

# 非豆科植物共生固氮的研究

## 1. 根瘤内生菌的观察方法

杜大至 王毅岩

(山西省生物研究所, 太原)

介绍一种根瘤涂片法。在光学显微镜和扫描电镜下, 可以直接观察到根瘤内生菌不同发育阶段的形态特征和表面结构。以沙棘 (*Hippophae rhamnoides* L.) 根瘤做材料, 首次观察到内生菌孢囊、的孢囊和孢囊孢子及其表面结构, 以及拟类菌体的形成过程、多种形态和表面结构。本方法可广泛应用于非豆科植物共生固氮方面的研究。

目前, 绝大多数非豆科植物根瘤的内生菌尚未分离成功。对于根瘤内生菌的观察, 通常采用根瘤切片法。但是, 采用这种方法在光学显微镜下只能观察到侵染细胞在根瘤内的分布情况, 即使在油镜下也只能看到侵染细胞内一些球形的囊状结构。在透射电镜下, 虽然可以通过超薄切片观察到内生菌的菌丝、孢囊和拟类菌体以及它们的内部结构<sup>[1-4]</sup>, 但由于受切片部位、厚度和方向所限, 也只能看到菌体的一些片断, 反映不出内生菌的整体形态和立体构型。近年来, 有人利用半薄切片在扫描电镜下进行观察<sup>[4]</sup>, 但仍然无法看到完整的菌体。这就给认识这些内生菌造成很大局限性。

我们提出一种新的涂片技术, 在光学显微镜下可以直接观察到根瘤内生菌的不同发育形态, 在扫描电镜下还可以看到菌体的立体构型和表面结构。

## 材 料 和 方 法

以沙棘 (*Hippophae rhamnoides* L.) 根瘤为材料, 样品分别于 1981 年 5 月、8 月、10 月采自太原古交西山。

### (一) 光学显微镜制片

选表面灭过菌并经无菌水充分洗涤的根瘤, 切去外皮层、瘤柄和顶端的分生组织, 只留侵染细胞集中的部位备用。在干净的载玻片上滴加蒸馏水, 将修好的根瘤块挤出汁液, 均匀地涂抹在水滴中, 自然风干。滴加 1% 刚果红溶液, 风干后再滴加 95% 盐酸酒精。

### (二) 扫描电镜制片

用毛细管吸取上述载玻片上的菌液, 滴到贴有 Formvar 膜的微型盖玻片上, 自然干燥后用导电胶固定到直径为 1 cm 的铜样品台上, 喷涂后立即观察, 以防样品皱缩或龟裂。样品如需长时间保存, 可用临界点干燥法制片。

### (三) 仪器和测试条件

光学显微镜: AHS-2-HL 型万能显微镜、蔡司显微镜。

电子显微镜: 样品经 JFC-1100 型离子溅射仪喷金, 在 JSM-35C 型扫描电镜下观察。测试电压 15 KV, 放大倍数 2,600—40,000 倍。

## 结 果 和 讨 论

### (一) 菌丝体

在光学显微镜下, 可以观察到沙棘根瘤内生菌的菌丝体或菌丝片断。大部分菌

本文于 1982 年 4 月 23 日收到。

本文承杜竹铭教授审阅。扫描电镜制片、照相由山西省电镜测试中心白春生、范建、孔繁荣同志承担。

丝粗细不匀、多弯曲、有分枝,横隔不清晰,直径  $0.5-1.5\ \mu\text{m}$  (图 1-1)。还有一种更纤细的菌丝体,粗细较均匀、波曲、分枝、未见到横隔,直径只有  $0.3-0.6\ \mu\text{m}$  (图 1-2)。二者形态不尽相同。在扫描电镜下,可以观察到菌丝的表面比较粗糙、凸凹不平(图版 I-1)。从它们的形态、直径及分化过程来看,应该属于放线菌的菌丝体。

## (二) 孢囊、孢囊和孢囊孢子

光学显微镜下可看到在一些成片菌丝的末端,长有许多球状或纺锤状的孢囊(图 1-3)。球状孢囊直径  $2-3.5\ \mu\text{m}$ , 纺锤状孢囊是一种皱缩的孢囊,直径  $2.5 \times 4\ \mu\text{m}$  左右,一般认为孢囊是内生菌固氮的场所。在春季,根瘤内纺锤状孢囊较多,秋季则球状孢囊较多。可能由于黄土高原春季气候干燥、秋季雨水充足的缘故。孢囊呈不规则的圆形或椭圆形,涂片时因轻微着色而呈淡紫色,直径  $5-15\ \mu\text{m}$ ,常从菌丝上脱落下来单独存在(图 1-4)。内生菌的孢囊孢子在涂片中无色透明,呈不规则的球状(图 1-5),直径  $1.5-4\ \mu\text{m}$ ,大部分  $2\ \mu\text{m}$  左右,由成熟的孢囊破裂后释放而出(图 1-6)。

在同一涂片中,还经常可以看到另外一种较小的球形体(图 1-7),直径只有  $0.6-1\ \mu\text{m}$ 。这些球形体常堆积在一起呈葡萄串状,与上述孢囊孢子在大小和群体形态上有一定差别,而且常与拟类菌体同时出现。因此,它们究竟是一种小型孢子,还是另一种形态的拟类菌体,目前尚难做定论。

在扫描电镜下,可以观察到孢囊的表面比较光滑,有稀疏的瘤状凸起(图版 I-1)。而孢囊的表面呈现凸凹不平,凸起部分的形状很不规则,边缘极不整齐(图版 I-2)。孢囊破裂释放出孢囊孢子后,孢囊壁成为一个皱缩干瘪的空壳(图版 I-3)。孢

囊孢子表面非常光滑,有的十分饱满、呈球状,有的则皱缩变形,象瘪缩的皮球。但在这种孢子的表面,特别是孢子的瘪缩部位,常可看到一个孤立的瘤状凸起(图版 I-4)。那种较小的球形体,虽然表面也比较光滑,但除有一些皱褶外,再无任何装饰物(图版 I-5)。所以二者除大小不同之外,其表面结构也是有一定区别的。

## (三) 拟类菌体

在涂片中,在光学显微镜下还可以观察到大量杆状、弧状、棒槌状或其它形状的拟类菌体(图 1-8)。其形状不规则、大小悬殊,一般  $0.4-3.0 \times 2-10\ \mu\text{m}$ 。它们是由菌丝断裂而成(图 1-9)。初断裂时,一般呈比较均匀的杆状,而后逐渐增粗、变形,形成各种独特的形态。它们既不同于内生菌的菌丝、孢囊和孢子,也有异于一般细菌,极易辨认。

在扫描电镜下可以观察到:拟类菌体的形态极不规则,独为一体,与菌丝片断有明显的区别。它的表面呈瘤状或丘状的凸起,凸起的形状和大小很不规则,边缘也不整齐,但有明显的层叠结构(图版 I-6)。

大量的观察结果表明,通常在幼嫩的根瘤里内生菌处于发育的初期阶段,因而菌丝体较多。孢囊、孢子和拟类菌体较少。而成熟的根瘤里,内生菌则主要以孢囊或孢囊孢子的形式存在,其次是拟类菌体,很少见到菌丝体。根瘤中内生菌的各种发育形态,受季节的影响不太明显。但是如果寄主植物遇到干旱、低温、营养缺乏等不良条件或根瘤样品存放过久时,根瘤内拟类菌体就会显著增加。

必须指出,在光学显微镜制片时,采用常规的正染色法,虽然可以看到菌丝体、孢囊和孢子,但观察效果较差。尤其是拟类菌体的细胞壁不易着色,正染时往往观察不到。所以采用本文所推荐的负染色法,

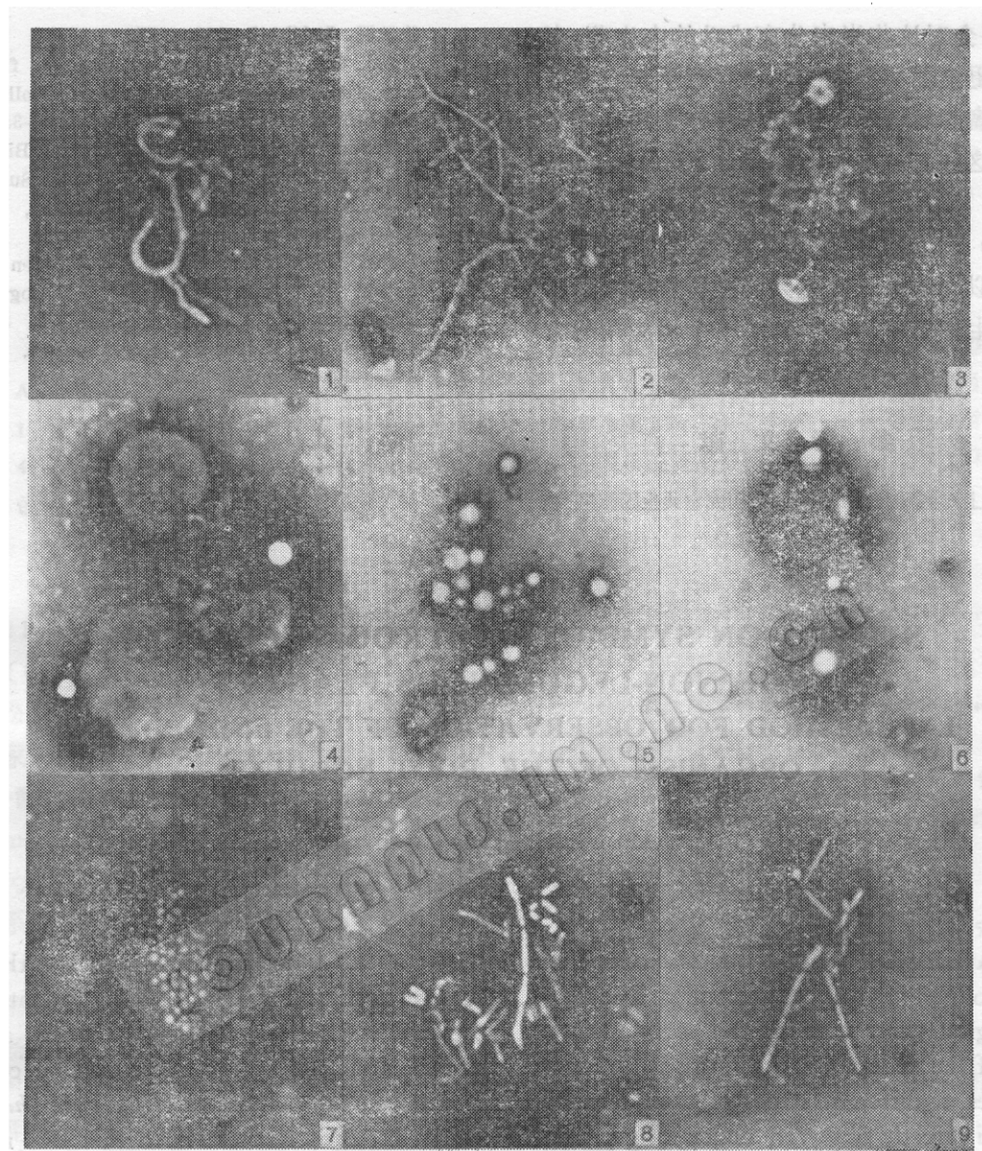


图1 沙棘根瘤涂片的光学显微镜照片( $\times 1350$ )

1. 粗菌丝; 2. 细菌丝; 3. 球状孢囊和纺锤状孢囊; 4. 孢囊; 5. 孢囊孢子; 6. 孢囊壁破裂释放出孢囊孢子; 7. 小孢子; 8. 各种形态的拟类菌体; 9. 菌丝断裂形成拟类菌体。

Fig. 1 Micrographs of the smears of a root nodule of *Hippophae rhamnoides* L. ( $\times 1350$ )

1. Thick hyphae; 2. Thin hyphae; 3. Spherical vesicles and spindle vesicles; 4. Sporangia; 5. Sporangiospores; 6. Sporangiospores from the ruptured sporangium walls; 7. Small spores; 8. Bacteroid-like cells in various forms; 9. Bacteroid-like cells formed from split hyphae.

观察效果较为理想。不过, 本方法不适于显示菌丝体的横隔膜, 必要时可采用其它染色法观察。

涂片法不仅使内生菌免受机械作用和

化学试剂的破坏, 保持了菌体的原状, 而且具有方法简单、操作方便、观察迅速、结果准确的优点。在进行非豆科植物根瘤内生菌的形态研究时, 如果能与切片法结合使

用,将会对这些尚未分离成功的内生菌,有一个更全面和深刻的认识。对于其它非豆科结瘤固氮植物,本方法同样适用。作者曾用这种方法观察了翅果油树 (*Elaeagnus mollis* Diels)、伞花胡颓子 (*Elaeagnus umbellata* Thunb) 等根瘤的内生菌,得到了较为类似的结果。这就为非豆科共生固氮植物内生菌的研究,提供了一个可应用的方法。

### 参 考 文 献

[1] 上海植物生理研究所固氮研究室共生固氮组: 植

物学报, 19(4)247—250, 1977。

- [2] Bond, G.: The Biology of nitrogen fixation (ed. by Quispel, A.), North-Holland Publishing Company, 1974, pp. 349—354.
- [3] Lalonde, M.: Recent Advances in Biological Nitrogen Fixation, (ed. by Subba Rao, N. S.) Edward Arnold, 1980, pp. 421—430.
- [4] Isobel C. Gardner: Symbiotic nitrogen fixation in plants, International Biological Programme 7 (ed. by Nutman, P. S.), Cambridge University Press, 1976, pp. 485—495.

## STUDIES ON SYMBIOTIC NITROGEN FIXATION OF NON-LEGUMINOUS PLANTS

### I. A METHOD FOR OBSERVATION OF THE ENDOPHYTIC ORGANISM OF THE ROOT NODULES

Du Dazhi Wang Yiyan

(Shanxi Institute of Biology, Taiyuan)

A smearing method for observing on the root nodules was recommended. The morphological characteristics and surface structure of the endophytic organisms in the root nodules at different stages of their develop can be directly observed under a light microscope and a scanning electron microscope. The authors were the first who made the observations on the sporangia and sporangio-

spores of the endophytic organism and their surface structure. as well as their formation process, various morphological forms and surface structure of the bacteroid-like cells in detail in the nodules of *Hippophae rhamnoides* L.. It is recommended that this method can be applied extensively to the studies on the symbiotic nitrogen fixation of other non-leguminous plants.