

学校编码：10384

分类号 _____ 密级 _____

学号：21620120153813

UDC _____

厦门大学

博士学位论文

枸杞可育和不育花药中超微结构、ATP、钙
和转录组学初步研究

The Study of Ultrastructure、ATP、Calcium and RNA-Seq
in fertile and sterile anthers of *Lycium Barbarum* L.

杨淑娟

指导教师姓名：田惠桥 教授

带格式的：字体：四号，非加粗

带格式的：缩进：首行缩进： 7.82 字符

专业名称：植物生殖生物学

论文提交日期：2016年 05 月

论文答辩时间：2016年 05 月

学位授予日期：2016年 月

带格式的：字体：四号，非加粗

带格式的：缩进：首行缩进： 0 字符

带格式的

答辩委员会主席： _____

评 阅 人： _____

2016 年 5 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):

年 月 日

带格式的: 居中, 缩进: 首行缩进: 0 字符

带格式的: 字体: (默认) 仿宋_GB2312, (中文) 仿宋_GB2312

带格式的: 字体: (默认) 仿宋_GB2312, (中文) 仿宋_GB2312

带格式的: 字体: (默认) 仿宋_GB2312, (中文) 仿宋_GB2312

带格式的: 字体: (默认) 仿宋_GB2312, (中文) 仿宋_GB2312

带格式的: 字体: (默认) 仿宋_GB2312, (中文) 仿宋_GB2312

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）：

年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

目 录

摘 要	III
Abstract	III
第一章 引言	144
1 植物雄性不育的类型及遗传特点	222
1.1 植物雄性不育分类的几种学说	222
1.2 植物雄性不育的其他分类标准	333
1.3 植物雄性不育的遗传特点	333
2 植物雄性不育发生的时期和败育方式	555
2.1 植物雄性不育的发生时期	555
2.2 植物雄性不育的败育方式	666
3 植物雄性不育的细胞学研究	666
3.1 绒毡层	777
3.2 花粉壁与花粉败育	104010
4 植物雄性不育和物质代谢关系的研究	124212
5 植物雄性不育的生理生化研究	124212
6 植物雄性不育和能量代谢关系的研究	134313
6.1 ATP 对植物发育的影响	134313
6.2 ATPase 对植物发育的影响	144414
7 植物雄性不育和钙的相关研究	154515
8 植物雄性不育的分子生物学研究	164616
9 枸杞雄性不育的研究现状	194919
10 转录组学在植物雄性不育研究中的应用	202020
11 本研究的的目的和意义	212121
第二章 枸杞可育花药与不育花药的超微结构特征	232323
1 材料与方法	232323
2 结果分析	242424
2.1 可育花药发育过程中的超微结构	272727

2.2 不育花药的超微结构.....	363636
3 讨论	484848
3.1 枸杞雄性不育花药的超微结构特征.....	484848
3.2 枸杞不育枸杞绒毡层的异常特征.....	494949
3.3 枸杞不育花药花粉外壁的异常特征.....	505050
第三章 枸杞可育与不育花药中 ATPase 的分布特征	525252
1 材料与方法	535353
2 结果分析	535353
2.1 可育花药发育过程中 ATPase 的分布.....	535353
2.2 不育花药中 ATPase 的分布.....	666666
3 讨论	747475
3.1 枸杞可育花药发育过程中 ATPase 的分布特征及功能探讨.....	757575
3.2 不育花药中 ATPase 分布状态与花粉不育.....	767676
3.3 绒毡层细胞中 ATPase 与花粉败育的关系.....	777777
第四章 枸杞可育与不育花药中 Ca²⁺ 分布特征	797979
1 材料与方法	808080
2 结果分析	808080
2.1 可育花药发育过程中 Ca ²⁺ 的分布.....	808080
2.2 不育花药中 Ca ²⁺ 的分布.....	939393
3 讨论	101401401
3.1 Ca ²⁺ 在可育花药发育过程中的分布动态特征及功能.....	101401401
3.2 不育花药中 Ca ²⁺ 的分布动态特征.....	103403403
第五章 枸杞可育和不育花药转录组分析和差异基因表达谱分析	105405405
1 材料与方法	105405405
2 结果分析	110410410
2.1 转录组测序分析结果 (RNA-Seq).....	110410410
2.2 数字基因表达谱 (DGE) 分析结果.....	126426426

3 讨论	145145145
3.1 胼胝质相关调控基因与花药败育的关系	145145145
3.2 ATPase 对花粉发育的影响	145145145
3.3 绒毡层相关基因的正常表达与花粉败育的关系	146146146
第六章 结论	148148148
参考文献	150150150
缩写目录	157157157
致 谢	158

厦门大学博硕士论文摘要库

摘 要

高等植物的雄性不育是杂种优势利用的基础，避免了去雄的繁杂程序。植物雄性不育的种类很多，形成原因也很复杂，对雄性不育机理的探索一直是一个热门研究领域。枸杞雄性不育系是近年来新发现的一种不育类型，具有很大应用潜力，为了明确其雄性不育发生的机制并更好地开发利用这一宝贵种质资源，我们从结构、生理和分子生物学等几个方面展开了研究。

本研究以可育系宁杞 1 号和不育系宁杞 5 号为实验材料，用超微结构、ATPase 和 Ca^{2+} 的细胞化学定位，以及转录组和数字基因表达谱研究了枸杞花药发育的特征并比较了不育花药形态、结构和基因表达的差异。主要研究结果如下：

(1) 超微结构研究结果显示，不育花药最早出现的结构异常是在四分体形成后。减数分裂后有些四分体小孢子直接退化，在质膜下方出现大量液泡，进而败育；而有些四分体小孢子的内部结构没有出现异常，可分化出花粉外壁原基，但花粉外壁的主要成分--孢粉素在外壁原基上沉积异常，花粉外壁不能完整构建，始终缺乏覆盖层。这一结果表明四分体胼胝质壁不分解及花粉外壁原基异常可追溯到绒毡层细胞的异常和四分体小孢子的异常。胼胝质壁的不降解无疑与绒毡层细胞中胼胝质酶的代谢相关，而花粉外壁的构建异常则与小孢子的指导构建有关。在不育花药的四分体后期，绒毡层细胞的内切向壁显著加厚，前乌氏体在细胞壁中大量积累，不能分泌出细胞。乌氏体异常是绒毡层细胞发生偏差的另一现象。

(2) ATPase 定位观察研究结果显示，可育花药四分体小孢子的质膜和胼胝质壁中均无明显 ATPase 分布，而在不育花药小孢子母细胞及四分体的胼胝质壁和质膜中一直含有较多的 ATPase，形成明显的差别。不育四分体小孢子和绒毡层细胞除了细胞核外，其它部位很少含有 ATPase。在以后的发育中，可育花药中的 ATPase 呈特异性分布，而不育花药中的分布杂乱无章，没有特异性。可育花药与不育花药中 ATPase 分布差异表明花粉育性改变与细胞能量代谢有关。不育小孢子母细胞胼胝质壁中积累较多的 ATPase 暗示着构建的胼胝质壁可能性质或结构发生异常（如糖的连接方式或数量的改变），导致四分体胼胝质壁无法被一般胼胝质酶分解。

(3) Ca^{2+} 亚细胞化学定位结果显示,在可育花药的四分体胼胝质壁中基本没有钙沉淀颗粒,而在不育花药中,在四分体的胼胝质壁和花粉外壁原基中积累了很多钙沉淀颗粒。败育花药中四分体胼胝质壁不降解,小孢子虽然可分化出很多细胞器,形成不完全的小孢子壁,但不会继续发育形成大液泡。在不育花药药室的高 Ca^{2+} 环境中,小孢子细胞质却只含有很少钙沉淀颗粒的现象提示,很可能是四分体小孢子质膜上的钙通道发生了异常,阻止 Ca^{2+} 进入小孢子中,结果造成了四分孢子外的胼胝质壁中积累了大量钙沉淀颗粒,而细胞内却很少的异常现象。其结果是导致败育小孢子细胞质中由于缺少 Ca^{2+} 不能形成大液泡,发生胞质收缩而最终败育。四分体小孢子质膜上的钙通道异常与四分体胼胝质壁异常的关系还不清楚,但质膜与胼胝质壁紧密相邻的位置不能排除这种推测。

(4) 转录组测序分析结果显示,测序后总共获得 110,728,908 条原始数据,这些原始数据经过过滤后,最终得到了总大小为 10,8602,248 的 clean reads。转录本组装后共得到 80,266 条 Unigene,平均长度为 731 bp。将枸杞花药整套转录组用 7 个公共数据库 Nr、NCBI、Nt、SwissProt、GO、KOG 和 KEGG 进行 Blast 比对功能注释,其中 47.6% 的 Unigene 与 NR 蛋白数据库有同源比对信息。与所有数据库都比对上的有 9,301 条,占 8.47%;至少在一个数据库中比对上的有 61,591,占 56.09%。总共 108,602,248 条基因,比对上的有 92,754,342,比对率(mapping-rate)为 85.41%。将这些注释成功的 unigenes 按照 GO 的细胞组分、分子功能、生物学过程三大功能分类分别包含了 14、11 和 22 个功能亚类。KOG 功能聚类分析共有 27,907 个 unigenes 注释到 KOG 的 26 个分组中,最多的是一般功能预测,其次分别是翻译后修饰,蛋白反转和分子伴侣等。KEGG 功能注释分析中有 32 个亚类,最主要的代谢通路分别是碳水化合物代谢(801, unigenes),信号转导(700, unigenes),翻译(690, unigenes),折叠、排序和退化等(659, unigenes)等。

(5) 高通量数字基因表达谱结果显示,通过对可育花药发育的 6 个文库和不育花药的 3 个文库,及可育花药与不育花药相对应的 6 个不同时期的基因表达谱的比较,获得了差异表达基因。差异表达基因分析表明,随着花药的发育,差异表达基因数目增多。在不育花药中,差异基因下调表达的数目远多于上调表达。GO 功能富集表明,不育花药下调差异表达基因富集在花粉外壁构建物质的合成、

分泌和转运等生物过程上，而上调差异表达基因富集的很少。KEGG 代谢通路功能富集表明，差异基因也相应的富集在与花粉外壁形成相关的次生物合成及光合作用相关的代谢通路。这些差异表达基因与绒毡层代谢和花粉壁发育相关，涉及的生物过程和富集的通路与胼胝质合成、小孢子壁构建以及孢粉素、黄酮类一些次生代谢物的合成、分泌和转运相关。上述这些过程的异常归根结底还是由于绒毡层的结构和生理功能异常造成的。进一步分析表明在不育花药中，绒毡层细胞中脂类代谢、内质网中蛋白代谢、ATP 转运及钙信号等相关的基因表达量很低，使得与花粉发育相关的胼胝质壁的降解及外壁发育相关的原外壁和孢粉素的沉积都受到了影响，最终导致花粉外壁出现严重缺陷，花粉败育。

关键词：雄性不育；钙；枸杞；超微结构；ATPase；转录组学；表达谱

Abstract

The male sterility (MS) of higher plants is the basis for utilization of heterosis. However, there are many types of MS and the reasons caused to it are very complex. The mechanism of male sterility is still unclear, and the research of MS has been a hot research field for a long time. Ningqi 5 is a new type of MS found in *Lycium Barbarum* L. in 2005. In order to figure out the mechanism of MS and apply this precious resource completely, this research will be carried out from the structure, physiology and molecular biology.

With the fertile tie Ning qi 1 and sterile lines Ning qi 5 as the experiment materials, we observed the difference and characteristics of ultrastructure, distribution of ATPase and Ca^{2+} by TEM, as well as compared the different expression genes (DEGs) by mRNA sequencing and digital gene profile(DGE).

Major results were as follows:

(1) The study of ultrastructure showed that the earliest structural abnormalities of the sterile anther appeared after the stage of tetrad. Some of tetrad microspore degraded directly after meiosis tetrad microspore, with a large number of vacuoles appeared in the bottom of plasma membrane. Some can keep developing and form extine primordium, but they can not be built completely. Sporopollenin as the most important pollen wall substance can not get to the extine primordium correctly, so the extin are always lack of this cover of sporopollenin. The tetrad callose wall did not decompose and extine can not be built may be closely related to the degradation of tapetal cells and the abnormal microspore. On the other hand, the tangential wall of tapetal cells became significantly thicken, and a large number of former ubisch body accumulated in cell wall. As a result the former ubisch body and maybe some other substance cannot be secreted from tapetal cells. The abnormality of Ubisch body is another phenomenon of tapetum cells.

(2) The study of ATPase distribution showed there were no obvious ATPase precipitation particles located in a fertile anther tetrad microspore of callose wall and plasma membrane. On the contrary, much more ATPase precipitation particles are

distributed in sterile anther of microspore mother cells, tetrad callose wall and plasma membrane. In the future development, ATPase precipitation particles in fertile anther are distributed specially, but desultorily in the sterile anther. The difference of ATPase precipitation particles distribution in fertile anther and sterile anthers showed that pollen sterility changing was associated with cell energy metabolism. More ATPase precipitation particles accumulated in sterile microspore mother cells and callose wall suggested that changes about the nature and quantity of callose wall, such as the ways of connections or the changes of sugar can cause the tetrad callose wall cannot be generally decomposed by callose enzyme.

(3) The study of subcellular location of Ca^{2+} showed that there ~~were~~^{are} much more calcium precipitation particles distributed in the callose wall and extin primordium in sterile anther tetrad callose wall other than fertile anther. The sterile microspore would not continue to develop a big vacuole. Although there are much more calcium precipitation particles in sterile anther chamber, but there ~~were~~^{are} ~~little~~^{few} calcium precipitation particles in the cytoplasm of microspore. As a result, no big vacuole can be formed and abortive microspore is most likely due to the lack of Ca^{2+} . The relationship between the tetrad abnormal calcium channels on the plasma membrane of microspore tetrad and the abnormal callose wall was unclear. It suggested that calcium channels on the plasma membrane of microspore are more likely to be changed at the stage of tetrad, and which stops the Ca^{2+} into microspore.

(4) By transcriptome sequencing analysis, we got 110728908 raw data, and 1086010860 clean reads. There are 80266 Unigenes obtained after assembly. And the average length of Unigenes is 731 bp. Blast to the 7 public database Nr, NCBI, Nt, SwissProt, GO, KOG and KEGG, there are 47.6% of the Unigenes successfully blasted to Nr protein database information. 9301(8.47%) Unigenes can be blasted to all the public data. The mapping rate is 85.41%. By GO functional annotation it showed that all the Unigenes were classified in 14 terms of the cell component, 11 terms of molecular function, and 22 terms of biological process. After KOG function clustering analysis, 27907 unigenes were annotated to KOG 26 groups, the main groups were general function prediction only, posttranslational modification, protein

turnover, chaperones, etc. There were 32 pathways by KEGG functional annotation, the main pathways were carbohydrate metabolism (801, unigenes), signal transduction (700, unigenes), translation (690, unigenes)-.

(5) There were 9 cDNA libraries were build. After digital gene expression profile analysis, we obtained the DEGs between the different samples. The results showed that as the development of anthers, DEGs in ningqi 1 and ningqi 5 increased, and totally the quantity of up regulated genes are much more than down regulated genes. GO functional enrichment analysis showed that the DEGs were down regulated in sterile anther. And most of the DEGs were related to the substance participating in pollen wall and extin building. KEGG pathway functional enrichment analysis showed that most of the DEGs were riched in the pathways of metabolic pathways, formation biosynthesis of pollen wall and photosynthesis related metabolic pathways. Actually these DEGs finally related to the metabolism of tapetum and pollen wall involving the biological process such as sporopollenin, some secondary metabolites of flavonoids synthesis, secretion and transshipment. These anomalies were mainly because of abnormal of the process of the structure and physiological function in tapetal cells. Further analysis showed that the expression levels of genes regulating lipid metabolism, protein metabolism, ATP transshipment in the endoplasmic reticulum and related gene expression of calcium signal are very low. Finally the pollen wall appeared serious defect in the sterile anther, and became abortive.

Key words: Male sterility; Calcium; *Lycium barbarum* L.; Ultrastructure; ATPase; transcriptome; digital gene expression

第一章 引言

植物雄性不育 (male sterility, MS) 是植物有性繁殖过程中由于生理、环境或遗传等因素导致植物不能产生正常的花药、花粉或雄配子的一种现象, 如植物花药中无花粉、花粉败育或花药不开裂等均属雄性不育。雄性不育本身对植物并无好处, 但它不产生可育花粉的特征避免了杂交育种中的去雄程序, 是作物杂种优势利用的基础。同时雄性不育突变体也是植物生殖生物学中研究花粉发育的一个重要实验体系, 其在基础理论研究和作物改良应用中具有非常重要的地位。雄性不育是植物界中一种非常普遍的现象, 据统计已在 43 科、162 属、320 个种的 617 个品种或种间杂种中发现了雄性不育现象, 这个数据还在不断增加^[1]。在水稻、小麦、大麦和玉米等几乎所有的主要农作物中都有雄性不育的报道, 另外在一些木本植物如文冠果、枣、杏、樱桃和白杨树等中也发现了雄性不育现象^[2]。在农业生产中由于雄性不育可以免去人工去雄环节, 大大节省了人力、物力和财力, 所以备受重视。

有关植物雄性不育机理的探索一直是一个非常活跃的研究领域, 对败育机理的探索也从未间断。前人已从细胞学、生理学、分子生物学等方面进行了研究, 尤其以模式植物拟南芥和水稻为主, 对植物雄性不育的生理生化和相关分子机理研究已经取得了很大进展。近年来对雄性不育的分子生物学研究更是成果颇丰已有不少关于雄性不育机制的综述文章, 并提出了若干相应的理论和假说, 丰富了杂种优势利用的理论^[3]。但高等植物雄性不育产生的机理极其复杂, 不育类型繁多, 导致花粉败育的原因也存在很大差异。但不管是何种原因引起的雄性不育, 都与细胞准确无误地分化密切相关, 尤其减数分裂和绒毡层发育过程对花粉的影响非常大。植物雄性不育花粉败育的方式常因种类不同而不同, 即使同一种植物, 也存在多种败育类型。在水稻的相关研究中, 发现其花粉败育有可能发生在母细胞、小孢子或二胞花粉等不同时期, 所以要全面了解及阐述雄性不育产生的机制, 仍有许多内容有待深入研究^[2]。

随着人们对植物雄性不育的逐渐了解, 以及各种实验技术手段的综合应用, 尤其各种新技术、新方法的不断研制成功, 将为植物雄性不育的研究提供了更为先进的手段, 使植物雄性不育的研究更加深入。本项研究的开展将为揭示枸杞雄

性不育机理,进而大幅度提高杂交效率、优化品质、辅助选育等提供重要的理论和实践指导。

1 植物雄性不育的类型及遗传特点

世界各国科学工作者的研究发现,高等植物雄性不育的形成原因和应用等存在多样性,因此雄性不育的类型也是多种多样的。植物雄性不育划分类型复杂而多样,常因分类标准不同而有不同的分类系统,可以对不育材料按恢保关系、不育细胞质来源、花粉败育形态和遗传特点等分别进行划分。植物雄性不育的类型的划分也依据人们对雄性不育的逐渐认识而先后出现了多种分类系统。

域代码已更改

1.1 植物雄性不育分类的几种学说

1947年,美国科学家 Sears 根据雄性不育材料基因型的差异提出了“三型学说”即核质互作型、胞质型和核型 3 种类型。该学说认为植物雄性不育或可育是细胞内基因固有的属性,不因受精过程或个体发育而发生任何本质性的变化,不因内外环境条件的影响而发生改变^[4]。“三型学说”是对雄性不育遗传关系的经典概括和解释,但它不能解释水稻、油菜等作物上出现的多种遗传形式的雄性不育现象,如育性表现为连续性变异,光温敏雄性不育等,因此存在一定局限性。

域代码已更改

1970年,Edwar-dson 在 T 型玉米中筛选出恢复系之后,则认为不存在细胞质不育,于是将“三型学说”修正为“二型学说”。该学说认为不存在细胞质作用雄性不育,胞质型与核质互作型应归为一类,即雄性不育共划分为胞质作用型和核作用型两类^[4]。该学说得到了多数人的认可,但它和三型学说存在同样的局限性。

域代码已更改

我国科技工作者高明尉等^[5]根据自己的研究和育种实践,提出“核质协调学说”。该学说认为不存在可育基因型与不育基因型,育性决定于双亲所具有的遗传物质在受精后能否取得生理协调,如果细胞核与细胞质关系协调则正常可育,不协调则产生雄性不育。应用该学说能解释二、三型学说不能解释的部分内容,但仍不能解释光温敏等不育现象。

域代码已更改

孙东发^[6]综合前人对植物雄性不育生物学特点研究结果,提出了植物雄性不育的新解释——“变异基因假说”。该学说认为雄性不育是在植物体花器发育过程中,由于细胞质或细胞核异常变异基因,导致某些生理生化反应失调和某些正常物质代谢发生障碍的结果。不同作物以及同一作物都可能存在不同的产生雄性不

域代码已更改

育的途径,依据引起生理生化反应异常的基因来源与环境的关系,将雄性不育分为四大类型,即细胞质基因作用不育型、细胞核基因作用不育型、核质基因互作不育型和基因型—环境互作型雄性不育。

1.2 植物雄性不育的其他分类标准

Heslop-Harrison 按世代交替把雄性不育划分为孢子体不育和配子体不育 2 种类型:孢子体不育指花粉育性受到孢子体(植株)基因型控制,与花粉本身所含基因无关,表现为纯合突变体不能产生种子;配子体不育是指花粉育性直接受雄配子体(花粉)本身基因所决定,表现为杂合突变体,无法产生纯合突变体^[4]。

域代码已更改

Kaul 将植物雄性不育归纳为可遗传型和非遗传型 2 大类,它们主要是由环境因素作用的结果。非遗传的类型根据不育性诱发原因被分为化学诱导、生理诱导和生态诱导 3 个类型;可遗传的类型又分为染色体型和基因型^[1]。染色体型是由远缘杂交引起,由于进行远缘杂交的两个亲本的遗传性状差异较大,造成子代生理上的不协调而导致植物雄性不育。基因型类型又分为核不育型和核质互作型 2 种类型。

域代码已更改

光周期和温度是诱导育性转换的主导因子,如按植物对光照和温度的敏感性,可将雄性不育分为光敏型(photoperiod sensitive type)和温敏型(temperature sensitive type)。如粳稻品种“农垦 58”即为光敏型,籼稻属于温敏类型。雌雄生殖器官对外界因素的敏感性存在着差异,光温敏感雄性不育即由温度、光照等环境条件引起的可遗传雄性不育类型,这类核型不育型受光周期、温度或这两者互作的控制。温敏型不育系在正常气候条件下,均表现不育,但在高温或低温下表现可育。光敏型核不育的育性转化主要由日照长度控制^[7]。据 Kaul 统计,70%的不育基因型对环境条件十分敏感,其中细胞质不育敏感类型比例(3:1)高于细胞核不育敏感类型比例(2.3:1),温度敏感性(50%)明显多于光周期敏感类型(13%)^[1]。

域代码已更改

域代码已更改

1.3 植物雄性不育的遗传特点

1.3.1 细胞核雄性不育型(GMS)

核不育型是由染色体基因组所控制的遗传现象和遗传规律,表现为细胞核遗传,是由核基因突变引起的,与细胞质无关。可划分为显性基因作用(基因符号

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 for delivery details.