

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学 号: 21620071154212

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

利用增强型绿色荧光蛋白基因标记尖孢 镰刀菌甜瓜专化型菌丝

Marking the Mycelium of *Fusarium oxysporum* f. sp. Melon by Using the Enhanced Green Fluorescent Protein Gene

刘 铭

指导教师姓名: 周涵韬 副 教 授

张赛群 助理教授

专 业 名 称: 发育生物学

论文提交日期: 2010 年 04 月

论文答辩时间: 2010 年 06 月

学位授予日期: 2010 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2010年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈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其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

2010 年 月

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

2010年 月 日

目 录

目 录	I
CATALOGUE	IV
摘 要	1
ABSTRACT	2
1 前 言	4
1.1 瓜类枯萎病及其致病菌尖孢镰刀菌研究现状	4
1.1.1 瓜类枯萎病的发生与危害	4
1.1.2 瓜类枯萎病致病菌尖孢镰刀菌的研究	5
1.1.3 甜瓜枯萎病防治措施及存在问题	6
1.2 绿色荧光蛋白标记真菌的研究与应用现状	7
1.2.1 绿色荧光蛋白基础理论研究	7
1.2.2 绿色荧光蛋白标记的应用优点	11
1.2.3 绿色荧光蛋白标记真菌的应用及前景	12
1.3 丝状真菌的遗传转化	15
1.3.1 研究概况	15
1.3.2 丝状真菌的转化方法	15
1.3.3 根癌农杆菌介导丝状真菌转化法(<i>Agrobacterium tumefaciens</i> -mediated transformation, AtMT)的研究	17
1.4 研究目的、意义及研究内容	21
1.4.1 研究目的和意义	21
1.4.2 主要研究内容	21
2 材料和方法	22
2.1 材料	22
2.1.1 菌株与质粒	22
2.1.2 试验作物	22
2.1.3 培养基	23
2.1.4 试剂	24
2.1.5 仪器	24

2.2 方法	24
2.2.1 质粒的保存和提取鉴定	24
2.2.2 质粒 pUPGT 转化根癌农杆菌	26
2.2.3 尖孢镰刀菌的菌丝培养及分生孢子的获得	27
2.2.4 原始尖孢镰刀菌对潮霉素的敏感性鉴定	27
2.2.5 根癌农杆菌介导尖孢镰刀菌甜瓜专化型的遗传转化	27
2.2.6 根癌农杆菌介导尖孢镰刀菌遗传转化条件优化	28
2.2.7 尖孢镰刀菌转化子的 PCR 检测	30
2.2.8 转化子的抗性遗传稳定性鉴定	32
2.2.9 尖孢镰刀菌 eGFP 转化子荧光性的鉴定	32
2.2.10 转化子的微生物学特性鉴定	32
2.2.11 转化子致病性鉴定	33
3 结果与讨论	34
3.1 质粒的保存和提取鉴定	34
3.1.1 质粒鉴定结果	34
3.1.2 讨论	34
3.2 质粒 pUPGT 转化根癌农杆菌的鉴定	34
3.2.1 PCR 鉴定	34
3.2.2 酶切鉴定	35
3.2.3 讨论	36
3.3 尖孢镰刀菌的菌丝培养及分生孢子的获得	36
3.3.1 尖孢镰刀菌的菌丝培养	36
3.3.2 尖孢镰刀菌分生孢子的获得	36
3.3.3 讨论	37
3.4 尖孢镰刀菌对潮霉素的敏感性鉴定	37
3.4.1 尖孢镰刀菌潮霉素敏感性鉴定结果	37
3.4.2 讨论	37
3.5 根癌农杆菌介导的尖孢镰刀菌转化子的筛选	38
3.5.1 转化子筛选结果	38
3.5.2 讨论	38
3.6 根癌农杆菌介导尖孢镰刀菌遗传转化条件优化	39
3.6.1 不同根癌农杆菌菌种对转化影响	39
3.6.2 乙酰丁香酮含量对转化影响	40
3.6.3 根癌农杆菌初始菌液量对转化的影响	41
3.6.4 初始尖孢分生孢子浓度对转化影响	41
3.6.5 不同共培养方式对转化影响	42
3.6.6 共培养时间对转化影响	43
3.6.7 尖孢镰刀菌最高转化率的测定	44
3.7 尖孢镰刀菌 eGFP 转化子的 PCR 鉴定	45
3.7.1 CTAB 法提取基因组 DNA 结果	45

3.7.2 尖孢镰刀菌 eGFP 转化子的 PCR 鉴定	46
3.7.3 讨论	49
3.8 尖孢镰刀菌 eGFP 转化子的抗性遗传稳定性及荧光性鉴定	49
3.8.1 尖孢镰刀菌 eGFP 转化子的抗性稳定性鉴定	49
3.8.2 尖孢镰刀菌 eGFP 转化子的荧光性鉴定	49
3.8.3 讨论	51
3.9 尖孢镰刀菌 eGFP 转化子的微生物学特性鉴定	51
3.9.1 产孢量的测定	51
3.9.2 生长速度的测定	52
3.9.3 讨论	53
3.10 尖孢镰刀菌 eGFP 转化子致病性鉴定	53
3.10.1 回接甜瓜盆栽苗观察发病情况	53
3.10.2 讨论	54
4 总结与展望	55
参考文献	56
致 谢	62

Catalogue

Catalogue in Chinese	I
Catalogue in English	IV
Abstract in Chinese	1
Abstract in English	2
1 Introduction	4
1.1 Present study state of wilt disease in melon crop and its pathogens <i>Fusarium oxysporum</i>	4
1.1.1 Occurrence and harm of wilt disease in melon crop	4
1.1.2 Study of <i>Fusarium oxysporum</i>	5
1.1.3 Preventive measures and problems of the wilt disease in melon	6
1.2 Study and applications of the Green fluorescent protein in filamentous fungi	7
1.2.1 Basic theories study of the Green fluorescent protein	7
1.2.2 Advantages of the Green fluorescent protein	11
1.2.3 Applications and prospects of the Green fluorescent protein in filamentous fungi	12
1.3 Transformation system of filamentous fung	15
1.3.1 Study state	15
1.3.2 Transformation methods of filamentous fungi	15
1.3.3 Study of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -mediated transformation system of filamentous fungi	17
1.4 Purpose、 significance and content of this thesis	21
2 Materials and methods	22
2.1 Materials	22

2.2 Methods	24
2.2.1 Plasmid conservation、 extraction and identification.....	24
2.2.2 Transformed plasmid pUPGT into <i>Agrobacterium tumefaciensis</i>	26
2.2.3 Mycelium culture and conidiophore collection of <i>Fusarium oxysporum</i>	27
2.2.4 The hygromycin resistance of original <i>Fusarium oxysporum</i>	27
2.2.5 <i>Agrobacterium tumefaciensis</i> mediated <i>Fusarium oxysporum</i> transformation	27
2.2.6 Optimization of the <i>Agrobacterium tumefaciensis</i> -mediated transformation system.....	28
2.2.7 The PCR identification of transformants	30
2.2.8 Inheritance stabilization of transformants	32
2.2.9 Fluorescence identification of transformants	32
2.2.10 Characteristic dentification of transformants in microbiology	32
2.2.11 Identification of virulence of transformants.....	33
3 Results and discussion	34
3.1 Plasmid conservation、 extraction and identification	34
3.1.1 Results of plasmid identification	34
3.1.2 Discussion	34
3.2 Transformed plasmid pUPGT into <i>Agrobacterium tumefaciensis</i>	34
3.2.1 The PCR identification of <i>Agrobacterium tumefaciensis</i> transformants	34
3.2.2 The enzyme digestion dentification of <i>Agrobacterium tumefaciensis</i> transformants	35
3.2.3 Discussion	36
3.3 Mycelium culture and conidiophore collection of <i>Fusarium oxysporum</i>	36
3.3.1 Mycelium culture of <i>Fusarium oxysporum</i>	36
3.3.2 Conidiophore collection of <i>Fusarium oxysporum</i>	36
3.3.3 Discussion	37
3.4 The hygromycin resistance of original <i>Fusarium oxysporum</i>	37

3.4.1 Result of the hygromycin resistance of original <i>Fusarium oxysporum</i>	37
3.4.2 Discussion	37
3.5 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> mediated <i>Fusarium oxysporum</i>	
transformation	38
3.5.1 Result of selection of transformants.....	38
3.5.2 Discussion	38
3.6 Optimization of the <i>Agrobacterium tumefaciens</i>-mediated transformation	
system	39
3.7 The PCR identification of transformants	45
3.7.1 Extraction of genome DNA by CTAB method.....	45
3.7.2 The PCR identification of transformants	46
3.7.3 Discussion	49
3.8 Inheritance stabilization and Fluorescence identification of transformants	
.....	49
3.8.1 Inheritance stabilization of transformants	49
3.8.2 Fluorescence identification of transformants	49
3.8.3 Discussion	51
3.9 Characteristic identification of transformants in microbiology	51
3.9.1 Mensuration of spores number	51
3.9.2 Mensuration of growth speed	52
3.9.3 Discussion	53
3.10 Identification of virulence of transformants	53
3.10.1 Analysis of pathogenesis of the inoculated melons.....	53
3.10.2 Discussion	54
4 Conclusion and Expectation	55
Reference	56
Acknowledgements	62

摘要

尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)是一种世界性分布的重要的植物病原真菌, 寄主范围广泛, 可引起100多种植物的维管束萎蔫病害, 即植物枯萎病。尖孢镰刀菌甜瓜专化型(*F.oxysporum* f.sp.melonis)是甜瓜枯萎病致病真菌。

本研究通过根癌农杆菌介导转化法 (*Agrobacterium tumefaciens* Mediated Transformation, AtMT), 将构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 的甘油醛-3-磷酸脱氢酶启动子P*gpdA*驱动的增强型绿色荧光蛋白基因*eGFP*成功转入尖孢镰刀菌甜瓜专化型菌株L128。

建立了尖孢镰刀菌甜瓜专化型菌株的AtMT转化方法, 并对转化条件进行了优化, 得出最佳转化条件: 150 μ l OD_{600nm}值约为0.6的AS活化的根癌农杆菌AGL-1菌液离心后用100 μ lIM液体培养基悬浮, 悬浮液与100 μ l浓度为 1×10^6 个/ml的尖孢镰刀菌分生孢子液混和, 均匀涂布在紧贴与固体诱导培养基的尼龙膜上, 25 $^{\circ}$ C共培养48小时, 可以达到最高转化率, 300-350个转化子/ 10^6 个孢子。

PCR鉴定表明, 潮霉素标记基因*HPH*和增强型绿色荧光蛋白基因*eGFP*片段已稳定整合到转化子基因组; 通过蓝光激发转化子菌丝, 观察到绿色荧光现象, 表明绿色荧光蛋白基因在转化子中正确表达; 对转化子微生物特性进行检测, 证明转化子微生物特性与原始菌差异不明显; 致病性鉴定表明, 转化子比原始菌株致病性强。

本研究获得了遗传性稳定的*eGFP*标记的转化菌株, 为利用*eGFP*标记, 进一步在活体细胞水平上阐明尖孢镰刀菌对甜瓜的侵染机制及研究不同致病力菌株之间相互作用机制奠定了基础, 对生防菌的有效筛选也具有重要意义和深远影响。

关键词: 尖孢镰刀菌甜瓜专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. melon); 根癌农杆菌介导转化法 (*Agrobacterium tumefaciens* Mediated Transformation, AtMT); 增强型绿色荧光蛋白 (*eGFP*)

Abstract

Fusarium oxysporum causes wilt disease in more than 100 plant species all over the world and is one of the most important plant pathogenic fungi. *Fusarium oxysporum* f. sp. melon is the pathogen of melon wilt.

In our research, we transformed *eGFP* gene under the promoter of *PgpdA* from *Aspergillus nidulans* to the strain L128 of *Fusarium oxysporum* f. sp. melon by *Agrobacterium tumefaciens* Mediated Transformation (AtMT).

This study constructed a mature AtMT transformation method on *Fusarium oxysporum* f. sp. Melon and optimized the transformation system, we got the best transformation conditions: Centrifugal 150 μ l OD_{600nm} =0.6 *Agrobacterium tumefaciens* suspension that grewed in the AS presence induction medium (IM+AS), and diluted to 100 μ l in induction medium(IM) before mixing it with an equal volume of a conidial suspension from strain L128 (1×10^6 conidia per ml); this mix was plated on Nylon film which was placed on cocultivation medium in the presence of AS, and incubated at 25°C for 48 hours, then got to the highest transformation efficiency, 300 to 350 transformants per 1×10^6 conidia.

By PCR analysis, we found that both of the marker gene *HPH* and target gene *eGFP* were integrated into the genome of transformed L128. Green fluorescence can be seen in transformants when activated with blue light which indicates the correct expression of the target gene *eGFP*. Comparing the microbiological characteristics, we found the transformants are almost the same as the previous strain. But the pathogenicity of transformants is more severe than the previous strain.

This study gained the eGFP marked strain. The eGFP marked strain will be helpful for the better understanding of the infection mechanism of *Fusarium oxysporum* to the melon plant, the mechanism's illustration of the interaction among strains with different pathogenicities and selection of the strains of bio-control function.

Keywords: *Fusarium oxysporum* f. sp. melon; *Agrobacterium tumefaciens* Mediated Transformation (AtMT); enhanced green fluorescent protein (eGFP)

厦门大学博硕士学位论文摘要库

1 前 言

1.1 瓜类枯萎病及其致病菌尖孢镰刀菌研究现状

1.1.1 瓜类枯萎病的发生与危害

1.1.1.1 瓜类枯萎病的发生

瓜类枯萎病又称萎蔫病、死秧病、蔓割病，是由一类称为尖孢镰刀菌的真菌（*Fusarium oxysporum*Schl.）寄生引起的瓜类土传病害。该病首先由美国研究者在水瓜上发现并报道，1955年我国报道了有关黄瓜和甜瓜枯萎病的发生^[1]。随着我国瓜类种植面积的不间断扩大，加之长年连作，该病危害程度逐年加重，成为瓜类蔬菜等农作物的重要病害之一，全国各地均有发生。

1.1.1.2 危害症状

瓜类植株被病原菌侵染后，典型发病症状是萎蔫。在植株整个生育期病症均可发生，但以植株开花至坐果期发病最多且重。种子发芽期发病，种子发芽后生长极为缓慢，能够长出胚芽，但不长或很难长出胚根，幼嫩组织变淡褐色；苗期发病，叶色变浅，逐渐萎蔫，茎基部变褐缢缩，下部叶片变黄猝倒而死，严重时幼苗僵化枯死；成株期发病初期，植株叶片从基部向顶端逐渐萎蔫，中午明显，开始早晚可以恢复，几天后植株全部叶片萎蔫下垂，不再恢复，茎蔓基部变褐缢缩，易拔起，潮湿时根茎部呈水渍状腐烂，表面常产生白色或粉红色霉状物^{[2][3]}。田间常见瓜类枯萎病症状如图1.1所示，



A

B

图1.1 瓜类枯萎病

A 西瓜枯萎病；B 甜瓜枯萎病

Fig.1.1 Fusarium wilt disease in melon

1.1.1.3 病害流行

20世纪50年代我国瓜类枯萎病病情并不十分严重,但20世纪80年代以来随着我国温室塑料大棚种植技术的快速发展,温室及塑料大棚相对封闭的设施内形成的特殊小气候有利于作物生长的同时,也为枯萎病虫害滋生提供了温床,加之长年连作,土壤菌量积累不断增多,瓜枯萎病的发生日趋严重。在我国南方,作物枯萎病中以瓜类枯萎病发生最为严重。瓜类枯萎病一般导致减产10%~30%,严重田块可达40%以上,甚至绝产,已成为限制我国瓜类作物生产发展重要因素^[1]。

1.1.2 瓜类枯萎病致病菌尖孢镰刀菌的研究

1.1.2.1 尖孢镰刀菌的特点

尖孢镰刀菌属半知菌类(*Fungi imperfecti*)、梗孢目(*Moniliales*)、痂孢科(*Tubercular*)、镰刀菌属(*Fusarium*)。自从Snyder和Hansen(1940)把镰刀菌属美丽组内的种合并为1个,成为尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)。

尖孢镰刀菌产生3种孢子,即小型分生孢子、大型分生孢子和厚垣孢子。病株茎基部表面所见粉红色霉层是病菌的菌丝体、分生孢子和厚壁孢子。小型分生孢子椭圆形,有0~1隔,产生量最多,是在被侵染植株导管中产生量最多的孢子类型;大型分生孢子镰刀形,有3~5个隔,这些孢子一般可在死亡植株的表面和分生孢子座群中发现;厚垣孢子为圆形,从老的菌丝体或分生孢子上产生,有0~1隔。分生孢子萌发的温度范围为8~36℃,最适温度为28~30℃,pH值范围为3~10,最适pH值为5~7。菌丝生长的温度范围为8~34℃,最适温度为25~28℃,pH值范围为3~10,最适pH值为6~7^[4]。

1.1.2.2 尖孢镰刀菌的分类

尖孢镰刀菌是一类土壤中常见的真菌,我国报道侵染瓜类的尖孢镰刀菌分为5个专化型及多个生理小种,且对不同瓜类的致病力有明显差异。尖孢镰刀菌西瓜专化型[*F. oxysporum* (Schi.) f.sp. *niveum*]主要侵染西瓜、冬瓜,甜瓜可轻微发病,瓠瓜、南瓜、黄瓜、丝瓜不发病;黄瓜专化型[*F. oxysporum* (Schi.) f.sp. *cucumerium* Owen.]主要侵害黄瓜,但对甜瓜也有较强的致病力,不侵染西瓜、瓠瓜、南瓜、丝瓜;甜瓜专化型[*F. oxysporum* (Schi.) f.sp. *melonis*]主要侵染甜瓜、菜瓜,黄瓜可轻微发病,西瓜、瓠瓜、南瓜、丝瓜无病状;瓠瓜专化型[*F. oxysporum* (Schl.) f.sp. *lagenariae*]主要侵害瓠瓜、葫芦,南瓜轻微发病,不侵

染黄瓜、西瓜、甜瓜；丝瓜专化型[*F. oxysporum* (Schi.) f. sp. luffae]主要侵害丝瓜、甜瓜可轻微发病，不侵害西瓜、黄瓜。瓜类枯萎病菌有生理小种分化。其中，黄瓜枯萎病菌专化型有4个生理小种（我国的黄瓜枯萎病菌为4号小种），西瓜枯萎病菌专化型有3个生理小种^[5]。

1.1.2.3 尖孢镰刀菌侵染作物的过程

尖孢镰刀菌可以菌丝体、3种孢子形式（小型分生孢子、大型分生孢子、厚垣孢子）在土壤或病残体上长期生存。在土壤中休眠的尖孢镰刀菌，次年受到瓜类蔬菜根系分泌物的刺激，打破休眠，在适宜条件下萌发的孢子或菌丝体从根部、根尖、根部伤口或是侧根生长点侵入植株体，一旦进入植株体，菌丝体就在根皮层细胞间生长，菌丝体生长过程中产生小型分生孢子，分生孢子萌发时，菌丝体会穿透木质部上层壁进入木质部，通过木质部的纹孔侵入相邻导管，在导管中产生更多的小型分生孢子。病原菌在导管中自下而上生长，至植株的茎和顶部。病原菌在植株维管组织内生长，植株的营养和水分供应受到很大影响，从而导致叶片气孔的关闭、萎蔫和植株的整体死亡。且病原菌也可分泌毒素，干扰植株的代谢作用，致使植株中毒死亡。病原菌侵入植株的软组织，最终到达死亡组织的表面，在那里大量地产生孢子，这些孢子又成为病原菌进一步扩散的接种体^{[6][7]}。

1.1.2.4 尖孢镰刀菌的传播方式

枯萎病原菌尖孢镰刀菌以菌丝体、孢子（小型分生孢子、大型分生孢子、厚垣孢子）在土壤、病残体、未腐熟的堆肥越冬，种子也可带菌，成为次年的侵染源。在田间尖孢镰刀菌主要通过风与带菌种苗进行长距离传播，短距离传播主要通过灌溉水和带菌农作用具传播，带菌地下害虫和线虫也可传播病原菌^[8]。

1.1.3 甜瓜枯萎病防治措施及存在问题

1.1.3.1 甜瓜枯萎病的防治措施

随着甜瓜种植面积的不断扩大，我国许多省市甜瓜枯萎病发生严重，且危害程度逐年加重，对瓜的品质、产量影响很大。目前对其防治措施有：

① 选用抗病品种：选用抗病品种是防止枯萎病的有效途径，近年来培育出的甜瓜抗枯萎病品种有美国UoC PmR4S 和法国M17-18 等^[9]。

② 轮作：与非瓜类作物实行五年以上轮作，特别是与禾本科、豆科作物如大豆、玉米等效果更好。

③改良土壤理化性质：尖孢镰刀菌适宜弱酸环境，可施石灰改变土壤酸碱性，降低枯萎病发生率^[9]。

④化学药剂防治：播种前种子可用 50%多菌灵可湿性粉剂 1000 倍液浸种 40min 或 0.5%的高锰酸钾溶液浸种 5min 处理;重病田可使药土,药土的比例为 1:100, 在穴内下铺、上盖, 然后覆土。可选择的药剂有 70%甲基托布津、50%多菌灵等。田间发病初期可选用 25%溶菌灵可湿性粉剂, 或 50%多菌灵可湿性粉剂 500~800 倍液在植株根部浇灌, 每株灌药液 250 毫升, 每 5~7 天 1 次, 连灌 3 次。用“绿亨一号”、“绿亨二号”、“绿亨五号”进行土壤处理苗床, 每平方 1 克对枯萎病防治效果较好^{[10][11]}。

⑤嫁接：用南瓜、瓠瓜作砧木对甜瓜进行嫁接栽培。

⑥生物防治：目前主要采用拮抗微生物减低病原菌的密度或削弱病原菌的致病力从而达到控制病害的目的^{[12][13]}。其防治机理主要包括与病原菌间的位点及营养竞争、产生嗜铁素抑制病原菌的增殖、诱导寄主产生抗性^[9]及交叉保护作用^[9]。

1.1.3.2 存在问题

目前对甜瓜枯萎病的防治主要依靠化学农药, 但化学防治不仅成本高, 易造成农药残留, 污染环境, 对人畜有害, 且枯萎病为土传病害, 难以实现大面积的土壤药剂处理; 抗病品种在一定程度上起到了防病效果, 但抗病育种受抗病品种资源稀少、病原菌有多种专化型且不稳定等多种因素影响, 难以满足生产上的需要; 传统的农业措施也难以长期凑效。

随着生物防治的研究与应用受到越来越广泛的重视, 所以现在迫切需要利用生物学方法探索新的技术手段更深入的探究尖孢镰刀菌的侵染机制, 进而为生物防治提供理论依据。

1.2 绿色荧光蛋白标记真菌的研究与应用现状

1.2.1 绿色荧光蛋白基础理论研究

1.2.1.1 发展历史

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 for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库