北京林业大学学报
JOURNAL OF BEIJING FORESTRY UNIVERSITY

miR167–*XsARF6*–IAA模块在文冠果雌蕊败育中的调控机制

汪晋竹 敖妍 赵雅欣 陈雨欣 王雪彬 刘阿曼 许叶 郑雅琪 宋文静

Mechanism of the miR167-*XsARF6*-IAA regulatory module in pistil abortion in *Xanthoceras sorbifolium*

Wang Jinzhu, Ao Yan, Zhao Yaxin, Chen Yuxin, Wang Xuebin, Liu Aman, Xu Ye, Zheng Yaqi, Song Wenjing

引用本文:
汪晋竹, 敖妍, 赵雅欣, 陈雨欣, 王雪彬, 刘阿曼, 许叶, 郑雅琪, 宋文静. miR167–*XsARF6*–IAA模块在文冠果雌蕊败育中的调控机制[J]. 北京林业大学学报, 2026, 48(6):59–70. doi: 10.12171/j.1000–1522.20260162
Wang Jinzhu, Ao Yan, Zhao Yaxin, Chen Yuxin, Wang Xuebin, Liu Aman, Xu Ye, Zheng Yaqi, Song Wenjing. Mechanism of the miR167–*XsARF6*–IAA regulatory module in pistil abortion in *Xanthoceras sorbifolium*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2026, 48(6):59–70. doi: 10.12171/j.1000–1522.20260162

在线阅读 View online: https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20260162

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

油茶胚珠败育的组织学特性及相关基因表达分析
Histological characteristics and related gene expression analysis of ovule abortion in *Camellia oleifera*
北京林业大学学报, 2023, 45(9): 9–20. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20220182

高温诱导银灰杨花粉败育的细胞学机理研究
Cytological mechanism of pollen abortion induced by high temperature in *Populus canescens*
北京林业大学学报, 2023, 45(5): 25–34. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210498

MeJA介导的bHLH转录因子家族对板栗果实发育和品质的影响
Effects of MeJA mediated bHLH transcription factor family on development and quality of *Castanea mollissima* fruits
北京林业大学学报, 2025, 47(8): 23–41. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20250063

油松*PtNF–YC1*基因鉴定及其调控球花发育的作用机制研究
Identification of *PtNF–YC1* of *Pinus tabuliformis* and its molecular mechanism involved in regulation of cone development
北京林业大学学报, 2023, 45(9): 1–8. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20220250

白桦*BpSPL6*基因启动子的克隆及表达分析
Cloning and expression analysis of *BpSPL6* promoter from *Betula platyphylla*
北京林业大学学报, 2022, 44(2): 1–10. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20200174

槲树雌花和种子生长发育动态研究
Dynamics of female flower and seed growth and development in *Quercus dentata*
北京林业大学学报, 2024, 46(3): 17–26. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20220505

DOI:10.12171/j.1000−1522.20260162

miR167-*XsARF*6-IAA 模块在文冠果雌蕊败育中的调控机制

汪晋竹　敖　妍　赵雅欣　陈雨欣　王雪彬　刘阿曼
许　叶　郑雅琪　宋文静
（北京林业大学林学院，林木资源高效生产全国重点实验室，国家能源非粮生物质原料研发中心，北京 100083）

摘要:【目的】雌蕊败育是限制文冠果产量的关键因素，miR167 可能通过调控 *ARF* 基因参与生长素通路，但在文冠果雌蕊败育中的具体功能尚不清晰。本研究旨在探究文冠果雄花雌蕊败育过程中 miR167-*XsARF*-IAA 模块的调控机制，明确 IAA 通路关键基因 *XsARF*6 受 miR167 调控的功能，以期为解析文冠果雌蕊败育的调控机制奠定前期理论基础。**【方法】**以文冠果雌雄花 3 个关键发育时期的雌蕊为材料，开展全转录组测序，联合 miRNA 与 mRNA 数据分析筛选关键 xso-miR167；结合生物学验证及激素测定，分析 miRNA 与 mRNA 表达特征，测定过表达文冠果种仁 IAA 含量及转基因拟南芥表型，阐明 miR167-*XsARF*-IAA 的动态调控机制。**【结果】**(1)在雄花雌蕊败育 3 个关键时期共鉴定出 481 个 miRNA，预测靶基因 2 266 个，差异 miRNA 表达具有明显阶段特异性，表明不同 miRNA 在败育进程中发挥关键调控作用。(2)雄花雌蕊发育过程中 xso-miR167 表达持续升高，显著抑制靶基因 *XsARF*6.2 表达，表达趋势呈负相关，推测这一调控对是雌蕊败育的关键因素之一。(3)xso-miR167 过表达文冠果种仁 IAA 含量显著低于野生型与空载体对照。(4)在拟南芥中过表达 xso-miR167，花粉活力从 90.9% 降至 43.68% 和 62.25%，同时柱头直径、雌雄蕊长度显著缩短，且开花延迟，花器官发育异常。**【结论】**文冠果雄花雌蕊中存在 miR167-*XsARF*-IAA 调控模块，miR167 通过抑制 *XsARF*6.2 表达，影响 IAA 的合成、代谢或转运过程，进而在雌蕊败育中发挥关键作用。研究为揭示生长素调控文冠果雌蕊发育的分子机制提供了新视角，为相关基础研究与育种应用提供理论依据。

关键词：文冠果；雌蕊败育；miR167；生长素响应因子 (ARF6)；生长素 (IAA)；异源转化；生殖发育；转录后调控
中图分类号：S722.3；Q943.2　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1000−1522(2026)06−0059−12
引文格式：汪晋竹，敖妍，赵雅欣，等. miR167-*XsARF*6-IAA 模块在文冠果雌蕊败育中的调控机制［J］. 北京林业大学学报，2026，48(6)：59−70. Wang Jinzhu, Ao Yan, Zhao Yaxin, et al. Mechanism of the miR167-*XsARF*6-IAA regulatory module in pistil abortion in *Xanthoceras sorbifolium*［J］. Journal of Beijing Forestry University, 2026, 48(6): 59−70.

Mechanism of the miR167-*XsARF*6-IAA regulatory module in pistil abortion in *Xanthoceras sorbifolium*

Wang Jinzhu　Ao Yan　Zhao Yaxin　Chen Yuxin　Wang Xuebin　Liu Aman
Xu Ye　Zheng Yaqi　Song Wenjing
(School of Forestry, Beijing Forestry University, State Key Laboratory of Efficient Production of Forest Resources, National Energy R & D Center for Non-food Biomass, Beijing 100083, China)

Abstract:［**Objective**］Pistil abortion is a key factor limiting *Xanthoceras sorbifolium* yield. miR167 may participate in the auxin pathway by regulating *ARF* genes, but its specific function in the pistil abortion of *Xanthoceras sorbifolium* remains to be elucidated. This study aimed to investigate the regulatory mechanism

收稿日期: 2026−04−07　**修回日期:** 2026−05−11
基金项目: 国家自然科学基金项目(32572006)，国家重点研发计划(2024YFD2201101-6)，中央高校基本科研业务费专项(2025XJ04)。
第一作者: 汪晋竹。主要研究方向：森林培育。Email: wangjinz1028@163.com　地址：100083 北京市海淀区清华东路 35 号北京林业大学林学院。
责任作者: 敖妍，教授。主要研究方向：森林培育。Email: aoyan316@163.com　地址：同上。
本刊网址: https://j.bjfu.edu.cn; https://journal.bjfu.edu.cn

of the miR167-*XsARF*-IAA module during pistil abortion in male flowers of *X. sorbifolium* Bunge, and to clarify the function of the key IAA pathway gene *XsARF*6 regulated by miR167, so as to lay a preliminary theoretical foundation for dissecting the regulatory mechanism of pistil abortion in this species. [**Method**] Pistils of female and male flowers at three key developmental stages were sampled for whole-transcriptome sequencing. The key xso-miR167 was identified by integrated miRNA and mRNA analyses. Biological validation and hormone measurement were performed to analyze the expression patterns of miRNAs and mRNAs were analyzed. IAA content in kernels of *X. sorbifolium* overexpressing xso-miR167 and phenotypes of transgenic *Arabidopsis thaliana* were determined to elucidate the dynamic regulation of the miR167-*XsARF*-IAA module. [**Result**] (1) A total of 481 miRNAs and 2 266 predicted target genes were identified across the three key stages of pistil abortion, with differentially expressed miRNAs showing clear stage-specific patterns, indicating that different miRNAs play critical regulatory roles during the abortion process. (2) The expression of xso-miR167 increased continuously during pistil development in male flowers, significantly repressing its target gene *XsARF*6.2, and their expression trends were negatively correlated, suggesting that this regulatory pair is a key factor in pistil abortion. (3) xso-miR167 overexpression significantly decreased kernel IAA content compared with wild-type and empty-vector controls. (4) In transgenic *A. thaliana*, pollen viability decreased from 90.9% in the wild type to 43.68% and 62.25%, stigma diameter and lengths of pistils and stamens were significantly reduced, flowering was delayed, and floral organ development was abnormal. [**Conclusion**] The miR167-*XsARF*-IAA regulatory module exists during pistil development in male flowers of *X. sorbifolium*. miR167 participates in regulating the biosynthesis, metabolism or transport of IAA by inhibiting the expression of *XsARF*6.2, and plays a key role in pistil abortion of *X. sorbifolium*. This study provides a new perspective on the molecular mechanism of auxin-regulated pistil development in *X. sorbifolium* and offers a theoretical basis for fundamental research and breeding applications.

Key words: *Xanthoceras sorbifolium*; pistil abortion; miR167; auxin response factor (ARF6); indole-3-acetic acid (IAA); heterologous transformation; reproductive development; post-transcriptional regulation

文冠果(*Xanthoceras sorbifolium*)是我国北方特有珍稀木本油料树种，兼具重要经济和生态价值。其种仁含油率高[1]、脂肪酸组成与石化柴油相近，是优质生物柴油原料[2]，且富含珍稀神经酸[3]，在食品、医药及能源领域开发潜力巨大[4]。但文冠果普遍产量偏低、结实不稳，严重制约产业化发展，除栽培管理与种质因素外，其雌花多着生于顶生花序，雄花集中于侧生花序，雌花比例低导致结实率不足，是关键限制因子[5]。因此，阐明文冠果雄花雌蕊败育机制，揭示性别分化规律，对文冠果遗传改良、提高雌雄花比例及丰产稳产具有重要意义。

雌蕊败育是植物生殖发育常见现象，直接影响产量。研究表明，MADS-box、ARF 等转录因子在雌雄花发育中差异表达，参与植物激素信号转导、花器官发育等通路[6−8]。生长素是植物生长核心调控激素，在雌蕊发育中发挥关键作用。*ARF* 家族作为生长素信号通路核心，可响应 IAA 信号调控雌蕊发育，在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)研究中证实 *ARF*6/8 功能缺失会导致胚珠发育异常，植株不育[9−11]，是连接生长素信号与雌蕊育性的关键。

MicroRNA(miRNA)是内源性非编码小 RNA，通过靶向调控基因参与植物生殖发育[12]。其中 miR167 可靶向 *ARF*6/8 等生长素响应因子[13]，在牵牛花(*Ipomoea nil*)[14]、番茄(*Solanum lycopersicum*)[15]等物种中调控雌蕊育性，该调控模式高度保守，通过抑制 *ARF* 表达干扰生长素信号，影响雌蕊正常发育。

文冠果中雌雄花芽内源激素差异显著，雌花 IAA 含量显著高于雄花，高水平 IAA 有利于雌花发育[16]，揭示 IAA 可能是调控其性别分化与雌蕊育性的关键激素。本团队前期研究已明确文冠果雄花雌蕊败育关键时期[17]，发现 *XsARF*6 受 miR167 靶向，且 miR167 在雄花雌蕊中特异高表达，推测其通过抑制 *XsARF*6 导致雌蕊败育。但相关分子机制仍缺乏系统解析与本体功能验证。

基于此，本研究围绕 miR167-*XsARF*-IAA 调控模块，通过解析核心 miRNA 与靶基因的靶向调控关系及生长素信号通路的动态变化规律，揭示其介导文冠果雄花雌蕊败育的内在机制。并结合内源表达特征与异源、同源功能验证体系，系统解析该调控模

块在文冠果雌蕊发育中的生物学功能。本研究旨在完善木本油料树种雌蕊败育与性别分化的分子调控体系，并为文冠果雌雄花比例定向调控、高产优质品种分子育种提供可利用的基因靶点与理论支撑。

1　材料与方法

1.1　材　料

文冠果试验树均来自辽宁省文冠果试验基地（41°25′N，120°16′E），该区域属于温带大陆性气候，年均温 6～9 ℃。试验材料选用 11 号文冠果无性系，平均株高约 2.5 m，平均冠幅约 1.6 m。采用常规田间管理模式，株行距为 1.5 m × 4.0 m。试验所用拟南芥哥伦比亚野生型（Col，Colombia）的种子由实验室保存。培养条件：光照周期 16 h/8 h（光照/黑暗），培养温度 22 ℃，光照强度 12 000 lx。

1.2　采样方法

基于课题组前期研究基础及基地当地气候，依据花芽形态特征确定 3 个关键采样时期[17]：4 月 23 日（雌蕊败育前期 e）花芽逐步分离并趋于圆润饱满；4 月 26 日（雌蕊败育中期 m）花芽顶端变尖、彼此分离程度加大；4 月 28 日（雌蕊败育后期 l）花芽膨大趋于成熟，侧生花芽雌蕊逐渐干瘪退化，颜色转变为黄色。在每株植株的东、南、西、北 4 个方位选取一年生枝条，采集顶生花芽（雌花芽）与侧生花芽（雄花芽）并剥离出雌蕊放入液氮速冻，后于–80 ℃ 超低温保存，用于 RNA 的提取。所有样品均设置 3 个生物学重复。

1.3　构建组装测序文库

为解析文冠果雌蕊发育过程中 RNA 转录水平变化，本研究委托北京百迈客生物科技有限公司（Biomarker）进行 Illumina 测序和 RNA-seq 分析，分别构建 sRNA 文库[18]及 cDNA 文库[19]，并使用 fastp 对原始测序数据进行质控，去除低质量数据，保证后续分析数据的可靠性。

1.4　miRNA 鉴定、靶基因预测及生物信息学分析

为全面鉴定文冠果中差异表达 miRNA 及其作用靶点，将质控后的有效序列比对至文冠果参考基因组，与 miRBase（v22）已知 miRNA 比对（允许 1 个错配）鉴定已知 miRNA。未比对上的序列使用 miRDeep2 软件预测新 miRNA。使用 Target Finder 预测保守与新 miRNA 的靶基因。利用 MEME 分析成熟序列保守性，TBtools 完成可视化分析；在 RNAfold 网站预测前体序列的二级结构和最小自由能（minimum free energy, MFE）。在 Plant-CARE 网站预测启动子顺式作用元件。使用 MEGA7.0 软件采用邻接法（NJ）构建系统发育树，分析 miRNA 的进化规律。

1.5　差异表达基因的筛选及功能分析

为筛选参与文冠果雌蕊败育的核心差异基因，本研究分别采用 FPKM、TPM 值对 mRNA 与 miRNA 表达量进行标准化处理。对于 mRNA 采用 DESeq2 进行差异分析，筛选标准为$|\log_2(FC)| \geqslant 0.58$ 且 $P < 0.01$。对于 miRNA 表达数据采用$|\log_2(FC)| \geqslant 0.58$ 且 $P \leqslant 0.05$ 作为筛选阈值。利用 BMKCloud 工具采用超几何检验方法对差异表达基因进行 GO 分类、KEGG 富集分析，挖掘差异基因参与的雌蕊发育过程中关键代谢通路。

1.6　xso-MIR167a 过表达载体构建与功能验证

为验证 xso-MIR167a 在文冠果雌蕊发育中的生物学功能，提取文冠果雌雄混合花芽 DNA，进行 PCR 扩增，程序如下：95 ℃、3 min，95 ℃、30 s，57 ℃、15 s，72 ℃、30 s，34 个循环，72 ℃、5 min。测序鉴定后将 xso-MIR167a 基因片段插入 pCambia1301 表达载体，构建过表达载体。采用农杆菌 GV3101 真空渗透法转化文冠果种仁、花序浸染法转化野生型拟南芥；转基因拟南芥经卡那霉素筛选至 T_3 代纯合株系。观察 T_3 代转基因与野生型拟南芥表型差异，每株系选择 20 株，使用体式显微镜拍照记录。将文冠果种子浸泡在侵染液中 12 h 后，放入培养箱共培养 3 d，然后进行染色观察。使用 ELISA 酶联免疫法检测转基因 xso-MIR167a 文冠果种仁的 IAA 含量。使用 Excel、Graphpad Prism 10.1.2 对数据进行统计分析和绘图。

1.7　miRNA 与靶基因表达模式分析

利用 qRT-PCR 分析关键基因表达水平，使用 RN52-EASYspin 通用植物 RNA 快速提取试剂盒（北京艾德莱公司）提取的文冠果种仁总 RNA，分别以 U6、UBQ 为 miRNA、mRNA 内参基因，使用茎环法对 miRNA 进行反转录，采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算基因的相对表达量[20]。引物序列见表 1。

2　结果与分析

2.1　雌蕊发育过程中差异表达 mRNA 分析

对文冠果雌蕊败育过程中差异表达的 mRNA 开展了进一步分析，结果表明在文冠果雌蕊败育关键时期存在大量差异表达 mRNA，且显著富集于激素信号相关通路。通过对文冠果雌雄花芽中链特异性 RNA 测序数据分析，鉴定出雌蕊败育前中后 3 个时期共 1 986 个差异表达 mRNA（上调 1 586 个，下调 400 个）。对差异 mRNA 进行 GO 和 KEGG 分析，GO 富集分析显示（图 1A），在生物过程（BP）类别中，主要富集到代谢过程、信号传导、发育过程等；KEGG

表 1 试验所用的引物序列

Tab. 1 Primers used in the research

引物名称	上游引物序列(5′→3′)	下游引物序列(5′→3′)	用途
pCambia1301	GACGTAAGGGATGACGCACAATC	AGAGAAAAGGGTCCTAACCAAG	通用引物
xso-miR167a	ATGGACCACTGAACTGACATCTG	CCTTGCTGGGTAATAATGGC	目的片段克隆
	gcTGAAGCTGCCAGCATGATCTA	GATCGCCCTTCTACGTCGTAT	文冠果miRNA实时荧光定量PCR
	acggactcttgacccatggCCTTGCTGGGTAATAATG	tagaatacccaagatctATGGACCACTGAACTGACAT	过表达载体构建
XsARF6.2	TTCCAGCAAACAGCCAACC	GCTACTCGCAAGACACCATCA	文冠果种仁实时荧光定量PCR
UBQ	GACCAAGACCAAGACCAA	ATCTACCACTACTGCTGAAG	
U6	GATAAAATTGGAACGATACAG	ATTTGGACCATTTCTCGATTT	

富集分析显示(图 1B),玉米素生物合成、类黄酮生物合成等通路显著富集,其中有大量基因也富集到植物 MAPK 信号通路、植物激素信号转导等。该结果与本团队在前期研究中发现以 ARF 为核心的调控网络结果相一致[17],进一步证明了植物激素,尤其是生长激素在文冠果雌蕊发育过程中的重要作用。

进一步对 1 986 个差异 mRNA 进行 miRNA 靶基因预测分析,发现其中 1 196 个 mRNA 受到 miRNA 靶向调控(图 1C),这些结果表明 mRNA 受到 miRNA 靶向调控参与的生物学过程和通路存在差异,其中植物激素信号转导、MAPK 信号通路等在花芽发育中可能起到关键作用,共同调控雌蕊发育。

2.2 雌蕊发育过程中 miRNA 全转录组分析

小 RNA 测序结果表明,文冠果雌蕊败育过程中鉴定出大量 miRNA,其靶基因多富集于信号调控相关通路。其中共检测到 481 个 miRNA,已知 miRNA 45 个,新预测 miRNA 436 个,预测到 miRNA 靶基因 2 266 个,并对差异 miRNA 靶基因进行了 KEGG 富集和注释分析。从图 2A 可见,植物 MAPK 信号通路、内质网中的蛋白质加工、植物–病原菌互作等通路显著富集,说明这些通路可能在文冠果雄花雌蕊败育中发挥关键作用。差异 miRNA 注释分类结果显示(图 2B),差异 miRNA 靶基因广泛参与遗传信息处理、环境信息处理、细胞过程等多个功能模块,其中 Signal transduction(45 个基因)、Translation(30 个基因)和 Environmental adaptation(31 个基因)模块基因富集数量较高,差异 miRNA 可能通过调控这些通路参与雄花雌蕊败育过程。进一步对分化各时期差异 miRNA 的上调和下调数量分析(图 2C)发现,在雌蕊发育后期(Fl ~ Ml),雌雄花间差异表达 miRNA 的上调、下调数量分别为 106 和 108 个;在雄花中,雌蕊发育早期与后期(Me ~ Ml)的上调、下调数量最高,分别为 128 和 123 个。雄花雌蕊与雌花雌蕊在发育前期(Fe ~ Me)的差异 miRNA 表达数量差异较少,但中期(Fm ~ Mm)出现明显的差异 miRNA 调控变化,且不同发育阶段差异表达 miRNA 的数量存在明显差异,说明 miRNA 在文冠果雄花雌蕊败育不同时期具有特异性调控作用。上述结果表明,差异 miRNA 富集的功能通路与雌蕊发育过程相关,提示 miRNA 可能通过调控这些关键通路参与文冠果雄花雌蕊败育过程。

2.3 关键 miRNA 的鉴定与分析

鉴定结果显示 xso-miR167 可靶向结合 *XsARF* 家族基因,且靶基因集中富集于激素信号通路。通过 sRNA 测序并结合 miRBase、RNAhybrid 等数据库,筛选出文冠果中 MIR167 主要调控 *XsARF*6.1、*XsARF*6.2 和 *XsARF*18,如图 3A 所示,xso-miR167 的靶基因显著富集于植物激素信号转导通路,这与本研究关注的激素信号调控及雌蕊发育过程高度相关,因此本研究针对 xso-miR167 开展进一步的分析工作。

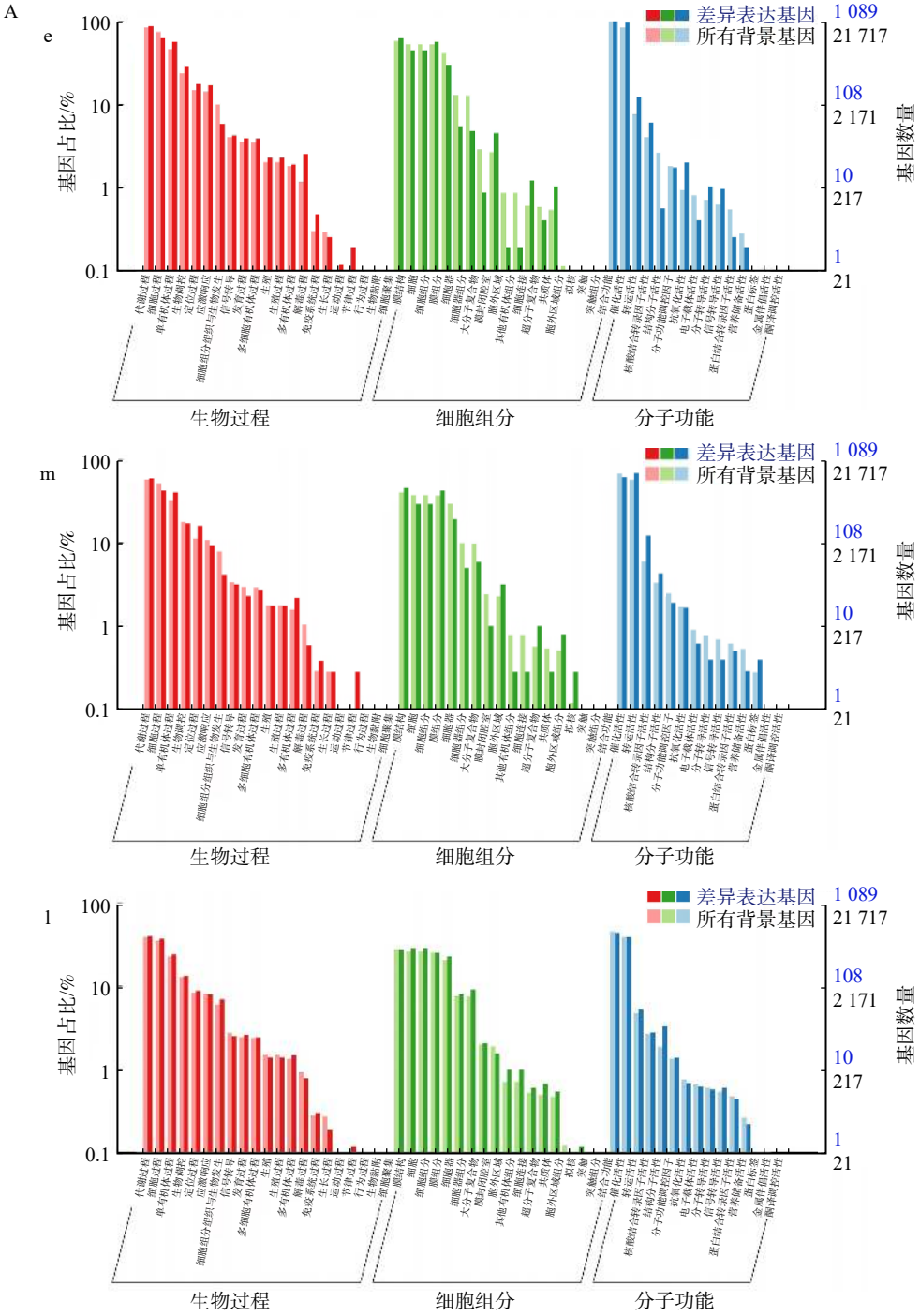
xso-miR167 在雄花雌蕊中表达上调,与其靶基因 *XsARF* 家族表达趋势呈相反模式。对文冠果雌蕊败育过程中的 xso-miR167 及其靶基因的 TPM 和 FPKM 值进行分析(图 3B),发现在雌蕊发育过程中,雌花雌蕊中 xso-miR167a-5p 的表达都低于雄花,靶基因 *XsARF*6.1、*XsARF*6.2 和 *XsARF*18 在雌花雌蕊中含量偏高,这与 xso-miR167a-5p 相反。xso-miR167a-5p 在雌花和雄花的雌蕊中的表达上调,靶基因 *XsARF*6.1、*XsARF*6.2 和 *XsARF*18 的表达下调,两者表达趋势基本呈现相反趋势。这说明 xso-miR167 可能对 *XsARF*6.1、*XsARF*6.2 和 *XsARF*18 有靶向抑制作用。

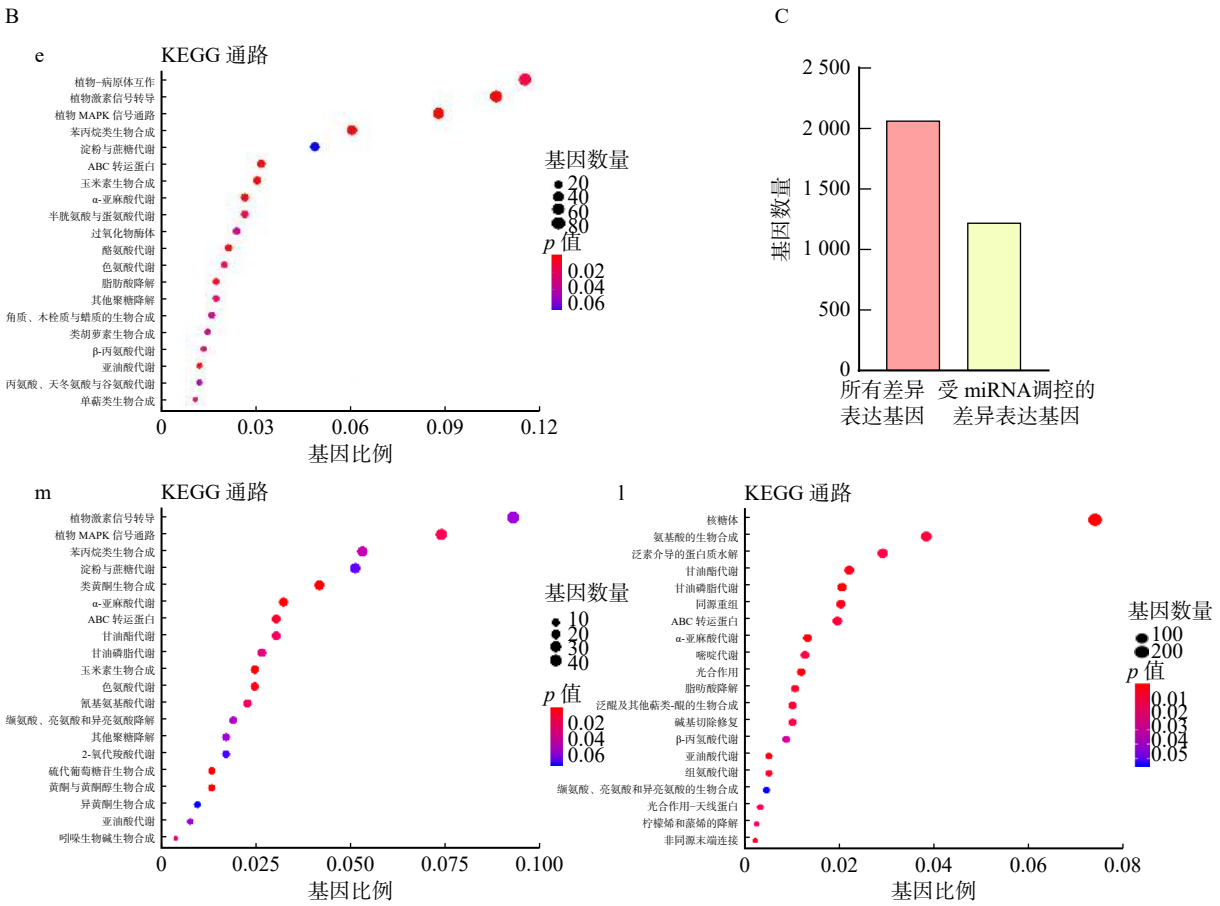
2.4 靶向 *XsARF* 基因的 miR167 生物信息学分析

经鉴定 xso-MIR167 家族有 7 个成员,其前体序列保守且可形成典型茎环结构。前体分别命名为 xso-MIR167a、xso-MIR167b、xso-MIR167c、xso-MIR167d、xso-MIR167e、xso-MIR167f 和 xso-MIR167g。通过将文冠果雌蕊转录组中靶向 *XsARF* 基因的 MIR167 家族所有前体序列,与文冠果参考

基因组进行重新比对，获得了文冠果 MIR167 家族的前体序列。MIR167 家族保守性分析如图 4A 所示，前体序列长度为 75 nt，在每个前体的 5′和 3′端都存在两个保守区域，并且前体中的两个成熟序列能够互补配对，这使得前体序列能够形成茎环结构。其中 xso-MIR167a/b 进化高度保守，其前体序列的二级结构预测及 MFE 如图 4B 所示。预测结果均为茎环结构，符合前体序列结构。其中可能靶向 *XsARF* 基因的成熟 miRNA 序列用红色（5′端成熟体）标记。预测结果表明 MIR167 主要是 5′端成熟体靶向 *XsARF* 基因并发挥调控作用。在 MIR167 家族中观察到最高值（−36.68 kcal/mol），且平均 MFEs 值低于 tRNA（−27.5 kcal/mol）和 rRNA（−33 kcal/mol），符合 sRNA 的 MFE 值范围。

启动子顺式作用元件分析表明，xso-MIR167 家族成员富含多种调控元件，且存在功能分化。为了进一步研究 miRNA 靶向 *XsARF* 基因的潜在调控机制，使用前体序列起始位点的 2kb 上游序列来分析其顺式作用元件（图 4C）。共鉴定到光响应元件、植物激素相关元件、生长发育相关元件及逆境响应元件。结果显示 xso-MIR167a 启动子中的元素数量最多（44 个），xso-MIR167a、xso-MIR167b 的启动子序





A. 文冠果 11 号无性系雌蕊发育前期（e）、中期（m）、后期（l）GO富集分析柱状图；B. 文冠果 11 号无性系雌蕊发育前期（e）、中期（m）、后期（l）KEGG 富集气泡图；C. 受 miRNA 调控与未受 miRNA 调控的差异表达 mRNA 数量。

图 1 文冠果雌蕊败育 3 个时期差异表达基因的富集及靶向调控分析

Fig. 1 Enrichment and targeted regulation analysis of differentially expressed genes at three stages of pistil abortion in *Xanthoceras sorbifolium*

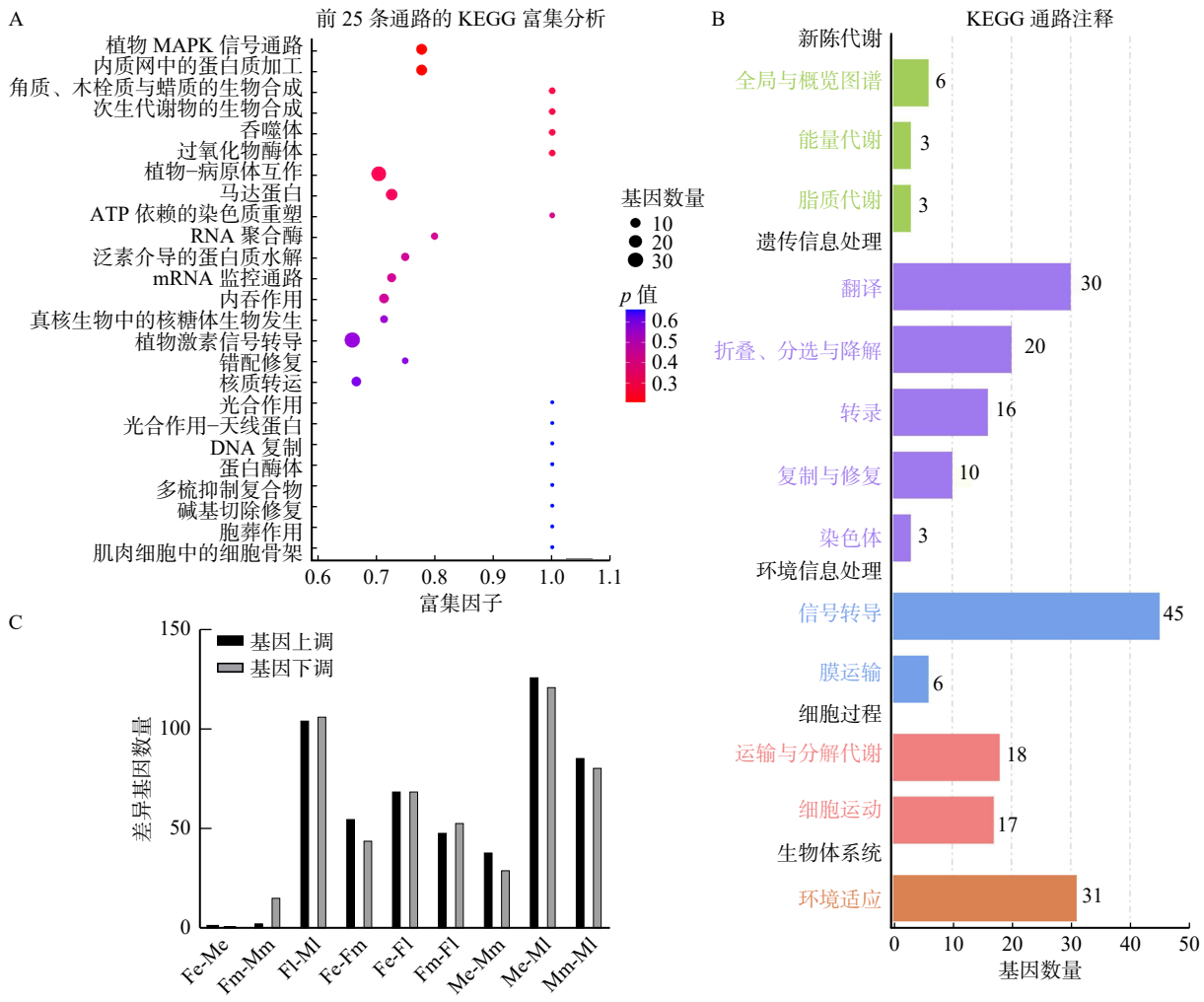
列含有最多的激素相关元件，xso-MIR167b 启动子序列中包含与生长素相关的反应元件。

系统发育分析显示，文冠果 MIR167 家族与拟南芥等物种中已知功能基因高度同源，其中 xso-MIR167a 亲缘关系最近。如图 5 所示，对靶向 *XsARF* 基因的 MIR167 全部前体序列开展同源性分析，并构建系统发育树。结果表明，文冠果 MIR167 家族多数前体与甜橙（*Citrus sinensis*）、拟南芥的同源前体亲缘关系较近，且与拟南芥前体序列高度相似，整体序列特征符合物种系统发育规律。已有研究表明，拟南芥、甜橙、龙眼（*Dimocarpus longan*）等植物中该类 MIR167 同源基因的功能与花发育、植物激素信号传导密切相关[21]。由于 xso-MIR167a 与上述功能明确的同源基因亲缘关系更近，序列保守性更高，因此本研究优先选择 xso-MIR167a 开展后续功能研究。

2.5 xso-miR167 的本体瞬时表达分析

本研究成功构建 xso-MIR167a 过表达载体，并在文冠果种仁中实现瞬时表达。结合 miRNA 表达量差异，选取表达水平更高的 xso-MIR167a 基因构建至植物表达载体 pCambia1301-GUS 中，并采用农杆菌介导的瞬时转化技术用 xso-MIR167a-GUS 载体的农杆菌浸泡处理后文冠果种仁进行 GUS 染色分析，结果见图 6，其中 A 为浸泡 12 h 清水对照的文冠果种仁，该种仁各部分中均没有 GUS 基因的表达。由 B、C、D 观察可知，种仁在 GUS 染色后可清晰地观察到蓝色信号，且伤口处呈现的蓝色略深于其他部位，表明载体已成功转化并在文冠果种仁中表达。

qRT-PCR 及 IAA 含量测定结果显示，xso-miR167 过表达可显著抑制其靶基因 *XsARF*6.2 的表达，并显著降低文冠果种仁中 IAA 含量。提取共培养 3 d 的瞬时转化文冠果种仁 RNA，反转录后进行 qRT-PCR，检测 xso-miR167 与 *XsARF*6.2 的表达变化，结果如图 7 所示，与 WT、EV 植株相比，xso-miR167 在 xso-MIR167-OE 株系中表达量上调 10 倍以上，证明其成功实现过表达。而 xso-miR167 的靶基因 *XsARF*6.2 基因表达量在过表达株系中显著降低，验证了二者靶向调控关系，表明 xso-miR167 对 *XsARF*6.2 具有反向抑制作用；xso-MIR167a 转基因文冠果种仁



A. 差异 miRNA 靶基因 KEGG 富集气泡图；B. 差异 miRNA 注释分类柱状图；C. 雌蕊分化各时期差异 miRNA 上调及下调数量。Fe 表示雌花雌蕊发育前期，Me 表示雄花雌蕊发育前期，Fm 表示雌花雌蕊发育中期，Mm 表示雄花雌蕊发育中期，Fl 表示雌花雌蕊发育后期，Ml 表示雄花雌蕊发育后期。下同。

图 2　文冠果雄花雌蕊败育过程中 miRNA 差异表达与功能分析

Fig. 2　Analysis of miRNA differential expression and function during the pistil abortion process of *X. sorbifolium* male flowers

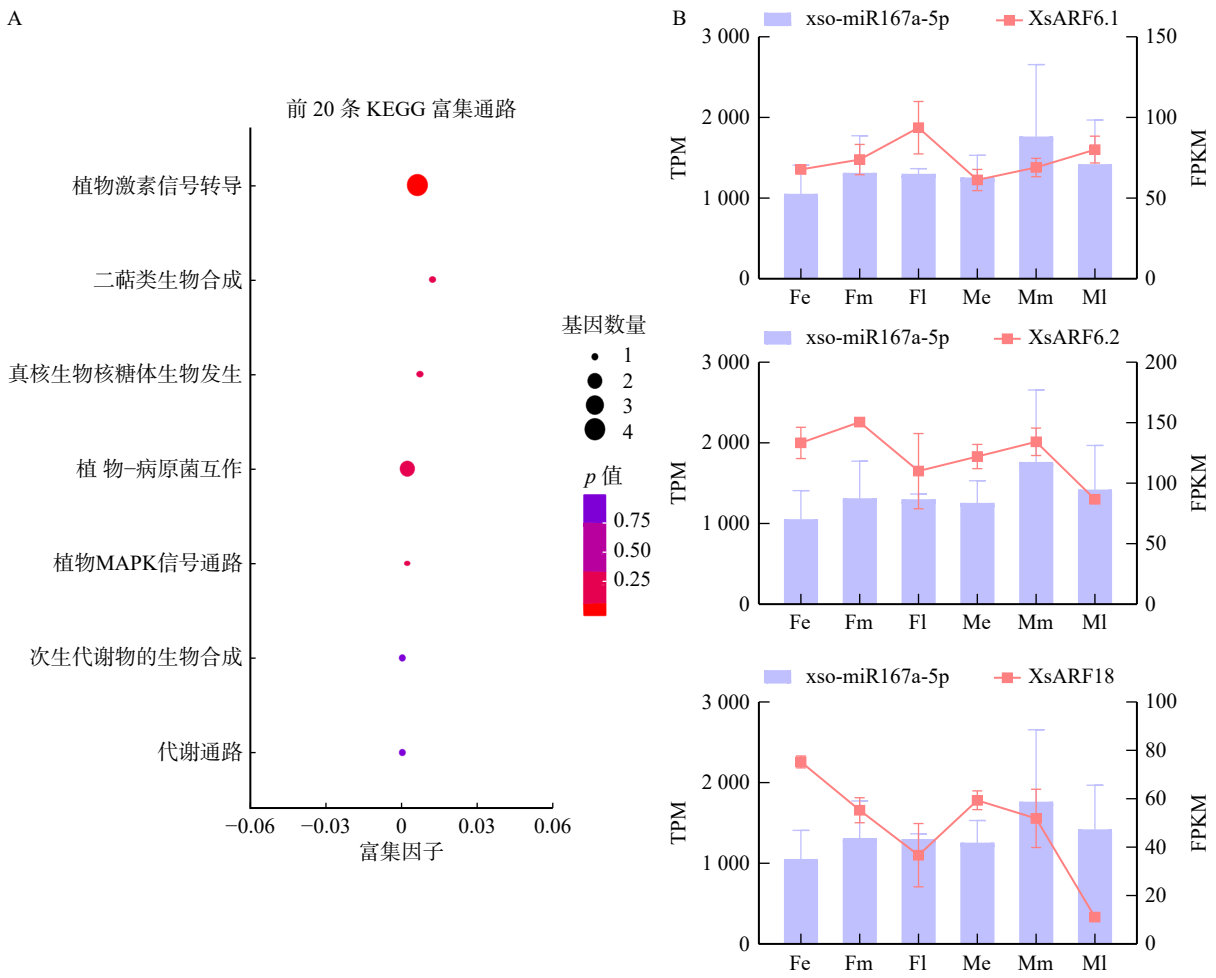
IAA 含量变化由图 7 所示，结果表明 WT 组与 EV 组的 IAA 含量相近，均处于约 0.4 nmol/g 的水平，在 xso-MIR167a 转基因文冠果种仁中，IAA 含量较 WT 和 EV 组极显著下降约 50%，说明 xso-miR167 参与调控文冠果种仁 IAA 含量，进而对雌蕊发育过程具有关键调节作用。

2.6　转基因拟南芥的表型分析

过表达 xso-MIR167a 能够导致转基因拟南芥花序形态变化及花器官发育异常。为研究靶向 *XsARF* 基因的 xso-miR167 功能，使用包含关键 miRNA 前体序列的表达载体农杆菌侵染拟南芥，并获得稳定遗传的转基因植株，随机选择两个性状不分离的纯合株系（xso-MIR167a#OE2 和 xso-MIR167a#OE18），进行后续转基因拟南芥的表型观察。对比空载体型拟南芥（EV）、转基因拟南芥和野生型拟南芥（WT）的顶端花序发育特征（图 8）。结果显示，WT、EV 植株的花序分生组织可以正常分化成为花分生组织，形成花原基并发育成完整的花器官，而 xso-MIR167a 转基因株系表型变化最为显著，其顶端花序转为有限花序形态，同时伴随花器官发育异常。

过表达 xso-MIR167a 也会导致拟南芥花朵变小，选取 4 个发育时期的花器官进行观测比较转基因植株和野生型拟南芥的花器官形态结构（图 9）。可以看出转基因 xso-MIR167a 植株的花朵较野生型更小；但在发育过程中，除花朵大小外，EV、xso-MIR167a 的拟南芥与 WT 花朵无显著差异。

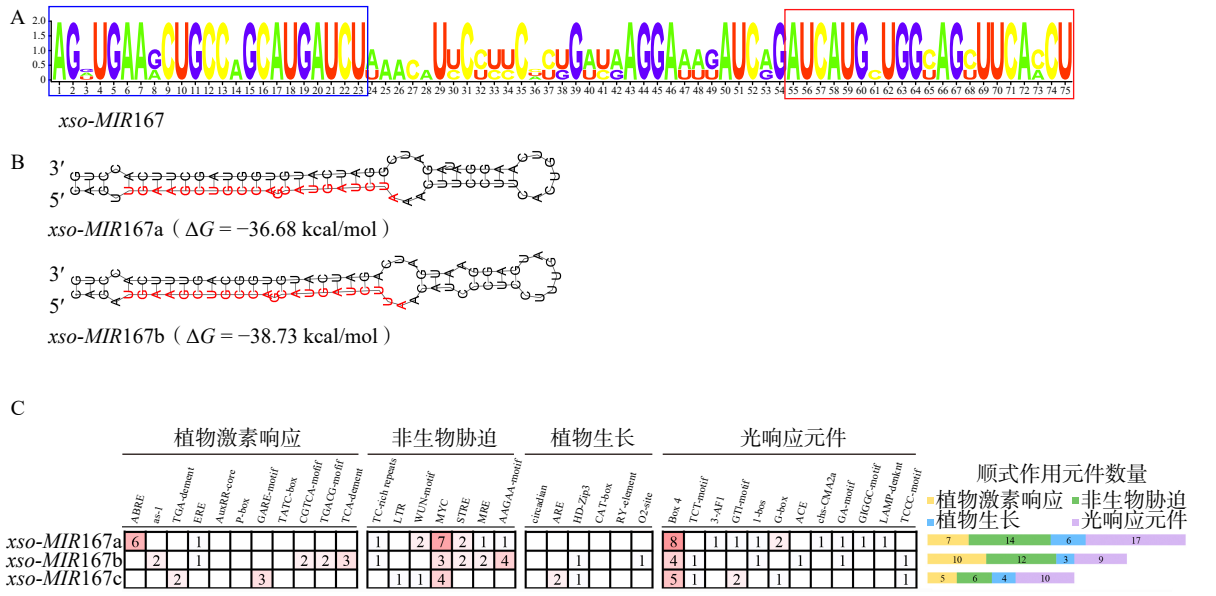
对转基因拟南芥的花发育数据进行统计分析，结果表明过表达 xso-MIR167a 会导致拟南芥花粉活力下降、柱头及雌雄蕊长度缩短，但对花瓣长度无显著影响。选取 2 个独立的 T3 代纯合转基因株系 xso-MIR167a#OE2 和 xso-MIR167a#OE18，每个株系随机选取 6 株，共 12 株进行表型统计分析。图 10 结果显示：EV、xso-MIR167a 的拟南芥开花略晚于 WT，且 WT 的平均花粉活力为 90.9% 与 EV 无明显区别，



A. miR167 靶基因的 KEGG 分析；B. 通过 RNA-seq 分析 xso-miR167a-5p 与 *XsARF*6.1、*XsARF*6.2 和 *XsARF*18 表达量对比。

图 3 文冠果雌蕊败育中关键 miRNA 与 *XsARF* 表达模式分析

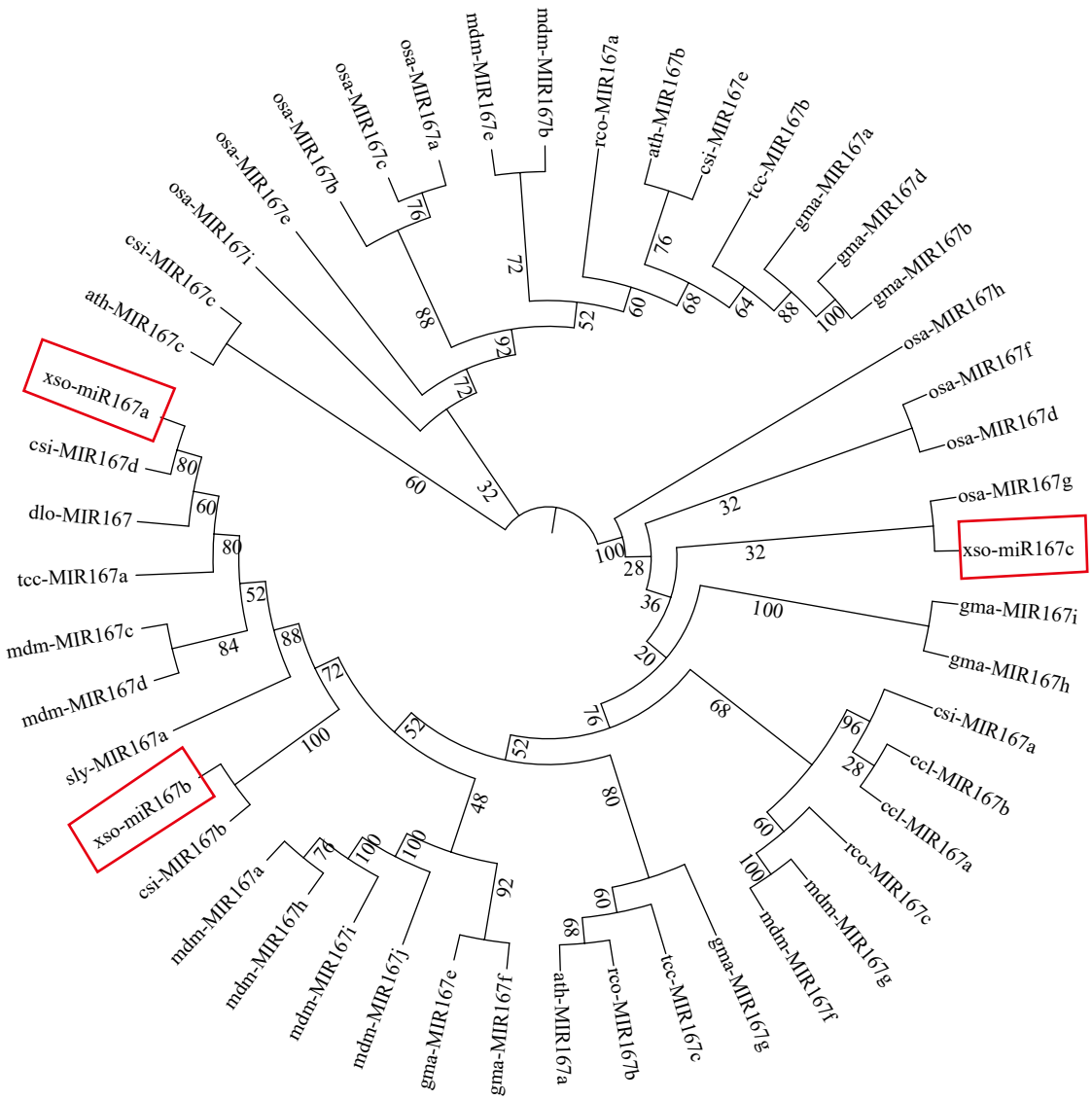
Fig. 3 Expression pattern analysis of key miRNA and *XsARFs* during pistil abortion in *X. sorbifolium*



A. 文冠果 xso-miRNAs 的保守性分析；B. 靶向 *XsARF* 基因的 xso-miR167 前体序列的二级结构；C. 文冠果 MIR167 前体序列的启动子区域顺式作用元件分析。蓝色框内为 5′ 端成熟体序列，红色框内为 3′ 端成熟体序列。靶向 *XsARF* 基因的成熟 miRNA 序列用红色标记。Δ*G* 表示最小自由能（MFE）。

图 4 文冠果雌蕊败育中靶向 *XsARF* 基因的 xso-MIR167 鉴定

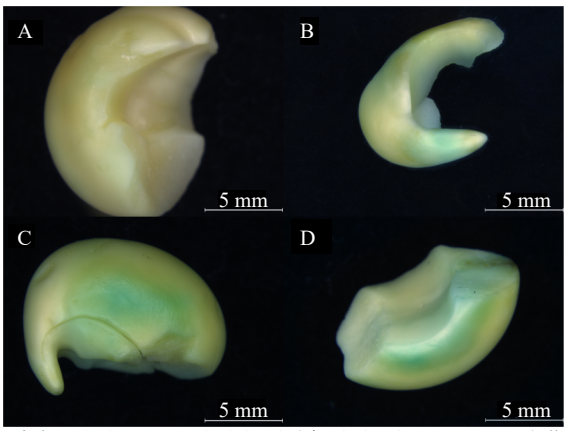
Fig. 4 Identification of key miRNAs targeting *XsARF* genes during pistil abortion in *X. sorbifolium*



节点处数字为 Bootstrap 支持度。图中基因名称前的物种缩写含义：xso（文冠果，*Xanthoceras sorbifolium*）、csi（甜橙，*Citrus sinensis*）、dlo（龙眼，*Dimocarpus longan*）、tcc（可可，*Theobroma cacao*）、mdm（苹果，*Malus domestica*）、sly（番茄，*Solanum lycopersicum*）、ath（拟南芥，*Arabidopsis thaliana*）、ccl（山核桃，*Carya cathayensis*）、rco（蓖麻，*Ricinus communis*）、gma（大豆，*Glycine max*）、osa（水稻，*Oryza sativa*）。

图 5　文冠果 MIR167 家族及其同源基因的系统发育树

Fig. 5　Hylogenetic tree of the MIR167 families in *X. sorbifolium* and their homologs

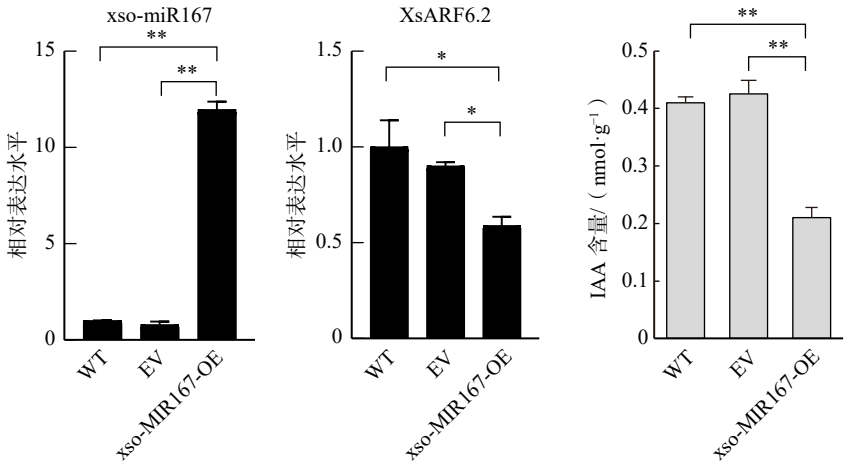


A. 清水浸泡处理 12 h 的文冠果种仁（对照）；B、C、D为菌液 OD_{600} = 0.8 浸泡处理 12 h 的文冠果种仁。

图 6　文冠果种仁瞬时转化后的 GUS 染色结果

Fig. 6　GUS staining results of *X. sorbifolium* seeds after transient transformation

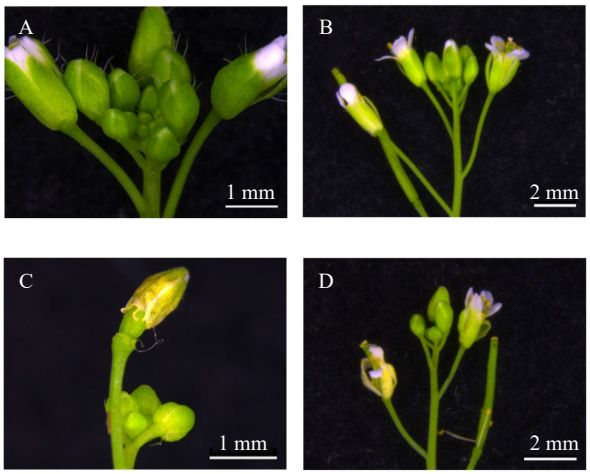
而转基因 xso-MIR167a#OE2 和 xso-MIR167a#OE18 拟南芥的花粉活力显著下降至 43.68% 和 62.25%。WT 和 EV 的柱头平均直径分别为 0.364 0、0.369 6 mm，xso-MIR167a 株系的柱头均值为 0.311 9 mm，和 WT 相比显著缩短。WT 的雄蕊平均长度为 1.534 2 mm，转基因 xso-MIR167a#OE2 拟南芥的雄蕊平均长度为 1.393 7 mm，显著短于 WT 和 EV；WT 的雌蕊长度为 1.805 7 mm，EV 植株雌蕊长度为 1.703 1 mm，显著高于转基因 xso-MIR167a 株系；WT、EV 植株的花瓣平均长度分别为 2.023 3、2.085 2 mm，xso-MIR167a 株系的花瓣长度与 WT 和 EV 无显著差异。上述结果表明过表达 xso-MIR167a 对拟南芥花器官发育产生影响，能通过调控靶基因参与花器官发育过程。



WT 表示清水对照，EV 表示空载体对照，xso-MIR167-OE 为 xso-MIR167 过表达，下同。* 代表在 0.05 水平上差异显著，** 代表在 0.01 水平上差异显著。

图 7 xso-MIR167a 转基因文冠果种仁的基因表达量及激素含量

Fig. 7 The gene expression levels of the kernels in xso-MIR167a transgenic *X. sorbifolium*



A. 野生型拟南芥（WT）的顶端花序放大特征；B. 空载体型拟南芥（EV）的顶端花序整体特征；C. 转基因 *xso-MIR*167a#OE2 拟南芥的顶端花序放大特征；D. 转基因 *xso-MIR*167a#OE18 拟南芥的顶端花序整体特征。拟南芥为 Columbia 生态型（Col）。下同。

图 8 WT、EV 和转基因拟南芥的顶端花序特征

Fig. 8 Characterization of apical inflorescence of WT, EV and transgenic *A. thaliana*

3 讨 论

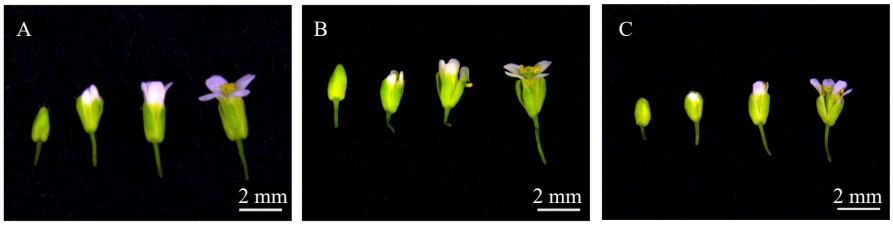
3.1 miR167-*ARF* 模块在植物花器官发育中的保守调控作用

植物雌蕊败育是多基因、多通路协同调控的复杂发育过程，miRNA 介导的转录后调控在植物雌蕊中发挥核心作用。雌蕊败育是文冠果产量受限的关键因素，但其内在分子调控机制仍缺乏系统解析。在文冠果雌蕊败育过程中，我们鉴定出靶向差异表达 *XsARF* 基因的差异表达 miR167，已有研究表明，miR167 家族作为植物中高度保守的 miRNA 家族之一，可以通过调控生长素反应因子（*ARFs*）参与调控植物发育[22]。生长素信号通路影响植物雌蕊发育过程[23]，IAA 浓度升高促使 Aux/IAA 蛋白降解，释放的 *ARF* 结合生长素响应元件（AuxRE），调控细胞分裂与分化[24]。miR167 精准调控 *ARF*6/8 的表达量，避免因 *ARF* 过量积累导致 IAA 信号通路过度激活[25]。在拟南芥中，miR167 功能缺失或过表达均导致花器官发育异常及育性下降[26]，本研究结果与上述结果相似：拟南芥异源过表达 xso-MIR167a，植株表现为开花延迟，有限花序，且花器官缩小，花粉活力显著下降，暗示其可能参与雌蕊发育调控。此外，小麦中 miR167 同源家族通过靶向 ARFs 参与雄蕊花丝伸长和柱头大小调控[27]。以上均表明 *ARF* 基因是生长素转录响应的核心因子，而靶向 *ARF* 的 miRNA 通过调控激素合成，最终影响 *ARF* 基因表达。

3.2 文冠果中 miR167-*XsARF*-IAA 调控模块的鉴定与功能分析

文冠果中 xso-miR167 与 *XsARF*6.2 存在典型的负调控关系，二者通过调控内源 IAA 含量形成 miR167-*ARF*-IAA 功能模块，最终参与到雌蕊败育过程中。本研究发现，xso-miR167 表达量显著高于雌花雌蕊，而靶基因 *XsARF*6.2 表达持续偏低。在雄花雌蕊发育后期，xso-miR167 高表达导致 *XsARF*6.2 显著下调，下游发育基因无法有效激活，进而引起雌蕊败育。在雌花雌蕊发育中期，*XsARF*6.2 显著上调，从而维持雌蕊正常发育。xso-MIR167a 在文冠果种仁中实现过表达，对 xso-miR167 过表达种仁进行激素含量测定，与野生型文冠果 WT 和空载体型文冠果 EV 相比，IAA 含量显著下降，揭示文冠果中可能存在“miR167-*ARF*-IAA”调控模块。

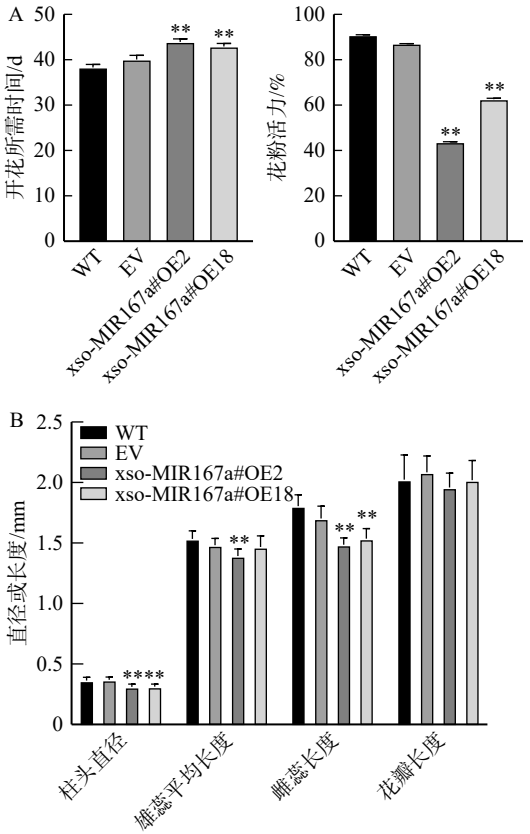
本研究通过对 miR167 及雌蕊败育过程中差异 mRNA 进行了生物信息学分析，明确了 miR167 与 *ARF* 家族关键成员的靶向关系，通过拟南芥稳定转化体系验证了 miR167 的功能，并进一步在文冠果本



A. WT 的花发育过程；B. EV 的花发育过程；C. 转基因 *xso-MIR*167a#OE2 拟南芥的花发育过程。

图 9　WT、EV 和转基因拟南芥的花发育过程

Fig. 9　Characterization of flower development of WT, EV and transgenic *A. thaliana*



* 代表与 WT 相比在 0.05 水平上差异显著，** 代表与 WT 相比在 0.01 水平上差异显著。

图 10　WT、EV 和转基因拟南芥的花发育数据的统计结果

Fig. 10　Flower development data statistics of WT, EV and transgenic *A. thaliana*

体中验证了 xso-miR167 与 *XsARF*6.2 的互作模式，明确其在文冠果雌蕊发育中的重要作用。

3.3　研究展望

本研究发现过表达 miR167 后 IAA 含量下降，但并未证明该基因直接调控了 IAA 的合成、代谢或转运过程，该调控是直接还是间接作用仍有待阐明。后续可进一步解析 IAA 信号通路中 *XsARF* 下游的 Aux/IAAs、GH3s、SAURs 等靶基因，构建以 miRNA-*ARF* 为核心的遗传发育调控网络，并对其他 *XsARF* 基因及 IAA 通路中的其他关键基因进行系统研究。同时，也可结合激素喷施、环境因子调控等手段，在 IAA 处理基础上加入其他激素干预，利用激素互作促进文冠果雌蕊发育，调控文冠果雌雄花比例，进一步提高文冠果产量。本研究为解析文冠果雌蕊发育与激素信号互作机制提供新的研究思路，丰富了木本植物 miRNA-*ARF* 调控模块的研究体系。

4　结　　论

本研究旨在解析文冠果雄花雌蕊败育过程中 miR167-*XsARF*6.2-IAA 模块的调控机制。首次在文冠果体系中揭示了 miR167-*XsARF*6.2 的靶向调控关系，并结合异源转化拟南芥实验验证了 miR167-*XsARF*6.2-IAA 模块的功能，探究了 IAA 介导的 miR167-*XsARF*6.2 调控模式在雌蕊发育中的核心作用，为文冠果性别调控与高产育种提供更多理论基础。本研究可得出如下结论。

（1）在雄花雌蕊败育的 3 个关键时期，共鉴定 481 个 miRNA，预测到 miRNA 靶基因 2 266 个，并筛选出 1 986 个差异表达 mRNA，其差异表达呈明显阶段特异性；且 miRNA 靶向的 mRNA 显著富集于信号转导等信号通路，参与雌蕊原基分化和花器官发育。这揭示了 miRNA 通过调控这些功能基因的表达，主导雄花雌蕊发育的分子过程。

（2）miR167 显著富集于植物激素信号转导通路，且外源 IAA 处理可抑制 miR167 表达，解除其对 XsARF6.2 的抑制，并激活生长素信号通路。由此，提示 miR167 是调控雌蕊发育的关键 miRNA。

（3）雄花雌蕊发育过程中，xso-miR167 表达持续升高，其靶基因 *XsARF*6.2 表达显著下调；xso-miR167 过表达实验证实，该基因可显著降低文冠果种仁中 IAA 含量，表明其可能参与 IAA 的合成、代谢或转运过程；外源 IAA 处理可显著抑制 miR167 在雌蕊关键发育期的功能，解除其对 *XsARF*6.2 的抑制，激活 IAA 信号通路，进一步验证了该基因与生长素信号转导的密切关联。

（4）转基因拟南芥中花粉活力大幅降低，由野生型的 90.9% 依次降至 43.68% 和 62.25%，且伴随着雌雄蕊形态萎缩、开花滞后、花器官发育畸形等特征。这进一步佐证了 miR167-*ARF* 调控模式是调控雌蕊

发育的关键因子。

参 考 文 献

[1] 唐东慧, 阮成江, 孟婷, 等. 不同种质文冠果含油量及油中脂肪酸组成分析 [J]. 中国油脂, 2017, 42(3): 77−81.
Tang D H, Ruan C J, Meng T, et al. Oil contents and fatty acid composition in different germplasm of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge [J]. China Oils and Fats, 2017, 42(3): 77−81.

[2] Yu H, Fan S, Bi Q, et al. Seed morphology, oil content and fatty acid composition variability assessment in yellow horn (*Xanthoceras sorbifolium* Bunge) germplasm for optimum biodiesel production [J]. Industrial Crops and Products, 2017, 97: 425−430.

[3] Liang Q, Fang H, Liu J, et al. Analysis of the nutritional components in the kernels of yellowhorn (*Xanthoceras sorbifolium* Bunge) accessions [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2021, 100: 103925.

[4] Ma Y, Bi Q, Li G, et al. Provenance variations in kernel oil content, fatty acid profile and biodiesel properties of *Xanthoceras sorbifolium* Bunge in northern China [J]. Industrial Crops and Products, 2020, 151: 112487.

[5] 敖妍, 段劼, 于海燕, 等. 文冠果研究进展 [J]. 中国农业大学学报, 2012, 17(6): 197−203.
Ao Y, Duan J, Yu H Y, et al. Research progress on *Xanthoceras sorbifolium* [J]. Journal of China Agricultural University, 2012, 17(6): 197−203.

[6] Shi T, Iqbal S, Ayaz A, et al. Analyzing differentially expressed genes and pathways associated with pistil abortion in Japanese apricot *via* RNA-seq [J]. Genes, 2020, 11(9): 1079.

[7] Chen J, Zhang J, Liu Q, et al. Mining for genes related to pistil abortion in *Prunus sibirica* L [J]. PeerJ, 2022, 10: e14366.

[8] Zhao T, Cheng L, Chen C L, et al. Microstructural observation on pistil abortion of 'Li Guang' apricot and transcriptome reveal the mechanism of endogenous hormones involved in pistil abortion [J]. Scientia Horticulturae, 2022, 293: 110749.

[9] Nagpal P, Ellis C M, Weber H, et al. Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation [J]. Development, 2005, 132(18): 4107−4118.

[10] Ru P, Xu L, Ma H, et al. Plant fertility defects induced by the enhanced expression of microRNA167 [J]. Cell Research, 2006, 16(5): 457−465.

[11] Zheng L, Nagpal P, Villarino G, et al. miR167 limits anther growth to potentiate anther dehiscence [J]. Development, 2019, 146(14): dev174375.

[12] Bartel D P. microRNAs genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2004, 116(2): 281−297.

[13] 张立霞, 李霄, 许蕾, 等. 蒺藜苜蓿 miR167c 调控生长和花器官发育的功能验证 [J]. 草地学报, 2023, 31(10): 2925−2937.
Zhang L X, Li X, Xu L, et al. Functional validation of *Medicago truncatula* miR167c in regulating plant growth and flower organ development [J]. Acta Agrestia Sinica, 2023, 31(10): 2925−2937.

[14] Glazińska P, Wojciechowski W, Wilmowicz E, et al. The involvement of InMIR167 in the regulation of expression of its target gene InARF8, and their participation in the vegetative and generative development of *Ipomoea nil* plants[J]. Journal of Plant Physiology, 2014, 171(3−4): 225−234.

[15] Duan W, Yan J, Li L, et al. Silencing Sly-miR167a delayed preharvest ripening of tomato fruit [J]. Postharvest Biology and Technology, 2024, 211: 112828.

[16] 张宁, 黄曜曜, 敖妍, 等. 文冠果花芽分化过程及内源激素动态变化 [J]. 南京林业大学学报 (自然科学版), 2019, 43(4): 33−42.
Zhang N, Huang Y Y, Ao Y, et al. Dynamic changes of flower bud differentiation and endogenous hormones in *Xanthoceras* sorbifolia Bunge [J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2019, 43(4): 33−42.

[17] 陈雨欣. 基于 IAA 转导通路的文冠果雌蕊发育过程中 ARF 及 miRNA 的鉴定分析 [D]. 北京: 北京林业大学, 2023.
Chen Y X. Identification and analysis of ARF and miRNA during the development process of pistils of *Xanthoceras sorbifolium* based on IAA signal transduction pathway[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2023.

[18] Gilbert K, Fahlgren N, Kasschau K, et al. Preparation of multiplexed small RNA libraries from plants [J]. Bio-protocol, 2014, 4(21): e1275.

[19] Bjornson M, Kajala K, Zipfel C, et al. Low-cost and high-throughput RNA-seq library preparation for Illumina sequencing from plant tissue [J]. Bio-protocol, 2020, 10(20): e3799.

[20] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2−ΔΔC T method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402−408.

[21] 王静宇, 申序, 陈晓慧, 等. 龙眼 miR167 家族分子特性及其潜在靶标在体胚发生早期的表达模式 [J]. 应用与环境生物学报, 2021, 27(1): 146−157.
Wang J Y, Shen X, Chen X H, et al. Molecular characteristics and expression pattern of miR167 family and their potential targets during early somatic embryogenesis in Longan (*Dimocarpus longan* Lour.) [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2021, 27(1): 146−157.

[22] Liu X, Huang S, Xie H. Advances in the regulation of plant development and stress response by miR167 [J]. Frontiers in Bioscience-Landmark, 2021, 26(9): 655.

[23] Han L, Li M, Li C, et al. ARF3-mediated auxin signaling is essential for sex determination in cucumber [J]. Science, 2026, 391: 59−63.

[24] Wu M F, Tian Q, Reed J W. *Arabidopsis* microRNA167 controls patterns of *ARF*6 and *ARF*8 expression, and regulates both female and male reproduction [J]. Development, 2006, 133(21): 4211−4218.

[25] Arora S, Singh A K, Chaudhary B. Target-mimicry based miRNA167-diminution ameliorates cotton somatic embryogenesis *via* transcriptional biases of auxin signaling associated miRNAs and genes [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2020, 141(3): 511−531.

[26] Yao X, Chen J, Zhou J, et al. An essential role for miRNA167 in maternal control of embryonic and seed development [J]. Plant Physiology, 2019, 180(1): 453−464.

[27] Wang Y, Duan W, Bai J, et al. Constitutive expression of a wheat microRNA, TaemiR167a, confers male sterility in transgenic *Arabidopsis* [J]. Plant Growth Regulation, 2019, 88(3): 227−239.

（责任编辑 吴 娟 赵田芸
责任编委 马履一）