

引用格式: 李娇娇, 王晓光, 白梦岚, 等. 农杆菌介导的植物非组培遗传转化技术研究进展[J]. 浙江农林大学学报, 2025, 42(5): 888–897. LI Jiaojiao, WANG Xiaoguang, BAI Menglan, *et al.* Research progress on *Agrobacterium*-mediated genetic transformation technology of plant non-tissue culture[J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2025, 42(5): 888–897.

农杆菌介导的植物非组培遗传转化技术研究进展

李娇娇¹, 王晓光², 白梦岚¹, 侯小改¹, 郭丽丽¹

(1. 河南科技大学 农学院/牡丹学院, 河南 洛阳 471000; 2. 洛阳市园林绿化中心, 河南 洛阳 471000)

摘要: 植物遗传转化技术是现代植物基因功能研究以及分子育种方面的关键手段。然而, 运用传统方法开展遗传转化对植物组织培养的依赖性极强, 另外还存在明显的基因型限制等问题。农杆菌 *Agrobacterium* 介导的非组培遗传转化技术, 因操作简便易行、不需要经历脱分化及再生等优势渐渐在多种植物中应用。本研究较为系统地梳理了农杆菌介导遗传转化的基本原理及非组培转化的各种方法, 包含了种子介导法、花器官转化法、活体注射递送法、切割-浸渍-出芽法、电穿孔法、病毒递送法等; 还总结了其他非组培遗传转化方法, 如纳米载体辅助递送法、发育调控因子辅助转化法、花粉管介导法、病毒载体介导法。通过对不同方法的应用实例、转化效率、优缺点以及适用植物进行比较, 较为清晰地展现非组培转化体系在提升遗传转化效率、拓宽物种适用范围、降低转化技术要求等方面所拥有的潜力, 以期建立高效、稳定且普适性强的植物非组培遗传转化体系提供理论参考及技术支持。表 2 参 71

关键词: 非组培; 根癌农杆菌; 遗传转化; 综述

中图分类号: S722 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2025)05-0888-10

Research progress on *Agrobacterium*-mediated genetic transformation technology of plant non-tissue culture

LI Jiaojiao¹, WANG Xiaoguang², BAI Menglan¹, HOU Xiaogai¹, GUO Lili¹

(1. College of Agriculture/Tree Peony, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, Henan, China;

2. Luoyang Landscape and Greening Center, Luoyang 471000, Henan, China)

Abstract: Plant genetic transformation technology is a key means in modern plant gene function research and molecular breeding. However, the use of traditional methods for genetic transformation is highly dependent on plant tissue culture, and there are obvious genotype limitations and other problems. *Agrobacterium*-mediated non-tissue culture genetic transformation technology has emerged as a new form, which is gradually applied in a variety of plants due to its simple operation and no need to undergo dedifferentiation and regeneration. This paper systematically sorts out the basic principles of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and various methods of non-tissue culture transformation, including seed-mediated method, flower organ transformation method, living injection delivery method, cutting-impregnation-budding method, virus delivery method, electroporation method, etc. Other non-tissue culture genetic transformation methods independent of *Agrobacterium* were also summarized, including nanoparticle-assisted delivery, developmental regulator-assisted transformation, pollen tube-mediated transformation, and viral vector-mediated transformation. By comparing application examples, transformation efficiencies, advantages and disadvantages, and suitable plant species across different methods, it clearly demonstrates the potential of non-tissue-culture transformation

收稿日期: 2025-08-12; 修回日期: 2025-09-10

基金项目: 河南省中药产业技术体系 (2024-23)

作者简介: 李娇娇 (ORCID: 0009-0006-2991-4721), 从事牡丹芍药组织培养及遗传转化研究。E-mail: 18439400256@163.com。通信作者: 郭丽丽 (ORCID: 0009-0000-4893-0213), 教授, 博士, 从事牡丹高效培育与产业化研究。E-mail: guolili@haust.edu.cn

systems in enhancing genetic transformation efficiency, broadening the range of applicable species, and lowering the technical barriers required for transformation. The purpose is to provide corresponding theoretical reference and technical support for the establishment of efficient, stable and universal plant non-tissue culture genetic transformation. [Ch, 2 tab. 71 ref.]

Key words: non-tissue culture; *Agrobacterium*; genetic transformation; review

遗传转化技术作为植物遗传改良的核心手段，在基因功能研究、基因编辑及分子育种等领域发挥着重要作用。该技术通过将外源基因整合到植物基因组，赋予植物新性状，为缓解全球粮食需求压力和促进环境可持续发展提供关键技术支撑^[1-2]。然而，传统遗传转化技术高度依赖植物组织培养体系，导致在多数植物种类和特定基因型中面临转化率低、植株再生困难等技术问题，严重限制了该技术的广泛应用^[3]。

农杆菌 *Agrobacterium* 介导的遗传转化技术因其外源基因整合稳定、拷贝数少、表达稳定等优势，已成为植物转基因研究的主流手段^[4]。与基因枪法相比，该技术成本低廉，对受体细胞损伤较小且生物安全性高，在双子叶植物研究中展现出较为明显的适用性^[5]。但该技术对植物组培技术依赖性较高，脱分化、再分化等各个环节都需要对植物激素配比、培养基成分以及培养环境等进行精准调控^[6]。在构建玉米 *Zea mays* 转化体系时，常因组织培养阶段出现阻滞，使整体耗时长且转化效率低^[7]。在组培过程中易发生体细胞变异，造成材料基因型前后差异，进而影响侵染效率及后续再生过程^[8]。在转化体系相对成熟的物种中，再生和侵染效率依然是制约整体转化能否成功的瓶颈。在大豆 *Glycine max* 的离体培养中常因不定芽分化、根系发育异常，转基因植株获得率较低^[9]。胡欢等^[10]研究指出：许多优良粳稻品种因再生能力差而导致整体转化效率下降。近年来，农杆菌介导的植物非组培遗传转化已然取得了颇为显著的进展，该技术核心优势在于能够针对活体植株的不同器官（如种子^[11]）进行转化，避免了繁琐的组培过程^[12]，展现出良好的应用前景。鉴于此，本研究对农杆菌介导及其他非组培遗传转化技术进行了综述，以期能为植物遗传转化的理论研究及实践应用提供科学依据。

1 农杆菌介导遗传转化的基本原理

农杆菌属根瘤菌科 Rhizobiaceae，是一类在土壤中广泛存在的革兰氏阴性细菌，具有独特的感染特性^[13]。根据质粒类型不同，农杆菌主要包括根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 与发根农杆菌 *Agrobacterium rhizogenes*，两者分别携带 Ti 质粒与 Ri 质粒。两者质粒均存在一段可转移的 DNA，即 T-DNA。以根癌农杆菌的 Ti 质粒为例，其功能核心区域由 T-DNA 区与 Vir 区组成^[13]。T-DNA 长度大多为 12~24 kb，两端各有一段长 25 bp 的直接重复边界序列，该特殊结构使根癌农杆菌在侵染植物细胞时能够被精准切割、转移并整合到植物基因组中。重要的是，T-DNA 区含有致瘤基因可被外源目的基因替换，从而为植物遗传转化提供操作靶点^[14]。Vir 区独立于 T-DNA 区，占据约 35 kb，虽然 Vir 区不能被转移到植物细胞内，但它编码的一系列蛋白（如 VirD2、VirE2）在 T-DNA 切割、转移及整合的过程中发挥着重要作用。

农杆菌介导的遗传转化过程属于复杂的生物学过程。首先，当植物受伤时，伤口细胞会释放出乙酰丁香酮 (acetosyringone) 等酚类化合物及糖类物质，这些物质能够吸引农杆菌朝受伤部位聚集，并促使其附着植物细胞表面^[13]。在这些信号分子的诱导下，农杆菌的 VirA 蛋白作为受体与之结合并发生磷酸化，随后将磷酸基团传递给 VirG 蛋白使其磷酸化并被激活。被激活的 VirG 蛋白启动 Vir 区一系列基因的表达活动。其中，由 VirD1 和 VirD2 蛋白形成的复合物能够将 T-DNA 两端的边界序列识别并切割，产生一条单链 T-DNA，即 T-链。T-链的 5'端与 VirD2 蛋白共价结合，在 VirE2 等蛋白的包裹下共同构成 T-DNA 复合体。VirD4 与 VirB 等蛋白会在农杆菌细胞膜上完成组装，形成 T4SS-VirB/D4 型分泌通道^[13-15]。凭借该通道 T-DNA 复合体从农杆菌细胞转移至植物细胞内，并在一些植物蛋白（如 VIP1）的协助下，通过核孔进入细胞核并在植物基因组中随机组合，从而完成遗传转化的整个过程^[14]。

农杆菌的遗传背景及 Vir 基因区表达活性对非组培转化效率具有显著影响。目前，常用的农杆菌菌株（如 EHA105、GV3101、LBA4404 等）在不同植物中的转化效率存在显著差异。有研究指出：借助基

因工程手段使 VirG 的表达增强,以维持 Ti 质粒的稳定性,从而显著提高 T-DNA 的转化效率^[15]。与此同时,上调宿主细胞中 VIP1、Actin 等核导蛋白的表达水平,能够显著促进 T-DNA 的核内导入与整合过程,为提升转化效率提供新的思路^[16]。农杆菌介导的遗传转化技术从模式植物烟草 *Nicotiana tabacum*^[17]、经济作物大豆 *Glycine max*^[18],逐步拓展到水稻 *Oryza sativa*^[19]、小麦 *Triticum aestivum*^[20] 等重要作物,成为植物基因工程研究中的重要工具。

2 农杆菌介导的非组培转化技术的主要方法

近年来,为克服传统组培技术存在的各种问题,农杆菌介导的非组培遗传转化技术得到了快速发展^[21]。该技术体系主要包括以下几种方法:种子介导法、花器官转化法、活体注射递送法、切割-浸渍-出芽法、电穿孔法以及病毒递送法。

2.1 种子介导法

植物种子的胚含有初生分生组织,具备发育成完整植株的潜力,常作为遗传转化的受体材料^[22]。种子介导法是在植物种子萌发前后,直接和含有目的基因的农杆菌菌液共培养,实现外源基因的导入,此过程不需要经过组培环节^[6]。植物非组培遗传转化技术最初是在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中建立起来的,将萌发的种子放入农杆菌菌液中浸泡 24 h,把侵染后的种子转移到湿润的蛭石上培养,可收获转基因植株及转基因种子。虽操作简便但转化效率低,未能成为拟南芥遗传转化的主流方法^[23]。在水稻种子萌发阶段,把芽鞘切割与农杆菌共培养可实现 CRISPR/Cas9 系统的导入,有效绕过组培环节且转化效率达 9.0% (表 1)^[24]。对于大多数以种子繁殖的作物,特别是粮食作物及部分经济作物,种子作为外植体可一次性被侵染几千甚至几万颗^[25],这对构建突变体库、创造新种质资源以及培育优良新品种有极大的帮助。将超声波处理、真空渗透技术在共培养阶段作为辅助手段能显著提高植物转化效率^[26]。如豇豆 *Phaseolus vulgaris* 种子经 5 min 超声波和真空渗透联合预处理后,转化效率提升至 12.0%^[27]。印度小扁豆 *Lens culinaris* 去皮种子经 20 kHz 超声波处理 60 s,真空渗透 5 min,获得 68.0% 的瞬时 β -葡萄糖苷酸酶基因表达。这种方法不受基因型的影响,成功实现了转基因植株的再生^[28]。燕麦 *Avena sativa* 采用真空渗透处理可获得 21.8% 的转化效率^[29]。KARTHINK 等^[30] 待花生 *Arachis hypogaea* 萌发后,将带有子叶的一半种子与农杆菌共培养,并结合上述方法,可将阳性苗转化效率提高到 31.3%~38.6%。然而,种子介导法并不是在所有物种上都能实现,在番茄 *Solanum lycopersicum* 等^[31] 植物中利用成熟或未成熟种子作为外植体时,转化效率较低。这种在多个物种中都呈现出转化效率高,且不依赖基因型的特点被称为不依赖基因型的转化方法^[25]。总体而言,种子介导法的转化效率受多种因素的影响,如种子状态、种皮通透性、农杆菌菌株与菌液浓度、共培养条件、物种基因型差异及转化后植株的再生能力,在实际应用中常结合超声波处理、真空渗透等辅助手段以提升转化效率。

2.2 花器官转化法

在植物开花时通过蘸花、喷雾等方式直接处理花器官,利用胚珠等实现外源基因导入的技术被称为花器官转化法^[32]。该方法最初在拟南芥中建立,蕾期花序放到菌液中浸泡,能够将 T-DNA 转入胚珠细胞,并在子代植株中检测到稳定整合的转基因后代,也称为花序侵染法^[33]。有研究运用 GUS 组织化学染色技术,明确了 T-DNA 在胚珠中的表达模式,并证实了雌配子体是遗传转化的主要靶细胞^[32]。花器官转化法在小麦^[34]、大豆^[35]、甘蓝型油菜 *Brassica napus*^[36]、白菜 *Brassica rapa pekinensis*^[37] 和番茄^[38] 等植物中都有应用,但转化效率普遍不高。花器官转化法除了使用花序作为外植体外,还利用花药^[35]、花粉^[39]、花梗^[39] 和柱头^[38] 作为外植体。花器官转化效率通常受花器官发育阶段、外植体类型、农杆菌菌株与菌液浓度以及侵染后植株的生长环境等的影响。然而,该方法存在物种适用性有限、对花期依赖性强等问题。目前,花器官转化法仍是拟南芥遗传转化应用最广泛的方法,该方法为植物非组培遗传转化提供了重要的借鉴依据。

2.3 活体注射递送法

活体注射递送法通过借助注射器或微型穿刺装置,把携带目的基因的农杆菌悬液注入植物茎秆、节间、花芽等组织中,在不依赖组培体系的情况下,实现 T-DNA 在植物体内整合,以获取转基因阳性芽或根^[40]。观察菌液侵染后的甘薯 *Ipomoea batatas* 茎切面发现:转基因阳性芽或根始于韧皮部的分生组

织^[41]。烟草和拟南芥利用菌液对造伤部位注射侵染诱导产生转基因芽，对转基因植物商业化发展起推动作用^[40]。HUANG 等^[42]研究表明：在花生开花前的 2~3 h 内，把菌液注射到花生的花柱腔中，可获得较高的转化效率。在摩帝兜兰 *Paphiopedilum maudiae*^[43] 和长春花 *Catharanthus roseus*^[44] 中利用此方法同样获得了较高的转化效率。在甘薯茎节的上端注射农杆菌菌液，直到菌液从其他针孔流出，确保农杆菌被递送到韧皮部并再生出阳性芽，切取阳性芽，通过茎扦插得到再生植株^[41]。这一方法在三七 *Panax notoginseng* 和百合 *Lilium regale* 植物中均成功获得转基因植株^[45]。在金鱼草 *Antirrhinum majus* 与番茄的研究中，注射菌液获得的阳性芽再生效率偏低；而借助发育调控基因完成转化转基因阳性芽的获得率明显提升^[46]。值得注意的是，活体注射递送法与注射部位、菌株类型及菌液浓度等因素密切相关，这种将菌液送达植物分生组织的方式，简化了转化流程、增强了侵染效果，但在木本植物中，因植株组织结构致密、分生组织位置深藏等仍面临着技术难题。

2.4 切割-浸渍-出芽法

植物的芽点、腋芽等具有发芽潜力。切割-浸渍-出芽法 (cut-dip-buding, CDB) 通常是将带芽根部稍微切开，使分生组织露出，放入侵染液中浸泡，处理后将植物材料放回适宜生长的场所，诱导其原位萌发芽体长成完整植株，又称为切割-浸渍-出芽递送法^[47]。CDB 递送法的转化效率受多种因素的影响，包括植物材料的选择、切割方式、侵染液浓度与处理时间、回栽后的生长环境以及物种特性等。该方法最早建于橡胶草 *Taraxacum koksaghyz*，其根部有芽原基，当根系与母体分离时，芽原基分化形成不定芽，进而形成完整植株^[47]。块根植物甘薯、木本植物臭椿 *Ailanthus altissima*、辽东槲木 *Aralia elata*、臭茉莉 *Clerodendrum chinense*、黄连木 *Pistacia chinensis*、草本植物牛蒡 *Arctium lappa* 和小冠花 *Coronilla varia* 等通过 CDB 递送法获得转基因植株，有极高的转化效率，再生阳性根和芽的总体转化效率为 10%~80%，但耗时相对较长^[47]。为缩短转化周期，研究者在橡胶草中开发了一种简化的 CDB 程序，可以把毛状根的形成过程省略^[48]。CDB 递送法也在长寿花 *Kalanchoe blossfeldiana*、玉树 *Euphorbia tirucalli*、虎尾兰 *Sansevieria trifasciata*^[49]、桃 *Prunus persica*^[50] 和蒙古蒲公英 *Taraxacum mongolicum*^[51] 中应用较好，但由于物种局限性，在杨树 *Populus spp.*^[52] 等植物中仍需要大量研究。

2.5 电穿孔法

电穿孔在遗传转化中属物理法介导的基因转化技术。该原理是通过短时下施加高强度脉冲电场在植物上形成暂时性纳米级通道，这些孔隙为外源遗传物质 DNA、RNA、蛋白质等开辟了一条跨膜运输的路径，使其能够进入细胞质并转运到细胞核中^[53]。电穿孔法可作用于活体组织，在原位转化上有独特优势。该方法转化效率与多种因素有关，包括脉冲电场强度、持续时间、植物材料的类型与生长状态等。电穿孔最初应用于原生质体的瞬时表达分析中，因其能高效介导外源基因在细胞中的快速表达，成为基因功能验证的常用方法^[54]。随着该技术应用范围逐渐扩展，在豆科 Leguminosae 植物中，研究者通过电穿孔将质粒 DNA 导入节部分生组织，成功获得阳性植株^[55]。随着技术的迭代优化，电穿孔得到进一步提升，便携式电脉冲发生器与柔性电极装置显著增强了该技术在活体组织原位操作的便利性；结合高渗溶液预处理调节细胞渗透压可显著提高植物细胞膜的通透性，进而提升转化效率^[54]。

2.6 病毒递送法

病毒递送法 (virus-induced gene silencing, VIGS) 属于 RNA 介导的反向遗传学技术，由 RNA 病毒防御机制开发的病毒诱导基因沉默^[56]。该方法将目的基因序列重组到病毒载体中，凭借农杆菌瞬时转化系统将携带目的基因的病毒载体引入植物体内，促使植物内同源 mRNA 降解或发生表观修饰现象，进而诱导植物内源基因沉默，从而引发表型改变^[57]。VIGS 通常选取幼苗、叶片、茎尖、果实等作为受体材料^[58]。在番茄、辣椒 *Capsicum annuum* 等植物中也采用此方法进行基因功能验证^[59-60]。利用 VIGS 来验证基因沉默对棉花 *Gossypium hirsutum* 纤维生长产生的影响取得了一定的进展^[61]。在中国枣 *Ziziphus jujuba*^[62] 对光漂白症状和调控果实品质基因的研究中，也采用 VIGS 瞬时转化来验证。VIGS 的转化效率受病毒载体与宿主的适配性、受体材料的选择及生理状态、导入方式与接种条件、目的基因片段的设计、外部环境条件以及宿主植物的抗病毒反应等的影响。虽然病毒递送法在瞬时表达的研究中转化效率较高，但由于其无法感染生殖细胞，因而不能稳定的遗传给后代，因此目前该方法主要应用于基因功能验证的研究中。

表 1 农杆菌介导的非组织培养遗传转化方法及应用特点比较

Table 1 List of *Agrobacterium*-mediated non-tissue culture genetic transformation methods and comparison of their application characteristics

方法	物种	侵染部位	转化效率/%	参考文献	优点	局限性
种子介导法	水稻 <i>Oryza sativa</i>	种子	9.0	[24]	①无需组培，操作简便，省时省力；②高通量潜力巨大；③可结合辅助技术提高转化效率	①转化效率普遍偏低；②物种适用性有限；③条件依赖性强
	大豆 <i>Glycine max</i>	种子	35.0	[26]		
	豇豆 <i>Phaseolus vulgaris</i>	种子	12.0	[27]		
	小扁豆 <i>Lens culinaris</i>	种子	68.0	[28]		
	燕麦 <i>Avena sativa</i>	种子	21.8	[29]		
	花生 <i>Arachis hypogaea</i>	种子	31.3~38.6	[30]		
花器官转化法	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	花	0.5~3.0	[33]	①避免组培环节；②外源基因直接导入胚珠细胞能够稳定遗传	①受开花时期限制；②转化效率受外植体选择影响较大；③物种适用性有限
	小麦 <i>Triticum aestivum</i>	花	0.3~1.0	[34]		
	大豆 <i>Glycine max</i>	花	1.2~2.2	[35]		
	甘蓝型油菜 <i>Brassica napus</i>	花	1.0~3.0	[36]		
	白菜 <i>Brassica rapa pekinensis</i>	花	0.1	[37]		
	番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	花	40.0	[38]		
活体注射递送法	甘薯 <i>Ipomoea batatas</i>	茎基部	12.5~37.5	[40]	①操作简便，无需组培；②适用性较广	①转化效率差异明显；②受组织结构限制
	甘薯 <i>Ipomoea batatas</i>	茎段	40.0	[41]		
	花生 <i>Arachis hypogaea</i>	花柱腔	2.6	[42]		
	摩帝兜兰 <i>Paphiopedilum maudiae</i>	子房	2.6	[43]		
	长春花 <i>Catharanthus roseus</i>	子房	12.0	[44]		
	三七 <i>Panax notoginseng</i>	剪口芽点	25.0~35.0	[45]		
切割-浸渍-出芽递送法	百合 <i>Lilii Bulbus</i>	鳞茎芽点	30.0~40.0	[45]	①转化效率高；②无需组培体系及无菌环境；③原位发育完整植株	①存在物种局限性；②对操作技术要求高；③环境条件依赖性强
	橡胶草 <i>Taraxacum koksaghyz</i>	根	14.5~25.0	[47]		
	甘薯 <i>Ipomoea batatas</i>	茎基部	15.0~35.0	[47]		
	臭椿 <i>Ailanthus altissima</i>	茎基部	15.0~25.0	[47]		
	辽东楸木 <i>Aralia elats</i>	茎基部	25.0~30.0	[47]		
	臭茉莉 <i>Clerodendrum chinense</i>	茎基部	47.6	[47]		
	黄连木 <i>Pistacia chinensis</i>	叶柄基部	40.0~50.0	[47]		
	牛蒡 <i>Arctium lappa</i>	根尖分生组织	15.0~20.0	[47]		
	小冠花 <i>Coronilla varia</i>	茎节间	25.0~30.0	[47]		
	长寿花 <i>Kalanchoe blossfeldiana</i>	叶片基部	74.0	[49]		
	玉树 <i>Euphorbia tirucalli</i>	茎段	8.0~10.0	[49]		
	虎尾兰 <i>Sansevieria trifasciata</i>	叶片基部	3.9~7.8	[49]		
	桃 <i>Prunus persica</i>	地下芽	26.7	[50]		
	蒙古蒲公英 <i>Taraxacum mongolicum</i>	根横切面	42.0	[51]		
	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	原生质体	20.0~30.0	[54]		
电穿孔法	水稻 <i>Oryza sativa</i>	原生质体	5.0~15.0	[54]	①高效快速，常用于基因功能验证；②常用于活体原为组织转化	①对操作条件要求高；②由于物种和组织局限性，转化效率受限
	豆科 <i>Leguminosae</i> 植物	节分生组织	2.8	[55]		
病毒递送法	辣椒 <i>Capsicum annuum</i>	叶片	15.0~20.0	[60]	高效便捷，操作简便	①宿主范围有限；②遗传不稳定

3 其他非组培依赖的遗传转化方法

3.1 非生物介导型转化方法

3.1.1 纳米载体辅助递送法 纳米材料凭借其物理特性在植物遗传工程领域中广泛运用。功能型碳纳米管、金属纳米粒子、石墨烯等纳米载体充当 DNA、RNA 的递送工具，能够精准地把外源遗传物质导入到植物细胞内部。借助石墨烯量子点可将 DNA 递送到烟草叶片细胞中，且转化效率达 90.0% 以上 (表 2)^[63]。LDH 纳米载体不仅具备基因编辑能力，而且能够增强荧光，两者相结合可成功解决编辑及转化效率存在滞后性的问题^[64]。纳米材料的类型、粒径、表面修饰及受体组织的特性等因素决定了外源遗传物质能否穿过细胞壁进入细胞内部，这是优化纳米材料应用时必须重点考虑的环节。以纳米材料为基础，不破坏组织结构就能够完成基因的导入，这无疑在未来构建无创、高效且具有普适性转化的重要发展趋势。

3.1.2 发育调控因子辅助转化法 在非组培遗传体系不断发展的进程中，引入了发育调控因子辅助系统。研究发现：PLT5、WUS2、BBM、WOX5、GRF-GIF 等关键转录因子具备诱导植物体内新生分生组织形成的能力，能够实现转基因植株的再生，植株转化效率和适用范围显著提高^[65]。MAHER 等^[40]提出“从头诱导分生组织”，即利用 PLT5、WUS2 等在玉米和烟草中成功获得活体芽再生。MAREN 等^[66]借助 GRF-GIF 表达系统将小麦转化效率提升至 30.0%~50.0%。通常选择发育调控因子的种类和组合等，是影响该方法转化效率的关键因素。发育调控因子辅助转化法在提高转化效率、缓解基因型依赖性等方面有极大的推动作用，为非模式植物转化开拓了新的路径。

3.2 生物介导型转化方法

3.2.1 花粉管介导法 花粉管介导法于 1983 年在棉花中建立^[67]。该方法在授粉后期将外源 DNA 沿着花粉管送入到胚珠，整合到受体细胞基因组中，并伴随着受精卵发育，形成转基因植株^[67]。随着花粉管介导法的推广，在大豆^[68]等作物上也成功运用。有研究表明：花生采用花粉管介导法经抗性筛选及分子鉴定，其转基因后代平均转化效率为 2.6%^[42]。该方法转化效率与授粉后注入的时间、受体基因型与花器官生理状态等因素有关。虽然该方法转化效率较低，但对植物遗传育种具备一定的应用价值。

3.2.2 病毒载体介导法 像 TRV、PVX、BSMV 等部分病毒，经工程化处理被用于基因敲除或 CRISPR 元件的递送中，并在烟草、小麦、棉花等植物中得到广泛应用^[69]。该方法的优点是不依赖组织培养，且转化效率高，但表达率较低，且受宿主限制。病毒载体介导法与病毒种类及基因组稳定性、外源片段大小与结构、植株生理状态及宿主的抗病毒反应和环境条件等因素有关，合理选择病毒载体并优化递送条件，是该方法应用推广的关键。

表 2 其他非组培依赖的遗传转化方法及应用特点

Table 2 Other non-tissue culture-dependent genetic transformation methods and their application characteristics						
类型	方法	物种	侵染部位	载体类型	转化效率/%	参考文献
非生物介导型	纳米载体辅助递送法	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	叶片	石墨烯量子点	>90.0	[63]
		拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	叶片	LDH纳米	33.0	[64]
	发育调控因子辅助转化法	玉米 <i>Zea mays</i>	叶片	PLT5、WUS2	10.0~20.0	[40]
		烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	叶片	PLT5、WUS2	30.0~50.0	[40]
		小麦 <i>Triticum aestivum</i>	胚	GRF-GIF	30.0~50.0	[66]
生物介导型	花粉管介导法	棉花 <i>Gossypium hirsutum</i>	胚珠		1.0~2.0	[67]
		大豆 <i>Glycine max</i>	子房		1.2	[68]
		花生 <i>Arachis hypogaea</i>	子房		2.6	[42]
	病毒载体介导法	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	叶片	PEBV、TRV	15.0~20.0	[69]
		小麦 <i>Triticum aestivum</i>	叶片	BSMV	>53.8	[69]
		棉花 <i>Gossypium hirsutum</i>	幼苗	TRV	1.0	[69]

4 结论与展望

农杆菌介导的植物非组培遗传转化技术凭借操作简便、适用范围广、成本效益高等优势，突破了传

统转化中木本植物、禾本科 Poaceae 作物等再生困难与基因型限制等问题^[4],并在多种植物中获得了稳定的遗传后代。然而该技术面临物种适应性有限、转化效率受多因素影响、T-DNA 整合随机性及筛选方法受限等问题,亟待进一步优化与完善。

农杆菌介导的植物非组培遗传转化技术:一方面,应拓宽至经济林木、药用植物等的应用,并建立相应的适配性转化体系;另一方面,通过优化农杆菌侵染条件、结合 CRISPR/Cas 等基因编辑工具及开发绿色无抗性筛选技术等提升转化效率,并构建标准化、高通量的筛选方式^[70-71]。该技术有望成为植物育种和功能基因研究的核心,对推动植物基因工程领域的深入发展具有重要意义。

5 参考文献

- [1] RAHMAN S U, KHAN M O, ULLAH R, *et al.* *Agrobacterium*-mediated transformation for the development of transgenic crops; present and future prospects[J]. *Molecular Biotechnology*, 2024, **66**(8): 1836–1852.
- [2] 张晓琳, 纵丹, 李嘉其, 等. 滇杨组织培养再生及遗传转化体系建立[J]. *浙江农林大学学报*, 2024, **41**(2): 314–321.
ZHANG Xiaolin, ZONG Dan, LI Jiaqi, *et al.* Regeneration system and genetic transformation of *Populus yunnanensis* [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2024, **41**(2): 314–321.
- [3] KHATUN M, BORPHUKAN B, ALAM I, *et al.* An improved *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration protocol for successful genetic engineering and genome editing in eggplant[J/OL]. *Scientia Horticulturae*, 2022, **293**: 110716[2025-08-01]. DOI: [10.1016/j.scienta.2021.110716](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110716).
- [4] WU Minyi, CHEN Ao, LI Xiaomeng, *et al.* Advancements in delivery strategies and non-tissue culture regeneration systems for plant genetic transformation[J/OL]. *Advanced Biotechnology*, 2024, **2**(4): 34[2025-08-01]. DOI: [10.1007/s44307-024-00041-9](https://doi.org/10.1007/s44307-024-00041-9).
- [5] QUIROZ L F, KHAN M, GONDALIA N, *et al.* Tissue culture-independent approaches to revolutionizing plant transformation and gene editing[J/OL]. *Horticulture Research*, 2024, **12**(2): uhae292[2025-08-01]. DOI: [10.1093/hr/uhae292](https://doi.org/10.1093/hr/uhae292).
- [6] LAMBOLEZ A, KAWAMURA A, TAKAHASHI T, *et al.* Warm temperature promotes shoot regeneration in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2022, **63**(5): 618–634.
- [7] KAUSCH A P, WANG Kan, KAEPLER H F, *et al.* Maize transformation: history, progress, and perspectives[J/OL]. *Molecular Breeding*, 2021, **41**(6): 38[2025-08-01]. DOI: [10.1007/s11032-021-01225-0](https://doi.org/10.1007/s11032-021-01225-0).
- [8] 马曦, 张金睿, 庄红梅, 等. 发根农杆菌介导的芜菁高效遗传转化体系建立[J]. *园艺学报*, 2025, **52**(5): 1389–1398.
MA Xi, ZHANG Jinrui, ZHUANG Hongmei, *et al.* Establishment of an efficient genetic transformation system mediated by *Agrobacterium rhizogenes* in turnip [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2025, **52**(5): 1389–1398.
- [9] XU Hu, GUO Yong, QIU Lijuan, *et al.* Progress in soybean genetic transformation over the last decade[J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, **13**: 900318[2025-08-01]. DOI: [10.3389/fpls.2022.900318](https://doi.org/10.3389/fpls.2022.900318).
- [10] 胡欢, 李媛, 丁筠, 等. 农杆菌介导遗传转化获得转 CP4 基因籼稻的研究[J]. *浙江农林大学学报*, 2021, **38**(2): 420–425.
HU Huan, LI Yuan, DING Yun, *et al.* *Agrobacterium*-mediated transformation of CP4 gene into indica rice [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2021, **38**(2): 420–425.
- [11] ZHANG Yue, QIN Chunxiao, LIU Shijia, *et al.* Establishment of an efficient *Agrobacterium*-mediated genetic transformation system in halophyte *Puccinellia tenuiflora*[J/OL]. *Molecular Breeding*, 2021, **41**(9): 55[2025-08-01]. DOI: [10.1007/s11032-021-01247-8](https://doi.org/10.1007/s11032-021-01247-8).
- [12] 叶如梅, 汪长天, 韩潇, 等. 闽楠叶片原生质体分离及瞬时转化体系的建立[J]. *浙江农林大学学报*, 2025, **42**(3): 592–600.
YE Rumei, WANG Changtian, HAN Xiao, *et al.* Establishment of protoplast isolation and transient expression system in *Phoebe bournei* leaves [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2025, **42**(3): 592–600.
- [13] HUANG Zhiwei, ZOU Junnan, GUO Minliang, *et al.* An aerotaxis receptor influences invasion of *Agrobacterium tumefaciens* into its host[J/OL]. *PeerJ*, 2024, **12**: e16898[2025-08-01]. DOI: [10.7717/peerj.16898](https://doi.org/10.7717/peerj.16898).
- [14] NEELAKANDAN A K, KABAHUMA M, YANG Qin, *et al.* Characterization of integration sites and transfer DNA structures in *Agrobacterium*-mediated transgenic events of maize inbred B104[J/OL]. *G3*, 2023, **13**(10): jkad166[2025-08-01]. DOI: [10.1093/g3journal/jkad166](https://doi.org/10.1093/g3journal/jkad166).

- [15] SWACKHAMMER A, PROVENCHER E A P, DONKOR A K, *et al.* Mechanistic analysis of the VirA sensor kinase in *Agrobacterium tumefaciens* using structural models[J/OL]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, **13**: 898785[2025-08-01]. DOI: [10.3389/fmicb.2022.898785](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.898785).
- [16] ZHAO Pei, WANG Ke, LIN Zhishan, *et al.* Cloning and characterization of *TaVIP2* gene from *Triticum aestivum* and functional analysis in *Nicotiana tabacum*[J/OL]. *Scientific Reports*, 2016, **6**: 37602[2025-08-01]. DOI: [10.1038/srep37602](https://doi.org/10.1038/srep37602).
- [17] LIU Yukun, KONG Xiangpei, PAN Jiaowen, *et al.* VIP1: linking *Agrobacterium*-mediated transformation to plant immunity? [J]. *Plant Cell Reports*, 2010, **29**(8): 805–812.
- [18] ZHONG Heng, ELUMALAI S, LI Changbao, *et al.* Development of high-throughput tissue culture-free plant transformation systems[J/OL]. *The Plant Journal*, 2025, **121**(1): e17163[2025-08-01]. DOI: [10.1111/tpj.17163](https://doi.org/10.1111/tpj.17163).
- [19] SEBIANI-CALVO A, HERNÁNDEZ-SOTO A, HENSEL G, *et al.* Crop genome editing through tissue-culture-independent transformation methods[J/OL]. *Frontiers in Genome Editing*, 2024, **6**: 1490295[2025-08-01]. DOI: [10.3389/fgeed.2024.1490295](https://doi.org/10.3389/fgeed.2024.1490295).
- [20] YE Xudong, SHRAWAT A, MOELLER L, *et al.* *Agrobacterium*-mediated direct transformation of wheat mature embryos through organogenesis[J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, **14**: 1202235[2025-08-01]. DOI: [10.3389/fpls.2023.1202235](https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1202235).
- [21] HAO Siyi, ZHANG Yongyan, LI Ruide, *et al.* *Agrobacterium*-mediated in planta transformation of horticultural plants: current status and future prospects[J/OL]. *Scientia Horticulturae*, 2024, **325**: 112693[2025-08-01]. DOI: [10.1016/j.scienta.2023.112693](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112693).
- [22] YE Xudong, SHRAWAT A, WILLIAMS E, *et al.* Commercial scale genetic transformation of mature seed embryo explants in maize[J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, **13**: 1056190[2025-08-01]. DOI: [10.3389/fpls.2022.1056190](https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1056190).
- [23] 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.
- [24] TAMIZI A A, MD-YUSOF A A, MOHD-ZIM N A, *et al.* *Agrobacterium*-mediated in planta transformation of cut coleoptile: a new, simplified, and tissue culture-independent method to deliver the CRISPR/Cas9 system in rice [J]. *Molecular Biology Reports*, 2023, **50**(11): 9353–9366.
- [25] ZHONG Heng, LI Changbao, YU Wenjin, *et al.* A fast and genotype-independent in planta *Agrobacterium*-mediated transformation method for soybean[J/OL]. *Plant Communications*, 2024, **5**(12): 101063[2025-08-01]. DOI: [10.1016/j.xplc.2024.101063](https://doi.org/10.1016/j.xplc.2024.101063).
- [26] ARUN M, SUBRAMANYAM K, MARIASHIBU T S, *et al.* Application of sonication in combination with vacuum infiltration enhances the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in Indian soybean cultivars [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, **175**(4): 2266–2287.
- [27] LIU Zaochang, PARK B J, KANNO A, *et al.* The novel use of a combination of sonication and vacuum infiltration in *Agrobacterium*-mediated transformation of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with *Lea* gene [J]. *Molecular Breeding*, 2005, **16**(3): 189–197.
- [28] CHOPRA R, APARNA, SAINI R. Use of sonication and vacuum infiltration for *Agrobacterium*-mediated transformation of an Indian lentil (*Lens culinaris* Medik.) cultivar [J]. *Scientia Horticulturae*, 2012, **143**: 127–134.
- [29] DATTONDE N, TIWARI S, SAPRE S, *et al.* Genetic transformation of oat mediated by *Agrobacterium* is enhanced with sonication and vacuum infiltration[J/OL]. *Iranian Journal of Biotechnology*, 2019, **17**(1): e1563[2025-08-01]. DOI: [10.21859/ijb.1563](https://doi.org/10.21859/ijb.1563).
- [30] 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]. *3 Biotech*, 2018, **8**(4): 202[2025-08-01]. DOI: [10.1007/s13205-018-1231-1](https://doi.org/10.1007/s13205-018-1231-1).
- [31] ABOOFAZELI N, KHOSRAVI S, BAGHERI H, *et al.* Conquering limitations: exploring the factors that drive successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of recalcitrant plant species [J]. *Molecular Biotechnology*, 2025, **67**(8): 3010–3026.
- [32] DESFEUX C, CLOUGH S J, BENT A F. Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the *Arabidopsis* floral-dip method [J]. *Plant Physiology*, 2000, **123**(3): 895–904.

- [33] CLOUGH S J, BENT A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Journal*, 1998, **16**(6): 735–743.
- [34] AGARWAL S, LOAR S, STEBER C, *et al.* Floral transformation of wheat[M]//JONES H, SHEWRY P. *Transgenic Wheat, Barley and Oats, Methods in Molecular Biology*, Vol. 478. New Jersey: Humana Press, 2009.
- [35] 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 Cuiyan, DING Dongfeng, YU Xiaojie, *et al.* Application of floral dip on the transformation of soybean [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis*, 2010, **43**(1): 34–38.
- [36] LI Juan, TAN Xiaoli, ZHU Fuge, *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.
- [37] GAO Yang, REN Xiangliang, RUAN Songlin, *et al.* Genetic transformation of Chinese cabbage (*Brassica rapa pekinensis*) with floral-dip method [J]. *Agricultural Biotechnology*, 2012, **1**(4): 22–24.
- [38] SUN H J, UCHII S, WATANABE S, *et al.* A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2006, **47**(3): 426–431.
- [39] EAPEN S. Pollen grains as a target for introduction of foreign genes into plants: an assessment [J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2011, **17**(1): 1–8.
- [40] MAHER M F, NASTI R A, VOLLBRECHT M, *et al.* Plant gene editing through *de novo* induction of meristems [J]. *Nature Biotechnology*, 2019, **38**(1): 84–89.
- [41] MEI Guoguo, CHEN Ao, WANG Yaru, *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[2025-08-01]. DOI: [10.1016/j.xplc.2024.100822](https://doi.org/10.1016/j.xplc.2024.100822).
- [42] HUANG Chen, YANG Chen, YANG Huifang, *et al.* Systematic investigation and validation of peanut genetic transformation via the pollen tube injection method[J/OL]. *Plant Methods*, 2024, **20**(1): 190[2025-08-01]. DOI: [10.1186/s13007-024-01314-z](https://doi.org/10.1186/s13007-024-01314-z).
- [43] LUO Baixue, ZHANG Li, ZHENG Feng, *et al.* Ovule development and in planta transformation of *Paphiopedilum maudiae* by *Agrobacterium*-mediated ovary-injection[J/OL]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, **22**(1): 84[2025-08-01]. DOI: [10.3390/ijms22010084](https://doi.org/10.3390/ijms22010084).
- [44] BAHARI Z, SAZEGARI S, NIAZI A, *et al.* The application of an *Agrobacterium*-mediated in planta transformation system in a *Catharanthus roseus* medicinal plant [J]. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 2020, **56**(1): 34–41.
- [45] DENG Jie, LI Wenyun, LI Xiaomin, *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[2025-08-01]. DOI: [10.3390/plants13172509](https://doi.org/10.3390/plants13172509).
- [46] LIAN Zhaoyuan, NGUYEN C D, LIU Li, *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.
- [47] CAO Xuesong, XIE Hongtao, SONG Minglei, *et al.* Cut-dip-budding delivery system enables genetic modifications in plants without tissue culture[J/OL]. *The Innovation*, 2023, **4**(1): 100345[2025-08-01]. DOI: [10.1016/j.xinn.2022.100345](https://doi.org/10.1016/j.xinn.2022.100345).
- [48] CAO Xuesong, XIE Hongtao, SONG Minglei, *et al.* Extremely simplified cut-dip-budding method for genetic transformation and gene editing in *Taraxacum koksaghyz*[J/OL]. *The Innovation Life*, 2023, **1**(3): 100040[2025-08-01]. DOI: [10.59717/j.xinn-life.2023.100040](https://doi.org/10.59717/j.xinn-life.2023.100040).
- [49] LU Jinghua, LI Shanshan, DENG Shuai, *et al.* A method of genetic transformation and gene editing of succulents without tissue culture [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2024, **22**(7): 1981–1988.
- [50] 鞠琳璐. 桃非组培遗传转化体系初探[D]. 武汉: 华中农业大学, 2023.
- JU Linlu. *Preliminary Study on Non-tissue Culture Genetic Transformation System of Peach*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2023.
- [51] CAO Xuesong, XIE Hongtao, SONG Minglei, *et al.* Simple method for transformation and gene editing in medicinal plants [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2024, **66**(1): 17–19.
- [52] 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 Yingnan, HU Chuanjing, ZHUGE Qiang, *et al.* Thirty years of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of

- Populus* [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2022, **58**(12): 114–129.
- [53] WEAVER J C. Electroporation theory: concepts and mechanisms [M]// NICKOLOFF J A. *Plant Cell Electroporation and Electrofusion Protocols, Methods in Molecular Biology*, Vol. 55. New Jersey: Humana Press, 2003.
- [54] OZYIGIT I I. Gene transfer to plants by electroporation: methods and applications [J]. *Molecular Biology Reports*, 2020, **47**(4): 3195–3210.
- [55] SUBBURAJ S, AGAPITO-TENFEN S Z. Establishment of targeted mutagenesis in soybean protoplasts using CRISPR/Cas9 RNP delivery via electro-transfection[J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, **14**: 1255819[2025-08-01]. DOI: [10.3389/fpls.2023.1255819](https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1255819).
- [56] ZULFIQAR S, FAROOQ M A, ZHAO Tiantian, *et al.* Virus-induced gene silencing (VIGS): a powerful tool for crop improvement and its advancement towards epigenetics[J/OL]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, **24**(6): 5608[2025-08-01]. DOI: [10.3390/ijms24065608](https://doi.org/10.3390/ijms24065608).
- [57] 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.
FENG Mengqi, WANG Ruoyu, SIMA Lu, *et al.* Genetic transformation system of plants with non-tissue culture and its application [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2025, **44**(2): 228–242.
- [58] CHENG Jun, SHAO Yun, HU Xinyue, *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): uhac155[2025-08-01]. DOI: [10.1093/hr/uhac155](https://doi.org/10.1093/hr/uhac155).
- [59] 刘倩. 番茄斑萎病毒介导的 CRISPR 核酸酶递送及其在多种作物基因编辑中的应用[D]. 杭州: 浙江大学, 2023.
LIU Qian. *Tomato Spotted Wilt Virus-based CRISPR/cas Delivery Systems for Targeted Genome Editing in Multiple Crops*[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2023.
- [60] 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.
- [61] TIAN Yue, FANG Yao, ZHANG Kaixin, *et al.* Applications of virus-induced gene silencing in cotton[J/OL]. *Plants*, 2024, **13**(2): 272[2025-08-01]. DOI: [10.3390/plants13020272](https://doi.org/10.3390/plants13020272).
- [62] ZHANG Yao, NIU Nazi, LI Shijia, *et al.* Virus-induced gene silencing (VIGS) in Chinese jujube[J/OL]. *Plants*, 2023, **12**(11): 2115[2025-08-01]. DOI: [10.3390/plants12112115](https://doi.org/10.3390/plants12112115).
- [63] HII A R K, QI Xiaole, WU Zhenghong. Advanced strategies for CRISPR/Cas9 delivery and applications in gene editing, therapy, and cancer detection using nanoparticles and nanocarriers [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2024, **12**(6): 1467–1489.
- [64] RABIEE N, BAGHERZADEH M, GHADIRI A M, *et al.* ZnAl nano layered double hydroxides for dual functional CRISPR/Cas9 delivery and enhanced green fluorescence protein biosensor[J/OL]. *Scientific Reports*, 2020, **10**: 20672[2025-08-01]. DOI: [10.1038/s41598-020-77809-1](https://doi.org/10.1038/s41598-020-77809-1).
- [65] 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.
- [66] MAREN N A, DUAN Hui, DA Kedong, *et al.* Genotype-independent plant transformation[J/OL]. *Horticulture Research*, 2022, **9**: uhac047[2025-08-01]. DOI: [10.1093/hr/uhac047](https://doi.org/10.1093/hr/uhac047).
- [67] ZHOU Guangyu, WENG Jia, ZENG Yishen, *et al.* Introduction of exogenous DNA into cotton embryos [J]. *Methods in Enzymology*, 1983, **101**: 433–481.
- [68] CHATTERJEE A, PURKAYSTHA S, BHATTACHARYYA S, *et al.* Genetic engineering and genome editing for enhancing nutritional quality of legumes[M]//MATHUR P, GUPTA A. *Recent Trends and Applications of Leguminous Microgreens as Functional Foods*. Cham: Springer Nature Switzerland, 2025: 389–419.
- [69] ALI Z, EID A, ALI S, *et al.* Pea early-browning virus-mediated genome editing via the CRISPR/Cas9 system in *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis* [J]. *Virus Research*, 2018, **244**: 333–337.
- [70] LI Xinxin, GAO Yuehao, MA Haowen, *et al.* Non-tissue culture genetic modifications for plant improvement[J/OL]. *Plant Molecular Biology*, 2025, **115**(3): 67[2025-08-01]. DOI: [10.1007/s11103-025-01594-6](https://doi.org/10.1007/s11103-025-01594-6).
- [71] YANG Lei, MACHIN F, WANG Shuangfeng, *et al.* Heritable transgene-free genome editing in plants by grafting of wild-type shoots to transgenic donor rootstocks [J]. *Nature Biotechnology*, 2023, **41**(7): 958–967.