

# 茄子及西红柿诱发根瘤内生菌的观察研究

郭永军<sup>\*</sup> 王毅岩

(北京六合新星生物技术有限公司中国 G 实验室, 北京 100832)

## ENDOPHYTIC BACTERIA IN INDUCED ROOT NODULES ON EGGPLANT AND TOMATO

Guo Yong-jun Wang Yi-yan

(Beijing Liuhe Newhope Bio-tech CO., LTD, G-laboratory, Beijing 100832)

关键词 诱发根瘤, 超微结构, 固氮菌, 共生体系

中图分类号 Q939.11<sup>+</sup>4

人工诱发非豆科经济作物结瘤固氮是国际生物工程领域的尖端课题, 目前国内外尚未见成功的先例。中国 G 实验室开展此项研究工作已有 15 年历史。大量实验表明, G 式复合生物菌肥是一种新型、无公害的生物肥料, 它能使作物增产、优质和改善生态环境, 在一定条件下尚能使 130 多种植物形成根瘤。为了进一步弄清在人工条件下自然诱发根瘤的形成、结构、功能以及微生物与植物共生所产生的生理作用, 我们以中国 G 实验室诱导的茄子、西红柿根瘤为材料, 用光学显微镜、透射电镜和扫描电镜对根瘤的超微结构及其内生菌进行了观察研究, 发现有两种自生固氮菌在根瘤内与植物共生, 形成了新的共生体系。目前, 这项研究工作国内外均未见报道。

## 1 材料和方法

根瘤样品分别于 1998 年 3 月、7 月、8 月三次采自中国 G 实验室诱导的茄子、西红柿根系。

### 1.1 光学显微镜制片

1.1.1 石蜡切片 新鲜根瘤样品用清水充分洗涤, FAA 溶液固定。石蜡包埋, 切成 34 μm 厚的切片, 乙醇逐级脱水, 二甲苯透明。脱蜡后分别用 1% 赤藓红和亚甲基绿对染。切片用加拿大树胶永久封固, 以供镜检。

1.1.2 根瘤涂片 将洗净的根瘤用 4 mmol L<sup>-1</sup> HgCl<sub>2</sub> 灭菌 10min, 再用无菌水冲洗。切去多余部分, 只留侵染细胞比较集中的部位备用。在干净的载玻片上滴加无菌生理盐水一滴, 将修好的根瘤块挤出汁液, 与水滴混合均匀, 涂片后自然风干。滴加 1% 刚果红溶液, 风干后再滴加 95% 盐酸酒精供镜检。

<sup>\*</sup> 通讯地址: 北京西城区阜城门外大街 34 号, 北京 100832

收稿日期: 2000-05-17; 收到修改稿日期: 2001-03-20

### 1.2 扫描电镜制片

用毛吸管吸取少量菌悬液,滴到带有 Formvar 膜的微型盖玻片上,自然干燥后用等电胶固定在直径为 1cm 的铜样品台上,喷涂后立即观察。同时用根瘤横切面喷涂,对内生菌在根瘤组织内的分布进行观察。扫描电镜为 JSM-35C 型(日本)。

### 1.3 透射电镜制片

根瘤洗净后,选侵染细胞集中的部位修成 1mm 见方的方块,用戊二醛和饿酸双重固定,EPON812 包埋,切 0.05 $\mu$ m 厚的超薄切片,固定在带有 Formvar 膜的微型铜网上,经醋酸双氧铀、柠檬酸铅染色。透射电镜为 JEM-100X 型(日本)。

## 2 结果和讨论

### 2.1 根瘤中的侵染细胞

根瘤切片在光学显微镜下,可以看到许多被内生菌侵染的细胞。大量的菌体被赤藓红染成红色,而植物组织却被亚甲基绿染成浅绿色,在显微镜下十分醒目(图版 I, 3)。这些侵染细胞是内生菌和寄主植物进行共生的场所。侵染细胞比较膨大,大都集中在根瘤皮层组织中,特别是外皮层尤为明显。许多侵染细胞内充满了圆形的球菌(图版 I, 4)。中柱为厚壁细胞和导管细胞所组成,其中也有许多膨大细胞,这些细胞的大小是其周围正常细胞的几十倍。有时这些膨大细胞互为比邻,其内部充满了短杆状细菌和一些球菌的孢囊(图版 I, 5)。这些杆菌在高倍镜下看得十分清楚(图版 I, 6)。在整个观察研究中,我们注意到,短杆菌不仅在中柱厚壁细胞中存在,它也生活在皮层的薄壁细胞中(图版 II, 1)。而球菌不仅在皮层薄壁细胞中普遍存在(图版 II, 3),而且在中柱厚壁细胞中它也大量存在(图版 II, 4)。

### 2.2 细胞中的短杆菌

根瘤切片在油镜下观察,可以清楚地看到在膨大的中柱细胞和部分薄壁细胞中存在大量的杆菌。在细胞壁或球菌孢囊的附近常可见到大的菌群(图版 I, 5)。这些杆菌大都单个存在,很少有两个以上的长链。菌体形态为圆端短杆形。大小(0.5~0.7) × (0.8~1.3) $\mu$ m(图版 I, 6)。透射电镜观察,所见菌体形态与上述相同(图版 II, 1)。因制片过程中未做鞭毛染色,故在观察中未见鞭毛。这种杆菌经分离后,可在修改的伯克(Burk)氏无氮培养基上生长。菌落白色,半透明,呈凸起状。菌体形态与细胞内生长的短杆菌一样。但该菌在无钼加钒的培养基上不生长。在蛋白胨琼脂平板上也不生长。生长和固氮不需要钙。过氧化氢酶阳性。从菌落和菌体形态以及生理生化特性上考察,经过详细地检索,认为这种短杆菌是拜叶林克氏菌属(*Beijerinckia* Derx 1950)的一种固氮菌。

### 2.3 细胞中的球菌

在根瘤内,球菌分布在从皮层到中柱的各种细胞中,根瘤切片在光学显微镜下观察,可见许多圆球形的菌体在皮层细胞内分布(图版 I, 3)。菌体圆形,表面光滑,直径约 2~8 $\mu$ m,一般 5 $\mu$ m 左右。呈单个、成对或不规则的堆团状分布(图版 II, 2)。由于分裂和生长过程中的挤压,许多菌体表面有多处凹陷,形成明显的多形态(图版 I, 4)。涂片观察,可见菌体的形态、大小和分裂状态(图版 I, 7)。在扫描电镜下,可以看到球菌的各种生长、繁殖状态:单个细胞、成对和不规则堆团;两两分裂;三、四个细胞呈链状由少量细胞膜

连接, 或者呈四垒球形。应当指出四个以上的细胞链在观察中是很少见的(图版 II, 2, 5)。在菌体十分拥挤的堆团中, 可以看到菌体细胞充分利用空间长成各种形态, 有的菌体长达十几  $\mu\text{m}$ 。可以充分观察到, 这种球菌具有明显的多形态性(图版 II, 6)。在观察中, 未见该菌产生芽孢和鞭毛。分离后可在伯克氏无氮培养基上生长, 好气, 形成突起的无色及暗褐色菌落。生长初期的菌体为长圆形(1.5~2.5)  $\times$  (3~6)  $\mu\text{m}$ , 周生鞭毛, 能运动, 以后逐渐形成圆形或 8 字形, 失去鞭毛, 形成孢囊和荚膜粘液。菌体直径 5  $\mu\text{m}$  左右。革兰氏染色阴性, 过氧化氢酶阳性。可在去铝加钒的培养基上生长, 可以利用淀粉作唯一碳源。

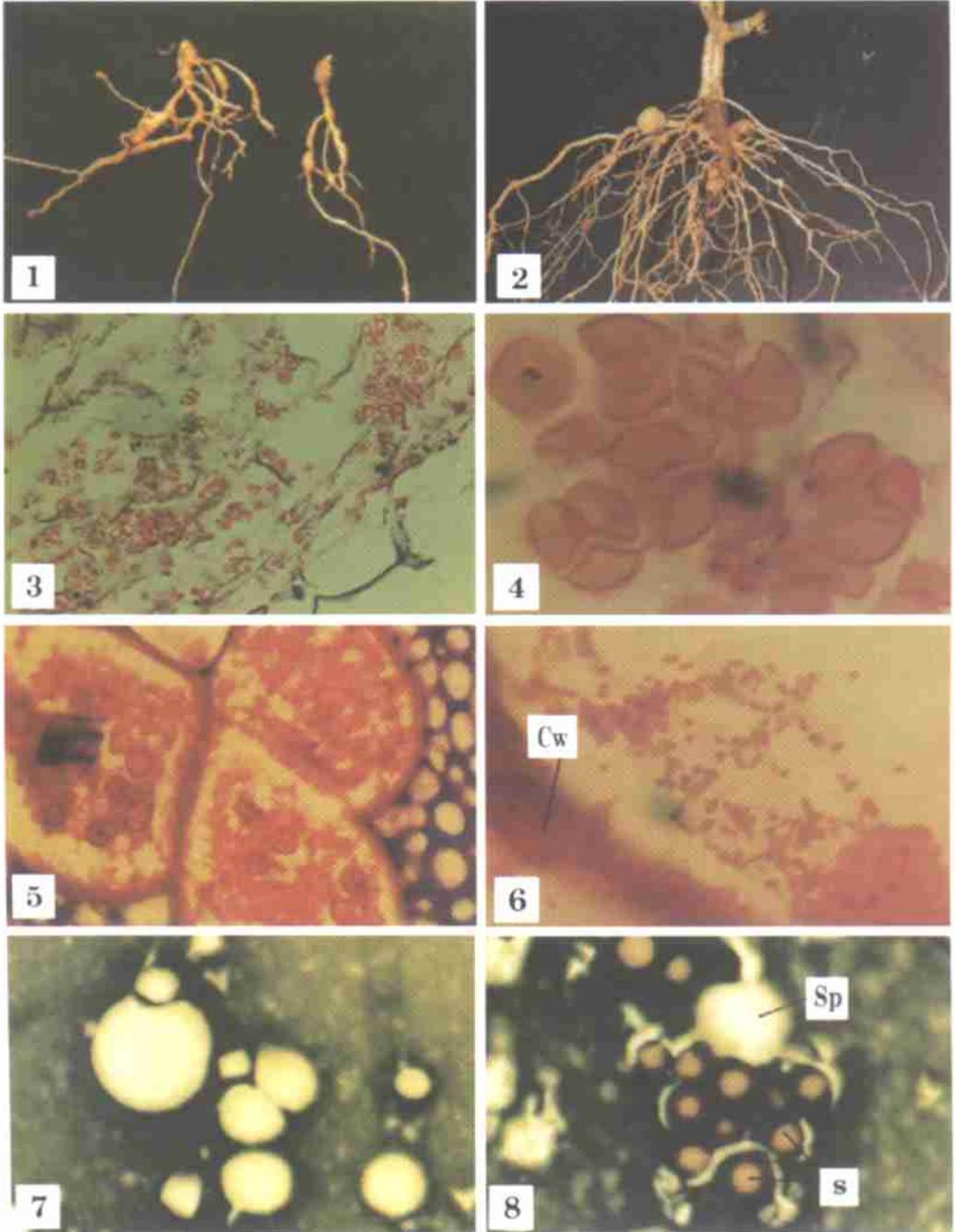
## 2.4 孢囊和孢囊孢子

球菌不但可以分裂繁殖, 而且可以进一步生长发育。在不同环境下, 形成大小不等、形态各异的孢囊。孢囊内形成大小不同的孢囊孢子。成熟的孢囊破裂后放出孢子(图版 I, 8)。这些孢子又可发育成新的球菌。在扫描电镜观察中, 可以看到孢囊的不同形态。其表面比较光滑, 成熟孢囊内的孢子隐约可见(图版 II, 7)。在透射电镜下, 不仅可以看到大小、形态不同的孢囊和囊内孢子的形态、分布, 而且可以看到孢囊的厚壁(图版 II, 8)。从扫描和透射电镜考察, 孢囊呈圆形或不规则的长圆形, 表面比较光滑, 直径约 3~20  $\mu\text{m}$ , 一般十几  $\mu\text{m}$ , 长圆形孢囊最长可达 30  $\mu\text{m}$ 。孢子呈圆球形, 无色透明, 表面光滑, 有时由于挤压而产生凹陷, 在涂片观察时可被刚果红染成淡紫色, 直径 1~3.5  $\mu\text{m}$ , 一般 2  $\mu\text{m}$  左右(图版 I, 8)。通过透射电镜, 可见孢囊具有较厚而且界线十分清楚的细胞壁, 壁的外侧与寄主细胞的原生质紧密相连, 壁厚在 0.2~0.3  $\mu\text{m}$ (图版 II, 8)。在孢囊内部, 除孢子外, 细胞质中还均匀地分布一种物质, 这种物质对铅和铀的亲合力很强, 故细胞质被染成黑色, 与寄主植物的细胞质对铅、铀的亲合力形成极大的反差。这与弗兰克氏菌的固氮孢囊作透射电镜观察时出现的情况极为相似<sup>[1]</sup>。是否孢囊内也含有固氮酶, 这个问题尚需采用组织化学的方法<sup>[2]</sup>进一步研究。

## 3 结论

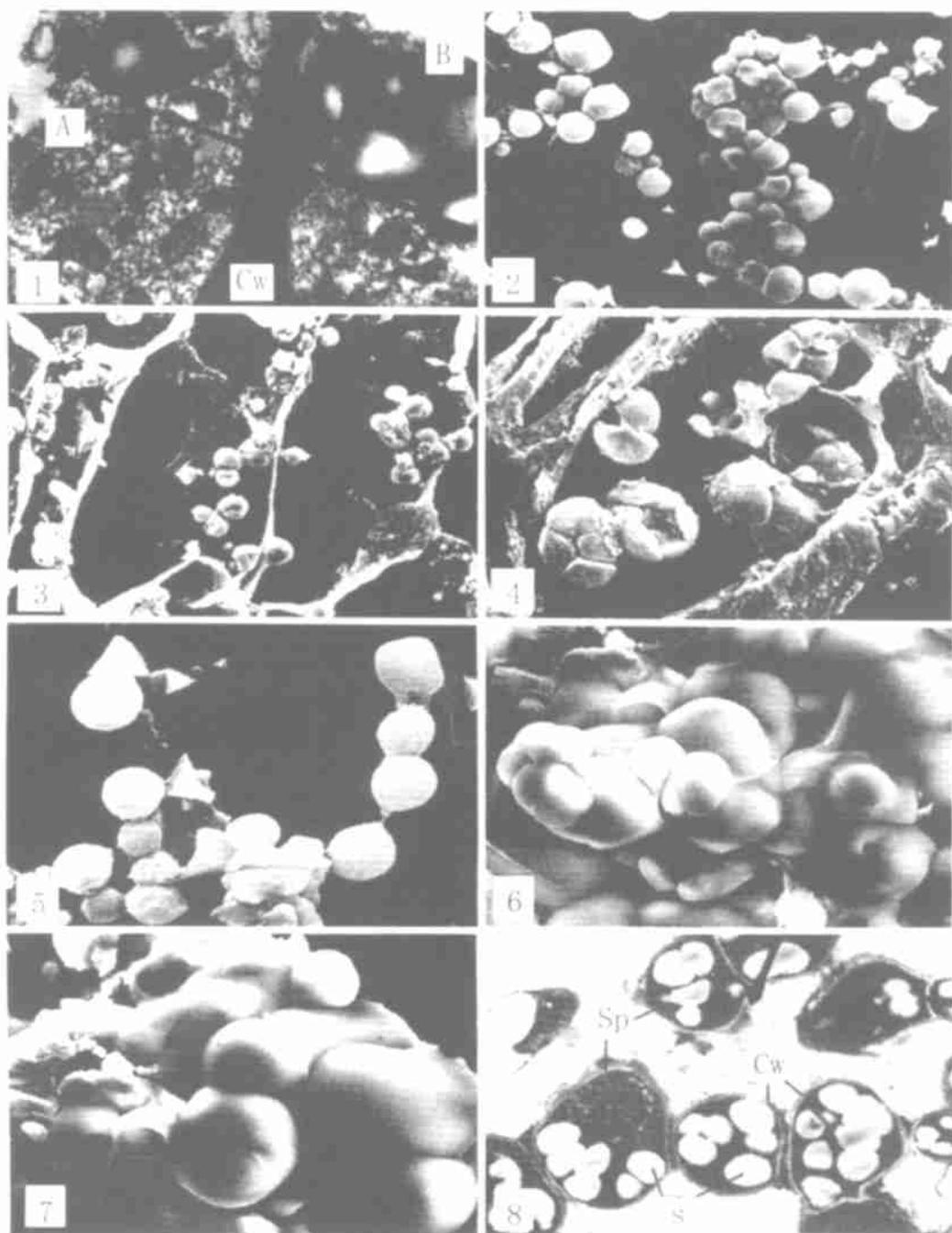
茄子、西红柿两种茄科植物的诱发根瘤中, 有两种形态不同的细菌与植物共生。两种菌经分离, 均可在无氮培养基上生长。通过对菌体形态和菌落形态的观察以及生理生化特性的研究, 在对有关资料<sup>[3,4]</sup>的检索、分析认为, 杆菌是拜叶林克氏菌属(*Beijerinckia* Derx 1950)的一种固氮菌。球菌是固氮细菌属(*Azotobacter* Beijerinck 1901)中的模式种褐球固氮菌(*Azotobact Chroococcum* Beijerinck 1901)。两种菌, 特别是球菌, 不仅在膨大的根瘤中存在, 而且在许多、特别是幼嫩的根中早已侵入, 而且使皮层细胞及许多中柱细胞膨大, 在未形成根瘤前就已开始共生。这通过根的切片和涂片观察已经证实。随着这些内生菌的生长繁殖和植物的生长发育, 许多根形成中部或末端膨大的膨大根。也有些根形成球状或串球状的根瘤。随着植物的进一步生长发育, 根瘤也在不断增大。幼根上的根瘤直径 1~2  $\mu\text{m}$ , 而老根上的根瘤直径可达 10mm 以上。还有些根则在根段上形成瘤状物(图版 I, 1, 2)。细胞的膨大乃至根瘤的形成, 是共生的结果。它为入侵的内生菌创造了新的栖息环境。植物细胞为内生菌提供了碳水化合物、维生素和矿质元素, 而微生物的生长繁殖及其代谢产物刺激了植物的生长并为其提供了一定的营养, 因而使新的共





Cw: 细胞壁 Sp: 孢囊 S: 孢子

1. 茄子根瘤 2. 西红柿根瘤 3. 根瘤皮层感染细胞×200 4. 细胞中的球菌×1000 5. 中柱感染细胞×200 6. 细胞中的杆菌×1000 7. 球菌×1000 8. 孢囊释放出孢子



A: 杆菌 B: 球菌 Cw: 细胞壁 Sp: 孢囊 S: 孢子

1. 细胞中的杆菌和球菌×8000 2. 球菌堆团×1300 3. 皮层细胞中的球菌×700 4. 中柱细胞中的球菌×2400 5. 分裂中的球菌×2400 6. 拥挤状态下的球菌堆团×2000 7. 孢囊×2000 8. 孢囊中的孢子×4000