

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2026.08.004

引用格式:朱梦馨,于博洋,滕守振,等.饲用燕麦高效基因编辑体系创制[J].草地学报,2026,34(8):2787-2792

ZHU Meng-xin, YU Bo-yang, TENG Shou-zhen, et al. The Establishment of an Efficient Genome Editing System in Forage Oat[J]. Acta Agrestia Sinica, 2026, 34(8):2787-2792

饲用燕麦高效基因编辑体系创制

朱梦馨^{1#}, 于博洋^{2#}, 滕守振², 胡涛^{1*}, 王赞^{2*}

(1. 兰州大学草地农业科技学院, 甘肃 兰州 730020; 2. 中国农业大学草业科学与技术学院, 北京 100193)

摘要:创建饲用燕麦(*Avena sativa*)高效基因编辑体系一直是燕麦种质创新的重要途径。然而,因为饲用燕麦为异源六倍体,遗传转化效率较低,利用基因编辑技术创制新种质存在较大困难。本研究通过外源添加小肽显著提高了饲用燕麦遗传转化效率,同时通过T5E融合蛋白提高基因编辑效率,建立了饲用燕麦自主知识产权、多基因和单碱基三种基因编辑技术体系,编辑效率分别为20%,23%和21.4%。本研究建立的燕麦高效的遗传转化和基因编辑体系对于饲用燕麦基因功能研究和种质创新具有重要意义。

关键词:基因编辑;CRISPR/Cas9;饲用燕麦;小肽

中图分类号:S512.6

文献标识码:A

文章编号:1007-0435(2026)08-2787-06

The Establishment of an Efficient Genome Editing System in Forage Oat

ZHU Meng-xin^{1#}, YU Bo-yang^{2#}, TENG Shou-zhen², HU Tao^{1*}, WANG Zan^{2*}

(1. School of Pastoral Agriculture Science and Technology of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu Province 730020, China;

2. College of Grassland Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: Establishing an efficient genome editing system in forage oats has long been a crucial approach for oat germplasm innovation. However, due to the hexaploid nature of forage oats, genetic transformation efficiency is relatively low, posing significant challenges in creating new germplasms using genome editing technology. Here, the genetic transformation efficiency of forage oats was significantly improved through the exogenous addition of small peptides. Simultaneously, genome editing efficiency was enhanced by employing T5E fusion proteins, leading to the development of an independent intellectual property genome editing technology system for forage oats with an editing efficiency of 20%. Additionally, a multi-genome editing system for forage oats was established with an editing efficiency of 23%, and a single base editing system for forage oats was developed with an editing efficiency of 21.4%. The establishment of highly efficient genetic transformation and genome editing systems for oats holds significant importance for gene function research and germplasm innovation in forage oats.

Key words: Genome editing; CRISPR/Cas9; Forage oat; Peptide

燕麦(*Avena sativa*)是禾本科燕麦属的一年生异源六倍体($2n=6x=42$, AACDD)粮饲兼用型植物。其在全球五大洲76个国家广泛种植^[1],是我国重要的饲草作物,种植历史悠久,主要产区包括河北、内蒙古、青海、甘肃等省区^[1]。饲用燕麦耐寒、耐贫瘠、耐盐碱,具有产量高、营养价值高、适口性好等特点,不仅能解决我国冬春草场牧草供应不足的重大问题,还是调养幼畜、病畜的优质饲料^[2]。同时,饲用燕麦在盐碱土地改良、促进草地畜牧业发展和生

态环境改善方面也发挥着重要作用。当前,饲用燕麦的种植面积不断扩大,对新品种的需求也日益迫切,系统开展饲用燕麦生物育种技术创新,创制优质饲用燕麦新种质,是实现饲草种源自主可控和解决优质牧草依赖进口“卡脖子”问题的重要举措。

基因编辑(Genome editing)技术因为操作简单、灵活、成本低,能够对目标基因进行精准修饰和引入等位基因多样性,获得可稳定遗传的优良性状,已在水稻(*Oryza sativa*)、小麦(*Triticum aesti-*

收稿日期:2026-02-15;修回日期:2026-04-30

作者简介:朱梦馨(2000-),女,汉族,山东临沂人,博士研究生,主要从事饲用燕麦基因编辑育种研究,E-mail:zhumengxin1840@163.com;于博洋(2002-),女,朝鲜族,内蒙古通辽人,硕士研究生,主要从事饲用燕麦基因编辑育种研究,E-mail:zhumx2023@lzu.edu.cn;*通信作者 Author for correspondence, E-mail:zanwang@cau.edu.cn;hut@lzu.edu.cn

vum)、玉米(*Zea mays*)等作物上广泛应用^[3]。在羊茅(*Festuca arundinacea*)、紫花苜蓿(*Medicago sativa*)等11种草类植物中也陆续建立了基因编辑体系,但是因其遗传转化效率不高,导致基因编辑效率普遍较低^[4]。燕麦基因组由于大规模易位和倒位造成的育种障碍,以及遗传位点的重组抑制和假连锁,很难通过传统育种方法实现性状渐渗。这突出了采用最新的基因编辑技术进行燕麦遗传改良的迫切性。我们之前已建立了异源六倍体饲用燕麦基因编辑体系,但是编辑效率为3.77%~15.09%^[5],获得目标性状的突变体仍旧困难,急需创制高效的饲用燕麦基因编辑体系。本文进一步优化饲用燕麦遗传转化体系,并创制了饲用燕麦单基因、自主知识产权和多基因编辑高效基因编辑体系,编辑效率为20%~23%。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试的饲用燕麦品种为‘青海甜燕麦’,其种子取自兰州大学草地农业科技学院试验田。CRISPR-Cas12i载体由中国农业大学赖锦盛教授馈赠;靶目标基因 *AsARE1* 的基因编辑载体 *AsARE1*-Cas12i由实验室之前构建和保留^[5];多基因编辑载体 pMGE1-Cas9由上海师范大学张辉教授馈赠,靶标 *AsARE1*, *AsSPDT*, *AsAPP1* 的多基因编辑载体 ASA-pMGE1Cas9由实验室之前构建和保留^[5];单碱基编辑载体 rABE8e由上海师范大学张辉教授馈赠;小肽 AsCLE(序列:RLVPTGPNPLHH),由北京擎科生物科技股份有限公司合成。

1.2 目标性状基因克隆

根据燕麦基因组序列,通过同源比对获得 *AsEPSPS* 基因序列,使用 Primer 5.0 软件设计克隆引物 *EPSPS*-F: ATGGCCATGGCGGGCGCAGC-GGCC 和 *EPSPS*-R: TTATAGCATCCCGAT-GTCGAAGTA。分别以饲用燕麦品种‘青海甜燕麦’的 cDNA 和 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。扩增产物片段纯化回收后构建 T 载体,并测序鉴定。

1.3 单碱基编辑载体构建

设计 *AsEPSPS* 的靶位点 gRNA: GAAAAGG-ATGCCAAAGAGGAAG。根据靶位点设计引物 sg-F: GAAAAGGATGCCAAAGAGGAAG, sg-R:

CTTCCTCTTTGGCATCCTTTTC。将载体 rABE8e 用 BsaI 酶切,根据诺唯赞公司回收试剂盒 FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit (DC301) 回收酶切载体产物备用。取 1 μ L sg-F 与 1 μ L sg-R, 加入 8 μ mol $\cdot$ L⁻¹ 退火缓冲液 (TE 缓冲液含 50 mmol $\cdot$ L⁻¹ NaCl) 充分混匀; 95 $^{\circ}$ C 孵育 10 min, 以 0.1 $^{\circ}$ C $\cdot$ s⁻¹ 的速率梯度降温至 20 $^{\circ}$ C, 使 sg-F 与 sg-R 退火形成双链片段。连接体系配制如下: 2 μ L 退火产物、2 μ L 回收纯化后的酶切载体、0.5 μ L 10 $\times$ T4 Buffer、0.5 μ L T4 连接酶, 室温连接 15 min 后转化 DH5 α 感受态细胞, 单克隆菌液 PCR 验证后, 阳性克隆送北京擎科生物科技股份有限公司测序检测。

1.4 饲用燕麦遗传转化

以‘青海甜燕麦’种子为外植体, 其去皮后用 75% C₂H₅OH 浸泡 5 min, 5% NaClO 浸泡 6 min, 无菌水清洗 5~7 次, 无菌水浸泡 24 h 后备用。经过消毒处理的燕麦种子置于 1/2 Murashige and Skoog (MS) 培养基中, 在恒温 (26 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 的组培室中黑暗培养 2 天。待种子发芽长至 0.1~0.3 cm, 取胚芽尖置于诱导培养基中。1/2 MS 培养基配方: MS 培养基粉末 2.17 g $\cdot$ L⁻¹ + 蔗糖 30 g $\cdot$ L⁻¹ + 琼脂 7 g $\cdot$ L⁻¹, pH=5.8。诱导培养基配方: L3 基础基粉末 4.49 g $\cdot$ L⁻¹ + 盐酸硫胺素 10 mg $\cdot$ L⁻¹ + L-谷氨酰胺 420 mg $\cdot$ L⁻¹ + 2, 4-二氯苯氧乙酸 (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid, 2, 4-D) 2 mg $\cdot$ L⁻¹ + 水解酪蛋白 0.25 g $\cdot$ L⁻¹ + MES 1.95 g $\cdot$ L⁻¹ + 30 g $\cdot$ L⁻¹ 麦芽糖 + 3.5 g $\cdot$ L⁻¹ 植物凝胶 + 1 nmol $\cdot$ L⁻¹ AsCLE, pH=5.8。培养基配置后在 115 $^{\circ}$ C 高压湿热灭菌 30 min 冷却备用。在恒温 (25 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 的组培室中黑暗培养 30 d 后, 胚性愈伤转至继代培养基中暗培养一周。预培养基配方: 1.99 g $\cdot$ L⁻¹ N6 培养基粉末 + 1 g $\cdot$ L⁻¹ 脯氨酸 + 30 g $\cdot$ L⁻¹ 葡萄糖 + 5.0 mg $\cdot$ L⁻¹ 2, 4-D + 0.1 mg $\cdot$ L⁻¹ 6-苄氨基嘌呤 (6-Benzylaminopurine, 6-BA) + 3.5 g $\cdot$ L⁻¹ 植物凝胶 + 1 nmol $\cdot$ L⁻¹ AsCLE, pH=5.4, 115 $^{\circ}$ C 高压灭菌 30 min, 冷至室温后加入 200 μ mol $\cdot$ L⁻¹ 乙酰丁香酮。转移至含 200 μ mol $\cdot$ L⁻¹ AS 的预培养基中暗培养 1 d。

预培养后的愈伤组织, 于含有基因编辑载体的农杆菌菌液 (OD₆₀₀=0.4~0.6) 中侵染 40 min, 其中真空处理 10 min, 80 r $\cdot$ min⁻¹ 摇床中振荡 30 min。倒掉组织侵染液, 用灭菌滤纸吸干愈伤组织表面的菌液, 将干燥愈伤组织转移至共培养基暗培养 2 d。共培养基配方: 3.99 g $\cdot$ L⁻¹ N6 培养基 salts + 1 g $\cdot$ L⁻¹ 酸水解酪蛋白 + 1 g $\cdot$ L⁻¹ 脯氨酸 + 60 g $\cdot$ L⁻¹ 麦芽糖

+5.0 mg·L⁻¹ 2, 4-D+0.1 mg·L⁻¹ 6-BA+3.5 g·L⁻¹ 植物凝胶+1 nmol·L⁻¹ AsCLE;pH调至5.7,115℃高压灭菌30 min,冷至室温后加入200 μmol·L⁻¹ 乙酰丁香酮。将共培养的愈伤组织用无菌头孢水洗涤4~6次,无菌水漂洗2~3次,吸干水分,在滤纸上平铺晾干,并转到筛选培养基中,暗培养30 d。筛选培养基配方:3.99 g·L⁻¹ N6培养基粉末+1 g·L⁻¹ 酸水解酪蛋白+1 g·L⁻¹ 脯氨酸+30 g·L⁻¹ 麦芽糖+5.0 mg·L⁻¹ 2, 4-D+0.1 mg·L⁻¹ 6-BA+3.5 g·L⁻¹ 植物凝胶+1 nmol·L⁻¹ AsCLE;pH调至5.7,115℃高压灭菌30 min,冷却至室温后加入200 mg·L⁻¹ 特美汀和30 mg·L⁻¹ 潮霉素。挑选新生的愈伤组织接种于抗性愈伤分化培养基,光下培养15~25 d。分化培养基配方:4.43 g·L⁻¹ MS培养基粉末+30 g·L⁻¹ 麦芽糖+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+3.5 g·L⁻¹ 植物凝胶+1 nM AsCLE;pH调至5.7,115℃高压灭菌30 min,冷却至室温后加入150 mg·L⁻¹ 特美汀、30 mg·L⁻¹ 潮霉素和0.5 mg·L⁻¹ 萘乙酸。再生的小苗转移到生根培养基上进行生根培养,20 d后将再生苗在纯水中炼苗7 d,然后移栽至草炭:蛭石=1:1的基质中,温室培养。生根培养基:2.22 g·L⁻¹ MS培养基+30 g·L⁻¹ 麦芽糖+3.5 g·L⁻¹ 植物凝胶+1 nmol·L⁻¹ AsCLE;pH调至5.7,115℃高压灭菌30 min。

1.5 转化植株PCR鉴定和编辑位点Sanger检测

用CTAB法提取转化株叶片DNA,然后用引物Cas9-F:AAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCA和Cas9-R:GGATCACTCTCTTGGA-GAACTCGCTGA扩增Cas9基因片段。扩增程序:98℃ 2 min,98℃ 15 s,58℃ 15 s,72℃ 15 s,扩增30个循环,72℃延伸2 min。产物经1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测。PCR鉴定后的阳性植株,其PCR产物送北京擎科生物科技股份有限公司进行测序。

1.6 数据处理

使用Excel 365和SPSS17.0软件进行数据处理和方差分析。每组处理4个生物学重复。

2 结果与分析

2.1 T5E蛋白提高饲用燕麦基因编辑效率

为了进一步提高饲用燕麦基因编辑效率,利用饲用燕麦自身的U6启动子以驱动四个gRNA的表达,对T5E蛋白进行了燕麦密码子优化,并利用优化的T5E蛋白与Cas9形成融合蛋白,改造基因编辑载体,最终获得8棵植株,其中1棵发生单碱基编辑,编辑效率达到12.50%(图1)。

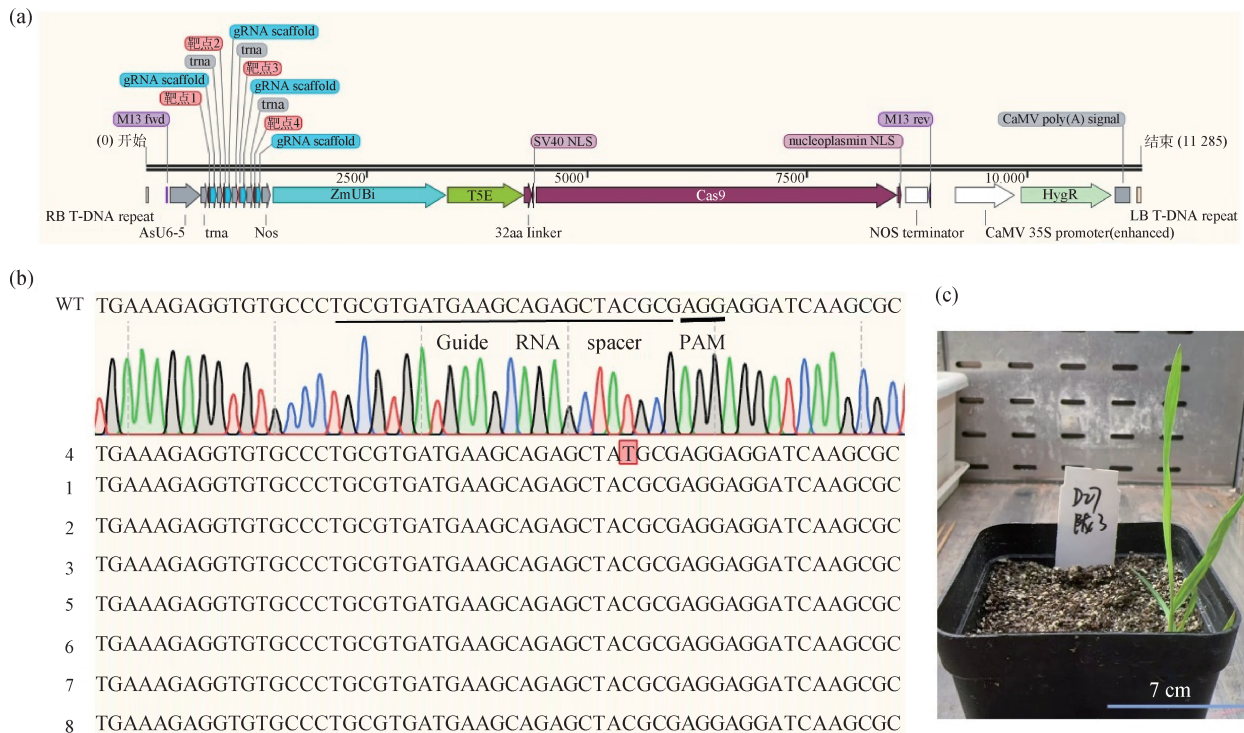


图1 T5E蛋白提高饲用燕麦CRISPR/Cas9基因编辑效率

Fig. 1 T5E protein enhances CRISPR/Cas9 genome editing efficiency in forage oat

注:a,基因编辑载体;b,基因编辑位点;c,基因编辑植株表型

Note:a, Editing vector; b, Editing sites; c, Phenotype of edited oat

2.2 小肽提高愈率及遗传转化效率

为进一步提升饲用燕麦的遗传转化及基因编辑效率,我们尝试通过外源添加小肽的方法进行优化。培养基中小肽的添加量和方法参考Yang等^[6]。

结果表明,使用小肽 AsCLE 后,饲用燕麦愈伤出愈率从 65%~75% 提升至 95%~100%,再生率从 42%~65% 提升至 77%~82%,生根率从 75%~83% 提升至 95%~96%,遗传转化效率从不足 10% 提升至 15%~22%(图 2)。可以看出,与对照(外源添加物浓度为 0)相比,外源添加小肽 AsCLE 显著提高了饲用燕麦的遗传转化效率。

2.3 小肽提高饲用燕麦多基因编辑效率

为了进一步提高饲用燕麦多基因编辑效率,选择对 *AsARE1*(调控植物氮利用率)、*AsAPPI*(调控光合作用效率)、*AsSPDT*(调控磷转运)三个靶基因进行多基因编辑,并全程添加小肽 AsCLE。结果表明,使用小肽 AsCLE 后,饲用燕麦多基因编辑效率显著提高。随机选取 100 株转化饲用燕麦进行测序鉴定,获得基因编辑植株 23 株以上,编辑效率 >23%,其中,同一植株中 3 个基因 3 个拷贝同时被编辑效率 >15%。与之前未添加小肽相比^[5],饲用燕麦基因编辑效率提高 52%。其中,编辑效率为编辑植株数目与转化植株数目的比值(下同)。同时,在同一植株中检测到 3 个基因被同时编辑(图 3)。

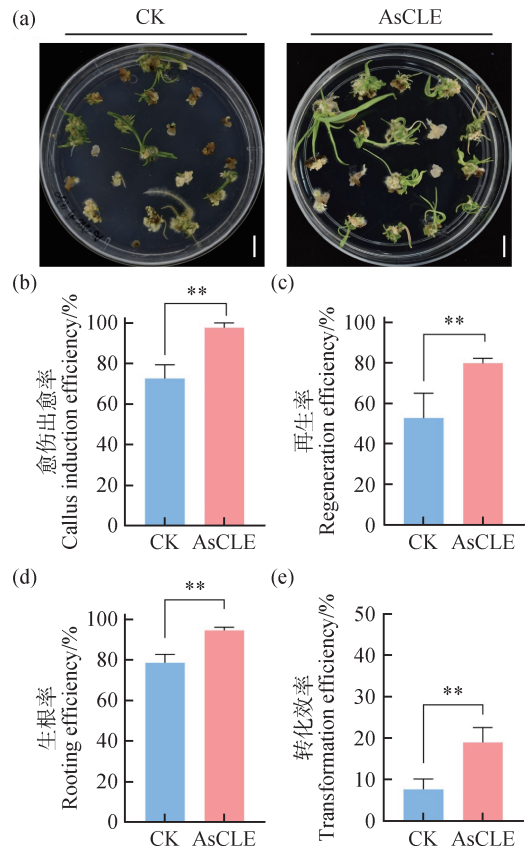


图2 小肽提高饲用燕麦遗传转化效率

Fig. 2 Small peptides enhance the genetic transformation efficiency in forage oat

注:CK表示对照;AsCLE表示添加小肽 AsCLE 处理,*表示差异显著(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)

Note: CK represents control group, AsCLE indicates treatment with small peptide AsCLE, and * indicates significant difference (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)

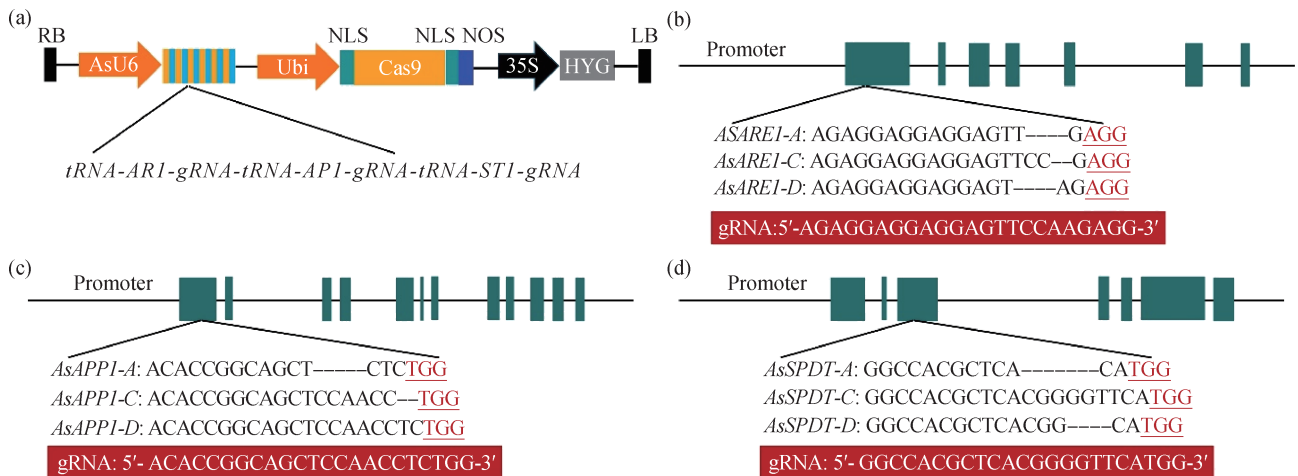


图3 饲用燕麦多基因编辑载体和编辑位点

Fig. 3 Multigenic editing vector and the editing sites for forage oat

注:a,基因编辑载体;b,c,d,基因编辑位点

Note:a, Editing vector; b,c,d, Editing sites

2.4 小肽提高饲用燕麦单碱基基因编辑效率

为了进一步提高饲用燕麦单碱基基因编辑效率,选择对 *AsEPSPS*(抗草甘膦基因)靶基因进行单碱基基因编辑,编辑位点参考水稻单碱基编辑位点^[7],并全程添加小肽 AsCLE。结果表明,使用 $1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 小肽 AsCLE 后,饲用燕麦单碱基基因编辑效率显著提高,编辑效率达到 21.4%(图4)。

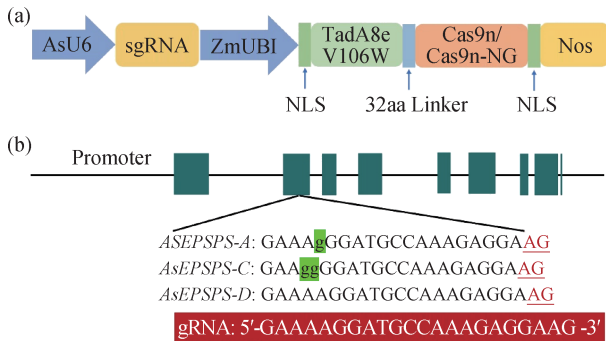


图4 饲用燕麦单碱基基因编辑载体和编辑位点

Fig. 4 A high-efficiency adenine base editor and the editing sites for forage oat

注:a,基因编辑载体;b,基因编辑位点

Note:a, Editing vector; b, Editing sites

2.5 小肽提高饲用燕麦自主知识产权基因编辑效率

为了进一步提高饲用燕麦自主知识产权基因编辑效率,选择对 *AsARE1* 靶基因利用自主知识产权基因编辑体系进行编辑,并全程添加小肽 AsCLE。结果表明,使用 $1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 小肽 AsCLE 后,饲用燕麦自主知识产权基因编辑效率显著提高。与未添加小肽处理相比^[5],饲用燕麦基因编辑效率提高 60%,编辑效率达到 20%(图5)。

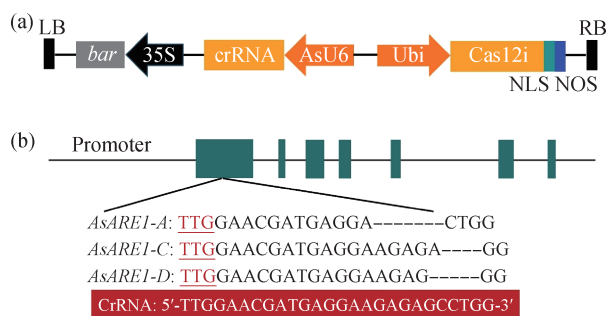


图5 饲用燕麦自主知识产权基因编辑载体和编辑位点

Fig. 5 Genome editing vector with independent intellectual property rights and the editing sites for forage oat

注:a,基因编辑载体;b,基因编辑位点

Note:a, Editing vector; b, Editing sites

3 讨论与结论

遗传转化及基因编辑体系是现代饲草育种的

关键核心技术,在提高牧草产量、改善品质、增强抗逆性以及实现可持续生产等方面具有革命性的推动作用。遗传转化作为基因的主要投递工具,可跨物种导入优良基因(如抗病虫、耐盐碱基因),打破生殖隔离。CRISPR/Cas9等基因编辑育种技术能对牧草基因组进行“定点修饰”,精准敲除、替换或插入目标基因,无需引入外源DNA,缩短育种周期至2~3年,是解决我国饲草依赖进口的重要途径。作为一种重要的饲草作物,饲用燕麦的遗传转化及基因编辑效率提升一直是该领域的研究热点,众多学者对此进行了积极探索。以裸燕麦‘白燕10号’为材料,建立并优化农杆菌介导的燕麦遗传转化体系,结果表明60%的再生苗在基因组水平可检测到GFP基因^[8]。利用含抗磺酰脲类除草剂基因 *AHAS* 的根癌农杆菌对“HXh1”和“HXh2”燕麦胚性愈伤组织进行转化,转化率分别为15.57%和12.33%^[9]。对8个裸燕麦品种的成熟胚进行诱导愈伤和分化培养,结果表明:在ML2诱导培养基中‘裸燕麦1号’出愈率达87.33%^[10]。

本研究结果显示,利用饲用燕麦自身的U6启动子和T5E蛋白进行燕麦密码子优化,饲用燕麦基因编辑效率达到12.50%。利用外源小肽饲用燕麦愈伤出愈率达95%~100%,再生率提高为77%~82%,生根率为95%~96%,遗传转化效率显著提高为15%~22%。同时,小肽也显著提高了饲用燕麦基因编辑效率。饲用燕麦自主知识产权基因编辑技术编辑效率达20%;饲用燕麦多基因编辑体系编辑效率为23%;饲用燕麦单碱基基因编辑体系编辑效率为21.4%。以上建立和优化的饲用燕麦遗传转化和基因编辑体系,为饲用燕麦生物育种奠定了坚实基础。然而,燕麦为异源六倍体,一个基因有多个拷贝,且往往同一性状受多基因调控。同时,饲用燕麦遗传转化还存在基因型依赖问题。为高效实现饲用燕麦生物育种4.0,还须持续开展工作,进一步提高饲用燕麦遗传转化和基因编辑效率。

参考文献

- [1] 任长忠,胡跃高. 中国燕麦学[M]. 北京:中国农业出版社, 2013:3-6
- REN C Z, HU Y G. China oat science[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2013:3-6
- [2] 李忆菲,师尚礼,刘林波,等. 黄土高原西部地区饲用燕麦品种生产性能和营养成分评价[J]. 草业科学, 2026, 43(4):

- 968-982
- LI Y F, SHI S L, LIU L B, et al. Evaluation of production performance and nutritional ingredient of forage oat varieties of west in Loess Plateau[J]. *Pratacultural Science*, 2026, 43(4): 968-982
- [3] 刘耀光, 李构思, 张雅玲, 等. CRISPR/Cas 植物基因组编辑技术研究进展[J]. *华南农业大学学报*, 2019, 40(5): 38-49
- LIU Y G, LI G S, ZHANG Y L, et al. Current advances on CRISPR/Cas genome editing technologies in plants[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2019, 40(5): 38-49
- [4] BILAL M, GENG J, CHEN L, et al. Genome editing for grass improvement and future agriculture[J]. *Horticulture Research*, 2025, 12(2): uhae293
- [5] SHI K, HUANG W H, ZHU M X, et al. Efficient genetic transformation and genome editing via an *Agrobacterium*-mediated in commercial oat (*Avena sativa* L.) cultivars[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2025, 67(7): 1697-1699
- [6] YANG W T, ZHAI H W, WU F M, et al. Peptide REF1 is a local wound signal promoting plant regeneration [J]. *Cell*, 2024, 187(12): 3024-3038
- [7] WEI C, WANG C, JIA M, et al. Efficient generation of homozygous substitutions in rice in one generation utilizing an rABE8e base editor[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, 63(9): 1595-1599
- [8] 王迅婧, 倪秀珍. 农杆菌介导的燕麦遗传转化体系的建立[J]. *河南农业大学学报*, 2015, 49(4): 457-460
- WANG X J, NI X Z. Establishment of an *Agrobacterium* mediated genetic transformation system for oat (*Avenue Nuda* L.) [J]. *Journal of Henan Agricultural University*, 2015, 49(4): 457-460
- [9] 黄雪洁. 燕麦再生体系的建立及抗磺酰脲类除草剂燕麦新种质创制[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2024: 25
- HUANG X J. The establishment of oat regeneration system and the creation of new germplasm of oat with sulfonylurea herbicide resistance[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2024: 25
- [10] 马佳星, 李庆华, 刘玉海, 等. 裸燕麦成熟胚组织培养体系的优化及创伤胚转化体系的初探[J]. *大麦与谷类科学*, 2024, 41(5): 21-28, 36
- MA J X, LI Q H, LIU Y H, et al. Optimization of mature embryo culture system of naked oat and preliminary study on transformation system of traumatized embryo [J]. *Barley and Cereal Sciences*, 2024, 41(5): 21-28, 36

(责任编辑 闵芝智)