

بررسی بیان ژن‌های دخیل در سازش به کمبود فسفر در گره‌های

دو سویه از باکتری همزیست نخود

مریم نصرافهانی¹

استادیار گروه زیست‌شناسی دانشگاه لرستان؛ Esfahani.m@lu.ac.ir

دریافت: 94/7/21 و پذیرش: 95/7/12

چکیده

تولید محصول در لگوم‌های مهم مانند نخود اغلب توسط کمبود فسفر خاک کاهش پیدا می‌کند. این کاهش به بازداشتن شدن فعالیت گره و نتیجتاً کاهش تثبیت نیتروژن در شرایط کمبود فسفر نسبت داده می‌شود. بنابراین شناسایی مکانیسم‌های مولکولی مسئول بهبود عملکرد همزیستی تحت شرایط کمبود فسفر در رابطه همزیستی نخود-مزوریوبیوم می‌تواند برای بالا بردن پتانسیل تولید محصول این لگوم از طریق روش‌های مهندسی ژنتیک و اصلاح نباتات استفاده شود. در این مطالعه، میزان تغییرات در بیان برخی ژن‌ها تحت شرایط کمبود فسفر در مقایسه با شرایط فسفر کافی (شاهد) در دو رابطه همزیستی (نخود-*M. mediterraneum* SWRI9 و نخود-*M. ciceri* CP-31) توسط روش *Real-time PCR* بررسی شد. نتایج مربوط به پارامترهای رشد و محتوی فسفات معدنی در گره و ریشه نشان داد که رابطه همزیستی نخود-*M. mediterraneum* SWRI9 نسبت به کمبود فسفر حساس و نخود-*M. ciceri* CP-31 نسبت به کمبود فسفر مقاوم است. در شرایط کمبود فسفر، میزان بیان ژن‌های *Inorganic phosphate transporter 1-4like* و *Malate dehydrogenase* در گره‌های نخود-*M. ciceri* CP-31 افزایش معنی‌داری را در مقایسه با میزان بیان این ژن‌ها در گره‌های تحت شرایط فسفر کافی نشان داد. بیان ژن *Phosphate transporter 1* در گره‌های هر دو رابطه همزیستی تحت تنش کمبود فسفر کاهش پیدا کرد. به علاوه، سطح بیان ژن *Histidine kinase* در گره‌های نخود-*M. mediterraneum* SWRI9 افزایش قابل ملاحظه‌ای را در پاسخ به کمبود فسفر نشان داد. پاسخ متفاوت عملکرد همزیستی به شرایط کمبود فسفر در دو رابطه همزیستی با اختلاف در سطح بیان ژن‌های مورد بررسی مرتبط می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: مزوریوبیوم سیسری، مزوریوبیوم مدیترانیوم، فسفر معدنی، بیان ژن، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در زمان

واقعی

¹ نویسنده مسئول، آدرس: خرم آباد، دانشگاه لرستان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

مقدمه

فسفر بعد از نیتروژن یکی از عناصر غذایی ضروری برای رشد و نمو گیاه است که در بسیاری از فرآیندهای متابولیسم گیاه شامل تولید و انتقال انرژی، انتقال سیگنال، تثبیت نیتروژن، فتوسنتز و تنفس نقش ایفاء می‌کند. این عنصر همچنین جزئی از ساختار برخی از مولکول‌های سلولی مانند ATP، نوکلئیک اسیدها، فسفولیپیدها و قندهای فسفریله شده را تشکیل می‌دهد و بنابراین در متابولیسم کربن و نیتروژن دخالت دارد (والدز-لوپز و هرناندز، 2008). ریشه گیاهان، فسفر را عمدتاً به شکل $H_2PO_4^-$ از محلول خاک جذب می‌کنند. غلظت فسفر قابل جذب توسط ریشه گیاه در محلول خاک معمولاً 1 تا 10 میکرومول است که از میزان غلظت اپتیمم مورد نیاز برای رشد گیاه (فانگ و همکاران، 2009) و نمو گره¹ در لگوم-ها (بارگاز و همکاران، 2011) بسیار پایین‌تر است به دلیل این‌که این عنصر به راحتی در خاک‌های آهکی با منیزیم و کلسیم و در خاک‌های اسیدی با آهن و آلومینیوم کمپلکس‌های غیرمحلول را تشکیل می‌دهند (لوپز-آردوندو و همکاران، 2014). بنابراین فسفر یکی از عوامل مهم محدود کننده رشد و تولید محصول در بیش از 30 درصد خاک‌های کشاورزی است (وانس و همکاران، 2003). اضافه کردن کودهای فسفر به خاک می‌تواند کمبود فسفر خاک را جبران کند ولی ورود مقادیر زیاد فسفر به خاک آسیب‌های جدی را به محیط زیست وارد می‌کند مانند آلوده کردن خاک و آب‌های زیرزمینی (لوپز-آردوندو و همکاران، 2014). به علاوه، به دلیل افزایش روزافزون جمعیت، تقاضا برای کودهای فسفر افزایش یافته است و بنابراین پیش‌بینی می‌شود که در 50 تا 100 سال آینده ذخایر فسفر جهان پایان یابد (رامیرز و همکاران، 2013).

کمبود فسفر یکی از عوامل مهم محدود کننده تشکیل گره و نیز تثبیت نیتروژن در لگوم‌هاست که به کاهش رشد و تولید محصولات لگوم در سرتاسر جهان منجر می‌شود (والنتاین و همکاران، 2011). نیاز بالای فسفر در لگوم-های وابسته به تثبیت زیستی نیتروژن با تأمین انرژی مورد نیاز برای فعالیت آنزیم نیتروژناز در درون گره مربوط می‌باشد. در گزارش‌های متعددی بیان شده است که لگوم-هایی که نیتروژن مورد نیاز برای رشدشان را از طریق ایجاد رابطه همزیستی با مزوریزوبیوم و تثبیت زیستی نیتروژن به دست می‌آورند، در مقایسه با لگوم‌هایی که نیاز

نیتروژنی‌شان مورد نیازشان از طریق کودهای نیتروژنی تأمین می‌شود، به مقادیر بالاتری فسفر نیاز دارند (سلیمان و ترن، 2015). به این ترتیب، با توجه به این‌که یک رابطه مستقیم بین سرعت تثبیت نیتروژن و محتوی فسفر گره وجود دارد، به منظور حفظ سرعت بالای تثبیت نیتروژن و در نتیجه رشد مناسب لگوم، لازم است سطح فسفر در درون گره در حد اپتیمم حفظ شود (کین و همکاران، 2012). یکی از استراتژی‌ها برای ثابت نگه-داشتن سطح اپتیمم فسفر در درون گره‌ها، تنظیم سرعت انتقال فسفر به درون گره است. دو مسیر برای انتقال فسفر به داخل گره وجود دارد: یک مسیر جذب مستقیم فسفر از محیط کشت به داخل گره و دیگری جذب غیر مستقیم فسفر توسط گره که مستلزم انتقال فسفر از بخش‌های مختلف گیاه به درون گره است. جذب فسفر از طریق عملکرد چندین ترانسپورتر فسفات (Phosphate transporter) صورت می‌گیرد که توسط ژن-های *Phosphat transporter (Pht)* کد می‌شوند. این ژن-ها در چهار خانواده شامل *Pht1*، *Pht2*، *Pht3* و *Pht4* گروه‌بندی می‌شوند. در مطالعات انجام شده روی سویا، برنج، ذرت و جو نشان داده شده است که افزایش سطح بیان ژن‌های *Pht* یک پاسخ سازشی در گیاهان مقاوم به کمبود فسفر است (لوپز-آردوندو و همکاران، 2014).

کمبود فسفر بیان ژن‌ها را در مسیرهای مختلف متابولیسمی تحت تأثیر قرار می‌دهد به عنوان مثال بیان ژن-های کد کننده آنزیم‌های جایگزین² برای مسیر گلیکولیتیک مانند مالات دهیدروژناز و فسفوانول پیروات دکربوکسیلاز، بیان ژن‌های کد کننده پروتئین‌های انتقال دهنده الکترون میتوکندریایی که فسفر یا آدنیلات‌ها را به عنوان سوبسترا نیاز ندارند و نیز بیان ژن‌های کد کننده آنزیم‌هایی که فسفر را از منابع درونی محتوی فسفر آزاد می‌کند مانند نوکلئازها، فسفاتازها و فسفولیپازها در پاسخ به کمبود فسفر افزایش می‌یابد (گوآد و همکاران 2008؛ زانگ و همکاران، 2008). به علاوه، تولید و ترشح اسید فسفاتازها به درون ریزوسفر باعث آزادسازی فسفات معدنی از منابع آلی می‌شود که توسط ریشه گیاهان قابل جذب است. در برخی مطالعات نشان داده شده است بیان ژن‌های کد کننده اسید فسفاتازها در پاسخ به کمبود فسفر در بخش‌های مختلف گیاه نظیر ریشه (سیرسکو و همکاران، 2011) و گره (بارگاز و همکاران 2013) افزایش می‌یابد و به این ترتیب با هیدرولیز فسفات از طیف گسترده‌ای از مونواسترهای فسفات، سطح فسفر

² Alternative

¹ Nodule

استخراج RNA کل، سنتز cDNA و واکنش *Real time* PCR

به منظور استخراج RNA کل، گره‌های جمع-آوری شده در هاون استریل با استفاده از نیتروژن مایع پودر شدند و RNA با استفاده از RNeasy Plant Mini Kit and QIacube systm (Qiagen) مطابق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده استخراج شدند. غلظت RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ (Nano Drop Technology, Wilmington, DE, USA) اندازه‌گیری شد. برای برداشتن آلودگی DNA ژنومی، مراحل حذف DNA ژنومی روی 4 میکروگرم از RNA کل مربوط به هر نمونه با استفاده از TURBO DNA-free DNaseI مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. بعد از تیمار با DNaseI، غلظت RNA مجدداً توسط اسپکتروفتومتر نانودراپ اندازه‌گیری شد. مقدار A260/A280 در تمام نمونه‌های RNA استفاده شده در این مطالعه بین 2/13 و 2/16 و نسبت‌های A260/A230 در همه نمونه‌ها بین 2/1 و 2/3 بود. سنتز cDNA با یک میکروگرم RNA فاقد DNA ژنومی با استفاده از ReverTra Ace qPCR RT kit (Toyobo, Japan) در حجم نهایی 20 میکرولیتر بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. پرایمرهای اختصاصی مربوط به ژن‌های مورد بررسی توسط نرم‌افزار Primer3 طراحی شد و پرایمر مربوط به *IF4a* به عنوان ژن مرجع استفاده شد (جدول 1). واکنش RT-qPCR در پلت‌های 96 چاهک توسط دستگاه (Agilent MX3000P technologies, Santa Clara, CA, USA) با کیت سایبرگرین Thundebird™SYBR®qPCR Mix (Toyobo, Japan) بر طبق دستورالعمل پیشنهادی شرکت انجام شد. برنامه دمایی برای RT-qPCR با واسرشت اولیه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد برای 1 دقیقه آغاز و با 40 سیکل دو مرحله‌ای واسرشت‌سازی در دمای 95 درجه سانتی‌گراد برای مدت 15 ثانیه، اتصال پرایمرها و طول شدن رشته‌ها در دمای 60 درجه سانتی‌گراد برای 1 دقیقه ادامه یافت. منحنی ذوب بعد از آخرین سیکل واکنش زنجیره‌ای پلیمرز اجرا شد. منحنی ذوب با برنامه دمایی 0/5 درجه سانتی‌گراد در هر چرخه بین دمای 55 تا 95 درجه سانتی‌گراد رسم شد. پس از دریافت داده‌های خام به صورت Ct (Threshold cycle)، داده‌ها توسط روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (لی و همکاران، 2012).

اندازه‌گیری فسفات معدنی (Inorganic Phosphate)

غلظت فسفات معدنی (Pi) در ریشه و گره در دو رابطه همزیستی مورد بررسی تحت شرایط فسفر کافی

درون گره در حد مناسب حفظ می‌کند. بنابراین القاء سنتز اسیدفسفاتازها یک پاسخ منحصر به فرد به کمبود فسفر در گیاهان عالی شناخته شده است. فیتاز، فسفوانول پیروات فسفاتاز و ترهالوز-6-فسفات فسفاتاز از جمله اسیدفسفاتازهایی هستند که سطح بیان ژن‌های کد کننده آنها در گره‌ها تحت شرایط کمبود فسفر خاک افزایش پیدا می‌کند. در این تحقیق، تغییرات در سطح بیان برخی ژن‌ها شامل:

Phosphate transporter 1 (pho1)
Inorganic phosphate transporter 1-4like (ipt)
Inorganic phosphatase 2-like (PPase)
Histidin kinase (HK)

و *Malate dehydrogenase (MDH)* در گره‌های حاصل از همزیستی نخود با *Mesorhizobium ciceri* CP-31 یا با *Mesorhizobium mediterraneum* SWRI9 در پاسخ به کمبود فسفر مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، بذره‌های نخود رقم کابلی ILC482 از موسسه دیم کشور فراهم شد و آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. بذره‌های نخود در گلدان‌های پر شده با ورمیکولیت استریل کشت شدند و با سوسپانسیون‌های باکتریایی *M. ciceri* CP-31 و *M. mediterraneum* SWRI9 باکتریایی تلقیح شدند. سوسپانسیون‌های باکتریایی در محیط کشت YEMB (Yeast Extract Mannitol Broth) با تجمع سلولی 10^9 سلول در هر میلی‌لیتر¹ تهیه شد. تلقیح با گونه‌های مزوریزوبیوم مورد نظر در 3 و 6 روز بعد از کاشت نیز تکرار گردید. گلدان‌ها برای مدت 4 هفته در شرایط کنترل شده گلخانه (12 ساعت روشنایی/12 ساعت تاریکی، 30 درجه سانتی‌گراد، 60 درصد رطوبت نسبی و نور 150 میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه) نگهداری شدند (ها و همکاران، 2014). گیاهان سه روز در هفته با محلول غذایی فاقد نیتروژن آبیاری شدند (نصراصفهانی، 1392). به منظور اعمال تیمار کمبود فسفر، گیاهان به دو گروه تقسیم شدند: در گیاهان شاهد، $0.5 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ به محیط غذایی اضافه شد در حالی که در گیاهان تحت تیمار تنش کمبود فسفر $5 \mu\text{M KH}_2\text{PO}_4$ به محلول غذایی اضافه گردید. 30 روز بعد از کاشت، گره‌ها جمع‌آوری شده و اندازه‌گیری فسفات معدنی (Pi) و نیز برای استخراج RNA کل و بررسی سطح بیان ژن‌های *pho1*، *MDH* و *HK*، *PPase*، *ipt* مورد استفاده قرار گرفتند.

¹ Cell. ml⁻¹

MM 311 Vibration Mill (GmbH & Co. KG, Haan, Germany) در یک فرکانس 15 هرتز در ثانیه برای 10 دقیقه در 4 درجه سانتی‌گراد عصاره‌گیری شد. اندازه‌گیری محتوی Pi در عصاره‌های حاصل از ریشه و گره توسط GC-MS (LECO Corp., St Joseph, (MI, USA) در موسسه تحقیقاتی ریکن در کشور ژاپن انجام شد و آنالیز داده‌های خام گرفته شده از دستگاه GC-MS بر اساس روش کوسانو و همکاران (2007) انجام شد.

(5mM KH₂PO₄) و کمبود فسفر (5μM KH₂PO₄) توسط GC-MS (gas chromatography-time-of-flight) اندازه‌گیری شد. برای عصاره‌گیری، از بافر استخراج شامل متانول/کلروفرم/آب (2:6:2 v/v/v) محتوی 10 ایزوتوپ از ترکیبات رفرنس ([¹³C₃]-myristic acid, [¹³C₄]-hexadecanoic acid, [²H₄]-succinic acid, [¹³C₅, [¹⁵N]-glutamic acid, [²H₇]-cholesterol, [¹³C₅]-proline, [¹³C₄]-disodium α-ketoglutarate, [¹³C₁₂]-sucrose, [²H₄]-putrescine, [²H₆]-salicylic acid, and [¹³C₆]-glucose) استفاده شد. 25 میلی‌گرم از بافت ریشه یا گره توسط یک میلی‌لیتر بافر استخراج توسط (Retsch

جدول 1- جفت پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن‌های *Inorganic phosphate transporter 1-4like Phosphate transporter1* و *Malate dehydrogenase IF4a* و *Histidin Kinase Inorganic phosphatase 2like*

ژن	شماره شناسایی ژن	توالی
<i>Phosphate transporter 1</i>	LOC101500734	F: 5'ATCCGCGTCATTGCGAACAT3' R: 5'TCTTGCACATTGCATAGCACG3'
<i>Inorganic phosphate transporter 1-4like</i>	LOC101490799	F: 5' TTTGGAATTTTGGCTGGCGG3' R: 5' GCAGCCGCTTGTTTAGCATT3'
<i>Inorganic phosphatase 2-like</i>	LOC101501234	F: 5' CTAGACTGCATGGAGGGGACTG3' R: 5' CAACCATGGGTGCACTGAGAA3'
<i>Histidin kinase</i>	LOC101507032	F: 5' CTAGACTGCATGGAGGGGACTG3' R: 5' CAACCATGGGTGCACTGAGAA3'
<i>Malate dehydrogenase</i>	LOC101498271	R: 5' AACTCCTGAGGGCACCTTTG3' F: 5' CGGCACAGGTAACAGGGAAT3'
<i>IF4a</i>	LOC101508424	R: 5'TGGACCAGAACAACACTAGGGACATT3' F: 5'AAACACGGGAAGACCCAGAA3'

با رابطه همزیستی نخود-CP-31 *M. ciceri* بالاتر بودند (جدول 2) و به این ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که در شرایطی که مقادیر کافی فسفر در محیط کشت گیاه وجود دارد، عملکرد همزیستی بین نخود با سویه *M. ciceri* *mediterraneum* SWRI9 در مقایسه با سویه *M. ciceri* CP-31 بالاتر است. این نتایج تأیید می‌کند که کارایی همزیستی بین لگوم و مزوریزوبیوم به سویه مزوریزوبیوم تلقیح شده وابسته است (لاراینزار و همکاران، 2014؛ نصراصفهان‌ی و همکاران، 2014). در شرایط کمبود فسفر، وزن خشک ساقه در هر دو رابطه همزیستی در مقایسه با شاهدشان کاهش معنی‌دار نشان داد ولی میزان کاهش در همزیستی نخود با *M. mediterraneum* SWRI9 در مقایسه با *M. ciceri* CP-31 بالاتر بود. وزن خشک ساقه در همزیستی نخود-*M. mediterraneum* SWRI9 47 درصد و در نخود-*M. ciceri* CP-31 24 درصد کاهش را در پاسخ به کمبود فسفر نشان دادند (جدول 2). کمبود فسفر باعث کاهش تقریباً یکسان در وزن خشک ریشه در هر دو رابطه همزیستی شد (جدول 2). در مقابل، پاسخ وزن خشک گره به کمبود فسفر در دو رابطه همزیستی مورد مطالعه متفاوت بود به طوری که در رابطه همزیستی

نتایج و بحث

در گزارشات متعددی کمبود فسفر به عنوان یکی از عوامل مهم محدود کننده رشد و تولید محصول در لگوم-های تثبیت کننده نیتروژن عنوان شده است که عمدتاً به تأثیرات منفی کمبود فسفر روی تشکیل، رشد و عملکرد گره و نتیجتاً کاهش تثبیت زیستی نیتروژن نسبت داده می‌شود (سلیمان و ترن، 2015؛ اولیورا و همکاران، 2004). سطح پایین فسفر خاک می‌تواند عملکرد گره را به طور مستقیم از طریق تأثیر روی رشد و متابولیسم گره و یا به طور غیرمستقیم با کاهش سرعت فتوسنتز و بنابراین تأثیر روی تامین کربن احیاء شده مورد نیاز تنفس باکتریوئید تحت تأثیر قرار دهد (ولنتاین و همکاران، 2011). در این مطالعه پاسخ عملکرد همزیستی در دو رابطه همزیستی شامل نخود-*M. ciceri* CP-31 و نخود-*M. mediterraneum* SWRI9 به تنش کمبود فسفر مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که وزن خشک گره در دو رابطه همزیستی مورد بررسی در شرایطی که فسفر به میزان کافی در دسترس گیاه باشد تقریباً یکسان است در حالی که وزن خشک ساقه و وزن خشک ریشه در رابطه همزیستی نخود-*M. mediterraneum* SWRI9 در مقایسه

گره به نوع سویه مزوریزوبیوم تلقیح شده بستگی دارد. همچنین، سویه‌های مزوریزوبیوم علاوه بر تثبیت نیتروژن از طریق همزیستی با لگوم‌ها، توانایی بالایی برای حل کردن فسفات آلی یا معدنی از طریق مکانیسم‌های مختلف دارند. بنابراین انتخاب تجمع‌های همزیستی کارآمد با پتانسیل بالای حل‌کنندگی فسفات یکی از ارزان‌ترین استراتژی‌ها برای بهبود رشد و تولید محصول در لگوم‌ها در شرایط دسترسی پایین به فسفر است به طوری که تجمع‌های همزیستی با کارایی بالا قادرند فسفر قابل دسترس برای گیاه را افزایش دهند. تفاوت در کارایی عملکرد همزیستی بین سویه‌های مختلف ریزوبیوم در مطالعه انجام شده روی دو تجمع همزیستی شامل *Medicago truncatula-Sinorhizobium meliloti* 2011 و *M. truncatula-S. meliloti* 102F51 تحت شرایط کمبود فسفر توسط سلیمان و همکاران (2013) تأیید شد.

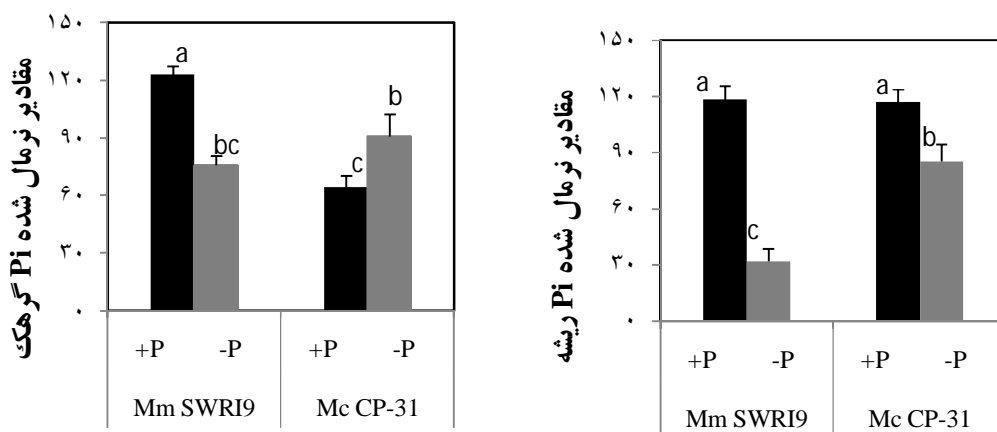
نخود-*M. mediterraneum* SWRI9 وزن خشک گره تفاوت معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان نداد در حالی که در همزیستی نخود با *M. ciceri* CP-31، وزن خشک ساقه در پاسخ به کمبود فسفر 142 درصد افزایش پیدا کرد (جدول 2). بر اساس نتایج شاخص‌های رشد می‌توان نتیجه گرفت که اگرچه در شرایط فسفر کافی عملکرد بالاتر همزیستی در همزیستی بین نخود با *M. mediterraneum* SWRI9 در مقایسه با *M. ciceri* CP-31 مشاهده شد ولی در شرایط کمبود فسفر، همزیستی نخود با *M. ciceri* CP-31 کارایی همزیستی بالاتری را در مقایسه با *M. mediterraneum* SWRI9 نشان داد. به علاوه، نتایج مربوط به اندازه‌گیری Pi گره تحت شرایط فسفر کافی و کمبود فسفر نیز اختلاف در عملکرد همزیستی را در دو رابطه همزیستی مورد نظر تأیید کرد (شکل 1). بنابراین تأثیر کمبود فسفر روی رشد و عملکرد

جدول 2- تأثیر کمبود فسفر روی تعداد گره و وزن خشک ساقه، ریشه و گره در گیاه نخود تلقیح شده با *M. mediterraneum* SWRI9 یا با *M. ciceri* CP-31. مقادیر میانگین 5 تکرار \pm SE بوده و حروف یکسان بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است. +P: گیاهان رشد یافته در محیط کشت دارای $0.5 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ (شاهد)، -P: گیاهان رشد یافته در محیط کشت دارای $5 \mu\text{M KH}_2\text{PO}_4$

شاخص‌های رشد	<i>M. mediterraneum</i> SWRI9		<i>M. ciceri</i> CP-31	
	+P	-P	+P	-P
وزن خشک ساقه	0/388±0/013 ^a	0/205±0/006 ^d	0/343±0/02 ^b	0/261±0/01 ^c
وزن خشک ریشه	0/16±0/002 ^a	0/095±0/005 ^c	0/138±0/006 ^b	0/085±0/003 ^c
وزن خشک گره	0/051±0/001 ^b	0/052±0/001 ^b	0/051±0/002 ^b	0/072±0/001 ^a
وزن خشک کل گیاه	0/599±0/011 ^a	0/353±0/008 ^d	0/533±0/027 ^b	0/419±0/012 ^c

سطح Pi در ریشه‌های هر دو رابطه همزیستی مورد بررسی کاهش معنی‌داری را در پاسخ به سطح پایین فسفر در محیط کشت نشان داد ولی میزان کاهش در ریشه‌های مربوط به *M. mediterraneum* SWRI9 در مقایسه با *M. ciceri* CP-31 به میزان قابل‌ملاحظه‌ای بالاتر بود (شکل 2). بنابراین براساس این نتایج می‌توان پیشنهاد کرد که در رابطه همزیستی نخود-*M. ciceri* CP-31 تحت شرایط کمبود فسفر انتقال ترجیحی فسفر از ریشه‌ها به گره صورت می‌گیرد که با کاهش سطح Pi در ریشه همراه می‌شود. به علاوه، افزایش میزان Pi در گره‌های *M. ciceri* CP-31 در پاسخ به کمبود فسفر نشان می‌دهد که گره‌ها مکانیسم‌هایی را برای حفظ هموستازی Pi در درون گره بکار می‌برند. سطح Pi در درون بافت‌های گیاهی در شرایط کمبود فسفر توسط مکانیسم‌های کسب فسفر از منابع خارجی (محیط ریزوسفر) و منابع ذخیره‌ای در بخش‌های مختلف گیاه تنظیم می‌شوند (لوپز-آردوندو و همکاران، 2014).

در شرایط وجود فسفر کافی در محیط کشت، میزان Pi در گره‌های حاصل از *M. mediterraneum* SWRI9 تقریباً 191 درصد بالاتر از میزانش در گره‌های حاصل از *M. ciceri* CP-31 تخمین زده شد (شکل 1). از آنجایی که غلظت Pi در درون گره با سرعت تثبیت نیتروژن و بنابراین کارایی همزیستی رابطه مستقیم دارد (کلینرت و همکاران، 2014)، به این ترتیب، سطح بالاتر Pi در درون گره‌های این رابطه همزیستی با عملکرد بالاتر همزیستی آن در شرایط وجود فسفر کافی مرتبط می‌باشد. در گزارشات دیگری نیز نشان داده شده است که گره‌ها به دلیل تقاضای بالای انرژی برای تثبیت نیتروژن یک بافت مخزن مهم برای Pi هستند (ولنتاین و همکاران، 2006؛ چن و همکاران، 2011؛ شولزه و همکاران، 2006). در شرایط کمبود فسفر، سطح Pi در گره‌های حاصل از *M. mediterraneum* SWRI9 تقریباً 39 درصد کاهش نشان داد در حالیکه سطح آن در گره‌های مربوط به *M. ciceri* CP-31 141 درصد افزایش پیدا کرد (شکل 1). به علاوه،



شکل 1- تأثیر کمبود فسفر روی میزان Pi در گره و ریشه در گیاه نخود تلقیح شده با *M. mediterraneum* SWRI9 (MmSWRI9) یا *M. ciceri* CP-31 (McCP-31). مقادیر میانگین $5 \pm SE$ بوده و حروف یکسان بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است. +P: گیاهان رشد یافته در محیط کشت دارای $0.5 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ (شاهد)، -P: گیاهان رشد یافته در محیط کشت دارای $5 \mu\text{M KH}_2\text{PO}_4$.

SWRI9 بالاتر است و به این ترتیب می‌توان پیشنهاد کرد که عملکرد بالاتر همزیستی در رابطه همزیستی نخود- *M. ciceri* CP-31 مربوط به سطح بالاتر این ژن در گره‌ها است. اختلاف در سطح بیان ژن *ipt* در گره‌های دو رابطه همزیستی در پاسخ به کمبود فسفر مشاهده شد به طوری که بیان این ژن در گره‌های *M. mediterraneum* SWRI9 تقریباً 37 درصد کاهش را در مقایسه با شرایط دسترسی کامل به فسفر نشان داد در حالی که در رابطه همزیستی نخود- *M. ciceri* CP-31 بیان ژن *ipt* در گره‌های تحت تیمار کمبود فسفر یک افزایش دو برابری را در مقایسه با بیان این ژن در گره‌های تحت فسفر کافی نشان داد (شکل 2B). در یک مطالعه انجام شده روی آراییدوپسیس تالیانا نشان داده شده است میزان بیان ژن‌های *ipt* در پاسخ به کمبود فسفر افزایش می‌یابد که در تأمین فسفر برای گیاه نقش مهمی ایفا می‌کند (رمی و همکاران، 2012). تولید و ترشح اسید فسفاتازها توسط گیاهان به عنوان یک مکانیسم سازشی مهم به شرایط کمبود فسفر گزارش شده است که در آزادسازی Pi از منابع فسفر آلی خاک نقش مهمی ایفا می‌کند (دیک و همکاران، 2011). اهمیت اسید فسفاتازها در تأمین Pi در گیاهانی مانند آراییدوپسیس (لیانگ و همکاران، 2010)، سویا (زانگ و همکاران، 2014) و نیز در گندم، جو، ذرت و برنج (دیونیسو و همکاران، 2011) به خوبی شناخته شده

در گزارشات متعددی نشان داده شده است که ترانسپورترهای گیاهی نقش مهمی در حفظ هموستازی Pi در گیاهان بازی می‌کنند و مسئول انتقال Pi از بخش‌های هوایی به بخش‌های زیرزمینی و نیز از بخش‌های مسن‌تر به بافت‌های ذخیره هستند (ناگراجان و همکاران، 2011؛ سان و همکاران، 2012). گزارشات محدودی در مورد نقش ترانسپورترهای Pi برای حفظ سطح فسفر در درون گره در پاسخ به کمبود فسفر وجود دارد. در یک مطالعه روی گره‌های سویا تحت شرایط کمبود فسفر نشان داده شده است که بیان ژن ترانسپورتر فسفات (*GmPT5*) در پاسخ به کمبود فسفر افزایش می‌یابد به طوری که ترانسپورترهای حاصل از بیان این ژن، ورود Pi را از ریشه به گره افزایش داده و به این ترتیب سطح فسفر درون گره را در حد اپتیمم نگه می‌دارد (کین و همکاران، 2012). در گزارش دیگری، سبزا و همکاران (2014) بیان دو ژن *ipt* و *pho1* در گره‌های *M. truncatula* تحت شرایط کمبود فسفر مورد بررسی کرده و نشان دادند که بیان این ژن‌ها در گره تیمار شده با کمبود فسفر به میزان قابل ملاحظه‌ای افزایش پیدا می‌کند. در این مطالعه، میزان بیان این دو ژن (*ipt* و *pho1*) در پاسخ به کمبود فسفر در گره‌های مربوط به دو رابطه همزیستی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در هر دو رابطه مورد بررسی سطح بیان ژن *pho1* در گره‌های تحت تنش کمبود فسفر کاهش معنی‌دار را نشان می‌دهد (شکل 2A). به هرحال، میزان بیان ژن مورد نظر در گره‌های مربوط به *M. ciceri* CP-31 در مقایسه با گره‌های *M. mediterraneum*

MDH در گره‌های حاصل از *M. ciceri* CP-31 افزایش قابل ملاحظه‌ای را در شرایط کمبود فسفر در مقایسه با شرایط وجود فسفر کافی نشان داد (شکل 2D). افزایش بیان ژن *MDH* در گره‌های *M. ciceri* CP-31 در پاسخ به کمبود فسفر احتمالاً با افزایش فعالیت *MDH* و نتیجتاً افزایش تولید ملات در این گره‌ها همراه می‌شود. بنابراین افزایش در بیان ژن *MDH* می‌تواند با عملکرد بالاتر همزیستی در رابطه همزیستی نخود-*M. ciceri* CP-31 تحت تنش کمبود فسفر مرتبط باشد.

نقش برجسته و مهم سیتوکینین در مسیر سیگنالینگ تنش کمبود فسفر به منظور کنترل متابولیسم و نمو گیاه به خوبی شناخته شده است به طوری که در گزارشات متعددی نشان داده شده است که سطح سیتوکینین در بافت‌ها تحت شرایط کمبود فسفر کاهش پیدا می‌کند و به این ترتیب سیتوکینین روی پاسخ‌های گیاه به کمبود فسفر تأثیر منفی دارد. تأثیر سیتوکینین روی پاسخ‌های گیاه به شرایط کمبود فسفر با عملکرد رسپتور هیستیدین کیناز مربوط می‌شود (فرانکو-زوریلا و همکاران، 2005؛ فرانکو-زوریلا و همکاران، 2002). در یک مطالعه انجام شده روی آرابیدوسیس نشان داده شده است که در موتانت‌های هیستیدین کیناز، تأثیر بازدارندگی سیتوکینین روی ژن‌های پاسخ دهنده به کمبود فسفر کاهش پیدا می‌کند و بنابراین یک رابطه معکوس بین عملکرد هیستیدین کیناز و نتیجتاً سیتوکینین با سازش به کمبود فسفر وجود دارد (فرانکو-زوریلا و همکاران، 2005). در این مطالعه تغییرات در بیان ژن *HK* در گره‌های تحت تنش کمبود فسفر در دو رابطه همزیستی مورد نظر بررسی شد. نتایج نشان داد که تحت تنش کمبود فسفر سطح بیان این ژن در رابطه همزیستی نخود-*M. ciceri* CP-31 تفاوتی را با سطح بیان این ژن در حضور مقادیر کافی فسفر نشان نداد در حالی که در رابطه همزیستی نخود-*M. mediterraneum* SWR19 سطح بیان ژن *HK* در گره‌های تحت تیمار کمبود فسفر 7/6 برابر سطح بیان این ژن در گره‌های رشد یافته تحت مقادیر کافی فسفر بود (شکل 2E). بر اساس این نتایج می‌توان پیشنهاد کرد که کارایی پایین‌تر همزیستی در رابطه همزیستی نخود-*M. mediterraneum* SWR19 تحت شرایط کمبود فسفر با بیان افزایش یافته ژن *HK* در گره‌ها مرتبط می‌باشد که به احتمالاً با کاهش در بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به کمبود فسفر منجر می‌شود (شکل 2E).

به طور کلی نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که دو رابطه همزیستی مورد مطالعه (نخود-*M. mediterraneum* SWR19 و نخود-*M. ciceri* CP-31) تفاوت قابل

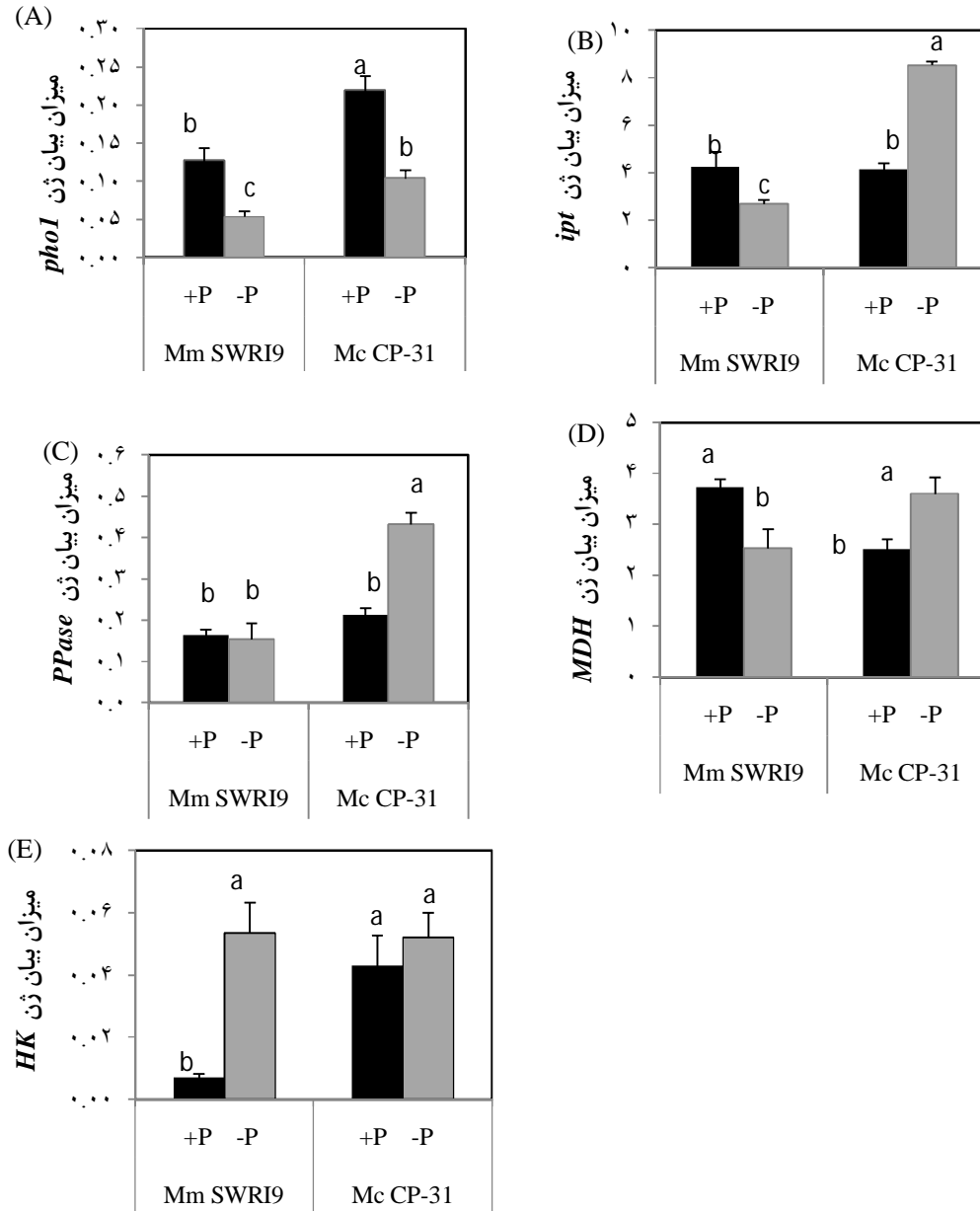
است. بنابراین پیشنهاد شده است که بیان افزوده¹ ژن‌هایی که کد کننده اسید فسفاتازها هستند یک روش مناسب برای ایجاد گیاهان کارآمد برای شرایطی با دسترسی پایین به فسفر است (دیک و همکاران، 2011). در این تحقیق سطح بیان ژن *PPase* در گره‌های دو رابطه همزیستی مورد بررسی تحت شرایط کمبود فسفر بررسی شد (شکل 2C). نتایج نشان داد که در گره‌های حاصل از همزیستی نخود با *M. mediterraneum* SWR19 تفاوتی در سطح بیان این ژن در گره‌های تحت تیمار کمبود فسفر و شاهد مشاهده نشد در صورتی‌که در گره‌های مربوط به همزیستی نخود با *M. ciceri* CP-31 سطح بیان ژن *PPase* در شرایط کمبود فسفر تقریباً 2 برابر سطح بیان این ژن در گره‌های شاهد بود. وانگ و همکاران (2009) نشان دادند که افزایش بیان یک ژن کد کننده اسید فسفاتاز *PAP15 (Purple acid phosphates 15)* در ریشه‌های سویا باعث افزایش 1/5 برابری در تولید اسید فسفاتاز از ریشه‌ها می‌شود که رشد کارآمد سویاهای ترانس‌ژنیک در شرایط کمبود فسفر بهبود می‌بخشد.

تولید و ترشح اسیدهای آلی مانند ملات و سترات از ریشه قابلیت دسترسی گیاه به Pi را افزایش می‌دهد به نحوی اسیدهای آلی ترشح شده از ریشه، Pi باند شده به Al^{3+} ، Fe^{3+} و Ca^{2+} موجود در خاک را آزاد می‌کند و به این ترتیب میزان Pi قابل دسترس برای ریشه گیاه را افزایش می‌دهد (لوپز-آزردوندو و همکاران، 2014). افزایش سنتز و ترشح اسیدهای آلی با فعالیت افزایش یافته برخی از آنزیم‌های متابولیکی مانند ملات دهیدروژناز مرتبط می‌باشد. (اود-استون و همکاران، 20013). در گره‌های تحت تنش کمبود فسفر، فعالیت ملات دهیدروژناز در تأمین سوبسترای تنفسی برای باکتریوئیدها عمل می‌کند. به علاوه، ملات دهیدروژناز به همراه فعالیت فسفوانول پیرووات دکربوکسیلاز تولید اسیدهای آلی را در گره‌ها افزایش داده و با ترشح به ریزوسفر میزان فسفر قابل دسترس برای گیاه را افزایش می‌دهد (والنتاین و همکاران، 2011). نتایج مطالعه اخیر نشان داد که بیان ژن *MDH* در گره‌های دو رابطه همزیستی مورد بررسی، پاسخ متفاوتی به شرایط کمبود فسفر نشان دادند. در شرایط کمبود فسفر، سطح بیان ژن *MDH* در گره‌های حاصل از *M. mediterraneum* SWR19 کاهش معنی‌دار را در مقایسه با سطح بیان این ژن در گره‌های تحت مقادیر کافی فسفر نشان داد در صورتی که میزان بیان ژن

¹ Overexpression

نخود- *M. mediterraneum* SWRI9 در شرایط کمبود فسفر بالاتر بود که به افزایش در بیان برخی ژن‌های دخیل در سازش گیاه به شرایط کمبود فسفر مانند *MDH ipt* و *PPase* در گره‌های رابطه همزیستی نخود- *M. ciceri* CP-31 نسبت داده می‌شود.

ملاحظه‌ای را از لحاظ شاخص‌های رشد (تعداد گره، وزن خشک ساقه، وزن خشک ریشه، وزن خشک گره و وزن خشک کل گیاه) در پاسخ به کمبود فسفر نشان دادند. براساس نتایج شاخص‌های رشد، عملکرد همزیستی در رابطه همزیستی نخود-CP-31 *M. ciceri* در مقایسه با



شکل 2- تأثیر کمبود فسفر روی بیان ژن‌های *Phosphate transporter 1 (pho1)* (A)، *Inorganic phosphate transporter 1-like (ipt)* (B)، *Inorganic phosphatase 2-like (PPase)* (C)، *Malate dehydrogenase (MDH)* (D) و *Histidine kinase* (E) در گره گیاه نخود تلقیح شده با *M. mediterraneum* SWRI9 (MmSWRI9) یا با *M. ciceri* CP-31 (McCP-31). مقادیر میانگین \pm SE تکرار 5 بوده و حروف یکسان بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است. +P: گیاهان رشد یافته در محیط کشت دارای 0.5 mM KH_2PO_4 (شاهد)، -P: گیاهان رشد یافته در محیط کشت دارای $5 \text{ }\mu\text{M}$ KH_2PO_4

تحقیقاتی ریکن ژاپن برای طراحی پرایمرها و اندازه‌گیری فسفات غیرآلی با دستگاه GC-MS تشکر و قدردانی می‌کند.

تشکر و قدردانی

نویسنده از حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی دانشگاه لرستان صمیمانه سپاسگزاری می‌کند. نویسنده همچنین از کمک‌های ارزنده دکتر سان ترن از موسسه

فهرست منابع:

1. نصراصفهانی، م. 1392. بررسی تغییرات الگوی بیان پروتئین‌ها و ایزوزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز گرهک تحت شرایط تنش خشکی در همزیستی بین نخود با سه سویه *Mesorhizobium ciceri*. زیست‌شناسی خاک. شماره 2، جلد 1: 71-82
2. Bargaz, A. Ghoulam, C. Drevon, J.J. 2013. Specific expression and activity of acid phosphatases in common bean nodules. *Plant Signaling and Behavior* 8(8): 1-8.
3. Bargaz, A. Ghoulam, C. Faghire, M. Aslan-Attar, H. Drevon, J.J. 2011. The nodule conductance to O₂ diffusion increases with high phosphorus content in the *Phaseolus vulgaris*-rhizobia symbiosis. *Symbiosis* 53: 157-164.
4. Cabeza, R.A. Liese, R. Lingner, A. Von Stieglitz, I. Neumann, J. Salinas-Riester, G. Pommerenke, C. Dittert, K. and Schulze, J. 2014. RNA-seq transcriptome profiling reveals that *Medicago truncatula* nodules acclimate N₂ fixation before emerging P deficiency reaches the nodules. *Journal of Experimental Botany* 65: 6035-6048.
5. Chen, Z. Cui, Q. Liang, C. Sun, L. Tian, J. and Liao, H. 2011. Identification of differentially expressed proteins in soybean nodules under phosphorus deficiency through proteomic analysis. *Proteomics* 11: 4648-4659.
6. Ciereszko, I. Szczygła, A. Żebrowska, E. 2011. Phosphate deficiency affects acid phosphatase activity and growth of two wheat varieties. *Journal of Plant Nutrition* 34: 815-829.
7. Dick, C.F. Dos-Santos, A.L.A. Meyer-Fernandes, J.R. 2011. Inorganic phosphate as an important regulator of phosphatases. *Enzyme Research* 2011: 1-7.
8. Dionisio, G. Madsen, C.K. Holm, P.B. Welinder, K.G. Jørgensen, M. Stoger, E. Arcalis, E. and Brinch-Pedersen, H. 2011. Cloning and Characterization of Purple Acid Phosphatase Phytases from Wheat (*Triticum aestivum* L.), Barley (*Hordeum vulgare* L.), Maize (*Zea maize* L.) and Rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiology* 156(3): 1087-1100.
9. Fang, Z. Shao, C. Meng, Y. Wu, P. Chen, M. Phosphate signaling in Arabidopsis and *Oryza sativa*. 2009 *Plant Science* 176:170-180.
10. Franco-Zorrilla, J.M. Martín, A.C. Leyva, A. Paz-Ares, J. 2005. Interaction between Phosphate-Starvation, Sugar, and Cytokinin Signaling in Arabidopsis and the Roles of Cytokinin Receptors CRE1/AHK4 and AHK3. *Plant Physiology* 138: 847-857.
11. Franco-Zorrilla, J.M. Martin, A.C. Solano, R. Rubio, V. Leyva, A. and Paz-Ares, J. 2002. Mutations at CRE1 impair cytokinin-induced repression of phosphate starvation responses in Arabidopsis. *The Plant Journal* 32: 353-360.
12. Gaude, N. Nakamura, Y. Scheible, W.R. Ohta, H. and Dörmann, P. 2008. Phospholipase C5 (NPC5) is involved in galactolipid accumulation during phosphate limitation in leaves of Arabidopsis. *The Plant Journal* 56: 28-39.
13. Ha, C.V. Nasr Esfahani, M. Watanaba, Y. Tran, U. T. Sulieman, S. Mochida K. Nguyen D.V. and Tran, L.S.P. 2014. Genome-Wide Identification and Expression Analysis of the CaNAC Family Members in Chickpea during Development, Dehydration and ABA Treatments. *PLOS ONE* 5: 1-22
14. Kleinert, A. Venter, M. Kossmann, J. Valentine, A. 2014. The reallocation of carbon in P deficient lupins affects biological nitrogen fixation. *Journal of Plant Physiology* 171: 1619-1624.

15. Kusano, M. Fukushima, A. Kobayashi, M. Hayashi, N. Jonsson, P. Moritz, T. Ebana, K. and Saito, K. 2007. Application of a metabolomic method combining one-dimensional and two-dimensional gas chromatography-time-of-flight/mass spectrometry to metabolic phenotyping of natural variants in rice. *Journal of Chromatography B* 855: 71-79.
16. Larrainzar, E. Gil-Quintana, E. Seminario, A. Arrese-Igor, C. and González, E.M. 2014. Nodule carbohydrate catabolism is enhanced in the *Medicago truncatula* A17-*Sinorhizobium medicae* WSM419 symbiosis. *Frontiers in Microbiology* 5: 447.
17. Le, D.T. Nishiyama, R. Watanabe, Y. Tanaka, M. Seki, M. Ham, L.H. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki, K. and Tran, L.S.P. 2012. Differential gene expression in soybean leaf tissues at late developmental stages under drought stress revealed by genome-wide transcriptome analysis. *PLOS ONE* 7(11): 1-10.
18. Liang, C. Tian, J. Lam, H.M. Lim, B.L. Yan, X. and Liao, H. 2010. Biochemical and Molecular Characterization of PvPAP3, a Novel Purple Acid Phosphatase Isolated from Common Bean Enhancing Extracellular ATP Utilization. *Plant Physiology* 152: 854-865.
19. López-Arredondo, D.L. Leyva-González, M.A. González-Morales, S.I. López-Bucio, J. Herrera-Estrella, L. 2014. Phosphate nutrition: improving low-phosphate tolerance in crops. *Annual Review of Plant Biology* 65: 95-123.
20. Nagarajan, V.K. Jain, A. Poling, M.D. Lewis, A.J. Raghothama, K.G. and Smith, A.P. 2011. *Arabidopsis* Pht1;5 mobilizes phosphate between source and sink organs, and influences the interaction between phosphate homeostasis and ethylene signaling. *Plant Physiology* 156(3): 1149-1163.
21. Nasr Esfahani, M. Sulieman, S. Schulze, J. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki, K. and Tran, L.S.P. 2014. Approaches for enhancement of N₂ fixation efficiency of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under limiting nitrogen conditions. *Plant Biotechnology Journal* 12: 387-397.
22. Olivera, M. Tejera, N. Iribarne, C. Ocaña, A. and Lluch, C. 2004. Growth, nitrogen fixation and ammonium assimilation in common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of phosphorus. *Physiologia Plantarum* 121: 498-505.
23. Qin, L. Zhao, J. Tian, J. Chen, L. Sun, Z. Guo, Y. Lu, X. Gu, M. Xu, G. and Liao, H. 2012. The high-affinity phosphate transporter *GmPT5* regulates phosphate transport to nodules and nodulation in soybean. *Plant Physiology* 159: 1634-1643.
24. Ramírez, M. Flores-Pacheco, G. Reyes, J.L. Álvarez, A.L. Drevon, J.J. Girard, L. and Hernández, G. 2013. Two common bean genotypes with contrasting response to phosphorus deficiency show variations in the microRNA 399-Mediated PvPHO2 regulation within the PvPHR1 signaling pathway. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 8328-8344.
25. Remy, E. Cabrito, T.R. Batista, R.A. Teixeira, M.C. Sá-Correia, I. and Duque, P. 2012. The Pht1;9 and Pht1;8 transporters mediate inorganic phosphate acquisition by the *Arabidopsis thaliana* root during phosphorus starvation. *New Phytologist* 195: 356-371.
26. Schulze, J. Temple, G. Temple, S.J. Beschow, H. and Vance, C.P. 2006. Nitrogen fixation by white lupin under phosphorus deficiency. *Annals of Botany* 98: 731-740.
27. Sulieman, S. Tran, L.S.P. 2015. Phosphorus homeostasis in legume nodules as an adaptive strategy to phosphorus deficiency. *Plant Science* 239: 36-43.
28. Sulieman, S. Ha, C.V. Schulze, J. Tran, L.S.P. 2013. Growth and nodulation of symbiotic *Medicago truncatula* at different levels of phosphorus availability. *Journal of Experimental Botany* 64: 2701-2712.
29. Sun, S. Gu, M. Cao, Y. Huang, X. Zhang, X. Ai, P. Zhao, J. Fan, X. and Xu, G. 2012. A Constitutive Expressed Phosphate Transporter, OsPht1;1, Modulates Phosphate Uptake and Translocation in Phosphate-Replete Rice. *Plant Physiology* 159: 1571-1581.

30. Uhde-Stone, C. Gilbert, G. Johnson, J.F. Litjens, R. Zinn, K. Temple, S. Vance, C. and Allan, D. 2003. Acclimation of white lupin to phosphorus deficiency involves enhanced expression of genes related to organic acid metabolism. *Plant Soil* 248: 99-116.
31. Valdés-López, O. and Hernández, G. 2008. Transcriptional regulation and signaling in phosphorus starvation: what about legumes? *Journal of Integrative Plant Biology* 50: 1213-1222.
32. Valentine, A.J. Benedito, V.A. Kang, Y. 2011. Legume nitrogen fixation and soil abiotic stress: from physiology to genomics and beyond. *Annual Plant Reviews* 42: 207-248
33. Vance, C.P. Uhde-Stone, C. Allan, D.L. 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* 157, 423-447.
34. Wang, X. Wang, Y. Tian, J. Lim, B.L. Yan, X. and Liao, H. 2009. Overexpressing AtPAP15 Enhances phosphorus efficiency in soybean. *Plant Physiology* 151, 233-240.
35. Zhang, D. Song, H. Cheng, H. Hao, D. Wang, H. Kan, G. Jin, H. and Yu, D. 2014. The Acid Phosphatase-Encoding Gene GmACP1 Contributes to Soybean Tolerance to Low-Phosphorus Stress. *PLOS Gen* 10 (1): 1-16.
36. Zhang, W. Gruszewski, H.A. Chevone, B.I. Nessler, C.L. 2008. An *Arabidopsis* purple acid phosphatase with phytase activity increases foliar ascorbate. *Plant Physiology* 146: 431-440

