作物学报 ACTA AGRONOMICA SINICA 2026, 52(2): 349−362 http://zwxb.chinacrops.org/
ISSN 0496-3490; CN 11-1809/S; CODEN TSHPA9 E-mail: zwxb301@caas.cn

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2026.55035

Bna-miR1040-*EIF3A* 模块调控油菜开花时间的功能研究

马毅娜 吴晓明玉 李藕琪 王 圆 陈 丽 张盈川 赵 伦 文 静 傅廷栋 沈金雄*

华中农业大学作物遗传改良全国重点实验室 / 国家油菜工程技术研究中心, 湖北武汉 430070

摘 要: 开花时间是作物重要发育性状, 对作物产量有显著影响。miRNA 是一类由生物体内源 *MIR* 基因转录后加工而形成的小分子 RNA, 可通过切割靶基因影响靶基因的表达。前期研究基础上在甘蓝型油菜中发现一个未知生物学功能的新的小分子 RNA, novel-Bna-miR1040, 本研究过表达 Bna-miR1040 的甘蓝型油菜较野生型花期延迟。降解组测序表明 *BnaEIF3A* 是 Bna-miR1040 的潜在靶基因, 5'RACE 和烟草瞬时转化试验表明, Bna-miR1040 可以切割 *BnaEIF3A*, 使 *BnaEIF3A* 的表达量降低; 进化分析结果表明, *BnaEIF3A* 在不同物种中具有保守性; 亚细胞定位结果显示 BnaEIF3A 定位在细胞核上; 通过 CRISPR/Cas9 创建 *BnaEIF3A* 的功能缺失突变体, 突变体较野生型也表现为花期延迟。本研究结果为甘蓝型油菜 miRNA 调控开花时间提供了数据, 为甘蓝型油菜不同花期品种选育提供了理论参考。

关键词: 甘蓝型油菜; miRNA; Bna-miR1040; *EIF3A*; 开花时间

Functional analysis of the Bna-miR1040-*EIF3A* module in regulating flowering time in rapeseed (*Brassica napus*)

Ma Yi-Na, Wu Xiao-Ming-Yu, Li Ou-Qi, Wang Yuan, Chen Li, Zhang Ying-Chuan, Zhao Lun, Wen Jing, Fu Ting-Dong, and Shen Jin-Xiong*

National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University / National Engineering Research Center of Rapeseed, Wuhan 430070, Hubei, China

Abstract: Flowering time is a critical developmental trait in crops that significantly influences yield. MicroRNAs (miRNAs), a class of small endogenous RNAs processed from *MIR* gene transcripts, regulate gene expression by mediating transcript cleavage. In this study, we identified a novel miRNA—novel-Bna-miR1040—in rapeseed (*Brassica napus*), whose biological function had not been previously characterized. Transgenic rapeseed plants overexpressing Bna-miR1040 exhibited delayed flowering compared to wild-type plants. Degradome sequencing identified *BnaEIF3A* as a potential target of Bna-miR1040. This interaction was validated by 5′RACE and transient expression assays in tobacco leaves, which confirmed that Bna-miR1040 cleaves *BnaEIF3A*, significantly reducing its transcript levels. Evolutionary analysis showed that *BnaEIF3A* is highly conserved across diverse plant species. Subcellular localization analysis revealed that the BnaEIF3A protein is exclusively localized in the nucleus. To further investigate its function, we generated *BnaEIF3A* loss-of-function mutants using CRISPR/Cas9 genome editing. These mutants also exhibited delayed flowering phenotypes compared to wild-type controls. Together, our findings demonstrate that Bna-miR1040 regulates flowering time in rapeseed by suppressing *BnaEIF3A* expression, providing novel insights for molecular breeding strategies aimed at optimizing flowering time in rapeseed.

Keywords: *Brassica napus*; miRNA; Bna-miR1040; *EIF3A*; flowering time

---

本研究由国家自然科学基金项目(31930032)和财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-12)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China project (31930032) and the China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-12).

* 通信作者(Corresponding author): 沈金雄, E-mail: jxshen@mail.hzau.edu.cn

第一作者联系方式: E-mail: mayina202202@163.com

Received (收稿日期): 2025-06-03; Accepted (接受日期): 2025-10-30; Published online (网络出版日期): 2025-11-05.

URL: https://link.cnki.net/urlid/11.1809.S.20251105.1042.004

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

开花时间是影响植物生长发育重要的因素之一, 它与作物产量高度相关。开花必须在生长季节足够早地发生, 以便在不利条件开始之前完成种子生产[1-2]。正常情况下光和温度是决定开花的关键因素[3], 植物根据对光周期反应的不同可以分为: 长昼植物, 例如拟南芥; 短昼(长夜)植物, 如水稻; 和日中性植物, 如番茄[4]。另外, 低温春化和温度性季节性变化也会导致植物开花时间的不同[5]。除环境因素外植株自身的内源性物质如糖(海藻糖-6-磷酸)信号传导和激素(脱落酸、细胞分裂素、油菜素类固醇、生长素和独脚金内酯)信号传导和反应也是影响植物开花的重要因素[6]。长江流域作为我国油菜最重要的种植区域, 虽上中下游的年降水量、年辐照量和冬季低温分布特征整体相似, 但存在油菜种植和生长周期的不同, 通过研究开花时间调控油菜生育期具有重要的理论和实践价值[7]。

miRNA 是一类由生物体内源 *MIR* 基因转录后加工而形成的小分子 RNA, 长度介于 20~24 nt 之间。成熟的 miRNA 分子为单链且无编码能力, 但可在 RNA 水平互补靶标基因 mRNA 序列, 从而发挥自身作用影响生物体生长发育[8]。早期研究中, AGO1 蛋白因其展现出的核酸内切酶活性, 被视为 miRNA 的辅助因子, 起到切割靶 mRNA 的作用[9]。Kasschau 等[10]和 Chen[11]通过 5′RACE 试验检测出 miR172 对 *AP2* 的切割产物, 表明植物体内 miRNA 对靶 mRNA 切割与翻译抑制有概率同时存在。植物从种子萌发到结实成熟是一个轮回更新的生命过程, 在其中植物体会受到来自内部和外部众多因素的精细调控。miRNA 充当植物体关键的调控因子, 存在时空特异性表达的特点[12]。不同 miRNA 与靶基因共同构成的重叠调控网络可覆盖到植物生长发育各个阶段, 影响根、茎、叶、花、种子等组织的发育和形成。miRNA 在调控植物开花方面发挥重要作用, 经研究发现 miR156 和 miR172 在多种作物中具有保守性[13-15]。随着油菜基因组测序的完成, 甘蓝型油菜中 miRNA 的研究在各个方面迎来了新突破。Wang 等[16]在甘蓝型油菜中鉴定到 4 个 miR172 成员, 可精准靶向 euAP2 家族 17 个成员, 调控开花时间。另外, 油菜中 miRNA 还参与胁迫响应过程, 例如 Bna-miR397a-*BnaLAC2* 模块可提高油菜对低温的适应性[17]; miR169 突变后靶向甘蓝型油菜中的 NF-YA8 提高了抗旱性[18]。

真核翻译起始因子 3 复合体(EIF3)是当前被认为最大的翻译起始因子, 在植物中含有 13 个小亚基[19], 在 mRNA 翻译过程、植物生长发育及逆境方面发挥着重要作用。有研究表明, EIF3 亚基参与植物营养生长、生殖生长以及与抗逆性相关过程; 拟南芥中 *ateif3e* 的突变导致植株开花延迟、花瓣减少、雄蕊变短等[20]; *ateif3f* 突变体花粉萌发率下降, 胚胎发育异常导致幼苗畸形、缺乏叶绿素, 对外源糖敏感[21]; 拟南芥中异位过表达 *TaeIF3g* 在 NaCl、ABA、干旱方面表现出更高的抗性[22]。有研究报道, EIF3A 含有高度保守的蛋白结构域 PCI [23], 在水稻中可受生长素诱导表达[24]。油菜作为我国油料产业的重要支柱, 自 2016 年以来种植面积持续稳步增长, 展现了良好的发展态势。目前, 种植面积稳定在 700 万公顷左右, 其植物油总产量占全国近 50%, 保障油菜的可持续发展对国家植物油供给安全具有重要意义[25]。然而, 要实现油菜产量与品质的快速双重提升, 通过常规育种难以在短时间内突破瓶颈。因此, 结合科技快速发展的生物技术育种, 将会成为油菜产业当下及未来的主流以及必然趋势。本研究以甘蓝型油菜 Westar 为材料, 初步明确了 Bna- miR1040-*BnaEIF3A* 模块可调控甘蓝型油菜的开花时间。这不仅丰富了甘蓝型油菜的 miRNA 数据库, 也为 miRNA 以及翻译起始因子参与油菜生长发育研究、油菜不同花期品种选育提供了理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为甘蓝型油菜 Westar 及以其为转化受体获得的转基因材料。亚细胞定位所用材料为本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)。试验涉及材料均种植于华中农业大学油菜试验田或快速育种温室。快速育种温室栽培条件为温度 22℃、16 h 光照/8 h 黑暗。

本研究所用的载体为携带双 35S 启动子的 pCAMBIA2300 过表达载体; 携带 Cas9 蛋白的 pKSE401 基因编辑载体(由中国农业大学陈其军教授提供); 携带 GFP 标签的 pMDC83 载体。所用的大肠杆菌感受态 Trans5α 和根癌农杆菌感受态 GV3101 购自北京擎科生物科技股份有限公司。引物合成由北京擎科生物科技有限公司完成, 测序由诺禾致源科技有限公司完成。

1.2 Bna-miR1040 序列和结构分析

Chen 等[26]以株型有显著差异的甘蓝型油菜回交群体中的矮秆紧凑突变体和正常株型油菜为试验

材料, 在抽薹初期分别取茎顶端组织, 进行 small RNA 测序和降解组测序。本研究以此为基础, 对预测到的 Bna-miR1040 展开研究。通过 RNAFold web server (univie.ac.at)在线网站绘制 Bna-miR1040 前体的二级结构图, 通过 DNAMAN 软件对不同甘蓝型油菜品种及拟南芥中的 Bna-miR1040 前体进行序列保守性和同源性分析。

1.3　载体构建

以甘蓝型油菜全基因组数据库 BnIR (https://yanglab.hzau.edu.cn/BnIR)为参考, 获取 Bna-miR1040 前体上下游各 200~300 bp 的序列, 通过同源重组, 构建以 pCAMBIA2300 为质粒骨架的 p35S::miR1040 过表达载体; 通过同源重组, 构建以 pMDC83 为质粒骨架的 p35S::BnaC09.EIF3A-GFP 表达载体进行亚细胞定位, 同时将 *BnaC09.EIF3A* 的编码序列中 7 个碱基进行同义突变, 构建以 pMDC83 为质粒骨架的 p35S::m7BnaC09.EIF3A-GFP 表达载体用于 miRNA 的切割验证。利用 sgRNA 靶点设计网站 (http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/)在 *BnaEIF3A* 外显子上分别设计 2 个 sgRNA 构建 6 拷贝敲除载体, 采用 Golden gate 的方式将靶点构建到中国农业大学陈其军教授实验室提供的质粒骨架 pKSE401 [27]中。利用农杆菌介导法[28]将过表达和 CRISPR/Cas9 载体转化到甘蓝型油菜 Westar 的下胚轴中, 经过组织培养获得阳性苗。

1.4　烟草叶片瞬时共转化实验

验证 Bna-miR1040 切割 *BnaC09.EIF3A* 将携带有 p35S::miR1040 的农杆菌活化至 OD 值为 0、0.3、0.6、0.9, 分别与 OD 值为 1.0 的 p35S::BnaC09.EIF3A-GFP、p35S::m7BnaC09.EIF3A-GFP 农杆菌液混合均匀; 亚细胞定位: 活化含 p35S::BnaC09.EIF3A-GFP 的菌株, 加入对应的细胞核 Marker, 于 28℃暗培养 1~2 h, 注射烟草叶片, 避光放置 48 h 后取样, 使用 Leica SP8 激光共聚焦显微镜观察荧光信号。

1.5　BnaEIF3A 基因家族生物信息学分析

以拟南芥中构成 EIF3 复合体的 12 个亚基(不包括 EIF3j)的编码序列为参考, 通过 NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)和芸薹属在线网站 BnTIR (https://yanglab.hzau.edu.cn/BnTIR)进行 BLAST 序列比对, 下载 EIF3A 各亚基在拟南芥及甘蓝型油菜 Westar 中的氨基酸序列, 使用 MEGA11 软件进行多序列比对, 构建“Unrooted trees”系统进化树, 并通过 iTOL (https://itol.embl.de/upload.cgi)在线网站美化 BnaEIF3A 基因家族进化树。以 BnaEIF3A 蛋白序列为参考, 在 NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)、Phytozome (https://phytozome-next.jgi.doe.gov/)、Evolview (https://www.evolgenius.info/evolview-v2)在线网站中进行 BLAST 比对, 筛选出其他物种中编码 EIF3A 的直系同源基因, 构建 EIF3A 在不同物种间的系统发育树。使用 TBtools [29]软件“Protein Paramter Calc”对 *EIF3A* 基因的蛋白质理化性质进行分析。使用 Ensembl Plants (https://plants.ensembl.org/index.html)在线网站下载拟南芥及甘蓝型油菜基因组信息, 使用 MEME (http://meme-suite.org/)网站分析 *EIF3A* 基因的保守基序, 利用 NCBI 网站的 Batch CD-search 工具预测 *EIF3A* 基因功能结构域, 将数据整合到 TBtools 软件中进行可视化分析。

1.6　DNA 提取

采用 CTAB 法[30]提取油菜鲜嫩叶片的 DNA。用 ddH_2O 调至 50 ng μL^{-1} 储存在–20℃备用。

1.7　RNA 提取、反转录和荧光定量 PCR 分析

使用 TRIzol 试剂(Invitrogen, 美国)提取总 RNA。分别取甘蓝型油菜 Westar 的根、茎、叶、花和角果的样品, 于液氮中速冻后, 转移至–80℃冰箱中长期保存备用, 利用 RNA 提取试剂盒(LS1040 购自上海普洛麦格有限公司)提取 RNA, 通过 qRT-PCR 方法检测 *BnaEIF3A* 和 Bna-miR1040 的相对表达水平。Bna-miR1040 反转录采用茎环反转录法, 茎环反转录使用南京诺唯赞生物科技股份有限公司(Vazyme)提供的 miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Kit (by stem-loop)试剂盒(Varkonyi-Gasic et al 2007), miRNA 使用诺唯赞公司(Vazyme)提供的 miRNA Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒, 进行 qRT-PCR 扩增; *BnaEIF3A* 采用第一链 cDNA 合成试剂盒(AE311, 北京全式金生物技术有限公司)进行反转录。反应体系为 10 μL, 包含上下游引物各 0.2 μL, cDNA 模板 4.6 μL, 2×Green qPCR SuperMix 5 μL, miRNA 油菜内参基因为 *U6*, 靶基因油菜内参为 *BnaActin7*。每个样品 3 次生物学重复, 每个重复取自 3 个单株的同组织混合, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [31]计算基因的相对表达量。本研究所有引物序列见附表 1。

1.8　转基因阳性植株鉴定和编辑情况检测

利用 U626-F/U629-R 引物对转基因植株进行阳性苗鉴定, 通过 Hi-TOM 高通量测序技术对阳性植株进行编辑情况检测[32]。数据由北京诺禾致源科技股份有限公司产生, 通过在线网站 Hi-TOM (http://www.

hi-tom.net/hi-tom/)分析阳性苗的编辑情况。编辑效率为编辑植株在阳性植株中所占的百分比, 双等位突变率为纯合编辑植株在阳性植株中所占的百分比。

1.9 过表达 Bna-miR1040 和 *BnaEIF3A* 突变体表型观察

将过表达 Bna-miR1040 和 *BnaEIF3A* 突变体以及野生型同时播种于温室中, 进行花期统计。每个不同基因型的株系 5~7 株, 在生长过程中记录开花时间并在第 46 天时照相记录。

1.10 数据分析

数据采用 *t* 检验(Student's *t* test)进行统计分析, 利用 GraphPad Prism 8.0 绘制柱形图。

2 结果与分析

2.1 Bna-miR1040 符合典型 miRNA 特征

small RNA 测序文库中预测到 Bna-miR1040 前体。前体及成熟体结构分析结果显示, 它们的序列长度在 278 bp 之间。使用 RNAFold web server 网站绘制 Bna-miR1040 前体(Bna-pre-miR1040)二级空间构象图, 结果显示其可折叠成茎环形态, 且最小自由能(MFE)为–92 kcal mol^{-1}, 满足 miRNA 最小自由能小于 –18 kcal mol^{-1} 的条件。所预测的前体的成熟体序列长度为 20 bp (5′-TAGGGTCTAAGACTTGGGTT-3′), 处于茎环臂的位置(图 1)。以上结果表明, Bna-miR1040 符合 miRNA 的基本特征。

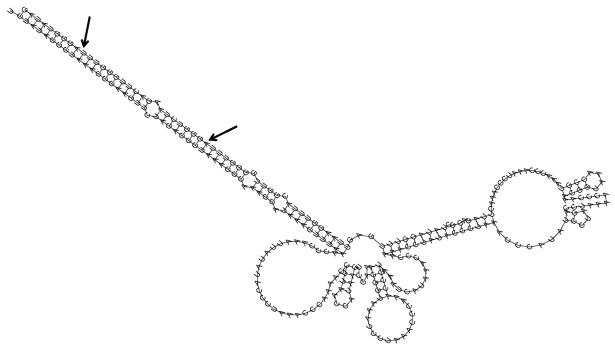


图 1 Bna-miR1040 前体二级结构预测图
Fig. 1 Predicted secondary structure of the Bna-miR1040 precursor
箭头所指处为成熟体序列。Arrows indicate mature sequence.

通过甘蓝型油菜 Darmor、Westar 数据库进行序列比对, 可将 Bna-miR1040 的前体定位于 C08 染色体非编码区。同时, 利用 miRBase 中已知的植物 miRNA 进行 BLAST 分析。结果显示, Bna-miR1040 前体序列可精确比对到甘蓝型油菜基因组具体位置, 但并未匹配到植物中已知 miRNA 序列。因此, Bna-miR1040 属于 novel miRNA。

通过 BnIR, 检索甘蓝型油菜 ZS11、Darmor、Quinta、Tapidor、Westar、No2127 中前体的核苷酸序列信息, 进行多序列比对。结果 Bna-pre-miR1040 前体在 6 个品种中序列完全相同, 表明序列保守, 进化过程中趋于稳定(比对结果见附图 1)。同时, 利用拟南芥数据库进行比对, 未发现相似序列, 进一步证明 Bna-miR1040 属于甘蓝型油菜的 novel miRNA。

2.2 过表达 Bna-miR1040 导致甘蓝型油菜花期延迟

为探究 Bna-miR1040 在甘蓝型油菜中的功能, 参考烟草叶片共转化结果, 截取 Bna-miR1040 前体及上下游 200~300 bp 序列创建过表达材料。对获得的转基因植株使用特异引物进行阳性鉴定, 结果显示, 在 T_0 代共获得 22 株 Bna-miR1040 过表达材料阳性单株, 阳性率为 91.67%。通过 qRT-PCR, 对 T_1 代的 OX#11、OX#20、OX#24 进行表达量鉴定。结果显示, 这 3 个株系中 Bna-miR1040 的表达量较野生型均显著提高, 提高幅度为 8~53 倍(图 2-B)。3 个过表达 Bna-miR1040 株系 OX#11、OX#20、OX#24 的花期较野生型晚 2~3 d (图 2-C)。

2.3 Bna-miR1040 靶向切割 *EIF3A*

降解组测序数据结果显示, 在甘蓝型油菜中, Bna-miR1040 存在 8 个潜在的靶基因(表 1), 分别为 *BnaA09g21660D*、*BnaC09g23910D*、*BnaA02g21720D*、*BnaCnng08330D*、*BnaA07g32230D*、*BnaA02g04280D*、*BnaC09g54340D*、*BnaCnng09000D*。其中 *BnaA09g21660D*、*BnaC09g23910D*、*BnaA02g21720D*、*BnaCnng08330D* 为编码 EIF3A 的基因。5′RACE 结果表明, Bna-miR1040 可识别 BnaC09g23910D mRNA 序列中位于 1076~1093 位置的靶标序列(5′-GAUUCAAUCUUGAACCUA-3′), 并在其成熟体 5′端的第 10 个和第 11 个核苷酸的位点对 *BnaC09g23910D* (*BnaC09.EIF3A*)有真实切割作用(图 3-A)。烟草转化试验结果显示, BnaC09.EIF3A 蛋白融合 GFP 标签后, 表达的 GFP 荧光可与核 marker 红色荧光重合(图 3-C), 说明 BnaC09.EIF3A 定位在细胞核中。另外随着 p35S::Bna-miR1040 农杆菌液 OD 值的升高, GFP 绿色荧光逐渐减弱, 当 OD 值达到 0.9 时, GFP 绿色荧光几乎消失不见(图 3-D)。然而, 当 p35S::m7BnaC09.EIF3A-GFP 与不同浓度 p35S::Bna-miR1040 农杆菌液混合侵染时, 烟草叶片中的 GFP 绿色荧光基本保

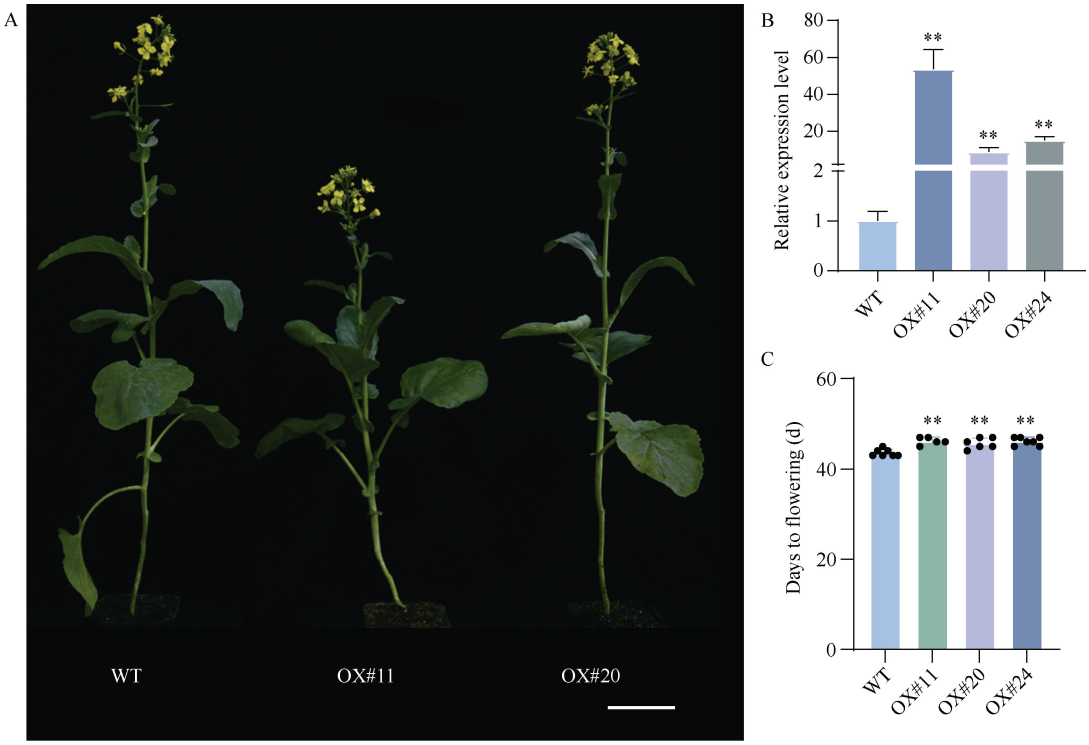


图 2　Bna-miR1040 过表达材料构建及初花期考察

Fig. 2　Characterization of Bna-miR1040 overexpression lines and flowering time assessment

A: 生长 46 d 的 WT 及 Bna-miR1040 过表达材料。标尺为 10 cm。B: Bna-miR1040 过表达材料表达量鉴定。C: WT 及 Bna-miR1040 过表达材料初花期统计。每株系考察 5~7 株, 3 次生物学重复, 3 次技术重复。采用 *t* 测验分析; **表示 $P < 0.01$。

A: WT, Bna-miR1040 overexpression materials grown for 46 days. Bar = 10 cm. B: identification of Bna-miR1040 overexpression materials. C: flowering time statistics of WT and Bna-miR1040 overexpression lines. Five to seven plants were evaluated per line, with three biological replicates and three technical replicates. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test; ** indicates $P < 0.01$.

表 1　Bna-miR1040 降解组测序预测的 8 个候选靶基因

Table 1　Eight candidate target genes of Bna-miR1040 predicted by degradome sequencing

miRNA 名称 miRNA name	靶基因 Target gene	拟南芥同源基因 *Arabidopsis thaliana* homologous gene	靶基因功能 Function of target gene
Bna-miR1040	*BnaA09g21660D*	*AT4G11420*	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A
	BnaC09g23910D		
	BnaA02g21720D		
	BnaCnng08330D		
	BnaA07g32230D	*AT1G75950*	SKP1-like protein 1A
	BnaA02g04280D	*AT5G19530*	Thermospermine synthase
	BnaC09g54340D	*AT5G60690*	Homeobox-leucine zipper protein
	BnaCnng09000D	*AT1G01960*	Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 3

持不变(图 3-D)。这表明当 *BnaC09.EIF3A* 靶序列发生改变, 可有效抑制 Bna-miR1040 产生的切割作用。通过 qRT-PCR 检测过表达 Bna-miR1040 甘蓝型油菜中 *BnaEIF3A* 各拷贝的表达量。结果显示, 过表达 Bna-miR1040 株系中, *BnaEIF3A* 的 4 个拷贝表达量显著降低(图 3-B)。这也进一步表明 Bna-miR1040 对靶序列 *BnaEIF3A* 存在切割作用, 影响了其在植物体内的 mRNA 表达水平。综上所述, 甘蓝型油菜中, Bna-miR1040 对 *BnaEIF3A* 产生切割作用, 抑制了 *BnaEIF3A* 的表达。

2.4　甘蓝型油菜 EIF3A 的进化与结构功能保守

通过 NCBI 和 BnTIR 在线网站, 在甘蓝型油菜 Westar 基因组中确定了编码不同 EIF3 亚基的 70 个成员。系统发育树(图 4)结果显示, 在甘蓝型油菜和拟南芥中, 组成 EIF3 复合体的各亚基所对应的基因独立于 1 个分支中, 总计形成 12 个小分支。整体来看,

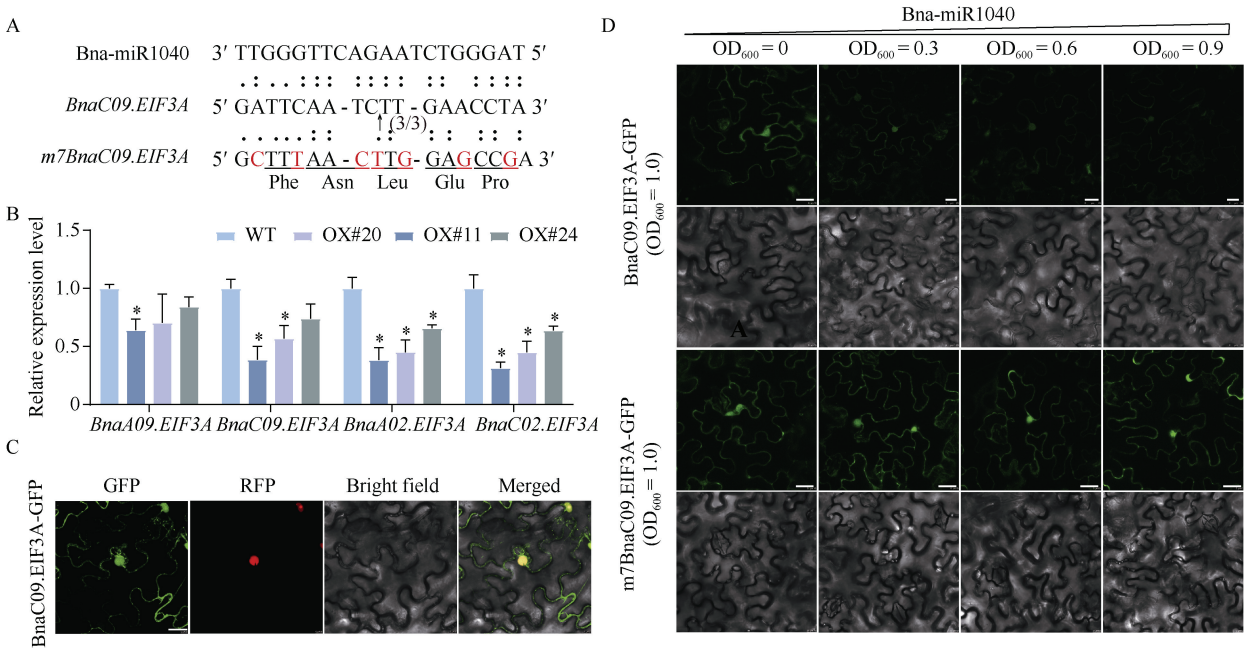


图 3 Bna-miR1040 靶基因验证

Fig. 3 Validation of Bna-miR1040 target gene

A: p35S::Bna-miR1040、p35S::*BnaC09.EIF3A*-GFP、p35S::*m7BnaC09.EIF3A*-GFP 载体构建图。“ : ”表示碱基配对, “.”表示 G/C: U 配对, 箭头表示 *BnaC09.EIF3A* 具体被切割的位置, 3/3 右边数字表示总挑斑克隆数、左边数字表示 *BnaC09.EIF3A* 在该位点被切割后所获得的克隆数。B: Bna-miR1040 过表达材料中靶基因 *BnaEIF3A* 四个拷贝表达量检测图, 3 次生物学重复, 3 次技术学重复。采用 *t* 测验分析, *表示 $P < 0.05$。C: BnaEIF3A 亚细胞定位。标尺为 20 μm。D: 共聚焦显微镜下不同浓度 p35S::Bna-miR1040 农杆菌液分别与 p35S::BnaC09.EIF3A-GFP、p35S::m7BnaC09.EIF3A-GFP 共侵染烟草叶片后表达 GFP 荧光信号图像, 标尺为 20 μm。

A: p35S::Bna-miR1040, p35S::*BnaC09.EIF3A*-GFP, p35S::*m7BnaC09*.EIF3A-GFP vector construction diagram. “ : ” indicates base pairing. “.” indicates G/C: U pairing, and the arrow indicates the specific cutting position of *BnaC09.EIF3A*, where 3/3 means the right side number represents the total number of screened clones, and the left side number represents the number of clones obtained after cutting *BnaC09.EIF3A* at this site. B: detection of the expression level of four copies of the target gene *BnaEIF3A* in Bna-miR1040 overexpression material.3 biological replicates and 3 technical replicates. Student’s *t*-test, * indicates $P < 0.05$. C: BnaEIF3A subcellular localization. Bar = 20 μm. D: under the confocal microscope, different concentrations of p35S::Bna-miR1040 agrobacterium solutions were co-inoculated with p35S::BnaC09.EIF3A-GFP and p35S::m7BnaC09.EIF3A-GFP on tobacco leaves, and the GFP fluorescence signal images were expressed. Bar = 20 μm.

BnaEIF3A、BnaEIF3L 和 BnaEIF3H 在进化树中聚集为一个大簇, 说明这 3 个亚基也在进化过程中具有较高的相似性, 它们的亲缘关系也更为相近, 可能会行使相似的功能。为了探究 EIF3A 在不同物种中的进化过程是否存在序列保守性和功能保守性, 选取具有代表性的物种, 通过 NCBI、Phytozome、Evolview 等在线网站获得各物种 EIF3A 蛋白序列, 构建系统发育树。结果显示, EIF3A 蛋白在水稻、玉米、小麦、甘蓝型油菜、萝卜、甘蓝、白菜、芥菜、拟南芥、番茄、马铃薯、大豆、酵母和智人中保守, 在进化过程中 PCI 作为共有的功能结构域处于蛋白序列中间位置(图 5-A)。PCI 结构域分为 2 部分, C 端保守的“翼状螺旋” (WH)结构域, 负责连接不同 PCI 结构域间的相互作用; N 端的四肽重复单位(TPR), 保守性相对较差。大部分物种中 EIF3A 仅存在 1~2 个同源拷贝, 而十字花科中(除拟南芥以外) EIF3A 同源拷贝数显著增多, 其中甘蓝型油菜 A09、A02、A03a、A03b 四个拷贝分别来自白菜(*Brassica rapa*)中对应的染色体; 而 C09、C02、C03、C07 四个拷贝则分别来自甘蓝(*Brassica oleracea*)中对应的染色体。通过 Ensembl Plants 在线网站获取甘蓝型油菜与拟南芥全基因组序列和基因组注释文件, 检索 EIF3A 相关基因, 利用 MEGA11 软件构建 2 个物种进化树; 通过 The MEME Suite 在线网站查找 EIF3A 保守基序, 发现在 2 个物种中, 所包含的 10 个保守基序完全相同; 通过 NCBI 在线网站的“Batch CD-Search”检索 EIF3A 保守结构域, 发现在 2 个物种中都含有保守的 PCI 结构域(PINT 也称为 PCI), 除此之外 AT4G11420.1 和 BnaA09.EIF3A、BnaC09.EIF3A、BnaA03a.EIF3A、BnaC03.EIF3A 含有一个 PTZ00121 结构域, BnaA02.EIF3A、BnaA03b.EIF3A、BnaC07.EIF3A 含有一个 DUF5401 结构域。

将所有文件传至 TBtools 的“Gene Structure View”进行可视化分析(图 5)。结果显示, *ATEIF3A* 基因序列最长, *BnaA03b.EIF3A* 序列最短, 各基因的外显子为 11~13 个, 大部分基因都含有 3′UTR 区域, 少部分丢失了 5′UTR 区域。总体而言, BnaEIF3A 及拟南芥同源基因在基因结构、蛋白结构域、基序、理化性质等方面较保守, 暗示其在植物体内可能发挥相同的功能。

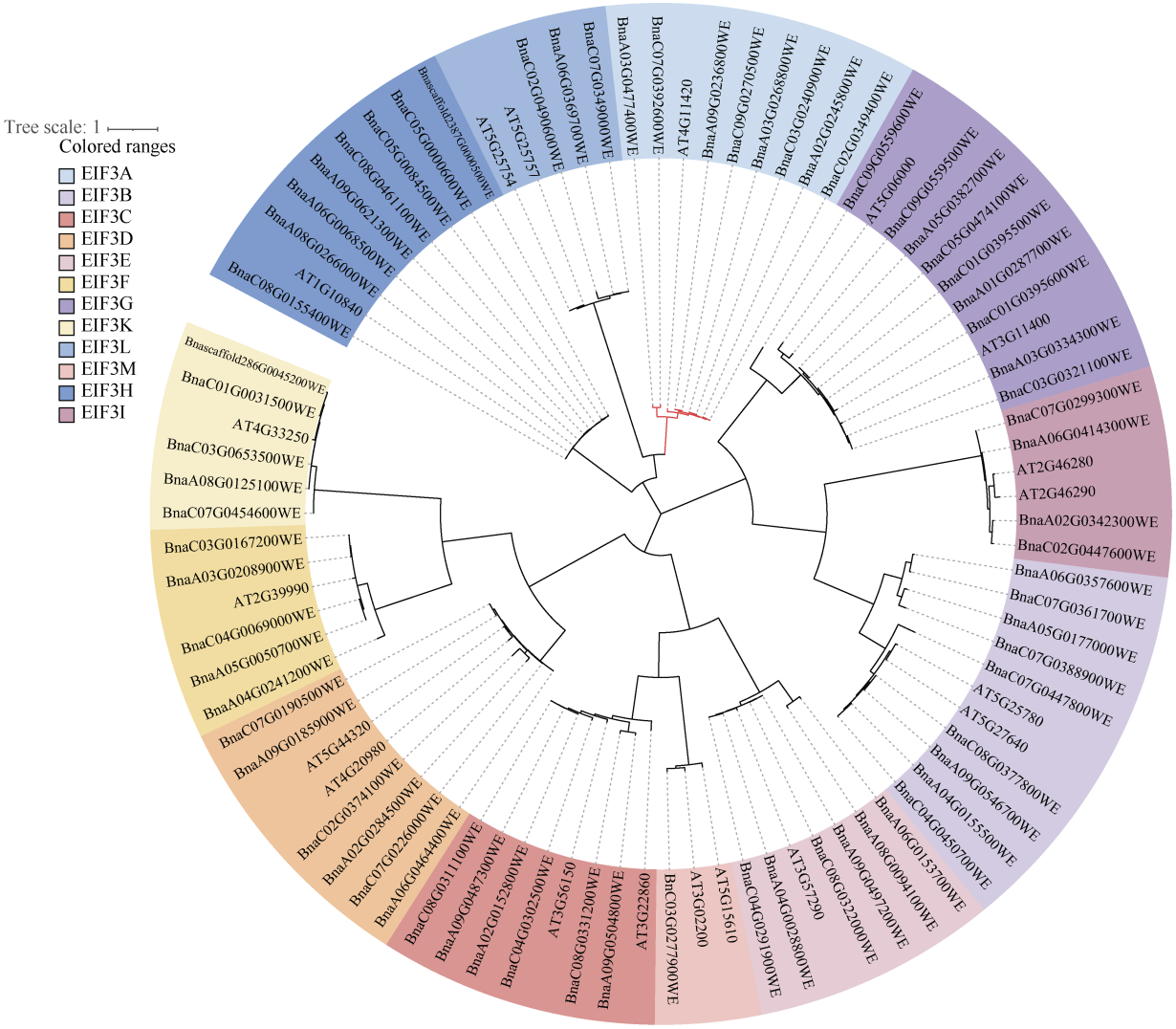
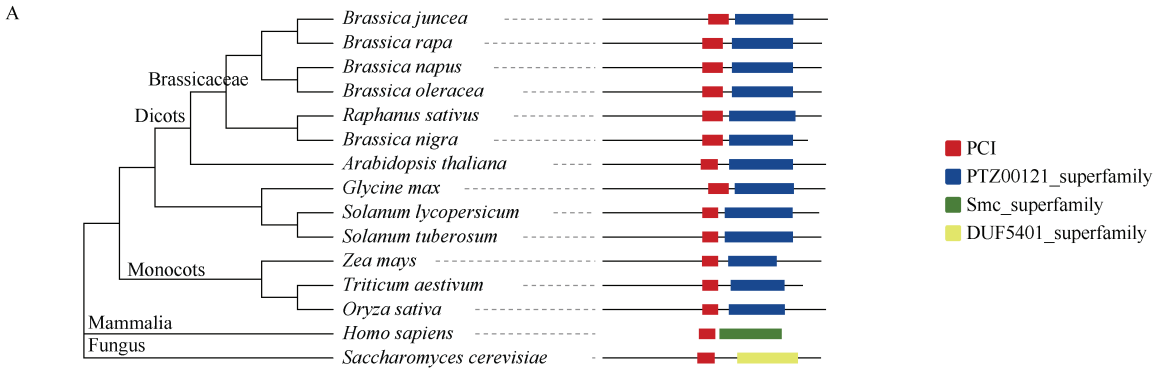


图 4　BnaEIF3 家族系统发育树

Fig. 4　Phylogenetic tree of the BnaEIF3 family



(图 5)

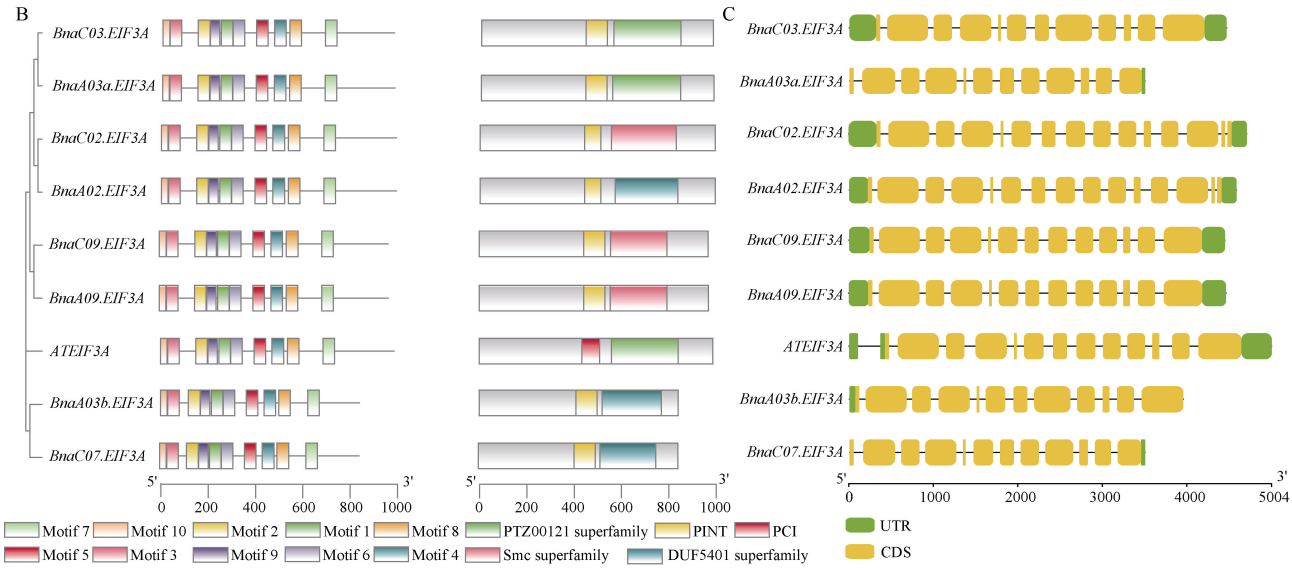


图 5 *BnaEIF3A* 生物信息学分析

Fig. 5 Bioinformatics analysis of *BnaEIF3A*

A: EIF3A 在不同物种间的进化关系。B: *BnaEIF3A* 及拟南芥同源基因 Motif 分析。C: *BnaEIF3A* 及拟南芥同源基因功能结构域。

A: evolutionary relationship of EIF3A among different species. B: motif analysis of *BnaEIF3A* and its homologous genes in *Arabidopsis*. C: functional domain of *BnaEIF3A* and its homologous genes in *Arabidopsis*.

2.5 *BnaEIF3A* 多拷贝组织特异性表达模式解析

利用 qRT-PCR 分析 *BnaEIF3A* 在甘蓝型油菜各组织中的表达模式发现，*BnaEIF3A* 有 2 个拷贝 *BnaA03b.EIF3A*、*BnaC07.EIF3A* 在各组织中几乎不表达，其余 6 个拷贝均在角果中高表达，其次在叶片、根、茎中表达(图 6)。

2.6 甘蓝型油菜 *BnaEIF3A* 突变体花期延迟

通过 CRISPR/Cas9 系统获得不同基因型的 *BnaEIF3A* 基因编辑株系(图 7-A)。T_0 代转基因植株共 132 株，阳性率 70.23%，编辑效率为 64.12% (附表 2)。靶点 1 总编辑效率为 60.31%，靶点 2 总编辑效率为 30.53%。上述结果表明，过表达 Bna-miR1040 会导致开花时间延迟。Bna-miR1040 可以切割 *BnaEIF3A* 影响其表达。因此，本研究重点考察 *BnaEIF3A* 三突和六突的突变体材料 T_0 代的花期。结果显示，多拷贝敲除突变体植株相较于野生型出现了生长发育延迟的现象。因此，在收获 T_0 代突变体后，于温室种植 T_1 代进行分离的同时，选择编辑情况不同的 2 个株系各 5~7 株(附图 2)，在温室初步考察初花期。

统计结果发现，*BnaEIF3A* 三突株系(CR#23、CR#67)较野生型晚 2~3 d 开花；*BnaEIF3A* 六突株系(CR#15、CR#100、CR#32、CR#102)较野生型晚 5~8 d 开花(图 7)。说明 *BnaEIF3A* 可参与调控甘蓝型油菜

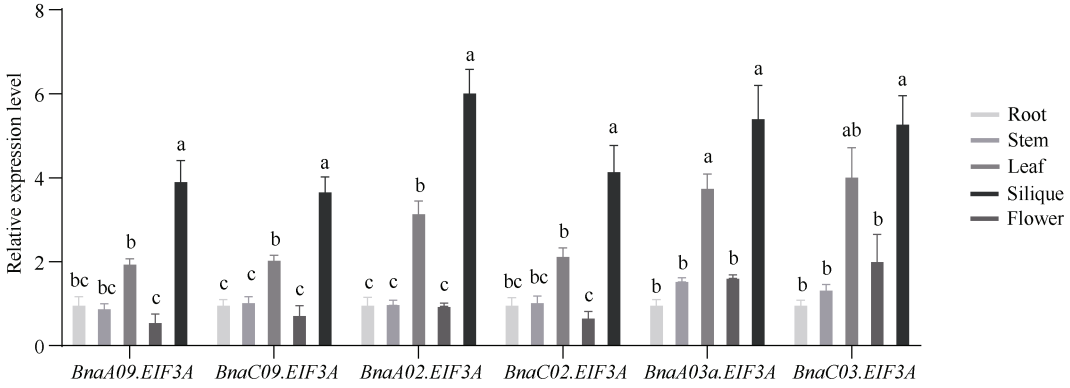


图 6 不同拷贝 *BnaEIF3A* 在 Westar 各组织中的相对表达量

Fig. 6 Relative expression of different *BnaEIF3A* gene copies in various tissues of Westar

不同字母表示 *BnaEIF3A* 同一拷贝中不同组织间差异显著($P < 0.05$)。

Different letters indicate significant differences between tissues in the same copy of *BnaEIF3A* ($P < 0.05$).

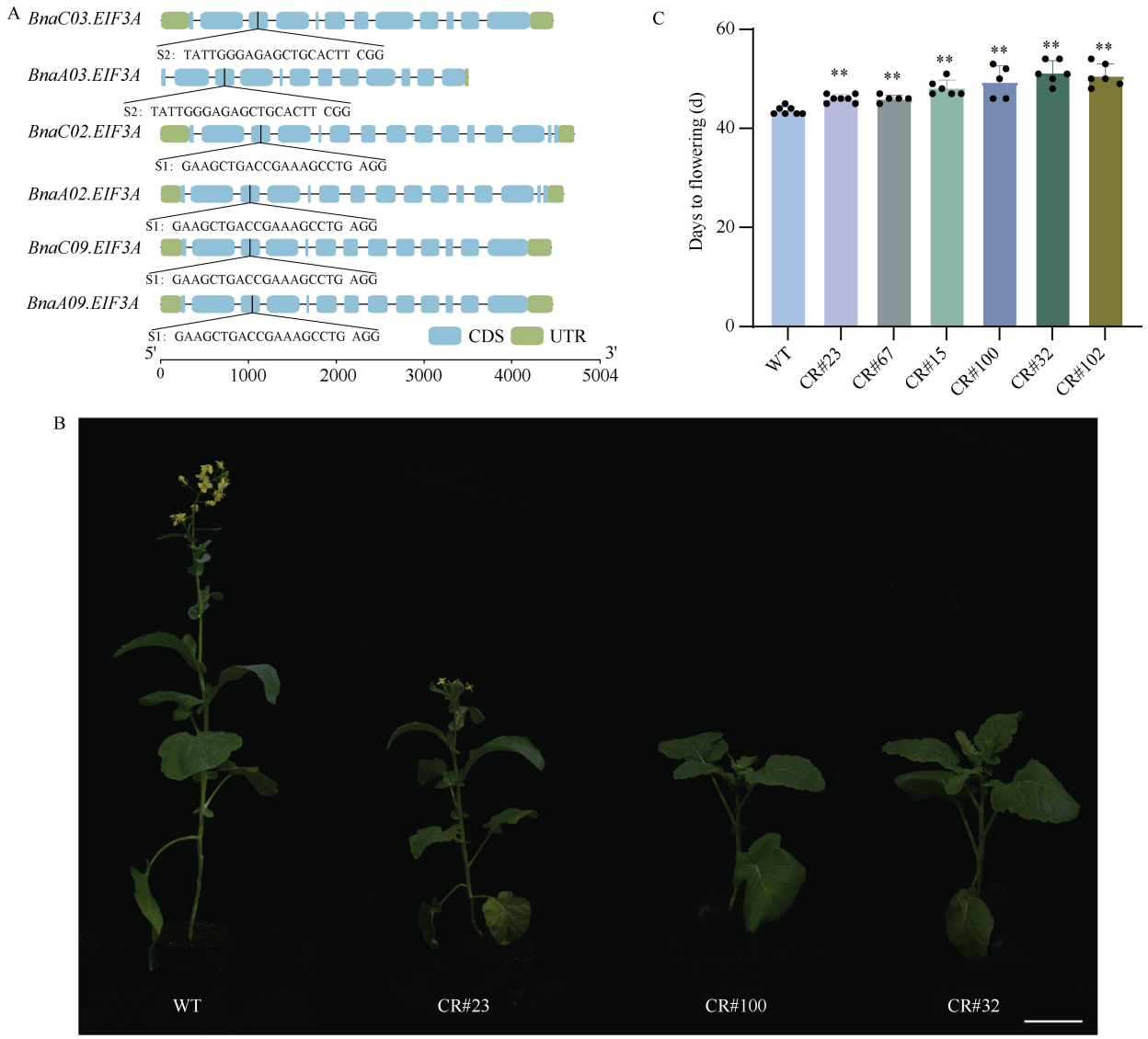


图 7　*BnaEIF3A* 敲除材料 T_1 代初花期统计

Fig. 7　Flowering time statistics of T_1 generation *BnaEIF3A* knockout lines

A: *BnaEIF3A* 敲除载体靶点分布图。B: 生长 46 d 的 WT、CR#23、CR#100、CR#32。标尺为 10 cm。C: WT、CR#23、CR#67、CR#15、CR#100、CR#32、CR#102 初花期统计图, 每株系统计 5~7 株。采用 *t* 测验分析, **表示 $P < 0.01$。

A: target distribution of *BnaEIF3A* knockout vector. B: WT, CR#23, CR#100, and CR#32 grown for 46 days. Bar = 10 cm. C: WT, CR#23, CR#67, CR#15, CR#100, CR#32, and CR#102 early flowering period statistics, each plant system totals 5–7 plants. *t*-test analysis was used, ** indicates $P < 0.01$.

生殖生长过程, 并且同源拷贝间存在功能冗余, 当多个拷贝同时发生突变时, 将延迟突变体开花时间。

3　讨论

甘蓝型油菜中 miRNA 的研究开展较晚。最初, Xie 等[33]于 2007 年以拟南芥、水稻 miRNA 数据库为参考, 初步筛选出甘蓝型油菜基因组中 21 个候选同源保守 miRNA。随着高通量测序技术的迅猛发展, 甘蓝型油菜中 miRNA 的研究得到了极大的推动。然而, 当前的研究更多集中于物种间保守 miRNA 对甘蓝型油菜生长发育过程的调控机制。而针对甘蓝型油菜中 novel miRNA 及其靶标的研究, 则大多停留在预测阶段, 缺乏深入的探究。目前, 已在甘蓝型油菜叶片、角果发育阶段、开花早期茎尖、腋芽以及各种胁迫处理中, 预测到大量 novel miRNA 的存在, 但缺乏进一步的功能验证[34-36]。本研究探索了 Bna-miR1040 在甘蓝型油菜中花发育方面的功能。填补了甘蓝型油菜中 novel miRNA 数据。有研究表明, novel miRNA 的出现是植物适应环境变化的结果, 然而往往只有部分发挥功能作用的 novel miRNA

可在基因组保留并稳定遗传[37]。

miRNA 在植物生长发育, 包括开花时间的调控中扮演着重要角色。目前, 在甘蓝型油菜中鉴定出部分 miRNA 可参与调控开花时间。有研究表明, miR172 作为晚花基因 *euAP2* 的抑制因子, 参与甘蓝型油菜中复杂的花期调控网络[16]。在自然条件下, miR1885 保持在低水平以维持正常发育和基础免疫力, 但在花过渡期间达到峰值以促进芸苔属开花[38]。本研究中, Bna-miR1040 过表达材料导致甘蓝型油菜花期延迟。但与 *bnaeif3a* 多拷贝敲除突变体相比, Bna-miR1040 过表达材料并未展现出幼苗生长迟缓、开花时间大幅度延迟的情况。可能有以下原因: 首先, Bna-miR1040 作为芸苔属中可能新进化出的 novel miRNA, 在植物体各个部位表达量较低。这种特点与拟南芥、水稻、小麦等各个物种中鉴定到的大多数 novel miRNA 相似, 均表现出组织特异性表达和低丰度表达的特点[39-40]。或是低丰度 miRNA 会导致成熟体的低水平积累和错误生成, 从而引起靶标 mRNA 的不精确切割[37]。其次, 通过发芽试验和初花期调查发现, 靶基因的同源拷贝间存在功能冗余, 而 Bna-miR1040 过表达材料中, 仅一定程度降低了其中 4 个拷贝的表达量, 猜测可能是剩余同源拷贝间可弥补 Bna-miR1040 过表达引起的表达量下降而造成的功能缺失。有研究表明, miRNA 植物生长的不同时期也存在靶向切割的特异性, 例如, 在水稻中 miR156 的不同前体在靶向切割 SPL 家族成员时, 存在不同生长阶段偏好性, 在幼苗中优先表达的 miR156a-j 可靶向切割 SPL 家族 12 个成员。miR171 可靶向切割 GRAS 家族成员, 普遍表达的 miR171b-f 和穗序偏好的 miR171i 都有 5 个潜在靶标, 包括 GRAS8、21、31、9 和 40; 而根偏好 miR171g.2 和 miR171h.2 可靶向切割 GRAS8、21、31 和 13 [41]。猜测在发芽期 Bna-miR1040 过表达材料未出现生长延迟的现象, 可能是在该时期表达量过低或是靶向拷贝数较少, 后续试验中可针对该猜测进行试验验证。此外, miRNA 与靶基因并不是纯粹的一一对应关系, 通常一个靶基因可能存在一个到数个不同种类的 miRNA 靶向切割。正如在人体组织中对 *EIF3A* 基因的研究发现, 该基因可被 miR488、miR875-5p、miR769-5p 等多种 miRNA 调控。猜测在植物中, *EIF3A* 基因也存在相同的状况, Bna-miR1040 作为 EIF3A mRNA 的切割因子之一, 未发挥较大的效应。综上所述, Bna-miR1040 过表达材料在初花期延迟时间比 *BnaEIF3A* 突变体延迟时间的较短的原因。

EIF3 作为一个由 12 个亚基构成的复合物, 是真核生物中最复杂的翻译起始因子, 其中 EIF3a、EIF3c、EIF3e、EIF3k、EIF3l 和 EIF3m 6 个亚基均含有 PCI 结构域, 通过空间结构上的相互连接组成核心八聚体, 在翻译起始过程中发挥重要作用[20]。先前有研究表明, *EIF3A* 同家族拥有 PCI 结构域的 *EIF3E* 在水稻中被敲除, 会使植株在营养生长和生殖生长阶段表现出严重缺陷, 酵母双杂结果显示, *OsEIF3e* 可与细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(ICK1、5、6)特异性结合[42]; 同样在拟南芥中下调 *EIF3C* 的表达, 也会影响植株的生长导致结实率降低[43]; 前人有研究发现 *ateif3e*-Tp 突变体开花延迟、花瓣减少、雄蕊变短等[22]。而 *EIF3A* 作为 EIF3 的关键核心亚基也存在 PCI 结构域, 这些都充分证明油菜 *EIF3A* 的 PCI 结构域失去功能会影响油菜开花时间和生长发育。另外本研究未能将 *EIF3A* 全部拷贝失去功能, 目前观察到的植株表现出开花时间延迟, 后期将持续关注 *EIF3A* 全部拷贝失去功能对植株的影响。同时后期将关注开花相关基因, 例如 *FT*、*SAM*、*AP1* 和 *ELF*, 探索 *EIF3A* 调控开花时间的机制[44]。然而, 目前对 *EIF3A* 在植物生长发育方面的研究较少。本研究发现 *BnaEIF3A* 可受 Bna-miR1040 靶向切割, 初步发现 *BnaEIF3A* 下调表达会使突变体较野生型出现生长迟缓, 开花延迟, Bna-miR1040-*BnaEIF3A* 模块在甘蓝型油菜开花时间方面发挥功能。综上所述, *BnaEIF3A* 和其拥有相同结构域的基因在生长发育方面的表型是一致的。

4 结论

本研究通过 5′RACE 与烟草瞬时转化证实 Bna-miR1040 特异性切割 BnaEIF3A; 利用过表达株系及 CRISPR/Cas9 多拷贝突变体, 证实二者均导致开花显著延迟, 揭示 Bna-miR1040 通过负调控 *BnaEIF3A* 表达延迟开花。这不仅发现了一个甘蓝型油菜开花调控新型 miRNA, 也首次建立了 *EIF3A* 在作物开花时间调控中的功能角色, 进一步为深入解析 miRNA 与翻译起始因子构成的调控模块在发育调控中的作用提供重要理论支撑。

References

[1] Verrico B, Preston J C. Historic rewiring of grass flowering time pathways and implications for crop improvement under climate change. New Phytol, 2025, 245: 1864–1878.

[2] Collins C G, Angert A L, Clark K, et al. Flowering time responses to warming drive reproductive fitness in a changing Arctic. Ann Bot, 2025, 135: 255–268.

[3] Praena J, van Veen E, Henriques R, et al. Assessing flowering time under different photoperiods. Methods Mol Biol, 2022, 2494: 101–115.

[4] Yang H Y. Solar rhythm in the regulation of photoperiodic flowering of long-day and short-day plants. J Exp Bot, 2013, 64: 2643–2652.

[5] Xu S J, Chong K. Remembering winter through vernalisation. Nat Plants, 2018, 4: 997–1009.

[6] Zhu Y, Klasfeld S, Jeong C W, et al. TERMINAL FLOWER 1-FD complex target genes and competition with FLOWERING LOCUS T. Nat Commun, 2020, 11: 5118.

[7] 万明. *BnaFTs* 和 *BnaFLCs* 协同调控油菜开花时间和生态型分化的遗传基础. 华中农业大学博士学位论文, 湖北武汉, 2024.
Wan M. Genetic Basis of Flowering Time and Ecotypedifferentiation Coordinately Regulated by *BnaFTs* and *BnaFLCs* in Rapeseed (*Brassica napus* L.). PhD Dissertation of Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, China, 2024 (in Chinese with English abstract).

[8] Li C, Zhang B H. microRNAs in control of plant development. J Cell Physiol, 2016, 231: 303–313.

[9] Tang G L, Reinhart B J, Bartel D P, et al. A biochemical framework for RNA silencing in plants. Genes Dev, 2003, 17: 49–63.

[10] Kasschau K D, Xie Z X, Allen E, et al. P1/HC-pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. Dev Cell, 2003, 4: 205–217.

[11] Chen X M. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* flower development. Science, 2004, 303: 2022–2025.

[12] Galagali H, Kim J K. The multifaceted roles of microRNAs in differentiation. Curr Opin Cell Biol, 2020, 67: 118–140.

[13] Zhou D, Zhao S K, Zhou H Y, et al. A lncRNA bra-miR156HG regulates flowering time and leaf morphology as a precursor of miR156 in *Brassica campestris* and *Arabidopsis thaliana*. Plant Sci, 2023, 337: 111889.

[14] Wang J W, Czech B, Weigel D. miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. Cell, 2009, 138: 738–749.

[15] Zhang B L, Chen X M. Secrets of the MIR172 family in plant development and flowering unveiled. PLoS Biol, 2021, 19: e3001099.

[16] Wang J L, Mei J, Ren G D. Plant microRNAs: biogenesis, homeostasis, and degradation. Front Plant Sci, 2019, 10: 360.

[17] Hussain M A, Huang Y, Luo D, et al. Integrative analyses reveal *Bna-miR397a-BnaLAC2* as a potential modulator of low-temperature adaptability in *Brassica napus* L. Plant Biotechnol J, 2025, 23: 1968–1987.

[18] Li J, Duan Y J, Sun N L, et al. The miR169n-NF-YA8 regulation module involved in drought resistance in *Brassica napus* L. Plant Sci, 2021, 313: 111062.

[19] Browning K S, Bailey-Serres J. Mechanism of cytoplasmic mRNA translation. Arabidopsis Book, 2015, 13: e0176.

[20] Querol-Audi J, Sun C M, Vogan J M, et al. Architecture of human translation initiation factor 3. Structure, 2013, 21: 920–928.

[21] 李竑, 沈思师, 许智宏, 等. 水稻 eIF3 大亚基(eIF3a)编码基因的克隆及其表达模式分析. 实验生物学报, 2003, 36(1): 54–60.
Li H, Shen S S, Xu Z H, et al. Isolation and expression pattern analysis of rice auxin-induced eIF3a coding gene. Acta Biol Exp Sin, 2003, 36(1): 54–60 (in Chinese with English abstract).

[22] Yahalom A, Kim T H, Roy B, et al. *Arabidopsis* eIF3e is regulated by the COP9 signalosome and has an impact on development and protein translation. Plant J, 2008, 53: 300–311.

[23] Xia C, Wang Y J, Li W Q, et al. The *Arabidopsis* eukaryotic translation initiation factor 3, subunit F (AteIF3f), is required for pollen germination and embryogenesis. Plant J, 2010, 63: 189–202.

[24] Singh B, Chauhan H, Khurana J P, et al. Evidence for the role of wheat eukaryotic translation initiation factor 3 subunit g (TaeIF3g) in abiotic stress tolerance. Gene, 2013, 532: 177–185.

[25] 方振, 李谷成. 我国油菜籽增产潜力与实现路径. 中国油脂, 2025, 50(4): 1–9.
Fang Z, Li G C. Potential and realization path of rapeseed yield increase in China. China Oils Fats, 2025, 50(4): 1–9 (in Chinese with English abstract).

[26] Chen L, Chen L, Zhang X X, et al. Identification of miRNAs that regulate silique development in *Brassica napus*. Plant Sci, 2018, 269: 106–117.

[27] Liu H, Chen W D, Li Y S, et al. CRISPR/Cas9 technology and its utility for crop improvement. Int J Mol Sci, 2022, 23: 10442.

[28] Wang Y, Wu W H. Potassium transport and signaling in higher plants. Annu Rev Plant Biol, 2013, 64: 451–476.

[29] Chen C J, Chen H, Zhang Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. Mol Plant, 2020, 13: 1194–1202.

[30] Bujarrabal A, Schumacher B. Hormesis running hot and cold. Cell Cycle, 2016, 15: 3335–3336.

[31] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nat Protoc, 2008, 3: 1101–1108.

[32] Liu Q, Wang C, Jiao X Z, et al. Hi-TOM: a platform for high-throughput tracking of mutations induced by CRISPR/Cas systems. Sci China Life Sci, 2019, 62: 1–7.

[33] Xie F L, Huang S Q, Guo K, et al. Computational identification of novel microRNAs and targets in *Brassica napus*. FEBS Lett, 2007, 581: 1464–1474.

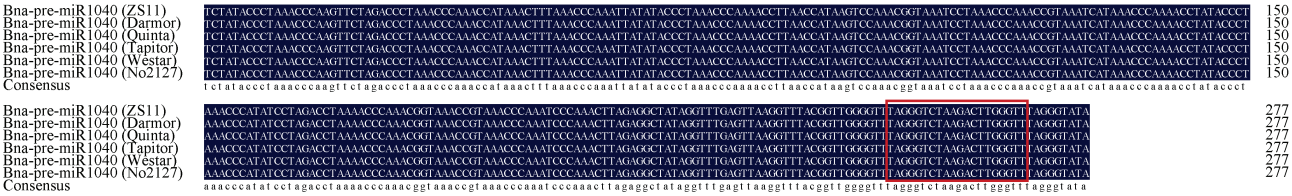
[34] Xu M Y, Dong Y, Zhang Q X, et al. Identification of miRNAs and their targets from *Brassica napus* by high-throughput sequencing and degradome analysis. BMC Genomics, 2012, 13: 421.

[35] Wang W Y, Xu M Y, Liu X J, et al. The rice eukaryotic translation initiation factor 3 subunit e (OseIF3e) influences organ size and pollen maturation. Front Plant Sci, 2016, 7: 1399.

[36] Shen Y F, Sun S, Hua S J, et al. Analysis of transcriptional and epigenetic changes in hybrid vigor of allopolyploid *Brassica napus* uncovers key roles for small RNAs. Plant J, 2017, 91: 874–893.

[37] Cuperus J T, Fahlgren N, Carrington J C. Evolution and functional diversification of *MIRNA* genes. Plant Cell, 2011, 23: 431–442.

[38] Cui C, Wang J J, Zhao J H, et al. A *Brassica* miRNA regulates plant growth and immunity through distinct modes of action. Mol Plant, 2020, 13: 231–245.
[39] Fahlgren N, Howell M D, Kasschau K D, et al. High-throughput sequencing of *Arabidopsis* microRNAs: evidence for frequent birth and death of *MIRNA* genes. PLoS One, 2007, 2: e219.
[40] Rogers K, Chen X M. Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. Plant Cell, 2013, 25: 2383–2399.
[41] Jeong D H, Park S, Zhai J X, et al. Massive analysis of rice small RNAs: mechanistic implications of regulated microRNAs and variants for differential target RNA cleavage. Plant Cell, 2011, 23: 4185–4207.
[42] Wang J, Jian H J, Wang T Y, et al. Identification of microRNAs actively involved in fatty acid biosynthesis in developing *Brassica napus* seeds using high-throughput sequencing. Front Plant Sci, 2016, 7: 1570.
[43] Raabe K, Honys D, Michailidis C. The role of eukaryotic initiation factor 3 in plant translation regulation. Plant Physiol Biochem, 2019, 145: 75–83.
[44] Yang M K, Lin W J, Xu Y R, et al. Flowering-time regulation by the circadian clock: from *Arabidopsis* to crops. Crop J, 2024, 12: 17–27.



附图 1 不同甘蓝型油菜品种中 Bna-pre-miR1040 序列比对图

Fig. S1 Sequence alignment of Bna-pre-miR1040 in different *Brassica napus* varieties

框内为成熟体序列。Bna-pre-miR1040 在 ZS11、Darmor、Quinta、Tapidor、Westar、No2127 六种油菜品种中对应的核苷酸序列比对。

Inside the box is the mature sequence. Comparison of nucleotide sequences corresponding to Bna-pre-miR1040 in six *Brassica napus* varieties: ZS11, Darmor, Quinta, Tapidor, Westar, and No2127.

附表 1 载体构建扩增引物

Table S1 Primers of gene amplification for constructing vector

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5′–3′)
Bna-miR1040-F	CAGGTCGACTCTAGAGGATCCACGCTAACGATTCCAGCTAA
Bna-miR1040-R	CGAGAATTCGAGCTCGGTACCGACGCTAACGCTTCCAACGAA
BnaC09.EIF3A-GFP-F	CTTGCATGCCTGCAGGTCGACATGGCGAATTTTGCCAAACCTG
BnaC09.EIF3A-GFP-R	TCTACCGGTACCCGGGGATCCCCACGCTGTGGCCTGGGC
m7*BnaC09.EIF3A*-GFP-F	CTTGCATGCCTGCAGGTCGACATGGCGAATTTTGCCAAACCTG
m7*BnaC09.EIF3A*-R	TCGGCTCCAAGTTAAAGCCAATGAGGTTGGCCATCCTCAA
m7*BnaC09.EIF3A*-F	GCTTTAACTTGGAGCCGAAATTCGAGGGCAGAGATATGGT
C83-R	CTTGCATGCCTGCAGGTCGACCCACGCTGTGGCCTGGGC
bnaeif3a-DT1-BsF	ATATATGGTCTCGATTGGCGAACAACAGAGTTCCGTGTT
bnaeif3a-DT1-F0	TGGCGAACAACAGAGTTCCGTGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
bnaeif3a-DT2-R0	AACTTGGTCTCTGTACTTGTTCCAATCTCTTAGTCGACTCTAC
bnaeif3a-DT2-BsR	ATTATTGGTCTCGAAACTTGGTCTCTGTACTTGTTCCAA
BnaC09.EIF3A-S1-F	ggagtgagtacggtgtgcCCTCTCATCTTTAGTTGATTAAGCTCTA
BnaC09.EIF3A-S1-R	gagttggatgctggatggTCAGGTTTGCCAAATGGTTTCTGATA
BnaA09.EIF3A-S1-F	ggagtgagtacggtgtgcCCGTAAATCTTTAGTTGATTAAGGTC
BnaA09.EIF3A-S1-R	gagttggatgctggatggCAGGTTCGCCAAATGGTTCCTG
BnaA02.EIF3A-S1-F	ggagtgagtacggtgtgcGATTTGTTCATTGTGTAGATGACAGC
BnaA02.EIF3A-S1-R	gagttggatgctggatggGAGCTGCAAGCTCTCTGGG
BnaC02.EIF3A-S1-F	ggagtgagtacggtgtgcCGTGTAGATGACCGCACATAAAGCCTTT
BnaC02.EIF3A-S1-R	gagttggatgctggatggCAGCTGCAAGCTCTCCGGG
BnaA02.EIF3A-S1-F	ggagtgagtacggtgtgcGATTTGTTCATTGTGTAGATGACAGC

(续附表 1)

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5′–3′)
BnaA02.EIF3A-S1-R	gagttggatgctggatggGAGCTGCAAGCTCTCTGGG
BnaC02.EIF3A-S1-F	ggagtgagtacggtgtgcCGTGTAGATGACCGCACATAAAGCCTTT
BnaC02.EIF3A-S1-R	gagttggatgctggatggCAGCTGCAAGCTCTCCGGG
BnaA03a.EIF3A-S2-F	ggagtgagtacggtgtgcCGAGTTCCGTAGGCTTTGTGAAATC
BnaA03a.EIF3A-S2-R	gagttggatgctggatggAGGTAAAGCTGCAAGCTCTCAGGA
BnaC03.EIF3A-S2-F	ggagtgagtacggtgtgcGAGTTCCGCAGGCTTTGTGAAATC
BnaC03.EIF3A-S2-R	gagttggatgctggatggAAGCTGCAAGCTCTCTGGG
RT Bna-miR1040-primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAACCCA
qRT Bna-miR1040-F	CGCGCGTAGGGTCTAAGACT
qRT Bna-miR1040-R	AGTGCAGGGTCCGAGGTATT
RT *U6*-primer	TTGGACCATTTCTCGATTTTTG
qRT *U6*-F	TTGGAACGATACAGAGAAGATTAGCA
qRT *U6*-R	TTGGACCATTTCTCGATTTTTG
qRT *BnaC09.EIF3A* -F	GACCGAAAGCCTGAGGATCTG
qRT *BnaC09.EIF3A* -R	CGCTTTATGTGCAGTCATCGCG
qRT *BnaA09.EIF3A* -F	CCAGGCACTTCATGATCTCATCACG
qRT *BnaA09.EIF3A* -R	GGAAAGGTGCAGGAAGTGCTTGATA
qRT *BnaA02.EIF3A* -F	GTCGTTTCGCCAAGGACGGT
qRT *BnaA02.EIF3A* -R	CGGCCTTGTCGGTAGAGAGATGA
qRT *BnaC02.EIF3A* -F	GGGTCGTTTCGCTAAGGACGGA
qRT *BnaC02.EIF3A* -R	TGCATCAGCCTGAGAACGAGCCA
qRT *BnaA03a.EIF3A* -F	GTGGCAGAAGCCGCTCGAGAA
qRT *BnaA03a.EIF3A* -R	GCTCACATTCACTTGCTGGCATACA
qRT *BnaC03.EIF3A* -F	CATGGCAGAAGCCGCTCGAAA
qRT *BnaC03.EIF3A* -R	GCTGGCAAACGATACGGTACTGG
qRT *BnaA03b.EIF3A* -F	TAGATGATCTTGAGGTTACACCATGG
qRT *BnaA03b.EIF3A* -R	GTACTTCTTGCAGAACTGGAAGGCT
qRT *BnaC07.EIF3A* -F	CCGTAATTCTTGTCAGCAAGTGAACC
qRT *BnaC07.EIF3A* -R	CTCCCACAAGAACTTGAACCATGG
qRT *BnaACT7*-F	CTATCCTCCGTCTCGATCTCGC
qRT *BnaACT7*-R	CTTAGCCGTCTCCAGCTCTTGC
Bna-miR1040-4-JCF	TCTAGACCCTAAACCCAAACCATAAACT
BnaC09.EIF3A-JCF	TTGAGTTGAAGTGTATGAGGTCCA
C83-GFP-R	CAAGAATTGGGACAACTCCAGTG

附表 2　*bnaeif3a* 敲除材料 T_0 代编辑情况统计

Table S2　Statistics of editing of T_0 generation of *bnaeif3a* knockout materials

载体 Vectors	拷贝数 Copy number	野生型 WT (%)	单拷贝突变 One copy mutated (%)	两拷贝突变 Two copies mutated (%)	三拷贝突变 Three copies mutated (%)	四拷贝突变 Four copies mutated (%)	五拷贝突变 Five copies mutated (%)	六拷贝突变 Six copies mutated (%)
bnaeif3a	6	35.88	5.34	1.53	26.72	9.92	10.69	9.92

CR-3#23

	S1	
	GCGAACAACAGAGTTCCGTAGG	WT
A09	GCGAACAACAGAGTTCTCGTAGG	+T
C09	GCGAACAACAGAGTTCTCGTAGG	+T
A02	GCGAACAACAGAGTTC---GTAGG	-C
C02	GCGAACAACAGAGTTCGTAGG	WT
	S2	
	GAACAAGTACAGAGACCAA AGG	WT
A03	GAACAAGTACAGAGACCAA AGG	WT
C03	GAACAAGTACAGAGACCAA AGG	WT

CR-3#67

	S1	
	GCGAACAACAGAGTTCCGTAGG	WT
A09	GCGAACAACAGAGTTCTCGTAGG	+T
C09	GCGAACAACAGAGTTCACGTAGG	+A
A02	GCGAACAACAGAGTTCTCGTAGG	+T
C02	GCGAACAACAGAGTTCGTAGG	WT
	S2	
	GAACAAGTACAGAGACCAA AGG	WT
A03	GAACAAGTACAGAGACCAA AGG	WT
C03	GAACAAGTACAGAGACCAA AGG	WT

CR-3#15

	S1	
	GCGAACAACAGAGTTCCGTAGG	WT
A09	GCGAACAACAGAGTTCTCGTAGG	+T
	GCGAACAACAGAGTTCACGTAGG	+A
	GCGAACAACAGAGTTCGCGTAGG	+G
	GCGAACAACAGAGTTC---GTAGG	-C
C09	GCGAACAACAGAGTTCTCGTAGG	+T
	GCGAACAACAGAGTTCACGTAGG	+A
	GCGAACAACAGAGTTCGCGTAGG	+G
	GCGAACAACAGAGTTCCCGTAGG	+C
A02	GCGAACAACAGAGTTCGCGTAGG	+G
C02	GCGAACAACAGAGTTCGTAGG	WT
	GCGAACAACAGAGTTCTCGTAGG	+T
	GCGAACAACAGAGTTCACGTAGG	+A
	S2	
	GAACAAGTACAGAGACCAA AGG	WT
A03	----------	-28D
C03	GCGAACAACAGAGTTCTCGTAGG	+T
	GCGAACAACAGAGTTCACGTAGG	+A
	GCGAACAACAGAGTTCGCGTAGG	+G
	GCGAACAACAGAGTTC---GTAGG	-C
	GCGAACAACAGAGTTCGTAGG	WT

CR-3#100

	S1	
	GCGAACAACAGAGTTCCGTAGG	WT
A09	GCGAACAACAGAGTTC---GTAGG	-C
C09	GCGAACAACAGAGTTCACGTAGG	+A
A02	GCGAACAACAGAGTTCTCGTAGG	+T
	GCGAACAACAGAGTTCACGTAGG	+A
	GCGAACAACAGAGTTCGCGTAGG	+G
C02	GCGAACAACAGAGTTCGTAGG	WT
	GCGAACAACAGAGTTCTCGTAGG	+T
	GCGAACAACAGAGTTCACGTAGG	+A
	S2	
	GAACAAGTACAGAGACCAA AGG	WT
A03	----------	-28D
	GCGAACAACAGAGTTCCCGTAGG	+C
	GAACAAGTACAGAGACCAA AGG	WT
C03	GCGAACAACAGAGTTCTCGTAGG	+T
	GCGAACAACAGAGTTCACGTAGG	+A
	GCGAACAACAGAGTTCGCGTAGG	+G
	GCGAACAACAGAGTTC---GTAGG	-C
	GCGAACAACAGAGTTCGTAGG	WT

CR-3#32

	S1	
	GCGAACAACAGAGTTCCGTAGG	WT
A09	GCGAACAACAGAGTTCTCGTAGG	+T
	GCGAACAACAGAGTTCACGTAGG	+A
	GCGAACAACAGAGTTCGCGTAGG	+G
	GCGAACAACAGAGTTC---GTAGG	-C
C09	GCGAACAACAGAGTTCTCGTAGG	+T
	GCGAACAACAGAGTTCACGTAGG	+A
	GCGAACAACAGAGTTCGCGTAGG	+G
A02	GCGAACAACAGAGTTCTCGTAGG	+T
	GCGAACAACAGAGTTCACGTAGG	+A
	GCGAACAACAGAGTTCGCGTAGG	+G
	GCGAACAACAGAGTTC---GTAGG	-C
C02	GCGAACAACAGAGTTCGTAGG	WT
	GCGAACAACAGAGTTCTCGTAGG	+T
	GCGAACAACAGAGTTCACGTAGG	+A
	S2	
	GAACAAGTACAGAGACCAA AGG	WT
A03	GCGAACAACAGAGTTCTCGTAGG	+T
	GCGAACAACAGAGTTCACGTAGG	+A
	GCGAACAACAGAGTTCGCGTAGG	+G
	GCGAACAACAGAGTTC---GTAGG	-C
	GCGAACAACAGAGTTCGTAGG	WT
C03	GAACAAGTACAGAGA------ AGG	- CCAA

CR-3#102

	S1	
	GCGAACAACAGAGTTCCGTAGG	WT
A09	GCGAACAACAGAGTTCTCGTAGG	+T
	GCGAACAACAGAGTTCACGTAGG	+A
	GCGAACAACAGAGTTCGCGTAGG	+G
	GCGAACAACAGAGTTC---GTAGG	-C
C09	GCGAACAACAGAGTTCTCGTAGG	+T
	GCGAACAACAGAGTTCACGTAGG	+A
	GCGAACAACAGAGTTCGCGTAGG	+G
A02	GCGAACAACAGAGTTCTCGTAGG	+T
	GCGAACAACAGAGTTCACGTAGG	+A
	GCGAACAACAGAGTTCGCGTAGG	+G
	GCGAACAACAGAGTTC---GTAGG	-C
C02	GCGAACAACAGAGTTCGTAGG	WT
	GCGAACAACAGAGTTCTCGTAGG	+T
	GCGAACAACAGAGTTCACGTAGG	+A
	GCGAACAACAGAGTTCGCGTAGG	+G
	S2	
	GAACAAGTACAGAGACCAA AGG	WT
A03	GCGAACAACAGAGTTCTCGTAGG	+T
	GCGAACAACAGAGTTCACGTAGG	+A
	GCGAACAACAGAGTTCGCGTAGG	+G
	GCGAACAACAGAGTTC---GTAGG	-C
	GCGAACAACAGAGTTCGTAGG	WT
C03	GCGAACAACAGAGTTCTCGTAGG	+T
	GCGAACAACAGAGTTCACGTAGG	+A
	GCGAACAACAGAGTTCGCGTAGG	+G
	GCGAACAACAGAGTTC---GTAGG	-C
	GCGAACAACAGAGTTCGTAGG	WT

附图 2 T_1 代 *bnaeif3* 编辑情况

Fig. S2 Editing status of *bnaeif3* in the T_1 generation