

菊花miRNA在花发育中的功能研究进展

徐诗瑶

(湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南省长沙市, 410128; 3303598428@qq.com)

摘要: 菊花 (*Chrysanthemum Morifolium*) 具有重要的观赏价值和经济价值, 其花发育的研究对于菊花品种改良和花卉产业具有重要意义。近年来, microRNA (miRNA) 作为非编码小分子RNA中重要的基因表达调控因子, 在调控植物生长发育过程中发挥关键作用。本文系统综述了菊花miRNA在花发育中的功能研究进展, 重点探讨了miRNA在开花时间调控、花器官形态建成以及花色形成中的作用机制, 并展望了其在菊花分子育种中的应用潜力。

关键词: 菊花; miRNA; 花发育; 基因调控; 拟南芥转化

引言

菊花 (*Chrysanthemum Morifolium*) 作为世界四大切花之一, 其在全球花卉市场占据核心地位。但其典型的短日开花特性与非生物胁迫敏感性, 严重限制了周年化生产与品质稳定性。因此, 阐明菊花花发育与调控网络, 是分子育种领域亟待解决的关键问题。

在植物基因表达调控中, microRNA (miRNA) 凭借转录后水平的精准调控作用, 成为解析复杂性状的核心分子开关。从拟南芥到水稻, 保守的miRNA通路 (如miR156-SPL和miR172-AP2模块) 已被证实是调控植物发育阶段转换、开花时间及器官发育的核心调控枢纽。这些在模式植物中取得的突破性发现, 为我们理解生命过程的调控提供了经典范式。

然而, 将模式植物的简单调控模型迁移至菊花这类具有复杂基因组 (如异源六倍体) 的园艺作物时, 我们面临着显著的演化鸿沟。作为异源六倍体, 菊花基因组存在大量基因冗余、旁系同源基因功能分化及物种特异性调控因子, 使得其miRNA调控网络呈现出远超模式植物的复杂性。尽管高通量测序技术已初步揭示了菊花miRNA组的组成, 然而, 绝大多数新鉴定的miRNA分子仍功能未知状态, 其转录调控机制、靶标基因的网络调控模式、以及如何整合内外源信号精确调控花器官发育与花色形成, 仍是当前研究的核心问题, 尚未得到系统解答。

这种功能的缺失, 严重阻碍了miRNA理论向菊花分子育种技术的转化。因此, 系统梳理菊花miRNA研究的现状, 厘清其从生物合成到功能执行的独特路径, 解析复杂调控逻辑背后的共性规律与物种特异性特征, 已成为连接基础研究与育种应用的必要桥梁

1. 菊花miRNA的克隆与鉴定

1.1. 传统克隆与高通量测序技术

菊花miRNA的克隆与鉴定经历了从传统Sanger测序到高通量测序 (NGS) 的技术革新。早期研究受限于测序通量和成本, 主要通过构建小RNA文库结合Sanger测序鉴定miRNA, 例如通过差异筛选法发现与花发育相关的保守miRNA (如miR156、miR172)。然而, 传统方法效率低且难以覆盖低丰度miRNA [1-2]。

随着Illumina HiSeq、PacBio SMRT等NGS技术的发展, 菊花miRNA的鉴定效率显著提升。对菊花不同发育阶段的花芽进行sRNA测序, 共鉴定出58个保守miRNA家族和21个物种特异性miRNA, 其中包括多个与花器官形成相关的miRNA (如Cmo-miR319、Cmo-miR164) [3]。此外, 三代测序 (PacBio) 因其长读长优势, 能够准确解析miRNA前体 (pre-miRNA) 的二级结构, 为菊花miRNA的功能研究提供了结构生物学基础。

1.2. 生物信息学预测与验证

1.2.1. 生物信息学预测

生物信息学预测是菊花miRNA鉴定的重要辅助手段。通过比对miRBase数据库中的已知miRNA序列,结合机器学习算法(如miRDeep2、miRPlant)预测候选miRNA。例如,我们可以利用miRDeep2预测菊花中的miR285c家族成员,并通过RACE技术验证nov_miR285c的前体序列。

1.2.2. miRNA功能验证

Northern Blot为检测miRNA表达水平的经典方法。该技术可直观显示miRNA的长度和表达丰度,适用于低通量验证。在菊花研究中,Northern Blot可以验证Cmo-miR156在菊花花芽分化期的显著积累。研究显示,Cmo-miR156在营养生长期高表达,而在光周期诱导后表达量显著下降,这一动态变化与其靶基因SPL的转录抑制效应高度吻合。该研究不仅验证了Cmo-miR156的时空特异性表达,还为阐明miR156-SPL模块调控菊花成花转变的分子机制提供了关键实验证据。然而,该方法对操作技术要求较高,且存在灵敏度较低、样本需求量大[4-5]。实时荧光定量PCR则利用茎环引物进行miRNA特异性扩增,定量分析其在花发育不同阶段的动态表达。该方法灵敏度高,可检测低至10拷贝的miRNA,适用于多样本、多时间点的动态分析。然而,茎环引物的设计需严格匹配miRNA的5'端序列,以避免非特异性扩增。在菊花研究中,Wang等通过qRT-PCR分析了Cmo-miR172在短日照处理下的表达模式。结果显示,光周期诱导后Cmo-miR172的表达量上升2.5倍,而其靶基因CmTOE1(AP2-like转录因子)mRNA水平显著下降。这一负调控关系揭示了Cmo-miR172通过抑制成花抑制因子促进菊花开花的分子机制[6-7]。此外,内参基因的选择(如U6 snRNA或5S rRNA)对数据可靠性至关重要,需通过geNorm或NormFinder软件验证其稳定性。另外,降解组测序则是通过捕获miRNA介导的mRNA剪切产物,直接鉴定miRNA的靶基因。该技术的核心优势在于高通量解析靶基因网络,且无需依赖序列保守性假设。降解组测序显示,Cmo-miR858在菊花花瓣中特异性剪切MYB75mRNA的10-11位核苷酸,导致花青素合成基因(CmANS、CmUFGT)表达下调,花色由深红变为浅粉[8]。

2. 菊花microRNA在花发育中的功能

2.1. 开花时间调控

菊花开花时间受光周期和温度信号的精密调控,miRNA通过靶向成花相关基因参与这一过程[9]。Cmo-miR156是调控菊花成花转变的核心因子,其通过剪切SPL(SQUAMOSA-promoter binding protein-like)基因家族成员(如SPL3和SPL9)的mRNA,抑制其蛋白翻译。SPL蛋白可直接激活成花素基因FT(FLORERING LOCUS T)的表达,而Cmo-miR156的高表达可显著延迟菊花从营养生长向生殖生长转变。

此外,Cmo-miR172通过抑制AP2-like转录因子(如TOE1)解除对FT的抑制,从而促进开花。研究显示,短日照或低温处理下Cmo-miR172的表达量上升2.5倍,与TOE1的下调呈显著负相关。Cmo-miR399通过调控磷信号通路影响开花时间,表明miRNA在环境信号与成花途径间起桥梁作用。然而,miRNA介导的调控网络可能受表观遗传修饰(如DNA甲基化)影响,其具体机制仍需进一步解析。

2.2. 花器官形态建成

菊花花器官的形态多样性(如舌状花与管状花的比例)受miRNA介导的细胞增殖和极性调控。Cmo-miR319通过靶向TCP4基因调控花瓣细胞扩张。在重瓣菊花品种中,Cmo-miR319的高表达导致TCP4mRNA的剪切,抑制其蛋白功能,最终形成较小且对称性增强的花瓣。此外,Cmo-miR164通过沉默NAC1(NAM/ATAF/CUC)基因调控花器官边界形成。研究表明,Cmo-miR164的过表达导致舌状花数量增加,而敲除该miRNA则使管状花比例上升。这一发现揭示了miR164-NAC模块在菊花花型多样性进化中的关键作用。值得注意的是,miRNA的功能可能受miRNA(miRNA互补链)的竞争性抑制,需通过链特异性qRT-PCR区分其活性形[10]。

2.3. 花色形成

花色由类黄酮、花青素和类胡萝卜素等色素共同决定,miRNA通过靶向色素合成相关基因调控花色[11]。Cmo-miR858通过剪切MYB75基因的mRNA抑制其翻译,导致花青素合成酶基因(如CmANS和CmUFGT)的表达下调,从而使花瓣颜色由深红变为浅粉。降解组测序显示,Cmo-miR858在花瓣发育中期特异性结合MYB75mRNA的第10-11位核苷酸[12]。此外,Cmo-miR828通过生成次级phasiRNA(phased, secondary, small interfering RNA)沉默多个花色苷合成基因(如CHS和DFR),形成级联调控网络[13]。然

而，环境因素（如光照强度和pH值）可能干扰miRNA的稳定性，需结合代谢组学分析色素含量与miRNA表达的相关性。

3. 拟南芥转化分析

近年来，菊花早期花发育阶段的miRNA研究取得显著进展。通过sRNA测序和降解组分析，研究者从菊花花芽分化初期筛选到一类新型miRNA（如nov_miR285c）。生物信息学分析表明，其前体序列在基因组中缺乏保守同源区域，提示其为菊花特有的调控因子 [14-15]。为验证其功能，研究可采用模式植物拟南芥（*Arabidopsis Thaliana*）异源转化系统进行功能解析，凭借其基因组高度注释、遗传操作便捷以及表型分析标准化等优势，为菊花miRNA的功能解析提供了高效且可靠的异源验证平台。

3.1. 技术体系

3.1.1. 载体设计与遗传转化

采用基因克隆技术，以菊花为材料，扩增miRNA编码基因。利用miRNA Design引物设计软件（Vazyme）进行特异的逆转录引物设计和后续的qPCR引物设计，通过PCR技术扩增目的基因，并与线性化载体连接形成重组DNA [16]；将重组DNA导入大肠杆菌，农杆菌介导的花序侵染法（Floral Dip）转化拟南芥。这个过程是基因工程中实现目的基因稳定表达和遗传的关键步骤。

3.1.2. 转基因阳性植株的筛选与鉴定

目前，该流程主要依赖于分子鉴定与抗性筛选相结合的策略。PCR扩增是验证T-DNA整合的常用方法，通常利用针对外源表达框设计的特异性引物进行。为弥补PCR可能存在的假阳性，常辅以Basta喷施筛选鉴定和多次自交纯化阳性苗 [17]，通过观察后代群体的抗性分离比确认转基因株系的纯合状态。然而，菊花miRNA前体序列与拟南芥内源序列可能存在较高同源性，使得PCR引物设计面临特异性挑战。因此，优化引物设计流程对提升研究结论的准确性至关重要。

3.2. 表型分析及功能验证

3.2.1. 表型分析

观察转基因拟南芥植株的表型变化，分析miRNA对花发育的影响。Cmo-miR858在拟南芥中的功能验证表明其通过调控花青素合成相关基因影响花色。Cmo-miR858通过剪切MYB75基因的mRNA，抑制其翻译，导致花青素合成酶基因（如CmANS和CmUFGT）的表达下调，从而使花瓣颜色由深红变为浅粉。降解组测序显示，Cmo-miR858在花瓣发育中期特异性结合MYB75 mRNA的第10-11位核苷酸。此外，Cmo-miR828通过生成次级phasiRNA（phased siRNA）沉默多个花色苷合成基因（如CHS和DFR），形成级联调控网络。这些研究表明，miRNA在菊花花色调控中起着重要作用 [18-19]。

3.2.2. 基因表达分析

通过实时荧光定量PCR（RT-qPCR）技术检测开花相关基因的表达水平，进一步分析miRNA的功能。例如，在转基因拟南芥中，花器官发育相关基因AP1、FUL、SOC1等的表达显著上调 [20]，而开花抑制子FLC的表达下调。

3.2.3. 功能机制

菊花miRNA通过靶向关键调控因子，形成级联信号网络以精细调控花发育。Cmo-miR319通过靶向TCP4基因调控花瓣细胞扩张，高表达导致TCP4 mRNA的剪切，抑制其蛋白功能，最终形成较小且对称性增强的花瓣 [21]。此外研究表明，Cmo-miR164通过沉默NAC1基因调控花器官边界形成。超表达菊花CmSPL4.1基因拟南芥植株开花时间显著提前，表明miR156通过靶向CmSPL4.1调控菊花的开花时间 [22]。

4. 菊花miRNA研究的挑战与展望

4.1. 当前问题

4.1.1. 基因组复杂性

尽管菊花miRNA研究已取得显著进展，但其基因组复杂性和功能验证技术不足仍是主要障碍。菊花（*Chrysanthemum Morifolium*）作为异源六倍体植物（ $2n=6x=54$ ），基因组中存在大量重复序列和旁系同源基因，导致miRNA靶标预测的准确性受限 [23]。例如，单个miRNA可能靶向多个同源基因（如SPL家族成员），而现有生物信息学工具（如psNATarget）难以区分其功能优先级。此外，尽管近年发布了菊花基因组草图，但其组装连续性（Contig N50仅为1.2 Mb）和注释完整性（约60%基因功能未知）仍远低于模式植物 [24]。这一局限性直接影响了miRNA调控网络的全局解析。

4.1.2. 功能验证体系不完善

菊花遗传转化效率低（通常低于5%）且周期长（需6-8个月），严重制约了稳定转基因株系的构建。目前研究多依赖瞬时表达系统，如农杆菌注射（Agroinfiltration）或病毒诱导基因沉默（VIGS），但这些方法存在表达不稳定和脱靶效应问题 [25]。

4.2. 未来研究方向

4.2.1. 多组学整合与单细胞技术

结合单细胞测序（scRNA-seq）和空间转录组技术，可解析miRNA在花器官特定细胞层（如表皮、维管束）中的时空表达模式 [26-27]。例如，通过scRNA-seq揭示Cmo-miR164在舌状花原基细胞中的特异性分布，将深化对花型建成的理解。此外，整合代谢组学分析色素含量与miRNA表达的相关性，可建立“miRNA-靶基因-代谢物”三维调控网络。

4.2.2. 精准基因编辑技术

传统CRISPR/Cas9系统因依赖DNA双链断裂修复机制，在六倍体菊花中易产生嵌合体突。新兴的CRISPR/Cas13d系统可直接靶向miRNA前体（pre-miRNA）的茎环结构，实现miRNA的敲低或过表达，避免基因组不可逆编辑 [28]。此外，利用纳米材料（如碳点）递送Cas13d核糖核蛋白复合体（RNP），可显著提高转化效率并缩短周期。

4.2.3. 分子育种与合成生物学应用

开发miRNA分子标记辅助选择（MAS）技术，可加速培育花期可调、花型多样的菊花新品种 [29]。例如，基于Cmo-miR172的单核苷酸多态性（SNP）标记，可筛选早花性状的育种材料。此外，合成生物学策略（如人工miRNA模拟物）通过叶面喷施或纳米载体递送，可实现非转基因的花色调控。近期研究表明，脂质体包裹的Cmo-miR858模拟物可穿透菊花花瓣表皮细胞，显著抑制MYB75表达并改变花色。

5. 结语

菊花miRNA在花发育中的功能研究为解析其开花时间、花器官形态和花色形成的分子机制提供了新的视角。尽管面临基因组复杂性和功能验证技术不足等挑战，但随着高通量测序和基因编辑技术的快速发展，菊花miRNA的功能解析及其在分子育种中的应用前景广阔。新miRNA（如nov_miR285c）的鉴定与跨物种功能验证，为菊花花发育研究提供了新的切入点。尽管拟南芥模型加速了功能解析，但菊花基因组复杂性和转化技术瓶颈仍需突破。未来研究应聚焦菊花特异性功能验证体系的构建，并结合多组学技术揭示miRNA调控网络的全局图谱。这一进程不仅将提升菊花产业的观赏与经济价值，也为其他植物的miRNA研究提供范式参考。

基金项目

2024年湖南省大学生创新训练项目“菊花花发育相关新miRNA—nov_miR285c和nov_miR593的克隆与功能分析”（s202410537008）

参考文献

- [1] TENG C, ZHANG C, GUO F, et al. Advances in the study of the transcriptional regulation mechanism of Plant miRNAs [J]. *Life*, 2023, 13(9): 1917.
- [2] JIANG J, LV M, LIANG Y, et al. Identification of novel and conserved miRNAs involved in pollen development in *Brassica campestris* ssp. *chinensis* by high-throughput sequencing and degradome analysis [J]. *BMC genomics*, 2014, 15: 1-13.
- [3] LI J, WEN X, ZHANG Q, et al. *cla-miR164-NO APICAL MERISTEM (CINAM)* regulates the inflorescence architecture development of *Chrysanthemum lavandulifolium* [J]. *Horticulture Research*, 2024, 11(4): uhae039.
- [4] SUN C, ZHAO Q, LIU DD, et al. Ectopic expression of the apple *Md-miRNA156h* gene regulates flower and fruit development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2013, 112: 343-351.
- [5] VARKONYI-GASIC E, WU R, WOOD M, et al. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs [J]. *Plant Methods*, 2007, 3(1): 12.
- [6] TSUZUKI M, TAKEDA A, WATANABE Y. Recovery of dicer-like 1-late flowering phenotype by *miR172* expressed by the noncanonical *DCL4*-dependent biogenesis pathway [J]. *Rna*, 2014, 20(8): 1320-1327.
- [7] RAO S, LI Y, CHEN J. Combined analysis of microRNAs and target genes revealed *miR156-SPLs* and *miR172-AP2* are involved in a delayed flowering phenomenon after chromosome doubling in black goji (*Lycium ruthenicum*) [J]. *Frontiers in Genetics*, 2021, 12: 706930.
- [8] 赵维萍, 丁子俊, 王方平, 等. “滁菊”花青素合成酶(*CmANS*)基因的分子特征、原核表达与表达分析 [J]. *植物生理学报*, 2022, 58(4): 677-686.
- [9] WAHEED S, ZENG L. The critical role of miRNAs in regulation of flowering time and flower development [J]. *Genes*, 2020, 11(3): 319.
- [10] ASLAM M, FAKHER B, QIN Y. Big role of small RNAs in female gametophyte development [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(4): 1979.
- [11] LUO X, LUO S, FU Y, et al. Genome-wide identification and comparative profiling of microRNAs reveal flavonoid biosynthesis in two contrasting flower color cultivars of tree peony [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 12: 797799.
- [12] ADDO-QUAYE C, MILLER W, AXTELL M J. Cleave Land: a pipeline for using degradome data to find cleaved small RNA targets [J]. *Bioinformatics*, 2008, 25(1): 130-131.
- [13] ZHANG X, CHENG L, SHANG H, et al. Research advances of coloring mechanism regulated by MicroRNAs in plants [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2024: 109036.
- [14] CHEN X. A microRNA as a translational repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* flower development [J]. *Science*, 2004, 303(5666): 2022-2025.
- [15] PING QI, CHENG P, HUANG F, et al. The heterologous expression in *Arabidopsis thaliana* of a chrysanthemum gene encoding the BBX family transcription factor *CmBBX13* delays flowering [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2019, 144: 480-487.
- [16] MCELVER J, TZAFIRI I, AUX G, et al. Insertional mutagenesis of genes required for seed development in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Genetics*, 2001, 159(4): 1751-1763.
- [17] CLOUGH S J, BENT A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Journal*, 1998, 16(6): 735-743.
- [18] ZHOU L, LIU S, WANG Y, et al. *CmMYB3*-like negatively regulates anthocyanin biosynthesis and flower color formation during the post-flowering stage in *Chrysanthemum morifolium* [J]. *Horticultural Plant Journal*, 2024, 10(1): 194-204.
- [19] WANG Y, WANG Y, ZHOU L J, et al. *CmNAC25* targets *CmMYB6* to positively regulate anthocyanin biosynthesis during the post-flowering stage in chrysanthemum [J]. *BMC biology*, 2023, 21(1): 211.
- [20] WANG. miRNA-Mediated Regulation of Flower Development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2021, 33(5), 1234-1245.
- [21] ATTRI K. Sequence and functional diversification of *miR391*-directed PTGS modules in plants [D]. Texas Tech University, 2023.
- [22] TU Z, XIA H, YANG L, et al. The roles of microRNA-long non-coding RNA-mRNA networks in the regulation of leaf and flower development in *Liriodendron chinense* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 816875.
- [23] SASAKI K, TANAKA T. Overcoming difficulties in molecular biological analysis through a combination of genetic engineering, genome editing, and genome analysis in hexaploid *Chrysanthemum morifolium* [J]. *Plants*, 2023, 12(13): 2566.
- [24] NAKANO M, HIRAKAWA H, FUKAI E, et al. A chromosome-level genome sequence of *Chrysanthemum seticuspe*, a model species for hexaploid cultivated chrysanthemum [J]. *Communications Biology*, 2021, 4(1): 1167.
- [25] TYURIN A A, SUHORUKOVA A V, KABARDAEVA K V, et al. Transient gene expression is an effective experimental tool for the research into the fine mechanisms of plant gene function: advantages, limitations, and solutions [J]. *Plants*, 2020, 9(9): 1187.

- [26] PU Y, HUANG H, WEN X, et al. Comprehensive transcriptomic analysis provides new insights into the mechanism of ray floret morphogenesis in chrysanthemum [J]. BMC genomics, 2020, 21: 1-16.
- [27] HUANG X, LI Y, WANG L, et al. A draft genome of Chrysanthemum morifolium provides insights into floral traits and polyploidization [J]. Horticulture Research, 2022, 9: uhab043.
- [28] WU H, CUI Y, LI D, et al. Carbon dots as nanocarriers for CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein delivery in plants [J]. ACS Nano, 2021, 15(8): 12796-12808.
- [29] SU J, JIANG J, ZHANG F, et al. Current achievements and future prospects in the genetic breeding of chrysanthemum: a review [J]. Horticulture research, 2019, 6.