

苜蓿根瘤菌胞外多糖缺损突变体侵染方式的超微结构*

杨 澄

(北京大学生物系, 北京 100871)

应用透射电子显微镜观察到缺损胞外多糖根瘤菌突变体侵染苜蓿根的方式与前人描述的一般根瘤菌的侵染有明显不同。突变菌贴近根毛时, 根毛外层壁被降解, 突变菌陷入根毛外层壁中。突变菌由外层壁移入内层壁后, 在菌体周围形成大量新的壁物质。被新沉积的壁物质形成细胞内生包被的突变菌进一步形成宽的感染线, 这种感染线内不含有细的颗粒基质, 突变菌被包埋在壁物质中, 以后感染线解体。说明突变菌感染线的发生与一般根瘤菌在已降解的根毛壁侵染原位直接发生感染线是不一样的。

突变菌诱导的根瘤起始于根的维管柱中的薄壁细胞不规则分裂, 以及与木质部极相对的皮肤细胞。随着根瘤进一步发育在皮层细胞内形成一个宽的分生组织带, 根瘤细胞内不含突变菌, 说明突变菌诱导的根瘤与野生苜蓿根瘤菌诱导的根瘤的发育途径是十分不同的。

关键词 苜蓿; 突变体(根瘤菌); 根毛感染

在共生固氮的研究领域, 根瘤菌突变体已经被用来研究根瘤发育的早期过程, 特别是在根瘤菌的侵染和根瘤发生的研究中, 根瘤菌突变体是一种好材料。

用苜蓿根瘤菌胞外多糖突变体接种苜蓿幼苗后, 突变体细菌诱使根毛畸变, 并形成没有细菌的无效根瘤^[1-3]。然而根瘤菌的表面多糖在侵染过程中的确切作用仍然是不清楚的。

许多研究者认为水解酶可能参与降解根毛的细胞壁^[4-7], 但是根瘤菌在侵染位置上根毛壁的实际降解过程并未被证实。此外, 根毛壁是由植物本身产生的酶, 还是由细菌产生的酶降解也是个谜。

我们的研究详细地揭示了苜蓿根瘤菌胞外多糖缺损突变体侵染根毛的过程以及感染线的形成, 并且描述了突变体根瘤菌诱导的根瘤起始和发育, 与一般苜蓿根瘤发育途径是不相同的。

材 料 和 方 法

(一) 幼苗培育

将苜蓿 (*Medicago sativa* L. cv. Iroquois) 种子先放在 70% (V/V) 酒精中浸泡 10 分钟, 0.1% (W/V) HgCl_2 浸泡 3 分钟, 2.6% (V/V) 次氯酸钠中振荡 20 分钟。消毒后的种子用无菌水洗 5 次, 然后将种子放在含 1% 琼脂培养皿中, 置 23℃ 培养箱中萌发。

本文于 1990 年 7 月 27 日收到。

* 本文部分工作是作者访问美国麻省理工学院生物系及 Wellesley 文理学院生物系期间的研究成果。研究中得到 E. R. Signer 和 A. M. Hirsch 两位教授的指导和帮助, 特此致谢。

(二) 细菌系

菌株 *Rhizobium meliloti* 1021 来自共生有效 Su47 系^[9]。菌株 Rm7094 (*exoB*) 和 Rm 7029 (*exoE*)；来源于 *R. meliloti* 1021, Rm 7094 是 Tn 5 突变体, 这种突变体缺损胞外多糖, 并且在植物中不能固氮, Rm 7029 是本身载有一个胞外多糖致死基因^[8]。

5ml 根瘤菌培养物在 LB 培养液中过夜, 离心收集, 用磷酸缓冲液 (每升含 8.0g NaCl, 0.2g KCl, 1.44g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2g KH_2PO_4 ; pH 6.8) 洗一次。细菌沉淀物悬浮于 1/10 PBS 中。悬浮液用 Fahraeus 液稀释为密度 1×10^7 细胞/ml。

(三) 苜蓿幼苗根的接种

将幼苗根放入含根瘤菌及 3% 蔗糖的 Fahraeus 液体培养液^[10]处理 1 小时。再用 Fahraeus 溶液洗三次, 然后转移到含有 Jensen 培养基^[11]的试管中。上述操作全部在无菌条件下进行。试管置 25℃, 1000 lx 日光灯连续光照下培养。

(四) 根毛畸形测定

将接种 Rm 7094, Rm 7029 与 Rm 1021 后 1 小时的苜蓿根, 用 Fahraeus 溶液洗三次, 分别置于载玻片上。在超净工作台上用显微镜观察, 将不同类型畸形根毛分五个等级 $0 < 1 < 2 < 3 < 4$ 。记录结果用 Macintosh 计算机进行方差分析。每个处理测定 12 株幼苗, 观察幼苗整个根系, 主要测定 120 μm 长以下的根毛 (正在发育的根毛)。

(五) 显微镜材料的制备

切下的根段或根瘤用 2.5% 戊二醛固定 2 小时, 再用 1% 锇酸固定 1 小时, 丙酮系列脱水, 样品用 Spurr 树脂包埋。0.5—1 μm 的半薄切片用甲苯胺蓝 O 染色。系列切片是从 10 个以上不同根瘤切片制得的。超薄切片用醋酸铀和柠檬酸铅双重染色。切片是用 LKB-III 型切片机制得的。在 JEMCX-100 电子显微镜下观察。

结 果

(一) 突变体细菌引起的畸形根毛

苜蓿幼根在含有突变菌 Rm 7094 (*exoB*) 和 Rm 7029 (*exoE*) 的 Fahraeus 的培养液中处理 0.5—1 小时, 即有突变体细菌贴近正在发育的根毛。位于正在发育根毛带的大部分根毛呈挺直状, 畸形根毛所占比例较少。畸形根毛类型如下: 顶部或基部膨大, 轻微波浪形, 侧突起, 弯曲。24—48 小时, 畸形根毛延长, 分枝根毛增多 (图版 I-3)。在接种后第四天可以在延长根毛中看见根毛卷曲。两种突变菌与野生型根瘤菌在处理 1 小时后诱导畸形根毛相对能力的比较见表 1。

(二) 突变体细菌的侵染方式

突变菌侵染苜蓿根有两种方式: 第一种方式: 当突变菌贴近根毛后, 开始降解根毛外层细胞壁 (图版 I-1, I-2), 细胞壁被降解形成空隙, 周围未被降解的纤维层向外突出, 然后突变菌进入空隙 (图版 I-2), 突变菌完全进入外层壁后, 壁自动愈合, 突变菌陷入外层壁中 (图版 I-2 箭头)。在浸染位置附近出现一些小泡 (Vesicles)。突变菌由根毛外层壁移入内层壁后, 在突变菌附近或周围形成大量新的壁物质 (图版 I-1, I-5), 壁稍向内突。图版 I-4, II-6 箭头示一个突变体细菌紧贴质膜, 被新生成的壁物质形成内生包被 (encapsule)。在壁降解原位, 突变菌不能直接形成感染线。有内生包被的突变菌可以进

表 1 突变菌与野生型苜蓿根瘤菌诱导畸形根毛相对能力的比较

Table 1 Relative ability of Rm7094 (*exoB*), Rm7029 (*exoE*), Rm1021 on causing deformation of alfalfa root hair

细菌系 Strains	畸形根毛 Deformation of root hair			
	波 状 Waviness	膨 大 Swollen	侧 突 起 Lateral	弯曲 90° Curling
<i>exo B</i>	2.1	2.1	3.6	1.2
<i>exo E</i>	0.2	1.1	0.3	0.2
Rm 1021	0.2	1.0	3.0	2.1

注: 此表系在 Macintosh 计算机上方差分析的结果。

A minimum of 10—12 seedlings were examined for each treatment.

Root hair deformation was determined after 1h of treatment.

一步形成感染线。在直根毛内突变菌起始的感染线中, 突变菌被新形成的纤维微丝包围, 感染线的壁与根毛内壁相连并增厚, 在感染线内没有细的颗粒性基质(图版 II-7), 根毛的细胞质已解体。增殖的突变菌被包埋在厚的壁物质中, 突变菌感染线的壁的纤维排列整齐(图版 II-8, 9), 囊内的突变菌不含聚 β -羟基丁酸盐 (Poly- β -hydroxy butyrate) 颗粒(图版 II-9), 有一些小泡分布在感染线附近(图版 II-8)。在图版 II-8 右上方示具有

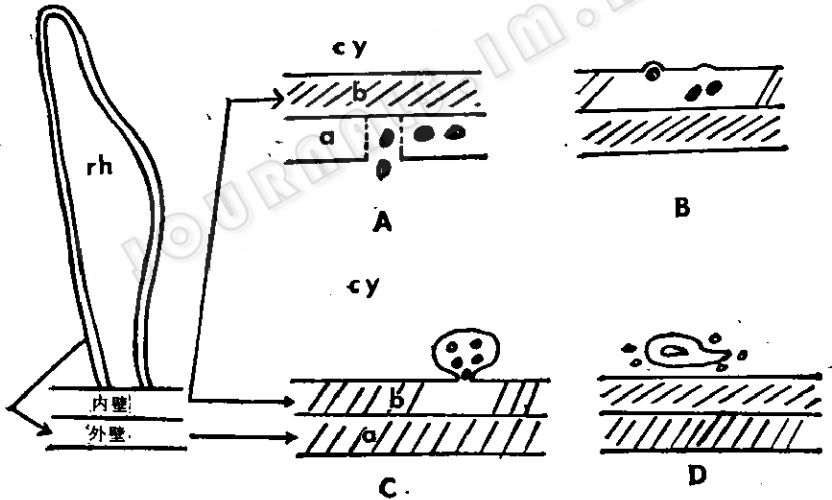


图 1 突变菌侵染方式的模式图

Fig. 1 Model of infection mode of *exo* mutant rhizobia

Infections initiated by *exo* mutant rhizobia which degraded directly the outer layer wall without a small colony of rhizobia.

- A. 突变菌降解根毛外层壁 (a) 并陷于外层壁中; B. 突变菌由外层壁进入内层壁 (b);
C. 感染线形成和突变菌 (r) 增殖; D. 感染线败育。

A. Degradation of the outer layer of the hair cell wall (.....) and entry of *exo* mutant rhizobia (r) into outer layer of hair cell wall (a). B. The *exo* mutant rhizobia moved from the outer layer of the wall to the inner layer wall (b). C. The infection thread formed by extension of *exo* mutant rhizobium encapsulated. D. The infection thread aborted within root hair cell.
rh=root hair cell, cy=cytoplasm, it=infection thread.

内生包被的突变菌(r)正透入根毛细胞内的过程,沿着内壁感染位置有许多小泡(v)。通常突变菌感染线败育在根毛或表皮细胞内,有时留下感染线残迹和一些没有膜被(membrane envelope)裸露的突变菌散布在已解体的细胞质内(图版 III-10)。图 1 示突变菌侵染方式的模式图。

突变菌侵染的第二种方式是突变菌从根毛与表皮细胞相压处缝隙间透入细胞间隙(图版 I-1 左下方)。在根毛与表皮细胞相压的缝隙间充满粘质(Mucige),突变菌降解周围的粘质,以单行透入细胞间隙。突变菌在细胞间隙能够大量增殖,形成大的菌胶团。

(三) 结瘤

接种后 7—9 天肉眼可见突变菌诱导的根瘤,主要分布在侧根上。根瘤呈白色圆形。根瘤起始于畸形根毛下,根的维管柱中的薄壁细胞不规则分裂,以及对木质部极的内部皮层细胞分裂(图版 III-11)。根瘤进一步发育,在皮层内可见一个比较宽的分生细胞带(图版 III-12, III-13)。在根瘤皮层细胞内不含突变菌,感染线败育在表皮细胞内。但有些皮层细胞内出现与早期被侵染细胞类似的特征如核膜内陷,形成所谓的核仁联合体。

讨 论

苜蓿根际分泌物——藤黄菌素(Luteolin)作为植物一种信号,已经证实这种复合物主要从刚露出的根毛带释放出,能迅速活化根瘤菌的结瘤基因^[12]。一旦这种复合物与根瘤菌结瘤基因产物相结合,感染过程立刻开始。被诱导的根瘤菌机能可能是贴近,诱使根毛弯曲,降解根毛细胞壁,以及合成根瘤菌引起皮层细胞分裂的信号物质。近年对缺损胞外多糖合成的突变体研究已经普遍认为,胞外多糖在豆科感染中起着重要作用,许多基因影响和参与胞外多糖合成,但是对缺少胞外多糖影响植物-根瘤菌之间共生的主要原因尚不清楚^[1-3]。

作者研究观察到突变体细菌 Rm7094(exo B)和 Rm7029(exo E)的侵染过程是相似的。突变体细菌都能够贴近根毛,说明在起始感染中可以被识别。但是,突变体细菌在刚贴近根毛时不能诱使根毛卷曲;野生型根瘤菌在接种后 6—8 小时可以见到根毛 360°卷曲,但突变菌在接种后 4 天才出现卷曲,并且突变菌不能在感染部位壁降解前形成菌落,这可能影响下一步的感染。因为固氮根瘤的根毛中感染线起点都在侵染部位的菌落区^[7,15,17]。

我们的电镜观察揭示了突变体细菌降解和进入根毛外层壁的过程,进一步证实早期工作者在这个问题上的观点^[15],也说明缺少胞外多糖不影响诱导根瘤菌的壁降解酶的机能。但是我们可以看到固氮根瘤菌侵染部位——根毛壁改变或降解与感染线起始是在同一部位^[7,15-18],然而突变体细菌进入根毛外层壁后不能在原位形成感染线,虽然其原因我们还无法说清楚,可是差异是明显的。突变体细菌感染线发生于已由内壁物质形成包被(encapsule)的突变体细菌,进一步内壁内陷和扩展形成宽厚的感染线,这与一般固氮根瘤菌的感染线的起源也不相同。曾有研究者推测感染线中的基质(Thread matrix)是来自根瘤菌^[16],或基质就是胞外多糖^[2]。我们的结果表明,突变体细菌感染线形成过程中没有细的颗粒性物质,突变体细菌不是被包埋在感染线基质中,而是被包埋在厚的壁物质中,由此可以说明突变体细菌不能合成胞外多糖与突变体细菌形成的感染线中没有基质

有关系。突变体细菌形成不正常感染线随后不久就解体了,裸露的、蜕化的突变体细菌存留在细胞质已降解的根毛细胞内。这一事实或许可以说明一些工作者不知突变体细菌如何进入根毛或表皮细胞的^[19]。以上结果证实了根瘤菌表面酸性多糖在建立豆科-根瘤菌共生的感染线中起着重要作用,不正常的感染线中止对皮层细胞的进一步感染。

突变体细菌诱导的根瘤起始于维管束内的薄壁细胞及对着木质部极的内部皮层细胞的有丝分裂,而野生型苜蓿根瘤菌诱导的根瘤发生于根的内皮层^[20],因此导致两种完全不同的发育途径。对于突变体细菌与野生型苜蓿根瘤菌在合成引起皮层细胞分裂信号上的差异,有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Finan, T. M. et al.: *Cell*, **40**: 869—877, 1985.
- [2] Leigh, J. A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 6231—6235, 1985.
- [3] Leigh, J. A. et al.: *Cell*, **51**: 579—587, 1987.
- [4] Ljunggren, H. and G. Fahraeus: *J. Gen. Microbiol.*, **26**: 521—528, 1961.
- [5] Hubbell, D. H. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**: 210—213, 1978.
- [6] Verma, D. P. S. et al.: *Plant Sci. Lett.*, **13**: 137—142, 1978.
- [7] Ridge, R. W. and B. G. Rolfe: *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**: 717—720, 1985.
- [8] Finan, et al.: *J. Bacteriol.*, **170**: 474—477, 1988.
- [9] Meade, H. M. and E. R. Signer: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 2076—2078, 1977.
- [10] Fahreus, G.: *J. Gen. Microbiol.*, **16**: 374—381, 1957.
- [11] Vicent, J. M.: *A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria* (Blackwell, Oxford), 1970.
- [12] Peters, K. N. et al.: *Science*, **233**: 977—979, 1986.
- [13] Plazinski, J. and B. G. Rolfe: *J. Plant Physiol.*, **120**: 181—187, 1985.
- [14] Vennigerholz, F. and B. Walles.: *Protoplasma*, **140**: 110—117, 1987.
- [15] Callahan, D. A. and J. G. Torrey.: *Can. J. Bot.*, **59**: 1647—1664, 1981.
- [16] Newcomb, W. E.: *INT. Rev. Cytol.*, **13**(suppl): 247—248, 1981.
- [17] Turgeon, B. G. and W. D. Bauer: *Planta*, **163**: 328—349, 1985.
- [18] Pueppke, S. G.: *Physiol. Plant*, **67**: 262—266, 1986.
- [19] Le Gal, M. F. and S. L. A. Hobbs: *Can. J. Bot.*, **67**: 2435—2443, 1989.
- [20] Dudley, M. E. et al.: *Planta*, **171**: 289—301, 1987.

ULTRASTRUCTURE OF INFECTION MODE OF *R. MELILOTI* EXOPOLYSACCHARIDE MUTANT IN ALFALFA

Yang Cheng

(Department of Biology, Peking University, Beijing 100871)

The mode of infection of *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide (exo) mutant into alfalfa root has been studied at the ultrastructure level. The exo mutant rhizobia attached, actually degraded, and trapped only the outer layer wall of root hair or epidermal, and then the exo mutant rhizobia moved from outer layer to inner layer of root hair wall. A large amount of new wall material was deposited in the vicinity of rhizobia in inner layer wall. The rhizobia were encapsulated by new wall material in inner layer wall and infection thread was formed. The proliferating mass of exo mutant rhizobia were embedded in wall material in infection sac. Infection thread usually aborted within root hair or epidermal cells. The nodules elicited by *R. meliloti* exo mutant arised from parenchyma cell divisions in vascular cylinder and cortical cell divisions near xylem pole opposite the deformation hair in the root. Further development of nodules produced a broad meristematic region. The exo mutant-induced nodules may be a different developmental pathway from that of wild-type induced nodules.

Key words

Medicago; Mutant (*Rhizobium*); Root hair infection

图 版 说 明

Explanation of plates

图 版 I

1. 突变体根瘤菌 (r) 贴近根毛 (rh) 和降解及根毛外层壁。在左下方, 突变菌降解根毛与表皮细胞 (E) 相压处缝隙间粘液物质 (Mucigel), 侵入细胞间空隙 ($\times 5600$)。2. 一个突变菌正降解和进入外层壁 (a), 另一突变菌 (r) 已陷入外层壁 (箭头), 在细胞质中有一些小泡 (v) ($\times 41400$)。3. 突变菌诱导的延伸的分枝, 波状, 及顶端膨大根毛 ($\times 150$)。4. 突变菌已从根毛外层壁 (a) 移向内层壁 (b), 一个与质膜靠近的突变菌 (r) 被新沉积的壁物质包围形成细胞内生包被 (双箭头) ($\times 3900$)。5. 图版 1-4 中单箭头部分放大, 在突变菌附近沉积大量新的壁物质 (*), 外层壁 (a) 纤维排列整齐 ($\times 36000$)。

图 版 II

6. 图版 1-4 中双箭头部分放大 ($\times 17700$)。7. 突变菌感染线 (it) 正在直根毛 (rh) 内形成, 细胞质内无细胞质内含物 ($\times 6900$)。在图的左方是放大的突变菌感染线, 突变菌 (r) 四周有一些纤维微丝 (箭头), 感染线内没有细的颗粒性基质 ($\times 24900$)。8. 增殖的突变菌 (r) 被包埋宽的感染线壁物质中。在图的右上方, 一个突变菌 (r) 感染线正起始 (箭头), 一些小泡 (v) 存在于感染线附近 ($\times 9100$)。9. 图版 II-8 中感染线部分放大, 清楚显示感染线的壁是内壁的凹陷和增大 (w) ($\times 20400$)。