

TARTU ÜLIKOOL

GEOGRAAFIA INSTITUUT

MAIT METSPALU

**LÄMMASTIKU FIKSEERIMINE**  
***ALNUS – FRANKIA SÜMBIOOSIS***

BAKALAUREUSETÖÖ LOODUSGEOGRAAFIAS

Juhendajad:

prof. Ülo Mander  
vanemteadur Krista Lõhmus

TARTU 1999

<b>1</b>	<b>LÄMMASTIKU SÜMBIONTNE FIKSEERIMINE <i>ALNUS-FRANKIA</i> SÜMBIOOSIS</b>	<b>4</b>
1.1	SAATEKS:	4
1.2	BIOLOOGILINE LÄMMASTIKU FIKSEERIMINE	5
1.3	FRANKIA - SÜMBIONTNE LÄMMASTIKU FIKSEERIJA	6
1.3.1	INFEKTSIOON	6
1.3.2	SÜMBIOOSI BIOLOOGIA	8
1.3.3	SPOOR-POSITIIVSED JA SPOOR-NEGATIIVSED <i>FRANKIA</i> TÜVED	10
1.3.4	<i>FRANKIA</i> MULLAS VÄLJASPOOL PEREMEESTAIME	11
1.4	FIKSEERITUD LÄMMASTIKU ASSIMILATSIOON PEREMEESORGANISMIS	12
1.5	LÄMMASTIKU FIKSEERIMISE AKTIIVSUST MÕJUTAVAD TEGURID	13
1.5.1	FIKSEERIMISE AASTANE JA ÖÖPÄEVANE TSÜKKEL NING SÜSINIKU STRESS	13
1.5.2	O <sub>2</sub> TUNDLIKKUS	14
1.5.3	MINERAALSE LÄMMASTIKU MÕJU	15
1.5.4	TAGASISIDE KUI N <sub>2</sub> FIKSEERIMISE KONTROLLMEHCHANISM.	18
1.6	FIKSEERITUD LÄMMASTIKU KOGUSE MÄÄRAMISE MEETODID	19
1.6.1	<sup>15</sup> N ANALÜÜS	19
1.6.2	ATSETÜLEENI-ETÜLEENI MEETOD	20
1.6.3	ATSETÜLEENI MÕJU NITROGENAASI AKTIIVSUSELE	21
1.7	AKTINORIISATAIMEDE SÜSTEMAATIKA JA FÜLOGENEES	22
1.8	FRANKIA (ACTINOMYCETALES) TAKSONOOMIA UURINGUD	24
1.9	ENSÜÜM NITROGENAAS	25
1.9.1	ENSÜÜMI EHITUS	25
1.9.2	ENSÜÜMI TÖÖMEHCHANISM	26
1.10	PEREMEESTAIME GEENIEKSPRESSIOON	27
1.11	FRANKIA GEENIEKSPRESSIOON	28
<b>2</b>	<b>TÖÖ EKSPERIMENTAALNE OSA</b>	<b>30</b>
2.1	SISSEJUHATUS	30
2.2	MATERJAL JA METOODIKA	33
2.2.1	LÄMMASTIKU FIKSEERIMISE AKTIIVSUSE MÄÄRANGUD: PINDALAÜHIKULE EKSTRAPOLEERIMISE OPTIMEERIMINE	33
2.2.1.1	Porijõe uurimisala kirjeldus	34
2.2.1.2	Kasutatud andmed	35
2.2.2	LÄMMASTIKU FIKSEERIMINE SÕLTUVALT VÄETUSKOORMUSEST	36
2.2.2.1	Katseseadeldis	36
2.2.2.2	Katsetaimed ja katsvusubstraat	36
2.2.2.3	<sup>15</sup> N lisamine	37
2.2.2.4	Väetuskormused	37

2.2.2.5	Katse kulg	37
2.2.3	ANDMETE STATISTILINE TÖÖTLUS	39
<b>2.3</b>	<b>TULEMUSED</b>	<b>40</b>
2.3.1	AKTIIVSE NOODULIMASSI PINDTIHEDUSE HINDAMINE PORIJÕE UURIMISALAL	40
2.3.1.1	Proovide kuivmassid.	40
2.3.1.2	Noodulite tipmiste ja basaalosade lämmastiku- ja tselluloos+ligniini sisaldused	42
2.3.2	LÄMMASTIKU FIKSEERIMINE SÕLTUVALT VÄETUSKOORMUSEST	44
2.3.2.1	Mullaanalüüsid	44
2.3.2.2	Katsetaimede biomassid	44
2.3.2.3	<sup>15</sup> N‰ ja N% katsetaimede analüüsitud biomassi fraktsioonides sõltuvalt väetuskooormusest.	47
2.3.2.4	Biomassifraktsioonidesse inkorporeeritud <sup>15</sup> N hulgad (µg) sõltuvalt väetuskooormusest	50
<b>2.4</b>	<b>ARUTELU</b>	<b>54</b>
2.4.1	LÄMMASTIKU FIKSEERIMISE AKTIIVSUSMÄÄRANGUD: PINDALAÜHIKULE EKSTRAPOLEERIMISE OPTIMEERIMINE	54
2.4.1.1	Lämmastik mullas ja noodulis	54
2.4.1.2	Nooduli aktiivse osa eraldamine	55
2.4.1.3	Nooduli tipmiste osade pindtiheduse võrdlus noodulite pindtihedusega ja sellest tulenevad järeldused	55
2.4.2	LÄMMASTIKU FIKSEERIMISE SÕLTUVUS MINERAALSE LÄMMASTIKU VÄETUSKOORMUSEST	57
2.4.2.1	Väetuskooormused ja mullaniiskus	57
2.4.2.2	Tulemuste varieerumine	58
2.4.2.3	Väetuskooormuste mõju lämmastiku fikseerimisele	58
<b>3</b>	<b>KOKKUVÕTE</b>	<b>60</b>
<b>4</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>61</b>
<b>5</b>	<b>KIRJANDUSE LOETELU</b>	<b>62</b>

# 1 Lämmastiku sümbiontne fikseerimine *Alnus-Frankia* sümbioosis

## 1.1 Saateks:

Lämmastikku fikseerivad sümbioosid on juba pikka aega maastikuökoloogide huviorbiidis. Sellises sümbioosis taimede võimalikult efektiivsem kasutamine intensiivselt kultiveeritavate muldade toitainetesisalduse tõstmisel ja vaeste muldade parandamisel ning nende mõistlikul kasutusel on üks võimalikke arengusuundi. Nii on külvikordade vaheldumine ja liblikõieliste kasutamine selles ökoloogilise põllumajanduse üks alustalasid. Sümbiontselt lämmastikku siduvate puuliikide kasutamine on perspektiivne karjäärade ja saastatud alade rekultiveerimisel. Need liigid suudaksid pioneerkooslusena luua head tingimused metsa arengule. Eestis on lepa kasutamine sellel eesmärgil väga efektiivne. Nimelt areneb normaalse suksessiooni käigus lepikust kliimaskooslusena kuusik. Ka taastuva energiaallikana aktuaalseks muutunud energiametsaks sobiks lepikud hästi. Energiamets kui monokultuur vajab tõhusa kasvu tagamiseks lämmastikuga väetamist. Lepa puhul võiks selline vajadus ära langeda.

Lepp kui kiiresti kasvav puuliik leiab tihti kasutust ka mitmesugustes kaitseribades, milliseid kasutatakse näiteks veekogude kaitseks reostuse eest. Sellised puhvertsoonid on küllaltki efektiivsed ja seovad suure osa neid läbivast fosforist ja lämmastikust. Lepa otstarbekus sellisel puhul on aga olnud kahtluse all. Nimelt võib ta õhulämmastiku sidujana käituda vastupidiselt soovitud ja olla täiendava lämmastikureostuse allikas. Uurimused, mis on püüdnud seda küsimust selgitada, ei ole täit selgust toonud. Ilmselt mängib lämmastikust puhastumisel kaitseribades suurt rolli ka denitrifikatsioon. Head tulemused lepikute biogeene puhverdava toime kinnituseks on saadud Viiratsi ja Porijõe uurimisalade lepikute kohta, mida TÜ Geograafia Instituudi poolt on viimastel aastatel intensiivselt uuritud (Mander *et al.*, 1995, 1997; Lõhmus *et al.*, 1996). Samas on nimetatud töödes lämmastiku fikseerimise voog hinnatud vaid kaudselt (noodulite biomassi alusel). Käesoleva töö pikemaajaliseks eesmärgiks tulebki lugeda antud voo täpsemat hindamist halli lepa (*Alnus incana*) puhver-puistutes. Käsitletakse nii tulemuste ekstrapoleerimise optimeerimist kui lämmastiku fikseerimise sõltuvust mineraalse lämmastiku

koormusest. Viimase küsimuse lahendamisel kasutatakse otsest meetodit ( $^{15}\text{N}$  inkorporeerimine).

## **1.2 Bioloogiline lämmastiku fikseerimine**

Lämmastik on asendamatu vajalik kõigile elusorganismidele. Assimilatsiooniks sobivates vormides lämmastiku kättesaadavus on sageli kasvu limiteerivaks teguriks. Samas on lämmastik atmosfääri peamiseks komponendiks, moodustades sellest 78%. Atmosfääris on lämmastik valdavalt molekulaarsel ( $\text{N}_2$ ) kujul. Sellisel kujul lämmastik on kõikidele eukarüootidele ja enamusele prokarüootidest kättesaamatu. Assimilatsioonikõlblikuks muudetakse atmosfääri lämmastik redutseerimise teel.

Mõnedel prokarüootidel esineb ensüüm nitrogeenaas, mis on võimeline redutseerima atmosfääri lämmastikku ammoniumiks. Seda ülitähtsat protsessi, bioloogilist lämmastiku fikseerimist, viivad bakterid läbi kas iseseisvalt, sümbioosis või assotsiatiivses sümbioosis mõne eukarüootiga.

Vabalt elavaid lämmastikku fikseerivaid baktereid on paljudes perekondades: nii anaeroobseid kui aeroobseid, autotroofseid kui heterotroofseid, fototroofseid kui kemotroofseid. Mõned liigid, keda kutsutakse assotsiatiivseteks lämmastiku fikseerijateks, elavad risosfääris. Taime ülesandeks on siin bakteri varustamine juureeritiste kaudu. Fikseeritud lämmastik saab taimetele kättesaadavaks bakteri surma järel. Assotsiatiivsetest lämmastiku fikseerijatest on uurituimad perekonnad *Azospirillum*, *Klebsiella* ja *Enterobacteria*.

Sümbiontsete lämmastikufikseerijate hulka kuuluvad tsüanobakterid ja perekondade *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* ja *Frankia* liikmed. Rohkem on uuritud sümbioosi liblikõieliste ja *Rhizobium*'i (või *Bradyrhizobium*'i) vahel, mis omab rakenduslikku väärtust põllumajanduses. Viimasel kümnendil on aga hakatud sügavamalt huvi tundma ka *Frankia* ja aktinoriisataimede vahelise sümbioosi vastu. Aktinoriisataimed (ing. k. *actinorhizal plants*) on taimed, kes osalevad lämmastiku sümbiontses fikseerimises sümbioosis aktinomütsetidega perekonnast *Frankia*. Need taimed on oma kasvukoha muldadele üheks peamistest lämmastikuallikatest. Osa fikseeritud lämmastikust siseneb mulda otse juurtest (juureeritised), kuid suurem osa fikseeritud

lämmastikust satub mulda siiski varise kaudu (Huss-Danell, 1986). Lepalehtede lämmastikusisaldus on tavaliselt 2-3% so. 2-3 korda suurem kui teistel Euroopa laialehelistel puuliikidel (Mikola, 1958). Lepp ei transpordi lämmastikku enne lehtede langemist puu teistesse osadesse samal määral kui seda teevad teised puuliigid (Viro, 1955). Lepa lehevaris mineraliseerub kiirelt (Mikola, 1958), mistõttu lepikevad tõstavad oluliselt muldade lämmastikusisaldust. Akumulatsiooni hinnangud kõiguvad sõltuvalt tingimustest 12 kuni 300 kg N ha<sup>-1</sup> a<sup>-1</sup> (Tarrant and Trappe, 1971). On näidatud, et näiteks hall lepp (*Alnus incana*) võib saada umbes 55% lämmastikust fikseerimise teel (Rytter *et al.*, 1991). Kindlasti on seegi number oluliselt sõltuv keskkonna tingimustest.

### 1.3 Frankia - sümbiontne lämmastiku fikseerija

Lämmastiku fikseerimise sümbioosis *Frankiaga* moodustuvad aktinoriisataimede juurtel juurenoodulid (e. aktinoriisad). Need on mitmeaastased modifitseerunud lateraalsed juured. Juurenoodul kasvab tipust ja hargneb koraljalt. Joonisel 1. on toodud kahe mitmeaastase valge lepa (*Alnus incana*) juurenooduli foto.



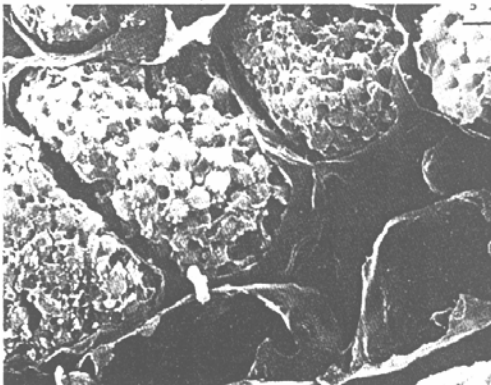
Joonis 1. Juurenoodulid *Alnus incanal*. Suurema nooduli läbimõõt on ~6 cm. Fotot lubas lahkelt kasutada I. Ostonen. Värviline joonis lisas 1.

#### 1.3.1 Infektsioon

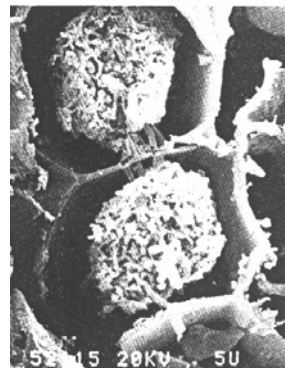
Aktinoriisad e. noodulid e. juuremügarad arenevad lateraalse juure (külguure) kasvukuhikust ja säilitavad modifitseerunud juure struktuuri, omades nii keskmist vaskulaarkambiumi kui perifeerset kortikaalkude. *Frankia* nakatab peremeestaime juuri kas juurekarva kaudu (Berry *et al.*, 1986) või tungides läbi juure epidermaalkoe

(Liu and Berry, 1991; Miller and Baker, 1986). Taimedel, mis nakatuvad juurekarva kaudu, nagu näiteks lepad, on juurekarva keerdumine, mis toimub esimese paari tunni jooksul pärast nakatumist, esimeseks nähtavaks märgiks nakatumise toimumise kohta. Juurekarva keerdumisele järgneb *Frankia* hüüfi sisenemine juurekarvara (sissepungumise teel) ning kortikaalrakkude jagunemine, mis viib prenoduli moodustumiseni. Prenodul on lokaalne kortikaalkoe tihenend paksend. Prenoduli kolonisatsioonile järgneb peritsükli prenoduli lähedal lateraalse juure kasvukuhiku initsiatsioon. Lateraalse juure kasvukuhik kasvab läbi prenoduli, kusjuures mikrosümbiont tungib tema postmeristeemsetesse rakkudesse. Peremeesrakkudes mikrosümbiont prolifereerub intensiivselt ning alustab lämmastiku fikseerimist. Taimedel, mis nakatuvad *Frankiaga* viimase tungides juure epidermaalkoesse, prenodulit ei moodustu ning rakkudesse tungib *Frankia* hüüf (*frankae*) alles siis kui lateraalne juur tungib läbi nakatunud kortikaalkoe. Mõlemal juhul on tulemuseks juurenodulid, kus toimub lämmastiku fikseerimine (Newcomb and Wood, 1987).

Infektsiooni regulatsiooni uurimisel on näidatud, et peremeestaim on tõenäoselt võimeline *Frankiaga* nakatumist mõjutama nii positiivses kui negatiivses suunas. Punase lepa (*Alnus rubra*) seemnetest eraldatud flavonoididele sarnanevatest seitsmest ühendist olid üks nakatumisele positiivse ning kaks negatiivse mõjuga (Benoit and Berry 1997).



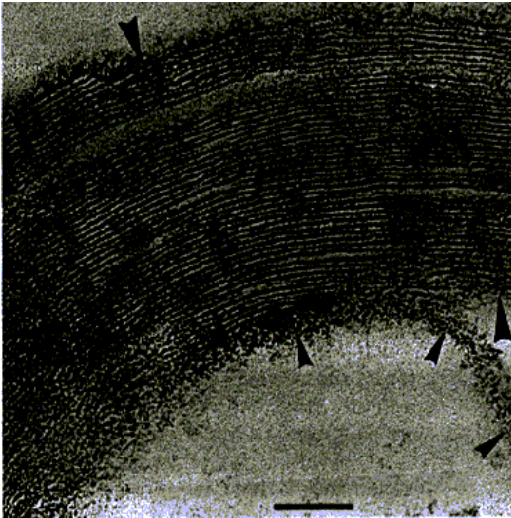
Joonis 2. *Alnus rubra* juurenodul. Näha on vesiikulitega täitunud nakatunud rakud ja vesiikuliteta mittenakatunud rakud. Skaneeriv elektronmikroskoopia. Prescott et al., 1996.



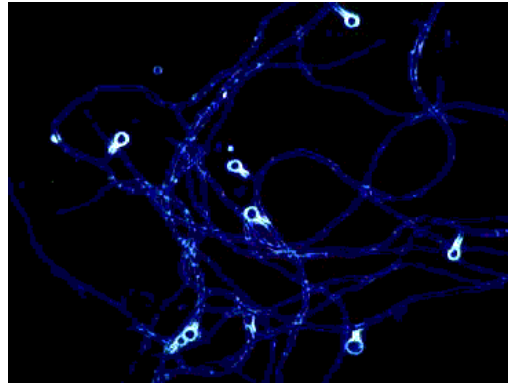
Joonis 3. *Casuarina* juure kaks nakatunud kortikaalrakku. Näha on ka rakke ühendavad hüüfid. Skaneeriv elektronmikroskoopia. Prescott et al., 1996.

### 1.3.2 Sümbioosi bioloogia

Nii infektsiooni kui sümbioosi kogu aja vältel on mikrosümbiont peremeesraku tsütoplastmast eraldatud modifitseeritud taimerakuseina materjaliga, mida kutsutakse kapseldumismaterjaliks (ing. k. *encapsulation material*), mis koosneb pektiinist, tselluloosist ja hemitselluloosist (Huss-Danell and Lundquist, 1993). Kapseldumismaterjali tootmine ja eksport moodustab suurema osa nakatunud raku suurenenud metaboolsest aktiivsusest. Peremeesrakkudes moodustab *Frankia* paljuhargnenud hüüfide (diameeter ~ 1 µm) "puu", kusjuures paljude hüüfide tippu moodustub vesiikul diameetriga 1-4 µm (joonis 2, 3, 5). Vesiikulite kuju sõltub peremeestaimest (Torrey, 1985), lepa puhul on nad sfäärilised (Lalonde and Knowles, 1975).



Joonis 4. *Frankia* vesiikuli membraani mitmekihiline struktuur. (<http://www-chem.ucdavis.edu/~farmer/hopane.html>)

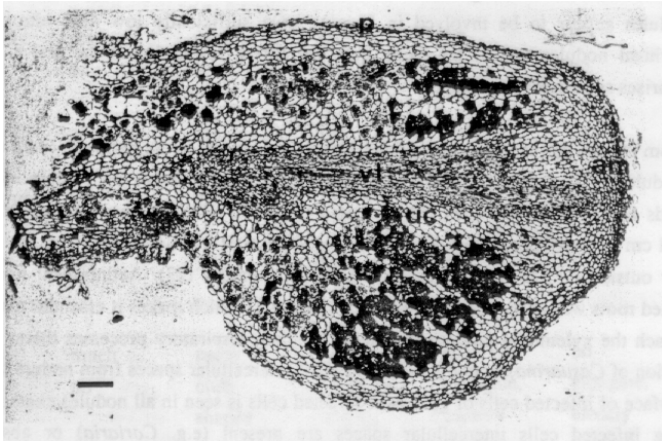


Joonis 5. *Frankia* vesiikulid hüüfide otstes. (<http://www-chem.ucdavis.edu/~farmer/hopane.html>)

Need vesiikulid ongi lämmastiku fikseerimise kohaks. Vesiikulites on lämmastiku fikseerimiseks vajalik redutseeriv keskkond (Akkermans, 1971). Vesiikulite, mitmekihilise struktuuriga membraanil ehk ka lipiidisel lamiiniumil, on oma osa mängida ka nitrogenaasi kaitsmisel hapniku eest (joon 4) (Berry and Harriott, 1993). Nimetatud membraani moodustavad valdavalt kaks lipiidi: hobaan tetrool ja hobaan tetrool fenüülatsetaat. Kõikidest *Frankial* esinevatest lipiididest moodustavad need



kaks 30-50% ning vesiikulite membraani lipiididest 100% (Kleemann and Alskog 1994). Nitrogenaas on äärmiselt hapnikutundlik ensüüm (vt. O<sub>2</sub> tundlikkus p. 1.5.2). Pawlowski et al. (1995) näitasid, et lämmastiku fikseerimine saab alguse alles siis, kui kogu rakk on täitunud hüüfidest. Hüüfide "puid" eri rakkudes ühendavad hüüfid, mis on tunginud läbi rakuseina (joon. 3) (Prescott et al., 1996).



Joonis 6. Noore *Alnus incana* juurenooduli pikiläbilõige. Noodulit ümbritseb periderm (p). Keskosas on näha vaskulaarkude (vt). Paljud kortikaalrakud on nakatunud *Frankia*'ga ning on värvunud tumedalt (ic), suur osa kortikaalrakkudest on aga nakatumata (uc). Meristeemis (am) kiirelt jagunevad kortikaalrakud on nooduli kasvu mootoriks. Joone pikkus on 100µm. (Huss-Danell and Lundquist, 1993)

On tähtis meeles pidada, et nii hüüfi -"puu" kui ühendushüüfid on kogu aeg ümbritsetud kapseldumismaterjaliga ega ole kunagi otseses kontaktis perimeesraku tsütoplasmaaga. Neid võib lugeda sisuliselt ekstratsellulaarseteks. Seega mistahes ainevahetus taime ja sümbiondi vahel läbib järgmised takistused: taimeraku membraan ja sein; *Frankia* rakumembraan, rakukest ja lipiidne lamiinium (*lipid laminae*) (Huss-Danell and Lundquist, 1993). Joonisel 6 on toodud noore *Alnus incana* juurenooduli pikiläbilõige. Näha on vaskulaarkude, periderm, meristeem, *Frankia*'ga nakatunud ja nakatumata kortikaalrakud.

### 1.3.3 Spoor-positiivsed ja spoor-negatiivsed *Frankia* tüved

Mõnedes juurenoodulites moodustuvad lisaks hüüfidele ja vesiikulitele ka spoorid. Schaede (1933) märkas esimesena *Alnus glutinosa*'l kahte tüüpi nooduleid, mida tänapäeval tuntakse kui spoor-positiivseid (spoor<sup>+</sup>) ja spoor-negatiivseid (spoor<sup>-</sup>) nooduleid (van Dijk 1978). Sellest ajast on paljudel aktinoriisataimede liikidel leitud ja uuritud mõlemat tüüpi nooduleid. Spoor<sup>+</sup>- noodulites tekivad spoorid nooduliharu basaalosas ning nende teke on tihti samaaegne *Frankia* vesiikulite kadumisega nakatunud rakkudest (van Dijk, 1978; Schwinzer *et al.* 1982). Spoor<sup>-</sup>- noodulitel spoorid puuduvad või on väga vähearvukad. Spoor<sup>+</sup>- ja spoor<sup>-</sup> noodulite erinevus tuleneb geneetilistest erinevustest endofüütide vahel, st. me räägime spoor<sup>+</sup> ja spoor<sup>-</sup> *Frankia* tüvedest. (van Dijk 1978; Normand and Lalonde, 1982). Samas tuleb arvestada ka taime ja keskkonna tingimuste mõju sporulatsiooni avaldumisele (Torrey, 1987).

Spoor<sup>+</sup>- ja spoor<sup>-</sup>- noodulid erinevad nii mõnede füsioloogiliste kui ka ökoloogiliste näitajate poolest.

Atsetüleenireduktseerimise aktiivsuses ei leidnud Akkermans (1971) ega van Dijk (1978) spoor<sup>+</sup>- ja spoor<sup>-</sup>- noodulitega taimedel erinevust. Paljudes teistes uurimustes on aga spoor<sup>-</sup> noodulid osutunud efektiivsemateks nii atsetüleenireduktseerimises kui taimekasvu toetamises (Normand and Lalonde, 1982; Wheeler *et al.*, 1986; Weber *et al.*, 1989; Van den Bosch and Torrey, 1984; Monz and Schwinzer, 1989). Põhjusteks võiksid siin olla nii erinev energiakulu kui ka erinev nitrogeeni aktiivsus (VandenBosch and Torrey, 1984; Monz and Schwinzer, 1989). N<sub>2</sub> fikseerimise aktiivsuses on varieeruvus neis kahes grupis siiski suur.

Spoor<sup>+</sup>- ja spoor<sup>-</sup>-setest noodulitest valmistatud homogenaat on taime nakatamisel erineva efektiivsusega. Spoor<sup>+</sup> noodulite homogenaat on (toorkaalu baasil) 100-1000 korda suurema nodulatsioonivõimega (*nodulation capacity*) kui spoor<sup>-</sup> noodulitest valmistatud homogenaat (van Dijk, 1979, 1984; Houwers and Akkermans 1981). Kuigi otsest tõestusmaterjali pole, võib arvata, et juure läheduses toimub spooride avanemine, misjärel hüüfid juurekarva rakkudesse tungivad.

Samal taimel võib leida mõlemat tüüpi nooduleid (van Dijk, 1978).

#### 1.3.4 *Frankia* mullas väljaspool peremeestaime

Üldiselt on *Frankia*'st mullas teada väga vähe. Peremeestaime kohalolekul saab *Frankia* prolifereeruda noodulis. Van Dijk (1979, 1984) uuris (kaudsel meetodil vt. allpool) *Frankia* populatsiooni *Alnus glutinosa* puistu mullas. *Frankia* arvukus mullas oli seletatav surevatest noodulitest vabanevate endofüütide sattumisega mulda (kui eeldada, et *Frankia* suudab mullas vabalt vastu pidada vähemalt aasta (van Dijk, 1979; Akkermans and van Dijk, 1981).

Aladel, kus peremeestaimes puuduvad, on leitud nii *Frankia*'ga asustatud kui ka asustamata muldadega piirkondi (van Dijk, 1984). Nendest andmetest tulenevalt on oletatud, et *Frankia* võiks kasvada saprofüütselt mullas, kuid lõplikku kinnitust sellele hüpoteesile ei ole esitatud.

*Frankia* morfoloogia mullas on teadmata. Siiani ei ole suudetud kasutada ühtegi otsest meetodit *Frankia* tuvastamiseks ja arvukuse määramiseks mullas. Kaudse meetodina kasutatakse mulla nodulatsioonivõime määramist (*nodulation capacity*). Tööd tehakse selles suunas, et kasutusele võtta otseseid meetodeid, nagu näiteks *in situ* hübridiseerimist *Frankia* spetsiifiliste proovidega.

Kaudset meetodit kasutades leidis Smolander (1990) arukase (*Betula pendula*) puistute muldades suuri *Frankia*-populatsioone, mis olid oma suuruselt võrreldavad (või isegi suuremad) peremeestaimeid (*Alnus spp.*) asustatud aladelt saadud vastavate tulemustega. Samas *Betula pubescens*'i puistute muldades *Frankia* puudus. *Frankia* kasvas *Betula pendula* juurte risosfääris. Saadud tulemused annavad alust arvata, et *Frankia* ja *Betula pendula* vahel on tegu assotsiatiivse sümbioosiga.

Nii *Frankia* püsimine mullas kui ka mulla nodulatsioonivõime sõltuvad mõlemad mulla pH-st. Happeline keskkond avaldab *Frankia*'le negatiivset mõju, pH optimum tundub *Frankia* jaoks olevat pH ~ 6 juures (Smolander, 1990). Sümbioosi puhul on *Frankia* mullatingimustest siiski rohkemal või vähemal määral eraldatud, kuna paikneb noodulis. Smolander (1990) leidis ka happelistel muldadel (pH ~ 3-4) edukaid sümbioosinäiteid *Frankia* ja *Alnus incana* vahel.

#### **1.4 Fikseeritud lämmastiku assimilatsioon peremeesorganismis.**

Nii aktinoriisettes kui ka kõigis teistes tänini uuritud lämmastiku fikseerimise sümbioosides saab taim fikseeritud lämmastiku  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  kujul. Ammoonium ( $\text{NH}_4^+$ ) on nitrogeeni (vt. Ensüümi töömehhanism) produkt ja akumulatsioonides võib osutada taimede ja/või sümbiontile toksiliseks. Samas rakkude neutraalse pH taseme juures kaldub  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  tasakaal  $\text{NH}_4^+$  poole, mis allub tavaliselt taimekudedes kiirele assimilatsioonile glutamiin süntetaasi ning glutamaat süntetaasi (GS/GOGAT) poolt. Viimased produtseerivad glutamiini ning glutamaati  $\alpha$ -ketoglutaraadist ning  $\text{NH}_4^+$ -st. Järgnevalt transporditakse fikseeritud lämmastik taime kasvupiirkondadesse. Ksüleemi voog on peamine taime maa-alustest osadest maapealsetesse osadesse toimuva transpordi rada. Seda rada kasutatakse ka fikseeritud lämmastiku transpordiks. Tulenevalt taimespetsiifilistest biosünteesilistest radadest leitakse erinevate taimede ksüleemi voogudes transporditavat fikseeritud lämmastikku seotuna erinevatesse ühenditesse. Liblikõieliste puhul, mis transpordivad noodulitest ureiide, on ksüleemis märkimisväärses koguses allantoiini ja allantoiinhappeid. Amiide eksportivate liblikõieliste puhul transporditakse aga peamiselt asparagiini ning glutamiini. Ka erinevad aktinoriisataimed kasutavad lämmastiku transpordiks erinevaid ühendeid. Enamiku lepalikide puhul on peamiseks transportühendiks tsitrulliin. On näidatud, et vähemalt sanglepa (*Alnus glutinosa*) puhul toimub fikseeritud lämmastiku inkorporeerimine tsitrulliini peamiselt *Frankia*-ga nakatunud rakkudes (Guan *et al.*, 1996). Teiste aktinoriisataimede puhul kasutatakse peamiselt glutamiini, glutamaati, arginiini ning asparagiini.

Peamine lämmastikuühend noodulis või ksüleemis ei pea veel tingimata olema valdav hiljuti fikseeritud lämmastiku esinemisvorm. Nii näiteks peeti enne allantoiini ja allantoiinhapete tuvastamist ureiide transportivate liblikõieliste peamiseks transportühendiks asparagiini, mis esineb sojaoa noodulites kõrgetel kontsentratsioonidel. Kui aga sojaoa nooduleid inkubeeriti  $^{15}\text{N}$  juuresolekul, ei märgistunud asparagiin märkimisväärselt, mis viitab tema akumulatsioonile noodulites maapealsetest taimeosadest lähtuva floemivoo kaudu. Aktinoriisataimede noodulite aktiivsus ning kasv on tõenäoselt mõjutatud taime lämmastiku staatusest, kusjuures on võimalik, et teatud aminohappeid floemi voo kaudu transportides toimub signalisatsioon, nagu seda hiljuti näidati liblikõieliste puhul (Parsons *et al.*

1993). Enne kui saab, uurida millised ühendid võivad osaleda floemi kaudu toimivas võimalikus taime lämmastiku staatuse signalisatsioonis nooduleisse, peab selgeks tegema ammooniumi assimilatsiooni rajad neis taimedes.

Fikseeritud lämmastiku assimilatsioon toimub kiiresti. Baker ja Parsons (1997) näitasid oma katsetes, et hariliku porsu (*Myrica gale*) noodulites inkorporeerunud esimesed lisatud  $^{15}\text{N}$  ( $\text{N}_2$ -na) aatomid 30 sekundi pärast glutamiini. Lisaks näidati, et ühe tunni jooksul fikseeritud lämmastikust oli 9 tunni pärast noodulis alles vaid 20 %.

## **1.5 Lämmastiku fikseerimise aktiivsust mõjutavad tegurid**

### **1.5.1 Fikseerimise aastane ja ööpäevane tsükkel ning süsiniku stress**

Lämmastiku sümbiontne fikseerimine ei toimu kogu aasta vältel. See saab alguse kevadel lehtede ilmumise ajal, jõuab maksimumini suve keskel (juuli esimene pool) ning kahaneb lõppedes oktoobri keskel. Fikseerimise seiskumine ei ole (vähemalt suurematel puudel) seotud niivõrd lehtede langemisega vaid madala temperatuuriga (Rytter *et al.*, 1991).

Noortel taimedel on nitrogeenaktiivsuses täheldatud süstemaatilisi ööpäevaseid kõikumisi (Wheeler and Lawry 1976, Dawson and Gordon 1979 läbi Rytter *et al.*, 1991), mis on korrelatsioonis fotosünteesi tsükliga valguses ja pimedas. Vanematel taimedel ööpäevaseid kõikumisi ei täheldata. Ilmselt on tegu sellega, et neil on suuremad süsivesinike reservid, mis võimaldavad nooduleid pidevalt toita ja seega mitte sõltuda päevasest fotosünteesist. Nitrogeenaktiivsust mõjutab ka temperatuur. Johnsund (1978 läbi Rytter *et al.*, 1991) näitas, et atsetüleeni redutseerimise aktiivsus (*Alnus incanal*) on proportsionaalne temperatuuriga, kui see on vahemikus 9-16 C° .

Kui taim ei saa valgust, blokeerub fotosüntees ja häiritud saab ka juba valmis süsinikuühendite transport nooduleisse. Selle tulemusena langeb noodulites respiratsiooni intensiivsus ja mis veelgi olulisem - aeglustub valgusüntees noodulis (osalt substraadi, osalt ATP puuduse tõttu). Lämmastiku fikseerimine väheneb

drastiliselt: 42% esimese päevaga ja teise päeva lõpuks on alles vaid 10% algväärtusest. Süsinikustressis olevates noodulites nitrogenaasi hulka uurides leiti, et suure osa lämmastiku fikseerimise vähenemisest kirjeldab *Mo-Fe valgu* hulga vähenemine. Ülejäänud on põhjustatud ATP puudusest ja O<sub>2</sub> kontsentratsiooni tõusust, mis inaktiveerib nitrogenaasi. (Lundquist and Huss-Danell 1991 a, b)

### 1.5.2 O<sub>2</sub> tundlikkus

Nitrogenaas on äärmiselt hapnikutundlik ensüüm. Viimasega interageerudes inaktiveerub ta pöördumatult. Eriti tundlik on *Fe- Valk*, mille poolestusaeg õhus on mõõdetav sekundites. Samas on hapnikku vaja oksüdatiivsel fosforüleerimisel, kus toodetakse ATPd, mille kasutamisel nitrogenaas eriti kokku ei hoia.

Seetõttu on äärmiselt oluline säilitada ensüümi vahetus naabruses anaeroobseid tingimusi. Seda teostavad eri bakterid erinevalt. *Cyanobacteria* suudab aeroobsetes tingimustes lämmastikku fikseerida spetsiaalselt diferentseerunud rakkudes-*heterotsüstides*. Neil rakkudel on paksem rakukest ja neil puudub fotosüntees II, seega ei produtseerita neis hapnikku. *Rhizobia*-tel luuakse nitrogenaasile hapnikuvabad tingimused tänu leghemoglobiinile ja intensiivsele respiratsioonile. Leghemoglobiin on nakatatud rakkudes väga kõrgetel kontsentratsioonidel (700 µM) ja annab noodulitele roosa värvuse. Ta on väga efektiivne hapnikusiduja, sidudes kogu bakterisse siseneva hapniku. Leghemoglobiini hulgaga rakus korreleerub hästi ka nitrogenaasi aktiivsus. Ühtlasi talitleb leghemoglobiin ka hapnikukandjana. Seega on tal osalt sarnased funktsioonid hemoglobiiniga, mis on tuntud hapnikukandja loomsetes tsirkulatsiooni süsteemides. Suharjo ning Tjepkema (1995) näitasid hemoglobiini esinemist sanglepa (*Alnus glutinosa*) noodulites. Kuigi tundus, et hemoglobiin on seotud *Frankia* klastritega noodulis, ei selgunud valgu täpne lokatsioon noodulis *in vivo*. Hemoglobiini kontsentratsioon noodulis oli madal, millele on kaks interpretatsiooni. Esiteks, lepa noodulites ei ole hemoglobiin seotud O<sub>2</sub> transpordiga kaitsmaks nitrogenaasi (vähemalt olulisel määral). Teiseks, hemoglobiin esineb noodulis ruumiliselt kitsal alal, kus tema kontsentratsioon on siiski kõrge ja efektiivne. (Suharjo and Tjepkema, 1995) *Frankia*-tel paikneb nitrogenaas vesiikulites ja hapniku eest kaitsevad teda paksem membraan ning spetsiifilised lipiidid selle koostises. Nendeks on kolm hopanoidset lipiidi: bakteriohopanetetool (bht) ja kaks isomeerset fenüülatsetüül-monoester bht-d moodustavad 80% vesiikuli membraani lipiididest.

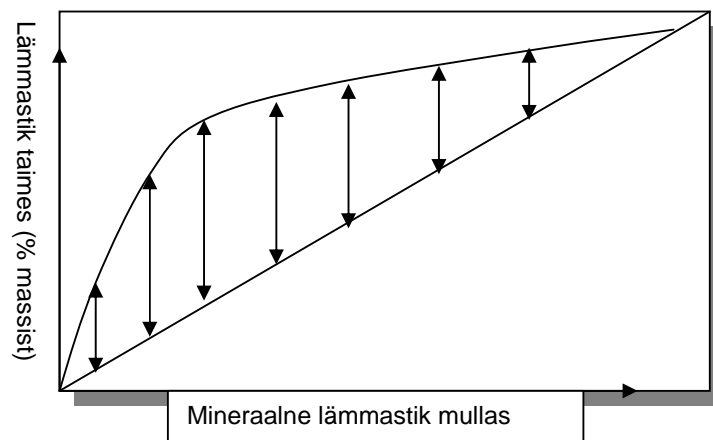
Veel on reaktsioon inhibeeritud ADP poolt. *In vivo* neutraliseeritakse see efekt tänu magneesiumile. Pole juhuslik, et nitrogeenaas tarvitab just MgATP-d. Nimelt seondub Mg paremini ATPga kui ADPga ja seega tõstab ATP efektiivset kontsentratsiooni. Niisiis rakus olev kõrge ADP kontsentratsioon ei pruugi saada saatuslikuks nitrogeenaasi tegevusele, sest selleks, et seonduda ensüümiga, peab ta enne olema seondunud Mg-ga, viimane aga seondub meelsamini hoopis ATPga.

Ka  $H_2$  võib suurtes kontsentratsioonides olla inhibiitoriks (eriti HUP<sup>-</sup> fenotüüpidel (*hydrogen uptake*)).

### 1.5.3 Mineraalse lämmastiku mõju

Toitainetest kõige suurema mõjuga lämmastiku fikseerimisele on kahtlemata mineraalne lämmastik (ammoonium, nitraat). Mineraalne lämmastik võib fikseerimise aktiivsusele mõjuda kas positiivselt või negatiivselt sõltuvalt paljudest teguritest, milledest peamine on kättesaadava mineraalse lämmastiku hulk.

Tänaseks rohkem uuritud liblikõieliste sümbioosi puhul on teada, et vähene mineraalse lämmastiku lisamine stimuleerib  $N_2$  fikseerimist. Koormuse kasvades fikseerimine aga väheneb. (Joonis 7)



Joonis 7. Mineraalse lämmastiku omastamise ning lämmastiku fikseerimise vahelise seose lihtsustatud skeem liblikõieliste kohta (Marschner 1995).

Vähene mineraalse lämmastiku lisamine stimuleerib lämmastiku fikseerimist liblikõielistel nn. vahefaasi esinemise tõttu. Vahe faas (*lag phase*) on aeg juurte sümbiondiga nakatumise ja N<sub>2</sub> fikseerimise alguse vahel. Sel ajal on mineraalne lämmastik limiteeriv tegur piisava lehepinna moodustumisel, mis tagaks noodulite kasvu toetamiseks vajamineva assimilaatide tootmise (Marschner 1995).

Liblikõieliste noodulid on üheaastased st. igal kevadel toimub uus nakatumine ja uute noodulite kasv, siit tuleneb ka nn. vahe faasi olemasolu.

Tabel 1 N<sub>2</sub> fikseerimise, taime maapealsetes osade lämmastikusisalduse (N%) ning taimede kuivmassi muutumine vastavalt N väetuskooormustele sojaoa puhul (Marschner 1995).

Koormus (Kg N ha <sup>-1</sup> )	Nitrogenaasi aktiivsus ( $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ taim}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )		N (%)	Taime kuivmass
	35. päeval	49. päeval		
0	1,13	0,19	1,54	2,53
25	2,26	0,33	1,82	3,35
50	0,60	0,10	1,67	3,65
100	0,14	0,03	1,69	4,35

Mineraalse lämmastiku koormuse kasvades langevad nii nodulatsioonivõime kui N<sub>2</sub> fikseerimise aktiivsus liblikõielistel märgatavalt. Samas N sisaldus taimes aga kasvab. Tabelis 1 on toodud N<sub>2</sub> fikseerimise, taime maapealsetes osade lämmastikusisalduse (N%) ning taimede kuivmasside muutumine N väetuskooormuste suurenedes sojaoa puhul (Marschner 1995).

On näidatud, et nitraadi (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) negatiivne mõju nii noodulite kasvu kui fikseerimise aktiivsusele on suurem kui ammooniumi (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) pärssiv toime. Samas vähegi detailidesse minnes ei saa tulenevalt taimespetsiifikast teha suuri üldistusi.

Aktinoriisettes sümbioosides on noodulid mitmeaastased, mistõttu vahefaasi mõju ei tohiks olla oluline. Samas on ka siin näidatud mõõduka mineraalse lämmastiku



koormuse positiivset efekti nii noodulite arvule, kasvule (Lõhmus *et al.*, 1996) kui ka N<sub>2</sub> fikseerimisele. Seda on näidatud nii ammooniumi (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) (Bond *et al.*, 1954; Stewart and Bond 1961) kui nitraadi (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (Zavitkovski and Newton 1968; Kohls and Baker 1989) lisamisel kasvukeskkonda (viited läbi Rytter *et al.*, 1991). Ingestad (1980) leidis, et vaid väga kõrge mineraalse lämmastiku koormuse korral on viimase pärssiv mõju lämmastiku fikseerimisele täheldatav. Järgnevatel töodes jõudis Ingestad (1987) järeldusele, et nii kaua kui ökosüsteem suudab lisatud lämmastiku ära kasutada, ei ilmne negatiivseid efekte. Ka Rytter *et al.*, (1991) jõudsid samale järeldusele, kui pärast pikka aega tugevalt väetatud (kuni 8 gN m<sup>-2</sup> päev<sup>-1</sup>, kokku 297 kg N ha<sup>-1</sup> a<sup>-1</sup>) lepinkus nitrogenaasi aktiivsus järsult langes. Selles katses oli tegemist 3-aastaste hallide leppadega (*Alnus incana*), mis kasvasid väljas looduslikul lubjatud turbamullal. Kahjuks ei ole esitatud andmeid noodulite suhtelise massi muutuste kohta.

Baker *et al.*, (1997b) uurisid nitrogenaasi aktiivsust sõltuvalt lisatud lämmastiku vormist hariliku porsu (*Myrica gale*) puhul. Taimi väetati 8 nädalat (15mg N nädal<sup>-1</sup> 800 cm<sup>-3</sup> e. taim<sup>-1</sup>) kas NO<sub>3</sub><sup>-</sup> või NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-iga. Vaid nitraadiga väetamisel ilmnis taime kohta usaldusväärselt madalam N<sub>2</sub> fikseerimise tase, mis seletus noodulimassi kahanemisega. Sarnane katse tehti ka sanglepa (*Alnus glutinosa*) kohta (Baker *et al.*, 1997a), kus väetusnormiks oli 34mg N nädal<sup>-1</sup> 800 cm<sup>-3</sup> e. taim<sup>-1</sup>. Leppi väetati 10 nädalat, kusjuures nii NO<sub>3</sub><sup>-</sup> kui NH<sub>4</sub><sup>+</sup> põhjustasid noodulimasside kahanemist võrreldes väetamata kontrolliga. Taimede juurdekasvud ja nitrogenaasi aktiivsus noodulimassi kohta ei erinenud oluliselt, kuigi oli trend mõlema vähenemisele nitraadiga väetatud leppade puhul (Tabel 2) (Baker *et al.*, 1997a).

Tabel 2. Kuivmass, noodulite fraktsioon (%. kuivmassist) ning noodulite aktiivsus sanglepal sõltuvalt lisatud lämmastikuvormist (Baker *et al.*, 1997a). Andmed toodud 95% usalduspiiridega 6 mõõtmise keskmistena.

Väetamine 34 mg nädal <sup>-1</sup>	Kuivmass (g)	Noodulite fraktsioon (%)	Noodulite aktiivsus (μmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> g <sup>-1</sup> nood. KM h <sup>-1</sup> )
Väetamata kontroll	12,8 ± 2,9	1,5 ± 0,4	184 ± 64
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	14,2 ± 1,7	0,9 ± 0,1	291 ± 110
NO <sub>3</sub>	9,7 ± 1,5	0,5 ± 0,1	138 ± 73

Mõlema katse puhul kasvasid taimed 800 cm<sup>3</sup> pottides savimineraalide vermikuliidi ja perliidi (1/1) segul.

Mida me näeme kui kõrvutame kolmes nimetatud katses (Rytter *et al.*, 1991; Baker *et al.*, 1997a; Baker *et al.*, 1997b) saadud tulemusi? Esiteks paistab, et looduslikes (poollooduslikes) tingimustes realiseeruv (*Alnus-Frankia*) sümbioos talub kõrgemaid väetuskoormusi kui puhastel savimineraalidel ja/või väikestes anumates. Välikatses ilmnes nitrogeeni aktiivsuse langus koormuse piike arvestades kuni 6 korda suurema koormuse korral kui potikatses kasutati. Potikatses, tõsi küll, nähti sel koormusel vaid trendi nitrogeeni aktiivsuse vähenemisele, st. see vähenes vähem kui välikatses. On loogiline, et looduslikes tingimustes talutakse kõrgemaid koormusi, kuna lämmastiku tarbijaid on oluliselt rohkem. Samas ei saa nende katsete baasil kindlaid väiteid esitada, kuna katsetes kasutati erinevaid lepalikke vastavalt halli leppa (*A. incana*) Rytter *et al.* ja sangleppa (*A. glutinosa*) Baker *et al.* Teiseks tundub, et nitraat omab ka aktinoriisettes sümbioosides N<sub>2</sub> fikseerimisele negatiivsemat efekti kui ammoonium. Kolmandaks tundub, et taime lämmastiku fikseerimise maharegulatsioon saab alguse noodulimassi kahandamisest st. olemasolevad noodulid omavad suuremat tõenäosust surra ja uusi kasvab vähem.

Kuidas saab taime lämmastikuseisundist lähtuv lämmastiku fikseerimise regulatsioon toimuda?

#### **1.5.4 Tagasiside kui N<sub>2</sub> fikseerimise kontrollmehhanism.**

Fikseeritud lämmastik liigub erinevate ühenditena (peamiselt aminohapped) mööda ksüleemivoogu taime maapealsetesse osadesse. Noodulite toitainetega varustamiseks kasutatakse floemi- e. laskuvat voogu. Ka juurte kaudu mullast omastatud mineraalne lämmastik jõuab (muidugi vaid osaliselt) nooduleisse floemivooga, olles seega eelnevalt läbinud pika teekonna läbi lehtede (Parsons *et al.*, 1993). On näidatud, et näiteks *Lupinus albus* puhul transporditakse kuni 50% ksüleemi lämmastikust floemivooga läbi noodulite (Parsons and Baker 1996). Liblikõieliste puhul on pakutud, et lämmastiku fikseerimise kontroll realiseerubki mingi lämmastikuühendi transpordil läbi taime. Seda hüpoteesi toetab tõsiasi, et noodulite aktiivsus korreleerub taime lämmastikuga varustatusega. Näiteks, kui *Myrica gale* nooduleid eksponeeriti O<sub>2</sub> –ga

ning peatati sellega lämmastiku fikseerimine, vastas taim sellele noodulite arvu ja massi suurendamisega (Baker *et al.*, 1997b). On võimalik, et selline tagasisidemel põhinev kontrollsüsteem eksisteerib kõigis lämmastikku fikseerivates sümbioosides.

Eelnevalt kirjeldatud eksperimendis erinevatel lämmastiku allikatel kasvanud sanglepa kohta (Baker *et al.*, 1997a) leiti, et sõltuvalt lisatud lämmastiku vormist (ammoonium, nitraat) ning N lisamisest üldse, muutus tsitrulliini sisaldus ksüleemivoos. Tsitrulliini sisaldus paistab suurenevat, kui lämmastik ei ole limiteeriv ning vähenema kui lämmastikku on puudu. Seega võib oletada, et: 1) *Alnus glutinosa* puhul on tsitrulliini lämmastiku ladustamiseks kasutatav aminohape, 2) tsitrulliini kontsentratsiooni kõikumine floemivoos võib toimida kui lämmastiku fikseerimise kontrollmehhanism.

Hüpoteesi kontrolliks sobiks järgmine katse: inaktiveerida tsitrulliini tootmine ning jälgida, kuidas reageerivad nitrogenaasi aktiivsus ning noodulite mass erinevate mineraalsete lämmastikuühendite lisamisele ning väetuskooormustele.

## **1.6 Fikseeritud lämmastiku koguse määramise meetodid**

Lämmastiku fikseerimise mõõtmised saavad baseeruda kas ökosüsteemi või selle osade üldlämmastiku sisalduse muutusel, stabiilse isotoobi  $^{15}\text{N}$  inkorporatsioonil taime kudedesse või nitrogenaasi aktiivsuse määramisel ensüümi poolt toodetud etüleen koguse mõõtmise kaudu. Nitrogenaas on võimeline redutseerima ka teisi substraate peale õhulämmastiku, nende seas ka atsetüleen, kusjuures produktiks on etüleen.

### **1.6.1 $^{15}\text{N}$ analüüs**

Lämmastik aatommassiga 15 ( $^{15}\text{N}$ ) on looduslikult esinev stabiilne isotoop, mis moodustab 0.38% kogu õhulämmastikust. Kui lämmastikku fikseeriv süsteem asetada mingiks ajaks  $^{15}\text{N}$ -ga ( $\text{N}_2$  kujul) kunstlikult rikastatud keskkonda, võib  $^{15}\text{N}$  inkorporeerimise järgi taimes hinnata kogu lämmastiku sidumist. Selleks kasutatakse mass-spektromeetria, mille alusel saadakse taime(mikroobi)koes  $^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$  suhe, mis fikseerival taimel peaks olema suurem kui kontrolltaimel.

Teine sellel lämmastiku isotoobil baseeruv meetod on nn. loomuliku külluse (*natural abundance*) meetod. Meetod baseerub  $^{15}\text{N}$  kontsentratsiooni erinevustel mullas ja atmosfääris. Nimelt on muldades seda isotoopi rohkem kui atmosfääris (seda lihtsal põhjusel, et  $^{15}\text{N}$  on pisut raskem kui  $^{14}\text{N}$ ). Vahe küündib kuni 0,5-1,0 %-ni (*Rennie et al.*, 1976). Seega peaks fikseerivate organismide kudedes olema  $^{15}\text{N}$  vähem kui tavalistes, mille järgi on võimalik sidumine välja arvutada. Selle meetodi kasutamisel on aga teostuslikku laadi probleeme, mistõttu see ei ole eriti levinud.

### 1.6.2 Atsetüleeni-etüleeni meetod

Atsetüleeni redutseerimine diasotroofide poolt avastati 1966.a. (üksteisest sõltumatult Dillworth ja Schöllhorn). Detailne protsessi käsitus publitseeriti 1968 aastal R.W.F. Hardy ja kolleegide poolt. Nitrogenaasi aktiivsuse määramine baseerub, nagu juba mainitud, etüleeni produtseerimisel vastava substraadi - atsetüleeni esinemisel keskkonnas. Selleks inkubeeritakse nooduleid atsetüleeni (tavaliselt 10% mahust) sisaldavas õhus hermeetilises anumad. Inkubatsiooniaja möödudes analüüsitakse gaasis etüleeni/ atsetüleeni suhet gaaskromatograafia abil. Selle meetodi lihtsus ja odavus on põhjusteks, miks ta on nii populaarne ja laialt levinud. Kahjuks on meetodil rida olulisi puudusi.

Suureks probleemiks on näiteks raskused lühiajaliselt atsetüleeni redutseerimiselt saadud tulemuste ekstrapoleerimisel pikaajaliseks lämmastiku fikseerimiseks. Inkubatsiooniajad on tihti alla kahe tunni, samas pikemad inkubatsiooniajad võivad omakorda viia vea suurenemisele, sest nii atsetüleen kui ka etüleen adsorbeeruvad klaasile jms. materjalile, millest on valmistatud katseanumad.

Teoreetiliselt peaks õhulämmastiku ja atsetüleeni redutseerimise suhe olema 1:3, tulenevalt sellest, et ühe  $\text{N}_2$ atomi sidumiseks kulub 6 elektroni, atsetüleeni puhul aga 2. Publitseeritud üleminekukordajad kõiguvad aga vahemikus 1:1 kuni 1:7. Siin on ilmselt mitmeid põhjusi, milledest kaks peamist võiks olla nitrogenaasi aktiivsuse märgatav vähenemine atsetüleeni juuresolekul ning tihti just varasemates töödes kasutatud eraldatud noodulite meetod (*Rytter et al.*, 1991 ja viited seal).

Meetod, kus noodulid lõigatakse juure küljest lahti ning inkubeeritakse atsetüleeni juuresolekul gaasikindlas anumad, viib arvestatavale nitrogenaasi aktiivsuse langusele

võrreldes intaktsete juurestikega (Rytter *et al.*, 1991). Seega oleks mõistlik gaasikindlalt isoleerida (ja atsetüleenini redutseerimist mõõta) kas: **1)** kogu taim, seejuures juurt ega nooduleid vigastamata või **2)** taime juurelõik koos "töötava" nooduliga. Mõlemad variandid on kirjanduse baasil esindatud (Rytter *et al.*, 1991). Võrdluseks kasutatud nn. eraldatud noodulite meetodi puhul saadi tulemuseks 10 korda madalam sidumise tase.

Intaktse analüüsi kirjeldus (Rytter *et al.*, 1991):

**1)** Lepad pakiti nii maa-aluses kui maapealses osas suurtesse kilekottidesse. Mõõtmiseks viidi atsetüleenini tase 10%-ni, inkubeerimisaeg oli alguses 24 tundi. Hiljem kui selgus, et etüleenini tootmine on ajast lineaarses sõltuvuses, piirdui 4 tunniga. Gaasilekete tõttu tekkiva vea elimineerimiseks kasutati markergaasina propaani.

**2)** Kahest osast koosnev torujas küvetti asetati ümber hoolikalt mullast puhastatud noodulitega juureosa ja suleti gaasikindlalt klambritega. Juure sisenemis- ja väljumisavad tihendati samuti gaasikindlalt. Atsetüleenini ja propaani sissesüstimiseks ja gaasiproovide võtmiseks oli küveti seinal kummikork. Atsetüleenini sisestati kontsentratsiooniga 14% ja propaani 0,15% küveti üldmahust (130 ml).

Fikseeritud ajavahemike järel võeti korduvalt gaasiproove ja analüüsiti neid gaaskromatograafia abil.

Kuid nagu hiljem selgus, ei kaotanud ka see täiustus meetodi puudulikkust.

### **1.6.3 Atsetüleenini mõju nitrogeenaasi aktiivsusele.**

Nagu juba mainitud, väheneb nitrogeenaasi aktiivsus atsetüleenini juuresolekul funktsioonina ajast. Vähenemine võib olla tingitud  $\text{NH}_4^+$  tootmise kahanemisest, mistõttu taim ei pruugi noodulit enam "toita". Põhjus võib olla ka millegis muus. Mõnede aktinoriisete sümbiooside puhul esineb osaline või pea täielik aktiivsuse taastumine. Nii aktiivsuse languse kui taastumise kiirus ja määr sõltuvad taimeliigist, taime vanusest ning keskkonna tingimustest, milledes taimed kasvatatakse ning analüüsitakse (Schwintzer and Tjepkema 1997; Tjepkema 1997, samuti viited neis). Üldiselt ei täheldata aktiivsuse langust enne 2-3 min. möödumist atsetüleenini lisamisest. Seega on lämmastiku fikseerimise hindamise seisukohast mõistlik atsetüleenini redutseerimist mõõta vaid 2 –3 minuti jooksul. Selleks on optimaalne kasutada gaasi läbivooluga süsteemi, kus läbivool ( $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ) on vähemalt kolmekordne küveti ruumala (mL), mitte aga inkubeerimist kinnises anumal. Selline katseseadeldis on kirjeldatud ja kasutatud Schwintzer-i ja Tjepkema (1997) poolt.

Samas võib atsetüleen – etüleen meetod fikseerimist ka ülehinnata. Nimelt supresseerib atsetüleen endogeenselt produtseeritud etüleeni oksüdatsiooni. Etüleen on minoorne fermentatsiooniprodukt ja tema normaalne käik on saada kiirelt oksüdeeritud. Normaalselt on etüleeni nii vähe, et teda on väga raske määrata. Kui aga oksüdeerimine on blokeeritud, kasvab ka etüleeni kontsentratsioon. Kuna ei ole vahet endogeensel ja nitrogeenaasi poolt toodetud etüleenil, siis on kerge fikseerimist ülehinnata.

Lisaks sellele tundub, et atsetüleeni redutseerimisel ei esine kasvuperioodi faasist sõltuvat aktiivsuse muutumist (Schwintzer and Tjepkema 1997) nagu see on dokumenteeritud lämmastiku fikseerimisel (Rytter *et al.*, 1991).

### **1.7 Aktinoriisataimede süstemaatika ja fülogenees.**

Aktinoriisataimed on taimed, kes osalevad lämmastiku sümbiontses fikseerimises sümbioosis aktinomütsetidega perekonnast *Frankia*. On teada umbes 194 aktinoriisataime liiki, mis jaotuvad kaheiduleheliste katteseemnetaimede klassis kaheksasse sugukonda ja 24 perekonda (Benson ja Silvester, 1993). Tabelis 3 on toodud aktinoriisataimede sugukonnad ja perekonnad, millised on esitatud teiste autorite poolt (Prescott *et al.*, 1996). Sellest tulenevalt on tabelis 3 aktinoriisataimede perekondi mitte 24, vaid 23.

Tabel 3. Aktinoriisataimede sugukonnad ja perekonnad (Prescott *et al.*, 1996) ning nende geograafiline levik (Huss-Danell and Lundquist, 1993)

<u>Sugukond</u>	<u>Perekond</u>	<u>Geograafiline levik</u>
<i>Casuarinaceae</i>	<i>Allocasuarina</i>	Okeaania
	<i>Casuarina</i>	Okeaania
	<i>Ceuthostoma</i>	Okeaania
	<i>Gymnostoma</i>	Okeaania
<i>Coriariaceae</i>	<i>Coriaria</i>	Euraasia, Põhja-Ameerika, Lõuna-Ameerika, Okeaania
<i>Datisceae</i>	<i>Datisca</i>	Euraasia, Põhja-Ameerika
<i>Betulaceae</i>	<i>Alnus</i>	Euraasia, Põhja-Ameerika, Lõuna-Ameerika.
<i>Myricaceae</i>	<i>Comptonia</i>	Põhja-Ameerika

	<i>Myrica</i>	Euraasia, Põhja-Ameerika, Lõuna-Ameerika, Okeania, Aafrika
<i>Elaeagnaceae</i>	<i>Elaeagnus</i>	Euraasia, Põhja-Ameerika
	<i>Hippophaë</i>	Euraasia
	<i>Shepherdia</i>	Põhja-Ameerika
<i>Rhamnaceae</i>	<i>Ceanothus</i>	Põhja-Ameerika
	<i>Colletia</i>	Lõuna-Ameerika
	<i>Discaria</i>	Lõuna-Ameerika, Okeania
	<i>Kentrothamnus</i>	Lõuna-Ameerika
	<i>Retanilla</i>	Lõuna-Ameerika
	<i>Trevoa</i>	Lõuna-Ameerika
	<i>Cercocarpus</i>	Põhja-Ameerika
<i>Rosaceae</i>	<i>Chaemabatia</i>	Põhja-Ameerika
	<i>Cowania</i>	Põhja-Ameerika
	<i>Dryas</i>	Euraasia, Põhja-Ameerika
	<i>Purshia</i>	Põhja-Ameerika

Traditsioonilistes taksonoomilistes jaotustes, mis põhinevad morfoloogilistel tunnustel, asetatakse aktinoriisataimede sugukonnad kaheksasse seltsi, mis jaotuvad viiest katteseemne taimede alamklassist nelja vahel (Cronquist, 1988). Sellisest jaotusest tuleneb, et paljud neist taimeliikidest on üksteisega vaid väga kauged sugulased. Nii mõnedki uurijad ei olnud päriselt rahul tunnuste valikuga, mille alusel toimus klassifitseerimine. Paremate tunnustena pakuti välja molekulaarsed tunnused. Võrreldakse mingi geeni (olenevalt liikide omavahelisest kaugusest ka muid genoomi piirkondi) nukleotiidset järjestust erinevatel liikidel. 1993. aastaks oli *rbcL* (ribuloos bifosfaat karboksülaas oksügenaasi suure subühiku geen) sekvineerimine jõudnud ulatuseni, mil selle alusel oli võimalik konstrueerida katteseemnetaimede üldine fülogeneetiline puu (Chase et al., 1993). Kuigi Chase'i analüüsis oli kasutatud vaid väheseid aktinoriisataimede perekondi, selgus, et vähemalt mõned perekonnad on lähemalt suguluses kui ennist arvati. Seejärel lisati *rbcL* andmebaasi veel aktinoriisataksoneid ning lõpuks saadi fülogeneetiline puu, kus kõik teadaolevad aktinoriisataksonid, nende mittesümbiontsed sugulased, liblikõielised ja *Parasponia* langesid ühte klaadi, mis on üks *Rosidae* neljast põhiklaadist (Soltis et al., 1995; Swensen, 1996; Swensen and Mullin, 1996). See avastus näitas, et ainult väikesel

osal katteseemnetaimedest on geneetiline "eelsoodumus" osaleda sümbiontses lämmastiku fikseerimises. Lisaks saadi kinnitust seisukohale, et sümbiontne lämmastiku- fikseerimine on evolutsioonis tekkinud ühel korral. Sai selgemaks ka see, et kõik taimed, kes on võimelised osalema sümbiontses lämmastiku fikseerimises, on omavahel palju lähemalt sugulased kui arvati. Samas on nodulatsioon nii liblikõielistel kui aktinoriisadel evolutsioonis mitu korda tekkinud (Doyle, 1994; Sprent, 1994; Swensen, 1996).

### **1.8 Frankia (*Actinomycetales*) taksonoomia uuringud.**

Aktinomütseedid on gramm-positiivsed aeroobsed bakterid, kes moodustavad harunevaid niidistikke (hüüfistikke) ja aseksuaalseid spoore. Perekond *Frankia* on praeguseni määratletud järgmiste tunnuste põhjal: morfoloogilised tunnused nagu sporangiumide ja vesiikulite moodustumine, raku keemia nagu rakuseina tüüp III, fosfolipiid-tüüp I ja 2-O-metüül-mannoosi olemasolu ning võime siduda lämmastikku ja astuda teatud taimedega sümbiontsetesse suhtesse (Benson and Silvester 1993, Lechevalier, 1994). Molekulaarne analüüs on aga asetanud mõned lämmastikku mittefikseerivad ja taime mittenakatavad isolaadid aktinoriisa juurenoodulitest fülogeneetilisse sugulusse autentsete *Frankia* tüvedega (*strains*) (Hönerlage et al., 1994; Mirza et al., 1994b; Nick et al., 1992). Sugukond *Frankiaceae* (perekonnad *Frankia* ja *Geodermatophilus*) asukoha leidmiseks aktinomütsetide fülogeneetilisel puul ja perekond *Frankia* kvantitatiivse evolutsiooni ning teiste bakteritega sugulusastme uurimisel on kasutatud 16S ribosomaalse RNA (rRNA) molekuli konserveerunud osi (Hahn et al., 1989). Aktinomütsetide üldine fülogeneetiline puu, mis on konstrueeritud 16S rRNA järjestuste võrdlemisel, on toodud lisas 2. On otsustatud, et perekond *Frankia* sisese süstemaatika käsitlemisel ei kasutata terminit liik, enne kui on selgem, mille alusel *Frankia* liike eristada (Lechevalier and Lechevalier, 1989). Igat isolaati käsitletakse *Frankia* tüvena, mis tähistatakse arvude ja tähtede kombinatsiooniga (Lalonde et al., 1981; Lechevalier, 1983). Fenotüüpiliste tunnuste alusel on *Frankia* tüvesid raske eristada. Eristamise tunnuste osas on uurijad erinevatel arvamustel. Osad teadlased (Lechevalier, 1994) leiavad, et nende raskestik kasvavate organismide klassifitseerimisel saab edu olla vaid molekulaarseid tunnuseid kasutades. Teised aga (Benson and Silvester 1993) väidavad, et



aeganõudvamad füsioloogilised uuringud on lämmastiku fikseerimise sümbioosi bioloogia uurimise seisukohalt tähtsamad, mistõttu tuleks ka taksonoomiate koostamisel füsioloogilistele uuringutele tähelepanu pöörata. Perekond *Frankia* sisese struktuuri uurimisel on siiski rohkem mindud molekulaarsete tunnuste kasutamise teed. Tähelepanu all on kaks genoomset regiooni: ribosomaalsete geenide operon ja nitrogenaasiregioon. Geenid ise on aga liiga konserveerunud, et uurida perekonnasiseseid erinevusi. Seetõttu uuritakse geenide vahelisi genoomi piirkondi näiteks IGS'e (*intergenic spacer* IGS). Põhjalikuma ülevaate perekond *Frankia* fülogeneesi ja süstemaatika uurimise seisust annavad Mullin and Dobritsa (1996).

## 1.9 Ensüüm nitrogenaas

### 1.9.1 Ensüümi ehitus

Lämmastiku fikseerimist viib läbi ensüümkompleks, mille tuumiku moodustab nitrogenaas. Aminohappelise järjestuse uurimine on näidanud, et ensüüm on väga konserveerunud ja sarnane nii sümbiontsel-asümbiontsel kui ka eu- ja arheabakteritel, kes fikseerivad õhulämmastikku. Seetõttu on olnud võimalik ühe bakteriliigi ensüümi struktuuri, talitluse ja selle kontrolli (seda vaid osaliselt) uuringute tulemusi kasutada teise liigi uurimisel (Dennis and Turpin, 1993).

Nitrogenaas koosneb kahest subühikust: nitrogenaas reduktaasist (*Fe- Valk*) ja nitrogenaasist (*MoFe-Valk*) (inglisekeelses kirjanduses tihti *nitrogenase proper*). Nitrogenaas reduktaas omakorda on homodimeer molekulaarmassiga 60 - 64 kDa. Teda kodeerib geen *nifH*. Tähtsat osa mängib 4Fe-4S klaster, mis seob subühikuid ja kannab elektrone nitrogenaasile. *Fe valgul* on kaks Mg-ATP sidumiskohta. ATP-de seondudes muutub 4Fe-4S klastris olevate elektronide elektronpotentsiaal negatiivsemaks, muutes seeläbi elektronide ülekande *MoFe-valgule* võimalikuks.

Nitrogenaas (*Mo-Fe valk*) on tetrameer ( $2\alpha 2\beta$ ) molekulaarmassiga  $\sim 220$  kDa;  $\alpha$ -subühikul 56 kDa ja  $\beta$ -subühikul 60 kDa. Nad on kodeeritud vastavalt geenide *nifD* ja *nifK* poolt. *Mo-Fe valgul* on neli 4Fe-4S klastrit ning kaks Mo aatomit. Mo aatomid on seotud *Mo-Fe kofaktoreisse*, mida on kaks. *Mo-Fe valgu* ülesanne on elektronide ülekandmine  $N_2$ -le ning  $H^+$  -le (Dennis and Turpin, 1993; Garret and Grisham, 1995).

Viimase ajal on avastatud paar "alternatiivset" nitrogeenaasisüsteemi. Esimeses neist on molübdeen asendatud vanaadiumiga. Teises ei ole leitud ei molübdeeni ega vanaadiumi. Selliseid ensüüme pole leitud sümbiontsetel bakteritel ja seetõttu on need ensüümid veel suhteliselt vähe uuritud (Dennis and Turpin, 1993).

### 1.9.2 Ensüümi töömehhanism

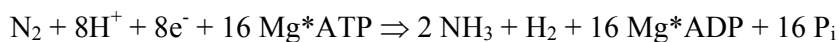
Lämmastiku fikseerimisel kantakse elektrone redutseeritud ferrodoksiinilt *Fe valgule*, mis omakorda kannab neid üle *Mo-Fe valgule*, mis on tegelik N<sub>2</sub> redutseerija. Ferrodoksiini redutseerimine toimub mitmeti: tsüanobakteritel fotosünteesi käigus, aeroobsetel lämmastiku fikseerijatel respiratoorsetes protsessides ja anaeroobsetel bakteritel fermentatsiooni käigus.

Nitrogeenaasi töömehhanismi kirjeldamisel ei ole ühest seisukohta. Järgnevalt esitan ühe levinuima kirjelduse.

Thorneley ja Lowe esitasid 1985. a. mudeli, mis kirjeldab nitrogeenaasi töö põhimõtet (lisa 3) (Dennis and Turpin, 1993). *Fe valgul* on kaks ATP sidumiskohta. Kui need on täidetud ATP-dega, siis on ta võimeline siduma ühe elektroni *ferrotoksiinilt* (või *flavotoksiinilt*) ja seejärel seonduma *Mo-Fe valguga*. Toimub ATP hüdrolyüs, mis muudab elektroni ülekande *Mo-Fe valgule* võimalikuks. Seejärel kompleks dissotsieerub. Sel viisil lisatakse *Mo-Fe valgule* 8 elektroni ja valk fikseerib 1 aatomi lämmastikku. Obligatoorseks kaasproduktiks on seejuures H<sub>2</sub>, sest ensüüm redutseerib ka ühe molekuli vett, kust vabanev H<sub>2</sub> reageerib dimiiniga (HN=NH). On tähtis teada, et kõik need seandumised on pöörduvad, st. toimuvad mõlemas suunas ja teatud kiirusega. Eriti aeglane on kompleksi dissotsieerumine (k<sub>3</sub>). See muudab nitrogeenaasi üheks aeglasemaks ensüümiks üldse, nimelt suudab üks ensüüm fikseerida vaid 3 molekuli N<sub>2</sub> sekundis. Piisava koguse lämmastiku fikseerimine tagatakse ensüümi rohkusega. N<sub>2</sub> ei ole mitte algusest peale seotud *Mo-Fe valguga*, vaid seotakse alles siis, kui valk on sidunud juba 3-4 elektroni. Sidumine toimub koos ühe molekuli vesiniku vabanemisega, siit ka obligatoorne kaasprodukt (Dennis and Turpin, 1993). Mudelit on täiustanud ning arendanud C. J. Pickett (1996)

Teise mudeli kohaselt kantakse elektrone üle kahekaupa (Prescott et al., 1996).

Lihtsustatud õhulämmastiku redutseerimise keemiline valem on järgmine:



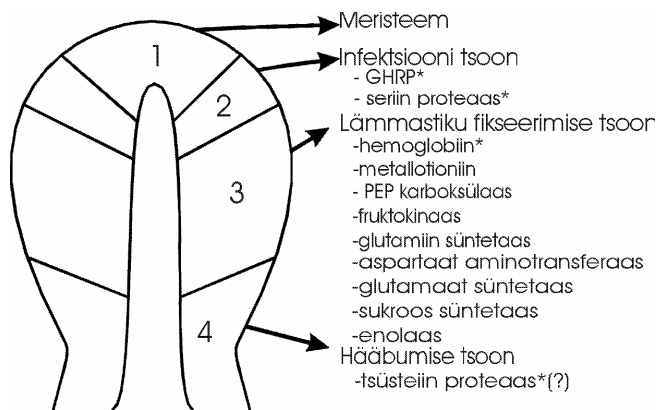
Tegelikult kulub ühe molekuli lämmastiku fikseerimiseks ATPd aga pea kaks korda rohkem kui valemist selgub (reeglina 25 – 30) (Marschner 1995). Nitrogenaas on võimeline redutseerima ka teisi substraate ( $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{N}_3$  (*atsiid*) ja atsetüleen  $\text{C}_2\text{H}_2$ ). Viimast kasutatakse nitrogenaasi aktiivsuse määramisel (vt Fikseeritud lämmastiku koguse määramise meetodid).

### **1.10 Peremeestaime geeniekspressioon.**

Noodulitest on eraldatud mitmeid valke, mis on sümbioosi-spetsiifilised. Noodul-spetsiifilisi valke, nii taimse kui bakteriaalse päritoluga, on nimetatud aktinoriisiinideks (*actinorhizins*). Kümndal rahvusvahelisel konverentsil *Frankia* ja aktinoriisataimede teemal (6-11 aug. 1995, Davis, CA) otsustati peremeestaime valke, mis ekspresseeruvad noodulites ja mitte juurtes, edaspidi noduliinideks kutsuma hakata.

Diferentsiaalset geeniekspressiooni on aktinoriisataimedel sümbioosis *Frankia*'ga molekulaarsete meetoditega uuritud ja dokumenteeritud vaid viimase nelja-viie aasta vältel (Mullin et al., 1993). Pärast mitmeid aastaid ebaõnnestunud katseid on nüüd mitmeid uurimisgrupe, kellel on õnnestunud noodulitest eraldada mRNA ja konstrueerida ning skriinida cDNA raamatukogud. On kasutatud viit erinevat moodust, mis kõik kasutavad cDNA sünteesi, et identifitseerida RNA transkripte, mis on ekspresseeritud spetsiifiliselt noodulites või millede ekspressiooni tase noodulis on erinev tasemest juures (Mullin and Dobritsa, 1996).

Ribeiro et al. (1995) defineerisid arenevates noodulites neli erineva metaboolse aktiivsusega tsooni. Tsoon 1 on nooduli meristeem, mis koosneb nakatamata meristeemsetest ja postmeristeemsetest rakudest. Tsoonis 2 paiknevad postmeristeemsed rakud, milledest mõned on nakatunud endofüüdi niitidega, kuid lämmastiku fikseerimist seal veel ei toimu. Tsoonis 3 on nakatunud ja mitternakatunud rakud. See tsoon on ka peamiseks lämmastiku fikseerimise kohaks. Tsoonis 4 on mitmetes staadiumides vananevad rakud.



Joonis 8. Riberio *et al.*, (1995) poolt defineeritud areneva nooduli tsoonid. Toodud on ka valgud, millede asukoht noodulis on tuletatud nende mRNA-de ekspresseerumise järgi. Tärniga (\*) on tähistatud noodulspetsiifilised valgud (Mullin and Dobritsa, 1996).

*In situ* hübridiseerimise abil on määratud mitmete aktinoriisa mRNAde ekspresseerumise koht ja aeg. Joonisel 8 on toodud Riberio *et al.* (1995) poolt defineeritud tsoonid ja valgud, millede kohta on teada, et nad on neis tsoonides ekspresseeritud. Põhjalikumaks ülevaateks peremeestaime geeni-ekspressiooni kohta aktinoriisa sümbioosis (vt. Mullin and Dobritsa, 1996).

### 1.11 Frankia geeniekspressioon.

Paljud geeniekspressiooni ja selle regulatsiooni uurimiseks mikroobigeneetikas laialt kasutatavad meetodid ei ole *Frankia* uurimiseks veel kohandatud. Siin on mitmeid põhjusi, millede lahtikirjutamine väljuks selle töö raamest. Samas on immunoloogilisi meetodeid kasutades olnud võimalik *nif*-geenide produktide ekspressiooni taset uurida sõltuvalt keskkonnanätingimustest (Lundquist, 1993). Immunoloogilised meetodid on lihtsustatult seletades mingi tuntud valgu vastu sünteesitud fluorestseeruvast märgistatud antikeha kasutamine selle sama tuntud valgu ja/või selle hulga tuvastamiseks mingis koes või rakus. Fikseeritud lämmastiku edasist transformatsiooni on samuti uuritud immunoloogilisi meetodeid kasutades.

Ammooniumi assimilatsioon saab alguse glutamiin-süntetaasi (GS) tööga. Immunoloogiliste uurimustega on näidatud, et *Frankial* on esindatud kaks GS-i: GS1 ja GS2. Neist esimene on tüüpiline prokarüootne GS, mida ekspresseeritakse lämmastikurikas keskkonnas. GS2 on iseloomulik lämmastikku fikseerivatele organismidele ja ekspresseeritakse mineraalse lämmastiku vaeses keskkonnas. Uuriti

nende kahe ja taime noodul-spetsiifilise GSn-i ekspressiooni kolmel juhul: 1) *Frankial*, keda kasvatati söötmel (mittesümbiontselt), 2) sümbiontsel *Frankial*, (sümbioosis *Alnus incanaga*) ja 3) sümbiontsel *Rhizobial*. Tuvastati üheselt, et juhtudel 2 ja 3 ei ekspresseeru kumbki bakteri GS. Juhul 1 aga võivad olenevalt keskkonnast ekspresseeruda mõlemad. Samas leiti, et juhtudel 2 ja 3 on kõrgelt ekspresseerunud taime GSn (noodul-spetsiifiline). Sellest järeldati, et sümbiontses bakteris ei toimu fikseeritud lämmastiku metabolismi. Kogu vajaliku lämmastiku peab sümbiontne bakter saama taimelt. Võimalik, et ammooniumi assimilatsiooni inhibeerimine on sümbiontses bakteris sümbioosile äärmiselt kasulik. Nimelt on vabalt mullas elavatel lämmastikufikseerijatel ammoonium fikseerimist inhibeerivaks faktoriks, kusjuures selleks on vaja ammooniumi konverteerimist glutamiiniks. Sümbioosis blokeerib taime bakteri GSid ja bakter ei "tunne" kõrgele ammoniaumi ( $\text{NH}_4^+$ ) kontsentratsiooni ning lämmastiku fikseerimine võib jätkuda (Lundquist and Huss-Danell, 1992).

Lisaks immunoloogilistele meetoditele on viimasel ajal kasutatud ka *in situ* RNA hübridisatsiooni, et määrata uuritavate mRNAde ekspressiooni asukoht, hulk ja aeg noodulis. Pawlowski *et al.*, (1995) leidsid seda meetodit kasutades, et *nifH*, geen, mis kodeerib nitrogeenaas reduktaasi, ekspresseerub kõrgel tasemel vesiikulites, mis paiknevad nooduli kolmanda tsooni rakkudes. Neljandas tsoonis leiti *nifH* ekspressiooni vaid hääbuvate rakkude üksikutes vesiikulites. Hääbunud rakkudes *nifH* ekspressiooni ei tuvastatud.

## 2 Töö eksperimentaalne osa

### 2.1 Sissejuhatus

Sõltumata sellest, kas lämmastiku fikseerimist mõõdetakse atsetüleeni meetodil või  $N^{15}$  meetoditega, kasutatakse siiani tulemuse ekstrapoleerimiseks lepiku pindalaühikule noodulite pindtihedust, mis näitab noodulite massi pindala kohta. Riberio *et al.*, (1995) defineeris arenevate noodulite harudes kolmanda tsoonina tsooni, kus toimub lämmastiku fikseerimine (vt. joon. 4, 5). Vanematel noodulitel paikneb see tsoon nooduliharu tipu lähedal. Lisaks on Pawlowski *et al.* (1995) tuvastanud, et *nifH*, geen, mis kodeerib nitrogenaasi, ekspresseerub samuti selles kolmandas tsoonis. Seega võime öelda, et lämmastiku fikseerimine leiab aset nooduliharu tipu lähedal. Neljas tsoon, mis moodustab vanemates noodulites suurema osa noodulist, on vananevate rakkude tsoon, kus ilmselt lämmastiku fikseerimist olulisel määral enam ei toimu.

Erineva vanusega noodulitel on nooduli tipmiste osade osakaal nooduli üldmassis erinev. Nimelt on vanematel noodulitel tipmise osa osakaal suhteliselt väiksem kui noortel noodulitel, mis tuleneb noodulite kasvu iseärasustest. Noodul kasvab tipust ja hargneb koraljalt (vt. joon. 1). Samuti võib nooduliharude tipmiste osade osakaal nooduli üldmassis erineda ka erinevatel tingimustel kasvanud samavanuseliste leppade puhul. Täiendavateks mõjuriteks võiksid olla nii niiskusrežiim, mulla toitaine sisaldus kui ka mulla lõimis. Viimased võivad ka ühtlase vanusega lepikus suhteliselt väikesel alal piisavalt suures ulatuses kõikuda.

Ülalöeldust tulenevalt ei tundu otstarbekas lämmastiku fikseerimise mõõtmistulemusi pindalaühikule ekstrapoleerides kasutada noodulite pindtihedust, vaid nooduli harude kolmanda tsooni pindtihedust. Kuna aga esimene ja teine tsoon moodustavad väga väikese osa noodulist, sest tegemist on vastavalt meristeemi ja valdavalt nakatamata postmeristeemiga (Riberio *et al.*, 1995), võiks ka nooduliharu kogu tipmise osa pindtiheduse kasutamine nimetatud ekstrapoleerimisel tulemuse täpsust juba oluliselt tõsta. Selle töö esimeses osas ongi peamise eesmärgina püütud välja tuua nooduliharude tipmiste osade osakaalu erinevused, sõltuvalt lepiku vanusest ja

mullatingimustest (üldlämmastiku, nitraatiooni ning ammooniumiooni kontsentratsioonid mullas).

Üldlevinud on arusaam, et ammoonium ja nitraat ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) mõjutavad õhulämmastiku fikseerimist: nii selle aktiivsuse, st. ensüümi nitrogeenaasi aktiivsuse ja/või hulga kui ka suhtelise noodulimassi kaudu. Liblikõieliste puhul on teada, et vähene mineraalse lämmastiku lisamine stimuleerib  $\text{N}_2$  fikseerimist, samas koormuse kasvades kahanevad nii fikseerimise aktiivsus kui taime nodulatsioonivõime (Marschner 1995). Ka aktinoriisete sümbiooside puhul on näidatud mõõduka mineraalse lämmastiku koormuse positiivset efekti nii noodulite pindtihedusele ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) (Lõhmus *et al.*, 1996) kui ka  $\text{N}_2$  fikseerimisele. Viimast on näidatud nii ammooniumi ( $\text{NH}_4^+$ ) (Bond *et al.*, 1954; Stewart and Bond 1961) kui nitraadi ( $\text{NO}_3^-$ ) (Zavitkovski and Newton 1968; Kohls and Baker 1989) lisamisel kasvukeskkonda (viited läbi Rytter *et al.*, 1991). Ingestad (1980) leidis, et vaid väga kõrge mineraalse lämmastiku koormuse korral on viimase pärssiv mõju lämmastiku fikseerimisele täheldatav. Järgnevatel töödes jõudis Ingestad (1987) järeldusele, et nii kaua kui ökosüsteem suudab lisatud lämmastiku ära kasutada, ei ilmne negatiivseid efekte. (viited läbi Rytter *et al.*, 1991). Ka Rytter *et al.*, (1991) jõudsid samale järeldusele kui pärast pikka aega tugevalt väetatud (kuni  $8 \text{ gN m}^{-2} \text{ päev}^{-1}$ , kokku  $297 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ ) leplikus nitrogeenaasi aktiivsus järsult langes. Hilisemates eksperimentides on  $\text{N}_2$  fikseerimisele negatiivseid efekte leitud ka madalamate väetuskooormuste puhul  $15 \text{ mg N nädal}^{-1} \text{ } 800 \text{ cm}^{-3}$  e. taim $^{-1}$  (ca.  $50 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ ) *Myrica gale* puhul ning  $34 \text{ mg N nädal}^{-1} \text{ } 800 \text{ cm}^{-3}$  e. taim $^{-1}$  (ca.  $130 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ ) *Alnus glutinosa* puhul (Baker *et al.*, 1997a, 1997b) (Põhjalikum kokkuvõte p. 1.5.3).

Tulemuste varieerumine viitab sümbionitse lämmastiku fikseerimise regulatsiooni keerukusele ning kompleksusele. Samas ei saa välistada ka meetoditest tulenevat viga. Nitrogeenaasi aktiivsuse määramisel on valdavalt kasutatud nn. atsetüleenireduktseerimise meetodit, mis põhineb nitrogeenaasi võimel redutseerida atsetüleenietüleeniks. Selle meetodi tundlikkus ning odavus on põhjuseks tema laialdase kasutusele. Kahjuks on see meetod siiski kaudne, sest mõõdetakse atsetüleenireduktseerimise kiirust ning hinnatakse selle alusel  $\text{N}_2$  redutseerimise aktiivsust.

Atsetüleenil on nitrogeenaasi aktiivsusele inhibeeriv mõju (p. 1.6.3) (Schwintzer and Tjepkema 1997, Tjepkema 1997 ja viited neis). Schwintzer and Tjepkema (1997)

näitasid, et kuna atsetüleenist tingitud nitrogenaasi aktiivsuse järsk langus saab alguse 2-3 minuti järel pärast atsetüleeni lisamist, saab nitrogenaasi aktiivsuse hindamisel kasutada vaid 2-3 minutilisi atsetüleeni-inkubatsiooniaegu. Sellest tulenevalt peeti otstarbekamaks kasutusele võtta gaasi läbivooluga süsteem, kus fikseeritakse atsetüleeni redutseerimise hetkeseis. Mõistagi ei ole vanemates (Rytter *et al.*, 1991, Ingestad 1980) töödes atsetüleeni inhibeerivat toimet arvestatud ning inkubatsiooniajad on küündinud tundidesse. Ka hilisemates töödes (Baker *et al.*, 1997a, 1997b) on kasutatud 10 – 25 minutilisi inkubatsiooniaegu.

Ka gaasi läbivoolu süsteemi puhul, kus määratakse usaldusväärne nitrogenaasi aktiivsuse hetkeseis, jäävad probleemid püsima. Kuivõrd tingimused, millest lämmastiku fikseerimise aktiivsus sõltub, ei ole piisavalt selged, on väga raske hetkeseisu põhjal pikemaajaliselt fikseeritud lämmastiku hulka arvutada. Seda enam, et näiteks *Myrica gale* puhul on pärast O<sub>2</sub>-ga inaktiveerimist näidatud väga kiiret (4 h) lämmastiku fikseerimise taastumist (Baker *et al.*, 1997b), mis viitab lämmastiku fikseerimise regulatsiooni suurele mobiilsusele.

Lisaks eeltoodule tundub, et atsetüleeni redutseerimisel ei esine kasvuperioodi faasist sõltuvat aktiivsuse muutumist (Schwintzer and Tjepkema 1997) nagu see on dokumenteeritud lämmastiku fikseerimisel (Rytter *et al.*, 1991). (Põhjalikum ülevaade p. 1.6)

Käesoleva töö teise osa peamiseks eesmärgiks ongi otsesest meetodit (<sup>15</sup>N inkorporatsioon) kasutades kontrollida mineraalse lämmastiku erinevate koormuste mõju lämmastiku fikseerimisele *Alnus incana* – *Frankia* sümbioosis.



## 2.2 Materjal ja metoodika

### 2.2.1 Lämmastiku fikseerimise aktiivsuse määrangud: pindalaühikule ekstrapoleerimise optimeerimine

Halli lepa (*Alnus incana* (L.) Moench.) juurenoodulid korjati Lõuna - Eestist, Porijõe uurimisalalt kolmelt erinevate tingimustega alalt (10 cm mullakihist) 1997 a. septembri keskel. Kokku koguti kümme noodulite kompleksproovi, mis kujutasid endast juhuslikke noodulite kogumeid toormassiga ~ 10-15 g. Esimeselt alalt korjati 3, teiselt 4 ja kolmandalt 3 kompleksproovi. Kui alade piiritlemine ei olnud juhuslik, vaid tingitud erinevatest tingimustest neis, siis alade sees kompleksproovid võeti juhuslikult. Aladelt 1, 2 ja 3 korjatud kompleksproovid moodustasid vastavalt esimese, teise ja kolmanda noodulite grupi.

Alad 1, 2 ja 3 paiknevad mõttelisel joonel, mis on üldiselt risti Porijõe voolusängiga (vt. lisa 4: Porijõe uurimisala plaan). Seega esimene ala on jõest kõige kaugemal ~30m, kolmas jõe perval ja teine nende vahel jõest ~10m kaugusel. Esimene ala on rohumaale pioneer-metsakooslusena kasvav umbes 2-4 aastaste puudega lepanoorendik. Teine ja kolmas ala jäävad naadi-hall lepikusse, mille keskmine vanus on 17 aastat. Teine ala asub lepiku rohumaapoolses servas ulatudes viimasest umbes 2 m ulatuses lepikusse. Kolmas ala kujutab endast jõeperve nimetatud mõttelisel joonel.

Järgmisel päeval valiti juhuslikult umbes 1/5 igast kompleksproovist. Noodulid pesti, lõigati juurtest lahti ning eraldati harudeks. Seejärel lõigati iga haru kaheks osaks nii, et ühe osa moodustas nooduliharu tipmine osa ning teise osa nooduliharu basaalosa. Tipmise osana defineeriti visuaalselt eristuv noorem, heledama värvusega ning enamasti veidi suurenenud läbimõõduga nooduliharu osa. Lõige sooritati nooduliharul kõige tipmisema tumedama vöödi kohalt, mille kohalt defineeritud tipmine osa läks üle basaalosaks. Nii saadi iga kompleksproovi kohta kaks proovi, millised tähistati vastavalt 1<sub>o</sub>, 1<sub>s</sub>; 2<sub>o</sub>, 2<sub>s</sub> jne., kusjuures proov 1<sub>o</sub> koosnes esimese kompleksproovi noodulite tipmistest osadest ja 1<sub>s</sub> vastavalt selle kompleksproovi noodulite basaalosadest. Proovid kuivatati 70°C juures 20 tunni vältel konstantse

kaaluni, ning kaaluti 0,5 mg täpsusega. Proovide üldlämmastiku sisaldus määrati Kjeldahli meetodil EPMÜ Taimebiokeemia laboratooriumis. Kahest kompleksproovist: noodulite tipmistest osadest ja noodulite basaalosadest määrati tselluloosi ning ligniini sisaldus (Tecator ASN 3430/1990 Reference method AOAC 973.18). Analüüs sooritati EPMÜ Taimebiokeemia laboratooriumis.

### 2.2.1.1 Porijõe uurimisala kirjeldus.

Porijõe uurimisala asub Porijõe keskjooksul Kambja lähedal. Porijõe valgla ja vastava piirkonna kirjeldus on esitatud varasemates töödes (Mander *et al.*, 1995). Uurimisalal on levinud deluviaal-gleimullad (lõimis pinnalt sügavamale: toorhuumus-liiv/kruus-savi). Alal 1 on huumuskiht savikam, alal 2 on pindmises kihis toorhuumus ning alal 3 on toorhuumus pisut liivakam (alluviaalsetted). Uurimisala keskmine kalle jõe suunas on ~ 5°. Taimekoosluste tüübid uurimisalal suunaga jõe poole on järgmised: söötis rohumaa, hall-lepa noorendik (3-5 a.), märg rohumaa (kus domineerivad *Filipendula ulmaria*, *Aegopodium podagraria*, *Cirsium oleraceum* ja *Urtica dioica*) ning hall-lepa (*Alnus incana*) puistu (keskmine vanus 17 a.). Ala täpsemaks kirjelduseks vt. Mander *et al.*, (1997) Uurimisala skeem (Mander *et al.*, 1997) on toodud lisas 4. Puistu iseloomustus (andmed 1995) on toodud tabelis 4.

Tabel 4. Porijõe uurimisala hall-lepa puistu iseloomustus (Lõhmus *et al.*, 1996)

Puistu tihedus (tk ha <sup>-1</sup> )	Leppade tihedus (tk ha <sup>-1</sup> )	Rinnasdia-meeter (cm)	Puistu keskm. kõrgus (m)	Rinnas-pind <sup>†</sup> (m <sup>2</sup> ha <sup>-1</sup> )	LAI* (m <sup>2</sup> m <sup>-2</sup> )
6110	5240	8,9	11.0	33,4	4,5

\* Lehepinna indeks (LAI - Leaf Area Index)

† Puutüvede summaarne ristlõike pindala 1,3 m kõrgusel hektari kohta

### 2.2.1.2 Kasutatud andmed

Porijõe uurimisalal on mitmel järjestikusel aastal erinevatel transektidel süstemaatiliselt uuritud mulla üldlämmastiku sisaldust. Osa uuritud transektidest langevad aladesse 2 ja 3. Seega võib neid andmeid kasutada nimetatud alade iseloomustamiseks. Mulla üldlämmastiku sisalduse andmeid lubas lahkelt kasutada Krista Lõhmus.

Vaatlusperioodil 07. 1996 - 07. 1997 oli alal 2 keskmine mulla üldlämmastiku kontsentratsioon  $0,835\% \pm 0,047$  ja alal 3 vastavalt  $0,264\% \pm 0,033\%$ . Mõlema ala vaatluspunktide andmed olid normaaljaotusega ning erinesid statistiliselt usaldusväärset (olulisustõenäosus  $p < 0,0001$ ).

1995 a. juulis määrati Porijõe uurimisala lepikus lepa juurenoodulite pindtihedust kolmes eri piirkonnas milledest esimene ja kolmas kattuvad selles töös kirjeldatud aladega 2 ja 3. Seega võib piirkonna 1 noodulite pindtihedust käsitleda kui ala 2 noodulite pindtihedust ja piirkonna 3 noodulite pindtihedust vastavalt kolmanda ala noodulite pindtihedusena. Noodulite pindtiheduste andmeid lubas lahkelt kasutada Krista Lõhmus.

Alal 2 on noodulite pindtihedus (kuivmass)  $12,91 \text{ g m}^{-2} \pm 1,7$  ning alal 3 vastavalt  $8,28 \text{ gm}^{-2} \pm 1,6$ . Teise ala noodulite pindtihedus osutus statistiliselt usaldusväärset suuremaks kui kolmanda ala noodulite pindtihedus ( $p < 0,05$ ) (K. Lõhmus, avaldamata andmed). Noodulite pindtihedus määrati Krista Lõhmuse poolt väljatöötatud meetodikaga (Lõhmus *et al.*, 1996).

Nitraatiooni ja ammooniumiooni kontsentratsioonide mõõtmistulemusi pinnasiseses äravoolus Porijõe uurimisala kohta lubas lahkelt kasutada prof. Ülo Mander (Mander *et al.*, 1995). Selle töö seisukohalt on olulised kahe mõõtmispunkti andmed - mõõtmispunktid 5 ja 6. Neist esimene asub lepiku rohumaapoolses servas ja teine Porijõe perve lähedal. Veeanalüüside tulemused on representatiivsed alade 2 ja 3 suhtes.

Vaatlusperioodil 1992-1993 oli keskmine nitraatiooni kontsentratsioon viiendas punktis  $1,7 \text{ mg NO}_3\text{-N l}^{-1}$  ning kuuendas punktis alla  $0,5 \text{ mg NO}_3\text{-N l}^{-1}$ . Ammooniumi

konsentratsioon samal perioodil samades punktides varieerus vähem, jäädes mõlemas punktis alla 0,5 mg NH<sub>4</sub>-N l<sup>-1</sup>. Seega on alad 2 ja 3 nitraatiooni kontsentratsiooni põhjal pinnasiseses äravoolus erinevad (Mander *et al.*, 1995).

## **2.2.2 Lämmastiku fikseerimine sõltuvalt väetuskõormusest**

### **2.2.2.1 Katseseadeldis**

Katseseadeldis valmistati roostevabast terasest Tartu Ülikooli Arenduskojas. Seadeldise moodustasid 35 kuusnurkse põhjapinnaga anumad (a = 11 cm, h = 22 cm), mis läbi omandas seadeldis kõrgstruktuuri. Anumad olid 7 kaupa üksteistest eraldatud, seega tekkisid 5 ühise mullaruumiga vannid. Mullapiirist (h = ca 20 cm) kõrgemalt olid kõik vannid ühenduses õhuavade kaudu (läbimõõt 2 cm). Vahetult enne inkubatsiooniaja algust seadeldis hermetiseeriti: polümetüül-metakrülaadist (pleksiklaas 0,5 cm) kaaneribad asetati ettevaatlikult seadeldisele ja vahed hermetiseeriti silikoonmassiga ("SILIRUB 2"). Seega moodustusid 5 eraldatud mullaruumiga, kuid ühise õhuruumiga vannid.

Vannide ühtedes otstes olid liigvee väljalaskmisavad, mis kuni inkubatsiooniaja alguseni olid avatud.

<sup>15</sup>N sisestamiseks oli seadeldisel ventiil, kuhu hermeetiliselt kinnitus <sup>15</sup>N gaasiballoon.

Katseseadeldise skeem ning fotod toodud vastavalt lisades 5, 6, 7, 8.

### **2.2.2.2 Katsetaimed ja kasvusubstraat**

Valged lepad (*Alnus incana*) olid 3-4 aastased ja pärit kõik ühest kohast - söötis heinamaalt Kambja lähistelt, mis oli pea üleni kaetud kase ja lepa (vähesel määral ka haava) noorendikuga. Viis leppa (iga rea esimene) pärinesid nende leppade hulgast, mis olid umbes nädal aega varem üles kaevatud ja olid seni seisnud varjulises kohas. Viimaseid oli kokku umbes 50, neist valiti välja 5 elujõulisemat. Ülejäänud lepad kaevati välja vahetult enne ümberistutamist. Kogu istutusmaterjal oli seemnetekkeline ja paljasjuurne.

Kuna kasutati ümberistutamist, ei olnud *Frankia*-ga nakatamine vajalik. Kõikide puude juurtel oli nooduleid näha. Muld katseseadeldisse koguti salu-kuusikuga piirnevast hall-lepiku huumushorisondist, kus *Frankia* populatsioon on tõenäoselt arvukas.

### 2.2.2.3 <sup>15</sup>N lisamine

<sup>15</sup>N lisati nii, et ~2% vanne ühendavast õhuruumist moodustaks <sup>15</sup>N. Kahe liitri N<sub>2</sub> (99,95% N<sup>15</sup>, CK Gases USA) lisamisel saavutati <sup>15</sup>N osakaaluks 2,066%. Arvutamisel kasutati eeldust, et 90% vanni ruumalast täidab muld, mille gaasisaldus on ca. 1/3.

### 2.2.2.4 Väetuskoormused

Taimi väetati ammoonium-nitraadiga. Väetuskoormustena otsustati kasutada järgmisi koormusi: 0, 25, 50, 100, 150 kg N ha<sup>-1</sup>a<sup>-1</sup>. Väetamine viidi läbi kolmes etapis, et minimeerida potentsiaalset väetamisest põhjustatud stressi ümberistutatud (mõningate juurekahjustustega) puudele.

### 2.2.2.5 Katse kulg

**15.05.98.** Katseseadeldis (kast) paigaldati Veskimõisa loodusliku lepanoorendiku alale (salu-kuusikuga piirneva vanema lepiku servas, poolvarjus). Kast paigaldati väikese kaldega (ca. 2°) väljavoolu ventiilide suunas. Nimetatud hall-lepikust kaevatud muld (15/20 cm paksune pealmine kiht) sõeluti ~1cm sõelaga. Samas võeti ka mullaproov, et määrata NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ning üldlämmastik. Kast täideti mullaga ning lepad istutati. Puid kasteti tiigiveega kuni mulla ühtlase märgumiseni. Kasti kõrvale kaevati kolm kraavi (25x20x150cm), mis täideti sama mullaga. Nendesse istutati veel ca. 30 hall leppa ca. 20 cm sammuga (varutaimed ning kontroll-taimed).

Järgneva kahe nädala jooksul kasteti leppi kahel korral ning ühtekokku 12 leppa vahetati välja, kuna nad ei osutunud elujõulisteks.

Edaspidi osutus kastmine mittevajalikuks, kuna sademetest piisas.

**13.06.98** Alustati ammoonium- nitraadiga väetamisega koormustega 0, 25, 50, 100, 150 kg N ha<sup>-1</sup> a<sup>-1</sup>. Arvutatud väetise koguhulk vanni kohta jagati kolmeks, et väetamine läbi viia kolmes etapis. Reale mõeldud väetise hulk lahustati liitris tiigivees. Väetiselahus kanti ühtlaselt kasvusubstraadile. Samas võeti ka tiigivee proov, et määrata NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ning üldlämmastik. Tiigivee analüüs kõigi väetamiste keskmistena: NO<sub>3</sub> < 0,01 mg/l, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> < 0,05 mg/l, TKN < 2 mg/l).

**19.06.98** Väetamise teine etapp.

**25.06.98** Väetamise kolmas etapp.

**27.06.98** Hermetiseerimine. Polümetüül-metakrülaadist (pleksiklaas) kaante ribadesse viiliti õõnsused nii, et puude tüved ribade vahelt läbi mahuksid. Kasti lisati kohati vähesel määral mulda (sama algne sõelutud muld), tasandamaks kastmisvee poolt põhjustatud nõrka erosiooni. Iga renni kasteti 1 l tiigiveega. Kaaneribade ning kasti ja kaaneribade endi vahelised kokkupuutepinnad tihendati hermeetilise massiga "SILIRUB 2". Puude tüved ümbritseti veekindla kleeplindiga, misjärel hermetiseeriti tüvede ja kaaneribade vahelised pilud kasutades eelpool mainitud vahendit. Kaan hermetiseeriti kell 17.00.

**28.06.98** Hommikul sooritati lisatihendamine ja õhtul 20.00 sisestati <sup>15</sup>N (N<sub>2</sub>) gaas, mille sisaldus katseseadeldise õhuruumis viidi 2%-ni.

Inkubatsiooni periood kestis kuni **07.07.98** õhtuni, mil leppade maapealsed osad eraldati ja pandi kilekottidesse. Kaas avati ning leppade juurestikud kaevati välja ning pandi kilekottidesse. Inkubatsiooniaja lõpu tingis leppadel leviv leherooste, mistõttu lehed hakkasid varisema. (Võrastike alumiste kolmandike lehed olid inkubatsiooniaja lõpuks juba suures osas langenud, ning seen levinud võrastike kõrgemate osade lehtedele.) Kaane avamisel levis mullast ebameeldivat lõhna, mis viitas anaeroobsele keskkonnale.

**08.07.98** Mõõdeti leppade kõrgused, toormassid ning tüve läbimõõdud juurekaelal. Leppade maapealsed osad jaotati lehtedeks, auksiblastideks, oksteks, tüvedeks ning kuvatati õhukuivaks. Juurestikud säilitati külmkapis (~0°C).

**September-Oktoober '98** Juurestikest eraldati elusad noodulid, mis pesti, puhastati, kuivatati (toatemperatuuril ~48h ning 72°C 24h) ning kaaluti. Lehed, auksiblastid, oksad ning tüved kuivatati 72°C juures 24-48h konstantse kaaluni ning kaaluti.

**Detsember '98**

Noodulid, auksiblastid ning lehed jahvatati (partikli läbimõõt ca. 100µm), misjärel neis proovides määrati kolmes korduses N% ning <sup>15</sup>N%. Analüüs viidi läbi Umweltforschungszentrum Leipzig - Halle GmbH (UFZ) laboris Dr. Rolf Russow juhendamisel kasutades isotoop massispektromeetrit "Finigan ΔS", mis oli ühendatud elementaaranalüsaatoriga "Vario EL". Nulltasemeks oli kalibreeritud 0,366 aatom%, mis on <sup>15</sup>N looduslik foon keskkonnas.

### **2.2.3 Andmete statistiline töötlus**

Statistiliseks analüüsiks kasutati programmpakette STATGRAPHICS Plus 7.1 ja EXCEL. Tunnuste vastavust normaaljaotusele kontrolliti  $\chi^2$ -testi ja Kolmogorov-Smirnovi testi abil. Keskmiste võrdlemiseks kasutati t-testi. Võrrandite parameetrite leidmiseks kasutati regressioonanalüüsi. Faktorite mõju olulisust kontrolliti ühefaktorilisel dispersioonanalüüsil. Kui dispersioonanalüüsi eeldused ei olnud täidetud, st. uuritavate tunnuste tinglikke jaotusi ei õnnestunud normaliseerida või rühmadispersioonid erinesid, kasutati mitteparameetrilist Kruskal-Wallis'e mitteparameetrilist dispersioonanalüüsi. Kõigi meetodite korral oli olulisuse nivoo  $\alpha = 0,05$ .

## 2.3 Tulemused

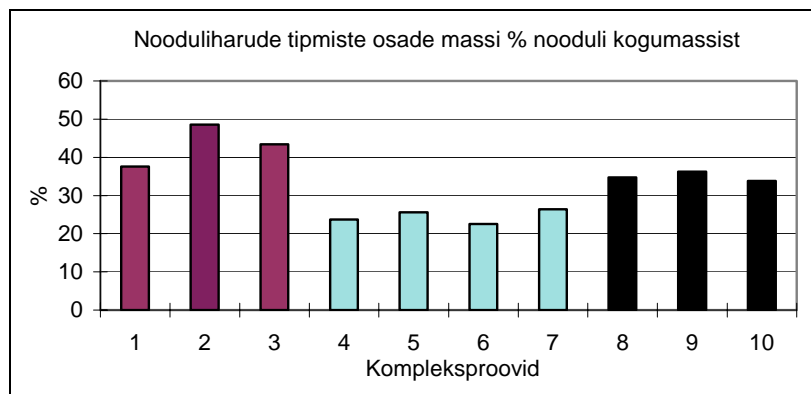
### 2.3.1 Aktiivse noodulimassi pindtiheduse hindamine Porijõe uurimisalal

#### 2.3.1.1 Proovide kuivmassid.

Noodulite kompleksproovide (1-10) tipmiste ja basaalosade (vastavalt *o* proovid ja *s* proovid) kuivkaalud on toodud tabelis 5. Lisaks on tabelis 5 kompleksprooviti näidatud tipmiste osade massi protsent kogu kompleksproovi (st. tervete nooduliharude) massist (joonis 8).

Tabel 5. Proovide kuivmassid; *o* (nooduliharude tipmised osad); *s* nooduliharude basaalosad. Toodud on ka *o* proovi massi protsent kogu kompleksproovi (*o+s*) massist ( $o/(o+s)$ ).

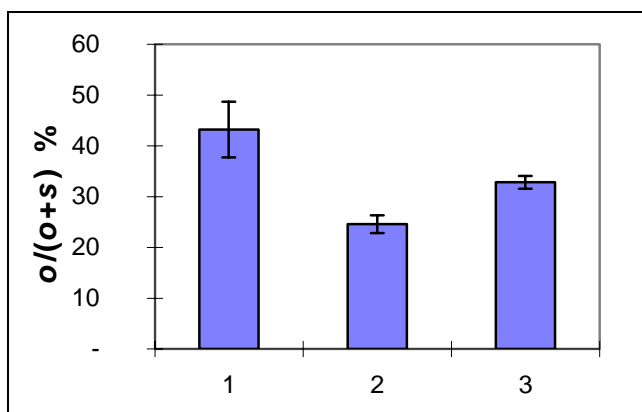
Kompleks-proovi nr.	<i>o</i> (mg)	<i>s</i> (mg)	$o/(o+s)$ %
1	82	136	37,61
2	171	181	48,58
3	136	177	43,45
4	96	308	23,76
5	162	470	25,63
6	150	515	22,56
7	127	354	26,40
8	238	446	34,80
9	148	260	36,27
10	147	288	33,79



Joonis 8. *o* proovide ehk nooduli tipmiste osade masside protsendid vastavate kompleksproovide kogumassist



Nooduliharude tipmiste osade protsentuaalse osakaalu põhjal nooduli üldmassis eristusid 1, 2 ja 3 alalt (vt. 2.2.1) kogutud kompleksproovid. Vastavad grupid erinesid statistiliselt usaldusväärselt Kruskal-Wallis'e dispersioonanalüüsil ( $p < 0.02$ ). Joonisel 9 on nende tulemuste põhjal näidatud kolme grupi kompleksproovide eristumine. X teljel on grupi number ja Y teljel aktiivse noodulimassi protsent. Gruppide keskmised nooduliharude tipmiste osade massi protsendid nooduli üldmassist koos vastava standardhälbe on toodud tabelis 4.



Joonis 9.

Kolme ala noodulite eristumine nooduliharude tipmiste osade massi protsentuaalse osakaalu põhjal nooduli üldmassis. X-teljel on grupi number ja Y-teljel nimetatud protsent.

Tabel 4. Alade keskmised nooduli tipmiste osade masside osatähtsused nooduli üldmassist ning vastav standardhälve.

Alad	%	STDEV
1	43,21	5,49
2	24,59	1,75
3	32,82	1,25

Nendest tulemustes lähtuvalt võime öelda, et lämmastiku fikseerimise seisukohalt aktiivsete varieerub sõltuvalt puu vanusest: grupp 1 *versus* grupid 2 ja 3 (vanematel puudel on nimetatud osakaal väiksem); ning mullatingimustest (vt. 2.2.1.2): grupp 2 *versus* grupp 3. Suurema üldlämmastiku sisaldusega ( $\sim 0,8\%$  *versus*  $\sim 0,2\%$ ) ning kõrgema nitraatiooni kontsentratsiooniga ( $1,7$  *versus*  $< 0,5$  mg  $\text{NO}_3\text{N l}^{-1}$ ) alal 2, oli nooduli tipmiste osade osakaal väiksem.

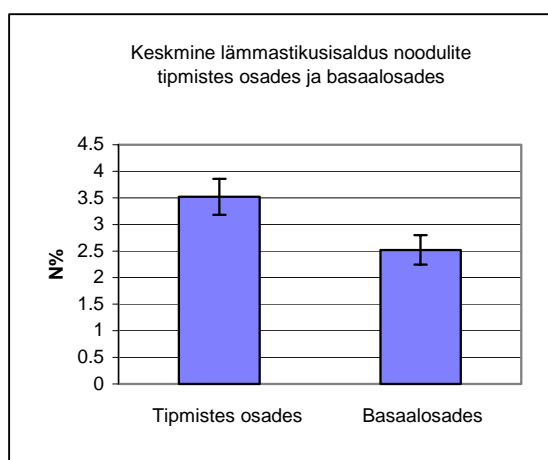
### 2.3.1.2 Noodulite tipmiste ja basaalosade lämmastiku- ja tselluloos+ligniini sisaldused

Porijõe uurimisalalt kolmest erinevast kohast kogutud noodulite tipmistes ja basaalsetes osades määrati Kjeldahli meetodil lämmastikusisaldus. Tulemused on toodud tabelis 5.

Tabel 5. Nooduli lämmastiku kontsentratsioonid (N%).

Ala	1			2				3		
Kompleksproovi nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
N% nooduli tipmistes osades (o proov)	3,75	3,52	3,97	3,67	2,97	3,79	2,95	3,72	3,49	3,38
N% nooduli basaalosades (s proov)	2,69	2,66	2,66	2,36	2,83	2,55	2,75	2,04	2,26	2,96

Keskmine lämmastikusisaldus nooduliharude tipmistes osades oli 3,521%  $\pm$ 0.10. Basaalosades oli lämmastikku 2,576%  $\pm$ 0.088. Mõlemad andmerekad olid normaaljaotusele lähedase jaotusega. Lämmastikusisaldused nooduliharude tipmistes ja basaalosades erinesid statistiliselt usaldusväärsetl (olulisustõenäosus  $p < 0,0001$ ), keskmised ja standardhälbed on toodud joonisel 10.



Joonis 10. Lämmastikusisaldus nooduliharude tipmistes ja basaalosades (N%).

Lämmastikuisalduse alusel noodulites kolme ala noodulid ei eristunud ühefaktorilisel dispersioonanalüüsil usaldusväärselt ( $p = 0.7$ ).

Seega võime öelda, et vähemalt sellistes tingimustes, kus üldlämmastiku kontsentratsioon mullas kõigub vahemikus 0,2% ja 0.8(0,9)% ning nitraatiooni kontsentratsioon pinnasiseses äravoolus on vahemikus 0,5 - 1,7  $\text{NO}_3\text{-N } \Gamma^{-1}$ , ei sõltunud lämmastiku kontsentratsioon halli lepa noodulis lämmastiku kontsentratsioonist mullas.

Proovides määrati summaarne tselluloosi ning ligniini sisaldus. Keskmise tselluloosi+ligniini sisaldus noodulite tipmistes osades oli 43,30% ning basaalosades 33,04%.

## 2.3.2 Lämmastiku fikseerimine sõltuvalt väetuskormusest

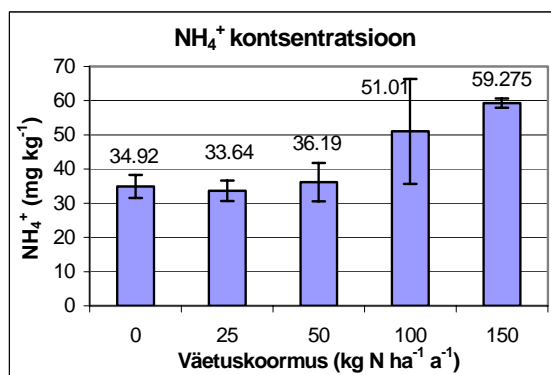
### 2.3.2.1 Mullaanalüüsid

$\text{NH}_4^+$  kontsentratsioon mullaproovides suurenes usaldusväärse trendina suurema väetuskormuse suunas (determinatsiooni kordaja  $r^2 = 0,725$ ,  $p < 0,005$ )(joonis 11). Katseseadeldise kõrval samal mullal kasvanud kontrollkatse leppade juurest võetud mullaproovides oli  $\text{NH}_4^+$  kontsentratsioon oluliselt väiksem kui mistahes vannis, olles samas inkubatsiooniaja lõpuks suurem kui kevadel istutamise ajal (tabel 4). Samas oli  $\text{NO}_3$  kontsentratsioon eri väetuskormustega vannides äärmiselt varieeruv ning raskesti seletatav (tabel 6). Ilmselt mängis siin suurt rolli denitrifikatsioon.

Tabel 6. Mullaanalüüside tulemused. K I – III on kontrollid enne istutamist. K IV on kontroll katse lõpus. Igast vannist koguti 2 proovi, vastavalt vannide ülemistest ja alumistest osadest (vt tekst).

Proov	KA%	$\text{NO}_3\text{-N}$ ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	$\text{NH}_4\text{-N}$ ( $\text{mg kg}^{-1}$ )
K I	83,22	2,98	11,34
K II	83,19	3,25	11,97
K III	83,56	3,06	10,05
I M ülal	77,99	1,84	31,54
I M all	74,43	0,070	35,74
II M ülal	81,66	1,64	40,17
II M all	80,10	3,40	32,21
III M ülal	72,76	2,52	40,13
III M all	68,18	0	61,89
IV M ülal	63,80	5,64	58,31
IV M all	64,41	0	60,24
V M ülal	64,51	0	32,55
V M all	63,87	0	37,29
K IV	77,14	8,40	16,65

Joonis 11.  $\text{NH}_4^+$  kontsentratsioon eri väetuskormustel (esitatud koos standardhälbega)



### 2.3.2.2 Katsetaimede biomassid

Vahetult pärast  $^{15}\text{N}$  inkubatsiooniaja lõppu määrati taimede maapealsete osade toormassid, puude pikkused ning tüveläbimõõdud juurekaelal. Edaspidi määrati lehtede, auksiblastide, okste, tüvede ning noodulite fraktsioonide kuivmassid. Tulemused koos vanni keskmiste ning vastavate standardhälvetega on toodud tabelis 7. Iga vanni seitsmest taimest valiti pärast toormasside määramist viis edasiseks analüüsiks

Tabel 7. Katsetaimede maapealsete osade toormassid, puude kõrgused, tüveläbimõõdud juurekaelal ( $d_0$ ) ning lehtede, auksiblastide, okste, tüvede ja noodulite fraktsioonide kuivmassid koos vanni keskmiste ning vastavate standardhälvetega.

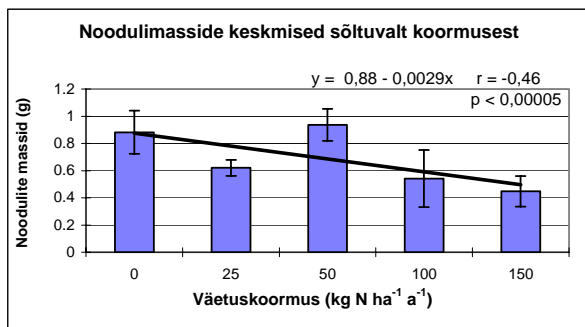
Vann (koormus kg ha <sup>-1</sup> a <sup>-1</sup> ) Puu	Puude mõõtmised ja toormass (g)			Kuivmassid (g)				
	$d_0$ - (mm)	h (cm)	Toormass (g)	lehed	võsud	oksad	tüved	noodulid
<b>K</b>								
1	9,0	100		5,42	1,01	3,06	9,95	0,23
2	10,9	103		9,08	1,95	3,91	15,19	0,61
3	12,6	132		11,60	2,79	7,42	24,33	1,34
<b>STDV</b>	<b>1,801</b>	<b>17,673</b>		<b>3,107</b>	<b>0,890</b>	<b>2,311</b>	<b>7,278</b>	<b>0,564</b>
<b>Keskmine</b>	<b>10,8</b>	<b>111,7</b>		<b>8,7</b>	<b>1,9</b>	<b>4,8</b>	<b>16,5</b>	<b>0,7</b>
<b>V(0)</b>								
1	9	100	47,1	4,42	2,71	2,49	9,95	1,1
2	10,9	122	72,2	4,7	1,66	5,89	20,35	0,3
3	8,6	94	35,3					
4	13,3	134	103,1	6,1	3,96	9,23	28,09	1,13
5	13,7	123	101,2	8,46	3,57	9,21	24,84	1,1
6	11,3	124	65,31					
7	10,6	111	46,22	4,46	1,5	5,59	14,33	0,81
<b>STDV</b>	<b>1,940</b>	<b>14,351</b>	<b>26,880</b>	<b>1,727</b>	<b>1,103</b>	<b>2,832</b>	<b>7,432</b>	<b>0,354</b>
<b>Keskmine</b>	<b>11,11</b>	<b>113,86</b>	<b>66,93</b>	<b>6,10</b>	<b>2,60</b>	<b>6,48</b>	<b>18,86</b>	<b>0,88</b>
<b>I(25)</b>								
1	10,9	108	70,69	7,2	1,81	6,45	15,58	0,56
2	10,1	103	63,76	4,73	1,36	6,58	16,48	0,77
3	9,9	101	40,02					
4	11,8	130	95,77	9,38	3,79	6,94	26,64	0,84
5	9	111	41,77	3,24	0,85	3,97	11,55	0,54
6	10,9	114	72,3	6,83	3,52	5,82	14,3	0,69
7	9,2	116	49,47					
<b>STDV</b>	<b>1,005</b>	<b>9,686</b>	<b>19,893</b>	<b>2,367</b>	<b>1,316</b>	<b>1,179</b>	<b>5,748</b>	<b>0,130</b>
<b>Keskmine</b>	<b>9,86</b>	<b>109,14</b>	<b>54,25</b>	<b>5,05</b>	<b>1,68</b>	<b>5,36</b>	<b>13,89</b>	<b>0,62</b>
<b>II(50)</b>								
1	10,2	135	62,92	5,61	1,55	2,25	16,89	0,57
2	11,5	138	73,63					
3	12,8	140	91,37	6,49	2,6	4,69	24,77	1,05
4	10,8	118	66,8	6,09	3,02	4,99	14,13	0,9
5	13	130	114,3	8,81	3,79	9,24	23,32	1,2
6	10,6	128	79	6,96	2,75	4,47	17,38	0,66
7	10,9	102	50,25					
<b>STDV</b>	<b>1,097</b>	<b>13,351</b>	<b>20,940</b>	<b>1,233</b>	<b>0,809</b>	<b>2,541</b>	<b>4,536</b>	<b>0,263</b>
<b>Keskmine</b>	<b>11,71</b>	<b>129,00</b>	<b>83,68</b>	<b>7,34</b>	<b>2,90</b>	<b>5,98</b>	<b>21,14</b>	<b>0,94</b>

III(100)								
1	9,4	89	47,75	3,73	0,78	3,76	8,26	0,45
2	10,6	115	73,02					
3	12,8	135	74,12	3,43	0,75	5,34	24,32	1,4
4	8,7	103						
5	10,1	91	39,23	1,3	0,32	6,52	8,66	0,13
6	11,3	122	69,42	5,46	1,92	6,86	14,44	0,54
7	11,6	130	84,52	8,12	2,95	3,69	20,68	0,6
<b>STDV</b>	<b>1,391</b>	<b>18,316</b>	<b>17,373</b>	<b>2,548</b>	<b>1,076</b>	<b>1,489</b>	<b>7,154</b>	<b>0,470</b>
<b>Keskmine</b>	<b>10,84</b>	<b>110,43</b>	<b>61,04</b>	<b>3,89</b>	<b>1,17</b>	<b>5,45</b>	<b>14,17</b>	<b>0,54</b>
IV(150)								
1	13,9	127	108,07	10,69	4,09	13,02	23,75	0,16
2	8,5	90	23,35					
3	10,3	106	43,9	2,6	0,98	4,7	12,48	0,55
4	8,4	91	27,7	1,04	0,39	1,6	9,54	0,18
5	9,1	119	48,65	3,25	1,49	2,12	13,03	0,39
6	7,7	110	35,3					
7	10,9	120	76,75	7,67	3,05	6,05	17,67	0,75
<b>STDV</b>	<b>2,114</b>	<b>14,376</b>	<b>30,341</b>	<b>4,000</b>	<b>1,530</b>	<b>4,586</b>	<b>5,552</b>	<b>0,250</b>
<b>Keskmine</b>	<b>9,93</b>	<b>113,00</b>	<b>54,95</b>	<b>5,49</b>	<b>2,22</b>	<b>5,60</b>	<b>15,99</b>	<b>0,45</b>

Vanniti e. eri koormustel (0, 25, 50, 100, 150 kg N ha<sup>-1</sup> a<sup>-1</sup>) ei erinenud taimede maapealsete osade kuivmassid üksteistest statistiliselt usaldusväärselt olles lehtede, võsude, okste ja tüvede puhul vahemikes vastavalt (vannikeskmised): 3,98g - 7,34g, 1,17g - 2,9g, 5,36g - 6,48g, 21,14g - 13,89. Seega ei omanud väetuskormused katse vältel leppade kasvule olulist mõju. Samas ilmnes ka, et koormusel 50 kg N ha<sup>-1</sup> a<sup>-1</sup> kasvasid puud jõudsamalt (suurimad toor- ja kuivmasside keskmised), kuigi erinevused ei olnud statistiliselt usaldusväärsed. Noodulimasside varieeruvus oli suhteliselt suur, ulatudes (puuti) 0,13g - 1,4g, siiski leiti usaldusväärne trend ( $r = 0,46$   $p < 0,001$ ) väetuskormuse kasvades noodulimassi vähenemisele (Joonis 9).

Lisaks nimetatud trendile olid koormustel 0 ja 50 kg N ha<sup>-1</sup> a<sup>-1</sup> kasvanud leppade noodulite kogumassid 95% usalduspiiride alusel suuremad kui koormusel 150 kg N ha<sup>-1</sup> a<sup>-1</sup> kasvanud noodulite kogumassid.

Puude biomassi fraktsioonide (lehed, oksad, tüved, auksiblastid) massid olid omavahel ootuspäraselt heas korrelatsioonis. Noodulite kuivmassid korreleerusid hästi puude toormassidega, auksiblastide - ja eriti tüve kuivmassidega ( $r = 0,53$   $p < 0,01$ ), kuid ei korreleerunud lehtede ning okste kuivmassidega. Korrelatsiooni puudumine lehemassiga võis olla tingitud lehtede osalisest varisemisest katse lõpul.



Joonis 12. Noodulite kuivmassi (g) vähenemine väetuskormuse kasvades. Esitatud on rühmakeeskemised väärtused standardveaga.

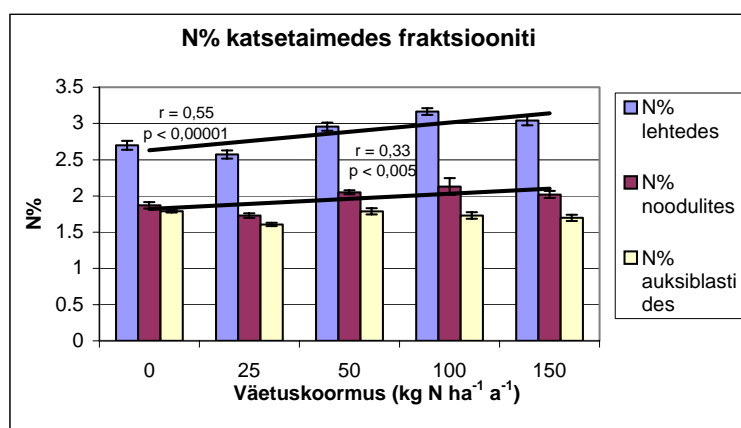
### 2.3.2.3 <sup>15</sup>N‰ ja N% katsetaimede analüüsitud biomassi fraktsioonides sõltuvalt väetuskormusest

Lämmastiksisaldusnoodulites jäi oodatust (vt. tabel 5) mõnevõrra madalamaks, küündides harva üle 2%, mis viitab ilmselt mõningasele häiritusele katsetaimede normaalses elutegevuses (istutusjärgne stress). Samas lehtede ning auksiblastide N% (tabel 8) olid kooskõlas varasemate tulemustega (Lõhmus, *et al.*, 1996). Ootuspäraselt suurenesid lämmastiku protsendid noodulites ning lehtedes väetuskormuse kasvades kõrgelt usaldusväärsete kuid samas nõrkade trendidena (noodulite puhul:  $y = 1,85 + 0,0016x$ ;  $r = 0,33$ ,  $p < 0,005$ , lehtede puhul:  $y = 2,67 + 0,0030x$ ,  $r = 0,55$ ,  $p < 0,00001$ ). Auksiblastide N% väetuskormuse kasvades ei muutunud usaldusväärset (joonis 13). Noodulite N% vähenes logaritmiliselt noodulimassi kasvades puu kohta ( $\ln N\% = 0,613 - 0,098 \ln(\text{noodulitekogumass})$ ,  $r = -0,46$ ,  $p < 0,0001$ ).

<sup>15</sup>N kontsentratsioonid (väljendatuna promillides) analüüsitud katsetaimede biomassi fraktsioonide lämmastikust olid <sup>15</sup>N juures inkubeeritud taimedel oluliselt suuremad kui kontrolltaimedel (joonis 14), kusjuures auksiblastide ning lehtede puhul jäi <sup>15</sup>N ‰ kontrolltaimedel alla looduslikku taset 0,366 aatom protsenti. Edaspidises analüüsis on negatiivsed tulemused arvestatud 0 – väärtustena. Seega võib väita, et katsesaadeldises kasvanud lepad rikastusid *Frankia* poolt fikseeritud õhulämmastikuga.

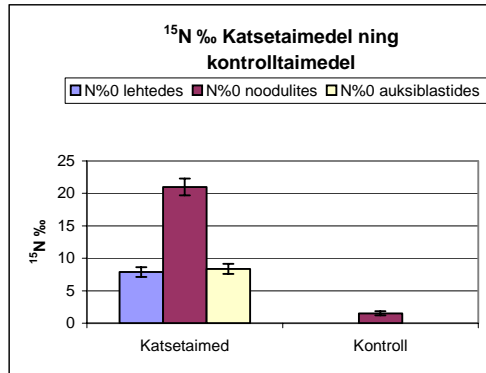
Tabel 8. Katsetaimede biomassi fraktsioonide N % ning <sup>15</sup>N ‰ sõltuvalt väetuskormusest. Andmed on kolme mõõtmise keskmised. Negatiivsed tulemused osutavad looduslikust <sup>15</sup>N foonist madalamatele sisaldustele, mistõttu on neid edaspidi arvestatud 0 – väärtustena.

Vann / puu	N% noodulites	N% auksiblastides	N% lehtedes	N‰ noodulites	N‰ auksiblastides	N‰ lehtedes
V 1	1,79		2,49	26,60	-0,93	-1,20333
V 2	2,04		3,043333	30,08	25,16667	25,23333
V 4	1,71	1,823333	2,633333	25,92	15,00333	9,543333
V 5	1,73	1,736667	2,456667	36,77	16,62667	14,80667
V 7	2,10	1,81	2,87	5,23	10,48333	13,11333
I 1	1,61	1,56	2,48	10,19	1,63	0,806667
I 2	1,57	1,67	2,256667	31,45	7,79	8,173333
I 4	1,82	1,50	2,543333	22,90	2,00	1,453333
I 5	1,76	1,73	2,876667	17,42	2,71	8,59
I 6	1,87	1,58	2,7	39,92	19,90667	18,51
II 1	2,14	1,726667	2,663333	21,30	11,27	8,513333
II 3	1,98	2,09	3,06	33,27	11,45667	10,35
II 4	2,15	1,67	3,186667	6,13	-0,80333	-0,39
II 5	1,89	1,653333	2,763333	25,61	11,26667	6,926667
II 6	2,08	1,796667	3,103333	27,54	8,323333	11,22
III 1	1,72	1,483333		22,19	4,746667	4,256667
III 3	1,88	1,72		8,16	0,473333	1,096667
III 5	2,90	1,833333	3,256667	3,77	0,04	-0,08
III 6	1,89	1,966667	3,306667	23,57	12,68	13,65667
III 7	2,27	1,646667	2,93	33,93	6,386667	6,17
IV 1	2,09	1,663333	2,813333	8,26	0,38	0,576667
IV 3	1,72	1,756667	3,243333	4,53	-0,19333	0,153333
IV 4	2,00	1,49	3,05	6,36	0,366667	0,94
IV 5	2,00	1,883333	3,34	19,19	7,416667	4,993333
IV 7	2,28		2,75	34,32	4,773333	3,976667
K I	2,36	1,79	3,063333	2,77	0,096667	-1,255
K II	2,49	2,32	3,413333	1,04	-0,53667	-1,32667
K III	2,02	1,83	2,916667	0,74	-1,55333	-1,51
Keskmine	1,99	1,7488	2,892692	18,90	6,320595	6,061928



Joonis 13. Lämmastiksisaldus katsetaimede biomassi fraktsioonides sõltuvalt väetuskormusest. Esitatud on rühmakeskmised väärtused koos standardveaga, trendide võrrandid: noodulid:  $y = 1,85 + 0,0016x$ , lehed:  $y = 2,67 + 0,0030x$ .





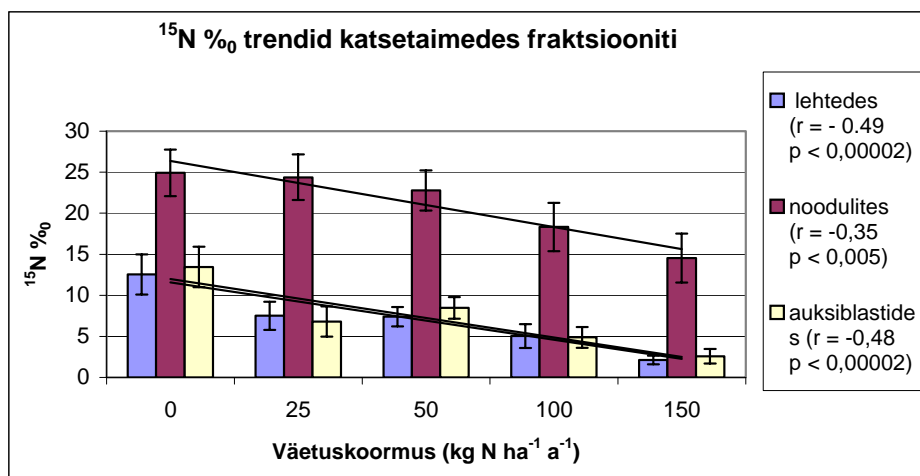
Joonis 14.  $^{15}\text{N}\%$  katsetaimedes ning kontrolltaimedes. Esitatud on rühmakeskmised väärtused koos standardveaga.

Väetuskormuse kasvades vähenesid  $^{15}\text{N}\%$  katsetaimede analüüsitud biomassi fraktsioonides usaldusväärsete trendidena (lehtedes:  $y = 10,8 - 0,059x$ ;  $r = -0,49$ ,  $p < 0,00002$ , noodulites:  $y = 25,7 - 0,073x$ ;  $r = -0,35$ ,  $p < 0,005$ , auksiblastides:  $y = 11,2 - 0,060x$ ,  $r = -0,48$ ,  $p < 0,00002$ ) (joonis 15).

Lisaks eeltoodule leidsime, et  $^{15}\text{N}\%$  oli usaldusväärset (95% usalduspiiridel) suurem väetuskormustel 0, 25 ja 50 kg N ha<sup>-1</sup> a<sup>-1</sup> kasvanud leppade lehtedes kui väetuskormusel 150 kg N ha<sup>-1</sup> a<sup>-1</sup> kasvanud leppadel varieerudes vahemikus vastavalt 0% – 25% ja 0,15% – 4,9%. Väetuskormustel 100 ja 150 kg N ha<sup>-1</sup> a<sup>-1</sup> oli  $^{15}\text{N}\%$  auksiblastides usaldusväärset (95% usalduspiiridel) madalam kui kormusel 0 kg N ha<sup>-1</sup> a<sup>-1</sup> olles arvuliselt vastavalt vahemikes 0% – 7,4% ja 0% – 25%.

Analüüsitud biomassifraktsioonide  $^{15}\text{N}\%$  olid omavahel heas korrelatsioonis (lehtede ja auksiblastide vahel:  $r = 0,95$ ,  $p < 0,0001$ ; lehtede ja noodulite vahel:  $r = 0,59$ ,  $p < 0,0001$ ; ning auksiblastide ja noodulite vahel:  $r = 0,65$ ,  $p < 0,0001$ )

Suure osa  $^{15}\text{N}\%$  varieeruvusest noodulites kirjeldas auksiblastide kuivmassi varieerumine ( $^{15}\text{N}\% = 14,69 \text{ auksiblastide kuivmass}^{-1/2}$ ,  $r^2 = 0,84$ ;  $p < 0,0001$ ).



Joonis 15. <sup>15</sup>N‰ katsetaimede biomassi fraktsioonides. Esitatud on rühmakeskmised väärtused koos standardveega, trendide võrrandid: noodulid:  $y = 1,85 + 0,0016x$ ; lehed:  $y = 2,67 + 0,0030x$ , auksiblastid:  $y = 11,2 - 0,060x$ .

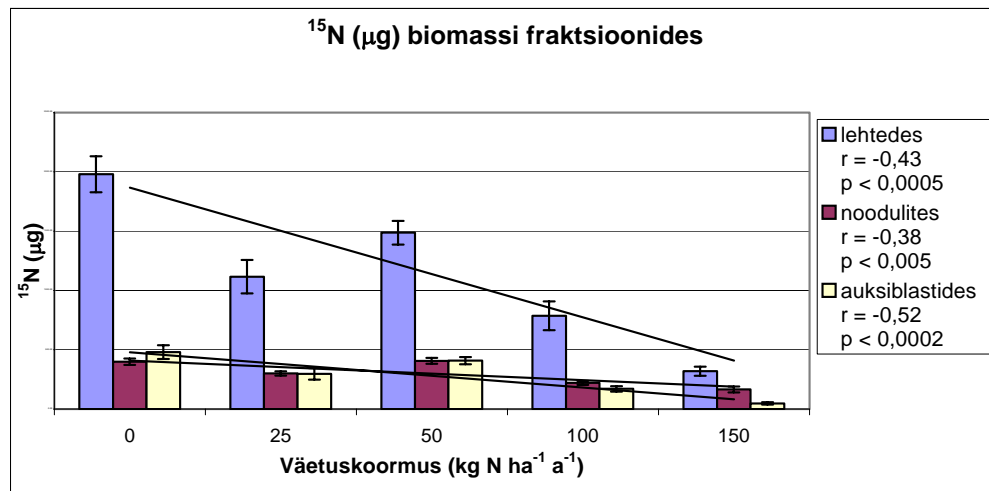
#### 2.3.2.4 Biomassifraktsioonidesse inkorporeeritud <sup>15</sup>N hulgad (µg) sõltuvalt väetuskormusest.

Katsetaimede biomassi erinevatesse fraktsioonidesse inkorporeeritud <sup>15</sup>N hulgad (µg) vähenesid väetuskormuse kasvades usaldusväärsete trendidena (lehtedes:  $y = 178,5 - 0,88x$ ,  $r = -0,43$ ,  $p < 0,0005$ , noodulites:  $y = 239,8 - 0,15x$ ;  $r = -0,38$ ,  $p < 0,005$ , auksiblastides:  $y = 56,7 - 0,37x$ ,  $r = -0,52$ ,  $p < 0,00002$ ) (joonis16).

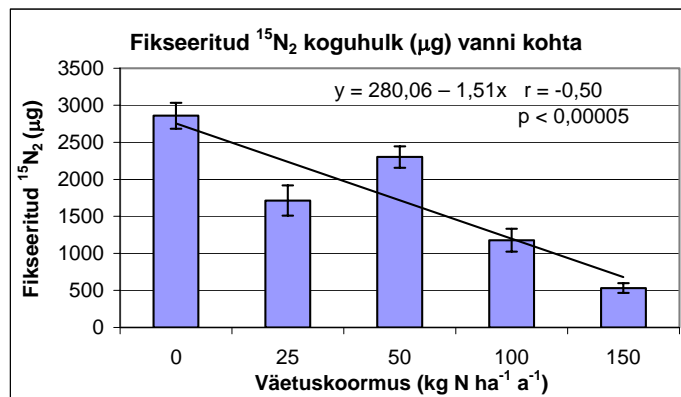
Väetuskormuse kasvades vähenes katsetaimedesse inkorporeeritud <sup>15</sup>N hulk (µg) sõltuvalt koormusest usaldusväärse trendina ( $y = 280,06 - 1,51x$ ,  $r = -0,50$ ,  $p < 0,00005$ ) (joonis 17). Koormusel 150 kg N ha<sup>-1</sup> a<sup>-1</sup> oli 95% usalduspiiride testil katsetaimedesse inkorporeeritud <sup>15</sup>N absoluutmass usaldusväärsest väiksem kui teiste koormuste puhul.

Fraktsioonide kuivmassid olid üldiselt heas positiivses korrelatsioonis inkorporeeritud <sup>15</sup>N massidega nii fraktsiooniti kui üldiselt. Noodulimasside

varieerumine kirjeldas 73% kogu inkorporeeritud  $^{15}\text{N}$  massi varieerumisest erinevatel koormustel ( $p < 0,0001$ ).



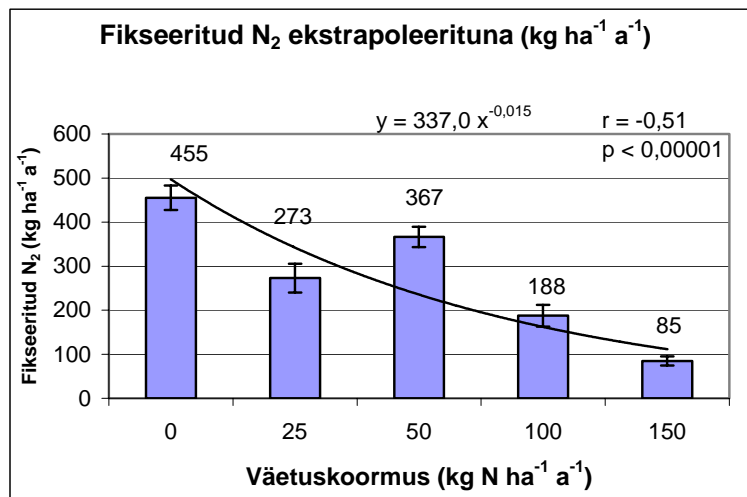
Joonis 16.  $^{15}\text{N}$  hulgad katsetaimede biomassi fraktsioonides. Esitatud on rühmakeskmised väärtused koos standardveaga, trendide võrrandid: lehed:  $y = 178,5 - 0,88x$ , noodulid:  $y = 239,8 - 0,15x$ , auksiblastid:  $y = 56,7 - 0,37x$ .



Joonis 17. Fikseeritud  $^{15}\text{N}_2$  koguhulk ( $\mu\text{g}$ ) erinevate väetuskormuste korral. Esitatud on rühmakeskmised väärtused koos standardveaga.

Saadud tulemusi (inkorporeeritud  $^{15}\text{N}$ ) ekstrapoleerides leidsime, et antud väetuskormustel näitaksid katsetingimustele lähedastes oludes kasvavad 3 – 4 aastased halli lepa puistud  $\text{N}_2$  fikseerimistulemusi, mis on toodud joonisel 18. Ilmnes usaldusväärne trend fikseeritud  $\text{N}_2$  koguse vähenemisele väetuskormuse kasvades (y

=  $337,0 x^{-0,015}$ ,  $r = -0,52$ ,  $p < 0,00001$ ) Fikseeritud lämmastiku ekstrapoleeritud koguhulkade keskmised vastavalt koormustele 0, 25 50, 100 ja 150 kg N ha<sup>-1</sup> a<sup>-1</sup> olid: 450, 270, 370, 190 ja 85 kg N ha<sup>-1</sup> a<sup>-1</sup>. Ekstrapoleerimisel kasutati järgmisi eeldusi: <sup>15</sup>N<sub>2</sub> inkubatsiooniaja jooksul (28.06.98 - 07.07.98) fikseeriti ca. 10% kogu kasvuperioodi jooksul fikseeritud N<sub>2</sub>-st; <sup>15</sup>N<sub>2</sub> osakaal N<sub>2</sub>-st katseseadeldises ei erinenud oluliselt planeeritud 2%; valdav osa fikseeritud N<sub>2</sub> –st seletub noodulesse, lehtedesse ja auksiblastidesse kui intensiivselt kasvavatesse taimeosadesse transporditud inkorporeeritud <sup>15</sup>N-ga. 95% usalduspiiridega oli koormusel 0 kg N ha<sup>-1</sup> a<sup>-1</sup> fikseeritava N<sub>2</sub> hulk usaldusväärselt suurem kui koormustel 100 ja 150 kg N ha<sup>-1</sup> a<sup>-1</sup> ning koormusel 50 kg N ha<sup>-1</sup> fikseeritava N<sub>2</sub> hulk usaldusväärselt suurem kui koormustel 150 kg N ha<sup>-1</sup>.

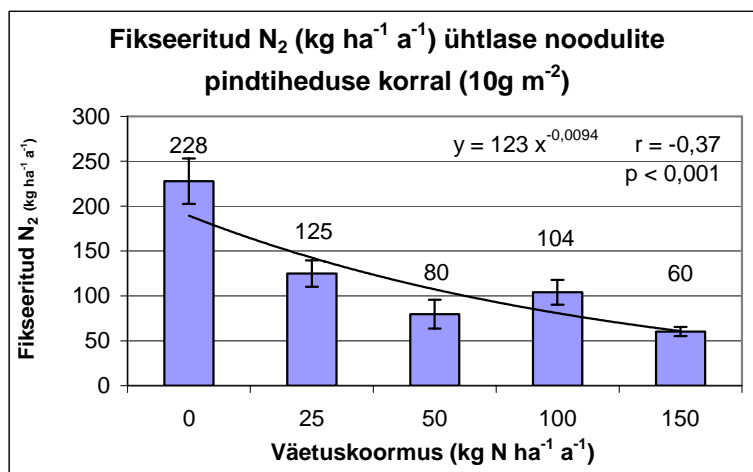


Joonis 18. <sup>15</sup>N<sub>2</sub> inkorporeerimis-tulemusi ekstrapoleerides saadud N<sub>2</sub> fikseerimise hinnangud antud väetuskormuste korral. Esitatud on rühmakeskmised väärtused koos standardveaga, ekstrapoleerimise eeldused on toodud tekstis.

Lämmastiku fikseerimise suhtelise aktiivsuse (nitrogenaasi aktiivsus ja/või hulk noodulites) hindamiseks taandati noodulimassidest tingitud varieerumine. Selleks viidi noodulite pindtihedused kõigis vannides arvutuslikult kirjanduses avaldatud noodulite pindtiheduste (Lõhmus *et al.*, 1996) alusel keskmisele tasemele 10 g m<sup>-2</sup>. Seeläbi elimineeriti väetuskormuse kasvades ilmnenud noodulimasside kahanemisest tingitud fikseeritud N<sub>2</sub> koguse vähenemine. Tulemused on toodud joonisel 19. Ilmnes usaldusväärne trend nitrogeenaktiivsuse ja/või hulga

vähenevalele noodulites väetuskormuse kasvades ( $y = 123 x^{-0,0094}$ ,  $r = -0,37$ ,  $p < 0,001$ ). Väetuskormuse 150 kg N ha<sup>-1</sup> puhul oli lämmastiku fikseerimise suhteline aktiivsus 95% usalduspiiridega väiksem kui kormuste 0 ja 50 kg N ha<sup>-1</sup> korral.

Lämmastiku fikseerimise ekstrapoleerimise tulemused korreleerusid hästi ka inkubatsioonaja alguses võetud mullaproovides määratud NH<sub>4</sub><sup>+</sup> kontsentratsioonidega. Regressioonanalüüsil leiti usaldusväärne kahanev mittelineaarne trend ( $y = 3 x^{-0,079}$ ,  $r = -0,51$ ,  $p < 0,00001$ ). Selline seos oli äärmiselt ootuspärane, sest NH<sub>4</sub><sup>+</sup> kontsentratsioon korreleerus ülihästi väetuskormusega ( $r = 0,96$ ,  $p < 0,0001$ )



Joonis 19. Noodulite pindtiheduste erinevuste taandamisel leitud lämmastiku fikseerimise suhtelise aktiivsuse (nitrogenaasi aktiivsus ja/või hulk noodulites) hinnangud sõltuvalt väetuskormusest. Esitatud on rühmakeskmised väärtused koos standardveaga.

## **2.4 Arutelu**

### **2.4.1 Lämmastiku fikseerimise aktiivsusemäärangud: pindalaühikule ekstrapoleerimise optimeerimine**

#### **2.4.1.1 Lämmastik mullas ja noodulis**

Esitatud tulemustest selgub, et üldlämmastiku sisaldus mullas vahemikus 0,2-0,8% ei mõjutanud lämmastiku kontsentratsiooni noodulis. Samuti ei paista nitraatiooni kontsentratsiooni kõikumine pinnavees vahemikus 0,5-1,7 mg NO<sub>3</sub>-N l<sup>-1</sup> mõjutavat lämmastikusisaldust noodulis.

Suur osa fikseeritud lämmastikust ladustatakse noodulis seotuna aminohappesse tsitrulliin (Smolander, 1990). Ladustatud lämmastik võiks moodustada suure osa lämmastikusisaldusest noodulis. Teisalt annab suure panuse nooduli üldlämmastiku sisaldusesse valgurikkus, mils seondub noodulite suure metaboolse aktiivsusega. Kolmandaks tuleks märkida meristeemi, mis on samuti väga lämmastikurikas. Töös leitud noodulite äärmiselt suur lämmastikusisaldus (vt. joon. 10) tulenebki ilmselt kolmest nimetatud tegurist.

Kui nitraatiooni aastakeskmise kontsentratsioon Porijõe uurimisala mullaaves 1,7 mg NO<sub>3</sub>-N l<sup>-1</sup> oleks lämmastiku fikseerimise seisukohalt ebasoodsam kui vastav kontsentratsioon 0,5 mg NO<sub>3</sub>-N l<sup>-1</sup> (Mander *et al.*, 1995), siis võiks arvata, et ka lämmastiku ladustamine nooduleisse oleks esimesel juhul väiksema ulatusega ning langenud lämmastiku fikseerimise aktiivsus omaks ilmselt negatiivset mõju ka metaboolsele aktiivsusele nooduleis, st. ka ensüümide hulgale neis. Siit tulenevalt võiks antud ulatuses varieeruva nitraadi kontsentratsiooni puhul varieeruda ka lämmastikusisaldus noodulis. Seda aga ainult juhul, kui nendes piirides nitraadi kontsentratsioonide maksimum ja miinimum omavad lämmastiku fikseerimisele erinevat mõju. Lämmastikusisaldus töös kasutatud nooduleis oli aga ühtlane, mis eelpooltoodud eelduste paikapidamise korral viitab sellele, et sellistes piirides tingimused lämmastiku fikseerimist ei mõjuta.

#### 2.4.1.2 Nooduli aktiivse osa eraldamine

Nagu eelpool kirjeldatud, eraldati nooduliharud kahte ossa vaid morfoloogilisi tunnuseid arvestades. Kuivõrd lõiget ei ole sooritatud tingimustes, kus oleks kindel nakatunud rakkude rõhuva enamuse sattumine nn. nooduliharu tipmisse ossa, ei saa kindlalt väita, et nooduli kahte ossa jaotamine oli sooritatud adekvaatselt. Nimetatud tingimustel peaks ühel ja samal ajal olema võimalik jälgida noodulis nakatunud rakke nagu joonisel 6 ning sooritada lõiget. Sellised tingimused on aga praeguste võimaluste juures kättesaamatud või äärmiselt komplitseeritud.

Kaudseid tõestusi Riberio *et al.*, (1995) poolt defineeritud neljanda nooduli tsooni (vt. joon. 8) eraldamise täpsuse kohta ülejäänud noodulist, on nende tulemuste põhjal kaks.

Esiteks, rakku sissepungunud *Frankia* hüüf jääb kogu sümbioosi aja vältel ümbritsetuks taimeraku seina materjali sarnase matejaliga, mis koosneb pektiinist, tselluloosist ja hemitselluloosist. *Frankia* hüüfid täidavad raku peaaegu üleni (vt. joon. 2, 3). Hüüfe ümbritseva seina pindala on seega tohutu. Seega peaks neljandat tsooni ülejäänud noodulist eristama madalam tselluloosisisaldus. Käesolevas töös eraldatud nooduliharude tipmiste osade tselluloosi+ligniini sisaldus osutuski 1,3 korda suuremaks kui basaalosades (ligniini sisaldus noodulis on tselluloosi sisaldusega võrreldes tühine).

Teiseks üldlämmastiku sisaldus oli nooduliharude tipmistes osades suurem kui basaalosades (cá 1,4 korda). See võiks viidata tipmiste osade suuremale metaboolsele aktiivsusele ja/või suuremale fikseeritud lämmastiku ladustamise ulatusele.

#### 2.4.1.3 Nooduli tipmiste osade pindtiheduse võrdlus noodulite pindtihedusega ja sellest tulenevad järeldused.

Käesolevas töös esitatud andmetest tuleneb, et ühtlase vanusega lepikus, kus mullatingimused ja noodulite pindtihedus muutuvad suhteliselt väikesel alal, ei varieerunu nooduliharude tipmiste osade pindtihedus proportsionaalselt noodulite pindtihedusega.

Alad 2 ja 3 Porijõe 17-aastases naadi-hall-lepikus on üksteisele väga lähedal, vahe on umbes 10 m. Samas oli mulla üldlämmastiku kontsentratsioon teisel alal 4 korda suurem. Ka nitraatiooni kontsentratsioon pinnasiseses äravoolus oli teisel alal 3,4 korda suurem. Kolmanda ala muld on pisut liivakam, kui teisel alal. Nimetatud erinevused on peamised, mille poolest nende Kaks ala teineteisest erinevad.

Krista Lõhmuse poolt määratud noodulite pindtihedused nende alade kohta olid vastavalt 12,9 g m<sup>-2</sup> teisel ja 8,3 g m<sup>-2</sup> kolmandal alal. Nooduliharude tipmiste osade pindtihedus aga oli, lähtuvalt selles töös leitud, vastavalt 3,2 g m<sup>-2</sup> ja 2,7 g m<sup>-2</sup>. Teise ala noodulite pindtihedus on 36% võrra suurem kolmanda ala vastavast näitajast. Nooduliharude tipmiste osade pindtihedus oli teisel alal vaid 14,4 % kolmanda ala nooduliharude tipmiste osade pindtihedusest suurem. Seega on noodulite pindtiheduse erinevus neil aladel 1,56 kordne, lämmastiku fikseerimise seisukohalt aktiivse nooduli fraktsiooni pindtiheduste erinevus aga vaid 1,16 kordne. Kahjuks puuduvad noodulite pindtiheduse andmed esimese ala (lepanoorendik) kohta.

Kui lämmastiku fikseerimise mõõtmistulemuste ekstrapoleerimisel heterogeensete tingimustega lepiku pindalaühikule kasutada selle lepiku keskmist noodulite pindtihedust, mis on küll osa-alade pindtiheduste kaalutud keskmine, võib tulemus olla petlik. Kui tingimused, mille poolest osa-alad on erinevad, on sellised, mis viivad peale noodulite pindtiheduste erisuse ka nooduli eri osade erinevale osakaalule noodulis, siis ülehinnatakse suhteliselt suuremate basaalosadega noodulitega ala lämmastiku fikseerimist. Alade 2 ja 3 puhul ülehinnatakse teise ala lämmastiku fikseerimist võrreldes kolmanda alaga ~20%.

Kirjeldatud olukorras on võimalik viga vähendada, mõõtes iga osa-ala kohta, mis eristusid noodulite pindtiheduse põhjal, eraldi keskmine lämmastiku fikseerimine. Kui aga osa-alad ei eristu noodulite pindtiheduse põhjal vaid nooduliharude tipmiste osade pindtiheduse põhjal, on tulemus vigane.

Seega on heterogeensete tingimustega lepikutes soovitatav mõõta lämmastiku fikseerimist mitte nooduli massiühiku kohta, vaid nooduliharude tipmiste osade massiühiku kohta ning tulemuste ekstrapoleerimisel lepiku pindalaühikule kasutada nooduliharude tipmiste osade pindtihedust.



Miks nooduliharude tipmiste osade pindtihedus ei varieeru proportsionaalselt noodulite pindtihedusega, nendest andmetest ei selgu. Seetõttu ei ole kohane sel teemal siin spekuleerida.

## **2.4.2 Lämmastiku fikseerimise sõltuvus mineraalse lämmastiku väetuskooormusest**

### **2.4.2.1 Väetuskooormused ja mullaniiskus**

Väetuskooormuste mõju hindamiseks võeti vahetult enne inkubatsiooniaja algust igast vannist kaks mullaproovi, kus määrati  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  ning kuivaine sisaldus. Proovid võeti vanni mõlemast otsast st. kõrgemalt ja madalamalt. Arvestades vannide kallet (ca.  $2^\circ$ ) on loogiline, et nende alumistes otstes oli muld üldiselt niiskem (tabel 6). Samas oli katseseadeldis pisut kaldu ka vannidega ristisuunas (kalde järjekorras vannid väetuskooormustega (25, 50, 100, 150 ja 0 kg N ha<sup>-1</sup> a<sup>-1</sup>). Samas suunas tõusis ka muldade niiskus (tabel 4), mis võib viidata mõningasele vee vahetumisele vannide vahel. Pidades silmas väetusperioodi ajal esinenud intensiivseid vihmavalanguid, ei saa katseseadeldises osalist lühiajalist veetaseme tõusu vanne ühendavate õhuavadeni võimatuks pidada. Samas, kui oleks esinenud olulist väetuskooormuste segunemist, oleks see pidanud olema märgatav väetusperioodi lõpul vannidest võetud mullaproovides määratud  $\text{NH}_4^+$  kontsentratsioonides. Nimetatud kontsentratsioonid korreleerusid aga äärmiselt hästi väetuskooormustega ( $r = 0,963$ ,  $p < 0,0001$ ), mistõttu võib väita, et kui esineski mõningast vannidevahelist väetuskooormuste segunemist, ei olnud see väetusrežiimi muutmiseks piisav, seega ebaoluline.

Katseseadeldise kaldest tulenenud mullaniiskuse suurenemine (vt. tabel 7), võis olla tulemuste lisavarieerumise allikaks. Vannid 4 ja 5 olid ühtlaselt madala mulla kuivaine sisaldusega (vt. tabel 6), kuid kõige erinevamate väetuskooormustega. Kuna praktiliselt kõikides analüüsides (noodulite kuivmassid, N%, <sup>15</sup>N‰) näitasid nimetatud vannid diametraalselt erinevaid tulemusi, võib mullaniiskuse mõju katsetulemustele pidada väheolulisteks (võrreldes väetuskooormuste mõjuga).

#### 2.4.2.2 Tulemuste varieerumine

Kogu eksperimendi kõige nõrgemaks küljeks tuleks lugeda tulemuste suurt varieeruvust, mis on ilmselt peamiselt tingitud kahest tegurist. Katsetaimed istutati katseseadeldisse ümber vaid pea kuu aega enne väetusperioodi algust, millele kahe nädala pärast järgnes inkubatsiooniperiood. Enne väetusperioodi algust tuli veel 12 leppa välja vahetada, kuna need osutusid elujõuetuiks, mistõttu asenduspuude aklimatsiooniaeg jäi veelgi lühemaks. Liiatigi toimus ümberistutamine liiga hilja - kui leppade lehed olid juba ca. 1-2 cm<sup>2</sup> suurused. Ülalöeldust tulenevalt peab tõdema, et katsetaimed pidid üle elama stresse, mis kindlasti jätsid jälje tulemuste varieerumisse. Teiseks tõenäoseks varieerumise allikaks oli *Frankia*-populatsiooni heterogeensus. Nimelt kuna katse ettevalmistusperiood (katsetaimede ettekasvamise aeg) jäi teatud põhjustel lühikeseks, ei olnud mõeldav katsetaimede nakatamine homogeense (ühest tüvest koosneva) *Frankia* populatsiooniga. Samas vastasid katsetingimused nii paremini *Frankia* looduslikule heterogeensusele.

#### 2.4.2.3 Väetuskoormuste mõju lämmastiku fikseerimisele

Suurele varieerumisele vaatamata näitas fikseeritud lämmastiku kogus taimedes väetuskoormuse kasvades usaldusväärset trendi vähenemisele (joonis 17). 73% sellest seosest kirjeldas noodulimasside vähenemine väetuskoormuse kasvades. Need tulemused viitavad noodulimassi reguleerimisele (siin: noodulite suremus) kui potentsiaalselt peamisele lämmastiku fikseerimist kontrollivale mehhanismile antud sümbioosis. See on kooskõlas ka varasemate töödega (Baker *et al.*, 1997a), kus nii nitraadi kui ammooniumiga väetamisel koormusel 130 kg N ha<sup>-1</sup> a<sup>-1</sup> (ümbär arvatud avaldatud koormusest 34mg N nädal<sup>-1</sup> 800cm<sup>-3</sup> e. taim<sup>-1</sup>) leiti sanglepa (*Alnus glutinosa*) puhul noodulimassi usaldusväärne vähenemine ning nitraadiga väetamisel vaid trendi nitrogeeni aktiivsuse (mõõdetuna atsetüleeni-etüleeni meetodil) vähenemisele noodulimassi kohta. Ka käesolevas töös näitas nitrogeeni hulk ja/või aktiivsus noodulites (hinnanguline) väetuskoormuse kasvades langevat trendi (joonis 19).

Vastupidiselt paljudele varasematele töödele nii liblikõieliste puhul (kokkuvõtvalt Marschner 1995) kui aktinoriisete sümbiooside korral (Bond *et al.*, 1954; Stewart and

Bond 1961, Zavitkovski and Newton 1968; Ingestad 1980, Ingestad 1987, Kohls and Baker 1989, Rytter *et al.*, 1991, Lõhmus *et al.*, 1996), ei esinenud antud töös madalate väetuskooormuste korral ei noodulimassi ega nitrogenaasi aktiivsuse tõusu. Selle töö tulemusel oleks ennatlik väita, et sellist positiivset efekti ei ole. On võimalik, et väetuskooormus  $0 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$  ei olnud tänu, vee võimalikule segunemisele katseseadeldise vannide vahel, siiski päris olematu. Lisaks muutis n hilisest istutamisest tingitud stress väetamisest tingitud katsetaimede reaktsiooni lämmastiku fikseerimisele tundlikumaks. Liiatigi oli väetusperiood nii lühike, et võimalikud mõjud noodulite kasvule ei olnud analüüsitavad. Seda kinnitab ka asjaolu, et eri koormustel kasvanud puude biomassi teised fraktsioonid ei näidanud mingit trendi ootuspärasele suurenemisele koos koormuse kasvuga.

Fikseeritud lämmastiku koguse ekstrapoleerimisel ei kasutatud noodulite pindtiheduse asemel noodulite tipmiste osade pindtihedust nagu eelneva uuringu tulemusena soovitati, sest algselt olid kõik puud kasvanud ühesugustes tingimustes, mistõttu nende noodulite tipmiste ja basaalosade masside varieerumine oli proportsionaalne, mida ka vaatlustel kinnitati. Väetusperiood oli aga liiga lühike noodulite kasvus erinevuste ilmnemiseks.

### 3 Kokkuvõte

Käesolev töö käsitleb sümbiontset lämmastiku fikseerimist *Alnus* – *Frankia* sümbioosis. Töö esimeses osas püütakse anda võimalikult lai ülevaade antud valdkonnast. Kirjeldatakse sümbiontse lämmastiku fikseerimise füsioloogiat, selle aktiivsust mõjutavaid tegureid ning mõõtmismeetodeid. Lisaks peatutakse sümbioosi mõlema osapoole fülogeneesil.

Töö eksperimentaalne osa jaotub kaheks. Esimeses osas tuuakse ära autori poolt 1997. a. läbi viidud uurimus lämmastiku fikseerimise aktiivsuse määrangute pindalaühikule ekstrapoleerimise optimeerimise kohta (Porijõe uurimisala naadi-halli-lepiku näitel). Lähtuvalt sellest, et lämmastiku fikseerimise seisukohalt on aktiivsed vaid noodulite tipmised osad, seatakse kahtluse alla senini kasutusel olev meetod, kus nimetatud ekstrapoleerimisel kasutatakse noodulite pindtihedust. Näidatakse, et heterogeensete tingimustega lepikutes on soovitatav lämmastiku fikseerimist mõõta mitte nooduli massiühiku kohta vaid nooduliharude tipmiste osade massiühiku kohta ning tulemuste ekstrapoleerimisel lepiku pindalaühikule kasutada nooduliharude tipmiste osade pindtihedust.

Eksperimentaalse töö teine osa käsitleb lämmastiku fikseerimise sõltuvust mineraalse lämmastiku väetuskooormusest halli-lepa (*Alnus incana*) – *Frankia* sümbioosis. Siin saadakse otsest meetodit,  $^{15}\text{N}$  inkorporatsiooni, kasutades toetust teiste autorite poolt näidatud mineraalse lämmastiku negatiivsele mõjule lämmastiku fikseerimisele. Seejuures on autorile teadaolevatel andmetel esmakordselt kasutatud  $^{15}\text{N}$  inkorporatsiooni meetodit  $\text{N}_2$  fikseerimise intensiivsuse määramiseks halli-lepa (*Alnus incana*) – *Frankia* sümbioosis sõltuvalt mineraalse lämmastiku koormusest vaadeldavas süsteemis. Vastava eksperimendi teostamiseks ehitati originaalne katseseade. Ammoonium – nitraadi väetuskooormustel 0, 25, 50, 100 ja 150 kg N ha<sup>-1</sup> a<sup>-1</sup> näidatakse statistiliselt usaldusväärset trendi ( $r = -0,51$ ,  $p < 0,00001$ ). Katsetaimedesse inkorporeeritud  $^{15}\text{N}$  koguhulkade ümardatud keskmised vastavalt nimetatud koormustele: 2,8; 1,7; 2,3; 1,1; 0,5 (mg  $^{15}\text{N}$  puu<sup>-5</sup> päev<sup>-10</sup>).

## 4 Summary

The current paper deals with symbiotic nitrogen fixation in *Alnus* – *Frankia* symbiosis. In the first part the author gives an overview of the issue. The nature and physiology of the symbiosis are described. In the overview the author stresses on the control of - and the various methods available to measure the activity of symbiotic nitrogen fixation. In addition attention is paid on the phylogenesis of both counterparts of the symbiosis.

In the second part of the paper the author describes two studies conducted by him in 1997 – 1999. The aim of the first study was to optimise the extrapolation of nitrogen fixation activity measurements to land unit. As regarding to nitrogen fixation, only the tips of *Alnus* nodule lobes are active e.g. the fixation takes place only there. In the light of this knowledge the author doubts the accuracy of wide used method where areal mass density of the nodules is used to extrapolate nitrogen fixation measurements. It is shown that, in case of alder stands where conditions and tree age varies, more precise results can be obtained if, nitrogen fixation is calculated respecting to the mass of the tips of nodule lobes and during extrapolation areal mass density of the same tips of the nodule lobes is used.

The second study emphasizes on the relation of nitrogen fixation in *Alnus incana* – *Frankia* symbioses to availability of combined nitrogen. Using the direct method to measure nitrogen fixation ( $^{15}\text{N}$  incorporation) the author obtains data which are in general consistent with other published findings showing the inhibitory nature of added mineral nitrogen to the symbiotic nitrogen fixation. To our knowledge the  $^{15}\text{N}$  incorporation method was used for the first time to evaluate the response of nitrogen fixation in *Alnus incana* – *Frankia* symbioses to various loads of mineral nitrogen. Ammonium - nitrate adding rates equivalent to 0, 25, 50, 100 and 150 kg N ha<sup>-1</sup> a<sup>-1</sup> induced a negative logarithmic trend ( $r = -0,51$ ,  $p < 0,00001$ ) in total fixed nitrogen. Total amount of  $^{15}\text{N}$  incorporated into studyplants respective to addition rates of ammonium - nitrate: 2,8; 1,7; 2,3; 1,1; 0,5 (mg  $^{15}\text{N}$  tree<sup>-5</sup> day<sup>-10</sup>).

## 5 Kirjanduse loetelu

- Akkermans A D L 1971 Nitrogen fixation and nodulation of *Alnus* and *Hippophae* under natural conditions. PhD. thesis. State University of Leiden, The Netherlands.
- Akkermans A D L and Van Dijk C 1981 Non-leguminous root-nodule symbioses with actinomycetes and *Rhizobium*. In: Nitrogen fixation. Vol. 1. Ecology. Ed. W J Broughton. Oxford University Press. pp. 57-103.
- Baker A, Hill G F and Parsons R 1997a Evidence for N feedback regulation of N<sub>2</sub> fixation in *Alnus glutinosa* L. J. Experimental Botany 48(306): 67-73.
- Baker A, Hill G F and Parsons R 1997b Alteration of N nutrition in *Myrica gale* induces changes in nodule growth, nodule activity and amino acid composition. Physiologia plantarum 99:632-639.
- Baker A and Parsons R. 1997 Rapid assimilation of recently fixed N<sub>2</sub> in root nodules of *Myrica gale*. Physiol. Plantarum 99: 640-647.
- Benoit L and Berry A M. 1997 Flavonoid-like compounds from seeds of red alder (*Alnus rubra*) influence host nodulation by *Frankia* (*Actinomycetales*). Physiol. Plantarum. 99: 588-593.
- Benson D R and Silvester W B 1993 Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. Microbiol. Rev. 57: 293-319.
- Berry A M and Harriott O T 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 6091-6094.
- Berry A M, McIntyre L and McCully M E 1986 Fine structure of root hair infection leading to nodulation in the *Frankia-Alnus* symbiosis. Can J. Bot. 64: 292-305.
- Chase *et al.* 1993 Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. Ann. Missouri Bot. Garden 80: 528-580.
- Cronquist A 1988 The Evolution and Classification of flowering plants. New York Botanical Garden, Bronx, New York, USA.
- Dennis D T and Turpin D H 1993 Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Department of Biology, Queen's University, Kingston, Canada, 526 pp.
- Doyle J J 1994 Phylogeny of the legume family: An approach to understanding of the origins of nodulation. Ann Rev. Ecol. Syst. 25: 325-349.
- Garret G and Grisham D 1995 Biochemistry. Saunders College Publishing, 1020 pp.
- Guan C, Riberio A, Akkermans A D, Jing Y, van Kammen A, Bisseling T and Pawlowski K. 1996 Nitrogen metabolism in actinorhizal nodules of *Alnus glutinosa*: expression of glutamine synthetase and acetylornithine transaminase. Plant Molecular Biology 32(6):1177-1184.
- Hahn D, Lechevalier M P, Fischer A and Stackebrandt E 1989 Evidence for a close phylogenetic relationship between the members of genera *Frankia*, *Geodermatophilus*, and "*Blastococcus*" and emendation of the family *Frankiaceae*. Syst. Appl. Microbiol. 11: 236-242.
- Houwers A and Akkermans A D L 1981 Influence of inoculation on yield of *Alnus glutinosa* in the Neatherlands. Plant soil 61: 189-202.
- Huss-Danell K 1986 Nitrogen in shoot litter, root litter and root exudates from nitrogen fixing *Alnus incana*. Plant Soil 91: 43-49.
- Huss-Danell K and Lundquist P-O 1993 *Frankia* symbioses, with emphasis on their N<sub>2</sub>-fixation. In: Endocytobiology V 5<sup>th</sup> International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis. Eds. Sato S, Ishida M and Ishikawa H. Tübingen University Press.
- Hönerlage W *et al.*, 1994 A hypervariable 23S rRNA region provides a discriminating target for specific characterization of uncultured and cultured *Frankia*. Syst. Appl. Microbiol. 17: 433-443.
- Ingestad T 1980 Growth, nutrition, and nitrogen fixation in grey alder at varied rate of nitrogen addition. Physiol Plant 50: 353 – 364.
- Ingestad T 1987 New concepts on soil fertility and plant nutrition as illustrated by research on forest trees and stands. Geoderma 40: 237 – 252.
- Kleemann G and Alskog G. 1994 Protoplasm. 183: 107-115.
- Lalonde M and Knowles R 1975 Ultrastructure of the *Alnus crispa* var. *mollis* Fern. root nodule endophyte. Can. J. Microbiol. 21: 1058-1080
- Lalonde M, Calvert H E and Pine S 1981 Isolation and use of *Frankia* strains in actinorhizae formation. In: Current perspectives in nitrogen fixation. Eds. A H Gibson and W E Newton. pp. 296-299. Australian Academy of Science, Canberra.
- Lechevalier M P 1983 Cataloging *Frankia* strains. Can. J. Bot. 61: 2964-2967.
- Lechevalier M P 1994 Taxonomy of genus *Frankia* (*Actinomycetales*). Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 1-8.

- Lechevalier M P and Lechevalier H A 1989 Genus *Frankia* Brunchorst 1886, 174<sup>AL</sup>. In: Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 4. Ed. S T Williams.. Williams & Wilkins, Baltimore. pp. 2410-1417.
- Liu Q and Berry A M 1991 The infection process and nodule initiation in the *Frankia-Ceanothus* root nodule symbiosis: A structural and histochemical study. *Protoplasma* 163: 82-92.
- Lundquist P-O 1993 Dynamics of nitrogenase in the *Frankia-Alnus incana* symbiosis. PhD Dissertation, University of Umeå, Sweden.
- Lundquist P.-O. and K Huss-Danell 1991a Nitrogenase activity and amounts of nitrogenase proteins in a *Frankia-Alnus incana* symbiosis subjected to darkness. *Plant Physiol.* 95: 808-813.
- Lundquist P.-O. and K Huss-Danell 1991b Response of nitrogenase to altered carbon supply in a *Frankia-Alnus incana* symbiosis. *Physiologia Plantarum* 83: 331-338.
- Lundquist P-O and Huss-Danell K 1992 Immunological studies of glutamine synthetase in *Frankia-Alnus incana* symbioses. *Microbiology Letters* 91: 141-146.
- Lõhmus K, Mander Ü, Tullus H and Keedus K 1996 Productivity, buffering capacity and resources of grey alder forests in Estonia. In: Short Rotation Willow Coppice for Renewable Energy and Improved Environment. Eds. K Perttu , A Koppel. pp. 95-105.
- Mander Ü, Kuusemets V and Ivask M 1995 Nutrient dynamics of riparian ecotones: A case study from the Porijõgi River catchment, Estonia. *Landscape and Urban Planning* 31: 333-348.
- Mander Ü, Lõhmus K, Kuusemets V and M Ivask 1997 The potential role of wet meadows and grey alder forests as buffer zones. In: Buffer Zones. Their processes and Potential in Water Protection. (Eds.) N E Haycock, T P Burt, K W T Goulding and G Pinay. Quest Environmental, Harpenden, UK. pp. 147-154.
- Marschner H 1995 Nitrogen fixation in Mineral nutrition of higher plants, second edition. Ed. Marschner Horst.. Acad. Press, 889p.
- Mikola P 1958 liberation of nitrogen from alder leaf litter. *Acta For. Fenn.* 67: 1-10.
- Miller I M and Baker D D 1986 Nodulation of actinorhizal plants by *Frankia* strains capable of both root hair infection and intercellular penetration. *Protoplasma* 131: 82-91.
- Mirza M S, Hahn D, Dobritsa S V and Akkermans A D L 1994b Phylogenetic studies on uncultured *Frankia* populations in nodules of *Datisca cannabina*. *Can. j. Microbiol.* 40: 313-318.
- Monz C A and Scwinzer C R 1989 The physiology of spore-negative and spore-positive nodules of *Myrica gale*. *Plant and Soil* 118: 75-87.
- Mullin B C and Dobritsa S V 1996 Molecular analysis of actinorhizal symbiotic systems: Progress to date. *Plant and Soil* 186: 9-20.
- Mullin B C, Goetting-Minesky M P and Twigg P 1993 Differential gene expression in the development of actinorhizal root nodules. In *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Eds R. Palacios, J. Mora and W E Newton. Kluwer Academic Publishers, Boston, USA. pp 309-314.
- Newcomb W and Wood S M 1987 Morphogenesis and fine structure of *Frankia* (*Actinomycetales*): The microsymbiont of nitrogenfixing actinirhizal root nodules. In *International Review of Cytology*, Vol. 109. Eds. G H Bourne, K W Joen and M Friedlander. Academic Press, New York, USA. pp 1-88.
- Nick G, Paget E, Simonet P and Nazaret S 1992 The nodular endophytes of *Coriaria* spp. from distinct ineage within the genus *Frankia*. *Mol. Ecol.* 1: 175-181.
- Normand P and Lalonde M 1982 Evaluation of *Frankia* strains isolated from provenances of two *Alnus* species. *Can. J Microbiol.* 28: 1133-1142.
- Parsons R and Baker A 1996 Cycling of amino compounds in symbiotic lupin. *J. Exp. Bot* 47: 421-429.
- Parsons R, Stanforth A, Raved J and Sprent J I. 1993. Nodule growth and activity may be regulated by a feedback mechanism involving phloem nitrogen. *Plant Cell Environ* 16: 125-136.
- Pawlowski K, Akkermans A D L, Vankammen A and Bisseling T 1995 Expression of *Frankia nif* genes in nodules of *Alnus glutinosa*. *Plant and Soil* 170(2): 371-376.
- Pickett C.J. 1996 The Chatt cycle and the mechanism of enzymic redction of molecular nitrogen. *J. Biol. Inorganic Chemistry* 1(6):601 – 606.
- Prescott L M, Harley J P and Klein D A 1996 *Microbiology*, Third edition. Times Mirror Higher Education Group. Inc. pp. 199-200; 496-496; 871-872.
- Ribeiro A, Akkermans A, van Kammen A, Bisseling T and Pawlowski K 1995 A nodule-specific gene encoding a subtilisin-like protease is expressed in early stages of actinorhizal nodule development. *Plant Cell* 7: 785-794.
- Rytter L, Arveby A S, and U Granhall 1991 Dinitrogen (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) fixation in relation to nitrogen fertilisation of grey alder [*Alnus incana* (L.) Moench.] plantations in a peat bog. *Biology and Fertility of Soils* 10: 223-240.

- Schaede R 1993 Über die Symbionten in den Knöllchen der Erle und des Sanddornes und die cytologischen Verhältnisse in ihnen. *Planta* 19: 389-416.
- Schwinzer C R, Berry A M and Disney L D 1982 Seasonal patterns of root nodule growth, endophyte morphology, nitrogenase activity, and shoot development in *Myrica gale*. *Can. J. Bot.* 60: 746-757.
- Schwinzer C R and Tjepkema J D. 1997 Field nodules of *Alnus incana* ssp. *Rugosa* and *Myrica gale* exhibit pronounced acetylene – induced declines in nitrogenase activity *Can. J. Bot.* 75: 1415 – 1423.
- Smolander A 1990 *Frankia* in Forest Soils. Academic dissertation in Microbiology. Faculty of Agriculture and Forestry University of Helsinki.
- Soltis D E, Soltis P S, Morgan D R, Swensen S M, Mullin B C, Dowd J M and Martin P G 1995 chloroplast gene sequence data suggest a single origin of the predisposition for symbiotic nitrogen fixation in angiosperms. *Proc. Natl. acad. Sci. USA* 92: 2647-2651.
- Sprent J I 1994 Evolution and diversity in the legume-*Rhizobium* symbiosis: Chaos theory? *Plant and Soil* 161: 1-10.
- Suharjo U K J, Tjepkema J D 1995 Occurrence of hemoglobin in the nitrogen - fixing root nodules of *Alnus glutinosa*. *Physiologia Plantarum* 95(2):247-252.
- Swensen S 1996 The evolution of actinorhizal symbiosis: evidence for multiple origins of the symbiotic association. *Am. J. Bot. (In press)*.
- Tarrant R F and Trappe J N 1971 The role of *Alnus* in improving the forest environment. *Plant Soil, Special Vol.*: 335-348.
- Tjepkema J D. 1997 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> and Ar induce rapid declines in nitrogenase activity and CO<sub>2</sub> evolution in nodules of *Datisca glomerata*. *Physiologia Plantarum* 99: 648-652
- Torrey J G 1985 The site of nitrogenase in *Frankia* in free-living culture and in symbiosis. *In* Nitrogen fixation research progress. Eds. H J Evans, P J Bottomley and W E Newton. Martinus Nijhoff Publishers. pp. 239-299.
- Torrey J G 1987 Endophyte sporulation in root nodules of actinorhizal plants. *Physiologia Plantarum* 70: 279-288.
- Van Dijk C 1978 Spore formation and endophyte diversity in root nodules of *Alnus glutinosa* (L.) Vill. *New Phytol.* 81: 601-615.
- VandenBosch K A and Torrey J G 1984 Consequences of sporangial development for nodule function in root nodules of *Comptonia peregrina* and *Myrica dale*. *Plant Physiol.* 76: 556-560.
- VanDijk C 1979 Endophyte distribution in the soil. *In: Symbiotic nitrogen fixation in the management of temperate forests*, Eds. J C Gordon, C T Wheeler and D A Perry. Oregon State University Press. pp. 84-94.
- VanDijk C 1984 Ecological aspects of spore formation in the *Alnus-Frankia* symbiosis. PhD. thesis. State University of Leiden.
- Weber A, Sarsa M and Sundman V 1989 *Frankia-Alnus incana* symbiosis: Effect of endophyte on nitrogen fixation and biomass production. *Plant Soil* 120: 291-297.
- Wheeler C T, Hooker J E, Crowe A and Berrie A M M 1986 The improvement and utilisation in forestry of nitrogen fixation by actinorhizal plants with special reference to *Alnus* in Scotland. *Plant Soil* 90: 393-406.
- Viro P J 1955 Investigation on forest litter. *Commun. Inst. For. Fenn.* 45: 1-65.



## Tänuavaldused

Eelkõige tahan tänada juhendajaid, Ülo Manderit ja Krista Lõhmust nõu, jõu ja abivalmiduse eest. Edasi Dr. Jürgen Augustini Zentrum für Agrarlandschafts – und Landntzungs – forschung e. v. –st (ZALF), kelle abil õnnestus organiseerida <sup>15</sup>N analüüs Umweltforschungszentrum-is Leipzig - Halle GmbH (UFZ) Dr. Rolf Russow juhendamisel kellele tahan avaldada samuti suurt tänu.

Ei saa kuidagi kahe silma vahele jätta ka häid sõpru, kes käe külge löid. Nii juhtus, et minu armas abikaasa Pille Metspalu pidi nii mõnelgi korral oma näpud mullaseks tegema. Jüri-Ott Salm oli tegev katseseadeldise projekteerimisel ning Peep Leppikuga sai katse läbiviimisel tublisti töövõtteid arendatud.