生物技术通报
·综述与专论· BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):1-12

植物再生与遗传转化技术:从经验摸索到理性设计

张婉钰 邢俊强 孙勤富 王幼平*
(扬州大学生物科学与技术学院,扬州 225000)

摘 要: 植物再生与遗传转化技术是植物生物技术和精准育种的基础。然而,其应用长期受到“基因型依赖性”和“再生效率低下”问题的困扰,严重限制了其在多数作物(尤其是难转化种质)中的广泛应用。近年来,随着植物发育生物学、表观遗传学、合成生物学等领域的深入发展与交叉融合,植物再生与遗传转化正经历从“经验依赖”到基于分子机制的“理性设计”的范式转变,为解决上述问题提供了关键突破口。本综述系统梳理并深入剖析了四大核心领域的最新进展:一是发育调控因子的工程化应用,特别是GRF-GIF嵌合体系统的发现与普适性验证;二是表观遗传调控网络的机制解析与化学干预策略;三是基因递送系统的创新与多路径突破;四是不依赖组织培养的“原位转化”技术的兴起与发展。这些进展相互协同,共同构成了一个强大的技术体系,正逐步打破基因型依赖的壁垒,为全球作物改良与功能基因组学研究开启新篇章。

关键词: 植物再生;遗传转化;GRF-GIF;表观遗传调控;三元载体系统;原位转化
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1380

Plant Regeneration and Genetic Transformation: From Empirical Exploration to Rational Design

ZHANG Wan-yu XING Jun-qiang SUN Qin-fu WANG You-ping*
(*College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou* 225000)

Abstract: Plant regeneration and genetic transformation are fundamental to plant biotechnology and precision breeding. However, their application across diverse crops has long been hindered by the persistent challenges of “genotype dependency” and “low regeneration efficiency”, which severely limit their broad utility, especially in recalcitrant germplasms. In recent years, with the deepening development and interdisciplinary convergence of fields such as plant developmental biology, epigenetics, and synthetic biology, the field of plant regeneration and transformation is undergoing a paradigm shift from “experience-dependent” practice to “mechanism-based rational design”. This shift is enabling critical breakthroughs to address these bottlenecks. This review systematically outlines and critically analyzes the latest advancements in four core areas: first, the engineered application of developmental regulators, particularly the discovery and universal validation of the GRF-GIF chimeric system; second, the mechanistic elucidation of epigenetic regulatory networks and corresponding chemical intervention strategies; third, innovations and multipronged breakthroughs in gene delivery systems; and fourth, the emergence and development of tissue culture-independent *in planta* transformation technologies. These synergistic advances collectively constitute a powerful toolbox that is progressively dismantling the barriers of genotype dependency, thereby opening new chapters for global crop improvement and functional genomics research.

Keywords: plant regeneration; genetic transformation; GRF-GIF; epigenetic regulation; ternary vector system; *in planta* transformation

植物细胞的全能性(totipotency)即单个体细胞发育为完整植株的潜能,是植物再生技术的理论基础。自20世纪80年代首例转基因植物问世以来,农杆菌介导的遗传转化和基因枪轰击等技术已成为植物生物学研究与作物育种的核心手段。然而,经过近半个世纪的技术积累,仍存在一个根本性难题:

收稿日期:2025-12-17
基金项目:国家自然科学基金项目(U24A20398,W2412098)
*通信作者:王幼平 wangyp@yzu.edu.cn

对绝大多数作物品种及其野生近缘种而言，建立高效、稳定的遗传转化和再生体系仍极具挑战[1]。这种“难转化性”（recalcitrance）不仅严重阻碍了功能基因验证与性状快速改良，更成为基因组编辑技术在作物中规模化应用的最大瓶颈。

针对植物再生与转化效率低下的问题，传统主要依赖经验性的培养基优化策略，包括调整植物生长调节剂（如生长素和细胞分裂素）的种类、浓度与配比，尝试不同的外植体（如胚、茎段、叶片）以及优化培养条件（光照、温度）[2]。这类方法本质属于“试错”，成功率高度依赖于操作者的经验与植物本身的特性。尽管通过优化农杆菌侵染方法、外植体类型与植物生长调节剂组合，已在黑果枸杞（*Lycium ruthenicum* Murr.）与楸树（*Catalpa bungei* C.A.Mey）等物种中将遗传转化效率提升至90%以上[3-4]，但对于禾谷类、林木及豆科等重要经济作物，此类经验性优化手段往往效果有限。

近年来，植物发育生物学、表观遗传学、合成生物学及单细胞组学等领域的高速发展与交叉融合，使研究者得以深入解析植物分生组织维持、器官发生和体细胞胚诱导的关键调控网络。基于这些基础研究成果，科研人员开始突破传统的激素调控框架，通过主动干预甚至“重编程”细胞的发育命运，从根本上克服植物固有的再生限制[5]，这标志着该领域正式迈入从经验摸索向理性设计转型的新阶段。例如，过表达BABY BOOM（BBM）、WUSCHEL（WUS）等发育调控因子，可显著增强植物的再生与转化效率[6-7]；将纳米载体、两性微针等新型递送系统与优化的三元载体系统结合，可实现外源基因或基因编辑工具高效无创伤递送[8-9]。这些技术相互关联、协同增效，共同构建了一套全新的技术体系，为打破基因型依赖、提升再生效率奠定了坚实的技术基础。

现代植物再生与遗传转化的核心路径可概括为以下4个关键环节（图1）：首先，通过农杆菌介导、纳米颗粒递送等多样化的基因递送系统将外源遗传物质导入植物细胞；其次，利用RUBY、荧光蛋白等可视化标记系统快速鉴定转化或编辑事件；同时，借助以GRF-GIF为代表的发育调控因子增强细胞重编程与再生能力；最终，通过组织培养依赖或非依赖的方式实现植物的高效、稳定遗传转化与植株再生。上述技术框架整合了本文梳理的关键技术模块及其协同作用，为后续各部分的深入阐述提供整体思路。

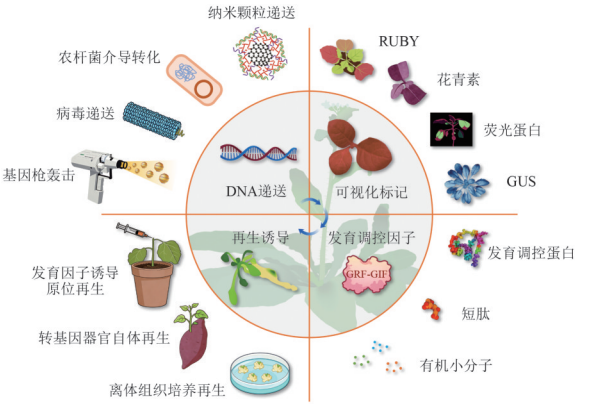


图1 植物再生与遗传转化的关键技术组件示意图

Fig. 1 Schematic diagram of key technological components for plant regeneration and genetic transformation

1 基因递送系统的创新

将外源基因高效、完整地递送到植物细胞内是遗传转化的第一步，也是决定转化效率的关键环节。近年来，传统递送技术得到了显著优化，一系列新型递送技术也不断涌现，为解决不同物种的转化难题提供了多样化选择。目前常用的基因递送方法包括农杆菌介导转化、基因枪轰击法、纳米载体递送和病毒载体递送（表1）。

1.1 农杆菌介导转化方法的深度优化

根瘤农杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）介导的遗传转化技术，因其能实现大片段的DNA转移，且整合的外源基因通常拷贝数较低，仍是目前植物遗传转化的首选方法。最近报道的三元载体系统是对传统双元载体系统的重大升级。该系统在传统双元系统（含T-DNA载体和辅助质粒）基础上，引入了第3个携带额外毒力（*vir*）基因（如来自高毒力菌株的*virG*、*virB*、*virE*等）的辅助质粒，这些额外的Vir蛋白能显著提升T-DNA的加工和递送效率[10]。研究证实，使用三元载体系统可使玉米、高粱等难转化作物的稳定转化效率提高1.5-21.5倍，极大地扩展了农杆菌的宿主范围[9, 11]。

抑制农杆菌过度生长是提高遗传转化中外植体

表1　植物遗传转化主要递送系统对比

Table 1　Comparison of major delivery systems for plant genetic transformation

递送系统 Delivery system	主要原理 Principal mechanism	核心优点 Key advantages	主要局限/挑战 Major limitations/ Challenges	典型适用场景 Typical applications
农杆菌介导	利用细菌天然机制将T-DNA整合至植物基因组	整合拷贝数低； 可转移大片段； 技术成熟、操作简便、成本较低	存在宿主偏好性，对部分单子叶及难转化物种效率低	多数双子叶及部分单子叶植物的稳定转化
基因枪轰击	通过高压气体将包裹DNA的金属微粒（金/钨）直接轰击入植物细胞或细胞器	几乎不受物种、基因型限制； 可递送多种形态物质； 能高效转化叶绿体和线粒体	整合拷贝数多且随机，易导致基因沉默或表达不稳定； 设备成本较高； 条件优化复杂； 可能造成组织物理损伤	小麦、水稻等单子叶作物的遗传转化； 细胞器转化
纳米载体递送	利用纳米材料（如碳纳米管、脂质体）包裹核酸，通过物理或化学作用穿透细胞壁和细胞膜递送基因	潜力上可适用于任何物种； 可递送核蛋白复合体，避免DNA整合； 避免核酸胞内降解，转化效率高	技术不成熟，缺乏标准化流程； 纳米材料的环境影响尚不明确	CRISPR/Cas9等基因编辑工具的递送； 难转化物种（如林木、藻类）的遗传工程
病毒载体递送	利用改造后的植物病毒在体内移动和复制	快速产生大量目标蛋白，无需基因组整合； 不依赖组织培养	承载容量小； 通常不整合入基因组，外源基因无法稳定遗传； 存在生物安全风险	基因功能快速验证； 植物生物反应器生产药用蛋白； 基因编辑

存活率的有效策略。例如，利用胸腺嘧啶营养缺陷型菌株（如EHA105Thy-）侵染外植体后，在缺乏胸腺嘧啶的培养基中培养可阻止农杆菌过度增殖，从而简化除菌步骤并提高外植体存活率，且该改造不会影响农杆菌的T-DNA递送能力[9]。

对于对根瘤农杆菌不敏感的植物物种，发根农杆菌（*Agrobacterium rhizogenes*）提供了有效替代方案。该系统已成功用于诱导马铃薯近缘种的转基因毛状根，并最终实现基因编辑植株的再生[12]。在黄瓜、西瓜等作物中也建立了毛状根转化体系，可用于CRISPR构建体的快速验证和转化材料的快速获得[13]。

1.2　基因枪（微弹轰击）法的革新

基因枪法通过高速微粒轰击将外源DNA导入植物细胞，具有操作简便、受植物物种和基因型影响小的特点，是植物遗传转化常用技术之一。通过优化外植体前处理条件、轰击次数、压力和距离等参数，可显著提升转化效率，如在白菜小孢子转化中，经参数优化后转化率最高可达10.82%[14]。

尽管基因枪法已应用数十年，但其转化效率低、结果一致性差的问题仍长期存在。近期研究发现，传统基因枪递送效率很大程度上受限于气体与颗粒流的物理障碍。针对该问题，研究者通过优化“枪管”设计，开发出新型导向枪管，显著提高了外源基因的递送效率[15]。该优化方案在多种作物中得到验证，如在洋葱表皮中瞬时转染效率提升22倍，玉米幼胚的稳定转化频率提升10倍以上，小麦茎尖分生组织中CRISPR系统介导的基因编辑效率实现翻倍[16]，同时还实现了不依赖组织培养的稳定遗传转化，进一步提高了该技术的应用价值。

1.3　纳米材料递送技术与应用前景

纳米技术的发展为植物遗传转化开辟了不依赖生物载体、可跨越物种障碍的新路径。通过设计如介孔二氧化硅纳米颗粒（MSNs）、脂质纳米粒（LNPs）以及阳离子修饰的纤维素纳米晶体CNC和玉米醇溶蛋白Zein等植物源生物聚合物纳米晶体，可将DNA、RNA或蛋白质复合物（如Cas9/sgRNA核糖核蛋白复合体）高效包裹并递送进入植物细胞。这些纳米材料能保护核酸免于降解，并通过物理方

法（如叶片注射或真空渗透）辅助其穿越细胞壁，借助内吞等途径实现胞内递送与外源基因的瞬时表达[17]。目前，纳米材料递送技术主要应用于瞬时表达或基因编辑研究，在实现稳定遗传转化方面仍需进一步探索，但其在递送CRISPR核糖核蛋白复合体实现高效、低脱靶基因编辑方面已展现出巨大潜力。

近期，更多创新性递送平台的出现进一步推动了该领域的发展。例如，基于天冬氨酸修饰的聚合物胶束（Asp/PDPA-NP）等仿生型纳米载体，能利用植物内源的氨基酸转运蛋白实现外源物质的快速、跨物种胞内递送，可在10 min内将物质（如植物激素ABA）送入细胞，已在作物抗旱改良中展现出应用价值[8]。此外，物理装置型递送系统也取得重要突破，如适用于水陆环境的两栖微针（amphibious microneedles），其独特的核–壳结构可在不同环境中实现核酸、蛋白质、活性农杆菌等货物的可控释放，为复杂环境下的植物工程提供了通用工具[18]。

1.4 病毒载体递送系统的发展与应用

植物病毒载体是一种利用改造后的病毒基因组递送外源基因的工具，具有表达快速高效、通常无需组织培养的特点，在基因功能研究和生物技术应用中占有独特地位。其核心原理是将外源基因序列插入病毒基因组的非必需区域，构建重组病毒感染性克隆，通过机械接种等方式导入植物，利用病毒自身的复制和移动能力实现外源基因的高水平表达。自1980年Howell等[19]首次证实克隆的花椰菜花叶病毒（CaMV）DNA具有感染性，以及1984年Brisson等[20]利用该病毒载体在植物中表达细菌基因以来，植物病毒载体正式成为植物遗传工程的重要工具。

历经数十年发展，植物病毒载体的设计和应用日趋精细化、多元化。为克服病毒基因组承载容量小、外源基因不稳定的局限，研究者开发了双启动子、自切割多肽融合以及双组分体内重组（如magnICON系统）等多种策略[21]；同时，病毒载体的应用场景也从早期的蛋白表达和基因沉默，逐步拓展至基因编辑工具的递送。例如，Weiss等[22]对烟草脆裂病毒（TRV）进行改造，将紧凑型基因编辑系统TnpB-ISYmu1递送至拟南芥中，实现了无需组织培养、可遗传的“一步法”基因编辑，在突破传统递送技术瓶颈方面展现出巨大潜力。基于马铃薯Y病毒（PVY）和辣椒脉斑驳病毒（PVMV）构建的载体系统可同时高效表达2个外源蛋白，大幅提升了基因功能研究的效率[23]。

总体而言，病毒载体递送技术具有外源基因表达快速高效、宿主范围相对广泛且通常不依赖组织培养等显著优势。但该技术也存在明显局限，如外源基因承载容量有限、通常无法稳定遗传，同时存在潜在的生物安全风险。未来，通过将病毒载体与纳米材料等新兴递送系统联用，并通过删除致病基因、拆分功能模块等方式加强生物安全设计，有望使植物病毒载体在作物精准改良和合成生物学中发挥更关键的作用。

除上述递送系统外，原生质体转化法也是一类重要的植物遗传转化技术，在特定场景中发挥重要作用。该技术通过酶解法去除植物细胞壁获得原生质体，随后利用聚乙二醇（PEG）介导的化学转化、电穿孔或脂质体包裹等方法将外源DNA导入细胞[24]。原生质体转化具有细胞均一性好、转化效率高、可进行瞬时表达与稳定转化等优点。在CRISPR介导的基因编辑中，可直接向原生质体递送RNP复合物，实现无外源DNA整合的编辑，展现出独特的技术优势[25]。目前，原生质体转化技术已在水稻、拟南芥、烟草及多种药用植物中成功应用，成为基因功能研究、基因组编辑及合成生物学调控元件筛选的重要平台。但原生质体转化也存在明显局限：其应用高度依赖成熟的原生质体制备与植株再生体系，整体操作流程复杂、实验周期较长，且部分物种至今仍难以实现原生质体的高效再生，成为该技术规模化应用的主要瓶颈。

2 发育调控因子的工程化应用

向细胞内导入核心再生转录因子，人为诱导细胞“重编程”并重塑细胞命运，是克服植物再生障碍的有效技术路径。BBM、WUS、GRF等发育调控因子的工程化应用取得了系列突破，其中GRF与其互作因子GIF构成的嵌合蛋白最具代表性[6]。

2.1 GRF-GIF系统的机制解析与应用

GRF是植物特有的一类转录因子，广泛存在于各类陆生植物类群中。在叶片、花器官的组织中，GRF可以与转录共激活因子GIF互作形成转录调控

复合物，在分生组织特性（meristematic specification）维持中发挥功能[26]。2020年Kong等[27]研究证明异源表达拟南芥*AtGRF5*基因可以显著提高甜菜、油菜、向日葵、大豆及玉米的再生或遗传转化效率。随后，Debernardi等[6]将小麦*TaGRF4*和*TaGIF1*基因的编码区通过一段柔性linker融合为单一嵌合基因*TaGRF4-GIF1*，过表达该基因能显著提升小麦、小黑麦和水稻的再生效率，缩短再生时间，并扩大可转化基因型的范围，标志着GRF-GIF嵌合蛋白工程化应用正式开始。目前，该策略已在多种重要作物得到广泛验证，展现出优异的再生增强效果（表2）。

表2　GRF-GIF嵌合体在植物再生与遗传转化中的应用效果

Table 2　Application performance of GRF-GIF chimeras in plant regeneration and genetic transformation

嵌合体 Chimera	转化物种 Transformed species	外植体类型 Explant type	效果 Performance	参考文献 Reference
TaGRF4-GIF1	小麦、水稻、柑橘	幼胚、愈伤组织	显著提高再生效率，缩短再生时间，提高可转化基因型数量	[6]
TaGRF4-GIF1	小麦、大麦	幼胚	促进再生，但大麦中抑制再生，需优化表达	[38]
TaGRF4-GIF1 ZmGRF1-GIF1	玉米	幼胚	与三元载体系统结合，小麦来源与玉米来源的GRF-GIF均大幅提高再生转化频率	[11]
TaGRF4-OsGIF1	高粱	幼胚	与三元载体系统结合，转化效率达38.28%，为原始方法的7.71倍，转化流程缩短	[28]
TaGRF4-GIF1 DcGRF4-GIF1	铁皮石斛	叶片、茎段	显著提高植株再生效率	[29]
GRF5	甜菜、油菜、大豆、向日葵、玉米	愈伤组织、幼胚	提高再生与转化效率，克服基因型依赖性	[27]
ClGRF4-GIF1	西瓜	子叶、下胚轴	转化效率最高达67.27%，实现基因型非依赖性转化	[32]
SlGRF4c-GIF1a	番茄	愈伤组织	显著提高再生效率，缩短再生周期约1个月	[31]
TaGRF4-TaGIF1 VvGRF4-VvGIF1 CcGRF4-GIF1	二倍体野生草莓	叶片	三种来源的嵌合体均显著提高再生效率	[34]
AtGRF5	黄瓜、甜瓜、西瓜	子叶、愈伤组织	促进愈伤增殖与干细胞扩增，提高转化效率	[39]
GmGRF3-GIF1	大豆	子叶节	显著提高再生与转化效率，扩大可转化品种范围	[30]
AcGRF4-AcGIF1	猕猴桃	叶片、下胚轴、顶芽；叶柄	显著提高发根农杆菌介导的毛状根诱导率和再生效率	[35]
BoGRF4-GIF-BoGRF4 BoGRF5-GIF-BoGRF5	甘蓝	子叶、下胚轴	均显著提高再生效率，BoGRF5-GIF-BoGRF5效果更强，再生效率提高55.2%	[37]
GRF4-GIF1	莴苣	子叶	显著提升多个栽培及野生种的体外再生效率和不定芽发生频率	[33]
CpGRF4-CpGIF1	柑橘	上胚轴	植物再生率达44.17%，为空载对照的3倍	[36]

在玉米中，结合三元载体系统，*ZmGRF1-ZmGIF1*嵌合体可使自交系B104的转化效率提升3.5–6.5倍[11]；单独表达内源*GRF5*或来源于小麦的*TaGRF4-GIF1*同样能提升玉米转化效率[27]。在高粱中，*GRF4-GIF1*嵌合体和三元载体系统联用，成功建立了快速高效的遗传转化及基因编辑平台[28]。在铁皮石斛（*Dendrobium catenatum*）中，来源于小麦的*TaGRF4-GIF1*和内源*DcGRF4-GIF1*均可显著提高叶片和茎段的再生效率[29]。值得注意的是，*TaGRF4-GIF1*可在无外源细胞分裂素的条件下诱导小麦高效再生，为开发无选择标记的植物转化系统提供了新可能[6]。

在双子叶植物中，GRF-GIF嵌合体同样能发挥高效的再生调控作用。*GmGRF3-GIF1*嵌合体可以提高大豆遗传转化与基因编辑效率[30]；SlGRF-GIF可使番茄组织培养时芽再生时间提前约1个月，并将

转基因效率加倍[31]。在西瓜中，表达microRNA396（miR396）靶位点突变的*ClGRF4-GIF1*嵌合体实现了高达67.27%的转化效率，且突破了基因型限制[32]。该系统在莴苣[33]、草莓[34]、猕猴桃[35]和柑橘[6, 36]等多种作物中均表现出强大的再生增强效应。在甘蓝中，研究者设计了*BoGRF5-GIF-BoGRF5*嵌合体，以子叶和下胚轴为外植体进行遗传转化时，可将甘蓝转化效率提高55%[37]。

*GRF*是miR396的下游靶标基因，其基因表达受到miR396转录后抑制[40]。因此，可对*GRF*基因的的miR396靶向位点进行定点突变以阻断miR396介导的切割，或在细胞中表达靶标模拟物MIM396以抑制miR396活性，从而提升GRF–GIF蛋白含量、增强其再生促进能力[29]，但GRF-GIF蛋白含量过高也可能会危害植株的正常发育[34]。蛋白结构的研究进一步确定了GRF-GIF复合体协同工作的原理：GRF单独表达时，其DNA结合结构域的活性受抑制；而GRF和GIF结合后，其DNA结合结构域开放，实现高效的转录上调[41]。GRF-GIF嵌合蛋白可以跨物种发挥功能，但会受到供体植物和受体植物间亲缘关系的影响。如在草莓中，来源于葡萄、小麦和柑橘的*GRF4-GIF1*均可提高草莓再生效率，而葡萄来源的*VvGRF4-GIF1*的效果最好，且不会产生异常表型[34]。

系统进化分析发现GRF和GIF蛋白家族在陆地植物中广泛存在，并存在成员多样化现象。两者间的蛋白相互作用早在蕨类植物中就有体现，并在不同植物亚门中也普遍保守[42]。这种进化上的保守性是GRF-GIF系统跨物种发挥作用，成为再生诱导的普适性工具的分子基础。以上结果说明，在应用GRF-GIF时需注意其物种来源及表达情况，实现再生效率与植株正常发育之间的平衡。

2.2 其他关键发育调控因子的功能与应用

除GRF-GIF外，许多在胚胎发生和分生组织维持中发挥核心调控作用的转录因子在植物再生诱导中也展现出巨大潜力[43]。例如，在木兰科木本植物鹅掌楸（*Liriodendron hybrid*）中过表达*LhBBM*基因能显著促进体细胞胚胎发生并提高遗传转化效率[7]。在拟南芥和辣椒中，通过协同应用根干细胞微环境（root stem cell niche）的关键因子（如RBR、SCR、SHR、AIL/PLT和WOX家族成员），可在不依赖外源植物激素的情况下诱导体细胞胚胎再生[5]。在芜菁和白菜中共表达发育调节因子ZmWUS2-IPT-AtPLT5，可实现高效再生及转化[44–45]；玉米ZmH-SCF1通过促进胚胎愈伤组织增殖而显著提高农杆菌介导的转化效率[46]。

GRF-GIF可与其他再生调节因子协同发挥功能。例如拟南芥GRF-GIF与AINTEGUMENTA（ANT）可以协同促进侧生器官的分生能力[47]，GRF-GIF-BBM组合也已被用于提高难转化植物再生效率[48]。这些结果表明，通过合理搭配不同的调控因子，有望在不同植物中实现更精准、更高效的再生调控。

2.3 多肽及小分子化合物在植物再生中的调控作用

多肽类信号分子正日益成为优化植物再生效率的重要调控工具。近年来研究发现，多种植物内源多肽在组织培养过程中参与再生调控。分泌型多肽RGF家族成员RGF3、RGF8[49]以及PIP家族成员PIP1、PIPL3[50]，可通过RGI或RLK7受体激活下游SERK-MKK-MAPK级联，稳定PLT等核心多能性蛋白，增强愈伤组织的芽再生能力。REF1作为不依赖于系统素的局部创伤信号多肽，被其受体激酶PORK1识别后，激活下游MAPK信号通路并上调*WIND1*等核心转录因子的表达，进而激活*ESR1*等基因启动细胞重编程[51–52]，活化的WIND1可进一步促进REF1前体基因的表达，实现损伤部位再生信号的放大与稳定。

在实践中，可以外源施加人工合成的多肽提升再生与转化效率。在拟南芥、番茄、水稻组织培养时加入PIPL3，外植体再生效率提高1.4–2.8倍[53]；在番茄、大豆、小麦、辣椒和玉米等作物中，添加REF1多肽可将再生与转化效率提升数倍至数十倍[51, 54]，与使用再生调控蛋白的策略形成有效互补。除多肽外，多种小分子化合物也在植物再生和遗传转化中发挥重要调控作用。细胞分裂素类似物thidiazuron（TDZ）[55]、广谱性再生激活剂ferric pyrophosphate X（FPX）[56]、抗氧化剂glutathione（GSH）[57]和ascorbic acid（ASC）[58]等，均可通过不同机制提升植物再生效率。

研究发现，原本开发用于治疗阿尔茨海默病等人类疾病的GSK-3β抑制剂TDZD-8，在甘蓝型油菜、

大麦等作物和林木植物栓皮栎中，可显著促进微孢子胚胎发生和体细胞胚胎发生[59]。其作用机制主要是上调*FUS3*、*LEC2*等胚胎发生关键基因及*TAA1*等生长素合成基因的表达，并动态调控油菜素内酯通路，从而高效促进植物胚胎发生。HIR99021、BIO、LiCl等其他结构的GSK-3β抑制剂也可能具备类似的跨界活性，有望为植物再生调控提供全新的化学遗传学工具箱。

3　植物再生的表观遗传调控

植物再生是已分化细胞通过重编程获得多能性或全能性的动态过程，该过程的有序进行依赖多层次的调控机制。其中，DNA甲基化、染色质可及性变化和microRNA介导的调控等表观遗传机制，共同构成一个精细的调控网络，在植物再生的细胞命运转变中发挥关键作用[60]。

3.1　小分子化合物介导的表观遗传调控

借助小分子化合物调控细胞组蛋白修饰从而提升植物再生效率是一种简便高效的思路。目前最有效的表观遗传调控分子主要包含DNA甲基转移酶抑制剂和组蛋白去乙酰化酶抑制剂两类。如DNA甲基转移酶抑制剂氮杂胞苷（Aza）能够加快桃（*Prunus persica*）愈伤组织的生长，而H3K27me3去甲基化酶抑制剂GSK-J4会阻碍愈伤组织生成，证实DNA低甲基化状态及H3K27me3去甲基化程度在植物再生中发挥重要调控功能[61]。在生菜（*Lactuca sativa* L.）和本氏烟（*Nicotiana benthamiana*）原生质体的培养过程中，向培养基内加入组蛋白去乙酰化酶抑制剂曲古抑菌素A（TSA）或丁酸钠（NaB）后，细胞分裂率会提高20%以上，加速愈伤组织的增殖[62]；TSA通过提高组蛋白H3乙酰化程度，上调*CDK*、*CYCD3-1*等细胞周期相关基因和*WUS*的表达。5-氮杂胞苷（5-azaC）能够降低黑刺槐（*Robinia pseudo-acacia* L.）的全基因组DNA甲基化水平，激活以Rp-MYB2为主的转录网络，改善不定根的再生能力[63]。BIX-01294通过抑制H3K9me2水平和DNA甲基化，促进甘蓝型油菜和大麦小孢子培养早期的重编程、全能性获得及胚状体形成[64]。这些研究结果表明，表观遗传化学调节方法可以在一定程度上普遍应用于各类植物，提升其再生效率。

3.2　内源表观遗传因子在再生中的核心作用

内源性表观遗传因子本身是再生调控网络的核心组件[65]。在拟南芥中，组蛋白甲基转移酶ATX4通过对*STM*等芽分生组织关键基因进行H3K4me3修饰，调控芽再生过程[66]；PRC2复合物（催化H3K27me3）[67]、组蛋白乙酰转移酶（HATs）[68]、去乙酰化酶（HDACs）[69]等表观遗传因子，通过调控H3K27me3的去沉积、H3乙酰化水平的升降，精确控制*WUS*、*LEC*等再生相关转录因子的时空表达。这些研究充分表明，表观遗传重编程是植物再生过程中细胞命运转变的必需环节。

3.3　等位基因与细胞区室水平的表观调控

当前，植物再生的表观遗传调控研究正朝着更精细的时空维度深入，一系列新发现不断深化对该调控网络的认知。研究表明，表观遗传调控机制在物种间存在显著差异，不同植物可能通过不同的表观机制实现再生[60]；Guo等[70]利用杂交杨树系统研究发现，芽再生过程中，来源于不同亲本的等位基因甲基化模式与基因表达保持相对独立。综上所述，表观遗传调控网络可能与代谢、离子信号等生理过程存在耦联，共同构成了植物再生背后多维、动态的表观遗传调控景观。

4　不依赖组织培养的“原位转化”技术

前文系统阐述了基因递送系统的创新发展、发育调控因子及表观调控因子的工程化应用，这些进展为实现高效遗传转化奠定了核心工具基础。但传统转化流程高度依赖离体组织培养，不仅操作步骤繁琐，还受到基因型的显著限制。“原位转化”（*in planta* transformation）技术的核心目标是整合并应用上述种类工具，直接在完整植株或特定器官中完成基因递送、细胞重编程及再生过程，从而彻底或部分绕过离体组织培养过程。从本质而言，原位转化是一个多技术整合的工具体系：首先依赖于高效、适配的递送系统，将外源组件送入植物适宜部位，其次需要借助发育调控因子或多肽信号，主动诱导细胞重编程与再生结构发生，同时，还可结合可视化标记技术，实现转化事件的快速初筛。本章将重点综述该领域的主要技术路径，这些路径均清晰体现了从“离体经验操作”向“原位理性设计”的范式转变。

4.1 发根农杆菌介导的毛状根转化与再生系统

发根农杆菌（*Agrobacterium rhizogenes*）侵染能够在不依赖激素、不需要无菌环境的情况下，在侵染部位直接诱导产生转基因毛状根，为根特异表达基因功能研究、根生理及根际微生物互作研究提供了高效的瞬时表达平台[71]。利用发根农杆菌递送CRISPR组件，也可作为基因编辑效率快速验证和高通量筛选的强大工具。无菌条件下诱导得到的毛状根也可作为稳定遗传转化的外植体，因此也是连接瞬时转化与稳定遗传转化的重要桥梁。

4.2 基于“切–浸–萌芽”策略的原位转化系统

近年来，一类基于“切–浸–萌芽”（Cut-Dip-Budding, CDB）策略的简化原位转化方法在多种植物中取得了显著成功。该方法的核心操作是：在植株顶芽、腋芽等分生组织处制造切口，随后用农杆菌侵染液侵染切口部位，利用植物自身的创伤响应与再生能力，在伤口部位直接诱导形成转基因芽。CDB策略彻底绕过了离体组织培养步骤，具有操作简便、周期短、无需昂贵设备、对基因型依赖度较低等突出优点，在蒲公英（*Taraxacum mongolicum*）和地黄（*Rehmannia glutinosa*）[72]、长寿花（*Kalanchoe blossfeldiana*）和虎尾兰（*Sansevieria trifasciata*）[73]等植物中都得到了成功应用。

一个类似的方法是将农杆菌侵染液注射到植物组织内，农杆菌通过韧皮部传递到分生组织中，并诱导转基因不定根或侧芽的形成，最终实现在非组培条件下的植株再生，该策略被称为RAPID（regenerative activity-dependent in planta injection delivery）[74]。运用该方法成功对红薯（*Ipomoea batatas*）、马铃薯（*Solanum tuberosum*）和番薯藤（*Ipomoea pescaprae*）等植物进行高效遗传转化。

4.3 发育调控因子驱动的原位分生组织诱导

对于再生能力较弱的植物，研究人员将CDB或RAPID策略与发育调控因子（如BBM、WUS等）的递送相结合，以主动增强伤口部位细胞的重编程与再生能力，进而在植株非分生组织部位直接诱导形成新的分生组织，从而完全或部分绕过愈伤组织阶段[75]。2020年，Cody等[76]报道了DD（direct delivery）和Fast-TrACC（fast-treated *Agrobacterium* co-culture）技术，在本氏烟中使用再生调控因子WUS2、BBM和IPT，直接在幼苗上诱导出能够发育成完整植株的新生分生组织。

除此之外，通过WIND1和IPT以及CRISPR组分的组合应用，在本氏烟、番茄、大豆植株的节间直接诱导出转基因或基因编辑的新芽[52]。这些研究表明，通过理性设计与组合关键发育调控因子，能够实现对再生位点的精准操控，推动“组织培养无关”转化平台的发展，同时针对特定植物的技术参数仍需精细优化。

4.4 可视化标记系统在转基因筛选中的应用

原位转化过程无需组培，更依赖快速筛选，因此灵敏可靠的可视化标记系统的使用将极大提高原位转化的筛选效率。目前经典的可视化标记系统包括GUS等酶促报告系统、GFP、DsRed、mCherry等荧光蛋白报告系统，以及荧光素酶等生物发光报告系统。但上述系统均存在明显局限性：GUS染色为有损检测，且需添加底物、染色反应耗时较长；荧光蛋白检测依赖专用设备，且信号相对较弱，难以精准观测；生物发光系统通常需要外源添加底物，且信号强度低、持续时间短，不适合高通量筛选或田间初步鉴定。

近年来开发的RUBY系统，因表型直观、物种普适性强等优势受到广泛关注。该系统通过表达3个甜菜红素合成基因，使转化组织呈现红色，实现了转基因事件的无损、快速、直观鉴定[77]。利用*PL1*、*ANT1*等花青素合成相关调控基因作为可视选择标记，也在多种作物遗传转化中展现出良好的应用效果[78]。这些可视化工具与前述再生增强技术联用，共同构建了更高效、更便捷的植物遗传转化与基因编辑平台。

5 总结与未来展望

5.1 核心进展总结

近年来，植物再生与遗传转化领域的核心进展体现在：（1）关键调控因子的工程化应用，特别是GRF-GIF嵌合蛋白的使用，为跨越基因型障碍提供了普适性工具；（2）表观遗传重编程机制的解析与干预，揭示了染色质状态动态在细胞命运决定中的核心作用，并催生了化学干预新策略；（3）递送系统的多元化创新，三元载体、纳米材料及病毒载体等提升了外源生物大分子的递送效率与适用范围；

（4）原位转化技术的兴起，如CDB、Fast-TrACC等策略，正推动遗传操作向“非组织培养依赖”方向演进。

当前的重要趋势是将上述技术模块化整合，构建一体化的解决方案。例如，将高效递送系统（如三元载体）、可视化标记（如RUBY）、再生增强因子（如GRF-GIF）与CRISPR/Cas9编辑工具耦合，借助原位转化方法进行递送，有望实现从基因递送、编辑、再生到鉴定的全流程优化。事实上，这种融合已见端倪，Prusty等[38]将GRF4-GIF1与RUBY可视化标记系统结合，成功用于小麦和大麦的转化与编辑事件筛选，并进一步通过编辑RUBY通路基因实现编辑子的便捷初筛，为技术模块的集成应用提供了有益示范。

5.2　重要挑战与关键科学问题

尽管进展显著，该领域仍面临一系列深层挑战，制约其真正迈向“理性设计”。

一是植物再生的机制尚未完全解析。植物再生是一个由激素信号、机械力、细胞形态及表观遗传状态共同调控的高度动态、自组织过程[54]。然而，目前对该过程在单细胞分辨率和连续时空维度上的解析仍然不足[79]。

二是技术工具的物种适配性问题。调控因子的功效常具有物种特异性，例如，小麦TaGRF4-GIF在大麦中不仅无法发挥再生促进作用，反而会抑制再生进程[38]，WUS、BBM在部分植物中的应用也会产生不利的发育表型[43，80]。同样，基因递送系统的效率、原位转化策略的适用性也受到宿主生理与遗传背景的显著影响，目前尚未形成普适性理论框架，用于预测并指导不同植物中最优技术工具的组合与应用。

三是生物安全问题。实现高效、精准且无外源DNA整合的基因编辑，并确保编辑性状的稳定遗传，仍是植物遗传转化领域的技术难点。与此同时，病毒载体在环境中的传播、重组及致病性恢复风险尚需系统评估；纳米材料颗粒在植物体及土壤生态系统中的持久性、迁移行为及潜在毒性尚不明确；遗传转化操作中用到的天然或合成基因及调控元件在植物群体中的潜在扩散风险也需纳入考量。针对上述风险，建立一套与之匹配、科学合理的生物安全评估体系与监管机制，已成为推动这些技术规模化应用的迫切需求。

5.3　未来发展路径

为化解前述相关挑战并推动植物遗传转化技术的优化发展，后续可统筹多个方向共同推进，逐步搭建高效、简便且成本可控的植物遗传操作技术体系。

近来的研究重心为工具箱的优化、整合现有技术并完成标准化、降低技术使用成本和操作门槛。第一，要把已验证过的再生调控因子系统梳理整合，搭建可共享的再生调控“工具库”；第二，优化原位转化流程，同时整合RUBY等无损可视化标记技术，构建低成本、高通量的遗传转化和阳性初筛体系；第三，开发可响应生物或环境信号的诱导型载体，完成对外源基因表达或基因编辑过程的精准时空调控。整体上看，这一阶段的核心目标是将前沿研究成果转化为稳定、易用的标准化操作方案。

中期阶段研究方向为围绕整个再生调控过程的机制解析。运用单细胞组学这类高分辨率技术，从时空维度动态解析再生过程中细胞重编程的分子与表观遗传变化轨迹。在此基础上搭建整合多组学数据和相关AI工具的预测模型，用于筛选适配特定物种的最优策略，设计调控因子的最优组合。同时梳理医学等领域已明确生物活性的小分子，可为植物再生化学工具箱补充一类独有的、能快速验证的新化合物，加速再生调控剂的筛选。

长期目标是高效再生与性状设计的深度耦合，开展理性设计育种，加速农作物优质品种的培育。此外，还需要同时构建与技术创新相适应的生物安全评估与全球治理框架，推进以科学证据为基础的国际监管共识及社会接受度研究，保障技术实际应用的安全性、伦理规范性与可持续性，为粮食安全应用与农业领域长期可持续发展给出符合实际且可落地的解决路径。

参考文献

[1] Nivya VM, Shah JM. Recalcitrance to transformation, a hindrance for genome editing of legumes [J]. Front Genome Ed, 2023, 5: 1247815.

[2] 周媛, 贺贝, 童俊等. 杜鹃再生及遗传转化 [J]. 分子植物育种, 2025: 1-15.
Zhou Y, He B, Tong J, et al. Regeneration and genetic transformation

system of *Rhododendron* [J]. Mol Plant Breed, 2025, 1-15

[3] Sun Y, Hong Z, Wang W, et al. Establishment of an efficient and versatile genome editing platform for *L. ruthenicum* [J]. Plant Physiol, 2025, 199(2): kiaf486.

[4] Sun J, Li J, Zhao M, et al. Successful establishment of somatic embryogenesis and shoot organogenesis systems in *Catalpa bungei* C.A.Mey [J]. Plants (Basel), 2025, 14(17): 2688.

[5] Wittmer J, Pijnenburg M, Wijsman T, et al. Rational design of induced regeneration via somatic embryogenesis in the absence of exogenous phytohormones [J]. Plant Cell, 2025, 37(11): koaf252.

[6] Debernardi JM, Tricoli DM, Ercoli MF, et al. A GRF-GIF chimeric protein improves the regeneration efficiency of transgenic plants [J]. Nat Biotechnol, 2020, 38(11): 1274-1279.

[7] Zhang J, Hao Z, Ruan X, et al. Role of BABY BOOM transcription factor in promoting somatic embryogenesis and genetic transformation in a woody magnoliid *Liriodendron* [J]. Plant Cell Environ, 2025, 48 (7): 4859-4872.

[8] Xia X, Dong JW, Li AJ, et al. Amino acid transporters mediate autonomous delivery of nanoparticle vehicles into living plants [J]. Nat Commun, 2025, 16(1): 6715.

[9] Aliu E, Ji Q, Wlazlo A, et al. Enhancing *Agrobacterium*-mediated plant transformation efficiency through improved ternary vector systems and auxotrophic strains [J]. Front Plant Sci, 2024, 15: 1429353.

[10] Jeong J-H, Jeon E-Y, Hwang MK, et al. Development of super-infective ternary vector systems for enhancing the *Agrobacterium*-mediated plant transformation and genome editing efficiency [J]. Hortic Res, 2024, 11(9): uhae187.

[11] Vandeputte W, Coussens G, Aesaert S, et al. Use of GRF-GIF chimeras and a ternary vector system to improve maize (*Zea mays* L.) transformation frequency [J]. Plant J, 2024, 119(4): 2116-2132.

[12] Butler NM, Jansky SH, Jiang J. First-generation genome editing in potato using hairy root transformation [J]. Plant Biotechnol J, 2020, 18(11): 2201-2209.

[13] Nguyen DV, Hoang TT, Le NT, et al. An efficient hairy root system for validation of plant transformation vector and CRISPR/Cas construct activities in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. Front Plant Sci, 2021, 12: 770062.

[14] Liu Y, Zhang S, Zhang S, et al. Efficient transformation of the isolated microspores of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) by particle bombardment [J]. Plant Methods, 2024, 20 (1): 17.

[15] Li ZP, Thorpe C, Jiang S, et al. Measuring plasmodesmata-mediated intercellular trafficking using microparticle bombardment in arabidopsis and crops [J]. Curr Protoc, 2025, 5(8): e70194.

[16] Thorpe C, Luo W, Ji Q, et al. Enhancing biolistic plant transformation and genome editing with a flow guiding barrel [J]. Nat Commun, 2025, 16(1): 5624.

[17] Vinzant K, Rashid M, Clouse DE, et al. From plants to plants: Plant-derived biological polymers as sustainable and safe nanocarriers for direct delivery of DNA to plant cells [J]. Nano Lett, 2025, 25 (14): 5572-5581.

[18] Shen D, Rajappa S, Zhao Y, et al. Amphibious microneedles for programmable delivery of biomolecules and microorganisms in living plants [J]. Nat Commun, 2025, 16(1): 10993.

[19] Howell SH, Walker LL, Dudley RK. Cloned cauliflower mosaic virus DNA infects Turnips (*Brassica rapa*) [J]. Science, 1980, 208 (4449): 1265-7.

[20] Brisson N, Paszkowski J, Penswick JR, et al. Expression of a bacterial gene in plants by using a viral vector [J]. Nature, 1984, 310(5977): 511-514.

[21] Abrahamian P, Hammond RW, Hammond J. Plant virus-derived vectors: Applications in agricultural and medical biotechnology [J]. Annu Rev Virol, 2020, 7(1): 513-535.

[22] Weiss T, Kamalu M, Shi H, et al. Viral delivery of an RNA-guided genome editor for transgene-free germline editing in *Arabidopsis* [J]. Nat Plants, 2025, 11(5): 967-976.

[23] Li N, Deng C, Zhu Y, et al. Development of convenient potyvirus-based vectors for simultaneous expression of two heterologous proteins in solanaceous plants [J]. BMC Plant Biol, 2025, 25(1): 1572.

[24] Xu Y, Li R, Luo H, et al. Protoplasts: small cells with big roles in plant biology [J]. Trends Plant Sci, 2022, 27(8): 828-829.

[25] Liang Z, Chen K, Li T, et al. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes [J]. Nat Commun, 2017, 8: 14261.

[26] Kim JH. Biological roles and an evolutionary sketch of the GRF-GIF transcriptional complex in plants [J]. BMB Rep, 2019, 52(4): 227-238.

[27] Kong JX, Martin-Ortigosa S, Finer J, et al. Overexpression of the transcription factor *GROWTH-REGULATING FACTOR5* improves transformation of dicot and monocot species [J]. Front Plant Sci, 2020, 11: 572319.

[28] Li J, Pan W, Zhang S, et al. A rapid and highly efficient sorghum transformation strategy using GRF4-GIF1/ternary vector system [J]. Plant J, 2024, 117(5): 1604-1613.

[29] Yang Z, Zhao M, Zhang X, et al. *MIR396-GRF/GIF* enhances *in planta* shoot regeneration of *Dendrobium catenatum* [J]. BMC Genomics, 2024, 25(1): 543.

[30] Zhao Y, Cheng P, Liu Y, et al. A highly efficient soybean transformation system using GRF3-GIF1 chimeric protein [J]. J Integr Plant Biol, 2025, 67(1): 3-6.

[31] Swinnen G, Lize E, Loera Sanchez M, et al. Application of a GRF-GIF chimera enhances plant regeneration for genome editing in tomato [J]. Plant Biotechnol J, 2025, 23(9): 4044-4056.

[32] Feng Q, Xiao L, He Y, et al. Highly efficient, genotype-

independent transformation and gene editing in watermelon (*Citrullus lanatus*) using a chimeric *ClGRF4-GIF1* gene [J]. J Integr Plant Biol, 2021, 63(12): 2038-2042.

[33] Bull T, Debernardi J, Reeves M, et al. GRF-GIF chimeric proteins enhance in vitro regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation efficiencies of lettuce (*Lactuca* spp.) [J]. Plant Cell Rep, 2023, 42(3): 629-643.

[34] Sanchez ER, Price RJ, Marangelli F, et al. Overexpression of *Vitis GRF4-GIF1* improves regeneration efficiency in diploid *Fragaria vesca* Hawaii 4 [J]. Plant Methods, 2024, 20(1): 160.

[35] He Y, Bai ZM, Wu T, et al. AcGRF4-AcGIF1 chimeric protein improves the transformation and regeneration efficiency in kiwifruit [J]. Sci Hortic, 2025, 354: 114518.

[36] 沈文忠, 袁梦影, 黄丽婷等. 基于CRISPR/dCas9-TV系统激活发育调控因子表达提高柑橘转基因效率的研究 [J]. 园艺学报, 2025: 1-18.
Shen WZ, Yuan MY, Huang LT, et al. Enhancing citrus transformation efficiency by activating developmental regulators via the CRISPR/dCas9-TV system [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2025, :1-18

[37] Zhang Y, Liu J, Li Y, et al. Generation of novel *bpm6* and *dmr6* mutants with broad-spectrum resistance using a modified CRISPR/Cas9 system in *Brassica oleracea* [J]. J Integr Plant Biol, 2025, 67(5): 1214-1216.

[38] Prusty MR, Shatil-Cohen A, Kumar R, et al. Pigments to precision: RUBY aiding genetic transformation and genome editing in wheat and barley [J]. Physiol Mol Biol Plants, 2025, 31(4): 545-554.

[39] Li Y, Wang N, Feng J, et al. Enhancing genetic transformation efficiency in cucurbit crops through *AtGRF5* overexpression: Mechanistic insights and applications [J]. J Integr Plant Biol, 2025, 67(7): 1843-1860.

[40] Liebsch D, Palatnik JF. MicroRNA miR396, GRF transcription factors and GIF co-regulators: a conserved plant growth regulatory module with potential for breeding and biotechnology [J]. Curr Opin Plant Biol, 2020, 53: 31-42.

[41] Nosaki S, Ohtsuka M. The DNA binding of plant-specific GROWTH-REGULATING FACTOR transcription factors is stabilized by GRF-INTERACTING FACTOR coactivators [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2025, 89(5): 761-768.

[42] Cheng Z, Wen S, Wu Y, et al. Comparatively evolution and expression analysis of GRF transcription factor genes in seven plant species [J]. Plants (Basel), 2023, 12(15): 2790.

[43] Bakulin SD, Monakhos SG, Bruskin SA. Morphogenetic factors as a tool for enhancing plant regeneration capacity during in vitro transformation [J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(17): 8583.

[44] Wang Y, Yang X, Wang W, et al. Efficient genetic transformation and gene editing of Chinese cabbage using *Agrobacterium rhizogenes* [J]. Plant Physiol, 2024, 197(2): kiae543.

[45] 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(05): 1389-1398.
Ma X, Zhang JR, Zhuang HM, et al. Establishment of an efficient genetic transformation system mediated by *Agrobacterium rhizogenes* in turnip [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2025, 52(05):1389-1398

[46] Li Y, Geng Y, Qing X, et al. *ZmHSCF1* enhances *Agrobacterium*-mediated transformation frequency in commercial maize inbred lines by promoting embryogenic callus proliferation [J]. Plant Commun, 2025, 6(12): 101525.

[47] Jung JH, Mai TT, Kim E, et al. The GRF-GIF duo and AINTEGUMENTA act cooperatively for the meristematic competence of lateral organs in *Arabidopsis* [J]. J Exp Bot, 2025, 76: 6841-6852.

[48] Yarra R, Krysan PJ. GRF-GIF duo and GRF-GIF-BBM: novel transformation methodologies for enhancing regeneration efficiency of genome-edited recalcitrant crops [J]. Planta, 2023, 257(3): 60.

[49] Shinohara H, Mori A, Yasue N, et al. Identification of three LRR-RKs involved in perception of root meristem growth factor in *Arabidopsis* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(14): 3897-3902.

[50] Toyokura K, Goh T, Shinohara H, et al. Lateral inhibition by a peptide hormone-receptor cascade during *Arabidopsis* lateral root founder cell formation [J]. Dev Cell, 2019, 48(1): 64-75.

[51] Yang W, Zhai H, Wu F, et al. Peptide REF1 is a local wound signal promoting plant regeneration [J]. Cell, 2024, 187(12): 3024-3038.e14.

[52] Kshetry AO, Ghose K, Alok A, et al. A synthetic transcription cascade enables direct *in planta* shoot regeneration for transgenesis and gene editing in multiple plants [J]. Mol Plant, 2025, 18(12): 2066-2081.

[53] Hong C, Lee HG, Shim S, et al. Histone modification-dependent production of peptide hormones facilitates acquisition of pluripotency during leaf-to-callus transition in *Arabidopsis* [J]. New Phytol, 2024, 242(3): 1068-1083.

[54] Youngstrom C, Wang K, Lee K. Unlocking regeneration potential: harnessing morphogenic regulators and small peptides for enhanced plant engineering [J]. Plant J, 2025, 121(2): e17193.

[55] Velda AC, Rodriguez SaG, Descalsota MLV, et al. Thidiazuron-mediated and genotype-independent regeneration system for tomato (*Solanum lycopersicum* L.) [J]. J Appl Biol Biotechnol, 2023, 11(4): 128-134.

[56] Nakano T, Tanaka S, Ohtani M, et al. FPX is a novel chemical inducer that promotes callus formation and shoot regeneration in plants [J]. Plant Cell Physiol, 2018, 59(8): 1555-1567.

[57] Bednarek PT, Orłowska R, Mańkowski DR, et al. Glutathione and copper ions as critical factors of green plant regeneration efficiency of triticale *in vitro* anther culture [J]. Front Plant Sci, 2022, 13: 926305.

[58] Zhao H, Tan Z, Wen X, et al. An improved syringe agroinfiltration protocol to enhance transformation efficiency by combinative use of 5-azacytidine, ascorbate acid and tween-20 [J]. Plants (Basel), 2017, 6(1): 9.

[59] Berenguer E, Carneros E, Pérez-Pérez Y, et al. Small molecule inhibitors of mammalian GSK-3β promote *in vitro* plant cell reprogramming and somatic embryogenesis in crop and forest species [J]. J Exp Bot, 2021, 72(22): 7808-7825.

[60] Chen C, Hu Y, Ikeuchi M, et al. Plant regeneration in the new era: from molecular mechanisms to biotechnology applications [J]. Sci China Life Sci, 2024, 67(7): 1338-1367.

[61] Zheng B, Liu J, Gao A, et al. Epigenetic reprogramming of H3K27me3 and DNA methylation during leaf-to-callus transition in peach [J]. Hortic Res, 2022, 9: uhac132.

[62] Choi SH, Ahn WS, Lee MH, et al. Effects of TSA, NaB, Aza in *Lactuca sativa* L. protoplasts and effect of TSA in *Nicotiana benthamiana* protoplasts on cell division and callus formation [J]. PLoS One, 2023, 18(2): e0279627.

[63] Hussain SS, Li Y, Liu J, et al. DNA hypomethylation activates the *RpMYB2*-centred gene network to enhance regeneration of adventitious roots [J]. Plant Cell Environ, 2025, 48(2): 1674-1691.

[64] Berenguer E, Bárány I, Solís MT, et al. Inhibition of histone H3K9 methylation by BIX-01294 promotes stress-induced microspore totipotency and enhances embryogenesis initiation [J]. Front Plant Sci, 2017, 8: 1161.

[65] Liu XM, Zhu K, Xiao J. Recent advances in understanding of the epigenetic regulation of plant regeneration [J]. aBIOTECH, 2023, 4 (1): 31-46.

[66] Lee K, Park OS, Choi CY, et al. *ARABIDOPSIS TRITHORAX 4* facilitates shoot identity establishment during the plant regeneration process [J]. Plant Cell Physiol, 2019, 60(4): 826-834.

[67] He C, Chen X, Huang H, et al. Reprogramming of H3K27me3 is critical for acquisition of pluripotency from cultured *Arabidopsis* tissues [J]. PLOS Genetics, 2012, 8(8): e1002911.

[68] Rymen B, Kawamura A, Lambolez A, et al. Histone acetylation orchestrates wound-induced transcriptional activation and cellular reprogramming in *Arabidopsis* [J]. Commun Biol, 2019, 2(1): 404.

[69] Zhang H, Guo F, Qi P, et al. OsHDA710-mediated histone deacetylation regulates callus formation of rice mature embryo [J]. Plant Cell Physiol, 2020, 61(9): 1646-1660.

[70] Guo Y, Feng Y, Yang G, et al. Allele-specific DNA methylation and gene expression during shoot organogenesis in tissue culture of hybrid poplar [J]. Hortic Res, 2024, 11(3): uhae027.

[71] Ron M, Kajala K, Pauluzzi G, et al. Hairy root transformation using *Agrobacterium rhizogenes* as a tool for exploring cell type-specific gene expression and function using tomato as a model [J]. Plant Physiol, 2014, 166(2): 455-469.

[72] Cao X, Xie H, Song M, et al. Simple method for transformation and gene editing in medicinal plants [J]. J Integr Plant Biol, 2024, 66 (1): 17-19.

[73] Lu J, Li S, Deng S, et al. A method of genetic transformation and gene editing of succulents without tissue culture [J]. Plant Biotechnol J, 2024, 22(7): 1981-1988.

[74] Mei G, Chen A, Wang Y, et al. A simple and efficient in *planta* transformation method based on the active regeneration capacity of plants [J]. Plant Commun, 2024, 5(4): 100822.

[75] Niu YX, Wu QY, Ren SN, et al. Developmental regulators and additives in promoting genetic transformation and genome editing efficiency [J]. Plant Physiol Biochem, 2025, 230: 110811.

[76] Cody JP, Maher MF, Nasti RA, et al. Direct delivery and fast-treated *Agrobacterium* co-culture (Fast-TrACC) plant transformation methods for *Nicotiana benthamiana* [J]. Nat Protoc, 2023, 18(1): 81-107.

[77] He Y, Zhang T, Sun H, et al. A reporter for noninvasively monitoring gene expression and plant transformation [J]. Hortic Res, 2020, 7: 152.

[78] Kumar M, Ayzenshtat D, Rather GA, et al. Breaking the glass ceiling of stable genetic transformation and gene editing in the popular pepper cv Cayenne [J]. J Exp Bot, 2025, 76(10): 2688-2699.

[79] Tang L, Zhai L, Li J, et al. Time-resolved reprogramming of single somatic cells into totipotent states during plant regeneration [J]. Cell, 2025, 188(24): 6923-6938.e18.

[80] Yavuz C, Tek AL, Çalışkan ME. Induction of chromosomal aberrations with ectopic expression of native *BABY BOOM1* (*GmBBM1*) in soybean [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2024, 158(3): 59.

（责任编辑　张婷婷）