

冯梦琦,王若雨,司马璐,等.植物非组培遗传转化体系及其应用[J].华中农业大学学报,2025,44(2):228-242.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2025.02.023

植物非组培遗传转化体系及其应用

冯梦琦¹,王若雨¹,司马璐¹,姜楠²,翟晓巧³,赵振利¹,范国强¹

1.河南农业大学林学院,郑州450046;2.中国林业科学研究院经济林研究所,郑州450003;
3.河南省林业科学研究院,郑州450002

摘要 植物高效稳定的遗传转化体系是基因功能解析和分子育种的重要技术支撑,然而组织培养体系不完善严重阻碍其在诸多植物尤其作物中的应用。为了解决上述问题,近年来建立了不少高效的非组培遗传转化体系。本文着重综述农杆菌介导的非组培遗传转化体系,包括花器官侵染法、切-浸-芽(cut-dip-budding, CDB)递送法、依赖再生活力的活体注射递送法(regenerative activity-dependent in planta injection delivery, RAPID)、种子侵染法、发育调控基因(development regulatory, DR)辅助转化法和病毒递送法在植物中的应用现状、转化效率影响因素和基因编辑应用;总结了不依赖农杆菌的花粉管通道法、粒子轰击法和纳米递送法在植物中的应用,旨在为更多物种建立高效、简便、基因型不依赖的非组培遗传转化体系提供参考,助力植物功能基因研究和分子育种实践。

关键词 植物遗传转化;非组培;农杆菌;基因编辑;基因型不依赖

中图分类号 S-1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2025)02-0228-15

高效稳定的植物遗传转化体系是解析基因功能、定向改良植物性状的重要工具和关键手段^[1-2]。常规杂交育种存在生殖隔离、育种周期长等障碍,而利用基于植物遗传转化的基因编辑技术,可以定向操作基因,改良性状,有效规避上述问题,加速育种进程^[3-4]。现有的植物遗传转化方法包括农杆菌介导法^[4]、花器官侵染法^[4]、病毒载体递送法^[5-8]、粒子轰击法^[1]、花粉管通道法^[1]、纳米递送法等^[9]。其中,农杆菌介导的遗传转化由于效率高、拷贝数低、可靠性高,应用最广泛^[4]。用于植物遗传转化的农杆菌主要有根癌农杆菌和发根农杆菌2种类型,分别含有Ti质粒和Ri质粒,其上有一段T-DNA,农杆菌通过侵染植物伤口进入细胞后,将T-DNA插入到植物基因组,2类农杆菌诱导的器官类型不同,其中发根农杆菌主要诱导再生阳性根,而根癌农杆菌诱导再生阳性芽^[10]。由于植物细胞具有多能性和全能性,多种细胞具备发育成各种器官和完整植株的潜能^[11]。传统的农杆菌介导的植物遗传转化的受体材料多为离体植物组织,包括无菌种子、幼胚、叶片、上胚轴、下胚轴、愈伤组织等^[1]。然而该方法受多种因素限制,

首先需要建立高效稳定的离体再生体系,其次该方法对植物基因型也有一定的偏好性,且转化细胞培养过程昂贵、复杂、持续时间长、转化效率低。目前在37万个植物物种中,仅0.1%建立了稳定的遗传转化体系,大量植物仍未建立组培条件下根癌农杆菌介导的遗传转化体系^[12]。拟南芥利用浸花法进行稳定的遗传转化,有效避免了繁琐的组培过程,为非组培遗传转化提供了重要参考^[13]。早期发现在非组培条件下利用发根农杆菌悬浮液注射菜豆叶结节处,可以形成大量的毛状根,转化效率高达70%~90%,该方法为发根农杆菌介导遗传转化提供了重要参考^[14]。近年随着基因编辑技术快速发展,利用遗传转化和基因编辑技术创制优良新种质取得了显著成效^[15]。虽然植物细胞具有多能性和全能性,但并非所有细胞都能再生,生殖器官或分生组织由于细胞分化程度低而具有较强再生能力^[16-17]。非组培条件下生长的植物,其腋芽分生组织、茎分生组织都具有强再生能力,可作为遗传转化的受体材料。近年非组培遗传转化方法不断被建立和优化^[4]。本文总结了近年来建立的非组培遗传转化体系及其在植物基

收稿日期:2025-01-17

基金项目:国家自然科学基金项目(32401613);中国博士后科学基金项目(2024M750814)

冯梦琦, E-mail: fengmengqi@henau.edu.cn

通信作者:范国强, E-mail: zlx64@henau.edu.cn

因编辑中的应用,并展望非组培遗传转化的发展趋势,旨在为更多物种建立高效、简便、基因型不依赖的非组培遗传转化体系提供参考。

1 农杆菌介导的非组培遗传转化体系

农杆菌介导的非组培遗传转化主要借助植物有性和无性繁殖方式,利用植物自身再生能力,获得转基因再生器官或再生植株,其遗传转化效率高,在植物中应用广泛^[4]。目前常用的农杆菌介导的非组培遗传转化主要包括:花器官侵染法、切-浸-芽(cut-dip-budding, CDB)递送法、依赖再生活力的活体注射递送法(regenerative activity-dependent in planta injection delivery, RAPID)、种子侵染法、发育调控基因(development regulatory, DR)辅助转化法和病毒递送法。

1.1 花器官侵染法

花器官侵染法最早在拟南芥中建立,其做法是将开花早期的拟南芥花序浸泡在农杆菌菌液中,并进行真空渗透处理,农杆菌进入子房将携带目的基因的T-DNA插入卵细胞基因组,借助有性生殖方式直接获得转基因种子(图1A)。该方法无需组织培养和再生步骤,操作简单,周期短^[13]。在拟南芥中利用该方法创制了大量(>2万)T-DNA插入系,构建了多个突变体库,突变位点几乎覆盖拟南芥基因组中的全部基因,为正向遗传学和基因功能互补验证提供了可靠材料^[18-19]。我国研究人员利用喷雾法代替花序浸泡,成功创制了2万个独立转化株系,构建了携带激活标签的功能获得型拟南芥突变体库^[20]。喷雾法代替浸花法,为大规模转化提供了便利,且转化效率相当^[21]。花序侵染法除应用于十字花科植物北方小油菜^[22]、甘蓝型油菜^[23-24]、萝卜^[25]、芥菜^[26]、白菜^[27]和盐芥^[28]外,也被应用于重要的农作物小麦^[29-30]和大豆^[31],以及经济作物苜蓿^[32]等。尽管浸花法遗传转化体系已在多个物种中被建立,但由于其转化效率较低,普遍在0.01%~4%之间^[18-32](表1),且受植物发育时期影响较大,多数植物以初花期最佳,转基因后代需自交筛选获得纯合体,耗时较长,因此该方法适用于生长周期短且自交亲和植物。花器官侵染法除花序外,花药、花粉、花梗和柱头也被用作农杆菌介导遗传转化的外植体。报春花以花梗作为外植体进行遗传转化,由于活体再生能力差,仍需通过组织培养途径获得转基因再

生植株^[33]。农杆菌介导的花器官侵染法目前仍是拟南芥遗传转化应用最广泛的方法,该方法为非组培遗传转化提供了重要借鉴,为后期非组培遗传转化的快速发展奠定了基础。

1.2 切-浸-芽递送法

花器官侵染法在外植体选择上具有一定的局限性,研究人员开发了以植物营养器官为外植体的普适性更广的遗传转化方法,称为切-浸-芽(CDB)递送法^[12],该方法主要是借助于植物无性繁殖方式进行遗传转化。CDB递送法最早在橡胶草中建立,该方法主要包括4步:切取根段-蘸菌-诱导生根-根诱导生芽,最终获得完整的转基因植株(图1B)^[12]。橡胶草的根具有芽原基,当根系与母体分离后,芽原基分化形成不定芽伸出地面形成完整植株。利用根进行无性繁殖的草本植物绣球小冠花、块根植物甘薯和木本植物臭椿、辽东槲木和臭茉莉等均能通过CDB法获得转基因植株^[12]。CDB转化效率虽在不同物种中存在较大差异,但在多个物种中均表现出极高的转化效率,再生阳性根的效率普遍在10%~90%之间,再生阳性芽的效率在2%~80%(表1),相较于浸花法提高10倍左右,为高通量遗传转化提供了有利的技术保障^[12]。CDB方式包括4个步骤,周期约为14周,耗时相对较长,为了进一步缩短转化周期,研究者开发了更加简便的3步侵染法,称为极简切-浸-芽系统(extremely simplified cut-dip-budding, ES-CDB)(图1C),该方法直接以橡胶草的根作为外植体,蘸取固体培养基中的发根农杆菌,放在湿润的蛭石上直接诱导不定芽,省略了诱导毛状根的步骤,将遗传转化周期缩短至2周左右,ES-CDB相较于传统CDB,更加简便且快速^[34]。CDB在多个具有无性繁殖能力的物种中也得到了应用,包括药用植株荆芥、地黄、丹参和蒙古蒲公英^[35],以及多肉植物双子叶长寿花、玉树和单子叶虎尾兰^[36]。自然界中有许多植物可利用根进行无性繁殖,特别是具有根蘖繁殖能力的植物,例如菊科植物和木本植物尤为普遍,包括紫茎泽兰、万寿菊、杨树、枣树等,尽管这些植物都已建立了遗传转化体系,但均需要经历组织培养过程,且部分物种存在转化效率低的问题^[37-41],因此有必要建立CBD递送法,简化操作、提高效率、缩短周期。

发根农杆菌介导的CDB遗传转化系统,具有操作简便、转化效率高的特点,在无性繁殖能力弱或不具有根蘖繁殖能力的植物中得到了广泛的应用,如



图1 农杆菌介导的非组培遗传转化流程图

Fig. 1 Flow chart of non-tissue culture genetic transformation mediated by *Agrobacterium*

木本果树柑橘^[42-44]、桃^[45]、杜梨^[46]、茶树^[47]以及十字花科的大白菜^[48]等,这些植物通过CDB递送法获得了阳性根,但由于其根系难再生芽,无法获得完整的转基因再生植株,严重阻碍了其在分子育种中的应用。但对于根系生物学特性的研究,由于其不必获得完整的再生转基因植株,利用发根农杆菌介导的遗传转化,可在短时间内获得大量的转基因阳性根,可应用于研究根系的抗寒、抗旱等抗逆相关性状^[44]。在麻风树和柑橘中也利用类似于CDB的方法进行遗传转化,通过去除地上部顶端分生组织,在伤口处蘸取菌液,诱导分生组织再生阳性芽,待阳性芽长大后观察地上部表型,该方法也被称为植物原位转化法(图1D);可有效规避根再生芽的过程,比较适用于无根蘖繁殖能力且仅需观察地上部性状的木本果树

等^[49-51]。CDB相比于浸花法,可以选择根段、茎和叶片等多种营养器官作为外植体,不经历有性生殖过程,后代无需多代自交,具有应用范围广、周期短、操作简便等特点;特别是针对难转化的多年生木本植株具有极大的应用潜力,且利用发根农杆菌介导的遗传转化,再生根或再生芽来源于单细胞,有效避免了转基因嵌合现象。

1.3 依赖再生力的活体注射递送法

依赖再生力的活体注射递送法(RAPID)也属于植物原位转化的一种,主要依赖于植物细胞本身的再生能力,该方法根据植物分生组织再生能力强的特点,在去除原有分生组织基础上,利用注射器将农杆菌递送至分生组织周围,获得转基因阳性芽或阳性根^[52]。注射侵染后的茎切面观察发现新生组织

(转基因阳性芽或阳性根)起始于韧皮部的分生组织^[53]。该方法与CDB方法类似,借助于植物无性繁殖方式,诱导转基因阳性芽或阳性根形成完整的转基因植株^[12,53]。在甘薯中,通过茎节的上端或下端注射根癌农杆菌,直至菌液从其他针孔或切口处流出,以保证农杆菌被递送至韧皮部,韧皮部的分生组织被感染后再生阳性根或阳性芽,切取再生阳性根或芽,利用茎扦插或块根无性繁殖方式获得再生植株(图1E)^[53]。该方法在甘薯6种不同基因型品种中都具有较高的转化效率(12.5%~37.5%)(表1),表现出基因型不依赖潜力。该方法在马铃薯、月桂草、三七和百合等多种植物均成功获得了转基因植株^[53-54]。在烟草、金鱼草和番茄中,注射农杆菌进行侵染,再生阳性芽效率较低,利用 *Wuschel*(*WUS*)或 *PLETHORAS*(*PLT5*)等发育调控基因协助转化,可显著提高获得转基因阳性芽的效率^[52,55]。在甘薯中比较 RAPID 与传统的组培遗传转化方法,发现 RAPID 转化周期仅需3~10周,组培方法需24~40周,转化周期至少缩短75%;RAPID 转化效率为28%~40%,组培方法则为0.004%~0.2%,转化效率至少提高100倍;可见,RAPID 相比组培方法更简便和高效。相较于CDB只是将农杆菌涂在伤口处,RAPID 的农杆菌在后续共培养过程中再递送至分生组织,且利用注射器施加外压将菌液直接递送至植物分生组织,侵染效果更佳。

1.4 种子侵染法

基因型依赖是植物遗传转化应用于分子育种的主要障碍,尽管在许多物种中已建立了稳定的遗传转化体系,但仅在少数基因型中适用,打破基因型依赖是遗传转化广泛应用于分子育种的前提^[56]。植物种子中的胚包含有初生分生组织,具有发育成完整植株的能力,常作为遗传转化的受体材料^[4]。以萌发种子作外植体的非组培遗传转化方法最早在拟南芥中建立,将萌发的拟南芥种子与农杆菌菌液共同浸泡24 h,将侵染后的种子转移到湿润的蛭石进行培养,可获得转基因植株并收获转基因种子,该方法操作简便且有效避免了漫长的组织培养过程,但其转化效率最高仅有0.32%,显著低于拟南芥浸花法(4%),未成为拟南芥遗传转化的主流方法^[57]。但该方法相较于花器官侵染法不受花发育时期的影响,相较于切-浸-芽方法可应用于再生能力弱的植物。对于大多数通过种子繁殖的植物特别是农作物和经济作物,种子作为遗传转化外植体可以实现大规模

侵染(一次可侵染几千到几万颗种子)^[57],方便构建突变体库,创制大量转基因新种质,培育优良新品种。在菌液浸泡种子时,利用超声波和真空渗透处理可有效提高种子的转化效率,在花生^[58]、大豆^[59]、棉花^[60]和柑橘^[44]等植物中都有应用,且都表现出不受基因型限制的潜力(图1F)。以花生萌发后的半种子(胚和一半胚乳)作为外植体,通过超声处理和真空渗透法结合,显著提高转化效率至31.3%~38.6%(表1),相较于早期拟南芥种子侵染法效率提高100倍左右,且该方法对花生5种基因型均适用,不受基因型限制^[58]。利用该方法在50多个品质优良的商业化大豆品种中进行转化,均获得转基因再生植株,转化效率可达30%左右(表1),充分表明该方法在大豆中不受基因型依赖,可用于遗传改良^[59]。在柠檬、枳壳、甜橙和柚子4个不同基因型的柑橘中,以萌发的种子作为外植体,利用发根农杆菌进行侵染,并抽真空10 min,可获得转基因阳性根,转化效率均高于50%,其中柠檬和柚子的转化效率高达90%以上^[44](表1)。该遗传转化方法在多个物种中都表现出转化效率高和基因型不依赖的特性,被命名为不依赖基因型的转化方法(GIFT)。然而该方法并非适用于所有的物种,例如在单子叶植物玉米^[61]、高粱^[62],以及果树葡萄^[63]中利用未成熟的胚或败育的胚作为外植体,在无外界辅助条件下,仍难获得高效的转化效率。此外,对于高度杂合的植物,后代会出现性状分离,所以不同转基因植株之间的性状分离会影响转基因植物表型分析的准确性。尽管GIFT存在一些弊端,但由于其具有操作简便,转化外植体基数大,不受再生能力和基因型限制等优势,在植物遗传改良和分子育种中具有广泛的应用前景。

1.5 发育调控(DR)基因辅助转化法

尽管依靠植物无性繁殖的特点和自身的强再生能力,在多个物种中建立了非组培遗传转化体系,但自然界仍有许多植物由于再生能力弱,而无法建立高效的非组培遗传转化体系。植物发育调控基因辅助转化,可以打破基因型限制,显著提高了植物的再生能力和转化效率^[55-56,64]。利用发育相关基因辅助转化,许多难转化的单子叶植物或基因型建立了高效稳定的转化体系,例如高粱、水稻和玉米等^[64]。随后,大量发育调控基因被报道可以提高转化效率,包括 *Baby boom* (*BBM*)^[64]、*WUS*^[64]、*WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN 5* (*WOX5*)^[65]、*PTL*^[55]、*isopentenyl transferase* (*ipt*)^[52]、*WOUND INDUCED*

DEDIFFERENTIATION 1 (WIND1)^[55]、*ENHANCED SHOOT REGENERATION (ESR1)*、growth regulator factor-GRF interacting protein (*GRF-GIF*)^[56,61]等。在难转化的玉米自交系中过量表达 *ZmBBM* 和 *ZmWUS*, 成功获得了转基因再生植株, 转化效率超 40%^[64]。在单子叶植株高粱未成熟胚、甘蔗愈伤组织和水稻愈伤组织中异源表达 *ZmBBM* 和 *ZmWUS*, 也可以提高转化效率^[64]。*BBM* 和 *WUS* 单独或同时过表达, 已被广泛应用于多个物种中以提高转化效率, 例如果树葡萄^[63]和禾本科植物画眉草、柳枝稷、美洲千尾草、狐尾草、先锋春小麦、黑麦、大麦等^[66]。过量表达 *WOX5* 可以显著提高苹果和猕猴桃遗传转化再生效率和转化效率^[65]。然而, 持续过表达 *BBM* 和 *WUS2* 会产生叶片扭曲、降低育性等影响植物正常发育的不利性状^[67-68]。为解决以上问题, 可通过切除辅助转化的发育相关基因或将辅助转化的基因和转化的目标基因分别插入不同载体, 筛选获得目标转化基因却不携带辅助转化子的转基因植株^[67], 但以上方法均存在一定随机性和工作量大等问题。而 *GRF-GIF* 嵌合基因或 *GRF5* 在促进遗传转化的同时不会使植物发育异常, 在多个物种中被报道, 包括小麦^[69]、柑橘^[69]、大麻^[70]、高粱^[62]、大豆^[71], 且 *BBM-GRF-GIF (BGG)* 组合在提高玉米转化效率的同时也未引起发育异常^[72]。因此, *GRF-GIF* 嵌合基因具备辅助难转化植物遗传转化的优良属性。以上研究多在组培条件下促进转化效率的提升。在非组培条件下, 将 *WUS2* 与细胞分裂素生物合成基因异戊烯基转移酶 (*ipt*) 组合, 即过量表达 *Wus2-ipt* 组合显著提高烟草再生芽能力^[52] (表 1); 在金鱼草和番茄中, 利用农杆菌在茎尖分生组织处注射携带 *PLT5*、*WIND1* 和 *ESR1* 基因的过量表达载体, 显著促进了伤口部位愈伤组织形成和芽再生^[55]。*PTL5* 在组培条件下促进甘蓝的再生和遗传转化, 以及甜椒体胚的形成, 表明发育调控因子在组培和非组培的应用具有普适性^[55] (表 1), 其他发育调控相关基因也可尝试应用于提高非组培遗传转化效率。

1.6 病毒递送法

病毒递送法是基于 RNA 病毒防御机制开发出来的病毒诱导的基因沉默 (virus induced gene silencing, VIGS), 通过将目的基因序列重组至病毒载体, 递送至植物组织, 引起植物内源同源 mRNA 降解或表观修饰, 诱导植物内源基因沉默, 引起表型变化^[6]。

VIGS 无需组培操作, 可以使用幼苗、叶片、果实等作为受体材料, 通过农杆菌携带病毒载体进入植物组织和细胞并瞬时表达, 在植物中被广泛应用于基因功能瞬时验证^[73-74]。辣椒、桃等转基因顽拗植物目前尚未构建出农杆菌介导的稳定转化体系以获得转基因再生植株, 常采用 VIGS 系统验证基因功能^[73,75]。对于童期长的果树, 研究调控果实品质基因的功能也常采用 VIGS 瞬时验证方法^[76]。病毒递送效率明显高于传统质粒, 但大多数病毒无法感染生殖细胞或分生组织, 因而无法稳定遗传给后代, 仅用于瞬时表达研究。将 *FT (flowering locus T)* 基因融合至烟草脆裂病毒载体 (tobacco rattle virus, TRV) 或棉花叶皱病毒 (cotton leaf crumple virus, CLCrV), 可以引导病毒 RNA 载体移动至顶端分生组织和花器官, 可利用病毒递送法无需经过组织培育即可获得转基因苗^[5,77]。病毒递送相较于二元载体, 其递送效率更高, 不产生外源基因插入, 利用 *FT* 基因辅助转化能产生可遗传变异, 有潜力用于创制非转基因可稳定遗传的基因编辑植株。

2 农杆菌介导非组培遗传转化的影响因素

农杆菌介导的非组培遗传转化具有操作简便、周期短、效率高等特点, 已被广泛应用于基因功能验证和分子育种^[12]。然而, 目前仍有许多物种未建立农杆菌介导的非组培遗传转化体系, 或转化效率较低。农杆菌介导非组培遗传转化体系能否成功主要受外植体、农杆菌、侵染方式和筛选方法等多种因素影响。了解农杆菌介导的非组培遗传转化的影响因素, 将为更多物种建立高效非组培遗传转化体系提供参考。

2.1 外植体类型与状态

非组培遗传转化使用的外植体类型分为生殖器官和营养器官 2 种, 其中花器官侵染法是利用生殖器官并借助有性生殖过程完成转化, 种子侵染法是利用生殖器官但借助发育过程完成转化, 而 CDB、RAPID 和病毒递送都是利用营养器官并借助无性繁殖过程完成转化。用于非组培遗传转化的外植体种类广泛, 包括种子、根、茎 (叶芽分生组织和茎基部)、叶、花和果实等, 一般选择植物再生能力强的器官或部位作为外植体进行农杆菌侵染。浸花法以花器官作为外植体进行农杆菌侵染, 在十字花科植物尤其拟南芥中应用较多, 转化效率 0.1%~4%。以种子作

表1 农杆菌介导的非组培遗传转化效率

Table 1 Efficiency of *Agrobacterium*-mediated non-tissue culture genetic transformation systems

方法 Methods	物种 Species	侵染部位 Infection site	转化效率/% Transformation efficiency	参考文献 References
花器官侵染法 Floral dipping method	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	花 Flower	0.5~3.0	[18-21]
	北方小油菜 <i>Brassica campestris</i>	花 Flower	0.01	[22]
	甘蓝型油菜 <i>Brassica napus</i>	花 Flower	1.0~3.0	[23-24]
	萝卜 <i>Raphanus sativus</i>	花 Flower	1.4	[25]
	芥菜 <i>Brassica juncea</i>	花 Flower	0.4~2.3	[26]
	白菜 <i>Brassica rapa pekinensis</i>	花 Flower	0.1	[27]
	盐芥 <i>Eutrema salsugineum</i>	花 Flower	1.0	[28]
切-浸-芽递送法 Cut-dip-budding delivery method	橡胶草 <i>Taraxacum kok-saghyz</i>	根 Root	40.0~50.0	[12]
	甘薯 <i>Ipomoea batatas</i>	幼苗茎基部 Base of seedling stem	20.0~30.0	[12]
	臭椿 <i>Ailanthus altissima</i>	幼苗茎基部 Base of seedling stem	39.1	[12]
	辽东槲木 <i>Aralia elats</i>	幼苗茎基部 Base of seedling stem	2.0	[12]
极简切-浸-芽法 Extremely simplified cut-dip-budding delivery method	臭茉莉 <i>Clerodendrum chinense</i>	幼苗茎基部 Base of seedling stem	47.6	[12]
	橡胶草 <i>Taraxacum kok-saghyz</i>	根 Root	15.4~25.0	[34]
	地黄 <i>Rehmannia glutinosa</i>	根 Root	11.8~20.0	[34]
	丹参 <i>Salvia miltiorrhiza</i>	叶柄 Petiole	6.42	[34]
切-浸-芽-原位转化法 Cut-dip-bud- in situ delivery method	远志 <i>Polygala tenuifolia</i>	叶柄 Petiole	2.94	[34]
	柚子 <i>Citrus maxima</i>	顶芽 Apical bud	20.41	[49]
依赖再生力的活体注射递送法 Regenerative activity- dependent in planta injection delivery method	甜橙 <i>Citrus sinensis</i>	顶芽 Apical bud	9.1~17.8	[51]
	甘薯 <i>Ipomoea batatas</i>	幼苗茎基部 Base of seedling stem	12.5~37.5	[53]
	马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	幼苗茎基部 Base of seedling stem	10.0~40.0	[53]
种子侵染法 Seed inoculation method	厚藤 <i>Ipomoea pes-caprae</i>	幼苗茎基部 Base of seedling stem	20.0~30.0	[53]
	花生 <i>Arachis hypogaea</i>	种子 Seed	31.3~38.6	[58]
	大豆 <i>Glycine max</i>	种子 Seed	2.0~29.2	[59]
	甜橙 <i>Citrus sinensis</i>	种子 Seed	52.3	[44]
	枳 <i>Poncirus trifoliata</i>	种子 Seed	73.8	[44]
发育调控基因辅助转化法 Developmental regulation gene assisted transformation method	柠檬 <i>Citrus limon</i>	种子 Seed	91.6	[44]
	柚子 <i>Citrus grandis</i>	种子 Seed	90.5	[44]
	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	腋芽 Axillary bud	26.3	[52]
发育调控基因辅助转化法 Developmental regulation gene assisted transformation method	金鱼草 <i>Antirrhinum majus</i>	腋芽伤口 Wound of axillary bud	8.3~9.3	[55]
	番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	腋芽伤口 Wound of axillary bud	10.0~16.6	[55]

为外植体,多选用萌发的种子,并使用超声波和真空渗透处理,转化效率在30%以上^[78]。利用根作为外植体通常使用具有根蘖繁殖能力的植物^[12]。茎是非组培条件遗传转化应用最广泛的外植体之一,利用顶芽、腋芽分生组织和茎基部的再生能力获得转化植株。大豆^[59]和马鞭草^[79]通过顶芽侵染,金鱼草和番茄通过腋芽注射均获得转基因阳性芽^[55],甘薯^[53]和金鱼草^[53]通过腋芽注射获得转基因阳性根。农杆菌侵染茎基部后诱导获得阳性毛状根或不定芽应用最广泛,在多种一年生草本和多年生木本植物中被应用^[12,42,46,48]。利用VIGS进行瞬时转化也常使用

叶片作为外植体,但由于多数叶片分化程度高,再生能力差,难以通过非组培途径获得再生芽或根^[73]。但多肉植物叶片具有强再生能力,自然条件下可进行插叶繁殖,由此建立了以叶片作为外植体的多肉植物非组培遗传转化体系^[36]。外植体类型的选择,主要依据植物繁殖方式,选择分化程度低,再生能力强的器官或组织作为非组培遗传转化的受体材料。对于以有性繁殖为主的粮食作物或经济作物可选择花器官或种子作为外植体,对于以营养繁殖为主的多年生木本或草本植物则可选择根、茎和叶片等营养器官作为外植体。

外植体的生长状态和发育阶段也对转化效率具有重要影响,一般情况下随着植物年龄的增强,植物分裂能力降低,分化程度升高,再生能力发生不可逆减弱,尽管一些外源的刺激或处理可以使植物表现出幼龄期表型,但难以恢复到幼龄期状态^[80]。幼嫩材料具有较好的再生效果,能显著提高植物的再生率。然而幼嫩植物本身对逆境抵抗能力差,因此过于幼嫩的植物受到农杆菌侵染,容易褐化或死亡。因此,选择幼嫩且生活力强的外植作为受体材料尤为重要。例如橡胶草选择播种后3周左右幼苗,甘薯选择块根定植15 d的茎作为遗传转化外植体^[12]。

2.2 菌株类型

植物遗传转化常见的农杆菌类型主要包括根癌农杆菌和发根农杆菌,其中根癌农杆菌有GV3101、EHA105、EHA101、AGL1和LBA4404菌株,发根农杆菌有K599、C85C1、MSU440、Ar. A4、Ar. Qual和Ar.1193菌株。这些菌株在基因型上存在一定差异,对不同物种具有一定的偏好性,侵染效率也有较大差异。甘薯RAPID方法中使用4种根癌农杆菌GV3101、EHA105、EHA101、AGL1和1种发根农杆菌K599分别注射至甘薯茎分生组织,比较发现AGL1菌株转化效率最高可达28%,K599转化效率小于2%^[53]。而采用CDB方法进行的遗传转化都使用K599菌株^[12, 35],在甘薯中转化效率均在90%以上,最高可达100%^[81]。甘薯RAPID法和CDB法均使用了K599菌株,但转化效率却相差极大,表明对于同一个物种,侵染方式和外植体不同,菌株侵染效果也可能存在差异^[12, 35, 53]。目前非组培条件下常用的菌株为K599发根农杆菌菌株,该菌株宿主范围较广、转化效率高。

2.3 菌液浓度和侵染时间

农杆菌菌液浓度过高或侵染时间过长,都会引起细菌过度生长,导致外植体坏死、转化效率降低,但侵染浓度过低或时间过短又会使外植体与农杆菌接触不充分,导致侵染效果变差,因此选择合适的侵染浓度和时间很重要。当菌液悬浮液 $OD_{600\text{nm}}$ 值为0.5时,对甘薯的侵染效果最好,转化效率为25%,而当 $OD_{600\text{nm}}$ 值为0.01时,侵染效果不佳,未获得转基因阳性根^[53]。一般情况下侵染液 $OD_{600\text{nm}}$ 值为0.6~1.0时,侵染效果最佳。侵染时间过长不仅会使农杆菌在外植体中过度残留,也会对植物组织造成损伤,引起细胞坏死;但侵染时间过短,则会导致农杆菌与植物组织接触不完全,转化效率过低。最佳侵染时

间因外植体的类型不同而有所差异,例如柳树叶片外植体的侵染时间为10~20 min时,阳性率最高为41.3%~44.4%,茎段的侵染时间大多在10~30 min;芽苗侵染15 min;种子侵染30 min效果较好^[82]。侵染时间与外植体类型和外植体状态有关,但一般侵染时间在10~30 min时,阳性率较高,且不易造成组织坏死。

2.4 侵染方式

常见的侵染方式包括浸泡、真空渗透、注射、超声损伤和蘸菌法等。以甘薯茎做为外植体,分别尝试浸泡、真空渗透、注射多种方式进行非组培遗传转化,仅注射法获得转基因阳性根^[53]。在传统的组培遗传转化中,浸泡法应用最广泛,将外植体浸泡在农杆菌悬浮液中,操作简便。但该方法侵染时间较长,菌液进入植物细胞效率较低,而且外植体长时间浸泡在农杆菌悬浮液中,容易造成细胞渗透压失衡,出现组织坏死^[52]。为促使菌液进入植物细胞,常采取2种策略,一是通过真空渗透和注射施加外部压力,在杜梨、柑橘和甘薯等植物中使用^[46, 52-53],二是通过超声波处理给植物制造微小伤口,在大豆、棉花和百合中使用^[58-60]。蘸菌法主要利用发根和根癌农杆菌可以在土壤中生存的特点,外植体蘸菌后插入基质,待阳性转化根长出^[12, 35-36, 48]。在实际转化过程中,可以使用单一的侵染方式或采用多种方式结合,减少对植物损伤的同时提高转化效率^[36]。使用CDB遗传转化法,外植体蘸菌处理后插入潮湿的蛭石,每个外植体再浇灌3~5 mL菌液,提高转化效率^[12]。

2.5 筛选方式

转基因阳性组织或器官的筛选方式主要包括抗性基因和可视化基因筛选,常用的抗性基因包括卡那霉素、潮霉素和抗除草剂基因^[83]等;常用的可视化基因主要包括葡萄糖苷酶基因*GUS*、荧光素酶报告基因(*LUC*)、荧光蛋白基因(*GFP*、*RFP*、*mCherry*)和甜菜碱合成酶基因*Ruby*等^[12, 52-53]。在大豆非组培遗传转化过程利用乙酰乳酸合成酶基因(*ALS*)或5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合酶基因(*EPSPS*)作为筛选基因,通过喷施除草剂进行抗性筛选^[59]。尽管抗生素在一定程度上能抑制非阳性组织生长,但抗生素浓度过低对阳性组织筛选效果差,浓度过高抑制植物生长,因此利用抗性基因进行阳性筛选,必须先明确抗生素筛选浓度,且避免出现假阳性现象。为了解决这一问题,可视化报告基因被广泛应用于植物遗传转化筛查。在甘薯中携带*GUS*基因的转基因

阳性根被染成明显的蓝色^[53],在拟南芥和烟草中携带 *LUC* 基因的叶片使用化学试剂涂抹,在化学发光仪下有明显的信号,但 GUS 染色或 LUC 处理后植物组织无法继续生长;转而选择绿色荧光蛋白(GFP)、红色荧光蛋白(RFP 或 mCherry)作为报告基因^[35,54],在相应激发光下,可以看到明显的绿色荧光或红色荧光,该筛选方法对植物组织无损伤,且可以及时去除非阳性组织,避免与阳性组织竞争营养,促进阳性组织生长;且便于统计转化效率和筛选阳性组织,目前大多数载体都会插入 *GFP*、*RFP* 或 *mCherry* 报告基因,用于转基因筛选;该方法在杜梨^[46]、大白菜^[48]、长寿花、玉树以及单子叶虎尾兰^[36]和棉花^[60]等多个物种中得到应用。荧光蛋白做报告基因需荧光灯设备辅助筛选,且有些植物存在自发荧光,干扰实验结果。甜菜碱合成酶基因(*Ruby*)可以合成颜色紫红色的甜菜碱,在遗传转化中用作报告基因,在转化成功的组织或器官表现出肉眼可见的紫红色,该报告基因相比于荧光蛋白,无需荧光灯照射,观察起来更加方便,在甘薯^[12,53]、金鱼草^[55]和番茄^[55]等多个物种被用于构建高效遗传转化体系。利用可视化报告基因筛选遗传转化阳性组织、器官和植株更为简单高效,在植物非组培遗传转化中被大量应用。

3 农杆菌介导的非组培遗传转化在基因编辑中的应用

基因编辑技术在植物中快速发展,高效简便的农杆菌介导的非组培遗传转化被广泛应用于基因编辑^[12,52-53,59]。植物缺失八氢番茄红素脱氢酶基因(*phytoene desaturase, PDS*),表现明显的白化表型,因此在基因编辑体系建立时常采用该基因作为靶基因设计 guide RNA (gRNA);通过观察植物白化现象,分析基因编辑效果,进而构建和优化植物基因编辑体系。携带 *PDS* 基因 gRNA 的编辑载体通过农杆菌介导的高效非组培遗传转化体系 CDB、RAPID 和 GIFT 进行转化,都获得了白化芽或白化苗,且编辑效率可在 T₁ 代中稳定遗传,表明这些高效遗传转化体系能与基因编辑结合创制稳定遗传的新种质^[12,52-53,59]。在菊花中将 CDB 非组培遗传转化与表观基因编辑 CRISPR/dCas9 结合,表观调控花青素合成关键基因 *CmMYB6* 的启动子,实现对菊花花色深浅双向调控^[84]。发育调控基因也被应用于提高基因编辑效率,将 *WUS2-ipt* 构建至携带 *PDS* 基因

gRNA 的 CRISPR-Cas9 载体,侵染烟草叶芽分生组织,再生白化芽,且基因编辑效果能传递给下一代^[52]。*GRF-GIF* 嵌合基因过量表达不引起发育异常表型,在遗传转化中被广泛用于提高转化效率。在组培条件下 *GRF-GIF* 嵌合基因也被重组至基因编辑载体,提高转化效率和编辑效率。大麻^[70]、西瓜^[83]、玉米自交系^[72]、高粱^[62]和 大豆^[71]等植物均已通过该方法获得了基因编辑植株。过表达不引起发育异常的发育调控基因 *GRF-GIF* 有望被应用到更多的植物物种或基因型中,为基因编辑精准创制新种质提供技术支持。

病毒载体递送基因编辑组件获得非转基因的基因编辑植株称为病毒诱导的基因组编辑(virus-induced genome editing, VIGE)。植物病毒载体具有递送效率高、寄主范围广等特点,利用病毒诱导基因沉默在植物基因功能验证中被广泛应用^[74]。传统的病毒载体可以递送小的核酸元件,通常在 1 kb 以内,而 CRISPR-Cas9 骨架大约 4 kb,超过了其容量限制。针对该问题,首先创制出 Cas9 转基因植物,再将 gRNA 重组至病毒载体,递送至 Cas9 转基因植物,进而获得基因编辑植株^[5-6,85]。然而,对于遗传转化效率低的植物,难以创制 Cas9 转基因植物,利用病毒载体直接递送整个 CRISPR-Cas 组件可以有效避免外源基因插入,创制非转基因的基因编辑植株,因此挖掘和开发大容量病毒载体是将病毒载体广泛应用于基因编辑的关键。目前开发的具有较大转运容量的病毒载体有马铃薯 X 病毒(PVX)、大麦黄条纹花叶病毒(BYSMV)、苦苣菜黄网病毒(SYNV)和番茄斑萎病毒(TSWV)等^[86-87]。PVX 是一种弯曲棒状病毒,利用农杆菌介导法将插入 CRISPR-Cas9 组件的 PVX 接种烟草叶片,通过组织培养获得的再生芽 60% 具有编辑效果^[88]。SYNV 和 BYSMV 属于植物负链 RNA 病毒,相较正链 RNA 病毒与 DNA 病毒具有更强大的承载能力和基因稳定性。在烟草中利用 SYNV 和 BYSMV 携带 CRISPR-Cas9 相关组件,实现了烟草基因组编辑^[9]。TSWV 也是天然的大容量病毒载体,其宿主范围广,多达 1 000 多个,在难转化植物辣椒中利用 TSWA 载体携带 CRISPR-Cas9 组件,转化辣椒组培苗,获得的再生植株 77.9% 具有可遗传突变^[8,86]。由于病毒载体难以进入分生组织,目前用病毒载体递送 CRISPR-Cas9 等基因编辑组件多通过组培途径再生基因编辑植株,鉴于 *FT* 基因可协助病毒载体移动至分生组织^[5],利用 *FT* 基因辅助转

化结合大容量病毒载体递送,可以创制非组培、可稳定遗传、非转基因的基因编辑种质。

4 其他非组培遗传转化方法

4.1 花粉管通道法

花粉管通道法主要是利用植物授粉完成后形成花粉管,外源DNA或外源基因顺着花粉管进入不具有细胞壁或细胞壁不完整的胚囊,整合到卵细胞、合子或早期胚胎的转化方式^[89]。1983年花粉管通道法首先在棉花中建立^[89],由于该方法无需建立组培体系且不依赖基因型,在许多物种中被广泛应用,包括草本植物小麦^[90-91]和玉米^[92]以及木本植物月季^[93]、石榴^[93]和茶树^[94]等。花粉管通道法导入外源DNA的方式主要分为3种,花粉粒携带法、子房注射法和柱头切除法^[95]。棉花中主要以子房注射法为主^[96],利用花粉管通道法已培育了大量转基因棉花新品种^[97]。水稻花粉管通道法起步较早,早在1985年利用该方法获得具有紫色颖壳的转基因水稻^[98]。目前该方法在水稻遗传改良中已应用40多年,成功培育出多个具有早熟、晚熟、优质和抗性优良的水稻新品系和新品种。小麦利用花粉管通道法获得了抗虫、叶片衰老延缓和品质改良的转基因材料^[99-100]。在玉米自交系中通过花粉管通道法转化*EPSPS*基因,成功创制耐草甘膦玉米新种质,转化效率为1.03%^[92]。花粉管通道法虽然在多个物种中用于遗传育种,但要求的条件相对严苛,重复性差、效率低,且结果受环境因子影响明显。

4.2 粒子轰击法

粒子轰击又称基因枪,其原理主要是利用高速气体冲击波将表面吸附包含目的基因DNA序列的金粉或钨粉进行射击,使其穿透细胞壁和细胞膜到达细胞核,最终整合至基因组,完成转基因。粒子轰击不受基因型限制,适用的物种范围更广泛,尤其被广泛应用于难转化的禾本作物水稻^[101]、小麦^[102]、玉米^[103]、高粱^[104]和甘蔗^[105]等的遗传改良。粒子轰击介导的遗传转化,常使用愈伤组织、未成熟的胚作为受体材料,通过组织培养过程获得转基因再生植株,在大麦中利用非组培条件下的种子作为外植体进行基因瞬时表达分析^[106],但利用粒子轰击进行非组培条件下的稳定遗传转化鲜有报道。利用粒子轰击递送基因编辑CRISPR/Cpf1或ZFNs骨架至植物组织中已在水稻^[101]和大豆^[107]中被报道。尽管粒子轰击具有不受基因型依赖、操作简便等优点,但是其仍存

在一些缺点,如设备昂贵导致转化成本高、轰击随机性强使转化效率低、且容易对植物组织造成损伤,这些因素都限制了粒子轰击在植物遗传转化中的广泛应用。

4.3 纳米递送法

纳米颗粒在无外力的情况下能穿透植物细胞壁,使其成为外源分子递送的理想材料。纳米材料递送外源分子或者核酸无需外力作用,只需要简单的注射或者喷洒即可实现纳米基因载体的递送和表达,且不受物种限制。近年尝试将纳米材料应用于植物遗传转化领域,在烟草、棉花、水稻等植物中作为核酸载体得以应用^[108]。纳米材料递送外源核酸分子进入植物细胞,不像农杆菌介导一般整合到基因组上遗传给后代,所以常用于瞬时表达荧光蛋白进行亚细胞定位^[109]或者递送小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)^[110]、RNA干扰(RNA interference, RNAi)^[7]和双链RNA(double strand RNA, dsRNA)^[111]等非编码RNA进行转录后基因沉默。利用纳米材料递送CRISPR-Cas基因编辑载体,可在无外源基因插入的情况下,在基因组上进行基因编辑等修饰,并使基因编辑效果稳定遗传给后代,是创制非转基因基因编辑材料的有效手段。在动物细胞中,通过脂质纳米颗粒递送稳定的CRISPR-Cas9核糖核蛋白对肺和肝脏组织中致病的*SFTPC*基因进行编辑,编辑效率高达19%^[112]。利用纳米材料递送CRISPR-Cas组件在植物基因工程领域具有广泛的应用前景。

5 总结与展望

高效稳定的遗传转化和基因编辑技术是分子设计育种的关键,尽管目前已建立了多个高效的非组培遗传转化体系,且在基因编辑中得到应用,但这些方法仍未在多种植物中推广。限制植物遗传转化成功的关键原因有植物再生能力差、递送效率低和农杆菌不敏感等问题。结合目前已有的非组培遗传转化体系,对植物未来选择合适的遗传转化方式进行展望。

针对植物再生能力差的问题,植物细胞都具有发育成完整植株的潜能,但随着植物年龄的增长和分化程度提高,再生能力不断减弱。植物分生组织存在着分生干细胞,这些细胞分化程度低,再生能力强,在遗传转化过程中应充分利用植株分生组织再生能力强这一特点,设计转化方法,例如选择包含

分生组织的茎尖作为外植体,或者利用注射器、真空渗透等方式,将农杆菌渗透至分生组织,以提高转化效率;针对无性繁殖能力强的植物,依据其无性繁殖规律,选择茎基部或根作为受体材料,可以显著提高转化效率。当这2种方式都无法提高转化效率时,可借助发育相关基因辅助遗传转化,特别是持续过量表达不会引起发育缺陷的 *GRF-GIF* 嵌合基因。不同植物发育调控基因促进转化的效果并不一样,可以通过尝试使用多种发育调控基因或组合成不同的嵌合序列进行辅助转化。

针对递送效率低的问题,在植物遗传转化中常使用的质粒是由双链DNA形成的环状双元载体,大小在1 000 kb左右,其递送片段的效果远低于RNA病毒载体,因此选择大容量病毒载体携带基因编辑组件进入植物细胞进行编辑,可有效解决编辑效果差的问题。针对阳性筛选的问题,利用可视化的阳性植物筛选标记例如GFP荧光标记或Ruby等,可以在无损情况下,无需复杂仪器,无损观察转基因效果,便于早期筛选转基因阳性组织。针对农杆菌不敏感型植物,可结合纳米材料递送法和粒子轰击法进行基因型不依赖的遗传转化。综上,通过强再生能力外植体选择、发育基因辅助、病毒载体、可视化筛选编辑、粒子轰击和纳米材料递送等方式,可以有效解决遗传转化困难的问题。未来将高效转基因技术与基因编辑结合,在植物中实现精准分子设计育种。

参考文献 References

- [1] BÉLANGER J G, COPLEY T R, HOYOS-VILLEGAS V, et al. A comprehensive review of in planta stable transformation strategies[J/OL]. *Plant methods*, 2024, 20(1): 79 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1186/s13007-024-01200-8>.
- [2] BENNUR P L, O' BRIEN M, FERNANDO S C, et al. Improving transformation and regeneration efficiency in medicinal plants: insights from other recalcitrant species[J]. *Journal of experimental botany*, 2025, 76(1): 52-75.
- [3] CHEN Z L, DEBERNARDI J M, DUBCOVSKY J, et al. Recent advances in crop transformation technologies[J]. *Nature plants*, 2022, 8(12): 1343-1351.
- [4] HAO S Y, ZHANG Y Y, LI R D, et al. *Agrobacterium*-mediated in planta transformation of horticultural plants: current status and future prospects[J/OL]. *Scientia horticulturae*, 2024, 325: 112693 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1186/s13007-024-01200-8>.
- [5] ELLISON E E, NAGALAKSHMI U, GAMO M E, et al. Multiplexed heritable gene editing using RNA viruses and mobile single guide RNAs[J]. *Nature plants*, 2020, 6(6): 620-624.
- [6] LI T D, HU J C, SUN Y, et al. Highly efficient heritable genome editing in wheat using an RNA virus and bypassing tissue culture[J]. *Molecular plant*, 2021, 14(11): 1787-1798.
- [7] LIU Q, ZHAO C L, SUN K, et al. Engineered biocontainable RNA virus vectors for non-transgenic genome editing across crop species and genotypes[J]. *Molecular plant*, 2023, 16(3): 616-631.
- [8] MA X N, ZHANG X Y, LIU H M, et al. Highly efficient DNA-free plant genome editing using virally delivered CRISPR-Cas9[J]. *Nature plants*, 2020, 6(7): 773-779.
- [9] LAW S S Y, LIOU G, NAGAI Y, et al. Polymer-coated carbon nanotube hybrids with functional peptides for gene delivery into plant mitochondria[J/OL]. *Nature communications*, 2022, 13(1): 2417 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30185-y>.
- [10] ZHU Y T, ZHU X, WEN Y, et al. Plant hairy roots: induction, applications, limitations and prospects[J/OL]. *Industrial crops and products*, 2024, 219: 119104 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.119104>.
- [11] 许智宏, 张宪省, 苏英华, 等. 植物细胞全能性和再生[J]. *中国科学: 生命科学*, 2019, 49(10): 1282-1300. XU Z H, ZHANG X S, SU Y H, et al. Plant cell totipotency and regeneration[J]. *Scientia sinica (vitae)*, 2019, 49(10): 1282-1300 (in Chinese with English abstract).
- [12] CAO X S, XIE H T, SONG M L, et al. Cut-dip-budding delivery system enables genetic modifications in plants without tissue culture[J/OL]. *The innovation*, 2023, 4(1): 100345 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2022.100345>.
- [13] BECHTOLD N, PELLETIER G. In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration[J]. *Methods in molecular biology*, 1998, 82: 259-266.
- [14] ESTRADA-NAVARRETE G, ALVARADO-AFFANTRANGER X, OLIVARES J E, et al. Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*[J]. *Nature protocols*, 2007, 2(7): 1819-1824.
- [15] ZHAN X Q, LU Y M, ZHU J K, et al. Genome editing for plant research and crop improvement[J]. *Journal of integrative plant biology*, 2021, 63(1): 3-33.
- [16] SANG Y L, CHENG Z J, ZHANG X S. iPSCs: a comparison between animals and plants[J]. *Trends in plant science*, 2018, 23(8): 660-666.
- [17] ROEDER A H K, OTEGUI M S, DIXIT R, et al. Fifteen compelling open questions in plant cell biology[J]. *The plant cell*, 2022, 34(1): 72-102.
- [18] SESSIONS A, BURKE E, PRESTING G, et al. A high-throughput *Arabidopsis* reverse genetics system[J]. *The plant*

- cell, 2002, 14(12):2985-2994.
- [19] ALONSO J M, STEPANOVA A N, LEISSE T J, et al. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* [J]. Science, 2003, 301(5633):653-657.
- [20] 李志邈, 张海扩, 曹家树, 等. 拟南芥激活标记突变体库的构建及突变体基因的克隆[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2005, 31(5):499-506. LI Z M, ZHANG H K, CAO J S, et al. Construction of an activation tagging library of *Arabidopsis* and cloning for mutant genes [J]. Acta photophysiological sinica, 2005, 31(5):499-506 (in Chinese with English abstract).
- [21] CHUNG M H, CHEN M K, PAN S M. Floral spray transformation can efficiently generate *Arabidopsis* transgenic plants [J]. Transgenic research, 2000, 9(6):471-476.
- [22] LIU F, CAO M Q, YAO L, et al. In planta transformation of Pakchoi (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis*) by infiltration of adult plants with *Agrobacterium* [J]. Acta horticulturae, 1998(467):187-192.
- [23] WANG W C, MENON G, HANSEN G. Development of a novel *Agrobacterium*-mediated transformation method to recover transgenic *Brassica napus* plants [J]. Plant cell reports, 2003, 22(4):274-281.
- [24] LI J, TAN X L, ZHU F G, et al. A rapid and simple method for *Brassica napus* floral-dip transformation and selection of transgenic plantlets [J]. International journal of biology, 2010, 2(1):127-131.
- [25] CURTIS I S, NAM H G. Transgenic radish (*Raphanus sativus* L. *longipinnatus* Bailey) by floral-dip method: plant development and surfactant are important in optimizing transformation efficiency [J]. Transgenic research, 2001, 10(4):363-371.
- [26] 代法国, 胡宗利, 陈国平, 等. 一种获得转基因芥菜的简便方法 [J]. 生命科学研究, 2011, 15(1):19-23. DAI F G, HU Z L, CHEN G P, et al. A simple method to obtain transgenic mustard [J]. Life science research, 2011, 15(1):19-23 (in Chinese with English abstract).
- [27] GAO Y, REN X L, RUAN S L, et al. Genetic transformation of chinese cabbage (*Brassica rapa pekinensis*) with floral-dip method [J]. Agricultural biotechnology, 2012, 1(4):22-24.
- [28] BRESSAN R A, ZHANG C, ZHANG H, et al. Learning from the *Arabidopsis* experience: the next gene search paradigm [J]. Plant physiology, 2001, 127(4):1354-1360.
- [29] AGARWAL S, LOAR S, STEBER C, et al. Floral transformation of wheat [J]. Methods in molecular biology, 2009, 478:105-113.
- [30] ZALE J M, AGARWAL S, LOAR S, et al. Evidence for stable transformation of wheat by floral dip in *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant cell reports, 2009, 28(6):903-913.
- [31] 王翠艳, 丁东风, 于晓菊, 等. Floral dip法在大豆遗传转化中的应用研究 [J]. 南开大学学报(自然科学版), 2010, 43(1):34-38. WANG C Y, DING D F, YU X J, et al. Application of floral dip on the transformation of soybean [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis, 2010, 43(1):34-38 (in Chinese with English abstract).
- [32] TRIEU A T, BURLEIGH S H, KARDAILSKY I V, et al. Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium* [J]. The plant journal, 2000, 22(6):531-541.
- [33] HAYTA S, SMEDLEY M A, LI J H, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation systems of *Primula vulgaris* [J/OL]. Plant methods, 2018, 14: 93 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0360-1>.
- [34] CAO X S, XIE H T, SONG M L, et al. Extremely simplified cut-dip-budding method for genetic transformation and gene editing in *Taraxacum kok-saghyz* [J/OL]. The innovation life, 2023, 1(3):100040 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.59717/j.xinn-life.2023.100040>.
- [35] CAO X S, XIE H T, SONG M L, et al. Simple method for transformation and gene editing in medicinal plants [J]. Journal of integrative plant biology, 2024, 66(1):17-19.
- [36] LU J H, LI S S, DENG S, et al. A method of genetic transformation and gene editing of succulents without tissue culture [J]. Plant biotechnology journal, 2024, 22(7):1981-1988.
- [37] 宋洪英, 谢响明, 刘忠华, 等. 农杆菌介导的紫茎泽兰遗传转化研究 [J]. 生物技术通报, 2010, 26(7):153-156. SONG H Y, XIE X M, LIU Z H, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of *Eupatorium adenophorum* spreng [J]. Biotechnology bulletin, 2010, 26(7):153-156 (in Chinese with English abstract).
- [38] 余晓敏, 王亚琴, 刘雨茵, 等. 根癌农杆菌介导万寿菊遗传转化体系的建立 [J]. 植物学报, 2023, 58(5):760-769. YU X M, WANG Y Q, LIU Y H, et al. Establishment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation system of marigold (*Tagetes erecta*) [J]. Chinese bulletin of botany, 2023, 58(5):760-769 (in Chinese with English abstract).
- [39] 陈赢男, 胡传景, 诸葛强, 等. 杨树农杆菌遗传转化研究30年 [J]. 林业科学, 2022, 58(12):114-129. CHEN Y N, HU C J, ZHUGE Q, et al. Thirty years of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Populus* [J]. Scientia silvae sinicae, 2022, 58(12):114-129 (in Chinese with English abstract).
- [40] 周义杰, 姜梦嫣, 闫希焕, 等. 枣树遗传转化研究进展 [J]. 北京农学院学报, 2019, 34(1):107-112. ZHOU Y J, JIANG M Y, YAN X H, et al. Progress on genetic transformation of jujube [J]. Journal of Beijing University of Agriculture, 2019, 34(1):107-112 (in Chinese with English abstract).
- [41] 许德荣. T4溶菌酶基因的遗传转化及作为选择标记基因的研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2010. XU D R. Studies on T4 lysozyme gene genetic transformation and its potential as a selection marker gene [D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2010 (in Chinese with English abstract).
- [42] XIAO Y X, DUTT M, MA H J, et al. Establishment of an efficient root mediated genetic transformation method for gene

- function verification in *Citrus* [J/OL]. *Scientia horticulturae*, 2023, 321: 112298 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112298>.
- [43] MA H J, MENG X Y, XU K, et al. Highly efficient hairy root genetic transformation and applications in *Citrus* [J/OL]. *Frontiers in plant science*, 2022, 13: 1039094 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1039094>.
- [44] WANG M, QIN Y Y, WEI N N, et al. Highly efficient *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root transformation in citrus seeds and its application in gene functional analysis [J/OL]. *Frontiers in plant science*, 2023, 14: 1293374 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1293374>.
- [45] XU S L, LAI E H, ZHAO L, et al. Development of a fast and efficient root transgenic system for functional genomics and genetic engineering in peach [J/OL]. *Scientific reports*, 2020, 10 (1) : 2836 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59626-8>.
- [46] XIAO Y X, ZHANG S C, LIU Y, et al. Efficient *Agrobacterium*-mediated genetic transformation using cotyledons, hypocotyls and roots of 'Duli' (*Pyrus betulifolia* Bunge) [J/OL]. *Scientia horticulturae*, 2022, 296: 110906 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.110906>.
- [47] ALAGARSAMY K, SHAMALA L F, WEI S. Protocol: high-efficiency *in-planta* *Agrobacterium*-mediated transgenic hairy root induction of *Camellia sinensis* var. *sinensis* [J/OL]. *Plant methods*, 2018, 14: 17 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0285-8>.
- [48] WANG H Y, ZHENG Y S, ZHOU Q, et al. Fast, simple, efficient *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation system to non-heading Chinese cabbage with transgenic roots [J]. *Horticultural plant journal*, 2024, 10(2) : 450-460.
- [49] ZHANG Y Y, ZHANG D M, ZHONG Y, et al. A simple and efficient *in-planta* transformation method for pommelo (*Citrus maxima*) using *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Scientia horticulturae*, 2017, 214: 174-179.
- [50] JAGANATH B, SUBRAMANYAM K, MAYAVAN S, et al. An efficient *in-planta* transformation of *Jatropha curcas* (L.) and multiplication of transformed plants through *in vivo* grafting [J]. *Protoplasma*, 2014, 251(3) : 591-601.
- [51] 谢幸男, 杨莉, 刘范, 等. '伏令夏橙' 原位转化体系的建立及优化 [J]. *园艺学报*, 2020, 47(1) : 111-119. XIE X N, YANG L, LIU F, et al. Establishment and optimization of Valencia sweet orange in *in-planta* transformation system [J]. *Acta horticulturae sinica*, 2020, 47(1) : 111-119 (in Chinese with English abstract).
- [52] MAHER M F, NASTI R A, VOLLBRECHT M, et al. Plant gene editing through *de novo* induction of meristems [J]. *Nature biotechnology*, 2020, 38(1) : 84-89.
- [53] MEI G G, CHEN A, WANG Y R, et al. A simple and efficient *in-planta* transformation method based on the active regeneration capacity of plants [J/OL]. *Plant communications*, 2024, 5 (4) : 100822 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2024.100822>.
- [54] DENG J, LI W Y, LI X M, et al. A fast, efficient, and tissue-culture-independent genetic transformation method for *Panax notoginseng* and *Lilium regale* [J/OL]. *Plants*, 2024, 13(17) : 2509 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.3390/plants13172509>.
- [55] LIAN Z Y, NGUYEN C D, LIU L, et al. Application of developmental regulators to improve *in-planta* or *in vitro* transformation in plants [J]. *Plant biotechnology journal*, 2022, 20(8) : 1622-1635.
- [56] MAREN N A, DUAN H, DA K D, et al. Genotype-independent plant transformation [J/OL]. *Horticulture research*, 2022, 9: uhac047 [2025-01-17]. <http://doi.org/10.1093/hr/uhac047>.
- [57] FELDMANN K A, DAVID MARKS M. *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: a non-tissue culture approach [J]. *Molecular and general genetics* MGG, 1987, 208(1) : 1-9.
- [58] KARTHIK S, PAVAN G, SATHISH S, et al. Genotype-independent and enhanced *in-planta* *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of peanut [*Arachis hypogaea* (L.)] [J/OL]. *3 biotech*, 2018, 8(4) : 202 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1231-1>.
- [59] ZHONG H, LI C B, YU W J, et al. A fast and genotype-independent *in-planta* *Agrobacterium*-mediated transformation method for soybean [J/OL]. *Plant communications*, 2024, 5 (12) : 101063 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2024.101063>.
- [60] GE X Y, XU J T, YANG Z E, et al. Efficient genotype-independent cotton genetic transformation and genome editing [J]. *Journal of integrative plant biology*, 2023, 65(4) : 907-917.
- [61] HOERSTER G, WANG N, RYAN L, et al. Use of non-integrating *Zm-Wus2* vectors to enhance maize transformation [J]. *In vitro cellular & developmental biology-plant*, 2020, 56(3) : 265-279.
- [62] LI J P, PAN W B, ZHANG S, et al. A rapid and highly efficient *Sorghum* transformation strategy using GRF4-GIF1/ternary vector system [J]. *The plant journal*, 2024, 117(5) : 1604-1613.
- [63] ZHAO H X, XIE Y P, ZHENG Q L, et al. A simple and efficient non-tissue culture method for genetic transformation of grape immature zygotic embryos via *VvBBM* overexpression [J/OL]. *Scientia horticulturae*, 2024, 337: 113581 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2024.113581>.
- [64] LOWE K, WU E, WANG N, et al. Morphogenic regulators *Baby boom* and *Wuschel* improve monocot transformation [J]. *The plant cell*, 2016, 28(9) : 1998-2015.
- [65] LIU L, QU J H, WANG C Y, et al. An efficient genetic transformation system mediated by *Rhizobium rhizogenes* in fruit trees based on the transgenic hairy root to shoot conversion [J].

- Plant biotechnology journal, 2024, 22(8):2093-2103.
- [66] WANG N, RYAN L, SARDESAI N, et al. Leaf transformation for efficient random integration and targeted genome modification in maize and sorghum [J]. Nature plants, 2023, 9(2): 255-270.
- [67] AREGAWI K, SHEN J Q, PIERROZ G, et al. Morphogene-assisted transformation of *Sorghum bicolor* allows more efficient genome editing [J]. Plant biotechnology journal, 2022, 20(4):748-760.
- [68] WANG N, ARLING M, HOERSTER G, et al. An efficient gene excision system in maize [J/OL]. Frontiers in plant science, 2020, 11: 1298 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01298>.
- [69] DEBERNARDI J M, TRICOLI D M, ERCOLI M F, et al. A GRF-GIF chimeric protein improves the regeneration efficiency of transgenic plants [J]. Nature biotechnology, 2020, 38(11):1274-1279.
- [70] ZHANG X Y, XU G C, CHENG C H, et al. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in Hemp (*Cannabis sativa* L.) [J]. Plant biotechnology journal, 2021, 19(10): 1979-1987.
- [71] ZHAO Y, CHENG P, LIU Y, et al. A highly efficient soybean transformation system using GRF3-GIF1 chimeric protein [J]. Journal of integrative plant biology, 2025, 67(1):3-6.
- [72] CHEN Z, DEBERNARDI J M, DUBCOVSKY J, et al. The combination of morphogenic regulators BABY BOOM and GRF-GIF improves maize transformation efficiency [DB/OL]. bioRxiv, 2022 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1101/2022.09.02.50637>.
- [73] CHENG J, SHAO Y, HU X Y, et al. A simple and efficient gene functional analysis method for studying the growth and development of peach seedlings [J/OL]. Horticulture research, 2024, 11(7): uhae155 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1093/hr/uhae155>.
- [74] BURCH-SMITH T M, ANDERSON J C, MARTIN G B, et al. Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants [J]. The plant journal, 2004, 39(5):734-746.
- [75] BAEK W, BAE Y, LIM C W, et al. Pepper homeobox abscisic acid signalling-related transcription factor 1, CaHAT1, plays a positive role in drought response [J]. Plant, cell & environment, 2023, 46(7):2061-2077.
- [76] WANG W, LIU S H, CHENG X, et al. Ethylene and polyamines form a negative feedback loop to regulate peach fruit ripening *via* the transcription factor PpeERF113 by regulating the expression of PpePAO1 [J/OL]. Postharvest biology and technology, 2022, 190: 111958 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.111958>.
- [77] LEI J F, DAI P H, LI Y, et al. Heritable gene editing using FT mobile guide RNAs and DNA viruses [J/OL]. Plant methods, 2021, 17(1): 20 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1186/s13007-021-00719-4>.
- [78] SUBRAMANYAM K, RAJESH M, JAGANATH B, et al. Assessment of factors influencing the *Agrobacterium*-mediated in planta seed transformation of brinjal (*Solanum melongena* L.) [J]. Applied biochemistry and biotechnology, 2013, 171(2):450-468.
- [79] LU J H, LU S H, SU C L, et al. Tissue culture-free transformation of traditional Chinese medicinal plants with root suckering capability [J/OL]. Horticulture research, 2023, 11(2): uhad290 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1093/hr/uhad290>.
- [80] YE B B, ZHANG K, WANG J W. The role of miR156 in rejuvenation in *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of integrative plant biology, 2020, 62(5):550-555.
- [81] ZHANG W, ZUO Z D, ZHU Y X, et al. Fast track to obtain heritable transgenic sweet potato inspired by its evolutionary history as a naturally transgenic plant [J]. Plant biotechnology journal, 2023, 21(4):671-673.
- [82] YANG J L, YI J, YANG C P, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of *Salix matsudana* Koidz. using mature seeds [J]. Tree physiology, 2013, 33(6): 628-639.
- [83] FENG Q, XIAO L, HE Y Z, et al. Highly efficient, genotype-independent transformation and gene editing in watermelon (*Citrullus lanatus*) using a chimeric *CIGRF4-GIF1* gene [J]. Journal of integrative plant biology, 2021, 63(12):2038-2042.
- [84] LI X Q, BU F Q, ZHANG M, et al. Enhancing nature's palette through the epigenetic breeding of flower color in *Chrysanthemum* [J]. New phytologist, 2025, 245(5):2117-2132.
- [85] LEE H J, BAIK J E, KIM K N. Development of an efficient and heritable virus-induced genome editing system in *Solanum lycopersicum* [J/OL]. Horticulture research, 2024: uhae364 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1093/hr/uhae364>.
- [86] ZHAO C L, LOU H H, LIU Q, et al. Efficient and transformation-free genome editing in pepper enabled by RNA virus-mediated delivery of CRISPR/Cas9 [J]. Journal of integrative plant biology, 2024, 66(10):2079-2082.
- [87] ZHANG C, LIU S H, LI X, et al. Virus-induced gene editing and its applications in plants [J/OL]. International journal of molecular sciences, 2022, 23(18): 10202 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.3390/ijms231810202>.
- [88] ARIGA H, TOKI S, ISHIBASHI K. Potato virus X vector-mediated DNA-free genome editing in plants [J]. Plant & cell physiology, 2020, 61(11):1946-1953.
- [89] ZHOU G Y, WENG J, ZENG Y S, et al. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos [J]. Methods in enzymology, 1983, 101:433-481.
- [90] 叶兴国, 徐惠君, 杜丽璞, 等. 小麦规模化转基因技术体系构建及其应用 [J]. 中国农业科学, 2014, 47(21):4155-4171.

- YE X G, XU H J, DU L P, et al. Establishment and application of large-scale transformation systems in wheat [J]. *Scientia agricultura sinica*, 2014, 47 (21) : 4155-4171 (in Chinese with English abstract).
- [91] 于美,唐华丽,叶兴国. 利用转基因技术和基因编辑技术改良小麦进展[J]. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(1): 102-116. YU M, TANG H L, YE X G. Progresses on wheat improvement by using transgenic and genome editing technologies [J]. *Journal of plant genetic resources*, 2023, 24 (1) : 102-116 (in Chinese with English abstract).
- [92] 李向龙,郑登俞,张春,等. 花粉管通道法转EPSPS基因创制耐草甘膦玉米种质[J]. *福建农业学报*, 2023, 38(5) : 524-529. LI X L, ZHENG D Y, ZHANG C, et al. Glyphosate-tolerant maize plants generated by pollen tube pathway method [J]. *Fujian journal of agricultural sciences*, 2023, 38(5) : 524-529 (in Chinese with English abstract).
- [93] 唐丽颖,陈利娜,敬丹,等. 采用花粉管通道法遗传转化月季石榴的研究[J]. *江西农业学报*, 2021, 33(3) : 17-24. TANG L Y, CHEN L N, JING D, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of dwarf pomegranate (*Punica granatum*) by pollen tube pathway method [J]. *Acta agriculturae Jiangxi*, 2021, 33(3) : 17-24 (in Chinese with English abstract).
- [94] 李玲玲,江昌俊,房婉萍,等. 花粉管通道法对茶树进行dsTCS基因转化的初步研究[J]. *安徽农业大学学报*, 2007, 34(1) : 20-22. LI L L, JIANG C J, FANG W P, et al. Transform of dsTCS into tea plant (*Camellia sinensis*) by pollen-tube pathway [J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2007, 34(1) : 20-22 (in Chinese with English abstract).
- [95] 陈彦. 花粉管通道导入外源DNA方法的研究[J]. *北方园艺*, 2010(13) : 226-228. CHEN Y. Study on techniques of introduction of exogenous DNA into plants via pollen tube pathway [J]. *Northern horticulture*, 2010 (13) : 226-228 (in Chinese with English abstract).
- [96] 马盾,黄乐平,黄全生,等. 提高棉花花粉管通道法转化率的研究[J]. *西北农业学报*, 2005, 14(1) : 10-12. MA D, HUANG L P, HUANG Q S, et al. Study on improvement of pollen tube pathway transformation efficiency through field concrete operation [J]. *Acta agriculturae boreali-occidentalis sinica*, 2005, 14(1) : 10-12 (in Chinese with English abstract).
- [97] 刘传亮,田瑞平,孔德培,等. 棉花规模化转基因技术体系构建及其应用[J]. *中国农业科学*, 2014, 47(21) : 4183-4197. LIU C L, TIAN R P, KONG D P, et al. Establishment and application of efficient transformation system for cotton [J]. *Scientia agricultura sinica*, 2014, 47 (21) : 4183-4197 (in Chinese with English abstract).
- [98] 段晓岚,陈善葆. 外源DNA导入水稻引起性状变异[J]. *中国农业科学*, 1985, 18(3) : 6-10. DUAN X L, CHEN S B. Variation of the characters in rice (*Oryza sativa*) induced by foreign DNA uptake [J]. *Scientia agricultura sinica*, 1985, 18(3) : 6-10 (in Chinese with English abstract).
- [99] 奚亚军,林拥军,张启发,等. 利用花粉管通道法将叶片衰老抑制基因P_{SAG12}-IPT导入普通小麦的研究[J]. *作物学报*, 2004, 30(6) : 608-612. XI Y J, LIN Y J, ZHANG Q F, et al. Studies on introduction of leaf senescence-inhibition gene P_{SAG12}-IPT into common wheat through pollen-tube pathway [J]. *Acta agronomica sinica*, 2004, 30 (6) : 608-612 (in Chinese with English abstract).
- [100] 侯文胜,郭三堆,路明. 利用花粉管通道法将cryIa基因导入小麦[J]. *作物学报*, 2003, 29(6) : 806-809. HOU W S, GUO S D, LU M. Development of transgenic wheat with a synthetic insecticidal crystal protein gene via pollen-tube pathway [J]. *Acta agronomica sinica*, 2003, 29 (6) : 806-809 (in Chinese with English abstract).
- [101] BEGEMANN M B, GRAY B N, JANUARY E, et al. Precise insertion and guided editing of higher plant genomes using Cpf1 CRISPR nucleases [J/OL]. *Scientific reports*, 2017, 7 (1) : 11606 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11760-6>.
- [102] DUAN X L, HOU Q L, LIU G Y, et al. Expression of *Pinelia pedatisecta* lectin gene in transgenic wheat enhances resistance to wheat aphids [J/OL]. *Molecules*, 2018, 23 (4) : 748 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.3390/molecules23040748>.
- [103] DU H W, SHEN X M, HUANG Y Q, et al. Overexpression of *Vitreoscilla* hemoglobin increases waterlogging tolerance in *Arabidopsis* and maize [J/OL]. *BMC plant biology*, 2016, 16:35 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0728-1>.
- [104] BELIDE S, VANHERCKE T, PETRIE J R, et al. Robust genetic transformation of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) using differentiating embryogenic callus induced from immature embryos [J/OL]. *Plant methods*, 2017, 13: 109 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0260-9>.
- [105] GAO S W, YANG Y Y, WANG C F, et al. Transgenic sugarcane with a *cryIaC* gene exhibited better phenotypic traits and enhanced resistance against sugarcane borer [J/OL]. *PLoS One*, 2016, 11 (4) : e0153929 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153929>.
- [106] ZHANG L Y, GU L K, RINGLER P, et al. Three WRKY transcription factors additively repress abscisic acid and gibberellin signaling in aleurone cells [J]. *Plant science*, 2015, 236: 214-222.
- [107] BONAWITZ N D, AINLEY W M, ITAYA A, et al. Zinc finger nuclease-mediated targeting of multiple transgenes to an endogenous soybean genomic locus via non-homologous end joining [J]. *Plant biotechnology journal*, 2019, 17(4) : 750-761.
- [108] DEMIRER G S, ZHANG H, MATOS J L, et al. High aspect ratio nanomaterials enable delivery of functional genetic material without DNA integration in mature plants [J]. *Nature nanotechnology*, 2019, 14(5) : 456-464.

- [109] THAGUN C, CHUAH J A, NUMATA K. Targeted gene delivery into various plastids mediated by clustered cell-penetrating and chloroplast-targeting peptides [J/OL]. *Advanced science*, 2019, 6 (23) : 1902064 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1002/advs.201902064>.
- [110] WANG B, HUANG J, ZHANG M L, et al. Carbon dots enable efficient delivery of functional DNA in plants [J]. *ACS applied bio materials*, 2020, 3(12):8857-8864.
- [111] MITTER N, WORRALL E A, ROBINSON K E, et al. Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses [J/OL]. *Nature plants*, 2017, 3:16207 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.207>.
- [112] CHEN K, HAN H S, ZHAO S, et al. Lung and liver editing by lipid nanoparticle delivery of a stable CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein [J/OL]. *Nature biotechnology*, 2024: 1-32 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1038/s41587-024-02437-3>.

Genetic transformation system of plants with non-tissue culture and its application

FENG Mengqi¹, WANG Ruoyu¹, SIMA Lu¹, JIANG Nan², ZHAI Xiaoqiao³, ZHAO Zhenli¹, FAN Guoqiang¹

1. College of Forestry, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, China;

2. Institute of Non-timber Forestry, Chinese Academy of Forestry Sciences, Zhengzhou 450003, China;

3. Henan Academy of Forestry Sciences, Zhengzhou 450002, China

Abstract The efficient and stable genetic transformation system of plants is an important technical support for the analysis of gene function and molecular breeding. However, the imperfect tissue culture system seriously hinders its application in many plants, especially in crops. In recent years, many efficient genetic transformation systems of plants with non-tissue culture have been established to solve the problems mentioned above. This article focuses on the genetic transformation system of plants with non-tissue culture mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in terms of the current status of application, factors affecting transformation efficiency, and applications of gene editing with flower organ infection, cut-dip-budding (CDB) delivery, regenerative activity dependent in plant injection delivery (RAPID), seed inoculation, development regulatory (DR) assisted transformation, and virus delivery in plants. The application of pollen tube channel method, particle bombardment method and nano delivery method in plants independent of *Agrobacterium tumefaciens* was summarized. It will provide reference for establishing efficient, simple and genotype-independent genetic transformation system with non-tissue culture in more species and assisting the studies on plant functional genes and the practices of molecular breeding.

Keywords genetic transformation system of plant; non-tissue culture; *Agrobacterium*; gene editing; genotype independent

(责任编辑:葛晓霞)