

大豆幼苗根和叶片原生质的分离与纯化

张晓可¹, 於丙军^{1,2}

(¹南京农业大学生命科学学院, 江苏 南京 210095, ²南京农业大学大豆研究所, 农业部国家大豆改良中心, 江苏 南京 210095)

摘 要:研究了大豆幼苗根和叶片原生质体的分离、纯化方法及其影响因素。结果表明:适宜大豆根和叶片原生质体分离的酶种类、浓度分别为 CPW-13M {CPW(细胞清洗液)+13% (W/V) 甘露醇}+3% 纤维素酶 (cellulose R-10)+1.1% 果胶酶 (macerozyme R-10)+1.0% 半纤维素酶 (hemicellulase) 和 0.15% CaCl₂·2H₂O+9% 甘露醇+1% cellulase R-10+0.20% pectolaseY-23, pH 5.8, 酶解温度为 28℃。在根酶解时间为 16 h 时, 原生质体产量可高达 1.46×10⁵ 个·g⁻¹FW, 活力达 57.8%; 叶片酶解时间为 4 h 时, 原生质体产量可高达 1.74×10⁶ 个·g⁻¹FW, 活力达 70.3%。对于根而言, 从产量和活力两方面考虑, 其原生质体用 23% 蔗糖和 CPW-18M 混合后的下沉法纯化效果较好, 而叶片用 25% 蔗糖的上浮法纯化效果较好。

关键词:大豆; 根; 叶片; 原生质体; 分离

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2009)04-0697-05

Isolation and Purification of Protoplasts in Roots and Leaves of Soybean Seedlings

ZHANG Xiao-ke¹, YU Bing-jun^{1,2}

(¹College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095; ²Soybean Research Institute, Nanjing Agricultural University; National Center for Soybean Improvement, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, Jiangsu, China)

Abstract: The methods for isolation and purification of protoplast in roots and leaves of soybean seedling were investigated together in this study. The results showed that, the suitable enzyme species and concentrations for isolation of root protoplasts were CPW-13M+13% (W/V) mannitol+3% cellulose R-10+1.1% macerozyme R-10+1.0% hemicellulase, pH5.8; those for leaf were 0.15% CaCl₂·2H₂O+9% mannitol+1% cellulase R-10+0.20% pectolaseY-23, pH 5.8, and the temperature was 28℃. The reasonable enzymatic times for isolation of root and leaf protoplasts were 16 and 4 h, respectively; and the higher protoplast yield and viability were accordingly 1.46×10⁵ protoplasts·g⁻¹FW and 57.8%, 1.74×10⁶ protoplasts·g⁻¹FW and 70.3%. The better purification for root protoplasts was the sinking method of 23% sucrose mixed with CPW-18M, that for leaf was the rising method of 25% sucrose.

Key words: Soybean; Root; Leaf; Protoplast; Isolation

自从 20 世纪 60 年代初 Cocking 首次采用纤维素酶从番茄根中成功分离获得原生质体以来, 迄今已有数百种高等植物进行了原生质体分离、培养并获得再生植株。原生质体的分离和提纯是植物生理学、细胞生物学中的一项基本技术。利用制备的原生质体可进行离体培养、全能性表达、细胞壁再生、质膜特性, 以及各种细胞操作 (如原生质体融合)、遗传操作 (如外源基因的导入) 等, 广泛应用于植物抗性生理、植物病理和作物遗传改良等研究。

大豆原生质体的分离和培养一直为国内外学者所关注, 但大部分都集中在大豆的子叶、茎、下胚轴或其悬浮培养细胞上^[1-2], 而关于大豆幼苗根和叶片原生质体分离和纯化的报道较少。以栽培大豆幼苗为研究对象, 对其根和叶片原生质体的分离、纯化、产量、活力及其影响因素等进行了优化分析和比较研究, 以便为进一步从细胞学水平上研究大豆的耐逆机理及其遗传改良提供技术支持。

收稿日期: 2009-03-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30871462); 江苏省自然科学基金青年科技创新人才 (学术带头人) 资助项目 (BK2007525)。

作者简介: 张晓可 (1982-) 男, 硕士研究生, 研究方向为植物逆境生物学。

通讯作者: 於丙军, 教授, 博士生导师。E-mail: bjiyu@njau.edu.cn。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为栽培大豆 (*Glycine max* L.) N23674 品种,种子用 0.1% HgCl_2 消毒 10 min,自来水充分冲洗后在恒温箱(25℃)内浸种约 8 h,然后置于发芽床上在暗中催芽后,选取发芽一致者播于盛有石英砂的塑料杯中。覆盖石英砂后,转置于盛有 1/2 Hoagland 营养液的周转箱中,在自然光照、室温昼夜温度分别为(28±2)℃和(20±2)℃的条件下,培养至第 1 对真叶展开时,选取生长一致者转移到塑料周转箱(30 cm×20 cm×10 cm,内含 1/2 Hoagland 营养液)上泡沫板的小孔中,室温培养,每 4 d 换一次培养液。待幼苗长出第 1 对复叶时,每天光照 8 h,分别在第 3 d 取根和第 8~15 d 取叶片作为试验材料。

1.2 方法

1.2.1 根和叶片原生质体分离的酶种类和浓度的筛选 根和叶片原生质体分离所需酶种类和浓度筛选均采用 4 因素 3 水平正交实验设计 $L_9(3^4)$ 方法^[3]。根处理参照许智宏等^[4]方法,取幼根用去离子水洗净,吸水纸擦干后,称 1 g 用双面刀片将其切成 0.5 mm 长的小段,放入 CPW-13M 中约 1 h,使根质壁分离。然后换入混合酶液(CPW-13M + 不同浓度 Cellulase R-10 + Macerozyme R-10 + Hemicellulase + Pectolase Y-23)(表 1)中,在水平摇床(60 r·min⁻¹,28℃)上放置 16~18 h 后过滤(200 目尼龙网),滤液离心(100 g,10 min),弃上清液(酶液)后,将沉淀用 CPW-13M 清洗离心,得根原生质体。叶片处理采用罗希明和简玉瑜^[5]方法略加改动,取叶片用去离子水洗净,吸水纸擦干后,称 1 g 将其切成 0.5 mm 长的小条,放入 0.15% $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 9% 甘露醇 + 0.1% BSA 中震荡(40 r·min⁻¹,30 min)游离出单细胞,过滤(200 目尼龙网)后离心(130 g,6 min)收集单细胞,然后将沉淀单细胞用混合酶液($\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 9% 甘露醇 + 不同浓度 Cellulase R-10 + Macerozyme R-10 + Hemicellulase + Pectolase Y-23)(表 2)重新悬浮,转入培养皿中,在摇床(60 r·min⁻¹,28℃)中暗酶解 1~4 h。然后用 0.15% $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 9% 甘露醇重新悬浮,离心(100 g,1 min),得叶片原生质体。

1.2.2 最佳酶解时间的选择 将预处理后的根或叶片放入选出的最佳酶液(pH 5.8)组合中暗酶解

(60 r·min⁻¹,28℃),酶解时间根设 8、12、16、18、20 h,叶片设 2、4、6、8、10 h。分别测定各处理下原生质体的产量和活力。

1.2.3 最佳渗透剂浓度的选择 根酶解液中设 11%、12%、13%、14%、15% 共 5 个甘露醇浓度,叶片酶解液组合中设 8%、9%、10%、11%、12% 共 5 个甘露醇浓度,然后将预处理后的根或叶片放入不同的酶解液中,给予最佳酶解时间,分别检测各处理下原生质体产量及其活力。

1.2.4 原生质体的纯化 根原生质体纯化采用蔗糖等密度离心下沉法^[4]。叶片原生质体纯化采用蔗糖等密度离心上浮法^[6]。

1.2.5 原生质体产量和活力的测定 原生质体产量和活力测定采用黄静等^[7]方法。

上述试验均重复 3~5 次。数据用统计分析软件(SPSS 13.0)进行均值、标准差和差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 大豆根和叶片原生质体分离的酶种类和浓度的筛选

采用正交试验设计对大豆根和叶片原生质体分离所需要的酶种类及其最佳使用浓度进行筛选,据极差值(R 值)可以看出,A(Cellulase R-10)、B(Hemicellulase)、C(Pectolase Y-23)、D(Macerozyme R-10)等因子对大豆根原生质体分离产量的影响顺序为:A>D>B>C,且显示 $A_1D_3B_2C_2$ 为最优组合;对叶片原生质体分离产量的影响顺序是:A>C>B=D,且显示 $A_2C_3B_3D_2$ 为最优组合。其中,A 因子的 R 值都最大,表明它是影响大豆根和叶片原生质体分离产量最重要的酶类;而 C 因子的 R 值在根原生质体游离时最小,B、D 因子的 R 值在叶片原生质体分离时较小,表明它们对原生质体分离产量的影响也较小。此外,方差分析表明:根中 A、B 和 D 三因子各水平间存在极显著差异($F_{0.05}=3.57, F_{0.01}=6.12$),且 A>D>B,而 C 因子各处理间差异不显著,且原生质体产量最高都出现在 A_1 水平下,因此可确定 A 因子浓度;C 因子不同处理浓度间无显著差异,对原生质体游离的影响较小,应选择最低处理浓度或不用。叶片中 A 和 C 两因子各水平间存在极显著差异($F_{0.05}=2.14, F_{0.01}=4.07$),且 A>C,且原生质体产量最高都出现在 A_2 水平下,因此可确定 A 因子浓度;B 和 D 因子各处理间差异不显著,对原

生质体游离的影响较小,应选择最低处理浓度或不 用(表 1)。

表 1 不同酶种类及浓度下大豆根和叶片原生质体产量及极差分析

试验号 Numbers		因素 Factors								原生质体产量 Protoplast yield/ × 10 ⁵ 个·g ⁻¹ FW		原生质体活力 Protoplast viability/%	
		根 Root				叶 Leaf				根 Root	叶 Leaf	根 Root	叶 Leaf
		A	B	C	D	A	B	C	D				
1		1(3.0)	1 (0.5)	1(0.1)	1(0.5)	1(0.6)	1(0.05)	1(0.1)	1(0.05)	1.27	10.2	57.2	59.2
2		1(3.0)	2(1.0)	2(0.15)	2(0.8)	1(0.6)	2(0.1)	2(0.15)	2(0.1)	1.36	10.9	55.4	57.3
3		1(3.0)	3(1.5)	3(0.2)	3(1.1)	1(0.6)	3(0.0)	3(0.2)	3(0.0)	1.32	11.7	55.7	58.9
4		2(4.0)	1(0.5)	2(0.15)	3(1.1)	2(1)	1(0.05)	2(0.15)	3(0.0)	1.40	15.3	51.9	60.7
5		2(4.0)	2(1.0)	3(0.2)	2(0.8)	2(1)	2(0.1)	3(0.2)	2(0.1)	1.29	15.9	53.8	63.4
6		2(4.0)	3(1.5)	1(0.1)	1(0.5)	2(1)	3(0.0)	1(0.1)	1(0.05)	1.17	16.8	50.1	69.2
7		3(5.0)	1(0.5)	3(0.2)	2(0.8)	3(1.4)	1(0.05)	3(0.2)	2(0.1)	1.14	13.4	49.6	67.3
8		3(5.0)	2(1.0)	1(0.1)	3(1.1)	3(1.4)	2(0.1)	1(0.1)	3(0.0)	1.17	12.5	50.8	70.6
9		3(5.0)	3(1.5)	2(0.15)	1(0.5)	3(1.4)	3(0.0)	2(0.15)	1(0.05)	1.03	11.8	47.3	68.6
T1		3.95	3.81	3.61	3.47	3.28	3.89	3.95	3.88				
T2		3.86	3.82	3.79	3.79	4.80	3.93	3.80	4.02				
T3		3.34	3.52	3.75	3.89	3.77	4.03	4.10	3.95				
R value		0.61	0.30	0.18	0.42	1.52	0.14	0.30	0.14				

A represents cellulaseR – 10 (Onozuka,Yakult Honsdha Co.,Ltd,Tokyo,Japan);B represents hemicellulase (Sigma,USA);C represents pectolas-eY-23 (Yakult Honsdha Co.,Ltd,Tokyo,Japan);D represents macerozyme R-10 (Yakult Honsdha Co.,Ltd,Tokyo,Japan)。

2.2 酶解时间对原生质体分离的影响

采用筛选出的最佳混合酶液,对根分别进行 6、12、16、18 和 20 h 的酶解处理,对大豆叶片分别进行 2、4、6、8 和 10 h 的酶解处理。结果表明,根酶解时间为 16 h 时,原生质体产量可达 1.46 × 10⁵ 个·g⁻¹ FW,活力达 57.8%;叶片酶解时间为 4 h 时,原生质

体产量可达 1.74 × 10⁶ 个·g⁻¹ FW,活力达 70.3%。当酶解时间超过 16 h(根)和 4 h(叶片)后,由于悬浮液中原生质体破裂加速,原生质体的碎片显著增加,原生质体产量相对降低,原生质体活力也呈现类似变化趋势(表 2)。因此 16 和 4 h 可分别作为大豆幼苗根和叶片原生质体最佳的酶解时间。

表 2 酶解时间对大豆根和叶片原生质体分离的影响

酶解时间 Time/h		原生质体产量 Protoplasts yield/ × 10 ⁵ 个·g ⁻¹ FW		原生质体活力 Protoplasts viability/%	
		根 Root	叶 Leaf	根 Root	叶 Leaf
6	2	1.06 ± 0.09c	9.6 ± 0.12b	60.5 ± 1.67a	79.2 ± 1.15a
12	4	1.14 ± 0.14bc	17.4 ± 0.17a	59.2 ± 1.97a	70.3 ± 2.54ab
16	6	1.46 ± 0.21a	16.9 ± 0.26a	57.8 ± 0.91ab	71.2 ± 3.13ab
18	8	1.22 ± 0.16ab	15.3 ± 0.31a	52.1 ± 1.78b	68.6 ± 1.98ab
20	10	1.31 ± 0.19ab	10.2 ± 0.09b	50.1 ± 3.08b	50.8 ± 1.18b

2.3 渗透剂浓度对原生质体分离的影响

在最佳的酶液组合和浓度下,使用 11% ~ 15% (根)和 8% ~ 12% (叶片)甘露醇来调节渗透压,测定不同渗透压下根和叶片原生质体产量及活力。可以看出,甘露醇浓度为 13% (根)和 9% (叶片)时,它们的原生质体产量和活力都达到最高值,其中根分别为 1.43 × 10⁵ 个·g⁻¹ FW 和 56.7%,叶片分别为 1.79 × 10⁶ 个·g⁻¹ FW 和 71.2% (表 3)。因此,在分离大豆幼苗根和叶片原生质体时,以 13% 和 9% 的

甘露醇浓度较为较适宜。

2.4 蔗糖浓度对原生质体纯化的影响

采用不同浓度蔗糖溶液对所分离的大豆根、叶片原生质体进行等密度离心纯化,可以看出,随着蔗糖浓度的增加,纯化的原生质体产量也在增加,在 23% 时根原生质体产量达到最高,为 10.2 × 10⁴ 个·g⁻¹ FW,在 25% 时叶片原生质体产量达到最高,为 7.54 × 10⁵ 个·g⁻¹ FW(表 4)。不过,根原生质体需要先与 23% 的蔗糖混合后,再加入等量的 CPW-18M,

在 200 g 下离心 10 min,纯化效果较好,而叶片则直接离心(130 g,10 min),杂质少,原生质体破裂少,

表 3 甘露醇浓度对大豆根和叶片原生质体分离的影响

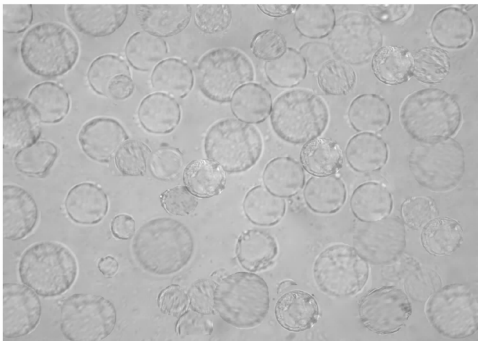
甘露醇浓度		原生质体产量		原生质体活力	
Mannitol concentration/%		Protoplasts yield/ × 10 ⁵ 个· g ⁻¹ FW		Protoplasts viability/%	
根 Root	叶 Leaf	根 Root	叶 Leaf	根 Root	叶 Leaf
11	8	1.21 ± 0.09c	16.5 ± 0.34ab	49.8 ± 1.98c	67.4 ± 2.78b
12	9	1.32 ± 0.18b	17.9 ± 0.15a	55.6 ± 2.87a	71.2 ± 1.13a
13	10	1.43 ± 0.05a	15.7 ± 0.42abc	56.7 ± 0.78a	65.1 ± 2.65b
14	11	1.29 ± 0.38c	13.5 ± 0.67bc	54.2 ± 1.67ab	66.3 ± 1.09b
15	12	1.38 ± 0.47b	12.8 ± 0.19c	52.3 ± 1.49b	60.9 ± 3.28c

表 4 不同蔗糖浓度离心法对大豆幼苗根和叶片原生质体产量的影响

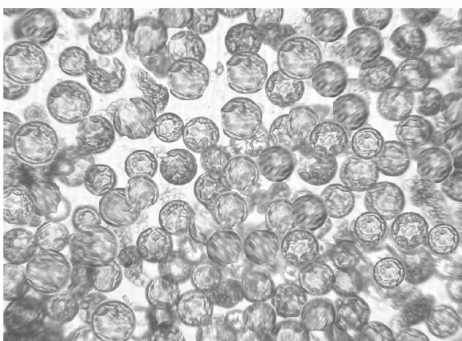
Table 4 Effect of the centrifugation method with different sucrose concentrations on root and leaf protoplast yield of soybean seedlings

蔗糖浓度 Sucrose concentrations /%	原生质体产量 Protoplasts yield	
	下沉法(根)	上浮法(叶片)
	Sinking method for root / × 10 ⁴ 个· g ⁻¹ FW	Rising method for leaf / × 10 ⁵ 个· g ⁻¹ FW
21	8.97 ± 0.15b	2.43 ± 0.12d
23	10.2 ± 0.25a	5.12 ± 0.67b
25	7.12 ± 0.19bd	7.54 ± 0.31a
27	7.86 ± 0.31bc	5.09 ± 0.29b
29	6.58 ± 0.23d	4.98 ± 0.25c

A:CPW - 13M + 3% cellulase R - 10 + 1.1% macerozyme R - 10 + 1.0% hemicellulase, pH 5.8, 16 h; B:0.15% CaCl₂ · 2H₂O + 9% mannitol + 1.0% cellulase R - 10 + 0.2% pectolaseY - 23, pH 5.8, 4 h



A Root×400



B Leaf×400

图 1 大豆幼苗根和叶片原生质体的分离和纯化

Fig. 1 Isolation and purification of protoplasts in roots and leaves of soybean seedlings

酶解后悬浮液中碎片较多,不易纯化,且原生质体活力保持时间较短;如果选取较老的材料,酶解时间也会相对增长,悬浮液中原生质体破裂加速,产量也会相对降低。分别选取 3 d 根龄的幼根和 8 ~ 15 d 叶龄的叶片为材料分离和纯化其原生质体,都得到了

纯化效果较好(图 1)。

3 讨论

影响植物原生质体分离、产量和活力的因素有多种,其中所用的酶因起到降解构成植物细胞壁纤维素、半纤维素和果胶质的作用,其种类、浓度和酶解时间影响最大^[8]。从原生质体的分离效果上来说,就是要用最简单的酶种类组合、最低的酶浓度和最短的酶解时间获得大量有活力的原生质体。酶种类组合过多和酶液浓度过大,会导致原生质体破裂数增多,影响原生质体活力;酶解时间较长,也会导致较早分离出的原生质体破裂。另外,供试植株材料的生理状态(如根、叶龄)和生长环境(如光照时间)对所分离原生质体的活力和完整性也有很大影响,材料的一致性可以增强试验效果和重复性。就材料年龄而言,如果选取太嫩的根和叶片作为材料,

良好效果。
通过 4 因素(4 种酶)3 水平(3 种浓度)正交实验设计,经过筛选(运用直观和方差分析),得出大豆根原生质体分离的酶种类组合和浓度为 CPW-13M + 3% Cellulase R-10 + 1.1% Macerozyme R-10

+1.0% Hemicellulase,pH 5.8,而 Pectolase Y-23 在根原生质体分离时可以省去;叶片原生质体分离的酶种类组合和浓度为 0.15% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ +9% 甘露醇 +1.0% Cellulase R-10 +0.2% PectolaseY-23,pH 5.8,而 Macerozyme R-10 和 Hemicellulase 对叶片原生质体的分离不是必须的。通过原生质体产量和活力指标的比较,发现 16 和 4 h 可分别作为大豆幼苗根和叶片原生质体分离的最佳酶解时间(表 2)。此外,预高渗处理可以使原生质收缩,胞间连丝断裂,并减少细胞融合和酶对细胞膜的伤害,提高原生质体的分离效果,但可能引发过度质壁分离^[9]。对供试材料进行每天 8 h 的光照,并用 13% 甘露醇(对根)和 9% 甘露醇(对叶片)分别进行 30 min ~ 1 h 的预高渗处理,得到较好的效果。

所分离的原生质体在做进一步研究前都还需纯化方可,其具体方法也直接影响到原生质体的产量及活力。蔗糖等密度离心法是纯化植物原生质体常用的一种方法^[4]。从产量和活力两方面考虑,就大豆幼苗根而言,其原生质体用 23% 蔗糖和 CPW - 18M 混合后的等密度离心下沉法纯化效果较好,而叶片用 25% 蔗糖等密度离心上浮法纯化效果较好。

参考文献

[1] Wei Z M,Xu Z H. Plant regeneration from protoplasts of soybean (*Glycine max* L.) [J]. Plant Cell Report,1988,7;348-351.

[2] 罗希明,赵桂兰,安利佳,等. 大豆 (*Glycine max*) 原生质体培养

(上接第 696 页)

[8] 韩善华. 大豆根瘤非侵染细胞的主要功能[J]. 大豆科学, 2006,25(3):304- 308. (Han S H. Main function of uninfected cells in soybean root nodules[J]. Soybean Science,2006,25(3): 304-308.)

[9] 邹琴,杨雨晗,韩善华,等. 烟草类根瘤中质体蛋白体的超微结构研究[J]. 四川大学学报,2009,46(1):250-254. (Zou Q, Yang Y H,Han S H,et al. Study on the ultrastructure of the protein bodies in the tobacco paranodule plastids[J]. Journal of Sichuan University,2009,46(1):250-254.)

[10] 韩善华,张红. 大豆根瘤细菌周膜的冷冻复型研究[J]. 西北植物学报,1999,19(2):241- 245. (Han S H,Zhang H. Freeze frac-ture study on peribacteroid membranes in soybean root nodules [J]. Acta Botanica Boreali- occidentalia Sinica,1999,19(2): 241- 245.)

[11] Parsons R,Day D A. Mechanism of soybean nodules adaptation to different oxygen pressures[J]. Plant Cell and Develooment,1990, 13;300-312.

[12] Sanjuan J,Olivares J. Implication of nifa in regulation genes located on a Rhizobium meliloti cryptic plasmid that affect nodulation effi-

与分化[J]. 大豆科学,1989,8(3):301-304. (Luo X M,Zhao G L,An L J,et al. Culture and differentiation of protoplasts in soybean (*Glycine max*) [J]. Soybean Science,1989,8(3):301-304.)

[3] 李春喜,王文林. 生物统计学[M]. 北京:科学出版社,1997,198-205. (Li C X,Wang W L. Biostatistics[M]. Beijing:Science Press, 1997,198-205.)

[4] 许智宏,Davey M R,Cocking E C. 高等植物根原生质体的分离和 培养[J]. 中国科学(B 辑),1984,11:27-31. (Xu Z H,Davey M R,Cocking E C. Isolation and culture of protoplasts in roots of high- er plants[J]. Science in China (Ser. B),1984,11:27-31.)

[5] 罗希明,简玉瑜. 大豆叶肉细胞原生质体的游离和培养[J]. 吉 林农业科学,1984,2:20-23. (Luo X M,Jian Y Y. Isolation and culture of protoplast in leaf mesophyll cells of soybean[J]. Jilin Ag- ricultural Science,1984,2:20-23.)

[6] 张献龙,唐克轩. 植物生物技术[M]. 北京:科学出版社,2004, 111-115. (Zhang X L,Tang K X. Plant biotechnology[M]. Beijing: Science Press,2004,111-115.)

[7] 黄静,赵奇,李楠,等. 烟草原生质体活力检测和细胞核染色方 法研究[J]. 首都师范大学学报(自然科学版),2007,8:34-39. (Huang J,Zhao Q,Li N,et al. Research on the livability detection of plant protoplast and the staining method of protoplast nucleus [J]. Journal of Capital Normal University (Nature Science),2007, 8;34-39.)

[8] 邢朝斌,沈海龙,赵星宇,等. 刺五加幼叶原生质体的分离法 [J]. 植物生理学通讯,2006,42(2):288-290. (Xing Z B,Shen H L,Zhao X Y,et al. Method for isolation of protoplast from young leaves of Eleutherococcus senticosus(Rupr. Et Maxim) harms[J]. Plant Physiology Communications,2006,42(2):288-290.)

[9] Ishii S. Factors influencing protoplast viability of suspension cultured rice cells during isolation process[J]. Plant Physiology,1988,8;26-29.

ciency[J]. Journal of Bacteriology,1989,171:4154-4161.

[13] Tu J C. Rhizobium root nodules of soybean as revealed by scanning and transmission electron microscopy [J]. Phytopathology,1976, 65;447-454.

[14] Newcomb W,Creighton S,Latta L. A reinvestigation of the origin of the peribacteroid membrane in root nodulesof Vicia Faba[J]. Ca- nadina Journal of Botany,1981,89;1547-1552.

[15] Bergersen F G,Lyttleton P. Bullivant S,et al. Membranes in lupi- nuse root nodules. I. The role of Golgi bodies in biogenesis of infec- tion threads and Peribacteroid membranes[J]. Journal of Cell Sci- ence,1978,30;129-149.

[16] Roth L,Stecay G. Bacterium release into host cells of Nitrogen-fix- ing soybean nodules;The symbiosome membrane comes from three sources[J]. European Journal of Cell Biology,1989,49;13-23.

[17] 韩善华,张红. 豌豆根瘤侵染细胞中造粉体的研究[J]. 作物学 报,2003,29(3):432-435. (Han S H,Zhang H. Study on the Amyloplasts during the development in the infected cells of pea root nodules [J]. Acta Agronomica Sinica,2003,29(3): 432-435.)