

羊奶果不同发育阶段根瘤的细胞结构及固氮、吸氢活性

刘育梅^{1,2} 黄维南¹ 黄志宏¹ 刘剑秋²

(1. 福建省亚热带植物研究所, 福建 厦门 361006; 2. 福建师范大学生物工程学院, 福建 福州 350007)

摘要: 比较羊奶果根瘤三个不同发育阶段的显微、亚显微结构和固氮、吸氢活性的差异, 探讨了根瘤结构与功能的关系。结果表明: 早期侵染方式为皮层细胞间隙侵染, 此期的内生菌是一种分枝、具隔膜的菌丝体, 早期侵染细胞有脂体存在。成熟根瘤含菌细胞明显多于幼瘤和衰老瘤。成熟根瘤具有大量泡囊, 成熟泡囊具分隔、双层壁结构。衰老瘤泡囊分隔消失, 不呈双层壁结构。成熟根瘤的固氮、吸氢活性明显高于幼瘤和衰老瘤。

关键词: 羊奶果; 根瘤; 亚显微结构; 固氮活性; 吸氢活性

中图分类号: Q939.132.04

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2003)01-0023-04

Cellular Structure of Root Nodules of *Elaeagnus conferta* Roxb. and Nitrogen Fixation Activity

LIU Yu-mei^{1,2} HUANG Wei-nan¹ HUANG Zhi-hong¹ LIU Jian-qiu²

(1. Fujian Institute of Subtropical Botany, Xiamen 361006, China; 2. Bio-engineering Collage, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China)

Abstract: The ultrastructure of root nodules of *Elaeagnus conferta* Roxb. and the activities of nitrogen fixation and hydrogen uptake were studied. The results show that *Frankia* hyphae exist at early stage in intercellular space in nodule cortex. The filamentous hyphae are branched with septa. Lipid bodies are distributed in infected young cells. The number of infected cells in mature nodules is much larger than that of young and senescent nodules. Apical endophytic hyphae swell to form lots of vesicles which are septate and double-walled. Vesicles are suggested to be important in nitrogen fixation. In senescent nodules, the vesicles disintegrate. Nitrogen fixation and hydrogen uptake activities in mature nodule is much higher than that in young and senescent nodules.

Key words: *Elaeagnus conferta*; Root nodule; Ultrastructure; Nitrogen fixation activity; Hydrogen uptake activity

羊奶果(*Elaeagnus conferta* Roxb.) (密花胡颓子、南胡颓子、大果胡颓子) 是胡颓子科胡颓子属的多年生常绿灌木, 野生于热带密林中, 适应性强, 生长迅速, 果实营养丰富, 是一种有发展前景的热带淡季水果。羊奶果也是药用植物和非豆科结瘤固氮植物, 其根瘤是由放线菌中的弗兰克氏菌(*Frankia*) 侵染结瘤的。有关羊奶果的根瘤内生菌的亚显微结构已有研究报道^[1,2], 但羊奶果根瘤不同发育阶段的细胞结构和固氮功能的关系, 则尚未见报道。本文用光镜

和透射电镜方法观察研究了羊奶果幼瘤、成熟瘤、衰老瘤的显微和亚显微结构, 并测定了其固氮、吸氢活性, 比较根瘤在不同发育程度上结构的变化, 同时探讨其根瘤结构与功能的关系。

1 材料和方法

材料 羊奶果幼瘤、成熟瘤、衰老瘤取自厦门福建省亚热带植物研究所实验地的多年生植株。

光镜观察 新鲜根瘤洗净后, 用 FAA 溶液固定, 石蜡包埋, 切片厚度 10 μm , PAS- 苏木精染色^[3], 加拿大中性树胶封片, Olympus H 显微照相。

透射电镜观察 新鲜根瘤洗净后, 经 2.5% 戊二醛和 1% 四氧化锇双重固定后, 酒精逐级脱水, 环

收稿日期: 2002-04-08 接受日期: 2002-09-10

基金项目: 福建省科委资助项目。

福建省亚热带植物研究所植物生理学及福建农业科学院电镜室黄进华等同志协助工作, 谨致谢意。

氧丙烷过渡, Epon812 包埋, Sorvall MT-6000 型超薄切片器切片, 醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色, 用 JEM-100CX/II 型透射电镜观察。

固氮酶活性 依照乙炔还原法测定^[4]。

吸氢酶活性 参照汪化等方法^[5], 用 103 型气相色谱仪热导检测器测定。

2 结果和分析

2.1 外部形态

根瘤菌刺激皮层细胞不断分裂, 在羊奶果侧根上形成珊瑚状的根瘤簇, 根瘤一般是短椭圆形或棒状, 每个根瘤最初含有 2-3 个瘤瓣, 瘤瓣顶端无瘤根 (nodule root), 属桤木型根瘤^[6]。瘤瓣顶端白色, 其余部分深灰色, 横切面浅褐色, 有一圈带红色的含菌组织, 纵切面观, 顶端为分生组织, 下方分化出维管束和皮层组织, 皮层中的侵染细胞, 从瘤瓣顶端到基部, 呈逐渐发育成熟的趋势。幼瘤较小, 根瘤顶部为乳白色或略显黄色, 成熟瘤较大, 为黄棕色, 衰老瘤呈深褐色。

2.2 细胞结构

光镜下(图版 I: 1-3), 经 PAS- 苏木精染色后, 含菌细胞被染蓝黑色, 未染菌的皮层细胞被染成紫色。幼瘤染菌的细胞较少(图版 I: 1), 成熟瘤的较多(图版 I: 2), 衰老瘤的染菌和未染菌细胞都有部分解体(图版 I: 3)。电镜下(图版 I: 4-9), 可见根瘤菌在皮层细胞之间穿行(图版 I: 4, 5), 根瘤菌的这种早期侵染方式为胞间隙侵染。此期的内生菌是具有隔膜的分枝菌丝, 直径约 0.3-0.7 μm , 其细胞壁为电子密度较高的单层壁, 体内核物质分散, 没有明显的细胞核结构, 这与前人在一些胡颓子科植物根瘤内生菌的报道^[7, 8]一致。电镜观察表明, 成熟瘤(图版 I: 6, 7)中有许多泡囊, 泡囊是菌丝增殖到一定程度后, 在菌丝及其分枝的末端膨大形成的, 是 *Frankia* 不断发育分化的结果, 泡囊呈椭圆球形, 直径比菌丝大, 约 1.9-2.4 μm , 成熟泡囊电子密度高, 内外壁之间产生明显的“空区”, 内层壁内伸形成许多隔, 隔随机产生, 泡囊分成大小形状不规则的亚单元, 亚单元有条纹体, 由电子明暗相间的条纹组成。电镜下的幼瘤菌体呈黑点样, 幼瘤的侵染细胞中, 细胞核膨大, 并分叉变成指状核, 细胞中可见有脂体存在, 这与沙棘早期侵染细胞类似^[9]。衰老瘤内部已有部分解体, 泡囊分隔逐渐消失, 泡囊内出现空腔, 泡囊壁不呈双层壁结构(图版 I: 8, 9)。

2.3 固氮、吸氢活性

我们于 2001 年 11 月和 2002 年 3 月多次取样测定不同成熟度的羊奶果根瘤固氮活性, 表 1 的结果显示, 成熟瘤的固氮活性最高, 幼瘤次之, 衰老瘤的活性很低, 甚至测不出。不同时期取样的根瘤固氮活性也不同, 11 月份取样的根瘤固氮活性显著高于 3 月份取样的, 这和我们过去研究的结果一致^[10], 即根瘤固氮活性的变化和季节有关, 其规律是夏秋(6-11 月)活性较高, 冬季与早春由于根瘤大多衰败, 新瘤刚形成, 且气温较低, 活性也较低。表 2 表明, 羊奶果根瘤离体 6 h 后的固氮活性仍维持在一定水平上, 且变化不大。

表 1 羊奶果不同成熟度根瘤固氮活性
Table 1 Nitrogen fixation activity ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{FW h}^{-1}$) of root nodules at different developmental stages

| 测定日期 Date | 幼瘤 Young nodules | 成熟瘤 Mature nodules | 衰老瘤 Senescent nodules |
|--------------|---------------------|-----------------------|--------------------------|
| 2001-11-28 | 3.4906 | 12.3146 | - |
| 2002-3-21 | 1.1775 | 2.0138 | 0.0300 |

加 C_2H_2 后反应 3 h, 每个样品为 3-4 个重复。Three hours after reaction with C_2H_2 . Three or four replicates in each determination.

表 2 离体时间对羊奶果根瘤固氮活性的影响
Table 2 Effect of duration of excised root nodules on nitrogen fixation activity ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{FW h}^{-1}$)

| 材料 Materials | 离体时间 Duration of excised root nodules (h) | | | | | | |
|-----------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 3 | 3.5 | 4 | 4.5 | 5 | 5.5 | 6 |
| 幼瘤 Young nodules | 1.665 | 1.437 | 1.370 | 1.298 | 1.249 | 1.217 | 1.164 |
| 成熟瘤 Mature nodules | 2.704 | 2.459 | 2.365 | 2.330 | 2.295 | 2.244 | 2.194 |

测定时间: 2002.3.22, 每个样品 3-4 个重复。Determined on 22 March, 2002. Three or four replicates in each determination.

羊奶果根瘤具有吸氢酶^[10], 可回收固氮过程中放出的 H_2 , 重新获得能量, 从而提高固氮效率。从表 3 可见, 与不同成熟度的根瘤固氮活性的趋势一样, 成熟瘤的吸氢活性最高, 幼瘤次之, 衰老瘤最低。

表 3 羊奶果不同成熟度根瘤的吸氢活性
Table 3 Hydrogen uptake activity ($\mu\text{mol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{FW min}^{-1}$) of root nodules at different developmental stages

| 材料 Materials | 反应时间 Incubation time (h) | | | |
|-----------------------|--------------------------|------|------|------|
| | 1.5 | 3 | 4.5 | 6.0 |
| 幼瘤 Young nodules | 0.61 | 0.26 | 0.11 | 0.05 |
| 成熟瘤 Mature nodules | 0.81 | 0.34 | 0.22 | 0.14 |
| 衰老瘤 Senescent nodules | 0.37 | 0.14 | 0 | 0 |

2002.3.29 测定, 每个样品 3 个重复。Determined on 29 March, 2002. Three replicates in each determination.

3 讨论

在已出现有泡囊结构的植物根瘤中, 泡囊都是菌丝顶端膨大发育形成的, 且大多数是在成熟根瘤中出现。组织化学的研究表明, 用四氯唑盐处理的根瘤切片, 还原产生的大量的三苯基甲酯(formazane)结晶均集中于泡囊, 证明泡囊是根瘤中还原性最高的部位^[1], 而氮分子的固定要求很强的还原条件, 这是认为泡囊含有固氮酶的缘故。Van Straden 等^[12]报道, 从桤木(*Alnus glutinosa*)分离的一簇泡囊, 在适当的培养条件下可显示固氮活性。Vanden 等^[13]用香杨梅(*Myrica gale*)内生菌接种香蕨木(*Comptonia peregrina*), 产生的有效瘤和无效瘤的最明显区别是后者缺乏泡囊, 因此可认为泡囊是固氮的场所。王慧英等^[14]根据杨梅的实验结果, 也认为泡囊的大量出现可能是提高固氮活力的标志。本文的结果表明羊奶果的成熟瘤固氮活性较幼瘤、衰老瘤高, 在结构上最明显特征是产生了大量的泡囊。这也支持了“泡囊是固氮场所”的结论。

Newcomb^[15]用冰冻蚀刻法证明, 牛奶子根瘤泡囊的“空区”是由 12-15 个薄层组成, 这些薄层由脂类构成, 在常规制样中容易被抽提, 一般认为这些脂质层是泡囊内固氮酶的防氧屏障。从本文结果看, 在羊奶果成熟根瘤的成熟泡囊中, 也存在这种“空区”。在衰老瘤的残留泡囊中, “空区”消失, 可能是由于泡囊内固氮酶的防氧屏障丧失, 导致固氮能力明显下降, 甚至消失。

羊奶果成熟瘤的固氮活性较幼瘤和衰老瘤高, 且在离体后能在较长时间内维持一定水平, 这除与泡囊结构有关外, 可能与其具有吸氢酶活性也有关, 因吸氢酶能回收固氮过程中放出的 H_2 。通过对 H_2 的氧化, 保护固氮酶免受氧的损伤, 并可消除细胞内过量 H_2 对固氮作用的抑制^[16], 从而提高固氮效率。

参考文献

- [1] Wang H Y (王慧英), Huang W N (黄维南). The ultrastructure of endophyte and the infection thread in root nodule of *Elaeagnus conferta* Roxb. [A] In: You C B, Chen Z L. Agricultural Biotechnology [M]. Beijing: China Sci Techn Press, 1992. 787-788. (in Chinese)
- [2] Wang H Y (王慧英), Huang W N (黄维南). Submicroscopic structure of infection thread and infected cell in root nodules of *Elaeagnus conferta* [J]. Subtrop Plant Res Commun (亚热带植物通讯), 1995, 24(1):1-3. (in Chinese)
- [3] Li Z L (李正理). Technology of Plant Sectioning [M]. Beijing: Science Press, 1978. 67-69. (in Chinese)

- [4] Shanghai Society for Plant Physiology (上海植物生理学会). Handbook of Phytophysiological Experiment [M]. Shanghai: Shanghai Sci Techn Press, 1985. 259-264. (in Chinese)
- [5] Wang H (汪化), Song H Y (宋鸿遇). A H_2 -uptake hydrogenase in *Rhizobium astragali* in relation to nitrogen fixation [J]. Acta Phytophysiol Sin (植物生理学报), 1984, 10(1):63-71. (in Chinese)
- [6] Zeng D (曾定). The Biology of Nitrogen Fixation [M]. Xiamen: Xiamen Univ Press, 1987. 183-212. (in Chinese)
- [7] Research Group of Symbiotic Nitrogen Fixation, Laboratory of Nitrogen Fixation, Shanghai Institute of Plant Physiology (上海植物生理研究所共生固氮组). Investigations on symbiotic nitrogen fixation of non-leguminous plant II. The fine structure of the root nodules of *Elaeagnus* [J]. Acta Bot Sin (植物学报), 1977, 19(4): 247-251. (in Chinese)
- [8] Wang H Y (王慧英), Huang W N (黄维南), Cai K Q (蔡克强). The submicroscopic structure of the endophyte of *Elaeagnus conferta* Roxb. [J] Acta Phytophysiol Sin (植物生理学报), 1993, 19(1): 61-65. (in Chinese)
- [9] Qu D M (曲东明), Wang S (王双), Han S H (韩善华). Nitrogen-fixing root nodules and its *Frankia* endophyte of *Hippophae rhamnoides* L. [J] Acta Bot Boreal-Occident Sin (西北植物学报), 1998, 18(1):60-65. (in Chinese)
- [10] Cai K Q (蔡克强), Lan G (蓝谷), Huang W N (黄维南). Nodulation and nitrogen fixation in *Elaeagnus conferta* [J]. Subtrop Plant Res Commun (亚热带植物通讯), 1990, 19(2):6-10. (in Chinese)
- [11] Angulo A F, Van Dijk C, Quispel A. Symbiotic interactions in non-leguminous root nodules [A]. In: Nutman P S. Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants [M]. Cambridge England: Cambridge University Press, 1976. 457-484.
- [12] Van Straden J, Akkermans A D L, Roelfsen W. Nitrogenase activity of endophyte suspension derived from root nodules of *Alnus*, *Hippophae shepherdia* and *Myrica* spp. [J] Nature, 1977, 266:257-258.
- [13] Vanden Bosch K A, Torrey J G. Host-endophyte interactions in effective nodules induced by the endophyte of *Myrica gale* [J]. Can J Bot, 1983, 61:2898-2909.
- [14] Wang H Y (王慧英), Huang W N (黄维南). Observation on the structure and ultrastructure of root nodule and nitrogenase activity in *Myrica rubra* [J]. Acta Phytophysiol Sin (植物生理学报), 1990, 16(2):153-157. (in Chinese)
- [15] Newcomb W, Baker D, Torrey J G. Ontogeny and fine structure of effective root nodules of the autumn olive (*Elaeagnus umbellata*) [J]. Can J Bot, 1987, 65:80-94.
- [16] You C B (尤崇钧), Jiang Y M (姜涌明), Song H Y (宋鸿遇). Biological Nitrogen Fixation [M]. Beijing: Science Press, 1987. 129-162. (in Chinese)

图版说明

图版 I

1-3 光学显微镜, 4-9 透射电子显微镜。

1. 幼瘤。示未侵染细胞 (UC) 和侵染细胞 (IC); $\times 40$

2. 成熟瘤。示维管束 (VB); $\times 40$

3. 衰老瘤。未侵染细胞 (UC) 和侵染细胞 (IC) 都有部分解体; $\times 40$
4. 幼瘤。菌体透过细胞壁 (CW) 侵入皮层细胞; $\times 4\ 000$
5. 幼瘤。皮层细胞中可见有脂体 (L) 存在; $\times 14\ 000$
6. 成熟瘤。出现大量泡囊 (V); $\times 4\ 000$
7. 成熟瘤。示菌丝 (H) 和泡囊 (V) 的双层壁之间的“空区” (ETR); $\times 10\ 000$
8. 衰老瘤。泡囊 (V) 不呈双层壁结构, 泡囊逐渐解体; $\times 5\ 000$
9. 衰老瘤。示泡囊内出现空腔或内容物解体。 $\times 10\ 000$

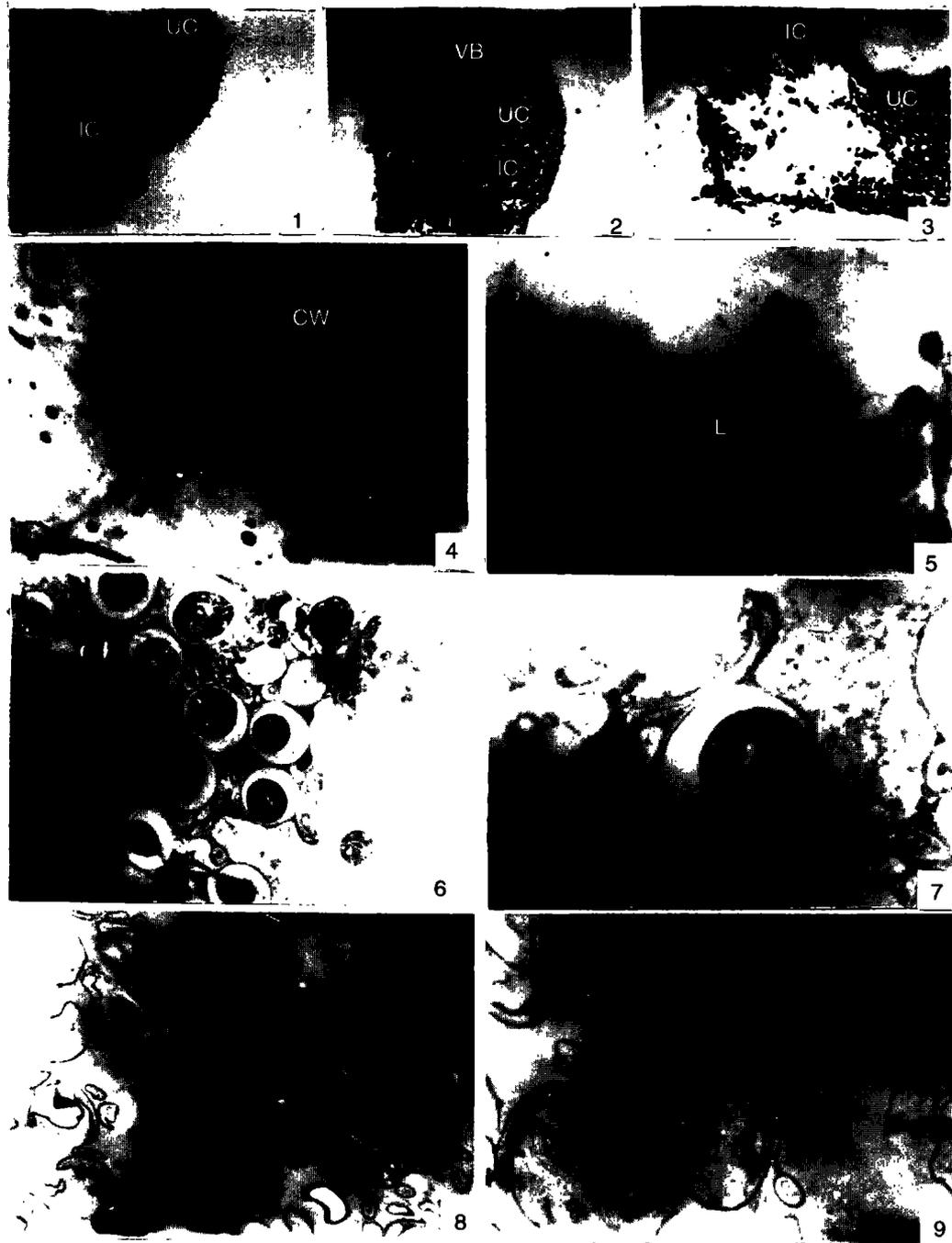
Explanation of plate

Plate I

1-3 light microscope, 4-9 transmission electron microscope.

1. Young nodules, showing uninfected cells (UC) and infected cells (IC); $\times 40$

2. Mature nodules, showing vascular bundle (VB); $\times 40$
3. Senescent nodules. Both uninfected cells (UC) and infected cells (IC) are degenerating partly; $\times 40$
4. Young nodules. *Frankia* penetrate cell walls (CW) of nodule cortex; $\times 4\ 000$
5. Young nodules. Lipid body (L) existing in infected cells; $\times 14\ 000$
6. Mature nodules, showing numerous vesicles (V); $\times 4\ 000$
7. Mature nodules, showing the electron transparent region (ETR) between the double walls of hyphae (H) and vesicle (V); $\times 10\ 000$
8. Senescent nodules. Double walls disappear and the vesicles (V) are degenerating; $\times 5\ 000$
9. Senescent nodules, showing degenerated vesicles. $\times 10\ 000$



See explanation at the text