

# УЛЬТРАСТРУКТУРНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГРИБОВ И РАСТЕНИЙ ПРИ СИМБИОЗЕ НА ПРИМЕРЕ МИКОРИЗЫ ОРХИДЕИ *COELOGINA CRISTATA LINDL.*

(Представлена академиком НАН РК И. О. Байтулиным)

Приведены результаты изучения взаимодействия грибов и растений при симбиозе на примере микоризы орхидеи *Coelegina cristata Lindl.* с применением метода электронной микроскопии. Исследование инфицированных микоризным грибом корней показало, что эндофит не проникает в ткани, где происходят метаболизм и транспорт, а также в центральный цилиндр. Процесс переваривания начинается при преодолении грибом сложного лабиринта выростов оболочки клеток экзодермы, где, как нам представляется, гифы испытывают наибольшее воздействие ферментативной системы растения-хозяина.

Для семейства *Orchidaeae Lindl.* характерна толипофаговая микориза. Эндомикоризы орхидных впервые были обнаружены и описаны в начале XIX в., однако, до сих пор они являются интереснейшими объектами исследования. Вопросами симбиоза орхидей и эндомикризных грибов занимались такие выдающиеся ученые как Bernard [1], Knudson [2] Curtis [3], Burgeff [4] и др. И хотя эти работы ныне стали классическими, в этой области исследований, на наш взгляд, имеется не мало белых пятен. Имеющиеся в литературе данные не могут в полной мере, ответить на основной вопрос: какова интимная сторона, внутренняя природа взаимодействия микоризного гриба и высшего растения,

какова биологическая сущность процессов, протекающих в местах контакта гиф с клетками корня. Даже общая сторона проблемы – выяснение причин образования сожительства и условий, способствующих или препятствующих его возникновению, – очерчена не полно и не убедительно. Неоднозначно трактуется и механизм распределения эндомикризных грибов в корнях орхидей: одни авторы связывают особенности микоризации с защитными реакциями клеток коровой паренхимы корня, другие – с физиологической специфичностью эндомикризной ассоциации орхидея – гриб. Третий – с сезонными изменениями.

Исходя из изложенного, целью нашей работы было изучение строения воздушных и субстратных

корней, выявление эндомикоризного гриба, установление степени инфицирования, особенностей локализации и развития эндофита внутри тканей поглощающих органов.

### Материал и методика

Объектом исследования служили инфицированные микоризным грибом воздушные и субстратные корни орхидеи *Coelogina cristata* Lindl.

С этой целью отрезки корней орхидеи фиксировали 6% глутаровым альдегидом на 0,1 М фосфатном буфере ( $\text{pH} = 6,8$ ) с постфиксацией 2% OsO<sub>4</sub> на том же буфере, обезвоживали серией спиртов возрастающей концентрации и заключали в эпоксидную смолу Эпон 812. Ультратонкие срезы получали с помощью ультрамикротома LKB-880, окрашивали уранилацетатом и лимонно-кислым свинцом [5]. Просмотр препаратов осуществляли в электронном микроскопе Филипс EM-301.

### Результаты исследования и их обсуждение

Эндотрофная микориза была обнаружена практически у всех растений *Coelogina cristata*, выращиваемых в горшечной культуре на органических и неорганических субстратах. В корнях, развивающихся внутри субстрата и в участках корней, соприкасающихся с субстратом, обнаружен эндофит на разных стадиях его развития, начиная от его внедрения через корневые волоски и кончая его “перевариванием” в клетках коровой паренхимы. Корни, не погруженные в субстрат и не соприкасающиеся с ним, были лишены микоризы.

Пройдя через корневые волоски, гриб попадает в веламен. Несмотря на определение веламена как ткани, состоящей из мертвых клеток в современной литературе, посвященной орхидным, эпидермальный покров корней наземных и эпифитных орхидей называется веламеном независимо от того, содержат его клетки протопласты или нет. В нашей работе мы также условно называем эпидермальный покров корней, состоящий из живых или мертвых клеток, веламеном.

Клетки веламена с довольно мощными клеточными стенками, имеют характерные утолщения. В нем гифы эндофита распространяются в разных направлениях. Следует отметить, что гриб не везде остается здоровым. В веламене, наряду с гифами, хорошо сохранившими внутреннюю структуру, обнаруживаются клетки грибов, находящиеся на разной стадии деградации. Начальная фаза ее характеризуется неначительной



Рис. 1. Облитерированные гифы гриба. Ув. 18 000

дезорганизацией цитоплазмы, появлением многочисленных вакуолей, частичным плазмолизом. По мере проникновения гиф вглубь тканей корня признаки разрушения клеточных структур гриба усиливаются и как конечный результат деградации гиф можно отметить их полную некротизацию: содержимое гиф становится бесструктурным и электронно-плотным. Впоследствии происходит облитерация гиф (рис. 1).

Гифы окружены фибрillлярной оболочкой, состоящей из двух слоев, заполнены цитоплазмой средней электронной плотности и содержат присущие им органоиды.

Плазматическая мембрана в одних гифах гриба прилегает к клеточной стенке и имеет более или менее ровные очертания, тогда как в других приобретает извилистый характер.

Ядро располагается по периферии клетки и имеет округлую форму. Ядерная оболочка слегка волнистая, в ней встречаются немногочисленные поры, наружная мембрана без рибосом. Большая часть ядра занята диффузным хроматином. Ядрышко одно и несколько смещено от центра ядра.

Митохондрии немногочисленны, 1–2 на срез, они округлой либо овальной формы, ограничены двухслойной мембраной, внутренний слой которой образует кристы. Матрикс митохондрий средней электронной плотности, в нем обнаруживаются темные интрамитохондриальные гранулы и миторибосомы.

Эндоплазматический ретикулум гранулярного типа, отдельные цистерны его на всем своем протяжении несут рибосомы.

В цитоплазме отмечаются многочисленные гранулы, сходные с рибосомами, часто собранные в полисомы.

Липидные капли единичные, размеры их варьируют. Гранул гликогена, широко распро-

страненного запасного вещества грибов, также незначительное количество.

Вакуоли с зернисто-фибриллярным содержимым ограничены элементарной мембраной. На отдельных срезах отмечаются вакуоли довольно крупных размеров с электронно-плотным включением, расположенным по периферии, и занимающим четвертую часть ее объема.

Мицелий гриба септированный. Клетки гиф отделены друг от друга симметричными перегородками – септами, состоящими из трех слоев: двух широких электронно-плотных и узкого светлого слоя между ними. В центре септы располагается пора, окруженная светлым долипоровым утолщением, в которое входят темные слои септы. Поры в септах, образованные вследствие врастания внутреннего слоя стенок гиф, открыты. Пробки в них отсутствуют.

Темные слои септы в зоне поры, расширяясь за счет светлого центрального слоя, формируют канал поры. От канала поры по обе ее стороны находятся скопления осмиофильного материала, имеющего зернисто-фибриллярную структуру, который прилегает к краям септ, простираясь в область долипорового утолщения. С наружной стороны от септ пора ограничена колпачком, по своему строению сильно отличающегося от элементов порового аппарата. Он имеет вид очень плотного полумесяца и образован из нескольких чередующихся по толщине, темных и светлых слоев, причем толщина темных слоев значительно превышает толщину светлых, что на первый взгляд даже дает ощущение однородности строения колпачка (рис. 2).

В зоне выростов сложной конфигурации на наружной поверхности стенки клеток экзодермы, направленных в сторону веламена, и условно названных нами “зоной лабиринта”, обнаружива-

ются признаки значительного разрушающего действия растения-хозяина на гриб. Гифы находятся в тесном контакте с выростами клеточной стенки, образующие лабиринтоподобные структуры. Следует отметить, что степень развития выростов неодинакова. Так, над живыми тонкостенными пропускными клетками экзодермы выросты развиты сильнее, их плотность и высота значительно превышает таковые над другими тонкостенными клетками экзодермы. Вероятно, выросты играют роль защитного барьера, препятствующего проникновению гиф эндофита в глубжележащие ткани корня, т.к. именно через живые тонкостенные пропускные клетки гриб преодолевает экзодерму и распространяется в клетках коровой паренхимы. Конгломераты облитерированных гиф гриба с полностью деградированной цитоплазмой (пелотоны) обнаружены нами в гипертрофированных клетках коровой паренхимы. В местах контакта гриба с клетками растения отмечается отложение аморфного электронно-плотного вещества. Кроме того, довольно часто встречаются гифы, наружный слой оболочки которых покрыт сверху слоем электронно-плотного вещества, при этом утолщение и образование новых слоев оболочки на поверхности плазмолизированной цитоплазмы происходит по концентрическому типу, вследствие чего появляются гифы с довольно причудливой конфигурацией клеточных оболочек. Цитоплазма отдельных гиф содержит многочисленный вакуолярный материал (рис. 3).

Часть вакуолей с электронно-плотным содержимым, в некоторых вакуолях содержимое невысокой электронной плотности. Наблюдаемые многочисленные мелкие пузырьки, по-видимому, представляют собой остатки вакуолизированных митохондрий с разрушенными кристами, транс-

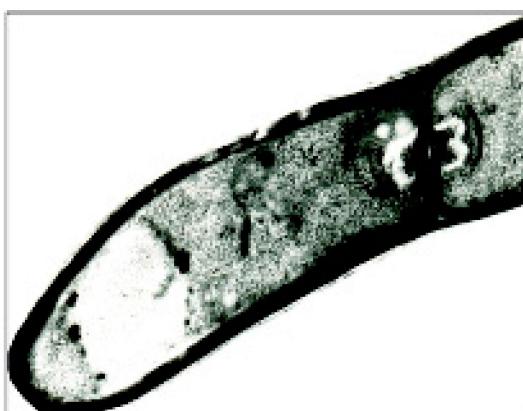


Рис. 2. Гифа гриба с септальной порой. Ув. 36 000

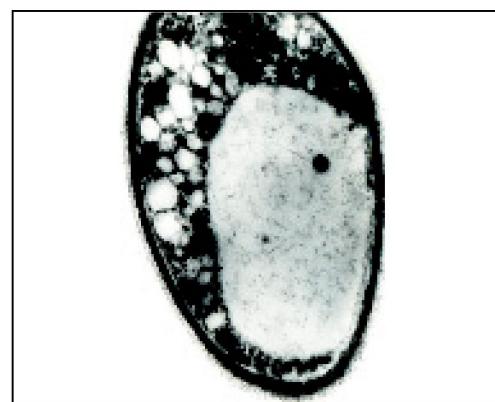


Рис. 3. Гифа с вакуолизированной цитоплазмой. Ув. 66 000

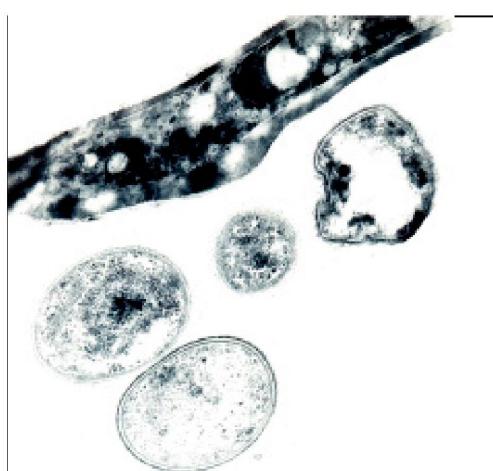


Рис. 4. Бактерии по соседству с гифой. Ув. 28 000

формировавшимися в отдельные пузырьки. В достаточно большом количестве выявляются осмиофильные глобулы, различных размеров, возможно, являющиеся полифосфатами. Отмечающиеся особенности строения гиф и инфицированных клеток корня обусловлены, по всей вероятности, взаимным действием гриба на растение-хозяина и растения на гриб и являются следствием защитной реакции обоих партнеров.

При исследовании этой зоны в электронном микроскопе нами были обнаружены многочисленные бактерии (рис. 4).

Они заселяли свободные от выростов пространства, располагаясь поодиночке, либо группами. Некоторые из них плотно прилегали к выростам. Присутствие бактерий в клетках корня наряду с гифами гриба дает основание предполагать наличие тройного симбиоза: растение-гриб-бактерия. Однако явление тройного симбиоза, также как и факт симбиоза гриба и бактерии, нуждается в дополнительном исследовании.

В центральном цилиндре гифы гриба не обнаружены. Исследования инфицированных мицелий грибом корней *Coelogina cristata* подтвердили вывод о том, что эндофит никогда не проникает туда, где происходит активный метаболизм и транспорт, т.е. в проводящие, хлорофиллоносные, меристематические ткани. Mac Dougal и Dufreney [6], исследуя орхидеи из рода *Corallrhiza*, также указывали на то, что грибы-симбионты не пересекают границы эндодермы, и не проникают в центральный цилиндр [7].

Таким образом, проведенное исследование позволяет сделать вывод, что переваривание

гриба осуществляется в клетках коровой паренхимы. Процесс переваривания начинается при преодолении грибом сложного лабиринта выростов оболочки клеток экзодермы, где, как нам представляется, гифы испытывают наибольшее воздействие ферментативной системы растения-хозяина.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Bernard N. Revolution dans la symbiose, les Orchées et leur champignons commensaux // Ann. d. sci.nat., Bot. Ser., 1909. V. 9. P. 1-196.*
2. *Knudson L. Seed germination and growth of Calluna vulgaris // New Phytol. 1929. V. 28. P. 369-385.*
3. *Curtis J.T. The relation of specificity of orchid mycorrhizal fungi to the problems of symbiosis // American J. of Botany. 1939. V. 26. P. 390-398.*
4. *Burgeff N. Problematized mycorrhiza // Naturwissenschaft. 1943. T. 47-48. S. 558-567.*
5. *Reynolds E. The Use Lead Citrate at high pH as an electron stain in electron microscopy // J. Cell Biol. 1963. V. 17. N. 1. P. 208-213.*
6. *Mac Dougal, Dufreney J. Mycorrhizal symbiosis in Aplectrum, Corallorrhiza and Pinus // Plant Physiology. 1944. V. 19. P. 440-465.*
7. *Залукаева Г.Л. О мицоризе тропических и субтропических орхидей в оранжерейной культуре // Бюлл. МОИП. Отд. биол. М., 1990. Т. 95, вып. 3. С. 111-117.*

#### Резюме

Санырау құлактармен өсімдіктердің орхидей *Coelogina cristata* Lindl. мицоризасы симбиозды қарым катынастың әрекеттерін электрон микроскоп әдісімен зерттеу нәтижелері келтірілген. Мицориздың санырау құлактарды өсімдік тамырына жүқтырғанда, эндофит метаболизм және транспорт жүретін үлпаларна, және орталық цилиндрде енбайде. Корыту процесі санырау құлактың экзодерма клеткаларының құрамды бездер лабиринтерінен откеннен кейін ғана корыту процесі басталады бідің ойымыша, гифтер өсімдіктің ферменттивтік жүйесінің өте қатты әсеріне тап болады

#### Summary

Results of studying with method electron microscopy on interaction fungi and plants with symbiosis (on example mycorrhiza orchid *Coelogina cristata* Lindl.) are adduced in the paper. On infection mycorrhizal fungi of roots the endophyte hadn't penetrated in central cylinder and tissues, where metabolism and transport occurred. Cells covers of ecdoderma formed complicated labyrinths from excrescences. In our opinion process of digesting at penetrating fungi endophyte gypes have begin here, were gypes have experienced the most dependence of fermentative system of plant-host.

УДК 57.086.3.581.557.24

Институт ботаники и фитоинтродукции

МОН РК, г. Алматы

Поступила 2.03.10г.