

白桦 *BpDMPs* 基因家族生物信息学及 *BpDMP7* 功能分析

武思尧 王新宇 孙子腾 郑志民*

(东北林业大学林学院, 林木遗传育种全国重点实验室(东北林业大学), 哈尔滨 150040)

摘要 白桦(*Betula platyphylla*)作为多年生木本植物因生长周期较长、基因型复杂等问题, 育种过程中难以获得纯合植株和家系, 进而导致育种工作进展较慢。双单倍体(doubled haploid, DH)育种技术是近年来兴起的一种育种方法, 只需要两代即可得到纯合的植物家系。因此, DH 育种技术可以大大缩短林木育种周期并获得纯合家系, 而 *DMP* 基因的发现与应用为双单倍体种开辟了一个新的研究方向。该研究旨在通过生物信息学分析揭示白桦 *BpDMPs* 基因家族的理化性质、蛋白结构、系统进化、基因结构、染色体分布及其在白桦生长发育过程中潜在的功能; 通过表达模式分析鉴定该基因家族中具有单倍体诱导功能的白桦 *DMP* 基因, 并通过拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)回补试验验证基因功能。生物信息学分析结果显示: 在白桦中, *DMP* 基因包含 14 个基因家族成员, 分布在 6 条染色体上; 系统发育分析表明, *BpDMPs* 基因家族中 14 个基因分属 5 个分支; 对启动子顺式作用元件的预测分析表明, *BpDMPs* 基因家族的启动子中包含生长发育、激素代谢、胁迫响应等相关的反应元件。qRT-PCR 结果显示, *BpDMPs* 在白桦各组织中表达水平差异较大, 其中, *BpDMP2* 和 *BpDMP7* 在雄蕊中表达量较高, 拟南芥回补试验证明, *BpDMP7* 基因可以回补拟南芥 *dmp8dmp9* 突变体籽粒败育的表型。为进一步验证 *BpDMP7* 诱导白桦产生单倍体, 用 CRISPER/Cas9 基因编辑技术将该基因进行靶向敲除并获得突变体植株。该研究为进一步研究白桦 *BpDMPs* 基因家族的功能和调控机制提供了基础信息, 并为理解这些基因在植物生长发育及环境适应过程中扮演的角色提供了新的视角。

关键词 白桦; 单倍体诱导系; *DMP* 基因; 生物信息学

中图分类号: S792.153 文献标志码: A doi: 10.7525/j.issn.1673-5102.2025.05.008

Bioinformatics Analysis of the *BpDMPs* Gene Family in *Betula platyphylla* and Exploration of the Function of *BpDMP7* gene

WU Siyao WANG Xinyu SUN Ziteng ZHENG Zhimin*

(State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding(Northeast Forestry University), College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040)

Abstract Birch (*Betula platyphylla*), as a perennial woody plant, is difficult to obtain homozygous plants and families due to its long growth cycle and complex genotype, which leads to slow progress in its breeding work. Double haploid breeding technology is a breeding method that has emerged in recent years. It only requires two generations to obtain homozygous plant families. Therefore, double haploid breeding technology can greatly shorten the process of forest breeding and obtain homozygous families, while the discovery and application of the *DMP* gene has opened up a new research direction in doubled haploid breeding. This article aimed to study the *BpDMPs* gene family in birch, and revealed its physicochemical properties, protein structure, systematic evolution, gene structure, chromosome distribution, and potential functions in the growth and development process of birch through bioinformatics analysis; to identify the birch *DMP* gene with haploid induction function in the gene family through expression pattern analysis, and verify the gene function through *Arabidopsis* complementation experiments. The bioinformatics analysis results showed that birch contained 14 gene family members, distributed on six chromosomes. Phylogenetic analysis showed that 14 genes in the *BpDMPs* gene

基金项目: 中国博士后科学基金第 75 批面上项目(2024M750382)。

第一作者简介: 武思尧(1999—), 女, 硕士研究生, 主要从事林木遗传育种研究。

* 通信作者: E-mail: zmzheng@nefu.edu.cn。

收稿日期: 2025 年 2 月 19 日。

family belonged to five branches. The predictive analysis of *cis*-acting elements in the promoter of the *BpDMPs* gene family showed that the promoter contained response elements related to growth and development, hormone metabolism, stress response, and so on. The qRT-PCR results showed that there were significant differences in the expression levels of *BpDMPs* in various tissues of birch, with *BpDMP2* and *BpDMP7* having higher expression levels in the stamens. Through *Arabidopsis* complementation experiments, it was demonstrated that the *BpDMP7* gene can replenish the phenotype of *Arabidopsis dmp8dmp9* mutant grain sterility. This article provided basic information for further studying the functions and regulatory mechanisms of the *BpDMPs* gene family, and offered a new perspective for understanding the roles these genes play in plant growth, development, and environmental adaptation processes.

Key words birch; haploid induction system; *DMP* gene; bioinformatics

白桦 (*Betula platyphylla*) 是桦木科 (Betulaceae) 桦木属 (*Betula*) 落叶乔木, 目前主要的繁殖方式有种子繁殖、扦插、压条等。因分布广泛、形态变异复杂, 白桦良种的优良性状难以保持, 且白桦的开花时间为 3~5 a, 以传统育种方式选育优良家系或优良单株育种周期较长。在实际生产中, 由于林木自身生长周期较长且基因型复杂, 使得林木育种工作进展较慢。相较于传统育种方法的多世代自交和回交, 利用倍性育种技术, 创制双单倍体 (double haploid, DH) 可以在 2 代内固定单倍型, 在有效缩短育种周期的同时, 还能够选择和固定优良性状^[1]。故利用 DH 育种技术, 创制林木的 DH 植株和家系, 可高效解决现阶段林木育种中的瓶颈问题。

DH 是由单倍体植株经染色体加倍获得的, 单倍体的获得方式可分体外诱导和体内诱导 2 种^[2]。体外诱导是通过培养单倍体细胞的方式获得^[3], 如花粉、花药离体培养和子房离体培养、胚乳离体培养等; 体内诱导方式多样, 有种间杂交、利用单倍体诱导系进行种内杂交、利用 CENH3 着丝粒组蛋白进行体内诱导、孤雌生殖诱导、对花粉进行处理等^[2]。

体外诱导的育种方法最早可追溯至 20 世纪 60 年代, Guha 和 Maheshwari^[4] 通过体外培养曼陀罗 (*Datura stramonium*) 花药产生单倍体胚胎和植株。这种体外培养配子体的诱导方式目前应用仍然较为广泛, 如大麦 (*Hordeum vulgare*)、小麦 (*Triticum aestivum*)、洋葱 (*Allium cepa*)、胡萝卜 (*Daucus carota*)、水稻 (*Oryza sativa*)、土豆 (*Solanum tuberosum*) 等农作物都通过该方法获得了单倍体^[5-9]。林木中也有诸多物种利用体外诱导获得单倍体, 王敬驹等^[10] 早在 20 世纪 60 年代就利用花药离体培养获得欧洲黑杨 (*Populus nigra*) 的单倍体植株, 随后在其他品系的杨树和杂交品系中也通过此种方

法获得了单倍体^[11-14]; 除杨树外, 研究人员在其他木本植物中通过花药、花粉体外诱导技术也获得了单倍体, 如大叶合欢 (*Albizia lebbbeck*)^[15]、茶树 (*Camellia sinensis*)^[16]、印楝 (*Azadirachta indica*)^[17]、栓皮栎 (*Quercus suber*)^[18]、麻风树 (*Jatropha curcas*)^[19]、柬埔寨茶 (*Camellia assamica* ssp. *lasiocalyx*)^[20] 等。Cardemil 和 Jordan^[21] 通过培养雌配子体获得了智利南洋杉 (*Araucaria araucana*) 单倍体; Li 等^[22] 通过胚乳离体培养获得南方红豆杉 (*Taxus chinensis* var. *mairei*) 单倍体; Winton 和 Einspahr^[23] 对花药进行热处理后杂交获得杨树单倍体; Li 等^[24] 高温处理雌花获得孤雌生殖的杜仲 (*Eucommia ulmoides*) 单倍体。随着研究手段和研究方法的推陈出新, 体外培养单倍体的效率虽有所提高, 但这种诱导方式依旧存在很多弊端, 如对植物基因型高度依赖, 组织培养过程中发生突变的概率高, 培养过程耗费人力物力等^[1-3, 9]。除此之外, 还有许多重要的双子叶植物作物, 如茄科 (Solanaceae)^[25] 和葫芦科 (Cucurbitaceae)^[26] 的成员, 仍然对体外单倍体诱导具有抗性, 至今尚未有通用的体外诱导单倍体的体系能够适用所有物种。

在体内诱导获得单倍体的方式中, 利用单倍体诱导系进行种内杂交获得单倍体植株的方式在单、双子叶植物中均有报道, 这种育种方式不需要任何组织培养步骤, 能够通过简单的杂交产生单倍体胚胎和植株。单倍体诱导系的概念^[27] 最早于 1959 年提出, 密苏里大学的 Edward 教授在试验田中发现 1 个可以诱导单倍体的玉米 (*Zea mays*) 品系并命名为 Stock6, 该品系作为父本与不同的母本杂交时有 2%~3% 的概率可产生单倍体, 因此, Edward 将 Stock6 称作“单倍体诱导系”。对 Stock6 及其衍生系进一步研究发现, 玉米单倍体诱导能力主要受 2 个关键的数量性状位点控制: *qhir1* (*ggi1*) 和 *qhir8*, 这 2 个数量性状位点分别可以解释

66% 和 20% 单倍体诱导率(HIR)的遗传变异^[28-31]。虽然 Stock6 可诱导产生玉米单倍体的现象在 60 多年前就被发现,但其生物学机制仍不清楚。近年来,一些关键的影响玉米 HIR 的数量性状位点 QTLs 已经被定位:主效 QTL(可解释 66% 的遗传变异)位于 1 号染色体 bin1.04 的 *qhir1*,通过对该区域进行图位克隆,定位到 *MTL/PLA1/NLD* (*MATRI-LINEAL/patatin-like phospholipaseA1/NOT LIKE DAD*) 基因^[32-34],该基因羧基末端有 4 个碱基插入,编码花粉特异性磷脂酶;微效 QTL(可解释 20% 的遗传变异)位于 9 号染色体 bin 9.01 上的 *qhir8*,通过对该区域进行图位克隆,定位到 *DMP* (*DOMAIN OF UNKNOWN FUNCTION 679 membrane protein*) 基因,该基因中的单核苷酸突变导致氨基酸序列变化,编码 1 个未知功能结构域的蛋白。*DMP* 基因是花粉特异性表达基因,其上有 1 个单核苷酸突变,导致第 1 个预测的跨膜结构域中的单个氨基酸替换,进而导致该基因发生突变。玉米 *ZmMTL/PLA1/NLD* 基因突变,HIR 为 2%~3%;玉米 *ZmDMP* 基因突变,HIR 为 0.1%~0.3%,当 2 个基因同时突变时,HIR 可提高至 6%~10%^[35]。

在水稻^[36]和小麦^[37-38]中 *ZmMTL/PLA1/NLD* 同源基因功能丧失也会诱导母体产生单倍体,但由于缺乏可识别的 *ZmMTL/PLA1/NLD* 同源基因,这种方法尚未应用于双子叶植物。相比之下,双子叶植物中 *DMP* 基因比较保守,是定位在植物花粉中的 1 个编码跨膜蛋白的基因,其上有 1 个保守的跨膜结构域 DUF679^[39-40]。该基因突变后使植物在双受精过程中,精、卵细胞无法进行正常的膜融合,而只进行中央细胞的单受精,从而产生单倍体植株^[9]。目前,*DMP* 基因在单、双子叶植物中均保守存在,在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)^[41]、番茄 (*Solanum lycopersicum*)^[42]、蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*)^[43]、西瓜 (*Citrullus lanatus*)^[44]、黄瓜 (*Cucumis sativus*)^[45]、烟草 (*Nicotiana tabacum*)^[46]、欧洲油菜 (*Brassica napus*)^[46]、棉花 (*Gossypium hirsutum*)^[47]、土豆^[48] 等中均有报道该基因突变后可诱导产生单倍体。

本研究系统分析白桦 *BpDMPs* 基因家族,通过鉴定基因家族成员,分析基因结构和染色体分布,构建系统发育树,进行蛋白质功能域、顺式作用元件分析以及物种共线性分析,揭示 *BpDMPs* 基因家族在白桦中具有多样性和复杂性。本研究利用

qRT-PCR 对白桦不同组织的 *BpDMPs* 基因家族成员进行表达量检测,鉴定该基因家族中是否存在具有诱导单倍体功能的基因,之后将候选基因回补至拟南芥突变体中进行验证,进而探讨其在白桦生长发育过程中潜在的功能。同时,本研究利用 CRISPER/Cas9 基因编辑技术和白桦遗传转化技术将该候选基因进行靶向敲除并获得突变体植株,为进一步探讨白桦 *DMP* 诱导单倍体的功能研究做准备。诱导单倍体的相关基因大都在草本植物或农作物中有相关报道,在林木中鲜有相关研究。本研究结果可为白桦 *BpDMPs* 基因家族成员的功能分析及白桦的单倍体分子育种提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究采用东北林业大学校园内野生型白桦为试验材料。试验所用种子来源于东北林业大学白桦强化种子园,通过白桦遗传转化获得转基因株系及突变体。

拟南芥 *dmp8dmp9* 突变体为 Col-0 背景的生物转移材料,来自中国农业国家玉米改良中心;所有拟南芥生长在 20 °C 的生长室(相对湿度 70%)中,每周浇 2 次水。拟南芥在 LED 光照下保持 16 h 光照/8 h 黑暗周期。

1.2 试验方法

1.2.1 白桦 *BpDMPs* 基因家族成员鉴定及理化性质预测

以玉米 *ZmDMP* 基因为参考基因,以高质量白桦参考基因组为参考基因组^[49]。共筛选出 17 个白桦候选基因(附表 1,见本刊网站)。使用在线分析软件 SMART(https://smart.embl.de/smart/change_mode.cgi)预测 17 个白桦候选基因的保守功能结构域,去除不含有特征结构域的基因后依次命名为 *BpDMP1~BpDMP14*。使用在线分析软件 expasy(<https://www.expasy.org/>)分析白桦 *BpDMPs* 基因家族编码蛋白氨基酸数目、分子质量、等电点及总平均亲水性。使用在线分析网站 <http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/> 预测白桦 *BpDMPs* 基因家族编码蛋白亚细胞定位。

1.2.2 常见植物系统发育分析

在 NCBI 等网站下载玉米、拟南芥、大豆 (*Glycine max*) 等 12 个物种的 *DMP* 基因家族编码蛋白序列(附表 2,见本刊网站)。使用 MEGA7 对 12 个

物种的 *DMP* 基因家族及白桦 *DMP* 基因家族的蛋白序列构建系统发育进化树,进行多序列比对,将比对结果在 MODELS 进行合适的模型预测,选择最合适的模型用最大似然法构建系统发育进化树。将生成的进化树导入在线网站 iTOL(<https://itol.embl.de/>)进行可视化。

1.2.3 保守结构域、保守基序和基因结构分析

用 TBtools 软件对白桦 *DMP* 基因家族编码蛋白进行序列比对,标注保守结构域。将白桦 *DMP* 基因家族编码蛋白导入在线网站 MEME(<https://meme-suite.org/meme/>)进行 Motif 分析,下载 MEME result 中的 Motif 分析结果,使用 TBtools 将结果可视化。从白桦基因组注释文件 GFF 中下载白桦 *DMP* 基因位置信息,使用 TBtools 中 Visualize Gene Structure (from GTF/GFF3 File) 程序将白桦 *DMP* 基因结构可视化。

1.2.4 染色体定位分析

在 TBtools 软件中导入白桦染色体信息,输入 *BpDMPs* 基因号,使用 Gene Location Visualize from GTF/GFF 进行染色体定位分析。

1.2.5 启动子顺式作用元件分析

使用 TBtools 软件获取 14 个白桦 *DMP* 基因起始密码子上游 2 000 bp 序列作为白桦 *DMP* 基因启动子序列。使用在线分析网站 <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/> 对启动子进行顺式作用元件分析,使用 TBtools 将结果可视化。

1.2.6 共线性分析

在 NCBI 网站下载拟南芥、玉米、毛果杨 (*Populus trichocarpa*) 基因组。输入 TBtools 软件进行共线性分析,使用 TBtools 软件中 Advanced Circos 插件进行种内及白桦和拟南芥、玉米、毛果杨物种间共线性分析的可视化。

1.2.7 白桦 *BpDMPs* 基因家族的组织表达特异性分析

以野生型白桦的雄蕊、雌蕊和叶片为试验材料,用植物 RNA 提取试剂盒 (DNase I) (康为世纪,中国) 提取试验材料的总 RNA,然后使用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Takara, 日本) 反转录试剂盒进行反转录获得 cDNA。以 *BpTubulin* 基因为内参基因 (附表 3, 见本刊网站), 根据 cDNA 序列信息设计引物 (附表 3), 以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR, 反应程序为 95 °C 预

变性 5 min, 95 °C 变性 5 min, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 72 °C 终延伸 5 min, 循环数为 35^[50], 结果按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算相对表达量并进行分析^[51]。

1.2.8 拟南芥转基因

用附表 4 (见本刊网站) 中引物构建拟南芥回补载体, 将构建好的载体转化至农杆菌 (*Agrobacterium*) 中, 过夜培养至 OD₆₀₀ 为 1.5 左右。将 200 mL 菌液分装至 50 mL 离心管中, 4 000 g 离心 10 min, 收集菌体沉淀。每 200 mL 离心出来的菌体沉淀加入等量悬浮液。200 mL 悬浮液中含有 10 g 蔗糖 (5%) 和 40 μL Silwet L-77 (0.02%)。用浸花法浸染拟南芥未开放花苞, 暗处理 16~24 h。放入生长室, 正常培养至成熟。

1.2.9 拟南芥籽粒发育情况观测

拟南芥角果的观测及籽粒数目计数方法参照 Cyprys 等^[39] 文献。取授粉后约 15 d 的拟南芥角果, 放入 V(乙醇):V(乙酸) 为 3:1 的溶液中透明。在体积分数 70% 乙醇中孵育 1 h, 然后储存在含有体积分数 30% 甘油和体积分数 0.1% Triton X-100 的水中。使用 Zeiss 体式显微镜观察和拍摄。

1.2.10 遗传转化方法

根据基因编辑引物设计原则设计引物 (附表 5, 见本刊网站), 使用 T4 连接酶将二聚化引物连入 pSC1-CRISPR-*BpU6-2* 载体, 经菌液鉴定和 Sanger 测序后将构建成功的载体分别转化农杆菌 EHA105, 使用农杆菌介导的白桦合子胚遗传转化法获得转基因材料^[52], 以 Basta 为选择试剂, 筛选转基因阳性植物。

2 结果与分析

2.1 白桦 *BpDMPs* 基因家族生物信息学分析

2.1.1 白桦 *BpDMPs* 基因家族鉴定及编码蛋白质理化性质分析

将玉米 *ZmDMP* 编码蛋白质序列在白桦数据库中进行本地 BLAST 检索, 共得到 17 个白桦基因。对 17 个白桦基因序列进行结构域预测, 有 14 个候选基因包含 DUF679 保守结构域, 按照蛋白质相似数值从大到小依次命名为 *BpDMP1*~*BpDMP14* (表 1)。对白桦 *BpDMPs* 基因家族编码蛋白质理化性质分析表明, 14 个候选基因的编码蛋白质理化性质差异较大。氨基酸数目从 107 个到 363 个氨基酸不等, 其中, 氨基酸数量最少的是 *BpDMP14* 编码蛋白, 氨基酸数量最多的是

BpDMP10 编码蛋白;分子质量大小从 11 381.06 到 39 524.96 不等,其中,分子质量最小的是 *BpDMP14* 编码蛋白,分子质量最大的是 *BpDMP10* 编码蛋白;等电点大小从 5.56 到 9.64 不等,等电点最小的是 *BpDMP10* 编码蛋白($pI=5.56$),等电点最大的是 *BpDMP14* 编码蛋白($pI=9.64$);白桦 *BpDMPs* 基因家族编码蛋白中的总平均亲水值有正值和负值,除 *BpDMP10* 和 *BpDMP14* 编码蛋白总平均亲水

值为负值是亲水蛋白外,家族中其余基因编码蛋白的总平均亲水值均为正值,为疏水蛋白。亚细胞定位预测结果表明,白桦 *BpDMPs* 基因家族编码蛋白在细胞内分布较广,其中, *BpDMP1* 编码蛋白分布在叶绿体中, *BpDMP4* 编码蛋白分布在叶绿体、线粒体、细胞核中, *BpDMP5* 编码蛋白分布在细胞膜和细胞壁中, *BpDMP9* 编码蛋白分布在叶绿体中,家族中的其余基因均分布在细胞膜中(表 1)。

表 1 白桦 *BpDMPs* 基因家族编码蛋白理化性质

Table 1 Analysis of the physicochemical properties of the proteins encoded by *BpDMPs* gene family in birch

基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	所在染色体 Chromosome	基因位置 Gene location	氨基酸数目 Number of amino acids	分子质量 Molecular mass/Da	等电点 Isoelectric point	总平均亲水性 Total average hydrophilicity	亚细胞定位 Subcellular location
<i>BpDMP1</i>	BPChr08G17023	8	38650991-38651641	216	23 342.28	6.50	0.292	CP
<i>BpDMP2</i>	BPChr07G18894	7	22585554-22586180	208	22 727.21	5.61	0.279	CM
<i>BpDMP3</i>	BPChr11G17728	11	3219693-3220379	228	24 285.32	9.18	0.347	CM
<i>BpDMP4</i>	BPChr11G13419	11	25274063-25274683	206	22 923.87	9.03	0.264	CP, Mito, Nucleus
<i>BpDMP5</i>	BPChr08G05126	8	10638147-10638761	204	21 735.80	8.54	0.093	CM, CW
<i>BpDMP6</i>	BPChr01G23597	1	6378106-6378753	215	24 248.03	8.15	0.191	CM
<i>BpDMP7</i>	BPChr06G30721	6	19021326-19021925	199	21 589.71	5.84	0.232	CM
<i>BpDMP8</i>	BPChr08G05134	8	10612115-10612687	190	20 441.58	8.66	0.357	CM
<i>BpDMP9</i>	BPChr12G26817	12	3237953-3238363	156	17 233.41	9.13	0.160	CP
<i>BpDMP10</i>	BPChr06G30778	6	19025688-19026779	363	39 524.96	5.56	-0.182	CM
<i>BpDMP11</i>	BPChr10G03440	10	10633218-10633790	190	20 246.45	8.79	0.297	CM
<i>BpDMP12</i>	BPChr10G03567	10	10667452-10668458	198	21 427.86	9.08	0.360	CM
<i>BpDMP13</i>	BPChr10G03436	10	10671858-10672481	207	22 453.96	6.25	0.561	CM
<i>BpDMP14</i>	BPChr10G03476	10	10661594-10661917	107	11 381.06	9.64	-0.040	CM

注: CP. 叶绿体; CM. 细胞膜; Mito. 线粒体; Nucleus. 细胞核; CW. 细胞壁。

Note: CP. Chloroplast; CM. Cell membrane; Mito. Mitochondria; CW. Cell wall.

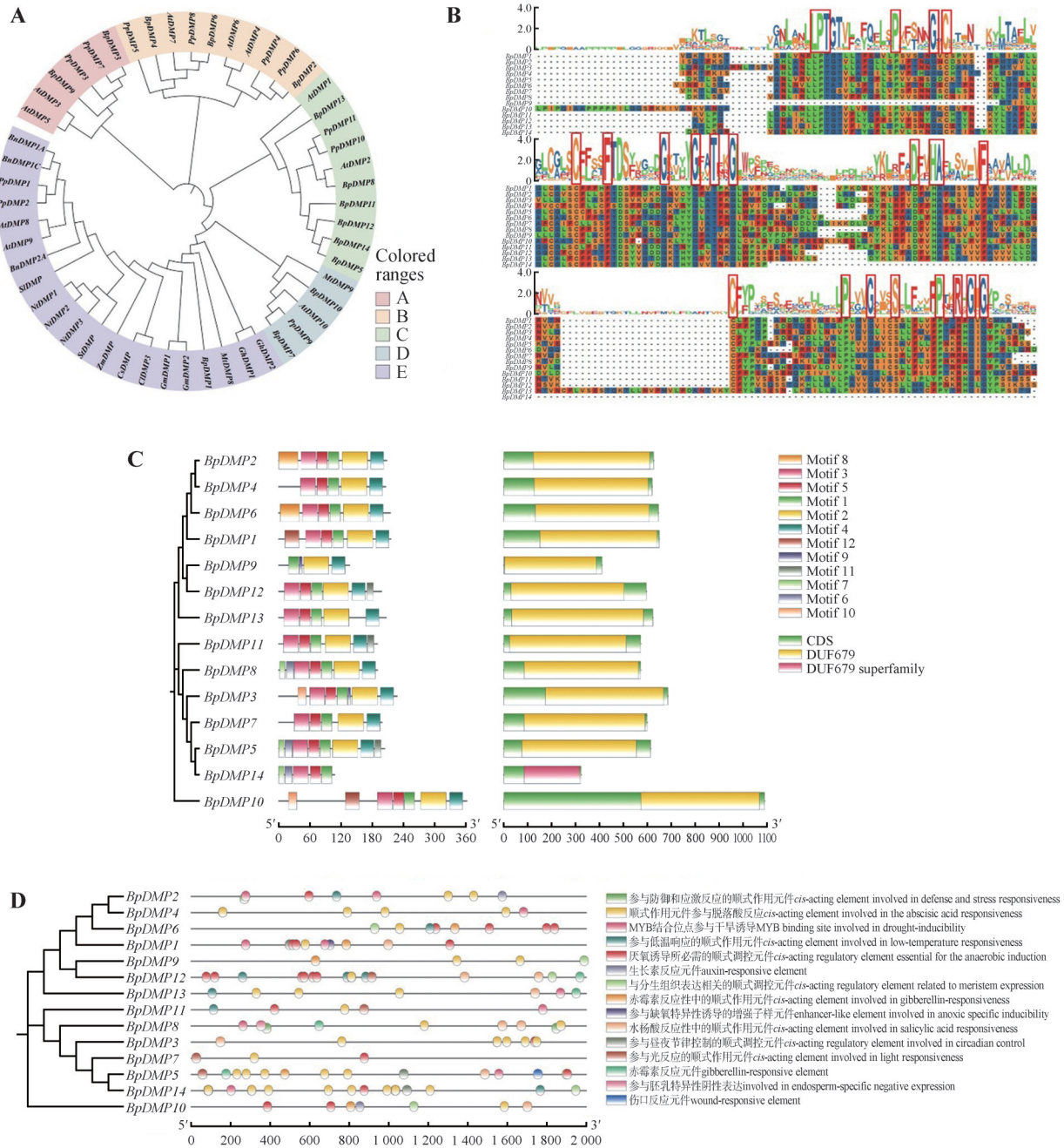
2.1.2 白桦 *BpDMPs* 基因家族系统发育分析

为明确白桦 *BpDMPs* 基因家族的系统发育进化关系,将白桦、番茄、土豆、欧洲油菜、蒺藜苜蓿、棉花、烟草、大豆、黄瓜、西瓜、玉米、拟南芥、毛果杨共 13 个物种的 *DMP* 基因编码蛋白序列进行比对并构建系统发育树。使用 MEGA7 进行进化树分析,将结果导入在线网站 iTOL 进行可视化分析(图 1A),根据进化树的亲缘关系远近,将结果分为 A、B、C、D、E, 5 组均有白桦的 *DMP* 基因分布。从系统发育树来看, *BpDMP1* 与 E 组中的棉花、蒺藜苜蓿、大豆、拟南芥、玉米、番茄等物种的 *DMP* 基因亲缘关系较近, *BpDMP7* 基因与拟南芥 *AtDMP10* 编码蛋白质序列相似度更高。此外,相较于拟南芥、大豆等物种,白桦与毛果杨 *DMPs* 基因家族基因分化程度更低。

2.1.3 白桦 *BpDMPs* 基因家族保守结构域、保守基序和基因结构分析

使用 TBtools 软件,进一步分析得到的 *BpDMPs* 基因家族编码蛋白序列,对白桦中的 14 个 *DMPs* 编码蛋白序列进行多序列比对(图 1B),结果发现: *BpDMPs* 基因家族编码蛋白序列相似度较高,家族内存在多个保守的氨基酸。

为进一步探究 *BpDMPs* 基因家族中各基因结构特征,对 *BpDMPs* 基因家族的保守基序和基因结构进行分析。使用 MEME 在线工具和 TBtools 联合绘图得到分析结果(图 1C)。保守基序分析结果显示: Motif 2 为 *DMP* 基因家族特有结构域 DUF679,除 *BpDMP14* 外, *BpDMPs* 基因家族成员均含有 DUF679 保守结构域,但 *BpDMP14* 含有 DUF679 超级家族结构;在 14 个家族基因中, *BpD-*



Bp. 白桦; Sl. 番茄; St. 土豆; Bn. 欧洲油菜; Mt. 蕨藜苜蓿; Gh. 棉花; Nt. 烟草; Gm. 大豆; Cs. 黄瓜; Cl. 西瓜; Zm. 玉米; At. 拟南芥; Pp. 毛果杨。红框为保守区域。A. 白桦、番茄、土豆、欧洲油菜、蕨藜苜蓿、棉花、烟草、大豆、黄瓜、西瓜、玉米、拟南芥、毛果杨 *DMP* 基因系统发育树; B. 白桦 *BpDMPs* 基因家族保守结构域分析; C. 白桦 *BpDMPs* 基因家族保守基序(左)和基因结构分析(右); D. 白桦 *BpDMPs* 基因启动子顺式作用元件分析。

Bp. Birch; Sl. Tomato; St. Potato; Bn. Edible rape; Mt. *Medicago truncatula*; Gh. Cotton; Nt. Tobacco; Gm. Soybean; Cs. Cucumber; Cl. Watermelon; Zm. Corn; At. *Arabidopsis*; Pp. Black cottonwood. The red box represented the conservative area. A. *DMP* phylogenetic trees of birch, tomato, potato, edible rape, *Medicago truncatula*, cotton, tobacco, soybean, cucumber, watermelon, corn, *Arabidopsis* and black cottonwood; B. Conservative domain analysis of *BpDMPs* gene family in birch; C. Conservative motif (left) and gene structure (right) analysis of the *BpDMPs* gene family in birch; D. Analysis of *cis*-acting elements in the promoter of the *BpDMPs* gene in birch.

图1 白桦 *BpDMPs* 基因家族生物信息学分析

Fig.1 Bioinformatics analysis of the *BpDMPs* gene family in birch

MP9 的保守基序最少,为 4 个, *BpDMP5* 的保守基序最多,为 8 个;除 *BpDMP9*、*BpDMP14* 和 *BpDMP3* 外, *BpDMPs* 基因家族成员均含有 Motif 3+Motif 5+Motif 1+Motif 2+Motif 4 的连续保守基序组合,说明该基序组合在 *BpDMPs* 基因家族中可能发挥重要作用,其中, *BpDMP3* 拥有 Motif 3+Motif 5+Motif 1+Motif 9+Motif 2+Motif 4 的连续保守基序组合。 *BpDMPs* 基因家族基因结构分析结果显示,该家族基因结构比较相似,均不含有内含子,全部为外显子,除 *BpDMP9*、*BpDMP14* 和 *BpDMP10* 外, *BpDMPs* 基因家族成员的基因长度大约在 600~700 bp,最长的是 *BpDMP10*,为 1 092 bp,基因长度最短的是 *BpDMP14*,为 324 bp。

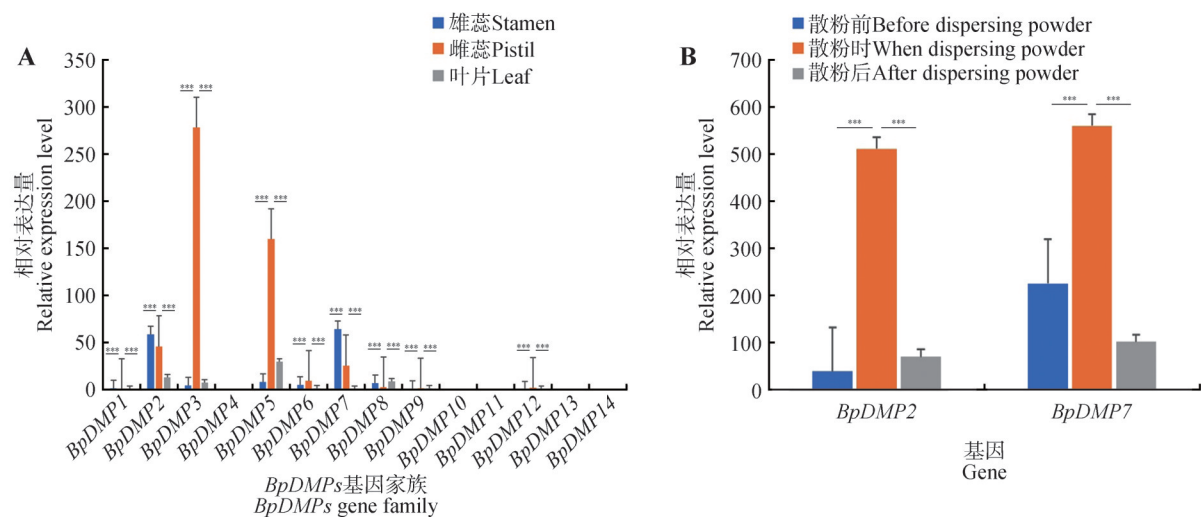
2.1.4 白桦 *BpDMPs* 启动子顺式作用元件分析

为了研究白桦 *BpDMPs* 基因家族对白桦生长发育的调控,对 *BpDMPs* 基因家族启动子区域的顺式作用元件进行预测分析。结果表明,在每个 *BpDMPs* 基因家族基因启动子上都存在多个不同功能的顺式作用元件(图 1D),共可分为 3 个部分:一是响应不同逆境胁迫反应的元件,包括防御和应激、干旱胁迫、低温胁迫元件;二是响应不同激素反应的元件,包括水杨酸、脱落酸、赤霉素和茉莉酸甲酯的响应元件;三是光通路过程相关元件,

包括光感应元件、光响应元件、光调控元件等。由此说明, *BpDMPs* 基因家族在白桦的光形态建成及生长发育等过程可能发挥重要作用。除此之外,还存在少量厌氧诱导反应元件、昼夜节律反应元件、分生组织相关反应元件、玉米醇溶蛋白代谢调控的顺式作用元件等。这些元件的存在也表明, *BpDMPs* 基因家族在调控白桦的逆境胁迫、激素变化、光利用、生长发育等方面都发挥着重要作用。

2.2 白桦 *BpDMPs* 基因家族表达模式分析

在拟南芥中具有诱导产生单倍体功能的 *DMP* 基因在花粉中特异性表达^[35,39],为了研究 *BpDMPs* 基因家族中是否具有诱导产生单倍体功能的 *DMP* 基因,检测了 *BpDMPs* 基因家族所有基因在白桦不同生殖组织(雄蕊、雌蕊)及叶片的相对表达量(图 2A)。结果显示, *BpDMP2*、*BpDMP7* 在雄蕊的表达量较高。为进一步探究 *BpDMP2* 和 *BpDMP7* 基因的表达模式,检测了这 2 个基因在雄蕊散粉前、散粉时和散粉后的表达情况(图 2B),结果显示, *BpDMP2* 和 *BpDMP7* 基因均在雄蕊散粉时表达量极高。上述试验结果表明, *BpDMP2* 和 *BpDMP7* 是白桦 *BpDMPs* 基因家族中具有诱导单倍体功能的候选基因。



A. 白桦 *BpDMPs* 基因家族在不同组织相对表达量; B. 白桦 *BpDMP2*、*BpDMP7* 基因在雄蕊的表达模式。图 2A 显著性为每个基因雄蕊分别与雌蕊和叶片通过 Student's *t*-test 得到;图 2B 显著性为每个基因散粉前分别与散粉时和散粉后通过 Student's *t*-test 得到 (***, $P < 0.001$)。

A. Relative expression level of *BpDMPs* gene family in different tissues; B. Expression pattern of *BpDMP2*, *BpDMP7* gene in stamens of birch. The significance of Fig.2A was obtained by Student's *t*-test for each gene of the stamens, pistils, and leaves; the significance of Fig.2B was obtained by Student's *t*-test for each gene before dispersing powder, dispersing powder and after dispersing powder (***, $P < 0.001$).

图 2 白桦 *BpDMPs* 基因家族组织表达分析

Fig.2 Analysis of tissue expression of *BpDMPs* gene family in birch

2.3 *BpDMP7* 基因回补拟南芥 *dmp8dmp9* 双突变体

拟南芥 *AtDMP8* 和 *AtDMP9* 具有诱导产生单倍体的功能, 突变体表型为籽粒败育, 且拟南芥 *dmp8dmp9* 双突变体的籽粒败育更为明显。若经结构域比对将蛋白序列相似度高的候选基因回补至拟南芥 *dmp8dmp9* 双突变体中, 该基因可以弥补拟南芥突变体的籽粒败育表型, 那么就证明候选基因的功能与拟南芥 *AtDMP8* 和 *AtDMP9* 一致^[46]。在拟南芥 *AtDMPs* 基因家族中各基因表达情况大不相同, 只有 *AtDMP8*、*AtDMP9*、*AtDMP10* 基因在花中表达^[40], 而在精细胞中特异性表达的只有 *AtDMP8* 和 *AtDMP9*^[39]。结合生物信息学分析, 在白桦中 *BpDMP7* 基因与 *AtDMP10* 基因分支距离最近, 这说明 *BpDMP7* 基因在白桦的生物进化过程中与有性生殖相关, 所以在构建拟南芥回补载体时, 选择更具有代表性的 *BpDMP7* 基因, 因此构建 *pBpDMP7::BpDMP7*、*pAtDMP9::BpDMP7*、*p35s::BpDMP7* 等 3 种回补载体 (图 3A) 回补至拟南芥 *dmp8dmp9* 双突变体中。结果显示, 与 *dmp8dmp9* 双突变体对比, 在转基因 T1 代 3 个载体回补后拟南芥的籽粒败育现象明显减少 (图 3B、3C), 表明 *BpDMP7* 基因能够在一定程度上回补拟南芥 *dmp8dmp9* 在双受精过程中的功能丧失^[39,41,53]。

2.4 *BpDMP7* 基因编辑及纯合突变体的获得

为探究 *BpDMP7* 基因是否能够诱导白桦产生单倍体, 用 CRISPER/Cas9 基因编辑技术将该基因进行靶向敲除。对 *BpDMP7* 基因进行基因结构分析可知, 该基因全长 600 bp, 无内含子, CDS 上有

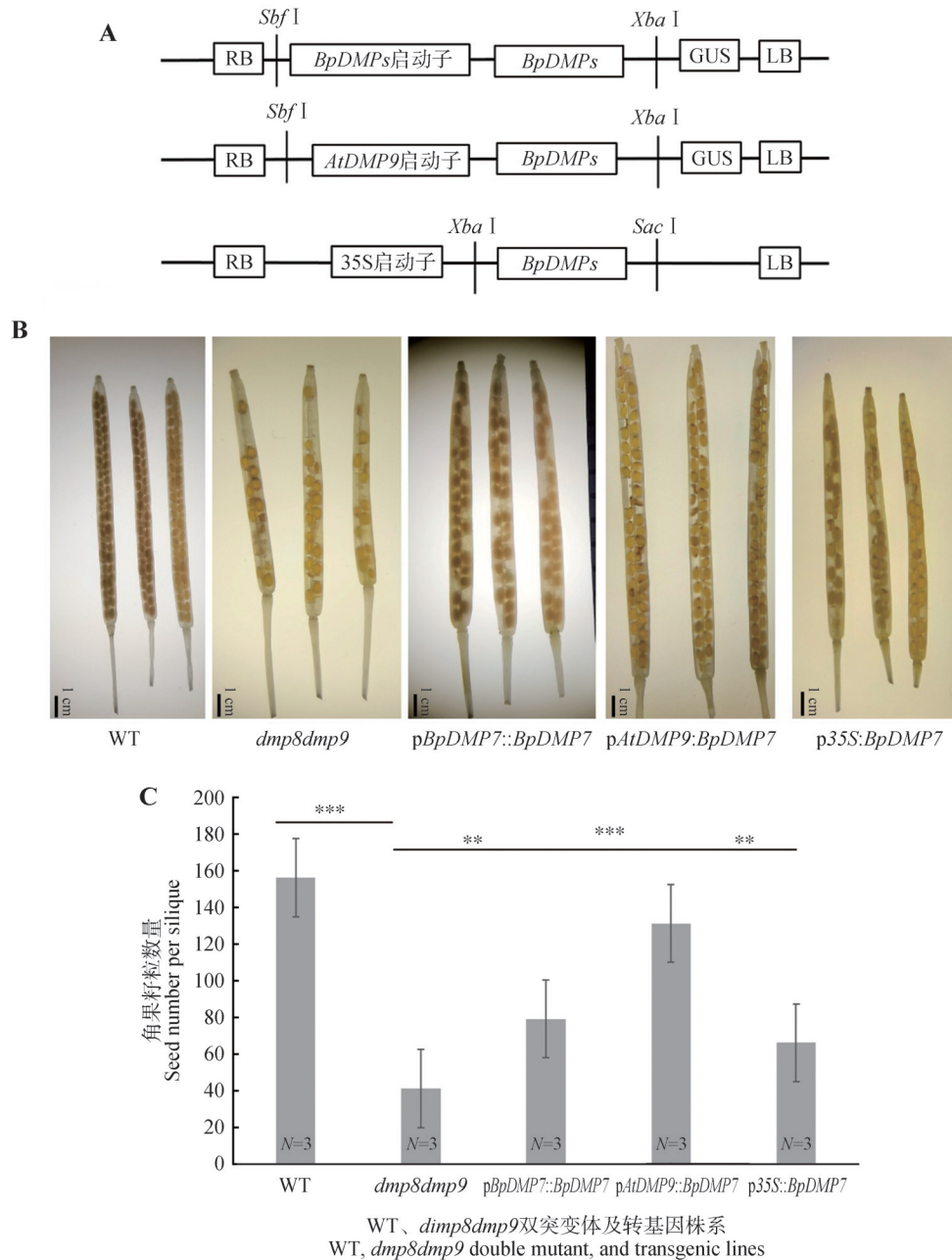
保守的功能结构域 DUF679 和多个跨膜结构域 (图 4A)。在如图所示的位置, 根据基因编辑靶点设计原则共设计 3 个靶点 (附表 5), 其中 2 个在功能结构域上, 1 个不在功能结构域上。采用合子胚遗传转化的方法对白桦进行遗传转化, 分为共培养、选择培养、分化培养、继代培养、生根培养及炼苗移栽 6 个主要流程 (图 4B)。白桦 *BpDMP7* 基因靶点载体 sgRNA1、sgRNA2、sgRNA3 分别侵染 76、66、33 粒外植体, 得到 152、132、66 个合子胚。取继代培养初期组培苗的叶片, 提取白桦基因组 DNA, 以此为模板进行 T0 代植株的 sgRNA 检测, 扩增片段大小约为 500 bp, 经分化筛选培养后得到抗草铵膦的白桦转基因幼苗共 131 株, 其中, 靶点 sgRNA1 有 56 株, 靶点 sgRNA2 有 52 株, 靶点 sgRNA3 有 23 株, 转基因效率分别为 73.68%、78.79%、69.70%。

根据基因组序列, 在靶点附近设计上、下游引物进行基因组扩增 (附表 5), 对阳性植株 DNA 进行片段扩增, 大小约为 1 000 bp, PCR 产物送 Sanger 测序, 检测靶位点编辑情况。测序结果统计如下: 靶点 sgRNA1 共检测出 56 株阳性苗, 基因测序显示其中 2 株为 indel 或有意义突变体材料, 编辑方式为缺失、有意义替换; 靶点 sgRNA2 共检测出 52 株阳性苗, 基因测序显示其中 2 株为 indel 或有意义突变体材料, 编辑方式为插入、替换 (图 4C); sgRNA3 送测样品未检测到有意义突变体编辑植株。通过阳性植株数量/外植体侵染数量计算转化效率, 编辑植株数量/阳性植株数量计算编辑效率。结果表明, *BpDMP7* 基因 3 个载体的平均转化效率为 74.06%, indel 或有意义突变的平均编辑效率为 3.05% (表 2)。

表 2 基因编辑植株信息统计

Table 2 Gene editing plant information statistics

载体名称 Vector name	外植体数量 Number of explants	阳性植株数量 Number of positive plants	转化效率 Transformation efficiency/%	基因编辑数量	基因编辑效率
				(Indel 或有意义突变) Number of gene edits (Indel or significant mutation)	(Indel 或有意义突变) Gene editing efficiency (Indel or significant mutation)/%
pSC1-CRISPR- <i>BpU6-2</i> -sgRNA1	76	56	73.68	2	3.57
pSC1-CRISPR- <i>BpU6-2</i> -sgRNA2	66	52	78.79	2	3.85
pSC1-CRISPR- <i>BpU6-2</i> -sgRNA3	33	23	69.70	—	—
合计	175	131	74.06	4	3.05

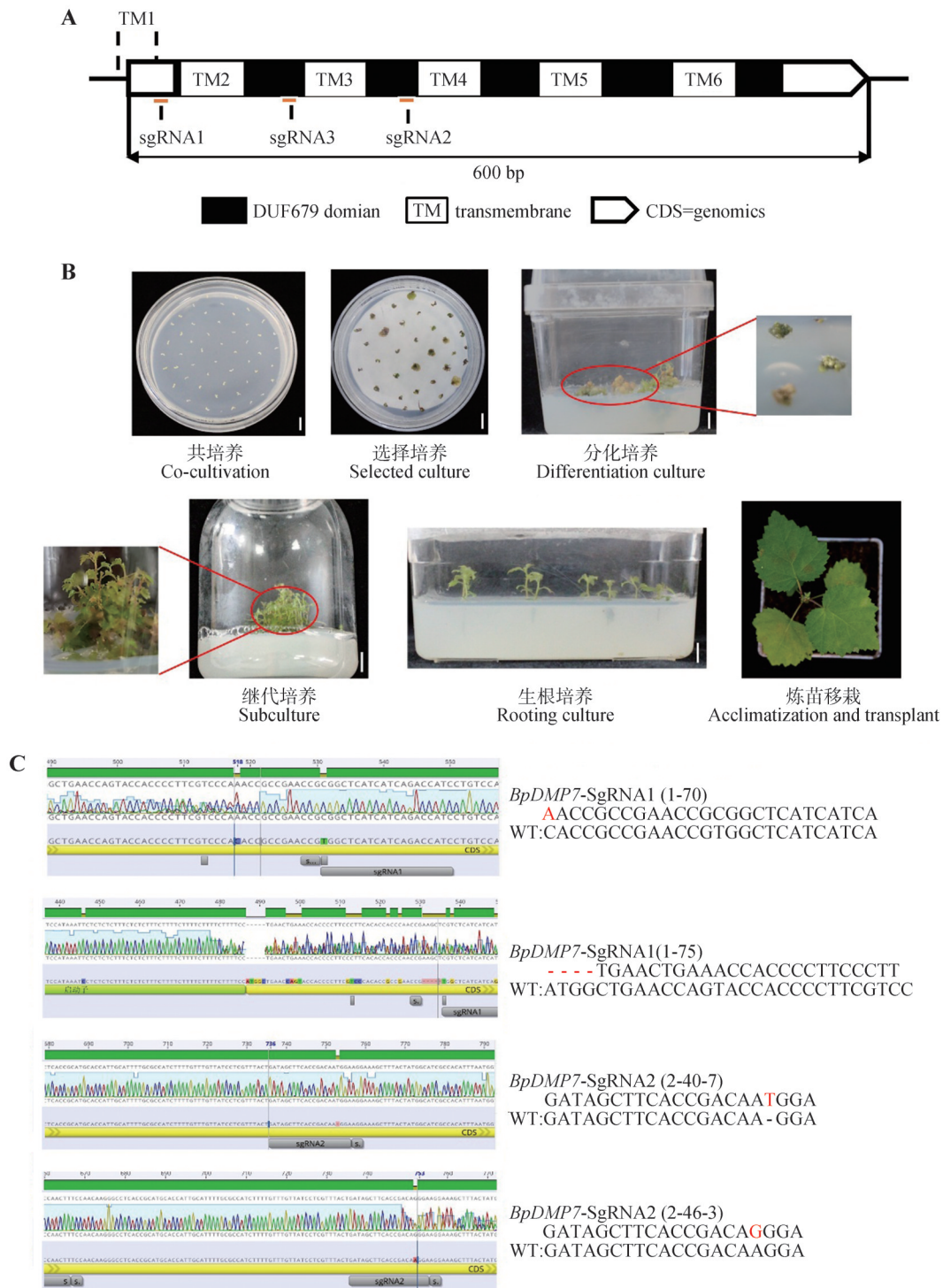


A. *BpDMP7* 基因回补系载体构建; B. *dmp8dmp9* 双突变体和 *BpDMP7* 基因回补系在 *dmp8dmp9* 双突变体背景下的角果图片; C. *dmp8dmp9* 双突变体和 *BpDMP7* 基因回补系中角果内籽粒数量。WT. 野生型株系, *dmp8dmp9* 代表拟南芥 *DMP* 基因双突变体, p*BpDMP7*::*BpDMP7*、p*AtDMP9*::*BpDMP7*、p35*S*::*BpDMP7* 分别代表 3 个回补株系。误差线代表 3 个生物学重复的标准误差。显著性为 WT 与 *dmp8dmp9*、*dmp8dmp9* 与 p*BpDMP7*::*BpDMP7*、*dmp8dmp9* 与 p*AtDMP9*::*BpDMP7*、*dmp8dmp9* 与 p35*S*::*BpDMP7* 分别通过 Student's *t*-test 得到 (**, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$)。N. 生物学重复次数。

A. The *BpDMP7* gene complementation constructs; B. Images of siliques from the *dmp8dmp9* mutant and the different *BpDMP7* genes complementation lines in the *dmp8dmp9* background; C. Quantification of seed number per silique in the *dmp8dmp9* mutant and the *BpDMP7* genes corresponding complementation lines. WT represented the wild-type strain, *dmp8dmp9* represented the double mutant of *Arabidopsis DMP* gene, p*BpDMP7*::*BpDMP7*, p*AtDMP9*::*BpDMP7*, p35*S*::*BpDMP7* represented the three complementation lines, respectively. The error line represented the standard error of three biological replicates. The significance was obtained through Student's *t*-test between WT and *dmp8dmp9*, between *dmp8dmp9* and p*BpDMP7*::*BpDMP7*, between *dmp8dmp9* and p*AtDMP9*::*BpDMP7*, and between *dmp8dmp9* and p35*S*::*BpDMP7*, respectively (**, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$). N represented the number of biological replicates.

图 3 *BpDMP7* 基因回补 *dmp8dmp9* 双突变体

Fig.3 *BpDMP7* genes complement *dmp8dmp9* phenotypes in *Arabidopsis*



A. *BpDMP7* 基因结构; B. 白桦合子胚遗传转化流程; C. *BpDMP7* 基因编辑突变位点检测。
 A. The gene structure of *BpDMP7*; B. Genetic transformation process of birch zygotic embryo; C. Detection of *BpDMP7* gene editing mutation site.

图 4 *BpDMP7* 基因编辑及遗传转化

Fig.4 *BpDMP7* gene editing and genetic transformation

3 讨论

3.1 林木育种技术创新

现阶段林木育种大多停留在传统育种方式

上,即实生苗木繁殖、杂交育种及嫁接、扦插等。然而,林木的生长周期和生长方式与农作物相比较为特殊,主要体现在育种周期长,通常需要数十

年才能获得优良品种^[54]。DH 育种作为一种高效的育种技术,在林木遗传改良中具有重要的技术创新意义,其通过单倍体诱导和染色体加倍,可在短时间内获得纯合的 DH 植株,极大地缩短育种周期,加速遗传改良进程。DH 群体具有高度的遗传纯合性和性状一致性,有利于进行精准的表型鉴定和基因型分析^[55]。结合现代分子标记技术,可以更准确地筛选出目标性状优异个体,提高选择效率^[56]。此外,DH 群体也为基因定位和功能研究提供了理想的材料,有助于解析林木重要性状的遗传机制,为分子设计育种奠定基础。DH 育种可以快速固定杂种优势,创制出具有优良性状的新种质。通过不同亲本杂交后诱导单倍体,可以获得具有双亲优良性状的纯合材料,为林木育种提供丰富的遗传资源^[57]。DH 育种为解决林木育种中的一些难题提供了新的思路。例如,对于难以进行无性繁殖的树种,DH 育种可以快速获得纯系,为后续育种工作提供材料基础。对于遗传背景复杂的树种,DH 育种可以简化遗传背景,便于进行基因定位和功能研究^[2]。此外,DH 育种还可以与分子设计育种相结合,实现目标性状的精准改良^[58]。

本研究以林木育种为出发点,借助现代分子育种思路探寻其在林木中的可行性并找到了倍性育种在林木育种中的突破口。随着现代生物技术的不断发展,DH 育种将在林木遗传改良中发挥越来越重要的作用,为培育高产、优质、抗逆的林木新品种提供强有力的技术支撑。

3.2 具有单倍体诱导能力的白桦 *DMP* 基因

DMP 基因的发现与应用为农业育种开辟了新的篇章,同时也扩展了林木育种的思路。该基因在植物雄性生殖细胞中特异性表达,在植物双受精时发挥重要作用。*DMP* 基因突变使后代单倍体出现的概率提高^[9],故 *DMP* 是诱导植物产生单倍体的关键基因之一。qRT-PCR 分析表明,*BpDMP2* 和 *BpDMP7* 基因在白桦雄蕊中表达量较高,同时这 2 个基因在雄蕊散粉时表达量较高,表明 *BpDMP2* 和 *BpDMP7* 在白桦有性生殖过程中发挥着重要作用。结合系统发育树来看,白桦 *BpDMP7* 基因与拟南芥 *AtDMP10* 基因编码蛋白质序列相似度更高;而 *AtDMP10* 基因在拟南芥花中特异性表达,意味着在基因进化过程中,*BpDMP7* 与 *AtDMP10* 亲缘关系更近,故在拟南芥回补试验中选择更有

说服力的 *BpDMP7* 基因回补至拟南芥 *dmp8dmp9* 突变体中。拟南芥回补试验表明,*BpDMP7* 基因能够回补双突变体拟南芥的籽粒败育表型,也证明了该基因能够弥补拟南芥 *AtDMP8* 和 *AtDMP9* 在双受精过程中的功能丧失。综上,在各类作物中 *DMP* 基因的研究成果日渐丰富,但目前关于白桦 *BpDMPs* 基因家族的系统性分析以及 *DMP* 基因在白桦中的鉴定还未见报道,以上结果为后续木本植物白桦 *BpDMPs* 基因家族分析提供了一定的理论依据。

3.3 单倍体诱导技术加快白桦育种进程

现阶段白桦的育种大多停留在传统育种模式,如优质种源收集与评价、建立种子园、杂交育种等^[59-60],白桦倍性育种技术大多基于物理或化学方法创制白桦单倍体或多倍体后进行不同倍性白桦之间的杂交和选育^[61],目前尚无关于利用分子生物技术对白桦进行 DH 育种的报道。

单倍体育种作为一种高效的育种手段,在现代分子育种技术的推动下,在林木遗传改良中展现出巨大的应用潜力和发展前景。如结合基因编辑技术(如 CRISPR/Cas9),可对单倍体进行定向遗传改良,创制具有优良性状的新种质^[19,55-56];结合表观遗传调控和细胞工程技术,开发适用于不同树种的单倍体高效诱导和加倍技术,提高单倍体育种效率;结合多组学技术,解析林木抗逆、品质等复杂性状的遗传机制,为分子育种提供理论依据。本研究利用现代分子育种方法,鉴定了白桦中具有诱导单倍体功能的基因,不仅能够加快白桦倍性育种进程,也为后续白桦育种提供了更多的优质种质资源,还能够为其他木本植物育种提供新的思路。

大量报道揭示了 *DMP* 基因在农作物单倍体创制过程的关键作用^[9,41-48,53],在拟南芥^[41,53]、番茄^[42]、蒺藜苜蓿^[43]、西瓜^[44]、黄瓜^[45]、烟草^[46]、欧洲油菜^[46]、棉花^[47]、土豆^[48]等植物中,均可以通过敲除 *DMP* 基因获得单倍体诱导系,将其与野生型植株杂交进而获得单倍体。本研究对白桦 *BpDMPs* 基因家族进行研究并筛选到可供创制白桦单倍体诱导系的候选基因 *BpDMP7*,进一步通过 CRISPR/Cas9 技术获得了白桦单倍体诱导系。但在遗传转化过程中,白桦该基因的编辑效率较低,综合分析原因认为可能是基因编辑靶点选择不合理,导致被编辑的植株较少,如 sgRNA3 靶点在 23 个阳性

植株中检测到的基因编辑植株数为0。尽管本研究中编辑效率较低,但是最终仍获得了4株基因编辑植株,可继续开展后续试验。然而,这种单倍体材料的创制方法需要经历一代有性生殖过程,这使得通过基因编辑技术获得单倍体的方式在林木中的应用与推广也存在一定局限。因此,如何加速白桦从营养生长向生殖生长的快速转变,并将其与单倍体诱导系技术相结合是今后研究的重点。

参 考 文 献

- [1] CHANG M T, COE E H. Doubled haploids[M]//KRIZ A L, LARKINS B A. Molecular genetic approaches to maize improvement. Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009: 127-142.
- [2] KALINOWSKA K, CHAMAS S, UNKEL K, et al. State-of-the-art and novel developments of *in vivo* haploid technologies[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2019, 132: 593-605.
- [3] DWIVEDI S L, BRITT A B, TRIPATHI L, et al. Haploids: constraints and opportunities in plant breeding[J]. Biotechnology Advances, 2015, 33(6): 812-829.
- [4] GUHA S, MAHESHWARI S C. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*[J]. Nature, 1964, 204: 497.
- [5] DAVEY M R. Advances in haploid production in higher plants[J]. Annals of Botany, 2009, 104(7): 10.
- [6] MALUSZYNSKI M, KASHA K J, FORSTER B P, et al. Doubled haploid production in crop plants: a manual[M]. New York: Springer Dordrecht, 2003: 309-335.
- [7] BAJAJ Y P S. *In vitro* production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding[M]//BAJAJ Y P S. Haploids in crop improvement I: from fundamentals to quantum computing. New York: Springer Berlin Heidelberg, 1990: 3-30.
- [8] MOHAN JAIN S, SOPORY S K, VEILLEUX R E. *In vitro* haploid production in higher plants[M]. Dordrecht: Springer Dordrecht, 1996.
- [9] JACQUIER N M A, GILLES L M, PYOTT D E, et al. Puzzling out plant reproduction by haploid induction for innovations in plant breeding[J]. Nature Plants, 2020, 6: 610-619.
- [10] 王敬驹, 朱至清, 孙敬三. 杨树花粉植株的诱导[J]. 植物学报, 1975(1): 56-59.
WANG J J, ZHU Z Q, SUN J S. The induction of *Populus* pollen-plants[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 1975(1): 56-59.
- [11] DEUTSCH F, KUMLEHN J, ZIEGENHAGEN B, et al. Stable haploid poplar callus lines from immature pollen culture[J]. Physiologia Plantarum, 2004, 120(4): 613-622.
- [12] LI Y, LI H, CHEN Z, et al. Haploid plants from anther cultures of poplar (*Populus×beijingensis*)[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2013, 114: 39-48.
- [13] YANG J L, LI K, LI C Y, et al. *In vitro* anther culture and *Agrobacterium*-mediated transformation of the *API* gene from *Salix integra* Linn. in haploid poplar (*Populus simonii×P. nigra*)[J]. Journal of Forestry Research, 2017, 29: 321-330.
- [14] LIU B, WANG S, TAO X Y, et al. Molecular karyotyping on *Populus simonii* × *P. nigra* and the derived doubled haploid[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(21): 11424.
- [15] GHARYAL P K, RASHID A, MAHESHWARI S C. Production of haploid plantlets in anther cultures of *Albizia lebeck* L.[J]. Plant Cell Reports, 1983, 2: 308-309.
- [16] SERAN T H, HIRIMBUREGAMA K, SHANMUGARAJAH V. Regeneration of plantlets from cultured anthers of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze)[J]. Journal of Tropical Agricultural Research, 1998, 10: 271-281.
- [17] SRIVASTAVA P, CHATURVEDI R. Increased production of azadirachtin from an improved method of androgenic cultures of a medicinal tree *Azadirachta indica* A. Juss [J]. Plant Signaling & Behavior, 2011, 6(7): 974-981.
- [18] PINTOS B, MANZANERA J A, GÓMEZ-GARAY A. Production of doubled haploid embryos from cork oak anther cultures by antimetabolic agents and temperature stress[J]. Methods in Molecular Biology, 2021, 2289: 199-219.
- [19] AROCKIASAMY S, PATIL M, YEPURI V, et al. Anther culture in *Jatropha curcas* L.: a tree species[J]. Methods in Molecular Biology, 2021, 2289: 221-233.
- [20] MISHRA V K, BAJPAI R, CHATURVEDI R. Androgenic haploid plant development via embryogenesis with simultaneous determination of bioactive metabolites in Cambod tea (*Camellia assamica* ssp. *lasiocalyx*) [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2022, 148: 515-531.
- [21] CARDEMIL L, JORDAN M. Light and electron microscopic study of *in vitro* cultured female gametophyte of *Araucaria araucaria* (Mol.) Koch [J]. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 1982, 107(4): 329-338.
- [22] LI Y L, HUANG S W, ZHANG J Y, et al. A protocol of homozygous haploid callus induction from endosperm of *Taxus chinensis* Rehd. var. *mairei*[J]. SpringerPlus, 2016, 5: 659.
- [23] WINTON L L, EINSPAHR D W. The use of heat-treated

- pollen for aspen haploid production[J]. *Forest Science*, 1968, 14(4):406-407.
- [24] LI Y, WEI H R, YANG J, *et al.* High-quality de novo assembly of the *Eucommia ulmoides* haploid genome provides new insights into evolution and rubber biosynthesis[J]. *Horticulture Research*, 2020, 7:183.
- [25] HOOGHVORST I, NOGUÉS S. Opportunities and challenges in doubled haploids and haploid inducer-mediated genome-editing systems in cucurbits[J]. *Agronomy*, 2020, 10(9):1441.
- [26] HOOGHVORST I, NOGUÉS S. Chromosome doubling methods in doubled haploid and haploid inducer-mediated genome-editing systems in major crops[J]. *Plant Cell Reports*, 2021, 40:255-270.
- [27] COE Jr E H. A line of maize with high haploid frequency[J]. *The American Naturalist*, 1959, 93:381-382.
- [28] BARRET P, BRINKMANN M, BECKERT M. A major locus expressed in the male gametophyte with incomplete penetrance is responsible for in situ gynogenesis in maize [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2008, 117:581-594.
- [29] PRIGGE V, XU X W, LI L, *et al.* New insights into the genetics of *in vivo* induction of maternal haploids, the backbone of doubled haploid technology in maize[J]. *Genetics*, 2012, 190(2):781-793.
- [30] LIU C X, LI W, ZHONG Y, *et al.* Fine mapping of *qhir8* affecting *in vivo* haploid induction in maize[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2015, 128:2507-2515.
- [31] DONG X, XU X, MIAO J, *et al.* Fine mapping of *qhir1* influencing *in vivo* haploid induction in maize[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2013, 126:1713-1720.
- [32] KELLIHER T, STARR D, RICHBOURG L, *et al.* *MATRILINEAL*, a sperm-specific phospholipase, triggers maize haploid induction[J]. *Nature*, 2017, 542:105-109.
- [33] LIU C X, LI X, MENG D X, *et al.* A 4-bp insertion at *Zm-PLAI* encoding a putative phospholipase a generates haploid induction in maize [J]. *Molecular Plant*, 2017, 10(3):520-522.
- [34] JANG J H, SEO H S, WIDIEZ T, *et al.* Loss-of-function of gynoceium-expressed phospholipase *pPLAI γ* triggers maternal haploid induction in *Arabidopsis* [J]. *New Phytologist*, 2023, 238(5):1813-1824.
- [35] ZHONG Y, LIU C X, QI X L, *et al.* Mutation of *ZmDMP* enhances haploid induction in maize [J]. *Nature Plants*, 2019, 5:575-580.
- [36] YAO L, ZHANG Y, LIU C X, *et al.* *OsMATL* mutation induces haploid seed formation in *indica* rice [J]. *Nature Plants*, 2018, 4:530-533.
- [37] LIU C X, ZHONG Y, QI X L, *et al.* Extension of the *in vivo* haploid induction system from diploid maize to hexaploid wheat [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(2):316-318.
- [38] LIU H Y, WANG K, JIA Z M, *et al.* Efficient induction of haploid plants in wheat by editing of *TaMTL* using an optimized *Agrobacterium*-mediated CRISPR system [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2020, 71(4):1337-1349.
- [39] CYPARYS P, LINDEMEIER M, SPRUNCK S. Gamete fusion is facilitated by two sperm cell-expressed DUF679 membrane proteins [J]. *Nature Plants*, 2019, 5:253-257.
- [40] KASARAS A, KUNZE R. Expression, localisation and phylogeny of a novel family of plant-specific membrane proteins [J]. *Plant Biology*, 2010, 12(s1):140-152.
- [41] ZHONG Y, CHEN B J, LI M R, *et al.* A *DMP*-triggered *in vivo* maternal haploid induction system in the dicotyledonous *Arabidopsis* [J]. *Nature Plants*, 2020, 6:466-472.
- [42] ZHONG Y, CHEN B J, WANG D, *et al.* *In vivo* maternal haploid induction in tomato [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2022, 20:250-252.
- [43] WANG N, XIA X Z, JIANG T, *et al.* *In planta* haploid induction by genome editing of *DMP* in the model legume *Medicago truncatula* [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2022, 20(1):22-24.
- [44] CHEN X E, LI Y X, AI G L, *et al.* Creation of a watermelon haploid inducer line via *CIDMP3*-mediated single fertilization of the central cell [J]. *Horticulture Research*, 2023, 10(6):uhad081.
- [45] YIN S, LI S, SUN L, *et al.* Mutating the maternal haploid inducer gene *CsDMP* in cucumber produces haploids *in planta* [J]. *Plant Physiology*, 2024, 194(3):1282-1285.
- [46] ZHONG Y, WANG Y W, CHEN B J, *et al.* Establishment of a *DMP* based maternal haploid induction system for polyploid *Brassica napus* and *Nicotiana tabacum* [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2022, 64(6):1281-1294.
- [47] LONG L, FENG Y M, SHANG S Z, *et al.* *In vivo* maternal haploid induction system in cotton [J]. *Plant Physiology*, 2024, 194(3):1286-1289.
- [48] ZHANG J Z, YIN J, LUO J Y, *et al.* Construction of homozygous diploid potato through maternal haploid induction [J]. *ABIOTECH*, 2022, 3:163-168.
- [49] CHEN S, WANG Y C, YU L L, *et al.* Genome sequence and evolution of *Betula platyphylla* [J]. *Horticulture Research*, 2021, 8:37.
- [50] LIU Z Y, WANG P L, ZHANG T Q, *et al.* Comprehensive analysis of *BpHSP* genes and their expression under heat

- stresses in *Betula platyphylla* [J]. Environmental and Experimental Botany, 2018, 152: 167-176.
- [51] SONG Q X, LI Q T, LIU Y F, *et al.* Soybean *GmbZIP123* gene enhances lipid content in the seeds of transgenic *Arabidopsis* plants [J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(14): 4329-4341.
- [52] CHENG D W, LIU Y Y, WANG Y, *et al.* Establishment of high-efficiency genome editing in white birch (*Betula platyphylla* Suk.) [J]. Plant Biotechnology Journal, 2024, 22: 7-9.
- [53] TAKAHASHI T, MORI T, UEDA K, *et al.* The male gamete membrane protein *DMP9/DAU2* is required for double fertilization in flowering plants [J]. Development, 2018, 145(23): dev170076.
- [54] KOSKI V, ROUSI M. A review of the promises and constraints of breeding silver birch (*Betula pendula* Roth) in Finland [J]. Forestry: An International Journal of Forest Research, 2005, 78(2): 187-198.
- [55] KELLIHER T, STARR D, SU X J, *et al.* One-step genome editing of elite crop germplasm during haploid induction [J]. Nature Biotechnology, 2019, 37: 287-292.
- [56] WANG B B, ZHU L, ZHAO B B, *et al.* Development of a haploid-inducer mediated genome editing system for accelerating maize breeding [J]. Molecular Plant, 2019, 12(4): 597-602.
- [57] WANG C, LIU Q, SHEN Y, *et al.* Clonal seeds from hybrid rice by simultaneous genome engineering of meiosis and fertilization genes [J]. Nature Biotechnology, 2019, 37: 283-286.
- [58] MARIMUTHU M P A, JOLIVET S, RAVI M, *et al.* Synthetic clonal reproduction through seeds [J]. Science, 2011, 331(6019): 876.
- [59] GENG W L, LI Y Y, SUN D Q, *et al.* Prediction of the potential geographical distribution of *Betula platyphylla* Suk. in China under climate change scenarios [J]. PLoS One, 2022, 17(3): e0262540.
- [60] 陈柄华, 张杰, 刘桂丰, 等. 白桦半同胞家系纸浆材优良家系选择及选择方法评价 [J]. 植物研究, 2023, 43(5): 690-699.
- CHEN B H, ZHANG J, LIU G F, *et al.* Selection of excellent families and evaluation of selection method for pulpwood half-siblin families of *Betula platyphylla* [J]. Bulletin of Botanical Research, 2023, 43(5): 690-699.
- [61] 孙子腾, 王新宇, 侯丽丽, 等. 白桦 *BpGRFs* 基因鉴定与功能初步分析 [J]. 植物研究, 2025, 45(2): 191-201.
- SUN Z T, WANG X Y, HOU L L, *et al.* Identification and preliminary functional analysis of the *BpGRFs* gene in *Betula platyphylla* [J]. Bulletin of Botanical Research, 2025, 45(2): 191-201.