

## 几种罗汉松属植物根瘤的形态与结构

黄宝灵<sup>1</sup>, 吕成群<sup>1</sup>, 于新宁<sup>1</sup>, 马光庭<sup>2</sup>, 武波<sup>3</sup>, 叶建仁<sup>4</sup>

(1. 广西大学林学院, 广西南宁 530004; 2. 广西大学农学院, 广西南宁 530004; 3. 广西大学生命科学学院, 广西南宁 530004; 4. 南京林业大学森林资源与环境学院, 江苏南京 210037)

**摘要:** 对分布在广西的几种罗汉松属植物自然结瘤的根瘤形态和显微结构进行了观察。结果表明: 几种罗汉松属植物所结的根瘤形态是一致的, 均为球形或近球形, 直径约 1.0~1.5 mm。根瘤的组织结构从内向外包括: 维管组织、薄壁细胞、侵染细胞和表皮(周皮); 侵染细胞与薄壁细胞呈不均匀的相间分布。侵染细胞中所含菌体为细菌。此外还发现细叶罗汉松根瘤的侵染细胞中有变形膨大的细胞核。总体上看, 罗汉松属植物根瘤在形态与结构上与豆科植物的根瘤有许多相似之处。

**关键词:** 罗汉松属; 根瘤; 形态; 结构

**中图分类号:** Q944.49 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2005)03-0226-03

## The form and structure of the nodules of several species of *Podocarpus*

HUANG Bao-ling<sup>1</sup>, LU Cheng-qun<sup>1</sup>, YU Xin-ning<sup>1</sup>,  
MA Guang-ting<sup>2</sup>, WU Bo<sup>3</sup>, YE Jian-ren<sup>4</sup>

(1. Forestry College, Guangxi University, Nanning 530004, China; 2. Agricultural College, Guangxi University, Nanning 530004, China; 3. Life Sciences College, Guangxi University, Nanning 530004, China; 4. College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

**Abstract:** It is a universal phenomenon in natural world that there are nodule on the roots of *Podocarpus*. The form and the structure of the nodules of four species of *Podocarpus* distributed in Guangxi were studied in this paper. The shape of the natural nodules of *Podocarpus* plants is identical. They are spherical or approximate spherical. The diameter of the nodule is about 1.0~1.5 mm. *Podocarpus* root nodules are composed of four major types of tissues, i. e., vascular, parenchymatous cell, infected cell and cortex; Parenchymatous cell is alternate but unwell-distributing with infected cell. The germs in the infected cell is bacterium. In addition, we discovered a large and out of shape nucleus in the infected cells of the nodules. To sum up, the shape and structure of the nodule of *Podocarpus* plants are similar to that of legume.

**Key words:** *Podocarpus*; root nodule; form; structure

在自然界中, 罗汉松属植物普遍具有结瘤的现象。根瘤是豆科植物与根瘤菌、木本双子叶植物与弗氏放线菌共生形成的特殊结构, 是生物固氮的重要场所; 肿瘤是土壤农杆菌侵染植物导致植物病害

的特殊病症。自它们被发现一百多年来, 人们不仅对它们的互作关系进行了广泛而深入的研究, 对其瘤的形态和结构也进行了比较细致的研究(韩善华, 1988。曲东明等, 1997)。罗汉松属(*Podocarpus*)

收稿日期: 2004-07-08 修订日期: 2004-09-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30170033)

作者简介: 黄宝灵(1957-), 女, 广西凌云人, 博士, 研究员, 主要从事森林培育和森林微生物学研究。

植物根瘤虽被林业工作者发现,但对其根瘤的形态、结构和功能至今未见诸报道。作者经系统调查,证实在自然界中,罗汉松属植物的根系普遍具有结瘤现象,并对罗汉松(*Podocarpus macrophyllus*)的根瘤内生细菌进行分离纯化,回接宿主幼苗结瘤,证明罗汉松根瘤为其内生细菌所致(黄宝灵等,2002)。为了弄清罗汉松属植物自然根瘤与上述三种微生物互作致瘤体系所形成的瘤结构的同异,本研究采集了分布在广西的4种罗汉松属植物的根瘤,采用植物解剖学技术,研究其形态和结构。

## 1 材料与方 法

### 1.1 根瘤样品的采集及采集地点

罗汉松采自广西大学林学院苗圃约20年生的小树林,海拔约100 m;鸡毛松采自防城城市十万大山山脚约500年生的古树,海拔约600 m;小叶罗汉松采自广西大学东校园约10年生的绿化树,海拔约80 m;短叶罗汉松采自广西大明山自然保护区山顶天然林,树龄不详,海拔约1500 m。其树下植被均无豆科植物。采用“顺藤摸瓜”的方法,取结瘤的细根或树下结瘤的小树苗带回实验室,洗净根瘤表面的泥土,拍照后处理备用。

### 1.2 根瘤扫描

日本产JEM-1200EX/S电子显微镜扫描瘤体外观。

### 1.3 超薄切片的制作

将根瘤样品用戊二醛固定24 h,饿酸后固定3 h,醋酸铀块染,经梯度乙醇脱水,环氧树脂包埋,超薄切片机切片,切片厚约90 nm,铅盐染色,电子显微镜观察,摄影。

### 1.4 半薄切片的制作

将包埋好的样品切成0.6  $\mu\text{m}$ 半薄切片,在万能显微镜下观察拍片。

## 2 结果与分析

### 2.1 根瘤的形态

在自然界中,罗汉松属植物根瘤形态多呈球形或近球形,直径约1.0~1.5 mm。不同树种之间无明显差别;根瘤主要着生在侧根上,初生根瘤多呈两侧排列,而较老的根瘤有簇生现象(图版I和图版II)。水洗时,部分根瘤很容易脱落,但相当部分的

瘤不脱落;不脱落的根瘤手感质地硬,老龄、色黑褐的瘤用刀片解剖时坚硬而有矿化感,说明罗汉松属植物的根瘤中有一部分可宿存较长时间,直到幼根发育成为粗根才消失或随幼根的死亡而死亡。脱落与不脱落根瘤的这种差异可能与其发育的程度有关。当切开根瘤时,没有发现类似豆科植物根瘤那样的红色根瘤组织,因而推测这种根瘤组织可能不含血红蛋白或含量很少。

### 2.2 根瘤的显微结构

从根瘤的纵向切面(图版III:A、B、C)可以看到,罗汉松属植物根瘤的前端无分生组织,为有限根瘤。根的维管组织长入到根瘤中部,说明根瘤与根之间存在物质交换的关系;维管组织外有一层类似中柱鞘的组织结构,由于富含内含物而着色很深。同时,根瘤外层有周皮,内为薄壁细胞。在小叶罗汉松根瘤的切片(图版III:A)中,可以看到有细菌分布在薄壁细胞的细胞壁间;而在鸡毛松根瘤的切片(图版III:B)中,细菌已经侵入到薄壁细胞内部,形成了明显的侵染细胞,而且侵染细胞在根瘤中的分布主要位于瘤前端,基部分布较少,这反应出根瘤中的侵染细胞的形成时期是不一致的。

从鸡毛松根瘤的横向切面也可以看到,根瘤由周皮、薄壁细胞、侵染细胞和维管组织等几部分组成(图版III:E),此结构与豆科植物根瘤的相似。从小叶罗汉松和短叶罗汉松根成熟瘤前部横切观,只看到周皮、薄壁细胞和被细菌侵染的侵染细胞(图版III:D、F),侵染细胞集中分布在根瘤的中央,而薄壁细胞包围其外。同样,在未被细菌侵染的薄壁细胞的细胞壁上也可以看到细菌的分布。此外,在图版III:E中还看到两个大的侵染物体,从而证实了宿存根瘤中可能存在矿化侵染物的现象。

### 2.3 根瘤的超显微结构

在罗汉松属植物根瘤内被细菌侵染的一些细胞中,细胞的结构发生了明显的变化,细胞核膨大变形,细胞器和膜系统发达(图版IV:A、B)。

但细菌侵入到细胞之后,在不同树种根瘤中的分布情况却不尽相同,如在罗汉松、小叶罗汉松和短叶罗汉松根瘤的细胞中,菌体的数量较少(图版IV:F、D、E),而在鸡毛松的细胞中,不仅菌体数量多,而且菌体的形态还发生了明显的不规则的变化(图版IV:C)。在小叶罗汉松的衰老根瘤细胞中,一些大的类囊体正在分解或已经分解,囊内的菌体外溢进入细胞质中而留下一个个空囊和膜的碎片(图版IV:

G)。在图版 IV: H 中还发现一些特殊的未知结构, 这些结构外膜很厚, 膜内物质浓, 其中一个与一电子透明区相连的一端, 膜结构已消失, 另两个的膜结构也有开始分解的迹象, 这种结构的功能有待进一步阐明。

### 3 讨论

豆科植物与根瘤菌共生结瘤已为人们所熟知, 弗氏放线菌与一些双子叶植物共生结瘤的研究也在深入。这两类共生结瘤系统由于具有固定大气中氮素的功能而引起了人们的高度重视。然而, 从生物进化理论的角度看, 生物进化发展的进程虽然有跳跃式的, 但更多的是连续渐进式的。在高度进化发展的双子叶植物(含豆科植物)中, 人们发现了植物与细菌共生结瘤现象, 同时在较低等的裸子植物苏铁植物中也发现了苏铁的根与蓝细菌共生结瘤固氮的现象, 为此多年以来一直努力寻找更多的有益共生结瘤固氮体系。本实验观察结果表明, 在自然界中, 裸子植物罗汉松属的 4 种植物普遍具有根系与细菌共生形成根瘤的现象, 这一现象应该引起人们的关注。

从根瘤的纵切面和横切面的结构来看, 罗汉松属植物的根瘤结构与豆科植物的根瘤结构有相似之处, 即都由表皮(周皮)、薄壁细胞、侵染细胞和维管组织构成(黄大肪等, 2001), 而与根癌农杆菌形成的肿瘤有明显的不同。但瘤的顶端无分生组织, 故成熟根瘤为有限型。由于罗汉松属植物为乔木树种, 根瘤有宿存现象, 因而其根瘤表皮有栓化现象, 并发育出较坚硬的周皮。本实验中还发现, 少数根瘤有矿化的侵填体, 这在豆科植物根瘤和放线菌根瘤中未见有报道。

在根瘤菌根瘤和弗氏放线菌根瘤中, 细菌均是通过侵入线侵入宿主细胞中的(韩善华, 1988; 王慧英等, 1993), 但在本实验中未观察到此类结构, 内生细菌是如何释放到宿主细胞中尚不清楚。但从根瘤的纵、横切面以及电镜切片中均可明显看到, 这类内生细菌的迁移是通过胞壁间隙来完成的。

在豆科植物根瘤中, 根瘤的侵染细胞常常充满

根瘤菌(黄大肪等, 2001; 荆玉祥等, 1988), 而在罗汉松属植物根瘤的侵染细胞中菌体的数量要少得多, 尤其是在罗汉松和短叶罗汉松的根瘤细胞中, 菌体常常呈零星分布。

研究表明, 豆科植物根瘤的侵染细胞随着根瘤菌的侵染, 细胞质逐渐变浓, 核糖体、膨胀型内质网、质体、线粒体和高尔基体不断增多, 有时甚至在核膜和细菌之间还出现链状高尔基体(韩善华等, 1987)。在本试验中, 尽管没有发现这诸多的变化, 但也发现罗汉松和小叶罗汉松根瘤的侵染细胞中有细胞核膨大、膜系统发达的现象。

由于罗汉松属植物根瘤的形态和结构与豆科植物的根瘤有较多相似之处, 但又不完全一致, 这种差异是否会导致两类根瘤在功能上的差异有待进一步研究。

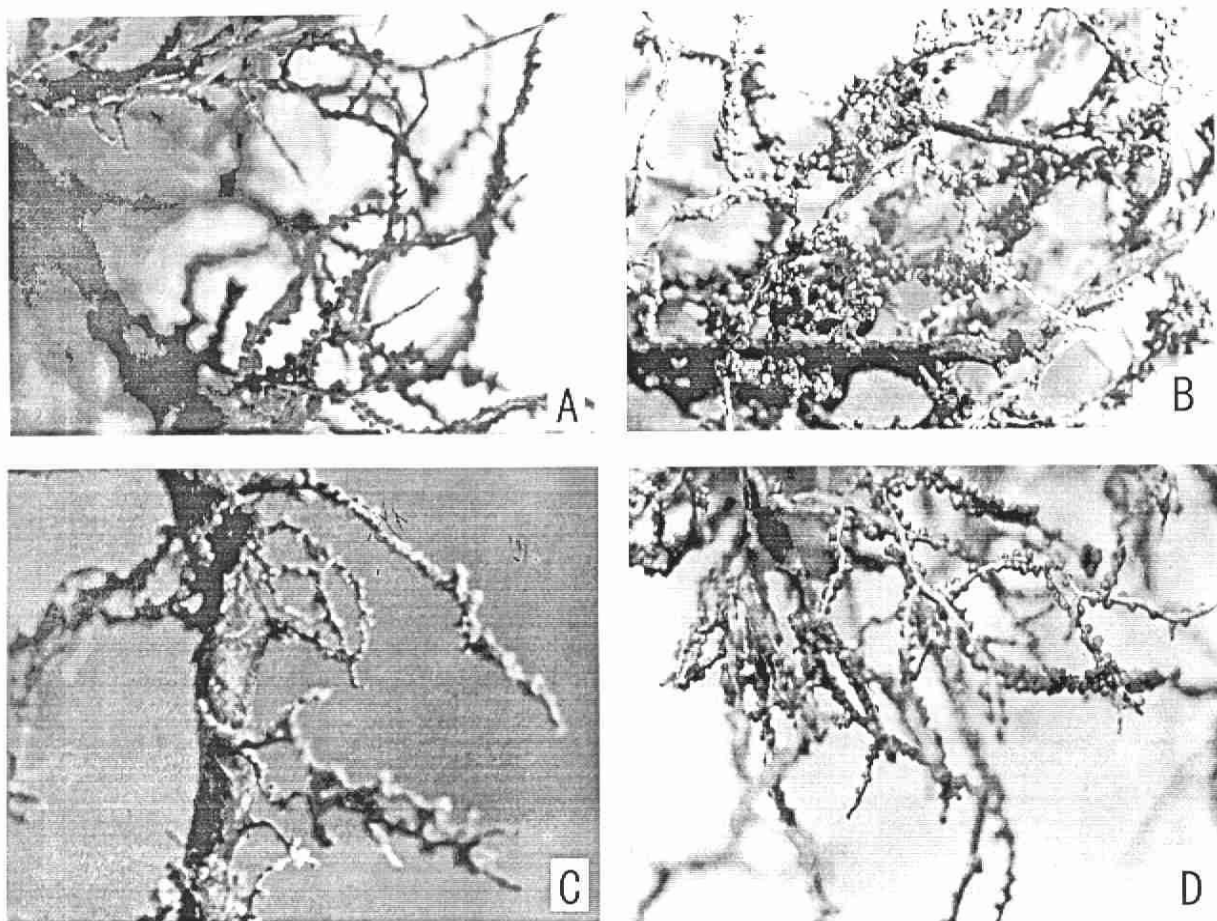
本文得到广西大学生物实验中心柏学亮教授、电镜室的文宗振高级工程师、赵会敏老师、广西林学院韦原莲实验师的大力支持, 特致谢忱。

### 参考文献:

- 曲东明, 范浩南, 韩善华. 1997. 放线菌根瘤的形成方式及组织结构[J]. 微生物学通报, 24(3): 165-167.
- 黄大肪, 林敏. 2001. 农业生物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 14-17.
- 韩善华. 1988. 豆科根瘤的超微结构研究[J]. 微生物学通报, 15(1): 19, 37-38.
- Huang BL(黄宝灵), Lu CQ(吕成群), Tang TJ(唐东阶), et al. 2002. Isolation and characteristics of bacteria in the nodule structure from *Podocarpus macrophyllus* (罗汉松根瘤内生细菌的分离和特性)[J]. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 42(5): 620-624.
- Han SH(韩善华), Yang AF. 1987. Ultrastructural features of Chinese soybean rootnodules(大豆根瘤的超微结构特征)[J]. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 27(3): 217-222.
- Jing YX(荆玉祥), Zhang BT(张宝田). 1988. Ultrastructural change in *Sesbania cannabina* rootnodules during their developments(发育过程中田菁根瘤超微结构的变化)[J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 30(2): 207-209.
- Wang HY(王慧英), Huang WN(黄维南), Cai KQ(蔡克强). 1993. The submicroscopic structure of the endophyte of *Elaeagnus conferta* Roxb(羊奶果根瘤内生菌的亚显微结构)[J]. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), 19(1): 61-65.

黄宝灵, 等: 几种罗汉松属植物根瘤的形态与结构  
HUANG Bao ling, et al.: The form and structure of the nodules of several  
species of *Podocarpus*

图版 I  
Plate I



四种罗汉松属植物的根瘤

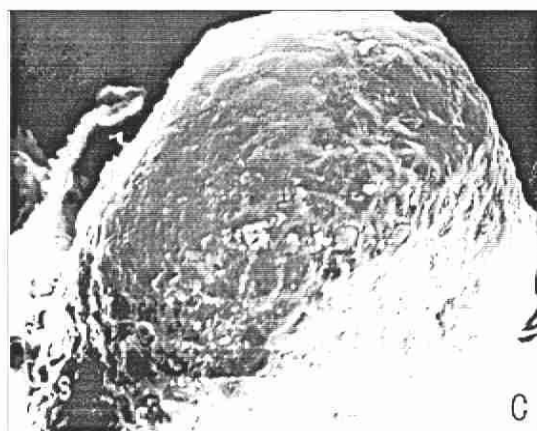
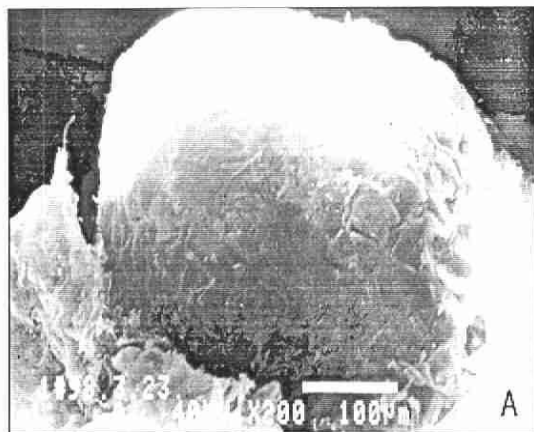
The nodules of four species of *Podocarpus*

A: 罗汉松根瘤; B: 鸡毛松根瘤; C: 小叶罗汉松根瘤; D: 短叶罗汉松根瘤。

A: The nodules of *P. macrophyllus*; B: The nodules of *P. imbricatus*; C: The nodules of  
*P. macrophyllus* var. *maki*; D: The nodules of *P. brevifolius*.

黄宝灵, 等:  
HUANG Bao-ling, *et al.* :

图版 II  
Plate II



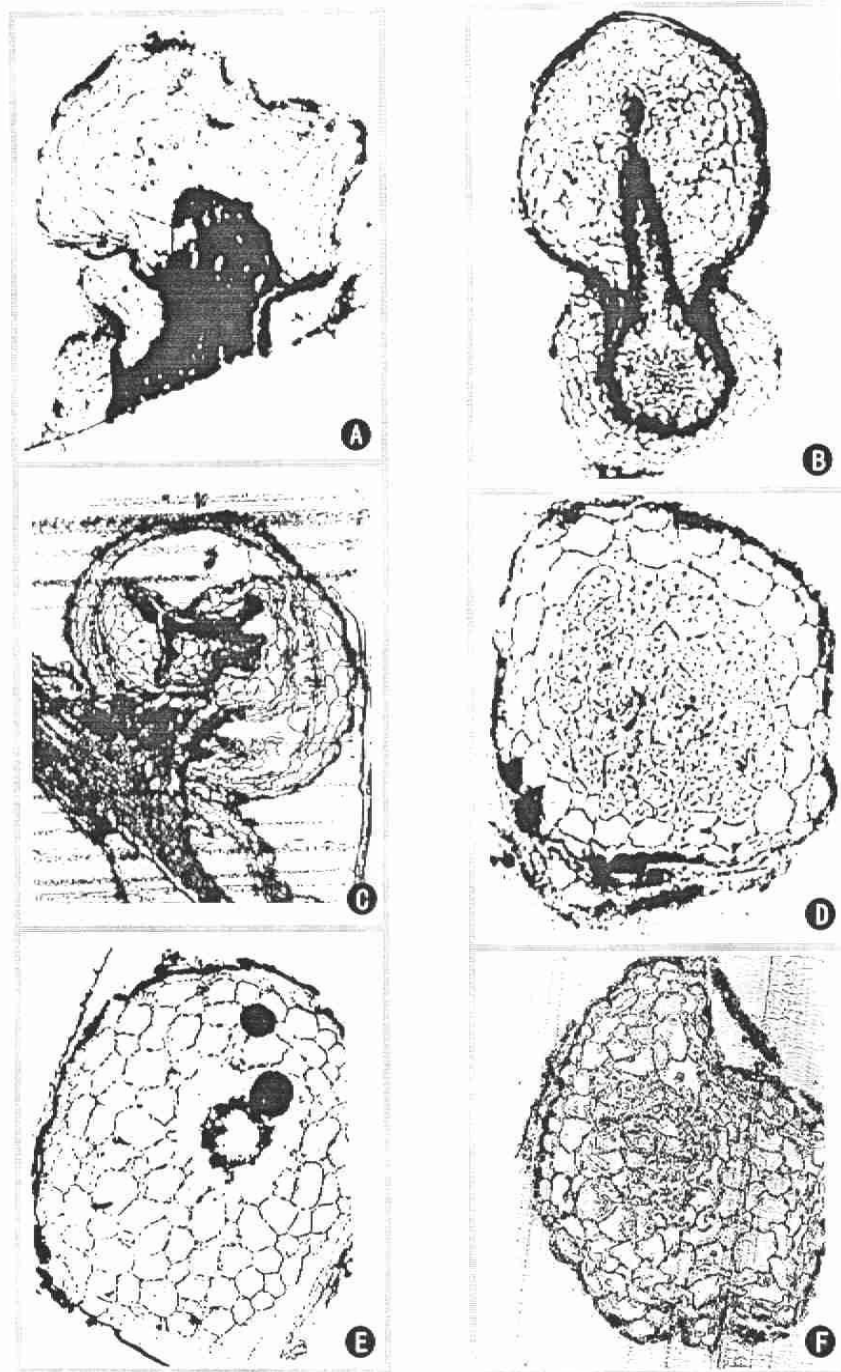
三种罗汉松属植物根瘤的形态

The nodules form of three species of *Podocarpus*

A: 罗汉松根瘤; B: 鸡毛松根瘤; C: 小叶罗汉松根瘤。

A: The nodules of *P. macrophyllus*; B: The nodules of *P. imbricatus*;

C: The nodules of *P. macrophyllus* var. *maki*.

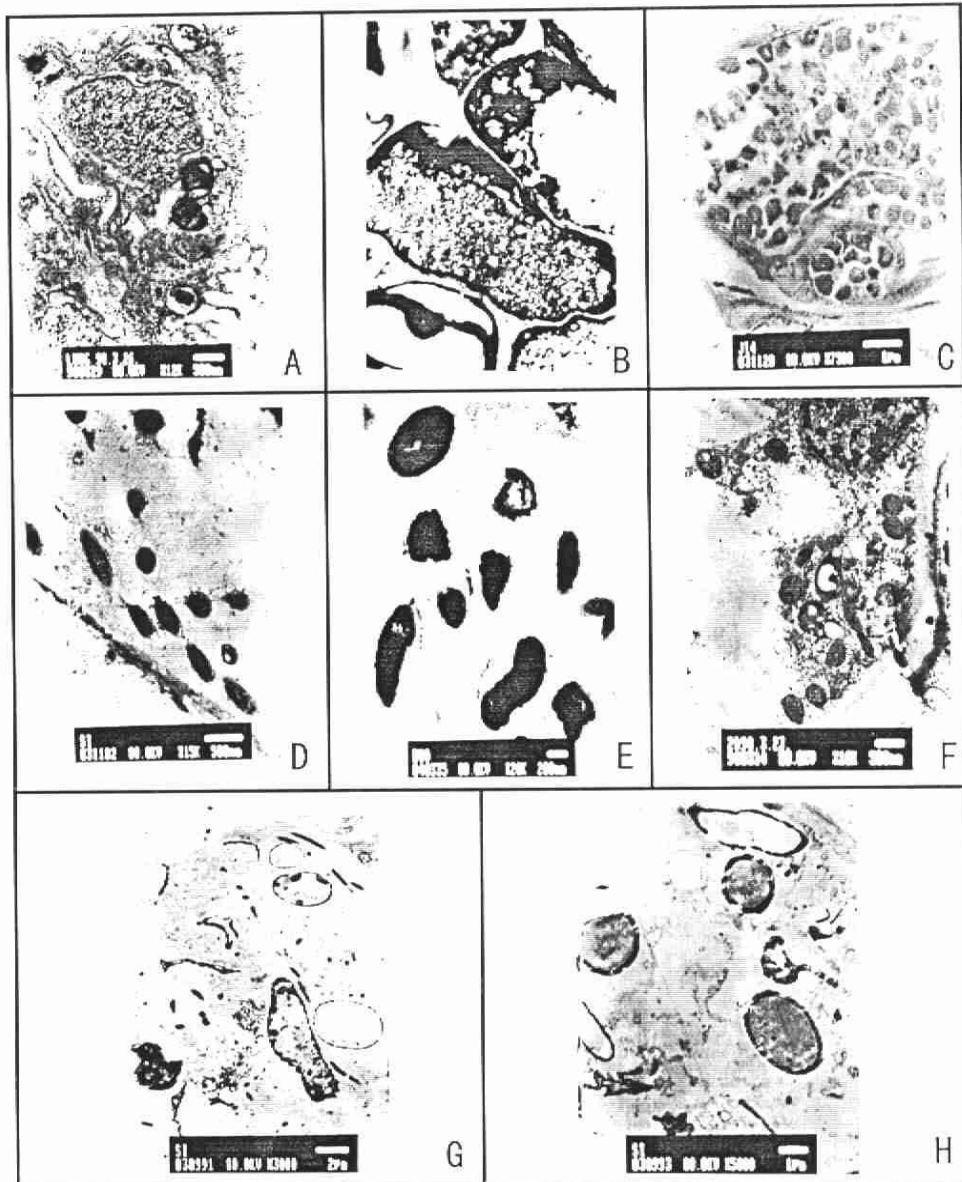


三种罗汉松属植物根瘤剖面

The microscopic structures of the nodules of three species of *Podocarpus*

A: 小叶罗汉松根瘤纵切面; B: 鸡毛松根瘤纵切面; C: 短叶罗汉松根瘤纵切面; D: 小叶罗汉松根瘤横切面; E: 鸡毛松根瘤横切面; F: 短叶罗汉松根瘤横切面。

A: The vertical section of the nodules of *P. macrophyllus* var. *maki*,  $\times 25$ ; B: The vertical section of the nodules of *P. imbricatus*,  $\times 33$ ; C: The vertical section of the nodules of *P. brevifolius*  $\times 50$ ; D: The transverse section of the nodules of *P. macrophyllus* var. *maki*,  $\times 25$ ; E: The transverse section of the nodules of *P. imbricatus*,  $\times 33$ ; F: The transverse section of the nodules of *P. brevifolius*,  $\times 50$ .



## 根瘤感染细胞的结构

The structure of the nodule infective cell of *Podocarpus*

A: 罗汉松根瘤感染细胞的变形细胞核、发达的膜结构和细胞器,  $\times 12\ 000$ ; B: 小叶罗汉松感染细胞的巨大变形核,  $\times 20\ 000$ ; C: 鸡毛松根瘤感染细胞中的菌体分布,  $\times 7\ 500$ ; D: 小罗松根瘤感染细胞中的菌体分布,  $\times 15\ 000$ ; E: 短叶罗汉松根瘤感染细胞中的菌体分布,  $\times 12\ 000$ ; F: 罗汉松根瘤感染细胞中的菌体分布,  $\times 10\ 000$ ; G: 小叶罗汉松根瘤衰败细胞中类囊体周膜,  $\times 3\ 000$ ; H: 小叶罗汉松根瘤衰败细胞中的特殊结构,  $\times 5\ 000$ 。

A: A out of shape nucleus and the structure of well-developed membrane and some organelle of the infected cell of the nodule of *P. macrophyllum*,  $\times 12\ 000$ ; B: A large and out of shape nucleus of the infected cell of the nodule of *P. macrophyllum* var. *maki*,  $\times 20\ 000$ ; C: Distribution of the bacterium in the infected cell of the nodules of *P. imbricatus*,  $\times 7\ 500$ ; D: Distribution of the bacterium in the infected cell of the nodules of *P. macrophyllum* var. *maki*,  $\times 15\ 000$ ; E: Distribution of the bacterium in the infected cell of the nodules of *P. brevifolium*,  $\times 12\ 000$ ; F: Distribution of the bacterium in the infected cell of the nodules of *P. macrophyllum*,  $\times 10\ 000$ ; G: The membrane envelope of some bacteroid in the degenerating cell of the nodule of *P. macrophyllum* var. *maki*,  $\times 3\ 000$ ; H: Some special structure in the degenerating cell of the nodule of *P. macrophyllum* var. *maki*,  $\times 5\ 000$ .