

# 大豆根瘤侵染细胞发育中高尔基体的变化

韩善华

(四川师范大学细胞生物研究室,四川 成都 610066)

**摘要:**为了探讨高尔基体与细菌增殖和周膜扩展的关系,用电子显微镜研究了大豆根瘤侵染细胞发育中高尔基体的变化。结果表明:幼龄侵染细胞中有高尔基体,但在成熟和衰老的侵染细胞中却几乎没有这种结构。高尔基体随幼龄侵染细胞中细菌的增多而增多,它们主要位于细菌附近。这些高尔基体的生理活性较高,不断向周围的细胞质分泌含有纤维状物质的小泡,有的小泡还在向细菌运动。一些小泡位于细菌的周膜上,其附近细菌的周膜常向外形成隆起,并有纤维状物质出现在其中。由此说明,大豆根瘤侵染细胞中的高尔基体参与了细菌的增殖和周膜的扩展。

**关键词:**大豆根瘤;侵染细胞;高尔基体;细菌;细菌周膜

**中图分类号:**S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2009)04-0693-04

## Changes of Golgi Bodies during the Development of the Infected Cells in Soybean Root Nodules

HAN Shan-hua

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

**Abstract:** In order to discuss the correlation between Golgi bodies and the increase of bacteria and their peribacteroid membranes, the changes of Golgi bodies were studied by electron microscopy during the development of the infected cells in soybean root nodules. Results showed that the infected cells were divided into young infected cell, mature infected cell and senescent infected cell. They were increased with the bacteria in the young infected cells, but this structure almost disappeared in mature and senescent infected cells. Golgi bodies were mainly located near bacteria and were very active in bio-physiology, they often secreted vesicles with fibrilliform material to surrounding cytoplasm, some vesicles continuously moved to near bacteria, some vesicles even closed to the bacteria or were located on the peribacteroid membranes of bacteria and some peribacteroid membranes of near bacteria formed different bulges out with fibrilliform material. Thus it could be revealed that Golgi bodies participated in the increase of the bacteria and their peribacteroid membranes during the development of the infected cells of soybean root nodules.

**Key words:** Soybean root nodule; Infected cell; Golgi body; Bacterium; Peribacteroid membrane

大豆是一种极其重要的经济作物,它能为工业,特别是轻工业提供重要的原料,也能为人类提供大量的蛋白质。不仅如此,而且还能产生根瘤,进行固氮,且固氮活性高,固氮量大。因此,它是一种研究生物固氮的常用材料,也是研究寄主细胞与细菌之间共生关系最理想的材料之一。不少学者对其进行了研究,如根瘤的超微结构<sup>[1-2]</sup>、线粒体与质体的关系<sup>[3]</sup>、巨型线粒体的形成机理<sup>[4]</sup>、内质网与细菌周膜的关系<sup>[5]</sup>和侵染细胞中内含物的组化研究<sup>[6]</sup>等。高尔基体是一种极其重要的细胞器,广泛存在于真

核细胞中,其主要作用是参与细胞蛋白质的合成和运输<sup>[7]</sup>。国内外对大豆根瘤的超微结构已有许多报道,但很少有人研究它侵染细胞中高尔基体的变化及其与细菌增殖和周膜扩展的关系,故就此进行研究。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

供试材料为丰收11号大豆(*Glycine max* L.),系兰州大学王志清先生赠送。

收稿日期:2009-03-03

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30671164)。

作者简介:韩善华,(1940-),男,硕士,教授,研究方向为细胞结构与功能。

## 1.2 方法

1.2.1 植物培养 将大豆种子在培养皿中(室温)萌发24 h,然后种在盛有蛭石的花盆中,移至培养室中培养,1周后以纯培养根瘤菌(*Rhizobium japonicum* L.)DGM372接种。生长条件为:每天光照14 h,光强5 000~10 000 lux,温度25°C。

1.2.2 电镜样品的制备 将接种根瘤菌14,21,28和35 d,直径约为2 mm的根瘤取下,切成小块,放入3%戊二醛的0.05 mol·L<sup>-1</sup>磷酸缓冲液(pH7.0)中固定3 h,用同种缓冲液冲洗干净,再在1%锇酸的同种缓冲液中后固定2 h。乙醇系列脱水,Spurr树脂包埋聚合。以上操作除聚合外均在室温下进行。接着用玻璃刀在ReichertOMU2超薄切片机上切片,以铀-铅双染色,最后在飞利浦EM300电镜下观察和拍照。

## 2 结果

### 2.1 侵染细胞的结构特征

大豆根瘤为球形,侵染区位于根瘤的中央部分。在成熟的大豆根瘤中,侵染区特别大,占去了根瘤绝大部分体积。侵染区由侵染细胞和非侵染细胞组成,前者体积较大,数量较多;后者与此相反,它们体积较小,数量较少,分散在前者之中<sup>[1]</sup>。

大豆根瘤侵染细胞来自大豆根瘤分生细胞,但不同于一般植物的分生细胞,因它们内部有细菌存在。根据寄主细胞的形态结构及细菌的数量和生长状况,又可将其分为寄主细胞正在增大,细菌数量不断增多的幼龄侵染细胞;寄主细胞不再增大,细菌数量不再增加的成熟侵染细胞及寄主细胞和细菌开始解体的衰老侵染细胞等3种。

### 2.2 侵染细胞中高尔基体的变化

在早期的幼龄侵染细胞中,侵入线刚释放细菌,胞中细菌很少,它们分散在细胞质中。这些细胞中有高尔基体,它们多位于侵入线周围(图1-1)。随着细胞的发育,细菌开始增加,但数量仍然不多。此时细菌体积较小,形状较规则,多为圆形或椭圆形,一般都是一个细菌一个周膜,周膜与菌体之间有一个较小的电子密度较低的透明区。高尔基体除了个别仍位于侵入线周围外,其余绝大部分则存在于细胞其他部分的细胞质中,而且常出现在细菌附近(图1-2)。由于细菌的不断分裂和发育,细菌的数量逐渐增多,体积继续变大,周膜与菌体之间的电子透明区也日益变宽,致使细胞中的细胞质越来越少。

这些细胞中的高尔基体较多,经常可见,它们通常不出现在大片的细胞质中,而是位于细菌与细菌之间的细胞质内(图1-3)。

在幼龄侵染细胞中,虽然大多数高尔基体呈分散分布,但有时也有多个高尔基体同时出现在细胞的一个较小的区域内。不仅如此,而且有些高尔基体的分布十分特别,它们呈集聚状态。不过高尔基体集聚的程度并不完全相同,甚至差异很大,如有的彼此靠得很近,有的则相互离得较远;有时只有2个高尔基体在一起,有时却是3个高尔基体聚在一块(图1-4,5),偶尔还有4个高尔基体相聚在一处,但更多的现象一般不太多见。

在周膜较大,电子透明区较宽的细菌附近常有高尔基体,它们的生理活性较高,如组成它们扁平囊泡的数量较多,两端膨大,不断向周围细胞质分泌小泡,其中一些还在向细菌运动。这些小泡与细胞中的一般小泡不同,它们中含有电子密度较高的纤维状物质,小泡越大,纤维状物质越多。小泡的体积一般与它们离高尔基体的距离有关,离高尔基体越近,体积越小,离高尔基体越远,体积则越大(图1-5)。细菌周围的细胞质中常有纤维状物质小泡出现,这些小泡有的离细菌较近,有的紧靠细菌表面,有的贴在细菌周膜上。不仅如此,而且它们附近细菌的周膜还有不同程度的扩展,有的甚至向外形成隆起,并含有数量不等,染色较深的纤维状物质(图1-6)。幼龄侵染细胞中的内质网也十分丰富,随处可见,虽然光面内质网和粗面内质网均有存在,但以后者居多。它们经常位于高尔基体周围(图1-3,4),有的内质网离高尔基体非常近(图1-7)。

与幼龄侵染细胞相反,成熟侵染细胞的体积最大,细菌数量最多,它们几乎充满了整个细胞。与此不同,此时细胞质非常少,它们存在于细菌之间。虽然细胞质中也有内质网,但很难见到高尔基体(图1-8),在衰老的侵染细胞中更是如此。

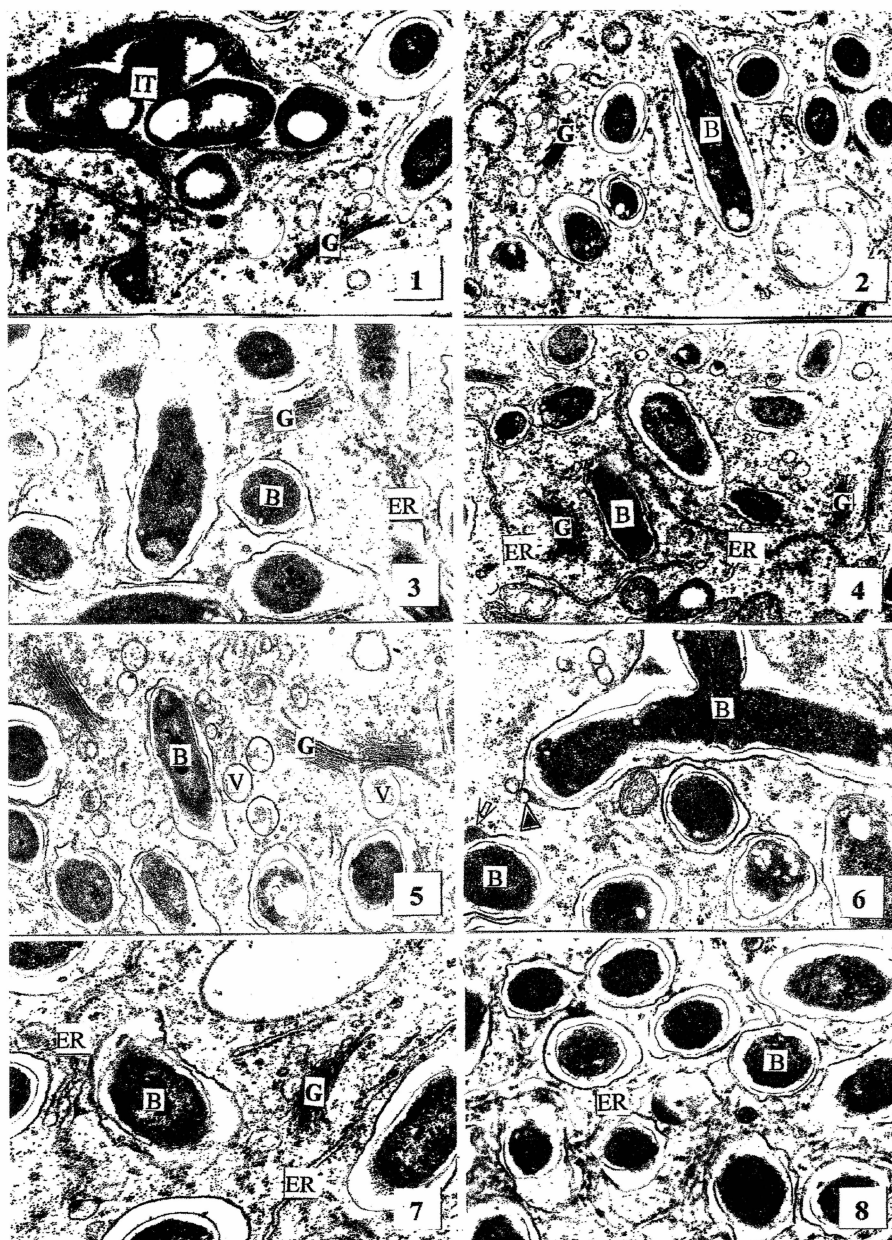
## 3 讨论

### 3.1 与细菌增殖的关系

幼龄侵染细胞中有不断分裂,不断生长的细菌<sup>[8]</sup>,为了满足它们生长变大和数量增多的需要,这些细胞必须进行旺盛的蛋白质合成。一般认为,高尔基体的主要功能是参与蛋白质的合成,特别是对从内质网运来的蛋白质进行加工、分类与包装,然后再通过分泌小泡,将其输送到细胞的特定部分加以利用,

或将它储藏起来以备利用(如蛋白质),也可分泌到细胞之外<sup>[9]</sup>。如果细胞中没有高尔基体,内质网合成的

蛋白质就不能被加工、分类与包装,蛋白质就不能被运到细胞需要的部分,就不能为细胞生长发育所用。



B:细菌;ER:内质网;G:高尔基体;V:小泡

1 一个位于侵入线(IT)附近的高尔基体. ×22000;2 一个位于细菌附近的高尔基体. ×20000;3 一个存在于两个细菌之间高尔基体. ×25000;4 一些聚在一起的高尔基体. ×20000;5 细菌附近正在分泌小泡的高尔基体. ×20000;6 一个存在于细菌周膜上的小泡(箭头),在附近细菌的周膜隆起中有一些纤维状物质(破箭头). ×25000;7 一些内质网位于一个高尔基体附近. ×30000;8 一个没有高尔基体的成熟侵染细胞. ×25000。

B: Bacterium; ER: Endoplasmic reticulum; G: Golgi body; V: Vesicle

1 A Golgi body near an infection thread (IT). ×22000; 2 A Golgi body near bacteria. ×20000; 3 A Golgi body between two bacteria. ×25000; 4 Some Golgi bodies got together. ×20000; 5 Some Golgi bodies secreting vesicles near bacteria. ×20000; 6 A vesicle (arrow) on a peribacteroid membrane, and the peribacteroid membrane of a near bacterium possessed a bulge out with some fibrillar material (broken arrow). ×25000; 7 Some endoplasmic reticulum near a Golgi body. ×30000; 8 A mature infected cell without Golgi body. ×25000.

图1 高尔基体的变化

Fig. 1 Change of Golgi body

在不同发育阶段的侵染细胞中,高尔基体的数量和分布明显不同,而且很有规律,如在刚侵染的细胞中,细菌数量较少,高尔基体也相对较少。当侵染细胞中细菌的体积不断变大和数量逐渐增多后,高尔基体的数量随之增多,并出现不同程度的集聚现象。但当细胞发育成熟后,胞中细菌体积不再增加,数量不再增多时,细胞中的高尔基体也就明显减少。上述现象与在大豆根瘤侵染细胞中观察到的内质网变化有些相似<sup>[5]</sup>。在大豆根瘤侵染细胞发育中,高尔基体数量和活性的变化很有规律,与细菌的增殖呈正相关。固然原因很多,其主要原因之一很可能与侵染细胞中细菌生长和分裂对蛋白质需求的数量和快慢有关。

### 3.2 与细菌周膜的关系

一般认为,只有侵染细胞中的细菌(根瘤菌)才有固氮能力,位于细胞之外的细菌是不能固氮的。为了探明其原因,许多学者对它们的精细结构进行了深入而系统的比较研究。研究发现,二者的基本结构相同,主要差异是前者表面有一层独特的膜状结构—细菌周膜,它将细菌包围起来,使其与细胞质分开,而后者则没有这种结构<sup>[1-2,5,10]</sup>。

细菌周膜的重要功能除了将细菌与寄主细胞质分开,使细菌不被细胞质中的有关酶降解外,它还是细菌与细胞进行物质和信息交流的唯一通道<sup>[10]</sup>。Parsons等<sup>[11]</sup>认为,它的上面有豆血红蛋白,能吸收氧,具有降低细菌内部氧浓度的功能。细菌周膜的存在既充分满足了细菌生活和固氮所需的氧,又不因细菌中氧浓度过高,破坏了对氧十分敏感的固氮酶的结构,使其丧失固氮能力,故它在豆科根瘤固氮中起着其他结构无法取代的作用。Sanjuan等<sup>[12]</sup>指出,细菌周膜能影响固氮基因的表达,对细菌固氮具有一定程度的调控功能,Tu<sup>[13]</sup>甚至认为,胞内细菌之所以能固氮,是因为它们具有细菌周膜。同时他还认为,细菌周膜是细菌固氮的场所,侵染细胞固氮能力的高低与细胞中细菌周膜总面积的大小呈正相关。

对于细菌周膜起源于细胞质膜已无争议,为学者们接受。因为大量的研究表明,细菌周膜来自侵入线膜,而侵入线膜又是由寄主细胞质膜内陷而成<sup>[1,14]</sup>。Bergersen等<sup>[15]</sup>在羽扇豆根瘤中发现,一些细菌开始没有周膜,但它们周围常有高尔基体出现,因此认为高尔基体可能参与了细菌周膜的形成。而后,Roth等<sup>[16]</sup>在其他豆科根瘤中也观察到类似现

象,并指出细菌周膜不仅来自细胞质膜,也可能来自高尔基体。上述学者的观点并未得到多数学者的支持,其主要原因是因为试验数据太少,证据不够充分,故用更多的试验加以验证就显得十分必要。研究发现,大豆根瘤侵染细胞中的高尔基体分泌含有纤维状物质的小泡,并不断向细菌周膜运动,有的甚至贴在细菌周膜上。同时,它们附近细菌的周膜又常常扩展,向外形成隆起,其中有的隆起内还含有数量不等的纤维状物质。加之高尔基体的数量、分布状态和生理活性又与细菌周膜扩展呈一定的正相关,因此高尔基体通过分泌小泡与细菌周膜融合,参与细菌周膜的扩增是完全可能的。此外,侵染细胞利用这种方式扩展细菌的周膜,不仅能充分满足细菌在生长发育中细菌周膜迅速扩展的需要,而且还比自己在细胞中直接利用蛋白质和脂等合成细菌周膜的速度更快,更节省能量,这对能有效利用能量的细胞而言无疑是一种最佳的选择。因为根瘤在生长发育中不仅细胞长大需要大量的能量,而且细菌的生长分裂和固氮也需要大量的能量,而细胞中可利用的能量又十分有限<sup>[17]</sup>。

### 参考文献

- [1] 韩善华, Yang A F. 大豆根瘤的超微结构特征[J]. 微生物学报, 1987, 27(3): 217-222. ( Han S H, Yang A F. Ultrastructural features of Chinese soybean root nodules [J]. Acta Microbiologica Sinica, 1987, 27(3): 217-222. )
- [2] Bergersen F G, Goodchild D J. Aeration pathways in soybean root Nodules [J]. Australian Journal of Biological Science, 1973, 26: 729-740.
- [3] Han S H, Zheng G. Formation and features of close Association of mitochondrion- plastid [J]. Chinese Science Bulletin, 1991, 36 (19): 27-31.
- [4] 韩善华, 郑国昌. 巨型线粒体形成机理的探讨[J]. 大豆科学, 1994, 13(1): 27-31. ( Han S H, Zheng G C. Study on mechanism of formation of the huge mitochondrion [J]. Soybean Science, 1994, 13(1): 27-31. )
- [5] 韩善华. 内质网在细菌周膜形成中的作用[J]. 植物学报, 1991, 33(8): 569-573. ( Han S H. Role of endoplasmic reticulum in the formation of peribacteroid membranes [J]. Acta Botanica Sinica, 1991, 33(8): 569-573. )
- [6] 韩善华, 周向军. 侵染细胞中一种内含物的组化研究[J]. 实验生物学报, 1994, 27(3): 251-258. ( Han S H, Zhou X J. Histochemical studies on a Kind of inclusions in infected cells [J]. Acta Biologica Experimentalis Sinica, 1994, 27(3): 251-258. )
- [7] Chrispeels M J. The Golgi apparatus mediates the transport Phytohemagglutinin to the protein bodies in bean cotyledons [J]. Planta, 1983, 158: 140-151. (下转第 701 页)

+1.0% Hemicellulase, pH 5.8, 而 Pectolase Y-23 在根原生质体分离时可以省去; 叶片原生质体分离的酶种类组合和浓度为 0.15%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  + 9% 甘露醇 + 1.0% Cellulase R-10 + 0.2% Pectolase Y-23, pH 5.8, 而 Macerozyme R-10 和 Hemicellulase 对叶片原生质体的分离不是必须的。通过原生质体产量和活力指标的比较, 发现 16 和 4 h 可分别作为大豆幼苗根和叶片原生质体分离的最佳酶解时间(表 2)。此外, 预高渗处理可以使原生质收缩, 胞间连丝断裂, 并减少细胞融合和酶对细胞膜的伤害, 提高原生质体的分离效果, 但可能引发过度质壁分离<sup>[9]</sup>。对供试材料进行每天 8 h 的光照, 并用 13% 甘露醇(对根)和 9% 甘露醇(对叶片)分别进行 30 min ~ 1 h 的预高渗处理, 得到较好的效果。

所分离的原生质体在做进一步研究前都还需纯化方可, 其具体方法也直接影响到原生质体的产量及活力。蔗糖等密度离心法是纯化植物原生质体常用的一种方法<sup>[4]</sup>。从产量和活力两方面考虑, 就大豆幼苗根而言, 其原生质体用 23% 蔗糖和 CPW - 18M 混合后的等密度离心下沉法纯化效果较好, 而叶片用 25% 蔗糖等密度离心上浮法纯化效果较好。

## 参考文献

- [1] Wei Z M, Xu Z H. Plant regeneration from protoplasts of soybean (*Glycine max* L.) [J]. *Plant Cell Report*, 1988, 7: 348-351.
- [2] 罗希明, 赵桂兰, 安利佳, 等. 大豆 (*Glycine max*) 原生质体培养

与分化[J]. *大豆科学*, 1989, 8(3): 301-304. (Luo X M, Zhao G L, An L J, et al. Culture and differentiation of protoplasts in soybean (*Glycine max*) [J]. *Soybean Science*, 1989, 8(3): 301-304.)

- [3] 李春喜, 王文林. 生物统计学[M]. 北京: 科学出版社, 1997, 198-205. (Li C X, Wang W L. *Biostatistics* [M]. Beijing: Science Press, 1997, 198-205.)
- [4] 许智宏, Davey M R, Cocking E C. 高等植物根原生质体的分离和培养[J]. *中国科学(B辑)*, 1984, 11: 27-31. (Xu Z H, Davey M R, Cocking E C. Isolation and culture of protoplasts in roots of higher plants [J]. *Science in China (Ser. B)*, 1984, 11: 27-31.)
- [5] 罗希明, 简玉瑜. 大豆叶肉细胞原生质体的游离和培养[J]. *吉林农业科学*, 1984, 2: 20-23. (Luo X M, Jian Y Y. Isolation and culture of protoplast in leaf mesophyll cells of soybean [J]. *Jilin Agricultural Science*, 1984, 2: 20-23.)
- [6] 张献龙, 唐克轩. 植物生物技术[M]. 北京: 科学出版社, 2004, 111-115. (Zhang X L, Tang K X. *Plant biotechnology* [M]. Beijing: Science Press, 2004, 111-115.)
- [7] 黄静, 赵奇, 李楠, 等. 烟草原生质体活力检测和细胞核染色方法研究[J]. *首都师范大学学报(自然科学版)*, 2007, 8: 34-39. (Huang J, Zhao Q, Li N, et al. Research on the livability detection of plant protoplast and the staining method of protoplast nucleus [J]. *Journal of Capital Normal University (Nature Science)*, 2007, 8: 34-39.)
- [8] 邢朝斌, 沈海龙, 赵星宇, 等. 刺五加幼叶原生质体的分离法[J]. *植物生理学通讯*, 2006, 42(2): 288-290. (Xing Z B, Shen H L, Zhao X Y, et al. Method for isolation of protoplast from young leaves of *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. Et Maxim) harms [J]. *Plant Physiology Communications*, 2006, 42(2): 288-290.)
- [9] Ishii S. Factors influencing protoplast viability of suspension cultured rice cells during isolation process [J]. *Plant Physiology*, 1988, 8: 26-29.

(上接第 696 页)

- [8] 韩善华. 大豆根瘤非侵染细胞的主要功能[J]. *大豆科学*, 2006, 25(3): 304-308. (Han S H. Main function of uninfected cells in soybean root nodules [J]. *Soybean Science*, 2006, 25(3): 304-308.)
- [9] 邹琴, 杨雨晗, 韩善华, 等. 烟草类根瘤中质体蛋白体的超微结构研究[J]. *四川大学学报*, 2009, 46(1): 250-254. (Zou Q, Yang Y H, Han S H, et al. Study on the ultrastructure of the protein bodies in the tobacco paranodule plastids [J]. *Journal of Sichuan University*, 2009, 46(1): 250-254.)
- [10] 韩善华, 张红. 大豆根瘤细菌周膜的冷冻复型研究[J]. *西北植物学报*, 1999, 19(2): 241-245. (Han S H, Zhang H. Freeze fracture study on peribacteroid membranes in soybean root nodules [J]. *Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica*, 1999, 19(2): 241-245.)
- [11] Parsons R, Day D A. Mechanism of soybean nodules adaptation to different oxygen pressures [J]. *Plant Cell and Development*, 1990, 13: 300-312.
- [12] Sanjuan J, Olivares J. Implication of nifA in regulation genes located on a *Rhizobium meliloti* cryptic plasmid that affect nodulation effi-

ciency [J]. *Journal of Bacteriology*, 1989, 171: 4154-4161.

- [13] Tu J C. Rhizobium root nodules of soybean as revealed by scanning and transmission electron microscopy [J]. *Phytopathology*, 1976, 65: 447-454.
- [14] Newcomb W, Creighton S, Latta L. A reinvestigation of the origin of the peribacteroid membrane in root nodules of *Vicia Faba* [J]. *Canadian Journal of Botany*, 1981, 89: 1547-1552.
- [15] Bergersen F G, Lyttleton P, Bullivant S, et al. Membranes in lupinise root nodules. I. The role of Golgi bodies in biogenesis of infection threads and Peribacteroid membranes [J]. *Journal of Cell Science*, 1978, 30: 129-149.
- [16] Roth L, Stecay G. Bacterium release into host cells of Nitrogen-fixing soybean nodules; The symbiosome membrane comes from three sources [J]. *European Journal of Cell Biology*, 1989, 49: 13-23.
- [17] 韩善华, 张红. 豌豆根瘤侵染细胞中造粉体的研究[J]. *作物学报*, 2003, 29(3): 432-435. (Han S H, Zhang H. Study on the Amyloplasts during the development in the infected cells of pea root nodules [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2003, 29(3): 432-435.)