

УДК 582.866:631.46

АЗОТОФИКСИРУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ КОРНЕВЫХ КЛУБЕНЬКОВ ОБЛЕПИХИ

СИМОНОВ И. Н., ЖИЗНЕВСКАЯ Г. Я., ХАЙЛОВА Г. Ф., ИЛЬСОВА В. Б.,
КУДРЯВЦЕВА Н. Н., ТИБИЛОВ А. А.

(Кафедра виноградарства и виноделия ТСХА, Институт физиологии растений АН СССР)

Облепиха относится к семейству лоховых *Elaeagnaceae*, объединяющему 3 рода, в которые входят 45 видов деревьев и кустарников. В масле из плодов облепихи содержатся каротиноиды (до 180 мг%), оксикумарин, витамин K_1 и витамин Е (до 16 мг%), а также непредельные жирные кислоты, предупреждающие отложение холестерина в стенках кровеносных сосудов. Оно используется в качестве лечебного средства при ряде тяжелых заболеваний. В связи с этим для выращивания облепихи были организованы специализированные совхозы и разработана заводская технология производства масла.

На корнях облепихи уже у однолетних сеянцев образуются клубеньки, по внешнему виду напоминающие клубеньки бобовых растений. Способность корневых клубеньков облепихи к симбиотической фиксации атмосферного азота была определена различными методами. В ранних работах (1934 г.) ставились долгосрочные эксперименты по выращиванию растений на безазотной среде, прирост азота в растениях и в среде учитывался по Къельдалю [24, цит. по 23]. Позднее в

Т а б л и ц а I

Небобовые растения (деревья или кустарники), имеющие корневые клубеньки

Род, вид	Семейство	Порядок (по Тахтаджану, 1966)	Число видов, имеющих клубеньки (в скобках об- щее их чис- ло)	Район произрастания
Ольха		21	12 (35)	Везде в умеренном поясе
<i>Alnus glutinosa</i> Казуарина	Betulaceal	Betulales 19	14 (45)	Австралия, острова Тихого океана
<i>Casuarina cunningghamiana</i>	Casuarinaceal	Casuarinales 54	12 (15)	Новая Зеландия, Япония, Испания, Америка
<i>Coriaria</i> Лох	Coriariaceae	Rutales 63	9 (45)	Умеренный пояс, Азия
<i>Elaeagnus</i> Облепиха	Elaeagnaceae	Elaeagnales »	1 (1)	Везде
<i>Hipporhae rhamnoides</i> Мирт болотный		23	12 (35)	Тропический полукустарник
<i>Myrica gale</i>	Myricaceae	Myricales		

этих целях стали использовать меченые изотопы азота. В опытах с ^{15}N было показано, что уровень азотфиксации у облепихи на прибрежных дюнах Великобритании колебался от 27 кг азота на 1 га в год у 3-летних растений и до 179 кг/га у 13-летних [26]. Для сравнения укажем, что, по расчетам Е. Н. Мишустина [8], многолетние бобовые дают за счет азотфиксации в среднем 40 кг азота на 1 га в год.

Вопрос об исследовании оптимальных условий азотного питания и азотофиксирующей способности у корневых клубеньков облепихи имеет существенный интерес. Облепиха растет на бедных почвах, где возделывание других сельскохозяйственных растений затруднено, и обогащает почву биологически связанным азотом. Широкое распространение имеет, например, культура облепихи на отвоеванных у моря польдерах и песчаных дюнах Голландии [15]. По данным голландского исследователя Аккерманса [15], азотфиксирующая способность клубеньков облепихи, определенная ацетиленовым методом, была выше, чем у клубеньков ольхи.

К настоящему времени установлено, что симбиотической азотфиксирующей активностью обладают корневые клубеньки как бобовых растений, так и ряда семейств покрытосемянных двудольных небобовых растений — деревьев и полукустарников (табл. 1).

У бобовых растений атмосферный азот фиксируют клубеньковые бактерии рода *Rhizobium*, внедряющиеся в корень и приобретающие внутри образовавшихся корневых клубеньков форму бактериоидов [9, 10]. Вопрос же о природе азотофиксирующего эндофита у корневых клубеньков небобовых кустарниковых растений вообще, и у облепихи, в частности, еще окончательно не решен, однако большинство исследователей полагает, что эндофит относится к актиномицетам [16, 17, 20, 23, 25]. Из зрелых клубеньков были выделены бактериоидоподобные образования, что послужило основой для не подтвердившегося в дальнейшем заключения о бактериальной природе симбионта в клубеньках облепихи [6].

Трудность идентификации эндофита состоит в том, что он до сих пор не выделен в чистой культуре. В ранних работах Кравцова Б. И. [7] было показано, что при обработке черенков облепихи одно-двух-летнего возраста растертыми в воде клубеньками облепихи, взятыми с других растений, происходила инокуляция, и через год клубеньки образовывались у 80% взятых в опыт растений. Отмечено [11] улучшение роста растений и увеличение содержания хлорофилла в листьях в результате обработки молодых сеянцев облепихи суспензией из растертых клубеньков. При этом уже у однолетних сеянцев облепихи образовывались клубеньки на стержневом корне (рис. 1), а в последующие

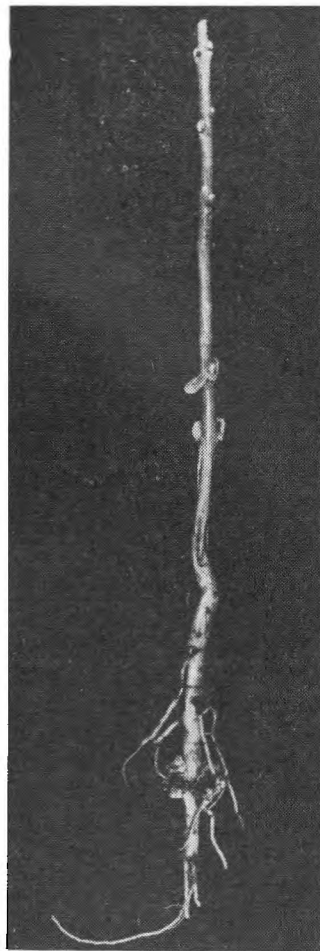


Рис. 1. Трехмесячный сеянец облепихи с корневыми клубеньками.

азотфиксацией в клубеньках желтого люпина сорта Быстрорастущий 4, который выращивали на дерново-подзолистых почвах (песчаных) участка ИФР АН СССР (г. Москва).

Для определения содержания гемоглобина и общего гематина клубеньки облепихи и желтого люпина сразу после сбора замораживали жидким азотом и затем хранили в сосудах Дьюара с твердой углекислотой. Масса образца 2—3 г, повторность 3-кратная. Гемоглобин выделяли методом адсорбционной хроматографии на колонках окиси алюминия по Е. Федорову [13], общий гематин в виде пиридингемохромагена определяли по Хартри [22], как описано нами ранее [4]. Регистрацию спектров поглощения проводили на приборе Specord UV-Vis (ГДР).

Результаты и обсуждение

Уровень азотфиксирующей активности клубеньков облепихи в наших опытах колебался по фазам развития растения от 0,7 до 6,7 мкмоль C_2H_4 на 1 г сырой массы в 1 ч. Можно отметить, что в опытах Аккеманса [15] ацетиленвосстанавливающая активность в клубеньках облепихи колебалась от 8 до 24 мкмоль/г·ч, а у индивидуальных клубеньков от 0 до 16 мкмоль C_2H_4 . В среднем уровень активности был ниже 10 мкмоль C_2H_4 . Клубеньки облепихи не уступали по своей азотфиксирующей активности клубенькам люпина. В наших опытах 1977 г. азотфиксирующая активность у последних колебалась по фазам развития люпина от 0,007 до 12,14 мкмоль C_2H_4 /г·ч.

Азотфиксирующая активность клубеньков облепихи, инкубированных в газовой смеси I, выше, чем в газовой смеси II, вероятно, вследствие присутствия в последней молекулярного азота, конкурирующего с ацетиленом в качестве субстрата, восстанавливаемого азотфиксирующей системой.

Из данных табл. 2 видно, что азотфиксирующая активность клубеньков облепихи меняется в течение вегетационного периода. В начале вегетации фиксация азота в клубеньках облепихи отсутствовала, а в фазы цветения и начала образования плодов наблюдался ее максимум. Максимум азотфиксации в клубеньках желтого люпина приходился на фазу бутонизация — начало цветения.

Во Владимирской области азотфиксирующая способность клубеньков облепихи была неодинаковой у растений разного пола и возраста (табл. 3), находящихся на одной и той же фазе развития.

Т а б л и ц а 2

Азотфиксирующая активность клубеньков облепихи и люпина (мкмоль C_2H_4 на 1 г сырой массы в 1 ч) в зависимости от фазы вегетации

фаза вегетации	Облепиха		Люпин	
	в газовой смеси I	в газовой смеси II	фаза вегетации	в газовой смеси I
Распускание почек	0	0	8 листьев	0,007±0,006
Цветение	0,23±1,42	2,47±0,67	Бутонизация — начало цветения	12,14±14,45
Начало образования плодов	6,77±5,48	3,58±4,07	Полное цветение	1,18±1,04
Рост плодов	—	1,78±1,81	Конец цветения	3,08±2,65

Примечание. Состав газовой смеси I: аргон — 70%, кислород — 20, ацетилен — 10 CO_2 — 0,03%; газовой смеси II: воздух — 90, ацетилен — 10%.

годы жизни растения клубеньковые образования обычно присутствовали почти на всех боковых корнях.

В 1977 г. сотрудники кафедры виноградарства и виноделия Тимирязевской академии совместно с лабораторией биохимии микрорезентов ИФР АН СССР начали совместное исследование азотфиксирующей способности у корневых клубеньков облепихи и для сравнения у люпина в условиях Московской и Владимирской областей. Сравнительные исследования азотфиксирующей активности у различных симбиотических систем, созданных природой, могут помочь в решении вопроса о создании искусственных эффективных азотфиксирующих систем.

Материалы и методы

Анализируемые растения были выращены на Опытной станции лесоводства ТСХА (15—16-летние), на участке поселка Мичуринец Московской области (4—5-летние) и на опорном облепиховом участке во Владимирской области (3—7-летние).

Почвы опытных участков Московской области дерново-подзолистые, несколько обогащенные гумусом, а во Владимирской области — песчаные, в поверхностный слой которых периодически вносили органические и минеральные удобрения.

На дерново-подзолистых почвах Московской области корневые клубеньки собирали у облепихи в фазы набухания почек (конец апреля), распускания почек (конец мая), цветения (начало июня) и образования плодов (середина июня), а на песчаных почвах — в фазу роста плодов.

Для сбора корневых клубеньков вскрывали почвенный горизонт до глубины залегания боковых корней и отделяли клубеньковые образования, расположенные в узлах ответвляющихся боковых корней. Клубеньки имели коралловидную форму, размер — от 5 до 30 мм в диаметре. Их отмывали от следов почвы, а в дальнейшем обрабатывали различными способами в зависимости от задач исследования.

Анатомо-цитологические исследования клубеньков облепихи проводили на постоянных препаратах. Для этого свежесобранные клубеньки фиксировали смесью ФСУ-1. Парафинированные образцы резали на салазочном микротоме английской фирмы MSE. Толщина срезов 7 мкм. Срезы окрашивали двумя проционовыми красителями, идентифицирующими белковые и углеводные компоненты клетки [5]. Порционовые красители химически связываются со свободными NH_2 -группами белка (рН 5,6) и ОН-группами углеводов (рН 9,0). В каждом варианте по 10 повторностей. Препараты исследовали и фотографировали под микроскопом марки NU-21 фирмы Карл Цейс.

Известно, что нитрогеназа может восстанавливать не только молекулярный азот, но и другие соединения с тройной связью, например, ацетилен $\text{HC}\equiv\text{CH}$. При этом количество восстановленного ацетилена прямо пропорционально количеству восстановленного атмосферного азота [21]. О степени активности азотфиксирующей системы клубеньков облепихи судили по количеству восстановленного из ацетилена этилена.

Клубеньки инкубировали в пенициллиновых пузырьках с вакуумными затворами в атмосфере воздуха с добавлением 10% ацетилена. В пузырек брали по 0,1—0,2 г клубеньков (повторность 10-кратная). Количественное определение образовавшегося этилена проводили в ИФР АН СССР на газовом хроматографе «Хром-4» (ЧССР), как описано нами ранее [14]. Азотфиксирующую активность выражали в микромолях образовавшегося этилена на 1 г сырой массы клубеньков в 1 ч инкубации. Азотфиксацию клубеньков облепихи сравнивали с

Таблица 3

Уровень азотификации
(мкмоль C_2H_4 г·ч) у клубеньков
облепихи разного возраста, пола и сорта

Пол	Сорт	Возраст	Азотификация
Женский	5 ^a	2	3,74±2,32
»	320	3	0,99±1,13
»	320	4	3,74±2,52
ужской	320	5	3,37±1,64
Женский	320	5	1,2±1,56
»	111	6	1,2±0,86
»	111	7	0,07±0,05

беньков бобовых, должна быть в контакте с леггемоглобином или другим белком, переносчиком кислорода с высоким сродством к O_2 [18]. Работы, посвященные этому вопросу, проводились еще в начале 50-х годов. Так, Смит (цит. по [19]) не обнаружил гемоглобина в клетках клубеньков Мугиса, аналогичные отрицательные результаты были получены в работах Эгле и Мундини (1951 г.) с *Alnus*, *Hippurhae* и *Mugica* (цит. по [19]). Но они показали, что содержание общего гематина в клубеньках было в 4—5 раз выше, чем в коре клубеньков. Гематин определяли как пиридингемохромоген. В работе Давенпорта [19] в клубеньках казуарина было обнаружено наличие гемоглобина. Об этом свидетельствовала диффузная полоса абсорбции с максимумом при 562 нм, сходная со спектром дезоксигенированного гемоглобина. До настоящего времени это единственная работа, в которой говорится о наличии гемоглобина в клубеньках небобовых покрытосемянных растений. Данные Давенпорта не были в дальнейшем подтверждены. Эплби [18] не нашел в клубеньках тропического небобового *Trema cannabina* следов гемоглобина и других гемоглобинподобных компонентов. В то же время Эплби удалось выявить наличие в клубеньках *Trema cannabina* гемопротейда, но в гораздо меньших количествах,

Как известно, в азотифицирующих клубеньках бобовых растений всегда присутствует уникальный гемопротейд — леггемоглобин [4], способный к обратимому связыванию кислорода, подобно гемоглобинам и миоглобинам животных. Присутствие леггемоглобина в клубеньках бобовых создает оптимальный кислородный режим для работы азотифицирующей системы. Поэтому можно было предположить, что азотифицирующая ассоциация клубеньков небобовых растений, как и у бактериоидов клу-

чем содержание леггемоглобина в клубеньках бобовых. Этот растворимый гемопротейд не связывает кислород в окисленной форме и имеет молекулярную массу и каталитические активности, характерные для растительных пероксидаз. Известно, что в этих клубеньках очень активна полифенолоксидазная система, в частности тирозиназа. Последняя может быть обратимо окислирована, т. е. возможно, что она является системой, переносящей кислород в клубеньках небобовых покрытосемянных растений.

В наших исследованиях при использовании метода адсорбционной хроматографии на колонках окиси алюминия в клубеньках облепихи не было найдено леггемоглобинподобного белка. Определяя гематин в клубеньках облепихи по пиридингемохромогену, мы не об-

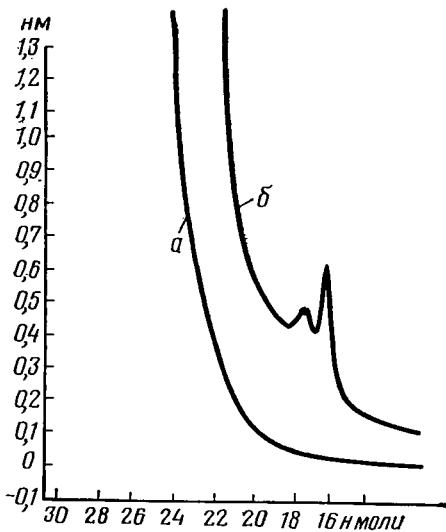
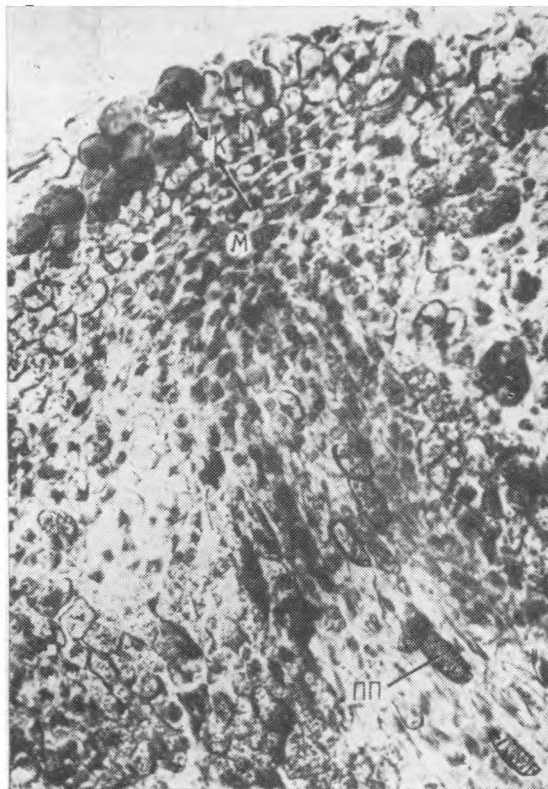


Рис. 2. Спектр поглощения пиридингемохромогена.

а — из клубеньков облепихи; б — из клубеньков люпина желтого.

Рис. 3. Продольный срез одной из секций клубенька облепихи.

К — кора; М — меристема; ПП — проводящий лучок. Увеличение 10×6,3.



наружили спектральных максимумов, характерных для пиридингемохромогена, в то время как при таких же условиях клубеньки люпина давали типичный спектр гемохромогенов (рис. 2), указывающий на присутствие леггемоглобина. Полученные данные подтверждают мысль о различиях в организации симбиотических азотфиксирующих систем бобовых и небобовых растений.

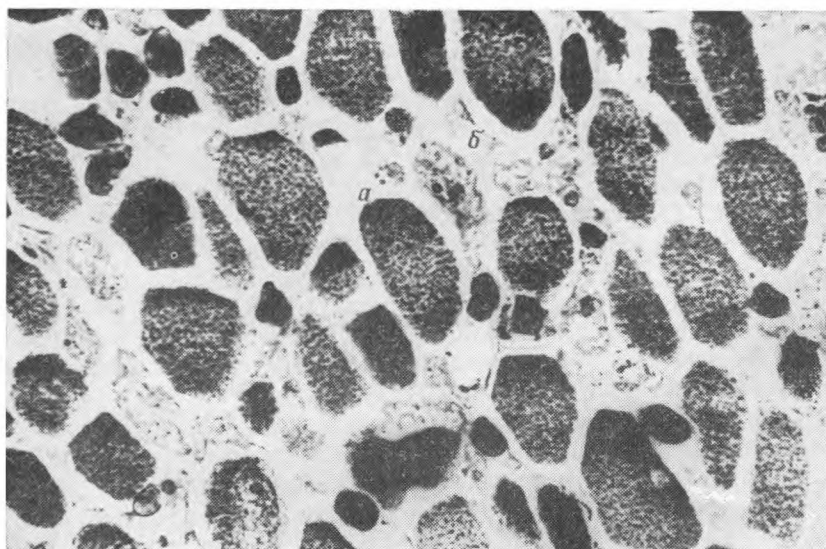


Рис. 4. Ткань клубенька, содержащая эндофиты. Увеличение 2,5×6,3.
а — клетки с эндофитами; б — клетки, содержащие крахмал.

Анатомо-цитологические исследования показали, что клубеньки облепихи, подобно клубенькам, образующимся на корнях бобовых растений, имеют органоподобное строение — собственную зону роста, свою проводящую систему (рис. 3) и ткань, в клетках которой находится эндофит (рис. 4). При этом клетки, содержащие эндофитные организмы, окружены стерильными клетками, в которых содержится крахмал. Клетки, содержащие эндофиты, сильно гипертрофированы. На рис. 5

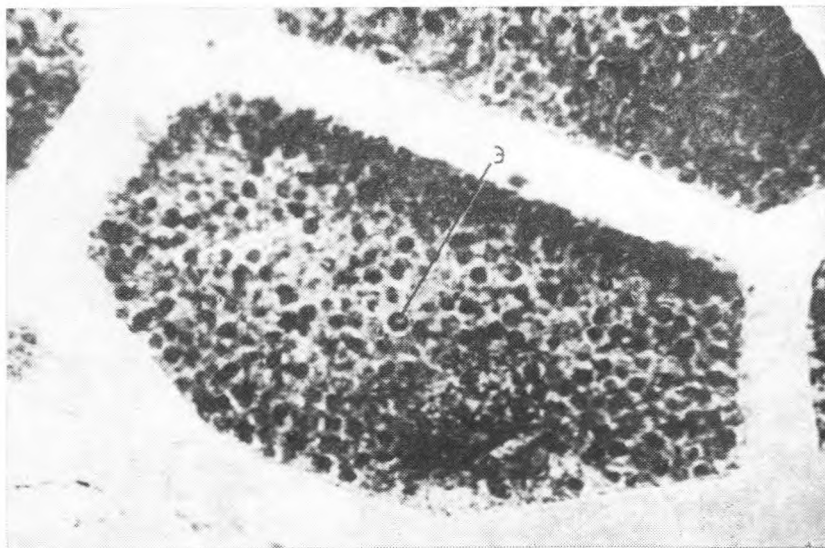


Рис. 5. Клетка клубенька облепихи с эндофитами (Э). Увеличение $100\times 6,3$.

изображена клетка клубенька облепихи, содержащая эндофиты. По своей морфологии и размерам эндофиты, населяющие клетки клубенька облепихи, отличаются от бактерий рода *Rhizobium*, населяющих клубеньки бобовых растений.

Заключение

Показано, что в условиях Московской и Владимирской областей клубеньки облепихи не уступают по своей азотофиксирующей способности (активности) клубенькам люпина (при определении азотофиксациии ацетиленовым методом). Азотофиксирующая способность клубеньков облепихи зависит от фаз вегетации растения, сорта, пола и возраста.

В отличие от клубеньков бобовых в клубеньках облепихи не найдено гемоглобина и гемоглобиноподобных соединений. По-видимому, механизм симбиотических взаимоотношений эндофита в клубеньках облепихи отличается от механизма симбиотических взаимоотношений клубеньковых бактерий и бобового растения.

Исходя из результатов анатомо-цитологических исследований клубеньков облепихи можно предположить, что эндофит этих клубеньков не является бактерией, принадлежащей к роду *Rhizobium*.

Анатомическое строение клубеньков облепихи напоминает анатомическое строение клубеньков, образующихся на корнях бобовых растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бродский В. Я. О способах фиксации и подготовки материала для количественного цитохимического анализа. «Цитология», 1960, № 2, с. 605—613. — 2. Вигоров Л. И. Сад лесных культур. Свердлов. Среднеурал. кн. изд-во, 1976. — 3. Гатин Ж. И. Облепиха, М., Сельхозиздат, 1963. — 4. Жизневская Г. Я. Медь, молибден и железо в азотном обмене бобовых растений. М., «Наука», 1972. — 5. Иванов В. Б., Литинская Т. К. Одновременная окраска белков и углеводов проционовыми красителями. «Цитология», 1967, № 9, с. 1163—1165. — 6. Козлова Е. И., Бадумян Л. С., Вендило М. В. Свойства бактерий из клубеньков облепихи. «Микробиология», 1966, т. XXXV, вып. 4, с. 699—705. — 7. Кравцов Б. И. Свойства клубеньков лоха и облепихи. «Лес и степь», 1950, № 9, с. 89—90. — 8. Мишустин Е. Н. Биологический азот и его значение в сельском хозяйстве. В сб.: Механизм биологической фиксации азота. 1973, с. 5—12. — 9. Мишустин Е. Н., Шильникова В. К. Биологическая фиксация атмосферного азота. М., «Наука», 1968. — 10. Пейве Я. В. О биологической фиксации азота. «Почвоведение», 1976, № 4, с. 3—10. 11. Симонов И. Н. Тр. ин-та им. И. В. Мичурина. т. XVIII, 1965, с. 56—59. — 12. Трофимов Т. Т. Облепиха в культуре. М., Изд-во МГУ, 1967, с. 68—70. — 13. Федоров Е. А. О роли гемоглобина в клубеньках корней бобовых растений. Автореф. канд. дис. ТСХА, 1955. — 14. Хайлова Г. Ф., Мамедов К. Ю., Шильникова В. К., Ильясова В. Б. Симбиотическая ассоциация каллусов корней люцерны с *Rhizobium meliloti*. «Изв. ТСХА», 1977, вып. 4, с. 18—22. — 15. Akkermans A. D. L. Nitrogen fixation and nodulation of *Alnus* and *Hippophae* under natural conditions. Leiden, 1971. — 16. Beeching Y. H. "Plant a. soil", 1970, vol. 32, p. 611—654. — 17. Bond G. Jn: The biology of nitrogen fixation. North-Holland, Publ. Co. Amsterdam — Oxford, 1974, p. 342—381. — 18. Coventry D. R., Trink M. J., Appleby C. A. "Bioch. et Biophys. Acta", 1976, vol. 420, p. 105—111. — 19. Davenport H. E. "Nature", 1960, vol. 186, p. 653—654. — 20. Catner E. M. S., Gardner J. C. "Arch. Microbiol.", 1970, vol. 70, p. 183—196. — 21. Hardy R. W., Holsten R. D., Jackson E. K. "Plant Physiol.", 1968, vol. 8, p. 1185—1207. — 22. Hartree E. F. In: Morden Methoden der Pflanzenanalyse. Berlin — Göttingen — Hidelberg, D. Stringer — Verlag, 1955, p. 239 — 23. Quspel A. The biology of nitrogen fixation. Amsterdam — Oxford, 1974, 499—511. — 24. Roberg M. "Jahrb. wiss. Botan.", 1934, 79, p. 472—492. — 25. Silver W. S. In: The chemistry and biochemistry of nitrogen fixation. Plenum. Press. 1971, p. 246—276. — 26. Steward W. D. P., Pearson M. C. "Plant a. Soil", 1967, vol. 26, p. 348—360.

Статья поступила 7 октября 1977 г.

SUMMARY

In Moscow and Vladimir regions sea-buckthorn nodules are not inferior to lupine nodules in their nitrogen-fixing ability (activity). Nitrogen fixation by sea-buckthorn is dependent on vegetative phases and the age of the plant. No hemoglobin or hemoglobin-like compounds have been found in the nodules of sea-buckthorn. The mechanism of symbiotic relations of endophyte in sea-buckthorn nodules seem to be unlike that in legumes.

On the base of anatomical and cytological study of sea-buckthorn nodules one may suppose that the endophyte of these nodules is not a bacterium belonging to *Rhizobium* genus.

What is common for sea-buckthorn nodules and nodules of legumes is the structure of functional tissue.