

PHB 颗粒在红豆草根瘤细菌发育中的动态变化*

韩善华

(四川师范大学细胞生物研究室 成都 610066)

郑国铝

(兰州大学细胞生物研究室 兰州 730000)

摘 要 红豆草根瘤细胞间隙和侵入线中另有个别细菌含有 PHB 颗粒,而且数量很少,一个细菌通常仅有一个。随着细菌被从侵入线中释放到寄主细胞中,这些 PHB 颗粒立即消失。幼龄细菌不含 PHB 颗粒,成熟细菌一般也不含这种内含物。当细菌衰老时,它们又再度出现,并大量增加,而后很快减少,直至完全消失。从未发现这种颗粒存在于解体细菌中,尽管它们处于各种不同的解体状态。PHB 颗粒在细菌发育中的变化表明,它的多少不仅与根瘤细菌发育密切相关,而且也受制于根瘤品种。

关键词 红豆草根瘤, 细菌, 发育, PHB, 动态变化

豆科根瘤中的细菌是共生细胞不可分割的一部分,起着将空气中的分子氮转变为氨的作用,因此它在发育中的变化,其中包括内含物的变化,一直是固氮细胞生物学研究的重要内容之一。

根瘤细菌中含有多种多样的内含物,其中以 PHB 颗粒最为常见,而且研究较多。Werner 等^[1]认为,它存在于所有根瘤的细菌中,而且含量是基本一样的。对于 PHB 的生理功能目前还无一致意见,多数人认为它与类菌体固氮需要的电子和能量供应有关^[2-3]。近来发现^[4],某些根瘤中的固氮细菌自始至终没有 PHB 颗粒,因此对 PHB 恒定不变和参与共生固氮的观点提出了怀疑。

红豆草是一种适应性很强的优质牧草,而且还能大量结瘤,有效提高土地肥力。因此对它的根瘤是否含有 PHB 颗粒?在细菌发育过程中有什么变化?与共生固氮有何联系等一系列问题有必要进行详细研究。作者在这方面进行了一些工作,现报道如下。

1 材料和方法

将红豆草(*Onobrychis viciaefolia* Scop.)种子种于校园中,在自然条件下生长结瘤,然后从根部取出不同发育程度的根瘤,按前文^[5]报道的方法进行制样和观察。

* 国家自然科学基金资助课题。

本文于 1994 年 2 月 8 日收到。

2 结果

红豆草根瘤中位于胞间隙和侵入线里面的细菌一般近似圆形或椭圆形。它们的周围有一层荚膜, 荚膜内侧是细胞壁。在细胞壁与原生质之间是一圈含有纤维状物质的电子密度较低的区域。这些细菌中的细胞质和拟核电子密度很高, 里面无明显结构存在, 二者之间也无清晰界限。它们中只有少数细菌具有 PHB 颗粒, 而且数量极少, 一般为一个, 二个或二个以上的现象很难发现。PHB 颗粒很小, 多近似圆形或椭圆形, 分布在细胞的外周部分 (图版 I-1, 2)。

在早期侵染细胞中, 细胞质不多, 主要分布在细胞壁附近, 或形成细胞质带存在于液泡之间。此时细胞中细菌数量很少, 但均有自己的周膜。它们的核物质呈纤维状或团块状分散在细胞质中, 因而无明显的拟核区。这些细菌不仅浸有多聚磷酸盐颗粒, 也没有 PHB 颗粒, 即使刚从侵入线释放出来的细菌也是如此 (图版 I-3)。

随着侵染细胞逐渐发育成熟, 里面的细胞质越来越多。与此同时, 细菌也越来越多, 几乎充满了整个细胞。这些细菌也不含 PHB 颗粒, 只有偶尔有些例外, 即使如此, 一般也只有一个 (图版 I-4)。进一步发育时, 细胞中的小液泡相互融合而成为大的中央液泡, 并把细胞质及其里面的细菌挤向四周。尽管这样, 里面的细菌仍很少有 PHB 颗粒存在 (图版 I-5)。

当侵染细胞开始衰老时, 里面的细菌也出现明显的衰老症状, 如细菌周膜变大, 电子透明区加宽并含有数量不等的纤维状等物质。这些细菌都有自己的周膜, 结构也较清晰, 但有时有质壁分离现象。这些细菌几乎都含有 PHB 颗粒, 它们体积大小不等, 数量也不完全一样, 少的只有一个, 多的则有 4—5 个。PHB 颗粒既可存在于细菌细胞质的外周部分, 也可位于细菌的中央区域, 但有 PHB 颗粒出现的地方, 一般电子密度相对较低 (图版 I-6)。

当细菌进一步衰老时, 最引人注目的现象是它们的电子密度增高, 对比度下降, 结构显得不清楚, 某些部分甚至完全变为一团电子密度很高的物质。与此同时, PHB 颗粒大量增多, 有时一个细菌中多达 20 多个, 而且常常聚集在一起。虽然如此, 但 PHB 颗粒之间仍保持着自己完整性, 很少出现融合现象 (图版 I-7)。

当细菌严重衰老时, 它们的电子密度再度增高, 以致无法看清原有的结构, 而且细菌周膜出现断裂或缺失, 并在断裂处与邻近周膜融合在一块, 变为特大细菌周膜, 致使一个细菌周膜中常常多达 10 多个细菌。不过这种融合与细菌发育即将成熟时的融合不同, 不仅形成的细菌周膜不稳定, 会进一步解体, 而且它所包围的细菌结构很不清楚或者完全丧失。在这些细菌中虽然也有 PHB 颗粒存在, 但不是全部细菌, 只是其中一部分, 而且数量大大减少, 一般只有 1—2 个。虽然有些细菌含有较多的 PHB 颗粒, 但由于相互融合, 丧失了自己的完整性, 变为一团形状不规则, 体积较大的电子透明区 (图版 I-8)。

随着细菌周膜的解体, 原生质发生大量凝聚, 变为一些电子密度很高的团絮状物质。而后出现溶解, 整个细菌就变为一团杂乱无章的复合膜泡状结构。不管这些细菌解体程度如何, 它们中均无 PHB 颗粒 (图版 I-9)。

3 讨论

过去认为, PHB 颗粒在细菌发育过程中的变化有两种类型。一种为大豆型, 即胞间隙和侵入线中偶尔有 PHB 颗粒, 当这些细菌被释放到寄主细胞后, PHB 颗粒则随细菌发育程度的增加而增加, 最后占去细菌很大一部分体积^[6]。另一种是苜蓿型^[7], 其中包括三叶草^[8]和田菁^[9], 它们的特点是胞间隙和侵入线中的细菌有时有 PHB 颗粒, 细菌被释放到寄主细胞后仍含有这种内含物, 而后消失, 直到细菌衰老时又再度出现。后来作者发现豌豆根瘤与上不同, 虽然它的胞间隙和侵入线中的细菌也含有 PHB 颗粒, 有时甚至还有二个 PHB 颗粒的现象。奇怪的是当这些细菌被释放到寄主细胞后, 它们的 PHB 颗粒便立即消失^[10], 即使这些细菌已经衰老和解体, PHB 颗粒也不再出现^[11]。箭舌豌豆不仅侵染细胞中的细菌, 包括已经衰老和解体的细菌没有 PHB 颗粒^[4], 甚至胞间隙和侵入线中的细菌也不含这种物质^[12]。红豆草根瘤中细菌 PHB 颗粒的动态变化表明, 它既不属于大豆型和苜蓿型, 也不属于豌豆型和箭舌豌豆型, 则是一种与众不同的新类型, 或者说是到目前为止发现的第五种类型。由此可见, PHB 颗粒在根瘤细菌发育中的消长变化不仅随根瘤品种不同而异, 也与根瘤中细菌的发育程度有关, 更不是恒定不变的。

大豆、苜蓿、三叶草、田菁和豌豆及红豆草等根瘤中虽然都有 PHB 颗粒, 但彼此并不完全相同, 差异甚大。有的只有胞间隙和侵入线中的细菌含有这种内含物, 而侵染细胞中的细菌则无^[11]。有些虽然侵染细胞中的细菌含有 PHB 颗粒, 但只有在个别根瘤中它们是存在于幼龄、成熟和衰老细菌里面^[6], 更多的则是存在于幼龄和衰老细菌中^[7-9], 或者只位于衰老细菌里面。一般认为, 根瘤品种很多, 固氮活性也不一样, 但它们的固氮活性都与细菌的发育程度紧密相关, 即胞间隙和侵入线中的细菌没有固氮活性, 进入侵染细胞中的幼龄细菌也没有固氮活性, 或者活性很低。只有当细菌发育成熟(类菌体)后, 它们的固氮活性才达到高峰, 而且由于此时侵染细胞急剧变大, 细菌体积和数量迅速增加, 所以需要的能量也最多^[1]。以后随着细菌的衰老和解体, 固氮活性越来越弱, 需能也越来越少。由此不难发现, 在根瘤细菌发育过程中, PHB 颗粒的增加或减少没有一个共同的规律, 与侵染细胞的固氮活性和能量需要也无明显的联系。因此, 作者再次认为豆科根瘤中细菌 PHB 颗粒的生理作用与细菌固氮时电子和能量供应有关的观点值得商榷, 至少它与固氮没有必然联系, 否则对豌豆和箭舌豌豆一类侵染细胞中没有 PHB 颗粒的固氮根瘤的固氮作用就难以作出令人满意的解释。

在红豆草根瘤的相邻细胞中, 常常有的含 PHB 颗粒较多, 有的较少, 有的甚至没有。不仅如此, 即使在同一细胞的细菌中也有类似现象。这种现象广泛存在于从即将成熟一直到衰老乃至解体细菌中。作者认为所以如此, 除了切片位置不同外, 发育不同步可能是一重要因素。

致谢 王双同志洗印图版照片, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Werner D, Morschel E. *Planta*, 1978, 141: 169—177.

- [2] Graig A S, Grunwood R M, Williamson K I. *Arch Microbiol*, 1973, **89**: 23—32.
- [3] Wong P P, Evans H J. *Plant Physiol*, 1971, **47**: 750—755.
- [4] 韩善华. 微生物学报, 1992, **32**: 42—46.
- [5] 韩善华. 植物学报, 1990, **32**: 809—811.
- [6] Basset B, Goodman RN, Novacky A. *Can J Microbiol*, 1977, **23**: 573—582.
- [7] Patel J J, Yang A F. *Can J Microbiol*, 1981, **27**: 36—43.
- [8] Grouret J P, Fernandez-Arias H. *Can J Microbiol*, 1974, **20**: 1169—1181.
- [9] 荆玉祥, 张宝田. 植物学报, 1988, **30**: 207—209.
- [10] 韩善华, Yang A F. 实验生物学报, 1987, **20**: 13—21.
- [11] 韩善华, Yang A F. 植物学报, 1988, **30**: 124—128.
- [12] 韩善华. 实验生物学报, 1991, **24**: 175—179.

CHANGES OF PHB GRANULES DURING THE BACTEROIDAL DEVELOPMENT IN *ONOBRYCHIS VICIAEFOLIA* NODULES

Han Shanhua

(Cell Biology Laboratory, Sichuan Normal University, Chengdu 610066)

Zheng Guochang

(Cell Biology Laboratory, Lanzhou University, Lanzhou 730000)

Abstract Only very few bacteria contain PHB granules in the intercellular spaces and the infection threads of *Onobrychis viciaefolia* nodules and usually is one in a bacterium. After the bacteria are released from their infection threads to host cells, the PHB granules disappear. The young bacteroids in infected cells do not contain PHB granule, the mature bacteroids in infected usually also do not contain PHB granule, when the bacteroids start senescence, PHB granules appear in the bacteroids again and quickly increase, sometimes they even reach to more than 20, and they can fuse each other and form some larger irregular electron transparent spaces. Then the PHB granules rapidly decrease until they completely disappear. We never find that the PHB granule appear in the disintegrated bacteroids which may be different in disintegration degrees. The changes of PHB granules during the development of the bacteroids in *Onobrychis viciaefolia* nodules show the PHB granules in the bacteroids are not a constant, on the contrary, they are not only close relation with the bacteroidal development in the nodule but also are affected by the nodule variety.

Key words *Onobrychis viciaefolia* nodule, Bacteroid, Development, PHB, Change