

尼泊尔马桑放线菌 共生固氮根瘤的感染和发育*

吴捷 陈华癸

(华中农业大学土化系, 武汉 430070)

周平贞**

(中国农业科学院油料作物研究所, 武汉 430062)

提 要 弗兰克氏放线菌通过感染尼泊尔马桑的根毛侵入根的皮层细胞。由于内生菌侵入的刺激, 部分皮层细胞分裂和增大, 产生前根瘤原基。根瘤原基分裂、分化, 形成初生根瘤瘤片。瘤片顶端分生组织不断双又分枝, 发育, 并伴随着内生菌感染的寄主细胞, 产生多次双又分枝的珊瑚状根瘤。观察瘤片的横切面, 含菌组织是一个马蹄形的致密整体, 不完全地包围着稍偏的中柱。观察瘤片的纵切面, 可将其划分为6个区域, 即顶端分生组织, 未感染皮层细胞组织、新感染含菌组织、成熟含菌组织、衰老含菌组织和中柱及其外围数层富含淀粉粒的皮层细胞。

关键词 马桑根瘤; 生物固氮; 弗兰克氏菌; 非豆科共生体系

在豆科植物以外, 能与固氮微生物共生、结瘤的植物中, 只有榆科的 *Parasponia* 一属是和根瘤菌 (*Rhizobium*) 形成共生固氮根瘤的^[7,8], 其他都是和一属称为弗兰克氏菌 (*Frankia*) 的放线菌形成共生固氮根瘤。搜集现有的报道, 和弗兰克氏放线菌形成共生固氮根瘤的植物有200种以上, 分布在7目, 8科, 23属中^[2,5,10]。我国已报道的有5目, 5科, 6属42种^[1]。

关于弗兰克氏放线菌感染寄主以及共生根瘤的组织发育过程, 前人的报道都是片断的, 只有综合各家的报道, 才能取得弗兰克氏放线菌共生根瘤组织形态发育的基本模式。本文报道了弗兰克氏放线菌与尼泊尔马桑 (*Coriaria nepalensis* Wall.) 形成共生根瘤的组织形态发育的全过程。

材 料 和 方 法

1. 植物和根瘤来源

(1) 尼泊尔马桑和四川桤木 (*Alnus cremastogyne*) 的种子和根瘤, 最初采集于云南、四川和湖北宜昌, 在中国农业科学院油料作物研究所 (武汉) 的苗圃内种植,

本文于1989年9月1日收到。

*国家自然科学基金资助课题。

**课题主持人。

从中采取种子和根瘤。

(2) 搪瓷杯和广口瓶中装蛭石或土壤蛭石混合物, 灭菌。播种表面灭菌的马桑种子, 接种马桑根瘤的压碎汁, 置温室中培养。植株生长, 形成根瘤后, 采取根瘤和根样品。

2. 光学显微镜观察

(1) 用相差显微镜观察根毛感染。

(2) 石蜡切片 用 FAA 液固定根瘤, 按常规进行石蜡包埋。用旋转式切片机切片(厚度 5—8 μm)。在玻片上脱蜡后用番红-固绿、高碘酸席夫试剂、苏丹 VI 和碘液染色。在光学显微镜下观察、摄影。

(3) 半薄切片 取受感染的根段和根瘤组织, 切成 1 mm³ 大小, 2.5% 戊二醛前固定, 磷酸缓冲液清洗, 1% 锇酸后固定, 乙醇和丙酮系列脱水, Epon 812 树脂包埋, 用玻璃刀在超薄切片机上切成半薄切片(厚度 1—2 μm), 片切置玻片上, 在温台(70°C 左右)上展开, 用 10% KOH 溶液溶去树脂, 复红染色, 用光学显微镜观察、摄影。

3. 扫描电镜观察

将石蜡包埋块切成 20—24 μm 厚片, 粘在盖玻片上, 脱蜡后固定在样品台上, 用 Eiko IB—5 离子溅射代喷金 8 分钟, 用 Hitachi TS—50 型扫描电镜观察、摄影。

结果和讨论

1. 菌丝的入侵

关于弗兰克氏菌侵入寄主的途径, 前人报道有两种。一种是根毛区的新鲜根毛受弗兰克氏菌的刺激而伸长和弯曲, 弗兰克氏菌菌丝侵入变形根毛, 进入皮层细胞^(5,4,6,9)。另一种途径是弗兰克氏菌菌丝直接在根表皮细胞间穿透进入寄主体内。我们观察弗兰克氏菌菌丝侵入尼泊尔马桑属前一途径(图版 I:1,2)。这里应该指出, 这种根毛感染和入侵与根瘤菌感染和入侵豆科寄主根毛不同, 虽然都刺激根毛伸长、弯曲, 并在弯曲处入侵, 根瘤菌在入侵处刺激根毛内陷, 内陷逐渐深入形成侵入线, 根瘤菌在侵入线内随着侵入线的延伸而大量增殖, 在弗兰克氏菌的根毛感染过程中, 我们通过光镜观察到, 菌丝穿入根毛, 并向根毛基部发展, 但未观察到菌丝在根毛内部大量增殖。

2. 前根瘤的形成, 内生菌感染部分皮层细胞, 根瘤原基的发生

尼泊尔马桑和其他一些寄主一样, 在被弗兰克氏菌感染后, 首先形成前根瘤。前根瘤是在入侵菌刺激之下, 寄主的皮层细胞分裂增殖而成的(图版 I:3,4)。在前根瘤的顶端, 一小部分细胞先被菌丝感染, 成为含菌细胞。在寄主细胞内的菌丝称为内生菌, 内生菌是穿壁进入寄主细胞的。在前根瘤的底部, 原根中柱鞘位置的细胞恢复分生能力, 产生分生组织, 称为根瘤原基(图版 I:3)。

3. 真根瘤的形成

由于内生菌的逐渐穿壁入侵, 含菌细胞逐渐增多, 前根瘤中的根瘤原基不断发展分化, 产生维管组织和皮层细胞。当部分皮层细胞被来自前根瘤中的内生菌侵染后, 就形成初生根瘤(图版 I:5)。初生根瘤的顶端分生组织随后双叉分枝、发展, 形成两个生

长点, 位于双叉连接处的含菌细胞中的内生菌分别向两面穿壁入侵, 形成两个含菌瘤片(图版 I: 6, 7)。由于两个瘤片的分生组织是从一个共同的分生组织分叉产生的, 随着分生组织的向前发展, 细胞的伸长和分化, 形成底部相连, 分叉的中轴组织, 并在内皮层外面形成含菌组织。由于分生组织的多次快速分叉, 形成几十个生长点, 发育成为几十个瘤片, 在外形上幼嫩根瘤的许多瘤片紧密团聚在一起(图版 I: 8); 成长的根瘤表现为多次分叉的珊瑚状根瘤(图版 I: 9), 每个分叉的前端有一个具有含菌组织的瘤片。含有几十个瘤片的根瘤的自然直径可达 20—40mm, 固氮活性最旺盛的根瘤其直径为 8—10mm。Becking 将放线菌根瘤的外形分为两类: 柁木型和杨梅/木麻黄型。杨梅/木麻黄型根瘤的每一瘤片顶端都有一根背地性生长的“根瘤根”。柁木型的瘤片顶端没有这种根瘤根。按这种分型法, 尼泊尔马桑属于柁木型。

4. 瘤片的构造

一个瘤片的横切面在显微镜下显示出图版 II: 10 的形态, 马蹄形的含菌组织不完全地包围着偏心的中柱。在内皮层和含菌组织之间有 4—5 层不含菌、但含大量淀粉粒的皮层细胞。在皮层细胞(包括含菌和不含菌的)和表皮细胞之间, 有 6—7 层栓质化的细胞, 用苏丹 VI 染色均呈红褐色, 靠外 2—3 层细胞栓质化程度高, 靠内 3—4 层栓质化程度低。观察瘤片的纵切面, 从顶端向后, 依次为顶端分生组织、未感染皮层细胞组织、新感染含菌细胞组织、成熟含菌细胞组织和衰老含菌细胞组织, 纵切面中间为中柱, 中柱外围有数层不含菌但富含淀粉粒的皮层细胞(图版 II: 11, 12)。在未感染皮层细胞组织中, 细胞含有大量淀粉粒和一种尚未鉴定的小颗粒(图版 II: 13)。在新感染含菌细胞组织中, 细胞中除含淀粉粒和小颗粒外, 还含有刚侵入的、分枝的放线菌菌丝(图版 II: 14)。

5. 尼泊尔马桑和四川柁木根瘤含菌组织的比较

图版 II: 10 和图版 II: 15 (四川柁木瘤片的横切面) 相比, 显示出明显的区别。尼泊尔马桑根瘤的含菌组织是一个致密的整体, 其中每一个细胞都是含菌细胞, 而不含菌皮层细胞位于含菌组织的另一边; 四川柁木的含菌组织则是少量含菌细胞成簇地分散在不含菌细胞内, 这种成簇分散的含菌细胞在木麻黄(*Casuarana*)、杨梅(*Myrica*)、胡颓子(*Eleaegus*)、仙女木(*Dryas*)和悬钩子(*Rubus*)等属的根瘤中都有报道^[9]。

关于尼泊尔马桑根瘤含菌细胞内生菌的形态在文献中已做初步报道, 关于尼泊尔马桑根瘤含菌细胞和内生菌的超微构造将另文报道。

参 考 文 献

- 1 黄家彬等. 第五届国际固氮会议论文集, 荷兰. 1983
- 2 Bond G Ed. *P S Nutman*. 1976; 443—474
- 3 Berry A M et al. *Can J Bot*. 1986; 64: 292—305
- 4 Callahan D et al. *Bot Gaz*. 140 (Suppl.) 1979; S1-S9
- 5 Lechevalier M P. *Can J Bot*. 1983; 61: 2964—2967
- 6 Lalond M Ebs, Newton W, L R Postgate and Rodriguez-Barrue. Academic Press, London. 1977; 569—589
- 7 Trinick M J. *Nature (London)*. 1973; 224: 459—460
- 8 Trinick M J. *Can J Microbiol*. 1979; 25: 565—578
- 9 Torrey J C. *Amr J Bot*. 1976; 63: 335—344
- 10 Zhongze Z et al. *Plant and Soil*. 1985; 87: 1—16

INFECTION AND DEVELOPMENT OF SYMBIOTIC NITROGEN-FIXING ACTINORHIZA OF *CORIARIA NEPALENSIS* WALL.

Wu Jie, Chen Huakui

(Department of Soil Science and Chemistry, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Zhou Pingzhen

(Institute of Oil Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062)

Abstract Frankia hyphae penetrate root hairs and invade root cortical cells of *Coriaria nepalensis* Wall., leading to nodulation. Owing to the stimulation caused by infection, a part of the cortical cells in the infected root divide and hypertrophy, resulting in the formation of a prenodule in which the nodule primordium develops. The primordium divides and differentiates, forming a primary nodule lobe. The apical meristem of a lobe branches dichotomously and the branchings develop with the infection of new host cells by the endophytes, giving rise to a coralloid root nodule consisting of many dichotomic branchings. In cross-section, the endophyte-infected tissue zone in a lobe is a horse-shoe-shaped compact mass, incompletely surrounding the acentral stele. In longitudinal section, the apical part of a mature lobe is the meristem, followed successively by the non-infected tissue, the newly infected tissue, the mature infected tissue and the senescent infected tissue. The lobal stele is surrounded by several layers of cortical cells containing starch granules.

Key words *Coriaria* nodule; Nitrogen fixation; *Frankia*; Non-leguminous symbiosis

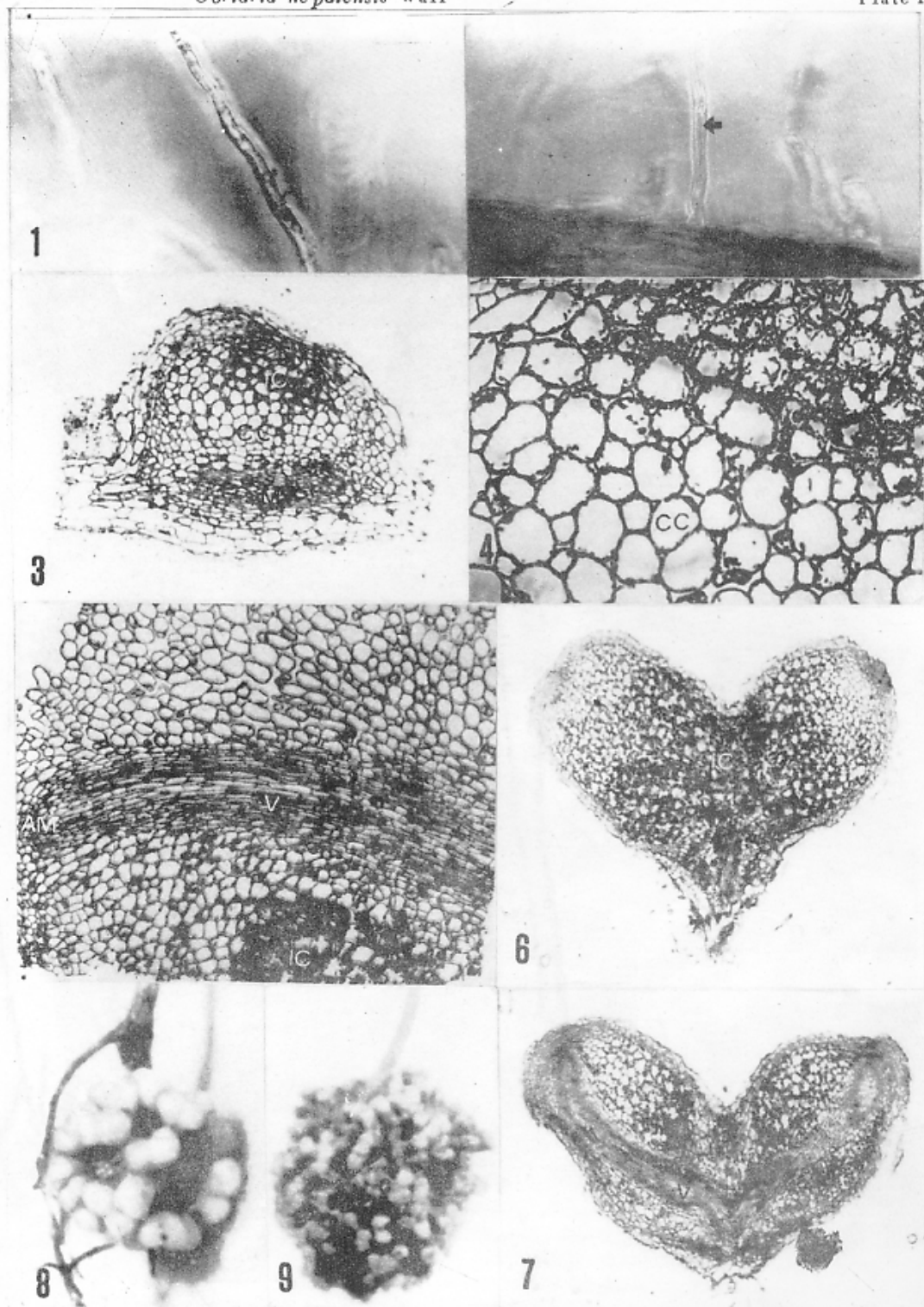
Explanation of plates

Plate I

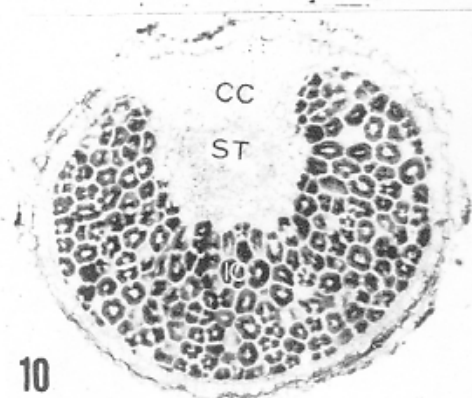
1. A non-infected root hair; 2. A endophyte-infected root hair, showing a infection thread (arrow); 3—4. A prenodule, showing infected cells (IC), non-infected cortical cells (CC) and a meristem (MT); 5. A primary nodule, showing infected cells (IC), a vascular system (V) and a apical meristem (AM); 6—7. Branching of a nodule lobe, showing infected cells (IC) and vascular bundles (V); 8 A young and healthy root nodule; 9 A mature and large root nodule;

Plate II

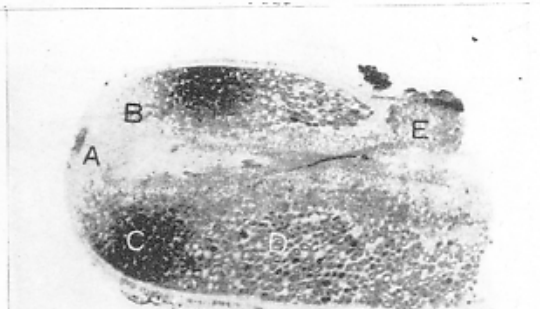
10. Transection of endophyte-infected tissue zone of a mature nodule lobe, showing horseshoe-shaped infected tissue (IC), a acentric stele (ST) and non-infected cortical cells; 11—12. Longitudinal sections of a mature nodule lobe, showing the apical meristem (A), the non-infected tissue (B), the newly infected tissue (C), the mature infected tissue (D) and the senescent infected tissue (E); 13. Non-infected cells filling in starch grains and a kind of Unidentified smaller granules; 14. A newly infected cell containing starch granules (S), unidentified smaller granules (G) and hyphae (H); 15. Transection lobe of mature nodule lobe of *Alnus cremastogyne*,



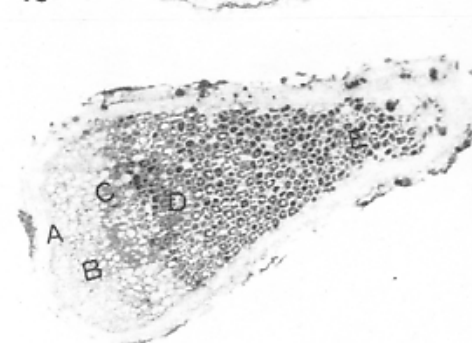
1.未感染根毛；2.被感染根毛，示感染线（箭头）；3, 4.前根瘤，示含菌细胞(IC)，未感染皮层细胞(CC)和分生组织(MT)；5.初生根瘤，示含菌细胞(IC)，维管组织(V)和顶端分生组织(AM)；6, 7.瘤片分叉，示含菌细胞(IC)和维管束(V)；8.健旺幼嫩根瘤；9.成熟的大根瘤。



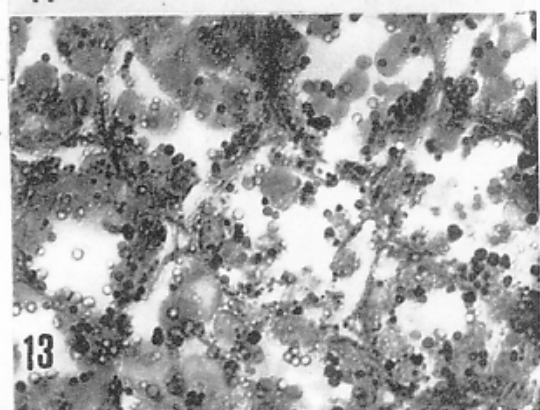
10



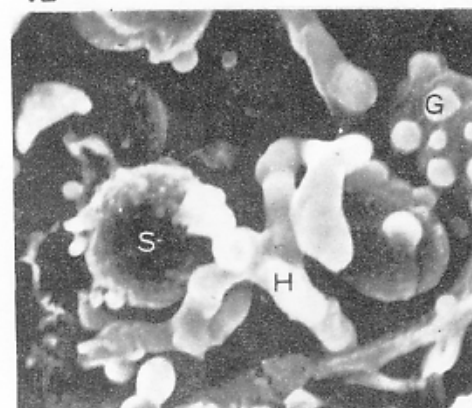
11



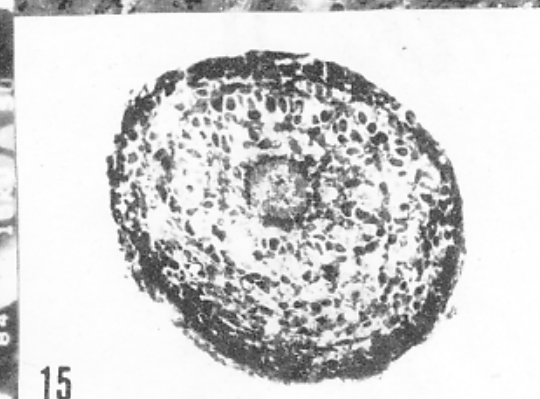
12



13



14



15

10. 成熟瘤片含菌区域的横切面, 示马蹄形含菌组织 (IC), 稍偏的中柱 (ST) 和未感染的皮层细胞 (CC); 11, 12. 成熟瘤片的纵切片, 示顶端分生组织 (A), 未感染皮层组织 (B), 新感染含菌组织 (C), 成熟含菌组织 (D) 和衰老含菌组织 (E); 13. 未感染细胞, 富含淀粉粒和一种未鉴定的小颗粒; 14. 新感染细胞, 含菌丝 (H)、淀粉粒 (S) 和未鉴定小颗粒 (G); 15. 成熟的四川椴木瘤片的横切面。