

## 6-BA, NAA 和 Vc 浓度对比对山葵试管苗增殖体系的影响

崔翠 何凤发\* 周清元

(西南大学农学与生命科学院, 重庆 400716)

**摘要:** 山葵为十字花科山葵属多年生草本植物, 具有强烈的香辛味, 是一种高级蔬菜和药用植物。在山葵生产中存在的一个最大问题即健壮种苗的供给, 通过山葵的茎尖培养建立组培快繁体系是解决该问题的有效手段。本文通过 311-A 最优回归设计研究 6-BA, NAA 和 Vc 浓度对比对山葵试管苗增殖体系的影响, 对 11 种不同配方培养基中山葵苗的增殖系数进行调查, 通过 DPS3.01 数据统计软件建立回归方程, 并对回归方程进行主效因子及其互作效应分析。结果发现: 当 6-BA( $X_1$ )、NAA( $X_2$ )、Vc( $X_3$ ) 的浓度分别为 1.2504mg/L、0 mg/L、1.9668 mg/L 时, 增殖系数可以达到 6.8380, 进一步优化了山葵试管苗增殖的体系。

**关键词:** 山葵 组织培养 311-A 回归设计

## The Study on Improving Plantlet Propagation Coefficient of Wasabi Through Optimizing Concentration of 6-BA, NAA and Vc

Cui Cui He Fengfa Zhou Qingyuan

(College of Agronomy and Life Science, Southwest University, Chongqing 400716)

**Abstract:** Wasabi (*Eutrema wasabia* (Sieb.) Maxim.) is a member of cruciferae. Wasabi is a rare worldwide vegetable used both for culinary and medicinal purpose for its strong pungent. However, one of the main problems in planting wasabi is the production of wasabi seedlings, in order to resolve efficiently this problem, a shoot-tip culture system have been established. The study focuses on improving plantlet propagation, optimization regress analyse called 311-A was firstly applied in wasabi multiplication culture. The multiplication coefficients of 11 medium with different level 6-BA and NAA and Vc were investigated. The regress equation was deduced on 6-BA( $X_1$ ), NAA( $X_2$ ) and Vc( $X_3$ ) as variable factor, and single factor effect and mutual effect were analyzed. The result showed that proliferation coefficient might increase to 6.8380 while MS medium contained 6-BA 1.2504mg/L and Vc 1.9668 mg/L.

**Key words:** Wasabi Tissue culture 311-A regression design

山葵又名山葵菜, 为十字花科山葵属多年生草本半阴生植物, 原产中国和日本<sup>[1]</sup>。其根状茎不仅含有丰富的营养, 而且含有一种黑芥子甙(sinigrin)类的物质。这类物质能使山葵产生强烈的辛辣味及特殊的芳香, 具有很强的杀菌和助消化功能, 还能促进淀粉性食物的消化, 稳定胃肠中的维生素 C, 消灭消化道中寄生虫, 具有良好的防病治病作用<sup>[2,3]</sup>。将山葵的根状茎磨成糊是日本、韩国等地

人们鲜食生鱼片等海鲜的必备调味品, 近年来国内一些大中城市也开始从国外进口山葵, 而且食用量正逐年增加<sup>[1]</sup>。

山葵生产中存在的一个最大问题即健壮种苗的供给, 通过山葵的茎尖培养建立组培快繁体系是解决该问题的有效手段之一。日本在山葵组织培养方面的工作开展较早, 我国近几年开始该方面的研究, 也取得了一定的研究进展<sup>[1,4-7]</sup>。本试验采用 311-

基金项目: 国家星火计划项目(2002EA812002); 重庆市科委应用基础项目(2003023)

作者简介: 崔翠(1974-), 女, 内蒙古赤峰人, 讲师, 主要从事于应用生物技术研究。E-mail: cuigreeny@163.com

通讯作者: 何凤发, 副教授, 主要从事于遗传及应用生物技术研究。E-mail: Hefengfa@swau.cq.cn

A 最优回归设计方法<sup>[8]</sup>, 研究 6-BA、NAA 及 Vc 浓度对比对组织培养中山葵试管苗增殖系数的影响, 进一步提高了繁殖系数。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

实验材料为山葵品种“岛根 3 号”的组培试管苗。

### 1.2 方 法

1.2.1 试验设计及培养条件 采用 311-A 最优回归设计(表 1), 以试验因子 6-BA、NAA 与 Vc 的质量浓度为自变量, 以增殖系数为目标函数。为了使回

归关系标准化, 消除量纲和自变量取值的影响, 对试验因子的设计水平进行无量纲线性编码代换, 其编码代换列于表 1。采用 MS 基本培养基, 以自变量编码值相应的浓度添加不同浓度的 6-BA、NAA 与 Vc (如表 2)设计 11 种不同培养基, 每种培养基中添加 3% 蔗糖和 0.48% 卡拉胶, pH = 5.8。将山葵试管苗接入 11 种不同培养基。每瓶内接种 4 株带有两个芽的外植体, 其重量 0.16g 左右, 每个处理接种 10 ~ 15 瓶, 18℃ 左右, 光照 12h/d。

表 1 自变量水平编码

自变量类型	水平范围	间隔	自变量水平						
			-2	-1.414	-1	0	1	1.414	2
6-BA	0.0 - 2.0	0.5	0	0.293		1		1.707	2110
NAA	0.0 - 1.0	0.25	0	0.1465		0.5		0.8535	
Vc	0.0 - 10.0	2.5	0		2.5	5	7.5		

1.2.2 增殖系数及回归方程的确定 试管苗在不同增殖培养基上培养 35d, 每一处理随机抽取 3 瓶, 统计每瓶增殖后总芽数, 并计算增殖系数。增殖系数 = 总芽数/接种幼芽数。

对处理间和重复间进行方差分析, 并以每个处理的平均增殖系数为因变量, 以 6-BA、NAA 和 Vc 所对应编码值  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  为自变量建立多项式回归方程:

$$\hat{Y}b_0 + \sum_{j=1}^3 b_j x_j + \sum_{i<j} b_{ij} x_i x_j + \sum_{j=1}^3 b_{jj} x_j^2$$

表 2 6-BA, NAA, Vc 组合 (mg/L) (处理) 及其调查结果

处理号	6-BA	NAA	Vc	增殖系数	
				平均	理论
1	0(1)	0(0.5)	2(10)	1.708	1.280
2	0(1)	0(0.5)	-2(0)	2.125	2.553
3	-1.414(0.293)	-1.414(0.1465)	1(7.5)	2.458	2.672
4	1.414(1.707)	-1.414(0.1465)	1(7.5)	3.167	3.381
5	-1.414(0.293)	1.414(0.8535)	1(7.5)	2.208	2.422
6	1.414(1.707)	1.414(0.8535)	1(7.5)	2.125	2.339
7	2(2)	0(0.5)	-1(2.5)	2.458	2.249
8	-2(0)	0(0.5)	-1(2.5)	1.583	1.369
9	0(1)	2(1)	-1(2.5)	3.250	3.036
10	0(1)	-2(0)	-1(2.5)	6.925	6.711
11	0(1)	0(0.5)	0(5)	3.625	3.625

备注: 括号内为各因子不同水平编码相对应的浓度 (mg/L)

其中,  $b_0$  为常数项,  $b_j$  为一次项回归系数,  $b_{ij}$  为交互项回归系数,  $b_{jj}$  为二次项回归系数

## 2 结果与分析

### 2.1 不同培养基对山葵增殖系数影响的方差分析

对实验所得增殖系数进行方差分析(表 3), 结果显示, 重复间差异不显著, 11 个处理间差异达到极显著水平, 因此, 利用各个重复间的平均数进行进一步分析是有效的(表 2)。

表 3 不同培养基对山葵增殖系数影响的方差分析表

变异来源	自由度	平方和	均方	F 值
重复间	2	0.3728	0.1864	0.9592
处理间	10	66.4106	6.6411	34.1796 **
误差	20	3.8860	0.1943	
总变异	32	70.6694		

\*\* 表示在 1% 水平下差异极显著

## 2.2 试验因子对山葵增殖系数的影响

2.2.1 回归方程的建立 根据实验中各处理平均增殖系数(表 2),通过 DPS v3.01 专业统计软件建立 6-BA( $X_1$ )、NAA( $X_2$ )、Vc( $X_3$ )各自变量因子与山葵增殖系数  $\hat{Y}$  的多项式回归方程为:

$$\hat{Y} = 3.6298 + 0.1657X_1 - 0.5740X_2 - 0.3181X_3 - 0.4283X_1^2 + 0.3391X_2^2 - 0.4274X_3^2 - 0.0988X_1X_2 - 0.0543X_1X_3 + 0.3460X_2X_3 \quad (1)$$

该回归方程是否反映了 6-BA,NAA,Vc 的不同浓度对山葵增殖系数的影响?为了检测该回归方程的有效性,利用该方程计算理论增殖系数(如表 2)并计算  $X^2$  值,结果显示  $X^2 = 0.7337$ ,差异不显著;同时对该回归方程进行显著性检验,结果相关系数  $R = 0.9833$ ,F 值 = 3.2433,表明方程各因子与实验结果的拟合效果较好。

2.2.2 试验因子的主效应分析 由于设计中各因素处理进行正交编码,回归方程中的统计值已相对独立,反映各因子与实验结果的关系时,只要把其它两个实验因子以零水平处理代入回归方程,可得到本试验中 6-BA( $X_1$ )与增殖系数( $\hat{Y}_1$ ),NAA( $X_2$ )与增殖系数( $\hat{Y}_2$ ),Vc( $X_3$ )与增殖系数( $\hat{Y}_3$ )的 3 个一元二次数学方程为:

$$\hat{Y}_1 = 3.6298 + 0.1657X_1 - 0.4284X_1^2 \quad (2)$$

$$\hat{Y}_2 = 3.6298 - 0.5740X_2 + 0.3391X_2^2 \quad (3)$$

$$\hat{Y}_3 = 3.6298 - 0.3181X_3 - 0.4275X_3^2 \quad (4)$$

由回归方程求出试验中各自变量 6-BA( $X_1$ )、NAA( $X_2$ )、Vc( $X_3$ )不同编码值对应的增殖系数绘制各主效因子 6-BA、NAA 及 Vc 水平编码值与对应增殖系数变化曲线图(图 1)。图 1 说明,在低浓度范围内,6-BA 和 Vc 浓度增大对山葵增殖系数具有正向作用,而 NAA 浓度增加,增殖系数则下降。从试验因子的主效应分析中可以看到,三者均具有一个极值(最

大值或者最小值)浓度。根据一元二次方程的极值公式<sup>[15]</sup>  $x_i = \frac{b_i}{-2b_{ii}}$ 可求得各试验因子增殖系数最大时,相应的 6-BA( $X_1$ )、NAA( $X_2$ )以及 Vc( $X_3$ )浓度。但是,从总回归方程(1)可知,试验因子之间有着大小、正负不同的互作效应,因此仅从主效应分析来选各因子的最佳用量显然是不全面的。因此,对试验因子间一级互作进行分析是非常必要的。

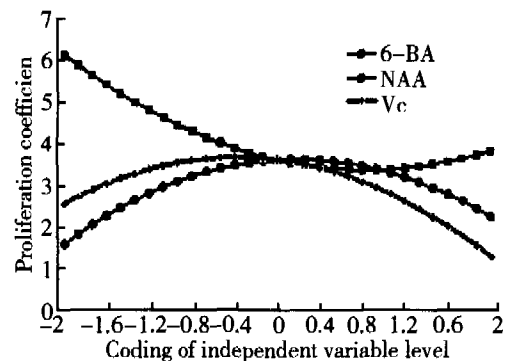


图 1 6-BA,NAA,Vc 对快繁系数的主效应分析

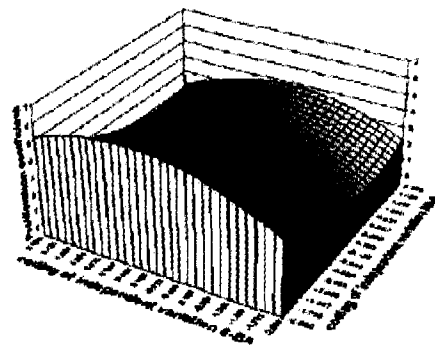


图 2 6-BA 和 NAA 互作对山葵增殖系数的影响

## 2.2.3 试验因子间互作效应分析

### 2.2.3.1 6-BA( $X_1$ )和 NAA( $X_2$ )的互作效应分析

将 Vc( $X_3$ )实验因子以零水平处理代入可得 6-BA

( $X_1$ ) 和 NAA( $X_2$ ) 互作的回归方程:

$$\hat{Y} = 3.6298 + 0.1657X_1 - 0.5740X_2 - 0.4283X_1^2 + 0.3391X_2^2 - 0.0988X_1X_2 \quad (5)$$

以不同 6-BA( $X_1$ ) 和 NAA( $X_2$ ) 自变量水平编码代入该方程, 求出各种不同浓度的增殖系数结果见图 2。由图 2 可知, 当 NAA( $X_2$ ) 自变量水平编码为 -2 (浓度为 0mg/L) 时, 6-BA 在一定浓度下可以获得较高的增殖系数。将  $X_2 = -2$  (浓度为 0mg/L) 代入回归方程 (5) 获得一个一元二次数学方程为:

$$\hat{Y} = 6.1342 + 0.3633X_1 - 0.4283X_1^2 \quad (6)$$

由极值公式  $x_i = \frac{b_i}{-2b_{ii}}$  求出当 6-BA( $X_1$ ) 编码值为 0.4241 (浓度为 1.2121mg/L) 时, 增殖系数达到 6.2112。随着 NAA 浓度的变化, 增殖系数的最大值发生较大变化, 6-BA 的取值也发生变化

### 2.2.3.2 6-BA( $X_1$ ) 和 Vc( $X_3$ ) 的互作效应分析

将 NAA( $X_2$ ) 实验因子以零水平处理代入可得 6-BA( $X_1$ ) 和 Vc( $X_3$ ) 互作的回归方程:

$$\hat{Y} = 3.6298 + 0.1657X_1 - 0.3181X_3 - 0.4283X_1^2 - 0.4274X_3^2 - 0.0543X_1X_3 \quad (7)$$

以不同 6-BA( $X_1$ ) 和 Vc( $X_3$ ) 自变量水平编码代入方程 (7), 求出各种不同浓度的增殖系数结果见图 3。

图 3 中可以看到, 6-BA( $X_1$ ) 和 Vc( $X_3$ ) 对增殖系数的影响都较大; 当 6-BA( $X_1$ ) 浓度在 0 ~ 1.1089mg/L (自变量编码为 -2 ~ 0.2179) 范围内, Vc 为 0 ~ 4.0351mg/L (自变量编码为 -2 ~ -0.3860), 它们对增殖系数的影响是相辅相成的, 可见只有二者合理的配合, 才能获得理想的效果。当 6-BA( $X_1$ ) 为 1.1089mg/L, Vc( $X_3$ ) 为 4.0351mg/L 时, 山葵增殖系数最高可以达到 3.7092。高浓度的 6-BA 和 Vc 对增殖系数的提高不利。

### 2.2.3.3 NAA( $X_2$ ) 和 Vc( $X_3$ ) 的互作效应分析

将 6-BA 实验因子以零水平处理代入可得 Vc( $X_3$ ) 和 NAA( $X_2$ ) 互作的回归方程:

$$\hat{Y} = 3.6298 - 0.5740X_2 - 0.3181X_3 + 0.3391X_2^2 - 0.4274X_3^2 + 0.3460X_2X_3 \quad (8)$$

以不同 NAA( $X_2$ ) 和 Vc( $X_3$ ) 自变量水平编码代入方程 (8), 求出各种不同浓度的增殖系数, 结果见

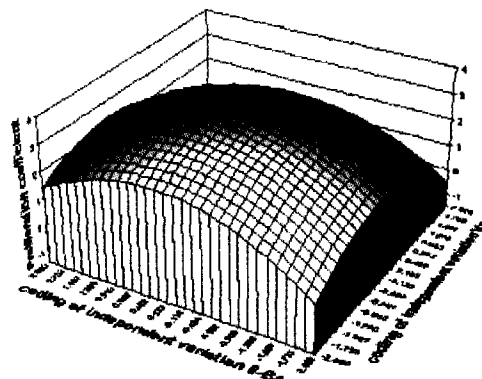


图 3 6-BA 和 Vc 互作对山葵增殖系数的影响

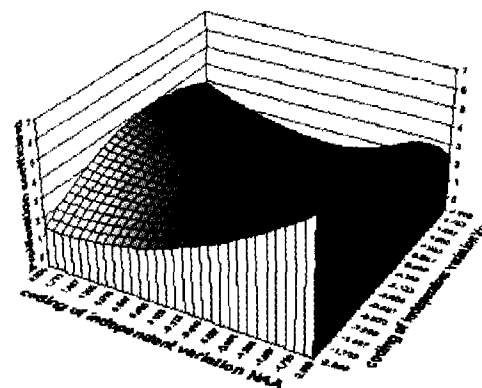


图 4 NAA 和 Vc 互作对山葵增殖系数的影响

图 4。由图 4 可知, 当 NAA( $X_2$ ) 自变量水平编码为 -2 (浓度为 0mg/L) 时, Vc 在一定浓度下可以获得较高的增殖系数。将  $X_2 = -2$  (浓度为 0mg/L) 代入回归方程 (8) 获得一个一元二次数学方程为:

$$\hat{Y} = 6.1342 - 1.0117X_3 - 0.4274X_3^2 \quad (9)$$

由极值公式  $x_i = \frac{b_i}{-2b_{ii}}$  求出当 Vc( $X_3$ ) 编码值为 -1.1836 (浓度为 2.0411mg/L) 时, 增殖系数达到 6.7329。二者互作和 6-BA, NAA 互作变化趋势相似。

### 2.2.4 最佳组合方案优选与验证

根据多元函数极值求解方程 (1), 当 6-BA、NAA、Vc 的水平编码值分别为 0.5009、-2.000、-1.2133 时, 即它们浓度为 1.2504mg/L、0 mg/L、1.9668 mg/L 时, 增殖系数最大可以达到 6.8380。

根据筛选出最佳组合中 6-BA 和 Vc 的浓度配制快繁培养基, 将试管苗分割成只有双芽的外植体

接入快繁培养基, 35d 后统计增殖系数进行验证, 结果平均增殖系数达到 6.930, 和理论增殖系数差异不明显。

### 2.3 不同增殖培养基中试管苗生长状况

培养 30d 左右, 从试管苗叶色、丛生芽长势、基部愈伤、褐化等方面进行调查, 结果 10 号培养基中山葵试管苗叶色浓绿, 丛生芽紧凑、整齐、长势旺盛, 基部无褐化, 无愈伤, 叶缘黑斑最少, 叶片大小均匀 (如图 5), 在 11 种培养基中其表现效果最好。10 号培养基激素浓度配比和理论最佳培养基接近, 结合试管苗增殖效果 (如表 2) 和生长状况, 该种培养基为理想的增殖培养基。



图 5 10 号培养基和 3 号培养基上山葵试管苗形态比较

## 3 讨论

在生产上, 山葵存在种苗繁殖供不应求的问题。山葵种苗繁殖方式过去主要采用分株繁殖、种子繁殖。分株繁殖不仅繁殖速度慢, 而且常年连续无性繁殖会因为病菌侵染而导致种性退化; 种子繁殖则由于种子难以保存及发芽率较低等, 这些在很大程度上限制了种苗的供应<sup>[9,10]</sup>。于是, 茎尖脱毒培养成为解决山葵种苗生产问题的有效方法之一。

山葵的组织培养较其它十字花科植物要困难的多, 主要是繁殖系数较低, 生长速度慢等问题。日本学者细木高志等<sup>[1]</sup>在对“岛根三号”、“真妻”等的增殖培养中, 选用添加 0.1 ~ 0.2mg/L 6-BA 的 MS 培养基获得增殖系数 4.0 和 3.9, 且认为激素中除了 6-BA 以外, 不需要添加任何生长素。我国部分研究者对种苗的快速繁殖方面也进行了一定的研究工作, 虽然起步较晚, 研究人员少, 但是在提高繁殖系数方面也取得了一定的研究进展<sup>[5-7]</sup>。如吴震等以山葵茎尖为材料进行山葵的增殖培养<sup>[7]</sup>, 发现最佳增殖培养基为 MS + 0.5mg/L 6-BA (0.5mg/L KT)

+ 0.05mg/LNAA, 且获得了较高的增殖系数 5.1。由于山葵本身含有多酚氧化酶, 培养基中的细胞分裂素物质 (如 6-BA) 在培养过程中有提高山葵多酚氧化酶活性的作用, 从而在培养基内产生并积累了酚、酮类深褐色色素物质。这类物质常产生毒害, 抑制组织生长, 严重时组织完全褐化而死亡。褐化的程度随细胞分裂素浓度的提高而加深, 影响山葵的增殖效果, 因此, 有人提出适当添加 Vc 或者 PVP, 以克服或者减轻褐化现象<sup>[6]</sup>。

本研究结合前人研究结果, 利用 311-A 最优回归设计研究 6-BA、NAA、Vc 对山葵增殖系数的影响, 并获得了多项式回归方程:

$$\hat{Y} = 3.6298 + 0.1657X_1 - 0.5740X_2 - 0.3181X_3 - 0.4283X_1^2 + 0.3391X_2^2 - 0.4274X_3^2 - 0.0988 X_1X_2^2 - 0.0543 X_1X_3 + 0.3460X_2X_3。$$

筛选出 6-BA、NAA、Vc 的浓度分别为 1.2504mg/L、0 mg/L、1.9668 mg/L 时, 增殖系数可以达到 6.8380。结果表明, MS 培养基中添加细胞分裂素 6-BA, 再辅以一定的 Vc, 可以获得较好的增殖效果。对于 NAA, 在该研究中发现, 不添加 NAA 可以获得较好的效果, 在低浓度水平下, 随着 NAA 的增加, 其繁殖系数逐步下降。从方程 (3) 的分析中发现, 高浓度的 NAA 有利于繁殖系数的提高。为了验证 NAA 对增殖的影响是否呈先降后升的一种变化趋势, 我们以 10 号增殖培养基为基础, 将 NAA 设置 5 个不同的浓度梯度, 分别是 0.05mg/L、0.5 mg/L、1 mg/L、2 mg/L、4 mg/L。培养 20d 后, 表现出当 NAA 浓度为 0.05mg/L 时, 试管苗愈伤并不明显, 但新生芽只有 4 个左右, 当 NAA 浓度为 0.5 mg/L、1 mg/L、2 mg/L 时各处理外植体都有不同程度的愈伤, 且随着 NAA 浓度的增大, 愈伤程度越来越明显, 外植体长势变差, 当 NAA 浓度为 4 mg/L 时, 试管苗叶柄基部很快变黑, 很快死亡。因此, NAA 对增殖系数的提高是不利的。

### 参考文献

- 1 王广东. 珍贵稀有香辛植物山葵 (*Eutrema fasabjii*) 的组培增殖及其根状茎发育生理研究 [博士论文]. 南京: 南京农业大学, 1999, 6 ~ 29.

(下转第 371 页)

- (1): 143 ~ 169.
- 3 阎冰, 洪葵, 许云, 马超. 微生物学通报, 2005, 32(1): 113 ~ 117.
  - 4 Patrick Robe, Renaud Nalin, Carmela Capellano, Timothy M. Vogel, Pascal Simonet. European Journal of Soil Biology, 2003, (39): 183 ~ 190.
  - 5 Zhou J Z, Mary A B, Tiedje J M. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(2): 316 ~ 322.
  - 6 Proteous LA, Armstrong JL, Seidler RJ, Watrud LS. Curr. Microbiol, 1994, 29: 301 ~ 307.
  - 7 Andrew E. Berry, Claudia Chiochini, Tina Selby. FEMS Microbiology Letters, 2003, 223: 15 ~ 20.
  - 8 Gabor E M, Cries E J, Janssen D B. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 44(2): 153 ~ 163.
  - 9 Yeates C, Gillings MR, Davison AD, Altavilla N, Veal DA. Biol. Proced. Online, 1998, (1): 40 ~ 47.
  - 10 Andrew E. Berry, Claudia Chiochini, Tina Selby, Margherita Sossio, Elizabeth M. H Wellington. FEMS Microbiology Letters, 2003, 223: 15 ~ 20.
  - 11 L. R. Bakken, V. Lindahl, Nucleic Acids in the Environment: Methods and Applications, pringer - Verlag, Heidelberg, Germany, 1995: 9 ~ 27.

—————  
 (上接第 355 页)

- 2 Ina K, Takasawa R, Yagi A, et al. Agricultural and Biological Chemistry, 1989, 53(2): 537 ~ 538.
- 3 Ina K, Wu Js, Etoh H, et al. Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology, 1993, 40(12): 859 ~ 862.
- 4 刘琴. 山葵 (*Wasabi japonica* Matsum) 组培快繁的关键技术研究 [硕士论文]. 南京: 南京农业大学, 2002, 15 ~ 16.
- 5 王广东, 李式军. 植物生理学通讯, 1998, 34(4): 267 ~ 267.
- 6 王俐, 龙春林. 中国蔬菜, 2002, (2): 15 ~ 16.
- 7 吴震, 王广东, 刘琴, 等. 西南农业学报, 2002, 15(3): 66 ~ 69.
- 8 徐中儒. 农业试验最优回归设计[M]. 哈尔滨: 黑龙江农业科技出版社, 1988.
- 9 崔翠, 何凤发, 周清元. 西南农业大学学报. 2005, 27(1): 78 ~ 80.
- 10 吴震, 王广东, 翁忙玲, 等. 园艺学报, 2003, 30(3): 287 ~ 290.

—————  
 (上接第 361 页)

- 7 David M. Long, I Eric D. Smidansky, Amy J. Archer, Gary A. Strobel In Vivo Addition of Telomeric Repeats to Foreign DNA Generates Extrachromosomal DNAs in the Taxol - Producing Fungus *Pestalotiopsis microspore* Fungal Genetics and Biology 1998, 24: 335 ~ 344.
- 8 观荣编写. 紫杉醇植物内生真菌来源及其生物多样性[M]. 国外医药抗生素分册, 1998, 19(4): 265 ~ 266.
- 9 王建锋, 吕华鹰. 微生物学通报, 2000, 27(1): 58560.
- 10 Walker K, Fujisaki S, Long R, Croteau R. Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(20): 12715 ~ 12720.
- 11 孙丽. 蕈菌遗传转化系统的建立与应用, 北京大学博士研究生学位论文, 2001, 5.
- 12 马玉超, 赵凯, 王世伟, 张建, 齐晓辉, 周东坡. 菌物研究, 2003, 1(1): 28 ~ 32.
- 13 Strobel GA, Hess WM. Aust J Biotech, 1997, 45: 107321082.
- 14 Li J Y, Sidhu R S. J Industrial Micro Biotech, 1998, 20: 2592264.
- 15 Stierle A, Strobel G, Stierle D. Science, 1993, 260: 214 ~ 216.
- 16 万波, 李安明, 王晓力. 中国科学, 2001, 31(3): 271 ~ 274.
- 17 陈毅坚, 张灼, 王艳, 苏源, 张睿. 生物技术, 2003, 13(2): 10 ~ 11.