



利用原生质体融合构建竞争结瘤能力强且耐酸性固氮菌

王金生¹, 王 君², 吴俊江¹, 刘庆莉¹, 王树林¹, 张 鑫¹, 魏岚岚¹

(1. 黑龙江省农业科学院 大豆研究所/农业部大豆栽培重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 黑龙江省德强生物股份有限公司, 黑龙江 哈尔滨 150060)

摘要: 为获得固氮、竞争结瘤能力强且耐酸的功能菌株, 促进新型多功能微生物肥料的研究与开发, 以前期分离、鉴定获得的竞争结瘤能力强的大豆根瘤菌菌株 YA-1 和耐酸性菌株 BQ-2 为材料, 按照功能互补的原则进行原生质体融合, 针对融合子采用全氮比色法测定其固氮能力, 利用 BOX-PCR 生物学技术评价其竞争结瘤能力, 以 GGE 双标图的数学模型绘制出融合子和 pH 环境图标, 进行融合子耐酸性状和稳定性的评价分析。结果表明: 两供试菌株原生质体易于融合, 连续传代 10 次后, 共获得稳定融合子 5 株。固氮活性测定结果显示融合子 YB-3 生物固氮量最高, 较出发菌株 YA-1 和 BQ-2 有显著的提高; 融合子在竞争结瘤能力方面对两出发菌株进行了平衡, 接种融合子 YB-3 菌株图谱与结瘤菌株图谱一致性较高, 其占瘤率最高为 95%, 菌株竞争结瘤能力强于土著根瘤菌。GGE 双标图分析结果表明, 菌株耐酸性顺序为 YB-2 > YB-3 > BQ-2 > YB-4 > YA-1 > YB-5 > YB-1, 稳定性顺序为 YB-5 > YB-3 > YB-1 > YA-1 > YB-2 > YB-4 > BQ-2, 耐酸性强且稳定性较好的融合子菌株为 YB-3。综合比较而言, 获得了一株表现出双亲优良性状的集高固氮、竞争结瘤能力强且耐酸性的新型固氮菌 YB-3。

关键词: 根瘤菌; 原生质体融合; BOX-PCR; GGE-Biplot

Using Protoplast Fusion to Construct a Nitrogen Fixing Bacteria with Strong Competitive Nodules and Acid-resistance

WANG Jin-sheng¹, WANG Jun², WU Jun-jiang¹, LIU Qing-li¹, WANG Shu-lin¹, ZHANG Xin¹, WEI Lan-lan¹

(1. Soybean Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Soybean Cultivation, Ministry of Agriculture, Harbin 150086, China; 2. Deqiang Biology Company Limited in Heilongjiang Province, Harbin 150060, China)

Abstract: In order to obtain the functional strains with strong nitrogen fixing, competitive nodules and acid resistance, promoting research and development of new multifunctional microbial fertilizer, this study used the YA-1 strain isolated and identified with strong competitive nodules and BQ-2 strain that have acid resistance as materials. Protoplast fusion was performed according to the principle of complementary, we determined the nitrogen fixation capacity of the fusion hybrid by the total nitrogen colorimetry, evaluated its ability to compete tumor formation by BOX-PCR evaluate, drew the fusion child and pH environment icon with the mathematical model of GGE biplot, evaluate the acid resistance and stability of the fusion seeds. Results showed that: The protoplast of the two strains was liable to fuse, and after 10 consecutive generations, 5 stable trains of fusion were obtained. The results of nitrogen fixation showed that the nitrogen fixation was the highest in the sub YB -3, which was significantly higher than that of the starting strain YA-1 and BQ-2. The fusion cells were balanced in terms of their ability to compete for nodule formation. The consistency between the bacterial map of the fusion strain YB-3 and the tumor-forming strain was higher, with the highest tumor rate 95%. The competition ability of the YB-3 strains was stronger than that of indigenous rhizobia. The result of GGE double plot analysis showed that the acid resistance sequence was YB-2 > YB-3 > BQ-2 > YB-4 > YA-1 > YB-5 > YB-1, and the stability sequence was YB-5 > YB-3 > YB-1 > YA-1 > YB-2 > YB-4 > BQ-2, and the fusion substrain with strong acid resistance and better stability was YB-3. In the comprehensive comparison, we obtained a new type of nitrogen fixing bacteria YB-3, with high nitrogen fixation, competitive nodule ability and acid resistance.

Keywords: *Rhizobia*; Protoplast fusion; BOX-PCR; GGE-Biplot

收稿日期: 2018-04-04

基金项目: 黑龙江省农科院院级科研项目专项资金(2017ZC06); 国家重点研发计划课题(2017YFD0101306); 国家现代农业产业技术体系(nycyt-004)。

第一作者简介: 王金生(1981-), 男, 硕士, 助理研究员, 主要从事大豆耕作与栽培研究。E-mail: jinshengwang1981@163.com。

通讯作者: 吴俊江(1970-), 男, 博士, 研究员, 主要从事大豆耕作与栽培技术研究。E-mail: nkywujj@126.com。

氮对大豆的生长发育和产量形成起着至关重要的作用,大豆的氮素营养相对于其它作物较为复杂。大豆根瘤菌通过与豆科植物的相互识别,侵染其根部并形成根瘤,以此作为功能结构为豆科植物提供氮素营养、培肥地力^[1]、增加植物产量和优化品质^[2-6]。接种根瘤菌后的大豆,根瘤菌的数量明显增加、根瘤菌和土壤微生物的活性均有所提高^[7-9]、固氮能力显著增强、根系生长旺盛^[10],从而能提高大豆的产量,降低大豆生产成本^[11]。更为深远的影响是根瘤菌的利用能够改善大豆的营养平衡,减少化学氮肥大量投入以及对大气环境和水环境的破坏。因此,研究和开发适于大豆生产的根瘤菌资源,利用其与豆科植物的共生固氮体系有重要的现实意义。

近几十年来,随着人们对生物固氮的关注及其在农业上应用地位的上升,各种根瘤菌肥应运而生,但其促生效果参差不齐。究其原因,一是接种根瘤菌竞争结瘤能力较差,大量适应土壤环境的土著根瘤菌与接种根瘤菌互相竞争,土著根瘤菌在大多数情况下占明显优势,但结瘤固氮能力不强^[12-13];二是接种菌种抗逆性较差,接种到土壤后存活率不高。理想化的根瘤菌菌株应该是功能性强且适应性广的菌株。微生物菌种的选育技术不断改进和完善。目前,微生物育种包括自然选育、诱变选育、杂交育种、原生质体融合技术和基因工程技术^[14]等。原生质体融合技术是20世纪60年代发展起来的基因重组技术^[15],是指通过人为的方法,使遗传性状不同的两个细胞的原生质体进行融合,借以获得兼有双亲遗传性状的稳定重组子的过程。原生质体融合技术打破了微生物的种界界限,可实现远缘菌株的基因重组。使遗传物质传递更为完整、获得更多基因重组的机会,至今已成为基础分子生物学研究和微生物育种的一种有效方法,具有遗传信息传递量大、不受亲缘关系的影响、可有目的地选择亲株以选育理想的融合株、便于操作等优点,是进行菌株改良的简单、高效、安全的技术手段^[16]。

本研究以前期分离、鉴定获得的竞争结瘤能力强的大豆根瘤菌菌株YA-1和耐酸性菌株BQ-2为材料,按照功能互补的原则进行融合,筛选集固氮、竞争、结瘤能力强和耐酸性功能于一体的多功能融合子,并通过功能性测定,获得固氮、竞争结瘤能力强且耐酸的功能菌株,以用于新型多功能微生物肥料的研究与开发。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 大豆根瘤菌菌株YA-1从黑龙江省依安县田间采集根瘤分离纯化获得,经前期鉴定其竞争结瘤能力较强,耐酸能力较差,对青霉素抗性较好;大豆根瘤菌菌株BQ-2,从黑龙江省拜泉县田间采集根瘤分离纯化获得,经前期鉴定其耐酸性能力较强,但对青霉素抗性较弱。

1.1.2 试剂 SMM高渗透缓冲液:0.5 mol·L⁻¹蔗糖,0.02 mol·L⁻¹顺丁稀二酸,0.02 mol·L⁻¹MgCl₂·6H₂O,用NaOH调节至pH6.7,0.07 MPa灭菌20 min。

溶酶菌:购自上海生工生物工程技术服务公司,用SMM高渗透压缓冲液溶液配制成50 mg·mL⁻¹浓度,用无菌的微孔滤膜(孔径0.22 μm)过滤除菌,-20℃保存。

PEG溶液:40 g 聚乙二醇(6000)溶于100 mL SMM缓冲液。

新生钙液:0.54 g KH₂PO₄·3H₂O和29.4 g CaCl₂·H₂O分别溶于100 mL水中灭菌,使用时等体积混合,现配现用。

1.1.3 培养基 大豆根瘤菌培养基:采用YMA培养基,即甘露醇10 g,酵母膏3.0 g,K₂HPO₄ 0.5 g,MgSO₄·7H₂O 0.2 g,CaCO₃ 3.5 g,NaCl 0.1 g,蒸馏水1 000 mL,pH6.8~7.2。

再生培养基:柠檬酸钠3.0 g,K₂HPO₄ 0.64 g,KH₂PO₄ 0.16 g,CaCO₃ 5.0 g,MgSO₄·7H₂O 8.0 g,NaCl 40.0 g,KCl 2.0 g,CaSO₄·2H₂O 0.1 g,蔗糖20.0 g,琼脂18.0 g,蒸馏水1 000 mL,pH7.0。

高渗透选择性培养基:再生培养基40 μg·mL⁻¹,pH4.5。

1.2 方法

1.2.1 原生质体的制备及融合 将新鲜斜面接入YMA液体培养基中26~28℃培养过夜,再以5%接种量接入新鲜YMA液体培养基中,振荡培养到对数期(10⁸ cfu·mL⁻¹)6 000 r·min⁻¹离心15 min,收集菌体,用SMM缓冲液洗涤两次后悬于SMM缓冲液中,37℃预热,加入溶菌酶,使溶菌酶终浓度达到1.5 mg·mL⁻¹,37℃酶解30 min,立刻用SMM缓冲液洗涤,并重新悬浮备用。

将两亲本原生质体各取0.5 mL,按1:1比例混合,3 000 r·min⁻¹离心10 min,沉淀物中加入1 mL 40% PEG 6000和0.1 mL新生钙液摇匀,置于37℃

水浴保温 10 min,离心沉淀,用 5 mL SMM 缓冲液稀释,并涂于高渗选择性培养基平板上,置 28 ~ 30℃ 恒温箱培养 3 d,在此平板上生长的可初步断定为融合子。在此基础上转接于再生培养基上进行稳定性试验,连续传代 10 次以上,筛选出性状稳定的菌株。

1.2.2 融合子的功能测定及评价方法

固氮活性测定:参照黄熬梅等^[17]的全氮比色法计算微生物量氮,依此推算供试菌株的固氮能力。

竞争结瘤能力测定:参照王金生等^[18]方法,利用 BOX-PCR 生物学技术评价融合子的竞争结瘤能力。

耐酸性测定:参照王金生等^[19]方法,利用 GGE 双标图的数学模型绘制出融合子和 pH 环境图标,进行融合子耐酸性状和稳定性的评价分析。

2 结果与分析

2.1 原生质体的融合效果

考虑到固氮菌菌株 YA-1 抗青霉素不耐酸,而菌株 BQ-2 耐酸但不抗青霉素的特性,根据互补原则,对两菌株进行原生质体融合,通过含青霉素的酸性选择性培养基分离筛选耐酸且竞争结瘤能力强的固氮融合子。结果表明,两供试菌株原生质体易于融合,连续传代 10 次后,共获得稳定融合子 5 株(图 1)。



图 1 稳定融合子
Fig.1 Stable fusant

2.2 固氮活性分析

由表 2 可知,融合子 YB-1、YB-3、YB-4、YB-5 生物固氮量均比出发菌株 YA-1 和 BQ-2 有明显的提高,其固氮量分别为 312.5,334.6,321.6,和 314.5 mg·L⁻¹,较出发菌株 YA-1 (285.2 mg·L⁻¹) 分别提高 9.57%、17.32%、12.76% 和 10.27%,较出发菌株 BQ-2(291.3 mg·L⁻¹) 分别提高 7.2%、14.86%、

10.40% 和 7.96%。

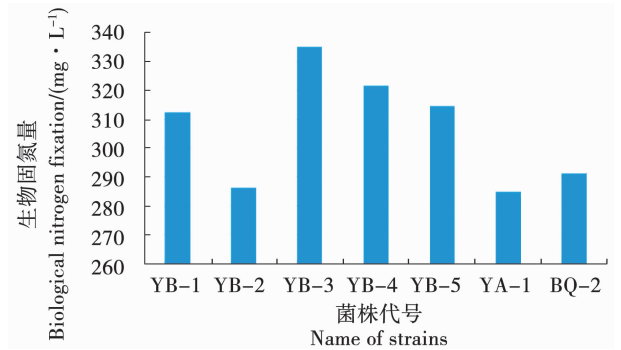


图 2 融合子生物固氮量对比

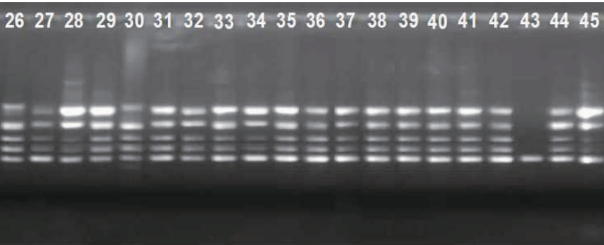
Fig.2 Contrast of the biological nitrogen fixation of fusant
2.3 竞争结瘤能力测定分析

对融合子及出发菌株进行盆栽接种并对结瘤菌株进行分离,共保存获得 140 株结瘤菌株。采用 GUTC 裂解法提取 DNA,用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的浓度,并以此为模板进行 BOX-PCR 扩增。通过分离菌株与接种菌株 BOX 图谱类型比较,获得每接种菌株的占瘤率和 BOX 指纹图谱。

由表 1 可知,接种菌株的占瘤率为 10% ~ 95%,占瘤率变化幅度较大,平均占瘤率为 69%。其中,接种融合子 YB-3 菌株图谱与结瘤菌株图谱一致的相对较多,其占瘤率最高,为 95%(图 3、表 1),高于出发菌株 YA-1 的占瘤率;接种融合子 YB-1、YB-2 菌株图谱与结瘤菌株图谱一致的相对较少,其占瘤率为 60%。所有融合子的占瘤率均显著高于出发菌株 BQ-2,而融合子 YB-1、YB-2、YB-4 和 YB-5 的占瘤率则低于出发菌株 YA-1。说明通过原生质体融合获得的融合子在竞争结瘤能力方面对两出发菌株进行了平衡,甚至出现了超亲现象,大幅提高了与土著根瘤菌的竞争结瘤能力。

表 1 不同接种菌株对占瘤率及 BOX-PCR 图谱类型的影响
Table 1 Correlation analysis of nitrogen fixation index with material separated from different stains

菌株处理 Strains	接种菌株图谱类型 Profile types of riginal strain	结瘤菌株图谱 Profile types of re-isolated strain	占瘤率 Occupancy rate/%
YB-1	A	A(12);其它 Other(8)	60
YB-2	B	B(12);其它 Other(8)	60
YB-3	C	C(19);其它 Other(1)	95
YB-4	D	D(18);其它 Other(2)	90
YB-5	E	E(16);其它 Other(4)	80
YA-1	F	F(18);其它 Other(2)	90
BQ-2	G	G(2);其它 Other(18)	10



26 ~42、44、45 为接种融合子菌株 YB-3;43 为土著菌株。
26-42, 44, 45 represent inoculated fusant YB-3; 43 represents indigenous strains.

图3 接种融合子 YB-3 菌株获得的结瘤菌株图谱
Fig. 3 Map of tumor strain of inoculated fusant YB-3

2.4 耐酸性分析

如图4所示,第1主成分 PC1 解释了 49.1% 的效应,第2主成分 PC2 解释了 27.2% 的效应,PC1 和 PC2 共解释 G 与 GE 互作效应的 76.3%, 据此分析推断可靠性较大。把各个方向上距离最远的点用直线连接起来,构成了一个五边形,通过中心对五条边做五条垂线,将双标图分为 5 个扇区,菌株在 5 个扇区都有分布,位于五边形顶角的菌株是扇区内环境下生长量最高的菌株。由双标图 4 可知:菌株 YB-2 在 pH3 和 pH5 的环境条件下生长量最大,而 BQ-2 在 pH4 和 pH6 的环境条件下生长量最大。

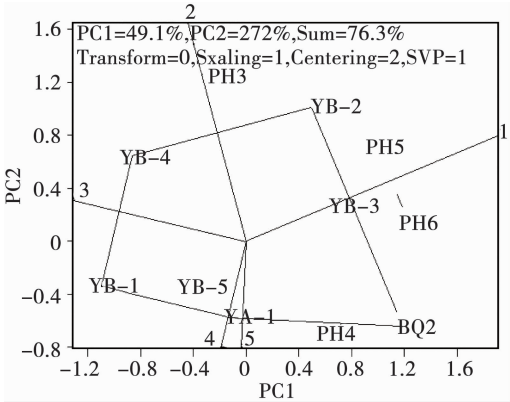


图4 供试菌株耐酸性在 4 个酸性环境中的分组
Fig. 4 Grouping of acid tolerance of tested strains in acidic environments

GGE 双标图分析中,AEA 代表了菌株的某一特定性状平均值在 AEA 的投影,箭头所示方向为正,即各个菌株在 AEA 轴上的投影点越靠右,其菌株特性越强。在 AEC 纵轴右边的菌株,其特性值大于平均值,而在 AEC 纵轴左边的菌株,其特性值小于平均值;AEA 纵轴代表了菌株的稳定性,AEA 横轴上垂线的长短显示菌株稳定性的大小,此值越接近于 0,稳定性越好(图 5)。可以看出出供试菌株耐酸性顺序为 YB-2 > YB-3 > BQ-2 > YB-4 > YA-1 > YB-5 > YB-1,稳定性顺序为 YB-5 > YB-3 > YB-1 > YA-1 > YB-2 > YB-4 > BQ-2。综合比较而言,耐酸性强且稳

定性较好的融合子菌株为 YB-3。

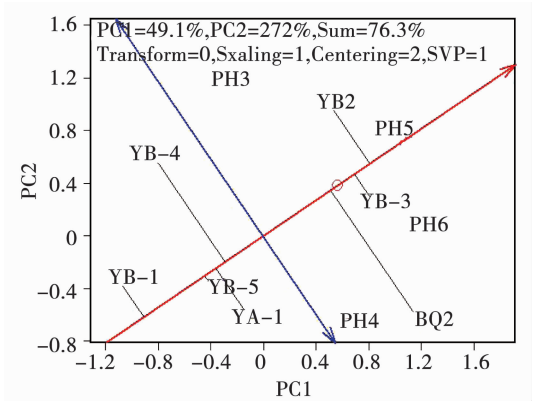


图5 供试菌株耐酸性表现及其稳定性
Fig. 5 Comparisons of tested strains for acid stress tolerance and its stability

3 讨论

豆科植物与根瘤菌共生固氮作用一直以来都是研究的重点。前人研究更多的是集中在根瘤菌固氮能力的提高方面。虽然人工筛选获得的根瘤菌菌株优点突出,固氮性能较高,但应用到实际生产当中并没有发挥出其应有的共生固氮潜能^[20-21]。究其原因忽略了筛选菌株与土著根瘤菌相比其竞争结瘤能力不强,且抗逆性较差的因素。本研究供试大豆根瘤菌菌株 YA-1,其固氮性能及竞争结瘤能力较强但耐酸性较弱,在土壤偏酸的地区使用难以发挥重要作用。因此,本研究采用基础分子生物学研究中的技术手段-原生质体融合技术将耐酸性根瘤菌菌株 BQ-2 与之细胞融合,在保障根瘤菌固氮性能的基础上,力争筛选获得竞争结瘤能力强且抗逆性好的优势大豆根瘤菌菌株,使根瘤菌能在大豆生产中得以充分利用,优良特性得以有效发挥。结果表明融合效果较好,共获得稳定融合子 5 株。全氮比色法测定融合子生物固氮量。结果显示融合子 YB-1、YB-3、YB-4、YB-5 生物固氮量均比出发菌株有显著的提高。原因可能是原生质体融合技术不但改良了出发菌株的不良特性,同时对其主要生物特性进行了效应累加,该结果有待于进一步论证。本研究相比于基因工程技术构建的融合子对环境更安全,避免了转基因工程可能造成的潜在的威胁。也间接证明了通过原生质体融合技术构建多功能融合菌株可行、有效,为获得具有多种优良性状的新型菌株的探索提供新的理论依据和技术支持。

由于植株生长环境充斥着大量的土著根瘤菌,所以植物所结根瘤并非都是接种菌株发挥效果所致,因此应用分子标记的方法对田间根瘤菌菌株进

行检验是必要的^[22]。BOX-PCR 分子标记技术能够克服试验过程中不稳定的因素,获得较好的检验效果。本研究应用 BOX-PCR 分子标记技术,结果显示融合子在竞争结瘤能力方面对两出发菌株进行了平衡,接种融合子 YB-3 菌株图谱与结瘤菌株图谱一致的相对较多,其占瘤率最高为 95%,提高了菌株与土著根瘤菌的竞争结瘤能力。

双标图数据分析方法适用于分析环境因子对表型性状的影响,其模型分析的结果可以用图形直观地表达解析,可清楚地揭示数据的内在结构模式。该方法已广泛用于区域试验中评价参试品种的丰产性、稳定性和适应性以及试验点的鉴别力和代表性^[23]。本研究以微生物培养条件模拟区域生态环境,单位时间生长量模拟区域产量,利用双标图数据分析方法评价菌株在特定环境下的抗逆性及稳定性。本研究拓展双标图的应用范围,同时也为其它相关研究提供了一个全新的方法。

4 结 论

利用原生质体融合技术共获得稳定融合子 5 株,融合子 YB-1、YB-3、YB-4、YB-5 生物固氮量均比出发菌株有显著的提高,在竞争结瘤能力方面对两出发菌株进行了平衡,菌株耐酸性顺序为 YB-2 > YB-3 > BQ-2 > YB-4 > YA-1 > YB-5 > YB-4,稳定性顺序为 YB-5 > YB-3 > YB-1 > YA-1 > YB-2 > YB-4 > BQ-1。研究获得了一株表现出双亲优良性状的高固氮、竞争结瘤能力强且耐酸性的新型固氮菌 YB-3。

参考文献

[1] 俞艳春,文定良,罗心平,等. 接种根瘤菌对豆科绿肥的固氮效果研究[J]. 云南农业科技, 2006(2): 21-22. (Yu H C, Wen D L, Luo X P, et al. Effect of rhizobium inoculation on nitrogen fixation of leguminous green manure[J]. Yunnan Nongye Keji, 2006(2): 21-22.)

[2] 陈文新. 建议将豆科植物根瘤菌共生固氮体系的应用纳入西部大开发规划[N]. 科学时报, 2000-04-17(1). (Chen W X. It is suggested that the application of symbiotic nitrogen fixing system of legume rhizobia be included in the western development plan[N]. Science Times, 2000-04-17(1).)

[3] 陈文新,汪恩涛,陈文峰. 根瘤菌-豆科植物共生多样性与地理环境的关系[J]. 中国农业科学, 2004, 37(1): 81-86. (Chen W X, Wang E T, Chen W F. The relationship between the symbiotic promiscuity of rhizobia and legumes and their geographical environments[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2004, 37(1): 81-86.)

[4] 赵宇枢,段玉玺,王媛媛,等. 辽宁省大豆根瘤菌资源抗逆性及生防潜力研究[J]. 大豆科学, 2009, 28(1): 113-117.

(Zhao Y S, Duan Y X, Wang Y Y, et al. Stress resistance and biocontrol potential of soybean rhizobia resources isolated from Liaoning province[J]. Soybean Science, 2009, 28(1): 113-117.)

[5] 江木兰,张学江,徐巧珍,等. 大豆-根瘤菌的固氮作用[J]. 中国油料作物学报, 2003, 25(1): 50-54. (Jiang M L, Zhang X J, Xu Q Z, et al. Nodulation and nitrogen-fixation in soybean-rhizobium[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2003, 25(1): 50-54.)

[6] 马中雨,李俊,张永芳,等. 大豆根瘤菌与大豆品种共生匹配性研究[J]. 大豆科学, 2008, 27(2): 221-227. (Ma Z Y, Li J, Zhang Y F, et al. Symbiotic matching between soybean rhizobium and soybean cultivars[J]. Soybean Science, 2008, 27(2): 221-227.)

[7] Marinkovic J. Effect of bean inoculation with rhizobium phaseoli on soil microbial activity[J]. Soil and Plant, 2006, 55(1): 61-66.

[8] Prasad J, Ram H. Effect of zinc, copper and Rhizobium inoculation on microbial population in soil and yield of greengram (*Phaseolus radiatus*)[J]. International Journal of Tropical Agriculture, 1992, 10(2): 157-160.

[9] 王静,马玉珍,史清亮. 大豆根瘤菌与光合细菌混合接种效果[J]. 土壤肥料, 1997(2): 41-42. (Wang J, Ma Y Z, Shi Q L. Nodulation effect of mixed inoculation of soybean rhizobia and photosynthetic bacteria[J]. Soil Fertilizer, 1997(2): 41-42.)

[10] Staehelin C, Charon C, Boller T, et al. Medicago truncatula plants overexpressing the early nodulin gene enod40 exhibit accelerated mycorrhizal colonization and enhanced formation of arbuscules[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(26): 15366-15371.

[11] 谭娟. 接种俄罗斯大豆根瘤菌对大豆生长和产量的影响[J]. 作物杂志, 2007(4): 36-37. (Tan J. Effects of inoculation with Russian soybean rhizobia on soybean growth and yield[J]. Crop Journal, 2007(4): 36-37.)

[12] Dudeja S S, Khurana A L. Persistence of *Bradyrhizobium* sp. (caianus) in a sandy loam[J]. Soil Biology & Biochemistry, 1989, 21(5): 709-713.

[13] 陈翠翠,马元武,冯永君,等. MADS-box 家族蛋白在植物开花、结实及根瘤形成中的多功能调节作用[J]. 华北农学报, 2008, 23(S2): 80-83. (Chen C C, Ma Y W, Feng Y J, et al. Multifunctional regulation of MADS-box family proteins in plant blooming, fruit mature and nodule formation[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2008, 23(S2): 80-83.)

[14] 单尹珮. 微生物菌种选育技术的发展和研究[J]. 生物技术, 2013, 3(2): 24-37. (Shan Y P. The development and research of microorganism breeding technology[J]. Biotechnology, 2013, 3(2): 24-37.)

[15] 霍乃蕊,韩克光. 细胞融合技术的发展与应用[J]. 激光生物学报, 2006, 15(2): 209-213. (Hong N X, Han K G. The development and application of cell fusion technology[J]. Journal of Laser Biology, 2006, 15(2): 209-213.)

[16] 张广志,杨合同,李纪顺,等. 利用原生质体融合构建耐盐固氮菌[J]. 中国土壤与肥料, 2010(2): 86-89. (Zhang G Z, Yang H T, Li J S, et al. The application of protoplast fusion to build salt-tolerant nitrogen-resistant bacteria[J]. Chinese Soil and Fertilizer, 2010(2): 86-89.) (下转第 942 页)