

珠状巨孢囊霉孢子的扫描和透射电镜观察

龙良鲲^{1,2}, 姚青³, 艾云灿², 朱红惠¹

(1 广东省微生物研究所, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东 广州 510070;
2 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275; 3 华南农业大学园艺学院, 广东 广州 510642)

摘要:对珠状巨孢囊霉 *Gigaspora margarita* 孢子壁进行了扫描电镜(SEM)和透射电镜(TEM)观察. SEM观察到孢子外壁有不规则的侵蚀状小孔, 且表面附着有多种形态的微生物. TEM观察到整个孢子壁由4层组成. 最外层孢壁(I层)厚1.5~1.8 μm; 次外层孢壁(II层)为条纹状的刚性层, 厚0.6~0.8 μm; 第III层孢壁约占整个孢子壁的80%, 该层孢壁存在隐约的亚层结构, 部分第III层孢壁出现侵蚀层, 侵蚀层中分布着大量由微小颗粒状生物体聚集成的细胞团; 最内层孢壁(IV层)非常薄, 仅0.15~0.20 μm, 其内侧间隔分布有因内壁加厚形成的乳凸状结构. 观察到的与珠状巨孢囊霉孢子壁紧密联系的微生物可能具有特殊的生态功能, 值得深入研究.

关键词:丛枝菌根真菌; 珠状巨孢囊霉; 超微结构; 伴生微生物

中图分类号: Q939.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2009)03-0045-04

Observation of *Gigaspora margarita* Spore-Wall with Scan and Transmission Electricity Microscope

LONG Liang-kun^{1,2}, YAO Qing³, AI Yun-can², ZHU Hong-hui¹

(1 Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou 510070, China;
2 College of Life Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;
3 College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Spore-wall of arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* was observed with scan electricity microscope (SEM) and transmission electricity microscope (TEM). SEM observation demonstrated many irregular eroded pits and diversity of microorganisms on the surface of the spore. TEM observation indicated that the spore-wall was composed of four layers. The outer layer was 1.5 – 1.8 μm thick, the second layer was 0.6 – 0.8 μm thick with stripe and rigidity, and the third layer was relatively thicker and accounting for up to 80% of the whole spore-wall. In the third layer, some indistinct sublayers were observed, clear eroded sublayers also appeared in partial sections, and lots of small granule-shaped organisms unevenly clustered in these eroded sublayers. The innermost layer was very thin, about 0.15 – 0.20 μm, and some warts due to the thickening of the inner wall discontinuously distributed in inside of this layer. Those microorganisms tightly associated with *G. margarita* spore may possess potential special ecological functions, and further study on it is deserved.

Key words: arbuscular mycorrhizal fungi; *Gigaspora margarita*; ultrastructure; associated microorganisms

丛枝菌根真菌 (Arbuscular mycorrhizal fungi, AMF) 是一类能与绝大多数植物互惠共生的土壤微生物^[1]. 由于具有独特的生命形式和特有的生态功能, AMF 的相关研究一直受到国内外的广泛关注. 从

超微水平上认识 AMF, 是揭示其生命规律或本质的重要途径之一. 国外很早就以电镜技术开展了 AMF 的超微结构研究, 并取得了许多具有积极意义的结论^[2,4]. 至今, 国内在该领域的研究鲜见文献报道. 珠

收稿日期: 2008-09-15

作者简介: 龙良鲲 (1978—), 男, 助理研究员, 博士; 通讯作者: 朱红惠 (1970—), 女, 研究员, 博士, E-mail: zhuhonghui66@yahoo.com.cn

基金项目: 广东省自然科学基金 (E05202480, 07000509)

状巨孢囊霉 *Gigaspora margarita* 是一种典型的 AMF, 其在我国南北分布广泛, 常作为模型菌种研究 AMF 各种生物学特征^[5]. 本文以扫描电镜 (SEM) 和透射电镜 (TEM) 技术, 针对珠状巨孢囊霉孢子壁的结构与特征进行了观察.

1 材料与方法

1.1 生物材料

珠状巨孢囊霉 *Gigaspora margarita* Becker & Hall MAFF 520054 源自日本农、林、渔业部遗传资源库, 由广东省菌种保藏与应用重点实验室以紫花苜蓿 *Medicago sativa* 为宿主植物和等体积砂、土混合物为基质进行扩繁, 并以湿筛法^[5] 收集成熟、健康的孢子, 备用.

1.2 SEM 观察

取 50 粒珠状巨孢囊霉孢子, 参照 Walley 等^[6] 方法制样. 孢子用 0.5 mL 无菌水漂洗 2 次后, 用 φ 为 1% 的 OsO_4 固定 1 h, 磷酸缓冲液 (PBS) 漂洗 2 次, 10 min/次, 然后用 φ 为 50% 和 70% 的乙醇各漂洗 10 min. 喷金后, 于 ESEM XL-30 扫描电镜 (荷兰 FEI 公司) 观察.

1.3 TEM 观察

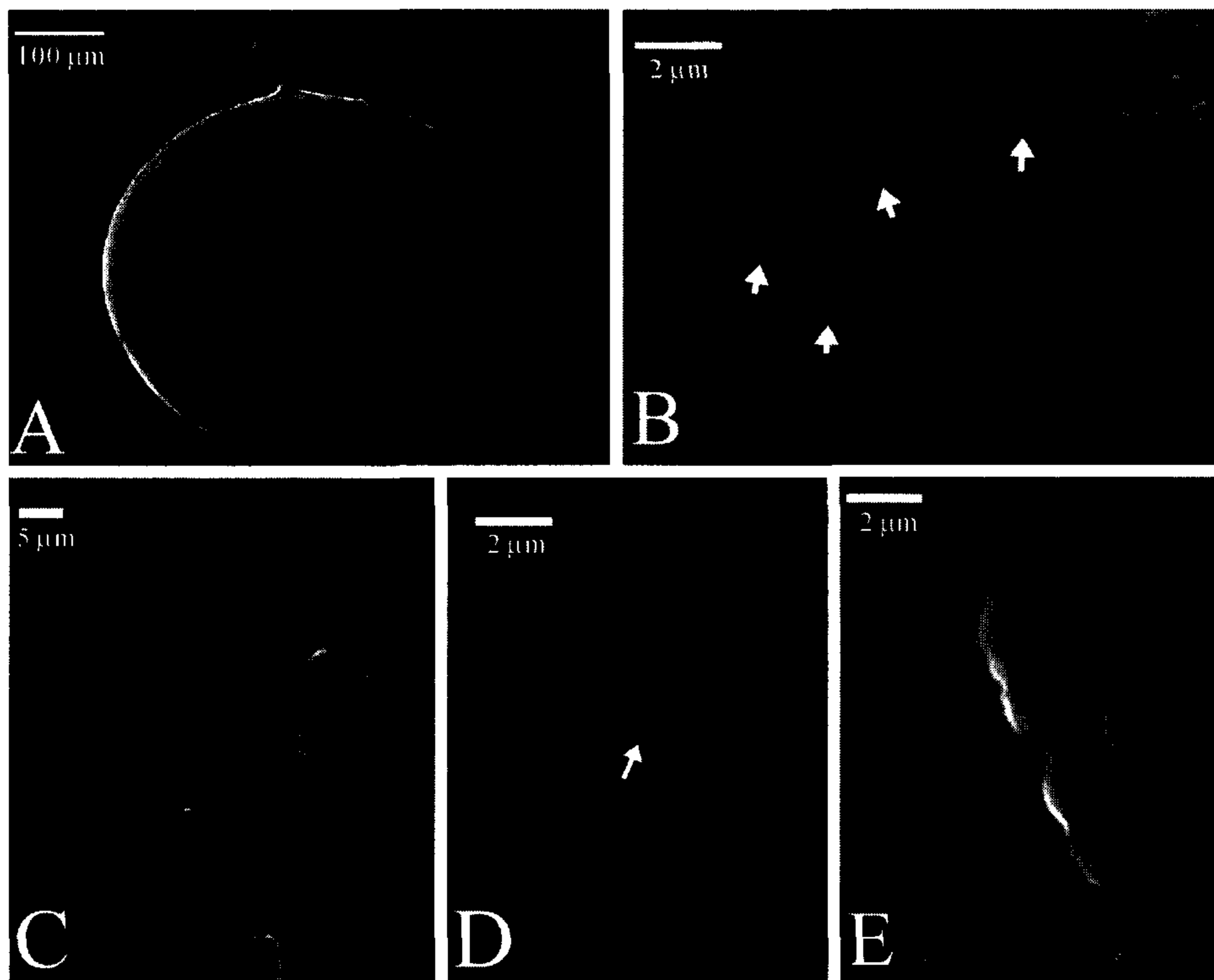
参照 Macdonald 等^[7] 的方法进行珠状巨孢囊霉孢子的 TEM 制样. 具体步骤为 (a) 孢子用 $\rho = 5 \text{ mg/mL}$ 的氯胺-T 表面消毒 10 min, 无菌水漂洗 2 次, 浸入 $\rho = 2 \text{ mg/mL}$ 的戊二醛 (0.1 mol/L 二甲砷酸钠缓冲

液配制) 中, 在解剖镜下, 用尖针将孢子 (保持在戊二醛固定液中) 轻轻对称刺破, 使得固定液进入孢子内部, 4 °C 放置 1 h; (b) 孢子样品用 0.1 mol/L 二甲砷酸钠缓冲液漂洗 3 次, 20 min/次; (c) 用 $\varphi = 1\%$ 的 OsO_4 (0.1 mol/L 二甲砷酸钠缓冲液配制) 固定 40 min, 0.1 mol/L 二甲砷酸钠缓冲液漂洗 3 次, 20 min/次; (d) 分别用 φ 为 50%、70%、80%、90%、99%、100% 的乙醇和 φ 为 99%、100% 的环氧丙烷进行梯度脱水, 各 15 min/次; (e) 以体积比为 3/1、1/1 和 1/3 的环氧树脂 (Epon 812)/环氧丙烷混合物逐级浸透样品 (轻轻振荡), 2 h/级; 纯环氧树脂浸透过夜; (f) 纯树脂包埋样品, 在 70 °C 培育 18 h; (g) 玻璃刀超薄切片, 厚度 80 ~ 90 nm; (h) 将切片以 $\rho = 2 \text{ mg/mL}$ 的乙酸双氧轴染色 40 min, 以及柠檬酸铅 (1.33 g 硝酸铅、1.76 g 柠檬酸三钠和 0.32 mg 氢氧化钠用蒸馏水溶解, 并定容至 50 mL) 染色 5 min; (i) FEI-Tecnai12 透射显微镜 (荷兰 FEI 公司) 观察.

2 结果

2.1 SEM 观察

通过 SEM 观察, 可见珠状巨孢囊霉孢子产生于菌丝顶端 (图 1 A), 孢壁表面凹凸不平, 不均匀地分布着许多侵蚀状的小孔 (图 1 B). 孢壁表面粘附有多种形态的微生物体, 如直径约 2 μm 的丝状体, 细小的分支状菌体 (直径约 0.2 μm), 以及较大 (约 2.3 $\mu\text{m} \times 8.5 \mu\text{m}$) 的串状粘质菌体 (图 1 C、D、E).



A: 菌丝顶端形成的孢子; B: 孢壁表面侵蚀状的小孔; C: 丝状菌体粘附于孢壁表面; D: 孢壁表面细小的丝状分枝菌体; E: 孢壁表面较大的串状粘质菌体

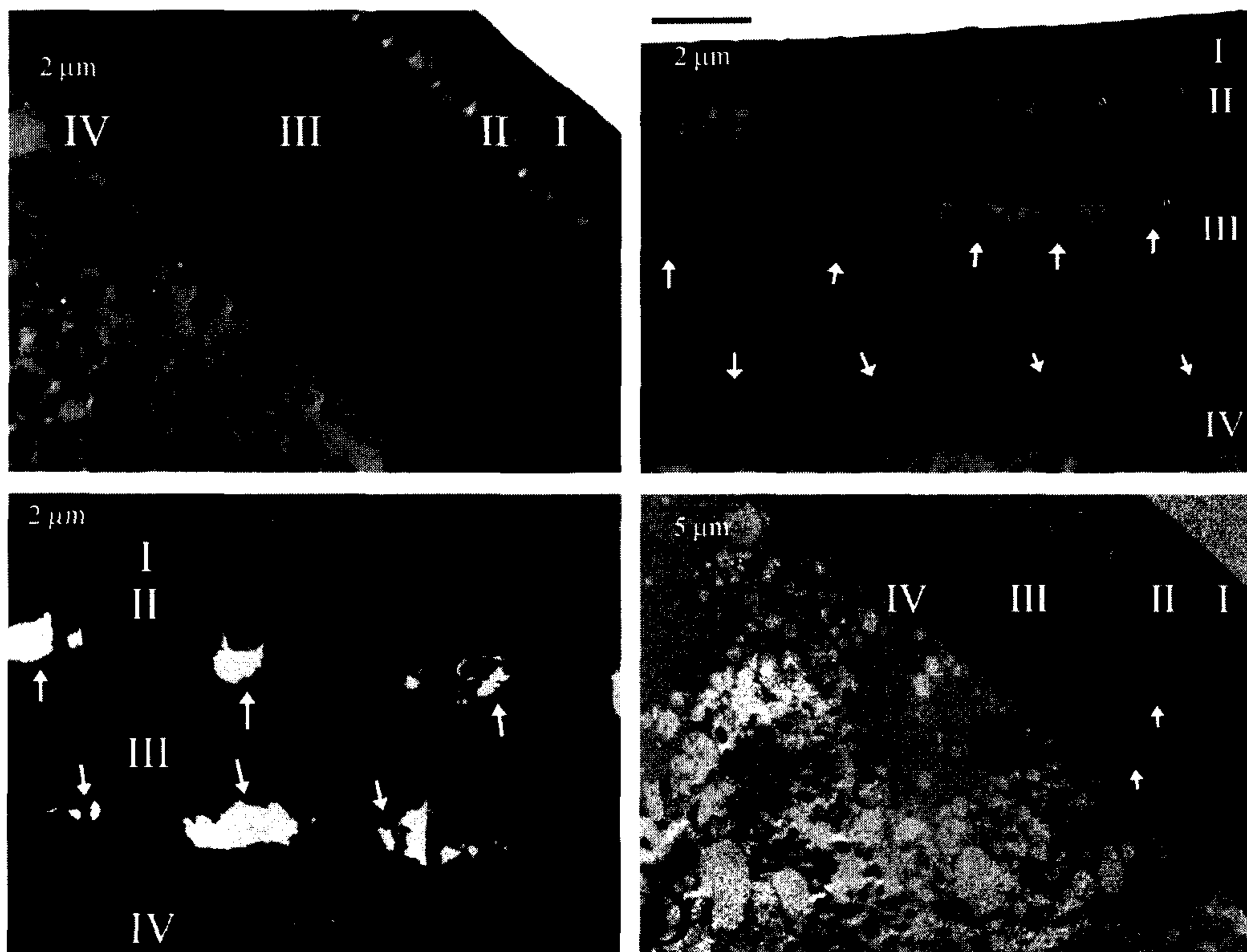
图 1 扫描电镜观察珠状巨孢囊霉孢子壁

Fig. 1 SEM images of *Gigaspora margarita* spore-wall

2.2 TEM 观察

以 TEM 技术对珠状巨孢囊霉孢子壁的横切面进行了观察. 整个孢子壁厚 $9 \sim 13 \mu\text{m}$, 由明显的 4 层壁 (I ~ IV) 组成, 其中: 最外层孢壁 (I 层) 质地细密, 厚 $1.5 \sim 1.8 \mu\text{m}$ (图 2 A); 次外层孢壁 (II 层) 为带条纹的刚性层, 厚 $0.6 \sim 0.8 \mu\text{m}$; 第 III 层孢壁约占整个孢子壁的 80%, 厚 $7 \sim 8 \mu\text{m}$, 该层存在隐约的亚层或迭片结构 (图 2 A), 部分第 III 层孢壁有明显分

层结构, 即出现 2 个连续的侵蚀层, 且这些侵蚀层中不均匀地分布着直径约 $0.1 \mu\text{m}$ 的颗粒状物聚集而成的细胞团, 这些细胞团电子密度高, 形状不规则, 数量众多 (图 2 B), 在部分切片的第 III 层孢壁的侵蚀层中存在空穴 (图 2 C); 最内层孢壁 (IV 层) 呈现为高电子密度, 非常薄, 仅 $0.15 \sim 0.30 \mu\text{m}$, 且其内侧有间隔分布的孢壁加厚形成的乳凸状结构 (图 2 D).



A: 完整的孢子壁由 I、II、III、IV 层组成; B: 第 III 层孢子壁出现侵蚀层, 侵蚀层中分布有微小颗粒状物聚集成的细胞团 (白色箭头, 高电子密度); C: 第 III 层孢子壁侵蚀层的空穴 (白色箭头); D: 第 III 层孢子壁明显的分层 (白色箭头), 及第 IV 层孢子壁内侧加厚形成乳突状结构 (WT, 黑色箭头); CP: 细胞质

图 2 透射电镜观察珠状巨孢囊霉孢子壁

Fig. 2 TEM images of *Gigaspora margarita* spore-wall

3 讨论

在珠状巨孢囊霉孢子的 SEM 制样过程中, 经过包括 ϕ 为 50% 和 70% 乙醇各漂洗 10 min 在内的多次漂洗之后, 观察结果仍然表明有多种形态的微生物粘附于孢子壁的外表面 (图 1 A、C、D、E), 显然这些微生物与珠状巨孢囊霉孢子具有较为紧密的联系. AMF 的孢子能够被其他细菌 (含放线菌) 或真菌定殖的报道已不少见, 如 Xavier 等^[8] 从表面消毒的明球囊霉 *Glomus clarum* 孢子上分离到许多种类的细菌, 而 Hijri 等^[9] 从盾巨囊霉 *Scutellospora castanea* 孢子中分离到 2 株子囊菌. 此外, 在珠状巨孢囊霉的孢子壁外表面观察到许多侵蚀状小孔, 这与 Roesti 等^[10] 对地球囊霉 *Glomus geosporum* 的 SEM 观察结果

一致. Filippi 等^[11] 用透射电镜发现摩西球囊霉 *Glomus mossea* 的孢子壁外层的孔中有细菌细胞存在, 并推测这些孔是细菌的裂解活性所致.

以 TEM 技术对 AMF 孢子进行观察的难点在于孢子壁厚且致密, 固定液和包埋剂难以进入孢子内部, 造成样品固定、包埋和超薄切片的困难^[12]. 借助外力将 AMF 孢子壁穿破, 能够较好地对样品进行固定和包埋^[13], 前期以次氯酸钠溶液处理 AMF 孢子, 可能对孢子的固定和浸透包埋有所帮助^[2], 也有人用抽真空结合激光微创的方法成功对 AMF 孢子进行了固定^[14]. 此外, 物理破壁及化学固定方法容易造成真菌内含物中某些细胞结构的改变, 而以冷冻切片技术进行制样, 能使这些问题得以较好地解决^[15]. 由于实验条件所限, 本研究用尖针将其孢子壁轻轻

刺破,尽管珠状巨孢囊霉孢子个体大,且孢壁厚,仍能使固定液对样品进行较好地固定.在珠状巨孢囊霉孢子的TEM制样中,戊二醛和锇酸的固定时间不宜过长,否则样品会变脆,难以实施超薄切片(未显示的数据).

TEM观察结果表明,正常的珠状巨孢囊霉孢子壁由4层组成,其中第Ⅲ层有隐约的亚层,这与Sward^[2]和Grandmaison等^[16]的报道一致.本文中珠状巨孢囊霉各层孢子壁的厚度与Sward^[2]的结果有所差异,这可能与试验菌株差异或制样方法的不完全一致有关.文中发现第Ⅲ层孢子壁会出现侵蚀层,且其中分布有大量比普通细菌小得多的颗粒状物(约0.1 μm)组成的细胞团,推测这些细胞团正在侵蚀孢子壁.其他一些AMF的相关研究也报道有细菌或细菌类似物能够存在于AMF的孢子壁中^[6-7],但这些生物体与本文中观察到的菌体在形态和着生位点上有明显不同.细菌或其类似物包埋于AMF孢子壁中可以得到更好的物理保护^[6],而这些微小生物体存在于健康的AMF孢子中,其与AMF究竟是怎样的生态关系值得进一步研究.此外,在TEM的观察过程中,也发现了大量的杆状菌体分布于珠状巨孢囊霉的细胞质中,这与Bianciotto等^[17]的报道相符.AMF的许多科学问题(如与植物的共生理理、不能进行纯培养等)还未能解决,从超微水平对AMF进行深入地观察和分析,将成为解决这些问题的重要途径之一.

致谢:感谢华南农业大学测试中心的陆东雯老师指导进行电镜制样!

参考文献:

- [1] KOIDE R T, MOSSE B. A history of research on arbuscular mycorrhiza[J]. *Mycorrhiza*, 2004, 14: 145-163.
- [2] SWARD R J. The structure of the spores of *Gigaspora margarita*: I. The dormant spore[J]. *New Phytol*, 1981, 87: 461-768.
- [3] MAIA L C, KIMBROUGH J W. Ultrastructural studies of spores and hypha of a *Glomus* species[J]. *International Journal of Plant Science*, 1998, 159: 581-589.
- [4] JEFFRIES P, ROBINSON-BOYER L, RICE P, et al. Ultrastructure of spore development in *Scutellospora heterogama*[J]. *Mycorrhiza*, 2007, 17: 395-403.
- [5] 刘润进, 李晓林. 丛枝菌根及其应用[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 192-198.
- [6] WALLEY F L, GERMIDA J J. Failure to decontaminate *Glomus clarum* NT4 spores is due to spore wall-associated bacteria[J]. *Mycorrhiza*, 1996, 6: 43-49.
- [7] MACDONALD R M, CHANDLER M R. Bacterium-like organelles in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus caledonius*[J]. *New Phytologist*, 1981, 89: 241-246.
- [8] XAVIER L J C, GERMIDA J J. Bacteria associated with *Glomus clarum* spores influence mycorrhizal activity[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2003, 35: 471-478.
- [9] HIJRI M, REDECKER D, PETETOT J-C, et al. Identification and isolation of two ascomycete fungi from spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Scutellospora castanea*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68: 4567-4573.
- [10] ROESTI D, INEICHEN K, BRAISSANT O, et al. Bacteria associated with spores of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus geosporum* and *Glomus constrictum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71: 6673-6679.
- [11] FILIPPI C, BAGNOLI G, CITERNESI A S, et al. Ultrastructural spatial distribution of bacteria associated with sporocarps of *Glomus mosseae*[J]. *Symbiosis*, 1998, 24: 1-12.
- [12] MAIA L C, KIMBROUGH J W. Problems with fixation and embedding of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales)[J]. *Mycologia*, 1993, 85: 323-330.
- [13] MILLER A S, JEFFRIES P. Ultrastructural observations and a computer model of the appearance of the spore wall of *Glomus geosporum*[J]. *Mycology Research*, 1994, 98: 307-321.
- [14] LEVY A, CHANG B J, ABBOTT L K, et al. Invasion of spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora decipiens* by *Burkholderia* spp. [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69: 6250-6256.
- [15] BONFANTE P, BALESTRINI R, MENDGEN K. Storage and secretion processes in the spore of *Gigaspora margarita* Becker & Ball as revealed by high-pressure freezing and freeze substitution[J]. *New Phytologist*, 1994, 128: 93-101.
- [16] GRANDMAISON J, BENHAMOU N, FURLAN V, et al. Ultrastructural localization of N-acetylglucosamine residues in the cell wall of *Gigaspora margarita* throughout its life-cycle[J]. *Biology of the Cell*, 1988, 63: 89-100.
- [17] BIANCIOTTO V, BANDI C, MINERDI D, et al. An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62: 3005-3010.

【责任编辑 李晓卉】