

## 箭舌豌豆根瘤液泡中细菌周膜来源的研究\*

韩善华

(四川师范大学细胞生物学研究室 成都 610066)

**摘要** 电镜观察结果表明, 幼龄箭舌豌豆根瘤侵染细胞的细胞质较少, 中央是一些体积较大的液泡。细胞质中侵入线经常可见, 由侵入线释放出来的细菌均有细菌周膜。这些细菌只位于细胞质中, 不出现在液泡里面。成熟根瘤中的侵染细胞与此不同, 它们中有大量的成熟侵染细胞, 细胞质丰富, 里面充满大量细菌, 中央常有一个大液泡。当中央液泡发育到一定程度时, 位于其附近的细菌可通过液泡膜内吞、液泡膜与细菌周膜融合及液泡膜破裂 3 种途径进入液泡, 后一种途径常伴有寄主细胞质。液泡中的细菌绝大部分裸露在外, 只有个别细菌具有细菌周膜且多位于液泡膜的破损处附近, 因此细菌周膜可能是原来就有的。

**关键词** 箭舌豌豆根瘤, 侵染细胞, 细菌周膜, 液泡膜, 液泡内含物

早在 1958 年, Bergersen 等<sup>[1]</sup>就指出, 细菌周膜与固氮有关。其后, Tu<sup>[2]</sup> 进一步指出, 细菌周膜是固氮的场所, 其固氮活性随单位体积内细菌周膜总的表面积增加而增加。最近, Day 等<sup>[3]</sup>甚至认为, 细菌周膜对通过它的离子及代谢产物有调节作用, 根瘤就是利用这种作用来控制固氮的。

作者在过去的工作中, 除了研究细菌周膜的功能外, 对其结构也极为重视, 如它在发育中的变化<sup>[4]</sup>, 与高尔基体<sup>[5]</sup>、内质网<sup>[6]</sup>的关系, 但研究得最多的是它的起源, 绝大部分学者认为它起源于寄主细胞质膜<sup>[7]</sup>, 也有学者认为它来自内质网<sup>[8]</sup>、核膜和边缘体<sup>[10]</sup>, 还有人称它是由液泡膜和液泡内含物形成的<sup>[11]</sup>。对于前几种观点已有不少评论, 目前争论基本解决。对于后一种看法提及的甚少, 未被广大学者所接受<sup>[12-15]</sup>, 故对此进行深入研究十分必要。

### 1 材料和方法

供试材料为箭舌豌豆的成熟根瘤及 0.5~2.0mm 的幼龄根瘤。取材和制样方法参照前文<sup>[16]</sup>进行。

### 2 结果

箭舌豌豆幼龄根瘤中的细胞主要是一些尚未发育成熟的侵染细胞。它们与一般豆科根瘤侵染初期的细胞类似, 细胞质较少, 主要位于细胞的外周部分。细胞质中侵入线随时可见, 大小形态不同, 分布位置各异。有的侵入线与寄主细胞壁和质膜紧紧连在一起, 有的则脱离寄主细胞壁存在于细胞质中(图版 I-1)。有的侵入线位于较大液泡附近, 有的

\* 国家自然科学基金资助项目。

本文于 1994 年 10 月 31 日收到。

甚至贴近液泡膜(图版 I-2)。这些侵入线发育程度差异很大,有的是刚刚形成,尚未向寄主细胞质释放细菌(图版 I-1);有的刚刚开始释放,其周围已有少量细菌(图版 I-3);有的释放时间较长,有较多的细菌存在于附近的细胞质中(图版 I-4)。由于侵入线不断释放细菌,以致寄主细胞质中的细菌越来越多,逐渐随细胞质从细胞外周部分向中心部分扩展(图版 I-5)。

幼龄根瘤侵染细胞的中央部分常有一些体积较大的液泡,它们或者彼此相连,或者被一些细胞质所隔开。液泡中有时有颗粒状和纤维状物质,偶尔也有数量不等、形状各异的膜状结构(图版 I-5)。在大量观察中,未发现细菌出现在这些液泡中(图版 I-1~5)。

成熟根瘤中也有一些刚被细菌侵染的细胞,主要位于侵入线入侵区域后端的早共生细胞区域中。它们的发育程度一般随离分生组织区域的距离增加而增加。这些细胞与幼龄根瘤中的侵染细胞相似,细菌密度较小,常有侵入线存在,有的侵入线还在向寄主细胞质中释放细菌(图版 I-6)。有的侵染细胞发育程度较高,表现出细胞质很多,几乎充满整个细胞,迫使中央部分的较大液泡消失,代之而起的是一些分散在细胞质中的小液泡。不仅如此,而且它们的细菌密度较高,线粒体和质体不呈随机分布,常常移到细胞的外周部分,或集中分布在胞间隙附近,此时的质体一般都含有淀粉粒(图版 II-7)。Newcomb<sup>[9]</sup> 在豌豆根瘤中也曾观察到这种现象。

成熟根瘤中除了部分幼龄侵染细胞外,它的里面还存在着大量的成熟侵染细胞,这些细胞主要位于晚共生细胞区域中。它们与幼龄侵染细胞不同,不仅细菌密度很大,形态更加多样化,中央液泡业已形成(图版 II-8)。当中央液泡继续变大时,液泡膜开始出现频繁的内吞现象,以致常常在液泡膜上形成一种由内吞而形成的突起。突起的外面是一层薄薄的液泡膜,里面是与寄主细胞质中完全一样的细菌。由于突起继续向液泡中央延伸,最后突起里面的细菌脱离寄主细胞质而游离在液泡中。用这种方式进入液泡的细菌不仅没有液泡膜包围在它的外面,而且原来具有的细菌周膜也已消失(图版 II-9)。

位于液泡膜附近寄主细胞质中的细菌,还可通过其细菌周膜与液泡膜相互融合而进入液泡。这种方式先是两种膜相互靠近,进而彼此融合。在融合膜解体后,原来存在于细菌周膜中的细菌就位于液泡中。由这种方式进入液泡的细菌也没有细菌周膜(图版 II-10)。

随着侵染细胞的发育,它的中央液泡变得越来越大,里面除含有数量不等的颗粒状和纤维状物质外,还常有一些细菌出现,有的甚至相当多。这些细菌与细胞质中的细菌明显不同,不但形态异常,结构模糊,它们中的绝大多数还没有细菌周膜(图版 II-11)。有时,液泡中没有颗粒状物质,而是一些体积较大,形状不规则的电子密度很高的物质。这种物质很可能是由颗粒状物质凝聚而成(图版 II-12)。在这些液泡中我们还发现,有的细菌虽然没有细菌周膜,但它们周围有一层类似电子透明区的电子密度很低的区域。在这些区域的边缘,有时有少量的膜片段或一圈小的颗粒状物质,有的还有小泡夹在其中。偶尔也有个别细菌与众不同,它们不仅形态正常,结构清晰,而且还具有完好的细菌周膜,以致它们与寄主细胞质中的细菌基本相同,彼此没有明显差异。这种类型的细菌分布也较特殊,它们一般不出现在液泡的中央部分,而且常常位于液泡膜附近,其中以液泡膜的破损处出现机率最高(图版 II-13)。

### 3 讨论

Prasal 等<sup>[17]</sup>在菜豆根瘤中观察到细胞质内有一些细菌没有周膜,同时发现核外膜能形成小泡,然后释放到细胞质中,再与液泡膜融合,并将附近没有细菌周膜的细菌包围起来,从而形成细菌周膜。作者在箭舌豌豆根瘤正常发育的侵染细胞中没有看到细菌无细菌周膜的现象,更未观察到核外膜和液泡膜能形成细菌周膜。Newcomb<sup>[18]</sup>认为,Prasal 等人所描述的上述现象并非客观存在,而是由于结构保存不好所致。

作者对箭舌豌豆幼龄根瘤中发育正常的侵染细胞进行了大量观察,虽然它们中有数量不等、大小不同、形态各异的液泡,而且有时液泡中也有颗粒状和纤维状物质,偶尔也有膜状结构,但始终未发现液泡中有细菌存在的现象,更未观察到一些液泡内含物附着在细菌表面,然后压缩成膜,变为包围在细菌外面的细菌周膜。

成熟根瘤,特别是成熟根瘤中的成熟侵染细胞与幼龄根瘤不同,当它们的中央液泡发育到一定程度时,其中常含有细菌,有时数量还很多。这些细菌绝大部分没有细菌周膜,只有个别细菌偶尔有些例外。这些液泡中的细菌有无细菌周膜主要与两个因素有关。一是细菌的形态结构。具有细菌周膜的细菌形态结构正常,与寄主细胞质中发育正常的细菌几乎完全一样;周围没有细菌周膜,但有电子密度较低区域的细菌虽然内部结构不十分清晰,但形态结构的轮廓依然存在;既无细菌周膜又无电子透明区的细菌不仅外部形态异常,内部结构也模糊不清,有的甚至明显解体,变为一些电子密度较低的区域。二是与细菌在液泡中的位置有关。有细菌周膜的细菌,特别是一些具有完好细菌周膜的细菌一般都靠近液泡膜,特别是液泡膜的破损处附近,很少存在于液泡的中央部分,可见它们可能是由破损处进入的。

寄主细胞质中的细菌都有细菌周膜,液泡中的细菌又都来自寄主细胞质中,但为何它们常常只有个别细菌才具有细菌周膜? 作者的看法是,一部分细菌没有细菌周膜是由于它们在进入液泡时其周膜已与液泡膜相互融合,变成了液泡膜的一部分;另一部分细菌虽然是从液泡膜的破损处进入的,进入时的确具有细菌周膜,但由于进入液泡后受到液泡液中有关水解酶的作用,它们的周膜逐渐被降解,致使细菌周膜出现局部断裂,进而断裂处增多,变为一些小的片段,小段卷曲变为小泡,严重降解者则完全消失。酶对底物的作用与时间有关,细菌进入液泡的时间越早,在液泡中停留的时间越长,细菌及其周膜的降解就越严重。因此,液泡中只有个别细菌具有细菌周膜,而且这些细菌形态结构正常,或者基本正常,它们可能是刚进入液泡,或进入液泡时间不太长的细菌。

致谢 王双同志洗印图版照片,特此致谢。

### 参 考 文 献

- [1] Bergersen F G, Briggs M J. *J Gen Microbiol*, 1958, 19 (4): 482~490.
- [2] Tu J C. *Phytopathol*, 1975, 65 (3): 447~454.
- [3] Day D A, Price G D, Udvardi M K. *Aust Plant Physiol*, 1989, 16(4): 525~536.
- [4] 韩善华,郑国银. 微生物学报,1989,29(6): 413~417.
- [5] Robertson J G, Lyttleton P, Bullivant S et al. *J Cell Sci*, 1978, 30 (1): 129~149.

- [6] 韩善华. 植物学报, 1990, 32(10): 809~811.  
 [7] 韩善华. 植物学报, 1991, 33(8): 610~613.  
 [8] Newcomb W. *Can J Bot*, 1976, 54 (12): 2163~2186.  
 [9] Jordan D G, Crinyer I, Coulter W H. *J Bacteriol*, 1963, 86 (1): 125~137.  
 [10] Generozova I P. *Fiziol Rass*, 1979, 26(6): 788~792.  
 [11] 唐佩华, 张宝田, 简令成. 植物学报, 1980, 22(2): 103~107.  
 [12] Newcomb W. *Int Rev Cytol*, 1981, 13 (Supplement): 249~297.  
 [13] Sutton W D. Nitrogen Fixation. Oxford: Clarendon Press, 1983. 144~212.  
 [14] Domigan N M, Farnden K F, Robertson J G *et al*. *Arch Biochem and Biophys*, 1988, 264 (4): 564~573.  
 [15] Both L E, Stacy G. *Eur J Cell Biol*, 1989, 49(1): 13~23.  
 [16] 韩善华. 微生物学报, 1992, 33(1): 42~46.  
 [17] Prasal D F, De Deepesh N. *Microbiol*, 1971, 4(1): 13~20.  
 [18] Newcomb W, Creighton S, Latta L. *Can J Bot*, 1981, 59 (9): 1547~1552.

## STUDY ON THE ORIGIN OF PERIBACTEROID MEMBRANE OF BACTERIODS IN VACUOLES IN *VICIA SATIVA* ROOT NODULES

Han Shanhua

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

**Abstract** The infected cells in young *Vicia sativa* root nodules possess a small amount of cytoplasm, their central parts are some larger vacuoles. Infection threads in host cytoplasm are often observed, they usually contain some bacteria and continuously release them to host cytoplasm, but the bacteroids only are to appear in host cytoplasm, never in vacuoles and the bacteroids all possess peribacteroid membranes which come from their infection thread membranes. Mature root nodules do not differ from young root nodules, they contain a large quantity of mature infected cells which possess abundant cytoplasm and many bacteroids, larger vacuoles have disappeared, some smaller vacuoles have appeared. Accompanying the development of infected cells, smaller vacuoles start fusion each other, finally they become into some large central vacuoles. When the central vacuoles further develop to certain degree, some bacteroids in host cytoplasm enter central vacuoles by three formations, namely tonoplast endocytosis, fusion of tonoplast with peribacteroid membrane and tonoplast break, last one often companies with some host cytoplasm. Absorbute majority of bacteroids in central vacuoles do not possess peribacteroid membranes, only individual bacteroids have the structure and the better the peribacteroid membrane is the clearer the structure of the bacteroid is. The bacteroids with peribacteroid membrane often locate near the break places of tonoplast, they usually not in the central parts of the central vacuoles. Therefore, peribacteroid membrane may be originally possessive but not formed in vacuole.

**Key words** *Vicia sativa* root nodule, Infection thread, Peribacteroid membrane, Tonoplast, Vacuole inclusion