

植物组织培养中的内生细菌污染问题

周俊辉, 周厚高, 刘花全

(仲恺农业技术学院园艺系, 广东广州 510225)

摘要: 植物组织中普遍存在内生菌, 当植物组织进行离体培养时, 这些内生菌就会产生污染。对内生菌污染概念进行了界定, 对内生菌污染的种类、普遍性、症状与危害性作了阐述, 综合了有关防治方法, 并讨论了抗生素使用的效果、稳定性和应注意的问题。

关键词: 组织培养; 内生菌污染; 防治方法; 抗生素

中图分类号: Q942.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2003)01-0041-07

Endophytic bacterial contamination in plant tissue culture

ZHOU Jun-hui, ZHOU Hou-gao, LIU Hua-quan

(Horticulture Department, Zhongkai Agrotechnical College, Guangzhou 510225, China)

Abstract: Bacterial contamination can be found in the process of plant tissue cultures. The paper deals with the concept, the genus and species, distribution, symptom and perniciousness of endophytic bacterial contamination respectively, and the effects, stability and cautions of antibiotics application are also discussed.

Key words: tissue culture; endophytic bacterial contamination; controlling; antibiotics

植物组织中普遍存在内生细菌(endophytical bacteria)。植物内生细菌是指那些在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物的各种组织和器官的细胞间隙或细胞内的细菌, 可通过组织学方法或从严格表面消毒的植物组织中分离或从植物组织内直接产生扩增出微生物 DNA 的方法来证明其内生, 被感染的寄主(至少是暂时)不表现出来外在病症^[1]。在植物组织培养中, 这些内生细菌就会生长出来并引起程度不一的污染, 产生程度不一的危害。

1 内生细菌污染

1.1 内生细菌污染的概念

在植物组织培养中, 由于材料内部(细胞内或细

胞间)的内生细菌不能被一般的表面消毒方法所清除, 随着材料带入培养过程, 引起的污染称为内生细菌污染或内源细菌污染^[2,3]。

1.2 内生细菌污染的种类

从已有报道看, 被鉴定的种类主要有: 黄单胞菌属(*Xanthomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、棒杆菌属(*Corynebacterium*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、短小杆菌属(*Curtobacterium*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)等(表 1)。引起内生细菌污染的内生细菌种类远不止表 1 所列。目前在各种农作物及果树等经济作物中发现的内生细菌已超过 129 种(隶属于 54 个属)^[1]。对于一种植物而言, 从中

收稿日期: 2002-01-14; 修订日期: 2002-04-01

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(001425)

作者简介: 周俊辉(1963-), 男, 江西临川人, 博士, 副教授, 从事园艺植物的组织培养和栽培生理的教学和科研工作。

分离到的内生真菌和内生细菌通常为数十种,有的甚至多达数百种。在热带植物中,内生菌的这种多样性更为突出。如 Anorld 等分析巴拿马雨林两种植物叶子中的内生菌,自 83 个健康叶片上分

离出的内生菌多达 418 种^[15]。

1.3 内生细菌污染的分布

内生细菌污染是普遍的,有时是严重的。如金线莲(*Anoectochilus roxburghii*)组培中污染率达到

表 1 在植物组织培养中已报道的部分内生细菌种类
Table 1 Endophytic bacteria reported in plant tissue cultures

植物属、种 Plants	内生菌属、种 Endophytic bacteria	文献 References
长春蔓 <i>Vinca major</i>	黄单胞菌属 <i>Xanthomonas</i>	翟建中 ^[4]
野百合 <i>Lilium brownmii</i>	土壤杆菌属 <i>Agrobacterium</i>	何云芳 ^[5]
半夏 <i>Pinellia ternata</i>		
大花天竺葵 <i>Pelargonium × domesticum</i> Bailey	天竺葵黄单胞菌 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pelargonii</i>	Barrett ^[6]
圆叶茅蕨菜 <i>Drosera rotundifolia</i>	葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i>	Kneifel ^[7]
白鹤芋属 <i>Spathiphyllum</i>	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	
白蝶合果芋 <i>Syngonium podophyllum</i> cv. <i>White Butterfly</i>	棒杆菌属 <i>Corynebacterium</i>	
高大肾蕨 <i>Nephrolepis exaltata</i>	泡囊假单胞菌 <i>Pseudomonas vesicularis</i>	
萱草属 <i>Hemerocallis</i>	植物乳芽孢杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i>	Leifert ^[8]
墨西哥桔属 <i>Choisya</i>	棒杆菌属 <i>Corynebacterium</i>	
翠雀属 <i>Delphinium</i>	腐生葡萄球菌 <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	
	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	
合果芋属 <i>Syngonium</i>	小麦拉氏杆菌 <i>Rathayibacter tritici</i>	Levin ^[9]
	凝结芽孢杆菌 <i>Bacillus coagulans</i>	
	深褐芽孢杆菌 <i>Bacillus atrophaeus</i>	
	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	
马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	荧光假单胞菌 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Long ^[10]
	棒杆菌属 <i>Corynebacterium</i>	
薯蓣属 <i>Dioscorea</i>	沙雷氏菌属 <i>Serratia</i>	Mantel ^[11]
	肠杆菌属 <i>Enterobacter</i>	
	黄单胞菌属 <i>Xanthomonas</i>	
	短小杆菌属 <i>Curtobacterium</i>	
	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	
欧洲榛 <i>Corylus avellana</i>	放射型土壤杆菌 <i>Agrobacterium radiobacter</i>	Reed ^[12]
	荧光假单胞菌 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	
	黄单胞菌属 <i>Xanthomonas</i>	
	肠杆菌属 <i>Enterobacter</i>	
	乳黄杆菌属 <i>Flavobacterium</i>	
	产碱菌属 <i>Alcaligenes</i>	
马蹄莲 <i>Zantedeschia aethiopica</i>	欧文氏菌属 <i>Erwinia</i>	Ruiz ^[13]
美洲榆 <i>Ulmus americana</i>	浸麻芽孢杆菌 <i>Bacillus macerans</i>	Schreiber ^[14]

50%^[16],仙客来(*Cyclamen persicum*)的块茎组织内生细菌污染率达 83.0%^[17],地黄(*Rehmannia glutinosa*)由于有内生细菌的存在污染率达 100%^[18]。除表 1 所示植物之外,有玉米(*Zea mays*)^[19]、绿巨人(*Spathiphyllum kochii*)^[20]、海芋(*Alocasia macrorrhiza*)^[21]、大绣球(*Hydrangea hortensis*)^[22]、欧洲樱草(*Primula vulgaris*)^[23]、薄荷属(*Mentha*)^[24]、罗伯利槭(*Acer lobelii*)^[25]、芋

(*Colocasia esculenta*)^[26]、甘薯(*Ipomoea batatas*)^[27]、番木瓜(*Carica papaya*)^[28]、小果咖啡(*Coffea arabica*)^[29]、芒果(*Mangifera indica*)^[30]、苹果属(*Malus*)、桃属(*Prunus*)、核桃属(*Juglans*)^[31]、山核桃(*Carya illinoensis*)^[32]、毛白杨(*Populus tomentosa*)^[33]、银白杨(*Populus alba*)^[34]、相思树(*Acacia confusa*)^[35]、宽叶紫荆木(*Madhuca latifolia*)^[36]、披散山龙眼(*Protea re-*

pens)^[37]等植物均存在内生细菌的污染。

已报道的资料表明,生长在高温多雨的热带、亚热带植物和多年生木本植物容易表现内生细菌污染。

1.4 症状

在初代培养中,表面细菌引起的污染通常在 2~3 d 就能在外植体周围或培养基表面形成明显的如水污状、油污状、气泡或干缩的红、黄、乳白等颜色的菌落。而在外植体培养后 3~5 d 内并未发现细菌污染,以后则不断出现明显的或不明显的细菌菌落,就可能由内生细菌引起的污染^[2,3]。

在某些植物初代培养或前几代的继代培养中存在的污染,并不形成明显的菌落而只在培养基内部形成“丝状物”,“晕状物”,不易被肉眼察觉,如不仔细观察很容易被忽视(背光检查时较易被发现)^[3],随着继代培养次数的增加,菌量逐渐累积,才在培养基上显现出来^[38]。

1.5 危害性

内生细菌引起的危害主要包括在早期导致培养失败,增殖效率的降低,培养物生长减缓,玻璃苗增加等。在后期导致试管苗移栽困难和死亡,有时污染也会引起培养物的遗传变异^[2,3]。但也有报道说一些潜在的污染并不影响培养物的增殖^[23,39]。

植物病理学方面的研究认为植物内生细菌是一种潜在的病原菌,它对于无病症寄主和感病寄主存在一定威胁。在无病症的健康植物组织中存在的内生休眠病原菌当寄主遇到恶劣的环境或外界微生物干扰时,内生病原菌能够重新活动,引起病害^[40]。试管苗中潜在的欧文氏菌属细菌可以引起许多植物的病害^[41];潜伏感染根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的紫苑属(*Aster*)、感染田野黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)的鸢尾属(*Iris*)试管苗移栽后表现出典型的病害^[42]。

2 内生细菌污染的防治措施

解决或减少组培中的内生细菌污染关键在于防止上,主要措施如下。

2.1 对母树的预处理

目的是减少植株的内生菌含量。

2.1.1 改善植株栽培环境 尽可能利用温室或人工气候室生长的植株作接种的材料,以减少表面和内生细菌的污染^[6,43,44]。

2.1.2 对母树喷布杀菌剂或抗生素 如在采集外植体前用敌菌丹(captatol)或异菌脲(iprodione)杀菌剂处理田间的披散山龙眼母树,使污染从对照的 90%减少至 14%^[37]。Mondal^[28]等在采集材料前,向番木瓜植株喷 1 000 mg/L 的庆大霉素(gentamycin),采芽后再用庆大霉素进行处理。

2.2 对母枝或外植体的预处理

2.2.1 促发新枝 如将田间采集的枝条用水冲洗干净后插入无糖的培养液或自来水中,使其发枝,然后以这种新抽的嫩枝作为外植体,可大大减少材料的污染^[45]。

2.2.2 黄化处理 在无菌条件下对采自田间的枝条进行暗培养,待抽出徒长的黄化枝条时取材,也可以减少污染^[45]。如使用仙客来黄化的叶柄进行培养时,可控制内生菌的污染^[17,46]。

2.2.3 热击 Langens 等^[25]将美丽百合(*Lilium speciosum*)的鳞茎外植体放入试管中进行 43 °C 热击处理,罗伯利碱的休眠芽进行 42.5 °C 或 45 °C 热击处理,可有效地减少内生菌污染。

2.2.4 用抗生素进行预培养 朱光廉^[35]对相思树的芽和茎段灭菌时,用皂液刷洗和乙醇杀菌后,转入 0.2% 苯菌灵(benlnete)和 0.2% 链霉素溶液中,在摇床上振荡过夜,再用 80% 乙醇和 0.1% 升汞分别杀菌 1 min 和 15 min,灭菌获得了满意的效果。

Reuveni 等^[47]将从温室中采下的番木瓜侧芽先用 300 mg/L 的利福平(rifampicin)溶液预处理,再按常规过程进行表面消毒,对减少外植体污染很有效,而且对番木瓜的生长无副作用。

但也有报道,羧苄青霉素(carbenicillin)、庆大霉素、卡拉霉素(kanamycin)、万古霉素(vancomycin)浓度为 5~50 mg/L 对预防地黄的污染无效^[18]。或许与使用浓度较低有关。

2.3 改进灭菌方法

2.3.1 真空减压灭菌 利用真空减压抽走植物组织中的空气使消毒剂更易侵入,从而增强杀菌效果。我们对玛丽安万年青(*Dieffenbachia amoena* 'cammilla')茎段使用该方法,可以把污染率从对照的 90%降低到 21%左右。

2.3.2 磁力搅拌、超声波振动 为减少在外植体表面形成的气泡,在浸泡时还可采用磁力搅拌和超声波振动的方法。如对苹果(*Malus pumila*)、月季(*Rosa chinensis*)和紫杉(*Taxus cuspidata*)的枝条用 0.1% 升汞磁力搅拌 15~20 min,再用无菌水磁

力搅拌清洗,降低了污染率^[48]。

2.3.3 多次消毒(灭菌) 周鹏等^[49]用饱和香皂水(比普通洗衣皂碱性弱)对番木瓜侧芽浸泡 20~30 min,再用 0.1%高锰酸钾溶液处理 5 min,然后进行消毒处理,然后用 4%次氯酸钠加 0.1%升汞消毒,最后用 500 mg/L 先锋霉素或羧苄青霉素的无菌水洗,污染率降低 50%。

2.3.4 使用混合的消毒液 Singh 等^[36]对宽叶紫荆木的茎段用含 PVP(聚乙烯吡咯烷酮)、柠檬酸、抗坏血酸、多菌灵、氨苄青霉素(ampicillin)或氯霉素(chloramphenicol)的混合液预处理,既可减少酚和乳汁的分泌,也减少了污染。对马蹄莲的根用克菌丹(captain)、代森锰锌(mancozeb)、抗生素 ABM1 和亚胺青霉烯(imipenem)进行预处理有灭菌效果^[38]。

2.3.5 灼烧 马蹄莲的根在 95%乙醇中浸泡 1 min 后,短暂地灼烧 2 次,外植体切割时也灼烧 2 次,比常规消毒降低污染率 60%^[13]。这种方法也适用蒜(*Allium sativum*)的小鳞茎和银白杨(*Populus alba*)的芽的消毒^[44]。

2.4 酸化培养基

除了欧文氏菌属外,大多数细菌在介质 pH 小于 4.5 时不能生长。在紫苑属、鸢尾属、蔷薇属植物组织培养中,将培养基的 pH 值由 5.8 调至 3.9~4.3,可防止大量的细菌污染^[42]。

2.5 在培养基中加入其他抑菌剂

许婉芳等^[16]在杀菌剂对金线莲组织培养中微生物污染的抑制实验中,50%多菌灵的效果优于 70%甲基托布津和 25%甲霜灵,其抑菌率达 100%,且能促进金线莲生长。

周俊辉等^[50]对细菌抑制的实验表明,丙酸钠、磷酸钠均能耐高温高压,0.3%的丙酸钠有较好的抑菌效果,在应用于美铁芋(*Zamioculcas zamiifolia*)的快速繁殖上,发现 0.5%的丙酸钠对外植体的生长影响不大。

3 抗生素的使用

在组织培养中,防止细菌特别是内源菌污染很重要的措施无疑就是在培养基中加入抗生素。

3.1 抗生素作用的原理

庆大霉素和链霉素,属于氨基糖苷类型,它们与细菌中的 30 S 核蛋白体亚单位结合,抑制细菌的油

酸甘油酯合成,通过阻断其正常代谢途径使微生物致死。但抗生素也可能抑制植物组织的叶绿体和线粒体的蛋白质的合成,导致叶片变小或变黄^[12]。高浓度的抗生素则会影响植物的生长。

3.2 影响抗生素稳定的因素

抗生素的抑制作用受其分子量的影响,如青霉素分子量小扩散容易而多粘菌素(polymyxins)分子量大扩散速率慢;有些抗生素对 pH 敏感,如林可霉素(lincomycin)和头孢利定(cephaloridine)在碱性条件下,四环素和二甲氧基苯青霉素(methicillin)在酸性条件下更有活性;四环素对光敏感,在光照下 3 d 后全部失去活性^[6]。

3.3 抗生素使用的效果

可能因植物的种类不同、植物所含内生菌种类的不同以及抗生素使用的种类和浓度不同,导致抗生素使用的效果变化很大。

3.3.1 能抑制细菌生长并对植物无影响 Reed^[6]在天竺葵组培中,发现头孢噻肟(cefotaxime)抑菌效果好,且对芽的增殖有促进作用,平均芽数/瓶与头孢噻肟的浓度呈高度正相关,头孢噻肟的浓度可达到 500 mg/L。在离体繁殖大绣球时,10 mg/L 的阿霉素(amycacin)对细菌污染的控制有效,且不抑制培养物的生长^[22]。韩美丽等(1999)^[20]在绿巨人组培中实验了青霉素钠、先锋霉素和庆大霉素对继代培养中细菌污染的抑制效果,先锋霉素抑菌最好,青霉素钠和庆大霉素次之。长期在这种培养基上继代无变异苗出现。

利福平(30 mg/L)在合果芋属芽继代培养中抑菌有效^[9];卡拉霉素(50 mg/ml)有效地抑制玉米成熟胚培养中细菌的污染^[19];链霉素能防除长春蔓的芽继代培养中出现的细菌^[4];链霉素能有效地消除已被感染的薄荷培养物的细菌^[24];庆大霉素、林可霉素在海芋茎段、茎尖培养中起到抑制内源菌污染的作用^[21];浓度为 50 mg/L 的庆大霉素对西洋梨(*Pyrus communis*)的培养无害^[51]。

在培养基中使用两种或两种以上的抗生素,可以防治细菌的抗药性,效果比单独使用效果更好。链霉素 20 mg/L 加头孢唑林钠 30 mg/L 能将长春蔓的芽内生菌的污染率控制在 40%以下^[4];对欧洲榛的抑菌试验中,使用 500 mg/L 或 1 000 mg/L 的羧噻吩青霉素钠(timentin)加 1 000 mg/L 的链霉素,12.5 mg/L 的庆大霉素加 1 000 mg/L 的链霉素能消除大多数的污染^[12]。

3.3.2 效果不理想或不稳定 Reed^[6]检测了氨苄青霉素、羧苄青霉素、头孢噻肟、氯霉素、庆大霉素、青霉素 G、四环素、土霉素(erythromycin)等 11 种抗生素对天竺葵黄单胞菌抑制实验,结果除四环素、头孢噻肟、氯霉素外,其他抗生素效果不稳定。Bis-trichanov 等^[22]在离体繁殖大绣球中,使用了头孢唑林(cephalexin)、四环素、阿霉素、Ospamox, 只阿霉素有效;玉米成熟胚培养中,检测了土霉素、青霉素、链霉素、四环素和卡拉霉素,只有卡拉霉素有效;陈维伦等^[33]用卡那霉素、氯霉素、链霉素、红霉素和青霉素等多种抗菌素(100 mg/L 以下)处理毛白杨污染的材料,无满意结果;对欧洲榛的抑菌试验中,使用单一的抗生素无效^[12]。

3.3.3 对培养物生长有害 氯霉素抑制了一些植物的器官再生;多粘菌素 B 对苹果、花旗松(*Pseudotsuga menziesii*)和杜鹃花属(*Rhododendron*)植物有很高的毒性^[6];2.5 mg/L 的庆大霉素加 1 000 mg/L 的链霉素组合对欧洲榛外植体的毒性较大^[12];Dodds 等^[52]发现庆大霉素强烈地抑制长叶莴苣(*Lactuca dolichophylla*)髓薄壁组织培养中的木质部管状分子的分化;链霉素或庆大霉素、羧苄青霉素或头孢金素(cephalothin)及利福平之间的混合均降低了铁线莲属(*Clematis*)、玉簪属(*Hosta*)、石楠属(*Photina*)、翠雀属和鸢尾属等的茎段培养中的增殖率^[53]。

3.4 抗生素使用注意的问题

多数情况下抗生素只能抑制细菌生长而不能完全杀死它^[3]。一种抗生素可能对某一种或几种细菌有效,浓度低了效果差而浓度高又容易对植物产生毒害。所以在使用前有必要对抗生素的种类、浓度水平和使用时间进行测试。还需考虑的是细菌获得抗性的复杂性,两种或更多的抗生素的使用必须考虑到它们之间的不相容性。此外,抗生素一般不稳定,遇酸、碱或加热都易分解而失去活性,所以应寻找稳定、能耐高温高压的抑菌剂,以减少组培中的工作量,降低成本,从而提高经济效益。

参考文献:

[1] Stone J K, Bacon C W, White J F Jr. An overview of endophytic microbes: endophytism defined[A]. Bacon C W, White J F Jr. Microbial endophytes[M]. New York: Marcel Dekker, 2000. 3—29.
[2] Leifert C, Waites WM. Contaminants of plant tissue

cultures[J]. *Int. Assoc. Plant Tissue Culture Newsl.*, 1990, **60**: 2—13.

- [3] 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.
[4] 翟建中, 顾梅俏. 长春蔓组培生产中污染的防除[J]. 森林病虫通讯, 1999, (4): 30—32.
[5] 何云芳, 郭达初. 百合及半夏试管繁殖中的污染防治初报[J]. 浙江农业大学学报, **22**(3): 322—324.
[6] Barrett C, Cassells AC. An evaluation of antibiotics for the elimination of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii*(Brown) from *Pelargonium* × *domesticum* cv. 'Grand Slam' explants in vitro[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1994, **36**(2): 169—175.
[7] Kneifel W, Leonhardt W. Testing of different antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from plant tissue culture[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1992, **29**(2): 139—144.
[8] Leifert C, Camotta H, Wright SM, et al. Elimination of *Lactobacillus plantarum*, *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus saprophyticus* and *Pseudomonas paucimobilis* from micropropagated *Hemerocallis*, *Choisya* and *Delphinium* cultures using antibiotics[J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1991, **71**(4): 307—330.
[9] Levin R, Stav R, Alper Y, et al. In vitro multiplication in liquid culture of *Syngonium* contaminated with *Bacillus* spp. and *Rathayibacter tritici* [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1996, **45**(3): 277—280.
[10] Long RD, Curtin TF, Cassells AC. An investigation of the effects of bacterial contaminants on potato nodal cultures[J]. *Acta Horticulturae*, 1988, **225**: 83—91.
[11] Mantell SH, Cassells AC. Microbes intimately associated with tissue and cell cultures of tropical *Dioscorea yams* [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1998, **52**(1~2): 47—52.
[12] Reed BM, Mentzer J, Tanprasert P, et al. Internal bacterial contamination of micropropagated hazelnut; identification and antibiotic treatment [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1998, **52**: 67—70.
[13] Ruiz Sifre G, Rosa Marquez E, Flores Ortega CE. *Zantedeschia aethiopica* propagation by tissue culture[J]. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico.*, 1996, **80**(3): 193—194.

- [14] Schreiber LR, Domir SC, Gingas VM. Identification and control of bacterial contamination in callus cultures of *Ulmus americana* [J]. *Journal of Environmental Horticulture*, 1996, **14**(2): 50—52.
- [15] Anorld A E, Marnard Z, Gilbert G S, et al. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? [J]. *Ecol Lett*, 2000, **3**: 267—274.
- [16] 许婉芳, 龚福生, 萧华山. 杀菌剂对金线莲组织培养中微生物污染的抑制作用[J]. *福建果树*, 1999, (4): 6—7.
- [17] Ando T, Murasaki K. In vitro propagation of *Cyclamen* by the use of etiolated petiole [J]. *Technol. Bull. Fac. Hort. Chiba Univ.*, 1983, **32**: 1—5.
- [18] Paek KY, Yu KJ, Park SI, et al. Micropropagation of *Rehmannia glutinosa* as medicinal plant by shoot tip and root segment culture [J]. *Acta Horticulturae*, 1995, **390**: 113—119.
- [19] Blackman SA, Brown KL, Manalo JR, et al. Embryo culture as a means to rescue deteriorated maize seeds [J]. *Crop Science*, 1996, **36**(6): 1 693—1 698.
- [20] 韩美丽, 陆荣生, 黄华艳, 等. 绿巨人组培苗继代过程中玻璃化苗及细菌污染的消除方法研究 [J]. *广西林业科学研究*, 1999, **28**(1): 16—19.
- [21] 傅婉华, 李文安. 利用抗菌素进行的海芋快速繁殖 [J]. *植物生理学通讯*, 1991, **27**(5): 373—374.
- [22] Bistrichanov S, Haralampieva V, Kaloyanova N. Testing of different types of antibiotics against bacterial contamination in *Hydrangea hortensis* in vitro [J]. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 1997, **3**(6): 749—753.
- [23] Seyring M. Detection and identification of endophytic bacteria in plant tissue cultures of *Primula vulgaris* Huds [J]. *Gartenbauwissenschaft*, 1998, **63**(1): 27—33.
- [24] Reed BM, Buckley PM, DeWilde TN. Detection and eradication of endophytic bacteria from micropropagated mint plants [J]. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 1995, **31**(1): 53—57.
- [25] Langens Gerrits M, Albers M, Klerk GJ de, et al. Hot-water treatment before tissue culture reduces initial contamination in *Lilium* and *Acer* [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1998, **52**(1~2): 75—77.
- [26] Gunua TG. Effect of contaminants in tissue cultures of taro (*Colocasia esculenta*) [J]. *Papua New Guinea Journal of Agriculture, Forestry and Fisheries*, 1997, **40**(1~2): 19—21.
- [27] Zamora AB, Gruezo SS. Meristem culture of sweet potato (*Ipomoea batatas*) [J]. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 1993, (91~92): 25—28.
- [28] Mondal M, Gupta S, Mukherjee BB. Callus culture and plant production in *Carica papaya* (var. *Honey Dew*) [J]. *Plant Cell Reports*, 1994, **13**(7): 390—393.
- [29] Lozoya Saldana H, Oicata L M, Borbor Ponce MM, et al. Biotic contamination of in vitro coffee (*Coffea arabica* L.) collections [J]. *Revista Mexicana de Fitopatologia*, 1991, **9**(2): 76—80.
- [30] Reuveni O, Golubowicz S. Trials of using in vitro techniques for vegetative propagation of mangos [J]. *Acta Horticulturae*, 1997, **455**: 496—504.
- [31] Viss PR, Brooks EM, Driver JA. A simplified method for the control of bacterial contamination in woody plant tissue culture [J]. *In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plan*, 1991, **27**(1): 42.
- [32] Obeidy AA, Smith MAL. Organogenesis from mature pecan cotyledons and embryonic axes [J]. *HortScience*, 1993, **28**(3): 213—215.
- [33] 陈维伦, 杨善英, 郭东红. 一种以黄化法为基础提高毛白杨快速繁殖效率的新方法 [J]. *植物学报*, 1991, **33**(1): 14—18.
- [34] 李春燕, 李颖. 组织培养中青霉素对细菌污染的抑制作用 [J]. *东北林业大学学报*, 2000, **28**(5): 97—98.
- [35] 朱广廉. 植物组织培养中的外植体灭菌 [J]. *植物生理学通讯*, 1996, **32**(6): 444—449.
- [36] Singh HP, Sanjay Singh, Saxena RP, et al. Pre-treatment of nodal segments for in vitro establishment and bud activation of *Madhuca latifolia* [J]. *Plant Physiology and Biochemistry New Delhi*, 1992, **19**(2): 116—122.
- [37] Rugge BA, Brits GJ (ed.), Wright MG. Micropropagation of *Protea repens* [J]. *Acta Horticulturae*, 1995, **387**: 121—127.
- [38] Kritzinger EM, Vuuren RJ van, Woodward B, et al. Elimination of external and internal contaminants in rhizomes of *Zantedeschia aethiopica* with commercial fungicides and antibiotics [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1998, **52**(1~2):

- 61—65.
- [39] Rossetto M, Dixon KW, Meney KA, *et al.* In vitro propagation of Chinese Puzzle(*Caustis dioica* Cyperaceae)-a commercial sedge species from Western Australia[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1992, **30**(1): 65—67.
- [40] 杨海莲, 孙晓璐, 宋 未. 植物内生细菌的研究[J]. *微生物学通报*, 1998, **25**(4): 224—227.
- [41] Knauss J F, Miller J W. A contaminant, *Erwinia carotovora*, affecting commercial plant tissue cultures[J]. *In Vitro*, 1978, **14**: 754—756.
- [42] Cooke DL, Waites WM, Leifert C. Effects of *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas campestris* on plant tissue cultures of *Aster*, *Cheiranthus*, *Delphinium*, *Iris* and *Rosa*; disease development in vivo as a result of latent infection in vitro [J]. *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 1992, **99**(5): 469—481.
- [43] Debergh PC, Maene LJ. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture [J]. *Scientia Hort.*, 1981, **14**: 335—345.
- [44] 奚元龄, 颜昌敬. 植物组织培养手册[M]. 农业出版社, 1992. 103.
- [45] 曹孜义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 甘肃科学技术出版社, 1996. 42—43.
- [46] Karam NS, Al-Majathoub M. In vitro shoot regeneration from mature tissue of wild *Cyclamen persicum* Mill[J]. *Scientia Hort.*, 2000, **86**: 323—333.
- [47] Reuveni O, Shlesinger D R, Lavi U. In vitro propagation of dioecious *Carica papaya* L. [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1990, **20**: 41—46.
- [48] 肖显华, 王顺珍, 林荣双. 植物材料表面消毒方法的改进[J]. *生物技术*, 1999, **9**(1): 43—45.
- [49] 周 鹏, 郑学勤, 陈向明. 成龄番木瓜的快繁技术[J]. *热带作物学报*, 1995, **16**(2): 66—69.
- [50] 周俊辉, 李宏彬, 杨耀强, 等. 植物组织培养中污染的鉴定与防止初步研究[J]. *微生物学杂志*, 2002, **22**(2): 53—55.
- [51] Chevreau E, Skirvin, RM, Abu Qaoud, *et al.* Adventitious shoot regeneration from leaf tissue of three pear (*Pyrus* sp.) cultivars in vitro[J]. *Plant Cell Reports*, 1989, **7**(8): 688—691.
- [52] Dodds JH, Roberts LW. Some inhibitory effects of gentamicin on plant tissue cultures[J]. *In Vitro*, 1981, **17**: 467—470. [53] Leifert C, Camotta H, Waites WM. Effect of combinations of antibiotics on micropropagated *Clemmatis*, *Delphinium*, *Hosta*, *Iris* and *Photinia* [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1992, **29**(2): 153—160.

(上接第 40 页 Continue from page 40)

- [13] 汪小全, 邹喻莘, 张大明, 等. 银杉遗传多样性的 RAPD 分析[J]. *中国科学(C 辑)*, 1996, **26**(5): 436—441.
- [14] 苏应娟, 王 艇, 黄 超, 等. 陆均松不同居群的 RAPD 分析[J]. *中山大学学报(自)*, 1999, **38**(1): 98—101.
- [15] 刘玲珑, 吴彦奇. 狗牙根种质资源及抗寒性研究进展[J]. *中国草地*, 2000, **6**: 45—50.
- [16] Jack R Harlan, J M J de Wet. Sources of variation in *Cynodon dactylon*[J]. *Crop Sci.*, 1969, **9**: 774—778.
- [17] 刘建秀, 贺善安, 刘永东, 等. 华东地区狗牙根形态分类及其坪用价值[J]. *植物资源与环境*, 1996, **5**(3): 18—22.
- [18] Gustavo Caetano-Anolles. Genetic instability of bermudagrass (*Cynodon*) cultivars 'Tifgreen' and 'Tifdwarf' detected by DAF and ASAP analysis of accessions and off-types [J]. *Euphytica*, 1998, **101**: 165—173.