

参赛队员姓名: 阿丝娜 齐乐遥

中学: 中国人民大学附属中学

省份: 北京

国家/地区: 中国

指导教师姓名: 李峰

论文题目: 一种新模式植物——微萍的生物学特征研究和生活周期控制

# 论文题目：一种新模式植物——微萍的生物学特征研究和生活周期控制

**摘要：** 微萍 (*Wolffia*) 是常见的水生植物，个体微小、为绿色叶状体，以分枝形式产生新个体，没有根茎叶分化。上世纪很多学者对微萍的生活史开展了研究，认为微萍是研究植物开花过程的良好材料。由于微萍形态简单、易于培养且生长分枝方式不同于已有的模式植物，微萍可以作为新的模式生物，研究多细胞生物形态建成的核心过程，是植物发育学研究的优秀材料。为了实现这一目标，在实验室环境下控制微萍的生活周期、尤其是诱导微萍由营养生长阶段进入生殖生长成为了首要任务。本文在微流系统中，第一次对多细胞生物，微萍属植物 *Wolffia ausriliana* 进行形态学和生理学研究，通过扫描电镜、透明切片染色、体式镜延时摄影等技术记录了 *Wolffia ausriliana* 的花器官结构和生长分枝过程，详细追踪了单个 *Wolffia ausriliana* 的生活周期；并用多种试剂组合诱导 *Wolffia ausriliana* 开花，得到最适诱导浓度 ( $10^{-4}$  M EDTA +  $10^{-7}$  M SA)，开花比例达到 25%；在微流平台上获得了 *Wolffia ausriliana* 的开花个体后，我们利用单个微萍 RNA-seq 技术检测了 EDTA 诱导 *Wolffia ausriliana* 开花不同阶段的基因表达差异，为后续对解析开花途径的基因调控网络奠定了坚实基础。并且通过对其进行痕量物质检测，发现 EDTA 处理的 *Wolffia ausriliana* 中金属离子浓度发生变化， $Zn^{2+}$  含量显著减少可能是 EDTA 诱导 *Wolffia ausriliana* 开花的原因之一，这为寻找新的调控开花途径基因提供了重要线索。

## **Title: Studies on Biological Characteristics and the Control of Life Cycle of *Wolffia australiana*—a new kind of model plant**

**Abstract:** *Wolffia* is a sort of small green aquatic plant without the differentiations of root, stem and leaf, which produces new foliaceous individual by branching. Since many scholars conducted research on the life history of *Wolffia* in the last century, it has been considered as a good research material in flowering physiology. Due to its simple morphology, easy cultivation and different growth and branching mode from the front model plants, *Wolffia* can be used as a new model organism with high value in studying the core process of multicellular organism's morphogenesis. In order to achieve this goal, controlling the life cycle of *Wolffia* in laboratory environment, especially inducing the transform from vegetative growth to reproductive growth, has become the primary task. In this paper, morphological and physiological studies was first conducted on multicellular organism--*Wolffia australiana* in the microfluidic system. Its flower structure and branching process were observed and recorded by SEM, transparentizing and staining as well as time-lapse photography by Stereo Microscope, the life cycle of a single *Wolffia australiana* is tracked in detail; Also, we induced *Wolffia australiana* to develop flower structures by a variety of reagent combinations, found out the optimum concentration ( $10^{-4}$  M EDTA and  $10^{-7}$  M SA), with the

flowering proportion up to 25%. After obtaining the flowering individuals of *Wolffia ausriliana* on the microflow platform, we used RNA-seq technology towards a single frond to detect the differences of gene expression in different stages of *Wolffia ausriliana* flowering that under the induction of EDTA, laying a solid foundation for the subsequent gene regulation of analyzing the flowering pathway. Through trace substance detection, it was found that the concentration of metal ions in *Wolffia ausriliana* treated by EDTA changed and the content of  $Zn^{2+}$  decreased significantly, which may be one of the reasons why EDTA induced the flowering of *Wolffia ausriliana*, which provided an important clue for finding new genes regulating the flowering pathway.

## 一、研究背景

微萍 (*Wolffia*) 属于单子叶植物纲、天南星目、浮萍科、微萍属, 微萍属中有 11 个种[1], 其中包括人类已知的最小被子植物。微萍在全世界水域范围内分布广泛[1], 单个个体为绿色叶状体 (Fronde), 以分枝的形式产生新个体, 且新产生的分枝会脱离上一分枝。微萍的叶状体以单个或者两个连在一起的状态存在, 没有根茎叶的分化。

微萍在生产生活中有很高的应用价值, 主要集中在饲料开发、环境监测和污水处理、医药产品开发等领域。微萍的优质蛋白含量高、氨基酸组份均衡, 在人类营养方面具有很高的实用价值[2]。微萍对培养基中镉和锂的含量比较敏感, 可以作为检测水污染的生物感应器, 并且在一定限度内可以吸收重金属和氮、磷等污染物, 起到净化水体作用[3]。此外, 近年来科学家利用转基因技术在微萍中表达重组蛋白以达到大量生产药物蛋白的目的[4]。

有关浮萍科植物的生理学研究最早见于 19 世纪末, 德国科学家 Hegelmaier、Engler 对于浮萍科植物的形态结构和系统分类有了早期的认识和研究, 随后美国学者 Florence 和印度学者 Sowjanja 等进一步研究了浮萍科植物的结构解剖和生活史[5][6]。在诱导开花方面, 印度学者 Mahcshwari 曾尝试研究水杨酸、EDTA、玉米素等对浮萍科植物分枝及开花的影响, 并成功诱导 *Wo. microscopica* 开花, Mahcshwari 认为微萍是研究开花生理的优秀材料[7][8]。

微萍个体小而形态简单, 个体数目增加快, 生活周期短, 易控制, 易于培养、便于取材, 且通常情况下为无性生殖, 遗传背景高度一致

[9]; 而微萍进行植物发育学研究的最大优势, 在于其生长分枝方式不同于其他已有的模式植物。正如白书农教授指出: 18 世纪以来, 由于植株是由种子萌发而来并逐渐形成叶、花等基本结构, 人们对植物发育的研究没有像动物一样集中于胚胎发生过程对个体形态建成的“发生原因”的研究, 而是分散为对植株生长过程中不同事件发生原因的研究, 如花器官形态建成、茎端分生组织的发育与保持等[10]。而想要真正了解多细胞生物形态建成的策略, 就要找到植物真正的发育单位并探究其调控机制的整体过程。现有的模式植物多是聚合体而难以找到分辨率较高的发育单位, 从而无法满足研究的需要。我们需要寻找新的模式植物, 而结构简单、以叶状体为单位发育的微萍或许可以回答这些问题。

目前针对微萍属植物 *Wolffia australiana* 的基因组测序工作已经基本完成, 微萍的转基因技术研究也逐渐趋于成熟, 而最关键的难题是在人工环境下完成和控制微萍的生活周期、尤其是诱导微萍由营养生长阶段进入生殖生长阶段。

为了完成单个微萍的完整生活周期, 以叶状体为单位探究连续而完整的植物发育过程, 我们尝试在实验室中建立以 plant-on-chip 为核心的微萍培养体系, 即借助微流技术解决传统三角瓶和培养皿无法有效跟踪并控制水生浮游植物个体的生活周期的难题。

微流技术 (microfluidic) 全称为微流控芯片实验室技术, 是利用使用尺寸为几十到几百微米的通道来处理或操纵流体和颗粒的技术平台[11]。20 世纪 90 年代以来, 随着软光刻技术的发展, 微流充分

展现出其体积小、需要样品少、易于制作和使用、可以灵敏地进行反应，分离和检测等优势[12]；广泛应用于各种生物学应用，如高通量药物筛选，分子样品制备、反应、分离、检测和细胞培养、分选、裂解，生物传感和即时诊断等[13]。

由于微萍个体微小（长不超过 1000 微米，宽约 600 微米），生长分枝时间比较短，我们可以充分发挥微流技术集成化、高通量化及快速化等特点，设计微萍培养体系，诱导微萍进入生殖生长阶段，完成生活周期，追踪单个微萍个体，建立以微流技术为基础的完整培养体系，进而回答植物发育过程中的核心问题。

## 二、实验结果

### 2.1 *Wolffia australiana* 的形态学观察

*Wolffia australiana* 的单个个体为船型叶状体，分背腹两面，背面暴露在空气中，呈绿色、扁平，分布着一定数目的气孔；腹面浸没在水下，淡黄绿色且透明、向下突起（Figure 1）。营养生长阶段，以分枝的形式产生新个体，且新产生的分枝长到与原个体相同大小时会脱离上一分枝（Figure 2）；生殖生长阶段，微萍背部裂开，出现中空的洞，伸出花器官（Figure 3），其花器官极度简化，无花柄、花托、花被，仅有雄蕊群和雌蕊群（Figure 4&5）。微萍的花以一雄一雌占多数，部分为二雄一雌，偶见二雄二雌。微萍的雄蕊花药纵裂；单雌蕊，子房一室，基生胎座[10]。

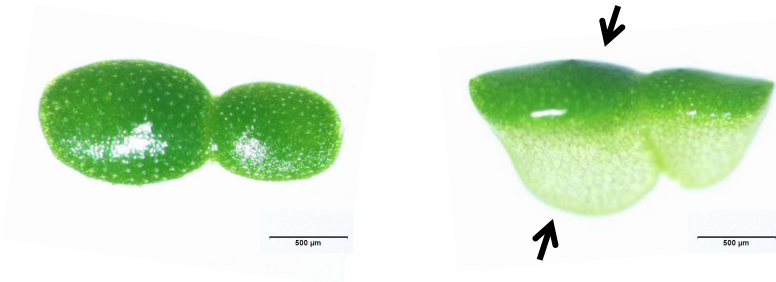


Figure 1 带分枝微萍的形态

带分枝的 *Wolffia australiana* 个体，上下箭头分别指示个体背面和腹面。



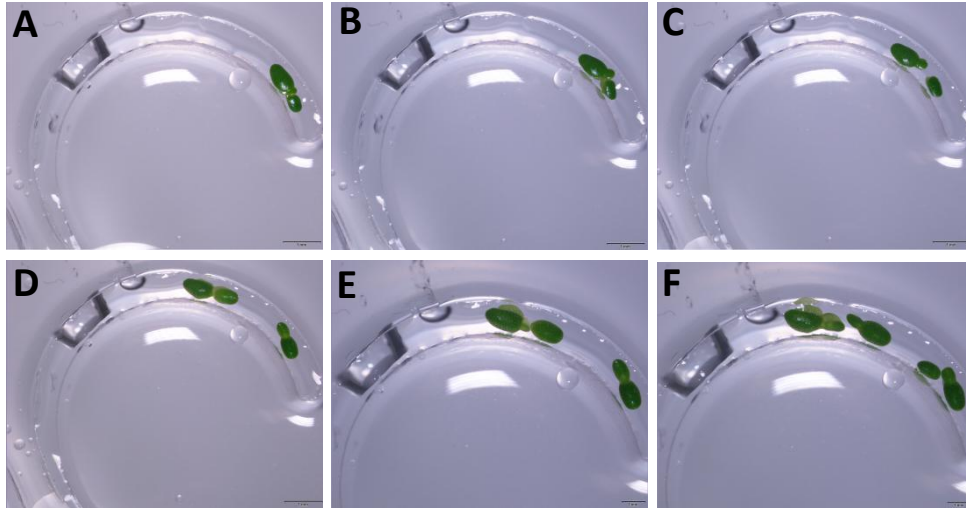


Figure 2 微萍的生长过程

A-E 为单个微萍个体放入微流沟槽后的分枝过程，即最先放入的带分枝个体逐渐移向两端，新个体的不断向中间生长分枝。

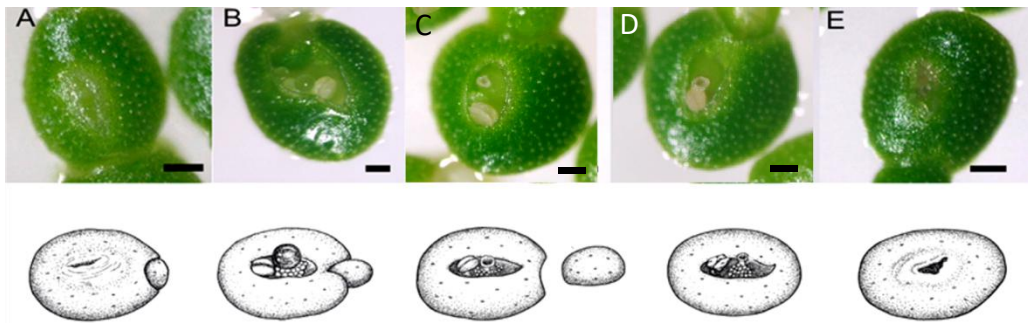


Figure 3 体式显微镜下微萍生殖生长过程

A 微萍上表面中央位置出现明显白色区域或细微裂口；B 雌蕊探出，表面有液滴状分泌物；可见未发育完全的雄蕊；C 雌蕊表面液滴消失，雄蕊呈淡黄色；D 雌蕊与雄蕊均变为黄棕色，皱缩，有枯萎迹象；E 雌蕊与雄蕊彻底枯萎，裂口开始愈合

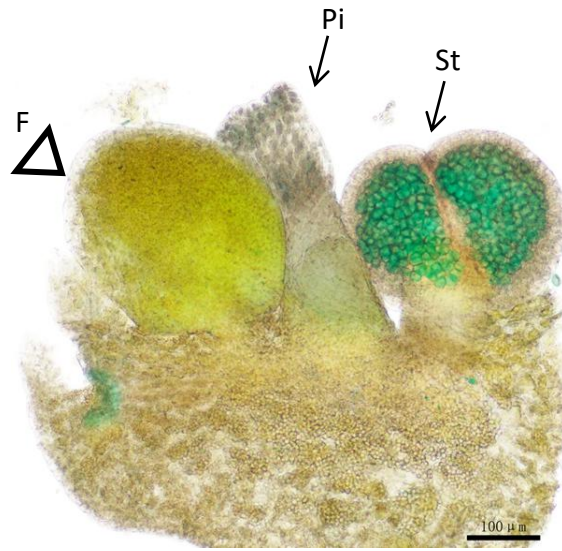


Figure 4 微萍花器官

微萍花器官经透明处理后染色, St (stamen) 为雄蕊 (绿色部分为经染色的花粉粒)、Pi (pistil) 为雌蕊、F (frond) 为微萍内部的新分枝 (黄色染色部分)。

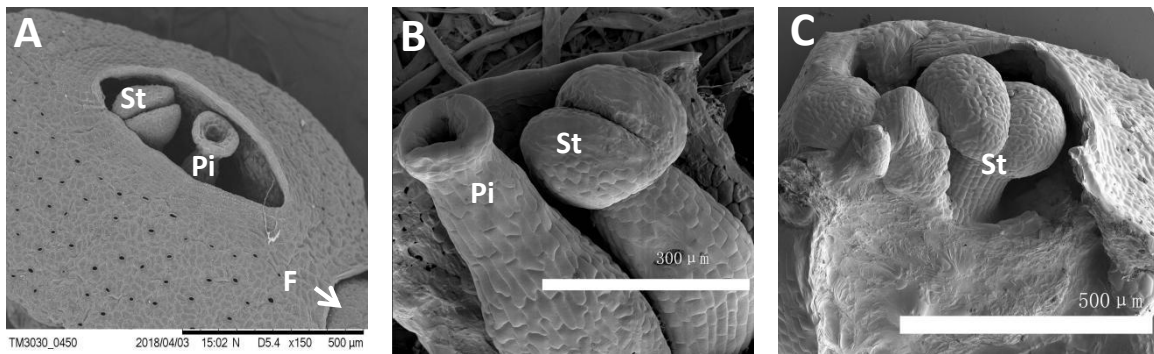


Figure 5 扫描电镜下微萍花器官结构

F (frond) 为新产生的分枝; St (stamen) 为相对于新分枝 (F) 内侧发育的雄蕊; Pi (pistil) 为相对于新分枝 (F) 外侧发育的雌蕊。

## 2.2 激素单独使用对微萍诱导开花及分枝速率的影响

### 2.2.1 EDTA 诱导 *Wolffia australiana* 开花及对分枝速率的影响

EDTA (乙二胺四乙酸) 是常见螯合剂, 能与  $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$  等二价金属离子结合形成稳定的水溶性络合物, 在植物研究中可被用于消除微量重金属导致的酶催化反应中的抑制作用[13]。

EDTA 可诱导 *Wolffia microscopica* 开花, 可能是由于 EDTA 螯合了其中某些关键的金属离子, 如二价铜离子[14]。

实验室所培养的 *Wolffia australiana* 在 1/2MS 培养基中生长, 在不添加任何激素的情况下, 无开花现象。在添加了浓度梯度为  $10^{-3} M \sim 10^{-8} M$  的 EDTA 后, 除  $10^{-3} M$  高浓度对其生长速率产生明显抑制作用, 其余浓度生长速率基本与对照组一致 (Figure 6-a)。EDTA 处理五天后有个体开花, 第十四天时  $10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M$  开花数量均在 5 个以上, 最高比例均超过 10%。 $10^{-3} M$  诱导开花比例最高达到 17%,

(Figure 6-b,c) 综合 *Wolffia australiana* 的生长情况及开花情况, 我们选取  $10^{-4} M$  EDTA 为最适诱导浓度。

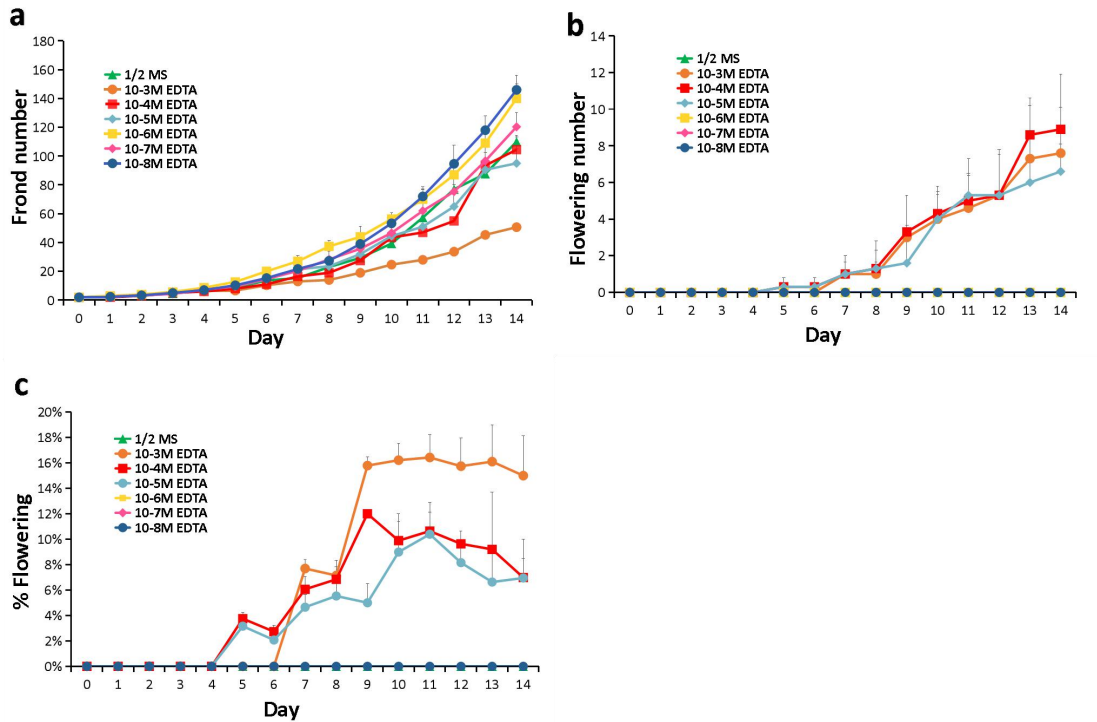


Figure 6 EDTA 诱导 *Wolffia australiana* 开花 (a) 生长速率  
 (b) 开花数目, (c) 开花比例

### 2.2.2 SA 诱导 *Wolffia australiana* 开花及对分枝速率的影响

水杨酸 (Salicylic acid, SA) 在植物对干旱、寒冷、重金属中毒、高温和非生物胁迫的响应过程中起着重要调节作用[15], 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[16], 对其他植物的开花也有相应调节作用[17]。

实验中 SA 处理浓度范围为 10<sup>-5</sup> M~10<sup>-9</sup> M, 从结果来看, SA 对 *Wolffia australiana* 的生长速率有非常明显的抑制作用 (Figure 7-a), 但诱导开花比例较高, 10<sup>-5</sup> M SA 开花比例可达到 30%。(Figure 7-b,c)

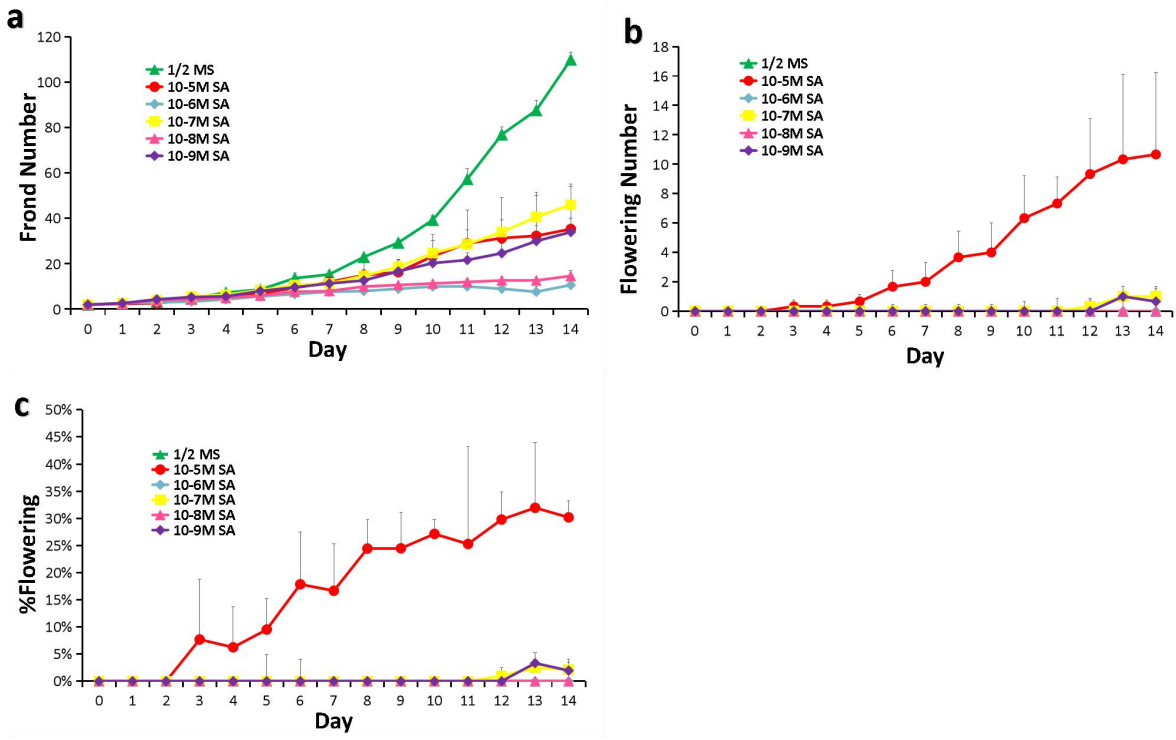


Figure 7 SA 诱导 *Wolffia australiana* 开花 (a) 生长速率  
 (b) 开花数目, (c) 开花比例

### 2.2.3 GA3 诱导 *Wolffia australiana* 开花及对分枝速率的影响

赤霉素 (Gibberellin, GA) 可通过解除蛋白的转录抑制因子对开花关键基因的抑制来促进植物开花[18], 广泛运用于农业生产。我们实验中使用了赤霉素中的 GA3。GA3 浓度梯度设置为 10<sup>-3</sup>M~10<sup>-8</sup>M, 经过重复实验, 我们发现 10<sup>-3</sup>M 与 10<sup>-6</sup>M GA3 均对 *Wolffia australiana* 的生长速率产生了抑制作用, 其他浓度的生长速率则与对照组基本一致 (Figure 8-a)。GA3 诱导开花的个数及比例均处于较低水平, 开花比例基本在 5%以内 (Figure 8-b,c)。因而 GA3 单独使用不适合诱导 *Wolffia australiana* 开花。

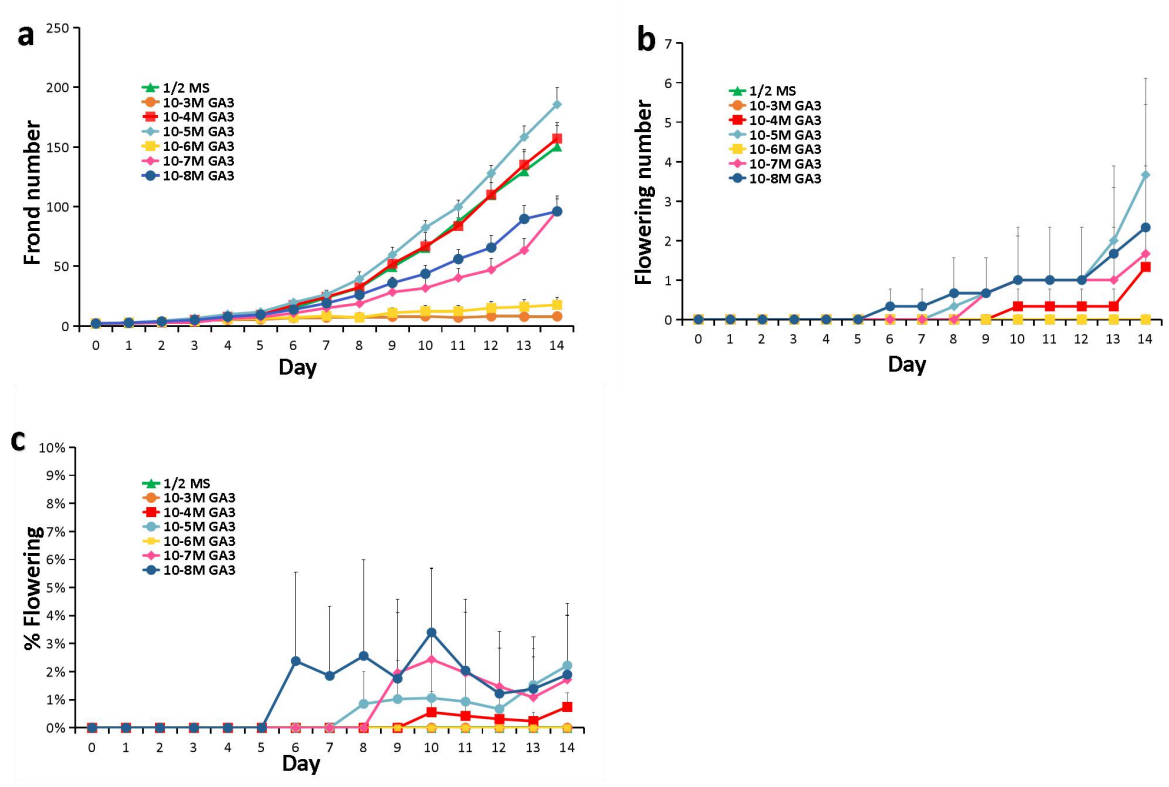


Figure 8 GA3 诱导 *Wolffia australiana* 开花 (a) 生长速率, (b) 开花数目, (c) 开花比例

## 2.3 激素组合使用对 *Wolffia australiana* 诱导开花及分枝速率的影响

植物激素间普遍具有复杂的相互作用关系。为探究以上三种诱导微萍开花的化学物质之间互作关系, 找到更加高效的诱导开花处理方式, 我们对这些化学物质进行组合来诱导 *Wolffia australiana* 开花。

### 2.3.1 EDTA 与 SA 组合诱导 *Wolffia australiana* 开花及对分枝速率的影响

基于实验上一阶段单独添加激素的处理结果, 选取 EDTA 的最适浓度为  $10^{-4}$  M, SA 的最适浓度为  $10^{-5}$  M 和  $10^{-6}$  M 进行组合处理。由于激素浓度过高, 对 *Wolffia australiana* 的生长产生的抑制作用过大, 即使有开花个体, 所处理的 *Wolffia australiana* 在五天以内全部死亡。为减少高浓度激素处理所带来的影响, 我们改用 EDTA  $10^{-4}$  M 与 SA  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M 处理, 14 天后 *Wolffia australiana* 生长状态良好且达到较高开花比例 (Figure 9-a,b,c)。实验结果表明, EDTA  $10^{-4}$  M 与 SA  $10^{-7}$  M 为最适组合, 开花比例达到 25% (Figure 9-c)。

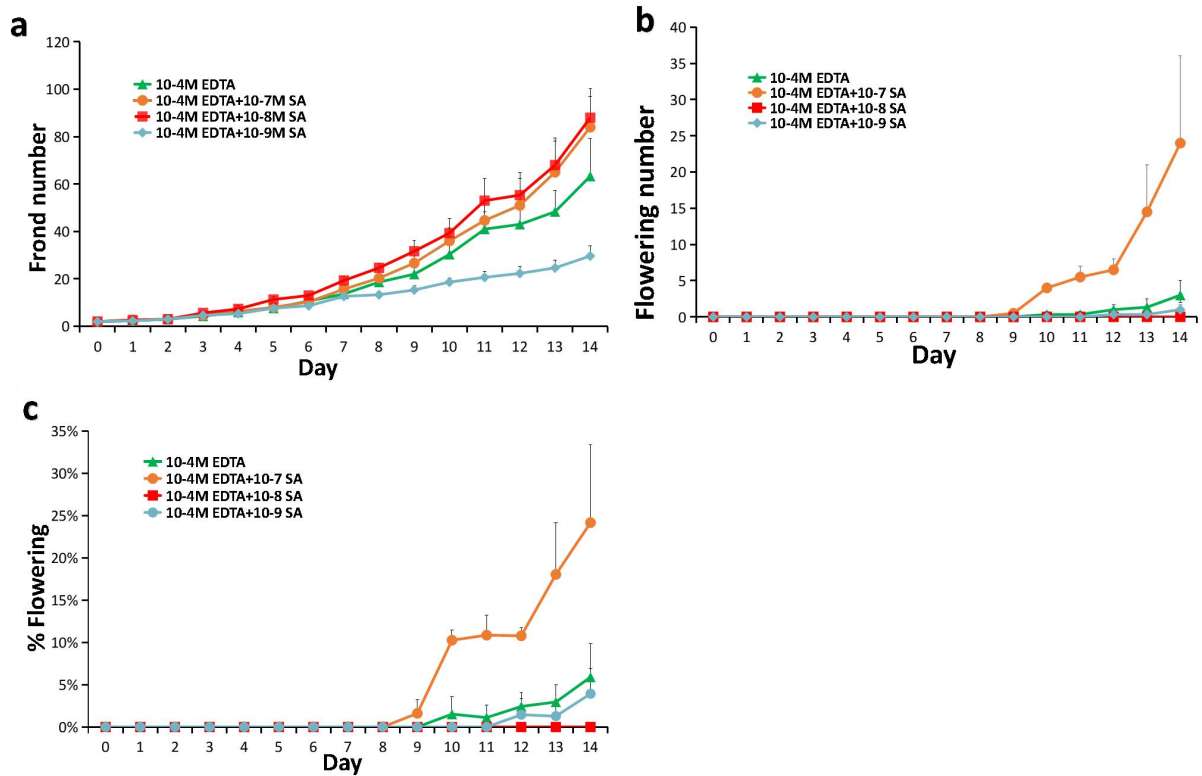


Figure 9 EDTA 与 SA 诱导 *Wolffia australiana* 开花 (a) 生长速率, (b) 开花数目, (c) 开花比例

### 2.3.2 EDTA 与 GA3 组合诱导 *Wolffia australiana* 开花及对分枝速率的影响

EDTA  $10^{-4}$  M 与 GA3  $10^{-4}$  M,  $10^{-5}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M 处理后 *Wolffia australiana* 的分枝速率, 开花个数及比例多数高于  $10^{-4}$  MEDTA 单独处理 (Figure 10-a, b, c)。其中 EDTA  $10^{-4}$  M 与 GA3  $10^{-5}$  M 达到正常生长和 25%高比例开花, 为最适组合。(Figure 10-c)



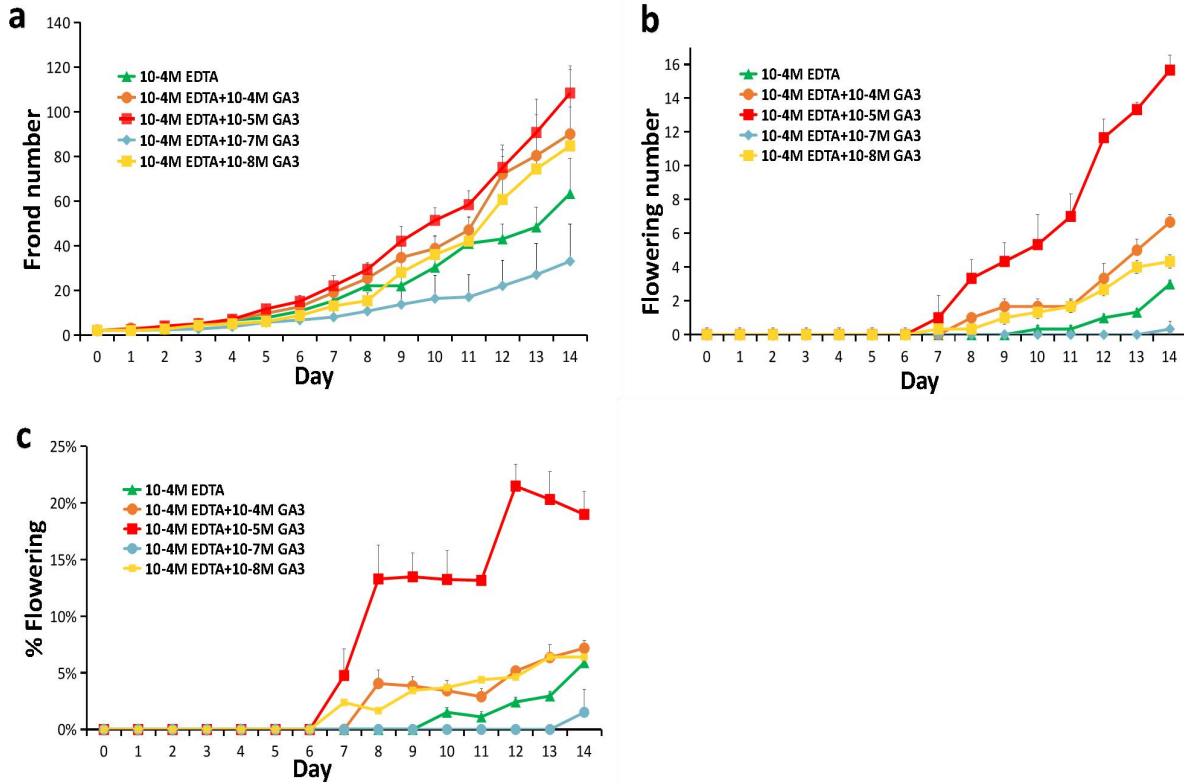


Figure 10 EDTA 与 GA3 诱导 *Wolffia australiana* 开花 (a) 生长速率, (b) 开花数目, (c) 开花比例

### 2.3.3 GA3 与 SA 组合诱导 *Wolffia australiana* 开花及对分枝速率的影响

SA  $10^{-7}$  M 与 GA3  $10^{-4}$  M,  $10^{-5}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M 处理, *Wolffia australiana* 的生长受到与 SA 单独处理同样的明显抑制, 且没有开花个体 (Figure 11-a)。因此我们认为 SA 与 GA3 组合处理效果较差。

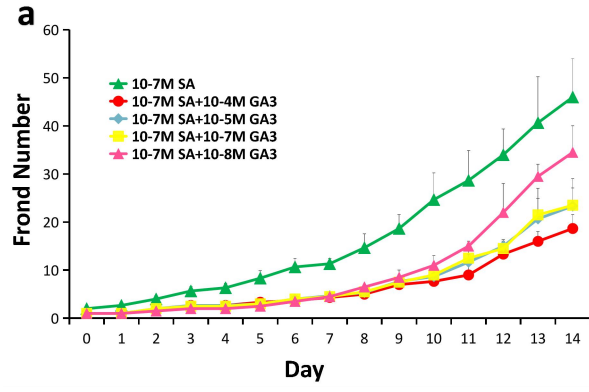


Figure 11 SA 与 GA3 诱导 *Wolffia australiana* 开花 (a) 生长速率, (b) 开花数目, (c) 开花比例

## 2.4 基于微流技术建立微萍培养体系

微流技术的优点在于可以准确根据 *Wolffia australiana* 在沟槽中的位置判断其生长时间、分枝状况, 且具有高效、集成化的特点, 可以同时进行多组对照实验。我们基于此设计了微流平台的微萍培养体系 (Figure 12), 实现了首次在微流平台上培养植物个体。我们根据单个 *Wolffia australiana* 的个体大小, 设计了比单个叶状体略宽的沟槽 (宽约 0.9mm) 保证微萍沿沟槽分枝生长; 并与控温和光照培养系统、显微拍摄等结合, 构建了实时追踪监测微萍生长状况的微流动培养与记录系统 (Figure 13)。通过对最佳的培养条件的摸索, 筛选探究了人工诱导开花的方式, 并尝试在人工环境下完成微萍生活周期控制。

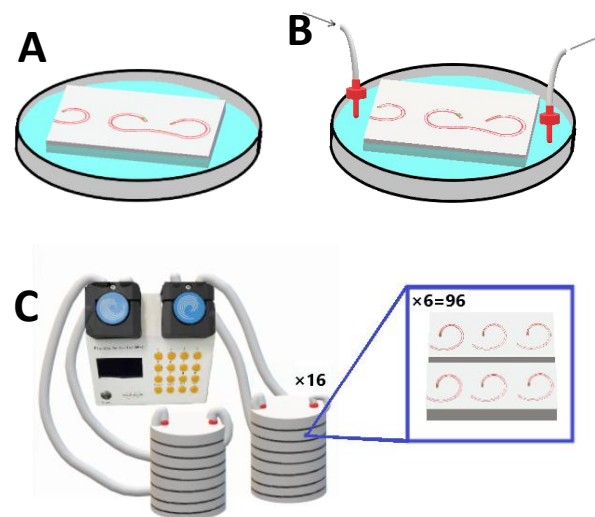


Figure 12 微流培养体系使用示意图

(a) 将微流平台置于培养基中。(b) 将传统的培养皿通过软管和直径约 2mm 的接头连接在微流蠕动泵上, 以控制液体流速和培养条件的一致性。(c) 单个蠕动泵可连接多组微流平台, 体现微流培养体系的高效性。

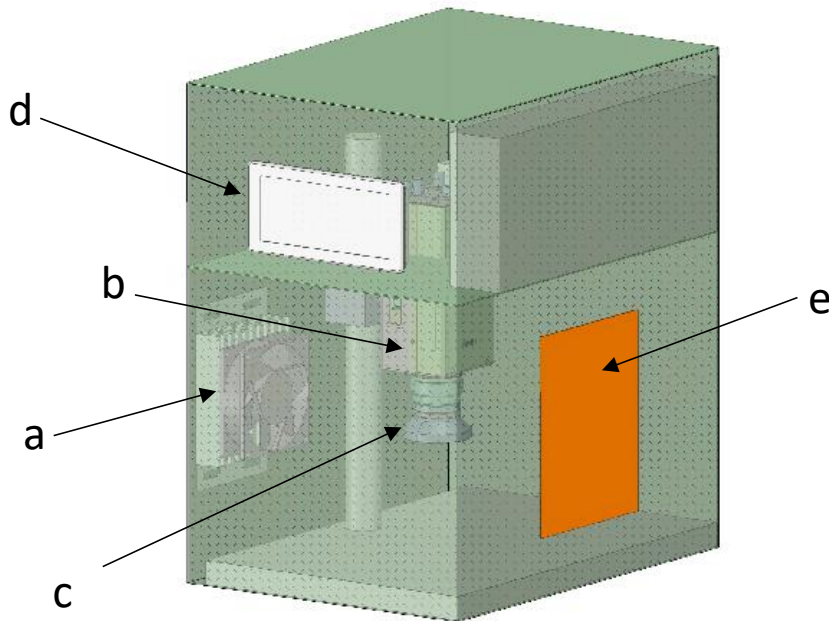
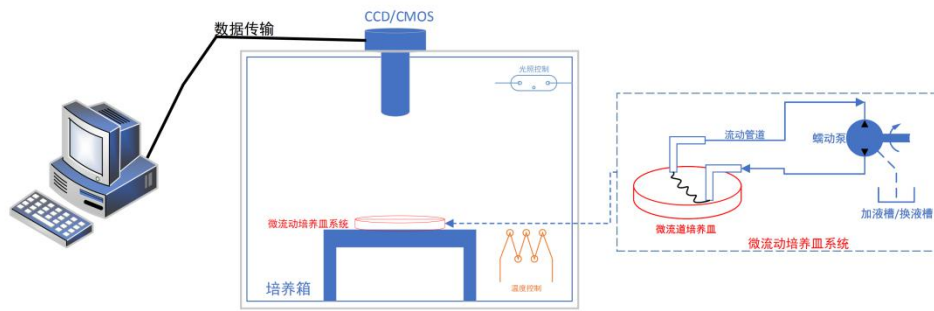


Figure 13 微流培养与记录系统

(a) 内置温度控制系统（加热器）与光照控制系统（LED 灯带）对培养箱内的温度和光照强度及时间进行调控。（b）（c）高清摄像头和电子显微镜镜头可采集微流培养皿系统动态视频，通过传输线传输到电脑。（d）触屏控制器可实时设置和更改系统内的培养条件。（e）舱门可便于放入和调整微流培养皿。

为了探究 EDTA 在不同阶段诱导微萍开花对基因表达的影响，我们利用微流培养体系对单个 *Wolffia australiana* 个体进行追踪和定位，用  $10^{-4}$  M EDTA 诱导 6 天实现部分微萍开花，并设计实验，在 1/2MS

对照组（Control）、EDTA 处理后开花组（Flower）和距离开花个体不同位置的诱导组（Induce）中各取 5 个个体作为重复；结合 RNA-seq 技术对于诱导开花不同阶段的 *Wolffia australiana* 以及未经 EDTA 处理的对照组个体进行单个微藻测序，进而检测其不同阶段基因表达的变化（Figure 14）。

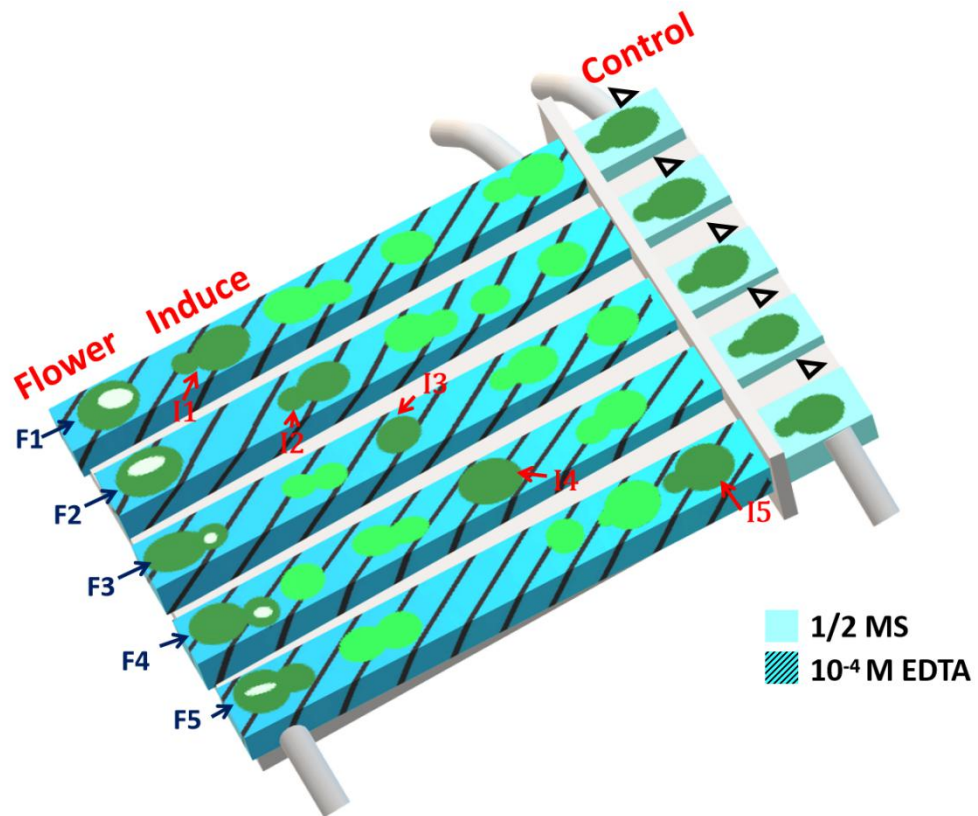


Figure 14 *Wolffia australiana* 测序实验设计示意图

深绿色个体为 *Wolffia australiana* 测序样品个体，其中三角指示为 5 组未经 EDTA 处理的对照个体 C1-5；F1-5 为开花个体；I1-5 为经  $10^{-4}$  M EDTA 诱导而未开花的个体，分别位于微流沟槽中距开花个体不同距离的位置。此外，由两侧到中间分枝脱离母体的时间依次变长，可推测 EDTA 的有效作用阶段。

## 2.5 单个微萍的少量细胞测序与表达谱分析

微流平台上的微萍开花诱导实验完成后, 由合作的北京大学汤富酬实验室进行了单个微萍的少量细胞测序、建库工作。由于汤富酬老师实验室在单细胞测序领域具有很强技术优势, 我们获得了高质量 RNA 与文库。其中 2 组生物重复样品已经完成测序工作。微萍基因组测序工作正在进行当中, 只完成了初步的组装工作, 根据我们目前基因组测序结果, 微萍基因组包含 2 万多个基因 (合作实验室未发表数据)。由于现阶段还没有完整、可靠的基因注释信息, 所以我们选择了未测序物种 RNA-seq 的分析策略: 使用现有的测序结果 (转录组序列 reads) 拼接成一个转录组, 理论上包括一个微萍所有基因的转录本。由美国范德堡大学的陈锐老师进行了测序结果质量分析, 将每个样本 (Control1-2, Induce1-2, Flower1-2) 的 reads 回帖到这个拼接好的转录组中。从结果看, 我们送测的样品具有比较好的重复性 (Figure 15)。下一步将把回帖好的 reads 进行基因定量差异表达分析进一步的功能分析。根据这些参考信息, 我们将对微流平台上进行的微萍诱导开花实验做出更加合理的改进, 调整实验中的取样时间点, 研究诱导开花的早期关键调控因子。

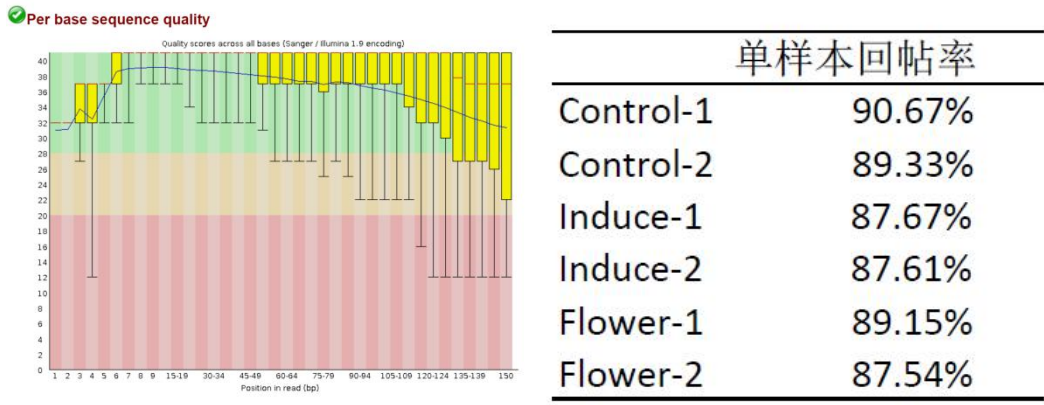


Figure 15 单个微萍测序实验部分的 RNA-seq 质量分析

(a) RNA-seq 中 reads 的质量分析, 来自美国范德堡大学陈锐实验室。(b) 两组送测样本有接近 90%的回帖率, 每组测到的 reads 都倾向于来自于一个转录组, 表明转录组拼接质量很好, 根据陈锐实验室分析数据整理。

## 2.6 EDTA 处理前后 *Wolffia australiana* 中元素含量的测定

EDTA 处理对 *Wolffia australiana* 诱导开花作用显著, 但是 EDTA 对植物开花的作用机制了解的很少。EDTA 作为螯合剂, 可与金属离子发生螯合作用导致其金属元素含量改变。为探究 EDTA 如何诱导 *Wolffia australiana* 开花, 是否与特定金属元素含量的变化有关, 我们对 EDTA 处理后 *Wolffia australiana* 中金属元素含量变化进行了定量分析。

经 EDTA 处理后, *Wolffia australiana* 体内金属元素含量普遍降低, 锌元素含量减少最为显著, 约为原来的 40% (Figure 16), 其减少量也是最多的 (Figure 17), 减少量为 171  $\mu\text{g/ml}$ ; 钠元素和锰元素减少比例均为 20%; 镁元素减少比例约 10%; 而硼元素比例增加了 15%, 铁元素和钙元素也有一定增加, 比例均小于 50%。此外, 我们在 *Wolffia australiana* 中并未检测到铜元素, 这说明 Satish C. Maheshwari 和 O. S. Chauhan 对 EDTA 的作用机理与铜离子有关的猜测[14]与实验结果不符。微量金属元素含量变化的实验结果, 为我们分析表达谱测序结果提供了极其有力的证据支持。我们将重点分析与以上金属元素密切相关的蛋白质家族。比如具有锌指结构的蛋白家族基因, 参与光合作用的  $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  离子相关基因等等。



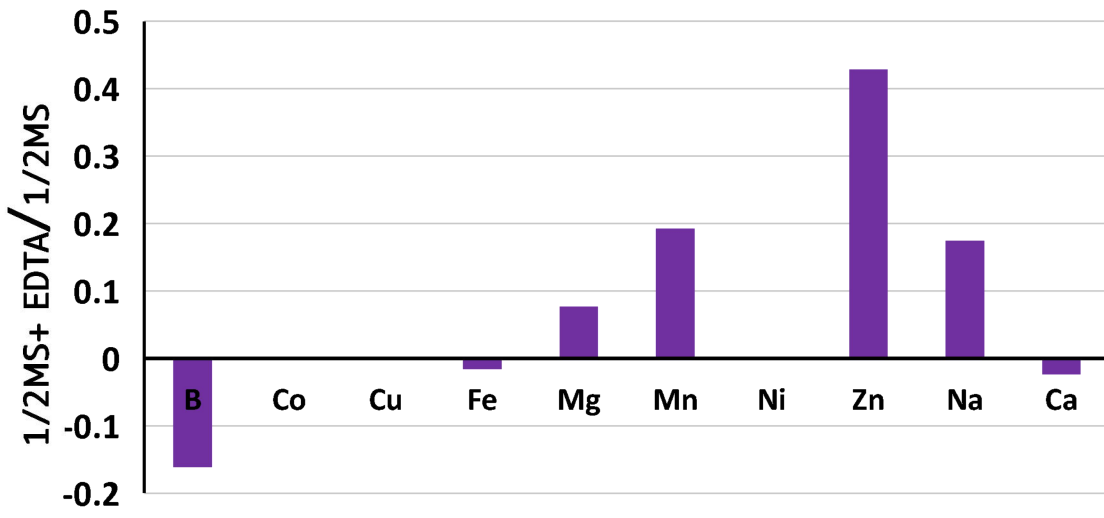


Figure 16 *Wolffia australiana* 经 EDTA 处理后各元素减少比例

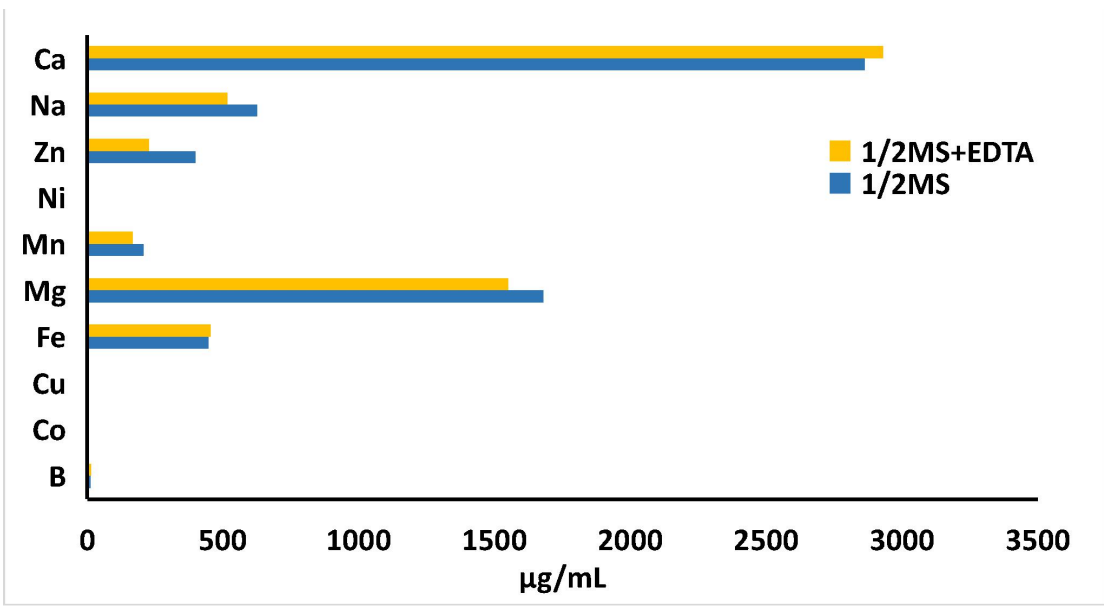


Figure 17 *Wolffia australiana* 经 EDTA 处理后各元素含量的变化

### 三、讨论

通过细致的形态观察和生理实验, 我们探究了经不同浓度 EDTA, SA, GA3 单独及组合处理后 *Wolffia australiana* 形态变化, 生长速率和开花比例的不同, 从而确定了开花比例为 25% 的  $10^{-4}$  M EDTA 与  $10^{-7}$  M SA 组合处理为 *Wolffia australiana* 诱导开花最适处理, 为微萍成为模式生物在诱导开花这一过程摸索出了稳定可靠的处理办法。另外, 我们对微流培养系统上开花诱导不同阶段的 *Wolffia australiana* 进行了单个微萍测序, 分析了样品质量, 从而进一步改善实验设计、探索开花诱导的关键基因调控; 我们还测定了 EDTA 处理前后 *Wolffia australiana* 体内金属元素含量的变化 推测  $Zn^{2+}$  的显著减少可能是其诱导 *Wolffia australiana* 开花的原因之一, 为寻找调控植物开花的新途径基因提供重要线索。

以往实验室通常在三角瓶内培养微萍, 但微萍个体微小, 常聚集漂浮在水面上, 这种培养方法即难于细致观察乃至追踪微萍个体的生长, 又占用大量空间, 极为不便。微流平台有高通量、集成化的优势, 建立微萍微流平台培养体系, 不仅能精确追踪单个微萍的生长发育历程, 为微萍研究打开新思路, 又可以高效实现微萍大规模培养, 节约实验空间和实验时间。微流技术在生物学研究中的应用多集中在细胞培养和分子生物学方面, 微萍是首次在微流系统下培养的多细胞生物, 我们成功地在微流平台上获得了 *Wolffia australiana* 开花个体, 并实现了单个微萍生长发育全过程的观察和记录, 为建立微萍为模式生物提供了非常宝贵的资料。

微萍个体微小, 结构简单, 生活周期过程中有且仅有一个合子、孢子和配子的单向过程, 生活周期存在植物发育的核心事件[19]。从微萍的形态结构和生活史这两点看, 微萍符合单个植物发育单位的概念, 在现代植物学中, 要真正了解多细胞生物形态建成、完成胚胎发生过程对个体形态建成的“发生原因”的探索、研究植物真正的发育单位并探究其调控机制的整体过程, 或许微萍在未来会给我们答案。

## 四、实验材料和方法

1. *Wolffia australiana* (澳大利亚微萍), 来自中国科学院水生生物研究所, 在人工培养箱中培养。人工培养箱 (Panasonic, MLR-352H-PC), 温度为 26°C, 8h 光照/16h 黑暗, 光强 22000lux。

### 2. 培养基配置

MS 粉末 (sigma), 蔗糖 (北京化工厂)。配制 1/20MS 1%蔗糖培养基, pH 计 (sartorius) 调约为 7-8, 都经过高温灭菌锅 (MLS-3781L-PC) 121°C, 15min 高温灭菌。

### 3. 试剂

EDTA, SA, GA3 处理

培养皿 (90mm 直径) 中加入 20mlMS 培养基, 分别滴加一定量的 0.1%M 或 0.04%M 的激素母液配置成  $10^{-3}$ ~ $10^{-9}$ M 溶液。激素与培养基充分混合后, 从 MS 培养环境下移入一个连有下一分枝的微萍, 记为 2 个, 作为第 0 天。每个浓度梯度做三组重复实验。微萍个体数及开花数每天统计 1 次, 统计 14 天, 最后根据每个梯度三组重复的平均数, 制作出分枝速率曲线图, 开花数量图及开花比例图。最后综合 *Wolffia australiana* 的生长状态, 分枝速率及开花比例选择适合 *Wolffia australiana* 诱导开花的培养条件。

### 4. 视频拍摄

*Wolffia australiana* 在微流中置于体视镜 (olympus, SZ2-ILST) 下对焦拍摄。设置拍照间隔为 10min, 总时长 72-168h。

### 5. 视频列表

Video 1 The growth process of *Wolffia australiana*. 24h 7200X, 标尺 1mm

Video 2 *Wolffia australiana* individual flowered on microfluidic platform.

32h 7200X, 标尺 1mm

## 6. 材料固定与扫描电镜

① FAA 固定（100%酒精：50ml，37-40%甲醛：10ml，乙酸：5ml）。

固定的步骤包括：取材并将材料浸泡在固定液中（醛类固定剂）；使用真空泵温和地抽气，直到材料沉入固定液内；固定 12-24 小时，中间换一次固定液。

② 脱水：过程逐级进行，一般的程序如下：50% 乙醇 20-30min；70% 乙醇 20-30min；90% 乙醇 20-30min；100% 乙醇两次，每次 20-30min。

③ 临界点干燥：材料转移到无水硫酸铜-酒精溶液中，放入样品篮，酒精没过材料，全程过程中材料不能干燥。

④ 喷金 90s：15nm 厚度（需要相对较厚，避免电导过低或不均匀）

⑤ 扫描电镜（Hitachi TM3030）拍照。

## 五. 致谢

感谢李峰老师对我们的悉心指导与帮助, 他不仅教授我们如何进行科学研究, 还一直鼓励我们主动思考、敢于质疑; 并在论文写作中认真地给予我们指导。

感谢北京大学白书农实验室在实验过程中的指导和无私帮助。感谢北京大学汤富酬实验室的单个微藻基因测序以及建库的技术支持。感谢美国范德堡大学的助理研究员陈锐老师帮助我们分析测序结果, 提供了高质量的数据。感谢北京大学化学学院仪器中心的张莉老师帮助我们进行痕量元素的测定。感谢中国科学院水生生物研究所提供的微藻材料。

## 参考文献:

1. Wang,WQ,et al., Evolution of Genome Size in Duckweeds (Lemnaceae).[J].*Journal of Botany*, 2011: 9 pages.
2. Appenroth,K.J., et al., Nutritional Value of the Duckweed Species of the Genus *Wolffia* (Lemnaceae) as Human Food.[J].*Front Chem*,2018,00483:483.
3. Piotrowska,A., et al., Changes in growth, biochemical components, and antioxidant activity in aquatic plant *Wolffia arrhiza* (Lemnaceae) exposed to cadmium and lead.[J].*Arch Environ*,2010,Apr58(3):594-604.
4. Khvatkov,P ., et al., Development of *Wolffia arrhiza* as a Producer for Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor.[J].*Front Chem*,2018,00304:304.
5. Florence A. B.& John M. B., Flower structure, anatomy and life history of *Woiffiia australiana* (Benth.) den Hartog & van der Plas.[J].*Bulletin of the Torrey Botanical Club*,1990,117(1):18-26.
6. Sreea,K.S., et al., The duckweed *Wolffia microscopica*. A unique aquatic monocot![J].*Flora* ,2015 (210): 31–39.
7. Mahesttwari,S.C.&Chauhan,D.C., IN vitro Control of Flowering in *Wolffia*

- microscopica*.[J].*Nature*,1963,4375:99-100.
8. Mahesttwari,S.C. & Nikataraman,R.V., Induction of Flowering in a Duckweed -- *Wolffia microscopica* -- By a New Kinin,Zeatin.[J].*Planta*,1966,70:304--306.
  9. 黄青.无根萍生物学特性研究.[D].中科院植物研究所博士学位论文, 2007
  10. 白书农. 2003. 植物发育生物学. 北京. 北京人学出版社.
  11. Leslie,Y.Y., et al., Microfluidic Devices for Bioapplications.[J].*Biomicrofluidics*,2011, 7(1):12-48
  12. Streeats,A.M. & Huang,Y.Y.,Chip in a lab:Microfluidics for next generation life science research.[J].*Biomicrofluidics*,2013,7(011302):23-46.
  13. Whitesides,G.M.,The origins and the future of microfluidics.[J].*Nature*,2006,442:368-374.
  14. Satish C. Maheshwari & O. S. Chauhan, In vitro Control of Flowering in *Wolffia microscopica*. [J].*Nature* ,1963,198, 4875, 99-100.
  15. Mariana Rivas.,et al.,Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development , [J]*Experimental Botany*, 2011,Vol. 62,No. 10,3321-3338.
  16. Khurana J.P.&Maheshwari S.C .Floral induction in *Wolffia microscopica* by salicylic acid and related compounds



under non-inductive long days. [J].The Plant Cell ,1983,  
24 (5): 907-912.

17. Wada K.C., Takeno K., Salicylic Acid: Plant Growth and Development. [J]. New York: Springer, 2013, 163~182.
18. Wang, X.B., et al., Gibberellin Controls Arabidopsis Floral Transition through miR156-Targeted SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE Transcription Factors, [J]. The Plant Cell , 2012, Vol 24: 3320-3332.
19. 孟海奇. 利用微流培养体系实现微萍生活周期控制. [D]. 北京大学硕士研究生学位论文, 2010

## 学术诚信声明

本参赛团队声明所提交的论文是在指导老师指导下进行的研究工作和取得的研究成果。尽本团队所知,除了文中特别加以标注和致谢中所罗列的内容以外,论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果。若有不实之处,本人愿意承担一切相关责任。

参赛队员:

阿丝娜

齐乐遥

指导老师:

李峰

2019年9月15日