

## СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА АЗОТФИКСИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ И УЛЬТРАСТРУКТУРЫ КОРНЕВЫХ КЛУБЕНЬКОВ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА ELAEAGNACEAE

Г.Г. Майстренко<sup>1</sup>, Н.Я. Гордиенко<sup>2</sup>, К.К. Сидорова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: sidorova@bionet.nsc.ru;

<sup>2</sup> Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: root@.botgard.nsk.su

Изучены сезонные колебания азотфиксирующей активности корневых клубеньков *Hippophaë rhamnoides* L., *Elaeagnus angustifolia* L., *Shepherdia argentea* (Pursh) Nutt. и ультраструктурные изменения инфицированных тканей. Отмечены высокие уровни нитрогеназной активности клубеньков в летние месяцы с максимумом в августе–сентябре, что обеспечивает высокий потенциал их азотфиксации в условиях юга Западной Сибири. Характер изменчивости азотфиксации согласуется с числом и физиологическим состоянием везикул, в которых локализован азотфиксирующий комплекс нитрогеназы, и биологическими особенностями изученных видов.

**Ключевые слова:** *Hippophaë rhamnoides* L., *Elaeagnus angustifolia* L., *Shepherdia argentea* (Pursh) Nutt., корневые клубеньки, ультраструктура, нитрогеназная активность, азотфиксация.

### Введение

Виды семейства Лоховые (Elaeagnaceae) *Hippophaë rhamnoides* L., *Elaeagnus angustifolia* L., *Shepherdia argentea* (Pursh) Nutt. являются типичными представителями актиноризных растений, насчитывающих к настоящему времени 200 видов из 25 родов и 8 семейств (Huss-Danell, 1997). Актиноризные растения вступают в симбиоз с азотфиксирующими почвенными бактериями из рода *Frankia* порядка Actinomycetales. Наряду с широко известным бобово-ризобиальным симбиозом актиноризный симбиоз вносит существенный вклад в поступление биологического азота в наземные экосистемы. В отличие от бобово-ризобиального симбиоза, вносящего существенный вклад в продуктивность агроценозов (Сидорова и др., 2006), актиноризный симбиоз играет важную роль в функционировании природных экосистем. Благодаря азотфиксирующей способности актиноризные растения выступают как пионерные виды в заселении крайне неблагоприятных местообитаний, включая песчаные дюны, засоленные и техногенно нарушенные

земли (Dawson, 2008). Кроме того, эта группа растений важна экономически, так как многие ее представители являются источниками ценной биомассы и плодов, а также используются как объекты озеленения и предшественники других экономически важных растений – зерновых, технических и др.

Определение количества азота, фиксированного актиноризными растениями, показало, что они идентичны бобовым культурам. Поступление азота составляет 40–350 кг на гектар почвы в год. Азотфиксирующая активность клубеньков актиноризных растений равна или выше, чем у бобовых в системе бобово-ризобиального симбиоза (Togrey, 1978).

Сезонная изменчивость азотфиксирующей активности клубеньков лоховых растений изучалась в других геоклиматических зонах. Известны ранние и более поздние исследования по этому вопросу (Stewart, Pearson, 1967; Андреева и др., 1982; Bermudes de Castro *et al.*, 1990). В Сибири подобные исследования не проводились.

Цель исследования состояла в изучении сезонной изменчивости нитрогеназной актив-

ности и ультраструктуры корневых клубеньков лоховых растений в Сибири для оценки потенциального поступления биологического азота в этих условиях.

### Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовали корневые клубеньки *H. rhamnoides*, *E. angustifolia*, *Sh. argentea*, произрастающих в питомнике Центрального сибирского ботанического сада СО РАН вблизи г. Новосибирска. К моменту эксперимента, проведенного в 2001–2003 гг., растения находились в средневозрастном генеративном состоянии. Корневые клубеньки собирали с мая по октябрь. Для анализа отбирали 2–4-лопастные клубеньки. Пробы для определения нитрогеназной активности брали в один и тот же интервал времени – с 10 до 11 часов. Активность определяли ацетиленовым методом (Hardy *et al.*, 1973). Навеску клубеньков (100 мг сырой массы) помещали в 15-миллилитровые флаконы с вакуумным затвором, в которые добавляли ацетилен –10 % к конечному объему. Инкубацию проводили в ультратермостате при 30 °С в течение одного часа. Реакцию останавливали введением 1 мл 5 % ТХУ. Образовавшийся этилен определяли газовой хроматографическим методом на хроматографе «Хром 5». В качестве газа-носителя использовали гелий, расход 35 мл/мин. Повторность определений 8–10-кратная. Азотфиксирующую активность выражали в микромолях образовавшегося этилена на 1 г сырой массы клубеньков за 1 час инкубации.

Для световой и электронной микроскопии клубеньки фиксировали 2,5 %-м раствором глутаральдегида в 0,25 М фосфатном буфере рН 6,8–7,0 при комнатной температуре в течение 12 часов, затем промывали фосфатным буфером 3 раза по 10 мин. Постфиксацию проводили в 1 %-м забуференном растворе четырехоксида осмия в течение 4 часов. После фиксации образцы промывали фосфатным буфером дважды по 10 мин и проводили по ряду спиртов возрастающей концентрации (30 %, 50 % и 70 %). Образцы выдерживали в каждой концентрации в течение 10 мин, затем помещали в абсолютный спирт на 15 минут. После замены спирта ацетоном образцы пропитывали заливочной смесью эпок-

сидной смолы (аралдита) в течение нескольких часов при комнатной температуре и переводили в свежую смесь для полимеризации блоков в термостате.

На ультрамикротоме «Tesla» при использовании стеклянных ножей получали полутонкие (1 мкм) и ультратонкие (25–30 нм) срезы. Полутонкие срезы окрашивали и просматривали в световом микроскопе марки «Цейсс». Ультратонкие срезы окрашивали уранилацетатом и цитратом свинца по методу E.S. Reynolds (1963), просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе марки «Tesla BS-500» и фотографировали на диапозитивные контрастные пластинки.

Число везикул подсчитывали в 54 мкм<sup>2</sup> инфицированной ткани в 20-кратной повторности. Ультраструктурный анализ инфицированной ткани клубеньков лоховых растений проведен в 3 срока: май–август–октябрь.

### Результаты и их обсуждение

Сезонные изменения нитрогеназной активности клубеньков лоха и облепихи представ-

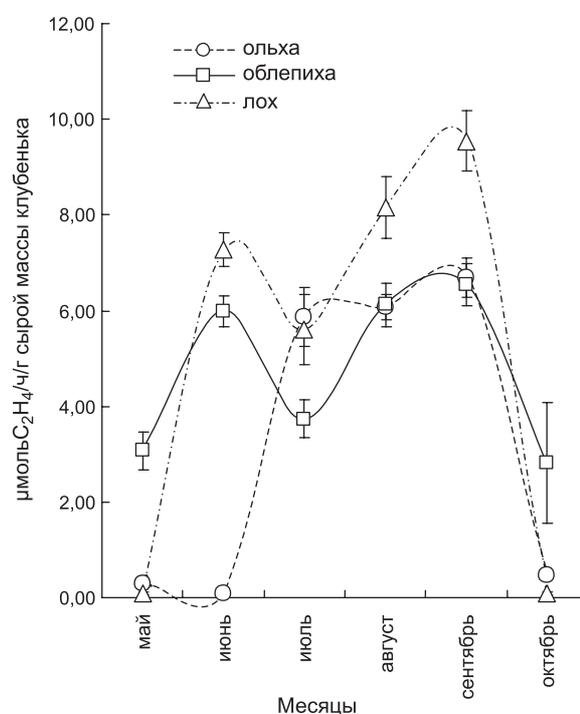


Рис. 1. Сравнительная динамика сезонной нитрогеназной активности корневых клубеньков облепихи, лоха, ольхи.

лены на рис. 1. Показан однотипный характер ферментативных колебаний у этих видов на протяжении всего периода вегетации. В мае наблюдались низкие (у облепихи) и крайне низкие (у лоха) уровни азотфиксирующей активности. В последующем отмечено два пика возрастания активности (в июне и в августе–сентябре). Первый (июньский) подъем азотфиксирующей активности по сравнению с майским сроком был наиболее значительным и у облепихи увеличивался в 1,9 раза, у лоха – в 70 раз. Августо-сентябрьский пик подъема активности был значительно ниже июньского, превышая его лишь на 2–6 % у облепихи и 10–11 % у лоха. В октябре наблюдался значительный спад азотфиксирующей активности клубеньков. Уровень нитрогеназной активности в этот период был ниже (у облепихи) или равен (у лоха) майскому сроку. За исключением весеннего срока, азотфиксирующая активность клубеньков лоха была выше, чем у облепихи. На рис. 1 представлены также некоторые отличия в азотфиксирующей активности лоховых растений по сравнению с ольхой (*Betulaceae*), описанной нами ранее (Майстренко и др., 2008).

Нитрогеназная активность клубеньков шефердии (*Sh. canadensis*) определялась лишь в два срока: в мае и в августе. Как и у других изученных нами лоховых растений, в мае она была крайне низкой и составляла лишь 0,017 мкМ  $C_2H_4$  в час на 1 г сырой биомассы клубеньков. В летнем сроке она возрастала до 2,87, что было сравнимо с уровнем азотфиксации у облепихи в этот срок и ниже, чем у лоха.

В общих чертах характер изменчивости азотфиксирующей активности клубеньков у представителей семейства *Elaeagnaceae* согласуется с данными других авторов по этому вопросу для лоховых и других актиноризных растений (Stewart, Pearson, 1967; Sharma, Ambasht, 1984; Bermudes de Castro *et al.*, 1990).

Известно, что на активность азотфиксации может влиять множество факторов окружающей среды. По мнению Г.Н. Зайцева (1983), ведущими экологическими факторами среды являются температура воздуха и длина фотопериода. Эти два фактора находятся в тесной коррелятивной связи со многими другими метеофакторами и экологическими условиями. Средняя длина светового дня в течение вегетационного периода

представлена на рис. 2. Показано, что в мае, июне, июле световой период остается на высоком уровне и укорачивается в августе, сентябре и особенно в октябре. Приведенные данные и сравнение их с сезонной изменчивостью азотфиксирующей активности клубеньков лоховых растений говорят об отсутствии между ними прямой связи.

Сравнение азотфиксирующей активности с дневными и ночными температурами в вегетационный период года исследований (по данным местной метеостанции) не выявило прямых связей с азотфиксирующей активностью.

При анализе полученных нами данных по динамике нитрогеназной активности лоховых растений возникает предположение о вероятной связи азотфиксации с биологическими особенностями лоховых растений. К настоящему времени установлено, что в родственном актиноризному бобово-ризобияльном симбиозе гены растения-хозяина оказывают воздействие на ряд событий в ходе симбиоза, определяя способность к формированию клубеньков, влияя на их численность, а также на внутриклеточную дифференциацию и эффективность азотфиксации (Сидорова и др., 2006).

В условиях юга Западной Сибири, по данным В.В. Мочалова (1970), Г.М. Скуридина (1999),

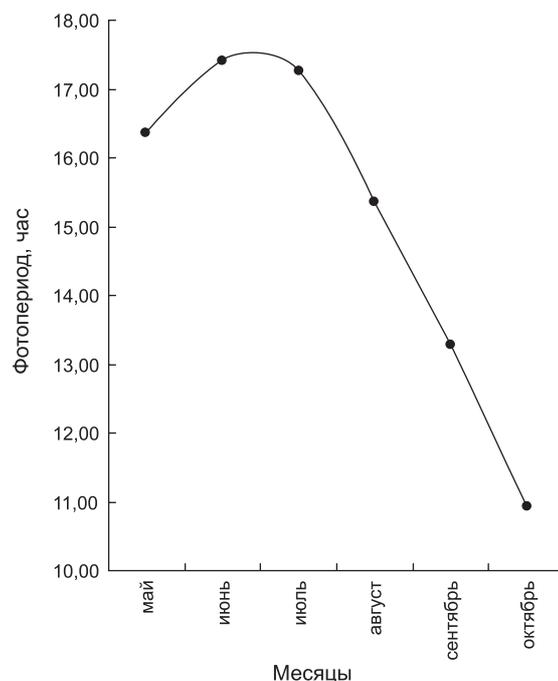


Рис. 2. Длина светового дня в исследуемый период.

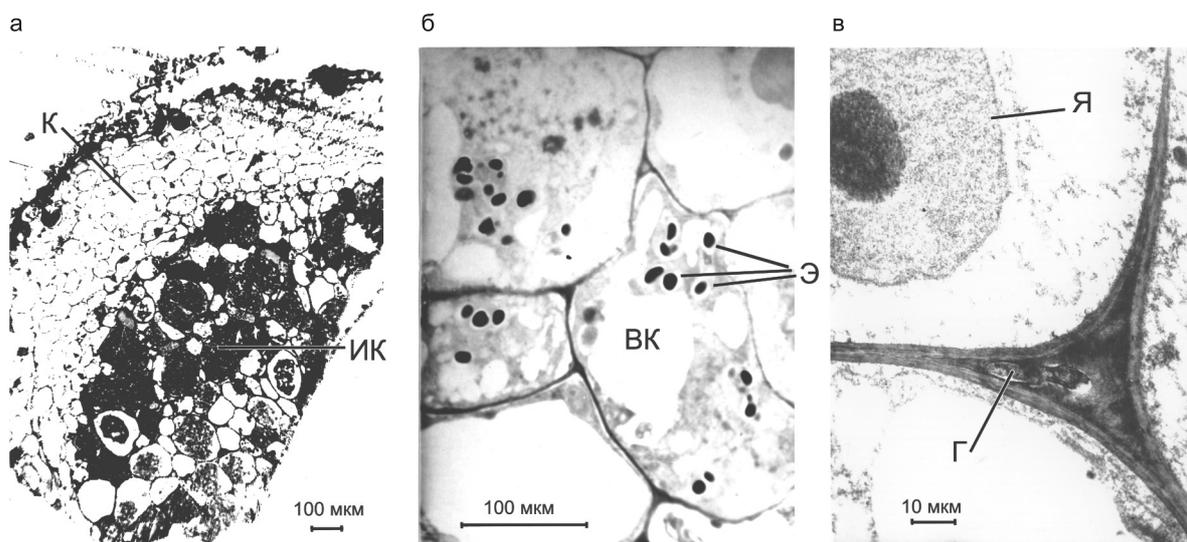
лоховые растения при плантационном выращивании развиваются по следующему циклу: вегетация начинается в первой декаде мая, цветение у облепихи происходит в середине–конце мая, у лоха – в июне. В этот месяц отмечен максимальный прирост корней, с образованием и разветвлением которых связано инфицирование франкциями и развитие клубеньков. Рост побегов тесно связан с развитием корневой системы. Поэтому, вероятно, первый пик азотфиксации происходит именно в этот период. В июле–августе прирост корневой системы значительно замедляется. В июне–июле отмечен бурный рост побегов, заканчивающийся в конце июля. Возможно, с этими процессами связано ослабление азотфиксации в июле. В августе–сентябре продолжается фотосинтез, позволяющий растению потратить часть своих фотоассимилятов на азотфиксацию. Резкое снижение азотфиксации в октябре связано, вероятней всего, с листопадом и прекращением притока углеводов – продуктов фотосинтеза.

Другие связи колебаний азотфиксирующей активности клубеньков лоховых растений в ходе вегетационного развития, возможно, согласуются с сезонными изменениями ультраструктуры инфицированной ткани, а также с особенностями функционирования в них эндофита.

Ультраструктура корневых клубеньков актиноризных, в том числе и лоховых растений

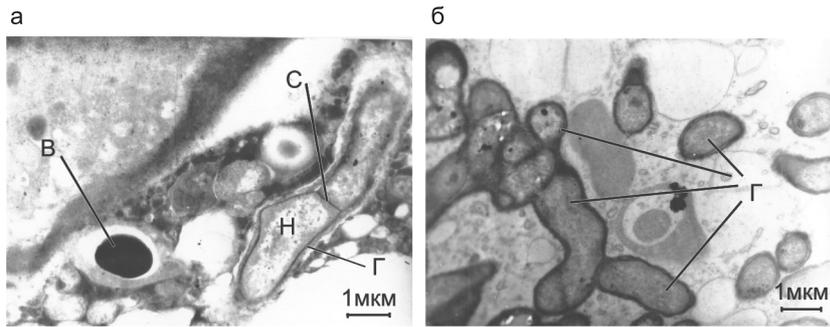
хорошо изучена (Gatner, Gardner, 1970; Gardner, Gatner, 1973; Майстренко и др., 1974; Майстренко, 1977; Андреева и др., 1980). По данным световой и электронной микроскопии, в корневых клубеньках лоховых растений показано образование в корневой паренхиме увеличенных по размерам клеток инфицированных эндофитом франкций. Инфекционная зона концентрируется в виде компактной области и заметно выделяется на фоне неинфицированной меристемы и сосудистой системы, занимающей центральную часть клубенька (рис. 3, а). Показано, что франкия инфицирует молодой корешок первичного строения. Гифы почвенных бактерий семейства Frankiaceae порядка Actinomycetales, как и ризобии, привлеченные корневыми экссудатами корня, проникают в кору лоховых растений через межклетники (рис. 3, в). Другого способа попадания инфекции в ткань мы не наблюдали. По литературным данным, известен также способ проникновения франкий через корневую волосок (Berry *et al.*, 1986).

В клетках клубенька эндофит лоховых растений представлен двумя морфологическими формами: гифами и везикулами (рис. 4, а, б). Образования спорангиев в инфицированной ткани лоховых растений нами не наблюдалось. С гифами эндофита связана первичная фаза инфекции. Мицелий эндофита тонкий, 0,8 мкм в



**Рис. 3.** Эндофит лоховых растений в ткани (а), в инфицированных клубеньках (б) и межклетнике (в) клубеньков.

Видны инфицированная (ИК) и неинфицированная (К) зоны клубенька, эндофит (Э), вакуоль (ВК), ядро растительной клетки (Я) и гифа (Г).



**Рис. 4.** Ультраструктура инфицированной ткани, шефердии (а) и лоха (б) в мае.

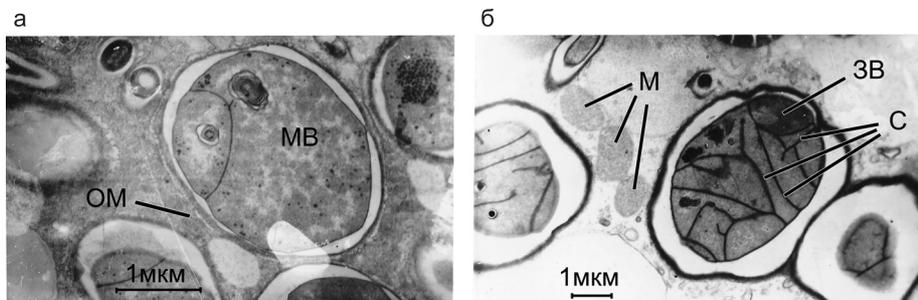
Г – гифа эндофита, В – везикула, Н – нуклеоид, С – септа.

диаметре. Заметной его особенностью является разветвленность и образование септ (рис. 3, а). Снаружи мицелий эндофита окружен гладким слоем, по структуре подобным материалу клеточной стенки растения-хозяина, и плазмалеммой растительного происхождения. Везикулы эндофита, достигающие 5 мкм в диаметре, появляются во второй фазе инфицирования растительной клетки как расширенное и увеличенное в размерах окончание разветвлений гиф. Они, как и мицелий, отделены от цитоплазмы растительной клетки мембраной растительного происхождения. С везикулами эндофита связана ее главная функция – способность фиксировать атмосферный азот, что коррелирует с локализацией в них нитрогеназного комплекса, что установлено многими авторами с применением современных методов исследования (Berry, 1994; Huss-Danell, 1997). По своей функции везикула является аналогом симбиосомы в бобово-ризобиальном симбиозе.

Ультраструктура инфицированной ткани корневых клубеньков лоховых растений в мае,

августе и октябре значительно различается. В мае в условиях юга Западной Сибири начинается вегетация растений. В середине мая появляется облиственность побегов и, как было указано выше, происходят образование новых корней, формирование на них клубеньков и нарастание новых лопастей у клубеньков, появившихся в прошлом сезоне. В этот период в инфицированной ткани отмечено множество разветвленных септированных гиф. Чаще всего они заполняют молодые клетки клубенька. Во второй половине мая на концах разветвлений гиф появляются первые единичные везикулы. Молодые везикулы значительно меньше зрелых (рис. 3, б, 4, а).

В августе в инфицированных клетках отмечено образование множества зрелых везикул, в меньшем числе встречались молодые несептированные везикулы (рис. 5, а, б). Функционирование везикул проходит в активно метаболизирующих клетках, о чем свидетельствовало присутствие в цитоплазме растительных клеток таких органелл, как митохондрии, рибосомы, эндоплазматический ретикулум.



**Рис. 5.** Ультраструктура инфицированной ткани клубеньков лоха (а) и облепихи (б) в августе.

МВ – молодая везикула, ЗВ – зрелая везикула, М – митохондрия, ОМ – окружающая мембрана.

В октябре в клетках инфицированной ткани лоховых растений отмечено появление деградирующих везикул (рис. 6).

В связи с тем, что с везикулами связана азотфиксирующая активность, нами подсчитано среднее число везикул в единице площади, указанной в разделе «Методы исследования». Было подсчитано число везикул, оценена степень их функционирования или разрушения; этот показатель сравнен с сезонной изменчивостью азотфиксирующей активности клубеньков. Полученные данные представлены в таблице.

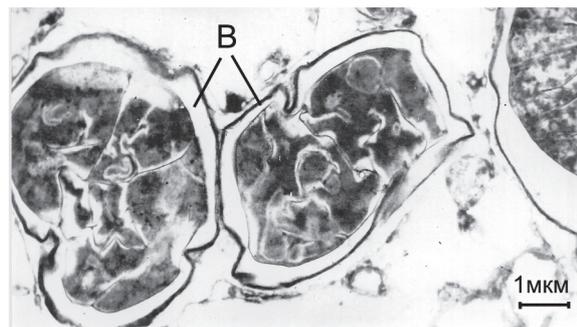
**Таблица**

Число и состояние везикул  
в одном поле зрения. Увеличение  $\times 10$  тыс.

Месяцы	Число везикул			
	всего	без септ	септированные	деградированные
Май	$2,4 \pm 0,3$	$2,4 \pm 0,3$	0	0
Август	$5,2 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,1$	$4,0 \pm 0,6$	0
Октябрь	$5,4 \pm 0,4$	0	$1,3 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,5$

Полученные данные свидетельствуют о том, что в августе происходит увеличение числа везикул в просматриваемом участке инфицированной клетки в 2,2 раза по сравнению с майским сроком. По данным И.А. Андреевой с соавт. (1982), площадь инфицированных клеток к этому периоду возрастает в среднем на 20 %. Следовательно, можно полагать, что в летний (августовский) срок увеличивается и число везикул на одну инфицированную клетку. Большинство везикул в этом сроке являются зрелыми, септированными, функциональными. В октябре число везикул сохраняется на прежнем уровне, но не образуются новые везикулы. Большинство везикул находится в стадии деградации. Увеличение зрелых функциональных везикул в летнем сроке согласуется с возрастанием азотфиксирующей активности клубеньков лоховых растений в этот же срок.

Таким образом, проведенные исследования по изучению динамики азотфиксирующей активности клубеньков *H. rhamnoides*, *Elaeagnus angustifolia*, *Sh. argentea* показали, что в условиях юга Западной Сибири имеется большая продолжительность периода азотфиксации и



**Рис. 6.** Ультраструктура инфицированной клетки облепихи в октябре.  
Видны дегенеративные формы везикул (В).

Видны дегенеративные формы везикул (В).

достаточно высокие ее уровни в летние месяцы. Показаны минимумы азотфиксации в первой половине мая и в октябре. Отмечены два пика азотфиксирующей активности в июне и в августе–сентябре. Максимальные значения азотфиксации в клубеньках лоховых растений согласуются не только с числом везикул в клетке, но и с их физиологическим состоянием – степенью зрелости и отсутствием признаков деградации. Азотфиксирующая активность везикул в *Frankia-Elaeagnaceae* симбиозе связана также с биологическими особенностями растений – характером роста побегов, обеспечивающих приток углеводов к клубенькам, и скоростью нарастания корневой массы, обеспечивающей возможность формирования самого симбиотического аппарата лоховых растений.

Выражаем искреннюю благодарность Т.М. Мищенко за помощь в подготовке и оформлении работы.

### Литература

- Андреева И.Н., Тиболов А.А., Ильясова В.Б., Жизневская Г.Я. Ультраструктура азотфиксирующих клубеньков у сеянцев облепихи // Физиол. растений. 1980. Т. 27. Вып. 4. С. 791–793.
- Андреева И.Н., Федорова Е.Э., Ильясова В.Б., Тиболов Ф.Ф. Ультраструктура азотфиксирующих и зимующих клубеньков однолетних саженцев облепихи и лоха // Физиол. растений. 1982. Т. 29. Вып. 1. С. 127–132.
- Зайцев Г.Н. Оптимум и норма в интродукции растений. М.: Наука, 1983. 258 с.
- Майстренко Г.Г. Симбиоз у небобовых древесных

- растений на примере облепихи // Структурные и функциональные связи высших растений и микрорганов: Сб. статей. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1977. С. 17–55.
- Майстренко Г.Г., Гордиенко Н.Я., Новикова Т.И., Банаев Е.В. Сезонные изменения азотфиксирующей активности и ультраструктуры корневых клубеньков *Alnus hirsuta* (Betulaceae) // Сиб. экол. журнал. 2008. Т. XV. Вып. 4. С. 531–537.
- Майстренко Г.Г., Яковлева З.М., Майстренко А.Г. Особенности ультраструктуры эндофита *Hippophae rhamnoides* L. // Микробиология. 1974. Т. 43. Вып. 3. С. 504–507.
- Мочалов В.В. Культура облепихи в условиях леса и лесостепи Новосибирской области // Облепиха в культуре: Сб. статей. Барнаул, 1970. С. 29–34.
- Сидорова К.К., Шумный В.К., Назарюк В.М. Симбиотическая азотфиксация: генетические, селекционные и эколого-агрономические аспекты. Новосибирск: Академическое изд-во «Гео», ИЦиГ СО РАН, 2006. 134 с.
- Скуридин Г.М. Биологические особенности облепихи // Облепиха в лесостепи Приобья: Сб. статей. Новосибирск, 1999. С. 6–28.
- Bermudes de Castro F., Aranda F., Schmitz M.F. Acetylene-reducing activity and inputs in a bluff of *Elaeagnus angustifolia* L. // Orsis. 1990. V. 5. P. 85–89.
- Berry A.M., Melntyre L., McCully M.E. Fine structure of root hair infection leading to nodulation in the Frankia-Alnus symbiosis // Can. J. Bot. 1986. V. 64. № 2. P. 292–305.
- Berry A. Recent developments in actinorhizal symbioses // Plant and Soil. 1994. V. 161. P. 133–143.
- Dawson I.O. Ecology of actinorhizal plants // Nitrogen fixing actinorhizal symbioses. Netherlands: Springer, 2008. P. 199–254.
- Hardy R.W.F., Burns R.S., Holsten R.D. Application of the acetylene-ethylen assay for measurement of nitrogen fixation // Soil. Biol. Biochem. 1973. V. 5. № 1. P. 41–83.
- Gardner J.C., Gatner E.M. The formation of vesicles in the developmental cycle of the nodule endophyte of *Hippophae rhamnoides* L. // Arch. Mikrobiol. 1973. Bd. 89. № 3. S. 233–240.
- Gatner E.M., Gardner J.C. Observations on the fine structure of the root nodule endophyte of *Hippophae rhamnoides* L. // Arch. Mikrobiol. 1970. Bd. 70. № 3. S. 183–199.
- Huss-Danell K. Actinorhizal symbioses and their N<sub>2</sub> fixation // New. Phytolog. 1997. V. 136. № 3. P. 375–405.
- Sharma E., Ambasht R.S. Season variation of nitrogen fixation by different ages of root nodules of *Alnus nepalensis* in the eastern Humalayas // J. Appl. Ecol. 1984. V. 21. P. 265–270.
- Stewart W.D.P., Pearson M.C. Nodulation and nitrogen-fixation by *Hippophae rhamnoides* L. in the field // Plant and Soil. 1967. V. 26. № 2. P. 348–360.
- Reynolds E.S. The use bead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy // J. Cell. Biol. 1963. V. 17. P. 208–212.
- Torrey J.G. Nitrogen fixation by actinomycete-nodulated angiosperms // Bioscience. 1978. V. 28. № 9. P. 586–592.

## SEASONAL VARIATION IN THE NITROGEN-FIXING ACTIVITY AND ROOT NODULE ULTRASTRUCTURE IN ELAEAGNACEAE

G.G. Maistrenko<sup>1</sup>, N.Ja. Gordienko<sup>2</sup>, K.K. Sidorova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: sidorova@bionet.nsk.ru;

<sup>2</sup> Central Siberian Botanical Garden, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: root@.botgard.nsk.su

### Summary

Seasonal nitrogenase activity variation has been monitored in root nodules of *Hippophaë rhamnoides* L., *Elaeagnus angustifolia* L., and *Shepherdia argentea* (Pursh) Nutt., and ultrastructural changes in the infected tissue have been studied. The activity is high in summer and peaks in August–September, which accounts for high nitrogen-fixing potential of nodules in southern West Siberia. The nitrogen fixation rate variation is consistent with the number and physiological state of the vesicles containing the nitrogen-fixing complex (nitrogenase) and has a specific pattern in each of the species studied.

**Key words:** *Hippophaë rhamnoides* L., *Elaeagnus angustifolia* L., *Shepherdia argentea* (Pursh) Nutt., root nodules, nitrogenase activity, ultrastructure, nitrogen fixation.