

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: B200226003

UDC \_\_\_\_\_

厦门大学

博士学位论文

中国水仙遗传多样性及其不育机理研究

Studies on Genetic Diversity of *Narcissus tazetta* L. var.  
*chinensis* Roem and its Mechanism of Sterility

陈林姣

指导教师姓名: 田惠桥教授

专业名称: 植物学

论文提交日期: 2006年6月12日

论文答辩日期: 2006年7月29日

学位授予日期: 2006年 月 日

答辩委员会主席: 黄维南\_\_\_\_\_

评阅人: \_\_\_\_\_

2006年6月



# 厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士



# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（ ），在          年解密后适用本授权书。

2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：                          日期：          年    月    日

导师签名：                          日期：          年    月    日



# 目录

中文摘要	1
英文摘要	3
<b>第一章 前言</b>	<b>7</b>
1 植物遗传多样研究方法及其意义	7
2 水仙植物资源及生物学特性	11
3 植物细胞程序性死亡研究进展	15
4 本论文的研究内容及意义	21
<b>第二章 中国水仙种质资源遗传多样性分析</b>	<b>22</b>
1 中国水仙资源及生境自然概况	22
2 材料与方法	24
3 结果与分析	27
3.1 模板 DNA 的提取及检测	27
3.2 RAPD 反应条件优化	28
3.3 中国水仙栽培品种 RAPD 扩增结果与分析	29
3.4 ISSR 反应条件优化	32
3.5 中国水仙栽培品种 ISSR 扩增结果与分析	35
3.6 中国水仙种群 ISSR 扩增结果与分析	37
4 讨论	40
4.1 RAPD 反应体系优化及扩增产物稳定性	40
4.2 ISSR 反应体系优化及扩增产物稳定性	41
4.3 中国水仙栽培品种遗传多样性	42
4.4 中国水仙种群的遗传变异	43
4.5 中国水仙资源保护和品种选育	44
<b>第三章 中国水仙胚胎学研究</b>	<b>46</b>
1 材料与方法	46
2 结果与分析	50

2.1 大孢子发生和雌配子体发育	50
2.2 小孢子发生和雄配子体发育	51
2.3 不同发育时期的花粉生活力检测结果	53
2.4 成熟花粉萌发试验结果	53
2.5 花药发育过程中多糖及脂类的分布特征	54
<b>3 讨论</b>	<b>55</b>
3.1 中国水仙大孢子发生和雌配子体发育	55
3.2 中国水仙小孢子发生和雄配子体发育	56
图版及图版说明	58
<b>第四章 中国水仙小孢子发育过程中细胞程序性死亡</b>	<b>69</b>
1 材料与方法	69
2 结果与分析	77
2.1 小孢子发生和发育过程中的荧光显微结构特点	77
2.2 小孢子发生和发育过程中的超微结构特点	78
2.3 不同发育时期小孢子 TUNEL 检测	79
2.4 小孢子发育过程中 DNA 的特异性降解	79
2.5 p53 同源基因在小孢子发育过程中的时空表达分析	79
2.6 小孢子发育过程中活性氧水平变化	80
2.7 小孢子发育过程中抗氧化酶活性及其同工酶分析	82
<b>3 讨论</b>	<b>86</b>
3.1 小孢子败育的结构原因	86
3.2 小孢子 PCD 的分子生物学证据	87
3.3 p53 同源基因表达与小孢子败育	88
3.4 活性氧代谢变化与小孢子败育的关系	88
图版及图版说明	91
<b>第五章 中国水仙花药离体培养</b>	<b>99</b>
1 材料与方法	99
2 结果与分析	100
2.1 花药愈伤组织的诱导	100



2.2 花药愈伤组织的分化·····	102
2.4 花药愈伤组织的起源及再生植株的细胞学分析·····	103
2.5 花药再生植株的遗传变异分析·····	104
3 讨论·····	104
图版及图版说明·····	106
<b>参考文献</b> ·····	108
<b>本文缩写词</b> ·····	126
<b>博士期间发表的论文</b> ·····	128
<b>致谢</b> ·····	129

厦门大学博硕



## Catalogue

Chinese abstract.....	1
English abstract.....	3
Chaper 1 Introduction.....	7
1 The methods and significance on study of plant genetic diversity.....	7
2 The resources and biology characteristics of Narcissus plants.....	11
3 Advance on plant programmed cell death.....	15
4 Purpose of this thesis.....	21
Chapter 2 Genetic diversity analysis of <i>Narcissus tazetta</i> var. <i>chinensis</i> .....	22
1 The resource of Chinese narcissus and its entironment.....	22
2 Materials and methods.....	24
3 Results and analysis.....	27
3.1 DNA extraction and concentration confirmation.....	27
3.2 Optimization of RAPD-PCR reaction parameters.....	28
3.3 RAPD amplification results and analyses of cultivars of Chinese narcissus .....	29
3.4 Optimization of ISSR-PCR reaction parameters.....	32
3.5 ISSR amplification results and analyses of cultivars of Chinese narcissus .....	35
3.6 ISSR amplification results and analyses of populations of Chinese narcissus .....	37
4 Discussion.....	40
4.1 The optimization of RAPD-PCR reaction condition and stability of products.....	40
4.2 The optimization of ISSR-PCR reaction condition and stability of products.....	41

4.3 Genetic diversity of Chinese narcissus cultivars.....	42
4.4 Genetic variation of Chinese narcissus populations.....	43
4.5 Resource conservation and breeding of Chinese narcissus.....	44
<b>Chapter 3 Embryological investigation of <i>Narcissus tazetta</i> var.</b>	
<b><i>chinensis</i></b> .....	46
1 Materials and methods.....	46
2 Results and analysis.....	50
2.1 Megasporogenesis and the development of female gametophyte.....	50
2.2 Microsporogenesis and the development of male gametophyte.....	51
2.3 Microspore viability detection.....	53
2.4 The features of distribution of polysaccharides and lipids in the development of anther.....	53
2.5 Results of pollen germination.....	54
3 Discussion.....	54
3.1 Megasporogenesis and the development of female gametophyte.....	55
3.2 Microsporogenesis and the development of male gametophyte.....	55
Figures and figures explanation.....	57
<b>Chapter 4 Programmed cell death during microspore development</b>	
<b>of <i>Narcissus tazetta</i> var. <i>chinensis</i></b> .....	69
1 Materials and methods.....	69
2 Results and analysis.....	77
2.1 The fluorescence microscopic features of microspores at different developmental stages.....	77
2.2 The changes of ultrastructure during microspore development.....	78
2.3 TUNEL assay of microspore at different stages.....	79
2.4 The characteristic of DNA fragmentation of microspore .....	79
2.5 Expression of human p53 gene homologues during microspore development.....	80
2.6 The changes of ROS level during microspore development.....	80

2.7 The changes of antioxidative enzyme activity in the development of microspore.....	83
<b>3 Discussion</b> .....	86
3.1 The structure reason of microspore abortion.....	86
3.2 The molecular evidence of PCD of microspore.....	87
3.3 The expression of p53 homologous gene in microspore and the abortion of microspore.....	88
3.4 The change of reactive oxygen species metabolism and the abortion of microspore.....	88
Figures and figures explanation.....	91
<b>Chapter 5 Anther culture of <i>Narcissus tazetta</i> var. <i>chinensis</i></b>	
1 Materials and methods .....	99
2 Results and analysis .....	100
2.1 Anther callus induction.....	100
2.2 Anther callus differentiation.....	102
2.3 Callus histological observation and cytological analysis of regenerated plants.....	103
2.4 Genetic stability analysis of anther-derived plants.....	104
3 Discussion.....	104
Figures and figures explanation.....	106
<b>References</b> .....	108
<b>List of abbreviations</b> .....	126
<b>Published papers during studying</b> .....	128
<b>Acknowledgements</b> .....	129



## 摘要

中国水仙 (*Narcissus tazetta* var. *chinensis* Roem) 只开花不结实, 以无性繁殖来繁衍后代。至今, 中国水仙品种稀少, 新品种培育困难, 而且存在种质退化、抗性减弱、品质下降等问题, 严重影响了该花卉的进一步生产和发展。本文对中国水仙种质资源遗传多样性及其不育机理进行了研究, 并对其花药进行培养, 以期为中国水仙资源保护及育种提供理论依据和应用基础。研究结果如下:

1 采用 RAPD 和 ISSR 分子标记, 从 DNA 水平检测和分析了中国水仙主要栽培品种的遗传多样性及其亲缘关系, 并对漳州、平潭、普陀和崇明 4 个主要产地的中国水仙种群共 40 个个体进行了遗传变异分析。在混合取样的中国水仙栽培品种中, 33 条 RAPD 引物和 16 条 ISSR 引物分别扩增出 278 和 163 条带, 多态性条带比率分别为 29.5% 和 38%。对于 4 个不同产地的中国水仙种群, 16 条 ISSR 引物共扩增出 155 条带。在物种水平上, 多态位点百分率为 40%, Nei's 遗传多样性和 Shannon's 信息指数分别为 0.1276、0.1914; 在种群水平上, 多态位点百分率在 14.84~30.48% 之间, Nei's 遗传多样性和 Shannon's 信息指数分别为 0.0754、0.1119。其中, 种群内遗传变异占总遗传变异的 59%, 41% 的遗传变异分布于种群间。4 个种群中, 以漳州种群的多态位点百分率最高 (30.48%), 遗传变异最为丰富; 崇明种群的多态位点百分率最低 (14.84%), 遗传变异最少。上述结果表明, 中国水仙资源的遗传多样性水平较低, 生境和地理隔离对中国水仙种群遗传分化产生了一定程度的影响。基于研究结果, 提出采用现代生物工程技术引进新种质选育水仙新品种的思路和保护中国水仙资源的重要性。

2 中国水仙胚囊发生属于单孢型, 由合点端的大孢子形成, 仅约 4.5% 的胚珠中能形成 7 细胞 8 核的蓼型胚囊, 而大多数胚珠中大孢子的产生和发育显示出各种异常现象。小孢子母细胞减数分裂十分异常, 形成的小孢子大多数具微核, 在随后的发育过程中生活力逐渐丧失, 约 25.7% 的花粉能继续存活, 并积累脂类物质。但成熟花粉离体萌发实验显示, 只有 3.4% 的花粉能萌发, 且仅 1.3% 的花粉管形态显示正常。因此, 绝大多数的雌、雄配子体不能正常发育是中国水仙只开花不结实的一个重要原因。此外, 自花和异花授粉试验表明, 花粉在柱头上不能萌发出花粉管是中国水仙有性生殖的另一个障碍。

3 通过荧光显微观察、超微结构、TUNEL 检测和 DNA ladder 检测等多种细

胞程序性死亡研究方法首次证实了三倍体植物中国水仙大部分小孢子的败育是由减数分裂异常导致小孢子染色体组受损而引起的细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD)。相对动物 PCD, 有关植物 PCD 信号转导途径和分子机理研究尚处于探索阶段。本研究通过细胞免疫化学方法检测了在 PCD 中具有重要作用, 且高度保守的 p53 同源基因在中国水仙小孢子发育过程中的时空表达。结果显示, 在发育异常的小孢子细胞核中检测到 p53 同源基因持续、强烈表达, 而形态正常的小孢子一般没有检测到 p53 同源蛋白, 说明 p53 同源蛋白可能在中国水仙小孢子基因组损伤反应和 PCD 过程中起重要作用。此外, 还对小孢子发育过程中活性氧含量和主要抗氧化酶活性及表达进行了分析。结果显示, 随着小孢子的发育, 过氧化物酶(POD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)等主要抗氧化酶活性明显下降, 且其表达也发生了明显变化, 过氧化氢等活性氧含量明显上升。过量活性氧的积累伴随着小孢子 PCD 信号的出现, 表明活性氧的积累与小孢子 PCD 的发生密切相关。

4 首次在水仙属植物中开展花药培养研究。小孢子早期至中期的中国水仙花药在附加  $0.5-1 \text{ mgL}^{-1}$  的 2,4-D 和  $0.5-2 \text{ mgL}^{-1}$  的 6-BA 的 MS 培养基上, 愈伤组织诱导率达 71.8—80.6%。愈伤组织在添加  $3 \text{ mgL}^{-1}$  6-BA 的 MS 培养基上分化率达 33.5%。通过对愈伤组织的切片观察和再生植株细胞学分析证实了花药再生植株为体细胞来源。进一步 RAPD 分析表明花药再生植株和供体植株具有良好的遗传一致性。花药培养不仅可作为中国水仙体外快速繁殖的一种有效新方法, 而且为通过现代细胞工程、基因工程等手段改良水仙和创造新品种奠定了基础。

**关键词:** 中国水仙; 遗传多样性; 胚胎学研究; 细胞程序死亡; 花药培养



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

廈門大學博碩