

**МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО СПЕЦИАЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
САМАРКАНДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ АЛИШЕРА НАВОИ**

На правах рукописи
УДК 576.8

ПРЕЙС ЗИНАИДА

**ИЗУЧЕНИЕ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ ОБЛЕПИХИ
КРУШИНОВИДНОЙ, ПРОИЗРАСТАЮЩЕЙ В
ЗАРАФШАНСКОМ ЗАПОВЕДНИКЕ**

**СПЕЦИАЛЬНОСТЬ: 5А420106 «МИКРОБИОЛОГИЯ»
ДИССЕРТАЦИЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ СТЕПЕНИ МАГИСТРА**

Научный руководитель:
доц. Кабулова ФД. _____

САМАРКАНД - 2012

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
1. Обзор литературы	9
1.1. Характеристика и значение облепихи крушиновидной.....	9
1.2. Особенности взаимодействия растений с почвенными микроорганизмами.....	13
1.2.1. Корневые выделения растений и их биологическая роль.....	13
1.2.2. Симбиотические отношения между макро- и микросимбионтами.....	19
1.3. Клубеньковые образования у небобовых растений.....	26
1.3.1. Характеристика корневых и листовых клубеньков.....	26
1.3.2. Симбиоз актиномицетов с лоховыми.....	31
1.4. Характеристика актиномицетов - как азотфиксирующих симбионтов лоховых.....	39
2. Условия, объекты и методы исследования	47
2.1. Условия проведения исследований.....	
2.2. Объекты исследований.....	
2.3. Методы исследований.....	
3. Результаты исследований	
3.1. Морфологическая и биохимическая характеристика форм облепихи, используемые в исследованиях.....	
3.2. Исследование корневой системы различных форм облепихи.....	
3.3. Исследование клубеньковых образований корневой системы облепихи.....	
Выводы	
Рекомендации.....	
Список использованной литературы.....	

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Ритмы нашей жизни неразрывно связаны с ритмами природы. Современная цивилизация осуществляет невиданное давление на природу. В своем «триумфальном» шествии люди часто оставляют после себя покрытые солончаками, затопленные болотами, изрытые карьерами, непригодные для жилья и хозяйствования территории. Сегодня прогресс со всей остротой поставил проблему взаимодействия человека с землей. Современный глобальный экологический кризис может быть определен как нарушение равновесия в экологических системах и в отношениях человеческого общества с природой.

Кислотные дожди, глобальное потепление (так называемый парниковый эффект), возникновение озоновых дыр и другие приметы неблагоприятного состояния атмосферы оказывают неблагоприятное воздействие на человечество, происходит загрязнение продуктов питания радионуклидами, токсинами и другими вредными для человека веществами. В настоящее время 60% населения земного шара проживают в районах повышенного риска природных и техногенных катастроф. Изменения геофизических полей приводят к спазмам сосудов, мгновенному нарушению функций жизненно важных органов. Человек вступает в ступор или, наоборот, крайне возбуждается. Сложно найти человека свободного от страхов и тревог. Поэтому здоровое тело – редкость, а продлить хорошее самочувствие можно только при помощи витаминов.

Двадцать лет продуктовый ассортимент был не таким широким как сейчас, зато более ценным по содержанию полезных веществ. Сегодня даже при очень разнообразном меню будет сохраняться витаминный запас в 20-30%. Всемирная организация здравоохранения считает дефицит витаминов особым голодом, который приводит к задержке в умственном и физическом развитии.

На проходившей в Дании конференции по проблемам детского здоровья было отмечено, что в мире, в среднем, 40% шестилеток по уровню интеллектуального развития не готовы идти в школу. В 80-е годы таких первоклашек насчитывалось вдвое меньше. Причина такого явления: недостаточное поступление витаминов и незаменимых микроэлементов, необходимых для нормальных обменных процессов в организме и деятельности центральной нервной системы ребенка.

Природными источниками витаминов и биологически активных веществ являются плоды, ягоды, листья, кора, почки растений. Известно, что фрукты являются обязательным компонентом пищевого рациона богатый запас витаминов, сахаров, органических и других веществ дают плодовые культуры: яблоня, груша, вишня, слива и т.д.

Однако в последние годы возрос интерес к нетрадиционным растениям: барбарису, боярышнику, облепихе и т.д. Каждое из этих культурных и дикорастущих растений обладает уникальными хозяйственно-ценными признаками.

Большим спросом у населения пользуется облепиха, которую выращивают не только в производственных насаждениях, но и на приусадебных хозяйствах.

Облепиха является уникальной культурой. Плоды ее богаты витаминами, маслом. Кора, листья, семена и почки облепихи используются в качестве лекарственного сырья, кроме того, облепиха обладает экологической пластичностью, что очень важно для современного состояния биосферы.

Данную культуру можно выращивать на бедных и эродированных (бросовых) землях, малопригодных для основных сельскохозяйственных культур. С экономической точки зрения это весьма выгодно, так как в большинстве районов смытая и потенциально эрозионно-опасная пашня составляет большие территории.

Особую ценность представляет свойство облепихи симбиотически, с помощью микроорганизмов в корневых клубеньках, усваивать атмосферный азот и обогащать им почву. Во всем мире ощущается дефицит почвенного азота, а избыточно вносимые минеральные удобрения загрязняют среду вредными для человека соединениями.

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 [102]. 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. [59], 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 [100].

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 [112].

Цель и задачи исследования. Целью данного исследования является изучение клубеньковых бактерий облепихи крушиновидной, произрастающей в Зарафшанском заповеднике.

Для достижения этой цели были поставлены нижеследующие задачи:

- изучить морфологическую и биохимическую характеристику форм облепихи, используемых в исследованиях;
- исследовать корневую систему различных форм облепихи;
- исследовать клубеньковое образование корневой системы облепихи.

Степень решения проблемы. Учитывая цели и задачи данного исследования проведён анализ литературы по следующим направлениям:

- характеристика и значение облепихи крушиновидной.
- особенности взаимодействия растений с почвенными микроорганизмами.
- корневые выделения растений и их биологическая роль.
- симбиотические отношения между макро- и микросимбионтами.
- клубеньковые образования у небобовых растений
- характеристика корневых и листовых клубеньков.
- симбиоз актиномицетов с лоховыми.
- характеристика актиномицетов - как азотфиксирующих симбионтов лоховых.

Основная часть магистерской диссертации выполнена в полевых и лабораторных условиях и проанализирована.

Научная новизна. Впервые в условиях Зарафшанского государственного заповедника изучена корневая система различных форм облепихи, выращенных в полевой коллекции, а также изучены клубеньковые образования на них.

Данная магистерская работа выполнена при поддержке сотрудников Зарафшанского государственного заповедника. Мы выражаем большую благодарность всем организациям оказавшим нам помощь и поддержку.

Предмет и объект исследования. Предмет исследования относится к ботанике и физиологии растений и направлен на изучение клубеньковых образований облепихи крушиновидной, произрастающей в Зарафшанском заповеднике.

Объектом исследования является облепиха крушиновидная, произрастающая на территории Зарафшанского государственного заповедника.

Практическая ценность работы. Результаты работы могут быть использованы для дальнейшего размножения форм облепихи на бедных песчаных и галечниковых почвах с целью повышения плодородия почв.

Рекомендация к защите:

- охарактеризовать морфологическую и биохимическую характеристику форм облепихи, используемых в исследованиях;
- представить данные по исследованию корневой системы различных форм облепихи;
- представить данные по исследованию клубеньковых образований корневой системы облепихи.

Апробация работы. Результаты исследований были обсуждены на заседаниях кафедры ботаники и физиологии растений СамГУ (2012 год) и на научной конференции магистров. Итоги исследований были изложены и опубликованы в виде 2 статей в материалах республиканских конференциях молодых ученых:

1. Республиканская конференция молодых ученых, проведенная в рамках программы Школа экобизнеса для молодёжи, организованная Экологическим движением Узбекистана на тему: «Экология ва бизнес табиат билан уйгунлик сари», Ташкент, 2012.

2. Республиканская научно-практическая конференция молодых ученых «Проблемы сохранения агробιοразнообразия, его роль в развитии

АПК, достижения продовольственной безопасности и устойчивости окружающей среды», Самарканд, 2012.

Объем и строение диссертации. Магистерская работа состоит из 90 страниц включающая введение, обзор литературы, основная часть (условия, объект, методы и результаты исследований), выводы, рекомендации, список использованной литературы, 6 таблиц, 8 фотографий. В диссертации использовано 113 литературных источников, из них 33 иностранных.

1. Обзор литературы

1.1. Характеристика и значение облепихи крушиновидной

Среди дикорастущих растений Узбекистана особое место занимает облепиха крушиновидная – ценное пищевое, лекарственное и декоративное растение. Это древовидный кустарник высотой от 2, 5 – 6 м высотой, который в основном встречается вдоль рек. В дикорастущих зарослях образует большое разнообразие форм, которые всесторонне изучаются. Каждый орган растения содержит в своем составе комплекс биологически активных веществ, которые полезны человеку. Одной из особенностей облепихи является ее способность фиксировать атмосферный азот атмосферы.

Облепиха с древних времен использовалась в многочисленных лечебных сборах народной медицины [10]. Плоды и листья применялись в тибетской медицине 1300 лет назад. В народной медицине плоды и листья применяли для лечения желудочных, ревматических заболеваний. В тибетской медицине сладкие препараты из облепихи применяли для прекращения кровотечений при распаде легких. Сердцевина ствола использовалась для усиления свертываемости крови, снятия коклюшей боли и жара, зола – при болях в тонких кишках [4].

Плоды (семена) облепихи содержат ненасыщенные жирные кислоты, до 3% органических кислот, дубильные вещества, флавоноиды, витамины (А, С, В₁, В₂, В₁₂, Е, К, Р), до 12% сахаров, 15 микроэлементов и другие биологически активные вещества. Плоды содержат до 8% жирного масла. Благодаря этому облепиха является прекрасным иммуномодулятором и иммунопротектором [57, 7, 71].

Плоды облепихи и продукты ее переработки содержат значительное количество аминокислот и минеральных веществ, таких как калий, магний и кальций. Облепиха содержит полиненасыщенные жирные кислоты -

линолевую и линоленовую, являющиеся биоантиоксидантами. В ее плодах имеется фурукумарин, лейкоантоциан, а в коре - серотонин, обладающий противоопухолевым действием. Из серотонина изготавливают препарат - гиппофеин, который сдерживает развитие десяти видов злокачественных опухолей [101].

Перечисленные вещества содержатся в плодах, листьях, семенах и корнях облепихи. Использование содержащегося в облепихе бета-каротина (провитамина А) способствует развитию эмбриона человека, течению беременности, росту и общему состоянию человека. Облепиха - эффективное средство предупреждения инфекционных болезней. Она восстанавливает силы человека после сложных хирургических операций, делает кровеносные сосуды эластичными. Достаточное количество альфа-токоферола обеспечивает нормальное функционирование сердца, желез внутренней секреции и других органов. Профилактические приемы продуктов и препаратов из облепихи позволяет предупредить заболевания органов дыхания, желудочно-кишечного тракта, в том числе язвенные и предъязвенные процессы, а также заболевания половых органов [57].

В медицинской практике широкое применение находит облепиховое масло, которое оказывает эпителизирующее действие, стимулирует рост грануляций и заживляет раны. Обладает болеутоляющим и антисептическим свойством [79, 78, 36, 52]. Масло применяют в послеоперационном периоде при удалении небных миндалин, а также при лечении некоторых форм острого и хронического гайморита [69, 51] указывает на лечебное действие облепихового масла при атеросклерозе.

Облепиховое масло оказывает положительное действие на состояние гематологических показателей красной крови и биохимических показателей, отражающих состояние окислительно-восстановительных процессов функции печени [1]. Оно обладает защитным действием по отношению к клеточным и субклеточным мембранам при повреждении их

гликопротеидных комплексов [38]. Облепиховое масло оказывает нормализующий эффект на концентрацию нуклеиновых кислот в печени при ее хроническом поражении [45], оказывает выраженное анаболическое влияние на белковый обмен [45, 38].

Установлено, что облепиховое масло в завышенных дозах не оказывает токсического действия на биохимические показатели организма, оно интенсифицирует окислительный метаболизм углеводов, создавая тем самым все условия для стимуляции белкового синтеза.

И.И.Матафонов [47] приводит обобщенные данные по фармакологии, лечебному применению, химическому составу и свойствам препаратов из облепихи (плоды, масло, натуральный сок, жом, экстракт, настойка, гиппофеин, листья, побеги и корень).

А.А.Лагерь [37] указывает на широкое применение всех частей растения облепихи (плодов, семян, листьев, ветвей, коры и древесины) в древней медицине. Облепиховое масло широко использует масло при различных заболеваниях кожи, слизистой оболочки рта, пищевода, язве желудка и двенадцатиперстной кишки, как профилактическое средство для уменьшения дегенеративных изменений слизистой оболочки пищевода при лучевой терапии рака. Масло используется при лечении гинекологических заболеваний, для ингаляций при хронических заболеваниях верхних дыхательных путей.

Экстракты из коры облепихи обладают цитостатическим и противопухолевым действием, тормозя рост прививаемых белым мышам опухолей Пухальская, Петрова, Меньшиков [55]. Алкалоид гиппофеин, найденный в коре облепихи используется в комплексе с рентгенотерапией при лечении раковых заболеваний Балицкий и др. [5]. В.Ф.Турецкая и О.В.Азарова [68] указывают на то, что кора и побеги облепихи могут служить источником биологически активных веществ противоязвенного действия, в частности каротиноидов, суммы липофильных веществ,

кумаринов, флавоноидов и дубильных веществ. По содержанию витаминов плоды облепихи стоят на одном из первых мест среди плодовых и ягодных культур.

Л.И.Вигоров [9] установил, что облепиха накапливает витамин Е, его количество в плодах составляет от 8 до 16 мг%. В плодах облепихи обнаружено высокое содержание витамина К₁(0,8-1,2 мг%). В облепихе найдено 3-6 мг% серотонина, которое стабилизирует кровяное давление и обладает противоопухолевым действием. Плоды облепихи применяют для профилактики склероза, язвенной болезни, гастрита, дистрофии мышц, а также для предупреждения склеротических изменений стенок кровеносных сосудов.

Следует отметить, что плоды облепихи с давних пор использовались как пищевой продукт в свежем и переработанном виде [10, 66].

Из них готовят компоты, варенье, джемы, соки, мармелад, нектар, масло, пюре, желе, настои. Облепиха также используется в парфюмерии при изготовлении шампуней, косметических кремов, освежителей кожи, красок для волос. Облепиха используется в агролесомелиорации как закрепитель песков, склонов, оврагов, сильно эродированных земель, непригодных для дальнейшей эксплуатации [40, 54, 65, 39].

В последние годы облепиха нашла широкое применение при рекультивации отвалов каменноугольных шахт, разрезов, карьеров, а ее свойство образовывать мощную корневую систему используется для укрепления прибрежных наносов рек [11].

Заросли облепихи играют существенную роль в жизни животных. Особенно заросли облепихи являются любимым местом обитания фазанов. На это указывает одно из народных немецких названий облепихи – Fasanbeere (фазанья ягода) Darmer, [99]. На берегах озера Иссык-Куль на базе естественных зарослей созданы заповедники и охотничьи хозяйства, в

которых обитает множество фазанов. В 1975 году в Узбекистане, на территории Самаркандской области был организован Зарафшанский заповедник целью которого было сохранение и восстановление зарафшанского фазана и его кормовой базы облепихи крушиновидной.

1.2. Особенности взаимодействия растений с почвенными микроорганизмами

1.2.1. Корневые выделения растений и их биологическая роль

Одной из основных проблем современной биологии и, в частности, экологии, является изучение факторов и механизмов, регулирующих формирование структуры экосистем, их функционирование и динамику. Химические метаболиты и биохимические процессы, в которые они вовлечены и результатом которых являются, играют основополагающую роль в опосредовании и регуляции межорганизменных отношений.

Любой живой организм, являясь открытой системой, способен обмениваться с окружающей его средой, в том числе и с другими живыми организмами, веществом, энергией и информацией. В целом, взаимодействия между живыми организмами (членами биоценозов) можно разделить на два основных типа:

1) взаимодействия, основанные на использовании живыми организмами веществ, служащих источниками энергии для них, или выполняющих роль строительных компонентов, без которых невозможен рост и развитие любого организма;

2) взаимодействия с участием молекул, обеспечивающих регуляцию отношений членов биоценоза, или обеспечивающих передачу информации от одного организма к другому.

Биохимические взаимодействия в биоценозе весьма разнообразны. Это объясняется различиями физиолого-биохимических процессов, лежащих в основе функционирования представителей различных царств живых

организмов, а также той средой обитания, экологическими нишами, которые занимают эти организмы. Вещества, продуцируемые организмами, могут служить в качестве аттрактантов, факторов защиты и атаки, для регуляции взаимодействий внутри популяции или внутри биоценоза, для сдерживания конкурентов, за те или иные ресурсы, а, порой, одно и то же вещество может выполнять различные функции в зависимости от микроокружения данного организма [30].

В выделениях растений имеются компоненты, которые позволяют этим организмам выполнять разнообразные функции:

- 1) подвижные, которыми растения обмениваются с окружающей средой;
- 2) балластные, от которых растения освобождаются;
- 3) привлекающие полезных и отпугивающие вредных для растений организмов;
- 4) вещества, полученные от симбионтов;

Из корней в почву выделяются разнообразные органические вещества, благодаря широкому спектру которых растения способствуют круговороту физиологически активных соединений в фитоценозах и в биоценозах в целом.

Выделение органических веществ в почву является активным физиологическим процессом. Некоторые вещества определяют аллелопатические отношения в фитоценозах, другие - играют важную роль во взаимодействиях растений с почвенной микрофлорой, в том числе и с микроорганизмами, способными вступить в симбиотические отношения с макросимбионтом.

Положительное влияние корневых выделений на микрофлору получило название ризосферного эффекта. Наряду с этим установлено и противоположное явление — ризосферный "антиэффект" [1], заключающийся в том, что корневые выделения угнетают или убивают некоторые

существующие в среде микроорганизмы и тем самым формируют вокруг себя новый состав микрофлоры .

Взаимодействие корневых выделений с микрофлорой почвы очень сложно и неоднозначно. Корни растений, растущих в природных условиях, окружены определенными популяциями бактерий, грибов, актиномицетов, среди которых могут быть и симбиотрофные виды.

Взаимоотношение ризосферного растения с клубеньковыми бактериями начинается намного раньше, чем происходит непосредственный контакт между ними и осуществляется оно посредством химических веществ, источником которых могут быть корневые выделения, негумифицированное органическое вещество, продукты жизнедеятельности микроорганизмов. Наиболее подвижными фракциями негумифицированного органического вещества являются углеводы, белки, низкомолекулярные органические кислоты и биологически активные вещества, такие как фенольные соединения, витамины, алкалоиды, гликозиды и фитогормоны. Эти соединения легко усваиваются почвенной микрофлорой и, в основном, сосредотачиваются в корнеобитаемом слое, т.е. в зоне его ризосферы.

Показано, что за счет продуктов минерализации пожнивно-корневых остатков люпина и его корневых выделений повышается биологическая активность почвы. Корневые выделения менее активны по сравнению с выделениями листьев и стеблей растений. В целом объем корневых выделений высших растений составляет 8-25% фотосинтетической продуктивности растений .

Наибольший интерес представляют вещества фенольной природы, которые принимают участие в важнейших физиолого-биохимических процессах. Они тесно связаны с процессами роста и развития. По мнению исследователей содержание фенольных веществ в растении, их распределение по отдельным органам может указывать на интенсивность протекающих в них процессов роста, степень онтогенетического развития,

старения тканей. Известно, что вещества именно этой группы, синтезируемые высшими растениями, являются наиболее распространенными токсинами, обладают физиологической активностью и могут выступать активаторами или ингибиторами многих обменных процессов.

По данным защитный эффект фенольных соединений, синтезируемых растениями против бактериальной инфекции, по-видимому, реализуется через ингибирование факторов вирулентности патогенов.

Некоторые растительные флавоноиды являются хемоэффекторами для клубеньковых бактерий, активными в очень низких концентрациях. Так, гесперидин и кверцетин задерживали, а в некоторых вариантах подавляли рост клубеньковых бактерий гороха со слабо выраженной пектиназной активностью и стимулировали рост ризобий с высокой пектиназной активностью.

Фенольные соединения корневых выделений растений могут выступать также в роли индукторов (сигнальных веществ) во взаимосвязях растения и микроорганизма. Установлено, что соединения фенольной природы являются активирующим компонентом экссудата корня и обладают способностью экспрессировать гены, необходимые для осуществления последовательных стадий взаимодействия растения-хозяина с микросимбионтом. Подобная функция флавоноидов описана для бактерий *Risobium*, имеющих *nod*-гены, ответственные за процессы формирования клубеньков на корнях растения-хозяина и экс-прессируемые веществами фенольной природы.

Фенольные соединения обнаружены в прижизненных корневых выделениях высших растений и значительное количество их поступает в субстрат с корневыми и послеуборочными остатками.

Многие фенольные вещества, идентифицированные в растениях, накапливаются в почве под ними в довольно значительных количествах. Даже связываясь с почвой, они сохраняют свою биологическую активность.

Кроме того, при выращивании растений в нестерильных условиях источником фенольных соединений могут служить метаболиты микроорганизмов. Микроорганизмы также способны превращать некоторые неактивные продукты жизнедеятельности высших растений в соединения, которые оказывают ингибирующее действие на растения.

В корневых выделениях растений обнаружены органические кислоты, которые кроме токсинов, ингибиторов и ферментов играют немалую роль в защите растений от различных организмов, в частности, грибов и микроорганизмов. Поскольку органические кислоты изменяют рН среды, то в результате сдвига рН в область, где токсичность грибов понижается, растения уменьшают эффективность воздействия этих токсинов на корневую систему и все растение в целом.

Обнаруженные в корневых выделениях белки и вещества пептидной природы, в частности, ферменты, могут выступать в роли химических модификаторов токсичных для растений веществ, выделяемых патогенными для растений микроорганизмами или грибами. Некоторые ферменты наоборот - способны изменять вещества, находящиеся в почве таким образом, что они становятся весьма полезными для растений и микросимбионтов. Среди экскретируемых ферментов есть такие, которые катализируют перекисное окисление липидов в почве. В результате этого процесса образуется активная форма кислорода, являющаяся токсичной для некоторых микроорганизмов, окружающих растения.

Фитогормоны, обнаруженные в корневых выделениях высших растений, по-видимому, могут в какой-то степени принимать участие в конкурентных отношениях данного растения с другими членами фито- и биоценоза. Выделенные растением фитогормоны являются экзогенными регуляторами роста других растений. Известно, что вещества с физиологической активностью фитогормонов (например, гиббереллинов) обнаружены среди продуктов жизнедеятельности разнообразных почвенных

обитателей (водорослей, актиномицетов, бактерий). Однако в литературе практически нет данных о влиянии экскретируемых растением фитогормонов на рост и развитие почвенных микроорганизмов.

Роль гиббереллиноподобных веществ, активно синтезируемых клубеньковыми бактериями, во взаимоотношениях с бобовыми растениями мало изучена. Гиббереллин снижает степень образования клубеньков, что вызвано его действием на растение-хозяина. Показано, что содержание гиббереллинов в клубеньках бобовых растений на несколько порядков выше, чем в корнях. Обнаружено также, что в листьях и корнях инокулированных растений содержание гиббереллиноподобных веществ и активность их выше по сравнению с неинокулированными.

Накопление гиббереллиноподобных веществ в тканях растений связывают с регуляцией скорости деления, роста и развития клеток. Гиббереллин специфически повышает в тканях активность гидролаз, способствует высвобождению ИУК из связанных форм.

Не исключено, что некоторые химические вещества могут нести несколько экологических функций. Вещества, выделяемые растениями в почву в составе корневых выделений, могут играть важную роль в регуляции направления потока энергии через экосистему, где происходит разделение энергетического потока на пастбищную и детритную трофическую цепи. Та часть растительной биомассы, которая окажется доступной для редуцентов (грибов, бактерий) и усвоенной ими, идет по детритной трофической цепи. Та часть растений, которые окажутся недоступными (в значительной мере благодаря химическим средствам защиты растений) для бактерий и грибов, наоборот, становятся потенциальным энергетическим ресурсом для консументов 1-го порядка и может использоваться далее для пастбищной трофической цепи.

Важную роль в направлении энергии по пастбищно-трофическом направлении играют симбиотические отношения, возникающие между макро

- и микросимбионтами. Растение, получающее больше азота за счет симбиоза с микросимбионтом, обладает повышенной устойчивостью к действию патогенных для него грибов и микроорганизмов.

В заключение следует сказать, что взаимоотношения клубеньковых бактерий с растением-хозяином происходит на различных стадиях развития макросимбионта. На формирование эффективного симбиоза влияет биохимическая среда вокруг корней растения. Некоторые биологически активные вещества (ферменты, сахара, органические кислоты и др.), выделяемые растением, способны стимулировать размножение клубеньковых бактерий, повышать их активность и вирулентность. Однако, известен и ингибирующий эффект некоторых веществ (например, некоторых веществ фенольной природы) на ризобии растений.

Хемотаксис в значительной степени определяет способность микросимбионтов адсорбироваться корнями растения (этап непосредственного взаимодействия партнеров. На первых этапах растительно-микробного взаимодействия вещества, выделяемые корнями растений (органические кислоты, сахара и др.) выполняют роль хемoeffекторов, то на последующих они могут использоваться микроорганизмами как субстраты для процессов роста.

1.2.2. Симбиотические отношения между макро- и микросимбионтами

Потребность в азотных удобрениях ежегодно в мире увеличивается на 1.5%. На сегодняшний день каждый год в сельском хозяйстве используются сотни миллионов тонн азотных удобрений. Альтернативный источник азота позволил бы существенно удешевить производство сельскохозяйственной продукции и уменьшить экологические риски, связанные с применением азотных удобрений. Перспективным решением этой задачи является

создание небобовых трансгенных растений, вступающих в азотфиксирующий симбиоз с клубеньковыми бактериями.

Симбиотическая фиксация атмосферного азота растениями является одним из основных процессов в природе, обеспечивающим почву связанным азотом, и следовательно, имеющим прямое отношение к повышению плодородия почв, увеличению продуктивности сельского и лесного хозяйства. Резкое удорожание азотных удобрений и растущая очевидность пагубных последствий их неорганизованного использования также служат существенными стимулами исследования этого процесса. В настоящее время становится все более очевидным, что еще длительное время изучение и оптимизация деятельности имеющихся в природе, а не создание новых типов симбиозов, будут основным путем развития исследований по биологической азотфиксации.

Фиксация азота встречается у различных групп растений. Широко распространена она у цианобактерий. Цианобактерии обитают практически во всех освещенных среды на Земле или играют ключевую роль в углерода или азота цикла biosphere. Generally, цианобактерии способны к использованию многообразия неорганических и биологических ресурсов смешанных с солями азота, аммония, нитритов, нитратов, как мочевины или какой-либо аминокислоты acids.

Потребность в азотных удобрениях ежегодно в мире увеличивается на 1.5%. На сегодняшний день каждый год в сельском хозяйстве используются сотни миллионов тонн азотных удобрений. Альтернативный источник азота позволил бы существенно удешевить производство сельскохозяйственной продукции и уменьшить экологические риски, связанные с применением азотных удобрений. Перспективным решением этой задачи является создание небобовых трансгенных растений, вступающих в азотфиксирующий симбиоз с клубеньковыми бактериями.

Одним из критических факторов на пути формирования бобово-ризобиального симбиоза являются лектины, которые обеспечивают узнавание растением-хозяином специфической для него бактерии. Эти белки, благодаря своим углеводсвязывающим свойствам, определяют избирательные взаимодействия растений с ризобиями, участвуя в адгезии бактерий к корневым волоскам, формировании инфекционных нитей и образовании клубеньков. В ряде работ ключевая роль лектинов убедительно доказана экспериментами, в которых внедрение гена лектина одних видов бобовых растений в другие приводило к тому, что последние приобретали способность дополнительно нодулироваться новым для них видом ризобий

Таким образом, эксперименты с трансгенными растениями, несущими различные гены лектинов бобовых, позволяют расширять круг микросимбионтов растений.

Из трех типов азотфиксирующих симбиозов - цианобактерий с голосеменными растениями, клубеньковых бактерий с бобовыми растениями и актиномицетов с покрытосеменными древесными и кустарниковыми растениями ("актинориза")- последний тип симбиоза наименее изучен [12].

Между тем этот симбиоз занимает первое место среди других по таксономическому разнообразию растений -хозяев, отличается значительной эффективностью процесса азот-фиксации, играет особую роль в природных экосистемах умеренного климата. Особенно примечательна роль этих растений как пионеров растительности: в течение сотен тысяч лет они поселялись на бесплодных землях, делая их плодородными для других растений. Актиноризные растения используются для повышения плодородия лесных и болотистых почв, в борьбе с эрозией и при рекультивации нарушенных земель. Хотя первые эмпирические попытки практического использования этих растений в сельском, лесном и садовом хозяйствах относятся ко временам древнего мира, обсуждаемое ныне использование симбиоза в рамках современных биотехнологических программ связано с

необходимостью устранения многих белых пятен в знаниях о его природе и принципах функционирования.

Чистые культуры актиномицетов-эццосимбионтов р. *Frankia* удалось получить сравнительно недавно и вовлечение их продолжает оставаться одной из актуальных задач, решение которой необходимо как для представления об объеме рода, его экологическом разнообразии, так и с практической целью - для выявления наиболее эффективных форм, которые могут быть использованы как основа нового бактериального удобрения. Франкии представляют интерес не только как активные симбиотические азотфиксаторы. Принадлежность франкий, способных фиксировать азот атмосферы в значительных количествах и в чистой культуре, к группе прокариот, имеющих большое промышленное значение, позволяет надеяться, что их практическая роль может быть дополнена использованием как продуцентов антибиотиков и других ценных метаболитов; продуцентов, способных расти на простых селективных средах без азота.

Известно, что корневые системы многих древесных растений вступают в тесную взаимосвязь с мицелием некоторых высших грибов, образуя микоризу. Между растением-хозяином и бактериями-симбионтами происходит обмен разнообразными химическими соединениями - продуктами обмена веществ. Микробы при этом получают питание (главным образом, сахара) и энергию для собственной жизнедеятельности, отдавая взамен растению азотные соединения и физиологически активные вещества, стимулирующие его рост и развитие. Рост-стимулирующие ризобактерии - универсальные симбионты высших растений, повышающие адаптивный потенциал своих хозяев за счет механизмов фиксации молекулярного азота, мобилизации труднодоступных питательных веществ почвы, защиты корней от патогенов, синтеза фитогормонов и витаминов [48, 49].

Среди этих эффектов наиболее изучена способность рост-стимулирующих бактерий ингибировать развитие почвенных патогенов,

связанная с синтезом антифунгальных метаболитов, конкуренцией за питательные субстраты и поверхность корней, а также с индукцией защитных систем растений.

Почвенные микроорганизмы стимулируют выделение органических веществ корнями, т.е. влияют на выделительную функцию растений; при этом усиливается метаболизм корней; микроорганизмы нейтрализуют вещества, входящие в состав корневых выделений и выделяют биологически активные вещества, являющиеся уже продуктами жизнедеятельности микроорганизмов.

Одним из важных свойств микроорганизмов является их способность к таксису, благодаря чему они находят специфические экологические ниши обитания - микрониши. Своеобразной нишей обитания клубеньковых бактерий является корень ризосферного растения. Различают три зоны активного взаимодействия микроорганизмов с корнем растения - корневая, прикорневая и зона ризосферы.

Хемотаксис клубеньковых бактерий к корневым выделениям растения является, пожалуй, одним из первых этапов взаимодействия симбионтов, осуществляемого ими на доконтактном уровне. В тоже время происходит распознавание потенциальных симбионтов в форме обмена специфическими сигнальными молекулами, которые присутствуют в выделениях корней.

Результатом обмена специфическими сигналами между партнерами является биохимические, морфологические, физиологические изменения в ответной реакции каждого из симбионтов, направленные на подчинение членов межвидового сообщества функционированию его как единого организма.

Указывая на роль хемотаксиса в распознавании бактериями растений-хозяев, считают, что таксисная реакция бывает двух типов: 1) таксис бактерий к простым молекулам (сахарам, органическим кислотам, аминокислотам), следствием которого является неспецифическое

привлечение широкого круга микроорганизмов в ризосферу корня; 2) таксис к более крупным молекулам, выделяемым растительной тканью (флаванам, гормонам, ферментам и др.), осуществляемый в пределах самой ризосферы, в основе которого лежит обмен специфическими сигналами между микро- и макросимбионтом.

Биологическая фиксация атмосферного азота небобовыми растениями может иметь большое экономическое значение как потенциальный источник азота для сельского хозяйства. За последнее десятилетие установлено существование гораздо большего, чем предполагалось ранее, числа семейств растений, вступающих в эндогенный и экзогенный симбиоз с почвенными азотфиксирующими микроорганизмами. Определена способность к усвоению атмосферного азота в ризосфере производственно ценных сельскохозяйственных растений, обладающих значительной нитрогеназной активностью в зоне корней.

Азотфиксирующая способность отмечена в ризосфере риса, величина которой в 10 раз ниже по сравнению с азотфиксирующей активностью бобовых растений. Связывание азота атмосферы происходит в результате жизнедеятельности микроорганизмов, обитающих в почве ризосферы, населяющих поверхность и внутренние сферы корней, стеблей, листьев и использующих в качестве энергетического материала углеродные соединения, которые образуются растениями в процессе фотосинтеза.

Азотфиксирующие бактерии обнаружены в ризосфере риса, тропических трав, сахарного тростника, кукурузы, пшеницы, овсяницы, полевицы. Наиболее хорошо изученными являются взаимоотношения бобовых растений и клубеньковых бактерий.

Бобовые растения, благодаря симбиозу, т.е. взаимовыгодному сожительству с азотфиксирующими бактериями рода *Rhizobium*, обогащают почву азотными соединениями за счет фиксации атмосферного азота. А. Хелльригель в 1886 году объяснил подобную способность бобовых растений

наличием на их корнях клубеньков, развитие которых вызывается микроорганизмами. Вывод немецкого ученого был подтвержден через несколько лет, когда голландскому бактериологу Мартину Бейеринку удалось выделить азотфиксирующий микроорганизм из клубеньков в чистой культуре. В дальнейшем была показана способность ризобий инфицировать корни бобовых и вызывать образование на них клубеньков, в которых собственно и протекает азотфиксация.

Бобово-ризобиальная система - межвидовое сообщество, образуемое высшими растениями (бобовыми) и микроорганизмами (клубеньковыми бактериями). В симбиотическом сообществе бактерии фиксируют азот атмосферы и передают его растению в доступной для него форме, а сами получают защиту от неблагоприятных условий окружающей среды (клубенек — растительное образование, содержащее бактерии) и источник питания (поступающие в клубенек ассимиляты растения).

Формирование азотфиксирующего клубенька на корне бобового растения представляет сложный многоэтапный процесс, в результате которого происходят глубокие структурные, физиологические, биохимические перестройки симбионтов.

Некоторые авторы связывают успешное протекание процессов прикрепления бактерий к корням растений наличием комплементарно соответствующих друг другу поверхностно локализованных структур партнеров. Выделяют следующие этапы образования клубенька: хемотаксис, индукция экспрессии *nod*-генов клубеньковых бактерий и выделение *nod*-фактора, скручивание корневых волосков, образование инфекционных нитей, деление клеток коры корня, морфогенез клубенька, проникновение бактерий в клетки растения с последующим их преобразованием в бактериоиды, функционирование зрелого клубенька.

Клубеньки начинают образовываться на корнях после появления первых листьев, т.е. когда начинается фотосинтетическая деятельность

растения. Наиболее интенсивно симбиотические клубеньки формируются в период активного роста и развития растения, когда формируется и начинает функционировать большая часть листьев. Листья являются одним из решающих факторов в процессе образования клубеньков, их развития и жизнедеятельности, поскольку они дают энергетический материал (глюкозу и другие органические вещества), необходимый как растению, так и микроорганизмам .

1.3. Клубеньковые образования у небобовых растений

1.3.1 Характеристика корневых и листовых клубеньков

Корневые клубеньки или образования, напоминающие клубеньки, широко распространены на корнях не только бобовых растений. Они обнаружены у голосеменных и покрытосеменных двудольных растений. Имеется до 200 видов различных растений, связывающих азот в симбиозе с микроорганизмами, образующими клубеньки на их корнях (или листьях). Клубеньки голосеменных растений (порядки *Cycadales* - саговники, *Ginkgoales* - гинкговые, *Coniferales* - хвойные) имеют ветвящуюся коралловидную, сферическую или четковидную форму. Они представляют собой утолщенные, видоизмененные боковые корни. Природа возбудителя, вызывающего их образование, до сих пор не выяснена. Эндифиты голосеменных растений относят и к грибам (фикомицетам), и к актиномицетам, и к бактериям, и к водорослям. Некоторые исследователи предполагают существование множественного симбиоза. Например, считают, что у саговников в симбиозе принимают участие азотобактер, клубеньковые бактерии и водоросли. Также не решен вопрос и о функции клубеньков у голосеменных. Ряд ученых пытается в первую очередь обосновать роль клубеньков как азотфиксаторов. Некоторые исследователи рассматривают клубеньки подокарповых как резервуары воды, а клубенькам саговников

нередко приписывают функции воздушных корней. У ряда представителей покрытосеменных двудольных растений клубеньки на корнях были обнаружены свыше 100 лет назад.

В литературе имеется характеристика клубеньков деревьев, кустарников и полукустарников (семейства *Coriariaceae*, *Mugicaceae*, *Betulaceae*, *Casuarinaceae*, *Elaeagnaceae*, *Rhamnaceae*), входящих в эту группу. Клубеньки большинства представителей данной группы — коралловидные гроздья розово-красного цвета, с возрастом приобретающие коричневую окраску. Имеются данные о наличии в них гемоглобина. У видов рода *Elaeagnus* (лоховые) клубеньки белого цвета. Нередко клубеньки имеют большие размеры. У казуарин (*Casuarina*) они достигают в длину 15 см. Функционируют несколько лет. Растения с клубеньками распространены в разных климатических поясах или приурочены к определенному ареалу. Так, *Shepherdia* и *Ceanothus* встречаются только в Северной Америке, *Casuarina* - преимущественно в Австралии. Значительно шире распространены лоховые и облепиха [6].

Многие растения рассматриваемой группы произрастают на бедных питательными элементами почвах - песках, дюнах, скальных породах, болотах. Подробнее всего изучены клубеньки ольхи (*Alnus*), в частности *A. glutinosa*, обнаруженные еще в 70-х годах прошлого столетия М. С. Ворониным. Существует предположение, что клубеньки свойственны не только современным, но и вымершим видам ольхи, поскольку их находили на корнях ископаемой ольхи в третичных отложениях долины реки Алдана - в Якутии.

Эндофит в клубеньках полиморфен. Он обычно встречается в виде гиф, везикул и бактериоидов. Таксономическое положение эндوفита до сих пор не установлено, поскольку многочисленные попытки выделить его в чистую культуру оказывались бесплодными, а если и удавалось выделить культуры, они оказывались невирулентными.

Основное значение всей этой группы растений, по-видимому, заключается в способности фиксировать молекулярный азот в симбиозе с эндофитом. Произрастая в областях, где разведение сельскохозяйственных растений с точки зрения экономики нерационально, они играют роль пионеров в освоении земли. Так, ежегодная прибавка азота в почве дюн Ирландии (мыс Верде) под посадками *Casuarina equisetifolia* достигает 140 кг/га. Содержание азота в почве под ольхой на 30-50% выше, чем под березой, сосной, ивой. В высушенных листьях ольхи азота вдвое больше, чем в листьях других древесных растений. По расчетам ученых, роща ольхи (в среднем 5 растений на 1 м²) даёт за 7 лет прибавку азота 700 кг/га.

Значительно реже клубеньки встречаются у представителей семейства *Zygorhysseae* (парнолистниковые). Впервые они были обнаружены на корневой системе *Tribulus terrestris*. Позднее клубеньки были найдены и у других видов якорцев.

Большинство представителей семейства *Zygorhysseae* — ксерофитные кустарники или многолетние травы. Они распространены в пустынях тропических и субтропических областей, растут и на песчаных дюнах, пустошах и болотах умеренного пояса.

Интересно отметить, что такие тропические растения, как парнолистник ярко-красный, образуют клубеньки только при высокой температуре и низкой влажности почвы. Увлажнение почвы до 80% от полной влагоемкости препятствует формированию клубеньков. Как известно, у бобовых растений умеренного климата наблюдается обратное явление. При недостаточной влажности они не образуют клубеньков.

Клубеньки у растений семейства парнолистниковых различаются размерами и расположением на корневой системе. Крупные клубеньки обычно развиваются на главном корне и близко от поверхности почвы. Более мелкие находятся на боковых корнях и на большей глубине. Иногда клубеньки образуются на стеблях, если они лежат на поверхности почвы.

Клубеньки у якорцев наземных на песках вдоль Южного Буга имеют вид мелких белых слегка заостренных или круглых бородавок. Они обычно покрыты сплетением грибных гиф, проникающих внутрь коры корня.

У парнолистника ярко-красного клубеньки представляют собой концевые утолщения боковых корней растений. В клубеньках обнаруживаются бактериоды; бактерии очень напоминают клубеньковые.

Клубеньки тропических растений *Tribulus cistoides* твердые, округлые, около 1 мм в диаметре, соединены с корнями широким основанием, на старых корнях нередко мутовчатые. Чаще располагаются на корнях, чередуясь, с одной или с двух сторон. Для клубеньков характерно отсутствие зоны меристемы. Подобное явление отмечается при образовании клубеньков у хвойных растений. Клубенек поэтому возникает за счет деления клеток перицикла стелы.

Гистологическое изучение клубеньков *Tribulus cistoides* на разных стадиях развития показало, что в них отсутствуют микроорганизмы. На основании, этого, а также скопления в клубеньках больших количеств крахмала их считают образованиями, выполняющими функцию обеспечения растений запасными питательными веществами.

Клубеньки вейника лесного — сферические или несколько удлиненные образования до 4 мм в диаметре, плотно сидящие на корнях растений. Цвет молодых клубеньков чаще всего белый, изредка розоватый, старых - желтый и бурый. Клубенек связан с центральным цилиндром корня широким сосудистым пучком. Так же как и у *Tribulus cistoides*, клубеньки вейника имеют кору, коровую паренхиму, эндодерму, перициклическую паренхиму и сосудистый пучок.

Бактерии в клубеньках вейника лесного очень напоминают клубеньковых бактерий бобовых растений. Клубеньки найдены на корнях капусты и редьки - представителей семейства крестоцветных.

Предполагается, что их образуют бактерии, которые обладают способностью связывать молекулярный азот.

Среди растений семейства мареновых клубеньки встречаются у кофейных *Coffea robusta* и *Coffea klainii*. Они дихотомически ветвятся, иногда уплощены и имеют вид опахала. В тканях клубенька встречаются бактерии и бактериоидные клетки. Бактерии, по мнению Стейарта, относятся к *Rhizobium*, но названы им *Bacillus coffeicola*.

Клубеньки у растений семейства розанных были обнаружены на дриаде (куропаточьей траве). У двух других представителей этого семейства - *Purshia tridentata* и *Cercocarpus betuloides* - описаны типичные коралловидные клубеньки. Однако никаких данных о строении этих клубеньков и природе их возбудителя в литературе нет.

Из семейства вересковых можно упомянуть только одно растение - медвежье ушко (или толокнянка), имеющее клубеньки на корневой системе. Многие авторы считают, что это коралловидные эктотрофные микоризы. У покрытосеменных однодольных растений клубеньки распространены среди представителей семейства злаковых: лисохвоста лугового, мятлика лугового, волоснеца сибирского и волоснеца солончакового. Клубеньки образуются на концах корней; бывают продолговатыми, округлыми, веретеновидными. У лисохвоста молодые клубеньки светлые, прозрачные или полупрозрачные, с возрастом приобретают бурую или черную окраску. Данные о наличии бактерий в клетках клубеньков разноречивы.

Листовые клубеньки. Известно свыше 400 видов различных растений, образующих клубеньки на листьях. Наиболее хорошо изучены клубеньки у *Ravetta* и *Psychotria*. Они располагаются на нижней поверхности листьев вдоль основной жилки или рассеяны между боковыми жилками, имеют интенсивный зеленый цвет. В клубеньках сконцентрированы хлоропласты и танин. При старении на клубеньках часто появляются трещины.

Сформировавшийся клубенок заполнен бактериями, инфицирующими листья растения, очевидно, в момент прорастания семян. При выращивании стерильных семян клубеньки не возникают и растения развиваются хлоротичными. Выделенные из листовых клубеньков *Psychotria bacteriophyla* бактерии оказались принадлежащими к роду *Klebsiella* (*K. rubiacearum*). Бактерии фиксируют азот не только в симбиозе, но и в чистой культуре — до 25 мг азота на 1 г использованного сахара. Надо полагать, что они играют немаловажную роль в азотном питании растений на малоплодородных почвах. Есть основания полагать, что они снабжают растения не только азотом, но и биологически активными веществами.

Иногда на поверхности листьев можно увидеть глянцевые пленки или разноцветные пятна. Их образуют микроорганизмы филлосферы - особая разновидность эпифитных микроорганизмов, которые также участвуют в азотном питании растений. Бактерии филлосферы преимущественно олигонитрофилы (живут за счет ничтожных примесей азотсодержащих соединений в среде и, как правило, фиксируют небольшие количества молекулярного азота), тесно контактирующие с растением.

1.3.2. Симбиоз актиномицетов с лоховыми

Наряду с бобовыми широко известны симбиозы с актиномицетами таких растений, как облепиха (*Hippophae*), лох (*Elaeagnus*), восковница (*Myrtila*) [91]. Актиноризные растения семейства лоховых формируют бактериосимбиотрофические отношения с содержащимися в почве актиномицетами рода *Frankia*. Актиномицеты из рода *Frankia* могут продуцировать некоторые фитогормоны и сидерофоры. Растения обладают повышенной способностью "извлекать" из почвы и культивировать на корнях актиномицеты [59, 61].

Бактериосимбиотрофия относится к одной из положительных форм положительных взаимоотношений высших растений и бактерий. Микробные симбионты трансформируют элементы минерального питания растений, продуцируют биологически активные соединения, выполняют защитную функцию, ассимилируют молекулярный азот. Накопление азота в почве при участии таких растений может достигать 150-300 кг на 1 га в год .

Клубеньковые бактерии проявляют антагонистический эффект против многих патогенных грибов. Система клубеньков на корнях лоховых растений по аналогии с микоризой носит название актиноризы. В настоящее время подобный тип взаимоотношений покрытосеменных растений с азотфиксирующими актиномицетами описан более чем для двух сотен видов, преимущественно древесных. Интересно то, что если в симбиозе с ризобиями макросимбионтами являются только растения семейства бобовых, то в отношении актиномицетов список семейств растений-макросимбионтов более обширен.

По мнению Е.Н. Мишустина актиномицеты осуществляют влияние на азотный баланс почвы. Так, представители рода *Frankia* формируют ассоциации с небобовыми растениями (ольха, облепиха и др.). Растение в ответ на инвазию актиномицета формирует клубеньки на корнях. В этих условиях актиномицеты начинают интенсивно фиксировать атмосферный азот. В настоящее время с несомненностью доказана возможность фиксации азота *in vitro* актиномицетами рода *Frankia*. Описание [86] рода *Frankia*, объединившего актиномицеты, способные образовывать азотфиксирующие клубеньки, было сделано на основании изучения свойств актиномицетов *in vivo*. Однако только в 1975 году была получена первая чистая культура актиномицетов в анаэробных условиях на сложной среде для культуры тканей, методом Lalonde . В состав рода *Frankia* входят виды с хорошо развитым мицелием, спорангии формируются только из части клеток нити в виде интерка-лярных и терминальных "опухолей". При распаде спорангиев

из них освобождаются подвижные и неподвижные споры [82]. Воздушный мицелий отсутствует. Все представители группы - хемоорганогетеротрофы с высокими пищевыми потребностями, аэробы (главным образом микроаэрофилы), мезофилы.

Впервые способность усваивать азот атмосферы растений семейства лоховых была показана в 1897 году. Процесс азотфиксации у франкий локализован в особых структурах (везикулах) размером 3-5 мкм, развивающихся на терминальных окончаниях гиф интеркалярно или на коротких выростах мицелия, нанизываясь подобно бусинам. По данным Г.Г. Майстренко [42] везикулы могут быть окружены капсульным слоем, толщина и плотность которого варьирует в зависимости от возраста и состояния растения-хозяина. Мицелиальная форма Калакуцкий Л.В. [26] встречается, как правило, в молодых клубеньках растений и в единичных клетках верхушек зрелых функционирующих клубеньков. Везикулы появляются в клетках начинающих ветвиться клубеньков растений и преобладают в активно фиксирующих азот клубеньках [88].

Л.В. Калакуцкий [27]) указывали, что по количеству фиксированного азота на единицу массы клубенька *Frankia* значительно превосходят клубеньковые бактерии, а по энергетической экономичности азотфиксации симбиоз актиномицетов с растениями превосходит все типы азотфиксирующих симбиозов.

В последние годы получены интересные сведения, раскрывающие немало сокровенных тайн симбиоза актиномицетов с высшими растениями. Без его оптимизации практически невозможно интенсивное лесоводство. Селекционеры создают растения с определенными свойствами, удачно сочетающимися с наиболее эффективными штаммами *Frankia*. Создание современных методов их культивирования и отбора - крупная заслуга микробиологов. На основе их достижений были разработаны оригинальные подходы к рекультивации нарушенных земель, найдены пути повышения

эффективности биологической фиксации азота в агросистемах. Стало очевидным, что отсутствие в почве необходимого количества актиномицетов, обязательных для заражения корневой системы и образования клубеньков, может стать непреодолимым препятствием в закреплении растений-пионеров на бесплодных участках. Между тем, достаточно заразить посадочный материал чистыми культурами *Frankia*, чтобы без существенных затрат значительно увеличить продуктивность актиноризных симбиозов.

Перспективность подобных подходов убедительно доказана неоднократно опытами с черной ольхой, высаживаемой на рукотворных песчаных дюнах. В настоящее время культивирование различных штаммов *Frankia* становится объектом биотехнологического производства. Имеются обширные возможности их использования для заражения молодых растений, предназначенных для рекультивации нарушенных территорий, сопровождающих карьерную добычу полезных ископаемых. Посадочный материал, заранее обеспеченный зачатками актиноризы, выгодно отличается по скорости роста, темпам накопления биомассы и эффективности усвоения азота [56].

Почва - наилучшая среда обитания актиномицетов. Они характерны для всех материков. Видов, способных проникать в ткани корня, тоже немало и они достаточно разнообразны.

В природе взаимовыгодный союз франкий и древесных растений продолжается в течение всего периода вегетации. Он служит убедительным примером энергетической экономичности. Потребности в энергии удовлетворяются за счет фотосинтеза, протекающего в листьях макросимбионта. Накопление азота может еще стимулироваться увеличением освещенности, добавлением в почву суперфосфата, не менее существенно присутствие молибдена и кобальта.

Известны отечественные и зарубежные исследования, посвященные изучению влияния микоризы на поддерживаемость и рост сеянцев древесных

пород, где отмечено стимулирующее воздействие корневых выделений на грибы-симбионты [33, 34, 35].

Грибы-симбионты в экотрофных микоризах расширяют возможность контакта между растениями и почвой вследствие разветвленности, биохимической активности и образованию грибных чехлов. Важна также защитная роль эктомикоризы по отношению к фитопатогенам, что проявляется в утилизации корневых углеводов и других питательных веществ, в выделении антибиотиков, поддерживающих защитную ризосферную популяцию других видов микроорганизмов.

Бактериосимбиотрофия относится к одной из положительных форм позитивных взаимоотношений высших растений и бактерий. Микробные симбионты трансформируют элементы минерального питания растений, продуцируют биологически активные соединения, выполняют защитную функцию, ассимилируют молекулярный азот.

В ольховых насаждениях формируется более полезный травяной покров; отмечена более высокая активность свободноживущих азотфиксаторов, стимулирующих развитие травянистых растений. На этом основании в разных странах используют некоторые виды ольхи для улучшения почв, бедных органическим веществом и азотом, для закрепления песков и повышения продуктивности лесных насаждений.

Использование азотфиксирующих микроорганизмов в сельском хозяйстве можно рассматривать как одно из важных направлений повышения эффективности биологической фиксации азота в агросистемах. В агросистемах азотфиксирующие микроорганизмы, развивающиеся в особых, узкоспециализированных структурах, создаваемых макросимбионтом, обеспечивают благоприятные условия для диазотрофов. Поэтому распространение процесса симбиотической азотфиксации на растения, неспособные образовывать подобные структуры естественным путем, признается одним из важных способов повышения эффективности

биологической фиксации азота в агросистемах. Принципиальная возможность такого подхода базируется на фундаментальной концепции, что в природе все растения формируют континуум ассоциированных с корнями микроорганизмов, распространяющийся из ризосферы в ризоплану и, далее, глубже в растительные ткани, включая эпидермис, кортекс, эндодерму и васкулярную система корня.

Хорошо известно, что микробное население прикорневой зоны растений оказывает значительное влияние на их развитие и количество урожая. Влияние всех физических, химических и биологических свойств почвы на растение наиболее ярко проявляется именно через ризосферу и обитающие в ней микроорганизмы. Ризосфера является переходным местообитанием между собственно почвой и ризопланой, напоминая почву динамикой численности основных групп микроорганизмов, а ризоплану спецификой видового состава микромицетов, существенно отличающегося от почвенного. Взаимосвязь микробиологических процессов, протекающих в почве, ризосфере и ризоплане в ходе колонизации микроорганизмов прикорневой зоны показывает, что для целенаправленного изменения структуры микробного комплекса прикорневой зоны необходимы меры по регуляции микробного комплекса почвы в целом..

В условиях Новосибирска изучены сезонные изменения нитрогеназной активности клубеньков лоха и облепихи. Установлена сравнительная динамика сезонной нитрогеназной активности корневых клубеньков облепихи, лоха, ольхи. Исследователями показано, что у этих видов однотипный характер ферментативных колебаний наблюдается 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 [43].

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 возросла 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.

Известно, что на активность азотфиксации может влиять множество факторов окружающей среды. 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. Исследователями установлено, 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 азот-фиксирующей 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 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 актиноризмному бобово-ризобиальном 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.

В условиях юга Западной Сибири, по данным В.В. Мочалова[50], Г.М. Скуридина [61], 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.

1.4. Характеристика актиномицетов - как азотфиксирующих симбионтов

Актиномицеты (устаревшее название **лучистые грибки**) - бактерии, имеющие способность к формированию на некоторых стадиях развития ветвящегося мицелия (некоторые исследователи, подчёркивая бактериальную природу актиномицетов, называют их аналог грибного мицелия тонкими нитями) диаметром 0,4-1,5 мкм, которая проявляется у них в оптимальных для существования условиях. Имеют грамположительный тип клеточной стенки и высокое (60-75 %) содержание ГЦ пар в ДНК.

Наиболее распространены в почве: в ней обнаруживаются представители почти всех родов актиномицетов. Актиномицеты обычно составляют четверть бактерий, вырастающих на традиционных средах при посевах их разведённых почвенных суспензий и 5-15 % прокариотной биомассы, определяемой с помощью люминесцентной микроскопии. Их экологическая роль заключается чаще всего в разложении сложных устойчивых субстратов; предположительно они участвуют в синтезе и разложении гумусовых веществ. Могут выступать симбионтами беспозвоночных и высших растений.

В 1874 Ф. Кон в пробе из слёзного канала человека впервые обнаружил нитчатую бактерию, названную в честь врача, взявшего пробу *Streptothrix foersteri*. Поскольку родовое название *Streptothrix* уже было занято грибом, позднее бактерия была переименована в *Streptomyces foersteri*. В 1877 патолог Боллингер и ботаник Гарц исследовали опухоли (актиномикозные узлы) коров и обнаружили их возбудителя, которого из-за лучистого расположения нитей называли лучистым грибом (*Actinomyces*). Это название вскоре стало собирательным для нескольких близких родов.

В 1884 Израиль получил первую чистую культуру актиномицета (*Actinomyces israelii*). В дальнейшем было обнаружено множество

патогенных форм (1888 - из ноги больного мадуровой болезнью человека Нокардом был выделен первый представитель рода *Nocardia*), в 1890-1892 Госпирини составил список родов актиномицетов [27, 28].

В 1912-1916 стали появляться первые описания непатогенных актиномицетов, выделенных из обычных природных субстратов. В этот период свой вклад в развитие актиномицетологии внесли С. А. Ваксман, Краинский, Рудольф Лиске.

Новый этап развития науки начался в 1939, когда Красильников получил в нативном виде антибиотик мицетин, выделяемый стрептомицетами. В 1945 Ваксман, Шатц и Буги выделили стрептомицин. На актиномицеты оказалось обращено большое внимание, однако в основном развивались прикладные аспекты актиномицетологии, связанные с получением и применением антибиотиков. Тем не менее в это период также были получены сведения об экологии, биохимии, строении, циклах развития, которые в свою очередь позволили разработать принципы классификации актиномицетов.

С 1980-х-1990-х внимание переключилось на изучение экологических функций актиномицетов, их взаимоотношения в естественных условиях с животными, растениями и микроорганизмами. Происходит пересмотр систематики, связанный с получением данных о геноме актиномицетов [104, 105].

Актиномицеты имеют определенное строение. Дифференциация мицелия - процесс усложнения в процессе развития колонии актиномицета. Прежде всего она проявляется в делении на первичный (субстратный) и вторичный (воздушный) мицелий. Воздушный толще, он гидрофобен, содержит больше ДНК и ферментов, на поверхности его клеток имеются различные структуры (палочковидные, фибриллы).

Мицелий с редкими перегородками, практически ценоцитный у спорообразующих, с частыми перегородками (септами) у форм, для которых

мицелий распадается и близких к ним. Вегетативные клетки большинства форм делятся поперечными перегородками, *Geodermatophilus* и *Dermatophilus* - во взаимно перпендикулярных направлениях, некоторые актиномицеты содержат клетки с септами, проходящими в совершенно разных направлениях (спорангии *Micromonospora*, везикулы *Frankia*). Ветвление происходит по механизму почкования [62, 63].

Образование септы начинается с впячивания цитоплазматической мембраны.

Часто дифференциация проявляется в образовании амицелиарных структур:

- коремии - тесное переплетение слившихся гиф, склеенных слизью с оксидами железа;
- агрегаты клеток;
- кристаллы вторичных метаболитов;
- «серные гранулы»;
- склероции - утолщённые гифы с вакуолями, заполненными липидами, может прорасти как спора;
- везикулы - инкапсулированные азотфиксирующие образования у *Frankia*.

В процессе старения цитоплазма клеток приобретает неравномерную электронную плотность, в ней перестают различаться рибосомы, граница нуклеоида расплывается, клеточная стенка становится тонкой и рыхлой, образуется микрокапсула. При автолизисе в цитоплазме образуются обширные светлые участки, нуклеоид распадается, в клеточной стенке образуются отверстия, клетка заполняется мембранными структурами, разрушающимися последними.

Нокардиоформные актиномицеты редко образуют споры и размножаются преимущественно фрагментами быстро распадающегося мицелия. Актиномицеты, имеющие продолжительные мицелиальные стадии, различаются по типу спорообразования.

Актиномицеты (особенно рода *Micromonospora*) обнаруживаются в водоёмах и их донных осадках, однако не решен вопрос о том являются ли они постоянными их обитателями или занесены из почвы, неизвестна также их роль в данных местообитаниях.

Почвы являются тем природным субстратом, откуда актиномицеты выделяются в наибольшем разнообразии. Однако большая часть биомассы актиномицетов представлена спорами, которые и дают колонии при учёте популяций в почве методом посева, лишь 1-4 % биомассы занимает мицелий[1]. Он обнаруживается в микроразонах с повышенным содержанием органического вещества.

Актиномицеты доминируют на поздних стадиях микробной сукцессии, когда создаются условия для использования труднодоступных субстратов. Активация актиномицетной микрофлоры происходит при внесении в почву крахмала, хитина, нефтепродуктов и т. д. В то же время из-за медленного роста актиномицеты не способны конкурировать с немиецелиальными бактериями за легкодоступные вещества. Возможно, что вторичные метаболиты (в особенности, меланоидные пигменты) играют какую-то роль в образовании гумуса.

Ценозообразующую роль актиномицеты играют в местах первичного почвообразования, находясь в этих условиях в ассоциации с водорослью. Эти ассоциации в лабораторных условиях формировали лишайникоподобный таллом (актинолишайник).

Актиномицеты (рода *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Micromonospora*, *Actinomadura*) являются постоянными обитателями кишечника дождевых червей, термитов и многих других беспозвоночных. Разрушая целлюлозу и другие биополимеры, они являются их симбионтами. Представители рода *Frankia* способны к азотфиксации и образованию клубеньков у небобовых растений (облепиха, ольха и др.). Есть патогенные формы, вызывающие актиномикоз. В организме человека обитают в ротовой полости, в

кишечнике, в дыхательных путях, на коже, в зубном налете, в кариозных зубах, на миндалинах [94].

Большинство актиномицетов - аэробы, факультативные анаэробы присутствуют лишь среди актиномицетов с непродолжительной мицелиальной стадией. Здесь усматривается некоторая параллель с грибами, среди которых лишь немикелиальные дрожжи также способны жить в анаэробных условиях. Предполагается что менее эффективный анаэробный тип метаболизма успешен при большей относительной поверхности клеток, которая достигается фрагментацией мицелия.

Считается, что актиномицеты более устойчивы к высушиванию чем немикелиальные бактерии, благодаря чему они доминируют в пустынных почвах. Лабораторное хранение почвенных образцов в условиях, не способствующих вегетативному росту прокариот увеличивает относительное содержание актиномицетов, учитываемое методом посева. Особенно долго способны сохраняться при высушивании склероции, образуемые родом *Chainia*. Показано что при $a_w=0,50$ некоторые споры прорастают (*r. Streptomyces*, *Micromonospora*), однако образовавшийся мицелий не ветвится. При $a_w=0,86$ прорастают споры практически всех актиномицетов, у некоторых мицелий ветвится, образуются микроколонии, оптимум достигается при $a_w=0,95$.

Чаще всего актиномицеты нейтрофилы, однако некоторые роды ацидофильны или алкалофильны. Характерным свойством актиномицетов является ацидотолерантность, благодаря чему их доля в микробном комплексе лесных почв относительно высока. Отмечено что на кислой среде продлевается вегетативная стадия, на щелочной, напротив, ускоряется спорообразование.

Актиномицеты не требовательны к содержанию органического углерода в среде, многие из них способны расти на «голодном» агаре. Представители рода *Nocardia* способны осуществлять хемосинтез, окисляя

водород, метан и метанол. Широко среди актиномицетов распространена гетеротрофная фиксация CO_2 .

Для актиномицетов отмечается наличие редких метаболических путей и ферментных систем. Например, для них характерен путь расщепления глюкозы Энтнера-Дудорова, встречается полифосфатгексокиназа (вместо обычной гексокиназы), существуют особенности в синтезе ряда аминокислот; во вторичном метаболизме им свойственен шикиматный путь синтеза ароматических соединений, включение цельных углеродных скелетов глюкозы во вторичные метаболиты, например, антибиотики [106, 110, 111, 112].

Отличительной особенностью актиномицетов является способность к синтезу физиологически-активных веществ, антибиотиков, пигментов, пахучих соединений. Именно ими формируется специфический запах почвы и иногда воды (вещества геосмин, аргосмин, муцидон, 2-метил-изоборнеол). Актиномицеты являются активными продуцентами антибиотиков, образуя до половины известных науке [44].

Актиномицеты делятся на

- 1) Нокардиоформные актиномицеты
- 2) Роды с многогнездовыми спорангиями

Франкии - азотфиксирующие симбионты ольхи и других небобовых растений, образующие на их корнях клубеньки. Место обитания: почва, воды и кожа млекопитающих.

- 3) Актинопланы
- 4) Стрептомицеты и близкие роды
- 5) Мадуромицеты
- 6) Термомоноспоры и близкие роды
- 7) Род *Thermoactinomyces*

Актиномицеты – симбионты способны инфицировать только паренхимные клетки коры корня. Как и при заражении бобовых

микроорганизм проникает в корни из почвы через корневые волоски, которые в результате скручиваются. В месте инфицирования стенки корневого волоска утолщаются и гифы, проникшие внутрь клетки, покрываются толстым чехлом. По мере продвижения гиф по корневым волоскам чехол утоньшается и вокруг гиф формируется капсула, которая, как считают, образуется как растением, так и актиномицетом.

Из корневого волоска гифы проникают в эпидермис и кору корня, вызывая деление и гипертрофию инфицированных клеток. Клубки гиф заполняют центр клеток растения, у клеточных стенок происходит расширение и деление концов гиф, в последнем случае формируются специфические структуры, так называемые везикулы. В клубеньках образуется вещество, подобное леггемоглобину бобовых растений. В конце вегетации везикулы деградируют, но в клетках растений сохраняются гифы, заражающие весной новые ткани. Обычно при симбиозе с небобовыми растениями энергия азотфиксации актиномицетами рода *Frankia* больше, чем у клубеньковых бактерий бобовых растений [109].

Симбиоз растений с актиномицетами рода *Frankia* – еще один тип клубенькового симбиоза. Этот тип симбиоза характеризуется менее эффективной азотфиксацией, чем бобово-ризобиальный. Однако данные последних лет по экспрессии отдельных генов у актиноризных растений позволяют заключить, что азотфиксация у них имеет много общего с этим процессом у бобовых [81, 82, 83]. По меньшей мере, семь общих генов задействованы в этих двух типах симбиоза. Эти гены получили название “common symbiosis genes”. В их число, например, входят гены, отвечающие за образование “пре-инфекционных нитей”, которые впоследствии заселяются симбиотическими бактериями [84, 85, 86, 87, 88, 90]. Существует вероятность, что лектины актиноризных растений (аналогично лектинам бобовых) участвуют в инициации симбиоза с *Frankia* [106, 107, 108]. Таким образом, первыми модельными небобовыми растениями, узнаваемыми

ризобиями и вступающими с ними в симбиотические отношения, могут стать трансгенные актиноризные растения (в частности, облепиха, тип симбиоза у которой относительно близок к таковому у параспонии и некоторых бобовых [95, 97, 100]).

2. Условия объекты и методы исследования

2.1. Условия проведения исследования

Исследования проводились на территории Зарафшанского государственного заповедника, который расположен на нижней террасе средней части реки Зарафшан, длиной 45 км и занимает площадь 2352 га. Покрытая площадь лесом составляет 868 га.

Климат. Климат заповедника типичен для континентальных субтропиков и характеризуется большими амплитудами как суточном, так и в годовом ходе температур воздуха при резко выраженной периодичности выпадения атмосферных осадков с приуроченностью их к зимнему сезону. Летом воздух отличается большой сухостью и в летние месяцы осадки не выпадают, в холодный период выпадает основная масса осадков, обуславливающая высокую влажность воздуха зимой.

Осадки выпадают преимущественно в виде дождя. В виде снега выпадают в незначительном количестве с начала декабря по первую декаду марта. Устойчивого снежного покрова не образуется. Преобладающими ветрами зимой и летом являются ветры восточных направлений, а осенью и весной – юго-восточных.

Почвы. Почвообразующими породами являются галечно-песчаные отложения – продукты выноса реки Зарафшан. В верхней части заповедника почва сформирована на галечниках при глубоком залегании грунтовых вод. Галечники здесь имеют незначительное количество мелкоземных прослоек. Близкое залегание к поверхности грунтовых вод способствовало развитию на нижних террасах 4-х типов почв: сероземно- луговые, аллювиально-луговые, лугово-болотные и болотные. Облепиха, в основном, произрастает на аллювиально-луговых почвах.

Растительность исследованного района относится к тугайному типу и включает более 300 видов высших растений. Эта растительность входит в

ассоциации различных формаций: травянистые, кустарниковые, древесные, образующие сложные комплексы в речных долинах. Древесно-кустарниковая растительность представлена следующими основными лесообразующими породами: *Populus alba*, *Populus pruinosa*, *Populus diversifolia*, *Populus nigra*, *Salix Olgae*, *Salix tuvanica*, *Salix Wilhelmsiana*, *Salix songorica*, *Elaeagnus angustifolia*, *Platanus orientalis*, *Gledisehia briacanthus*, *Robinia pseudoacacia*, *Ailanthus altissima*, *Acer platanoides*, *Tamarix pentandra* и др. В районе исследования формация облепихи представлена несколькими ассоциациями.

Наиболее широко распространенными являются – облепиховая, облепихово-ивовая, облепихово-ивово-лоховая и облепихово-ивово-разнотравная.

2.2. Объекты исследования

Материалом для работы служили желтоплодные, оранжевоплодные и красноплодные формы облепихи 6-летнего возраста, выращенные в полевой коллекции Зарафшанского государственного заповедника.

2.3. Методы исследования

Изучение корневой системы проводилось методом монолита [31]. Корни извлекались из почвы послойно, через каждые 20 см, и после промывки сортировались по толщине на четыре фракции: с диаметром до 1 мм, от 1 до 3 мм, от 3 до 8 мм и более 8 мм. Затем корни каждой фракции измеряли по длине миллиметровой линейкой (рис.2.1 и 2.2).

В качестве объектов исследования использовали корневые коралловые образования *H. rhamnoides*, произрастающих в полевой коллекции Зарафшанского государственного заповедника. К моменту эксперимента, проведенного в 2010–2011 гг., растения находились в 6-летнем генеративном состоянии. Корневые клубеньки собирали с мая по октябрь. Для анализа отбирали 2-4-лопастные клубеньки (рис.2.3 – 2.4).

Рис.2.1- Раскопки корневой системы облепихи в полевой коллекции заповедника

2.2 Поиск клубеньковых образований на корнях облепихи у молодых сеянцев

Рис.2.3 - Расположение клубеньковых образований на корневой системе облепихи

Рис.2.4 - Коралловые образования на корнях облепихи

Для световой и электронной микроскопии клубеньки фиксировали 2,5 %-м раствором глутаральдегида в 0,25 М фосфатном буфере pH 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 эпоксида 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.

3. Результаты исследования

3.1. Морфологическая и биохимическая характеристика форм облепихи, используемые в исследованиях

Облепиха крушиновидная – *Hippophae rhamnoides* L. относится к семейству лоховых – *Elaeagnaceae* Juss. и представляет собой древовидный куст или небольшое деревце. В зависимости от происхождения и условий обитания облепиха может достигать высоты от 0,7 до 12 м.

Количество скелетных ветвей колеблется от 3 до 9. Ветвление начинается на высоте 0,2-0,5 м от поверхности почвы. Молодые побеги и листья покрыты звездчатыми чешуйками, многочисленными щитками [10]. Цвет коры, ветвей и ствола - бурый различных оттенков от буро-зеленого, коричневого, темно-бурого до черного.

На плодоносящем растении облепихи имеются побеги трех типов: ростовые, смешанные и генеративные. Ростовые образуются из спящих почек на 2-4 летних ветках. Они растут в течение вегетационного периода, достигая длины 45-80 см. На ростовых побегах формируются вегетативные почки [7].

Смешанные побеги появляются из почек на однолетних ветках, растут с конца мая до начала августа. У основания этих побегов появляются цветки (затем плоды), выше – листья. Побеги достигают длины 12-35 см. На них в течение лета закладываются генеративно-вегетативные (смешанные) почки, в которых формируются зачатки листьев и цветков – урожай следующего года. До 96-100% урожая облепихи сосредоточено на однолетнем приросте [20, 21, 22, 23, 24, 25].

Часть почек облепихи на однолетних ветках, особенно у их основания, имеют зачатки цветков и только 1-3 листа. Побеги, выросшие из таких почек называются генеративными, так как зачатки листьев на них недоразвиты. Они растут только в течение первой половины лета. В конце июня рост

прекращается, и побеги, достигшие длины 3-6 см, с плодами у основания образуют так называемые «слепые початки». К концу вегетации после сбора урожая генеративные побеги усыхают, образуя сухие, колючие веточки. Верхушечные почки облепихи недоразвиты, и побеги оканчиваются колючкой различной длины и твердости. Побеги продолжения образуются из 3-4 боковых пазушных почек на верхушке прошлогоднего прироста [53].

Наличие колючек является биологической особенностью облепихи. При оценке форм их подразделяют по выраженности данного признака на слабо-, средне-, и сильноколючие. У слабоколючих форм на побеге только одна верхушечная твердая колючка длиной 1-5 мм. У среднеколючих форм колючки твердые, длиной 5-10 мм, на концах побегов и изредка боковые. При сильной колючести длина твердых колючек 10-25 мм и более. Они расположены как на верхушке, так и довольно равномерно по побегу. Большое количество колючек является серьезным препятствием при сборе плодов, поэтому такие формы обычно выбраковываются селекционерами.

На побегах закладываются вегетативные и смешанные (вегетативно-генеративные) почки. Вегетативные почки формируются преимущественно у растений, не вступивших в плодоношение. Они мельче смешанных, прижаты к побегу, имеют 2 кроющие чешуи. На растениях, вступивших в плодоношение формируются смешанные почки. Они имеют разную форму в зависимости от пола растений. У мужских растений почки крупные, оттопыренные, имеют 6-8 покровные чешуи и напоминают маленькие шишки. На женских растениях почки менее крупные, удлиненные, прилегающие к побегу, кроющих чешуй только 2.

Листья облепихи простые, цельные, на коротких черешках, удлиненно-ланцетной формы, от мелких (длиной 2-3 см и шириной 0,5 см) до крупных (длиной 7-10 см, шириной 1,0-1,2 см). Листовая пластинка может быть плоской, выпуклой, вогнутой, сложенной по средней жилке, по-разному изогнутой у верхушки. Листья опушены волосками, причем сильнее с

нижней стороны листа. Оно придает листьям серебристо-зеленый цвет разной интенсивности.

Облепиха – раздельнополюе, двудомное растение: женские (пестичные) и мужские (тычиночные) цветки формируются на разных растениях. Женские цветки одиночные, образуются в пазухах кроющих чешуй и нижних листьев. Они не имеют лепестков, развивается только чашечковидный двухлопастной околоцветник длиной 2-4 мм, на короткой цветоножке. Пестик состоит из завязи, очень короткого столбика и удлиненного, желтоватого рыльца длиной 3-5 мм. Завязь окружена разросшимся цветоложем серебристо-зеленого цвета.

Мужские цветки собраны у основания побегов в пазухах кроющих чешуй и нижних листьев. Из каждой почки развивается от 2 до 8, иногда до 10-12 цветков. Каждый цветок состоит из округло-овального двураздельного околоцветника зеленовато-серого цвета. Тычинок 4, на коротких нитях. Пыльца светло-желтая, мелкая, легкая. В период цветения доля околоцветника раздвигается, образуя щели, через которые пыльца выдувается ветром.

Различия между тычиночными и пестичными растениями хорошо заметны в период цветения, так как у мужских растений рост побегов еще не начался, листьев почти не видно, но хорошо заметны зеленовато-серые цветки, собранные в колосовидные соцветия, окруженные у основания буроватыми чешуями. Женские растения в период цветения уже имеют листья, в пазухах нижних находятся женские цветки.

Плод облепихи считается ложной сочной семянкой, но его чаще называют ягодой. Масса 100 плодов варьируется от 4 г у дикорастущей облепихи до 8-100 г у культурной. Мелкими считаются плоды с массой до 0,3 г, средними - от 0,3 до 0,6 г, крупными – выше 0,6 г. Форма плодов разнообразна: шаровидные, реповидные, овальные, бочонковидные,

цилиндрические, яйцевидные. Плоды окрашены в желтые, оранжевые и красные тона.

Плодоножки длиной 1-8 мм. Облепиха не имеет отделительного слоя, образующегося у плодоножки большинства растений при созревании плодов. При сборе плодов происходит либо разрыв плодоножки (сухой отрыв), либо разрыв кожицы плода у основания (мокрый отрыв).

Внутри плода развивается одно семя удлинено-овальной формы, довольно крупное: масса 1000 семян составляет от 12 до 20 г, т.е. в 1 г содержится 35-85 семян. Семена покрыты блестящей кожурой от серовато-коричневой до почти черной окраски. У большинства форм они темно-коричневые.

Корневая система облепихи состоит из светлых, довольно толстых, шнуровидных корней, которые выполняют проводящую функцию, и обрастающих более мелких активных корешков. На корнях имеются характерные округлые, желтовато-белые выросты разной величины – клубеньки. С помощью таких клубеньков облепиха способна усваивать атмосферный азот.

На проводящих корнях облепихи имеются спящие придаточные почки, которые пробуждаются при благоприятных условиях и дают жизнь новому растению – корневому отпрыску. Таким образом, в природных условиях формируются куртины облепихи – корнеотпрысковое потомство одного материнского растения. На строение корневой системы и глубину ее залегания влияют механический состав и увлажнение почвы. Основная масса корней залегает в верхних слоях почвы. Как указывает Т.Т.Трофимов [66], стержневой корень, достигнув в первые годы жизни 0,5-1 м глубины, приостанавливает свой рост, в следующие годы усиленно разрастаются горизонтально отходящие боковые корни второго и третьего порядка, которые могут распространяться во взрослом состоянии до 12 м.

На территории Зарафшанского заповедника встречается большое формовое разнообразие облепихи. Эти формы различаются по многим параметрам. Ранее некоторые исследователи описывали эти формы, но полного изучения их до настоящего времени не проводилось. Нами при помощи методики В.Т.Кондрашова были описаны и выделены распространенные формы облепихи, у которых был сделан биохимический анализ плодов. В дикорастущих зарослях Зарафшанского заповедника мы различили облепиху по следующим показателям:

По возрастному составу. От молодняков до старых деревьев. Часто в зарослях встречаются несколько групп возраста. В зарослях обнаружено большое количество одно-двулетних растений, образованных от корневых отпрысков. В русле реки Зарафшан наблюдается очень хорошее возобновление облепихников.

По полу в зарослях отмечались чистые колонии мужских экземпляров, чистые колонии женских и смешанные с преобладанием того или иного пола. На территории заповедника встречаются большие куртины как женских так и мужских растений. Куртины могут состоять из 7-9 растений, а в некоторых местах в русле реки встречаются большие куртины включающие от 65-70 растений.

По высоте различаются заросли с градациями через 0,5 м – (до 1, 1,5, 2, 0, 2, 5, 3, 0, 3, 5, 4, 0, 4, 5, 5, 0. и выше). Наиболее распространенные заросли по 3-4 метров высоты. В куртинах встречается большое количество молодых растений 0,5-1 метров высоты.

По степени покрытия площади отмечаются сплошные заросли куртинного характера, полосы, группы. На территории заповедника больше встречается сплошных зарослей куртинного характера, реже группами и единичными экземплярами. В русле реки найдены большие куртины (до 70 растений) облепихи, крупные древесные формы с одинаковой окраской плодов.

По цвету плодов выделили облепиху с желтыми, желто-оранжевыми, оранжевыми, красно-оранжевыми и красными плодами, интенсивность их изменяется от светлой до темной окраски. Заросли встречаются чистые, то есть с плодами только одного цвета, и смешанные – с плодами разных цветов. На территории заповедника встречается большое количество с оранжевыми средними плодами. В русле реки очень много облепихи с желтыми плодами.

По форме и размеру плодов: отмечаются круглые, овальные, цилиндрические и т.д., крупные (8 мм и выше), средник 6-8 мм, мелкие – менее 6 мм. В основном распространены формы с овальными и средними плодами, реже встречаются формы с круглыми и цилиндрическими плодами..

По степени урожайности: слабое плодоношение – на побегах единичные плоды или плодоносящие побеги (початки), облепленные плодами, среднее- початки длиной 4-5 см, хорошее, початки 6-10 см, обильное – початки крупные (свыше 10 см) или густо облепленные плодами. На территории заповедника много форм с обильным плодоношением, крупные длинные початки с густо облепленными плодами.

В зарослях в основном встречаются здоровые кустарники, с хорошим облиствлением ветвей. Очень мало усыхающих – заросли с наличием небольшого количества отмерших побегов. Сильно усохших растений почти не встречается. Но имеются растения с плохо облиствленными побегами, со слабым плодоношением. На территории заповедника единичными экземплярами встречаются и очень интересные перспективные формы – слабо околюченные, с крупными плодами желтой и красновато-оранжевой окраски.

Нами при обследовании территории Зарафшанского заповедника изучено большое количество разнообразных форм и выделены наиболее распространенные, характеристика которых приведена в таблице 3.1.

Таблица - 3.1.1

Морфологическая характеристика основных выделенных форм облепихи на территории Зарафшанского заповедника

Номер Формы	№ Участк а	Место по GPS	Высота расте ния (м)	Фор ма кроны	Угол отхожд скелет. ветвей	Тип кроны	Гус тота кроны	Околюч е-нность растени я	Длина колючек на плодонос. побеге(см)	Окрас ка листь ев	Сте пень плодо ноше ния
4	1	N39,38,69 3 E067,07,4 58	2-2,5	Кони- Чес кая	45°	компак тная	сред няя	средняя	3-7	зелёная	сред няя
11	1	N39,39,29 4 E067,06,6 06	1,5-2	оваль- ная	45°	поник- лая	сред няя	средняя	4-6	тёмно- зелёная	сред няя
17	1	N39,40,18 9 E067,05,0 54	3-3,5	кони- чес кая	65-70°	поник- лая	очень слабая	слабая	4-8	зелёная	сред няя

Продолжение таблицы

Число плод. из 1 плод. почки (шт.)	Длина плод ножки (мм)	Степень плодоно- шения	Предпо- лагае- мое назна- чение	ПЛОДЫ							
				Окрас ка	Форма	Длина (мм)	Ширина (мм)	Инде кс	Характе р отрыва	Масса 100 плодов (гр)	Вкус
4-6	0,3-0,4	средняя	декора тивная	жёлтая	цилин- дрическ ая	0,6-0,8	0,4-0,5		мокрый	13,4	кислый с го речью
7-8	0,4-0,5	средняя	декора тивная	оранже вая	цилин- дричес кая	0,6-0,7	0,4-0,5		сухой	10,5	кислый
3-6	0,2-0,4	слабое	декора тивная	Крас ная	Округ лая	0,65- 0,7	0,55-0,6		сухой	12,5	кислый

Из таблицы видно, что основным показателем по которым отличались формы друг от друга является цвет, размер и форма плода. У форм разная форма, тип и густота кроны, различная околюченность, окраска, форма и размеры плода и длина плодоножки. В общем, в этих таблицах представлены данные о наиболее распространенных формах, произрастающих в Зарафшанском государственном заповеднике. Многие из этих форм представляют большой интерес для проведения селекционной работы.

Облепиха крушиновидная – поливитаминное растение. Результаты многих исследований показали, что плоды содержат каротиноиды, флавоноиды, кумарины, стерины, сахара, кислоты, лейкоантоцианоиды, трипертеноиды и различные витамины [78, 77, 103].

Особое значение в плодах облепихи имеет жирное масло. Оно содержится в водянистой мякоти плода и семенах. Наиболее ценным считается масло плодовой мякоти, являющимся природным концентратом витаминов.

Основным веществом, которое делает облепиху весьма ценной являются также каротиноиды. При изучении биохимического состава плодов зарафшанской популяции на эти вещества и обратили внимание. Изучение химического состава плодов облепихи из долины реки Зарафшан было начато в 70-х годах [74, 15].

Е.Е.Шишкиной [74] проанализировано несколько образцов облепихи из окрестностей Самарканда. На основе этих исследований было сделано заключение о том, что облепиха из долины реки Зарафшан характеризуется высокой масличностью, высоким содержанием каротина и представляет интерес как исходный материал для селекции.

Нами в процессе изучения выделенных форм наряду с ботанической характеристикой был проведен анализ биохимического состава плодов. При анализе плодов определялась влажность плодов, масличность плода на сухое вещество и с учетом общей влажности, содержание каротиноидов в плодах и масле плодов, состав жирных кислот, в частности миристиновая,

пальмитиновая, пальмитолеиновая, стериариновая, олеиновая, линолевая, линоленовая. Результаты этих анализов представлены в таблице – 3.1.2

Таблица -3.1.2

Физико-химические показатели разных форм облепихи

П/п	Название формы	Влажность		Масличность,% от массы	
		целых плодов, % от массы	остаточная (измельченных плодов)	плода на сухое вещество	с учетом общей влажности
4	Желтая крупная цилиндрическая	69,7	4,7	20,9	6,3
11	Оранжевая средняя цилиндрическая	71,5	4,5	21,0	6,0
17	Красная средняя округлая	74,7	5,1	20,3	5,1

Из таблицы видно, что по содержанию влажности в плодах формы особо не отличаются друг от друга. Этот показатель особо не зависит от цвета, величины и формы плодов и составляет 65,4-77,4% от массы плодов.

Относительно низкая влажность у оранжевых и красных мелких плодов, самая высокая влажность у оранжевой крупной формы. Что касается масличности, то этот показатель также особо не зависит от величины и формы плода. Однако от цвета плодов зависит повышение содержания масла, например у некоторых красных форм масличность составляет до 8,4%. Помимо влажности и масличности в плодах семнадцати форм было определено содержание каротиноидов. Эти данные приведены в таблице – 3.1.3.

Содержание каротиноидов в плодах разных форм облепихи

№№	Форма	В плодах, мг/%		В масле плодов, мг/%
		с учетом общ. влажности	в сухих плодах	
4	Желтая крупная цилиндрическая	11,1	36,6	168,2
11	Оранжевая средняя цилиндрическая	12,3	43,1	213,6
17	Красная средняя округлая	22,2	87,9	433

Из таблицы видно, что содержание каротиноидов в общем не сильно зависит от величины и формы плода, но зато у красных форм этот показатель в 3-4 раза выше. То же самое наблюдается и по содержанию каротиноидов в масле плодов.

3.2. Исследование корневой системы различных форм облепихи

Почва, как окружающая среда, отличается стабильностью, а значит влияние ее на корни растений многих поколений вида постоянно и продолжительно. Вследствие этого в разных частях ареала вида, отличающихся экологическими условиями и прежде всего, комплексом эдафических факторов, могут формироваться популяции с различными морфологическими признаками корневой системы. Известно, что на юге, в засушливых областях, а также на песчаных почвах корни плодовых и ягодных культур располагаются глубже, что является приспособлением их к недостатку влаги. Высокий уровень грунтовых вод, а также избыток влаги в почве обуславливают слабое развитие корневой системы [31].

Природные местообитания *H.rhamnoides*, ее экотоп – это поймы рек, берега озер и морей. Однако в различных частях естественного ареала облепихи эдафические условия экотопа неодинаковы. Эти различия могут иметь место даже в пределах популяции. В результате в широких межгорных долинах, на равнине, где степень увлажнения корнеобитаемого слоя выше вследствие близости подпочвенных вод, у облепихи формируется слаборазветвленная поверхностная корневая система. Такие морфологические особенности характерны для облепихи из низовьев реки Катунь (Алтайский край) [10].

Высокогорная облепиха южного происхождения (особи популяций рек Каратал и Баксан), а также сибирские образцы из популяций, сформировавшихся в засушливых условиях Бурятии и Тувы, отличаются более развитой корневой системой. Корневая система калининградской облепихи, произрастающей на примитивных песках Балтийского побережья, с относительно глубоким стоянием подпочвенных вод, имеет глубокопроникающие вертикальные корни. Суровые условия Саянских гор, маломощный гумусовый горизонт, близкое залегание вечной мерзлоты не позволяет облепихе восточно-саянских популяций формировать мощную корневую систему [70, 71, 72].

Облепиха имеет важную биологическую особенность. Независимо от происхождения и индивидуальных свойств особи облепихи на водоразделах формируют сильно разветвленную корневую систему. Этот факт отмечен и другими авторами, изучавшими корневую систему облепихи на разных типах почв [13, 8].

Массовое обрастание обрастающих корней и их усиленное ветвление происходит уже в однолетнем возрасте. Эта особенность является ответной реакцией прежде всего на недостаток влаги в почве. Если какой-нибудь из экологических факторов отклоняется от оптимального для данного вида, в растении происходит структурно-функциональная перестройка отдельных его органов, регулируемая генетическими и физиологическими механизмами.

Свойство формировать хорошо разветвленную корневую систему было уже в геноме предковых форм облепихи, сформировавшихся в горах, так как высокогорные растения отличаются повышенной способностью к образованию сильноразветвленных корней. Для них же характерно сосредоточение корней в верхних горизонтах почвы. Затем, произрастая длительное время на увлажненных местообитаниях речных долин и морских побережий, корневая система облепихи модифицировалась и приобрела гидроморфные черты [16, 17, 18].

Особенности формирования корневой системы облепихи в естественных условиях сохраняются и при интродукции. Причем различия проявляются уже на ранних этапах онтогенеза, что свидетельствует об их генетической обусловленности. Эти различия являются результатом эдафической изменчивости (действия почвенно- гидрологических условий). Облепиха различного происхождения на водоразделах, в отличие от естественных местообитаний, формирует сильноразветвленную мочковатую корневую систему. Эта закономерность является проявлением преадаптации в новых условиях выращивания и свидетельствует о филогенетическом единстве многочисленных популяций.

Корневая система облепихи изучалась многими авторами в различных почвенно-климатических условиях. Раскопки корней, проводившиеся в естественных условиях и в культуре, позволили установить, что на песчаной слоистой пойме и на черноземовидных супесчаных почвах алтайская облепиха имеет радиально расположенные, веревкообразные (шнуровидные), слаборазветвленные корни. По данным Ж.Гатина, у взрослых кустов, произрастающих в поймах рек Катунь и Обь, корневая система достигает протяженности по радиусам более чем 12 м, и основная масса корней находится на глубине 0,5-1 м.

Исследованиями А.П.Рыжкова и Т.С.Рыжковой [56] установлено, что корни 13 летних деревьев облепихи проникают до глубины 80 см, но основное их количество (до 86%) было сосредоточено в слое почвы 30-50 см.

На характер размещения корней и проникновение их в глубину, по мнению тех же авторов, оказывают влияние плотность почвы, а также карбонаты и крупный галечник, залегающие на глубине 70 и более сантиметров. Раскопки, проведенные в пойме низовья реки Катунь, показали что корни дикорастущей облепихи проникают на глубину залегания подстилающих пород (до 1 м), однако основная их масса сосредоточена в горизонте 50-80 см.

И.П.Елисеев с соавторами [13 14] изучали морфологию корневой системы восточно-саянской и алтайской облепихи на светло-серых лесных суглинках и лугово-черноземных почвах в условиях Горьковской области. Было установлено, что облепиха на водоразделах, в отличие от речных пойм, имеет сильно развитую мочковатую корневую систему. Протяженность мелких обрастающих корешков толщиной до 3 мм составляет 50-74% от общей длины корней всех фракций. По мнению указанных авторов, образование сильноразветвленных обрастающих корней у облепихи является приспособлением к новым местообитаниям, как реакция на недостаточное увлажнение. Исследованиями вышеупомянутых авторов установлено, что нет каких-либо существенных различий в строении корневой системы у растений мужского и женского пола.

Сведения о корневой системе облепихи в культуре ограничены и касаются в основном алтайских [14, 73] и восточно-саянских [13] образцов. По данным А.П.Рыжкова и О.Н. Маслюк [56]. в саду Омского сельскохозяйственного института на выщелоченном черноземе основная масса горизонтальных корней как женских, так и мужских растений облепихи, залегает в слое почвы 0-30 см, вертикальных – 30-120 см. У мужских растений корневая система распространяется в радиусе 4 м и на глубину до 2,7 м, а у женских – в радиусе до 1 м на глубину до 2,2 м.

По данным И.П.Елисеева и И.А.Мишулиной [13], на светло-серых почвах Нижегородской области, на водоразделах девятнадцатилетние растения имели сильно развитую мочковатую корневую систему, которая у

высокорослых форм достигала глубины 120-140 см, а у низкорослых – 80-120 см. Диаметр корневой системы высокорослых кустов в 1,3-1,5 раза превышал диаметр их кроны, у низкорослых, соответственно, в 2,3-3,0 раза. По сообщению И.М.Ващенко [8], корневая система облепихи на бедных песчаных почвах располагается поверхностно. Максимум корней приходится на слой 20-40 см, где температура почвы, увлажнение и аэрация оптимальные. Диаметр корневой системы - 8-9 м.

Как указывалось выше, в наших условиях изучение корневой системы проводилось впервые методом монолита [31]. Раскопки корневой системы плодоносящих растений (возраст 6 лет) проводили в конце мая – первой половине июня. Корни извлекались из почвы послойно, через каждые 20 см, и после промывки сортировались по толщине на четыре фракции: с диаметром до 1мм, от 1 до 3 мм, от 3 до 8 мм и более 8 мм. Затем корни каждой фракции измеряли по длине миллиметровой линейкой.

При раскопке корней мы изучили распределение корней различных форм облепихи по горизонтам почвы. Результаты наших исследований приведены в таблице - 3.2.1.

Таблица – 3.2.1

Распределение корней различных форм облепихи по горизонтам почвы

№№	Глубина, см	Желто- плодная		Оранжево- плодная		Красно- плодная		Мужское растение	
		м	%	М	%	м	%	м	%
1	0-20	599,5	66	376,7	38	397,9	42	639	52
2	20-40	181,4	20	203,9	20	320,3	33	379,9	31
3	40-60	68,9	7	244,8	25	102,4	11	116,4	9
4	60-80	35,6	4	112,6	11	95,0	10	56,7	5
5	Более 80	26,1	3	64,2	6	43,6	4	39,2	3

Данные таблицы 3.2.1 показывают, что основная масса корней (до 90%) сосредоточена в слое почвы 0-40 см. Неглубокое проникновение корней является наследственно обусловленным признаком для облепихи, многочисленные популяции которой длительное время формировались в поймах рек в зоне достаточного увлажнения, где нет необходимости развивать растениям глубоко проникающие корни в поисках влаги. Корневую систему, глубже проникающую в почву, имеет оранжево-плодная облепиха, у которой до 25% корней находится в горизонте почвы 40-60%. Оранжево-плодная облепиха произрастает в более засушливых и отдаленных от реки условиях, вследствие чего ее особи отличаются более глубокой проникающей корневой системой.

Помимо вышеизложенного, нами измерялась длина корней различных форм облепихи по фракциям. Полученные результаты представлены в таблице -3.2.2.

Таблица – 3.2.2.

Длина корней различных форм облепихи по фракциям

№№	Форма	Общая длина, м	Длина корней по фракциям, %		
			до 1 мм	1-3 мм	более 3 мм
1	Желтоплодная	911,5	64	28	8
2	Оранжевоплодная	930,2	68	27	5
3	Красноплодная	959,2	65	28	7
4	Мужское растение	1002,2	43	43	14

Наши исследования показали, что все изученные формы имеют хорошо развитую мочковатую корневую систему. На долю мелких обрастающих корешков (толщиной до 3 мм) приходится от 85 до 95% общей длины корней растения.

Кроме этого, при раскопке корней облепихи нами были обнаружены коралловые образования, которые могут встречаться в верхней части корневой системы. Как известно, они чаще всего образуются азотфиксирующими актиномицетами рода *Frankia*, которые являются аэробными организмами с септированным мицелием, образующим спорангии. Они образуют сначала выступы уплощенной формы на корне, что позволяет отличить их от конических выступов боковых корней.

Нами было обнаружено, что у исследованной нами облепихи корневые клубеньки не совсем крупные и представлены в виде густых сплетений корней, разветвленных наподобие кораллов), которые в основном формируются на боковых корнях. Больше всего клубеньков было обнаружено на боковых корнях, находящихся в верхнем слое (5-20 см) почвы. Рассмотрение микроорганизмов показало, что они проникает в корни из почвы через корневые волоски, которые в результате скручиваются. В месте инфицирования стенки корневого волоска утолщаются и гифы, проникшие внутрь клетки, покрываются толстым чехлом. По мере продвижения гиф по корневым волоскам чехол утоньшается и вокруг гиф формируется капсула, которая, как считают, образуется как растением, так и актиномицетом.

Из корневого волоска гифы проникают в эпидермис и кору корня, вызывая деление и гипертрофию инфицированных клеток. Клубки гиф заполняют центр клеток растения, у клеточных стенок происходит расширение и деление концов гиф, затем формируются специфические структуры, так называемые везикулы размером 3-5 мкм, развивающихся на терминальных окончаниях гиф интеркалярно или на коротких выростах мицелия, нанизываясь подобно бусинам. Везикулы могут быть окружены капсульным слоем, толщина и плотность которого варьирует в зависимости от возраста и состояния растения-хозяина.

Таким образом, наши исследования показали, что все изученные формы облепихи имеют хорошо развитую мочковатую корневую систему,

основная масса которых сосредоточена в слое почвы 0-40 см. Оранжевоплодная облепиха имеет относительно длинные корни, которые находятся в горизонте почвы 40-60 см и на долю мелких обрастающих корешков (толщиной до 3 мм) приходится от 85 до 95% общей длины корней растения. Клубеньки на корнях располагаются в любом месте, по размеру не совсем крупные и, в основном, формирующиеся на боковых корнях.

3.3. Исследование клубеньковых образований корневой системы облепихи

На стержневых и боковых корнях облепихи, как и у других представителей семейства лоховых (лох, шефердия), имеются корневые клубеньки, развивающиеся в виде коралловидных образований. Исследователями установлено, что эти образования практически в состоянии обеспечить всю потребность растения в азоте (грибы микоризы фиксируют азот из почвенного воздуха). Поэтому облепиха может расти и на почвах, бедных минеральным азотом. В литературе имеются сведения, что для лучшего роста молодых растений в зону корневой системы следует вносить почву из-под взрослой облепихи, уже обогащенной микрофлорой. Семена, черенки или саженцы обрабатывают настоем из клубеньков взрослого растения облепихи. Опыты показали, что это имеет определенное значение для сеянцев.

Клубеньки на корнях облепихи лучше образуются в рыхлой почве с нейтральной реакцией. На очень кислых почвах (рН 3-4) облепиха не образует их и почти не растет, на среднекислых (рН 4-5) и слабокислых (рН 5-6) почвах у растения вырастает очень мало слаборазвитых клубеньков и оно также плохо растет.

Больше всего клубеньков образуется на боковых корнях, находящихся в верхнем слое (5-20 см) почвы. Существует мнение, что, помимо фиксации молекулярного азота воздуха, клубеньковые образования выполняют

функции поглощения, минерализации органических веществ почвы, перевода трудно растворимых минеральных и органических соединений в усвояемые формы. Микроорганизмы, симбиотические связанные с корнями облепихи, видимо, снабжают растение витаминами регуляторами роста. Эти особенности питания облепихи следует учитывать при освоении новых земель. Корневые клубеньки облепихи состоят из тех же тканей, что и корни.

Клубеньки представляют собой видоизмененные под влиянием инфекции корни. Место сосредоточения инфекции в клубеньках - коровая паренхима. По наличию разветвленного мицелия, сравнительно крупному размеру (0,6-0,7 мкм), а также по своим структурным особенностям возбудитель корневых клубеньков облепихи, по Майстренко, может быть отнесен к представителям порядка актиномицетов (*Actinomycetales*), т. е. она присоединилась к выводу, высказанному более ста лет назад крупным микологом М. С. Ворониным. В сводной работе по симбиозу у небобовых древесных растений на примере облепихи Г. Г. Майстренко [42] повторила свое заключение. С. Серветтаз опытным путем выяснила значение клубеньков. Она протравила семена облепихи, высеяла их в горшок со стерильной почвой и поливала дистиллированной водой. Из 33 полученных сеянцев 30 не имели клубеньков. Эти сеянцы она разделила на две группы по 15 экз. Корни одной намочили в настое из растертых клубеньков, другую высадили в качестве контроля, без привития возбудителя клубеньков. В результате сеянцы первой группы образовали клубеньки на корнях и развивались нормально, а контрольные погибли.

По нашим наблюдениям корневые клубеньки на корнях сеянцев облепихи начинают появляться при наличии у них 4-5 пар листьев (кроме семядолей) - в начале июня. В опытных посевах у сеянцев в конце мая - первой 5-дневке июня в 2010 г. корневых клубеньков не было; в начале II декады июня они встречались у части сеянцев в виде небольших белесоватых бугорков. Позднее их стало много на корнях большинства выкопанных сеянцев; увеличился и размер клубеньков. Чаще всего клубеньки

встречаются при первом их появлении на стержневом корне, реже — на боковых корешках.

Корневые клубеньки могут развиваться в продолжение всего вегетационного периода и связаны с ритмом (сезонами) развития корней. Корневые клубеньки - многолетние образования. У взрослых растений облепихи они достигают достаточно крупных размеров - до 3-4 см, иногда даже больше наряду с большим количеством более мелких образований. Молодая (наружная) часть клубенька обычно пергаментно-белая, старая (внутренняя) - коричневая. Такие клубеньки обычны на боковых корнях, чаще - в узлах их ветвления. При разведении облепихи на сероземных почвах на корнях сеянцев корневые клубеньки появляются без внесения их со стороны. По этому поводу можно высказать два предположения: или возбудители клубеньков передаются с семенами облепихи, или же они находятся в самой почве.

В связи с тем, что у нас в лабораториях не имеется светового микроскопа, мы для изучения ультраструктуры клубеньковых образований облепихи собрали образцы коралловых образований с корневой системы различных форм облепихи и отправили в Новосибирск, в лабораторию института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской Академии Наук, где они были проанализированы.

Ультраструктура корневых клубеньков актиноризных, в том числе и лоховых растений хорошо изучена [95, 96, 41, 42, 2]. По данным световой и электронной микроскопии, в корневых клубеньках лоховых растений показано образование в корневой паренхиме увеличенных по размерам клеток инфицированных эндофитом франкия. Инфекционная зона концентрируется в виде компактной области и заметно выделяется на фоне неинфицированной меристемы и сосудистой системы, занимающей центральную часть клубенька (рис-3.3.1). 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. Другого способа попадания инфекции в ткань не наблюдалось. По литературным данным, известен также способ проникновения франкий через корневой волосок [92].

В клетках клубенька эндофит лоховых растений представлен двумя морфологическими формами: гифами и везикулами (рис-3.3.2). Образования спорангиев в инфицированной ткани лоховых растений нами не наблюдалось. С гифами эндофита связана первичная фаза инфекции. Мицелий эндофита тонкий, 0,8 мкм в диаметре. Заметной его особенностью является разветвленность и образование септ. 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 [92, 102].

По своей функции везикула является аналогом симбиосомы в бо-бово-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

Рис. 3.3.1- Эндодит лоховых растений в ткани (а), в инфицированных клубеньках и межклетнике клубеньков
(ИК – инфицированная зона клубенька; К- неинфицированная;
Э – эндодит; ВК – вакуоли; Я – ядро; Г –гифа)

Рис -3.3.2.Ультраструктура инфицированной ткани облепихи
(Г- гифа эндодита; В –везикула; Н – нуклеоид; С –септа).

клубенька. Во второй половине мая на концах разветвлений гиф появляются первые единичные везикулы. Молодые везикулы значительно меньше зрелых (рис.-3.3.3).

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

В октябре в клетках инфицированной ткани лоховых растений отмечено появление деградирующих везикул (рис. 3.3.4).

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-3.3.1.

Таблица-3.3.1

Число и состояние везикул в одном поле зрения

Увеличение x 10 тыс.

Месяц	Число везикул			
	всего	без септ	септированные	дегради
Май	2,4 ± 0,3	2,4 ± 0,3	0 4,0 ± 0,6 1,3 ± 0,1	0
Август	5,2 ± 0,4	1,2 ± 0,1		0

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 [2] площадь инфицированных клеток к этому периоду возрастает в среднем на 20 %. Следовательно, можно полагать, что в летний (августовский) срок

Рис . 3.3.3 - Ультраструктура инфицированной ткани клубеньков облепихи (МВ –молодая везикула; ЗВ – зрелая везикула; М –митохондрия; ОМ – окружающая мембрана).

Рис. 3.3.4 - Ультраструктура инфицированной клетки облепихи (В –дегенеративные формы везикул).

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*, показали, что в условиях Зарафшанского заповедника имеется большая продолжительность периода азотфиксации и 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.

ВЫВОДЫ

1. Облепиха крушиновидная является ценным плодовым, лекарственным, техническим и декоративным растением Узбекистана.
2. На территории Зарафшанского заповедника облепиха крушиновидная представлена древесными и кустарниковыми формами и она различается по следующим показателям: по возрастному составу, по полу, по высоте, по степени покрытия площади, по цвету, форме, размеру плодов, по степени урожайности.
3. На территории Зарафшанского заповедника широко представлены желто, оранжево и красноплодные формы облепихи.
4. Выделенные формы отличаются по химическому составу плодов, в частности по содержанию жирного масла, каротиноидов и жирнокислотному составу масла.
5. Все изученные формы облепихи имеют хорошо развитую мочковатую корневую систему, основная масса которых сосредоточена в слое почвы 0-40 см. Оранжевоплодная облепиха имеет относительно длинные корни, которые находятся в горизонте почвы 40-60 см и на долю мелких обрастающих корешков (толщиной до 3 мм) приходится от 85 до 95% общей длины корней растения.
6. Клубеньки на корнях располагаются в любом месте, по размеру не совсем крупные и в основном, формирующиеся на боковых корнях. У взрослых растений облепихи они достигают достаточно крупных размеров - до 3-4 см, иногда даже больше наряду с большим количеством более мелких образований.
7. Корневые клубеньки на корнях сеянцев облепихи начинают появляться при наличии у них 4-5 пар листьев (кроме семядолей) - в

начале июня. Чаще всего клубеньки встречаются при первом их появлении на стержневом корне, реже - на боковых корешках.

8. В клетках клубенька эндофит лоховых растений представлен двумя морфологическими формами: гифами и везикулами. Мицелий эндофита тонкий, 0,8 мкм в диаметре. Заметной его особенностью является разветвленность и образование септ
9. Везикулы эндофита, достигающие 5 мкм в диаметре, появляются во второй фазе инфицирования растительной клетки как расширенное и увеличенное в размерах окончание разветвлений гиф. С везикулами эндофита связана ее главная функция – способность фиксировать атмосферный азот, что коррелирует с локализацией в них нитрогеназного комплекса.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПРОИЗВОДСТВУ

Результаты проведенных исследований могут быть использованы для культивирования облепихи крушиновидной по берегам рек Узбекистана в целях повышения плодородия почв.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абертене Д.Ю., Малаховских А.И. Совместное действие цитостатического препарата и облепихового масла на рост сарком М-1 у крыс и на гематологические и биохимические показатели (сарколизин).// Труды АН Лит. ССР. 1974. № 3. С. 181-184.
2. Андреева И.Н., Тибиллов А.А., Ильясова В.Б., Жизневская Г.Я. Ультраструктура азотфиксирующих клубеньков у сеянцев облепихи // Физиол. растений. 1980. Т. 27. Вып. 4. С. 791–793.
3. Андреева И.Н., Федорова Е.Э., Ильясова В.Б., Тибилов Ф.Ф. Ультраструктура азотфиксирующих и зимующих клубеньков однолетних саженцев облепихи и лоха // Физиол. растений. 1982. Т. 29. Вып. 1. С. 127–132.
4. Асеева Т.А., Найданова Ц.А. Облепиха крушиновая // Пищевые арстения в Тибетской медицине. Улан_Удэ, 1983. С.61, 114.
5. Балицкий К.П., Воронцова А.П., Карпухина А.М. Лекарственные растения в терапии злокачественных опухолей. Киев: здоровье, 1966. 231 с.
6. Биологическая фиксация азота. Новосибирск. Наука. 1991
7. Букштынов А.Д., Трофимов Т.Т., Ермаков Б.С. Облепиха. Москва. Лесная промышленность, 1978, с. 191.
8. Ващенко И.М. Реакция облепихи на почвенно-климатические условия //Состояние и перспективы развития культуры облепихи в Нечерноземной зоне РСФСР. М.: Наука, 1986.
9. Вигоров Л.И. Облепиха. Сад лечебных культур. Свердловск, 1976. С.69-72.
10. Гатин Ж.И. Облепиха. М.:Сельхозиздат, 1963. - 159 с.
11. Джафаров А.Ф., Рязанова О.А. Биохимический состав плодов облепихи на рекультивируемых землях // Садоводство. 1984. № 5. С. 24.
12. Егорова С.В., Степанова М.Ф. Биомасса различных групп микроорганизмов в ризосфере и на поверхности древесных растений. В: "Вопросы численности биомассы и продуктивности почвенных микроорганизмов", Ленинград, 1972, 192-198.

13. Елисеев И.П., Мишулина И.А. Корневая система облепихи на светло-серых почвах Горьковской области //Тр. ГСХИ. 1972. Т.38. С. 99 - 106.
14. Елисеев И.П., Логинова В.Н. Корневая система облепихи на лугово-черно-земных почвах Горьковской области //Тр. ГСХИ, 1976. Т. 100. С. 30 - 33.
15. Елисеев И.П., Фефелов В.А., Мишулина И.А. Биологически активные вещества в плодах облепихи Северного Кавказа и Средней Азии. Труды Горьковского СХИ, 1976, том 100, с. 42-45.
16. Елисеев И.П. Экологические и генетические аспекты формообразования у облепихи в природе и культуре //Биология, химия, интродукция и селекция облепихи. Сб. науч. тр. ГСХИ.- Горький, 1986, С. - 3 - 16.
17. Елисеев И.П. Эколого-генетические аспекты создания адаптивных сортов облепихи для различных географических районов Европейской части СССР // Биология, селекция и агротехника плодовых и ягодных культур. Сб. науч. тр. ГСХИ.- Горький, 1987. С. 5-14.
18. Елисеев И.П., Андреанов С.И., Сурков А.И. Морфология корневой системы прибалтийской облепихи на светло-серой лесной почве Приочья. //Вопросы физиологии и биохимии культурных растений. Сб. научн. тр. /НГСХА.- Н. Новгород, 1995. С. 108 - 118.
19. Зайцев Г.Н. Оптимум и норма в интродукции растений. М.: Наука, 1983. 258 с.
20. Закиров К.З. Флора и растительность бассейна р.Зарафшан. Часть 2 Конспект флоры. Ташкент, АН УзССР, 1961. Облепиха, с. 275.
21. Икрамов М.И. , Кабулова Ф.Д. Морфологическая изменчивость форм облепихи крушиновидной в долине реки Зарафшан. В сб. Использование растительных ресурсов и повышение продуктивности культурных растений. Самарканд, 1981, с. 18-26.
22. Кабулова Ф.Д., Кабулов А.Д. , Сарымсаков З.Х. К биологии цветения и плодообразования облепихи крушиновидной в Самаркандской области. В сб.

Перспективные сырьевые растения Узбекистана и их культура. Изд. «Фан» УзССР, 1979, с. 96-98.

23. Кабулова Ф.Д. О размножении облепихи в условиях Самаркандской области. Тезисы докладов республиканской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Туркменистана. Ашхабад, 1980, с.125.

24. Кабулова Ф.Д. О введении в культуру облепихи крушиновидной в Узбекистане. «Материалы республиканской научно-практической конференции Интродукция растений: проблемы и перспективы» Хива, 2003, стр.29-30.

25. Кабулова Ф.Д., Бабаджанов Ф.Н. Особенности зарафшанской популяции облепихи (*Hipporhae rhamnoides* L.) и перспективы ее практического применения. Материалы международной научной конференции :»Развитие ботанической науки в Центральной Азии и ее интеграция в производство», Ташкент, 2004, с.399-400.

26. Калакуцкий Л.В., Агре Н.С. "Развитие актиномицетов", М., Наука, 1977.

27. Калакуцкий Л.В., Кузнецов В.Д. Новый вид рода *Actino-planes Couch-Actinoplanes armeniacus* n.sp.И некоторые особенности его спорообразования, Микробиология, 1984, т.33, вып.4, стр.613-621.

28. Калакуцкий Л.В., Парийская А.Н. Азотфиксирующие симбиозы актиномицетов с растениями. Изв. АН СССР, сер. биол., 1982, 2, стр.255-269.

29. Калинина И.П. Облепиха //Наука СССР, №2, 1988. С. 80 - 87.

30. Кириллова Н.П., Стасевич Т.А., Кожевин П.А., Звягинцев Д.Г., Динамика популяций бактерий в системе почва-растение.--Микробиология, 1981, т.50, вып.1, стр.128-133.

31. Колесников В.А. Корневая система плодовых и ягодных растений и методы ее изучения. – М.: Изд-во с.-х. литературы, журналов и плакатов, 1962, с. 72.

32. Кондрашов В.Т. К методике описания дикорастущих форм облепихи. Раст. Ресурсы, том XIII, вып. 1, 1977, с. 140-144.

33. Красильников Н.А. "Лучистые грибки и родственные им организмы", М., Изд-во АН СССР, 1938.
34. Красильников Н.А. "Лучистые грибки. Выспи© формы", М., Наука, 1970.
35. Красильников Н.А., Гаркина Н.Р. Групповой состав лучистых грибков в актиномикозных узлах. В сб.: "Биология отдельных групп актиномицетов", под ред. Красильников Н.А., Изд-во Наука, 1965, стр.269-293.
36. Куликов В.В. Лекарственные растения Алтайского края. Барнаул, 1975. 193 с.
37. Лагеръ А.А. Облепиха в доме. Земля сибирская, дальневосточная. 1986. № 3. С.52.
38. Линчевская А.А. Содержание Маловых кислот при введении этанола в изолированном и в сочетании с четыреххлористым углеродом виде. Влияние облепихового масла . // Экспериментальная патология печени, Алкоголь и печень. Душанбе, 1976. С. 134-138.
39. Лобжанидзе В.Э. Противоэрозионная роль облепиховых зарослей в Дарьяльском ущелье (Грузинская ССР) // Биологические аспекты интродукции, селекции и агротехники облепихи. Горький, 1985. С. 164-168.
40. Ломака М.Д. Облепиха как закрепитель склонов // Лес и степь. 1952. № 6. С. 79.
41. Майстренко Г.Г., Яковлева З.М., Майстренко А.Г. Особенности ультраструктуры эндофита *Hirporhae rhamnoides* L. // Микробиология. 1974. Т. 43. Вып. 3. С. 504–507.
42. Майстренко Г.Г. Симбиоз у небобовых древесных растений на примере облепихи // Структурные и функциональные связи высших растений и микроорганизмов: Сб. статей. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1977. С. 17–55.
43. 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. X V. Вып. 4. С. 531–537.

44. Малишкайте Ю.Б. "Таксономическое положение актиномицетов актиноризы и ризосферы небобовых растений". Дисс. на соискание ученой степени кандидата биол.наук, Москва, 1984.
45. Мансурова И.Д., Ковалева Н.К. Содержание РНК и ДНК в печени и тимусе крыс при отравлении их этанолом и четыреххлористым углеродом. Влияние облепихового масла.// Экспериментальная патология печени. Алкоголь и печень. Душанбе, 1976. С.114-118.
46. Мансурова И.Д., Линчевская К.С. Облепиховое масло – стабилизатор биологических мембран. Фармакология и токсикология. 1978.Т.41. № 1. С. 105-109.
47. Матафонов И.И. Облепиха (влияние на организм животного). Новосибирск: Наука, 1983. 165 с.
48. Мишустин Е.Н., Шильникова В.К. "Биологическая фиксация атмосферного азота". Изд-во Наука, Москва, 1968.
49. Мишустин Е.Н., Шильникова В.К. "Клубеньковые бактерии и инокуляционный процесс". Изд-во Наука, Москва, 1973.
50. Мочалов В.В. Ку л ь т у р а облепихи в условиях леса и лесостепи Новосибирской области // Облепиха в культуре: Сб. статей. Барнаул, 1970. С. 29.
51. Олзийхутаг А. Влияние облепихового масла на клиническое проявление и показатели липидного обмена у больных атеросклерозом и на течение экспериментального атеросклероза: автореф.дис.канд.наук. Улан-Уде, 2001. 17 с.
52. Петровский К.С. Облепиха. Биологическая ценность. Садоводство. 1976. №8. С. 19-20.
53. Плеханова М.Н. Облепиха. Л., 1988, 79 с.
54. Попов В.В. Облепиха и дефляция почв. // Вестник сельскохозяйственной науки. 1967. № 8. С. 22-25.
55. Пухальская Е.Г., Петрова М.Ф., Меньшиков Г.П. 5-окситриптамиин из *Hipporhae rhamnoides* как противоопухолевый препарат в опытах на

животных. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1960. № 10. С. 105-110.

56. Рыжков А.П. Структура и мощность корневых систем плодовых и ягодных культур в Западной Сибири // Агротехника и биология пл-яг. и овощных культур в Зап. Сибири. Омск.:Изд-во Омского СХИ, 1983. - С. 10 - 12.

57. Салатова Н.Г., Литвинчук Л.Н., Жуков А.М. Облепиха в Сибири. Изд. Наука. Сибирское отделение. Новосибирск, 1974, с. 132.

58. Сарымсаков З.Х. Облепиха крушиновидная в Южном Кыргызстане. Жалалабат, 2004, 130 с.

59. 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.

60. Симаков И.Н., Дудкин Г.И., Маткаримова Р.К. Особенности размещения корневой системы облепихи в Каракалпакии // Вестн. Каракалпакского ФАН Узб.ССР, 1984, №2. С. 41 - 44.

61. Скуридин Г.М. Биологические особенности облепихи // Облепиха в лесостепи Приобья: Сб. статей. Новосибирск, 1999. С. 6–28.

62. Структурные и функциональные связи растений и микроорганизмов. Новосибирск. Наука. 1977.

63. Суетин С.О. Способ подготовки образца для электронно-микроскопических исследований ризосферы корней высших растений. Авторское свидетельство № 794075, ИБФМ, 24.07.1979.

64. Суетин С.О., Парийская А.Н., Калакуцкий Л.В., Электронно-микроскопическое изучение цикла развития актиномицета эндосимбионта в азотфиксирующих клубеньках на корнях *Ainus glutinosa*. -Микробиология, 1980, т.44, вып.4, стр.604-607.

65. Титов Е.И. Культура облепихи в Монголии. // Новости с.-х науки и практики. 1968. № 5. С.49-51.

66. Трофимов Т.Т. Облепиха в культуре. М.: Изд-во МГУ, 1976. - 160 е.

67. Трофимов Т.Т. Облепиха. М.: Изд-во МГУ, 1988.-224 с.
68. Турецкова В.Ф., Азарова О.В. О возможности рационального использования отходов возделывания облепихи. Материалы III Международного симпозиума по облепихе. Новосибирск, 1998. С. 107-109.
69. Файман Б.А., Кошелев Ю.А. Облепиховое масло и его применение в медицине. Барнаул: Алт. Книжн. Изд-во, 1975. 70 с.
70. Фефелов В.А., Ивашин И.И., Шелехов В.А. Корневые системы сеянцев некоторых популяций облепихи на светло-серых лесных почвах Горьковской области //Плодовые и ягодные культуры. Сб. научн. тр. ГСХИ. Горький, 1983.-С. 52-57.
71. Фефелов В.А. Морфобиологические особенности корневой системы облепихи различного происхождения //Биология , селекция и агротехника плодовых и ягодных культур. Горький, 1987а. - С. 84-91.
72. Хайлова Г.Ф., Тибилов А.Н., Симонов И.Н. Структура клубеньков облепихи и их азотфиксирующая активность //Изв. ТСХА, 1981. Вып. 5. С. 181 -186.
73. Царькова Т.Ф. Корневая система облепихи на дерново-подзолистых почвах Московской области //Прогрессив. способы возделывания и сортоизуч. ягод, культур. -М., 1985. С. 14 - 23.
74. Шишкина Е.Е. Селекция облепихи на улучшенный химический состав. В кн.:«Облепиха в культуре». Барнаул, 1970, с. 54-57.
75. Шишкина Е.Е. Влияние метеорологических условий на масличность плодов облепихи //Биологически актив, вещ-ва плодов и ягод. Мат-лы V Все-союз. Семинара (27-28 марта 1975г.). -М. 1976. С. 101 - 104.
76. Шишкина Е.Е. Биохимический состав плодов облепихи. В кн. Облепиха., М., Лесная промышленность , 1978, с. 173-177.
77. Шишкина Е.Е., Лоскутова Г.А., Архипова Т.Н. Биохимическая характеристика сортов облепихи селекции НИИСС им. М.А.Лисавенко //Биологические аспекты интродукции, селекции и агротехники облепихи: Сб. научн. тр. /ГСХИ. Горький, 1985. - С. 117 - 122.

78. Шнайдман Л.О., Шугам Н.А. Биологически активные вещества масла облепихи. В кн. Труды по витаминам из природного сырья. Уфа, 1971, с.186-189.
79. Юдкина Л.Н. Опыт применения масла облепихи при некоторых кожных заболеваниях. Вестник венерологии и дерматологии. 1954. № 2. С.20.
80. Яковлева З.М. Бактероиды клубеньковых бактерий. Новосибирск. Наука. 1975.
81. Baker D.A cumulative listing of isolated Frankia, the symbiotic nitrogen fixing actinomycetes. The Actinomycetes, 1982-1983, 17, 1, pp.35-42.
82. Baker D., CPKeefe M. A modified sucrose fractionation procedure for the isolation of Frankia from actinorhizal root nodules and soil samples. АЪз. workshop "Frankia symbiosis", Wageningen, Sept. 5-6, 1983.
83. Baker D., Torrey I., Kidd G.H. Isolation by sucrose-density fractionation and cultivation in vitro of actinomycetes from nitrogen-fixing root nodules. Nature, 1979, 281, 5726, pp.76-78.
84. Becking I.H. In vitro cultivation of alder root-nodule tissue containing the endophyte. Nature, 1965, 207, pp.885-887.
85. Becking I.H. Interactions nutritionelles plantes-actinomycetes. Ann,Inst.Pasteur, 1966, suppl.3, pp.211-254.
86. Becking I.H. Frankiaceae fam. nov.(Actinomycetales) with one new combination and six new species of the Genus Frankia Brun-chorst 1886, 174. Int. Journ.Syst.Bact., 1970, 20, 2, pp.201-220.
87. Becking I.H., Family IV. Frankiaceae, Becking, 1970. In "Bergey's manual of determinative bacteriology". Eds.: Buchanan R.E., Gibbons U.E. 1974, Baltimore, The Williams and Wilkins Company, pp.601-607.
88. Becking I.H. The genus Frankia. In "The prokaryotes. A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria". Eds.: Starr M.P., Stolp H., Truper H.G., Balows A., Schlegel H.G., 1981, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, pp.1991-2003.

89. Benson D. Isolation of Frankia strains from alder acti-norhizal root nodules. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1982, 44, 2, pp. 461-465.
90. Bond G. Root nodulos symbioses with actinomycete like organisms. In "The biology of nitrogen fixation". Ed.: Quis-pel A., 1974, North - Holland Publishing Co., Amsterdam, pp. 342--378.
91. 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.
92. 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.
93. Berry A. Recent developments in actinorhizal symbioses // *Plant and Soil*. 1994. V. 161. P. 133–143.
94. Callaham D., Tredici P.D., Torrey J.G. Isolation and cultivation in vitro of the actinomycete causing root nodulation in *Comptonia*. *Science*, 1978, 199, 4331, pp. 899-902.
95. Gartner E.M., Gardner I.C. Observation on the fine structure of the root nodule endophyte of *Hippophae rhamnoides* Ь.- *Arch. Mikrob.*, 1970, 70, 3, pp. 183-196.
96. Gardner J.C., Gartner 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.
97. Gardner I.C. Ultrastructural studies of non-leguminous root nodules. In "Symbiotic nitrogen fixation in plants." Ed.: Nut-man P.S., 1975, Cambridge Univer. Press, Cambridge, pp. 485-495.
98. Gartner 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.
99. Darmer G. *Der Sanddorn als Wild – und Kulturpflanze*. Leipzig, 1952. 89 s.
100. Dawson I.O. Ecology of actinorhizal plants // *Nitrogenfixing 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.
101. Eidelnant A.S. Seabuckthorn – a unique medicinal and food plant. Congress of the International Seabuckthorn Association – ISA, Berlin, Germany, 2003, p.30.
102. Huss-Danell K. Actinorhizal symbioses and their N₂ fixation // *New. Phytolog.* 1997. V. 136. № 3. P. 375–405.
103. Kala R., Hema P.S., Dwivedi S., Chaurasia O.P., Banerji A. Phytochemical research unit, regional research laboratory, trivandrum-695 019, India. Congress of the International seabuckthorn association- ISA/ Berlin, 2003 , p.23-24.
104. Katznelson H., Cole S.E. Production of gibberelin-like substances by bacteria and actinomycetes. *Can. Journ. Microb.*, 1965, 11, 4 , pp. 733-742.
105. Knowlton S., Berry A., Torrey J.G. Evidence that associated soil bacteria may influence root hair infection of acti-rhizal plants by *Frankia*. *Can. Journ. Microb.*, 1980, 26, 8, pp. 971-977.
106. Lalonde M., Calvert H.E., Pine E . Isolation and use of *Frankia* strains in actinorhizae formation. In "Current perspectives in nitrogen fixation ." Eds.: Gibson A.H., Newton W.E. Australian Acad. Sci., Canberra, 1981, pp. 296-299.
107. Lechevalier M.P., Horriere P., Lechevalier H. The biology of *Frankia* and related organisms. In "Development in industrial microbiology," Publication of the Society for industrial microbiology, 1982, 23 pp. 51-60.1» .
108. Niewiarowska I. Morphologie et physiologie des actinomycetes symbiotiques des Hippophae. *Acta Microb. Polonica*, 1961,10, pp. 271-286.
109. Quispel A., Burggraaf J.P. *Frankia*, the diazotrophic endophyte from actinorhizas. In "Current perspectives in nitrogen fixation." Eds.: Gibson A.H., Newton W., Austral. Academ. Sci., Canberra, 1981, pp. 229-236.
110. 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.
111. 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 of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy // *J. Cell. Biol.* 1963. V. 17. P. 208–212.
112. Torrey J.G. Nitrogen fixation by actinomycete-nodulated angiosperms // *Bioscience*. 1978. V. 28. № 9.
113. Fefelov V.A. New ways in the seabuckthorn breeding. Congress of the International Seabuckthorn Association – ISA, Berlin, Germany, 2003, p.31.