

薄荷属植物的组织培养研究进展

王小敏¹, 李维林², 赵志强², 梁呈元¹

(1. 江苏省中国科学院植物研究所, 江苏南京 210014; 2. 江苏省科技厅, 江苏南京 210008)

摘要: 结合国内外有关资料, 综述了薄荷属植物在组织培养研究和应用方面所取得的成果与进展, 针对当前在薄荷属植物组织培养中存在的突出问题如外植体污染、褐变以及组培苗玻璃化等现象作了分析, 提出对策。

关键词: 薄荷属; 组织培养; 综述

中图分类号: S567.23*5.035.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-1302(2007)04-0116-05

全世界薄荷属植物 (*Mentha* L.) 约有 30 种, 140 多个变种, 其中有 20 多个变种在世界各地栽培^[1-2]。我国约有 12 种, 其中 6 种为野生, 其余为引进栽培品种^[3]。薄荷属植物常见的栽培种有薄荷 (*M. haplocalyx* Briq.)、留兰香 (*M. spicata* L.)、椒样薄荷 (*M. piperita* L.)、唇萼薄荷 (*M. pulegium* L.)、水薄荷 (*M. aquatica* L.) 及柠檬留兰香 (*M. citrata* L.) 等。结合本种形态特征和地理分化趋势, 可将薄荷划分为两大种群且作为两个种处理, 即欧洲、西亚及北美地区的薄荷种群, 仍用学名 *M. arvensis* L., 东亚及热带亚洲的薄荷种群, 用学名 *M. haplocalyx* Briq.。

薄荷属植物是一种用途广泛的中药材, 也是世界上主要的香料植物之一^[4-6]。薄荷属植物内种间杂交情况十分普遍, 有性繁殖极易造成品种混杂, 难以区分。一般都采用无性繁殖, 但长期采用无性繁殖, 导致病毒病十分普遍, 引起品种的退化和产量、质量的下降。通过组织培养可以对植株进行脱毒复壮, 并且可以保持植物优良性状遗传的稳定性, 防止品种过快退化^[7]。组织培养技术还可以用来进行薄荷的诱变育种和种质保存, 如方晓志等^[8]在组织培养条件下进行了薄荷化学试剂和射线辐射诱变育种技术的研究, 获得了多个薄荷株系; Hirai 等^[9]利用留兰香组培苗的腋芽低温贮藏, 寻找到一种新的

种质资源保存方法。组织培养技术在薄荷属植物的生产中应用十分广泛。虽然针对薄荷属植物组织培养技术研究在国内外已有一些报道^[10-12], 但在某些技术环节方面还存在一些限制因素, 如外植体的污染、褐变、组培苗玻璃化现象以及病毒检测等。现就国内外对薄荷属植物组织培养的研究进展与组织培养中出现的突出问题及解决方法综述如下。

1 无菌再生体系的建立

1.1 外植体的获取

薄荷属植物组织培养常用的外植体有茎尖、顶端分生组织、茎段、叶片、种子、原生质体。一般来说应选择幼嫩、生长旺盛的外植体, 这与不同部位、不同时期细胞的理化性质及其功能有关^[13]。

沙红等^[14]、赖家业等^[15]曾用留兰香、野薄荷的种子作为外植体成功培育出完整的试管苗。王小刚等^[16]、丁琤等^[17]用茎尖对薄荷进行脱毒培养。李格等^[11]用薄荷茎段成功诱导产生丛生芽。师素云等^[18]分别用薄荷的叶片、茎尖与茎节进行愈伤组织诱导, 结果表明选用茎尖作为愈伤组织诱导的外植体较好。臧玉琦等^[19]对不同生长时期的薄荷茎尖外植体的成活率及分化情况进行比较分析, 结果表明处于营养生长时期的健壮植株, 其茎尖成活率高, 分化快; 而进入生殖生长旺盛时期的植株茎尖, 成活率低, 分化慢。Hiroshi 等^[20]、Chaput 等^[21]都曾用原生质体对椒样薄荷成功地进行了再生培养。Rech 等^[22]曾用留兰香的腋芽作为组织培养的外植体。

外植体的选择和处理对褐变有较大影响, 而选材粗细对后代生长无显著影响。刘铭等^[23]研究发现, 用薄荷同一材料但粗细差异极其显著的母本茎

收稿日期: 2006-12-31

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (编号: 2006BAI06A12-12); 江苏省高技术研究项目 (编号: BG2005317)。

作者简介: 王小敏 (1980—), 女, 山东苍山人, 硕士生, 研究方向为药用植物栽培与生物技术。Tel: xmwang525@163.com。通讯作者: 李维林, Tel: (025)84347081; E-mail: lwlcnbj@mail.cnbg.net。

段接种于不同浓度和配比的 6-BA 和 NAA 的组合培养基上,培养 3 代后,其后代粗细无显著差异,但粗茎段母本的后代在生长性状上优于细茎段母本。此外,外植体组织受伤害程度直接影响褐变,在切取外植体时,伤口面积越小,表面消毒剂对外植体伤害越少,褐变越轻。

1.2 外植体的灭菌

张艳玲等^[24]研究了唇萼薄荷组织培养中污染的控制方法,结果表明采用加吐温-80 的灭菌方法可降低污染率。王小刚^[25]对薄荷外植体不同灭菌方法的效果进行了比较研究,试验结果确定最佳灭菌方案为将田间所采的芽用洗洁精洗去表面灰尘和细菌,在水龙头下流水冲洗 2 h 左右,先用 75% 酒精浸泡 30 s,再用 2% 次氯酸钠浸泡 10 min,最后用无菌水冲洗 4~5 次。沙红^[26]用 0.5 mg/L GA 处理留兰香的种子 24 h 后,用 70% 酒精浸泡 30 s,再用 0.1% 升汞溶液浸泡 6~8 min,无菌水冲洗 3~4 次。

为获得无菌外植体,在选择消毒剂时要考虑既能杀死附着在植物表面的微生物,又不伤害组织,这就需要根据不同的植物材料采用不同的消毒剂、不同的浓度以及不同的处理时间。升汞对外植体的损伤最强,易残留不易清洗;酒精极易使外植体发褐;次氯酸钠损伤最小。

1.3 培养基的选择

在离体培养条件下,不同植物的组织对营养条件要求不同,甚至同一种植物不同部位的组织对营养成分的要求也不相同,只有根据各自的特殊要求并尽量给予满足,才可能顺利地生长发育。薄荷属植物对培养基的适应性与其基因型密切相关,不同品种对培养基的适应程度不同。

1.3.1 基本培养基 Rusera^[27]提出在以 LS 为基本培养基的试验中发现培养基中的大量元素含量高时,留兰香生长得好。沙红^[26]选用 MS 作为留兰香快速繁殖的基本培养基。王小刚^[25]选用 MS 作为薄荷茎尖脱毒培养的基本培养基。师素云等^[18]分别以 B5、MS、N6 为基本培养基对薄荷茎尖进行愈伤组织诱导培养,结果表明 B5 培养基优于 MS 培养基和 N6 培养基,扩繁仅用 B5 培养基,不加任何激素薄荷苗生长较好。

吴涛等^[28]以 1/2MS、2/3MS、3/4MS 和 MS 培养基作为薄荷组培苗快繁培养的基本培养基,研究结果发现 2/3MS、3/4MS 培养基中,培养物的生长状况介于 1/2MS 和 MS 之间。徐德然等^[29]用不同的

MS、BN、B5、SH 培养基进行试验,结果发现 MS 培养基上 6 d 后出芽率达 90%,而 BN、B5、SH 培养基上最高出芽率仅为 66.1%;从出芽率达 98% 所需天数看,MS 培养基最快,为 8 d,其次为 B5,需 12 d。由此说明 MS 为薄荷生长最佳基本培养基。

1.3.2 碳源 一般来说,蔗糖是最好的碳源,它具有遇热易变的性质,经高压灭菌后分解为更易吸收和利用的糖^[30]。糖的使用浓度一般在 2%~5%,根据培养目的不同而不同。李格^[31]分别用葡萄糖、蔗糖和普通食用白糖作为糖源及各糖源取 3 个浓度进行试验,表明 3 种糖源在浓度相同的条件下,30 d 内对薄荷茎段生长分化影响无显著区别;3 种糖源在浓度 2% 和 3% 时都比 1% 时生长表现好。王小敏等^[32]对不同浓度的蔗糖对薄荷玻璃化的影响进行研究,发现适当提高蔗糖浓度可降低玻璃化苗比率,当蔗糖浓度为 4% 时芽分化多,薄荷增殖系数高,玻璃化苗比率较低。对于已发生玻璃化的试管苗来说,适当提高培养基中蔗糖含量,降低培养基中的渗透势,可以降低玻璃化程度。薄荷属植物的组织培养中蔗糖的使用浓度一般在 3%~4%。

1.3.3 凝固剂 除液体悬浮培养外,所有培养物都应生长在固体或半固体培养基上,以防止培养物沉入液体培养基因缺氧而死亡^[33]。琼脂、结冷剂、滤纸是常用的几种固体培养凝固剂。薄荷属植物常用琼脂作为固体培养的凝固剂,浓度为 0.6%~0.75%。赵恒田等^[34]在薄荷快繁体系的建立中,琼脂的使用浓度为 0.6%~0.75%。

1.3.4 培养基的 pH 值 由于 pH 值直接影响培养材料对营养的吸收,因此配制培养基时调节 pH 值是必要的^[35]。不同的植物材料对培养基 pH 值的要求是不同的,大多在 5.0~6.5。薄荷属植物的培养基 pH 值常调节到 5.6~6.0。

1.3.5 活性炭 活性炭不是组织培养中的必需成分,但现有资料显示,活性炭在许多植物的组织培养中有重要作用。赖家业等^[15]在野薄荷的茎段组织培养中发现活性炭能明显地促进芽和根的生长。活性炭对外植体褐变有一定的抑制作用,除了能吸附培养基中的酚类物质,减轻对培养物的毒害外,还在一定程度上降低光照强度,从两方面减轻褐变^[36]。刘用生等^[37]研究活性炭吸附作用的结果表明,1 mg 活性炭大约能吸附 100 μg 的生长调节物质,通常活性炭的使用浓度在 0.02%~1% 之间。由于活性炭具有较强的吸附能力,它能使培养基内有效物质的

浓度降低,从而限制某些植物的生长,因此使用时应选择合适的浓度。

1.4 培养条件

组织培养的植物要受到温度、光照、湿度等环境条件的影响,如何根据需要来控制培养条件是组织培养的一个重要问题。薄荷属的不同植物根据不同的培养目的对培养条件有不同的要求。

一般来说,薄荷属植物在每天光照 12 h(光照强度 2 000 lx)、培养温度(25 ± 2) °C、湿度 60% 左右的条件下均可生长。沙红等^[14]在用留兰香的种子作为组织培养的外植体时,其初代、增殖及生根培养采用的培养条件均为 25 ~ 28 °C、光照强度 1 500 ~ 2 000 lx、每天光照 12 h。而沙红^[26]在其硕士论文中说,培养时有无光照对留兰香的种子发芽几乎无影响。李格^[31]通过 3 种不同温度(25 °C、15 °C、35 °C)的对比试验表明,25 °C 适合薄荷茎段组培苗的分化和生长;通过 3 种不同光照强度(1 500、3 000、4 500 lx)的对比试验表明,薄荷茎段分化的平均苗数及苗的平均高度无明显差异;通过 3 种光照时数(8、12、16 h/d)的对比试验表明,8 h/d 的光照下茎段分化出苗比后两种光照下的晚 2 ~ 3 d,并且苗长势弱。

有人用恒温和变温、高温和低温对培养物进行处理,结果对培养物的生长都有一定的影响,且处理温度高时培养数量和繁殖系数皆低,与处理时间的长短关系不大^[38-39]。

Fabio 等^[40]还曾经研究过重力方向的改变对椒样薄荷芽及不定根形成的影响,试验结果显示腋芽的增殖和不定根的形成不受外植体垂直方向改变的影响,但是椒样薄荷的节间长度和根的数量却有所增加。

2 继代增殖与愈伤组织诱导培养

增殖与愈伤组织诱导培养的关键是激素种类和用量的选择。激素是植物组织培养中除了遗传因素之外非常重要的因素,并且是非常难掌握的因素,几种植物激素在相互作用中有重叠和互补的效应^[41]。植物组织培养中常用到的植物激素有 6-BA、IAA、IBA、NAA 和 2,4-D。影响试管苗茎芽分化的植物生长调节剂主要有 BA、KT 等,2,4-D、NAA、IBA、BA 等可促进体细胞胚的发生,IAA、ABA、GA₃ 等抑制体细胞胚的发生^[42-43]。

李格等^[11]对激素 6-BA、NAA 及其组合诱导

薄荷茎段的分化与增殖进行研究,结果表明,6-BA 在 0.5 ~ 5 mg/L 范围内有利于茎段芽的诱导,且诱导芽数随着 6-BA 浓度的升高而增加;NAA 在 0.05 ~ 1 mg/L 范围内苗的生长明显;激素组合 2 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 最有利于芽的诱导。赖家业等^[15]研究了 6-BA 和 NAA 两种激素不同浓度对比对野薄荷茎段增殖培养的影响,认为 6-BA 1.0 mg/L 和 NAA 0.8 mg/L 配合使用有利于愈伤组织形成,6-BA 1.0 mg/L 和 NAA 0.4 mg/L 配合有利于芽的增殖。师素云等^[18]以 B5 为基本培养基,添加 1.0 mg/L NAA 和 0.4 mg/L BA,用薄荷幼嫩茎诱导愈伤组织,诱导率达到 90% 以上,在 B5 培养基中添加 0.1 mg/L NAA 和 5.0 mg/L BA,植株再生频率为 5%。丁琤等^[17]采用 MS 基本培养基,附加不同激素进行试验,结果显示培养基中附加激素 1 mg/L 6-BA 有利芽的发生,出芽率高且出芽数量多,对愈伤组织的增殖以添加 2,4-D 0.5 mg/L、NAA 0.5 mg/L 和 6-BA 1.0 mg/L 为最佳。

此外,激素浓度和继代培养次数的增加很易导致组培苗的玻璃化^[44-45]。因此在薄荷属植物的组织培养中也应注意激素浓度的使用以及尽量减少继代培养的次数。

3 固定化细胞培养及生物合成

固定化技术,就是将催化的酶或细胞固定在支持物上并组织其进入液相的一种生物技术。通过酶和细胞进行的生物催化可以产生高价值的食用、药用、香料等化合物。一些植物细胞培养产生的次生代谢产物甚至高于原植物的次生代谢产物量。薄荷属植物的细胞培养,目前国内外也有大量研究。

郝建平等^[46]将薄荷叶片外植体在 MS + 8 mg/L 2,4-D 液体培养基中诱导形成颗粒状愈伤组织,再用注射器抽取悬浮细胞和小愈伤组织,在一定的条件下进行固定化细胞培养,20 d 后即可产生薄荷醇及其他衍生物,并释放到细胞外。药用植物的细胞培养次生代谢产物的提高往往伴随着细胞的分化和器官的形成^[47],而不同的器官在不同的培养阶段其次生代谢产物的含量又会发生很大的变化。Savita 等^[48]曾研究过日本薄荷器官形成与萜类化合物的合成,结果表明,组织培养在扩繁薄荷的同时也得到了与母本结构性状一样的精油,但在培养的早期精油成分却存在根本性的变化,例如芽的早期培养中就含有较高的胡薄荷酮。Si-Hyung 等^[49]也曾

对异胡椒酮在椒样薄荷细胞悬浮培养中的新陈代谢作用做了较为深入的研究。

4 试管苗的生根诱导

Savita 等^[48]将日本薄荷的微繁苗培养在 1/2MS + 2 mg/L IAA 的培养基上,产生大量的根。丁玲等^[17]研究表明在无激素的 MS 培养基上薄荷的生根率为 82%,附加 0.2 mg/L NAA 后生根率可达 100%。而赖家业等^[15]研究激素对根的形成和生长的影响时发现,高浓度的 NAA 与高浓度的 6-BA 组合有利于根的增殖;高浓度的 NAA 与低浓度的 6-BA 组合有利于根的伸长。

对薄荷属植物的生根培养可采用两步法:即先在富含生长素的培养基上进行根的诱导,然后转接到无任何生长调节物质的培养基上进行根的伸长生长。这样不仅可提高生根率和有效根的数目,而且可限制芽苗基部愈伤组织的生成。

5 炼苗移栽

由于试管苗是在无菌、恒温、高湿、弱光的培养条件下生长发育的,不能立即适应栽培环境,因此必须有一个逐步驯化(也称炼苗)和适应的过程。在低温高湿、土壤肥沃、含微生物多的环境中,组培苗移栽很容易从根颈部长霉而导致腐烂坏死^[50]。因此,炼苗时需注意土壤温湿度等外部条件的控制。

炼苗的程序一般是将培养瓶打开瓶塞,在培养室里锻炼 2~3d,然后取出洗净转入已消毒的基质中炼苗,并添加 MS 培养液作养分,待生长稳定,长出 5~6 片叶后,再移栽到自然的光照条件下培养 3d,在长势良好且植株健壮条件下,最后移栽到大田中正常管理。

刘永明等^[51]进行精细炼苗的程序是将形成壮苗的试管瓶口打开,锻炼 7~10 d,第一次移植到盛有珍珠岩的育苗穴盘中,每隔 7 d 浇灌 1 次配方营养液。利用小拱棚保湿,昼夜温差 10℃左右,白天适温 20~25℃,夜间 10~15℃,当植株达到 10 cm 左右时移栽到温室中进行培育壮苗。

6 小结与展望

在目前的生产技术条件下薄荷属植物组织培养尚有不少问题,主要是:(1)虽然薄荷属某些植物组培试验再生苗能成功,但仍存在外植体玻璃化严重、污染率高等问题,不能进行批量生产,也不能真正用

于资源的开发和保护。(2)通过愈伤组织或细胞固定化培养繁殖出的植物易出现不良变异,使植物品质、抗性、产量均受影响,造成损失。有相当数量的重要化学成分在细胞培养中不存在或含量较低。(3)薄荷属植物的脱病毒研究尚待完善,病毒的检测方法须进一步科学化。以上问题随着科学的不断发展,技术水平的提高,将会逐步得到解决。

借助组织培养这一手段,我们可以将薄荷属植物的研究和利用向更深更广泛的方面发展。(1)进一步降低组培苗成本,对于大量需求的品种要进行工厂化生产。组培苗成本较高,进一步改良薄荷属植物组培技术,降低组培苗成本,是工厂化生产组培苗的迫切需要。(2)加强新品种的选育研究。我国薄荷属资源较少,大多为引进品种,因此有必要利用组织培养技术对薄荷属植物进行新品种的选育,为薄荷属资源的遗传转化、微型种质资源库的建立创造条件。(3)开展薄荷属植物遗传转化的研究。通过将外源基因转入植物中进行表达,定向修饰植物的某一性状如提高油的产量或某一化合物的含量等。但目前关于薄荷属植物遗传转化的研究尚未见成功报道,但薄荷属中许多种类植物的组织培养的成功为该属植物遗传转化奠定了坚实基础,相信在不远的将来转基因的薄荷或其化合物将打入市场,并取得较好的经济效益。(4)利用大规模生物反应器进行药物或香料合成,可望将那些数量极少而又极有价值的新型化合物进行扩增,满足医药、食品、化工等的需求,推动植物现代化发展的进程。(5)建立薄荷品种的微型种质资源基因库。通过组织培养技术建立薄荷属植物的微型种质资源基因库,充分发挥种质资源优势,为其转基因研究、原生质体培养、花药培养等提供种质资源。

参考文献:

- [1]戴克敏. 国产薄荷属(*Mentha* Linn.)的栽培种类的初步研究[J]. 药学学报,1981,16(11):349-353.
- [2]黄士诚. 薄荷属(*Mentha*)植物的染色体数目及其栽培种的起源[J]. 香料香精化妆品,1997(3):24-25.
- [3]中国植物志组委. 中国植物志,第66卷[M]. 北京:科学出版社,1972:260-274.
- [4]全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编:上册[M]. 北京:人民卫生出版社,1975:924.
- [5]中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:人民卫生出版社,2000.
- [6]鲁朝晖,张少艾. 唇萼薄荷屋顶草坪建植与养护技术研究[J]. 草原与草坪,2004(1):58-59.

- [7]汪茂斌,马宗新,赵红,等.薄荷品种提纯途径及程序[J].安徽农业科学,2000,28(2):235-236.
- [8]方晓志,高山林,赵梦晗.薄荷诱导株系田间农艺性状鉴定及挥发油含量测定[J].药物生物技术,2005,12(2):93-97.
- [9]Hirai D,Sakai A. Cryopreservation of *in vitro* grown axillary shoot - tip meristems of mint (*Mentha spicata* L.) by encapsulation vitrification[J]. Plant Cell Reports,1999,19(2):150-155.
- [10]柴明良.留兰香的试管繁殖[J].植物生理学通讯,1994,30(1):30.
- [11]李格,吕国华,贾晓鹰,等.6-BA、NAA及其组合对诱导薄荷茎段分化与增殖的影响[J].石河子大学学报:自然科学版,2002,22(4):305-308.
- [12]Bhat S,Maheshwari P,Kumrr S. *Mentha* species; *in vitro* regeneration and genetic transformation[J]. Molecular Biology Today,2002,3(1):11-23.
- [13]Rani A,Bhojwani S S. Establishment of tissue culture of cotton[J]. Plant Sci Lett,1986,7:163-169.
- [14]沙红,廖康.药用植物留兰香的组织培养研究[J].新疆农业大学学报,2003,26(1):10-12.
- [15]赖家业,杨振德.野薄荷的茎段培养[J].广西热作科技,2000(3):9-11.
- [16]王小刚,高山林,白雨,等.薄荷脱毒苗的农艺性状和有关生理指标的测定[J].药物生物技术,2003,10(2):92-95.
- [17]丁净,徐卫红.薄荷脱毒苗的离体培养及快速繁殖[J].上饶师范学院学报,2004,24(6):69-72.
- [18]师素云,炼兴明,薛汉汉,等.薄荷离体培养愈伤组织诱导与植株分化[J].江苏农业科学,2000(6):27-29.
- [19]臧玉琦,吴涛,朱玉灵,等.薄荷茎尖生长点离体培养[J].中国农学通报,1998,14(1):47,73.
- [20]Hiroshi S,Sueo E,Seibi O,et al. Plant regeneration from protoplasts of peppermint (*Mentha piperita* L.)[J]. Plant Cell Reports,1993,12:546-550.
- [21]Chaput M H, San H. How plant regeneration from *Mentha piperita* L. and *Mentha citrata* Ehrh. leaf protoplasts affect their monoterpene composition infild conditions[J]. Journal of Plant Physiology,1996,49(5):481-488.
- [22]Rech E L,Pires M J P. Tissue culture propagation of *Mentha* spp. by the use of axillary buds[J]. Plant Cell Report,1985(5):17-18.
- [23]刘铭,田伟,焦永刚.薄荷组织培养研究[J].现代中药研究与实践,2005,19(2):8-11.
- [24]张艳玲,姚雷,申晓辉.芳香植物唇萼薄荷组织培养中的污染控制[J].上海农业学报,2005,21(1):4-6.
- [25]王小刚.薄荷脱毒研究[D].南京:中国药科大学,2004.
- [26]沙红.几种药用芳香植物组织培养快速繁殖的研究[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2004.
- [27]Rusera R. *In vitro* culture of mint (*M. piperita*) with a high coefficient of multiplication[J]. Rasteniev Dni Nauki,1999,36(4):201-203.
- [28]吴涛,朱玉灵,范泽民.薄荷组培苗的组培快繁技术研究[J].安徽农业科学,1999,27(6):609,612.
- [29]徐德然,高山林,刘媛.薄荷组织培养快速繁殖技术的研究[J].中国药科大学学报,1992,23(2):115-117.
- [30]沈海龙.植物组织培养[M].北京:中国林业出版社,2005:37.
- [31]李格.薄荷再生植株构建中的产业化关键技术研究[D].石河子:石河子大学,2004.
- [32]王小敏,李维林,赵志强,等.不同培养条件对薄荷试管苗玻璃化现象的影响[J].植物资源与环境学报,2006,15(3):51-54.
- [33]高文远,贾伟.药用植物大规模组织培养[M].北京:化学工业出版社,2005:67.
- [34]赵恒田,王新华,班文杰.薄荷组培工厂化育苗技术[J].农业系统科学与综合研究,2004,20(1):60-61.
- [35]李俊明.植物组织培养教程[M].北京:中国农业大学出版社,2002:11.
- [36]高国训.植物组织培养中的褐变问题[J].植物生理学通讯,1999,35(6):501-506.
- [37]刘用生,曾兆云,王秀芹,等.活性炭吸附作用的生物鉴定[J].植物生理学通讯,1995,31(2):123-126.
- [38]Linsmatier E M,Skoog F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture[J]. Physiol Plant,1965,18:100-127.
- [39]Hasegawa P W. Propagation of asparagus through shoot apex culture, light and temperature requirements, transplantability of plants and cytological characteristics[J]. J A M Soc Hortie Sci,1973,98:143-149.
- [40]Paolicchi F,Mensuali - Sodi F,Fognoni F. Effect of clinorotation on *in vitro* cultured explants of *Mentha piperita* L.[J]. Scientia Horticulturae,2002,92:305-315.
- [41]周钟瑞.植物细胞、组织培养在药材生产中的应用[J].中国民族民间医药杂志,1994(11):19-31.
- [42]吕冬霞,曲长福.植物生长调节剂对愈伤组织培养的影响[J].北方园艺,2004(5):68.
- [43]吴沿友,刘建,李国祥,等.植物组织培养育苗微生态环境控制的研究进展[J].江苏农业科学,2006(4):1-4.
- [44]王爱勤,何龙飞,裴润梅,等.组培条件对不同芦荟试管苗玻璃化的影响[J].中国农学通报,2002,18(15):47.
- [45]蒋中海.蕨类植物组织培养研究进展[J].江苏农业科学,2005(5):100-103.
- [46]郝建平,周小梅,张江涛.薄荷固定化细胞培养产生薄荷醇[J].山西大学学报:自然科学版,1995,18(4):445-448.
- [47]高文远,贾伟.药用植物大规模组织培养[M].北京:化学工业出版社,2005:17.
- [48]Phatak S V,Heble M R. Organogenesis and terpenoid synthesis in *Mentha arvensis*[J]. Fitoterapia,2002,73:32-39.
- [49]Park S - H,Kim K - S,Suzuki Y S,et al. Metabolism of isopiperitenones in cell suspension culture of *Mentha piperita* [J]. Phytochemistry,1997,44(4):623-626.
- [50]曹义义,刘国民.实用植物组织培养技术教程[M].兰州:甘肃科学技术出版社,1999:67.
- [51]刘永明,刘伟,班文杰.薄荷种苗组培快繁技术[J].种子世界,2004(8):38.