зростали за умов оптимальної (70%) вологості ґрунту свідчить, що цей фермент бере активну участь в рості клітин, перекачуючи протони із цитозолу в апопласт для його підкислення, а значить активації рН-залежних ферментів розпушення та синтезу полісахаридів оболонки, зокрема ксилоглюкан ендотрансглюкозилази, енд-β-1,4-глюканази та пектинметил-естерази (SASIDHARAN *et al.* 2011;

Недуха 2015), які починають інтенсивно синтезуватися при рості клітин розтягом.

Отже, аналіз локалізації H^+ -АТФази на мембранах клітин кори ДЗР показав, що незалежно від сорту кукурудзи та від умов зростання рослин, H^+ -АТФаза локалізувалася на плазмалемі, тонопласті центральної вакуолі та мембранах везикулярних структур досліджуваних клітин. Проте, інтенсивність цитохімічної реакції була збільшена на тонопласті та знижена на плазмалемі клітин за умов посухи. Рідко трапляються глобули електронно-щільного осаду на плазмалемі клітин за умов посухи, що, очевидно, свідчать про нерівномірний розподіл ферментативної активності на плазмалемі. Тоді як на тонопласті центральної вакуолі за умов посухи розмір та площа преципітату достовірно збільшені майже в усіх клітинах, що, очевидно, свідчить про інтенсивне підкислення вакуолі та підтримання високого тургору за умов посухи. Відсутність преципітату цитохімічної реакції на тонопласті невеликих вакуоль, як в контролі, так і за умов посухи, та посилене маркування тонопласту центральних вакуоль свідчить про суттєві відмінності у функціонуванні невеликих та великих (центральных) вакуоль, аналогічно тому, що описано для лізосом різного розміру у тваринних клітин (LÜLLMANN-RAUCH 2005). Очевидно, в залежності від розміру вакуолі рослинної клітин, функціонування протонної помпи на тонопласті сильно різниться: чим більший розмір вакуолі у клітинах ДЗР коренів кукурудзи, тим вища активність H^+ -АТФази.

Враховуючи дані літератури про утворення кластерів ферментних одиниць H^+ -АТФази на мембранах (SONDERGAARD *et al.* 2004) та результати наших експериментів про збільшення площі продуктів реакції на тонопласті клітин ДЗР проростків за умов посухи, можна припустити, що активність досліджуваного ферменту значно підвищується в досліджуваних клітинах коренів кукурудзи за умов зниження водного забезпечення. Очевидно, що площа продукту цитохімічної реакції визначається активністю роботи

ферменту, тобто інтенсивністю утворення неорганічного фосфату. Отже, значний розмір та величина площі преципітату за умов посухи відображає підвищену гідролітичну активність H^+ -АТФази на тонопласті, а можливо, що посилення активності ферменту пов'язано з формуванням кластерів ферментних одиниць (SONDERGAARD *et al.* 2004).

Виявлений нами перерозподіл локалізації активності H^+ -АТФази в клітинах кори коренів кукурудзи, що зростали за різних умов водозабезпечення можливо пов'язаний із ізоформами цього ферменту, які характерні для певного типу мембран. Схожі дані раніше були описані при використанні імуноцитохімічного методу в клітинах коренів двох ліній гороху: чутливих до $NaCl$ та нечутливих до засолення (85 mM $NaCl$) (OLMOS & HELLIN 1997). Автори допускають існування різних ізоформ H^+ -АТФази в різних мембранних структурах у клітинах цих двох ліній гороху. Наявність ізоформ H^+ -АТФази виявлено і в колеоптилях кукурудзи (FRÍAS *et al.* 1996). Ми не виключаємо що в коренях кукурудзи також можуть бути різні ізоформи цього ферменту, а також різні і у двох сортів кукурудзи, які ми вивчали. До того ж відомо, що АТФаза активність на плазмалемі із коренів є видозалежна: так у коренях *Lycopersicon esculentum* Mill. АТФаза активність сильно понижувалась після обробки проростків сольовим розчином, тоді як у проростків іншого виду – гороху, які були адаптовані до засолення, активність цього ферменту на плазмалемі не відрізнялися від такої у контрольних зразків (SANCHEZ-AGUAYO *et al.* 1991).

Висновки

1. Електронно-цитохімічним методом у клітинах кори ДЗР коренів кукурудзи двох сортів 'Переяславський' та 'Достаток' незалежно від умов водозабезпечення ґрунту виявлена H^+ -АТФаза на цитоплазматичній мембрані, тонопласті центральних вакуолей та ядрі.

2. За допомогою програми ImageJ встановлено вплив зниження вологості ґрунту (до 20%) на площу продукту цитохімічної реакції, що маркує локалізацію H⁺-АТФази у клітинах кори коренів кукурудзи. Достовірне зниження площі продукту реакції на цитоплазматичній мембрані та збільшення на тонопласті центральних вакуолей, очевидно, сприяє адаптації рослин до ґрунтової посухи.

Використані джерела

- НЕДУХА О.М. 2015. Клітинна оболонка рослин і фактори середовища. Альгерпрес, Київ.
[Nedukha O.M. 2015. Plant cell wall and environment. Altpress, Kyiv. (In Ukrainian)]
- ПОЛЕВОЙ В.В. 1986. Роль ауксина в системах регуляції у рослин. Наука, Ленінград.
[Polevoy V.V. 1986. The role of auxin in regulation systems of plants. Science, Leningrad. (In Russian)]
- РУДАШЕВСКАЯ Е.А., ЯКОВЛЕВ А.Ю., ЯКОВЛЄВА О.В., ШИШОВА М.Ф. 2009. Изменение активности H⁺-АТФази плазмалеммы клеток coleoptилей проростков кукурузы разного возраста. *Цитология* 51: 149–154.
[Rudashevskaya E.L., Yakovlev A.Yu., Yakovleva O.V., Shishova M.F. 2009. The shift in plasma membrane H⁺-ATPase activity in coleoptile cells within maize seedling development. *Tsitologiya* 51: 149–154. (In Russian)]
- СКАЗКИН Ф.Д., ЛОВЧИНОВСКАЯ Е.И., КРАСНОСЕЛЬСКАЯ Т.А., МИЛЛЕР М.С., АНИКЕЕВ В.В. 1953. Практикум по физиологии растений. Сов. наука, Москва.
[Skazkin F.D., Lovchynovskaya Ye.I., Krasnoselskaya T.A., Miller M.S., Anikeev V.V. 1953. Practicum on plant physiology. Soviet Science, Moscow. (In Russian)]
- BELITSER N.V., ZAALISHVILI G.V., SYTNIANSKAYA N.P. 1982. Ca²⁺-binding sites and Ca²⁺-ATPase activity and its reveals by monovalent cations. *Physiol. Plant.* 54: 112–118.
- ДЕПТА Н., HOLSTEIN S.E.H., ROBINSON D.G., LUTZELSCHWAB M., MICHALKE W. 1991. Membranes markers in highly purified clathrin-coated vesicles from *Cucurbita hypocotyls*. *Planta* 183: 434–442.
- FRÍAS I., CALDEIRA M.T., PÉREZ-CASTIÑEIRA J.R., NAVARRO-AVIÑÓ J.P., CULIAÑEZ-MACIÁ F.A., KUPPINGER O., STRANSKY H., PAGÉS M., HAGER A., SERRANO R. 1996. A major isoform of the maize plasma membrane H⁺-ATPase: characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell.* 8: 1533–1544.
- ISHIKAWA H., EVANS M.L. 1993. The role of the distal elongation zone in the response of maize roots to auxin and gravity. *Plant Physiol.* 102: 1203–1210.
- ISHIKAWA H., EVANS M.L. 1995. Specialized zone of development of roots. *Plant Physiol.* 109: 725–727.
- HAGER A. 2003. Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *J. Plant Res.* 116: 483–505.
- HAGER A., DEBUS G., EDEL H.-G., STRANSKY H., SERRANO R. 1991. Auxin induces exocytosis and rapid synthesis of plasma-membrane H⁺-ATPase. *Planta* 185: 527–537.
- LUTHEN H., BOTTGER M. 1990. Reexamination of acid growth theory of auxin action. *Plant Physiol.* 93: 931–939.
- LÜLLMANN-RAUCH R. 2005. History and morphology of lysosome. In: SAFTIG P. Lysosomes (Online-Ausg. ed.): 1–16. Landes Bioscience, Georgetown, Tex.
- MARSOMME P., BOURTY M. 2000. The plant plasma membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1465: 1–16.
- OLMOS E., HELLIN E. 1997. Cytochemical localization of ATPase plasma membrane and acid phosphatase by cerium-based method in a salt-adapted cell line of *Pisum sativum*. *J. Exp. Bot.* 48: 1529–1535.
- PALMGREN M.G., HARPER J.F. 1999. Pumping with plant P-type ATPases. *J. Exp. Bot.* 50: 883–893.
- RAYLE D.L. 1973. Auxin induced hydrogen-ion excretion in *Avena coleoptiles* and its implications. *Planta* 114: 63–73.
- ROBINSON D.G., HASCHKE H.P., HINZ G., НОН В., МАЕШИМА М., MARTY F. 1996a. Immunological detection of tonoplast polypeptides in the plasma membrane of pea cotyledons. *Planta* 198: 95–103.
- ROBINSON D.G., HOPPENRATH M., OBERBECK K., LUYKX P., RATAJCZAK R. 1996b. Localization of pyrophosphatase and V-ATPase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bot Act.* 111: 108–122.
- SASIDHARAN R., VOSENEK L., PIERIK R. 2011. Cell wall modifying proteins mediate plant acclimatization to biotic and abiotic stresses. *Critical Rev. Plant Sci.* 30: 548–562.
- SANCHEZ-AGUAYO I., GONZALEZ-UTOR A.L., MEDINA A. 1991. Cytochemical localization of ATPase activity in salt-treated and salt-free grown *Lycopersicon esculentum* roots. *Plant Physiol.* 96: 153–158.
- SERRANO R. 1989. Structure and function of plasma membrane ATPase. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 61–94.
- SONDERGAARD T.E., SCHULZ A., PALMGREN M.G. 2004. Energization of transport processes in plants. Role of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol.* 136: 2475–2482.

ELECTRON-CYTOCHEMICAL STUDY OF H⁺-ATPASE IN MAIZE ROOTS

OLENA M. NEDUKHA *, ELIZAVETA L. KORDYUM, GALINA V. SHEVCHENKO, JULIA V. OVCHARENKO

Abstract. The results of electron-cytochemical study of the localization of Mg²⁺-activated H⁺-ATPase in *Zea mays* cortex cells of distal elongation zone (DEZ) of roots of 21-days old plants (cv. 'Perejaslavsky' and cv. 'Dostatok') grown under different soil moisture (70% and 20%) are presented. The participation of H⁺-ATPase in processes of maize adaptation to the conditions of reduced soil moisture was confirmed by electron-cytochemical method. The redistribution of H⁺-ATPase activity location in the cell membranes of DEZ cells of roots are revealed under influence of lowered soil humidity (to 20%). We proposed that the detected differences in reducing of products area of cytochemical reaction on plasma membrane and increasing of their area on tonoplast of vacuoles in the cells of DEZ of roots under conditions of drought obviously enhance turgor cells for optimize their growth and optimal physiological state and also for plant adaptation to reduce moisture in the soil.

Key words: *Zea mays*, electron-cytochemical microscopy, roots, soil drought, H⁺-ATPase location

*M.G. Kholodny Institute of Botany NAN Ukraine, Tereshchenkivska str. 2, 01004 Kyiv, Ukraine; * o.nedukha@hotmail.com*