

DOI: 10.13376/j.cblls/2020014

文章编号: 1004-0374(2020)02-0100-10

· 评述与综述 ·

浮萍合成生物学研究进展

唐娅丽^{1,2}, 于昌江², 刘宇², 王宇², 周功克², 杨军¹, 马玉彬^{2,3*}, 杨在君^{1*}

(1 西华师范大学西南野生动植物资源保护教育部重点实验室, 南充 637009; 2 中国科学院青岛生物能源与过程研究所生物燃料重点实验室, 青岛 266101; 3 中国海洋大学海洋生物遗传学与育种教育部重点实验室, 青岛 266003)

摘要: 随着浮萍基因组和转录组数据的不断获得, 以及高效稳定的浮萍遗传转化和基因编辑体系的建立, 以浮萍为底盘的表达系统已经成功表达了多种外源蛋白, 浮萍有望成为植物合成生物学的研究热点。现简要介绍浮萍的基本信息, 对浮萍科植物的基因组和转录组信息、遗传表达体系、浮萍合成生物学使能技术和合成的外源蛋白进行概述, 同时简要总结浮萍合成生物学的优势, 对浮萍合成生物学未来的发展前景进行展望。

关键词: 浮萍; 合成生物学; 遗传转化; 蛋白质

中图分类号: Q943.2; Q948.8 **文献标志码:** A

Advances in synthetic biology of duckweed

TANG Ya-Li^{1,2}, YU Chang-Jiang², LIU Yu², WANG Yu², ZHOU Gong-Ke²,
YANG Jun¹, MA Yu-Bin^{2,3*}, YANG Zai-Jun^{1*}

(1 Key Laboratory of Southwest China Wildlife Resources Conservation (Ministry of Education), China West Normal University, Nanchong 637009, China; 2 Key Laboratory of Biofuels, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, China; 3 Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: With the accumulation of more and more duckweed genome and transcriptome information, as well as establishment of efficient and stable duckweed genetic transformation systems and gene editing systems, duckweed-based expression systems have successfully expressed a variety of foreign proteins, indicating that duckweed could be considered as an important candidate for plant synthetic biology. This paper briefly introduces the basic information of duckweed, reviews the genome and transcriptome information, genetic expression system, technology used in duckweed synthetic biology and expressed proteins in duckweed plants, and briefly summarizes the advantages of duckweed synthetic biology, at last looks forward to the future development of duckweed synthetic biology.

Key words: duckweed; synthetic biology; genetic transformation; protein

1980年, 德国科学家芭芭拉·荷本在描述基因工程菌时采用了“合成生物学”一词^[1], 这是其第一次作为正式学术名词出现。合成生物学是基于工程化的原理, 设计和改造自然界中已有的生命系统, 或从头构建自然界没有的人造生命装置或体系^[2]。经过多年的研究, 合成生物学在高端制造、精准医疗和农业生产等领域展现了巨大的应用前景。目前, 在微生物中已经实现了多种天然产物及其前体物质

的人工从头合成^[3]。与此同时, 国内外多个科研团队依次实现了酵母基因 Sc2.0、酵母 4 条染色体的

收稿日期: 2019-12-18; 修回日期: 2020-01-09

基金项目: 国家自然科学基金联合基金项目(U1632140); 中国科学院重点部署项目(ZDRW-ZS-2017-2-1); 中国科学院STS区域重点项目(KFJ-STQ-QYZX-018)

*通信作者: E-mail: mayubin@ouc.edu.cn (马玉彬); yangzaijun1@126.com (杨在君)

人工合成, 并第一次人工创建了单条染色体的酵母细胞^[4-5]。

随着研究的发展与深入, 植物合成生物学应运而生。相较于微生物, 植物为多细胞生物, 其丰富的内膜系统、细胞器和植物体表的腺毛构成了复杂的时空特性, 为众多酶和代谢物的合成提供了所需的基础^[2]。外源蛋白在植物体内的表达一直是植物合成生物学的研究热点, 随着转基因技术和基因编辑技术的发展以及基因组和转录组测序数据的大量获取, 烟草、玉米、水稻、马铃薯、浮萍、微藻、植物细胞悬浮系统和毛状根等成为了植物合成底盘的重点研究对象。与以动物和微生物为底盘的合成生物学相比, 植物合成生物学在表达外源蛋白方面具有突出的优势, 包括方法简单、成本低廉、易于规模化生产、储藏和运输方便等, 既能对表达蛋白进行翻译后折叠和糖基化修饰, 又没有感染人类病原或毒素的风险, 成为表达外源蛋白的理想选择之一^[6]。为了有效地生产外源蛋白, 选择宿主物种非常重要。相较于其他植物, 浮萍因具有生命周期短、生物量高、生产成本低、非粮作物、可食用等优点, 成为了植物合成生物学的理想底盘之一。本文主要对浮萍合成生物学的研究进展进行概述, 并展望了浮萍合成生物学未来的发展前景。

1 形态与分类

浮萍是浮萍科植物的总称, 属于被子植物门(Angiosperm), 单子叶植物纲(Monocotyledons), 槟榔亚纲(Arecidae), 天南星目(Arales), 浮萍科(Lemnaceae)^[7]。浮萍科植物都是小型的自由漂浮的淡水植物, 是世界上最小的开花植物, 也是已知的形态退化最严重的植物^[8]。浮萍分布广泛, 除了南极和北极地区外, 在全球范围均有分布^[9]。浮萍共有5属: 青萍(*Lemna*)、多根紫萍(*Spirodela*)、少根紫萍(*Landoltia*)、芜萍(*Wolffia*)和无根芜萍(*Wolffiella*), 共38种^[10]。中国有4个属: 青萍、多根紫萍、少根紫萍和芜萍, 共12种^[11]。紫萍属和青萍属由一个叶片、一朵花和一条或多条根组成, 根的数量因品种而异; 芜萍的形态进一步退化且具有多样性, 由细小的叶片和单一的一朵花组成, 甚至没有根^[8]。

2 生长习性

浮萍进行无性繁殖, 通过从母叶片中分裂出新叶片的方式来产生子代, 同时通过根和叶片直接从空气中吸收CO₂、从水中吸收氮磷等营养物质^[8]。

浮萍生长的最适温度和pH因品种不同而有所差异, 最适温度范围为23~26℃, 最适pH范围为4.5~7.2^[8]。浮萍生长迅速, 一般情况下, 浮萍生物量1~2d增加一倍, 最短为20~24h, 浮萍的品种和培养环境是影响浮萍生物量倍增的主要因素^[12-13]。研究表明, 在实验室条件下, 浮萍生物量积累可达每周1~2kg/m²^[14]。在温室条件下, 浮萍的生物量积累也可达每周1kg/m²(鲜重)^[15]。Cheng等^[16]的研究表明, 在野外条件下, 浮萍生物量积累达到了每周0.2kg/m²(干重)。浮萍的干鲜重比因品种和生长条件而异, 干重通常为鲜重的6%~20%^[14,17]。据报道, 在不同的生长条件下, 大多数浮萍蛋白质含量为干重的15%~45%^[18-19], 介于苜蓿(20%)和大豆(41.7%)之间^[20]。

3 浮萍的遗传背景

浮萍每个体细胞核的DNA含量因品种不同而存在较大的差异, 为1.2~6.5pg, 从而导致了浮萍染色体数目因品种不同而存在变化^[14]。Mardanov等^[21]在2008年获得了青萍*Lemna minor*叶绿体基因组测序结果及信息, 并对其与其他被子植物的亲缘关系进行了比较。*L. minor*叶绿体基因组是一个大小为165955bp的环状分子, 含有一对31223bp的反向重复区, 分别由89906bp和13603bp的两个单拷贝区分开。基于61个叶绿体基因的系统发育分析结果表明, 青萍与菖蒲科植物的亲缘关系更近。Martirosyan等^[22]在2009年确定了叶绿体*rpS16*基因内含子序列, 并对代表9个浮萍物种的25个浮萍种质进行了表征, 展示了使用*rpS16*内含子序列进行浮萍系统发育研究的可行性。Wang和Messing^[23]在2011年对*Wolffiella*和*Wolffia*的基因组进行了测序, 其基因组大小分别为973Mb和1881Mb, 系统发育结果显示*Wolffiella*和*Wolffia*的系统进化关系更为接近。Wang等^[24]在2012年对*Spirodela polyrhiza*的线粒体基因组进行了测序分析, 结果显示其线粒体基因组大小为228493bp, 共有57个基因, 编码35种已知蛋白质、3种核糖体RNA和19种识别15种氨基酸的tRNA。Wang等^[25]在2014年对*S. polyrhiza*进行了全基因组测序, 发现其基因组大小为158Mb, 共有19623个蛋白质编码基因, 比双子叶植物拟南芥低28%, 比单子叶植物水稻低50%, 是迄今为止最小的单子叶植物基因组, 为研究单子叶植物的进化史提供了宝贵基因组资源。VanHoeck等^[26]在2015年完成了*L. minor*5500的基因组测序, 发现其基因组大小为472Mb, 含有

22 382 个蛋白质编码基因和 61.5% 的重复序列。Hoang 等^[27]在 2019 年对来自 5 个属的 11 种浮萍进行了测序,发现浮萍的基因组大小从 *S. polyrhiza* 的 160 Mb 到 *W. arrhiza* 的 2 203 Mb 不等,在 *Wolffia* 属中发生了最大的基因组大小变异(从 432 Mb 到 2 203 Mb)。除了两种紫萍之外,其他浮萍的基因组大小测量结果比 Wang 等^[28]对相同浮萍测得的值高出 26%。近期,An 等^[29]基于 PacBio 长读长测序平台对 *S. polyrhiza* 的基因组进行了重新测序,Contig N50 增加 44 倍达到 831 kb,同时覆盖了之前紫萍基因组数据中 95.4% 的缺口。长读长测序获得的序列信息有助于阐明植物的进化和对环境的适应性,而且还促进了其在生物能源和植物修复中的应用。

在对浮萍基因组进行测序的同时,转录组方面的研究也有大量报道。Tao 等^[30]在 2013 年对营养缺乏处理后的 *Landoltia punctata* 进行了转录组测序,发现参与淀粉和类黄酮生物合成的关键酶基因表达上调,而参与光合作用和木质化的关键酶基因表达下调。为了进一步探究 *L. punctata* 黄酮积累机制,Tao 等^[31]在 2017 年对营养缺乏处理后的 *L. punctata* 进行了转录组、代谢组和蛋白质组分析,结果表明在全营养培养基中淀粉和黄酮含量较低,营养缺乏刺激了淀粉和黄酮类化合物的积累,植物生长抑制剂烯效唑抑制黄酮类生物合成,促进淀粉积累。*L. punctata* 6001 可有效去除水中的重金属镉,为进一步探索其镉抗性的潜在分子机制,Xu 等^[32]在 2018 年对镉处理的 *L. punctata* 6001 进行了转录组分析,结果发现浮萍对镉离子胁迫的响应是系统性的,包括 DNA、RNA 和蛋白质代谢都参与该响应过程;为应对镉离子产生的细胞毒害,浮萍体内的硫和活性氧代谢过程显著增强,碳水化合物代谢流发生明显变动;液泡作为细胞内镉离子的“存储器”,在镉离子解毒方面发挥重要的作用。除了对少根紫萍的转录组进行测序分析外,科研人员也对多根紫萍和青萍的转录组进行了测序分析。Wang 等^[33]在 2014 年对用脱落酸(abscisic acid, ABA)处理的发育中的 *S. polyrhiza* 的休眠体进行了转录组测序,结果发现休眠体脱水、碳水化合物、次级代谢和衰老的相关基因表达上调,而负责快速生长、生物量积累和蛋白质合成的基因表达下调。Wang 等^[34]在 2016 年对高浓度 NH_4^+ 处理的 *L. minor* 进行了转录组分析,检测到活性氧清除酶相关基因,如编码超氧化物歧化酶和过氧化物酶的基因表达上调。紧随其后, Van Hoeck 等^[35]在 2017 年通过 RNA-Seq

检测了 *L. minor* 在不同剂量的 γ 辐射和 β 辐射下 7 d 内的基因表达情况,发现 *L. minor* 可以通过触发细胞壁修饰和类黄酮生物合成来耐受较低剂量的辐射,在高剂量辐射下浮萍中参与抗氧化防御系统和 ATP 生成的基因表达上调,而 DNA 修复和有丝分裂相关基因表达下调。同年, Yu 等^[36]为了研究参与浮萍缺氮诱导淀粉积累的基因,对 *Lemna aequinoctialis* 6000 缺氮处理后的转录组进行了测序,发现代谢流调控在淀粉积累过程中也起到关键作用;缺氮处理后浮萍代谢流发生重新分配,底物葡萄糖-1-磷酸更易流向淀粉合成途径,而分支途径果胶生物合成途径受阻,最终导致浮萍淀粉大量积累。

4 浮萍遗传转化方法

从 20 世纪 90 年代初开始,多个实验室开始探索浮萍遗传转化方法,主要用了两套遗传转化体系:愈伤组织转化体系(callus transformation system, CTS)和叶片转化体系(frond transformation system, FTS)。

愈伤组织转化体系需要先获得愈伤组织,利用愈伤组织进行遗传转化,然后通过再生获得稳定转化的浮萍植株。因此,在遗传转化前建立一套完整高效的组织培养方法是愈伤组织转化体系的基石。自 20 世纪 70 年代中期以来,多个科研团队对浮萍科植物的组织培养展开了研究。Chang 和 Chiu^[37-38]、Moon 和 Stomp^[39]以及 Li 等^[40]先后探究并建立了 *L. gibba* 的组织培养方法。与此同时,Chang 和 Hsing^[41]成功诱导出了 *Lemna perpusilla* 的愈伤组织,并完成了再生培养。Frick^[42]和 Stefaniak 等^[43]分别于 1991 年和 2002 年建立了 *L. minor* 的组织培养方法。Chhabra 等^[44]于 2011 年建立了 *L. minor* 的愈伤组织转化体系,其效率仅为 10%。2015 年, Cantó-Pastor 等^[45]建立了 *L. gibba* G3 和 *L. minor* 8627 的愈伤组织转化体系,效率达到了 59%。Yang 等^[46]于 2018 年建立了 *L. minor* ZH0055 的愈伤组织转化体系,效率为 80%。Firsov 等^[47-48]在 2015 年对 *L. minor* 的愈伤组织转化体系进行了探索,并于 2018 年成功建立了相关转化体系,效率为 82.5%。Liu 等^[49]于 2019 年在 *L. aequinoctialis* 中通过优化已有的转化方法,将农杆菌介导的转化方法时间缩短至 5~6 周,成功率超过了 94%,极大地提高了转化效率。随着青萍组织培养方法的逐步确立,紫萍和芜萍的组织培养方法也被陆续建立。Li 等^[40]于 2004 年成功建立紫萍 *Spirodela oligorrhiza* Hegelm SP 和 *Spirodela punctata* 8717 的组织培养方法。Huang 等^[50]在 2018

年成功诱导出 *S. polyrhiza* 的愈伤组织, 并完成了再生。在紫萍组织培养方法建立的同时, 科研人员也在不断探索并建立紫萍的愈伤组织转化体系。Vunsh 等^[51] 在 2007 年建立了 *S. oligorrhiza* SP 的愈伤组织转化体系, Rival 等^[52] 在 2008 年建立相关转化体系, 后者转化效率仅为 5%。Yang 等^[53] 于 2018 年建立了 *S. polyrhiza* 5543 的愈伤组织转化体系, 转化效率为 13%。芜萍的组织培养方法和愈伤组织转化体系的建立相对紫萍较晚。2015 年, Khvatkov 等^[54] 报道了两步法诱导芜萍 *Wolffia arrhiza* 愈伤组织的方法, 这是芜萍组织培养方法的首次报道。2018 年, Khvatkov 等^[55] 和 Heenatigala 等^[56] 分别建立了 *W. arrhiza* 5564 和 *Wolffia globosa* 5563 的愈伤组织转化体系, 其效率分别为 0.4% 和 0.14%。上述浮萍品种的愈伤组织转化体系方法详见表 1。

然而, 虽然愈伤组织转化体系被广泛应用于植物遗传转化, 针对浮萍的遗传转化应用仍有一定的局限性。其中一个限制因素是组织培养周期较长, 特别是愈伤组织诱导和随后的叶片再生, 耗时且费力。另一个限制因素是浮萍的组织培养条件因物种甚至生态型而存在差异, 一些生态型无法实现愈伤组织的诱导或再生, 限制了一些优良株系的转化^[39]。因此, 有必要在不使用愈伤组织的情况下建立快速有效的遗传转化方法, 叶片转化体系方面的尝试应运而生。叶片转化体系利用农杆菌对浮萍叶片分生组织进行遗传转化, 随后通过叶片再生获得完整浮萍植株。Ko 等^[57] 于 2011 年建立了 *L. minor* 的叶片转化体系, 其效率未报道。Yang 等^[46] 于 2018 年成功建立了 *L. minor* 的叶片转化体系, 其效率为 40%。这是迄今为止叶片转化体系在浮萍科植物中取得的仅有的成功(表 1), 为其他浮萍物种叶片转化体系的建立提供了宝贵的经验。

5 浮萍合成生物学使能技术

随着浮萍基因组和转录组信息的不断获得, 以及浮萍遗传转化体系的不断完善, 浮萍合成生物学得以飞速发展, 基因沉默、基因共表达、基因过表达和 CRISPR/Cas9 技术在浮萍合成生物学中被广泛应用。Cox 等^[62] 于 2006 年在 *L. minor* 中通过共表达单克隆抗体的重链和轻链与靶向内源性 α -1,3-岩藻糖基转移酶和 β -1,2-木糖基转移酶基因表达的 RNA 干扰构建体来优化单克隆抗体针对人 CD30 的糖基化。2013 年, Yang 等^[61] 在 *L. minor* 中成功过表达了拟南芥光呼吸通路丝氨酸:乙醛酸氨基转移

酶, 以此来研究光呼吸对盐胁迫的影响。2017 年, Yang 等^[62] 通过在 *L. turionifera* 5511 中过表达 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白提高转基因植物对镉和盐的抗性。2019 年, Liu 等^[49] 首次将 CRISPR/Cas9 技术应用于 *L. aequinoctialis* 中, 并产生了 15 个 (14.3% 成功率) 双等位基因 *LaPDS* 突变体, 其显示白化表型。这一研究使浮萍合成生物学研究深入到了基因编辑的领域。

与此同时, 科研团队成功将多个外源蛋白基因整合到浮萍基因组中, 并使其表达出相应的目的产物, 而含有目的产物基因的质粒的构建成为推动浮萍合成生物学进步的重要一环。美国的 BIOLEX 公司以 *L. minor* 建立表达系统, 成功表达了多种药用蛋白。其中, 干扰素 $\alpha 2$ 、人生长素、Fab 片段和单克隆抗体所用表达载体为 pBMSP-3^[63], 纤溶酶原所用表达载体为 pBMSP-1^[64], 启动子皆为 mas 启动子。此外, 自 2007 年以来, 多个科研团队先后以青萍、多根紫萍和芜萍建立表达系统。Sun 等^[59] 在 2007 年以 *L. minor* 8627 建立表达系统, 所用表达载体为 pBI121, 启动子为 CaMV 35S 启动子。Firsov 团队于 2015 年以 *L. minor* L. 建立表达系统并成功表达了含有流感病毒基质 2 蛋白胞外域 (extracellular domain of Matrix 2, M2e) 的融合蛋白 M130- β -葡萄糖醛酸苷酶^[47], 随后在 2018 年成功表达了含有肽 M2e 的融合蛋白 RTB-M130^[48], 所用表达载体皆为 pBI121, 启动子皆为 CaMV 35S 启动子。Rival 等^[52] 在 2008 年以 *S. oligorrhiza* 建立表达系统, 所用表达载体为 pBIN+, 启动子为 CaMV 35S 启动子。Khvatkov 等^[55] 在 2018 年以 *W. arrhiza* 建立表达系统, 所用表达载体为 pCamPPVcp, 启动子为 CaMV 35S 启动子。

6 浮萍生物合成产物

浮萍遗传转化体系和表达系统的陆续建立, 使得多种外源蛋白在浮萍中得以成功表达。Cox 等^[62] 于 2006 年在 *L. minor* 中表达了人单克隆抗体, 为生产人兽共患病病原体的治疗性蛋白提供了优化系统。2007 年, Sun 等^[59] 在 *L. minor* 8627 中成功表达了解纤维热酸菌的内切葡聚糖酶 E1, 且其表达量可达总可溶性蛋白的 0.24%。2008 年, Rival 等^[52] 在 *S. oligorrhiza* 中实现了抑肽酶的稳定表达, 其表达量为可溶性蛋白的 3.7%。2011 年, Ko 等^[57] 在转基因浮萍 *L. minor* 中表达了猪流行性腹泻病毒的保护性抗原, 利用 PCR、RT-PCR 以及蛋白质印迹分析验证转基因成功, 这是动物传染病疫苗抗原在

表1 浮萍的遗传转化方法

品种	外植体	扩繁培养基	诱导培养基	农杆菌类型		再生培养基	转化效率	参考文献
				侵染方法	侵染方法			
<i>Lemma aequinoctialis</i> 6002	愈伤组织	SH培养基含10 g/L蔗糖	MS培养基含30 g/L蔗糖、4.52 μmol/L 2,4-D、0.45 μmol/L TDZ和7.9 g/L 细菌琼脂	EHA105	真空渗透10 min, 超声处理5 min, 真空渗透10 min 并振荡30 min	B5培养基含4.65 μmol/L KT、2.57 μmol/L IAA、1%蔗糖、9.48 μmol/L潮霉素和600 μmol/L TMT	94%	[49]
<i>Lemma gibba</i> G3	愈伤组织	SH培养基含10 g/L蔗糖	MS培养基含30 g/L蔗糖、5 μmol/L 2,4-D、0.5 μmol/L TDZ和5 g/L细菌琼脂	GV3101	浸没5 min	10 g/L蔗糖、200 mg/L羧苜青霉素、500 mg/L头孢噻吩、10 mg/L PPT、5 g/L 细菌琼脂	59%	[42]
<i>Lemma minor</i> 8627	愈伤组织	霍格兰培养基含10 μmol/L 6-BA	B5培养基含1%蔗糖、5 μmol/L 2,4-D、50 μmol/L 2-iP或50 μmol/L 2,4-D、5 μmol/L TDZ和0.35% 植物凝胶	EHA105	用0.2%吐温20预洗液, 以80 rpm 的转速振荡60 min	B5 培养基含1%蔗糖、5 μmol/L KT、25 μmol/L IAA、125 mg/L卡那霉素和500 mg/L头孢噻吩	10%	[44]
<i>Lemma minor</i> ZH0055	愈伤组织	霍格兰液体培养基含1.5%蔗糖	MS培养基含30 g/L蔗糖、10 mg/L 2,4-D、0.5 mg/L 2-iP和3 g/L 植物凝胶	EHA105	浸没并真空渗透10 min	MS培养基含30 g/L蔗糖、10 mg/L 2,4-D、0.5 mg/L 2-iP、3 g/L 植物凝胶、100 mg/L TMT、100 mg/L PRM和20 mg/L G418	80%	[46]
<i>Lemma minor</i> ZH0055, 6580, 6591	叶片	霍格兰液体培养基含1.5%蔗糖	MS培养基含30 g/L蔗糖、4 g/L细菌琼脂、1.5 g/L 植物凝胶、10 mmol/L NAA和10.5 mmol/L TDZ (<i>L. gibba</i> G3)或5 mmol/L 2,4-D和10.5 mmol/L TDZ (<i>L. minor</i>)	EHA105	真空渗透10 min	MS培养基含30 g/L蔗糖、10 mg/L 2,4-D、0.5 mg/L 2-iP、3 g/L 植物凝胶、100 mg/L TMT、100 mg/L PRM和20 mg/L G418	40%	[46]
<i>Lennaminor</i> 8627, 8744	愈伤组织	SH液体培养基含10 g/L蔗糖	MS培养基含30 g/L蔗糖、4 g/L细菌琼脂、1.5 g/L 植物凝胶、10 mmol/L NAA和10.5 mmol/L TDZ (<i>L. gibba</i> G3)或5 mmol/L 2,4-D和10.5 mmol/L TDZ (<i>L. minor</i>)	C58-z707	浸没3~5 min	MS培养基含30 g/L蔗糖、1 mmol/L 2,4-D、2 mmol/L 6-BA、4 g/L细菌琼脂、1.5 g/L 植物凝胶、10 mg/L 卡那霉素和500 mg/L头孢噻吩		[58-59]

表1 浮萍的遗传转化方法(续表)

品种	外植体	扩繁培养基	诱导培养基	农杆菌类型	侵染方法	再生培养基	转化效率	参考文献
<i>Lemma minor</i>	叶片		1/2 MS培养基含1 mg/L 6-BA、0.4 mg/L 盐酸硫胺、100 mg/L 肌醇、15 g/L 蔗糖和4 g/L 植物凝胶	EHA105	浸没30 min	1/2 MS培养基含1 mg/L 6-BA、0.4 mg/L 盐酸硫胺、100 mg/L 肌醇、15 g/L 蔗糖、4 g/L 植物凝胶和300 mg/L 头孢噻肟和200 mg/L 卡那霉素	[57]	
<i>Lemma minor</i>	愈伤组织		B5培养基含1.5%蔗糖、15 mg/L 麦草畏、3.5 mg/L 2,4-D和1 mg/L 6-BA	EHA105	用0.2%吐温20预洗涂, 以80 rpm 的转速振荡60 min	B5培养基含1.5%蔗糖、1 mmol/L L-丝氨酸和1 mg/L 潮霉素	[61-62]	
<i>Lemma minor</i>	愈伤组织	MS液体培养基含2%蔗糖	MS培养基含3%蔗糖、0.4%琼脂、0.15%植物凝胶和1 mg/L TDZ	CBE21	浸没30 min	MS培养基含3%蔗糖、0.4%琼脂、0.15%植物凝胶、2 mg/L 6-BA、0.1 mg/L IAA、200 mg/L 头孢噻肟和35 mg/L 卡那霉素	82.5%	[47-48]
<i>Spirodela oligorrhiza</i> SP	愈伤组织	1/2 Hutner's 培养基	McCown Woody 植物培养基含1.5% 半乳糖、50 mg/L 麦草畏和2 mg/L 6-BA	EHA105	用无DNA的钙颗粒处理, 浸没并真空渗透5 min	SP液体培养基含1%蔗糖、200 mg/L 羧苄青霉素和2~5 mg/L 卡那霉素	5%	[51-52]
<i>Spirodela polyrrhiza</i> 5543	愈伤组织	1/2 MS培养基含1%蔗糖	1/2 MS培养基含1%蔗糖、22.62 μmol/L 2,4-D和8.88 μmol/L 6-BA	LBA4404	在80~100 rpm 下振荡20 min, 真空渗透10 min	1/2 MS培养基含1%蔗糖、0.6%琼脂、9.99 mmol/L (NH ₄) ₂ SO ₄ 、22.62 μmol/L 2,4-D、8.88 μmol/L 6-BA、0.63 mmol/L 头孢噻肟和96.25 μmol/L G418	13%	[53]
<i>Wolffia arrhiza</i> 5564	愈伤组织	SH培养基含1%甘露醇、1%山梨醇、2%葡萄糖、5 mg/L 2,4-D和0.5 mg/L 6-BA	SH培养基含1%甘露醇、1%山梨醇、2%葡萄糖、2.0 mg/L 2,4-D和2.0 mg/L 6-BA	EHA105	振荡30 min	SH培养基含1%甘露醇、1%山梨醇、2%葡萄糖和5.0 mg/L 潮霉素	0.4%	[54-55]
<i>Wolffia globosa</i> 5563	愈伤组织	SH培养基含5.0 mg/L 2,4-D和0.5 mg/L 6-BA	SH液体培养基含1%山梨醇、5%蔗糖和10 μmol/L AS	EHA105	添加玻璃珠, 180 rpm 振荡30 min	SH培养基含2%蔗糖、150 mg/L 头孢噻肟和40 mg/L G418	0.14%	[56]

浮萍中的首次表达。2015年, Firsov等^[47]通过农杆菌介导的愈伤转化系统, 在 *L. minor* L. 中成功表达了含有肽 M2e 的 M130- β - 葡糖醛酸糖苷酶融合蛋白, 在转基因浮萍鲜重中的含量为 40 $\mu\text{g/g}$, 与病毒瞬时表达体系水平相当, 为研制可食用的植物性禽流感疫苗开辟了新途径。同年, Bertran等^[65]在 *L. minor* 中成功表达了一个来自禽流感病毒 H5N1 的血凝素合成基因, 转基因浮萍来源的血凝素可以作为生产高质量的抗 H5N1-HPAI 病毒注射疫苗抗原的良好替代品。2018年, Firsov等^[48]将 H5N1 的 M2e 基因成功转化进 *L. minor* L., 含有肽 M2e 的融合蛋白 RTB-M130 得到表达, 在浮萍鲜重中的含量为 0.25~2.5 $\mu\text{g/g}$, 为可溶性蛋白总量的 0.0006%~0.01%, 并在进行口服免疫的小鼠中检测到了针对肽 M2e 的特异性抗体, 为基于浮萍表达系统生产抗禽流感的可食用疫苗提供了更多信息。同年, Khvatkov等^[55]在 *W. arrhiza* 中成功表达人粒细胞集落刺激因子, 在 *W. arrhiza* 鲜重中含量达到 35.5 mg/kg, 为可溶性蛋白总量的 0.194%, 为开发基于 *Wolffia* 的表达系统奠定了基础。

此外, 美国的 BIOLEX 公司以 *L. minor* 建立表

达系统 (简称为 LEX SystemTM), 能高水平且稳定生产药用蛋白和单克隆抗体。其中, 干扰素 $\alpha 2$ 的产量达培养液蛋白含量的 30% 以上; 人生长素在培养液中的含量为 609 mg/L; Fab 片段在浮萍干重中的含量为 8.62 g/kg, 占总可溶性蛋白的 4%; 单克隆抗体蛋白在浮萍干重中的含量为 5.6 g/kg, 占总可溶性蛋白的 2.8%^[63]; 纤溶酶原占总可溶性蛋白的 3.3%^[64]。而法国 LemnaGene 公司用 *Spirodela oligorhiza* 建立表达系统 (简称为 LemnaGeneTM SA), 成功转化表达了抗原、药物和工业用酶的编码基因, 并获得了疫苗、药用因子和食品添加剂等。浮萍生物合成产物详细信息见表 2。

7 浮萍合成生物学的优势

浮萍作为植物合成生物学的底盘植物, 相较于大多数底盘植物具有一定的优势, 是一种极具应用潜力的表达系统。浮萍作为底盘植物主要具有以下优势: (1) 浮萍主要以无性生殖为主, 生长快, 部分品种 16~24 h 就可以繁殖一代^[66]; (2) 浮萍在水温高于 5 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下即可生长, 在温带至热带地区能全年生长, 可长期循环生产^[9]; (3) 浮萍在低成

表2 浮萍生物合成产物

品种	遗传转化方法	产物	产量	载体	启动子	参考文献
<i>Wolffia arrhiza</i>	CTS	人粒细胞集落刺激因子	在浮萍鲜重中的含量为35.5 mg/kg, 占总可溶性蛋白的0.194%	pCamPPVcp	CaMV 35S 启动子	[55]
<i>Lemna minor</i> 8627	CTS	解纤维热酸菌的内切葡聚糖酶E1	占总可溶性蛋白的0.24%	pBI121	CaMV 35S 启动子	[59]
<i>Lemna minor</i>	CTS	融合蛋白RTB-M130 (含M2e)	在浮萍鲜重中的含量为0.25~2.5 $\mu\text{g/g}$, 占总可溶性蛋白的0.0006%~0.01%	pBI121	CaMV 35S 启动子	[48]
<i>Lemna minor</i>	-	血凝素	-	-	-	[65]
<i>Lemna minor</i> L	CTS	M130- β -葡糖醛酸糖苷酶	在浮萍鲜重中的含量为0.09~0.97 mg/g, 占总可溶性蛋白的0.12%~1.96%	pBI121	CaMV 35S 启动子	[47]
<i>Spirodela oligorhiza</i>	CTS	抑肽酶	占总可溶性蛋白的3.7%	pBIN+	CaMV 35S 启动子	[52]
<i>Lemna minor</i>	-	单克隆抗体	在浮萍干重中的含量为5.6 g/kg, 占总可溶性蛋白的2.8%	pBMSP-3	mas启动子	[62]
<i>Lemna minor</i>	-	干扰素 $\alpha 2$	占培养液蛋白含量的30%以上	pBMSP-3	mas启动子	[63]
<i>Lemna minor</i>	-	纤溶酶原	占总可溶性蛋白的3.3%	pBMSP-1	mas启动子	[64]
<i>Lemna minor</i>	-	Fab片段	在浮萍干重中的含量为8.62 g/kg, 占总可溶性蛋白的4%	pBMSP-3	mas启动子	[63]
<i>Lemna minor</i>	-	人生长素	在培养液中的含量为609 mg/L	pBMSP-3	mas启动子	[63]

本的营养盐溶液和简单的环境条件下即可快速生长, 生产成本低^[8]; (4) 浮萍在水面漂浮生长, 易于采收, 也可进一步降低生产成本^[67]; (5) 浮萍生活在水环境中, 可做到“不与粮争地”; (6) 利用浮萍的根分泌系统可将目的蛋白直接分泌到培养液中^[68], 由于培养液成分简单, 从而简化了表达产物的分离和纯化步骤, 极大地降低了生产成本; (7) 浮萍只含少量或不含木质素^[69-70], 细胞壁易破碎, 产物易提取; (8) 与其他植物只有部分器官可用于目的蛋白生产相比, 浮萍整个植株都可投入生产; (9) 浮萍可食用, 在口服疫苗方面应用前景广阔^[71]; (10) 浮萍作为植物合成生物学的底盘植物, 表达的目的蛋白不易被人和动物病原微生物感染, 提高了表达产物的安全性^[8, 72]。

8 展望

为了推动浮萍合成生物学的发展, 应加快进行更多浮萍科植物的基因组和转录组的测序, 提供更丰富的遗传背景。此外, 针对不同浮萍品种开发高效稳定的遗传转化体系对于浮萍合成生物学的发展也十分重要。然而, 浮萍作为植物合成生物学的底盘植物, 在外源蛋白的生产中存在如下问题有待解决: (1) 外源蛋白能否在细胞质中进行正确的折叠与修饰; (2) 能否建立适宜的技术途径, 进一步优化表达载体, 进而获得稳定的转基因植物与外源蛋白, 以及能否建立良好的生产规范, 优化表达产物提取和纯化流程以及最终产物的质量控制等, 从而降低生产成本; (3) 能否实现大规模的标准化生产。就目前而言, 浮萍合成生物学真正走向产业化任重而道远。但是, 通过研究者的持续努力, 相信在不久的将来, 随着浮萍高通量测序数据的大量积累, 针对更多浮萍品种的高效稳定遗传表达体系被成功建立, 最终一定会形成经济适宜的浮萍合成生物学“上下游”产业链, 浮萍合成生物学将具有更加广阔的应用前景, 带来巨大的经济和社会效益。

[参 考 文 献]

- [1] Hobom B. Gene surgery: on the threshold of synthetic biology. *Med Klin*, 1980, 75: 834-41
- [2] 王勇. 新本草计划——基于合成生物学的药用植物活性代谢物研究. *生物工程学报*, 2017, 33: 478-85
- [3] 李福利. 中国合成生物学发展前景可期. *高科技与产业化*, 2019, 272: 34-6
- [4] Richardson SM, Mitchell LA, Stracquandano G, et al. Design of a synthetic yeast genome. *Science*, 2017, 355: 1040-4
- [5] Shao Y, Ning L, Wang ZF, et al. Creating a functional single-chromosome yeast. *Nature*, 2018, 560: 331-5
- [6] Ma KC, Drake PM, Christou P. Genetic modification: The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet*, 2003, 4: 794-805
- [7] Les DH, Landolt E, Crawford DJ. Systematics of the *Lemnaceae*(duckweeds): inferences from micromolecular and morphological data. *Plant Syst Evol*, 1997, 204: 161-77
- [8] Les DH, Crawford DJ, Landolt E, et al. Phylogeny and systematics of Lemnaceae, the duckweed family. *Syst Bot*, 2002, 27: 221-40
- [9] Stomp AM. The duckweeds: a valuable plant for biomanufacturing. *Biotechnol Annu Rev*, 2005, 11: 69-99
- [10] Xu J, Zhao H, Stomp AM, et al. The production of duckweed as a source of biofuels. *Biofuels*, 2012, 3: 589-601
- [11] 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. *环境工程*, 2015, 33: 315-8
- [12] Seth PN, Venkataraman R, Maheshwari SC. Studies on the growth and flowering of a short-day plant, *Wolffia microscopica*: II. Role of metal ions and chelates. *Planta*, 1970, 90: 349-59
- [13] Chang SM, Yang CC, Sung SC. Cultivation and the nutritional value of *Lemnaceae*. *Bull Inst Chem Acad Sin*, 1977, 24: 19-30
- [14] Hejný S, Ellias Landolt. The family of *Lemnaceae*-a monographic study-Vol.1 biosystematic investigations in the family of duckweeds (*Lemnaceae*) (Vol.2). *Folia Geobot Phytotax*, 1993, 28: 50
- [15] Marvin E. Transgenic *Spirodela*: a unique, low-risk, plant biotechnology system. *Plant Biol*, 2003: 25-30
- [16] Cheng J, Landesman L, Bergmann BA, et al. Nutrient removal from swine lagoon liquid by *Lemna minor* 8627. *Trans ASAE*, 2002, 45: 1003
- [17] Tillberg E, Holmvall M, Ericsson T. Growth cycles in *Lemna gibba* cultures and their effects on growth rate and ultrastructure. *Physiol Plant*, 2006, 46: 5-12
- [18] Porath D, Hopher B, Koton A. Duckweed as an aquatic crop: Evaluation of clones for aquaculture. *Aquat Bot*, 1979, 7: 273-8
- [19] Appenroth KJ, Augsten H, Liebermann B, et al. Effects of light quality on amino acid composition of proteins in *Wolffia arrhiza* (L.) Wimm. using a specially modified bradford method. *Biochem Physiol Pflanz*, 1982, 177: 251-8
- [20] Hillman WS, Culley DD Jr. The uses of duckweed. *Am Sci*, 1978, 66: 442-51
- [21] Mardanov AV, Ravin NV, Kuznetsov BB, et al. Complete sequence of the duckweed (*Lemna minor*) chloroplast genome: structural organization and phylogenetic relationships to other angiosperms. *J Mol Evol*, 2008, 66: 555-64
- [22] Martirosyan EV, Ryzhova NN, Kochieva EZ, et al. Analysis of chloroplast *rpS16* intron sequences in *Lemnaceae*. *Mol Biol*, 2009, 43: 32-8
- [23] Wang W, Messing J. High-throughput sequencing of three

- Lemnoideae* (duckweeds) chloroplast genomes from total DNA. PLoS One, 2011, 6: e24670
- [24] Wang W, Wu Y, Messing J. The mitochondrial genome of an aquatic plant, *Spirodela polyrhiza*. PLoS One, 2012, 7: e46747
- [25] Wang W, Haberer G, Gundlach H, et al. The *Spirodela polyrhiza* genome reveals insights into its neotenus reduction fast growth and aquatic lifestyle. Nat Commun, 2014, 5: 3311
- [26] Van Hoeck A, Horemans N, Monsieurs P, et al. The first draft genome of the aquatic model plant *Lemna minor* opens the route for future stress physiology research and biotechnological applications. Biotechnol Biofuels, 2015, 8: 188
- [27] Hoang PTN, Schubert V, Meister A, et al. Variation in genome size, cell and nucleus volume, chromosome number and rDNA loci among duckweeds. Sci Rep, 2019, 9: 3234
- [28] Wang W, Kerstetter RA, Michael TP. Evolution of genome size in duckweeds (*Lemnaceae*). J Bot, 2011, 2011: 1-9
- [29] An D, Zhou Y, Li C, et al. Plant evolution and environmental adaptation unveiled by long-read whole-genome sequencing of *Spirodela*. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116: 18893-8
- [30] Tao X, Fang Y, Xiao Y, et al. Comparative transcriptome analysis to investigate the high starch accumulation of duckweed (*Landoltia punctata*) under nutrient starvation. Biotechnol Biofuels, 2013, 6: 72
- [31] Tao X, Fang Y, Huang MJ, et al. High flavonoid accompanied with high starch accumulation triggered by nutrient starvation in bioenergy crop duckweed (*Landoltia punctata*). BMC Genomics, 2017, 18: 166
- [32] Xu H, Yu C, Xia X, et al. Comparative transcriptome analysis of duckweed (*Landoltia punctata*) in response to cadmium provides insights into molecular mechanisms underlying hyperaccumulation. Chemosphere, 2018, 190: 154-65
- [33] Wang W, Wu Y, Messing J. RNA-Seq transcriptome analysis of *Spirodela* dormancy without reproduction. BMC Genomics, 2014, 15: 60
- [34] Wang W, Li R, Zhu Q, et al. Transcriptomic and physiological analysis of common duckweed *Lemna minor* responses to NH_4^+ toxicity. BMC Plant Biol, 2016, 16: 92
- [35] Van Hoeck A, Horemans N, Nauts R, et al. *Lemna minor* plants chronically exposed to ionising radiation: RNA-seq analysis indicates a dose rate dependent shift from acclimation to survival strategies. Plant Sci, 2017, 257: 84-95
- [36] Yu C, Zhao X, Qi G, et al. Integrated analysis of transcriptome and metabolites reveals an essential role of metabolic flux in starch accumulation under nitrogen starvation in duckweed. Biotechnol Biofuels, 2017, 10: 167
- [37] Chang WC, Chiu PL. Induction of callus from fronds of duckweed (*Lemna gibba* L.). Bot Bull Acad Sinica, 1976, 17: 106-9
- [38] Chang WC, Chiu PL. Regeneration of *Lemna gibba* G3 through callus culture. J Plant Physiol, 1978, 89: 91-4
- [39] Moon HK, Stomp AM. Effects of medium components and light on callus induction, growth, and frond regeneration in *Lemna gibba* (duckweed). In Vitro Cell Dev Biol Plant, 1997, 33: 20-5
- [40] Li J, Jain M, Vunsh R, et al. Callus induction and regeneration in *Spirodela* and *Lemna*. Plant Cell Rep, 2004, 22: 457-64
- [41] Chang WC, Hsing YI. Callus formation and regeneration of frond-like structures in *Lemna perpusilla* 6746 on a defined medium. Plant Sci Lett, 1978, 13: 133-6
- [42] Frick H. Callogenesis and carbohydrate utilization in *Lemna minor*. J Plant Physiol, 1991, 137: 397-401
- [43] Stefaniak B, Woźny A, Budna I. Callus induction and plant regeneration in *Lemna minor* L. Biologia Plantarum, 2002, 45: 469-72
- [44] Chhabra G, Chaudhary D, Sainger M, et al. Genetic transformation of Indian isolate of *Lemna minor* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and recovery of transgenic plants. Physiol Mol Biol Plants, 2011, 17: 129-36
- [45] Cantó-Pastor A, Mollá-Morales A, Ernst E, et al. Efficient transformation and artificial miRNA gene silencing in *Lemna minor*. Plant Biol, 2015, 17: 59-65
- [46] Yang GL, Fang Y, Xu YL, et al. Frond transformation system mediated by *Agrobacterium tumefaciens* for *Lemna minor*. Plant Mol Biol, 2018, 98: 319-31
- [47] Firsov A, Tarasenko I, Mitiouchkina T, et al. High-yield expression of M2e peptide of avian influenza virus H5N1 in transgenic duckweed plants. Mol Biotechnol, 2015, 57: 653-61
- [48] Firsov A, Tarasenko I, Mitiouchkina T, et al. Expression and immunogenicity of M2e peptide of avian influenza virus H5N1 fused to ricin toxin B chain produced in duckweed plants. Front Chem, 2018, 6: 22
- [49] Liu Y, Wang Y, Xu S, et al. Efficient genetic transformation and CRISPR/Cas9-mediated genome editing in *Lemna aequinoctialis*. Plant Biotechnol J, 2019, 17: 2143-52
- [50] Huang M, Ma X, Zhong Y, et al. Callus induction and plant regeneration of *Spirodela polyrhiza*. Plant Cell Tissue Organ Cult, 2018, 135: 445-53
- [51] Vunsh R, Li J, Hanania U, et al. High expression of transgene protein in *Spirodela*. Plant Cell Rep, 2007, 26: 1511-9
- [52] Rival S, Wisniewski JP, Langlais A, et al. *Spirodela* (duckweed) as an alternative production system for pharmaceuticals: a case study, aprotinin. Transgenic Res, 2008, 17: 503-13
- [53] Yang JJ, Li GJ, Hu SQ, et al. A protocol for efficient callus induction and stable transformation of *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden using *Agrobacterium tumefaciens*. Aquat Bot, 2018, 151: S0304377018301244
- [54] Khvatkov P, Chernobrovkina M, Okuneva A, et al. Callus induction and regeneration in *Wolffia arrhiza* (L.) Horkel ex Wimm. Plant Cell Tissue Organ Cult, 2015, 120: 263-73
- [55] Khvatkov P, Firsov A, Shvedova A, et al. Development of

- Wolffia arrhiza* as a producer for recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Front Chem*, 2018, 6: 304
- [56] Heenatigala P, Yang J, Bishopp A, et al. Development of efficient protocols for stable and transient gene transformation for *Wolffia globosa* using *Agrobacterium*. *Front Chem*, 2018, 6: 227
- [57] Ko SM, Sun HJ, Oh MJ, et al. Expression of the protective antigen for PEDV in transgenic duckweed, *Lemna minor*. *Hortic Environ Biotechnol*, 2011, 52: 511
- [58] Yamamoto YT, Rajbhandari N, Lin X, et al. Genetic transformation of duckweed *Lemna gibba* and *Lemna minor*. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 2001, 37: 349-53
- [59] Sun Y, Cheng JJ, Himmel ME, et al. Expression and characterization of *Acidothermus cellulolyticus* E1 endoglucanase in transgenic duckweed *Lemna minor* 8627. *Bioresour Technol*, 2007, 98: 2866-72
- [60] Yang L, Han H, Liu M, et al. Overexpression of the *Arabidopsis* photorespiratory pathway gene, serine: glyoxylate aminotransferase (*AtAGT1*), leads to salt stress tolerance in transgenic duckweed (*Lemna minor*). *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2013, 113: 407-16
- [61] Yang L, Han Y, Wu D, et al. Salt and cadmium stress tolerance caused by overexpression of the *Glycine Max* Na⁺/H⁺ Antiporter (*GmNHX1*) gene in duckweed (*Lemna turionifera* 5511). *Aquat Toxicol*, 2017, 192: 127-35
- [62] Cox KM, Sterling JD, Regan JT, et al. Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant *Lemna minor*. *Nat Biotechnol*, 2006, 24: 1591-7
- [63] Lynn D, John G, Anne MS. Expression of biologically active polypeptides in duckweed: European, EP1305437[P]. 2001-7-26
- [64] Spencer D, Dickey LF, Gasdaska JR, et al. Expression of plasminogen and microplasminogen in duckweed: Canada, CA2555609[P]. 2005-2-11
- [65] Bertran K, Thomas C, Guo X, et al. Expression of H5 hemagglutinin vaccine antigen in common duckweed (*Lemna minor*) protects against H5N1 high pathogenicity avian influenza virus challenge in immunized chickens. *Vaccine*, 2015, 33: 3456-62
- [66] Peng JF, Wang BZ, Song YH, et al. Modeling N transformation and removal in a duckweed pond: model development and calibration. *Ecol Modell*, 2007, 206: 147-52
- [67] 于昌江, 朱明, 马玉彬, 等. 新型能源植物浮萍的研究进展. *生命科学*, 2014, 26: 458-64
- [68] Hull A, Criscuolo C, Mett V, et al. Human-derived, plant-produced monoclonal antibody for the treatment of anthrax. *Vaccine*, 2005, 23: 2082-6
- [69] Zhao Y, Fang Y, Jin Y, et al. Potential of duckweed in the conversion of wastewater nutrients to valuable biomass: a pilot-scale comparison with water hyacinth. *Bioresour Technol*, 2014, 163: 82-91
- [70] Zhao H, Appenroth K, Landesman L, et al. Duckweed rising at Chengdu: summary of the 1st International Conference on duckweed application and research. *Plant Mol Biol*, 2012, 78: 627-32
- [71] Popov SV, Golovchenko VV, Ovodova RG, et al. Characterisation of the oral adjuvant effect of *Lemnan*, a pectic polysaccharide of *Lemna minor* L. *Vaccine*, 2006, 24: 5413-9
- [72] 朱晔荣, 马荣, 刘清岱, 等. 浮萍相关研究的几方面重要进展. *生物学通报*, 2011, 46: 8-10