

## 大豆根瘤的超微结构特征

韩善华

(兰州大学细胞生物化学研究室, 兰州)

A. F. Yang

(加拿大化学和生物研究所, 渥太华)

用透射电镜研究了中国丰收 11 号大豆根瘤 (*Glycine max* L.) 的超微结构。它主要由外部的皮层及内部的中心组织组成。在其发育过程中,除一般的细微结构变化外,还具有以下一些特征:(1)早期侵染细胞具有核仁联合体;(2)有一种大而长并包围着造粉体的特殊类型的线粒体;(3)在幼龄侵染细胞中有一种染色很深,圆形或近似圆形的内含体;(4)细菌中含有大量的多聚磷酸盐颗粒。本文详细地描述了上述各种变化,同时讨论了这些变化的意义与根瘤发育的关系。

**关键词** 中国大豆;根瘤;超微结构特征

大豆根瘤是一种十分重要的豆科根瘤。早在本世纪的五十年代, Bergersen 等人<sup>[1]</sup>就用电镜观察了它的中心组织细胞及其细菌的组成。随后,又有根瘤的发育和分化<sup>[2-4]</sup>,侵染丝中细菌的释放及其释放后细胞质、质膜和细胞壁的变化<sup>[5-8]</sup>、非侵染细胞的细微结构<sup>[9,10]</sup>等的报道。

寄主植物对根瘤发育有着重要的影响<sup>[11,12]</sup>,我们<sup>[13,14]</sup>在研究中国豌豆根瘤的超微结构时也再次证明了这一点。到目前为止,还未有中国大豆根瘤超微结构的详细报道,对其他大豆根瘤侵染细胞核观察的报道也很少。故我们对中国丰收 11 号大豆根瘤的超微结构进行了研究,现将有关结果报道如下。

### 材料和方法

将丰收 11 号大豆 (*Glycine max* L.) 种子放在铺有湿滤纸的培养皿中,在室温下萌发 24 小时,然后种在盛有蛭石粉的塑料盆中,移至温室中生长,一周后用纯培养的根瘤菌 (*Rhizobium jaf*

*nicum*) DGM372 接种。植株每天光照 14 小时,光强 5000—10000Lux, 温度  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

在接种后 14、21、28、35 和 42 天取下直径约为 2mm 左右的根瘤。将根瘤切块放在含有 3% 戊二醛的 0.05M 的磷酸缓冲液中 (pH7.0) 固定 3 小时,同种缓冲液冲洗,然后在含有 1% 锇酸的上述缓冲液中后固定 2 小时,再经乙醇系列脱水,最后包埋在 Spurr's 树脂中。以上操作除聚合外,均在室温下进行。用玻璃刀在 Reichert OMU2 超薄切片机上切片。厚切片用甲苯胺蓝 O 染色,在光学显微镜下观察。薄切片用标准的铀-铅双染色,然后在非利蒲 EM300 透射电镜下观察并照相,加速电压为 60kV。

### 结 果

中国丰收 11 号大豆根瘤呈球形或近似球形,表面棕褐色,主要由外部的皮层和内部的中心组织两大部分组成(图版 I-1)。

本文于 1986 年 3 月 24 日收到。

本工作曾得到加拿大化学和生物研究所的大力支持;兰州大学医学院王志清医生赠送大豆种子,在此一并致谢。

后者含有大量的体积较大且染色较深的侵染细胞和一些与此相反的非侵染细胞(图版 I-2)。

细胞侵染后,可能由于细菌刺激,体积不断变大。这些细胞含有许多的粗糙型内质网,核糖体,高尔基体,线粒体和质体,以及一个具有显著核仁的大核。核的附近常有一些含有泡状物质的小液泡(图版 I-3)。有时大核仁的表面还附着一个小核仁,形成所谓的核仁联合体(nucleolus-associated body)。虽然这两种核仁大小不同,但染色性质和电子密度都极其相似(图版 I-4)。在某些切片中,核膜出现内陷,常有细菌或细胞器存在于该处,该处核内一般都有一些浓的染色质团块(图版 II-5)。

随着细胞发育,细菌不断增多并逐渐从细胞内周移向中央。相反,线粒体和质体却被挤到细胞的内周附近,常常集中在细胞间隙周围。在这些细胞中还存在着一种特殊类型的线粒体,它们不仅又长又大,在外形上与众不同,而且内部结构也很特殊,它不像一般植物分生组织细胞中的线粒体,而像动物肌肉细胞中具有高能转换的线粒体<sup>[15]</sup>。它们很少单独存在,总包围着一些含有大量淀粉的质体,形成一种所谓线粒体和造粉体的紧密联合(close association)(图版 II-6)。但在质体淀粉消失之后,这种现象也就消失了。

在这些细胞中还发现了一种经甲苯胺蓝 O 染色后呈深蓝色的圆形或近似圆形的内含体,它们通常单个存在于细胞内周附近。电镜观察表明,它们经钼-铅双染色后,染色性质与核仁和多聚核糖体颇为类似。它的内部有时还有 1—2 个具有纤维状或泡状物质的较大的小泡。但内含体的表面没有界膜,只有一些小的突起或凹陷,有的突起已与附近的核糖体或多聚核糖体融合。此外,常有许多粗糙型内质网和一

些高尔基体及小泡位于内含体附近(图版 II-7)。

在幼龄根瘤的中心组织中,常有侵染丝存在,它是一种管状结构,中间的基质可能是粘多糖<sup>[6]</sup>,一些染色很深的细菌包埋在里面。基质的外面是一层与寄主细胞壁相连续的壁,壁的外面为一层染色性质和细胞质膜极其类似并与此相连续的膜。许多粗糙型内质网,高尔基体及一些含有泡状或纤维状物质的小泡常分布在它的周围,而且一些小泡似乎已和侵染丝膜结合在一起(图版 II-8)。

细菌从侵染丝进入寄主细胞质后,逐渐发育变大,它们通常为棒状。寄主细胞质中,所有的幼龄细菌都有一层清楚的泡囊(membrane envelope)、细菌细胞壁和质膜。它们的细胞质含有丰富的核糖体和一些纤维状核物质,后者一般位于它们的中央部分,有的似乎呈螺旋形,有的则与其长轴平行。在这些核物质上经常都有染色很深的圆形颗粒,有时甚至在一个切面上多达 10 个以上,它们可能是多聚磷酸盐<sup>[15]</sup>(图版 III-9、10)。当细菌分裂时,多聚磷酸盐颗粒常常被分配到两个子细胞中,不过此时细菌的分裂是在它的泡囊内单独进行的,它的泡囊并不同时分裂(图版 III-11)。因此,在成熟的侵染细胞中常常是多个细菌共享一个泡囊。

在大豆根瘤中,非侵染细胞比侵染细胞体积较小,而且常有一个含有泡状物质的中央液泡。液泡周围有一薄层细胞质,而且主要集中在细胞间隙附近,里面有许多内质网、核糖体和一些体积很大且不规则的造粉体。高尔基体虽也存在,但远不如侵染细胞那样多(图版 III-12)。在中国丰收 11 号大豆根瘤的非侵染细胞中,还有许多染色较浅的圆形或椭圆形结构,它们可能是微体(microbody)或过氧(化)物

酶体 (peroxisome)。另外,一些相对染色较深的可能是圆球体 (spherosome)<sup>[10]</sup> (图版 III-13)。此外在非侵染细胞壁上还常有胞间连丝存在。

## 讨 论

Kidby 等<sup>[11]</sup>在研究寄主植物对根瘤发育的影响时发现,即使在完全相同的条件下,不同寄主根瘤的超微结构也是不同的,它们或许控制 (1) 泡囊的分裂; (2) 一定的细菌内含物的形成; (3) 侵染细胞中淀粉粒的发育。我们的观察表明,中国丰收 11 号大豆根瘤的超微结构与其他大豆根瘤虽有某些相似之处,但是在许多方面却独具一格,这可能与寄主植物不同有关。

细胞侵染后,细胞质、内膜系统和液泡的变化已有报道<sup>[5,6,17,18]</sup>,然而对核的观察却为数极少,即使在豌豆根瘤中略有描述,但也矛盾重重。如 Libbenga 等<sup>[19]</sup>发现,细胞侵染后核膨大,核膜内陷,有时还有一些细菌和侵染丝存在于核膜的凹陷处,但不久有人<sup>[20]</sup>却认为,在豌豆根瘤中,除了衰老的侵染细胞外,很少有这种现象。然而,我们在大豆根瘤中却观察到了类似于 Libbenga 等所描述的现象,不过没有侵染丝存在于核膜的内陷处。虽然 Barlow<sup>[21,22]</sup>已在一些植物的根尖分生组织细胞中发现了核仁联合体,而且进行了详细研究。认为它是一种动态结构,可能与核物质转移有关。但这种结构除了我们在豌豆根瘤中首次发现并作了详细描述外<sup>[13]</sup>,在其他豆科根瘤中还尚无报道,因此这是大豆根瘤中也有核仁联合体的第一次报道。Mitchell<sup>[23]</sup>在研究豌豆根瘤时发现,细菌进入寄主细胞质后,核逐渐变大。他认为,这种现象可能与核内 DNA 含量的增加,从而导致内多倍性 (endopolyploidy) 的产生有关。

一些研究者<sup>[1,2,24]</sup>发现,在细胞刚侵染

时,线粒体和质体通常是随机分布的,但后来由于细菌大量增加,才逐渐移到细胞内周附近。Werner 等人<sup>[14]</sup>在研究大豆根瘤的发育和分化时看到,在接种后 15—20 天侵染细胞中有一种特殊类型的大线粒体,其长度往往是它宽度的好几倍,并具有高能转换线粒体的特征,常常绕着造粉体,形成一种紧密联合。在接种后 30 天左右也有这种情况,不过此时围绕的不是造粉体,而是不含淀粉的质体。故认为,这种紧密联合与侵染细胞的生长、细菌的增殖和细胞内固氮有关。在我们的研究中也看到了类似现象,不过它更加显著,线粒体的长度有时甚至超过它宽度的 10 倍,几乎完全包围着一个造粉体。但这种线粒体只存在于侵染细胞的早期(接种后 20 天左右),而且只包围造粉体,不包围没有淀粉的质体。如果 Werner 等人关于这种紧密联合可以作为细菌增殖和固氮活性高峰的细胞学标志的意见是正确的,那么这种现象出现在固氮活性最高的时期似乎更有道理。

在大豆根瘤侵染细胞中发现一种染色很深的圆形或近似圆形的内含体,这在国内外还是首次报道,即使在其他根瘤中也是如此。这种内含体不仅有一定的形状,结构和分布位置,而且只出现在幼龄的侵染细胞中。在这些细胞成熟之后,它们也就逐渐消失了。因此,这种内含体的出现可能与侵染细胞的发育和固氮有关。

多聚磷酸盐颗粒广泛分布在细菌、蓝绿藻、真菌、原生动物和藻类中<sup>[25,27]</sup>,但存在于大豆根瘤菌中的报道却不多<sup>[15,28]</sup>。即使存在,也只出现在侵染细胞的少数根瘤菌中,一般只有一个。我们的结果表明,它们不仅广泛存在于幼龄细菌中,而且数量之多在豆根瘤菌中前所未见,即使在其他根瘤中,这种现象也是十分罕见的(图版 III-9、10)。这些多聚磷酸盐颗粒大量出

现在细菌迅速增殖的时期,以后就逐渐减少,这类似于 Friedberg<sup>[29]</sup> 等人的观察。他们在溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*) 中发现,多聚磷酸盐颗粒积累于生长的对数期,消失于静止期。Harold<sup>[25]</sup> 在研究生物体内的无机多聚磷酸盐的结构、新陈代谢和功能时指出,无机多聚磷酸盐的作用目前还不十分清楚,它可能是一种合成 mRNA,核糖体的贮备物和一种有利于细菌开始生长的新陈代谢的中间产物。

过去一般认为,非侵染细胞在根瘤的发育中仅起一个支持作用,与根瘤固氮无直接关系,因而在研究根瘤超微结构时往往对它们重视不够。但是 Newcomb 等<sup>[10]</sup> 在研究大豆根瘤非侵染细胞时发现事实并非如此,相反,它们在从固定的氮到脲化物的产生中起了重要作用。他们还发现,固氮发生在侵染细胞中,脲化物的产生却出现在非侵染细胞里,这主要与非侵染细胞内的一种专一性结构有关。经证明,这种结构是微体或者过氧(化)物酶体。在我们的观察中也发现了类似结构,从而首次证实了 Newcomb 的观察结果。

## 参 考 文 献

- [1] Bergersen, F. J. and M. Briggs: *J. Gen. Microbiol.*, **19**: 482—490, 1958.
- [2] Goodchild, D. J. and F. J. Bergersen: *J. Bacteriol.*, **92**: 204—213, 1966.
- [3] Tu, J. C.: *Phytopathology*, **65**: 447—454, 1975.
- [4] De Herrera, E. C. and M. F. Pascual: *Phytopath. Z.*, **103**: 173—185, 1982.
- [5] Tu, J. C.: *Phytopathology*, **66**: 1065—1071, 1976.
- [6] Tu, J. C.: *Physiological Plant Pathology*, **15**: 35—41, 1979.
- [7] Bassett, B. et al.: *Can. J. Microbiol.*, **23**: 573—582, 1977.
- [8] Bal, A. K. et al.: *Can. J. Microbiol.*, **26**: 1096—1103, 1980.
- [9] Newcomb, E. H. and S. K. Tandon: *Science*, **212**: 1394—1396, 1981.
- [10] Newcomb, E. H. et al.: *Protoplasma*, **125**: 1—12, 1985.
- [11] Kidby, D. K. and D. J. Goodchild: *J. Gen. Microbiol.*, **45**: 147—152, 1966.
- [12] Dixon, R. O. D.: *Annu. Rev. Microbiol.*, **23**: 137—158, 1969.
- [13] 韩善华, A. F. Yang: *实验生物学报*, **20**: 13—21, 1987.
- [14] 韩善华, A. F. Yang: *植物学报*(待发表).
- [15] Werner, D. and E. Morchel: *Planta*, **141**: 159—177, 1978.
- [16] Dart, P. J.: *The development and function of root*. Edited by J. G. Torrey and D. T. Clarkson, Academic Press, London, pp. 467—506, 1975.
- [17] Kijne, J. W.: *Physiological Plant Pathology*, **5**: 75—79, 1975.
- [18] Kijne, J. W. and K. Planque: *Physiological Plant Pathology*, **14**: 339—345, 1979.
- [19] Libbenga, K. K. and K. G. Bogers: *The biology of nitrogen fixation*. Edited by A. Quispel. North Holl and Publ. Co., Amsterdam, pp. 430—472, 1974.
- [20] Newcomb, W.: *Can. J. Bot.*, **54**: 2163—2186, 1976.
- [21] Barlow, P. W.: *Protoplasma*, **115**: 1—10, 1983.
- [22] Barlow, P. W.: *Protoplasma*, **118**: 104—113, 1983.
- [23] Mitchell, J. P.: *Ann. Bot., N. S.*, **29**: 371—376, 1965.
- [24] Tu, J. C.: *Can. J. Bot.*, **55**: 35—43, 1977.
- [25] Harold, M. F.: *Bacteriological Reviews*, **30**: 772—794, 1966.
- [26] Graig, A. S. and K. Z. Williamson: *Arch. Mikrobiol.*, **87**: 165—171, 1972.
- [27] Graig, A. S. et al.: *Arch. Mikrobiol.*, **89**: 23—32, 1973.
- [28] Dart, P. J.: *A treatise on dinitrogen fixation section III. Biology*. Edited by R. W. F. Hard and W. S. Siver. John Wiley and Sons. New York, pp. 367—372, 1977.
- [29] Friedberg, I. and G. Avigad: *J. bacteriol.*, **96**: 544—553, 1968.

# ULTRASTRUCTURAL FEATURES OF CHINESE SOYBEAN ROOT NODULES

Han Shanhua

(Cell Biology Laboratory, Lanzhou University, Lanzhou)

A. F. Yang

(Chemistry and Biology Research Institute, Ottawa, Canada)

The ultrastructure of Chinese soybean root nodules (*Glycine max* L. cv. Harvest 11) had been studied by light microscopy and transmission electron microscopy. Chinese soybean root nodules are composed of two major types of tissues, i.e., cortex and central tissue. The latter consists of a large number infected cells and some uninfected cells. During development, besides general structural changes of nodule formation, Chinese soybean root nodules show some distinct features: (1) nucleolus-associated bodies are present in early infected cells; (2) unusually large and long mitochondria often surround amyloplasts; (3)

round or proximately round darkly-stained inclusion bodies often appear in some young infected cells; (4) a large number of polyphosphate granules are found in the bacteria.

Above changes of Chinese soybean root nodules are described in detail, and the significance of the structural changes and their relationship to the development of root nodules is discussed.

## Key words

Chinese soybean; Root nodule; Ultrastructural feature

## 图 版 说 明

Explanation of plates

### 图 版 I

1. 通过根瘤中部的纵切片, 1 为中心组织, 2 为皮层组织 ( $\times 63$ )。2. 含有大量侵染细胞 (IC) 和一些非侵染细胞 (UC) 的中心组织 ( $\times 450$ )。3. 含有许多核糖体、内质网 (ER)、高尔基体 (G)、液泡 (V)、线粒体 (M), 具有淀粉 (S) 的质体、胞间连丝 (箭头) 和具有一个显著核仁 (NU) 的大核及许多细菌 (B) 的侵染细胞 ( $\times 5,200$ )。4. 具有一个核仁 (NU) 和核仁联合体 (NAB) 的侵染细胞 ( $\times 28,400$ )。

### 图 版 II

5. 由一个膨大的裂片状核 (N) 所包围的一个细菌 (B) ( $\times 28,300$ )。6. 一个几乎完全包围着一个具有淀粉 (S) 的质体 (AP) 的大的线粒体 (M), ER 示内质网 ( $\times 39,700$ )。7. 含有一个具有两个小泡 (箭头) 的内含体 (SS) 和许多的内质网 (ER)、线粒体 (M)、小液泡 (V) 及具有淀粉 (S) 的质体的侵染细胞 ( $\times 24,200$ )。8. 一些内质网 (ER)、一个高尔基体 (G) 和一些小泡 (V) 存在于一个侵染丝的附近, 其中一些小泡似乎与侵染丝膜融合 (小箭头), 侵染丝膜与其相邻细胞质膜相连续 (大箭头); 并示这些细胞中的核 (N)、线粒体 (M)、中央液泡 (V)、微体 (MB) 和细胞壁 (CW) 及一些细菌 ( $\times 14,500$ )。

### 图 版 III

9. 含有 10 个以上多聚磷酸盐颗粒 (大箭头) 和一些电子密度很高的螺旋形纤维状核物质 (中箭头) 及多聚- $\beta$ -羟基丁酸

盐颗粒(小箭头)的一个细菌( $\times 25,300$ )。10.含有一串多聚磷酸盐颗粒(大箭头)和一些电子密度很高的纤维状核物质(中箭头)及多聚- $\beta$ -羟基丁酸盐颗粒(PHB)的一个细菌( $\times 40,300$ )。11.具有电子密度很高的纤维状核物质和两个多聚磷酸盐颗粒的一个正在分裂的细菌,但它的泡囊未分裂( $\times 43,600$ )。12.有许多具有淀粉(S)的质体和中央液泡(V)和其他细胞器的非侵染细胞( $\times 4,600$ )。13.含有许多微体(MB)和一个圆球体(SB)的非侵染细胞,CW 示细胞壁( $\times 16,400$ )。

### Plate I

1. A longitudinal section through the middle of root nodule, 1 showing central tissue, 2 showing cortex. 2. Central tissue containing a large number of infected cells (IC) and some uninfected cells (UC). 3. An infected cell containing numerous ribosomes, endoplasmic reticulum (ER), Golgi bodies (G), vacuoles (V), mitochondria (M), plastids with starch (S), plasmodesmata (arrow), a large nucleus with a prominent nucleolus (NU), and many bacteria (B). 4. An infected cell with a nucleolus (NU) and a nucleolus-associated body (NAB).

### Plate II

5. A bacterium (B) surrounded by an extensively lobed nucleus (N). 6. A large mitochondrion (M) almost completely surrounding a plastid (AP) with starch(S), ER showing endoplasmic reticulum. 7. An infected cell containing an inclusion body (SS) with two vesicles (arrow) and numerous endoplasmic reticulum (ER), A Golgi body (G), some vesicles(V) are found near an infection thread, some vesicles (V) appear to fuse with the membrane of the infection thread (small arrow), the membrane is continuous with the plasma membrane of the adjacent cell (large arrows); and showing a nucleus (N), numerous mitochondria (M), a central vacuole (V), a microbody (MB) and cell wall (CW) and some bacteria in these cells.

### Plate III

9. A bacterium containing more than ten polyphosphate granules (large arrow), twisted coarse strands of electron-dense nuclear material (medium arrow) and poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid granules (small arrow). 10. A bacterium containing a string of polyphosphate granules (large arrow) and some coarse strands of electron-dense nuclear material (medium arrow) and poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid granules (PHB). 11. A bacterium with some coarse strands of electron-dense nuclear material and two polyphosphate granules are dividing into two daughter cells, but the membrane envelope do not divide at this stage. 12. Several uninfected cells containing numerous plastids with starch (S) and central vacuoles (V) and other organelle. 13. An uninfected cell containing numerous microbodies (MB) and a spherosome (SB), CW showing cell wall.