

УДК 582.866:631.461.5

## СТРУКТУРА КЛУБЕНЬКОВ ОБЛЕПИХИ И ИХ АЗОТФИКСИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ

Г. Ф. ХАЙЛОВА, А. А. ТИБИЛОВ, И. Н. СИМОНОВ  
(Кафедра виноградарства и виноделия ТСХА,  
Институт физиологии растений АН СССР)

Среди плодово-ягодных культур, перспективных для широкого внедрения в сельскохозяйственное производство Нечерноземной зоны РСФСР, важное место занимает облепиха. Внимание ученых и практиков к этой культуре обусловлено тем, что ягоды ее содержат много ценных биологически активных веществ (масла, витамины), а также тем, что она, как активный азотфиксатор, способна произрастать на бедных азотом почвах.

Симбиотическую азотфиксирующую систему небобовых (облепихи, лоха, ольхи) начали изучать сравнительно недавно. Поэтому особенности функционирования данной системы окончательно не выяснены.

Задачей настоящей работы было исследование гисто- и цитологических особенностей клубеньков облепихи в связи с их азотфиксирующей активностью.

#### Материалы и методы

Опыты проведены на 53 — 133-дневных сеянцах облепихи. Семена урожая 1977 г. стратифицировали в регулируемой термокамере при +2° в течение 90 дней. Сеянцы выращивали в песчаной и почвенной культурах на питательной смеси Кюпа в факторастатной оранжерее при 20°. Клубеньки на корнях сеянцев облепихи появлялись на 29—32-е сутки после высева семян. Азотфиксирующую активность определяли ацетиленовым методом [9] начиная с 3-недельного возраста через каждые 7 дней. Клубеньки из опытных сосудов доставляли в лабораторию в течение 15—20 мин и промывали водой. Образцы из средних проб массой 0,1—0,2 г помещали в 100 мл флаконы, снабженные вакуумными затворами. Из флаконов откачивали воздух форвакуумным насосом и заполняли их газовой смесью, состоящей из аргона (69,9 %), кислорода (20 %), ацетилена (10 %) и углекислого газа (0,03 %). В этой газовой среде клубеньки инкубировали в течение 1 ч, а затем определяли количество образовавшегося этилена на газовом хроматографе «Хром-4». Контролем служили образцы клубеньков облепихи, инкубированные в течение 1 ч в газовой смеси, не содержащей ацетилена. Азотфиксирующую активность выражали в микромолях образовавшегося этилена на 1 г сырой массы клубеньков за 1 ч. Повторность 10-кратная.

Одновременно с определением азотфиксирующей активности клубеньков изучали состояние их паренхиматозной ткани, в клетках которой находится актиномицет.

Анатомо-цитологические исследования проводили на постоянных препаратах продольных срезов клубеньков, для чего последние фиксировали смесью ФСУ (формалин, спирт, ледяная уксусная кислота в соотношении 10 : 3 : 1). Срезы толщиной 5—7 мкм, обработанные по стандартной методике, окрашивали проционовыми красителями [2]. Проционовый краситель при pH 5,6 и температуре 60° реагирует со свободной аминогруппой белков препарата, а при pH 9,0 и комнатной температуре — с ОН-группами углеводов. В наших опытах белковые компоненты препаратов окрашивали проционовым синим, а углеводы — проционовым красным. При стандартной методике приготовления постоянных препаратов, которой мы пользовались, из них вымываются все легкорастворимые углеводы. В клетках остается только нерастворимый углевод крахмал. Опыты повторены трижды.

#### Результаты и их обсуждение

Во всех опытах клубеньки появлялись на корнях сеянцев на 28—32-е сут после высева семян. В первые дни после появления клубеньки на корнях облепихи представляют собой выросты цилиндрической формы. Вскоре на клубеньках возникают все новые и новые выросты (лопасти) и они превращаются в многолопастные образования (рис. 1).

В начальный период рост клубенька обусловлен функционированием одной точки роста, расположенной в апикальной его части. Затем в клубеньке закладываются новые точки роста, деятельность которых обуславливает рост клубенька во многих направлениях, и в результате образуются многолопастные клубеньки. Из рис. 2, где представлена

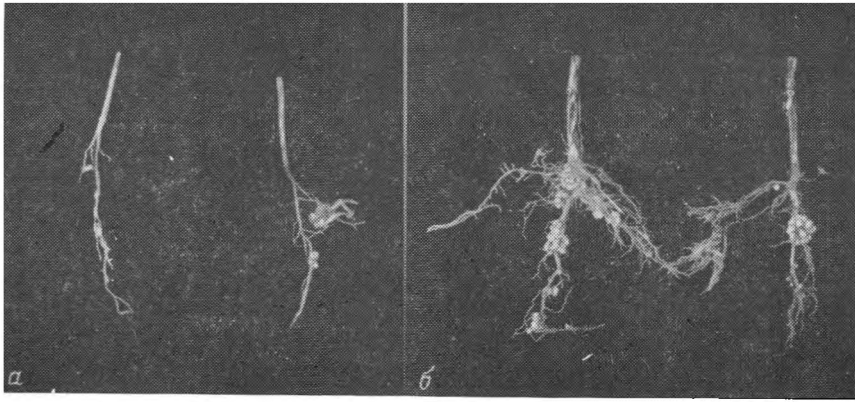


Рис. 1. Клубеньки сеянцев облепихи.  
а — 2-дневные; б — 43-дневные.

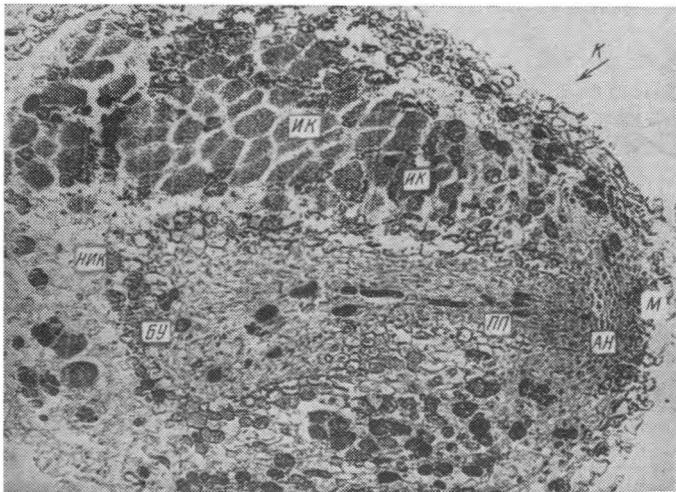


Рис. 2. Продольный срез 20-дневного клубенька облепихи.  
М — меристема; ПП — проводящий пучок; К — кора; ИК и НИК — инфицированные и неинфицированные клетки; АЧ — апикальная часть; БЧ — базальная часть.

часть продольного среза молодого клубенька облепихи с несколькими точками роста, видно, что новые меристематические очаги появляются не только в апикальной части клубенька, но и в его латеральных участках.

Азотфиксирующая активность у клубеньков обнаруживается уже на 2-й день после их появления на поверхности корня (32—34-е сут после посева). У 2-дневных клубеньков азотфиксирующая активность очень небольшая — 0,44 мкмоля (таблица). Этот показатель повышается с увеличением размера клубенька и числа его лопастей. Как следует из таблицы, 20-дневные клубеньки восстанавливают ацетилен в 4 раза быстрее, чем 2-дневные.

Интенсивность азотфиксации клубеньков увеличивалась до 56—58-дневного возраста. Повышение скорости восстановления ацетилена единицей массы клубенька в этот период происходит в основном за счет увеличения доли зрелых клеток паренхиматозной ткани, содержащей эндофит. В дальнейшем, до конца эксперимента, соотношение объ-

**Нитрогеназная активность (мкмоль  $C_2H_4$  на 1 г сырой массы за 1 ч)  
и наличие крахмала в срезах клубеньков семян облепихи разного возраста**

| Возраст клубенька, сут | Азотфиксация    | Наличие крахмала | Возраст клубенька, сут | Азотфиксация    | Наличие крахмала |
|------------------------|-----------------|------------------|------------------------|-----------------|------------------|
| 2                      | $0,44 \pm 0,10$ | +                | 63—65                  | $32,4 \pm 8,7$  | +++              |
| 20                     | $1,6 \pm 0,8$   | ++               | 70—72                  | $42,0 \pm 5,9$  | ++               |
| 41—43                  | $14,2 \pm 4,7$  | +-               | 79                     | $33,7 \pm 17,9$ | +-               |
| 58—50                  | $21,5 \pm 2,7$  | ++               | 86                     | $29,2 \pm 4,0$  | —                |
| 56—58                  | $39,1 \pm 21,4$ | —                | 93                     | $30,5 \pm 4,9$  | —                |
|                        |                 |                  | 100                    | $33,6 \pm 5,0$  | —                |

Обозначения: — крахмал отсутствует; + наличие крахмала; ++ много; +++ очень много крахмала.

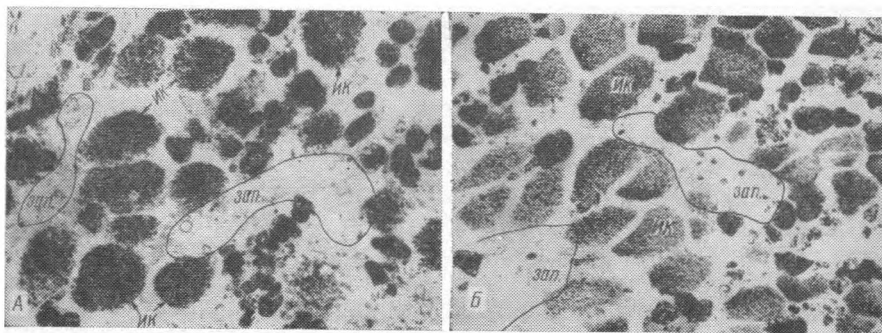
емов различных тканей клубенька (меристемы, проводящих тканей, молодой и зрелой инфицированной эндофитом паренхимы) остается постоянным. Поэтому скорость восстановления ацетилена начиная с этого периода изменяется мало.

Зрелые инфицированные клетки паренхимы клубенька заполнены эндофитами в форме гиф и везикул [1]. Как правило, появление в инфицированных клетках везикул совпадает с возникновением нитрогеназной активности в клубеньке. В инфицированных клетках активно фиксирующих клубеньков часто наблюдается интенсивное образование везикул. В последних отсутствуют вакуоли, как и в клубеньках бобовых растений.

В клубеньках облепихи обнаружен крахмал, что характерно и для клубеньков бобовых. У последних крахмал часто присутствует в клетках деградирующей бактериоидной ткани при неэффективном симбиозе (когда клубеньки не восстанавливают азот) в клубеньках, образованных в результате инфицирования корней неэффективным штаммом клубеньковых бактерий [10], и в клубеньках, образованных в результате инфицирования корней эффективными штаммами, но на растениях, испытывающих борное [7], медное [8] и кальциевое [5] голодание.

В связи с этим сложилось мнение, что между отложением крахмала в клубеньках и деструкцией клеток бактериоидной ткани существует причинная связь [4, 6]. Однако это бывает не всегда [3, 11]. В активно фиксирующих клубеньках накопленный крахмал может затем утилизироваться и структура бактериоидсодержащей ткани клубенька при этом не разрушается [3, 12].

Отложение крахмала наблюдалось уже у 2-дневных клубеньков облепихи, и он сохранялся в течение 2,5 мес. Крахмал обнаруживал-



**Рис. 3.** Участки продольного среза:

А — 43-дневного клубенька, в клетках которого откладывается крахмал; Б — 93-дневного клубенька, в клетках которого крахмал почти полностью отсутствует.  
Зпт — запасные клетки; ИК — инфицированные клетки паренхиматозной ткани.

ся, как и у большинства видов бобовых растений, в неинфицированных клетках, расположенных между клеток с эндофитом (рис. 3).

Данные по содержанию крахмала в паренхиматозной ткани клубеньков разного возраста представлены в таблице. Интересно отметить, что в одних клубеньках крахмал откладывался, а в других — нет. Причем крахмал накапливался в отдельных случаях в очень больших количествах, например, у некоторых клубеньков 48- и 63-дневного возраста. В 70-дневных клубеньках крахмала было мало, а в течение трех последних недель эксперимента его практически не было (таблица).

Структура инфицированных клеток сохраняла целостность по крайней мере в продолжение 3,5 мес. Деградации клеток, содержащих эндофит, не наблюдалось (рис. 3).

Таким образом, наши наблюдения за структурой клеток паренхиматозной ткани клубеньков сеянцев облепихи показали, что какой-либо связи между отложением крахмала в клетках паренхиматозной ткани и ее деградацией не существует. Наличие крахмала, вероятно, свидетельствует о некотором превышении притока ассимилятов в клубенек над их расходом симбиотической азотфиксирующей системой.

#### Заключение

Изучение структуры инфицированных клеток паренхиматозной ткани клубеньков облепихи показало, что образование многолопастных клубеньков обуславливается функционированием нескольких точек роста.

Усиление азотфиксирующей активности клубеньков в начальный период их роста в значительной степени происходит за счет увеличения в них доли зрелых клеток паренхиматозной ткани, содержащей эндофит. В дальнейшем соотношение объемов различных тканей клубенька (молодой и зрелой инфицированной эндофитом паренхимы, меристемы и т. д.) остается постоянным и поэтому азотфиксирующая активность в расчете на единицу массы клубенька изменяется мало.

Наличие крахмала в неинфицированных клетках паренхиматозной ткани свидетельствует о некотором превышении притока ассимилятов в клубенек над их расходом симбиотической азотфиксирующей системой.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Андреева И. Н., Симонов И. Н., Тибилев А. А., Ильясов В. Б., Федорова Е. Ф., Хайлова Г. Ф. Ультраструктура эндофита в клетках клубеньков облепихи и их азотфиксирующая активность. — Изв. ТСХА, 1979, вып. 4, с. 186—191.
2. Иванов В. Б., Литинская Т. К. Одновременная окраска белков и углеводов проционовыми красителями. — Цитология, 1967, т. IX, с. 1163—1165.
3. Хайлова Г. Ф. Изучение структуры клеток бактериальной ткани клубеньков бобовых в связи с отложением в ней крахмала. — Физиол. растений, 1978, т. 25, вып. 6, с. 1172—1177.
4. Allen E. K., Allen O. N. — *Bacteriolog. rev.*, 1950, vol. 14, N 4, p. 274—330.
5. Banarth C. L., Greenwood E. N., Lonoregan J. P. — *Plant Physiol.*, 1966, vol. 41, N 5, p. 760—763.
6. Bergersen P. J. — *Austral. J. Biolog. Sci.*, 1957, vol. 10, N 3, p. 233—242.
7. Brenchley W. E., Thornton H. G. — *Proc. Roy. Soc.*, 1925, vol. 98, p. 373—398.
8. Cartwright B., Hallsworth E. G. — *Plant a. Soil*, 1970, vol. 33, p. 685—698.
9. Hardy R. W., Holsten R. D., Jackson R. C., Burns R. C. — *Plant Physiol.*, 1968, vol. 43, p. 1185—1207.
10. Mosse B. J. — *Gen. Microbiol.*, 1964, vol. 36, N 1, p. 49—66.
11. Newcomb W. — *Canad. J. Bot.*, 1976, vol. 54, N 18, p. 2163—2186.
12. Phillips D. A., Newell K. D., HasselSn. A., Felling C. E. — *Amer. J. Bot.*, 1976, vol. 62, p. 356—362.

*Статья поступила 2 декабря 1980 г.*

#### SUMMARY

Formation of many-lober nodules in sea-buckthorn is caused by functioning of several growth points in their apical and basal portions.

In the initial period of growth nitrogen-fixing activity of the nodules is intensified

mainly due to increased portion of mature cells of parenchymatous tissue containing endophyte. Later on the ratio of different tissues (in volume) remains constant, that is why the nitrogen-fixing activity does not vary much.

The presence of starch in nono- infected cells of parenchymatous tissue shows that somewhat higher amount of photosynthetic products comes into nodules compared to that consumed by symbiotic nitrogen-fixing system.