

豌豆根瘤细菌周膜在发育中的变化

韩善华 郑国锴

(兰州大学细胞生物医学研究室, 兰州)

细菌周膜随发育不同而异。侵入线中的细菌没有细菌周膜, 刚从侵入线释放到寄主细胞质中的细菌虽有这一特殊结构, 但一般较小, 表面光滑。然后随着发育而不断变大, 有的表面甚至出现凹凸不平。在这些细菌周膜附近, 常有一些高尔基体和内质网, 有的还有一些纤维状物质和泡状结构位于它所包围的电子透明区域中。当细菌周膜继续向外扩展时, 常与相邻细菌周膜相互嵌合, 进而彼此融合。这种融合是一种不对称性融合, 只出现在即将或已成熟的被侵染的细胞中。细菌周膜融合可能与共生体系的固氮和物质交换有关。

关键词 豌豆根瘤; 细菌周膜; 发育; 嵌合和融合

一般认为, 豆科根瘤中只有类菌体才能固氮, 而存在于侵入线中的细菌和已经衰败的细菌都没有这种能力。因此, Bergersen^[1] 和 Mosse^[2] 等认为, 细菌周膜与根瘤固氮有关, 甚至可能是固氮场所。虽然这一看法至今还没有被直接证明, 但细菌周膜在根瘤发育中的重要作用却无人怀疑^[3]。国内外许多学者已对此进行了研究, 不过主要集中于它的起源问题^[4-7]。即使有时在研究根瘤发育时也提到一点有关它的其他方面的内容, 一般也是既不系统也不深入。

Gunning^[8] 在豌豆根瘤研究中曾发现有细菌周膜融合现象, 但是他并没有看到整个融合过程, 在许多方面纯属推测。此后, Newcomb^[9] 在研究豌豆根瘤中看到少数细菌周膜中具有两个以上细菌的现象, 怀疑是由于细菌周膜融合所致。于是豌豆根瘤中是否有细菌周膜融合, 怎样融合, 有何意义, 无疑就成为人们十分关心的问题。为此, 我们在过去工作的基础上进行了这一研究, 现将结果报道如下。

材料和方法

将豌豆 (*Pisum sativum* L.) 种子在室温下萌发 24h, 然后种在砾石粉中。植株在温室中生长, 温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 每天光照 14h, 光强 5000—10000lx。3 天后用纯培养的豌豆根瘤菌 (*R. leguminosarum*) 128C53 接种。在适当时候摘瘤, 取其侵染组织作为实验材料。

电镜制样按前文所描述的方法进行^[10]。即戊二醛-锇酸双固定, 乙醇系列脱水, Spurr's 树脂包埋。然后用 LKB-I 型超薄切片机切片, 铀-铅双染色, 最后在飞利浦 EM400T 电镜下观察和照相。电压为 60kV。

结 果

在豌豆根瘤中, 它的侵入线一般呈袋状, 常有一些细菌位于其中。它们电子密度较高, 体积较小, 通常近似杆形。有时它们还有 1—2 个多聚- β -羟基丁酸盐颗粒, 但很少有多磷酸盐颗粒。侵入线中的细菌之间可能存在着这样或那样的差异, 但有

本文于 1988 年 7 月 16 日收到。

一点是完全相同的,即它们都没有细菌周膜(图版 I-1)。

当侵入线释放出细菌侵染寄主细胞后,细胞的超微结构便发生一系列变化。刚被细菌侵染的寄主细胞,细胞质和细胞器逐渐增多。在这些细胞质中,一般只有为数不多的细菌,它们通常只分布在细胞边周。这些刚释放出来的细菌与侵入线的细菌相比,体积较大,染色变浅,多聚- β -羟基丁酸盐颗粒(PHB)消失,但是最明显的变化是它外面多了一层来自寄主细胞质膜的细菌周膜。此时的细菌周膜表面光滑,紧紧地包裹在细菌外面,而且细菌与其周膜之间形成了一层几乎没有什么可见成份,染色很浅的电子透明区域。这些电子透明区域所包围的细菌通常只有一个,很少有例外(图版 I-2)。

随着侵染细胞的发育,细菌体积不断增大,逐渐发育成为类菌体。在细菌变大的同时,它的周膜也不断扩增,并常常有一些内质网、高尔基体和小泡位于这些周膜附近。由于细菌周膜日益变大,透明区域也相应加宽,里面常有一些大小不等的泡状结构(图版 I-3),有时还有一些纤维状物质分布在细菌周膜的内侧(图版 I-4)。值得注意的是,不管是泡状结构还是纤维状物质,它们一般都位于电子透明区域中的较宽部分,并靠近细菌周膜,因此它们的出现很可能与细菌周膜的扩展有关。当细菌周膜不断向外扩展时,周膜表面经常变得不太规则,甚至出现凹凸不平的现象,有的凹陷得很深,几乎快与细菌壁连在一起,而有的细菌周膜却与此相反,高高向外凸起,伸入寄主细胞质中。在生理状态十分活跃、固氮活性日趋增强的侵染细胞中,细菌周膜出现这种现象可能与增大细菌周膜的表面积,促进细菌与寄主细胞之间的物质交换有着密切的联系。

当侵染细胞进一步发育时,由于细菌大量分裂,细胞中的细菌日趋增多,并逐渐从细胞边周向中央扩展,最后它们几乎占据了整个细胞质。在细菌密度很大时,一个细菌的周膜凹陷或凸起常常使相邻细菌在其周膜的对应部分形成凸起或凹陷,相互嵌合在一起(图版 II-5)。豌豆根瘤细菌周膜的嵌合方式多种多样,彼此很不相同,有的细菌膜只在一处与相邻细菌周膜相互嵌合,有的则不然,在一小段细菌周膜上出现犹如犬牙交错的多处嵌合(图版 II-6)。有的细菌周膜嵌合面积很小,其嵌合度也很低,有的细菌周膜则与此不同,嵌合又大又深(图版 II-7)。随着时间的推移,两嵌合周膜之间的距离越来越小,最后两膜合二而一,融为一体,形成一种融合膜。用这种方式形成的融合膜极不稳定,很快就在某一点断开,并迅速向外收缩,逐渐形成一种具有共有电子透明区域和细菌周膜的新生融合体(图版 II-8)。这种融合既可在两个细菌周膜间进行,也可在多个细菌周膜的不同部位发生,甚至还可在形成融合体后再与相邻细菌周膜继续融合。因此,用这种方法形成的融合体不仅有亚铃形,也有其他形状,不仅一个细菌周膜中有两个细菌,有时也可有多个细菌存在。虽然由细菌周膜融合而形成的融合膜断裂很快,向外收缩十分迅速,但它毕竟有一个时间过程。因此,我们在细菌周膜的融合处常常发现有一些融合后的线状遗留物,有时还有一些泡状结构和纤维状物质位于附近的电子透明区域中(图版 II-9)。

讨 论

细菌周膜随细菌发育而不断变化,逐渐由紧紧包裹而变得宽松,由表面光滑而变得粗糙,甚至出现深深的凹陷,或者高高的凸起。因此,它们是处在一个十分活跃

的动态变化之中,其变化趋势是不断增大其表面积。在此过程中,附近的高尔基体和内质网可能参与了细菌周膜的形成。关于高尔基体在细菌周膜形成中的作用,Dart 等^[11]和 Robertson 等^[12]已有报道,但内质网是否也有类似功能目前还不清楚。不过 Tu^[13]发现,大豆根瘤侵染细胞中的粗糙型内质网常常与细菌周膜连在一起。最近, Mellor 等^[14]进一步用 ¹⁴C 标记大豆根瘤中的内质网,经一段时间体外培育后发现,内质网中带有标记的磷脂转移到了细菌周膜里面。由此可见,内质网参与细菌周膜形成的可能性还是存在的。

对豌豆根瘤已进行过许多研究,但只有个别品种有细菌周膜融合现象^[8-10],而其他品种未见有关报道。因此,这种现象的产生可能与寄主植物的品种有关。此外,我们的观察表明,细菌周膜融合还要有一定条件,否则也难以实现。主要条件有两个:一是侵染细胞中的细菌数量要多,特别是它的密度要大,细菌周膜之间距离要小;二是细菌周膜代谢活动要旺盛。正因为如此,故中国豌豆根瘤中细菌周膜的融合一般只出现在即将成熟和已经成熟的侵染细胞中。在幼龄的侵染细胞中,虽然细菌周膜代谢活动很旺盛,但因细菌密度太小,这种融合现象一般也很少见到;在衰老的侵染细胞中,虽然细菌密度很高,细菌周膜也大,但由于这些细菌开始衰老,其周膜的代谢活动已随之下降,因而细菌周膜融合也难以发生^[10,15]。但不同材料也可能有不同结果,例如 Tu^[13]曾发现,大豆根瘤中的细菌周膜融合现象既不出现在幼龄侵染细胞中,也不发生在即将成熟和已经成熟的侵染细胞中,而是大量存在于衰老的侵染细胞里面。

中国豌豆根瘤中的细菌周膜融合有其自己的特点,它与 Gunning^[8]所描述的情

况明显不同。它几乎没有什么对称性融合,只有非对称性嵌合融合。这种融合不是暂时的、可逆的,而是一种持续的、稳定的,有一定规律的过程。融合方式也十分复杂,不仅在不同细菌周膜融合中彼此不同,即使在同一细菌周膜的不同融合部分也差异很大。我们与 Gunning 的观察所以如此不同,原因很多,但主要可能有两方面,一是因寄主植物品种不同所致,二是与观察方法有关。可能由于 Gunning 是首次对细菌周膜融合进行研究,放大倍数太大,视野太小,未对较多的侵染细胞进行仔细观察,更未看到整个融合过程,因而得到了他所描述的结果。

细菌周膜出现彼此融合可能不是一种偶然现象,而是某些生理功能在结构上的反映。Tu^[13]曾指出,根瘤固氮能力的大小不应单纯看根瘤体积,而应由每个侵染细胞中细菌周膜总的表面积来决定。因此,随着侵染细胞固氮活性的不断增高,细菌周膜总的表面积也应相应增大。它的增大主要依赖于侵染细胞中细菌数目的增多和每个细菌平均周膜表面积扩大。当侵染细胞成熟时,一般认为它的细菌数目已达到最大,从此不再增加,因为此时的类菌体通常已失去了分裂能力。在此情况下,每个细菌平均细菌周膜表面积的增加就成为最关键的因素,而细菌周膜之间的融合恰能达此目的,因此在即将成熟和已经成熟的侵染细胞中出现了频繁的细菌周膜融合现象。

参 考 文 献

- [1] Bergersen, F. J. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 19: 482—490, 1958.
- [2] Mosse, B.: *ibid.*, 36: 49—64, 1964.
- [3] Robertson, J. G. et al.: *In Nitrogen Fixation Research, Proceedings of the 5th International Symposium on Nitrogen Fixation* (Eds. Veejer, C. et al.), Noordwijkerhout, Netherland, p.

- 475—481, 1984.
- [4] Jordan, D. C. et al.: *J. Bacteriol.*, **86**: 125—137.
- [5] Dart, P. J. et al.: *Arch. Microbiol.*, **49**: 209—235, 1964.
- [6] Generozova, I. P.: *Fiziol. Rast.*, **26**: 788—792, 1979.
- [7] Newcomb, W. et al.: *Can. J. Bot.*, **59**: 1547—1552, 1981.
- [8] Gunning, B. E. S.: *J. Cell Sci.*, **17**: 307—317, 1970.
- [9] Newcomb, W.: *Can. J. Bot.*, **54**: 2163—2186, 1976.
- [10] 韩善华等: 实验生物学报, **20**: 13—22, 1987.
- [11] Dart, P. J. et al.: *Arch. Microbiol.*, **46**: 383—401, 1963.
- [12] Robertson, J. G. et al.: *J. Cell Sci.*, **30**: 129—149, 1978.
- [13] Tu, J. C.: *Phytopathology*, **65**: 447—454, 1975.
- [14] Mellor, R. B. et al.: *Z. Naturforsch.*, **40C**: 73—79, 1985.
- [15] 韩善华等: 植物学报, **30**: 124—128, 1988.

PERIBACTERIOD MEMBRANE CHANGES DURING THE DEVELOPMENT OF PEA ROOT NODULES

Han Shanhua Zheng Guochang

(Cell Biology Laboratory, Lanzhou University, Lanzhou)

Ultrastructural changes of the peribacteroid membranes of the pea root nodules during development were observed by transmission electron microscopy. Observations show the peribacteroid membranes are various comparing developments. The bacteria in the infection threads are without peribacteroid membranes but the bacteroids liberated from the infection threads to the host cytoplasm possess the special structure which derive from the host plasma membrane. In general, the peribacteroid membranes are smaller in size, their surfaces are smoother, and there is one bacteroid enclosed by each peribacteroid membrane. As the time goes on, the peribacteroid membranes gradually become more extensive than before, some Golgi bodies and endoplasmic reticulum often locate near the peribacteroid membranes, some of which are excreting vesicles, at the same time, there are some fibril-

lar-shaped and vesicular-shaped material in the electron-empty spaces of the bacteroids. When the peribacteroid membranes spread to the host cytoplasm, their surfaces often form some protrusions or hollows, and occur chimera phenomenon, then some of the chimera peribacteroid membranes fuse together, forming a new fusion body which possesses a common peribacteroid membrane and electronempty space. However, the peribacteroid membrane fusion is a kind of asymmetric fusion, it usually only appear in nearly mature or mature infected cells. The peribacteroid membrane fusion may be closely related to nitrogen fixation and material exchange in symbiotic system.

Key words

Pea root nodule; Peribacteroid membrane; Development; Chimera and fusion

图 版 说 明

Explanation of plates

图 版 I

1. 一个侵入线中有许多细菌(B), 这些细菌没有细菌周膜, 但有的细菌有多聚- β -羟基丁酸盐颗粒(PHB)。当它们被释放到寄主细胞质后, 虽有了细菌周膜(空心箭头), 但 PHB 却消失了, 并常有一些内质网(ER) 和高尔基体(G) 在它们附近($\times 7,500$)。2. 一些具有光滑细菌周膜(空心箭头)和电子透明区域(ES) 的幼龄细菌(B) 及其附近的内质网(ER) 和高尔基体(G) ($\times 22,000$)。3. 在电子透明区域中具有泡状结构(三角形)或纤维状物质(细箭头)的类菌体(B) 及其附近的内质网(ER) ($\times 13,000$)。4. 具有纤维状物质(细箭头)并出现细菌周膜相互嵌合(粗箭头)的类菌体(B) ($\times 15,000$)。

图 版 II

5. 具有细菌周膜嵌合现象(粗箭头)的几个类菌体(B) 及其附近的内质网(ER) ($\times 15,000$)。6. 具有细菌周膜多处嵌合(粗箭头)的两个类菌体(B) 及其附近的内质网($\times 15,000$)。7. 具有不同细菌周膜嵌合方式(粗箭头)的几个类菌体(B) ($\times 15,000$)。8. 细菌周膜(空心箭头)相互融合, 电子透明区域已连在一起(大箭头)的两个类菌体(B) ($\times 20,000$)。9. 包围二个或二个以上类菌体(B) 和宽大电子透明区域(ES) 并有嵌合现象(粗箭头)的细菌周膜(空心箭头)。在电子透明区域中有一些线状遗留物(双箭头), 一些泡状(三角形)和纤维状物质(细箭头)还出现在细菌周膜融合处附近($\times 11,000$)。

Plate I

1. The bacteria(B) of a infection thread without peribacteroid membranes but some of them with poly- β -hydroxybutyric and granules(PHB), however, the bacteroids in the host cytoplasm with peribacteroid membranes(empty arrow) but without PHB, and some endoplasmic reticulum(ER) and a Golgi body(G) near them. 2. The young bacteria with smoother peribacteroid membranes(empty arrows) and electron-empty spaces(ES), and some endoplasmic reticulum(ER) and a Golgi body(G) near them(B). 3. The electron-empty spaces(ES) of the bacteroids(B) with some vesicular-shaped material(triangles) or fibrillar-shaped material(thinner arrow) and some endoplasmic reticulum(ER) near them. 4. Two bacteroids(B) with fibrillar-shaped material(thinner arrows) and chimera phenomenon of peribacteroid membranes(thicker arrow).

Plate II

5. Some bacteroids(B) with chimera phenomenon of peribacteroid membranes(thicker arrows), and some endoplasmic reticulum(ER) near them. 6. Two bacteroids(B) with chimera phenomenon in many parts of their peribacteroid membranes(thicker arrow). 7. some bacteroids with various chimera formations of peribacteroid membranes(thicker arrows). 8. The peribacteroid membranes(empty arrow) of two bacteroids have fused and the electron-empty spaces have joined together(larger arrow). 9. The peribacteroid membranes(empty arrows), enclosed two or more than two bacteroids and with chimera phenomenon(thicker arrow), larger electron-empty spaces(ES) of the bacteroids with line-shaped remnant of fusion(double arrow), some vesicular-shaped(triangle) and fibrillar-shaped material(thinner arrow) near fusion parts.