

## 紫萍营养繁殖过程的解剖观察

李兰芝, 张家明\*

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

**摘要:** 以采自海南陵水的紫萍 (*Spirodela polyrhiza* DW2501-4) 为材料, 观察紫萍的营养繁殖过程。紫萍 DW2501-4 培养在 0.5 倍 Hoagland's 液体培养基中, 先不断长出新的叶状体, 随着营养物质的减少, 长出休眠体进入休眠状态。休眠体经过 4 °C 处理 7 d 后, 可在含 1% 蔗糖的 Hoagland's 固体培养基中重新萌发。为了进一步观察叶状体、类休眠体和休眠体的组织结构差异, 以及休眠体萌发过程中组织结构的变化, 制作了石蜡切片。观察结果显示: 紫萍叶状体有数条叶脉, 细胞中含少量的淀粉粒, 表皮层以下有分层的气室, 通常分上下两层, 上层气室比下层气室小。类休眠体也有数条叶脉和少量气室, 细胞中有较多淀粉粒。休眠体的细胞差异不明显, 几乎没有气室, 细胞内有大量的淀粉粒, 部分细胞含有单宁; 随着休眠体萌发, 细胞中淀粉粒不断变小, 同时分生组织分化出根和新的叶状体。

**关键词:** 紫萍; 营养繁殖; 叶状体; 休眠体; 石蜡切片; 解剖结构

中图分类号: Q944.52

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2016)04-0314-06

## Anatomical Studies on Turion-mediated Reproduction in *Spirodela polyrhiza*

LI Lan-zhi, ZHANG Jia-ming\*

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

**Abstract:** *Spirodela polyrhiza* strain DW2501-4 collected from Lingshui, Hainan was used to study turion-mediated reproduction. Results showed that new fronds reproduced continually in half-strength Hoagland's solution until nutrition was scarce. Dormant organ called turion was then formed. The turions were collected and cold-treated for one week at 4 °C, and were transferred into half-strength Hoagland's solid medium with 1% sucrose, and incubated at 24 °C. The turions germinated in 3 days. Paraffin sections of the fronds, turion-like fronds, and turions were prepared to observe their anatomical structures. Results indicated that fronds had several veins and a small amount of starch grains in the cells, and were full of air chambers. The air chambers in the upper layer were small while the air chambers in the bottom layer were big. Turion-like fronds contained a few veins and some small air chambers, and a lot of starch grains in their cells. Veins and air chambers were not observed in turions. A lot of starch grains were observed in turion cells, and some cells were observed to contain high level of tannin. During germination of turion, the starch grains were digested and became smaller and smaller, and roots and new fronds were formed.

**Key words:** *Spirodela polyrhiza*; turion-mediated reproduction; frond; turion; paraffin section; anatomical structure

(Life Science Research, 2016, 20(4): 314~319)

收稿日期: 2015-11-02; 修回日期: 2015-12-08

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

作者简介: 李兰芝(1990-), 女, 湖北广水人, 硕士研究生, 主要从事生物化学与分子生物学研究; \*通讯作者: 张家明(1966-), 男, 湖北公安人, 博士, 中国热带农业科学院生物技术研究所研究员, 海南大学兼职教授, 主要从事生物质能源领域的应用, Tel: 0898-66984866, E-mail: jmzhang@vip.163.com.

浮萍科有5属37种,包括浮萍属(*Lemna*)、紫萍属(*Spirodela*)、少根紫萍属(*Landoltia*)、无根萍属(*Wolffia*)、扁平无根萍属(*Wolffiella*)。紫萍*Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden 属于浮萍科紫萍属,为一年生浮水植物,常与其他浮萍一起形成飘浮植物群落,生于水田、池塘等静止的水域,分布于全球温带及热带地区<sup>[1]</sup>。紫萍具有生长速度快、易打捞、淀粉和蛋白质含量高特点,常作为动物饲料;全草还可作为中药;紫萍也可以直接利用废水进行生物生长,达到净化水质的作用<sup>[2-8]</sup>。因此,紫萍是一种具有饲用、药用、环境、能源等多重效益的新型能源生物。

紫萍一般进行营养生殖,依据环境的不同,可以形成叶状体或者休眠体<sup>[9]</sup>。自然界中,夏末生长季节结束时紫萍会产生休眠体<sup>[9]</sup>。新形成的休眠体会沉入水底,经历一段时间的低温冬眠;随着春天温度上升,在光照和光敏色素介导下,通过调节碳水化合物的新陈代谢冬眠才会打破<sup>[10, 11]</sup>。休眠体萌发时会从两个分生侧囊中长出新的叶状体,但不会生成休眠体<sup>[12]</sup>。通过消耗休眠体内积累的大量淀粉,新叶会快速生长<sup>[13]</sup>。紫萍可以通过其产生的休眠体在恶劣环境中生存,而且休眠体中的淀粉含量可达干重的60%左右<sup>[14]</sup>。因此,研究紫萍的休眠体,对保存紫萍资源和开发生物质能源方面具有重要意义。

目前国内关于紫萍休眠体的研究处于空白,不过国外关于紫萍休眠体已有一些研究,比如:诱导紫萍休眠体形成的因子包括低温、营养缺乏(包括缺氮、缺磷、缺硫等)、ABA等<sup>[15-18]</sup>;诱导休眠体萌发的因子包括温度、光照、营养条件、GA<sub>3</sub>等<sup>[19-22]</sup>。虽然对休眠体的组织结构已有报道<sup>[9]</sup>,但关于类休眠体的组织结构和休眠体萌发过程中组织结构的变化并未见报道。本实验通过培养紫萍,使其产生休眠体,并诱导休眠体萌发,进而通过制作石蜡切片,观察比较了叶状体、类休眠体和休眠体的组织结构差异,以及休眠体萌发过程中组织结构的变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

采自海南陵水的紫萍 *Spirodela polyrhiza* DW2501-4,先用自来水冲洗,无菌水洗3次,再用5%的次氯酸钠消毒1 min,消毒至叶片边缘发白,无菌水冲洗3次,接种到添加1%蔗糖的MS

固体培养基<sup>[23]</sup>上,以获得无菌无藻的叶状体。材料培养于宁波江南仪器厂RXZ智能型人工气候箱内,温度24℃,光周期为16 h光照/8 h黑暗,相对湿度75%,光照强度40 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>。

### 1.2 试剂和器材

实验中所用有机试剂均为分析纯,购自西陇化工股份有限公司。石蜡购自国药集团化学试剂有限公司, Ehrlich 苏木素染色液购自北京雷根生物技术有限公司,中性树胶购自广东光华化学厂有限公司。RM2245 半自动轮转式切片机来自德国徕卡显微系统有限公司, KD-P 摊片机和 KD-H 烘片机购自浙江金华市科迪仪器设备有限公司,蔡司荧光数码生物显微镜来自德国卡尔·蔡司股份公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 紫萍的培养

挑选长势良好的无菌无藻的紫萍,接种到0.5倍 Hoagland's 液体培养基<sup>[24]</sup>中,置于人工气候箱中培养。

#### 1.3.2 休眠体萌发诱导

收集紫萍产生的休眠体,在4℃冰箱中放置7 d,接种到含1%蔗糖的 Hoagland's 固体培养基上,放置于人工气候箱中培养,定期观察,并在江南 JSZ6S 体视显微镜下用佳能 G11 拍照。

#### 1.3.3 石蜡切片制作

固定:叶片用 FAA 固定,类休眠体和休眠体用 FPA 固定,固定24 h 以上。

PAS 法染色:材料用蒸馏水冲洗后,在0.4%高碘酸溶液中氧化3~5 h,蒸馏水冲洗后再浸洗3~4 h, Schiff 试剂(冷配法配制,4℃避光保存)染色12~24 h,蒸馏水冲洗,浸洗至溶液不再呈红色为止<sup>[25, 26]</sup>。

脱水:用乙醇/正丁醇系列逐级脱水,具体操作作为正丁醇10 mL、无水乙醇40 mL、蒸馏水50 mL 混合液中浸泡1.5 h;正丁醇20 mL、无水乙醇50 mL、蒸馏水30 mL 混合液中浸泡1.5 h;正丁醇35 mL、无水乙醇50 mL、蒸馏水15 mL 混合液中浸泡1.5 h;正丁醇55 mL、无水乙醇40 mL、蒸馏水5 mL 混合液中浸泡1.5 h;正丁醇75 mL、无水乙醇25 mL 混合液中浸泡3 h;100 mL 正丁醇中浸泡3 h;100 mL 正丁醇中浸泡两次,每次5 h。如需过夜,放置于70%酒精中。

浸蜡、包埋:把材料放入石蜡与正丁醇等量混合的混合液中60℃恒温浸蜡4 h,再依次将材

料转入到石蜡 1、石蜡 2、石蜡 3 中, 60 °C 恒温浸蜡 4 h, 最后用纯石蜡熔液包埋材料, 待完全冷却后切片。其中石蜡 1 为石蜡和二甲苯 1 : 1 混合液, 石蜡 2 为石蜡和二甲苯 3 : 1 混合液, 石蜡 3 是纯石蜡熔液。

切片、贴片、烤片: 用 RM2245 半自动轮转式切片机, 将包埋好的材料切成 8 μm 薄片, 45 °C 下展片, 贴片后, 55 °C 下烤片。

脱蜡、浸洗、复水、复染、透明: 在二甲苯中浸泡两次, 每次 10 min; 无水乙醇中浸泡两次, 每次 3~5 min; 95%、85%、70%、50% 梯度酒精复水, 每级 1~2 min; 蒸馏水冲洗 1~3 min, Ehrlich 苏木素染色液复染 10~15 min, 蒸馏水冲洗 20~30 s, 1% 稀氨水分色 20~40 s 后镜检; 在 95% 酒精中浸泡 2 min, 无水乙醇中浸泡 3 min, 纯酒精和二甲苯等体积混合液中透明 1 min, 用二甲苯透明两次, 每次 2~3 min。

封片: 在二甲苯干燥前, 用中性树胶封片, 封片后可在 48 °C 下烘烤使切片平整。

最后, 用 Axio Scope A1 蔡司荧光数码生物显微镜在 10×5、10×20、10×40 下镜检照相。

## 2 结果与分析

### 2.1 紫萍的生活史观察

通过培养紫萍发现, 在营养充足、温度适宜的条件下, 紫萍进行营养生长, 从两侧的分生囊中长出新的叶状体(图 1A, B)。叶状体呈椭圆, 上表面绿色, 下表面紫色, 有 5~10 条叶脉, 5~11 条根。随着氮、磷等营养物质的消耗减少, 叶片上表面逐渐变黄, 从母叶侧囊中分化出休眠体(图 1C, D)。休眠体和母叶刚开始由一条白色的柄相连(图 1E), 随后与母叶分离沉入水底进入休眠状态。休眠体很小, 直径约 2 mm, 呈椭圆形, 灰褐色(图 1F)。紫萍有时也会产生类休眠体, 与母叶分离后浮在水面, 体积较小, 最初呈灰褐色, 和休眠体相似, 随后变绿, 并缓慢长大, 直至与正常叶状体相似(图 1G)。通过对休眠体进行萌发诱导处理发现, 诱导 24 h 时, 休眠体外表无变化; 48 h 后, 可以看到根(图 1H); 72 h 后, 休眠体侧囊中长出 0.5~1 mm 新叶(图 1I)。新叶长大后两侧可再长出新的叶状体(图 1J, K, L), 同时休眠体供给完营养后发白死亡。

### 2.2 紫萍叶状体、类休眠体和休眠体的解剖结构观察

从紫萍叶状体的横切面看, 上层组织的气室小, 下层组织的气室大(图 2A)。从紫萍叶状体的纵切面看, 有数条叶脉、很多气室(图 2B), 细胞中含少量的淀粉粒, 淀粉粒被染成红色(图 2C)。

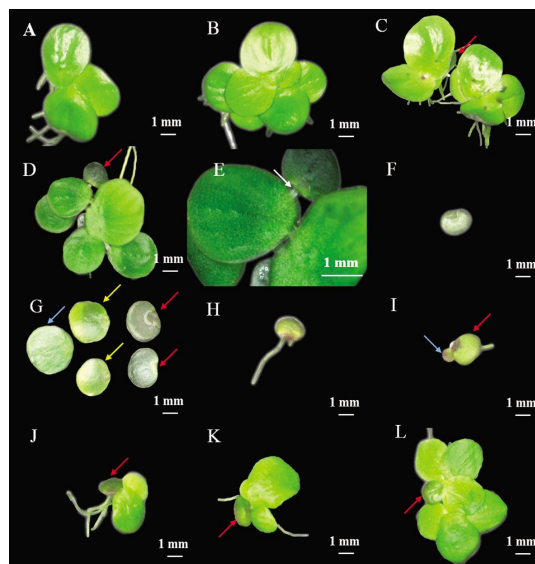


图 1 紫萍营养繁殖过程的观察

A-B: 叶状体出芽生殖; C-D: 休眠体产生过程; E: 白色箭头指示休眠体与母叶连接的柄; F: 休眠体; G: 叶状体、类休眠体和休眠体的外观差异; H-I: 休眠体萌发过程; J-L: 新生叶状体繁殖过程。红色箭头指示休眠体, 蓝色箭头指示叶状体, 黄色箭头指示类休眠体。

#### Fig.1 Vegetative reproduction of *Spirodela polyrhiza* by turion

A-B: Vegetative growth by budding; C-D: Production of turion; E: The white arrow points to the stolon which links turion and frond; F: A turion; G: Comparison between frond, turion-like frond and turion; H-I: Germination of turion; J-L: Reproduction of the new fronds. Red arrows indicate turions, blue arrows indicate fronds, and yellow arrows indicate turion-like fronds.

观察新产生的类休眠体横切面,发现下层组织有一些气室(图 2D)。从其纵切面观察,有数条叶脉,远离根基部的一端有一些气室,呈渔网状,与叶状体相似,靠近根基部的一端只有少量的气室(图 2E),细胞中充满淀粉粒,有一些单宁,与休眠体类似(图 2F)。

休眠体的横切面图显示,与叶状体组织结构相比,休眠体上层和下层的组织结构几乎没有差别(图 2G)。从休眠体纵切面观察,细胞内有大量的淀粉粒,没有观察到气室,有一些呈黄褐色的单宁(图 2H, I)。

### 2.3 休眠体萌发过程中组织结构的变化

首先是休眠体萌发过程中淀粉粒的变化。以黑暗处理萌发前的休眠体作为对照(图 3A),通过对比切片结果可知,休眠体萌发诱导 24 h 时,淀粉粒变化不明显(图 3B);诱导 48 h 时,淀粉粒变小(图 3C);诱导 72 h 时,淀粉粒变得更小,出现气室(图 3D);诱导 96 h 时,淀粉粒变得非常小(图 3E)。

其次是休眠体萌发过程中分生区的变化。同样以黑暗处理萌发前的休眠体作为对照,通过切片观察可知,对照中的分生区呈圆形(图 3F, G);萌发诱

导 24 h 时,形成两个分生组织(图 3H, I),甚至多个;萌发诱导 48 h 时,可以看到分化出的根(图 3J, K),同时分生区分化形成多个叶原基(图 3L);萌发诱导 72 h 时,叶原基发育形成首个叶状体(图 3M),而且新形成的叶状体中就存在叶原基(图 3N)。叶原基由单层细胞组成的叶护套保护着(图 3O)。

## 3 讨论

### 3.1 石蜡切片制作的改进

实验操作中发现,如果用完整的叶片和休眠体制作石蜡切片,PAS 法整染时应延长高碘酸氧化和 Schiff 试剂染色时间,否则中间的细胞会染色不充分。为了使整染染色充分明显,可将材料的边缘切去一点点,既不影响整体细胞结构观察,而且染色快速,但材料经过固定和系列脱水后很脆,容易破碎,每步操作应小心。另外,本实验 Schiff 试剂采用的冷配法,配置容易,染色效果也很好。需要注意的是,Ehrlich 苏木素染色液容易变质,应避光保存,用后及时盖上盖子,如果放置数月后再使用,使用之前最好用稀氨水检测是否可以蓝化。此外,在包埋过程中,材料从石蜡 3 中

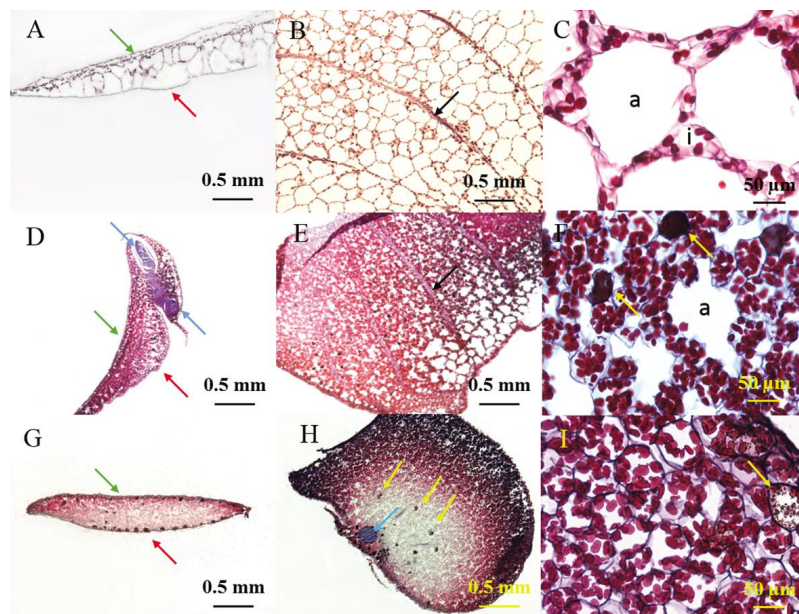


图 2 紫萍叶状体、类休眠体和休眠体的解剖结构观察

A: 叶状体横切; B-C: 叶状体纵切; D: 类休眠体横切; E-F: 类休眠体纵切; G: 休眠体横切; H-I: 休眠体纵切。绿色箭头指示上层,红色箭头指示下层,黑色箭头指示叶脉,黄色箭头指示单宁,蓝色箭头指示分生组织, a 表示气室, i 表示细胞间隙,淀粉粒被染成红色。

### Fig.2 Anatomical structures of frond, turion-like frond and turion

A: Transverse section of a frond; B-C: Longitudinal section of a frond; D: Transverse section of a turion-like frond; E-F: Longitudinal section of a turion-like frond; G: Transverse section of a turion; H-I: Longitudinal section of a turion. Green arrows indicate the upper layer, red arrows indicate the bottom layer, black arrows indicate the veins, yellow arrows indicate tannin, and blue arrows indicate the meristematic region. "a" indicates the air chamber, "i" indicates the intercellular space. Starch granules were stained red.

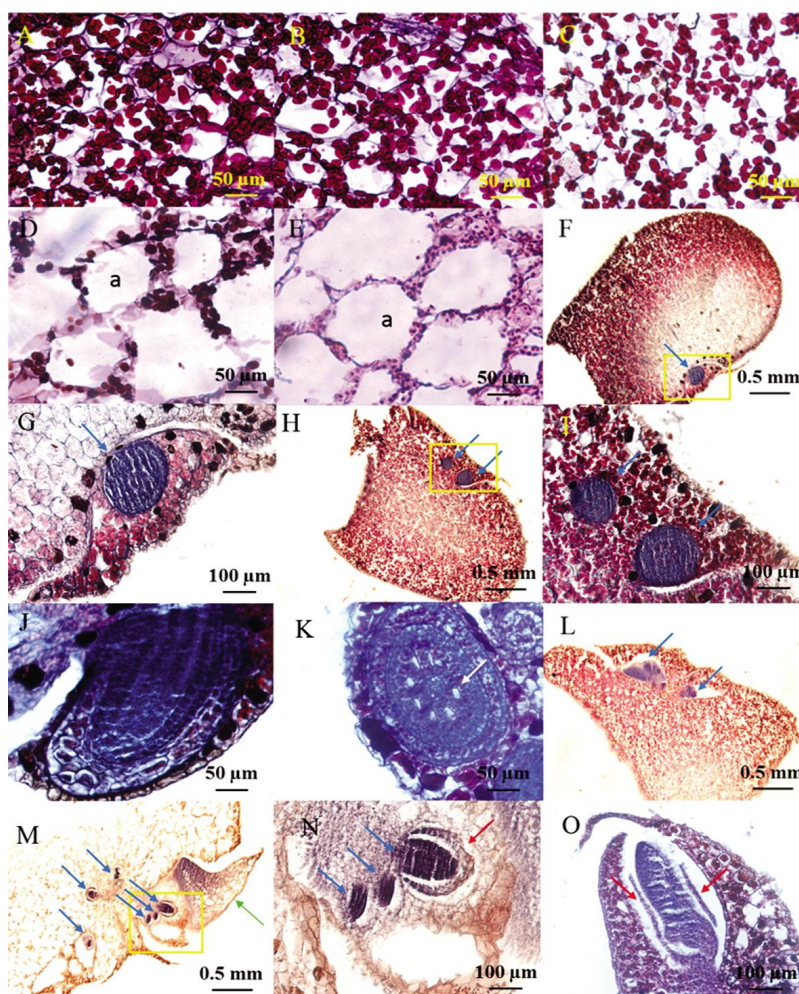


图3 休眠体萌发过程组织结构的观察

A-E: 休眠体的纵切面, 显示淀粉粒降解过程。A: 黑暗冷处理后萌发前的对照; B: 诱导萌发 24 h; C: 诱导 48 h; D: 诱导 72 h; E: 诱导 96 h。F 和 G: 对照组中的分生组织; H 和 I: 诱导 24 h 时的两个分生组织; J: 诱导 48 h, 分生区分化出根; K: 根的横切面; L: 诱导 48 h, 分生组织分化出叶原基; M: 诱导 72 h, 形成多个叶原基; N: 新的叶状体中的叶原基; O: 叶原基结构和叶护套横切面。a 表示气室, 蓝色箭头指示分生组织, 白色箭头指示根的导管, 绿色箭头指示新叶, 红色箭头指示叶护套, 淀粉粒被染成红色, 分生组织被染成蓝色。

### Fig.3 Structural changes of turion during germination

A-E: Longitudinal section of a turion, showing degradation of the starch grains in turion germination process. A: Control sample before germination induction after dark and cold treatment; B: Induced for 24 h; C: Induced for 48 h; D: Induced for 72 h; E: Induced for 96 h. F and G: The meristem in control sample; H and I: Two meristematic tissues in turion after induced for 24 h; J: Meristematic zone differentiated into root after induced for 48 h; K: Transverse section of a root; L: Meristem differentiated into frond primordium after induced for 48 h; M: Meristem formed multiple frond primordia after induced for 72 h; N: Frond primordia protected by foliage sheath; O: Transverse section of frond primordium and foliage sheath. "a" indicates air chamber. Blue arrows indicate meristems, white arrows indicate the vessel of root, the green arrow indicates new frond, and red arrows indicate foliage sheath. Starch grains were stained red, and meristem was stained blue.

取出后在包埋时要迅速, 因为材料冷却后易卷曲, 这样很难切到较完整的纵切面。

当然, 虽然利用石蜡切片技术, 采用 PAS 法整染结合 Ehrlich 苏木素染色液复染的方法, 能使淀粉粒和分生组织染色分明(图 2, 3), 使人们能很好地观察到淀粉粒和分生组织在休眠体萌发过程中的变化(图 3), 但是从石蜡切片上无法观察到其他的细胞器, 例如叶绿体。此外, 对于叶状体

和已经萌发的休眠体, 因为细胞中充满气室, 很难获得结构完整清晰的切片, 可见材料的固定方法还有待改进。

### 3.2 紫萍的休眠体和生存策略

本实验利用石蜡切片观察到, 紫萍叶状体中有发达的气室(图 2A, B, C), 可以使紫萍保持平衡浮在水面, 接受光照进行光合作用, 具有浮生水生植物的典型特征; 而休眠体细胞结构致密,

而且含有大量淀粉粒(图 2G, H, I), 有助于沉入水底进行休眠。Appenroth 等<sup>[9]</sup>通过扫描电镜发现, 休眠体中淀粉粒随着光照诱导时间的延长, 淀粉粒也逐渐变小。本实验也发现休眠体经过萌发诱导 48 h 后淀粉粒变小(图 3C), 72 h 后明显变小(图 3D), 说明休眠体能快速降解自身储存的淀粉粒, 为休眠体萌发提供营养, 使新的叶状体快速长大; 而且重新形成的气室有助其浮出水面, 更好地接受光照。综上分析可知, 休眠体的形成相对正常的叶状体来说是一种生存策略。

此外, 休眠体中淀粉含量很高, 可以考虑用作生物产品。而且, 休眠体与母叶分离后沉入水底, 在进入到适宜条件之前都不会萌发生长, 可以长期有效地保存自身, 因此可以利用休眠体来长期保存紫萍的种质资源。基于此, 优化诱导休眠体产生的条件或者筛选休眠体高产植株将成为下一步研究的主要任务。

#### 参考文献(References):

- [1] 吴征镒, 李恒. 浮萍科[EB/OL]. <http://www.eflora.cn/sp/Spirodela%20polyrhiza>, 1978.
- [2] 于昌江, 朱明, 马玉彬, 等. 新型能源植物浮萍的研究进展[J]. 生命科学 (YU Chang-jiang, ZHU Ming, MA Yu-bin, et al. Advances in research on duckweeds—a new energy plant[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences), 2014, 26(5): 458–464.
- [3] 朱晔荣, 李亚辉, 刘苗苗, 等. 新型能源植物浮萍生物质能的研究与开发[J]. 自然杂志(ZHU Ye-rong, LI Ya-hui, LIU Miaomiao, et al. Research and development of biomass energy of duckweed—a new energy plant[J]. Chinese Journal of Nature), 2013, 35(5): 359–364.
- [4] 崔姜伟, 崔卫华, 郝春博. 浮萍在环境保护领域的应用研究进展[J]. 环境工程(CUI Jiang-wei, CUI Wei-hua, HAO Chun-bo. The research progress in application of duckweed in environmental preservation[J]. Environmental Engineering), 2015, 33 (suppl. 1): 306–309.
- [5] 刘璐嘉, 陈汉新, 周明耀, 等. 江苏地区富营养化水体浮萍修复技术应用研究[J]. 江苏农业科学(LIU Lu-jia, CHEH Han-xin, ZHOU Ming-yao, et al. Study on remediation technology of duckweed in eutrophicated water bodies and its application in Jiangsu Province[J]. Jiangsu Agricultural Sciences), 2014, 42 (5): 320–323.
- [6] 薛慧玲, 董志红, 赵海, 等. 水生能源植物浮萍生产燃料乙醇[J]. 可再生能源(XUE Hui-ling, DONG Zhi-hong, ZHAO Hai, et al. Producing fuel ethanol from energy hygrophyte duckweed[J]. Renewable Energy Resources), 2013, 31(7): 55–59.
- [7] 张震, 辛静, 蔡树美, 等. 不同磷浓度下浮萍生长和去除磷效率研究[J]. 江西农业学报(ZHANG Zhen, XIN Jing, CAI Shu-mei, et al. Study on growth of duckweed and its removal efficiency of phosphorus under different P-concentration[J]. Acta Agriculturae Jiangxi), 2011, 23(7): 160–162.
- [8] 凌云, 何板作, 鲍燕燕, 等. 浮萍的化学成分研究[J]. 中草药(LING Yun, HE Ban-zuo, BAO Yan-yan, et al. The research on the chemical composition of duckweed[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs), 1990, 30(2): 89–91.
- [9] APPENROTH K J, KERESZTES A, FISCHER W, et al. Light-induced degradation of starch granules in turions of *Spirodela polyrhiza* studied by electron microscopy[J]. Plant and Cell Physiology, 2011, 52(2): 384–391.
- [10] APPENROTH K J, NICKEL G. Induction of turion formation in *Spirodela polyrhiza*: the environmental signals that induce the developmental process in nature[J]. Physiologia Plantarum, 2010, 138(3): 312–320.
- [11] APPENROTH K J, PALHARINI L, ZIEGLER P. Low-molecular weight carbohydrates modulate dormancy and are required for post-germination growth in turions of *Spirodela polyrhiza*[J]. Plant Biology, 2013, 15(2): 284–291.
- [12] NEWTON R J, SHELTON D R, DISHAROON S, et al. Turion formation and germination in *Spirodela polyrhiza*[J]. American Journal of Botany, 1978, 65(4): 421–428.
- [13] APPENROTH K J, ZIEGLER P. Light-induced degradation of storage starch in turions of *Spirodela polyrhiza* depends on nitrate[J]. Plant Cell and Environment, 2008, 31(10): 1450–1469.
- [14] APPENROTH K J. Co-action of temperature and phosphate in inducing turion formation in *Spirodela polyrhiza* (Great duckweed)[J]. Plant Cell and Environment, 2002, 25(9): 1079–1085.
- [15] KATJA K, APPENROTH K J. Influence of salinity and high temperature on turion formation in the duckweed *Spirodela polyrhiza*[J]. Aquatic Botany, 2012, 97(1): 69–72.
- [16] APPENROTH K J, HERTEL W, JUNGNICHEL F, et al. Influence of nutrient deficiency and light on turion formation in *Spirodela polyrhiza* (L.) SCHLEIDEN[J]. Biochemie und Physiologie der Pflanzen, 1989, 184(5–6): 395–403.
- [17] SMART C C, TREWAVAS A J. Abscisic-acid-induced turion formation in *Spirodela polyrhiza* L.I. production and development of the turion[J]. Plant Cell and Environment, 1983, 6(6): 507–514.
- [18] PERRY T O, BYRNE O R. Turion induction in *Spirodela polyrhiza* by abscisic acid[J]. Plant Physiology, 1969, 44(5): 784–785.
- [19] REIMANN R, HIPPLER M, MACHELETT B, et al. Light induces phosphorylation of glucan water dikinase, which precedes starch degradation in turions of the duckweed *Spirodela polyrhiza*[J]. Plant Physiology, 2004, 135(1): 121–128.
- [20] MALEK L, COSSINS E A. Senescence, turion development, and turion germination in nitrate- and sulfate-deficient *Spirodela polyrhiza*. Relationships between nutrient availability and exogenous cytokinins[J]. Canadian Journal of Botany, 1983, 61(7): 1887–1897.
- [21] APPENROTH K J, AUGSTEN H. Photophysiology of turion germination in *Spirodela polyrhiza* (L.) SCHLEIDEN-V. Demonstration of a calcium-requiring phase during phytochrome mediated germination[J]. Photochem Photobiology, 1990, 52(1): 61–66.
- [22] PERRY T O. Dormancy, turion formation, and germination by different clones of *Spirodela polyrhiza*[J]. Plant Physiology, 1968, 43(11): 1866–1869.
- [23] MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures[J]. Physiologia Plantarum, 1962, 15(3): 473–497.
- [24] 李风童, 陈秀兰, 刘春贵, 等. 不同配方营养液对水培风信子生长及观赏品质的影响[J]. 中南林业科技大学学报(LI Feng-tong, CHEN Xiu-lan, LIU Chun-gui, et al. Effects of different nutrient solutions on growth and ornamental quality of hydroponic *Hyacinthus orientalis* L.[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology), 2012, 32(10): 130–134.
- [25] 王玲玲, 刘智, 熊飞. 固定和染色方法对小麦胚乳细胞结构显示的影响[J]. 作物学报(WANG Ling-ling, LIU Zhi, XIONG Fei. Effect of fixation and staining methods on structure observation of endosperm cell of wheat[J]. Acta Agronomica Sinica), 2012, 38(9): 1688–1697.
- [26] 康海岐, 常红叶, 许育彬, 等. 水稻籽粒胚乳的石蜡切片方法改良及其结构发育观察[J]. 西北植物学报(KANG Hai-qi, CHANG Hong-ye, XU Yu-bin, et al. Improvement of paraffin section methods and structural observation to endosperm development of rice kernel[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica), 2008, 28(5): 1069–1074.