

# 白花天目地黄的愈伤组织再生体系研究

马丹丹, 夏国华, 金翡翡, 李根有\*

(浙江农林大学 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300)

**摘要:** 白花天目地黄是天目地黄的一个优良变型, 其资源稀少。本研究以白花天目地黄幼嫩叶片为外植体, 探讨不同生长调节物质对其愈伤组织诱导及植株再生的影响。结果表明: MS+BA 1.5 mg·L<sup>-1</sup>+IBA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>是诱导叶片愈伤组织最佳的培养基; MS+BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>培养基对不定芽分化的效果最好; 不定芽增殖最适宜的培养基为 MS+BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+IBA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>; 其不定芽的最佳生根培养基为 1/2MS+NAA 0.05 mg·L<sup>-1</sup>; 试管苗移栽成活率达到 96.7%。同时, 在此基础上探讨了白花天目地黄的园林绿化及对地黄属药用方面的利用前景。

**关键词:** 白花天目地黄; 幼嫩叶片; 愈伤组织; 植株再生

**中图分类号:** Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2010)05-0686-05

## Study on regeneration system from callus of *Rehmannia chingii* f. *albiflora*

MA Dan-Dan, XIA Guo-Hua, JIN Fei-Fei, LI Gen-You\*

(School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Agricultural and Forestry University, Lin'an 311300, China)

**Abstract:** *Rehmannia chingii* f. *albiflora* is a particular and scarce form of *R. chingii*. In the present research, its young leaves were used as explants to study the effects of the growth regulators on callus induction and plant regeneration. The results indicated that the optimal media for induction and differentiation of callus were MS+BA 1.5 mg·L<sup>-1</sup>+IBA 0.5 mg·L<sup>-1</sup> and MS+BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>, respectively; the effective medium for cultivating adventitious buds was MS+BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+IBA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>; moreover, it's found that the best inducing combination for root formation was 1/2MS+NAA 0.05 mg·L<sup>-1</sup>; the survival rate of test-tube plantlets could reach 96.7% after transplanting. In addition, the prospects of its gardening application and medicinal value were discussed.

**Key words:** *Rehmannia chingii* f. *albiflora*; young leaves; callus; plant regeneration

天目地黄(*Rehmannia chingii*)与地黄相似, 性味甘、苦、寒, 有清热凉血、补益肝肾的功效, 同时以其花多繁茂、抗逆性强, 根系发达, 在园林中也有应用, 如种植于林下做耐荫观花地被。白花天目地黄(*Rehmannia chingii* f. *albiflora*)是天目地黄的野生变型, 具有天目地黄的药用及抗逆性等优良特性; 且该变型花色洁白优雅(花冠白色, 喉部淡黄色), 在地黄属中较少见, 是园林观赏、花坛花境应用的优良选材。本课题组于 2006 年在浙江临安市功臣山山

脚发现该变型 4~5 株, 并部分移栽于浙江林学院珍稀植物园大棚内, 进行多次观察, 均未见结实, 且其野生植株在原生长地已经灭绝。为了保存这一优良资源, 笔者在前人研究(温学森等, 2002; 解晓红等, 2003; 陈敏艳等, 2004; 梁佼等, 2007; Cui 等, 2000; 李根有等, 2009)的基础上, 研究白花天目地黄的愈伤组织再生体系, 以期建立其愈伤组织再生体系, 解决因其不能结实而造成繁殖问题, 并为地黄属植物资源的开发利用和新品种选育方面提供参考。

收稿日期: 2009-04-22 修回日期: 2010-01-05

基金项目: 浙江省科技厅项目(2006C22076)[Supported by Science and Technology Department of Zhejiang Province(2006C22076)]

作者简介: 马丹丹(1982-), 女, 河南洛宁县人, 硕士, 主要从事野生花卉的引种与应用研究, (E-mail)adan1178@126.com.

\* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: ligy1956@163.com)

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料及处理

2006 年~2007 年间,待移栽后白花天目地黄长势稳定,选择其新芽抽出后的幼嫩完好叶片,用流水冲洗 2 h,75%(v/v)的乙醇浸泡 10~15 s,无菌水冲洗 3 次,0.1% HgCl<sub>2</sub> 浸泡 8~10 min,无菌水冲洗 5~8 次,无菌滤纸吸干表面水分,剪成规格为 0.5 cm × 0.5 cm 的外植体接种于愈伤组织诱导培养基中。生根处理中以丛生芽长株高为 4 cm、具 4~6 片真叶的小植株为试验材料。

### 1.2 试验设计及培养条件

1.2.1 试验设计 在对白花天目地黄的愈伤组织诱导、不定芽诱导及增殖过程中,以 MS 为基本培养基,根据试验目的添加不同种类和浓度的 6-BA、IBA、NAA,其中愈伤组织诱导中 6-BA 浓度为 0.5、1.0、1.5 mg · L<sup>-1</sup>,IBA 浓度为 0.5、1.0、2.0 mg · L<sup>-1</sup>;不定芽诱导中 6-BA 浓度为 1.0、2.0、3.0 mg · L<sup>-1</sup>,NAA 浓度为 0.1、0.5 mg · L<sup>-1</sup>;增殖培养中 6-BA 浓度为 0.2、0.5、1.0、2.0 mg · L<sup>-1</sup>,NAA 浓度为 0.1、0.2、0.5、1.0 mg · L<sup>-1</sup>;以上处理均采用完全随机试验设计。

在生根诱导过程中以 1/2MS 为基本培养基,采用不同浓度单一生长素类物质 (IBA、NAA) 及其相同浓度配比,其中 NAA 浓度为 0.05、0.2、1.0 mg · L<sup>-1</sup>,IBA 浓度为 0.05、0.2、1.0 mg · L<sup>-1</sup>,NAA+IBA 的浓度分别为:0.025+0.025、0.5+0.5、1.0+1.0 mg · L<sup>-1</sup>。

1.2.2 培养条件 上述培养基中均附加琼脂 6.8 g · L<sup>-1</sup>,蔗糖 30 g · L<sup>-1</sup>,pH5.8~6.0;培养温度 (25±2)℃,光照时间 14 h/d。每个处理接种 10~16 个外植体,重复 2~3 次。

### 1.3 数据收集与统计分析

白花天目地黄愈伤组织再生体系建立过程中,在各个培养阶段培养 20~30 d 后,分别统计其愈伤组织诱导率、不定芽分化率、芽增殖倍数、生根率、移栽成活率。以上数据采用 SPSS 软件分析数据。统计方法:(1)愈伤组织诱导率=形成愈伤组织块数/接种外植体块数×100%;(2)不定芽分化率=分化不定芽的外植体数/接种外植体数×100%;(3)芽增殖倍数=不定芽增殖数/接种不定芽数;(4)生根率=分化不定根的外植体数/接种外植体数×100%;

(5)移栽成活率=移栽成活的苗数/移栽苗总数×100%。

表 1 不同浓度的 6-BA、IBA 对白花天目地黄叶片愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of different combinations of 6-BA and IBA on callus induction rate of *Rehmannia chingii* f. *albiflora*

培养基 Media (mg · L <sup>-1</sup> )	接种叶片数 No. of explants	形成愈伤组织的块数 No. of callus	愈伤组织诱导率(%) Induction rate of callus
MS+6-BA0.5+IBA0.5	48	24	50.0e
MS+6-BA0.5+IBA1.0	45	25	55.5d
MS+6-BA0.5+IBA2.0	41	28	68.3c
MS+6-BA1.0+IBA0.5	46	37	80.4ab
MS+6-BA1.0+IBA1.0	43	33	76.7b
MS+6-BA1.0+IBA2.0	44	34	77.2b
MS+6-BA1.5+IBA0.5	48	40	83.3a
MS+6-BA1.5+IBA1.0	45	36	80.0ab
MS+6-BA1.5+IBA2.0	48	20	41.7f

注:同列内相同字母表示邓肯氏新复极差法检验在 0.05 水平上差异不显著。下同。

Note: Different letters within a column indicated significant difference at  $P < 0.05$  by Duncan smultiple range test. The same below.

## 2 结果与分析

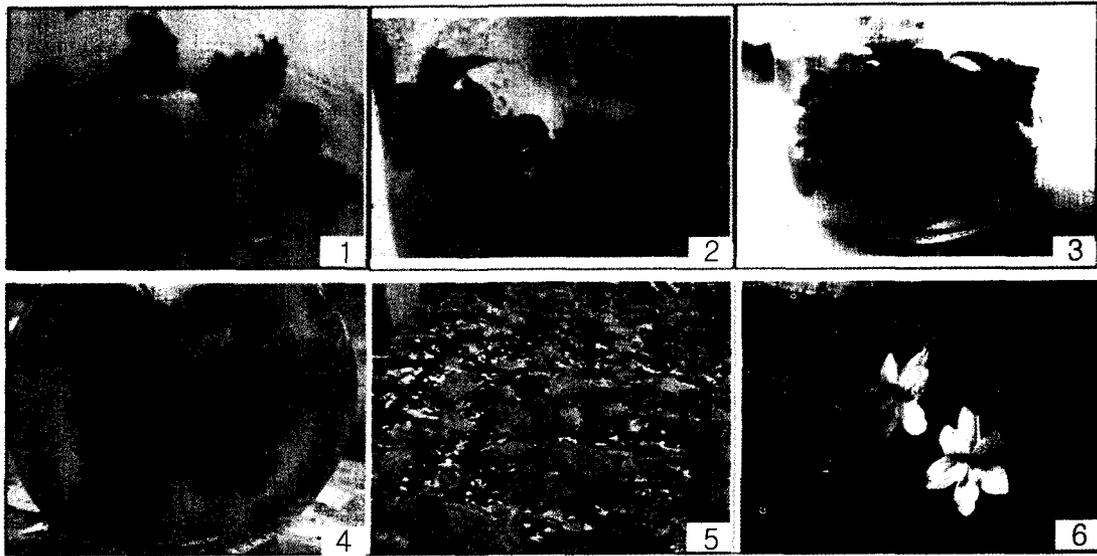
### 2.1 不同浓度的 6-BA、IBA 配比对白花天目地黄叶片愈伤组织诱导率的影响

由表 1 看出,不同浓度 6-BA、IBA 配比处理间的白花天目地黄愈伤组织诱导率差异显著。当 6-BA 浓度为 1.0~1.5 mg · L<sup>-1</sup> 时,其处理间的愈伤组织诱导率随着 IBA 浓度的增加而整体呈下降趋势,其中以 MS+6-BA1.5 mg · L<sup>-1</sup>+IBA0.5 mg · L<sup>-1</sup> 愈伤组织诱导率最高,达到 83.3%,MS+6-BA1.0 mg · L<sup>-1</sup>+IBA0.5 mg · L<sup>-1</sup> 和 MS+6-BA1.5 mg · L<sup>-1</sup>+IBA1.0 mg · L<sup>-1</sup> 两处理的愈伤组织诱导率也达到了 80.0% 以上;MS+6-BA1.5 mg · L<sup>-1</sup>+IBA2.0 mg · L<sup>-1</sup> 处理的诱导率仅为 41.7%,但发现有少量叶片直接形成不定根的现象。而 6-BA 浓度为 0.5 mg · L<sup>-1</sup> 时,其处理间的愈伤组织诱导率随着 IBA 浓度的增加而逐渐增加,但其最高诱导率仅为 68.3%。同时观察发现在叶片接种后 5~6 d 逐渐膨大,边缘外卷,叶片颜色变深;10 d 后在边缘切口及叶脉处出现愈伤组织;15 d 后,叶片边缘及叶脉处出现大量的愈伤组织且多为绿色或浅绿色(图版 I:1)。其中愈伤组织诱导率达到 80.0% 以上的三个处理形成

的愈伤组织幼小突起均较多且生长速度较快。因此,MS+6-BA1.5 mg · L<sup>-1</sup>+IBA0.5 mg · L<sup>-1</sup>为白花天目地黄叶片愈伤组织的最佳培养基。

## 2.2 不同浓度的 6-BA、NAA 对比对白花天目地黄不定芽分化的影响

由表 2 可以看出,6-BA 浓度为一定浓度时,不



图版 I 1. 愈伤组织诱导; 2. 不定芽分化; 3. 不定芽增殖; 4. 不定根诱导; 5. 移栽苗; 6. 开花的植株。

Plate I 1. Callus induction; 2. Differentiation of adventitious buds; 3. Reproduction buds; 4. Root induction; 5. Transplanted plantlet; 6. Flowering plant

定芽的分化率随着 NAA 浓度的增加均呈下降趋势;而 NAA 浓度为一定浓度时,不定芽的分化率随着 6-BA 浓度的增加而呈上升趋势;其中以 MS+6-BA2.0 mg · L<sup>-1</sup>+NAA0.1mg · L<sup>-1</sup>处理的白花天目地黄的不定芽分化率最高,达 66.6%,其次为 MS+6-BA3.0 mg · L<sup>-1</sup>+NAA0.1 mg · L<sup>-1</sup>处理,其分化率达到 60.0%;且各处理间差异显著。但当 6-BA 浓度达到 3.0 mg · L<sup>-1</sup>,即 6-BA/NAA 比值为 30 时,愈伤组织诱导产生的不定芽部分呈现玻璃化现象,其分化率也降低。因此,一定浓度范围内,6-BA/NAA 比值对白花天目地黄叶片的愈伤组织诱导不定芽分化影响较大。同时观察发现愈伤组织于培养 14 d 后开始膨大,并出现绿色小芽点,17 d 后芽点长大,叶片展开,形成具有 2~3 片叶的小植株(图版 I:2)。因此,MS+6-BA2.0 mg · L<sup>-1</sup>+NAA0.1mg · L<sup>-1</sup>处理为白花天目地黄叶片不定芽分化的最适宜培养基。

## 2.3 不同浓度的 6-BA、IBA 对白花天目地黄不定芽增殖的影响

由表 3 看出,在 IBA 为一定浓度的条件下,白花天目地黄的丛生芽数量和不定芽增殖倍数随着 6-BA 浓度的增加而增大,如 6-BA 浓度为 2.0 mg ·

L<sup>-1</sup>时,处理间的不定芽平均增殖倍数达到最大值,为 3.0;而当 6-BA 浓度不变时,不定芽的增殖系数随着 IBA 浓度的增加而整体呈下降趋势;说明 6-BA 对白花天目地黄不定芽增殖的影响较大。各种处理中以

表 2 不同浓度的 6-BA、NAA 对白花天目地黄不定芽分化的影响

Table 2 Effects of different combinations of 6-BA and NAA on differentiation of *Rehmannia chingii* f. *albi flora*

培养基 Media (mg · L <sup>-1</sup> )	接种愈伤组织的块数 No. of inoculating callus	分化不定芽的块数 No. of differentiation adventitious buds	不定芽分化率(%) Differentiation rate of adventitious buds
MS+6-BA1.0+NAA0.1	38	20	52.6c
MS+6-BA1.0+NAA0.5	36	16	44.4d
MS+6-BA2.0+NAA0.1	42	28	66.6a
MS+6-BA2.0+NAA0.5	40	18	45.0d
MS+6-BA3.0+NAA0.1	40	24	60.0b
MS+6-BA3.0+NAA0.5	38	19	50.0c

MS+6-BA2.0 mg · L<sup>-1</sup>+IBA0.1 mg · L<sup>-1</sup>处理效果最好,芽增殖倍数达到 3.3,其次为 MS+6-BA2.0 mg · L<sup>-1</sup>+IBA0.2 mg · L<sup>-1</sup>和 MS+6-BA2.0 mg · L<sup>-1</sup>+IBA0.5 mg · L<sup>-1</sup>处理,增殖倍数分别达到 3.1 和 2.9。同时观察发现不定芽接种 6d 后,其叶腋、茎切断处开

始出现嫩绿色的小芽;且上述不定芽增殖倍数达到 2.9 以上的三种处理中不定芽增殖的速度较快且生长健壮,说明一定的 IBA 与 6-BA 浓度配比不仅对白花天目地黄不定芽增殖具有重要作用,且对其不定芽质量也有一定的促进作用。因此,MS+6-BA2.0 mg·L<sup>-1</sup>+IBA0.1 mg·L<sup>-1</sup> 处理为白花天目地黄叶片不定芽增殖的最适宜培养基。

表 3 不同浓度的 6-BA、IBA 对白花天目地黄不定芽增殖的影响

Table 3 Effects of different combinations of 6-BA and IBA on adventitious buds reproducing of *Rehmannia chingii* f. *albiflora*

培养基 Media (mg·L <sup>-1</sup> )	不定芽接 种数 No. of inoculating adventitious buds	芽增殖数 No. of repro- ducting buds	芽增殖系数 Multiple of reproducing buds
MS+6-BA0.2+IBA0.1	19	14	1.8f
MS+6-BA0.2+IBA0.2	21	21	2.0efg
MS+6-BA0.2+IBA0.5	20	20	2.0efg
MS+6-BA0.2+IBA1.0	20	15	1.8f
MS+6-BA0.5+IBA0.1	22	35	2.6cd
MS+6-BA0.5+IBA0.2	25	32	2.3def
MS+6-BA0.5+IBA0.5	27	35	2.3def
MS+6-BA0.5+IBA1.0	15	22	2.5cd
MS+6-BA1.0+IBA0.1	24	35	2.5cd
MS+6-BA1.0+IBA0.2	18	17	1.9fg
MS+6-BA1.0+IBA0.5	19	29	2.5cd
MS+6-BA1.0+IBA1.0	20	27	2.4de
MS+6-BA2.0+IBA0.1	27	63	3.3a
MS+6-BA2.0+IBA0.2	14	29	3.1ab
MS+6-BA2.0+IBA0.5	26	50	2.9bc
MS+6-BA2.0+IBA1.0	28	44	2.6cd

#### 2.4 NAA、IBA 对白花天目地黄不定芽生根的影响

从表 4 可知,单一 NAA 条件下,白花天目地黄的 不定芽生根率随着 NAA 浓度的增加呈下降趋势;单一 IBA 条件下,白花天目地黄不定芽的生根率随着 IBA 浓度的增加呈上升趋势;且处理间均差异显著;而两者组合的培养基,诱导生根效果较差,生根率明显低于单个因子处理。其中以 1/2MS+NAA0.05 mg·L<sup>-1</sup> 或 1/2MS+IBA1.0 mg·L<sup>-1</sup> 处理的生根率最高,达 100%;但观察发现 1/2MS+NAA0.05 mg·L<sup>-1</sup> 处理的根系生长状况较好,其根长,侧根多;而 1/2MS+IBA1.0 mg·L<sup>-1</sup> 处理的根系生长状况一般。因此,1/2MS+NAA0.05 mg·L<sup>-1</sup> 培养基是白花天目地黄不定芽的最适生根培养基。

同时观察发现小植株在培养 10d 后,茎基部开始长出较细的不定根,约两周后即可获得根系发达、

生长旺盛的完整植株(图版 I:4)。

表 4 不同浓度 NAA、IBA 对白花天目地黄不定芽生根的影响

Table 4 Effects of different combinations of NAA and IBA on rooting of *Rehmannia chingii* f. *albiflora*

培养基 Media (mg·L <sup>-1</sup> )	接种不 定芽数 No. of inocula- ting adven- titious buds	形成不 定根数 No. of differen- tiation adventi- tious roots	生根率 Rooting rate (%)	根系生 长情况 Growth of root
1/2MS+NAA0.05	22	22	100.0a	根长,侧根多
1/2MS+NAA0.2	21	16	76.2e	根短,细
1/2MS+NAA1.0	22	15	68.4f	根细,少
1/2MS+IBA0.05	29	27	93.1b	根长,细
1/2MS+IBA0.2	25	20	80.0d	根细,少
1/2MS+IBA1.0	20	20	100.0a	根短,细
1/2MS+NAA 0.025+IBA0.025	28	24	85.7c	根短,细
1/2MS+NAA0.5 +IBA0.5	28	17	60.7g	根短,细
1/2MS+NAA1.0 +IBA1.0	25	22	88.0c	根短,粗

#### 2.5 再生苗的移栽

将长势旺盛的再生苗培养瓶移至昼夜温差为 15~25℃ 的温室内,在散射光下进行培养,5 d 后打开盖子,使瓶中空气湿度降低,通气加强,再过 2 d 后,将生长健壮的小苗取出并洗净根部,然后移栽于基质(河沙:腐殖质=1:1)中,湿度保持 70% 左右。20 d 后成活率达 96.7%,植株生长健壮,同时保存了母株的优良花色(图版 I:5)。

### 3 讨论

在本试验中发现愈伤组织的诱导与 6-BA/IBA 的比值有关,IBA 浓度过高,愈伤组织生长状况不好,这与赵楠等(2007)的研究结果一致;而 MS+6-BA 1.5 mg·L<sup>-1</sup>+IBA 2.0 mg·L<sup>-1</sup> 处理时发现外植体出现不定根的现象,可能与 IBA 浓度较高促进了外植体的生根,或者与该植物材料本身有关,具体原因需要进一步进行研究探讨。在 不定芽分化试验中,发现高比值的 6-BA/NAA 有利于分化不定芽,而当 6-BA 浓度达到 3.0mg·L<sup>-1</sup> 时,产生的不定芽部分呈现玻璃化现象,分化率也随之降低,说明高浓度的 6-BA 不利于不定芽的生长,这与邵春月等(2008)的研究结果一致。而一定的 IBA 与 6-BA 浓度配比不仅对白花天目地黄不定芽增殖具有重要作

用,且对其不定芽质量也有一定的促进作用;但是长期使用6-BA会产生玻璃化现象。低浓度的NAA适宜于白花天目地黄不定芽的生根。

本试验成功建立白花天目地黄愈伤组织再生体系,为其在庭院观赏花卉绿化应用提供了可能性;同时在保存地黄属优良种质资源和改良地黄药材品质等方面具有重大意义。

### 参考文献:

- Chen MY(陈敏艳),Liang ZS(梁宗锁),Wang JZ(王吉之),*et al.* 2004. Tissue culture and plantlet regeneration of *Rehmannia glutinosa* (地黄组织培养及植株再生的研究)[J]. *Acta Bot Boreai-Occident Sin*(西北植物学报),**24**(6):1 083-1 089
- Cui YY,Hahn EJ,Toyoki Kozai,*et al.* 2000. Number of air exchanges, sucrose concentration, photosynthetic photon flux, and differences in photoperiod and dark period temperatures affect growth of *Rehmannia glutinosa* plantlets *in vitro* plant cell[J]. *Tissue Organ Culture*, **62**:219-226
- Seon JH,Cui YY,Toyoki Kozai,*et al.* 2000. Influence of *in vitro* growth conditions on photosynthetic competence and survival rate of *Rehmannia glutinosa* plantlets during acclimatization period Plant Cell[J]. *Tissue Organ Culture*,**61**:135-142
- Li GY(李根有),Xia GH(夏国华),Ma DD(马丹丹). 2009. Two new forms of *Rehmannia chingii* Li from Zhejiang(浙江天目地黄 2 新变型)[J]. *Acta Bot Boreai-Occident Sin*(西北植物学报),**29**(1):193-194
- Liang J(梁佼),Cheng LJ(程丽娟),Chen Y(陈莹),*et al.* 2007. Tissue culture and establishment of clonal propagation of *Digitalis purpurea* variant(毛地黄优良变异植株组织培养及无性系的建立)[J]. *Shandong Agric Sci*(山东农业科学),**6**:11-13
- Shao CY(邵春月),Gao SL(高山林),Chen F(陈峰),*et al.* 2008. Virus-free culture and rapid-propagation of *Rehmannia glutinosa* Libosch(怀地黄分生组织培养脱病毒及快速繁殖技术的研究)[J]. *Pharm Biotech*(药物生物技术),**15**(4):258-261
- Wen XS(温学森),Huo DL(霍德兰),Yang SL(杨世林),*et al.* 2002. Multiplication of virus-free seedlings of *Rehmannia glutinosa* cv. 85-5 *in vitro* (地黄优良品种“85-5”脱毒苗的快速繁殖研究)[J]. *Chin Trad Herb Drugs*(中草药),**33**(5):452-455
- Xie XH(解晓红),Wu ZX(武宗信),Feng WL(冯文龙). 2003. *Rehmannia* stem-apex-propagation techniques and problems(地黄茎尖快繁技术及其问题探讨)[J]. *J Shanxi Agric Sci*(山西农业科学),**31**(3):66-68
- Yan K(闫坤),Zhao N(赵楠),Li HQ(李宏庆). 2007. Systematic relationships among *Rehmannia* (Scrophulariaceae) species(地黄属种间亲缘关系研究)[J]. *Acta Bot Boreai-Occident Sin* (西北植物学报),**27**(6):1 112-1 120
- Zhao N(赵楠),Wu W(武雯),Yan K(闫坤),*et al.* 2007. Effect of different plant growth regulators on tissue culture and plantlet regeneration of *Rehmannia chingii*(不同植物生长调节物质对天目地黄组织培养及植株再生的影响)[J]. *J Henan Agric Univ*(河南农业大学学报),**41**(1):33-37
- [M]. New York:John Wiley
- Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae, Agendae Academiae Sinicae Edita. 1988. Flora Reipublicae Sinicae Tomus 62. [M]. Beijing:Science Press,385-386
- Eames AJ. 1961. Morphology of the Angiosperms [M]. New York:McGrAw-Hill Book Company Inc.
- Echilin P. 1971. The role of tapetum during microsporogenesis of angiosperms[M]. London:Butterworth; In Heslop Harrison, J. (ed.). Pollen development and physiology
- Guerin P. 1926. Le development de l'anthere chez les Gentianaceae[J]. *Bull Soc Bot*,**73**(ser5):5-18
- Geng SS,Wang ZY,Jiang JZ,*et al.* 1994. Cytological studies on microsporogenesis of the male sterile lines of pepper[J]. *Acta Hort Sin*,**21** (2):165-169
- Johri BM, Ambegaokar KB, Srivastava PS. 1992. Comparative Embryology of Angiosperms [M]. Berlin:Springer-Verlag
- Li DY. 2006. Redundancy theory and its application to ecology [J]. *J Nantong Univ(Nat Sci)*,**5**(1):50-54
- Li HJ,Wang YZ. 1994. Embryological studies in *Gentiana macrophylla*[J]. *Acta Bot Boreai-Occident Sin*,**14**(4):243-248
- Liu JQ,He TN. 1997. Embryology of *Gentianopsis paludosa*[J]. *Acta Biol Plateau Sin*,**13**:31-41
- Long H,Huang HY. 2008. The seed germination of *Swertia*. *Bi-maculata*[J]. *Bull Bot Res*,**28**(3):347-352
- Ralph MW. 1949. On the embryology of *Swertia carolinensis*[J]. *Bull Torrey Bot*,**76**(6):430-439
- Rao KS,Chinnappa CC. 1983. Studies in Gentianaceae. Microsporangium and pollen[J]. *Can J Bot*,**61**:324-336
- Steffen K, Landmann W. 1958. Entwicklungsges chichtliche und cytologische untersuchungen am balken tapetum von *Gentiana cruciata* and *Impatiens glandulifera*[J]. *Planta*,**50**:423-460
- Tang YC,Cao YL,Xi YZ,*et al.* 1983. Systematic studies on chinese stachyuraceae(1)-phytogeographical, cytological, palynological[J]. *Acta Phytotax Sin*,**21**(3):236-253
- Wu HM,Yu JM,Zhao HL,*et al.* 1988. Cytological observation on the male-sterile and maintainer lines of *Capsicum frutescens* var. *longrum* Bailey[J]. *Jiangsu J Agric Sci*,**4**(2):35-38
- Wang SB,Luo XD,Dai LF,*et al.* 2004. Meiotic observation and male gametes development in cytoplasmic male sterile of pepper (*Capsicum annuum*)[J]. *Acta Hort Sin*,**31**(6):807-810
- Wei ZX,Yang ZH. 2001. Growth, development and some biological phenomena of *Stachyurus himalaicus* under different environmental conditions[J]. *Chin J Appl Environ Bio*,**7**(4):315-320
- Wei ZX,Jin QJ,Yang SX,*et al.* 2002. The development of male and female gametophytes of *Stachyurus himalaicus* and its systematic enlightenment[J]. *Acta Bot Yunnan*,**24**(6):733-742
- Yuan RJ, Li P, Zhen X J. 1991. Mega-microsporogenesis and mega-microgametogenesis and changes in Polysaccharides in *Cli-tonia udensis*[J]. *Acta Bot Yunnan*,**13**(3):197-302
- Zhu XH,Shen JH. 1989. Microsporogenesis and megasporogenesis, and the development of the male and female gametophytes in *Gentiana manshurica*[J]. *Nat Sci J Harbin Normal Univ*,**5**:63-73

(上接第 593 页 Continue from page 593)