

根瘤菌在寄主细胞内的分化及存活性

曹燕珍 周俊初 陈华癸

(华中农学院土壤化学系, 武汉)

摘 要

本文证明在快生型紫云英、苜蓿、三叶草和苕子根瘤菌的成熟根瘤内的类菌体组织细胞中,根瘤细菌有两种形态,一种为已分化发育的类菌体,一般呈棒状、T 状或 Y 状,即通常认为活跃固氮的形态,它们不能生长繁殖;另一种为未经分化的杆状菌,与在培养基上生长的形态一样,它们能够生长繁殖。

在慢生型的大豆根瘤含菌组织中,类菌体形态分化不明显,菌体的形状大小同在培养基上生长的类似,它们绝大多数都是能够生长繁殖的。

通常将能否进行繁殖作为细菌细胞的生存界限。先前(Almon, 1933 年)认为豆类植物根瘤中的类菌体是不能繁殖的^[1],即失去了存活性。Bergensen (1968 年)报告说大豆根瘤的含菌细胞中的类菌体只有 0.02% 能在甘露醇酵母洋菜(RMY)上生长繁殖^[2]。Sutton 等(1977 年)发现羽扇豆根瘤的类菌体的繁殖能力随瘤龄而变化,并认为其繁殖能力依赖于培养基渗透压的保护作用^[3]。Tsien 等(1977 年)发现不同年龄的大豆和菜豆根瘤中的类菌体几乎 100% 具有活力^[4]。Gresshoff 等人(1977 年)的研究结果表明,三叶草根瘤的类菌体在渗透压保护下有 60—90% 能繁殖^[5]。Gresshoff 和 Rolfe (1978 年)报道说大豆根瘤类菌体在一定的试验条件下能繁殖^[6]。他们的实验表明大豆根瘤内的类菌体只有在含高浓度甘露醇的培养基(B⁺Man)上能够繁殖。但高浓度甘露醇的作用是否起了渗透保护作用,不能肯定。因为在处理过程中菌体经过等渗液(PDB)或水都不能影响菌体繁殖能力。这些研究者们都把根瘤中的含菌细胞内所有的细菌个体全部看做是类菌体,而不论它们表现为什么形态。在第四次国际生物固氮会议上,Pankhurst (1980 年)建议,“只把存在于成熟的,有固氮活性的含菌植物细胞中的细菌称为类菌体,以避免混乱”^[7]。明确地表达了这种观念。

本文介绍根瘤菌在寄主细胞内的分化及存活性研究工作,对含菌细胞中细菌的形态分化及繁殖能力提供了直接的验证。

一、材料和方法

1. 豆类-根瘤菌共生体

本实验采用了 5 种豆科植物及相应的根瘤菌(表 1; 其中快生型根瘤菌为紫云英、苜蓿、三叶草和苕子,慢生型根瘤菌为大豆)。

表 1 试验豆类-根瘤菌共生体

豆 类	接种菌株
紫 云 英	Ra 106
苜 蓿	M3
三 叶 草	T8
苕 子	自然感染
大 豆	SM31

表 2 培养根瘤菌的培养基成分

	RGY*	RMY*	RSY*	B ⁺ Man** ^[1]
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O				0.36g
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.5g	0.5g	0.5g	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2g	0.2g	0.2g	0.08g
FeCl ₃ ·6H ₂ O				0.003g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1g			0.04g
CaCO ₃		3.0g	3.0g	
NaCl	0.1g	0.1g	0.1g	
甘露醇		10g		37.0g
蔗糖			10g	
甘油	10ml			
谷氨酸钠				0.5g
酵母		5.0g	5.0g	0.5g
微量元素†	4ml	4ml	4ml	4ml
洋葱**				
维生素 H	0.001g			
维生素 B ₆	0.005g			
泛酸钙	0.005g			

† 微量元素: 0.5% H₃BO₃; 0.5% Na₂MoO₄ 等量混合液。

* RGY, RMY, RSY 均为华农生物固氮研究室培养根瘤菌常用培养基。

** 洋葱用量按需要添加。

2. 培养基的种类和成分 (表 2)

3. 等渗溶液 (PDB)

Gresshoff 等^[5]用的 PDB (0.25 M 甘露醇, 0.25 M 山梨醇, 10m M K₂HPO₄, 2m M CaCl₂, pH 5.8) 等渗溶液。

4. 结瘤试验

按本研究室的常规洋葱管结瘤和砂培结瘤法^[8]进行。

5. 根瘤含菌细胞原生质体的分离

根瘤按常规方法表面灭菌后, 转入灭菌 PDB 液 (0.5 M) 中, 切去根瘤前端, 以排除侵入线新侵染的细胞, 然后将剩余根瘤切成 0.2 毫米左右的薄片, 再用 PDB 液洗一次。每个根瘤薄片分别放入容量为 5 毫升的小瓶中; 加入用 PDB 液 (0.5 M) 配制的 4% 纤维素酶 (Cellulase "ONO-ZUKA" R-10 Yakult Biochemicals, Japan) 0.5 毫升, 于 36°C 下酶解一小时, 用吸管将根瘤薄片吸入放有一滴 PDB 液 (0.5 M) 的载玻片上, 在低倍显微镜下观察。用显微镜操作器和无菌毛细管将单个原生质体吸出移到另一载玻片上, 并用 PDB 液洗涤几次, 洗去原生质体

外可能存在的游离细菌,然后将单个原生质体放在相差显微镜下检查,确证原生质体外无游离细菌。

6. 从单个含菌原生质体中释放出细菌

将表面无游离细菌的原生质体,从 0.5 M PDB 液移到 0.25 M PDB 中或水中,在 2—3 分钟内即可观察到原生质体先吸水涨圆,随后崩裂,原生质体内含的细菌逐渐释放出来。

7. 单个原生质体中总菌数的测定

在相差显微镜下用血球计数器测数。

8. 单个原生质体中活菌数的测定

在含 1 毫升无菌蒸馏水(或 1 毫升 0.25 M PDB 液)的 5 毫升无菌小玻璃瓶(瓶中放 2 粒小玻珠)中,移入一个原生质体,振荡 2—3 分钟,使原生质体破裂,释放出所含细菌。对此菌悬液进行平板培养测数。

9. 微室培养

从原生质体破裂后释放出的细菌悬液中取一环放在盖玻片上,随即加一小滴融化并冷至 55℃ 的洋菜培养基 (B^+ Man 或 RSY),用接种环迅速混匀,将盖玻片反扣在凹玻片上,用凡士林密封,将此凹玻片放入培养皿(皿底放湿滤纸保湿)中,28℃ 保温培养,定位和定时观察微室培养中菌体的繁殖情况,连续观察 8—10 天。

10. 原生质体中大小菌体的过滤分离

用纤维素酶处理快生型根瘤获得大量含类菌体的原生质体,待胀破原生质体释放出细菌,用灭菌过滤器过滤(重熔玻璃过滤器 G5,孔径 1.5—2.5 微米),将过滤液和未过滤物悬浮液分别接种在 RSY 平板上培养,检查菌落生长情况。

二、试验结果

共观察了根瘤中分离出来的 3,000 多个单原生质体。

1. 成熟的含类菌体原生质体

在 0.5 M PDB 液(等渗液)中,含类菌体原生质体的外形如图 1 a (紫云英),1 b (三叶草),1 c (大豆)。

2. 含菌原生质体中释放出细菌

将原生质体悬浮在蒸馏水或 0.25 M PDB 液(低渗压)中,在相差显微镜下,可以清晰地观察到原生质体的膨胀和崩裂情况,崩裂后细菌逐步地从原生质体中释放出来。在 0.25 M PDB 液中有时需要挤压后,原生质体才破裂。图 2a, 2b, 2c 显示紫云英根瘤内含菌原生质体胀圆、崩裂,释放出细菌;图 2d 是释放出来的细菌个体形态。

图 3 显示大豆根瘤含菌原生质体释放出细菌。

3. 快生型根瘤含类菌体原生质体中菌体形态的分化和存活性

从紫云英和其它快生型根瘤的成熟的含类菌体原生质体中释放出来的细菌在形态上明显地分为两类,一类是大的、棒状、Y 状或 T 状的类菌体,一类是与常用培养基上生长的小杆菌在大小、形态上相同(图 2d)。

测定了单个原生质体中释放出的细菌个体的数目。103 个紫云英根瘤含类菌体原生质体中平均含细菌细胞数为 2.34 万个。紫云英的含类体原生质体释放出的细菌接种到 RSY 或

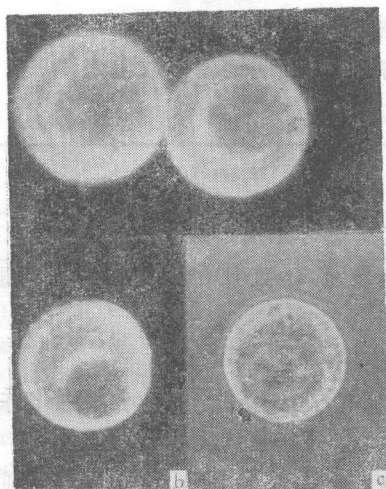


图1 含类菌体原生质体的外形
(a. 紫云英 约 $\times 560$, b. 三叶草 约 $\times 560$,
c. 大豆 约 $\times 560$)

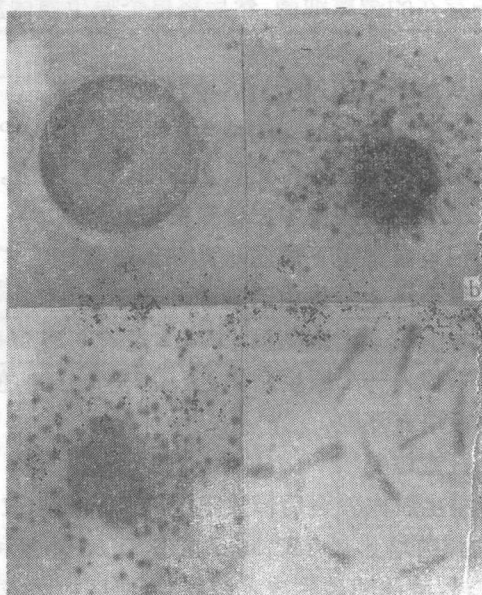


图2 紫云英根瘤内含菌原生质体胀圆
崩裂释放出细菌

(a. 原生质体胀圆 约 $\times 640$, b. 原生质体开始崩裂
释放出细菌 约 $\times 640$, c. 原生质体完全崩裂
约 $\times 640$, d. 原生质体中释放出来的两类细菌形
态约 $\times 3200$)

B^+ Man 培养基上,进行微室培养。在培养过程中定点观察,每日观察三次,小的杆菌逐渐繁殖形成微菌落,大的类菌体经九天都没有分裂繁殖(图4)。

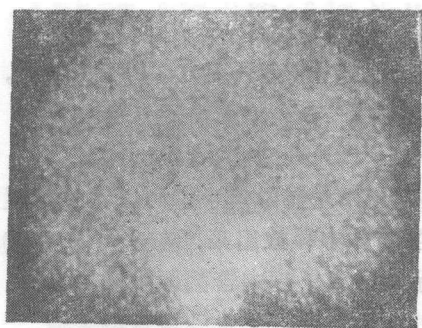


图3 大豆根瘤含菌原生质体释放出细菌

用重铬过滤 G5 过滤分离紫云英根瘤含菌原生质体中释放出来的细菌悬液。小杆菌可以滤过,大的类菌体不能滤过,将滤过的小杆菌接种于 RSY 培养基上,能够繁殖形成正常菌落(图5)。过滤器上面留下的大类菌体经接种在同样培养基上,不能繁殖形成菌落。

从紫云英根瘤成熟的含类菌体原生质体中释放出的小杆菌取得了 300 个培养系,对每个培养系进行了结瘤试验,结果有 277 个培养系在紫云英根上结瘤。

用其它快生型豆类-根瘤菌共生体来进行平行实验,包括苜蓿,三叶草和苕子,所得试验结果相同。

4. 快生型共生体的含菌细胞中的菌体总数和活菌体数

五个豆类-根瘤菌共生体系中每个成熟的类菌体细胞所含总菌数和活菌数的测定结果见表3。

每个原生质体中的细菌总数均在两万个上下,其中活菌数只占 0.09%~0.27%。

5. 紫云英不同瘤龄的根瘤原生质体中的活菌数与根瘤乙炔还原活性的反相关

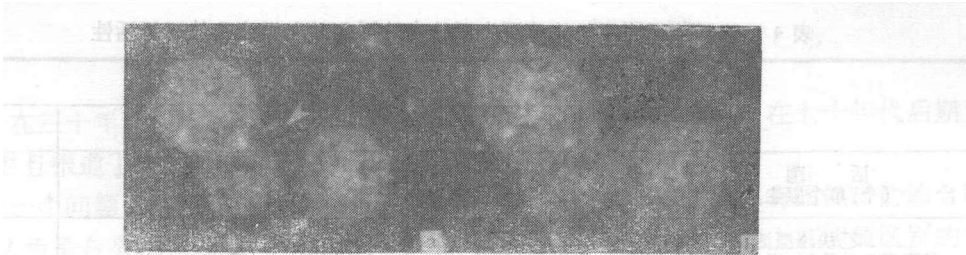


图 4 紫云英根瘤原生质体释放出的根瘤细菌在微室培养中的情况
[a. 小杆菌已繁殖成微菌落, 大类菌体(箭头所指)不能繁殖; b. 微菌落进一步发展, 并覆盖了部分类菌体(箭头所指)]



图 5 从紫云英根瘤原生质体中释放的细菌中过滤出的小杆菌形成正常菌落
(为正常大小的 1/2)

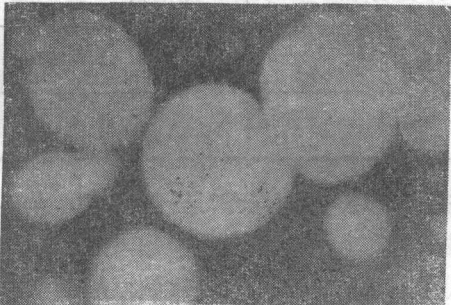


图 6 从大豆根瘤原生质体中释放的细菌进行微室培养形成的微菌落 约×245

表 3 测定从紫云英、苜蓿、三叶草和苕子根瘤含菌原生质中释放出的菌数

植 物	测数方法	测定的原生质个数	平均每个原生质体中菌数(个)	每个原生质体中活菌数百分比
紫云英	平板测数*	17	63.9	0.27%
	直接测数**	103	23375.5	
苜 蓿	平板测数	28	26.5	0.11%
	直接测数	15	22755.0	
白三叶草	平板测数	15	17.7	0.09%
	直接测数	11	19509.0	
地三叶草	平板测数	29	19.3	0.11%
	直接测数	15	17813.0	
苕 子	平板测数	28	29.9	0.12%
	直接测数	15	23973.0	

* 用 B+Man 培养基平板测活菌数。
** 用血球计数器测总菌数。

随着紫云英植物不同瘤龄的变化,我们发现不同瘤龄的单个原生质体中的活菌数和乙炔还原活性有明显反相关(见表 4)。

6. 大豆-根瘤菌(菌株 SM31)含类菌体细胞中的菌体形态和存活性

大豆根瘤菌和其它慢生型共生体系中的红色的、成熟的、有固氮功能的含类菌体细胞中的

表 4 紫云英不同瘤龄的单原生质体中的活菌数和根瘤乙炔还原活性

	瘤 龄 (天)			
	14	21	45	180
活 菌 数 (个/单个原生质体)	1600	154	145	810
乙炔还原活性 毫微克分子乙炔/毫克鲜重/小时	1.05	7.61	8.55	0.38

表 5 大豆根瘤含菌原生质体中释放出的菌数

测 数 方 法	测定的原生质体 个 数	平均每个原生质 体含菌数	每个原生质体中活 菌数百分比
平板测数	52	50903	81%
直接测数	216	62781	

菌体并没有形态分化、全都是杆状细菌,大小也和培养基上生长的菌体相似。

用同样的方法制备原生质体,释放出的细菌,成活率很高。每个原生质体中所含活菌数的百分比为 81%(见表 5)。进行微室培养几乎所有细菌都能繁殖形成微菌落(图 6)。

表 6 水胀破或 0.25 M PDB 胀破对细菌存活性的影响

	胀 破 液	测定的原生质体数	活菌数* 原生质体	平均数标准差
三叶草	水	10	14.5	±6.2
	0.25 M POB	10	14.25	±5.3
苜 蓿	水	6	20.37	±7.6
	0.25 M PDB	6	27.62	±11.6

* 活菌数用 RSY 平板培养测定。

7. 渗透压保护对类菌体活性的影响

表 6 说明用水或用 0.25 M PDB 胀破原生质体时,对于每个原生质体内的活细胞数没有不同的影响。

表 7 说明培养基渗透压不同,并不明显地影响每个原生质体中活细胞的百分数。

表 7 不同渗透压培养基对细菌存活性的影响

植 物	培 养 基	测定的原生质体数	活菌数 原生质体	平均数标准差
苜 蓿	RSY	12	24	±10.4
	B+Man	12	22.1	±9.5
大 豆	RSY	12	25.6×1000	±25.5×1000
	B+Man	12	34.1×1000	±24.0×1000

三、讨 论

这个在三十年代提出并进行过初步研究的问题 (Almon, 1933 年), 在七十年代后期又重新提出, 并且报道了一些互相矛盾的实验结果和见解。

首先一个问题是, 在豆类-根瘤菌共生的根瘤中的红色的、成熟的、有固氮功能的含菌细胞(通常认为是含类菌体细胞)中的细菌有没有分化成为在形态上和功能上有明显区别的细菌体?

Pankhurst (1980 年)对于类菌体所下的定义,对大豆-根瘤菌共生体系而言是适合的,但是根据我们的研究结果,对于快生型共生体系是不适合的。在这类含菌细胞中的细菌有明显的形态和功能分化;(1)棒状、Y 状、T 状的大类菌体有固氮功能(类菌体有固氮功能是早已验证的,见 Mulder, 1975 年^[9])、但失去了繁殖能力;(2)正常的小杆菌保持有繁殖能力。也就是说,形态和功能都有明显差别。可以认为,从根瘤中分离培养根瘤菌,实质上是这种小杆菌的后代,对于大豆-根瘤菌共生根瘤中含菌细胞中的细菌,则并没有这种形态和功能分化。

第二个问题是:从根瘤含菌细胞中取出细菌细胞,渗透压保护是不是必须的条件? 过去的结论也是分歧的。本文报道的试验表明,它并不是必须的条件,在大豆-根瘤菌共生体中,不论是在水中或 0.25 M PDB 中都有 80% 左右细菌能繁殖,并同时是固氮的功能者,在快生型细菌的共生体中,小杆菌的繁殖能力也不受水或 0.25 M PDB 的影响。

在衰老的快生型根瘤中,通常发现含菌组织形态腐烂,其中充满了大量的小杆菌。一直认为这些小杆菌是由大的类菌体转化的,是根瘤菌在寄主细胞中的生活史的一个阶段。这篇报道的试验结果表明,在衰老的含菌组织中的大量小杆菌是本来存在于健康的含菌细胞中的小杆菌的大量繁殖(衰老的植物细胞实际上提供了根瘤菌腐生生活的条件)结果,而不是类菌体向杆菌的形态转化。

参 考 文 献

- [1] Almon, L., Cited from Gresshoff, P. M. & Rolfe, B. G., *Planta*, **142** (1978), 329—333.
- [2] Bergersen, F., *Trans. 9th Int. Congr. Soil Sci.*, Adelaide, (1968), 2, 49—63.
- [3] Sutton, W., Jepsen, N. & Shaw, B., *Plant Physiol.*, **59** (1977), 741—744.
- [4] Tslen, H. C., Cain, P. S. & Schmidt, E. L., *Appl. and Environ. Microbiol.*, **34** (1977), 854—856.
- [5] Gresshoff, P. M., Skotnicki, M. L., Eadie, J. F. & Rolfe, B. G., *Plant Science Letters*, **10** (1977), 299—304.
- [6] Gresshoff, P. M. & Rolfe, B. G., *Planta*, **142** (1978), 329—333.
- [7] Pankhurst, C. E., in *Current Perspectives in Nitrogen Fixation* (Ed. Gibson, A. H. & Newton, W. E.), Australian Academy of Science, Canberra, (1981), 304.
- [8] 陈华癸,微生物学实验,农业出版社,1962, 119—122.
- [9] Mulder, E. G., in *Nitrogen fixation by free-living micro-organisms* (Ed. Steward, W. D. P.). Cambridge University Press, (1975), 3—28.