

# 草珊瑚组培中外植体消毒方法的研究

朱淑颖<sup>1,2</sup>, 陆颂规<sup>3</sup>, 梁承邺<sup>2</sup>, 曾宋君<sup>2</sup>, 陈之林<sup>2</sup>, 张明永<sup>2</sup>

(1. 湖州师范学院, 浙江 湖州 313000; 2. 中国科学院华南植物园, 广东 广州 510650;

3. 敬修堂(药业)股份有限公司, 广东 广州 510130)

**摘要:** 在建立草珊瑚组培快繁体系过程中, 采用常规的表面消毒方法难以获得有效的无菌材料。本文报道了不同的表面消毒方法和抗生素结合使用对组培中污染菌的防除有较好作用。最有效的外植体消毒方案为: 草珊瑚的幼嫩茎段经 75% 酒精处理 30 s 后, 用 0.1% 升汞溶液消毒 10 min, 无菌水冲洗 3~4 次, 然后浸于 120 mg·L<sup>-1</sup> 利福平溶液中振荡预培养 2~4 d, 再用 0.1% 升汞溶液消毒 10 min, 无菌水冲洗 3~4 次, 可以达到较佳的消毒效果, 消毒成功率可达 55.56%。

**关键词:** 草珊瑚; 外植体; 消毒; 组培快繁

**中图分类号:** S567; Q949.732.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7351(2007)04-0082-05

## A protocol for explant sterilization of *Sarcandra glabra* in tissue culture

ZHU Shu-ying<sup>1,2</sup>, LU Song-gui<sup>3</sup>, LIANG Cheng-ye<sup>2</sup>, ZENG Song-jun<sup>2</sup>, CHEN Zhi-lin<sup>2</sup>, ZHANG Ming-yong<sup>2</sup>

(1. Huzhou Normal College, Huzhou, Zhejiang 313000, China;

2. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510650, China;

3. Guangzhou Jingxiutang (Pharmacy) Company Limited, Guangzhou, Guangdong 510130, China)

**Abstract:** During developing the rapid propagation system of *Sarcandra glabra*, it's very difficult to obtain plenty of sterilized materials by using conventional surface sterilization methods. A sterilization protocol for *S. glabra* rapid propagation is reported that a combination of surface sterilizations and antibiotic was effective to the elimination of contaminants in tissue culture. The most effective protocol: Firstly the explants were sterilized by immersion in 75% ethanol for 30 s, and immersion in 0.1% HgCl<sub>2</sub> for 10 min with agitation; then the explants were rinsed with sterile distilled water, and immersed in 120 mg·L<sup>-1</sup> rifampicin solution with gentle shaking for 2~4 d; Finally the explants were immersed in 0.1% HgCl<sub>2</sub> again and rinsed with sterile water before transferred onto media. This protocol could obtain about 55.56% sterilized explants, which has been primarily employed in explant disinfection of micropropagation of *Sarcandra glabra* in vitro.

**Key words:** *Sarcandra glabra*; explant; sterilization; rapid propagation

草珊瑚(*Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai)别名九节茶、肿节风、接骨莲,为金粟兰科草珊瑚属多年生常绿半灌木,多生于山坡、沟谷林下阴湿处,在我国长江以南各省、日本南部及东南亚等地均有分布<sup>[1]</sup>。具有清热解毒、祛风活血、抗菌消炎等作用,特别是对呼吸系统、消化系统的炎症性疾患具有较好疗效,同时可用于治疗骨伤科疾病及癌症,是一种药理作用广泛、毒性低的优良中药材<sup>[2]</sup>。

草珊瑚作为多种中成药的原材料,近年对其需求量不断增加,无限制地采挖使野生资源遭到严重破坏。人工栽培中常用的繁殖方法是扦插和播种繁殖,但繁殖速度慢、增殖率低,仍无法满足生产需求。因此,建立一个程序简单、重复性好的离体快繁体系,就显得十分重要,以使其能从野生资源转变成家养种植,并将在保护野生资源、促进野生资源的再生利用等方面起到积极的指导作用。

在建立以野生草珊瑚茎段为外植体的离体快繁体系的过程中,发现使用普通的植物组织培养的表面消毒方法,外植体初代培养的污染率几乎为 100%,从而限制了进一步研究。本实验的目的在于降低草珊瑚外植体初代培养的污染率,以获得足够的无菌材料,保证研究的顺利开展,并最终建立完善的草珊瑚组培快繁体系。

**收稿日期:** 2007-04-20; **修回日期:** 2007-05-28

**基金项目:** 国家自然科学基金(30670169)、广东省科技计划项目(2006A20101004)和敬修堂(药业)股份有限公司科技项目

**作者简介:** 朱淑颖(1980-),女,浙江湖州人,湖州师范学院生命科学学院助教,从事植物遗传育种研究。

**通讯作者:** 张明永(1968-),男,四川资中人,中国科学院华南植物园研究员,博士,硕士生导师,从事植物遗传育种研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

采用广州市帽峰山草珊瑚 GAP 示范基地(敬修堂药业)的草珊瑚野生植株。

### 1.2 外植体的表面消毒方法

晴天午后,取林间生长良好、长势均匀的草珊瑚枝条,装入洁净塑料袋中,带回实验室。剪去叶片,用自来水冲洗 10~15 min,75%酒精棉球擦拭外表,将其剪成长 2 cm 左右的茎段(仅取枝条上端 4 节,第 1 节带有顶芽的茎段)。

在超净工作台上,将以上材料先用 75%酒精处理 30 s,再用无菌水冲洗 3~4 次,然后分别进行如下处理:A. 用 2%次氯酸钠溶液消毒 10 min,无菌水冲洗 3~4 次;B. 用 2%次氯酸钠溶液消毒 20 min,无菌水冲洗 3~4 次;C. 浸于 2%次氯酸钠溶液中,用真空泵减压抽气 20 min,无菌水冲洗 3~4 次;D. 用 2%次氯酸钠溶液消毒 10 min 后,浸于无菌水中振荡 2 d,再用 2%次氯酸钠溶液消毒 10 min,无菌水冲洗 3~4 次;E. 用 0.1%升汞溶液消毒 10 min,无菌水冲洗 3~4 次;F. 用 0.1%升汞溶液消毒 20 min,无菌水冲洗 3~4 次;G. 浸于 0.1%升汞溶液中,用真空泵减压抽气 20 min,无菌水冲洗 3~4 次;H. 用 0.1%升汞溶液消毒 10 min 后,浸于无菌水中振荡 2 d,再用 0.1%升汞溶液消毒 10 min,无菌水冲洗 3~4 次。其中,0.1%升汞和 2%次氯酸钠中均加“吐温 80” 6~7 滴·L<sup>-1</sup>,2%次氯酸钠溶液是指有效氯的含量。处理后的材料分别接种到培养基中,每个处理接种 30 个外植体,重复 3 次。每隔 3 d 记录一次污染状况和外植体生长状况,并通过观察培养基上的菌落形态,将污染分为 2 类:一类是霉菌状污染,它们的菌落较大,质地疏松,外观干燥,不透明,呈现或紧或松的绒毛状、棉絮状或毡状;另一类为细菌状污染,菌落湿润、较光滑、较透明、较粘稠、质地均匀。至 50 d 时统计结果。

### 1.3 抗生素在草珊瑚茎段培养污染防止上的应用

由于研究过程中发现初代培养后期绝大多数污染为细菌状污染,且难以消除,于是对此类污染菌进行分离,并测定其对抗生素的敏感性,以筛选出合适抗生素用于细菌状污染的控制。

1.3.1 常见污染菌的分离 选取在初代培养后期(接种 15 d 以后)出现污染的外植体材料,在 10 ml 无菌水中蘸洗几次,制成菌体悬浮母液,并依次稀释 10<sup>2</sup>、10<sup>4</sup> 倍。母液直接划线,稀释液各取 100 μl 涂板,于 26~28 ℃培养,48 h 后观察结果。挑取单菌落继续划线分离,直至得到单一纯化的菌落。

分离微生物使用改良的肉汁胨培养基<sup>[3]</sup>,配方为:牛肉膏 3.0 g,蛋白胨 5.0 g,酵母提取物 1.0 g,葡萄糖 10.0 g,琼脂 15.0 g,用蒸馏水定容至 1 000 ml,调 pH 到 7.0~7.2。以上不加琼脂即为肉汁胨液体培养基。

1.3.2 不同抗生素对离体污染菌的抑制作用 将分离所得的菌在肉汁胨液体培养基中培养 48~60 h 后,将菌液稀释到 OD<sub>600</sub> = 0.8 的悬菌液,取 50 μl 分别接入含抗生素和不含抗生素的 100 ml 的肉汁胨液体培养基中,在 28℃下,以 100 转·min<sup>-1</sup>振荡培养 48 h 后观察结果。试验重复 3 次。

用于筛选的抗生素有氨苄青霉素(Ampicillin, 100 mg·L<sup>-1</sup>)、氯霉素(Chloramphenicol, 50 mg·L<sup>-1</sup>)、链霉素(Streptomycin, 50 mg·L<sup>-1</sup>)、卡那霉素(Kanamycin, 50 mg·L<sup>-1</sup>)、利福平(Rifampicin, 20 mg·L<sup>-1</sup>)、壮观霉素(Spectinomycin, 50 mg·L<sup>-1</sup>)、红霉素(Erythromycin, 20 mg·L<sup>-1</sup>)、四环素(Tetracycline, 50 mg·L<sup>-1</sup>)等 8 种。以上选用的浓度为每种抗生素常用有效抑菌浓度。

1.3.3 利用筛选出的抗生素处理外植体 结合处理 H,在 2 次 0.1%升汞溶液消毒的间期,将外植体投入装有不同浓度的抑菌效果最佳的该种抗生素溶液的玻璃瓶中,密封、遮光,100 转·min<sup>-1</sup>振荡预培养一定时间,其他步骤同处理 H,分别接种。其中将第 1 节和第 2 节茎段作为一类外植体,第 3、4 节作为另一类。

### 1.4 草珊瑚组织培养条件

所用培养基为 MS+6-BA 4.0 mg·L<sup>-1</sup>,附加 30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖、7.0 g·L<sup>-1</sup>琼脂,pH 5.7~5.9。培养温度(25±2)℃,光照度 30~40 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>,光照时间 12 h·d<sup>-1</sup>。

## 1.5 数据处理和分析

参考肖显华等<sup>[4]</sup>的方法,并略作修改,其中:

$$\text{污染率} = (\text{污染外植体数} / \text{接种外植体数}) \times 100\%$$

$$\text{死亡率} = (\text{死亡不污染外植体数} / \text{接种外植体数}) \times 100\%$$

$$\text{成功率} = (\text{萌芽不污染外植体数} / \text{接种外植体数}) \times 100\%$$

试验数据用 SPSS 软件进行统计分析,并用其中的 Duncan's 法作显著性差异分析<sup>[5]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同表面消毒方法的消毒效果

表 1 结果表明,草珊瑚外植体用 75% 酒精处理 30 s 后,再用 2% 次氯酸钠消毒 10 min(处理 A)、连续消毒 20 min(处理 B)、浸于 2% 次氯酸钠溶液并用真空泵抽气 20 min(处理 C)及用 2% 次氯酸钠溶液先后处理 2 次 10 min 中间间隔 2 d(处理 D)的污染率分别等于或接近 100%,污染极其严重。

外植体用 75% 酒精处理 30 s 后,再用 0.1% 升汞溶液处理,初代培养的污染率有所降低,其中用 0.1% 升汞溶液消毒 10 min 间隔 2 d 后再消毒 10 min(处理 H)最低,为 92.22%。而用 0.1% 升汞溶液消毒 10 min(处理 E)和连续消毒 20 min(处理 F)的污染率之间不存在显著性差异,故单纯地延长消毒时间无法降低污染率,却使外植体延迟出芽 3~4 d,这可能是因为外植体的芽点遭到消毒剂损伤的缘故。同样,浸于 0.1% 升汞溶液并用真空泵抽气 20 min(处理 G)也不能降低污染率,但出芽和开始出现污染的时间都有所推迟。

霉菌状污染与细菌状污染的比值,处理 A、B、C、D>处理 E、F、G>处理 H。其中 75% 酒精处理 30 s 后,再用 2% 次氯酸钠消毒的方法(处理 A、B、C、D)所得的霉菌状污染与细菌状污染比值介于 5~7 之间,用 0.1% 升汞溶液消毒 10 min(处理 E)、消毒 20 min(处理 F)和浸于 0.1% 升汞溶液并用真空泵抽气 20 min(处理 G)的这一比值介于 2~3 之间,霉菌状污染仍然相当严重,但其在总的污染中所占比例显著降低,说明 0.1% 升汞溶液对霉菌状污染有一定控制作用;而用 0.1% 升汞溶液消毒 10 min 间隔 2 d 后再消毒 10 min(处理 H)的这一指标的值为 0.6~0.8,霉菌状污染得到较有效地抑制,污染类型以细菌状污染为主。所以,后面的试验结合处理 H 这一消毒方法进行设计。

此外,观察还发现处理 H 中的细菌状污染一般出现较迟,通常在接种后 15 d 才开始大量出现。草珊瑚茎段对消毒剂的耐受力强,经过以上各种消毒方法处理后,未污染的外植体均未死亡,可诱导出芽。

### 2.2 抗生素防止草珊瑚茎段培养污染的效果

为了对初代培养后期出现的细菌状污染进行抑制,决定采用抗生素处理外植体。但抗生素种类繁多,为更有针对性地使用抗生素,通过检测各种抗生素对分离的污染菌的抑制作用进行筛选。

2.2.1 常见污染菌的分离 经反复分离、纯化,并根据各菌落成色、质地、形态及生长特性,排除重复菌落

表 1 不同消毒方法对草珊瑚茎段培养污染防止的效果

消毒方法	污染率 / %	开始出芽的天数 / d	开始出现污染的天数 / d	霉菌状与细菌状污染比值
A	100.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	7~8	3~4	5~7
B	100.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	7~8	3~4	5~7
C	97.78 ± 1.92 <sup>ab</sup>	7~8	3~4	5~7
D	97.78 ± 3.85 <sup>ab</sup>	7~8	3~4	5~7
E	95.56 ± 1.92 <sup>abc</sup>	7~8	6~7	2~3
F	93.33 ± 3.33 <sup>bc</sup>	10~11	6~7	2~3
G	93.33 ± 3.33 <sup>bc</sup>	11~13	8~9	2~3
H	92.22 ± 1.92 <sup>c</sup>	11~13	11~12	0.6~0.8

\*:不同小写英文字母表示不同处理在 P=0.05 水平上存在显著性差异。

表 2 草珊瑚组培中常见污染菌的分离结果

分离菌株号	菌落特征(培养 48 h)
A1-1	菌落直径 < 0.5 mm, 单个显极淡红色, 成片颜色稍深
A1-2	菌落稍大, 直径约 1 mm, 呈淡白色
B1-1	菌落较大, 直径约 1.5 mm, 土黄色, 略偏红
B1-2	菌落直径约 1 mm, 淡红色
B5-1	菌落直径约 1 mm, 金黄色
B5-2	菌落直径 1~1.5 mm, 土红色
D1	菌落直径 < 0.5 mm, 红色
D3-1	菌落直径约 1 mm, 呈淡白色

后,共分离到8个污染菌菌株,见表2。根据菌落特征和显微镜观察可判断,它们都属于细菌。

2.2.2 不同抗生素对分离的污染菌的抑制作用 由表3可见,利福平对所有菌株表现出抑制性,且效果明显和稳定,所以后续试验中使用利福平。

表3 不同抗生素对污染菌株的抑制性

菌株号	氨基青霉素	氯霉素	利福平	红霉素	壮观霉素	链霉素	卡那霉素	四环素
A1-1	-	-	+	+	+	+	-	+
A1-2	+	-	+	+	+	+	+	+
B1-1	+	+	+	+	-	+	+	-
B1-2	+	+	+	+	+	+	+	+
B5-1	-	+	+	-	+	-	+	+
B5-2	+	+	+	+	+	+	+	+
D1	+	+	+	+	+	+	+	-
D3-1	-	-	+	+	-	+	+	+

\*:表中“+”表示抗生素对菌体生长抑制,“-”表示不抑制。

2.2.3 利福平溶液预培养外植体对草珊瑚茎段培养污染防止的效果 结合前面试验中处理H这一方法,并在2次0.1%升汞溶液消毒的间期用利福平溶液预培养外植体,初代培养的污染率、死亡率及成功率均有所变化。

由表4可见,第1、2节茎段的污染率随着所使用利福平溶液浓度的升高而逐步降低,当利福平浓度达到 $160\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,污染率仅为25.77%,比对照(消毒间期外植体浸于未加利福平的无菌水中振荡预培养)降低了60.90%;但同时外植体死亡率有所升高,利福平 $160\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时外植体死亡率高达30.56%,导致此时的成功率反而低于利福平浓度为 $120\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的情况;利福平溶液浓度为 $120\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,消毒成功率最高,可达55.56%。第3、4节的消毒效果就不如前者显著。

表4 不同浓度利福平溶液预培养外植体的消毒效果(预培养时间为2d)

利福平浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	污染率/%		死亡率/%		成功率/%	
	第1、2节	第3、4节	第1、2节	第3、4节	第1、2节	第3、4节
CK	$86.67\pm 6.67^a$	$93.33\pm 6.67^a$	$0.00\pm 0.00^d$	$0.00\pm 0.00^b$	$13.33\pm 6.67^d$	$6.67\pm 6.67^c$
20	$62.74\pm 3.49^b$	$93.33\pm 6.67^a$	$6.67\pm 1.65^c$	$0.00\pm 0.00^b$	$30.59\pm 4.36^c$	$6.67\pm 6.67^c$
40	$54.31\pm 6.88^b$	$88.73\pm 3.57^a$	$6.67\pm 3.57^c$	$0.00\pm 0.00^b$	$39.02\pm 3.85^b$	$11.27\pm 3.49^b$
80	$40.95\pm 1.65^c$	$86.67\pm 6.67^a$	$12.50\pm 2.26^b$	$0.00\pm 0.00^b$	$46.55\pm 6.67^b$	$13.33\pm 7.70^b$
120	$28.89\pm 7.70^d$	$68.89\pm 10.18^b$	$15.56\pm 2.56^b$	$0.00\pm 0.00^b$	$55.56\pm 3.85^a$	$31.11\pm 10.18^a$
160	$25.77\pm 4.35^d$	$62.89\pm 9.18^b$	$30.56\pm 5.68^a$	$10.16\pm 6.67^a$	$43.67\pm 3.37^b$	$26.95\pm 3.56^a$

\*:不同小写英文字母表示同一列中不同处理在 $P=0.05$ 水平上存在显著性差异。

从表5可以看出,外植体用浓度为 $120\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的利福平溶液预培养1d,第1、2节和第3、4节的污染率分别为84.44%和93.33%;预培养2d以上,污染率才明显降低,其中第1、2节的污染率的下降幅度更大;但是外植体的死亡率受到预培养时间的严重影响,预培养7d,2类外植体死亡率分别达到了28.33%和10.59%,导致第1、2节的消毒成功率反而低于预培养2d和4d时的成功率。说明利福平溶液在一定的浓度下,外植体的预培养时间需适宜,时间太短或太长都不能得到理想的消毒效果。第1、2节茎段预培养2~4d为宜,第3、4节需预培养4d以上。

表5 外植体预培养时间对消毒效果的影响(利福平浓度为 $120\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )

预培养时间/ /d	污染率/%		死亡率/%		成功率/%	
	第1、2节	第3、4节	第1、2节	第3、4节	第1、2节	第3、4节
1	$84.44\pm 7.70^a$	$93.33\pm 6.67^a$	$0.00\pm 0.00^c$	$0.00\pm 0.00^b$	$15.56\pm 7.70^c$	$6.67\pm 6.67^c$
2	$28.89\pm 7.70^b$	$68.89\pm 10.18^b$	$15.56\pm 2.56^b$	$0.00\pm 0.00^b$	$55.56\pm 3.85^a$	$31.11\pm 10.18^b$
4	$26.67\pm 6.67^b$	$68.89\pm 13.88^b$	$17.78\pm 3.85^b$	$0.00\pm 0.00^b$	$55.56\pm 7.70^a$	$31.11\pm 13.88^b$
7	$36.94\pm 3.37^b$	$46.80\pm 0.23^c$	$28.33\pm 4.41^a$	$10.59\pm 3.49^a$	$34.72\pm 7.09^b$	$42.61\pm 3.56^a$

\*:不同小写英文字母表示同一列中不同处理在 $P=0.05$ 水平上存在显著性差异。

综上所述,结合处理 H,在 2 次 0.1% 升汞溶液处理的间期,用利福平溶液预培养外植体,对降低草珊瑚组培过程中初代培养的污染率具有良好效果,且利福平的浓度和预培养时间都会影响成功率。草珊瑚茎段最有效的消毒方案是:取幼嫩茎段,经 75% 酒精处理 30 s 后,用 0.1% 升汞溶液消毒 10 min,无菌水冲洗 3~4 次,浸于  $120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的利福平溶液中预培养 2~4 d,再用 0.1% 升汞溶液消毒 10 min,无菌水冲洗 3~4 次,外植体消毒成功率可达 55.56%。

### 3 讨论

不同表面消毒方法处理外植体的污染率均非常高,其中最低的污染率仍高达 92.22% (处理 H)。这可能是因为茎段外植体取自成年野生植株,且草珊瑚为阴生植物<sup>[1]</sup>,茎叶表面滋生着大量微生物,并附着大量的霉菌孢子和细菌芽孢,甚至一些菌丝体侵入表皮薄壁细胞<sup>[6]</sup>,所以用常规表面消毒方法很难获得理想消毒效果。

处理 H 消毒效果相对最佳,使霉菌状污染得到有效遏制,该方法的关键在于采用了 2 次 10 min 升汞溶液处理,且这 2 次处理间隔 2 d,类似方法前人曾采用并取得良好效果,称为“间二消毒法”<sup>[7,8]</sup>。在本实验中,此方法使污染率略有降低但仍偏高,主要是因为培养后期(接种 15 d 以后)会出现大量细菌状污染,这很可能是内源性细菌引起的。表面微生物引起的污染通常数天内就能观察到,而在培养后期不断出现的明显或不明显的细菌菌落就可能是由内源细菌引起的污染<sup>[9]</sup>。

此类污染较难解决,采用表面消毒方法通常无法有效控制,而使用抗生素是有效措施之一<sup>[10]</sup>,可用抗生素对外植体预培养或直接加在培养基中。本实验将间二消毒法与抗生素预培养法巧妙结合,在 2 次升汞溶液处理间期用筛选所得抗生素即利福平进行预培养,并确定了合适的利福平浓度和预培养时间。在以幼嫩茎段为外植体的前提下,用  $120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  利福平溶液预培养 2~4 d,消毒成功率可达 55.56%。笔者亦尝试直接将抗生素加入培养基中(实验数据未列出),但效果不如前者显著。

本实验建立的消毒方案,已成功运用于草珊瑚组培育苗的外植体灭菌,而且对其它难消毒材料的污染防止也有一定的参考价值。但应该指出,不同种类的植物材料,同一植物不同成熟程度的外植体,对消毒剂包括抗生素的耐受力不同,在进行消毒处理时,应根据具体情况决定消毒剂的浓度和处理时间,以获得较高的成功率。

### 参考文献:

- [1]中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物:第 20 卷 1 分册[M]. 北京:科学出版社,1982:79-80.
- [2]陆颂规. 肿节风的研究进展[J]. 中药材,2001,24(8):606-608.
- [3]袁军,孙福在,田宏先,等. 防治马铃薯环腐病有益内生细菌的分离和筛选[J]. 微生物学报,2002,42(3):270-274.
- [4]肖显华,王顺珍,戴林荣,等. 植物材料表面消毒方法的改进[J]. 生物技术,1999,9(1):43-45.
- [5]卢纹岱. SPSS for WINDOWS 统计分析[M]. 北京:电子工业出版社,2002:146-205.
- [6]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):444-446.
- [7]王子成,李忠爱,邓秀新. 柑橘成年态茎段外植体消毒方法研究[J]. 河南大学学报:自然科学版,2005,35(2):57-60.
- [8]Pol I E, Arendonk W G C, Mastwijk H C, et al. Sensitivities of germinating spores and carvacrol-adapted vegetative cells and spores of *Bacillus cereus* to nisin and pulsed-electric-field treatment [J]. Applied Environmental Microbiology, 2001, 67(4): 1693-1699.
- [9]周俊辉,周厚高,刘花全. 植物组织培养中的内生细菌污染问题[J]. 广西植物,2003,23(1):41-47.
- [10]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的研究[J]. 广西植物,2005,25(3):233-235.