

豌豆根瘤胞间细菌的扩展及其“前途”*

韩 善 华

(兰州大学细胞生物化学研究室, 兰州)

中国张家川豌豆根瘤是一种很特殊的根瘤, 它的侵入线体积较大, 数量很多, 在所有发育阶段的寄主细胞中几乎都存在。此外, 它还有许多基质丰富, 含细菌很少, 通常没有壁的类侵入线结构, 有时它们的膜、壁和基质还分别与附近侵入线的膜、壁和基质连在一起。在这种根瘤中, 胞间细菌不仅能以侵入线方式向新形成的分生细胞扩展, 而且也能通过胞间层和胞间隙向根瘤端部白色区域移动。虽然多数侵入线能向寄主细胞释放细菌, 但有的直到寄主细胞衰败也无细菌释放, 即使细菌在侵入线壁解体后有机会进入这些衰败细胞, 它们也很快被细胞中的酶所消化。

关键词 豌豆根瘤菌; 侵入线; 胞间扩展

土壤中的根瘤菌大都是通过根毛细胞壁内陷形成侵入线而进入豆科植物的根部, 并刺激前方的皮层细胞产生分裂, 形成根瘤分生组织。然后释放出细菌, 侵染这些分生细胞。于是侵染细胞逐日增多, 根瘤体积不断变大^[1,2]。虽然在过去的根瘤研究中, 已有一些学者用光学显微镜或电子显微镜观察过侵入线的形成, 但都属于它们的早期发生^[3-6], 或仅限于细菌释放^[7,8], 而对较老根瘤中侵入线的分布和发育状况及其衰老过程, 胞间细菌的扩展方式和它们间的相互关系及其“前途”等, 不仅国内尚无报道, 国外也研究甚少, 对豌豆根瘤更是如此。为此, 我们进行了这方面的研究。

材 料 和 方 法

豌豆 (*Pisum sativum* L.) 植株的培养和根瘤菌的接种详见前文^[9]。在接种后第 28、35 和 42 天取样, 根瘤长度为 2—3 mm。分别将其分生、侵染和衰老组织切成小块, 在 2.5% 戊二醛的 0.05mol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.8) 中固定 3h, 同种缓冲液冲洗几次, 在 1% 锇酸的上述缓冲液中

再固定 2h, 乙醇系列脱水, 包埋在 Spurr's 树脂中。除聚合外, 均在室温下进行。切片用铀-铅双染色, 最后在非利浦 EM400T 电镜下观察和照相。加速电压为 60kV。

结 果

中国张家川豌豆根瘤的侵入线数量众多, 分布极广, 除大量位于根瘤的白色和粉红色区域外, 还经常出现在基部绿色区域, 有时甚至在完全瓦解的细胞中也可见。此外, 侵入线的形态和结构变化也很大, 不仅在不同部位有所不同, 即使在同一切片中往往不一样。早期侵入线一般呈管状, 管中细菌不多, 多呈单行排列, 它们之间只有很少的基质 (图版 I-1)。随着侵入线的发育, 管中细菌不断增多, 排列方式日趋紊乱, 致使侵入线的形状逐渐由原来的管状变为大小不等的袋状。虽然如此, 但它们基部的壁仍与寄主细胞壁紧紧连在一起, 而且两者的厚度和染色性质也基本一样 (图版 I-2)。当这些侵入线进一步发育时, 逐渐从寄主细胞外围移向细胞中心部分,

本文于 1989 年 3 月 6 日收到。

* 承郑国钊教授指导, 谨致感谢。

由于发育程度不同,它们有时位于细胞壁附近,有时则出现在细胞核旁(图版 I-3)。与此同时,这些侵入线的壁开始变得薄厚不均,它的某些部分壁很厚,另一些地方壁却非常薄,乃至完全没有壁。不仅如此,侵入线中的细菌也逐渐移向侵入线壁附近,致使侵入线的中间部分常常出现一些没有或只有少量细菌的基质。由于寄主细胞壁的内吞作用,这些位于侵入线外周的细菌便开始从侵入线的无壁处释放到寄主细胞质中(图版 I-4)。

在这种根瘤中,除了上述这些侵入线外,还有不少的类型侵入线结构,它们与管状和袋状侵入线有相似处,但也有不同点。它们的壁很薄,有时甚至完全没有,仅有一层薄薄的膜包围在它们的外面。虽然它们中间的基质十分丰富,但基质中经常没有或只有很少的细菌。类侵入线的分布也较特殊,很少单独存在,经常与侵入线在一起,有时它们的膜,乃至壁和基质都分别与附近侵入线的膜、壁和基质完全连在一起(图版 I-5,6)。

在这种根瘤中,常有许多细菌既不位于管状或袋状侵入线中,也不存在于寄主细胞质里面,而是居于胞间隙(图版 II-7)或胞间层中(图版 II-8)。位于胞间层中的细菌多少不等,分布情况也很不相同,有的靠近胞间隙,有的程度不同地远离胞间隙;有的只在一处聚集,有的则在多处出现;有的两侧寄主细胞壁只微微向外鼓起呈梭形,有的则与寄主细胞壁一起内陷而趋向形成管状或袋状侵入线(图版 II-9)。这些位于胞间隙和胞间层中的细菌体积很小,一般只有侵染细胞中成熟细菌(类菌体)的几分之一或更小。它的外面没有细菌周膜,内部的细胞质和拟核区的电子透明度差异不大,核纤维分布无一定规律,虽有时也含有多聚- β -羟基丁酸盐颗粒(PHB),但

很少有多磷酸盐颗粒。

在过去的研究中,一般认为根瘤中的侵入线都能将其中的细菌释放到寄主细胞中,并发育为类菌体,参与根瘤共生固氮^[10,11]。但我们的研究结果则与此不同,其中一些侵入线只有到寄主细胞衰败后才开始释放细菌(图版 II-10)。有的甚至在寄主细胞彻底瓦解后,侵入线中的细菌也不能进入寄主细胞。不过这些侵入线已经开始解体,它的膜常常变得不连续,乃至完全消失(图版 II-11)。接着侵入线壁也出现解体,形成一些缺口,里面的细菌和基质随之从缺口流入瓦解的寄主细胞中。以这种方式出来的细菌不属于侵入线的正常释放,因为它们不是有条不紊的逐个释放,而是成群结队的蜂涌而出。同时,用这种方式出来的细菌外面没有一层来自侵入线膜的保护膜——细菌周膜,细菌细胞壁直接与寄主细胞质接触。这些细菌通常不能发育成正常的类菌体,因为它们进入瓦解的寄主细胞后,很快就被寄主细胞中的酶消化,变成一些泡状、膜状和纤维状物质(图版 II-12)。

讨 论

在豆科根瘤中,细菌大都是通过侵入线从侵染区向分生区生长来实现其扩展的^[12]。我们的研究表明,张家川豌豆根瘤除了这种方式外,它的细菌还可能有一种直接在胞间层和胞间隙中向前扩展的能力。这种现象虽在某些热带豆科根瘤和一些非豆科根瘤中有所发现^[13-15],但在一般豆科根瘤中却非常少见。至今为止,对豌豆根瘤已进行过许多研究,但这种现象还无人发现^[16]。我们认为,张家川豌豆根瘤中细菌扩展的这两种方式不是孤立的、毫无联系的,在一定条件下它们还可能相互转化。如细菌在胞间层中扩展时,由于

前方受阻,加之两侧或一侧寄主细胞壁较薄,这些胞间层中的细菌就有可能促使寄主细胞壁内陷而变为管状或袋状侵入线。反之,当管状或袋状侵入线的壁太厚,里面的细菌无法被释放到寄主细胞中时,日益增多的细菌就有可能沿侵入线基部分离的胞间层扩展,转化为胞间层和胞间隙扩展方式。否则就很难解释为什么会有如此之多的细菌存在于胞间层和胞间隙中,同时也无法说明这些细菌最后又怎样进入寄主细胞,发育为类菌体。因为至今还无人报道土壤中的根瘤菌不是通过形成侵入线而直接由胞间隙进入豌豆根部,而且也没有人发现,豌豆根瘤侵染细胞中的细菌不是由于侵入线的释放,而是直接来自胞间层或胞间隙的^[16]。

对于侵入线中细菌的释放已有不少报道,多数学者认为是由于寄主细胞壁内吞作用所致^[17]。Mosse^[18]进一步指出,这种由内吞作用而引起的细菌释放与侵入线中的细菌和基质增加无关。然而,事实并非完全如此,因为我们发现,在侵入线释放细菌时,总要在侵入线表面,特别是它的前部形成一些含有细菌的小泡(或隆起),这种小泡只出现在侵入线壁较薄,或没有侵入线壁的地方(图版 II-2,4)。进一步观察还发现,某些侵入线所以不释放细菌,原因虽然很多,但一个十分引人注目的现象是它们的壁都很厚(图版 II-11,12)。由此说明,细菌释放与侵入线壁厚度有关。不仅如此,它还与侵入线中细菌和基质有着密切联系。因为只有当寄主细胞壁的内吞作用力,加上侵入线壁内外压力差之和大于侵入线壁所能承受力的强度极限值时,侵入线壁才可能出现内吞现象。而侵入线壁所承受的内压力自然来自它所包围的细菌

和基质,并随它们增长速度的增加而增加。根瘤中的一些侵入线不释放细菌并非偶然,很可能与根瘤自然衰老时能向土壤中释放出幼龄细菌有关,因此它有着重要的生物学意义^[13,20]。

参 考 文 献

- [1] Patel, J. J. and A. F. Yang: *Can. J. Microbiol.*, **27**: 36—43, 1981.
- [2] Verma, D. P. S. and S. Long: *Int. Rev. Cytol.*, **14**: 211—245, 1983.
- [3] Callaham, D. A. and J. G. Torrey: *Can. J. Bot.*, **59**: 1647—1664, 1981.
- [4] Higashi, S. A. and M. Abe: *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**: 1094—1099, 1980.
- [5] Turgeon, B. G. and W. D. Bauer: *Can. J. Bot.*, **60**: 152—161, 1982.
- [6] Turgeon, B. G. and W. D. Bauer: *Plasma*, **163**: 328—340, 1985.
- [7] Goodchild, D. J. and F. J. Bergersen: *J. Bacteriol.*, **92**: 204—213, 1966.
- [8] Bassett, B. et al.: *Can. J. Microbiol.*, **23**: 573—582, 1977.
- [9] 韩善华, A. F. Yang: 实验生物学报, **20**: 13—22, 1987.
- [10] Libbenga, K. B. and R. J. Bogers: *The Biology of Nitrogen Fixation*. Edited by A. Quispel. North-Holland Publ. Co., Amsterdam, pp. 430—472, 1974.
- [11] Newcomb, W.: *International Review of Cytology, Supplements*, **13**: 247—297, 1981.
- [12] Newcomb, W. et al.: *Can. J. Bot.*, **57**: 2603—2616, 1979.
- [13] Chaudler, M. R. et al.: *J. Exp. Bot.*, **33**: 47—57, 1982.
- [14] Tsien, H. C. et al.: *J. Bacteriol.*, **156**: 888—897, 1983.
- [15] Miller, I. M. and D. D. Baker: *Protoplasma*, **128**: 107—119, 1985.
- [16] Newcomb, W.: *Can. J. Bot.*, **54**: 2163—2186, 1976.
- [17] Napoli, C. A. and D. H. Hubbell: *Appl. Microbiol.*, **30**: 1003—1009, 1975.
- [18] Mosse, B.: *J. Gen. Microbiol.*, **56**: 49—66, 1964.
- [19] Sutton, W. D.: In *Nitrogen Fixation*, Edited by W. J. Broughton, Clarendon Press, Oxford, UK, pp. 144—212, 1983.
- [20] 韩善华, A. F. Yang: 植物学报, **30**: 124—128, 1988.

SPREAD AND "FUTURE" OF INTERCELLULAR BACTERIA IN PEA ROOT NODULES

Han Shanhua

(Cell Biology Laboratory, Lanzhou
University, Lanzhou)

Chinese pea (*Pisum sativum* cv Zhang Jiachuan) root nodule is a kind of quite special root nodule in which infection threads are larger in size and also a good many in number, they almost appear in all developmental stages of the host cells. At the same time, in the root nodules there still are a large quantity of infection-thread-like structures in which matrix is specially abundant, however, bacteria are less in number. The wall thickness of the infection-thread-like structures is very thin. The structures are often near infection threads, sometimes their membranes, walls and matrix connect with the membranes, walls and matrix of nearby infection threads. The spread of intercellular bacteria in the root nodules mainly depend on the continuous growth of infection threads towards new forming

meristematic cells, they can also move to the end white regions of the root nodules through the middle lamella and the intercellular spaces. Though the majority of infection threads in the root nodules can release their bacteria into the host cells, the minority of infection threads do not release their bacteria into the host cells till the host cell senescing or disintegrating. Even if some bacteria are released into the host cells from the holes formed by disintegration in the infection thread walls, they are rapidly digested by some enzymes in the host cells.

Key words

Rhizobium leguminosarum; Infection thread; Intercellular spread