

УДК 57.012.4/017.7:576.311.347:57.045

В.О. БРИКОВ

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України
вул. Терещенківська, 2, Київ, МСП – 1, 01601

УЛЬТРАСТРУКТУРА МІТОХОНДРІЙ ТА ДИХАННЯ КОРЕНІВ *PISUM SATIVUM* L. В УМОВАХ МОДЕЛЬОВАНОЇ МІКРОГРАВІТАЦІЇ

Наведені дані досліджень ультраструктури мітохондрій в різних ростових зонах кореня гороху після 3-и добового клінонстатування. Показано, що тільки в дистальній зоні розтягу кореня під впливом клінонстатування відбувається помірна конденсація мітохондрій. Швидкість поглинання кисню кореневими апексами *in vivo*, а також максимальна ємність альтернативного електронно-транспортного ланцюга не змінювалися, що свідчить про стійкість цих загальних параметрів функціонування мітохондрій до дії модельованої мікрогравітації.

Ключові слова: клінонстатування, мітохондрії, ультраструктура, тканинне дихання

Структурно-функціональна організація рослинних мітохондрій є надзвичайно пластичною, що забезпечує адаптацію клітин до постійного пресингу навколишнього середовища. Під впливом клінонстатування та реальної мікрогравітації раніше в літературі описані структурні перебудови мітохондрій у різних видів рослин, виявлені за допомогою електронно-мікроскопічного методу. Спектр цих перебудов надзвичайно широкий – від набухання органел [8] до їх конденсації [2], від редукції крист [2] до появи замкнених на собі крист, розміщених концентрично [7]. Дані щодо перебудов ультраструктури мітохондрій в рослинних клітинах торкаються переважно гравірецепторних клітин кореневого чохла та меристематичних клітин власне кореня і можуть відображати, на думку авторів, досить широкий спектр змін у функціонуванні органел в цих умовах. Наші попередні дослідження ультраструктури мітохондрій в різних ростових зонах кореня показали, що після 5-ти добового клінонстатування мітохондрії не зазнавали структурних змін у меристемі та центральній зоні розтягу (ЦЗР) кореня, але разом з тим помірно конденсувалися в дистальній зоні розтягу (ДЗР) [1]. Залишається досі не відомим, яким чином така неоднакова реакція мітохондрій в різних ростових зонах кореня відображає загальний стан функціонування системи окислювального фосфорилування органел у відповідь на дію модельованої мікрогравітації. Отже, метою даної роботи було встановлення швидкості поглинання кисню кореневими апексами на фоні перебудов ультраструктури мітохондрій під впливом модельованої мікрогравітації, а також визначення ємності альтернативного електронно-транспортного шляху, активація якого в стресових умовах може суттєво зменшувати ефективність окислення субстратів мітохондріями [6].

Матеріал і методи досліджень

Моделювання мікрогравітації проводили за допомогою повільного горизонтального клінонстатування з швидкістю обертання ротора 2 об/хв. Попередньо відібране насіння *Pisum sativum* L. сорту Альфа клінонстатували на протязі 3-х діб, після чого відразу відсікали кореневі апекси довжиною 4-6 мм та фіксували матеріал для електронно-мікроскопічного дослідження по методу описаному раніше [1]. Ультратонкі зрізи (50-70 нм) отримували на мікротомі RMC MT-XL (США) та контрастували ураніл ацетатом і цитратом свинцю [5]. Зразки досліджували на електронних мікроскопах JEM 1200EX та JEM 1230EX (Японія). На знімках вимірювали площу мітохондрій на зрізах та відношення площі крист до загальної площі органели на зрізі (відносна площа крист).

Дослідження поглинання кисню кореневими апексами гороху (4-6 мм) визначали за допомогою кисневого електроду полярографічним методом на приладі Hansatech (Англія).

Відсічені кореневі апекси відразу поміщали у термостатовану (24°C) електродну чашу з дистильованою водою, та відразу починали вимірювання швидкості поглинання кисню на протязі 10-15 хв., в часовому інтервалі, поки дихання носило лінійний характер. Максимальну смність альтернативного електронно-транспортного шляху, або KCN-резистентне дихання, визначали як швидкість поглинання кисню у присутності оптимальної концентрації KCN як інгібітору цитохромного електронно-транспортного шляху. Визначення оптимальної концентрації KCN, яка склала 3 мМ, проводили у спеціальному титрувальному експерименті.

Використовували стандартні методи статистичного аналізу для 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 у формі коробчастих діаграм $Me [25\%;75\%]$ на рис.2, де Me – медіана, 25% 75% – значення першої і третьої квартилі, що включає 50% варіант вибірки, мінімальне і максимальне значення.

Результати досліджень та їх обговорення

Дослідження ультраструктури мітохондрій у різних ростових зонах кореня 3-х добових проростків гороху показало, що кліноостатування викликало деякі зміни структури органел в ДЗР кореня (рис. 1), в той же час не відбувалося змін в структурі органел в меристемі власне кореня в ЦЗР. Зміни ультраструктури мітохондрій в ДЗР кореня полягали у помірній конденсації органел, що виявлялася у зменшенні їх розміру (рис. 2), збільшенні відносної площі крист на зрізах (таблиця), підвищенні електронної щільності матриксу, а також у зменшенні площі, або ж взагалі відсутності електронно прозорих ділянок у матриксі (рис.1). Дослідження впливу кліноостатування на ультраструктуру мітохондрій у різних ростових зонах кореня у 5-ти добових проростків, проведене в наших попередніх аналогічних досліджень [1], теж показало появу конденсованих мітохондрій саме в ДЗР кореня. Зміни в ультраструктурі мітохондрій чіткіше простежуються після 5-ти добового кліноостатування, що дає підставу припустити посилення впливу кліноостатування на процес дихання мітохондрій із збільшенням його тривалості.

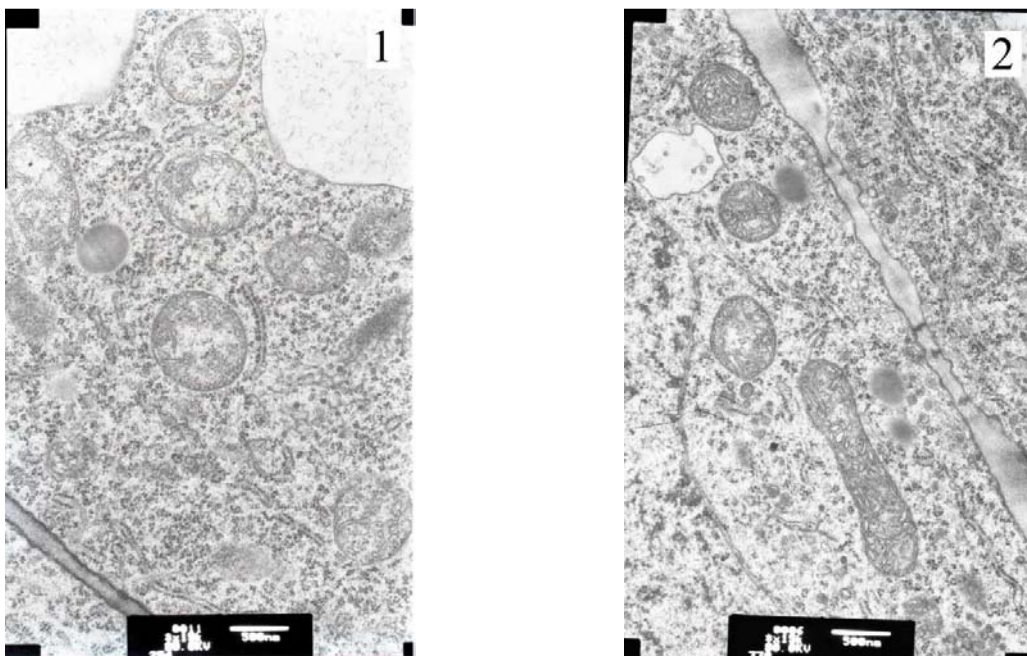


Рис. 1. Фрагменти клітин ДЗР 3-х добових проростків гороху в контролі (1) та після кліноостатування (2). Масштаб – 500 нм

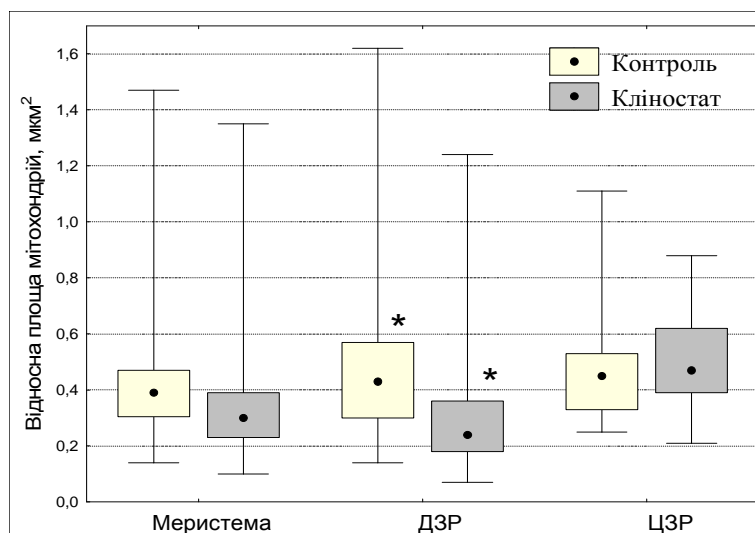


Рис. 2. Вплив 3-и добового кліноустатування на розмір мітохондрій у різних ростових зонах кореня гороху. * – достовірна різниця між значеннями

Таблиця

Вплив 3-и добового кліноустатування на відносну площу крист у мітохондріях у ростових зонах кореня гороху. * – достовірна різниця між значеннями. n – кількість досліджених органел

Ростова зона кореня	Відносна площа крист у мітохондріях, %	
	Контроль	Кліноустатування
Меристема	7.1±1.80 (n=47)	7.5±1.91 (n=62)
ДЗР	10.1±2.15* (n=69)	14.0±3.87* (n=71)
ЦЗР	9.3±2.63 (n=47)	9.0±2.64 (n=49)

Встановлено, що кліноустатування на протязі 3-х діб суттєво не впливало на швидкість поглинання кисню кореневими апексами гороху (рис. 3).

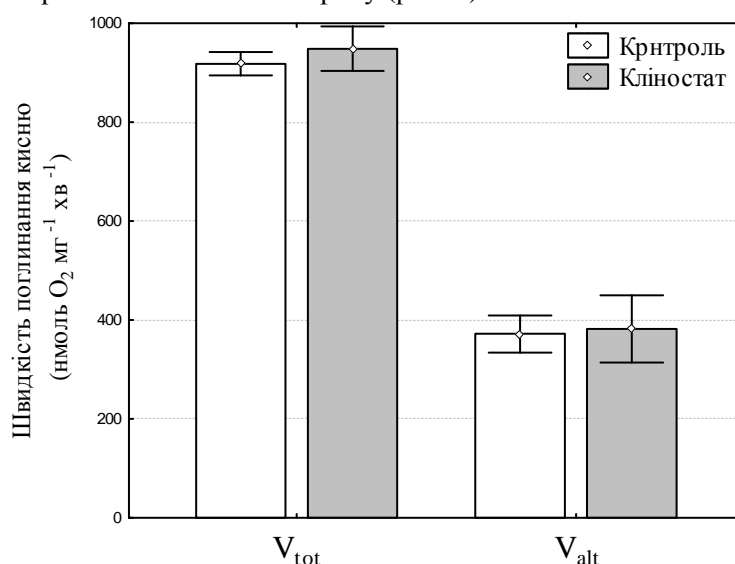


Рис. 3. Загальна швидкість поглинання кисню (V_t) та максимальна ємність альтернативного електронно-транспортного ланцюгу (V_{alt}) у корневих апексах 3-идобових проростків гороху в контролі та після кліноустатування

Відомо, що реальна мікрогравітація та її моделювання в лабораторних умовах несе відчутний негативний вплив на ультраструктуру та функціонування мітохондрій тваринних

клітин. Так, поруч з появою деструктивних змін структури мітохондрій, зафіксовано зниження трансмембранного потенціалу мітохондрій [3], зниження внутрішньоклітинного рівня АТФ [9]. Припускаємо, що ці зміни мітохондрій не є реакцією на відсутність гравітаційного стимулу, а можуть бути наслідком порушення клітинного метаболізму внаслідок зменшення функціонального навантаження органел. Порівнюючи реакцію мітохондрій тваринних та рослинних клітин можна сказати, що якраз мітохондріям рослинних клітин притаманна більша стійкість до умов мікрогравітації. Відомо, що рослинні мітохондрії володіють унікальною розгалуженою системою електронного транспорту [4], фізіологічною роллю якої, вважається, є забезпечення функціонування органел в стресових умовах середовища [6]. Дослідження ємності альтернативного електрон-транспортного шляху, який є частиною цієї системи, показало відсутність змін у його функціонуванні при дії кліностагування (рис. 3). На підставі одержаних даних ми припускаємо, що за умов кліностагування у рослинних мітохондріях функціонують певні компенсаторні механізми, що дозволяють органелам успішно функціонувати в цих умовах.

Висновки

Встановлено, що мітохондрії в різних ростових зонах кореня виявляють різну чутливість на структурному рівні до дії модельованої мікрогравітації. Виявлені зміни в структурі мітохондрій, тобто їх конденсація, відбуваються тільки в клітинах ДЗР кореня. Припускається, що дані структурні перебудови пов'язані із специфічними фізіологічними властивостями ДЗР і відображають зрушення в енергетичному метаболізмі клітин цієї зони. Відсутність змін у швидкості поглинання кисню кореневими апексами та ємності альтернативного електронно-транспортного шляху, досліджених *in vivo*, свідчить про стійкість цих фізіологічних параметрів функціонування мітохондрій до дії модельованої мікрогравітації.

1. Бриков В.О. Ультраструктура мітохондрій у клітинах різних ростових зон кореня *Pisum sativum* L. при кліностагуванні / В.О. Бриков // Укр. ботан. журн. – 2009. – Т. 66, №5. – С. 722 – 729.
2. Климчук Д.О. Структурно-функціональні особливості мітохондрій в статочитах коренів сої за умов мікрогравітації / Д.О. Климчук // Цитология и генетика. – 2007. – Т. 41, №1. – С. 30 – 35.
3. Degan P. Exposure of human lymphocytes and lymphoblastoid cells to simulated microgravity strongly affects energy metabolism and DNA repair / P. Degan, M. Sancandi, A. Zunino [et al.] // J Cell. Biochem. – 2004. – Vol. 94, № 3. – P. 460 – 469.
4. Møller I.M. A new dawn for plant mitochondrial NAD(P)H dehydrogenases // TRENDS in Plant Science / I.M. Møller. – 2002. – Vol.7, № 6 – P. 235 – 237.
5. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy / E.S. Reynolds // J. Cell Biol. – 1963. – Vol. 17, №1. – P. 208 – 212.
6. Plaxton W.C. The functional organization and control of plant respiration / W.C. Plaxton, E.F. Podestá // Crit. Rev. Plant. Sci. – 2006. – Vol. 25, №2. – P. 159 – 198.
7. Popova A.F. Comparative characteristic of mitochondria ultrastructural organization in *Chlorella* cells under altered gravity conditions / A.F. Popova // Adv. Space Res. – 2003. – Vol. 31, №10. – P. 2253 – 2259.
8. Slocum R.D. Cytological and ultrastructural studies on root tissues / R.D. Slocum, J.J. Gaynor, A.W. Galston // Ann. Bot. – 1984. – Vol. 54. – P. 65 – 76.
9. Yang H. Clinostat Rotation Induces Apoptosis in Luteal Cells of the Pregnant Rat / H. Yang, G.K. Bhat, R. Sridaran // Biol. Reprod. – 2002. – Vol. 66, № 3. – P. 770 – 777.

В.А. Брыков

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

УЛЬТРАСТРУКТУРА МИТОХОНДРИЙ И ДЫХАНИЕ КОРНЕЙ *PISUM SATIVUM* L. В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ МИКРОГРАВИТАЦИИ

Проведено исследование ультраструктуры митохондрий в разных ростовых зонах корня гороха под воздействием 3-х суточного клиностагирования. Установлено, что происходит конденсация митохондрий только в дистальной зоне растяжения корня. Исследование *in vivo* скорости поглощения кислорода корневыми апексами, а также емкости альтернативного

електронно-транспортного пути показало устойчивость этих общих параметров функционирования митохондрий к действию моделированной микрогравитации.

Ключевые слова: клинотатирование, митохондрии, ультраструктура, тканевое дыхание

V.O. Brykov

Institute of Botany of National Academy of Science of Ukraine, Kyiv

MITOCHONDRIAL ULTRASTRUCTURE AND PEA ROOT TISSUE RESPIRATION IN SIMULATED MICROGRAVITY

We investigated the mitochondria ultrastructure in different zones of *Pea* root under clinorotation. The condensation of mitochondria was found only in the distal elongation zone of the root. *In vivo* investigations of total oxygen uptake by the root apexes as well as capacity of alternative pathway have shown that above parameters of mitochondria functioning are tolerant to the impact of simulated microgravity.

Key words: clinorotation, mitochondria, ultrastructure, root tissue respiration

Рекомендує до друку

Надійшла 22.09.2010

М.М. Барна

УДК 581.557:582.739

А.В. ВІТЕР, Н.Е. ЕЛЛАНСЬКА, О.В. ЗАКРАСОВ, Г.І. КРИВОРЧУК, О.П. ЮНОШЕВА

Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України
вул. Тимірязєвська, 1, Київ, 01014

РОЗВИТОК КОРЕНІВ І КОРЕНЕВИХ БУЛЬБОЧОК У СИМБІОТИЧНІЙ СИСТЕМІ ЛЮЦЕРНА ПОСІВНА – SINORHIZOBIUM MELILOTI ПІД ВПЛИВОМ КЛІНОСТАТУВАННЯ

Вивчали закономірності впливу кліностатування на морфометричні показники коренів рослин люцерни посівної сорту Ярославна, вирощеної з насіння, інфікованого спонтанно малопродуктивними щодо азотфіксації дикими формами ризобій й інокульованого *Sinorhizobium meliloti* вискоєфективного штаму 441, а також бульбочок на коренях. Встановлено, що в умовах імітованої мікрогравітації пригнічується ріст кореня між 30-ою та 50-ою добами з моменту висіву насіння порівняно зі стаціонарним варіантом. Відзначено, що кліностатування помітно не впливає на кореневі бульбочки як спеціалізований орган азотфіксації. Умови належного азотного забезпечення як результат взаємодії люцерни посівної з ризобіями вказаного штаму сприяють прояву ефектів кліностатування.

Ключові слова: *Medicago sativa* L., *Sinorhizobium meliloti*, кліностатування, кореневі бульбочки, морфометричні показники

Незважаючи на те, що різні рослинні організми використовували як об'єкти для вивчення впливу мікрогравітації, комплексні дані щодо розвитку азотфіксуючих біосистем в цих умовах досить обмежені [1, 6-8, 11]. Результати окремих раніше проведених досліджень за умов мікрогравітації дали змогу виявити певні відмінності структурних показників рослин [3, 4, 8]. Автори вважають, що однією з причин таких відхилень можуть бути порушення, пов'язані з живленням рослин у цих умовах.

Бобово-ризобіальні симбіози з властивою їм азотфіксацією представляють науковий інтерес, перш за все, для розробки і впровадження нових технологій удобрення рослин в