

豆科根瘤拟菌体周膜来源和扩增方式的多样性*

单雪琴 侯淑琴 荆玉祥

(中国科学院植物研究所, 北京 100044)

摘 要

豆科植物根瘤内的共生拟菌体需有周膜包围。田菁[*Sesbania cannabina* (Retz.) Pers.], 大豆[*Glycine max* (L.) Merr.]和豌豆(*Pisum sativum* L.)的根瘤拟菌体周膜内有多个拟菌体。在周膜形成和周膜内的拟菌体由1个到多个的根瘤发育过程中,要有大量的膜来源和周膜的扩增才能适应这种生理变化。同一种根瘤内周膜扩增有周膜间的镶嵌融合,周膜与内质网及其小泡、小液泡膜融合等多种方式。细胞化学表明:周膜、质膜和内质网膜具有相同型的ATP酶,周膜是一种嵌合膜,与质膜、内质网膜和液泡膜有共性。最后对周膜来源和扩增方式多样性的生理意义进行了讨论。

关键词 豆科植物;根瘤;拟菌体周膜;膜融合

DIVERSITY OF ORIGIN AND EXPANSION MODE OF PERIBACTEROID MEMBRANE IN LEGUME NODULES

Shan Xue-qin, Hou Shu-qin and Jing Yu-xiang

(Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing 100044)

Abstract

Bacteroids, in numbers of two, three or more, in the legume nodules of *Sesbania cannabina* (Retz.) Pers., *Glycine max* (L.) Merr. and *Pisum sativum* L. were enclosed in each peribacteroid membrane (PBM). In view that PBM was formed synchronously with the bacteroid reproduction, the origin as well as the expansion of PBM ought to be in large scale in order to meet the need of the physiologic process of symbiotic nature. It was observed that in the same nodule sample there were kinds of modes of the PBM expansion, such as chimeric fusion between, or among the PBMs in which a protrusion of one PBM fit into a depression of another PBM, fusions of the PBM with endoplasmic reticulum (ER) and its vesicles, with small vacuole membrane, etc. Cytochemical study indicated that

收稿日期:1994-07-16 接受日期:1995-03-16

* 国家自然科学基金资助。

PBM. plasma membrane. ER membrane. etc. possessed the same type of ATPase. and the PBM was structurally similar to the plasma membrane. Therefore. the PBM appears to be a mosaic membrane possessing features of the plasma membrane. ER membrane and vacuole membrane. etc. In final. the physiological significance of the diversity in the origin and expansion modes of the PBM was discussed.

Key words Legume; Nodule; Peribacteroid membrane; Membrane fusion

豆科植物根瘤受侵染的宿主细胞内的拟菌体,被周膜包围才能形成共生关系。随着不同豆科植物根瘤的发育,有的周膜内始终只有一个拟菌体,有的从一个变成多个,与此同时,周膜需进行扩增才能容纳拟菌体数的增加。关于周膜的来源,多认为从宿主细胞质膜^[1]来,也有认为从核膜^[2]、内质网^[3]、液泡膜^[4]以及重新合成^[5]而来。种种说法都是基于对豆科植物根瘤发育的某一阶段单一现象的观察。但有一点是共同的,即都认为是起源于宿主细胞。周膜的扩增涉及增加的膜的来源。我们曾报道了小液泡膜与周膜的融合^[6]。本文以田菁、大豆、豌豆和紫云英的根瘤为材料,观察到拟菌体周膜扩增的多种方式和扩增时膜的多种来源,即使是同一种根瘤内,也具有这种多样性。

1 材 料 和 方 法

田菁 [*Sesbania cannabina* (Retz.) Pers.] 3 号来自辽宁省盐碱地利用研究所、大豆 [*Glycine max* (L.) Merr.] “黑农 3 号”来自黑龙江省农业科学院,早熟豌豆 (*Pisum sativum* L.) 和紫云英 (*Astragalus sinicus* L.) “闽紫 5 号”来自北京中国农业科学院。大豆根瘤菌 [*Bradyrhizobium japonicum* (Kirchner Buchanan)] 005、豌豆根瘤菌 (*Rhizobium leguminosarum* Frank) 5017、紫云英根瘤菌 (*Rhizobium astragali* Huakui) 38D 均来自北京中国农业科学院土壤肥料研究所。

田菁幼苗不需接种就可结根瘤。其他植物栽种、根瘤菌培养和接种、根瘤取样、固定、包埋等技术参阅文献^[6,7],根瘤细胞内 ATP 酶定位参阅文献^[7]。

2 观 察 结 果

周膜内拟菌体数目的多少,随不同豆科植物的根瘤和发育阶段而异。苜蓿和紫云英的根瘤,不论在壮年期还是衰老期,拟菌体周膜内只有一个拟菌体^[6,8,9];而田菁^[10]、大豆^[11]和豌豆^[12]根瘤的拟菌体周膜内有 1 到 2、3 个甚至多个拟菌体。当根瘤发育到周膜内由 1 个拟菌体到多个时,周膜要扩增才能容纳,同时要有增加膜的来源才能完成这种转变。只有选择周膜内的拟菌体数正在增加时的根瘤发育阶段,才能观察到周膜扩增及其方式和扩增时膜的来源。

拟菌体周膜与周膜之间的融合是周膜扩增的一种方式。在田菁、大豆和豌豆的根瘤中观察到,拟菌体周膜与周膜之间的融合可以是周膜间紧密贴接融合(图版 I, 1、3、4;图版 II, 6、8、9),一个拟菌体周膜的突出与另一个拟菌体周膜的凹陷镶嵌融合(图版 I, 2~5;图版 II, 6、8、9),也可以是双突出与双凹陷镶嵌融合(图版 I, 4、5;图版 II, 6、8)。融合过程中也可以是 3 个周膜以至多个周膜同时融合(图版 I, 2、4、5;图版 II, 6、9)。这与我们以前

的^[6,10]和韩善华的观察^[11,12]基本一致。

拟菌体周膜的扩增,不仅仅以相邻拟菌体周膜镶嵌融合方式进行,还可以泡状物与周膜融合方式进行。有的泡状物较大,是小液泡,与周膜融合(图版 I, 2~4; 图版 II, 9)。有的泡状物较小,似泡囊,与周膜融合(图版 I, 1, 4; 图版 II, 6, 9)。融合后留有膜片段痕迹。特别指出的是,图版 I 图 4 细胞核的 1/2 侧悬在大液泡中(图仅示很小部分大液泡),其余一侧为众多拟菌体和小液泡。大液泡和小液泡内含物结构相似,小箭头示大液泡正在形成小液泡。大箭头示典型的小液泡膜与周膜融合。我们以前曾观察到紫云英根瘤拟菌体周膜与小液泡膜的融合^[6],但没有像在田菁、大豆和豌豆根瘤中看到的那样,不同大小的泡状物与周膜融合的数量如此之多和具有普遍性。

大豆根瘤宿主细胞中还有很多泡状物未与周膜融合。本文所示大豆根瘤细胞的超微结构图均出自同一根瘤样品。图版 II 图 7、8 的细胞结构显示宿主细胞核的外膜与内质网管状结构沟通,更显示靠近细胞核的密集的泡状物结构和在中间的内质网膜及其小泡。这些小泡状物似由内质网衍生而来,它们似乎是周膜及其扩增所需增加的膜的来源。

拟菌体周膜扩增还可以内质网与周膜融合或作为周膜组成部分的方式进行。图版 I 图 1 和图版 II 图 6 箭头示内质网在周膜附近,有两处内质网成为周膜的一部分,内质网端部与周膜接触似有伸入之势。

进行以上观察的同时,还见有以下结构特征:豌豆根瘤宿主细胞质和拟菌体细胞质颗粒特别致密。拟菌体内有数量不等的泡状化结构,以及与拟菌体质膜靠近的电子透明环围绕的一团致密物质。绝大多数拟菌体没有 PHB 颗粒,但其中少数仍有这种结构(图版 II, 9)。拟菌体的壁和质膜也有突起,有的与周膜接触或沟通(图版 II, 9)。也证实我们以前在紫云英根瘤中所见到的拟菌体泡状化和周膜与拟菌体通过其互相突起,融合沟通的结构^[6]。在田菁根瘤宿主细胞壁上多处有内突起(图版 I, 1),类似于行使短距离运输功能的传递细胞。

3 讨 论

拟菌体周膜扩增的大小和程度,取决于根瘤发育到一定时期周膜内拟菌体数目的多少。像苜蓿和紫云英根瘤周膜内的拟菌体数,在根瘤整个发育时期始终只有一个^[8]。虽然在根瘤发育的中后期或在根瘤基部周膜也扩增,但变化不剧烈。田菁、大豆、豌豆等根瘤周膜内的拟菌体数一开始只有一个,到后来有数个的发育中,周膜要大大扩增,才能经受剧烈变化。仅仅以拟菌体周膜镶嵌融合等单一方式,不能满足这种变化的需要,必须有其他来源的膜的加入,才能保持拟菌体作为内共生体的生理需要。关于拟菌体周膜的性质,很多形态学证据表明来自宿主细胞质膜^[1],也有人认为来自核膜^[2]、内质网^[3]、液泡膜^[4,6,10]或膜重新合成^[5],但这些观察基本上是以一种豆科植物的根瘤为材料,观察到周膜扩增的单一方式。我们观察到田菁、大豆和豌豆根瘤内拟菌体周膜扩增可同时以多种方式进行的普遍性,表明周膜的来源可以同时来自内质网及其小泡,液泡膜和泡囊膜等。关于周膜的生化性质也有一些资料。Blumwald 等^[13]和我们^[7]曾证明周膜和质膜都有相同型的 ATP 酶。我们也证明内质网膜具有和质膜、周膜相同型的 ATP 酶^[7](图版 II, 10)。近年报道周膜具有质膜和液泡膜的性质,提出泡囊运输蛋白由内质网经高尔基体,再到质膜、周膜和

液泡膜的模式,并在大豆、豇豆中分离到泡囊传递蛋白在传递过程中有关蛋白的 cDNA 克隆^[4]。因此,周膜与质膜、内质网膜及其泡囊、液泡膜和高尔基体小泡有紧密关系。田菁、大豆和豌豆等豆科植物根瘤内周膜扩增方式和膜来源具有多样性。这种多样性具有重要的生理意义。当根瘤菌从侵入线释放后,宿主细胞便以质膜内吞作用将细菌引入^[1],但是根瘤菌释放是大量的,同时在宿主细胞内又进行分裂繁殖,每个细菌又都要从速完成膜包裹。仅仅以细胞质膜的内吞作用进行,在膜的数量上和包裹细菌的时间进程上都不可能满足迅速建立共生关系的生理需要。我们认为,只有质膜、内质网膜及其衍生小泡、小液泡膜等多种来源的膜才能使根瘤菌在大量释放后和在迅速分裂繁殖的过程中被一一包围,才能在根瘤发育周膜扩增阶段中提供更多的膜的需要。60年代以来细胞超微结构的研究表明,内质网膜与细胞核的外膜相接,内质网小管构成了从细胞核到质膜的连通管道,因此,质膜、核膜和内质网形成了一个单一的膜系统。膜系统的不同部位各有其相对稳定的生化功能,但是细胞质又具有流动性,膜又具有可塑性,以适应原生质运动。豆科植物根瘤中充满宿主细胞的拟菌体,是外界根瘤菌进入宿主细胞后被大量的膜包围而成的共生体。在此期间膜系统要经过剧烈变化,打破不同区域膜系统生化功能上的相对平衡,重新组合,然后再恢复生化功能上的相对平衡,或建立新的平衡。从这个观点看,周膜来源和扩增方式的多样性是可以被理解的。当然,这种看法是否正确,还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Newcomb W. A correlated light and electron microscope studies of symbiotic growth and differentiation in *Pisum sativum* root nodules. *Can J Bot.* 1976. **54**: 2163~2186
- 2 Prasad D N. De D N. Ultrastructure of release of *Rhizobium* and formation of membrane envelope in root nodules. *Microbiosis.* 1971. **4**: 13~20
- 3 Jordan D C. Grinyer I. Coulter W J. Electron microscopy of infection thread and bacteria in young root nodules of *Medicago sativa*. *J Bacteriol.* 1963. **86**: 125~137
- 4 Verma D P S. Chen C-I. Lee N-G *et al.* Biogenesis of peribacteroid membrane (PBM) forming a subcellular compartment essential for symbiotic nitrogen fixation. In: Palacios R. Mora J. Newton W E eds. *New Horizons in Nitrogen Fixation.* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 1993. 269~274
- 5 Dart P. Mercer F V. Fine structure of bacteroids in root nodules of *Vigna sinensis*, *Acacia longifolia*, *Viminaria juncea* and *Lupinus angustifolius*. *J Bacteriol.* 1966. **99**: 1314~1319
- 6 荆玉祥, 张宝田, 侯淑琴. 拟菌体包裹膜的动态变化和宿主细胞与细菌的相互关系. *植物学报.* 1984. **26**: 473~478
- 7 荆玉祥, 张宝田, 侯淑琴. 豆科植物固氮根瘤内 ATP 酶的定位和活性的动态变化. *植物学报.* 1987. **29**: 594~600
- 8 单雪琴, 侯淑琴, 荆玉祥. 根瘤菌在宿主细胞内的存在形式及其命运. *植物学报.* 1995. **37**: 522~526
- 9 Paa A S. Bloch C B. Brill W J. Development fate of *Rhizobium meliloti* bacteroids in alfalfa nodules. *J Bacteriol.* 1980. **143**: 1480~1490
- 10 荆玉祥, 张宝田. 发育过程中田菁根瘤超微结构的变化. *植物学报.* 1988. **30**: 207~209
- 11 韩善华. 大豆根瘤中公共细菌周膜形成的一种特殊方式. *微生物学报.* 1993. **33**: 400~404
- 12 韩善华, 郑国锷. 豌豆根瘤细菌周膜在发育中的变化. *微生物学报.* 1989. **26**: 413~417
- 13 Blumwald E. Fortin M G. Pea P A *et al.* Presence of host-plasma membrane type H⁺-ATPase in the membrane-envelope enclosing the bacteroids in soybean root nodules. *Plant Physiol.* 1985. **78**: 665~672

图 版 说 明

B. 拟菌体 CW. 细胞壁 es. 电子透明区 N. 细胞核 V. 液泡 v. 小泡

图 版 I

1~3. 田菁根瘤材料。4,5. 大豆根瘤材料。1. 细胞壁多处内突,似传递细胞(粗箭头)。小泡与周膜融合(三角箭

头),周膜间已经融合,并留有痕迹片段(长箭头)。×10000 2. 周膜间镶嵌(小箭头),周膜间已经融合(大箭头),小泡与周膜的融合(三角箭头)和小液泡与周膜趋向靠拢融合(弯箭头)。×15000 3. 大液泡形成小液泡(小箭头),周膜之间(三角箭头)和小液泡膜与周膜之间已融合(大箭头)。注意小液泡和大液泡内含物结构相似和众多小液泡膜与周膜的融合。×8600 4. 数个拟菌体周膜相互突出和凹陷的镶嵌融合(小箭头),小液泡和小泡与周膜间的融合(大箭头),小泡与3个拟菌体周膜已镶嵌的周膜镶嵌融合(弯箭头)。注意这些融合方式的普遍性。×16000 5. 数个小泡的膜与两个拟菌体周膜已融合的周膜镶嵌融合(箭头),注意这种现象的普遍性。×14000

图 版 II

6~8. 大豆根瘤材料。9. 豌豆根瘤材料。10. 紫云英根瘤材料。6. 内质网及其部分成为拟菌体周膜的一部分(箭头),注意周膜之间和周膜与泡状物之间的镶嵌融合。在周膜与拟菌体之间的电子透明区内有片段和泡状物结构。×18000 7. 内质网与细胞核外膜的沟通(双箭头),注意细胞核附近较多的内质网,大量的膜片段和小泡状物(v)结构。×27000 8. 细胞核膜(箭头)和内质网(双箭头)与核外膜的沟通。注意内质网右端膨大成泡状和小泡(v)与拟菌体周膜以及周膜之间的镶嵌融合。×27000 9. 少量的拟菌体内有电子透明的多羟基丁酸盐(PHB)颗粒(大箭头),靠近拟菌体周膜附近透明环围绕的中间体状的结构(长箭头),周膜间(弯箭头)和周膜与小泡之间(小箭头)的融合,注意拟菌体的泡状化和拟菌体壁和质膜的突起凹陷结构。×10000 10. 内质网(双箭头)和周膜(单箭头)有相同型的ATP酶。注意内质网、周膜和宿主细胞质内ATP酶黑色颗粒。×26000

Explanation of Plates

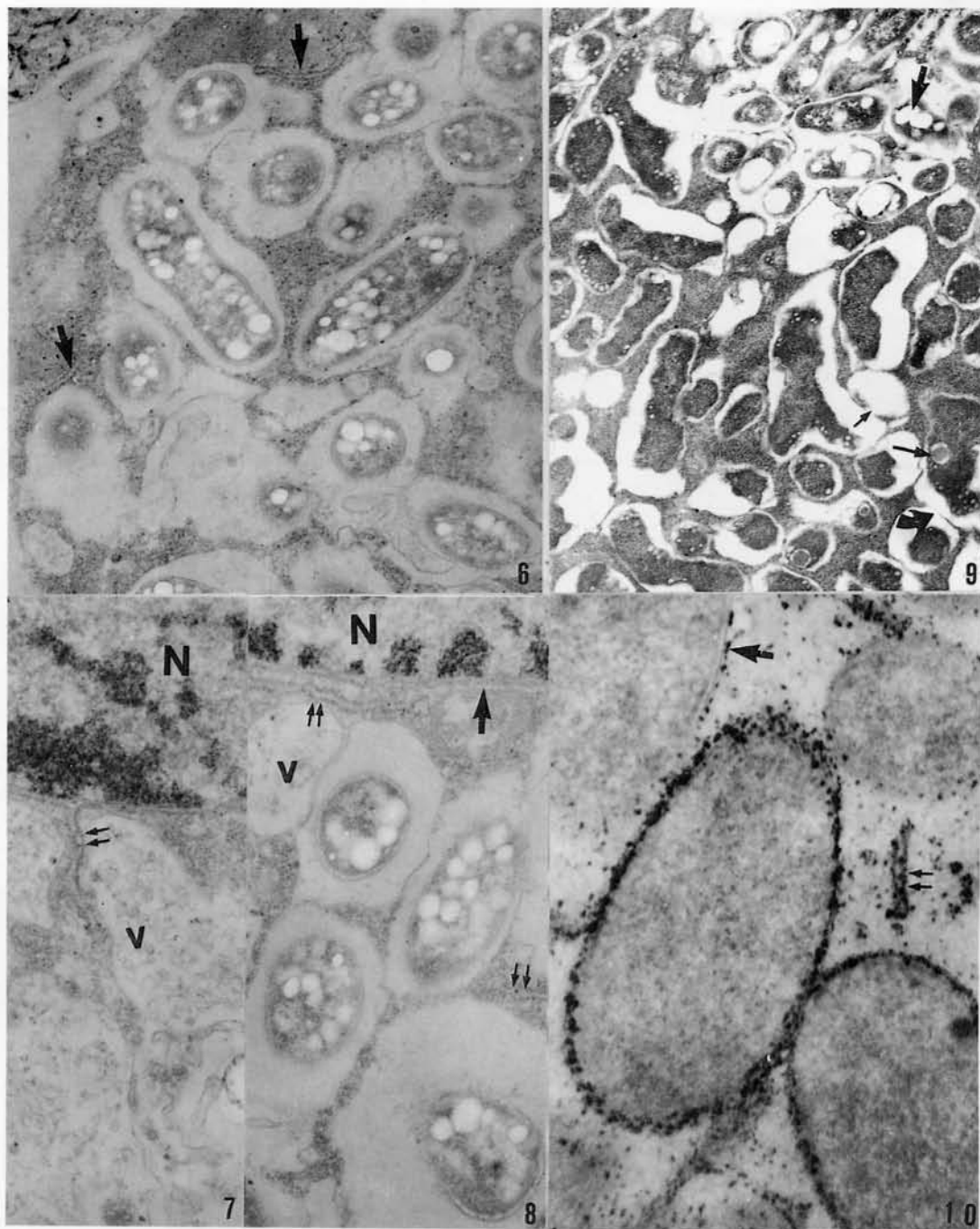
B. Bacteroid CW. Cell wall es. Electron transparent space N. Nucleus V. Vacuole v. Vesicle

Plate I

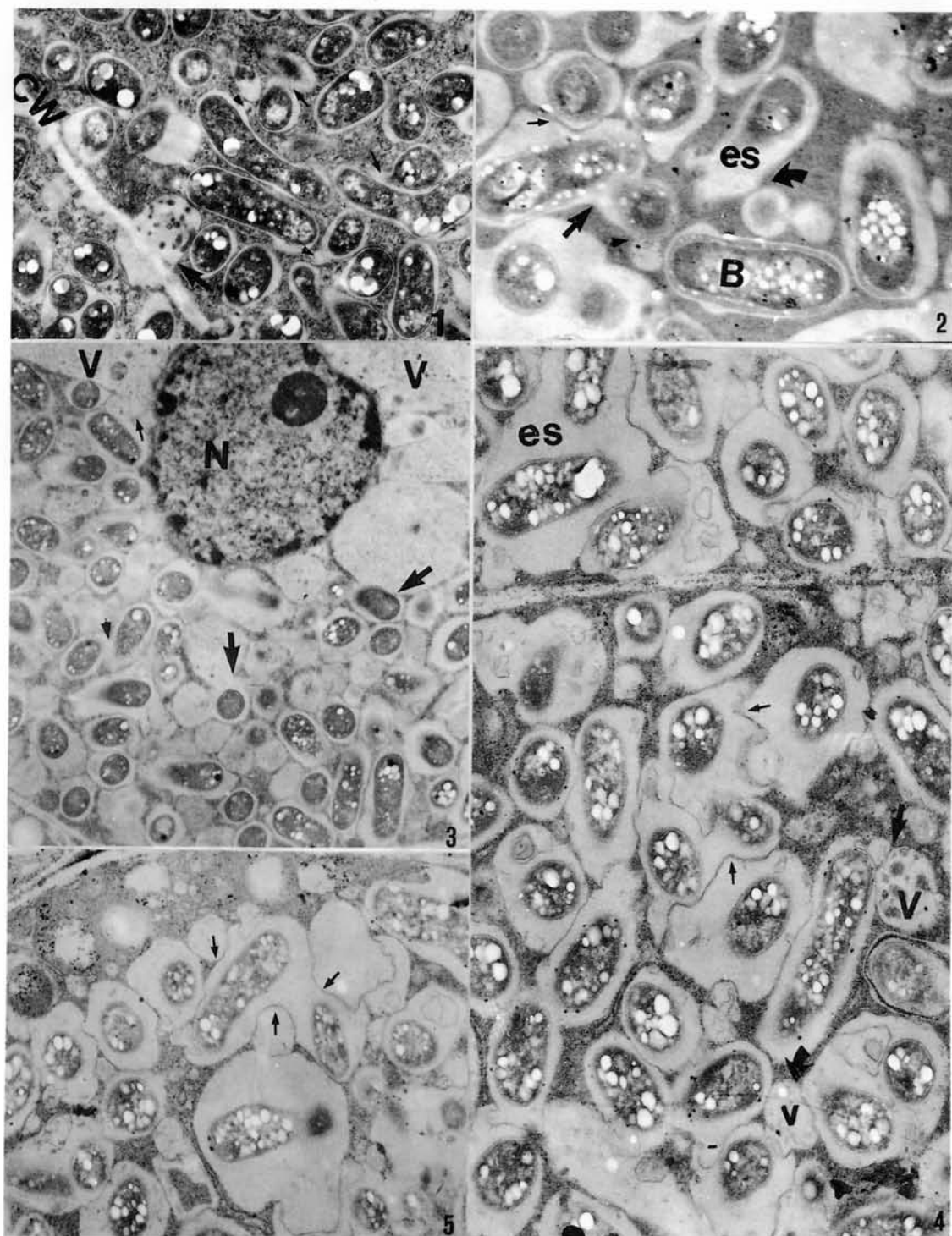
Figs. 1~3 and 4. 5. Ultrastructures of *Sesbania cannabina* and soybean nodules, respectively. Fig. 1. Cell wall with protrusions (thick arrow) possessing the characteristics of transfer cell, showing fusion of vesicles with peribacteroid membrane (PBM) (triangle arrows) and fusion between PBMs with trace membrane fragments (long arrow). ×10000 Fig. 2. Inter-PBM chimeric phenomenon (small arrow), two PBMs being fusion (large arrow), fusion of vesicle with PBM (triangle arrow), and of small vacuole with PBM (bent arrow). ×15000 Fig. 3. Small vacuole fragmented from large vacuole (small arrow). Fusions between PBMs (triangle arrow), fusion of tonoplasts of small vacuoles with PBMs (large arrow). Note similar structure between large and small vacuoles, and fusions among a number of tonoplasts of small vacuoles with PBMs. ×8600 Fig. 4. Chimeric fusions of a number of PBMs with protrusions and dents (small arrows), fusion of a vesicle with chimerism of three PBMs (bent arrow), fusions of PBM with a vesicle and a small vacuole (large arrow). Note popularization of fusions in these manners. ×16000 Fig. 5. Chimeric fusions of a number of vesicles with two already fused PBMs (arrow). Note the popularization of this phenomenon. ×14000

Plate II

Ultrastructures of soybean nodule (Figs. 6~8), of pea nodule and milk vetch nodule (Figs. 9, 10), respectively. Fig. 6. Endoplasmic reticula (ER) showing part of them becoming constituent of PBMs (arrow). Note chimeric fusions among PBMs, fusions of vesicles with PBMs, and the structures of membrane fragments and vesicle in electron transparent space between bacteroids and PBMs. ×18000 Fig. 7. Channel between ER and outer membrane of nuclear membrane (double arrow). Note the more ERs, large number of membrane fragments and vesicles near the nucleus. ×27000 Fig. 8. Nuclear membrane (arrow), ER (double arrow) and channel between ER and outer membrane of nuclear membrane. Note the expansive terminal right of the ER, and chimeric fusions of vesicle (v) with PBM, and among PBMs. ×27000 Fig. 9. A few bacteroids with electron transparent PHB granules (large arrow), mesosome-like structure enclosed by electron transparent circle near plasma membrane of bacteroids (long arrow) and fusions between PBMs, and of PBM with vesicle (small arrow). Note vesiculation of bacteroids and the bacteroid structures of cell wall and plasma membrane with protrusions and dents. ×10000 Fig. 10. The same type of ATPase on ER (double arrow) and PBM (single arrow). Note the black granules of ATPase on ER, PBM and in cytoplasm of host cell. ×26000



See explanation at the end of text



See explanation at the end of text