

doi: 10.3969/j.issn.1674-232X.2018.05.012

发根农杆菌 Ri 质粒介导的植物基因工程及应用

吴 萼¹,张 瑞¹,张 超¹,朱 瑶¹,李晨曦¹,张娜娜¹,谌 容¹,
葛晓萍²,谢 恬¹,殷晓浦¹

(1. 杭州师范大学医学院,浙江 杭州 310036;2. 杭州科技职业技术学院,浙江 杭州 311402)

摘 要:发根农杆菌 Ri 质粒作为一种天然存在的植物遗传转化系统,已在植株再生,品种改良,增强植物抗逆性以及生产次生代谢产物等方面得到广泛应用,并取得了巨大的经济和社会效益.全文概述了发根农杆菌 Ri 质粒介导的植物基因工程原理、方法、影响因素、应用前景及存在的问题.

关键词:发根农杆菌;Ri 质粒;毛状根;基因工程

中图分类号: Q37

文献标志码: A

文章编号: 1674-232X(2018)05-0520-06

1907 年,Smith 和 Townsend 两位科学家首次发现发根农杆菌可以诱导植物“五倍子”生成毛状根的现象^[1].近年来人们逐渐发现毛状根是由土壤农杆菌感染植物细胞后产生的一种病理状态,是土壤农杆菌 Ri 质粒上的一部分 DNA(称为 T-DNA)片段插入宿主植物细胞基因组后得到的表型.目前,已在重要作物、果树、蔬菜、花卉等诸多植物中诱导出毛状根.全文就发根农杆菌 Ri 质粒介导的植物基因工程的原理、方法、影响因素、应用与展望等方面作了简要叙述.

1 发根农杆菌 Ri 质粒的分类及结构特征

当发根农杆菌感染植物时,菌体本身不会进入细胞内,而是 Ri 质粒中的 T-DNA 片段进入植物细胞中,在植物细胞中进行随机整合,并利用植物体内的酶系统进行转录和表达,产生大量分支的不定根,称为毛状根或发根^[2].毛状根是细胞单克隆产物,大部分植株诱导生成的毛状根都具有一些相同特征,如繁殖能力强;适用于离体培养;一些植物的毛状根还具有生物转化功能,能够形成含量较高的次生代谢产物^[3].

1.1 发根农杆菌 Ri 质粒的分类

发根农杆菌 Ri 质粒是独立于细胞染色体之外的共价闭合环状的基因组 DNA,具有独立的遗传复制能力,大小在 200~800kb 之间,是自然界中天然存在的大型侵入性质粒^[4].当 Ri 质粒上的 T-DNA 区整合到受体植物细胞后,能产生一种特殊的“非蛋白态的氨基酸”——冠瘿碱.根据受体植物细胞中检测到的冠瘿碱不同,将发根农杆菌分为 4 类:黄瓜碱型、异黄瓜碱型、甘露碱型和农杆菌型^[5].

收稿日期:2017-03-12

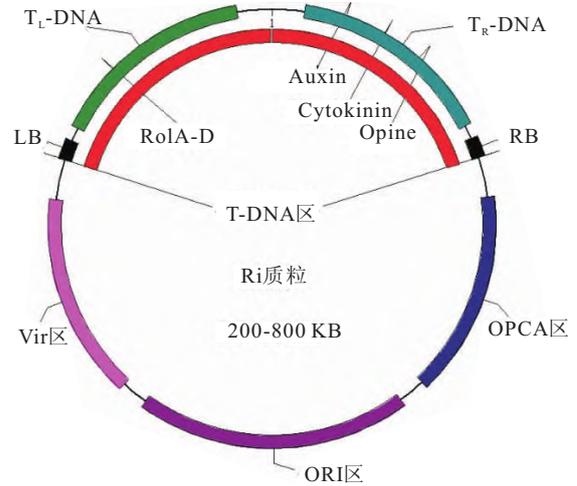
修回日期:2017-05-15

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(21606062);浙江省自然科学基金项目(LY15B060012,LQ15C020003);杭州市重大科技专项(20142013A63).

通信作者:殷晓浦(1980—),男,助理研究员,博士,主要从事生物催化研究. E-mai:yinxp@hznu.edu.cn

1.2 发根农杆菌 Ri 质粒的结构及功能特征

在对发根农杆菌的研究中发现,其发根功能主要集中在体内的 Ri 质粒上,根据 Ri 质粒的各个结构的功能不同将其分为 4 个功能区^[4](见图 1). 1) T-DNA 区:是 Ri 质粒上唯一整合到植物基因组的 DNA 片段,大小约 10~30kb. 农杆菌型发根农杆菌 Ri 质粒的 T-DNA 区由两段不连续的 T_L-DNA 和 T_R-DNA 片段组成^[6]. 编码农杆菌合成酶与生长素合成酶的基因在 T_R-DNA 区,决定毛状根生成及再生植株形态特征的基因分布在 T_L-DNA 区,它包含 Rol A、Rol B、Rol C、Rol D 4 个基因群,又称为核心 T-DNA 区,Rol A-C 均可单独诱导生成毛状根,Rol D 则与植物愈伤组织形成有关. 其它三型发根农杆菌 Ri 质粒的 T-DNA 区是由一条连续的片段组成,且 T-DNA 区上没有生长激素合成酶基因序列. 各种类型的发根农杆菌 Ri 质粒 T-DNA 两端都含有 25 bp 的重复序列,它是限制性内切酶对 T-DNA 区进行特异性识别的酶切位点. 2) Vir 毒性蛋白区:该区是发根农杆菌实现高效侵染所必需的区域,大小约 20kb,它由 Vir A-G 7 个操纵子组成,当 Vir A 区编码的跨膜蛋白感受酚类信号后,激活 Vir B-G 基因的转录与表达,各基因区编码不同的蛋白发挥各自的作用,使 T-DNA 从 Ri 质粒上进行分离,并对 T-DNA 进行加工和转运,抵抗 3'和 5'外切核酸酶及内切核酸酶的降解^[7]. 3) Ori 区与 OPCA 区:即复制起始区与功能代谢区,研究表明这两个基因区对发根农杆菌 Ri 质粒的 T-DNA 转移不起重要作用^[8].

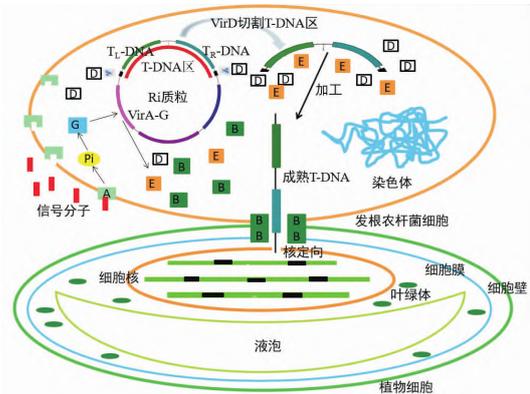


T_L-DNA:含 Rol A, B, C, D 基因; T_R-DNA:含 Auxin(生长素), Cytokinin(细胞分裂素), Opine(冠瘿碱)合成酶基因; LB/RB:限制性内切酶对 T-DNA 区进行特异性识别的酶切位点; Vir 区:激活 T-DNA 区进行转移的区域,由 Vir A-G 组成; Ori 区:复制起始区;OPCA 区:功能代谢区.

图 1 农杆菌 Ri 质粒示意图
Fig. 1 Agropine type of root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*

2 发根农杆菌 Ri 质粒介导的植物基因工程技术

发根农杆菌 Ri 质粒是植物基因工程技术中的天然载体,因 Ri 质粒上的 T-DNA 对植物体无致病性,且植物体对其基因表达产物无排斥反应,所以野生型的发根农杆菌可直接用于外植体转化实验^[9](见图 2). 但是由于 Ri 质粒过大(200~800 kb),限制性内切酶与酶切位点不是一一对应的关系,酶切后的片段难以环化成以前的顺序,而且 Ri 质粒无法在大肠杆菌中进行克隆复制,因而用野生型的发根农杆菌感染外植体时只能获得含 Ri 质粒上 T-DNA 片段的毛状根^[10]. 如果需要转入目的片段,则需要再构建一个与 Ri 质粒序列同源的小型中间载体,利用特定的转化方法,将含目的片段的中间载体转入发根农杆菌中,由于 Ri 质粒的 Vir 毒性蛋白区能够通过顺式调控和反式调控在一个或在两个质粒上分别执行功能,因而能使中间载体上的 T-DNA 片段与目的基因一同转入受体植物细胞^[11]. 基于发根农杆菌 Ri 质粒介导的植物基因工程



信号分子:如乙酰丁香酮等;A:Vir A 基因产物,激活 Vir B-G 基因;D:Vir D 基因产物,识别并切割 T-DNA 区;E:Vir E 基因产物,与 D 一起对切割下的 T-DNA 进行加工;B:Vir B 基因产物,在植物细胞与发根农杆菌细胞之间形成通道复合体.

图 2 野生型发根农杆菌 Ri 质粒转化植物细胞示意图
Fig. 2 Transformation of wild-type Ri plasmid into plant cell

有一元载体系统和双元载体系统法。

2.1 一元载体系统

一元载体系统利用含中间载体(含有目的基因并与 Ri 质粒序列同源)如 pBR322 的大肠杆菌作为供体菌,将野生型的发根农杆菌作为受体菌。由于这类中间载体自身无穿梭功能,所以在构建发根农杆菌工程菌的过程中必须使用一种协助中间载体转移进入发根农杆菌的大肠杆菌质粒,如大肠杆菌 HB101 含有的质粒 pRK2013^[12]。将供体菌、受体菌和大肠杆菌三者共培养一段时间后,当质粒 pRK2013 穿梭进入供体菌后,利用自身的游动和转移功能,协助供体菌内的中间载体(pBR322 质粒)进入发根农杆菌,随后含目的基因的中间载体利用同源重组使目的片段和抗性标记整合到 T-DNA 区中,而提供游动能力的 pRK2013 质粒因无法在发根农杆菌中进行同源重组和复制,最终会自行丢失。利用抗性标记筛选重组发根农杆菌,最后通过发根农杆菌 Ri 质粒 Vir 毒性蛋白区的转移功能和桥梁作用将 T-DNA 片段内的目的基因一同转入受体植物细胞^[13](见图 3)。

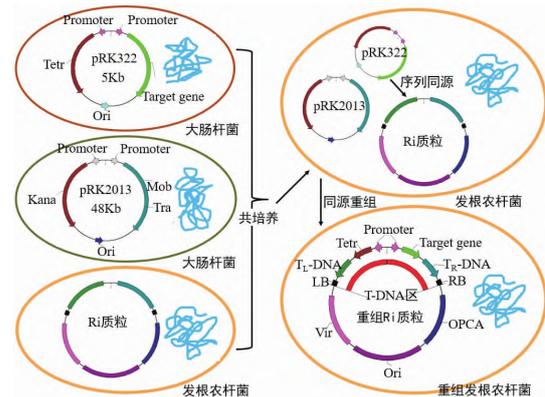
2.2 双元载体系统

双元载体系统的应用过程中不需要其它细菌的协同参与,它的作用机制是 Vir 毒性蛋白可以同时 Ri 质粒和穿梭质粒(含“T-DNA”功能区的微型质粒)上进行加工,分别促进 Ri 质粒和穿梭质粒上的 T-DNA 区转移进入受体植物细胞^[14]。常用的质粒载体有 pCAMBIA1301, pCAMBIA1304 等,这类载体可以分别在大肠杆菌以及发根农杆菌中进行克隆,不需要依赖于同源序列在发根农杆菌进行整合即可自行复制。在应用过程中,只需要将目的片段插入到小型穿梭质粒中,将构建好的质粒转入野生型的发根农杆菌感受态细胞,并通过穿梭质粒上自身携带的抗性标记筛选重组发根农杆菌,最后通过发根农杆菌 Vir 毒性蛋白的辅助转移作用,将目的片段与 Ri 质粒的 T-DNA 区一同导入受体植物细胞中^[15](见图 4)。因为双元载体系统操作简单,易于筛选,阳性率高,现已成为植物基因工程中的常用方法。

3 发根农杆菌介导的植物基因工程影响因素

3.1 发根农杆菌菌株型及生长期对转化的影响

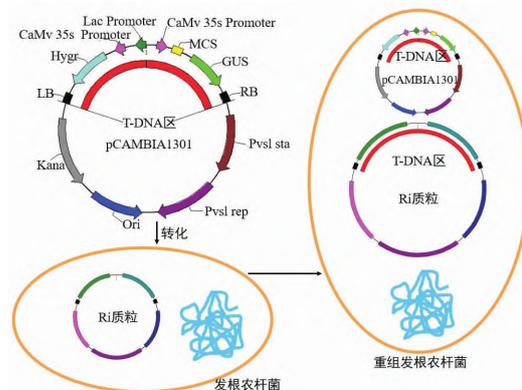
研究表明农杆菌型发根农杆菌具有最为广泛的宿主植物细胞,常见的农杆菌型菌株有 1855, 15834, A4, HRI, TR105 等。不同菌株感染受体植物产生毛状根的能力各不相同^[16]。在诱导番茄毛状根的研究中,利用 R1000、A4 和 ATCC 15834 进行转化,发现 ATCC 15834 诱导番茄生根率最高^[17]。另外,转化时的菌液浓度与转化效率密切相关,菌液浓度过高对植物损伤过大,外植体还未长出毛状根即褐化死去,菌液浓度过低使质粒难以



PRK322 质粒:含目的基因并与 Ri 质粒序列同源;PRK2013 质粒:结合辅助型质粒,协助 PRK322 质粒转入发根农杆菌细胞内;Ri 质粒:具有使 T-DNA 区穿过细胞壁转入植物细胞的能力。

图 3 一元载体系统示意图

Fig. 3 Co-integrated plasmid system



质粒 pCAMBIA1301: T-DNA 区:含 LB/RB(限制性内切酶对 T-DNA 区进行特异性识别的酶切位点), Hygr(潮霉素抗性基因区), CaMV 35S Promoter(花椰菜花叶病毒 35S 启动子), Lac Z alpha(乳糖启动子), MCS(多克隆位点), GUS(β -葡萄糖苷酸酶基因); Kana: 卡那霉素抗性基因区; Ori: 复制起始区。重组发根农杆菌:含野生型 Ri 质粒与 pCAMBIA1301 重组质粒。

图 4 双元载体系统示意图

Fig. 4 Binary vector system

保持有效的转化活力.因此,应用时常选用 $OD_{600}=0.6$ 的菌液进行转化,此时细菌处于对数生长期,活力最强.

3.2 外植体的选择与状态对转化的影响

幼嫩植物细胞有初生分生组织,能保持植物细胞的分裂机能,不断分裂产生新的细胞群,并且植物细胞只有处于分裂期时才能与外源 DNA 进行整合,当发育早期的组织,如分生组织,维管束形成层组织,薄壁组织及胚、雌雄配子体发生创伤或环境诱导时则进一步加速分裂,即处于转化的敏感期.因此选择幼嫩的外植体作为受体细胞转化效率远高于成熟的外植体.

3.3 预培养的时间对转化的影响

将植物通过预培养可以促进细胞分裂,使受体细胞处于易于转化的状态.周济铭等利用发根农杆菌导入外源 GUS 基因研究中,将小麦新鲜幼胚分别预培养 0 d 和 4 d 发现,没有经过预培养的外植体 GUS 基因瞬时表达率为 0,而预培养 4d 的外植体 GUS 基因平均瞬时表达都超过了 90%^[18].此外,不同种类的外植体最佳预培养时间都存在差异.

3.4 诱导剂对转化的影响

发根农杆菌 Ri 质粒转化受体植物细胞时,需要酚类化合物作为信号分子诱导 Vir 区毒性蛋白基因的活化与表达,促使发根农杆菌对植物细胞产生趋向作用而吸附在外植体损伤部位,并且起始 Vir 毒性蛋白区的 VirA 区产物磷酸化以及一系列的连锁反应,使 T-DNA 区顺利进入并整合到受体植物细胞基因组中.糖类物质、氨基酸类、低磷酸和酸性 pH 环境可增强酚类信号对 Vir 区基因的诱导^[19].双子叶植物的损伤细胞会自发释放出乙酰丁香酮、羟基乙酰丁香酮等信号分子,单子叶植物因自身无法释放这类信号分子,实验过程中通常人为加入这类激活因子作为转化信号.

3.5 植物蜡被对转化的影响

常见植物叶表面都覆盖有一层蜡质,俗称蜡被^[20].单子叶植物相对于双子叶植物,叶片表面的蜡质更多更厚.此结构大多由脂类化合物组成,不仅可以防止叶片水分蒸腾过多,也可以起到免疫防御作用,阻止微生物的入侵^[21].在对发根农杆菌 Ri 质粒介导的植物基因工程技术实践中,需要提前对叶片进行预处理,以提高转化效率.ChandrasekaranThilip 在对睡眠茄科的毛状根诱导中,采用了 41 °C 水浴 5 min 的方法^[22],SongulGurel 以 43 °C 水浴 3 min 的方法去除表面蜡质^[23].MuthuThiruvengadama 在对睡眠茄科的毛状根诱导中,使用洗涤剂清洗 5 min,并辅以乙醇和次氯酸钠以清除植物叶表面油脂提高转化效率^[22].

3.6 培养基的酸碱度及光照对转化的影响

发根农杆菌作为一种土壤杆菌,可以在黑暗条件下迅速繁殖,并通过植物损伤细胞将外源基因片段导入外植体,因此大多数的毛状根在黑暗的条件下进行诱导.而红豆杉毛状根诱导的最佳条件是光照 24 h.发根农杆菌对温度条件极为敏感,37 °C 条件下,生长极为缓慢,过高的温度也会导致 VirA、VirD、VirE 等基因的表达受阻^[24].25 °C 至 30 °C 生长条件及活力最佳,此时的转化效率最高. Vir 毒性蛋白区的 VirG 基因有两个启动子,一个对磷酸饥饿敏感,另一个对强 pH、DNA 损伤应答启动,随后激活 Vir 区的 VirB、VirD、VirE 等基因族转录,在 T-DNA 区转移进入受体细胞过程中起到剪刀和桥梁的作用.因而 pH 值的改变直接关系到 Vir 区的活化,0.3 的改变就会大大影响转化效率^[25].

4 植物基因工程的应用

4.1 植物品种改良

许多研究表明,发根农杆菌 Ri 质粒诱导植物产生毛状根获得再生植株后,可以引起植株的表型发生改变,如植株矮化,花期延长,提前开花,雄性不育等,这些特性在植株品种改良中具有重大的应用价值^[26-27].在对发根农杆菌 Ri 质粒的研究中发现,这些转基因植株发生的表型改变与核心 T-DNA 区 Rol A-D 基因表达有关.敖小平等利用农杆菌介导法,将 Rol B 基因单独转化大红甜橙,使转基因植株发生了形态改变,与对照组相比,转基因甜橙的株高缩短了 6.48~9.38 倍^[28].施和平等利用发根农杆菌 15834 转化五寸石竹并诱导生成再生植株,与对照组相比,再生植株开花期提前了 18 d^[29].徐洪伟等利用发根农

杆菌转化玉米生成再生植株,在形态学上表现为根系更为发达,侧根丛生^[30].经统计学证实,与对照组相比,该植株在增强玉米抗旱性方面具有显著性意义.目前,发根农杆菌 Ri 质粒介导的基因工程技术在增强植物抗逆性、观赏性等方面均发挥了巨大作用,这些性状改变在研究植物品种改良中具有重大的应用价值.

4.2 基因瞬时沉默技术

基因沉默是在植物界中广泛存在的一种生物防御机制,通过抑制体内特定基因的表达以抵御外源或内源性的病原体侵害. RNA 干扰技术(RNA interference, RNAi)是一种转录后水平上的序列特异性基因沉默方法^[31].刘鹏等以 RNA 干扰技术为基础,以发根农杆菌介导法为手段,将 RNAi 沉默载体通过发根农杆菌 C58C1 瞬时表达进入小麦叶片中,成功地瞬时沉默了小麦 HCP1 基因,使小麦对抗叶锈菌的能力增强^[32].许娜等将 DAD 基因构建到 RNAi 沉默载体中,利用电击法将载体转化进发根农杆菌 K599 菌株中,并通过菌液注射法获得大豆毛状根组织,经 qRT-PCR 检测证实 DAD 基因转录水平沉默率在 45%~70%左右^[33].该方法大大节约了传统 RNA 干扰技术的实验周期,可有效实现基因定点沉默,对植株的进一步改造研究具有重要意义.

4.3 植物代谢工程

发根农杆菌 Ri 质粒诱导植物产生的毛状根拥有该植株所具有的全部基因,并且易于培养,生长迅速,同时遗传性能稳定,现已被广泛用于药用植物有效成分的生产,成为人们提取或合成某种次生代谢产物活性成分的有效手段,目前已在人参、青蒿、丹参、喜树等药用植株中获得成功^[34-35].赵寿经通过诱导人参生成毛状根,使毛状根中人参单体皂甙 Rb1 含量达到 10.38mg/g,超过栽培 6 年生人参根中人参单体皂甙 Rb1 含量(6.45 mg/g)^[36].赵生琴利用发根农杆菌 ATCC15834 诱导西兰花生成毛状根,经 HPLC 测定,西兰花毛状根中萝卜硫素含量远高于西兰花叶片及原始根系,最高时含量可达 2939.159ug/gDW^[37].付晓利用发根农杆菌 C58C1 对甜叶菊进行毛状根诱导,优化不同碳源与激素的培养条件,将毛状根总绿原酸类化合物产量提高到了 233.54mg/100ml,为利用毛状根技术生产绿原酸类化合物提供了重要参考^[38].

5 应用前景及存在的问题

利用基因工程对植物品种进行遗传改良,增强抗逆性,提高粮食作物的产量和质量,是我国农业发展的重要途径.随着发根农杆菌 Ri 质粒介导植物基因工程技术的不断成熟与发展,其应用范围将推广到更多的植物.然而,植物基因工程技术在带来巨大经济效应的同时,也对生态环境带来了潜在的危险.基因工程植株能够在与近缘种的基因交流中造成外源基因扩散和漂移,改变野生植株的基因型.同时,在重要粮食作物的安全性上,粮食作物引入的外源基因是否会对人体基因型造成影响,是否会产生毒素或引发过敏反应,国际社会也没有统一定论.建立环境友好且可持续发展的新一代植物基因工程技术,降低安全风险,保护生态多样性是科研工作者们今后不断奋斗的目标.

参考文献:

- [1] SMITH E F, TOWNSEND C O. A plant-tumor of bacterial origin [J]. *Science*, 1907, 25(643): 671-673.
- [2] KREGTEN M V, PATER S de, ROMEIJN R, et al. T-DNA integration in plants results from polymerase- θ -mediated DNA repair [J]. *Nature Plants*, 2016, 2(11): 16164.
- [3] MAISTRENKO O M, LUCHAKIVSKA Y S, ZHOLOBAK N M, et al. Obtaining of the transgenic *Heliantus tuberosus* L. plants, callus and "hairy" root cultures able to express the recombinant human interferon alpha-2b gene [J]. *Cytology and Genetics*, 2015, 49(5): 308-313.
- [4] JOUANIN L. Restriction map of an agropine-type Ri plasmid and its homologies with Ti plasmids [J]. *Plasmid*, 1984, 12(2): 91-102.
- [5] PETIT A, DAVID C, DAHL G A, et al. Further extension of the opine concept: Plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 1983, 190(2): 204-214.
- [6] VILAINE F, CASSE-DELBART F. Independent induction of transformed roots by the TL and TR regions of the Ri plasmid of agropine type *Agrobacterium rhizogenes* [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 1987, 206(1): 17-23.
- [7] SATUTI N N, MORIGUCHI K, SATO M, et al. Genome structure of Ri plasmid (3). Sequencing analysis of the vir region of pRi1724 in Japanese *Agrobacterium rhizogenes* [J]. *Nucleic Acids Symposium*, 2000, 44(1): 95-96.

- [8] MORIGUCHI K, MAEDA Y, SATOU M, et al. The complete nucleotide sequence of a plant root-inducing (Ri) plasmid indicates its chimeric structure and evolutionary relationship between tumor-inducing (Ti) and symbiotic (Sym) plasmids in Rhizobiaceae [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2001, 307(3): 771-784.
- [9] LIN J, ZHOU B, YANG Y, et al. Piercing and vacuum infiltration of the mature embryo: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of indica rice [J]. *Plant Cell Reports*, 2009, 28(7): 1065-1074.
- [10] HOSOKAWA K, MATSUKI R, OIKAWA Y, et al. Genetic transformation of gentian using wild-type *Agrobacterium* rhizogenes [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1997, 51(2): 137-140.
- [11] VILAINE F, CASSE-DELBART F. A new vector derived from *Agrobacterium* rhizogenes plasmids: a micro-Ri plasmid and its use to construct a mini-Ri plasmid [J]. *Gene*, 1987, 55(1): 105-114.
- [12] SRIPRIYA R, SANGEETHA M, PARAMESWARI C, et al. Improved *Agrobacterium*-mediated co-transformation and selectable marker elimination in transgenic rice by using a copy number pBIN19-derived binary vector [J]. *Plant Science*, 2011, 180(6): 766-774.
- [13] RADUTOIU S, MADSEN L H, MADSEN E B, et al. *Agrobacterium* rhizogenes pRi TL-DNA integration system: a gene vector for *Lotus japonicus* transformation [M]. Berlin: Springer Netherlands, 2005: 285-287.
- [14] ZHOU H, CHEN S, LI X, et al. Generating marker-free transgenic tobacco plants by *Agrobacterium*-mediated transformation with double T-DNA binary vector [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2003, 45(9): 1103-1108.
- [15] SUKHAPINDA K, SPIVEY R, SIMPSON R B, et al. Transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) transformed with a binary vector in *Agrobacterium* rhizogenes: Non-chimeric origin of callus clone and low copy numbers of integrated vector T-DNA [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 1987, 206(3): 491-497.
- [16] GANGOPADHYAY M, DEWANJEES, BHATTACHARYYA S, et al. Effect of different strains of *Agrobacterium* rhizogenes and nature of explants on *Plumbago indica* hairy root culture with special emphasis on root biomass [J]. *Natural Product Communications*, 2010, 5(5): 1913-1916.
- [17] 胡霄. 不同发根农杆菌菌株诱导番茄毛状根的研究 [J]. *广东农业科学*, 2015, 42(3): 20-23.
- [18] 周济铭. 农杆菌敏感小麦基因型筛选与转化条件的优化 [J]. *种子*, 2016, 35(5): 31-35.
- [19] 孙洁, 黄团, 李加纳, 等. 农杆菌培养方式和预培养基激素配比对甘蓝型油菜下胚轴转化效应分析 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2007, 29(12): 49-53.
- [20] DOVE H, MAYES R W. Plant wax components: a new approach to estimating intake and diet composition in herbivores [J]. *Journal of Nutrition*, 1996, 126(1): 13-26.
- [21] NEDELA V, TIHLARIKOVA E, SCHIEBERTOVA P. Study of plant waxes using low temperature method for ESEM [J]. *Microscopy & Microanalysis*, 2016, 22(3): 1180-1181.
- [22] THILIP C, RAJU S C, VARUTHARAJU K, et al. Improved *Agrobacterium* rhizogenes-mediated hairy root culture system of *Withania somnifera* (L.) Dunal using sonication and heat treatment [J]. *Biotech*, 2015, 5(6): 949-956.
- [23] GUREL S, GURELI E, KAUR R, et al. Efficient, reproducible *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum using heat treatment of immature embryos [J]. *Plant Cell Reports*, 2009, 28(3): 429-444.
- [24] YU K W, MURTHY H N, HAHN E J, et al. Ginsenoside production of hairy root cultures of *Panax ginseng*: influence of temperature and light [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2005, 23(1): 53-56.
- [25] GODWIN I, TODD G, FORD-LLOYD B, et al. The effects of acetosyringone and pH on *Agrobacterium* -mediated transformation vary according to plant species [J]. *Plant Cell Reports*, 1991, 9(12): 671-675.
- [26] KODAHN N, MULLER R, LUTKEN H. The *Agrobacterium* rhizogenes oncogenes rolB and ORF13 increase formation of generative shoots and induce dwarfism in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh [J]. *Plant Science*, 2016, 252(2): 22-29.
- [27] SHI H, WANG B, YANG S, et al. Induction of hairy roots of *dianthus chinensis* and its plant regeneration [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2016, 23(3): 92-97.
- [28] 敖小平. 侣基因转化大红甜橙的研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2009.
- [29] 施和平. 五寸石竹毛状根诱导及其植株再生 [J]. *植物学报*, 2016, 51(3): 363-368.
- [30] 徐洪伟. 发根农杆菌诱导玉米毛状根再生植株及抗旱性研究 [D]. 长春: 东北师范大学, 2007.
- [31] 张鑫, 郝玉琴. RNA 干扰技术的研究进展 [J]. *中国麻风皮肤病杂志*, 2016, 32(2): 119-122.
- [32] 刘鹏, 王帅帅, 杨高山, 等. 农杆菌介导瞬时沉默小麦 HCP1 的研究 [J]. *中国农业科学*, 2015, 48(20): 4188-4196.
- [33] 许娜, 崔晓霞, 郭娜, 等. 发根农杆菌介导的大豆 DAD 基因沉默嵌合植株的获得 [J]. *大豆科学*, 2015, 34(4): 576-581.
- [34] AL-SHALABI Z, DORAN P M. Biosynthesis of fluorescent CdS nanocrystals with semiconductor properties: Comparison of microbial and plant production systems [J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 223(10): 13-23.

with Applications, 2015, 42(6):3205-3218.

- [6] YEO K S, ROFAIL S S, GOH W L. CMOS/BiCMOSULSI: low voltage, low power[M]. Englewood: Prentice Hall PTR, 2002.
- [7] 张官志, 姚茂群, 施锦河. 和图及其在 I²L 电路设计中的应用[J]. 电路与系统学报, 2011, 16(6):94-98.
- [8] 张官志, 姚茂群, 施锦河, 等. 阈算术代数系统及电流型 CMOS 电路设计[J]. 浙江大学学报(理学版), 2013, 40(1):51-55.
- [9] 姚茂群, 张立彬. 基于阈算术代数系统的 ECL 触发器设计[J]. 浙江大学学报(理学版), 2014, 41(6):664-669.
- [10] 吴训威. 多值逻辑电路设计原理[M]. 杭州:杭州大学出版社, 1994.

Design of Current-mode BiCMOS Multiple-valued Adder Based on Threshold-arithmetic Algebraic System

YAO Maoqun, ZHOU Chuanxin

(Hangzhou Institute of Service Engineering, Hangzhou Normal University, Hangzhou 311121, China)

Abstract: This paper analyzed the features of current-mode BiCMOS circuits and designed current-mode BiCMOS multiple-valued adder which based on the threshold-arithmetic algebraic system. HE map was used as the graphic representation of threshold-arithmetic functions. The design method of current-mode BiCMOS multiple-valued adder which converted logic functions into threshold-arithmetic functions with HE map was expounded. The HSPICE simulated results confirmed that the designed circuit had correct logic function and good transient characteristic. The circuit design not only improved the design of threshold-arithmetic algebraic system, but also made the design of the current-mode BiCMOS multiple-valued adder become simpler, more intuitive and effective with optimized performance.

Key words: threshold-arithmetic algebraic system; HE map; multi-valued logic; adder

~~~~~  
(上接第 525 页)

- [35] GAI Q Y, JIAO J, LUO M, et al. Establishment of hairy root cultures by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Isatis tinctoria* L. For the efficient production of flavonoids and evaluation of antioxidant activities [J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0119022. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0119022>.
- [36] 赵寿经, 杨振堂, 李昌禹, 等. 发根农杆菌诱导人参产生发根及离体发根中人参皂甙含量的测定 [J]. 吉林农业大学学报, 2001, 23(2):57-63.
- [37] 赵生琴. 西兰花毛状根的诱导及扩繁体系的建立 [D]. 兰州:甘肃农业大学, 2015.
- [38] 付晓. 甜叶菊毛状根培养体系的建立及绿原酸类化合物的积累研究 [D]. 南昌:江西农业大学, 2015.

## Plant Genetic Engineering and Application with Ri Plasmid of *Agrobacterium Rhizogenes*

WU E<sup>1</sup>, ZHANG Rui<sup>1</sup>, ZHANG Chao<sup>1</sup>, ZHU Yao<sup>1</sup>, LI Chenxi<sup>1</sup>, ZHANG Nana<sup>1</sup>,  
CHEN Rong<sup>1</sup>, GE Xiaoping<sup>2</sup>, XIE Tian<sup>1</sup>, YIN Xiaopu<sup>1</sup>

(1. School of Medicine, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China; 2. Hangzhou Polytechnic, Hangzhou 311402, China)

**Abstract:** The root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*, as a natural plant genetic transformation system, is widely applied in plant regeneration, variety improvement, stress resistance and secondary metabolites production, and achieves great economic and social benefits. The principles, methods, affecting factors, prospect and problems of the plant genetic technologies with Ri plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* are reviewed.

**Key words:** *Agrobacterium rhizogenes*; Root-inducing plasmid; hairy roots; genetic engineering