

УДК 582.866:631.461.5

## УЛЬТРАСТРУКТУРА ЭНДОФИТА В КЛЕТКАХ КЛУБЕНЬКОВ ОБЛЕПИХИ И ИХ АЗОТФИКСИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ

И. Н. АНДРЕЕВА, И. Н. СИМОНОВ, А. А. ТИБИЛОВ, В. Б. ИЛЬЯСОВА,  
Е. Э. ФЕДОРОВА, Г. Ф. ХАЙЛОВА

(Кафедра виноградарства и виноделия ТСХА и Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева АН СССР)

Облепиха (*Hippophae rhamnoides* L.) относится к группе полкустарниковых и древесных растений, обладающих способностью вступать в симбиотические взаимоотношения с микроорганизмами, фиксирующими молекулярный азот [7]. По азотфиксирующей способности клубеньки, образующиеся на корнях облепихи, не уступают клубенькам бобовых растений [2, 4], что дает возможность облепихе расти на бедных почвах и обогащать их биологически связанным азотом.

Клубеньки облепихи по своему внешнему виду и тканевой структуре сходны с клубеньками бобовых растений [1, 2, 10]. Однако в последних эндофитом-симбиотом являются бактерии рода *Rhizobium*, а в клубеньках облепихи, как и большинства небобовых растений, он относится к актиномицетам [1, 5, 14, 16]. Из-за отсутствия методов выращивания эндофитов небобовых растений в культуре на питательных средах затрудняется их идентификация. Исследование ультраструктуры и жизненного цикла эндофита в клетках клубенька дает возможность подойти к выяснению его природы и функциональных особенностей.

Ультраструктура эндофитов в клетках клубеньков изучена у ряда небобовых растений: ольхи *Alnus glutinosa* L. [6, 13], облепихи [8, 10], мирта болотного *Myrica gale* L. [9], *Ceanothus velutinus* Dougl. [9], *Ceanothus integerrimus* H. [17], *Comptonia peregrina* (L.) Coult [15], *Casuarina cunninghamiana* Miq. [9, 18]. У всех этих растений она имеет наряду с некоторыми видовыми особенностями много общего. Эндофит проникает в коровые клетки клубенька в виде гиф, на концах которых в дальнейшем образуются шарообразные разрастания — везикулы. Эти две формы — везикулы и гифы — являются, по данным Аккерманса [4], азотфиксирующими структурами эндофита-симбионта, хотя в настоящее время вопрос о локализации аппарата азотфиксации у эндофитов небобовых растений еще не решен окончательно.

Ультраструктура эндофита и инфицированных клеток клубенька не остается неизменной в течение вегетации растений и несколько изменяется от верхушки до основания клубенька.

Нами сделана попытка сопоставить азотфиксирующую активность и ультраструктуру эндофита и инфицированных клеток клубеньков в процессе их развития (от начального состояния до многолопастных клубеньков) при выращивании проростков облепихи, а также в разные периоды вегетации растений.

### Материалы и методы

Сеянцы облепихи выращивали в песчаной культуре в вегетационных сосудах на среде Кнопа в факторостатной оранжерее при температуре 20°. Инокуляцию семян проводили растертыми клубеньками, взятыми с 2-летних растений.

После образования клубеньков (29—30-е сутки со дня посева) определяли азотфиксирующую активность клубеньков и исследовали ультратонкое строение их клеток. Пробы брали через каждые 7 дней. Кроме того, изучалась ультраструктура клеток клубеньков на 2-летних растениях, привезенных из Бийска и высаженных на полевом участке Института физиологии растений. В этом случае пробы были взяты после перезимовки растений (25 апреля), летом (в июле) и осенью (в октябре — ноябре) в период вхождения их в покой с одного и того же клубенька, что давало возможность проследить этапы его отрастания летом и перестройку ультраструктуры клеток и содержащегося в них эндофита перед перезимовкой.

Азотфиксирующую активность клубеньков облепихи определяли газохроматографическим методом, основанным на определении количества восстановленного из ацетиленэтилена, так как количество восстановленного азота пропорционально количеству восстановленного атмосферного азота [11]. Количественное определение этилена проводили на газовом хроматографе «Хром 4» (ЧССР), как описано нами ранее [3]. Азотфиксирующую активность выражали в микромолях образовавшегося этилена на 1 г сырой массы клубеньков за 1 ч инкубации.

Для электронно-микроскопического исследования кусочки ткани, взятой из различных

**Азотфиксирующая активность клубеньков проростков облепих**  
(мкмоль  $C_2H_4$  на 1 г сырой массы за 1 ч)

Сутки после посева	Азотфиксация	Сутки после посева	Азотфиксация
34	$0,44 \pm 0,10$	85	$32,33 \pm 7,69$
41	$1,60 \pm 0,81$	92	$27,24 \pm 6,05$
48	$17,18 \pm 0,54$	120	$30,52 \pm 4,86$
64	$14,21 \pm 4,69$	134	$31,22 \pm 4,85$
78	$21,52 \pm 2,75$		

участков клубенька, фиксировали в смеси 2,5% глутарового альдегида и 2% деполимеризованного параформальдегида в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4), дофиксацию проводили 1%  $OsO_4$  в том же буфере [12]. Материал дегидратировали в спирте и ацетоне и заливали в Эпон 812. Срезы делали на ультрамикротоме ЛКВ-7800, их подкрашивали водным раствором уранилацетата и лимоннокислым свинцом и просматривали в электронном микроскопе JEM-100В.

же тканей, что и корень, — меристемы, коры, центрального цилиндра. Эндофит находится только в клетках коровой паренхимы, никогда не инфицируя клетки меристемы и центрального цилиндра. Гифы эндифита проникают во вновь образованные коровые клетки клубенька через клеточную стенку, воздействуя на ее химическими веществами [13, 15].

На рис. 1 виден поперечный срез гифы (а), находящейся в межклетнике в исследован-

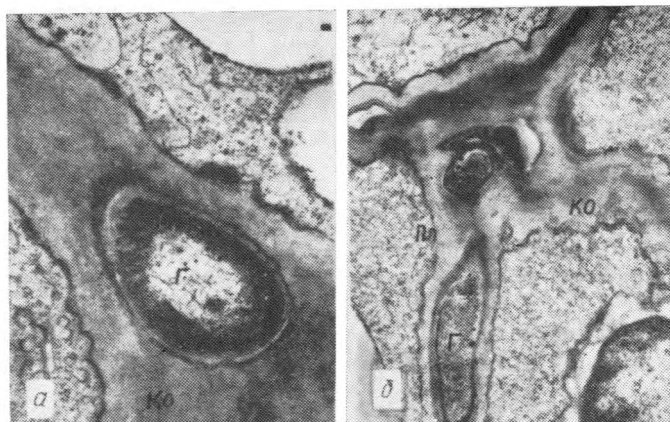


Рис. 1. Проникновение гифы эндифита через клеточную оболочку коровой клетки клубенька.

а — поперечный срез гифы, находящейся в межклетнике, ув. 17 000;  
б — продольный срез, ув. 12 000; КО — клеточная оболочка; Г — гифа;  
Пл — плазмалемма.

## Результаты и обсуждение

Всходы облепихи появились на 7—8-е сутки, а клубеньки на корнях проростков начали образовываться на 29—32-е сутки после посева. Первое определение азотфиксирующей активности клубеньков было проведено на 34-е сутки после посева, при этом зачаточные, одно- и двухлопастные клубеньки брались вместе. Фиксация азота была невысокой — 0,44 мкмоль этилена на 1 г сырой массы клубеньков за 1 ч инкубации (таблица).

На 38-е сутки изучалась ультраструктура одно- и двухлопастных клубеньков, а также зачаточных клубеньков, которые имели вид выпуклости на корнях не более 1 мм в диаметре. У всех клубеньков независимо от размеров анатомическое строение сходно со строением корня, т. е. они состоят из тех

ном зачаточном клубеньке; в дальнейшем гифа растет во внутрь клетки, она окружена мембраной, являющейся инвагинирующей плазмалеммой клетки хозяйина (б). Между этой мембраной и клеточной стенкой гифы расположен электронноплотный материал, близкий по строению к клеточной стенке и являющийся продолжением клеточной стенки растения.

На рис. 2, а, б показан участок инфицированной клетки зачаточного клубенька с проникшими в нее гифами эндифита. Гифа имеет собственную плазменную мембрану и клеточную стенку, снаружи она окружена материалом капсулы и мембраной капсулы растительного происхождения. Цитоплазма гифы богата рибосомами и ядерным материалом, но ядерная мембрана отсутствует, что подтверждает прокариотическую природу эндифита. Гифа разделена поперечными

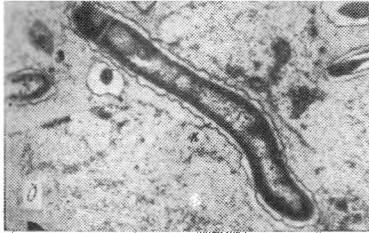


Рис. 2. Участок инфицированной клетки однолопастного клубенька с гифами эндофита (а), ув. 15 000; гифа в коровой клетке клубенька (б), ув. 10 000.

К — капсула эндофита; МК — мембрана капсулы; М — митохондрия; Лп — лейкопласт; остальные обозначения те же, что на рис. 1.

перегородками — септами на компартменты, каждый из которых имеет свой нуклеоид. Гифы в растительной клетке ветвятся, образуя сложную сеть. Коровые растительные клетки в это время богаты рибосомами, цистернами гранулярного эндоплазматического

ретикулума, диктиосомами, митохондриями. Лейкопласты содержат большое количество крахмала (рис. 2, а). В коровых клетках, оставшихся неинфицированными, тоже имеются крупные лейкопласты, заполненные крахмалом.

Исследованные нами зачаточный и однолопастной клубеньки содержали эндофит в основном в форме гифы. В более старых клетках однолопастного клубенька и у двухлопастного клубенька наблюдали образование везикул, которые возникают путем набухания и разрастания концевой части гифы (рис. 3, а). У очень молодых везикул цитоплазма является продолжением цитоплазмы гифы, она содержит большое количество рибосом и нуклеоид низкой электронной плотности. Новообразованная везикула окружена общей с гифой капсулой и мембраной капсулы с волнистым контуром, что способствует большому контакту между эндофитом и цитоплазмой растительной клетки. В дальнейшем внутри везикулы образуются перегородки — септы, деля ее на компартменты. Перегородки могут быть завершенными (рис. 3, б), т. е. идти от одной стенки везикулы до противоположной, но могут быть и незавершенными. Плазменная мембрана эндофита выстилает компартменты везикулы, тем самым увеличивается протяженность мембранной системы последней. В каждом компартменте свой нуклеоид, рибосомы, гранулы запасных веществ, а также тела белковой природы, имеющие вид кристаллической решетки (рис. 3, б). Внутри компартментов гиф и везикул есть мембранные образования, являющиеся производными плазменной мембраны — плазмалеммасы.

В инфицированных клетках молодых клубеньков содержится очень небольшое коли-

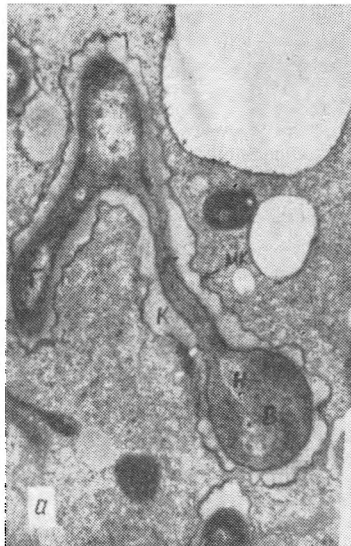


Рис. 3. Образование везикулы на концевой части гифы (а), ув. 12 000; септированная везикула в инфицированной коровой клетке клубенька (б), ув. 20 000.

В — везикула; С — септа; Н — нуклеоид; КС — клеточная стенка эндофита; остальные обозначения те же, что на рис. 1.

число везикул и преобладающей формой эндодита являются гифы. У этих клубеньков азотфиксирующая активность еще невысока. В последующие 7 суток азотфиксация клубеньков возрастала в 4 раза (таблица). В это время в инфицированных клетках клубеньков происходит массовое образование везикул, которые у облепихи, в отличие от ольхи, располагаются равномерно по всему

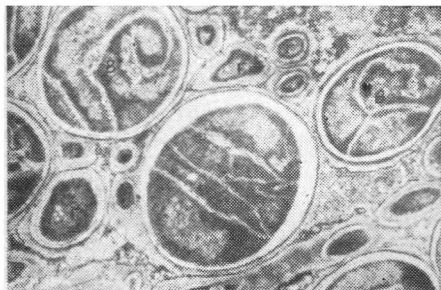
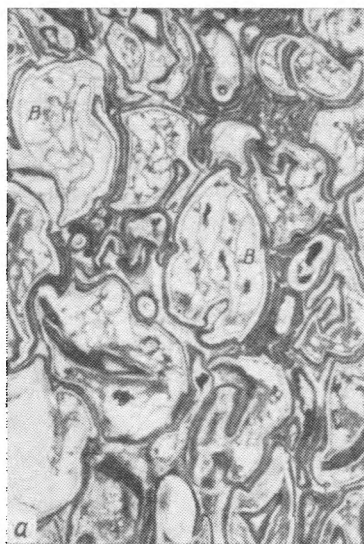


Рис. 4. Часть инфицированной клетки клубенька с везикулами разной степени зрелости и гифами, ув. 13 500.

объему клетки. Вновь образованные везикулы проходят следующие стадии созревания: увеличение объема, образование септ, уплотнение цитоплазмы компарментов. Диаметр зрелой везикулы 3—4 мкм. На некотором отдалении от меристемы в клетках срединной части клубенька можно наблюдать все стадии образования и созревания везикул. На рис. 4 представлен участок клетки с гифами и везикулами, имеющими по несколько компарментов, но с еще неплотной цитоплазмой.



К 48-м суткам после прорастания семян происходит новый подъем азотфиксирующей активности — до 17,2 мкмоль этилена за 1 ч, а в последующем — до 21—32 мкмоль (таблица). Это максимальная активность фиксации азота, наблюдаемая нами у клубеньков проростков облепихи. Данный период характеризуется увеличением числа лопасти клубенька до 8—10 и ростом объе-

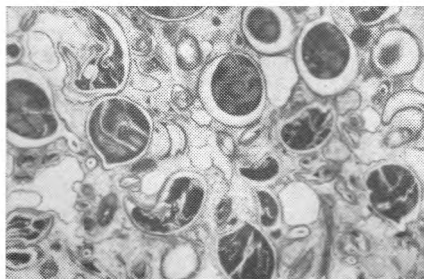


Рис. 5. Стареющие, деформированные везикулы в инфицированной клетке нижней части клубенька, ув. 6000.

ма каждой лопасти. Инфицированные клетки полностью заполнены гифами и везикулами с уплотненной цитоплазмой, имеющей в каждом компарменте нуклеоид, плазмалеммасы, плотные гранулы. В цитоплазме растительной клетки находится много рибосом, крупных митохондрий с очень большим числом крист, лейкопластов, не содержащих крахмала, что свидетельствует об активном процессе азотфиксации. Диктиосомы и цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума встречаются редко. В неинфици-



Рис. 6. Инфицированные клетки клубенька двухлетнего саженца после перезимовки.

*a* — участок с деформированными погибшими везикулами и гифами, ув. 5000; *б* — сохранившиеся неповрежденными гифы в коровой клетке клубенька, ув. 10 000.

рованных клетках лейкопласты в преобладающем числе случаев содержат крахмал, в вакуолях накапливается электронплотное вещество полифенольной природы [15].

Необходимо отметить, что в таких активно фиксирующих азот клубеньках в базальной их части имеются инфицированные клетки со стареющими деформированными везикулами. На рис. 5 показан участок инфицированной клетки со стареющими везикулами. Старение их начинается с резкого уплотнения цитоплазмы компарментов. Затем везикулы деформируются, приобретая неправильную форму, напоминающую вдавленный мяч. В дальнейшем происходит распад и исчезновение содержимого компарментов. В цитоплазме растительной клетки снижается число органелл, т. е. одновременно со старением и разрушением эндодита разрушается цитоплазма клетки-хозяина.

Азотфиксирующая активность клубеньков продолжала оставаться высокой до 4,5-месячного возраста растений; в дальнейшем наблюдения не проводились.

У растений облепихи 4—5-летнего возраста [2] во время распускания почек (конец мая) фиксация азота в клубеньках отсутствовала, а максимум ее приходился на фазы цветения и начала образования плодов. Электронно-микроскопические наблюдения показали, что ранней весной до распускания почек в коровых клетках клубенька везикулы и гифы находятся в состоянии деградации (рис. 6, а). Везикулы крайне деформированы, цитоплазма компарментов отсутствует, сохраняются только клеточная стенка и содержимое капсулы эндодита. Везикулы лежат в клетке, плотно прижатые одна к другой, органеллы в растительной клетке отсутствуют. Однако в отдельных коровых клетках в цитоплазме наблюдаются в небольшом количестве неизменные гифы (рис. 6, б) с ультраструктурой, описанной нами выше для клеток клубенька проростка; везикулы в этих клетках отсутствуют. Следовательно, в перезимовавшем клубеньке сохраняется жизнеспособный эндодит в виде гиф, которые затем прорастают в новые клетки отрастающего клубенька.

Летом на старых отмерших клубеньках

отрастают новые лопасти. Ультраструктура инфицированных клеток в июле полностью соответствует той, которую мы наблюдали в клетках активно фиксирующего азот клубенька проростка (рис. 4). Осенью (в октябре — ноябре) снова происходит деградация эндодита в преобладающем числе клеток стареющего клубенька, но в отдельных клетках гифы сохраняются. В таком виде клубеньки уходят под зиму.

Таким образом, гифальная форма эндодита является первичной, инфицирующей новые клетки. В этом же виде эндодит перезимовывает в клетках старого клубенька. В коровых клетках клубеньков мы никогда не наблюдали бактериоподобных тел — гранул, которые, по мнению ряда авторов, являются репродуктивной формой эндодита [9, 19].

## Заключение

Прослежена ультраструктура и азотфиксирующая активность клубеньков проростков облепихи с момента образования клубеньков до 4,5-месячного возраста растений. Азотфиксирующая активность была минимальной у молодых одно- и двухлопастных клубеньков, она достигала максимума к 3-месячному возрасту проростков. Эта величина (32 мкмоль  $C_2H_4$  на 1 г сырой массы за 1 ч) не меньше величины азотфиксирующей способности клубеньков сои.

Ультраструктура эндодита-актиномицета усложняется по мере развития в коровых клетках клубенька от единичных гиф до сложной системы гиф и везикул. Наивысшей азотфиксацией обладают клубеньки, имеющие инфицированные клетки, заполненные гифами и созревшими везикулами. Одновременно в клетках базальной части клубенька происходит деструкция эндодита.

При перезимовке клетки клубенька и эндодита деградируют и отмирают. В небольшом числе живых клеток сохраняются гифы эндодита, которые инфицируют вновь образованные клетки при отращивании клубенька весной. Бактериоподобная форма эндодита (гранулы) в клетках клубеньков проростков и саженцев не обнаружена.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Майстренко Г. Г. Симбиоз у небовых древесных растений на примере облепихи. В сб.: Структурные и функциональные связи высших растений и микроорганизмов. М., «Наука», 1977, с. 17—55.
2. Симонов И. Н. и др. Азотфиксирующая способность корневых клубеньков облепихи. «Изв. ТСХА», 1978, вып. 1, с. 142—148.
3. Хайлова Г. Ф. и др. Симбиотическая ассоциация каллусов корней люцерны с *Rhizobium meliloti*. «Изв. ТСХА», 1977, вып. 4, с. 18—22.
4. Akkermans A. D. L. Nitrogen fixation and nodulation of *Alnus* and *Hippophae* under natural conditions. Leiden, 1971.—5. Becking J. H. "Int. J. Syst. Bacteriol.", 1970, vol. 20, p. 201—220.—6. Becking J. H., De Boer W. E., Houwink A. L., Antonie van Leeuwenhoek. "J. Microbiol. Serol.", 1964, vol. 30, p. 343—376.—7. Bond G. In: Symbiotic nitrogen fixation in plants. Cambridge Univ. Press, Cambridge, U. K., 1976, p. 443—474.—8. Gardner I. C., Gartner E. M. S. "Arch. Microbiol.", 1973, vol. 89, p. 233—240.—9. Gardner I. C. In: Symbiotic nitrogen fixation in plants. Cambridge Univ. Press, Cambridge, U. K., 1976, p. 486—495.—10. Gartner E. M. S., Gardner I. C. "Arch. Microbiol.", 1970, vol. 70, p. 183—196.—11. Hardy R. W., Holsten R. D., Jackson E. K. "Plant physiol.", 1968, vol. 8, p. 1185—1207.—12. Karnovsky M. J. "J. Cell Biol.", 1968, vol. 27, p. 137 A.—13. Lalonde M., Knowles R. "Canad. J. Microbiol.", 1975, vol. 21, p. 1058—1080.—14. Lalonde M., Knowles R. "Canad. J. Microbiol.", 1975, vol. 21,

p. 1901—1920. — 15. Newcomb W., Peterson R. L., Callaham D., Terrey J. G. "Canad. J. Bot.", 1978, vol. 56, p. 502—531. — 16. Quispel A. In. The biology of nitrogen fixation. Amsterdam—Oxford, 1974, p. 499—520. — 17. Strand R., Laetsch

W. M. "Protoplasma", 1977, vol. 93, p. 165—190. — 18. Torrey J. G. "Amer. J. Bot.", 1976, vol. 63, p. 335—344. — 19. Van Dijk, Mercus E. "New Phytol.", 1976, vol. 77, p. 73—91.