

## 大豆根瘤菌 1132-2 结构的电镜观察

张锦珠 韩行采

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

在对液体培养的大豆根瘤菌 1132-2 的电镜观察中发现, 由于细胞质的分布和内含颗粒的不同, 有四种基本类型的结构。并且处于不同时期的培养物中, 这四种类型的细胞比例不同。此外, 还阐明了液体培养的大豆根瘤菌 1132-2 的细胞个体发育中结构的变化。

**关键词** 大豆根瘤菌; 大豆根瘤菌的结构

大豆的根瘤是由于根瘤菌的侵染而发生的。根瘤不但能将空气中的氮变成可被植物吸收的含氮化合物, 而且能使土壤肥力增加。

大豆根瘤菌 1132-2 是在中国土壤中筛选出的慢生长型、固氮活力高的菌株<sup>[1]</sup>。本文报道了对液体培养的大豆根瘤菌 1132-2 所进行的电镜观察的结果。

关于离体培养的根瘤菌的结构曾有些报道, 例如 Vincent 等人<sup>[2]</sup>曾观察到根瘤菌的外膜大约为 30Å; Craig 和 Willianson<sup>[3]</sup>在离体培养的根瘤菌和与根瘤细胞共生的根瘤菌(即类菌体)内都观察到多聚磷酸盐 (poly phosphate 简称 PP) 颗粒, 多聚 β-羟基丁酸盐 (poly-β-hydroxybutrate, 简称 PHB) 颗粒和糖原 (glycogen, 简称 G) 颗粒。Tsein 等人<sup>[4]</sup>观察到离体培养的大豆根瘤菌的对数生长期的细胞内, 细胞质的分布是有极性的。近年来, 某些作者<sup>[5-6]</sup>在观察根瘤菌细胞外的多糖结构以及利用免疫电镜技术研究根瘤菌荚膜中的与大豆凝集素 (soybean lectin) 结合的受体方面, 取得了较好的进展。然而对处于不同培养时期的大豆根瘤菌的结构及其差别, 以及原核细胞在个体发育过程中结构变化的报道却较少。现就这些问题进行报道。

## 材料和方 法

### (一) 根瘤菌的培养

采用的大豆根瘤菌为慢生长型、固氮活力高的 1132-2 菌株 (中国农业科学院徐玲玖同志提供)。固体培养采用甘露醇酵母膏培养基 (1000ml 培养基中含甘露醇 10g, NaCl 0.2g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2g,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1g,  $\text{CaCO}_3$  1g, 酵母膏 0.5g, 琼脂 15g, pH6.8)。液体培养采用改良的 Tsein<sup>[4]</sup> 营养液 (1000ml 培养基中含甘露醇 10g,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  1.5g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g, NaCl 20mg,  $\text{CaCl}_2$  10mg,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  10mg,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  10mg, 硫胺素 0.2mg, 生物素 0.02mg,  $\text{CaCO}_3$  1g, 酵母提取物 1.5g, pH6.9)。

将培养一周的固体斜面大豆根瘤菌接种液体培养基 (50ml 三角瓶) 中, 在 28°C 旋转摇床振荡 120r/min。每隔两小时用国产 751 型分光光度计于 420nm 波长测光密度, 得出生长曲线。

### (二) 电镜技术

将处于不同生长时期的菌液, 用自制的台式离心机沉淀 (7000g, 5 分钟)。去掉上清液, 将沉淀用 2.5% 戊二醛固定 0.5—2 小时, 室温。戊二醛固定液配在 0.1M 磷酸缓冲液 (pH 7.2) 中。用相同的缓冲液洗两次 (每次 15 分钟) 后, 将沉淀

本文于 1986 年 9 月 10 日收到。

承叶时璋教授的指导和关怀; 本所电镜组协助, 在此一并致谢。

切成小于  $1\text{mm}^3$  的小块, 于  $1\%$   $\text{OsO}_4$  (用相同缓冲液) 固定 2—3 小时 ( $0-4^\circ\text{C}$ )。用相同的缓冲液洗后, 经乙醇系列脱水, 丙酮置换, Epon 812 包埋, 于  $45^\circ\text{C}$  聚合 12 小时后,  $60^\circ\text{C}$  再聚合 12 小时。用 LKB III 型切片机切片, 铀与铅双染色, JEM-100CX 电镜观察, 操作电压为  $80\text{kV}$ 。

## 结 果

### (一) 根瘤菌结构的一般特点

大豆根瘤菌 1132-2 是两端为半圆形的杆菌(图版 I)。在对 100 个以上的菌的观察中发现, 该菌的直径为  $0.40-0.55\mu\text{m}$ , 长度为  $1.3-2.9\mu\text{m}$ 。由于菌的个体发育所处的时期不同, 菌的长度变化很大, 但直径变化不大。处在不同时期的培养物(例如处在对数生长期早期的培养物或处在稳定期的培养物), 其中根瘤菌的大小, 无论是直径或长度基本一致。但由于培养条件的不同, 菌的大小也有所不同。

该菌的膜结构属典型革兰氏阴性结构, 在质膜(图版 I-D 中小箭头所示)外, 还有明显的外膜(图版 I-D 中大箭头所示)。

对任何一个非同步的液体培养物的电镜观察发现, 尽管它们所处的时期不同, 根据细胞质内所含颗粒的不同和细胞质的分布, 归纳起来, 都含有以下四种类型结构的细胞(即图版 I 中 A、B、C、D 四种类型)。

其中 A 型细胞的细胞质分布均匀, 细胞质内未见明显的 PHB 颗粒, 少数的 G 颗粒只分布在周边, 如箭头所示。菌的中心区 DNA 纤维分布疏松, 伸展。

B 型细胞的细胞质的分布开始出现不均匀, 细胞质内已有明显的 PHB 颗粒(图版 I-B、III-d 中箭头所示), 但仍未见 G 颗粒在 PHB 颗粒周围凝聚。

C 型细胞的细胞质内的一端除了有明显的 PHB 颗粒外, 并有较明显的 G 颗粒

凝聚在 PHB 颗粒周围(图版 III-e)。核糖体和多聚核糖体有所增加。

D 型细胞与 C 型细胞类似, 但细胞质内无明显的 PHB 颗粒, 只有 G 颗粒的凝聚。C 型和 D 型结构的中心区的 DNA 纤维, 不像 A、B 型那样疏展, 较为浓缩。上述各种类型结构的细胞中心区, 有时可见到一个或几个深染的 PP 颗粒。

虽然以上 A、B、C、D 四种类型的细胞, 在任何一个非同步生长的群体培养的任何时期都可被观察到, 但由于液体培养所处的时期不同, 这四种细胞的比例大不相同。处在对数生长期早期的培养物, 大多数为 A 型细胞(图版 II-a)。处于稳定期的培养物, 大多数为 C 型细胞(图版 II-b)。

### (二) 个体发育中的结构变化

由于不同时期的培养物中, 上述四种类型细胞的组成不同, 因而从中不难看出大豆根瘤菌 1132-2 有其个体发育过程。幼龄的细胞为 A 型结构。随生长发育到一定程度, 细胞质的分布开始出现不均匀, 在一端首先出现 PHB 颗粒, 也有先出现 G 颗粒凝聚的, 即出现极性。DNA 纤维状结构也开始浓缩。更进一步的生长发育, 在极性端, 即出现 PHB 颗粒一端, 出现 G 颗粒, 并且它们大多数凝聚在 PHB 颗粒周围(图版 I 中 C 型)。

观察中还发现, 有的细胞出现两个极(如图版 III-a—c 所示)。这些具有两极的细胞, 多数是在稳定期的培养物中发现的。这种细胞有的正在形成非正常的隔膜(septum)(如图版 III-c 所示, 箭头系指正在形成的隔膜)。

## 讨 论

大豆根瘤菌 1132-2 是在我国分离的慢生长型固氮活力高的菌株。对它的液体

培养物的电镜观察发现,有四种结构类型的细胞。处于不同时期的培养物,所含这四类细胞的比例不同。根瘤菌的细胞个体,在生长发育过程中其结构发生一系列变化。这种结构上的变化怎样与功能结合起来是值得进一步研究的问题。

如上所述,在对数生长期早期的培养中,以A型为主,但也发现有B型细胞(图版 III-d)。G颗粒在A型细胞中和B型细胞中很少。而在C型细胞中较多,并凝聚在PHB颗粒周围,这类情况多数是在稳定期的培养物中发现的,如图版 III-e所示。然而这不排除PHB颗粒和G颗粒都是在个体发育中逐渐形成的。

以上对大豆根瘤菌1132-2菌株结构的研究是用目前常规的电镜方法进行的,然而随着今后技术的改进,定会揭示出一些新的结构信息或纠正某些由于制样过程

中所出现的人为假象。这里特别指出的是,关于DNA纤维凝聚结构,可能是由于钨酸固定而引起的假象,因为在Dubochet等<sup>[7]</sup>利用冰冻含水切片对*E. coli*所作的观察中,以及Hobert等<sup>[8]</sup>利用冰冻取代方法对*E. coli*所作的观察中都得到了证实。

### 参 考 文 献

- [1] 张学江等:中国油料, 1: 62, 1986。
- [2] Vincent, J. M. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 29: 551, 1962.
- [3] Craig, A. S. and K. L. Williamson: *Archs. Microbiol.*, 87: 165, 1972.
- [4] Tsein, H. C. and E. L. Schmidt: *Can. J. Microbiol.*, 23: 1274, 1977.
- [5] Calvert, H. E. et al.: *ibid.*, 24: 785, 1978.
- [6] Tsein, H. C. and E. L. Schmidt: *J. Bacteriol.*, 145: 1063, 1981.
- [7] Dubochet, J. et al.: *ibid.*, 155: 381, 1983.
- [8] Hobert, J. A. et al.: *ibid.*, 162: 960, 1985.

## STRUCTURAL STUDIES ON *RHIZOBIUM JAPONICUM* 1132-2 BY ELECTRON MICROSCOPY

Zhang Jinzhu Han Xingcai

(Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing)

Electron microscopic observations have been made on the liquid cultures of *Rhizobium japonicum* 1132-2 which was identified as a slow-growing and high nitrogen fixing strain isolated from China. The observations have revealed that according to the plasma distributions and the contained granules of the prokaryotic cells, in any asynchronous culture there are four different structural forms in terms of type A, B, C, D. However for one culture, different growth phases have different composition of the four forms, for in-

stance, the early exponential phase mainly contains cells with A type whereas the stationary phase mainly contains the C type cells. During the individual development of a bacterial cell, a series of changes in cell structures have been observed.

### Key words

*Rhizobium japonicum*: Structure of *Rhizobium japonicum*

## 图 版 说 明

## Explanation of plates

## 图 版 I

大豆根瘤菌 1132-2 的典型结构。根据细胞质的分布和细胞质内的颗粒, 分为 A、B、C、D 四种类型 (50,000 $\times$ )。

## 图 版 II

不同培养时间的大豆根瘤菌的超薄切片。a. 对数生长期培养物的切片 (27,000 $\times$ ); b. 处于稳定期培养物的根瘤菌切片 (20,000 $\times$ )。

## 图 版 III

a-c. 具有两极的根瘤菌的切片; d. 在对数生长期培养物中的 B 型细胞; e. 稳定期培养物中的代表性细胞(均为 50,000 $\times$ )。

## Plate I

Typical structures of *Rh. japonicum* 1132-2. According to the plasma distributions and the contained granules of the bacterial cells, there are four different structural forms A, B, C, D.

## Plate II

Ultrathin sections of liquid cultured *Rh. japonicum* in different phases. a. A section of cultured *Rh. japonicum* in exponential phase. b. A section of cultured *Rh. japonicum* in stationary phase.

## Plate III

a-c. Ultrathin sections of *Rh. japonicum* with double poles. d. A section of B type cells observed in exponential culture. e. A section of typical cell of stationary phase.