

رابطه الگوی بیانی ژن‌های ناقلین فسفات و آنزیم فسفاتاز PAP26 در

گیاه *Arabidopsis thaliana*

The expression patterns of phosphate transporter genes in relationship with PAP26 encoding a phosphatase enzyme in *Arabidopsis thaliana*

محدثه زال^۱، محمدصادق ثابت^{۲*}، محمدعلی ملبوبی^۳

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی،

دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

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

۳- استاد، گروه زیست فناوری مولکولی گیاهی، پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی

ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

Zal M¹, Sabet MS^{*2}, Malboobi MA³

1- MSc Graduated Student, Agricultural Biotechnology, Department of Plant Genetics and Breeding, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University (TMU), Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Department of Plant Genetics and Breeding, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University (TMU), Tehran, Iran

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

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ms.sabet@modares.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۱/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۹/۱۸)

چکیده

فسفر (P) یکی از اصلی‌ترین عناصر برای حیات کلیه موجودات زنده محسوب می‌شود و از اجزای اصلی تشکیل دهنده مولکول‌های زیستی ضروری و واکنش‌های متابولیکی است. گیاهان در مواجهه با کمبود فسفات، راه‌کارهای متعددی از جمله بیان اسیدفسفاتازها، ناقلین فسفر و همچنین ترشح اسیدهای آلی در ریزوسفر را به‌کار می‌گیرند. در شرایط تنش کمبود فسفر، حفظ هومئوستازی فسفر سلولی در گرو تعامل بین این اجزا می‌باشد. در مطالعه حاضر رابطه بیانی ژن‌های سه خانواده ناقلین فسفات PHT1، PHT2، و PHO1 در تعامل با آنزیم فسفاتاز PAP26 به‌عنوان یکی از مهم‌ترین ۲۹ اسیدفسفاتاز گیاه *Arabidopsis thaliana* در مواجهه با شرایط فقدان فسفر (-P) و فسفر کافی (+P) به‌ترتیب دارای KH_2PO_4 صفر و ۱/۲۵ میلی‌مولار در محیط کشت MS مورد بررسی قرار گرفت. از گیاهان طبیعی *A. thaliana* واریته col-0 به‌عنوان شاهد (Wt)، لاین‌های جهش‌یافته هموزیگوت دارای قطعه T-DNA در ژن *AtPAP26* (Mu26) و لاین‌های بیش‌بیان هموزیگوت ژن مذکور (OE26) استفاده شد. نتایج حاکی از کاهش معنی‌دار بیان ژن‌های PHT1، PHT2، و PHO1 و همچنین فعالیت فسفاتازی در گیاهان Mu26 نسبت به گیاهان Wt در شرایط کمبود فسفر بود. در شرایط +P افزایش معنی‌دار ۵۸٪ و ۴۲٪ به‌ترتیب در میزان فسفر کل و آزاد و افزایش ۱/۳ برابری وزن خشک گیاهان Mu26 نسبت به گیاهان Wt مشاهده شد. از طرفی نتایج حاکی از بهبود ویژگی‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک در گیاهان OE26 نسبت به گیاهان Wt در هر دو شرایط محیطی بود. بر اساس نتایج حاصل، حفظ هومئوستازی فسفر سلولی در این گیاهان مستلزم تعامل فسفاتازهای مهم از جمله *AtPAP26* با ناقلین فسفات در شرایط تنش فسفر است که می‌تواند در تولید گیاهان با قابلیت جذب حداقل مقدار فسفر موجود در محیط جهت رشد گیاه در شرایط تنش فسفر استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی

اسیدفسفاتازهای ارغوانی

بیش‌بیان

جهش‌یافته

عملکرد گیاهچه

فعالیت فسفاتازی

محتوای فسفر

مطالعه و بررسی قرار گرفته‌اند (Haran et al. 2000; Li et al. 2002; Tran et al. 2010; Wang et al. 2011). یکی از اسیدفسفاتازهای ارغوانی گیاه *A. thaliana* آنزیم PAP26 می‌باشد. بررسی‌ها نشان می‌دهد بیان ژن رمزکننده این آنزیم به‌عنوان یکی از اسیدفسفاتازهای اصلی درون سلولی و ترشحی، در شرایط تنش کمبود فسفات افزایش می‌یابد (Veljanovski et al. 2010; Tran et al. 2006). در شرایط تنش کمبود فسفات آنزیم PAP26 در بازجذب فسفات درون سلولی و همچنین در تحرک مجدد فسفات از منابع فسفات آلی برگ‌های پیر دخالت دارد (Smith et al. 2003). به‌علاوه با فعالیت در ریزوسفر و جاروب فسفات از مخازن فسفر خاک و همچنین بازیافت فسفر از فسفومونواسترهایی که از طریق سیتوپلاسم به دیواره سلولی ترشح یافته‌اند، به گیاه در شرایط کمبود فسفات کمک می‌کند (Robinson et al. 2012). با این وجود آنچه تأمین و حفظ همئوستازی فسفات گیاه را تضمین می‌نماید، اثر متقابل عملکرد اسیدفسفاتازها با مجموعه ناقلین سلولی فسفات می‌باشد.

افزایش بیان ژن‌های رمزکننده ناقلین فسفات از دیگر سازوکارهای عمومی گیاهان در پاسخ به تنش کمبود فسفر می‌باشد (Lee 1982; Drew et al. 1984; Ullrich-Eberius et al. 1984; Shimogawara and Usuda 1995). در صورت در دسترس نبودن فسفر کافی، گیاهان مجموعه‌ی جامع و متنوعی از ناقل‌های درگیر در انتقال کارآمد Pi از محلول خاک به سلول‌های ریشه و توزیع آن در سطح بافت (ریشه به ساقه) و در سطح درون سلولی (اندامک‌های مختلف) را در خود تکامل داده‌اند (Lin et al. 2009). پنج خانواده ناقلین فسفات شامل PHT1، PHT2، PHT3، PHT4 و PHT5 در گیاه *A. thaliana* شناسایی شده است. از این بین دو خانواده PHT1 و PHT2 در تغییرات غلظت Pi نقش کلیدی دارند (Lin et al. 2009). خانواده PHT1 شامل نه ژن *Pht1;1* تا *Pht1;9* است. این ناقلین در K_m^4 در محدوده میکرومولار فسفر فعال می‌شوند و به کمبود فسفر پاسخ می‌دهند (Cogliatti and Clarkson 1983; Drew et al. 1984). خانواده PHT2 تنها یک عضو (*Pht2;1*) دارد و در محدوده غلظت میلی‌مولار فسفر فعالیت داشته و به کمبود فسفر پاسخ می‌دهد

فسفر (P^1) یکی از ریز مغذی‌های ضروری برای تمام موجودات زنده از جمله گیاهان است. فسفر به شکل معدنی و آلی در بسیاری از خاک‌ها یافت می‌شود ولی گیاهان تنها قادر به جذب فسفات معدنی (Pi^2) آزاد حل شده در فاز آبی هستند. با وجود غنی بودن اغلب خاک‌ها از فسفر، به‌دلیل تثبیت این عنصر حیاتی توسط ذرات خاک، از طریق ریشه گیاهان قابل جذب و استفاده نمی‌باشد (Vance et al. 2003). استفاده از کودهای شیمیایی فسفره یکی از راه‌کارهای تأمین فسفات مورد نیاز گیاهان می‌باشد ولی تنها کمتر از ۲۰٪ از کود مصرفی جذب گیاهان می‌شود و مابقی آن توسط ذرات خاک تثبیت شده و عملاً از دسترس گیاه خارج می‌شود. از طرفی فسفات تثبیت شده علاوه بر تخریب ساختمان خاک و همچنین رشد سیانوباکتری‌های سمی، سایر فرآیندهای مخرب زیست محیطی را به همراه دارد. کودهای فسفات غالباً از منابع تجدیدناپذیر ذخایر سنگ‌های فسفات تهیه می‌شوند که پیش‌بینی می‌شود طی ۶۰ سال آینده به اتمام برسند (Vance et al. 2003) از این‌رو تنش کمبود فسفات به یک عامل محدودکننده برای رشد و عملکرد گیاهان در اکوسیستم‌های کشاورزی و طبیعی تبدیل شده است.

گیاهان برای سازگاری با تنش کمبود فسفر قابل دسترس، بیان اسیدفسفاتازهای خود را افزایش می‌دهند. ترشح اسیدفسفاتازها از ریشه گیاهان در پاسخ به تنش کمبود فسفر نقش اصلی در تأمین فسفر معدنی از منابع فسفر آلی در ریزوسفر و نیز چرخش فسفر در خاک دارد (Richardson et al. 1994). اسیدفسفاتازهای ترشحی، هیدرولیز Pi را از فسفومونواسترها و فسفودی‌استرها به‌عهده دارند و در تولید، انتقال و بازجذب یا بازیافت فسفر، نقش اساسی دارند (Tran et al. 2010; Plaxton and Tran 2011). از بین ۵۸ اسیدفسفاتاز شناسایی شده در گیاه *Arabidopsis thaliana*، ۲۹ اسیدفسفاتاز ارغوانی (PAP^3) به‌دلیل نقش به‌سزایی که در رهاسازی فسفات و حفظ همئوستازی فسفات درون سلولی گیاه بر عهده دارند، بیشتر از سایرین مورد

¹ Phosphorus; P

² Inorganic Phosphate; Pi

³ Purple Acid Phosphatase; PAP

⁴ Affinity Value in Michaelis-Menten Kinetics; K_m

نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴°C و در تاریکی قرار گرفتند و سپس به شرایط نوری ۷۰۰۰ لوکس بر سانتی‌متر مربع و دمای ۲۵ ± ۲°C و شرایط ۱۶ ساعت روشنایی / ۸ ساعت تاریکی در اتاقک رشد منتقل شدند. به منظور اعمال تیمار فسفر، گیاهچه‌های هفت روزه به مدت ۱۴ روز به محیط کشت MS فاقد فسفر (-P) و واجد فسفات کافی (+P) (به ترتیب حاوی KH₂PO₄ صفر و ۱/۲۵ میلی‌مولار) منتقل شدند. در محیط کشت بدون فسفر از KCl با غلظت ۱/۲۵ میلی‌مولار به‌عنوان جایگزین KH₂PO₄ استفاده شد. در نهایت گیاهچه‌های ۲۱ روزه به تفکیک اندام هوایی و بافت ریشه‌ی جداسازی و تا زمان انجام آزمایشات در فریزر ۸۰°C- نگهداری شدند.

به‌منظور بررسی الگوی بیانی ۱۰ ژن مورد مطالعه (جدول ۱)، استخراج RNA کل از گیاهچه‌های ۲۱ روزه رشد یافته در غلظت‌های مختلف فسفر به تفکیک بافت هوایی و ریشه با استفاده از کیت RNXTM (Plus) شرکت سیناژن انجام گرفت. حذف آلودگی احتمالی RNA استخراجی با DNA ژنومی با استفاده از تیمار DNaseI مطابق با دستورالعمل شرکت Roche اعمال شد. کمیت و کیفیت RNA استخراجی کلیه نمونه‌ها با استفاده از دستگاه نانودراپ (مدل EPOCH) و ژل آگارز یک درصد تأیید شد. ساخت cDNA با استفاده از RNA استخراجی شده عاری از DNA طبق روش Zamani et al. (2012) انجام شد. کیفیت cDNA ساخته شده با استفاده از واکنش PCR و آغازگرهای آلفاتوبولین مورد بررسی قرار گرفت.

آغازگرهای اختصاصی ژن‌های مورد بررسی توسط نرم‌افزار Oligo7 طراحی شد (جدول ۱). اختصاصیت آغازگرهای طراحی شده با استفاده از نرم‌افزار PrimerBLAST قابل دسترس از پایگاه NCBI بررسی شد. بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه در واکنش RT-PCR به‌صورت: یک مرحله واسرشته‌سازی اولیه شامل یک چرخه ۵ دقیقه دمای ۹۴°C، مرحله دوم شامل ۳۵ چرخه متناوب واسرشته شدن در دمای ۹۴°C به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۶۰-۶۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، بسط در دمای ۷۲°C به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت یک مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۵ دقیقه بهینه شد. کمی‌سازی بیان ژن‌ها بر اساس شدت نوار حاصل از تکثیر ژن آلفا-توبولین (به‌عنوان ژن کنترل

(Daram et al. 1999, Raghothama 2000). گروه دیگری از ناقلین فسفات، خانواده ناقلین PHO1 است که در بارگیری Pi از ریشه به آوند چوبی نقش دارد (Poirier and Bucher 2002). افزایش کارایی گیاهان در تأمین و جذب فسفر یکی از راهکارهای مؤثر در افزایش تحمل گیاهان به کمبود فسفر می‌باشد. طراحی و بهبود سیستم‌های جذب عناصر غذایی، مستلزم شناخت و درک روابط بین ژن‌ها و نحوه تعامل آن‌ها در پاسخ به شرایط مختلف محیطی است. در بررسی حاضر به‌منظور شناسایی ژن‌های مؤثر و کارآمد در تأمین فسفات از خاک و استفاده بهینه از فسفر جذب شده، الگوی بیانی ژن‌های سه خانواده ناقلین فسفات PHT1، PHT2 و PHO1 درگیر در حفظ هومئوستازی فسفات سلولی، در تعامل با اسیدفسفاتاز ارغوانی PAP26 به‌عنوان یکی از مهم‌ترین اسیدفسفاتازهای گیاه آرآیدوپسیس، در مواجهه با شرایط کمبود فسفات محیط در دو گروه گیاهان جهش‌یافته و بیش‌بیان ژن PAP26 مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از گیاه *A. thaliana* واریته Columbia-0 (Wt¹) به‌عنوان شاهد استفاده شد. لاین‌های هموزیگوت جهش‌یافته (Mu²) این گیاه (Mu26) دارای قطعه T-DNA در ژن *AtPAP26* (با شماره دسترسی NC_003076.8) و لاین‌های هموزیگوت بیش‌بیان³ ژن مذکور (OE26) به‌منظور انجام این تحقیق از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری تهیه شدند. ضدعفونی بذور کلیه ژنوتیپ‌ها به مدت ۲ دقیقه در اتانول ۷۰٪ و یک مرحله شستشو با آب مقطر استریل انجام شد. سپس به مدت ۳ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ شستشو و ۷-۶ مرحله با آب مقطر اتوکلاو شده آبکشی شد. بذور پس از ضدعفونی روی محیط کشت MS (Murashige and Skoog 1962) حاوی KH₂PO₄ ۱/۲۵ میلی‌مولار (فسفر کافی)، ۱۰ گرم در لیتر ساکارز و ۶ گرم در لیتر آگار-آگار در پتری‌دیش‌های ۱۰ cm کشت شد. به‌منظور خواب‌شکنی و هم‌زمانی جوانه‌زنی بذور کشت شده،

¹ Wild-type; Wt

² Mutant line; Mu

³ Overexpressed; OE

کمی سازی فعالیت آنزیمی با استفاده از منحنی استاندارد برای هر سری از سنجش‌ها و به کمک غلظت‌های مشخص فسفات (KH_2PO_4 صفر، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار) و ضریب رگرسیونی انجام شد. مقادیر جذب حاصل از هر نمونه در طول موج ۳۵۵ nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل 6305 ساخت کمپانی JENWAY انگلستان)، پس از قرار گرفتن در فرمول رگرسیونی منحنی استاندارد محاسبه شد. غلظت پروتئین کل به روش Bradford (1976) و با استفاده از منحنی استاندارد سرم آلبومین گاو (BSA^2) تعیین شد. مقدار فسفر آزاد شده بر حسب میکرومول به ازای یک میلی‌گرم از پروتئین محلول ($\mu\text{mol mg}^{-1}$) در مدت زمان یک دقیقه گزارش شد.

داخلی) روی ژل آگارز یک درصد در دو تکرار زیستی و سه تکرار آزمایشگاهی انجام شد. بیان کل ژن‌های ناقلین خانواده PHT1 به صورت مجموع میزان بیان همه ژن‌های اعضا محاسبه شد. محتوای فسفر آزاد و کل گیاهچه‌های رشد یافته در محیط‌های -P و +P به روش Zamani et al. (2012) بر حسب میکرومول به ازای هر گیاه تعیین شد. همچنین به منظور اندازه‌گیری فعالیت فسفاتازی، بافت‌های گیاهی در نیتروژن مایع پودر و در بافر استخراج (۱۰۰ میلی‌مولار استات سدیم سرد $\text{pH} = 5/6$) همگن شدند. ترکیب حاصل دو بار در 12000 g به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 4°C سانتریفیوژ شد. در نهایت از عصاره به دست آمده برای اندازه‌گیری فعالیت فسفاتازی استفاده شد. تمام مراحل استخراج بر روی یخ انجام شد. فعالیت آنزیمی در دمای 37°C به مدت ۳۰ دقیقه در بافر ۱۰۰ میلی‌مولار سدیم استات ($\text{pH} = 5/6$) حاوی پنج میلی‌مولار سوبسترای عمومی $p\text{NPP}^1$ اندازه‌گیری شد.

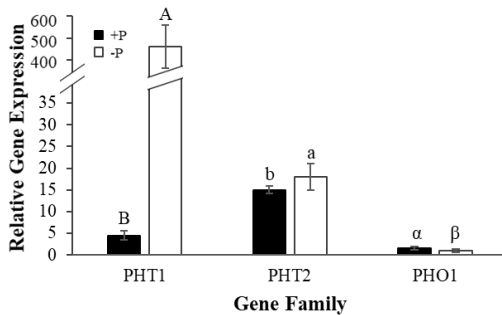
² Bovine Serum Albumin; BSA

¹ Para-Nitro Phenyl-Phosphate; pNPP

جدول ۱- مشخصات ژن‌ها و آغازگرهای مورد استفاده در مطالعه بیان ژن‌های ناقلین فسفات

نام خانواده ژنی	نام ژن	AC. NO.	محل روی کروموزوم	طول ژن (bp)	تعداد آگرون	طول CDS (bp)	Primer sequence (5' → 3') ^a	طول محصول PCR (bp)	دمای اتصال (°C)
PHT1	<i>Pht1;1</i>	NC_003076.8	۵	۲۳۹۰	۳	۲۰۱۲	F-CCACATATAGTCTCTCCTCAACTCTCCAG R-CCTTAGCCTGGCCGGGAATATCTC	۱۳۸۶	۶۰
	<i>Pht1;2</i>	NC_003076.8	۵	۲۲۷۵	۳	۱۸۶۹	F-CCCCACCATTAGCGCACAAACG R-CCTTAGCCTGGCCGGGAATATCTC	۱۳۵۵	۶۳
	<i>Pht1;4</i>	NC_003071.7	۲	۳۰۹۷	۲	۱۹۹۹	F-GCAGCTTCAACGATCATTCCACTTCC R-ACGCACCAACCATGCTCCTAA	۱۵۳۳	۶۴
	<i>Pht1;5</i>	NC_003071.7	۲	۲۱۵۸	۳	۱۸۸۳	F-GCCACCTACGAGGTTGATCCTG R-TCCAACAATCGTCCCGCCTTAC	۷۸۴	۶۳
	<i>Pht1;6</i>	NC_003076.8	۵	۱۵۵۱	۱	۱۵۵۱	F-TCCTCTCTCGGCTACGATCATGTC R-CCTTGATTTTCTCCGGCTCAGTTTC	۱۰۹۷	۶۲
	<i>Pht1;7</i>	NC_003074.8	۳	۲۷۳۵	۲	۲۰۰۲	F-TCGAAGCAGAGCAGCAGGGAAC R-ACGCACCAACCATGCTCCTAA	۵۶۵	۶۴
	<i>Pht1;8</i>	NC_003070.9	۱	۴۹۵۵	۲	۱۸۸۹	F-GCTGTTTTGCGTGGCGTTTAAGAGAAG R-AAGCAAAGTGCTCACGGAGGATTG	۱۰۶۵	۶۴
	<i>Pht1;9</i>	NC_003070.9	۱	۳۱۲۸	۲	۱۹۶۷	F-CGAACGTGGCGGGTTAGAGAC R-AAACCGTCTCTTCATGGTGTCT	۸۳۲	۶۴
PHT2	<i>Pht2;1</i>	NC_003074.8	۳	۲۴۴۳	۳	۲۳۸۴	F-CCTCACATTCCTGTGCCACCATC R-CGTTGCCTCCGTGAGCGAATGAC	۱۵۳	۶۴
					۴	۲۴۶۱	R-CGTTGCCTCCGTGAGCGAATGAC	۹۲۲	۶۰
PHO1	<i>Pho1</i>	NC_003074.8	۳	۶۰۷۰	۱۵	۲۹۹۴	F-AGCTCGTTAAACAACCCAAGAT R-CGCCCATGAAGAAATCAAC	۸۷۶	۶۰
	<i>α-Tubulin</i>	NC_003070.9	۱	۲۴۱۵	۴	۱۷۷۵	F-GCTTTCACACCTTCTTCAG R-GAATAGTTCGCTTGGTCTT	۸۸۳	۶۰

*F و R به ترتیب آغازگرهای مستقیم و معکوس



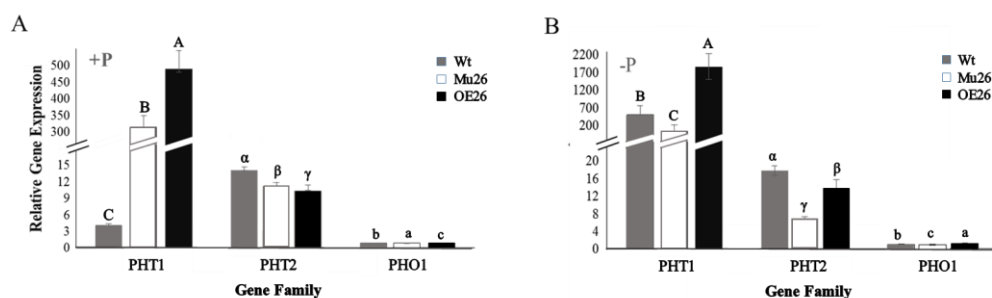
شکل ۱- تغییرات بیان ژن‌های ناقلین فسفات خانواده PHT1، PHT2 و PHO1 در گیاهچه‌های طبیعی *Arabidopsis thaliana* در دو شرایط محیطی فقدان فسفر (-P) و واجد فسفات کافی (+P) محیط (داده‌ها نسبت به بیان ژن توبولین استاندارد شده‌اند). داده‌ها میانگین حداقل سه تکرار زیستی می‌باشد. اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها ($P < 0.05$) توسط آزمون t-test و با حروف مختلف نشان داده شده است (به دلیل اختلاف زیاد بین بیان ژن‌ها و پوشیده شدن اثر آن‌ها، هر یک از خانواده‌های ژنی به‌طور مجزا آنالیز و از علائم مختلف برای نشان دادن تفاوت میانگین‌ها استفاده شده است).

با تخریب ژن *PAP26* در گیاهان جهش‌یافته *Mu26* میزان بیان ژن‌های ناقلین فسفات خانواده PHT1 در شرایط +P به میزان ۷۲ برابر در مقایسه با گیاهان *Wt* افزایش یافت (شکل ۲A). همچنین افزایش ۸/۷ برابری بیان ژن *Pho1* نسبت به گیاهان *Wt* در شرایط +P مشاهده شد. این در حالی بود که بیان ژن ناقل خانواده PHT2 با کاهش ۱/۳ برابری مواجه شد. با حذف فسفر از محیط بیان ژن‌های هر سه خانواده ناقلین فسفات PHT2، PHT1 و PHO1 در گیاهان *Mu26* به ترتیب با کاهش معنی‌دار ۲/۷، ۲/۷ و ۲۳ برابری نسبت به گیاهان *Wt* مواجه شد (شکل ۲B).

وزن خشک گیاهچه‌های ۲۱ روزه در سه تکرار زیستی (هر پتری دیش یک تکرار و هر تکرار شامل هشت گیاهچه) انجام شد. اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌ها از هم جدا و به مدت ۷۲ ساعت (تا ثابت شدن وزن نهایی) در دمای 70°C در آون خشک شدند. آزمایش‌ها به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار زیستی اجرا شد. فرض نرمال بودن باقی‌مانده داده‌ها و محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS v.16 صورت گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن و t-test در سطح احتمال معنی‌داری $P < 0.05$ و $P < 0.01$ انجام شد.

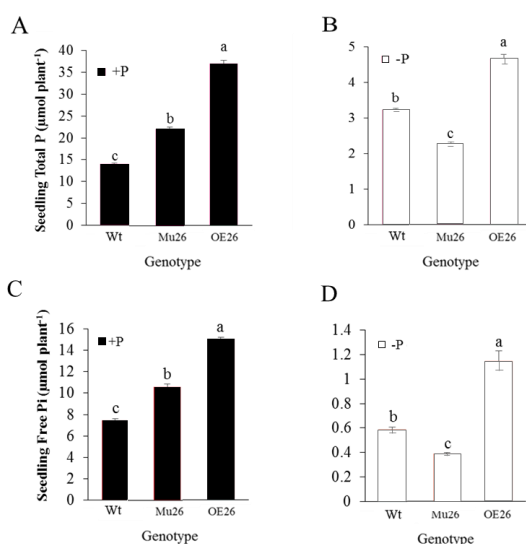
نتایج

مطالعه الگوی بیانی ژن‌های ناقلین فسفات گیاهان طبیعی نشان داد که در شرایط فسفر کافی (+P)، از میان ژن‌های ناقلین خانواده‌های PHT1، PHT2 و PHO1 بیشترین میزان بیان متعلق به ناقلین خانواده PHT2 بود (شکل ۱). با حذف فسفر از محیط (-P)، افزایش ۱۱۴ برابری میزان بیان ژن‌های ناقلین فسفات PHT1 در مقایسه با شرایط واجد فسفر کافی مشاهده شد، این در حالی بود که در شرایط مشابه میزان بیان ژن‌های ناقلین خانواده PHT2 با افزایش ۱/۲ برابری و PHO1 با کاهش ۲/۴ برابری در مقایسه با شرایط واجد فسفر کافی مواجه شد (شکل ۱).



شکل ۲- تغییرات بیان ژن‌های ناقلین فسفات خانواده‌های PHT1، PHT2 و PHO1 در گیاهچه‌های طبیعی (*Wt*)، جهش‌یافته ژن *PAP26* (*Mu26*) و بیش‌بیان ژن *PAP26* (*OE26*) *Arabidopsis thaliana* در شرایط (A) واجد فسفات کافی محیط ($1/25 \text{ KH}_2\text{PO}_4$ میلی‌مولار) و (B) فقدان فسفات محیط (KH_2PO_4 صفر میلی‌مولار) (داده‌ها نسبت به بیان ژن توبولین استاندارد شده‌اند). داده‌ها میانگین حداقل سه تکرار زیستی می‌باشد. اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها ($P < 0.05$) با حروف مختلف نشان داده شده است (به دلیل اختلاف بیان زیاد بین ژن‌ها و پوشیده شدن اثر آن‌ها هر یک از خانواده‌های ژنی به‌طور مجزا آنالیز شد و از علائم مختلف برای نشان دادن تفاوت‌ها استفاده شد).

نتایج بررسی محتوای فسفات کل و آزاد سلولی گیاهان مورد مطالعه نشان داد که در شرایط واجد فسفات کافی (+P)، میزان فسفات کل و آزاد در گیاهان Mu26 به ترتیب ۵۸٪ و ۴۲٪ نسبت به گیاهان Wt بیشتر بود (شکل ۴A-C). در حالی که با حذف فسفر از محیط و اعمال شرایط -P، کاهش معنی‌دار ۳۶٪ و ۳۴٪ محتوای فسفر کل و آزاد در گیاهان Mu26 نسبت به گیاهان Wt مشاهده شد (شکل ۴B-D). از سوی دیگر بررسی گیاهان بیش‌بیان نشان داد که در هر دو شرایط فسفات کافی (+P) و تنش فقدان فسفات (-P)، محتوای فسفات کل و آزاد سلولی این گیاهان به‌طور معنی‌داری بیش از گیاهان Wt بود (به ترتیب ۱۶۴٪ و ۱۰۰٪ فسفر کل و فسفر آزاد بیشتر در شرایط +P و ۳۱٪ و ۹۴٪ در شرایط -P) (شکل ۴A-C)

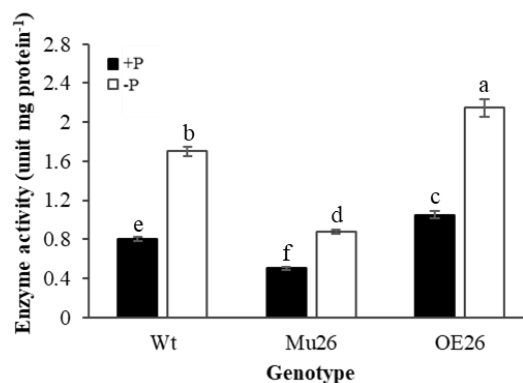


شکل ۴- میزان فسفر کل و آزاد درون سلولی گیاهچه‌های طبیعی (Wt)، جهش‌یافته ژن *PAP26* (Mu26) و بیش‌بیان *PAP26* (OE26) *Arabidopsis thaliana* رشدیافته در محیط کشت جامد MS حاوی ۱/۲۵ میلی‌مولار فسفات (+P) (A-C) و فاقد فسفات (-P) (B-D). داده‌ها میانگین حداقل سه تکرار زیستی می‌باشد. اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها ($P < 0.05$) توسط حروف مختلف نشان داده شده است.

در شرایط فسفات کافی (+P)، وزن خشک گیاهان Mu26 ۱/۳ برابر بیشتر از گیاهان Wt بود (شکل ۵). همچنین گیاهان OE26 افزایش معنی‌دار ۱/۹ برابری عملکرد گیاهچه‌ها در مقایسه با گیاهان Wt در شرایط مشابه نشان دادند. این در حالی بود که در شرایط تنش فقدان فسفات (-P) کاهش معنی‌دار ۱/۶ برابری وزن

بیش‌بیان ژن *PAP26* در گیاهان OE26 سبب افزایش معنی‌دار ۱۰۸ برابری در میزان بیان ژن‌های ناقلین فسفات خانواده‌ی PHT1 در مقایسه با گیاهان Wt در شرایط +P شد (شکل ۲A). با این وجود میزان بیان ژن‌های ناقلین فسفات خانواده‌های PHT2 و PHO1 به ترتیب کاهش معنی‌دار ۵/۱ و ۱/۷ برابری نسبت به گیاهان طبیعی نشان دادند. در حالی که حذف فسفر از محیط و بیش‌بیان ژن *PAP26* سبب افزایش معنی‌دار ۳/۸ و ۳۱/۴ برابری و کاهش معنی‌دار ۰/۸ برابری به ترتیب در میزان بیان ژن‌های ناقلین فسفات خانواده‌های PHT1، PHO1، و PHT2 نسبت به گیاهان طبیعی شد (شکل ۲B).

نتایج فعالیت آنزیمی گیاهان Mu26 در مقایسه با گیاهان Wt در شرایط +P حاکی از کاهش معنی‌دار ۴۰٪ فعالیت فسفاتاززی در این گیاهان بود (شکل ۳). از سوی دیگر بیش‌بیان ژن *PAP26* موجب افزایش معنی‌دار ۳۱٪ فعالیت فسفاتاززی کل در گیاهان OE26 نسبت به گیاهان Wt در شرایط مشابه شد. با اعمال تنش فقدان فسفات (-P)، کاهش معنی‌دار ۴۸٪ فعالیت فسفاتاززی گیاهان Mu26 نسبت به گیاهان طبیعی مشاهده شد، در حالی که فعالیت فسفاتاززی در گیاهان OE26 نسبت به گیاهان طبیعی افزایش معنی‌دار ۲۷٪ نشان داد (شکل ۳).



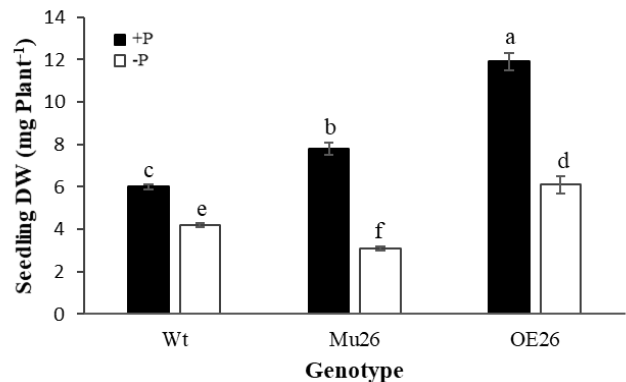
شکل ۳- تغییرات فعالیت فسفاتاززی در گیاهچه‌های طبیعی (Wt)، جهش‌یافته ژن *PAP26* (Mu26) و بیش‌بیان ژن *PAP26* (OE26) *Arabidopsis thaliana* رشدیافته در محیط کشت جامد MS فاقد فسفات (-P) و حاوی ۱/۲۵ میلی‌مولار فسفات (+P). داده‌ها میانگین حداقل سه تکرار زیستی می‌باشد. اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها ($P < 0.05$) توسط حروف مختلف نشان داده شده است.

الگوی بیانی ژن‌های ناقلین فسفات در گیاهان طبیعی در پاسخ به غلظت‌های مختلف فسفر محیط نشان داد که به دنبال کاهش فسفر داخلی گیاه در پی کمبود فسفر محیط، بیان ژن‌های خانواده PHT1 به شدت افزایش یافت، در حالی که کاهش فسفر داخلی گیاه تأثیر قابل توجهی بر بیان ژن‌های PHT2 و PHO1 نداشت (شکل ۱). بر اساس نتایج حاصل، کمبود محتوای فسفر داخلی گیاه تأثیر بیشتری بر بیان ژن‌های خانواده ناقلین PHT1 در مقایسه با خانواده‌های PHT2 و PHO1 دارد. بررسی‌های قبلی نیز نشان می‌دهد وضعیت‌های فسفر ساقه تأثیر کمی بر تنظیم ژن *Ph2;1* دارد. به نظر می‌رسد این دسته از ناقلین صرفنظر از میزان فسفر محلول در خاک، عمل می‌کند (Vance et al. 2003; Lin et al. 2009). تنظیم بیان PHO1 نیز ارتباط ضعیفی با دسترسی گیاهان به P_i خاک دارد به نحوی که گیاهان رشد یافته در محیط دارای کمبود P_i در مقایسه با محیط‌های حاوی مقدار زیاد P_i ، افزایش کمتر از دو برابری در میزان رونوشت ژن *Pho1* نشان داده‌اند (Hamburger et al. 2002; Liu et al. 2014).

مطالعه الگوی بیانی ژن‌های ناقلین فسفات در گیاهان جهش‌یافته Mu26 نشان داد علی‌رغم وجود فسفر کافی در محیط +P، تخریب ژن *PAP26* سبب کمبود تأمین فسفر درون سلولی شده و بیان ناقلین PHT1 به منظور تأمین کمبود فسفر سلولی، مشابه با شرایط -P بود. از این رو میزان بیان این ژن‌ها جهت بهبود نقل و انتقالات فسفر با افزایش مواجه شد (شکل ۲). مؤید این مطلب افزایش در بیان ژن *Pho1* به منظور افزایش بارگذاری فسفر از بافت ریشه به آوند چوبی است. نتیجه آنکه با وجود تخریب ژن *PAP26* در گیاهان جهش‌یافته و کاهش فعالیت فسفاتازهای در این گیاهان، میزان فسفر کل و آزاد و در نتیجه عملکرد در این گیاهان افزایش یافت. بر اساس نتایج حاصل، پیش‌نیاز اصلی بهبود رشد و عملکرد گیاهان در شرایط کمبود P_i صرفنظر از میزان فسفر محیط، تأمین P_i درون سلولی است که در تعامل با فعالیت ناقلین فسفات تکمیل می‌گردد.

با تخریب ژن *PAP26* در گیاهان Mu26 و حذف فسفات از محیط کشت (-P)، نه تنها تأثیری بر افزایش بیان ژن‌های خانواده ناقلین مشاهده نشد، بلکه بیان این ژن‌ها با کاهش نیز مواجه شد. این نتایج به روشنی نشان داد بخشی از فرآیند تنظیم بیان ژن‌های

خشک گیاهان Mu26 و افزایش معنی‌دار ۱/۵ برابری وزن خشک گیاهان OE26 در مقایسه با گیاهان Wt مشاهده شد (شکل ۵).



شکل ۵- وزن خشک گیاهچه‌های طبیعی (Wt)، جهش‌یافته ژن *PAP26* (Mu26) و بیش‌بیان ژن *PAP26* (*Arabidopsis thaliana* (OE26) رشد یافته در محیط کشت جامد MS فاقد فسفات (-P) و دارای ۱/۲۵ میلی‌مولار فسفات (+P). داده‌ها میانگین حداقل سه تکرار زیستی می‌باشد. اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها ($P < 0.05$) توسط حروف مختلف نشان داده شده است.

بحث

شناخت اجزای سیستم‌های ارتباطی در گیاهان در مواجهه با شرایط تنش فسفر منجر به افزایش کارایی استفاده از فسفر موجود در خاک به منظور تولید محصولات زراعی پرعملکرد و کاهش اثرات زیست محیطی مرتبط با کودهای شیمیایی فسفره و ضایعات زیست محیطی ناشی از آن‌ها خواهد شد. اهمیت فعالیت فسفاتازهای آنزیم *PAP26* در تأمین فسفات قابل استفاده برای گیاهان در شرایط تنش کمبود فسفر به اثبات رسیده است (Veljanovski et al. 2006; Hurley et al. 2010; Tran et al. 2010). از سوی دیگر بررسی‌ها نشان می‌دهد که خانواده‌های PHT1 و PHT2 ناقلین فسفات، در پاسخ به تغییرات غلظت P_i نقش کلیدی دارند (Lin et al. 2009). تنظیم رونویسی از ژن‌های PHT1 به طور عمده توسط غلظت فسفر داخلی گیاه کنترل و تنظیم می‌شود (Hammond et al. 2003; Misson et al. 2005; Morcuende et al. 2007; Thibaud et al. 2010). در مطالعه حاضر، به منظور بررسی اثرات متقابل این ژن‌ها بر هم و در پاسخ به تنش فسفر محیطی، فعالیت آنزیم فسفاتاز *PAP26* و بیان ژن‌های ناقلین فسفات به طور هم‌زمان مورد بررسی قرار گرفت.

افزایش فعالیت فسفاتازهای گیاهان در مواجهه با شرایط تنش کمبود فسفات از جمله مهم‌ترین پاسخ سلولی در جهت حفظ و تأمین فسفر مورد نیاز گیاه است (Plaxton and Tran 2011). بر اساس تحقیقات صورت گرفته، تخریب برخی از ژن‌های *PAP* تأثیری بر میزان فعالیت اسیدفسفاتازی کل گیاهان آرابیدوپسیس نداشته است. جهش‌یافته‌های *Y-DNA* *Mu23* فاقد تغییرات معنی‌داری در فعالیت اسیدفسفاتازی بودند (Zhu et al. 2005). به‌طور مشابه، جهش‌یافته‌های *Mu15* در مقایسه با گیاهان طبیعی شش برابر فعالیت فیتازی کمتر و فعالیت فسفاتازی بدون تغییر بودند (Zhang et al. 2008). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که گیاهان *Mu26* در شرایط *-P* در مقایسه با شرایط *+P* با کاهش شدیدتر عملکرد گیاهیچه نسبت به گیاهان *Wt* مواجه شدند. این مطلب بیانگر این واقعیت است که در شرایط *-P* آنزیم *PAP26* یکی از اسیدفسفاتازهای اصلی و غالب درون سلولی در گیاهان *Arabidopsis* است.

در تحقیق حاضر بیش‌بیان ژن *PAP26* سبب افزایش بیان ژن‌های ناقلین *PHT1* در هر دو شرایط *+P* و *-P* شد که افزایش انتقال فسفر به سلول و نیز بین بافت‌های مختلف گیاه را در پی داشت. در مطالعه‌ای بیش‌بیان ژن *AtPAP15* در ریشه‌های موئین سویا منجر به افزایش فعالیت اسیدفسفاتازی تا ۱/۵ برابر در ریشه‌های تراریخت در شرایط حاوی فسفات کافی شده است (Wang et al. 2009). در مطالعه‌ی دیگری بیش‌بیان ژن *AtPAP18* نیز در گیاه توتون موجب افزایش بیش از دو برابری در فعالیت فسفاتازی گیاهان تراریخت توتون نسبت به گیاهان *Wt* در هر دو شرایط *+P* و *-P* شده است (Zamani et al. 2012). انتقال ژن *AtPAP26* به گیاه *A. thaliana* نیز موجب افزایش دو برابری در فعالیت فسفاتازی گیاهان *OE* نسبت به گیاهان *Wt* شده است (Wang et al. 2014). همچنین در مطالعه دیگر انتقال ژن *AtPAP26* به گیاه *Nicotiana tabacum* نیز موجب افزایش فعالیت فسفاتازی گیاهان بیش‌بیان توتون نسبت به گیاهان شاهد شده است (Sabet et al. 2018).

بیش‌بیان ژن *AtPAP26* در گیاهان *OE26* در هر دو شرایط محیطی فاقد و واجد فسفر سبب افزایش ترکیبات فسفات و در نتیجه محتوای فسفر کل و آزاد شد. این امر منجر به افزایش وزن

ناقلین فسفات خود توسط حضور فسفر در محیط رشدی گیاه کنترل می‌شود. به‌دلیل وجود فسفات کافی در محیط و تأمین آن در سلول طی دوره هفت روز اول رشد گیاهیچه‌ها در محیط طبیعی، گیاهان *Mu26* با وجود عدم فعالیت آنزیم *PAP26*، همانند گیاهان *Wt* اقدام به رهاسازی و تأمین فسفات نمودند. با شروع شرایط تنش کمبود فسفات و اتمام ذخایر فسفات درون سلولی طی دوره دوم رشد (۲۱-۷ روزگی)، گیاهان جهش یافته *Mu26* به‌دلیل عدم فعالیت آنزیم *PAP26* زودتر از گیاهان *Wt* کمبود فسفات درون سلولی را درک می‌کنند. با این وجود به‌دلیل فقدان فسفر در محیط تنش، کاهش در بیان ژن‌های خانواده ناقلین *PHT1* و *PHO1* مشاهده شد. افزایش در بیان ژن‌های خانواده ناقلین *PHT1* و *PHO1* در گیاهان *Mu26* در شرایط *+P* مؤید این مطلب است که در پی تأمین فسفات در دوره دوم رشدی (۱۴ روز) حادث شد. تحقیقات نشان می‌دهد که در شرایط *-P* پس از تخلیه خزانه فسفات سلولی و درک شرایط تنش فقدان فسفات توسط گیاه، بیان ژن‌های وابسته به تنش فقدان فسفات افزایش می‌یابد (Wu et al. 2003). با حذف فسفر از محیط، همسو با کاهش میزان بیان ژن‌های کلیه ناقلین فسفات مورد بررسی، میزان فعالیت فسفاتازی، فسفر کل و آزاد سلولی و همچنین عملکرد گیاهان جهش‌یافته نسبت به گیاهان *Wt* کاهش یافت. گزارش Hurley et al. (2010) نیز حاکی از کاهش معنی‌دار میزان فسفر آزاد و کل در گیاهان *Mu26* نسبت به گیاهان *Wt* در شرایط *-P* بود (Hurley et al. 2010).

تغییر در میزان دسترسی گیاهان به عناصر غذایی از جمله فسفات با ایجاد تغییراتی در فنوتیپ آن‌ها به‌ویژه در عملکرد وزن خشک نیز همراه است (Czarnecki et al. 2013). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بین فنوتیپ رشد و میزان دسترسی به فسفر ارتباط مستقیم وجود دارد. بر اساس نتایج Wang et al. (2014)، جهش در ژن *AtPAP26* سبب تغییر در میزان زیست توده ریشه گیاه *A. thaliana* در شرایط *-P* شده است. از طرفی کاهش قابل توجهی در رشد گیاهان جهش‌یافته *Mu12* و *Mu26* و جهش‌یافته دوگانه *Mu12/26* رشد یافته در شرایط *-P* گزارش شده است (Hurley et al. 2010; Robinson et al. 2012).

کمبود فسفات محیط مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل، تنظیم بیان ژن‌های خانواده ناقلین فسفات به سطح فسفر درون سلولی بستگی دارد، در حالی که تداوم بیان آن‌ها به سطح حداقلی از فسفر در محلول خاک وابسته بود. در صورت عدم وجود فسفر قابل دسترس در محیط رشد، تأثیر مثبتی در بیان ناقلین فسفات جهت تأمین فسفات مورد نیاز سلول مشاهده نشد. از این رو ایجاد گیاهان بیش‌بیان ژن‌های خانواده PHT1 ناقلین فسفات، راه‌کاری مؤثر به‌منظور تأمین مؤثر فسفات مورد نیاز سلول در محیط‌های با حداقل مقدار فسفر خاک می‌باشد. با این وجود به‌دلیل وجود فسفر در اغلب خاک‌های قابل کشت جهان بیش‌بیان توأم PHT1 و PHT2 و PHT3 ناقلین فسفات خانواده PHT1 می‌تواند به‌طور چشمگیری توانایی گیاه را در دسترسی و جذب فسفر افزایش دهد. این امر نه تنها افزایش عملکرد در گیاهان را به‌همراه خواهد داشت، بلکه جذب حداکثری فسفر از محلول خاک نیز امکان‌پذیر می‌شود.

منابع

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72: 248-254.

Cogliatti DH and Clarkson DT (1983) Physiological changes in, and phosphate uptake by potato plants during development of, and recovery from phosphate deficiency. *Physiologia plantarum* 58: 287-294.

Czarnecki O, Yang J, Weston DJ, Tuskan GA and Chen JG (2013) A dual role of strigolactones in phosphate acquisition and utilization in plants. *International journal of molecular sciences* 14: 7681-7701.

Daram P, Brunner S, Rausch C, Steiner C, Amrhein N and Bucher M (1999) Pht2;1 encodes a low-affinity phosphate transporter from *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 11: 2153-2166.

Drew MC, Saker LR, Barber SA and Jenkins W (1984) Changes in the kinetics of phosphate and potassium absorption in nutrient-deficient barley roots measured by a solution-depletion technique. *Planta* 160: 490-499.

Farhadi S, Sabet MS, Malboobi MA and Moieni A (2020) The critical role of *AtPAP17* and *AtPAP26* genes in *Arabidopsis* phosphate compensation network. *Frontiers in plant science* 11: 1495.

Hamburger D, Rezzonico E, Petétot JMC, Somerville C and Poirier Y (2002) Identification and characterization of the *Arabidopsis* PHO1 gene involved in phosphate loading to the xylem. *The Plant Cell Online* 14: 889-902.

خشک در گیاهان OE26 نسبت به گیاهان Wt در هر دو شرایط محیطی فسفر شد. افزایش وزن خشک مشاهده شده در تحقیق حاضر در توافق با سایر پژوهش‌های مرتبط با اسیدفسفاتازهای ارغوانی است (Wang et al. 2011; Wang and Liu 2012; Wang et al. 2014; Farhadi et al. 2020). بیش بیان ژن *AtPAP15* در ژنوم گیاه سویا موجب افزایش ۶۲/۶ درصد محتوای فسفر این گیاهان در مقایسه با گیاهان Wt شده است (Wang et al. 2009). همچنین انتقال ژن *AtPAP26* و *AtPAP18* به‌ترتیب به گیاهان *A. thaliana* و توتون موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیمی فسفاتازی و محتوای فسفر گیاهان بیش‌بیان در مقایسه با گیاهان Wt شده است (Zamani et al. 2012; Wang et al. 2014).

نتیجه‌گیری کلی

در تحقیق حاضر، پاسخ بیانی ژن‌های ناقلین فسفات در تعامل با آنزیم کلیدی *AtPAP26* گیاه آرابیدوپسیس تحت شرایط تنش

Hammond JP, Bennett MJ, Bowen HC, Broadley MR, Eastwood DC, May ST, Rahn C, Swarup R, Woolaway KE and White PJ (2003) Changes in gene expression in *Arabidopsis* shoots during phosphate starvation and the potential for developing smart plants. *Plant Physiology* 132: 578-596.

Haran S, Logendra S, Seskar M, Bratanova M and Raskin I (2000) Characterization of *Arabidopsis* acid phosphatase promoter and regulation of acid phosphatase expression. *Plant Physiology* 124: 615-626.

Hurley BA, Tran HT, Marty NJ, Park J, Snedden WA, Mullen RT and Plaxton WC (2010) The dual-targeted purple acid phosphatase isozyme AtPAP26 is essential for efficient acclimation of *Arabidopsis* to nutritional phosphate deprivation. *Plant Physiology* 153: 1112-1122.

Lee RB (1982) Selectivity and kinetics of ion uptake by barley plants following nutrient deficiency. *Annals of Botany* 50: 429-449.

Li D, Zhu H, Liu K, Liu X, Leggewie G, Udvardi M and Wang D (2002) Purple acid phosphatases of *Arabidopsis thaliana* comparative analysis and differential regulation by phosphate deprivation. *Journal of Biological Chemistry* 277: 27772-27781.

Lin WY, Lin SI and Chiou TJ (2009) Molecular regulators of phosphate homeostasis in plants. *Journal of experimental botany* 60: 1427-1438.

- Liu TY, Lin WY, Huang TK and Chiou TJ (2014) MicroRNA-mediated surveillance of phosphate transporters on the move. *Trends in plant science* 19: 647-655.
- Misson J, Raghothama KG, Jain A, Jouhet J, Block MA, Bligny R, Ortet P, Creff A, Somerville S and Rolland N (2005) A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 11934-11939.
- Morcuende R, Bari R, Gibon Y, Zheng W, Pant BD, BLÅSING O, Usadel B, Czechowski T, Udvardi MK and Stitt M (2007) Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of *Arabidopsis* in response to phosphorus. *Plant, cell and environment* 30: 85-112.
- Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15: 473-497.
- Plaxton WC and Tran HT (2011) Metabolic adaptations of phosphate-starved plants. *Plant Physiology* 156: 1006-1015.
- Poirier Y and Bucher M (2002) Phosphate transport and homeostasis in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis book*. American Society of Plant Biologists 1.
- Raghothama K (2000) Phosphate transport and signaling. *Current opinion in plant biology* 3:182-187.
- Richardson AE, Pankhurst C, Doube B, Gupta V and Grace P (1994) Soil microorganisms and phosphorus availability. *Soil biota: management in sustainable farming systems*: 50-62.
- Robinson WD, Park J, Tran HT, Del Vecchio HA, Ying S, Zins JL, Patel K, McKnight TD and 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: 6531-6542.
- Sabet MS, Zamani K, Lohrasebi T, Malboobi MA and Valizadeh M (2018) Functional assessment of an overexpressed *Arabidopsis* purple acid phosphatase gene (*AtPAP26*) in tobacco plants. *Iranian journal of biotechnology* 16: 31-41.
- Smith FW, Mudge SR, Rae AL and Glassop D (2003). Phosphate transport in plants. *Plant and soil*, 248: 71-83.
- Shimogawara K and Usuda H (1995) Uptake of inorganic phosphate by suspension-cultured tobacco cells: kinetics and regulation by Pi starvation. *Plant and cell physiology* 36: 341-351.
- Thibaud MC, Arrighi JF, Bayle V, Chiarenza S, Creff A, Bustos R, Paz-Ares J, Poirier Y and Nussaume L (2010) Dissection of local and systemic transcriptional responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 64: 775-789.
- Tran HT, Qian W, Hurley BA, SHE YM, Wang D and 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: 1789-1803.
- Ullrich-Eberius C, Novacky A and Van Bel A (1984) Phosphate uptake in *Lemna gibba* G1: energetics and kinetics. *Planta* 161: 46-52.
- Vance CP, Uhde-Stone C and Allan DL (2003). Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* 157: 423-447.
- Veljanovski V, Vanderbeld B, Knowles VL, Snedden WA and Plaxton WC (2006) Biochemical and molecular characterization of *AtPAP26*, a vacuolar purple acid phosphatase up-regulated in phosphate-deprived *Arabidopsis* suspension cells and seedlings. *Plant Physiology* 142: 1282-1293.
- Wang L, Li Z, Qian W, Guo W, Gao X, Huang L, Wang H, Zhu H, Wu JW and Wang 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: 1283-1299.
- Wang L and Liu D (2012) *Arabidopsis* purple acid phosphatase 10 is a component of plant adaptive mechanism to phosphate limitation. *Plant signaling and behavior* 7: 306-310.
- Wang L, Lu S, Zhang Y, Li Z, Du X and Liu D (2014) Comparative genetic analysis of *Arabidopsis* purple acid phosphatases *AtPAP10*, *AtPAP12*, and *AtPAP26* provides new insights into their roles in plant adaptation to phosphate deprivation. *Journal of integrative plant biology* 56: 299-314.
- Wang X, Wang Y, Tian J, Lim BL, Yan X and Liao H (2009) Overexpressing *AtPAP15* enhances phosphorus efficiency in soybean. *Plant Physiology* 151: 233-240.
- Wu P, Ma L, Hou X, Wang M, Wu Y, Liu F and Deng XW (2003) Phosphate starvation triggers distinct alterations of genome expression in *Arabidopsis* roots and leaves. *Plant Physiology* 132: 1260-1271.
- Zamani K, Sabet MS Lohrasebi T, Mousavi A and Malboobi MA (2012) Improved phosphate metabolism and biomass production by overexpression of *AtPAP18* in tobacco. *Biologia* 67: 713-720.
- Zhang W, Gruszewski HA, Chevone BI and Nessler CL (2008) An *Arabidopsis* purple acid phosphatase with phytase activity increases foliar ascorbate. *Plant Physiology* 146: 431-440.
- Zhu H, Qian W, Lu X, Li D, Liu X, Liu K and 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: 581-594.