

بررسی مکانیزم‌های بیوشیمیایی مقاومت به کمبود فسفر در برنج در مسیر گلیکولیز

سپیده ترابی^۱ و سید قاسم حسینی سالکده^{۲*}

۱، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، گروه اصلاح نباتات، تهران، ایران

۲، بخش ژنومیکس، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۳۰ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۳/۴)

The Study of Biochemical Mechanisms of Phosphorous Deficiency in the Glycolysis Pathway of Rice

S. TORABI¹ AND GH. HOSSENI SALEKDEH^{2*}

1, Department of Plant Breeding, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

2, Department of Genomics, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran

(Received: February 19, 2013 - Accepted: May 25, 2013)

Abstract

Rice is one of most important crops feeding about half of the world population. Phosphorous is one of limiting factors of rice growth and its deficiency substantially decreases rice yield. In this study, we aimed to identify biochemical mechanisms of rice adaptation to phosphorous deficiency in leaf and root. We compared the metabolites in parental lines, Nipponbare, and its near isogenic line (NIL6-4) containing a major QTL for phosphorous uptake (PUP1) on chromosome 12. Phosphorous deficiency resulted in significant decrease in number of tillers and fresh weight in both parental line and its near isogenic line, however, this reduction was more pronounced in the parental line. Analysis of the level of several soluble sugars and activity of enzymes involved in energy production revealed that phosphorous deficiency could lead to some changes in glycolysis pathway in rice near isogenic line so that the plant could cope with the ATP shortage. It is most likely that enhancement of this biochemical pathways may increase rice adaptation to phosphorous deficiency and consequently increase plant production with less phosphorus fertilizer required.

Keywords: Phosphorous deficiency, Rice, Metabolom

چکیده

برنج یکی از مهمترین محصولات غذایی است که غذای تقریباً نیمی از مردم جهان را تأمین می‌کند. فسفر یکی از عوامل محدودکننده رشد و توسعه برنج می‌باشد و کمبود آن تأثیر بسیار شدیدی بر عملکرد برنج خواهد داشت. هدف از این مطالعه شناسایی مکانیزم‌های بیوشیمیایی مقاومت برنج به کمبود فسفر در ریشه و برگ می‌باشد. متابولیت‌های مرتبط با کمبود فسفر در دو لاین والدینی Nipponbare و لاین ایزوژنیک (NIL6-4) که حامل مکان‌ژنی اصلی جذب فسفر (PUP1) روی کروموزوم ۱۲ می‌باشد، مقایسه گردیدند. تنش فسفر موجب کاهش در تعداد پنجه و وزن تر هر دو لاین گردید اما این کاهش در لاین والدینی بیشتر از لاین ایزوژنیک بود. اندازه‌گیری میزان انواع قندهای محلول و فعالیت آنزیم‌های مرتبط با تولید انرژی در این تحقیق نشان داد که در شرایط کمبود فسفر، تغییراتی در مسیرهای اصلی گلیکولیز در لاین ایزوژنیک برنج صورت می‌گیرد، تا گیاه بدین وسیله بر مشکل کمبود فسفر فائق آید و تا حد امکان کمبود ATP را جبران نماید.

واژه‌های کلیدی: تنش کمبود فسفر، برنج، مکانیزم مقاومت، متابولوم

بومی به نام Kasalath (هندی، مقاوم) استفاده نمودند. آن‌ها یک QTL اصلی روی کروموزوم ۱۲ برای جذب فسفر، راندمان استفاده از فسفر، وزن خشک و تعداد پنجه تعیین کردند (Wissuwa et al., 1998). Ni et al., (1998) با استفاده از یک جمعیت RIL از تلاقی IR20 (متحمل) با IR55178-3B-9-3 (حساس)، یک QTL مشابه در همان مکان پیدا کردند (Ni et al., 1998).

Wissuwa et al., (2001) لاین‌های ایزوژنیکی تولید کرد که آلل بخشنده از Kasalath را در یک زمینه ژنتیکی Nipponbare حمل می‌کنند و سبب افزایش جذب تا ۳-۴ برابر نسبت به والد تکراری می‌گردد. این مسأله به خاطر رشد بیشتر ریشه در شرایط کمبود فسفر می‌باشد. درحالی‌که در رقم Nipponbare رشد ریشه در شرایط کمبود فسفر قابل دسترس به شدت کاهش می‌یابد (Wissuwa et al., 2001a). این مکان ژنی در نهایت PUP1 نامیده شد (Wissuwa et al., 2002). بر این اساس برای روشن کردن مکانیزم سازگاری برنج به کمبود فسفر و تغییرات در سنتز متابولیت‌های مرتبط با کمبود فسفر ما لاین والدینی Nipponbare را با لاین ایزوژنیک (NIL6-4) حمل‌کننده مکان ژنی اصلی جذب فسفر (PUP1) روی کروموزوم ۱۲ را با یکدیگر مقایسه کردیم. هدف از این مطالعه شناسایی ژن‌های دخیل در مقاومت برنج به کمبود فسفر در ریشه و اندام‌هوایی و مقایسه پاسخ متابولوم این دو بافت تحت شرایط کمبود فسفر بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این آزمایش کشت Nipponbare و NIL6-4 تحت شرایط کمبود فسفر و نرمال در خاک مطابق با روش ارائه شده توسط Wissuwa et al., (1998) انجام گرفت به طوری‌که از قسمتی از خاک‌های موجود در محوطه دانشگاه NIAES که مدت ۳۰ سال هیچ کود فسفره‌ای به آن اضافه نگردیده است و دارای کمبود فسفر می‌باشد، استفاده گردید بدین ترتیب کلیه کارهای مربوط به کشت گیاهان و نمونه‌گیری آن‌ها در مرکز تحقیقات بین‌المللی در علوم کشاورزی این دانشگاه در شهر تسوکوبا^۱ ژاپن صورت گرفت. در این تحقیق نمونه‌گیری از بافت ریشه و اندام‌هوایی به محض اینکه با اندازه‌گیری‌های صفات مرفولوژیکی اعمال تنش در گیاهان مشاهده شد، انجام گرفت.

مقدمه

برنج یکی از مهمترین محصولات غذایی است که غذای تقریباً نیمی از مردم جهان را تأمین می‌کند. فسفر یکی از عناصر ضروری گیاه و دومین عنصر غذایی محدودکننده در تولیدات زراعی بعد از نیتروژن می‌باشد. چگونگی درک یا حس کردن کمبود فسفر در گیاه و پاسخ آن‌ها می‌تواند انتخاب، اصلاح و روش‌های انتقال ژن برای توسعه محصولات گیاهان زراعی را آسان نماید و مصرف کودهای فسفره را کاهش دهد. این عنصر نقش مهمی در تولید انرژی، سنتز اسیدهای نوکلئیک، فتوسنتز، گلیکولیز، تنفس، سنتز و پایداری غشاء و فعال‌سازی و غیرفعال کردن آنزیم‌ها، فعالیت‌های اکسایشی، انتقال پیام، متابولیسم کربوهیدرات‌ها و تثبیت نیتروژن دارد. چگالی یا شیب غلظت از محلول فسفر خاک به سلول گیاهی تا ۲۰۰۰ برابر افزایش می‌یابد (با میانگین غلظت فسفات معدنی $1 \mu\text{M}$ در محلول خاک). این غلظت بسیار پایین‌تر از km مربوط به جذب گیاه می‌باشد. بنابراین هر چند فسفر تثبیت‌شده در بسیاری از خاک‌ها فراوان است، ولی این فسفر برای گیاه غیرقابل دسترس می‌باشد. این مسأله سبب می‌شود عملکرد گیاهان زراعی در ۳۰-۴۰ درصد زمین‌های دنیا به وسیله کمبود فسفر محدود شوند. علاوه بر این، فسفر به علت ترکیب شدن با کاتیون‌ها به خصوص آلومینیوم و آهن تحت شرایط اسیدی به سرعت غیرمحلول می‌گردد. خاک‌های اسیدی مناطق گرمسیری یا استوایی و نواحی زیراستوایی تمایل زیادی به کمبود فسفر دارند. فسفر در خاک‌های قلیایی نیز به سرعت با یون کلسیم ترکیب نامحلولی می‌سازد. در حقیقت فسفر تنها در محدوده کمی از pH ۵-۴/۵ به صورت محلول می‌باشد. در نتیجه فسفر محدودکننده‌ترین عنصر برای رشد و توسعه گیاه می‌باشد (Raghothama et al., 2005; Vance et al., 2003; Hammond et al., 2004; Ismail et al., 2007). گیاهان مکانیزم‌های زیادی برای سازگاری به کمبود فسفر در خود توسعه داده‌اند که شامل افزایش جذب فسفر و بالبردن کارائی همان میزان فسفر موجود در گیاه می‌باشد (Hammond et al., 2004). هر چند نقش این مکانیزم در افزایش جذب فسفر در برنج و مکانیزم‌های مولکولی تحمل برنج به کمبود فسفر هنوز روشن نشده است.

برای تحمل به کمبود فسفر، دو مطالعه نقشه‌یابی مکان ژنی صفات کمی در برنج گزارش شده است. Wissuwa et al. (1998) از یک جمعیت اینبرد حاصل از تلاقی برگشتی با والد تکراری Nipponbare (ژاپنی، حساس) و یک رقم

جدید منتقل شده و این ظروف جهت تیخیر کامل الکل به دستگاه سانتریفیوژ مخصوص که به یک پمپ خلاء متصل شده بود (Savant SPD1018) و دمای آن روی ۵۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شده است، به مدت یک تا ۱/۵ ساعت منتقل شدند. سپس قندهای باقی‌مانده در ظروف پلاستیکی در ۲۵۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر شده حل شده و در دمای ۲۰- سانتی‌گراد تا زمان اندازه‌گیری قندهای محلول نگهداری شدند. برای اندازه‌گیری غلظت هریک از قندهای گلوکز، فروکتوز و ساکاروز از دستگاه فتومتریک با استفاده از روش آنزیمی *Hajirezaei et al.* (2000) استفاده شده و با استفاده از فرمول ۱ مقدار آن‌ها محاسبه گردید.

$$(1) \quad \text{حجم محلول درون ظروف فتومتر (}\mu\text{l)} \times \text{حجم محلول استخراج شده (}\mu\text{l)} \times \text{میزان تغییر چگالی نوری (OD)} \\ = \frac{\text{غلظت قندهای محلول (}\mu\text{mol/gfw)}}{1000 \times \text{وزن تر نمونه (g)} \times \text{حجم نمونه مورد اندازه‌گیری قرارگرفته (}\mu\text{l)} \text{ (}\mu\text{l)} \text{ توسط فتومتر (}\mu\text{l)} \times 6/19}$$

میکرولیتر دیگر به هر کدام از ظروف پلاستیکی هیدروکسید پتاسیم ۰/۲ نرمال اضافه شده و در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه نگهداری شدند. بعد از آن ۷۰ میکرولیتر اسیداستیک ۱ نرمال به هر کدام از ظروف پلاستیکی جهت خنثی‌سازی نمونه‌ها اضافه شد و نمونه‌ها ۱ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول روئی جهت هضم نمونه‌ها برای اندازه‌گیری نشاسته استفاده شد و ۱۰۰ میکرولیتر از بافر استات سدیم که به ازاء هر میلی-لیتر آن ۲ میلی‌گرم آنزیم آمیلوگلوکوزیداز (سیگما) به آن اضافه شده بود، اضافه گردید و نمونه‌ها به مدت یک شب در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از خارج‌سازی نمونه‌ها از انکوباتور جهت اندازه‌گیری نشاسته مورد استفاده قرار گرفتند. بقیه مراحل اندازه‌گیری همانند روش استفاده‌شده برای اندازه‌گیری قند محلول از روش *Hajirezaei et al.* (2000) استفاده گردیده بود. و با استفاده از فرمول ۲ مقدار نشاسته به‌دست‌آمده محاسبه گردید.

$$(2) \quad \text{حجم کلی محلول هضم‌شده (}\mu\text{l)} \times \text{حجم محلول درون ظروف فتومتر (}\mu\text{l)} \times \text{حجم محلول استخراج شده (}\mu\text{l)} \times \text{میزان تغییر چگالی نوری (OD)} \\ = \frac{\text{غلظت نشاسته (}\mu\text{mol glucose/g fw)}}{1000 \times \text{وزن تر نمونه (g)} \times \text{حجم نمونه مورد اندازه‌گیری قرار گرفته توسط فتومتر (}\mu\text{l)} \times \text{حجم نمونه مورد هضم قرار گرفته (}\mu\text{l)} \times 6/19}$$

چینی کاملاً پودر شد سپس بافر استخراج (حاوی ۵۰ mM تریس، ۵ mM کلریدمنیزیم، ۵ mM مرکاپتوتانول، ۱۵٪ گلایسیرین، ۱ mM اتیلن دی‌آمید تترا استیک‌اسید، ۱ mM

استخراج و اندازه‌گیری قندهای محلول و نامحلول

مطابق با روش *Sonnewald et al.* (1992) و با کمی تغییرات قندهای محلول استخراج شدند. ۷۵۰ میکرولیتر اتانول ۸۰ درصد به ظروف پلاستیکی ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌گرم نمونه‌تر اندام‌هوایی و ۱۰ میلی‌گرم بافت فریز درایر شده ریشه که قبلاً به‌وسیله هاون و ازت مایع پودر شده بودند، اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در ۸۰ درجه سانتی‌گراد جهت استخراج کامل قندهای محلول نگهداری شدند و جهت خنک‌کردن به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. نمونه‌های خنک‌شده به مدت پنج دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول روئی ظروف پلاستیکی به ظروف

استخراج و اندازه‌گیری نشاسته

محتوای نشاسته اندام‌هوایی و ریشه نمونه‌هایی تهیه شده با کمی تغییرات با استفاده از روش *Sonnewald et al.* (1992) اندازه‌گیری شد. ۵۰ میلی‌گرم بافت‌تر اندام‌هوایی و ۱۰ میلی‌گرم بافت‌خشک ریشه در یک ظرف پلاستیکی ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته و ۷۵۰ میکرولیتر اتانول ۸۰ درصد به آن اضافه شد. ظروف پلاستیکی به مدت ۶۰ دقیقه در ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا اینکه قندهای محلول آن‌ها کاملاً استخراج شود. بعد آن‌ها به مدت سه دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و محلول روئی آن‌ها که حاوی قندهای محلول بود دور ریخته شد. عمل اضافه کردن الکل ۸۰ درصد، سانتریفیوژ و دور ریختن محلول روئی دوبار دیگر تکرار شد. سپس ظروف پلاستیکی حاوی رسوبات زیر هود به مدت ۳۰ دقیقه کاملاً خشک شدند. رسوبات ته آن‌ها در ۲۰۰ میکرولیتر هیدروکسیدپتاسیم ۰/۲ نرمال حل شده و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد نمونه‌ها از چهار درجه سانتی‌گراد خارج شده و ۲۰۰

استخراج آنزیمی

۵۰ میلی‌گرم بافت‌تر اندام‌هوایی و ۱۰ میلی‌گرم بافت خشک ریشه تهیه‌شده به‌وسیله نیتروژن مایع در یک هاون

اندازه‌گیری فعالیت اینورتاز واکوئلی (ایزوفرم اسیدی)

اینورتاز واکوئلی از روش Hajirezaei *et al.*, (1994) با کمی تغییرات استفاده شد. طبق این روش برای هر نمونه همانند ایزوفرم سیتوسولی دو ظرف پلاستیکی ۲ میلی‌لیتری در نظر گرفته شد در هر دو آن‌ها به ترتیب ۲۰ میکرولیتر از بافر استات سدیم با pH حدود ۴/۸، ۲۰ میکرولیتر محلول ۰/۵ مولار ساکاروز و ۳۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر شده ریخته شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از روشناور به دست آمده از نمونه‌های برگ یا ریشه به هر کدام از آن‌ها اضافه شده و به سرعت ۱۰ میکرولیتر بافر تریس ۱ مولار با pH حدود ۸ اضافه کرده و به دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه منتقل شد که نشان‌دهنده زمان صفر یا عدم فعالیت آنزیم بود و ظرف پلاستیکی دیگر برای انجام فعالیت آنزیم به دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۶۰ دقیقه منتقل شد. در پایان زمان ذکر شده و به منظور پایان دادن به واکنش آنزیمی ظرف پلاستیکی دوم ابتدا ۱۰ میکرولیتر بافر تریس ۱ مولار با pH حدود ۸ اضافه کرده و در ادامه همانند ظرف پلاستیکی اولی به سرعت به مدت ۵ دقیقه به دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. در پایان میزان افزایش گلوکز موجود در ظرف دوم نسبت به ظرف اول مبنای فعالیت آنزیم قرار گرفت. برای اندازه‌گیری غلظت گلوکز از روش ذکر شده در بند اندازه‌گیری قندهای محلول به روش فتومتری استفاده شد و میزان فعالیت آنزیم بر اساس میکرومول گلوکز در میلی‌گرم وزن تر اندام‌هوایی و وزن خشک ریشه در ۱ دقیقه محاسبه شد.

اندازه‌گیری فعالیت اینورتاز آپوپلاستی (ایزوفرم اسیدی)

مطابق روش Hajirezaei *et al.*, (1994) با کمی تغییرات بود. برای این منظور از رسوبات شسته شده در قسمت استخراج استفاده شد. به رسوب مذکور ۲۰ میکرولیتر از بافر استات سدیم با pH حدود ۴/۸، ۲۰ میکرولیتر محلول ۰/۵ مولار ساکاروز و ۵۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر شده اضافه شد. سپس به دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۶۰ دقیقه منتقل شد. در پایان زمان ذکر شده و به منظور پایان دادن به واکنش ابتدا ۱۰ میکرولیتر بافر تریس ۱ مولار با pH حدود ۸ اضافه کرده و در ادامه به سرعت به مدت ۵ دقیقه به دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. در پایان میزان افزایش گلوکز موجود مبنای فعالیت آنزیم قرار گرفت. برای اندازه‌گیری غلظت گلوکز از روش ذکر شده استفاده شد و میزان فعالیت آنزیم بر اساس میکرومول گلوکز در میلی‌گرم وزن تر در اندام‌هوایی و وزن خشک در ریشه در ۱ دقیقه محاسبه شد.

اتیلن گلایکول تترااستیک اسید و ۰/۱mM بازدارنده فسفاتازها (Pefablock phosphatase inhibitor) با pH=۶/۸ که قبلاً بر روی یخ خنک شده بود به آن اضافه شده و در دمای ۴ درجه به مدت ۱۵ دقیقه به وسیله شیکر تکان داده شد. در ادامه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ۱۸۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس روشناور برداشته شده و به ظروف پلاستیکی جدید منتقل گردیدند. از این روشناور برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی اینورتاز سیتوسولی (قلیائی)، واکوئلی (اسیدی)، گلیسرآلدئید فسفات دهیدروژناز سیتوسولی، ADPGlc پیروفسفوریلاز، پیرووات کیناز و مالیت دهیدروژناز می‌توان استفاده نمود. برای اندازه‌گیری فعالیت اینورتاز آپوپلاستی (اسیدی) نیز از رسوبات باقی‌مانده ته ظروف پلاستیکی بعد از چندین بار شستن این رسوبات به وسیله بافر استخراج و در هر بار سانتریفیوژ کردن تحت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت سه دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور ریختن روشناور، استفاده شد (Hajirezaei *et al.*, 1994).

اندازه‌گیری فعالیت اینورتاز سیتوسولی (ایزوفرم قلیایی)

اینورتاز سیتوسولی طبق روش Hajirezaei *et al.*, (1994) با کمی تغییرات بود. به این ترتیب که، برای هر نمونه دو ظرف پلاستیکی ۲ میلی‌لیتری در نظر گرفته شد. در هر دو آن‌ها به ترتیب ۲۰ میکرولیتر از بافر هپس با pH حدود ۸، ۲۰ میکرولیتر محلول ۰/۵ مولار ساکاروز و ۴۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر شده ریخته شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از محلول روئی به دست آمده از نمونه‌های اندام‌هوایی و ریشه به هر کدام از آن‌ها اضافه شده و به سرعت یک ظرف پلاستیکی به عنوان شاهد به دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه منتقل شد که نشان‌دهنده زمان صفر یا عدم فعالیت آنزیم بود و ظرف پلاستیکی دیگر برای انجام فعالیت آنزیم به دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۶۰ دقیقه منتقل شد. در پایان زمان ذکر شده و به منظور پایان دادن به واکنش، این ظرف پلاستیکی همانند ظرف پلاستیکی اولی به مدت ۵ دقیقه به دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. در پایان میزان افزایش گلوکز موجود در ظرف پلاستیکی دوم نسبت به ظرف پلاستیکی اول مبنای فعالیت آنزیم قرار گرفت. برای اندازه‌گیری غلظت گلوکز از روش ذکر شده در بند اندازه‌گیری قندهای محلول به روش فتومتری استفاده شد و میزان فعالیت آنزیم بر اساس میکرومول گلوکز در میلی‌گرم وزن تر در اندام‌هوایی و وزن خشک در ریشه در ۱ دقیقه محاسبه شد.

اندازه‌گیری فعالیت فسفوفروکتوکیناز وابسته به ATP^۴

فسفوفروکتوکیناز وابسته به ATP طبق روش Wang *et al.*, (1997) با کمی تغییرات بود. به این ترتیب که، مقدار ۲۹۰ میکرولیتر از بافر (شامل ۷۵ mM HEPES-۶ فسفات، ۰/۱ mM NADH) و ۵ میکرولیتر از نمونه‌های موردنظر به انضمام آلدولاز، گلیسرول ۳-فسفات دهیدروژناز، تریوزفسفات ایزومراز در چاهک‌های ظرف مخصوص فتومتر ریخته شد و به مدت ۱۰-۵ دقیقه اجازه می‌دهیم تا قرائت انجام گیرد سپس ATP برای شروع کار اضافه می‌گردد و ۴۰ دقیقه قرائت ادامه پیدا خواهد کرد.

اندازه‌گیری فعالیت مالیت دهیدروژناز^۵

مالیت دهیدروژناز طبق روش Hajirezaei *et al.*, (1994) با کمی تغییرات بود. به این ترتیب که، مقدار ۲۹۵ میکرولیتر از بافر (شامل ۵۰ mM TES با pH=۷/۲، ۵ کلریدمنیزیم، ۰/۲ mM NADH، ۰/۰۵٪ Triton X-100) و ۵ میکرولیتر از نمونه‌های موردنظر در چاهک‌های ظرف مخصوص فتومتر ریخته شد و به مدت ۵ دقیقه اجازه می‌دهیم تا قرائت انجام گیرد سپس اوگزالواستات برای شروع کار اضافه می‌گردد و ۴۰ دقیقه قرائت ادامه پیدا خواهد کرد.

تجزیه آماری

کلیه محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزارهای MSTATC و برای رسم نمودارها و جداول آماری نیز از نرم‌افزارهای Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

اندازه‌گیری‌های فیزیولوژی

بر روی نمونه‌های کشت شده دو صفت مورفولوژی اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از تعداد پنجه و وزن تر اندام‌هوایی نشان داد که Nipponbare و Nil-6.4 هر دو تحت تأثیر تنش قرار گرفته‌اند و در شرایط تنش تعداد پنجه و وزن تر اندام‌هوایی به شدت کاهش می‌یابد (شکل ۱). که این نتایج در کارهای قبل که توسط Torabi *et al.*, (2009) انجام شد نیز مشاهده گردید.

قندهای محلول و نامحلول در اندام‌هوایی

در تنش فسفر گیاه حساس و مقاوم هر دو در شرایط تنش

براساس میکرومول گلوکز در میلی‌گرم وزن تر در ۱ دقیقه محاسبه شد.

اندازه‌گیری فعالیت گلیسرآلدئیدفسفات دهیدروژناز سیتوپلاسمی^۱

گلیسرآلدئیدفسفات دهیدروژناز طبق روش Biemett *et al.*, (1999) با کمی تغییرات بود. به این ترتیب که، مقدار ۲۷۵ میکرولیتر از بافر (شامل ۱۰۰ mM Tris/HCl با pH=۷، ۵ mM کلریدمنیزیم، ۱ mM ناتریوم فلوراید^۱، ۵ mM DTT، ۰/۵ mM NADH و ۳-فسفوگلیسریت ۱۰۰ mM) در چاهک‌های ظرف مخصوص فتومتر (Plate) ریخته شد و ۵ میکرولیتر نمونه استخراج شده اضافه گردید به انضمام تریوزفسفات ایزومراز و فسفوگلیسریت کیناز سپس ظرف مخصوص فتومتر را در دستگاه گذاشته و اجازه می‌دهیم ۱۰ دقیقه در طول موج ۳۴۰ نانومتر خوانده شود تا مقدار NADH‌های موجود محاسبه گردد آن‌گاه برای شروع واکنش ATP اضافه گردید و تا ۴۰ دقیقه قرائت را ادامه خواهیم داد.

اندازه‌گیری فعالیت پیروات کیناز^۳

پیروات کیناز طبق روش Hajirezaei *et al.*, (1980) با کمی تغییرات بود. به این ترتیب که، مقدار ۲۹۵ میکرولیتر از بافر (شامل ۵۰ mM TES با pH=۷/۹، ۱۰ mM کلرید منیزیم، ۴۰ mM کلرید پتاسیم، ۰/۱ mM NADH، ۲ mM DTT، ۰/۵ mM PEP) و ۵ میکرولیتر از نمونه‌های موردنظر و در نهایت آنزیم لاکتادهیروژناز در چاهک‌های ظرف مخصوص فتومتر ریخته شد و به مدت ۵ دقیقه اجازه می‌دهیم تا قرائت انجام گیرد سپس ADP برای شروع کار اضافه می‌گردد و ۴۰ دقیقه قرائت ادامه پیدا خواهد کرد.

اندازه‌گیری فعالیت پیروفسفوریلاز UDPGlc

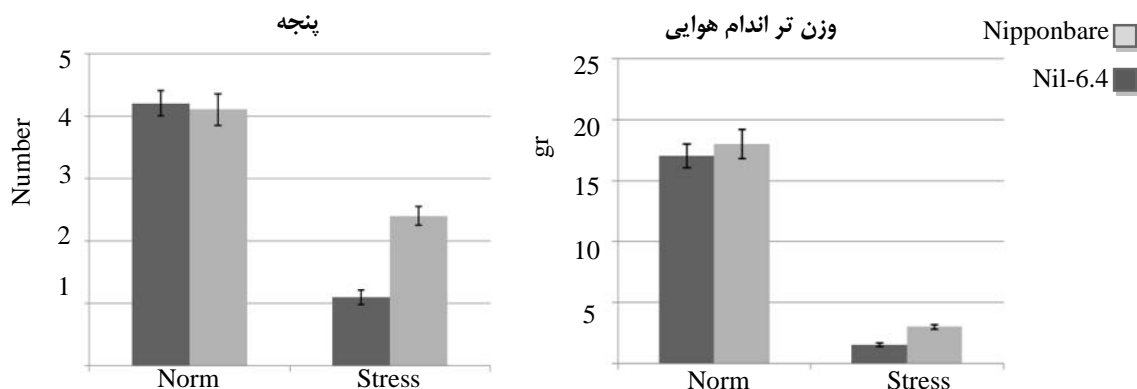
پیروفسفوریلاز طبق روش Zrenner *et al.*, (1993) با کمی تغییرات بود. به این ترتیب که، مقدار ۲۹۵ میکرولیتر از بافر (شامل ۱۰۰ mM Tris/HCl با pH=۸، ۱۰ mM کلرید منیزیم، ۱ mM NADP، ۲ mM Na-ppi، ۱ mM NaF) و ۵ میکرولیتر از نمونه‌های موردنظر و در نهایت آنزیم گلوکز ۶-فسفات دهیدروژناز و فسفوگلوکوموتاز در چاهک‌های ظرف مخصوص فتومتر ریخته شد و به مدت ۵ دقیقه اجازه می‌دهیم تا قرائت انجام گیرد سپس UDPGlc برای شروع کار اضافه می‌گردد و ۴۰ دقیقه قرائت ادامه پیدا خواهد کرد.

1. GAPDH
2. Natrium fluoride
3. Pyruvate Kinase

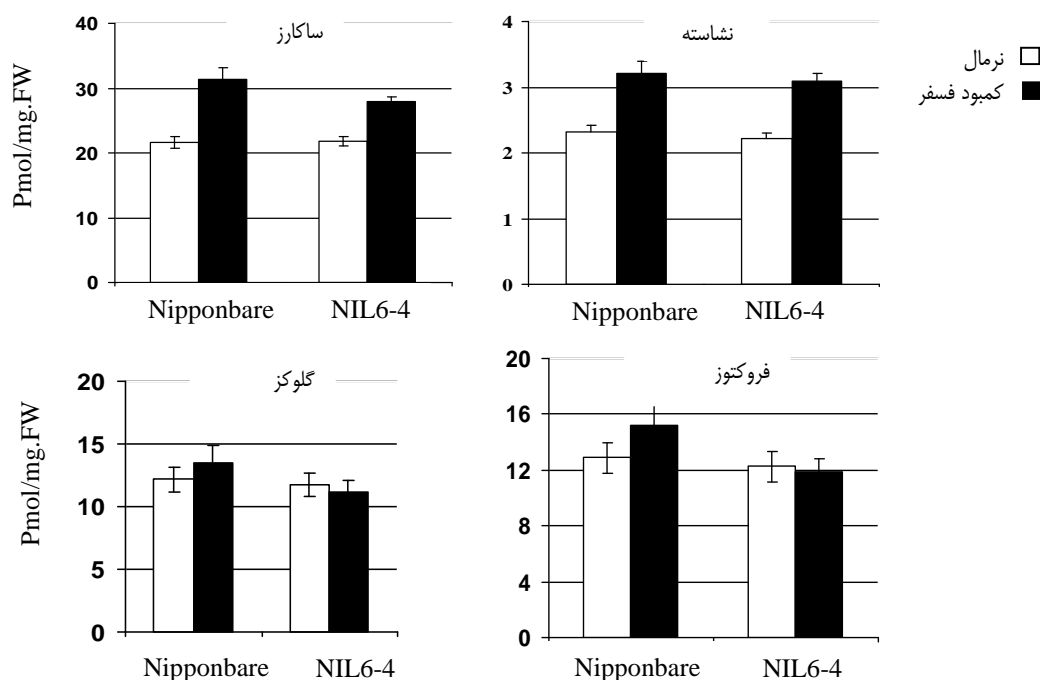
4. ATP dependent phosphofructokinase
5. Malate dehydrogenase

نداشت (شکل ۲) ولی مقدار نشاسته در آن‌ها افزایش یافته است (شکل ۲).

مقدار ساکاروز خود را در اندام‌هوایی افزایش دادند (شکل ۲). مقدار فروکتوز و گلوکز آن‌ها در هر دو شرایط تغییر معنی‌داری



شکل ۱- تأثیر تنش فسفر بر رشد اندام‌هوایی و تعداد پنجه



شکل ۲- تأثیر کمبود فسفر بر گلوکز، فروکتوز، ساکارز و نشاسته در اندام‌هوایی

دارد تا به این وسیله گیاه قادر به نجات خود تحت شرایط کمبود فسفر باشد (Hammond *et al.*, 2004; Hammond and White, 2008; Plaxton and Carswell, 1999). در این مسیر جایگزین، ساکاروز سنتز به جای فعالیت اینورتازها برای تبدیل ساکاروز به فروکتوز و گلوکز تبدیل ساکاروز به UDP-Glucose و فروکتوز را کاتالیز می‌نماید. بنابراین در طول کمبود فسفر تبدیل ساکاروز به جای استفاده از ATP می‌تواند در یک مسیر وابسته به

قندهای محلول و نامحلول در ریشه

سطوح گلوکز و فروکتوز تحت شرایط کمبود فسفر در ریشه در Nipponbare کاهش یافت، هنگامی که در Nil-6.4 به‌طور معنی‌داری افزایش داشته‌اند (شکل ۳). همچنین در Nipponbare مقدار فروکتوز تقریباً مساوی با سطح گلوکز است ولیکن در Nil-6.4 مقدار فروکتوز ۲ برابر گلوکز است (شکل ۳). این امر نشان‌دهنده این است که Nil-6.4 مسیر متابولیک دیگری برای گلیکولیز سیتوزولی

خاک افزایش یابد و به این وسیله خود را با شرایط کمبود فسفر سازگار نماید (Hammond, 2008).

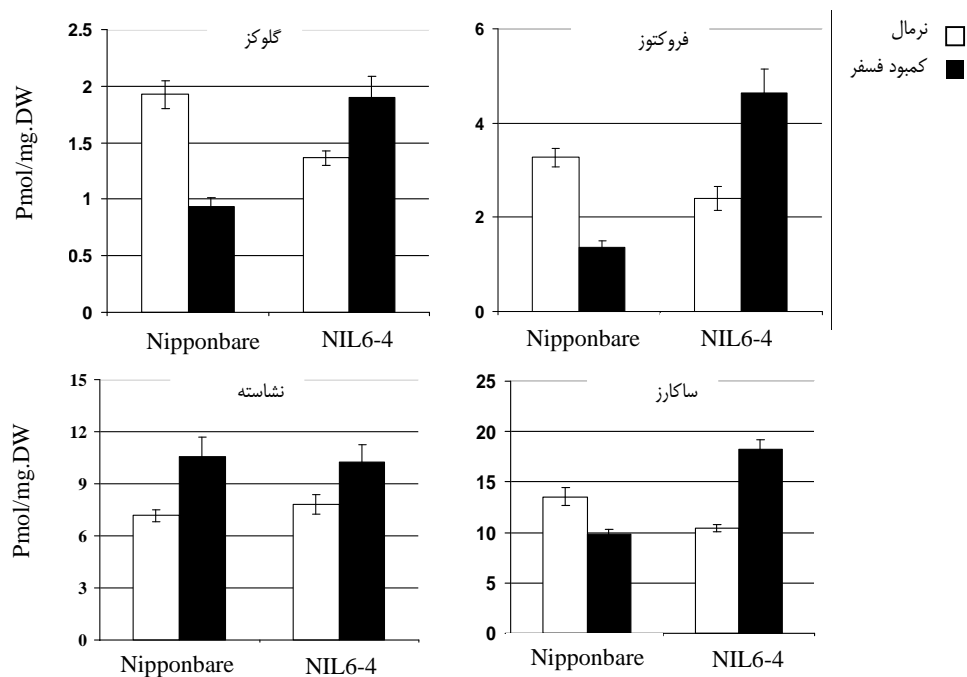
در اندام‌های هوایی هر دو رقم مقدار ساکاروز افزایش پیدا کرد. این افزایش در رقم حساس (Nipponbare) بیشتر از رقم مقاوم مشاهده شد (شکل ۲). این نتیجه تأییدی بر این است که رقم حساس، ساکاروز کمتری را به ریشه منتقل می‌نماید. نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که تحت شرایط کمبود فسفر هر دو ژنوتیپ در اندام‌هوایی و ریشه محتوای نشاسته خود را افزایش داده‌اند. این مهم در بافت‌های گیاهان مختلف تحت شرایط کمبود فسفر گزارش شده است (Wang *et al.*, 1997; Ciereszko *et al.*, 1996; Kondracka and Rychter, 1997; Ciereszko and Barbachwska, 2000). این امر می‌تواند به این علت باشد که کمبود فسفر خروج تریوزفسفات را از کلروپلاست تحت تأثیر قرار داده و آن را کاهش می‌دهد و در نتیجه تبدیل به نشاسته می‌گردد (Hammond, 2008).

اینورتازها

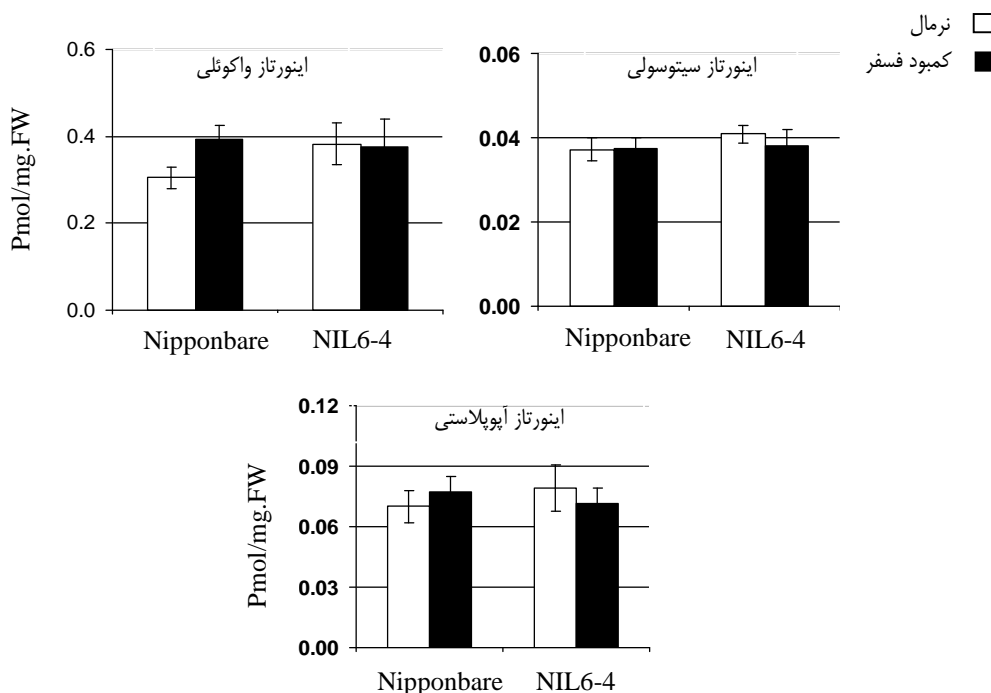
فعالیت سه گروه اینورتازی شامل اینورتازهای واکوئلی، سیتوزولی و آپوپلاستی در شرایط *In vitro* بررسی گردید. در اندام‌هوایی، هیچ‌کدام از این اینورتازها تغییر محسوسی را مشاهده نشد (شکل ۴). که این امر نتایج قندهای گلوکز و فروکتوز را نیز تأیید می‌نماید زیرا گلوکز و فروکتوز نیز تحت شرایط تنش تغییر محسوسی را نشان ندادند.

پیروفسفات (PPI) انجام گیرد، که خود یکی از راهکارهای دیگر برای سازگاری گیاه مقاوم می‌باشد (Hammond *et al.*, 2008).

مقدار ساکاروز ریشه در شرایط کمبود فسفر در Nipponbare کاهش معنی‌داری پیدا کرده است (شکل ۵) ولی در Nil-6.4 به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است (شکل ۳). بنابراین سطح ساکاروز در شرایط تنش به‌طور قابل ملاحظه‌ای در Nil-6.4 بیشتر از Nipponbare می‌باشد. شواهدی وجود دارد که تأثیر زیاد ساکاروز بر رشد و توسعه ریشه را نشان می‌دهد به‌طوری‌که افزایش آن باعث طولیل‌شدن طول ریشه می‌گردد (Jain *et al.*, 2007). همچنین گزارش شده است که Nil-6.4 در شرایط کمبود فسفر طول ریشه خود را افزایش می‌دهد ولی در Nipponbare این مسئله مشاهده نگردیده است (Wissuwa and Ae, 2001a; Torabi *et al.*, 2009). سطح بالاتر ساکاروز در ریشه Nil-6.4 می‌تواند یک دلیل بر نسبت رشد بالاتر ریشه در شرایط تنش باشد. که این مسئله در گزارش Nipponbare مشاهده نگردید. افزایش ساکاروز علاوه بر افزایش طول ریشه می‌تواند ترشح اسیدهای ارگانیک را القاء نماید (Kentaro *et al.*, 2003). همچنین افزایش ساکاروز می‌تواند پتانسیل شروع آبشار پیام‌رسانی ساکاروز را بالا برد که این مسئله سبب بیان ژن‌های دخیل در بهینه‌سازی بیوشیمی ریشه برای به‌دست‌آوردن فسفر خاک شود تا بیان و فعالیت ناقلین فسفات معدنی افزایش یابد و ترشح اسید فسفاتازها و ارگانیک اسیدها برای آزادسازی فسفر



شکل ۳- تأثیر کمبود فسفر بر گلوکز، فروکتوز، ساکارز و نشاسته در ریشه

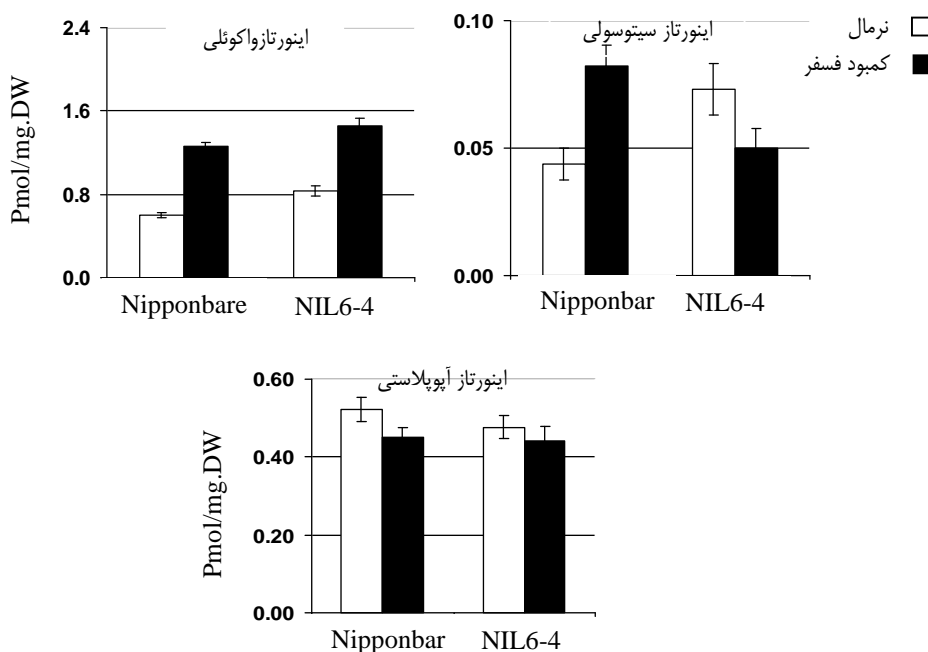


شکل ۴- تغییرات اینورتاز در اندام‌هوایی

دارد. این نکته در نتایج مربوط به قندها نیز تأیید شد. بنابراین این احتمال وجود دارد که گیاهان مورد مطالعه برای تجزیه ساکاروز از مسیر سوکروز سنتاز استفاده نماید تا به این وسیله بتواند مشکل کمبود فسفر خود را تا حدود زیادی برطرف نماید زیرا در این مسیر UDP-glucose pyrophosphorylase وجود دارد که به جای مصرف ATP از PPI استفاده

نتایج بررسی اینورتازها در ریشه نشان داد که اینورتاز واکوئلی تحت شرایط استرس در هر دو ژنوتیپ افزایش یافته است. اینورتاز سیتوپلاسمی در Nipponbare افزایش یافت ولی در NIL-6.4 کاهش معنی‌داری نداشت (شکل ۵). این کاهش می‌تواند تأییدکننده این مسئله باشد که رقم مقاوم مسیر جایگزینی را برای رفع مشکل کمبود فسفر در اختیار

می‌نماید.



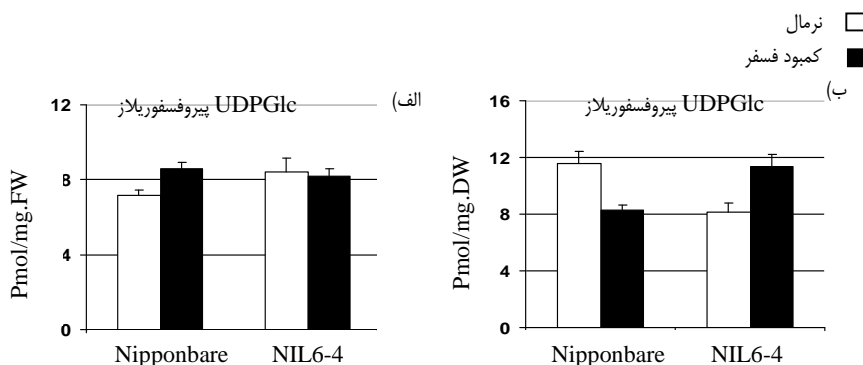
شکل ۵- تغییرات اینورتاز در ریشه

سوگروزستاز را در پیش می‌گیرد. Hammond *et al.*, (2004) اعلام داشتند که گیاهان در شرایط کمبود فسفر یک سری مسیرهای جایگزینی را در گلایکولیز و تنفس اتخاذ می‌کنند تا راندمان مصرف فسفر بالا رود. یکی از این راهکارها جایگزینی مسیر تبدیل ساکاروز به فروکتوز ۶- فسفات با فعالیت بیشتر این آنزیم، در مقایسه با فعالیت آنزیم اینورتاز می‌باشد.

UDP-Glucose Pyrophosphorylase

این آنزیم در اندام‌هوایی در هر دو ژنوتیپ، در شرایط تنش تغییر محسوسی نسبت به شرایط نرمال نداشت. اما در ریشه در Nipponbare در شرایط کمبود فسفر به شدت کاهش و در ریشه NIL-6.4 این آنزیم به شدت افزایش یافت (شکل ۶). Ciereszko and Kleczkowski (2006) و نیز این افزایش را در آرآبیدوسیس مشاهده نمودند که این

مسئله کاملاً اثبات می‌نماید که رقم مقاوم NIL-6.4 مسیر



شکل ۶- تغییرات UDPGlc (پیروفسفوریلاز، الف) اندام‌هوایی، ب) ریشه در اندام‌هوایی

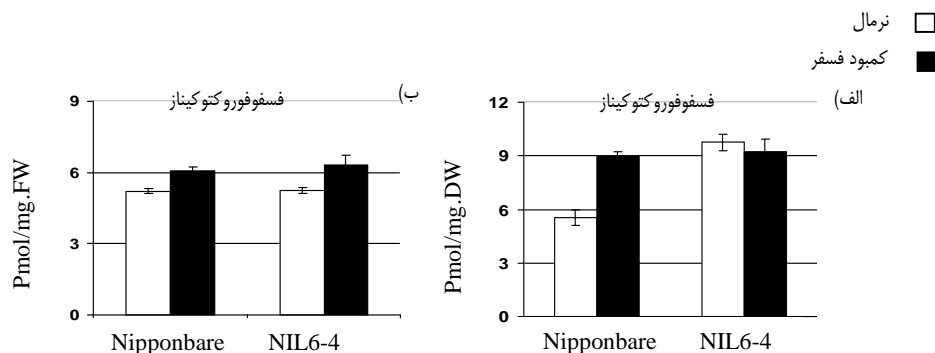
وابسته به PP_i صورت می‌گیرد که نتایج آزمایشات گذشته افزایش فعالیت آنزیم دوم را در تنش فسفر نشان می‌دهد (Hammond *et al.*, 2004). نتایج حاصل از اندازه‌گیری

فسفوفروکتوکیناز وابسته به ATP

تبدیل فروکتوز ۶- فسفات به وسیله فسفوفروکتوکیناز وابسته به ATP یا مسیر جایگزین آن یعنی فسفوفروکتوکیناز

مقادیر قندهای ساکاروز، گلوکز و فروکتوز در شرایط تنش در NIL-6.4 به شدت افزایش یافته است. می‌توان نتیجه گرفت که رقم مقاوم، برای مصرف این قندها به جای استفاده از مسیر PFK وابسته به ATP، از آنزیم PFK وابسته به PPI بهره می‌برد. بر اساس نظریه Hammond *et al.* (2004) در رقم مقاوم باید فعالیت آنزیم فسفوفروکتوکیناز وابسته به پیروفسفات افزایش یافته باشد تا راندمان مصرف فسفر بالا رود به علاوه Plaxton (2010) نیز این مسئله را تأیید می‌نماید.

فعالیت فسفوفروکتوکیناز وابسته به ATP نشان داد که در رقم مقاوم (NIL-6.4) فعالیت این آنزیم در هر دو شرایط نرمال و تنش تغییری نکرده است. ولی در رقم حساس (Nipponbare) فعالیت این آنزیم در شرایط تنش فسفر افزایش پیدا کرده است (شکل ۷) و این نتیجه نشان‌دهنده این است که رقم حساس برای تولید انرژی و متابولیت بیشتر سعی در افزایش تنفس دارد و این کار را با افزایش فعالیت این آنزیم انجام می‌دهد. در رقم مقاوم (NIL-6.4) این فعالیت در هر دو شرایط یکسان بوده است (شکل ۷). با توجه به اینکه



شکل ۷- تغییرات فسفوفروکتوکیناز. الف) ریشه، ب) اندام‌هوایی

این آنزیم محسوب می‌شود. در بررسی فعالیت این آنزیم در اندام‌هوایی مشاهده گردید که فعالیت آن در رقم مقاوم در هر دو شرایط یکسان بوده ولی در رقم حساس در شرایط کمبود فسفر افزایش مشاهده شد (شکل ۸).

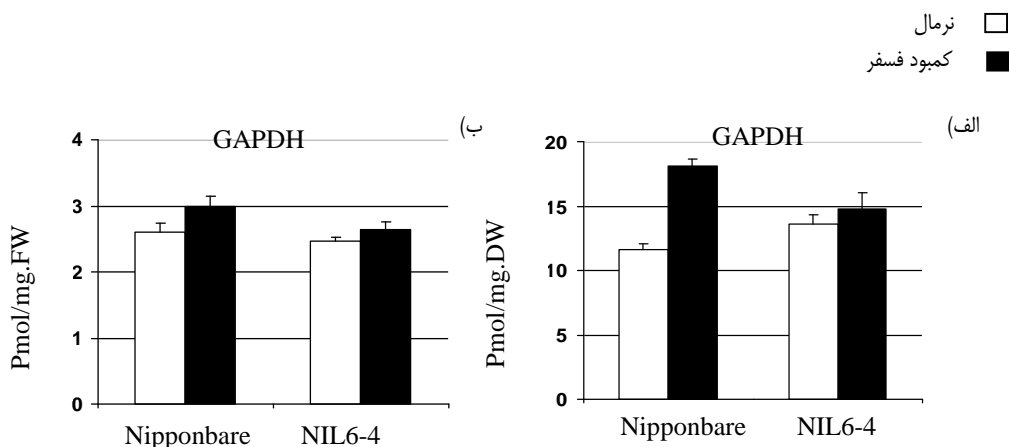
پیرووات کیناز

این آنزیم با مصرف آدنوزین دی‌فسفات^۱، PEP را به پیرووات تبدیل می‌نماید. در تخمین فعالیت این آنزیم در ریشه مشاهده گردید که فعالیت این آنزیم در شرایط کمبود فسفر در هر دو ژنوتیپ افزایش یافته است که این مسئله با فرضیه Hammond *et al.* (2004) مطابقت ندارد (شکل ۹). در اندام‌هوایی نیز پیرووات کیناز همانند ریشه در هر دو رقم در شرایط کمبود فسفر افزایش نشان داد (شکل ۹).

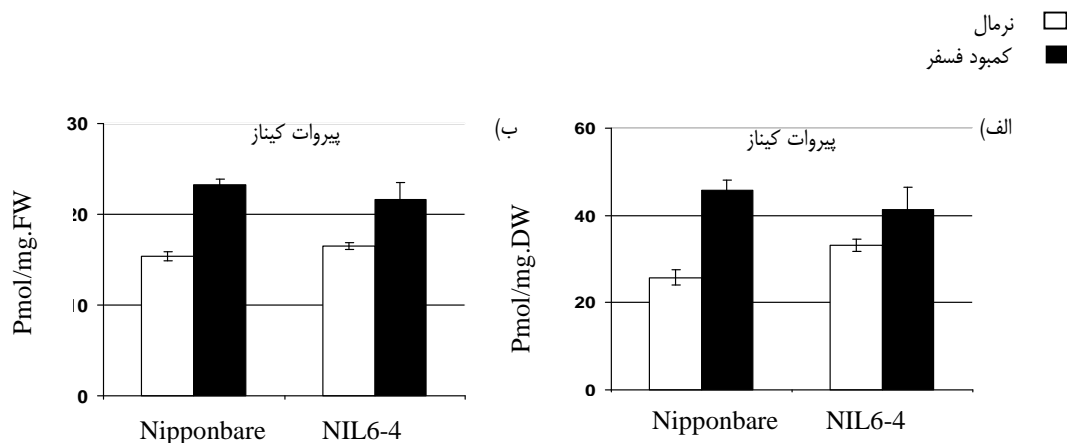
گلایسرآلدئید فسفات دهیدروژناز سیتوپلاسمی (GAPDH)

این آنزیم تبدیل G3P را به 3PGA انجام می‌دهد که این تبدیل به‌طور غیرمستقیم با مصرف ATP صورت می‌گیرد. در بررسی مقدار فعالیت این آنزیم در ریشه مشاهده گردید که فعالیت این آنزیم در رقم مقاوم (NIL-6.4) در هر دو شرایط نرمال و تنش یکسان بود ولی در رقم حساس فعالیت آن در شرایط تنش به شدت افزایش پیدا کرد (شکل ۸). در حقیقت این‌طور به نظر می‌رسد که رقم حساس برای افزایش سرعت تنفس، این آنزیم را افزایش می‌دهد درحالی‌که به‌نظر می‌رسد رقم مقاوم راهکار دیگری اعمال نموده است. این راهکار مبتنی بر افزایش فعالیت آنزیم G3PDH وابسته به NADP می‌باشد که مسیر جایگزین

1. ADP



شکل ۸- تغییرات گلايسرالدهیدفسفات دهیدروژناز سیتوپلاسمی. الف) ریشه، ب) اندام‌هوایی



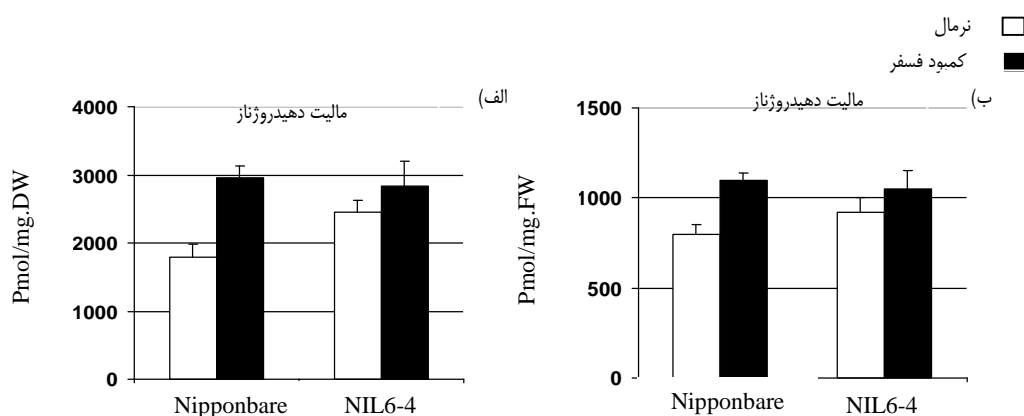
شکل ۹- تغییرات پیرووات کیناز. الف) ریشه، ب) اندام‌هوایی

می‌گیرد. همچنین ممکن است رقم مقاوم این مالات تجمع یافته را برای ترشح به محیط بیرون (خاک) استفاده نماید، چون یکی از راهکارهای گیاهان متحمل به کمبود فسفر ترشح مالیت و سیترات از ریشه به خاک می‌باشد تا به این وسیله فسفر خاک را آزاد نماید و در اختیار گیاه قرار دهد (Wissuwa *et al.*, 2001b). در تخمین فعالیت این آنزیم در اندام‌هوایی نیز دقیقاً همین روند مشاهده گردید (شکل ۱۰).

مالات دهیدروژناز

این آنزیم سبب هیدرولیز مالات می‌گردد. در بررسی فعالیت این آنزیم در ریشه مشاهده گردید، که فعالیت آن در رقم حساس در شرایط تنش افزایش یافت ولی در رقم مقاوم تغییر معنی‌داری ملاحظه نشد (شکل ۱۰). به نظر می‌رسد رقم حساس مالات تولیدشده را با فراوانی بیشتر به اگزالواستات تبدیل می‌نماید ولی در رقم مقاوم این تبدیل کمتر صورت

1. Oxaloacetate



شکل ۱۰- تغییرات مالیت دهیدروژناز. (الف) ریشه، (ب) اندام هوایی

آزمایش نشان داد که رقم مقاوم Nil-6.4 برنج برای سازگاری خود به تنش فسفر سعی در جایگزین نمودن آنزیم‌های وابسته به PPI به جای آنزیم‌های وابسته به ATP در مسیر گلایکولیز دارد به این علت مشاهده می‌گردد که در گیاه مقاوم بیان سوکروز سنتاز، UDP-glucose pyrophosphorylase را به طور معنی‌داری افزایش یافته که این مسئله قبلاً نیز گزارش گردیده است (Plaxton and Podestá, 2006; Li *et al.*, 2008). مسیره‌های سیتوزولی وابسته به PPI برای کمک به زنده ماندن گیاهان در شرایط تنش اثبات گردیده است تا به این وسیله مشکل کمبود فسفر تا حدود زیادی کاهش یابد.

سپاسگزاری

از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات که در اجرای این تحقیق همکاری داشته‌اند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

- Biemett S, Hajrezaei MR, Melzer M, Albrecht G, Sonnewald U (1999) Sucrose synthase activity does not restrict glycolysis in roots of transgenic potato plants under hypoxic condition. *Planta* 210 (1): 41-9.
- Ciereszko I, Barbachowska A (2000) Sucrose metabolism in leaves and roots of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during phosphate

نتیجه‌گیری کلی

پیروفسفات معدنی (PPI) محصول جانبی از بیوستتاز یک واکنش می‌باشد. هیدرولیز پیروفسفات به وسیله فسفاتاز معدنی کاتالیز می‌گردد. در همه موجودات و تعداد زیادی از میکروب‌ها مقدار زیادی از PPI به وسیله فسفاتاز معدنی کاتالیز می‌شود. PPI تولیدشده در طول بیوستتاز در صورتی که فسفاتاز معدنی کم بوده و یا اصلاً نباشد، تجمع پیدا می‌نماید ولی اگر باشد مصرف می‌شود. بعلاوه اگر آنزیم‌های وابسته به PPI که برای کارهای مفید سلول به جای ATP از PPI استفاده نمایند موجود باشد سبب می‌شوند که PPI به عنوان یک منبع انرژی مصرف گردد (Plaxton, 2010). مقدار ATP گیاهان به طور قابل ملاحظه‌ای به تنش‌های محیطی مانند کمبود فسفر حساس می‌باشد و ذخیره ATP سلولی به طور معنی‌داری در شرایط تنش کاهش می‌یابد (Plaxton and Podesta, 2006). ولی از آنجایی که در شرایط تنش نیز PPI در طول بیوستتاز ماکرومولکول‌های ضروری مانند پروتئین‌ها، نوکلئوتیدها و پلی‌ساکاریدها تولید می‌شود پس می‌توان نتیجه گرفت، که سطح PPI در هنگام تنش نیز در گیاهان تقریباً ثابت می‌ماند (Plaxton, 2010). به نظر می‌رسد تحمل گیاهان به تنش‌هایی مانند کمبود فسفر بستگی به سازگاری‌های مورفولوژیکی و متابولیکی دارد. نتایج این

- deficiency. *J. Plant Physiol.* 156:640-644.
- Ciereszko I, Gniazdowska A, Mikulska M, Rychter AM (1996) Assimilate translocation in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) during phosphate deficiency. *J. Plant Physiol.* 149: 343-348.
- Ciereszko L, Kleczkowski L (2006) Phosphate deficiency-dependent upregulation of UDP-glucose

- pyrophosphorylase genes is insensitive to ABA and ethylene status in Arabidopsis leaves. *Acta Physiologiae Plantarum*. 28(5): 387-393.
- Hajirezaei MR, U Sonnewald, R Viola, Carlisle D, Dennis M (1994) Transgenic potato plants with strongly decreased expression of pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase show no visible phenotype and only minor changes in metabolic fluxes in their tubers. *Planta* 192: 16-30.
- Hammond John P, Broadley MR, White PJ (2004) Genetic responses to phosphorus deficiency. *Annals of Botany*. 94: 323-332.
- Hammond JP, With PJ (2011) Sugar signaling in root responses to low phosphorus availability. *Plant Physiology* 156:1033-1040.
- Ismail AM, Heuer S, Thomson MJ, Wissuwa M (2007) Genetic and genomic approaches to develop rice germplasm for problem soils. *Plant Mol. Biol.* 65:547-570.
- Jain A, Poling MD, Karthikeyan AS, Blakeslee JJ, Peer WA, Titapiwatanakun B, Murphy AS, Raghothama KG (2007) Differential effects of sucrose and auxin on localized phosphate deficiency-induced modulation of different traits of root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 144: 232-247.
- Kentaro T, Nozomu K, Fumihiko S (2003) Transcriptional activation of phosphoenolpyruvate carboxylase by phosphorus deficiency in tobacco. *Journal of Experimental Botany*. 54(384): 961-969.
- Kondracka A, Rychter AM. (1997) The role of Pi recycling processes during photosynthesis in phosphate deficient bean plants. *J. Exp. Bot.* 48:1461-1468.
- Li K, Xu C, Li Z, Zhang K, Yang A, Zhang J (2008) Comparative proteome analyses of phosphorus responses in maize (*Zea mays* L.) roots of wild-type and a low-P-tolerant mutant reveal root characteristics associated with phosphorus efficiency. *Plant J.* 55: 927-939.
- Ni J, Wu P, Senadhira D, Huang N (1998) Mapping QTLs for phosphorus deficiency tolerance in rice (*Oryza Sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 97:1361-1369.
- Plaxton WC (2010) Metabolic Flexibility help plants to survive stress. *Plant Physiology*. Online.
- Plaxton WC, Carswell MC (1999) Metabolic Aspects of the Phosphate Starvation Response in Plants. In: "Plant Responses to Environmental Stresses: From Phytohormones to Genome Reorganization" (HR Lerner, ed.), M. Dekker Inc., NY; pp. 349-372.
- Plaxton, WC, Podestá FE (2006) The functional organization and control of plant respiration. *Crit. Rev. Plant Sci.* 25: 159-198.
- Raghothama KG, Karthikeyan AS (2005) phosphate acquisition. *Plant and Soil*. 274: 37-49.
- Sonnewald U (1992) Expression of *E. coli* inorganic pyrophosphatase in transgenic plants alters photoassimilate partitioning. *Plant J.* 2: 571-581.
- Torabi S, Wissuwa M, Heidari M, Naghavi MR, Gilany K, Hajirezaei MR, Omidi M, Yazdi-Samadi B, Ismail AM, Salekdeh GH. (2009) A comparative proteome approach to decipher the mechanism of rice adaptation to phosphorous deficiency. *Proteomics*. 9(1): 159-170.
- 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.
- Wang C, Tillberg JE (1997) Effects of short-term phosphorus deficiency on carbohydrate storage in sink and source leaves of barley (*Hordeum vulgare*). *New Phytol.* 136: 131-135.
- Wissuwa M, Ae N (2001a) Further characterization of two QTLs that increase phosphorus uptake of rice (*Oryza sativa* L.) under phosphorus deficiency. *Plant and Soil* 237: 275-286.
- Wissuwa M, Ae N (2001b) Genotypic variation for tolerance to phosphorus deficiency in rice and the potential for its exploitation in rice improvement. *Plant Breeding*. 120: 43-48.
- Wissuwa M, Wegner J, Ae N, Yano M (2002) Substitution mapping of Pup1: a major QTL increasing phosphorus uptake of rice from a phosphorus-deficient soil. *TAG. Theoretical and Applied Genetics*.

105: 890-897.
Wissuwa M, Yano M, Ae N (1998) Mapping of QTLs for phosphorus-deficiency tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 97: 777-783.

Zrenner R, Willmitzer L, Sonnewald U (1993) Analysis of the expression of potato uridinediphosphate-glucose pyrophosphorylase and its inhibition by antisense RNA. *Planta.* 190: 247-252.