

國立臺灣大學生物資源暨農學院園藝暨景觀學系

碩士論文

Department of Horticulture and Landscape Architecture

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis



利用農桿菌滲入法與農桿菌注射法

建立監測植體含磷狀態之系統

Development of an in Planta System to Monitor  
Phosphorus Status by Agroinfiltration and Agroinjection

林佳螢

Jia-Ying Lin

指導教授：林淑怡 博士、羅筱鳳博士

Advisor: Shu-I Lin, Ph.D. and Hsiao-Feng Lo, Ph.D.

中華民國 103 年 7 月

July, 2014



國立臺灣大學碩士學位論文  
口試委員會審定書

利用農桿菌滲入法與農桿菌注射法  
建立監測植體含磷狀態之系統

Development of an *in Planta* System to Monitor  
Phosphorus Status by Agroinfiltration and Agroinjection

本論文係林佳螢君 (R01628107) 在國立臺灣大學園藝暨景觀學系完成之碩士學位論文，於民國 103 年 07 月 08 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

邱子珍博士  
中央研究院農業生物科技研究中心

邱子珍

羅筱鳳博士  
國立臺灣大學園藝暨景觀學系

羅筱鳳


(指導教授)

林淑怡博士  
國立臺灣大學園藝暨景觀學系

林淑怡

(指導教授)

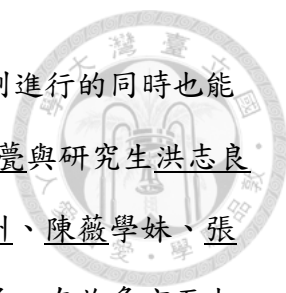
## 誌謝



此篇論文得以完成，最要感謝我的指導教授 林淑怡 博士。在我碩一時，我的專業基礎程度與其他同屆的同學相比是有落差的，上台也很沒有自信心，還記得當時老師說：「不要和別人比，和自己比，只要今天和昨天相比有成長就是一種進步。」之後老師總是願意花費比別人多一倍的時間教導我，非常有耐心與我討論許多實驗相關問題，並循序漸進地引導我尋找答案，使我在碩士班求學期間收益良多且也增加了不少自信心。然而對於我來說老師也像是家人，在季節交替之時，老師總是不斷囑咐要多加件外套不要感冒了；在討論實驗之餘老師也總是不吝於分享她的點心。此外碩班期間也特別感謝共同指導教授 羅筱鳳 博士，羅老師在我沒有信心之時，總是能伸出援手給予我無限的鼓勵，在進度考核時也給予我許多寶貴的建議。感謝兩位老師這段時間的教導與包容才能成就今日的我，而在這段求學期間無論是專業知識或是心理層面上我皆成長許多，在此我要獻上無限的感謝與祝福。

論文初成時，感謝中央研究院農業生物科技研究中心 邱子珍 博士對論文的審閱校正，並提供我許多實驗上的寶貴建議，方能使這份論文更加嚴謹的完整，在此致上最深的謝意。求學期間特別感謝植物科學研究所 鄭秋萍 博士與研究生 林露 學姊、林玉梅 學姊、劉安琪 學長，總是能在我實驗求助無門之時，提供我實驗操作上的建議與幫助。感謝園藝系 許輔 博士與研究生，提供我實驗上的幫助使我的實驗能順利完成。此外也感謝園藝系 王自存 博士、張育森 博士與 吳俊達 博士與其研究生，總是能義不容辭地供給我測量所需的儀器，使我在試驗設計之時能無後顧之憂。

在這說長不長說短不短的研究生活，感謝我的學姊同時也是實驗室助理 蘇瑞媛 學姊，在我心情不好時或是有飢荒之時能提供我最好的幫助。感謝我的同窗好同學 李佳穎 學姊、郭美琳、張凱傑、張富翔，在課業上或是實驗上都能一同討論並且一同分享生活的點滴，使得研究生活不孤單。感謝實驗室貼心的好學妹 陳羿



臻與李宜庭學妹，總是能多方面地幫忙我，使我的實驗得以順利進行的同時也能挺住數個飢餓的吃飯時間。此外也感謝 羅筱鳳博士的助理謝易薈與研究生洪志良學長、孫偉翔學長、李香誼、姚靜樺、古壁甄、劉彥彤、魏良州、陳薇學妹、張至緣學弟、王展麒學弟、洪瑄斐學妹，不僅在實驗上幫助我許多，在許多方面也因為有他們的陪伴使得我碩士生涯更加精采。

特別感謝陪伴我走過數個實驗低潮的夥伴蘇志陞，在我實驗遇到瓶頸之時，即使夜深了身體倦了，他也總是能第一時間的出現並給予我最大的鼓勵，使我能盡快的振作精神並步入軌道。因為有他的陪伴使我的碩士生涯充滿歡笑與不平凡的感動。

最後，我將今日的成就歸屬於我的家人，沒有他們一路的扶持，將沒有今日的我。將此成果獻給我的母親 陳秀菊女士、阿姨 陳秀雲女士、乾媽 李秀鳳女士、姨丈 洪福來先生、乾爸 陳國雄先生、姊姊 林佩汝，謝謝你們能讓我在沒有後顧之憂的情況下完成碩士學業。人生是奇妙的，我從來沒想過自己會踏上這明星學校，在臺大的日子使我產生許多新的想法、新的價值觀，我非常珍惜在這兒的每一天、每一次的學習機會，謝謝上蒼 謝謝臺大使我的生命旅程充滿許多驚喜，也為我的人生藍圖增添許多色彩。

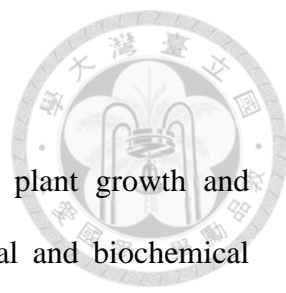


## 摘要

磷 (Phosphorous, P) 是植物生長發育所需必要營養元素之一，參與調控植物體內多項生理、生化反應。本研究於菸草與番茄之營養生長期進行缺磷處理，地上部與根部之無機磷濃度快速降低，葉綠素螢光  $Fv/Fm$  讀值、葉綠素相對含量與地上部鮮重的減少較緩慢，而根部對地上部鮮重之比值則逐漸增加。再者，番茄植株於生殖生長期遭遇缺磷逆境時，果實之無機磷濃度快速降低，進而降低果實產量與可溶性固形物含量。以上結果說明菸草與番茄植株的營養生長以及番茄果實最終之產量與品質皆仰賴於磷肥的充足供應。本研究進一步發現，短暫缺磷雖然會迅速降低地上部或果實的無機磷濃度，但是若在尚未對植株地上部鮮重或果實產量與品質造成不利影響前，迅速補充磷肥，可迅速提升地上部或果實中的無機磷濃度，因而不會對植株地上部鮮重或果實的產量與品質造成不利影響。這說明透過監測作物營養狀態，而適當的供給肥料將可確保作物的產量與品質。本研究透過農桿菌滲入法和農桿菌注射法的方式，證實 GUS 報導基因在番茄 *TPSII* 啟動子的驅動下，可快速、忠實反應菸草葉片與番茄果實面臨缺磷逆境的情形，故知農桿菌滲入法和農桿菌注射法短暫表現的系統可用以監測植體缺磷狀態。而 GUS 報導基因的表現並不受磷以外的其他營養元素缺乏所影響，說明此套農桿菌滲入法短暫表現的系統具專一性。由於此套系統可方便、快速、準確反應植體缺磷狀態，未來將可進一步應用於其他作物；若透過以其他適合的啟動子取代 *TPSII*，此套系統也可應用於監測其他營養元素之狀態。

**關鍵詞：**磷、菸草、番茄、農桿菌滲入法、農桿菌注射法

## Abstract



Phosphorous (P), one of the essential mineral nutrients for plant growth and development, is involved in the regulation of several physiological and biochemical processes in plants. In our study, it was found that, in the tobacco and tomato plants at vegetative growth stage under phosphorus deficiency treatment, the phosphate (Pi) concentration in shoot and root decreased rapidly, the chlorophyll fluorescence ( $F_v/F_m$ ), chlorophyll content and shoot fresh weight decreased relatively slowly, while the root/shoot fresh weight ratio increased gradually. Furthermore, in tomato plants at reproductive growth stage under Pi starvation, the Pi concentration in fruit decreased rapidly, and then the fruit yield and total soluble solids decreased. Accordingly, it is shown that the vegetative growth of tobacco and tomato plants as well as the final yield and quality of tomato depend on whether phosphorus fertilizer is supplied sufficiently. It was further found that, while temporary phosphorus deficiency may immediately lead to the decrease of the Pi concentration in shoot or fruit, the shoot fresh weight or the fruit yield and quality may not be adversely impacted thereby so long as phosphorus fertilizer is timely supplemented to rapidly increase the Pi concentration in shoot or fruit. This indicates that the yield and quality of crops can be ensured by monitoring the nutritional status of the crops and supplying fertilizer as appropriate. By Agroinfiltration and Agroinjection, this study demonstrated that the expression of GUS reporter gene driven by tomato *TPSII* promoter can rapidly and truly reflect the phosphorus deficiency stress in tobacco leaf and tomato fruit. This indicates that the employed Agroinfiltration/Agroinjection transient expression system is useful in monitoring the Pi status in plants. Further, the aforesaid expression of GUS reporter gene is independent of the deficiency of the mineral nutrients other than phosphorus, indicating the specificity of the employed Agroinfiltration transient expression system. Because the

application of the aforesaid system is convenient and leads to rapid and accurate reflection of phosphorus status in plants, the aforesaid system should be applicable to other crops or to monitor other mineral nutrient status if the tomato *TPSII* promoter is replaced by other appropriate promoters.

**Key words : phosphorus 、 tobacco 、 tomato 、 agroinfiltration 、 agroinjection**

# 內容目錄



口試委員會審定書 .....	i
誌謝 .....	ii
摘要 .....	iii
Abstract .....	vi
內容目錄 .....	vii
表目錄 .....	ix
圖目錄 .....	x
第一章、前言 .....	1
第二章、前人研究 .....	3
一、磷的重要性與有效性 .....	3
二、植物缺磷逆境下的適應機制 .....	4
三、番茄的重要性與缺磷逆境對番茄生長發育之影響 .....	6
四、磷礦石的有限性 .....	8
五、合理化施肥及營養診斷方式 .....	9
六、磷吸收與轉運的分子調控機制 .....	11
七、智慧型植物的發展 .....	14
八、農桿菌滲入法與農桿菌注射法之應用 .....	15
第三章、試驗動機與目的 .....	17
第四章、材料與方法 .....	18
一、試驗材料與栽培管理 .....	18
(一) 植物材料 .....	18
(二) 栽培方式與栽培地點 .....	18
(三) 營養元素缺乏之處理方式與處理時間 .....	19
二、農桿菌滲入法與農桿菌注射法 .....	21
(一) 載體構築與農桿菌轉殖 .....	21
(二) 農桿菌滲入法方式 .....	22
(三) 農桿菌注射法方式 .....	23
三、調查項目與分析方法 .....	23
(一) 植物組織鮮重 .....	23
(二) 葉綠素螢光計 .....	23
(三) 葉綠素含量測定 .....	24



(四) 植體無機磷濃度測定 .....	24
(五) GUS 定性分析 .....	25
(六) GUS 定量分析 .....	25
(七) Luciferase 定量表現分析.....	26
(八) 花青素相對含量測定 .....	26
(九) 可溶性固形物測定 .....	27
<b>第五章、結果.....</b>	<b>35</b>
一、 缺磷對菸草營養生長之影響.....	35
二、 農桿菌滲入法應用於菸草葉片磷含量充足與否之診斷.....	36
三、 TPS11 於不同營養元素缺乏之專一性測試 .....	37
四、 缺磷逆境對番茄營養生長之影響.....	38
五、 農桿菌滲入法應用於番茄葉片磷含量充足與否之診斷.....	39
六、 缺磷逆境對番茄生殖生長之影響.....	40
七、 農桿菌注射法應用於番茄果實磷含量充足與否之診斷.....	41
八、 農桿菌滲入法應用於其他茄科蔬菜作物.....	41
<b>第六章、討論.....</b>	<b>68</b>
一、 缺磷逆境對菸草與番茄營養與生殖生長之影響.....	68
二、 其他生理指標用於診斷植體磷含量充足與否之可能性.....	69
三、 農桿菌滲入法與農桿菌注射法用於診斷植體磷含量充足與否之可行性...	70
四、 農桿菌滲入法與農桿菌注射法之應用性.....	72
<b>第七章、結論.....</b>	<b>75</b>
<b>第八章、參考文獻.....</b>	<b>76</b>

## 表目錄

表 1. 本試驗所用之水耕養液配方 .....	28
表 2. 不同營養元素缺乏處理之水耕養液配方 .....	29



## 圖目錄

圖 1. 水耕番茄栽培期間之溫室氣象資料 .....	30
圖 2. 番茄、青椒、辣椒與茄子栽培期間之溫室氣象資料 .....	30
圖 3. (a) TPSII promoter: GUS (b) 35S promoter: GUS (c) 35S promoter: Luc 之載體構 築 .....	31
圖 4. 菸草缺磷處理與農桿菌滲入法時間 .....	32
圖 5. 菸草不同營養元素缺乏處理與農桿菌滲入法時間 .....	33
圖 6. 番茄缺磷處理與農桿菌注射法時間 .....	34
圖 7. 缺磷與磷肥恢復處理不同天數對菸草外觀之影響 .....	42
圖 8. 磷肥處理不同天數對菸草(a)地上部與(b)根部鮮重之影響 .....	43
圖 9. 磷肥處理不同天數對菸草根/地上部鮮重比值之影響 .....	44
圖 10. 磷肥處理不同天數對菸草(a)葉片與(b)根部無機磷濃度之影響 .....	45
圖 11. 磷肥處理不同天數對菸草(a)葉綠素螢光與(b)葉綠素含量之影響 .....	46
圖 12. 磷肥處理不同天數對進行農桿菌滲入法之菸草植體無機磷濃度之影響 .....	47
圖 13. 磷肥處理不同天數對菸草葉片 GUS 染色結果之影響 .....	48
圖 14. 磷肥處理不同天數對菸草葉片 GUS 活性之影響 .....	49
圖 15. 不同營養元素缺乏處理對菸草外觀之影響 .....	50
圖 16. 不同營養元素缺乏處理對菸草無機磷濃度之影響 .....	51
圖 17. 不同營養元素缺乏處理對菸草葉片 GUS 染色結果之影響 .....	52
圖 18. 不同營養元素缺乏處理對菸草葉片 GUS 活性之影響 .....	53
圖 19. 缺磷與磷肥恢復處理不同天數對番茄外觀之影響 .....	54
圖 20. 磷肥處理不同天數對番茄(a)地上部與(b)根部鮮重之影響 .....	55
圖 21. 磷肥處理不同天數對番茄根部/地上部鮮重比值之影響 .....	56
圖 22. 磷肥處理不同天數對番茄(a)葉片與(b)根部無機磷濃度之影響 .....	57
圖 23. 磷肥處理不同天數對番茄(a)葉綠素螢光與(b)葉綠素含量之影響 .....	58
圖 24. 磷肥處理不同天數對番茄花青素累積量之影響 .....	59
圖 25. 磷肥處理不同天數對番茄葉片 GUS 染色結果之影響 .....	60
圖 26. 不同番茄品種與農桿菌菌液濃度對番茄葉片(a)GUS 染色結果與(b)葉片壞疽 情形之影響 .....	61
圖 27. 番茄生殖生長期進行磷肥處理不同天數對(a)地上部與(b)根部鮮重之影響 .....	62
圖 28. 磷肥處理不同天數對番茄(a)綠熟期與(b)紅熟期果實無機磷濃度之影響 .....	63
圖 29. 磷肥處理不同天數對番茄果實(a)產量與(b)可溶性固形物含量之影響 .....	64
圖 30. 磷肥處理不同天數對番茄果實 GUS 染色之影響 .....	65
圖 31. 磷肥處理不同天數對番茄果實 GUS 活性之影響 .....	66
圖 32. 青椒、辣椒與茄子利用農桿菌滲入法表達 GUS 情形 .....	67



## 第一章、前言

磷 (Phosphorous, P) 是植物生長發育所需之一必要營養元素。由於一般土壤中的磷含量低且有效性低，因此大多數農作物需要藉由施用磷肥來維持作物的產量與品質，但一般農民常會過度施用磷肥，不僅提高生產成本，而過多的磷肥流入河川及湖泊，進一步造成水質的優氧化 (eutrophication)，導致生態環境的破壞 (Hammond and White, 2008; Holford, 1997; Raghothama, 1999; Withers et al., 2001)。再者，萃取磷肥之磷礦石為非再生性的資源 (Cordell et al., 2009)，其所具備的有限性與衍生出的價格不穩定性將逐漸影響到農作物的生產與農民的收益。

因此在環境保育與經濟效益的考量下，近幾年來行政院農業委員會 (農委會) 結合植體與土壤樣品之營養元素分析診斷結果推動合理化施肥策略 (林等, 2008; 陳, 1998; 陳等, 2008)。但傳統植體與土壤樣品營養元素含量多寡的檢測需依賴特定儀器設備與專業人員的操作，往往耗時、耗工與耗費，且分析之樣本易因採樣的誤差而導致誤判之情形發生。近年來雖然也有一些非破壞性的檢驗設備被研發出來，但仍侷限於特定營養元素 (主要以氮為主)，且其結果易受其他環境逆境所影響 (李等, 2003; 李等, 2005; Samborski, 2009)。隨著分子生物學的進展，利用基因轉殖方式獲得智慧型植物 (smart plant) 或是以微陣列 (microarray) 方式分析基因變化情形的方式 (Hammond et al., 2003; Hammond et al., 2011) 被提出，但有轉殖技術受限於特定植物種類、技術門檻高、消費者對基因改造作物 (Genetically Modified crops, GM-crops) 存在疑慮、成本高等缺點，因此尚未見到實際應用在農作物生產上。

本試驗利用水耕方式人為調控磷肥的供應，藉此調查缺磷逆境對菸草 (*Nicotiana benthamiana*) 與番茄 (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) 植株生長情形與植體磷酸鹽濃度之影響，從中探討是否存在其他缺磷之生理指標可應用於

植體磷含量之診斷，另一方面透過農桿菌滲入法 (agroinfiltration) 和/或農桿菌注射法 (agroinjection) 的技術建立一套方便、快速可正確檢測植體磷酸鹽含量充足與否的方法，以達最終適時適量施肥、減少支出及維護生態之目標。





## 第二章、前人研究

### 一、磷的重要性與有效性

除了陽光、空氣與水外，營養元素是植物維持其生長發育所不可或缺的物質，營養元素的缺乏或不足將嚴重影響作物的產量與品質。植物生長發育所需之營養元素中，磷為一必要、巨量元素 (macro elements)，不僅是構成細胞結構及能量上的重要組成，例如核酸 (nucleic acid)、細胞膜 (plasma membrane)、三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 等，同時磷也參與許多酵素反應與訊號傳遞，例如蛋白質的磷酸化作用 (Marschner, 1995; Raghothama and Karthikeyan, 2005; Raghothama, 1999)。

磷以多種化學組合方式存在於土壤中，但大體可分為無機磷 (inorganic phosphate, Pi) 和有機磷 (organic phosphate, Po) 兩類。植體吸收磷的型式以無機磷為主，根據統計，無機磷通常在土壤中約佔總磷含量 35~70% (Shen et al., 2011)。有機磷存在於土壤中，主要以肌醇磷酸 (inositol phosphates)、磷酸酯 (phosphonates)、正磷酸二酯 (orthophosphate diesters) 方式穩定存在，其次，正磷酸單酯 (orthophosphate monoesters)、有機多磷酸鹽 (organic polyphosphates) 也是廣泛存在土壤中之有機磷形式 (Condrón et al., 2005; Shen et al., 2011; Turner and Leytem, 2004)。

影響磷有效性的因子，包含土壤酸鹼值 (pH)、土壤中其他陽離子的分佈情形、微生物作用與雨水淋洗。當土壤 pH 值小於 6.8 時，土壤中的磷型式為單價正磷酸根離子  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ，此型式為植物根部容易吸收之型式；土壤 pH 值介於 6.8~7.2 之間，土壤中磷的型式是二價正磷酸根離子  $\text{HPO}_4^{2-}$ ，此型式為植物根部較難吸收的型式；當土壤 pH 值大於 7.2，土壤中磷的型式是三價的  $\text{PO}_4^{3-}$ ，此型式無法被植體吸收利


用 (Hopkins and Hüner, 2006)。土壤中無機磷容易與其他陽離子鍵結形成複合物，其中又以鈣、鐵、鋁等的鍵結最為常見，而鍵結後的磷無法被植物體所吸收利用。此外，無機磷也可能被土壤中的微生物轉換成有機磷，亦或受雨水淋洗而流失，因而導致土壤中植物可吸收的磷是有限的，也因此大部分無人工施用磷肥的土地其作物產量常偏低 (Raghothama and Karthikeyan, 2005; Vance et al., 2003)。

## 二、植物缺磷逆境下的適應機制

植物為了克服土壤中常見的低磷逆境而演化出不同的應變措施，大體可分為兩大方向，(1) 對外提高磷的吸收，包含根形態的改變、根部與菌根菌 (mycorrhizal fungi) 發展共生關係 (symbiotic association)、根圍分泌有機酸 (organic acids)、合成磷酸酶 (phosphatase) 與核酸酶 (nuclease)、誘導高親和性磷轉運蛋白 (high-affinity phosphate transporter) 的表現等；(2) 對內則設法調整磷的分配與利用，例如糖解作用 (glycolysis) 以替代路徑進行或將老葉的磷運移至幼葉或生長點供其生長使用 (Bielecki and Ferguson, 1983; Mimura, 1995)。

植物遭遇缺磷逆境時可透過改變根部的形態來提高磷的吸收，例如先前研究指出植株缺磷逆境下有 90% 的磷是藉由根毛吸收的 (Gahoonia and Nielsen, 1998)。植物對應低磷逆境所衍生出根部形態的改變依植物種類而具有多樣性，以模式植物- 阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) 為例，在缺磷逆境下主根細胞長度與主根根長變短、根部分生組織處的表皮細胞數減少 (Sanchez-Calderon et al., 2005; Williamson et al., 2001)、側根與根毛的生長增加、地下部/地上部比值提高 (Williamson et al., 2001)。而山龍眼科 (Proteaceae) 植物在缺磷環境下會誘導形成由密集枝根所組成稱 proteoid roots 之特殊根結構 (Watt and Evans, 1999)。

許多植物可與菌根菌發展出共生關係，菌根菌藉由菌絲 (hyphae) 提高磷的吸收面積，再將磷運輸至根部的皮層供植物使用，目前也已知菌根菌可誘導植物產



生特定的磷轉運蛋白用以提高磷肥吸收 (Karandashov and Bucher, 2005; Raghothama and Karthikeyan, 2005; Smith et al., 2003)，例如水稻 (*Oryza sativa*) 的 OsPT1 磷轉運蛋白、馬鈴薯 (*Solanum tuberosum*) 的 StPT3 磷轉運蛋白都與菌根菌有關 (Rausch et al., 2001)。

相較於單子葉植物，雙子葉植物特別是豆類植物，吸收磷的效率較高，因為大多數豆類作物在缺磷逆境下於根尖 1~2 公分處會分泌有機酸，其中又以蘋果酸 (malic acid) 與檸檬酸 (citric acid) 最為常見。根分泌有機酸可利用螯合作用 (chelation) 幫助磷從與陽離子結合的複合物中釋放出來 (Hoffland et al., 1992; Johnson et al., 1996)。例如苜蓿 (*Medicago sativa*) 在磷缺乏環境下，會增加檸檬酸排出的量 (Lipton et al., 1987)，白色羽扇豆 (*Lupinus albus*) 在磷缺乏環境下，大量分泌蘋果酸、檸檬酸、琥珀酸 (succinate) (Johnson et al., 1996)。

高等植物在缺磷逆境下生長普遍會合成磷酸酶與核酸酶 (Duff et al., 1994; Poirier and Bucher, 2002)。磷酸酶根據螯合的 pH 值分為鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase) 與酸性磷酸酶 (acid phosphatase) (Duff et al., 1994)。植體內的鹼性磷酸酶是高專一性的受質，在代謝中扮演重要角色，相對的酸性磷酸酶較不具專一性。此外核酸酶與酸性磷酸酶的功能相同，在缺磷逆境期間，細胞外或細胞內皆會產生核酸酶與酸性磷酸酶，可幫助植體從外部或是內部獲得更多的磷供其使用。酸性磷酸酶的分泌現象可透過 BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) 染色方式觀察到，例如在阿拉伯芥、羽扇豆、水稻 (*Oryza sativa*)、小麥 (*Triticum aestivum*)、番茄皆有觀察到在缺磷環境下其根部表現高的酸性磷酸酶 (Ciereszko et al., 2011; Lloyd et al., 2001; Sanchez-Calderon et al., 2005; Tadano and Sakai, 1991; Trull and Deikman, 1998; Trull et al., 1997)。當植物暴露在土壤有機磷含量高達 80% 以上時，細胞外的酸性磷酸酶與核酸酶會分解有機質如植酸 (phytate) 進而釋放出磷供給植體使用，而細胞內的磷酸酶與核酸酶可能用來參與調節磷的重新分配 (Duff et al.,





1991; Poirier and Bucher, 2002)。


植物缺磷時會誘導高親和性磷轉運蛋白的表現，其中像是 PHT1 家族常被提及在缺磷逆境時會增加表現量，其表現在根部，負責磷的吸收(Lee, 1993; Mitsukawa et al., 1997; Raghothama, 1999)，有關這類磷轉運蛋白將於下面章節做更詳細的介紹。

植體在缺磷時細胞內 ATP 與核苷酸含量會顯著下降，此時植體會改變糖解作用路徑，並藉由許多酵素如 UDP-glucose pyrophosphorylase、pyrophosphate-dependent phosphofructokinase 等的參與，以替代的路徑 pyrophosphate (PPi)-dependent pathway 進行，此替代路徑不僅可減少糖解作用 ATP 能量的消耗，也利於進行花青素 (anthocyanin) 生合成路徑，使得植物體在缺磷逆境下花青素大量累積，而花青素的累積又可以保護核酸避免 UV 光的傷害與保護葉綠體在光合成中不受光抑制 (photoinhibition) 的傷害 (Hoch et al., 2001; Plaxton and Carswell, 1999; Poirier and Bucher, 2002)。

為了在缺磷逆境下使磷達到最佳化利用，磷會由老葉運移到幼葉或重新分配磷從非必要性的組織到必要組織 (Bielecki and Ferguson, 1983; Raghothama and Karthikeyan, 2005; Raghothama, 1999)。在細胞層級上，當磷充足時，植體會將磷運移到液胞貯存，此為維持植體內磷平衡的一個重要過程，因此在短期缺磷逆境下，磷會由液胞運移出以維持細胞質的磷濃度在一個平衡的狀態 (Bielecki, 1973; Lee and Ratcliffe, 1993; Mimura et al., 1996; Sakano et al., 1992; Tu et al., 1990)。

### 三、番茄的重要性與缺磷逆境對番茄生長發育之影響

番茄 (*Solanum lycopersicum* L.) 為世界重要蔬菜，原生地為南美安地斯山區、祕魯、厄瓜多、玻利維亞等地，其營養價值高，如富含維生素 C、維生素 A、鉀等營養，又因逐漸瞭解番茄果實中所含的茄紅素 (lycopene) 及其他有效成分與降低前列腺癌、肺癌、胃癌等癌症的發生有關 (Giovannucci, 1999; Story et al., 2010)，




在消費市場中廣受消費者喜愛。番茄依照食用方式的不同可分為加工用或是鮮食用，目前國內加工用番茄栽培較少，但鮮食用番茄因近年來國內陸續培育出新品種，品質、風味佳，糖度高達 6~12° Brix，因此深受國人喜愛，依據行政院農業委員會農糧署 2012 年農業統計年報顯示，番茄總栽培面積已超過 4,501 公頃，總產量高達 111,361 公噸（農業統計年報；<http://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx>），其中大多都是鮮食用，主要產地集中在中南部（郭和何, 2010）。

缺磷逆境普遍來說會導致植株高度降低、抑制分蘖、延長休眠、提早老化、減少花及花苞的數量及大小、造成花青素的累積等，最終影響作物的產量及品質（Hammond and White, 2008; Marschner, 1995）。同樣的，缺磷逆境將影響番茄生長與發育，例如 20 天苗齡的番茄植株培養在缺磷環境下，將會降低其地上部及根部的乾物重，此外也降低磷在地上部的比例（Biddinger et al., 1998）；若是在結果時期進行缺磷處理，則降低果實、葉片、莖及根的磷含量、減少果實與地上部的乾重，也降低光合作用效率、氣孔導度（stomatal conductance）與蒸散速率（transpiration rate）及造成莖徑、果徑的下降，因而影響最終的品質與產量（Fujita et al., 2003）。

植物依照對於磷的吸收效率可分為高效率（high efficient）與低效率（low efficient）兩種，高效率植物像是菠菜（*Spinacia oleracea* L.）、油菜（*Brassica campestris* L.）、小麥（*Triticum aestivum* L.）、黑麥（*Secale cereal* L.）等，低效率植物像是洋蔥（*Allium cepa*. L.）、番茄、豆類等，影響吸收效率的高低與根部本身對磷的吸收速率高低及植株地下部/地上部比值大小有關（Raghothama, 1999）。由於番茄屬於低效率的植物，充足的磷肥供給對番茄生產扮演重要性，再者，番茄以採收果實為主，磷肥需求高。目前建議的施肥量，在基肥時每公頃需要施用高達 833~1,111 公斤的過磷酸鈣（戴等, 2010）。

上述提及植物面臨缺磷逆境時有各式各樣的適應方式，但每種植物所採取的



策略不一，效果也不同。雖然也有學者嘗試利用這些特性來提高植體磷含量，例如利用接種不同的叢狀菌根菌 (Arbuscular mycorrhizal, AM)，如 *G. rosea*、*G. caledonium*、*G. intraradices*. 等來提高亞麻 (*Linum usitatissimum* L. cv Linetta)、番茄 (*Solanum lycopersicum* cv Rio-Grande 76R)、苜蓿 (*Medicago truncatula* L. cv Jemalong) 植體的磷含量 (Smith et al., 2003)，或是透過菌根菌接種使洋蔥 (*Allium cepa*) 具有較高的磷濃度與較高的乾物重 (Tawaraya et al., 2006)。但現代農業為追求高效率與獲得高產、高品質的農產品，大多還是採用施肥方式補足作物所需之磷肥。

#### 四、磷礦石的有限性

典型地面上的磷循環主要受到農業與人類活動所控制 (Oelkers and Valsami-Jones, 2008)。多數植物組織磷的濃度為 5~20 mM (Raghothama, 1999)，但一般土壤可供植物體所利用的無機磷濃度很少超過 10  $\mu$ M (Bielecki, 1973)。在全球熱帶、亞熱帶地區的潮濕土壤及半乾旱地區的砂質土壤，常見作物的產量因為磷的缺乏而嚴重降低 (Raghothama, 1999)。

為使土壤保有充足的磷供作物生長，農民藉由施用磷肥以維持甚或提高作物產量與品質。磷肥主要是由磷礦石開採提煉而來，磷礦石開採主要集中在世界上的幾個國家，像是中國、美國與摩洛哥三個國家開採的量即大約佔世界產量的三分之二 (Potashcorp; [http://www.potashcorp.com/industry\\_overview/2011/nutrients/23/](http://www.potashcorp.com/industry_overview/2011/nutrients/23/))。再者，磷礦石為非再生性的資源，隨著需求量的增加，磷礦石被過度地開採，根據學者推估磷礦石若依照目前的趨勢持續開採，預計全世界磷礦石的貯存量可能在 50-100 年內用盡 (Cordell et al., 2009; Runge-Metzger, 1995; Steen, 1998)。磷礦石的開採也帶來嚴重的生態破壞，以南太平洋小島諾魯 (Nauru) 為例，諾魯曾是世界三大磷礦石的生產地，磷礦分佈於全島 70% 土地上，隨著島上礦產的開發耗盡，使得約 80% 土地受到破壞，也使得 40% 鄰近海洋生物因泥沙和磷礦的徑流而

死亡 (Republic of Nauru, 1999)。



## 五、合理化施肥及營養診斷方式

由於土壤中的磷具有有效性，加上露天栽培時磷肥易受雨水淋洗而流失，磷肥的充足給予對作物生產扮演重要角色。但隨著氣候變遷問題加劇，設施栽培 (protected cultivation) 已成為各類作物穩定生產之一趨勢，同時具有提高產量與品質之優點 (郭, 1985; 黃等, 2009; 詹和陳, 2003; 劉等, 2009)。以番茄來說，臺灣夏季高溫高濕，加上常有颱風、豪雨侵襲，造成番茄栽培困難；秋冬時節氣候雖適宜番茄生長，但露地栽培病蟲害危害嚴重，因此為提高番茄之產量與品質，近年來已多採用設施栽培 (劉等, 2009)。雖然設施栽培不會有雨水淋洗問題，但也因為缺乏雨水淋洗，加上農民過度施用肥料，不僅提高生產成本，也造成土壤鹽類的累積，緊接著伴隨而來的是影響水分的吸收、過多的鹽分造成根部傷害、養分間不平衡引起養分拮抗作用、破壞土壤微生物活力，甚至因為微生物相的不平衡易使作物發生病害 (王等, 2011; 黃等, 2007; 羅, 2002)。

現今農民為了確保農作物的產量與品質，不論露天或設施栽培，過度施肥已成為常見現象。過度施肥除了具有上述缺點外，以磷來說，過度施用磷肥還造成過多的磷隨著地下水徑流流到排水溝，進入河川與湖泊，導致水質優養化，造成環境生態的破壞。另一方面，隨著磷礦石漸漸地使用耗盡，也將造成磷肥價格的波動，以摩洛哥出產的磷礦石為例，根據 IndexMundi 統計指出 2008 年每公噸的磷礦石價格升高至約 430 美元，較 2007 年增加超過 70% (IndexMundi; <http://www.indexmundi.com/commodities/?commodity=rock-phosphate&months=240>)。由於國內製造肥料的原料大多只能仰賴進口，因此常受國際價格波動所影響，使得國內肥料價格浮動高，為此農委會於民國 97 年的重要措施之一就是成立「肥料價格審議小組」進行價格趨勢分析，並進一步透過補助方式穩定國內肥料價格。但補助畢竟不是長久之計，且對政府來說是一財政負擔，也因此農委會也同時成

立「肥料配銷督導小組」及由各區農業改良場組成「合理化施肥輔導小組」用以穩定肥料供應及輔導農民合理化施肥，即最終希望透過合理化施肥的政策，降低農民肥料使用量，以達減少肥料支出成本及增加收益之目標（農業委員會；<http://www.coa.gov.tw/view.php?catid=17615>）。

所謂的「合理化施肥」，乃是依照作物的種類、特性及生長情形，配合不同的田間土壤條件及肥料特性來制訂出最經濟、最合理的施肥策略，而且同時要能兼顧作物產量及品質，如此不僅可以減少肥料支出，也可以避免過度施肥造成土壤鹽化、酸化及環境污染等問題。因此合理化施肥不僅可以維持作物生產、降低肥料成本，更可以增加肥料的永續性以及降低環境污染（林, 2005; 林等, 2008; 陳等, 2008; 陳, 1998; 蕭和賴, 2010）。

為制訂合理化施肥策略，需要先知道作物的營養是否充足，作物營養的不足雖說可借肉眼判斷，但僅有經驗的專家才可判斷，且當肉眼可見時往往都已為時過晚，因此，目前多是採取植體或土壤樣品進行各種營養元素含量多寡的檢驗（林等, 2008; 陳等, 2008; Campbell, 1994; Hammond and White, 2008）。植體中各種營養元素濃度的高低是各類因子之綜合反應結果，其濃度可做為營養缺乏或過多的診斷指標，而土壤肥力狀態能反應土壤對作物生長之養分供給能力（張和李, 1989）。然而，利用植體診斷作物營養狀態，容易因植體本身遭遇病蟲害、環境因素與作物本身品種的差異而導致誤判的情形發生，此外採樣組織的部位與年齡的不同也可能造成分析的誤差；利用土壤進行分析則因分析過程土壤需經陰乾、過篩方能測定土壤 pH 值、電導度值 (Electrical Conductivity, EC) 及有機質，且需經進一步萃取方能分析土壤養分含量，往往需要耗費許多時間，而在等待的過程中植體可能已經發生嚴重養分缺乏情形（林, 2007; 張和李, 1989; 彭, 2005）。目前臺灣是由各大改良場免費替農民進行檢驗，但這樣的檢驗方式往往需要使用到原子吸收光譜儀 (Atomic Absorption Spectrometer, AA)、感應偶合電漿質譜儀 (Inductively

Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS) 等昂貴儀器，加上樣品製備過程複雜且耗時，往往需要仰賴專業人員的操作 (張和李, 1989)，因此勢必會增加政府農政單位的財政負擔。



除了上述傳統的檢驗方式，隨著科技的發展，也有不少非破壞性的探測器被研發出來，例如可透過偵測葉綠素、polyphenolics 等含量的變化來判讀植物是否缺乏氮肥，但其結果易受人為操作方式、季節變化、不同營養元素缺乏或不同環境逆境等因素所影響 (李等, 2003; 李等, 2005; Samborski, 2009)。再者，目前這類的儀器主要都是用於測定氮肥供應的充足與否，尚未有商業化的磷肥診斷儀器被推出。

## 六、磷吸收與轉運的分子調控機制

植體吸收磷需要先消耗 ATP 以產生質子梯度 (proton gradient)，再利用磷轉運蛋白 (phosphate transporter) 輸送磷至植體內部。依照酵素動力學的特性，磷轉運蛋白可區分為高親和性 (high affinity) 與低親和性 (low affinity) 兩種 (Furihata et al., 1992; Raghothama, 1999)。而依照序列相似性則可分為 Pht1、Pht2、Pht3 與 Pht4 四大家族 (Karandashov and Bucher, 2005; Poirier and Bucher, 2002)。Pht1 家族的多數成員被認為是高親和性磷轉運蛋白，由 Pht1:1~Pht1:9 等成員組成，主要位於根系細胞膜上，但在花、子葉出水孔 (hydathode)、花粉、葉片維管束組織 (vascular tissue)、芽等部位也都有所表現 (Karthikeyan et al., 2002; Mudge et al., 2002)。Pht1 家族中的 Pht1:1、Pht1:2、Pht1:3 與 Pht1:4 等成員在缺磷時誘導表現，主要在根部負責吸收無機磷，也是目前研究最多的磷轉運蛋白 (Mudge et al., 2002; Raghothama and Karthikeyan, 2005)。Pht2:1 是目前唯一已知的 Pht2 家族成員，屬於低親和性磷轉蛋白，主要位於葉綠體膜上 (Versaw and Harrison, 2002)。Pht3 家族的成員包含 Pht3:1、Pht3:2、Pht3:3，主要位於粒線體膜上。Pht4 家族的成員有 6

個，Pht4:1~Pht4:6，主要位於根部與葉片，Pht4:1~Pht4:5 在質粒體 (plastid) 也有所表現，Pht4:6 則在高爾基體 (Golgi apparatus) 表現，說明 Pht4 可能參與細胞質與質粒體或與高爾基體間磷的運輸 (Guo et al., 2008)。



如上所述，根部磷的吸收主要由 Pht1 家族所負責，透過 iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantitation) 定量膜蛋白質體的技術，目前得知 Pht1 家族中不少成員受 UBC24/PHO2 蛋白質所調控。PHO2 位於細胞內膜 (endomembrane) 上，為一泛素接合酵素 (ubiquitin-conjugating E2 enzyme)，具有調控 PHT1 蛋白質降解的功能 (Huang et al., 2013)。另一方面，透過突變株篩選的方式，PHO2 被證實也可調控 PHO1 (PHOSPHATE 1) 蛋白質的表現 (Liu et al., 2012)。PHO1 為一膜蛋白 (membrane protein)，主要表現在根部的維管束細胞，參與無機磷木質部的裝載 (xylem loading)，因此阿拉伯芥 *pho1* 突變株造成磷運載到地上部的功能受損，導致其根部磷含量雖正常但地上部磷含量低，因而其外表形態較一般野生型阿拉伯芥矮小 (Poirier et al., 1991)。而阿拉伯芥 *pho2* (*phosphate 2*) 突變株地上部出現磷毒害的現象乃是因為降低 PHT1 與 PHO1 蛋白質的降解，進而提高磷的吸收與磷由根部運載到地上部的功能所致 (Aung et al., 2006; Huang et al., 2013; Liu et al., 2012)。


微型核糖核酸 (microRNAs, miRNAs) 是小分子核糖核酸 (small RNAs) 的一員，長度只有 20-21 個鹼基，具有副調控基因表現的功能，在調控動植物各項生理反應上扮演重要角色 (Bonnet et al., 2006; Jones-Rhoades et al., 2006; Lin et al., 2008; Mallory and Vaucheret, 2006; Sunkar et al., 2007)。上述 PHO2 的表現受微型核糖核酸 399 (miR399s) 所調控，缺磷時會誘導 miR399s 的表現，進而抑制 PHO2 的表達，因此大量表現 miR399s 的阿拉伯芥轉殖株相較於野生型阿拉伯芥會有較高的磷吸收與轉運能力，致使植株出現磷毒害現象 (Aung et al., 2006; Chiou et al., 2006)。再者，透過嫁接實驗，miR399s 被證實可長距離的由地上部運移到根部，進而調控植

物無機磷的體內平衡 (Homeostasis) (Lin et al., 2008; Pant et al., 2008)。

缺磷逆境下的磷訊號調節伴隨著許多基因的參與，但大抵可分為早期基因 (early gene) 與晚期基因 (late gene)，早期基因為缺磷時快速誘導表現的基因，多與訊息傳遞有關，晚期基因多與形態、生理與代謝改變有關 (Hammond et al., 2004; Vance et al., 2003)。這些基因在阿拉伯芥中已被廣泛描述 (Chiou and Lin, 2011; Vance et al., 2003)。番茄中較早被描述到缺磷誘導表現的基因為 *TPSII* (tomato phosphate starvation-induced gene)，此基因在缺磷時會快速的在根部及葉片表達，因而被歸類為早期基因 (Biddinger et al., 1997; Liu et al., 1997)。與 *TPSII* 相似的基因包含有阿拉伯芥中發現的 *IPS1*、*At4*、*At4.1*、*At4.2* (Burleigh and Harrison, 1997; Martín et al., 2000; Shin et al., 2006)，苜蓿 (*Medicago truncatula*) 中發現的 *Mt4* (Burleigh and Harrison, 1997; Burleigh and Harrison, 1998)，水稻中發現的 *OsIPS1*、*OsIPS2* (Hou et al., 2005; Wasaki et al., 2003)，他們都被歸類為非編碼的 RNA (non-coding RNAs)，也都受缺磷逆境誘導表現，但除了存在 22-24 個核苷酸 (nucleotide, nt) 的相似序列外，其他地方序列則不相似 (Burleigh and Harrison, 1998; Martín et al., 2000)。AT4 與 *IPS1* 近來被認為可模仿 miR399 目標基因-*PHO2* 的序列 (target mimicry)，因為其所存在的 22-24 個核苷酸相似序列部分互補 (complementarity) 於 miR399 的序列，但於中間重要區域序列則不具互補性，因而可減緩 miR399 對 *PHO2* 的抑制作用 (Franco-Zorrilla et al., 2007)。

除了上述提及利用菌根菌接種的方式提高植物磷肥吸收效率外，隨著分子生物學的進展，陸續有學者嘗試利用基因工程方式提升根部磷的吸收效率，以減少磷肥的施用量。例如，菸草透過基因轉殖檸檬酸合成之編碼序列 (*Pseudomonas aeruginosa* CS gene) 而獲得大量生合成檸檬酸之轉植株，於營養期、開花期與著果期進行缺磷處理，結果顯示轉植株在缺磷下仍可與對照組野生型植株置於磷充足環境下達到一樣生長狀況 (Lopez-Bucio et al., 2000)。此外，菸草透過基因轉殖





酸性磷酸酶- LASAP2，於含植酸的環境下，轉植株因能有效水解植酸，使得轉植株相較野生型植株有較高的磷含量與較高的乾物重 (Wasaki et al., 2009)。而基因轉殖菸草大量表現阿拉伯芥高親和性磷轉運蛋白基因 PHT1; 1，在缺磷逆境能提升菸草對磷的吸收能力 (Mitsukawa et al., 1997)。亦或大量表現 miR399 的阿拉伯芥或菸草轉植株相較於野生型植株也可以有較高的磷吸收與轉運能力 (Aung et al., 2006; Chiou et al., 2006)，可惜的是可能因為啟動子 (promoter) 表現太強，致使植株出現磷毒害現象，未來若可透過啟動子的篩選將有機會提高磷的吸收效率但又不致於使植株出現磷毒害現象，或是也可考慮在極端缺磷的土壤環境栽培此類轉殖植株。以上例子雖說明透過基因轉殖的確可提高磷的吸收效率，但因為是基因轉殖植物，若要實際運用到農作物上即成為基因改造作物 (Genetically Modified crops, GM-crops)，而目前認為基因改造作物可能存在一定的潛在危機，如影響生態系的平衡、抗藥性、抗生素抗性等等的考量 (Chiter et al., 2000; Schuler et al., 1999; 黃和曾, 2001)，因此目前一般消費者對基因改造作物仍具有一定的顧慮，也減緩此方式實際應用在作物上的時間。

## 七、智慧型植物的發展

除了利用基因工程方式提升根部磷的吸收效率外，伴隨著分子生物學的發展，發展智慧型植物的概念在 2003 年被提出，當時乃利用在阿拉伯芥轉殖帶有缺磷專一誘導表現基因-SQD1 (sulfoquinovosyl diacylglycerol 1) 的啟動子與報導基因 (reporter gene) 的構築，預期該轉植株遭受缺磷逆境時，將誘導 SQD1 表現，並進一步導致報導基因的表達，試驗結果也的確證實該阿拉伯芥轉植株可透過報導基因的表現情形，成功表達自身是否遭遇缺磷逆境 (Hammond et al., 2003)。這樣的轉植株將可幫助我們更精密控制磷肥的施用、降低花費、保護自然資源與減少環境汙染，以達合理化施肥之目標。但是這樣的智慧型植物一直還沒有實際應用到農作物上，主要的限制就是基因轉殖在一般作物所需時間長、技術層面高不易達


成，且目前不是每樣作物都可以成功再生得到基因轉殖植物，以及消費者對基因改造作物的疑慮。

除了發展智慧型植物，近來也有學者提出使用微陣列的方式來診斷植株缺磷與否，主要是將植體抽取核糖核酸後進行微陣列分析，再依照基因的表現情形來整體衡量作物是否缺磷 (Hammond et al., 2011)。其好處是同一時間可看很多基因的表現，用以當作衡量缺磷與否的標準會更客觀，但相對來說，如果每隔一段時間，就要針對各種作物做微陣列分析，所需經費還是相當高昂且其分析方式相對較為複雜，目前仍不適合實際應用。

#### 八、農桿菌滲入法與農桿菌注射法之應用

為了研究基因的功能，以往普遍利用農桿菌 (*Agrobacterium*) 進行基因轉殖，之後再生形成基因轉殖植物，但是這樣的過程，往往耗時、耗錢，且技術難易度依植物種類而異。農桿菌滲入法於 1997 年被提出，此技術可短暫表現 (transient expression) 目標基因，透過 CaMV35S (Cauliflower mosaic virus) 啟動子接上 GUS ( $\beta$ -glucuronidase) 報導基因或目標基因  $\beta$ -1,3-glucanase (GLUase)、chitinase (CHNase)，於農桿菌滲入後不同天數檢測活性，發現在滲入後第 4 天便有高的活性，且到第 10 天仍維持高活性，說明可透過此種短暫表現方式了解基因的功能 (Schöb et al., 1997)。該方法目前在轉基因補償作用 (transgenic complementation)(Bendahmane et al., 2000; Johansen and Carrington, 2001; Shao et al., 2003; Van der Hoorn et al., 2000)、啟動子功能分析 (Yang et al., 2000) 及蛋白質生產 (Vaquero et al., 1999; Vaquero et al., 2002) 上已有相關應用例子。另一方面，也有學者利用農桿菌滲入法結合啟動子與報導基因的構築成功偵測菸草葉片是否遭遇病原菌攻擊或遭受熱逆境 (Yang et al., 2000)。

早期農桿菌滲入法大多侷限於菸草使用，隨著技術不斷的改進，目前在阿拉伯芥、番茄及萵苣 (*Lactuca serriola*)(*Lactuca sativa*) 等作物都可成功表達



(Wroblewski et al., 2005)，大幅提高這項技術應用的空間。然而農桿菌滲入法在非模式植物容易出現葉片壞疽情形，需透過使用不同的農桿菌品系來加以克服，例如一般試驗常用農桿菌品系-GV3101、C58C1 等會造成番茄葉片在農桿菌滲入後出現壞疽情形，進而干擾報導基因的表現。透過改成滲入大理花 (*Dahli*) 中發現的野生型農桿菌-1D1249 品系，可減緩番茄葉片出現壞疽情形。因此農桿菌品系的選擇於農桿菌滲入法中是一關鍵影響因子。

農桿菌注射法與農桿菌滲入法類似，都是短暫基因表現的系統，相對於農桿菌滲入法是在葉片表現，農桿菌注射法則可表現於果實上，操作上則是利用帶有針頭的針筒將農桿菌菌液注射到果實組織即可 (Orzaez et al., 2006b)。番茄利用農桿菌注射法於注射後 3~4 天在果實胎座附近呈現高表現量的報導基因 (Orzaez et al., 2006)，除了番茄外，農桿菌注射法也可應用在蘋果、梨子、桃子、草莓與橙等果實上 (Spolaore et al., 2001)。此方法已被應用於啟動子方面的研究，例如利用阿拉伯芥熱休克蛋白 (heat shock protein 70, HSP70) 啟動子配合 GUS 報導基因，可在熱休克處理下偵測到果實大量表現 GUS 報導基因。另外結合農桿菌注射法與病毒誘導基因靜默 (virus induced gene silencing, VIGS) 系統，Orzaez 等人透過注射帶有 *PDS* (phytoene desaturase) 相關病毒靜默載體的農桿菌於番茄果實可成功地默化番茄 *PDS* 基因，因該基因參與胡蘿蔔素生合成功能，因此使果實呈現白化徵狀 (Orzaez et al., 2006)。

### 第三章、試驗動機與目的



由於磷在土壤中具有有效性與磷肥本身具有有限性，為兼顧經濟發展與環境生態考量，除了可透過提高磷肥的吸收效率使磷能夠更有效率地被作物吸收利用外，另一方面則需透過合理化施肥策略達成同時兼顧作物產量與減少磷肥施用量之目的。要進行合理化施肥，最重要的就是需要準確的進行營養診斷，但傳統營養診斷方式耗時、耗錢，且需專業人士進行操作。近年來發展出的非破壞性儀器、智慧型植物與微陣列等檢測方式，則有特定元素侷限、易受其他逆境影響、轉殖技術受限於特定植物種類、技術門檻高、消費者對基因改造作物的疑慮、成本高等缺點，因此並不容易實際應用於農作物生產。

本研究首先希望透過缺磷逆境的處理，探討缺磷對於草與番茄植株生長的影響，透過一系列生理反應的檢測，希望尋得潛在可應用於植體磷含量診斷之生理指標。另一方面，*TPSII* 於短時間缺磷處理即在葉片大量表達，因此本研究希望利用番茄 *TPSII* 啟動子接上報導基因的構築，結合農桿菌滲入法和/或農桿菌注射法方式將其表現在菸草與番茄的葉片與果實，藉此建立一套快速、準確的植體磷含量充足與否的檢測方式，透過報導基因的表現量來告知栽培者作物目前的營養狀態。該作物並不食用，而是作為指標作物，透過該指標作物報導基因的表現量即時呈現植體營養狀態供作施肥之參考，以達最終適時適量施肥、減少支出及維護生態之目標。

## 第四章、材料與方法



### 一、試驗材料與栽培管理


#### (一) 植物材料

本研究植物材料以菸草 (*Nicotiana benthamiana*) 與番茄 (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) 為主，兩植物的種子皆取自中央研究院 (Academia Sinica) 農業生物科技研究中心 (Agricultural Biotechnology Research Center, ABRC) 邱子珍老師實驗室。其他植物材料包括番茄‘金剛二號’、辣椒‘滿天紅’、青椒‘翠綠星’、茄子‘一口茄’等品種的種子則購自農友種苗股份有限公司 (KNOWN-YOU SEED CO., LTD.)。

#### (二) 栽培方式與栽培地點

菸草與‘Micro-Tom’番茄皆以水耕方式栽培，以逆滲透水 (Reverse osmosis water, RO water) 做為水源配製養液，養液配方參考 Half-strength modified Hoagland nutrient solution (Millner and Kitt, 1992; Hoagland and Arnon, 1950)，再略作調整 (表 1)。水耕液配方由養液 I、II、III、IV、V、VI 所組成，養液 I 含有 2.5 mM 的  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  與  $\text{KNO}_3$ ，養液 II 為 1 mM 的  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，養液 III 為 50  $\mu\text{M}$  的 NaFe EDTA (EDTA ferric sodium salt, Sigma)，養液 IV 為  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ，依試驗目的所需而調整濃度，+Pi 時為 0.5 mM，進行缺磷處理時，則以 KCl 補充因缺  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  導致同時缺少的鉀，養液 V 包含 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ 、0.2  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.2  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  與 25  $\mu\text{M}$  HCl，養液 VI 為 0.5 mM MES (2-N-Morpholino ethanesulfonic acid)。配製後用 HCl 或 NaOH 調整 pH 至 5.7。

水耕栽培方式是先將菸草與‘Micro-Tom’番茄種子置於含 1 % 次氯酸鈉



(Sodium hypochlorite, NaOCl) 與微量 Tween20 的消毒液中震盪 15 分鐘，進行種子消毒。於無菌水清洗後菸草種子播種於  $2.5 \text{ cm}^3$  的十字海綿，並給予含  $250 \text{ }\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  的 Hoagland 水耕液 7 天，之後移至含充足磷肥 (+Pi,  $500 \text{ }\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 的 Hoagland 水耕液中定植，期間每隔 5 天更換一次水耕液，栽培地點為國立臺灣大學生物資源暨農學院附設人工氣候室，環境條件為光/暗期=16/8 小時、日/夜溫= $25/20 \text{ }^\circ\text{C}$ 、光強度= $120 \text{ }\mu\text{M m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。‘Micro-Tom’ 番茄種子經消毒後，播種於附有濕濾紙的培養皿中，置於黑暗下 5 天待胚根突破種皮後，移至  $2.5 \text{ cm}^3$  的十字海綿上，並培養於含充足磷肥 (+Pi,  $500 \text{ }\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 的 Hoagland 水耕液中，栽培期間同樣每隔 5 天更換一次水耕液，栽培地點為國立臺灣大學生物資源暨農學院附設農業試驗場園藝分場之溫室，利用資料收集器 (WatchDog 1000 Series Data Loggers, Spectrum Technologies) 結合光量子感應器 (Quantum Light Sensor) 紀錄溫度與光度，栽培期間溫室環境氣象資料如圖 1 所示。

除了菸草與‘Micro-Tom’ 番茄利用水耕進行栽培外，其餘試驗作物皆以 1:1 比例混和 Sunshine #5 Natural & Organic 介質 (Sun Gro Horticulture, Canada) 與珍珠石進行土耕栽培，栽培地點為國立臺灣大學園藝暨景觀學系溫室，並於每週噴施稀釋 1000 倍之花寶二號速效肥 (20-20-20)，栽培期間溫室環境氣象資料如圖 2 所示。

### (三) 營養元素缺乏之處理方式與處理時間

菸草水耕定植後 20 天，收集部分植物材料 (+Pi0D) 供後續分析使用，另一部分植物材料進行不同天數的磷肥處理，包括磷肥充足 (+Pi,  $500 \text{ }\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 與缺乏 (-Pi,  $0 \text{ }\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 處理 1 天 (+Pi1D 及 -Pi1D)、3 天 (+Pi3D 及 -Pi3D)、5 天 (+Pi5D 及 -Pi5D)、7 天 (+Pi7D 及 -Pi7D)，處理後同樣收集材料供後續實驗使用。另外將缺磷逆境處理 3 天之植物置放回  $500 \text{ }\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  養液進行磷肥恢復處理 1 天 (Re1D)、3 天 (Re3D) 及 5 天 (Re5D)，一樣收取植物材料供後續分析使用。試



驗設計採完全隨機設計 (Complete Randomized Design, CRD) ，每處理 3 重複，每重複 1 株植株。

另一方面，菸草於水耕定植後 20 天，進行不同營養元素缺乏之逆境處理，分別為缺氮 (-N)、缺磷 (-P)、缺鉀 (-K)、缺鈣 (-Ca)、缺鎂 (-Mg)、缺硫 (-S)、缺鐵 (-Fe)，對照組則培養於原本的 Half-strength modified Hoagland nutrient solution 養液 (Full) 中，處理後 7 天收取植物組織供後續試驗使用。詳細營養元素缺乏之養液配法如下：缺氮：以  $\text{CaCl}_2$  與  $\text{KCl}$  取代養液 I 的  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  與  $\text{KNO}_3$ ，以補充缺氮處理時同時缺少的鈣與鉀；缺磷：以  $\text{KCl}$  取代養液 IV 的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ，以補充缺磷處理時同時缺少的鉀；缺鉀：以  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  與  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  取代養液 I 的  $\text{KNO}_3$  與養液 IV 的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ，以補充缺鉀處理時同時缺少的氮與磷；缺鈣：以  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  取代養液 I 的  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ，以補充缺鈣處理時同時缺少的氮；缺鎂：以  $\text{CaSO}_4$  取代養液 II 的  $\text{MgSO}_4$ ，以補充缺鎂處理時同時缺少的硫；缺硫：以  $\text{MgCl}_2$  取代養液 II 的  $\text{MgSO}_4$ ，以補充缺硫處理時同時缺少的鎂；缺鐵：不添加養液 III。各處理詳細元素含量如 (表 2) 所示。本試驗採完全隨機設計，每處理 3 重複，每重複 1 株植株。

水耕定植 22 天的 'Micro-Tom' 番茄植株進行不同天數的磷肥處理，包括磷肥充足 (+Pi, 500  $\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 與缺乏 (-Pi, 0  $\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 處理 1 天 (+Pi1D 及 -Pi1D)、5 天 (+Pi5D 及 -Pi5D)、10 天 (+Pi10 及 -Pi10D) 後收取植物材料。缺磷逆境處理 10 天後進一步進行磷肥恢復處理 1 天 (Re1D) 及 5 天 (Re5D)，同樣收取植物材料進行後續分析。試驗採完全隨機設計，每處理 3 重複，每重複 1 株植株。

另外，將持續培養在磷肥充足環境 (+Pi, 500  $\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 145 天達開花結果階段的 'Micro-Tom' 番茄進行不同天數的磷肥處理，包括磷肥充足 (+Pi, 500  $\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 與缺乏 (-Pi, 0  $\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 處理 5 天 (+Pi5D 及 -Pi5D)、10 天 (+Pi10D 及 -Pi10D)、15 天 (+Pi15D 及 -Pi15D)、20 天 (+Pi20 及 -Pi20D) 後收取植物材料。缺磷逆境 10 天後進行磷肥恢復處理 5 天 (Re5D) 及 10 天 (Re10D)，同樣收取植

物材料進行後續分析。試驗採完全隨機設計，每處理 3 重複，每重複 1 株植株。



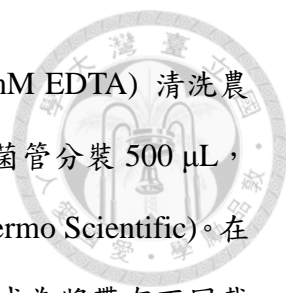
## 二、農桿菌滲入法與農桿菌注射法

### (一) 載體構築與農桿菌轉殖

TPSII promoter:GUS (圖 3a)、35S promoter:GUS (圖 3b)、與 35S promoter:LUC (圖 3c) 之構築皆由中央研究院邱子珍老師提供。35S promoter:GUS 並不需要構築，直接利用 pCambia 1301 當載體。TPSII promoter:GUS 的構築是先以 5'-gaacaacacttggcgaataca-3' 與 5'-ccctaaaagttggtggcaaa-3' 兩引子進行 PCR 獲得 1,561 bp 產物，將該 PCR 產物送入 pGEM-T easy vector (Promega) 並定序後，利用 5'-ggggacaagtttgtaaaaaagcaggcttcaagctatgcatccaacgcg-3' 與 5'-ggggaccactttgtacaagaaagctgggtccgacgtcgcgatgctcccggc-3' 兩引子進行 PCR 得到 attB1 與 attB2 site，再利用 Gateway® Technology (Invitrogen) 進行 BP 與 LR recombination，其中 BP recombination 所用之 pDONR<sup>TM</sup> vector 是使用 pDONR221，LR recombination 所用之 destination vector 是 pMDC164。而 35S promoter:LUC 的構築則是利用限制酶 (restriction enzyme) *NcoI* 和 *SacI* 將 Luciferase 基因由 pJD301 載體切下，另外將 pCambia 1302 利用 *NcoI* 和 *Pml* 限制酶進行切割，最後利用連接酶 (Ligase) 將兩者接合 (ligation) 在一起。

上述載體同時都轉殖至農桿菌 C58C1 與 1D1249 品系。農桿菌 C58C1 品系由中央研究院邱子珍老師實驗室提供，農桿菌 1D1249 品系由 Michelmores 實驗室 (University of California, Davis) 提供。轉殖方式主要分為勝任細胞 (competent cell) 製作與轉殖 (transformation)，勝任細胞製作過程為培養農桿菌 C58C1 與 1D1249 品系在 5 mL YEP 培養液 (Bacto-peptone 10 g L<sup>-1</sup>; Yeast extract 10 g L<sup>-1</sup>; NaCl 5 g L<sup>-1</sup>) 於 28 °C 恆溫震盪器 (LM-570RD, YIH-DER) 震盪 (轉速 200 rpm) 培養 16 hr 後，將菌液加入 100 mL YEP 培養液中至 O.D.<sub>550</sub>=0.5~0.8，於 5,000 rpm, 4 °C 下離心 10





分鐘沈澱農桿菌，去除上清液後利用 TE buffer (10 mM Tris; 1 mM EDTA) 清洗農桿菌殘留之鹽類，加入 10 mL YEP 培養液並混合均勻，每管凍菌管分裝 500  $\mu$ L，利用液態氮瞬間冷凍後保存於 -80  $^{\circ}$ C 冰箱 (Forma 900 Series, Thermo Scientific)。在進行農桿菌轉殖前，需先抽取質體 DNA (plasmid DNA)，抽取方式為將帶有不同載體的大腸桿菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) (35S promoter:GUS in DH5 $\alpha$ 、TPS11 promoter:GUS in Top10、35S promoter:LUC in Top10) 培養在 LB 培養液，於 37  $^{\circ}$ C 恆溫震盪器震盪 (轉速 200 rpm) 培養 16 hr 後，利用 Plasmid DNA Extraction System (Cat.#GF2001, Viogene) 進行質體 DNA 抽取，抽取步驟參考 Viogene 公司所附流程。轉殖過程將農桿菌 C58C1 與 1D1249 勝任細胞置於冰上退冰，加入 10  $\mu$ L 目標質體 DNA，於冰上 5 分鐘後丟入液態氮 5 分鐘，再於 37  $^{\circ}$ C 水浴 5 分鐘後加入 1 mL YEP 培養液，於 28 $^{\circ}$ C 恆溫震盪器震盪 (轉速 200 rpm) 培養 2~4 hr 後，取 100  $\mu$ L 菌液加 100  $\mu$ L YEP 培養液混合均勻，塗盤至 YEP 培養基 (Bacto-peptone 10g L $^{-1}$ ; Yeast extract 10 g L $^{-1}$ ; NaCl 5 g L $^{-1}$ ; Bacto-agar 1.5 %; 含抗生素 Kanamycin 50 mg L $^{-1}$ 、Rifampicin 50 mg L $^{-1}$ )，於 28  $^{\circ}$ C 恆溫震盪器培養 2 天。

## (二) 農桿菌滲入法方式

試驗步驟參考前人研究 (Liu et al., 2010; Liu et al., 2012; Orzaez et al., 2006a; Wroblewski et al., 2005)。大抵流程是將已完成轉殖之 1D1249 及 C58C1 農桿菌以 YEP 培養液配合恆溫震盪器在 28  $^{\circ}$ C 震盪 (轉速 200 rpm) 培養 16 hr 後，再移至含 10 mM MES, 20  $\mu$ M AS (Acetosyringone) 之 YEP 液態培養基中，再震盪培養 5~7 hr。利用全波長光度計 (U-5100, Hitachi) 測量 O.D.600 之讀值 (一般約略會等於 1)，再以離心機 (Hermle) 於 5,000 rpm, 4  $^{\circ}$ C 下離心 10 分鐘沈澱農桿菌，並利用注射液 [10 mM MgCl $_2$ , 10 mM MES (pH5.6), 100  $\mu$ M AS] 將其濃度稀釋至 O.D.600=1、0.5、0.25、0.125、0.0625 (圖表中沒特別註明時則為 O.D.600=1)，稀釋後菌液放置於黑暗下 3 小時後利用沒有針頭的針筒 (Terumo) 以手指施壓的方式將農桿菌滲

入番茄、菸草、青椒、茄子、辣椒葉片的下表皮中。為了試驗磷元素缺乏與 TPSII promoter 表現量之關係，詳細植株進行缺磷處理時間與農桿菌滲入菸草的時間如圖 4 所示。在專一性測定上，植株進行不同營養元素缺乏處理時間與農桿菌滲入菸草葉片的時間如圖 5 所示。農桿菌滲入後 3 天，收集注射過農桿菌的植物組織，部分材料直接進行 GUS 染色，其餘材料經液態氮處理後保存於-80 °C 冰箱供後續分析使用。

### (三) 農桿菌注射法方式

農桿菌培養方法與農桿菌滲入法相同，注射方式參照前人研究 (Orzaez et al., 2006)。詳細方式為事先標記番茄花朵自然授粉時間，之後挑選授粉後約 15 天大之綠熟果進行試驗，以帶有針頭之針筒 (Terumo) 將農桿菌由番茄果梗以注射的方式滲入整顆果實中。詳細植株進行缺磷處理時間與農桿菌注射入番茄果實時間如圖 6 所示。農桿菌注射後 3 天，同樣收取注射的植物組織，部分材料直接進行 GUS 染色，其餘材料經液態氮處理後貯存於-80 °C 冰箱供後續分析使用。

## 三、調查項目與分析方法

### (一) 植物組織鮮重

不同時間點採收之試驗植物將之分為根與地上部，地上部直接以天平 (XS204, Mettler Toledo) 秤量各組織鮮重，根部則需先以紙巾吸乾多餘水分後再秤重。

### (二) 葉綠素螢光計

待測植物葉片利用鋁箔紙包覆，黑暗馴化 30 分鐘後利用葉綠素螢光計 (Pocket PEA, Hansatch) 測量成熟展開葉之葉綠素螢光讀值。



### (三) 葉綠素含量測定

植物組織先以均質機 (SH-100, KURABO) 與液態氮在低溫下將樣品研磨成粉, 秤取約 100 mg 研磨後粉末加入 6 mL 95% 乙醇 (Ethanol), 以水浴槽 (BU-410D, YIH-DER) 於 68 °C 下加熱 2 小時, 於室溫下以 5,000 rpm 離心 10 分鐘後分別測定 O.D.665、O.D.649、O.D.470 之吸光值。再以下列公式換算求得葉綠素 a、葉綠素 b 濃度:

$$Ca (\text{葉綠素 a}) = 13.95A_{665} - 6.88A_{649}$$

$$Cb (\text{葉綠素 b}) = 24.96A_{649} - 7.32A_{665}$$

求得色素濃度後, 再按下式計算單位鮮重組織中各色素的含量:

$$\text{葉綠體色素的含量 (mg/g)} = [\text{色素的濃度 (mg/L)} \times \text{萃取液體積 (L)}] / \text{樣品鮮重 (g)}$$

最後將葉綠體色素 a 的含量與葉綠體色素 b 的含量加總即是總葉綠素含量。

### (四) 植體無機磷濃度測定

秤取上述研磨後粉末 (葉片及根秤取約 30 mg 粉末, 果實以混合 3 顆果實粉末後秤取約 100 mg 粉末), 參考前人研究方式 (Ames, 1966; Chiou et al., 2006) 進行無機磷濃度測定。方法為每 1 mg 鮮重的組織溶解在 10  $\mu$ L 的 1% 冰醋酸 (Glacial acetic acid) 溶液中, 震盪均勻後於 13,000 rpm 轉速下離心 10 分鐘, 取 10  $\mu$ L 的上清液置於 96 孔盤 (Basic Life) 並加入 50  $\mu$ L 1% 冰醋酸, 混合均勻在 42 °C 下培養 30 分鐘, 之後加入 140  $\mu$ L 磷分析液 (0.35 %  $\text{NH}_4\text{MoO}_4$ 、0.86 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 、1.4 % ascorbic acid), 充分混合後於 42 °C 下培養 30 分鐘。同時以  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  作為標準品繪製標準曲線。最後以全波長微量光度計 (EnSpire Multimode Plate Readers, PerkinElmer) 測定 820 nm 波長下的吸光值。



#### (五) GUS 定性分析

GUS 定性實驗步驟參考 Jefferson 等人的方法 (Jefferson RA, 1987) 再略作修正。GUS 定性分析緩衝劑配方略作修正如下：0.15 % X-gluc (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Glucuronic Acid) 以 1.25 % DMSO (Dimethyl sulfoxide) 溶解 X-gluc 粉劑，加入目標體積一半的水後依序加入 100 mM Phosphate buffer、10 mM Na<sub>2</sub>EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate)、0.5 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (Potassium Hexacyanoferrate III)、0.5 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (Potassium Hexacyanoferrate II)、0.1 % Triton X-1000 (Octyl Phenol Ethoxylate)、10 % Methanol，最後利用去離子水 (Deionized water) 定量至目標體積。將植物葉片組織以刀片切下約 10 mm\*10 mm 的葉片組織浸泡於上述緩衝液中，利用真空幫浦 (Rocker 610) 於 90 kpa 下抽真空 1 分鐘，置至 37 °C 染色 2 hr，最後以 75 % 酒精褪染後觀察 GUS 染色情形。果實組織以刀片切下約 3mm 厚的果實組織浸泡於上述緩衝液中，利用真空幫浦於 90 kpa 下抽真空 3 分鐘，置至 37 °C 染色 13 hr，最後以 75 % 酒精褪染後觀察 GUS 染色情形。

#### (六) GUS 定量分析

GUS 定量實驗步驟參考前人方法 (Jefferson RA, 1987; Spolaore et al., 2001)。GUS 定量分析分為組織螢光值測定與蛋白質含量測定。利用天平秤取約 200 mg 上述研磨後粉末，加入預冷過之 GUS extraction buffer 包含 0.1 M Potassium phosphate buffer、1 mM Na<sub>2</sub>EDTA、10 % Glycerol、7 mM  $\beta$ -mercaptoethanol、0.1 % Triton X-100、2 % Polyvinylpyrrolidone (cross linked)。樣本粉末與 GUS extraction buffer 混合均勻後於 4 °C 下離心 (10,000 rpm) 15 分鐘，取上清液再次於 4 °C 下離心 (10,000 rpm) 15 分鐘，將上清液置於 96 孔黑盤 (NUNC)，加入受質 10mM MUG (4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide trihydrate) 於 37 °C 下作用 0、10 及 20 分鐘後

加入 0.2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 終止反應。以 4-MU (7-hydroxy-4-methylcoumarin) 作為標準品繪製標準曲線。待測樣品以微量分光光度計 (i-control, Tecan) 於 excitation=355 nm、emission=460 nm 條件下測定螢光值。



蛋白質含量測定方法則是將上述離心後樣本取 4 $\mu$ L 之上清液置於 96 孔盤，再加入 156  $\mu$ L 之去離子水與 40  $\mu$ L Protein assay dye reagent (Bio-Rad) 後，於 37 °C 下作用 30 分鐘，以微量光度計 (i-control, Tecan) 測定波長 595 nm 下之吸光值。以 BSA (Bovine serum albumin) 當標準品繪製標準曲線。GUS 的濃度以(反應時間內組織螢光差值/反應時間)/蛋白質含量公式計算。

#### (七) Luciferase 定量表現分析

螢火蟲冷光蛋白 (Luciferase) 定量分析以 Luciferase Assay System kit (Promega) 進行分析。實驗步驟參考 Promega 公司所附流程略做修改，方法為取 5  $\mu$ L 上述溶於 GUS extraction buffer 且經離心後之樣本置入 96 孔白盤 (Microton), 加入 90  $\mu$ L GUS extraction buffer，再加入 25  $\mu$ L Luciferase Reagent，利用微量光度計 (i-control, Tecan) 測定冷光下之吸光值。

#### (八) 花青素相對含量測定

花青素含量測定參考前人方法 (Lange et al., 1971)，步驟為秤取上述研磨後粉末約 200 mg，加入 1 mL 萃取液 (Propanol:HCl:H<sub>2</sub>O = 18:1:81)，放入 95 °C 水浴槽加熱 1.5 分鐘後迅速地插在冰上至少 3 分鐘，以 13,000 rpm 轉速離心 5 分鐘，取上清液 200  $\mu$ L 置入 96 孔盤，利用全波長微量光度計 (EnSpire Multimode Plate Readers, PerkinElmer) 測定 535 nm、650 nm 波長下的吸光值。兩種吸光值之數值帶入下列公式  $[A_{535} - (2 A_{650})]$  / 鮮重，即可計算出花青素相對含量。

(九) 可溶性固形物測定

‘Micro-Tom’番茄依照不同處理的時間點採收，每株採 6 顆果實，根據重量加入一倍體積的去離子水，利用研鉢研磨成泥，使用糖度計 (Pocket Refractometer PAL-1, Atago) 測得果實糖度，單位為 °Brix。





表 1. 本試驗所用之水耕養液配方

Table 1. Hydroponic nutrient recipes in this research.

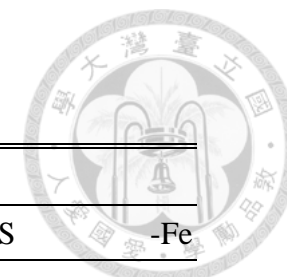
Stock no.	Macronutrients	Molecular weight	Stock concentration (M)	Final concentration (mM)
I	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	236.15	1.00	2.50
	KNO <sub>3</sub>	101.11	1.00	2.50
II	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	246.48	1.00	1.00
III	NaFe EDTA	367.10	0.10	0.05
IV	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136.09	1.00	0.50
Stock no.	Micronutrients	Molecular weight	Stock concentration (mM)	Final concentration (μM)
V	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61.83	10.00	10.00
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	241.95	0.20	0.20
	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	287.50	1.00	1.00
	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	197.90	2.00	2.00
	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	249.70	0.50	0.50
	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	237.90	0.20	0.20
	HCl	36.46	25.00	25.00
VI	MES	213.24	500.00	500.00

Modified from Millner and Kitt, 1992 and Hoagland and Arnon, 1950.

表 2. 不同營養元素缺乏處理之水耕養液配方

Table 2. Hydroponic nutrient recipes for treatments of different nutrient deficiency.

Element	Concentrations of individual elements in various treatments (mg/L)							
Macronutrients	Full	-N	-P	-K	-Ca	-Mg	-S	-Fe
N	105.00	<b>0.00</b>	105.00	105.00	105.00	105.00	105.00	105.00
P	15.50	15.50	<b>0.00</b>	15.50	15.50	15.50	15.50	15.50
K	117.00	117.00	117.00	<b>0.00</b>	117.00	117.00	117.00	117.00
Ca	100.00	100.00	100.00	<b>150.00</b>	<b>0.00</b>	<b>150.40</b>	100.00	100.00
Mg	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	<b>0.00</b>	24.00	24.00
S	32.05	32.05	32.05	32.05	32.05	<b>72.37</b>	<b>0.00</b>	32.05
Micronutrients	Full	-N	-P	-K	-Ca	-Mg	-S	-Fe
Fe	2.80	2.80	2.80	2.80	2.80	2.80	0.10	<b>0.00</b>
Cl	1.04	<b>267.29</b>	<b>18.79</b>	1.04	1.04	1.04	<b>72.04</b>	1.04
Mn	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.00	0.17
B	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.03	0.11
Zn	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.00	0.07
Cu	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.00	0.03
Mo	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.00	0.03





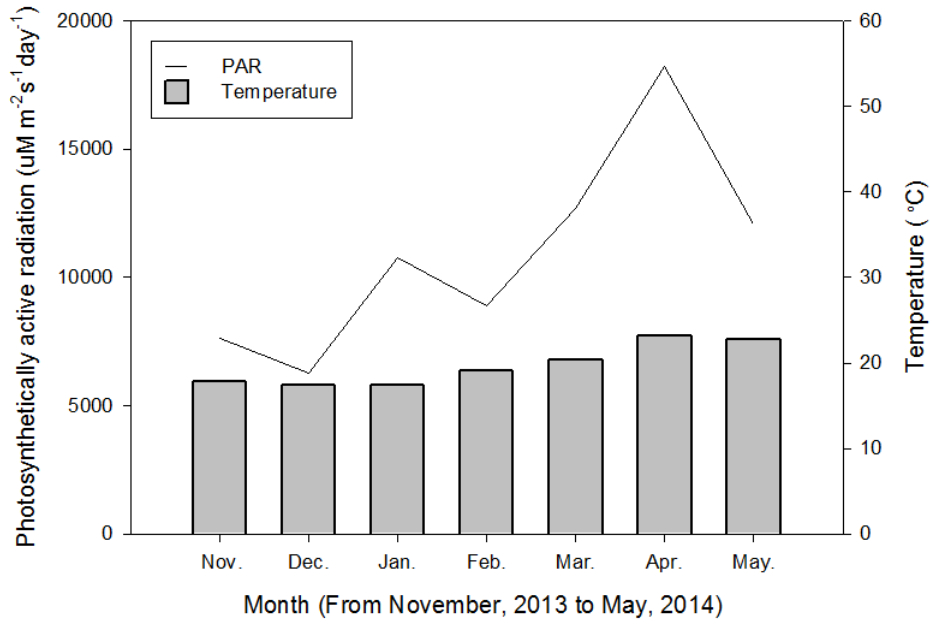


圖 1. 水耕番茄栽培期間之溫室氣象資料

Figure 1. The meteorological data in greenhouse during hydroponic culture of tomato.

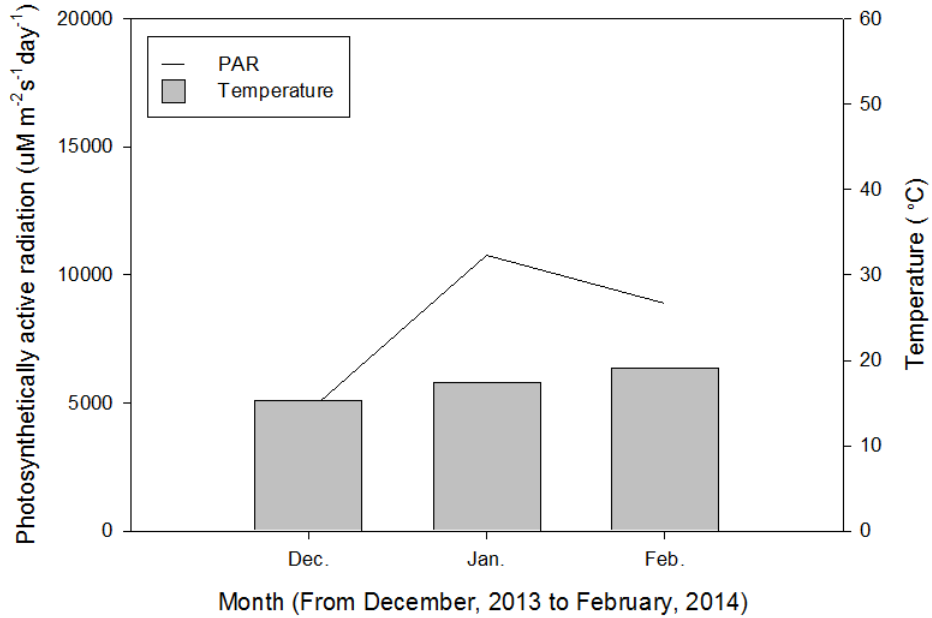
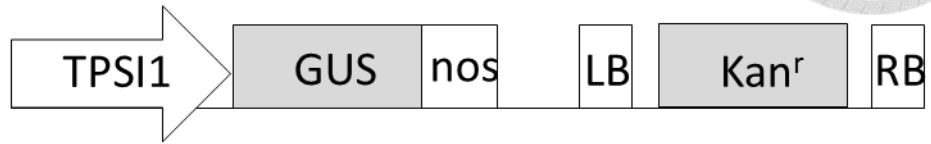


圖 2. 番茄、青椒、辣椒與茄子栽培期間之溫室氣象資料

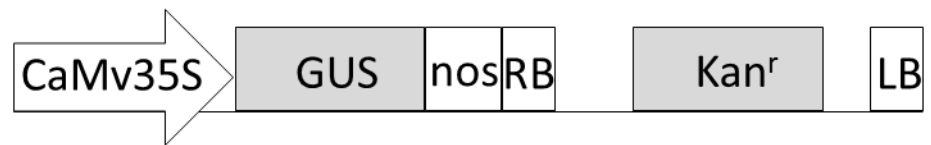
Figure 2. The meteorological data in greenhouse during soil culture of tomato, bell pepper, hot pepper and eggplant.



(a)



(b)



(c)

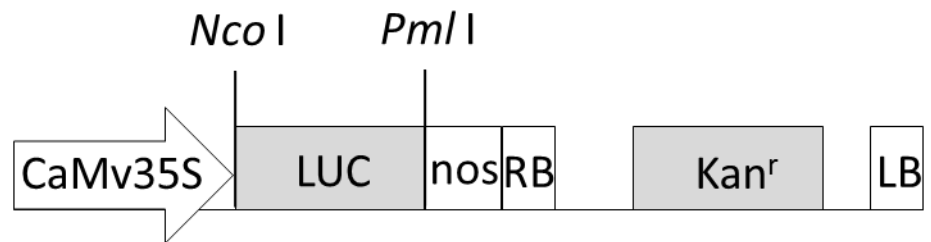


圖 3. (a) TPSI1 promoter: GUS (b) 35S promoter: GUS (c) 35S promoter: Luc 之載體構  
築

Figure 3. Maps of (a) TPSI1 promoter: GUS, (b) 35S promoter: GUS and (c) 35S  
promoter: Luc constructs.

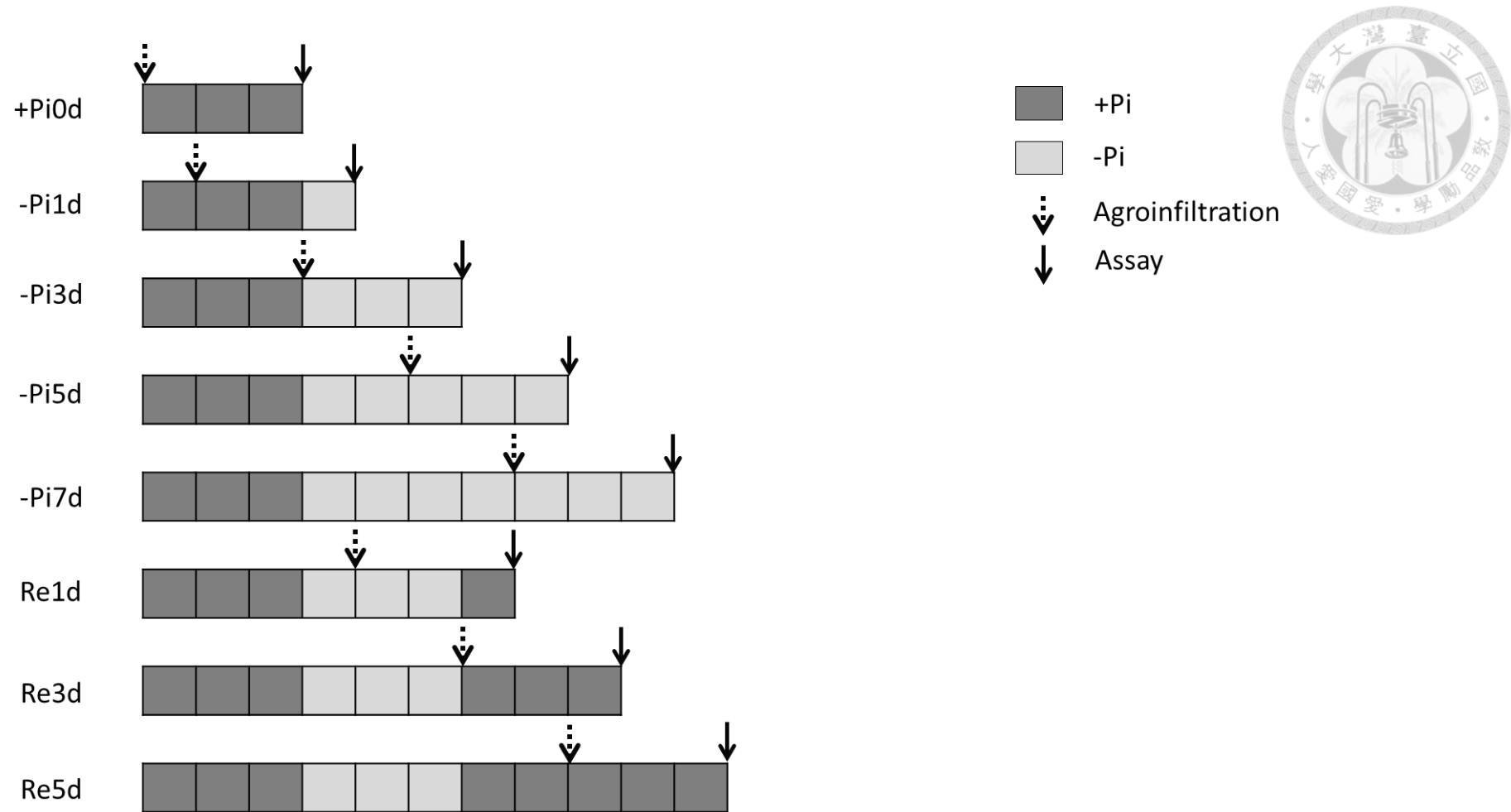


圖 4. 菸草缺磷處理與農桿菌滲入法時間

Figure 4. Time frames of Pi starvation treatments and agroinfiltration in *Nicotiana benthamiana*.

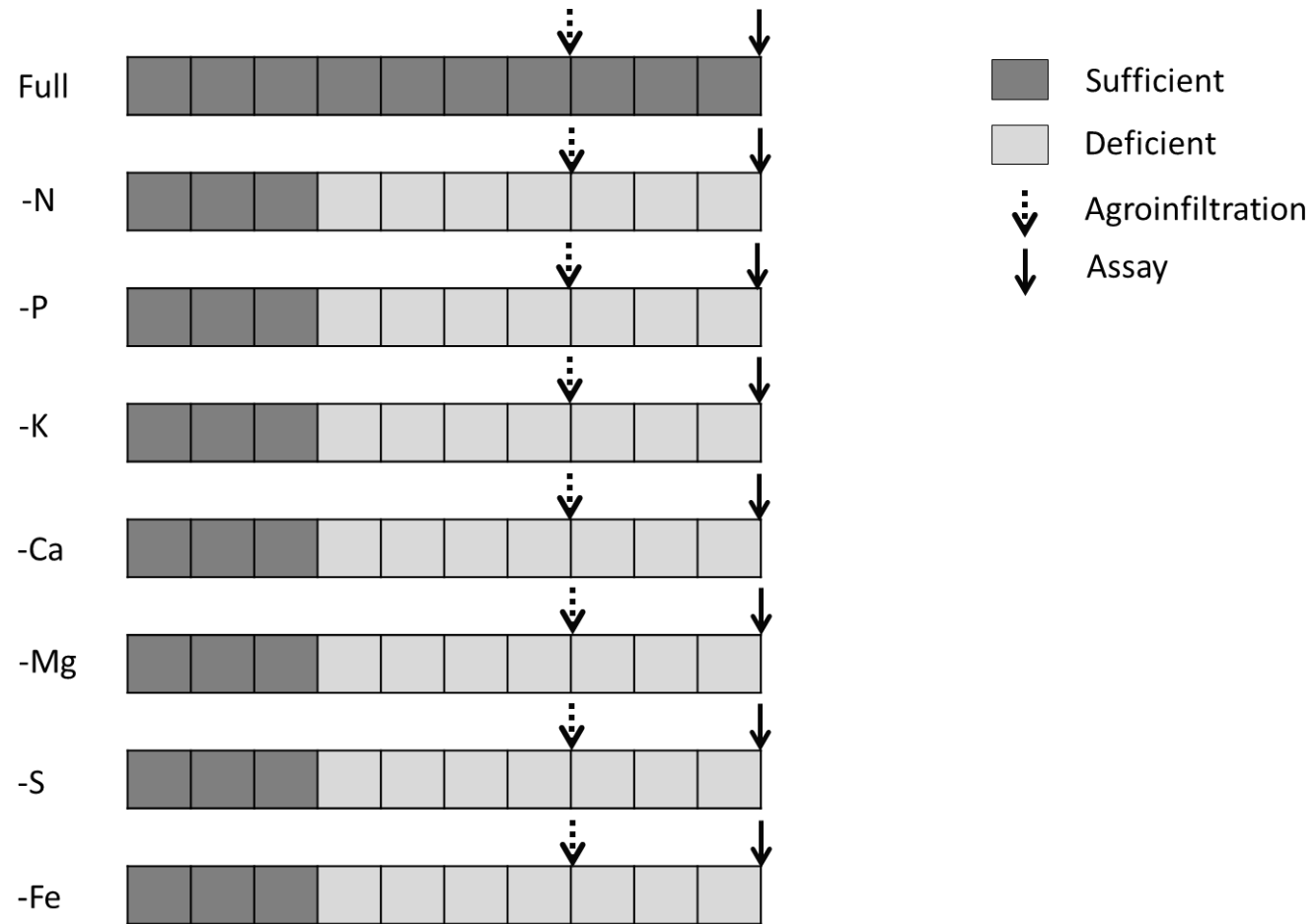


圖 5. 菸草不同營養元素缺乏處理與農桿菌滲入法時間

Figure 5. Time frames of different nutrient deficiency and agroinfiltration in *Nicotiana benthamiana*.

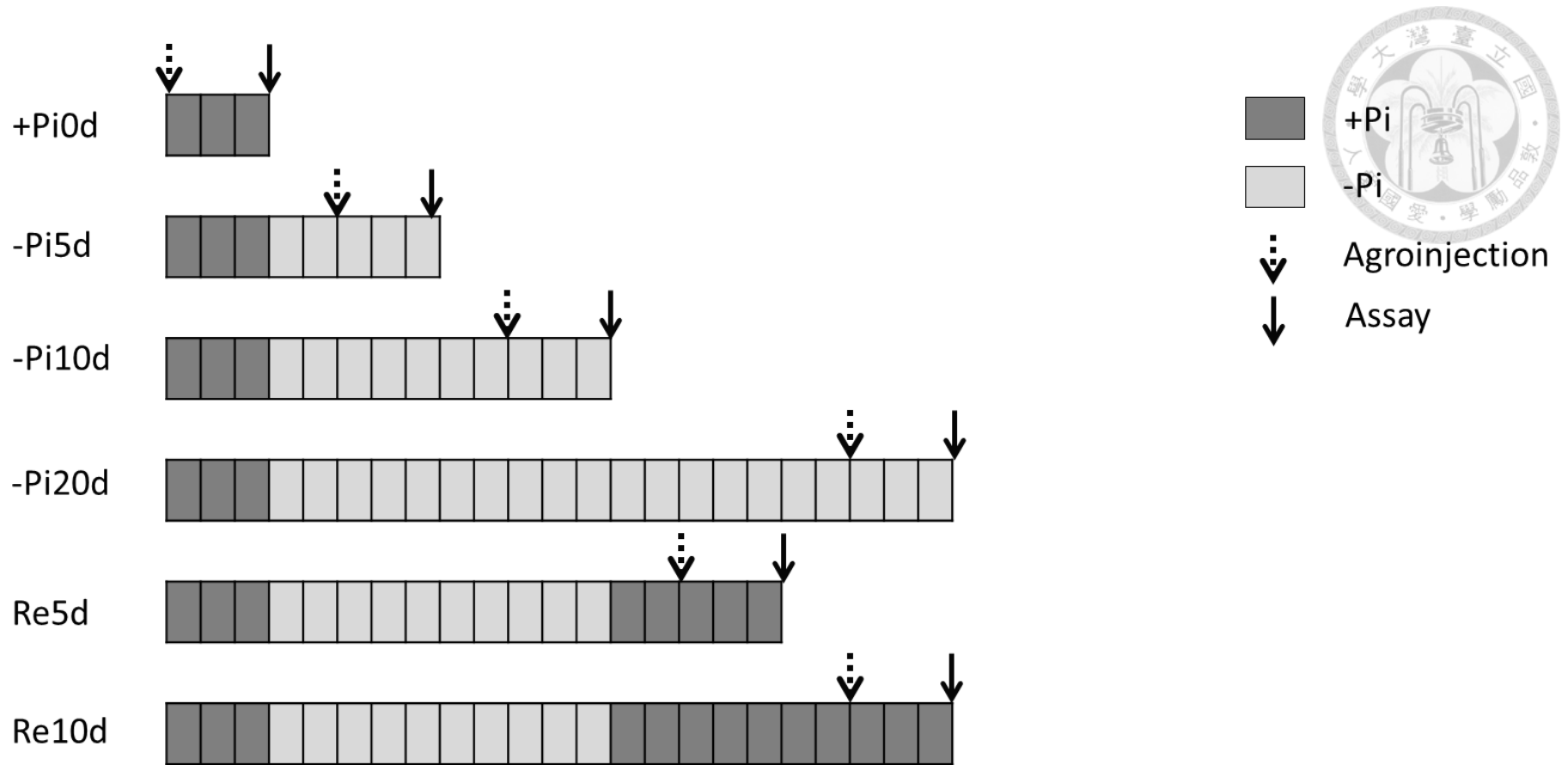


圖 6. 番茄缺磷處理與農桿菌注射法時間

Figure 6. Time frames of Pi starvation treatments and agroinjection in tomato.



## 第五章、結果

### 一、缺磷對於菸草營養生長之影響

為了解磷對植物營養生長之重要性與供後續農桿菌滲入法實際應用效率之對照使用，於磷肥處理後先進行不同生理指標的調查。結果顯示缺磷抑制菸草地上部生長，隨著處理時間的加長，+Pi 與 -Pi 處理間的差異更逐漸加大 (圖 7 與圖 8a)，而缺磷處理對根部的抑制效果相對較小 (圖 7 與圖 8b)。由於缺磷對地上部的抑制效果高於根部，因此可見缺磷處理後提高根部/地上部鮮重比值，該比值隨著缺磷處理天數的增加而不斷提高，在 -Pi5D 時該比值即顯著高於同時間之對照組 (+Pi5D)(圖 9)。菸草在缺磷處理 1 天，葉片與根部的磷濃度相較於同時間之對照組 (+Pi1D) 即達顯著下降，且隨著缺磷天數的增加，其數值不斷的下降 (圖 10a 與圖 10b)。利用非破壞性葉綠素螢光計測定缺磷處理對於葉綠素之影響，結果顯示雖然葉綠素螢光計讀值隨著缺磷處理時間的增加略有下降趨勢，但在統計上與對照組 (+Pi) 相比不具顯著性差異 (圖 11a)。由於葉綠素螢光讀值與葉綠素含量具有相關性，因此改以分析葉片葉綠素含量，結果顯示葉綠素含量隨著缺磷處理時間的增加而有下降趨勢 (圖 11b)。

於缺磷處理後 3 天進行磷肥恢復處理，雖然處理時地上部鮮重在 +Pi3d 與 -Pi3d 間不具顯著性差異，且觀察到磷肥恢復處理後，地上部鮮重緩慢上升，但因其上升速度遠不及 +Pi 對照組，導致磷肥恢復處理後 1 天 (Re1d) 地上部鮮重仍略低於 +Pi4d，但隨著磷肥恢復處理時間的增加則與 +Pi 之間無顯著差異 (圖 8a)；根部變化趨勢與地上部鮮重相似，但處理間不具顯著差異 (圖 8b)。根部/地上部鮮重比值於磷肥恢復處理的趨勢皆與 +Pi 相似 (圖 9)。磷肥恢復處理後一天(Re1D)顯著提升葉片與根部磷濃度，明顯高於對照組 (+Pi4D)，之後隨著天數增加才逐漸下降 (圖

10a 與圖 10b)。葉綠素螢光計讀值於不同處理間皆沒有顯著差異 (圖 11a)，不像缺磷處理後葉綠素含量不斷下降，磷肥恢復處理使葉綠素含量維持穩定，處理期間都與對照組 (+Pi) 相當 (圖 11b)。



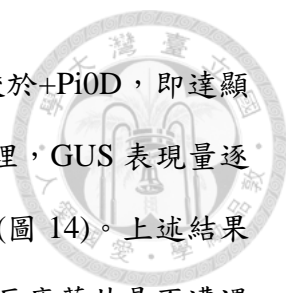
## 二、農桿菌滲入法應用於菸草葉片磷含量充足與否之診斷

由於農桿菌滲入法於菸草已廣泛被應用，因此先以菸草當作模式植物測試應用農桿菌滲入法診斷葉片磷含量是否充足的可行性。為了確認磷肥處理的有效性與之後報導基因表現量對照之用，進行農桿菌滲入後的葉片與根部先取部分植體測定磷濃度，結果顯示隨著缺磷處理天數的增加，根與葉片的磷濃度逐漸降低，在 -Pi3D 處理後進行磷肥恢復處理迅速提升根與葉片的磷濃度 (圖 12)。

由於將帶有目標基因載體的農桿菌菌液滲入葉片時容易因葉片大小不一，而有農桿菌滲入量之差異，因此將帶有 35S promoter:LUC 載體的農桿菌菌液與帶有目標基因載體的農桿菌菌液以等比例方式混合後滲入菸草葉片，以降低此差異帶來表現量之誤差，而最終 GUS 表現量都先以 LUC 表現量進行校正後呈現。

為測試農桿菌滲入法是否可正常表達 GUS 報導基因於水耕菸草葉片，因此先以帶有 35S promoter:GUS 載體與不帶任何載體的 C58C1 農桿菌當做正向與負向對照組進行測試，於農桿菌滲入法後 3 天進行 GUS 染色，如預期的正向對照組可大量表現 GUS，反之野生型的 C58C1 農桿菌則不會有 GUS 的表現 (圖 13)。利用帶有 TPSII promoter: GUS 載體的 C58C1 農桿菌進行試驗，結果顯示在 +Pi 時 GUS 有微量之表現，隨著缺磷時間越長，GUS 表現量越高，磷肥恢復處理後 GUS 表現量逐漸下降 (圖 13)。

GUS 定量分析結果與 GUS 染色結果相似，帶有 35S promoter:GUS 載體的正向對照組 GUS 表現量明顯高於負向對照組，而負向對照組因 GUS 表現量極低故以 ND (Not Detectable) 表示。隨著缺磷處理天數的增加，滲入 TPSII promoter: GUS



農桿菌的葉片其 GUS 的活性也隨之增加，在-Pi1D 其活性相較於+Pi0D，即達顯著性增加，直到-Pi7D 達到最高峰，在-Pi3D 後進行磷肥恢復處理，GUS 表現量逐漸降低，至 Re3D 即顯著低於-Pi3D，與+Pi 相比已無顯著差異（圖 14）。上述結果顯示 GUS 定量分析與 GUS 染色結果相似，亦即兩者皆可忠實反應葉片是否遭遇缺磷逆境。

### 三、TPSII 於不同營養元素缺乏之專一性測試

上述結果顯示以 TPSII promoter: GUS 做載體可成功利用農桿菌滲入法診斷菸草葉片是否遭遇缺磷逆境，為了進一步證實此套系統是否會遭受其他元素缺乏逆境所干擾，因此進一步以此系統結合不同營養元素缺乏之處理進行試驗。菸草在缺氮時生長受阻，葉片呈現黃化的現象；缺磷則是葉片相對較小；缺鉀在 7 天的處理下與對照組 (Full) 相比尚未觀察到顯著差異；缺鈣導致新葉黃化且扭曲；缺鎂使得葉片皺縮且出現葉脈間黃化情形；缺硫使葉片黃化；缺鐵較其他營養元素缺乏的癥狀更為明顯，其新生葉變黃，甚至轉白（圖 15）。

為了解不同營養元素缺乏是否影響植體磷的吸收，因此於不同營養元素缺乏後進行植體磷濃度檢測。結果顯示除了缺磷顯著降低植體磷濃度外，不同營養元素缺乏後地上部與根部磷的濃度約在 20 nmole/mg F.W.不等，與對照組 (Full) 相比沒有顯著性差異；但缺氮處理葉片磷濃度相較於缺鈣與缺鐵處理低（圖 16）。

結合不同營養元素缺乏處理的菸草與帶有 TPSII promoter: GUS 載體的 C58C1 農桿菌進行試驗，於農桿菌滲入後 3 天，發現除了缺磷的組別有高的 GUS 表現量外，其他營養元素缺乏的組別其 GUS 表現量與培養在充足營養元素環境下相似，僅有微弱表現（圖 17）。同樣的，進一步進行 GUS 定量分析，其結果與 GUS 染色結果相符，在缺磷時大量誘導 GUS 的表現，而其他營養元素缺乏處理 GUS 的表現量與對照組 (full) 相當，不具顯著性差異（圖 18）。





#### 四、缺磷逆境對番茄營養生長之影響

由於使用 TPSII promoter: GUS 載體結合農桿菌滲入法已成功地建立於草葉片磷含量充足與否的檢測系統，因此進一步希望此系統也能應用在園藝作物番茄上。同樣的，在進行農桿菌滲入法前，先調查缺磷處理對番茄營養生長期之影響。缺磷造成植株外觀較矮小（圖 19），實際量測地上部與根部鮮重，可觀察到缺磷處理 11 天(-Pi11D) 相對於對照組 (+Pi11D) 顯著降低地上部鮮重（圖 20a），但缺磷處理不同天數，根部鮮重與對照組無顯著差異（圖 20b）。缺磷處理造成根部/地上部鮮重比值隨著處理時間增加而不斷提高，且在第 5 天時 (-Pi5D) 即顯著高於對照組 (+Pi5D)（圖 21）。缺磷處理降低根部與葉片磷濃度，於缺磷處理 1 天(-Pi1D) 即顯著低於對照組(+Pi1D)，且隨著缺磷天數增加，磷濃度持續下降(圖 22a 與圖 22b)。相較於缺磷處理 1 天 (-Pi1D) 即可觀察到磷濃度顯著低於對照組 (+Pi1D)，非破壞性葉綠素螢光計讀值與葉綠素含量則需要缺磷處理 11 天 (-Pi11D) 才可觀察到顯著低於對照組(+Pi11D)（圖 23a 與圖 23b）。

缺磷處理後 10 天進行磷肥恢復處理，雖然處理時地上部與根部鮮重在+Pi10d 與-Pi10d 間不具顯著性差異，但磷肥恢復處理後 1 天 (Re1D)，地上部鮮重顯著低於對照組 (+Pi11D)，說明缺磷處理過的樣品進行磷肥恢復處理，雖然其鮮重有逐漸增加趨勢，但因其生長速度無法馬上跟上一直生長在+Pi 環境的植物，因此 Re1D 的地上部鮮重低於+Pi11D，但第 5 天時 (Re5D) 地上部鮮重即可上升至與+Pi 對照組 (+Pi15D) 相當（圖 20a）。根部鮮重差異小，於處理間不具顯著性差異（圖 20b）。根部/地上部鮮重比值於磷肥恢復處理後一直低於-Pi 處理，但其比值在試驗期間始終還是高於+Pi 對照組（圖 21）。磷肥恢復處理 1 天 (Re1D)顯著提高根部與地上部的磷濃度，之後才逐漸降低（圖 22a 與圖 22b）。磷肥恢復處理 1 天 (Re1D) 葉綠素螢光計讀值與葉綠素含量即可恢復到與對照組 (+Pi11D)相當（圖 23a 與圖 23b）。

花青素的累積為缺磷逆境之一常見指標。番茄於缺磷不同時間點檢測花青素含量，顯示缺磷 5 天 (-Pi5D) 花青素的累積量已顯著高於對照組 (+Pi5D)，且隨著缺磷時間的拉長，花青素的含量逐漸增加；而-Pi10D 後進行磷肥恢復處理可逐漸降低花青素含量，Re5D 後即可恢復至與對照組 (+Pi15D) 相當的含量 (圖 24)。

## 五、農桿菌滲入法應用於番茄葉片磷含量充足與否之診斷

由於番茄葉片容易因為農桿菌的滲入而有壞疽產生，因此改以農桿菌 1D1249 品系表達 35S promoter: GUS、TPS11 promoter:GUS 載體，結果顯示不論帶有何種載體或是野生型的 1D1249 農桿菌，也不論是+Pi 或是-Pi 環境生長的 Micro-Tom 番茄葉片，在農桿菌滲入後第三天進行 GUS 染色，發現即使將 X-gluc 濃度由原本的 0.15 % 提高至 0.3 %，仍未發現有 GUS 表現量 (圖 25)。另外也測試了不同株齡、不同葉片部位、不同菌液濃度跟不同緩衝液配方，其結果皆與圖 25 相同，未發現有 GUS 表現量 (資料未呈現)。

由於農桿菌 1D1249 品系無法利用農桿菌滲入法正常表達 GUS (圖 25)，推測可能與農桿菌品系或植物品種有關，因此進一步利用帶有 35S promoter: GUS 載體的 C58C1 農桿菌品系滲入‘金剛二號’與‘Micro-Tom’兩種不同品種的番茄葉片。另一方面，因為也擔心高濃度的 C58C1 菌液容易導致壞疽情形，因此同時也測試不同濃度菌液，結果顯示相較於農桿菌 1D1249 完全無法表達 GUS (圖 25)，農桿菌 C58C1 至少可觀察到 GUS 的表現 (圖 26a)；菌液濃度在  $OD_{600}=0.125$  表現最強 (圖 26a)；且‘金剛二號’表現量較‘Micro-Tom’高 (圖 26a)。但因 GUS 在葉片表現不均勻，且不論何種菌液濃度，葉片仍容易產生壞疽情形 (圖 26 b)，加上之後的重複實驗無法得到穩定的表現量等原因，因而未進一步往下進行葉片磷含量充足與否的檢測。



## 六、缺磷逆境對番茄生殖生長之影響

番茄栽培以採收果實為目的，因此調查缺磷逆境對番茄生殖生長之影響。結果顯示在-Pi15D 之前，缺磷處理對於番茄地上部鮮重並未有任何顯著性的影響，直到-Pi20D 與+Pi20D 相比才有顯著性差異 (圖 27a)；在根部方面，缺磷逆境在處理期間對於根部的鮮重沒有顯著影響 (圖 27b)。

為了得知缺磷處理是否影響番茄果實磷濃度與磷濃度在不同成熟度果實是否有差異，進一步將'Micro-Tom'果實分為綠熟果與紅熟果兩種成熟度果實並進行果實磷濃度測定。結果顯示缺磷處理顯著降低綠熟果與紅熟果的磷濃度，兩者皆在缺磷 5 天 (-Pi5D) 即顯著低於對照組 (+Pi5D)，且隨著缺磷天數的增加磷濃度逐漸下降 (圖 28a 與圖 28b)。缺磷處理後 10 天進行磷肥恢復處理，結果顯示磷肥恢復處理後 5 天(Re5D)後，磷濃度即顯著上升，至 10 天 (Re10D) 時即可恢復至與對照組相當 (+Pi20d)(圖 28a 與圖 28b)。有趣的是比較圖 28a 與圖 28b 可發現+Pi 時綠熟果實磷濃度略高於紅熟果。

在果實產量方面，缺磷初期並未顯著降低果實的產量，直到-Pi20D 才顯著降低果實產量 (圖 29a)。另外缺磷處理導致果實可溶性固形物含量降低，-Pi15D 即顯著低於對照組 (+Pi15D)(圖 29b)。缺磷處理後 10 天進行磷肥恢復處理，由於處理時 (-Pi10D) 產量尚未顯著低於對照組 (+Pi10D)，之後產量一直維持與對照組 (+Pi)相當 (圖 29a)。磷肥恢復處理後顯著提升可溶性固形物含量，於處理後第 5 天 (Re5D) 即可回復到與對照組相當 (+Pi15D)，顯著高於-Pi 處理 (-Pi15D)(圖 29b)。



## 七、農桿菌注射法應用於番茄果實磷含量充足與否之診斷

由於果實是番茄主要的經濟利用部位，且農桿菌滲入法無法於番茄葉片穩定表達，因此改以農桿菌注射法建立番茄植體磷含量充足與否之診斷系統。利用帶有 35S promoter:GUS 載體的 C58C1 農桿菌品系先進行測試，證實番茄綠熟果實可大量表現 GUS 報導基因，反之野生型的 C58C1 農桿菌則不會有 GUS 的表現 (圖 30)。之後利用帶有 TPSII promoter: GUS 載體的 C58C1 農桿菌進行試驗，結果顯示番茄果實在+Pi 下具有微量 GUS 表現，隨著缺磷時間越久，果實 GUS 的表現量越高，而-Pi10D 後恢復磷的供應，GUS 表現又會隨之下降 (圖 30)。

之後更進一步進行 GUS 定量分析，同上，本試驗也利用 LUC 進行校正。結果顯示 GUS 的活性隨著缺磷的天數增加而有增加的現象，恢復磷肥供應後 GUS 表現量迅速下降，且僅需 5 天 (Re5D) 即下降的比-Pi10D 還低，達到跟對照組相當的活性 (+Pi0D) (圖 31)。

## 八、農桿菌滲入法應用於其他茄科蔬菜作物

為了之後進一步將此系統應用至更多農作物，先選用青椒、辣椒與茄子等茄科蔬菜作物做為材料，測試是否也可適用農桿菌滲入法進行基因表達。本試驗以帶有 35S promoter:GUS 載體的 C58C1 農桿菌品系進行測試，結果顯示，茄子穩定且均勻表達 GUS 報導基因；青椒雖有表現，但是表現量不平均，且之後進行重複試驗其表現量不穩定；辣椒則無法順利表達 GUS 報導基因 (圖 32)。

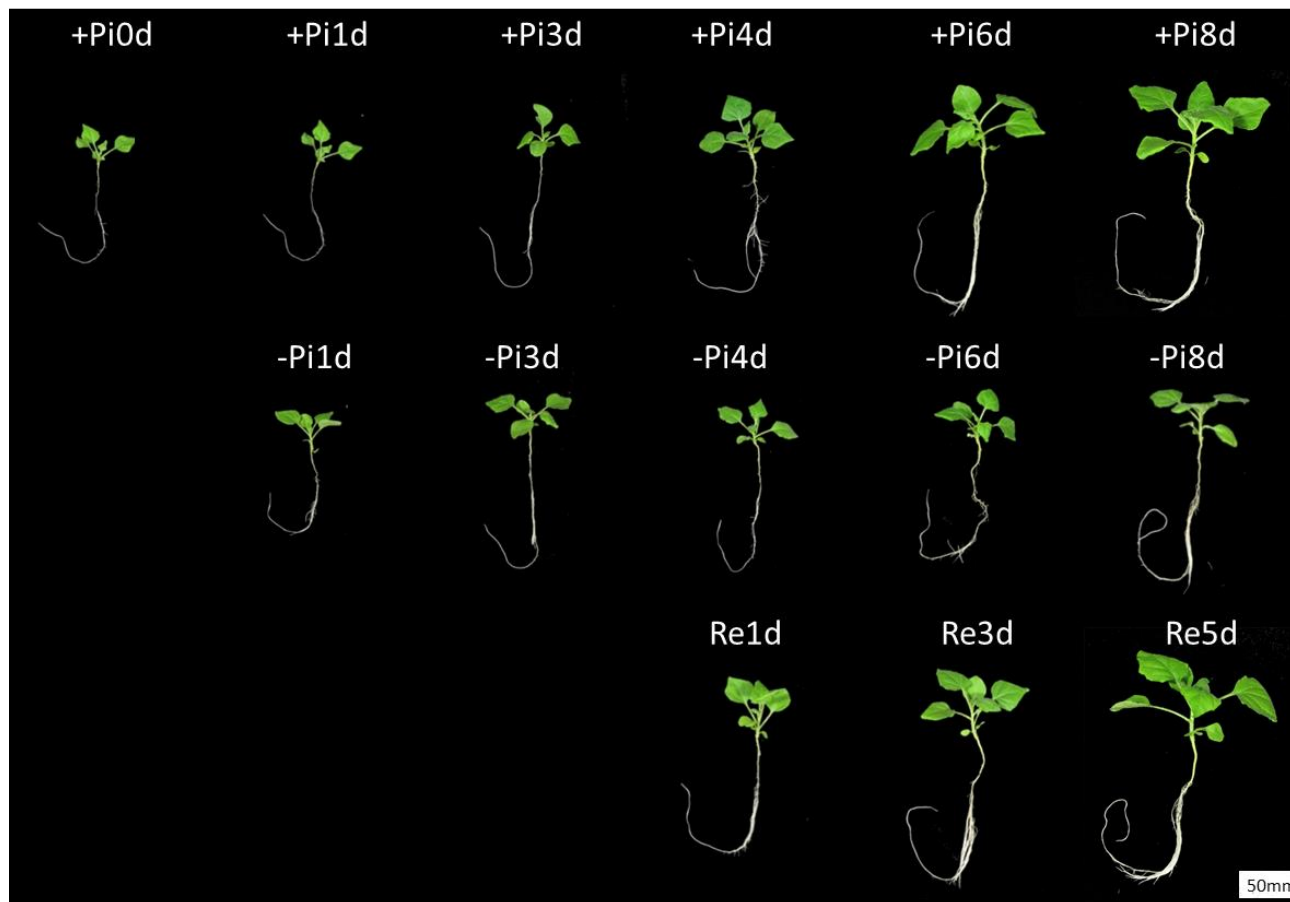


圖 7. 缺磷與磷肥恢復處理不同天數對菸草外觀之影響

Figure 7. Effects of different days of Pi sufficient (+Pi), Pi deficient (-Pi) and Pi resupply (Re) treatments on physical appearances of *Nicotiana benthamiana*. Pi resupply was started after three days of Pi deficiency.

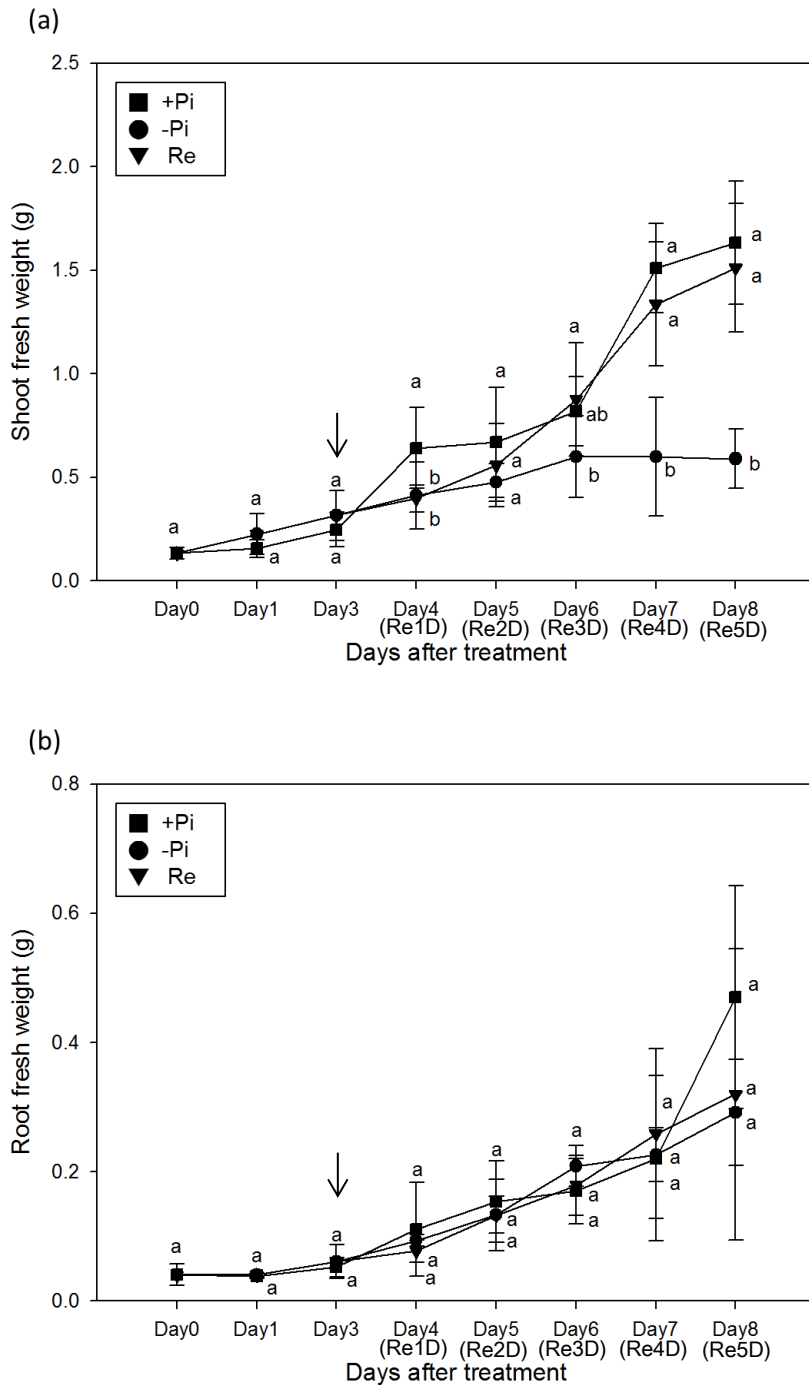


圖 8. 磷肥處理不同天數對菸草(a)地上部與(b)根部鮮重之影響

Figure 8. Effects of Pi sufficient (+Pi), Pi deficient (-Pi) and Pi resupply (Re) treatments for different duration on (a) shoot fresh weight and (b) root fresh weight in *Nicotiana benthamiana*.

Pi resupply was started after three days of Pi deficiency (arrow). Error bars represent standard error (SE) of the mean for six replicates (n = 6). Means with the same letters are not significantly different between Pi treatments as compared by least significant difference (LSD) at P=0.05 level.

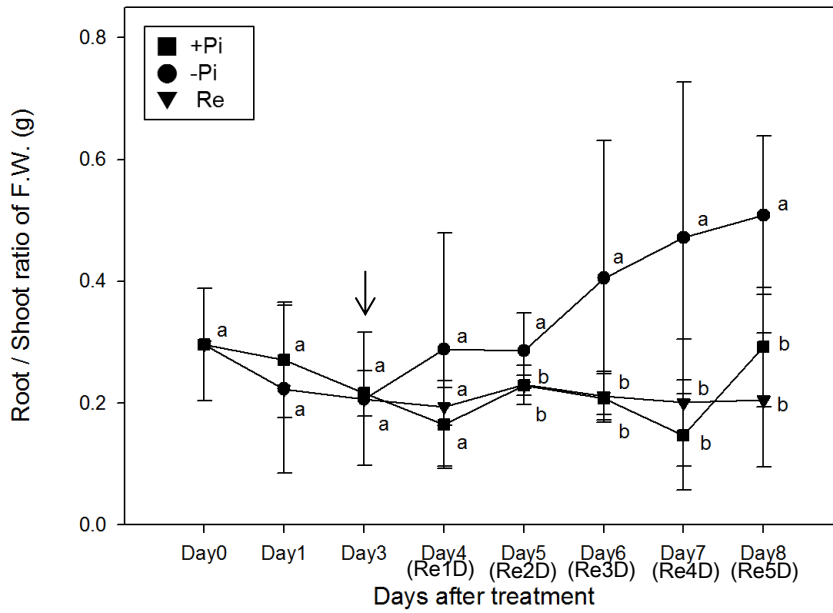


圖 9. 磷肥處理不同天數對菸草根/地上部鮮重比值之影響

Figure 9. Effects of Pi sufficient (+Pi), Pi deficient (-Pi) and Pi resupply (Re) treatments for different duration on root/shoot fresh weight ratio in *Nicotiana benthamiana*.

Pi resupply was started after three days of Pi deficiency (arrow). Error bars represent standard error (SE) of the mean for six replicates (n = 6). Means with the same letters are not significantly different between Pi treatments as compared by least significant difference (LSD) at P=0.05 level.

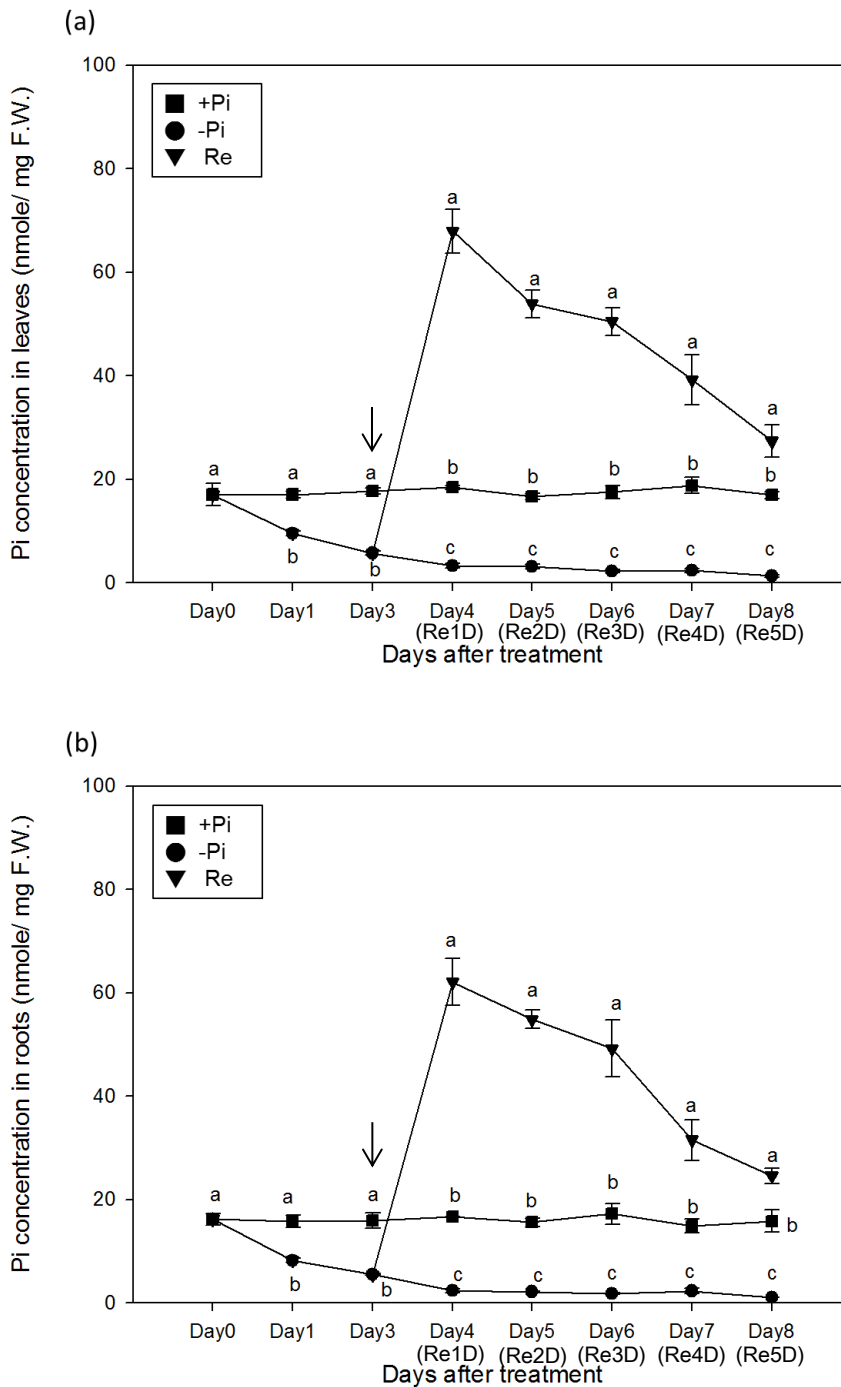


圖 10. 磷肥處理不同天數對菸草(a)葉片與(b)根部無機磷濃度之影響

Figure 10. Effects of Pi sufficient (+Pi), Pi deficient (-Pi) and Pi resupply (Re) treatments for different duration on (a) leaves Pi concentration and (b) root Pi concentration in *Nicotiana benthamiana*.

Pi resupply was started after three days of Pi deficiency (arrow). Error bars represent standard error (SE) of the mean for three replicates (n = 3). Means with the same letters are not significantly different between Pi treatments as compared by least significant difference (LSD) at P=0.05 level.



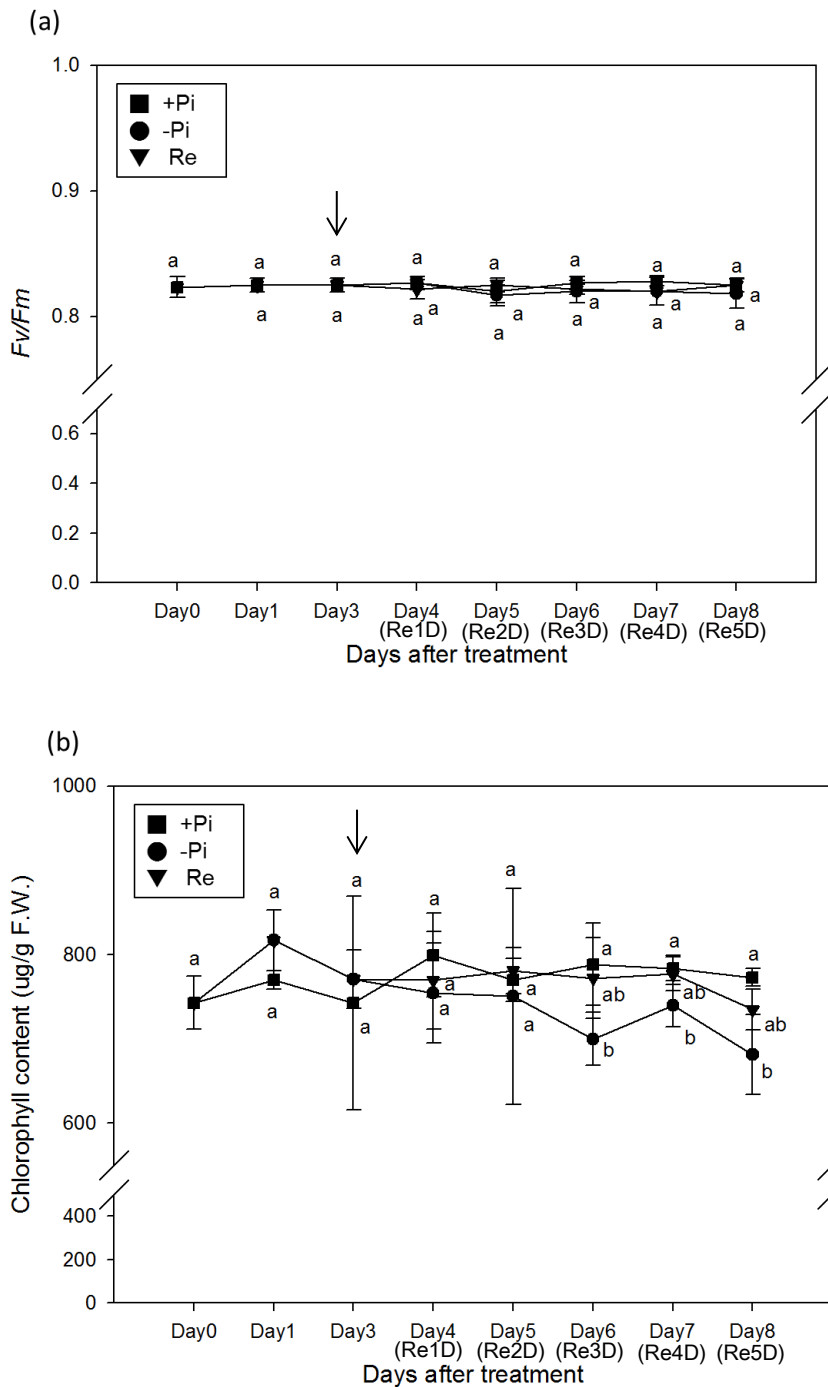


圖 11. 磷肥處理不同天數對菸草(a)葉綠素螢光與(b)葉綠素含量之影響

Figure 11. Effects of Pi sufficient (+Pi), Pi deficient (-Pi) and Pi resupply (Re) treatments for different duration on (a) chlorophyll fluorescence and (b) chlorophyll content in *Nicotiana benthamiana*.

Pi resupply was started after three days of Pi deficiency (arrow). Error bars represent standard error (SE) of the mean for three replicates ( $n = 3$ ). Means with the same letters are not significantly different between Pi treatments as compared by least significant difference (LSD) at  $P=0.05$  level.

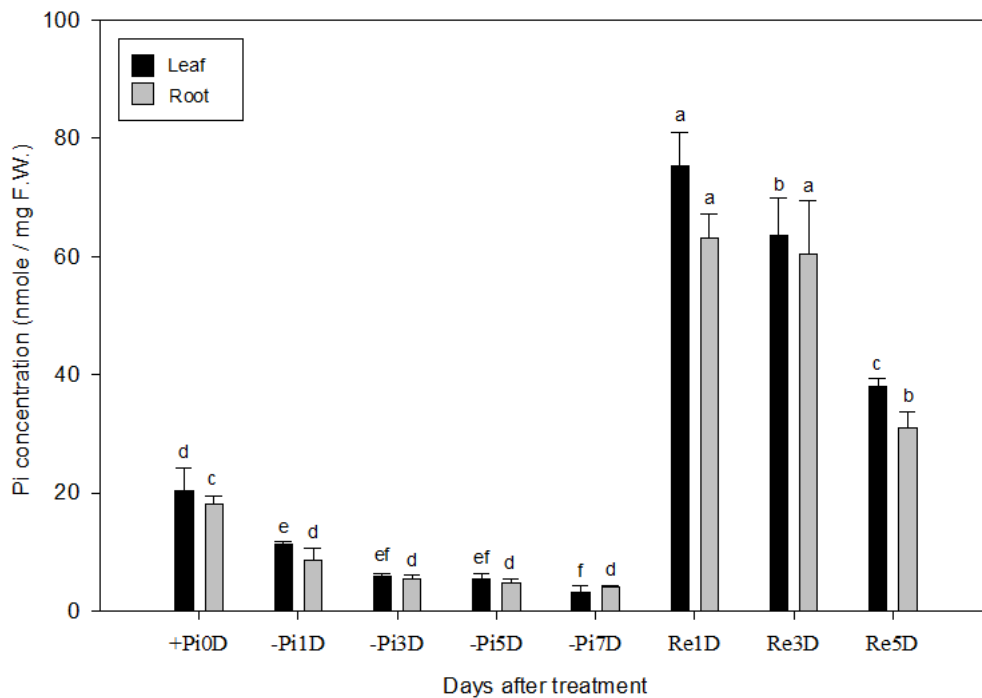


圖 12. 磷肥處理不同天數對進行農桿菌滲入法之菸草植體無機磷濃度之影響

Figure 12. Effects of Pi deficient (-Pi) and Pi resupply (Re) treatments for different duration on leaf and root Pi concentrations in *Nicotiana benthamiana* after agroinfiltration.

Pi resupply was started after three days of Pi deficiency. Error bars represent standard error (SE) of the mean for three replicates ( $n = 3$ ). Means with the same letters are not significantly different between Pi treatments as compared by least significant difference (LSD) at  $P=0.05$  level.

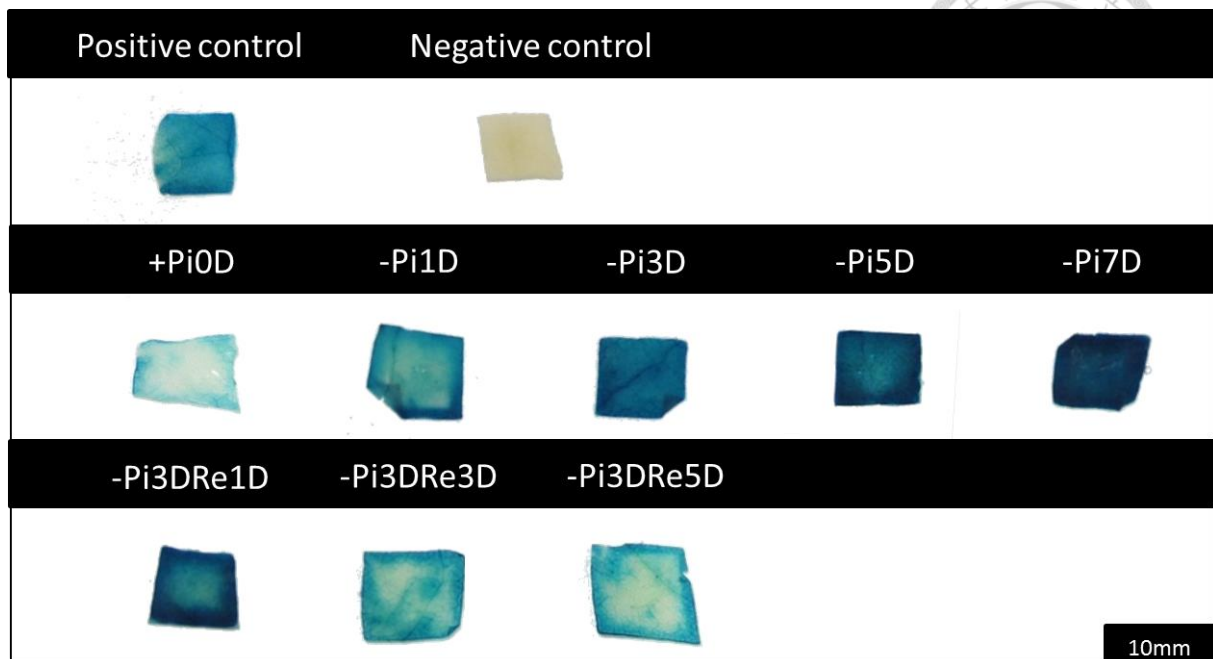


圖 13. 磷肥處理不同天數對菸草葉片 GUS 染色結果之影響

Figure 13. Effects of Pi sufficient (+Pi), Pi deficient (-Pi) and Pi resupply (Re) treatments for different duration on GUS staining level in *Nicotiana benthamiana* leaves.

Except of positive and negative controls, all leaves used for GUS staining were transformed with the TPSII promoter:GUS construct using *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 strain via agroinfiltration. The positive control was transformed with 35S promoter:GUS construct. The negative control was not transformed with any construct.

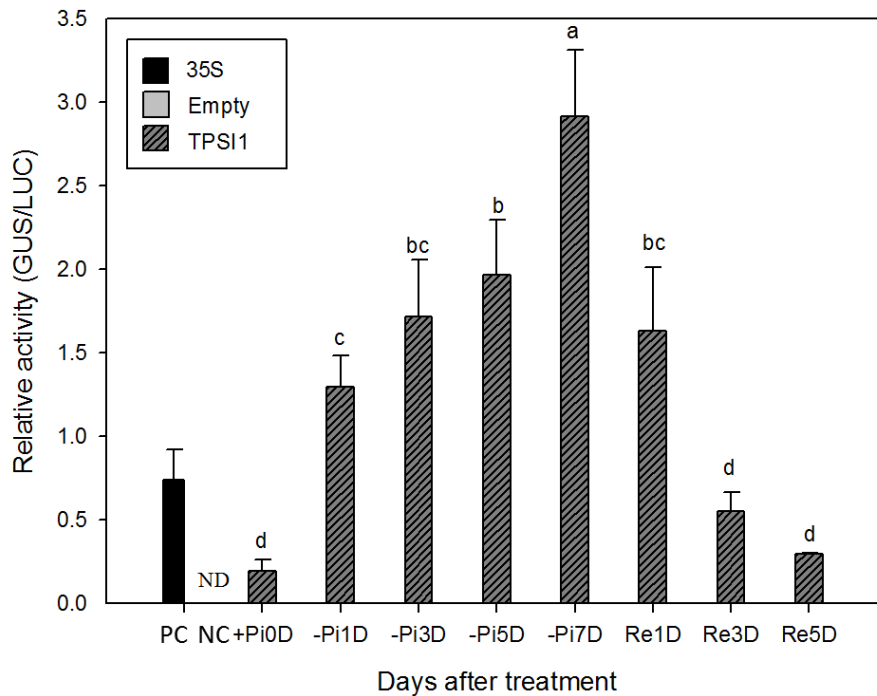


圖 14. 磷肥處理不同天數對菸草葉片 GUS 活性之影響

Figure 14. Effects of Pi sufficient (+Pi), Pi deficient (-Pi) and Pi resupply (Re) treatments for different duration on relative GUS activity levels in *Nicotiana benthamiana* leaves. Leaves used for relative GUS activity assay were transformed with 35S promoter:GUS construct (35S, black bars, PC), TPSII promoter:GUS construct (TPSII, slash bars) or no construct (Empty, gray bars, NC) using *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 strain via agroinfiltration. The level of relative GUS activity was normalized by the level of luciferase luminescence (LUC) expressed by the 35S promoter:LUC construct co-transformed with the above constructs. Error bars represent standard error (SE) of the mean for three replicates (n = 3). Means with the same letters are not significantly different between Pi treatments as compared by least significant difference (LSD) at P=0.05 level.

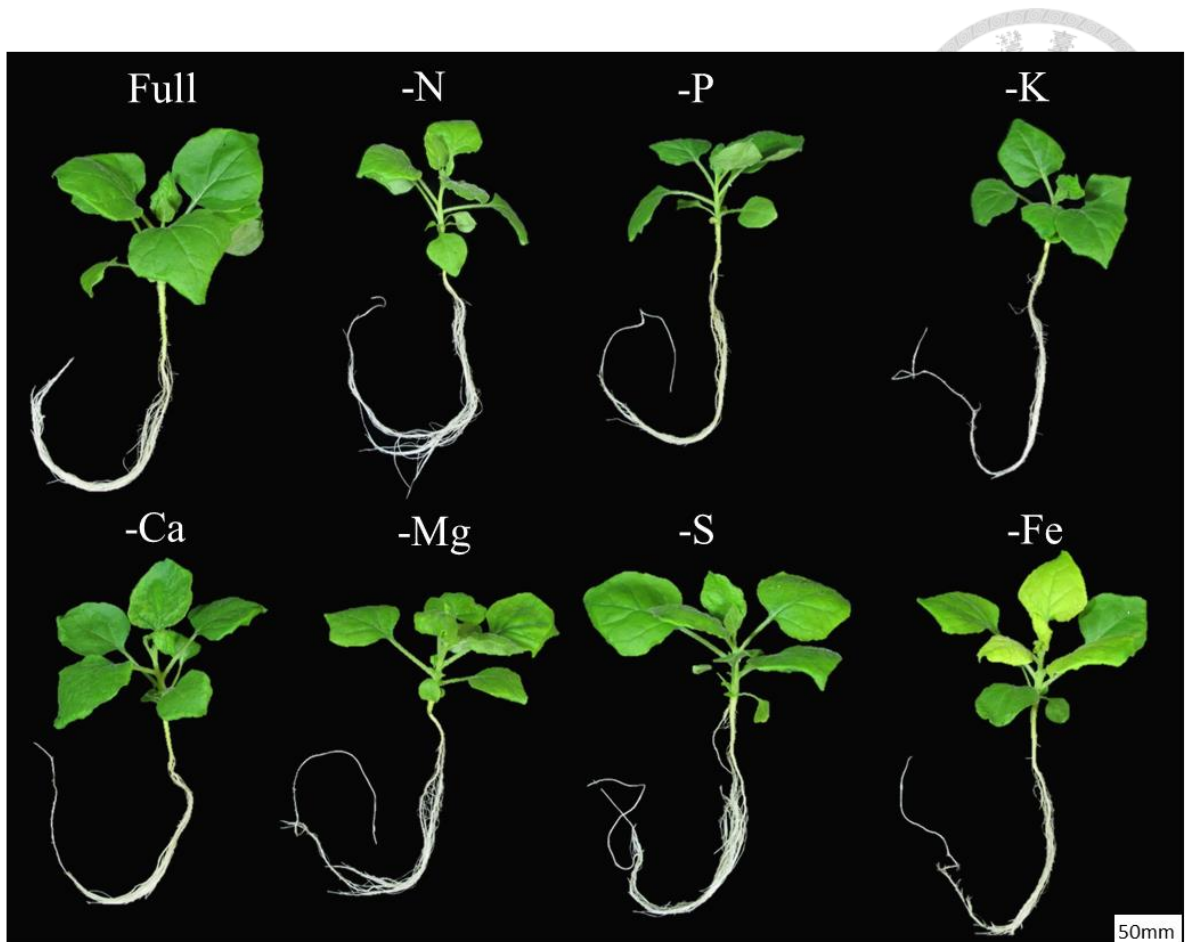


圖 15. 不同營養元素缺乏處理對菸草外觀之影響

Figure 15. Physical appearances of *Nicotiana benthamiana* after treatments with different nutrient deficiencies.

For treatments with different nutrient deficiencies, the indicated specific nutrient element was withdrawn from the nutrient solution for 7 days. The control (Full) plant was maintained in the Half-strength modified Hoagland nutrient solution with full nutrients.

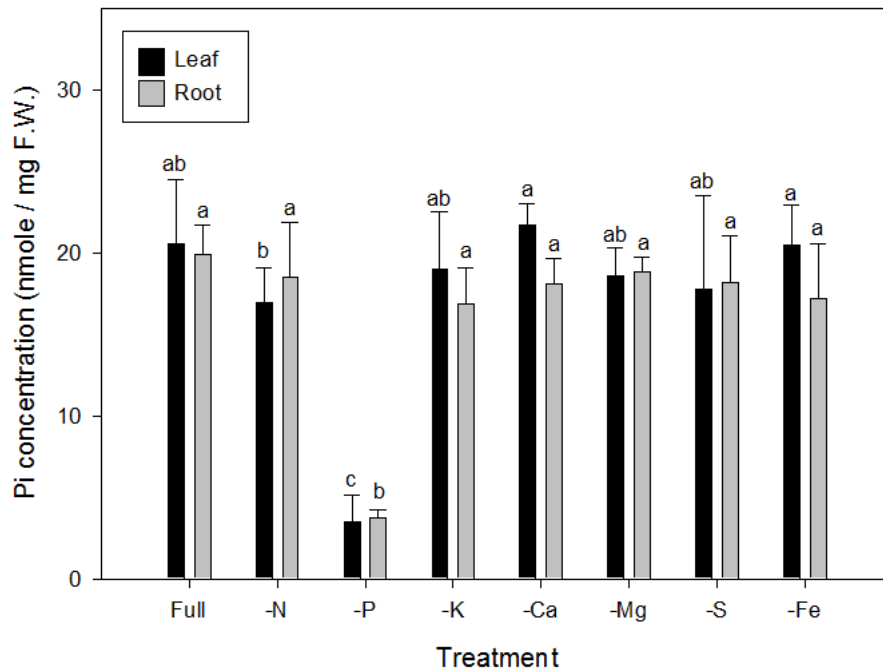


圖 16. 不同營養元素缺乏處理對菸草無機磷濃度之影響

Figure 16. Effects of different nutrient deficiencies on leaf Pi concentration (black bars) and root Pi concentration (gray bars) in *Nicotiana benthamiana*.

For treatments with different nutrient deficiencies, the indicated specific nutrient element was withdrawn from the nutrient solution for 7 days. The control (Full) plants were maintained in the Half-strength modified Hoagland nutrient solution with full nutrients. Error bars represent standard error (SE) of the mean for three replicates ( $n = 3$ ). Means with the same letters are not significantly different between nutrient treatments as compared by least significant difference (LSD) at  $P=0.05$  level.

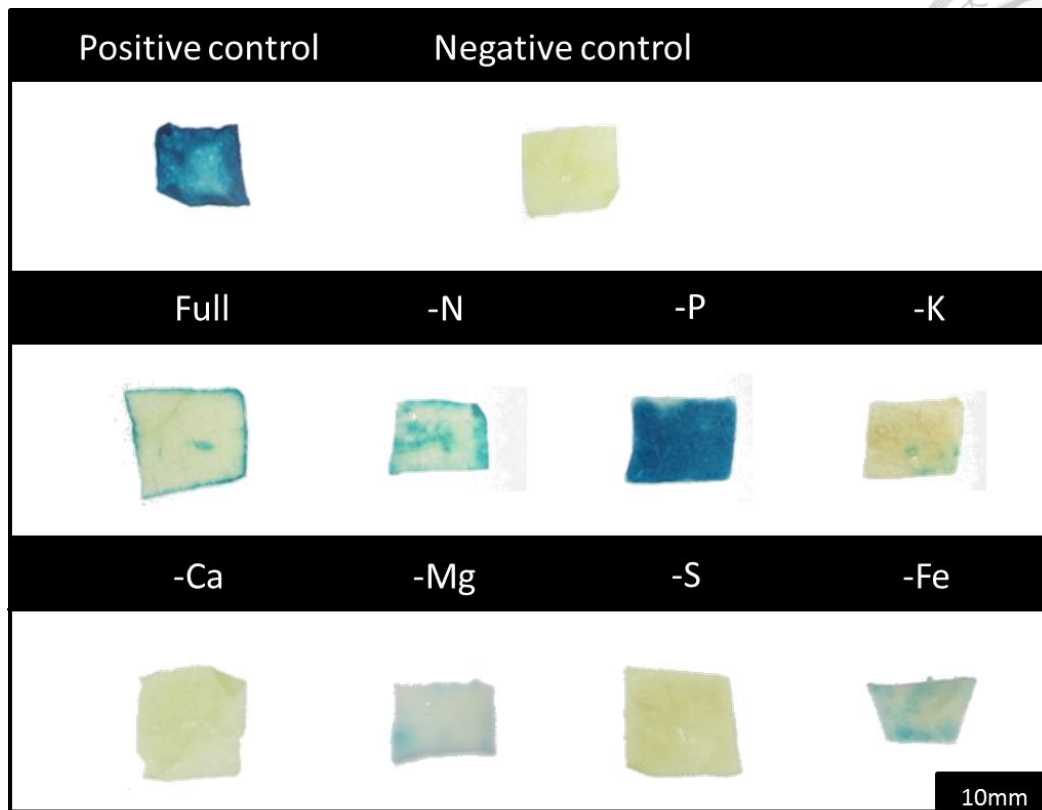


圖 17. 不同營養元素缺乏處理對菸草葉片 GUS 染色結果之影響

Figure 17. Effects of different nutrient deficiencies on GUS staining levels in *Nicotiana benthamiana* leaves.

Except of positive and negative controls, all leaves used for GUS staining were transformed with the TPSII promoter:GUS construct using *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 strain via agroinfiltration. The positive control was transformed with 35S promoter:GUS construct. The negative control was not transformed with any construct.

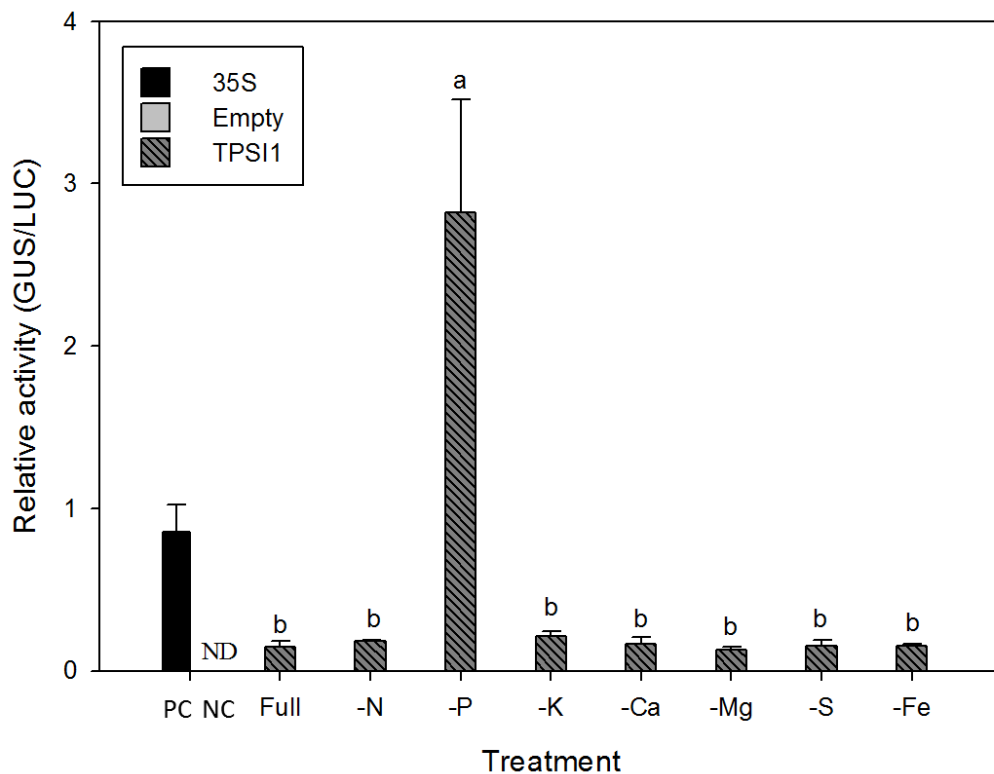


圖 18. 不同營養元素缺乏處理對菸草葉片 GUS 活性之影響

Figure 18. Effects of different nutrient deficiencies on relative GUS activity levels in *Nicotiana benthamiana* leaves.

Leaves used for relative GUS activity assay were transformed with 35S promoter:GUS construct (35S, black bars, PC), TPSII promoter:GUS construct (TPSII, slash bars) or no construct (Empty, gray bars, NC) using *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 strain via agroinfiltration. The level of relative GUS activity was normalized by the level of luciferase luminescence (LUC) expressed by the 35S promoter:LUC construct co-transformed with the above constructs. Error bars represent standard error (SE) of the mean for three replicates ( $n = 3$ ). Means with the same letters are not significantly different between Pi treatments as compared by least significant difference (LSD) at  $P=0.05$  level.



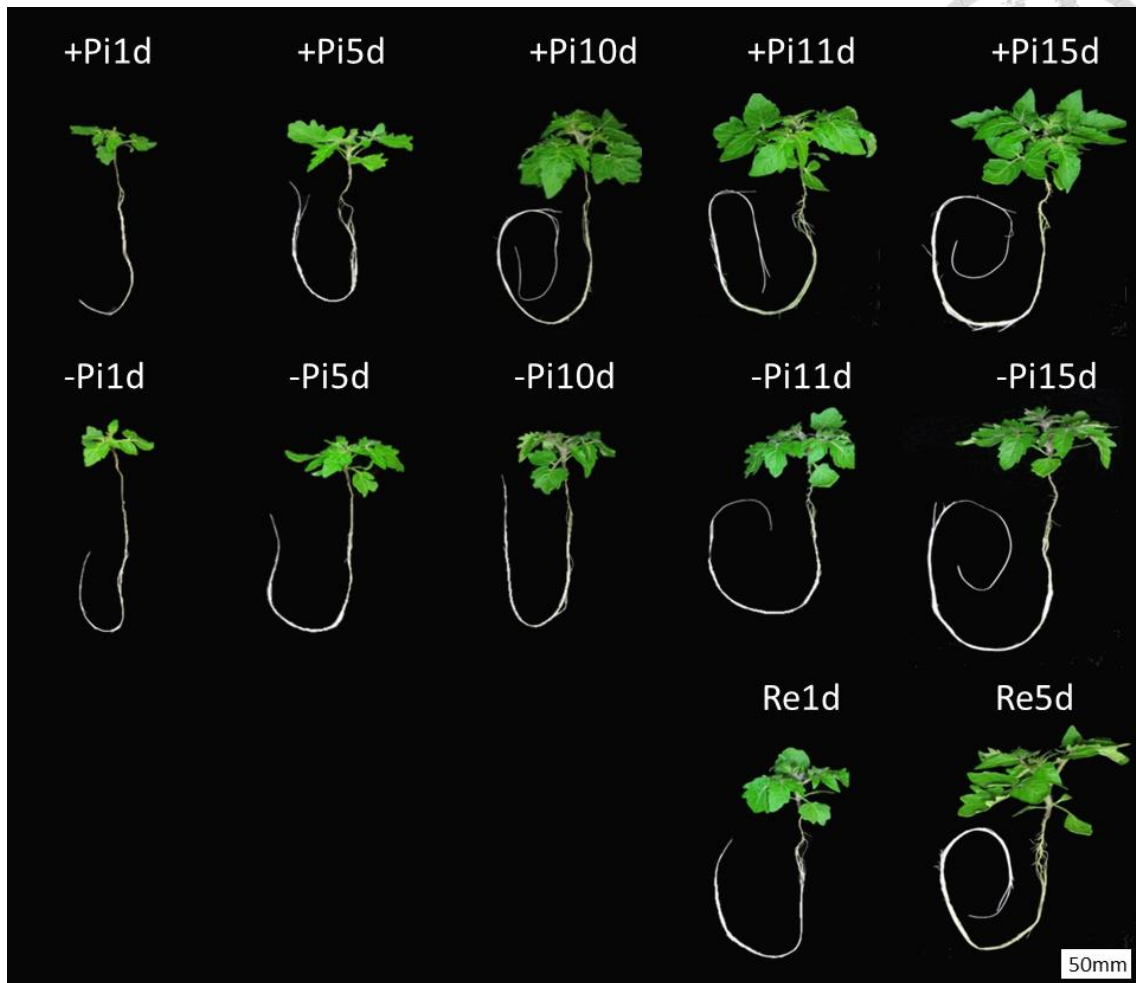


圖 19. 缺磷與磷肥恢復處理不同天數對番茄外觀之影響

Figure 19. Effects of Pi sufficient (+Pi), Pi deficient (-Pi) and Pi resupply (Re) treatments for different duration on physical appearances of tomato. Pi resupply was started after ten days of Pi deficiency.

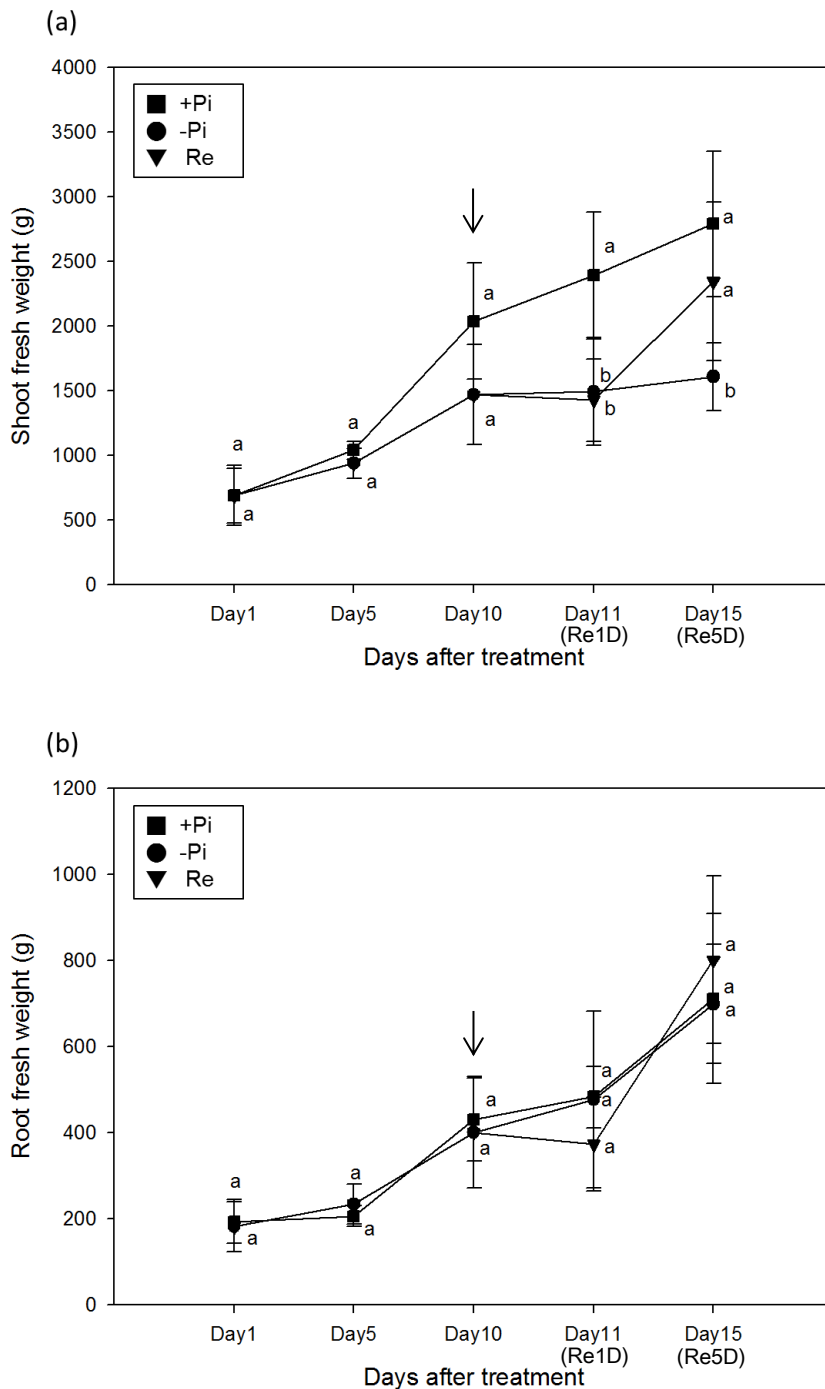


圖 20. 磷肥處理不同天數對番茄(a)地上部與(b)根部鮮重之影響

Figure 20. Effects of Pi sufficient (+Pi), Pi deficient (-Pi) and Pi resupply (Re) treatments for different duration on (a) shoot fresh weight and (b) root fresh weight in tomato.

Pi resupply was started after ten days of Pi deficiency (arrow). Error bars represent standard error (SE) of the mean for three replicates ( $n = 3$ ). Means with the same letters are not significantly different between Pi treatments as compared by least significant difference (LSD) at  $P=0.05$  level.

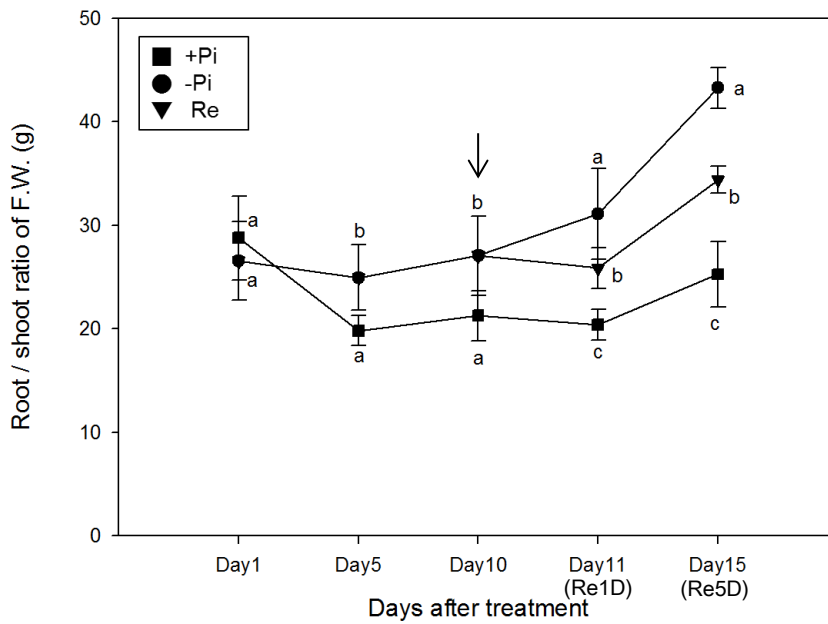


圖 21. 磷肥處理不同天數對番茄根部/地上部鮮重比值之影響

Figure 21. Effects of Pi sufficient (+Pi), Pi deficient (-Pi) and Pi resupply (Re) treatments for different duration on root/shoot fresh weight ratio in tomato.

Pi resupply was started after ten days of Pi deficiency (arrow). Error bars represent standard error (SE) of the mean for three replicates ( $n = 3$ ). Means with the same letters are not significantly different between Pi treatments as compared by least significant difference (LSD) at  $P=0.05$  level.

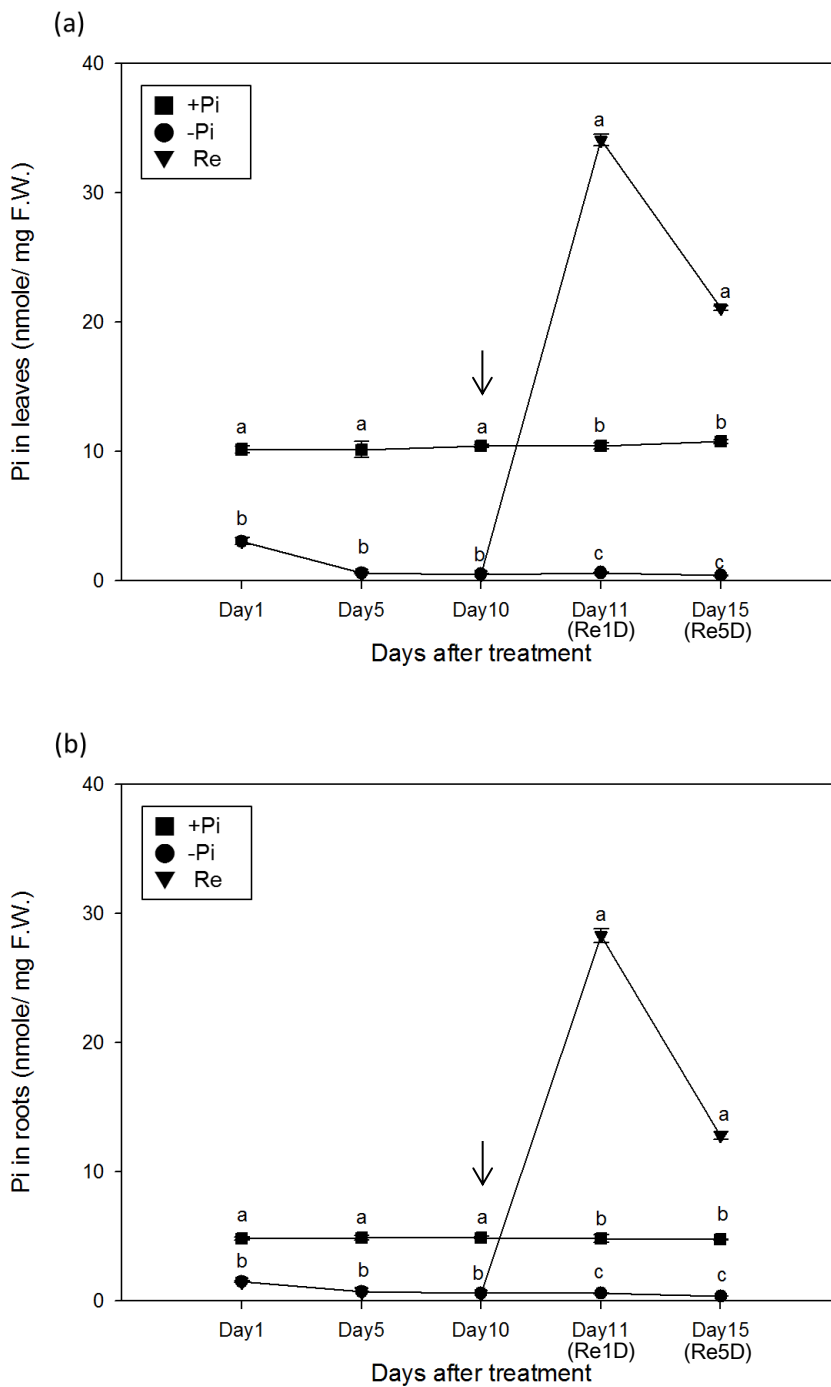


圖 22. 磷肥處理不同天數對番茄(a)葉片與(b)根部無機磷濃度之影響

Figure 22. Effects of Pi sufficient (+Pi), Pi deficient (-Pi) and Pi resupply (Re) treatments for different duration on (a) leaf Pi concentration and (b) root Pi concentration in tomato.

Pi resupply was started after ten days of Pi deficiency (arrow). Error bars represent standard error (SE) of the mean for three replicates ( $n = 3$ ). Means with the same letters are not significantly different between Pi treatments as compared by least significant difference (LSD) at  $P=0.05$  level.

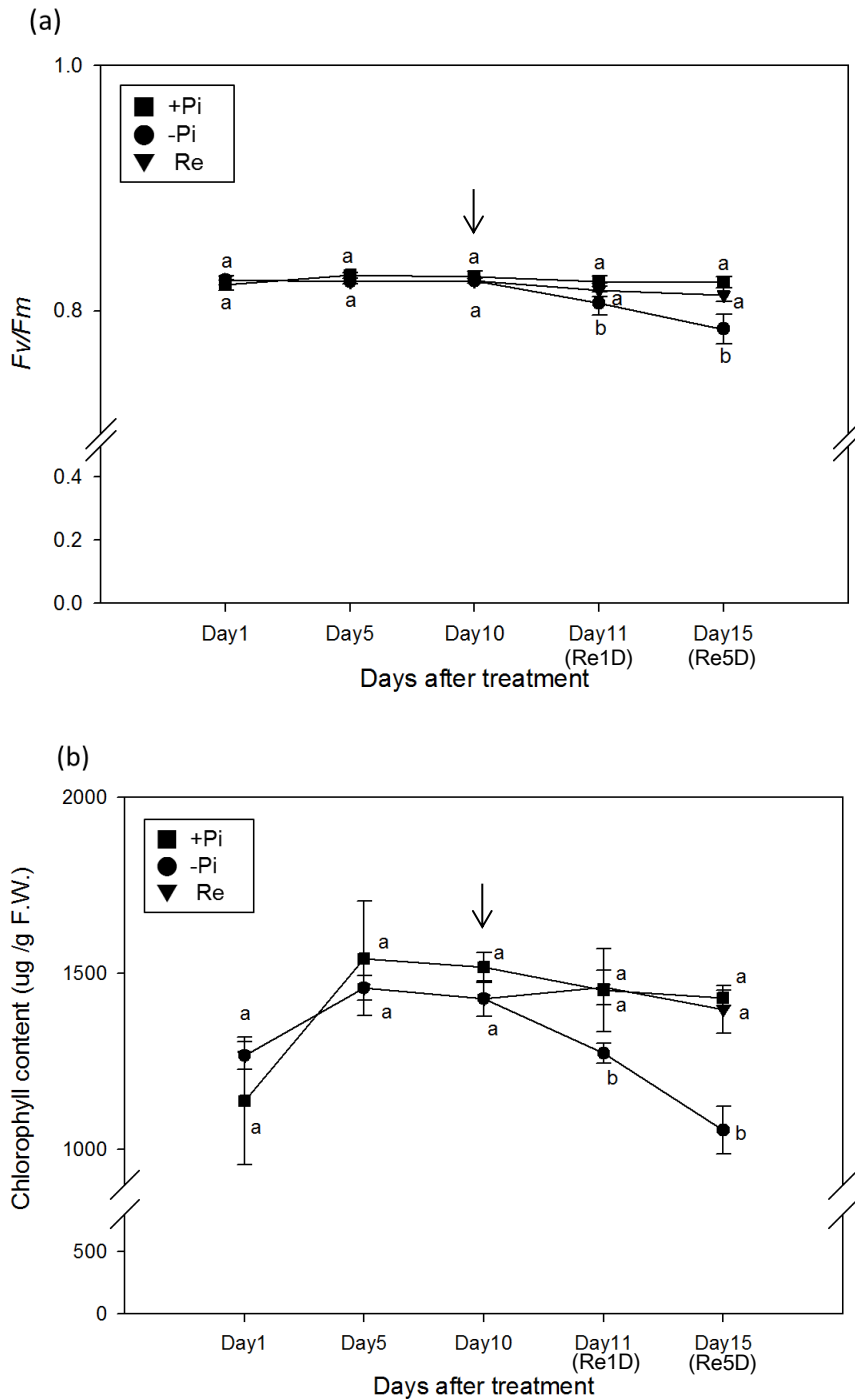


圖 23. 磷肥處理不同天數對番茄(a)葉綠素螢光與(b)葉綠素含量之影響

Figure 23. Effects of Pi sufficient (+Pi), Pi deficient (-Pi) and Pi resupply (Re) treatments for different duration on (a) chlorophyll fluorescence and (b) chlorophyll content in tomato.

Pi resupply was started after ten days of Pi deficiency (arrow). Error bars represent standard error (SE) of the mean for three replicates ( $n = 3$ ). Means with the same letters are not significantly different between Pi treatments as compared by least significant difference (LSD) at  $P=0.05$  level.

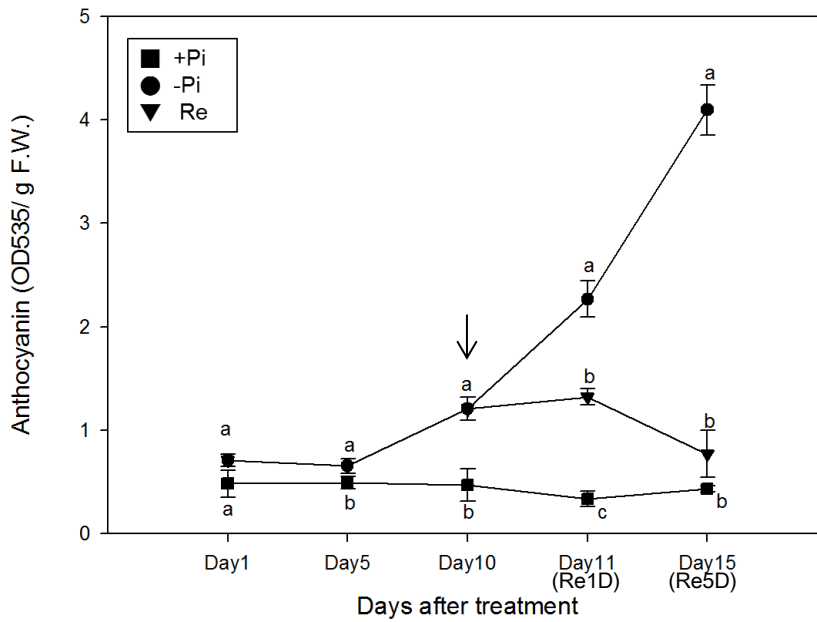


圖 24. 磷肥處理不同天數對番茄花青素濃度之影響

Figure 24. Effects of Pi sufficient (+Pi), Pi deficient (-Pi) and Pi resupply (Re) treatments for different duration on anthocyanin concentration in tomato.

Pi resupply was started after ten days of Pi deficiency (arrow). Error bars represent standard error (SE) of the mean for three replicates ( $n = 3$ ). Means with the same letters are not significantly different between Pi treatments as compared by least significant difference (LSD) at  $P=0.05$  level.










Treatment Constructs	+Pi	-Pi2d	-Pi4d
Empty			
35S:GUS			
TPS11:GUS			

圖 25. 磷肥處理不同天數對番茄葉片 GUS 染色結果之影響

Figure 25. Effects of Pi sufficient (+Pi) and Pi deficient (-Pi) treatments for different duration on GUS staining levels in tomato leaves.

Except of positive and negative control, all leaves used for GUS staining were transformed with the TPS11 promoter:GUS construct using *Agrobacterium tumefaciens* 1D1249 strain via agroinfiltration. The positive control was transformed with 35S promoter:GUS construct. The negative control was not transformed with any construct.

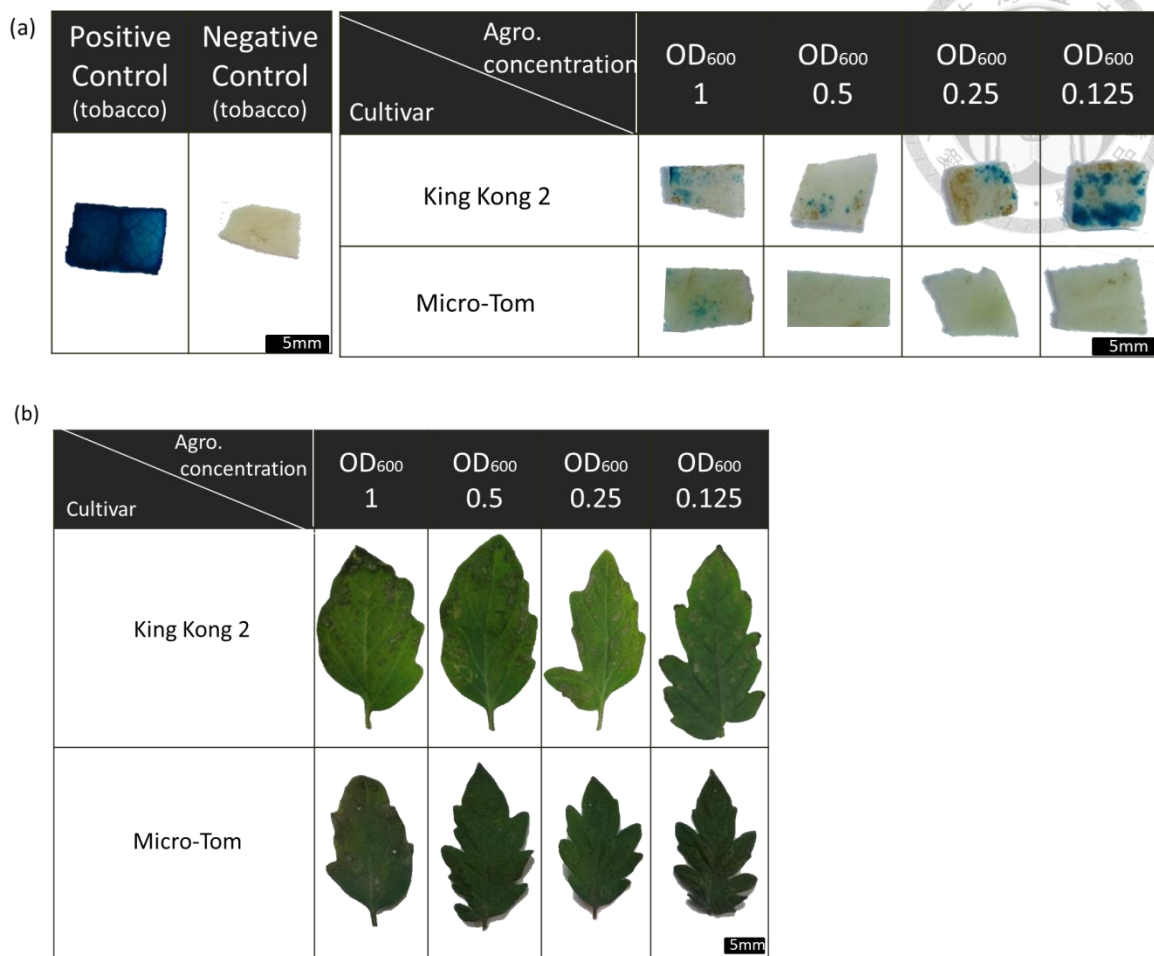


圖 26. 不同番茄品種與農桿菌菌液濃度對番茄葉片 (a) GUS 染色結果與 (b) 葉片壞疽情形之影響

Figure 26. Effects of cultivar and *Agrobacterium tumefaciens* concentration on (a) GUS staining level and (b) leaf necrosis in tomato.

All tomato leaves used for GUS staining were transformed with the 35S promoter:GUS construct using *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 strain via agroinfiltration. For positive and negative controls, tobacco leaves used for GUS staining were transformed with the 35S promoter:GUS construct or not transformed with any construct using *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 strain via agroinfiltration.



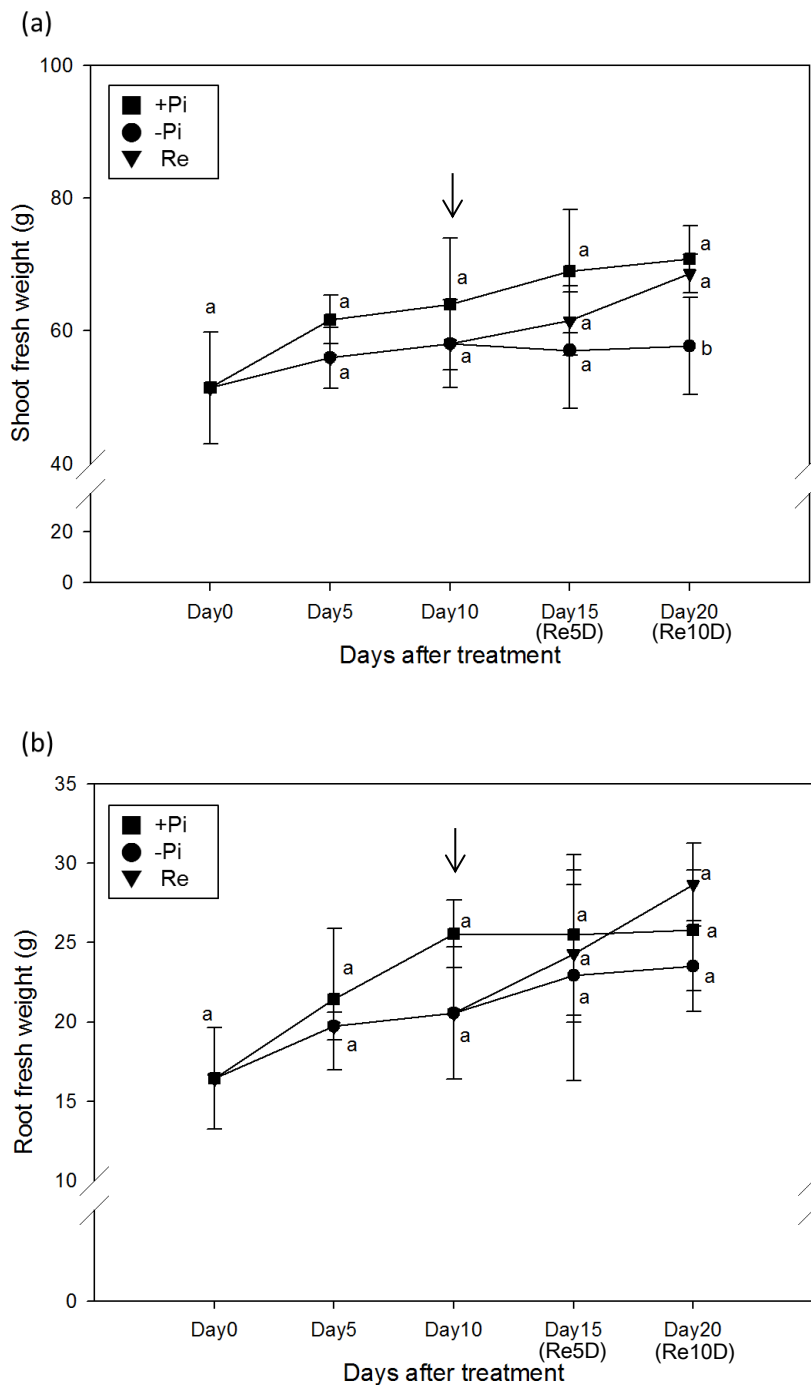


圖 27. 番茄生殖生長期進行磷肥處理不同天數對(a)地上部與(b)根部鮮重之影響  
 Figure 27. Effects of Pi sufficient (+Pi), Pi deficient (-Pi) and Pi resupply (Re) treatments for different duration on (a) shoot fresh weight and (b) root fresh weight in tomato during reproductive stage.

Pi resupply was started after ten days of Pi deficiency (arrow). Error bars represent standard error (SE) of the mean for three replicates (n = 3). Means with the same letters are not significantly different between Pi treatments as compared by least significant difference (LSD) at P=0.05 level.

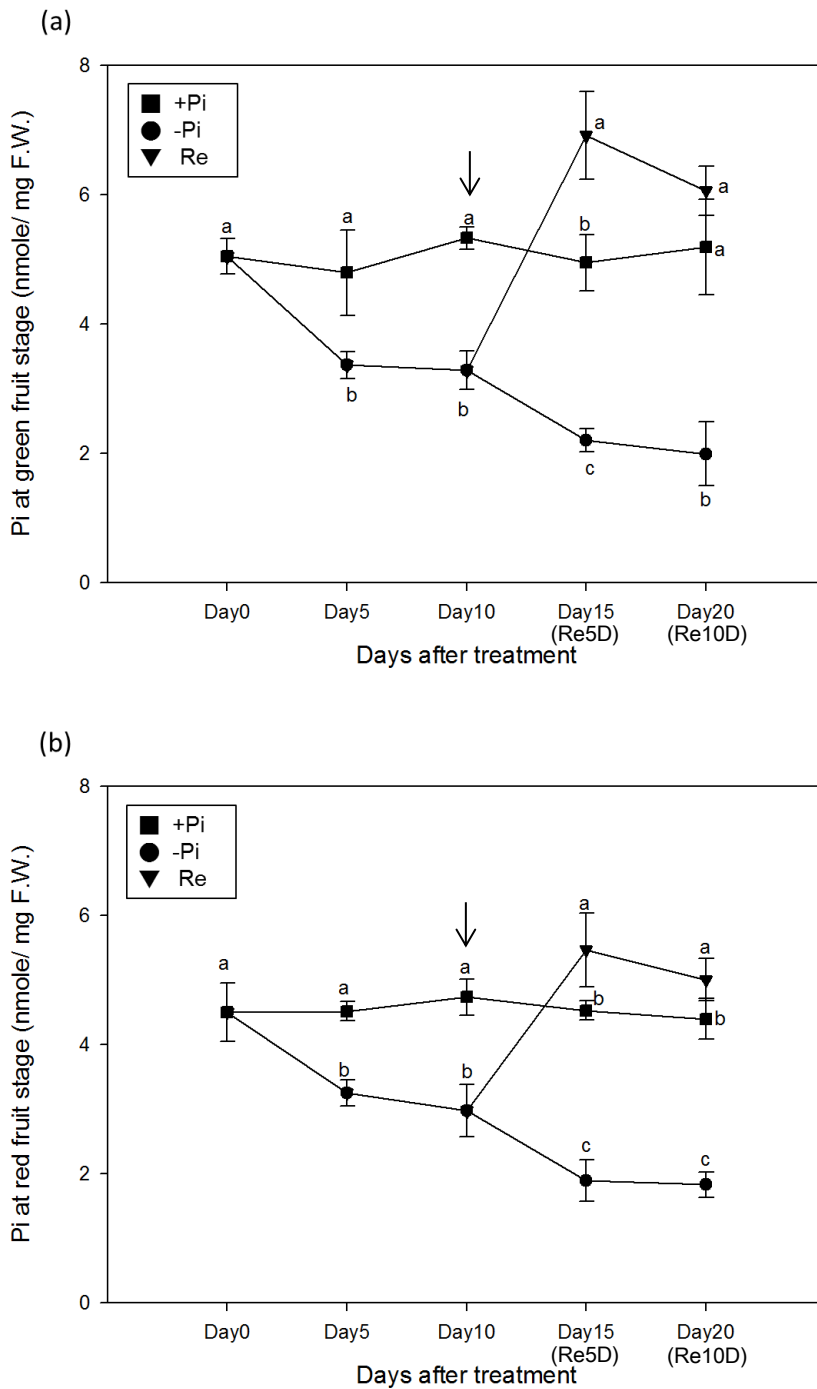


圖 28. 磷肥處理不同天數對番茄(a)綠熟期與(b)紅熟期果實無機磷濃度之影響  
 Figure 28. Effects of Pi sufficient (+Pi), Pi deficient (-Pi) and Pi resupply (Re) treatments for different duration on Pi concentration in tomato fruit at (a) green fruit and (b) red fruit stages.

Pi resupply was started after ten days of Pi deficiency (arrow). Error bars represent standard error (SE) of the mean for three replicates ( $n = 3$ ). Means with the same letters are not significantly different between Pi treatments as compared by least significant difference (LSD) at  $P=0.05$  level.

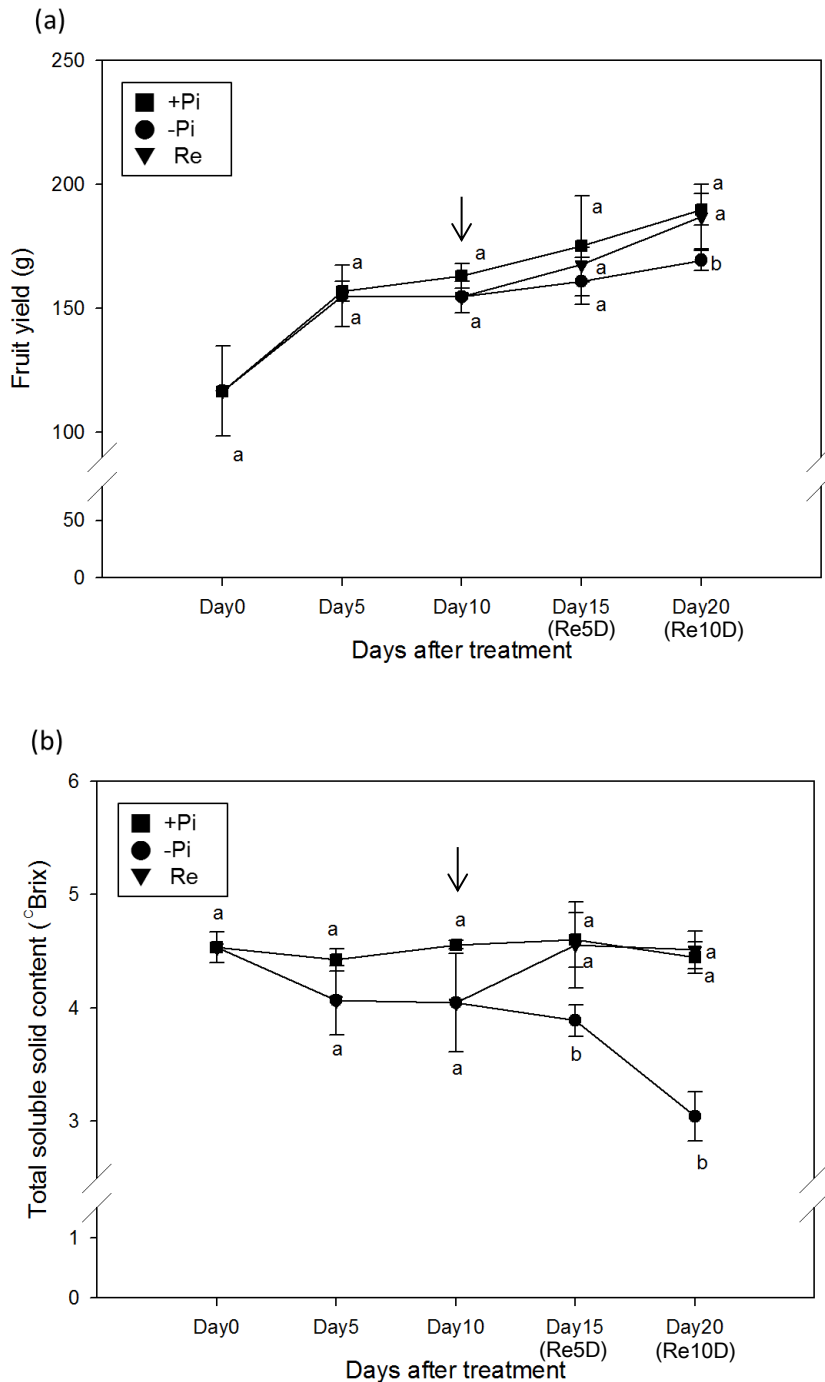


圖 29. 磷肥處理不同天數對番茄果實(a)產量與(b)可溶性固形物含量之影響

Figure 29. Effects of Pi sufficient (+Pi), Pi deficient (-Pi) and Pi resupply (Re) treatments for different duration on (a) yield and (b) total soluble solids content in tomato fruits.

Pi resupply was started after ten days of Pi deficiency (arrow). Error bars represent standard error (SE) of the mean for three replicates ( $n = 3$ ). Means with the same letters are not significantly different between Pi treatments as compared by least significant difference (LSD) at  $P=0.05$  level.

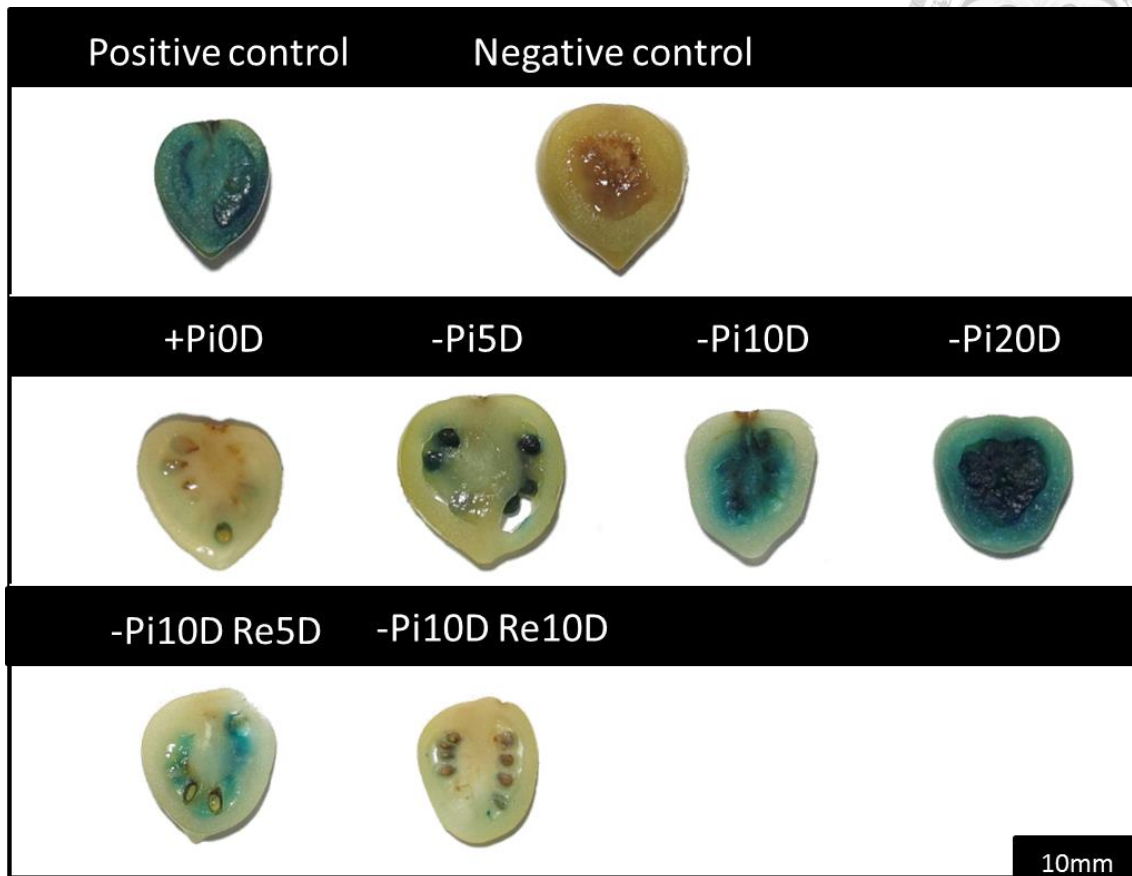


圖 30. 磷肥處理不同天數對番茄果實 GUS 染色之影響

Figure 30. Effects of Pi sufficient (+Pi), Pi deficient (-Pi) and Pi resupply (Re) treatments for different duration on GUS staining level in tomato fruits.

Except of positive and negative controls, all leaves used for GUS staining were transformed with the TPSII promoter:GUS construct using *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 strain via agroinjection. The positive control was transformed with 35S promoter:GUS construct. The negative control was not transformed with any construct.

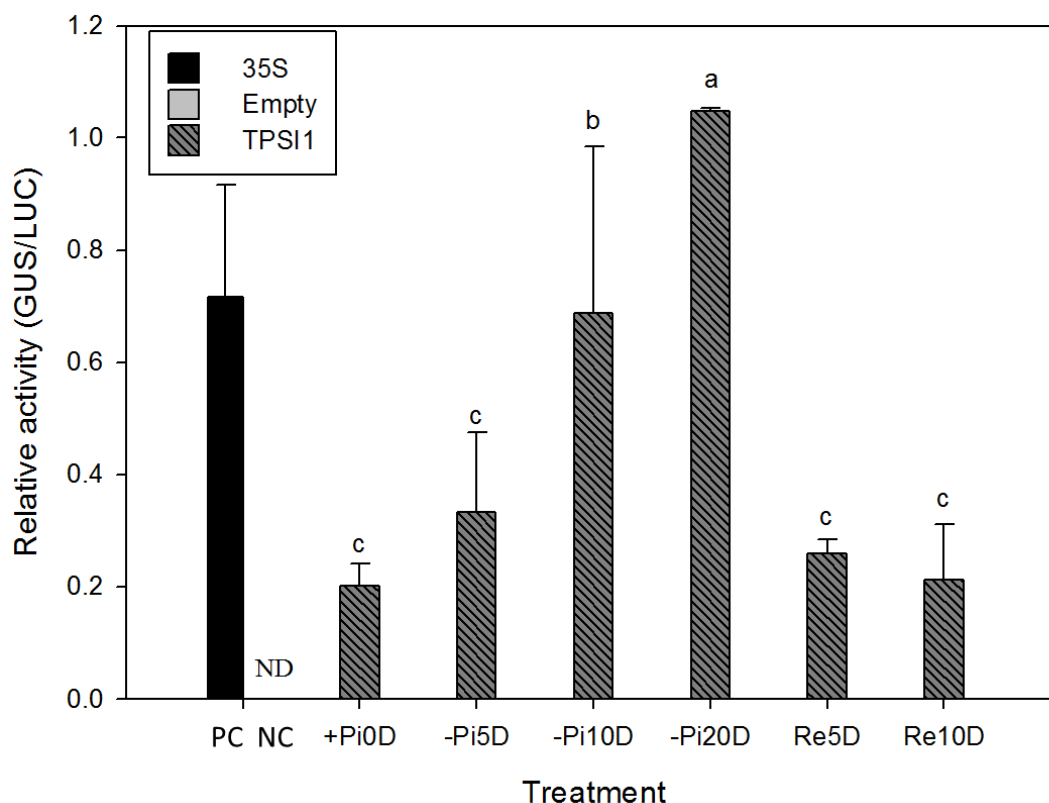
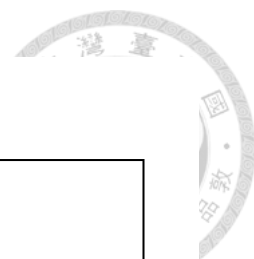


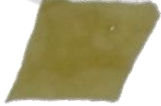
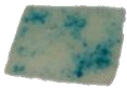




圖 31. 磷肥處理不同天數對番茄果實 GUS 活性之影響

Figure 31. Effects of Pi sufficient (+Pi), Pi deficient (-Pi) and Pi resupply (Re) treatments for different duration on relative GUS activity levels in tomato fruits.

Fruits used for relative GUS activity assay were transformed with 35S promoter:GUS construct (35S, black bars), TPSI1 promoter:GUS construct (TPS11, slash bars) or no construct (Empty, gray bars) using *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 strain via agroinjection. The level of relative GUS activity was normalized by the level of luciferase luminescence (LUC) expressed by the 35S promoter:LUC construct co-transformed with the above constructs. Error bars represent standard error (SE) of the mean for three replicates ( $n = 3$ ). Means with the same letters are not significantly different between Pi treatments as compared by least significant difference (LSD) at  $P=0.05$  level.

Species Constructs	Bell pepper	Hot pepper	Eggplant
Empty			
35S:GUS			

5mm

圖 32. 青椒、辣椒與茄子利用農桿菌滲入法表達 GUS 情形

Figure 32. GUS staining of bell pepper, hot pepper and eggplant leaves transformed with the 35S promoter:GUS construct using *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 strain via agroinfiltration. The negative control was not transformed with any construct.

## 第六章、討論




### 一、缺磷逆境對菸草與番茄營養與生殖生長之影響

前人研究指出植株在缺磷環境下生長，會降低地上部及根部的乾重、植體磷含量與提高根部/地上部之比值 (Biddinger et al., 1998; Raghothama, 1999)。本研究結果顯示菸草與番茄於營養生長期進行缺磷處理也降低植株地上部鮮重 (圖 8a 與圖 20a)、植體無機磷濃度 (圖 10 與圖 22)，增加根部/地上部比值 (圖 9 與圖 21)，結果皆與前人研究相符。相反的，試驗期間針對菸草進行長達 8 天的缺磷處理或是針對番茄進行長達 15 天的缺磷處理，並不會顯著降低根部鮮重，其根部鮮重都與對照組相當 (圖 8b 與圖 20b)，說明缺磷處理對地上部的抑制效果較高，以及缺磷時植株藉由提高根部/地上部之比值以增加根部獲取磷的機會。

前人研究也指出番茄於生殖生長期進行缺磷處理，降低果實、葉片、莖及根的磷含量、減少果實與地上部的乾重，此點與營養生長期的反應相似；此外也會降低光合作用效率、氣孔導度、蒸散速率、莖徑、果徑 (Fujita et al., 2003)。本研究在菸草與番茄營養生長期時，利用非破壞性葉綠素螢光計檢測葉綠素螢光，並以破壞性方式測定葉綠素含量，結果顯示營養生長期時缺磷顯著降低菸草與番茄葉綠素含量 (圖 11b 與圖 23b)，也降低番茄葉綠素螢光 (圖 23a)，說明磷肥缺乏將影響菸草與番茄的光合作用效率，此點與前人研究相符。此外，試驗結果顯示番茄於生殖生長期進行缺磷處理不僅造成地上部鮮重的下降 (圖 27a)，也降低果實無機磷濃度 (圖 28a 與圖 28b) 及減少果實產量 (圖 29a) 與可溶性固形物含量 (圖 29b)，說明磷含量的多寡不僅對植株營養生長扮演重要角色，也影響最終產量與品質的表現。

花青素的累積是植物缺磷常被描述到的反應，花青素的產生也可保護核酸避免 UV 光的傷害與保護葉綠體在光合成中不受光抑制的傷害 (Hoch et al., 2001)。在本次研究中也檢測缺磷處理對菸草與番茄花青素含量的影響，結果菸草在不同



時間的缺磷逆境處理下無法偵測到花青素的含量 (資料未呈現)，但缺磷致使番茄花青素迅速累積，在缺磷第 5 天 (-Pi5D) 便顯著高於對照組 (+Pi5D) (圖 24)，此點說明缺磷逆境的確會導致花青素的累積，但並非每種植物都會因為缺磷而累積花青素。


## 二、其他生理指標用於診斷植體磷含量充足與否之可能性

上述結果說明缺磷逆境導致植物產生一系列生理反應變化以因應磷的缺乏，以另一個角度來看，若能藉由這些生理指標的測定，將可幫助我們及早得知作物是否面臨缺磷逆境，而在缺磷逆境影響生長與最終產量與品質前適時給與磷肥補充，以達合理化施肥目的。這樣的生理指標必須具備專一性與敏感度，亦即不受其他因子影響與反應迅速，如此才可減少結果的誤判與及時施肥。此外，若能具有方便、非破壞性與適用不同作物之特點，將可幫助該指標的普及化。一般的營養診斷主要是採取植體進行營養元素分析，因此這些指標是否能夠及時反應植體磷濃度充足與否為最主要的考量。

菸草與番茄在營養生長期僅需 1 天的缺磷處理 (-Pi1D)，葉片的磷濃度即顯著低於對照組 (+Pi1D) (圖 10a 與圖 22a)；番茄於生殖生長期也僅需 5 天的缺磷處理 (-Pi5D)，果實的磷濃度即顯著低於對照組 (+Pi5D) (圖 28a 與圖 28b)。說明這樣的指標最好可在 1-5 天內反應植體磷濃度的充足與否最佳。葉綠素螢光計雖具備不破壞組織之特點，但菸草於營養生長期即使進行 8 天的缺磷處理 (-Pi8D)，其讀值與對照組 (+Pi8D) 相比，仍無顯著差異 (圖 11a)；而番茄於營養生長期進行 11 天的缺磷處理 (-Pi11D) 其讀值雖可低於對照組 (+Pi11D) (圖 23a)，但整體反應速度太慢而不適合做為指標。

相較於葉綠素螢光計，菸草於營養生長期時缺磷處理 6 天 (-Pi6D) 葉綠素含量即顯著低於對照組 (+Pi6D) (圖 11b)，說明其反應較葉綠素螢光計快，但番茄於營養生長期需進行 11 天的缺磷處理 (-Pi11D) 葉綠素含量才顯著低於對照組






(+Pi11D) (圖 23b)，因此整體速度還是太慢且不同植物反應不一。再者，不論是使用葉綠素螢光計進行偵測或是進行葉綠素含量檢測，都是在診斷植株光合作用效率的高低，但不同營養元素缺乏以及許多環境因子皆會影響其表現量，例如缺氮就會影響葉綠素的含量 (李等, 2003; 李等, 2005; Samborski, 2009)，因此不具專一性。

花青素於番茄缺磷處理後 5 天 (-Pi5D) 迅速累積，顯著高於同時期的對照組 (+Pi5D) (圖 24)。相較於葉綠素螢光計與葉綠素含量，其反應快，可惜的是並非每種作物皆可適用，例如本試驗所用的菸草在缺磷處理期間無法觀察到花青素的累積。再者，很多生物性與非生物性逆境也會誘導花青素的累積，例如高光或低溫逆境都會誘導花青素的表現 (Rabino and Mancinelli, 1986)，因此如在一般露地栽培的環境下，欲使用花青素作為缺磷的指標，在實際應用上可能有執行上之困難度。

### 三、農桿菌滲入法與農桿菌注射法用於診斷植體磷含量充足與否之可行性

本研究利用帶有 *TPSII promoter:GUS* 載體的 C58C1 農桿菌品系，結合農桿菌滲入法與 GUS 染色與定量分析，發現 GUS 的表現量可隨著缺磷天數增加而提高，缺磷後恢復磷肥供應也可快速地降低 GUS 的表現量 (圖 13 與圖 14)，成功於菸草建立此診斷系統。由於此方法在缺磷逆境處理後 1 天 (-Pi1D)，GUS 活性即顯著高於對照組 (+Pi0D) (圖 13 與圖 14)，說明其具備高敏感性；GUS 活性隨著缺磷處理天數的增加而逐漸提高，磷肥恢復處理後又逐漸降低 (圖 13 與圖 14)，其結果與植體磷濃度的變化 (圖 12) 相呼應，說明其具備準確度與可逆性；GUS 活性的高低不因其他營養元素的缺乏而提高表現，說明此系統具專一性 (圖 17 與圖 18)。其中，磷肥恢復處理後可降低 GUS 的表現量，此對於實施合理化施肥具有重要性，因可避免農民過度施肥造成成本提高與環境污染之問題。

前人研究指出 *TPSII RNA* 於充足磷肥供應環境下具有微弱的表現量，而缺磷逆境 1 天即可大量在葉片誘導表現，且隨著缺磷天數的增加，其表現量逐漸提高



(Liu et al., 1997)。此結果與本系統看到的結果相符，即使在充足磷肥供應下，GUS 的染色與定量結果皆有微弱的表現量，說明在充足磷肥供應下 *TPSII* 仍會正常轉錄，只是表現量較低；而隨著缺磷逆境時間的增加，GUS 表現量逐漸增加（圖 13 與圖 14）。為了測試 *TPSII* 對於缺磷反應的專一性，前人研究指出在缺氮、缺鉀、缺鐵等逆境下，*TPSII* 僅有與+Pi 一樣微弱的表現量，只有缺磷處理才能大量誘導其表現 (Liu et al., 1997)，此結果與本系統看到的結果相符，即在缺氮、缺鉀、缺鐵以及新增的缺鈣、缺鎂、缺硫等逆境下，GUS 活性皆與磷肥充足的對照組相當，僅有缺磷可大量誘導 GUS 表現（圖 17 與圖 18）。

大多數的農作物其食用的部位往往不是葉片，以番茄來說，果實才是其食用部位。因此本研究進一步以帶有 *TPSII* promoter:GUS 載體的 C58C1 農桿菌品系結合農桿菌注射法與 GUS 染色與定量分析系統，建立番茄果實磷含量充足與否的診斷系統。在本系統中可觀察到隨著缺磷逆境天數的增加，果實 GUS 活性增加，主要表現在種子與果實胎座附近，在果皮附近表現量比較弱；磷肥恢復處理後，GUS 表現量則下降；其結果與果實的磷濃度相呼應（圖 28、圖 30 與圖 31）。然而，前人利用 CaMV35S promoter 的結果，指出農桿菌注射法後進行番茄果實 GUS 染色主要在果皮與胎座附近表現比較強，種子表現量比較弱 (Orzaez et al., 2006a)，此差異推測可能與 *TPSII* 表現的位置有所關係。


對於農作物來說，最終產量的高低是農民最在乎的事情。以菸草來說，營養生長期缺磷處理 4 天才會造成地上部鮮重的降低（圖 8a），但此系統在缺磷 1 天即可偵測到 GUS 的高度表現（圖 14）；而對於番茄來說，生殖生長期缺磷處理 20 天才會影響最終果實產量（圖 29a），而此系統在缺磷 10 天即可觀察到高的 GUS 活性（圖 31）。說明利用此系統可迅速反應植體遭遇缺磷逆境狀態，且經診斷後及時補充磷肥將不致影響作物最終的產量。



#### 四、農桿菌滲入法與農桿菌注射法之應用性

試驗期間曾經嘗試以番茄葉片進行農桿菌滲入法，可惜的是農桿菌滲入造成葉片壞疽，根據前人研究選用農桿菌 1D1249 品系可減緩此問題 (Wroblewski et al., 2005)。但即使使用帶有 35S promoter:GUS 載體的農桿菌 1D1249 品系與參考前人的方式進行農桿菌滲入法，結果仍顯示番茄葉片於農桿菌滲入後 2 天即出現壞疽現象，且完全無法觀察到報導基因的表現 (圖 25)，期間也測試過不同株齡、不同葉片部位、不同菌液濃度與不同緩衝液配方，也都無法觀察到報導基因的表現，推測可能是此農桿菌由提供者運送到實驗室過程中，遇到一些環境因素導致誘變，因而使此農桿菌不正常表現。經與提供農桿菌 1D1249 品系的實驗室人員討論，對方指出在進行農桿菌 1D1249 品系培養時常會因一些尚不清楚的環境因子導致其表現量出現差異 (Wroblewski et al., 2005)，因此推測也可能與 1D1249 農桿菌本身的表現量與穩定性有關。因其穩定性不佳而不適用此系統，也因此並未往下測試以此系統診斷磷含量充足與否的可行性。由於農桿菌 1D1249 品系無法作用，改以農桿菌 C58C1 品系帶有 35S promoter:GUS 載體進行測試，雖說不同菌液濃度與番茄品種影響 GUS 活性的表現，但因滲入後仍有壞疽現象產生及 GUS 的表現量不均勻且不穩定 (圖 26a 與圖 26b)，因此也不適合進一步應用於植體磷含量充足與否的檢測。

雖然農桿菌滲入法無法應用於番茄葉片磷濃度的檢測，但本試驗證實農桿菌注射法可順利表達於番茄果實，結合帶有 TPSII promoter:GUS 載體的農桿菌後便可成功用於監測番茄果實含磷狀態 (圖 30 與圖 31)。再者，也可利用上述菸草葉片農桿菌滲入法監測磷含量充足與否的系統，建立菸草缺磷逆境狀態與報導基因表現量相對照的資料庫，利用菸草不同程度的報導基因表現量反應土壤的含磷程度，因此便不需要建立許多不同作物的監測系統，只需於種植番茄或其他作物時，將

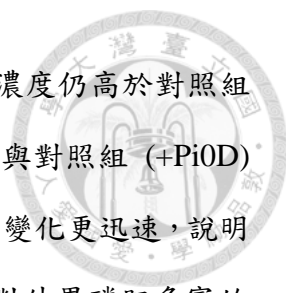


菸草種植於旁邊當做指標作物使用，由該指標作物報導基因的表現量與資料庫做對照，便可知該土壤磷的可利用率。但該資料庫的建立仍有賴未來測試不同磷濃度、不同缺磷逆境時間與報導基因表現量之相關性，且這樣的系統僅侷限於土壤磷濃度的檢驗。

另一方面，由於農桿菌滲入法也適用在茄子，說明茄子具有建立該診斷系統的潛力 (圖 32)。此外，前人研究提及除菸草外，萵苣與阿拉伯芥也適用農桿菌滲入法 (Wroblewski et al., 2005)，未來也值得測試其他農作物是否適用農桿菌滲入法以提高此系統的應用性。再者，若將 TPSII 啟動子取代成其他營養元素缺乏誘導表現的啟動子，此系統也將具有潛力應用於其他營養元素的診斷。

本系統以 GUS 作為報導基因，在檢測時需要使用相對較昂貴的受質 (substrate) 進行反應呈色，未來若能篩選其他報導基因，將可更加提高此系統的方便性。例如 GFP (Green fluorescent protein) 也是一個常用的報導基因，其具備敏感且不需要特定基質即可反應之特點，且只要表現量夠強，不需螢光，僅需在一般紫外光 (UV 光) 照射下透過濾鏡即可觀察。可惜的是，我們雖然曾經嘗試以帶有 35S promoter:GFP 載體的 C58C1 農桿菌品系進行農桿菌滲入法測試在菸草葉片的表現情形，但因其表現量相對較低且不穩定而沒有往下進一步做測試。再者，GFP 僅能供定性實驗之用，而無法進行定量實驗，這樣在實施精準田間施肥建議時將會遭遇困難。相對來說，若能找到植物自發性的誘導癥狀，將可降低成本與提高簡易度，例如前人研究利用 VIGS 系統使植物體出現白化現象 (Liu et al., 2002; Orzaez et al., 2006)，但須考量其外表徵狀反應的速度。隨著科技不斷的演進，相信未來可以有更好的報導基因做選擇。

有趣的是，將植體磷的濃度與 GUS 的活性高低做對照，雖說 GUS 的高低與磷的濃度成相關性，但發現磷肥恢復後 3 天 (Re3D) 菸草葉片磷濃度仍高於處理前的對照組 (+Pi0D)(圖 12)，但此時 GUS 的活性已經可以恢復到與對照組 (+Pi0D)



相當 (圖 14)；同樣的，番茄磷肥恢復後 5 天 (Re5D) 果實磷濃度仍高於對照組 (+Pi15D) (圖 28a 與圖 28b)，但此時 GUS 的活性已經可以恢復到與對照組 (+Pi0D) 相當 (圖 31)。由於磷肥恢復處理後 GUS 的反應比植體磷濃度的變化更迅速，說明此植體含磷狀態的診斷系統相較於直接測定植體磷濃度來說，對外界磷肥多寡的變化可能更具敏感度，推測植體磷濃度的多寡可能因為同時受到植株大小、生長速度所影響，因此反應略微緩慢些。



## 第七章、結論

本試驗結果顯示，營養生長期磷肥的缺乏降低菸草與番茄植體無機鹽濃度、地上部的鮮重、葉綠素螢光讀值與葉綠素含量，同時也增加根部對地上部之比值。番茄於生殖生長期磷肥的缺乏導致果實磷濃度降低，進而降低果實產量、可溶性固形物含量。短暫缺磷處理後恢復磷肥供應，無論是菸草或番茄皆可逐漸恢復其生長，說明適時施肥將可確保作物的產量與品質。

為了判定作物營養元素的供應是否充足，傳統都是利用土壤或植體進行植體營養元素分析，但檢測過程往往需要耗費許多時間、人力與金錢。本試驗利用農桿菌滲入法與農桿菌注射法，表達帶有 TPS11 promoter:GUS 載體的農桿菌於菸草葉片與番茄果實，建立迅速、準確、方便表達植體缺磷狀態的系統。此系統可以忠實反應植體缺磷狀態，未來將可結合不同啟動子應用於檢測其他營養元素含量。此外，茄子以及文獻中提及的萵苣都適用農桿菌滲入法，未來值得更進一步評估兩作物及其他農作物是否具有發展該系統的潛力。

透過這樣的系統，將可使植物表達自身磷素含量充足與否之狀態，將方便栽培者更有效率地進行適當的施肥策略以維持作物的生長，同時兼顧磷礦永續性之考量。此系統所用植物可說是一種指示植物，用以及時並準確告知栽培者是否需要施肥，雖說此植物也屬基因轉殖植物，但未來可在田間逢機選擇數株作物表達此系統即可，亦即僅作為指標使用，不具食用目的，也因此可以消除人們對基因轉殖作物的疑慮。地球資源有限，合理化施肥為增加肥料永續性的途徑之一，而此系統的發展將可更有效率的達此目標。

## 第八章、參考文獻

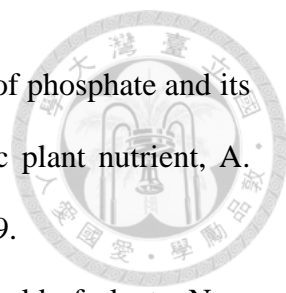


- 王毓華、林子凱、林照能. 2011. 農業環境變遷對葫蘆科蔬菜育種與栽培技術之挑戰. 因應氣候變遷作物育種及生產環境管理研討會專刊 153-161.
- 李志宏、劉宏斌、張福鎖. 2003. 應用葉綠素儀診斷冬小麥氮營養狀況的研究. 植物營養與肥料學報 9:401-405.
- 李剛華、丁豔鋒、薛利紅、王紹華. 2005. 利用葉綠素計(SPAD-502)診斷水稻氮素營養和推薦追肥的研究進展. 植物營養與肥料學報 11:412-416.
- 林俊義. 2005. 永續農業之理念與發展策略. 合理化施肥專刊 121:1-14.
- 林晉卿. 2007. 建立快速且大量的土壤與植體營養診斷技術: 第 1 年. 行政院農業委員會農業試驗所 98 年度科技計畫研究報告. 1-19.
- 林晉卿、黃瑞彰、林經偉、江汶錦、卓家榮. 2008. 推動雲嘉南地區作物合理化施肥. 臺南區農業專訊 66:1-3.
- 卓家榮. 2005. 柑桔土壤肥力檢測及營養診斷技術. 農業試驗所特刊第 121 號-合理化施肥專刊:177-191.
- 郭宏遠、何超然. 2010. 臺灣番茄市場及品種簡介. 苗栗區農業專訊 50:11-13.
- 郭孚耀. 1985. 簡易設施栽培對蔬菜生產之影響. 台中區農業改良場農業彙報 11:59-69.
- 張愛華、李蘭帝. 1989. 現行土壤、植體分析方法及效率之檢討. 農業試驗所特刊第 28 號-果園作物營養診斷應用研習會專輯: 63-71.
- 陳榮五、邱禮弘、陳鴻堂、賴文龍、蔡宜峰、白桂芳. 2008. 作物合理化施肥理念. 臺中區農業專訊 61:21-23.
- 陳鴻堂. 1998. 合理化施肥的意義與措施. 臺中區農業專訊 24:11-16.
- 黃三光、曾經洲. 2001. 基因改造作物的優勢與潛藏危機. 藥毒所專題報導 63:1-11.
- 黃瑞彰、黃山內、林晉卿、卓家榮、吳建銘、林經偉. 2007. 設施栽培土壤肥培管



- 理實例. 臺南區農業專訊 61:11-18.
- 黃瑞彰、林晉卿、孫文章. 2009. 設施栽培合理化施肥技術. 臺南區農業改良場技術專刊 138:1-20.
- 彭德昌. 2005. 植體診斷在作物合理化施肥之應用. 花蓮區農業專訊 53:20-22.
- 詹朝清、陳吉村. 2003. 設施蔬菜栽培施肥改進試驗. 花蓮區農業改良場研究彙報 21:71-79.
- 劉依昌、謝明憲、黃瑞彰、林經偉、林棟樑、王仕賢. 2009. 設施番茄養液土耕栽培技術. 臺南區農業專訊 67:7-9.
- 戴振洋、蔡宜峰、陳榮五. 2010. 食用番茄合理化施肥技術. 臺中區農業專訊 69:9-13.
- 蕭政宏、賴文龍. 2010. 甘藍合理化施肥技術. 台中區農業改良場特刊 100:99-102.
- 羅秋雄. 2002. 設施栽培土壤鹽分累積預防與改善. 桃園區農業專訊 41:10-11.
- Ames, B.N. 1966. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol.* 8:115-118.
- Aung, K., S.-I. Lin, C.-C. Wu, Y.-T. Huang, C.-I. Su, and T.-J. Chiou. 2006. *pho2*, a phosphate overaccumulator, is caused by a nonsense mutation in a microRNA399 target gene. *Plant Physiol.* 141:1000-1011.
- Bendahmane, A., M. Querci, K. Kanyuka, and D.C. Baulcombe. 2000. *Agrobacterium* transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the *Rx2* locus in potato. *Plant J.* 21:73-81.
- Biddinger, E.J., C. Liu, R.J. Joly, and K.G. Raghothama. 1998. Physiological and molecular responses of aeroponically grown tomato plants to phosphorus deficiency. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 123:330-333.
- Bialeski, R.L. 1973. Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24:225-252.



- 
- Bielecki, R.L. and I.B. Ferguson. 1983. Physiology and metabolism of phosphate and its compounds, In *Encyclopedia of plant physiology: Inorganic plant nutrient*, A. Lauchi and R.L. Bielecki, eds (Springer-Verlag) , pp. 422–429.
- Bonnet, E., Y. Van de Peer, and P. Rouzé. 2006. The small RNA world of plants. *New Phytol.* 171:451-468.
- Burleigh, S.H. and M.J. Harrison. 1997. A novel gene whose expression in *Medicago truncatula* roots is suppressed in response to colonization by vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi and to phosphate nutrition. *Plant Mol. Biol.* 34:199-208.
- Burleigh, S.M. and M.J. Harrison. 1998. Characterization of the Mt4 gene from *Medicago truncatula*. *Gene* 216:47-53.
- Campbell, L.C. 1994. Plant and soil analysis: an Australian perspective. *Communications in soil science and plant analysis.* 25:767-780.
- Chiou, T.-J., K. Aung, S.-I. Lin, C.-C. Wu, S.-F. Chiang, and C.-I. Su. 2006. Regulation of phosphate homeostasis by microRNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:412-421.
- Chiou, T.-J. and S.-I. Lin. 2011. Signaling network in sensing phosphate availability in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62:185-206.
- Chiter, A., J.M. Forbes, and G.E. Blair. 2000. DNA stability in plant tissues: implications for the possible transfer of genes from genetically modified food. *FEBS Letters* 481:164-168.
- Ciereszko, I., A. Szczygła, and E. Żebrowska. 2011. Phosphate deficiency affects acid phosphatase activity and growth of two wheat varieties. *J. Plant Nutr.* 34:815-829.
- Cordell, D., J.-O. Drangert, and S. White. 2009. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environ. Change* 19:292-305.

Duff, S.M., W.C. Plaxton, and D.D. Lefebvre. 1991. Phosphate-starvation response in plant cells: *de novo* synthesis and degradation of acid phosphatases. Proc. Natl. Acad. Sci. 88:9538-9542.

Duff, S.M.G., G. Sarath, and W.C. Plaxton. 1994. The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. Physiol. Plantarum 90:791-800.

Franco-Zorrilla, J.M., Valli, A., Todesco, M., Mateos, I., Puga, M.I., Rubio-Somoza, I., Leyva, A., Weigel, D., Garcia, J.A., and Paz-Ares, J. 2007. Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. Nature genetics 39:1033-7.

Fujita, K., M. Okada, K. Lei, J. Ito, K. Ohkura, J.J. Adu-Gyamfi, and P.K. Mohapatra. 2003. Effect of P-deficiency on photoassimilate partitioning and rhythmic changes in fruit and stem diameter of tomato (*Lycopersicon esculentum*) during fruit growth. J. Exp. Bot. 54:2519-28.

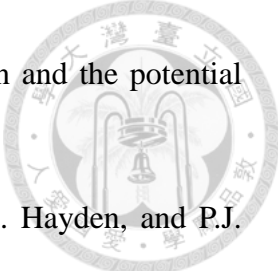
Furihata, T., M. Suzuki, and H. Sakurai. 1992. Kinetic characterization of two phosphate uptake systems with different affinities in suspension-cultured *Catharanthus roseus* protoplasts. Plant Cell Physiol. 33:1151-1157.

Gahoonia, T. and N. Nielsen. 1998. Direct evidence on participation of root hairs in phosphorus (<sup>32</sup>P) uptake from soil. Plant Soil 198:147-152.

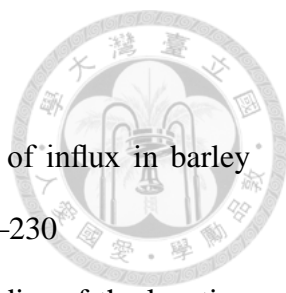
Giovannucci, E. 1999. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: Review of the epidemiologic literature. J. Natl. Cancer Inst. 91:317-331.


Guo, B., Y. Jin, C. Wussler, E.B. Blancaflor, C.M. Motes, and W.K. Versaw. 2008. Functional analysis of the *Arabidopsis* PHT4 family of intracellular phosphate transporters. New Phytol. 177:889-98.

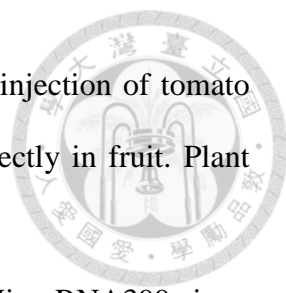
Hammond, J.P., M.J. Bennett, H.C. Bowen, M.R. Broadley, D.C. Eastwood, S.T. May, C. Rahn, R. Swarup, K.E. Woolaway, and P.J. White. 2003. Changes in gene

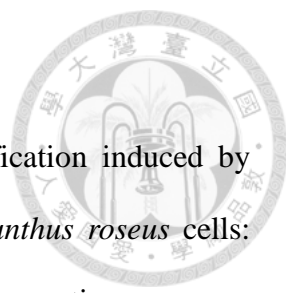
- 
- expression in Arabidopsis shoots during phosphate starvation and the potential for developing smart plants. *Plant Physiol.* 132:578-596.
- Hammond, J.P., M.R. Broadley, H.C. Bowen, W.P. Spracklen, R.M. Hayden, and P.J. White. 2011. Gene expression changes in phosphorus deficient Potato (*Solanum tuberosum* L.) leaves and the potential for diagnostic gene expression markers. *PLoS ONE* 6(9):e24606.
- Hammond, J.P., M.R. Broadley, and P.J. White. 2004. Genetic responses to phosphorus deficiency. *Ann. Bot.* 94:323-332.
- Hammond, J.P. and P.J. White. 2008. Diagnosing phosphorus deficiency in crop plants, In *The ecophysiology of plant phosphorus interactions*, J.P. Hammond and P.J. White eds (Springer), pp. 225-246.
- Heath, M. 2000. Hypersensitive response-related death, In *Programmed cell death in higher plants*, E. Lam, H. Fukuda and J. Greenberg eds (Springer Netherlands), pp. 77-90.
- Hoagland, D.R. and D.I. Arnon. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. Hoagland, D.R. and D.I. Arnon eds (California Agricultural Experiment Station), pp. 1-32.
- Hoch, W.A., E.L. Zeldin, and B.H. McCown. 2001. Physiological significance of anthocyanins during autumnal leaf senescence. *Tree Physiol.* 21:1-8.
- Hoffland, E., R. Van Den Boogaard, J. Nelemans, and G. Findenegg. 1992. Biosynthesis and root exudation of citric and malic acids in phosphate-starved rape plants. *New Phytol.* 122:675-80.
- Holford, C.R. 1997. Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. *Aust. J. Soil Res.* 35:227-239.
- Hopkins, W.G. and Hüner, N.P.A. 2006. Introduction to plant physiology, In *Roots, soils,*

- and nutrient uptake.( John Wily and Sons), pp. 39-60.
- Hou, X.L., Wu, P., Jiao, F.C., Jia, Q.J., Chen, H.M., Yu, J., Song, X.W., and Yi, K.K. 2005. Regulation of the expression of *OsIPS1* and *OsIPS2* in rice via systemic and local Pi signalling and hormones. *Plant Cell Environ.* 28:353-364.
- Huang, T.-K., C.-L. Han, S.-I. Lin, Y.-J. Chen, Y.-C. Tsai, Y.-R. Chen, J.-W. Chen, W.-Y. Lin, P.-M. Chen, T.-Y. Liu, Y.-S. Chen, C.-M. Sun, and T.-J. Chiou. 2013. Identification of downstream components of ubiquitin-conjugating enzyme PHOSPHATE2 by quantitative membrane proteomics in *Arabidopsis* Roots. *The Plant Cell.* 25:4044-4060.
- Jefferson RA, K.T., Bevan MW. 1987. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6:3901-3907.
- Johansen, L.K. and J.C. Carrington. 2001. Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA Silencing in the *Agrobacterium*-mediated transient expression system. *Plant Physiol.* 126:930-938.
- Johnson, J.F., C.P. Vance, and D.L. Allan. 1996. Phosphorus deficiency in *Lupinus albus* (altered lateral root development and enhanced expression of phosphoenolpyruvate carboxylase). *Plant Physiol.* 112:31-41.
- Jones-Rhoades, M.W., D.P. Bartel, and B. Bartel. 2006. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:19-53.
- Karandashov, V. and M. Bucher. 2005. Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. *Trends Plant Sci.* 10:22-9.
- Karthikeyan, A.S., D.K. Varadarajan, U.T. Mukatira, M.P. D'Urzo, B. Damsz, and K.G. Raghothama. 2002. Regulated expression of *Arabidopsis* phosphate transporters. *Plant Physiol.* 130:221-233.
- Lange, H., W. Shropshire, and H. Mohr. 1971. An Analysis of Phytochrome-mediated

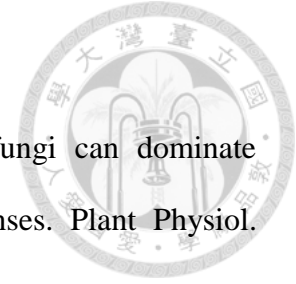
- 
- Anthocyanin Synthesis. *Plant Physiol.* 47:649-55.
- Lee, R.B. (1993). Control of net uptake of nutrients by regulation of influx in barley plants recovering from nutrient deficiency. *Ann. Bot.* 72: 223–230
- Lee, R.B. and R.G. Ratcliffe. 1993. Nuclear magnetic resonance studies of the location and function of plant nutrients in vivo, In *Plant nutrition from genetic engineering to field practice*. N. J. Barrow eds (Springer Netherlands), pp. 47-57.
- Lin, S.-I., S.-F. Chiang, W.-Y. Lin, J.-W. Chen, C.-Y. Tseng, P.-C. Wu, and T.-J. Chiou. 2008. Regulatory network of microRNA399 and *PHO2* by systemic signaling. *Plant Physiol.* 147:732-746.
- Lipton, D.S., R.W. Blanchar, and D.G. Blevins. 1987. Citrate, malate, and succinate concentration in exudates from P-sufficient and P-stressed *Medicago sativa* L. Seedlings. *Plant Physiol.* 85:315-7.
- Liu, C., U.S. Muchhal, and K.G. Raghothama. 1997. Differential expression of *TPSII*, a phosphate starvation-induced gene in tomato. *Plant Mol. Biol.* 33:867-74.
- Liu, L., Y. Zhang, S. Tang, Q. Zhao, Z. Zhang, H. Zhang, L. Dong, H. Guo, and Q. Xie. 2010. An efficient system to detect protein ubiquitination by agroinfiltration in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* 61:893-903.
- Liu, T.-Y., T.-K. Huang, C.-Y. Tseng, Y.-S. Lai, S.-I. Lin, W.-Y. Lin, J.-W. Chen, and T.-J. Chiou. 2012. PHO2-dependent degradation of PHO1 modulates phosphate homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 24:2168-2183.
- Liu, Y., M. Schiff, and S.P. Dinesh-Kumar. 2002. Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J.* 31:777-86.
- Lloyd, J.C., O.V. Zakhleniuk, and C.A. Raines. 2001. Identification of mutants in phosphorus metabolism. *Ann. Appl. Biol.* 138:111-115.

- 
- Lopez-Bucio, J., O.M. de La Vega, A. Guevara-Garcia, and L. Herrera-Estrella. 2000. Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate. *Nat. Biotechnol.* 18:450-3.
- Martin, A.C., del Pozo, J.C., Iglesias, J., Rubio, V., Solano, R., de La Pena, A., Leyva, A., and Paz-Ares, J. 2000. Influence of cytokinins on the expression of phosphate starvation responsive genes in *Arabidopsis*. *Plant J.* 24:559-67.
- Mallory, A.C. and H. Vaucheret. 2006. Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nat. Genet.* 38:31-6.
- Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London.
- Millner, P.D. and D.G. Kitt. 1992. The Beltsville method for soilless production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 2:9-15.
- Mimura, T. 1995. Homeostasis and transport of inorganic phosphate in plants. *Plant Cell Physiol.* 36:1-7.
- Mimura, T., K. Sakano, and T. Shimmen. 1996. Studies on the distribution, re-translocation and homeostasis of inorganic phosphate in barley leaves. *Plant Cell Environ.* 19:311-320.
- Mitsukawa, N., S. Okumura, Y. Shirano, S. Sato, T. Kato, S. Harashima, and D. Shibata. 1997. Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* high-affinity phosphate transporter gene in tobacco cultured cells enhances cell growth under phosphate-limited conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:7098-7102.
- Mudge, S.R., A.L. Rae, E. Diatloff, and F.W. Smith. 2002. Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in *Arabidopsis*. *Plant J.* 31:341-353.
- Oelkers, E.H. and E. Valsami-Jones. 2008. Phosphate mineral reactivity and global sustainability. *Elements* 4:83-87.

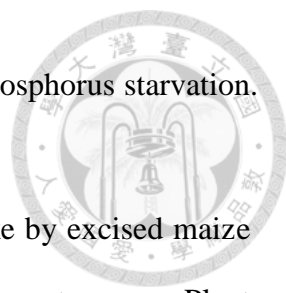
- 
- Orzaez, D., S. Mirabel, W.H. Wieland, and A. Granell. 2006. Agroinjection of tomato fruits. A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. *Plant Physiol.* 140:3-11.
- Pant, B.D., A. Buhtz, J. Kehr, and W.R. Scheible. 2008. MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. *Plant J.* 53:731-8.
- Plaxton, W.C. and Tran, H.T. 2011. Metabolic adaptations of phosphate-starved plants. *Plant Physiol.* 156:1006-1015.
- Poirier, Y., Thoma, S., Somerville, C., and Schiefelbein, J. 1991. Mutant of *Arabidopsis* deficient in xylem loading of phosphate. *Plant Physiol.* 97:1087-1093.
- Poirier, Y. and M. Bucher. 2002. Phosphate transport and homeostasis in *Arabidopsis*, In *The Arabidopsis book*, C.R. Somerville and E.M. Meyerowitz , eds (American Society of Plant Biologists) , pp.1110-1199.
- Rabino, I. and A.L. Mancinelli. 1986. Light, temperature, and anthocyanin production. *Plant Physiol.* 81:922-924.
- Raghothama, K. and A. Karthikeyan. 2005. Phosphate acquisition. *Plant Soil* 274:37-49.
- Raghothama, K.G. 1999. Phosphate acquisition. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:665-693.
- Rausch, C., P. Daram, S. Brunner, J. Jansa, M. Laloi, G. Leggewie, N. Amrhein, and M. Bucher. 2001. A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. *Nature* 414:462-470.
- Republic of Nauru climate change response. 1999. First national communication. (Under the united nations framework convention on climate change), pp. 1-70.
- Runge-Metzger, A. 1995. Closing the cycle: obstacles to efficient P management for improved global food security, In *Phosphorus in the Global Environment*, H.

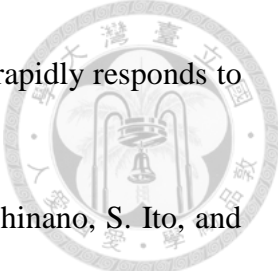
- 
- Tiessen eds ( John Wiley and Sons), pp. 54
- Sakano, K., Y. Yazaki, and T. Mimura. 1992. Cytoplasmic acidification induced by inorganic phosphate uptake in suspension cultured *Catharanthus roseus* cells: measurement with fluorescent pH indicator and P-nuclear magnetic resonance. *Plant Physiol.* 99:672-80.
- Samborski, S.M., Tremblay, N., and Fallon, E. 2009. Strategies to make use of plant sensors-based diagnostic information for nitrogen recommendations. *Agron. J.* 101:800-816.
- Sanchez-Calderon, L., J. Lopez-Bucio, A. Chacon-Lopez, A. Cruz-Ramirez, F. Nieto-Jacobo, J.G. Dubrovsky, and L. Herrera-Estrella. 2005. Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 46:174-84.
- Schöb, H., C. Kunz, and F. Meins Jr. 1997. Silencing of transgenes introduced into leaves by agroinfiltration: a simple, rapid method for investigating sequence requirements for gene silencing. *Mol. Gen. Genet.* 256:581-585.
- Schuler, T.H., G.M. Poppy, B.R. Kerry, and I. Denholm. 1999. Potential side effects of insect-resistant transgenic plants on arthropod natural enemies. *Trends Biotechnol.* 17:210-216.
- Shao, F., C. Golstein, J. Ade, M. Stoutemyer, J.E. Dixon, and R.W. Innes. 2003. Cleavage of *Arabidopsis* PBS1 by a bacterial type III effector. *Science* 301:1230-1233.
- Shen, J., L. Yuan, J. Zhang, H. Li, Z. Bai, X. Chen, W. Zhang, and F. Zhang. 2011. Phosphorus dynamics: from soil to plant. *Plant Physiol.* 156:997-1005.
- Shin, H., Shin, H.S., Chen, R., and Harrison, M.J. 2006. Loss of *At4* function impacts phosphate distribution between the roots and the shoots during phosphate





- starvation. *Plant J.* 45:712-26.
- Smith, S.E., F.A. Smith, and I. Jakobsen. 2003. Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiol.* 133:16-20.
- Spolaore, S., L. Trainotti, and G. Casadoro. 2001. A simple protocol for transient gene expression in ripe fleshy fruit mediated by *Agrobacterium*. *J. Exp. Bot.* 52:845-850.
- Steen, I. 1998. Phosphorus availability in the 21st century: management of a non-renewable resource. *Phosphorus Potassium.* 217:25-31.
- Story, E.N., R.E. Kopec, S.J. Schwartz, and G.K. Harris. 2010. An update on the health effects of tomato lycopene. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 1:189-210.
- Sunkar, R., V. Chinnusamy, J. Zhu, and J.-K. Zhu. 2007. Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends Plant Sci.* 12:301-309.
- Tadano, T. and H. Sakai. 1991. Secretion of acid phosphatase by the roots of several crop species under phosphorus-deficient conditions. *Soil Sci. Plant Nutr.* 37:129-140.
- Taiz, L. and E. Zeiger. 2010. Mineral nutrition, In *Plant physiology*, Arnold J. Bloom, eds (Sinauer Associates) , pp. 108-124.
- Tawaraya, K., M. Naito, and T. Wagatsuma. 2006. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by hyphal exudates of arbuscular mycorrhizal fungi. *J. Plant Nutr.* 29:657-665.
- Trull, M.C. and J. Deikman. 1998. An *Arabidopsis* mutant missing one acid phosphatase isoform. *Planta* 206:544-50.
- Trull, M.C., M.J. Gultinan, J.P. Lynch, and J. Deikman. 1997. The responses of

- 
- wild-type and ABA mutant *Arabidopsis thaliana* plants to phosphorus starvation. *Plant Cell Environ.* 20:85-92.
- Tu, S.-I., J.R. Cavanaugh, and R.T. Boswell. 1990. Phosphate uptake by excised maize root tips studied by *in Vivo*  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiol.* 93:778-784.
- Turner, B.L. and Leytem, A.B. 2004. Phosphorus compounds in sequential extracts of animal manures: chemical speciation and a novel fractionation procedure. *Environ. Sci. Technol.* 38:6101-8.
- Van der Hoorn, R.A.L., F. Laurent, R. Roth, and P.J.G.M. De Wit. 2000. Agroinfiltration is a versatile tool that facilitates comparative analyses of *Avr9/Cf-9*-induced and *Avr4/Cf-4*-induced necrosis. *Mol. Plant Microbe In.* 13:439-446.
- Vance, C.P., C. Uhde-Stone, and D.L. Allan. 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol.* 157:423-447.
- Vaquero, C., M. Sack, J. Chandler, J. Drossard, F. Schuster, M. Monecke, S. Schillberg, and R. Fischer. 1999. Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:11128-11133.
- Vaquero, C., M. Sack, F. Schuster, R. Finnern, J. Drossard, D. Schumann, A. Reimann, and R. Fischer. 2002. A carcinoembryonic antigen-specific diabody produced in tobacco. *FASEB J.* 16:408-10.
- Versaw, W.K. and M.J. Harrison. 2002. A chloroplast phosphate transporter, PHT2;1, influences allocation of phosphate within the plant and phosphate-starvation responses. *Plant Cell* 14:1751-66.
- Wasaki, J., R. Yonetani, T. Shinano, M. Kai and M. Osaki. 2003. Expression of the

- 
- OsP11* gene, cloned from rice roots using cDNA microarray, rapidly responds to phosphorus status. *New Phytol.* 158:239-248.
- Wasaki, J., H. Maruyama, M. Tanaka, T. Yamamura, H. Dateki, T. Shinano, S. Ito, and M. Osaki. 2009. Overexpression of the *LASAP2* gene for secretory acid phosphatase in white lupin improves the phosphorus uptake and growth of tobacco plants. *Soil Sci. Plant Nutr.* 55:107-113.
- Watt, M. and J.R. Evans. 1999. Proteoid roots. Physiology and development. *Plant Physiol.* 121:317-323.
- Williamson, L.C., S.P.C.P. Ribrioux, A.H. Fitter, and H.M.O. Leyser. 2001. Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126:875-882.
- Withers, P.J.A., A.C. Edwards, and R.H. Foy. 2001. Phosphorus cycling in UK agriculture and implications for phosphorus loss from soil. *Soil Use Manage.* 17:139-149.
- Wroblewski, T., A. Tomczak, and R. Micheltmore. 2005. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol. J.* 3:259-273.
- Yang, Y., R. Li, and M. Qi. 2000. In vivo analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. *Plant J.* 22:543-551.