

· 研究报告 ·

矮牵牛花朵大小遗传规律及相关基因的表达分析

孙苗苗¹, 张蔚^{1,2}, 张林霞¹, 霍竣涛^{1,2}, 李志能^{2*}, 刘国锋^{1*}

¹广州市林业和园林科学研究院, 广州 510405; ²西南大学园艺园林学院, 重庆 400715

摘要 花朵大小是植物进化及物种形成过程中的关键因子, 也是决定植物观赏价值的重要性状, 研究其遗传规律与调控机制具有重要的科学意义和实用价值。以不同花朵大小的矮牵牛(*Petunia hybrida*)自交系和原生种为材料, 配制大花×中花和大花×小花杂交组合, 构建遗传群体, 研究其花朵大小的遗传规律。结果表明, 大花自交系W与腋花矮牵牛S26 (中花)杂交F₁群体均为大花, F₂群体中大花与中花的分离比接近3:1, BC₁回交群体中大花与中花的分离比接近1:1; 大花自交系W与中花自交系S杂交F₁群体均为大花, F₂群体花朵大小出现分离, 大花与中花的比例接近2:1; 大花自交系W与膨大矮牵牛S6 (小花)杂交F₁群体均为中花, F₂群体则出现花径从大到小的连续分布。利用主基因+多基因混合模型分析, 按照AIC值最小的标准选出W × S26组合的最优模型为1MG-AD, W × S的最优模型为2MG-EAD, 由此判定W大花对S26中花由1对主显性基因控制, 具加性-显性效应, W大花对S中花则由2对主基因控制, 具等加性-显性效应。此外, 根据前期大、小花转录组分析结果, 选取9个可能调控花朵大小的基因, 通过qPCR检测了它们在不同花朵大小的矮牵牛株系花瓣中的表达水平, 结果发现细胞分裂素受体基因*PhHK*以及响应细胞分裂素信号的type-A *RRs*基因在大花中的表达水平普遍高于中花和小花, 表明细胞分裂素信号途径可能是参与调控矮牵牛大花性状的关键因素。

关键词 矮牵牛, 花朵大小, 遗传规律, 细胞分裂素信号途径

孙苗苗, 张蔚, 张林霞, 霍竣涛, 李志能, 刘国锋 (2024). 矮牵牛花朵大小遗传规律及相关基因的表达分析. 植物学报 59, 422–432.

花朵大小(flower size)影响植物的传粉与繁殖, 是决定植物进化及物种形成的关键因子(Fenster et al., 2004)。对于观赏植物而言, 花朵大小直接决定其观赏价值和经济价值, 因此培育花朵大小丰富的植物品种是园林园艺育种者追求的重要目标。植物花朵的大小受遗传和环境因素双重调节。在自然界中, 传粉者、天敌和逆境胁迫等多种因素相互制约, 作为选择压力共同影响花器官形态和繁殖能力, 最终通过选择合适的基因型, 推动花器官大小的进化(Krizek and Anderson, 2013)。多项研究表明, 植物花朵大小属于数量性状, 遗传基础复杂, 目前的研究主要集中在进化与传粉生物学方面, 关于遗传与分子调控机制的研究则相对较少, 并且主要来源于模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) (Krizek and Anderson, 2013; Huang and Irish, 2016)。由于拟南芥花器官较小, 且花朵大小的变异范围十分有限, 因此其用于花器官大

小研究有很大的局限性。

矮牵牛(*Petunia hybrida*)即碧冬茄, 为茄科矮牵牛属(*Petunia*)多年生草本植物, 具有很高的观赏价值(代色平和和包满珠, 2004)。与拟南芥相比, 矮牵牛花器官大而显著, 且花朵大小变异丰富, 其中大花者花径可达10 cm以上, 小花者花径仅1–2 cm。此外, 矮牵牛具有易繁殖栽培、幼年期短和易转化等优势(Vandenbussche et al., 2016), 且有2个原生种已完成全基因组测序(Bombarely et al., 2016), 因而是研究花朵大小性状遗传及分子调控机理的理想材料。然而, 目前关于矮牵牛花朵大小的遗传研究较少, 且结果不太一致(Ewart, 1984; Galliot et al., 2006; Venail et al., 2010; Cao et al., 2019)。基于此, 本研究以不同花朵大小的矮牵牛纯系为材料, 通过杂交、自交和回交等手段系统研究其花朵大小的遗传规律。同时, 根据大、小花转录组测序结果及相关文献报道, 选择

收稿日期: 2023-10-16; 接受日期: 2024-03-18

基金项目: 广东省自然科学基金面上项目(No.2019A1515011840)和广州市林业和园林局部门预算项目(No.穗财编[2024]4号)

* 通讯作者。E-mail: znli@swu.edu.cn; gzifla_lgf@gz.gov.cn

9个基因分析其在不同花朵大小矮牵牛株系中的表达水平。研究结果进一步明确了矮牵牛花朵大小的遗传特点, 为其花径育种提供了科学依据。同时, 本研究创制了单基因和双基因控制的花朵大小分离群体, 为花朵大小调控基因的定位和克隆提供了研究材料, 具有重要的理论意义和实用价值。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验材料包括矮牵牛(即碧冬茄(*Petunia hybrida* (Hook) E Vilm.))自交系W(花径9.0–10.3 cm)、DHZ(花径8.5–10.0 cm)、KZ(花径8.0–8.5 cm)、S(花径4.0–5.0 cm)、SW(花径3.8–4.5 cm)、HC(花径2.5–3.1 cm)、SP(花径3.1–4.0 cm)以及W115(花径5.0–5.5 cm)、腋花矮牵牛(*P. axillaris*) S26(花径4.8–5.6 cm)和膨大矮牵牛(*P. inflata*) S6(花径2.3–2.8 cm)。其中, 自交系均由本实验室从商业品种经多代自交选育而来, W115、S26和S6由荷兰阿姆斯特丹大学Ronald教授惠赠, 实验室自交保存。所有材料花径大小性状稳定(图1)。

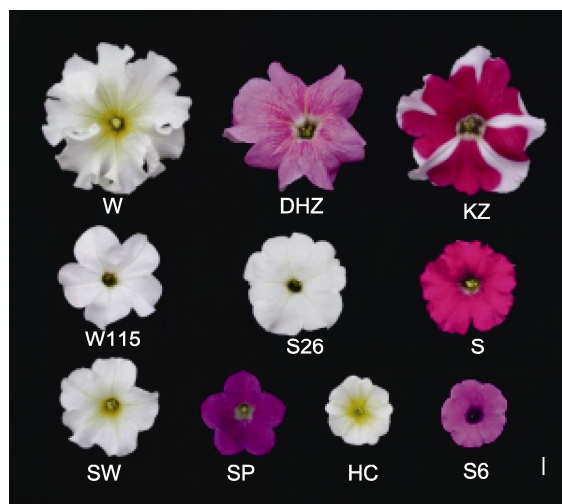


图1 不同花朵大小矮牵牛实验材料

W、DHZ、KZ、W115、S、SW、HC和SP: 矮牵牛自交系; S26: 腋花矮牵牛; S6: 膨大矮牵牛。Bar=1 cm

Figure 1 The tested materials of petunia with different flower sizes

W, DHZ, KZ, W115, S, SW, HC, and SP: The inbred lines of *Petunia hybrida*; S26: *P. axillaris*; S6: *P. inflata*. Bar=1 cm

1.2 实验方法

1.2.1 分离群体的构建与种植

将自交系W与腋花矮牵牛S26杂交, 配制大花×中花杂交组合, 然后对F₁进行自交和回交, 获得F₂和BC₁, 在BC₁群体中分别选择大花和中花植株自交获得BCF₂; 同时, 将自交系W分别与S和S6杂交代配杂交组合, 构建F₁和F₂群体。在广州市园林植物科技资源圃温室, 相同的栽培管理条件下种植亲本、F₁、F₂、BC₁和BCF₂群体, 其中亲本和F₁群体种植30株以上, F₂、BC₁和BCF₂群体种植100–300株。播种基质采用进口泥炭:珍珠岩=3:1 (v/v), 待幼苗长出2–3片真叶后, 将其移栽于15 cm × 15 cm的花盆内, 进入盛花期时测量花径。

1.2.2 花径测量

于盛花期对群体的所有植株进行花径测量。随机选取植株上3朵盛开的花, 测量其花冠横轴和纵轴的长度, 取平均值。

1.2.3 RNA提取与cDNA合成

分别取不同花朵大小矮牵牛株系处于花冠筒伸长期的花瓣, 利用Trizol法提取总RNA。用1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性, 然后保存于–80°C冰箱。使用PrimeScript RT-PCR Kit反转录试剂盒(TaKaRa, 日本)对总RNA进行反转录, 具体操作步骤参照试剂盒说明书。将获得的cDNA保存于–20°C冰箱。取出部分cDNA原液稀释20倍, 用于下一步实时荧光定量PCR分析。

1.2.4 基因表达分析

根据矮牵牛大小花转录组测序结果及相关文献报道, 对不同花朵大小的矮牵牛株系选择9个基因(表1)进行表达分析。通过Blast搜索和序列比对, 从茄科基因组网站(www.sgn.cornell.edu)获得目标基因的全长序列。以矮牵牛EF1a基因作为内参基因, 利用Beacon designer 8.0软件设计内参基因和目标基因的特异性引物(表1)。引物由上海生工生物工程有限公司合成。使用ddH₂O将引物稀释至100 μmol·L⁻¹, 于–20°C冰箱保存备用。

以cDNA为模板, 使用Illumina ECO Real-Time PCR系统和TB Green® Premix Ex Taq™ II (TaKa-

表1 实时荧光定量PCR引物

Table 1 Primers used for quantitative real-time PCR

Gene name	Primer name	Primer sequence (5'-3')
<i>PhARR496</i>	qPhARR496-F	GCAACAACAAAGAAGCAGAGCAGTT
	qPhARR496-R	GGTGATGATGGTAATGGCTGTGTCA
<i>PhARR828</i>	qPhARR828-F	CATCTTCCTCGCTCTCGCTCTC
	qPhARR828-R	TGAGTCGTCGTGTTGGTGAATGT
<i>PhARR970</i>	qPhARR970-F	ACTCCTCTTCCTCATCAGTCATCATCA
	qPhARR970-R	GCTGCTGCCATTCCATTGTTG
<i>PhARR1029</i>	qPhARR1029-F	GCAAGAGCATGAACAGAACAAGTCA
	qPhARR1029-R	CCAGGCATACAGTAGTCCGTGATAA
<i>PhARGOS057</i>	qPhARGOS057-F	TCTCTCCATCATACGCTTTGGTCAA
	qPhARGOS057-R	AGGCAAGAACCATAGGAGATTGTTGA
<i>PhARGOS459</i>	qPhARGOS459-F	GCACATGGAATCATCAGCAGAAGC
	qPhARGOS459-R	GGTGGAATGGTGGAAAGGATCAA
<i>PhHK</i>	qPhHK-F	CCAAGTTCTTTGAATCCAAGCCTCAC
	qPhHK-R	AATAAGAATGCAGCACCAGCAGAATG
<i>PhTCP3b</i>	qPhTCP3b-F	CCTCTCTGCTCACACAGCCATTC
	qPhTCP3b-R	GCCCAGCAATACTGTCAACTAACT
<i>PhTCP4a</i>	qPhTCP4a-F	TGACCAAGCAGCCCTTTTCTCT
	qPhTCP4a-R	TGGAAGCTCTGTGGTGAATGTCTGT

Ra, 日本)进行实时荧光定量PCR分析,检测相关基因在不同花朵大小材料中的表达情况。qRT-PCR反应体系总体积为10 μ L,包括1 μ L cDNA,5 μ L TB Green[®] Premix Ex Taq[™] II,上、下游引物各0.2 μ L,3.6 μ L ddH₂O。反应程序为95°C30秒;95°C5秒,60°C5秒,40个循环;65–95°C,每步上升0.5°C,停留5秒,进行溶解曲线分析。最后运用Illumina ECO软件,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法(LivaK and Schmittgen, 2001)分析数据,获得基因在不同材料中的相对表达量。每种材料设置3个生物学重复,每个样品重复3次。

1.3 矮牵牛花径的主基因+多基因混合模型分析

使用Excel软件处理数据,并进行数据分析、作图和卡方检验(谭永强等,2010)。使用SEA v2.0软件(王靖天等,2022)对各杂交组合的花径数据进行联合分析,计算出24种模型下各世代的极大似然函数值和AIC(Akaike information criterion)值;通过AIC值选出备选模型,进行适合性检测,包括 U_1^2 、 U_2^2 、 U_3^2 、Smirnov检验(nW^2)和Kolmogorov检验(D_n),根据AIC

值最小原则和适合性检测结果选出最优模型。

2 结果与讨论

2.1 矮牵牛花朵大小遗传规律分析

2.1.1 W × S26的花朵大小遗传规律

自交系W的花径分布在9.0–10.3 cm之间,均值为(9.7±0.3) cm(图2A);腋花矮牵牛S26的花径分布在4.8–5.6 cm,均值为(5.3±0.2) cm(图2B)。以W为母本、S26为父本配制杂交组合,对其F₁代和F₂代群体的花朵大小进行统计,结果显示,F₁群体花径分布在7.0–9.5 cm,均值为(8.3±0.7) cm,比亲本W的花径略小,但均为大花(图2C);F₂群体的花径出现大小分离,且明显分为2个区间:6.8–10.0 cm(大花)和4.4–6.2 cm(中花),其中大花植株的数量为98株,中花植株的数量为36株,大花与中花的分离比接近3:1(图2D)。

将W × S26 F₁代植株与S26回交,构建BC₁群体,对其花朵大小进行统计。结果显示,BC₁群体的花径分离为6.8–9.4 cm(大花)和4.4–6.4 cm(中花)两个区

间, 其中大花株数为67, 中花株数为62, 分离比接近1:1 (图2E)。在 BC_1 群体中随机选取大花和中花各1株进行自交, 构建大花 BCF_2 和中花 BCF_2 群体, 对其花朵大小进行统计。结果显示, 大花 BCF_2 群体出现大花(花径7.0–10.2 cm)和中花(花径4.0–6.3 cm)分离, 其中大花植株数为194, 中花植株数为65, 分离比接近3:1 (图2F); 而中花 BCF_2 群体的花径未出现大小分离, 所有植株均为中花(花径4.6–6.4 cm) (图2G)。

此外, 我们发现杂交分离群体中, 大花植株与中花植株的叶片和苞片也存在一定差异, 其中大花植株的叶片和苞片比中花植株略大, 边缘呈波状皱曲, 且颜色比中花植株浅(呈黄绿色)。

2.1.2 $W \times S$ 和 $W \times S_6$ 的花朵大小遗传规律

自交系S的花径分布在4.0–5.0 cm, 平均值为(4.5±0.3) cm (图3A)。以W为母本、S为父本配制杂交组合, 对其 F_1 和 F_2 群体花朵大小进行统计。结果显示, F_1 群体的花径分布在6.9–8.8 cm, 平均值为(7.8±0.4) cm, 比亲本W的花径略小, 但明显大于亲本S的花径, 定为大花(图3C)。 F_2 群体的花径出现大小分离, 但无明确的分离区间; 如果按照 $W \times S_26$ 群体的分离情况, 将花径>6.8 cm定为大花, 4.0–6.8 cm定为中花, 那么 F_2 群体的大花(6.8–10.3 cm)植株数为76, 花径均值为(8.5±0.8) cm, 中花(4.2–6.8 cm)植株数为39, 花径均值为(5.8±0.7) cm, 大花与中花植株的比例接近2:1 (图3D)。

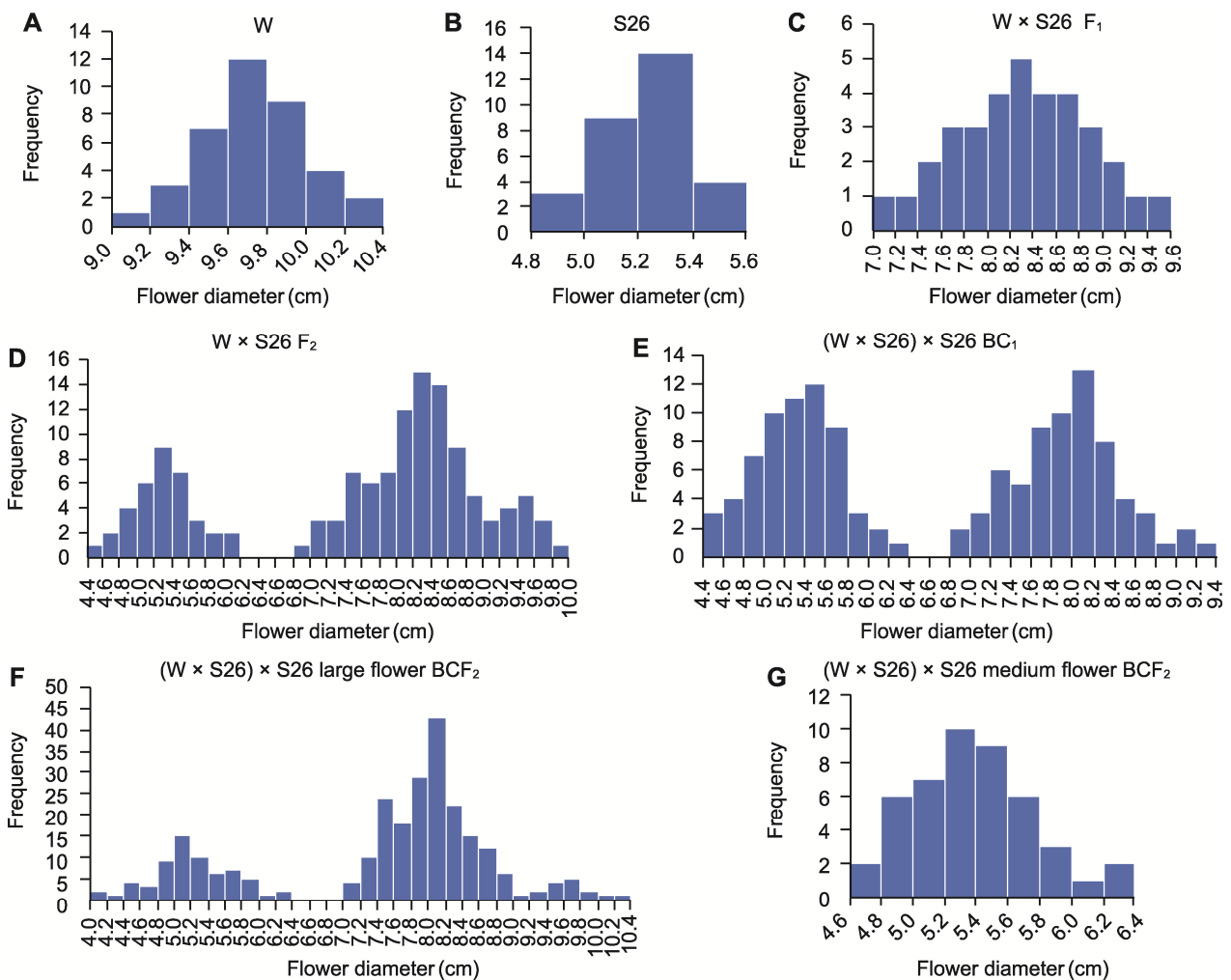


图2 $W \times S_26$ 亲本及不同后代群体花径的频数分布

(A) 母本W; (B) 父本S26; (C) F_1 群体; (D) F_2 群体; (E) BC_1 群体; (F) 大花 BCF_2 群体; (G) 中花 BCF_2 群体

Figure 2 Frequency distribution histogram of flower diameter for parents and filial generations of $W \times S_26$

(A) Female parent W; (B) Male parent S26; (C) F_1 generation; (D) F_2 generation; (E) BC_1 generation; (F) BCF_2 generation from large flower; (G) BCF_2 generation from medium flower

膨大矮牵牛S6的花径分布在2.3–2.8 cm, 平均值为(2.6±0.1) cm (图3B)。以W为母本、S6为父本配制杂交组合, 对其F₁和F₂群体的花朵大小进行统计, 结果显示, F₁群体的花径分布在4.3–6.1 cm, 平均值

为(5.2±0.4) cm, 处于两亲本之间, 且明显小于大花亲本, 全部为中花(图3E)。F₂群体出现花朵大小的广泛分离, 且花径在2.6–7.8 cm范围内呈连续分布(类似正态分布), 其中大花(>6.8 cm)、中花(4.0–6.8 cm)和

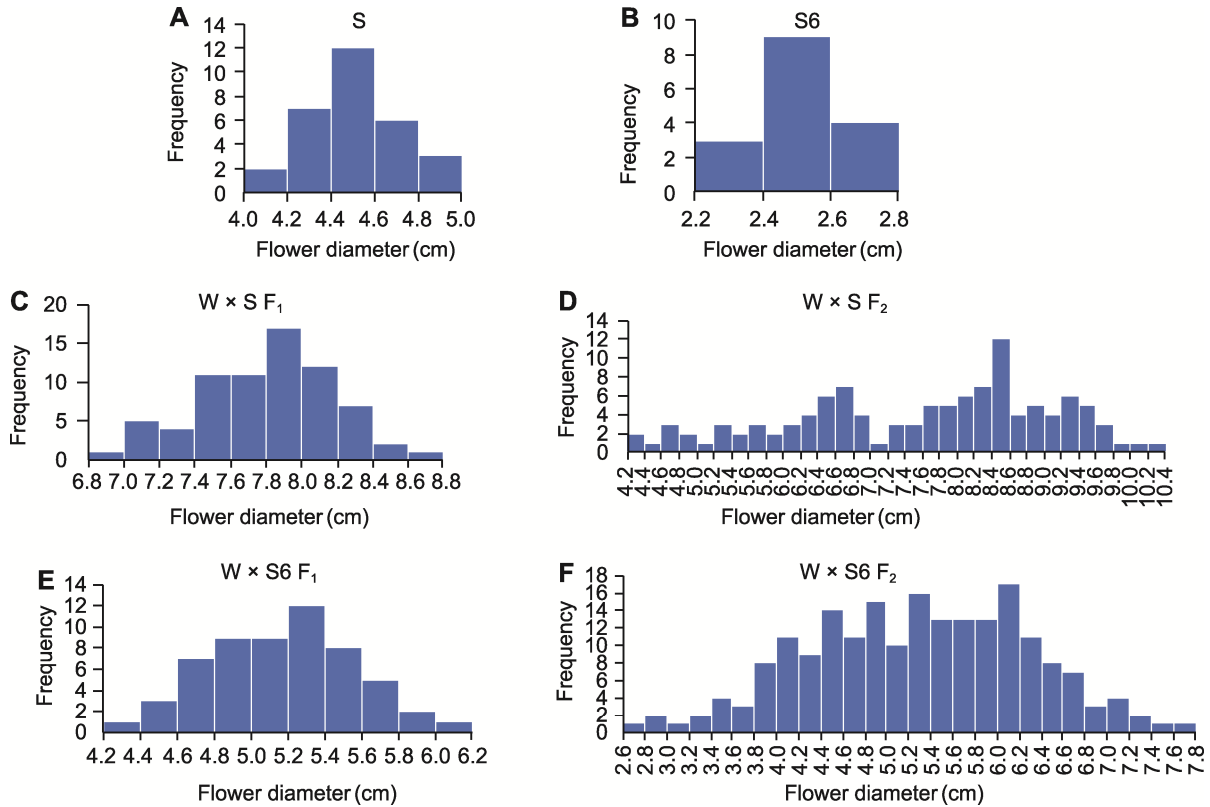


图3 W × S和W × S6亲本及F₁、F₂群体花径频数的分布

(A) 亲本S; (B) 亲本S6; (C) W × S F₁群体; (D) W × S F₂群体; (E) W × S6 F₁群体; (F) W × S6 F₂群体

Figure 3 Frequency distribution histogram of flower diameter for parent, F₁, and F₂ generations of W × S and W × S6 (A) Parent S; (B) Parent S6; (C) F₁ generation of W × S; (D) F₂ generation of W × S; (E) F₁ generation of W × S6; (F) F₂ generation of W × S6

表2 各遗传模型极大似然值(MLV)、AIC (Akaike information criterion)值和达到显著水平个数

Table 2 Maximum likelihood value (MLV), Akaike information criterion (AIC) value, and the number of reaching significant levels for each genetic model

Cross combination	Genetic model	Maximum likelihood value	AIC	Number of significant levels ($P < 0.05$)				
				U_1^2	U_2^2	U_3^2	nW^2	D_n
W × S26	1MG-AD	-599.9208	1207.8420	0	0	0	0	0
	2MG-ADI	-596.0287	1212.0570	0	0	0	0	0
	MX1-AD-AD	-596.8717	1211.7440	0	0	0	0	0
W × S	2MG-EAD	-242.0814	492.1628	0	0	0	0	0
	MX2-EAD-AD	-245.5385	495.0770	0	0	0	0	0
	2MG-EA	-244.9837	497.9675	0	0	0	0	0

MG: 主基因模型; MX: 主基因+多基因混合模型; AD: 加性-显性效应; ADI: 加性-显性-上位性效应; EA: 等加性效应; EAD: 等加性-显性效应

MG: Major gene model; MX: Major gene+polygene model; AD: Additive-dominant effect; ADI: Additive-dominant-epitasis effect; EA: Equal additive effect; EAD: Equal additive-dominant effect

小花(<4.0 cm)的植株数分别为11、168和21株, 花径平均值为(5.2±1.0) cm (图3F)。

2.2 矮牵牛花径的主基因+多基因混合模型分析

利用植物主基因+多基因混合遗传模型分析法对大花×中花的杂交组合W × S26群体, 以及大花×小花的杂交组合W × S群体进行遗传分析, 根据AIC值最小原则, 每个组合获得3个备选模型, 对备选模型进行适合性检验(U_1^2 、 U_2^2 、 U_3^2 、 nW^2 和 D_n)。结果表明, 各模型的统计量均未达显著水平(表2), 因此选择AIC值最小的为最优模型, W × S26组合的最优模型为1MG-AD, W × S的最优模型为2MG-EAD。

2.3 卡方检验及遗传规律图解

对W × S26的F₂、BC₁和BCF₂群体花朵大小性状进行卡方检验(表3), 结果表明, 后代群体的卡方值为0.001–0.249, 均小于3.85, P值为0.294–0.971, 均大于0.05, 认为实际值与理论值均不存在显著差异, 且通过植物主基因+多基因混合遗传模型得出W × S26组合的最优模型为1MG-AD。因此, 判定矮牵牛自交系W的大花性状对S26的中花性状由1对主基因控制。具体遗传规律如图4所示。

2.4 矮牵牛花朵大小相关基因的表达分析

根据矮牵牛大小花转录组差异表达基因及相关文献报道, 我们选择9个可能参与调控花朵大小的基因, 包括细胞分裂素受体基因(*PhHK*)、*ARGOS*同源基

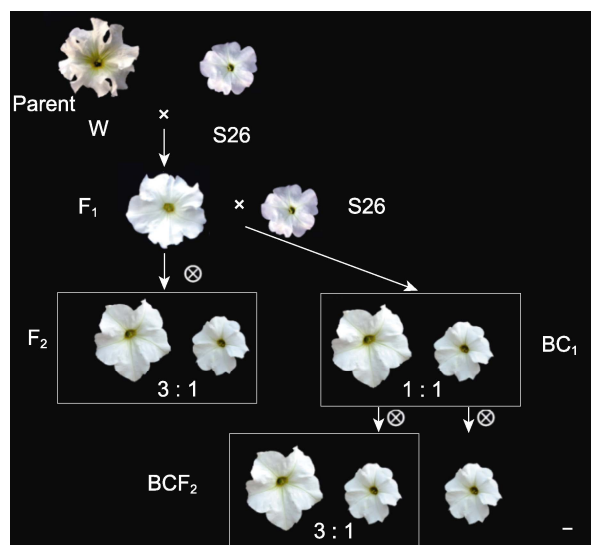


图4 W × S26花朵大小遗传规律图解
Bar=1 cm

Figure 4 Diagram of genetic law of flower size for W × S26
Bar=1 cm

因(*PhARGOS057*和*PhARGOS459*)、type-A *RRs* (*PhARR496*、*PhARR828*、*PhARR970*和*PhARR1029*) 以及TCP家族基因(*PhTCP3b*和*PhTCP4a*), 检测它们在不同花朵大小矮牵牛株系花瓣中的表达水平。根据各株系的花冠直径, 将其分为大花、中花和小花3种类型, 其中自交系W、DHZ和KZ为大花, 花径大于8.0 cm; S、S26和W115株系为中花, 花径在4.0–6.0 cm; 自交系SW、HC、SP和S6为小花, 花径在2.0–4.0 cm。qRT-PCR分析结果(图5)显示, *PhARR496*和*PhHK*在

表3 矮牵牛杂交后代群体花朵大小分离卡方检验

Table 3 Chi square test for flower size segregation in the hybrid offsprings of petunia

Cross combination (female × male)	Population types	Plant numbers	Large flower	Medium flower	Small flower	Theoretical ratio	Actual ratio	(χ^2) Chi-square test	P
W × S26	F ₁	32	32	0	0	—	—	—	—
	F ₂	134	98	36	0	3:1	3:1	0.249	0.618
	BC ₁	129	67	62	0	1:1	1:1	0.194	0.660
	Large flower BCF ₂	259	194	65	0	3:1	3:1	0.001	0.971
	Medium flower BCF ₂	44	0	44	0	—	—	—	—
W × S	F ₁	72	72	0	0	—	—	—	—
	F ₂	115	76	39	0	—	—	—	—
W × S6	F ₁	57	0	57	0	—	—	—	—
	F ₂	200	11	168	21	—	—	—	—

$\chi^2 < 3.84(1)$, $P > 0.05$, 不显著; $\chi^2 > 3.84(1)$, $P < 0.05$, 显著。

$\chi^2 < 3.84(1)$, $P > 0.05$, non-significant; $\chi^2 > 3.84(1)$, $P < 0.05$, significant.

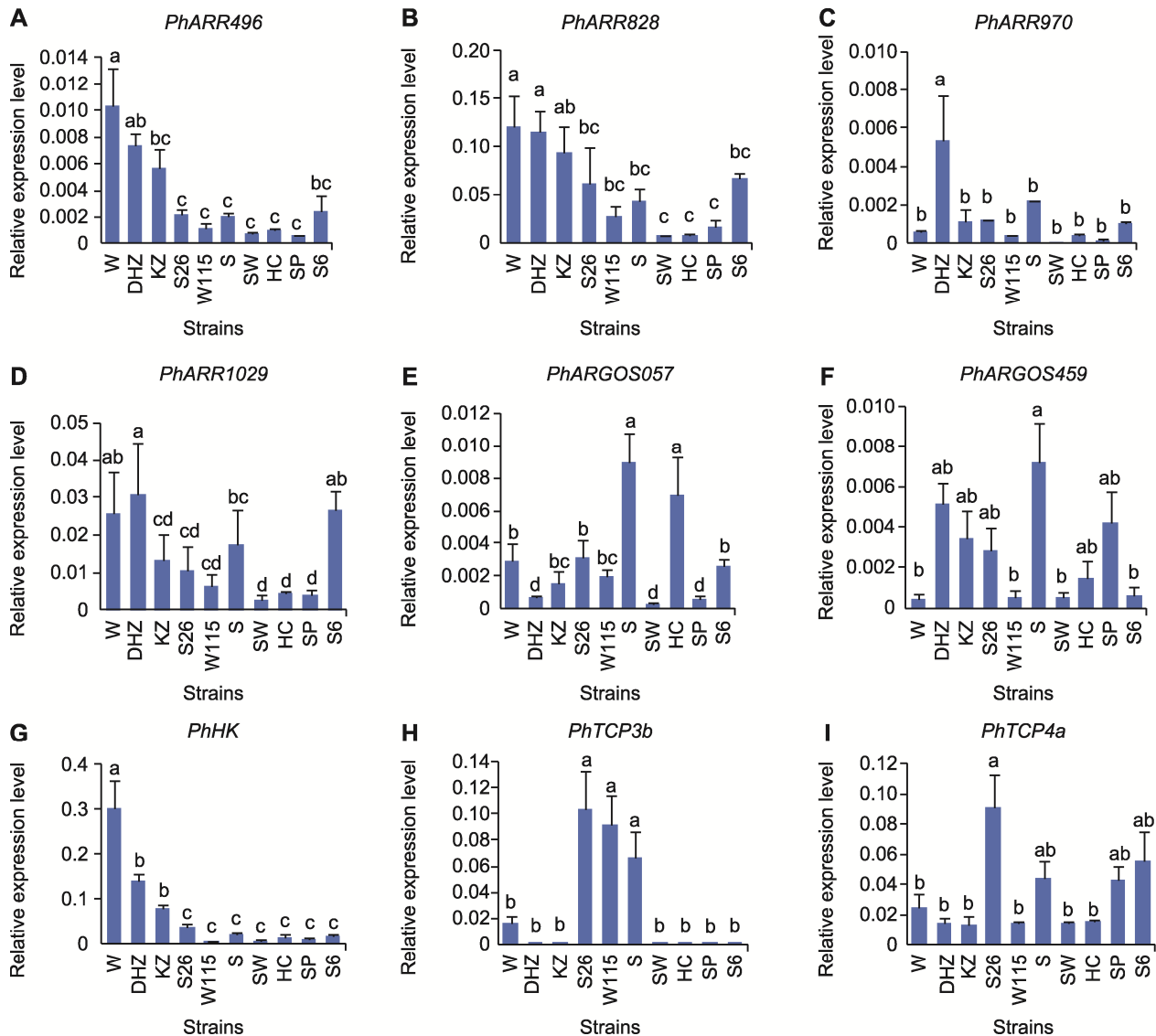


图5 参与调控花朵大小的相关基因在不同矮牵牛株系中的表达水平
误差线代表3个生物学重复的标准误差。不同小写字母表示不同株系间差异显著。

Figure 5 Expression levels of flower size regulating related genes in different strains of petunia
Vertical bars represent SE of three biological replicates. Different lowercase letters indicate significant differences among strains.

大花中的表达水平明显高于中花和小花，在中花和小花中的表达水平相差不大，*PhARR828*和*PhARR1029*在大花中的表达水平也普遍高于中花和小花，但个别中花和小花中的表达水平也相对较高，*PhTCP3b*在中花和部分小花中的表达水平明显高于大花，其它基因的表达水平与花朵大小无明显关系。

2.5 讨论

花朵大小是影响植物进化及其观赏价值的重要性状，

然而，目前对其分子调控机制的研究和认识还十分有限，其中重要原因之一是花朵大小遗传基础复杂，呈现数量性状特点，且表型易受环境影响，传统的遗传学方法无法获得理想的效果。矮牵牛生育期短、花器官大小变异丰富，且具备成熟的遗传转化技术体系，是进行花朵大小遗传研究的理想材料。

Galliot等(2006)利用2个野生矮牵牛材料*P. axillaris*和*P. inflata*的BC₁群体进行QTL分析，结果发现杂交F₁的花冠筒长度介于两亲本之间，并鉴定到6个

影响花冠筒长度的QTLs, 其中4个QTLs同时影响花径大小, 合计可解释68.7%的亲本花径差异。Cao等(2018, 2019)分别利用*P. axillaris* × *P. exserta*和*P. integrifolia* × *P. axillaris*的重组近交系(RIL)群体, 通过SNP和SSR标记对花朵数目、花径和花冠长度等6个性状进行QTL分析, 结果在*P. axillaris* × *P. exserta*群体中获得4个控制花径的QTLs, 在*P. integrifolia* × *P. axillaris*群体中获得2个花径相关QTLs。上述研究显示, 控制矮牵牛主要原生种花大小变化(2.5–6.0 cm)的主效基因数目可能有4–6个。本研究以大花矮牵牛自交系(W)与腋花矮牵牛(S26)和中花自交系(S)进行杂交, 探讨大花×中花的花径遗传规律, 结果发现W × S26组合的花大小变化由1对主基因控制, 且等位基因间存在加性和显性效应, 而W × S组合的花大小变化受2对主基因控制, 基因和等位基因间存在等加显性效应。这一结果表明, 决定矮牵牛花径性状由中花(4.0–6.4 cm)到大花(>6.8 cm)的基因可能只有1–2对, 且一定程度上具有不完全显性的遗传特点或显性基因剂量效应, 这与Ewart (1984)提出的矮牵牛大花基因只有1个的观点相近。W × S F₂群体未出现经典的由2对基因控制的性状分离比, 可能是由于基因的不完全显性和加性效应所致。假设F₁的基因型为AaBb, 那么F₂群体中AABB、AABb、AaBB、AaBb基因型(占比9/16)的表型一定为大花; 如果A基因的贡献大于B基因, AAAb (占比1/16)的表型也可能为大花, 而Aabb、aaBB、aaBb和aabb基因型(占比6/16)的表型则为中花, 这与我们得到的大花与中花的比例接近2:1相符。我们也配制了大花×小花的杂交组合(W × S6), 其F₁代花径处于两亲本之间(4.3–6.1 cm), 且明显小于大花亲本(9.0–10.3 cm), F₂群体则出现花径的广泛分离(2.6–7.8 cm), 且无明显的分离规律, 说明有多对基因参与调控花朵大小。本研究获得的W × S26 F₂和BC₁分离群体为矮牵牛大花基因的定位克隆提供了理想的研究材料。

在花发育过程中, 细胞增殖和扩张最终决定花器官大小, 它们受多种激素调控, 其中生长素和细胞分裂素发挥重要作用(Santner et al., 2009)。例如, 拟南芥ARGOS (*AUXIN-REGULATED GENE INVOLVED IN ORGAN SIZE*)基因受生长素信号诱导, 通过调控下游ANT (*AINTEGUMENTA*)基因的表达控制花器官大小(Hu et al., 2003); ARGOS基因的表达水

平上调或下调, 会相应地促进和抑制花器官的细胞增殖, 从而产生较大或较小的花器官(Hu et al., 2006)。在矮牵牛花中特异表达农杆菌细胞分裂素合成酶基因IPT, 可增加细胞数目从而使花朵变大(Verdonk et al., 2008); 外源施加细胞分裂素也可使花冠显著增大(Nishijima et al., 2006); 拟南芥细胞分裂素受体基因AHK2和AHK3的功能获得型突变导致花器官增大(Bartrina et al., 2017)。这些结果表明, 细胞分裂素及其信号转导对花器官大小具有重要调控作用, 但具体作用机制尚不清楚。type-A RRs转录因子是植物细胞分裂素信号转导过程中的反馈调节因子, 其受细胞分裂素信号诱导表达, 通过竞争磷酸基团反向抑制细胞分裂素信号传递(To et al., 2004, 2007; Kieber and Schaller, 2018)。在矮牵牛大花株系(W)和小花株系(SW)花瓣转录组测序结果中, 我们发现其ARGOS同源基因PhARGOS057、AHK同源基因PhHK以及多数type-A RRs基因(包括PhARR496、PhARR828、PhARR970和PhARR1029等)在大花中的表达水平显著高于小花。因此, 本研究通过qRT-PCR检测了它们在不同花朵大小矮牵牛株系花瓣中的表达情况, 结果显示, PhARR496和PhHK在所有大花材料中的表达水平明显高于中花和小花, PhARR828和PhARR1029在大花中的表达水平也普遍高于中花和小花, 且它们在大花材料中的表达量与花朵大小呈正相关, 即花朵越大(W>DHZ>KZ), 表达水平越高(图5); 而PhARGOS057和PhARR970的表达水平与花朵大小无直接关系, 虽然二者在W株系中的表达水平明显高于SW株系, 这与转录组测序结果一致。基于此, 我们推测细胞分裂素受体基因PhHK的表达上调可能与矮牵牛的大花基因有关, 而type-A RRs在大花中的表达水平普遍高于中花和小花则是由PhHK的上调表达引起。然而, Nishijima等(2011)研究表明, PhHK转基因及其高水平表达并不能诱导矮牵牛的花器官增大。因此, 矮牵牛的大花基因有可能是与细胞分裂素信号途径相关的其它组分基因, 尚待深入研究。后续我们将利用W × S26的F₂和BC₁分离群体, 对矮牵牛的大花决定基因进行定位和分离鉴定。

TCP (TEOSINTE BRANCHED1/CYCLOIDEA/PCF)-miR396-GRF是调控植物器官大小的另一条途径。拟南芥II类TCP基因功能缺失导致叶片边缘细胞分裂加快从而使叶片呈波浪状, 且伴随着明显的叶片

增大(Nath et al., 2003), 其中TCP4基因兼具抑制花瓣生长的作用(Nag et al., 2009); 与之不同的是, 金鱼草(*Antirrhinum majus*) II类TCP基因CIN (CINCINNATA)也抑制叶片生长, 但促进花瓣裂片细胞的分裂和生长(Crawford et al., 2004)。本研究选取2个TCP3/4 (II类TCP基因)同源基因PhTCP3b以及PhTCP4a, 检测其在不同花朵大小矮牵牛株系花瓣中的表达水平, 结果发现它们的表达水平与花朵大小无明显的相关性, 但在大花材料中的表达水平普遍较低, 且有几个中花和小花株系的表达量明显高于大花(图5), 这与II类TCP基因一般具有抑制细胞分裂的功能一致, 但也不排除PhTCP3b和PhTCP4a具有类似金鱼草CIN基因促进花瓣细胞分裂和生长的作用。我们之前的研究显示, PhTCP3b和PhTCP4a基因在矮牵牛大花株系LW中(特别是在花瓣发育的中后期)的表达水平显著高于小花株系SW (Zhang et al., 2020)。因此, PhTCP3b和PhTCP4a对矮牵牛器官大小的调控作用有待进一步研究。

作者贡献声明

孙苗苗: 设计并完成实验, 分析数据并撰写论文; 张蔚和张林霞: 协助实验; 霍竣涛: 协助分析数据; 李志能: 指导实验设计; 刘国锋: 项目构思及总负责, 指导实验设计并修改论文。

参考文献

- Bartrina I, Jensen H, Novák O, Strna M, Werner T, Schmülling T (2017). Gain-of-function mutants of the cytokinin receptors AHK2 and AHK3 regulate plant organ size, flowering time and plant longevity. *Plant Physiol* **173**, 1783–1797.
- Bombarely A, Moser M, Amrad A, Bao MZ, Bapaume L, Barry CS, Bliet M, Boersma MR, Borghi L, Bruggmann R, Bucher M, D'Agostino N, Davies K, Druège U, Dudareva N, Egea-Cortines M, Delledonne M, Fernandez-Pozo N, Franken P, Grandont L, Heslop-Harrison JS, Hintzsche J, Johns M, Koes R, Lv XD, Lyons E, Malla D, Martinoia E, Mattson NS, Morel P, Mueller LA, Muhlemann J, Nouri E, Passeri V, Pezzotti M, Qi QZ, Reinhardt D, Rich M, Richert-Pöggeler KR, Robbins TP, Schatz MC, Schranz ME, Schuurink RC, Schwarzacher T, Spelt K, Tang HB, Urbanus SL, Vandembussche M, Vijverberg K, Villarino GH, Warner RM, Weiss J, Yue Z, Zethof J, Quattrocchio F, Sims TL, Kuhlemeier C (2016). Insight into the evolution of the Solanaceae from the parental genomes of *Petunia hybrida*. *Nat Plants* **2**, 16074.
- Cao Z, Guo YF, Yang Q, He YH, Fetouh MI, Warner RM, Deng ZA (2018). Genome-wide search for quantitative trait loci controlling important plant and flower traits in *Petunia* using an interspecific recombinant inbred population of *Petunia axillaris* and *Petunia exserta*. *G3* **8**, 2309–2317.
- Cao Z, Guo YF, Yang Q, He YH, Fetouh MI, Warner RM, Deng ZA (2019). Genome-wide identification of quantitative trait loci for important plant and flower traits in *Petunia* using a high-density linkage map and an interspecific recombinant inbred population derived from *Petunia integrifolia* and *P. axillaris*. *Horti Res* **6**, 27.
- Crawford BCW, Nath U, Carpenter R, Coen ES (2004). CINCINNATA controls both cell differentiation and growth in petal lobes and leaves of *Antirrhinum*. *Plant Physiol* **135**, 244–253.
- Dai SP, Bao MZ (2004). Advances in genetics and breeding of *Petunia hybrida* Vilm. *Chin Bull Bot* **21**, 385–391. (in Chinese)
- 代色平, 包满珠 (2004). 矮牵牛育种研究进展. 植物学通报 **21**, 385–391.
- Ewart L (1984). Plant breeding. In: Sink KC, ed. *Petunia*. Berlin: Springer. pp. 180–202.
- Fenster CB, Armbruster WS, Wilson P, Dudash MR, Thomson JD (2004). Pollination syndromes and floral specialization. *Annu Rev Ecol Evol Syst* **35**, 375–403.
- Galliot C, Hoballah ME, Kuhlemeier C, Stuurman J (2006). Genetics of flower size and nectar volume in *Petunia* pollination syndromes. *Planta* **225**, 203–212.
- Hu YX, Poh HM, Chua NH (2006). The *Arabidopsis* ARGOS-LIKE gene regulates cell expansion during organ growth. *Plant J* **47**, 1–9.
- Hu YX, Xie Q, Chua NH (2003). The *Arabidopsis* auxin-inducible gene ARGOS controls lateral organ size. *Plant Cell* **15**, 1951–1961.
- Huang TB, Irish VF (2016). Gene networks controlling petal organogenesis. *J Exp Bot* **67**, 61–68.
- Kieber JJ, Schaller GE (2018). Cytokinin signaling in plant development. *Development* **145**, dev149344.
- Krizek BA, Anderson JT (2013). Control of flower size. *J Exp Bot* **64**, 1427–1437.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**, 402–408.

- Nag A, King S, Jack T** (2009). miR319a targeting of *TCP4* is critical for petal growth and development in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 22534–22539.
- Nath U, Crawford BCW, Carpenter R, Coen E** (2003). Genetic control of surface curvature. *Science* **299**, 1404–1407.
- Nishijima T, Miyaki H, Sasaki K, Okazawa T** (2006). Cultivar and anatomical analysis of corolla enlargement of petunia (*Petunia hybrida* Vilm.) by cytokinin application. *Sci Hortic* **111**, 49–55.
- Nishijima T, Niki T, Niki T** (2011). The large-flowered petunia (*Petunia hybrida* Vilm.) genotype promotes expressions of type-A response regulator and cytokinin receptor genes like cytokinin response. *J Japan Soc Hort Sci* **80**, 343–350.
- Santner A, Calderon-Villalobos LIA, Estelle M** (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nat Chem Biol* **5**, 301–307.
- Tan YQ, Yu HQ, Chen QS, Liu Y** (2010). Application of excel in establishment of Chi-square test analysis module in agricultural statistic. *Hubei Agricul Sci* **49**, 3192–3195. (in Chinese)
- 谭永强, 余华强, 陈桥生, 刘莹 (2010). 利用Excel软件建立卡方检验分析模板在农业统计中的应用. *湖北农业科学* **49**, 3192–3195.
- To JPC, Deruère J, Maxwell BB, Morris VF, Hutchison CE, Ferreira FJ, Schaller GE, Kieber JJ** (2007). Cytokinin regulates type-A *Arabidopsis* response regulator activity and protein stability via two-component phosphorylation. *Plant Cell* **19**, 3901–3914.
- To JPC, Haberer G, Ferreira FJ, Deruère J, Mason MG, Schaller GE, Alonso JM, Ecker JR, Kieber JJ** (2004). Type-A *Arabidopsis* response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell* **16**, 658–671.
- Vandenbussche M, Chambrier P, Bento SR, Morel P** (2016). Petunia, your next supermodel? *Front Plant Sci* **7**, 72.
- Venail J, Dell'olivo A, Kuhlemeier C** (2010). Speciation genes in the genus *Petunia*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**, 461–468.
- Verdonk JC, Shibuya K, Loucas HM, Colquhoun TA, Underwood BA, Clark DG** (2008). Flower-specific expression of the *Agrobacterium tumefaciens* isopentenyl-transferase gene results in radial expansion of floral organs in *Petunia hybrida*. *Plant Biotech J* **6**, 694–701.
- Wang JT, Zhang YW, Du YW, Ren WL, Li HF, Sun WX, Ge C, Zhang YM** (2022). SEA v2.0: an R software package for mixed major genes plus polygenes inheritance analysis of quantitative traits. *Acta Agron Sin* **48**, 1416–1424. (in Chinese)
- 王靖天, 张亚雯, 杜应雯, 任文龙, 李宏福, 孙文献, 葛超, 章元明 (2022). 数量性状主基因+多基因混合遗传分析R软件包SEA v2.0. *作物学报* **48**, 1416–1424.
- Zhang ST, Zhou Q, Chen F, Wu L, Liu BJ, Li F, Zhang JQ, Bao MZ, Liu GF** (2020). Genome-wide identification, characterization and expression analysis of TCP transcription factors in *Petunia*. *Int J Mol Sci* **21**, 6594.

Inheritance Analysis of Flower Size and Expression of Related Genes in *Petunia hybrida*

Miaomiao Sun¹, Wei Zhang^{1,2}, Linxia Zhang¹, Juntao Huo^{1,2}, Zhineng Li^{2*}, Guofeng Liu^{1*}

¹Guangzhou Institute of Forestry and Landscape Architecture, Guangzhou 510405, China

²College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract Flower size is a key factor in plant evolution and speciation, and also an important trait that determines plant ornamental value, so it is of great scientific significance and practical value to study the inheritance law and regulatory mechanism of floral size. To clarify the inheritance law of flower size in petunia, the inbred lines and wild species of *Petunia hybrida* with different flower sizes were used to make cross combinations and construct genetic populations in this study, including large-flowered line × medium-flowered lines (W × S26 and W × S) and large-flowered line × small-flowered line (W × S6). The results showed that all F₁ generation of W × S26 were large-flowered plants, while the flower size appeared separation in F₂ population with the ratio between large- and medium-flowered individuals of about 3:1, and the segregation ratio between large- and medium-flowered plants was close to 1:1 in the BC₁ backcross population. For the W × S combination, all F₁ individuals were large-flowered, while the flower size appeared separation in the F₂ population, with large- to medium-flowered plants close to 2:1. The F₁ progenies of W × S6 are all medium-flowered plants, while the flower size of the F₂ generation showed evident variation and continuous distribution. Performing mixed major gene plus polygene inheritance model analysis, the optimal models for W × S26 and W × S combination were 1MG-AD and 2MG-EAD, respectively, according to the standard of minimum AIC value. It is reasonable to conclude that the large flower trait of the inbred line W is controlled by a single dominant gene related to the middle flower trait of S26, with additive dominant effect, whereas the large flower of the inbred line W is controlled by two major genes related to the small flower of the inbred lines with equal additive dominant effect. In addition, nine genes that may regulate flower size of petunia were selected based on the transcriptomic analysis of large and small flowers, and their expression levels were detected in the petals of various strains with different flower sizes by qRT-PCR. The results showed that the expression levels of cytokinin receptor gene *PhHK* and Type-A *RRs* in response to cytokinin signal were generally higher in large flowers than in medium and small flowers, suggesting that cytokinin signaling pathway may be a key factor involved in regulating the large flower trait in petunia.

Key words petunia, flower size, inheritance law, cytokinin signaling pathway

Sun MM, Zhang W, Zhang LX, Huo JT, Li ZN, Liu GF (2024). Inheritance analysis of flower size and expression of related genes in *Petunia hybrida*. *Chin Bull Bot* **59**, 422–432.

* Authors for correspondence. E-mail: znli@swu.edu.cn; gzifla_lgf@gz.gov.cn

(责任编辑: 朱亚娜)