

DOI: 10.11686/cyxb2025047

http://cyxb.magtech.com.cn

王豫婉, 刘凌云, 郭一荻, 等. 基于纳米磁珠介导的狼尾草花粉管通道转化法体系的建立. 草业学报, 2025, 34(12): 183—194.

WANG Yu-wan, LIU Ling-yun, GUO Yi-di, et al. Efficient transformation of *Pennisetum alopecuroides* using pollen transfected by DNA-coated magnetic nanoparticles. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(12): 183—194.

基于纳米磁珠介导的狼尾草花粉管通道转化法体系的建立

王豫婉^{1,2}, 刘凌云³, 郭一荻³, 范希峰³, 岳跃森³, 穆娜³, 肖国增^{1,2*}, 滕珂^{3*}

(1. 长江大学园艺园林学院, 湖北 荆州 434025; 2. 长江大学香辛园艺植物种质创新与利用湖北省重点实验室, 湖北 荆州 434025; 3. 北京市农林科学院草业花卉与景观生态研究所, 北京 100097)

摘要:近年来纳米磁珠介导的遗传转化体系克服了传统转基因方法需组织培养再生的问题,能够缩短转基因植物培育周期,适用范围广泛。目前狼尾草尚未建立纳米磁珠介导的转化体系,且现有遗传转化体系尚不成熟。为建立纳米磁珠介导的狼尾草花粉转化体系,本研究以‘丽秋’狼尾草为材料,分析了‘丽秋’狼尾草花粉转染的最适温度和处理时间、纳米磁珠负载能力、杂交授粉和转基因株系筛选等纳米磁珠介导转化的关键环节。结果表明:与12、16和25℃处理相比,4和8℃下狼尾草花粉的活力较高。开孔转染时间0.5~2.0 h的花粉开孔率无显著差异,不同开孔转染时间下的花粉活力无显著差异,故选择了0.5 h为转染开孔时间。用转染后的花粉对‘丽秋’狼尾草进行授粉,随机挑选了自然结实获得的150粒种子。播种后利用80 mg·L⁻¹潮霉素进行筛选,之后经PCR检测和GFP荧光蛋白观察,获得了7株转基因植株。本研究建立了狼尾草纳米磁珠介导的花粉管通道转化法体系,5个月左右可以获得转基因苗,转化率达4.66%,为狼尾草遗传转化和分子改良提供了新的可行方案。

关键词:狼尾草;纳米磁珠;花粉孔;花粉磁转染;转基因植株

Efficient transformation of *Pennisetum alopecuroides* using pollen transfected by DNA-coated magnetic nanoparticles

WANG Yu-wan^{1,2}, LIU Ling-yun³, GUO Yi-di³, FAN Xi-feng³, YUE Yue-sen³, MU Na³, XIAO Guo-zeng^{1,2*}, TENG Ke^{3*}

1. The College of Horticulture and Garden, Yangtze University, Jingzhou 434025, China; 2. Hubei Key Laboratory of Spices & Horticultural Plant Germplasm Innovation & Utilization, Yangtze University, Jingzhou 434025, China; 3. Institute of Grassland, Flowers and Landscape Ecology, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China

Abstract: In recent years, nanoparticle-mediated gene transformation has overcome the problem of traditional transgenic methods that require tissue regeneration and culture. This method shortens the cultivation cycle of transgenic plants, and has a wide range of applications. No mature genetic transformation systems are available for the grass *Pennisetum alopecuroides*, so the aim of this study was to develop a nano-magnetic bead-mediated transformation system for this plant. The *P. alopecuroides* ‘Liqu’ was used to optimize the key steps including transfection temperature and processing time, nanomagnetic bead loading capacity, and the hybridization and

收稿日期:2025-02-18;改回日期:2025-04-15

基金项目:北京市农林科学院创新能力建设专项(KJCX20250917, KJCX20230119和KJCX20251208)和云南省科技计划(202403AP140045)资助。

作者简介:王豫婉(2001—),女,河南信阳人,在读硕士。E-mail: 1994820747@qq.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: x_gz99@163.com, tengke.123@163.com

screening of transgenic lines. The results showed that the vitality of *P. alopecuroides* pollen was higher after treatments at 4 and 8 °C than after treatments at 12, 16, and 25 °C. There was no significant difference in the pollen opening rate between 0.5 and 2 hours of transfection time, and pollen vitality was not affected by the duration of the transfection time. Accordingly, 0.5 hours was selected as the transfection time. The transfected pollen was used to pollinate *P. alopecuroides* 'Liqui', and 150 seeds were randomly selected from the naturally obtained hybrid seeds. Transgenic seedlings were screened on medium containing 80 mg·L⁻¹ hygromycin. Subsequently, PCR detection and green fluorescent protein observation results confirmed that seven transgenic plants had been obtained. In summary, a pollen tube channel transformation system based on DNA-coated nanomagnetic beads was established for *P. alopecuroides*. Our results show that transgenic seedlings can be generated within 5 months with a transformation rate of about 4.66%. This system represents a new solution for genetic transformation and molecular improvement of *P. alopecuroides* in the future.

Key words: *Pennisetum alopecuroides*; magnetic nanoparticles; pollen pore; pollen magnetofection; transgenic plant

狼尾草(*Pennisetum alopecuroides*)是多年生禾本科狼尾草属植物,具有较强的抗逆性,是一种重要的观赏草、生态草和饲草^[1]。随着社会快速发展,现有的狼尾草品种已不能满足应用和生产需求,迫切需要培育更多新品种^[2]。目前国内外狼尾草育种受限于其异花授粉、倍性复杂等生物学特性以及缺乏稳定遗传转化体系,仍以常规杂交、选择育种为主,基因工程育种在狼尾草上的应用尚不成熟^[3-4]。加快建立和完善狼尾草遗传转化体系,培育高观赏价值的狼尾草是当前狼尾草育种的重要目标。

遗传转化是植物基因工程育种的关键技术,传统的植物遗传转化方法包括根癌农杆菌介导法、基因枪法以及电穿孔法等^[5-8]。2002年Maram等^[9]通过基因枪法获得具有除草剂抗性基因的美洲狼尾草(*P. glaucum*)。王凭青等^[10]将拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)*CBF1*转录因子通过农杆菌介导法转化杂交狼尾草叶片,成功获得转基因再生植株。牟彤等^[11]以狼尾草愈伤组织为受体,利用农杆菌介导法导入黑麦草(*Lolium perenne*)抗冻蛋白基因,初步建立了狼尾草的遗传转化体系。但这些传统方法依旧具有局限性:例如基因枪法需要昂贵的设备和材料,DNA片段过大时易断裂^[12];农杆菌介导法转化效率低,需要有成熟的遗传转化体系,操作步骤繁琐。这些因素限制了狼尾草基因工程育种的应用和发展^[13-14]。因此急需一种不依赖组培体系、不受基因型限制的狼尾草高效DNA导入方法。

近年来随着纳米技术迅速发展,用于基因工程纳米技术的突破为植物的遗传转化提供了一种新的、更有利的工具^[15]。Chang等^[16]开发了功能化介孔二氧化硅纳米颗粒,将外源DNA递送到拟南芥根中。Susana等^[17]使用金纳米颗粒功能化介孔二氧化硅纳米颗粒递送系统将蛋白质和质粒DNA共同递送至洋葱(*Allium cepa*)细胞。利用磁性纳米载体运输外源基因,通过磁场作用进入和转化细胞的过程被定义为磁转染^[18]。Wang等^[19]通过转染缓冲液促进萌发孔开放,利用磁转染成功将抗草铵膦基因导入玉米(*Zea mays*)。Zhao等^[20]利用磁性纳米颗粒作为基因载体,成功筛选到转融合抗虫基因的棉花(*Gossypium hirsutum*)。Zhang等^[21]在百合(*Lilium* spp.)上建立了一种涉及花粉磁转染的新型瞬时转化方法,并评估了磁转染花粉在不同种质中的外源基因表达。纳米技术在以上这些物种上的成功应用,为加快基因工程育种提供了新工具。但目前为止,未见有狼尾草上应用的案例报道。

本实验室培育了‘丽秋’狼尾草,构建了全基因组草图,并解析了落粒的分子机制,筛选关键基因,为分子改良育种提供了参考^[22-23]。为开发高效遗传转化体系加快育种速度,本研究对狼尾草花粉转染的最适温度、处理时间、纳米磁珠负载能力、杂交授粉和转基因株系筛选等关键环节进行了系统分析,旨在狼尾草上建立纳米磁珠介导的花粉管通道转化体系,以期对狼尾草基因工程育种提供支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

植物材料为‘丽秋’狼尾草(国S-BV-PA-007-2021),种植于国家精准农业研究基地。磁板MagnetIFACTOR-96板(9008-96), Fe_3O_4 纳米磁珠PolyMAG-1000(9003),购于德国Chemicell GmbH公司。选用质粒为pMDC85-GFP(本实验室保存)。潮霉素(31282-04-9),赤霉素(77-06-5),购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。内切酶*Xho* I(1635),购自宝日医生物技术(北京)有限公司。2×Taq Master Mix(Dye Plus)(P112-01),购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。蔗糖、硼酸、氯化钙、硝酸钾、硝酸钙、硫酸镁、硫酸锰和赤霉素等为分析纯。花粉收集的牛皮纸袋、尼龙布、吸水纸、玉米淀粉、筛子(2 mm)等为实验室常规耗材。

1.2 狼尾草花粉观察

收集当天散粉的狼尾草花粉,过筛。取花粉置于液体离体培养基($50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖+ $80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼酸+ $40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钙)中培养,使用BX53生物显微镜(奥林巴斯,日本)和Pharos G2台式扫描电镜(飞纳,荷兰)观察花粉的形态。取花粉置于开孔转染液($0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖, $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼酸, $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硝酸钾, $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硝酸钙, $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸锰, $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸镁和 $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 赤霉素)中培养10 min,干燥后在台式扫描电镜下观察经过处理和未处理的花粉形态。

1.3 纳米磁珠负载保护能力分析

为探究磁性纳米载体对DNA的负载能力,以磁性纳米颗粒PolyMAG-100作为基因载体,以pMDC85-GFP质粒构建纳米载体-基因复合物,构建不同质量比的纳米载体-基因复合物。按DNA:MNP分别为1:2、1:4、1:10、1:20、1:50、1:100的质量比,将纳米载体-基因复合物在室温下静置30 min,其中DNA的量固定为 $1\text{ }\mu\text{g}$ 。将纯质粒DNA和复合物通过琼脂糖凝胶电泳阻滞实验分析磁性纳米颗粒PolyMAG-100与DNA的结合能力。酶切后电泳实验的样品同上述条件制备,质粒DNA、MNP、MNP/DNA复合物样品分别用 $1\text{ }\mu\text{L}$ 的*Xho* I在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 酶切16 h。

1.4 花粉最适转染条件优化

1.4.1 温度对花粉萌发率的影响 以‘丽秋’狼尾草作为试验材料,使用半透明透气袋对处于抽穗期的狼尾草幼穗进行套袋隔离,当穗子成熟散粉后,收集花粉。将花粉在液体离体培养基中于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $8\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $12\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $16\text{ }^\circ\text{C}$ 和室温(room temperature, RT)下暗培养3 h,在BX53生物显微镜下观察花粉状态。使用细胞计数板计数,统计萌发率并使用SPSS 18.0软件统计结果,采用单因素方差分析(Duncan),确定最适的花粉转染温度。

1.4.2 转染时间对花粉开孔率的影响 对采集的‘丽秋’狼尾草新鲜花粉过筛,将质粒DNA和磁性纳米磁珠以最适比例在室温下静置30 min后加入花粉转染液中。称取1 g花粉使其充分浸没在4 mL花粉转染液中,设置0.5、1、2、5 h共4个不同的转染时间。磁性纳米磁珠吸附质粒DNA,在磁场的作用下经花粉孔导入花粉。对经过不同时间转染后的花粉进行干燥处理后,在Pharos G2台式扫描电镜(飞纳,荷兰)下观察花粉,研究其形态结构,探索在不同转染条件下花粉的开孔率和活力。采用SPSS 18.0软件进行单因素方差分析(Duncan),确定适宜的开孔时间。

1.5 田间狼尾草纳米磁珠转化

2023年4—6月,在国家精准农业研究基地进行育苗。在6—11月,首先对抽穗期的狼尾草幼穗进行套袋处理,防止其他花粉污染。在晴朗的上午9:00—12:00收集‘丽秋’狼尾草新鲜花粉,称取过筛花粉约1 g,小心转移至离心管中,再加入4 mL含有磁珠-DNA混合物的花粉转染培养液充分浸没。将其置于磁板上按照最适温度和开孔时间进行花粉的磁转染,每隔15 min轻柔摇晃离心管使花粉转染培养液充分浸没花粉。对经过磁转化后的花粉进行干燥,取 0.03 mm 尼龙布均匀平铺,在下面垫8~10层吸水滤纸,将磁转化后的花粉转移至尼龙布上吸干水分。取干燥后的花粉,选择套袋隔离的花序,对雌蕊柱头露头1~4 mm而雄蕊还未露出外稃的花序进行授粉,对授粉后的花序依旧进行套袋隔离防止污染。等到散粉完成、柱头无活力后,更换袋子为网兜,等待种子成熟。

1.6 阳性植株的检测

穗子成熟后采收种子于常温保存。为建立‘丽秋’狼尾草的潮霉素抗性筛选体系,配制了浓度分别为0、60、70、80 mg·L⁻¹潮霉素的1/2 MS培养基(2.2 g·L⁻¹ Murashige & Skoog Basal Salt Mixture, 30 g·L⁻¹ 蔗糖, 6 g·L⁻¹ Phytigel, pH=5.7)。对未进行磁转染的‘丽秋’狼尾草种子进行消毒,将其接种到不同工作浓度的潮霉素培养基中,观察幼苗根系的发育状况,筛选潮霉素最适工作浓度。之后对转染 pMDC85-GFP 质粒的种子进行筛选。筛选根系生长良好的幼苗移入盆中,对成活的幼苗提取 DNA,并根据潮霉素抗性基因序列设计引物(HYG-F: 5'-CTTCTGCGGGCGATTTGTGT-3', HYG-R: 5'-GGCCGTGGTTGGCTTGTATG-3')进行 PCR 鉴定。进一步利用 LEICA-SP8 激光共聚焦显微镜(莱卡,德国)观察 GFP 荧光蛋白的发光情况,进一步筛选转基因株系。

1.7 数据处理

采用 Excel 2019 整理数据并作图,采用 SPSS 26.0 对各指标进行单因素方差分析和 Duncan 多重比较 ($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 ‘丽秋’狼尾草花粉萌发孔观察

为了研究‘丽秋’狼尾草是否适用于纳米磁珠介导花粉的转化方法,首先对‘丽秋’狼尾草花穗和花粉形态进行观察。‘丽秋’狼尾草为圆锥花序,主轴密生柔毛,具有刚毛。花期主要集中在6—10月,开花过程由雌蕊柱头露出,雄蕊扬花散粉和扬花后雄蕊退化这3个主要时期组成(图1),每个时期大概持续1~3 d。由于其独特的开花习性,在‘丽秋’狼尾草雌蕊露出而雄蕊未散粉时,可以先于其自身花粉对雌蕊进行人工授粉,获得杂交种子。

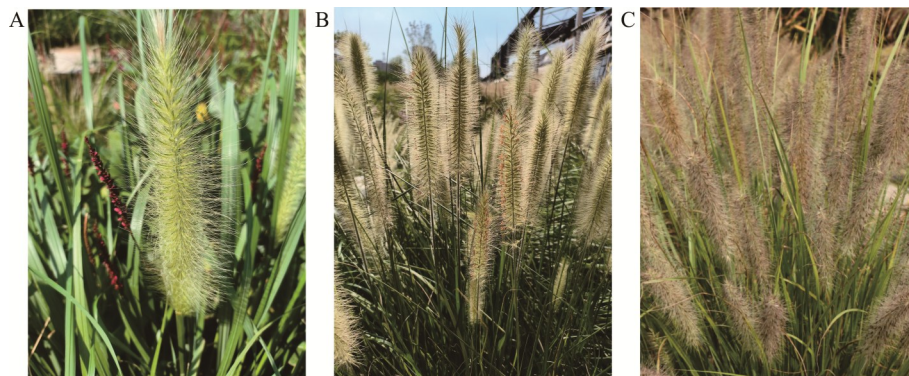


图1 ‘丽秋’狼尾草开花过程

Fig. 1 The flowering process of *P. alopecuroides* ‘Liqiu’

A: 雌蕊柱头露出 Pistil stigma exposed; B: 雄蕊扬花散粉 Stamens bloom and disperse powder; C: 扬花后雄蕊退化 Stamen degeneration after flowering.

取盛花期相应花序上的成熟‘丽秋’狼尾草花粉颗粒,在光学显微镜和电子扫描镜下进行花粉粒形态与外壁纹饰的观察。结果发现,花粉粒形态近球形,具孔盖,花粉粒大小在45 μm左右,粒壁2层(图2A)。扫描电镜下花粉粒形态有皱褶、穿孔,花粉粒外壁为细小颗粒状纹饰,由细小颗粒组成的块状纹饰形状不一,大小较为一致,块间裂隙明显(图2B)。

对搜集到的4℃保存的花粉过筛,取新鲜干净的花粉1 g放入4 mL花粉开孔培养液中培养10 min。将未经过花粉开孔液的花粉和经过处理后干燥的花粉置于扫描电镜下观察花粉形态,可以看到经过10 min培养后,‘丽秋’狼尾草花粉萌发孔打开,方便外源物质进入(图2C,D)。

2.2 纳米磁珠负载检测

由于凝胶阻滞,MNP/DNA复合物停留在点样孔中,泳道中没有条带出现;而随着MNP的量不断减少,未形

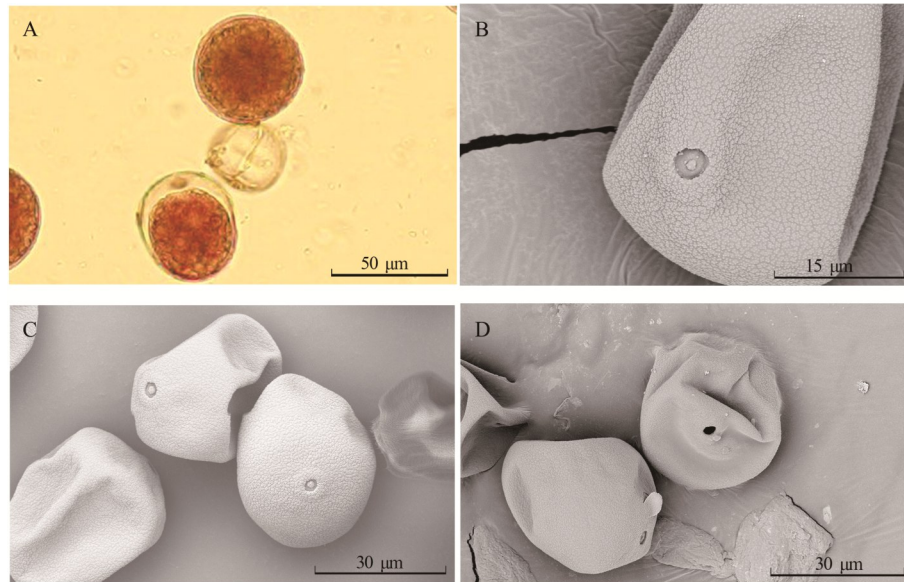


图 2 ‘丽秋’狼尾草花粉形态观察

Fig. 2 Pollen morphology observation of *P. alopecuroides* ‘Liquiu’

A: 光学显微镜下花粉形态特征 Pollen was observed under orthostatic optical microscope; B: 扫描电镜下花粉形态观察 Pollen was observed under scanning electron microscope (SEM); C: 未经过花粉开孔液处理的花粉孔状态 Pollen pore status that has not been treated with pollen pore-opening solution; D: 经过花粉开孔液处理的花粉孔状态 Pollen pore status that has been treated with pollen pore-opening solution.

成 MNP/DNA 复合物的过量 DNA 逐渐显示迁移条带,在 1:20、1:50 及 1:100 的泳道中出现了明显的带移。磁性纳米颗粒除了具有良好的 DNA 负载结合能力,还能保护 DNA 免受酶的降解。对 MNP/DNA 复合物用限制性内切酶 *Xho* I 在 37 °C 酶切 16 h 后,进行琼脂糖凝胶电泳。结果显示 MNP/DNA 复合物能有效抵抗核酸酶的消化作用,质量比分别为 1:2、1:4、1:10 的 MNP/DNA 复合物(绿色)仍然停留在点样孔中,泳道中没有酶切的弥散条带出现(图 3);相对应的,随着 MNP 的量不断减少,在 1:20、1:50 及 1:100 的泳道中,过量的 DNA 随电场迁移,并被限制性内切酶 *Xho* I 切开形成一条线性质粒条带。

2.3 温度和转染时间对转染效率的影响

花粉转染温度筛选结果发现,当转染温度在 4 和 8 °C 时花粉的萌发率较大,且 4、8 °C 下进行转染的花粉萌发率和常温下未进行转染的花粉萌发率之间没有显著差异($P > 0.05$);而 12 和 16 °C 下的萌发率较低(图 4)。与在室温(RT)下进行磁转染相比,在低温下进行磁转染对花粉活力的影响较低。

将质粒 DNA 和磁性纳米磁珠以最适比例 4:1 在 25 °C 下静置 30 min,使纳米磁珠可以充分地结合质粒 DNA,之后将其加入 8 °C 预冷的花粉转染液中。在 0.5、1、2、5 h 转染时间下,通过电子显微镜观察到花粉的开孔状态(图 5A),5 h 处理后花粉的开孔率最大,可以达到 48.6%。0.5 h 处理后花粉的开孔率为 27.9%,与 1、2 h 的开孔率没有显著差异($P > 0.05$,图 5B)。花粉转染时间对活力的影响没有显著性差异(图 5C)。在选择最适开孔时间时,本研究综合考虑了‘丽秋’狼尾草花粉活力和开孔率等因素,选择了 0.5 h 作为开孔液转染时间。

2.4 阳性植株的鉴定

通过不同浓度的潮霉素对‘丽秋’狼尾草种子进行筛选,可以看到在浓度为 80 mg·L⁻¹ 的潮霉素培养基中,大部分种子生根困难或者生根后根尖发育不良,逐渐黄化。用 80 mg·L⁻¹ 的潮霉素对转染了 pMDC85-GFP 质粒的‘丽秋’狼尾草种子随机选取 150 粒进行筛选,有 13 株植株成活,对这 13 株幼苗提取 DNA,在潮霉素抗性基因序列上进行引物设计,PCR 扩增检测,PCR 鉴定的程序按照诺唯赞 2×Taq Master Mix(Dye Plus)试剂说明书进行,PCR 反应程序为 95 °C 15 s;60 °C 15 s;72 °C 30 s;30 个循环;72 °C,5 min。PCR 反应结束后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果发现 7 株中可以扩增出清晰的目的条带,且 PCR 测序结果正确,证明得到 7 株阳性植株(图 6)。

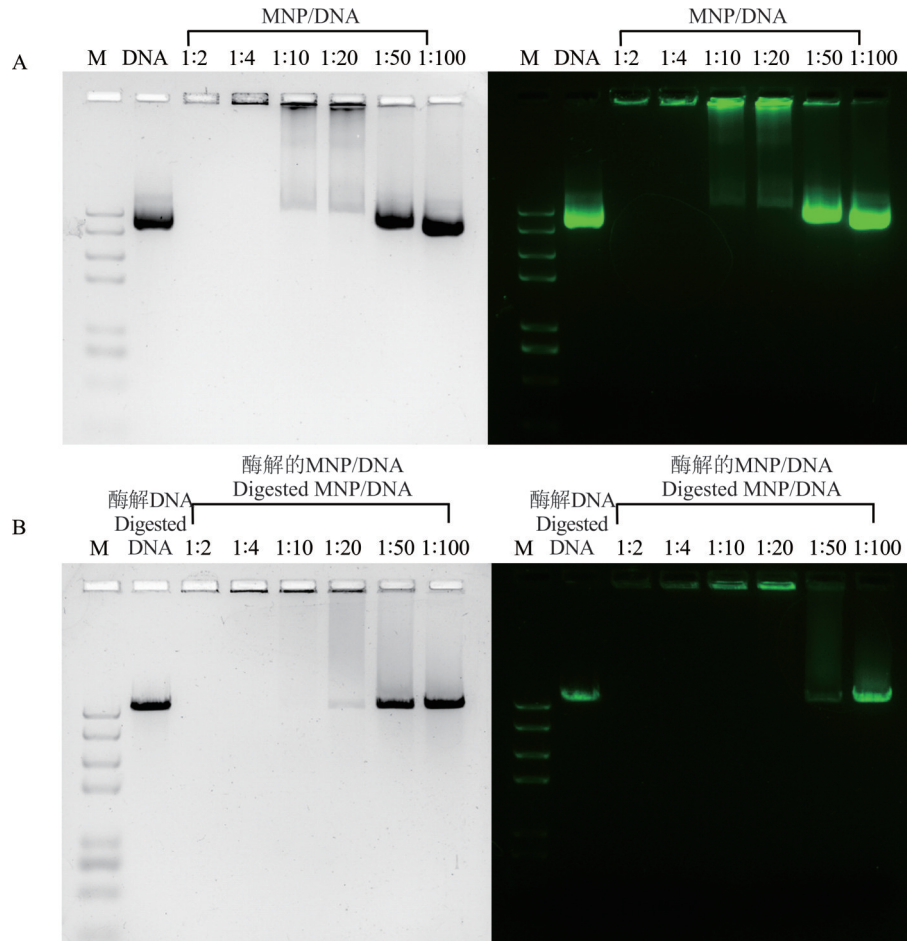


图3 纳米磁珠对质粒DNA的负载和保护能力

Fig. 3 The loading and protective capabilities of magnetic nanoparticles for plasmid DNA

A: MNP/DNA 复合物的琼脂糖凝胶电泳分析 Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA and MNPs/DNA; B: MNP/ DNA 复合物酶切产物的琼脂糖凝胶电泳分析 Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA and MNPs/DNA complexes digested with *Xho* I ; M: *Trans* 15K DNA Marker.

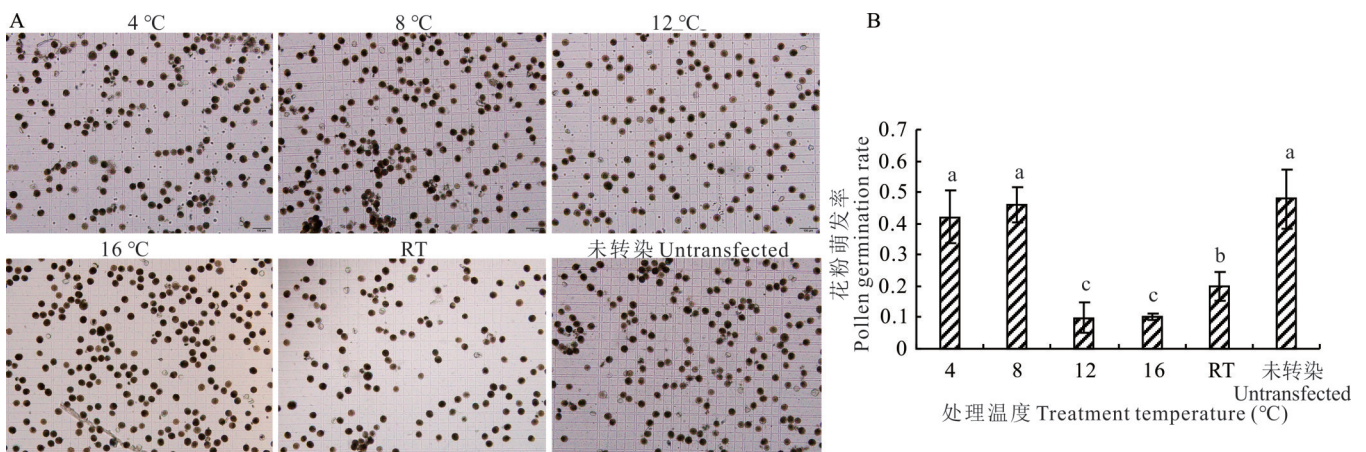


图4 ‘丽秋’狼尾草转染的最适温度

Fig. 4 Optimal temperature for transfection of *P. alopecuroides* ‘Liqui’

A: 转染缓冲液预处理后,将花粉粒转入发芽液中,在室温下培养 3 h After pretreatment with transfection buffer, pollen grains were transferred into germinating media and incubated 3 h under RT (直立光学显微镜下观察花粉萌发情况 Pollen germination was observed under orthostatic optical microscope); B: 未经预处理或在指定温度下预处理的花粉发芽情况 Germination of pollen without pretreatment with transfection or pretreated under indicated temperatures; RT: 室温 Room temperature; 不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著,下同 Different lowercase letters indicate significant differences at $P < 0.05$ level, the same below.

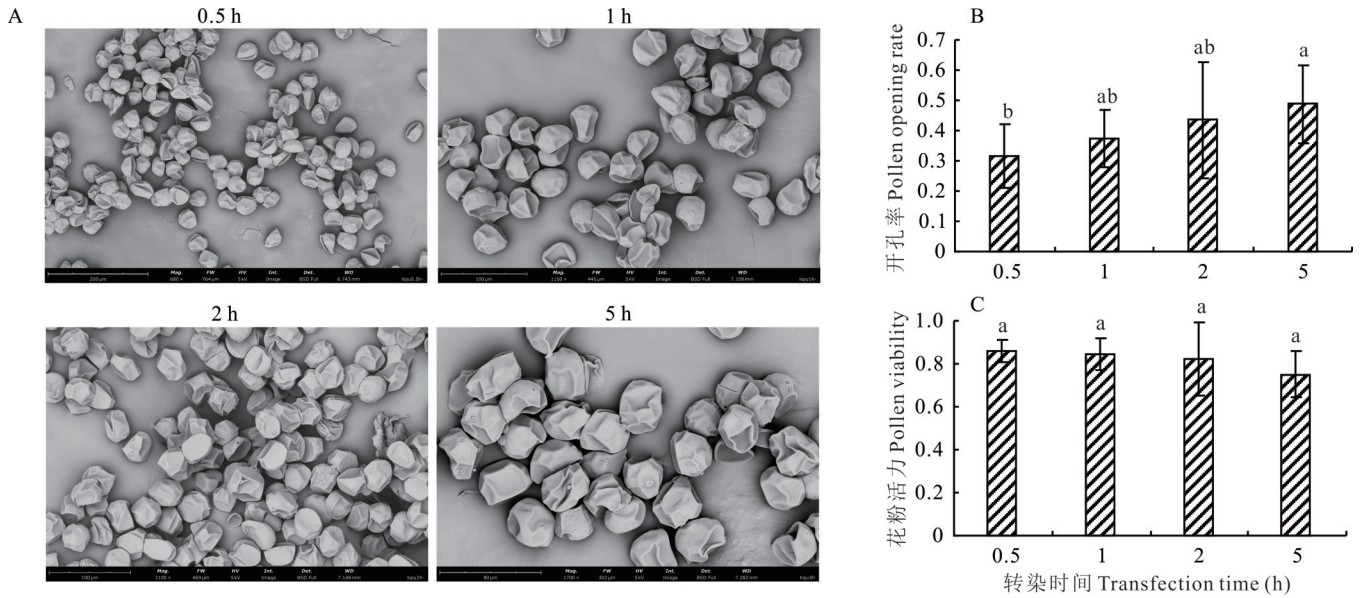


图5 ‘丽秋’狼尾草开孔转染的最适时间

Fig. 5 Optimal time for transfection of *P. alopecuroides* ‘Liqui’

A: 8 °C下不同时间转染缓冲液预处理的花粉电镜图像 Scanning electron microscope (SEM) images of pollen pretreated with transfection buffer at 8 °C for different times; B: 不同转染时间的狼尾草花粉开孔率 Pollen opening rate after pretreatment in transfection buffer at different times; C: 不同转染时间的狼尾草花粉活力 Pollen viability after pretreatment in transfection buffer at different times.

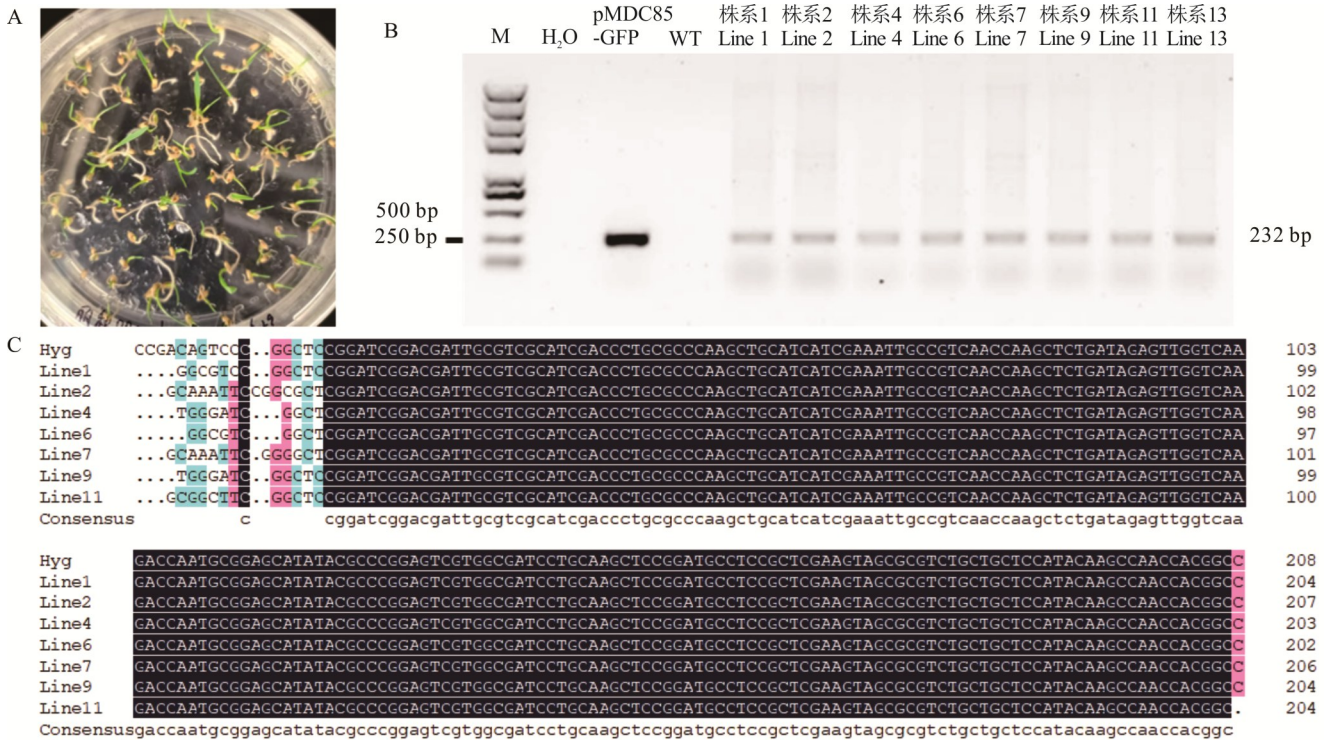


图6 阳性植株验证

Fig. 6 Verification of positive plants

A: 潮霉素筛选‘丽秋’狼尾草转染的种子 Hygromycin screening seeds transfected with *P. alopecuroides* ‘Liqui’; B: 阳性植物 PCR 检测结果 PCR test results of positive plants; C: DNAMAN 比对结果 DNAMAN comparison results; M: Trans2K[®] Plus II DNA Marker; WT: 未转染植株 Non-transfected plant.

2.5 转基因株系荧光蛋白观测

GFP 蛋白的荧光较为稳定,受外界的影响较小,检测十分方便且伤害小,因此本研究选用携带 GFP 标签的

pMDC85-GFP质粒。烟草瞬时表达结果发现,该质粒的荧光主要分布在细胞膜上(图7)。对上一步获得的阳性植株取根尖部位,进行压片。在激光共聚焦显微镜下进行观察,发现转染了pMDC85-GFP质粒的植株在共聚焦显微镜下细胞膜显示出绿色的荧光(图8)。结合PCR检测和GFP荧光蛋白观察结果,证明得到了7株阳性植株,转化率可达4.66%(7/150)。综上所述,通过花粉磁转染(图9),报告基因被有效地传递到‘丽秋’狼尾草中,成功表达了该蛋白。

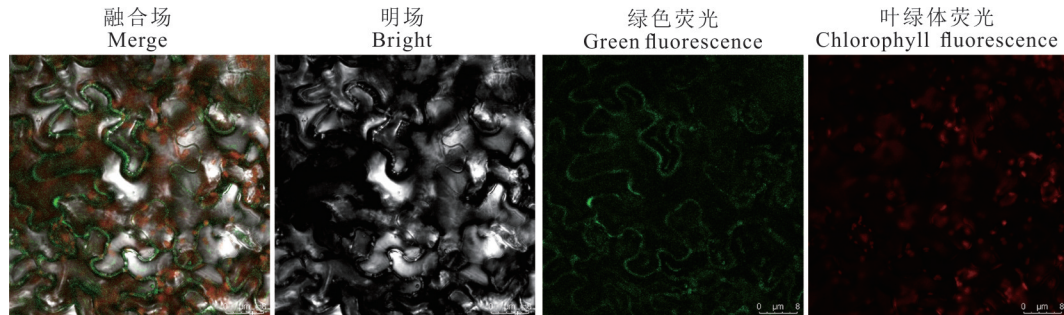


图7 pMDC85-GFP亚细胞定位结果

Fig. 7 Subcellular localization of pMDC85-GFP

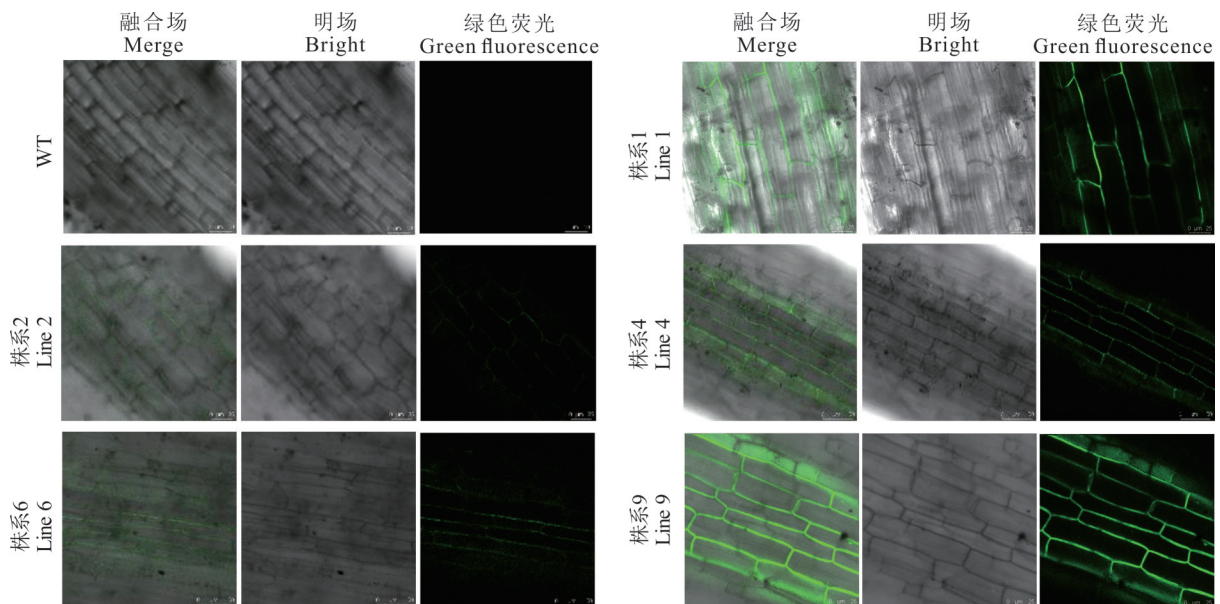


图8 激光共聚焦显微镜下的阳性植株根尖

Fig. 8 The roots of positive transgenic plants under confocal microscope

3 讨论

研究表明,磁性纳米载体 MNPs 可以吸附外源 DNA 并形成稳定的 MNPs/DNA 复合物,受体细胞通过胞吞可以吸收外源 DNA,并表现出较为理想的转化效率^[24]。花粉磁转染的方式已在玉米^[19]、棉花^[20]、百合^[21]、黄瓜 (*Cucumis sativus*)^[25]等经济作物上得到验证。‘丽秋’狼尾草观赏效果好,花期早且持续时间长,并完成了全基因组测序^[22]。因此,本研究利用‘丽秋’狼尾草开展纳米磁珠介导的花粉管通道转化体系研究。

花粉萌发时,花粉内壁从萌发孔向外突出,形成花粉管。萌发孔的形状、结构、数目和大小随植物种类不同而异,是鉴别植物的依据^[26-27]。双子叶植物花粉最典型的萌发孔由在花粉表面等距平行排列的3个花粉沟组成;而单子叶植物具有在远端分布的单个萌发孔^[28]。开放的花粉孔是应用花粉磁转染的前提,在利用温室培养的百合、高粱 (*Sorghum bicolor*) 和玉米进行花粉转染时,由于孔被壁材料或盖膜覆盖,阻止了外来 DNA 的进入^[29]。‘丽秋’



图 9 利用纳米磁珠负载 DNA 转染‘丽秋’狼尾草花粉的步骤

Fig. 9 Steps in *P. alopecuroides* ‘Liqiu’ pollen transfection using DNA-coated magnetic nanoparticles

狼尾草具有单子叶植物典型的单萌发孔,花粉粒形态为近球形,在正常情况下,‘丽秋’狼尾草的萌发孔关闭,外源物质无法进入。通过花粉转染液处理后,花粉孔的孔盖打开,方便纳米磁珠在磁场的作用下通过花粉孔携带质粒 DNA 进入花粉。

保证花粉的活力是提高花粉转染率的前提。不同植物的花粉具有不同的特性,温度、湿度、光照等都会影响花粉活性^[30]。1998年,李要民等^[31]发现与玉米、水稻(*Oryza sativa*)花粉相比,狼尾草花粉最耐贮藏,且低温高湿对禾本科花粉贮藏最为有利。本研究通过花粉离体培养来确认花粉转染的最适温度,确保花粉在转染过程中能保持较强的活力,提高转染成功率。花粉经过开孔转染液处理之后,打开萌发孔方便外源物质进入,开孔率在在一定程度上也影响着外源质粒进入花粉的概率。当花粉孔打开时,转染效率提高,从而消除了外源 DNA 进入细胞壁的障碍^[19]。玉米经过转染液处理后开孔率提高,成功转入目的基因的花粉粒数也得到提高。对于棉花的开放花粉孔,无需开孔液的诱导,也能观察到磁珠转染进入花粉。‘丽秋’狼尾草在开孔液的诱导下,产生开放的萌发孔方便纳米磁珠携带外源基因进入花粉粒。在开孔时间的选择上,本研究设立不同的处理时间来观察花粉的开孔率,选择 30 min 的开孔转染时间以保证花粉的活力和较好的开孔率。

纳米基因载体 MNPs 对质粒 DNA 的负载保护能力试验表明, MNPs 与 DNA 在质量比为 1:10 至 1:2 时可以稳定结合,并且 MNPs 能够保护 DNA 免受酶的降解,这有助于纳米磁珠保护并负载质粒 DNA 进入花粉粒。作为一种理想的基因载体,纳米磁珠 PolyMAG1000 通过静电相互作用与带负电的 DNA 结合,游离的小分子 DNA 能够穿透琼脂糖凝胶孔隙,从负极向正极方向游动;而纳米磁珠由于其粒径较大,不能通过孔隙,在电泳过程中则被阻滞在点样孔中^[20]。不同的纳米磁珠最适负载比例也有差别,这可能与质粒的大小、结合液的 pH 以及修饰基团有关^[32-34]。关于 MNPs 能够保护 DNA 免受酶的消化作用,有研究认为是纳米材料在空间上妨碍了消化酶、 Mg^{2+} 与 DNA 的结合,从而阻碍 DNA 消化酶的作用^[35]。也有研究认为纳米颗粒所带的正电荷基团,使得 Mg^{2+} 与 DNA/纳米颗粒互斥,以及 DNA 与纳米颗粒的结合可能导致了 DNA 结构上的变异,从而保护了 DNA 免受酶切影响^[36]。

潮霉素 B 相较于其他抗生素类和除草剂类筛选剂具有筛选时间短和假阳性率低等优点^[37]。抗性基因表达产物是一个蛋白激酶,通过磷酸化潮霉素 B 使其丧失活性,通过潮霉素 B 对转基因生物进行筛选已经在实验室被广泛选用^[38-39]。潮霉素 B 对植物的生长发育有显著的毒性作用,不同的植物具有不同的潮霉素敏感性^[40]。本研究在培养基中添加不同浓度的潮霉素 B 作为筛选压,结果发现在潮霉素 B 浓度为 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的条件下,大部分幼苗

根尖表现出褐化、长势变弱、根停止生长、侧根发生受到抑制、生长明显缓慢停滞、存活率逐渐下降。GFP蛋白性质极其稳定,对细胞无毒性,耐受高温处理,在紫外光或蓝光下激发,即可发出绿色荧光^[41]。在GFP应用中,由于其可以与蛋白质的N端或C端结合,使基因可视化表达,同时也被用于转基因的遗传和跟踪^[42]。在pMDC85-GFP质粒中带有GFP标签,通过激光共聚焦显微镜观察存活植株的根尖,成功转入质粒的植株在质膜上显示出绿色荧光,证明pMDC85-GFP质粒成功转入。

4 结论

本研究对狼尾草基于纳米磁珠介导的花粉管通道转化法的纳米磁珠负载能力、开孔时间和温度进行了系统筛选。纳米磁珠保护DNA免受酶的降解,其与DNA在质量比为1:4时最佳,可负载DNA进入花粉孔。不同温度和开孔时间会对狼尾草花粉的萌发率和开孔时间产生影响,在转染温度为8℃、开孔时间为30 min时,‘丽秋’狼尾草能够保持较好的花粉活力,且能获得较大的开孔率。经过80 mg·L⁻¹潮霉素浓度培养基的初筛,对成活幼苗进行PCR检测和激光共聚焦显微镜观察,最后从随机选取的150粒种子中鉴定到7株阳性植株,转化率达到4.66%(7/150)。本研究将纳米磁转染与花粉介导法相结合,建立了狼尾草的纳米磁珠转化体系,填补了狼尾草纳米磁珠介导的花粉管通道转化法研究的空缺,为后续研究工作中利用转基因和基因编辑技术开展基因工程育种提供了基础。

参考文献 References:

- [1] Wu J Y, Teng W J, Wang Q H. Basic botanic characters, adaptabilities and applying in landscape architecture of *Pennisetum alopecuroides*. Chinese Landscape Architecture, 2005, 21(12): 57–59.
武菊英,滕文军,王庆海. 狼尾草的生物学特性及在园林中的应用. 中国园林, 2005, 21(12): 57–59.
- [2] Hou X C, Teng K, Guo Q, et al. Research advances in forage *Pennisetum* resource. Chinese Bulletin of Botany, 2022, 57(6): 814–825.
侯新村,滕珂,郭强,等. 狼尾草属牧草研究进展. 植物学报, 2022, 57(6): 814–825.
- [3] Tang J, Zhou H L, Wang W Q, et al. Advances in breeding and molecular biology research of *Pennisetum*. Chinese Journal of Tropical Crops, 2018, 39(11): 2313–2320.
唐军,周汉林,王文强,等. 狼尾草属牧草育种及分子生物学研究进展. 热带作物学报, 2018, 39(11): 2313–2320.
- [4] Liu Z P, Liu W X, Yang Q C, et al. Progress and existing problems of forage breeding in China. Bulletin of National Natural Science Foundation of China, 2023, 37(4): 528–536.
刘志鹏,刘文献,杨青川,等. 我国牧草育种进展及存在问题. 中国科学基金, 2023, 37(4): 528–536.
- [5] Shahnam A D, Mahin P. *Agrobacterium tumefaciens*—mediated plant transformation: A review. Molecular Biotechnology, 2024, 66(7): 1563–1580.
- [6] Zou Z, Lu C M. An overview of plant factors influencing *Agrobacterium*—mediated transformation. Biotechnology Bulletin, 2008(1): 1–9.
邹智,卢长明. 影响农杆菌介导遗传转化的植物因子研究进展. 生物技术通报, 2008(1): 1–9.
- [7] Yang S K, Lai K, Low L Y, et al. Transgenic plants: Gene constructs, vector and transformation method. Rijeka: Intech Open, 2018.
- [8] Wang M, Sun R, Zhang B, et al. Pollen tube pathway-mediated cotton transformation. Methods in Molecular Biology, 2019, 1902: 67–73.
- [9] Maram G, Maretha M O, Anika M, et al. Transgenic and herbicide resistant pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) R. Br. via microprojectile bombardment of scutellar tissue. Molecular Breeding, 2002, 10(4): 243–252.
- [10] Wang P Q, Duan C R, Wang B C, et al. Tissue culture with different organs of *Pennisetum pureum*. Journal of Chongqing University (Natural Science Edition), 2005, 28(6): 118–120.
王凭青,段传人,王伯初,等. 杂交狼尾草不同外植体材料组织培养实验. 重庆大学学报(自然科学版), 2005, 28(6): 118–120.
- [11] Mu T, Zhang X Y, Wang J G, et al. The optimization of *Pennisetum agrobacterium*—mediated transformation system and obtaining of transgenic plants. Crops, 2013(1): 45–48.

- 牟彤, 张晓莹, 王金刚, 等. 狼尾草农杆菌转化体系的优化和转基因植株的获得. 作物杂志, 2013(1): 45—48.
- [12] Ozyigit I I, Kuaybe Y K. Particle bombardment technology and its applications in plants. *Molecular Biology Reports*, 2020, 47(12): 9831—9847.
- [13] Rahman S U, Khan M O, Ullah R, *et al.* *Agrobacterium*—mediated transformation for the development of transgenic crops; present and future prospects. *Molecular Biotechnology*, 2024, 66(8): 1836—1852.
- [14] Su W, Xu M, Radani Y, *et al.* Technological development and application of plant genetic transformation. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(13): 10646.
- [15] Wu K, Xu C, Li T, *et al.* Application of nanotechnology in plant genetic engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(19): 14836.
- [16] Chang F P, Kuang L Y, Huang C A, *et al.* A simple plant gene delivery system using mesoporous silica nanoparticles as carriers. *Journal of Materials Chemistry B*, 2013, 1(39): 5279—5287.
- [17] Susana M O, Valenstein J S, Lin V S Y, *et al.* Gold functionalized mesoporous silica nanoparticle mediated protein and DNA codelivery to plant cells via the biolistic method. *Advanced Functional Materials*, 2012, 22(17): 3576—3582.
- [18] Mykhaylyk O, Antequera Y S, Vlaskou D, *et al.* Generation of magnetic nonviral gene transfer agents and magnetofection in vitro. *Nature Protocols*, 2007, 2(10): 2391—2411.
- [19] Wang Z, Zhang Z B, Zheng D Y, *et al.* Efficient and genotype independent maize transformation using pollen transfected by DNA—coated magnetic nanoparticles. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2022, 64(6): 1145—1156.
- [20] Zhao X, Meng Z G, Wang Y, *et al.* Pollen magnetofection for genetic modification with magnetic nanoparticles as gene carriers. *Nature Plants*, 2017, 3(12): 956—964.
- [21] Zhang M F, Ma X, Jin G, *et al.* A modified method for transient transformation via pollen magnetofection in *Lilium* germplasm. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(20): 15304.
- [22] Xu Y, Liu L, Jia M, *et al.* Transcriptomic and physiological analysis provide new insight into seed shattering mechanism in *Pennisetum alopecuroides* ‘Liqiu’. *Theoretical and Applied Genetics*, 2024, 137(7): 157.
- [23] Teng K, Guo Q, Liu L, *et al.* Chromosome—level reference genome assembly provides insights into the evolution of *Pennisetum alopecuroides*. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14(8): 1195479.
- [24] Kievit F M, Stephen Z R, Veisheh O, *et al.* Targeting of primary breast cancers and metastases in a transgenic mouse model using rationally designed multifunctional SPIONs. *ACS Nano*, 2012, 6(3): 2591—2601.
- [25] Park C W, Choi J Y, Son Y J, *et al.* Magnetofected pollen gene delivery system could generate genetically modified *Cucumis sativus*. *Horticulture Research*, 2024, 11(8): 179.
- [26] Zhang Y L, Zhang Q X, Xie S L. Pollen morphology of 8 species in *Lilium* from Qinba Mountain areas. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2010, 19(1): 144—146.
张延龙, 张启翔, 谢松林. 秦巴山及其毗邻地区8种野生百合孢粉学研究. *西北农业学报*, 2010, 19(1): 144—146.
- [27] Xu W J, Zhang C, Wu Y, *et al.* The pollen morphological characteristics from five closely related medicinal plants of the genus *Ligusticum*. *Journal of Northeast Forestry University*, 2024, 52(11): 56—63.
徐皖菁, 张超, 吴宇, 等. 5种藜本属近缘药用植物花粉的形态特征. *东北林业大学学报*, 2024, 52(11): 56—63.
- [28] Furness C A, Rudall P J. Pollen aperture evolution: A crucial factor for eudicot success? *Trends in Plant Science*, 2004, 9(3): 154—158.
- [29] Vejlupekova Z, Warman C, Sharma R, *et al.* No evidence for transient transformation via pollen magnetofection in several monocot species. *Nature Plants*, 2020, 6(11): 1323—1324.
- [30] Wang J X, Chen L B. Changes of vigor and respiratory rate of three kinds of grasses pollen stored under different gas conditions. *Plant Physiology Communications*, 2001, 37(2): 113—116.
王金祥, 陈良碧. 不同气体下贮藏的3种禾本科植物花粉活力和呼吸速率变化. *植物生理学通讯*, 2001, 37(2): 113—116.
- [31] Li Y M, Chen L B. Vigor change of several grasses pollen stored in different temperature and humidity conditions. *Plant Physiology Communications*, 1998, 34(1): 35—37.
李要民, 陈良碧. 不同温湿条件下贮藏的3种禾本科植物花粉活力变化. *植物生理学通讯*, 1998, 34(1): 35—37.
- [32] Lu Y M. Progress of magnetic nanoparticles as gene vector. *Letters in Biotechnology*, 2013, 24(5): 736—740.
卢艳敏. 磁性纳米颗粒作为载体在基因转染中的研究进展. *生物技术通讯*, 2013, 24(5): 736—740.
- [33] Peng Z A, Li D D, Xia A Y, *et al.* Study on magnetic nanoparticle loading plasmid DNA. *Journal of South China Agricultural University*, 2020, 41(1): 78—82.

- 彭子艾, 李丹丹, 夏澳运, 等. 磁性纳米颗粒负载质粒DNA的研究. 华南农业大学学报, 2020, 41(1): 78–82.
- [34] Hou X X, Zhang H, Zhang D S. Research progress of magnetic nanoparticles as gene vector. *Journal of Medical Postgraduates*, 2013, 26(2): 186–189.
- 侯欣欣, 张皓, 张东生. 磁性纳米颗粒作为基因载体的研究进展. 医学研究生学报, 2013, 26(2): 186–189.
- [35] Stephanie R, Hagen B, Helga R W, *et al.* Human serum albumin-polyethylenimine nanoparticles for gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 2003, 92(1/2): 199–208.
- [36] He X, Wang K, Tan W, *et al.* Bioconjugated nanoparticles for DNA protection from cleavage. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(24): 7168–7169.
- [37] Sun H, Zhang J Y, Luo L J, *et al.* Development of transgenic hairy root induction and protoplast preparation systems for *Stylosanthes leiocarpa*. *Acta Agrestia Sinica*, 2024, 32(5): 1583–1591.
- 孙昊, 张建禹, 罗丽娟, 等. 光果柱花草转基因毛状根及其原生质体制备体系的建立. 草地学报, 2024, 32(5): 1583–1591.
- [38] Qin A G, Luo X F. Transformation of transcription factor *DREB1C* gene into the fast-growing black locust mediated with *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Beijing Forestry University*, 2007, 29(6): 29–34.
- 秦爱光, 罗晓芳. 农杆菌介导转录因子 *DREB1C* 基因转化速生型刺槐的研究. 北京林业大学学报, 2007, 29(6): 29–34.
- [39] Elzen P J, Townsend J, Lee K Y, *et al.* A chimaeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells. *Plant Molecular Biology*, 1985, 5(5): 299–302.
- [40] Oung H, Lin K, Wu T, *et al.* Hygromycin B-induced cell death is partly mediated by reactive oxygen species in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Molecular Biology*, 2015, 89(6): 577–588.
- [41] Ge X, Xu J, Yang Z, *et al.* Efficient genotype-independent cotton genetic transformation and genome editing. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2023, 65(4): 907–917.
- [42] Nguyen T T, Hai-Vy V N, Hieu T V. Prokaryotic expression of chimeric GFP-hFc protein as a potential immune-based tool. *Molecular Biology Research Communications*, 2021, 10(3): 105–108.