

<https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.11.078>

УДК 576.311.347:581.43

В.О. Бриков

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України

E-mail: brykov_vo@nas.gov.ua

Радіальний градієнт ультраструктури мітохондрій у коренях *Pisum sativum* L.

Представлено членом-кореспондентом НАН України Є.Л. Кордюм

Тканинна гіпоксія кореня наземних рослин у середовищі, насиченому киснем, обумовлена високою щільністю тканини та утилізацією кисню в процесі клітинного дихання і простежується у формі поступового зниження концентрації кисню від поверхні органу. Дану природну модель використано на прикладі головного кореня 5-добових проростків *Pisum sativum* L. для дослідження ультраструктури мітохондрій у тканині, де знижується вміст кисню. Встановлено, що у напрямі від поверхні кореня до ендодерми відбувається поступове збільшення розміру органел, обумовлене набряканням та частково злиттям органел. Утворення однієї глибокої інвагінації призводить до формування чашоподібних органел. Такі зміни в структурі органел названо радіальним градієнтом ультраструктури мітохондрій, який демонструє послідовну перебудову органел на фоні зниження концентрації кисню в тканині. Припускається, що зміна структури мітохондрій може бути неспецифічною відповіддю на дію чинників, які обумовлюють інгібування їхніх енергетичних та/або метаболічних функцій.

Ключові слова: мітохондрія, корінь, ультраструктура, гіпоксія.

Кисень є необхідним компонентом середовища для існування аеробних організмів, оскільки використовується в процесі клітинного дихання, де виступає кінцевим акцептором електронів у електронно-транспортному ланцюзі мітохондрій (ЕТЛ). Гіпоксія тканин є поширеним явищем у рослинному організмі і обумовлена просторовою організацією тканин у нормі та лімітуванням кисню в зовнішньому середовищі за умов затоплення [1]. Досягнуто значного прогресу в дослідженні молекулярних і сигнальних шляхів у адаптації клітинного дихання та регуляції метаболічних шляхів під час гальмування або зупинки окиснювального фосфорилування за умов індукованої гіпоксії й аноксії [2, 3]. Водночас немає цілісного уявлення щодо перебудови мітохондрію клітин та її значення в адаптивних змінах метаболізму як в умовах гіпоксії, так і під дією інших абіотичних стресів. Як відомо, просторова структура мітохондрій вважається одним із ключових факторів, які визначають біоенергетичний статус клітин [4].

Цитування: Бриков В.О. Радіальний градієнт ультраструктури мітохондрій у коренях *Pisum sativum* L. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2020. № 11. С. 78–84. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.11.078>

Тканинна гіпоксія обумовлена утилізацією кисню в процесі клітинного дихання, а також потужністю тканинного бар'єра, що перешкоджає його надходженню із середовища, а також власне вмістом газу в середовищі [5]. Із використанням мікроелектродів показано, що вміст кисню поступово знижується в тканинах кореня від поверхні і становить 20 та 40 % у центральному циліндрі кукурудзи та гороху відповідно [6, 7]. Для нуту даний показник становить близько 8 % (0,007 кПа), що знаходиться на нижній межі чутливості мікроелектрода. Зі зниженням концентрації кисню в середовищі до 3,7 кПа розширюється центральна аноксична зона, яка сягає зовнішніх шарів кори [8]. Таким чином, корені наземних рослин, наприклад гороху, є вельми привабливою природною моделлю для дослідження ультраструктури мітохондрію та їх тканинної топології, тобто формування градієнта.

Матеріал та методи дослідження. *Рослинний матеріал та умови експерименту.* Об'єктом дослідження були кореневі апекси зародкових коренів *Pisum sativum* L. сорту Альфа. Насіння гороху підготовляли та загортали в трубочки з фільтрувального паперу. Проростки вирощували в темряві при 22–24 °С протягом 5 діб. Даний метод пророщення рослин забезпечує максимальний рівень аерації ризосфери. У міру необхідності трубочки з проростками зволожували дистильованою водою. У дослідженні використовували корені завдовжки 8–9 см.

Для електронної мікроскопії кореневі апекси завдовжки 4–5 мм відсікали та поміщали в розчин 2,5 % глутарового альдегіду ($C_5H_8O_2$) на 0,1 М натрій-кокодилатному буфері (рН 7,2). Постфіксацію зразків проводили розчином 1 % OsO_4 протягом 4 год при 4 °С. Після цього зразки промивали дистильованою водою і зневоднювали в серії спиртів зростаючої концентрації та ацетоні, потім заливали сумішшю епон–аралдит за стандартним методом.

Ультратонкі зрізи (50–70 нм) отримували на ультрамікротомі MT-XL (RMC, США) і контрастували ураніл ацетатом та цитратом свинцю. Зразки досліджували на електронних мікроскопах JEM 1200EX та JEM 1230EX (JEOL, Японія) і фотографували на плівку Alliance Camera CE (Agfa). Негативні зображення мікрофотографій зі збільшенням від 1500 до 15000 сканували, використовуючи Perfection V700 (Epson). Отримані цифрові зображення аналізували за допомогою програмного забезпечення Image J (<http://imagej.nih.gov>). Для оцінки розміру мітохондрій вимірювали площу кожної окремої органели на зрізах у різних шарах клітин у радіальному напрямі.

Статистичний аналіз. Отримані цифрові дані опрацьовували статистично за допомогою програмного забезпечення R (RStudio) та Excel (Microsoft). Для аналізу розмірів органел у вибірках використовували однофакторний дисперсійний аналіз і тест Тьюкі.

Результати та їх обговорення. Під час дослідження ультраструктури клітин головного кореня проростків гороху виявлено істотні відмінності в ультраструктурній організації мітохондрій у різних шарах клітин кори ростової зони кореня. Зміни ультраструктури мітохондрій мали градієнтний характер, тобто поступова зміна конформації органел відбувалася в радіальному напрямі. У клітинах епідермісу, першого (субепідерміс), другого та третього шарів кори мітохондрії, незалежно від розмірів, мали гладку поверхню без інвагінацій (рис. 1 а, б, в). Деяко розширені кристи рівномірно заповнювали матрикс середньої електронної щільності. У клітинах 4-го шару кори у напрямі до центрального циліндра спостерігалися мітохондрії з однією, рідше двома інвагінаціями (див. рис. 1, г). У матриксі

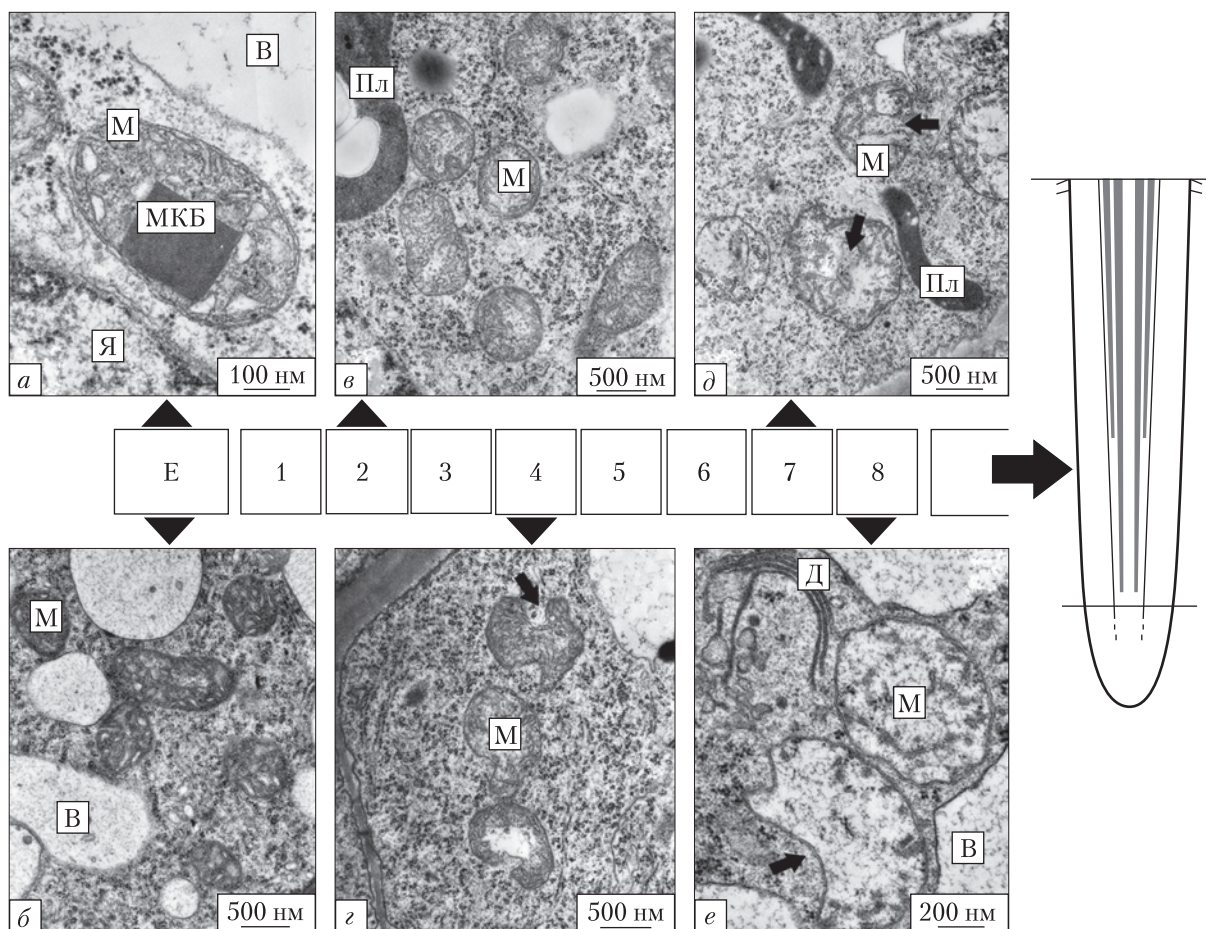


Рис. 1. Радіальний градієнт ультраструктури мітохондрій у клітинах епідермісу (Е) та послідовних шарах кори кореня гороху. а, б – епідерміс, в – 2-й, г – 4-й, д – 7-й, е – 8-й шар кори. М – мітохондрія, В – вакуоль, Я – ядро, МКБ – мітохондріальний білковий кристал, Д – диктіосома. Стрілки вказують на глибокі інвагінації оболонки мітохондрій

таких органел містилися електроннопрозорі ділянки, звужені кристи займали периферію органел. У 5–8-му шарах кори мітохондрії сильно набрякали і набували неправильної форми, часто з однією глибокою інвагінацією (див. рис. 1, д, е). Інколи в клітинах траплялися органели, що мали кільцеподібну форму на зрізах, де в просвіті розрізнялися елементи цитоплазми (див. рис. 1, д). Матрикс органел був низької електронної щільності, розріджений, кристи сильно звужені. Мітохондрії в клітинах кореневого чохла на рівні дистальної зони розтягу та епідермісу кореня за ультраструктурними ознаками були конденсованими, в ендодермі – набряклими. Загалом ультраструктура мітохондрій у клітинах кореневого апекса залежала насамперед від глибини залягання шару клітин у корені.

Аналіз розміру мітохондрій у різних шарах кори коренів гороху показав, що вони різко збільшуються від периферії кореня до центрального циліндра (рис. 2), що пов'язано з глибиною залягання клітинного шару. Збільшення розміру мітохондрій у радіальному напрямку кореня має логарифмічний характер ($R^2 = 0,98$). Середній розмір мітохондрій зростає, по-

Рис. 2. Площа мітохондрій у клітинах кореневого чохла (Ч), епідермісу (Е) та послідовних шарах (1–8) кори дистальної зони розтягу кореня 5-добових етіюльованих проростків гороху. Дані наведені у вигляді коробкових діаграм Ме [25 %; 75 %], де Ме – медіана, 25 %; 75 % – значення першої і третьої кватилі, що включає 50 % значень вибірки, графічно відрізками вказаний діапазон Ме±1,5 кватилі. Різними літерами позначено статистично значущі відмінності

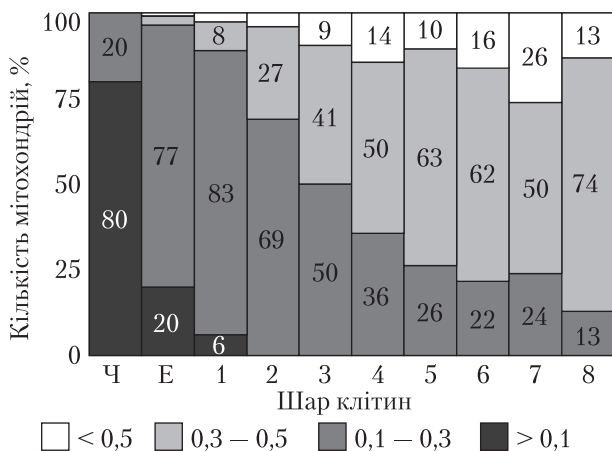
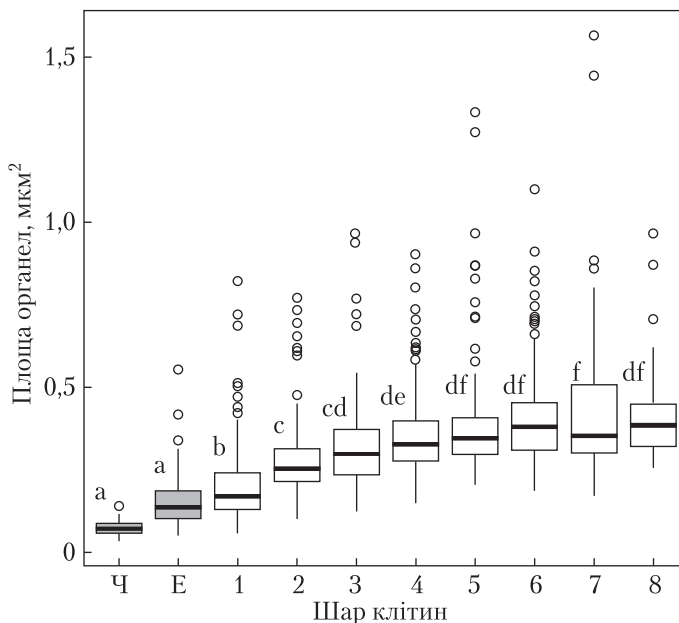


Рис. 3. Діаграма розподілу мітохондрій за площею в клітинах кореневого чохла (Ч), епідермісу (Е) та послідовних шарах (1–8) кори 5-добових етіюльованих проростків гороху на рівні дистальної зони розтягу кореня

чинаючи із субепідермісу до 5-го шару кори в 2 рази з 0,2 до 0,4 мкм², далі середній розмір органел не змінюється. Загалом мітохондріальна популяція в клітинах кожного шару є достатньо гомогенною за розміром (рис. 3). Домінуючим класом мітохондрій у чохлаку є дрібні конденсовані

органели розміром >0,1 мкм², від епідермісу до 3-го шару клітин кори – органели розміром 0,1–0,3 мкм², у шарах, що залягають глибше, – 0,3–0,5 мкм². Крім того, починаючи з 3-го шару вглиб кори в мітохондрію клітин спостерігається істотна частка (9–26 %) органел розміром >0,5 мкм², що приблизно в 7 разів перевищує за площею середнє значення розміру мітохондрій в епідермісі. У 5–7-му шарах кори мітохондрії можуть досягати розміру 1–1,6 мкм². У різних коренях градієнтні зміни ультраструктури мітохондрій у напрямі до центрального циліндра можуть бути виражені різною мірою. Якщо конденсовані мітохондрії в епідермісі є постійною ознакою для всіх досліджених коренів, то у напрямі до центрального циліндра інтенсивність змін ультраструктури на ортодоксальну може варіювати. Ступінь набрякості мітохондрій та інвагінацій в ендодермі різних коренів відрізняється, але в будь-якому випадку перебудова ультраструктури органел відбувається за описаним вище принципом.

У периферійних клітинних шарах кореня гороху мітохондрієм представлений у формі дискретних органел овальної та округлої форми, які є характерними для рослинних клітин загалом. Істотне зростання площі органел на зрізах у 5–8-му шарах кори може бути наслідком злиття органел в умовах гіпоксії. Показано, що дискретний мітохондрієм суспензійної культури *Nicotiana tabacum*, а також клітин мезофілу *Arabidopsis thaliana* в умовах гіпоксії переформатовується в ретикулум, де довжина окремих мітохондрій сягає 80 мкм [9, 10]. Злиття та формування гігантських мітохондрій відбувається в коренях пшениці у разі одночасної дії інгібіторів дихання (ротенон + антимицин А) [11]. Відповідь транскриптому клітин під дією антимицину А є найбільш подібною за механізмом дії до гіпоксії [2]. Відносне зниження енергетичного статусу клітин гіпокотила *A. thaliana* в умовах темряви призводить до формування видовжених органел, і навпаки, за високоенергетичного статусу клітин в умовах освітлення або наявності екзогенної сахарози мітохондрії зберігають дрібні розміри [12]. Таким чином, гіпоксія, а також фактори, що обмежують енергетичні функції мітохондрію спричиняють до злиття органел і збільшення їхніх розмірів.

На зрізах клітин внутрішніх шарів кори в основному спостерігаються мітохондрії з глибокою інвагінацією, а також кільцеподібної форми. За допомогою серійних зрізів показано, що мітохондрії кільцеподібної форми, що формуються у відповідь на комбіновану дію ротенону та антимицину А, є зрізами чашоподібних органел і тільки незначна частина кільцеподібних профілів мітохондрій на зрізах має просторову форму тороїду [13]. Формування такої форми органел відбувається також під дією охолодження, інгібіторів дихання та засолення [13–15] і, очевидно, є неспецифічною відповіддю мітохондрій на вплив несприятливих для їхнього функціонування факторів. Радіальний градієнт ультраструктури мітохондрій, виявлений нами у клітинах кори коренів гороху, ілюструє послідовні етапи зміни просторової конформації органел, а саме перетворення сферичних органел на чашоподібні в умовах градієнта кисню. Ми припускаємо, що злиття органел і поява в них глибоких інвагінацій, що призводить до збільшення площі контакту органел із цитозолем та інтеграції внутрішніх мітохондріальних мембран, є захисною структурною реакцією, що уніфікує метаболітичну і сигнальну відповідь мітохондрію на несприятливі умови. Вважаємо, що багат шарова структура щільно розміщених клітин зародкового кореня, а також адвентивних коренів, зокрема коренів із наявністю повітроносних порожнин — аеренхіми, є вдалими природними системами для дослідження індукованих гіпоксією структурних перебудов мітохондрій і з'ясування їхнього внеску у зміни енергетичного метаболізму клітин у тканинах коренів.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Van Dongen J.T., Licausi F. Oxygen sensing and signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2015. **66**. P. 345–367.
2. Wagner S., Van Aken O., Elsässer M., Schwarzländer M. Mitochondrial energy signaling and its role in the low-oxygen stress response of plants. *Plant Physiol.* 2018. **176**. P. 1156–1170.
3. Nakamura M., Noguchi K. Tolerant mechanisms to O₂ deficiency under submergence conditions in plants. *J. Plant Res.* 2020. **133**. P. 343–371.
4. Baker N., Patel J., Khacho M. Linking mitochondrial dynamics, cristae remodeling and supercomplex formation: How mitochondrial structure can regulate bioenergetics. *Mitochondrion.* 2019. **49**. P. 259–268.

5. Armstrong W., Armstrong J. Plant internal oxygen transport (diffusion and convection) and measuring and modelling oxygen gradients: van Dongen J., Licausi F. (Eds.). *Low-oxygen stress in plants*. Vienna: Springer, 2014. P. 267–297. (Plant Cell Monographs. Vol. 21). https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1254-0_14
6. Zabalza A., Van Dongen J.T., Froehlich A., Oliver S.N., Faix B., Gupta K.J., Schmäzlin E., Igal M., Orcaray L., Royuela M., Geigenberger P. Regulation of respiration and fermentation to control the plant internal oxygen concentration. *Plant Physiol.* 2009. **149**. P. 1087–1098.
7. Gibbs J., Turner D.W., Armstrong W., Darwent M.J., Greenway H. Response to oxygen deficiency in primary roots of maize. I. Development of oxygen deficiency in the stele reduces radial solute transport to the xylem. *Aust. J. Plant Physiol.* 1998. **25**. P. 745–758.
8. Colmer T.D., Winkel A., Kotula L., Armstrong W., Revsbech N.P., Pedersen O. Root O₂ consumption, CO₂ production and tissue concentration profiles in chickpea, as influenced by environmental hypoxia. *New Phytol.* 2020. **226**. P. 373–384. <https://doi.org/10.1111/nph.16368>
9. Van Gestel K., Verbelen J.P. Giant mitochondria are a response to low oxygen pressure in cells of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *J. Exp. Bot.* 2002. **53**. P. 1215–1218.
10. Ramonell K.M., Kuang A., Porterfield D.M., Crispi M.L., Xiao Y., Mclure G., Musgrave M.E. Influence of atmospheric oxygen on leaf structure and starch deposition in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 2001. **24**. P. 419–428.
11. Rakhmatullina D., Ponomareva A., Gazizova N., Minibayeva F. Mitochondrial morphology and dynamics in *Triticum aestivum* roots in response to rotenone and antimycin A. *Protoplasma*. 2016. **253**. P. 1299–1308. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0888-0>
12. Jaipargas E.-A., Barton K.A., Mathur N., Mathur J. Mitochondrial pleomorphy in plant cells is driven by contiguous ER dynamics. *Front. Plant Sci.* 2015. **6**. P. 783. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00783>
13. Ponomareva A.A., Polygalova O.O. Changes in mitochondrial shape in wheat root cells exposed to mitochondrial poisons. *Russ. J. Plant Physiol.* 2012. **59**. P. 428–433.
14. Vella N.G.F., Joss T.V., Roberts T.H. Chilling-induced ultrastructural changes to mesophyll cells of *Arabidopsis* grown under short days are almost completely reversible by plant re-warming. *Protoplasma*. 2012. **249**. P. 1137–1149. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0363-5>
15. Xi Y.X. NaCl-induced amoeboid plastids and mitochondria in meristematic cells of barley roots. *Biol. Plant.* 1995. **37**. P. 363–369. <https://doi.org/10.1007/BF02913979>

Надійшло до редакції 28.09.2020

REFERENCES

1. Van Dongen, J. T. & Licausi, F. (2015). Oxygen sensing and signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 66, pp. 345-367.
2. Wagner, S., Van Aken, O., Elsässer, M. & Schwarzländer, M. (2018). Mitochondrial energy signaling and its role in the low-oxygen stress response of plants. *Plant Physiol.*, 176, pp. 1156-1170.
3. Nakamura, M. & Noguchi, K. (2020). Tolerant mechanisms to O₂ deficiency under submergence conditions in plants. *J. Plant Res.*, 133, pp. 343-371.
4. Baker, N., Patel, J. & Khacho, M. (2019). Linking mitochondrial dynamics, cristae remodeling and supercomplex formation: How mitochondrial structure can regulate bioenergetics. *Mitochondrion*, 49, pp. 259-268.
5. Armstrong, W. & Armstrong, J. (2014). Plant internal oxygen transport (diffusion and convection) and measuring and modelling oxygen gradients. In van Dongen, J., Licausi, F. (Eds.). *Low-oxygen stress in plants* (pp. 267-297). *Plant Cell Monographs* (Vol. 21). Vienna: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1254-0_14
6. Zabalza, A., Van Dongen, J. T., Froehlich, A., Oliver, S. N., Faix, B., Gupta, K. J., Schmäzlin, E., Igal, M., Orcaray, L., Royuela, M. & Geigenberger, P. (2009). Regulation of respiration and fermentation to control the plant internal oxygen concentration. *Plant Physiol.*, 149, pp. 1087-1098.
7. Gibbs, J., Turner, D. W., Armstrong, W., Darwent, M. J. & Greenway, H. (1998). Response to oxygen deficiency in primary roots of maize. I. Development of oxygen deficiency in the stele reduces radial solute transport to the xylem. *Aust. J. Plant Physiol.*, 25, pp. 745-758.

8. Colmer, T. D., Winkel, A., Kotula, L., Armstrong, W., Revsbech, N. P. & Pedersen, O. (2020). Root O₂ consumption, CO₂ production and tissue concentration profiles in chickpea, as influenced by environmental hypoxia. *New Phytol.*, 226, pp. 373-384. <https://doi.org/10.1111/nph.16368>
9. Van Gestel, K. & Verbelen, J. P. (2002). Giant mitochondria are a response to low oxygen pressure in cells of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *J. Exp. Bot.*, 53, pp. 1215-1218.
10. Ramonell, K. M., Kuang, A., Porterfield, D. M., Crispi, M. L., Xiao, Y., Mclure, G. & Musgrave, M. E. (2001). Influence of atmospheric oxygen on leaf structure and starch deposition in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Envir.*, 24, pp. 419-428.
11. Rakhmatullina, D., Ponomareva, A., Gazizova, N. & Minibayeva, F. (2016). Mitochondrial morphology and dynamics in *Triticum aestivum* roots in response to rotenone and antimycin A. *Protoplasma*, 253, pp. 1299-1308. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0888-0>
12. Jaipargas, E.-A., Barton, K. A., Mathur, N. & Mathur, J. (2015). Mitochondrial pleomorphy in plant cells is driven by contiguous ER dynamics. *Front. Plant Sci.*, 6, pp. 783. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00783>
13. Ponomareva, A. A. & Polygalova, O. O. (2012). Changes in mitochondrial shape in wheat root cells exposed to mitochondrial poisons. *Russ. J. Plant Physiol.*, 59, pp. 428-433.
14. Vella, N. G. F., Joss, T. V. & Roberts, T. H. (2012). Chilling-induced ultrastructural changes to mesophyll cells of *Arabidopsis* grown under short days are almost completely reversible by plant re-warming. *Protoplasma*, 249, pp. 1137-1149. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0363-5>
15. Xi, Y. X. (1995). NaCl-induced amoeboid plastids and mitochondria in meristematic cells of barley roots. *Biol Plant.*, 37, pp. 363-369. <https://doi.org/10.1007/BF02913979>

Received 28.09.2020

V.O. Brykov

M.G. Kholodny Institute of Botany of the NAS of Ukraine, Kyiv

E-mail: vbrykov@gmail.com

RADIAL GRADIENT OF THE MITOCHONDRIAL ULTRASTRUCTURE IN *PISUM SATIVUM* L. ROOTS

Tissue hypoxia in roots of terrestrial plants in the environment saturated with oxygen is conditioned by the high tissue density and oxygen utilization during the cellular respiration, and it is followed by a gradual decrease in the oxygen concentration from the organ surface. We used this natural model on the example of the main roots of 5-day-old seedlings of *Pisum sativum* L. growing under well-aerated conditions to study the ultrastructure of mitochondria in tissue with reducing oxygen content. In the direction from the root surface to the endodermis, it was found a gradual increase in the size of mitochondria due to swelling and partial fusion of the organelles. The formation of one dominant invagination led to the appearance of cup-shaped organelles in inner cortex cell layers. Such successive changes in the structure of organelles were called the radial gradient of the mitochondrial ultrastructure under a gradual decrease in the cell oxygen content. It is suggested that the described transformations in the mitochondrial ultrastructure could be an unspecific response to conditions that limit their energy and / or metabolic functions.

Keywords: *mitochondrion, ultrastructure, root cortex, low oxygen, cup-shaped mitochondria.*