

Д.О. КЛИМЧУК

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, Київ
E-mail: dklmchuk@zeos.net

СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ МІТОХОНДРІЙ В СТАТОЦИТАХ КОРЕНІВ СОЇ ЗА УМОВ МІКРОГРАВІТАЦІЇ



Проведено дослідження впливу мікрогравітації та етилену на морфологію та ультраструктурну організацію мітохондрій в статоцитах кореневого апексу 6-добових проростків сої, що експонувалися на борту Колумбія STS-87. Проростки вирощували в герметичних контейнерах в присутності КМпО, для нейтралізації етилену. Встановлено, що більшість мітохондрій в клітинах польотних проростків незалежно від обробки КМпО, характеризувалися округлою або овальною формою та електронно просвітленим матриксом, тоді як в проростках наземних контролів органили відзначалися властивим для них поліморфізмом, більшими розмірами та вищою електронною щільністю матриксу. Розглянуто можливий механізм морфологічної та ультраструктурної перебудови органел в процесі адаптації проростків до умов мікрогравітації.

© Д.О. КЛИМЧУК, 2007

Вступ. Умови мікрогравітації викликають перебудову структурно-функціональної організації рослинних клітин [1–4], прискорене старіння вищих рослин [5–7]. Виявлено, що рослинні організми за умов мікрогравітації та кліностакування посилюють синтез етилену [8–11], утворення якого в тканинах вищих рослин відбувається з L-метіоніну [12] за участю АТФ, стимулюється в присутності відносно високих концентрацій (10^{-5} – 10^{-3} М) ауксину, цитокінінів [13]. Усунення несприятливої дії мікрогравітації вимагає дослідження її механізмів, зокрема, з'ясування взаємозв'язку прискореного розвитку з енергетичним статусом, який забезпечується в основному процесами окислювального фосфорилування, локалізованими в мітохондріях. Дослідження останніх років, проведені за допомогою прижиттєвих барвників, високовольної електронної мікроскопії, показують що мітохондрії є надзвичайно динамічними органелами. Їх субклітинний розподіл, рівень проліферації, розміри і організація внутрішньої мембрани тісно корелюють з енергетичними потребами, які варіюють в залежності від типу клітин, фази клітинного циклу, патофізіологічного стану тощо [14–16].

Водночас експериментальні дані [17–20], отримані за умов мікрогравітації та кліностакування, свідчать про зміни відносного об'єму мітохондрій, кількості крист, електронної щільності матриксу органел, які, за припущеннями авторів, зумовлені змінами їх функціональної активності. Зниження накопичення АТФ в клітинах проростків кукурудзи в умовах кліностакування корелювало з підвищенням інтенсивності дихання [21, 22]. В спеціально проведеному експерименті з проростками кукурудзи на біосупутнику «Космос-1514» відзначено зниження рівня енергетичного обміну [23], проте незначна вибірка (14 насінин на варіант) не дозволила зробити статистично переконливих висновків. В декількох дослідженнях показано наявність взаємозв'язку між кількістю крист на органелу і інтенсивністю дихання та активністю сукцинатдегідрогенази як інтегральної частини внутрішньої мембрани органел в клітинах водоростей *Funaria hydrometrica* [24], хлорели *Chlorella vulgaris* L. [25]. Слід зазначити, що обмежена кількість проведених досліджень, насамперед таких, які б поєднували показники функціональної активності з особливостями

структурної організації мітохондрій, не дозволяють зробити висновок стосовно енергетичного статусу рослинних клітин в умовах мікрогравітації, який є актуальним і потребує подальших досліджень.

В наших попередніх дослідженнях клітин кореневого апексу проростків сої, що експонувалися на борту Колумбія STS-87, було показано порушення структурної полярності статоцитів, посилення їх вакуолізації, зниження вмісту крохмалю в амілопластах [26, 27]. В даній роботі досліджено вплив умов мікрогравітації та етилену на морфологію і ультраструктурну організацію мітохондрій клітин центральної колумели проростків сої.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження були клітини центральної колумели кореневого апексу проростків сої (*Glycine max* L. [Merr.]), які вирощували на борту Шаттла «Колумбія» (STS-87) згідно з програмою спільного українсько-американського експерименту. Сухе насіння після поверхневої стерилізації загортали у фільтрувальний папір, клали в спеціальні герметичні BRIC (Biological Research in Canister) контейнери [10] діаметром 12 см і висотою 18 см. На внутрішній стороні кришки половини польотних і наземних контейнерів поміщали мішечок з п'юрафілом — хімічною речовиною, що містить 4 % перманганату калію для нейтралізації етилену. Контейнери обладнували також спеціальним пристроєм, що дозволяв відбирати з них проби повітря для визначення вмісту етилену та двоокису вуглецю в процесі проведення експерименту. За 6 діб до приземлення Шаттла до контейнерів додавали 50 мл стерильної дистильованої води для ініціації проростання насіння. Через 3 год після приземлення Шаттла контейнери при температурі 4 °С доставляли в наукову лабораторію Космічного центру ім. Д. Кеннеді (Флорида, США). Після взяття проб на стерильність кореневу систему проростків відділяли від колеоптилів, вимірювали, зважували; кореневі апекси завдовжки $4,0 \pm 0,5$ мм переносили в розчини фіксаторів.

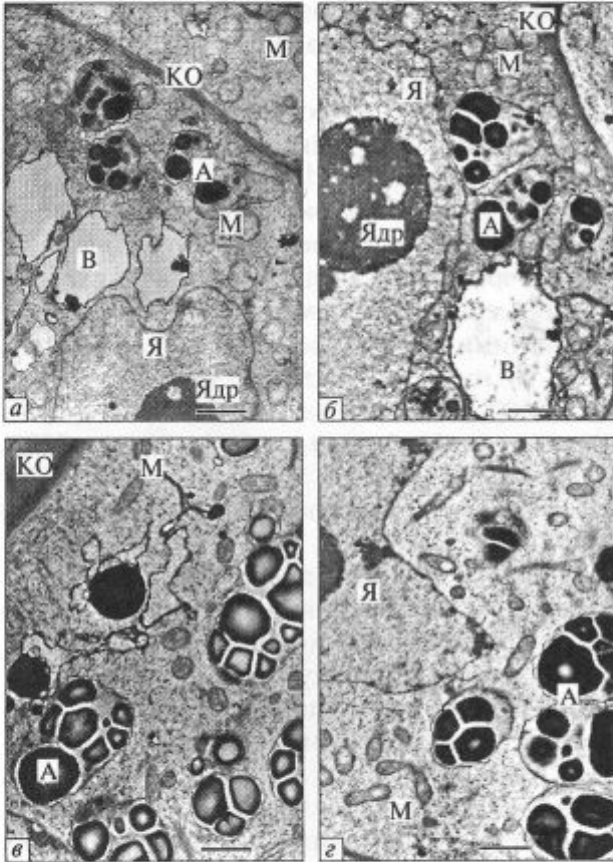
Наземний контрольний експеримент проводили з інтервалом у 2 доби для можливості відтворення в наземних умовах відхилень від запланованих умов, які могли мати місце при проведенні польотного експерименту, в на-

земних умовах. Підготовку і обробку матеріалу проводили за схемою, аналогічною польотному експерименту.

Для електронно-мікроскопічного дослідження кореневі апекси фіксували 2,5 % (об/об) глутаральдегідом на 0,1 М какодилатному буфері рН 7,2 з подальшою дофіксацією 1%-ним розчином тетроксиду осмію, збезводнювали в етанолі зростаючої концентрації та заключали у суміш епоксидних смол згідно з загальноприйнятими процедурами [28]. Зрізи товщиною 60 ± 10 нм отримували на ультрамікромомі LKB 8800, поміщали на мідні, покриті формваром сітки, фарбували цитратом свинцю [29], досліджували при 60 кВ в трансмісійному електронному мікроскопі JEM-1200 EX (JEOL, Японія).

Морфометричний аналіз проводили на електронно-мікроскопічних негативах $\times 5000$. Площу перерізу мітохондрій визначали під світлооптичним бінокулярним мікроскопом МБС-10. Тестова решіткова система, що містила 25 точок на 1 см^2 , накладалася на негатив, і кількість точок, які проектувалися на кожну органелу, були пораховані. Проаналізовано не менше 500 органел з шести головних коренів в кожному варіанті. Достовірність різниці між середніми показниками розмірів мітохондрій в досліджуваних умовах визначали, використовуючи критерій Ст'юдента [30] з ймовірністю, не меншою 95 % ($P \geq 0,95$).

Результати досліджень. Електронно-мікроскопічні дослідження медіально-поздовжніх зрізів корневих апексів показали, що мітохондрії в статоцитах польотних і наземних проростків хаотично розподілялися в гіалоплазмі відносно вегетативної вісі розвитку. Водночас більшість органел в статоцитах польотних проростків, що розвивалися при наявності KMnO_4 та без нього, характеризувалися округлою або еліпсоїдною формою (рисунки, а, б), тоді як форма мітохондрій в наземних контролях варіювала в значно більшій, властивій для них мірі, і була представлена округлою, еліпсоїдною формою у вигляді коротких з округленими кінцями паличок, довгих паличок тощо (рисунки, в, г). Більш високий поліморфізм органел в наземних контролях відзначався незалежно від обробки п'юрафілом. Мітохондрії проростків обох польотних варіантів відзнача-



Фрагменти статоцитів коренів проростків сої, які ілюструють морфологію та ультраструктурну організацію мітохондрій: *а, б* — умови мікрогравітації; *в, з* — наземні контролі; *а, в* — при наявності п'юрафілу; *б, з* — без п'юрафілу; М — мітохондрія, Я — ядро, Ядр — ядерце; А — амілопласт, В — вакуоля, КО — клітинна оболонка. Масштаб 1 мкм

лися також нижчою електронною щільністю матриксу, менш розвинутими кристами при порівнянні з наземними контролями (рисунок, *а, б*). Органели польотних варіантів за даними морфометричного аналізу характеризувалися відносно меншим об'ємом. Середні значення площі перерізу мітохондрій проростків, що розвивалися за умов мікрогравітації в присутності $KMnO_4$ та без нього, були на 12 і 9 % відповідно нижчими в порівнянні з наземними контролями (таблиця).

Обговорення одержаних даних. Отримані результати свідчать, що зміни в морфології та ультраструктурній організації мітохондрій, як і посилена вакуолізація, зниження вмісту крохмалю в амілопластах тощо, виявлені в попе-

редніх дослідженнях [26—28], не корелювали з обробкою $KMnO_4$. Зазначені ефекти мікрогравітації доцільно розглянути з урахуванням концентрації етилену в контейнерах, в яких вирощувалися проростки сої. В перерахунку на 1 г сирової маси проростків концентрація етилену в польотних контейнерах становила 24 і 53 мкл/л в присутності п'юрафілу та без нього в порівнянні з 8 і 9 мкл/л відповідно в каністрах наземних контролів [27]. Очевидно, що проростки сої за умов мікрогравітації в порівнянні з контрольними продукували значно вищий рівень етилену [9, 11, 31]. Концентрація етилену в польотних каністрах перевищувала контрольну в три рази в присутності п'юрафілу і майже в шість разів без нього. Таким чином, п'юрафіл не повністю нейтралізував етилен, що могло бути зумовлено, зокрема, недостатньою його поглинальною спроможністю, порушенням процесів тепло- та масообміну в умовах невагомості. Низька ж поглинальна ефективність п'юрафілу в наземних умовах можливо пов'язана з його реакційною залежністю від концентрації $KMnO_4$. Важливо зауважити, що діючий агент п'юрафілу — $KMnO_4$, окислюючи етилен (що знаходиться вже за межами тканин проростків) до етиленгліколю [32], не впливає безпосередньо на процеси його синтезу, дифузії до мішені [33] і запуску ймовірних подальших клітинних реакцій. Тому навіть повне поглинання етилену п'юрафілом могло не відобразитися на реалізації виявлених ефектів мікрогравітації, що дає підставу розглядати етилен як фактор, який причетний до перебудови структурно-функціональної організації мітохондрію в проростках обох польотних варіантів. Іншими дослідженнями [11, 34] показано, що підвищений

Розміри мітохондрій в статоцитах коренів проростків сої, що вирощувалися в умовах мікрогравітації в присутності п'юрафілу ($P < 0,05$)

Варіант	Середня площа перерізу мітохондрій, мкм ²	
	+ $KMnO_4$	- $KMnO_4$
Мікрогравітація	0,169 ± 0,004 (n = 650)	0,172 ± 0,004 (n = 510)
Наземний контроль	0,191 ± 0,004 (n = 650)	0,189 ± 0,004 (n = 650)

Примітка. n — кількість проаналізованих органел.

рівень етилену в умовах мікрогравітації корелював, зокрема, із зниженням вмісту крохмалю в амілопластах, причому зниження синтезу крохмалю в клітинах колумели дикого та крохмальдефіцитного типу арабідопсису відбувалося в наземних умовах при внесенні в каністри додаткової кількості екзогенного етилену [11]. Морфометричні дані, наведені в цьому ж дослідженні [11], також відображають тенденцію до зниження розмірів мітохондрій, достовірність якого, можливо, не доведена через незначну кількість проведених вимірів органел.

Посилений синтез етилену в наших дослідженнях міг стимулювати, подібно клітинам сім'ядолі квасолі в процесі її проростання [12], синтез ферментів клітинної стінки, які послаблюють її ригідність, знижують клітинний тургор, сприяючи посиленню вакуолізації [27]. Разом з тим прогресуючу вакуолізацію статочитів коренів вівса в умовах кліностагування [8] пов'язували з порушенням фосфоліпідного обміну мембран, їх проникності, посиленням вивільнення гідролітичних ферментів. Щодо нашого дослідження перебудова структурно-функціональної організації мітохондрій за умов зниженого клітинного тургору [27] могла бути зумовлена різницею гідростатичного тиску між матриксом органел і гіалоплазмою [35, 36]. Останній визначається як активністю транспортних систем внутрішньої мембрани мітохондрій, яка контролює водний потенціал матриксу, викликаючи набрякання чи зморщування органел, так і водним потенціалом гіалоплазми. Зростання гідростатичного тиску всередині органел внаслідок додаткового надходження води за градієнтом водного потенціалу може переважати силу, яка підтримує форму органел, сприяти перетворенню будь-якої їх форми в сферичну, збільшуючи при цьому їх об'єм. Проте, як зазначалося вище, мітохондрії польотних проростків, незалежно від обробки п'юрафілом, характеризувалися меншими розмірами порівняно з наземними контролями. Тому наведений механізм морфологічної перебудови органел міг мати місце за умови відносно вищого значення водного потенціалу їх матриксу, яке, очевидно, могло досягатися за рахунок зниження їх функціональної активності. Таке припущення підтверджується відносно нижчою

електронною щільністю матриксу мітохондрій польотних проростків. Водночас зниження розмірів органел, округлення їх форми, яке відповідає найменшій площі поверхні в порівнянні з будь-якою іншою, характерно також для низького рівня обмінних процесів між органелами і гіалоплазмою. Зниження енергетичного рівня клітин в умовах мікрогравітації [23] також узгоджується з даними наших попередніх досліджень щодо відставання росту проростків, зокрема, затримкою розвитку головних та формування бічних коренів (4 проти 26 відповідно в польотних та наземних варіантах) [26].

Отже, одержані дані дозволяють заключити, що морфологічна та ультраструктурна перебудова мітохондрій в статочитах коренів сої за умов мікрогравітації відображає зниження їх функціональної активності, зумовленої адаптацією проростків до підвищеного рівня етилену.

SUMMARY. The effects of microgravity and ethylene on morphology and ultrastructural organization of mitochondria in root statocytes of soybean seedlings grown for 6 days on the board of the space shuttle Columbia during the STS-87 mission were investigated. The spaceflight seedlings and the ground-grown control seedlings were grown in BRIG (Biological Research in Canister) in the presence of $KMnO_4$ to remove ethylene. It was revealed that irrespectively of $KMnO_4$ treatment the mitochondria in the spaceflight seedlings were characterized by round or oviform and by low electron density of organelle matrix, whereas the organelles in the ground controls were polymorphic in shape and had higher electron density of matrix. The possible mechanisms of morphological and ultrastructural rearrangements of mitochondria that may be involved in adaptation processes of soybean seedlings to microgravity conditions are discussed.

РЕЗЮМЕ. Проведено исследование влияния микрогравитации и этилена на морфологию и ультраструктурную организацию митохондрий в статочитах корней шестисуточных проростков сои, экспонируемых на борту Колумбия STS-87. Проростки выращивали в герметичных контейнерах в присутствии $KMnO_4$ для нейтрализации этилена. Обнаружено, что большая часть популяции митохондрий в клетках полетных проростков, независимо от обработки $KMnO_4$, характеризовалась округлой или овальной формой и электронно-просветленным матриксом, тогда как в проростках наземных контролей органеллы отличались типичным для них полиморфизмом, большими

размерами и более высокой электронной плотностью матрикса. Рассмотрен возможный механизм морфологической и ультраструктурной перестройки митохондрий в процессе адаптации проростков к условиям микрогравитации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brown A.H., Chapman D.K. Experiments on plants grown in space: A test to verify the biocompatibility of a microgravity environment // *Ann. Bot.* — 1984. — 54. — P. 19—31.
2. Меркис А.И. Сила тяжести в процессах роста растений. — М.: Наука, 1990. — 185 с.
3. Кордюм Е.Л., Сытник К.М., Белявская Н.А., Жадько С.И., Климчук Д.А., Полулях Ю.А. Современные проблемы космической клеточной фитобиологии. — М.: Наука, 1994. — 293 с.
4. Glaassen D.E., Spooner B.S. Impact of altered gravity on aspects of cell biology // *Int. Rev. Cytol.* — 1994. — 156. — P. 301—373.
5. Кордюм Е.Л., Ваулин Э.Н., Гречко Г.М., Жадько С.И., Кордюм В.А., Машинский А.Л., Нечитайло Г.С., Попов, А.Ф., Сытник К.М. Изменение скорости биологических процессов в условиях микрогравитации и клиностаტიрования: Препринт АН Украины / Ин-т ботаники. — Киев, 1989. — 38 с.
6. Kordyum E.L. Biology of plant cells in microgravity and under clinostating // *Int. Rev. Cytol.* — 1997. — 171. — P. 1—78.
7. Nedukha E., Kordyum E., Martyn G., Martyn G. A role of peroxidases in acceleration of the aging of potato minitubers under influence of microgravity // *J. Gravit. Physiol.* — 2005. — 12, № 1. — P. 197—198.
8. Hensel W., Iversen T.H. Ethylene production during clinostat rotation and effect on root geotropism // *Z. Pflanzenphysiol.* — 1980. — 97. — P. 343—352.
9. Brown C.S., Hilaire E.M., Guikema J.A., Piastuch W.C., Johnson C.F., Stryjewski E.C., Peterson B.V., Vordermark D.S. Metabolism, ultrastructure and growth of soybean seedlings in microgravity: results from the BRIC-01 and BRIC-03 experiments // *Amer. Soc. Gravitat. and Space Biol. Bull.* — 1995. — 9. — P. 93.
10. Hilaire E., Peterson B., Guikema J., Brown C. Clinorotation affects morphology and ethylene production in soybean seedlings // *Plant Cell Physiol.* — 1996. — 37. — P. 929—934.
11. Guisinger M.M., Kiss J.Z. The influence of microgravity and spaceflight on columella cell ultrastructure in starch-deficient mutants of *Arabidopsis* // *Amer. J. Bot.* — 1999. — 86, № 3. — P. 1357—1366.
12. Lieberman M. Biosynthesis and action of ethylene // *Ann. Rev. Plant Physiol.* — 1979. — 30. — P. 533—591.
13. Yang S.F., Hoffman N.E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants // *Ann. Rev. Plant Physiol.* — 1984. — 35. — P. 155—189.
14. Frey T.G., Mannella C.A. The internal structure of mitochondria // *Trends Biochem. Sci.* — 2000. — 25. — P. 319—324.
15. Perkins G.A., Frey T.G. Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy // *Micron.* — 2000. — 31. — P. 97—111.
16. Gripanic L., van der Blik A.M.A. The many shapes of mitochondrial membranes // *Traffic.* — 2001. — 2, № 4. — P. 235—244.
17. Ward C., Kind J. Effect of simulated hypogravity on respiratory and photosynthesis of higher plants // *Life Sci. Space Res.* — 1979. — 17. — P. 28—37.
18. Попова А.Ф., Василенко А.И. Ультраструктура митохондрий и содержание аденилатов в клетках хлореллы при различных сроках клиностаტიрования // *Цитология и генетика.* — 1995. — 29, № 1. — С. 3—8.
19. Sytnik K.M., Popova A.F. Changes in plant mitochondria ultrastructure and respiration intensity in altered gravity // *J. Gravit. Physiol.* — 1998. — 5, № 1. — P. 169—170.
20. Popova A.F. Comparative characteristic of mitochondria ultrastructural organization in *Clorella* cells under altered gravity conditions // *Adv. Space Res.* — 2003. — 31. — P. 2253—2259.
21. Таурбеков М.Г., Кабицкий Е.Н., Машиян Э.С. АТФ-азная активность в клетках корней кукурузы, выращенных в условиях измененной силы тяжести // *Физиология растений.* — 1980. — 27, № 4. — С. 883—885.
22. Таурбеков М.Г., Гужова Н.В., Девятко А.В., Розов А.Н. Газоэнергообмен растений при клиностаტიровании // *Физиология растений.* — 1984. — 31, № 2. — С. 385—388.
23. Таурбеков М.Г., Девятко А.В. Энергообмен растений в невесомости // *Докл. АН СССР.* — 1985. — 280, № 2. — С. 509—512.
24. Недуха Е.М. Влияние гипогравитации на активность дегидрогеназы в клетках *Funaria hydrometrica* // *Укр. биол. журн.* — 1985. — 42, № 1. — С. 52—55.
25. Popova A.F. Effect of altered gravity on the mitochondria ultrastructure, activity and fractional composition succinate dehydrogenase in *Clorella* cells // *J. Gravit. Physiol.* — 1999. — 6, № 1. — P. 145—146.
26. Klymchuk D.O., Brown C.S., Piastuch W.C., Kordyum E.L. Alteration in the root tip cells of soybean seedlings grown under microgravity // *J. Gravit. Physiol.* — 1999. — 12, № 1. — P. 97—98.
27. Klymchuk D.O., Kordyum E.L., Vorobyova T.V., Chapman D.K., Brown C.S. Changes in vacuolation in the root apex cells of soybean seedlings in microgravity // *Adv. Space Res.* — 2003. — 31, № 10. — P. 2283—2288.
28. Klymchuk D.O., Brown C.S., Chapman D.K., Vorobyova T.V., Martyn G.M. Cytochemical localization of calcium in soybean root cap cells in microgravity // *Adv. Space Res.* — 2001. — 27, № 5. — P. 967—972.

29. Reynolds S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy // J. Cell Biol. — 1963. — 17. — P. 208—212.

30. Деркач М.П. Елементи статистичної обробки результатів біологічного експерименту. — Львів, 1963. — 66 с.

31. Smalle J., Straeten D. Ethylene and vegetative development // Physiol. Plant. — 1997. — 100. — P. 593—605.

32. Sanders I.O., Smith A.R., Hall M.A. Ethylene metabolism in *Pisum sativum* L. // Planta. — 1989. — 179. — P. 104—114.

33. Sisler E.C., Blankenship S.M. Diazocyclopentadiene, a

light sensitive reagent for the ethylene receptor // Plant Growth Reg. — 1993. — 12. — P. 125—132.

34. Smalle J., Straeten D. Ethylene and vegetative development // Physiol. Plant. — 1997. — 100. — P. 593—605.

35. Munn E.A. On the structure of mitochondria and the value of ammonium molybdate as a negative stain for osmotically sensitive structures // J. Ultrastruc. Res. — 1968. — 25. — P. 362—380.

36. Zelling G., Zechmann B., PerctoldMunn E.A. Morphological and quantitative data of plastids and mitochondria within drought-stressed spinach leaves // Protoplasma. — 2004. — 223. — P. 221—227.

Надійшла 07.04.06