

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号:

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

\_\_\_\_\_ 硕 士 \_\_\_\_\_ 学 位 论 文

**基因 zCep85 和 zNek2 对斑马鱼早期胚胎发育的影响**

**The influence of zCep85 and zNek2 on the early embryonic development of zebrafish**

**作者姓名: 余成涛**

**指导教师姓名: 余娴文副教授**

**专业名称: 生物化学与分子生物学**

**论文提交日期:**

**论文答辩时间: 2016 年 5 月 19 日**

**学位授予日期:**

**答辩委员会主席: \_\_\_\_\_**

**评 阅 人: \_\_\_\_\_**

2016 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): 余成涛

年 月 日

## 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）：余成涛

年 月

# 目录

中文摘要 .....	VII
Absract.....	VIII
<b>第一章 前言.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 模式生物斑马鱼 .....</b>	<b>2</b>
1.1.1 斑马鱼简介 .....	2
<b>1.2 原肠运动.....</b>	<b>2</b>
1.2.1 斑马鱼发育胚胎分期简介 .....	2
1.2.2 原肠运动简介 .....	3
<b>1.3 中心体蛋白 Cep85 .....</b>	<b>6</b>
1.3.1 中心体蛋白概况 .....	6
1.3.2 中心体蛋白 Cep85.....	7
<b>1.4 Nek2 激酶 .....</b>	<b>7</b>
<b>1.5 CRISPR/CAS 9 基因编辑技术.....</b>	<b>8</b>
1.5.1 CRISPR/Cas 的基因座结构.....	9
1.5.2 CRISPR 研究历史.....	10
1.5.3 CRISPR/Cas 作用机制.....	10
1.5.4 CRISPR/Cas9 在基因治疗中的应用 .....	11
<b>第二章 材料与方 法 .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 常用药品和试剂.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2 分子克隆实验方法.....</b>	<b>12</b>
2.2.1. 目的核酸片段的扩增 .....	12
2.2.2 大肠杆菌感受态细胞的制备和质粒转化 .....	14
2.2.3 质粒 DNA 的提取.....	15

2.2.4 质粒 DNA 的工具酶处理.....	16
2.2.5 DNA 片段的回收和纯化.....	17
2.2.6 DNA 连接反应.....	18
2.2.7 总 RNA 的制备 (TRIZOL 法) .....	18
2.2.8 mRNA 反转录成 cDNA.....	20
2.2.9 相关质粒的构建 .....	21
<b>2.3 斑马鱼相关实验方法.....</b>	<b>22</b>
2.3.1 原位杂交技术 .....	22
2.3.3 胚胎显微注射 .....	29
2.3.4 活体显微摄影 .....	30
2.3.5 Western Blotting 分析.....	30
2.3.6 反义寡核苷酸 (morpholino) 基因敲除或敲低 .....	31
<b>2.4 蛋白质相关实验 .....</b>	<b>32</b>
2.4.1 蛋白质的 SDS-PAGE 电泳与 Western blot 分析.....	32
<b>2.5 CRISPR-Cas9 基因敲除技术.....</b>	<b>33</b>
2.5.1 Cas9 的靶位点选择 .....	33
2.5.2 Cas9 靶位点的确认 .....	34
2.5.3 构建 gRNA 体外转录载体.....	35
2.5.4 制备 Cas9 mRNA 和 gRNA .....	36
2.5.5 F0 斑马鱼的靶点突变效率检测 .....	38
2.5.6 检测 F0 的 germline transmission.....	38
2.5.7 筛选携带靶位点突变的 F1 成鱼 .....	39
<b>第三章 结果与分析 .....</b>	<b>41</b>
3.1 Cep85 的克隆和序列分析 .....	41

3.2 斑马鱼 zCep85 mRNA 表达谱分析.....	43
3.3 斑马鱼 zCep85 过量表达的表型分析 .....	44
3.4 斑马鱼基因 zCep85 的 CRISPR-Cas9 基因敲除试验 .....	46
3.4.1 靶位点的确定 .....	46
3.4.2 sgRNA 表达载体阳性结果验证.....	49
3.4.3 sgRNA 和 mRNA 体外转录.....	50
3.4.4 靶位点有效性的检测 .....	51
3.4.5 突变类型及检测效率 .....	52
3.5 斑马鱼敲除表型分析.....	52
3.6 zCep85 影响斑马鱼体轴与体节的发育.....	53
3.7 zCep85 影响斑马鱼原肠运动.....	54
3.8 zNek2 的时空表达谱.....	58
3.9 zNek2 在体节发育中的影响 .....	59
3.10 zNek2 影响斑马鱼原肠运动.....	60
第四章 讨论与展望 .....	62
参考文献 .....	64

<b>Abstract .....</b>	<b>VII</b>
<b>1 Introduction.....</b>	<b>VIII</b>
<b>1.1 Zebrafish(Danio rerio).....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Introduction of zebrafish .....	2
<b>1.2 Gastrulation movement .....</b>	<b>2</b>
1.2.1 Development of zebrafish embryo stage .....	2
1.2.2 Introduction of gastrulation movement .....	3
<b>1.3 Centrosome protein Cep85 .....</b>	<b>6</b>
1.3. 1 Introduction of Centrosome protein .....	6
1.3.2 Introduction of Cep85.....	7
<b>1.4 The phosphokinase Nek2 .....</b>	<b>7</b>
<b>1.5 The CRISPR/CAS 9 gene editing techniques .....</b>	<b>8</b>
1.5.1 The Locus structure of CRISPR/Cas 9 .....	9
1.5.2 The history of CRISPR.....	10
1.5.3 The mechanism of CRISPR/Cas.....	10
1.5.4 The Application of CRISPR/Cas9 in gene therapy .....	11
<b>2 Materials and methods .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Drugs and reagents.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2 Experiments and methods for cloning.....</b>	<b>12</b>
2.2.1. Polymerase chain reaction .....	12
2.2.2 Preparation of competent cells and transformation .....	14
2.2.3 Preparation of plasmid DNA .....	15
2.2.4 Enzymatic treatments of plasmid DNA.....	16

2.2.5 Recovery and purification of DNA .....	17
2.2.6 Ligation.....	18
2.2.7 Preparation of total RNA(TRIZOL).....	18
2.2.8 Preparation of cDNA by mRNA reverse transcription.....	20
2.2.9 Construction of plasmid expression vectors.....	21
<b>2.3 Experiments and methods for zebrafish .....</b>	<b>22</b>
2.3.1 In situ hybridization(ISH).....	22
2.3.3 Embryo microinjection.....	29
2.3.4 Living micrograph.....	30
2.3.5 Western Blotting assay.....	30
2.3.6 Morpholino knock down.....	31
<b>2.4 Experiments and methods for protein.....</b>	<b>32</b>
2.4.1 SDS-PAGE electrophoresis.....	32
<b>2.5 CRISPR-Cas9 gene knockout technology.....</b>	<b>33</b>
2.5.1 Targeted point selection.....	33
2.5.2 Targeted to confirm.....	34
2.5.3 Build gRNA carrier in vitro transcription.....	35
2.5.4 The preparation of Cas9 mRNA and gRNA.....	36
2.5.5 The detection efficiency of F0 zebrafish mutations.....	38
2.5.6 Detection of F0 germline transmission.....	38
2.5.7 Screening with targeted point mutations of F1 fish.....	39
<b>3 Result and analysis.....</b>	<b>41</b>
3.1 Cep85 cloning and sequence analysis.....	41
3.2 zCep85 mRNA expression spectrum analysis.....	43



<b>3.3 phenotypic analysis of zCep85 over-expression.....</b>	<b>44</b>
<b>3.4 Zebrafish genes zCep85 CRISPR - Cas9 knockout experiments.....</b>	<b>46</b>
3.4.1 The determination of targeted point .....	46
3.4.2 The positive results of sgRNA expression vector.....	49
3.4.3 Transcription in vitro of sgRNA and mRNA .....	50
3.4.4 Targeted at the effectiveness of the detection .....	51
3.4.5 Mutation types and detection efficiency.....	52
<b>3.5 Zebrafish knockout phenotypic analysis.....</b>	<b>52</b>
<b>3.6 zCep85 affect the growth of zebrafish body axis.....</b>	<b>53</b>
<b>3.7 The zCep85 influence of zebrafish gastrulation movement .....</b>	<b>54</b>
<b>3.8 The spatiotemporal expression of zNek2 .....</b>	<b>58</b>
<b>3.9 The influence of the somite development of zNek2 .....</b>	<b>59</b>
<b>3.10 zNek2 influence zebrafish gastrulation movement .....</b>	<b>60</b>
<b>4 Discussion and prospect .....</b>	<b>62</b>
<b>References.....</b>	<b>64</b>

## 中文摘要

zCep85 是哺乳动物中心体结合蛋白 Cep85 在斑马鱼中的同源蛋白, 其靠近 C 端的部分具有一个 coil-coiled 功能域, 这是大部分中心体结合蛋白共有的结构。目前对 zCep85 的研究尚浅, 本实验室早期报道显示, 哺乳动物细胞中 hCep85 特异性地拮抗 hNek2, 使得细胞停滞于 G2/M 期。但是, 我们对其在脊椎动物胚胎发育中的功能依然所知甚少。为了深入探究 zCep85 在发育中的作用, 本课题以斑马鱼 (*Danio rerio*) 为动物模型从基因结构、表达谱、功能分析等方面研究了 zCep85 在胚胎发育中的作用。此外, 也研究了 zNek2 在早期胚胎发育中的功能。

首先通过整胚原位杂交实验对 zCep85 的表达谱进行分析, 我们发现 zCep85 在斑马鱼胚胎发育的各个阶段均有表达: 卵裂期高表达, 原肠胚期在体轴发育区域特异性表达, 随后在胚胎躯干部位广泛的表达, 但是在肌节处具有特异性。这说明 zCep85 在胚胎发育过程中发挥功能, 尤其可能在原肠运动和体轴的形成中起重要作用。为了更加深刻的研究此基因, 我们在本实验室首次建立 CRISPR-Cas9 基因敲除平台, 利用基因敲除技术研究 zCep85 在胚胎发育中的作用。进一步实验证明过表达和敲除 zCep85 F0 代胚胎均能造成斑马鱼体轴、肌节发育的异常, 原肠运动标志基因 *noggin*、*chordin*、*gsc*、*hgg1*、*dlx3*、*ntl* 的表达水平和表达区域均也发生显著变化, 说明 zCep85 能够影响斑马鱼的原肠运动, 并且通过对细胞汇聚延伸运动的干扰进而影响斑马鱼的发育。同样的研究策略也运用于 zNek2 的研究中, 过表达和敲低的 zNek2 胚胎也能造成斑马鱼体轴、肌节发育的异常。特别的是, zNek2 敲低胚胎的体轴延伸变化与过表达 zCep85 的胚胎相似, 都受到了抑制。

综上所述, 本次研究首次证实了 zCep85 对斑马鱼胚胎原肠运动和体轴、肌节发育具有重要作用, 初步揭示了 zCep85 对脊椎动物胚胎发育的影响。此外, 我们通过对 zNek2 的研究也揭示了其在胚胎发育中的作用, 这为在后期探究 zCep85 和 zNek2 在斑马鱼早期胚胎发育中的相互关系奠定了基础。

关键字: zCep85; 原肠运动; CRISPR;

## **Absract**

zCep85 is homologous of mammal centrosome binding protein Cep85 in zebrafish, which has a coil - coiled functional domain near the C-terminal of protein. At present, the research on zCep85 is not much. hCep85 can specifically antagonise hNek2, which acts as the role in making the cell cycle arrested of G2 / M phase. In this project, zebrafish (*Danio rerio*) can be looked as an animal model of gene structure, expression profiling, functional analysis and other aspects of the study about zCep85. In addition, the role of zNek2 in embryonic development of vertebrate is also studied.

Firstly, Whole embryo in situ hybridization is used to analyze the zCep85 expression profile in early zebrafish embryos. The cleavage stage has high expression of zCep85 and the region of the body axis expressed specifically in gastrula stage, Then the gene expressed in embryonic trunk widely, But the sarcomere also expressed specifically. This indicates that zCep85 play a role in embryonic development, Especially in the gastrulation movement and the formation of the body axis. In order to study the role of zCep85 more deeply, We firstly set up the CRISPR-Cas9 Knock out platform to research the zCep85 in the embryonic development. Further experiments show that over-expression and knock-out zCep85 F0 generation embryos can make zebrafish body axis and sarcomere development abnormalities. In addition, the expression area and expression level of marker gene *noggin*, *chordin*, *gsc*, *hgg1*, *dlx3* and *ntl* are changed significantly, which explained that zCep85 can affect the gastrulation movement, especially in CE movement, affecting the formation and development of zebrafish body trunk. We also found that if we over-expressed and knocked down the gene of zNek2 in zebrafish embryos, the expression area and expression level of marker gene *noggin*, *chordin*, *gsc*, *hgg1*, *dlx3* and *ntl* are changed significantly.

In conclusion, The study confirmed that zCep85 play the important role of cell movement and embryo development of zebrafish body axis and sarcomere. It reveals that the zCep85 affect vertebrate embryonic development. In addition, The study of

zNek2 also reveals its role in embryonic development, which laid a solid foundation to explore their relationship on early embryonic development of zebrafish in future.

Keywords: zCep85; gastrulation movement; CRISPR

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 第一章 前言

### 1.1 模式生物斑马鱼

#### 1.1.1 斑马鱼简介

斑马鱼 (Zebrafish, *Danio rerio*) 是生存于热带地区及部分亚热带地区的小型鱼种, 属于辐鳍鱼纲、鲤形目、鲤科、短担尼鱼属, 原分布于巴基斯坦、印度、缅甸、尼泊尔、孟加拉等国的溪流中, 因为其体侧相间的蓝白色条纹而得名<sup>[1]</sup>。斑马鱼作为模式生物, 在各个领域都有着重要作用。在发育遗传研究中, 斑马鱼和传统模式生物果蝇一样, 受到了广泛的研究<sup>[2]</sup>。在筛选药物领域, 由于斑马鱼高通量、给药简单和表型明显等特点, 成为主要的药物前期筛选模型<sup>[3]</sup>。此外, 斑马鱼也促进了细胞生物学、遗传学、神经和发育生物学等多个学科的发展。作为模式生物的斑马鱼有以下优点: 1、成鱼体型小, 易大量培育, 成本低; 2、生长迅速, 性成熟快, 产卵多; 3、胚胎体外受精发育, 速度快, 受精卵体积大且透明, 易观察; 4、斑马鱼基因组测序已经完成, 遗传图谱完整, 操作技术成熟, 单倍体、孤雌二倍体、突变体均易得; 5、基因敲除技术和转基因技术趋于成熟<sup>[4]</sup>。

### 1.2 原肠运动

#### 1.2.1 斑马鱼胚胎发育分期简介

斑马鱼早期胚胎发育分期的划分主要强调发生在受精之后的前 3 天发育变化情况, 包括: 合子期 (zygote period)、卵裂期 (cleavage period)、囊胚期 (blastula period)、原肠胚期 (gastrula period)、体节期 (segmentation period)、咽囊期 (pharyngula period)、孵化期 (hatching period) 和早幼期 (early larval period)<sup>[5]</sup>。(见表一)

表一：斑马鱼早期胚胎发育分期表<sup>[5]</sup>

分期	h	HB	描述
合子期			
1-细胞	0	1, 2	胞质流向动物极, 形成胚盘
卵裂期			
2-细胞	0.75	3	部分卵裂
4-细胞	1	4	2×2排列的卵裂球
8-细胞	1.25	5	2×4排列的卵裂球
16-细胞	1.5	6	4×4排列的卵裂球
32-细胞	1.75	7	规则的2层卵裂球, 有时4×8排列
64-细胞	2	8	规则的3层卵裂球
囊胚期			
128-细胞	2.25	9	5层卵裂球; 卵裂面不规则
256-细胞	2.5		7层卵裂球
512-细胞	2.75		9层卵裂球; NO: YSL形成
1k-细胞	3	10	11层卵裂球; NO: 单排YSL核; 卵裂细胞周期轻度不同步
高囊胚	3.33		>11层卵裂球; 胚盘开始变平; NO: 2排YSL核; 分裂不同步
椭圆形	3.66	11	胚盘变平产生椭圆形; NO: 多排YSL核
球形	4	12	球形; 胚盘与卵黄之间为水平边界
穹顶	4.33	13	仍为球形; 当外包开始时, 卵黄细胞向动物极顶起
30%-外包	4.66	14	胚层如倒置杯状不均一增厚; 边缘达动植物极距离30%
原肠期			
50%-外包	5.25		胚层厚度仍不均一
胚环	5.66		胚环在动物极可见; 50%-外包
胚盾	6	15	胚盾在动物极可见; 50%-外包
75%-外包	8	16	背侧明显增厚; 可见上下胚层和排泄 (evacuation) 区
90%-外包	9		脑原基增厚; 脊索原基从节板分离
尾芽	10	17	尾芽显著; 脊索原基从神经突 (neural keel) 分离; 早期小膨出 (polster); 神经突前侧出现中间矢状沟; 100%-外包
体节期			
1-体节	10.33		第一体节沟
5-体节	11.66	18	小膨出显著; 视囊, Kuperffer囊
14-体节	16	19	EL=0.9mm; 眼基板; 脑神经元, V形躯干体节; NO: 前肾导管
20-体节	19	20	EL=1.4mm; 0.5<YE/YB<1; 肌收缩; 晶状体; 耳囊; 交叉条纹; 后脑神经元显著; 尾部延伸
26-体节	22		EL=1.6mm; HTA=125°; 侧向条纹; 耳石 (otoliths); 原基-3
咽囊期			
原基-5	24		EL=1.9mm; HTA=120°; OVL=5; YE/YB=1; 视网膜和皮肤早期色素沉着; 中鳍折叠; 卵黄血细胞; 心脏搏动
原基-15	30		EL=2.5mm; HTA=95°; OVL=3; YE/YB>1; YB/HD=2; 早期触碰反射和简单的应激运动; 视网膜色素沉着; 背侧条带达12体节; 弱循环; 主动脉至尾端一半; 主静脉编织; 浅胸鳍芽; 直尾; NO: 尾端细胞退化; 第1大动脉弓血液循环
原基-25	36		EL=2.7mm; HTA=75°; OVL=1; PF(H/W)=3/4; 早期运动; 尾部色素沉着; 背部条纹加深; 强循环; 单一大动脉弓对; 主静脉达尾部3/4; NO: PF顶端上胚层缘

高胸鳍	42	EL=2.9mm; HTA=55°; 1/2<OVL<1; YE/YB=1.5; YB/HD<1.3; PF(H/W)=1; 去绒毛胚胎游动后背上位静息; YE仍为锥形; PF顶端上胚层缘显著; 早期侧带; 完整的背侧带; 黄素细胞仅见头部; 虹膜色素细胞仅见视网膜; 心包显著; NO: 心腔; 血管段; 颌弓和舌弓; 前肠发育; 嗅觉纤毛; 耳囊壁增厚
孵化期		
长胸鳍	48	EL=3.1mm; HTA=45°; OVL=1/2; PF(H/W)=2; 背上位静息; YE开始变细, PF突出; 背腹侧条纹汇于尾部; 侧带约6个黑色素细胞; 视网膜上虹膜色素细胞丰富; 头部显著黄色; NO: 循环见于2-4大动脉弓及血管段; 嗅觉纤毛摆动; 半规管 (semicircular canal); 神经丘 (neuromast)
胸鳍	60	EL=3.3mm; HTA=35°; 运动迅速难以分辨; YR变细融入YB; 侧带约10个黑色素细胞; PF变平成鳍形, 有明显的循环; 视网膜虹膜色素细胞环加深; 虹膜色素细胞出现于背侧; NO: PF软骨和角质鳍条 (actinotrichia); 肠道; 耳囊分2腔; 早期颌软骨; 循环于5-6大动脉弓; 口仍小, 开于腹侧眼中线
突口	72	EL=3.5mm; HTA=25°; 宽口突出于眼前方; 虹膜色素细胞出现于卵黄带; 虹膜色素细胞覆盖眼部一半; 背部黄色与头部色调同; NO: 腮裂和腮丝芽基; 腮弓1-5软骨; 鳃盖覆住1-2腮弓; 匙骨 (cleithrum)

### 1.2.2 原肠运动简介

原肠运动 (gastrulation) 是指囊胚细胞经过剧烈并且有规律的迁移后, 细胞重新排列, 并形成胚胎结构的过程。原肠作用中, 细胞的运动是广泛的, 只有各种细胞间相互协调, 紧密联系, 才能正常的完成原肠运动<sup>[6]</sup>。

斑马鱼的原肠胚期从细胞迁移至整个卵黄的50%开始, 一直持续到尾芽期结束, 细胞外包速度约为15%/h。细胞外包运动促使了内卷 (involution) 的发生, 此时, 细胞开始向背部中线位置汇聚 (convergence) 并沿着中线延伸 (extension), 渐渐形成前后轴 (anterior-posterior axis, AP axis) 和背腹轴 (dorsal-ventral axis, DV axis), 分化出内胚层、中胚层和外胚层。其中内胚层发育成消化道、呼吸道上皮和肝脏及胰腺等; 中胚层可以发育为脊索、肌节、骨骼、排泄系统、生殖系统和循环系统等; 外胚层可以发育为表皮及其附属物和神经系统<sup>[7, 8]</sup>。

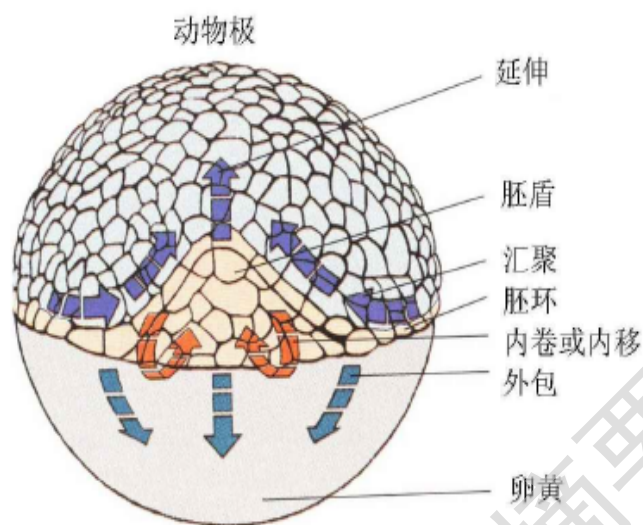


图1.3: 斑马鱼原肠胚期细胞运动示意图。

原肠胚初期，外包运动发生到50%后，细胞开始朝向胚盘边缘运动，使得其不断增厚，并且形成环状细胞的聚集结构——胚环（germ ring）。在此之后，神经外胚层细胞和中内胚层细胞快速汇聚和延伸，导致位于边缘区和胚胎腹侧以及侧向的细胞开始向卵黄的背部区域汇聚，大量中内胚层细胞集中在胚胎的一侧（背侧）形成加厚的结构——胚盾（embryonic shield）。此时期，细胞外包运动暂时停止，待胚盾形成后，外包继续发生<sup>[9]</sup>。此后，中轴和轴侧的细胞发生重排，内陷迁移，胚轴细胞聚集变窄，并且沿胚胎前后轴开始延伸。随着胚胎汇聚延伸运动的进行，斑马鱼胚胎的形状也开始改变，由球状逐渐延前后轴延伸变为卵圆形，体节、脊索和神经板也沿着中侧体轴变窄<sup>[2, 10]</sup>。（如图1.3）

原肠运动期间发生的汇聚和延伸在空间分布和运动方式上是不同的，胚盘腹侧的细胞向腹侧的卵黄囊运动最终抵达尾部；原肠侧面的细胞向着背侧发生逐步增高的汇聚、延伸运动；胚胎背侧的细胞则发生剧烈的延伸运动；卵黄多核体层细胞也同时发生类似外胚层和中内胚层细胞运动的汇聚延伸运动（如图1.4）。最终导致中、侧向细胞向胚胎中线运动，沿中侧向胚层逐渐变窄，而胚轴沿前后轴方向发生延伸变长。



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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.