

# 超量表达 GRF9 基因促进番茄生长并增强其对磷的吸收利用能力<sup>①</sup>

强晓敏<sup>1,2</sup>, 高南<sup>2</sup>, 冯晓宇<sup>2</sup>, 翟丙年<sup>1\*</sup>, 施卫明<sup>2\*</sup>

(1 西北农林科技大学资源环境学院, 陕西杨凌 712100 ;

2 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008)

**摘要:** 研究了编码拟南芥 14-3-3 蛋白的基因 grf9 导入番茄并超量表达后, 转 grf9 基因番茄在土壤不同供磷条件下的生长和对磷的利用特征。结果发现, 在 2 个供磷水平下, 转 grf9 基因番茄的地上部含磷量均显著高于野生型, 且分别提高 58.70% 和 56.68%, 磷素累积量较野生型增加 88%~90%; 同时转 grf9 基因番茄的地上部干重较野生型增加幅度约 20%。高供磷条件下种植转 grf9 基因番茄的土壤速效磷耗竭程度显著高于种植野生型番茄的土壤, 亏缺度增加 15.7%; 相应地, 高供磷条件下转基因番茄对土壤磷的农学利用率和生理利用率均有显著提高, 分别增强达 200% 和 165%。该结果为培育磷高效新品种提供了新思路 and 科学依据。

**关键词:** 番茄; 14-3-3; GRF9; 含磷量; 转基因

**中图分类号:** S641.2

磷在植物生长、发育、繁殖和提高对生存环境的适应性等过程中都起着举足轻重的作用<sup>[1-3]</sup>。在土壤中, 总磷含量较高, 但是超过 80% 的磷被吸附、固定或为有机态磷, 水溶性磷浓度一般在  $1 \sim 10 \mu\text{mol/L}$ <sup>[4-6]</sup>, 并且磷扩散速率是相当低的, 通常为  $10^{-12}$  到  $10^{-15} \text{ m}^2/\text{s}$ <sup>[7]</sup>。因此, 磷肥利用率相对较低。近年来, 我国设施农业快速发展, 给农民带来了显著的经济效益。但是设施农业在迅速发展的同时, 也出现了一系列问题, 如引起土壤酸化、次生盐渍化、养分不平衡等, 从而引起作物生长不良与农产品品质下降<sup>[8-10]</sup>。尽管设施农业土壤本身的养分含量很高, 但在这些土壤化学逆境条件下, 番茄等蔬菜的生长仍需投入大量的肥料<sup>[11-12]</sup>, 而长期过量施肥对土壤环境和周围水体造成了巨大的压力<sup>[13-14]</sup>, 陷入了不施肥则作物产量下降, 施肥则带来土壤质量退化和引起面源污染的两难境地<sup>[9-10, 15]</sup>。解决这一难题的关键之一是提高作物对磷的吸收利用。通过基因工程手段创造磷高效吸收利用的新品种是有效途径之一。

14-3-3 蛋白是一类高度保守的在所有真核生物中都表达的蛋白, 在一系列的生命过程中起着关键作用<sup>[16-19]</sup>。有试验发现, grf9 基因的表达和供磷水平存

在一定的正相关, 并且可能调节磷胁迫时的生理代谢<sup>[20]</sup>。Xu 等<sup>[21]</sup>报道, 番茄的 14-3-3 基因(TFT7)的过表达可以提高拟南芥的耐盐能力。但是 14-3-3 蛋白基因是否能够提高作物对磷的吸收利用, 尚不清楚。因此, 本研究采用农杆菌介导法将 grf9 基因导入番茄, 获得相应的转基因植株, 通过盆栽试验探讨 grf9 基因的超量表达在改善作物生长和提高对磷吸收利用中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

中蔬四号番茄 (*Solanum lycopersicum* L. cv Zhongshu No. 4)(WT), 购买自南京市金祥种业有限公司。构建受 35S 启动子控制的植物表达载体, 通过农杆菌介导的方法<sup>[22]</sup>, 将拟南芥的 grf9 基因导入 WT 番茄, 获得转 grf9 基因番茄(GRF9)。

选取饱满的 WT 和 GRF9 种子分别用自来水浸泡 15 min, 然后转入无菌操作台中, 用无菌水冲洗 4 次, 再用 2%(w/v)的次氯酸钠溶液表面灭菌 15 min, 接着用无菌水冲洗 8 次。然后将 GRF9 播种在含有卡那霉素(25 mg/L)的 MS 培养基上, WT 直接播种在不含卡

基金项目: 国家自然科学基金项目(41171234)和国家 973 项目(2007CB109303)资助。

\* 通讯作者 (bingnanz@sohu.com; wmsi@issas.ac.cn)

作者简介: 强晓敏(1986—), 女, 陕西宝鸡人, 硕士研究生, 主要从事植物营养方面的研究。E-mail: xiaomin8624@163.com

那霉素的 MS 培养基上<sup>[23]</sup>。转移至培养室生长约 10 天。光照培养室内条件为：温度(23±1)，光周期 16/8 h，光照强度 100 μmol/(m<sup>2</sup>·s)。培养至番茄的子叶完全展开。接着将主根长大于 3 cm 并带有侧根的番茄幼苗，转入修改的 1/5 JS(Johnson's solution)的营养液中在人工光照室培养<sup>[24]</sup>。人工光照室的培养条件为温度(25±1)，湿度为(65±1)%，光照强度为 60 μmol/(m<sup>2</sup>·s)。

## 1.2 试验处理

供试土壤采自江苏省宜兴市大浦露天菜园表层土(0~20 cm)，风干后过 20 目筛以供试验使用。土壤基本理化性质为 pH 6.27，碱解氮 40.2 mg/kg，速效磷(Olsen-P)含量 145 mg/kg，速效钾含量 61.2 mg/kg。试验中分别用 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 供磷、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 供钾、尿素供氮。纯 N 和 K<sub>2</sub>O 用量均为 150 mg/kg。为了保证番茄生长良好，以添加 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 150 mg/kg(CK)为对照，在此基础上再添加 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 150 mg/kg(+P)为加供磷处理，不同磷水平和两个试验材料进行完全组合，重复 3 次。土培试验在中国科学院南京土壤研究所的日光玻璃温室进行。选取在人工光照室培养 7 天的长势一致的番茄幼苗移到土培中。移栽成活后，通过称重法保证土壤水分的一致性。移栽后 45 天和 63 天分别测定植株株高和茎粗。移栽后 65 天收获，测定植物干重、含磷量和土壤速效磷(Olsen-P)含量。

## 1.3 试验方法

**1.3.1 转基因植株的分子检测** 转 grf9 基因番茄转入 1/5 JS 营养液培养 4 天后，采取每棵幼苗的一小片叶子使用 CTAB 法<sup>[25]</sup>提取番茄基因组 DNA，然后以 grf9 引物(F 端序列为 5'-AAGAGCGTGACA CTTTCG-3'；R 端序列为 5'-CAGCAGCAGTAGTAG CAATC-3')进行 PCR 扩增，扩增产物为 474 bp，扩增程序为：94 预变性 5 min；94 变性 30 s，55

退火 30 s，72 延伸 30 s，28 个循环；72 延伸 7 min。PCR 产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测。

**1.3.2 测定参数和测定方法** 植株全磷含量采用 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消煮，钒钼黄比色法测定。土壤碱解氮采用 1.0 mol/L NaOH 碱解扩散法测定；速效磷采用 0.5 mol/L NaHCO<sub>3</sub> 浸提，钼锑钒比色法测定；速效钾采用 1.0 mol/L 的乙酸铵(NH<sub>4</sub>OAc)浸提-火焰分光光度法测定<sup>[26]</sup>。株高由地上部开始测量到主茎的顶端截止；茎粗用游标卡尺在距离土壤 2 cm 左右测量。

**1.3.3 有关参数的计算方法** 植株磷浓度(mg/g)=植株吸磷量与整株干重之比<sup>[27]</sup>；磷肥农学利用率=(加供磷处理植株磷积累量-对照供磷植株磷积累量)/磷肥施用量×100%<sup>[28]</sup>；磷肥生理利用率(P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>·g/g)=(加供磷处理干重-对照供磷处理干重)/(加供磷处理植株总吸磷量-对照供磷处理植株总吸磷量)<sup>[29]</sup>。

## 1.4 数据统计分析

数据用 Excel software 和 SPSS 16.0 for Windows(SPSS Inc, USA)软件进行统计分析，LSD 法进行差异显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 转 grf9 基因番茄的分子检测

通过农杆菌介导的方法，将拟南芥的 grf9 基因导入 WT 番茄，获得 GRF9 番茄。图 1 显示的是移栽前转基因番茄 GRF9 的 PCR 扩增产物的凝胶电泳结果。从图 1 可以看到在约为 500 bp 附近有一条明亮条带，与目的基因片段扩增产物大小相符。出现这样的明亮条带的即为转基因番茄，没有条带的即为野生型番茄。分子鉴定结果表明，转基因番茄植株的基因组 DNA 含有 grf9 基因片段，而非转基因番茄植株没有该基因片段。



(M：标准分子量 DL2000；1~32：可能的转 grf9 基因番茄的不同植株；NC：野生型番茄)

图 1 转 grf9 基因番茄幼苗的 PCR 鉴定

Fig. 1 PCR analysis of putative grf9 over-expressing transgenic tomato seedlings

2.2 grf9 基因过量表达对番茄植株干重、吸磷量及叶茎分配的影响

从表 1 可知,在 2 个供磷水平下,GRF9 的叶吸磷量和地上部吸磷量显著高于 WT ;GRF9 的叶干重、地上部干重和茎吸磷量有高于 WT 的趋势。其中,在 CK 对照下,GRF9 的叶干重和地上部干重较 WT 高出 25.1% 和 20.1%。在+P 处理下,叶干重和地上部干重较 WT 高出 31.1% 和 19.7%。进一步比较发现,与 WT 相比,GRF9 番茄将干重较多的分配给叶,且 GRF9 在 CK 水平下的叶干重和地上部干重都仍然略高于 WT 在+P 水平下的叶干重和地上部干重。

2.3 grf9 基因过量表达对番茄株高和茎粗的影响

如图 2 所示,grf9 基因的过量表达对番茄的株高没有显著影响,但有略微降低株高的趋势。在对照供

磷条件下,转 grf9 基因番茄的茎粗显著大于野生型;在加供磷条件下,移栽后培养 63 天,转 grf9 基因番茄的茎粗大于野生型。说明 grf9 基因的过量表达有改善番茄株型的可能。

2.4 grf9 基因过量表达对番茄植株磷浓度和磷肥利用率的影响

由表 2 可看出,无论是在 CK 水平还是在+P 水平,GRF9 的磷浓度均显著高于 WT 的磷浓度,在 CK 时高出 58.7%,+P 水平时高出 56.7%。GRF9 的磷肥农学利用率和磷肥生理利用率均高于 WT 的,分别增加 200% 和 165%。

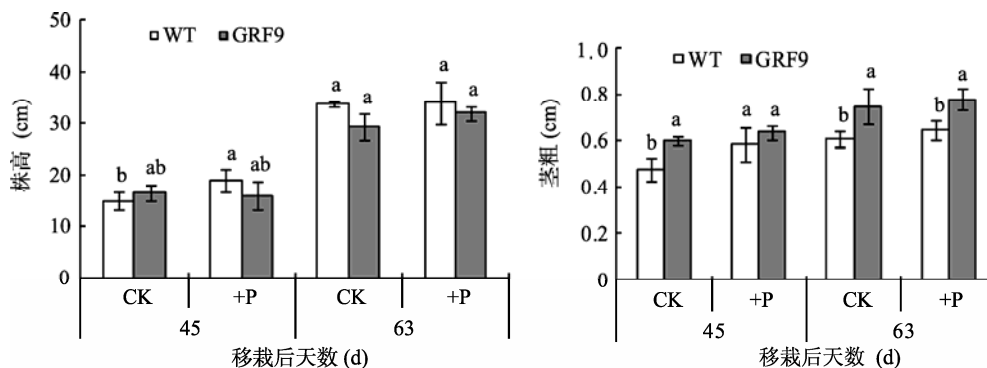
2.5 土壤速效磷(Olsen-P)含量的变化

图 3 显示了番茄收获后土壤速效磷(Olsen-P)的含量。从图中看出,无论是在 CK 水平还是在+P 水

表 1 番茄干重和吸磷量的比较  
Table 1 Comparison of dry weight and phosphorus uptake of tomato

植株部位	供磷水平	基因型	干重			吸磷量		
			数值(g)	增加量(%)	分配(%)	数值(mg/株)	增加量(%)	分配(%)
叶	CK	GRF9	5.022 ± 0.546 ab	25.1	70.8 ± 1.6 ab	25.7 ± 1.8 b	91.8	71.1 ± 3.2 a
		WT	4.016 ± 0.885 b	-	68.1 ± 1.4 b	13.4 ± 4.4 c	-	70.1 ± 2.2 a
	+P	GRF9	6.132 ± 0.504 a	31.1	74.3 ± 4.4 a	32.2 ± 3.2 a	102.5	73.9 ± 6.2 a
		WT	4.679 ± 0.479 b	-	68.0 ± 1.7 b	15.9 ± 1.8 c	-	69.1 ± 7.8 a
茎	CK	GRF9	2.072 ± 0.280 a	9.5	29.2 ± 1.6 ab	10.4 ± 1.5 ab	79.3	28.9 ± 3.2 a
		WT	1.892 ± 0.500 a	-	31.9 ± 1.4 a	5.8 ± 2.5 b	-	29.9 ± 2.2 a
	+P	GRF9	2.129 ± 0.469 a	0.0	25.7 ± 4.4 b	11.6 ± 4.1 a	69.4	26.1 ± 6.2 a
		WT	2.220 ± 0.390 a	-	32.0 ± 1.7 a	7.1 ± 1.8 ab	-	30.9 ± 7.8 a
地上部	CK	GRF9	7.094 ± 0.390 ab	20.1	-	36.1 ± 2.2 a	88.0	-
		WT	5.908 ± 1.377 b	-	-	19.2 ± 6.8 b	-	-
	+P	GRF9	8.261 ± 0.659 a	19.7	-	43.7 ± 5.8 a	90.0	-
		WT	6.899 ± 0.862 ab	-	-	23.0 ± 0.3 b	-	-

注: WT 和 GRF9 分别表示野生型和转 grf9 基因番茄;增加量=(GRF9-WT)/WT × 100%;干重分配=叶或茎干重/(地上部干重)×100%;吸磷量分配=叶或茎吸磷量/(地上部吸磷量)× 100%;数据小写字母不同表示不同处理间同一植株部位差异达到 P<0.05 显著水平。



(WT 和 GRF9 分别表示野生型和转 grf9 基因番茄; CK 和+P 分别表示供磷对照和加供磷处理;小写字母不同表示在同一测定时间时不同处理间差异达到 P<0.05 显著水平;下同)

图 2 grf9 基因过量表达对番茄株高和茎粗的影响

Fig. 2 Effects of over-expression of grf9 gene on plant height and stem width of tomato

表 2 番茄植株磷浓度和磷肥利用率的比较

Table 2 Comparison of P concentration and phosphorus use efficiency

磷水平	基因型	地上部磷浓度 (mg/g)	磷肥农学效率		磷肥生理利用率	
			数值(%)	增加量(%)	数值(P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , g/g)	增加量(%)
CK	GRF9	5.11 a	—	—	—	—
	WT	3.22 b	—	—	—	—
+P	GRF9	5.28 a	2.6	200	139.5	165
	WT	3.37 b	1.3	—	84.5	—

注：增加量=(GRF9-WT)/WT×100%；数据小写字母不同表示不同处理间差异达到 P<0.05 显著水平。

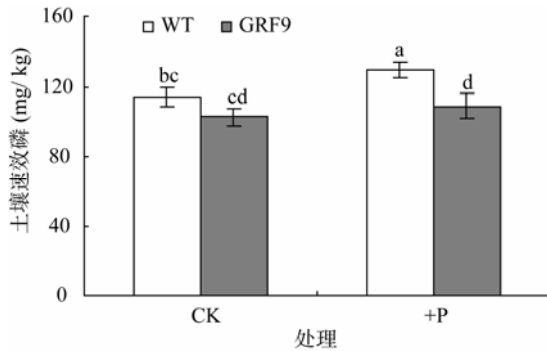


图 3 土壤速效磷(Olsen-P)含量的变化  
Fig. 3 Changes of soil available P (Olsen-P)

平, 种植过 GRF9 的土壤速效磷含量均低于种植过 WT 的土壤速效磷含量。在 CK 水平时, 种植过 GRF9 的土壤速效磷含量比种植过 WT 的土壤速效磷含量低 9.7%；在 +P 水平时, 种植过 GRF9 的土壤速效磷含量比种植过 WT 的土壤速效磷含量低 15.7%。该结果与转 grf9 基因番茄的植株吸磷量显著高于 WT 的现象相吻合。

### 3 讨论

近代生物技术和植物的遗传多样性为磷高效利用基因型的筛选及定向培育提供了可能, 现代分子生物学在基因组方面的研究使得目的基因在调节启动子的控制下向特定组织表达成为现实。因此, 通过克隆得到植物磷高效基因, 并导入植物体中, 促进磷的吸收和活化, 以使转基因植物获取较多的磷, 为磷高效植物基因型的遗传改良提供了有效途径。Park 等<sup>[30]</sup>将磷酸根转运子 *NiPT1* 基因插入水稻, 通过试验研究此转基因水稻与常规野生型相比增加了籽粒的千粒重。Mitsukawa 等<sup>[31]</sup>将拟南芥中的 *PHT1* 磷酸根转运子插入到烟草中, 发现可以增加烟草的细胞生长和提高其磷含量; Seo 等<sup>[32]</sup>的试验也证实了通过水稻中过量表达与磷酸根转运有关的基因 *OsPHT1* 基因, 无论是在施磷还是不施磷的条件下, 在水稻的分蘖期、抽穗期和收获期都可以增加体内的磷含量。

近年来发现的 microRNA399 在磷的高效累积中发挥着重要作用, 在水培高磷条件下, 可以显著提高转基因拟南芥、番茄的含磷量<sup>[23,33-35]</sup>。但作物生长(株高、茎粗、干重等)的改善情况不明显, 甚至还会降低作物的干重<sup>[23]</sup>。由于导入基因的产物大都是单一功能基因, 这些基因在植物体内过量累积会产生负面作用, 诱导作物产生反馈调节其生理过程, 从而限制了导入基因进一步发挥作用。本试验选用了具有多重功能的基因 *grf9* 来进行尝试。结果表明, *grf9* 的超量表达, 增加了番茄的茎粗, 但没有明显改变植株的株高(图 2)。从作物的农艺性状这个层面上看, 在作物的植株株高不变的情况下, 适当增加作物的茎粗可以使得植株不容易倒伏, 即增强了作物的抗倒伏能力, 这有利于增加农业生产的效益。张涛等<sup>[11]</sup>的研究表明, 在有效磷较高(Olsen-P 为 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 96.7 mg/kg)的土壤上, 为保证作物产量, 仍然要施用磷肥。梁林洲等<sup>[28]</sup>的研究也指出, 在 Olsen-P 为 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 96.7 mg/kg 的土壤中, 小白菜生长在添加 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 400 mg/kg 磷肥的土壤上比添加 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 200 mg/kg 磷肥的土壤上仍然有显著的增产效果。在本试验中, 为避免不施加外源磷而导致植物长势差, 以添加 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 150 mg/kg 作为对照(CK)。研究结果表明, 超量表达 *grf9* 基因的番茄 GRF9 与 WT 相比, 在对照供磷(CK)条件下, 植株地上部的干重明显增加, 且与加供磷处理(+P)WT 的地上部的干重没有差异, 即在相同供磷水平条件下, 种植超量表达 *grf9* 基因的番茄可以减少磷肥的施用而不减产。超量表达 *grf9* 的番茄产量的提高, 可能与 *grf9* 基因改善了番茄的磷营养有关。这与 Cao 等人<sup>[20]</sup>指出的植物体内的 14-3-3 蛋白可以响应低磷的胁迫相一致。除响应磷胁迫外, 14-3-3 蛋白还可调控 SSIII(淀粉合成过程中的重要酶), 激活质膜 H<sup>+</sup>-ATPase 酶, 参与 ABA 和胁迫信号调节等<sup>[20,36-37]</sup>。因此, 超量表达 *grf9* 的番茄也有可能是 *grf9* 基因首先改善了植物的生长, 进而改善了番茄的磷营养。由于盆栽试验时间较短, 磷肥利用率比大田中的磷肥利用率偏低, 这也与梁林

洲等人<sup>[28]</sup>的研究结果相似。但是,超量表达 grf9 基因的番茄的磷肥农学效率和磷肥生理利用率均明显高于野生型。这些初步结果说明,grf9 基因有通过基因工程手段培育出磷高效型作物的潜力。

除此之外,农田土壤的大量累积对水体环境的威胁也与日俱增<sup>[14,38]</sup>。杨林章等<sup>[12]</sup>的田间试验表明,太湖地区稻麦轮作系统农田养分的排放净负荷磷为 1.75 kg/hm<sup>2</sup>,其中稻季 1.16 kg/hm<sup>2</sup>,麦季 0.58 kg/hm<sup>2</sup>。磷的径流流失量占当年施肥量的 1.93%。曹志洪等<sup>[39]</sup>在太湖流域 5 年的研究发现,单位面积上径流迁移的土壤磷素是桑园 > 菜园 > 大田麦季 > 大田稻季;稻麦轮作田每年向水体排放的磷量为 0.84 kg/hm<sup>2</sup>,占当年磷肥用量的 2.5%,而菜园地 5 个月土壤磷素流失量就到 0.6 kg/hm<sup>2</sup>。张维理等<sup>[40]</sup>的研究指出太湖流域农田面源磷对水体磷的贡献率高达 19%。我们的试验结果表明,超量表达 grf9 基因的番茄地上部的含磷量和吸磷量均显著增加,且种植过 GRF9 番茄的土壤速效磷含量比种植过 WT 的速效磷含量低。即在相同供磷水平下,GRF9 番茄可以带走土壤中更多的有效磷。同时该结果也与超量表达 grf9 基因的番茄的吸磷量和磷肥利用率高于 WT 的结果相呼应。因此,我们初步结果表明,grf9 基因可以提高作物磷肥利用率,对减轻面源污染有积极的意义。当然,由于盆栽试验的时间较短,grf9 的超量表达对番茄生长和对土壤磷素利用的影响,还需要进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Abelson PH. A potential phosphate crisis[J]. Science, 1999, 283: 2 015-2 020
- [2] Ticconi CA, Abel S. Short on phosphate: Plant surveillance and countermeasures[J]. Trends in Plant Science, 2004, 9: 548-555
- [3] Theodorou ME, Plaxton WC. Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation[J]. Plant Physiologist, 1993, 101: 339-344
- [4] Raghothama KG. Phosphate acquisition[J]. Annual Review of Plant Physiologist, 1999, 50: 665-693
- [5] Poirer Y, Bucher M. Phosphate transport and homeostasis in Arabidopsis[A] // Somerville CR, Meyerowitz EM. The Arabidopsis Book[C]. Rockville: American Society of Plant Biologists, 2002
- [6] Vance CP, Uhde-stone C, Allan DL. Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource[J]. New Phytologist, 2003, 157: 423-447
- [7] Schachtman DP, Reid RJ, Ayling SM. Phosphorus uptake by plants: From soil to cell[J]. Plant Physiologist, 1998, 116: 447-453
- [8] 徐仁扣, Coventry DR. 某些农业措施对土壤酸化的影响[J]. 农业环境保护, 2002, 21(5): 385-388
- [9] 金赞芳, 王飞儿, 陈英旭, 小仓纪雄. 城市地下水硝酸盐污染及其成因分析[J]. 土壤学报, 2004, 41(2): 252-257
- [10] 袁晓燕, 余志敏, 施卫明. 大清河小流域城郊面源污染现状与对策研究[J]. 环境科学与技术, 2010, 33(9): 19-30
- [11] 张涛, 闵矩, 施卫明, 迟凤琴. 不同磷钾配比对大棚蔬菜养分吸收、产量及品质的影响[J]. 江苏农业学报, 2008, 24(5): 668-673
- [12] 杨林章, 王建德, 夏立忠. 太湖地区农业面源污染特征及控制途径[J]. 中国水利, 2004, 20: 28-30
- [13] Gahoonia TS, Nielsen NE. Barley genotypes with long root hairs sustain high grain yields in low-P field[J]. Plant and Soil, 2004, 262: 55-62
- [14] Shi WM, Yao J, Yan F. Vegetable cultivation under greenhouse condition leads to rapid accumulation of nutrients, acidification and salinity of soils and groundwater contamination in south-eastern China[J]. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 2009, 83: 73-84
- [15] 余海英, 李廷轩, 张锡洲. 温室栽培系统的养分平衡及土壤养分变化特征[J]. 中国农业科学, 2010, 43(3): 514-522
- [16] Comparot S, Lingiah G, Martin T. Function and specificity of 14-3-3 proteins in the regulation of carbohydrate and nitrogen metabolism[J]. Journal of Experimental Botany, 2003, 54: 595-604
- [17] Chen F, Li Q, Sun LX, He ZH. The rice 14-3-3 gene family and its involvement in responses to biotic and abiotic stress[J]. DNA Research, 2006, 13: 53-63
- [18] Hammond JP, White PJ. Sucrose transport in the phloem: Integrating root responses to phosphorus starvation[J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(1): 93-109
- [19] Chevalier D, Morris E, Walker J. 14-3-3 and FHA domains mediate phosphoprotein interactions[J]. Annual Review of Plant Biology, 2009, 60: 67-91
- [20] Cao AQ, Jain A, Baldwin JC, Raghothama KG. Phosphate differentially regulates 14-3-3 family members and GRF9 plays a role in Pi-starvation induced responses[J]. Planta, 2007, 226: 1 219-1 230
- [21] Xu WF, Shi WM. Mechanisms of salt tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* constitutively overexpressing the tomato 14-3-3 protein TFT7[J]. Plant and Soil, 2007, 301: 17-28
- [22] Gao N, Shen WS, Cao Y, Su YH, Shi WM. An improved bacterial preparation protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2009, 98(3): 321-330
- [23] Gao N, Su YH, Min J, Shen WS, Shi WM. Transgenic tomato overexpressing ath-miR399d has enhanced phos-

- phorus uptake efficiency through increased acid phosphatase and proton secretion as well as phosphate transporters[J]. *Plant and Soil*, 2010, 334 (12): 123–136
- [24] Johnson CM, Stout PR, Broyer TC, Carlton AB. Comparative chlorine requirements of different plant species[J]. *Plant and Soil*, 1957, 8(4): 337–353
- [25] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2002
- [26] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000
- [27] 阳显斌, 张锡洲, 李廷轩, 宋潇, 胡宏松. 磷素籽粒生产效率不同的小麦品种磷素吸收利用差异[J]. *植物营养与肥料学报*, 2011, 17(3): 525–531
- [28] 梁林洲, 沈仁芳, 伊晓云, 陈志长, 赵学强. 高磷土壤施用磷肥对小白菜和苋菜产量及肥料利用率的影响[J]. *江苏农业学报*, 2010, 26(1): 70–74
- [29] 张福锁, 王激清, 张卫峰, 崔振岭, 马文奇, 陈新平, 江荣风. 中国主要粮食作物肥料利用率现状与提高途径[J]. *土壤学报*, 2008, 45(5): 915–924
- [30] Park MR, Baek S, Benildo G, Reyes D, Yun SJ. Overexpression of a high-affinity phosphate transporter gene from tobacco (*NtPT1*) enhances phosphate uptake and accumulation in transgenic rice plants[J]. *Plant and soil*, 2007, 292: 259–269
- [31] Mitsukawa N, Okumura S, Shirano Y, Sato S, Kato T, Harshima S, Shibata D. Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* high-affinity phosphate transporter gene in tobacco cultured cells enhances cell growth under phosphate-limited conditions[J]. *Plant Biology*, 1997, 94: 7 098–7 102
- [32] Seo HM, Jung Y, Song S, Kim Y, Kwon T, Kim DH, Yi YB, Yi G, Nam MH, Nam J. Increased expression of *OsPT1*, a high-affinity phosphate transporter, enhances phosphate acquisition in rice[J]. *Biotechnology Letters*, 2008, 30: 1 833–1 838
- [33] Fujii H, Chiou TJ, Lin SI, Aung K, Zhu JK. A micro RNA involved in phosphate-starvation response in arabidopsis[J]. *Current Biology*, 2005, 15: 2 038–2 042
- [34] Chiou TJ, Aung K, Lin SI, Wu CC, Chiang SF, Su CL. Regulation of phosphate homeostasis by micro RNA in arabidopsis[J]. *The Plant Cell*, 2006, 18: 412–421
- [35] Doerner P. Phosphate starvation signaling: A threesome controls systemic Pi homeostasis[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2008, 11: 536–540
- [36] Zorb C, Schmitt S, Muhling KH. Proteomic changes in maize roots after short-term adjustment to saline growth conditions[J]. *Proteomics*, 2010, 10: 4 441–4 449
- [37] Speranza A, Crosti P, Malerba M, Stocchi O, Scoccianti V. The environmental endocrine disruptor, bisphenol A, affects germination, elicits stress response and alters steroid hormone production in kiwifruit pollen[J]. *Plant Biology*, 2011, 13: 209–217
- [38] 史春余, 张夫道, 张俊清, 何绪生, 张骏. 长期施肥条件下设施蔬菜土壤养分变化研究[J]. *植物营养与肥料学报*, 2003, 9(4): 437–441
- [39] 曹志洪, 林先贵, 杨林章, 胡正义, 董元华, 尹睿. 论“稻田圈”在保护城乡生态环境中的功能 I. 稻田土壤磷素径流迁移流失的特征[J]. *土壤学报*, 2005, 42(5): 799–804
- [40] 张维理, 徐爱国, 冀宏杰, Kolbe H. 中国农业面源污染形势估计及控制对策. 中国农业面源污染控制中存在问题分析[J]. *中国农业科学*, 2004, 37(7): 1 026–1 033

## GRF9 Over-expressing Improves Tomato Growth and Phosphorus Use Efficiency

QIANG Xiao-min<sup>1,2</sup>, GAO Nan<sup>2</sup>, FENG Xiao-yu<sup>2</sup>, ZHAI Bing-nian<sup>1\*</sup>, SHI Wei-ming<sup>2\*</sup>

(1 College of Resource and Environment, Northwest A& F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture (Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences), Nanjing 210008, China)

**Abstract:** By generating and examining transgenic tomato over-expressing *grf9* grown in a vegetable soil condition, this study aimed to investigate the effects of *grf9* from arabidopsis on tomato growth and phosphorus (P) use efficiency. Results showed that in these two P-level conditions shoot P concentration increased significantly, improved by 58.70% and 56.68% respectively, P uptake increased by 88%–90%; while in the transgenic tomato, shoot dry weight increased by about 20%. Soil available P decreased significantly by about 15.7% planted the transgenic tomato in the additional P soil condition; accordingly over-expression of *grf9* gene could improve P agronomic and physiological efficiencies in the additional P soil condition, and improved by 200% and 165% respectively. The results provided new idea and scientific basis for P use efficiency genetic modification.

**Key words:** Tomato, 14-3-3 protein, GRF9, Phosphorus concentration, Transgenic