

В.О. БРИКОВ

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України
вул. Терещенківська, 2, м. Київ, МСП-1, 01601, Україна
brykovvasja@gala.net

УЛЬТРАСТРУКТУРА МІТОХОНДРІЙ У КЛІТИНАХ РІЗНИХ РОСТОВИХ ЗОН КОРЕНЯ *PISUM SATIVUM* L. ПРИ КЛІНОСТАТУВАННІ

К л ю ч о в і с л о в а: кліностатування, мітохондрії,
ультраструктура, *Pisum sativum*, трансмісійна електронна
мікроскопія

Вступ

Значна кількість повідомлень щодо пошуку найуразливіших ланок клітинного метаболізму до впливу мікрогравітації на рівні ультраструктури клітин вказує на зміни мітохондрій у різних типах клітин [5, 10, 12, 17, 20, 23]. Як відомо, мітохондрії — один із центрів енергетичного метаболізму в рослинних клітинах — відіграють важливу роль у реакціях-відповідях рослини на дію різноманітних чинників навколишнього середовища [15, 19]. Проте існує дуже обмежена кількість праць, безпосередньо присвячених питанням дії зміненої гравітації на структурно-функціональну організацію мітохондріюму [3, 8, 21]. Тому ми поставили за мету дослідити ультраструктуру мітохондрій у клітинах різних ростових зон кореня під впливом кліностатування, яке частково відтворює ефекти реальної мікрогравітації в умовах космічного польоту.

Об'єкти та методи досліджень

Об'єктом дослідження були кореневі апекси проростків *Pisum sativum* L. Насіння гороху попередньо стерилізували і замочували в дистильованій воді протягом 5-ти годин. Відібрані насінини по одній загортали у трубочки з вологого фільтрувального паперу і вкладали у цукрові стаканчики висотою 9 см, які ставили на горизонтальний кліноостат (2 об./хв). Проростки росли в темряві 5 діб за температури 22—24 °С. Повторюваність дослідів чотирикратна. Кореневі апекси фіксували 2,5 %-м глютаровим альдегідом з подальшою постфіксацією 1 %-м OsO₄. Зразки зневоднювали в серії спиртів зростаючої концентрації та ацетоні, потім заливали сумішшю епон — аралдит за стандартним методом [27]. Ультратонкі зрізи (50—70 нм) отримували на мікротомі RMC MT-XL (США) та контрастували ураніл ацетатом і цитратом свинцю [22]. Зразки досліджували на електронних мікроскопах JEM 1200EX і JEM 1230EX (Японія). Оскільки ультраструктура різних шарів клітин кори відрізняється за певними ознаками, для порівняльних досліджень обрали

© В.О. БРИКОВ, 2009

другий і третій шари клітин з боку епідермісу в меристемі, дистальній (ДЗР) та центральній зонах розтягу (ЦЗР). Негативні зображення за збільшення 3000 та 15000 сканували й отримані цифрові зображення аналізували за допомогою програмного забезпечення UTHSCSA Image Tool 3.0. На знімках вимірювали площу мітохондрій, відношення площі крист до площі матриксу (відносна площа крист). Отримані дані опрацьовували статистично за допомогою програмного забезпечення Statistica 6.0, використовуючи стандартні методи порівняння двох незалежних вибірок t-test та Mann-Whitney U test при $p \leq 0,05$. Дані представлені у вигляді $M \pm SD$ (де M — середнє арифметичне, SD — середнє квадратичне відхилення) та $Me [25\%; 75\%]$ (Me — медіана, 25%; 75% — значення першої і третьої квартилей, що охоплює 50 %-й варіант вибірки, мінімальне і максимальне значення).

Результати досліджень та їх обговорення

Електронномікроскопічне дослідження мітохондрій у клітинах меристеми на рівні двошарового чохла показало, що вони мають типову для цих клітин будову. Популяції мітохондрій меристематичної клітини властива висока поліморфність (рис. 1). Площа органел варіює у межах 0,12—1,39 μm^2 .

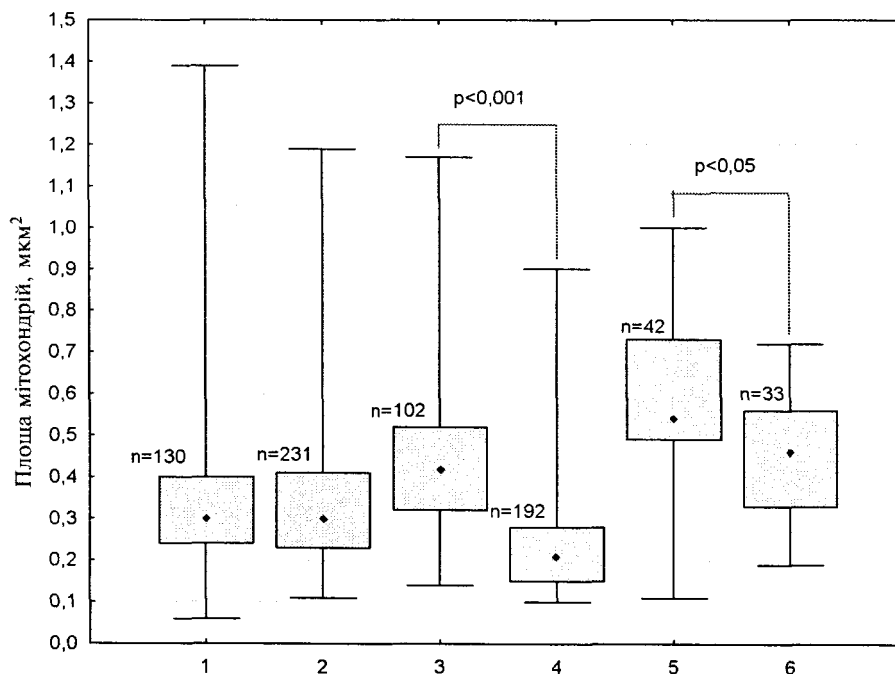


Рис. 1. Площа мітохондрій у клітинах різних ростових зон кореня проростків гороху в контролі (1, 3, 5) та при кліностауванні (2, 4, 6): 1, 2 — меристема; 3, 4 — ДЗР; 4, 5 — ЦЗР
 Fig. 1. Area of mitochondria in cells of different growth zones of pea roots in control (1, 3, 5) and under clinostat conditions (2, 4, 6): 1, 2 — meristem; 3, 4 — DEZ; 4, 5 — CZE

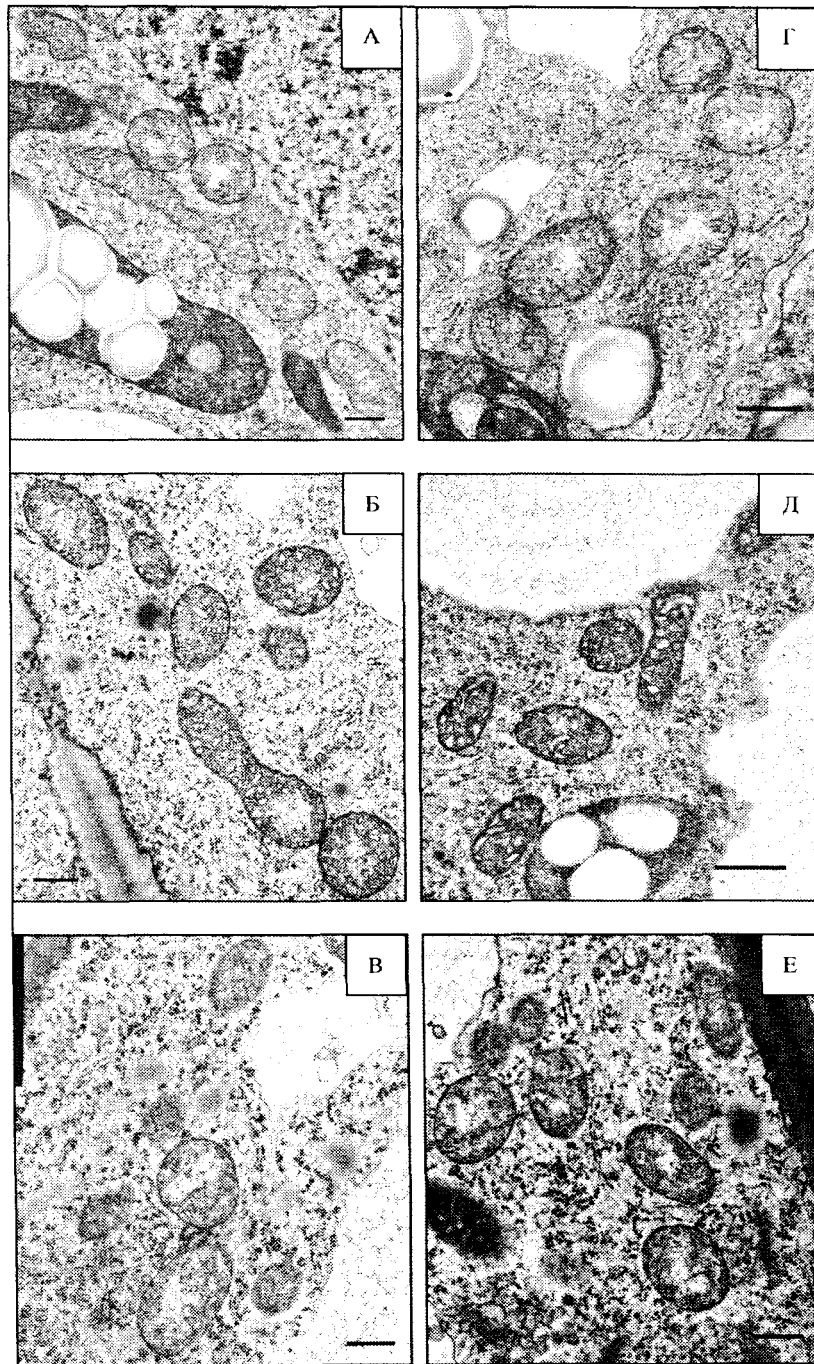


Рис. 2. Мітохондрії у клітинах меристеми (А, Г), дистальної (Б, Д) та центральної (В, Е) зон розтягу коренів проростків гороху: А, Б, В — контроль; Г, Д, Е — кліностакування. Масштаб = 0,5 мкм

Fig. 2. Mitochondria in pea root cells of meristem (A, G), distal elongation zone (B, D) and central elongation zone (B, E): A, B, B — control. G, D, E — clinorotation. Bar = 0.5 μ m

Переважають овальна та округла форми профілів органел на зрізах, хоча також виявлені видовжені та, інколи, розгалужені мітохондрії (рис. 2). Матрикс органел середньої електронної щільності, в ньому спостерігаються електронно-прозорі ділянки, де містяться фібрили мітохондріальної ДНК. Контраст мембранних компонентів мітохондрій, особливо зовнішньої мембрани, слабкий на тлі щільної гіалоплазми. Кристи мітохондрій не утворюють упорядковану систему, а розміщуються хаотично, їх відносна площа сильно варіює. В матриксі деяких мітохондрій спостерігаються інтрамітохондріальні гранули розміром $0,03 \pm 0,005$ мкм, розміщені біля внутрішньої мембранної оболонки мітохондрій.

Перебудови мітохондрій у клітинах ДЗР та ЦЗР кореня гороху в контролі відображають загальні закономірності змін при переході меристематичних клітин до росту розтягом. При збільшенні розміру клітини зростає площа мітохондрій (рис. 1). Зменшується поліморфність популяції мітохондрій за рахунок скорочення кількості видовжених органел. Переважають органели овальної форми. Також виявлено мітохондрії з інвагінаціями. Мембранні компоненти, на відміну від меристематичних клітин, чітко контрастні. Форма крист на зрізах досить сильно варіює: від пластинчастої з вузьким міжмембранним простором до сильно розширеної трубчастої. Відносна площа крист мітохондрій у ДЗР та ЦЗР не змінюється порівняно з меристематичними клітинами (таблиця).

Відносна площа крист мітохондрій у клітинах різних ростових зон кореня гороху, %, n = 50

Ростова зона кореня	Контроль	Кліноостатування
Меристема	10,08±4,28	10,03±3,59
ДЗР	10,5±4,46*	16,4±4,87*
ЦЗР	9,63±2,98	7,48±2,12

Примітка: * — достовірна різниця між результатами.

За умов кліноостатування відмінності в ультраструктурі мітохондрій меристематичних клітин кореня незначні порівняно зі стаціонарним контролем і не є статистично достовірними. Водночас у клітинах ДЗР кореня мітохондрії змінюються порівняно з контролем: зменшується поліморфність мітохондріюму, відсутні видовжені органели площею понад $0,9$ мкм², характерні для контролю. Конденсується структура органел, що полягає у зменшенні їх розміру та підвищенні електронної щільності матриксу. Характерні для контролю електронно-прозорі ділянки виявляються значно рідше або займають невелику площу в центральній частині органели. Відносна площа крист зростає на 53 % (таблиця) порівняно з контролем не за рахунок збільшення їх кількості, а внаслідок розширення міжмембранного простору крист. У клітинах ЦЗР при кліноостатуванні площа мітохондрій на зрізах дещо менша, ніж у стаціонарному контролі (рис. 1), але відсутні відмінності у внутрішній організації органел: площі та формі крист, щільності матриксу.

Таким чином, під впливом п'ятидобового клінонстатування мітохондрії не зазнають жодних деструктивних перетворень на рівні ультраструктури. Зберігається цілісність мембранних компонентів. Описані зміни мітохондрій чітко простежуються тільки на статистичному рівні, оскільки для них характерна висока варіабельність структурної організації.

Виявлено, що мітохондрії різних ростових зон кореня мають різну чутливість до клінонстатування. Ультраструктура мітохондрій меристематичних клітин кореня гороху майже не змінюється під впливом клінонстатування, що збігається з літературними відомостями, зокрема, щодо подібності мітохондрій кореневої меристеми проростків *Zea mays* L., які росли в умовах мікрогравітації на біосупутнику «Космос 1514» [11], та *Beta vulgaris* L. при клінонстатуванні [4]. Хоча у дослідженні кореневих апексів *Avena sativa* L. і *Vigna radiata* L. за дії мікрогравітації [23] вказується на процес набухання мітохондрій у клітинах меристеми, але повна відсутність статистичної інформації не дає можливості зробити однозначних висновків про структурні перебудови мітохондрію в цьому експерименті. Показано, що в мітохондріях клітин меристеми кореня гороху, які росли в умовах невагомості 7 та 18 діб на орбітальній станції «Салют», підвищується електронна щільність матриксу та збільшується кількість крист, а також гетерогенність мітохондріальної популяції за 18-добової експозиції. На підставі цих даних припускають, що в умовах мікрогравітації знижується функціональна активність меристематичних клітин [9].

Якщо в меристематичних клітинах та клітинах ЦЗР ультраструктура мітохондрій майже не змінюється порівняно з контролем, то в клітинах ДЗР зміни чітко виражені. Різна чутливість мітохондрій клітин ДЗР і ЦЗР за умов клінонстатування в наших дослідженнях показана вперше.

Відомо, що під впливом мікрогравітації знижується поліморфність мітохондрію, а також зменшується розмір органел у статоцитах кореневого чохла проростків *Glycine max* L. [3], подібно до перебудов мітохондрію в клітинах ДЗР у наших дослідженнях, але водночас відбувалося просвітлення матриксу і редукція крист. Вважається, що такі зміни мітохондрій за умов мікрогравітації відображають зниження їх функціональної активності, спричиненої адаптацією проростків до підвищеного рівня етилену [3]. Також описано конденсацію мітохондрій, збільшення їх парціального об'єму та появу великих органел з концентричними кристами за умов клінонстатування та мікрогравітації в одноклітинній зеленій водорості *Chlorella vulgaris* Beiger [21]. Ці зміни мітохондрій, що корелюють з підвищеним рівнем поглинання кисню клітинами хлорели [8, 24], на думку авторів, спрямовані на підвищення енергозабезпечення клітини, що, своєю чергою, посилює адаптивні можливості організму.

Таку варіабельність відповіді мітохондрій на дію мікрогравітації та клінонстатування можна пояснити. Відповідь мітохондрію може залежати від типу та фізіологічного стану тканини, тривалості дії зміненої гравітації. Зміна структури мітохондрій під впливом стресового фактора може мати фазовий [7]

або циклічний характер [1, 12]. Ультраструктура мітохондрій також залежить від способу фіксації та часу проникнення фіксатора у тканину [2, 7].

Встановлено, що за умов мікрогравітації (24 доби) порушуються пігментний склад листків, вуглеводний і мінеральний обмін у листках та пагонах гороху. Припускається, що це пов'язане з порушенням регуляторних механізмів метаболізму, які відповідають за реалізацію генетичної інформації онтогенезу рослинного організму [6]. Протеомний аналіз культури клітин *Arabidopsis thaliana* L. після кліноостатування виявив зміни 18 білків, що беруть участь у широкому колі клітинних процесів, а саме активації транскрипції, білковому синтезі, біосинтезі речовин клітинної стінки [26]. Під впливом кліноостатування поступово підвищується рівень активних форм кисню та експресії генів білків теплового шоку 70 і 90 кДа у коренях проростків гороху [14, 18]. Припускається, що за умов кліноостатування клітинний метаболізм найвідчутніше порушується в активно метаболізуючих клітинах, а саме клітинах ДЗР кореня [4]. Висока метаболічна активність клітин ДЗР полягає у формуванні специфічної ферментної системи, накопиченні матеріалу клітинної стінки, посиленому фосфорилуванні. Клітини цієї зони ростуть за рахунок цитоплазматичної експансії. В ДЗР формується центральна вакуоль, що в подальшому забезпечує швидке розтягнення клітин у ЦЗР [4]. Специфічна метаболічна активність може пояснювати відмінності у реакції клітини ДЗР на дію ауксину, електричного поля, водного стресу та гравітації [16]. Ультраструктурні перебудови мітохондрій під впливом кліноостатування чітко відображають порушення енергетичного метаболізму в клітинах ДЗР кореня.

Висновки

Встановлено, що під впливом кліноостатування ультраструктура мітохондрій ростових зон кореня не зазнає деструктивних змін, їх мітохондрії характеризуються різною чутливістю до дії кліноостатування.

Найсуттєвіші перебудови мітохондріюму, які полягають у зменшенні розміру органел, підвищенні електронної щільності матриксу та збільшенні відносної площі крист, відбуваються в клітинах дистальної зони розтягу кореня. Припускається, що вони пов'язані зі специфічними фізіологічними властивостями дистальної зони розтягу і відображають порушення в енергетичному метаболізмі клітин.

1. Генерозова И.П., Снхчан А.Г., Вартапетян Б.Б. Динамика изменения ультраструктуры митохондрий проростков кукурузы в условиях аноксии // Физиол. раст. — 1984. — 31, № 4. — С. 683—691.
2. Данилова М.Ф. Структурные основы поглощения веществ корнем. — Л.: Наука, 1974 — 207 с.
3. Климчук Д.О. Структурно-функціональні особливості мітохондрій в статочитах коренів сої за умов мікрогравітації // Цитология и генетика. — 2007. — 41, № 1. — С. 30—35.
4. Кордюм Е.Л., Мартын Г.И., Овчаренко Ю.В. Рост и дифференцировка клеток колумелы корневого чехлика и собственно корня в стационарных условиях и при клиноостатировании // Цитология и генетика. — 2008. — 42, № 1. — С. 3—12.

5. Кордюм Е.Л., Сытник К.М., Белявская Н.А. и др. Современные проблемы космической клеточной фитобиологии // Пробл. космич. биол. — М.: Наука, 1994. — 293 с.
6. Лавринявичус Р.С., Ярошюс А.В., Марчюкайтис А. Метаболизм растений гороха, выращенных в условиях космического полета // Биол. исслед. на орбитальных станциях «Салют». — М.: Наука, 1984. — 248 с.
7. Машанский В.Ф., Рабинович И.М. Ранние реакции клеточных органоидов. — Л.: Наука, 1987. — 120 с.
8. Попова А.Ф. Особенности локализации Mg^{2+} активируемых АТФаз в клетках хлореллы в условиях клиностаტიрования // Цитология и генетика. — 1994. — **28**, № 2. — С. 3—7.
9. Сытник К.М., Кордюм Е.Л., Белявская Н.А., Тарасенко В.А. Ультраструктура меристемы чехлика корней проростков гороха в условиях космического полета // Докл. АН УССР. Сер. Б. — 1982. — № 6. — С. 78—80.
10. Сытник К.М., Кордюм Е.Л., Недуха Е.М. и др. Растительная клетка при изменении геофизических факторов. — Киев: Наук. думка, 1984. — 136 с.
11. Таирбеков М.Г., Гриф В.Г., Бармичева Е.М., Волович Е.М. Цитоморфология и ультраструктура корневой меристемы кукурузы в невесомости // Изв. АН СССР. Сер. биол. — 1986. — № 5. — С. 680—687.
12. Тарасенко В.А. Ультраструктура клеток колумелы в корневом чехлике арабидопсиса в условиях клиностаტიрования и микрогравитации: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Л., 1985. — 35 с.
13. Удовенко Г.В., Машанский В.Ф., Цибковская Н.С. Изменение ультраструктуры митохондрий клеток листьев ячменя при засолении субстрата // Цитология. — 1980. — **22**, № 4. — С. 478—481.
14. Baranenko V.V. Lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in pea seedlings under clinorotation // J. Gravit. Physiol. — 1998. — **5**. — P. 157—158.
15. Grabelnych O.I. The energetic functions of plant mitochondria under stress // J. Stress Physiol. and Biochem. — 2005. — **1**, № 1. — P. 37—54.
16. Ishikawa H., Evans M.L. Specialized Zones of Development in Roots // Plant Physiol. — 1995. — **109**, № 3. — P. 725—727.
17. Kordyum E.L. Biology of plant cell microgravity and under clinostating // Int. Rev. Cytology. — 1997. — **171**. — P. 1—72.
18. Kozeko, L.Ye., Kordyum, E.L. Altered gravity effect on the heat-shock protein level in plants // J. Gravit. Physiol. — 2006. — **13**, № 1. — P. 117—118.
19. Mackenzie S., McIntosh L. Higher plant mitochondria // The Plant Cell. — 1999. — **11**, № 4. — P. 571—585.
20. Moore R., McClelen C.E., Fondren W.M., Wang C.L. Influence of microgravity on root-cap regeneration and the structure of columella cell in *Zea mays* // Amer. J. Bot. — 1987. — **74**, № 2. — P. 218—223.
21. Popova A.F. Comparative characteristic of mitochondria ultrastructural organization in *Chlorella* cells under altered gravity conditions // Adv. Space Res. — 2003. — **31**, № 10. — P. 2253—2259.
22. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // J. Cell Biol. — 1963. — **17**, № 1. — P. 208—212.
23. Slocum R.D., Gaynor J.J., Galston A.W. Cytological and ultrastructural studies on root tissues // Ann. Bot. — 1984. — **54**. — P. 65—76.
24. Sytnik K.M., Popova A.F. Changes of plant mitochondria ultrastructure and respiration intensity in altered gravity // J. Gravit. Physiol. — 1998. — **5**, № 1. — P. 169—170.
25. Vartapetian B.B., Andreeva I.N., Generozova I.P et al. Functional electron microscopy in studies of plant response and adaptation to anaerobic stress // Ann. Bot. — 2003. — **91**, Spec. No. — P. 155—172.
26. Wang H., Zheng H.Q., Sha W. et al. A proteomic approach to analysing responses of *Arabidopsis*

thaliana callus cells to clinostat rotation // J. Exp. Bot. — 2006. — 57, № 4. — P. 827–835.

27. Weigel D., Glazebrook J. *Arabidopsis: a laboratory manual*. — New York: Gold Spring Harbor Laboratory Press, 2002. — P. 354.

Рекомендує до друку
І.В. Косаківська

Надійшла 12.05.2009

В.А. Брыков

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, г. Киев

УЛЬТРАСТРУКТУРА МИТОХОНДРИЙ В КЛЕТКАХ РАЗНЫХ РОСТОВЫХ ЗОН КОРНЯ *PISUM SATIVUM* L. ПРИ КЛИНОСТАТИРОВАНИИ

Исследовано влияние клиностатирования на ультраструктуру митохондрий клеток меристемы, дистальной (ДЗР) и центральной (ЦЗР) зон растяжения корневых апексов пятисуточных проростков гороха. Показано, что митохондрии исследуемых ростовых зон корня имеют разную чувствительность к клиностатированию. Ультраструктура митохондрий в меристеме и ЦЗР существенно не изменялась. В то же время митохондрии в ДЗР конденсировались, что проявлялось в уменьшении площади сечения оргanelл, возрастании электронной плотности матрикса и увеличении относительного объема крист. Предполагается, что изменение ультраструктуры митохондрий отображает нарушение энергетического метаболизма в клетках ДЗР корня.

К л ю ч е в ы е с л о в а: клиностатирование, митохондрии, ультраструктура, *Pisum sativum*, трансмиссионная электронная микроскопия.

V.O. Brykov

M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

CHANGES OF MITOCHONDRIAL ULTRASTRUCTURE IN DIFFERENT GROWTH ZONES OF PEA ROOTS *PISUM SATIVUM* L.

Effects of clinorotation on the mitochondrial ultrastructure in cells of meristematic, distal (DEZ) and central (CEZ) elongation zones in roots of 5-day-old etiolated pea seedling were studied. It has been shown that mitochondria in cells of the studied root growth zones revealed different parameters of sensitivity to clinorotation. The ultrastructure of mitochondria in the meristem and CEZ cells did not substantially change in comparison with the stationary control. At the same time, changes in the mitochondrion ultrastructure were observed in DEZ under clinorotation, namely: a decrease in the mitochondrial size, an increase in the matrix electron density and crista volume. It is supposed that changes in the mitochondrial ultrastructure under clinorotation display the disturbance of energy metabolism in DEZ cells under these conditions.

К e y w o r d s: clinorotation, mitochondria, ultrastructure, *Pisum sativum*, transmission electron microscopy.