

اثر تغییر یافته سینک: نسبت منبع بر متابولیسم فتوسنتزی برگهای منبع

چکیده

زمانیکه هفت گونه از غلات تحت شرایط زیست محیطی یکسان کشت شدند، کاهش نسبت مخزن به منبع منجر به کاهش میزان فتوسنتز در عرض 1 الی 3 روز در گونه های *Cucumis sativus* L.، *Gessypium hirsutum* L. و *Raphanus sativus* L. گردید ولی در گونه های *Capsicum annuum* L.، *Solanum melongena* L.، *Phaseolus vulgaris* L. یا *Ricinus communis* L. چنین نبود. این کاهش به بستن روزنه ارتباطی نداشت. در گیاه پنبه و خیار، حذف مخزن منجر به افزایش میزان نشاسته و قند، در ذخایر گلوکز 6-فسفات و فروکتوز-6 فسفات گردید و نیز منجر به افزایش در نسبت 14C شناسایی شده در فسفات های قندی و UDP گلوکز پس از تامین 14CO₂ گردید. زمانیکه مانوز در اختیار دیسک های برگ قرار گرفت تا با فسفات غیرآلی سیتوپلاسمی تشکیل کمپلکس دهد، تحریک سنتز نشاسته، و مهار تثبیت CO₂، در دیسک های شاهد مشاهده گردید اما در دیسک های گرفته شده از گیاهان تحت آزمایش چنین نبود. بافر فسفات باعث کاهش سنتز نشاسته در گیاهان تحت آزمایش گردید ولی نه در دیسک های شاهد چنین نبود. این یافته ها نشان می دهد که حذف مخزن منجر به میزان کاهش یافته ای از فسفات غیرآلی به ترکیبات فسفریله می گردد. در لوبیا کربن 14C در فسفات های قندی بعد از حذف مخزن افزایش یافت ولی بدون تجمع سوکروز چنین گردید که نشانگر کنترل شدیدتر میزان قند در حالت بازخورد بود. نشاسته به میزان بالاتر از بقیه گیاهان تجمع یافت ولی میزان تثبیت CO₂ برای چندین روز ثابت بود.

مشاهده شده است که تقاضای تغییر یافته مخزن یافته منجر به تغییر میزان فتوسنتز برگ منبع در تعدادی از گونه ها شده است. مکانیسمی که طی آن شرایط مخزن به منبع انتقال می یابد هنوز روشن نیست. همچنین، در برخی تحقیقات تعامل مخزن به منبع چندان قابل شناسایی نبوده است. برخی از نتایج ضد و نقیض در متون علمی را می توان ناشی از تفاوت های موجود میان شرایط رشد و روش آزمایش در آزمایشگاه های مختلف دانست. سایر موارد را می توان به تفاوتها در پاسخ های میان گونه های مختلف نسبت داد. ما تحقیقی را درباره اثر روشهایی اجرا کردیم که میزان جابجایی را طبق فعالیتهای متابولیک برگهای منبع در چندین گونه گیاه پرورش یافته تحت شرایط زیست محیطی کنترل شده یکسانی تغییر می دهند. اخیراً دو اثر قابل مشاهده را در گیاه خیار بعد از عملیات حلقه یا حذف مخزن گزارش کردیم. یک اثر کوتاه مدت بعد از 3 ساعت با جبران متعاقب به حد ماکزیمم رسید، و شامل بستن روزنه احتمالاً بدلیل تحریک با افزایش موقتی استرس آب برگ و میزان ABA، بدون تغییر قابل شناسایی در الگوی ترکیب کربن 14C با متابولیت ها بوده است. یک اثر طولانی مدت بعد از 3 روز شناسایی گردید و شامل تغییراتی در مقدار نسبی کربن 14C ترکیبی با انواع محصولات فتوسنتزی و ترکیبات واسطه بود، ولی به پاسخ های روزنه ارتباطی نداشت. در این مقاله اثرات درازمدت متابولیسم مخزن را در تعدادی گونه های دیگر گزارش می دهیم و درباره این یافته ها در رابطه با ماهیت احتمالی پیامی که انتقال دهنده تقاضای مخزن برای فعالیت منبع می باشد، بحث می کنیم.

مواد و روشها

گیاهان پنبه (*Gossypium hisutum* L. cv Acala Sj-2)، لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L. cv Bulgarian)، خیار (*Cucumis sativus* L. cv Dalila)، تربچه (*Raphanus sativus* L. cv Munchner Bierrettich)، فلفل سبز (*Capsicum annum* L. cv California Wonder)، بادمجان (*Solanum melongena* L. cv Black Beauty) و کرچک (*Ricinus communis* L.) در یک ظرف پلاستیکی استوانه ای 2 لیتری مملو از ورمی کولیت پرورش یافتند. گیاهان به صورت یک گیاه در هر گلدان مدت کوتاهی بعد از پدیدار شدن هرس گردیدند و دو بار در هفته با آب دیونیزه آبیاری شدند و یک بار در هفته با محلول Hoagland نیمه قوی آبیاری شدند. آب و محلول اضافی از ته ظرف تخلیه گردید. همه گونه ها در

یک اتاقک که با حفظ دمای 25 درجه سانتیگراد با چگالی شار کوانتومی $1 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ } 450 \mu\text{mol}$ (400 الی 700 نانومتر) و یک دوره نوری 13 ساعته و تاریکی 11 ساعته رشد نمودند.

آزمایشات با گیاه پنبه حدود 10 روز بعد از پدیداری اولین گل (11 الی 12 هفته بعد از پدیداری خود گیاه) اجرا گردیدند. گیاهان لوبیا در مرحله اولین برگ جوانه زده کاملاً پهن شده استفاده گردیدند (22 الی 25 روز بعد از پدیداری خود گیاه).

یک آزمایش با گیاه پنبه (شکل 1) روی گیاهان پرورش یافته در مزرعه اجرا گردید، گیاه پنبه در 25 می در ردیفهای 1 متر جدا از هم کشت شد و بعد از پدیداری گیاه به تعداد 10 گیاه در هر متر مربع هرس گردید. بعد از نورافشانی برای اطمینان از پدیداری گیاه، یک سیستم آبیاری قطره ای نصب گردید. برگهای جانبی کنار ردیف های گیاهان واقع گردیدند و نورافشانها 40 سانتی متر از هم فاصله داشتند. گیاهان یک بار در روز آبیاری شدند و مقدار آب تامینی براساس تبخیر از یک ماهیتابه رده A تعیین گردید. نوترینتهای حاوی اوره، H_3PO_4 و KCl در نسبت N:P:K برابر با 4:1:2 در آب آبیاری با غلظت $80 \text{g} \times \text{m}^{-3}$ از قبل حل گردیدند. گیاهان برای این آزمایش در روز 12 آگوست استفاده گردیدند، یعنی زمانیکه حدود 10 غوزه پنبه یا گل در هر گیاه وجود داشت. مخزن حذف شده در مورد گیاه پنبه پرورش یافته در اتاقک رشد شامل اولین غوزه پنبه در حال رشد بود و اندازه گیریها روی برگ بالغ در مجاورت این غوزه پنبه صورت گرفت. در پنبه رشد کرده در مزرعه، انواع تعداد غوزه ها یا گلها حذف گردید، و اندازه گیریها روی چهار برگ با سنین مختلف در طول محور گیاهان اجرا گردید. عصاره های اینها با هم ترکیب گردید. در مورد گیاهان لوبیا، مخزن حذف شده شامل دومین برگ جوان در حال رشد در سه برگچه و غنچه های در حال رشد بود. اولین برگ در سه برگچه به عنوان برگ منبع در نظر گرفته شد. میزان تثبیت CO_2 در مساحت های دایره ای $1/5$ سانتیمتر مربعی از برگهای متصل طبق عملیاتی که در مقاله قبلی (12) شرح داده شد، اندازه گیری گردید.

این قسمتها در یک میکرواتاقک دربسته قرار گرفتند و در معرض جریان هوای حاوی $300 \mu\text{l L}^{-1}$ $14\text{CO}_2 + 12\text{CO}_2$ به مدت 60 ثانیه قرار گرفتند. مواد محلول اتانولی و مواد محلول HClO_4 طبق مقاله Mayoral و همکارانش (17) تعیین شدند. مواد محلول اتانولی در اصل شامل قندها و اسیدهای آمینه بودند، مواد محلول بعدی در اصل شامل نشاسته بود. توزیع کربن 14C در میان مواد واسطه و محصولات نهایی

فتوسنتزی با روش Calvin-Bassham بنا به شرح مقاله (17) تعیین گردید. قندها در عصاره های ترکیبی اتانول و آب انالیز گردیدند. گلوکز با استفاده از گلوکز اکسیداز و او-دیانیزیدین دهیدروکلراید برآورد گردید. فسفاتهای قندی روی 3 گرم از ماده برگ تازه نمونه برداری شده در وسط روز و بلافاصله هموژنیزه شدن در 12 میلی لیتر محیط سرد شده با یخ و حاوی 50mM MeS-NaOH تحت pH 6.0 و 0.5 g PVPP ، 150 mg BSA و 10mM DTT تعیین گردیدند. بعد از سانتریفوژ با سرعت 15000g لایه رویی به کمک HClO₄ (با غلظت نهایی 15٪) دپروتئینه گردید و به کمک KOH خنثی گردید. سپس این عصاره به مدت 2 دقیقه با کربن فعال شده در دستگاه همزن شیکر قرار گرفت.

ما این روش را روی مواد خود با روش مقاله Seeman & Sharkey (225) و نیز مقاله Lilley و همکارانش (15) مقایسه کردیم. برگ در نیتروژن N₂ مایع منجمد گردید ضمن اینکه همچنان به گیاه متصل بود، سپس در نیتروژن N₂ مایع خرد شده و به کمک HClO₄ عصاره گیری گردید ضمن اینکه همچنان در حالت یخ زده قرار داشت. بعد از تجزیه بعدی، فسفاتهای قندی براساس مساحت برگ بیان گردیدند. در یک مجموعه از آزمایشات مقادیر بدست آمده برای این دو روش خیلی نزدیک بهم بود، و مقادیری که با دومین روش بدست آمد همچنان بطور خیلی جزئی پایین تر بود

بعد از سانتریفوژ، لایه رویی برای تعیین دو فسفات هگزوز استفاده گردید. متعاقباً سنجش به کمک گلوکز 6-P دهیدروژناز و P-گلوکز ایزومراز انجام شد.

سوکروز به شکل قند احیاکننده بعد از هیدرولیز KOH طبق مقاله Handel (8) تخمین زد. ما این روش را برای ماده خود براساس روش گلوکز اکسیداز استاندارد کالیبره کردیم و یک رابطه خطی را بین مقادیر بدست آمده با این دو تکنیک بدست آوردیم. معادله ای که بیان کننده این نسبت بود برابر با $y=0.036+1.6x$ می باشد (ضریب همبستگی رگرسیون 0.86 می باشد)، که در آن y غلظت سوکروز بنا به اندازه گیری با روش دیگری است و x غلظتی است که به کمک گلوکز اکسیداز اندازه گیری می شود. نشاسته با روش مقاله 17 تجزیه گردید.

آزمایشات تغذیه با قند روی دیسک های برگ به مساحت 2 سانتیمتر مربع و شناور روی محلولهای سوکروز یا مانیتول به مدت 3 ساعت در تاریکی و سپس به مدت 30 دقیقه در نور انجام شدند. آزمایشات تغذیه با فسفات

روی دیسک های شناور بر محلولهای گوناگون (بخش نتایج) به مدت 16 ساعت در تاریکی و سپس به مدت 2 ساعت در نور انجام شدند. تثبیت CO₂ با دیسک هایی به شیوه مشابه با روشی که برای برگهای سالم بعد از آزمایش بلاتینگ نقطه گذاری روی کاغذ صافی بکار گرفته شد، تعیین گردید.

نتایج

تحقیق روی هفت گونه گیاه زراعی نشان داد که حتی زمانیکه کلیه گیاهان تحت شرایط زیست محیطی یکسان پرورش یافتند و در معرض تیمارهای مشابه قرار گرفتند، پاسخ ایشان به دستکاری مخزن متفاوت بود. این امکان فراهم گردید که گیاهان در دو گروه قرار گیرند (جدول 1). در گیاهان خیار، پنبه، و تربچه، کاهش تقاضای مخزن منجر به کاهش شدت معنی دار میزان فتوسنتز در برگ منبع گردید. امکان شناسایی چنین کاهش‌هایی در گیاهان فلفل، بادمجان، لوبیا یا کرچک مقدور نبود. از سوی دیگر، افزایش معنی دار محتوای نشاسته نه تنها در مورد اعضای گروه اول مشاهده گردید، بلکه در لوبیا، که عضو گروه دوم بود، نیز مشاهده گردید. یک عضو از هر گروه (پنبه و لوبیا به ترتیب) به تفصیل بیشتری بنا به گزارش ذیل مطالعه گردید.

جدول 2 نشان می دهد که، در مورد پنبه، کاهش 33 درصدی در میزان تثبیت CO₂ در برگ منبع در واقع 1 روز بعد از حذف مخزن ها قابل مشاهده بود. بعلاوه افزایش 3.3 برابری در محتوای نشاسته ی برگ منبع نیز در عرض 1 روز قابل مشاهده گردید. طی روزهای بعدی آزمایش، تجمع نشاسته همچنان افزایش یافت و میزان تثبیت CO₂ کاهش یافت و مقدار محتوای نشاسته بعد از 8 روز بیش از 5 برابر گیاه شاهد بود.

جدول 1- اثر نسبت تغییر یافته مخزن به منبع بر فتوسنتز و محتوای نشاسته ی برگهای منبع در انواع گونه های

گیاهان

مخزن ها (برگهای جوان، میوه ها، گلها یا غنچه ها) چیده شده و اندازه گیری ها چند روز بعد از تیمار طبق

توضیحات صورت گرفت. نتایج به صورت میانگین 10 تکرار $SE \pm$ بیان گردیده اند.

نشاسته	تثبیت CO2	زمان بعد از تیمار	منبع / مخزن	گونه ها
درصد وزن خشک	واحد $mg \cdot dm^{-2} \cdot h^{-1}$	واحد روز	واحد نسبت	
A-گونه هایی فتوسنتزشان با حذف مخزن کاهش یافت				
11 ± 1 20 ± 1	15 ± 1 5 ± 1	6	شاهد کاهش یافته	خیار
تعیین نشده تعیین نشده	28 ± 1 10 ± 1	5	شاهد کاهش یافته	پنبه
4 ± 1 8 ± 1	14 ± 1 7 ± 1	9	شاهد کاهش یافته	ترپچه
B-گونه هایی که فتوسنتزشان تحت تاثیر حذف مخزن نبود				
تعیین نشده تعیین نشده	30 ± 3 30 ± 3	6	شاهد کاهش یافته	فلفل
تعیین نشده تعیین نشده	22 ± 3 21 ± 3	6	شاهد کاهش یافته	بادمجان
10 ± 1 40 ± 1	14 ± 0 14 ± 4	4	شاهد کاهش یافته	لوبیا
تعیین نشده تعیین نشده	36 ± 4 30 ± 4	4	شاهد کاهش یافته	کرچک

جدول 2- اثر حذف مخزن بر میزان فتوسنتز. مقاومت روزنه و محتوای نشاسته ی برگهای منبع در گیاهان پنبه

SE±

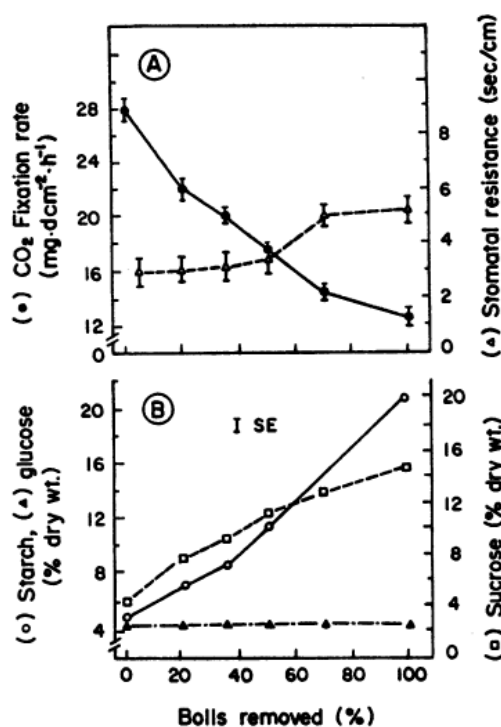
نشاسته	هدایت روزنه ای	میزان تثبیت CO2	زمان بعد از دستکاری منبع / مخزن	منبع / مخزن
درصد وزن خشک	$cm \cdot s^{-1}$	$mg \cdot dm^{-2} \cdot h^{-1}$	واحد روز	واحد نسبت
4.0 ± 0.9	0.26 ± 0.02	25.5 ± 0.5		تغییر نیافته
12.6 ± 1.0	0.26 ± 0.02	16.9 ± 0.4	1	کاهش یافته
15.0 ± 1.0	0.28 ± 0.03	6.4 ± 0.8	3	کاهش یافته
18.0 ± 1.2	0.27 ± 0.02	6.4 ± 0.8	6	کاهش یافته
22.0 ± 1.0	0.19 ± 0.02	3.5 ± 0.6	8	کاهش یافته
3.5 ± 0.5	0.34 ± 0.05	26.5 ± 1.0	3	افزایش یافته

کاهش میزان تثبیت CO2 را نمی توان به بستن روزنه استومات نسبت داد، درست همانند مورد اثر کوتاه مدت بر فتوسنتز که قبلا در مقاله 17 گفته شد، چرا که امکان اینکه هیچ گونه اثری بر مقاومت روزنه تا روز 8 ام

شناسایی گردد، وجود نداشت (جدول 2). افزایش نسبت مخزن به منبع هیچ گونه اثرات معنی داری بر پارامترهای برگ منبع اندازه گیری شده ایجاد نکرد ولی گرایش جزئی به میزان تثبیت CO₂ بالاتر و محتوای نشاسته پایین تر وجود داشت.

شکل 1 نشان می دهد که میزان فتوسنتز در برگ منبع (طبق اندازه گیری 4 روز پس از تیمار) تحت تابع وارون تعداد غوزه های پنبه حذف شده در حالت فعال رشد بوده است. درحالیکه محتوای گلوکز تغییری نکرد، تجمع نشاسته و نیز سوکروز نیز تابعی از درصد غوزه های پنبه حذف شده بود (شکل 1B). برعکس، مقاومت روزنه تحت تاثیر حذف تا 60 درصد غوزه های پنبه قرار نگرفت و تنها افزایشی جزئی را نشان داد اگر بیشتر از آن تعداد حذف می گردید.

نه تنها ذخیره نشاسته بعد از حذف مخزن بزرگتر بود (شکل Fig.1B)، بلکه اثر حذف مخزن روی توزیع کربن 14C بین نشاسته و مواد محلول در اتانول در عرض 5 دقیقه پس از تامین کربن 14CO₂ برای برگ منبع قابل مشاهده بود. در یک آزمایش مقدار 25±2% cpm از کل cpm در فراکسیون اتانول غیرمحلول در شاهد در مقایسه با مقدار 40±2% در مورد گیاهان دارای غوزه پنبه حذف شده یافت گردید.



شکل 1-A- Fig. اثر حذف غوزه پنبه از گیاهان پنبه روی فتوسنتز و مقاومت روزنه ای در برگهای منبع. B- اثر حذف غوزه پنبه روی سوکروز، گلوکز و محتوای نشاسته برگهای منبع. گیاهان پنبه در مزرعه با آبیاری قطره ای

پرورش یافتند. آزمایش روی گیاهان 80 روزه با دست کم 10 غوزه پنبه و گل در هر گیاه اجرا گردید. اندازه گیری ها روی چهار برگ منبع در طول محور گیاه 3 روز بعد از حذف تعداد مختلفی غوزه پنبه یا گل صورت گرفت.

تحقیق مفصل تر روی توزیع کربن 14C در میان انواع محصولات نهایی متابولیکی و واسطه های فتوسنتزی پس از 1 دقیقه از تامین 14CO₂ در جدول IIIA خلاصه سازی شده است. از نظر کمی، اثر حذف مخزن در برگهای جوان و پیر خیلی مشابه بود. همچنین، این اثر تا حد زیادی شبیه به الگویی است که قبلا برای خیار در مقاله 17 گزارش گردید. در کلیه سه مورد حذف مخزن تقریبا باعث کاهش در مقادیر کربن 14C ترکیبی در PGA، P-انول پیرووات و سوکروز گردید. از سوی دیگر، در کلیه سه مورد این تیمار باعث افزایش کربن 14C ترکیبی در گلوکز 6-P به اضافه سدوهپتولوز 7-P، فروکتوز 6-P، UDP گلوکز، آلانین، آسپاراتات (و در مورد برگهای جوان، همچنین در مالتوز) گردید.

الگوی ترکیب کربن 14C نشانگر این احتمال است که فسفات های قندی ممکن است در برگها بعد از حذف مخزن تجمع یابند. این احتمال بوسیله تحلیل های مستقیم اندازه های ذخایر برای گلوکز 6-P و فروکتوز 6-P بررسی گردید. جدول 4 نشان می دهد که افزایش معنی دار آماری در اندازه این ذخایر در واقع 3 روز بعد از حذف غوزه پنبه تظاهر یافت.

افزایش در مقدار فسفات باند شده به شکل فسفات های آلی که در جدول 4 نشان داده شد نشانگر آن بود که ممکن است کاهش مشابهی در محتوای فسفات آزاد سیتوپلاسمی، همراه با عواقبی در سنتز سوکروز و تشکیل نشاسته وجود داشته باشد. تعیین P1 سیتوپلاسمی، چون از تعیین آن در سایر بخشهای سلولی متفاوت بود، از دامنه تکنیک هایی که متداول استفاده می شوند، فراتر است هر چند در حال حاضر روشی با استفاده از NMR پیشگام می باشد. با اینحال درباره اثر تنظیم کننده غلظت P1 داخلی در خیار و پنبه تحقیق کردیم. دیسک های برداشته شده از برگهای شاهد یا کمربندی در بافر فسفات 50mM، بافر تریس-مالئات 50mM (به عنوان شاهد)، یا روی مانوز 10mM (که مشخص گردید P1 سیتوپلاسمی را به صورت مانوز فسفات جداسازی می کند) شناور گردیدند. جدول 5 یافته های جالبی را نشان می دهد مبنی بر اینکه اثر تیمار مانوز در مورد گیاهان شاهد به میزان اساسی بود، ولی در گیاهان کمربندی خیلی جزئی بود. در پنبه و نیز خیار، ذخیره مانوز نسبت

کربن 14C ترکیبی در نشاسته در دیسک های شاهد را افزایش داد که باعث کاهش کربن ترکیبی شناسایی شده در متابولیت های محلول اتانول گردید. همچنین باعث کاهش میزان تثبیت CO2 گردید.

جدول 3- اثر حذف مخزن بر توزیع کربن 14C در میان محصولات فتوسنتزی در برگهای منبع پنبه و لوبیا آزمایشات 3 روز پس از حذف مخزن در مورد پنبه پرورش یافته در مزرعه و پس از 3 یا 6 روز در مورد لوبیا اجرا گردید. نواحی دایره ای (1.5 cm²) روی برگهای متصل به گیاه به مدت 1 ماه با 14CO2 نشاندار گردیدند. کربن 14C شناسایی شده به شکل درصد کربن 14C کل بازیابی شده بیان گردیده است.

	برگهای جوان		برگهای بالغ	
	شاهد	مخزن حذف شده	شاهد	مخزن حذف شده
الف- گیاه پنبه				
PGA	8.4	6.0	9.7	2.2
فروکتوز 6-P	1.0	2.5	1.4	3.0
گلوکز 6-P + سدوهپتولوز + 7-P	11.5	4.7	16.7	10.0
P-انول پیرووات	5.9	6.1	5.0	4.4
فروکتوز	1.4	2.3	1.0	1.1
مالتوز	20.0	11.3	22.0	7.3
سوکروز	10.3	9.5	7.5	6.0
سرین+گلوکز+گلیسین	23.6	32.0	10.6	26.5
آلانین	1.3	3.0	0.5	3.3
UDP-گلوکز	9.3	11.2	16.5	15.8
گلیسرات	1.7	1.5	2.7	0.7
مالات	0.2	0.6	0.2	0.1
سیترات	4.1	6.3	4.3	6.8
نامشخص				
			تعداد روزهای پس از حذف مخزن	
	شاهد		3 روز	شش روز
ب- گیاه لوبیا				
PGA	12.6	12.8	5.4	
فروکتوز 6-P	1.7	1.5	3.8	
گلوکز 6-P + سدوهپتولوز + 7-P	2.3	2.4	14.5	
P-انول پیرووات	2.6	2.8	1.0	
فروکتوز	7.5	7.4	9.0	
مالتوز	3.0	3.1	8.5	
سوکروز	43.3	42.9	16.7	
سرین+گلوکز+گلیسین	1.9	1.8	4.4	
	10.7	10.8	18.1	
	1.0	1.0	1.5	
	9.6	9.7	12.0	
	1.8	1.7	0.8	
	2.0	2.1	4.3	

آلانین	
UDP-گلوز	
گلیسرات	
مالات	
نامشخص	

جدول 4- اثر حذف مخزن بر غلظت های گلوز 6-P و فروکتوز 6-P در برگهای منبع برگرفته از گیاهان پنبه گیاهان پنبه در مزرعه با آبیاری قطره ای پرورش یافتند. حدود 65٪ غوزه پنبه و گل از گیاهان 95 روزه جمع آوری گردید. برگها بین گره ها که مخازنشان حذف شده بود، طی 9 روز بعدی نمونه برداری گردیدند و در مزرعه در یخ خشک منجمد شده و در عرض 15 دقیقه عصاره گیری گردیدند.

زمان بعد از حذف مخزن	گلوز 6-P		فروکتوز 6-P	
	شاهد	تیمار	شاهد	تیمار
واحد روز	<i>nmol/g fresh wt ± SE</i>			
0	318 ± 20		50 ± 7	
3	350 ± 10	514 ± 32	41 ± 5	91 ± 10
5	380 ± 20	544 ± 40	61 ± 5	103 ± 6
7	390 ± 52	556 ± 31	82 ± 8	122 ± 5
9	328 ± 41	529 ± 39	51 ± 10	108 ± 19

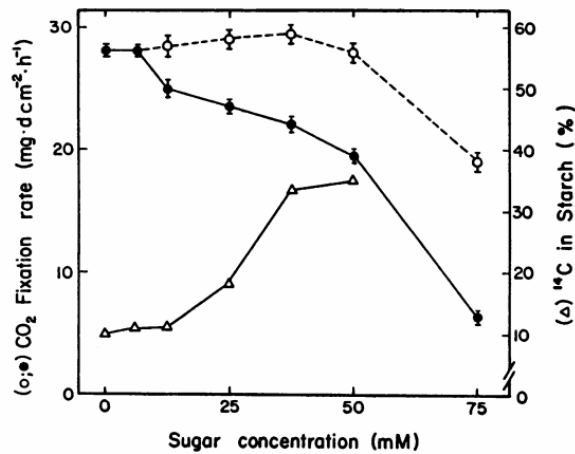
جدول 5- میزان تثبیت CO₂ و توزیع کربن 14C بین فتوسنتات محلول در اتانول و فتوسنتات محلول در HClO₄ در دیسک های شناور روی فسفات، مانوز یا بافرهای تریس-مالئات بعد از حذف آنها از پنبه کمربندی یا شاهد یا برگهای خیار

دیسک ها 3 روز بعد از کمربندسازی و شناورسازی روی تریس مالئات (50mM, pH6.8)، فسفات (50 mM, pH 6.8) یا مانوز 10mM به مدت 16 ساعت در تاریکی و پس از آن تا 2 ساعت در نور حذف گردیدند. دیسک ها در معرض 14CO₂ به مدت 1 دقیقه طبق جدول 1 قرار گرفتند. نتایج به شکل میانگین ده سری اندازه گیری +/- SE می باشند.

	شاهد			کمربنددار		
	میزان تثبیت CO2	محلول در اتانول	محلول در HClO4	میزان تثبیت CO2	محلول در اتانول	محلول در HClO4
	واحد $mg \cdot dm^{-2} h^{-1}$	واحد کربن 14C به شکل درصد کربن 14C بازیابی شده		واحد $mg \cdot dm^{-2} h^{-1}$	واحد کربن 14C به شکل درصد کربن 14C بازیابی شده	
الف-پنبه	29 ± 1	83 ± 2	17 ± 2	19 ± 2	76 ± 1	24 ± 1
تریس-مالئات	29 ± 1	87 ± 1	13 ± 2	16 ± 1	83 ± 1	17 ± 1
فسفات	19 ± 1	54 ± 1	46 ± 1	16 ± 1	76 ± 1	24 ± 1
مانوز						
ب-خيار	20 ± 2	76 ± 2	24 ± 2	9 ± 1	40 ± 1	60 ± 1
تریس-مالئات	15 ± 1	82 ± 1	18 ± 1	8 ± 1	76 ± 1	24 ± 1
فسفات	15 ± 1	55 ± 2	45 ± 1	6 ± 1	40 ± 1	60 ± 1
مانوز						

برعکس، در دیسک های گرفته شده از برگهای کمربنددار هیچ گونه اثر قابل شناسایی روی ترکیب کربن 14C با نشاسته در هر کدام از گیاهان وجود نداشت و اثر خیلی کوچکتري روی تثبیت CO2 وجود داشت. از طرفی، تیمار با بافر فسفات بر برگهای کمربنددار بطور قوی تری نسبت به گیاهان شاهد اثر گذاشت. در هر دو گونه گیاهی، درصد کربن 14C ترکیبی با نشاسته تا حد موجود در دیسک های گرفته شده از برگ های بدون کمربندسازی کاهش یافت. اما تامین فسفات نتوانست میزان تثبیت CO2 را تا حد برگهای بدون کمربندسازی افزایش دهد.

نقش سوکروز در واسطه گری کنترل تثبیت CO2 و توزیع کربن 14C در میان محصولات فتوسنتزی نیز به کمک دیسک های برگ جدا شده مطالعه گردید. زمانیکه سوکروز به چنین دیسک هایی اضافه گردید، ترکیب کربن 14C با نشاسته به شدت تقویت گردید و تا غلظت 75 mM سوکروز رسید که در این حالت به وضعیت ثابت رسید (شکل 2). تثبیت CO2 در کل دامنه غلظت آزمایش شده دچار افت گردید. به نظر می رسد اثر سوکروز به جای اینکه یک پدیده اسموزی باشد از نوع متابولیکی است چرا که بنا به این حقیقت اثبات گردید که وقتی مانیتول جانشین سوکروز شد، تثبیت CO2 تحت تاثیر غلظت مانیتول خارجی به اندازه 100 mM نبود (شکل 2).



شکل 2- میزان تثبیت $^{14}\text{C}\text{CO}_2$ و ترکیب کربن ^{14}C با نشاسته در دیسک های برگ پنبه که روی غلظتهای مختلف سوکروز یا مانیتول شناور بودند. دیسک های حاوی هیچگونه رگبرگ اصلی (به مساحت 2 سانتیمتر مربع) از تیغه های برگ پنبه جدا گردیدند و روی محلولهای سوکروز یا مانیتول به مدت 3 ساعت در تاریکی و سپس 30 دقیقه در نور شناور گردیدند. میزان تثبیت CO_2 در یک میکروآتاقک پر از $^{14}\text{CO}_2$ همانند برگهای سالم تعیین گردید. دایره ها یعنی تثبیت $^{14}\text{CO}_2$ برای دیسک ها در محیط مانیتول (O) یا سوکروز (●). مثلث ها یعنی کربن ^{14}C ترکیبی با نشاسته برای دیسک ها در محیط سوکروز. میله عمودی نشانگر خطای استاندارد میانگین هاست.

جدول 4- توزیع کربن ^{14}C در میان محصولات فتوسنتزی دیسک های برگ پنبه شناور در محلولهای سوکروز با غلظتهای مختلف و در معرض $^{14}\text{CO}_2$ به مدت 1 دقیقه

دیسک ها (2 سانتیمتر مربع) از برگها برداشته شدند و روی غلظتهای افزایشی سوکروز به مدت سه ساعت در تاریکی و سپس برای 30 دقیقه در نور شناور گردیدند. سپس در معرض $^{14}\text{CO}_2$ قرار گرفتند و طبق جدول 3 عصاره گیری گردیدند. ارقام نشانگر ^{14}C شناسایی شده به شکل درصد کربن ^{14}C بازیابی شده می باشد.

PGA	غلظت سوکروز در محیط (mM)			
	0	50	100	150
گلوکز 6-P + سدوهپتولوز 7-P	6.0	2.8	2.8	1.0
P-انول پیرووات	5.0	5.1	5.0	5.0
فروکتوز	13.1	4.3	3.1	1.4
مالتوز	4.7	3.6	3.6	2.5
سوکروز	2.5	2.5	2.5	2.5
گلوکز+سرین+گلايسين	13.1	9.8	6.8	3.0
الانين	13.8	12.8	12.4	12.8
گليسيرات	30.0	47.4	52.0	60.0
نامشخص	8.8	7.7	8.3	7.8
	3.0	4.0	3.5	4.0

در تعدادی از موارد، تغذیه با قند بر درصد ترکیب کربن 14C در محصولات متابولیکی به شیوه ای مشابه با حذف مخزن اثر گذاشت (جدول 4). ترکیب کربن در آلانین افزایش یافت، درحالیکه در سوکروز، فروکتوز، PGA، و P-انول پیرووات کاهش یافت بویژه به شکل متنابهی در P-انول پیرووات که حتی با یک غلظت سوکروز خارجی به میزان 50 mM، ترکیب 14C تا حدود دوسوم کاهش یافت (جدول 4).

در مورد لوبیا، که یک عضو گروه بدون پاسخ گیاهان بود (جدول 1)، حذف ساقه و برگهای جوان سه برگچه ای بر میزان تثبیت CO₂ برگهای منبع اثری نداشت (جدول 7). با اینحال، افزایش برجسته محتوای نشاسته (ولی نه قند) در برگهای منبع وانگهی قابل شناسایی بود. این تایید که میزان سنتز نشاسته قویا تحت تاثیر حذف مخزن می باشد می تواند در این حقیقت نهفته باشد که 3 روز پس از تیمار، به ترتیب 68 درصد و 28 درصد از 14CO₂ تثبیت شده طی یک دوره 60 ثانیه ای در نشاسته در حالت های کمر بندسازی و حذف مخزن در مقایسه با میزان 15 درصد در برگهای شاهد ترکیب گردید.

تغییرات در توزیع کربن 14C در میان محصولات فتوسنتزی در برگهای منبع تنها 6 روز بعد از حذف مخزن قابل شناسایی بود (جدول III B). سپس، همانند مورد پنبه (جدول III A) و خیار، این تیمار باعث کاهش درصد ترکیب در PGA، P-انول پیرووات، سوکروز و مالات و باعث افزایش ترکیب در گلوکز 6-P، فروکتوز 6-P، مالتوز، آلانین، گلیسرات، و آسپارات گردید.

جدول 7- اثر حذف مخزن بر میزان تثبیت CO₂. مساحت برگ، وزن خشک برگ، کلروپلاست، نشاسته، و محتوای قندی برگهای لوبیا (نتایج به صورت متوسط ده گیاه +/- انحراف استاندارد می باشند).

زمان پس از تیمار	میزان تثبیت CO ₂	مساحت برگ	وزن خشک برگ (Wt)	محتوای کلروپلاست	محتوای نشاسته	قندهای کل
واحد روز	$mg \cdot dm^{-2} h^{-1}$	cm^2	$mg \cdot dm^{-2}$	$mg \cdot dm^{-2}$		% dry wt
0	14.5 ± 0.5	91 ± 2	254 ± 4	3.0 ± 0.5	10 ± 2	5.0 ± 1.3
3	14.3 ± 0.8	100 ± 3	270 ± 9	4.0 ± 0.5	15 ± 1	5.5 ± 2.0
6	14.7 ± 0.6	108 ± 3	360 ± 12	6.0 ± 0.5	26 ± 2	6.0 ± 1.5
8	14.8 ± 0.4	113 ± 2	456 ± 12	7.5 ± 0.4	30 ± 4	5.0 ± 1.0

درصد بالای ماده نشاندار شناسایی شده در آلانین در کلیه گیاهان بررسی شده (خیار، پنبه و لوبیا) پس از حذف مخزن درخورد توجه است. آلانین در کلروپلاست ها از پیرووات سنتز می شود که به نوبه خود در سیتوپلاسم از واکنش P-انول پیرووات و ADP منشا می گیرد که کاتالیزور آن پیرووات کیناز می باشد. بررسی فعالیت پیرووات کیناز در برگهای خیار نشان داد که این آنزیم آشکارا پس از کمربندسازی و حذف مخزن فعال گردید (داده ها نشان داده نشد).

بحث

حتی زمانی که گیاهان آزمایشی تحت شرایط زیست محیطی یکسانی پرورش می یابند، پاسخ به دستکاری مخزن بین گونه ها متفاوت است (جدول 1). در گروهی از گیاهان شامل پنبه و خیار، حذف مخزن باعث کاهش در تثبیت CO₂ در عرض 1 الی 3 روز گردید. اندازه گیری های پرموتور نشان داد که برعکس مهار کوتاه مدت تر گزارش شده قبلی، این اثر ربطی به بستن روزنه ها نداشت (جدول 2). اندازه اثر روی تثبیت CO₂، و اندازه اثرات روی تجمع قند و نشاسته که با آن همراه است، یک رابطه کمی را با تعداد مخزن های حذف شده برقرار نمود (شکل 1).

Herold اشاره کرد که مانع کلروپلاستی را می توان یک مانع نهایی بین منبع و مخزن در نظر گرفت. تغییرات در شرایط مخزن می تواند به شکل میزان تغییر یافته واکنشهای مربوط به سنتز سوکروز نشان داده شود، که احتمالاً با تغییرات در میزان سنتز فروکتوز 2,6-bisP مرتبط است که نقش کلیدی در تنظیم سنتز سوکروز

دارد. اما در سطح پوشش کلروپلاست است که شرط مخزن نهایتاً مربوط به منبع است. چون انتقالات از میان این مانع به شدت حالت انتخابی دارد، تنها تعداد خیلی کمی متابولیت می توانند به شکل پیام رسان عمل کنند. بنابراین، P1، تریوز-P، و PGA که از میان این مانع به کمک P1-تریوز فسفات آنتی پورتر منتقل می شوند، باید به عنوان کاندیداهای احتمالی برای نقش اخیر در نظر گرفته شوند.

تحقیقات کنونی شواهدی هماهنگ با طرح پیشنهادی Herold فراهم کرده اند مبنی بر اینکه سیگنالی که حذف مخزن را به فعالیت منبع مرتبط می سازد، می تواند یک غلظت کاهش یافته P1 در سیتوپلاسم باشد. این وضعیت ناشی از مهار فیدبک به کمک سوکروز تجمع یافته ی سوکروز فسفات سنتتاز و یا سوکروز فسفات فسفاتاز با تجمع بعدی فسفاتهای قندی و از اینرو نسبت کاهش یافته P1/به ترکیب فسفریله می باشد. Huber گزارش داده است که فعالیت سوکروز-P سنتتاز از چندین گونه گیاهی توسط سوکروز در محیط آزمایشگاهی in vitro مهار می شود و اینکه محتوای نشاسته برگ به طور منفی با فعالیت این آنزیم همبستگی دارد. نسبت P1/به ترکیب فسفریله در نتیجه مهار FBPase سیتوزولی توسط Fru 2 و P2-6 باز کاهش خواهد یافت که میزان آن تحت این شرایط بویژه به دلیل افزایش غلظت Fru-6-P افزایش می یابد. طی سنتز بی درنگ سوکروز، چهار مولکول P1 در طول مسیر تبدیل چهار مولکول تریوز-P به یک مولکول سوکروز آزاد می شوند، و به داخل کلروپلاست با تبادیل تریوز-P توسط آنتی پورتر فسفات منتقل می شوند. P1 کاهش احتمالا باعث مهار فتوسنتز از طریق کاهش تبادیل تریوز-P/P1 بین پوشش کلروپلاست، همراه با کاهش متعاقب در نسبت ATP/ADP می شود. این امر منجر به نسبت بالای PGA/P1 در کلروپلاستها به نفع سنتز نشاسته می شود.

یک تکنیک برای تعیین کمی غلظت P1 در سیتوپلاسم سلولهای برگ، همانگونه که از سایر اجزای سلولی جدا گردید، اکنون در دسترس نیست، با اینحال یک تکنیک برپایه NMR می تواند در آینده نزدیک در اختیار قرار گیرد. اما روند یافته های ما همانند تصویری است که در اینجا شرح داده شد.

(a) حذف مخزن منجر به افزایش غلظت سوکروز گردید (شکل 1). همچنین منجر به افزایش اندازه ذخایر G6P و F6P طبق تعیین های مستقیم گردید (جدول 4) و باز با افزایش ثابت در نسبت کربن 14C شناسایی شده در فسفات های قندی و UDP-گلوکز (جدول 3، A,B) نشان داده شد. افزایش ذخایر فسفات قندی نشانگر نسبت کاهش یافته P1/به ترکیبات فسفریله است.

(b) Heldt و همکارانش نشان دادند که تامین مانوز در دیسک های برگ با کاهش P1 سیتوپلاسمی از طریق کمپلکس سازی آن به شکل مانوز فسفات می شود. این تیمار تا حد زیادی باعث تقویت سنتز نشاسته می شود هرچند C مانوز با اسکلت نشاسته ترکیب نشده است. در آزمایشات ما، تامین مانوز به طور قوی باعث تقویت ترکیب 14C در نشاسته در مورد دیسک های برگ حاصل از گیاهان شاهد طبق انتظار گردید و تثبیت CO₂ کاهش یافت (جدول 5, A,B). فقدان برجسته اثر قابل مقایسه در گیاهان تحت تیمار کمربندسازی (که بر فعالیتهای متابولیکی برگهای منبع به شیوه ای مشابه با حذف مخزن اثر می گذارد) با این گفته هماهنگی دارد که P1 سیتوپلاسمی در هر موردی در واقع در این برگهای منبع پایین است.

(c) تامین بافر فسفات به دیسک های برگ باعث کاهش میزان بالای کربن 14C ترکیبی در نشاسته در دیسک های گرفته شده از گیاهان کمربندسازی شده گردید و آنرا به سطح مشاهده شده در گیاهان شاهد رسانید (جدول 5, A, B). تامین فسفات اثر اندکی بر سنتز نشاسته در گیاهان شاهد داشت یا اینکه یا هیچ گونه اثری نداشت. این نتایج از این گفته حمایت می کند که P1 سیتوپلاسمی در برگهای گرفته شده از گیاهان تیمار شده پایین است. در هر دو مجموعه دیسک، تامین فسفات اثر مهارکنندگی جزئی بر فتوسنتز داشت و این پدیده را شاید بتوان بنا به اثر P1 فرابیهینه توضیح داد همانگونه که چند محقق دیگر هم نشان داده اند.

وقتی دیسک های برگ شاهد به طور تدریجی با غلظتهای بالاتر سوکروز تغذیه گردیدند، تشکیل کربن 14C- نشاسته افزایش یافت درحالیکه تثبیت 14CO₂ به طور تدریجی دچار کاهش شد (شکل 2). در یک آزمایش جالب، محققین Natr و همکارانش مشاهده کردند که تجمع فتوسنتات ها با شناورسازی قطعات برگ اثر مهارکنندگی نسبتا اندکی بر فتوسنتز دارد ولی تجمع ماده خشک که ناشی از جذب قبلی گلوکز بوده است، اثر مهارکنندگی خیلی قوی تر داشت. سنتز نشاسته تا اندازه ای در مورد اولی بیشتر بود. اکنون می گوئیم که این یافته گیج کننده می تواند براساس P1 سیتوپلاسمی توضیح داده شود. حالت دوم که طی آن مهار فیدبک توسط قند جذب شده منجر به تجمع فسفاتهای قندی می شود، بنا به انتظار در سطح پایین تری نسبت به حالت تجمع فتوسنتات حفظ گردید، که شامل برگشت مداوم P1 و سایر متابولیت ها بوده است.

در کلیه گونه های آزمایشی ما، نسبت کربن 14C وارد شده به فراکسیون اسید آمینه در برگهای گیاهان تیمار شده بالاتر از گیاهان شاهد بود. به خصوص آلانین در نتیجه دستکاری های مخزن تجمع یافت. پیرووات کیناز که

آنزیم درگیر در سنتز آلانین می باشد، یک آنزیم تنظیم کننده در گلیکولیز می باشد. افزایش فروکتوز 2,6-bisP در نتیجه حذف مخزن جریان متابولیت ها را در جهت گلیکولیز افزایش می دهد. با کنترل میزان تشکیل پیرووات از PEP، پیرووات کیناز نیز بنا به انتظار اثر تنظیمی بر شکل گیری بعدی آلانین در کلروپلاست ها دارد. فعالسازی آشکار پیرووات کیناز در محیط بدن *in vivo* در برگها 5 روز پس از حذف مخزن ها مشاهده گردید. فعالسازی نیز تحت شرایط تجمع کربوهیدرات به دلیل کمبود K گزارش گردیده است. آلانین می تواند به شکل ذخیره جایگزین برای ذخیره موقت کربن بعد از اشباع ذخیره سوکروز عمل کند.

با اینحساب، افزایش آلانین (که کاملاً نمی توان آنرا با کاهش P-انول پیرووات توجیه نمود) نشانگر آنست که FBPase نقش مهمی در آزمایشات ما دارد. از سوی دیگر، افزایش ماده نشانگر در UDP گلوکز، فروکتوز-6-P، و گلوکز 6-P نشانگر کنترل در محل سوکروز P سنتتاز می باشد. شاید هر دو آنزیم ها مسئول کاهش مشاهده شده در فتوسنتز باشند. مشخص شد که فعالیت این دو آنزیم زمانی تقویت می شود که تقاضا برای سوکروز بدلیل از بین رفتن بخشی از برگ گیاهان افزایش یابد.

عدم حذف مخزن برای سرکوبی فتوسنتز برگ منبع در گیاهان لوبیا به دلیل ذخیره متوسط کربوهیدرات ها یا افزایش فعالیت مخزن های جایگزین نبود چرا که طبق این شواهد است که نشاسته به طور متناهی در برگهای منبع تجمع یافت. هرچند افزایش قندهای فسفریله نشاندار با کربن ^{14}C در پنبه دیده شد، عدم تجمع سوکروز قابل شناسایی بود. این امر نشانگر آنست که کنترل فیدبک سنتز سوکروز با سطح سوکروز باید در این گیاه بطور دقیق تری مطرح باشد و افزایش جزئی در سوکروز بالاتر از حد آستانه باعث سرکوبی سنتز سوکروز P و یا فروکتوز بیس فسفاتاز به طور کاملتری می شود. کاهش برجسته تر در مقدار P1 منتقل شده به کلروپلاست آشکارا در این گیاه منجر به خودمختاری بیشتر در متابولیسم کربن کلروپلاست می شود. برگهای لوبیا می تواند نشاسته را به میزان خیلی بالاتر از آنچه در گیاهان گروه پنبه دیده شده است، متجمع سازد (جدول 1).

مشاهده قبلی ما مبنی براینکه غلظت های بالای CO_2 محیطی باعث می شود گیاه خیار میزان خیلی بالای فتوسنتز را علیرغم محتوای نشاسته ی بالایش کسب کند، سبب می شود این فرضیه را زیر سوال ببریم که تجمع نشاسته فتوسنتز را سرکوب می کند و اینکه اساس مهار فتوسنتز توسط نشاسته همان کاهش حجم استرومای آزاد، کاهش انتقال نور بدرون کلروپلاست، یا پیوند Mg^{2+} مورد نیاز برای فعالسازی ریبولوز-1,5

bisP کربوکسیلاز توسط نشاسته می باشد. شواهد کنونی ما این احتمال را تقویت می کند که افزایش میزان نشاسته مشاهده شده وقتی نسبت مخزن به منبع کاهش می یابد، دلیل میزان تثبیت پایین تر CO₂ نیست بلکه پیامد سایر مکانیسم های مرتبط با آن می باشد. همچنین فقدان مهار قابل شناسایی در گیاهان لوبیا بعد از حذف مخزن می تواند به تغییرات در ضخامت مزوفیل، Chl، و وزن خشک در واحد سطح برگهای منبع مرتبط باشد. این تغییرات مساحت برگ داخلی بیشتری را ایجاد می کند که CO₂ از طریق آن می تواند به آنزیم کربوسیله کننده انتشار یابد.

ترکیب تقویت شده CO₂ 14 با مالتوز مشاهده شده در لوبیا و سایر گونه ها بعد از حذف مخزن (جدول 3، A و B) ممکن است به دلیل P1 کاهش یافته باشد، چون واکنش بین گلوکز 1-P و گلوکز برای تشکیل مالتوز و P1 به حالت پیشرو تحت این شرایط هدایت می شود. مالتوز می تواند به شکل پرایمر برای سنتز نشاسته عمل کند.

LITERATURE CITED

1. ADAM H 1971 Adenosine-5'-diphosphate and adenosine-5'-monophosphate. In HU Bergmeyer, ed, Methods of Enzymatic Analysis. Academic Press. New York, pp 573-577
2. CARMÍ A, D KOLLER 1979 Regulation of photosynthetic activity in the primary leaves of bean (*Phaseolus vulgaris* L) by materials moving in the water conducting system. *Plant Physiol* 69: 285-288
3. CSEKE C, NF WEEDEN, BB BUCHANAN, K UYEM 1982 A special fructose bisphosphate function as a cytoplasmic regulatory metabolite in green leaves. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 4322-4326
4. DOEHLER DC, SC HUBER 1983 Regulation of spinach leaf sucrose phosphate synthetase by glucose-6-phosphate, inorganic phosphate, and pH. *Plant Physiol* 73: 989-994
5. FLUGGE UE, M FREISL, HW HELDT 1980 Balance between metabolite accumulation and transport in relation to photosynthesis by isolated spinach chloroplasts. *Plant Physiol* 65: 574-577
6. GEIGER DR 1976 Effects of translocation and assimilation demand on photosynthesis. *Can J Bot* 54: 2337-2343
7. HABESHAW D 1973 Translocation and the control of photosynthesis in sugar beet. *Planta* 110: 213-226
8. HANDEL VE 1968 Direct microdetermination of sucrose. *Anal Biochem* 22: 280-283
9. HELDT HW, CJ CHON, D MARONDE, A HEROLD, ZS STANKOVIC, DA WALKER, A KRAMINER, MR KIRK, U HEBER 1977 Role of orthophosphate and other factors in the regulation of starch formation in leaves and isolated chloroplasts. *Plant Physiol* 59: 1146-1155
10. HEROLD A 1980 Regulation of photosynthesis by sink activity-the missing link. *New Phytol* 86: 131-144
11. HEROLD A, EEM McGEE, DH LEWIS 1980 The effect of orthophosphate concentration and exogenously applied sugars on the distribution of newly fixed carbon in sugar beet leaf discs. *New Phytol* 85: 1-13
12. HEUER B, Z PLAUT 1981 Carbon dioxide fixation and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity in intact leaves of sugar beet plants exposed to salinity and water stress. *Ann Bot* 48: 261-268
13. HOHORST HJ 1971 D-Glucose-6-phosphate and D-fructose-6-phosphate dehydrogenase, and phosphoglucose isomerase. In HU Bergmeyer, ed, Methods of Enzymatic Analysis. Academic Press, New York, pp 134-138

14. HUBER SC 1981 Interspecific variation in activity and regulation of leaf sucrose phosphate synthetase. *Z Pflanzenphysiol* 102: 443-450
15. LILLEY RM, M STITT, G MADER, HW HELDT 1982 Rapid fractionation of wheat leaf protoplasts using membrane filtration. The determination of metabolite levels in the chloroplast cytosol and mitochondria. *Plant Physiol* 70: 965-970
16. LINDEN JC, N SCHILLING, H BRACKENHOFER, O KANDLER 1975 Asymmetric labelling of maltose during photosynthesis in ¹⁴CO₂. *Z Pflanzenphysiol* 76: 176-181
17. MAYORAL ML, Z PLAUT, L REINHOLD 1985 Effect of translocation-hindering procedures on source leaf photosynthesis in cucumber. *Plant Physiol* 77: 712-717
18. NAFZIGER ED, HR KOLLER 1976 Influence of leaf starch concentration on CO₂ assimilation in soybean. *Plant Physiol* 57: 560-563
19. NATR L, BT WATSON, PE WEATHERLEY 1974 Glucose absorption, carbohydrate accumulation, presence of starch, and rate of photosynthesis in barley leaf segments. *Ann Bot* 38: 589-573
20. NEALS TF, LD INCOLL 1968 The control of leaf photosynthesis rate by the level of assimilate concentration in the leaf: a review of the hypothesis. *Bot Rev* 34: 107-123
21. NOBEL PS 1977 Internal leaf area and cellular CO₂ resistance: photosynthetic implications of variations with growth conditions and plant species. *Plant Physiol* 40: 137-144
22. PREISS J 1982 Regulation of the biosynthesis and degradation of starch. *Annu Rev Plant Physiol* 33: 431-454
23. ROBERTS JKM 1984 Study of plant metabolism in vivo using NMR spectroscopy. *Annu Rev Plant Physiol* 35: 375-386
24. RuFmY TW, JR SCHUBER 1983 Changes in starch formation and activities of sucrose phosphate synthase and cytoplasmic fructose-1,6-bisphosphatase in response to source-sink alterations. *Plant Physiol* 72: 474-480
25. SEEMAN JR, TD SHARKEY 1986 Salinity and nitrogen effects on photosynthesis, ribulose- 1-5-bisphosphate carboxylase and metabolite pool sizes in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol* 82: 555-560
26. SMYTH DA, MX Wu, CC BLACK JR 1984 Pyrophosphate and fructose-2,6- bisphosphate effects on glycolysis in pea seed extracts. *Plant Physiol* 76: 316- 320
27. STITT M, B HERZOG, HW HELDT 1984 Control of photosynthetic sucrose synthesis by fructose 2,6-bisphosphate. I. Coordination of CO₂ fixation and sucrose synthesis. *Plant Physiol* 75: 548-553
28. SUGIYAMA T, Y GoTo, T AKAZAWA 1968 Pyruvate kinase activity of wheat plants grown under potassium deficient conditions. *Plant Physiol* 43: 730- 734
29. WALKER DA 1976 Interaction between cytoplasm and plastids. In A Pirson, M Zimmerman, eds, *Encyclopedia of Plant Physiology (New Series) Vol 3*. Springer-Verlag, Heidelberg, pp 85-136.