

УДК 57.012.4:576.311.347:581.45:582.573.21

УЛЬТРАСТРУКТУРНІ ЗМІНИ МІТОХОНДРІЙ ЛИСТКІВ *GALANTHUS NIVALIS* L. ПРИ ВЕГЕТАЦІЇ ЗА УМОВ ГІПОТЕРМІЇ

© 2015 р. О. М. Федюк, Н. О. Білявська

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного
Національної академії наук України
(Київ, Україна)

Наведено результати порівняльного аналізу ультраструктури мітохондрій листків *Galanthus nivalis* L., які зазнали впливу гіпотермії на різних етапах вегетації. За допомогою методів трансмісійної електронної мікроскопії та морфометричного аналізу виявлено залежність показників мітохондрій від температури навколишнього середовища. Встановлено, що в період до цвітіння квітки *G. nivalis* мітохондрії листків мають більш видовжену форму, збільшені лінійні розміри, площу зрізу і об'єм, ніж в період цвітіння рослини. Така ж тенденція характерна і для метричних показників крист. Зміни морфометричних показників мітохондрій та крист листків розглядаються як складові адаптації до впливу низьких температур навколишнього середовища.

Ключові слова: *Galanthus nivalis* L., гіпотермія, кристи, мітохондрії, морфометричний аналіз, ультраструктура

Протягом тривалого часу еволюції весняні ефемероїди набули здатності до росту і цвітіння в умовах гіпотермії, що сприяло не тільки їх виживанню, але й поширенню в нових ареалах з суворішими кліматичними умовами. Серед цих рослин увагу привертає *Galanthus nivalis* – один з типових представників ранньовесняних ефемероїдів родини *Amaryllidaceae*, поширений на значній площі із заходу на схід від Піренеїв до Дніпра (Артюшенко, 1970). Зважаючи на це, *G. nivalis* можна вважати зручним об'єктом для вивчення характерних особливостей екології, росту, розвитку, метаболізму та будови весняних ефемероїдів (Мельник, Діденко, 2013).

Чимало праць присвячено дослідженню морфологічних, анатомічних (Алхалкаци, Гвалдзе, 1992; Davis, Barnet, 1997; Scephankova, Hudak, 2003; Ozdemir, Alcytepe, 2010; Weryszko-Chmielewska, Chwil, 2010) і фізіологічних (Aschan, Pfan, 2006; Rejskova et al., 2010) особливостей рослин ефемероїдів. Проте в доступній нам літературі ми не знайшли даних, які б характеризували особливості ультраструктури мітохондрій листків *G. nivalis* та по-

яснювали їх зв'язок з метаболічною активністю за умов гіпотермії.

Можна припустити, що у *G. nivalis* під час ранньовесняної вегетації в умовах низьких температур навколишнього середовища, відбуваються ультраструктурні зміни мітохондрій, які, ймовірно, пов'язані з функціонуванням систем генерування енергії клітинами.

В результаті лабораторних досліджень впливу низьких температур на листки озимої суріпиці (*Brassica napus* L. var. *oleifera* L.) було виявлено, що у розбухлих мітохондрій практично зникла система крист (Stefanowska et al., 2002), як і у різущки (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, cv. Columbia) після впливу від'ємних температур (Ristic, Ashworth, 1993), тоді як при температурі +5°C у того ж виду інші автори спостерігали зменшення об'єму мітохондрій (Armstrong et al., 2006). Залишається нез'ясованим, як змінюється ультраструктура мітохондрій листків у *G. nivalis* ранньою весною на п'ятому році вегетації та наскільки ймовірні зміни форми, об'єму та локалізації мітохондрій можуть зумовлюватися впливом гіпотермії.

На нашу думку, виявлення закономірностей перебудов ультраструктури мітохондрій листків *G. nivalis* залежно від температури зовнішнього середовища дозволить наблизитися

Адреса для кореспонденції: Білявська Нінель Олександрівна, Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, вул. Терещенківська, 2, Київ, 01601, Україна;
e-mail: nabel2@yandex.ua

до розкриття ролі ультраструктурних змін у механізмах виживання ранньовесняних ефемероїдів за умов низьких температур навколишнього середовища.

МЕТОДИКА

Об'єктом дослідження обрано вид *Galanthus nivalis* L., який поширений у відкритому ґрунті на ділянках лісництв Рівненської області в Україні. Серед представників даного ефемероїду вилучали з ґрунту лише зразки п'ятого року вегетації, який характеризується вже закладеною квіткою. Відібрані зразки розміщували в ємкості з ґрунтом і доставляли в лабораторію.

Ультраструктурні зміни мітохондрій листків *G. nivalis*, зумовлені впливом гіпотермії, виявляли порівнюючи листки рослин на початковому етапі річної вегетації, коли температура навколишнього середовища становила вдень від -5 до $+1^{\circ}\text{C}$ і вночі нижче 0°C , та під час цвітіння ефемероїда – з переважанням температур вдень від $+1$ до $+10^{\circ}\text{C}$ та вночі від 0 до $+2^{\circ}\text{C}$.

Перед проведенням попередньої фіксації фрагментів листових пластинок доставлені в лабораторію ємкості із зразками *G. nivalis* розміщували у відкритому ґрунті, де вони перебували за вище зазначених температур протягом двох діб в природних умовах освітлення.

У день проведення попередньої фіксації листових пластинок з розміщених у відкритому ґрунті рослин зрізали листки і протягом 5 хв доставляли їх в приміщення лабораторії. З середньої частини листових пластинок вирізали фрагменти довжиною 2-3 мм та шириною 1 мм. Попередню фіксацію здійснювали з вакуумною інфільтрацією дослідних зразків у 2,5% розчині глутарового альдегіду (ГА), приготованому на 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,2) і 2% розчині сахарози при кімнатній температурі ($18-22^{\circ}\text{C}$). У свіжому розчині цього ж фіксатора дослідний матеріал залишали на добу у холодильнику (4°C). Через добу матеріал тричі промивали розчином 0,1 М какодилатного буферу і 2% сахарози. Для подальшої постфіксації використовували розчин 1% OsO_4 на 0,1 М какодилатному буфері (рН 7,2), в якому залишали матеріал на 12-14 год при 4°C . Після постфіксації матеріал ополіскували дистильованою водою та зневоднювали послідовною обробкою розчинами етанолу зростаючої концентрації (30° , 50° , 70° , 80° , 96° , 100°), при цьому 70° етанол був насичений 2% уранілацетатом. Зневоднення матеріалу 100° етанолом здійснювалось тричі з додаванням на кінцевому етапі пропіленоксиду. Пі-

сля цього матеріал спочатку насичували сумішшю епоксидних смол з пропіленоксидом, а потім заливали епон-аралдитною смолою за стандартною методикою. Полімеризацію смоли здійснювали в термостаті протягом трьох діб при температурі $+37$ і $+60^{\circ}\text{C}$.

Ультратонкі зрізи клітин листків, отримані із застосуванням ультрамікротома LKB-V (LKB, Швеція), розміщували на одношліпінні бленди з формваровою плівкою, вкритою вугільним напиленням. Після цього зрізи контрастували спочатку 1% розчином уранілацетату протягом однієї години в темряві, а потім розчином цитрату свинцю протягом 3-5 хв.

Підготовані рослинні препарати фотографували у трансмісійному електронному мікроскопі JEM-1300 (JEOL, Японія) з прискоренням напруги 80 кВ на плівку типу EB19H (AGFA, Бельгія). Для отримання цифрових зображень фото сканували на сканері Epson Perfection 3200 Photo. Для обробки растрових графічних зображень мітохондрій і крист застосовували комп'ютерну програму Corel Photo Paint 11.

Морфометричні зміни мітохондрій листків *G. nivalis*, зумовлені впливом гіпотермії на початковому етапі вегетації і під час цвітіння, аналізували на фото мітохондрій, зроблених при збільшенні 10000, 15000 та 100000 разів.

Лінійні розміри та площі визначали з мікрофотографій, використовуючи програму UTHSCSA ImageTool 3.0 (Сан Антоніо, США). Лінійні розміри мітохондрії (довжину і ширину) вимірювали як найдовшу і найкоротшу вісь на зрізі. Підрахунки середніх значень показників, співвідношення суми площ крист до площі мітохондрії та суми об'ємів крист до об'єму мітохондрії обчислювали засобами Microsoft Excel.

Індекс фенотипічної пластичності, що варіює в межах від нуля до одиниці, визначали для кожного показника на різних етапах вегетації як відношення різниці максимального і мінімального середніх значень до максимального середнього значення (Valladares et al., 2000). Середній індекс фенотипічної пластичності підраховували для кожного етапу вегетації як середнє суми значень індексів пластичності, отриманих для всіх показників.

Дані у таблицях представлено середніми зі стандартними похибками, які вираховували з 42-80 фотозображень мітохондрій кожного варіанта. Середні значення порівнювали, використовуючи тест Student-Newman-Keuls для 95% рівня значущості.

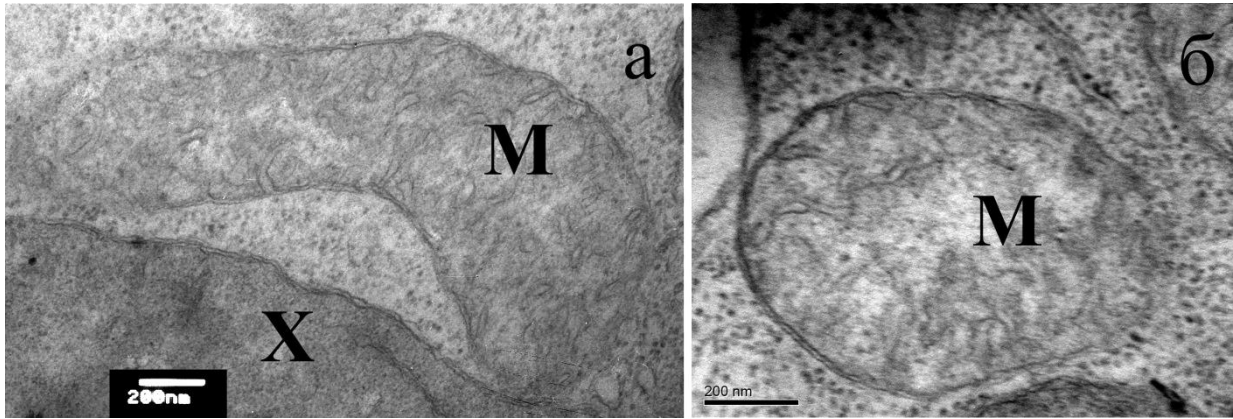


Рис. 1. Ультраструктура мітохондрій листків *Galanthus nivalis* L. в період до цвітіння (а) та під час цвітіння (б). Позначення: М – мітохондрія, Х – хлоропласт.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що на п'ятому році вегетації *G. nivalis*, коли вже закладена брунька, форма мітохондрій в листках динамічно змінюється залежно від періоду надземного розвитку рослини. В період вегетативного розвитку рослини до цвітіння квітки мітохондрії листків, як правило, мають видовжену форму і конденсовану конфігурацію, а їх кристи досягають значного розміру (рис 1а), що є характерним для активного продукування АТФ.

Потреба в активному продукуванні АТФ, можливо, зумовлена впливом гіпотермії, адже початковий етап (до цвітіння квітки) річного надземного розвитку *G. nivalis* припадає на грудень і січень, з середньодобовою температурою атмосферного повітря -10°C .

Під час цвітіння ефемероїда протягом березня і квітня, в умовах підвищення середньодобової температури атмосферного повітря до $0-2^{\circ}\text{C}$, переважна більшість мітохондрій листків набуває округлої форми, ортодоксальної конфігурації, з чітко вираженими кристами та зонами мітохондріального нуклеоїда (рис. 1б), що характерно для уповільненого продукування АТФ.

Поява мітохондрій іншої конфігурації у *G. nivalis* в період цвітіння, може вказувати на ймовірні зміни їх енергетичного статусу. З'ясувати це остаточно ми зможемо в подальших дослідженнях, застосовуючи метод полярографії.

Раніше повідомлялося про зміни морфології мітохондрій, що відбувалися в періоди різної дихальної активності у *Sauromatum guttatum* повідомлялося (Skubatz, Kunkel, 2000). Інші автори пов'язують зміну зовнішньої форми мітохондрій з перебудовами крист, які спричинюються змінами їх конформаційного стану (Logan, Leaver, 2000). Йошінага і співавтори вважають, що морфологічні зміни в мітохондріях є одним з ранніх проявів впливу оксидативного стресу (Yoshinaga et al., 2005). Механізми, які регулюють зміни морфології мітохондрій, залишаються недостатньо вивченими, проте сучасні дослідження показують, що будь-які зміни у формі мітохондрій можуть суттєво впливати на функціонування цих органел і навпаки (Soubannier, McBride, 2009).

На етапі цвітіння *G. nivalis* виявлено залежність кількісних характеристик ультраструктури мітохондрій від температури навколишнього середовища, про що свідчать отримані нами

Таблиця 1. Морфометричні показники мітохондрій листків *G. nivalis* за умов гіпотермії

Період вегетації	Довжина мітохондрії (мкм)	Ширина мітохондрії (мкм)	Площа зрізу мітохондрії (мкм ²)	Об'єм мітохондрії (мкм ³)	Відношення суми площ крист до площ мітохондрій
До цвітіння	$0,906 \pm 0,043$	$0,588 \pm 0,023$	$0,436 \pm 0,024$	$0,161 \pm 0,016$	$0,6 \pm 0,03$
Під час цвітіння	$0,625 \pm 0,050$	$0,404 \pm 0,036$	$0,202 \pm 0,027$	$0,059 \pm 0,013$	$0,3 \pm 0,02$

УЛЬТРАСТРУКТУРНІ ЗМІНИ МІТОХОНДРІЙ

Таблиця 2. Морфометричні показники крист мітохондрій листків *G. nivalis* за умов гіпотермії

Період вегетації	Довжина кристи (нм)	Ширина кристи (нм)	Площа зрізу кристи (нм ²)	Об'єм кристи (нм ³)	Відношення суми об'ємів крист до об'ємів мітохондрій
До цвітіння	217 ± 15	32,9 ± 2,1	2471 ± 171	4294 ± 1802	0,08 ± 0,01
Під час цвітіння	72,0 ± 5,8	9,23 ± 0,87	661 ± 84	3265 ± 862	0,01 ± 0,01

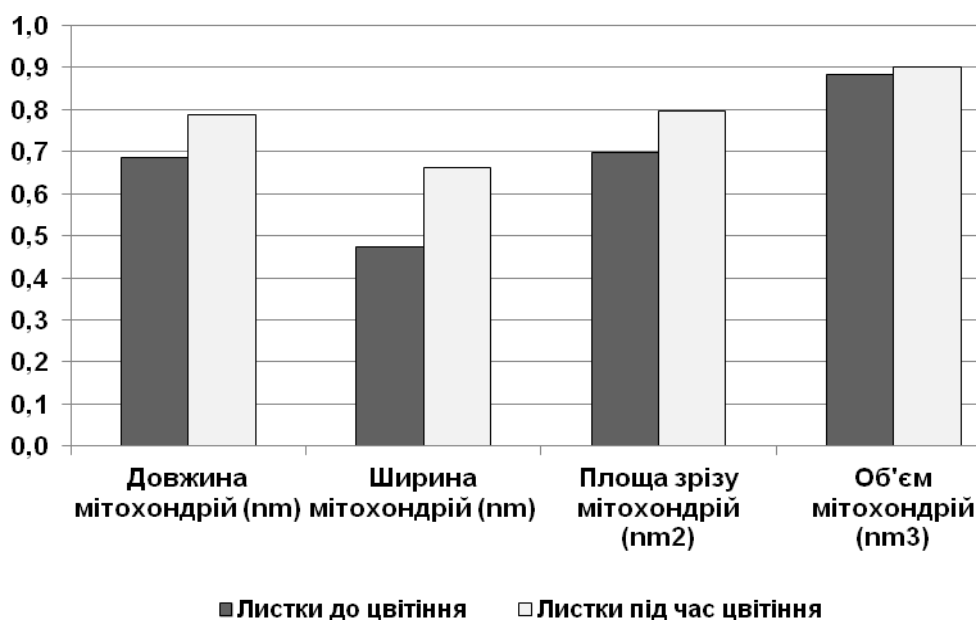


Рис. 2. Індекси фенотипічної пластичності розмірів мітохондрій листків *G. nivalis*.

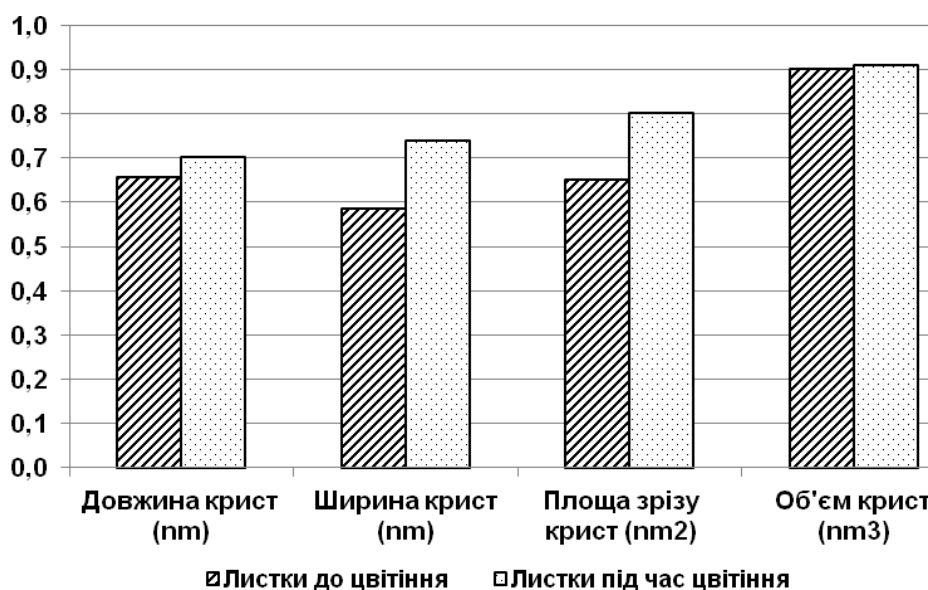


Рис. 3. Індекси фенотипічної пластичності розмірів крист мітохондрій листків *G. nivalis*.

морфометричні дані, наведені в табл. 1 та 2. На етапі цвітіння порівняно з періодом до цвітіння морфометричні показники мітохондрій, зокрема, їх довжина та ширина зменшилися на 31%, площа зрізу – на 46%, об'єм – на 36%; а показник відношення суми площ крист до площі мітохондрії листків зменшився на 50% ($p \leq 0,5$) (табл. 1).

На підставі цих даних можна припустити, що потреба в АТФ у листків, ймовірно, зменшується, а у квіток навпаки зростає. Проте для підтвердження цього припущення необхідні спеціальні дослідження функціональної активності мітохондрій.

Встановлено, що порівняно з періодом до цвітіння, під час цвітіння *G. nivalis* морфометричні показники крист, зокрема їх довжина зменшилась на 33 %, ширина – на 28 %, площа зрізу – на 27% ($p \leq 0,5$), а показник відношення суми об'єму крист до об'єму мітохондрії зменшився на 12 % ($p \leq 0,05$) (табл. 2).

В результаті обчислення індексу пластичності показників розмірів ультраструктури мітохондрій листків *G. nivalis*, виявлено що найбільша варіабельність притаманна показникам об'єму мітохондрій (рис. 2), а найменша – показникам ширини мітохондрій і площі крист в період до цвітіння квітки (рис. 3). Середній індекс фенотипічної пластичності усіх вимірюваних показників до цвітіння *G. nivalis* досягав 0,67, а під час цвітіння – 0,77.

Отже, в результаті проведеного дослідження виявлено, що в листках *G. nivalis* на п'ятому році вегетації ранньою весною під впливом низьких температур змінюються форма та розміри мітохондрій. Це свідчить про залежність ультраструктури мітохондрій від температури навколишнього середовища.

У даного ефемероїда спостерігається достатньо високий рівень структурної пластичності мітохондрій листків. Фенотипічна пластичність показників ультраструктури мітохондрій і крист може бути пов'язана з впливом умов гіпотермії. Очевидно, завдяки пластичності структурних і фізіологічних показників, ранньовесняний ефемероїд успішно долає несприятливі умови зовнішнього середовища. Адаптаційні властивості листків, ймовірно, пов'язані з дихальним ланцюгом і підвищенням рівня метаболізму за умов гіпотермії, що остаточно можна буде з'ясувати після застосування полярнографічного та інших методів оцінки функціональної активності мітохондрій. Припускаємо, що зв'язок перебудов ультраструктури мітохондрій листків з температурою навколишнього сере-

довища є важливою частиною механізму зміни ефективності продукування АТФ за умов гіпотермії.

Високий рівень адаптації забезпечує ефемероїду не тільки виживання, але й поширення на нові ареали з суворішими кліматичними умовами. Розуміння адаптивних механізмів листків *G. nivalis* допоможе вивчити шляхи поширення також і інших менш холодостійких рослин у зонах з холодним кліматом.

ЛІТЕРАТУРА

- Алхалкаци М. Ш., Гваладзе Г. Е. Сезонные изменения ультраструктуры зародышевого мешка *Galanthus nivalis* L. (*Amaryllidaceae*) // Ботан. журн. – 1992. – Т. 77, №1. – С. 66-73.
- Артюшенко З. Т. Амариллисовые (*Amaryllidaceae* Jaume St.-Hilaire) СССР. Морфология, систематика и использование. – Ленинград: Наука, 1970. – 59 с.
- Мельник В. І., Діденко С. Я. Види роду *Galanthus* L. (*Amaryllidaceae*) в Україні. – К.: НБС НАН України, ПАТ “ВІПОЛ”, 2013. – 152 с.
- Armstrong A.F., Logan D.C., Tobin A.K., O'toole P., Atkin O.K. Heterogeneity of plant mitochondrial responses underpinning respiratory acclimation to the cold in *Arabidopsis thaliana* leaves // Plant Cell Environ. – 2006. – V. 29. – P. 940-949.
- Aschan G., Pfanz H. Why Snowdrop (*Galanthus nivalis* L.) tepals have green marks? // Flora. – 2006. – V. 201. – P. 623-632.
- Davis A. P., Barnett J. R. The leaf anatomy of the genus *Galanthus* L. (*Amaryllidaceae* J. St.-Hil.) // Bot. Linnean Soc. – 1997. – № 123. – P. 332-352.
- Logan D., Leaver C. Mitochondria-targeted GFP highlights the heterogeneity of mitochondrial shape, size and movement within living plant cells // J. Exp. Bot. – 2000. – V. 51. – P. 865-871.
- Ozdemir C., Alcytepe E. Morphological and anatomical study on *Galanthus gracilis* (*Amaryllidaceae*) // Acta Bot. Hungarica. – 2010. – V. 52, № 1-2. – P. 151-157.
- Rejskova A., Brom J., Pokorn J., Korecko J. Temperature distribution in light-coloured flowers and inflorescences of early spring temperate species measured by infrared camera // Flora. – 2010. – V. 205. – P. 282-289.
- Ristic Z., Ashworth E. Changes in leaf ultrastructure and carbohydrates in *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh) cv. Columbia during rapid cold acclimation // Protoplasma. – 1993. – V. 172. – P. 111-123.
- Scepankova I., Hudak J. Leaf and tepal anatomy, plastid ultrastructure and chlorophyll content in *Galanthus nivalis* L. and *Leucojum aestivum* L. // Plant Systematics Evolution. – 2003. – № 23. – P. 211-219.
- Skubatz H., Kunkel D. Developmental changes in the ultrastructure of the *Sauromatum guttatum* (*Araceae*) mitochondria // J. Electron Microsc. – 2000. – V. 49. – P. 775-782.

УЛЬТРАСТРУКТУРНІ ЗМІНИ МІТОХОНДРІЙ

- Soubannier V., McBride H.* Positioning mitochondrial plasticity within cellular signaling cascades // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – V. 1793. – P. 154-170.
- Stefanowska M., Kura M., Kasperska A.* Low Temperature induced modifications in cell ultrastructure and localization of phenolics in winter oilseed rape (*Brassica napus* L. var. *oleifera* L.) leaves // *Annu. Bot.* – 2002. – V. 90. – P. 637-645.
- Valladares F., Ferri M., Baloguer L.* Low leaflevel response to light and nutrients in Mediterranean evergreen oaks: a conservative resource-use strategy? // *New Phytol.* – 2000. – V. 148. – P. 79-91.
- Weryszko-Chmielewska E., Chwil M.* Ecological adaptations of the floral structures of *Galanthus nivalis* L. // *Acta Agrobotanica.* – 2010. – V. 63, № 2. – P. 41-49.
- Yoshinaga K., Arimura S., Niwa Y.* Mitochondrial behaviour in the early stages of ros stress leading to cell death in *Arabidopsis thaliana* // *Annu. Bot.* – 2005. – V. 96. – P. 337-342.

Надійшла до редакції
08.04.2015 р.

ULTRASTRUCTURAL CHANGES IN *GALANTHUS NIVALIS* L. FOLIAR MITOCHONDRIA AT VEGETATION IN HYPOTHERMAL CONDITIONS

O. M. Fediuk, N. O. Bilyavska

*M.G. Kholodny Institute of Botany
of National Academy of Sciences of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)
e-mail: nabel2@yandex.ua*

Comparative analysis of mitochondria ultrastructure leaves of *Galanthus nivalis* L., which are affected by hypothermal conditions at different stages of vegetation was carried out. Using methods of transmission electron microscopy and morphometric analysis it was revealed dependence of morphometric indices of mitochondria on environmental temperature. It was established that mitochondria in leaves of *G. nivalis* had an elongated form before flowering, whereas they became rounded during flowering and their linear sizes, areas of sections, and volumes decreased. The same tendency was characteristic for metric indices of cristae too. Changes in morphometric indices of mitochondria and cristae may be considered as adaptive response of ephemeroïd, directed on a survival and development under low ambient temperatures of environment.

Key words: *Galanthus nivalis* L., cristae, hypothermal conditions, mitochondria, morphometric analysis, ultrastructure

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИТОХОНДРИЙ ЛИСТЬЕВ *GALANTHUS NIVALIS* L. ПРИ ВЕГЕТАЦИИ В УСЛОВИЯХ ГИПОТЕРМИИ

О. М. Федюк, Н. А. Белявская

*Институт ботаники им. Н.Г. Холодного
Национальной академии наук Украины
(Киев, Украина)
e-mail: nabel2@yandex.ua*

Проведен сравнительный анализ ультраструктуры митохондрий листьев *Galanthus nivalis* L., которые подвергались влиянию гипотермии на разных этапах вегетации. Методами трансмиссионной электронной микроскопии и морфометрического анализа выявлена зависимость показателей митохондрий от температуры окружающей среды. Установлено, что в период цветения *G. nivalis*, митохондрии листьев имеют более удлиненную форму, увеличенные линейные размеры, площадь среза и объем, чем в период цветения растения. Такая же тенденция характерна и для метрических показателей крист. Изменения морфометрических показателей митохондрий и крист могут рассматриваться как составляющие адаптации к условиям влияния низких температур окружающей среды.

Ключевые слова: *Galanthus nivalis* L., гипотермия, кристы, митохондрии, морфометрический анализ, ультраструктура