

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.10.120>

УДК 631.527:633.11

**Л.М. Бабенко, М.В. Водка, Ю.Н. Акимов,
А.В. Бабенко, И.В. Косаковская**

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

E-mail: lilia.babenko@gmail.com

Влияние экстремальных температур на ультраструктуру митохондрий клеток мезофилла листьев *Triticum spelta*

Представлено академиком НАН Украины Я.П. Дидуком

*Проанализированы эффекты высокой (40 °С, 2 ч) и положительной низкой (4 °С, 2 ч) температур на ультраструктуру митохондрий клеток мезофилла листьев *Triticum spelta* L. Показано, что у контрольных астилей митохондрии имели округлую форму, характеризовались электронноплотным матриксом и наличием многочисленных развитых крист пластинчатого типа. При гипертермии митохондрии “разбухали”, мембраны крист становились менее контрастными, снижалась электронная плотность матрикса, количество митохондрий возрастало. При гипотермии до 40 % митохондрий сохраняли округлую форму, появлялись органеллы “линзовидной”, “гантелевидной” и “чашевидной” формы. Количество митохондрий на диаметральном срезе клетки не изменялось. Изменение формы органелл приводило к увеличению площади их поверхности, что, вероятно, способствовало усилению обмена метаболитами с цитоплазмой и, таким образом, повышению стрессоустойчивости.*

Ключевые слова: *Triticum spelta*, температурный стресс, митохондрии.

Одним из ключевых экзогенных факторов, определяющим распространение и урожайность сельскохозяйственных культур, является температура. При температурном стрессе в результате образования активных форм кислорода, последующего пероксидного окисления липидов (ПОЛ) и нарушений в функционировании антиоксидантной системы происходят первичные изменения в клеточных мембранах. В плазмалемме и мембранах органелл наблюдается разрушение белково-липидных комплексов, что приводит к потере осмотических свойств клетки. В результате происходит дезорганизация многих клеточных функций, снижается скорость различных физиологических процессов, среди которых дыхание и фотосинтез [1]. Структурные изменения в мембранах митохондрий — основных генераторах энергии — сопровождаются нарушением гомеостаза и истощением клетки. Митохондрии, которые являются мишенью окислительного стресса и местом формирования первичной

© Л.М. Бабенко, М.В. Водка, Ю.Н. Акимов, А.В. Бабенко, И.В. Косаковская, 2018

реакции-ответа, играют важную роль в адаптации растений [2]. Показано, что при воздействии высокой температуры уменьшалось количество крист в митохондриях молодых листьев *Oryza sativa* [3]. В клетках корней *Zea mays* и *Valerianella locusta* снижалась электронная плотность матрикса митохондрий [4]. При отрицательной температуре отмечено набухание митохондрий без нарушения целостности мембран оболочки с исчезновением системы крист у *Brassica napus* [5] и *Arabidopsis thaliana* [6]. При низкой положительной температуре снижалась электронная плотность матрикса митохондрий в клетках мезофилла листьев и уменьшался объем митохондрий у *A. thaliana* [7]. Выявленный спектр изменений в ультраструктуре митохондрий при действии температурных стрессов указывает на возможность участия этих органелл в формировании стратегии выживания.

Пшеница занимает второе место по объему сбора урожая среди сельскохозяйственных культур в мире. В современном производстве обозначились тенденции к возрождению, селекции и внедрению в производство забытых региональных зерновых культур, так называемых античных злаков, которым является *Triticum spelta*. Благодаря ценным пищевым и хозяйственным свойствам эта культура переживает второе рождение.

Ранее нами было показано, что в митохондриях клеток мезофилла листьев *Triticum aestivum* жароустойчивого сорта Ятрань 60 гипертермия вызывала формирование развитых крист, а при гипотермии происходило уменьшение объема крист и разбухание органелл, тогда как у морозоустойчивого сорта Володарка при действии высокой температуры митохондрии имели тенденцию к округлению, расстояние между кристами возрастало, а при гипотермии — часть органелл сохраняла овальную форму, однако около 30 % органелл приобретали “гантелевидную” форму [8]. В настоящем исследовании мы изучали характер изменений в ультраструктуре митохондрий клеток мезофилла листьев *Triticum spelta* — дикого сородича культурной озимой пшеницы — в начальный период действия стрессовых температур для выяснения возможной роли структурных изменений этих органелл в формировании адаптивной реакции растения.

Материалы и методы. *Растительный материал и условия выращивания.* Опыты проводили с 14-суточными растениями *T. spelta* ($2n = 42$) сорта Франкенкорн, созданного в 1990-х годах на основе старых сортов спельты путем обратного скрещивания. Сорт среднерослый, устойчив к полеганию, чрезмерному увлажнению, морозоустойчивый, экологически пластичный, генетически чистый. Семена получены из коллекции Национального центра генетических ресурсов растений Украины (г. Харьков). Промытые в дистиллированной воде семена переносили в чашки Петри на увлажненную раствором Кнопа фильтровальную бумагу и помещали в термостат при 24 °С в темноте. Через сутки чашки с проросшими семенами переносили в камеру искусственного климата, где они находились 14 сут при 25 °С, относительной влажности 60–70 %, освещении 180 мкмоль/(м²·с), фотопериод составлял 16/8 ч (день/ночь). Для создания условий теплового и холодного стрессов 14-суточные растения подвергали кратковременному (2 ч) воздействию температур 40 и 4 °С при указанном режиме влажности и освещения.

Для электронномикроскопических исследований использовали высечки размером 1 × 2 мм, полученные из средней части второго листа. Предварительно образцы фиксировали 2,5 % глутаральдегидом в 0,1 М кокадилатном буфере (рН 7,2) в условиях вакуумной инфльтрации при комнатной температуре (1 ч), затем при 4 °С в течение 4 ч. Образцы про-

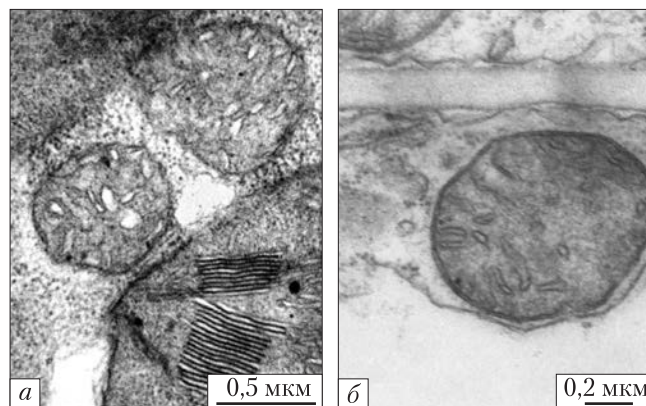


Рис. 1. Ультраструктура митохондрий *Triticum spelta*. а – контроль, б – гипертермия (40 °С, 2 ч)

мывали в том же буфере и проводили постфиксацию 1 % раствором OsO_4 в 0,1 М кокадилатном буфере (рН 7,2) при 4 °С в течение 12 ч. Для обезвоживания использовали растворы этилового спирта возрастающей концентрации и после обработки ацетоном заливали смесью эпоксидных смол эпона-812 и аралдита. Срезы, полученные на ультрамикротоме LKB-8800 (Швеция), анализировали на электронном микроскопе JEM-1230 (JEOL, Япония). Для проведения морфометрического анализа клеток и органелл использовали про-

грамму UTHSCSA Image Tool 3 (США), применяя масштабную линейку электронно-микроскопических изображений. В каждом варианте анализировали не менее 100 электронно-микроскопических изображений зафиксированных клеток.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием One-way ANOVA. Различия считали существенными при $P \leq 0,001$. Представленные значения соответствуют средним и их стандартным ошибкам.

Результаты и обсуждение. Биогенез митохондрий растений – сложный, многоступенчатый процесс, который зависит от согласованной экспрессии митохондриальных и ядерных генов. Баланс между различными этапами этого процесса определяет изменения митохондриального транскриптома и протеома, которые, в свою очередь, зависят от температуры окружающей среды [9].

В наших исследованиях было показано, что митохондрии в клетках мезофилла контрольных растений *T. spelta* имели округлую форму, характеризовались электронноплотным матриксом и многочисленными развитыми кристами пластинчатого типа (рис. 1, а). При действии высокой температуры в митохондриях мембраны крист становились менее контрастными. Наблюдалось частичное просветление матрикса органелл (см. рис. 1, б), количество которых возрастало (таблица). Кратковременная гипотермия вызывала сущест-

Ультраструктурные показатели митохондрий клеток мезофилла листа 14-суточных растений *Triticum spelta* после кратковременного (2 ч) действия высокой (40 °С) и низкой (4 °С) положительных температур

Показатель	Вариант		
	Контроль	40 °С, 2 ч	4 °С, 2 ч
Количество митохондрий на диаметральном срезе клетки	6,00 ± 0,09	7,14 ± 0,05***	5,99 ± 0,05
Площадь среза округлой митохондрии, мкм ²	0,21 ± 0,01	0,25 ± 0,01***	0,22 ± 0,01**

** Отличие от соответствующего контроля, $P \leq 0,01$ ($n = 100$).

*** Отличие от соответствующего контроля, $P \leq 0,001$ ($n = 100$).

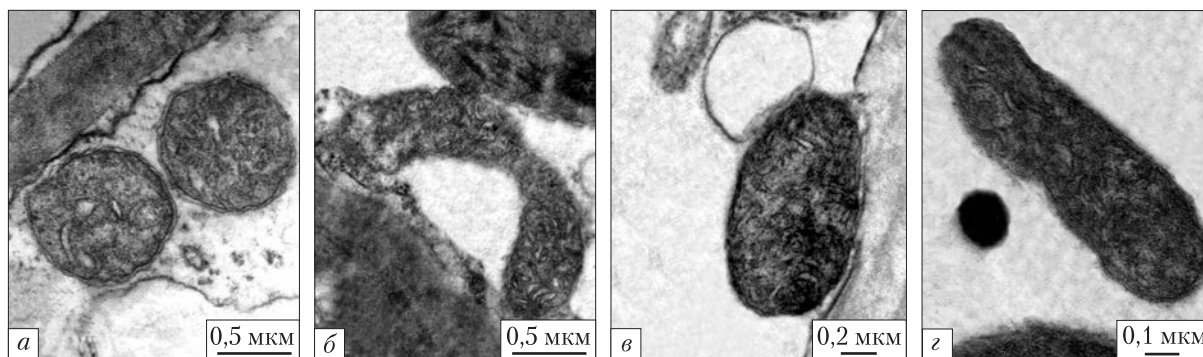


Рис. 2. Митохондрии в клетке мезофилла листка 14-суточных растений *Triticum spelta* после гипотермии (4 °С, 2 ч): а – округлые; б – “чашевидные”; в – “линзовидные”; з – “гантелевидные”

венные изменения архитектуры органелл: часть митохондрий (40 %) сохраняла круглую форму (рис. 2, а), однако отдельные органеллы приобретали “чашевидную” (б) и “линзовидную” форму (в), встречались также митохондрии “гантелевидной” формы (з). Размеры постстрессовых митохондрий значительно превышали размеры контрольных. Так, площадь среза “чашевидной” митохондрии составляла $1,02 \pm 0,01 \text{ мкм}^2$, “линзовидной” – $0,44 \pm 0,01 \text{ мкм}^2$, а “гантелевидной” – $0,35 \pm 0,01 \text{ мкм}^2$. Высокодинамичным структурным показателем является форма митохондрий [10]. Сообщалось, что у теплолюбивых растений *Episcia reptans* (Mart), *Ephedra vulgaris* (Richt.) изменение формы митохондрий сопровождается “высвечиванием” матрикса и исчезновением крист, что рассматривается в качестве симптома повреждения [11]. У холодоустойчивого вида *Arabidopsis thaliana* изменение формы митохондрий с округлой на “гантелевидную” и “чашевидную” носило обратимый характер [12]. У морозоустойчивого сорта *Triticum aestivum* Володарка при гипотермии нами также было зафиксировано образование “гантелевидных” митохондрий, размер которых достигал $0,40 \pm 0,02 \text{ мкм}^2$ [8]. Предполагается, что такая форма органелл способствует увеличению площади их поверхности и облегчает обмен метаболитами с цитоплазмой [12]. Показано, что увеличение размеров митохондрий при кратковременном стрессе свидетельствует о повышении дыхательной активности [12]. В работах других авторов сообщалось, что при длительном охлаждении растений увеличение размеров митохондрий не наблюдалось, однако отмечалось увеличение их количества [13].

Образование различных форм митохондрий может указывать на их энергетический статус, а изменение их морфологии рассматривается в качестве одного из ранних индикаторов влияния процесса ПОЛ на клетку [14]. С использованием различных ПОЛ-индуцирующих агентов показано, что морфологические изменения митохондрий происходят на фоне разобщения окислительного фосфорилирования в дыхательной цепи, которое, как известно, относится к неспецифическим стрессовым реакциям. Однако, определяются ли конформационные изменения митохондрий их энергетическим состоянием или же на энергетическое состояние влияют конформационные изменения, остается невыясненным [14].

В последние десятилетия сформировались представления, согласно которым повреждения растений вследствие действия температурного стресса начинаются с нарушений структуры и функций мембран. Мембранные изменения являются наиболее ранней реак-

цией на действие гипотермии. Предполагается, что ключевая роль в формировании устойчивости к гипотермии связана с увеличением доли ненасыщенных жирных кислот в липидном слое мембран [15]. Изменения жирнокислотного состава липидов направлены на сохранение текучести мембран на уровне, достаточном для функционирования фотосинтетического и энергетического аппаратов клетки, что позволяет растениям выживать в условиях экстремальных температур. Так, большая гибкость и эластичность мембран морозоустойчивых растений, содержащих значительные количества ненасыщенных жирных кислот, позволяют митохондриям в широком диапазоне температур активно изменять свой объем, что обеспечивает клетке более высокий энергетический потенциал. И, наоборот, меньшая гибкость мембран чувствительных к охлаждению тканей мешает клетке изменять скорость окисления, способствует снижению проницаемости для субстратов окисления, ведет к накоплению повреждающих клетки интермедиатов. Изменения физико-химических свойств мембран митохондрий, обуславливающие изменения в энергетическом метаболизме, отражались и на физиологических показателях.

В результате проведенных нами исследований выявлены изменения в ультраструктурной организации митохондрий 14-суточных растений *T. spelta*, зафиксированные в ответ на кратковременные температурные стрессы. При гипертермии увеличивалось число оргanelл и уменьшалась контрастность мембран крист, а также снижалась электронная плотность матрикса. Гипотермия сопровождалась изменениями в архитектуре митохондрий, появлением оргanelл “линзовидной”, “гантеливидной” и “чашевидной” формы, что приводило к увеличению площади их поверхности и способствовало усилению обмена метаболитами с цитоплазмой. В целом наши исследования показали, что митохондрии, являются не только мишенью стресса, но и активно участвуют в формировании реакции-ответа.

*Работа выполнена в рамках финансируемого НАН Украины проекта № III-82-17.454 “Фитогормональная система новых генотипов *Triticum aestivum* L. и её диких предков при действии экстремальных климатических факторов” (2017–2021 гг).*

Авторы благодарят заведующего Центром электронной микроскопии Института ботаники им. Н. Г. Холодного НАН Украины канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Д.А. Климчука за полезное обсуждение результатов исследований при подготовке публикации.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Hatfield J., Prueger J. Temperature extremes: Effect on plant growth and development. *Weather and Climate Extremes*. 2015. **10**. P. 4–10
2. Taylor N.L., Heazlewood J.L., Day D.A., Millar A.H. Differential impact of environmental stresses on the pea mitochondrial proteome. *Mol. Cell. Proteomics*. 2005. **4**. P. 1122–1133
3. Pareek A., Singla S., Grover A. Short-term salinity and high temperature stress associated ultrastructural alterations in young leaf cells of *Oryza sativa* L. *Ann. Bot.* 1997. **80**. P. 629–639.
4. Ciamporova M., Mistrik I. 1993. The ultrastructural response of root cells to stressful conditions. *Environ. Exp. Bot.* **33**. P. 11–26
5. Stefanowska M., Kuraś M., Kacperska A. Low temperature induced modifications in cell ultrastructure and localization of phenolics in winter oilseed rape (*Brassica napus* L. var. *oleifera*) leaves. *Ann. Bot.* 2002. **90**. P. 637–645.
6. Ristic Z., Ashworth E. Changes in leaf ultrastructure and carbohydrates in *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh) cv. Columbia during rapid cold acclimation. *Protoplasma*. 1993. **172**. P. 111–123.

7. 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. **29**. P. 940–949.
8. Бабенко Л.М., Щербатюк Н.Н., Косаковская И.В., Климчук Д.А. Структурно-функциональные особенности клеток мезофилла листьев *Triticum aestivum* L. при действии кратковременных температурных стрессов. *Цитология*. 2018. **60**, № 2. P. 128–135.
9. Rurek M. Plant mitochondria under a variety of temperature stress conditions. *Mitochondrion*. 2014. **19**, Pt. B. P. 289–294. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.02.007>
10. Logan D.C., Leaver C.J. Mitochondria-targeted GFP highlights the heterogeneity of mitochondrial shape, size and movement within living plant cells. *J. Exp. Bot.* 2000. **51**. P. 865–871.
11. Kratsch H.A., Wise R.R. The ultrastructure of chilling stress. *Plant Cell Environ.* 2000. **23**. P. 337–350.
12. Vella 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 rewarming. *Protoplasma*. 2012. **249**. P. 1137–1149.
13. Венжик Ю.В., Титов А.Ф., Таланова В.В. Кратковременное охлаждение проростков или корней пшеницы вызывает изменения в ультраструктуре клеток мезофилла листа. *Тр. Карел. науч. центра РАН*. 2017. **5**. P. 66–78.
14. Yoshinaga K., Arimura S., Niwa Y., Tsutsumi N., Uchimiya H., Kawai Yamada M. Mitochondrial behaviors in the early stages of ROS stress leading to cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Ann. Bot.* 2005. **96**. P. 337–342.
15. Theocharis A., Clement C., Barka E.A. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. *Planta*. 2012. **235**. P. 1091–1105.

Поступило в редакцию 13.06.2018

REFERENCES

1. Hatfield, J. & Prueger, J. (2015). Temperature extremes: Effect on plant growth and development. *Weather and Climate Extremes*, 10, pp. 4-10
2. Taylor, N. L., Heazlewood, J. L., Day, D. A. & Millar, A. H. (2005). Differential impact of environmental stresses on the pea mitochondrial proteome. *Mol. Cell. Proteomics*, 4, pp. 1122-1133.
3. Pareek, A., Singla, S. & Grover, A. (1997). Short-term salinity and high temperature stress associated ultrastructural alterations in young leaf cells of *Oryza sativa* L. *Ann. Bot.* 80, pp. 629-639.
4. Ciamporova, M. & Mistrik, I. (1993). The ultrastructural response of root cells to stressful conditions. *Environ. Exp. Bot.*, 33, pp. 11-26.
5. Stefanowska, M., Kuraś, M. & Kacperska, A. (2002). Low temperature induced modifications in cell ultrastructure and localization of phenolics in winter oilseed rape (*Brassica napus* L. var. oleifera) leaves. *Ann. Bot.*, 90, pp. 637-645.
6. Ristic, Z. & Ashworth, E. (1993). Changes in leaf ultrastructure and carbohydrates in *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh) cv. Columbia during rapid cold acclimation. *Protoplasma*. 172, pp. 111-123.
7. Armstrong, A. F., Logan, D. C., Tobin, A. K., O'Toole, P. & Atkin, O. K. (2006). Heterogeneity of plant mitochondrial responses underpinning respiratory acclimation to the cold in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Cell Environ.*, 29, pp. 940-949.
8. Babenko, L. M., Scherbatiuk, N. N., Klimchuk, D. A. & Kosakovskaya, I. V. (2018). Structural-functional peculiarities of leaf mesophyll cells of triticum aestivum cultivars with different cold/heat tolerance under short-term temperature stresses. *Tsitologiya*, 60, No. 2, pp. 128-135 (in Russian).
9. Rurek, M. (2014). Plant mitochondria under a variety of temperature stress conditions. *Mitochondrion*, 19, Pt. B, pp. 289-294. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.02.007>
10. Logan, D. C. & Leaver, C. J. (2000). Mitochondria-targeted GFP highlights the heterogeneity of mitochondrial shape, size and movement within living plant cells. *J. Exp. Bot.*, 51, pp. 865-871.
11. Kratsch, H. A. & Wise, R. R. (2000). The ultrastructure of chilling stress. *Plant Cell Environ.*, 23, pp. 337-350.
12. Vella, 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 rewarming. *Protoplasma*, 249, pp. 1137-1149.

13. Venzhik, Yu. V., Titov, A. F. & Talanova, V. V. (2017). Short-term chilling of wheat seedlings or roots affects the ultrastructure of mesophyll cells. *Trudy Karelskogo nauchnogo tsentra RAN*, 5, pp. 66-78 (in Russian).
14. Yoshinaga, K., Arimura, S., Niwa, Y., Tsutsumi, N., Uchimiya, H. & Kawai Yamada, M. (2005). Mitochondrial behaviors in the early stages of ROS stress leading to cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Ann. Bot.*, 96, pp. 337-342.
15. Theocharis, A., Clement, C. & Barka, E. A. (2012). Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. *Planta*, 235, pp. 1091-1105.

Received 13.06.2018

Л.М. Бабенко, М.В. Водка, Ю.Н. Акимов,
А.В. Бабенко, І.В. Косаківська

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, Київ
E-mail: lilia.babenko@gmail.com

ВПЛИВ ЕКСТРЕМАЛЬНИХ ТЕМПЕРАТУР НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ МИТОХОНДРІЙ КЛІТИН МЕЗОФІЛУ ЛИСТКІВ *TRITICUM SPELTA*

Проаналізовано ефекти високої (40 °С 2 год) і позитивної низької (4 °С 2 год) температур на ультраструктуру мітохондрій клітин мезофілу листків *Triticum spelta* L. Показано, що у контрольних рослин мітохондрії мали округлу форму, характеризувалися електроннощільним матриксом і наявністю численних розвинених крист пластинчастого типу. За умов гіпертермії мітохондрії “розбухали”, мембрани крист ставали менш контрастними, знижувалася електронна щільність матриксу, кількість мітохондрій зростала. За умов гіпотермії до 40 % мітохондрії зберігали округлу форму, з’являлися органели “лінзоподібної”, “гантелеподібної” і “чашоподібної” форми. Кількість мітохондрій на діаметральному зрізі клітини не змінювалася. Зміна форми органел зумовлювала збільшення площі їх поверхні, що, ймовірно, сприяло зростанню обміну метаболітами з цитоплазмою і, таким чином, підвищенню стресостійкості.

Ключові слова: *Triticum spelta*, температурний стрес, мітохондрії.

Л.М. Babenko, M.V. Vodka, Yu.N. Akimov,
A.V. Babenko, I.V. Kosakivska

M.G. Kholodny Institute of Botany of the NAS of Ukraine, Kiev
E-mail: lilia.babenko@gmail.com

EXTREME TEMPERATURE EFFECTS ON THE ULTRASTRUCTURE OF MITOCHONDRIA OF MESOPHYLL CELLS IN *TRITICUM SPELTA* LEAVES

The effects of high (40 °C, 2 h) and positive low (4 °C, 2 h) temperatures on the ultrastructure of mitochondria of the mesophyll cells in *Triticum spelta* L. leaves are analyzed. Control plants are shown to have round mitochondria and are characterized by an electron-dense matrix and the presence of numerous developed laminar cristae. Under conditions of hyperthermia, mitochondria were “swollen”, the crystal membranes became less contrast, the electron density of the matrix decreased, and the number of mitochondria increased. With hypothermia up to 40 %, the mitochondria retained a rounded shape, and organelles of “lenticular”, “dumbbell”, and “cup-shaped” forms appeared. The number of mitochondria in the diametrical section of a cell did not change. Changing in the shape of the organelles led to an increase in the area of their surface, which probably promotes the metabolites exchange with cytoplasm and thus contributes to the increased stress tolerance.

Keywords: *Triticum spelta*, temperature stress, mitochondria.