

# 纳米载体介导的植物遗传转化研究现状和前景

孙敬爽<sup>1</sup> 胡瑞阳<sup>1</sup> 郑广顺<sup>1</sup> 麻文俊<sup>2</sup> 许言<sup>1</sup> 王军辉<sup>2</sup>

(1. 中国林业科学研究院华北林业实验中心 楸树国家创新联盟 北京 102300; 2. 林木遗传育种国家重点实验室 国家林草局森林培育重点实验室 楸树国家创新联盟 中国林业科学研究院林业所 北京 100091)

**摘要:** 高效遗传转化技术是植物重要性状功能基因鉴定的前提和转基因育种的基础。随着纳米生物技术的发展,以纳米载体介导的植物转基因技术已显示出巨大的应用潜力。综述了国内外应用于植物纳米载体的类型、与外源基因的结合方式以及传输细胞的原理,重点阐述了影响纳米基因载体性能与转化效率的重要因素,以及纳米载体介导外源基因转化植物细胞的方法,分析了纳米载体介导法与其他转基因方法的特点和优势,并提出纳米载体介导的转化技术应加强稳定遗传转化、基因编辑与植物原位转化等方面探索研究,旨在为植物遗传转化技术和方法提供新的思路。

**关键词:** 纳米粒子;基因载体;载体性能;转化方法

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2020-0521

## Research Progress and Prospect of Plant Genetic Transformation Mediated by Nano-gene Vector

SUN Jing-shuang<sup>1</sup> HU Rui-yang<sup>1</sup> ZHENG Guang-shun<sup>1</sup> MA Wen-jun<sup>2</sup> XU Yan<sup>1</sup> WANG Jun-hui<sup>2</sup>

(1. Experimental Center of Forestry in North China, Chinese Academy of Forestry, National Innovation Alliance of *Catalpa bungei*, Beijing 102300; 2. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, National Forestry and Grassland Administration, National Innovation Alliance of *Catalpa bungei*, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091)

**Abstract:** Efficient genetic transformation technology is the prerequisite for the identification of functional genes for important traits in plants and the basis for transgenic breeding. With the development of nanotechnology, the genetic transformation technology of plant based on gene vector constructed by nano particle has shown great application potential. The type and properties of nano particle applied in gene vector of plant, its combination way with DNA and the basic principle of gene transfection technology were reviewed. In the meanwhile, the important factors that affect the performance and transformation efficiency of nano-gene vector, as well as the transformation methods by which nano-gene vectors mediate exogenous genes into plant cells, were expounded emphatically. The advantages of nano-gene vectors were analyzed compared with that of other vectors. Further researches are needed to improve the stable genetic transformation, gene editing and *in planta* transformation with nano-gene vector, which will provide new ideas for plant genetic transformation technology and methods.

**Key words:** nanoparticle; gene vector; vector performance; transformation method

遗传转化是植物功能基因组研究和分子育种的核心工作之一,发展高效、安全的新型遗传转化方法,一直是基因工程、分子生物学和遗传育种等

领域的研究热点之一<sup>[1]</sup>。传统的植物遗传转化方法,主要通过根癌农杆菌侵染、基因枪轰击和病毒侵染等转化方法获得转基因植株。目前已经广泛应

收稿日期: 2020-05-05

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 CAFYBB2020ZB004

作者简介: 孙敬爽,女,博士,研究方向: 林木遗传育种; E-mail: sjshuang1129@163.com, 胡瑞阳同为本文第一作者

通讯作者: 王军辉,男,博士,研究员,研究方向: 林木遗传育种; E-mail: wangjh@caf.ac.cn

用于拟南芥、烟草等模式植物和一二年生草本植物或园艺植物。但对于木本植物或顽拗型基因型的植物来说,仍存在遗传转化技术难题,获得转基因植株仍非常困难。例如,林木转基因研究主要集中于杨树(*Populus tremula* × *Palba.*)<sup>[2]</sup>、火炬松(*Pinus taeda*)<sup>[3]</sup>、刺槐(*Robinia pseudoacacia*)<sup>[4]</sup>、白云杉(*Picea glauca*)<sup>[5]</sup>、白桦(*Betula platyphylla*)<sup>[6]</sup>、落叶松(*Larix gmelinii*)<sup>[7]</sup>等20多个树种。大多数林木中克隆的功能基因只能转化到拟南芥和烟草等模式植株中进行分析验证,从而严重限制了植物分子育种以及基因功能的有效研究。

随着纳米技术的发展,纳米粒子作为基因载体已广泛应用于动物细胞、医学领域和基因治疗等领域<sup>[8-10]</sup>。因纳米载体具有大比表面积可高效负载基因、生物兼容性强可保护负载基因、毒性小安全性高等特点<sup>[11-12]</sup>。2007年,Torney等<sup>[13]</sup>首次利用介孔氧化硅纳米载体装载基因转化烟草细胞并获得成功,实现了纳米载体介导基因在植物细胞的转化,并逐渐发展成为一类具有创新性的高效植物转基因技术<sup>[14-15]</sup>。本研究根据纳米粒子特性介绍已应用于植物遗传转化的纳米基因载体类型、与外源基因的结合方式及传输细胞的原理,并重点介绍影响纳米载体性能的因素以及转化植物的方法,分析了与早前转基因方法的区别和优势,并对纳米载体介导外源基因转化存在的问题和发展前景进行了探讨,期望为植物遗传转化技术和方法提供新的思路。

## 1 纳米基因载体

纳米基因载体是一类由生物兼容性材料通过分子自组装的方法制备而成,用于运载基因的纳米微囊或纳米粒子的总称<sup>[16]</sup>。通过纳米载体表面修饰相应基团,使其以物理或化学亲和作用包裹或吸附外源DNA等核酸分子,从而形成纳米基因载体复合物,通过化学键或静电吸附作用与细胞表面受体结合,利用细胞胞吞作用实现基因的靶向运输<sup>[17]</sup>。

### 1.1 纳米基因载体的分类

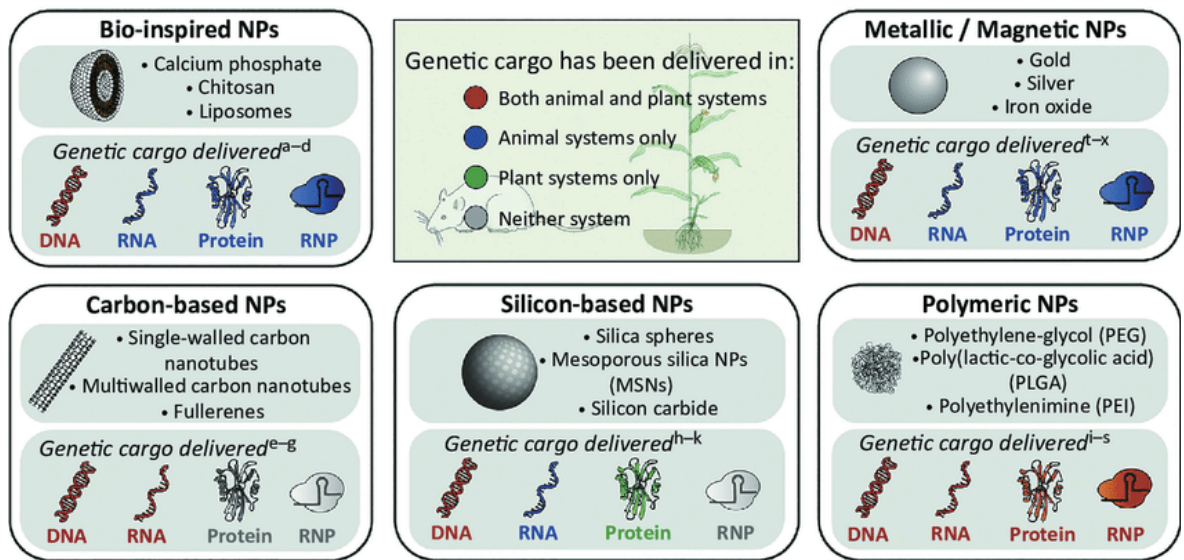
纳米基因载体从形态特征上分为纳米粒、纳米球、纳米囊、纳米孔及纳米片层等多种形态;从材料来源可以分为无机物纳米材料、天然高分子纳米材料和有机合成高分子纳米材料等<sup>[18]</sup>(图1)。

目前应用于植物遗传转化的纳米基因载体以无机物纳米材料为主(表1),包括以四氧化三铁( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )构建的磁性纳米粒子(Magnetic nanoparticles, MNP),以二氧化硅骨架构成的介孔二氧化硅纳米载体(Mesoporous silica nanoparticles, MSNs),以碳原子构成的单壁碳纳米管(Single-walled carbon nanotubes, SWCNTs)和多壁碳纳米管(Multiwalled carbon nanotubes, MWCNTs)等纳米材料构成的纳米载体。无机物纳米材料制作简单,可在水溶液中通过共沉淀或氧化共沉淀制备,合成重复性好,并根据反应条件调节纳米颗粒的粒径大小、形状和组成;且无机纳米材料作为基因载体具有生物亲和性好、免疫排斥反应低、降解后毒副反应小,可有效保护核酸免受核酸酶的降解等优势<sup>[19-20]</sup>。

其次以壳聚糖(Chitosan, CHS)、淀粉(Starch nanoparticles, StNP)和细胞穿膜肽(Cell penetrating peptides, CPPs)的天然高分子材料制备的纳米载体,以及由磷酸钙(Calcium phosphate, CaP)、甲基丙烯酸二甲氨基乙酯(Dimethylaminoethyl methacrylate, DMAEM)聚合物、聚酰胺型树枝状聚合物(Polyamidoamine, PAMAM)、多聚赖氨酸(Poly-L-lysine, PLL)、聚乙烯亚胺(Polyethylenimine, PEI)等人工合成的高分子材料作为植物基因载体也有少量应用<sup>[21]</sup>。天然高分子有机纳米材料来源容易,具有无毒抗菌、生物相容性好及生物易降解等特点;合成的高分子有机纳米材料合成制备相对容易,可规模化生产,具有良好的分散性、易于表面修饰、穿透膜能力强等优势。

### 1.2 纳米基因载体与DNA等核酸的结合方式

纳米粒子的小尺寸效应,大比表面积效应以及表面较强的物理化学活性使其能够负载多种不同类型的核酸分子,如DNA、siRNA、miRNA、dsRNA、蛋白和核糖核蛋白(Ribonucleoprotein, RNP)等<sup>[22]</sup>。无机类纳米粒子可以直接结合DNA等核酸分子,但由于负载效率低,需要对其化学结构进行阳离子聚合物或氨基硅烷化修饰,才能有效吸附与运输核酸分子。例如,介孔二氧化硅纳米载体是在多孔硅纳米颗粒或者壳-核型中空二氧化硅表面经过表面氨基化,通过化学偶联作用与核酸分子形成纳米载体



Bio-inspired: 生物分子纳米粒子; Carbon-based NPs: 以碳原子为单元的纳米粒子; Silicon-based NPs: 以硅为单元的纳米粒子;  
Polymeric NPs: 聚合物纳米粒子; Metallic/Magnetic NPs: 磁性纳米粒子

图1 应用于植物或动物外源基因转化的常见纳米粒子 (引自 [41])

基因复合物<sup>[23]</sup>; 磁性纳米载体可以通过表面改性与多种功能基团修饰, 如  $-NH_2$ 、 $-CHO$ 、 $-COOH$  和  $-OH$  等, 使纳米载体能够通过静电作用、化学偶联作用、配体反应等物理或化学亲和方式负载结合核酸分子<sup>[24-25]</sup>。而有机高分子形成的纳米粒子, 由于其表面负载氨基而带正电荷, 可以直接与带负电荷的 DNA 等核酸分子通过静电吸附作用结合, 使核酸分子由蓬松与分散状态浓缩至纳米颗粒中, 形成体积小、形状规则的纳米基因载体复合物<sup>[26-27]</sup>。

### 1.3 纳米基因载体复合物传输细胞的原理

目前, 纳米作为基因载体传输细胞的原理研究还相对较少。纳米载体基因复合物主要通过 3 种途径穿越植物细胞壁屏障: (1) 通过一定的外力在细胞上形成可逆的瞬间通道, 使纳米载体基因复合物直接进入细胞内部<sup>[13, 28]</sup>; (2) 利用纳米粒子的功能修饰, 如利用带阳离子肽聚合物的修饰, 与细胞壁上受体的相互作用来扩大细胞壁的孔径以提高纳米粒子的摄入<sup>[29]</sup>; (3) 纳米载体基因复合物利用细胞壁的孔隙直接通过细胞壁, 如花粉粒的花粉孔、叶片气孔保卫细胞孔隙<sup>[30]</sup>。

跨越细胞壁后, 纳米载体基因复合物主要是通过细胞的胞吞作用进入细胞。纳米载体基因复合物

表面多余的电荷使其以被动的形式快速黏附在细胞膜表面, 继而通过细胞的胞吞作用或摄取作用进入细胞<sup>[31]</sup>。细胞膜内陷形成内含体包裹纳米载体基因复合物, 并被细胞内的溶酶体吞噬<sup>[32]</sup>。在溶酶体内, 纳米载体上的阳离子基团不断置换质子, 抑制 pH 降低, 使质子不断泵入溶酶体, 导致溶酶体裂解, 最终纳米载体基因复合物通过质子-海绵效应的过程逃逸出溶酶体, 释放在细胞胞浆内<sup>[33]</sup>。但也有研究认为, 一些纳米粒子, 如 LDHs 负载外源基因通过非胞吞作用进入细胞, 典型的内吞抑制剂和低温孵育不能阻止 LDHs 的内吞, LDHs 是直接跨越细胞膜进入细胞内, 这种特性可能拓宽其在多种植物中的应用<sup>[34]</sup>。

从溶酶体释放的纳米载体基因复合物扩散到核膜表面, 有两种情况从核孔进入细胞核, 一种是纳米载体与核酸分子在细胞核外解离, 核酸分子单独进入细胞核; 另一种是纳米载体基因复合物进入细胞核, 在细胞核内部解离, 核酸分子与植物细胞的基因发生重组<sup>[35-37]</sup>; 然而对于纳米载体介导的外源基因进入核细胞与染色体的整合情况, 如外源基因的拷贝数与整合位点等方面研究仍不清楚, 是否类似于根癌农杆菌介导的 T-DNA 与染色体基因组的整



表 1 介导植物遗传转化的纳米载体类型、特性、功能修饰、转入植物细胞途径及基因表达情况

| 纳米载体类型           | 纳米粒子                                   | 纳米粒子特性                 | 功能修饰                                      | 转入植物细胞途径                                                                                                            | 转基因植株（组织或细胞）                                                                                                | 转入基因                                                | 转基因植株表达特性                                              | 参考文献                                        |
|------------------|----------------------------------------|------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| 无机物纳米材料          | 四氧化三铁（Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ） | 超顺磁性，外加磁场条件靶向性强        | PEI 修饰                                    | 外加磁场作用                                                                                                              | 棉花（ <i>Gossypium hirsutum</i> ）花粉                                                                           | <i>Bt</i> Δ <i>a</i> · <i>Cpti</i> 基因               | 稳定性表达，通过杂交获得抗虫转基因棉花                                    | [ 25 ]                                      |
|                  |                                        |                        | 未经修饰                                      | 悬浮细胞电击穿孔后直接转化                                                                                                       | 水稻悬浮细胞（ <i>Oryza sativa</i> ）                                                                               | GFP 质粒                                              | 瞬时表达                                                   | [ 56 ]                                      |
|                  | 磁性金纳米粒子（GNP）                           | 超顺磁性，外加磁场条件靶向性强        | PEI 修饰                                    | 外加磁场作用                                                                                                              | 拟南芥（ <i>A. thaliana</i> ）原生质体                                                                               | GFP 质粒                                              | 瞬时表达                                                   | [ 62 ]                                      |
|                  |                                        |                        | 异硫氰酸荧光素修饰（FITC）                           | 超声波作用                                                                                                               | 油菜悬浮细胞和原生质体（ <i>Brassica napus</i> var.Jec Neaf）                                                            | GUS 质粒                                              | 稳定表达                                                   | [ 63 ]                                      |
|                  |                                        |                        | 介孔二氧化硅（MSN）                               | 比表面积大，比孔容大，介孔孔径可调节                                                                                                  | 金纳米粒子包裹                                                                                                     | 基因枪                                                 | 烟草（ <i>N. tabacum</i> L.）子叶、玉米（ <i>Zea. mays</i> ）未成熟胚 | GFP 蛋白                                      |
|                  | 金纳米粒子覆盖                                | 基因枪                    |                                           |                                                                                                                     | 洋葱（ <i>Allium cepa</i> ）表皮细胞                                                                                | GFP 蛋白和 mCherry 蛋白                                  | 瞬时表达                                                   | [ 64 ]                                      |
|                  | 金纳米粒子覆盖                                | 基因枪                    |                                           |                                                                                                                     | 玉米（ <i>Z. mays</i> ）胚                                                                                       | DsRed2 质粒和 Loxp 蛋白                                  | 瞬时表达                                                   | [ 65 ]                                      |
|                  | TMAPS 等有机物修饰                           | 直接浸染                   |                                           |                                                                                                                     | 拟南芥（ <i>A. thaliana</i> ）根                                                                                  | mCherry 质粒                                          | 46.5% 瞬时表达                                             | [ 66 ]                                      |
|                  | 单壁碳纳米管（SWNT）                           | 高深径比，可塑性和生物兼容性强        | 有机物修饰                                     | 叶片组培孵育                                                                                                              | 烟草（ <i>N. tabacum</i> L.）叶子                                                                                 | <i>nptII</i> 基因                                     | 与组培培养结合获得了转 <i>nptII</i> 基因植株，转化率 6%                   | [ 67 ]                                      |
|                  |                                        |                        | 纯化单壁碳纳米管                                  | 直接叶片浸染                                                                                                              | 烟草（ <i>N. tabacum</i> L.）、芥菜（ <i>Eruca sativa</i> ）、小麦（ <i>Triticum aestivum</i> ）、棉花（ <i>G. hirsutum</i> ） | GFP-siRNA                                           | 实现在非模式植物基因的转录后沉默，瞬时沉默率 95%；                            | [ 58 ]                                      |
| 羧化壳聚糖（CS）等有机物的修饰 |                                        |                        | 直接叶片浸染                                    | 芥菜（ <i>E. sativa</i> ）、豆瓣菜（ <i>Nasturtium officinale</i> ）、烟草（ <i>N. tabacum</i> L.）、菠菜（ <i>Spinacia oleracea</i> ） | YFP 质粒                                                                                                      | 实现外源基因转化叶绿体质体基因组的 瞬时表达                              | [ 49 ]                                                 |                                             |
| 聚乙烯亚胺（PEI）功能修饰   |                                        |                        | 直接叶片浸染                                    | 烟草（ <i>N. tabacum</i> L.）、棉花（ <i>G.hirsutum</i> ）、小麦（ <i>T. aestivum</i> ）、芥菜（ <i>E. sativa</i> ）、                  | GFP 质粒                                                                                                      | 实现多种非模式植物瞬时转染                                       | [ 37, 59 ]                                             |                                             |
| 层状双氢氧化物（LDH-NS）  |                                        |                        | 典型的层状结构，一般为六角形纳米片，厚度 0.5–.0nm，粒径 30–60 nm | 片层间为阴离子乳酸修饰                                                                                                         | 叶面喷洒                                                                                                        | 拟南芥（ <i>A. thaliana</i> ）和烟草（ <i>N. tabacum</i> L.） | dsRNA                                                  | 使 <i>PMMoV</i> 和 <i>CMV</i> 同源基因沉默，延长植物抗虫效果 |
| 碳纳米点（CD）         | 类圆球形，<10 nm 粒子                         | 聚乙二醇（PEG）功能修饰          | 叶面喷洒                                      | 小麦（ <i>T. estivum</i> ）                                                                                             | GFP、Cas9 和 gRNA                                                                                             | <i>SPO11</i> 基因编辑，实现了作物的基因编辑                        | [ 30 ]                                                 |                                             |
| ZnS 量子点          | 粒径小仅 3–5 nm                            | 多聚赖氨酸（poly-L-lysine）修饰 | 超声波处理                                     | 烟草（ <i>N. tabacum</i> L.）悬浮细胞                                                                                       | GUS 质粒                                                                                                      | GUS 基因稳定表达                                          | [ 68 ]                                                 |                                             |

表 1 续表

| 纳米载体类型     | 纳米粒子                    | 纳米粒子特性                | 功能修饰                                 | 转入植物细胞途径     | 转基因植株(组织或细胞)                                                         | 转入基因         | 转基因植株表达特性                        | 参考文献   |
|------------|-------------------------|-----------------------|--------------------------------------|--------------|----------------------------------------------------------------------|--------------|----------------------------------|--------|
| 天然高分子有机物   | 淀粉纳米粒子 (StNP)           | 50–100nm, 生物降解与生物相容性好 | 多聚赖氨酸( poly-L-lysine )修饰             | 超声波处理悬浮细胞后转染 | 盾叶薯蓣 ( <i>Dioscorea zigerensis</i> ) 悬浮细胞                            | GFP 质粒       | 瞬时表达和稳定表达                        | [ 47 ] |
|            |                         |                       | 多聚赖氨酸( poly-L-lysine )和水溶性量子点 CdSe ) | 超声波处理悬浮细胞后转染 | 麻枫树 ( <i>J. curcas</i> ) 悬浮细胞                                        | GFP 质粒       | 瞬时表达                             | [ 69 ] |
|            |                         |                       | 多聚赖氨酸( poly-L-lysine )和水溶性量子点 CdSe ) | 与愈伤组织共孵育     | 麻枫树 ( <i>Jatropha curcas</i> ) 愈伤组织                                  | GFP 质粒       | 稳定表达                             | [ 70 ] |
|            |                         |                       | 未修饰                                  | 共孵育          | 拟南芥 ( <i>A. thaliana</i> ) 原生质体                                      | GFP 质粒       | 瞬时表达                             | [ 71 ] |
|            |                         |                       | 由 10-30 个氨基酸组成的短肽, 有较强的跨膜转运能力        | 聚阳离子和细胞穿膜肽融合 | 烟草 ( <i>N. tabacum</i> L. ) 和拟南芥 ( <i>A. thaliana</i> ) 叶片           | GFP 和荧光素酶基因  | 瞬时表达                             | [ 29 ] |
| 人工合成高分子有机物 | 甲基丙烯酸二甲氨基乙酯 (DMAEM) 聚合物 | 分支带正电荷, 与 DNA 以静电作用结合 | 聚阳离子和细胞穿膜肽融合                         | 叶片浸染         | 拟南芥 ( <i>A. thaliana</i> ) 叶片                                        | CHS siRNA    | YFP 和 CHS 瞬时沉默, 抑制低温条件下叶花青素合成    | [ 72 ] |
|            |                         |                       | 未修饰                                  | PEG 转化       | 拟南芥 ( <i>A. thaliana</i> ) 叶片                                        | GFP 质粒       | GFP 在表皮细胞的线粒体中表达                 | [ 73 ] |
|            |                         |                       | 线粒体靶向肽和细胞穿膜肽融合                       | 叶片浸染         | 烟草 ( <i>N. tabacum</i> L. ) 和角齿藓 ( <i>Ceratodon purpureus</i> ) 原生质体 | YFP 和 GFP 质粒 | 瞬时表达和稳定表达                        | [ 54 ] |
|            |                         |                       | 未修饰                                  | 胚轴组培转染       | 芥菜 ( <i>Brassica juncea</i> L. ) 胚轴外植体培养物                            | GUS 质粒       | 80.7% 稳定转化                       | [ 74 ] |
|            |                         |                       | 未修饰                                  | 幼苗根浸染        | 拟南芥 ( <i>A. thaliana</i> ) 根和幼苗                                      | dsRNA        | SAM 基因沉默表现型发生改变                  | [ 75 ] |
| 人工合成高分子有机物 | 阳离子荧光纳米粒子               | 水溶性并含有荧光发色团           | 未修饰                                  | 浸染           | 烟草 ( <i>N. tabacum</i> L. ) 原生质体                                     | SiRNA        | 抑制 <i>CesA-1</i> 基因表达, 丧失细胞壁再生能力 | [ 76 ] |

合机理, 目前还未见报道。

2 影响纳米基因载体性能的重要因素

纳米载体的粒径、形状、表面电荷、修饰的功能基团以及细胞内部环境等都会影响其负载外源基因、细胞摄入和基因表达效率的重要因素<sup>[ 38–39 ]</sup>。

2.1 纳米载体粒径

纳米载体的粒径是影响外源基因转化效率的重要因素。不同于动物, 植物具有细胞壁这一天然屏障, 纳米载体负载外源基因转化细胞核或原生质体需要通过细胞壁和质膜等屏障。植物细胞壁排除外源物的极限为 5–20 nm<sup>[ 40 ]</sup>, 植物细胞、细胞核或细

胞膜的限制范围为 300–500 nm, 阻止较大的外源分子进入<sup>[ 41 ]</sup>。纳米粒子是一类一维粒径至少小于 100 nm 的物质, 然而研究表明纳米粒径在 20–100 nm 范围内, 具有较强的穿透性, 既有利于纳米粒子携带外源基因, 经细胞摄取而进入细胞内部, 又不因过小而被过滤清除掉<sup>[ 42 ]</sup>。

2.2 纳米载体结构

纳米载体结构不同, 负载外源基因的形式不同。如球状纳米载体, 外源基因一般负载在表面; 多孔纳米载体, 外源基因多数负载在其孔内; 层状纳米颗粒, 外源基因负载在其片层内等。目前, 不同类

型的纳米负载外源基因的效果,以及外源基因传输细胞与转化效率未见系统的比较。但有研究发现,以 siRNA 作为外源基因,不同纳米结构形成的纳米载体复合物转入细胞的效率与细胞内基因沉默的效果相关, siRNA 负载在三维结构纳米载体中,能够使内源基因在转录水平和蛋白水平都沉默。但是负载在一维结构纳米载体中,只会使其在蛋白水平上发生沉默而在转录水平却得到了提高,说明纳米不同结构转入外源基因的原理可能不同<sup>[43]</sup>。

### 2.3 纳米载体表面修饰

纳米粒子富有活性的化学结构可以直接结合核酸分子,也可以通过不同基团修饰后再结合核酸分子,形成纳米载体-基因复合物<sup>[44]</sup>。纳米粒子经亲水性物质(如聚乙烯醇、聚乙烯亚胺、多聚赖氨酸等)表面修饰后,可以提高其在分散体中稳定性,增加与细胞膜的结合力<sup>[37, 45-46]</sup>;经过糖类物质(如壳聚糖、环糊精等)修饰的纳米粒子,能增加纳米载体对基因的负载量,增加复合物电位值 Zeta,提高穿越细胞膜等生物屏障能力,并且提高转基因的靶向性<sup>[47-48]</sup>。例如,以羧基化壳聚糖负载的 CS<sup>COV</sup>-SWNTs 负载外源基因进行烟草植物细胞转化,与其他修饰 SWNTs 相比,CS<sup>COV</sup>-SWNTs 不仅具有更多可用的壳聚糖链负载基因,而且 CS<sup>COV</sup>-SWNTs 具有更高的 C-C 共价键(~88 kcal/mol),电位 Zeta (37.6 mV)明显高于其他修饰,可以安全地携带外源基因通过生物屏障和细胞膜,进入细胞核内部,提高转化效率<sup>[49]</sup>。另外,纳米粒子在经表面活性剂(如葡聚糖、聚山梨脂和胆固醇等)修饰后,也可以保护外源分子免受降解,提高细胞对纳米载体摄取效率<sup>[50]</sup>。

### 2.4 环境条件

尽管大多数纳米粒子与外源基因结合方式比较温和,在室温条件下(25-35℃)孵育 15-30 min 即可结合形成纳米载体基因复合物<sup>[24, 49, 51]</sup>。但研究发现,纳米载体基因复合物转染效率是与其浓度、共孵育温度、时间及 pH 相关。在一定范围内增加纳米载体基因复合物浓度,延长与悬浮细胞的共培养时间,都可以有效增加外源分子在植物细胞的转染效率;植物细胞摄取纳米载体依赖一定温度条

件,研究发现在 4℃ 条件下共培养,即使共孵育时间延长 24 h 细胞内部也没有纳米粒子负载的荧光信号<sup>[52]</sup>;另外,利用植物细胞内不同结构的 pH 差异可以实现靶向转基因,植物细胞质 pH 值在 5.5 左右,而叶绿体的 pH 在 8.0 左右<sup>[53]</sup>,研究发现以壳聚糖修饰的单壁碳纳米管设计为在细胞外弱酸条件, pDNA 可以与单壁碳纳米管紧密结合,而在叶绿体弱碱环境中, pDNA-SWNT 的结合能力明显减弱,可以使 pDNA 在叶绿体中有效释放,从而实现纳米载体负载外源基因在叶绿体质体的靶向转基因<sup>[49]</sup>。因此,如何通过利用植物细胞不同结构的 pH 差异设计纳米载体,实现靶向转基因是今后重要研究方向。

## 3 纳米载体-基因复合物的在植物细胞中的转化方法

目前利用纳米粒子形成的纳米载体-基因复合物,通过磁转染、PEG 转染等外力以及直接转化的方式,将外源基因转入玉米胚<sup>[13]</sup>、盾叶薯蓣愈伤组织悬浮液<sup>[46]</sup>、芥菜、烟草原生质体或叶子<sup>[54]</sup>和拟南芥根<sup>[26, 55]</sup>等多种植物组织或器官(表 1)。

### 3.1 借助外力转化方法

借助合适的载体和外力可以提高纳米载体-基因复合物进入细胞核的数量<sup>[14]</sup>,易形成稳定的植物遗传转化(表 1)。Torney 等<sup>[13]</sup>4 位博士利用蜂窝状介孔二氧化硅纳米粒子为载体,利用基因枪方法将外源基因转入植物细胞中,并在细胞中适当的时间和地点释放,成功获得了转基因植株。利用电击法直接在植物细胞壁上穿孔, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米粒子负载 DNA 导入水稻悬浮细胞,该方法既保护了 DNA 分子免受电击、酶解的破坏,又提高了植物细胞的存活率<sup>[56]</sup>。Zhao 等<sup>[25]</sup>利用 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米颗粒的超顺磁性,在磁场的定向驱动作用下,纳米载体复合物通过花粉孔将外源 *BtΔα·Cpti* 基因转入棉花花粉,而花粉生活力没有改变,并通过杂交授粉获得转基因棉花。以多聚赖氨酸修饰的淀粉纳米粒子作为基因载体,将外源基因通过超声波介导法转入盾叶薯蓣细胞,实现基因的遗传转化<sup>[57]</sup>。

### 3.2 直接转化方法

研究表明纳米载体携带外源基因也可直接转化植物细胞。其中以碳原子构成的单壁碳纳米管、多



壁碳纳米管、碳纳米点等作为纳米载体已经成为实现完整植株遗传转化的热门材料,转化方法简便,转化效率高,但多以瞬时转化为主。例如,利用壳聚糖修饰的单壁碳纳米管( $CS^{COV}$ -SWNT)为载体,以叶片注射的方式将外源基因转入烟草、芥菜等植物叶绿体质体基因组<sup>[49]</sup>。siRNA 可以通过单壁碳纳米管载体有效地转化到烟草叶子,沉默外源基因的效率达 95%,并且研究发现基因沉默效率取决于纳米基因载体复合物颗粒的大小,性状、紧实度及 siRNA 负载的位点<sup>[58]</sup>。美国加州大学伯克利分校通过制备聚乙烯亚胺功能化的单壁碳纳米管(SWNT-PEI),通过叶片直接浸染可以瞬时转化完整烟草植株,从单壁碳纳米管功能修饰到转基因表达只需 5 d<sup>[37, 59]</sup>。英国布里斯托大学的 Whitney 团队利用合成的碳纳米点材料(Carbon dots, CD)包被含有 Cas9 和 gRNA 的质粒,通过直接喷洒叶片实现了 *SPO11* 基因的编辑<sup>[60]</sup>。此外,多层双金属氧化物也是近年来发展的直接植物细胞转化的重要载体<sup>[34]</sup>。Bao 等<sup>[55]</sup>用 LDHs 负载荧光分子、小片段双链 DNA,通过浸染方式成功转入拟南芥根表皮、叶肉表皮细胞及烟草悬浮细胞。Mitter 等<sup>[61]</sup>利用 LDHs 纳米材料负载植物抗病毒干扰 RNA,通过叶面喷洒实现了在植物叶面的长效递送。

#### 4 纳米载体介导的植物遗传转化的技术优势

传统的植物遗传转化方法主要为农杆菌侵染法、基因枪法和病毒载体介导法。自 1983 年获得第 1 例以农杆菌介导的转基因烟草以来,植物转基因技术迅猛发展,目前已经有百余种转基因植株问世,其中 80% 是以农杆菌介导法转化植株。但由于农杆菌转化过程中受到基因型和宿主范围限制、组培再生以及转化感受态细胞不一致等问题,使许多植物,尤其是多年生林木树种的遗传转化受到限制<sup>[77]</sup>。基因枪转化法虽然不受植物物种限制,但需要昂贵的专用设备,而且高轰击压力易造成组织损坏<sup>[78]</sup>,需要提供一定量的外源基因才达到预期的转基因效率,研究报道以 SWNT 作为载体介导植物遗传转化所用 pDNA 只有 20 ng,而基因枪转化则需要 5  $\mu$ g<sup>[79]</sup>。病毒载体介导法虽转染效率高、应用范围广,但更适宜于基因敲除、基因沉默等反向遗传学研究,属于

瞬时表达技术,受宿主载体的局限性明显<sup>[80]</sup>。

纳米载体介导的转基因技术,是一项纳米技术与生物技术交叉融合的新型转化技术<sup>[17, 81]</sup>。纳米载体介导转基因技术具有明显的优势:(1) 纳米载体体积小,大比表面积,易于化学基团的功能修饰,可以高效负载外源基因,提高转化效率;(2) 纳米粒子的结构特性能够保护负载基因免受 DNase I 酶解,保证外源基因在细胞内的稳定转化;(3) 纳米载体利用纳米粒子小体积效应、可调节的物理和化学特性使其通过植物细胞壁的屏障进入细胞内部,基本不受植物基因型和宿主范围限制;(4) 纳米载体介导外源基因转化,反应条件温和,操作简单,转化所需时间短,对植物生长发育无影响;(5) 纳米材料种类多样,粒径大小和结构类型易于变化、易于不同功能基团和荧光标记修饰,可形成多种不同类型的纳米载体用于植物遗传转化。

### 5 纳米粒子介导的植物遗传转化面对的问题和应用前景

#### 5.1 瞬时转化与稳定表达

尽管目前报道的以纳米载体介导的转基因技术,可以实现外源基因在叶片或叶肉细胞等部位的表达,但研究多以 GFP、GUS 或 *RNAi* 片段为外源基因的瞬时转化为主,如何将纳米载体介导的转基因进一步应用于植物,获得转基因植株,需要进一步扩大目的基因,优化转化方法、扩大转化受体细胞或组织的筛选,从而实现功能基因高效稳定转化获得转基因植株,建立纳米载体介导的简单、快捷、高效稳定的植物遗传转化体系。

#### 5.2 纳米载体介导的基因编辑技术

锌指核酸酶(Zinc fingernucleases)和 CRISPR-associated protein 9(Cas9)目前已经成为重要的基因编辑工具,尤其是 CRISPR-Cas9 已经在水稻、番茄、高粱、小麦和棉花成功实现性状改变<sup>[82]</sup>。CRISPR-Cas9 基因编辑的全方位和易操作性使其成为研究植物基因型-表现型对应关系的重要工具。然而 CRISPR-Cas9 基因编辑也面临着遗传转化中植物细胞壁屏障转化受体的限制<sup>[83]</sup>,尽管有少量研究报道可以通过基因枪转入原生质体和体胚<sup>[84-85]</sup>。目前已经实现碳纳米点载体介导的植物体内的瞬时基因编

辑,为纳米载体与基因组编辑工具结合起来提供一个良好的机会<sup>[37]</sup>。今后应利用纳米载体介导的瞬时转化,实现基因的瞬时沉默或增强基因表达,进一步开展植物发育研究与重要基因功能鉴定;另一方面应探索纳米载体介导的稳定、靶向性的基因编辑技术体系,实现植物品种改良。

### 5.3 纳米载体介导的植物原位转基因方法的探索

植物原位转化方法是一种不需要植物组织或细胞培养手段,而使植物在活体(*in vivo*)而非离体(*in vitro*)状态下的转化,能够避免植物组织培养产生的无性系变异和部分植株基因型难于进行组织培养的优点<sup>[86]</sup>。纳米粒子具有大比表面积、体积小、穿透性强的特性,通过注射、喷施及浸染等方式已实现了外源基因在完整植株叶片的转染,如何利用纳米粒子特性,进一步发展纳米载体介导的植物原位转基因技术,一方面发展不依赖组培再生的转基因技术,突破顽拗型植物基因型或种类的遗传转化技术难题;另一方面以纳米载体介导不同株龄植株的遗传转化,根据时空需要进行基因表达调控研究可能将是林业发展的又一种重要方向。

### 参考文献

- [1] 王瑶,林木兰,沈锡辉,等. 农杆菌介导的木本植物遗传转化[J]. 生物技术通报, 1999, 15 (6): 23-27.  
Wang Y, Lin ML, Shen XH, et al. Xylophyta genetic transformation by *Agrobacterium* [J]. Biotechnology Information, 1999, 15 (6): 23-27.
- [2] Strohm M, Jouanin L, Kunert KJ, et al. Regulation of glutathione synthesis in leaves of transgenic poplar (*Populus tremula* × *Palba*) overexpressing glutathione synthetase [J]. The Plant Journal, 1995, 7 (1): 141-145.
- [3] Tang W, Sederoff R, Whetten R. Regeneration of transgenic loblolly pine (*Pinus taeda* L.) from zygotic embryos transformed with *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Planta, 2001, 213 (6): 981-989.
- [4] Igasaki T, Mohri T, Ichikawa H, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Robinia pseudoacacia* [J]. Plant Cell Reports. 2000, 19 (5): 448-453.
- [5] Van Acker R, Vanholme R, Storme V, et al. Lignin biosynthesis perturbations affect secondary cell wall composition and saccharification yield in *Arabidopsis thaliana* [J]. Biotechnology for Biofuels, 2013, 6 (1): 46-63.
- [6] 黄海娇,李慧玉,姜静. BpAPI 转基因白桦中开花相关基因的时序表达[J]. 东北林业大学学报, 2017, 45 (1): 1-6.  
Huang HJ, Li HY, Jiang J. Quantitative expression analysis of several flowering related genes in BpAPI Transgenic Birch (*Betula platyphlla*) × *Betula pendula*) [J]. Journal of Northeast Forestry University, 2017, 45 (1): 1-6.
- [7] Huang Y, Diner AM, Karnosky DF. *Agrobacterium* rhizogenes-mediated genetic transformation and regeneration of a conifer: *Larix decidua* [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 1991, 27 (4): 201-207.
- [8] Zeng XH, Morgenstern R, Nyström AM. Nanoparticle-directed sub-cellular localization of doxorubicin and the sensitization breast cancer cells by circumventing GST-mediated drug resistance [J]. Biomaterials, 2014, 35 (4): 1227-1239.
- [9] Zhong J, Li L, Zhu X, et al. A smart polymeric platform for multistage nucleus-targeted anticancer drug delivery [J]. Biomaterials, 2015, 65: 43-55.
- [10] Dekiwadia CD, Lawrie AC, Fecondo JV. Peptide-mediated cell penetration and targeted delivery of gold nanoparticles into lysosomes [J]. Journal of Peptide Science, 2012, 18 (8): 527-534.
- [11] Davis ME, Zuckerman JE, Choi CHJ, et al. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles [J]. Nature, 2010, 464 (7291): 1067-1070.
- [12] Yan M, Du J, Gu Z, et al. A novel intracellular protein delivery platform based on single-protein nanocapsules [J]. Nature Nanotechnology, 2010, 5 (1): 48-53.
- [13] Torney F, Trewyn BG, Lin VSY, et al. Mesoporous silica nanoparticles deliver DNA and chemicals into plants [J]. Nature Nanotechnology, 2007, 2 (5): 295-300.
- [14] Joldersma D, Liu Z. Plant genetics enters the nano age? [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2018, 60 (6): 446-447.
- [15] 孔倩倩,李志辉,王琼,等. 纳米基因载体在植物遗传转化中的应用[J]. 生物技术通报, 2010 (6): 6-12.  
Kong QQ, Li ZH, Wang Q, et al. Application of nano-scale genetic carriers in plant transformation [J]. Biotechnology Bulletin, 2010 (6): 6-12.
- [16] Li Y, Gao J, Zhang C, et al. Stimuli-responsive polymeric nanocarriers for efficient gene delivery [J]. Topics in Current



- Chemistry, 2017, 375 ( 2 ) : 27-49.
- [ 17 ] Mohammad KK, Majid S, Mehrdad B, et al. Chemical coupling as a potent strategy for preparation of targeted bacteriophage-derived gene nanocarriers into eukaryotic cells [ J ] . Journal of Gene Medicine, 2018, 13 ( 11 ) : 622-631.
- [ 18 ] Zhang SM, Jin LJ, Arshad M, et al. Renewable biomaterials as nanocarriers for drug and gene delivery [ M ] . Cham, Switzerland : Springer International Publishing, 2017.
- [ 19 ] 霍爱玲, 陈金慧, 甄艳, 等. 无机纳米颗粒在植物转化中的应用 [ J ] . 南京林业大学学报 : 自然科学版, 2016, 40 ( 6 ) : 162-166.
- Huo AL, Chen JH, Zhen Y, et al. Inorganic nanoparticles as delivery vectors for plant transformation [ J ] . Journal of Nanjing Forestry University : Natural Sciences Edition, 2016, 40 ( 6 ) : 162-166.
- [ 20 ] 王悦敏, 赵嘉兰, 牛亚伟, 等. 无机纳米材料基因载体系统的研究进展 [ J ] . 中国新药杂志, 2017, 26 ( 21 ) : 59-66.
- Wang YM, Zhao JL, Niu YW, et al. Research progress in inorganic nanomaterials [ J ] . Chinese Journal of New Drugs, 2017, 26 ( 21 ) : 59-66.
- [ 21 ] 霍爱玲, 陈金慧, 甄艳, 等. 有机纳米材料在植物核酸递送中的研究进展 [ J ] . 江苏农业科学, 2017, 45 ( 22 ) : 9-12.
- Huo AL, Chen JH, Zhen Y, et al. Research progress in organic nanomaterials on nucleic acid delivery in plant [ J ] , Jiangsu Agricultural Science, 2017, 45 ( 22 ) : 9-12.
- [ 22 ] Mao HQ, Roy K, Troungle VL, et al. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers : synthesis, characterization and transfection efficiency [ J ] . Journal of Controlled Release : official Journal of the Controlled Release Society, 2001, 70 ( 3 ) : 399-421.
- [ 23 ] Roy I, Ohulchanskyy TY, Bharali DJ, et al. Optical tracking of organically modified silica nanoparticles as DNA carriers : A nonviral, nanomedicine approach for gene delivery [ J ] . Proceeding of the National Academy of Science of USA, 2005, 102 ( 2 ) : 279-284.
- [ 24 ] Scherer F, Anton M, Schillinger U, et al. Magnetofection : enhancing and targeting gene delivery by magnetic force *in vitro* and *in vivo* [ J ] . Gene Therapy, 2002, 9 ( 2 ) : 102-109.
- [ 25 ] Zhao X, Meng Z, Wang Y, et al. Pollen magnetofection for genetic modification with magnetic nanoparticles as gene carriers [ J ] . Nature Plants, 2017, 3 ( 12 ) : 956-964.
- [ 26 ] Haensler J, Szoka FC. Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture [ J ] . Bioconjug Chem, 1993, 4 ( 5 ) : 372-379.
- [ 27 ] Jiang L, Ding L, He B, et al. Systemic gene silencing in plants triggered by fluorescent nanoparticle-delivered double-stranded RNA [ J ] . Nanoscale Cambridge, 2014, 6 ( 17 ) : 9965-9969.
- [ 28 ] Amani A, Zare N, Asadi A, et al. Ultrasound-enhanced gene delivery to alfalfa cells by hPAMAM dendrimer nanoparticles [ J ] . Turkish Journal of Biology, 2018, 42 ( 1 ) : 63-75.
- [ 29 ] Lakshmanan M, Kodama Y, Yoshizumi T, et al. Rapid and efficient genedelivery into plant cells using designed peptide carriers [ J ] . Biomacromolecules, 2012, 14 ( 1 ) : 10-16.
- [ 30 ] Doyle C, Higginbottom K, Swift TA, et al. A simple method for spray-on gene editing *in planta* [ J ] . BioRxiv, 2019 : 805036.
- [ 31 ] Harush-Frenkel O, Debotton N, Benita S, et al. Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway [ J ] . Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 353 ( 1 ) : 26-32.
- [ 32 ] Namgung R, Singha K, Yu MK, et al. Hybrid superparamagnetic iron oxide nanoparticle-branched polyethylenimine magnetoplexes for gene transfection of vascular endothelial cells [ J ] . Biomaterials, 2010, 31 ( 14 ) : 4204-4213.
- [ 33 ] Nel AE, Mädler L, Velegol D, et al. Understanding biophysico-chemical interactions at the nano-biointerface [ J ] . Nature Materials, 2009, 8 ( 7 ) : 543-557.
- [ 34 ] Bao W, Wang J, Wang Q, et al. Layered double hydroxide nanotransporter for molecule delivery to intact plant cells [ J ] . Scientific Reports, 2016, 6 ( 1 ) : 26738.
- [ 35 ] 朱莉. 食品工业中的纳米技术 [ J ] . 食品科技, 2002 ( 11 ) : 7-8
- Zhu L. Nanotechnology in food industry [ J ] . Food Science and Technology, 2002 ( 11 ) : 7-8.
- [ 36 ] 赵翔. 基于四氧化三铁纳米磁转化系统的花粉介导棉花转基因技术 [ M ] . 北京 : 中国农业科学院, 2015.
- Zhao X. Pollen mediated transgenic technology of cotton by magnetofection system based on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles [ M ] . Beijing : Chinese Academy of Agricultural Science, 2015.
- [ 37 ] Demirer GS, Zhang H, Matos JL, et al. High aspect ratio nanomaterials enable delivery of functional genetic material without DNA integration in mature plants [ J ] . Nat Nanotechnol, 2019, 14 ( 5 ) : 456-464.

- [38] Akinc A, Querbes W, De S, et al. Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms [J]. Molecular Therapy, 2010, 18 (7): 1357-1364.
- [39] Petros RA, DeSimone JM. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications [J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2010, 9 (8): 615-627.
- [40] Zhang H, Demirer GS, Zhang H, et al. DNA nanostructures coordinate gene silencing in mature plants [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2019, 116 (15): 7543-7548.
- [41] Cunningham FJ, Goh NS, Demirer GS, et al. Nanoparticle-mediated delivery towards advancing plant genetic engineering [J]. Trends Biotechnol, 2018, 36 (9): 882-897.
- [42] Lee H, Lytton-Jean AK, Chen Y, et al. Molecularly self-assembled nucleic acid nanoparticles for targeted *in vivo* siRNA delivery [J]. Nature Nanotechnology, 2012, 7 (6): 389-393.
- [43] Zhang H, Demirer GS, Zhang H, et al. DNA nanostructures coordinate gene silencing in mature plants [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2019, 116 (15): 7543-7548.
- [44] Suzuki R, Yamada Y, Harashima H. Development of small, homogeneous pDNA particles condensed with mono-cationic detergents and encapsulated in a multifunctional envelope-type nano device [J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2008, 31 (6): 1237-1243.
- [45] Lee H, Jeong JH, Park TG. PEG grafted polylysine with fusogenic peptide for gene delivery: high transfection efficiency with low cytotoxicity [J]. Journal of Controlled Release, 2002, 79 (1-3): 283-291.
- [46] Liu J, Wang Fh, Wang Ll, et al. Preparation of fluorescence starch-nanoparticle and its application as plant transgenic vehicle [J]. Journal of Central South University of Technology, 2008, 15 (6): 768-773.
- [47] Singh R, Kostarelos K. Designer adenoviruses for nanomedicine and nanodiagnostics [J]. Trends in Biotechnology, 2009, 27 (4): 220-229.
- [48] Zhang Y, Yang M, Portney NG, et al. Zeta potential: a surface electrical characteristic to probe the interaction of nanoparticles with normal and cancer human breast epithelial cells [J]. Biomedical Microdevices, 2008, 10 (2): 321-328.
- [49] Kwak SY, Lew TTS, Sweeney CJ, et al. Chloroplast-selective gene delivery and expression in planta using chitosan-complexed single-walled carbon nanotube carriers [J]. Nat Nanotechnol, 2019, 14 (5): 447-455.
- [50] Range P, Unger RE, Oltrogge JB, et al. Polysorbate-80 coating enhances uptake of polybutylcyanoacrylate (PBCA)-nanoparticles by human and bovine primary brain capillary endothelial cells [J]. European Journal of Neuroscience, 2000, 12 (6): 1931-1940.
- [51] Wu Y, Gu W, Chen C, et al. Optimization of formulations consisting of layered double hydroxide nanoparticles and small interfering RNA for efficient knockdown of the target gene [J]. ACS Omega, 2018, 3 (5): 4871-4877.
- [52] 夏兵, 董琛, 张文一, 等. 杂交鹅掌楸悬浮细胞高效摄取具有良好生物相容性的超微介孔氧化硅纳米颗粒 [J]. 中国科学: 生命科学, 2013, 43 (2): 177-184.
- Xia B, Dong C, Zhang WY, et al. Highly efficient uptake of ultrafine mesoporous silica nanoparticles with excellent biocompatibility by *Liriodendron hybrid* suspension cells [J]. Science China Life Science, 2013, 56: 82-89.
- [53] Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular biology of the cell [M]. 4<sup>th</sup> ed. Garland Science, New York: OCLC, 2002.
- [54] Finiuk N, Buziashvili A, Burlaka O, et al. Investigation of novel oligoelectrolyte polymer carriers for their capacity of DNA delivery into plant cells [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCT-OC), 2017, 131 (1): 27-39.
- [55] Bao W, Wan Y, Baluka F. Nanosheets for Delivery of Biomolecules into Plant Cells [J]. Trends in Plant Science, 2017, 22 (6): 445-447.
- [56] 王凤华, 刘俊, 童春义, 等. 电击法磁性纳米颗粒作为水稻转基因载体的研究 [J]. 分析化学, 2010, 38 (5): 617-621.
- Wang FH, Liu J, Tong CY, et al. Magnetic nanoparticle as rice transgene vector mediated by electroporation [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2010, 38 (5): 617-621.
- [57] 刘俊. 基于纳米颗粒的植物转基因及其检测研究 [D]. 长沙: 湖南大学, 2005.
- Liu J. The study on gene transformation and detection mediated by nanoparticles in plant [D]. Changsha: Hunan University, 2005.
- [58] Demirer G, Zhang H, Goh N, et al. Nanotubes effectively deliver siRNA to intact plant cells and protect siRNA against nuclease degradation [J]. bioRxiv, 2019. DOI: 10.2139/ssrn.3352632.

- [ 59 ] Demirer GS, Zhang H, Goh NS, et al. Carbon nanotube-mediated DNA delivery without transgene integration in intact plants [ J ] . Nature Protocols, 2019, 14 ( 10 ) : 2954-2971.
- [ 60 ] Doyle C, Higginbottom K, Swift TA, et al. A simple method for spray-on gene editing in planta [ J ] . bioRxiv, 2019. DOI.org/10.1101/805036.
- [ 61 ] Mitter N, Worrall EA, Robinson KE, et al. Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses [ J ] . Nature Plants, 2017, 3 ( 2 ) : 1-10.
- [ 62 ] 卢艳敏, 崔海信, 崔金辉, 等. 磁性纳米颗粒作为基因转染载体的研究 [ J ] . 生物技术通报, 2012 ( 8 ) : 199-204.
- Lu YM, Cui HX, Cui JH, et al. Study on magnetic nanoparticles as carrier for gene transfection [ J ] . Biotechnology Bulletin, 2012 ( 8 ) : 199-204.
- [ 63 ] Hao Y, Yang X, Shi Y, et al. Magnetic gold nanoparticles as a vehicle for fluorescein isothiocyanate and DNA delivery into plant cells [ J ] . Botany, 2013, 91 ( 7 ) : 457-466.
- [ 64 ] Martin-Ortigosa S, Valenstein JS, Lin VSY, et al. Gold functionalized mesoporous silica nanoparticle mediated protein and DNA codelivery to plant cells via the biolistic method [ J ] . Advanced Functional Materials, 2012, 22 ( 17 ) : 3576-3582.
- [ 65 ] Martin-Ortigosa S, Peterson DJ, Valenstein JS, et al. Mesoporous silica nanoparticle-mediated intracellular Cre protein delivery for maize genome editing via loxP site excision [ J ] . Plant Physiology, 2014, 164 ( 2 ) : 537-547.
- [ 66 ] Chang FP, Kuang LY, Huang CA, et al. A simple plant gene delivery system using mesoporous silica nanoparticles as carriers [ J ] . Journal of Materials Chemistry B, 2013, 1 ( 39 ) : 5279-5293.
- [ 67 ] Burlaka OM, Pirko YV, Yemets AI, et al. Plant genetic transformation using carbon nanotubes for DNA delivery [ J ] . Cytology and Genetics, 2015, 49 ( 6 ) : 349-357.
- [ 68 ] Fu YQ, Li LH, Wang PW, et al. Delivering DNA into plant cell by gene carriers of ZnS nanoparticles [ J ] . Chemical Research Universities, 2012, 28 ( 4 ) : 672-676.
- [ 69 ] 孔倩倩. 麻疯树高效再生体系的建立及纳米载体转基因技术研究 [ D ] . 长沙 : 中南林业科技大学, 2010.
- Kong QQ. The research on high-frequency plant regeneration and nano-scale genic carriers in transformation of *Jatropha curcas* L. [ D ] . Changsha : Central South University of Forestry and Technology, 2010.
- [ 70 ] Wang Q, Chen J, Zhang H, et al. Synthesis of water soluble quantum dots for monitoring carrier-DNA nanoparticles in plant cells [ J ] . J Nanoscience Nanotechnology, 2011, 11 ( 3 ) : 2208-2214.
- [ 71 ] 宋瑜, 李颖, 崔海信, 等. 两种阳离子纳米基因载体及植物基因介导效果的研究 [ J ] . 生物技术通报, 2009 ( 6 ) : 78-83.
- Song Y, Li Y, Cui HX, et al. Study on cationic nanoparticles as gene carriers and the efficiency for transferring gene into plant cells [ J ] . Biotechnology Bulletin, 2009 ( 6 ) : 78-83.
- [ 72 ] Numata K, Ohtani M, Yoshizumi T, et al. Local gene silencing in plants via synthetic dsRNA and carrier peptide [ J ] . Plant Biotechnology Journal, 2014, 12 ( 8 ) : 1027-1034.
- [ 73 ] Chuah JA, Yoshizumi T, Kodama Y, et al. Gene introduction into the mitochondria of *Arabidopsis thaliana* via peptide-based carriers [ J ] . Scientific Report, 2015, 5 : 7751.
- [ 74 ] Naqvi S, Maitra AN, Abidin MZ, et al. Calcium phosphate nanoparticle mediated genetic transformation in plants [ J ] . Journal of Materials Chemistry, 2012, 22 ( 8 ) : 1-9.
- [ 75 ] Jiang L, Ding L, He B, et al. Systemic gene silencing in plants triggered by fluorescent nanoparticle-delivered double-stranded RNA [ J ] . Nanoscale, 2014, 6 ( 17 ) : 9965-9969.
- [ 76 ] Silva AT, Nguyen A, Ye C, et al. Conjugated polymer nanoparticles for effective siRNA delivery to tobacco BY-2 protoplasts [ J ] . BMC Plant Biology, 2010, 10 : 291.
- [ 77 ] 王景雪, 孙毅. 农杆菌介导的植物基因转化研究进展 [ J ] . 生物技术通报, 1999 ( 1 ) : 7-13.
- Wang XJ, Sun Y. Progress of plants genetic transformation by *Agrobacterium* [ J ] . Biotechnology Bull, 1999 ( 1 ) : 7-13.
- [ 78 ] Rafsanjani MS, Alvari A, Samim M, et al. Application of novel nanotechnology strategies in plant biotransformation : a contemporary overview [ J ] . Recent Patents on Piotechnology, 2012, 6 ( 1 ) : 69-79.
- [ 79 ] Klein TM, Wolf ED, Wu R, et al. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells [ J ] . Nature, 1987, 327 : 70-73.
- [ 80 ] 张新华, 季娜娜, 闵德栋, 等. VIGS 载体在果树中的应用研究进展 [ J ] . 果树学报, 2017, 34 ( 4 ) : 507-514.
- Zhang XH, Ji NN, Min DD, et al. Progress of research on application of VIGS in fruit trees [ J ] . Journal of Fruit Science, 2017, 34 ( 4 ) : 507-514.



[ 81 ] 王安琪, 朱华新, 赵翔. 基于纳米基因载体的动植物遗传转化研究进展 [ J ] . 生物技术进展, 2018, 8 ( 4 ) : 293-301.

Wang AQ, Zhu HX, Zhao X. Progress on genetic transformation of animals and plants based on nanogene vector [ J ] . Current Biotechnology, 2018, 8 ( 4 ) : 293-301.

[ 82 ] Bortesi L, Fischer R. The CRISPRCas9 system for plant genome editing and beyond [ J ] . Biotechnology Advances, 2015, 33 ( 1 ) : 41-52.

[ 83 ] Landry MP, Mitter N. How nanocarriers delivering cargos in plants can change the GMO landscape [ J ] . Nature Nanotechnology, 2019, 14 ( 6 ) : 512-514.

[ 84 ] Woo JW, Kim J, Kwon SI, et al. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins [ J ] . Nature Biotechnology, 2015, 33 ( 11 ) : 1162-1164.

[ 85 ] Svtashev S, Schwartz C, Lenderts B, et al. Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes [ J ] . Nature Communications, 2016, 7 ( 1 ) : 1-7.

[ 86 ] 马海燕, 袁雪, 刘丕庆. 农杆菌介导植物原位转化的研究进展 [ J ] . 分子植物育种, 2019, 17 ( 20 ) : 7764-7769.

Ma HY, Yuan X, Liu PQ. Research progress on *in planta* transformation mediated by *Agrobacterium* [ J ] . Molecular Plant Breeding, 2019, 17 ( 20 ) : 7764-7769.

( 责任编辑 狄艳红 )