

УДК 582.632.1+582.866]:631.52

## ВЗАИМОСВЯЗЬ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ И АЗОТФИКСИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ КОРНЕВЫХ КЛУБЕНЬКОВ ОЛЬХИ ALNUS CRISPA (AIT) PURSH И ЛОХА ELAEAGNUS ARGENTEA PURSH

И. Н. АНДРЕЕВА, Я. В. ХРЖАНОВСКИЙ, Л. К. НИЦЭ  
(Кафедра микробиологии ТСХА, Институт физиологии растений  
им. К. А. Тимирязева АН СССР)

В настоящее время известно более 160 видов небобовых растений, которые, подобно бобовым, образуют на корнях клубеньки, фиксирующие атмосферный азот [15]. В основном это деревья и кустарники, относящиеся к покрытосеменным двудольным растениям. Небобовые азотфиксаторы встречаются в различных климатических поясах. В умеренном поясе в нашей стране произрастают виды родов *Alnus*, *Hippophae*, *Elaeagnus*, *Mugica*. Рядом исследователей проведены определения азотфиксирующей способности клубеньков ольхи, лоха и облепихи ацетиленовым методом и с помощью  $^{15}\text{N}$  [2, 9, 16, 17]. Размеры азотфиксации колеблются в зависимости от условий произрастания растений, их возраста (2—30 мкмоль  $\text{C}_2\text{H}_4$  на 1 г сырой массы в 1 ч). Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что азотфиксирующая активность клубеньков небобовых растений близка к таковой у бобовых растений. Так, максимальная азотфиксирующая активность у клубеньков сои в наших исследованиях составляла около 30 мкмоль, а у люпина — 10—12 мкмоль  $\text{C}_2\text{H}_4$  на 1 г сырой массы за 1 ч [5]. Накопление азота в почве в год за счет азотфиксации клубеньков разных видов ольхи, по данным ряда исследователей, колеблется от 28 до 200 кг/га [12, 25, 26]. Бобовые травы (клевер, люцерна) накапливают в пахотном слое почвы от 75 до 100 кг, люпин — около 30 кг азота на 1 га в год [7]. Данных по накоплению азота в почве под посадками лоха в литературе нет.

Благодаря способности корневых клубеньков ольхи и лоха фиксировать атмосферный азот эти растения могут расти на бедных азотом почвах. Многие виды ольхи используются для восстановления истощенных и потерявших структуру почв рудничных отвалов, эродированных почв, оползней, вулканических отложений, а также для колонизации почв после ухода ледников на севере. В ФРГ и Голландии ольху выращивают при подготовке песчаных почв к посадке леса. Ольха стимулирует рост древесных культур при смешанных посадках с тополем [14], елью, сосной [21], дугласовой елью [10]. Так, при смешанных посадках ольхи и дугласовой ели получено в 2 раза больше древесины, ель имела большую высоту и диаметр ствола, чем при выращивании в чистой культуре [16].

Лох также рекомендуется для облесения рек, каналов, водоемов, для укрепления эродированных почв. Обладая высокой за-

сухо- и солеустойчивостью, лох хорошо растет на солонцеватых и солончаковых каштановых почвах тяжелого механического состава в Казахстане [6]. Он используется для почвозащитных и пескоукрепляющих целей, высаживается в полезащитных лесных полосах в чистой культуре и в смешанных посадках в Узбекистане [1].

Американские исследователи [18] рекомендуют выращивать лох (*Elaeagnus umbellata*) в смешанных посадках с черным орехом (*Yuglans nigra* L.) для повышения урожая орехов.

Структура клубеньков и ультраструктура симбионта в клубеньках ольхи и лоха изучались рядом исследователей [3, 8, 11, 19, 22]. Эндосимбионтом у этих растений является актиномицет, отнесенный к роду *Frankia* [12]. Актиниомцет в клетках клубеньков представлен тремя формами: гифами, везикулами и бактериоподобной формой. По данным авторов [9, 13], основной азотфиксирующей структурой эндосимбионта является везикула. Ультраструктура гиф и везикул значительно изменяется в течение вегетационного периода, изменяется также число и структура оргanelл в инфицированных клетках клубеньков [3].

С целью установления взаимосвязи между процессом азотфиксации и состоянием эндосимбионта в клетках клубеньков нами исследовались азотфиксирующая способность клубеньков ольхи и лоха, а также ультраструктуры и числа везикул эндосимбионта в клетках клубеньков в течение вегетационного периода.

### Методика

Опыты проведены с двухлетними саженцами лоха *Elaeagnus argentea* Pursh и ольхи *Alnus crispa* (Ait.) Pursh, выращенными на опытном участке Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева АН СССР. Пробы брали с мая по сентябрь. Азотфиксирующую активность клубеньков определяли ацетиленовым методом, исходя из того, что количество восстановленного азота в виде нитрогеназного комплекса ацетилена прямо пропорционально количеству восстановленного атмосферного азота [5]. Количественное определение этилена проводили на газовом хроматографе Хром 4 (ЧССР). Азотфиксирующую активность выражали в микромолях образовавшегося этилена на 1 г сырой массы клубеньков за 1 ч инкубации.

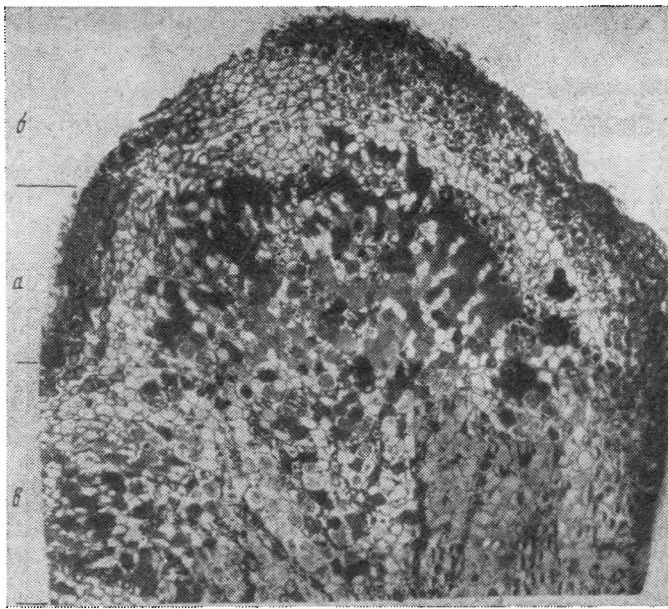


Рис. 1. Продольный срез лопасти клубенька ольхи.  
Зоны клеток: а — вновь инфицированных; б — с везикулами эндофита; в — с деградированным эндофитом.

Для электронно-микроскопического исследования пробы фиксировали в смеси 2,5 % глутарового альдегида и 2 % деполимеризованного параформальдегида в 0,1 М фосфатном буфере в течение 4 ч. После 3-кратной промывки тем же буфером проводили дофиксацию материала 1 %  $\text{OsO}_4$  в том же буфере [20]. Срезы делали на ультрамикротоме ЛКВ-7800 стеклянными ножами, подкрашивали насыщенным водным раствором уранилацетата (30 мин при  $50^\circ$ ) и лимоннокислым свинцом в течение 1—2 мин, затем просматривали в электронном микроскопе УЕМ-100 В.

Для световой микроскопии делали срезы с электронно-микроскопических препаратов (1—2 мкм толщиной) на пирамитоме ЛКВ-11800, окрашивали их метиленовым синим в 1 % буре, заливали в канадский бальзам и просматривали в микроскопе Ergoval (Карл Цейсе). На постоянных препаратах измеряли площади инфицированных и неинфицированных клеток в средней части клубеньков с помощью окулярмикрометра и подсчитывали числа везикул в клетке. Все полученные данные обрабатывали статистически.

### Результаты и их обсуждение

Исследованные нами лох и ольха относятся к разным семействам (Elaeagnaceae и Betulaceae) и инфицируются разными видами актиномицета (*F. elaeagni* и *F. alni*), отнесенными к роду *Frankia*. При перекрестном их заражении клубеньки не образуются.

У ольхи и лоха клубеньки одного типа [12], коралловидные, состоящие из большого количества лопастей, многолетние.

Каждый год у клубенька образуются новые лопасти, которые растут в течение всего вегетационного периода — с апреля по октябрь. Центральная часть клубенька при этом отмирает. На молодых корнях образуются новые клубеньки. Таким образом, в корневой системе находятся клубеньки разного возраста. Высокий уровень азотфиксации поддерживается молодыми клубеньками, так как у 2—3-летних клубеньков меньше активной ткани, чем у однолетних [24].

Нами исследовались весной вновь образовавшиеся лопасти на 1—2-летних клубеньках, а в середине и конце лета — и образованные в новом вегетационном периоде многолопастные клубеньки.

Клубеньки являются видоизмененными боковыми корнями с медленно растущей апикальной меристемой. На поперечном срезе лопасть имеет следующее строение. Снаружи находится слой эпидермальных клеток, далее расположена гипертрофированная коровая паренхима, часть клеток которой содержит актиномицет. Объем инфицированных клеток значительно больше, чем неинфицированных, содержащих фенольные соединения и крупные пластиды с крахмалом. В центре клубенька проходит проводящий пучок, окруженный эндодермой. В клетках проводящего пучка и эпидермальных эндофита не бывает.

На продольном срезе (рис. 1) в апикальной части клубенька находится меристема, клетки которой также никогда не инфицируются актиномицетом. Ниже видны клетки, в которые проникли гифы актиномицета — это зона начальной инфекции. Затем следует зона клеток, содержащих зрелую форму эндофита — гифы и везикулы. В базальной части лопасти клетки содер-

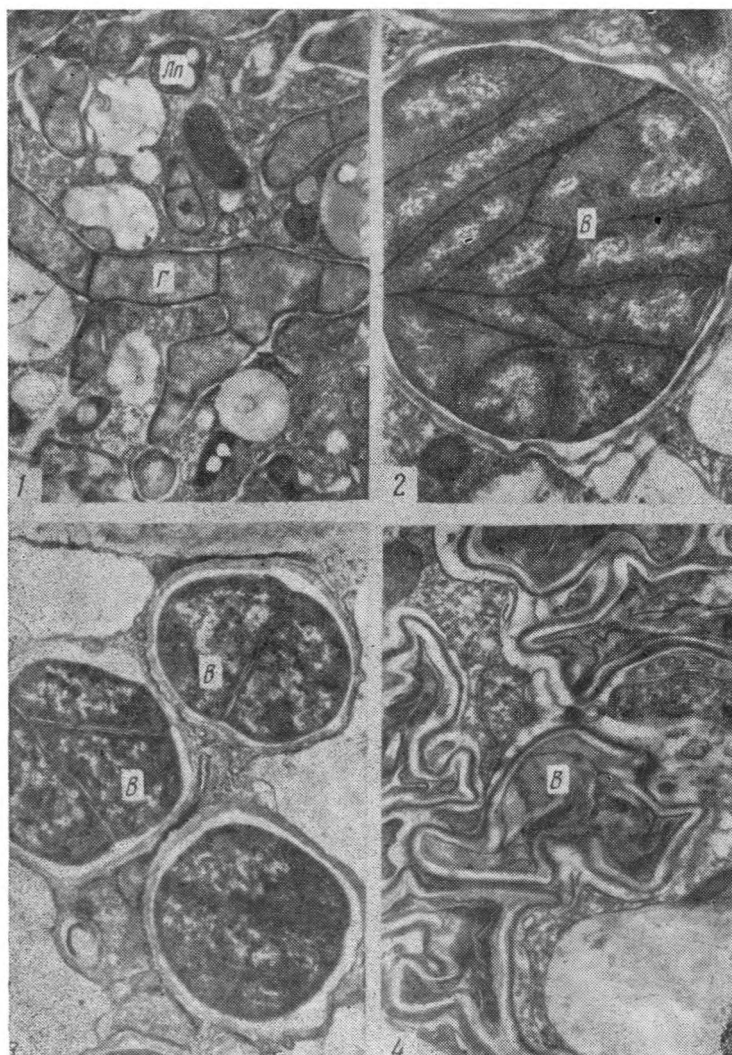


Рис. 2. Ультраструктура эндофита в клетках клубеньков ольхи.

1 — участок клетки с гифами (зона а); 2 — зрелая везикула с большим количеством септ; 3 — участок клетки со зрелыми везикулами (зона б); 4 — участок клетки с деградированным эндофитом (зона в).  
Г — гифа, В — везикула, Лл — лейкопласт.

жат эндофит в состоянии деградации.

Для установления взаимосвязи между интенсивностью процесса азотфиксации, с одной стороны, и состоянием ультраструктуры клеток клубенька и эндофита, с другой, нами было проведено электронно-микроскопическое изучение инфицированных клеток клубеньков одновременно с определением азотфиксирующей активности клубеньков. Особое внимание обращалось на состояние ультраструктуры эндофита и числа везикул в клетках средней части лопасти клубенька, так как эта зона характеризуется наиболее высокой азотфиксирующей активностью эндофита, о чем свидетельствуют данные, полученные Бекингом [13], работавшим с ольхой.

В зоне начальной инфекции в клетках преобладает мицелиальная форма эндофи-

та (рис. 2, а и 3, а). Гифы в растительной клетке ветвятся, они разделяются поперечными перегородками — септами на компартменты. У каждого компартмента свой нуклеоид, рибосомы, плазмалеммасы, у гиф — плазменная мембрана и клеточная стенка. Гифа растет внутрь клетки, ее окружает мембрана, являющаяся инвагинировавшей плазмалеммой клетки-хозяина. Между этой мембраной и клеточной стенкой гифы расположен материал капсулы, близкий по составу и строению к первичной клеточной стенке [23]. В цитоплазме вновь инфицированных клеток клубенька большое количество рибосом, профилей эндоплазматического ретикулума, митохондрий, пластид, содержащих крахмал.

Везикула эндофита образуется при разрастании концевой части гифы. Новообра-

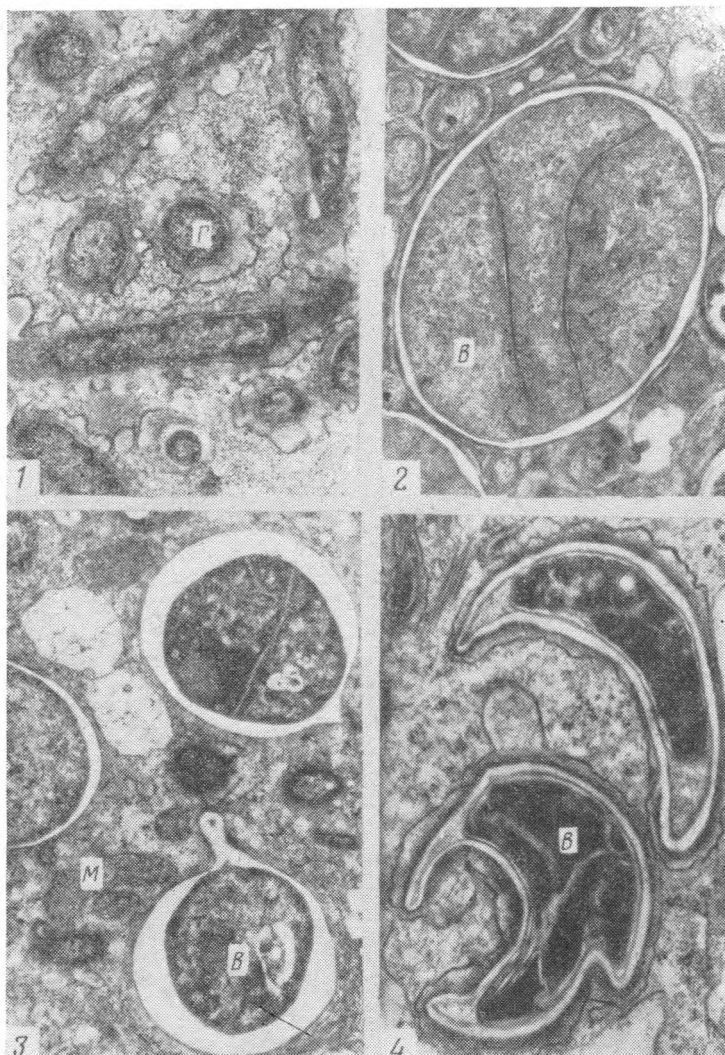


Рис. 3. Ультраструктура эндофита в клетках клубеньков лоха. 1 — участок клетки с гифами (зона а); 2 — везикула в начальной стадии септирования; 3 — участок клетки со зрелыми везикулами (зона б); 4 — деформированные везикулы (зона в); М — митохондрия; остальные обозначения те же, что на рис. 2.

зованная везикула окружена общей с гифой капсулой и мембраной капсулы (рис. 2, б; 3, б). Вновь образованная везикула сначала не имеет перегородок — септ, затем они образуются, деля везикулу на компартменты (рис. 2, б, в; 3, в). В каждом компартменте так же, как и у гифы, есть нуклеоид, рибосома, плазмалеммасы. На рис. 2 представлена зрелая везикула (в), имеющая в плоскости среза 11 компартментов. Такие зрелые сформировавшиеся везикулы преобладают в средней части лопастей клубеньков ольхи и лоха. Цитоплазма инфицированных клеток в этой зоне также богата рибосомами, профилями эндоплазматического ретикулума, митохондриями с большим числом крист; пластиды менее многочисленны и не содержат крахмальных зерен.

В базальной части клубенька наблюдается старение и деформация везикул эндофита: форма их становится неправильной, напоминает сдавленный мяч (рис. 3, г). В дальнейшем содержимое компартментов уплотняется и разрушается (рис. 2, г). В цитоплазме растительных клеток сокращается число органелл, а затем происходит разрушение цитоплазмы клетки-хозяина.

При сравнении ультраструктуры эндофита в клубеньках ольхи и лоха при общем их сходстве можно отметить некоторые различия. Так, диаметр гифы эндофита и везикулы в клетках ольхи больше, чем у лоха (1,0—1,4 и 0,5—0,7 мкм; 4—5 и 3—4 мкм). У лоха мембрана, окружающая капсулу эндофита, имеет значительно более волнистый контур, чем у ольхи.

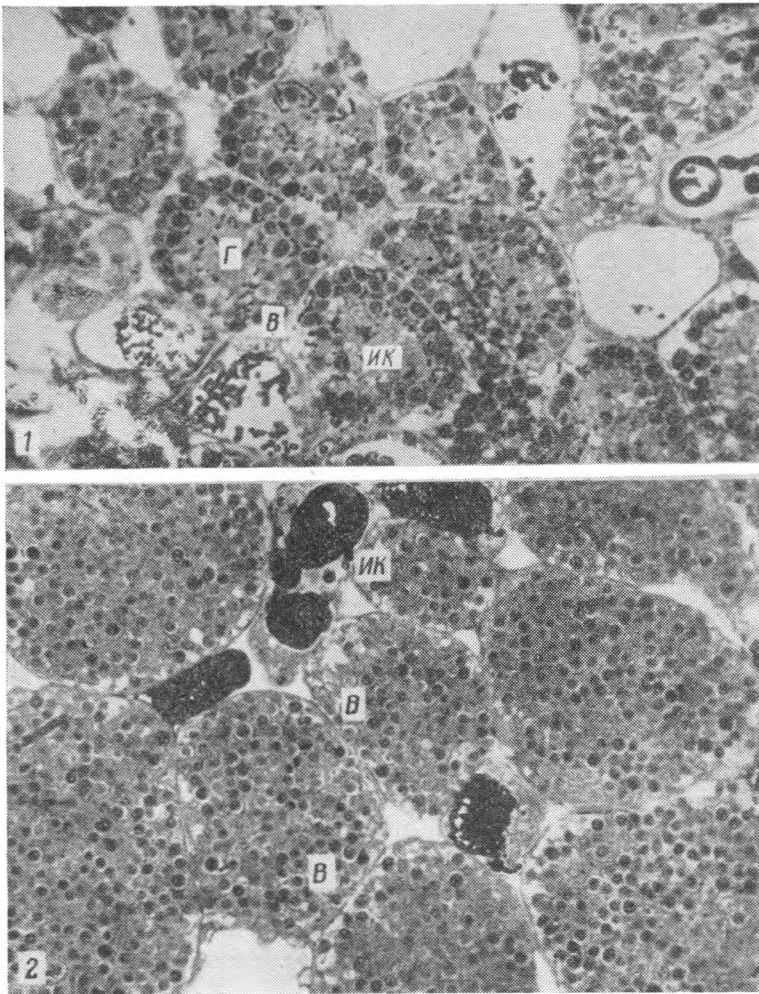


Рис. 4. Инфицированные клетки в средней части лопасти клубеньков ольхи (1) и лоха (2), содержащие везикулы эндофита. ИК — коровые клетки, содержащие эндофит; остальные обозначения те же, что на рис. 2.

В клубеньках лоха и ольхи различно расположение гиф и везикул эндофита: у лоха везикулы равномерно распределены по всему объему инфицированной клетки, а у ольхи — по периферии клетки ближе к клеточной стенке (рис. 4). Указанные особенности определяются природой самого эндофита.

Изученные свойства клубеньков ольхи и лоха обусловлены видовой спецификой растения-хозяина. В клубеньках лоха площадь инфицированных клеток в 5—6 раз больше, чем неинфицированных, а у ольхи — только в 1,5—2 раза (табл. 1). У лоха в плоскости среза 84 везикулы, а у ольхи — всего до 30. Однако благодаря различному размеру инфицированных клеток по плотности размещения везикул (их числу на 100 мкм<sup>2</sup>) эти растения мало различаются (табл. 1, 2).

Азотфиксирующая активность клубеньков ольхи и лоха была крайне низкой в

мае (табл. 2) в связи с тем, что холодная весна (средняя температура воздуха в мае составила 7,8°) вызвала задержку вегетации растений; во второй половине июня она повысилась, а в августе и сентябре она снова стала ниже.

Летом 1980 г. азотфиксирующая активность клубеньков лоха была значительно ниже, чем летом 1979 г., когда азотфиксация в июне-июле составила 11—13 мкмоль С<sub>2</sub>Н<sub>4</sub> [4]. Это, по-видимому, связано с низкими температурами воздуха и почвы и повышенной влажностью почвы.

Однако значения азотфиксации у *Alnus crispa* вполне сопоставимы с теми, которые были получены для этого же вида ольхи другими исследователями [16] (5—6 мкмоль), а также для *A. tenuifolia* [17] (0,03—10,9 мкмоль С<sub>2</sub>Н<sub>4</sub>).

Из сравнения плотности размещения везикул (табл. 1 и рис. 4, 5) в клетках средней части клубеньков ольхи и лоха и азот-

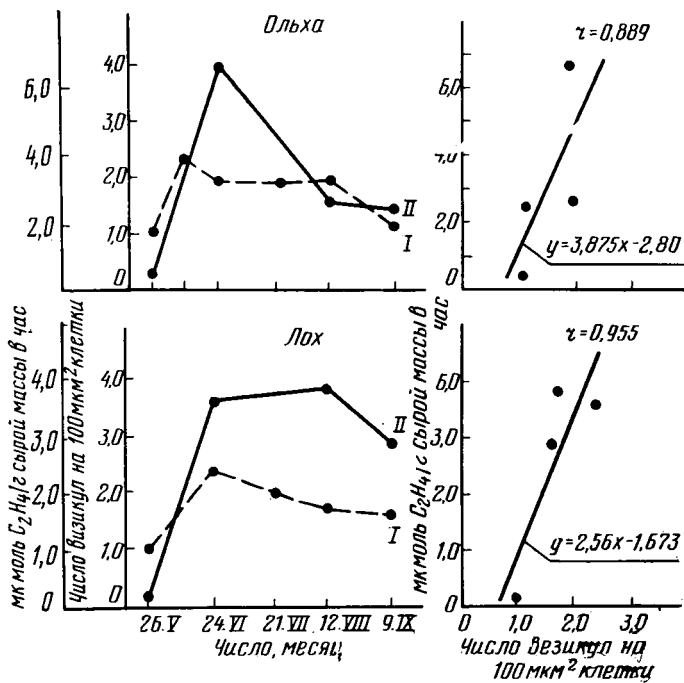


Рис. 5. Изменение числа везикул в инфицированных клетках средней части клубеньков ольхи и лоха (I) и азотфиксирующая активность клубеньков (II). Справа — корреляционная зависимость между I и II.

фиксирующей активности клубеньков (табл. 2) следует, что эти показатели находятся в прямой коррелятивной зависимости. Так, в конце мая число везикул на единицу площади клетки было невелико и азотфиксирующая активность тоже оказалась низкой. В июне число везикул эндофита в клетках резко возросло, одновременно усилилась и азотфиксирующая активность. Причем интенсивность увеличения азотфиксирующей активности у ольхи была

выше, чем у лоха. Максимальная плотность везикул наблюдалась в июне, а в июле и августе она снижалась (рис. 4, 5). В сентябре способность эндофита к образованию везикул уменьшается, возможно, в связи с ухудшением снабжения эндофита ассимилятами.

Коррелятивная зависимость данных показателей выражается линейной функцией вида  $y = ax - b$ . Это говорит о том, что плотность везикул в клетках средней зоны

Таблица 1

Изменение площади клеток и числа везикул в клетках средней части клубеньков ольхи и лоха в течение вегетационного периода

Дата	Площадь клеток, мкм <sup>2</sup>		Число везикул	
	инфицированных	неинфицированных	в клетке	на 100 мкм <sup>2</sup> клетки
Ольха				
26/V	1321,1 ± 309,0	743,1 ± 320,2	12,9 ± 2,0	1,04 ± 0,22
9/VI	1280,9 ± 338,6	856,9 ± 241,4	29,0 ± 6,0	2,33 ± 0,43
24/VI	1352,7 ± 274,6	661,3 ± 280,0	26,0 ± 4,4	1,92 ± 0,32
21/VII	1480,0 ± 273,5	944,4 ± 294,5	26,7 ± 4,6	1,91 ± 0,66
12/VIII	1456,7 ± 385,7	655,6 ± 186,7	27,1 ± 6,1	1,94 ± 0,36
9/IX	1380 ± 302,3	998,2 ± 288,0	15,2 ± 3,7	1,12 ± 0,26
Лох				
26/V	3534,4 ± 631,0	564,3 ± 203,2	34,3 ± 8,2	0,97 ± 0,14
24/VI	3603,8 ± 738,0	724,2 ± 210,1	84,9 ± 19,7	2,37 ± 0,39
21/VII	3721,1 ± 782,0	744,3 ± 194,5	74,5 ± 16,3	2,00 ± 0,19
12/VIII	3810,6 ± 921,2	812,2 ± 198,4	66,1 ± 18,1	1,73 ± 0,20
9/X	3570,6 ± 1060,5	824,3 ± 212,6	56,0 ± 11,2	1,65 ± 0,38

Азотфиксирующая активность клубеньков двухлетних саженцев лоха и ольхи  
(мкмоль  $C_2H_4$  на 1 г сырой массы за 1 ч)

Дата	Лох	Ольха	Среднесуточная t возд., °С
26/V	0,127±0,143	0,421±0,329	9,6
24/VII	3,625±2,570	0,659±3,458	20,8
19/VIII	3,859±2,960	2,609±1,514	11,4
9/IX	2,960±2,520	2,388±1,181	14,0

клубеньков ольхи и лоха является важным фактором, определяющим интенсивность азотфиксации единицы клубенька. Полученные данные подтверждают также вывод ряда исследователей [9, 13] о том, что везикула является основной азотфиксирующей структурой эндодифита.

#### Заключение

Показаны различия в структуре клубеньков, а также в ультраструктуре и размерах гиф и везикул эндодифита у ольхи и лоха. Особенности эндодифитов этих растений обусловлены как природой самого эндодифита, так и влиянием растения-хозяина.

Везикулы эндодифита образуются в инфицированных клетках клубеньков весной, число их в клетках средней части клубенька нарастает, достигая максимума в июне. Этот период характеризуется наивысшей

способностью клубеньков ольхи и лоха к азотфиксации. К осени образование везикул подавляется, снижается и азотфиксация клубеньков.

Между азотфиксирующей активностью клубеньков лоха и ольхи и плотностью размещения везикул в клетках клубенька наблюдается корреляционная зависимость, которая выражается линейной функцией вида  $y = ax - b$ . Это свидетельствует о том, что плотность везикул в клетках средней части клубеньков ольхи и лоха является важным фактором, определяющим интенсивность азотфиксации клубеньков.

Авторы выражают благодарность кандидату физико-математических наук В. Б. Ильясовой за помощь при определении азотфиксирующей активности клубеньков и доктору биологических наук Г. Я. Жизневской за ценные советы при выполнении и обсуждении настоящей работы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Азимов И. Лох — ценная культура. — Сельск. хоз-во Узбекистана, 1978, № 9, с. 42—43.
2. Андреева И. Н., Тибилова А. А., Ильясова В. Б., Жизневская Г. Я. Ультраструктура азотфиксирующих клубеньков у сеянцев облепихи (*Hipporhae glanoides* L.). — Физиол. растений, 1980, т. 27, вып. 4, с. 791—798.
3. Андреева И. Н., Федорова Е. Э., Жизневская Г. Я. Ультраструктурная организация взаимоотношений между эндодифитом и клетками азотфиксирующего клубенька у лоха серебристого. — Физиол. растений, 1981, т. 28, вып. 2, с. 413—420.
4. Андреева И. Н., Федорова Е. Э., Ильясова В. Б., Тибилова А. А. Ультраструктура азотфиксирующих и зимующих клубеньков однолетних саженцев облепихи и лоха. — Физиол. растений, 1981, т. 28, вып. 5.
5. Жизневская Г. Я., Ильясова В. Б., Троицкая Г. Н., Хайлова Г. Ф., Андреева И. Н. Сравнительное изучение симбиотической азотфиксации у клубеньков различных видов бобовых растений. — Физиол. растений, т. 26, вып. 1, с. 93—102.
6. Маланьин А. Н., Неофитов В. А., Крепкий И. С. Лох узколистный в лесозащитных насаждениях северного и западного Казахстана. — Вестн. с.-х. наук Казахстана, 1974, № 10, с. 82—89.
7. Мишустин Е. Н. Биологический азот и его значение в сельском хозяйстве. — Вестн. АН СССР, 1979, № 3, с. 59.
8. Суетин С. О., Парийская А. Н., Калакуцкий Л. В. Электронно-микроскопическое изучение цикла развития актиномицета эндосимбионта в азотфиксирующих клубеньках на корнях *Alnus glutinosa*. — Микробиология, 1980, т. 49, № 4, с. 604—608.
9. Akkermans A. D. L. — Thesis der Rijks-Universiteit. Leiden, 1971.
10. Atkinson W. A., Bormann B. T., De Bell D. S. — Bot. Gaz., 1979, vol. 140 (Suppl.), p. 102—107.
11. Becking J. H., De Boer W. E., Houwink A. L. — J. Microbiol. a. Serol., 1964, vol. 30, № 4, p. 343—376.
12. Becking J. H. — In: A treatise on dinitrogen fixation, sec. 111, John Wiley a. Sons, N. Y. — L., 1977, p. 185.
13. Becking J. H. — In: Recent developments in nitrogen fixation. L.: Acad. Press, 1977, p. 551.
14. De Bell D. S., Radwan M. A. — Bot. Gaz., 1979, vol. 140 (Suppl.), p. 97—101.
15. Bond G. — In: Symbiotic nitrogen fixation in plants. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1976, p. 531.
16. Dalton D. A., Naylor A. W. — Amer. j. Bot., 1975, vol. 62, № 1, p. 76—80.
17. Fleschner M. D., Delwiche C. C., Goldman C. R. — Amer. j. Bot., 1976, vol. 63, № 5, p. 945—950.
18. Funk D. T., Schlesinger R. C., Ponder T. — Bot. Gaz., 1979, vol. 140 (Suppl.), p. 110—114.
19. Hen-

- ry M. F.—Bull. Soc. Bot. Fr., 1979, vol. 126, № 2, p. 149—163. — 20. Karnovsky M. I.—J. Cell Biol., 1967, vol. 27, № 1, p. 137 A. — 21. Kohnke H. — J. Forestry, 1941, vol. 39, № 3, p. 333—334. — 22. Lalonde M., Knowles R. — Cand. j. Microbiol., 1975, vol. 21, p. 1058—1080.— 23. Lalonde M., Knowles R. — Cand. j. Bot., 1975, vol. 53, № 18, p. 1951—1971.— 24. Oremus P. A. J. — Plant a. Soil, 1979, vol. 52, № 1, p. 59—68. — 25. Silvester W. B. — In: A treatise on dinitrogen fixation, sec. 4. N. Y. — L.: John Wiley a. Sons, 1977, p. 141—190. — 26. Tarrant R. F.— Forest Sci., 1961, vol. 7, № 3, p. 238—246.

*Статья поступила 2 апреля 1981 г.*

#### SUMMARY

Variations in nodule structure, as well as in ultrastructure and sizes of endophyte hyphae and vesicles in alder and elaeagnus are found, which is due to both the nature of the endophyte and the effect of the host-plant on the structure of the nitrogen fixing nodule.

Endophyte vesicles are formed in the infected nodule cells in spring, then their number in cells of the middle portion of the nodule increases, reaching its maximum in June. This period is characterized by the highest nitrogen fixing activity of alder and elaeagnus nodules. By the fall the formation of vesicles is suppressed, the nitrogen fixing activity of the nodules getting lower too.