

miR156 调控菊花逆境响应与开花的表达特性研究

秦 梅, 田心宇, 于凯丽, 朱文静, 陈发棣, 陈素梅*

(南京农业大学 园艺学院, 南京 210095)

摘 要:为明确菊花 miR156 及其靶基因 *CmSPL13* 在逆境胁迫应答和生长发育中的表达特性, 该研究以菊花‘神马’为材料, 采用高保真 PCR 技术扩增 MiR156 启动子序列, 并分析该序列特性; 通过激素(茉莉酸甲酯、水杨酸甲酯、生长素类似物 NAA)和逆境胁迫(干旱、盐)处理, 分析菊花 miR156 及其靶基因 *CmSPL13* 对激素和逆境胁迫的响应表达特征; 并分析蔗糖处理下 miR156 表达特性与开花时间的关系, 为 miR156 参与菊花生长发育与逆境响应的分子机制研究奠定基础。结果表明: (1) 克隆获得了 MiR156 启动子 1 584 bp, 该启动子序列包含激素(茉莉酸、水杨酸和生长素)应答、厌氧和干旱诱导等逆境胁迫以及光响应等顺式作用元件。 (2) 茉莉酸甲酯处理下, miR156 的表达水平在 0~3 h 显著上调, 3 h 后逐渐下降, 呈现出先上升后下降的趋势, 而其靶基因 *CmSPL13* 的表达量呈先下降后上升的趋势, 在 12 h 达到峰值; 水杨酸甲酯和生长素 NAA 处理下, miR156 的表达在 3 h 显著下调, 而后逐渐升高, 在 6~12 h 时达到峰值, 而后又逐渐下降, 但 *CmSPL13* 的表达具有与之相反的趋势; PEG 处理下, miR156 的表达水平均低于处理前, 且在 6~24 h 逐渐下调, 其靶基因 *CmSPL13* 在 6~12 h 显著上调; 盐处理下, miR156 的表达水平在 0~3 h 显著上调, 而后逐渐降低, *CmSPL13* 的表达在 6~12 h 逐渐上调。 (3) miR156 的表达水平随着菊花叶片成熟度的增加而逐渐降低, 而 *CmSPL13* 的表达逐渐升高。 (4) 蔗糖可以抑制 miR156 的表达, 但蔗糖处理可显著提高开花相关基因 *CmFTL3*、*CmAP1L1* 和 *CmSOC1* 的表达, 从而促进菊花开花, 花期提前 2.8 d。研究认为, 菊花 miR156 及其靶基因 *CmSPL13* 有参与调控幼年期向成年期的功能, 也存在糖信号抑制 miR156 的表达从而促进菊花开花的调控机制; 茉莉酸和水杨酸可能在处理的后期拮抗调控菊花 miR156 及其靶基因的表达, 并且可能参与盐胁迫的早期应答。

关键词:菊花; miR156; *CmSPL13*; 启动子; 激素; 胁迫; 表达特性

中图分类号: Q785; Q786; Q789

文献标志码: A

Expression Characteristics of miR156 in Regulating Stress Responses and Flowering of Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*)

QIN Mei, TIAN Xinyu, YU Kaili, ZHU Wenjing, CHEN Fadi, CHEN Sumei*

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: To clarify the expression characteristics of chrysanthemum miR156 and its target gene *CmSPL13* in response to stress and growth and development, this study obtained the promoter sequence of MiR156 by high-fidelity PCR amplification and analyzed the sequence characteristics using chrysanthemum ‘Jinba’ as the plant material. Though hormone (methyl jasmonate, methyl salicylic acid, anxin NAA) and stress (drought, salt) treatments, the response and expression characteristics of chrysanthemum

收稿日期: 2022-09-04; 修改稿收到日期: 2023-02-23

基金项目: 国家自然科学基金(32030098, 319724510); 国家重点研发计划(2018YFD1000400)

作者简介: 秦 梅(1996—), 在读士研究生, 研究方向观赏植物遗传育种与分子生物学。E-mail: 2290284668@qq.com

* 通信作者: 陈素梅, 教授, 博士生导师, 研究方向观赏植物逆境与发育生物学。E-mail: chensm@njau.edu.cn

miR156 and the target gene *CmSPL13* to hormone and stress were analyzed. The relationship between miR156 expression characteristics and flowering time under sucrose treatment was analyzed, which laid a foundation for the molecular mechanism of miR156 involved in the growth and development of chrysanthemum and response to stress. The results show that: (1) the MiR156 promoter was successfully cloned, which contains *cis*-acting elements in response to hormones including jasmonic acid, salicylic acid and auxin, anaerobic induction, drought induction and other stresses, light response and so on. (2) Under methyl jasmonate treatment, the expression level of miR156 was significantly up-regulated from 0 to 3 h, and the expression level gradually decreased after 3 h, showing a trend of first increasing and then decreasing. The expression of the target gene *CmSPL13* showed a trend of first decreasing and then rising, reaching a peak at 12 h; under methyl salicylic acid and auxin NAA treatments, the expression of miR156 decreased significantly at 3 h, then increased gradually, reached a peak at 6–12 h, and then gradually decreased, the expression of *CmSPL13* has the opposite trend of miR156; under PEG treatment, the expression level of miR156 was lower than that before treatment, and gradually down-regulated from 6 to 24 h, the target gene *CmSPL13* was significantly upregulated from 6 to 12 h treatment; under salt treatment, the expression level of miR156 was significantly up-regulated from 0 to 3 h, and then gradually decreased, the expression of *CmSPL13* was gradually adjusted up from 6 to 12 h. (3) Quantitative real-time PCR analysis showed that the expression level of miR156 gradually decreased with the increase of chrysanthemum leaf maturity, however, the expression of *CmSPL13* is gradually increasing. (4) Sucrose could inhibit the expression of miR156, significantly increase the expression of flowering-related genes *CmFTL3*, *CmAP1L1* and *CmSOC1*, and promote the flowering of chrysanthemum, the flowering time in sucrose treated plants is 2.8 days earlier than non-treated control. It was suggested that miR156 and its target gene *CmSPL13* were involved in the regulation from infancy to adulthood, and there is also a regulatory mechanism that sugar signals inhibit the expression of miR156 to promote chrysanthemum flowering; jasmonate and salicylic acid may antagonistically regulate the expression of miR156 and its target genes in chrysanthemum at the later stage of treatment, and may participate in the early response to salt stress.

Key words: chrysanthemum; miR156; *CmSPL13*; promoter; hormones; stress; expression profiles

菊花(*Chrysanthemum morifolium*)原产中国,为菊科菊属多年生宿根草本花卉,是中国十大传统名花和世界四大切花之一,因其花型丰富、花色多样,且兼具药用食用价值,备受大众喜爱。菊花多为短日照植物,自然花期在 10~11 月份,难以满足周年供应的需求;另外,菊花栽培过程中土壤盐渍、干旱等胁迫严重影响其生长与品质。因此,解析菊花花期、逆境胁迫应答分子机制具有十分重要的意义。

microRNA (miRNAs)是植物中广泛存在的一类内源性非编码小 RNA 分子,大小通常在 20~24 nt 之间^[1-2]。miRNAs 无法单独行使功能,其通常通过靶切使得靶基因 mRNA 降解或对靶基因编码蛋白进行翻译抑制^[3]从而行使功能。miR156 是一类保守的非编码小 RNA,其靶基因为 SPL(*SQUAMOSA promoter binding like*)家族^[4-5],该家族是植物特有的一类多功能转录因子家族,其部分成员可受 miR156 的剪切调控。miR156-SPL 途径在多个植物生长发育过程发挥调控作用,包括营养相变、花期调控、株型结构、果实发育以及激素应答和胁迫响应等^[6-8]。例如,miR156-SPL 分子模块可以促进

拟南芥幼年期向成年期的转变^[9],并调控相关开花基因从而影响开花和分枝^[10-13];水稻中 miR156 可直接靶切 *OzSPL14*,过表达 *SPL14* 或突变其 miR156 的靶切位点可以减少水稻的分蘖数,增加分枝^[14];番茄^[15]和紫花苜蓿^[16]中过表达 miR156 或 *SPL13* 的 RNAi 干扰植株,侧枝数和营养枝数增加。另外,拟南芥 miR156 的靶基因 *AtSPL9* 与 JAZ3 蛋白互作从而参与茉莉酸介导的抗虫性^[17]。miR156 还可以响应盐^[18]、干旱^[19]、温度^[20]等胁迫,但 miR156 及其靶基因在菊花中参与胁迫应答和开花的功能尚未见报道。

本研究以菊花‘神马’为材料,克隆了 MiR156 启动子,分析 miR156 及其靶基因 *CmSPL13* 响应茉莉酸甲酯、水杨酸及 PEG 等处理的表达特性,为进一步探究 miR156 参与菊花生长发育与逆境响应的分子机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

本研究所用植物材料为菊花切花品种‘神马’,

由南京农业大学中国菊花种质资源保存中心提供。选取长势良好的‘神马’插穗,去除基部 2~5 cm 内的叶片,保留两叶一心,扦插于穴盘,生根后移栽至花盆中,栽培基质为营养土与蛭石(体积比为 1 : 3)混合而成,生长条件为光照强度 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,湿度 78%,温度 22 $^{\circ}\text{C}$,光照/黑暗条件设置短日照为 8 h/16 h、长日照为 16 h/8 h。试验所用组培苗由南京农业大学菊花遗传与育种实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 及 RNA 的提取与反转录 总 DNA 的提取采用 CTAB 法。总 RNA 的提取使用北京华越洋公司的 RNA 提取试剂盒,取 1 000 ng RNA 用作 cDNA 反转录模板,反转录试剂盒为 TaKaRa 公司生产的试剂盒(PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser)。miR156 的反转录采用茎环法^[21]。

1.2.2 基因的定量 PCR 分析 以反转录获得 100 μg cDNA 为模版,使用荧光定量仪 Real Time PCR (Eppendorf),定量反应体系为 20 μL :10 μL SYBR *Premix Ex Taq II*,5 μL cDNA 模板,正、反向引物各 1 μL (100 $\mu\text{mol/L}$,表 1),3 μL ddH₂O。反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s;58 $^{\circ}\text{C}$ 15 s;72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,40 个循环。每个处理包含 3 个生物学重复和 3

次技术重复。基因差异表达以 *CmEF1a*^[22] 为内参基因(表 1),miR156 的差异表达以菊花 *CmU6*^[23] 为内参基因。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 计算基因相对表达量^[24],激素和胁迫处理的相对表达量以处理组与相应对照组的比值表示。

1.2.3 菊花 MiR156 启动子的克隆 根据实验室已有的菊花基因组数据库查找 MiR156 启动子序列,使用 Primer Premier 5 软件设计特异引物(表 1),以‘神马’DNA 为模板克隆 MiR156 启动子区,并连接 pMD19-T 载体送测序,使用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)对克隆获得的 MiR156 启动子序列进行分析。

1.2.4 植物材料的激素处理 选取长势一致的 6~8 叶龄野生型‘神马’植株,对照组喷施清水,实验组分别喷施 0.1 mmol/L 茉莉酸甲酯 (MeJA)、0.1 mmol/L 水杨酸甲酯 (MeSA) 和 50 mg/L NAA,分别在处理后 0、3、6、12 和 24 h 采集对照组和实验组植株顶部第 2 片叶片以上部位。实验含 3 个生物学重复,于液氮中速冻研磨后提取 RNA 于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.5 植物材料的胁迫处理 选取长势一致的 6~8 叶龄野生型‘神马’植株,洗净根部基质后,分别

表 1 本研究所用的引物
Table 1 The primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence(5'→3')	用途 Application
promiR156-F	GCCAAACATTGTACCTACTAACTGTTGGCC	MiR156 启动子克隆 Promoter cloning of MiR156
promiR156-R	ACTTCTTTTTTCTTCATGAACAACC	
EF1 α -F	TTTTGGTATCTGGTCCTGGAG	定量内参引物 qRT-PCR inner reference primer
EF1 α -R	CCATTCAAGCGACAGACTCA	
U6-F	ATACAGAGAAGATTAGCATGGC	miR156 内参引物定量 qRT-PCR inner reference primer of miR156
U6-R	GGACCATTTCTCGATTGTGCG	
RT-miR156-F	GCGGCGGTGACAGAAGAGAGT	miR156 定量引物 qRT-PCR primer of miR156
RT-miR156-R	GCACTGGATACGACGTGCTCA	
miR156-Primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTAT-TCGCACTGGATACGACGTGCTC	miR156 反转录引物 Reverse transcription primer of miR156
RT- <i>CmSPL13</i> -F	ATGGGTATTGCCACCTGGTCGGGT	<i>CmSPL13</i> 定量引物 qRT-PCR primer of <i>CmSPL13</i>
RT- <i>CmSPL13</i> -R	ATGGGTATTGCCACCTGGTCGGGT	
RT- <i>CmFTL3</i> -F	TGGTTTTTGTGCTATTCCGG	<i>CmFTL3</i> 定量引物 qRT-PCR primer of <i>CmFTL3</i>
RT- <i>CmFTL3</i> -R	TCTCCGTCGTCCACCAAATC	
RT- <i>CmSOC1</i> -F	GGAGAAGGATTAGGAACCAGCACTAT	<i>CmSOC1</i> 定量引物 qRT-PCR primer of <i>CmSOC1</i>
RT- <i>CmSOC1</i> -R	TGCGTGTAGTTGTTCAATCTGTTCA	
RT- <i>CmAP1L1</i> -F	GAAAGATGGGAAGAGGTAAGGT	<i>CmAP1L1</i> 定量引物 qRT-PCR primer of <i>CmAP1L1</i>
RT- <i>CmAP1L1</i> -R	GGCTTTCTTCAATAAAACCACC	
RT- <i>CmLFY</i> -F	TGCTGGTTTCTCTTTGCAC	<i>CmLFY</i> 定量引物 qRT-PCR primer of <i>CmLFY</i>
RT- <i>CmLFY</i> -R	AAGAACACGTGGGCAACAAA	

置于清水和 20% PEG8000 中进行模拟干旱处理, 在处理 0、3、6、12 和 24 h 采集对照组和实验组植株的根, 置于液氮中速冻, -80 ℃ 保存。对于盐胁迫处理, 采集植株顶端第 3 片完全展开叶, 分别置于 200 mmol/L NaCl 或清水中^[22], 在处理 0、3、6、12 和 24 h 分别取样, 置于液氮中速冻, -80 ℃ 保存。

1.2.6 miR156 和 CmSPL13 的表达分析 本实验室先前的研究发现, 菊花 miR156 可以靶切 CmSPL13^[25], 为探究 miR156 和 CmSPL13 在菊花幼年或成年转变过程中的表达模式, 选取长势一致的 7 叶龄‘神马’组培苗, 分别取其第 1 至第 7 片叶提取 RNA 备用, 实验包含 3 个生物学重复。

1.2.7 糖处理下 miR156 的表达特性分析 取长势一致的 3~5 叶龄野生型‘神马’植株, 对照组浇清水, 实验组采用 20 mmol/L 蔗糖、20 mmol/L 甘露醇(排除渗透压对植株的影响)浇灌, 每 5 d 浇灌 1 次, 每次每盆浇灌 1.5 L, 而后置于长日照下培养 30 d, 再转入短日照下培养, 观察并记录现蕾时间; 于处理后 0、20、(30+7) d(短日照下培养 7 d)和(30+14) d(短日照下培养 14 d)采集植株顶端第 3 片完全展开叶和顶芽, 置于液氮中速冻后于 -80 ℃ 保存备用。实验包含 3 个生物学重复。

2 结果与分析

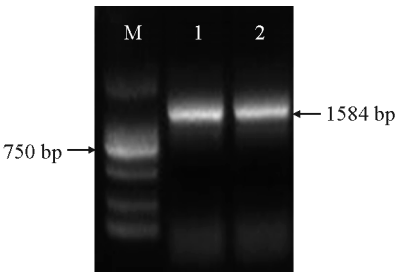
2.1 MiR156 启动子的克隆与分析

以菊花‘神马’DNA 为模板, 克隆获得了 MiR156 上游启动子序列 1 584 bp(图 1)。分析发现, MiR156 启动子含有茉莉酸甲酯响应元件 TGACG-motif、水杨酸响应元件 TCA-element、生长素响应元件 TGA-element, 还有参与干旱诱导响应元件 MBS、参与玉

米醇溶蛋白代谢调节的调控元件 O₂-site 和对厌氧诱导至关重要的顺式作用元件 ARE, 以及光响应元件 GT1-motif、I-box 和 Sp1 等(图 2)。

2.2 激素处理后 miR156 和 CmSPL13 的表达特性

根据菊花 MiR156 启动子区的顺式作用元件, 分别对菊花‘神马’进行茉莉酸甲酯、水杨酸甲酯和生长素类似物 NAA 喷施处理, 以探究 miR156 响应不同处理的表达情况。结果(图 3)显示, 在喷施茉莉酸甲酯后, miR156 的表达量在处理 3 h 达到峰值, 而在处理后 12 和 24 h 显著下降; miR156 的靶基因 CmSPL13 的表达量总体上与 miR156 的表达水平呈相反趋势, 呈现出先下降后逐渐上升的趋势, 在 12 和 24 h 表达量较高。在水杨酸甲酯的处理下, miR156 的表达水平在处理 12 和 24 h 表达量较高, 而该时间点 CmSPL13 的表达水平则较低。在 NAA 处理下, miR156 的表达量显著下调, 而 CmSPL13 的表达显著上调(图 3)。表明 miR156 和 CmSPL13 可响应 MeJA、MeSA 和 NAA 处理。

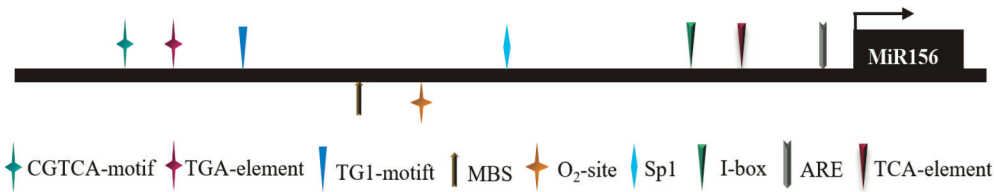


M. DL 2000; 1~2. MiR156 启动子

图 1 ‘神马’MiR156 启动子的克隆

M. DL 2000; 1—2. Promoter fragment of MiR156

Fig. 1 Cloning of MiR156 promoter from chrysanthemum ‘Jinba’



CGTCA-motif. 参与茉莉酸甲酯响应的顺式作用元件; TGA-element. 参与生长素响应的顺式作用元件; GT1-motif 和 Sp1. 光响应元件; MBS. MYB 结合位点参与干旱诱导的顺式作用元件; O₂-site. 参与玉米醇溶蛋白代谢调节的顺式调控元件; I-box. 光响应元件的一部分; TCA-element. 参与水杨酸响应的顺式作用元件; ARE. 对厌氧诱导至关重要的顺式调节元件

图 2 MiR156 启动子所含顺式作用元件模型

CGTCA-motif. *cis*-acting element involved in the MeJA response; TGA-element. Auxin responsive element; GT1-motif and Sp1. Light responsive element; MBS. MYB binding site involved in drought-inducibility; O₂-site. *cis*-acting regulatory element involved in zein metabolism regulation; I-box. Part of a light responsive element; TCA-element. *cis*-acting element involved in salicylic acid response; ARE. *cis*-acting regulatory element essential for the anaerobic induction

Fig. 2 Model diagram of *cis*-acting elements in MiR156 promoter

2.3 干旱和盐胁迫处理下 miR156 和 CmSPL13 的表达分析

结果(图 4)表明,在 20% PEG8000 处理下,miR156 的表达水平在 3 h 出现明显下降,且在 12~24 h 持续下降,而其靶基因 CmSPL13 在 12~24 h 显著上调。在 200 mmol/L 盐处理下,miR156 的表达量在 3 h 显著升高,而后逐渐降低,靶基因 CmSPL13 的表达在 6~12 h 逐渐上调(图 4)。

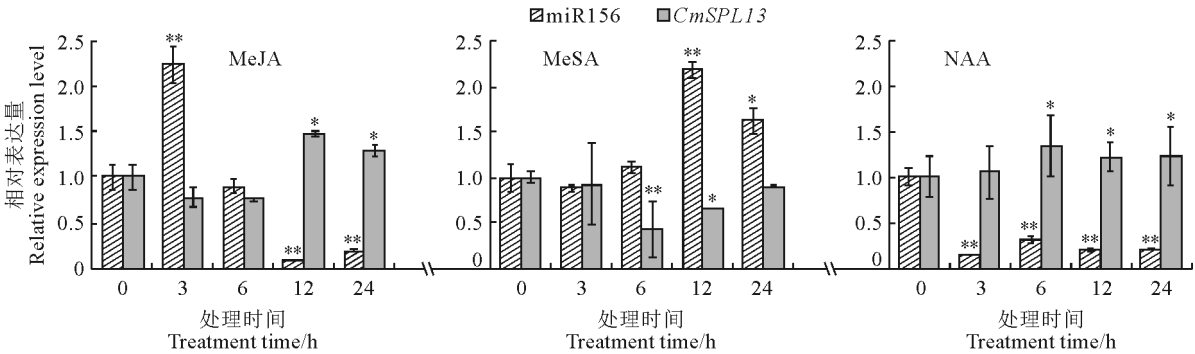
2.4 菊花不同龄叶片中 miR156 和 CmSPL13 的表达

为探究 miR156 在菊花幼苗中的表达模式,以

组培苗为材料,分析了 miR156 及其靶基因 CmSPL13 自基部至顶部叶片中的表达量。发现从基部第 1 片叶片至顶部第 7 片中,随着叶片成熟度的增加,miR156 的表达水平逐步下降,而其靶基因 CmSPL13 的表达量总体上逐渐升高(图 5)。

2.5 糖处理后 miR156 的表达及影响

为研究糖信号对 miR156 表达的影响,采用蔗糖连续处理菊花‘神马’,以甘露醇处理作为对照。研究发现,在长日照下处理 20 d,miR156 的表达水平显著下调,且蔗糖处理组表达水平显著低于甘露



* and ** 分别表示处理与对照(0 h)在 0.05 和 0.01 水平的差异显著性,下同
图 3 不同激素处理下 miR156 和 CmSPL13 的表达

* and ** indicate the significance difference between treatment and control (0 h) at 0.05 and 0.01, respectively, the same as below

Fig. 3 Expression of miR156 and CmSPL13 under treatments of different hormones

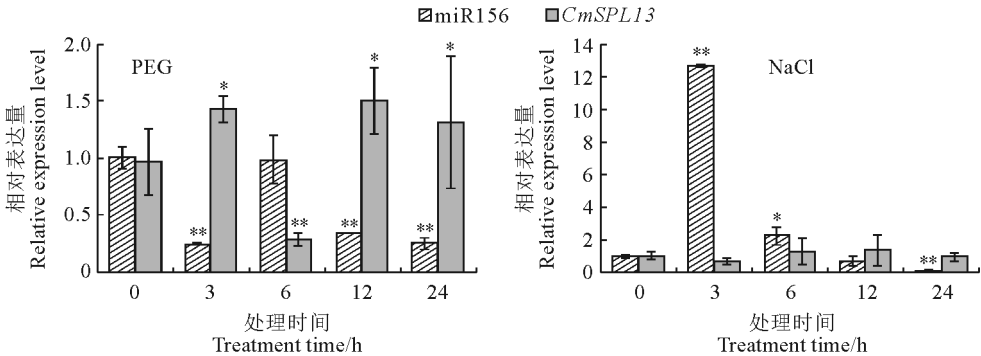


图 4 不同胁迫处理下 miR156 与 CmSPL13 的表达

Fig. 4 Expression patterns of miR156 and CmSPL13 under treatments of PEG and NaCl

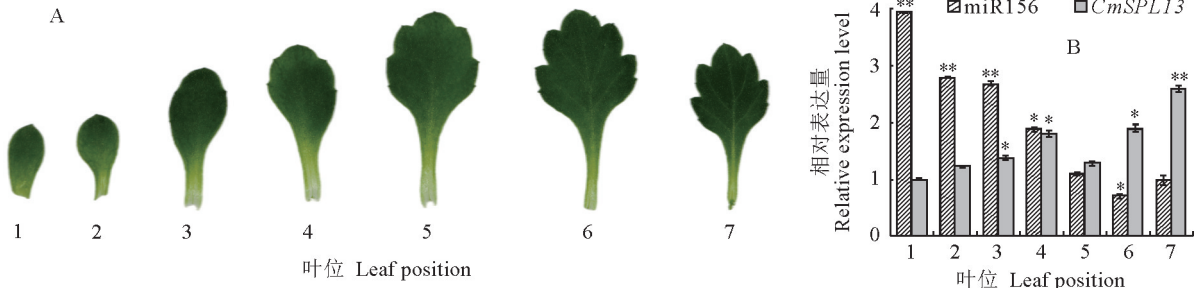


图 5 不同叶位中 miR156 和 CmSPL13 的表达

Fig. 5 Expression level of miR156 and CmSPL13 in leaves at different leaf positions

醇处理组和清水对照组;短日照下培养 7 和 14 d 后,miR156 的表达水平略有上调但仍显著低于处理前,与对照组相比,蔗糖处理组的表达水平最低。结果显示蔗糖可显著抑制 miR156 的表达(图 6)。

对蔗糖处理后的菊花‘神马’进行花期表型观察,发现蔗糖处理促进‘神马’花期提前 2.8 d,而甘露醇处理的植株花期与清水对照组无显著差异(图

7)。短日照处理 7 d 后不同处理的植株叶片和顶芽中基因表达结果(图 8)显示,蔗糖处理下,开花促进 *CmFTL3*、*CmAP1L1* 和 *CmSOC1* 基因的表达,并均显著上调表达,*CmLFY* 基因的表达没有显著变化,而甘露醇处理下各个基因的表达量与清水对照组差异不大(图 8)。

3 讨 论

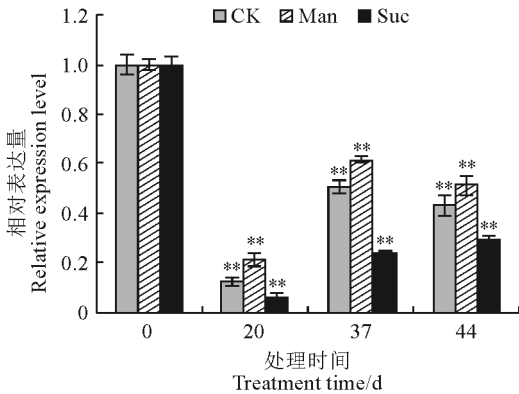
miR156 作为一类 miRNAs,参与调控植物生长和发育多个生命活动过程,在植物对生物和非生物胁迫的应答中也发挥着重要作用,并参与了多种激素响应和胁迫应答过程。本研究率先探讨了其在菊花中的表达特性。

3.1 miR156 参与菊花对激素的响应

本研究结果表明,外源激素 MeJA 处理菊花可以在短时间(3 h)内诱导 miR156 的表达,随着时间的推移在 12 h、24 h 时其表达水平显著下降,miR156 的靶基因 *CmSPL13* 的表达趋势总体上与 miR156 相反,与 miR156 靶切 *CmSPL13* 的结果相吻合。有趣的是,在本研究中 MeSA 处理 12~24 h 后,miR156 的表达水平显著上调,而 *CmSPL13* 的表达水平相应上调,表明在菊花中 JA 和 SA 可能在处理的后期拮抗调控 miR156 及其靶基因的表达。类似地,在拟南芥中茉莉酸(JA)含量随着年龄的增长而下降,表现出与 miR156 相同的表达模式。进一步研究发现,miR156 靶向的 *AtSPL9* 与 JAZs 蛋白的 N 端互作,抑制了 JAZ3 的降解,从而提高了拟南芥的抗病性^[17],表明 miR156 及其靶基因参与了 JA 调控的抗病性。在水稻中,JA 可以抑制 *OsSPL7*、*OsSPL11*、*OsSPL11*、*OsSPL28* 的表达,而水杨酸(SA)则诱导这些 SPLs 的表达^[26]。在本研究中,50 mg/L NAA 处理抑制了 miR156 的表达水平,而 *CmSPL13* 的表达显著上调。但是在小金海棠中的研究发现,生长素类似物 IBA 可以诱导小金海棠幼年期和成年期半木质化枝中 miR156b 和 miR156d 的表达,从而促进不定根的再生^[27]。因此推测,菊花中生长素对 miR156 调控作用不同于小金海棠,也可能 miR156 的表达水平受生长素类似物浓度的影响,将在今后进一步探究。

3.2 miR156 参与菊花对胁迫的应答响应

本研究表明,20% PEG8000 模拟干旱胁迫处理下,miR156 的表达水平平均低于处理前,并且在 6~12 h 持续下降,而 *CmSPL13* 的表达在 6~12 h 持续上调。类似地,在干旱胁迫下,玉米和水稻中



CK、Man、Suc 分别表示清水、甘露醇、蔗糖,下同

图 6 蔗糖处理后 miR156 的表达

CK, Man and Suc indicate water, mannitol and sucrose treatments, the same as below

Fig. 6 The expression patterns of miR156 under treatment of sucrose

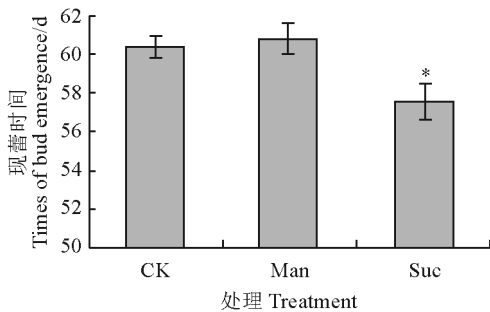


图 7 不同处理下‘神马’的现蕾时间

Fig. 7 The days of bud emergence of ‘Jinba’ under different treatments

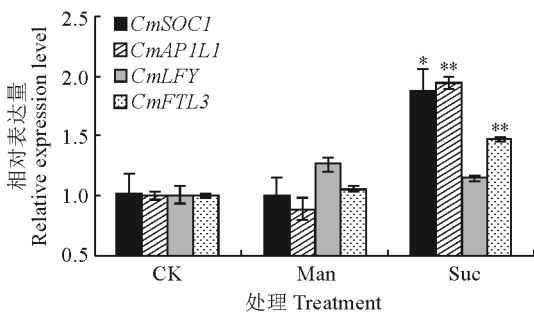


图 8 不同处理下开花相关基因的表达

Fig. 8 Expression of flowering time regulating genes under different treatments

miR156 表达量上调,而拟南芥、大麦、小麦、桃树、杨柳稷中其表达量下调^[28],因此推测菊花中 miR156 可能与玉米、水稻等植物中的 miR156 发挥着类似的干旱胁迫应答模式。在水稻中,miR156 过表达转基因幼苗表现出较高的耐盐性^[29]。但过表达 miR156 则降低了苹果的耐盐性,超表达其靶基因 *SPL13* 则耐盐性提高,进一步研究发现,其靶基因 *SPL13* 通过结合 *MdWRKY100* 启动子区的 GTAC 基序从而提高苹果耐盐性^[18]。本研究发现,200 mmol/L 盐处理下,miR156 的表达量在 3 h 显著升高,之后有所降低,而 *CmSPL13* 的表达变化差异不大;推测,菊花 miR156 可能参与盐胁迫早期应答,其对盐胁迫的应答可能通过调控 *CmSPL13* 以外的靶基因而发挥主要作用,或者在 *CmSPL13* 蛋白翻译水平发挥调控作用。

3.3 miR156 推迟菊花的营养相变和成花转变

高等植物的生命周期包括两个主要的阶段,第一阶段是幼年期向成年期的过渡,第二阶段是从成年期向生殖期的过渡,发育转变的正确时间对植物的生存和繁殖至关重要,miR156 则是调控这两个重要转化过程的关键核心因子^[30]。在植物发育过程中,miR156 表达水平的下调导致其靶基因 *SPLs* 的上调,从而促进植株从幼年期向成年期的转变。本研究以菊花组培苗为材料,分析了自基部至顶部叶片中 miR156 及其靶基因 *CmSPL13* 的表达量,发现从基部第 1 片叶片至顶部第 7 片中,随着叶片

成熟度的增加 miR156 的表达水平逐步降低,相应地,*CmSPL13* 表达水平逐渐增加。拟南芥中过表达 miR156 则表现出幼年期延长,花期推迟的表型^[31],而敲除 miR156,植株的幼年期则明显缩短^[9]。在玉米^[32]、矮牵牛^[33]、紫花苜蓿^[34]等物种中均发现 miR156-SPL 具有调控营养相变和开花时间的功能。因此推测菊花中 miR156-*CmSPL13* 也有参与调控幼年期向成年期转变的功能。越来越多的研究表明,糖信号可以抑制幼年期 miR156 的高表达进而促进营养相变。本研究结果表明蔗糖可显著抑制 miR156 的表达,促进菊花‘神马’花期提前,且发现蔗糖处理下开花促进基因 *CmFTL3*、*CmSOC1*、*CmAP1L1* 均出现显著上调表达,而 *CmLFY* 的表达没有明显变化,*CmLFY* 与 *CmFTL3* 等基因都参与调控花期,只是在不同的调控路径中^[9]。类似地在拟南芥中,*AtNF-YA8* 可以直接与 MiR156 的启动子结合并激活其转录,在幼年期 *AtNF-YA8* 整合年龄路径和糖信号直接触发 miR156-SPLs 调控过程,抑制营养相变;在成年期叶片中,随着发育年龄的增加和糖的积累,*AtNF-YA8* 的表达受到抑制,进而降低了 miR156 的表达,从而促进开花^[16]。葡萄糖处理可抑制拟南芥 miR156a 和 miR156c 的表达,缩短幼年期,促进植株提前开花^[35]。因此推测在菊花中也存在中糖信号抑制 miR156 的表达从而促进菊花开花的调控机制,这为今后进一步开展糖与 miR156 精细调控菊花开花奠定了基础。

参考文献:

[1] CHEN X M. Small RNAs and their roles in plant development [J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2009, 25: 21-44.

[2] SONG X, LI Y, CAO X, *et al.* MicroRNAs and their regulatory roles in plant-environment interactions [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2019, 70: 489-525.

[3] JEONG D H. Functional diversity of microRNA variants in plants [J]. *Journal of Plant Biology*, 2016, 59(4): 303-310.

[4] BONNET E, HE Y, *et al.* TAPIR, a web server for the prediction of plant microRNA targets, including target mimics [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(12): 1 566-1 568.

[5] RHOADES M W, REINHART B J, LIM L P, *et al.* Prediction of plant microRNA targets [J]. *Cell*, 2002, 110(4): 513-520.

[6] ZHENG C, YE M, SANG M, *et al.* A regulatory network for miR156-SPL module in *Arabidopsis thaliana* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(24): 6 166.

[7] WANG J W. Regulation of flowering time by the miR156-mediated age pathway [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(17): 4 723-4 730.

[8] WANG H, WANG H. The miR156/SPL module, a regulatory hub and versatile toolbox, gears up crops for enhanced agronomic traits [J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(5): 677-688.

[9] XU M L, HU T Q, ZHAO J F, *et al.* Developmental functions of miR156-regulated SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) genes in *Arabidopsis thaliana* [J]. *PLoS Genetics*, 2016, 12(8): e1006263.

[10] JUNG J, LEE H, RYU J, *et al.* SPL3/4/5 integrate developmental aging and photoperiodic signals into the FT-FD module in *Arabidopsis* flowering [J]. *Molecular Plant*, 2016, 9(12): 1 647-1 659.

[11] HYUN Y, RICHTER, VINCENT C, *et al.* Multi-layered regulation of SPL15 and cooperation with SOC1 integrate endogenous flowering pathways at the *Arabidopsis* shoot meristem [J]. *Developmental Cell*, 2016, 37(3): 254-266.

[12] XIE Y, ZHOU Q, ZHAO Y, *et al.* FHY3 and FAR1 integrate light signals with the miR156-SPL module-mediated aging pathway to regulate *Arabidopsis* flowering[J]. *Molecular Plant*, 2020, **13**(3): 483-498.

[13] XIE Y, LIU Y, MA M, *et al.* *Arabidopsis* FHY3 and FAR1 integrate light and strigolactone signaling to regulate branching[J]. *Nature Communications*, 2020, **11**(1): 1 955.

[14] JIAO Y, WANG Y, XUE D, *et al.* Regulation of OsSPL14 by OsmiR156 defines ideal plant architecture in rice[J]. *Nature Genetics*, 2010, **42**(6): 541-544.

[15] CUI L, ZHENG F, WANG J, *et al.* miR156a-targeted SBP-Box transcription factor SlSPL13 regulates inflorescence morphogenesis by directly activating SFT in tomato[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, **18**(8): 1 670-1 682.

[16] RUIMIN, GAO, MARGARET, *et al.* SPL13 regulates shoot branching and flowering time in *Medicago sativa* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2018, **96**(1): 119-133.

[17] MAO Y B, LIU Y Q, CHEN D Y, *et al.* Jasmonate response decay and defense metabolite accumulation contributes to age-regulated dynamics of plant insect resistance[J]. *Nature Communications*, 2017, **8**: 13 925.

[18] MA Y, XUE H, *et al.* The miR156/SPL module regulates apple salt stress tolerance by activating MdWRKY100 expression [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, **19**(2): 311-323.

[19] AYENNEW B, AMYOT L, *et al.* Involvement of the miR156/SPL module in flooding response in *Medicago sativa* [J]. *Scientific Reports*, 2021, **11**(1): 3 243.

[20] ZHANG M, AN P, LI H, *et al.* The miRNA-mediated post-transcriptional regulation of maize in response to high temperature[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, **20**(7): 1 754.

[21] CHEN C, RIDZON D, *et al.* Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, **33**(20): e179.

[22] 陈发棣, 种昕冉, 王海滨, 等. 一种荧光定量 PCR 鉴定菊花内, 外源基因拷贝数的引物对及方法: CN105112534A[P]. 2015-12-02.

[23] 黄飞飞, 李 贺, 张志宏. 苹果 MicroRNA 的茎环 RT-PCR 检测及离体试管苗与田间苗表达差异[J]. 华北农学报, 2010, **25**(1): 104-109.

HUANG F F, LI H, ZHANG Z H. Detection of microRNA in apple by stem-loop RT-PCR and different expression of them between *in vitro* plants and *in vivo* plants[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2010, **25**(1): 104-109.

[24] 于凯丽. 菊花 miR156 靶基因 *CmSPLs* 功能初步鉴定[D]. 南京: 南京农业大学, 2018.

[25] 刘 涛. 基于 RT-qPCR 技术的 microRNA 表达水平检测方法[J]. 生命的化学, 2022, **42**(4): 781-787.

LIU T. Research progress of microRNA expression level detection methods based on RT-qPCR[J]. *Chemistry of Life*, 2022, **42**(4): 781-787.

[26] 刘晓龙. 脱落酸(ABA)对水稻耐碱胁迫的诱抗效应及机理研究[D]. 哈尔滨: 中国科学院大学, 2019.

[27] 肖桂青, 卢向阳, 黄荣峰, 等. 3 个水稻类病变基因的逆境胁迫及激素响应特征[J]. 分子植物育种, 2015, **13**(7): 1 462-1 468.

XIAO G Q, LU X Y, HUANG R F, *et al.* Abiotic stresses and hormones responses in expression of three LMM genes in rice[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2015, **13**(7): 1 462-1 468.

[28] XU X, XU L, HU X, *et al.* High miR156 expression is required for auxin-induced adventitious root formation via *Mx-SPL26* independent of *PINs* and *ARFs* in *Malus xiaojinensis* [J]. *Front Plant*, 2017, **8**: 1 059.

[29] NADARAJAH K, KUMAR I S. Drought response in rice: the miRNA story[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, **20**(15): 3 766.

[30] CUI L G, SHAN J X, SHI M, *et al.* The miR156-SPL9-DFR pathway coordinates the relationship between development and abiotic stress tolerance in plants[J]. *The Plant Journal*, 2015, **82**(5): 901.

[31] MA J, ZHAO P, LIU S, *et al.* The control of developmental phase transitions by microRNAs and their targets in seed plants[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, **21**(6): 1 971.

[32] YANG L, XU M, *et al.* Sugar promotes vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana* by repressing the expression of MIR156A and MIR156C[J]. *eLife*, 2013, **2**: e00260.

[33] OSADCHUK K, CHENG C L, IRISH E E. The integration of leaf-derived signals sets the timing of vegetative phase change in maize, a process coordinated by epigenetic remodeling[J]. *Plant Science*, 2021, **312**: 111 035.

[34] ZHOU Q, SHI J, LI Z, *et al.* miR156/157 targets SPLs to regulate flowering transition, plant architecture and flower organ size in *petunia* [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2021, **62**(5): 839-857.

[35] HANG Z, KE L, LIN M, *et al.* *Arabidopsis* NUCLEAR FACTOR Y A8 inhibits the juvenile-to-adult transition by activating transcription of MIR156s[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2020, **71**(16): 4 890-4 902.

(编辑:宋亚珍)