

水杨酸诱导膨胀浮萍(*Lemna gibba* SH0204)开花

黄猛^{1,2}, 许亚良², Kanjana Khaeso², 孙雪飘², 张家明^{2,*}

¹海南大学农学院, 海口570228; ²中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 农业部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室, 海南省热带生物能源工程技术研究中心, 海口571101

摘要: 用水杨酸(SA)诱导膨胀浮萍开花, 结果显示, 在液体1/2Hoagland培养基中加入适当浓度的SA对开花有显著促进作用, SA浓度为20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时开花率最高, 达到39.37%。SA在诱导开花的同时, 明显抑制叶状体的生长, 在浓度为80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 叶状体死亡率达到94.38%。此外, 本研究尝试在固体1/2Hoagland培养基上诱导膨胀浮萍开花, 结果表明, 固体培养基比液体培养基更有利于诱导开花, SA浓度为20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 开花率超过45%, 死亡率显著降低。在固体培养基上, 方便对开花植株进行跟踪和操作, 因此, 用固体培养基诱导开花比液体培养基更有应用价值。光学和电子显微镜的观察结果显示, 花粉粒呈近圆球形, 表面有网状带刺纹饰。

关键词: 水杨酸; 膨胀浮萍; 开花诱导; 花粉粒

Flower-Induction of *Lemna gibba* SH0204 by Salicylic Acid

HUANG Meng^{1,2}, XU Ya-Liang², Kanjana Khaeso², SUN Xue-Piao², ZHANG Jia-Ming^{2,*}

¹College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China; ²Key Laboratory for Tropical Crops Biology and Genetic Resources Utilization, Hainan Bioenergy Engineering Center, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China

Abstract: Salicylic acid (SA) was used in the flower induction of the duckweed *Lemna gibba* SH0204. Flowers were induced efficiently by suitable concentrations of SA in the liquid 1/2Hoagland medium, and the highest induction rate reached 39.37% at 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA. In the meantime, SA inhibited the growth of *L. gibba*, and the frond mortality reached 94.38% at 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA. Solid medium was used in the flower induction of duckweeds, and was found to be more optimal compared to liquid medium. The highest flower induction rate reached 45% on the solid medium, and the frond mortality decreased significantly. Moreover, the fronds were kept in the original locations on the solid medium, avoiding the damage of the flowers on the liquid medium by moving around, and providing convenience of tracing or operation with the flowers. Therefore, solid medium is a practically more useful medium in flower induction of duckweeds. Electron and light microscopic observation revealed that the pollen grains were spheroid and small, with echinate-reticulate exine.

Key words: salicylic acid (SA); *Lemna gibba* SH0204; flower induction; pollen grains

浮萍科(Lemnaceae)植物漂浮生长在水面上, 是已知最小的开花植物, 全球共5个属37个种(Klaus等2013)。植株结构简单, 大部分浮萍仅由叶状体和根系组成, 根系主要起支撑作用而对营养吸收贡献较少(Yamaga等2010), 少数几个浮萍品种甚至没有根。叶状体直径从不足1 mm到几毫米不等。叶状体基部有囊, 主要进行无性繁殖, 于分生组织囊处产生新生子代。在特定条件下, 浮萍也能进行有性繁殖(Les等2002)。

浮萍科植物的无性繁殖能力特别强, 在合适的条件下每2~3 d即可繁殖1代(Les等2002)。但是浮萍有性繁殖能力有限, 自然条件下很难看到其开花。有关浮萍开花现象从上世纪20年代已经陆

续有报道(Saeger 1929), 但是直到20世纪60年代才出现有关浮萍开花诱导的实验室研究(Umemura等1963), 而且随后的研究多集中在膨胀浮萍、稀脉浮萍(*Lemna paucicostata*)等(Miyawaki等2013; Khurana等2014)。经过几十年的发展, 有关长日植物膨胀浮萍的开花诱导研究逐渐趋于成熟, 开花诱导技术不断改进, 开花率也达到较高水平(Endo等2009)。由于地理隔离以及气候差异等因素的作

收稿 2015-01-04 修定 2015-03-25

资助 科技部国际合作专项(2014DFA30680)、2014年海南省重大科技专项(ZDZX2013023)和海南省自然科学基金项目(310068)。

* 通讯作者(E-mail: jmzhang@vip.163.com; Tel: 0898-66984866)。

用,同种浮萍的不同株系在相同的诱导条件下开花率也会有显著差异(Cleland 1979; Fujioka等1983)。水杨酸(salicylic acid, SA)是诱导浮萍科各物种开花最常用的化学试剂,诱导频率相对较高(Khurana和Maheshwari 1980, 1983; Shimakawa等2012),对其他植物的开花也有相应调节作用(Wada和Takeno 2013; Yamada和Takeno 2014)。本研究针对从上海采集到的膨胀浮萍株系设置不同浓度的SA处理,在固体培养基上诱导浮萍开花,并研究了其花粉形态,丰富了其花粉形态学信息,为今后利用浮萍花药进行小孢子培养和有性繁殖、种质创新以及浮萍科植物的准确分类奠定基础,同时也对其他品种浮萍的开花诱导有借鉴意义(Shimakawa等2012)。

材料与方法

1 植物材料

膨胀浮萍(*Lemna gibba* L. SH0204)采集自上海浦东新区张江创新河。将长势良好的浮萍材料用自来水冲洗5次,再用蒸馏水洗涤3次,室温下在1/2 Hoagland营养液中培养1周;在超净工作台上用5%的NaClO溶液(分析纯)消毒1 min,无菌水洗涤3~5遍后接种于含3%蔗糖的MS固体培养基中筛选无菌无藻植株。获得的无菌无藻植株保存在浮萍种质资源库。

2 实验方法

2.1 培养基及培养条件

诱导前,将膨胀浮萍放在含糖量 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的1/2 Hoagland培养基中,于 $16\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 光照 $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养1~2个月,使其生理状态趋于稳定,以备实验所需。

膨胀浮萍开花诱导选用1/2 Hoagland培养基($10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖, pH 5.8),用超纯水配制培养基,分装于100 mL三角烧瓶中,每个三角瓶50 mL,固体培养基添加 $2.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的植物凝胶, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌20 min。SA通过过滤灭菌添加于诱导培养基中。分别设置0、3、10、20、30、50、 $80\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 7个SA浓度,重复3次。

取长势好、性状一致的三叶植株,每瓶液体培养基中接5个植株,每个固体培养基平板上接3个植株,放置于持续光照的人工气候箱(温度 $24\text{ }^{\circ}\text{C}$,湿度75%,光照强度 $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)中培养。20 d

后,统计总植株数,计算开花率和生长速率。开花率=(开花植株数/总植株数) $\times 100\%$;死亡率=(死亡植株数/总植株数) $\times 100\%$;生长速率利用公式(Landoldt 1957)计算: $K=0.43\times 1\,000\times(\ln N_2-\ln N_1)/t$, N_1 为初始接种叶片数, N_2 为最终统计叶片数, t 为培养天数。

2.2 开花膨胀浮萍叶片的石蜡切片制作

分别选取在 $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA液体培养基中培养20 d伸出雌蕊的叶状体及对照,于FAA(含福尔马林5 mL、冰醋酸5 mL、50%酒精90 mL)中室温固定12 h。石蜡切片参考潘叶等(2008)的方法。脱蜡后的切片用0.5%甲苯胺蓝(Solarbio)染色30 min,水洗后于0.5%冰醋酸中分化1 min,再次水洗,用二甲苯透明,中性树脂封片,于 10×5 光学显微镜下观察叶片空气组织变化。

2.3 单个花药花粉量统计

参照张建英等(2006)的方法,取10粒成熟花药置于1.5 mL离心管中,用接种针刺破使其内部花粉粒散出,加0.5 mL 2.5%的果胶酶溶液,混匀后处理4 h,再加0.5 mL 2.5%蔗糖溶液进行稀释,充分震荡后取 $1\text{ }\mu\text{L}$ 稀释液滴加于载玻片上,在 10×10 光学显微镜下观察计数,每个花药的花粉粒数=(观察到的花粉数 $\times 1\,000$)/10,观察5次,取其平均值。

2.4 花粉活性的测定

将2 g碘化钾溶于装有7 mL蒸馏水的棕色瓶中,再加入1 g碘,全部溶解后定容至100 mL,制成碘-碘化钾溶液(贾文庆和刘宇2007)。取成熟花药数枚置于载玻片上,用接种针针头压破花药使花粉散出,滴加1滴碘-碘化钾溶液,静置10 min后于显微镜下观察。被染成蓝色的为有活力的花粉,黄褐色的为缺失生活力的花粉。3次重复,每次观察3个视野,每个视野不少于20粒花粉。有活力花粉百分率=(有活力花粉数/花粉总数) $\times 100\%$ 。

2.5 花药和花粉粒形态的电镜观察

取成熟花药置于FAA固定液中室温固定过夜,经30%、50%、70%、80%、90%叔丁醇系列梯度脱水,每个梯度15 min,再用100%叔丁醇脱水3次,每次1 h。用接种针挤破花药使花粉粒释放于叔丁醇中,用移液枪滴1滴花粉悬浮液于载玻片上,自然干燥后粘附在电镜样品台上,用扫描电镜(FEI Phenom)观察,随机选取20粒花粉测量直径和刺

长。花粉术语近圆球形、网状带刺纹饰、刺长参考Punt等(2007)。另取刚脱完水的花药数枚经液氮处理, 冷冻真空干燥。利用FEI Phenom扫描电子显微镜观察。

3 数据统计分析

所得数据利用Excel和SPSS软件进行分析。

实验结果

1 在液体培养基中SA对膨胀浮萍开花诱导的影响

在不含SA的培养基中, 膨胀浮萍仅进行营养生长, 生长速率高, 未开花。在含适当浓度SA的液体培养基中培养20 d, 观察到雌蕊柱头从叶状体分生组织囊中伸出(图1-B)。雄蕊发育较迟, 在解剖镜下观察拥有雌蕊的分生组织囊, 2个雄蕊生长在分生组织囊内, 紧贴雌蕊两侧, 未完全成熟, 每个雄蕊有2个淡绿色花药(图1-C)。继续培养3 d, 雄蕊

发育成熟, 花药变为白色, 从分生组织囊内部伸出(图1-D和E), 但是并没有观察到花药散粉。

由表1可知, SA浓度对开花率有很大影响。低浓度($\leq 3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的SA不能诱导膨胀浮萍开花, 仅减缓生长速率。SA浓度为 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时膨胀浮萍即可以开花, 浓度为 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时开花率最高, 当浓度升高到 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时开花率有所降低, 但与 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理差异不显著。当SA浓度达到 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以上时, 膨胀浮萍的生长发育受到抑制, 叶状体大量死亡, 不能诱导开花。

经过SA处理的膨胀浮萍叶状体在形态上出现明显变化, 其叶片突起变厚, 背部颜色加深, 气室变大(图1-G)。SA浓度达到 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时产生不规则叶状体, 这些叶状体的尺寸小且不均一, 边缘出现缺口(图1-H)。

解剖观察在最佳SA浓度下诱导培养的不同发

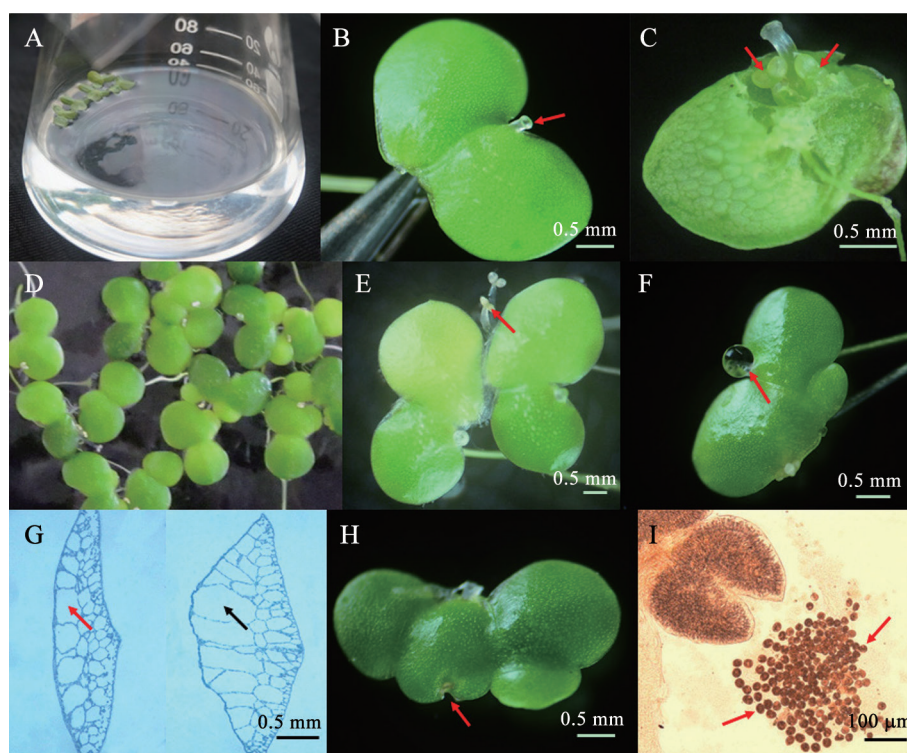


图1 在液体培养基中SA诱导膨胀浮萍开花

Fig.1 Flower induction of *L. gibba* SH0204 by SA in liquid medium

A: 初始培养的植株; B: 培养20 d后产生的具2个叶片的植株, 红色箭头指示雌蕊柱头; C: 解剖观察分生组织囊内部器官, 红色箭头指示仍未成熟的花药; D和E: 培养23 d后观察到大量雄蕊, 红色箭头指示成熟的白色花药; F: 雌蕊柱头凋亡前在顶端分泌的液体, 红色箭头指示直径0.5 mm左右的分泌物; G: SA处理导致气室膨大, 左为对照组培养20 d, 右为在 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA培养基中培养20 d, 红色和黑色箭头分别指示对照组和 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA处理后的叶状体气室; H: $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA处理20 d后产生的不规则叶状体, 红色箭头指示不规则缺口; I: 10×10 倍光学显微镜下观察到的单个成熟花药压片, 红色箭头指示花粉粒。

表1 液体培养基中SA对膨胀浮萍诱导开花和生长的影响

Table 1 Effects of SA on flower induction and growth of *L. gibba* SH0204 in liquid medium

SA浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	开花率/%	死亡率/%	生长速率/%	叶状体生长状况
0	0 ^b	9.09±3.11 ^{cd}	93.14±0.61 ^a	宽大饱满, 翠绿色
3	0 ^b	9.56±1.18 ^{cd}	83.32±0.59 ^b	略有卷曲, 翠绿色
10	5.86±3.45 ^b	11.97±2.36 ^{bc}	81.13±0.89 ^b	尺寸减小, 叶状体中部开始凸起, 深绿色
20	39.37±7.10 ^a	14.76±2.17 ^b	80.96±0.76 ^b	尺寸减小, 中部凸起明显, 两叶状体植株增多
30	35.22±1.64 ^a	6.25±1.15 ^d	76.81±4.98 ^c	不规则叶状体产生, 尺寸更小
50	0 ^b	7.69±1.89 ^{cd}	72.37±1.34 ^d	不能正常生长, 个体非常小
80	0 ^b	94.38±5.42 ^a	10.41±3.02 ^e	几乎全部变白死亡

^a不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。

育时期的叶状体, 发现雌蕊和雄蕊在发育初期均被一层膜状物质包裹(图2-A), 中期时雌蕊柱头率先突破此膜(图2-B), 这一时期在子房内部有2个绿色肾形胚珠(图2-D)。在发育后期, 雄蕊伸长, 从分生组织囊内部伸出, 此时雌蕊柱头退化甚至消失(图1-E、图2-C)。

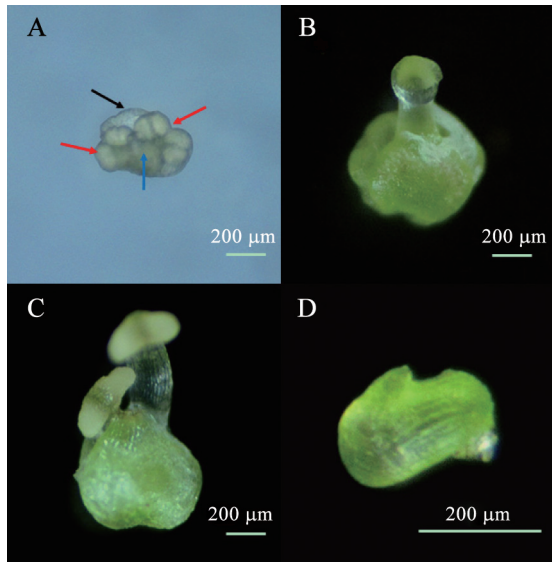


图2 花的3个发育阶段

Fig.2 Three development stages of flowers

A: 发育初期, 蓝色箭头指示雌蕊, 红色箭头指示雄蕊, 黑色箭头指示生长初期雌蕊和雄蕊外部包裹着的一层膜状组织; B: 发育中期, 雌蕊柱头开始产生并伸长; C: 发育后期, 雄蕊伸长的同时雌蕊开始衰败至消失; D: 发育中期的绿色胚珠。

2 在固体培养基上SA对膨胀浮萍开花诱导的影响

在固体培养基上, SA浓度对膨胀浮萍开花诱导影响的趋势与在液体培养基中相似。低浓度($\leq 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的SA不能诱导开花; $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时

开花率最高, 达到45.26%, 高于液体培养基中的39.37%; $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时开花率有所下降; 在 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA下, 膨胀浮萍在固体培养基上仍然有6.65%的开花率, 且叶状体生长基本正常(图3)。开花植株的雌蕊和雄蕊同步发育, 同时从分生组织囊中伸出(图4-C)。叶状体经SA处理后的平均死亡率为8.84%, 低于液体培养基中的21.96% (表1、图3)。此外, 生长速率随着SA浓度的升高降低不大, 在高浓度($80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的SA处理下, 生长速率仍超过50% (图3), 说明在固体培养基上培养的叶状体对SA的耐受性增强。

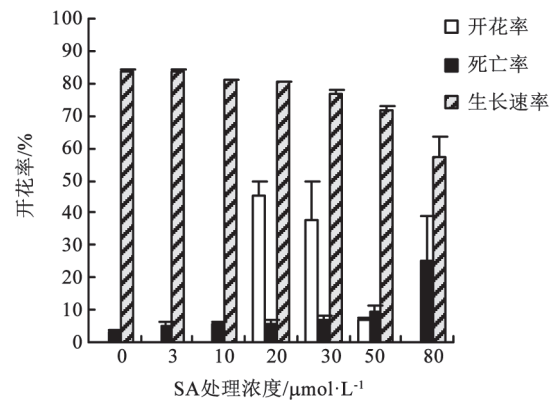


图3 固体培养基上SA对膨胀浮萍开花和生长的影响

Fig.3 Effects of SA on flower induction and growth of *L. gibba* SH0204 on solid medium

3 单个花药花粉量和花粉活性统计

取50个在固体培养基上诱导出的花药, 统计花粉量, 平均每个花药的花粉量为182粒, 说明该植物花粉量很小, 这可能跟花药体积太小有关。碘-碘化钾溶液染色观察表明, 棕色花粉的百分率

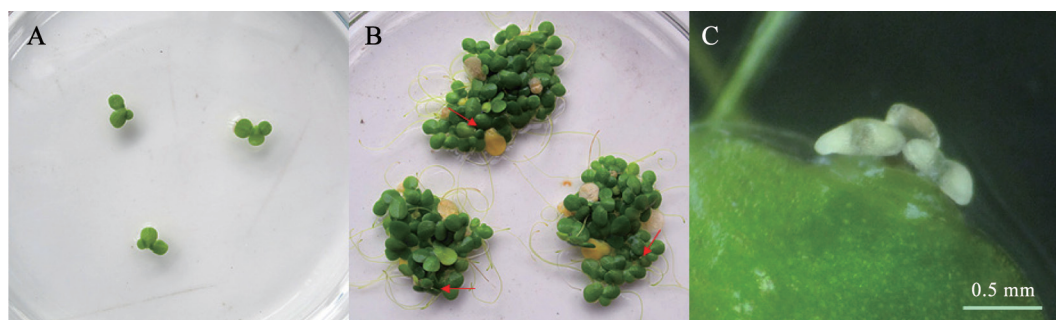


图4 在固体培养基上SA诱导膨胀浮萍开花

Fig.4 Flower induction of *L. gibba* SH0204 by SA on solid medium

A: 初始培养的叶片; B: 在30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA处理下培养20 d后的植株, 红色箭头指示已开花植株; C: 显微镜下观察的花器, 雌雄蕊同时出现。

为(70.01 \pm 7.49)%, 其余呈黄褐色(图5-A), 未观察到呈蓝色的花粉粒, 说明花粉中淀粉积累较少。

4 花药和花粉粒形态观察

扫描电镜观察结果表明, 膨胀浮萍花药有2个

药室, 成熟药室顶部有裂口(图5-B)。花粉粒比较饱满, 近圆球形, 直径15.6~21.7 μm , 外壁表面有网状带刺纹饰(图5-C), 纹理不规则, 刺长0.6~1.3 μm , 刺基部较宽, 末端尖锐, 分布不均匀(图5-C)。

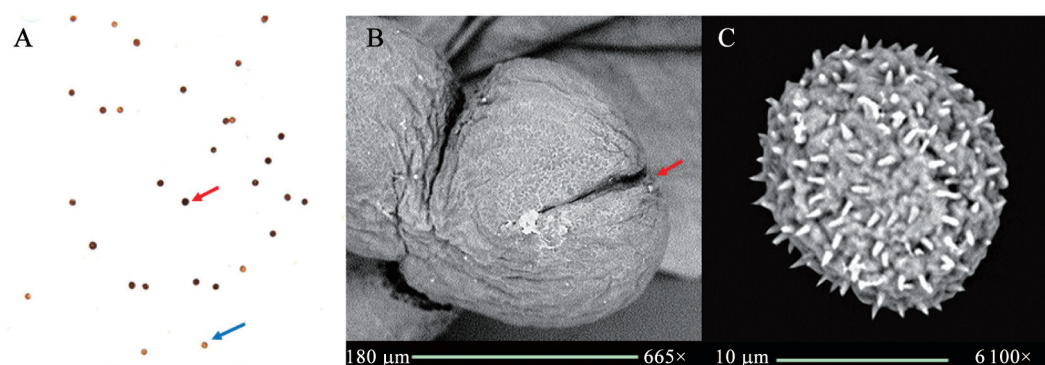


图5 膨胀浮萍花药和花粉粒的特点

Fig.5 The characteristics of anther and pollen grains of *L. gibba* SH0204

A: 花粉活力测定, 红色箭头指示染色后呈深棕色的花粉粒, 蓝色箭头指示染色后呈黄褐色的花粉粒, 5 \times 10倍光学显微镜观察; B: 花药扫描电镜图, 红色箭头指示裂口; C: 花粉粒扫描电镜观察。

讨 论

目前国外已有一些有关膨胀浮萍的开花诱导研究(Cleland和Tanaka 1979), 但国内还未见有报道。本研究中膨胀浮萍植株培养在1/2Hoagland培养基中长势良好, 生长速率超过90%。将SA添加到液态和固态1/2Hoagland培养基中诱导膨胀浮萍开花, 取得45%以上的开花率。SA被广泛用于浮萍科植物的开花诱导, Khurana和Maheshwari (1980, 1983)的研究发现SA不仅可以显著诱导*Spirodela polyrrhiza* SP₂₀和*Wolffia microscopica*开花, 而且也会影响浮萍叶状体的生长。多数研究利用去除了

Cu^{2+} 、 NH_4^+ 等的基础培养基诱导浮萍开花(Endo等2009; Miyawaki等2013), 因为de Cantú和Kandeler (1989)发现这两种离子对浮萍开花有抑制作用, 但是作为植物生长所需的重要营养元素, 它们的缺失势必会影响植物的正常生长(刘忠新和刘莉梅2008)。Li等(2004)利用1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA诱导*L. gibba* var. Hurfeish开花, 发现即使在含有 Cu^{2+} 和 NH_4^+ 的培养基中培养, 其开花率仍可高达90%。本研究采用含有 Cu^{2+} 和 NH_4^+ 的1/2Hoagland培养基, 成功诱导膨胀浮萍高频率开花。不同种类的浮萍对 Cu^{2+} 、 NH_4^+ 的反应可能不同。

在含适宜浓度($20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) SA的液体和固体培养基中培养20 d后均可以观察到膨胀浮萍开花(图1-D、图3-B和C), 过低和过高浓度的SA处理对开花诱导不利; 这与Cleland和Tanaka (1979)的研究结果一致。在液体培养基中诱导的植株, 其雄蕊和雌蕊并未同时出现在叶片同一侧分生组织囊处, 在雌蕊出现4~5 d后, 柱头顶端会有分泌液产生(图1-F), 这种现象在浮萍品种*W. microscopica*的自然开花过程中也有出现(Sree等2015), 至于此分泌液的成分和其产生的机理仍需后期进一步的研究。于固体培养基上培养的植株, 在 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA处理下其最高开花率高于在液体培养基中所能达到的, 而且雌雄蕊可以同侧同时伸出分生组织囊(图3-C), 雌蕊柱头顶端不会产生分泌液, 这有利于花粉粒进入雌蕊柱头, 为浮萍自交和杂交创造条件。在固体培养基上培养不显著影响叶片的生长速率, 还能提高开花率。最重要的是, 在固体培养基上的材料更加容易进行人工处理和计数, 方便对浮萍叶片的开花进行持续性观察比较, 有利于保持花药和雌蕊的完整性。综上可知, 膨胀浮萍开花诱导的基础培养基以固体培养基更好。

所有经SA诱导后的叶状体, 其内部气室会变得更加发达(图1-G), 而且所有开花植株其叶状体都会出现这种变化, 这与Pieterse和Müller (1977)的研究结果一致, 而且这种变化在其他品种浮萍的开花诱导过程中也有出现(Khurana和Maheshwari 1980)。但是并非所有出现这种变化的叶状体都能开花, 乙烯处理同样可以诱导膨胀浮萍的气室变大, 叶状体厚度增加, 但是并不能诱导其开花(Pieterse和Müller 1977)。

虽然膨胀浮萍花药有明显的裂口(图5-B), 但是在培养过程中并未观察到开花植株的花药自主开裂散粉现象, 而且花粉染色结果显示其花粉粒染色较浅, 可能没有活力。通过对花粉粒的扫描电镜观察, 展示了膨胀浮萍花粉粒形态, 这和Sree等(2015)观察到的另一种浮萍品种*W. microscopica*的花粉粒形态有很大不同。说明不同浮萍花粉形态差异很大, 孢粉学研究对浮萍科植物具有很大价值。

相关的研究已经证明, SA在植物防御反应中发挥重要作用(Pieterse 2013), 激发次级代谢产物

的生物合成并参与细胞内信号转导途径(Rivas-San Vicente和Plasencia 2011; Wang等2015)。经过SA的处理植物叶片内部活性氧和过氧化氢的含量增加, 激发其自身系统获得性抗性(systemic acquired resistance, SAR)以促进开花(Endo等2009)。SA有螯合金属离子二价铁的特性, 而二价铁是乙烯合成的关键辅因子(Bouzayen等1991), SA处理致使乙烯合成酶被抑制(Hong等2014), 抑制了乙烯合成, 进而促进植物开花(Raskin 1992)。本研究发现, SA处理20 d后的叶状体即使转接到不再含有SA的培养基中依然可以持续开花, 甚至一些新生叶也能高频率开花, 开花植株多是两片叶的植株(图1-B), 很多人认为这是由于母体叶片吸收的SA或其他代谢组分直接或间接传递给子代叶片, 从而促进这些叶片开花, 但是Khurana和Cleland (1992)通过示踪元素标记的研究结果显示, SA在开花诱导过程中基本上不会从母体叶片传入子代叶片中, 因此, 一定有什么其他物质进入子代叶片体内并参与其开花诱导过程。至于这种刺激物质的成分和在浮萍开花诱导过程中扮演何种角色需要未来更加深入的研究。

参考文献

- 贾文庆, 刘宇(2007). 紫薇花粉生活力的测定. 陕西农业科学, (1): 46-47
- 刘忠新, 刘莉梅(2008). 浅议植物生长所必需的营养元素与其生理功能. 农村实用科技信息, (12): 8
- 潘叶, 冯永庆, 马焕普(2008). 一种适用于植物组织的快速石蜡制片法. 中国农学通报, 24 (3): 112~115
- 张建英, 朱亚伟, 陈运娣(2006). 李品种花粉量及花粉发芽率的测定. 河北林业科技, (1): 9
- Bouzayen M, Felix G, Latché A, Pech JC, Boller T (1991). Iron: an essential cofactor for the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene. *Planta*, 184 (2): 244~247
- Cleland CF (1979). Comparison of the flowering behavior of the long-day plant *Lemna gibba* G3 from different laboratories. *Plant Cell Physiol*, 20 (7): 1263~1271
- Cleland CF, Tanaka O (1979). Effect of daylength on the ability of salicylic acid to induce flowering in the long-day plant *Lemna gibba* G3 and the short-day plant *Lemna paucicostata* 6746. *Plant Physiol*, 64 (3): 421~424
- de Cantú LB, Kandler R (1989). Significance of polyamines for flowering in *Spirodela punctata*. *Plant Cell Physiol*, 30 (3): 455~458
- Endo JI, Takahashi W, Ikegami T, Beppu T, Tanaka O (2009). Induction of flowering by inducers of systemic acquired resistance in the *Lemna* plant. *Biosci Biotech Bioch*, 73 (1): 183~185
- Fujioka S, Yamaguchi I, Murofushi N, Takahashi N, Kaihara S,

- Takimoto A (1983). The role of plant hormones and benzoic acid in flowering of *Lemna paucicostata* 151 and 381. *Plant Cell Physiol*, 24 (2): 241~246
- Hong K, Gong D, Xu H, Wang S, Jia Z, Chen J, Zhang L (2014). Effects of salicylic acid and nitric oxide pretreatment on the expression of genes involved in the ethylene signalling pathway and the quality of postharvest mango fruit. *New Zeal J Crop Hort*, 42 (3): 205~216
- Khurana A, Kumar R, Babbar SB (2014). Nitric oxide is involved in salicylic acid-induced flowering of *Lemna aequinoctialis* Welw. *Acta Physiol Plant*, 36 (10): 2827~2833
- Khurana JP, Cleland CF (1992). Role of salicylic acid and benzoic acid in flowering of a photoperiod-insensitive strain, *Lemna paucicostata* LP6. *Plant Physiol*, 100 (3): 1541~1546
- Khurana JP, Maheshwari SC (1980). Some effects of salicylic acid on growth and flowering in *Spirodela polyrrhiza* SP₂₀. *Plant Cell Physiol*, 21 (5): 923~927
- Khurana JP, Maheshwari SC (1983). Floral induction in *Wolffia microscopica* by salicylic acid and related compounds under non-inductive long days. *Plant Cell Physiol*, 24 (5): 907~912
- Klaus J, Nikolai B, Eric L (2013). Telling duckweed apart: genotyping technologies for the Lemnaceae. *Chin J Appl Environ Biol*, 19 (1): 1~10
- Landoldt E (1957). Physiologische und ökologische Untersuchungen an Lemnaceen. *Ber Schweiz Bot Ges*, 67: 271~410
- Les DH, Crawford DJ, Landolt E, Gabel JD, Kimball RT (2002). Phylogeny and systematics of Lemnaceae, the duckweed family. *Syst Bot*, 27 (2): 221~240
- Li J, Jain M, Vunsh R, Vishnevetsky J, Hania U, Flaishman M, Perl A, Flaishman M, Edelman M (2004). Callus induction and regeneration in *Spirodela* and *Lemna*. *Plant Cell Rep*, 22 (7): 457~464
- Miyawaki T, Matsumoto S, Takahashi W, Tanaka O (2013). Effect of heat-treated noradrenaline on flowering in *Lemna*. *Biosci Biotech Bioch*, 77 (7): 1586~1588
- Pieterse AH (2013). Is flowering in Lemnaceae stress-induced? A review. *Aquat Bot*, 104: 1~4
- Pieterse AH, Müller LJ (1977). Induction of flowering in *Lemna gibba* G3 under short-day conditions. *Plant Cell Physiol*, 18 (1): 45~53
- Punt W, Hoen PP, Blackmore S, Le Thomas A (2007). Glossary of pollen and spore terminology. *Rev Palaeobot Palynol*, 143 (1): 1~81
- Raskin I (1992). Role of salicylic acid in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 43 (1): 439~463
- Rivas-San Vicente M, Plasencia J (2011). Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *J Exp Bot*, 62 (10): 3321~3338
- Saeger A (1929). The flowering of Lemnaceae. *B Torrey Bot Club*, 351~358
- Shimakawa A, Shiraya T, Ishizuka Y, Wada KC, Mitsui T, Takeno K (2012). Salicylic acid is involved in the regulation of starvation stress-induced flowering in *Lemna paucicostata*. *J Plant Physiol*, 169 (10): 987~991
- Sree KS, Maheshwari SC, Boka K, Khurana JP, Keresztes Á, Appenroth KJ (2015). The duckweed *Wolffia microscopica*: a unique aquatic monocot. *Flora*, 210: 31~39
- Umemura K, Inokuchi H, Oota Y (1963). Flowering in *Lemna gibba* G3. *Plant Cell Physiol*, 4 (3): 289~292
- Wada KC, Takeno K (2013). Salicylic acid-mediated stress-induced flowering. In: Hayat S, Ahmad A, Alyemini MN (eds). *Salicylic Acid: Plant Growth and Development*. New York: Springer, 163~182
- Wang Z, Jia C, Li J, Huang S, Xu B, Jin Z (2015). Activation of salicylic acid metabolism and signal transduction can enhance resistance to *Fusarium* wilt in banana (*Musa acuminata* L. AAA group, cv. Cavendish). *Funct Integr Genomic*, 15 (1): 47~62
- Yamada M, Takeno K (2014). Stress and salicylic acid induce the expression of *PnFT2* in the regulation of the stress-induced flowering of *Pharbitis nil*. *J Plant Physiol*, 171 (3): 205~212
- Yamaga F, Washio K, Morikawa M (2010). Sustainable biodegradation of phenol by *Acinetobacter calcoaceticus* P23 isolated from the rhizosphere of duckweed *Lemna aoukikusa*. *Environ Sci Technol*, 44 (16): 6470~6474