

分类号 TP399;Q811

密 级 GK



学位代码 308

学校代码 10298

学 号 3070233

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：并行计算在生物信息学中的运用和实现

作 者：蒋安纳

专 业：计算机应用技术

研究方向：生物信息学

指导教师：童春发 副教授

二〇一〇年六月

摘 要

生物信息学是多门学科相互交叉而形成的一门新兴学科,是当今生命科学和自然科学的核心领域和最具活力的前沿领域之一。使用计算机系统进行科学计算和模拟已经成为现代生物研究最重要的方法之一。在生物信息学中,DNA 序列的比对、拼接和基因表达数据的聚类分析是最常见也是重要的内容,它们数据量多、计算量大,对计算机的处理速度等性能要求较高。虽然高性能并行计算机能够满足大规模计算的需要,但其价格昂贵,使用成本高。本文提出使用 PC 机构建局域网络,开发并使用并行化的生物信息学软件。

本文提出了一种可扩展的架构模式 Bio_Mpi。在深入分析现有的 phrap 软件的前提下,针对并行计算环境,提出一种新的并行算法并实现了基于 Bio_Mpi 架构下的并行拼接软件 mpiphrap。本文还针对 mpiblast 和 HMMER 这 2 款并行化的软件,给出了并行化接口并移植于 Bio_Mpi 架构下。

最后,分别针对基于 Bio_Mpi 架构下 mpiphrap、mpiblast 和 HMMER 这 3 款软件进行了测试,并给出了在单节点和多节点运行环境的情况下的测试结果。试验数据表明 mpiphrap、mpiblast 和 HMMER 的并行化是高效可行的。

关键词: 生物信息; MPI; 并行处理; phrap; mpiphrap; BLAST; mpiblast; HMMER

分类号 S722

密 级 GK



学位代码 309

学校代码 10298

学 号 3070479

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：美洲黑杨优良亲本选择及子代家系苗期测定

作 者：黄金勇

专 业：林木遗传育种

研究方向：林木遗传改良

指导教师：潘惠新 副教授

二〇一〇年六月

美洲黑杨优良亲本选择及子代家系苗期测定

摘 要

本文主要以美洲黑杨种质资源库为研究对象,分为美洲黑杨重要性状变异分析与优良无性系选择方法、美洲黑杨切枝杂交试验、美洲黑杨全同胞家系试验、美洲黑杨果序性状与种子性状变异研究、美洲黑杨半同胞家系试验等5个部分内容。采用多性状综合选择,初选出一些无性系,作为杂交的亲本。通过全同胞家系配合力测定和半同胞家系苗期试验,进一步进行优良亲本选择,为开展杨树高产优质高效育种提供理论依据。主要研究结论如下:

(1) 根据主成分分析、综合评分法、隶属函数法和灰色关联度分析,对美洲黑杨种质资源库202个无性系进行初选,获得102-14、101-4、103-3、103-20、66-9、63-13、81-16、81-30、86-10、86-2、86-8、89-2、89-3、89-7、95-33、95-44、96-5、96-10等18个生长量大、木材密度高、通直度好的优良无性系。

(2) 通过美洲黑杨切枝杂交试验,在室温为30℃,相对湿度为40%的恶劣环境下,父本为S3702的各杂交组合的果序发育程度仍然较优,表明S3702的杂种果序较耐高温、低湿。美洲黑杨枝条营养因子和杂种性状典型相关分析表明,美洲黑杨切枝杂交中,母本枝条保留花芽数和枝粗与果序发育状况相关紧密,枝条营养状况与坐果率、种子萌发率相关不明显。

(3) 通过美洲黑杨全同胞家系配合力测定,结果表明95-44、1-52的一般配合力较高,两者可用来营建种子园。而94-30和I-35、1-52和S3244与T120和95-44的特殊配合力较高,可分别营建种子园进行杂交,以获得优良地径与苗高的杂种,进一步进行遗传选择。同时,在以后的育种工作中不仅要注重亲本的生长表现,也要注重亲本间的交配方式,以期获得良好的杂种后代。

(4) 通过对美洲黑杨36个家系的果实性状的方差分析,结果表明美洲黑杨果实性状家系间差异非常大,也反映了果实性状多样性较为丰富。

(5) 在美洲黑杨半同胞家系试验中,通过LSD多重比较,结果表明94-18、T15、S373、S3127这4个半同胞家系生长量(地径和苗高)较大。以I-69半同胞家系作对照,利用DUNNET法进行多重对比,87-6、94-18、L232、L28、S3105、S3127、S3226、S3236、S3240、S3319、S3503、S373、S3814、T15等14个半同胞家系在地径和苗高生长量性状上均与I-69半同胞有显著差异,可对该14个家系进一步进行家系内试验,选择出优良半同胞家系和优良单株,进行遗传改良。通过聚类分析,可将37个美洲黑杨半同胞家系按当年生苗期生长性状大小划分为3个大类,其中,94-18、S3503、L28、S3127、S3319、S3814、S373、T15等8个半同胞家系,这类家系当年生苗期生长量最大。

关键词: 美洲黑杨 无性系选择 杂交 家系 子代测定

分类号 S722
密 级 MM



学位代码 309
学校代码 10298
学 号 3070480

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目: 杂交鹅掌楸体胚发生过程元素分析
及蛋白质组研究

作 者: 陈 琴

专 业: 林木遗传育种

研究方向: 林业生物技术

指导教师: 施季森 教 授

二〇一〇年六月

摘要

杂交鹅掌楸是一种具有较高观赏价值和经济价值的优良树种,但其自然种子繁殖的能力较低。因此,建立体细胞胚胎发生和植株再生体系具有重要的应用价值和经济意义。本实验通过对不同基因型体胚发生能力的比较,筛选出了7个具有较好胚胎发生能力的基因型。其中以基因型163024为材料建立了一种简单有效的杂交鹅掌楸体细胞胚高频率发生和同步发育的培养体系:经过多次继代获得的胚性愈伤,建立悬浮细胞系。过筛得到胚性悬浮单细胞,悬浮于新鲜的培养基(0.7MS+NAA 0.2mg/L+KT 0.5mg/L+BA 0.2mg/L+CH 500mg/L+VC 5mg/L+蔗糖 50g/L)中2d,用吸管吸取悬浮液,将其均匀地接种在表面垫有滤纸的固体培养基(0.7 MS+VC 5 mg/L+蔗糖 40g/L+活性炭 2g/L+琼脂)上,培养25d后转入植株再生培养基(0.7 MS+IAA 0.05mg/L+VC 5mg/L+蔗糖 30g/L+琼脂)上。

本研究用ICP-AES法分析了基因型163024胚性和非胚性两种类型的愈伤及不同发育时期的体胚。结果发现在体胚发生过程中Al、Ca、Mg、Fe、Mn这五种元素具有相似的规律,这表明这些元素可能在体胚发生过程中起重要作用。据此,本人对杂交鹅掌楸体胚发生的现有培养基提出了配方调整的建议。

以基因型163024两种类型的愈伤组织进行了蛋白质组学研究表明,在胚性愈伤组织中鉴定到特异表达的14种蛋白,分别涉及信号转导、蛋白质翻译与降解、逆境胁迫反应、细胞程序性死亡、氧化还原反应、细胞形态建成等生命活动过程。

关键词:杂交鹅掌楸;体胚发生;金属元素分析;蛋白质组

分类号 S722

密 级 GK



学位代码 309

学校代码 10298

学 号 3070481

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：杉木两水平双列杂交配合力及遗传参数分析

作 者：方扬辉

专 业：林木遗传育种

研究方向：林木遗传改良

指导教师：施季森 教 授

二〇一〇年六月

摘 要

本论文以 1986 年营建在福建省洋口林场的杉木种源内和种源间两水平双列交配设计 90 个杂交组合实验林 23 年的材料,对生长量和木材品质性状的配合力、杂种优势、相关关系以及综合指数选择进行了分析,主要研究结果如下:

1.配合力分析结果表明, 2×3 和 3×4 号种源组合在 23a 三个生长量性状中的总配合力表现均排在前三位; 2×4 号种源组合在 23a 胸径性状的总配合力表现最优; 2(4)×3(8)号家系组合在 23a 三个生长量性状中的总配合力表现均排在第一位。

2.研究了不同种源组间和家系间杂交组合的生长量性状杂种优势度的年变化及与不同配合力效应的相关性,发现杉木生长量性状的杂种优势度主要由杂交组合效应 $C_{(ik)(jl)}$, 即遗传效应控制, 显性效应的影响次之, 受加性效应的影响最小; 不同种源间的杂交组合和家系间的杂交组合在木材品质性状上的杂种优势度及与不同配合力效应的相关性, 红心率、偏心率和基本密度性状的杂种优势度控制模式与生长量性状相似, 微纤丝角性状的杂种优势度主要受种源母本的一般配合力效应的影响。

3.三个生长量性状相互之间均存在极显著的相互关系, 相关系数在 0.60503~0.97701 之间, 所示林龄的胸径性状与材积的相关系数都大于树高性状与材积的相关系数, 而且胸径性状与材积的相关系数都大于 0.95。三个生长量性状不同林龄之间的相关关系分别都达到了极显著水平。

4.对所有性状进行单性状选择及其遗传参数估计, 按 10%入选率选择的优良种源和优良家系, 预测子代遗传增益, 生长量性状中, 最高的为材积性状, 分别达到 28.04%和 23.07%, 树高和胸径性状也将有 5.38%~11.32%的遗传增益; 木材品质性状中, 最高的为偏心率性状, 分别达到 12.71%和 8.77%, 微纤丝角性状次之, 分别达到 7.45%和 5.57%, 基本密度性状也将分别有 6.68%和 1.78%的遗传增益, 红心率性状最低, 分别将有 0.60%和 1.63%的遗传增益。

5.用 23a 材积、红心率、偏心率、基本密度和微纤丝角三个性状构建了综合选择指数方程:

$$I = 0.287x_1 + 0.292x_2 - 0.803x_3 - 35.462x_4 - 0.917x_5$$

综合指数估计的准确度为 0.3275。

6.根据综合选择指数方程, 以 10%入选率选优了九个组合, 再在这九个组合中各选优了 2 个单株, 最后, 以参试试验林单株为单位, 依据综合选择指数方程选择 20 个最优单株。

关键词: 杉木; 两水平双列杂交; 杂种优势; 配合力; 相关系数

分类号 S772
密 级 GK



学位代码 309
学校代码 10298
学 号 3070483

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：杉木遗传转化体系的研究

作 者：姚甲宝

专 业：林木遗传育种

研究方向：林木生物技术

指导教师：施季森 教 授
席梦利 副教授

二〇一〇年六月

摘 要

杉木是我国特有常绿针叶树种之一，由于其生长快、材质优良，长期以来受到广泛栽培，目前位居南方针叶树人工林的首位，林木的蓄积量居人工林前列。但由于木质素化学结构的限制，在木本的生物质能源的转化中受到限制。本文试图利用阔叶树木质素合成关键酶 CAld5H 基因转化杉木，研究内容和结果如下：

以杉木茎段为外植体，系统研究影响愈伤组织诱导、继代和不定芽分化的各种因素，建立了高效稳定的组培体系。结果表明：愈伤组织诱导最适培养基为 P6 + BA 1.5mg/L + 2,4-D 0.2mg/L + NAA 0.1 mg/L，诱导率达 100%；DCR + 2,4-D 0.5mg/L + BA 0.5mg/L + KT 0.5mg/L + TDZ 0.008 mg/L 为愈伤组织继代增殖最佳培养基，15d 的增殖倍数为 5.4；适宜不定芽分化的培养基为 DCR + BA 1.5 mg/L + NAA0.1 mg/L + KT1.5 mg/L，不定芽的分化率达 $18.0 \pm 2.5\%$ ，平均不定芽数为 5.5 ± 0.43 。所有培养基均加蔗糖 30g/L，琼脂 6g/L。本实验还对愈伤组织褐化进行了研究，培养基中添加褐化抑制剂或改变培养条件，并未能显著的降低褐化率。

杉木遗传转化体系的研究，以卡那霉素为筛选剂，确定愈伤组织诱导、不定芽分化的最佳筛选浓度分别为 10~20mg/L、5~8mg/L。通过 GFP 瞬时表达，探索基因枪轰击的最佳参数，结果表明轰击距离为 9cm，金粉用量 300 μ g/枪，真空度 28 英寸汞柱，DNA 用量 1.5 μ g/枪，轰击 2 次（6cm & 9cm）时 GFP 瞬时表达效果最佳，以上参数为基因枪转化杉木最优参数。利用基因枪介导阔叶树木质素合成关键酶 CAld5H 基因实验，未得到抗性愈伤，说明外源基因未整合到植物基因组中，需进一步研究和探讨。

关键词：杉木，再生体系，遗传转化，CAld5H 基因，木质素，基因枪



南 京 林 业

大 学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：福建山樱花不定芽繁殖及体细胞胚胎发生研究

作 者：贾利娜

专 业：林木遗传育种

研究方向：林木生物技术

指导老师：施季森 教 授

二〇一〇 年 五 月

摘 要

福建山樱花 (*Cerasus campanulata*) 因其极高的观赏价值和用材价值, 因而具有良好的开发前景。本文主要对福建山樱花的不定芽繁殖和体细胞胚胎发生做了详细研究, 主要内容和结果如下:

1. 福建山樱花不定芽繁殖的诱导与分化。研究了外植体、基本培养基、激素种类及浓度配比等对福建山樱花不定芽诱导的影响, 确定的最佳培养基为: $1/2MS + 6-BA 0.5mg/L + IBA 0.01mg/L + \text{蔗糖 } 20g + VC 5mg/L$ 。

2. 福建山樱花不定芽的增殖培养, 对培养基中的大量元素及激素种类和浓度进行调整, 确定最佳增殖培养基为: $MS + 6-BA 0.5mg/L + IBA 0.1mg/L + GA 0.3mg/L + \text{蔗糖 } 20g/L + VC 5mg/L$ 。

3. 福建山樱花不定芽的生根培养, 通过对培养基成分进行调整, 确定不定芽生根的最佳培养基为: $1/2MS + NAA 0.2mg/L + \text{蔗糖 } 20g/L + VC 5mg/L$ 。

4. 福建山樱花体细胞胚胎发生的愈伤组织诱导, 研究了外植体、基本培养基、大量元素、激素种类和浓度等对福建山樱花愈伤组织诱导的影响, 确定最佳培养基为 $MS + 6-BA 1.0mg/L + 2,4-D 2.0mg/L + NAA 1.0mg/L + \text{蔗糖 } 30g/L + VC 5mg/L$ 。

5. 福建山樱花愈伤组织的增殖培养, 研究了培养基中大量元素与激素组合对福建山樱花愈伤组织增殖的影响, 确定的最佳增殖培养基为 $MS + 6-BA 0.5mg/L + 2,4-D 1.0mg/L + NAA 0.5mg/L + \text{蔗糖 } 30g/L + VC 5mg/L$ 。

6. 福建山樱花愈伤组织的分化, 研究了细胞分裂素与生长素及蔗糖浓度对福建山樱花细胞分化的影响, 确定的较好的分化培养基为: $MS + ZT 0.1 \sim 2mg/L + NAA 0.05 \sim 1mg/L + CH 0 \sim 0.5g/L + \text{蔗糖 } 30g/L$, 较好的成熟培养基为 $MS + ABA 0.25 \sim 3mg/L + CH 0.5g/L (LH 0.2g/L) + VC 5mg/L + \text{蔗糖 } 40g/L + \text{琼脂 } 6.2g/L$ 。

关键词: 福建山樱花 (*Cerasus campanulata*); 不定芽; 体细胞胚胎发生; 愈伤组织; 激素

分 类 号 S722

密 级 GK



学位代码 309
学校代码 10298
学 号 3070487

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：马尾松实生种子园家系特征分析及遗传评价

作 者：白天道

专 业：林木遗传育种

研究方向：林木遗传改良

指导教师：徐立安 教授

二〇一〇年六月

摘 要

对福建省上杭白砂国有林场 1991、1992 年营建的马尾松实生种子园及其自由授粉子代进行了综合研究，内容如下：

1. 分析了种子园母树表型、球果性状、平均单果出种量及家系产种量间的差异及相互关系。球果表型性状在家系间差异显著；母树表型与球果性状间存在不同程度的相关性；母树结实量与单果出种量相关不显著，但与家系产种量极显著相关。
2. 运用群体共祖系数，状态株树等指标，初步分析了该种子园疏伐前后家系结构的变化。认为疏伐方式较为合理。
3. 对 5、6 年生子代生长及干形性状进行了方差分析。结果表明：各性状在家系间存在极显著差异，存在较为丰富的遗传变异，具有一定的选择潜力。
4. 估算了各性状的单株及家系遗传力。6 年性状间家系遗传力大小依次为：胸径> 材积> 树高> 侧枝粗度> 冠幅> 通直度。5 年生性状遗传力值低于 6 年生对应性状，家系遗传力大小依次为胸径> 树高> 材积。
5. 进行了性状间相关分析。5、6 年生树高、胸径及材积的遗传相关在年度内及年度间均达极显著水平；6 年生性状除通直度外，各性状间均显著相关。
6. 采用 BLP 初步评定了各家系育种值。联合 5、6 年生材积数据，初选出 20 个优良家系；联合 6 年生生长及干形性状，初选出 20 个优良家系及单株。
7. 估算了种子园现实及期望遗传增益。与普通林分比较，材积现实增益达 8.54%。进行家系选择后，在原有基础上又可获得平均期望增益（入选率 30%）在 10% 以上。

关键词：马尾松实生种子园 种子产量 状态株树 子代变异 最佳线性预测

分类号
密 级



学位代 309
学校代 10298
学 号 3070488

南 京 林 业 大 学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：马尾松遗传连锁图谱构建

作 者： 陈文霞

专 业： 林木遗传育种

研究方向： 林木生物技术

指导教师： 徐立安 教 授

二〇一〇年 五 月

摘 要

本研究以广西种源马尾松 5916×浙江种源马尾松 1139 的 120 个 F1 代个体为作图群体, 利用 SSR、ESTP 和 SRAP 三种分子标记对已构建的含有 20 个连锁群, 共 87 个标记的马尾松遗传框架图谱进行了加密, 并与松属其他树种进行了图谱比较研究。

本研究新增了 196 个多态性标记(41 个 SSR、28 个 ESTP 和 127 个 SRAP), 共获得 562 个多态性位点(71 个 SSR、35 个 ESTP 和 456 个 SRAP), 其中 177 个新位点被定位到遗传连锁图上, 包括 40 个 SSR、22 个 ESTP 和 115 个 SRAP 标记。构建了一张包括 251 个标记(47 个 SSR、23 个 ESTP 和 181 个 SRAP)、17 个连锁群的马尾松连锁图谱。图谱中 12 个连锁群各含有 9-28 个标记, 另还有 1 个四联体、1 个三联体及 3 个二联体, 平均每个连锁群 14.76 个标记; 最大连锁群图距为 181.3cM, 最小连锁群图距为 16.4cM, 总图距长度为 1946.4cM, 平均每个连锁群长度为 114.49cM; 标记间最大间距为 44.0cM, 最小间距为 0.3cM, 平均间距为 8.32cM。

通过与松属其他树种的图谱比较, 可以找到 34 个同源标记(13 个 SSR、21 个 ESTP)。我们以 ESTP 同源标记数较多的火炬松和海岸松的遗传图谱进行了比较。马尾松与火炬松遗传图谱有 4 个同源连锁群(第 1、3、6 和 9 连锁群)和 4 个推定同源连锁群(第 2、4、7 和 10 连锁群); 与海岸松图谱有 5 个同源连锁群(第 1、3、6、7 和 10 连锁群)。马尾松图谱与火炬松、海岸松图谱之间具有较好的同线性和共线性, 与火炬松图谱有 10 个同线性标记, 占 66.67%; 与海岸松图谱有 11 个同线性标记, 占 91.67%, 海岸松同线性比例远远高于火炬松, 在一定程度上验证了海岸松与马尾松亲缘关系较近。马尾松图谱与火炬松、海岸松图谱分别有 10 个、6 个共线性标记, 标记的顺序在大多数情况下是一致的。另一方面, 本研究所构建的马尾松图谱上仍有 9 个连锁群不能在火炬松和海岸松图谱中找到 ESTP 同源位点, 因此开发出更多的共显性标记是构建马尾松遗传图谱努力的方向。

通过 NCBI 数据库分析, 我们获得了 4 个可能与木质素形成过程有关的 EST 序列, 5 个可能与抗胁迫过程有关的 EST 序列。本研究所构建的遗传图谱为今后数量性状定位(QTL)研究建立了基础。

关键词 马尾松 SSR SRAP ESTP 遗传图谱 图谱比较

分 类 号 S722

密 级 GK



学位代码 309
学校代码 10298
学 号 3070489

南 京 林 业 大 学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：杂种马褂木采穗圃母株性状观察及亲缘
关系分析

作 者：黄淑婧

专 业：林木遗传育种

研究方向：林木改良

指导教师：徐立安 教授

二〇一〇年六月

摘 要

本研究对初选杂种马褂木优良单株营建良种采穗圃母株进行生长量、形态特征及发枝力等性状的调查分析, 并利用 SSR 分子标记分析了采穗圃母株的亲缘关系。目的是为杂种马褂木良种繁殖体系的建立和优良母株的筛选等提供依据。主要结果如下:

1、生长表现分析结果表明: 各采穗母株间, 枝条的粗度变异不大, 基本都符合生产穗条的需要, 而枝条的总长性状变异较大, 可将其作为筛选优良采穗母株的重要性状。其中, 二级枝条在枝条产量中贡献最大, 是产穗的主要来源, 一级枝条次之。在挑选优良采穗母株时, 还应考虑有效枝条产率, 即有效枝条/无效枝条的比值, 提高单株穗条产量。

2、筛选出有效枝条产量高的采穗母株 18 个, 来自南京林业大学苗圃的采穗母株平均有效枝条产量最高。

3、形态特征分析结果表明: 母株主干上部生产的有效枝条产量最多, 下部发枝次之, 中部最少。不同部位上发枝类型存在极显著差异: 一级有效枝条主要来自主干下部, 三级枝条主要来自主干上部。采穗母株移栽前的生长状况对穗条产量有一定影响, 原有树高、胸径愈大, 有效枝条产量往往愈高。采穗母株萌芽期对枝条的产量也有显著影响, 萌芽愈早, 萌条数量往往愈多, 而有效枝条产量反而较低。

4、SSR 标记的研究结果表明, 所有个体的平均观测杂合度、期望杂合度分别为 0.6404 和 0.7087, 杂合度较高, 反映了杂种的特征。

5、在 80% 的置信度上, 在亲本分析软件参数设定宽松的条件下, 找到双亲的 124 个采穗母株, 组成了 26 个半同胞家系, 21 个全同胞家系, 9 个无性系 (28 对 SSR 引物无法区分同一无性系), 在软件参数设定严格的条件下, 找到双亲的 25 个采穗母株, 组成了 13 个半同胞家系, 1 个全同胞家系。随着软件参数设定条件的逐渐严格, 分析得到的亲本结果可信度越高, 但也会使一些真实亲本被排除掉。

6、在所有候选亲本中, 发现有 9 个候选亲本的 7 个亲本组合能产生较多的优良杂种后代, 还发现回交后代的有效枝条产量相对较高。

7、聚类分析表明, 现有采穗母株与北美鹅掌楸的遗传关系较为接近, 优良杂种后代可能有较多的遗传信息来自北美鹅掌楸。

8、通过对采穗圃母株的亲本分析, 对母株的亲缘有了基本了解, 母株之间既有一些有半同胞关系, 也有一些有全同胞关系, 甚至还辨别出 19 个采穗母株分属于 9 个无性系 (其中 1 个无性系包括 3 个个体, 其余 8 个各包括 2 个个体), 使得该采穗圃的基因型数量由原来的 190 个校正为 180 个。这些遗传信息对采穗圃的管理、以后的无性系造林、以及今后利用这些种质资源选择杂交亲本等均具有重要意义。

关键字: 采穗母株 有效枝条产量 形态特征 SSR 标记 亲本分析

分 类 号 S722

密 级 GK



学位代码 309
学校代码 10298
学 号 3070490

南 京 林 业 大 学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：柳树组培快繁体系研究

作 者：倪善红

专 业：林木遗传育种

研究方向：林业生物技术

指导教师：徐立安 教授

二〇一〇年六月

摘要

柳树生长迅速、适应性强、易扦插无性繁殖，许多为广泛栽培的用材、园林绿化和水土保持树种。但病虫害、盐碱环境等，常常使柳树发展受到很大的限制。通过转基因技术对柳树进行改良将是解决这一问题的的重要途径，但柳树组培繁殖系数低是一制约因素。本研究分别对推广的优良品种苏柳172、簸箕柳P61、P63及培育的杂交柳681（簸箕柳P61×绵毛柳718）进行研究，期望建立组培快繁体系，为今后遗传转化建立基础。

本文在柳树芽的诱导、增殖、生根壮芽进行综合的试验研究，初步试验结果如下：

1. 以柳树的带芽茎段为外植体，在不同的基本培养基及不同配比的 KT、IBA 下进行芽诱导培养，结果表明，三种柳树在芽诱导上差异不大，苏柳 172（J172）最优配方 MS+KT3.0mg/L+IBA0.5mg/L，芽诱导率 83.33%，平均芽高为 2.1cm；杂交柳（681）最优配方 MS+KT2.0mg/L+IBA(0.1-0.5mg/L)，芽诱导率为 93.33%，平均芽高为 2cm；簸箕柳 P61（P61）适宜配方为 MS+KT3.0mg/L+IBA0.1mg/L，芽诱导率为 95%，平均芽高为 0.9cm。
2. 增殖培养的结果表明，6-BA、TDZ 对 J172、681 增殖影响很大，J172 在 MS+6-BA0.2mg/L+TDZ0.005mg/L 下增殖效果最优，增殖系数平均达 10.9，且苗壮，681 以 MS+6-BA(0.1-0.2mg/L)+TDZ0.008mg/L 最合适，增殖系数达到 7.2，苗壮，当 TDZ 浓度过高时，虽增殖系数高，但苗生长不正常；两树种增殖不需要添加生长素。
3. 将从生芽接种到生根壮芽培养基中，柳树生根培养较容易，苏柳 172 在 MS 培养基中即可生根，生根率为 100%，且生长状况良好；681 在 MS 中亦可生根，但生长不佳，在 MS+KT1.0mg/L+IBA0.5mg/L 培养基中生根率高，达 100%，苗壮。
4. 试验表明簸箕柳增殖、生根壮芽培养较困难，簸箕柳对激素的要求浓度较高，在 6-BA2.0mg/L+KT3.0mg/L+TDZ0.001mg/L 时 P61 增殖系数为 2.1，P63 为 4.1，但苗都很矮小。总体生长上，P63 优于 P61。在生根壮芽培养中，以 WPM、B5、MS、1/2MS 培养基为基本培养基，配不同浓度的 GA、IBA，生根与芽状况均不佳，需进一步研究找到适合的培养条件。

关键词：苏柳 172、杂交柳 681、簸箕柳、组织培养、芽诱导、增殖

分类号 S722

密 级 BM



学位代码 309

学校代码 10298

学 号 3070491

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目: *AUX-IAA* 基因家族在杨树不定根发育中的功能研究

作 者: 苏 聃

专 业: 林木遗传育种

研究方向: 分子遗传学

指导教师: 诸葛强 教 授

二〇一〇年六月

摘 要

生长素作为一类重要的植物激素,参与调控了植物生长发育的多个生理反应过程。在细胞水平,生长素影响细胞的伸长、分裂和分化;在植株水平,生长素对于植物的顶端优势、不定根的形成、植物的向性反应、果实的座果和发育过程、维管组织的分化和胚的形成等多个发育过程都是必需的调节因子。*AUX/IAA*、*SAUR* 和 *GH3* 是三类主要参与生长素早期响应的基因家族,生长素能够诱导这三类基因家族中的多数基因快速、特异、并且在不需新的蛋白质生物合成的条件下表达,这些基因也被认为是生长素诱导的首要响应-基因。在这三类基因中,*AUX/IAA* 基因家族的研究相对较多。

以杨树为模式植物研究生长素信号传导相关的 *AUX/IAA* 基因的生物学功能,对全面了解生长素在木本植物根的生长、发育以及形态建成过程中发挥的作用,阐明不同植物中生长素信号传导同一性和多样性的分子机制具有重要的理论意义。

本研究主要结果如下:

1. 基于 Gateway 技术构建 *PeAux/IAA1*、*PeAux/IAA2*、*PeAux/IAA3* 和 *PeAux/IAA4* 等 4 个基因的过量表达载体。

2. 通过农杆菌介导遗传转化法,以杂种山杨株系 T89 的茎段为受体材料,分别构建过量表达株系,其中包括 5 株基因 *Aux/IAA1* 潮霉素抗性株系,38 株基因 *Aux/IAA2* 潮霉素抗性株系,30 株基因 *Aux/IAA3* 潮霉素抗性株系,35 株基因 *Aux/IAA4* 潮霉素抗性株系。

3. PCR 检测结果表明,未获得 *PeAux/IAA1* 阳性转化植株,并分别获得 33 株 *PeAux/IAA2* 为阳性转化植株,25 株 *PeAux/IAA3* 阳性转化植株,28 株 *PeAux/IAA4* 阳性转化植株。

4. 实时定量 RT-PCR 检测结果显示,相对于未转化野生型株系 T89,17 株 *PeAux/IAA2* 转化株系的 *Aux/IAA2* 相对表达量超过 50 倍,其中有 7 株相对表达量超过 1000 倍;15 株 *PeAux/IAA3* 转化株系的 *Aux/IAA3* 相对表达量超过 50 倍,其中有 11 株相对表达量超过 1000 倍;8 株 *PeAux/IAA4* 转化株系的 *Aux/IAA4* 相对表达量超过 50 倍。

5. 从 *PeAUX/IAA2*、*PeAUX/IAA3*、*PeAUX/IAA4* 三个基因的转基因植株中各挑选 5 株高表达量的株系进行扩大繁殖(每个株系扩繁到 10 株),进行总根长以及植株生物量测定。

6. 转基因研究表明,*PeAUX/IAA2*、*PeAUX/IAA3* 和 *PeAUX/IAA4* 的表达均不同程度影响杨树根系发育,其中 *PeAUX/IAA2* 影响最大,不定根发生受到抑制,*PeAUX/IAA3* 次之,而 *PeAUX/IAA4* 较小。此外,*PeAUX/IAA2*、*PeAUX/IAA3*、*PeAUX/IAA4* 三个基因的转基因植株对生长素敏感性均减低,大部分植株都纤细矮小,生物量也显著减少。

关键词: 欧洲杂种山杨 T89; *Aux/IAA* 基因; 遗传转化; 基因表达

分类号 S685
密 级 GK



学位代码 309
学校代码 10298
学 号 3070568

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：大花六道木体细胞胚诱导的研究

作 者：孙倩婷

专 业：园林植物与观赏园艺

研究方向：园林植物遗传育种

指导教师：季孔庶 教 授

二〇一〇年六月

摘 要

本论文首次以大花六道木 (*Abelia × grandiflora*) 幼嫩叶片和茎段为外植体, 对其体细胞胚诱导过程中的相关问题进行了研究, 并对诱导过程进行了细胞学观察和生理指标的测定, 为大花六道木高效体胚发生系统的建立和相关机理的探索奠定了基础。主要试验结果如下:

1. 比较了三种大花六道木的愈伤诱导率。其中‘法兰西’较‘爱德华’和‘矮美人’更容易诱导愈伤组织, 但三者的差异不显著。细胞学研究结果也表明, 三个品种的胚性细胞结构有很大的相似性。

2. 幼嫩叶片是大花六道木体胚诱导的最佳外植体。

3. 大花六道木叶片和茎段愈伤组织诱导的最佳培养基分别为 MS+3.5mg/L 2,4-D+0.2 mg/L NAA+1.0mg/L KT+0.05mg/L TDZ 和 MS+1.5mg/L 2,4-D+0.5mg/L NAA+0.5mg/L KT+0.1mg/L TDZ; 叶片和茎段胚性愈伤组织增殖的最佳培养基分别为 MS+1.0mg/L 6-BA+1.0mg/L KT+0.1mg/L NAA 和 MS+0.1mg/L 6-BA+0.1mg/L KT+0.1mg/L NAA, 均附加 100mg/L 肌醇, 200mg/L 水解酪蛋白和 15g/L 蔗糖, pH 值 5.8, 25℃下暗培养各 30d。

4. 2,4-D 在诱导愈伤阶段是很有效的生长素, NAA 诱导愈伤的效果不及 2,4-D。细胞分裂素在愈伤诱导时作用不明显, 但在增殖和体胚诱导中不可或缺, 6-BA 浓度应控制在 1.0mg/L, 可避免培养物褐化, KT 和 TDZ 对愈伤诱导和增殖的影响不明显。ABA 可以抑制畸形胚的生长, 大花六道木适宜的 ABA 浓度范围为 0.5~1.0 mg/L。

5. 胚性愈伤组织转入无激素的液体 MS 培养基悬浮培养后可以得到大量的根状物, 转入 MS+1.0mg/L 6-BA+30g/L 蔗糖的液体培养基悬浮培养后能够诱导出无根端的芽状物, 且无褐化现象。

6. 大花六道木不同阶段培养物的切片观察表明, 胚性愈伤的细胞体积小、排列紧密、细胞核大, 非胚性愈伤的细胞体积较大、排列疏松、细胞核小。体胚发生大多是由内起源的胚性细胞开始, 经历了鸟巢状多细胞原胚、球形胚, 心形胚和鱼雷胚的发育阶段。

7. 大花六道木球形胚时期的 SOD 活性和可溶性蛋白质含量均达到了顶峰, 为体胚分化和进一步发育提供了前提和物质基础。可溶性糖含量的变化与体胚发育时期的转折密切相关。胚性愈伤和心形胚时期的可溶性糖的累积为体胚的分化和发育提供了能量保证。

关键词: 大花六道木 (*Abelia × grandiflora*); 体细胞胚诱导; 细胞形态学; 生理特征

分类号 S602.2

密 级 GK



学位代码 309

学校代码 10298

学 号 3070569

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目: 黄杨属部分植物 nrDNA ITS 序列测定及亲缘关系分析

作 者: 刘娜娜

专 业: 园林植物与观赏园艺

研究方向: 园林植物遗传育种

指导教师: 季孔庶 教 授

二〇一〇年六月

摘 要

黄杨属 (*Buxus*) 植物多供观赏, 种类较多, 分类较为混乱。本文测定了黄杨属的 5 个种和中国特有的珍稀濒危植物珍珠黄杨 (*Buxus sinica* var. *parvifolia*) 的 5 个居群核 rDNA ITS 序列, 通过 ITS-PCR 体系优化、ITS 序列测序方法对比, 获得 ITS 序列。另外从 Genbank 获得 9 个黄杨属植物与外类群野扇花 (*Sarcococca ruscifolia*) 和顶花板凳果 (*Pachysandra terminalis*) 的 ITS 序列。运用 Phylip 软件对所获得的 ITS 序列进行分析, 构建了黄杨属系统发育树, 分析了所及植物之间的亲缘关系。研究结果如下:

①在总体积 50 μ L 的反应体系中, 建立了 Mg^{2+} 浓度 2.0mmol/L、引物浓度 0.3 μ mol/L、dNTP 浓度 0.3mmol/L、DNA 模板浓度 240ng/50 μ L、Taq DNA 聚合酶的用量 1.75U/50 μ L、退火温度 56 $^{\circ}$ C 的最佳 ITS-PCR 扩增条件。此优化体系保证了珍珠黄杨 ITS-PCR 产物的纯度和质量要求。珍珠黄杨 ITS 片段克隆测序后结果为 642bp。

②克隆测序对大花黄杨和珍珠黄杨的 ITS 区均可成功测序; 直接产物测序能对珍珠黄杨的 ITS1、ITS2 区分别成功测序, 却只对大花黄杨的 ITS1 区成功测序。相比直接测序, 克隆测序更简便易行、能够快速准确地得出测序结果, 适合黄杨属植物 ITS 的序列测定。

③相比锦熟黄杨 (*B. sempervirens*), 珍珠黄杨 (*B. sinica* var. *parvifolia*) 与瓜子黄杨 (*B. sinica*) 的亲缘关系更近; 但珍珠黄杨并非瓜子黄杨的变种; Genbank 中 *Buxus microphylla* var. *japonica* 与 *B. riparia* 为同种植物; Genbank 中 *Buxus balearica* 与雀舌黄杨 (*Buxus bodinieri*) 为同种植物。

关键词: 黄杨属; ITS-PCR 反应体系; 克隆测序; 直接测序; 亲缘关系

分类号 S602.2
密 级 GK



学位代码 309
学校代码 10298
学 号 3070570

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：黄杨属五种植物的核型分析

作 者：王丽平

专 业：园林植物与观赏园艺

研究方向：园林植物遗传育种

指导教师：季孔庶 教 授

二〇一〇年六月

摘 要

本文通过分析黄杨属五种植物染色体的核型，分别建立了其核型公式。并初步比较了雀舌黄杨和匙叶黄杨染色体的 C-带。同时分析了珍珠黄杨、雀舌黄杨、匙叶黄杨和大花黄杨的染色体 Ag-带，验证了其随体的有无和随体的数量。结果如下：

1) 瓜子黄杨、珍珠黄杨、雀舌黄杨、匙叶黄杨和大花黄杨的核型公式分别为 $2n=4x=56=32m+24sm(2SAT)$ ， $2n=2x=28=20m+8sm(2SAT)$ ， $2n=2x=28=26m+2sm(SAT)$ ， $2n=2x=28=24m+4sm(2SAT)$ ， $2n=2x=28=18m+10sm$ 。五种植物都是以中部和近中部着丝点染色体为主，核型都比较对称，属于比较原始的类型；雀舌黄杨和匙叶黄杨两者的亲缘关系比较近，瓜子黄杨、珍珠黄杨和大花黄杨三者的亲缘关系比较近。且雀舌黄杨和匙叶黄杨在系统演化中比瓜子黄杨、珍珠黄杨和大花黄杨更原始。

2) 雀舌黄杨的带型公式为 $2n=28=10C+6T^++4I^++2N^++2CI^+I_++4$ ，单套染色体的条带总数为 14 条。匙叶黄杨的带型公式为 $2n=28=10C+2T^++4I^++2N^++2T^+I_++2CI^++2CT^++4$ ，单套染色体的条带总数为 15 条。整体来看，两者的条带总数相差不大，且带纹大多分布在染色体的短臂上，次缢痕带明显，但每条染色体的带纹特征差异明显。染色体 Ag-带分析结果表明，珍珠黄杨、大花黄杨、雀舌黄杨和匙叶黄杨染色体中都能观察到随体，且随体的数目都为 1。

关键词：黄杨属；核型；C-带；Ag-带

分类号 S688

密 级 GK



学位代码 309

学校代码 10298

学 号 3070571

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：珍珠黄杨胚性愈伤组织诱导的研究

作 者：李 华

专 业：园林植物与观赏园艺

研究方向：园林植物遗传育种

指导教师：季孔庶 教 授

二〇一〇年六月

摘 要

珍珠黄杨为我国特有的树种，且有较高观赏价值，但其资源已濒于灭绝。本论文对其胚性愈伤组织诱导进行了研究，试图为其高效快速繁殖开拓新的领域。研究结果如下：

1.珍珠黄杨的胚性愈伤组织诱导

(1)珍珠黄杨愈伤组织诱导的最佳外植体是茎段。最佳灭菌方案为 0.1%升汞 2min+2%84 溶液 4min，污染率为 23.26%。最佳愈伤组织诱导培养基为 $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NAA}+2.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{6-BA}$ ，出愈率为 69.84%。最佳取材直径为 1.2~1.6mm。最佳愈伤继代培养基为 $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{2,4-D}+1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{6-BA}$ 。

(2)最佳胚性愈伤组织诱导培养基为 $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NAA}+1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{2,4-D}+0.2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{TDZ}$ ，诱导率高于 52%，2,4-D 为必需激素；胚性细胞悬浮培养中，最佳摇床转速为 $95\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ ，最佳激素组合为 $0.2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NAA}+1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{TDZ}$ ；胚性愈伤组织状态调整中，最适蔗糖浓度为 45~55 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，PEG 不利于胚性愈伤组织状态调整。

(3)珍珠黄杨防褐化研究中，2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 活性炭为最佳处理。

2.珍珠黄杨愈伤组织的生理生化指标测定

珍珠黄杨胚性愈伤组织与非胚性愈伤组织细胞内的可溶性糖、可溶性蛋白质的含量和超氧化物歧化酶的活性有着明显的不同，胚性细胞高于非胚性细胞。

3.珍珠黄杨愈伤组织的组织细胞学研究

应用石蜡切片法，观察到珍珠黄杨二细胞原胚、三细胞原胚、四细胞原胚、多细胞原胚、球形胚、心形胚，但始终未见接下来的鱼雷形胚和子叶形胚阶段。

关键词：珍珠黄杨；胚性愈伤；生理生化机制；体胚发育进程

分类号 Q94
密 级 GK



学位代码 309
学校代码 10298
学 号 7069005

南 京 林 业 大 学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：转 PEPE 基因杨树的光合特性分析

作 者：王小平

专 业：林木遗传育种

研究方向：林业生物技术

指导教师：诸葛强 教 授

二〇一〇年六月

摘 要

我国杨树人工林面积已达 700 万 hm^2 , 位居世界首位。利用基因工程技术培育高光效杨树新品种对我国杨树人工林产量的提高具有重要意义。本研究以转磷酸稀醇式丙酮酸羧化酶 (PEPC) 基因南林 895 杨 (*Populus* $\times$ *euramericana* cv. 'Nanlin895') 为材料, 对转基因植株与对照 (未转基因杨树) 在苗期生长、叶绿素含量、PEPCase 和 RuBPase 活性、光合作用相关参数指标和植株光合作用过程中保护性酶活力等方面的进行比较分析。为选育高光效转基因杨树新品种提供了依据。主要研究结果如下:

(1) 苗期观察分析结果显示, 转 PEPC 基因植株生长状况优于对照, 如大部植株系如 PE68、PE33、PE30、PE28、PE84 等株高高于对照, 最高较对照增高达 21.5cm; 分析表明各转基因株系叶绿素含量变化不大;

(2) 磷酸稀醇式丙酮酸羧化酶 (PEPCase) 是 C_4 植物 CO_2 同化途径中的关键酶, 本研究结果显示: 转基因杨树的 PEPCase 酶活性比对照增加显著, 最高达 22.3%;

(3) 光合作用相关参数测定, 并对转 C_4 植物 PEPC 基因杨树光合特性进行分析, 结果表明: 转基因杨树表现出较强的光能利用能力, 其光饱和点比对照提高约 10%~15%, 饱和点时的光合速率也比对照高, 且光补偿点低于对照, 表明转基因杨树利用弱光的能力也较强;

(4) 转基因杨树 CO_2 饱和点与 CO_2 补偿点均较低, 其光饱和点比对照减少, 有利于光合形成有机物积累; 羧化效率也比较高, 比对照增加最高达 36.4%, 表明转基因杨树利用 CO_2 的能力较强;

(5) 分析结果也显示转 PEPC 基因杨树在光合作用过程中, 光氧化保护性酶活性比对照显著增加, 表明转基因杨树具有较好的耐光氧化等能力。

关键词: 杨树; C_4 光合途径; PEPC; 转基因; 光合作用

分类号 Q586

密 级 GK



学位代码 307

学校代码 10298

学 号 3070146

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：湿加杂交松胚性愈伤超低温冷冻保存研究

作 者：刘伟东

专 业：生物化学与分子生物学

研究方向：植物细胞超低温生物学

指导教师：施季森 教 授

二〇一〇年六月

摘 要

湿×加杂交松(*Pinus elliottii* × *Pinus caribaea*)是指湿地松(*Pinus elliottii* Engemann)和加勒比松(*Pinus caribaea* Morelet)的杂交后代,已有研究表明,该杂种组合具明显的杂交优势,是人工培育的一个速生、丰产、优质、高效的优良新树种。本研究在已建立的湿×加杂交松体胚发生体系的基础上,利用未成熟胚诱导的胚性愈伤组织为材料,对四个杂交组合中的6个基因型分别用玻璃化法和程序降温法进行超低温冷冻保存及再生植株和生理生化指标的研究。实现了胚性愈伤的超低温保存后的再生和复温后的植株再生,完善了湿加杂交松的体胚发生技术体系。主要研究结果如下:

1、通过对四个杂交组合共6个体胚发生优良基因型的超低温冷冻保存研究发现,玻璃化超低温冷冻保存法复温后最高可达到34.97%的存活率;程序降温超低温冷冻保存法最高可达到64.77%的存活率。程序降温法在存活率、再生长等各个方面都明显好于玻璃化法。该方法保存的胚性愈伤最快7d可见新鲜再生愈伤组织,新再生的愈伤组织可正常生长。基因型间在冷冻以后的恢复再生能力差异较大,6号基因型在相同条件下冷冻保存后的存活率和再生情况都明显优于其他基因型。

2、杂交松胚性愈伤的超低温冷冻保存最佳流程是,继代培养9~12天的杂交松胚性愈伤组织经0.5M山梨醇预培养4天,0.6M山梨醇+10%(v/v)DMSO的冷冻保护液在0℃预处理20min,两步法降温后液氮保存,37℃水浴2min复苏,1M山梨醇的液体培养基清洗三次,以滤纸作支持物转到固体继代培养基再培养,可获得良好的愈伤组织再生。

3、经超低温冷冻后再生的愈伤组织,在固体继代培养基上正常生长后,与未冷冻的材料同时建立悬浮系,分三个阶段诱导体胚。使用最佳冷冻保存方案的材料和未冷冻的材料在相同的诱导和成熟条件下长出胚状体。体胚成熟阶段,ABA浓度5mg/L和GA浓度5mg/L诱导结果较好,改良P6培养基在体胚诱导中比DCR培养基要好。两者可溶性糖含量在体胚诱导阶段比愈伤增殖阶段均提高了10g左右,可溶性蛋白含量均提高了4倍左右。体胚诱导和生理生化指标验证了超低温冷冻方案具有较好的可靠性。

关键词: 湿地松和加勒比松杂交种; 胚性愈伤组织; 超低温冷冻保存;
程序降温法

分类号 S722
密 级 GK



学位代码 309
学校代码 10298
学 号 3070128

南 京 林 业 大 学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：杂交鹅掌楸优良遗传型选择及无性系指纹图谱构建

作 者：王龙强

专 业：遗传学

研究方向：数量与分子遗传

指导老师：李火根 教授

二〇一〇年六月

杂交鹅掌楸优良遗传型选择及无性系指纹图谱构建

摘 要

本文以鹅掌楸 68 个交配组合多地点子代测定林为材料，通过对其 3-4a 生长性状进行分析，开展杂交鹅掌楸优良遗传型选择；同时，利用 SSR 分子标记，构建了 330 个杂交鹅掌楸无性系的指纹图谱。主要研究结果如下：

通过对江西景德镇、镇江下蜀和安徽泾县三个试验点的鹅掌楸不同交配组合子代生长性状进行分析，结果表明鹅掌楸杂交子代树高和胸径在组合间差异达极显著水平，表明开展选择优良组合选择是可行的。综合三个试验点各组合的生长表现，选择出 7 个优良杂交组合，分别为 H×M、L×C3、S×Z、S×N、S×M、N1×C2、BM×C5。同时，根据子代测定结果分析了各交配母本的一般配合力，其中，S，L，N1 等 3 个母本的一般配合力较高，可作为杂交育种亲本。

多点联合方差分析结果表明，杂交鹅掌楸幼林期生长的地点与组合交互作用达显著水平。进一步利用 3 个试验点共有的 5 个杂交组合分析组合与地点的交互作用效应，并对各组合生长的适应性作了相应的评价。

从本实验室开发的 176 对鹅掌楸 EST-SSR 引物中筛选出 16 对多态性高、条带清晰、稳定性好的引物，作为构建杂交鹅掌楸指纹图谱的核心引物。应用该核心引物组合构建了 330 个杂交鹅掌楸无性系的指纹图谱，其中 13 个无性系仅用 1 对引物就可与其他无性系完全区分。

关键词：杂交鹅掌楸；选择；核心引物；SSR；指纹图谱

分类号 Q341
密 级 GK



学位代码 307
学校代码 10298
学 号 3070127

南 京 林 业 大 学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：鹅掌楸近交子代群体的遗传分析

作 者：姚俊修

专 业：遗传学

研究方向：分子遗传学

指导教师：李火根 教授

二〇一〇年 六月

摘 要

异交物种易发生近交衰退。鹅掌楸为濒危树种，现存种群规模小，其天然种群更新可能受到近交衰退的影响，因此，开展鹅掌楸近交子代遗传分析对于了解鹅掌楸濒危机制有重要意义，同时，对于鹅掌楸杂交育种及种子园管理也具有实践价值。本文以鹅掌楸属树种不同交配类型子代为材料，从种子饱满度、出苗率、苗期生长量、遗传多样性、纯合位点百分率等方面进行比较分析，估算鹅掌楸近交衰退程度。主要结论如下：

种子饱满度及出苗率在不同母本间、交配类型间、交配类型内组合间差异均达到了极显著水平。种内交配子代种子饱满度与出苗率均最高，种内交配子代饱满度平均高出种间杂交、回交交配、自交组合的 33.30%、89.02%、612%；出苗率平均高出 90.56%、119%、362%，不同交配类型子代饱满度、出苗率有相同的变异趋势：种内>种间>回交>自交。

在苗高和地径性状上，交配类型间、交配类型内组合间差异均达极显著水平。种间交配子代在两性状上均最高，种间交配子代地径平均高出自交组合、回交交配、种内组合分别为 7.98%、19.73%、91.30%；苗高平均高出 9.59%、36.70%、47.45%，不同交配类型子代地径与苗高变异趋势为：种间>自交>回交>种内。

12 对 SSR 引物对 27 个交配组合进行遗传多样性分析，以观测杂合度和 shannon 多样性指数为指标，种间群体均最高， H_o 平均高出回交群体、种内群体、自交群体的 17.99%、27.75%、269%；shannon 多样性指数平均高出 5.22%、13.34%、19.77%；遗传多样性变异趋势：种间>回交>种内>自交。

自交子代的纯合位点百分率最高为 76.82%，分别高出种内群体、回交群体，种间群体的 1.04 倍、1.37 倍、2.73 倍；由此推算出鹅掌楸、北美鹅掌楸亲本的平均基因杂合度分别为 42.72%、47.62%。

综上所述，与种内及种间交配子代相比较，鹅掌楸近交子代在种子饱满度、出苗率、遗传多样性、纯合位点百分率等方面均存在不同程度的衰退，但对于苗期生长量，近交衰退则不明显。

关键词： 鹅掌楸、SSR、遗传多样性、纯合位点、近交衰退

分类号

密 级



学位代码 307

学校代码 10298

学 号 3080146

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：植物磺胺素在杉木体胚发生中的调节作用

作 者：张绪忠

专 业：生物化学与分子生物学

研究方向：分子生物学

指导教师：施季森 教 授

陈金慧 副教授

二〇一一年五月

植物磺肽素 (PSK) 在杉木体胚发生过程中的调节作用

摘 要

杉木 (*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook), 是我国特有的主要用材树种, 在我国栽培历史悠久。杉木生长快, 产量高, 材质好, 用途广, 分布较广。在我国针叶材的木材产量中杉木木材产量占有较大比重。随着林木细胞工程技术在林木良种繁育事业上 日趋成熟, 杉木的细胞工程良种繁育技术也取得了较好的进展, 植物磺肽素 (PSK) 是最近几年发现的植物生长调节物质, 对于植物胚胎发育和种子的成熟有重要促进作用。本文以植物磺肽素 (PSK) 为主要调节因子, 探索杉木体细胞胚胎发生体系的优化途径和提高杉木体胚发育的质量, 研究内容和结果如下:

以杉木未成熟合子胚为外植体, 诱导杉木胚性愈伤组织。研究了合子胚不同发育阶段、外植体、基本培养基、激素种类及其浓度对比对杉木胚性愈伤组织诱导的影响。结果表明: 合子胚胚胎选择阶段适合杉木胚性愈伤组织的诱导, 诱导配方为 $BM_1+2,4-D\ 2mg/L+6-BA\ 0.5mg/L+KT\ 1mg/L+VC\ 10mg/L$ + 麦芽糖 $15g/L$, 其他添加物为肌醇 $100\ mg/L$, 谷氨酰胺 $450\ mg/L$, 水解酪蛋白 $500\ mg/L$, 活性炭 $2.0\ mg/L$ 。

杉木胚性胚柄细胞团的维持与增殖。杉木胚性胚柄细胞团的维持与增殖的优化培养基为 $BM_2+2,4-D\ 1mg/L+6-BA\ 0.5\ mg/L+KT\ 0.5mg/L$ + 麦芽糖 $30g/L$, 其他添加物为肌醇 $5000\ mg/L$, 谷氨酰胺 $750\ mg/L$, 水解酪蛋白 $500\ mg/L$, 植物磺肽素 (PSK) 为 $0.015mg/L$ 。实验发现, 添加植物磺肽素 (PSK) 的杉木胚性胚柄细胞团生长速度加快, 说明植物磺肽素 (PSK) 对杉木胚性胚柄细胞团的增殖有促进作用。在液体增殖培养中, 植物磺肽素 (PSK) 能促进低密度的细胞的增殖。

杉木胚性胚柄细胞团的预成熟。研究发现在预成熟培养基中添加 $8\ mg/L$ 浓度的 ABA 对于杉木胚性胚柄细胞团的预成熟有较好的促进作用。基本配方为 $BM_3+ABA\ 8\ mg/L+VC\ 10mg/L+PSK-\alpha\ 0.01mg/L$ + 麦芽糖 $20g/L$ 。在培养基中加入 $PSK-\alpha\ 0.01mg/L$ 之后能够提高杉木胚性胚柄细胞团的数量。① $10\times 187-01$ 每毫升的 ESM 能达到 50 个。

杉木体细胞胚胎的后期成熟。在杉木的体细胞胚胎成熟中, PEG、ABA、 GA_3 、活性炭、PSK 和低浓度的 NAA 共同调节杉木体细胞胚胎的后期成熟。基本配方为 $BM_4+PEG8000\ 80\ 000\ mg/L+ABA\ 3mg/L+GA_3\ 2mg/L+AC\ 1000\ mg/L+NAA\ 0.1\ mg/L+PSK-\alpha\ 0.01mg/L$ + 肌醇 $4\ 000\ mg/L$ 。

杉木体细胞胚胎发生中的可溶性蛋白质含量。在杉木胚性胚柄细胞团的维持和增殖中, 可溶性蛋白含量较低。经过 PSK 处理的材料可溶性蛋白质含量有所提高。最高的是① $10\times 187-01$, 能达到 $9.012\mu g/g$ 。在杉木体细胞胚胎的成熟阶段, 可溶性蛋白含量较高, 其中最高的还是经过 $PSK-\alpha$ 处理的① $10\times 187-01$, 达到了 $32.122\mu g/g$ 。在杉木体细胞胚胎发生中, 植物磺肽素 (PSK) 能提高体细胞胚可溶性蛋白的表达量。

关键词: 杉木; 体细胞胚胎发生; 植物磺肽素; 可溶性蛋白; 胚性愈伤组织; 萘乙酸

分类号 Q341

密 级 GK



学位代码 307

学校代码 10298

学 号 3080139

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：马尾松与黄山松种间基因渐渗研究

作 者：阎毛毛

专 业：遗传学

研究方向：分子遗传学

指导教师：尹佟明 教授

二〇一一年五月

马尾松与黄山松种间基因渐渗研究

摘 要

本文利用公共数据库中的松树 EST 序列,进行了微卫星(SSR)序列查找、引物设计和筛选,并利用筛选出的带型清晰的引物组合对按海拔高度采自安徽黄山的马尾松和黄山松 270 株个体进行了基因渐渗研究。分析的 270 株个体按海拔梯度分成 8 个组群,通过等位基因频率变异分析,揭示了马尾松与黄山松种间基因渐渗随海拔高度的变化趋势。主要研究内容与结果如下:

1. 统计了不同海拔松树种子的饱满度、发芽率及绝对发芽率,发现杂种区域(海拔约 900~1100m)的种子饱满度及绝对发芽率出现骤降的现象,这可能与两个物种的种间隔离障碍有关。

2. 为研究两个物种分化的遗传机制,本文开展了分子标记开发研究。首先进行了松树、桉树和杨树几个不同树种 EST 序列中微卫星的比对研究,微卫星序列是真核生物基因组中的重要特征序列,其变异情况与生物的进化历程相关,这一工作为利用微卫星标记进行马尾松与黄山松的种分化研究提供了生物信息学参考。

3. 对在松树 EST 序列中查找到的微卫星,进行了引物设计,并对其中的 301 对引物进行了引物合成,经初步筛选获得 218 对有扩增产物的引物。对这些扩增成功的引物,选取了其中的 150 对引物对它们在松科树种中的通用性进行了实验分析,结果显示本实验开发的 SSR 引物在松科树种中的通用率很高,达到 90%以上。在引物扩增实验的基础上,利用杂种域单株树上 8 粒种子的胚乳进行了引物扩增位点分析。

4. 在单倍体家系材料扩增实验的基础上,选取了 14 对带型清晰的引物,对采集的 270 株个体进行了基因渐渗按海拔高度变异趋势的实验分析。这些引物在群体中共扩增出了 56 个等位基因,每个引物扩增出的等位基因数在 2~6 个之间。研究发现大部分等位基因(70%)在两个树种间无明显的渐渗障碍,但有 17 个等位基因的渐渗情况随海拔高度有明显的变化趋势,其中 12 个等位基因频率随海拔升高而减少,而其它的 5 个等位基因频率随着海拔升高而增加。这一结果显示了两个树种基因组中的不同位点在两个树种间渐渗能力的差异,基因渐渗在两个树种中双向发生,但马尾松向黄山松的基因渐渗占主导地位。不同等位基因渐渗能力的差异预示了不同位点在维持两个树种分化中的不同作用,研究结果为了解马尾松与黄山松种分化的遗传机制提供了直接证据。

关键词: 物种分化; 马尾松; 黄山松; 基因渐渗; 微卫星

分类号 Q586
密 级 GK



学位代码 307
学校代码 10298
学 号 3080143

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：美洲黑杨遗传多样性分析与核心种质库构建

作 者：倪茂磊

专 业：生物化学与分子生物学

研究方向：分子生物学

指导教师：潘惠新 教 授

二〇一一年六月

摘 要

美洲黑杨 (*Populus deltoides*) 原产于北美洲密西西比等河的沿岸, 是北美重要的森林树种。它具有生长快, 材质好, 抗性强和适应性广等特点, 是我国重要的速生用材树种。本文对美洲黑杨种质资源进行了采样收集, 利用现代分子技术对其进行遗传多样性研究和核心种质库的构建, 为杨树育种研究提供科学依据。本研究利用 SSR 标记技术开展了对美洲黑杨遗传多样性研究和核心种质库的构建。获得的研究结果如下:

1、利用 24 对引物对 124 个美洲黑杨无性系亲缘关系进行了遗传分析, 共获得 89 个基因位点, 多态性达 100%, 平均每条引物扩增出 3.83 个基因位点, 其中, 最多达 6 个, 最少 2 个;

2、应用 SSR 标记技术对 124 个美洲黑杨种质资源无性系遗传多样性分析并用 PopGene 32 软件计算遗传相似系数, 从而获得 SSR 的多态性分析结果: 有效等位基因位点数为 1.3028~4.4644; Nei 基因多样性系数 0.2324~0.7760; Shannon's 信息指数为 0.4454~1.5463。结果表明美洲黑杨种质资源无性系间 SSR 变异较大, 多态性较高。在按 UPGMA 法进行聚类分析中, 将 21 个家系分为两大类, 除了家系 35、40、47、70 和 74 等因无性系数较少而出现错聚外, 所有家系聚类结果与家系来源地基本吻合。

3、本文在遗传多样性分析结果的基础上, 对现有美洲黑杨种质资源进行核心种质的初步构建。利用 PopGene 32 和 SAS 统计软件, 对总体种质进行逐步聚类随机取样构建美洲黑杨不同比例的初级核心种质。分别以 30%、20%、15%和 10%的选取比例从 179 份总体种质中选取 54 份、36 份、27 份和 18 份资源类型构成初级核心种质。结合观测等位基因数、有效等位基因数、Nei's 遗传多样性指数和 Shannon's 信息指数等分别对两组群体进行多样性评价和 t 检验, 初级核心种质和现有种质库的遗传多样性 t 检验未达到显著水平。说明构建的核心种质能够代表现有种质资源库的遗传多样性。

关键词: 美洲黑杨, SSR, 遗传多样性, 核心种质, 聚类分析

分类号 Q7
密 级 MM



学位代码 307
学校代码 10298
学 号 3080145

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：杂交鹅掌楸体胚发生早期差减文库的构建及 EST 分析

作 者：冉士孟

专 业：生物化学与分子生物学

研究方向：分子生物学

指导教师：施季森 教 授
陈金慧 副教授

二〇一一年六月

摘 要

杂交鹅掌楸是一种具有较高观赏价值和经济价值的优良树种,但其自然种子繁殖的能力较低,建立体细胞胚胎发生和植株再生体系具有重要的应用价值和经济意义。植物体细胞胚胎发生早期基因的表达关系着体胚形态建成的启动,目前对于体细胞胚发生早期表达基因的研究有限。本实验旨在通过对杂交鹅掌楸的体细胞胚发生过程进行阶段观察区分选定体胚早期发育阶段,运用构建抑制差减文库方法,寻找杂交鹅掌楸体细胞胚由单个胚性细胞到多细胞原胚细胞团的发育过程中差异表达的基因,以了解林木胚性发育基因及其表达规律,这对于优化和调控林木细胞工程体系,具有重要的意义。

主要结果如下:

1. 对 2009 年下蜀林场不同组合杂交授粉的鹅掌楸的未成熟胚进行愈伤诱导发现中国鹅掌楸×北美鹅掌楸组合极易诱导愈伤,但胚性愈伤诱导效率略低于北美鹅掌楸×中国鹅掌楸组合。

2. 为获得体胚发生早期差异表达基因,本研究利用的抑制杂交技术,以杂交鹅掌楸细胞系 163024 胚性愈伤,液体培养 7 天过 150 目筛网的杂交鹅掌楸细胞为驱动方(Driver),铺固体培养基平板诱导培养 2 天的细胞为测试方(Tester),构建了正向抑制差减文库,保存了 1300 个阳性克隆。利用引物 Nestd1 和 Nestd2R 进行 PCR 及 *EcoR* I 酶切鉴定,结果证明所构建的文库符合要求,具有代表性。

3. 选取部分阳性克隆进行测序,去除重复和低质量的序列,序列聚类分析后获得 52 个 Unigenes,其中包括 37 个 Contigs 和 15 个 Singletons。通过与 NCBI GenBank 中数据库进行 BLASTx 比较分析,发现有 46 条 ESTs(88.5%)可以找到同源序列,其中有 38 条 ESTs 功能已知(82.6%),8 条功能未知(17.4%)。6 条 ESTs(11.5%)没有任何匹配结果,推测它们可能是新的发育相关基因。功能已知的 ESTs 所编码的蛋白涉及杂交鹅掌楸的生长代谢,转录调控、信号转导、及胁迫抗逆等方面。就 BLAST 对比同源性最高的基因的来源看,大部分与烟草,拟南芥、法国梧桐、腊梅、籼稻和蓖麻等同源。

4. 通过对功能已知的基因进行分析,推测植物延伸因子 EF1 α 、脂质转运因子 LTP 等基因是杂交鹅掌楸体胚诱导过程中转录调控和细胞信号传递的相关基因,可能在胚性发育基因的表达调控中起到重要作用;过氧化物同工酶、细胞色素 P450、甜菜碱醛脱氢酶 BADH、金属硫蛋白 MT 等基因可能是参与了鹅掌楸体胚发生生长代谢和胁迫抗逆的重要基因。本研究找到的植物延伸因子 eEF1 α 、脂质转运因子 LTP、过氧化物同工酶基因是已知的重要的体胚发生标志基因。

关键词: 杂交鹅掌楸, 体细胞胚胎发生, 抑制差减杂交, 胚性发育基因

分类号 S722

密 级 XZ



学位代码 307

学校代码 10298

学 号 3080147

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：转 *PEPC* 基因南林 895 杨表达研究

作 者：王 群

专 业：生物化学与分子生物学

研究方向：植物基因与发育（基因型到表型）

指导教师：诸葛强 教 授

二〇一一年六月

摘 要

与 C₃ 植物比较, C₄ 植物具有 CO₂ 浓缩机制, 在高光强、高温及低浓度 CO₂、干旱等条件下具有更高的光合速率和营养、水分利用效率。利用 C₄ 光合途径关键基因 *PEPC* 开展 C₃ 植物杨树高光效基因工程研究具有重要意义, 将为林木高光效育种提供依据。

本研究在转 *PEPC* 基因杨树(*Populus × euramericana* cv. 'Nanlin895')的基础上, 通过对转基因植株 C₄ 途径有关光合酶活性、光合作用对光的响应和光抑制/光氧化条件下的叶绿素荧光特性等生理指标的比较, 分析转 *PEPC* 基因杨树光合生理特性。主要研究结果如下:

1. 对转 *PEPC* 基因杨树的生理特性研究发现导入的 C₄ 植物玉米 *PEPC* 基因显著地增加转基因杨树的光合能力, 在高光强下光合速率提高约 50%, 光饱和点提高 30% 左右, 光合作用的光抑制减轻。

2. 分析结果显示转基因杨树 CO₂ 饱和点与 CO₂ 补偿点均较低; 其光呼吸比对照减少, 有利于光合产物有机物形成; 转基因杨树羧化效率也较高, 比对照增加最高达 50.4%, 表明转基因杨树利用 CO₂ 的能力较强。

3. 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPCase) 是 C₄ 光合途径中的关键酶, 对转 *PEPC* 基因杨树的分析结果显示 PEPCase 活性比对照增加显著, 最高达 45%。其他 C₄ 途径相关酶活没有显著增加。

4. 与对照相比, 强光下转 *PEPC* 基因杨树 Fv/Fm、光化学淬灭系数(q^p)及 PS II 实际光化学效率减少较低, 而非光化学淬灭系数 q^N 则有很大程度的提高, 由此可见, 在高光强逆境下由于转基因植株中 *PEPC* 基因高表达, 使其保持着较高的光能转化效率, 并通过热耗散能力的增强消除了过剩的光能, 从而保护了光合途径 PS II 系统的稳定性。

关键词: *PEPC*; 转基因杨树; 光合作用; 叶绿素荧光

分类号 S722
密 级 XZ



学位代码 307
学校代码 10298
学 号 3080148

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：杨树转 *Bt* 基因和 *PEPC* 基因的研究

作 者：蒋金来

专 业：生物化学与分子生物学

研究方向：植物重组DNA与基因操作

指导教师：诸葛强 教 授

二〇一一年六月

摘 要

杨树是重要的速生用材树种之一,近年来我国杨树的栽培面积居世界首位,但大面积的人工造林,单一品种的过度利用导致病虫害愈演愈烈,基因工程技术的发展,为提高杨树生长量、增强抗病虫能力提供了一条有效途径。

本研究以本实验室已有的转 C_4 光合关键基因 *PEPC* 的南林 895 杨为试验材料,利用正选择标记系统中的甘露糖异构酶基因 *PMI* 为选择标记,开展转 *Bt* 抗虫基因的遗传转化研究。旨在为培育高产、多抗杨树新品种提供依据。主要研究进展如下:

1、进一步完善了杨树转基因研究中安全选择标记甘露糖异构酶 *PMI* 基因筛选体系。经南林 895 杨对甘露糖敏感试验,分化筛选培养基为:甘露糖 8g/L+蔗糖 22g/L+MS+6-BA 0.5mg/L+TDZ 0.002mg/L;芽伸长筛选培养基为:甘露糖 10g/L+蔗糖 20g/L+MS+6-BA 0.2mg/L+TDZ 0.001mg/L;生根筛选培养基为:甘露糖 6g/L+蔗糖 19g/L+1/2MS。

2、利用建立的 *PMI* 选择标记转化系统,通过农杆菌介导法,开展对转 *PEPC* 基因南林 895 杨再转 *Bt* 抗虫基因的研究,共计获得抗性植株 274 个株系。与抗生素筛选系统比较,利用 *PMI* 选择标记系统杨树遗传转化效率大大提高,最高可达 17.57%,平均转化效率为 12.82%。

3、对获得的抗性植株进行分子检测,经 PCR 分析显示阳性的有 57 个株系,并对 PCR 阳性植株进行 RT-PCR 分析,结果表明 57 个株系中有 8 个株系外源基因获得了表达。选取培养 40 天左右的转基因试管苗置于温室,练苗 5 天后移栽至花盆中。

4、采用杨小舟蛾健康四龄虫对 RT-PCR 检测阳性的 4 个株系进行室内饲虫试验,结果显示转基因株系表现出不同程度的抗虫性。其中 PB2 明显优于其他 3 个株系(PB27、PB43、PB86),用 PB2 株系叶片饲喂幼虫,校正死亡率约 30%。饲喂转基因植株叶片对幼虫化蛹率产生显著影响,1~3 龄幼虫的化蛹率分别为 27.4%、33.1%、30.8%,与对照化蛹率(74.3%~87.7%)的差异极显著。转基因杨树叶片对幼虫体重有显著抑制作用,饲喂幼虫平均体重下降约 40%。

关键词: 转基因杨树; *Bt* 基因; *PEPC* 基因; 抗虫; *PMI*

分类号 TP399;Q811
密 级 GK



学位代码 308
学校代码 10298
学 号 3080236

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：遗传连锁群中分子标记排序研究

作 者：董程玲

专 业：计算机应用技术

研究方向：生物信息学

指导教师：童春发 副教授

二〇一一年六月

摘 要

遗传连锁图谱是遗传育种学研究中一个很重要的领域, 连锁图谱构建工作包括: 两点连锁分析、多位点连锁分析、连锁群划分、多位点排序等。遗传连锁图谱构建的关键问题是要确定标记位点在染色体上的位置及其线性排列方式, 这就涉及到多位点排序问题。对于少量标记位点, 穷尽法是可行的, 然而对于连锁群中有中等个数的标记位点而言, 它所有可能的排序是非常巨大的。多位点排序属于著名的寻找最优解的 NP 问题或者称之为是 TSP 问题。许多求解的方法要么是在得到最优解的精确度上不高, 要么是需要耗费大量的计算机资源。本文基于隐马尔可夫模型 (HMM) 的多位点连锁分析方法, 通过计算机模拟验证了极大似然值作为目标函数在多位点排序中的有效性, 并总结了不同计算环境下所需的计算时间。对于含有较多标记位点的连锁群, 提出了多位点模拟退火并行算法和多位点启发式搜索并行算法, 并用 C+MPI 的方式编程实现。以 F_2 代为作图群体, 通过大量的计算机模拟证实两种并行算法快速有效, 比著名的作图软件 Mapmaker 有更高的精确度。本文结果有助于构建林木高密度遗传连锁图谱。

关键词: 遗传连锁图谱; 模拟退火算法; 启发式搜索算法;
隐马尔可夫模型(HMM); 消息传递接口(MPI);

分类号 S722

密 级 GK



学位代码 309

学校代码 10298

学 号 3080504

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：红花的组织培养和品质相关基因的克隆及分析

作 者：朱振贤

专 业：林木遗传育种

研究方向：生物技术

指导教师：潘惠新 教 授

二〇一一年六月

摘 要

红花(*Carthami Flos*)为菊科植物红花(*Carthmus tinctorius* L.)的干燥管状花,具有抗炎镇痛、扩张冠状动脉、降血压等多种药理作用,临床应用广泛。其中黄酮类成分羟基红花黄色素 A (HSYA)是红花的主要活性成分,由此羟基红花黄色素 A 含量的高低,直接影响红花品质的优劣。因此,从基因水平研究与 HSYA 生物合成相关的基因,最终从分子水平上定向调控红花品质,为红花的育种提供极大的便利。另外,利用组织培养技术,培育红花的再生再生植株,为快速扩繁红花和验证基因的功能奠定基础。

本研究获得的主要结果如下:

1. 筛选出红花种子的最佳 0.1% HgCl_2 消毒时间为: 30 分钟;通过对不同部位的外植体(子叶、根、茎、真叶)的诱导比较获知再生体系建立的最佳诱导材料是:子叶;通过试验比较细胞生长素 NAA 和细胞分裂素 6-BA、KT、TDZ 不同配比的培养基,筛选获得了最有利于诱导愈伤和诱导形成再生芽的培养基:MS+0.1mg/L NAA+2.0mg/L 6-BA+15mg/L KT 和 MS+0.1mg/L NAA+2.0mg/L 6-BA+20mg/L KT。

2. 利用高效液相技术完成了对 09 年红花中 HSYA 的含量的测定,含量分为 0%-2.6%不等。

3. 采用 cDNA 末端快速扩增(Rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术,首次从红花植物中克隆得到黄烷酮 3-羟化酶(F3H)基因。并对该基因进行了蛋白结构的预测和初步的生物信息学分析, F3H 基因其全 cDNA 为 1415bp(GenBank 登录号:JF737995)包含一个 1086bp 的开放阅读框(ORF),编码 361 个氨基酸残基。

4. 利用实时定量 PCR 检测了 F3H 基因在 HSYA 含量不同的红花样本中的表达差异。发现在 F3H 在白花(不含 HSYA)中的表达远远低于在黄花(含有 HSYA)的表达。

关键词: 红花, 羟基红花黄色素 A (HSYA), 组织培养, 基因克隆, 生物信息学分析, 实时定量

分类号 S722
密 级 BM



学位代码 309
学校代码 10298
学 号 3080505

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：杨树远缘杂种异源四倍体诱导与鉴定研究

作 者：陆宇晴

专 业：林木遗传育种

研究方向：林木遗传改良

指导教师：潘惠新 教 授

二〇一一年六月

摘 要

多倍体植物具有株形巨大、抗性强、材质优良等特征,日益受到育种工作者的青睐。本研究以美洲黑杨(*Populus deltoides* Marsh.)×小叶杨(*P. simonii* Carr.)远缘杂种F1代优良单株为诱导材料,秋水仙素($C_{22}H_{25}O_6N$)为诱变剂,对杂种幼苗顶端生长点进行不同浓度、不同时间的处理开展异源四倍体诱导,分别通过气孔观测、流式细胞分析、染色体计数进行多倍体的逐步鉴定,探索杨树远缘杂种异源四倍体诱导的最适处理条件和最佳鉴定方法。

主要研究结果如下:

1. 秋水仙素对杨树的毒害作用随着浓度和时间的增加而增大,0.2%的秋水仙素浓度处理24h的褐化率和死亡率最低,0.4%浓度下植株褐化率和死亡率最高,分别达到38.49%、20.63%。受害但未死亡的植株,初期生长受到抑制,后期逐渐恢复,并且比对照植株生长更旺盛。

2. 以茎尖生长点为受体,最佳诱导组合为:0.3%浓度秋水仙素处理24h。低浓度秋水仙素对杨树多倍体诱导效果不佳,在0.2%秋水仙素浓度处理下未产生四倍体植株,在0.3%和0.4%浓度秋水仙素处理下,虽然褐化率和死亡率相对较高,但诱导获得了四倍体。0.3%秋水仙素处理24h、48h,0.4%秋水仙素处理36h各获得了1株四倍体杨树。但0.4%秋水仙素浓度下植株褐化率和死亡率较高。研究结果显示,杨树多倍体诱导率并不随处理浓度和时间的增加而增加。

3. 形态学、解剖学研究表明,四倍体植株表现出多倍体特征,茎增粗、苗木变高,叶片厚实、宽阔,叶色深绿,叶间距变小,气孔明显大于二倍体,单位面积气孔数目少。

4. 采用流式细胞分析法测定细胞中DNA的相对含量,结果显示,混合酶液(1%纤维素酶,0.5%果胶酶)28℃处理3h、RNase37℃处理2h的条件下可获得较好的细胞核悬液。二倍体杨树细胞中的DNA含量为200,四倍体杨树细胞核DNA含量近似400,DI约为2。

5. 根尖染色体制片研究结果表明,上午09:00、10:00均可取材,0.7mmol/L环己酰胺常温处理2h、卡诺固定液4℃下固定24h以上、1mol/L的盐酸60℃解离6min获得的制片效果较好。

6. 对756株处理植株分步采用形态学和气孔观测,初步筛选出64株变异植株,用流式细胞术再次鉴定,获得了6株拟多倍体,分别为10-3、10-4、12-4、38-2、59-1-1、92-1,最后通过染色体计数,初步确定3株为四倍体杨树,分别为10-4、12-4、38-2,但在以后的生长发育中,是否会回复到二倍体,还有待进一步观测。

关键词: 四倍体 秋水仙素 气孔观测 流式细胞术 染色体制片

分类号 S722

密 级 XZ



学位代码 309

学校代码 10298

学 号 3080506

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：美洲黑杨种质资源遗传变异与无性系选择研究

作 者：李春涛

专 业：林木遗传育种

研究方向：林木遗传改良

指导教师：潘惠新 教 授

二〇一一年六月

摘要

本文研究内容主要包括美洲黑杨种质资源生长、材性、干形及物候期等重要性状遗传变异和美洲黑杨优良无性系选择。主要研究结果如下:

(1) 对种质资源库无性系树高、胸径、材积、尖削度、圆满度、弯曲度和密度等 7 个性状的遗传变异分析结果表明, 各性状在家系间达到了显著或极显著的差异。对美洲黑杨无性系生长、干形和材性等性状进行聚类分析, 选择适当的遗传距离, 将无性系在各性状上分成四类。从各性状的调查数据均值上选出 45、28、40 和 86 号等 4 个家系为种质资源库中生长性状较优的家系, 40、52、60、80 和 86 号等 6 个家系为干形较优家系, 7、77、70、28 和 87 号等 5 个家系为木材密度较大的家系。

(2) 对美洲黑杨种质资源库中 12a 生的 43 个家系, 210 个无性系进行开花、展叶和落叶等性状物候期观测, 将各个无性系开花、展叶和落叶日期分别量化后, 分析它们之间及其与生长性状间的相关性。结果表明各性状间相关性都比较显著, 落叶与生长期相关最密切, 其相关系数达到了 0.95854, 其次是展叶期与生长期, 呈现较强的负相关性, 其相关系数达到 -0.95620, 开花期与生长期也呈现一定的负相关性, 其相关系数达到 -0.51472, 开花与落叶性状呈现较显著的负相关性, 相关系数为 -0.36847; 开花性状与树高、胸径等生长性状均呈负相关, 展叶与树高、展叶与胸径均呈现中度的负相关性, 落叶与树高性状、落叶与胸径性状、生长期与树高性状、生长期与胸径性状均呈中度正相关; 落叶与展叶期呈现较强的负相关性, 相关系数达到 -0.86011。

(3) 运用主成分分析、综合评分法、隶属函数法和指数选择等四种方法对美洲黑杨无性系进行多性状联合选择, 从美洲黑杨种质资源库中的 230 个无性系中选出 1-1、22-2、22-4、31-14、48-5、52-1、66-16、74-4、80-5、81-16、86-2、86-8、87-5、89-18、89-2、89-3、93-2、95-27、95-33、95-36、95-43、95-44、101-3、102-14、102-21、102-8、102-9、和 103-9 等 28 个生长量大、木材密度高、干形好的优良无性系。

关键词: 美洲黑杨 遗传变异 相关分析 无性系选择

分类号 S722

密 级 MM



学位代码 309

学校代码 10298

学 号 3080512

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：杉木 SSR 引物及其在杂交群体中多态性研究

作 者：徐 阳

专 业：林木遗传育种

研究方向：森林分子遗传学

指导教师：施季森 教 授

二〇一一年六月

杉木 SSR 引物及其在杂交群体中多态性研究

摘 要

为研究杉木杂交群体的 SSR 分子标记的多态性,利用杉木转录组测序技术,获得一批 SSR 分子标记,对杂交群体的分子标记多态性进行了研究,主要结构如下:

1. 利用 misa 软件对杉木转录组的测序拼接后的序列进行微卫星查找,获得的复合型微卫星的比例为 18.4%。在设定不同的微卫星最小长度中调查结果中显示,各类型微卫星数在控制不同碱基长度条件时变化不一。其中单碱基,二碱基,三碱基,六碱基重复中的各类微卫星中的比例较为稳定。

2. 在单碱基的最小重复定为 20,二碱基的最小重复定为 9,三碱基的最小重复定为 6,四碱基的最小重复定为 5,五碱基的最小重复定为 5,六碱基的最小重复定为 4 的条件下,共获得 664 个微卫星,即平均每 47.8Kb 可以发现一个 SSR 位点。其中,三碱基(43.37%)为最多的重复类型基元,AG/CT 是杉木微卫星中主要的二基元重复,AAG/CTT 基元是三基元重复中最多的基元重复,六基元重复中 AAGAGG/CCTCTT 的数量为最多。

3. 利用根据转录组自行设计出的 411 对引物,对 8 个杉木三代种子园中的随机抽取的家系进行多态检验发现 161 对引物明显存在多态性(39.17%)。基于 GenBank 上的杉木 EST 序列开发的 28 对引物中,有 6 对 SSR 引物具有多态性,多态引物的含量约为 21.42%。两者相加目前共开发出 167 对 SSR 多态性引物。基于转录组序列开发的多态性引物的 PIC 在 0.08-0.71 之间,平均 PIC 为 0.36。基于杉木已公布的 EST 序列开发出的多态性引物 PIC 范围为 0.22-0.48,平均为 0.40,所开发的杉木微卫星引物具有中等强度的多态性。

4. 利用可能具功能 118 对微卫星标记,对 12 个群体中的不同个体进行了分析。结果表明,82 对多态性 SSR 引物共扩增出 242 个等位位点,平均 PIC 为 0.43。根据分子数据计算出各个体的杂合度,与亲本的遗传距离。同时分析了各性状杂种优势度,一般配合力,特殊配合力,父本效应,母本效应与对应的杂合度,遗传距离的相关关系。初步结果表明,胸径的杂种优势与 SSR 表现的杂合度呈负相关,材积的杂种优势与杂合度呈差异显著负相关,而其他各项间的未发现显著的相关性。

关键字: 杉木, SSR 标记, 多态性, 杂合度, 杂种优势

分类号 S722

密 级 XZ



学位代码 309

学校代码 10298

学 号 3080514

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目: MicroRNA172 及其靶基因的功能研究

作 者: 戴争妍

专 业: 林木遗传育种

研究方向: 林木生物技术

指导教师: 诸葛强 教 授

二〇一一年六月

MicroRNA172 及其靶基因的功能研究

摘 要

近年来, miRNA 被认为在很多植物的生长发育过程和对环境的响应中发挥了重要的调控作用。本研究旨在揭示不同物种中 miR172 的功能保守性以及 miR172 与靶基因功能相关性上的研究, 研究进展如下:

1. 本研究分别从模式植物拟南芥和水稻中扩增出对应 miR172 家族中 miR172a 的前体 *At-miR172a* 基因和前体 *Os-miR172a* 基因, 并构建了 *At-miR172a* 和 *Os-miR172a* 超表达质粒, 利用水稻幼胚材料进行遗传转化研究, 通过 miRNA Northern 方法证实转基因植株中出现了 miR172a 超表达, 获得阳性超表达转基因植株。

2. 通过对阳性转基因植株的表型进行宏观和微观的观察比较分析, 结果表明 *At-miR172a* 和 *Os-miR172a* 超表达对水稻生长发育具有相似的影响, 且花器官变异程度与 miR172a 超表达强弱有直接关系。表明不同物种中 miR172 不仅序列保守, 且功能也具有保守性。

3. 为了更好地研究 miR172 的功能及其与靶基因的关系, 本研究还对水稻中 miR172 的 5 个 *AP2-like* 靶基因进行了功能分析。分别构建了水稻中 5 个靶基因的超表达和 RNAi 质粒并转化野生型水稻, 结果表明大部分靶基因的超表达植株产生了表型变化, 但 RNAi 下调植株中未发现表型变化。

本研究结果不仅佐证了 miR172 的功能, 还为进一步研究 miR172 和靶基因间的调控关系奠定了基础。miR172 在水稻中主要影响穗型和花的发育, 在其它物种中的作用也主要体现在生殖发育方面。鉴于 miR172 序列和功能的保守性, 我们期望通过对模式植物的研究, 挖掘 miR172 对林木生殖发育可利用的调控技术, 应用于林木的遗传改良研究。

关键词: *At-miR172a* *Os-miR172a* *AP2* 水稻 拟南芥 生长发育 表型变化

分类号 S722
密 级 GK



学位代码 309
学校代码 10298
学 号 3080515

南 京 林 业 大 学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：新疆石竹属种间分子鉴别及种内遗传多样性分析

作 者：蒋劭妍

专 业：林木遗传育种

研究方向：分子遗传

指导教师：徐立安 教 授

二〇一一年 五 月

摘 要

本研究利用 SRAP 和 ISSR 分子标记,对在新疆收集的石竹属植物资源进行了种间指纹图谱分子构建及 4 个种种间及种内的遗传多样性的研究,结果如下:

通过正交实验和单因素实验完成了两种分子标记的体系优化,得到稳定可靠的反应体系。SRAP-PCR 优化体系为: Mg^{2+} 2.5mmol/L、dNTP 0.20mmol/L、正反向引物浓度均为 0.25 μ mol/L、TaqDNA 聚合酶 1U;反应程序前 5 个循环为 35℃,后 30 个循环为 50℃。ISSR-PCR 优化体系为: Mg^{2+} 1.75mmol/L、dNTP 0.425mmol/L、引物 0.8 μ mol/L、Taq 酶为 0.5U;反应的退火温度可采用 52℃,即建议退火温度的基础上增加 2.5℃。利用优化的体系成功从 80 对 SRAP 引物中成功筛选出 16 对多态引物,从 50 对 ISSR 中筛选出 6 对多态引物。

利用 SRAP 和 ISSR 分子标记对石竹属 10 个种的 DNA (各 7-9 个个体建立的 DNA 池)分析,结果表明:繸瓣组与齿瓣组可以明显的区分开来,其组内的遗传距离较小,不同组物种之间的遗传距离相比较远,平均遗传距离为 0.5424。成功构建了石竹属植物的指纹图谱,其中 Me3/Em 14 扩增效率最高,仅一对引物就可以鉴别石竹属的 10 个种,ISSR 分子标记则需要 4 对引物的组合,这进一步验证了 SRAP 标记用于构建植物种间指纹图谱的可行性和优越性。

对石竹属的 4 个种进行了遗传多样性检测,通过 POPGENE 分析表明,高石竹 Nei 基因多样性指数(h)和 Shannon 指数(I)最高,分别为 0.3695 和 0.5264。其它种遗传多样性大小依次是大苞石竹、瞿麦、遗传多样性最低的是准噶尔石竹(h)0.2955 和(I)0.4221,种间遗传分化系数(G_{st})为 0.1558。4 个种内平均 Nei 基因多样性指数(h)和 Shannon 指数(I)中准噶尔石竹遗传多样性最高,分别是 0.2479 和 0.3803,其次是高石竹、瞿麦。遗传多样性最低的是大苞石竹(h) 0.2102 和(I) 0.3341,种内家系间遗传分化系数平均值为 0.1035,即有 10.35%的遗传变异存在于家系之间,而有 89.65%的遗传变异存在于家系之内。

关键字: 石竹, ISSR, SRAP, 指纹图谱, 遗传多样性

分类号 S722
密 级 XZ



学位代码 309
学校代码 10298
学 号 3080513

南京林业大学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：马尾松无性系种子园亲本评价
及档案建立

作 者：沈敬理

专 业：林木遗传育种

研究方向：林木遗传改良

指导教师：徐立安 教 授

二〇一一年四月

摘要

本研究以福建省漳平五一国有林场马尾松无性系种子园亲本及其 1995、1996 年营建的半同胞子代林为对象,对亲本开花结实习性和 DNA 指纹,子代的生长、干形等性状进行了研究,建立了种子园亲本较为系统的档案,结果如下:

对 1995 和 1996 年造林的 2 片种子园自由授粉子代林的生长、干形性状进行了研究。结果表明,种子园子代家系的生长性状在不同年龄都存在极显著差异。8 年生之前,随年龄增大家系间的生长差异有所增大,随后略有下降,11 年后趋于平稳。生长量在年度间的相关性(5 年生、8 年生、11 年生与 15 年生时相关)也随年龄增加而增强,3 种生长性状的 11 年与 15 年时的相关系数基本都在 0.8 以上。当子代林 15 年生时,1995 子代林(119 个家系)平均树高 15.53m(变异系数 $CV=6.43\%$),胸径平均值为 16.68cm($CV=15.14\%$),平均材积 0.1639m^3 ($CV=30.68\%$);1996 年子代林(159 个家系)生长量总体相对较小,但变异系数更大(比 1995 年约大 10%),通直度变异系数为 6.99%。如果以种子园 30% 的优良亲本的种子造林,与当年当地商品种子相比,根据 1995 年的子代林结果可获得材积增益 28.55%(1996 年的子代林更高),根据子代测定结果对亲本选择将产生明显的改良效果。

从松属 6 个树种中应用的 SSR 引物 168 对,SRAP 上游引物 10 个,下游引物 8 个共 48 个组合,进行了指纹图谱构建的标记筛选。筛选出多态性高、条带清晰、重复性强的 SSR 标记 15 对,共检测到 55 个等位基因,平均每对引物可检测到 3.67 个等位基因(最多 6 个,最少 2 个)。利用 2 对引物组合(PtTX3116、PtTX3025)可区分出 18 个无性系,加入第 3 对引物可区分 52 个,加入第 4 对可区分 74 个,6 对引物组合可区分出 106 个无性系,但再增加引物组合,区分效率明显下降,到 10 对引物组合时只能区分 116 个无性系,再增加引物组合也不再发生变化,还剩 18 个无性系只能区分成 7 个组,每个组内各 2-3 个无性系不能被区分开。后经筛选出的 4 个 SRAP 标记组合能将剩下的所有 18 个无性系区分开,建立了可区分所有 134 个亲本无性系的指纹图谱。

根据 2 片子代林的试验结果,以及种子园亲本开花习性、种子产量及发芽率等,结合 134 个无性系的分子指纹图谱,建立了较为全面的种子园亲本综合档案,为种子园管理、种子园重建(新建)及多世代改良建立了良好基础。

关键词: 马尾松种子园 子代测定 指纹图谱 综合档案

分 类 号 Q786
密 级 BM



学 位 代 码 307
学 校 代 码 10298
学 号 3080133

南 京 林 业 大 学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：杨树中 flg22 诱导 MAPK 信号级联通路的研究

作 者：谭碧玥

专 业：遗传学

研究方向：杨树抗病分子机理

指导教师：徐立安 教 授

黄敏仁 教 授

二〇一一年六月

摘 要

植物与病原体协同进化过程中,逐渐形成了一系列复杂高效的保护机制来抵御病原物的侵染。其中包括一套适应性较广的由病原相关分子模式(PAMPs)触发的免疫(PTI),它可激活植物体中促丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路使植物产生早期应答反应。其中,鞭毛蛋白的保守序列 flg22 是目前研究最为深入的一种 PAMPs。MAPK 是普遍存在于真核生物中的一类保守的丝氨酸/苏氨酸类蛋白激酶,它通过逐级磷酸化传递环境刺激信号,参与植物生长发育和多种生物、非生物胁迫信号转导。杨树作为木本植物的模式物种,以它为材料研究林木抗病相关分子机制具有重要意义。本论文以南林 895 杨(*Populus×euramericana* cv.'Nanlin895')为材料,有对由 flg22 诱导的 MAPK 信号级联通路的传递展开一系列研究,具体结果如下:

1. 建立杨树原生质体瞬时表达体系。通过对酶的种类、PEG 浓度和质粒 DNA 含量进行优化,建立转化效率达到 80%以上的瞬时表达系统。其中,使用 2%纤维素酶 (v/v)(sigma)和 0.5%果胶酶 (v/v)(sigma)经过 2.5-3h 的酶解可获得足够的产量;在转化过程中,每 6×10^4 个原生质体中使用 30%的 PEG 和 10ng 质粒 DNA 可获得较高的转化效率。

2. 通过 RT-PCR 获得受 flg22 诱导的早期防御基因,并克隆其启动子与 LUC 基因相连接构建报告基因表达载体。首先利用 RT-PCR 得到 *CaBP*、*ERF74*、*WRKY33* 和 *WRKY29* 等 4 个受 flg22 诱导表达量上调的基因。根据预测结果,上述 4 个基因分别克隆上游 2000bp, 1500bp, 1600bp 和 1500bp 作为其启动子区域并连接 LUC 构建报告基因。经验证确定使用 *WRKY29-LUC* 和 *WRKY33-LUC* 作为报告基因载体进行后续实验。

3. 克隆 MAPK 各级候选基因,构建相关表达载体。其中,MPKs 内克隆得到 5 个基因,分别为 *PtMPK3-1*, *PtMPK3-2*, *PtMPK4*, *PtMPK6-1* 和 *PtMPK6-2*; MKKs 中克隆得到 6 个基因,分别为 *PtMKK2-1*, *PtMKK2-2*, *PtMKK3*, *PtMKK5*, *PtMKK6* 和 *PtMKK7*, 并将此类基因利用定点突变的方法改造成为激活型基因; MEKKs 中克隆得到 6 个激活型基因,分别为 *PtMEKK1-1*, *PtMEKK1-2*, *PtNPK1*, *PtNPK2*, *PtNPK3* 和 *PtNPK4*; 并且克隆 *PtMEKK1-1* 和 *PtNPK1* 的基因全长。将上述基因利用 Gateway 技术分别构建入 p2HAGW7.0, p2GWF7.0, pUC19-SPYNE 和 pUC19-SPYCE 表达载体中,共得到 65 个表达载体组合。

4. 根据上述克隆得到的基因,分析杨树中由 flg22 诱导的 MAPK 信号通路的传递方式。利用 luciferin 荧光检测,western blot,蛋白相互作用(BiFC)和亚细胞定位得到这条通路为: *PtNPK1*—*PtMKK2-2*—*PtMPK6-1*(*PtMPK3-1*), 且 *PtNPK1* 与 *PtMKK2-2* 在细胞膜上发生作用,*PtMKK2-2* 与 *PtMPK6-1* 在整个细胞中发生作用,而被激活的 *PtMPK6-1* 和 *PtMPK3-1* 转入细胞核中将信号进一步传递下去,引发杨树早期抗性。

关键词: flg22; 促丝裂原活化蛋白激酶(MAPK); 杨树; 信号通路

分类号 Q341
密 级 GK



学位代码 307
学校代码 10298
学 号 3080135

南京林业大学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：响叶杨×银白杨遗传图谱加密与
相关 QTL 初步定位

作 者：张福敏

专 业：遗传学

研究方向：分子遗传

指导教师：徐立安 教 授

二〇一一年五月

摘 要

本研究基于双拟测交(two-way pseudo-testcross)策略,以响叶杨(*P. adenopoda*)×银白杨(*P. alba*)132个F1代个体为作图群体,利用SSR和SRAP两种分子标记对王源秀(2008)构建的两亲本遗传图谱进行加密,并对叶片数量性状和生长量性状进行了QTL定位初步研究。

本研究新增461个多态性位点(23个SSR和438个SRAP),其中139个位点(7个SSR和132个SRAP)被连锁到母本响叶杨遗传连锁图上,150个位点(6个SSR和144个SRAP)被连锁到父本银白杨遗传连锁图上。新构建母本响叶杨的图谱包含24个连锁群、236个标记(98个SSR和138个SRAP),包括原图谱上98个标记(92个SSR和6个SRAP),24个连锁群各含有4~26个标记,连锁群图距从10.7cM~256.3cM,共2956.7cM,平均每个连锁群长度123.20cM,标记间距平均13.95cM(原为20.60cM);新构建父本银白杨的图谱包含28个连锁群、263个标记(109个SSR和154个SRAP),包括原图谱上113个标记(103个SSR和10个SRAP),28个连锁群各含有4~27个标记,连锁群图距从7.2cM~350.3cM,共3199.6cM,平均每个连锁群长度114.28cM,标记间距平均13.62cM(原为19.26cM)。响叶杨和银白杨估计基因组长度分别为2996.55cM和3217.78cM,基因组覆盖度分别为91.36%和89.21%。

应用复合区间作图法对叶面积、叶长、叶宽、叶周长、叶柄长、叶长宽比、叶背毛、树高、胸径、地径、萌枝数11个数量性状进行QTL定位和遗传效应分析,取LOD值为2.5,分别检测到控制这些性状有1、5、3、5、3、8、1、5、5、1、2个共39个QTL位点,遗传贡献率在6.82%~25.4%之间。

关键词 响叶杨; 银白杨; 遗传图谱; SSR; SRAP; QTL

分类号 S688.5

密 级 GK



学位代码 309

学校代码 10298

学 号 3080580

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：铁钱莲属 16 种植物的核型分析

作 者：盛 璐

专 业：园林植物与观赏园艺

研究方向：园林植物遗传育种

指导教师：季孔庶 教 授

二〇一一年六月

摘 要

本文研究了铁线莲属16种植物的染色体数目、随体数目和位置、核型公式、核型类型、臂比、相对长度、着丝点指数、核型不对称系数等内容,旨在探讨所及植物的核型特点和演化趋势,并为系统分类提供参考。主要结果如下:

1) 铁线莲属16种植物染色体数目稳定,为 $2n=16$ 和 $2n=32$,染色体基数为8,其中圆锥铁线莲为四倍体, $2n=32$,其余15种均为二倍体。

2) 铁线莲属16种植物染色体主要由中部着丝点(m)和具近端(st)或端部(t)着丝点染色体组成。平均臂比介于1.80~3.31之间。

3) 灌木铁线莲、毛叶铁线莲、女娄、湖州铁线莲、宽柄铁线莲、毛蕊铁线莲、神农架铁线莲、重瓣铁线莲、紫花铁线莲、*C. crispa*、*C. viticella*、圆锥铁线莲为“2A”型,核型都比较对称,属于比较原始的类型;单叶铁线莲、全缘铁线莲、日本铁线莲、长瓣铁线莲均为“2B”型,在系统演化中更为进化。

4) 从聚类分析的结果来看,16种铁线莲可以分为3类:第一类铁线莲包括湖州铁线莲、毛蕊铁线莲、重瓣铁线莲、圆锥铁线莲、全缘铁线莲、*C. viticella*;第二类铁线莲包括毛叶铁线莲、女娄、单叶铁线莲、长瓣铁线莲、神农架铁线莲;第三类铁线莲包括紫花铁线莲、*C. crispa*、灌木铁线莲、宽柄铁线莲、日本铁线莲。

关键词: 铁线莲属; 染色体; 核型; 聚类分析

分类号 S688.4
密 级 GK

学位代码 309
学校代码 10298
学 号 3080581

南京林业大学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：铁线莲组织培养的研究

专 业：园林植物与观赏园艺

研究方向：园林植物遗传育种

作 者： 忤丹丹

二〇一一年五月

摘 要

论文以当年新生枝条带芽茎段为外植体建立铁线莲再生体系，为铁线莲的快

速推广提供技术支持；同时为了探索高频率再生植株的形态发生途径和离体培养条件，也对铁线莲茎段诱导愈伤和相关生理特征进行了研究。主要结论如下：

1、铁线莲组织培养快繁技术

(1)铁线莲幼嫩茎段表面灭菌以 0.1% HgCl_2 为宜；较适取材季节为 4 月，污染率低，出芽率高。

(2) 铁线莲‘茱莉亚’腋芽增殖的较适培养基为 $\text{MS}+6\text{-BA}1.0\text{mg/L}+\text{IBA}0.15\text{mg/L}+\text{Sucrose}30.0\text{g/L}$ ，增殖系数为 4.03；适宜的生根培养基是 $1/2\text{MS}+\text{NAA}0.1\text{mg/L}$ ，生根率达 70%。

(3) 铁线莲‘阿拉贝拉’腋芽增殖的适宜培养基是 $\text{MS}+6\text{-BA}0.5\text{mg/L}+\text{IBA}0.1\text{mg/L}+\text{Sucrose}30\text{g/L}$ ，增殖系数为 3.98；较适生根培养基是 $1/2\text{MS}+\text{NAA}0.05\text{mg/L}$ ，生根率达 89.3%。

(4) 铁线莲‘Rooguchi’腋芽增殖的适宜培养基是 $\text{MS}+6\text{-BA}1.5\text{mg/L}+\text{IBA}0.1\text{mg/L}+\text{Sucrose } 40 \text{ g/L}$ ，增殖系数为 3.91。

(5)瓶苗移栽春季最佳，经过 5~7 天的开瓶炼苗，以珍珠岩：泥炭=1：3 为基质，其移栽成活率达 82.6%。

2、铁线莲愈伤组织诱导技术研究

以当年生嫩枝带芽茎段为外植体，铁线莲‘茱莉亚’愈伤组织较适诱导培养基为 $\text{MS}+6\text{-BA } 1.0\text{mg/L}+\text{NAA } 0.5\text{mg/L}$ ；铁线莲‘阿拉贝拉’愈伤组织适宜诱导培养基为 $\text{MS}+\text{TDZ } 0.3\text{mg/L}+\text{NAA } 0.1\text{mg/L}$ 。

3、铁线莲愈伤组织诱导过程中生理生化特征的研究

在铁线莲愈伤诱导过程中，‘阿拉贝拉’愈伤组织的可溶性蛋白质含量、可溶性糖含量、过氧化物酶（POD）活性和过氧化物歧化酶（SOD）活性四种生理指标的变化趋势与‘茱莉亚’基本相同，但四种生理指标值均略高于‘茱莉亚’。

关键词：铁线莲；组织培养；愈伤诱导；生理特性

分类号 S722
密 级 GK



学位代码 309
学校代码 10298
学 号 3080503

南京林业大学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：鹅掌楸杂交种子园建立技术研究

作 者：王昊

专 业：林木遗传育种

研究方向：林木遗传改良

指导教师：李火根 教授

二〇一一年五月

鹅掌楸杂交种子园建立技术研究

摘要

种子园是生产林木良种种子的种植园。与良种无性系规模扩繁相比,种子园繁育的良种还具有成本低廉、遗传多样性高等优点,因而,是常用的林木良种繁育方式。杂交鹅掌楸由于适应性广、杂种优势强,在园林绿化和工业用材林营建等领域逐渐推广应用,良种苗木供应不足矛盾日渐突出,因此,建立鹅掌楸杂交种子园迫在眉睫。本文以课题组前期积累的鹅掌楸属树种杂交育种及其子代测定数据为依据,结合杂交亲本的 SSR 遗传多样性分析结果,通过综合权衡种子园的遗传增益和遗传多样性,确定鹅掌楸杂交种子园适宜的无性系数数量;综合考察各亲本的育种值(一般配合力)、繁殖适合度、特殊配合力等指标确定鹅掌楸杂交种子园的建园亲本;最后,开展种子园无性系设计,并选取其中两种方案于 2010 年 3 月-2011 年 4 月在江苏句容南京林业大学下蜀实习林场建立鹅掌楸杂交种子园。主要研究结果如下:

种子园无性系数数量的确定。以江西景德镇、安徽泾县、镇江下蜀 3 地点 3 年生的 34 个鹅掌楸半同胞子代测定林为材料,以家系平均数为对照估算亲本遗传增益,利用 SSR 分子标记度量亲本遗传多样性,进而分析种子园遗传增益、遗传多样性随无性系数数量的变化趋势,并进行 logistic 曲线拟合。无性系数数量多至 10 个后其遗传多样性增加趋势趋于平缓;而无性系数数量达 30 个后其遗传增益降低趋势趋于平缓。综合权衡种子园的遗传增益与遗传多样性,最终确定鹅掌楸杂交种子园无性系数数量以 20 左右为宜。

种子园建园亲本的选择。以江西景德镇、安徽泾县、镇江下蜀 3 地点 75 个鹅掌楸交配组合子代测定林为材料,通过分析各亲本的育种值、一般配合力、特殊配合力、杂种优势大小,同时,参考课题组前期开展配子选择与繁殖适合度研究结果,制定鹅掌楸建园亲本选择原则为:适合作母本的无性系以一般配合力和育种值为主要依据,其次考虑雌性繁殖成效,最后考虑特殊配合力;适合作父本的无性系优先考虑一般配合力、育种值和与特殊配合力,其次考虑雄性繁殖成效。最终确定 24 个杂交亲本作为建园无性系,其中,其中, Z、L、J、N₂ 适合作母本, L₂、BK₁、XN₁、C₄、C₅、YY₁、FY₁、M、C₁、C₃、SZ、S₁、W、S、C₂、J₁、SZ₁、Z 适合作父本, N₁、BM、H 既适合作母本又适合作父本。

种子园无性系设计与营建。鹅掌楸杂交种子园无性系设计原则为:①尽量避免近交;②组配特殊配合力高的亲本;③考虑亲本的育种值及雌性繁殖适合度;④兼顾疏伐。据此,提出 5 种无性系设计方案,并以梅花型配置和单行单亲配置两种设计作为鹅掌楸杂交种子园的实际建园方案。2010 年 3 月定砧,2011 年 4 月嫁接,种子园面积 75 亩。

关键词: 鹅掌楸、种子园、无性系数数量、育种值、繁殖适合度、无性系设计

分类号: S722

密 级: GK

专业代码 0951

学校代码 10298

学 号 8107113



全日制专业学位研究生学位论文

论文题目: 植物品种遗传鉴别分子基础研究

作 者: 张红

学位类别: 农业推广硕士

专业领域: 林业

研究方向: 林木遗传育种

指导教师: 尹佟明 教授

张新叶 副研究员

二〇一二年六月

植物品种遗传鉴别分子基础研究

摘要

油茶是我国特有的木本食用油料树种，综合利用价值高。良种化及快速生长的培育是油茶品种得以健康持续发展的基础。目前飞速发展的分子标记技术为油茶优良品种的鉴别提供了重要的理论基础和实践经验。本研究不仅利用实验室建立的油茶微卫星数据库进行油茶 SSR 引物的开发与通用性研究，而且以现有的 EST 数据库为基础进行油茶 SNP 分子标记的开发与数据库的建立，主要研究结果如下：

（1）实验室通过测序油茶 10%基因组序列，建立了含 11343 个微卫星的油茶微卫星数据库，本研究利用此数据库，参照引物设计原则，共获得 6484 条油茶微卫星引物，引物设计成功率为 73.8%。对其中 900 对引物进行了合成，并对合成的引物进行了 PCR 扩增，扩增产物用 2%的琼脂糖凝胶进行电泳检测，筛选出有产物、主带明显的引物共 590 对，所占比例为 65.56%。同时，随机选取筛选出的 590 对中的 100 对，对 17 个油茶品种的 DNA 进行 PCR 扩增，发现这些引物在油茶品种内的通用率平均为 81.4%，最高的为 94%。说明本实验开发的 SSR 引物在种内的通用率非常高。

（2）建立了油茶 SNP 数据库，并初步建立了油茶 EST-SNP 开发体系，明确了油茶 EST 中 SNP 的分布规律，油茶编码区的 SNP 发生频率为 0.17%，即平均 598bp 就存在一个 SNP 位点。在拼接得到的 606 条 contig 序列中，共有 114 条 contig 序列发生突变，并发现了 486 个 SNP 候选位点。对 486 个 SNP 候选位点进行引物设计，共得到 94 条引物，引物设计成功率为 82.5%。在这 486 个 SNP 标记位点中，转换 61 个（14.61%），颠换 372 个（74.5%），插入突变的位点是 20 个（4.1%），缺失突变的位点是 33 个（6.79%）。

本研究对油茶分子鉴别、分子标记开发及基因改良等都有重要的意义。

关键词：油茶；遗传鉴别；SSR；通用性；SNP 数据库

分类号 Q37
密 级 XZ



学位代码 307
学校代码 10298
学 号 3090139

南京林业大学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：百合杂交后代的遗传变异研究和优良基因型选育

作 者：祁福娟

专 业：遗传学

研究方向：花卉遗传育种

指导教师：席梦利 副教授

施季森 教 授

二〇一二年六月

摘 要

东方百合花大芳香，是几大百合杂种系中花朵最大、最美丽的一类，自上世纪八十年代以来就成为切花百合市场上最主要的百合商品种。由于东方百合从种子到开花所需要的生长期很长，因此目前百合上的研究成果主要来自亚洲百合。本论文首次以东方百合商品种‘Constanta’（康斯坦萨）和‘Sorbonne’（索邦）及其杂交 F₁ 代群体为试验材料，初步分析了百合花色的变异；对百合主要数量性状进行了多元统计分析；同时检测了后代对百合专化型尖孢镰孢菌 (*Fusarium oxysporum* f.sp.*lilii*) 的抗性，最后初步选择了适合作为切花百合的优良基因型。主要试验结果如下：

1. 后代的花色变异非常复杂，后代中表现出红色的基因型的比例最高；此外，初步判断黄色的有无由单基因控制。

2. 从两年各性状的平均值来看，生殖器官性状比营养器官性状稳定；从变异系数来看，第二年的花苞数目的变异系数最大，为 64.4%，说明花苞数目在第二年不同基因型间的差异非常大，具有很大的选择空间。

3. 数量性状间的相关分析结果表明，在营养器官性状内部、生殖器官性状内部、营养器官性状和生殖器官性状之间都有显著或极显著的表型相关存在。其中，内外轮花瓣长之间的偏相关系数最大，为 0.90，说明这两个性状之间紧密相关。

4. 对第二年百合的 15 个数量性状进行主成分分析，得到前六个主成分，能够解释后代总变异的 81.73%。其中，前两个主成分可被分别命名为“花冠大小”因子和“茎秆”因子，对总变异的贡献率分别为 36.39% 和 19.08%。第三、四、五、六个主成分被分别命名为“雌蕊”因子、“叶密度”因子、“中部叶宽”因子和“花丝”因子。由于第一、第二主成分与决定切花百合品质的两个重要指标株高和花冠直径的关系最密切，因此计算各基因型前两个主成分的综合得分，初步选出前两个主成分综合得分较高的 30 个基因型。

5. 本试验中采用了一种更简便地检测后代对百合专化型尖孢镰孢菌 (*Fusarium oxysporum* f.sp.*lilii*) 抗性的方法：使用液体培养百合专化型尖孢镰孢菌获得的毒素粗提液对后代各个基因型的鳞片进行抗性检测。试验结果发现，后代中比抗性较强的亲本‘Sorbonne’的抗性更强的基因型占很大比例，为 39.8%，说明父本‘Sorbonne’对后代的抗性影响较大。

6. 根据后代对百合专化型尖孢镰孢菌的抗性、花色及其它特征、并结合后代前两个主成分的综合得分，初步筛选出 8 个综合表现良好的基因型，作为申报新品种的候选品种。

关键词：东方百合；花色变异；数量性状；多元统计分析；抗病性；优良基因型选育

分类号 Q786
密 级 XZ



学位代码 307
学校代码 10298
学 号 3090140

南 京 林 业 大 学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：百合转基因受体系统的建立及遗传转化研究

作 者：姜 珊

专 业：遗传学

研究方向：基因工程

指导教师：席梦利 副教授

施季森 教 授

二〇一二年六月

摘 要

百合在国内外花卉市场上占有极其重要的地位。传统百合杂交育种存在远缘杂交困难，引入某些优良性状时会伴随一些不良的性状等问题。而通过基因工程引入外来基因可以达到缩短育种时间，定向修饰花卉某些性状而保持其他性状不变的目的。因此，基因工程对于百合育种及品种性状的定向改良具有重要意义。

本实验以麝香百合两个品种‘雷山’和‘白狐狸’为材料，取其鳞片及叶片为外植体，从不同叶位、不同picloram浓度、不同培养方式、不同切割方式及愈伤再生植株等方面进行转化受体系统研究。最终确定以‘雷山’内层鳞片薄切片为转化外植体，利用根癌农杆菌介导法，进行麝香百合遗传转化体系的研究。

转化受体系统研究：首先，比较麝香百合两个品种，即‘雷山’和‘白狐狸’，两者选出较为合适的品种作为遗传转化实验研究材料；其次，比较不同的外植体，即鳞片和叶(叶分为叶片和叶柄)的愈伤诱导率，选出愈伤诱导率较高较稳定的外植体作为转化材料；再比较外植体的位置效应，即内层、中层、外层外植体对愈伤的诱导及愈伤再生植株能力的影响，选择较优位置的外植体做转化外植体；然后，比较不同培养方式，即光培养和暗培养，对外植体愈伤的诱导及愈伤再生植株能力的影响，选择适合转化的培养方式；最后，比较不同 picloram 的浓度对外植体愈伤的诱导，愈伤状态，愈伤再生植株能力以及植株状态的影响，结合实际因素选出较合适的 picloram 的浓度诱导愈伤。

转化受体系统研究结果表明：品种‘雷山’在愈伤的诱导及再生芽的生长速度上较‘白狐狸’快；两个品种叶片诱导愈伤能力皆远远低于鳞片；来源于内层鳞片的愈伤诱导率及愈伤再生芽能力高于外层；光照培养方式较暗培养方式更适合外植体愈伤诱导。因此确定了以‘雷山’中间层和内层鳞片为材料，在比较横切与纵切各自优缺点后决定采用纵切的方法，切成 0.3mm ~0.5mm 厚度的薄切片作为转化外植体。确定愈伤诱导培养基为 MS₀+4.0mg/L Picloram，在光照培养条件下诱导愈伤。愈伤再生植株培养基为 MS₀ 培养基。

遗传转化体系研究：本实验菌株采用EHA105，含GFP报告基因与卡那霉素抗性标记基因。首先，确定材料的抗生素筛选压力，抗生素设置6种浓度梯度(20 mg/L、30mg/L、40mg/L、50mg/L、60mg/L、70mg/L)；其次，比较共培养基成分对转化效率的影响，确定合适的共培养基；然后，对比共培养基不同pH，对转化效率的影响，确定适合转化的pH值；最后，比较预培养和共培养天数对转化效率的影响，确定合适的预培养天数及共培养天数。

遗传转化体系研究结果表明：经观察与统计后得知‘雷山’鳞片薄切片在 kan 50mg/L 时外植体褐化率过半，在 kan 为 70mg/L 时，外植体基本褐化死亡。因此本实验确定‘雷山’鳞片薄切片的抗生素筛选浓度为 50mg/L。外植体预培养基为 MS₀+4.0mg/L Picloram，pH 为 5.8 的培养基。共培养基中，大量元素 NH₄NO₃ 对

农杆菌生长有较强的抑制作用，而酚类物质(AS)的添加可以促进转化效率的提高。另外有研究表明共培养基 pH 较低也不利于农杆菌的生长。因此确定共培养基为不含 NH_4NO_3 的 $\text{MS}_0+4.0\text{mg/L Picloram}+ \text{AS } 100 \text{ mg/L}$ ，pH 为 5.8 的培养基。随着预培养天数增加，外植体存活率提高，转化率也明显提高，但假阳性概率也会随之提高；共培养天数的增加也会提高外植体转化效率，但时间过久会导致农杆菌生长过剩，外植体脱菌困难继而死亡；因此确定外植体预培养 4d，在菌液浓度 $\text{OD}=0.4$ 的重悬液中侵染 10min，共培养 8d。再换至 $\text{MS}_0+4.0\text{mg/L Picloram}+\text{kan } 50\text{mg/L}+\text{cef } 100\text{mg/L}$ 的筛选培养基上筛选抗性愈伤组织。

外植体每 21d 继代一次。将诱导出的抗性愈伤换至植株再生培养基上，将会逐渐再生出抗性植株。

关键词：麝香百合；转基因受体系统；转基因体系；鳞片薄切片；

分类号 Q341
密 级 GK



学位代码 307
学校代码 10298
学 号 3090142

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：浙江红山茶查耳酮合成酶基因的克隆与分析

作 者：黄瑞芳

专 业：遗传学

研究方向：分子遗传学

指导教师：徐立安 教 授

二〇一二年六月

摘 要

查耳酮合成酶(Chalcone synthase, CHS)是花色素(存在于植物的叶片、花、果实和种子中)生物合成途径的关键酶,查耳酮合成酶涉及苯丙氨酸代谢途径中各种具有防御性产物的生物合成,在植物的色素的积累,抗菌、抗低温等抗生物和非生物胁迫等方面起着重要的作用。

浙江红山茶是优良的产茶油树种,由于其花色艳丽、树形美观,被广泛作为庭院园林观赏植物。浙江红山茶自然分布于年平均气温12-14.5℃,极端低温-9℃,有较强的抗寒能力。浙江红山茶花色艳丽及较强的抗寒能力与CHS基因可能有着密切的关系。因此,分离克隆浙江红山茶CHS基因并对其进行研究具有重要的理论意义和实践价值。本研究的主要结果如下:

1.根据454 GS FLX Titanium高通量测序仪测序得到的ESTs序列,在与其他物种CHS基因序列比对的基础上,通过RACE技术克隆了浙江红山茶CHS基因,获得了该基因家族的3个成员CHS1、CHS2和CHS3的cDNA全长序列,其序列已上传至NCBI,其登录号分别为JN944573、JN944574、JN944575。

浙江红山茶3个CHS基因均包括1167 bp的开放阅读框,编码389个氨基酸,其中CHS1基因的cDNA全长1400 bp,其分子质量为42.6 kDa,PI为5.97;CHS2基因的cDNA全长1469 bp,其分子质量为42.6 kDa,PI为6.12;CHS3基因的cDNA全长1442 bp,其分子质量为42.8 kDa,PI为6.12。浙江红山茶CHS具有3个活性位点Cys164、His303和Asn336及2个决定底物特异性的苯丙氨酸残基Phe215和Phe265,序列分析表明,浙江红山茶的CHS基因与GenBank收录的其他植物的CHS基因均具有较高的同源性(蛋白序列多数相似度达到90%以上),依据CHS基因能明显区分不同植物科间的差异。浙江红山茶CHS1、CHS2与CHS3基因的核苷酸序列同源性较高(约为71.2%),蛋白差别则更小,只有15~16个蛋白的差别,相似度高达96%。

2.通过山茶属不同种(短柱茶、普通油茶、浙江红山茶)花的RT-PCR分析,结果表明CHS1、CHS2和CHS3均在短柱茶中表达量最高;而浙江红山茶不同组织器官(花、叶和种子)RT-PCR结果,显示出CHS1、CHS2和CHS3均在叶中的表达量最高;在浙江红花茶花发育的不同时期(花苞、半开花以及全开花),CHS1、CHS2和CHS3基因的RT-PCR结果均在花苞时期表达量最高。

3.通过原生质体瞬时表达系统研究了浙江红山茶CHS基因的亚细胞定位,发现浙江红山茶CHS1、CHS2和CHS3基因均定位在细胞膜上。

4.构建了浙江红山茶CHS2基因表达载体,并在拟南芥中进行了转化试验,结果显示转基因植株开花较早的迹象。由于转基因植株太少,还有待进一步研究。

关键词: CHS 基因; 浙江红山茶; RT-PCR; 原生质体瞬时表达系统;

分 类 号 TB322
密 级 GK



学位代码 308
学校代码 10298
学 号 3090578

南 京 林 业 大 学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：普通油茶 ACP、FAD2 和 KAS III 基因的克隆与
分析

作 者：潘艳

专 业：林木遗传育种

研究方向：林业生物技术

指导教师：徐立安 教授

2012 年 5 月

摘要

普通油茶 (*Camellia oleifera*) 原产中国, 因其种子可榨油供食用而命名, 是重要的木本食用油料植物, 茶油的不饱和脂肪酸含量高达 90%, 易被人体吸收, 长期食用能起到预防和治疗常见心血管疾病的作用。酰基载体蛋白基因 (ACP) 和 β -酮脂酰-ACP 合成酶基因 (KASIII) 是参与脂肪酸合成的重要基因, 油酸脱氢酶基因 (FAD2) 在脂肪酸脱饱和中发挥重要作用, 因此研究这 3 个基因的特征对于揭示油茶油脂合成和脱饱和过程, 揭示茶油形成机理, 为油茶分子育种建立基础具有重要意义。本文以普通油茶为材料, 运用 RACE 技术克隆了 ACP、KASIII 和 FAD2 基因, 通过生物信息学及实时荧光定量 PCR 等, 对基因进行了分析。主要研究结果如下:

1) 获得了 ACP 全长 cDNA 序列, 命名为 co-acp-2, GenBank 登录号为 JQ739517, 共 741bp, 开放阅读框位于 75-464bp, 编码 129 个氨基酸。co-acp-2 蛋白与双子叶植物、单子叶植物相似度分别为 75% 以上和 50%-60%。依据 ACP 构建系统发育树, 可以显著区分双子叶植物、单子叶植物和低等植物。co-acp-2 为不分泌的膜内蛋白, 具有保守的磷酸泛酰巯基乙胺结合位点, 二级结构以 α 螺旋为主。ACP 是一个基因家族, co-acp-2 与之前克隆的 co-acp 理化性质相似, 但序列除了磷酸泛酰巯基乙胺结合位点相似, 其余差异较大。

2) KASIII cDNA 全长 1654bp, GenBank 登录号为 JQ739519, 开放阅读框位于 295-1512bp, 编码 405 个氨基酸。其为不分泌的单拷贝膜结合蛋白, 具有 KASIII 的保守结构域。KASIII 蛋白与双子叶植物、单子叶植物相似度分别为 70% 以上和 50%-60%。依据 KASIII 的进化分析能明显区分双子叶植物、单子叶植物和低等植物, 同时大戟科、豆科和茄科 KASIII 基因能与其他科属植物能显著区分。

3) FAD2 全长 cDNA 序列, 命名为 co-fad2-2, GenBank 登录号为 JQ739518, 共 1558bp, 开放阅读框位于 163-1314bp, 编码 383 个氨基酸。其为不分泌的膜结合蛋白, 具有一个 FA_去饱和酶的保守结构域。FAD2 是 FAD 的一个亚基因家族, 在不同物种间及同物种不同家族成员间均较为保守。co-fad2-2 与其他植物的 FAD2 相似度都在 74%-96%。co-fad2-2 与同种的 co-fad2-1 不仅理化性质相似, 序列相似度也高达 76.5%。依据 FAD2 构建的系统发育树, 可以明显区分双子叶植物、单子叶植物和低等植物。

4) 获得了普通油茶、短柱茶和浙江红山茶 FAD2 的部分基因组 DNA, 三者只有 16 个碱基不同, 5 个氨基酸不同, 差异非常小, 且普通油茶与短柱茶差异更小, 只有 2 个氨基酸不同。比较普通油茶 FAD2 基因组和 cDNA 序列, 验证了 FAD2 无内含子。

5) 对幼苗期浙江红山茶的 FAD2 基因在根、茎、叶中的表达量进行了实时荧光定量 PCR, 结果显示表达量在叶和茎中分别是在根中 24 倍和 2 倍, 初步推断其为组成型表达。

关键词: 油茶; 脂肪酸; 基因克隆; 实时定量

分类号 Q341
密 级 XZ



学位代码 307
学校代码 10298
学 号 3090144

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：杨树转耐盐基因 *GmNHX1* 的研究

作 者：邓大霞

专 业：遗传学

研究方向：细胞遗传学

指导教师：诸葛强 教 授

二〇一二年六月

摘要

NHX1 为 Na^+/H^+ 逆向转运基因, 研究发现 *GmNHX1* 蛋白定位在液泡膜上, 分别起到控制液泡膜上 Cl^- 和 Na^+ 内流的作用, 液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白将细胞内 Na^+ 区隔化到液泡中。从而提高植物的耐盐性。本研究以南林 895 杨(*Populus x euramericana* cv 'Nanlin895') 叶片为材料, 在建立高效组培再生体系的基础上, 采用根癌农杆菌叶盘介导法, 开展 *GmNHX1* 基因的遗传转化研究, 为培育耐盐杨树新品种提供实验依据。取得的主要结果如下:

1. 高频组培再生体系的建立: 通过对基本培养基的筛选, 激素种类和浓度的调整以及培养条件的选择等, 获得了高效分化再生培养基($\text{MS}+6\text{-BA}0.5\text{mg/L}+\text{TDZ}0.002\text{mg/L}$), 叶盘分化率为 100%, 分化出的大量丛生芽, 为后续的遗传转化工作提供了坚实的基础;
2. 遗传转化中选择压的确定: 所用的筛选标记基因是新霉素磷酸转移酶(Npt II)基因, 在遗传转化中采用卡那霉素 (Kan^r) 作为筛选转化植株的选择剂。经过对比试验, 结果表明采用 Kan^r 浓度为 20mg/L 作为筛选时的选择压;
3. 遗传转化体系的优化: 研究了影响根癌农杆菌转化的多个因素, 筛选获得合适的遗传转化条件是: 预培养 3d, 菌液浓度 OD_{600} 为 0.8 左右, 侵染时间 15 min, pH 为 5.8, 共培养温度设为 28℃, 共培养 4d;
4. 转基因植株的获得和分子检测: 将经 Kan^r 筛选获得的 33 个转 *GmNHX1* 基因株系进行 PCR 检测和 Southern 杂交检测, 结果转 *GmNHX1* 基因的 Kan^r 再生植株 DNA 样品中有 7 个株系呈阳性, 试验结果证明目的基因 *GmNHX1* 已被导入到南林 895 杨基因组中;
5. 转基因植株耐盐性试验: 将 PCR 检测和 Southern 杂交检测为阳性的转基因植株进行扩繁, 设置不同盐浓度 (NaCl) 下转基因杨叶盘分化和试管苗耐盐性实验, 结果表明, 与对照未转基因植株相比, 转 *GmNHX1* 基因植株在同浓度的盐胁迫条件下, 耐盐能力有一定提高。200mmol/L 盐浓度处理下, 转基因组苗叶片的 SOD、POD 活性和可溶性蛋白含量平均比未转基因组高 53.77%、22.15%和 19.60%; 而对照组 MDA 含量和叶绿素相对含量平均为转基因组的 137.47%和 49.47%; 处理第 5、10、15d 时, 转基因株系的平均叶片脱落率仅为未转基因组的 64.03%、78.79%和 84.71%, 统计分析表明差异达显著水平 ($P<0.05$)。

关键词: 南林895杨; *GmNHX1*基因; 遗传转化; 耐盐

分类号 S722
密 级 XZ



学位代码 307
学校代码 10298
学 号 3090145

南京林业大学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：杂交鹅掌楸 WUS 基因的克隆与表达研究

作 者：张艳娟

专 业：细胞生物学

研究方向：分子细胞生物学

指导教师：陈金慧 副教授

施季森 教 授

二〇一二年四月

摘 要

体细胞胚胎发生（简称体胚发生）技术由于其发生的两极性、速度快、数量多等优点，已经成为优良林木资源快速无性繁殖的重要手段。有关林木体胚发生的机理研究已取得了很大的进展，但大多数研究还停留在形态发生方面，并且植物体胚发生的质量和数量都不尽人意，因此需要深入研究植物体细胞胚发生的分子细胞生物学机理，这样才能更好地了解细胞分化、发育、形态发生以及体胚发生过程中一些相关基因的表达和调控情况等。本课题主要是围绕杂交鹅掌楸体胚发生体系进行，首先进一步优化了杂交鹅掌楸的体胚发生体系，利用优化的体胚发生体系进行了植物体胚发生的分子生物学以及细胞生物学方面的一些研究，包括体胚发生过程中的信号转导，相关基因的表达调控和蛋白质表达调控等方面，具体研究内容包括：

1、杂交鹅掌楸的体细胞胚胎发生体系的优化。在实验室已建立的相对成熟的杂交鹅掌楸体胚发生体系的基础上，从材料背景，培养条件以及体胚再生植株培养等方面进行深入研究，发现早期未成熟胚诱导形成的愈伤组织状态对后期体胚诱导十分重要，0.1mg/L 的多肽类激素磺胺素（PSK）可提高未成熟胚的出愈率及胚性愈伤组织的诱导率；在体胚成熟及植株再生过程中，注意及时将体胚再生植株转移到不含激素的体胚再生植株生长培养基。

2、建立了模式植物拟南芥的体胚发生体系。以拟南芥未成熟胚为外植体的愈伤组织的诱导，胚性愈伤组织的获得，悬浮系的建立以及体胚诱导及发育等。在研究中发现 MS 基本培养基中添加 2.0 mg/L 2,4-D, 1.0 mg/L NAA 以及 0.5 mg/L BA 能够诱导胚性愈伤组织产生，而体细胞胚的诱导则需要加入 0.2 mg/L NAA, 1.0 mg/L KT 及 0.5 mg/L BA。通过试验获得了拟南芥的体胚苗。拟南芥体胚发生体系的建立为进行体胚发生相关基因的功能验证提供了一种新的途径。

3、成功克隆了杂交鹅掌楸 *LhWOX1,2,4,5,13* 基因。以杂交鹅掌楸胚性细胞、体胚再生植株、芽、根等组织器官为材料，利用杂交鹅掌楸转录组测序获得的序列信息，克隆获得了干细胞调控基因 WUSCHEL 相关同源盒基因 WOX 基因家族基因 *LhWOX1,2,4,5,13*，通过半定量和实时定量 PCR 来研究 *LhWOX* 基因在杂交鹅掌楸体胚发生典型阶段的表达规律。结果显示，5 个 *LhWOX* 基因在胚性愈伤组织中的表达量差异不大，在体胚诱导初期的单细胞中表达量最低，在早期球形胚以及后期子叶胚中表达量都有所提高，而且 5 个基因之间差异也明显增大，推测 WOX 家族基因参与植物胚胎发育中的形态建成，在胚胎发育后期，功能出现了分化。

4、*LhWOX2* 基因功能验证。构建 *LhWOX2* 基因过量表达载体，分别利用 *WOX2-4* 突变体和野生型拟南芥进行转基因的功能验证研究。通过观察转基因拟南芥植株 T1、T2 代的表型，来推测 *LhWOX2* 的功能。

关键词： 杂交鹅掌楸；体细胞胚胎发生；干细胞调控；PSK；WOX

分类号 Q23
密 级 XZ



学位代码 307
学校代码 10298
学 号 3090146

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：雄性不育百合的细胞遗传学研究及初步遗传分析

作 者：杨 斌

专 业：细胞生物学

研究方向：细胞遗传学

指导老师：席梦利 副教授

施季森 教授

二〇一二年五月

摘 要

雄性不育百合避免了花粉污染的问题，免除人工去雄的繁琐，提升了百合的品质，对于百合新品种的选育有重要价值。本课题组将雄性不育百合与可育百合杂交，利用胚拯救技术获得大量杂交后代，并对这些后代通过细胞遗传学手段分析鉴定其真实性，为进一步研究雄性不育打下基础。

本研究对雄性可育百合与雄性不育百合的花药进行石蜡切片分析，结论为：雄性可育百合花药具有完整的结构和正常的发育过程，雄性不育百合成熟时期的花药没有花粉囊，仅有表皮、基本组织和维管束组成，只进行边缘生长。结果表明雄性不育百合的花药在开花之前就已经败育，推测是在孢原细胞分裂产生造孢细胞时期出现异常。这一结论对进一步研究雄性不育机理有一定参考价值。

本研究选取商品种百合‘Pollyanna’、‘Ceb Dazzle’，与来自‘Golden Horn’×‘High Class’杂交F₁代的2个雄性不育后代GHC-01、GHC-02为材料，进行细胞学鉴定，并以雄性不育百合为母本，剩余两种百合为父本进行杂交育种。通过胚拯救的方式，获得较多的杂交后代。

本研究选取GHC-01×‘Ceb Dazzle’杂交组合的6个杂种后代进行杂种鉴定。染色体C-带实验结果表明：‘Ceb Dazzle’和GHC-01的带型均较为丰富，差异较为明显。在这6个后代中均能找到与亲本特征带一致的带型，初步证明了杂种后代的真实性。FISH分析结果表明，‘Ceb Dazzle’有14个45S rDNA杂交位点，GHC-01有11个45S rDNA杂交位点。杂交后代的杂交位点为11-12个，并且均检测到来自父母本含特征杂交位点的染色体，因此可以证明这6个后代都是真实的杂种后代。

本研究对GHC-01与‘Ceb Dazzle’杂交组合后代进行形态学分析，结果表明：后代的花色、叶长宽比、花瓣长宽比、花丝长、花柱长等指标处于亲本之间。结合荧光原位杂交，C-分带，确定后代为真实杂种。本研究还发现，多个杂交组合的后代中均出现雄性不育的现象，推测该雄性不育性状为核遗传雄性不育或核质互作雄性不育，同时为百合新品种的选育提供了良好的资源。

关键词：雄性不育，石蜡切片，胚拯救、C-分带、原位杂交、形态学鉴定

分类号 Q785
密 级 XZ



学位代码 307
学校代码 10298
学 号 3090150

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：杨树转抗病基因 RCH2 和 RPS4 的研究

作 者：陶维康

专 业：生物化学与分子生物学

研究方向：植物生物技术

指导教师：诸葛强 教 授

二〇一二年六月

摘 要

RCH2 和 RPS4 基因是从拟南芥克隆的具广谱性的抗病相关基因。本研究以南林 895 杨(*Populus deltoides* × *P. euramericana* cv 'Nanlin895')为受体材料,运用农杆菌介导法,开展抗病基因 RPS4 和 RCH2 的遗传转化研究,为杨树抗病新品种培育提供依据,本研究主要结果如下:

1.遗传转化中筛选压的确定。本研究采用的筛选标记基因是新霉素磷酸转移酶基因(npt-II),在遗传转化试验中以卡那霉素为筛选转化植株的选择剂,经过分析对照试验,选用 kan20mg/L 作为筛选时的选择压。筛选培养基中头孢的浓度设定为 200 mg/L。

2.遗传转化体系的优化:经过对多个影响转化效率的因素分析,获得了较适宜的遗传转化条件:预培养 3d;菌液浓度为 $OD_{600}=0.6$;侵染时间 RPS4、RCH2 为 20min, RPS4-RCH2 为 25min;共培养 3~3.5d。

3.在遗传转化条件优化的基础上,经卡那霉素严格筛选获得了一批转基因植株,其中,转 RPS4 基因的抗性植株 41 个株系;转 RCH2 基因的抗性植株 44 个株系;转 RPS4-RCH2 双基因的抗性植株 15 个株系。

4.经分子生物学检测(包括 PCR 和 RT-PCR),分析结果显示目的基因已经整合进部分转基因杨树基因组中。PCR 分析结果显示,转 RPS4 基因阳性植株 16 个株系,转 RCH2 基因阳性植株 14 个株系,转 RPS4-RCH2 双基因阳性植株 6 个株系。阳性率分别为:39.02%、31.82%和 35.29%。RT-PCR 分析结果显示,转 RPS4 基因植株有 6 株呈阳性,转 RCH2 基因植株有 5 株呈阳性,转 RPS4-RCH2 双基因植株有 2 株呈阳性,表明目的基因已在部分转基因杨树中得到表达。

5.利用引起杨树黑斑病最主要的病原菌杨生褐盘二孢菌(*Marssonina brunnea*)对转基因植株进行体外抑菌试验,结果表明与对照(未转基因南林 895 杨植株)比较,转 RPS4 基因和转 RCH2 基因植株的抗菌能力有一定提高,且转 RPS4-RCH2 双基因植株的抗菌效果明显提高。

关键词: 杨树, RPS4, RCH2, 遗传转化, 抗病

分类号 TP399; Q811

密 级 GK



学位代码 308

学校代码 10298

学 号 3090266

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：林木数量性状基因位点复合区间作图法及软件开发

作 者：郎咸业

专 业：计算机应用技术

研究方向：生物信息学

指导教师：童春发 教 授

二〇一二年六月

摘 要

林木作为多年生异花授粉植物,具有遗传杂合度高,生长周期漫长等复杂的生物学特性,它很难或者根本不可能产生近交系,也就无法直接将近交系中的数量性状基因(QTL)定位统计方法直接应用到林木中来,使得当前所开发的绝大多数QTL定位软件均不太适应于林木,从而导致林木分子数量遗传学的发展较为缓慢。因此,如何能进行深层次的林木数量性状研究是当前林木功能基因组学的一个重要课题。

本文基于由各种分离类型的分子标记构建的林木遗传连锁图谱,建立了利用林木杂交 F_1 代群体进行林木复合区间QTL作图的统计分析模型。同时开发了与之相对应的统计计算软件,软件严格按照林木特性要求和复合区间作图方法的步骤而设计,主要包括`opendata()`、`GenerateMarkType()`、`QtlCimMap()`、`Single()`和`FreqRecomABQ()`等多个子函数。使用置换表型数据的方法来确定LOD的临界值以判断基因组上某个位置是否是QTL。通过计算机随机模拟,验证了林木复合区间统计模型及其软件对相关数据计算的准确性。最后,对杨树生根性状进行QTL定位,发现在杨树第3个连锁群第11个标记区间13cM处存在一个控制杨树生根性状的QTL。本研究为林木育种工作者精确地进行林木QTL定位提供了一个强有力的分析工具。

关键词: 数量性状位点; 回归分析; 复合区间作图法; 林木; 全同胞家系

分类号 S722
密 级 GK



学位代码 309
学校代码 10298
学 号 3090563

南京林业大学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：马尾松不同外植体胚性愈伤诱导与增殖的研究

作 者：王潘潘

专 业：林木遗传育种

研究方向：林木遗传改良

指导教师：季孔庶教授

二〇一二年五月

摘 要

以马尾松 (*Pinus massoniana* Lamb.) 纸浆材优良家系成熟合子胚、嫩苗茎段及顶芽、组培苗茎段为起始外植体, 研究基本培养基、糖类及含量、激素种类及浓度、光暗条件等对马尾松不同外植体愈伤组织诱导的影响。

试验结果表明, 马尾松成熟胚在 DCR + 5.0 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA + 30 g/L 麦芽糖中, 愈伤诱导率最高, 愈伤的状态最好。在愈伤的继代增殖中, 当 2,4-D 浓度逐渐降至 1.0 mg/L 并添加肌醇至 3000 mg/L 时, 调节马尾松胚性愈伤的效果最好。对胚性细胞进行悬浮培养绘制的生长曲线符合“S”型曲线特征; 在 DCR+2,4-D 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+6-BA 1.0mg/L 时, 愈伤组织分化出嫩黄色不定芽, 并诱导出了生根苗。

剪取马尾松种子萌发的小苗茎段、顶芽做外植体诱导愈伤。20 d 苗龄期的茎段较其他时期更有利于愈伤组织的诱导, 较适诱导培养基为 DCR + 2.0 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA +20 g/L 麦芽糖。较适继代条件为 DCR+1.0 mg/L 2,4-D +0.1 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA+10.0 mg/L Vc。

10 d 苗龄期的马尾松茎顶芽较其他时期最有利于愈伤组织的诱导。较适诱导条件为 DCR+3.0 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA + 20 g/L 麦芽糖; 用 NAA 代替 2,4-D 在顶芽中心多长出畸形针叶, 比较不利于愈伤的诱导。顶芽诱导的愈伤在继代中很难调节成较好的状态, 还需要进一步的研究。

以马尾松组培苗茎段为外植体诱导愈伤时, 较适诱导条件为 DCR+3.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L 6-BA + 20 g/L 麦芽糖。在愈伤继代中添加 0.10 mg/L KT, 愈伤的增殖效果比单独使用 6-BA 时要好, 新长出的愈伤颜色较白, 质地较均匀, 增殖较迅速。

试验比较了不同外植体胚性愈伤诱导的差异, 优良顺序为成熟胚 > 嫩茎 > 顶芽 > 组培苗茎段; 对诱导出的胚性细胞建立了悬浮培养系; 通过间接器官发生成功获得了马尾松再生植株。

关键词: 马尾松; 外植体; 胚性愈伤组织; 继代与增殖; 间接器官发生; 体胚发生

分类号 S722
密 级 XZ



学位代码 309
学校代码 10298
学 号 3090564

南京林业大学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：马尾松 EST-SSR 引物开发及其转录组测序分析

作 者：王晓锋

专 业：林木遗传育种

研究方向：林木遗传改良

指导教师：季孔庶 教授

二〇一二年四月

摘 要

本文对松属 5 个树种（北美短叶松、辐射松、海岸松、扭叶松和火炬松）EST 序列分别进行了 SSR 位点查找、信息分析、引物设计和筛选，研究了不同树种 EST-SSR 的分布特征，并利用马尾松同一家系内 8 个个体以及松属内、属间和科间的 8 个树种，比较了它们的通用性和多态性差异。本文首次对马尾松 7 年生新梢转录组开展了测序，对序列进行基因注释和功能预测，SSR 位点查找和信息分析。主要研究内容和结果如下：

1 松属 5 个树种 EST-SSR 出现频率比较发现：火炬松和海岸松相对较高，均在 0.01 以上，辐射松和扭叶松较低，约为 0.006；EST-SSR 分布特征分析发现，除海岸松中二核苷酸重复所占比例最高外，其他 4 个树种为三核苷酸重复最高，而比例最低的均为四核苷酸重复；EST-SSR 重复基元分析得知，AAG/CTT 在北美短叶松、辐射松、扭叶松中比例最高，AT/AT 重复在辐射松、海岸松、火炬松中比例达到 15%以上。

2 利用上述查找到的 SSR 位点，采用 Primer3.0 软件进行引物设计。从设计出来的引物中分别树种各选取 20 对进行引物合成，检测其在马尾松上的扩增成功率在 60%-80%，最高的是辐射松，最低的是海岸松，平均为 72%；通用性最好的为辐射松，其属内的通用性为 94%，属间和科间通用性也分别达到 75%和 44%。马尾松群体检测发现，不同树种序列来源的 EST-SSR 引物其多态性在 10%-30%，最高的是北美短叶松，其次是辐射松，最低的是扭叶松和火炬松，平均为 17%。总共获得 72 对有扩增条带的引物，其中有 17 对具有清晰的多态性条带。

3 应用新一代高通量测序技术 Illumina 对 7 年生马尾松新梢的转录组进行测序，研究其基因表达谱、功能基因预测。序列拼接获得 83680 个 contig。其中 33772 个 contig 被注释为相应的 331669 对生物学功能，10647 个 contig 被注释具有酶功能。对马尾松转录组的 contig 进行 Pathway 生物学通路的注释和预测，共识别出 10647 个 contig 具有对应的 1029 种酶功能，并关联到 135 条生物学通路。SSR 查找发现，从 83680 个 contig 中找到 889 个 SSR 位点，占 contig 总数的比例为 1.06%。其中，三核苷酸重复所占比例最高，达到 48.37%，其次是六核苷酸重复，为 19.12%，比例最低的是四核苷酸重复，仅为 4.72%，二核苷酸重复和五核苷酸重复基本相同，分别为 14.62%和 13.16%。该结果与松属其它树种上 SSR 分布特征完全一致。SSR 不同重复基元类型中，出现频率最高的为 AT/AT，其次是 AGC/CTG 和 AAG/CTT。该结果与辐射松和扭叶松上的结果基本一致。

关键词：松属；马尾松；EST；SSR；转录组测序

分类号 TB322
密 级 GK



学位代码 308
学校代码 10298
学 号 3090565

南 京 林 业 大 学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：三种中国野生铁线莲组织培养研究

作 者： 王辉

专 业： 林木遗传育种

研究方向： 林木遗传改良

指导教师： 季孔庶

二〇一二年四月

摘 要

论文以当年生带芽茎段为外植体建立中国三个野生种铁线莲再生体系,为野生种铁线莲的快速推广提供技术支持;同时为探索高频率再生植株的形态发生途径和离体培养条件,也对湖州铁线莲茎段诱导体细胞胚胎和细胞学特征进行了研究。主要结论如下:

1、中国三个野生种铁线莲组织培养快繁技术

(1) 三种铁线莲外植体不定芽诱导适宜基本培养基为 1/2MS 培养基。生根培养适宜基本培养基为 MS 培养基。

(2) 增殖培养:湖州铁线莲腋芽增殖适宜培养基为 1/2MS+0.5 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IBA+Sucrose 30.0 g/L, 增殖系数为 4.43; 大花铁线莲腋芽增殖适宜培养基为 1/2MS+0.5 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IBA+Sucrose 40 g/L, 增殖系数为 4.42; 短柱铁线莲腋芽增殖适宜培养基为 1/2MS+0.3 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA+Sucrose 20 g/L, 增殖系数为 4.23。

(3) 生根培养:湖州铁线莲适宜生根培养基为 MS+NAA 0.05 mg/L, 生根率为 60%; 大花铁线莲适宜生根培养基为 MS+0.08 mg/L NAA+0.1 mg/L IBA, 生根率为 50%; 短柱铁线莲适宜生根培养基为 MS+0.1 mg/L NAA+0.5 mg/L IBA, 生根率为 43.3%。

(4) 瓶苗移栽:瓶苗移栽春季较好,基质以珍珠岩与蛭石 1:2 的比例较为适宜,移栽苗成活率可达 80%以上。

2、湖州铁线莲体细胞胚胎发生研究

(1) 胚性愈伤组织适宜诱导培养基为 1/2MS+0.2 mg/L TDZ+0.2 mg/L NAA+100 mg/L 肌醇+200 mg/L 水解酪蛋白+1 g/L 活性炭。附加蔗糖 30 g/L, 琼脂 5.8 g/L, pH 值为 5.8, 暗培养。

(2) 胚性愈伤继代增殖适宜培养基为 1/2MS+0.05 mg/L TDZ+0.05 mg/L NAA+100 mg/L 肌醇+200 mg/L 水解酪蛋白+1 g/L 活性炭。胚性愈伤组织在继代增殖 5 次以后增殖系数趋于稳定。

(3) 胚性愈伤组织诱导体细胞胚胎的形成在 1/2MS+0.03 mg/L ABA+0.05 mg/L NAA 中效果较好,体细胞胚胎的诱导率可达 10.526%。

3、通过组织细胞学方法研究湖州铁线莲愈伤组织及体细胞胚胎的起源与发生部位,发现湖州铁线莲多是单细胞起源,表面或近表面发生,体细胞胚经过球形胚、心形胚、鱼雷胚和子叶胚进而发育成完整的植株。

关键词: 铁线莲; 组织培养; 体细胞胚胎发生; 组织细胞学。

分类号 S722
密 级 GK



学位代码 309
学校代码 10298
学 号 3090566

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：马尾松实生种子园子代材性变异分析
及优良家系选择

作 者：康建诚

专 业：林木遗传育种

研究方向：林木遗传育种

指导教师：季孔庶 教授

二〇一二年五月

摘要

以福建省龙岩市上杭县白砂林场的68个7年生家系为试验材料,对生长量、木材性状进行测定、分析,主要研究结果如下:

1.方差分析结果表明,马尾松木材生长量、纤维形态、基本密度、微纤丝角、综纤维素在家系间差异极显著,木材基本密度、纤维长度、纤维长宽比、微纤丝角在家系内的差异不显著,说明在优良家系选择的基础上不适合优良单株的选择。

2.通过对马尾松各指标间的相关性分析发现,树高、胸径和材积相互之间存在显著的正相关关系,相关系数在 0.5396-0.9897 之间。树高、胸径和材积之间的相关系数都大于 0.7,树高和材积间的相关系数是 0.7364,胸径和材积间的相关系数是 0.9650,可以通过对胸径的选择和测量,获得材积高产的家系。

木材基本密度与纤维长度、纤维宽度、纤维长宽比、综纤维素呈正相关关系,与微纤丝角呈负相关关系。微纤丝角与其他性状间皆呈负相关关系。综纤维素与其他性状间皆呈微弱的正相关关系,可视为独立遗传。

树高与木材基本密度、纤维长度、纤维宽度呈正相关关系,与木材纤维长宽比、微纤丝角以及综纤维素含量呈负相关关系。胸径与木材纤维宽度呈正相关关系,与其他性状呈负相关。材积与胸径情况相似,与木材纤维宽度呈正相关,与其他性状呈负相关关系。

3.用马尾松材积、基本密度、纤维长度、纤维长宽比、微纤丝角、综纤维素含量六个性状构建了综合指数方程:

$$I=969.7656X_1+98.8485X_2+18.2616X_3+1.0215X_4+4.0521X_5+4.3257X_6$$

根据综合指数方程,以 15%入选率选择了 3、6、12、13、22、23、25、33、50、59 这 10 个优良家系,与对照相比较,所选家系木材基本密度、纤维长度、纤维长宽比、微纤丝角、综纤维素含量的遗传增益分别为: 11.9461%、9.5759%、4.1595%、18.2438%、5.5397%、1.8775%。

关键词: 马尾松; 材性; 遗传改良; 优良家系;

分类号 S722

密 级 GK



学位代码 309

学校代码 10298

学 号 3090571

南 京 林 业 大 学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：美洲黑杨基因型与环境互作研究

作 者：郎嵩简

专 业：林木遗传育种

研究方向：林木遗传改良

指导教师：潘惠新 教 授

二〇一二年六月

摘 要

本文调查了江苏泗洪、泗阳和湖南岳阳等3地11个美洲黑杨无性系8年生的树高、胸径和材积等生长量性状,并对11个美洲黑杨无性系生长性状进行了遗传分析,在此基础上,开展美洲黑杨基因型与环境互作研究。3个地点试验结果表明,树高、胸径和材积等生长性状在美洲黑杨无性系间无性系内均存在显著的变异;遗传方差大于环境方差,变异主要来源于遗传基础;3个性状的遗传力在3个地点的变化值,树高在0.5431-0.9531之间,胸径在0.5568-0.9571之间,材积在0.6201-0.9646之间;3个性状表型变异系数在3个地点的变化值,树高在8.63-10.27%之间,胸径在8.24-17.33%之间,材积在20.54-36.36%之间;3个性状的遗传变异系数在3个地点的变化值,树高在7.57-8.42%之间,胸径在8.07-13.89%之间,材积在20.21-28.85%之间。材积性状变异要大于胸径,树高性状变异最小。3个地点的试验结果表明,1-20、2-2、4-6和4-50等4个美洲黑杨无性系生长量大于其他无性系,无论树高、胸径,还是材积性状,均表现出明显的优势。3地点综合方差分析结果表明,树高、胸径和材积等性状在无性系与地点间存在显著的交互作用。在基因型与环境互作分析过程中,发现生长性状树高、胸径和材积基因效应因无性系不同存在差异,地点间环境效应也明显不同;基因型与环境互作效应因地点或无性系不同而发生变化。美洲黑杨生长性状基因型与环境交互作用模式3个地点上分析结果表明,胸径、树高和材积性状均同时包含B型和D型。本文采用Finlay和Wilkinson模型研究无性系生长性状在3个地点上的稳定性。通过品种的表现对环境平均数进行回归分析,估计回归系数。回归系数越大,表示该品种对环境的反应越敏感,因而稳定性低;反之,回归系数越小,表示该品种对环境的反应迟钝,因而稳定性好。稳定性分析结果表明,不同的生长性状各个无性系在3个地点上稳定性明显不同;稳定性在无性系间存在明显差异。生长比较好的4个无性系中2-2和4-50在3个性状上均表现出较好的稳定性,对环境反应不敏感,可作为大区域的推广品种;而1-20和4-6无性系,虽然生长量不差,但无性系稳定性上不如前两个无性系,尤其是1-20无性系,在胸径和材积性状上均表现出稳定性差的特性,但在某个环境条件下生长性状表现突出优势。

关键词: 美洲黑杨无性系、生长性状、遗传变异、基因型与环境互作

分类号 S722

密 级 GK



学位代码 309

学校代码 10298

学 号 3090573

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：林木纳米生物技术应用研究

作 者：董 琛

专 业：林木遗传育种

研究方向：纳米生物技术

指导教师：施季森 教 授

二〇一二年六月

摘 要

1980 年代以来, 纳米科学与技术发展十分迅速, 由化学、物理和材料等领域迅速扩展到生物科学领域, 并展示出了巨大的潜力, 但在林木生物技术中的应用研究报道尚不多。本文以纳米量子点、氧化硅、碳纳米管等纳米生物材料和微流控芯片等纳米技术为基础, 以杂交鹅掌楸等木本植株和模式植物拟南芥为实验材料, 通过对纳米生物材料表面进行化学修饰, 分析其与具有细胞壁的生物细胞的共孵育情况, 对完整的木本植物细胞、细菌在纳米材料和纳米微器件条件下的生物相容性进行观察和分析。主要内容和结果如下:

1. CdSe/ZnS 量子点与鹅掌楸完整细胞共孵育研究。结果表明: 表面带正电荷的量子点容易进入细胞内部, 表面带负电荷的量子点团聚在细胞壁外部; 聚乙二醇对细胞内吞量子点具有促进作用; CdSe/ZnS 量子点对完整植物细胞有较大毒性。

2. 与氧化硅纳米颗粒共孵育的鹅掌楸细胞的体胚诱导。结果表明: 氧化硅纳米颗粒对植物完整细胞具有较好的生物相容性, 不影响植物细胞的全能性, 内吞氧化硅纳米颗粒的细胞不影响杂交鹅掌楸由单个胚性细胞向体细胞胚胎发生方向发育。

3. 单壁碳纳米管 (SWNTs)、多壁碳纳米管 (MWNTs) 均可以通过杂交鹅掌楸植物细胞膜的内吞作用进入细胞内部; 应用微波辅助刺激处理, 可以加大杂交鹅掌楸对于碳纳米管的内吞量。

4. 单细胞微流控芯片的研制。应用三维微流控纳米细胞芯片进行细胞捕获是纳米生物技术的重要发展方向。本研究结果表明: 按 CAD 设计的模板, 通过光刻技术将聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 制作成 “C”、“O” 等性状的三维微流控纳米细胞芯片, 可以高效捕获悬浮培养条件下的杂交鹅掌楸的单个活体细胞、杨树和拟南芥的游离原生质体。

5. 聚醚酰亚胺 (PEI) 纳米薄膜的研制和抑菌性检验。结果表明: 通过 PEI 多循环氨基放大反应, 使纳米薄膜表面布满正电荷, 可以快速、高效粘附并杀死具有细胞壁的细菌, 且此方法具有广泛的应用前景。

关键词: 杂交鹅掌楸; CdSe/ZnS 量子点; 氧化硅; 碳纳米管; 微流控芯片。

分类号 S722
密 级 XZ



学位代码 309
学校代码 10298
学 号 3090575

南 京 林 业 大 学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：福建山樱花体细胞胚胎发生研究

作 者：张元莉

专 业：林木遗传育种

研究方向：林业生物技术

指导教师：施季森 教 授

摘 要

本研究建立了福建山樱花体细胞胚胎发生体系，筛选出了较合适的培养基和培养条件，培养出了福建山樱花体细胞胚胎再生植株；通过体细胞发育过程的解剖学观察，提供了福建山樱花体细胞胚胎的起源与发育过程的细胞学实验证据；通过体细胞胚胎不同发育阶段主要生理生化特性的分析进一步探讨了福建山樱花体细胞胚胎发生的生理机理。主要结果如下：

1、以福建山樱花未成熟种子为外植体研究了体细胞胚胎发生，分析了基因型、外植体发育阶段、培养条件、生长调节物质等对体细胞胚胎发生的影响；直接体胚发生的适宜的培养基为 MS 或 B5+BA0.5 mg/L+2,4-D 0.5~1.0 mg/L；添加 2,4-D 2 mg/L 有利于胚性愈伤组织高频诱导；福建山樱花胚性愈伤组织继代增殖培养基为添加 6-BA 0.5 mg/L 和 2,4-D 0.5 mg/L 及 NAA0.2mg/L 或添加 6-BA 0.5mg/L 和 2,4-D 0.5 mg/L 的 MS 培养基。

2、以福建山樱花冬芽诱导愈伤，在 B10 培养基（BA0.2 mg/L+2,4-D 0.8mg/L +NAA0.4 mg/L）上的愈伤诱导率最高为 98.43%；愈伤组织调整与分化的培养，在添加 BA0.5 或 1.0 mg/L 和 NAA0.2mg/L 的 MS 基本培养基上，基因型 U2 能诱导形成胚状体。

3、通过石蜡切片观察，发现福建山樱花体胚发生存在内部发生和外部发生两种方式。体细胞胚起源于单细胞，依次经历二细胞原胚，多细胞原胚、球形胚、心形胚、鱼雷胚、子叶胚阶段的发育过程；体细胞胚胎与周围愈伤组织存在着明显的维管组织的隔离。

4、体胚发生的不同发育时期，在生理生化特性方面具有明显差异。福建山樱花胚性愈伤组织的可溶性蛋白含量和 POD 活性高于非胚性愈伤组织；而非愈伤组织的 SOD 比胚性愈伤组织活性高；白色胚状体阶段即鱼雷胚和子叶胚阶段的可溶性蛋白、SOD 活性、POD 活性都高于其他发育阶段。

关键词：福建山樱花；体细胞胚胎发生；组织细胞学；生理生化

分类号 S722

密 级 XZ



学位代码 309

学校代码 10298

学 号 3090575

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：福建山樱花体细胞胚胎发生研究

作 者：张元莉

专 业：林木遗传育种

研究方向：林业生物技术

指导教师：施季森 教授
陈金慧 副教授

二〇一二年六月

摘 要

本研究建立了福建山樱花体细胞胚胎发生体系,筛选出了较合适的培养基和培养条件,培养出了福建山樱花体细胞胚胎再生植株;通过体细胞发育过程的解剖学观察,提供了福建山樱花体细胞胚胎的起源与发育过程的细胞学实验证据;通过体细胞胚胎不同发育阶段主要生理生化特性的分析进一步探讨了福建山樱花体细胞胚胎发生的生理机理。主要结果如下:

1、以福建山樱花未成熟种子为外植体研究了体细胞胚胎发生,分析了基因型、外植体发育阶段、培养条件、生长调节物质等对体细胞胚胎发生的影响;直接体胚发生的适宜的培养基为 MS 或 B5+BA0.5 mg/L+2,4-D 0.5~1.0 mg/L;添加 2,4-D 2 mg/L 有利于胚性愈伤组织高频诱导;福建山樱花胚性愈伤组织继代增殖培养基为添加 6-BA 0.5 mg/L 和 2,4-D 0.5 mg/L 及 NAA0.2mg/L 或添加 6-BA 0.5mg/L 和 2,4-D 0.5 mg/L 的 MS 培养基。

2、以福建山樱花冬芽诱导愈伤,在 B10 培养基(BA0.2 mg/L+2,4-D 0.8mg/L+NAA0.4 mg/L)上的愈伤诱导率最高为 98.43%;愈伤组织调整与分化的培养,在添加 BA0.5 或 1.0 mg/L 和 NAA0.2mg/L 的 MS 基本培养基上,基因型 U2 能诱导形成胚状体。

3、通过石蜡切片观察,发现福建山樱花体胚发生存在内部发生和外部发生两种方式。体细胞胚起源于单细胞,依次经历二细胞原胚,多细胞原胚、球形胚、心形胚、鱼雷胚、子叶胚阶段的发育过程;体细胞胚胎与周围愈伤组织存在着明显的维管组织的隔离。

4、体胚发生的不同发育时期,在生理生化特性方面具有明显差异。福建山樱花胚性愈伤组织的可溶性蛋白含量和 POD 活性高于非胚性愈伤组织;而非愈伤组织的 SOD 比胚性愈伤组织活性高;白色胚状体阶段即鱼雷胚和子叶胚阶段的可溶性蛋白、SOD 活性、POD 活性都高于其他发育阶段。

关键词: 福建山樱花; 体细胞胚胎发生; 组织细胞学; 生理生化

分类号 S722
密 级 XZ



学位代码 309
学校代码 10298
学 号 3090577

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：应用 ISSR 及 SRAP 标记构建百合遗传连锁框架图谱

作 者：丁信誉

专 业：林木遗传育种

研究方向：分子遗传学

指导教师：席梦利 副教授

二〇一二年六月

摘 要

本文采用 ISSR 与 SRAP 两种分子标记,以东方百合杂种系‘Constanta’和‘Sorbonne’为作图亲本,‘Constanta’×‘Sorbonne’的杂交 F₁ 代作为作图群体。利用筛选的 6 个 ISSR 引物及 57 对 SRAP 引物所获得的 192 个标记位点,采用 JoinMap 4.0 和 FsLinkageMap 2.0 两种作图软件构建东方百合亲本的遗传连锁框架图谱。在此基础上对两种软件构建的遗传连锁框架图谱进行比较。主要结论如下:

本研究对两种分子标记的反应体系进行了优化,优化的 ISSR 反应体系为:在 20 μ L 反应体系中,含 10×PCR Buffer 2 μ L、Mg²⁺ 1.75 mM、dNTPs 0.15mM、引物 0.6 μ M、Taq DNA 聚合酶 0.5 U、模板 DNA 40~100ng,不足部分以 ddH₂O 补足;优化的 SRAP 反应体系为:10 μ L 反应体系中,10×PCR Buffer 1 μ L、Mg²⁺ 2.7mM、dNTPs 0.25mM、引物 0.8 μ M、Taq DNA 聚合酶 1.5U、模板 DNA 60~100ng,不足部分以 ddH₂O 补足。

利用 JoinMap 4.0 构建的东方百合遗传连锁框架图谱,构建的母本‘Constanta’的连锁图包含 16 个连锁群,共包含 51 个标记位点,连锁标记覆盖的基因组总长度约为 938.7cM,标记间平均距离为 18.4cM;构建的父本‘Sorbonne’的连锁图有 17 个连锁群,共包含 49 个标记位点,连锁标记覆盖的基因组总长度约为 896.8cM,标记间平均距离为 18.3cM。利用 FsLinkageMap 2.0 构建东方百合遗传连锁框架图谱,构建的母本‘Constanta’的连锁图包含 15 个连锁群,共包含 61 个标记位点,连锁标记覆盖的基因组总长度为 1671.2 cM,标记间的平均距离为 27.4 cM;构建的父本‘Sorbonne’的连锁图谱有 19 个连锁群,共包含 53 个标记位点,连锁标记覆盖的基因组总长度 1282.5cM,标记间的平均距离为 24.2 cM。

JoinMap 4.0和FsLinkageMap 2.0两种作图方法的对比,在设置一致的作图分析参数条件下,根据图谱构建的结果可以看出用两种构图软件所构建的遗传连锁图谱所覆盖基因组的长度有着明显的差别,FsLinkageMap 2.0软件构建出的图谱比用JoinMap 4.0软件构建的图谱覆盖的的基因组长度长且连上的多态性标记位点多。

本研究建立的东方百合‘Constanta’和‘Sorbonne’的遗传连锁框架图,为百合分子标记辅助育种奠定坚实的理论基础。本试验所得到的遗传连锁图谱标记数目较少,构建的图谱质量不高,今后可以运用 SSR、AFLP、SNP 等分子标记获得更多的多态性位点,逐步建立较高密度的百合分子遗传连锁图谱,从而为重要经济性状的 QTL 定位打好坚实的基础。

关键词: 百合; 东方百合; ISSR; SRAP; 遗传连锁框架图谱

分类号 S722
密 级 XZ



学位代码 309
学校代码 10298
学 号 3090579

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：杨树 *CRY* 基因的功能验证

作 者：史晓露

专 业：林木遗传育种

研究方向：林业生物技术

指导教师：诸葛强 教 授

二〇一二年六月

摘 要

休眠是多年生植物经过长期演化而获得的一种对环境及季节性变化的生物适应性,其机制复杂。本研究基于杨树基因组序列信息,同源克隆杨树隐花色素CRY基因家族的3个成员片段,采用Gateway方法构建RNAi干涉表达载体,分别构建了RNAiCRY II、RNAiCRY V、RNAiCRY 273、RNAiCRY II+V和RNAiCRY II+V+273共5种载体,并以T89杨(*Populus tremula*×*P. tremuloides* Michx. clone T89)为受体材料,利用构建的表达载体经农杆菌介导开展杨树的遗传转化研究,通过抑制单个基因、两个基因和三个基因的表达,分析转基因植株的表型变化,鉴定隐花色素CRY基因的功能意义,为杨树休眠的分子机制研究提供依据。本实验获得的主要结果如下。

(1)通过不同因子的筛选实验,T89杨较合适的遗传转化条件为:摇菌的菌液浓度OD₆₀₀值0.3-0.6;使用1/2MS(无蔗糖)制备农杆菌重悬液的OD₆₀₀值为0.4;共培养时间2d;分化培养中潮霉素筛选浓度为20mg/L,芽伸长培养中潮霉素筛选浓度为15 mg/L,生根培养中潮霉素筛选浓度为10 mg/L;受体材料选择继代培养时间为40d~45d生长健壮的T89杨树组培苗;用于农杆菌侵染的为生长良好的植株第2、3、4节茎段,茎段长度为1cm左右;实验还发现,使用叶片的转化效率远低于茎段的转化效率。

(2)利用上述建立的遗传转化条件,以T89杨为受体材料,分别开展了RNAiCRY II、RNAiCRY V、RNAiCRY 273、RNAiCRY II+V及RNAiCRY II+V+273这5种载体的遗传转化研究。经筛选分别获得转RNAiCRY II植株20株;转RNAiCRY V植株22株,转RNAiCRY 273植株20株,转RNAiCRY II+V植株10株,转RNAiCRY II+V+273植株28株。

(3)采用PCR和RT-PCR技术对获得的转基因植株进行了分子检测,PCR结果显示相关目的片段已经成功导入大部分植株中;实时定量RT-PCR检测结果显示,与未转基因植株比较,大部分转基因植株相应基因的表达量有明显降低,表明导入转基因植株的干涉片段已发挥作用,相应基因的表达受到抑制。

(4)选择分子检测为阳性的转基因植株,进行短日照处理,分析对照组和转基因植株的表型变化。经过约9周的短日照(8h光照/16h黑暗)处理后,观察发现与未转基因植株比较,转基因植株提前形成休眠芽且节间缩短,大部分株高低于未转基因植株,其中尤以转RNAiCRY II+V+273载体的植株株高降低最为明显。表明杨树中CRY基因受抑制在短日照下会加速植株的生长停止。

关键词: CRY基因, RNAi, 遗传转化, 杨树, 休眠

分类号 S722

密 级 GK

专业代码 0951

学校代码 10298

学 号 8107087



南京林业大学

全日制专业学位研究生学位论文

论文题目：油茶 SSR 指纹图谱的构建

作 者：管宏伟

学位类别：全日制专业学位

专业领域：林木遗传育种

研究方向：分子遗传学

指导教师：尹佟明 教 授

张新叶 副研究员

二〇一二年六月

油茶 SSR 指纹图谱的构建

摘要

油茶 (*Camellia oleifera* Abel) 是世界四大木本油料树种之一, 也是我国最重要的木本油料经济作物, 具有一次种植, 多年收益的特点。在油茶产业发展过程中, 优良品种的使用是油茶林优质高产的关键。本实验基于 SSR 标记与毛细管电泳检测技术, 建立了一套真实、简便、快速、可靠的鉴定油茶品种的方法, 为油茶新品种保护、油茶产业的健康和可持续发展提供科学依据。主要研究结果如下:

1. 本实验基于 SSR 标记与毛细管电泳检测技术, 通过调整稀释倍数以及加入的内标量, 最终确立了一套适宜的上样体系: 将 PCR 产物稀释 10 倍后取 1 μ l, 加入 0.5 μ l 内标, 定容至 10 μ l。94 $^{\circ}$ C 变性 10min 后上样。

2. 本实验选取 8 对已筛选的多态性引物, 以 9 个油茶品种为供试材料, 对 PAGE (聚丙烯酰胺凝胶电泳技术)、QIAxcel 毛细管电泳技术以及毛细管电泳荧光检测技术的检测结果的比较表明, 荧光检测法克服了 PAGE 以及普通毛细管电泳方法的不足, 具有简便、可靠及高通量的优点。同时对微卫星荧光标记技术中存在的一些技术问题进行了探讨。

3. 本实验利用 10 对多态性荧光引物对 128 个油茶品种进行电泳分析, 并构建了油茶标准指纹图谱, 为油茶品种的鉴定以及新品种的保护提供科学依据。

关键词: 油茶; 品种鉴定; SSR 分子标记; 荧光检测技术; 指纹图谱

分类号 S722
密 级 GK



学位代码 309
学校代码 10298
学 号 3090570

南 京 林 业 大 学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：美洲黑杨×小叶杨 SSR 遗传图谱构建

作 者：李旭冉

专 业：林木遗传育种

研究方向：森林遗传学

指导老师：李火根 教授

二〇一二年五月

摘要

杨树是林木基因组学研究的模式树种,其基因组学、分子生物学等领域研究具有良好的基础;杨树全基因组信息为其他树种基因组研究提供了有价值的参考。本研究以美洲黑杨‘I-69’(*Populus deltoids* Bartr .cv. ‘Lux’ (I-69/55))为母本,小叶杨(*P. simonii*)为父本,经 2009~2011 年连续 3 年杂交,共获得杂种子代(F_1) 600 余株。以该杂种子代 205 个体为作图群体,利用 SSR 和 SRAP 两种分子标记,构建了美洲黑杨‘I-69’×小叶杨的遗传连锁图谱,分析了两种作图软件的作图效率,同时,并进行杨树遗传图谱比较,为今后构建杨树高密度遗传图谱、QTL 定位及标记辅助育种等领域研究奠定了一定的基础。主要结论如下:

(1) **美洲黑杨×小叶杨连锁遗传框架图谱构建:** 利用 FsLinkageMap 2.0 软件得到一张包含 108 个标记(88 个 SSR 标记和 20 个 SRAP 标记)、30 个连锁群的遗传框架图谱。其中,4 个标记(含 4 个)以上的连锁群 12 个,三联体 6 个,二联体 12 个。所获得图谱总图距为 1462.52cM,最大连锁群的图距为 140.10cM,最小连锁群的图距为 4.51cM,平均每个连锁群的长度为 34.75cM,标记间最大间距 34.6cM,最小间距为 1.0cM,标记间平均间距为 13.67cM。

(2) **两种构图软件的作图效率:** 两种作图软件所构图谱在连锁群数目、同一连锁群上的标记数目及标记顺序均存在差异。与 JoinMap 4.0 相比, FsLinkageMap 2.0 具有较高的作图效率,连锁群数目及标记数目均更多、图谱总图距及标记间距离更大。

(3) **杨树比较图谱:** 利用 54 个同源 SSR 标记对美洲黑杨×小叶杨图谱与毛果杨×美洲黑杨(*Populus trichocarpa*×*P.deltoides*)图谱进行比较分析,发现有 14 对同源连锁群和 1 对推定同源连锁群,同源连锁群之间最多有 9 个同源位点,各个同源连锁群之间存在良好的共线性关系;利用 29 个同源 SSR 标记对美洲黑杨×小叶杨图谱与美洲黑杨×欧美杨(*Populus deltoides*×*P.euramericana*)图谱进行比较,7 个连锁群可以建立同源连锁群关系,5 个连锁群建立推定同源连锁群,同源连锁群之间最多有 6 个同源位点。美洲黑杨×小叶杨图谱与响叶杨×银白杨(*P.adenopoda*×*P.alba*)图谱仅得到 7 个同源标记。依据这 7 个同源标记,美洲黑杨×小叶杨图谱的 7 个连锁群与响叶杨×银白杨图谱的 7 个连锁群可以建立推定同源连锁群关系。。

关键词: 美洲黑杨; 小叶杨; 遗传图谱; SSR; SRAP; 比较图谱

分类号 S722
密 级 GK



学位代码 309
学校代码 10298
学 号 3090569

南 京 林 业 大 学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：鹅掌楸近交衰退的 SSR 分析

作 者：潘文婷

专 业：林木遗传育种

研究方向：林木遗传改良

指导老师：李火根 教授

二〇一二年五月

摘 要

近交衰退是生物界普遍现象,但其机理不清。鹅掌楸为濒危树种,现存种群规模小,极易发生近交衰退。利用 DNA 分子标记开展鹅掌楸近交衰退研究对于探索鹅掌楸近交衰退机制具有重要意义。本文以鹅掌楸属树种 5 个自交组合子代为材料,以 4 个种内杂交子代及 8 个种间杂交子代为参照,结合 SSR 分子标记,分析鹅掌楸不同交配类型子代的 SSR 遗传多样性、纯合子比率、以及在生长量与存活率上的自交衰退表现;同时,筛选与鹅掌楸隐性致死相关基因的 SSR 位点,期望为鹅掌楸近交衰退遗传机理研究提供参考。主要研究结果如下:

鹅掌楸自交衰退程度 在胸径、树高和存活率性状上,鹅掌楸不同交配类型间差异均达极显著水平。自交与种内杂交和种间杂交相比较,胸径生长量由小到大顺序为:自交<种间杂交<种内杂交;而树高生长量和存活率由小到大顺序则为:自交<种内杂交<种间杂交。其胸径的衰退程度 δ 分别为:0.46 和 0.45;树高的衰退程度 δ 分别为:0.32 和 0.35;存活率的衰退程度 δ 分别为:0.25 和 0.30。可见,鹅掌楸自交衰退较为明显。

鹅掌楸不同交配组合子代遗传多样性 利用 20 对 SSR 引物分析了 3 种交配类型 17 个交配组合子代的遗传多样性,自交子代群体的 shannon 多样性指数为 0.3354,种内杂交和种间杂交子代群体分别高出自交子代 0.96 倍和 1.24 倍;自交子代观测杂合度为 0.23,种内杂交子代和种间杂交子代分别高出自交子代 1.78 倍和 2.28 倍。可见,近交造成子代遗传多样性和杂合度降低。三种交配类型子代遗传多样性由小到大的顺序为:自交、种内杂交、种间杂交。

鹅掌楸不同交配组合子代 SSR 纯合子比率 自交子代群体纯合子比率最高为 77.26%,种间杂交子代群体纯合子比率最低为 24.89%,二者相差 52.37%;三种交配类型子代纯合子比率由高到低趋势为:自交、种内交配、种间交配。

鹅掌楸隐性致死候选基因的筛选 利用 576 对引物对 17 个交配组合进行 SSR 分析,筛选鹅掌楸隐性致死候选基因。初步筛选出 2 个可能与隐性致死候选基因相关联的 SSR 位点。

关键词: 鹅掌楸; 近交衰退; SSR; 纯合子; 隐性致死基因

分类号 S722

密 级 GK

专业代码 0951

学校代码 10298

学 号 8107101



南京林业大学

全日制专业学位研究生学位论文

论文题目: 杞柳 AFLP 遗传图谱的构建

作 者: 渠纪腾

学位类别: 农业推广硕士

专业领域: 林 学

研究方向: 林木遗传育种

指导教师: 尹佟明 教 授

张新叶 副研究员

二〇一二年六月

杞柳 AFLP 遗传连锁图谱的构建

摘要

柳树属于杨柳科是我国重要的阔叶树种，具有美化环境、防风固沙、水土保持、保健的作用，生物多样性丰富，有灌木、乔木、乔灌木等生长类型。其中灌木柳因其生长速度快、产量高、耐干旱贫瘠、适应性强，因此被作为一种潜在的可再生能源而被广泛的利用。本研究选用南京林业大学树木园的杞柳回交群体作为作图群体，利用 AFLP 的方法构建了该群体的父本和母本的图谱，得到了以下结论：

1. 对 256 对引物进行筛选，获得了 99 对多态性较好的引物，利用亲本和 9 个子代对 99 对引物组合进行筛选共获得了 708 个多态位点，平均每对引物扩增 7.8 个位点，扩增位点中有 1:1 分离位点数目为 506 个，3:1 分离的位点数为 202 个。

2 利用 mapmaker3.0，根据拟测交策略构建了两个亲本的遗传框架图谱，父本图谱共含有 205 个标记位点，21 个连锁群，连锁群总长度约为 1824.7cM，标记间平均距离 8.9 cM，覆盖基因组约 81.39%。母本图谱共含有 241 个标记位点，24 个连锁群，连锁群总长度约为 2410.3 cM，标记间平均距离为 10.3 cM，覆盖基因组约 81.31%。

关键词：杞柳；AFLP；遗传图谱；分子标记

分类号 S722
密 级 GK



学位代码 309
学校代码 10298
学 号 3090568

南 京 林 业 大 学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：鹅掌楸杂交组合选择及无性系苗期测定

作 者：袁晓峰

专 业：林木遗传育种

研究方向：林木遗传改良

指导老师：李火根 教授

二〇一二年五月

鹅掌楸杂交组合选择及无性系苗期测定

摘要

杂交鹅掌楸生长具有明显的杂种优势，是山地造林和园林绿化的重要树种。本文以江西景德镇、安徽泾县和镇江下蜀3个试验点5-6 a的鹅掌楸不同交配组合子代测定林为材料，分析不同杂交组合子代的生长量，估算其遗传参数，在此基础上，开展优良杂交组合及优良单株选择，并对优良单株无性系进行苗期测定。主要研究结论如下：

（1）多地点多年份的子代测定数据分析结果表明：鹅掌楸杂交组合子代胸径年生长量为1.03-2.85 cm，平均1.94 cm；树高年生长量为0.73-1.92 m，平均1.35 m。其中，生长量最大的组合为M×S，在泾县试验点，胸径年生长量可达2.85 cm，树高年生长量可达1.92 m。

（2）单地点方差分析结果表明，鹅掌楸杂交子代生长量组合间差异显著，表明开展杂交组合选择是可行的。多地点联合方差分析结果表明，鹅掌楸杂交子代幼林期生长性状存在显著的组合×地点互作效应。利用3个试验点共有的5个组合，估算组合与地点交互作用效应大小，并对各组合的适应性做了评价。

（3）遗传力估算结果显示，杂交鹅掌楸早期生长的家系遗传力高于单株遗传力，表明应优先开展杂交组合选择。根据5-6 a子代测定结果对两批杂交组合进行选择，以生长量为选择指标，按 $\mu + 1\delta$ 为入选标准，共选出杂交组合21个，其胸径、树高平均年生长量为比群体平均值分别提高了16.3%、16.5%。

（4）分别对两批杂交鹅掌楸优良单株无性系进行苗期测定，参试无性系共276个。方差分析结果表明，苗期生长量在无性系间差异达极显著水平，表明开展无性系选择是可行的。利用苗高绝对标准法兼顾成活率，最终复选出92个无性系。

关键词：鹅掌楸；杂交组合；子代测定；无性系测定；选择

分类号 Q291
密 级 XZ



学位代码 307
学校代码 10298
学 号 3100137

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目: 银杏 SSR 标记规模化开发及初步应用

作 者: 王星星

专 业: 细胞生物学

研究方向: 植物分子细胞生物

指导教师: 徐立安 教 授

二〇一三年六月

摘要

银杏既是植物的“活化石”，又是用材（材用）、药用、食用，及观赏用等多用途树种，即是经济价值和研究价值均很高的树种。SSR 标记被公认为开展分子研究的较理想标记，但目前可有效利用的银杏 SSR 标记数量非常有限，不能满足银杏的研究。本研究利用新一代高通量 454 测序技术，获得大量转录组及基因组序列，规模化的开发了银杏 SSR 标记，并进行了初步应用，主要研究结果如下：

采用 454GSFLX 高通量测序仪，分别对银杏的雌株花芽与幼叶的 RNA 及银杏 DNA 进行测序，得到雌花芽 EST 序列 44068 条，雌株叶 EST 序列 29779 条，银杏基因组序列 157327 条。

利用 MISA 软件发现银杏转录组中雌花含 SSR 的序列 562 条，共 605 个 SSR；雌叶含 SSR 的序列 336 条，共 365 个 SSR；基因组含 SSR 的序列有 3044 条，3795 个 SSR；微卫星出现频率大小依次为基因组序列（0.019）>雌叶转录组序列（0.017）>雌花转录组序列（0.013）。二~六核苷酸微卫星中，二碱基重复所占比例最高，转录组序列中三碱基重复居于第二位，而在基因组序列中三碱基重复比四碱基少，居于第三位。二核苷酸重复中 AT 类型含量最多，CG 重复除在银杏基因组序列中极少量出现外，在转录组序列中未检测到。三核苷酸重复基序在银杏雌花转录组序列中以 ACT 类型为最多，在雌叶转录组序列中以 AGC 类型最多，而在银杏基因组序列中以 AAT 类型最多。

采用 Primer5.0 软件设计 556 对 EST-SSR 引物，有 417 对引物能够稳定扩增；设计 432 对基因组 SSR 引物，随机合成 200 对引物进行筛选，得到 132 对可以稳定扩增。利用 6 个个体进行多态检测，最后获得了 176 对 EST-SSR 和 82 对基因组 SSR 多态引物，多态引物占设计引物比例分别为 31.65%和 41.00%。在两类引物中，六核苷酸的多态性比例都较高，其次是二核苷酸和三核苷酸，四核苷酸多态性比例都较低。二核苷酸中都以 AT 基元比例最多，三核苷酸都以 AAG、AAT 基元多态比例较高。开发的 176 对 EST-SSR 引物和 82 对基因组 SSR 引物为今后银杏遗传学研究提供了较理想的分子工具，其中有 75 对 EST-SSR 和 19 对基因组 SSR 引物能够直接用于后续遗传图谱的构建。

利用开发的多态性引物，选取 30 对 EST-SSR 和 10 对基因组 SSR 引物对 48 个果用银杏无性系品种进行了检测，结果表明，40 对引物在 48 个银杏品种中最多检测到 7 个等位基因，平均每个位点检测到 3.4 个等位基因，平均观测杂合度为 0.3647，平均期望杂合度为 0.4729。同时对 48 个个体进行了指纹图谱构建，其中有 21 个银杏无性系有自己的特异性条带，只需用 1 对引物就可将其自身与其他无性系区分开。从中选出 5 对 EST-SSR 和 3 对基因组 SSR 核心引物就可完全区分所有 48 个银杏无性系，构建了 SSR 指纹图谱，其中引物 Gb_gSSR38 和 Gb_eSSR120 引物效率高，两个组合可区分 25 个无性系。

关键词：银杏，454 测序，微卫星，多态性

分类号 Q75
密 级 GK



学位代码 309
学校代码 10298
学 号 3100140

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：杨树 ERF 家族成员基因克隆与表达模式分析

作 者：宋佳亮

专 业：生物化学与分子生物学

研究方向：分子遗传学

指导教师：徐立安 教 授

二〇一三年六月

摘要

ERF类转录因子是植物中所特有的一类转录因子,在植物抗逆胁迫下发挥着重要功能,近年来在一些植物中对该类转录因子中的ERF3、ERF4和ERF5基因研究的较多,并且证明这3个基因在植物抗逆反应中发挥着重要的作用,在林木中关于ERF类基因功能研究的报道还很少,所以我们在杨树中对这3个基因进行了研究,主要研究结果如下:

采用RACE技术,在杨树895中分别克隆了这3个基因的全长,其中PeERF3登录号为JX220971,PeERF4登录号为JX220972;而ERF5基因得到了同源性很高的两个成员,即PeERF5.1(登录号为JX220973)和PeERF5.2(登录号为JX220974)。

PeERF3的cDNA全长和编码区长度分别为1185bp和660bp,PeERF4的分别为1102bp和675bp;PeERF5.1的分别为1326bp和1068bp,PeERF5.2的分别为1273bp和1038bp。PeERF3和ERF4编码的蛋白呈弱碱性且均含有EAR基序,而PeERF5.1和PeERF5.2编码的蛋白呈弱酸性且不含有EAR基序,但却均含有MAP激酶磷酸化位点。从基因长度和编码蛋白的性质来看,PeERF3和PeERF4亲缘关系较为接近。系统发育关系分析也表明,克隆的4个基因均为ERF基因,PeERF3和PeERF4有着更近的亲缘关系,可以归为一组,而PeERF5.1和PeERF5.2亲缘关系很近,并与其他物种的ERF5也很近,可看作ERF5的两个成员,而与PeERF3和PeERF4亲缘关系较远,可归于另一组。利用PEG法转化原生质体技术成功的对ERF基因在895杨中进行了亚细胞定位,结果表明4个基因均定位在细胞核内,符合转录因子的作用特点。

以南林895杨为材料,对4个基因进行了不同组织、不同胁迫及植物激素诱导下的表达及功能分析。结果表明,4个基因均在叶中表达水平最高,在茎中表达最低,PeERF3、PeERF4和PeERF5.2在根和茎中的表达都明显低于叶中,PeERF5.1在茎中的表达与其他3个基因相似,而在根中有较高的表达。当受低温胁迫时,PeERF5.1根和叶中均明显上调,PeERF5.2也有所上调;而高温胁迫时,仅PeERF4有所上调。干旱胁迫时,PeERF4、PeERF5.1和PeERF5.2在根中均略有上调;在受到盐胁迫时,PeERF5.1在根茎、叶中表达急剧上调,PeERF4和PeERF5.2在根、茎、叶也有明显上调,而PeERF3表达量没有明显变化;物理划伤后,只有PeERF4的表达明显上调。上述结果说明,在杨树中PeERF5.1可能是参与非生物胁迫,特别是盐胁迫调控的重要转录因子;PeERF4、PeERF5.2也参与一定的调控,PeERF4可能还对高温、物理伤害等敏感。在五聚几丁寡糖处理后,PeERF5.2的表达量有明显上调,杨生褐盘二孢菌杨生褐盘二孢菌的侵染后12小时后,PeERF5.1和PeERF5.2的表达则有不同程度的增加,而PeERF3和PeERF4的表达未表现显著变化,说明在杨树ERF5可能也与生物胁迫的调控有关。ERF3在生物及非生物胁迫实验中均未表现出明显的表达变化,其功能有待于今后进一步研究。

关键词: 南林895杨, 转录因子, 基因克隆, 抗逆性, 功能分析。

分类号 Q319

密 级 XZ



学位代码 307
学校代码 10298
学 号 3100129

南 京 林 业 大 学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目: *WUS*基因对杂交鹅掌楸体胚发生的影响

作 者: 吴亚云

专 业: 遗传学

研究方向: 细胞遗传学

指导教师: 陈金慧 副教授

二〇一三年六月

摘 要

杂交鹅掌楸是木材工业和环境绿化的重要树种,其体细胞胚胎发生的研究受到极大重视。本研究以杂交鹅掌楸成熟的体胚发生体系和根癌农杆菌介导的遗传转化系统为基础,对 *WUS* 基因和及其同源基因 *LhWOX2* 基因进行遗传转化研究。本试验应用 PCR, 反转录 PCR 和荧光定量 RT-PCR 技术对转基因株系进行了分子验证以及对两个目的基因在体胚诱导方面的研究进行了初步探索。其主要结论如下:

(1) Basta 影响杂交鹅掌楸愈伤组织生长的临界值为 40mg/L, Basta 影响杂交鹅掌楸 3~4cm 体胚苗生长的临界浓度为 50mg/L; Kan 影响杂交鹅掌楸愈伤组织生长的临界值为 50mg/L, Kan 影响杂交鹅掌楸 3~4cm 体胚苗生长的临界浓度为 450mg/L。(2) 转化材料经过 4 次洗菌后,农杆菌复发率为 0;与胚性愈伤相比,以胚性悬浮系为受体材料进行遗传转化,在筛选压下能够获得更多的转化体胚。

(3) 根据以 Basta 抗性 *WUS* 转基因植株与愈伤为材料的 PCR 检测结果统计,正常生长转基因植株转化率为 51.89%,畸形生长转基因植株转化率为 71.67%,转基因愈伤转化率为 70.56%;根据 Kan 抗性 *LhWOX2* 转基因植株与愈伤为材料的 PCR 检测结果统计,正常生长转基因植株转化率为 48.25%,畸形生长转基因植株转化率为 68.33%,转基因愈伤的转化率为 72.68%。

(4) 在 DEX 诱导 *WUS* 转基因愈伤体胚发生的研究中,有外源激素的条件下,可观察到转 *WUS* 基因的愈伤组织长出大量球形胚和少量畸形体胚苗;*WUS* 同源基因 *LhWOX2* 在外源激素诱导下,其愈伤组织表现出与 *WUS* 转基因愈伤类似的表型。

关键词: 杂交鹅掌楸; 体胚发生; *WUS* 基因; *LhWOX2* 基因; 遗传转化

分类号 Q348

密 级 XZ



学位代码 307

学校代码 10298

学 号 3100130

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：美洲黑杨生长与材性性状相关变异及新品种选择

作 者：张 衡

专 业：遗传学

研究方向：数量遗传学

指导教师：潘惠新 教 授

二〇一三年六月

摘 要

本文调查了泗洪陈圩林场 11 个美洲黑杨无性系 11 年生的树高、胸径、材积等生长性状, 以及气干密度、基本密度、顺纹抗压强度、抗弯强度、抗弯弹性模量等材性性状。并对 11 个美洲黑杨无性系的各性状进行了遗传分析, 在此基础上, 开展生长与材性性状间的相关性分析及新品种选择。研究结果表明:

(1) 树高、胸径、材积等生长性状在美洲黑杨无性系间存在显著差异, 遗传方差大于环境方差, 变异主要来源于无性系基因型间差异。树高、胸径、材积等 3 个生长性状的遗传力分别为 0.7353, 0.7597, 0.76433。遗传变异系数分别为 9.1358%, 15.3965%, 32.3327%。材积性状变异大于胸径, 树高性状变异最小。2-2、4-6 和 4-50 等 3 个无性系生长量大于其他无性系, 在树高、胸径、材积性状上, 均表现出明显的优势。

(2) 气干密度、基本密度、抗弯强度在无性系间存在显著变异, 顺纹抗压强度和抗弯弹性模量在无性系间变异达到 5% 的显著水平; 除了基本密度外, 其他材性性状在无性系间变异不显著。气干密度、基本密度、抗弯强度的遗传方差高于环境方差, 遗传变异系数高于环境变异系数, 变异主要来源于无性系基因型间差异; 而顺纹抗压强度、抗弯弹性模量的遗传方差低于环境方差, 遗传变异系数低于环境变异系数, 变异主要来源于环境差异。气干密度、基本密度、顺纹抗压强度、抗弯强度、抗弯弹性模量等 5 个材性性状的遗传力分别为 0.7082, 0.8181, 0.2380, 0.6345, 0.3204。遗传变异系数分别为 5.67%, 6.15%, 3.96%, 6.30%, 4.82%。材性性状的遗传变异系数大小为抗弯强度>基本密度>气干密度>抗弯弹性模量>顺纹抗压强度。4-45、7-40 和 10-34 等 3 个无性系材性性状表现较好。

(3) 树高、胸径、材积间遗传相关非常密切, 胸径对材积的作用要大于树高。材性性状间均呈正相关, 但相关系数大小不同, 力学性能与木材密度性状间的相关性大小如下: 抗弯强度>顺纹抗压强度>抗弯弹性模量。木材密度与生长性状间呈现显著负相关, 顺纹抗压强度、抗弯强度与生长性状间呈现负相关, 抗弯弹性模量与生长性状间不相关。

(4) 采用综合评分法选择出了 4-45、2-2、4-50、4-6 等 4 个优良无性系, 采用隶属函数法选出 4-45、4-6、2-2、7-40 等 4 个优良无性系, 采用指数选择法选出 2-2、4-6、4-45 等 3 个优良无性系。通过综合评分法、隶属函数法和指数选择法等 3 种方法, 对优良无性系的选择结果可以初步确定 2-2、4-6、4-45 等 3 个无性系为优良无性系, 可以作为新品种加以选择。

关键词: 美洲黑杨、遗传变异、相关分析、选择

分类号 S722
密 级 XZ



学位代码 307
学校代码 10298
学 号 3100132

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：杉木和杂交鹅掌楸*CLE*基因的克隆及表达研究

作 者：王 颖

专 业：遗传学

研究方向：分子遗传学

指导教师：施季森 教 授

二〇一三年六月

摘 要

本课题利用杉木(*Cunninghamia lanceolata*)和杂交鹅掌楸(*Liriodendron chinensis*)为实验材料,通过对 *CLE* 基因的克隆及表达研究了解 *CLE* 类基因表达调控机制。进而通过基因全长扩增、功能验证和表达分析深入揭示其对于干细胞的调控机制,进而促进杉木和杂交鹅掌楸的生长。

(1)利用生物信息学手段分析本实验室所测得的杉木和杂交鹅掌楸转录组数据设计特异引物,采用 cDNA 末端快速扩增技术(RACE)成功扩增出 1 个杉木 *CLE* 基因 *CICLE12* 和 2 个杂交鹅掌楸的 *CLE* 基因 *LhCLE12* 和 *LhCLE13*,各基因序列均含有完整的 ORF。通过蛋白序列比对发现:三个基因均存在明显保守的功能结构域。但是,目前研究表明此段结构域功能尚未完全了解,推测可能对干细胞活动起到调控作用。

(2)*CLE12* 的系统进化树中可以看到,入选物种可以分为单子叶植物和双子叶两大类。杂交鹅掌楸被分在双子叶植物类中,与拟南芥的进化关系相对最近,同时也与同为维管束植物的桃树相近。而杉木则单成一支,独立的分布在单子叶植物和双子叶两大类之外,作为裸子植物的代表。从 *CLE13* 的进化中入选物种同样可以分为单子叶植物和双子叶两大类,杂交鹅掌楸与桃树的进化关系最近,相对豆科的大豆和苜蓿的关系也较近,这些结果有益于分析裸子植物与被子植物的进化关系。

(3)通过 *CLE* 全基因家族系统进化分析,将所找到的 *CLE* 全家族的序列分为 14 组。本试验得到的 *CICLE12*、*LhCLE12*、*LhCLE13* 基因与已知功能的 *AtCLE8*、*MtCLE12*、*MtCLE13* 基因为同源基因而聚为一组,故推测本试验获得的 3 个基因可能也具有同 *AtCLE8*、*MtCLE12*、*MtCLE13* 基因相似的功能。

(4)运用实时定量 PCR 对 *CICLE12*、*LhCLE12* 和 *LhCLE13* 分别在杉木和杂交鹅掌楸的不同器官和组织进行基因表达的分析。结果显示 *CICLE12* 基因在芽中的表达量最高,其次是叶,在根的表达量最低。*LhCLE12* 在叶中表达量最多,而 *LhCLE13* 在茎中表达量最多。三个基因的表达模式可能与他们各自的功能相关。

(5)构建 *CICLE12*、*LhCLE12* 和 *LhCLE13* 基因的过量表达载体并转基因进行功能验证,同时转入野生型拟南芥和 *clv3* 基因突变体重进行表型观察。

关键词: 杉木; 杂交鹅掌楸; *CLE*; 系统进化; 表达分析

分类号 Q23

密 级 XZ



学位代码 307

学校代码 10298

学 号 3100133

南京林业大学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：部分野生百合核型、C-带及 FISH 分析

作 者：张晓玲

专 业：遗传学

研究方向：细胞遗传学

指导教师：席梦利 副教授

二〇一三年五月

摘 要

百合是世界五大鲜切花之一，其花色多样，药用及观赏价值极高。本研究对18种野生百合进行了核型，C-带及FISH分析，为百合属植物的系统演化、基因定位和杂种后代的真实性鉴定提供细胞学依据。主要研究结果如下：

1. 本研究除宜兴百合为三倍体，其余17种百合均为二倍体。核型类型除百合、淡黄花百合和宜兴百合为4B型，渥丹为3A型，其余均为3B型。所测得核型不对称程度均较高，介于84.43%~77.56%之间。最长与最短染色体之比介于1.98~2.66之间。18种野生百合都存在随体，淡黄花百合随体最多，有12个；岷江百合、渥丹和野铁炮随体最少，只有2个。

2. 利用改良的 Giemsa C-分带技术使9种百合染色体显示出丰富的C-带带型，条带数在6~17之间。南川百合、淡黄花百合和宜兴百合具有17条带，欧洲百合只有6条带。绝大部分染色体呈现着丝点带。少部分染色体的长臂、短臂上也显现1条至多条带，次缢痕和端部也观察到带型，但不同种之间染色体带型的差异比较大。

3. 本研究用45S rDNA对18种野生百合进行了荧光原位杂交，所得信号位点介于4~15之间，绝大部分的45S rDNA位点都是在着丝点附近。南川百合与湖北百合分别有4个和5个信号；百合、野百合、野铁炮、布朗百合属于百合组，有6个信号；宜昌百合有7个信号；淡黄花百合、金佛山百合、细叶百合、川百合、青岛百合有8个信号；青岛百合与欧洲百合属于轮叶组，但欧洲百合有13个信号；泸定百合有9个信号；岷江百合、药百合共12个信号；渥丹属于钟花组，有11个信号；宜兴百合($2n=3x=36$)有15个信号。

关键词：百合；核型；C-带；荧光原位杂交

分类号 S722.3

密 级 XZ



学位代码 307

学校代码 10298

学 号 3100134

南京林业大学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：柳杉组培快繁体系的研究

作 者：祝晨辰

专 业：遗传学

研究方向：细胞遗传学

指导教师：徐 进 教授

二〇一三年六月

摘 要

本研究以柳杉当年生茎段为外植体,利用对不同无性系之间芽增殖的差异性分析,建立了柳杉组培快繁体系,同时,通过形态解剖学观察,探究了柳杉试管苗不定根的起源,为柳杉的快速推广提供有力的技术支持。其主要结论如下:

1、柳杉组培快繁体系建立

(1)柳杉当年生茎段适宜的灭菌方法为用 0.1%升汞灭菌 10min;较适宜的取材时间为 5 月份,此时芽诱导率高,污染率低。

(2)011 号无性系较优的芽增殖培养基为 DCR+1.0mg/L 6-BA+0.05mg/L NAA,增殖系数为 4.05;精 1 号较优的芽增殖培养基为 DCR+1.0mg/L 6-BA+0.05mg/L NAA,增殖系数为 5.00;3 号较优的芽增殖培养基为 DCR+1.0mg/L 6-BA+0.05mg/L NAA,增殖系数为 3.93;59 号较优的芽增殖培养基为 DCR+1.0mg/L 6-BA+0.20mg/L NAA,增殖系数为 3.10;70 号无性系较优的芽增殖培养基为 DCR+1.0mg/L 6-BA+0.10mg/L NAA,增殖系数为 3.71;68 号无性系较优的芽增殖培养基为 DCR+1.0mg/L 6-BA+0.10mg/L NAA,增殖系数为 3.28。

(3)011 号、3 号以及 70 号无性系适宜的生根培养基均为 $1/2\text{DCR} + 0.10\text{mg/L IBA} + 0.20\text{mg/L NAA}$,平均生根率达 72.9%。

(4)瓶苗移苗采用的基质为珍珠岩:泥炭=1:1,移栽成活率达 86%以上,并且发现根长在 1-4cm 时植株移栽效果最好。

2、柳杉离体生根培养形态解剖学研究

本论文通过石蜡切片技术,从形态解剖学方面研究柳杉离体培养下不定根的发生过程,认为柳杉不同无性系之间不定根的起源方式并无差异,离体不定根起源于维管形成层与髓射线交接处的细胞。不定根在突破茎段皮层之前,其维管组织就已经与茎的维管系统相连接,另一端分化形成根冠,最后突破表皮,形成不定根。

关键词: 柳杉属;芽增殖;组织培养;解剖观察。

分类号 S722

密 级 XZ



学位代码 309

学校代码 10298

学 号 3100135

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：簸箕柳组培再生及遗传转化体系的研究

作 者：沙玉清

专 业：遗传学

研究方向：分子遗传学

指导教师：诸葛强 教 授

二〇一三年六月

摘 要

簸箕柳 (*Salix suchowensis*) 是一年就开花结实的木本植物, 与其他木本植物相比, 成长快, 生长周期短, 可作为多年生木本植物功能基因研究的理想材料。本研究拟在簸箕柳组织培养和再生体系的基础上, 通过 GUS 组织化学染色法研究了预培养时间、菌液浓度、侵染时间及共培养时间 4 个因素对簸箕柳愈伤组织遗传转化的影响, 建立遗传转化体系, 为林木功能基因的鉴定提供实验基础。主要研究结果如下:

1. 簸箕柳不定芽的诱导。探索了不同外植体、基本培养基、激素种类及浓度配比等对簸箕柳不定芽诱导的影响, 获得了簸箕柳不定芽诱导的合适培养基为: WP+KT0.5mg/L+蔗糖 25.0g/L+水晶洋菜 2.0g/L, 不定芽诱导率最高达到 88.3%。

2. 簸箕柳不定芽的增殖培养, 对培养基中的大量元素及激素种类和浓度进行调整, 获得了较合适的增殖培养基为: WP+KT0.3mg/L+IBA0.2mg/L+TDZ0.001mg/L+蔗糖 25.0g/L+AC0.5g/L+水晶洋菜 2.0g/L。

3. 簸箕柳不定芽的生根培养, 通过添加活性炭及培养基成分的调整, 获得了不定芽生根的合适培养基为: 1/2WP+KT0.2mg/L+NAA0.1mg/L+AC1.5g/L+蔗糖 20.0g/L+水晶洋菜 2.0g/L, 生根率达到了 100%。

4. 愈伤组织的诱导。采用簸箕柳茎段诱导愈伤组织, 研究了外植体、基本培养基、大量元素、激素种类和浓度等对簸箕柳愈伤组织诱导的影响, 获得了合适的培养基为: WP+KT0.5mg/L+NAA0.5mg/L+2,4-D2.0mg/L+蔗糖 25.0g/L+琼脂 0.7%, 愈伤组织诱导率达到了 69.1%。

5. 农杆菌介导的簸箕柳愈伤组织遗传转化研究。经过对多个影响遗传转化效率的因素分析, 获得了较适宜的遗传转化条件: 选择簸箕柳愈伤组织作为侵染的受体材料, 选择 EHA105 作为农杆菌侵染菌株, 预培养 2d, 菌液浓度取 $OD_{600}=0.6$, 侵染时间为 14min, 共培养时间为 3d。GUS 染色结果显示, 报告基因已导入簸箕柳愈伤组织细胞。初步建立了簸箕柳愈伤组织遗传转化体系。

关键词: 簸箕柳, 遗传转化, 体系, 植株再生

分类号 Q343

密 级 XZ



学位代码 307

学校代码 10298

学 号 3100138

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：杨树悬浮细胞系遗传转化体系的建立

作 者：郑小姣

专 业：细胞生物学

研究方向：细胞遗传学

指导教师：诸葛强 教 授

二〇一三年六月

摘 要

随着分子生物学技术的不断发展, 基因工程已成为植物遗传改良的重要途径之一。杨树转基因研究通常采用叶盘农杆菌介导法, 因叶盘细胞状态一致性差, 遗传转化条件不易控制, 影响效率的提高。悬浮细胞具有生长快、均一性好等特点, 本研究开展以杨树悬浮细胞系为受体材料农杆菌介导的遗传转化, 旨在建立快速、简便的杨树遗传转化体系。主要研究结果如下:

1. 生长迅速、均一性好的南林 895 杨 (*Populus×euramericana* . 'Nanlin895') 悬浮细胞系的建立。选择组培苗叶片和茎段为外植体材料, 愈伤组织诱导采用 2.0mg/L 2,4-D。以 MS 培养基为基本培养基, 附加 1.0-2.0mg/L 2,4-D, 细胞悬浮培养起始密度以 30ml 的液体培养基加入鲜重 2g 悬浮细胞, 5-8d 左右继代一次有利于杨树胚性悬浮细胞系的建立和保持。悬浮培养时采用添加 2.0mg/L 2,4-D、0.2mg/L NAA、0.1mg/L KT 和 500mg/L 水解乳蛋白。

2. 悬浮细胞培养植株再生研究。将悬浮细胞接种于芽分化诱导培养基上, 通过器官再生途径来实现南林 895 杨植株再生。悬浮细胞在分化过程中, 5-10d 后成块的愈伤组织由亮黄色变成绿色, 并产生绿色芽点, 25-30d 后长出不定芽。芽分化诱导培养基为附加 0.1mg/L NAA 和 1.0mg/L 6-BA 的 MS 培养基。

3. 杨树悬浮细胞系遗传转化体系的建立。探索了农杆菌菌液浓度、共培养时间以及侵染时间对转化效率的影响, 合适的遗传转化条件为: 菌液 OD₆₀₀ 为 0.6, 侵染时间 4-5min, 共培养时间 3-3.5d。经过抗生素筛选获得转基因植株 48 个株系。

4 采用 PCR 和 *GUS* 基因的组织化学定位检测法对获得的转基因植株进行检测, 结果显示目的基因已经成功导入大部分植株。对转基因植株进行染色、脱色处理可观察到 *GUS* 基因已成功导入。为杨树转基因研究提供了新途径。经 PCR 检测获得阳性植株 13 个株系, 转化率为 28.1%。

关键词: 悬浮细胞; 遗传转化; 南林 895 杨; 体系

分类号 Q7
密 级 GK



学位代码 307
学校代码 10298
学 号 3100139

南 京 林 业 大 学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：杉木 WOX1 基因及其启动子的功能初步研究

作 者：罗占收

专 业：生物化学与分子生物学

研究方向：植物基因表达与调控

指导教师：施季森 教 授

二〇一三年六月

杉木 WOX1 基因及其启动子的功能初步研究

摘 要

高等植物的顶端发育与侧生器官的发生分化是非常重要的生物学问题，也关系到一些作物和经济植物的株型建成、收获器官经济系数的高低。而 WOX 基因家族是植物所特有的一类转录因子，它们主要在植物的顶端发育，即茎尖分生组织和根尖分生组织中起表达调控作用，对于植物的生长发育非常重要，成为近年的研究热点。

本实验在实验室杉木 WOX1 基因克隆的基础上，进一步进行了 WOX1 基因启动子的克隆和分析，通过转基因实验初步研究了 WOX1 基因及其启动子的功能和表达模式，已取得主要结果如下：

1.利用 Tail-PCR 技术克隆了 1.5kb 的 WOX1 基因的启动子序列，命名为 pCIWOX1。在线综合分析表明该启动子具有保守的顺式作用元件，同时还含有的花药、花粉特异性表达相关元件、茎组织特异性表达相关元件、维管组织特异性表达相关元件，暗示了其组织、器官特异性表达功能。

2.构建了 WOX1 基因启动子分别融合 GUS 与 YFP 标记基因的植物表达载体 pCIWOX1::GUS 和 pCIWOX1::YFP，通过农杆菌介导法，烟草瞬时表达并胁迫处理发现低温、高盐、蔗糖、葡萄糖会抑制启动子的表达活性，30% PEG 会增强启动子活性。进行了转化拟南芥的初步研究，筛选获得了 T1 代，对阳性拟南芥小苗进行 GUS 组织化学染色和荧光显微观察，发现 pCIWOX1 启动子主要在花中表达，嫩叶、果荚柄、果荚中有少量表达，其他组织器官中未检测到表达。

3.进行了 WOX1 基因转化拟南芥的过量表达，发现筛选到的 T1 代植株产生植株矮小、侧生节点处重复出现类似莲座叶式发育模式、侧枝增多、侧枝果荚较小的性状。

以上问题的初步分析，对于揭示杉木 WOX1 基因表达调控机制奠定了基础，对于林木分子育种研究也具有一定的指导意义。

关键词：WOX1 基因；启动子；瞬时表达；胁迫；转基因拟南芥

分类号 S763.1
密 级 GK



学位代码 309
学校代码 10298
学 号 3100503

南京林业大学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：杨二孢胁迫下 miRNA 与其靶基因相互作用机制研究

作 者：王浩然

专 业：林木遗传育种

研究方向：林业生物技术

指导教师：陈英 副教授

黄敏仁 教 授

二〇一三年 五月

摘 要

杨树(*Populus*)是一种重要的用材树种,具有较高的经济环保价值。杨树黑斑病由 *Marssonina* 属真菌(如杨生褐盘二孢菌)引起,是杨树重要病害之一。目前,对杨树抗黑斑病的分子机制,特别是 miRNA 在杨树抗黑斑病途径中的分子调控机制还是知之甚少,对其分子机制的研究将为杨树黑斑病的防治奠定理论和实践基础。本文以抗病型的南林 895 杨(*Populus euramericana* CV. "Nanlin895")为材料,对杨生褐盘二孢菌胁迫下抗病相关的 miRNAs 及其分子机制进行研究,主要结果如下:

结合文献中抗病相关 miRNAs 的报道,预测抗黑斑病相关的 miRNAs,并设计杨生褐盘二孢菌侵染实验,使用 stem-loop RT-qPCR(茎环引物反转录的实时定量 PCR)检测法对其进行了鉴定,发现 miR156a 和 miR164a 的表达水平均在南林 895 杨被杨生褐盘二孢菌侵染后受到显著抑制。选择 miR164a 进行克隆,获得其前体基因 *MIR164a*。

预测 miR164a 的靶基因,使用 RACE 技术获得靶基因 *PdNAC1* 的全长序列,并通过 qRT-PCR 方法对 *PdNAC1* 进行表达分析,结果显示,在南林 895 杨被杨生褐盘二孢菌侵染后 *PdNAC1* 的表达量显著上升,*PdNAC1* 与 miR164a 的表达趋势呈现负相关。利用杨树原生质体瞬时转化体系作为平台,对 *PdNAC1* 进行了细胞定位的研究,结果发现 *PdNAC1* 转录因子主要定位在细胞核中,同时在细胞膜上也有表达。

基于目前技术较成熟的杨树原生质体瞬时表达体系,初步建立了一种比较简单、直观的靶标鉴定方法,并用于对 *PdNAC1* 上 miR164a 作用靶标的鉴定。结果显示,通过对 *PdNAC1* 上作用靶标的多位点突变,可以有效解除 miR164a 对其靶基因 *PdNAC1* 的表达抑制,验证了对 *PdNAC1* 上 miR164a 作用靶标的预测。

关键词: 杨树; 黑斑病; miRNA; 靶基因鉴定

分类号 S722

密 级 GK



学位代码 309

学校代码 10298

学 号 3100504

南京林业大学

研 究 生 硕 士 学 位

论文题目：樟子松开花结实促进技术研究

作 者：蔡卫佳

专 业：林木遗传育种

研究方向：林木遗传改良

指导教师：季孔庶 教 授

二〇一三年六月

摘 要

本文以内蒙古自治区霍洛林场樟子松 (*Pinus sylvestris* var. *mongolica*) 为试材, 比较樟子松原产地 (红花尔基樟子松自然保护区) 与引种地的生境, 观察球花发育过程, 从环境和生理两个水平来分析樟子松少花少实的原因, 并试图探索提高其产量的措施。

结论如下:

1. 土壤养分对比表明, 相比原产地, 引种地樟子松人工林土壤在有机质含量、氮含量和磷含量都处于较低水平, 因此在施肥试验中, 确定其最佳用量。另外, 引种区年平均气温、年平均日照时间、年平均无霜期和 $\geq 10^{\circ}\text{C}$ 年积温均大于原产地, 而年平均降水量、年平均风速均小于原产地, 这些因子影响了樟子松的开花结实。

2. 小孢子叶原基于 7 月 20 日左右形成, 8 月中旬形成小孢子囊。经过冬季休眠, 于翌年 4 月中下旬开始减数分裂, 5 月 7 日左右花粉粒成熟; 大孢子叶球原基于 8 月 5 日左右形成, 随后加速分裂, 在 8 月中旬形成芽鳞原基及中轴, 翌年 5 月上旬, 苞鳞原基分化, 5 月 20 日左右, 大孢子叶球原基趋于完善, 胚珠形成。

3. 樟子松雌花芽中内源激素 IAA、ZR_s、ABA 含量在花芽分化的前期都处于一个缓慢上升的状态, 其中 IAA 含量处于最高峰时, 雌花芽进入到了苞鳞原基分化期, ZR_s 含量处于最高峰时, 雌花芽处于苞鳞分化的前期, ABA 含量达到高峰伴随到雌花芽分化完成, 之后虽有下降, 但仍处于较高水平。雌花芽中 GA 含量在花芽分化前期处于较低水平, 且缓慢下降, 至翌年 4 月中旬, 其含量又急剧上升, 至苞鳞原基分化完成其含量又开始下降。

4. 施肥试验表明, 各施肥处理对樟子松雌花、雄花和 1 龄幼果量均有所增加, 说明施肥是一项实用措施, 其中第一年处理 3 施尿素 1kg/株、过磷酸钙 0.1kg/株、生物有机肥 10kg/株的效果最好, 可以使雌花序提高 68.9%, 雄花序提高 69.5%, 1 龄球果量提高 143.1%, 可以为今后的施肥作指导。施肥对第二年的花量仍有促进作用, 并且对雄花的促进幅度大于对雌花的促进幅度。

5. 喷施激素试验表明, 不同浓度激素处理对樟子松开花结实的影响表现为低浓度促进, 高浓度抑制, 在赤霉素喷施试验中, 以 500ppm 浓度赤霉素处理增花增果效果最明显, 处理组相比对照组平均 1 龄幼果增加 57.4%, 增幅最大, 平均雄花序多 15.75 个/枝, 增加 51.6%, 平均雌花序多 2.28 个/枝, 增加 16.3%; 在 6-BA 的喷施试验中, 以 250ppm 6-BA 处理增花增果最明显, 处理相比对照组平均雌花序提高 22.2%, 平均雄花序提高 42.7%, 而在 1 龄幼果的增量方面, 处理组比对照增加 31.8%。

关键词: 樟子松; 土壤养分; 花芽分化; 球花芽; 促花促果措施

分类号 S722
密 级 GK



学位代码 309
学校代码 10298
学 号 3100505

南京林业大学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：利用大配子体构建马尾松遗传图谱

作 者：何卫龙

专 业：林木遗传育种

研究方向：林木遗传改良

指导教师：季孔庶 教 授

二〇一三年六月

摘 要

本研究以单株马尾松的 142 个大配子体为作图群体,利用筛选的 55 对 SSR 引物和 142 对 SRAP 引物获得的 502 个标记,采用 JoinMap4.0 作图软件构建马尾松遗传连锁图谱。主要结论如下:

使用改良的 CTAB-SDS 法提取单粒胚乳 DNA,对其浓度和纯度进行检测。结果表明:运用 CTAB-SDS 法提取的马尾松胚乳 DNA 浓度高,纯度好,琼脂糖凝胶电泳条带清晰,点样孔干净。

利用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验表对影响 PCR 结果的 Mg^{2+} 、dNTP、模板 DNA、引物浓度、TaqDNA 聚合酶进行 5 因素 4 水平正交设计试验。建立了适合马尾松 SSR-PCR 和 SRAP-PCR 的反应体系。SSR-PCR 反应体系: 10 μ L 反应体系中, Mg^{2+} 浓度为 2.80mmol/L, dNTP 浓度为 0.35mmol/L, 引物浓度为 0.075 μ mol/L, 模板 DNA 浓度为 20ng/10 μ L, Taq 酶浓度为 0.50U/10 μ L; SRAP-PCR 反应体系: 10 μ L 反应体系中, Mg^{2+} 浓度为 2.80mmol/L, dNTP 浓度为 0.45mmol/L, 引物浓度为 0.15 μ mol/L, 模板 DNA 浓度为 25ng/10 μ L, Taq 酶浓度为 1.2U/10 μ L。

根据马尾松课题组最新测得的部分马尾松 EST 序列,利用 Primer 3.0 软件设计了 397 对 SSR 引物,加上已经公布的 104 对 SSR 引物,通过筛选,得到了 55 对具有多态性 SSR 引物。

利用 JoinMap4.0 软件构建了一张包含 237 个标记、18 个连锁群的马尾松遗传连锁图谱,237 个标记中包含 26 个 SSR 标记和 211 个 SRAP 标记。18 个连锁群中 14 个连锁群有 7-31 个标记不等,还有 1 个六联体、1 个五联体和 2 个四联体。所获得马尾松连锁图谱总图距为 1462.1cM,估计马尾松基因组长度为 1744.9cM,连锁图谱基因组覆盖率为 83.8%。最大连锁群图距为 136.4cM,最小连锁群图距为 36.7cM,平均每个连锁群长度为 81.2cM,标记之间平均图距为 6.2cM。

关键词: 马尾松; SSR; SRAP; 体系优化; 遗传连锁图谱

分类号 S722

密 级 XZ



学位代码 309

学校代码 10298

学 号 3100506

南京林业大学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：马尾松快繁体系的建立

作 者：阮倩倩

专 业：林木遗传育种

研究方向：林木遗传改良

指导教师：季孔庶 教授

二〇一三年六月

摘 要

本论文以福建马尾松优良家系成熟合子胚和实生苗顶芽为外植体,通过研究外植体的灭菌方式、基本培养基、生长调节剂以及添加物对组织培养各阶段的影响,建立了马尾松快繁体系。

试验结果表明,马尾松成熟种子的最佳灭菌方法为 70%酒精消毒 30s+20% 84 消毒液 5min,外植体成活率为 92%;实生苗顶芽的灭菌方法为 70%酒精 30s+20% 84 消毒液 5min+0.1%升汞 5min,灭菌后成活率为 96.67%。

成熟合子胚不定芽诱导阶段的适宜培养基为 DCR+0.5mg/L6-BA+0.1mg/LKT+0.05mg/LNAA+蔗糖 30g/L,诱导出不定芽数量多,长势旺盛,最高诱导率达 84%,接种后的种胚暗培养 3d 再转入光下培养,能有效降低褐化率。

成熟胚诱导的不定芽增殖过程中适宜培养基为 GD+1.5mg/L6-BA+0.15mg/LIBA+30g/L 蔗糖或 40g/L 食用白糖,增殖系数为 10.76,增殖后的丛生芽生长健壮,颜色深绿。实生苗顶芽的适宜增殖培养基为 GD+3.0mg/L6-BA+0.15 mg/LIBA+30g/L 蔗糖,增殖系数为 6.5,将带子叶顶芽接种到培养基上 30d 左右从子叶基部分化产生不定芽,25d 苗龄的顶芽增殖效果最好。不定芽和顶芽增殖后的合适伸长培养基为 GD+1g/L 活性炭+30g/L 蔗糖,伸长生长后平均芽高为 3.8cm,伸长迅速,茎干直立粗壮。

马尾松试管苗生根的适宜生根培养基为 1/2DCR+0.7mg/L NAA+0.5mg/LIBA+20g/L 蔗糖,生根率为 75.9%,生成的根条数多并伴有须根产生,生根质量好。活性炭的加入没有起到促进生根的作用,生根时进行 7d 暗培养处理对生根率没有显著影响,但有利于加快不定根产生。生根苗的移栽选择春季三月份,最佳的移栽基质为珍珠岩:泥炭土=1:1,两周后移栽成活率为 88%,一个月左右在苗的顶端长出新的芽。

以马尾松不同外植体为试验材料进行再生体系研究发现,采用成熟种胚作为外植体比实生苗顶芽作外植体增殖的速度更快、数量更多,而且实生苗顶芽作为外植体建立再生体系所需时间较长,不利于实现快繁,因此,采用马尾松成熟合子胚作为外植体更适合用于快繁体系建立,诱导率和增殖系数分别为 84%和 10.76,生根率为 75.9%,移栽成活率达到 88%。

关键词: 马尾松; 成熟合子胚; 实生苗顶芽; 直接器官发生; 快繁体系

分 类 号 S722

密 级 XZ



学位代码 307

学校代码 10298

学 号 3100511

南 京 林 业 大 学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：百合属部分种及品种间的遗传关系分析

作 者：方忆灵

专 业：林木遗传育种

研究方向：林木遗传改良

指导教师：席梦利 副教授

二〇一三年 五月

摘 要

百合是世界五大鲜切花之一，在世界花卉交易中占有十分重要的市场份额。全世界百合属植物共有115种，其中原产中国的有55个种和18个变种，但现有的百合栽培品种大部分由荷、美、日等国育成，中国还没有培育出具有商业价值的百合品种，其每年大约90%的百合种球依然依赖进口。因此，研究中国百合属植物遗传多样性及亲缘关系对于指导百合亲本选配，继而有针对性地培育百合新品种至关重要。

本研究以课题组收集的百合组培苗为实验材料，采用AFLP和SRAP两种分子标记获得百合属22个原生种和8个代表性园艺栽培品种的遗传差异数据；借助Phylip3.69软件包，分别使用最小进化法（ME）、邻接法（NJ）和最大简约法（MP）这三种建树方法对所得数据进行系统发生重建，并且使用自举法、最小二乘法和基于最大简约法的SH检验对基于两种分子标记、使用三种建树方法得到的6棵无根树进行了较为详细的比较评价；使用MEGA5软件对最终入选的AFLP最小进化树绘制百合属部分种及品种的系统发生图，对试验样本进行类群划分，揭示百合原生种与园艺栽培品种间的遗传关系。根据所绘制系统发生图，我们将试验样本大致划分为五大类，并且得出以下结论：

- （1）分子系统学研究与形态分类结果部分吻合。
- （2）百合属内遗传多样性丰富，无论两种分子标记的引物多态性还是系统发生图中外枝的长度，都支持这一观点。
- （3）8种百合园艺栽培品种中，代表亚洲百合杂种系的托里诺、多安娜、Royallace与卷丹聚为一类，代表麝香百合杂种系的白狐狸、雷山与麝香百合聚为一类，代表东方百合杂种系的索邦、康斯坦萨、Alust与药百合聚为一类。
- （4）卷瓣组内分化差异较大，传统分类中属于卷瓣组的8个百合原生种在图中被分散到其中的三大类中。
- （5）传统分类中属于百合组的宜昌百合、王百合、泸定百合、淡黄花百合与卷瓣组的湖北百合、南川百合聚为一类，表明后两者与百合组的亲缘关系较近。
- （6）钟花组的渥丹与4种卷瓣组百合原生种聚为一类，支持众多学者对于“钟花组与卷瓣组间存在基因交流”的分类观点。

关键词：百合属；百合栽培品种；AFLP；SRAP；系统发生；遗传关系

分类号 S722

密 级 XZ



学位代码 309

学校代码 10298

学 号 3100515

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目：影响南林895杨遗传转化体系几个主要因子的研究

作 者：于 娟

专 业：林木遗传育种

研究方向：林木遗传改良

指导教师：诸葛强 教授

二〇一三年六月

摘 要

南林 895 杨(*Populus deltoides* × *P. euramericana* cv 'Nanlin895')是近年来长江中下游地区广泛应用的杨树优良无性系,具有生长快、产量高等特点。然而由于单一品种的大面积造林,病虫害危害越来越严重,转基因技术是培育抗病虫杨树新品种的重要途径之一,本研究针对本实验室南林 895 杨遗传转化体系效率不高,影响转基因技术的应用,利用正交试验设计,通过 GUS 组织化学染色法研究了预培养时间、菌液浓度、侵染时间、共培养时间及菌株类型等 5 个主要因子对南林 895 杨遗传转化效率的影响。本研究主要结果如下:

1. 遗传转化中筛选压的确定。本研究采用的筛选标记基因是卡那霉素抗性基因(Kan^r),即新霉素磷酸转移酶基因(npt-II),经过分析对比试验,选用 kan 20mg/L 作为分化筛选时的选择压,选择 kan 15mg/L 作为生根生长时的选择压。筛选培养基中的头孢浓度选择 200mg/L。

2. 遗传转化体系的优化。经过对多个影响遗传转化效率的因子分析,对南林 895 杨较适宜的遗传转化条件为:采用杨树无菌苗健康叶盘,选择 EHA105 作为侵染菌株,预培养 3d,菌液浓度取 OD_{600} 为 0.6~0.8,侵染时间为 8min,共培养时间为 2~3d。

3. 经分子生物学检测(包括 PCR 和 RT-PCR 分析),结果显示 GUS 报告基因已经整合进部分转基因杨树中。对分子检测为阳性植株进行组织化学法染色,结果显示,被检测为阳性植株的器官均能被染成蓝色,表明报告基因已经在转基因南林 895 杨中得到了表达。上述 5 个主要影响因子的优化筛选,为今后南林 895 杨的转基因研究提供了良好的遗传转化体系。

关键词:南林 895 杨,正交设计,遗传转化,体系,优化

分类号 S722

密 级 XZ



学位代码 309

学校代码 10298

学 号 3100516

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目: 杨树转耐盐基因PtNHX的研究

作 者: 杨立恒

专 业: 林木遗传育种

研究方向: 林木遗传改良

指导教师: 诸葛强 教授

二〇一三年六月

摘 要

随着全球经济高速地发展, 人类生存的环境日益受到破坏, 以至于盐胁迫成为了全球范围内影响农作物及林木生长的非生物胁迫之一, PtNHX 基因是本实验室从毛果杨中克隆得到的, 是一种 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因, 通过对 Na^+ 的主动运输, Na^+/H^+ 逆向转运蛋白把细胞质中的 Na^+ 区隔到液泡中, 可有效降低细胞质中 Na^+ 含量, 从而减少了 Na^+ 对细胞器和酶系统的毒害, 从而提高植物的耐盐性。本研究以实验室组培苗南林 895 杨为原始材料, 利用卡那霉素筛选为选择标记, 开展了南林 895 杨转 PtNHX 耐盐基因的遗传转化研究, 通过分子检测, 筛选出含有目的基因 PtNHX 的抗性植株, 并通过生理生化方面的检测获得耐盐能力较强的转基因植株。

1、遗传转化体系的优化: 通过正交试验设计, 以卡那霉素 20mg/L 作为选择压进行实验, 确定影响遗传转化的因素预培养时间、菌液浓度和侵染时间三个因素中, 其对遗传转化的影响大小依次为预培养时间>菌液浓度>侵染时间, 本次研究中得到的最佳遗传转化体系为: 预培养 2 天, 菌液浓度为 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 为 0.6, 侵染时间为 10min。

2、转基因植株的获得和分子检测: 通过遗传转化实验共得到卡那抗性植株 145 株, 对阳性植株进行 PCR 检测共得到 35 株阳性植株, 转化率为 24.13%, 其中 7 株转基因植株经过 RT-PCR、Southern 杂交检测为阳性。

3、转基因植株的耐盐性测定: 将得到的转基因阳性植株进行扩繁, 选择生长性状一致的植株进行生理生化检测。通过设定不同的盐胁迫 (NaCl) 浓度, 测定转基因植株与对照的叶绿素含量、可溶性蛋白含量、MDA 含量、POD 活性、SOD 活性、PRO 含量。不同浓度的盐胁迫试验结果表明转基因株系的耐盐能力与对照植株相比有了一定水平的提高。为培育耐盐杨树新品种提供了实验基础。

关键词: 南林 895 杨; PtNHX 基因; 遗传转化; 耐盐

分类号: S722

密 级: GK

专业代码 095400

学校代码 10298

学 号 8115235



全日制专业学位研究生学位论文

论文题目: 杨树 EST-SNP 分析及第 IV 号

连锁群比较遗传图谱的构建

作 者: 王小龙

学位类别: 林业硕士

专业领域: 林 学

研究方向: 林木遗传育种

指导教师: 尹佟明 教 授

张新叶 副研究员

2013 年 5 月

摘 要

杨树(*Populus*)是我国适生范围较广的树种之一,为了选育优良抗病品种,本研究选用南京林业大学林木遗传实验室美洲黑杨杂交产生的群体,群体包含 84 个子代(其中母本中石 8 号为 I-69 与 63 杨杂交子代,父本 DD102-4 为引进的纯美洲黑杨无性系)。在 AFLP 构建该群体的父本和母本的联合图谱基础上使用 SSR 分子标记进行第四号染色体连锁群比较遗传图谱的构建。在 21 对 SSR 引物中筛选出第四号染色体多态性 SSR 引物 16 对,之后进行群体扩增,共获得 28 个多态性位点。其中父本 15 个位点,母本 13 个位点,成功定位了第四号染色体上的遗传图谱。在与 Family13 群体第四染色体母本遗传图对比中,所有相同 SSR 标记呈共线性相对关系。通过相互验证,使得本实验图谱具有很高的准确性及可用性。本研究还可利用已有研究成果,为该群体抗锈基因的克隆及抗病植株的选育奠定了坚实的基础。

本实验还建立杨属 SNP 数据库,并初步建立杨属 EST-SNP 开发体系,明确杨属 EST 中 SNP 的分布规律。从 GenBank 数据库中得到 433,533 条 EST 表达序列,拼接得到 28,134 条 contig 序列,总长度为 1,738,969bp,筛选后得到候选 SNP 位点 13,058 个。突变发生频率为 0.076%,即平均 1,332bp 就存在一个 SNP 位点。在这 13,058 个 SNP 标记位点中,单碱基置换位点为 12,094 个,占 92.6%。其中转换 7,591 个(62.77%),颠换 4,503 个(37.23%),单碱基 INDELs 位点为 276 个,多碱基 INDELs 位点为 297 个。

关键词: 抗锈病基因; SSR; 遗传图谱; EST-SNP

分类号 S722
密 级 GK

专业代码 0954
学校代码 10298
学 号 8115240



全日制专业学位研究生学位论文

论文题目：五种（品种）铁线莲组织培养研究

作 者：杨迎杰

学位类别：林业硕士

专业领域：林学

研究方向：林木遗传育种

指导教师：季孔庶 教授

陈亚斌 高级工程师

二〇一三年六月

摘 要

论文以圆锥、‘乌托邦’、单叶铁线莲当年生枝条带芽茎段为外植体建立铁线莲再生体系，同时也对铁线莲‘阿拉贝拉’、短柱铁线莲愈伤组织诱导进行了研究。主要结论如下：

1、铁线莲组织培养快繁技术

(1)圆锥、‘乌托邦’、单叶铁线莲幼嫩茎段表面灭菌以 0.1% HgCl_2 为宜；较适取材季节为 4 月，污染率低，出芽率高。

(2)圆锥铁线莲腋芽增殖的较适培养基为 $\text{MS}+0.3\text{mg/L KT}+0.05\text{mg/L NAA}+30.0\text{g/L sucrose}$ ，增殖系数为 4.16，适宜的生根培养基是 $1/2\text{MS}+0.05\text{mg/L NAA}$ ，生根率达 66%；铁线莲‘乌托邦’腋芽增殖的适宜培养基是 $1/2\text{MS}+0.6\text{mg/L 6-BA}+0.15\text{mg/L IBA}+40\text{g/L sucrose}$ ，增殖系数为 4.12；较适生根培养基是 $1/2\text{MS}+0.05\text{mg/L NAA}$ ，生根率达 75%；单叶铁线莲腋芽增殖的适宜培养基是 $\text{MS}+1.0\text{mg/L 6-BA}+0.1\text{mg/L NAA}+40\text{g/L sucrose}$ ，增殖系数为 4.07，适宜的生根培养基是 $1/2\text{MS}+0.05\text{mg/L NAA}+0.1\text{mg/L IBA}$ ，生根率达 63%。

(3)瓶苗移栽春季最佳，经过 5-7 天的开瓶炼苗，以营养土：珍珠岩：蛭石 =1：1：3 为基质，其移栽成活率达 81.6%。

2、铁线莲‘阿拉贝拉’、短柱铁线莲愈伤组织诱导技术研究

(1)以当年生嫩枝带芽茎段为外植体，铁线莲‘阿拉贝拉’愈伤组织较适诱导培养基为 $1/2\text{MS}+2.0\text{mg/L 6-BA}+0.1\text{mg/L NAA}$ ；短柱铁线莲愈伤组织适宜诱导培养基为 $1/2\text{MS}+0.4\text{mg/L TDZ}+0.2\text{mg/L NAA}$ 。

(2)铁线莲‘阿拉贝拉’愈伤组织适宜增殖培养基为 $1/2\text{MS}+1.5\text{mg/L 6-BA}+0.1\text{mg/L NAA}$ ；短柱铁线莲愈伤组织适宜增殖培养基为 $1/2\text{MS}+0.3\text{mg/L TDZ}+0.2\text{mg/L NAA}$ 。

(3)短柱铁线莲最佳胚性愈伤组织诱导培养基为 $1/2\text{MS}+0.1\text{mg/L TDZ}+0.05\text{mg/L NAA}$ ，附加 0.1g/L 肌醇、0.1g/L 水解络蛋白(CH)、蔗糖 30 g/L、0.05mg/L ABA、5 mg/L Vc 和 7.6g/L 琼脂；胚性细胞悬浮培养中，最佳摇床转速为 $105\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ ，最佳激素组合为 $1/2\text{MS}+0.2\text{mg/L TDZ}+0.1\text{mg/L NAA}$ 。

(4)短柱铁线莲愈伤不定芽适宜诱导培养基为 $1/2\text{MS}+0.3\text{mg/L TDZ}+0.1\text{mg/L NAA}$ ，诱导率达 63.3%。铁线莲‘阿拉贝拉’愈伤愈伤不定芽适宜诱导培养基为 $1/2\text{MS}+1.5\text{mg/L 6-BA}+0.2\text{mg/L NAA}$ ，诱导率达 46.7%。

关键词：铁线莲；组织培养；愈伤诱导；不定芽

分类号 S722

密 级 GK



学位代码 309

学校代码 10298

学 号 3100509

南 京 林 业 大 学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目: 鹅掌楸属基因进化差异研究—基于*Chs*、*Adh*
序列证据

作 者: 罗群凤

专 业: 林木遗传育种

研究方向: 森林遗传学

指导教师: 李火根 教授

二〇一三年六月

摘 要

鹅掌楸 (*Liriodendron chinense*) 和北美鹅掌楸 (*Liriodendron tulipifera*) 是木兰科 (Magnoliaceae) 鹅掌楸属 (*Liriodendron*) 仅存的两个种。两者在地理分布、生态环境、生物学特性等方面都表现出一定的差异, 种间杂交可育, 表明二者可进行基因交流。研究鹅掌楸种间遗传分化对于探测鹅掌楸、北美鹅掌楸的进化分歧有重要意义。

Chs 与 *Adh* 基因分别是植物类黄酮代谢和短链醇代谢过程中的重要基因, 对植物的生长、花色、抗性等有重要影响。二者同时也常用于研究属、种水平系统进化的低拷贝基因。本研究利用已知的北美鹅掌楸 *Chs*、*Adh* 基因 cDNA 片段, 以北美鹅掌楸花芽为材料, 运用 RACE 技术克隆鹅掌楸属 *Chs*、*Adh* 基因并对其序列进行分析, 比较鹅掌楸属种间、种内不同种群间基因进化差异, 进而探索鹅掌楸属种间遗传分化。主要研究结果如下:

1、获得了北美鹅掌楸 *Chs* 基因家族的 2 个基因 *Chs1*、*Chs2* 及 *Adh* 基因的全长序列。*Chs1* 基因 cDNA 全长 875bp, 编码 233 个氨基酸。*Chs2* 基因 cDNA 全长 1457bp, 编码 394 个氨基酸。*Adh* 基因 cDNA 全长 1163bp, 编码 268 个氨基酸。

2、鹅掌楸与北美鹅掌楸的 *Chs*、*Adh* 基因高度同源, 序列差异多为单碱基变异, 仅在 *Adh* 基因内含子 6 中存在 80bp 的长度差异。

3、两种鹅掌楸的 *Chs* 基因存在明显的组织表达差异。*Chs1* 基因只在北美鹅掌楸中表达, 而 *Chs2* 基因则在鹅掌楸中表达, 在杂交鹅掌楸中二者均有表达。

4、*Chs1* 基因的进化速率在鹅掌楸属种间存在明显差异。鹅掌楸的相对进化速率高于北美鹅掌楸。而种内不同种源间的相对进化速率并不存在显著差异。*Chs2* 外显子 II 的进化速率在鹅掌楸属种间不存在显著差异, 在北美鹅掌楸种源间也无显著差异, 但在鹅掌楸种源间的同义替换差异显著, 非同义替换差异不显著。

5、*Chs* 基因家族的 2 个基因的进化速率在鹅掌楸属种间及种内不同种源间均不一致, 呈极显著差异。

6、*Adh* 基因外显子在鹅掌楸属种间的同义替换有显著差异, 非同义替换差异不显著; 而该基因在种源间的相对进化速率不一致, 存在显著差异。*Adh* 基因的外显子与内含子的进化速率在鹅掌楸种源间差异不显著。

7、鹅掌楸属不同基因间进化速率差异明显。*Chs1*、*Chs2*exon2 与 *Adh* exon 在种间及种内不同种源间的进化速率都不一致, 呈极显著差异。*Chs2*exon2 受到的选择压力最大, 其次是 *Adh* exon, *Chs1* 基因受到的选择压力最小。

关键词: 鹅掌楸属 *Chs* *Adh* 进化速率 种间遗传分化

分 类 号 S722
密 级 GK



学位代码 309
学校代码 10298
学 号 3100507

南 京 林 业 大 学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：鹅掌楸 EST-SSR 引物大规模开发及应用

作 者：汪洁

专 业：林木遗传育种

研究方向：森林遗传学

指导教师：李火根 教授

二〇一三年六月

摘要

木兰科是被子植物较原始的类群,在研究植物系统进化中具有重要地位。由于缺乏合适的 DNA 分子标记,使木兰科植物的分子遗传学研究进展不大。近年来,虽然已从鹅掌楸属树种 EST 数据库中开发出一批 EST-SSR 标记,并发现其在木兰科不同属间具有较高的通用性。但总体上,木兰科植物的 SSR 标记数目仍偏少。因而,大规模开发鹅掌楸 EST-SSR 引物并检测其在木兰科不同属间通用性有重要的实践价值。本文利用北美鹅掌楸及鹅掌楸的转录组信息,根据引物设计原则,大规模开发一批 EST-SSR 引物。选取多态性引物,检测鹅掌楸天然群体的遗传多样性以及跨属间的通用性。主要研究结果如下:

鹅掌楸属树种 EST-SSR 引物的大规模开发 利用第二代高通量测序技术对鹅掌楸花瓣和叶片进行转录组测序,测序总量达 17G。经数据过滤、拼接,共获得 129097 条 EST 序列。利用生物信息学软件进行 SSR 位点搜寻及引物设计,最终开发出鹅掌楸 EST-SSR 引物 2001 对。同时,利用公共数据库中已公布的北美鹅掌楸转录组信息,开发出北美鹅掌楸 EST-SSR 引物 861 对。

利用北美鹅掌楸 EST-SSR 分子标记检测鹅掌楸天然群体遗传多样性 从北美鹅掌楸转录组中开发出的 861 对 EST-SSR 引物,利用北美鹅掌楸和鹅掌楸各 6 个基因型检测其多态性。发现有 671 对引物在鹅掌楸属中有扩增产物,多态性引物共 372 对,多态性引物比率为 55.44%。从中选取了 26 对多态性较高的引物应用于广西鹅掌楸天然群体的遗传多样性检测。有 18 对 SSR 引物在此鹅掌楸天然群体中表现出多态性。18 对 SSR 引物共检测到 104 个等位基因,平均每个位点观察到等位基因数为 5.8。其中,有效等位基因数的范围从 2.96 至 5.86,平均有效等位基因数为 4.16。Shannon 多样性指数平均为 1.5447,期望杂合度平均为 0.7632。表明该鹅掌楸天然群体具有较高的遗传多样性,同时,也说明该批北美鹅掌楸 EST-SSR 分子标记在鹅掌楸属树种中有较高的应用价值。

鹅掌楸 EST-SSR 引物的多态性及通用性分析 从已开发的鹅掌楸 EST-SSR 引物中,选取 192 对引物,利用北美鹅掌楸与鹅掌楸各 6 个基因型进行扩增。120 对引物在鹅掌楸中均有效扩增,多态性引物有 44 对,多态性引物比率为 36.7%; 107 对引物在北美鹅掌楸中有扩增产物,多态性引物有 34 对,多态性引物比率为 31.8%。总体上,鹅掌楸 EST-SSR 引物在属内通用率为 89.2%。从中选取 36 对多态性较高的引物应用于木兰科的跨属间通用性分析。在木莲属、木兰属、含笑属、单性木兰属、盖裂木属、拟单性木兰属、观光木属、华盖木属和合果木属不同种中的引物通用率分别为 22.2%~50.0%、27.8%~44.4%、36.1%~52.8%、33.3%、44.4%、55.6%、52.8%、50.0%、41.7%。表明,鹅掌楸 EST-SSR 引物在木兰科其他属树种中有较高的通用性。

关键词: 鹅掌楸属; 转录组; EST-SSR; 多态性; 通用性

分类号 Q754

密 级 XZ



学位代码 307

学校代码 10298

学 号 3110117

南京林业大学

硕 士 研 究 生 学 位 论 文

论文题目：美洲黑杨伸展蛋白基因家族群体 SNP 检测及连锁不
平衡分析

作 者：仰皖旭

专 业：生物化学与分子生物学

研究方向：植物基因与发育

指导教师：尹佟明 教授

二〇一四年六月

摘 要

伸展蛋白(extensin)是高等植物细胞壁中一类非常重要的结构蛋白,富含羟脯氨酸残基,在双子叶植物中占初生壁干重含量的1~15%。典型的伸展蛋白具有 Ser-(Hyp)₄ 重复五肽结构,属于极为冗余的细胞壁结构蛋白家族。伸展蛋白的主要功能是控制细胞伸展,增强细胞壁机械强度。近年,在对拟南芥 *rsh* 突变体的研究中发现,伸展蛋白在胞质分裂过程中对细胞板的定位与形成、胚胎的正常发育也起了至关重要的作用。因此,研究美洲黑杨伸展蛋白的结构功能对选育美洲黑杨优质品种具有重要意义。

本研究选取了 92 个美洲黑杨无性系为研究对象,通过 PCR 方法分别扩增出伸展蛋白基因家族中的 9 个基因,再通过 454 高通量进行测序,从而分别对每个基因的 SNP 及 LD 进行分析。主要结论如下:

1) 9 个基因共分成 41 个片段进行扩增,最后将每个样品等量混合构建测序文库。测序共获得 394Mb 的 DNA 序列,包含 94.7 万条序列,平均读长为 416bp,测序的平均深度为 160 倍,高覆盖度的测序序列,保证了 SNP 分析的准确性。

2) 对 9 个 *PdEXT* 基因的 SNP 位点统计分析发现: *PdEXT6* 基因检测得到 35 个 SNPs, *PdEXT18* 基因检测得到 12 个 SNPs, *PdEXT22* 基因检测得到 61 个 SNPs, *PdEXT25* 基因检测得到 36 个 SNPs, *PdEXT29* 基因检测得到 177 个 SNPs, *PdEXT32* 基因检测得到 123 个 SNPs, *PdEXT34* 基因检测得到 26 个 SNPs, *PdEXT40* 基因检测得到 65 个 SNPs, *PdEXT41* 基因检测得到 49 个 SNPs。除 *PdEXT18* 基因($T_s/T_v=0.5$),其他 8 个基因的 $T_s/T_v \geq 0.64$,发生转换偏差。SNP 出现频率最低是 1/86bp(*PdEXT34*),最高是 1/7bp(*PdEXT41*)。

3) 对 9 个 *PdEXT* 基因的 InDel 位点统计分析发现: *PdEXT6* 基因检测得到 5 个 InDels, *PdEXT18* 基因检测得到 5 个 InDels, *PdEXT22* 基因检测得到 32 个 InDels, *PdEXT25* 基因检测得到 50 个 InDels, *PdEXT29* 基因检测得到 127 个 InDels, *PdEXT32* 基因检测到 18 个 InDels, *PdEXT34* 基因检测得到 24 个 InDels, *PdEXT40* 基因检测得到 79 个 InDels, *PdEXT41* 基因检测得到 15 个 InDels。除 *PdEXT32*、*PdEXT22* 外,其他 7 个 *PdEXT* 基因的缺失均多于插入。在所有 InDel 中,单碱基变化类型最多,占 InDel 总量的 58.77%,低于 10bp 长的 InDel 占 InDel 总量的 86.35%,InDel 的数量都随着 InDel 长度的增加而下降。

4) 对 *PdEXT6*、*PdEXT34*、*PdEXT41* 三个基因进行 LD 分析发现: *PdEXT6* 基因有 1 个单体型块,5 对紧密连锁的 SNP 位点($r^2 > 0.75$); *PdEXT34* 基因有 3 个单体型块; *PdEXT41* 基因有 7 个单体型块,26 对紧密连锁的 SNP 位点。

关键词: 美洲黑杨; 伸展蛋白; 单核苷酸多态性; 插入/缺失

分类号 Q341

密 级 XZ



学位代码 309

学校代码 10298

学 号 3110110

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目: 杨树*ATAF1*基因的克隆和功能分析

作 者: 罗瑞捷

专 业: 遗传学

研究方向: 分子遗传学

指导教师: 诸葛强 教 授
程 强 副教授

二〇一四年六月

摘 要

NAC家族的ATAF基因是植物中重要的转录因子,在植物抵抗生物和非生物胁迫过程中具有重要作用。杨树生长快、分布广,是重要的速生工业用材树种之一,在维护生态环境等方面发挥着重要作用。但是,干旱、盐碱等因素严重制约了杨树的生长发育。本文以南林895杨(*Populus euramericana* 'Nanlin895')为材料,尝试建立叶片瞬时表达方法来优化遗传转化体系,克隆抗逆相关NAC家族中ATAF1基因,并对其特性和功能分析,旨在为林木植物的抗性育种提供科学依据。主要研究结果如下:

1. 本研究克隆了南林895杨的ATAF1基因全长编码序列(CDS),根据3'RACE测序结果,我们发现PdATAF1-1至少存在4种可变剪接形式,分别命名为PdATAF1-1 AS1、PdATAF1-1 AS2、PdATAF1-1 AS3和PdATAF1-1 AS4。由于在该转录过程中出现的4种可变剪接有可能翻译出三种不同氨基酸序列的ATAF1基因,其中PdATAF1-1 AS1和PdATAF1-1 AS2编码序列一致,对应的编码蛋白是C末端截短蛋白(161aa),PdATAF1-1 AS3(179aa)由于读码框位置发生偏移其对应的编码蛋白的C末端与预测蛋白完全不同,而PdATAF1-1 AS4(291aa)与预测蛋白完全一致。

2. 根据3'RACE的实验结果,实验设计了三对特异性的定量PCR引物,其可以检测编码三种蛋白的可变剪接形式。随后的定量PCR研究发现,不同类型的可变剪接形式在ABA处理和NaCl下表达模式基本一致,因此不同可变剪接的调控方式可能不存在于转录水平,而有可能存在于翻译后水平。

3. 将PdATAF1-1的两种可变剪接形式分别构建植物表达载体,并转入拟南芥中过量表达,实验结果显示PdATAF1-1 AS4具有抑制拟南芥生长的功能,此项功能与拟南芥AtATAF1的研究结果一致。另外,在分子检测的基础上,选取阳性植株分别进行干旱、GA3和ETH胁迫实验,结果表明随着处理时间的延长,野生型和转基因拟南芥均表现出受逆境阻抑的性状,但转基因拟南芥受到的影响小于野生型,说明ATAF1-1受干旱、GA3和ETH的诱导表达。

4. 尝试建立叶片瞬时表达方法来为优化遗传转化体系提供依据,发现农杆菌菌株的选择,农杆菌渗透方法和内质网抑制诱导物的添加对T-DNA进入杨树细胞并表达具有显著的影响。另外,在本研究中首次发现氧化型DTT(DTTox)可以明显提高瞬时表达效率,而且瞬时表达效率的提高很可能与提高农杆菌在叶片中的存活率密切相关。

关键词: 杨树; NAC转录因子; ATAF1基因; 胁迫应答

分类号 S781

密 级 GK



学位代码 307

学校代码 10298

学 号 3110118

南 京 林 业 大 学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：簸箕柳材性性状表型变异的研究

作 者：国增超

专 业：生物化学与分子生物学

研究方向：植物基因与发育

指导教师：尹佟明 教授

二〇一四年六月

摘 要

本文以簸箕柳为研究对象,对木材的基本密度,纤维素、半纤维素以及木质素含量进行了测定,采用方差分析、相关性分析等数理统计方法对所得数据做了必要的分析,揭示了簸箕柳木材主要化学成分及基本密度的变异规律,为进一步开展相关性状的遗传解析提供了重要的表型数据。主要研究结果如下:

1 簸箕柳木材的纤维素平均含量为 53.19%,变异范围为 47.91%~57.00%;木质素平均含量为 14.20%,变异范围为 12.28%~16.43%,半纤维素的平均含量为 19.80%,变异范围为 16.52%~23.76%,木材基本密度为 $0.3926\text{g}/\text{cm}^3$,变异范围为 $0.2416\text{g}/\text{cm}^3\sim 0.5044\text{g}/\text{cm}^3$ 。对所测性状进行正态分布检验,结果显示,所有性状表型值均符合或可以转换为正态分布,可以作为典型的数量性状做进一步的数量性状遗传位点定位分析。

2 相关性分析表明,半纤维素含量与纤维素及木质素含量之间呈极显著负相关;木材基本密度与纤维素含量呈极显著正相关,而与半纤维素含量呈显著负相关。

3 簸箕柳木材主要化学成分含量和基本密度值在树干高度方向上略有差异。纤维素及半纤维素含量在株内纵向变化的规律为由根部到梢部逐渐降低;木质素含量则表现出两头高,中间低的趋势,并且最高值出现在树干顶部。木材基本密度随着树干高度的增加呈现逐渐降低的趋势。但方差分析结果表明,在树干高度方向上,木材化学成分含量以及基本密度值在株内不存在统计上的显著性差异。

关键词: 簸箕柳; 基本密度; 纤维素; 半纤维素; 木质素

分类号 Q23

密 级 XZ



学位代码 307

学校代码 10298

学 号 3110106

南 京 林 业 大 学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：百合品种间杂交及其杂种后代细胞学分析

作 者：高婷婷

专 业：遗传学

研究方向：细胞分子遗传学

指导教师：席梦利 副教授

二〇一四年六月

摘 要

三倍体百合植株强健，是良好的育种资源，虽然由于减数分裂异常不能正常分裂，但可以选作母本与合适的父本杂交，从而进行百合种质渗入育种，荧光原位杂交技术可在早期用来鉴定百合杂种后代的真实性，这对于缩短新品种的培育进程具有重要意义，基因组原位杂交技术可以在百合远缘杂交育种中用于区分基因组和研究染色体重组；本试验运用 45S rDNA 荧光原位杂交和基因组原位杂交技术对杂交后代进行细胞学分析。主要结果如下：

1. 本研究应用 FISH 技术对‘Golden Horn’×‘Pollyanna’杂种后代进行分析，并结合形态学特征鉴定杂种后代的真实性，染色体制片结果表明，亲本和 5 个后代是二倍体 ($2n=2x=24$)，1 个后代是三倍体 ($2n=3x=36$)；FISH 结果表明‘Golden Horn’有 11 个位点位于第 1、2、3、4、7 和 11 号染色体上，‘Pollyanna’有 10 个信号点位于第 1、2、4、6、7 和 11 号染色体上，母本上的 3 号染色体和父本上的 6 号染色体可以选作鉴定后代真实性的主要标记，二倍体后代位点数为 9 或 11，三倍体后代有 14 个信号点。FISH 结果表明 GHP16、GHP142、GHP223 和 GHP245 是真实的杂种后代，形态学特征表明 GHP16、GHP116、GHP123、GHP223 和 GHP245 是真实的杂种。

2. 本研究选取 LA 系三倍体百合‘Royal Lace’作为母本与亚洲百合‘Pollyanna’作为父本进行杂交，利用 GISH 对母本和 6 个杂交后代的染色体数目和组成进行分析。染色体计数表明所选杂交后代都是非整倍体，染色体条数在 27-32 之间，倍性介于 $2x$ 和 $3x$ 之间，染色体数均值为 28.67 ($2.39x$)，可以推断母本‘Royal Lace’提供的功能配子为非整倍体，平均染色体数为 16.67；GISH 分析表明，‘Royal Lace’为异源三倍体，其染色体组中含有 11 条麝香百合染色体，23 条亚洲百合染色体，2 条重组染色体，其中部分后代中产生了新的重组染色体，染色体数目的变化和染色体的重组所引起的遗传变异，会给植物体带来生理和形态上的诸多变化，从非整倍体杂交后代中筛选具有优良性状的个体对新品种的培育有重大意义。

3. 本试验对‘Royal Lace’的花粉母细胞减数分裂染色体行为进行研究，并采用基因组原位杂交技术检测染色体的交换重组情况，减数分裂过程中出现了不平衡的染色体分离、染色体桥的形成、落后染色体现象，GISH 结果显示减数分裂中期，出现了单价体、二价体、三价体，导致在后期出现了染色体不均等分离。此外，减数分裂后期染色体发生了单交换 (SC) 和两线双交换 (TSD)，染色体的交换增加了遗传的多样性，使物种能够不断进化。

关键词：杂种后代鉴定；三倍体百合；荧光原位杂交；基因组原位杂交；非整倍体

分 类 号 Q943

密 级 XZ



学位代码 307

学校代码 10298

学 号 3110107

南 京 林 业 大 学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：农杆菌介导的麝香百合遗传转化研究

作 者：孙惠霖

专 业：遗传学

研究方向：基因工程

指导教师：席梦利 副教授

施季森 教 授

二〇一四年六月

摘要

百合科百合属植物多为世界著名的观赏花卉,适宜盆栽、鲜切花和庭园绿化,还具有食用和药用价值,正日益成为提升生活质量的首选花卉。百合品系繁多,市场上主要的百合切花品种多为亚洲百合、东方百合、麝香百合。目前百合育种在于花色、花香、株型、抗病性、生育周期等方面。植物转基因技术可缩短育种时间,定向修饰某些性状而保持其他性状不变,利用外源基因来改良植物的研究应用为改良植物品质和性状提供了新的途径。本课题以麝香百合为实验材料,鳞片为外植体,采取植物细胞薄层切片法,以浅层液体培养为基础,利用根癌农杆菌介导法进行麝香百合遗传转化的研究。分别将标记基因绿色荧光蛋白基因(GFP)和目的基因天麻抗真菌蛋白基因(GAFP)转入麝香百合,获得再生植株后分别采取正置体视式荧光显微镜观测;PCR和Southern杂交对抗性植株进行分子检测。本研究为百合遗传转化进行新品种创制打下基础。主要研究结果如下:

1、研究不同培养条件对百合转化的影响

以麝香百合‘雷山’鳞片薄层切片为外植体,预培养基MS₀+4.0 mg/L Picloram,共培养基为不含NH₄NO₃的MS₀+4.0 mg/L Picloram+100 mg/L AS,筛选培养基MS₀+4.0 mg/L Picloram+50 mg/L Km+100 mg/L Cef,再生培养基MS₀。转化中分别采取浅层液体培养和加琼脂的固体培养,结果表明,较固体培养浅层液体培养的百合鳞片薄层切片外植体的愈伤诱导率较高,愈伤形成速度更快;用于转化时正负对照愈伤诱导率差异明显可减少假阳性,转化外植体所得愈伤易于分化且褐化程度降低。浅层液体培养结合固体方式的百合愈伤培养体系用于百合遗传转化可缩短周期,且操作方便。

2、农杆菌介导的百合转GFP基因研究

转化以百合鳞片薄层切片为外植体预培养4 d,在OD₆₀₀为0.4的菌液重悬液中侵染10min。待抗性愈伤出芽后将抗性芽转至增殖培养基,最终再生出24株抗性植株。经体视荧光显微镜观察,根部、鳞茎、愈伤组织均不是百合良好表达GFP基因的组织器官,叶片、叶柄为良好的表达观察部位。在其中4株转基因百合的叶片、叶柄可检测到不同程度的绿色荧光。

3、农杆菌介导的百合转GAFP基因研究

以如上遗传转化体系进行麝香百合转GAFP基因,筛选后共得到18株抗性苗。以GAFP基因序列设计合成引物进行PCR检测,阳性质粒以及其中5株抗性苗检测结果有特异性条带,空白对照及阴性对照无特异性条带出现,实验重复性好。在用Southern杂交对PCR阳性苗进行检测时未检测出特异性条带。

关键词: 麝香百合; 遗传转化; 浅层液体培养; GFP基因; GAFP基因

分 类 号 Q341
密 级 XZ



学位代码 307
学校代码 10298
学 号 3110109

南 京 林 业 大 学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：基于 F1 群体的银杏遗传图谱初步构建

作 者：陶园园

专 业：遗传学

研究方向：分子遗传学

指导教师：徐立安 教 授

二〇一四年六月

摘 要

银杏为重要的材用、药用、观赏用等多用途树种，具有很高的经济价值和研究价值。本研究以银杏 184 个杂交 F1 代个体为作图群体，利用 SSR、SRAP 和 AFLP 三种分子标记开展了遗传图谱构建方面的研究，期望为银杏高密度遗传图谱构建、QTL 定位、分子标记辅助选择等研究建立基础。获得的主要结果如下：

利用 454GSFLX 高通量测序获得的银杏 EST 序列和基因组序列，新设计了 317 对 SSR 引物（其中 EST-SSR41 对，基因组 SSR276 对），共对 1122 对引物进行筛选，新开发出了 60 对 SSR 标记（EST-SSR 6 对，基因组 SSR54 对）适用于本研究的图谱构建的 SSR 多态标记。这些标记将在银杏今后的研究中得到高效利用。还有 917 对 SSR 引物产生了清晰的扩增产物，存在潜在的利用价值。

利用前人开发的 SSR 引物 573 对，新合成了 549 对 SSR 引物，共 1122 对银杏 SSR 引物（其中 EST-SSR478 对，基因组 SSR644 对）、160 对 SRAP 引物和 160 对 AFLP 引物以作图群体进行了筛选，其中获得多态的 SSR 引物 116 对（45 对 EST-SSR 和 71 对基因组 SSR），多态比例为 10.33%；SRAP 引物组合 58 对，多态比例为 36.25%；AFLP 引物组合 68 对，多态比例为 42.5%。本实验中应用的 58 对 SRAP 共产生 118 个多态性位点，平均每个引物组合产生 2 个位点；8 对 AFLP 引物组合共产生有 37 个多态性位点，平均每个引物组合产生 4.6 个位点。

在遗传图谱构建中，116 对 SSR 引物、58 对 SRAP 和 20 对 AFLP 引物组合共产生 265 个多态性位点。获得的图谱包含 153 个标记，含有 34 个连锁群，图谱中拥有 4 个及 4 个以上标记的连锁群 17 个，三联体 7 个，二联体 10 个；连锁群图距从 14.4~181cM，总图距长度为 1929cM，平均每个连锁群长度 56.74cM；标记间的最小间距为 0.1cM，最大间距为 54.9cM，标记间平均间距为 12.61cM。估算的银杏基因组的大小为 2370.43cM，基因组覆盖度为 81.38%。这是在银杏中首次利用人工控制杂交获得的 F1 作图群体构建的图谱，也是首次在银杏中利用 SSR、SRAP 和 AFLP 进行的遗传图谱构建。

利用银杏 EST-SSR 所在 EST 序列的信息，对这些序列可能的基因及功能进行了分析，其中有 6 个 EST-SSR 标记可能与细胞核定位、亚硝酸盐转运蛋白、赤霉素诱导蛋白等相关，这些标记分别位于连锁群 GB-1、GB-2、GB-3、GB-4、GB-5、GB-6、GB-7、GB-12、GB-14、GB-15、GB-18、GB-22、GB-25、GB-26 上。利用最小二乘法方差分析，通过对银杏杂交子代生长性状及 SSR 标记的分析，发现有 9 个 SSR 标记位点与银杏的表型性状相关。6 个微卫星标记与顶芽叶数显著相关，1 个与苗高连年生长量显著相关，2 个与顶芽叶数、苗高连年生长量显著相关，这些结果为今后银杏分子辅助选择研究提供了一些基础信息。

关键词：银杏 SSR SRAP AFLP 遗传图谱

分类号 Q341

密 级 XZ



学位代码 307

学校代码 10298

学 号 3110108

南 京 林 业 大 学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：银杏 *NCED* 基因及 *ERF* 转录因子的克隆与表达分
析

作 者：王 娜

专 业：遗传学

研究方向：林木分子遗传

指导老师：徐立安 教 授

二〇一四年五月

摘 要

银杏为银杏科唯一生存的种类，具有食用、药用、材用等多种价值，是我国具有多用途的重要经济树种之一。逆境胁迫是危害农林业生产的一个重要问题，*NCED* 及 *ERF* 转录因子在植物的抗逆胁迫中发挥着重要作用，近年来在许多物种中已开展了 *NCED* 及 *ERF* 转录因子在逆境胁迫方面的研究，我们在银杏中对这 2 个基因进行了研究，主要结果如下：

利用 454 测序获得的 EST 序列，采用 RACE 技术，从银杏叶中分别克隆了 *NCED* 及 *ERF* 的 cDNA 全长，其中 *NCED* 全长 2017bp，含有一个长为 1830bp（27-1859bp）的开放性阅读框，编码了 610 个氨基酸，其相对分子质量为 66.8372 kDa，蛋白质等电点为 6.14，属于弱酸性蛋白质，*ERF* 的 cDNA 全长 1922bp，其中开放阅读框为 1398bp（255-756bp），编码了 466 个氨基酸，相对分子质量为 52.2546kDa，属于酸性不稳定蛋白质，等电点为 4.69，不稳定系数为 49.80。2 个基因的均具有其基因家族的典型 DNA 结合域，同源性分析也表明 2 个基因与其他物种同家族基因的相似性与其他物种间相似度一致。说明我们克隆的 2 个基因确为 *NCED* 和 *ERF*。系统进化树分析结果显示，银杏 *NCED*、*ERF* 蛋白均与同为裸子植物的北美云杉亲缘关系较近，这与传统植物分类的亲缘关系一致。

从银杏 EST 序列中筛选出 23 个候选内参基因，通过实时定量 PCR 对四类不同样本中的表达稳定性进行评价，结果表明，*TUA1* 可作为银杏根、茎、叶不同组织的最佳内参基因，其次为 *40S* 和 *CYP* 基因；在进行芽的不同发育时期分析时，最好采用 *EF1 α* 基因作内参，其次是 *CYP*、*PDA1* 基因；*CYP* 和 *EF1 α* 适合作为研究叶不同发育时期的内参基因；而 *TUA5*、*CYP*、*EF1 α* 可作为盐胁迫的内参基因。综合所有样本的分析结果，*CYP* 和 *EF1 α* 可以作为银杏研究的通用内参基因使用。

以银杏根、茎、叶、芽为材料，以 *CYP* 为内参基因，对 *NCED* 及 *ERF* 进行实时定量 PCR 检测，结果表明，银杏 *NCED* 基因在根茎叶中组成型表达，主要是在地上部分组织中起作用。在芽的不同发育时期，休眠期 *NCED* 表达量最高，其次为展开期，显著高于萌动期和鳞片涨破期；在叶的不同发育时期，6 月份 *NCED* 的表达量明显增高达最大值，随后至 9 月逐渐下降；在盐胁迫处理一小时后，表达量明显上升，达到 15 倍，在叶中至 24 小时表达量维持在 4-5.5 倍。说明银杏 *NCED* 基因与逆境（寒冷、盐）胁迫的反应、旺盛生长、花芽分化的功能相关。*ERF* 在根茎叶中组成型表达，在根中表达量最高，在茎及叶中的表达差异不大；在盐胁迫下，*ERF* 的表达量均有上升（4-5 倍），在根、茎、叶中的表达量差异并不显著，在盐处理 1 小时的叶中表达量上调最明显（约 7 倍），随后表达量均略有下降，说明银杏 *ERF* 在根中发挥的作用较大，并参与盐胁迫反应。

关键词：银杏；*NCED* 基因；*ERF* 转录因子；内参基因；表达分析

分类号 Q341
密 级 XZ



学位代码 307
学校代码 10298
学 号 3110111

南京林业大学

研究生硕士学位论文

论文题目: HD-ZIP II 转录因子 *PttrHB* 基因的克隆和功能分析

作 者: 杨 杨

专 业: 遗传学

研究方向: 分子遗传学

指导教师: 诸葛强 教 授

二〇一四年六月

摘 要

同源异型域—亮氨酸拉链蛋白(homeodomain - leucine zipper protein, HD-ZIP)是近几年来发现的高等植物中特有的一类转录因子,与基因启动子区域中顺式作用元件发生特异性相互作用,对所控制的基因起转录激活或抑制作用。本研究基于杨树全基因组序列信息,克隆杨树 *PtrHB* 基因,并进行遗传转化研究,为杨树新品种培育提供依据。主要研究结果如下:

1. 利用杨树全基因组序列信息,在毛果杨(*Populus trichocarpa*)基因组上定位并克隆了4个 *PtrHB* 基因,命名为 *PtrHB1*、*PtrHB2*、*PtrHB7* 和 *PtrHB9*。序列分析结果表明 *PtrHB1* 阅读框为1125bp,编码375个氨基酸(aa)残基的蛋白质,分子量约为41.42Kda; *PtrHB2* 阅读框为810bp,编码270个氨基酸(aa)残基的蛋白质,分子量约为30.08Kda; *PtrHB7* 阅读框为822bp,编码277个氨基酸(aa)残基的蛋白质,分子量约为30.54Kda; *PtrHB9* 阅读框为1152bp,编码384个氨基酸(aa)残基的蛋白质,分子量约为42.24Kda。4个 *PtrHB* 基因均具有保守的同源异型域。

2. 根据系统进化树及实时定量结果选出 *PtrHB2* 基因,利用 Gateway 技术构建 *PtrHB2* 基因的过量表达载体 pH35GS::*PtrHB2*,经农杆菌介导转入南林895杨,通过优化的遗传转化条件及抗生素筛选获得了15个株系的转 *PtrHB2* 基因南林895杨植株,并对转基因植株进行了分子生物学鉴定和初步的生理指标检测。

3. PCR 和实时定量 RT-PCR 检测结果表明目的基因已经整合进杨树基因组并表达。在分子检测的基础上,选取阳性植株分别进行了温室移植苗的耐盐胁迫试验,并对转基因植株耐盐性进行了相关指标的检测。在盐胁迫下转基因株系叶片内超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)等含量增高幅度均大于对照植株,而丙二醛(MDA)、含量的增高幅度小于对照。转基因株系叶片水分利用效率也明显高于对照植株。在盐胁迫下对照植株的叶绿素合成量下降了10%,而转基因植株有的仅下降6.4%,增强约36.3%。

4. 对转基因植株茎的纤维长度测定分析显示,与非转基因植株比较,转基因植株从0.7mm~0.9mm其纤维长度比对照植株增长约10%。结果表明, *PtrHB2* 的表达提高了转基因杨树的纤维长。

关键词: 杨树, 遗传转化, *PtrHB2*, 功能分析

分 类 号 Q291

密 级 XZ



学位代码 307

学校代码 10298

学 号 3110113

南 京 林 业 大 学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目: *LhAP2*, *LhPIN1*, *LhWOX1*, *ClWOX1* 基因遗传转
化烟草的表型分析

作 者: 李美平

专 业: 细胞生物学

研究方向: 细胞分子生物学

指导教师: 施季森 教 授

陈金慧 教 授

二〇一四年六月

学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下进行的研究工作所取得的成果。尽我所知，除文中已经特别注明引用的内容和致谢的地方外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式注明并表示感谢。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者（本人签名）：李美平

2014年6月13日

学位论文出版授权书

本人及导师完全同意《中国博士学位论文全文数据库出版章程》、《中国优秀硕士学位论文全文数据库出版章程》（以下简称“章程”，见 www.cnki.net），愿意将本人的学位论文提交“中国学术期刊（光盘版）电子杂志社”在《中国博士学位论文全文数据库》、《中国优秀硕士学位论文全文数据库》中全文发表和以电子、网络形式公开出版，并同意编入 CNKI《中国知识资源总库》，在《中国博硕士学位论文评价数据库》中使用和在互联网上传播，同意按“章程”规定享受相关权益。

论文密级：

☐ 公开 ☒ 保密（2014年6月至2019年6月）（保密的学位论文在解密后应遵守此协议）

作者签名：李美平

导师签名：施学东

2014年6月13日

2014年6月15日

稿酬领取通知

学位论文出版后，杂志社向被录用论文作者支付稿酬，稿酬支付标准为博士论文作者一次性获得价值400元人民币的“CNKI网络数据库通用检索阅读卡”和100元人民币的现金稿酬；硕士论文作者一次性获得价值300元人民币的“CNKI网络数据库通用检索阅读卡”和60元人民币现金稿酬。

请作者直接与杂志社联系领取学位论文发表证书和稿酬。联系方式如下：

联系人：吴老师 电话：010-62791817（兼传真）、62793176、62701179（兼传真）

通讯地址：北京 清华大学邮局 84-48 信箱 采编中心 邮编：100084

分类号 Q785
密 级 XZ



学位代码 307
学校代码 10298
学 号 3110115

南 京 林 业 大 学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：杂交鹅掌楸 *WOX1* 基因的克隆与表达研究

作 者：吴 霜

专 业：生物化学与分子生物学

研究方向：分子生物学

指导教师：陈金慧 教 授

二〇一四 年 五 月

摘 要

杂交鹅掌楸是木兰科鹅掌楸属孑遗植物中国鹅掌楸与北美鹅掌楸的人工杂种。1963年由林木遗传育种学家叶培忠教授培育,表现出了明显的杂种优势,树形美观,叶形奇特,花苞大鲜艳,是重要的庭院绿化树种,也是重要的用材树种。

WUS 基因的表达可以维持分生组织细胞及诱导干细胞标志基因 *CLV3* 的表达,是茎顶端分生组织生长和发育所必需的。*WUS* 蛋白与其他转录因子相结合可以引导细胞的不同分化。而 *WUS* 的同源异型结构域由 66 个氨基酸残基组成,构成了复杂的 helix1-loop helix2-turn-helix3 空间结构,其功能是与特异 DNA 序列结合起作用。

调控因子 *WOX* (*WUSCHEL LIKE HOMEBOX*)类同源异型基因,在同源异型结构域的下游还有一个由 8 个氨基酸(TLPLFPMH)组成的保守的 *WUS box* 结构域。在模式植物拟南芥中,有 14 个 *WOX* 基因。*WOX* 基因是植物所特有的一类转录因子基因。根据现有的研究结果显示,植物所特有的 *WOX* 类转录因子对顶端发育以及细胞有丝分裂的调节起着非常重要的作用。在拟南芥中,*WOX1* 基因是 *SAM* 发育所必需的报告基因。过表达的 *WOX1* 很可能是通过减小了茎尖组织的大小导致了植株的矮小,使得叶片变小并且抑制了花粉囊开裂引起雄性不育。在分子生物学上研究证明了 *WOX1* 基因与干细胞 marker 基因 *CLV3* 是一种负反馈调节。

本课题主要是围绕杂交鹅掌楸,对关键转录调控基因 *WOX1* 基因进行克隆以及对表达水平,基因功能进行验证。

具体研究内容包括:

利用实验室已获得的杂交鹅掌楸转录组序列信息,克隆获得了干细胞调控基因 *WUSCHEL* 相关同源盒基因即 *WOX* 基因家族成员 *LhWOX1*。通过实时荧光定量 PCR 来研究 *LhWOX1* 基因在杂交鹅掌楸生长中的茎、叶、芽、花苞、花瓣、雄蕊、雌蕊等器官进行表达规律的分析。结果显示, *LhWOX1* 基因在杂交鹅掌楸成年树茎段中表达量最高,其次在花瓣、芽、叶片以及雌蕊中都有较高的表达。*LhWOX1* 基因在杂交鹅掌楸生长发育的各个部位都有表达并存在差异性,说明 *LhWOX1* 在杂交鹅掌楸的生长过程中起到了作用,并且在生殖发育过程中起到了作用。

使用 35S 启动子构建 *LhWOX1* 基因过量表达载体进行转基因功能验证,即转入野生型拟南芥 Col-0 中进行表型观察。通过观察过表达 *LhWOX1* 转基因拟南芥 T1、T2 代的表型,推测 *LhWOX1* 在干细胞调控中,影响了叶片、芽及花苞的形成,影响了器官的分化。*LhWOX1* 基因的过表达导致拟南芥的茎段部分发生卷曲和螺旋。在这些卷曲和螺旋化的茎段部位会增生出一些半透明状的突起组织,这些组织具有一定的分裂和分化的能力,可以分化成为叶片、芽类似器官、柱头类似器官、花苞等等。

利用扫描电镜对转基因阳性植株的茎段表面以及横切面进行细胞学观察,发现螺旋化的茎段表面有许多正在分化的组织,其中有一部分正在分化成为花苞。而横切面的电镜图片则显示造成茎段螺旋化以及茎段组织增生的原因是茎段内部的细胞增生。叶脉部位的扫描电镜图显示 *LhWOX1* 基因同样作用于叶脉部位,使得叶脉变粗,甚至从中萌发突起组织。结合茎段的横切面图片,茎段内组织增生的细胞层,以及茎中 *LhWOX1* 基因的高水平表达,维管系统可能是 *LhWOX1* 真正影响的部位。推测 *LhWOX1* 基因与植物的次生长相关。

对后期的 T2 代观察中,发现 *LhWOX1* 基因对转基因植株的生殖系统也造成了影响,在茎段表面增生出花苞结构以及柱头类似器官。在 T2 代种子的解剖观察中发现存在许多无胚的种子,说明过量的 *WOX1* 基因的表达对 T2 代种子的胚胎发育造成了影响。*LhWOX1* 基因所引起的 T2 代胚胎发育异常也值得继续观察研究。

关键词: 杂交鹅掌楸;干细胞调控; *WOX1* 基因;次生发育

分类号 S722
密 级 XZ



学位代码 307
学校代码 10298
学 号 3110119

南 京 林 业 大 学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目: *PtPRR5A*和*PtPRR5B* 基因的功能分析

作 者: 张伟娜

专 业: 生物化学与分子生物学

研究方向: 植物基因表达与调控

指导教师: 诸葛强 教 授

二〇一四年六月

摘 要

杨树是世界上重要造林绿化树种之一,也是生态防护林的主要树种。因其生长迅速,基因组相对较小,易于进行遗传研究等优点被作为林业研究的模式植物。植物生物钟是在与环境长期生存斗争中进化出来的一种适应性机制,它使生物体能够预测环境因素的变化,从而调节生理、代谢及发育过程。生物钟在植物的生长发育过程中发挥重要功能。本研究在从毛果杨中克隆的有关生物钟基因 *PtPRR5A* 和 *PtPRR5B* 的基础上,通过构建过量表达载体,采用农杆菌介导法转化南林 895 杨,通过分子检测和生理检测分析克隆基因 *PtPRR5A* 和 *PtPRR5B* 的表达及功能。主要研究结果如下:

(1)*PtPRR5A* 和 *PtPRR5B* 基因过量表达载体的构建。利用 pBI121 载体重组质粒,经酶切和测序证实正确后,转化大肠杆菌和农杆菌 EHA105,菌液 PCR 检测显示已成功构建了 *PtPRR5A* 和 *PtPRR5B* 基因过量表达载体。

(2)遗传转化中筛选压的确定。本研究以卡那霉素为筛选标记基因,通过实验选用卡那霉素 20mg/L 作为分化筛选时的选择压,选用卡那霉素 10mg/L 作为生根培养基的选择压,培养基中的头孢浓度为 200mg/L。转化效率最高为 36.2%。

(3)转 *PtPRR5A* 和 *PtPRR5B* 基因植株的获得和分子检测。采用农杆菌介导法转化南林 895 杨的叶片,获得转基因植株,并对转基因植株进行 PCR 检测、RT-PCR 检测和荧光实时定量检测,确定阳性植株。经筛选共获得转 *PtPRR5A* 基因植株 11 个株系,转 *PtPRR5B* 基因植株 9 个株系。

(4)在不同的光照条件下处理转基因植株,转 *PtPRR5A* 和 *PtPRR5B* 基因植株的株高与未转基因植株相比增高明显,而叶绿素含量增加最高达 39.2%。表明 *PtPRR5A* 和 *PtPRR5B* 基因可能通过调控杨树相关生物钟基因,在提高杨树生长量方面有一定作用,为研究杨树生物钟相关基因表达调控及新品种培育提供了依据。

关键词: *PtPRR5A*, *PtPRR5B*, 生物钟, 功能分析, 南林 895 杨

分类号 S722
密 级 XZ



学位代码 309
学校代码 10298
学 号 3110437

南京林业大学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目: *PeAFB* 基因在杨树生长发育中的功能分析

作 者: 邵志龙

专 业: 林木遗传育种

研究方向: 林业生物技术

指导教师: 陈英副教授

黄敏仁教授

二零一四年六月

摘要

杨树是一种重要的用材树种，具有较高的经济环保价值。杨树在我国分布广泛，生长较快，适应性强，繁殖容易，并且其基因组小，是林木育种研究的模式树种，为了提高经济和环保价值，开展对杨树的研究具有重要意义。

Auxin F-box (AFB) 基因家族属于转录因子，是生长素受体，可以在植物的生长素信号转导途径中调控生长素介导的信号转导，在植物的生长发育过程中有着重要的作用。本研究以南林 895 杨和欧美杂种山杨 T89 为材料，对 *AFB* 基因进行表达分析及功能验证的研究。

1. 利用生物信息学手段搜索鉴定南林 895 杨中 *AFB* 基因家族成员：

PeTIR1, *PeAFB2-1*, *PeAFB2-2*, *PeAFB2-3*, *PeAFB3*, *PeAFB5*, 采用 RACE 技术克隆获得其序列全长，并获得了相应 ORF，分别构建植物瞬时表达载体，利用 PEG 介导的杨树原生质体瞬时表达体系成功地对 *PeTIR1*, *PeAFB2-3*, *PeAFB3* 进行了亚细胞定位，结果表明 3 个基因均定位在细胞核内。

2. 对南林 895 杨采用低温、茉莉酸、PEG、脱落酸、DC3000 等处理，来研究目的基因 *PeTIR1*, *PeAFB2-3*, *PeAFB3* 在各种胁迫诱导下的表达模式，结果表明 3 个基因在胁迫诱导下表达量均发生较为明显的变化。

3. 利用 Gateway 技术构建目的基因 *PeTIR1* 的植物过量表达载体，采用农杆菌介导法转化欧美杂交山杨 T89，经潮霉素筛选，获得 31 株再生植株。通过 PCR 技术，荧光实时定量 PCR 技术等分子检测手段鉴定阳性转基因植株，并进行表型观测，阳性植株表现出矮化、根短的特点。

关键词：杨树；*AFB* 基因；生长素受体；*PeTIR*；

分 类 号 S722
密 级 GK



学位代码 309
学校代码 10298
学 号 3110438

南 京 林 业 大 学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：马尾松 CAD 和 CCoAOMT 基因的克隆与表达分析

作 者：张逢凯

专 业：林木遗传育种

研究方向：林木遗传改良

指导教师：季孔庶 教授

二〇一四年六月

摘 要

CAD 和 CCoAOMT 都是木质素生物合成中所需的酶, 已证实在木质素单体的合成中发挥重要的作用。马尾松是我国南方的重要用材树种, 但至今未见关于其 *CAD* 和 *CCoAOMT* 的研究报道。本文研究了马尾松中的两基因, 结果如下:

1、本研究利用CODEHOP设计简并引物, 采用RT-PCR和RACE技术, 从马尾松茎中克隆出*CAD*和*CCoAOMT*的cDNA全长, GenBank登入号分别为: KF419291和KF419292。*PmCAD*的cDNA全长1450bp, 包括1074bp完整的ORF, 编码357个氨基酸的蛋白, 所编码蛋白质的分子质量与等电点分别为38945.1u和5.8; *PmCCoAOMT*的cDNA全长1126bp, 包括780bp完整的ORF, 编码259个氨基酸的蛋白, 所编码蛋白质的分子质量与等电点分别为29068.3u和5.12。利用MEGA5.0、DNAMAN、ANTHEPROT等软件分析核苷酸序列及其编码的氨基酸序列。组织特异性分析结果, 马尾松*CAD*和*CCoAOMT*在嫩枝、根、叶和新芽中有不同程度的表达, 其中在嫩枝中的表达丰度最高, 在根和叶中次之, 在新芽中的表达丰度最低。

2、*PmCAD* 和 *PmCCoAOMT* 植物反义表达载体的构建以及在转基因植物中的表达。*PmCAD* 和 *PmCCoAOMT* 分别反向插入表达载体 pBI121 中, 采用液氮冻融法将载体导入农杆菌 EHA105 中, 用烟草叶盘做外植体材料将构建的反义表达载体转入烟草中, Klason 法测定植株中的木质素含量, 测定结果表明, 将 *PmCAD* 基因反向转入的烟草相对于野生型烟草中平均木质素含量降低较少, 将 *PmCCoAOMT* 基因反向转入的烟草相对于野生型烟草中平均木质素的含量降低了 6.6%, 两种转基因植物长势没有太大区别。

3、*PmCAD*基因的原核表达载体的分析。成功构建了*PmCAD*基因的原核表达载体, 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中进行诱导表达, 并对原核表达载体的外源诱导条件进行优化分析。诱导表达优化结果说明马尾松*CAD*在pH为7, 温度为37℃, IPTG为6.0时诱导3 h较好。并测得*PmCAD*基因在外源诱导表达的蛋白质分子质量约为39KDa。

关键词: 马尾松; 木质素合成; *CAD*; *CCoAOMT*; 表达分析

分类号 S722

密 级 GK



学位代码 309

学校代码 10298

学 号 3110439

南 京 林 业 大 学

研 究 生 硕 士 学 位 论 文

论文题目：马尾松 RCA 大小同工型基因的克隆和功能分析

专 业：林木遗传育种

研究方向：林木遗传改良

姓 名：潘 婷

导 师：季孔庶 教 授

二〇一四年六月

摘 要

马尾松(*Pinus massoniana*)是我国特有的乡土树种, 适应性强, 生长快, 用途广, 具有重要经济和环境价值, 所以对其功能基因进行研究, 尤其是光合作用相关基因进行的研究和利用具有重要意义。核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(RubisCO)是植物光合作用速率的关键酶也是限速酶, 但其活性低, 需要 RubisCO 活化酶(RCA)的活化。本论文以马尾松为材料, 对其 RCA 进行研究, 获得了以下结果:

通过反转录 PCR(RT-PCR)和 cDNA 末端快速扩增技术(RACE)从马尾松中克隆得到 RCA 大同工型和小同工型两个基因 *PMrca1* 和 *PMrca2*(登录号 KF420118 和 KF420119), 长度分别为 1816 和 1953bp, 开放阅读框长度分别为 1443bp 和 1323bp, 编码 480 和 440 个氨基酸。这两个蛋白质都属于 AAA⁺家族(ATPase associated with various cellular activities), 具有 RCA 特有的结构域和定位于叶绿体的转运肽, 且分别和美国红花槭的 RCA 大同工型和小同工型亲缘性达 78%。

通过 RT-PCR 克隆了马尾松 RCA 大小同工型的基因 cDNA 全长并通过酶切和 T4 酶连接将其分别插入到 pBI121 载体中构建其植物表达载体 pBI121-*rca1* 和 pBI121-*rca2*, 并通过叶盘法将载体分别转化烟草。通过抗性筛选和分子检测, 最终得到 9 株马尾松 RCA 大同工型基因转基因烟草植株和 7 株马尾松 RCA 小同工型转基因烟草植株。

观察转基因烟草和野生烟草的形态学表型发现, 与野生型烟草相比, 转马尾松 RCA 小同工型基因的烟草叶片数显著增多, 而转马尾松 RCA 大同工型的烟草的表型变化并不显著, 这说明马尾松 RCA 小同工型在烟草中的过量表达有利于烟草叶片的分化生长, 马尾松 RCA 大同工型对于烟草的生态学表型的影响比较小, 并不造成显著变化。

通过检测光合作用净速率对光照强度的反应曲线发现, 相对于野生型烟草, 转马尾松 RCA 大同工型基因的烟草和转马尾松 RCA 小同工型基因的烟草的最大光合速率分别上升 36%和 23%, 表观量子系数也分别提高了 32%和 16.2%, 但同时二者的光饱和点都提前 37.5%, 且暗呼吸速率则和光补偿点大幅下降。这说明马尾松 RCA 大小同工型都能提高烟草光合作用速率和对光能的利用能力与敏感性, 同时其过量表达会造成烟草暗呼吸速率增大。

通过 gateway 技术分别构建了马尾松 RCA 大同工型和小同工型与绿色荧光蛋白的融合蛋白的植物表达载体。

通过酶切和 T4 连接的方式将马尾松 RCA 大小同工型基因插入到了 pET-28a 质粒中构建了其原核表达载体, 通过诱导表达发现该原核表达载体的最佳 IPTG 浓度为 1.0mM, 适宜的导时间为 8h。

关键词: 马尾松、RCA、克隆、序列分析、表达载体构建

分 类 号 Q23

密 级 XZ



学位代码 309

学校代码 10298

学 号 3110443

南 京 林 业 大 学

硕 士 研 究 生 学 位 论 文

论文题目：异源三倍体百合种间杂交及其杂种后代的遗传分析

作 者：房磊

专 业：林木遗传育种

研究方向：细胞遗传学

指导教师：席梦利 副教授

施季森 教 授

二〇一四年六月

摘要

为了了解和研究观赏百合和异源三倍体百合的遗传规律以及在杂交育种中的应用价值,本研究利用涂片法对四种商品种百合进行了核型分析,对异源三倍体百合达诺('Ceb Dazzle')的花粉母细胞减数分裂过程中染色体的行为进行了观察以及采用基因组原位杂交技术,对达诺花粉母细胞减数分裂 I 中期过程中染色体的染色体行为以及 GHC-01(♀)×'Ceb Dazzle' (♂)的 2 个 F1 代个体进行了分析,同时采用核型分析方法,对 GHC-01(♀)×'Ceb Dazzle' (♂)杂交获得的 30 个杂交后代及其父母本进行了染色体数目的统计,以及利用 45S rDNA 荧光原位杂交技术,对父母本以及 10 个杂交后代进行了 45S rDNA 荧光原位杂交分析。主要实验结果如下:

(1)核型分析结果表明,‘白狐狸’('White Fox')核型为 3A,‘雷山’('Lei Shan')、‘水晶布兰卡’('Crystal Blanca')和‘康斯坦撒’('Constansa')的核型均为 3B,核不对称系数分别为 83.11%、82.78%、79.75%、81.22%。

(2)'Ceb Dazzle'花粉母细胞减数分裂过程的染色体行为观察结果基本与前人关于异源三倍体的研究结果相同。

基因组原位杂交结果表明, L 染色体组和 A 染色体组间有一定量的基因组间重组; F1 代个体 GHCD-04 存在父本独有的 A 染色体组染色体 1 个; F1 代个体 GHCD-15 存在 L 染色体组和 A 染色体组间的重组染色体一个。

(3)核型分析结果表明, GHC-01 和 'Ceb Dazzle' 的染色体数目分别为 24 ($2n=2x=24$)和 36 ($2n=3x=36$), 30 个杂交后代中染色体数目为 24、25、26、35、36 的分别有 13、10、4、2、1 个基因型的杂交后代; 荧光原位杂交结果表明, GHC-01 和 'Ceb Dazzle' 分别有 11 个和 14 个 45S rDNA 荧光原位杂交位点, 10 个所研究的杂交后代中均有不同数目的典型父本染色体, 结合对其 2 个后代的基因组原位杂交结果, 充分证明了其所研究 F1 杂种的真实性, 同时奠定了异源三倍体百合作为父本在百合杂交育种的可行性。

关键词: 百合; 杂交育种; 核型分析; 异源三倍体; 倍性变异; 荧光原位杂交.