

Эльве ТИКК, Антс-Пээп СИЛЬВЕРЕ

СВЯЗЬ МИКРООРГАНИЗМОВ С КОРНЕВЫМИ КЛУБЕНЬКАМИ ТРАВЯНИСТЫХ НЕБОБОВЫХ РАСТЕНИЙ НА ОСНОВЕ ИХ ГИСТОЛОГИИ И УЛЬТРАСТРУКТУРЫ

Взаимоотношения микроорганизмов с растениями, в первую очередь с их корневой системой, являются одним из компонентов плодородия почвы и в этом отношении особенно привлекают внимание исследователей. Интерес этот вызван существованием хорошо известной симбиотической ассоциации азотфиксирующих «клубеньковых» бактерий с тканями корней бобовых растений, обеспечивающей азотным питанием растение-хозяина и функционирующей как более или менее эффективный обогатитель почвы азотными соединениями, необходимыми для развития растений. С такой точки зрения рассматриваются часто и все другие ассоциации микроорганизмов с растениями, в том числе и признаки, указывающие на возможность связи растения с микроорганизмами, в первую очередь различные клубеньки и подобные им разрастания-утолщения корней. В отношении бобовых растений такой подход полностью оправдан, так как практически все клубеньки оказываются именно бактериальными, т. е. содержащими микроорганизмы, и кроме того, для бобовых, несущих корневые клубеньки, эта ассоциация, как правило, является основной формой существования соответствующих видов растений. Несколько иначе следует относиться к клубенькам и разрастаниям на корнях небобовых, у которых видимые клубеньки встречаются с различной частотой в различных условиях роста растений. Исследованию таких корневых образований и их функциональной связи с растениями (азотфиксацией) и микроорганизмами посвящены в последние два десятилетия многие работы, в результате которых выявлена более или менее равноценная азотфиксирующей ассоциации бобовых растений с микроорганизмами ассоциация актиномицетов с некоторыми кустарниковыми и древесными видами растений (Becking, 1970; Akkermans, 1978). Однако, открытым остается вопрос о существовании ассоциации почвенно-корневой микрофлоры с травянистыми небобовыми растениями, у которых обнаружено большое разнообразие клубеньков и подобных им образований—утолщений корней (Родынюк, Клевенская, 1977), встречающихся относительно спорадически в популяциях определенного вида растений. Из этого следует, на наш взгляд, что подобные клубеньки не являются обязательной частью корневой системы этих растений, и поскольку в них не всегда обнаруживаются микроорганизмы, они не связаны со специфической микробно-растительной ассоциацией.

Помимо интереса с точки зрения азотфиксации и участия в формировании плодородия почвы, ассоциации микроорганизмов с тканями растений представляют большой интерес в связи с развитием методов цитологического исследования, в первую очередь электронной микроскопии, с точки зрения познания механизмов взаимосвязей про- и эукариотных клеток на уровне их ультраструктуры. Этот аспект проблемы

ассоциации микроорганизмов с тканями растений связан с изучением как молекулярных механизмов взаимодействия компонентов различных ассоциаций — симбиотических в случае клубеньковых бактерий бобовых растений или антагонистических — патогенных — в случае бактериального рака растений, микоплазмозов и других бактериальных болезней, так и морфологических — ультраструктурных основ подобных взаимодействий и их формирования в развитии растительного организма.

Учитывая большое количество исследований, проведенных на древесных породах по взаимосвязям микроорганизмов, обитающих в корневых клубеньках, с растением-хозяином (Akkegmans, 1978; Newcomb и др., 1978; Andreeva, Zhiznevskaya, 1980; Baker, Miller, 1980; Baker и др., 1980; Ellmore и др., 1980) целесообразнее больше внимания уделять взаимосвязям микроорганизмов с травянистыми растениями как наиболее распространенным и имеющим, несомненно, большое значение в понимании процессов обогащения почвы азотными соединениями — основного фактора формирования плодородия почвы.

Соответствующие данные накапливались в течение последних 40 лет, начиная с описания Н. П. Ногтевым в 1938 г. у лисохвоста лугового в клетках клубнеподобных утолщений корня включений, сходных с involucreными формами микроорганизмов (Ногтев, 1938). Опыты по выделению обнаруженных микроорганизмов и их характеристика позволили описать грам-положительную спорогенную бациллу, способную проникать в клетки корневых тканей растения и вызывать образование клубеньков, а также предположительно фиксировать азот из воздуха. Десятью годами позже И. Л. Работнова и Н. И. Пономаренко (1949) на микротомных срезах клубеньков с корней лисохвоста микроорганизмов не обнаружили. Но с поверхностно-стерилизованных клубеньков им удалось выделить 85 бактериальных культур спорогенных бацилл, близких к бацилле, описанной Н. П. Ногтевым. На основании этих данных было выдвинуто предположение, что микроорганизмы способны проникать в поверхностные клетки паренхимы и вызывать образование клубенька. В дальнейшем эти клубеньки рассматривались исследователями как содержащие запасные питательные вещества утолщения корня (Силина, 1955). Изолированные из клубеньков микроорганизмы были отнесены к обычным ризосферным видам, способным проникать на определенную глубину в покровные слои клеток клубенька и оставаться там недоступными для стерилизующих веществ.

На других травянистых растениях изучение корневых клубеньков началось в конце 50-х годов, когда у многих видов растений были описаны клубеньки, содержащие микроорганизмы (Ронгинская, 1958; Савельев и др., 1958). Изолированные из клубеньков бактерии вызывали у подопытных растений образование новых клубеньков (Савельев и др., 1958). Разнообразные, по форме подобные клубенькам утолщения в последнее десятилетие описаны еще у ряда небобовых травянистых растений (Клебенская, Дударева, 1967; Лацинский, Ронгинская, 1967; Родынюк, Клебенская, 1977). В настоящее время список растений, у которых обнаружены на корнях различные «клубеньки», связываемые с симбиотической азотфиксирующей микрофлорой, охватывает для Западной Сибири, где они наиболее интенсивно изучаются, 75 видов из 21 семейства.

Гистологически в клубеньках небобовых травянистых растений выделяются эпидермис, коровая паренхима, эндодермис, перицикл и центральный сосудистый пучок. Клубеньки в основном отличаются от обычного корня лишь разрастанием — пролиферацией — коровой

паренхимы. Встречаются также клубеньки с несколькими проводящими пучками и более развитым перидиклом (Клевенская, Дударева, 1967; Родынюк, Клевенская, 1977). Микроорганизмы находятся, как правило, в расросшейся паренхиме, в основном в вакуолях клеток или в пустых клетках (Работнова, Пономаренко, 1949), часто скоплениями около клеточной стенки. Из поверхностно-стерилизованных клубеньков почти всегда можно выделить микроорганизмы, характеристика которых у разных исследователей заметно различается. В. П. Ногтев (1938) изолировал из клубеньков лисохвоста грам-положительную спорогенную бациллу, А. И. Красильникова-Крайнова (1962) — грам-отрицательную неспорогенную бактерию со сложным циклом развития и образующую бактериоиды, а в последнее время (Родынюк, Клевенская, 1977) из таких же клубеньков изолировали как грам-положительные бациллы, так и грам-отрицательные бактерии — близкие к родам *Rhizobium* и *Agrobacterium*.

По имеющимся данным можно предположить существование микробной ассоциации, связанной с клубеньками лисохвоста лугового, причем причинная связь между возникновением корневых клубеньков и микроорганизмами выявляется слабо. Нерешенным в силу скудности данных остается вопрос об азотфиксирующей способности подобных корневых клубеньков, тем более что у большинства видов растений, на корнях которых обнаружены клубнеподобные утолщения, наличие микроорганизмов доказано весьма неубедительно изолированием или выявлением на «ручных» или парафиновых микротомных срезах и при различной гистологической окраске. Электронно-микроскопического исследования цитологии рассматриваемых клубеньков и содержащихся в них микроорганизмов не проводилось. В связи с противоречивостью имеющихся данных, методической сложностью определения микробных клеток в тканевых срезах на уровне светового микроскопа и парафиновых срезов, а также значимостью вопроса о микробном симбиозе и азотфиксации у небобовых дикорастущих травянистых растений и относительно большим количеством видов, связанных с клубеньками, по данным И. С. Родынюк и И. Л. Клевенской (1977), представляло несомненный интерес изучить это явление на уровне электронно-микроскопической цитологии на доступном нам материале.

Из связанных с корневыми клубеньками небобовых растений были выявлены 25 видов из 11 семейств, произрастающие в Западной Эстонии в относительно одинаковых условиях в заповеднике Матсалу. Как видно из приведенной таблицы, клубеньки и подобные им образования найдены лишь у 11 видов растений из 3 семейств — в основном у осок и злаковых. При этом постоянно на всех обследованных растениях клубеньки встречались лишь у лисохвоста. У других видов клубеньки встречались спорадически или у отдельных растений.

Материал и методика

Материалом служили корни растений, которые выкапывали по возможности неповрежденными и промывали водой, чтобы обнаружить корневые утолщения — клубеньки. Собранные таким образом клубеньки фиксировали на месте в течение 2 ч в 6%-ном растворе глютарового альдегида в фосфатном буфере. После фиксации раствор, содержащий зафиксированный материал, разбавляли 10-кратным объемом буфера и хранили в таком виде до доставки в лабораторию. Дальнейшая обработка состояла в постфиксации 1%-ной четырехокисью осмия в фосфатном буфере, обезвоживании в градиенте этанола или ацетона и заливке в эпон 812. Срезы изготавливали на ультрамикротоме

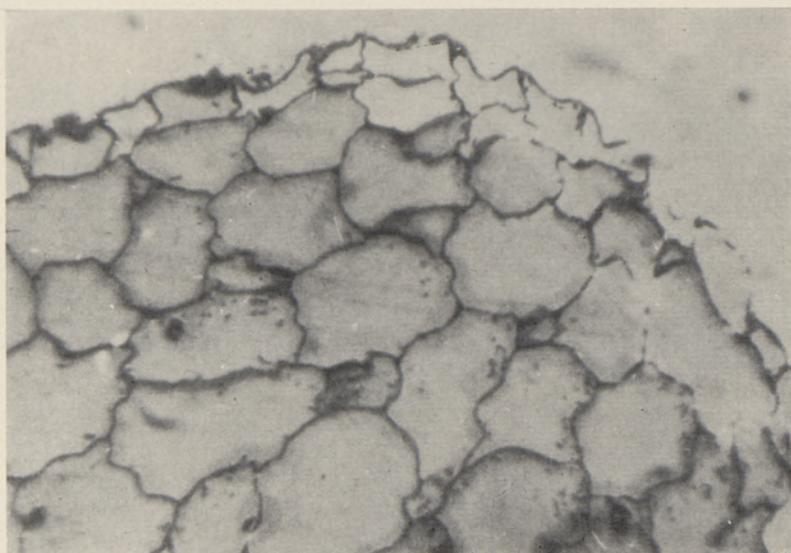


Рис. 1. Срез внешней части корневого клубенька лисохвоста лугового. В клетках, расположенных под однослойным эпидермисом коровой паренхимы, видны бактериеподобные тельца. Световая микроскопия. Увел. 640 \times .

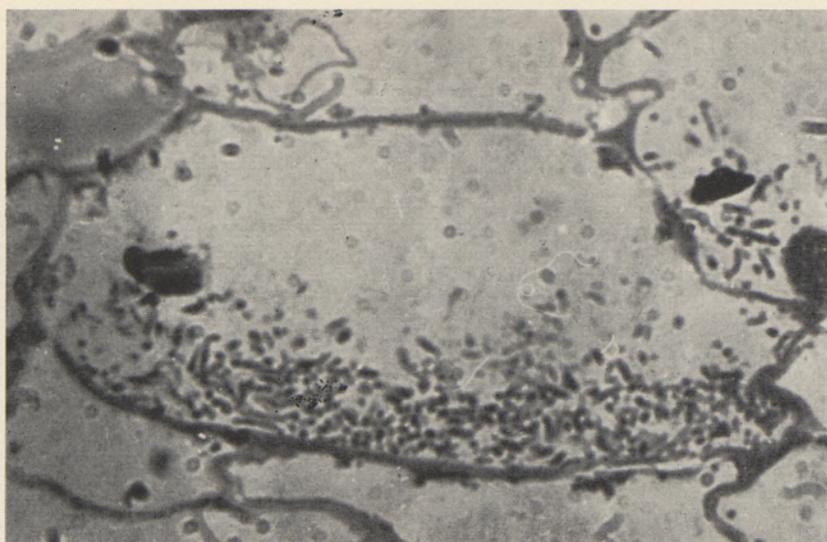


Рис. 2. Клетка коровой паренхимы лисохвоста лугового, содержащая бактерии. Световая микроскопия. Увел. 2500 \times .

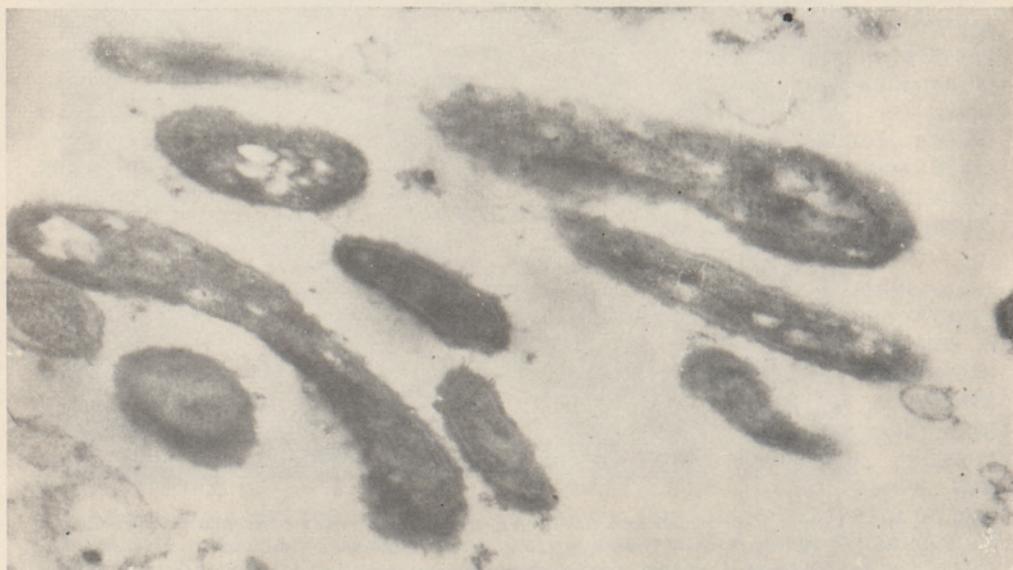


Рис. 3. Коринеподобные бактерии в клетке клубенька лисохвоста лугового. Электронная микроскопия. Увел. 41 000 \times .



Рис. 4. Покрытие капсулой бактериальные клетки у стенки растительной клетки. Электронная микроскопия. Увел. 30 500 \times .

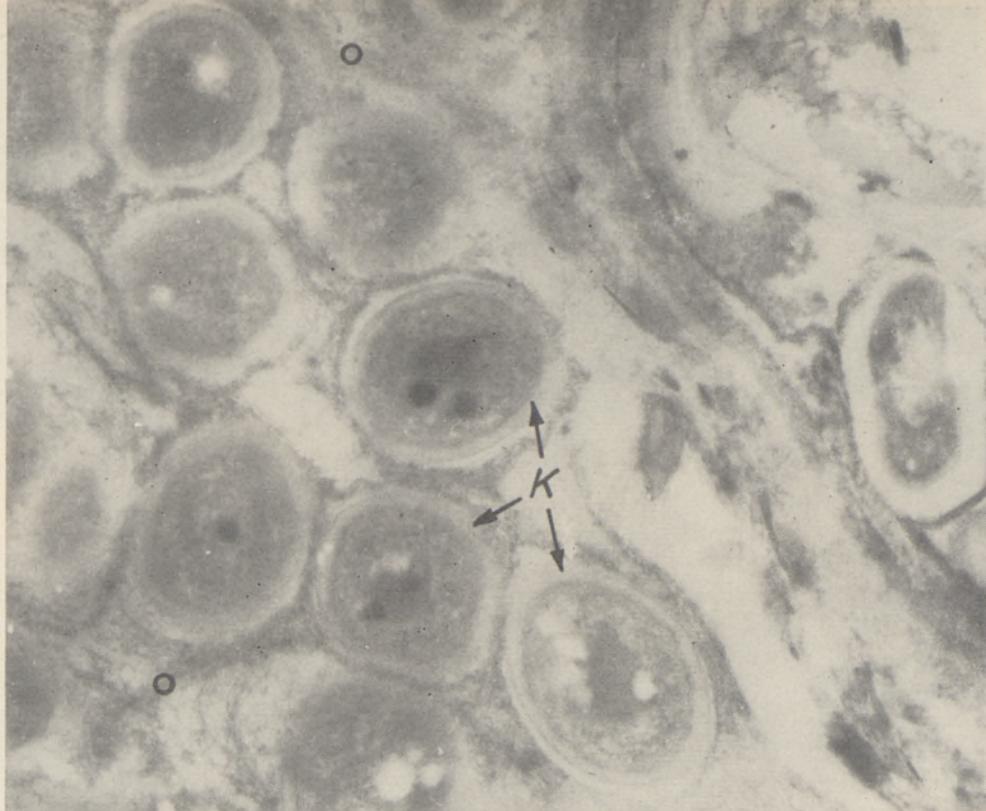


Рис. 5. «Инкапсулированные» бактерии в остатках цитоплазмы растительной клетки. (К — капсула бактерий, О — остатки цитоплазмы). Электронная микроскопия. Увел. 45 000X.



Рис. 6. Скопление-агрегат размножившихся в капсуле бактерий. Электронная микроскопия. Увел. 16 500X.



Рис. 7. Цитоплазматическое образование, содержащее бактерии, сходное с инфекционной нитью клубеньковых бактерий. Электронная микроскопия. Увел. 22 400X.



Рис. 8. «Растворение» стенки растительной клетки коринеподобной бактерией. Электронная микроскопия. Увел. 39 000 \times .

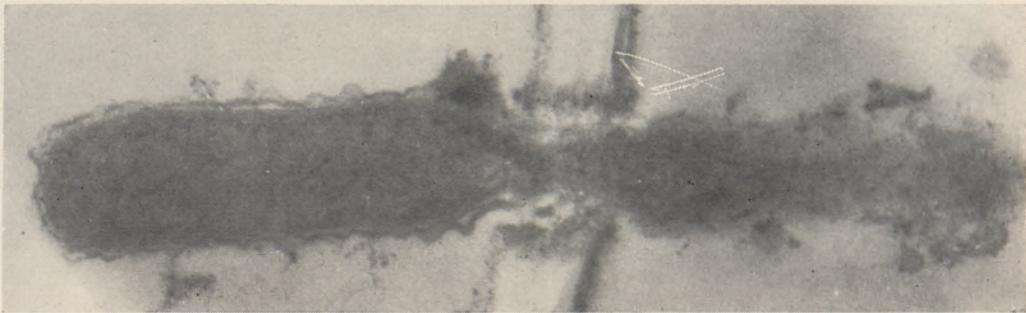


Рис. 9. Проникновение коринеподобной бактерии через стенки растительных клеток. Электронная микроскопия. Увел. 54 000 \times .

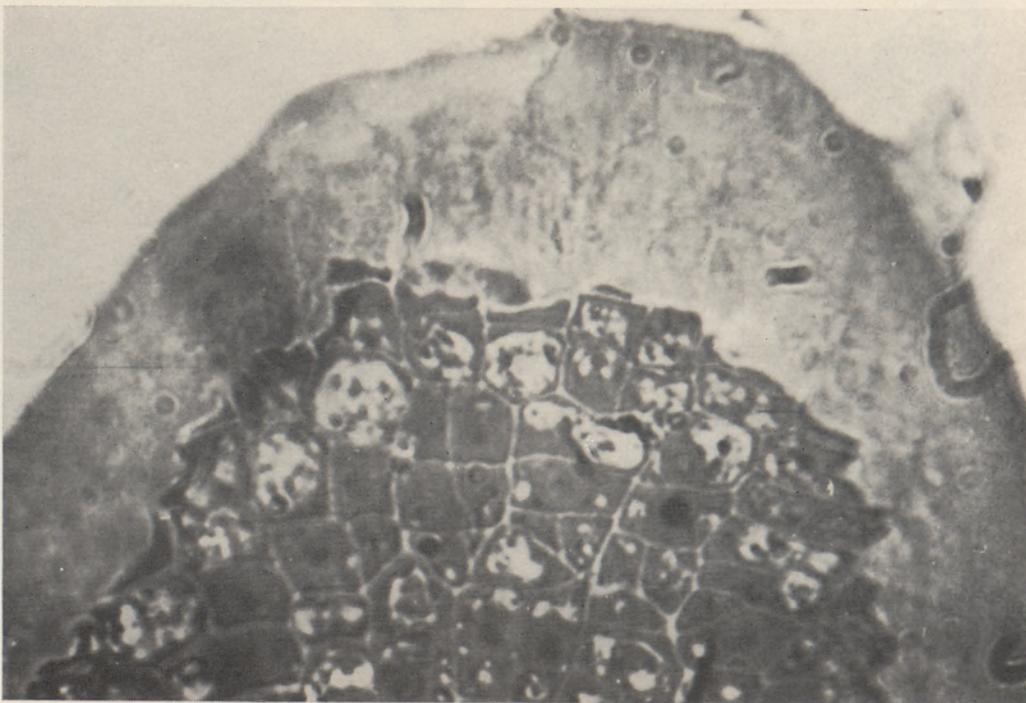


Рис. 10. Срез поверхностной части клубенька корня пестрой осины. В клетках паренхимы видны крупные вакуоли, содержащие бактериеподобные тельца. Световая микроскопия. Увел. 690 \times .

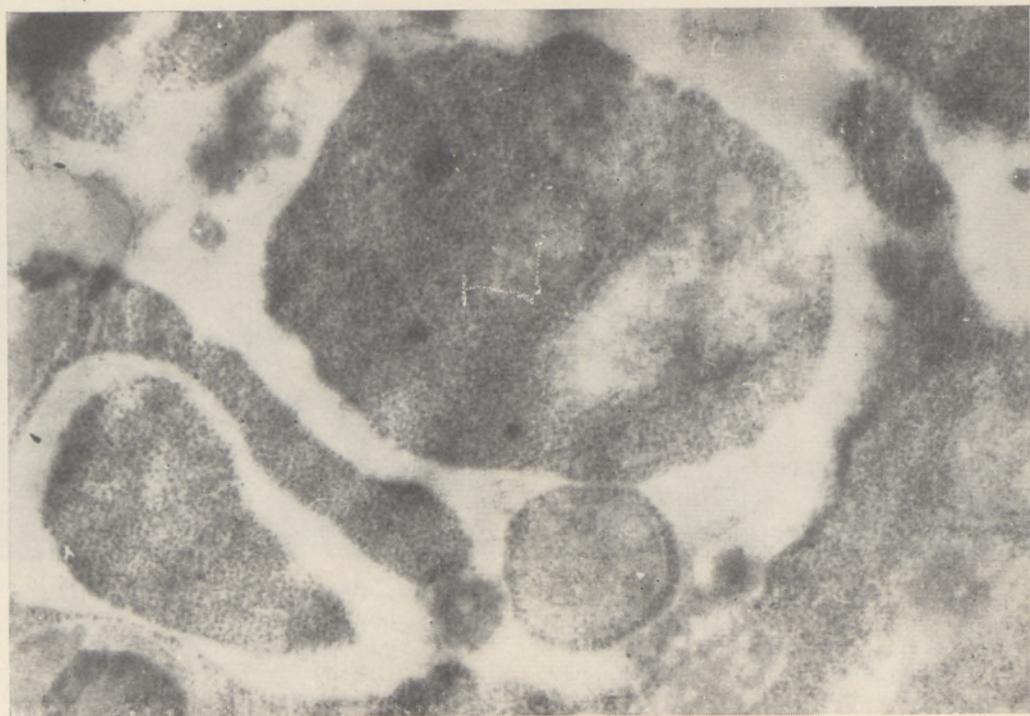


Рис. 11. Цитосегресома, содержащая автономные обрывки цитоплазмы клетки коровой паренхимы в зоне вакуолей, содержащих бактериеподобные тельца. Электронная микроскопия. Увел. 37 000 \times .

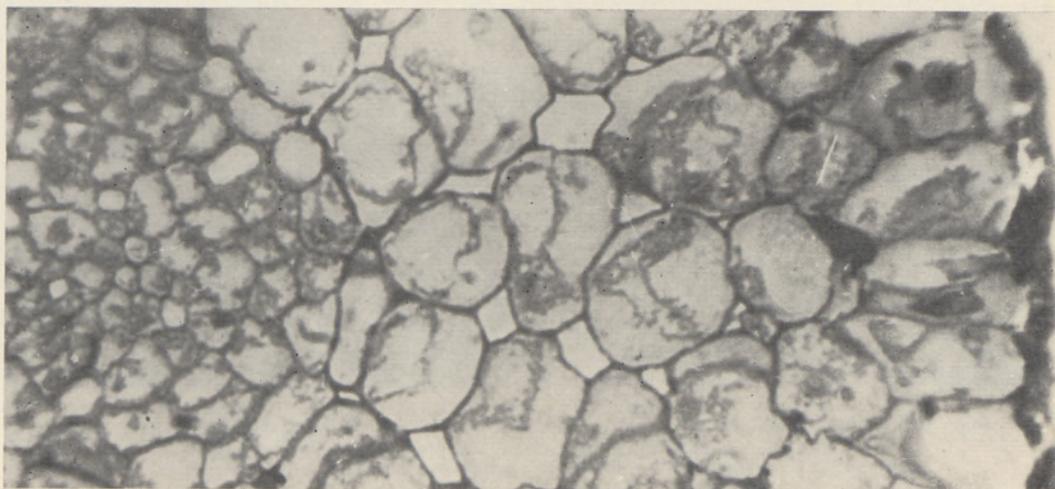


Рис. 12. Радиальный срез клубенька просяной осоки: в клетках коровой паренхимы слабо структурированное отложение запасных веществ. Световая микроскопия. Увел. 760 \times .

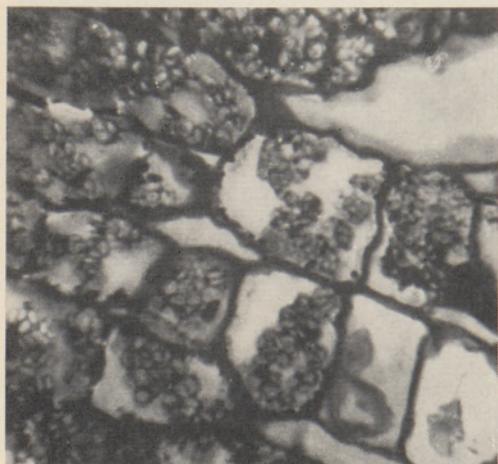


Рис. 13. Клетки коровой паренхимы клубенька сеслерии голубой, содержащие гранулы накапливаемого вещества. Световая микроскопия. Увел. 670 \times .



Рис. 14. Личинка галлицы из клубенька подмаренника бореального. Световая микроскопия. Увел. 40 \times .



Рис. 15. Гранулы накапливаемого вещества в клетках корневых клубеньков подмаренника бореального. Световая микроскопия. Увел. 710 \times .

Вид растения	Количество клубеньков на одно растение
Сем. <i>Equisetaceae</i>	
<i>Equisetum pratense</i> L. — хвощ луговой	—
Сем. <i>Ophioglossaceae</i>	
<i>Botrychium lunaria</i> (L.) Swartz — гроздовник полулунный	—
Сем. <i>Ranunculaceae</i>	
<i>Ranunculus polyanthemos</i> L. — лютик многоцветковый	—
Сем. <i>Rosaceae</i>	
<i>Sanguisorba officinalis</i> L. — кровохлебка аптечная	—
Сем. <i>Umbelliferae</i>	
<i>Angelica sylvestris</i> L. — дудник лесной	—
Сем. <i>Rubiaceae</i>	
<i>Galium boreale</i> L. — подмаренник бореальный	2—3
Сем. <i>Campanulaceae</i>	
<i>Campanula glomerata</i> L. — колокольчик скученный	—
Сем. <i>Compositae</i>	
<i>Antennaria dioica</i> L. — кошачья лапка двудомная	—
<i>Inula salicina</i> L. — девясил иволлистный	—
<i>Achillea millefolium</i> L. — тысячелистник обыкновенный	—
Сем. <i>Juncaginaceae</i>	
<i>Triglochin palustre</i> L. — триостренник болотный	—
Сем. <i>Cyperaceae</i>	
<i>Blysmus rufus</i> Link. — поточник рыжий	1—2
<i>Carex acuta</i> L. — осока острая	1—2
<i>Carex capillaris</i> L. — осока волосовидная	1—2
<i>Carex flacca</i> Schreb. — осока пестрая, осока поникающая	3—4
<i>Carex nigra</i> (L.) Reichard — осока черная	2—3
<i>Carex oederi</i> Retz. — осока Эдера	—
<i>Carex paniceae</i> L. — осока просьяная	3—4
Сем. <i>Gramineae</i>	
<i>Phleum pratense</i> L. — тимофеевка луговая	—
<i>Alopecurus pratensis</i> L. — лисохвост луговой	∞
<i>Alopecurus ventricosus</i> Pers. — лисохвост вздутый	∞
<i>Calamagrostis neglecta</i> (Ehrh.) Beauv. — вейник незамечаемый	3—4
<i>Sesleria coerulea</i> (L.) Ard. — сеслерия голубая	2—3
<i>Melica nutans</i> L. — перловник поникший	—
<i>Festuca pratensis</i> Huds. — овсяница луговая	—

«Тесла 490А» как для электронной микроскопии, так и для ориентировочной световой микроскопии, проводимой на полутолстых (0,5 мкм) срезах, окрашиваемых тройной краской (Сильвере и др., 1978). Ультратонкие срезы контрастировали в течение 15 мин подогретым раствором уранил-ацетата и в течение 30 мин ацетатом свинца, по Рейнольдсу. Препараты просматривали под электронным микроскопом «Тесла BS-613».

С учетом того, что на полумикронных срезах исключено наложение различных клеток растений или их структур на выявляемые клетки микроорганизмов в тканях изучаемого растения, по результатам изучения полутолстых срезов методами световой микроскопии решался вопрос о необходимости и целесообразности электронно-микроскопического изучения конкретного образца материала.

По данным ориентировочной световой микроскопии из изученного материала наибольший интерес представляли клубеньки лисохвоста, очевидно, связанные с микрофлорой. Клубеньки с корней осок оказались весьма однотипными, за исключением осоки пестрой (*C. flacca*), у которой в клетках клубеньков в вакуолях с помощью светового микроскопа были обнаружены полиморфные бактериеподобные тельца, которые могут быть бактероидами какого-либо почвенного или симбиотического микроорганизма. В остальных клубеньках изученных растений бактериеподобные структуры не обнаружены. Содержимое этих клубеньков анализировалось с точки зрения их возможной функции и происхождения.

У лисохвоста лугового (*Alopecurus pratensis*) гистологически выявляется однослойный эпидермис из уплощенных, в подавляющем большинстве пустых клеток. Лежащая ниже паренхима состоит из крупных клеток неправильной формы, между которыми остаются небольшие межклетники (рис. 1). Клетки паренхимы на изученной нами стадии развития, судя по светомикроскопической картине и гистологической окраске препаратов, не содержат активной цитоплазмы в заметном количестве — скорее всего они содержат крупные вакуоли, заполненные клеточным соком, отвечающим за слабую окраску бесструктурного содержимого их на гистологических препаратах. В таких пустых клетках встречаются различные кокковидные, удлиненные и полиморфные бактериоидные тельца, расположенные скоплениями около клеточной стенки (рис. 2). В клетках с бактериеподобными структурами отмечаются разрывы стенок растительной клетки. Под коровой паренхимой расположены пустые клетки эндодермы, окружающие элементы центрального сосудистого пучка. Бактериеподобных структур в этих тканях не обнаружено.

На электронно-микроскопических срезах в клетках коровой паренхимы обнаружены отдельные обрывки фибриллярного или гранулярного вещества — по-видимому, остатки цитоплазмы, а также обрывки мембран. Клеточные стенки — рыхло-фибриллярные, межклеточный слой выявляется слабо. Бактериеподобные тельца выявляются как типичные микробные клетки с характерной ультраструктурой (рис. 3, 4), в основном это длинные, слегка изогнутые палочки часто с утолщенными концами, содержащие различные электроннопрозрачные включения — гранулы или вакуоли. Наблюдается относительно большой разброс как в размерах бактериальных клеток, так и в их форме, что можно, вероятно, отнести за счет направления плоскости среза в отношении конкретной бактериальной клетки и неравномерного диаметра средней и концевой частей палочковидных клеток бактерий. По строению клеточной стенки описываемые микроорганизмы относятся, по-видимому, к грам-отрицательному типу, на клеточной стенке у которых отмечается какое-то рыхлое вещество — материал капсулы или другие выделения, в различной мере утолщающие клеточную стенку. Клеточная стенка часто извилистая, с несколько расширенным периплазматическим пространством.

Помимо этих микробных клеток, в непосредственном контакте со стенкой растительной клетки обнаруживаются кокковидные бактерии, заключенные в фибриллярный субстрат остатков цитоплазмы или клеточной стенки (рис. 5), имеющие в некоторых скоплениях хорошо развитую капсулу из умеренно электронноплотного вещества и содержащие наряду с электронноплотными гранулами электроннопрозрачные вакуолеподобные включения. Судя по строению этих клеток, можно предположить, что описанные выше палочковидные клетки, будучи

включены в плотный субстрат остатков цитоплазмы или стенки растительной клетки, округляются и образуют капсулу — как бы инкапсулируются. В некоторых клетках также в связи с остатками цитоплазмы у стенки растительной клетки обнаруживаются более специфические агрегаты микробных клеток (рис. 6), представляющие собой плотно сжатые бактерии в относительно тонкой общей оболочке — капсуле, наподобие консорциев, образуемых бактерией *Erwinia herbicola*. Микробные клетки в этих агрегатах содержат также электроннопрозрачные вакуолеподобные включения и плотные гранулы и имеют индивидуальную неплотную капсулу. Еще более сложно строение встречающегося весьма редко скопления микробных клеток в образовании, происходящем, очевидно, от растительной клетки и напоминающем инфекционную нить, образующуюся при внедрении клубеньковых бактерий в клетке корня бобовых растений (рис. 7).

Своеобразное взаимоотношение между стенкой растительной клетки и палочковидными бактериями наблюдаются в местах разрыва стенки растительной клетки. Эти разрывы появляются в результате деятельности описанных микроорганизмов, которые как бы растворяют клеточную стенку (рис. 8). Палочковидные бактерии обладают, по-видимому, целлюлозолитической активностью, позволяющей им активно проникать из одной растительной клетки в другую. В некоторых случаях происходит как бы «впрыскивание» только цитоплазмы (содержимого) бактериальной клетки в соседнюю растительную клетку (рис. 9).

Другой вид небобовых травянистых растений, у которого по данным световой микроскопии предполагается наличие микроорганизмов в клетках корневых утолщений-клубеньков, — это пестрая (или понижающая) осока (*Carex flacca*), у которой в вакуолях полиферированных паренхиматозных клеток, образующих клубеньки, видны полиморфные бактериеподобные тельца (рис. 10). Корневые клубеньки пестрой осоки покрыты толстым бесструктурным слоем электронноплотного вещества, напоминающего материал клеточных стенок, образующего своеобразную капсулу для клубенька, под которой плотно прилегающие друг к другу неправильной формы клетки очень слабо дифференцированы на ткани корня и представляют собой как бы массу однотипных паренхиматозных клеток, содержащих вакуоли различной величины, расположенных чаще по периферии клубенька.

При электронно-микроскопическом изучении этих клеток с вакуолями и содержащихся в них бактериеподобных структур на ультратонких срезах выявилось, что бактериеподобные тела в вакуолях растительной клетки лишены клеточной стенки, характерной для микробной клетки, и по ультраструктуре цитоплазмы идентичны цитоплазме растительной клетки, окружающей вакуоль (рис. 11). Из этого можно сделать только один вывод — бактериеподобные тела в вакуолях корневых клубеньков являются автономными «капельками» цитоплазмы растительной клетки, отторгнутыми от тонопласта в полость вакуоли. Этот вывод подтверждается и электронно-микроскопическими данными, показывающими «отпочкование» капелек цитоплазмы в полость вакуоли. В основе этого процесса лежит, очевидно, формирование канальцевидных вакуолей, окружающих определенный участок цитоплазмы. При расширении таких вакуолей капли цитоплазмы отрываются от тонопласта и оказываются автономными образованиями в вакуоли. В сущности это типичное формирование цитосегресомы, свойственное многим меристемальным и дифференцирующимся растительным клеткам (Данилова, 1974). В образующейся таким путем вакуоли происходит автолиз сегрегированных капелек цитоплазмы, которые светомикроскопически почти не отличаются от микробных клеток.

Что касается других изученных нами видов осок, несущих часто на корнях различные клубенькоподобные утолщения — осоки острой (*C. acuta*), волосовидной (*C. capillaris*), черной (*C. nigra*) и просяной (*C. paniceae*) —, то в целом строение их клубеньков отличается от строения клубенька пестрой осоки несколько менее развитым слоем бесструктурного вещества, покрывающего корень, и небольшими различиями внутри корневого клубенька. Так, у просяной осоки малодифференцированные клетки паренхимы округлые с крупными межклетниками и относительно четко выделяемым перициклом (рис. 12). Эпидермальный слой состоит из продолговатых клеток. Близким к описанному является строение клубенька у волосовидной осоки, хотя на некоторых уровнях разреза клубенька тканевая дифференциация прослеживается более четко. Общим для всех изученных клубеньков осок является, несомненно, их связь с отложением в клетках запасных питательных веществ в виде различного типа гранул и их скоплений. Степень заполнения клеток клубенька запасными веществами зависит, очевидно, от стадии развития этого органа и процесса накопления, но в целом создается впечатление, что мы имеем дело с типичными корневыми утолщениями, связанными с накоплением определенных веществ в клетках коровой паренхимы. Такая же природа клубеньков на корнях сеслерии голубой (*S. coerulea*). У подмаренника бореального (*G. boreale*) все клетки разросшейся паренхимы заполнены округлыми гранулами и скоплениями гранул запасаемого вещества (рис. 13, 15), и помимо этого в корнях у него обитают личинки галлицы *Ametrodiplosis auripes* F. Lw. (Мамаев, 1962), обнаруженные и нами во всех изученных клубеньках без исключения (рис. 14), так что развитие клубеньков, по-видимому, вызвано личинкой галлицы и сопровождается накоплением запасных веществ.

Обсуждение результатов

Результаты наших исследований в сопоставлении с данными литературы дают основание для обсуждения нескольких аспектов проблемы симбиоза микроорганизмов с корнями небобовых травянистых растений.

Определение характера взаимоотношений между корнями растений и почвенной микрофлорой. При изучении симбиотических связей исходят в основном из аналогии с корневыми клубеньками бобовых растений, что, на наш взгляд, недостаточно оправдано в силу общей тенденции корней растений к накоплению запасных питательных веществ, вызывающему утолщения — формирование различных клубеньков на корнях растений, в том числе и у небобовых травянистых растений (Ногтев, 1938; Силина, 1955; Савельев и др., 1958; Красильникова-Крайнова, 1962). При этом интенсивность накопления, очевидно, находится в определенной корреляции с объемом запасующей ткани — коровой паренхимы — и с объемом и количеством утолщений-клубеньков. Часто трудно определить первопричину гиперплазии коровой паренхимы, как например в случае подмаренника: невозможно точно определить заселяют ли личинки галлицы ткани, интенсивно накапливающие питательные вещества и в силу этого образующие утолщения (клубеньки) как специфический биотоп для развития личинки галлицы, или же личинки вызывают пролиферацию паренхимы корня, т. е. образуют для себя галлы, а накопление питательных веществ является как бы вторичным процессом.

Трудно уверенно утверждать, происходят у других исследованных видов растений индуцирование пролиферации коровой паренхимы бактериальной инфекцией корневых тканей или же причиной является

предпочтительное заселение микроорганизмами богатых питательными веществами (в основном полисахаридами) участков корневой системы. Причем часто в корковой зоне подобных корневых клубеньков встречаются отмершие, частично разрушенные клетки, доступные почвенным микроорганизмам. В таком случае наличие на корнях растений клубеньков, очевидно, не свидетельствует о бактериальном азотфиксирующем симбиозе, похожем на симбиоз у бобовых растений. Этот вывод хорошо согласуется как с нерегулярной встречаемостью таких клубеньков у небобовых растений, так и с характерной для них зависимостью от места произрастания, что трудно согласовать с таким специфическим явлением как бактериальный симбиоз.

Происхождение и состав обнаруживаемой микрофлоры. Как было отмечено выше, в результате изолирования микроорганизмов, проведенного различными исследователями, получен весьма большой набор микроорганизмов, которые можно в основном отнести к обычной микрофлоре почвы (Работнова, Пономаренко, 1949; Силина, 1955). Успех опытов по изолированию как и разнообразие изолированной микрофлоры, зависят, очевидно, от стерилизации поверхности клубеньков (Силина, 1955). Точнее, в силу сложности строения покровных структур и частичного разрушения подлежащих отмерших клеток невозможно определить реальную поверхность клубенька и обеспечить полную стерилизацию его, не повреждая при этом внутренность клубенька.

Таким образом, мнение о недостаточности доказательств связи бактерий с клубеньками небобовых травянистых растений как и фиксации атмосферного азота этими бактериями в корневых клубеньках (Работнова, Пономаренко, 1949; Родынюк, Клевенская, 1977), на наш взгляд, вполне оправдано, тем более что отмечено развитие подобных клубеньков и в стерильных условиях выращивания растения (Силина, 1955). Собственно азотфиксацию связывают в такой ситуации со свободноживущими почвенными микроорганизмами, локализующимися часто в ризоплане — на поверхности корней (Phillips и др., 1971; Nelson и др., 1976).

Обнаружение микроорганизмов в тканях и клетках корневых клубеньков небобовых травянистых растений. С одной стороны, как указывалось выше, нельзя достаточно точно оценить возможности проникновения почвенных микроорганизмов в полуразрушенные клетки корковой зоны клубенька (Работнова, Пономаренко, 1949; Силина, 1955; Красильникова-Крайнова, 1962). С другой стороны, отмечена (Old, Nicolson, 1975) способность различных почвенных микроорганизмов проникать через клеточные стенки путем их лизиса (Balandreau, Knowles, 1978). Последнее подтверждают и наши данные электронно-микроскопического изучения клубеньков на корнях лисохвоста лугового. Однако, считать эту способность микроорганизма обусловленной симбиотическими взаимоотношениями с тканями растения нет основания, скорее наоборот, целлюлозолитическая активность может быть основной патогенности соответствующих микроорганизмов. У изученной нами бактерии эта активность проявляется в настолько ограниченном пространстве на поверхности микробной клетки, что не может, очевидно, причинить сколько-нибудь значительного вреда растительной ткани.

Что касается микробных клеток, обнаруживаемых светооптическими методами в растительных клетках с интактной цитоплазмой, то, судя по нашим результатам, у осоки пестрой, выявляемые бактерии могут быть в действительности автономными тельцами из цитоплазмы растительной клетки в цитосегресомах. Микробную природу таких образований, очевидно, нельзя считать доказанной на основе светомикро-

скопической морфологии. Особо следует отметить микроорганизмы в клетках клубеньков лисохвоста лугового, микробная природа которых доказана и электронно-микроскопически. Анализируя наши данные исходя из предположения о специфичности связей микроорганизмов с этими клубеньками, т. е. из минимизации видового состава выявленных бактериальных клеток, их морфологическое разнообразие на ультратонких срезах можно достаточно обоснованно отнести к одному типу микробной клетки. Это, по-видимому, слегка изогнутые палочки с утолщенными концами и обильным содержанием электроннопрозрачных вакуолеподобных включений. В общих чертах это описание соответствует морфологической характеристике коринебактерий (Kiister, 1968), среди которых много почвенных форм, в том числе и фитопатогенных (Израильский, 1952), например, возбудитель вилта люцерны, обладающих способностью к капсулообразованию. С этой способностью коринебактерий может быть связано и формирование в клетках лисохвоста пристеночных скоплений инкапсулированных микробных клеток, как, вероятно, и консорциев. Определенный интерес представляет целлюлолитическая активность изученного нами коринеподобного микроорганизма, так как данных о подобной энзиматической активности у коринебактерий нет (Руководство..., 1968), но выявляемая на электронных микрофотографиях способность растворять клеточные стенки может и не проявляться в тестах на соответствующую энзиматическую активность. Что касается образований, сходных с инфекционной нитью клубеньковых бактерий, то их трудно связать с коринеподобной бактерией, но, учитывая изолирование из клубеньков лисохвоста близких к клубеньковым бактериям микроорганизмов (Клевенская, Дударева, 1967; Родынюк, Клевенская, 1977), можно думать, что такая весьма специфическая связь с микроорганизмом может возникать и у лисохвоста, хотя типичной для клубеньковых бактерий бактерондной ткани в клубеньках этого растения не обнаружено.

На основе рассмотренных данных можно считать обоснованным предположение о специфической, но не «симбиотической», связи микроорганизмов с клубеньками на корнях лисохвоста лугового и, по-видимому, на других видах лисохвоста. Эта связь основана, скорее всего, на возбуждаемой бактериальной инфекцией пролиферации коровой паренхимы. Однако, при этом следует учитывать, что явление симбиоза клубеньковых бактерий с бобовыми растениями основано на теснейшей взаимосвязи, доходящей до взаимной регуляции жизнедеятельности симбионта и растения-хозяина (Gresshoff и др., 1980; Burkardt, Kamberger, 1980), а также, по-видимому, на генетическом взаимодействии членов симбиотической ассоциации (Beltra и др., 1981). На основе полученных данных, предполагать такую тесную связь микроорганизмов с тканями растения в клубеньках лисохвоста и у других небобовых травянистых растений невозможно. Тем более, что другие корневые клубеньки обследованных нами растений и их связь с микрофлорой почвы, очевидно, обусловлены в первую очередь накоплением в коровой паренхиме определенных участков корня запасных питательных веществ и являются более или менее случайной.

Микроскопическое выявление ассоциированных с корневой тканью микробных клеток в силу ограниченности увеличения и разрешающей способности светового микроскопа позволяет получаемые данные оценить как ориентировочные. Наш опыт показывает, что наиболее адекватные результаты дает изучение клеточного состава и взаимосвязей ассоциирующихся с корневой системой микроорганизмов, в особенности эндобионтов, методами электронно-микроскопической цитологии.

Авторы считают своим долгом выразить благодарность старшему

научному сотруднику Института зоологии и ботаники К. Порку за предоставление возможности сбора материала для настоящего исследования и за помощь при ботанической характеристике.

ЛИТЕРАТУРА

- Данилова М. Ф. Структурные основы поглощения веществ корнем. Л., 1974.
- Израйльский В. П. Бактериальные болезни растений. М., 1952.
- Руководство для изучения бактериальных болезней растений. М., 1968.
- Клевенская И. Л., Дударева Т. Е. О природе клубеньков некоторых дикорастущих трав Сибири. — В кн.: Микроорганизмы и зеленое растение. Новосибирск, 1967, 52—65.
- Красильникова-Крайнова А. И. О природе клубеньков на корнях *Alopecurus pratensis*. — Микробиол., 1962, 31, 1041—1047.
- Лашинский Н. Н., Ронгинская А. В. О корневых клубеньках небобовых растений в Сибири. — В кн.: Микроорганизмы и зеленые растения. Новосибирск, 1967, 44—51.
- Мамаев Б. М. Галлицы, их биология и хозяйственное значение. М., 1962.
- Ногтев В. П. Клубеньки на корнях лугового лисохвоста (*Alopecurus pratensis* L.), их происхождение и физиологическая функция. — Ботан. журнал, 1938, 23, 143—150.
- Работнова И. Л., Пономаренко Н. И. Симбиотические бактерии лугового лисохвоста. — Микробиол., 1949, 18, 54—61.
- Родынюк И. С., Клевенская И. Л. Клубеньковые образования травянистых растений Сибири. Новосибирск, 1977.
- Ронгинская А. В. Формообразующее действие водного режима почв на корневые системы растений орошаемых ценозов Чуйской степи. — Изв. СО АН СССР, 1958, № 5, 130—137.
- Руководство для изучения бактериальных болезней растений. М., 1968.
- Савельев Н. М., Горбалева Г. Н., Клевенская И. Л. О роли клубеньков на корнях злаков. — Изв. СО АН СССР, 1958, № 10, 124—128.
- Силина К. А. Биологические особенности лисохвоста лугового в условиях лесотундровой зоны. — Ботан. журнал, 1955, 40, 592—596.
- Сильвере А.-П., Каареп Ю., Гийвель Т. О методике окраски срезов биологических объектов, залитых в эпоксидные смолы, для световой микроскопии. — Изв. АН ЭССР, Биология, 1978, 27, 150—152.
- Akkermans, A. D. L. Root nodule symbiosis in non-leguminous N₂-fixing plants. — In: Interactions between non-pathogenic soil microorganisms and plants. Amsterdam-Oxford-New York, 1978, 335—376.
- Andreeva, I. N., Zhiznevskaya, G. Ya. Ultrastructure of symbiotic nitrogen-fixing system in the root of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) and silverberry (*Elaeagnus argentea* Pursh.). — In: Proceedings of the 7th European congress on electron microscopy, Biology, 2, Hague, 1980, 476—477.
- Baker, D., Miller, N. G. Ultrastructural evidence for the existence of actinorhizal symbioses in the late Pleistocene. — Can. J. Bot., 1980, 58, 1612—1620.
- Baker, D., Newcomb, W., Torrey, J. G. Characterization of an ineffective actinorhizal microsymbiont, *Frankia* sp. Eul 1 (*Actinomycetales*). — Can. J. Microb., 1980, 26, 1072—1089.
- Balandreau, J., Knowles, R. The rhizosphere. — In: Interactions between non-pathogenic soil microorganisms and plants. Amsterdam-Oxford-New York, 1978, 243—268.
- Becking, J. H. Plant-endophyte symbiosis in non-leguminous plants. — Plant & Soil, 1970, 32, 611—654.
- Beltra, R., Diaz, F., Rubio-Huertos, M. Nodule-like structures induced on legume roots by the sterile fraction of nucleic acids isolated from *Rhizobium* species. — Zbl. Bakt., Abt. II, 1981, 136, 31—41.
- Burkhardt, H. J., Kamberger, W. Influence of the host plant on the morphology of *Rhizobium japonicum* bacteroids. — Electron Microscopy, 1980, 2, 474—475.
- Ellmore, G. S., Strand, R., Laetsch, W. M. Behavior in tissue culture of nitrogen-fixing root nodules of *Ceanothus integerrimus*. — Can. J. Bot., 1980, 58, 1121—1128.
- Gresshoff, P. M., Djorgevic, M., Carroll, B., Monapatra, S., Hughes, J., Shine, J., Scott, K., Rolfe, B. Symbiotic nitrogen fixation in white clover. — Second Intern. Congr. on Cell Biol. — European J. Cell Biol., 1980, 22, 231.
- Küster, E. Taxonomy of soil actinomycetes and related organisms. — In: The ecology of soil bacteria. Univ. of Toronto Press, 1968, 322—336.
- Nelson, A. D., Barber, L. E., Tjepkema, J., Russell, S. A., Powelson, R., Evans, H. J. Nitrogen fixation associated with grasses in Oregon. — Can. J. Microbiol., 1976, 22, 523—530.
- Newcomb, W., Peterson, R. L., Callahan, D., Torrey, J. G. Structure and

- host-actinomycete interactions in developing root nodules of *Comptonia peregrina*. — Can. J. Bot., 1978, 56, 502—531.
- Old, K. M., Nicolson, T. H. Electron microscopical studies of the microflora of roots of sand dune grasses. — New Phytol., 1975, 74, 51—58.
- Phillips, D. A., Torrey, J. G., Burris, R. H. Extending symbiotic nitrogen fixation to increase man's food supply. — Science, 1971, 174, 1969—1970.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
9/VII 1981

Elve TIKK, Ants-Peep SILVERE

MIKROORGANISMIDE SEOS MITTELIBLIKÖIELISTE ROHTTAIMEDE JUUREMÜGARATEGA NENDE HISTOLOOGIAST JA ULTRASTRUKTUURIST LAHTUDES

Artiklis on antud ülevaade probleemi kujunemisest ja praegusest seisust ning Eestis kogutud vastava materjali valgus- ja elektronmikroskoopilise analüüsi tulemused.

Juuremügaratega seotud õhulämmastikku siduva baktर्सүмбиоси esinemine liblikõielistel taimedel on andnud põhjust otsida analoogilist seost ka mitteliblikõieliste taimede juuremügarate ja baktर्सүмбиоси vahel. Funktsionaalselt ja struktuurselt samaväärne sümbioos kiirikseentega on tõestatud mõnedel puudel ja põõsastel; mitteliblikõielistel rohttaimedel esinevad juuremügarad sporaadiliselt sama taimeliigi populatsioonis ning nende seoste kohta mikroorganismide ja õhulämmastiku sidumisega on andmed üsna vasturääkivad. Põhjalikumalt on seda nähtust uuritud Lääne-Siberis, kus uurijate arvates esineb baktर्सүмбиоси 75 taimeliigil. Neist 25 liiki 11 sugukonnast oli võimalik uurida Eestis (tab. 1), kusjuures 11 liigil sedastati juuremügarataolisi moodustisi; ainult aas- ja mustjal rebasesabal (*Alopecurus pratensis* L. ja *A. ventricosus* Pers.) esines juuremügaraid kõikidel taimedel arvukalt.

Kogutud juuremügarad uuriti valgus- ja elektronmikroskoopia abil; valgusmikroskoopilise uurimisega määrati bakteritaoliste struktuuride esinemine juuremügarate kudedes ning elektronmikroskoopilise uurimise otstarbekus. Rebasesabade mügaraid moodustava juure vohava kooreparenühüümi välimistes protoplastita rakkudes leiti korünebakterite taolisi mikroorganisme (joon. 1—9), mis olid võimelised lahustama vahetult bakteri pinnaga kokkupuutuva taimeraku seinu, kuid sümbioosi tunnuseid nende suhetes taimedega ei sedastatud. Vesihalja tarna (*Carex flacca* Schreb.) mügarate kooreparenühüümi rakkude vakuoolides valgusmikroskoopiliselt nähtavad bakteritaolised struktuurid (joon. 10, 11) osutusid elektronmikroskoopilisel uurimisel vakuooli seinast irdunud taimetsütoplasma autonoomseteks piiskadeks. Selliste struktuuride teke on seotud noortes taimerakkudes vakuoolide moodustumisel tekkivate tsütosegresoomidega ega oma midagi ühist baktर्सүмбиосига. Teiste uuritud taimede juuremügarad moodustuvad põhiliselt säilitusainetega täidetud juure kooreparenühüümi rakkude vohamise teel (joon. 12—15); värvumadara (*Galium boreale* L.) mügarad on paksääse *Ametrodilopsis auripes* F. Lw. vastsete tüüpiliseks biotoobiks.

Saadud tulemuste põhjal võib väita, et enamikul juhtudel on juuremügarate leidmine mitteliblikõielistel rohttaimedel ebapiisav baktर्सүмбиоси eeldamiseks. Bakterioloogiliste isoleerimis(külvi-)katsete tulemused ei ole ilmselt usaldatavad taimeosade, eriti juurte ja juuremügarate pinna keeruka ehituse tõttu. See ei võimalda katsematerjali pindmiselt korrektselt steriliseerida ning sellistes katsetes on isoleeritud enamasti mitmesuguseid tavalisi mullamikroorganisme. Kõige adekvaatsemad tulemusi bakterite lokaliseerimise ja seoste kohta taime juurekudedega ning mügaratega võimaldavad elektronmikroskoopilise tsütoloogia meetodid.

Elve TIKK, Ants-Peep SILVERE

CONNECTIONS OF MICROORGANISMS AND ROOT NODULES OF NON-LEGUMINOUS GRASSES IN THE LIGHT OF THEIR HISTOLOGY AND ULTRASTRUCTURE

The authors give a review of the formation and the present state of the problem as well as the results of light and electron-microscopical analyses of local (Estonian) materials.

The analogy with the effective root-nodule symbiosis of leguminous plants serves as a basis for connecting the root nodules of non-leguminous plants with microorgan-

isms and with symbiotic nitrogen fixation as an essential factor of soil fertility. Similar symbiosis with actinomycetes has been formed in the case of some bushes and trees, whereas the data concerning nodule-like structures on the roots of non-leguminous grasses are rather inconsistent.

The distribution of nodule-like structures on the roots of non-leguminous grasses has been most thoroughly studied in western Siberia. Structures of that type could be recorded there on 75 plant species. Twenty-five of them were accessible to investigation in Estonia (Table 1), and nodule-like structures could be found on the roots of 11 species. On the roots of *Alopecurus pratensis* L. and *A. ventricosus* Pers. nodules were found on every plant in abundance.

The root nodules were properly prepared for investigation by light and electron microscopy, while the light microscopy served for obtaining preliminary data for electron microscopical investigation.

In the proliferated parenchyma cells of *A. pratensis* L. and *A. ventricosus* Pers. (Figs 1—9) there are some coryneform bacteria that are able to dissolve the walls of plant cells in the contact sites, but there is no evidence of a symbiotic relationship between these microorganisms and the plant cells. In the all vacuoles of the parenchyma cells of root nodules of *Carex flacca* Schreb., plenty of bacteria-like structures are visible light-microscopically (Fig. 10), while electron microscopy shows only the pieces of plant cytoplasm being repelled from the protoplast into the vacuoles. The formation of such autonomous cytoplasmic bodies is connected with the development of vacuoles from cytopesomes in the meristematic and other young plant tissues, and this has nothing to do with bacterial symbiosis. The root nodules of other investigated plant species are formed by means of parenchyma cells filling with different granules of storing materials, and in the case of *Galium boreale* L. the larvae of the gall-midge (*Ametrodilopsis auripes* F. Lw.) were also detected in every nodule.

On the basis of these results we suggested that in most cases the finding of some nodule-like structures on non-leguminous plants is insufficient for establishing the bacterial nitrogen-fixing symbiosis. The bacteriological method of isolating microorganisms from the nodule tissue is doubtful because of the difficulty of obtaining reliable sterility of the nodule, since the root surface has a very complicated relief. Most adequate data on the localization and connections of the microorganisms in root and nodule tissues are to be obtained by the methods of electron microscopical cytology.