

杨 雪,刘春雷,周 佳,等. 小麦花药培养中污染问题的研究近况[J]. 江苏农业科学,2015,43(6):17-20.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.06.004

# 小麦花药培养中污染问题的研究近况

杨 雪,刘春雷,周 佳,张丽琴,王世杰  
(河南教育学院生命科学系,河南郑州 450046)

**摘要:**小麦花药培养是近年来获得小麦单倍体植株的主要途径,具有迅速得到纯合植株、克服后代分离、缩短育种年限的优点,但同时存在污染、褐化、玻璃化等问题,易造成大量人力、物力、财力的浪费。本研究针对小麦花药培养中易出现的污染问题,对其出现原因和有效防治措施进行了系统的阐述。  
**关键词:**小麦;花药培养;污染;防治  
**中图分类号:** S512.103      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2015)06-0017-03

小麦花药培养是进行小麦育种的主要途径。20 世纪 70 年代初,小麦花药培养在我国首次成功,通过研究者的不断探索和改良,该技术的出愈率和绿苗分化率不断提高。而小麦花药培养中易出现的污染、褐化、玻璃化等问题也引起了研究者的关注。污染是植物组织培养中最常遇到的问题,其原因多种多样,易发生在培养体系的各个环节。植物组织培养中一旦出现污染,不仅造成生产成本的提高,且对珍贵材料的种质保存极为不利;因此,污染是该领域研究者最为棘手的问题。本文对小麦花药培养过程中可能出现的污染物种类,以及国内外对于污染原因和防治措施的研究现状进行了系统概述,以期为从事小麦花药培养的研究者提供理论参考。

## 1 污染源

能够引起植物组织培养污染的微生物主要为细菌、酵母菌、霉菌(表 1)。细菌主要包括:棒杆菌属、葡萄球菌属、短杆菌属、链球菌属等,可通过接触污染,如外植体带菌或试验操作不当,其潜伏期较长;酵母菌主要为隐球酵母属;霉菌主要包括:曲霉属、地霉属、青霉属、赤霉属、镰刀菌属等,这些霉菌能够产生孢子且繁殖力强,孢子可随空气的流动进行传播,依附在培养容器上,所造成的污染肉眼可见<sup>[1-3]</sup>。当培养基表面出现黑色、淡绿色、白色、粉红色等各色菌落,菌落表面呈粗糙不平的松絮状,且后期会出现孢子粉的堆积,多由青霉、地霉、曲霉属引起<sup>[4]</sup>;若菌落呈乳白色黏液状,与培养基表面界限清晰,多由芽孢杆菌、肠杆菌、棒杆菌属等引起<sup>[5]</sup>。屈云慧等认为螨和蓟马也可造成组培污染<sup>[6]</sup>。螨是一类节肢动物,能够寄生于植物或动物体并刺吸汁液或血液;蓟马是一类靠植物汁液维生的昆虫。二者可存在于实验室或操作间的角落等处,活动能力强,繁殖速度快,若不注意卫生,很容易导致培

养间及培养容器的污染。Leifert 等认为植物组织培养过程中细菌污染最为严重<sup>[7]</sup>。而某些细菌污染需要几次继代才能发现,因此其鉴定最为困难<sup>[8-9]</sup>。  
小麦花药培养属于植物组培的一种,因此对于植物组培污染物的研究同样适用于小麦花药培养。

表 1 污染源种类及表现形式

污染源	种类	表现形式
细菌	棒杆菌属、葡萄球菌属、短杆菌属、链球菌属	扁形、乳白色黏稠状、不透明、与培养基界限清晰
霉菌	曲霉属、地霉属、青霉属、赤霉属、镰刀菌属	黑色、淡绿色、白色、粉红色等菌落;表面粗糙不平呈松絮状
酵母菌	隐球酵母属	红色或白色圆形菌落、边缘整齐
寄生虫	螨、蓟马	以刺吸植物汁液为生、活动能力强、繁殖速度快、喜食菌丝、易存在于实验室或操作间的角落等处

## 2 污染原因

### 2.1 外植体

污染可由多方面原因造成,而外植体带菌则是最常见且难以避免的。外植体的种类、取材部位、取材时间、灭菌情况的不同常导致其表面或内部带菌。外植体内部携带的菌称为内生菌,内生菌通常可分离出多种杂菌,且在热带植物中尤为突出<sup>[9]</sup>。Leifert 等研究认为植物组培中细菌污染的主要来源有:(1)外植体内部灭菌处理不彻底,此污染占污染源的 1/3~1/2。(2)正常灭菌条件下内生菌仍能存活,此污染占污染源的 1/4。(3)来自寄主植物的污染占 1/4~1/2<sup>[7]</sup>。Blake 等认为牧草虫和螨是重要的污染源,其体表常带有细菌及霉菌的孢子,在 9、10 月份会造成材料带菌从而引发组培植物污染<sup>[10]</sup>。Reustle 等认为 8、9 月份牧草虫的大量繁殖容易造成严重的组培污染<sup>[11]</sup>。Enjalric 等在三叶胶初级培养污染的研究中发现:高温、多雨环境更易引发污染,且随植物材料年龄的增长,其健康状况亦不断恶化,加重组培污染<sup>[12]</sup>。

若采用冬小麦为小麦花药培养的试验材料,应在 4 月初

收稿日期:2014-07-02  
基金项目:国家自然科学基金(编号:31071413);河南省科技攻关重点项目(编号:122102110189);河南省教育厅科学技术研究重点项目(编号:12B180028);河南省自然科学基金项目(编号:2011B210002)。  
作者简介:杨 雪(1983—),女,河南浚县人,硕士,讲师,主要从事植物系统分类及组织培养研究。E-mail:sws211@163.com。

进行取材,优先选取呈半包状态的主茎穗,取旗叶下方的第 1 节,并立即镜检。合适的取材时间及取材部位将很大程度上降低污染的发生概率。而由外植体引发的污染,绝大多数由其表面或内部带菌所引起。

## 2.2 培养条件

吴林森研究认为植物组培中的污染主要为细菌污染和真菌污染,可通过培养基表面的菌落形态指标进行鉴定<sup>[4]</sup>。由细菌、真菌引起的污染,大多数是由于培养基、瓶塞等灭菌不彻底,或瓶口报纸未封严而导致真菌孢子随空气流动进入培养瓶中引起的。

方丽等研究认为植物组培培养室中存在的污染菌种类和数量最多,且 7 月份和 10 月份真菌污染最为严重,可能与环境污染、消毒措施不力有关<sup>[2]</sup>。小麦花药培养过程中,若培养基、培养容器、培养室灭菌不彻底,或培养室地面、空气不洁净,则很容易引起污染。

## 2.3 试验操作

在试验操作中,若无菌操作不当,则植物组培苗易受到污染。试验操作人员是最大的污染菌携带者,其毛发、衣服、手都隐藏着大量细菌。因此,操作人员进入操作间前应进行清洁处理,如洗手、换工作服和拖鞋,否则很容易污染试验材料。其次,若操作间存在细缝,导致携带有真菌孢子的空气进入操作间,也可造成组培苗的污染。操作间灭菌不彻底,以及超净工作台滤出空气中污染菌数量超标,同样会引起组培污染。烧杯、镊子、剪刀等用具灭菌不彻底也会引起组培污染。以上各种可能若同时存在,则会发生交叉污染<sup>[6-9]</sup>。

## 3 污染的防治措施

### 3.1 外植体的污染防治

**3.1.1 外植体的选择** 由于外植体的取材时间、取材部位不同,其所携带菌类也不同,取材应避免高温、多雨的天气或季节,而选择在晴天中午进行<sup>[13]</sup>,此时空气干燥,材料内的寄生菌较少。结合小麦花药发育时期,小麦花药培养的取材时间最好在晴天的 09:00—10:00 或 15:00—16:00。

**3.1.2 外植体的处理与消毒** 小麦花药培养中,采回的材料应立即用保鲜膜或塑料布包裹,并置于 4℃ 冰箱内进行低温预处理。低温可增加小麦花药的出愈率,降低外植体被污染的程度<sup>[14]</sup>。刚采回的外植体表面常带有一些微生物,需进行表面消毒,常用消毒剂有:75% 乙醇、氯化汞(升汞)、次氯酸盐、溴水、过氧化氢等。使用消毒剂前先用乙醇擦拭则效果更好,而氯化汞、次氯酸盐等消毒剂的浓度也是关键因素。彭广霖等研究认为 5~10 mg/L 的次氯酸钠溶液对马铃薯及切花菊组培的抑菌效果最好,是消除枯草杆菌的首选消毒剂<sup>[15]</sup>;彭广霖等研究认为 0.050~0.070 mg/L 的氯化汞溶液对大花萱草和切花菊苗的抑菌效果最好<sup>[16]</sup>;覃建兵等研究认为 10.0% 的家用消毒剂、0.1% 的升汞对小麦幼穗组织有等同、高效的灭菌效果<sup>[17]</sup>。但消毒剂的使用仍存在问题:消毒时间过长易对外植体造成伤害,降低成活率;时间过短则消毒不彻底,增加污染概率<sup>[18]</sup>。国内外研究者做了大量研究和筛选,尚未找到理想的消毒剂<sup>[19]</sup>。目前我国在组培中使用的消毒剂主要为氯化汞,但研究表明汞离子对细胞生长有负面影响,使用后须将汞离子彻底消除,以免对植物造成危害<sup>[20]</sup>。

崔刚研究认为抑生素的浸泡浓度、浸泡时间对外植体的污染率、成活率具有决定性作用<sup>[21]</sup>。对小麦外植体的研究中发现:用 4% 的抑生素浸泡 4~6 h 后接种于抑生素浓度为 2.0% 的培养基上,小麦的污染率为 30%,成活率为 81%,萌芽率为 81%,且生长健壮,可见此浓度的抑生素能有效防止大部分外植体污染。Reuveni 等认为用利福平溶液对番木瓜侧芽进行预处理,不但可减少外植体污染,对番木瓜也无毒副作用<sup>[22]</sup>。对于难以灭菌且易污染的外植体,常采用多种药剂交替浸泡法<sup>[23]</sup>。李颖等研究认为可用多菌灵和青霉素的混合液浸泡受污染的外植体,多菌灵能有效消除真菌,青霉素则在初代培养中有效抑制细菌,二者的结合使用可更加有效地防治污染<sup>[24]</sup>。

### 3.2 培养条件的污染防治

**3.2.1 培养基的灭菌** 高压蒸汽灭菌是组培中培养基常用的灭菌方法,而高压蒸汽灭菌锅是试验中必不可少的,排除锅内空气是其使用的关键。朱小虎研究认为一次排空气法无法完全排除锅内空气,因此采用二次排空气法<sup>[25]</sup>。首先按常规方法进行第 1 次排气并继续加热,当压力表再次上升时进行第 2 次排气,如此培养基便可彻底灭菌。另外,消毒桶内物品不应堆积太紧、太满,否则会阻碍桶内热空气的流通与交换,造成升温较慢,灭菌不彻底。使用高压蒸汽灭菌锅时对灭菌时间有严格的规定,任意延长灭菌时间会造成温度对培养基成分的破坏<sup>[26]</sup>。

**3.2.2 在培养基中添加抗生素等** 抗生素是组培中用于防治污染的传统药剂,但由于抗生素具有抑菌谱,且不同植物材料对不同抗生素的适应性各异,使其具有一定局限性。王春在对马铃薯试管苗的研究中发现:氨苄西林钠、硫酸链霉素的抑菌控制在 20 mg/L 左右时,对组培中的细菌污染具有较好的抑菌效果,而硫酸庆大霉素、盐酸林可霉素则对马铃薯的生长具有一定抑制作用<sup>[27]</sup>;王亦非等研究认为 200 mg/L 的青霉素对海芋内生菌有较好的抑制效果<sup>[28]</sup>;黄小荣等在香水白掌继代培养中发现:300 mg/L 的青霉素对革兰氏阳性菌有较好的抑制效果<sup>[29]</sup>;Levin 等研究认为 30 mg/L 利福平对合果芋丛生芽继代培养中的污染菌有较好的抑菌效果<sup>[30]</sup>。抗生素对部分植物的污染菌具有较好的抑菌效果,但单一抗生素适用的局限性太强,因此有些研究者将多种抗生素结合使用。翟建中等在长春蔓的研究中发现:同时使用链霉素、庆大霉素、头孢唑林钠能有效控制污染菌<sup>[31]</sup>;周俊辉等在万年青的组培研究中发现:25 mg/L 利福平、50 mg/L 氯霉素混合处理污染菌的抑菌效果较好<sup>[32]</sup>。此外,抗生素对外植体的愈伤组织诱导、分化具有一定影响。低浓度青霉素 G 钠(20 万单位/L)可促进外植体的生长及根系发育,高浓度则为抑制效果<sup>[33]</sup>;刘萍等研究发现 10 万单位/L 的青霉素能加快小麦幼穗愈伤组织的形成、生长及根的再分化<sup>[34]</sup>。

医用杀菌剂对组培中的真菌污染具有一定防治效果,但对组培苗的分化、生长有抑制作用。刘静等研究发现:将医用杀菌剂、抗生素混合使用可有效抑制组培中的污染菌,且基本不存在污染菌的反复性<sup>[35]</sup>。除抗生素和各种杀菌剂外,一些研究者发现壳聚糖对组培污染菌也有较好的抑菌效果。李春香等研究发现:1.5 mg/mL 的 5 万分子量壳聚糖对红掌继代培养中的污染菌有较好的抑菌效果<sup>[36]</sup>。窦玥研究发现:丁

香、黄连、大黄、菊花、小蘗这5种中草药的提取液对组培中常见的污染菌均有较好的抑菌效果<sup>[37]</sup>。

3.2.3 培养容器的灭菌 培养器皿和玻璃容器常使用干热灭菌,于160~170℃下连续灭菌1~2 h。容器放置过满、过挤,或升温时未打开箱顶通风孔均会影响灭菌效果。

3.2.4 培养室的灭菌 对培养室灭菌常采用:紫外灯照射、空气净化器、甲醛、高锰酸钾熏蒸、艾叶和仓术、艾叶和新洁尔灭等,其中紫外线、甲醛熏蒸对材料和人体都有一定危害性,要谨慎使用。空气中的真菌孢子和细菌是培养室的主要污染源,因此要保证培养室的清洁,如经常用新洁尔灭擦拭门窗、地面;定期打开紫外灯或臭氧发生器进行灭菌;每半月或1个月进行开窗通风,以免细菌大量繁殖;发现感菌材料立即将其转移,且不能随意丢弃,由专人回收,以免感染其他材料<sup>[38]</sup>。李文凯等研究发现:仓术熏蒸的灭菌效果与紫外线照射、甲醛熏蒸无显著差异,且对人体无毒副作用,灭菌效果维持时间较长<sup>[39]</sup>;邹瑜等研究发现:将空气灭菌器、艾叶和仓术熏蒸消毒法轮换使用,可使灭菌效果达到最佳,因此,使用中草药艾叶、仓术进行空气熏蒸是培养室空气灭菌的新方法<sup>[40]</sup>。

### 3.3 试验操作的污染防治

3.3.1 无菌室的灭菌 接种室环境相对封闭,若存在缝隙或密封不严的情况,易使外界不洁净的空气进入,导致空气中充满真菌孢子、细菌以及其他微生物。对于无菌室的灭菌,每次接种前先用75%乙醇向空气中喷雾,使空气中的细菌和真菌孢子沉降下来,之后打开紫外灯照射20~30 min。接种前用75%乙醇或1:50的新洁尔灭对超净工作台内部进行灭菌,接种后再次对无菌室进行紫外照射灭菌。

3.3.2 接种用具的灭菌 无菌操作试验中,镊子、手术刀等工具使用前先经灭菌才可拿进超净工作台。每次接种前先用75%乙醇蘸洗工具,并置于乙醇灯火焰处灼烧灭菌。对于接种镊子,其灼烧长度要大于插入容器的长度,包括镊子的内外两侧。灼烧后,工具温度降至常温时方可接种,因此,仅有1套接种工具将大大降低接种效率。

### 3.4 人为污染的防治

操作人员是组培试验中最大的带菌体。因此,人员进入无菌室之前,先清洗双手,再用75%乙醇擦拭双手及手臂<sup>[41]</sup>;穿上已灭菌的白大褂和拖鞋,并保证白大褂和拖鞋定期清洗灭菌;佩戴口罩,避免因说话、咳嗽产生污染。试验过程中避免双手碰触材料和器皿边缘,以免使材料交叉污染。

## 4 总结与展望

小麦花药培养是目前小麦产生单倍体的主要途径,不少研究者不断对其进行着探索和改良,但污染始终是制约小麦花药培养发展的主要因素之一。因此,国内外众多研究者针对污染问题寻求着各种对策,如培养室和无菌室的管理、培养基的灭菌方法、培养容器和接种工具的灭菌、外植体的选择与消毒、人为污染的防治。除使用各种抗生素和抑菌剂防治组培中的污染菌外,一些研究者提出了新思路。Herman 研究发现:有些菌类的存在不会对组培造成危害,反而能够刺激外植体某些器官的生长<sup>[42]</sup>。虽然该机理尚未明确,但为组培的研究提供了新的可能性。

## 参考文献:

- [1] 张薪薪. 抑菌剂筛选及对组培污染防治的初步研究[D]. 大连: 辽宁师范大学,2006.
- [2] 方丽,王连平,茹水江,等. 植物组培过程中污染微生物种类及其季节性的变化[J]. 浙江农业学报,2013,25(2):284-287.
- [3] 马琴萍. 植物组培污染防治的研究[D]. 泰安: 山东农业大学,2002.
- [4] 吴林森. 植物组织培养污染问题的研究及其控制措施[J]. 江苏林业科技,2005,32(1):28-31.
- [5] 程逸宇,郑建秋,迟卉,等. 植物组织培养中真菌污染防治方法研究[J]. 贵州科学,2006,24(3):40-43.
- [6] 屈云慧,杨春梅,蒋亚莲. 花卉组织培养中污染的发生与防治[J]. 北方园艺,2007(8):188-189.
- [7] Leifert C H. *Lactobacillus plantarum*: a deleterious contamination of plant tissue culture[J]. Journal of Applied Bacteriology,1989,67:363-370.
- [8] 袁源,何瑞,詹若挺. 青天葵组培扩繁中的污染控制初探[J]. 现代中药研究与实践,2010,24(2):25-27.
- [9] 王纪忠,蒋婷婷,朱丽丽,等. 植物组培技术存在的问题及解决方法[J]. 现代农业科技,2012(20):166-167.
- [10] Blake J. Mites and thrips as bacterial and fungi vectors between plant tissue culture[J]. Acta Horticulturae,1988,225:163-166.
- [11] Reustle G, Catron M P, Larder L. Contamination of primary culture in tropical areas; the case of *Hevea breailiensis*[J]. Acta Horticulturae,1988,225:53-57.
- [12] Enjalric M M. Problems with inflection in culture of grapevine[J]. Acta Horticulturae,1988,225:119-129.
- [13] 胡彦,赵艳. 植物组织培养技术的应用以及在培养中存在的问题[J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版,2004,32:130-134.
- [14] 于福科,张广军. 玫瑰组织培养污染控制技术措施[J]. 陕西农业科学,2002(11):47-48.
- [15] 彭广霖,李青,衣淑玉,等. 次氯酸钠防治组培苗污染的研究[J]. 安徽农业科学,2012,40(16):8806-8808.
- [16] 彭广霖,于咏梅,薛元霞,等. 氯化汞防治组培苗污染的研究[J]. 北方园艺,2012(15):131-133.
- [17] 覃建兵,汪越胜,何光源. 消毒剂对小麦组织培养的影响[J]. 华中科技大学学报: 自然科学版,2005,33(11):118-121.
- [18] 李晓燕. 抑菌剂抑菌能力比较及其对组培苗生长发育的影响[D]. 大连: 辽宁师范大学,2007.
- [19] 袁露. 化学性消毒剂在预防医学中应用方法的初探[J]. 医学动物防制,2004,20(1):44-46.
- [20] 沈维干,陈彦,李朝军,等. 汞对雌性小鼠生殖功能及脏器的影响[J]. 卫生研究,2000,29(2):75-77.
- [21] 崔刚. 植物开放式组织培养与工厂化育苗新模式的研究[D]. 泰安: 山东农业大学,2005.
- [22] Reuveni O, Shlesinger D R, Lavi U. *In vitro* clonal propagation of dioecious *Carica papaya*[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture,1990,20(1):41-46.
- [23] 王清莲. 植物组织培养[M]. 北京: 中国农业出版社,2002:20-23.
- [24] 李颖,李春燕. 多菌灵和青霉素在组培污染中的应用[J]. 林业科技,2002,27(1):6-8.
- [25] 朱小虎. 植物组培实验中存在的问题及改进方法[J]. 黑龙江生态工程职业学院学报,2009,22(1):110-111.

史艳慧,赵吉强,陈磊,等. 芹菜不同器官、品种 *CEL I* 核酸酶提取的比较[J]. 江苏农业科学,2015,43(6):20-23.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.06.005

# 芹菜不同器官、品种 *CEL I* 核酸酶提取的比较

史艳慧,赵吉强,陈磊,李丽霞,徐艳,张园园,郭善利,宋建成

(烟台大学生命科学学院,山东烟台 264005)

**摘要:**随着 TILLING 技术的发展,发挥关键作用的芹菜 *CEL I* 核酸酶也得到了越来越广泛的应用。鉴于其活性直接影响突变体检测的效果,而芹菜粗提物中 *CEL I* 核酸酶的含量和活性因提取组织及提取程序不同而有较大变化,所以本研究分析了芹菜不同器官、品种等因素对 *CEL I* 核酸酶粗提物提取量的影响,并用只含有 1 个碱基差异的 2 个目的 DNA 片段形成的杂交链为底物对其活性进行了鉴定。结果表明:芹菜不同器官和品种间的 *CEL I* 核酸酶提取量存在较大差异。不同器官的榨汁率和提取量,以茎的出汁率最高,而叶片中的提取量显著高于根和茎中的提取量;在本研究所用的 3 个品种中,以山东地方品种马家沟芹的提取量最高,山芹次之,西芹的提取量最低;*CEL I* 核酸酶的活性鉴定表明,*CEL I* 核酸酶粗提物能有效切割 DNA 双链中的错配碱基。

**关键词:**芹菜;品种;器官;*CEL I* 核酸酶;TILLING

**中图分类号:** S636.301 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)06-0020-04

定向诱导基因组局部突变技术<sup>[1]</sup> (targeting induced local lesions in genome, TILLING) 是研究功能基因组的重要技术之一,在众多反向遗传策略中最有应用前景<sup>[2]</sup>,利用 *CEL I* 核酸酶切割错配碱基在 TILLING 技术中检测突变位点时具有非常重要的作用<sup>[3-4]</sup>。TILLING 技术中用 *CEL I* 核酸酶进行突

变位点检测的主要流程如下:(1)以 50% 致死剂量的 EMS 诱变种子<sup>[5]</sup>,产生大量点突变,并组成饱和突变群体;(2)提取突变群体单株基因组 DNA 并构建 DNA 池;(3)根据目标基因设计特异引物,以 DNA 池为模板进行目的片段的 PCR 扩增;(4)扩增产物经变性、退火,获得野生型与突变型的异源双链核酸分子后进行 *CEL I* 核酸酶酶切<sup>[6-7]</sup>;(5)电泳检测含有突变位点的阳性 DNA 池;(6)相同方法从阳性 DNA 池中筛选突变个体;(7)突变体经测序、有效突变预测和表型鉴定获得目的基因的有效突变等位基因。*CEL I* 核酸酶是从芹菜中提取的分子量约为 43 ku 的单链特异性切割酶,能特异性切割错配碱基。商业高纯度 *CEL I* 核酸酶的价格昂贵,其应用在一般科研单位或进行 TILLING 育种实践时受到较大限制。尽管国内外相关文献已经报道了此酶的提取和纯化过

收稿日期:2015-02-06

基金项目:国家自然科学基金(编号:3137616);山东省自然科学基金(编号:ZR2011CM044、ZR2011CM006)。

作者简介:史艳慧(1988—),女,山东莱阳人,硕士研究生,主要从事植物分子育种研究。E-mail:1021789578@qq.com。

通信作者:宋建成,博士,教授,主要从事植物发育生物学及分子育种研究。E-mail:jcsong88@yahoo.com。

[26] 朱广廉. 植物组织培养中灭菌和无菌操作的几个问题[J]. 植物生理学通讯,1995,31(5):375-384.

[27] 王春. 医用抗生素在马铃薯组织培养中的抑菌效应研究[J]. 甘肃农业科技,2004(10):15-16.

[28] 王亦菲,陆瑞菊,周润梅,等. 彩色海芋组织培养过程中内生菌的抑制[J]. 上海农业学报,2001,17(2):82-83.

[29] 黄小荣,杨开太. 香水白掌的组织培养[J]. 广西林业科学,2001,30(1):39-40.

[30] Levin R, Stav R, Alper Y, et al. *In vitro* multiplication in liquid culture of *Syngonium* contaminated with *Bacillus* spp. and *Rhizobacter tritici*[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture,1996,45(3):277-280.

[31] 翟建中,顾梅俏. 长春蔓组培生产中污染的防除[J]. 森林病虫害通讯,1999(4):30-32.

[32] 周俊辉,杨妙贤,李春霞,等. 在培养基中加入抗生素防止万年青茎段培养污染研究[J]. 广西植物,2005,25(3):233-235.

[33] 潘学峰,庄伟,柯师明. 青霉素 G 钠对阴生植物绿巨人愈伤组织诱导分化及试管苗生长的影响[J]. 海南大学学报:自然科学版,2000,18(4):401-405.

[34] 刘萍,李春喜,姜丽娜,等. 青霉素对小麦生理活性及产量的影响[J]. 陕西师范大学学报:自然科学版,1999,27(2):82-84.

[35] 刘静,孙海伟,段祖安,等. 混合杀菌剂对植物组培污染防治试验[J]. 山东林业科技,2004(5):10-12.

[36] 李春香,高凤菊,孙献明. 壳聚糖对红掌组培污染菌的抑制作用[J]. 唐山师范学院学报,2008,30(5):44-48.

[37] 窦玥. 两种槭树的组织培养和防治组培污染的初步研究[D]. 大连:辽宁师范大学,2010.

[38] 孟庆祥. 实验室污染的防治及治理实验室污染的防治及治理[J]. 实验室科学,2009(6):161-162.

[39] 李文凯,贾晓鹰,郭海燕,等. 苍术控制植物组培环境污染的研究[J]. 石河子大学学报:自然科学版,2003,7(2):90.

[40] 邹瑜,林贵美,韦华芳,等. 四种方法对组培室内空气消毒效果的研究[J]. 北方园艺,2009(8):117-119.

[41] 周俊辉. 植物快速繁殖技术中存在的问题与对策[J]. 仲恺农业技术学院学报,1999,12(4):64-70.

[42] Herman E B. Non-axenic plant tissue culture: possibilities and opportunities[J]. Acta Horticulturae,1990,280:233-238.