

评述与展望

Review and Progress

根癌农杆菌介导的甘薯遗传转化影响因素研究进展

闫会¹, 李强^{1,2}

1. 中国农业科学院甘薯研究所, 中国农业科学院甘薯遗传改良重点开放实验室, 徐州, 221131

2. 江苏徐州甘薯研究中心, 农业部甘薯生物学与遗传育种重点实验室, 徐州, 221131

✉ 通讯作者: instrong@163.com ✉ 作者

分子植物育种, 2012 年, 第 10 卷, 第 31 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0031

收稿日期: 2012 年 04 月 25 日

接受日期: 2012 年 05 月 15 日

发表日期: 2012 年 06 月 13 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

闫会, 李强, 2012, 根癌农杆菌介导的甘薯遗传转化影响因素研究进展, 分子植物育种(online) Vol.10 No.31 pp.1218-1226 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0031)

引用格式(英文):

Yan and Li, 2012, Research progress of factors affecting genetic transformation of sweetpotato mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.31 pp.1218-1226 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0031)

摘要 甘薯是世界上重要的块根作物, 是生产动物饲料、淀粉和燃料乙醇的重要原料。甘薯为异源六倍体, 并且自交不亲和, 因此难以通过常规育种方法聚合优良性状。甘薯遗传转化体系的建立为甘薯转基因分子育种提供了技术手段, 使得高产、优质、耐逆等优异基因的利用更加高效。在甘薯遗传转化中, 应用最广泛的是根癌农杆菌介导法。本文探讨了根癌农杆菌介导的甘薯遗传转化影响因素, 主要包括遗传因素和环境因素两大类。其中遗传因素有菌株类型, 菌液浓度, 甘薯基因型, 转化受体类型, 外植体状态等; 环境因素包括诱导物种类, 如酚类化合物、糖类、硝酸银等, 共培养时间, 选择压, 选择方法, 侵染时间等。同时概述了有益性状基因转化甘薯的现状, 展望了甘薯遗传转化未来发展方向和应用前景。

关键词 甘薯; 根癌农杆菌; 遗传转化; 影响因素

Research progress of factors affecting genetic transformation of sweetpotato mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

Yan Hui¹, Li Qing^{1,2}

1. Sweetpotato Research Institute, Key Laboratory of Sweetpotato Genetic Improvement, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Xuzhou, 221131

2. Jiangsu Xuzhou Sweetpotato Research Center, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Sweetpotato, Ministry of Agriculture, Xuzhou, 221131

✉ Corresponding author, instrong@163.com; ✉ Authors

Abstract Sweetpotato is an important root crop and serves as raw material for the processing of feed, starch and biofuel in various industries. Conventional breeding method has a relatively low efficiency because of its allohexaploid and self-incompatibility. Establishment of efficient genetic transformation system provides an essential tool for sweetpotato improvement. It shortens breeding periods, and realizes resource efficient utilization, such as high yield, good quality and stress tolerance genes. Recently, *Agrobacterium*-mediated genetic transformation is widely used genetically modified method for sweetpotato. We discussed the factors affecting the genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in sweetpotato, including genetic factors and environmental factors. Genetic factors include strain type, bacteria liquid concentration, sweetpotato genotype and acceptance materials, explant state, etc., and the later include species of induction, training time, pressure selection, the choice method, infection time, etc. The inductor include phenolic compounds, sugar, nitric acid silver and so on. We also summarized the current status of beneficial genes used in sweetpotato, and visualized the direction of sweet potato genetic transformation and its prospects in the future.

Keywords Sweetpotato, *Agrobacterium tumefaciens*, Genetic transformation, Affecting factors

甘薯是世界上重要的粮食、工业原料和新型生物能源作物。据统计, 我国甘薯栽培面积和产量分别约占世界的 50% 和 80% (FAO, 2010, <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#an>

cor), 是世界上最大的甘薯生产国。因此, 中国甘薯产业发展具有全球意义。长期以来, 常规育种是甘薯品种改良的主要途径, 但是由于甘薯染色体遗传背景复杂及自交不亲和等特点(李强等, 2005b),



导致常规育种周期长、目标基因不明确, 严重制约了甘薯产业的发展, 甘薯转基因技术可弥补其不足, 可在短时间内定向改良现有品种的农艺性状, 实现种质创新。

目前用于植物遗传转化的方法主要有农杆菌介导法、基因枪法和电击法。对甘薯的遗传改良多集中在数量性状(如产量、抗病虫害、品质等), 相关基因片段较大, 多成簇排布(李卫等, 2000, 科学通报, 45(8): 798-807)。根癌农杆菌介导法无包装限制, 加上拷贝数低、遗传稳定、目标明确等优点, 该法成为目前研究最清楚、应用最成功的转化方法。在已获得的近 200 种转基因植物中, 约 80% 是由该菌介导完成(王关林和方洪筠, 2000, 植物基因工程原理与技术, pp.361)。自 1987 年 Eilers 利用甘薯品种 Jewel 获得首个转基因愈伤组织和少量植株, 到目前甘薯遗传转化已取得较大进展。本文详细论述了根癌农杆菌介导甘薯遗传转化的影响因素, 并简要列举了有益性状基因转化甘薯的进展, 分析甘薯遗传转化目前面临的问题, 并展望了未来发展方向和前景, 以期对未来甘薯遗传转化研究提供参考。

1 根癌农杆菌介导甘薯遗传转化影响因素

根癌农杆菌是否实现外源基因的导入并发生整合与表达, 取决于 *vir* 基因是否活化和植物细胞

的感受态, 通过直接或间接影响 *vir* 基因和植物细胞感受态可以影响转化效率。影响转化效率的因素可归为遗传和环境因素两大类(邹智和卢长明, 2008), 其中遗传因素包括根癌农杆菌和甘薯两方面。环境因素包括诱导物、共培养时间、选择压、侵染时间等。影响甘薯遗传转化效率的因素也归为遗传因素和环境因素。

1.1 遗传因素

1.1.1 菌株类型

目前, 在甘薯遗传转化中应用的菌株主要是根癌农杆菌(表 1)。农杆菌对受体的吸附能力与菌株类型有关, 因此不同菌株对同一外植体的感染能力不同。鲁迪慧(1998)以甘薯的近缘野生种 *I. triloba* 为材料, 比较了菌株 LBA4404、GV3111SE、A2083SE 和 EHA101 的转化效率, 结果表明, EHA101 的转化频率较高; Otani 和 Shimada (2001)以菌株 EHA101、LBA4404、R1000 (均携带 *GUS* 基因)感染甘薯胚性愈伤组织, 同样表明菌株 EHA101*GUS* 基因瞬时表达率最高, 蒋盛军(2003)的研究也表明, 菌株 EHA101 较 LBA4404 有更高的遗传转化率。因此, EHA101 是较为理想的转化菌株。EHA105 是 EHA101 的衍生菌(王关林和方洪筠, 2000, 植物基因工程原理与技术, pp.373), 在近年的甘薯遗传转化中也被广泛使用。

表 1 用于甘薯遗传转化的根癌农杆菌菌株

Table 1 Different strains of *Agrobacterium tumefaciens* used in genetic transformation of sweetpotato

菌系	菌株	作者及年份
Mycelium	Strains	Authors and years
Nop	A208SE	翟红和刘庆昌, 2003
Oct	LBA4404	Newell et al., 1995; 罗红蓉等, 2002; 蒋盛军, 2003; 蒋盛军等, 2004; 高峰等, 2001; 臧宁等, 2008; 毕瑞明和高峰, 2007; Yang et al., 2011
Agr/ Suc	EHA101	Gama et al., 1996; Otani et al., 2003; 蒋盛军, 2003; Shimada et al., 2006; 李强, 2005a; 王欣等, 2006
	EHA105	Choi et al., 2007; Song et al., 2004; Zang et al., 2009; Gao et al., 2011a; 2011b; Xing et al., 2007; Xing et al., 2008

1.1.2 菌液浓度

由于菌株类型和植物材料的差异, 不同研究所得出的最佳侵染浓度不同, 如凌键等(2004)用菌株 N9-1 与北京 553 的茎段外植体进行共培养, 得出 $OD_{600}=0.4$, 侵染时间 4 min 为甘薯较适宜的感染浓

度和侵染时间; 李强等(2005a)研究表明, 菌液 (EHA101)浓度处于 $OD_{600}=0.1\sim 0.9$ 之间时, 徐素 18 的遗传转化效率无显著变化; 而 Xing 等(2007)以徐 55-2 为材料, 结果表明当菌液(EHA105)浓度 $OD_{600}=0.8$ 时, *GUS* 瞬时表达率最高。虽然不同研

究采用的侵染浓度不同, 但所有研究采用的菌液都均处于对数生长期(Gama et al., 1996; 高峰等, 2001; 蒋盛军, 2003; 蒋盛军等, 2004; Xing et al., 2008; Gao et al., 2011a; 2011b), 从而保证了根癌农杆菌有最高的活性和侵染能力。

1.1.3 甘薯基因型

甘薯的遗传转化效率对基因型有很强的依赖性(李强等, 2005b), 不断优化遗传转化体系, 筛选转化率高和易再生的甘薯品种是甘薯转基因育种的重要任务。罗红蓉等(2002)和阎文昭等(2004)的研究表明, 不同甘薯品种的转化率和再生率存在显著差异。从甘薯遗传转化体系建立后(刘庆昌等, 1997), 基因型的依赖性依然是制约甘薯转基因育种的瓶颈。经过不断探索, Yang 等(2011)通过优化转化条件, 建立了适合十几个甘薯主栽品种的遗传转化体系, 实现了转基因植株的大量制备, 为甘薯的遗传改良及功能组学研究搭建了平台。

1.1.4 转化受体

目前用于甘薯遗传转化的外植体材料非常广泛, 可分为原生质体、组织细胞(胚性愈伤组织和胚性悬浮细胞系)和器官(叶片、叶柄、茎、新鲜块根等)三大类。原生质体是电击法和基因枪法常用的受体材料(Murata et al., 1998; Lawton et al., 2000; Winfield et al., 2001), 但因制备及再生较困难, 其应用受到了一定限制。叶片、叶柄等材料易得, 在早期甘薯遗传转化中较常用(罗红蓉等, 2002; Newell et al., 1995; Egnin and Prakash, 1995; 高峰等, 2001), 但该材料转化频率低、分化困难, 且在转化中常出现嵌合体现象。甘薯胚性悬浮细胞系的建立解决了上述难题(Liu et al., 1997; Liu et al., 2001), 该法因其高效、简便、适应性广而得到了广泛应用(Wakita et al., 2001; Otani et al., 2001; 翟红和刘庆昌, 2003; 臧宁等, 2008; 蒋盛军等, 2004; Lim et al., 2007; Zang et al., 2009; Gao et al., 2011a; 2011b)。

1.1.5 外植体状态

植物细胞处于分裂周期的 S 期时, 细胞分裂旺盛, 对农杆菌感受态强, 转化率较高(王关林和方洪筠, 2000, 植物基因工程原理与技术, pp.389)。因此用于转化的外植体应选择处于感受态时期的幼年组织。此外, 还能通过增强受体材料感受态的措施来提高目的基因转化效率。研究表明, 植物转化时, 适当的硝酸银(AgNO_3)处理能增强植物细胞的感受

态(Veluthambi et al., 1989), 在共培养基中适当添加 AgNO_3 可明显提高转化效率(陈永文等, 2002; 凌键等, 2004; 李强等, 2005a)。 Ag^+ 可竞争性结合细胞受创伤后产生的乙烯受体蛋白, 起到阻止或降低乙烯活性的作用, 从而解除了乙烯对细胞分化和器官形成的抑制作用(陈永文等, 2002)。关于 AgNO_3 能增强植物细胞感受态的机制, 有待进一步研究。

1.2 环境因素

1.2.1 诱导物

1.2.1.1 酚类化合物

在农杆菌介导的遗传转化中, T-DNA 的转移需要 vir 基因编码产物的参与, 因此, 凡是影响 vir 表达的物质均能影响转化率。一些植物中常见的酚类化合物都可激活 vir 区基因, 包括儿茶酚、没食子酸和香草醛等(王关林和方洪筠, 2000, 植物基因工程原理与技术, pp.366)。Stachel 等(1985)从代谢活跃的烟草愈伤组织的提取物中分离得到了乙酰丁香酮(AS), 证明它是 virD 的诱导剂, 它既可促使农杆菌吸附到受体细胞, 同时又可诱导 vir 基因的表达。(吴乃虎, 2010, 基因工程原理下册, pp. 248), 被证明是诱导效果最佳的诱导物。

AS 作用效果与其浓度和培养基的 pH 有关。AS 在低浓度时即可吸引农杆菌, 浓度高时反而会抑制农杆菌的生长和 vir 基因的表达(邹智和卢长明, 2008)。研究中常使用的浓度为 10 mg/L-30 mg/L(杨秀荣等, 2002; 凌键等, 2004; 毕瑞明和高峰, 2007)。当含 AS 的培养基 pH 为 5.0-5.6 时, Vir 区基因的诱导达最高水平(王关林和方洪筠, 2000, 植物基因工程原理与技术, pp.389)。杨秀荣等(2002)和凌键等(2004)的研究对此进行了充分证明。

1.2.1.2 糖类

Stachel 等(1985)和 Shimoda 等(1990)研究表明, 在少量 AS 诱导下, 许多中性糖如葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖和甘露醇等可强烈诱导 Vir 的表达, 糖类与农杆菌染色体毒性蛋白 chvE 结合, 激活 VirA 蛋白进而诱导 Vir 基因高水平表达, 并且该诱导效应随着 Vir 基因的删除而消失, 说明中性糖通过 chvE 和 VirA 蛋白起作用。关于糖类物质提高转化率的机理, 邹智和卢长明(2008)在其文章中进行了详细论述。

在甘薯遗传转化中, 在共培养之前用甘露醇处理胚性悬浮细胞, 可显著提高转化效率(李强, 2005a;

翟红和刘庆昌, 2003)。甘露醇除了间接诱导 Vir 基因表达外, 还有渗透剂的作用, 可使细胞发生质壁分离, 细胞质变浓厚, 减少转化对细胞的伤害, 并且利于转化细胞的有效恢复, 增强瞬时表达和稳定转化频率(Ye et al., 1990)。

1.2.1.3 AgNO₃

在植物遗传转化中应用 AgNO₃, 不仅可增强植物细胞的感受态, 还能抑制共培养过程中农杆菌的过度生长, 提高农杆菌的转化效率。在甘薯遗传转化中, 在预培养基中加入 AgNO₃ 不利于转化, 而在共培养中添加适当浓度的 AgNO₃ 则能极大促进甘薯的遗传转化频率(陈永文等, 2002; 凌键等, 2004)。在甘薯遗传转化中, 使用的 AgNO₃ 浓度通常为 1 mg/L~10 mg/L, 浓度过大会造成愈伤黄化甚至坏死, 对细胞产生毒害(Sharma et al., 1990)。

1.2.2 共培养时间

共培养是转化的关键环节, 农杆菌的附着、T-DNA 的转移及整合均在该环节完成。研究表明, 农杆菌在附着到受体细胞 16 h 之后才开始转化, 因此必须控制好共培养时间。共培养时间过短, T-DNA 转移过程不能完成; 共培养时间过长, 农杆菌过度繁殖从而不能有效抑制。在甘薯上, 经优化的农杆菌共培养时间为 3 d~5 d (王关林和方洪筠, 2000, 植物基因工程原理与技术, pp.393)。因不同研究采用的甘薯基因型、农杆菌菌株及外植体种类不同, 因此结果存在差异, 如高峰等(2001)以“新大紫”的茎段外植体为材料, 探索出最佳共培养时间为 2 d; 而翟红和刘庆昌(2003)以栗子香胚性悬浮细胞为受体, 结果表明共培养 4 d 时, 其 GUS 基因瞬时表达率最高。

1.2.3 选择压

不同植物对抗生素的敏感性不同, 要根据受体材料的特性确定最适宜的选择压。如 Gama 等(1996)在甘薯品种“White star”的遗传转化中发现, 抑制非转化愈伤组织的卡那霉素浓度为 25 mg/L, 而翟红和刘庆昌(2003)以甘薯品种“栗子香”的胚性悬浮细胞为材料, 得出的适宜的 Kn 浓度为 50 mg/L~75 mg/L (悬浮培养阶段)和 100 mg/L (增殖培养阶段和植株再生阶段)。

1.2.4 选择方法

研究表明, 适当的延迟选择培养能提高转化效

率。翟红和刘庆昌(2003)比较了共培养后立即选择和延迟选择两种方法对栗子香胚性悬浮细胞转化效率的影响。结果表明, 延迟选择 6 d 时, 抗性愈伤形成率最高, 达 47.7%, 而用直接筛选的方法最后得到抗性愈伤形成率仅为 27.7%。

1.2.5 侵染时间

控制好侵染时间, 有助于减少后继培养中可能造成的污染, 减轻农杆菌对植物细胞的毒害。研究中采用的侵染时间均不超过 10 min (Wakita et al., 2001; Xing et al., 2007; 2008)。侵染时间的确定还需考虑到菌液浓度, 当菌液浓度过高时, 即使侵染时间很短, 农杆菌也会在外植体表面生长过旺, 掩埋整个外植体, 最终导致外置体褐变并死亡(凌键等, 2004)。

总之, 根癌农杆菌介导的遗传转化受众多因素的影响, 同时各因素间存在互作, 如甘薯基因型与选择压、AS 与 pH, 菌液浓度与侵染时间等, 要想获得较高的转化效率, 必须根据外植体的特性对每个影响因子进行深入研究。

2 根癌农杆菌介导的甘薯有益性状基因的转化

随着甘薯遗传转化体系的不断优化, 甘薯遗传转化取得了重大进展。目前已有抗生物胁迫(抗虫、抗病毒、抗真菌病害)、改良作物品质、抗非生物胁迫(抗除草剂、抗旱抗寒等)等三大类基因转入甘薯基因组中, 并获得了转基因植株(表 2)。

3 问题及展望

根癌农杆菌介导的以胚性愈伤组织为受体材料的转基因体系的建立推动了甘薯转基因技术走向成熟, 但是胚性悬浮系建立后很长一段时间, 仅利用少数非主栽品种获得了转基因植株, 在生产上难以形成规模, 甘薯基因型的依赖性成为制约甘薯转基因技术应用的瓶颈。经过近几年的探索和研究, 目前已建立适宜多个甘薯主栽品种的非基因型依赖性遗传转化体系(Yang et al., 2011), 为甘薯的遗传改良及功能基因组学研究搭建了平台。尽管甘薯转基因技术趋于成熟, 但还有许多亟待解决的问题, 如甘薯遗传资源匮乏、优异野生种利用困难; 相对于马铃薯等其他作物, 甘薯特殊的营养和淀粉品质有待改良; 甘薯病毒及病虫害严重制约了甘薯的产业化; 抗生素等筛选标记基因的应用引发的人们对转基因植物环境安全性的担忧等。

表2 目的基因在根癌农杆菌介导的甘薯遗传转化中的应用

Table 2 The application of target genes on sweetpotato transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

基因类型 Gene types	目的基因 Target genes	用途 Purposes	作者及年份 Authors and years
抗虫害基因 Insects resistance	<i>CpTI</i> 、 <i>GNA</i>	抗虫 Insects resistance	Newell et al., 1995
	<i>SKTI-4</i>	抗甘薯蚁蠊 SP weevil resistance	Cipriani et al., 1999
	芽孢杆菌内毒素 <i>cryIII A</i> 基因 <i>Bacillus thuringiensis</i> <i>cryIII A</i> delta-endotoxin gene <i>OCI</i>	抗甘薯蚁蠊 SP weevil resistance 未报导 No report	Moran et al., 1998 阎文昭等, 2004; 蒋盛军等, 2004
		抗甘薯茎线虫病 SP stem nematodes resistance	Gao et al., 2011a
抗病毒基因 Virus disease resistance	<i>SPFMV-CP</i>	抗甘薯羽状斑驳病毒 SPFM virus resistance	Cipriani et al., 2001; Okada et al., 2001
抗真菌病害基因 Fungal pathogens disease-resistance	水稻几丁质酶基因与 β -1,3 葡聚糖酶基因 Rice chitinase gene and β -1,3 glucanase gene	抗真菌病原体 Fungal pathogens disease-resistance	Walls et al., 1996, In Vitro, 32(3): Pt.2, 105A
改良作物品质基因 Quality improvement genes	<i>NtFAD3</i>	改良脂肪酸组成 Alter fatty acid composition of TSP	Wakita et al., 2001
	<i>GBSSI</i>	改良淀粉品质 Alter starch composition of TSP	Kimura et al., 2001
	<i>SBD2</i>	未报道 Not reported	Xing et al., 2008
	<i>IbSBEII</i>	增加直链淀粉酶含量 Increase amylose content	Shimada et al., 2006
	玉米醇溶蛋白基因 zein gene	改良种子贮藏蛋白品质 Improved quality of seed storage protein	高峰等, 2001
	<i>ASP-1</i>	改良种子贮藏蛋白的品质 Improved quality of seed storage protein	Egnin and Prakash, 1995
抗非生物胁迫基因 Tolerant to environment stress	<i>Bar</i>	抗除草剂 Herbicide resistance	Otani et al., 2003; Choi et al., 2007; 臧宁等, 2008; Zang et al., 2009
	<i>Cu/Zn-SOD</i> 和 <i>APX</i>	清除活性氧能力及耐逆性(耐寒、耐旱、耐盐等)增强 With the enhancement of resistance to ROS and stress tolerance, such as chilling, drought and salt.	Lim et al., 2007; 李筠等, 2006; 陆燕元和邓西平, 2010; 伍小兵等, 2010
	<i>LOS5</i>	增强耐盐性 Tolerant to salt stress.	Gao et al., 2011b
	<i>IbLEA14</i>	通过 <i>IbLEA14</i> 高水平表达木质素, 增强甘薯愈伤组织的渗透胁迫和耐盐性 Increases osmotic and salt stress tolerance of transgenic calli through <i>IbLEA14</i> expression	Park et al., 2011

注: 转基因甘薯植株TSP; 豇豆胰蛋白酶抑制剂基因CpTI; 雪花莲凝集素基因GNA; 大豆Kunitz型胰蛋白酶抑制剂SKTI-4; 水稻巯基蛋白酶抑制剂基因OCI; 甘薯羽状斑驳病毒外壳蛋白基因SPFMV-CP; 烟草微粒体 ω -3脂肪酸脱氢酶基因NtFAD3; 颗粒结合淀粉合成酶基因GBSSI; 天冬氨酰蛋白酶基因ASP-1; 铜/锌超氧化物歧化酶基因Cu/Zn-SOD; 抗坏血酸过氧化物酶基因APX; 甘薯淀粉分支酶基因IbSBEII; 甘薯晚期胚胎富集蛋白基因IbLEA14

Note: Abbreviations Transgenic sweetpotato plant TSP; cowpea trypsin inhibitor gene CpTI; Galanthus nivalis agglutinin gene GNA; Soybean Kunitz trypsin inhibitor SKTI-4; Rice cysteine proteinase inhibitor gene OCI; Sweet potato feathery mottle virus coat protein gene SPFMV-CP; Tobacco microsomal ω -3 fatty acid desaturase gene NtFAD3; Granule bound starch synthase gene GBSSI; Aspartyl protease gene ASP-1; Cu/Zn superoxide dismutase gene Cu/Zn-SOD; Ascorbate peroxidase gene APX; Starch branching enzyme gene IbSBEII; Sweet Potato late embryogenesis abundant protein gene IbLEA14

目前, 非基因型依赖性的遗传转化体系已建立, 甘薯遗传转化技术的成熟为重要基因的功能验证提供了技术储备。通过导入基因研究其在杂交后代中的遗传规律, 甘薯的功能基因组学研究可能会成为甘薯科研人员的研究热点。近年来甘薯的营养价值越来越得到人们的认可, 富含 β -胡萝卜素的品种淀粉含量低, 针对这一问题, 可利用遗传改良技术在较短时间内有针对性地改良现有品种的农艺性状, 培育生物强化甘薯新品种, 从而解决贫困地区农民营养结构不均衡的问题。甘薯的病毒病及病虫害危害严重, 可以利用转基因技术, 将SKTI-4、OCI等抗病害基因导入甘薯主栽品种, 从而从根本上解决问题, 实现种质创新。目前采用的标记基因多是抗生素抗性基因, 它们可能随花粉扩散造成抗药病原微生物或“超级杂草”的出现, 对生态系统存在潜在威胁, 将筛选标记基因和目的基因(如抗除草剂)相结合的策略证明是可行的(Zang et al., 2009)。但从环境和生物安全性的角度考虑, 不依赖于除草剂和抗生素的筛选技术是甘薯遗传转化中亟需研究和解决的问题。在今后的研究中, 可引入正筛选或标记基因删除技术来解决这一安全隐患。

我国是世界上最大的甘薯生产国, 利用常规育种培育的甘薯优良品种对维护国家粮食安全在特定时期发挥过重要作用。当前, 我国面临耕地面积减少, 能源紧缺的局面, 利用分子育种技术在相对较短的时间培育高产、优质、耐逆性强的甘薯新品种, 开发利用边际性土地, 促进甘薯产业的发展, 将是当前育种工作者面临的巨大机遇和挑战。

作者贡献

闫会和李强是本综述的设计和研究的执行人; 闫会完成资料分析, 论文初稿的写作; 李强是本项目的构思者及负责人, 指导论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家高技术研究发展863计划(2012AA101204), 国家科技支撑计划(2009BADA7B03), 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-11), 江苏省“333工程”培养计划(BRA2011033)资助。感谢两位匿名的同行评审人的评审建议和修改建议。

参考文献

Bi R.M., and Gao F., 2007, Study on factors influencing efficiency of sweetpotato transformation, *Shengwu Jishu (Biotechnology)*, 17(4): 55-58 (毕瑞明, 高峰, 2007, 甘薯(*Ipomoea batatas* L.)遗传转化几个因素的研究, 生物

技术, 17(4): 55-58)

- Chen Y.W., Li K.P., Gao F., and Fang P., 2002, Effect of $AgNO_3$ on transformation of sweetpotato by *Agrobacterium tumefaciens*, *Xi'nan Shifan Daxue Xuebao (Journal of Southwest China Normal University (Natural Science Edition))*, 27(2): 226-230 (陈永文, 李坤培, 高峰, 方平, 2002, $AgNO_3$ 对根癌农杆菌介导的甘薯遗传转化的影响, 西南师范大学学报(自然科学版), 27(2): 226-230)
- Choi H.J., Chandrasekhar T., Lee H.Y., and Kim K.M., 2007, Production of herbicide-resistant transgenic sweet potato plants through *Agrobacterium tumefaciens* method, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 91(3): 235-242 <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-007-9289-1>
- Cipriani G., Michard D., Brunelle F., Golmirzaie A., and Zhang D.P., 1999, Expression of soybean proteinase inhibitor in sweetpotato, In: CIP (Centro Internacional de la Papa) (ed.), *Scientist and Farmer: Partners in Research for the 21st Century*, Program Report 1999-2000, International Potato Center, Lima, Peru, pp.271-277
- Cipriani G., Fuentes S., Bello V., Salazar L.F., Ghislain M., and Zhang D.P., 2001, Transgene expression of rice cysteine proteinase inhibitors for the development of resistance against sweetpotato feathery mottle virus, In: CIP (Centro Internacional de la Papa) (ed.), *Scientist and Farmer: Partners in Research for the 21st Century*, Program Report 1999-2000, International Potato Center, Lima, Peru, pp.267-271
- Egnin M., and Prakash C.S., 1995, Genetic transformation and regeneration of transgenic sweetpotato plants, *Hortscience*, 30(3): 435
- Gama M.I.C.S., Leite R.P.Jr, Cordeiro A.R., and Cantliffe D.J., 1996, Transgenic sweetpotato plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 46(3): 237-244 <http://dx.doi.org/10.1007/BF02307100>
- Gao F., Gong Y.F., Lin Z.P., and Wang X.J., 2001, *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Ipomoea batatas* and regeneration of transgenic plants, *Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica)*, 27(6): 751-756 (高峰, 龚一富, 林忠平, 王小佳, 2001, 根癌农杆菌介导的甘薯遗传转化及转基因植株的再生, 作物学报, 27(6): 751-756)
- Gao S., Yu B., Yuan L., Zhai H., He S.Z., and Liu Q.C., 2011a, Production of transgenic sweetpotato plants resistant to stem nematodes using oryzacystatin-I gene, *Scientia Horticulturae*, 128: 408-414 <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2011.02.015>
- Gao S., Yuan L., Zhai H., Liu C.L., He S.Z., and Liu Q.C.,

- 2011b, Transgenic sweetpotato plants expressing an LOS5 gene are tolerant to salt stress, *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 107: 205-213 <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-011-9971-1>
- Jiang S.J., 2003, Transformation of embryogenic suspension cultures and efficient regeneration of transgenic plants in sweetpotato (*Ipomoea Batatas* (L.) Lam.), Dissertation for Ph.D., China Agricultural University, Supervisor: Liu Q.C., pp.54 (蒋盛军, 2003, 甘薯胚性悬浮细胞的遗传转化和转基因植株的有效再生, 博士学位论文, 中国农业大学, 导师: 刘庆昌, pp.54)
- Jiang S.J., Liu Q.C., Zhai H., Wu L.S., and Wang Y.P., 2004, Regeneration of sweetpotato transgenic plants with *Oryza-cystatin-I* (OCI) gene, *Nongye Shengwu Jishu Xuebao* (Journal of Agricultural Biotechnology), 12(1): 34-37 (蒋盛军, 刘庆昌, 翟红, 邬丽莎, 王玉萍, 2004, 水稻巯基蛋白酶抑制剂基因OCI转化甘薯获得转基因植株, *农业生物技术学报*, 12(1): 34-37)
- Kimura T., Otani M., Noda T., Ideta O., Shimada T., and Saito A., 2001, Absence of amylose in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) following the introduction of granule-bound starch synthase Ic DNA, *Plant Cell Reports*, 20(7): 663-666
- Lawton R., Winfield S., Daniell H., Bhagsari A.S., and Dhir S.K., 2000, Expression of green fluorescent protein gene in sweetpotato tissues, *Plant Mol. Biol. Rep.*, 18(2): 139 <http://dx.doi.org/10.1007/BF02824022>
- Li J., Deng X.P., Kwak S.S., and Tanaka K., 2006, Drought tolerance of transgenic sweet potato expressing both Cu/Zn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase, *Zhiwu Shengli Yu Fenzi Shengwuxue Xuebao* (Journal of Plant Physiology and Molecular Biology), 32(4): 451-457 (李筠, 邓西平, 郭尚洙, 田中净, 2006, 转铜/锌超氧化物歧化酶和抗坏血酸过氧化物酶基因甘薯的耐旱性, *植物生理与分子生物学学报*, 32(4): 451-457)
- Li Q., Liu Q.C., and Ma D.F., 2005a, Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), In: Ma D.F., and Liu Q.C. (eds.), *Sweetpotato breeding and industrialization in China*, China Agricultural University Press, Beijing, China, pp.188-194 (李强, 刘庆昌, 马代夫, 2005a, 农杆菌介导的甘薯遗传转化影响因素的研究, 见: 马代夫, 刘庆昌编著, *中国甘薯育种与产业化*, 中国农业大学出版社, 中国, 北京, pp.188-194)
- Li Q., Liu Q.C., Ma D.F., Zang N., 2005b, Advances, problems and prospects in genetic transformation on sweetpotato, *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (Molecular Plant Breeding), 3(1): 99-106 (李强, 刘庆昌, 马代夫, 臧宁, 2005b, 甘薯遗传转化的研究现状、问题及展望, *分子植物育种*, 3(1): 99-106)
- Lim S., Kim Y.H., Kim S.H., Suk Y.K., Kwon S.Y., Lee H.S., Kim J.S., Cho K.Y., Paek K.Y., and Kwak S.S., 2007, Enhanced tolerance of transgenic sweetpotato plants that express both Cu/ZnSOD and APX in chloroplasts to methylviologen-mediated oxidative stress and chilling, *Mol. Breeding*, 19: 227-239 <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-006-9051-0>
- Ling J., Chen Y.W., Gong Y.F., Fang P., and Gao F., 2004, Optimization of system for in vitro genetic transformation in sweetpotato, *Xi'nan Shifan Daxue Xuebao* (Journal of Southwest China Normal University (Natural Science Edition)), 29(3): 466-470 (凌键, 陈永文, 龚一富, 方平, 高峰, 2004, 甘薯离体遗传转化体系的优化, *西南师范大学学报(自然科学版)*, 29(3): 466-470)
- Liu Q.C., Mi K. X., Lu D. H., Zhou H.Y., and Fu Z., 1997, Establishment of embryogenetic cell suspension cultures in sweetpotato, (*Ipomoea batatas* L. (Lam)), *Zuowu Xuebao* (Acta Agronomica Sinica), 23(1): 22-27 (刘庆昌, 米凯霞, 鲁迪慧, 周海鹰, 付哲, 1997, 甘薯胚性细胞悬浮培养系的建立, *作物学报*, 23(1): 22-27)
- Liu Q.C., Zhai H., Wang Y., and Zhang D.P., 2001, Efficient plant regeneration from embryogenic suspension cultures of sweetpotato, *In Vitro Cellular & Development Biology. Plant*, 37(5): 564-567 <http://dx.doi.org/10.1007/s11627-001-0098-7>
- Lu D.H., 1998, Establishment of cell suspension cultures and genetic transformation in sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), Thesis for M.S., China Agricultural University, Supervisor: Liu Q.C., pp.25-30 (鲁迪慧, 1998, 甘薯细胞悬浮培养系的建立及遗传转化的研究, 硕士学位论文, 中国农业大学, 导师: 刘庆昌, pp. 25-30)
- Lu Y.Y., and Deng X.P., 2010, Recovery effects of transferring both Cu/ Zn SOD and APX gene s in sweet potato under water stress, *Xibei Nonglin Keji Daxue Keji Xuebao* (Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)), 38(1): 67-74 (陆燕元, 邓西平, 2010, 转入Cu/ZnSOD和APX基因对甘薯旱后复水的恢复作用, *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 38(1): 67-74)
- Luo H.R., Zhang Y.W., and Zhang Y.Z., 2002, Study of transformation of sweetpotato with *Agrobacterium tumefaciens* and resistant callus obtained at high frequency, *Sichuan Daxue Xuebao* (Journal of Sichuan University (Natural Science Edition)), (39): 21-24 (罗红蓉, 张勇为, 张义正, 2002, 根癌农杆菌转化甘薯高频获得抗性愈伤组织的研究, *四川大学学报(自然科学版)*, (39): 21-24)
- Moran R., Garcia R., Lopez A., Zaldua Z., Mena J., Garcia M.,

- Armas, R., Somonte, D., Rodriguez, J., Gomez, M., and Pimentel E., 1998, Transgenic sweetpotato plants carrying the delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* var. tenebrionis, *Plant Science*, 139(2): 175-184 [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00179-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00179-4)
- Murata T., Okada Y., Saito A., Kimura T., Mori M., Nishiguchi M., Hanada K., Saika J., and Fukuoka H., 1998, Transformation by direct gene transfer in sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), In: Proceedings of International Workshop on Sweetpotato Production System toward the 21st Century held 9-10 Dec., 1997 at Miyakonojo, Miyazaki, Japan, pp.159-180
- Newell C.A., Lowe J.M., Merryweather A., Rooke L.M., and Hamilton W.D.O., 1995, Transformation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) with *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of plants expressing cowpea trypsin inhibitor and snowdrop lectin, *Plant Science*, 107(2): 215-227 [http://dx.doi.org/10.1016/0168-9452\(95\)04109-8](http://dx.doi.org/10.1016/0168-9452(95)04109-8)
- Okada Y., Saito A., Nishiguchi M., Kimura T., Mori M., Hanada K., Sakai J., Miyazaki C., Matsuda Y., and Murata T., 2001, Virus resistance in transgenic sweetpotato (*Ipomoea batatas* L. (Lam)) expressing the coat protein gene of sweet potato feathery mottle virus, *Theor. Appl. Genet.*, 103(5): 743- 751 <http://dx.doi.org/10.1007/s00-1220100654>
- Otani M., and Shimada T., 2001, Transgenic sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), In: Bajaj Y.P.S.(ed.), *Biotechnology in agriculture and forestry 47, transgenic crops II*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New Delhi, India, pp.183-204
- Otani M., Wakita Y., and Shimada T., 2001, Genetic transformation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) by *Agrobacterium tumefaciens*, *Acta Hort.*, 560: 193-196
- Otani M., Wakita Y., and Shimada T., 2003, Production of herbicide-resistant sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) plants by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, *Breeding Science*, 53:145-148 <http://dx.doi.org/10.1270/jsbbs.53.145>
- Park S.C., Kim Y.H., Jeong J.C., Kim C.Y., Lee H.S., Bang J.W., and Kwak S.S., 2011, Sweetpotato late embryogenesis abundant 14 (IbLEA14) gene influences lignification and increases osmotic- and salt stress-tolerance of transgenic calli, *Planta*, 233: 621-634 <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-010-1326-3> PMID:21136074
- Sharma K. K., Bhojwani S.S., and Thorpe T.A., 1990, Factors affecting high frequency differentiation of shoots and roots from cotyledon explants of *Brassica Juncea* (L.) Czern, *Plant Science*, 66(2): 247-253 [http://dx.doi.org/10.1016/0168-9452\(90\)90210-F](http://dx.doi.org/10.1016/0168-9452(90)90210-F)
- Shimada T., Otani M., Hamada T., and Kim S.H., 2006, Increase of amylose content of sweetpotato starch by RNA interference of the starch branching enzyme II gene (IbSBEII), *Plant Biotechnology*, 23: 85-90 <http://dx.doi.org/10.5511/plantbiotechnology.23.85>
- Shimoda N., Toyoda Y.A., Nagamine J., Usami S., Katayama M., Sakagami Y., and Machida Y., 1990, Control of expression of *Agrobacterium vir* genes by synergistic actions of phenolic signal molecules and monosaccharides, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 87(17): 6684-6688 <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.87.17.6684>
- Song G.Q., Honda H., and Yamaguchi K., 2004, Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) from stem explants using a two-step kanamycin-hygromycin selection method, *In Vitro Cellular & Developmental Biology, Plant*, 40(4): 359-365 <http://dx.doi.org/10.1079/IVP2004539>
- Stachel S.E., Messens E., Montagu M.V., and Zambryski P., 1985, Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*, *Nature*, 318: 624-629 <http://dx.doi.org/10.1038/318624a0>
- Veluthambi K., Krishnan M., Gould J.H., Smith R.H., and Gelvin S.B., 1989, Opines stimulate induction of the vir genes of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid, *Journal of Bacteriology*, 171(7): 3696-3703 PMID:2738020 PMID:210113
- Wakita Y., Otani M., Hamada T., Mori M., Iba K., and Shimada T., 2001, A tobacco microsomal ω -3 fatty acid desaturase gene increases the linolenic acid content in transgenic sweetpotato (*Ipomoea batatas*), *Plant Cell Reports*, 20(3): 244-249 <http://dx.doi.org/10.1007/s002990100316>
- Wang X., Zhou Z., Li Q., Gu X.H., and Ma D.F., 2006, Optimization of genetic transformation using SAAT in sweetpotato, *Jiangsu Nongye Xuebao (Jiangsu Journal of Agricultural Sciences)*, 22 (1): 14-18 (王欣, 周忠, 李强, 顾向华, 马代夫, 2006, 甘薯SAAT法遗传转化条件的优化, *江苏农业学报*, 22 (1): 14-18)
- Winfield S., Lawton R., Daniell H., and Dhir S.K., 2001, Transformation of sweetpotato tissues with green-fluorescent protein gene, *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 37(5): 648-653 <http://dx.doi.org/10.1007/s11627-001-0113-z>
- Wu X.B., Cheng Y.J., Deng X.P., and Kwak S.S., 2010, Effect of foliar spraying of H₂O₂ and Cu/Zn SOD and APX gene

- transferred in chloroplasts on the recoverability of sweet potato after chilling stress, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 43(7): 1379-1388 (伍小兵, 成雨洁, 邓西平, 郭尚洙, 2010, 叶片喷施 H₂O₂ 以及转Cu/Zn SOD和APX基因对甘薯幼苗冷后恢复的作用, *中国农业科学*, 43(7): 1379-1388)
- Xing Y.J., Ji Q., Yang Q., Luo Y.M., and Li Q., and Wang X., 2008, Studies on *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of embryogenic suspension cultures of sweet potato, *African Journal of Biotechnology*, 7(5): 534-540
- Xing Y.J., Yang Q., Ji Q., Luo Y.M., Zhang Y.F., Gu K., and Wang D.S., 2007, Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation parameters for sweet potato embryogenic callus using β -glucuronidase (GUS) as a reporter, *African Journal of Biotechnology*, 6(22): 2578-2584
- Yan W.Z., Wu J., Wang D.Y., Tan W.F., 2004, Introduction of rice cysteine proteinase inhibitor into sweet potato varieties, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 2(2): 203-207 (阎文昭, 吴洁, 王大一, 谭文芳, 2004, 将水稻半胱氨酸蛋白酶抑制剂(Oryzacystatin I)基因导入甘薯品种, *分子植物育种*, 2(2): 203-207)
- Yang J., Bi H.P., Fan W.J., Zhang M., Wang H.X., and Zhang P., 2011, Efficient embryogenic suspension culturing and rapid transformation of a range of elite genotypes of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), *Plant Sci.*, 181(6): 701-711 <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.01.005> PMID:21958713
- Yang X.R., Chen Y.W., Fang P., and Gao F., 2002, The effect of acetosyringone on transformation of sweetpotato by *Agrobacterium tumefaciens*, *Xinan Shifan Daxue Xuebao (Journal of Southwest China Normal University (Natural Science Edition))*, 27(5): 751-754, 758 (杨秀荣, 陈永文, 方平, 高峰, 2002, 乙酰丁香酮对根癌农杆菌介导的甘薯遗传转化的影响, *西南师范大学学报(自然科学版)*, 27(5): 751-754, 758)
- Ye G.N., Daniell H., and Sanford J.C., 1990, Optimization of delivery of foreign DNA into higher-plant chloroplasts, *Plant Mol. Biol.*, 15(6): 809-819 <http://dx.doi.org/10.1007/BF00039421> PMID:2103474
- Zang N., Zhai H., Gao S., Chen W., He S.Z., and Liu Q.C., 2009, Efficient production of transgenic plants using the bar gene for herbicide resistance in sweetpotato, *Scientia Horticulturae*, 122(4), 649-653 <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2009.06.023>
- Zang N., Zhang M.Y., Zhai H., Li X.Q., Wang Y.P., Liu Q.C., 2008, Generation of transgenic herbicide-resistant sweetpotato plants by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, *Nongye Shengwu Jishu Xuebao (Journal of Agricultural Biotechnology)*, 16(1): 103-107 (臧宁, 张美彦, 翟红, 李雪琴, 王玉萍, 刘庆昌, 2008, 根癌农杆菌介导的抗除草剂转基因甘薯植株的获得, *农业生物技术学报*, 16(1): 103-107)
- Zhai H., and Liu Q.C., 2003, Studies on the genetic transformation of embryogenic suspension cultures in sweetpotato, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 36(5): 487-491 (翟红, 刘庆昌, 2003, 甘薯胚性悬浮细胞遗传转化的研究, *中国农业科学*, 36(5): 487-491)
- Zou Z., and Lu C.M., 2008, An overview of plant factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation, *Shengwu Jishu Tongbao (Biotechnology Bulletin)*, 1: 1-9 (邹智, 卢长明, 2008, 影响农杆菌介导遗传转化的植物因子研究进展, *生物技术通报*, 1: 1-9)