

## 沙棘根瘤内生菌的多型性

张吉科 张小民

(山西大学生命科学系 太原 030006)

陆锡芳

(河南省云阳蚕业实验场 云阳 474676)

张国伟

(大同第二制药厂 大同 037000)

**摘 要** 用透射电子显微镜观察了春、夏、秋、冬四个季节的沙棘根瘤,以及瘤瓣上、中、下三个部位。结果表明,不同季节,不同部位的瘤瓣内,根瘤内生菌有 7 种不同形态。即侵染菌丝体、繁殖菌丝体、营养菌丝体、春孢子及春孢子囊、泡囊、冬孢子及冬孢子囊和类菌体。在多年生珊瑚状的根瘤中,它们的世代交替是:春夏季以侵染菌丝、繁殖菌丝、营养菌丝、春孢子囊及春孢子、泡囊为主;秋冬季以衰退的营养菌丝、衰老泡囊、冬孢子囊和冬孢子、类菌体为主。冬孢子和类菌体是休眠体。

**关键词** 沙棘,根瘤, *Frankia*, 多型性

1964 年 Becking<sup>[1]</sup>首次用透射电镜观察到桉木根瘤内生菌的超微结构,并指出它们属放线菌。1977 年 Becking<sup>[2]</sup>又通过根瘤切片确认,非豆科木本植物根瘤是由放线菌目中的 *Frankia* 菌共生引起的。1970 年 Catner 等<sup>[3]</sup>观察了沙棘根瘤内生菌的超微结构后指出,内生菌在形态上有菌丝、泡囊和类菌体。泡囊是菌丝顶端膨大而形成的。并进一步讨论了菌丝和泡囊的超微结构特征。1973 年 Cardner<sup>[4]</sup>等研究了沙棘根瘤泡囊的形成与发育过程。1974 年 Мийсменко<sup>[5]</sup>等明确指出沙棘根瘤内生菌是多形态的。1976 年 Gardner<sup>[6]</sup>在透射电镜下看到沙棘根瘤内有冬孢子囊和冬孢子。1979 年 Андреева 等<sup>[7]</sup>指出越冬后干枯了的菌丝颗粒(类菌体)是内生菌再侵染的形态。1982 年 Shipton<sup>[8]</sup>、1984 年杜大至等<sup>[9]</sup>从沙棘根瘤中分离出 *Frankia* 菌并回接成功,同时看到了菌丝、泡囊、冬孢子和类菌体。1982 年 Андреева 等<sup>[10]</sup>指出泡囊数与活力和固氮力呈正相关。作者近来通过透射电镜又看到了不同形态与功能的菌丝体、春孢子囊和春孢子。并对 *Frankia* 菌的多型性进行了讨论。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

在沙棘不同生长季节,分别于 1992 年 10 月 18 日,1993 年 1 月 22 日、4 月 18 日、7 月 2 日,1995 年 5 月 9 日取样于山西省岚县河滩地(海拔 1200m、东经 111°40′02″,

本文于 1995 年 11 月 10 日收到。

北纬  $38^{\circ}16'04''$ ) 20~30cm 根层中春、夏、秋、冬四种瘤。立即固定于 5% 戊二醛 (0.1mol/L 磷酸盐缓冲液) 中备用。

## 1.2 方法

用 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液冲净材料上戊二醛后,再用含 1% 纤维素酶加 1% 果胶酶, 30℃ 酶解 0.5h。然后将瘤瓣切成上、中、下三个部位。室温下 1% 锇酸后固定 2h, 乙醇逐级脱水, 到 70% 时, 用饱和醋酸铀染色 12h, 最后丙酮梯度置换, Epon812 包埋, 瑞典 LKB 2088 BROMMA ULTROTOME-V 超薄切片机切片, 醋酸铀、柠檬酸铅双染, JEM-100CX II (日) 透射电镜观察照相。

## 2 结果

### 2.1 春瘤内生菌的形态特征

从春瘤瘤瓣顶部近分生区超薄切片看到, 侵染菌丝是通过穿越细胞壁向新宿主细胞侵入 (图版 I-1), 正在穿壁的菌丝被包埋在壁内, 菌丝周围细胞壁有局部加厚现象, 菌体电子密度较高, 并有一层被囊包着。侵入新宿主细胞的菌丝是通过宿主细胞原生质“桥”向核附近凝集原生质区侵入 (图版 I-2)。在凝集原生质区内侵染菌丝转变为繁殖菌丝, 其特点是缢缩断裂方式繁殖 (图版 I-3)。侵染与繁殖菌丝最明显特征是整个菌丝体电子密度很高, 看不到内部结构。某些繁殖菌丝一端膨大, 形成一个中空的泡 (图版 I-4), 甚至整个被侵染的宿主细胞内的繁殖菌丝都通过这种方式形成了含有 2~6 个春孢子的春孢子囊 (图版 I-5)。而在同一被新侵染的细胞中, 个别繁殖菌丝一端膨大, 形成了内含中等电子密度的颗粒物质, 并有中间体存在的幼龄泡囊 (图版 I-6)。

### 2.2 夏瘤内生菌的形态特征

在夏瘤的中、上部瘤瓣的超薄切片中看到, 整个被侵染的细胞完全被营养菌丝和泡囊的复合体所占据 (图版 I-7)。营养菌丝的特征是有明显的分隔与分枝, 每个分隔内能看到一些小液泡、颗粒体和拟核物质, 整个菌丝电子密度较低, 被囊很明显。和春瘤中初生的幼龄泡囊相比, 成熟的泡囊被多条电子密度较低的细线分割成单独的不规则的小区, 小区内有电子密度高的物质, 并可看到有拟核区。成熟泡囊进一步发育产生了明显的质壁分离。这可能是泡囊成熟表现出的标志。

### 2.3 秋瘤内生菌的形态特征

从秋瘤的上、中部瘤瓣超薄切片看到, 菌丝和泡囊都表现出显著的衰老 (图版 I-8)。菌丝空泡化程度增加, 内含小泡和颗粒大部分消失, 细胞质有局部凝聚现象。泡囊衰老更为明显, 泡囊质壁分离程度增加, 泡囊内分隔线变粗、模糊, 内含物减少, 有些泡囊内含物大量消失, 甚至变成一个空腔。这表明泡囊的死亡。

### 2.4 冬瘤内生菌的形态特征

从冬瘤的上、中部瘤瓣的超薄切片上看到, 菌丝和泡囊都失去了原来固有的形态 (图版 I-9), 菌丝大都凝缩断裂成杆状、颗粒状或不规则状的类菌体。类菌体的特征是被囊明显加厚, 液泡完全消失, 胞质浓缩成丝、块状, 并凝聚在一起, 所有类菌体都不同程度地产生了轻微质壁分离。泡囊不仅干枯皱缩变形, 而且分隔细线变松, 变粗, 形态模糊, 内含物分散凝聚, 甚至产生空泡。

在冬瘤瘤瓣的上、中部切片中还看到了冬孢子囊和冬孢子(图版 I-10)。它们和春孢子明显区别是孢子囊内有柳叶状高电子密度聚集区,发育成熟的孢子呈椭圆型,质地硬而脆,以至于在切片时将其部分结构切掉(图版 I-11)。

### 3 讨论

作者所看到的沙棘根瘤内 *Frankia* 菌的再侵染过程和 Berry<sup>[11]</sup> 观察 *Frankia* 菌对桉木根毛侵染过程有着十分相似之处。被侵染的细胞壁能迅速形成不规则的电子密度中等的沉积物(deposit),这些沉积物不仅局部加厚了侵染位点及附近的细胞壁,而且也迅速转移到菌体上形成了菌体终身最外层保护结构——被囊(encapsulation)。被侵染的细胞在菌体未侵入细胞前就迅速转变成传递细胞<sup>[4, 11, 12]</sup>。侵染菌丝沿胞质桥进入新侵染的细胞是作者首次看到的。宿主细胞细胞质凝聚在核周围,可能是为侵入菌丝提供充足的营养有关。

从不同季节的根瘤中作者看到有四种不同形态与功能的菌丝体,即侵染菌丝、繁殖菌丝、营养菌丝和类菌体。侵染菌丝和繁殖菌丝在外观上都是电子密度很高的杆状体。它们主要区别在于前者小,后者大。繁殖菌丝体由于获得了宿主胞质营养而迅速生长。营养菌丝体特点更为明显:体积大,整个菌体电子密度降低,胞质分化出液泡和颗粒体,菌体有明显分隔和分枝,具有形成泡囊<sup>[3]</sup>和类菌体的功能。类菌体是成熟菌丝体在遇不良条件时保存生命的休眠体,它是越冬后萌发为新侵染菌丝体的基础<sup>[7]</sup>。

春孢子囊和春孢子是作者首次看到的(图版 I-5),它只发生在春瘤瘤瓣顶部近分生区中皮层刚被侵染的细胞内,是由分裂菌丝体分化而成。它的存在可能是侵染分裂后的菌丝体复壮的一条重要途径。它可以不经休眠便萌发为新的菌丝体。因为在春瘤瘤瓣的中、下部和夏、秋瘤中没有看到春孢子的存在。这个问题还有待于进一步研究。

泡囊是固氮场所<sup>[13]</sup>。泡囊除营养菌丝由顶端膨大而形成外<sup>[3]</sup>,作者看到它还可以由刚分裂后的菌丝体一端膨大而形成(图版 I-6)。有人报道<sup>[5]</sup>,泡囊也可以分化为类菌体。而其他学者<sup>[3, 4, 7]</sup>和作者大量观察结果看到,泡囊通过衰老而解体,转变为类菌体的可能性较小。

冬孢子囊和冬孢子是营养菌丝体遇不良条件下分化的休眠体,它可以萌发为新的菌丝体。

综上所述,在多年生沙棘珊瑚状的根瘤中,*Frankia* 菌的多型性表现为:春夏季被侵染的根瘤细胞中,以侵染菌丝、繁殖菌丝、春孢子囊和春孢子、营养菌丝和泡囊组成的复合体为主;秋冬季又以衰老的营养菌丝、衰退泡囊、冬孢子囊和冬孢子、类菌体组成的复合体为主。它们之间在世代交替中的关系尚需进一步研究。

**致谢** 电镜照片由中国核防护研究院电镜室赖炽香先生协助拍照,特此致谢。