ژنتیک نوین
دوره سیزدهم، شماره ۳،پاییز ۱۳۹۷
صفحه ۳۳۲ - ۳۲۱

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[۱]، محمد صادق ثابت[۲]، تهمینه لهراسبی[۳]، محمدعلی ملبوبی[*۳]

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[1], Sadegh Sabet M[2], Lohrasebi T[3], Malboobi MA[*3]

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 پرنیاز برای رشد گیاه فسفر است که به‌صورت فسفات از محلول خاک جذب شده و نقش مهمی در رشد و نمو گیاهان برعهده دارد. به‌منظور سازگاری با کمبود فسفات در محیط، گیاهان مجموعه‌ای از پاسخ‌های سازشی ساختاری و فیزیولوژیکی را نشان می‌دهند که ترشح اسیدفسفاتازها 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 به‌دنبال 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

مقدمه

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 ٦ اتفاق می‌افتد، شرایطی که شکل غالب فسفر $H_2PO_4^-$ است و نشان می‌دهد، فسفات به شکل تک‌ظرفیتی جذب می‌شود (Shen et al. 2011; Schachtman et al. 1998).

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 ترشحی 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 انتقال‌گذرای 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، ۲٦، ۳۵ و ۳۳ ژن اسید فسفاتاز ارغوانی هستند (Li et al. 2002, 2012; Zhang et al. 2011; Gonzalez-Munoz et al. 2015). 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 (HMW)[1] و وزن مولکولی پایین (LMW)[2] 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 ترشحی 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. 2014; Ravichandran et al. 2013) و بیش‌بیان 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). از 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 فسفاته و افزایش بهره‌وری از قابلیت زیستی این

[1] High Molecular Weight
[2] Low Molecular Weight

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 سوبسترایی 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 pARM1 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 تالینا 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 ۲٤ ساعت در دمای ٤ 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 ۱٤ روزه به محیط‌های مایع دارای فسفات ۵ mM (+P) و بدون فسفات (-P) به مدت ۱٤ روز دیگر انتقال یافتند. در شرایط بدون فسفات KH_2PO_4 با KCl غلظت ۵ mM جایگزین شد.

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. به‌منظور 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 $MgCl_2$، ٤۰ واحد RNAase inhibitor شرکت Roche و ۵۰ واحد از آنزیم SuperscriptII RT شرکت فرمنتاس به آن اضافه شد. مخلوط فوق در دمای ٤۲°C به مدت ۱/۵ ساعت قرار داده شد و برای واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. از ژن آلفا توبولین به‌عنوان 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 PAP18F2, R (جدول ۱) که به‌ترتیب 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 ۹٤°C و ۳۰ چرخه سه مرحله‌ای، ۱

دقیقه در دمای ۹٤°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 پروموتر CaMV35S در ناقل بیان گیاهی pARM1 قرار گرفت (Zamani et al. 2010) سازه حاصل با روش ذوب و انجماد به اگروباکتریوم سویه GV3101 منتقل شد (Holsters et al. 1978).

اگروباکتریوم تومه‌فاشنس (*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 ۵۰mgL^{-1} آنتی‌بیوتیک کانامایسین انتخاب و پس از خودگشنی، گیاهان هموزیگوس نسل چهارم از آن‌ها به‌دست آمد. وجود تراژن با آغازگرهای اختصاصی uni18F, R و بیان آن با استفاده از آغازگرهای QHisF و sp18R 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 جهش‌یافته فاقد بیان *AtPAP18*، SALK_001898، در خاک در شرایط گلخانه با دمای ۲۵°C و ۱٦ ساعت روشنائی و ۸ ساعت تاریکی کاشته شد. این گیاهان برای 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 ٤ دقیقه‌ای در دمای ۹٤°C و ۳۰ چرخه سه مرحله‌ای، ۱ دقیقه ۹٤°C، ۱ دقیقه ٦۲°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) کاملا مخلوط شد. این مخلوط یکنواخت دوبار هر بار به مدت ۳۰ دقیقه در g× ۱۲۰۰۰ 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 ۱۰۰سدیم استات (pH 5.6) حاوی ۵ mM 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 رگرسیونی محاسبه شد. هر واحد فعالیت آنزیمی با رهاسازی یک µmol از Pi در دقیقه در دمای ۲۵°C تعریف می‌شود (Bozzo et al. 2002). غلظت پروتئین کل بر اساس روش برادفورد (۱۹۷٦) و با استفاده از سرم آلبومین گاوی (BSA) به‌عنوان استاندارد تعیین شد. فعالیت اسید فسفاتازی به‌عنوان واحد بر میلی‌گرم (unit mg^{-1}) پروتئین‌های محلول بیان شد.

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′	
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′	

سنجش مقدار فسفات آزاد و فسفات کل

برای اندازه‌گیری میزان فسفات آزاد درون سلولی در گیاه، از روش ایمز (۱۹٦٦) و با تغییراتی در آن استفاده شد. بدین منظور ۱۰۰ mg بافت گیاهی منجمد در ازت مایع پودر و ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ ×g سانتریفوژ شد. ۵۰ µl از روشناور با ۲۵۰ µl آب رقیق و با ۷۰۰ µl از معرف سنجش فسفات (یک حجم اسید آسکوربیک ۱۰ درصد و شش حجم آمونیوم هپتامولیبدات ۰/٤۲ درصد در اسید سولفوریک یک نرمال) مخلوط شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ٤۵°C نگه‌داری شد. میزان فسفات محلول نمونه‌ها در طول موج ۸۲۰ nM با استفاده از یک منحنی رگرسیونی و با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

Value × dilution factor/1000= micromoles of soluble Pi/ mg fresh weight

به‌منظور 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 قرارگرفت 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 µl اسید پرکلریک ($HClO_4$) غلیظ به آن افزوده و در آن بسته شد. به‌منظور هیدرولیز کلیه پیروفسفات‌های موجود در خاکستر، لوله‌های حاوی بافت به مدت ٦۰ دقیقه در آب در حال جوش قرار داده شدند. این مخلوط با آب دو بار تقطیر به حجم نهایی ۵ ml رسانده شد. ۳۰۰ µl از این محلول همانند آنچه در بالا ذکر شد برای ارزیابی مقدار فسفات به‌کار 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 ۷۰°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 استاندارد مربوط به هر میانگین با استفاده از نرم‌افزار SPSS V16 انجام پذیرفت. از آزمون دانکن جهت مقایسه میانگین داده‌ها در سطح احتمال P-value<0.05 استفاده شد.

نتایج

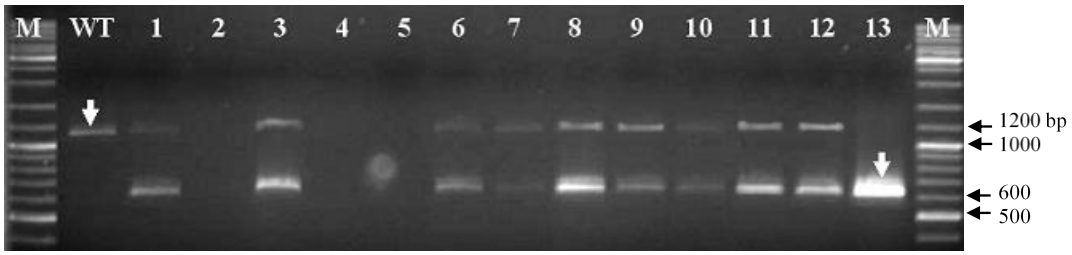
بر اساس مطالعات، ژن *AtPAP18* (AT3G20500) در گروه Ib-2 در بین ۲۹ AtPAP طبقه‌بندی شده‌است (Li et al. 2002). این ژن دارای یک قالب خواندنی باز (orf) با ۱۳۱٤ جفت‌باز است که پروتینی با ٤۳۷ اسیدآمینه را رمز می‌کند (Schenk et al. 1999; Li et al. 2002). این پروتئین دارای یک دامین متالوفسفاتاز بین اسیدآمینه‌های ۳۳۲–۱٤۱ و دارای دامین انتهای آمینی اسیدفسفاتازهای ارغوانی بین اسید آمینه‌های ۱۳٤–٤۷ است. AtPAP18 دارای یک توالی راهنما در انتهای آمینی بوده و پروتئینی با محل استقرار دوگانه واکوئلی و ترشحی است (Zamani et al. 2012). توالی ژنومی *AtPAP18* دارای ۵ اگزون است. توالی cDNA این ژن پایین دست پروموتر CaMV-35S همسانه‌سازی شد و با روش vacuum infiltration به گیاهان آرابیدوپسیس 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 جهش‌یافته فاقد بیان ژن *AtPAP18*

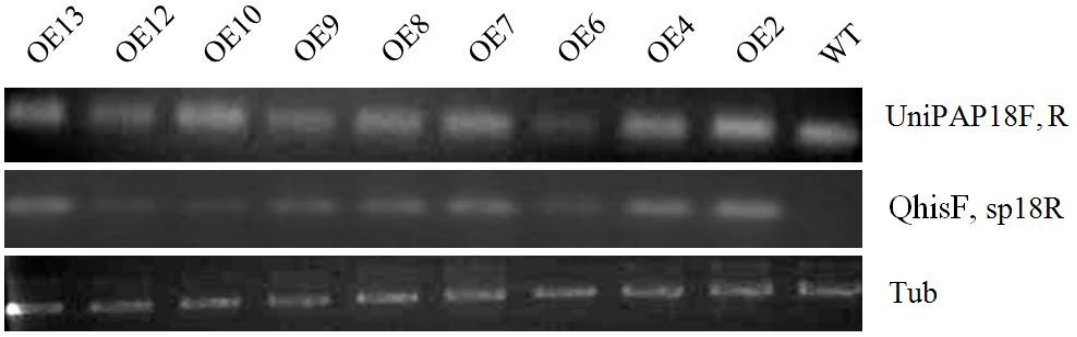
با جستجو در خزانه بذر انستیتو SALK لاین SALK-001898 انتخاب شد. در این لاین جهش‌یافته ورود T-DNA ناحیه پروموتری این ژن را گسیخته کرده است. بررسی ژنوتیپی این لاین با استفاده از DNA ژنومی و روش PCR و سه آغازگر، یکی در پروموتر ژن، Pro18F و دیگری در داخل ژن به نام sp18R و سومی یک آغازگر اختصاصی مربوط به ناحیه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

T-DNA به نام LBb1 انجام شد (شکل ۳a) که در ۱۳ گیاه نخست مورد بررسی ۳ گیاه هموزیگوس شناسایی شد (شکل۳b).

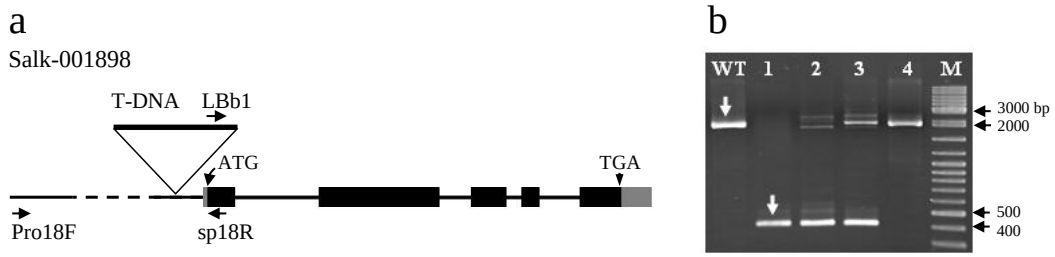
با استفاده از روش RT-PCR نیمه کمی عدم بیان ژن *AtPAP18* در ریشه و اندام هوایی گیاهان جهش‌یافته تایید شد (شکل٤).



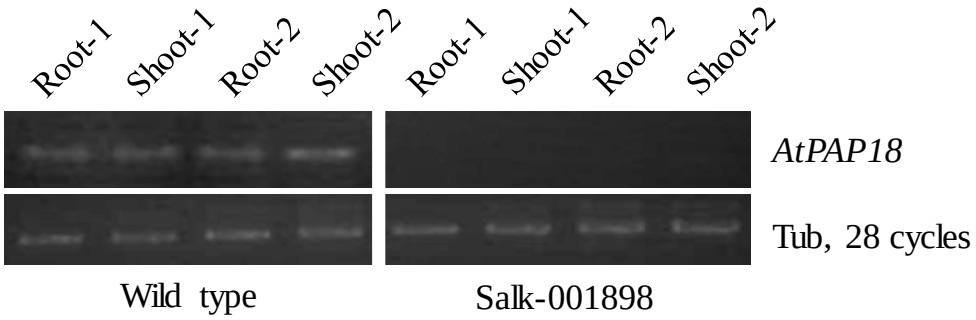
شکل ۱- آزمون PCR گیاهان تراریخت آرابیدوپسیس. ۱۲-۱) نمونه‌های تراریخت شده، WT) گیاه غیرتراریخته یا شاهد، ۱۳) پلاسمید T/A-PAP18، M) مارکر وزنی ۱۰۰ جفت‌بازی. پیکان‌ها نشانگر باندهای مربوط به ژن درونی و تراژن هستند.



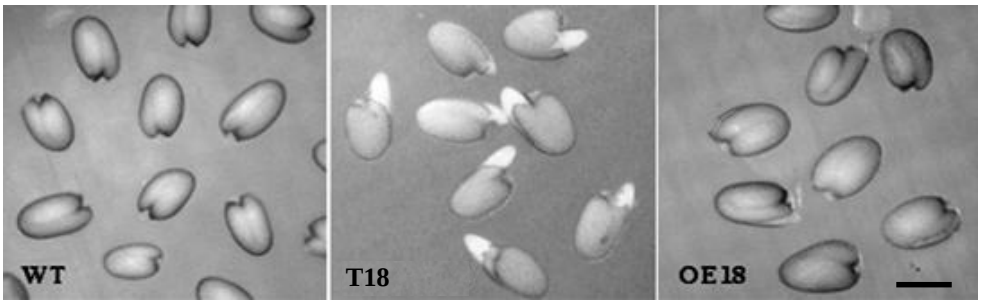
شکل۲- تایید بیان ژن انتقال یافته *AtPAP18* در گیاهان سبز مقاوم به کانامایسین و شناسایی گیاهان بیش بیان هموزیگوس آرابیدوپسیس که بیشترین بیان را دارد. ردیف بالا مجموع بیان تراژن و ژن درونی *AtPAP18*، ردیف وسط بیان تراژن *AtPAP18* و ردیف پایین بیان ژن آلفا توبولین با بیان همیشگی به عنوان شاهد درونی را نشان 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 پروموتری خود دارد. مستطیل‌های سیاه و طوسی اگزون‌ها (به‌ترتیب مناطق رمزکننده و غیر رمزکننده) و خطوط باریک اینترون‌ها 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 شده‌است. 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 ۲و۳) گیاه هتروزیگوس ٤) گیاه WT



شکل ٤- 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 α-Tubulin به‌عنوان شاهد درونی استفاده شده‌است.

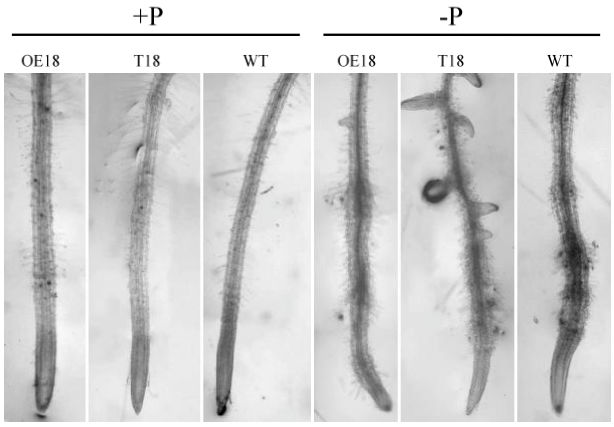


شکل ٥- اثر میزان بیان *AtPAP18* بر روی جوانه‌زنی بذر آرابیدوپسیس. مشاهدات در پنج پلیت با نتایج مشابه برای هر لاین انجام شد. سمت چپ گیاه شاهد (WT)، وسط گیاه جهش یافته فاقد بیان *AtPAP18* (T18) و سمت راست گیاه بیش بیان (OE18). Bar =1mM

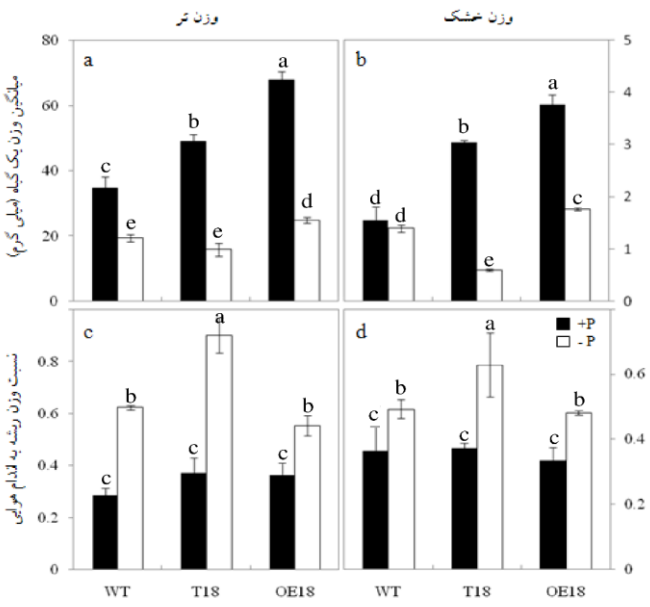
بررسی آثار فنوتیپی بیش‌بیانی و عدم بیان *AtPAP18* در گیاه آرابیدوپسیس

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 علی‌رغم سرمادهی برای هم‌زمان نمودن جوانه‌زنی، در گیاهان فاقد بیان، جوانه‌زنی سریع‌تر آغاز شده و ریشه‌چه زودتر پدیدار شده بود (شکل٥). بررسی ویژگی‌های ساختاری ۵ mM انتهای ریشه نیز نشان داد که در شرایط P+ تارهای کشنده گیاهان فاقد بیان در مقایسه با گیاهان شاهد و بیش‌بیان 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 بیش‌بیان مشاهده شد. در گیاهان شاهد در این ناحیه، ریشه فرعی مشاهده نشد (شکل٦).

به‌منظور 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 هوایی آن‌ها با گیاهان شاهد مقایسه شد. نتایج نشان داد که بیش بیان ژن *AtPAP18* باعث افزایش معنی‌دار وزن تر و خشک گیاهان بیش بیان در مقایسه با گیاه شاهد در هر دو شرایط P+ و - P شده‌است. لیکن گیاهان جهش‌یافته فاقد بیان *AtPAP18* رفتار متفاوتی را در شرایط تغذیه‌ای ذکر شده از خود نشان دادند.



شکل ٦- مقایسه ویژگی‌های ساختار ریشه در شرایط P+ و P-. بررسی‌ها بر روی پنج میلی‌متر انتهایی ریشه گیاهان آرابیدوپسیس انجام شد. از هر لاین حداقل پنج گیاه بررسی شد. نام‌گذاری گیاهان مانند شکل ۵ است.



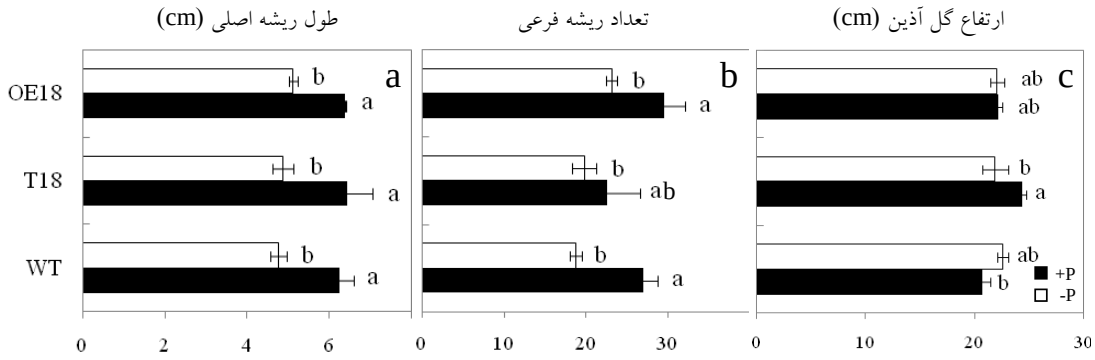
شکل ۷- مقایسه وزن تر و خشک (a, b) و نسبت وزنی ریشه به اندام هوایی (c, d) در گیاهان دارای بیان متفاوت AtPAP18 در محیط کشت دارای فسفات (+P) و فاقد فسفات (-P). نام‌گذاری گیاهان مانند شکل ۵ است. داده‌ها میانگین سه تکرار زیستی می‌باشد. اختلاف معنی‌دار در بین میانگین‌ها ($P<0.05$) توسط حروف مختلف نشان داده 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 وزن‌تر 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 ۷c, d). در آزمایشی دیگر از فسفات کلسیم نامحلول به‌عنوان تنها منبع فسفات در محیط کشت استفاده شد. در اطراف ریشه‌های گیاهان بیش‌بیان، 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 ۸ a, b).

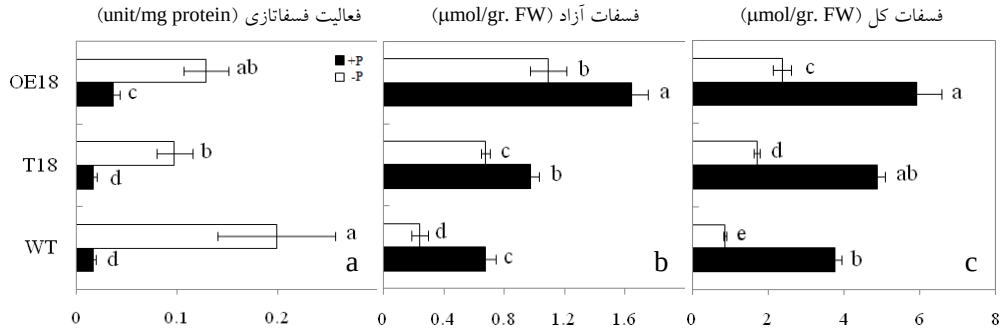
با بررسی گل‌آذین در گیاهان گلدانی در شرایط P- تفاوتی در اندازه و ظاهر گل‌آذین بین گیاهان مختلف مشاهده نشد. در شرایط P+ بیش‌ترین ارتفاع گل‌آذین مربوط به گیاهان فاقد بیان ژن *AtPAP18* و کمترین آن مربوط به گیاهان شاهد است. اختلاف ارتفاع گل‌آذین بین گیاهان فاقد بیان و بیش بیان از نظر آماری معنی‌دار نبود 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 ۸- مقایسه طول ریشه اصلی، تعداد ریشه فرعی و ارتفاع گل‌آذین در گیاهان آرابیداپسیس دارای بیان متفاوت *AtPAP18* در محیط کشت دارای فسفات (P+) و فاقد فسفات (P-). نام‌گذاری گیاهان مانند شکل ۵ است. a: طول ریشه اصلی b: تعداد ریشه فرعی c: ارتفاع گل‌آذین. داده‌ها میانگین سه تکرار زیستی می‌باشد. اختلافات معنی‌دار 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. نام‌گذاری 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 معنی‌دار در بین میانگین‌ها ($P<0.05$) توسط حروف مختلف نشان داده شده‌است.

بحث

همسانه‌سازی و بیش‌بیان 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 معمولا 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 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 احتمالا 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 بیش‌بیان 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).

در گیاهان بیش بیان آرابیدوپسیس 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 آن‌ها با استفاده از اگروباکتریوم رایزوژنز 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 شده‌است (Younessi-Hamzekhanlu et al. 2018). در شرایط P-، علی‌رغم افزایش معنی‌دار محتوای فسفات در گیاهان بیش‌بیان، اختلاف در فعالیت اسیدفسفاتازی در گیاهان شاهد و بیش‌بیان معنی‌دار نبود. فعالیت اسیدفسفاتازی در گیاهان فاقد بیان *AtPAP18* در شرایط P+ تفاوت معنی‌داری با گیاه شاهد نشان ندادند ولی در شرایط P- فعالیت اسیدفسفاتازی این گیاهان دچار کاهش شده‌است. با این وجود، در هر دو شرایط P+ و P- محتوای فسفات نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافته است (شکل ۹). بررسی‌ها نشان داده است که در خانواده‌های ژنی، وجود ژن‌های متعدد با عملکرد مشابه سبب همپوشانی عملکردی آن‌ها می‌شود و بیان آن‌ها در یک ارتباط شبکه‌ای تنظیم می‌شود (Buzduga et al. 2018).

به‌نظر می‌رسد که در شرایط عادی رشد (P+)، فقدان بیان *PAP18* با افزایش جزئی بیان دیگر ژن‌ها جبران شده‌است و با تخریب *AtPAP18*، ژن‌های کمکی فعال شده و تغییری در فعالیت فسفاتازی کل مشاهده نمی‌شود. 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 آزمایش‌ها، هیدرولیز سوبسترای عمومی pNPP بوده است. لذا احتمال می‌رود 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 بافتی در گیاهان جهش‌یافته فاقد بیان نسبت به گیاهان شاهد افزایش نشان داده است (شکل ۸). در شرایط تنش P- شاهد افزایش عمومی بیان ژن‌های فسفاتازی هستیم، احتمالا در گیاهان 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 آرابیدوپسیس 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 جهش‌یافته فاقد آنزیم PAP26 (لاین‌های 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 فسفوانول‌پیروات (PEP) و فسفاتیدیل‌کولین (PLP)، میزان فعالیت آنزیمی گیاهان مذکور نه تنها کاهش نداشت، بلکه افزایش ۱/۵ تا ۲ برابری نیز نشان داد. افزایش فعالیت فسفاتازی و محتوای فسفات در این گیاهان احتمالا به تغییر بیان اعضای این خانواده ژنی مربوط می‌شود. افزایش معنی‌دار وزن تر و خشک گیاهان بیش‌بیان 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 ۷) 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 به‌دست آمد که باز هم می‌تواند 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 آرابیدوپسیس طبیعی (شاهد)، فاقد بیان و بیش بیان مشاهده شد. این افزایش نسبت وزنی ناشی از ایجاد ریشه‌های جانبی ثانویه بر روی ریشه‌های جانبی اولیه بود و اختلافی در طول ریشه اصلی و تعداد ریشه‌های جانبی اولیه مشاهده نشد.

تغییر ویژگی‌های فنوتیپی در اثر غیر فعال نمودن یک ژن یکی از روش‌های مهم برای شناسایی عملکرد آن است. بررسی گیاهان فاقد بیان ژن *AtPAP18* در شرایط عادی، فنوتیپ واضحی همچون تغییر اندازه گیاه و یا اندام‌های آن، رنگیزه‌ها، کاهش باروری را نشان نداد. لیکن مشاهدات دقیق‌تر نشان داد که در این

گیاهان سرعت جوانه‌زنی بیشتر بوده و ریشه‌چه زودتر پدیدار می‌شود (شکل۵). هم‌چنین در این گیاهان ۵ میلی‌متر انتهای 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 (شکل٦). این نتایج نشان می‌دهد که عدم بیان یا بیان فراوان ژن *AtPAP18* به‌طور مستقیم یا غیر مستقیم در رشد و تمایز ریشه مؤثر بوده و تعیین نقش آن نیازمند تحقیقات بیشتر است.

به‌طور خلاصه، نتایج نشان می‌دهد تولید و توسعه ارقام گیاهان زراعی با بهبود جذب و استفاده از فسفات می تواند 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 آبزیان و محیط زیست است بنابراین چنین پروژه‌هایی می‌تواند با کاهش مصرف کودها، به حفظ سلامت محیط زیست نیز کمک شایانی نماید.

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 phosphate 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 β-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. InPlant 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 Physiolgy 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 (19900) 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.