

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2018.08.006

百脉根无效根瘤突变体的生物量及 无效根瘤的电镜观察分析^①

李永一¹, 孙云轩², 黄初女¹,
崔锡花¹, 张基德¹, 郑大浩²

1. 延边朝鲜族自治州农业科学院, 吉林 龙井 133400; 2. 延边大学 农学院, 吉林 延吉 133002

摘要: 百脉根是研究豆科植物根瘤形成和共生固氮分子机理的一种重要模式植物. 为探索百脉根根瘤的形成机制, 以 EMS 诱导野生 MG-20 突变并筛选的 No. 1006, No. 486 和 No. 2568 等 3 种无效根瘤突变体为材料, 测定其突变体植株生物量、根瘤数及固氮能, 并对无效根瘤中根瘤菌感染的细胞进行电镜观察. 结果表明: No. 1006 是根瘤原基突变体, No. 486 是白色无效根瘤突变体, No. 2568 是绿色无效根瘤突变体; 这 3 种无效根瘤突变体植株生长至 30 d 时, 根瘤数和固氮能以及株高、地上部干质量、根干质量和根长等生物量与 MG-20 野生株差异无统计学意义 ($p > 0.05$), 但生长至 40 d 开始均显著低于野生株 ($p < 0.05$). No. 486 的白色无效根瘤和 No. 2568 的绿色无效根瘤, 经切片后在电镜下观察, 无效根瘤细胞均存在不同程度的破坏; 其中 No. 2568 的绿色无效根瘤的细胞和由根瘤菌转化来的类菌体的破坏程度远大于 No. 486 的白色根瘤.

关键词: 百脉根; 无效根瘤; 类菌体; 固氮能; 生物量

中图分类号: S188

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2018)08-0039-09

氮是植物生长发育所需重要元素之一, 空气中约占 80% 的分子态氮, 无法被绝大多数植物所利用, 只能从土壤中吸收结合态氮. 然而, 土壤中的含氮化合物并非土壤本身固有, 而是来自生物固氮的产物, 包括土壤微生物固氮和豆科植物根瘤菌固氮. 据估计, 地球表面上, 生物固氮总量约为 70t/年; 其中, 豆科植物根瘤菌固氮量约占 60%^[1-5].

根瘤是豆科植物固氮的场所, 是由固氮细菌在植物根系上建成的共生组织. 根瘤菌不仅从根瘤细胞中摄取自身生活所需的养分, 而且能固定游离氮、合成含氮化合物, 供豆科植物生长发育所需的氮素. 另外, 由于根瘤的脱落和结有根瘤的根系遗留在土壤中, 增加土壤的肥力. 据研究, 豆科植物中, 类菌体分化和固氮体系形成与一些宿主基因有关^[6-7]; 根瘤菌侵入根细胞后, 宿主细胞的类黄酮诱导根瘤菌的 *nod* 基因表达、分泌出根瘤菌结瘤因子(Nod factor), 进而引起宿主植物的根瘤形成^[8]. 在豌豆中, *sym31* 和 *sym32* 基因在根瘤的形成中具有被感染细胞识别入侵的根瘤菌的功能^[9-10]. 虽然豌豆的 *Sym13* 基因被推定为在根瘤菌分化成类菌体时能够表达氮化酶蛋白的功能, 但在根瘤中并未检测到氮化酶的活性^[11].

百脉根是 Stougaard 等提倡的豆科植物分子遗传学研究的模式植物^[12]; 国内外研究者采用多种诱变法

① 收稿日期: 2017-06-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31660395); 吉林省高等教育专项资金项目(012013002).

作者简介: 李永一(1979-), 男, 博士, 副研究员, 主要从事作物遗传育种的研究.

通信作者: 郑大浩, 教授.

获得了大量百脉根突变体. 这些无效根瘤突变体的根瘤, 不仅固氮能力下降明显, 而且根瘤的早期老化现象严重^[12-17]; 其中, 结白色或绿色根瘤的无效根瘤突变体, 被用于共生固氮体系的建立和宿主基因的研究中. 根瘤菌侵入根细胞后建立共生关系的过程极为复杂, 根瘤菌的 Nod factor 收容和早期信号传达后, 根瘤菌感染和入侵细胞的过程、在被感染寄主细胞内建立共生关系、类菌体分化、共生根瘤的成熟及维持机制等诸多问题还有待进一步深入阐明.

本研究利用 EMS 诱变处理百脉根 MG-20 种子而获得的突变体库中筛选出的 3 种无效根瘤突变体^[18]为材料, 在前期研究的基础上, 对所筛选出的无效根瘤突变体植株的生物量及固氮能进行测定, 并对无效根瘤进行电镜切片观察, 为今后进一步阐明固氮机制奠定基础.

1 材料与方 法

1.1 材 料

本研究所用材料为 No. 1006, No. 486, No. 2568 等 3 种无效根瘤突变体. 这些突变体筛选自东京大学大学院农学生命科学研究科植物功能研究室用 EMS 处理野生型百脉根 MG-20 种子而获得的百脉根突变体库.

1.2 方 法

1.1.1 根瘤菌培养和接菌

在 TY 培养基(5 g Triptone, 3 g Yeast extract 和 0.83 g NaCl 溶于 1 L 蒸馏水中)上, 28 °C 下培养 *Mesorhizobium loti* MAFF303099 根瘤菌 2 d 后, 用 pH 值为 6.8 的 B&D(Broughton and Dilworth)液体培养基^[19]稀释根瘤菌, 再接种在野生和突变体百脉根植株上.

1.1.2 栽培条件

No. 1006, No. 486 和 No. 2568 无效根瘤突变体的种子, 播种在赤玉土(鹿沼兴产)和 Kreha soil(Kreha, Tokyo, Japan)(每公斤土壤中含有 53 mg 的 NH_4^+ 和 10 mg 的 NO_3^-)按 14 : 1 配制的含少量 N 源的土壤中, 上面覆盖蛭石^[20].

1.1.3 固氮能测定

接菌 10, 20, 30, 40 和 50 d 后, 野生株和突变体各取 10 株样品植株, 放入 20 mL 的玻璃管中, 用盖封口; 再以注入方式用乙炔替换玻璃管中 10% 的空气, 在 37 °C 条件下放置 2 h 后, 用 GC-17A Gas-Chromatograph 测定固氮量, 即固氮能力.

1.1.4 根瘤电镜观察

野生株根瘤和无效根瘤, 采用石蜡法切片后, 再进行前固定处理(固定液组成: 戊二醛 2.5%, 多聚甲醛 2%, pH 值为 7.0, HEPES buffer 50 mmol/L, D. W 9.3 mL 总量为 20 mL; 甲苯胺蓝染色液: 甲苯胺蓝 1% + 硼酸钠 1%)和后固定处理(固定液组成: 四氧化锇 2%, pH 值为 7.0, HEPES buffer 50 mmol/L, D. W 0.5 mL 总量为 2 mL)及树脂固定处理^[21], 最后在电子显微镜(日本电子制 JEM-1400)下观察根瘤菌感染后对宿主细胞的破坏程度.

2 结果与分析

2.1 无效根瘤突变体的根瘤

无效根瘤突变体接种根瘤菌后, 与野生株对比观察突变体的根瘤形状及根瘤颜色. 结果表明, No. 1006 突变体属于根瘤原基突变体, 绝大多数根瘤原基凸起后停止、不形成正常根瘤, 仅极少数发育形成正常根瘤(图 1); No. 486 突变体是结白色根瘤的突变体(发育成的根瘤呈白色)(图 2); No. 2568 突变体是结绿色根瘤突变体(发育成的根瘤呈绿色)(图 3).

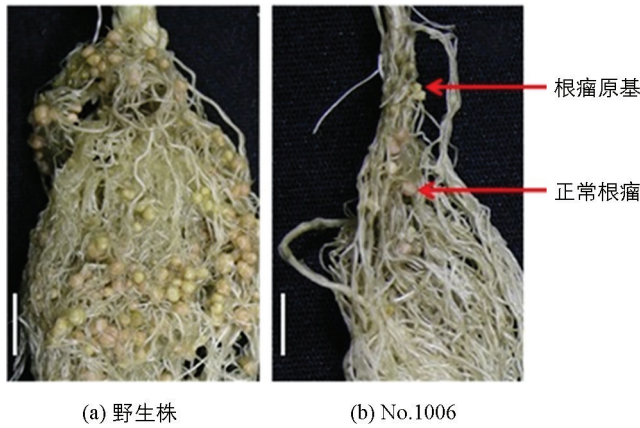


图 1 百脉根野生株的根瘤 (a) 和无效根瘤突变体 No. 1006 的根瘤 (b)

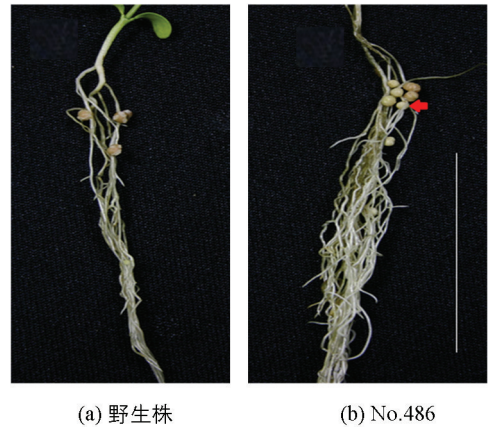


图 2 百脉根野生株的根瘤 (a) 和无效根瘤突变体 No. 486 的根瘤 (b)

2.2 无效根瘤突变体植株的生物量、固氮能力及根瘤数

在含少量氮源的低氮基质 (赤玉土: Kreha = 14 : 1) 中, 无效根瘤突变体 No. 486 和 No. 2568 植株生长至 30 d, 其株高、地上部干质量、根干质量、根长及根瘤数等与野生株差异无统计学意义 ($p > 0.05$), 但生长至 40 d 以后, 各性状均显著小于野生株 ($p < 0.05$) (图 4); 而在富氮基质 (Kreha soil) 中, 无效根瘤突变体 No. 486 和 No. 2568 植株的株高、地上部干质量、根干质量和根长与野生植株差异均无统计学意义 ($p > 0.05$) (图 5). 由于 No. 486 和 No. 2568 无效根瘤突变体植株所形成的根

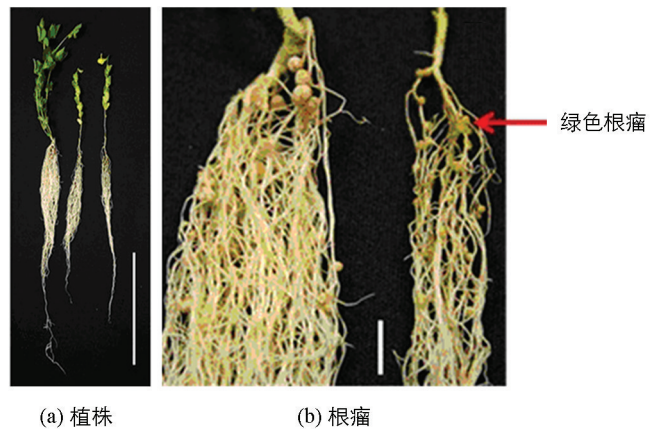
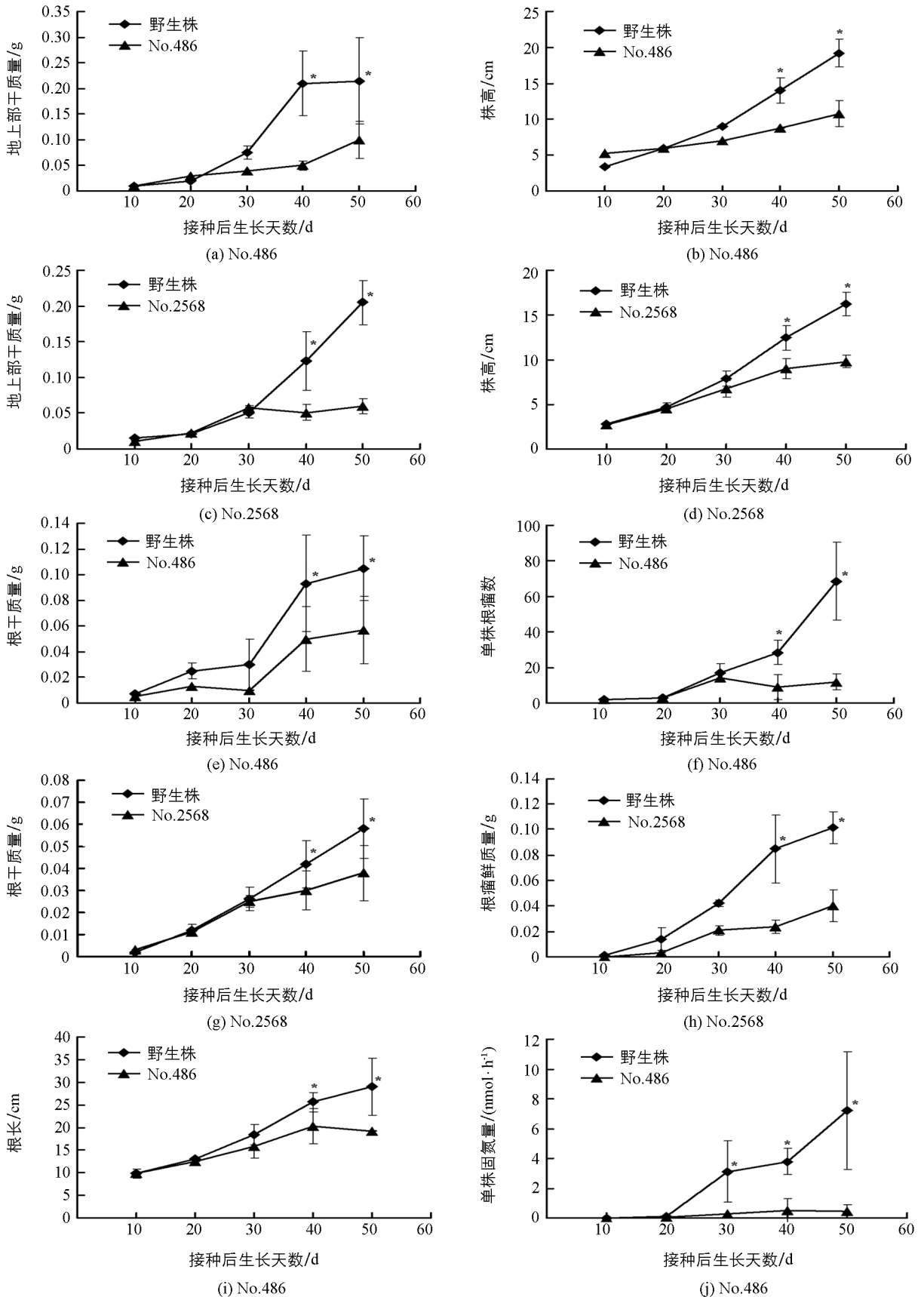


图 3 野生株 (a 左) 和无效根瘤突变体 No. 2568 植株 (a 右) 及其野生株根瘤 (b 左) 和突变株根瘤 (b 右)

瘤数很少、远远少于野生株, 固氮能力严重降低、无法或难以利用空气中存在的氮源, 低氮基质中仅存在少量的氮时, 无法满足植株生长所需, 其植株的生长受到严重影响; 而野生株由于正常形成根瘤、具备正常的固氮能力, 在仅存在少量氮的低氮基质中通过固氮摄取其植株生长所需的氮, 植株依然能够正常生长 (图 4). 而在富氮基质中, 虽然 No. 486 和 No. 2568 无效根瘤突变体植株无法通过固氮摄取其植株生长所需的氮, 但能够通过根系吸收基质中存在的氮、其根系摄取氮的能力并未受到影响, 无效根瘤突变体植株生长与野生株相比差异无统计学意义 (图 5), 意味着这两种突变体的突变基因只是与根瘤的形成有关.

2.3 无效根瘤突变体根瘤细胞的电镜观察

由于突变体 No. 1006 是一种根瘤原基突变, 故只对 No. 486 无效根瘤突变体的白色根瘤和 No. 2568 无效根瘤突变体的绿色根瘤进行了电子显微镜观察. 结果显示, 与野生百脉根根瘤 (图 6a) 相比, 根瘤菌侵入后, 这两种无效根瘤突变体的根瘤细胞, 均有不同程度的破坏; 其中, No. 486 无效根瘤突变体的白色根瘤细胞被破坏程度较轻 (图 6b), 而 No. 2568 无效根瘤突变体的绿色根瘤细胞被破坏的程度则非常严重 (图 6c).



* 表示野生株与无效根瘤突变体在 0.05 水平上差异有统计学意义。

图 4 低氮基质中野生株与无效根瘤突变体植株的生物量、根瘤数及固氮能

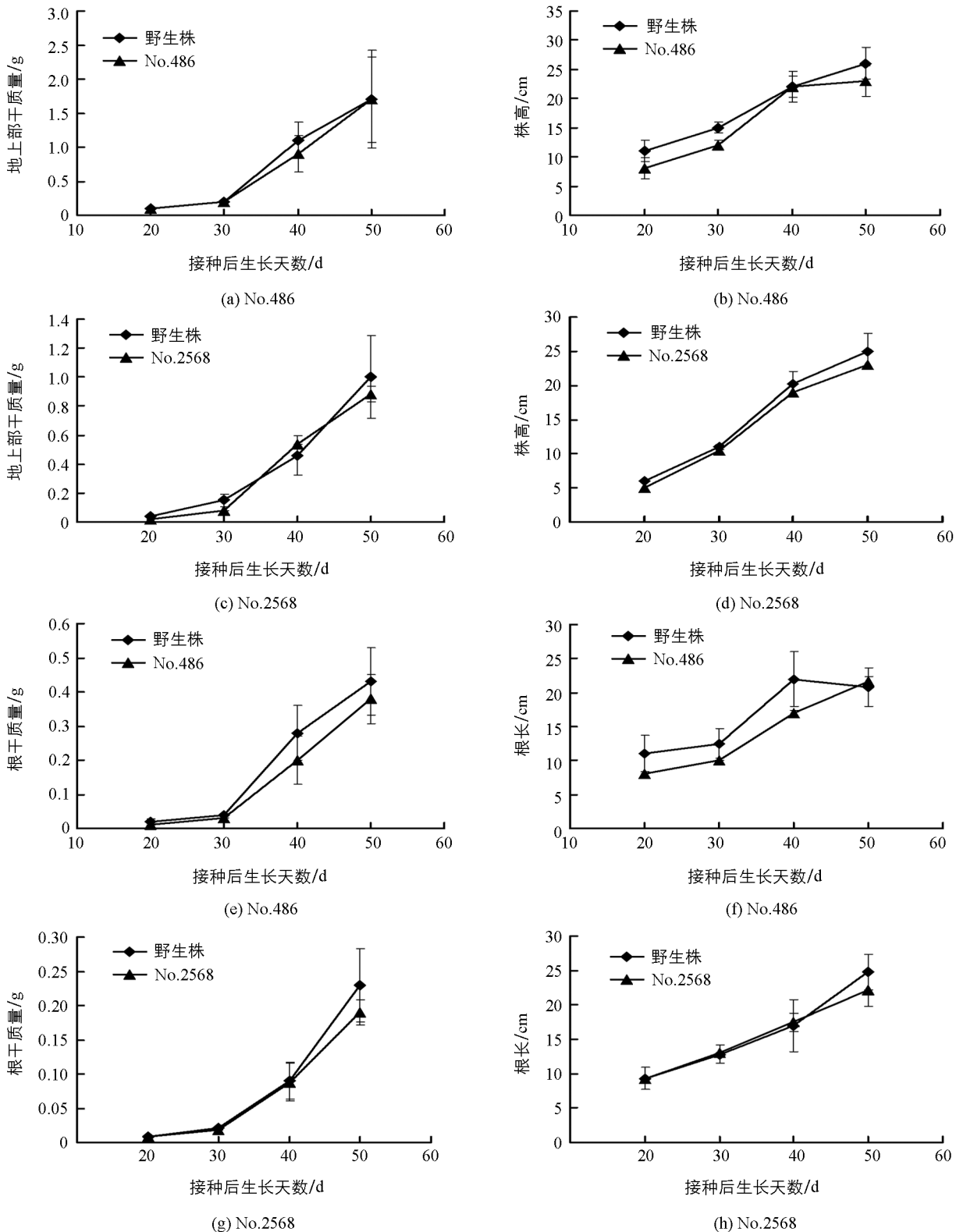
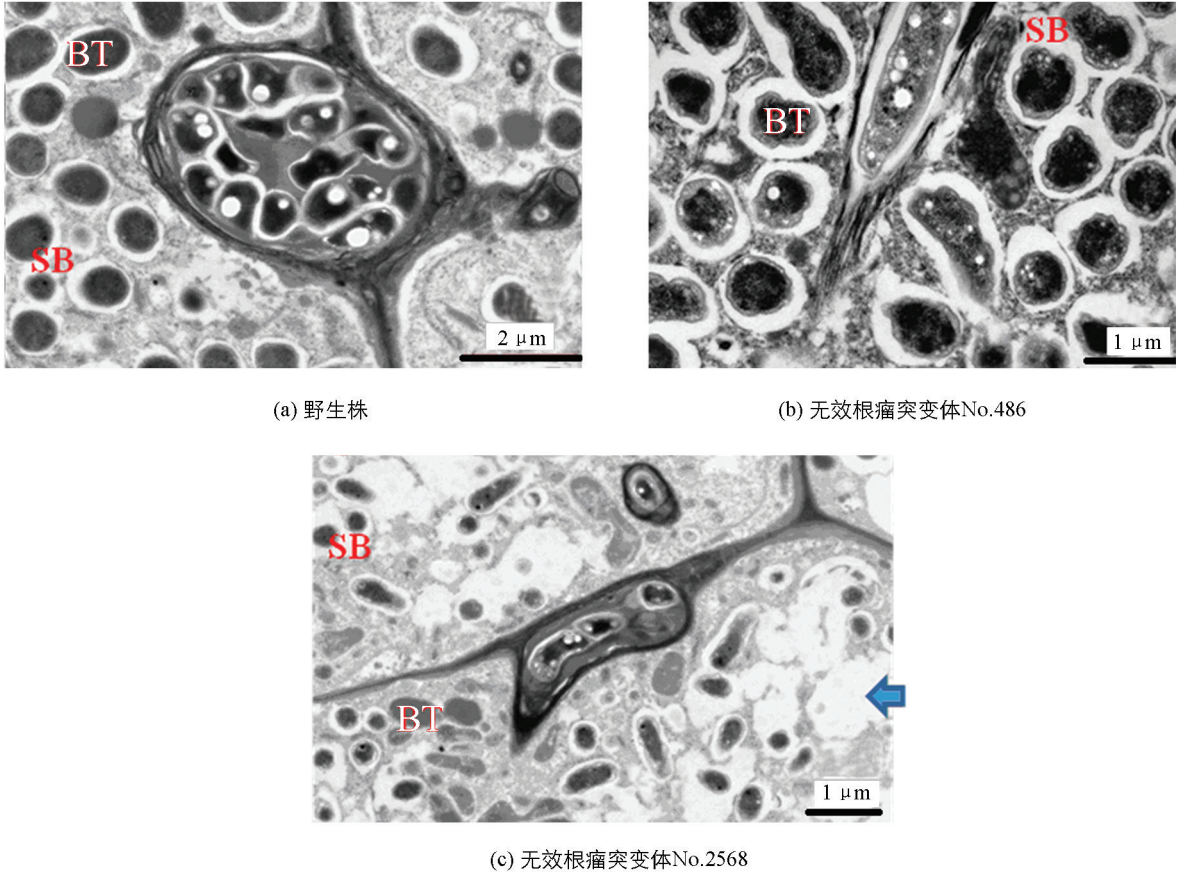


图 5 富氮基质中野生株与无效根瘤突变体植株的生物量

2.4 3 种无效根瘤突变体的突变基因在百脉根染色体上位置

为确定 No. 1006, No. 486 和 No. 2568 无效根瘤突变体的突变基因在百脉根染色体上的位置, 这 3 种突变体与野生株杂交获得 F_1 , 经套袋自交获得 F_2 群体; 随机选取 F_2 植株 100 株, 苗期采集叶片, 采用 CTAB 法提取 DNA; 利用 92 个 SSR 标记和 dCAPS 标记 (<http://www.kazusa.or.jp>) 进行基因分型,

对无效根瘤突变体的突变基因进行了定位(图 7). 结果表明, No. 1006 突变体的突变基因位于第 5 染色体上分子标记 TM0389(15.7 cM)和 TM0913(22.6 cM)之间(图 7a), 标记间隔小于 7 cM. No. 486 突变体的突变基因位于第 5 染色体顶端(图 7b), 与邻近分子标记 TM0180 之间距离为 0.4 cM. 而 No. 2568 突变体的突变基因位于第 4 染色体上分子标记 TM0719(8.0 cM)和 TM0530(8.4 cM)之间(图 7c), 标记间隔小于 0.5 cM.



BT 指类菌体, SB 指共生体; 标尺 A 为 2 μm , 标尺 B 和标尺 C 为 1 μm ; 箭头指产生破坏的感染细胞.

图 6 无效根瘤突变体 No. 486 和 No. 2586 的根瘤切片

3 讨论与结论

迄今为止,前人在多种豆科植物中筛选出许多无效根瘤突变体,这些无效根瘤突变体形成的无效根瘤与早期老化有关^[10-11, 14, 22-23]. 这种早衰现象在百脉根(*Lotus japonicus*)被 *R. etli*CE3 根瘤菌感染形成的根瘤中也被观察到^[12-17], 但根瘤的早衰并非简单地与只形成无效根瘤进而造成无固氮能力有关^[24]; 而且,与固氮有关的不同基因具有不同的功能,这些基因突变产生不同类型的突变体、固氮能力丧失机制也不同.

本研究中, No. 1006 突变体的突变基因被定位在第 5 染色体上分子标记 TM0389 和 TM0913 之间, 该定位区间内存在的 *sym7* 基因突变所产生的表型^[25], 与本研究中 No. 1006 突变体极为相似. No. 486 突变体的突变基因被定位在第 5 染色体顶端至接近顶端处分子标记 TM0180 之间, 该定位区间内存在的 *ign1* 基因突变所产生的表型^[26], 与本研究中 No. 486 突变体极为相似. 而 No. 2568 突变体的突变基因位于第 4 染色体上分子标记 TM0719 和 TM0530 之间, 该定位区间内存在的 *sen1* 基因突变所产生的表型^[7], 与本研究中 No. 2568 突变体极为相似. 由于这些突变在百脉根染色体上的定位区间小, 尤其是 No. 486 和 No. 2568 无效根瘤突变体的突变基因在百脉根染色体上的定位区间小于 0.5 cM. 所以, 可以推断 No. 1006

突变体的突变基因可能为 *sym7* 基因, No. 486 突变体的突变基因可能为 *ign1* 基因, 而 No. 2568 突变体的突变基因可能为 *sen1* 基因.

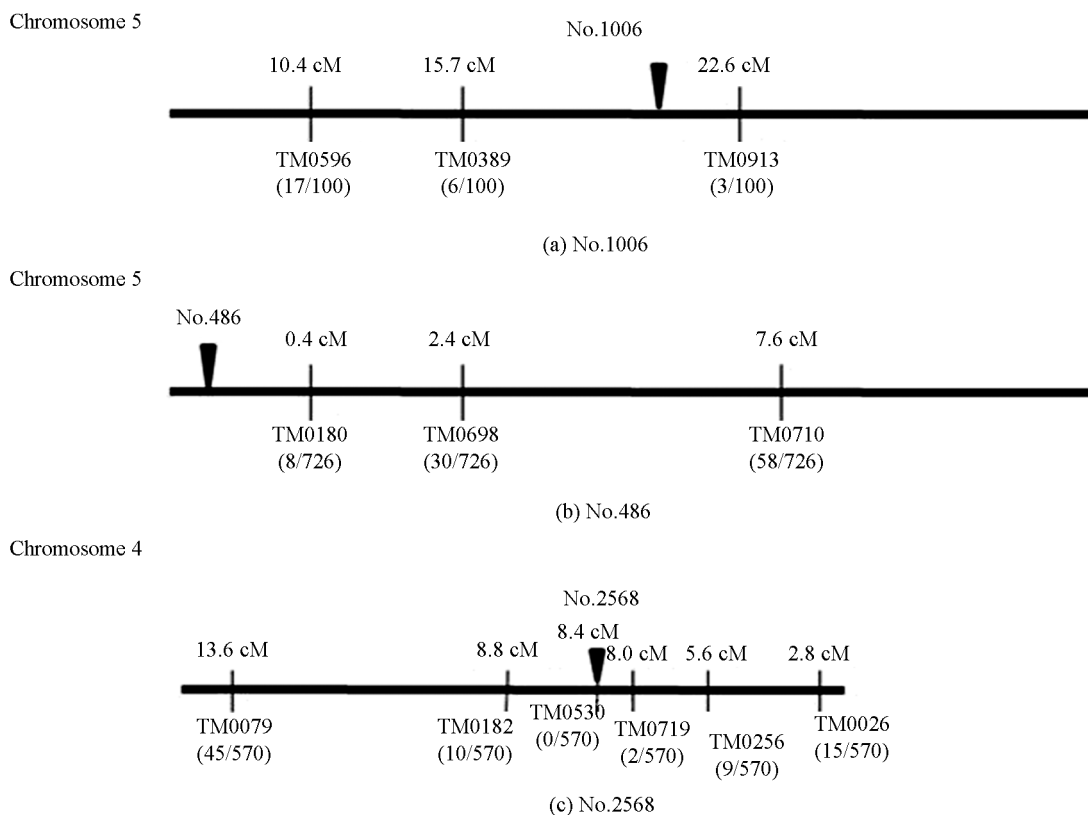


图 7 无效根瘤突变体 No. 1006, No. 486 和 No. 2568 的突变基因百脉根染色体上位置

No. 486 无效根瘤突变体的白色根瘤和 No. 2568 无效根瘤突变体的绿色根瘤组织的电镜观察结果显示, 与野生百脉根根瘤相比, 根瘤菌侵入后, 这两种无效根瘤突变体的根瘤细胞均有不同程度的破坏, 可能意味着 *ign1* 基因 (No. 486 突变体的突变基因) 和 *sen1* 基因 (No. 2568 突变体的突变基因) 的突变阻碍了根瘤菌与根细胞之间建立的共生体系; 相对而言, *sen1* 基因的突变对根瘤菌与根细胞之间共生体系建立的影响比 *ign1* 基因的突变更严重. 据研究, *ign1* 是编码类菌体和共生体的持续分化所必需的一种蛋白, 拥有跨膜结构域和 7 个锚蛋白重复序列 (Ankyrin-repeat), 在共生体系中发挥着很重要的作用^[26]. *Sen1* 基因的突变^[7], 导致固氮酶活性完全丧失, 进而造成类菌体 (bacteroides) 的根瘤菌分化能力丧失, 引起感染细胞产生空胞、共生体的扩大等早期老化现象, 最终导致形成无效根瘤^[27-28].

总之, 本研究中 No. 486 突变体 (推定为 *ign1* 突变) 和 No. 2568 突变体 (推定为 *sen1* 突变) 形成白色或绿色根瘤, 其固氮能力显著低于野生株形成的红色根瘤; 这两种突变体, 导致根瘤菌侵入根细胞后在两者间共生体系的建立过程受到影响、根瘤菌不能转化为有功能的类菌体、无法形成有固氮能力的根瘤, 最终导致严重降低或失去固氮能力.

致谢: 非常感谢东京大学大学院农学生命科学研究科植物功能研究室小柳津広志教授指导和帮助, 非常感谢刘启德博士在无效根瘤的切片、电镜观察中给予的帮助.

参考文献:

- [1] HERRIDGE D F, PEOPLES M B, BODDEY R M. Global Inputs of Biological Nitrogen Fixation in Agricultural Systems [J]. *Plant Soil*, 2008, 311(1): 1-18.
- [2] 李春明, 张磊, 徐征, 等. 根际联合固氮菌对玉米小麦及红薯的增产效应 [J]. *西南农业大学学报*, 2003, 25(6): 506-509.

- [3] 甄安忠, 何文高, 陈 懿, 等. 施氮量和留叶数对烤烟 K326 碳代谢和品质的影响 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2016, 38(9): 20—25.
- [4] 王园春. 大豆根瘤菌共生基因的筛选以及三型分泌系统效应分子的鉴定 [D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
- [5] 蒲 强, 谭志远, 彭桂香, 等. 根瘤菌分类的新进展 [J]. 微生物学通报, 2016, 43(3): 619—633.
- [6] VANCE C P, EGLI M A, GRIFFITH S M, et al. Plant Regulated Aspects of Nodulation and N₂ Fixation [J]. *Plant Cell and Environment*, 1988, 11(5): 413—427.
- [7] SUGANUMA N, NAKAMURA Y, YAMAMOTO M, et al. The *Lotus japonicus* *Sen1* Gene Controls Rhizobial Differentiation Into Nitrogen-Fixing Bacteroids in Nodules [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2003, 269(3): 312—320.
- [8] LEROUGE P, ROCHE P, FAUCHER C, et al. Symbiotic Host-Specificity of *Rhizobium-Meliloti* is Determined by a Sulfated and Acylated Glucosamine Oligosaccharide Signal [J]. *Nature*, 1990, 344(6268): 781—784.
- [9] BORISOV A Y, MORZHINA E V, KULIKOVA O A, et al. New Symbiotic Mutants of Pea (*Pisum-Sativum* L.) Affecting Either Nodule Initiation or Symbiosome Development [J]. *Symbiosis*, 1993, 14(1—3): 297—313.
- [10] MORZHINA E V, TSYGANOV V E, BORISOV A Y, et al. Four Developmental Stages Identified by Genetic Dissection of Pea (*Pisum sativum* L.) Root Nodule Morphogenesis [J]. *Plant Science*, 2000, 155(1): 75—83.
- [11] SUGANUMA N, SONODA N, NAKANE C, et al. Bacteroids Isolated from Ineffective Nodules of *Pisum sativum* Mutant E135 (*sym13*) Lack Nitrogenase Activity But Contain the Two Protein Components of Nitrogenase [J]. *Plant and Cell Physiology*, 1998, 39(10): 1093—1098.
- [12] STOUGAARD J. Regulators and Regulation of Legume Root Nodule Development [J]. *Plant Physiology*, 2000, 124(2): 531—540.
- [13] MADSEN E B, MADSEN L H, RADUTOIU S, et al. A Receptor Kinase Gene of the LysM Type is Involved in Legume Perception of Rhizobial Signals [J]. *Nature*, 2003, 425(6958): 637—640.
- [14] SAGAN M, DUC G. *Sym28* and *Sym29*, Two New Genes Involved in Regulation of Nodulation in Pea (*Pisum sativum* L.) [J]. *Symbiosis*, 1996, 20(3): 229—245.
- [15] OOKI Y, BANAB M, YANO K, et al. Characterization of the *Lotus japonicus* Symbiotic Mutant *Lot1* That Shows a Reduced Nodule Number and Distorted Trichomes [J]. *Plant Physiology*, 2005, 137(4): 1261—1271.
- [16] IMAIZUMIANRAKU H, KOUCHI H, SYONO K, et al. Analysis of *Enod40* Expression in *Alb1*, a Symbiotic Mutant of *Lotus japonicus* That Forms Empty Nodules with Incompletely Developed Nodule Vascular Bundles [J]. *Molecular and General Genetics*, 2000, 264(4): 402—410.
- [17] HOSSAIN M S, UMEHARA Y, KOUCHI H, et al. A Novel Fix-Symbiotic Mutant of *Lotus Japonicus*, *Ljsym105*, Shows Impaired Development and Premature Deterioration of Nodule Infected Cells and Symbiosomes [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2006, 19(7): 780—788.
- [18] 车成来, 金龙哲, 林 花, 等. 利用 EMS 筛选豆科模式植物百脉根的根瘤突变体及突变部位 [J]. 延边大学农学学报, 2016, 38(3): 235—241.
- [19] BROUGHTON W J, DILWORTH M Y. Control of Leghaemoglobin Synthesis in Snake Beans [J]. *Biochemical Journal*, 1971, 125(4): 1075—1080.
- [20] ISHIKAWA K, YOKOTA K, LI Y Y, et al. Isolation of a Novel Root-Determined Hypernodulation Mutant *Rdh1* of *Lotus japonicus* [J]. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2008, 54(2): 259—263.
- [21] TU J C. Rhizobial Root Nodules of Soybean as Revealed by Scanning and Transmission Electron Microscopy [J]. *Phytopathology*, 1975, 65(4): 447—454.
- [22] IMAIZUMIANRAKU H, KAWAGUCHI M, KOIWA H, et al. Two Ineffective-Nodulating Mutants of *Lotus japonicus*-Different Phenotypes Caused by the Blockage of Endocytotic Bacterial Release and Nodule Maturation [J]. *Plant Cell Physiology*, 1997, 38(7): 871—881.
- [23] NOVÁK K, PEŠINA K, NEBESÁROVÁ J, et al. Symbiotic Tissue Degradation Pattern in the Ineffective Nodules of 3 Nodulation Mutants of Pea(*Pisum-Sativum* L.) [J]. *Annals of Botany*, 1995, 76(3): 303—313.
- [24] BANBA M, SIDDIQUE A B, KOUCHI H, et al. *Lotus japonicus* forms Early Senescent Root Nodules with *Rhizobium*

etli [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2001, 14(2): 173–180.

- [25] SCHAUSER L, HANDBERG K, SANDAL N, et al. Symbiotic Mutants Deficient in Nodule Establishment Identified After T-DNA Transformation of *Lotus japonicus* [J]. *Molecular General Genetics*, 1998, 259(4): 414–423.
- [26] KUMAGAI H, HAKOYAMA T, UMEHARA Y, et al. A Novel Ankyrin-Repeat Membrane Protein, IGN1, is Required for Persistence of Nitrogen-Fixing Symbiosis in Root Nodules of *Lotus japonicus* [J]. *Plant Physiology*, 2007, 143(3): 1293–1305.
- [27] KAWAGUCHI M, IMAIZUMI-ANRAKU H, KOIWA H, et al. Root, Root Hair, and Symbiotic Mutants of the Model Legume *Lotus japonicus* [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2002, 15(1): 17–26.
- [28] SUGANUMA N, NAKAMURA Y, YAMAMOTO M, et al. The *Lotus japonicus Sen1* Gene Controls Rhizobial Differentiation Into Nitrogen-Fixing Bacteroids in Nodules [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2003, 269(3): 312–320.

Biomass of Ineffective Nodule Mutants of *Lotus japonicus* and Electron Microscopic Observation of Their Ineffective Nodules

LI Yong-yi¹, SUN Yun-xuan², HUANG Chu-nv¹,
CUI Xi-hua¹, ZHANG Ji-de¹, ZHENG Da-hao²

1. Yanbian Academy of Agricultural Sciences, Longjing Jilin 133400, China;

2. Agricultural College of Yanbian University, Yanji Jilin 133002, China

Abstract: *Lotus japonicus* is one of the important model plants in exploring the mechanism of nodule formation and symbiotic nitrogen fixation of legumes. In order to elucidate the mechanism of nodule formation in *L. japonicus* and the early aging of its ineffective nodules, three kinds of ineffective nodule mutants (No. 1006, No. 486 and No. 2568) obtained from EMS-treated MG-20 seeds were used as the experiment materials, and phenotypic analysis and determination of nitrogen fixation capacity of their ineffective nodules were carried out, and rhizobia-infected cells of the nodules were observed with an electron microscope. The results showed that No. 1006 was a nodule primordium mutant, No. 486 a white nodule mutant and No. 2568 a green nodule mutant. The number of nodules and their nitrogen fixation capacity as well as plant height, shoot dry weight, root dry weight and root length for these mutants were not significantly different from those of the wild type plant in the first 30 days of growth ($p > 0.05$), but were significantly lower than the wild type plant after 40 days of growth ($p < 0.05$). Electron microscopic examination revealed that the cells of ineffective nodules of mutants No. 486 and No. 2568 were damaged to varying degrees; and that cells and bacterioids in the green ineffective nodules of No. 2568 were more seriously damaged than those of the white ineffective nodules of No. 486.

Key words: *Lotus japonicus*; ineffective nodule; bacterioid; nitrogen fixing capacity; biomass