

小黑杨双单倍体生长性状及解剖结构分析

许云博¹ 张恒¹ 刘彩霞² 王萌¹
刘宇航¹ 王秋宇¹ 买明远¹ 曲冠证^{1*}

(1. 林木遗传育种全国重点实验室(东北林业大学), 哈尔滨 150040; 2. 木本油料资源利用全国重点实验室, 中南林业科技大学, 长沙 410004)

摘要 与传统育种相比, 双单倍体(doubled haploid, DH)诱导技术能够有效缩短纯合系的育种周期, 在短时间内快速获得林木纯合系。由于林木单倍体诱导困难, 难以建立规模化的遗传群体, 因此, 目前关于林木DH群体遗传变异的研究鲜有报道。该研究以小黑杨亲本和4个DH系为材料, 对其生长性状、叶片表型和解剖学特征开展测定与统计分析, 结果显示: 不同DH系存在明显的生长缺陷, DH系的株高、地茎、茎节数量、叶长、叶宽、叶面积等指标均显著低于亲本。顶芽解剖结构分析结果显示, 亲本与DH顶端分生组织生长点存在差异; 茎部石蜡切片及组织染色观察分析显示, DH系的形成层数量较少, 单个导管细胞平均面积小, 而导管和纤维细胞数量均极显著高于亲本。该研究结果表明, DH植株在次生长方面存在缺陷, 可为后续研究特定基因功能解析和育种策略优化提供材料基础。

关键词 小黑杨; 双单倍体; 生长性状; 解剖结构

中图分类号: S722.3 文献标志码: A doi: 10.7525/j.issn.1673-5102.2025.06.006

Analysis of Growth Traits and Anatomical Structures of Doubled Haploid Lines of *Populus simonii* × *P. nigra*

XU Yunbo¹ ZHANG Heng¹ LIU Caixia² WANG Meng¹
LIU Yuhang¹ WANG Qiuyu¹ MAI Mingyuan¹ QU Guanzheng^{1*}

(1. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding (Northeast Forestry University), Harbin 150040; 2. State Key Laboratory of Utilization of Woody Oil Resource, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004)

Abstract Compared with traditional breeding method, the doubled haploid (DH) induction technology can effectively shorten the breeding cycle and quickly obtain homozygous lines of trees. Due to the difficulty in inducing DH in trees, it is hard to establish large-scale DH genetic populations, therefore, there are currently few reports on the genetic variation of DH populations in trees. In this study, the growth traits, leaf phenotypes and anatomical characteristics of donor tree of *Populus simonii* × *P. nigra* and four DH lines were analyzed. The results showed that the DH lines had obvious growth defects. The height, ground diameter, number of stem nodes, leaf length, leaf width and leaf area of DH lines were significantly lower than those of donor trees. Anatomical analysis of the apical buds revealed distinct morphological differences in the apical meristem growth points between donor trees and DH lines. The observation and analysis of the paraffin sections of the stems and the tissue staining showed that the vascular cambium of DH lines was relatively smaller, the average area of each vessel cell was smaller, and the number of vessel and fiber cells was significantly higher than that of donor trees. This study revealed the defects of DH lines in secondary growth, and will provide a material basis for subsequent research on the function analysis of specific genes and the optimization of breeding strategies.

Key words *Populus simonii* × *P. nigra*; doubled haploid; growth traits; anatomical structures

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFD2200203)。

第一作者简介: 许云博(2001—), 女, 硕士研究生, 主要从事林木遗传育种研究。

* 通信作者: E-mail: gzqu@nefu.edu.cn。

收稿日期: 2025年8月29日。

单倍体(haploid)是指具有配子染色体数目的个体,其细胞中仅含一套染色体,具有基因组纯合和高突变率等特性。这些特性使得单倍体在植物育种、种质资源创新、遗传分析和基因功能鉴定等方面极具应用价值^[1],可应用于定位优良基因并缩短育种周期。双单倍体(doubled haploid, DH)是指单倍体经自发或者人工诱导染色体加倍后形成的基因型纯合个体。单倍体在自然界中可以通过自然或人为干预产生,1964年,Guha和Maheshwari^[2]利用花药离体培养的方法成功获得曼陀罗(*Datura stramonium*)花药植株后,花药培养诱导单倍体技术逐渐成为获得单倍体的有效途径之一。此外,还可以通过着丝粒介导法^[3]、单倍体诱导系^[4]、未成熟雌性或雄性配子体外培养^[5]、花药辐射等获得单倍体。随着现代生物技术的应用,单倍体诱导方式也取得创新性进展。Wang等^[6]研发了单倍体诱导基因组编辑(IMGE)方法,在玉米(*Zea mays*)中,利用携带CRISPR/Cas9的玉米诱导系为精英自交系授粉,可在两代内直接产生农艺性状改良的纯合DH系,规避了传统育种中冗长的回交程序。

在农作物领域,单倍体育种技术已成为推进禾谷类作物玉米、水稻^[7](*Oryza sativa*)和小麦(*Triticum aestivum*)^[8]等优良品种培育进程的有效手段,且部分改良品种已广泛推广。相较于系谱法、回交法等常规的育种方法,对玉米采用体外孤雌技术等单倍体育种技术可在短时间内获得纯合系^[9]。研究^[10]表明,维生素和玉米素处理可促进秋水仙碱诱导的玉米单倍体染色体加倍。Wang等^[11]发现,利用RUBY基因标记在玉米和番茄(*Solanum lycopersicum*)中诱导产生深色甜菜色素,实现了高效且不依赖遗传背景的单倍体鉴定,展现出广阔的应用前景。杨忠慧等^[12]建立了小麦DH高效生产技术规程,初步实现了批量生产和育种应用。Zhong等^[13]创制了番茄单倍体诱导系及其配套的诱导鉴别技术,为创建单、双子叶植物通用的跨物种单倍体快速育种技术体系及杂种优势利用效能提升开辟了新路径。DH技术在植物遗传育种和基因改良中的应用日益广泛,通过DH群体可使候选基因的靶向性更加准确^[14]。DH技术通过高效创制优良自交系、优化杂交亲本、缩短育种周期,可显著提高玉米产量和质量^[15]。

与农作物相比,木本植物普遍存在生长周期

长、基因组庞大、遗传杂合性高等天然限制,导致传统自交法难以创制纯合系,极大阻碍了林木基因组解析进程,且多数木本植物为自交不亲和或雌雄异株,因而人工诱导获得单倍体是获得林木纯合系最有效的方法。利用单倍体育种技术能够快速创制林木良种,显著加速育种进程并提高育种效率。Stoehr和Zsuffa^[16]通过辽杨(*Populus maximowiczii*)花药离体培养成功诱导14个单倍体植株和10个DH植株。此外,Li等^[17]通过多种培养基处理北京杨(*Populus × beijingensis*)花粉,诱变获得单倍体植株。Li等^[18]利用不同的高温处理雌花,通过孤雌生殖诱导杜仲(*Eucommia ulmoides*)单倍体。目前,小黑杨(*P. simonii × P. nigra*)^[19]、椰子(*Cocos nucifera*)^[20]和欧洲栓皮栎(*Quercus suber*)^[21]等林木品种均已获得单倍体植株。由于单倍体材料基因型高度纯合,其在分子生物学研究方面具有重要价值。刘彩霞^[22]以杨树(*Populus*)单倍体愈伤组织为材料,通过诱导及筛选,获得了基因纯合的悬浮细胞系,为林木分子研究提供了重要遗传材料。然而,林木单倍体植株诱导率较低,性状优良的品系再生难度大,多数情况下仅能获得少量株系。关于林木DH个体和群体生物学及育种研究仍较少,限制了杨树等林木种质资源创新和基因功能的深入研究,严重阻碍了林木单倍体育种技术的进一步发展。目前,基于杨树单倍体群体开展的生长表型及解剖结构等方面的研究报道较少。

杨树是我国重要的造林树种之一,生长周期短、速度快。作为木本植物生物学的模式物种,杨树基因组学和遗传育种研究已取得显著进展。小黑杨是由小叶杨(*Populus simonii*)和欧洲黑杨(*Populus nigra*)杂交选育的良种^[23]。该树种树干通直、树皮光滑、自然整枝良好,兼具强抗寒性、耐旱性、耐盐碱性,以及生长迅速、适应性强等优点,是重要的木材生产原料。研究团队以小黑杨为材料,首次建立了规模化的林木单倍体遗传群体^[24]。本研究以小黑杨亲本(donor tree, DT)和不同DH系(DH1588、DH3-50、DH1717、DH1716)为材料,分析其生长性状、叶片表型及茎解剖结构,旨在探究亲本与DH系和不同DH系植株之间生长发育的差异,揭示DH系在次生生长方面的差异,为单倍体遗传变异及木材形成等研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究试验材料包括1个小黑杨亲本和4个DH无性系,分别为DH1588、DH3-50、DH1717和DH1716。2024年1月,采集试验材料插条,在东北林业大学温室扦插扩繁,室内温度为(25±1)℃,选取活性较高、侧芽饱满、无病虫害的枝条。每根穗条长度为15~20 cm,切口位置上平下斜,下切口斜剪约45°,扦插基质为V(黑土):V(蛭石):V(珍珠岩)=5:2:1,每种试验材料包括30个重复。

1.2 表型测定

2024年5月,测定生长4个月的小黑杨亲本及DH系生长性状,分别使用钢尺和游标卡尺测量株高和地径,同时,记录每个单株的茎节数量和叶片数量,每个无性系包括30个重复。其后,测定、分析叶片性状参数,每个无性系随机选择3个植株,从顶芽下方第1片完全展开的叶片视为第1片叶,测定第5~8片叶的节间距,然后将叶片带回实验室,在方格纸上拍照后,利用ImageJ软件(<https://ij.imjoy.io/>)测定、分析叶长、叶宽和叶面积,叶片长宽比为叶长与叶宽比值。

1.3 石蜡切片

顶芽下面第1个茎节视为第1茎节,自上而下取12个茎节,用双面刀片切成2~4 mm的茎段,立即置于FAA固定液中,带回实验室,经包埋、切片和脱蜡后,再利用0.1%甲苯胺蓝、0.1%番红和0.1%固绿进行染色,在光学显微镜下,观察顶芽和茎段的解剖结构并拍照。根据采集的图像,利用ImageJ软件,采取随机抽样方法,从亲本及不同DH系的第3、5、7、9及11茎段的横切面内随机选取3个比例相同的区域,统计导管细胞、纤维细胞数量及导管细胞面积。

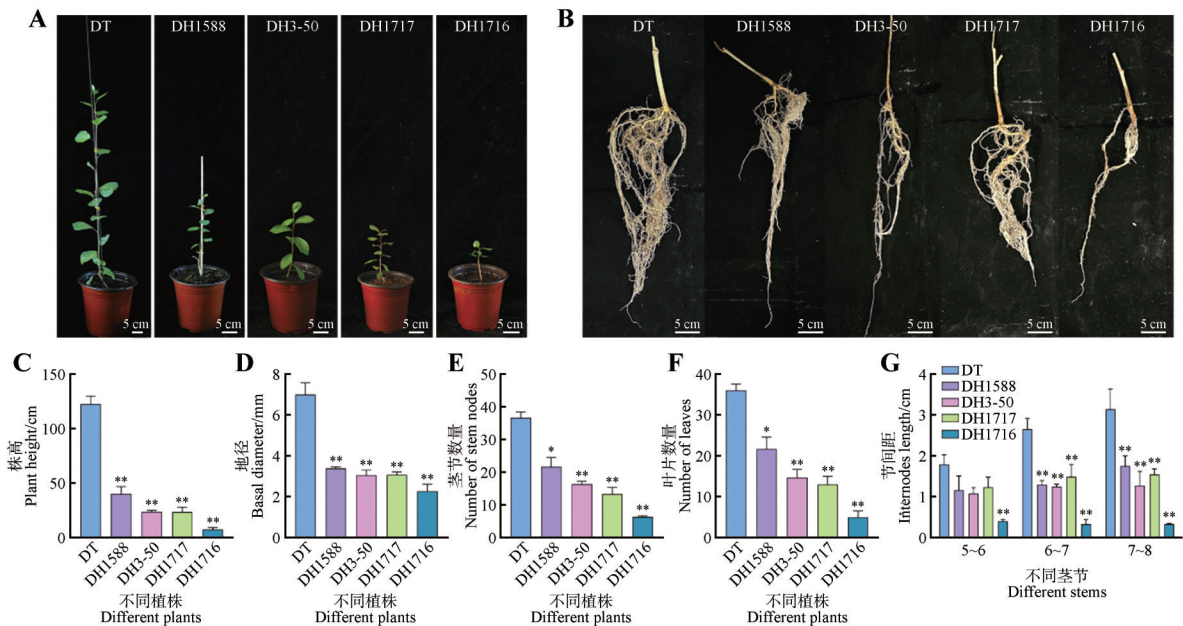
1.4 数据处理

本研究使用Excel 2021对试验数据进行整理。使用IBM SPSS Statistics 25.0软件对株高等性状进行单因素方差分析(one-way ANOVA),采用LSD法进行事后多重比较。使用GraphPad 9软件作图。

2 结果与分析

2.1 生长性状及植株表型分析

生长性状分析结果显示,DH系具有明显的生长缺陷,其株高、地径、叶片数量、根系数量和茎节数量均显著低于亲本($P<0.01$)(图1),其中,DH1588生长状态最好,但也显著低于亲本



A. 地上部分;B. 地下部分;C. 株高;D. 地径;E. 茎节数量;F. 叶片数量;G. 5~8 茎节节间距;DT. 亲本。*,**分别表示在0.05和0.01水平差异显著。

A. Aboveground part; B. Underground part; C. Plant height; D. Basal diameter; E. Number of stem nodes; F. Number of leaves; G. 5~8 stem internodes length; DT. Donor tree. *,** represented a significant difference at the 0.05 and 0.01 level, respectively.

图1 4月龄小黑杨亲本及不同DH系植株表型及生长指标

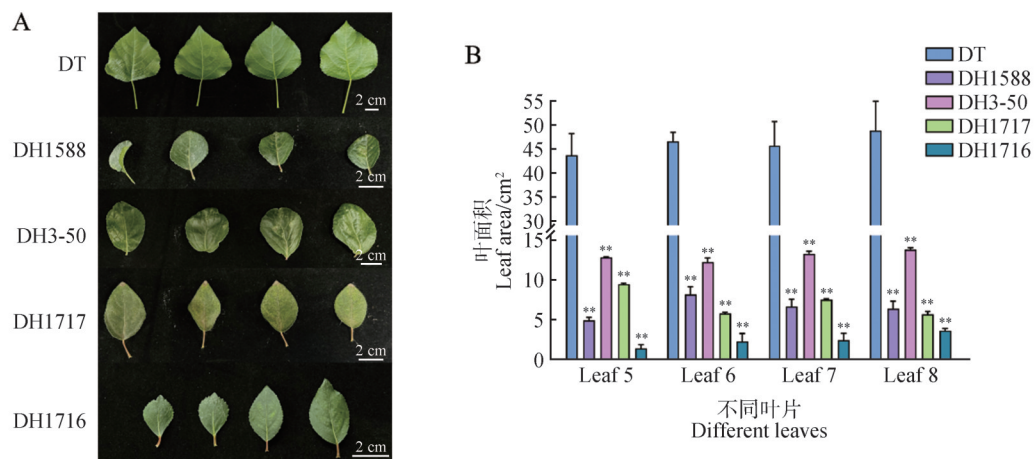
Fig.1 Phenotypic observation and growth indexes of 4-month-old DT and DH lines

($P < 0.01$), 其次是 DH3-50、DH1717、DH1716。亲本株高、地径、叶片数量和茎节数量平均值分别为 122.9 cm、6.9 mm、36 和 36。与亲本相比, DH1588、DH3-50、DH1717、DH1716 株高分别降低 67.01%、80.55%、80.71% 和 93.60%, 地径分别降低 51.26%、56.08%、56.03% 和 67.33%, 叶片数量分别减少 41.67%、59.26%、63.89% 和 86.11%, 茎节数量分别减少 49.09%、55.45%、61.82% 和 82.73%。第 5~8 茎节的节间距统计分析结果显示: 仅有 DH1716 的 5~6 茎节的节间距显著低于亲本($P < 0.01$), 而所有 DH 系的第 6~7、7~8 茎节的

节间距显著低于亲本($P < 0.01$)。

2.2 叶片表型分析

本研究对 4 月龄的小黑杨亲本和 4 个 DH 系自上而下的第 5~8 片叶的表型进行观测(图 2)。如图所示, 亲本的叶形呈三角形, DH1588 和 DH3-50 的叶形呈卵形, 而 DH1717 的叶形呈菱形, DH1716 的叶形呈长椭圆形。同时, 对第 5~8 片叶的叶长、叶宽和叶面积进行测定分析(表 1)。结果显示: 亲本的叶长、叶宽和叶面积均最大, DH 系次之, 其中, $DH3-50 > DH1717 > DH1588 > DH1716$ 。



A. 叶片表型照片; B. 叶面积; DT. 亲本。 **表示在 0.01 水平差异显著。

A. Leaf phenotype photos; B. Leaf area; DT. Donor tree. ** represented a significant difference at the 0.01 level.

图 2 小黑杨亲本及不同 DH 系植株叶片表型及叶面积

Fig.2 Leaf phenotypes and leaf area of DT and DH lines

表 1 小黑杨亲本及不同 DH 系第 5~8 片叶表型

Table 1 Phenotypic characteristics of the 5th to 8th leaves of DT and DH lines

亲本及双单倍体无性系 DT and DH lines	第 5 片叶 The fifth leaf			第 6 片叶 The sixth leaf			第 7 片叶 The seventh leaf			第 8 片叶 The eighth leaf		
	叶长 Leaf length /cm	叶宽 Leaf width /cm	叶长宽比 Leaf aspect ratio	叶长 Leaf length /cm	叶宽 Leaf width /cm	叶长宽比 Leaf aspect ratio	叶长 Leaf length /cm	叶宽 Leaf width /cm	叶长宽比 Leaf aspect ratio	叶长 Leaf length /cm	叶宽 Leaf width /cm	叶长宽比 Leaf aspect ratio
DT	7.03±1.93 ^a	6.33±2.72 ^a	1.19±0.27 ^b	7.27±1.88 ^a	7.20±2.43 ^a	1.03±0.11 ^b	8.43±0.32 ^a	8.30±0.36 ^a	1.02±0.04 ^d	9.13±0.35 ^a	8.47±0.23 ^a	1.08±0.02 ^c
DH1588	2.67±0.15 ^{bc}	2.47±0.58 ^b	1.12±0.24 ^b	3.20±0.10 ^b	3.30±0.17 ^{bc}	0.97±0.08 ^b	2.87±0.67 ^c	2.90±0.52 ^{bc}	0.98±0.06 ^d	2.90±0.26 ^c	2.50±0.10 ^c	1.16±0.07 ^{bc}
DH3-50	4.50±0.61 ^b	3.57±0.49 ^b	1.26±0.03 ^{ab}	4.20±0.70 ^b	3.87±0.49 ^b	1.08±0.06 ^b	4.37±0.58 ^b	3.53±0.55 ^b	1.24±0.04 ^c	4.83±0.55 ^b	3.97±0.12 ^b	1.22±0.13 ^{bc}
DH1717	3.63±0.81 ^{bc}	2.53±0.61 ^b	1.44±0.03 ^{ab}	3.40±0.44 ^b	2.07±0.21 ^{bc}	1.66±0.30 ^a	3.73±0.47 ^{bc}	2.60±0.35 ^c	1.44±0.04 ^b	3.63±0.40 ^c	2.70±0.26 ^c	1.34±0.03 ^b
DH1716	2.23±0.32 ^c	1.43±0.23 ^b	1.56±0.05 ^a	2.37±0.15 ^b	1.50±0.30 ^c	1.61±0.22 ^a	3.53±0.15 ^{bc}	2.17±0.31 ^c	1.65±0.18 ^a	3.73±0.47 ^c	2.33±0.45 ^c	1.62±0.20 ^a

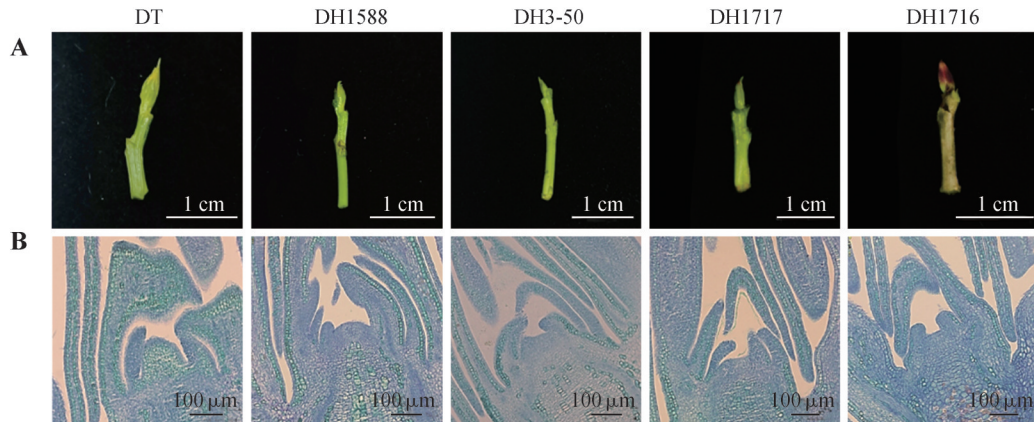
注: 数据为“平均值±标准差”; 不同小写字母表示同一叶序不同基因型之间差异显著($P < 0.05$); DT. 亲本。

Note: The data in the table were “mean ± standard deviation”; different lowercase letters indicated significant differences among different genotypes in the same phyllotaxy ($P < 0.05$); DT. Donor tree.

2.3 顶芽解剖结构分析

解剖及组织化学染色观察结果表明,亲本及不同DH系的生长点均被两侧叶原基包裹,但DH

系的顶端分生组织与亲本相比存在明显差异;亲本顶芽生长点向上隆起,呈圆锥形,相较于DH系更尖锐(图3)。



A. 顶芽状态;B. 顶芽甲苯胺蓝染色;DT. 亲本。

A. The terminal bud; B. The terminal bud stained with toluidine blue; DT. Donor tree.

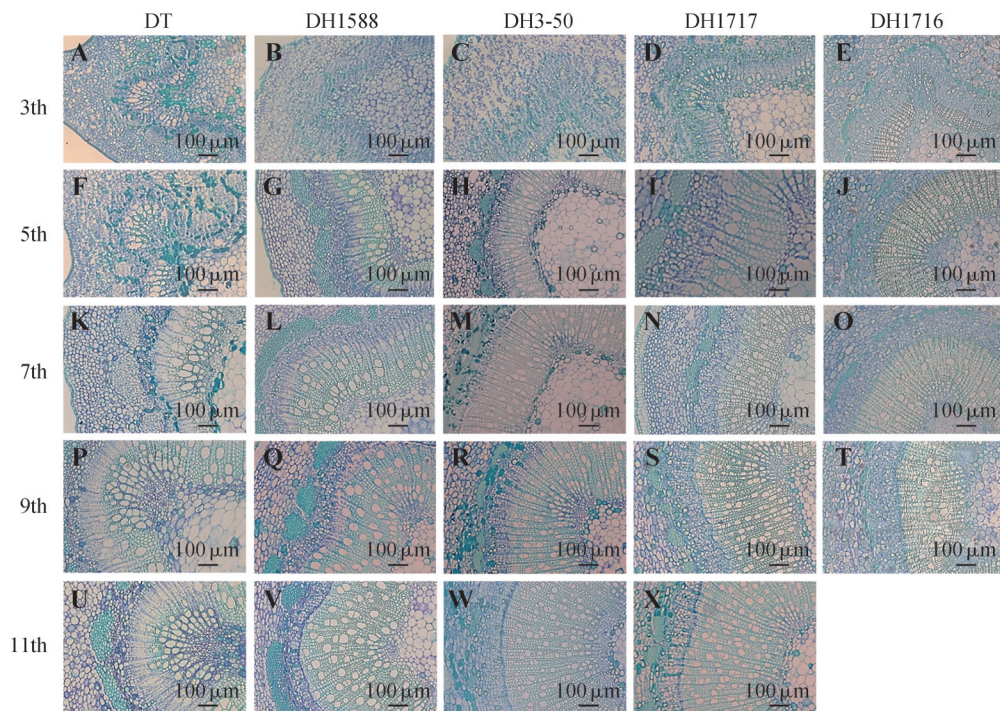
图3 小黑杨亲本及不同DH系的植株顶芽状态及组织染色

Fig.3 The top bud status and tissue staining of DT and DH lines

2.4 茎部解剖结构分析

观察经甲苯胺蓝染色的茎段横切面细胞发现,

DH系形成层细胞数量与亲本之间存在明显差异(图4),亲本形成层数量显著多于DH系($P < 0.01$)(图5)。

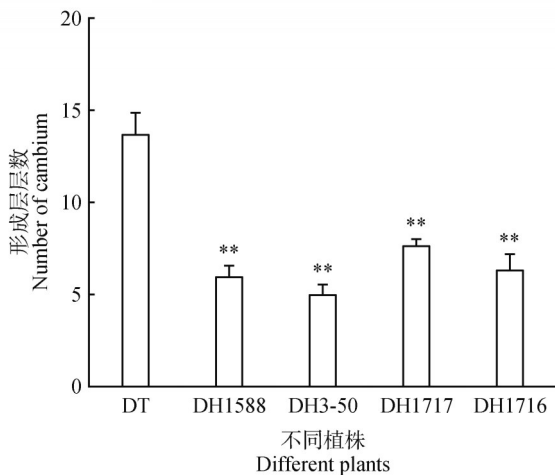


A~E. 小黑杨亲本及不同DH系第3茎节解剖图;F~J. 小黑杨亲本及不同DH系第5茎节解剖图;K~O. 小黑杨亲本及不同DH系第7茎节解剖图;P~T. 小黑杨亲本及不同DH系第9茎节解剖图;U~X. 小黑杨亲本及不同DH系第11茎节解剖图;DT. 亲本。

A~E. Anatomical diagrams of the 3rd stem node of *P. simonii* × *P. nigra* parents and different DH lines; F~J. Anatomical diagrams of the 5th stem node of *P. simonii* × *P. nigra* parents and different DH lines; K~O. Anatomical diagrams of the 7th stem node of *P. simonii* × *P. nigra* parents and different DH lines; P~T. Anatomical diagrams of the 9th stem node of *P. simonii* × *P. nigra* parents and different DH lines; U~X. Anatomical diagrams of the 11th stem node of *P. simonii* × *P. nigra* parents and different DH lines; DT. Donor tree.

图4 小黑杨亲本及不同DH系的植株茎节甲苯胺蓝染色结果

Fig.4 The toluidine blue staining of stem nodes of DT and DH lines



**表示数据在0.01水平差异显著。

** represented a significant difference at the 0.01 level.

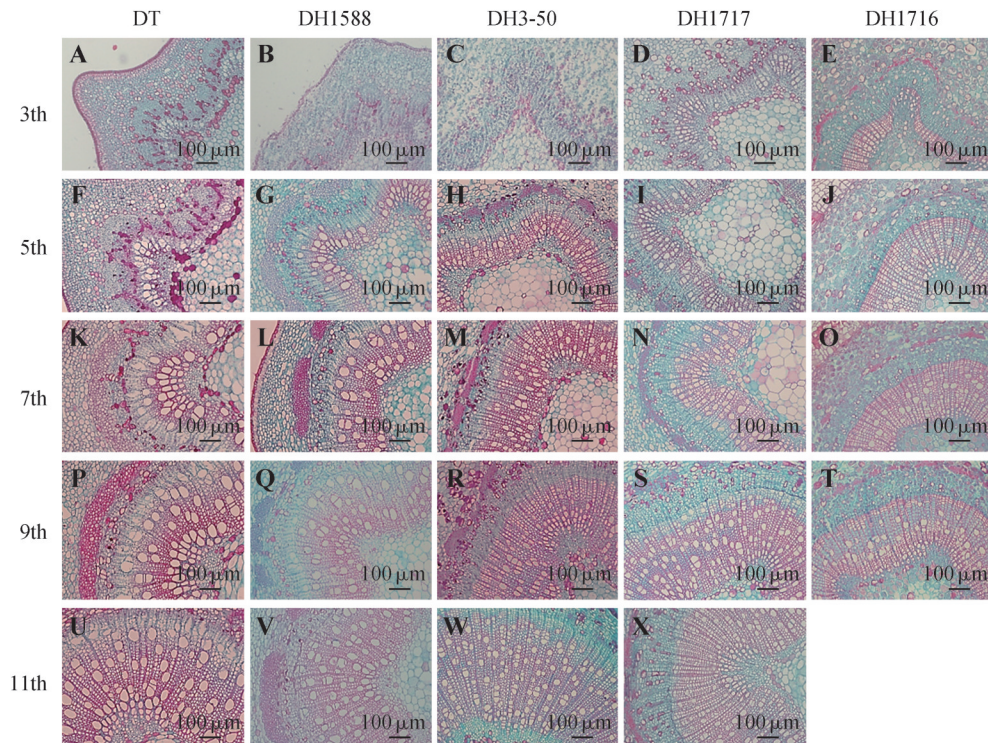
图5 小黑杨亲本及DH系的植株茎节形成层层数

Fig.5 The number of vascular cambium layers in the stem segments of DT and DH lines

与DH1588和DH3-50相比,亲本及DH1717、DH1716均在第3茎节木质部区域出现相对明显的着色(图6);随着茎节的增加,DH系的木质部髓射线排列更加紧密,木质部导管细胞面积较亲本更小,且纤维细胞数量较少。

进一步对单位面积内的导管细胞数量、单位面积内纤维细胞数量及单个导管细胞面积进行统计分析,由于DH1716植株较矮,无第11茎节,故仅统计第9茎节内的导管细胞数量、纤维细胞数量及导管细胞面积。结果如图7所示,DH系的导管和纤维细胞数量均极显著高于亲本($P<0.01$),但亲本单个导管细胞面积显著大于DH系($P<0.01$)。

同时,对亲本及不同DH系的横切面进行观察(图8),结果发现,亲本茎段横切面呈五边形,而DH系则趋于圆形。

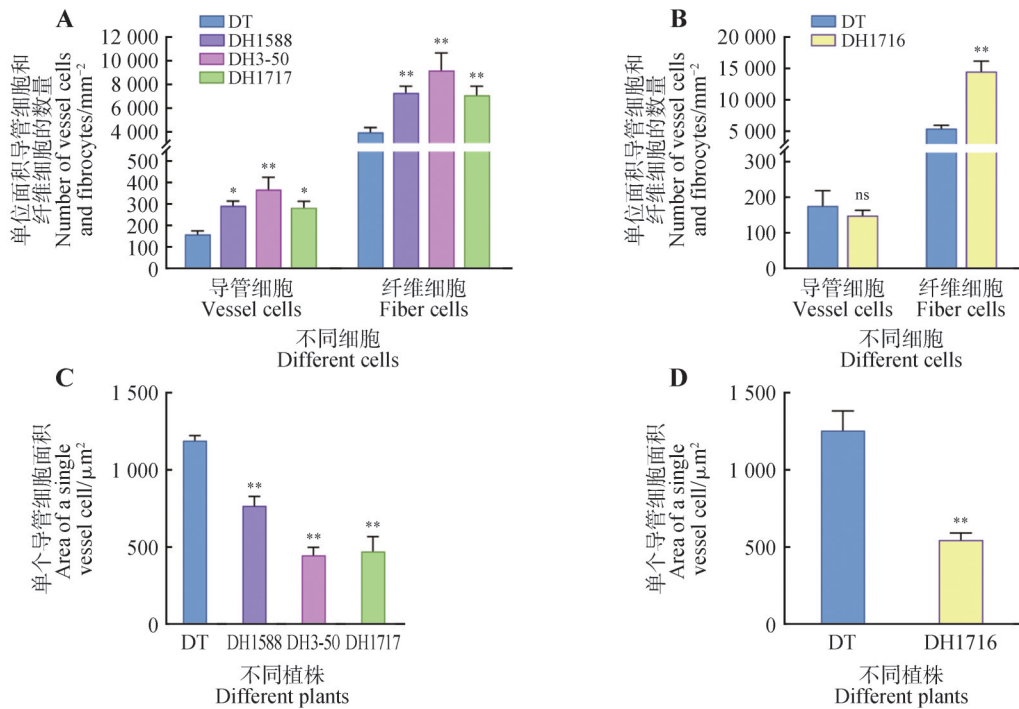


A-E. 小黑杨亲本及不同DH系第3茎节解剖图;F-J. 小黑杨亲本及不同DH系第5茎节解剖图;K-O. 小黑杨亲本及不同DH系第7茎节解剖图;P-T. 小黑杨亲本及不同DH系第9茎节解剖图;U-X. 小黑杨亲本及不同DH系第11茎节解剖图;DT. 亲本。

A-E. Anatomical diagrams of the 3rd stem internode of *P. simonii* × *P. nigra* parents and different DH lines; F-J. Anatomical diagrams of the 5th stem internode of *P. simonii* × *P. nigra* parents and different DH lines; K-O. Anatomical diagrams of the 7th stem internode of *P. simonii* × *P. nigra* parents and different DH lines; P-T. Anatomical diagrams of the 9th stem internode of *P. simonii* × *P. nigra* parents and different DH lines; U-X. Anatomical diagrams of the 11th stem internode of *P. simonii* × *P. nigra* parents and different DH lines; DT. Donor tree.

图6 小黑杨亲本及DH系的植株茎节番红固绿染色结果

Fig.6 The safranin-fast green staining of the stem nodes of DT and DH lines

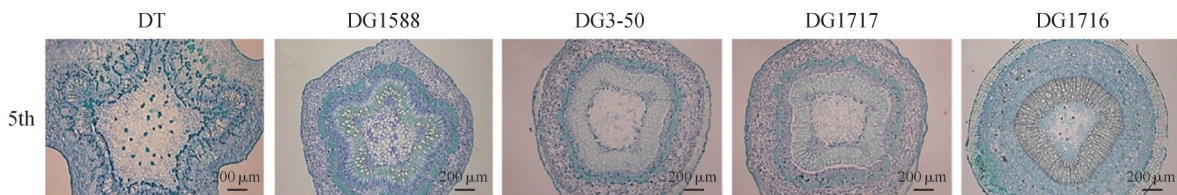


A. DT, DH1588, DH3-50, DH1717 第 11 茎节单位面积(mm^2)导管细胞和纤维细胞的数量; B. DT, DH1716 第 9 茎节单位面积(mm^2)导管细胞和纤维细胞的数量; C. DT, DH1588, DH3-50, DH1717 第 11 茎节单个导管细胞面积(μm^2); D. DT, DH1716 第 9 茎节单个导管细胞面积(μm^2); DT. 亲本。*, ** 分别表示在 0.05 和 0.01 水平差异显著。ns. 差异不显著。

A. The number of vessel cells and fiber cells per unit area (mm^2) at the 11th stem node of DT, DH1588, DH3-50, and DH1717; B. The number of vessel cells and fiber cells per unit area (mm^2) at the 9th stem node of DT and DH1716; C. The area of a single vessel cell at the 11th stem node (μm^2) of DT, DH1588, DH3-50, and DH1717; D. The area of a single vessel cell at the 9th stem node (μm^2) of DT and DH1716; DT. Donor tree. *, ** represented a significant difference at the 0.05 and 0.01 level, respectively. ns. No significant difference.

图 7 小黑杨亲本及 DH 系的植株茎节单位面积导管细胞及纤维细胞统计

Fig.7 Statistics of vessel and fiber cells per unit area of stem segments of DT and DH lines



A~E. 小黑杨亲本及不同 DH 系第 5 茎节解剖图; DT. 亲本。

A~E. Anatomical diagrams of the 5th stem node of *P. simonii* × *P. nigra* parents and different DH lines; DT. Donor tree.

图 8 小黑杨亲本及不同 DH 系的植株第 5 茎节甲苯胺蓝染色结果

Fig.8 The toluidine blue staining of 5th stem node of DT and DH lines

3 讨论与结论

以往研究^[25]表明,在生殖细胞第 1 次减数分裂期间,同源染色体配对并互换,从而重组连锁序列变异,并在单倍体配子中产生遗传多样性;而单倍体仅携带其二倍体亲本一半的染色体,隐性基因的表达可能导致 DH 植物中出现不寻常的表型^[26]。因此,每个单倍体产物具有独特的遗传组成。例

如,玉米 DH 系的遗传变异同样显著高于自交系^[27]。杨树具有高度杂合的基因组,理论上, DH 系基因组差异较大会导致表型存在明显差异。由于林木单倍体获得极其困难,在以往的研究中难以获得规模化的遗传群体,无法开展 DH 表型差异相关研究。本研究以亲本和 DH 系株系为试验材料,尽管不同 DH 系均来源于相同的亲本,但相较

于亲本及不同DH系之间仍存在显著差异,包括株高和地径等,这可能是由于小黑杨是高度杂合的品种,其DH系遗传基础差异较大,因而产生明显的遗传变异。

叶片是植物重要的营养器官,是植物进行光合作用的主要场所。在叶片发育过程中,茎端分生组织中的叶原基分化形成叶片。叶片形态是由叶片扩展和成熟过程共同决定的^[28],其中,叶片增大早期主要依赖细胞增殖,后期则主要依靠细胞体积膨大实现^[29],叶片大小也会影响植株的生长发育。基因通过调控细胞发育过程影响叶片性状。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中,*AtGEF9*基因通过抑制细胞增殖来限制细胞叶原基的大小,从而抑制叶片发育^[30];鹿凯峰等^[31]分析*PagKNAT2/6a*基因,发现该基因通过抑制细胞扩展影响叶片大小;转录因子MeTCP3a在木薯(*Manihot esculenta*)中通过调控下游基因影响叶片发育,导致木薯叶片出现畸形现象^[32]。本研究结果表明,DH系叶面积显著低于亲本($P<0.01$),且在生长过程中,DH系顶芽较早地开始休眠,可能是顶芽发育异常影响叶片发育。因此,本研究对DH系顶芽形态结构进行解剖学观察,结果发现,与DH系相比,亲本顶芽生长点呈较尖状态,圆锥形,而DH系顶芽生长点较扁平。有研究^[33]表明,顶端分生组织是生长发育的重要部位,该部分细胞分裂最为活跃,细胞分裂能力更强,所以推测亲本与DH系顶芽生长点形态的不同导致细胞分裂活跃程度产生差异,进而导致亲本与DH系的株高和节间距存在差异。后续可以通过基因组测序进一步探究DH系植株叶片与亲本叶片存在差异的原因。

石蜡切片是最常用的组织制片技术,用于清晰观察细胞与组织的形态结构。通过对亲本及DH系植株第3、5、7、9、11茎节进行细胞形态学观察发现,DH系茎形成层数量减少,抑制了形成层细胞增殖,进而影响木质部细胞发育;与亲本相比,DH系的导管细胞变小,数量变多。由于导管是植物水分运输的主要通道,导管数量和面积会影响植物的耐旱能力^[34]。导管面积变小会降低水分疏导效率,进而抑制茎的伸长。结合前面的研究结果可知,DH系的节间距缩短,导管面积变小,推测这可能是顶端分生组织异常分化导致的,该分化还间接导致DH系植株矮小、次生长缓慢,进而引发枝条生长缓慢,甚至停滞。已有研究^[35]

发现,亲本和不同DH系之间存在多种差异表达的基因,DH植物的纯合基因组导致植物表型和基因表达的显著改变。其中,在脱落酸的影响下,*PsnMYB73/77*和*PsnE2F*基因的表达受到抑制^[36],而*PsnHFR1/DELLA*和*PsnRGA/DELLA*基因的表达上调,抑制生长素合成,进而抑制根和芽生长,据此推测DH系顶端分生组织中的基因表达水平影响生长激素含量和分布,进而导致顶芽提早休眠并停止生长。同时,*PsnRGA/DELLA*和*PsnROGA/DELLA*基因表达上调还会促进形成层衰老,延缓分生组织发育,最终导致整株衰老。因此,关于调控DH系与亲本植株生长表型及解剖结构差异特定基因的分子作用机制尚需深入研究,下一步将探究这些机制是如何通过调控细胞分裂、激素信号响应及次级代谢产物合成,进而影响植株的表型特征和内在结构。

综上所述,本研究以小黑杨亲本和不同DH株系为材料,对其生长性状、叶片表型及茎部解剖结构进行分析,结果发现,DH系在生长发育和形态特征方面存在明显缺陷,其顶芽和茎部解剖特征均存在明显差异。研究结果可为后续基因功能解析及育种策略优化提供依据。

参 考 文 献

- [1] 胡建斌,李建吾,孙守如,等.植物单倍体材料创制方法及其应用[J].贵州农业科学,2007,35(4):135-137.
HU J B, LI J W, SUN S R, *et al.* Methods for creating plant haploid materials and its application[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2007, 35(4): 135-137.
- [2] GUHA S, MAHESHWARI S C. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura* [J]. Nature, 1964, 204: 497.
- [3] LV J, YU K, WEI J, *et al.* Generation of paternal haploids in wheat by genome editing of the centromeric histone *CENH3* [J]. Nature Biotechnology, 2020, 38: 1397-1401.
- [4] KERMICLE J L. Androgenesis conditioned by a mutation in maize [J]. Science, 1969, 166(3911): 1422-1424.
- [5] FERRIE A M R, CASWELL K L. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2010, 104: 301-309.
- [6] 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.
- [7] JIANG G H, HONG X Y, XU C G, *et al.* Identification of quantitative trait loci for grain appearance and milling

- quality using a doubled-haploid rice population[J]. *Journal of Integrative Plant Biotechnology*, 2005, 47(11): 1391-1403.
- [8] CHU C G, XU S S, FRIESEN T L, *et al.* Whole genome mapping in a wheat doubled haploid population using SSRs and TRAPs and the identification of QTL for agronomic traits[J]. *Molecular Breeding*, 2008, 22: 251-266.
- [9] 韩雅利, 史丽丽, 王磊, 等. 玉米孤雌生殖诱导育种法的研究进展[J]. *山西农业科学*, 2021, 49(10): 1242-1246.
- HAN Y L, SHI L L, WANG L, *et al.* Research progress on breeding methods of parthenogenesis induction in maize[J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2021, 49(10): 1242-1246.
- [10] CHEN C, ZHANG Y L, LIU C X, *et al.* Vitamin and zeatin treatments promote colehicine-induced haploid chromosome doubling in maize[J]. *The Crop Journal*, 2024, 12(6): 1677-1685.
- [11] WANG D, ZHONG Y, FENG B, *et al.* The *RUBY* reporter enables efficient haploid identification in maize and tomato[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2023, 21(8): 1707-1715.
- [12] 杨忠慧, 杨木军, 李绍祥, 等. 小麦DH高效生产技术体系在云南的研究与应用[J]. *麦类作物学报*, 2023, 43(10): 1311-1318.
- YANG Z H, YANG M J, LI S X, *et al.* Study and application of technological system for efficient production of wheat double haploid in Yunnan[J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2023, 43(10): 1311-1318.
- [13] ZHONG Y, CHEN B J, WANG D, *et al.* *In vivo* maternal haploid induction in tomato[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2022, 20(2): 250-252.
- [14] 赵振利, 张淑静, 范国强. 林木单倍体研究进展[J]. *河南农业大学学报*, 2023, 57(2): 179-185.
- ZHAO Z L, ZHANG S J, FAN G Q. Research progress of haploid in forest tree[J]. *Journal of Henan Agricultural University*, 2023, 57(2): 179-185.
- [15] 朱末, 闻竟, 李世界, 等. 玉米单倍体育种技术研究进展[J]. *东北农业科学*, 2023, 48(6): 64-68.
- ZHU M, WEN J, LI S J, *et al.* Advancements in research on haploid breeding technology in maize[J]. *Journal of Northeast Agricultural Sciences*, 2023, 48(6): 64-68.
- [16] STOEHR M, ZSUFFA L. Genetic evaluation of haploid clonal lines of a single donor plant of *Populus maximowiczii*[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1990, 80(4): 470-474.
- [17] 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(1): 39-48.
- [18] 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(1): 183.
- [19] 孟繁君, 熊忠平, 范海娟, 等. 转基因单倍体小黑杨对天幕毛虫的抗性分析[J]. *东北林业大学学报*, 2007, 35(2): 38-39.
- MENG F J, XIONG Z P, FAN H J, *et al.* Resistance of transgenic haploid xiaohei poplar to tent caterpillars[J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2007, 35(2): 38-39.
- [20] PERERA P I P, HOCHER V, VERDEIL J L, *et al.* Unfertilized ovary: a novel explant for coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis[J]. *Plant Cell Reports*, 2007, 26(1): 21-28.
- [21] PINTOS B, MANZANERA J A, BUENO M A. Antimitotic agents increase the production of doubled-haploid embryos from cork oak anther culture[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2007, 164(12): 1595-1604.
- [22] 刘彩霞. 小黑杨单倍体悬浮细胞筛选体系的建立及应用研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2021.
- LIU C X. Establishment and application of haploid suspension cell screening system from *Populus simonii* × *P. nigra*[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2021.
- [23] 杜兆伟, 郑唐春, 李爽, 等. 小黑杨快繁与再生体系的优化[J]. *植物研究*, 2015, 35(6): 904-907.
- DU Z W, ZHENG T C, LI S, *et al.* Rapid propagation and regeneration system of *Populus simonii* × *Populus nigra*[J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2015, 35(6): 904-907.
- [24] LIU C X, WANG S, LIU Y, *et al.* Exceptionally high genetic variance of the doubled haploid (DH) population of poplar[J]. *Forestry Research*, 2023, 34: 1941-1950.
- [25] LAWRENCE E J, GRIFFIN C H, HENDERSON I R. Modification of meiotic recombination by natural variation in plants[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68(20): 5471-5483.
- [26] LIU C X, FAN E Q, LIU Y H, *et al.* Genome-wide identification and analysis of the EIN3/EIL transcription factor gene family in doubled haploid (DH) poplar[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(7): 4116.
- [27] MAYOR P J, BERNARDO R. Genomewide selection and marker-assisted recurrent selection in doubled haploid versus F₂ populations[J]. *Crop Science*, 2009, 49(5): 1719-1725.
- [28] SMITH L G, HAKE S. The initiation and determination of leaves[J]. *The Plant Cell*, 1992, 4(9): 1017-1027.
- [29] DKHAR J, PAREEK A. What determines a leaf's shape?[J]. *EvoDevo*, 2014, 5(1): 47.

- [30] OMIDBAKHSHFARD M A, FUJIKURA U, OLAS J J, *et al.* GROWTH-REGULATING FACTOR 9 negatively regulates *Arabidopsis* leaf growth by controlling *ORG3* and restricting cell proliferation in leaf primordia [J]. *PLoS Genetics*, 2018, 14(7): e1007484.
- [31] 鹿凯峰, 李海阳, 赵立子, 等. 杨树 *PagKNAT2/6a* 对叶片发育的影响[J]. 分子植物育种, 2025-01-13 [2025-09-15]. <https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20250113.1622.004>.
- LU K F, LI H Y, ZHAO L Z, *et al.* Effect of poplar *PagKNAT2/6a* on leaf development [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2025-01-13 [2025-09-15]. <https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20250113.1622.004>.
- [32] 王连南, 李远超, 余乃通, 等. MeTCP3a 转录因子在木薯叶片发育中的功能鉴定[J]. 作物学报, 2024, 50(11): 2720-2730.
- WANG L N, LI Y C, YU N T, *et al.* Functional identification of MeTCP3a transcription factor in cassava leaf development [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2024, 50(11): 2720-2730.
- [33] 王俊丽, 林鉴钊, 李素丽, 等. 甘蔗茎尖初生增粗分生组织与顶端分生组织细胞分裂研究[J]. 广西农业生物科学, 2004, 23(1): 11-14.
- WANG J L, LIN J Z, LI S L, *et al.* Studies on the cell division of primary thickening meristem and apical meristem of the shoot apex in sugarcane [J]. *Journal of Guangxi Agricultural and Biological Science*, 2004, 23(1): 11-14.
- [34] LIU H Z, GAO J H, SUN J T, *et al.* Dimerization of PtrMYB074 and PtrWRKY19 mediates transcriptional activation of *PtrbHLH186* for secondary xylem development in *Populus trichocarpa* [J]. *New Phytologist*, 2022, 234(3): 918-933.
- [35] WANG Y R, YU J J, ZHANG X, *et al.* Morphological, histological, and transcriptome analysis of doubled haploid plants in poplars (*Populus simonii* × *Populus nigra*) [J]. *Forests*, 2023, 14(8): 1535.
- [36] GÓMEZ M S, SHERIDAN M L, CASATI P. E2Fb and E2Fa transcription factors independently regulate the DNA damage response after ultraviolet B exposure in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Journal*, 2021, 109(5): 1098-1115.