

马桑共生固氮根瘤及其内生放线菌

周 平 贞

(中国农业科学院油料作物研究所, 武汉)

吴 捷 陈 华 葵

(华中农业大学, 武汉)

马桑型非豆科内生放线菌的共生固氮根瘤的含菌组织与桤木型不同。前者为一马蹄形整体, 围绕着中柱维管束; 后者完全包围中柱, 其中含菌细胞和不含菌细胞交错存在或形成分散的含菌细胞组织团。

尼泊尔马桑 (*Coriaria nepalensis* Wall.) 根瘤的内生放线菌菌丝形态与桤木根瘤的内生菌形态相同, 具有一层电子密度很高的单层壁和具有单层壁的横隔膜。菌丝分枝, 具有中间体。成熟的含菌细胞内有一围绕着中央液泡的栅栏排列的柱形泡囊, 它们是菌丝的顶端细胞, 其电子密度比菌丝高。含菌组织的衰老部分有颗粒体, 颗粒体有双层壁, 内层壁与菌丝的相同, 外层壁比内层壁厚数倍, 电子密度低。

关键词 马桑根瘤; 内生放线菌; 非豆科共生固氮

非豆科植物和内生放线菌的共生固氮根瘤已在桤木等 21 属植物中发现^[1,2]。1978 年以来已报道从 9 个属的植物根瘤中分离出纯培养物并成功地回接寄主植物, 形成新的共生根瘤。从桤木等属分离的放线菌已定为 *Frankia* 属^[3-5]。

非豆科植物和内生菌的共生固氮根瘤是变形的支根。按照根瘤内含菌组织和内生菌的形态特征, 可以分为两个类型: (1) 桤木型, 代表除马桑属 (*Coriaria*) 和 *Datisca* 属外已发现的各属植物。在横断面上, 桤木型根瘤的含菌组织完全包围中柱, 含菌细胞和不含菌细胞交错存在或形成分散的含菌细胞团。含菌细胞中部充满内生放线菌的分枝菌丝。在寄主细胞壁附近, 菌丝顶端形成球形或其它形状的泡囊。衰老的含菌组织中含有颗粒体, Dijk 和 Merkus^[6]指出它们来自孢子囊。(2) 马桑型, Bond^[7]最先报道马桑属及其内生菌的共生固氮组

织在根瘤内为一整体, 横断面为马蹄形。其后 Newcomb 等报道 *Datisca* 属及其内生菌的共生固氮组织与马桑同型^[2,8,9,1]。但至今都没有从马桑或 *Datisca* 根瘤中分离出内生菌的纯培养物和回接成功的研究报告。

本文报道了尼泊尔马桑 (*Coriaria nepalensis* Wall.) 的共生固氮根瘤的含菌组织及其内生菌的形态研究。尼泊尔马桑广泛分布在长江中上游流域的丘陵山地上。

材料和方法

(一) 根瘤来源

1. 试验根瘤采自中国农业科学院油料作物研究所(武汉)种植的马桑苗圃园内。
2. 广口瓶中装土壤和蛭石混合物, 灭菌。播

本文于 1985 年 4 月 9 日收到。

承华中农业大学电镜室, 中国农业科学院原子能利用研究所傅仓生, 中国科学院武汉病毒研究所王学兰和武汉大学测试中心张起麟等同志协助和技术指导, 特此致谢。

种表面灭菌的马桑种子,接种马桑根瘤的压榨汁。植株生长,形成根瘤后采取根瘤样品。未接种马桑根瘤压榨汁的对照处理没有结根瘤。

(二) 光学显微镜观察

用FAA固定根瘤,按常规进行石蜡包埋。用旋转式切片机切片(厚度 $5-8\mu\text{m}$),在玻片上脱蜡后用番红-固绿双重染色,高碘酸席夫试剂染色,和碘液染色。在光学显微镜下观察,摄影。

(三) 扫描电镜观察

最初,用常规方法制样:用2.5%戊二醛固定根瘤指形小枝,经系列酒精脱水,用双面刀片切开,暴露含菌组织,将组织块粘在样品台上,临界点干燥,喷金后观察,结果含菌细胞中的内含物丢失。后改为石蜡包埋块,切成 $20-24\mu\text{m}$ 厚片,粘在盖玻片上,脱蜡后固定在样品台上,用Eiko IB-5离子溅射仪喷金8分钟,用Hitachi Ts-50型扫描电镜观察,摄影。

(四) 透射电镜观察

取根瘤的含菌组织,切成 1mm^3 大小,2.5%戊二醛前固定,磷酸缓冲液清洗,乙醇脱水,以上处理均在 4°C 进行。转入乙醇-丙酮(V/V:1)液和纯丙酮脱水。Epon 812或*618树脂包埋,用玻璃刀超薄切片。醋酸双氧铀-柠檬酸铅双染色,各染10分钟。Jeol CX-100型透射电镜观察、摄影。

结 果

(一) 根瘤形态和含菌组织

马桑根瘤为变形的分枝侧根,形成一丛指形物(图版I-1),每一指形物中间为中轴维管束组织。横断面的皮层组织感染后形成马蹄形的含菌组织,不完整地包围着中轴维管束(图版I-2)。指形物的纵切片可分为五段:①顶端分生组织;②顶端后的细胞分化为维管束、皮层和表皮层;③新感染的含菌组织;④成熟的含菌组织;⑤衰老的含菌组织。

(二) 含菌组织中的内生放线菌及其泡囊

含菌组织中的内生菌呈现为分枝有隔

膜的菌丝(图版I-3),宽 $0.4-0.8\mu\text{m}$,细胞壁为电子密度很高的单层壁,细胞质内有明显的单位膜中间体(图版I-4),菌丝纵剖面中可观察到中间体与原生质膜连接。这些特征表明内生菌是放线菌。

在双重染色的光学显微镜下,含菌细胞的中央为液泡,周围为一整圈栅栏状排列的柱状体,番红着色。柱状体圈外被固绿着色(图版I-5)。在透射电镜下,与番红着色的栅栏结构相应的是电子密度高的丝状细胞,长 $3.0-8.0\mu\text{m}$,宽 $0.7-1.0\mu\text{m}$,Newcomb^[10]和Mirza^[11]称它们为泡囊;而与固绿着色相应的是电子密度低的菌丝。电镜观察表明泡囊是菌丝的连续,比菌丝稍粗并与菌丝以横隔膜分开(图版I-6)。还不能解释同一菌丝的两段在染色反应上有这样明显的区别。

(三) 含菌组织的外围细胞和菌丝侵入细胞的初期

靠近中柱的几层皮层细胞充满淀粉粒,碘液染成蓝色,无菌丝感染。含菌组织前端新感染的皮层细胞碘液染色除有大颗粒的淀粉粒外,还含有大量未能鉴定的无色或浅蓝色小颗粒,用高碘酸席夫试剂染色,淀粉粒(大颗粒)紫红色,小颗粒深红色。扫描电镜观察,新入侵的分枝菌丝附着在淀粉粒上生长,还有球形体或球杆状体,表面光滑,直径与菌丝相当(图版I-7)。

(四) 衰老的含菌细胞

在含菌组织底部的衰老区,栅栏状泡囊的原生质浓缩,质壁之间形成空隙。同时出现聚集在一起的颗粒体群,颗粒体内部电子密度较高,具有电子通透的类脂颗粒,颗粒体壁两层,内层电子密度高,厚度与菌丝和泡囊的胞壁相同,外层电子密度较低,但比内层厚数倍(图版I-8)。

讨 论

1. 马桑型根瘤的含菌组织与桤木型的含菌组织形态有明显区别。本文报道的尼泊尔马桑含菌组织的形态与 Bond^[7]、Newcomb 等^[10]和 Mirza 等^[11]的相同,并增添了一些新内容。

2. 马桑根瘤的内生放线菌菌丝的超薄切片电镜图象与 Becking^[12]的相同,为分枝的丝状体。胞壁单层,电子密度高。菌丝内有单位膜中间体,与原生质膜相连。这与桤木型的内生菌丝相同。

3. 在含菌细胞内大量菌丝的顶端形成泡囊,泡囊紧密排列,形成栅栏状结构,围绕着寄主细胞的中央液泡。泡囊的电子密度比菌丝的高,石蜡切片经番红-固绿双重染色,在光学显微镜下泡囊被番红着色,菌丝和寄主细胞物质被固绿着色。这些与桤木型含菌细胞内的泡囊不同。周平贞等曾认为栅栏状菌体是细菌,电镜观察证明这是不正确的。

4. 靠近中柱的几层皮层细胞含淀粉粒。在含菌组织的前端,含淀粉粒的皮层细胞被菌丝侵入形成新的含菌细胞,其中含有分枝菌丝和与菌丝宽度相等的表面光滑的球状或球杆状体。

5. 在衰老的含菌细胞中,泡囊内容物与胞壁有明显的质壁分离现象。同时也形成一些颗粒体,颗粒体有两层壁,一层为电子密度高的内壁,一层为电子密度低且比内壁厚几倍的外壁,颗粒体的形态与 Becking^[6,14,15]等报道的桤木型内生放线菌的颗粒体(granule)或孢囊孢子(spore)相似,但尚不能证明它们来自孢子囊。

6. 由于马桑型的共生放线菌和含菌组织与桤木型的共生放线菌和含菌组织有以上异同,在肯定其为内生放线菌的前提下,是否与从桤木等植物根瘤分离得到的 *Frankia* 相同,有待于从马桑共生根瘤中分离出纯培养物和回接结瘤成功后解决。

参 考 文 献

- [1] Bond, G.: In *Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants*, Cambridge University Press, Cambridge, London, New York, Melbourne, pp. 443—475, 1976.
- [2] Akkermans, A. D. L. et al.: In *Advances in Nitrogen Fixation Research*, Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publisher, pp. 311—319, 1984.
- [3] Becking, J. H.: *Int. Syst. Bact.*, 20: 2, 1970.
- [4] Callaham, D. et al.: *Science*, 199: 899—902, 1978.
- [5] Lechevalier, M. P.: *Plant and Soil*, 78: 1—6, 1984.
- [6] van Dijk, C. and E. Merkus: *New Phytol.*, 77: 73—91, 1976.
- [7] Bond, G.: In *The Biology of Nitrogen Fixation*, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, Oxford American Elsevier Publishing Company, Inc. New York, pp. 342—378, 1974.
- [8] Newcomb, W. et al.: *New Zealand J. Botany*, 20: 105—113, 1982.
- [9] Hafeez, F. et al.: *Plant and Soil*, 79: 383—420, 1984.
- [10] Newcomb, W. et al.: *New Zealand J. Botany*, 20: 93—103, 1982.
- [11] Mirza, M. S. et al.: In *Advances in Nitrogen Fixation Research*, Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publisher, 1984.
- [12] Becking, J. H.: *Plant and Soil*, 32: 611—654, 1970.
- [13] 周平贞等:《中国油料》, 2: 1—3, 1980.
- [14] Becking, J. H. et al.: *Antonie van Leeuwenhoek*, 30: 343—376, 1964.
- [15] Gardner, I. C.: In *Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants*, Cambridge University Press, Cambridge, London, New York, Melbourne, pp. 485—496, 1976.

THE SYMBIOTIC NITROGEN-FIXING NODULE OF *CORIARIA* AND ITS ACTINOMYCETAL ENDOPHYTE

Zhou Pingzhen

(Institute of Oil Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan)

Wu Jie Chen Huakui

(Huazhong Agricultural University, Wuhan)

The endophyte-infected tissue in the symbiotic nitrogen-fixing non-leguminous actinomycetal nodule of the *Coriaria* type is different in many aspects from that of the *Alnus* type. The infected tissue of *Coriaria nepalensis* Wall. is horseshoe shaped, enclosing the stele incompletely. Almost all the cells in the infected tissue zone are infected. The *Alnus* type infected tissue zone forms a ring surrounding the stele, containing infected and uninfected cells in different proportions, sometimes sparingly as clusters of infected cells.

The hyphal form of the actinomycetal endophyte in the nodule of *Coriaria* is similar to that of the *Alnus* type, having a single layer of electron-dense cell wall and septa. The hyphae are branched. Unit membrane mesosome connects the cytoplasmic membrane. The central vacuole of the host cell is surrounded by characteristic palisade of pillar-shaped vesicles. The vesicles are in fact the terminal cells of the endophyte hyphae, but are electron dense. In reverse to the *Alnus*-type infected cells, the palisade of vesicle in the infected cells of *Coriaria* occurs at the inner part with normal hyphae at the outer part.

At the apex end of the infected tissue, new hyphae invade the cortical cells very rich of starch granules. Branched hyphae, coccoid and rod-coccoid bodies are present in such cells free from or attached to the starch granules.

In the senescent region of the endophyte infected tissue, the plasmic content of the vesicle constricts, resulting in plasmolysis. Clusters of granular bodies occur in the infected cells. The granular bodies have two wall layers. The inner layer is the same as that of the normal hyphal wall in thickness and electron density. The outer wall is several times thicker as well as electron rarer.

So far there has not been reported of pure culture isolated from the *Coriaria* nodule successfully proved to be the causal organism of nodule formation. The differences and similarities of the endophytes of the *Coriaria* type and *Alnus* type remain to be answered.

Key words

Coriaria nodules; Actinomycetal endophyte; Non-leguminous symbiosis

图 版 说 明

Explanation of plate

1. 马桑的共生固氮根瘤。

Symbiotic nitrogen-fixing nodule of *Coriaria*.

2. 马桑根瘤横切面, 马蹄形含菌组织不完整地包围中柱。(光学显微镜照片)

Transverse section of *Coriaria* nodule lobe. Horseshoe-shaped tissue containing endophyte, incompletely surrounding the stele. (Micrograph)

3. 分枝的内生放线菌菌丝, 有隔膜, 中间体与原生质膜连接。(透射电镜照片×17000)

Branched hyphae of actinomycetal endophyte with septa and mesosomes attached to plasma membrane. (TEM)

4. 菌丝的中间体, 显示单位膜结构。(透射电镜照片×116000)

Mesosome of hypha, showing unit membrane. (TEM)

5. 内生菌泡囊(电子密度高)和菌丝, 注意单层隔膜将泡囊和营养菌丝分开。(透射电镜照片×14000)

Endophytic vesicles (electron-dense) and hyphae. The endophytic vesicles are separated from the vegetative hyphae by septa. (TEM)

6. 含菌细胞中栅栏状排列的泡囊, 泡囊番红着色, 其它内含物固绿着色。(双重染色, 光学显微镜照片)

palisade of vesicle in endophyte-infected host cell, vesicles stained by safranin O and other contents stained by fast green. (Double staining micrograph)

7. 新感染的寄主细胞, 含淀粉粒、分枝菌丝、球状、球杆状体。(扫描电镜照片)

Freshly infected host cell containing starch granules, branched hyphae, cocci and cocci-balls. (SEM)

8. 颗粒体群, 显示双层壁。(透射电镜照片×19000)

Cluster of granular bodies, showing double-layered cell wall. (TEM)