

## بررسی عملکرد ژن *AtPAP18* رمزکننده یک اسید فسفاتاز ارغوانی از

### گیاه آرابیدوپسیس تالیانا

#### Functional analysis of *AtPAP18* gene encoding a purple acid phosphatase in *Arabidopsis thaliana*

کتایون زمانی<sup>۱</sup>، محمد صادق ثابت<sup>۲</sup>، تهمنه لهراسبی<sup>۳</sup>، محمدعلی ملبوبی<sup>\*۳</sup>

۱- استادیار، گروه پژوهشی مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان

تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۲- استادیار، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استادیار، استاد، پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران،

ایران

Zamani K<sup>1</sup>, Sadegh Sabet M<sup>2</sup>, Lohrasebi T<sup>3</sup>, Malboobi MA<sup>\*3</sup>

1- Assistant Professor, Department of genetic engineering and biosafety, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education, and Extension Organization, Karaj, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Department of Plant Genetics and Breeding, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Professor, Department of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: malboobi@nigeb.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۷/۳/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۵/۱۵)

### چکیده

یکی از سه عنصر اصلی پر نیاز برای رشد گیاه فسفر است که به صورت فسفات از محلول خاک جذب شده و نقش مهمی در رشد و نمو گیاهان برعهده دارد. به منظور سازگاری با کمبود فسفات در محیط، گیاهان مجموعه‌ای از پاسخ‌های سازشی ساختاری و فیزیولوژیکی را نشان می‌دهند که ترشح اسید فسفاتازها از آن جمله است. در این پژوهش توالی کامل cDNA ژن *AtPAP18* از گیاه آرابیدوپسیس تالیانا جدا و برای ایجاد گیاهان بیش بیان در ناقل بیانی گیاهی pARM1 همسانه‌سازی شد. همچنین لاین T-DNA فاقد بیان هموزیگوس برای ژن مذکور شناسایی شد. نتایج این پژوهش نشان داد که بیش بیان ژن *AtPAP18* در گیاهان آرابیدوپسیس موجب افزایش معنی‌دار محتوای فسفات و به دنبال آن افزایش توده زیستی در گیاهان آرابیدوپسیس در هر دو شرایط +P و -P شد. جوانه‌زنی سریع‌تر، کاهش معنی‌دار وزن خشک و بیش‌ترین افزایش نسبت وزنی ریشه به اندام هوایی در شرایط کمبود فسفات از شاخصه‌های واضح گیاهان فاقد بیان این ژن نسبت به گیاهان طبیعی و بیش بیان ژن *AtPAP18* بود. این نتایج نشان می‌دهد که بیش بیان ژن *AtPAP18* می‌تواند راهکاری مؤثر جهت استفاده بیش‌تر از فسفات نامحلول خاک و کاهش مصرف کودهای شیمیایی مرتبط باشد.

### واژه‌های کلیدی

فسفات

اسید فسفاتاز ارغوانی

آرابیدوپسیس تالیانا

*AtPAP18*

گیاهان بیش بیان

فسفر یکی از ۱۷ عنصر مورد نیاز برای رشد گیاهان است که نقش مهمی را در کلیه فرایندهای متابولیسمی گیاه شامل فتوسنتز، تنفس، ساخت اسیدهای نوکلئیک، تولید انرژی، ساخت غشاها و پایدار نمودن آن‌ها، فعال‌سازی و غیر فعال نمودن آنزیم‌ها، واکنش‌های احیا، پیام‌رسانی، متابولیسم کربوهیدرات‌ها و تثبیت نیتروژن بر عهده دارد. غلظت فسفر مورد نیاز درون سلولی برای رشد مطلوب گیاه بین ۲۰-۵ میلی‌مولار است که با غلظت فسفر محلول در خاک که بین ۱۰-۱ میکرومولار است فاصله زیادی دارد (Shen et al. 2011; Vance et al. 2003). شکل قابل جذب فسفر برای گیاهان  $H_2PO_4^-$  و  $HPO_4^{2-}$  است. مطالعات نشان می‌دهند که بالاترین میزان جذب فسفر بین pH ۵ و ۶ اتفاق می‌افتد، شرایطی که شکل غالب فسفر  $H_2PO_4^-$  است و نشان می‌دهد، فسفات به شکل تک‌ظرفیتی جذب می‌شود (Shen et al. 1998; Schachtman et al. 2011).

گیاه برای حفظ هموستازی فسفات درون سلولی در شرایط کمبود فسفات در محیط، با افزایش جذب فسفات از محیط خارجی و همچنین تبدیل و به حرکت درآوردن فسفات درونی سطح فسفات سلولی را تنظیم می‌نماید. بدین منظور، گیاهان مجموعه‌ای از پاسخ‌های سازشی همانند القاء سامانه‌های ناقل فسفات با میل ترکیبی بالا جهت جذب فسفات بیش‌تر، ترشح موادی هم‌چون اسیدفسفاتازها و اسیدهای کربوکسیلیک از ریشه به‌منظور رهاسازی فسفر نامحلول از خاک، تغییر شکل و ساختار ریشه با کاهش طول ریشه اصلی و افزایش طول و تراکم ریشه‌های جانبی و ریشه‌های مویی و ایجاد روابط همزیستی با قارچ‌های میکوریز را درپیش می‌گیرند (Lin et al. 2009). از مهم‌ترین ساز و کار گیاهان در حفظ هموستازی فسفات درون سلولی، تنظیم بیان و ترشح اسید فسفاتازها می‌باشد. ژنوم گیاهان مجموعه بزرگی از اسید فسفاتازهای درون سلولی و ترشحاتی را رمز می‌کنند که طیف وسیعی از فسفات‌های مونواستر و دی‌استر را هیدرولیز می‌کنند (Cox et al. 2007; Plaxton and Tran 2011) اسید فسفاتازهای ارغوانی بزرگ‌ترین گروه اسید فسفاتازها هستند. دلیل نام‌گذاری این خانواده، رنگ صورتی/ بنفش این آنزیم‌ها در محلول آبی آن‌هاست که نتیجه‌ای از انتقال‌گذاری بار، بین یون آهن

کروموفوریک و اسید آمینه تیروزین است (Vincent et al. 1990). برای مثال ژنوم گیاهانی مانند آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*)، برنج (*Oryza sativa*)، سویا (*Glycin max*) و ذرت (*Zea mays*) هر یک به‌ترتیب دارای ۲۹، ۲۶، ۳۵ و ۳۳ ژن اسید فسفاتاز ارغوانی هستند (Li et al. 2002, 2012; Zhang et al. 2015; Gonzalez-Munoz et al. 2011). مقایسه توالی‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی این آنزیم‌ها حاکی از وجود پنج موتیف و هفت اسید آمینه حفاظت شده (DXG/GDXXY/GNH(D/E)/VXXH/GHXH) در این خانواده است که برای قرارگیری اتم فلز ضروری است (حروف پررنگ، نواحی اتصال فلز است)، (Schenk et al. 1999). اسید فسفاتازهای ارغوانی گیاهی به دو گروه با وزن مولکولی بالا<sup>۱</sup> (HMW) و وزن مولکولی پایین<sup>۲</sup> (LMW) نیز تقسیم‌بندی شده‌اند. گروه اول با PAP‌های مایکوباکتری‌ها و گروه دوم با PAP‌های سیانوباکتری و پستانداران شباهت دارند. بسیاری از اسید فسفاتازهای ارغوانی گیاهی گلیکولیزه شده و در مسیرهای ترشحاتی هدایت می‌شوند (Schenk et al. 2000). وجود تعداد بسیار زیاد و قابل توجه اسید فسفاتازها در گیاهان حاکی از اهمیت بالای این خانواده آنزیمی در حفظ و تامین فسفات سلولی است. تاکنون عملکرد ۱۰ ژن از ۲۹ ژن اسید فسفاتاز ارغوانی گیاه آرابیدوپسیس تالیانا بررسی شده‌است (Del Pozo et al. 1999; Zhu et al. 2005; Tran et al. 2010; Zhang et al. 2008; Kuang et al. 2009; Wang et al. 2011, 2012; Robinson et al. 2012 a,b; Sun et al. 2012; Del Vecchio et al. 2014; Zamani et al. 2013; Ravichandran et al. 2014) و بیش‌بین برخی از آن‌ها در سیستم‌های همولوگ و هترولوگ با افزایش جذب فسفات و افزایش توده زیستی گیاه همراه بوده است (Sabet et al. 2018; Zamani et al. 2012; Zhang et al. 2012; Sun et al. 2012; Wang et al. 2009; Zhang et al. 2014; Wang et al. 2011). این رو، ایجاد گیاهانی با توانایی و قابلیت بیشتر در رهاسازی و جذب فسفات از طریق همسانه‌سازی و بیش بیان ژن‌های رمزکننده اسیدفسفاتاز، راهکاری مؤثر برای کاهش مصرف کودهای شیمیایی فسفات و افزایش بهره‌وری از قابلیت زیستی این

<sup>1</sup> High Molecular Weight

<sup>2</sup> Low Molecular Weight

بذر لاین T-DNA منتخب به نام SALK\_001898 که در آن بیان ژن رمزکننده *AtPAP18* متوقف شده بود از SALK Institute Genomic Analysis Laboratory (<http://signal.salk.edu/>) تهیه شد. بررسی ساختار ریشه گیاهان آرابیدوپسیس در پنج میلی‌متر انتهایی آن با کشت این گیاهان بر روی محیط کشت MS جامد به مدت ۵ روز و انتقال این گیاهان به محیط کشت MS مایع دارای ۵ mM فسفات (+P) یا فاقد آن (-P) به مدت پنج روز دیگر انجام شد. انتهای ریشه این گیاهان با استفاده از میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی ۳/۲X بررسی و عکسبرداری شدند.

#### استخراج RNA کل و ساخت cDNA

RNA کل با استفاده از کیت RNX شرکت سیناژن استخراج شد. به منظور حذف آلودگی‌های حاصل از DNA ژنومی نمونه‌های RNA با DNase I فاقد RNase A (Roche, Basel, Switzerland) طبق دستورالعمل شرکت تیمار شدند. برای ساخت cDNA، ۲ µg از RNA با ۱ µl از ۱۰۰ nM آغازگر الیگو dT (۲۰-۱۲)، ۱ µl از مخلوط ۱۰ mM dNTP مخلوط و با آب استریل به حجم ۱۰ µl رسانیده شد. مخلوط فوق به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۷۰°C گرم شد و سپس بر روی یخ قرار گرفت. مخلوط دیگری دارای ۲ µl بافر آنزیم، ۱ M DTT، ۵۰ mM  $MgCl_2$ ، ۴۰ واحد RNAase inhibitor شرکت Roche و ۵۰ واحد از آنزیم SuperscriptII RT شرکت فرمتاس به آن اضافه شد. مخلوط فوق در دمای ۴۲°C به مدت ۱/۵ ساعت قرار داده شد و برای واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. از ژن آلفا توپولین به عنوان کنترل درونی و برای همسان‌سازی غلظت cDNA در واکنش‌های PCR استفاده شد (Malboobi et al. 1997).

طول کامل cDNA رمزکننده ژن *AtPAP18* به طول ۱۳۵۲ bp (*locus No. At3g20500; Map Viewer at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/>*) توسط PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن P<sub>18</sub>F<sub>2</sub>, R (جدول ۱) که به ترتیب جایگاه‌های آنزیمی *Bam*HI و *Sac*I را در انتهای ۵' و ۳' توالی تکثیری ایجاد می‌کنند و آنزیم Expand High Fidelity شرکت Roche تکثیر شد. برنامه PCR شامل یک چرخه ۲ دقیقه‌ای در دمای ۹۴°C و ۳۰ چرخه سه مرحله‌ای، ۱

آنزیم‌ها برای دستیابی به فسفر نامحلول خاک یا حتی کودهای فسفاته است.

هدف از این پژوهش شناسایی راهکارهایی برای مهندسی ارقام زراعی در جهت کاهش مصرف بی‌رویه کودهای شیمیایی مورد استفاده در کشاورزی و جلوگیری از آلودگی محیط زیست است. استفاده مؤثر از فسفات آلی خاک نیاز به فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز دارد. در بین فسفاتازها گروه اسید فسفاتازهای ارغوانی با داشتن طیف گسترده سوبسترای از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند و شناسایی ویژگی‌ها و عملکرد این آنزیم‌ها در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا و در مراحل بعد، بیان آن‌ها در گیاهان زراعی می‌تواند منجر به افزایش عملکرد آن‌ها و همچنین کاهش مصرف کودهای شیمیایی شود.

در این راستا توالی کامل cDNA ژن *PAP18* از گیاه آرابیدوپسیس تالیانا جدا و برای ایجاد گیاهان بیش بیان در ناقل p<sub>AR</sub>M1 همسانه‌سازی شد. از سوی دیگر لاین‌های جهش یافته ناک اوت هموزیگوس فاقد بیان برای ژن مذکور شناسایی شد. برخی از شاخص‌های فنوتیپی و فیزیولوژیکی در گیاهان بیش بیان، فاقد بیان و گیاهان شاهد (wild type) مورد مقایسه و بررسی قرار گرفت.

#### مواد و روش‌ها

در کلیه آزمایش‌ها از گیاه آرابیدوپسیس تالیانا اکوتیپ کلمبیا (col-0) استفاده شد. شرایط استریل بذر و کشت گیاهچه‌ها توسط (Lohrasebi et al. 2007) توصیف شده‌است. به‌منظور هم‌زمان نمودن جوانه‌زنی بذرها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه قرار گرفتند. گیاهچه‌های ۱۱ روزه رشدیافته بر روی محیط کشت جامد MS به مدت سه روز به ۱۵ ml محیط کشت مایع MS نصف غلظت با یک درصد ساکارز منتقل شدند. سپس گیاهچه‌های ۱۴ روزه به محیط‌های مایع دارای فسفات ۵ mM (+P) و بدون فسفات (-P) به مدت ۱۴ روز دیگر انتقال یافتند. در شرایط بدون فسفات  $KH_2PO_4$  با KCl غلظت ۵ mM جایگزین شد.

حضور T-DNA توسط PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *Pro18F* و *sp18R* و یک آغازگر در مرز چپ T-DNA، *LBb1* (جدول ۱) ارزیابی شدند. برنامه PCR شامل یک چرخه ۴ دقیقه‌ای در دمای ۹۴°C و ۳۰ چرخه سه مرحله‌ای، ۱ دقیقه ۹۴°C، ۱ دقیقه ۶۲°C و ۱ دقیقه ۷۲°C و یک چرخه ۵ دقیقه‌ای در دمای ۷۲°C بوده است. صحت توالی تکثیر شده توسط PCR با توالی‌یابی تایید شد. درج T-DNA در ژن *PAP18* با آغازگرهای اختصاصی ژن *uni18F, R* و هم‌چنین عدم بیان آن با RT-PCR مطابق با روش ذکر شده در بالا تایید شد.

گیاهان تراریخته بیش‌بیان، جهش یافته فاقد بیان و وحشی رشد یافته در شرایط +P و -P با کمک نیتروژن مایع به طور کامل پودر و در محلول استخراج (10 mM sodium acetate, pH 5.6) کاملاً مخلوط شد. این مخلوط یکنواخت دوبار هر بار به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ ×g سانتریفوژ و فاز رویی برای سنجش فعالیت آنزیمی استفاده شد. همه مراحل استخراج بر روی یخ انجام شد. فعالیت آنزیمی در دمای ۳۷°C به مدت ۳۰ دقیقه و در بافر mM ۱۰۰ سدیم استات (pH 5.6) حاوی mM ۵ p-nitrophenyl phosphate (pNPP) اندازه‌گیری شد.

برای محاسبه فعالیت آنزیمی منحنی استاندارد برای هر سری از سنجش‌ها با استفاده از غلظت‌های مشخص فسفات رسم و ضریب رگرسیون محاسبه شد. هر واحد فعالیت آنزیمی با رها سازی یک μmol از Pi در دقیقه در دمای ۲۵°C تعریف می‌شود (Bozzo et al. 2002). غلظت پروتئین کل بر اساس روش برادفورد (۱۹۷۶) و با استفاده از سرم آلبومین گاوی (BSA) به‌عنوان استاندارد تعیین شد. فعالیت اسید فسفاتازی به‌عنوان واحد بر میلی‌گرم (unit mg<sup>-1</sup>) پروتئین‌های محلول بیان شد.

دقیقه در دمای ۹۴°C، ۱ دقیقه در دمای ۵۱/۵°C و ۱ دقیقه ۷۲°C و یک چرخه ۲۰ دقیقه‌ای در دمای ۷۲°C بوده است. محصول PCR در ناقل pTZ57R/T (Fermentas, Lithuania) همسانه‌سازی و صحت آن با توالی‌یابی تایید شد. این قطعه سپس پایین دست پروموتور CaMV35S در ناقل بیان گیاهی pARM1 قرار گرفت (Zamani et al. 2010) سازه حاصل با روش ذوب و انجماد به آگروباکتریوم سویه GV3101 منتقل شد (Holsters et al. 1978).

آگروباکتریوم *Agrobacterium tumefaciens* دارای سازه حاوی ژن *AtPAP18* برای تراریختی گیاهان آرابیدوپسیس با روش vacuum infiltration به‌کار رفت (Bechtold et al. 1993). گیاهان تراریخته روی محیط کشت MS جامد دارای ۵۰ mgL<sup>-1</sup> آنتی‌بیوتیک کانامایسین انتخاب و پس از خودگشتی، گیاهان هموزیگوس نسل چهارم از آن‌ها به‌دست آمد. وجود تراژن با آغازگرهای اختصاصی *uni18F, R* و بیان آن با استفاده از آغازگرهای *sp18R* و *QHIsF* تایید شد (جدول ۱). میزان بیان *AtPAP18* در گیاهان بیش بیان هموزیگوس، حاصل مجموع بیان تراژن و ژن درونی با روش RT-PCR نیمه کمی و آغازگرهای اختصاصی *uni18F, R* تعیین شد. شدت باندها در تصاویر ژل‌های رنگ شده با اتیدیوم بروماید با استفاده از نرم‌افزار (Phoretix TotalLab(International, New Castle, UK) تعیین شد و با مقایسه با میزان بیان ژن آلفا توبولین به‌عنوان کنترل درونی، استاندارد و اندازه‌گیری شد.

شناسایی گیاهان جهش یافته فاقد بیان *AtPAP18* دانه‌های گیاهان جهش یافته فاقد بیان *AtPAP18* SALK\_001898، در خاک در شرایط گلخانه با دمای ۲۵°C و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی کاشته شد. این گیاهان برای

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده برای همسانه‌سازی، بررسی بیان ژن *PAP18* و بررسی گیاهان با ژنوتیپ‌های مختلف مربوط به آن

نام آغازگر	توالی آغازگر	جایگاه آنزیمی
PAP18F	5'-GAA TCT GAA AGG ATC CGC TCG CAG AGA TG-3'	BamHI
PAP18R	5'-CTC ACT TTA TGG GAG CTC ATA TAA TTA AGG TT-3'	SacI
Uni18F	5'-GAA GAA TCC TCG AGT AAA GCT CGC AGA GAT GGA AA-3'	EcoRI
Uni18F	5'-GCT AAG CTT GAA TTC CCC CAA ACG TGT CCC ACT TA-3'	EcoRI
Pro18F	5'-GTC ATC ATC CCG ATC CTC TAC AGC TAC GCT TC-3'	
Sp18R	5'-ACC TGC TCG GAT CCA GAA GAG GAC TTT TG-3'	BamHI
LBb1	5'-GCG TGG ACC GCT TGC TGC AAC T-3'	
QHIsF	5'-CAC CAT CAC CAT CAC CAT-3'	
TubF	5'-GCT TTC AAC ACC TTC TTC AG-3'	
TubR	5'-GAA TAG TTC GCT TGG TCT T-3'	

استاندارد مربوط به هر میانگین با استفاده از نرم افزار SPSS V16 انجام پذیرفت. از آزمون دانکن جهت مقایسه میانگین داده‌ها در سطح احتمال  $P\text{-value} < 0.05$  استفاده شد.

### نتایج

بر اساس مطالعات، ژن *AtPAP18* (AT3G20500) در گروه Ib-2 در بین ۲۹ *AtPAP* طبقه‌بندی شده است (Li et al. 2002). این ژن دارای یک قالب خواندنی باز (orf) با ۱۳۱۴ جفت‌باز است که پروتئینی با ۴۳۷ اسید آمینه را رمز می‌کند (Schenk et al. 1999; Li et al. 2002). این پروتئین دارای یک دامین متالوفسفاتاز بین اسید آمینه‌های ۱۴۱-۳۳۲ و دارای دامین انتهای آمینی اسید فسفاتازهای ارغوانی بین اسید آمینه‌های ۱۳۴-۴۷ است. *AtPAP18* دارای یک توالی راهنما در انتهای آمینی بوده و پروتئینی با محل استقرار دوگانه واکوئلی و ترشحاتی است (Zamani et al. 2012). توالی ژنومی *AtPAP18* دارای ۵ اگزون است. توالی cDNA این ژن پایین دست پروموتور CaMV-35S همسانه‌سازی شد و با روش vacuum infiltration به گیاهان آرآبیدوپسیس منتقل شد (Bechtold et al. 1993). بیش از ده رخداد مقاوم به کانامایسین انتخاب و به خاک منتقل شدند و حضور تراژن با استفاده از PCR و آغازگرهای اختصاصی ژن *AtPAP18* تایید شد. این آغازگرها در دو طرف اینترون طراحی شدند تا ژن درونی و تراژن قابل تمایز باشند (شکل ۱). افزایش بیان تراژن در گیاهان هموزیگوس نسل چهارم با استفاده از روش RT-PCR و جفت آغازگری تایید شد که فقط تراژن را تکثیر می‌نماید (شکل ۲، ردیف میانی). از بین آن‌ها، رخداد شماره ۲ (OE2) با بیش‌ترین بیان حاصل از مجموع بیان ژن درونی و تراژن برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شد (شکل ۲، ردیف بالا).

تعیین ویژگی‌های گیاه جهش یافته فاقد بیان ژن *AtPAP18* با جستجو در خزانه بذر انستیتو SALK لاین SALK-001898 انتخاب شد. در این لاین جهش یافته ورود T-DNA ناحیه پروموتری این ژن را گسیخته کرده است. بررسی ژنوتیپی این لاین با استفاده از DNA ژنومی و روش PCR و سه آغازگر، یکی در پروموتور ژن، Pro18F و دیگری در داخل ژن به نام sp18R و سومی یک آغازگر اختصاصی مربوط به ناحیه نزدیک به مرز چپ

سنجش مقدار فسفات آزاد و فسفات کل برای اندازه‌گیری میزان فسفات آزاد درون سلولی در گیاه، از روش ایمز (۱۹۶۶) و با تغییراتی در آن استفاده شد. بدین منظور ۱۰۰ mg بافت گیاهی منجمد در ازت مایع پودر و ۱۰ دقیقه در  $12000 \times g$  سانتریفوژ شد. ۵۰  $\mu\text{l}$  از روشناور با ۲۵۰  $\mu\text{l}$  آب رقیق و با ۷۰۰  $\mu\text{l}$  از معرف سنجش فسفات (یک حجم اسید آسکوربیک ۱۰ درصد و شش حجم آمونیوم هپتامولیدات ۰/۴۲ درصد در اسید سولفوریک یک نرمال) مخلوط شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای  $45^\circ\text{C}$  نگه‌داری شد. میزان فسفات محلول نمونه‌ها در طول موج ۸۲۰ nm با استفاده از یک منحنی رگرسیون و با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{Value} \times \text{dilution factor}/1000 = \text{micromoles of soluble Pi}/\text{mg fresh weight}$$

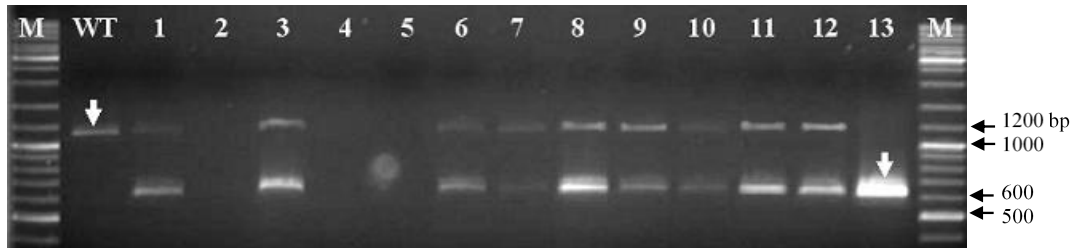
به منظور اندازه‌گیری مقدار فسفات کل، ۵۰ mg از بافت تازه در محلول ۱۰ درصد نیترات منیزیم در اتانول ۹۵٪ مخلوط و حجم نهایی به ۱/۵ ml رسانده شد. لوله حاوی بافت بر روی حرارت مستقیم شعله و با تکان‌های مداوم قرار گرفت تا بافت درون آن سوخته و در نهایت به خاکستر تبدیل شد. حرارت شعله تا ناپدید شدن کامل کف‌های قهوه‌ای رنگ ادامه یافت. پس از سرد شدن لوله آزمایش، ۵۰۰  $\mu\text{l}$  اسید پرکلریک ( $\text{HClO}_4$ ) غلیظ به آن افزوده و در آن بسته شد. به منظور هیدرولیز کلیه پیروفسفات‌های موجود در خاکستر، لوله‌های حاوی بافت به مدت ۶۰ دقیقه در آب در حال جوش قرار داده شدند. این مخلوط با آب دو بار تقطیر به حجم نهایی ۵ ml رسانده شد. ۳۰۰  $\mu\text{l}$  از این محلول همانند آنچه در بالا ذکر شد برای ارزیابی مقدار فسفات به کار رفت (Wang et al. 2011).

اندازه‌گیری وزن تر و خشک در گیاهان رشد یافته در شرایط +P و -P با سه تکرار آزمایشی و هر تکرار شامل ۸ گیاه انجام شد. اندام هوایی و ریشه گیاهان از هم جدا و پس از اندازه‌گیری وزن تر، بافت‌های گیاهی به مدت ۷۲ ساعت در دمای  $70^\circ\text{C}$  قرار گرفتند و سپس وزن خشک آن‌ها اندازه‌گیری شد.

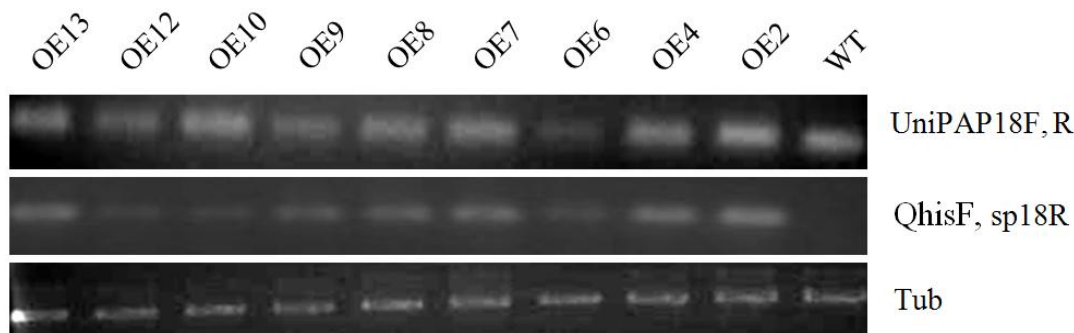
برای انجام بررسی‌های آماری ابتدا آزمون نرمال بودن داده‌ها و یکنواختی واریانس‌ها انجام و تجزیه واریانس داده‌ها بر اساس فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و حداقل سه تکرار انجام گرفت. بررسی‌های آماری از جمله محاسبه میانگین‌ها، خطای

با استفاده از روش RT-PCR نیمه کمی عدم بیان ژن *AtPAP18* در ریشه و اندام هوایی گیاهان جهش یافته تایید شد (شکل ۴).

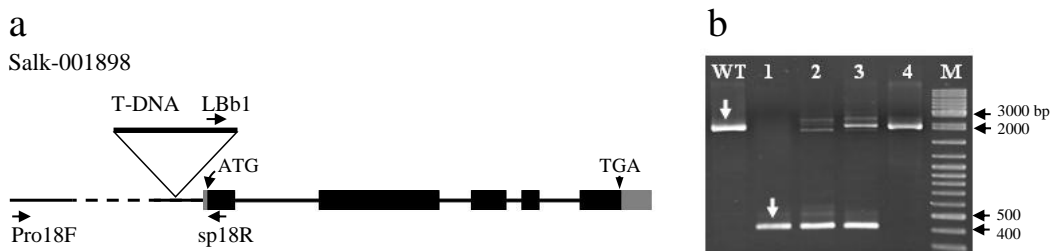
T-DNA به نام LBb1 انجام شد (شکل ۳a) که در ۱۳ گیاه نخست مورد بررسی ۳ گیاه هموزیگوس شناسایی شد (شکل ۳b).



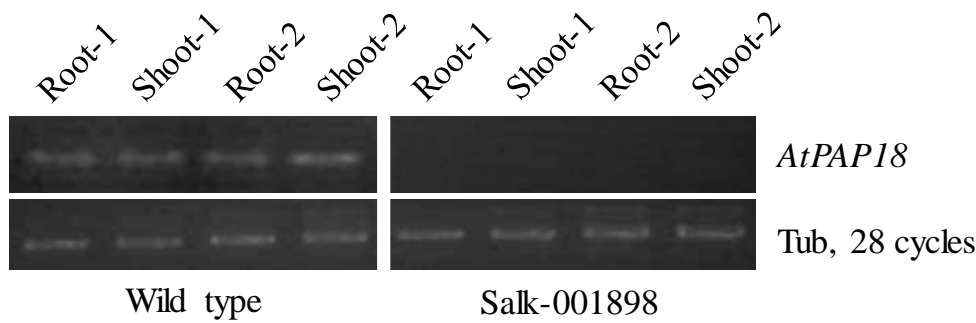
شکل ۱- آزمون PCR گیاهان تراریخت آرابیدوپسیس (۱۲-۱) نمونه‌های تراریخت شده، (WT) گیاه غیرتراریخته یا شاهد، (۱۳) پلاسمید T/A-PAP18، مارکر وزنی ۱۰۰ جفت‌بازی. پیکان‌ها نشانگر باندهای مربوط به ژن درونی و تراژن هستند.



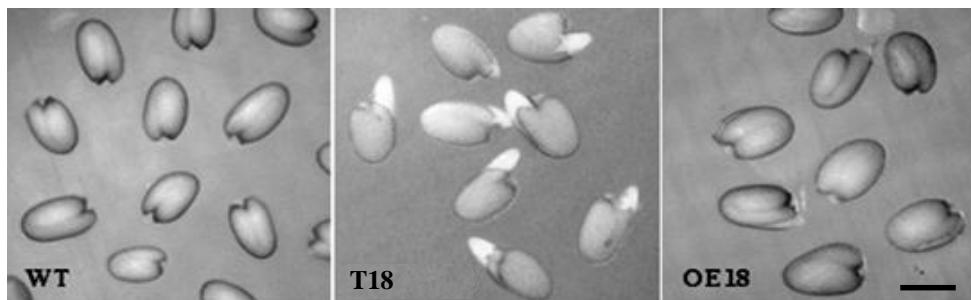
شکل ۲- تایید بیان ژن انتقال یافته *AtPAP18* در گیاهان سبز مقاوم به کانامایسین و شناسایی گیاهان بیش بیان هموزیگوس آرابیدوپسیس که بیشترین بیان را دارد. ردیف بالا مجموع بیان تراژن و ژن درونی *AtPAP18*، ردیف وسط بیان تراژن *AtPAP18* و ردیف پایین بیان ژن آلفا توبولین با بیان همیشگی به عنوان شاهد درونی را نشان می‌دهند. اسامی آغازگرهای مورد استفاده برای تشخیص میزان بیان از طریق RT-PCR در سمت راست هر ردیف آمده است.



شکل ۳- ویژگی‌های لاین جهش یافته SALK\_001898: a ساختار ژن *AtPAP18* در این لاین که یک T-DNA در ناحیه پروموتوری خود دارد. مستطیل‌های سیاه و طوسی آگزونها (به ترتیب مناطق رمزکننده و غیر رمزکننده) و خطوط باریک ایترونها را نشان می‌دهند. اندازه T-DNA در مقیاس صحیح نیست. موقعیت آغازگرهای (Pro18F, Sp18R, LBb1) مورد استفاده برای بررسی ژنوتیپی با روش PCR با پیکان نشان داده شده است. b: بررسی ژنوتیپی لاین SALK\_001898 با استفاده از DNA ژنومی. (WT) باند مربوط به ژن سالم در یک گیاه WT (۱) گیاه هموزیگوس لاین SALK\_001898 (۲ و ۳) گیاه هتروزیگوس (۴) گیاه WT

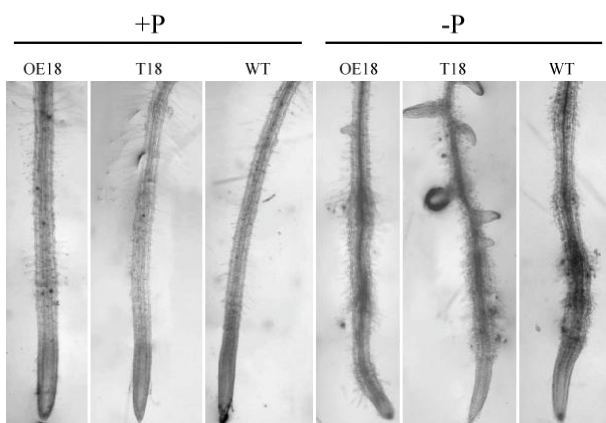


شکل ۴- آزمون RT-PCR برای تایید عدم بیان ژن *AtPAP18* در لاین SALK-001898 در مقایسه با گیاه شاهد (wild type). این آزمون با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (Uni18F, R) در ۲ تکرار در ریشه و اندام هوایی گیاهان مزبور صورت گرفت. از  $\alpha$ -Tubulin به عنوان شاهد درونی استفاده شده است.



شکل ۵- اثر میزان بیان *AtPAP18* بر روی جوانه زنی بذر آرابیدوپسیس. مشاهدات در پنج پلیت با نتایج مشابه برای هر لاین انجام شد. سمت چپ گیاه شاهد (WT)، وسط گیاه جهش یافته فاقد بیان *AtPAP18* (T18) و سمت راست گیاه بیش بیان (OE18). Bar = 1mm.

هوایی آن‌ها با گیاهان شاهد مقایسه شد. نتایج نشان داد که بیش بیان ژن *AtPAP18* باعث افزایش معنی دار وزن تر و خشک گیاهان بیش بیان در مقایسه با گیاه شاهد در هر دو شرایط +P و -P شده است. لیکن گیاهان جهش یافته فاقد بیان *AtPAP18* رفتار متفاوتی را در شرایط تغذیه ای ذکر شده از خود نشان دادند.



شکل ۶- مقایسه ویژگی های ساختار ریشه در شرایط +P و -P. بررسی ها بر روی پنج میلی متر انتهایی ریشه گیاهان آرابیدوپسیس انجام شد. از هر لاین حداقل پنج گیاه بررسی شد. نام گذاری گیاهان مانند شکل ۵ است.

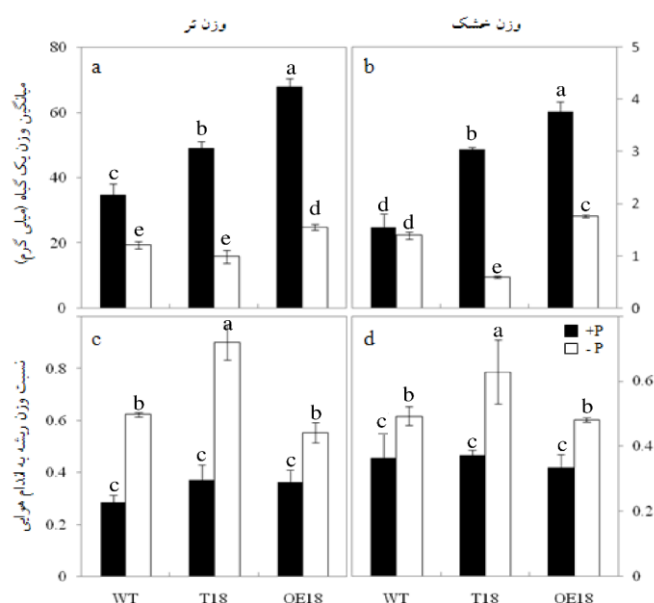
بررسی آثار فنوتیپی بیش بیانی و عدم بیان *AtPAP18* در گیاه آرابیدوپسیس گیاهان هموزیگوس آرابیدوپسیس فاقد بیان (T18) یا بیش بیان (OE18) در نسل T4 در مقایسه با گیاهان شاهد (WT) تفاوت فنوتیپی بارزی را نشان ندادند، به جز اینکه علی رغم سرمادهی برای هم زمان نمودن جوانه زنی، در گیاهان فاقد بیان، جوانه زنی سریع تر آغاز شده و ریشه چه زودتر پدیدار شده بود (شکل ۵). بررسی ویژگی های ساختاری ۵ mM ریشه نیز نشان داد که در شرایط +P تارهای کشنده گیاهان فاقد بیان در مقایسه با گیاهان شاهد و بیش بیان بلندتر هستند. در شرایط -P نیز گیاهان فاقد بیان دارای چندین ریشه فرعی در منطقه تارهای کشنده بودند. این پدیده با شدت بسیار کمتر و وجود تنها یک ریشه فرعی در این منطقه در گیاهان بیش بیان مشاهده شد. در گیاهان شاهد در این ناحیه، ریشه فرعی مشاهده نشد (شکل ۶). به منظور بررسی میزان بیان ژن *AtPAP18* بر رشد گیاه آرابیدوپسیس، گیاهان بیش بیان و فاقد بیان *AtPAP18* در شرایط +P و -P رشد یافتند و وزن تر و خشک مجموع ریشه و اندام

فسفات در محیط کشت استفاده شد. در اطراف ریشه‌های گیاهان بیش‌بیا، هاله‌ای شفاف که نشانه حل شدن و مصرف فسفات است ایجاد شده بود. این منطقه شفاف در سایر گیاهان دیده نشد. اندازه‌گیری وزن تر این گیاهان نیز افزایش وزن تر در گیاهان بیش بیان را نشان داد (داده‌ها نشان داده نشده است). همچنین بررسی ریشه‌ها حاکی از کاهش معنی‌دار طول ریشه اصلی و تعداد ریشه‌های فرعی در شرایط فقدان فسفات (-P) در کلیه ژنوتیپ‌ها نسبت به محیط واجد فسفات است و بین ژنوتیپ‌های مختلف از این نظر تفاوت معنی‌دار وجود ندارد (شکل ۸a, b).

با بررسی گل‌آذین در گیاهان گل‌دانی در شرایط -P تفاوتی در اندازه و ظاهر گل‌آذین بین گیاهان مختلف مشاهده نشد. در شرایط +P بیش‌ترین ارتفاع گل‌آذین مربوط به گیاهان فاقد بیان ژن *AtPAP18* و کمترین آن مربوط به گیاهان شاهد است. اختلاف ارتفاع گل‌آذین بین گیاهان فاقد بیان و بیش بیان از نظر آماری معنی‌دار نبود ولی تفاوت بین گیاهان فاقد بیان و شاهد معنی‌دار بود (شکل ۸c).

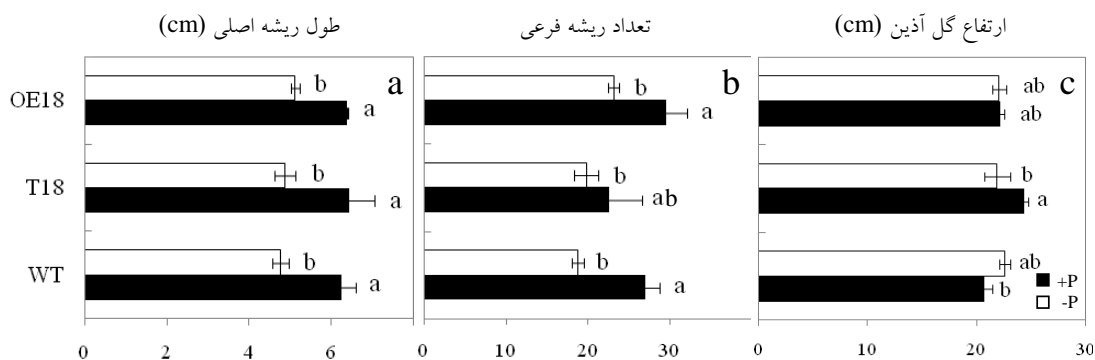
اثر بیش‌بیان و عدم بیان ژن *AtPAP18* بر فعالیت فسفاتازی و محتوای فسفات گیاه پژوهش‌ها نشان می‌دهند که فعالیت فسفاتازی در تنش کمبود فسفات به شدت افزایش می‌یابد (Malboobi et al 2012). در تحقیق حاضر بیش‌ترین میزان فعالیت فسفاتازی در شرایط +P با بیش از دو برابر افزایش در گیاهان بیش بیان مشاهده شد. در این شرایط اختلاف معنی‌داری بین گیاهان فاقد بیان *AtPAP18* و شاهد مشاهده نشد.

لیکن در شرایط -P کاهش معنی‌داری در فعالیت فسفاتازی گیاهان فاقد بیان *AtPAP18* نسبت به گیاهان شاهد مشاهده شد که برخلاف انتظار اختلاف بین گیاهان شاهد با گیاهان بیش‌بیان معنی‌دار نبود (شکل ۹a). بیش‌ترین مقدار فسفات کل و فسفات آزاد درون سلولی در گیاهان بیش‌بیان و کم‌ترین آن در گیاهان طبیعی مشاهده شد. در گیاهان جهش‌یافته فاقد بیان *AtPAP18* علی‌رغم عدم بیان ژن مذکور، میزان فسفات کل و آزاد درون سلولی بیش‌تر از گیاهان شاهد بود (شکل ۹b, c).

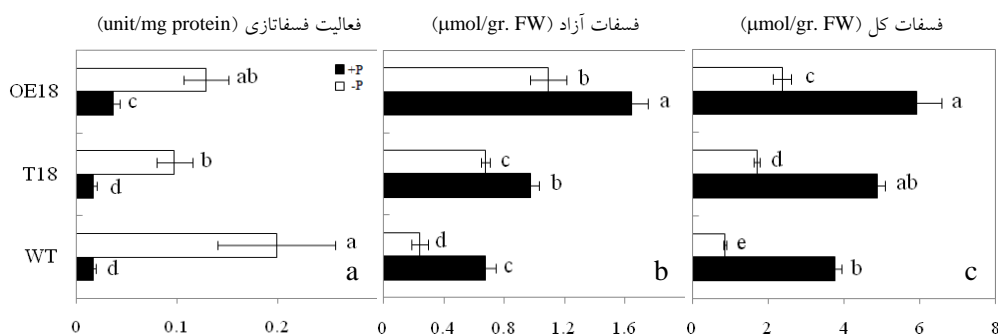


شکل ۷- مقایسه وزن تر و خشک (a, b) و نسبت وزنی ریشه به اندام هوایی (c, d) در گیاهان دارای بیان متفاوت *AtPAP18* در محیط کشت دارای فسفات (+P) و فاقد فسفات (-P). نام‌گذاری گیاهان مانند شکل ۵ است. داده‌ها میانگین سه تکرار زیستی می‌باشد. اختلاف معنی‌دار در بین میانگین‌ها ( $P < 0.05$ ) توسط حروف مختلف نشان داده شده‌است.

عدم بیان *AtPAP18* در گیاهان T18 در شرایط -P موجب کاهش معنی‌دار وزن تر و خشک نسبت به گیاه شاهد شد. بررسی‌های دقیق‌تر و اندازه‌گیری وزن بافت ریشه و اندام‌های هوایی به طور جداگانه نشان داد که این کاهش وزن حاصل کم شدن وزن اندام‌های هوایی است و وزن ریشه‌ها اختلاف معنی‌داری با سایر ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نشان نداد. برخلاف انتظار فقدان بیان *AtPAP18* در شرایط +P با افزایش وزن تر و خشک این گیاهان نسبت به گیاهان شاهد همراه است (شکل ۷a, b). از مهم‌ترین شاخص‌های فنوتیپی گیاهان تحت تنش کمبود فسفات، افزایش نسبت وزن ریشه به اندام هوایی است. همچنین در شرایط فقدان فسفات، نسبت وزن ریشه به اندام هوایی در کلیه گیاهان افزایش می‌یابد. در تحقیق حاضر، بیش‌ترین افزایش نسبت وزنی ریشه به اندام هوایی در گیاهان جهش یافته *AtPAP18* در شرایط -P مشاهده شد. در شرایط +P اختلاف معنی‌داری بین نسبت وزنی ریشه به اندام هوایی بین گیاهان مختلف مشاهده نشد (شکل c, d). در آزمایشی دیگر از فسفات کلسیم نامحلول به‌عنوان تنها منبع



شکل ۸- مقایسه طول ریشه اصلی، تعداد ریشه فرعی و ارتفاع گل آذین در گیاهان آرابیدوپسیس دارای بیان متفاوت *AtPAP18* در محیط کشت دارای فسفات (+P) و فاقد فسفات (-P). نام گذاری گیاهان مانند شکل ۵ است. a: طول ریشه اصلی b: تعداد ریشه فرعی c: ارتفاع گل آذین. داده‌ها میانگین سه تکرار زیستی می‌باشد. اختلافات معنی دار در بین میانگین‌ها ( $P < 0.05$ ) توسط حروف مختلف نشان داده شده‌است.



شکل ۹- مقایسه فعالیت فسفاتازی و محتوای فسفات آزاد و کل در گیاهان دارای بیان متفاوت *AtPAP18* آرابیدوپسیس. این بررسی در محیط کشت دارای فسفات (+P) و فاقد فسفات (-P) انجام شد. نام گذاری گیاهان مانند شکل ۵ است. a: فعالیت فسفاتازی b: فسفات آزاد c: فسفات کل. داده‌ها میانگین دو تکرار زیستی و دو تکرار تکنیکی می‌باشد. اختلافات معنی دار در بین میانگین‌ها ( $P < 0.05$ ) توسط حروف مختلف نشان داده شده‌است.

منابع و جذب آن توسط ریشه کمک می‌نماید (Plaxton and Tran, 2011). تحقیقات نشان داده است که ژن *AtPAP18* دارای محل استقرار دوگانه ترشحی و واکوئلی است (Zamani et al. 2012) و به همین دلیل احتمالاً در شرایط مختلف دارای عملکرد متفاوت است. نتایج برخی از تحقیقات نشان داده است که اسیدفسفاتازهای ارغوانی ترشحی مانند PAP10، PAP21، PAP26 به رهاسازی فسفات از ترکیبات نامحلول آن و سپس جذب فسفات از محیط کمک نموده و بیش‌بیا آن‌ها باعث بهبود عملکرد گیاه و افزایش توده زیستی در شرایط کمبود فسفات می‌شوند (Sabet et al. 2018; Wang et al. 2011; Mehra et al. 2017).

## بحث

همسازسازی و بیش‌بیا ژن‌ها در سیستم‌های همولوگ و همچنین جلوگیری از بیان یک ژن با گسیختن توالی آن روشی موثر جهت درک عملکرد یک ژن به‌ویژه ژن‌های متعلق به خانواده‌های ژنی است. گونه‌های مختلف گیاهی معمولاً حاوی چندین ژن اسید فسفاتاز ارغوانی هستند. افزایش فعالیت اسید فسفاتازهای درون سلولی و ترشحی یکی از پاسخ‌های گیاهان به تنش کمبود فسفات است. این آنزیم‌ها در همه اندام‌های گیاه و در همه مراحل رشد و نمو گیاه بیان می‌شوند (Duff et al. 1994; Li et al. 2002). بیش از ۵۰ درصد فسفات خاک را منابع آلی فسفات تشکیل می‌دهد و ترشح اسیدفسفاتازها از ریشه گیاهان به رهاسازی فسفات از این

OE18، بیش بیان *AtPAP18* به اندازه کافی بالا نبوده است تا اثر آن در فعالیت کلی فسفاتازها مشاهده شود.

نتایج تحقیقات (Sabet 2011 a,b) نشان داد که میزان فعالیت اسیدفسفاتازی کل در گیاهان آراییدوپسیس تالیانا به نوع سوبسترای مورد استفاده در آزمایش بستگی دارد. در این مطالعه بیشترین میزان فعالیت آنزیمی در گیاهان بیش بیان با سوبسترای pNPP مشاهده شد از سوی دیگر کاهش فعالیت اسیدفسفاتازی گیاهان جهش یافته فاقد آنزیم PAP26 (لاین های T-DNA و pup3) رشد یافته در شرایط فسفات کافی در مقایسه با گیاهان طبیعی تنها با سوبسترای pNPP مشاهده شد. این در حالی بود که با سوبستراهای فسفوانول پیرووات (PEP) و فسفاتیدیل کولین (PLP)، میزان فعالیت آنزیمی گیاهان مذکور نه تنها کاهش نداشت، بلکه افزایش 1/5 تا 2 برابری نیز نشان داد. افزایش فعالیت فسفاتازی و محتوای فسفات در این گیاهان احتمالاً به تغییر بیان اعضای این خانواده ژنی مربوط می شود. افزایش معنی دار وزن تر و خشک گیاهان بیش بیان ژن *AtPAP18* در هر دو شرایط +P و -P و کاهش آن در گیاهان فاقد بیان این ژن در -P نسبت به گیاهان طبیعی (شکل 7) بار دیگر با نقش آن در جذب و بازیافت فسفات از منابع درون و برون سلولی هماهنگ است. در گیاهان فاقد بیان در شرایط +P هم کاهش فعالیت فسفاتازی مشاهده نشد و هم افزایش رشد به دست آمد که باز هم می تواند نشانگر نقش جبرانی سایر اسید فسفاتازها باشد (Lohrasebi 2010).

اثر کمبود فسفات بر ساختار ریشه با افزایش نسبت وزنی ریشه به اندام هوایی در گیاهان آراییدوپسیس طبیعی (شاهد)، فاقد بیان بیش بیان مشاهده شد. این افزایش نسبت وزنی ناشی از ایجاد ریشه های جانبی ثانویه بر روی ریشه های جانبی اولیه بود و اختلافی در طول ریشه اصلی و تعداد ریشه های جانبی اولیه مشاهده نشد.

تغییر ویژگی های فنوتیپی در اثر غیر فعال نمودن یک ژن یکی از روش های مهم برای شناسایی عملکرد آن است. بررسی گیاهان فاقد بیان ژن *AtPAP18* در شرایط عادی، فنوتیپ واضحی همچون تغییر اندازه گیاه و یا اندام های آن، رنگیزه ها، کاهش باروری را نشان نداد. لیکن مشاهدات دقیق تر نشان داد که در این

در گیاهان بیش بیان آراییدوپسیس افزایش وزن تر و خشک با افزایش فعالیت اسیدفسفاتازی و به دنبال آن افزایش محتوای فسفات درون سلولی در شرایط +P در مقایسه با گیاهان شاهد و همچنین فاقد بیان مشاهده شد. این نتایج افزایش توده زیستی با بیش بیان ژن *AtPAP18* در گیاهان توتون مشاهده شده بود (Zamani et al. 2012). گیاهان مرکب سویا که ریشه آن ها با استفاده از آگروباکتريوم رایزوزنز دارای ژن *AtPAP18* تراریخت شدند نیز با افزایش دو برابری فعالیت فسفاتازی همراه بوده است که موجب افزایش محتوای فسفات محلول و فسفات کل در گیاه و افزایش تولید ماده زیستی شده است (Younessi-Hamzekhanlu et al. 2018). در شرایط -P، علی رغم افزایش معنی دار محتوای فسفات در گیاهان بیش بیان، اختلاف در فعالیت اسیدفسفاتازی در گیاهان شاهد و بیش بیان معنی دار نبود. فعالیت اسیدفسفاتازی در گیاهان فاقد بیان *AtPAP18* در شرایط +P تفاوت معنی داری با گیاه شاهد نشان ندادند ولی در شرایط -P فعالیت اسیدفسفاتازی این گیاهان دچار کاهش شده است. با این وجود، در هر دو شرایط +P و -P محتوای فسفات نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافته است (شکل 9). بررسی ها نشان داده است که در خانواده های ژنی، وجود ژن های متعدد با عملکرد مشابه سبب همپوشانی عملکردی آن ها می شود و بیان آن ها در یک ارتباط شبکه ای تنظیم می شود (Buzduga et al. 2018).

به نظر می رسد که در شرایط عادی رشد (+P)، فقدان بیان *PAP18* با افزایش جزئی بیان دیگر ژن ها جبران شده است و با تخریب *AtPAP18* ژن های کمکی فعال شده و تغییری در فعالیت فسفاتازی کل مشاهده نمی شود. لیکن فقدان *PAP18* در شرایط -P محسوس بوده و گیاه قادر به جبران کمبود فعالیت فسفاتازی مربوط به آن نیست. لازم به ذکر است که معیار فعالیت فسفاتازی در این آزمایش ها، هیدرولیز سوبسترای عمومی pNPP بوده است. لذا احتمال می رود گرچه فعالیت فسفاتازی علیه این سوبسترا کاهش یافته است، فعالیت فسفاتازی علیه سوبستراهای دیگری افزایش یافته باشد، زیرا در عمل مقدار فسفر کل و مقدار فسفر آزاد باقی در گیاهان جهش یافته فاقد بیان نسبت به گیاهان شاهد افزایش نشان داده است (شکل 8). در شرایط تنش -P شاهد افزایش عمومی بیان ژن های فسفاتازی هستیم، احتمالاً در گیاهان

به طور خلاصه، نتایج نشان می‌دهد تولید و توسعه ارقام گیاهان زراعی با بهبود جذب و استفاده از فسفات می‌تواند کمکی موثر جهت توسعه کشاورزی پایدار باشد. این پروژه گامی در جهت شناسایی ژن‌های جدید برای افزایش عملکرد گیاهان زراعی با افزایش حلالیت فسفات و کمک به جذب آن در منابع نامحلول فسفات است. علاوه بر این ورود کودهای فسفره به آب‌های سطحی و آلوده نمودن آن‌ها تهدیدی جدی برای حیات آبریان و محیط زیست است بنابراین چنین پروژه‌هایی می‌تواند با کاهش مصرف کودها، به حفظ سلامت محیط زیست نیز کمک شایانی نماید.

گیاهان سرعت جوانه‌زنی بیشتر بوده و ریشه‌چه زودتر پدیدار می‌شود (شکل ۵). هم‌چنین در این گیاهان ۵ میلی‌متر انتهایی ریشه نیز دستخوش تغییرات ساختاری می‌شود. در شرایط +P تارهای کشنده در لاین فاقد بیان در مقایسه با گیاهان شاهد بلندتر و در شرایط -P تمایز سلول‌ها برای ایجاد ریشه‌های فرعی سریع‌تر آغاز می‌شود و منطقه ریشه‌های فرعی وارد منطقه تارهای کشنده شده‌است (شکل ۶). این نتایج نشان می‌دهد که عدم بیان یا بیان فراوان ژن *AtPAP18* به طور مستقیم یا غیر مستقیم در رشد و تمایز ریشه مؤثر بوده و تعیین نقش آن نیازمند تحقیقات بیشتر است.

### منابع

- Bozzo GG, Raghothama KG, Plaxton WC (2002) Purification and characterization of two secreted purple acid phosphatase isozymes from phosphate-starved tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell cultures. *European Journal of Biochemistry* 269:6278-86.
- Buzduga IM, Volkov RA, Panchuk II (2018) Metabolic compensation in *Arabidopsis thaliana* catalase-deficient mutants. *Cytology and Genetics* 52:31-9.
- Cox RS, Schenk G, Mitic N, Gahan LR, Hengge AC (2007) Diesterase activity and substrate binding in purple acid phosphatases. *Journal of the American Chemical Society* 129:9550-9551.
- Del Pozo JC, Allona I, Rubio V, Leyva A, De La Peña A, Aragoncillo C, Paz-Ares J (1999) A type 5 acid phosphatase gene from *Arabidopsis thaliana* is induced by phosphate starvation and by some other types of phosphate mobilising/oxidative stress conditions. *The Plant Journal* 19:579-89.
- Del Vecchio HA, Ying S, Park J, Knowles VL, Kanno S, Tanoi K, She YM, Plaxton WC (2014) The cell wall-targeted purple acid phosphatase *AtPAP25* is critical for acclimation of *Arabidopsis thaliana* to nutritional phosphorus deprivation. *The Plant Journal* 80:569-81.
- González-Muñoz E, Avendaño-Vázquez AO, Montes RA, de Folter S, Andrés-Hernández L, Abreu-Goodger C, Sawers RJ (2015) The maize (*Zea mays* ssp. *mays* var. B73) genome encodes 33 members of the purple acid phosphatase family. *Frontiers in Plant Science* 6:341.
- Holsters M, de Waele D, Depicker A, Messens E, van Montagu M, Schell J (1978) Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular and General Genetics*, 163:181-187.
- Hurley BA, Tran HT, Marty NJ, Park J, Snedden WA, Mullen RT, Plaxton WC (2010) The dual-targeted purple acid phosphatase isozyme *AtPAP26* is essential for efficient acclimation of *Arabidopsis* to nutritional phosphorus deprivation. *Plant Physiology* 153:1112-22.
- Kuang R, Chan KH, Yeung E, Lim BL (2009) Molecular and biochemical characterization of *AtPAP15*, a purple acid phosphatase with phytase activity, in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 151:199-209.
- Li C, Gui S, Yang T, Walk T, Wang X, Liao H (2012) Identification of soybean purple acid phosphatase genes and their expression responses to phosphorus availability and symbiosis. *Annals of Botany* 109:275-85.
- Li D, Zhu H, Liu K, Liu X, Leggewie G, Udvardi M, Wang, D (2002) Purple acid phosphatases of *Arabidopsis thaliana*, Comparative analysis and differential regulation by phosphate deprivation. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 27772-27781.
- Lin WY, Lin SI, Chiou TJ (2009) Molecular regulators of phosphate homeostasis in plants. *Journal of Experimental Botany* 60:1427-1438.
- Lohrasebi T (2010) Global expression analysis of *Arabidopsis* acid phosphatase. Dissertation, National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Iran.
- Malboobi MA, Lefebvre DD (1997) A phosphate-starvation inducible  $\beta$ -glucosidase gene (*psr3. 2*) isolated from *Arabidopsis thaliana* is a member of a distinct subfamily of the BGA family. *Plant Molecular Biology* 34:57-68.
- Malboobi MA, Samaeian A, Sabet MS, Lohrasebi T (2012) Plant phosphate nutrition and environmental challenges. In *Plant Science InTech*.
- Mehra P, Pandey BK, Giri J (2017) Improvement in phosphate acquisition and utilization by a secretory purple acid phosphatase (*OsPAP21b*) in rice. *Plant Biotechnology Journal* 15:1054-67.
- Plaxton WC, Tran HT (2011) Metabolic adaptations of phosphate-starved plants. *Plant Physiology* 156:1006-15.
- Ravichandran S, Stone SL, Benkel B, Prithiviraj B (2013) Purple Acid Phosphatase5 is required for maintaining basal resistance against *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* 13:107.

- Robinson WD, Carson I, Ying S, Ellis K, Plaxton WC (2012) Eliminating the purple acid phosphatase AtPAP26 in *Arabidopsis thaliana* delays leaf senescence and impairs phosphorus remobilization. *New Phytologist* 196:1024-9.
- Robinson WD, Park J, Tran HT, Del Vecchio HA, Ying S, Zins JL, Patel K, McKnight TD, Plaxton WC (2012) The secreted purple acid phosphatase isozymes AtPAP12 and AtPAP26 play a pivotal role in extracellular phosphate-scavenging by *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 63:6531-42.
- Sabet MS, Zamani K, Lohrasebi T, Malboobi MA (2011a) Changes in Gene Expression and Developing profile in PAP26 mutants of *Arabidopsis thaliana*. The 7th National Biotechnology Congress of Iran, Tehran, Iran.
- Sabet MS, Zamani K, Lohrasebi T, Malboobi MA (2011b) Overexpression of AtPAP26 an *Arabidopsis thaliana* purple acid phosphatase encoding gene in tobacco plant. The 7th National Biotechnology Congress of Iran, Tehran, Iran.
- Sabet MS, Zamani K, Lohrasebi T, Malboobi MA, Valizadeh M (2018) Functional assessment of an overexpressed *Arabidopsis* purple acid phosphatase gene (*Atpap26*) in Tobacco plants. *Iranian Journal of Biotechnology*.
- Schachtman DP, Reid RJ, Ayling SM (1998) Phosphorus uptake by plants: From soil to cell. *Plant Physiology* 116: 447-453.
- Schenk G, Ge Y, Carrington LE, Wynne CJ, Searle IR, Carroll BJ, Hamilton S, de Jersey J, (1999) Binuclear metal centers in plant purple acid phosphatases: Fe-Mn in sweet potato and Fe-Zn in soybean. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 370:183-189.
- Schenk G, Guddat LW, Ge Y, Carrington LE, Hume DA, Hamilton S, de-Jersey J (2000) Identification of mammalian-like purple acid phosphatases in a wide range of plants. *Gene* 250: 117-125.
- Shen J, Yuan L, Zhang J, Li H, Bai Z, Chen X, Zhang W, Zhang F (2011) Phosphorus Dynamics: From Soil to Plant. *Plant Physiology* 156: 997-1005.
- Sun F, Suen PK, Zhang Y, Liang C, Carrie C, Whelan J, Ward JL, Hawkins ND, Jiang L, Lim BL (2012) A dual-targeted purple acid phosphatase in *Arabidopsis thaliana* moderates carbon metabolism and its overexpression leads to faster plant growth and higher seed yield. *New Phytologist* 194:206-19.
- Tran HT, Qian W, Hurley BA, She YM, Wang D, Plaxton WC (2010) Biochemical and molecular characterization of AtPAP12 and AtPAP26: the predominant purple acid phosphatase isozymes secreted by phosphate-starved *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment* 33:1789-803.
- Vance CP, Uhde-Stone C, Allan DL (2003) Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* 157:423-447.
- Vincent JB, Averill BA (1990) An enzyme with a double identity: purple acid phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase. *The FASEB Journal* 4:3009-3014.
- Wang L, Li Z, Qian W, Guo W, Gao X, Huang L, Wang H, Zhu H, Wu JW, Wang D, Liu D (2011) The *Arabidopsis* purple acid phosphatase AtPAP10 is predominantly associated with the root surface and plays an important role in plant tolerance to phosphate limitation. *Plant Physiology* 157:1283-99.
- Wang L, Liu D. *Arabidopsis* purple acid phosphatase 10 is a component of plant adaptive mechanism to phosphate limitation (2012) *Plant Signaling and Behavior* 7:306-10.
- Wang X, Wang Y, Tian J, Lim BL, Yan X, Liao H (2009) Overexpressing AtPAP15 enhances phosphorus efficiency in soybean. *Plant Physiology* 151:233-40.
- Younessi-Hamzekhanlu M, Izadi-Darbandi A, Malboobi MA, Ebrahimi M, Abdipour M, Sparvoli F, Paolo D (2018) *Agrobacterium* rhizogenes transformed soybeans with AtPAP18 gene show enhanced phosphorus uptake and biomass production. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 1:1-9.
- Zamani K, Lohrasebi T, Sabet MS, Malboobi MA, Mousavi A (2014) Expression pattern and subcellular localization of *Arabidopsis* purple acid phosphatase AtPAP9. *Gene Expression Patterns* 14:9-18.
- Zamani K, Malboobi MA, Lohrasebi T, Esfahani K (2010) Expression vectors for production and purification of recombinant protein in plants. *Iran patent No. 64775*.
- Zamani K, Sabet MS, Lohrasebi T, Mousavi A, Malboobi MA (2012) Improved phosphate metabolism and biomass production by overexpression of AtPAP18 in tobacco. *Biologia* 67:713-20.
- Zhang W, Gruszewski HA, Chevone BI, Nessler CL (2008) An *Arabidopsis* purple acid phosphatase with phytase activity increases foliar ascorbate. *Plant Physiology* 146:431-40.
- Zhang Y, Sun F, Fettke J, Schöttler MA, Ramsden L, Fernie AR, Lim BL (2014) Heterologous expression of *AtPAP2* in transgenic potato influences carbon metabolism and tuber development. *FEBS Letters* 588:3726-31.
- Zhang Y, Yu L, Yung KF, Leung DY, Sun F, Lim BL (2012) Over-expression of *AtPAP2* in *Camelina sativa* leads to faster plant growth and higher seed yield. *Biotechnology for Biofuels* 5:19.
- Zhu H, Qian W, Lu X, Li D, Liu X, Liu K, Wang D (2005) Expression patterns of purple acid phosphatase genes in *Arabidopsis* organs and functional analysis of *AtPAP23* predominantly transcribed in flower. *Plant Molecular Biology* 59:581-94.