

油菜對鎘的植生復育過程中蛋白質功能之研究

林永鴻¹

摘要

植生復育技術是將環境中鎘移除之經濟及有效的方法，然而，目前蛋白質於鎘的植物復育機制中所扮演的角色仍未完全被解開，因此，本試驗以常被做為重金屬復育研究的油菜為試驗作物，於水耕液中含有鎘 0, 10 及 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 的環境中種植，探討油菜中蛋白質在鎘的復育機制中所扮演的角色。結果顯示，隨著鎘處理濃度的提高，油菜除了某些蛋白質負責抗氧化及根型態的維護外，且經由醱解作用及三羧酸循環的增進產生較多的能量及有機酸來傳輸鎘以及免除鎘對植物的毒害。油菜對鎘的復育過程中蛋白質角色的釐清可做為爾後改善復育植物功能研究的參考。

關鍵詞: 油菜、鎘、植生復育、蛋白質

前言

鎘是一種具毒性的重金屬，其污染農地乃經由人類農業、工業及市鎮活動而累積於土壤環境中⁽¹⁸⁾。倘使植物吸收過量的鎘，易對其體內生理活動產生影響，諸如核醣酵素的抑制、硝酸還原酵素活性的抑制及總葉綠素含量的降低等^(12, 15, 24)，這些生理活性的降低進而對作物的生產產生不良影響⁽⁹⁾。此外，若鎘進入食物鏈，亦會導致人體健康上的疑慮，因此為了生產健康安全的農產品，因此鎘於土壤中維持安全的濃度是需受到重視的⁽²⁰⁾。一般土壤中的鎘可經由整治而達復育效果，然而，以往許多移除土壤中重金屬的方法，例如客土、化學處理等，不但成本昂貴，且費時、費力等問題，往往成為重金屬整治上的瓶頸。

植生復育技術(phytoremediation)是一種藉由綠色植物來移除土壤污染物質或降低其風險之新技術⁽²²⁾，由於具有環保、經濟、生態維護等諸多優點，目前應用於移除土壤中之有機及無機污染物質已漸受重視。此方法乃藉由植物的生長過程將污染物質濃縮於地上部，可使受污染土壤中之污染物質濃度逐漸降低。以往有諸多利用生物復育方式移除土壤鎘之研究，然而，從這些研究中發現，大多數的鎘乃累積於復育植物根部，只有少量的鎘被傳輸至莖部，甚至根中聚積的鎘濃度至少高於莖部 10 倍以上，顯示多數的復育植物並

¹ 行政院農業委員會高雄區農業改良場副研究員

利用 15000 G 離心 5 分鐘，接著以抽出劑 (2% Triton, 50 mM Tris, pH 7.4) 抽取蛋白質，然後加入 trichloroacetic acid (TCA) 進行沉澱，待分析蛋白質。依據 Bradford (1976) 的方法，將所抽取之蛋白質置於真空冷凍離心機 (Thermo, SPD111V)，於 -107°C 中乾燥 1 小時，然後加入 400 μ L 之再水合 (rehydration) 藥劑 (含 8.5 M urea、1 % Triton X-100、2 % DTT 及 1 % Amersham 之 IPG buffer)，使用研磨棒，讓蛋白質充分溶解於溶液中。

(二) 二維電泳 (2-dimension Electrophoresis) 之第一維 IEF (Iso-lectrofocusing) 電泳

首先將抽取之蛋白質沉澱物置於真空冷凍乾燥機 (Thermo, SPD111V) 中，以 -107°C 乾燥 1 小時，然後加入 400 μ L 之 rehydration buffer (8.5M urea、1% Triton X-100、2% DTT、1% Pharmalyte)，使用研磨棒將沉澱物充分研磨，使蛋白質能溶解於溶液中。接著將其裝填 (loading) 於乾膠條平衡槽 (Amersham, Immobiline DryStrip Reswellina Tray) 中，再將 13 cm、pH 3-10 NL (non-linear) 之 IPG (Immobilized pH gradient) 膠 (gel) 覆蓋其上。放置前小心將膠面護膜撕下，且膠面向下，並以 10 μ L 針頭去除氣泡，置於室溫下平衡過夜，平衡後之膠條以 Amersham 之 Multiphor II 裝置進行 IEF 電泳。首先，以去離子水濕潤濾紙條墊片，分別置放於正極與負極，再正確放置正負電極，進行 pH 3-10 NL IPG gel 之 IEF 電泳，電壓為 3500V，約 7 小時完成。當 IEF 電泳完成後，將膠條保存於 -20°C 冰箱中，待進行第二維電泳。

(三) 二維電泳之第二維 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 電泳⁽¹¹⁾

將 IPG gel 由 -20°C 冰箱中取出，浸於 SDS (sodium dodecyl sulfate) 平衡緩衝液 (25 mM Tris-HCl、36 % urea、30 % glycerol 與 1% SDS、1 % DTT) 中，平衡 1 小時。組合 Proteam II xi Cell 電泳裝置用的玻璃片，製作 40 mL 之 13.5% acryamide gel: 11.2 mL 去離子水、18 mL 之 30% monomer solution (29 % acryamide、1% Bis)、10 mL 之 4x running gel buffer (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8)、400 μ L 之 10 % SDS、400 μ L 之 10 % APS (ammonium persulfate)、16 μ L 之 TEMED (Tetramethylethylenediamine)，然後將其灌注於玻璃片中待其凝固，約需 1 小時。將平衡後的 IPG gel 置於 SDS-PAGE gel 上，以 0.5 % 之瓊脂糖 (agarose) 固定 IPG gel，以 50 mA 之條件進行第二維電泳，當追蹤染劑 (tracking dye) 離膠底 1 公分時停止電泳，一般需 5~6 小時。另外，於電泳過程中以冷循環器保持其電泳條件於 10°C。

(四)質譜分析及蛋白質的比對⁽²⁷⁾

完成電泳之膠片經固定後，加入 200 mL 之 SYPRO Ruby(一種螢光染料)進行染色 1.5 小時，然後加入退染液 (10 % methanol、7 % acetic acid)進行 30 分鐘之退染，染色膠片以 CCD 照相系統 (Perkin Elmer, MA)以激發光 (488 nm)及放射光 (610 nm)之波長擷取影像，影像則利用 Phoretix 2D Elite 軟體計算分子量。加入 200 μ L destaining solution (45 mL H₂O, 30 mL biotech grade acetonitrile) 置於 37 °C 下 30 分鐘，經離心後去除上清液，重複上述步驟一次，然後置入真空冷凍離心機 (Thermo, SPD111V)中以-107 °C 乾燥 45 分鐘，切下直徑約 1 mm 的膠條，蛋白質點加入 20 μ L 之 trypsin solution (以 100 μ L trypsin solubilization reagent 將 20 μ g proteomic grade trypsin 溶解，再加入 900 μ L trypsin reaction buffer ; trypsin reaction buffer : 10 mL H₂O、1 mL biotech grade acetonitrile)及 50 μ L trypsin reaction buffer 至含切離膠片之 2 mL eppendorf 試管中，置於 37°C 下反應過夜。第二天將溶液取出至另一 2 mL eppendorf 試管。為增加 peptide 樣品之含量，含切離膠片之 2 mL eppendorf 試管中再加入 50 μ L 之 peptide extraction solution (50 %之 acetonitrile 中含 0.1 %之 trifluoroacetic acid)置於 37°C 下 30 分鐘，之後將溶液取出加入前步驟之溶液中。最後將此溶液置於真空冷凍離心機(Thermo, SPD111V)中進行以-107 °C 乾燥 45 分鐘，再加入 6 μ L 之 peptide extraction solution (Walker, 2002)。以 ESI-MS-MS (MicroMass Q-TOF 2,UK)進行蛋白質身份鑑定，再將其分析後所得之資料以”MASCOT”蒐尋引擎(<http://www.matrixscience.com/>)進行 MS/MS Ions Search 比對。進行比對時所設之各參數如下：(1) database 設為 NCBIInr；(2)taxonomy 設為 plants；(3) enzyme 設為 trypsin；(4)allow to 1 missed cleavages；(5) MS/MS tolerance 設定為 0.3 Da；(6) peptide tolerance 設定為 0.3 Da。

結果與討論

一、不同鎘濃度處理後之油菜生長情形

以 10 μ mol L⁻¹ 及 30 μ mol L⁻¹ 鎘溶液處理後，油菜植株並無任何黃化或焦枯等現象，且無鎘毒害之目視徵狀，Nakamura *et al.* (2008)曾以相同株齡(6 週大)之油菜以 0, 10 μ mol L⁻¹ 及 30 μ mol L⁻¹ 處理 72 小時後，發現莖導管液中的鎘含量隨著水耕液中鎘濃度的增加而增加一倍以上，但植株並無任何鎘毒害徵狀產生⁽¹⁹⁾，本試驗的觀察亦有相同情形。在三種不同鎘濃度處理 72 小時後，截取油菜莖中段(1cm)進行蛋白質測定。

二、不同鎘濃度處理後之蛋白質電泳

油菜以不同鎘濃度處理後，SDS-PAGE 圖顯示根尖蛋白質主要分佈於 *pI* (等電點時之 pH 值) 4.5-6.5，在此範圍內有超過 100 個蛋白質點具定量上的差異(圖 1)。當中有 12 個最具顯著差異表現的蛋白質點，其中 6 個蛋白質隨著水耕液中鎘濃度的增加有表現量增加情形，顯示此 6 個蛋白質點應為鎘濃度高時所誘導出來的(圖 2)。另外，有 6 個蛋白質點，隨著水耕液中鎘濃度的提高，其表現量則是明顯降低的，特別是點 116 在低鎘濃度處理時具明顯表現，而高的鎘濃度處理時則明顯受到抑制(圖 3)。

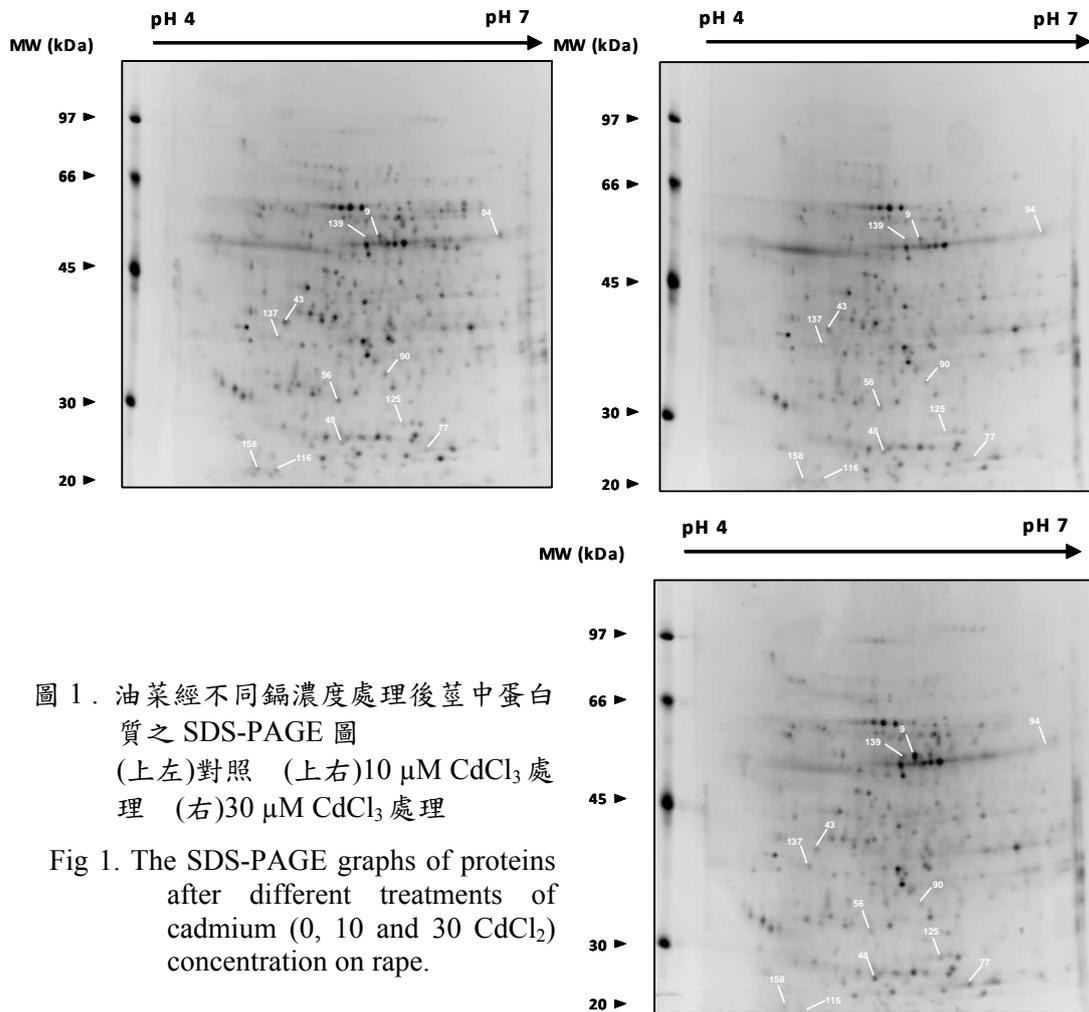


圖 1. 油菜經不同鎘濃度處理後莖中蛋白質之 SDS-PAGE 圖
 (上左)對照 (上右)10 μM CdCl₃ 處理 (右)30 μM CdCl₃ 處理

Fig 1. The SDS-PAGE graphs of proteins after different treatments of cadmium (0, 10 and 30 CdCl₂) concentration on rape.

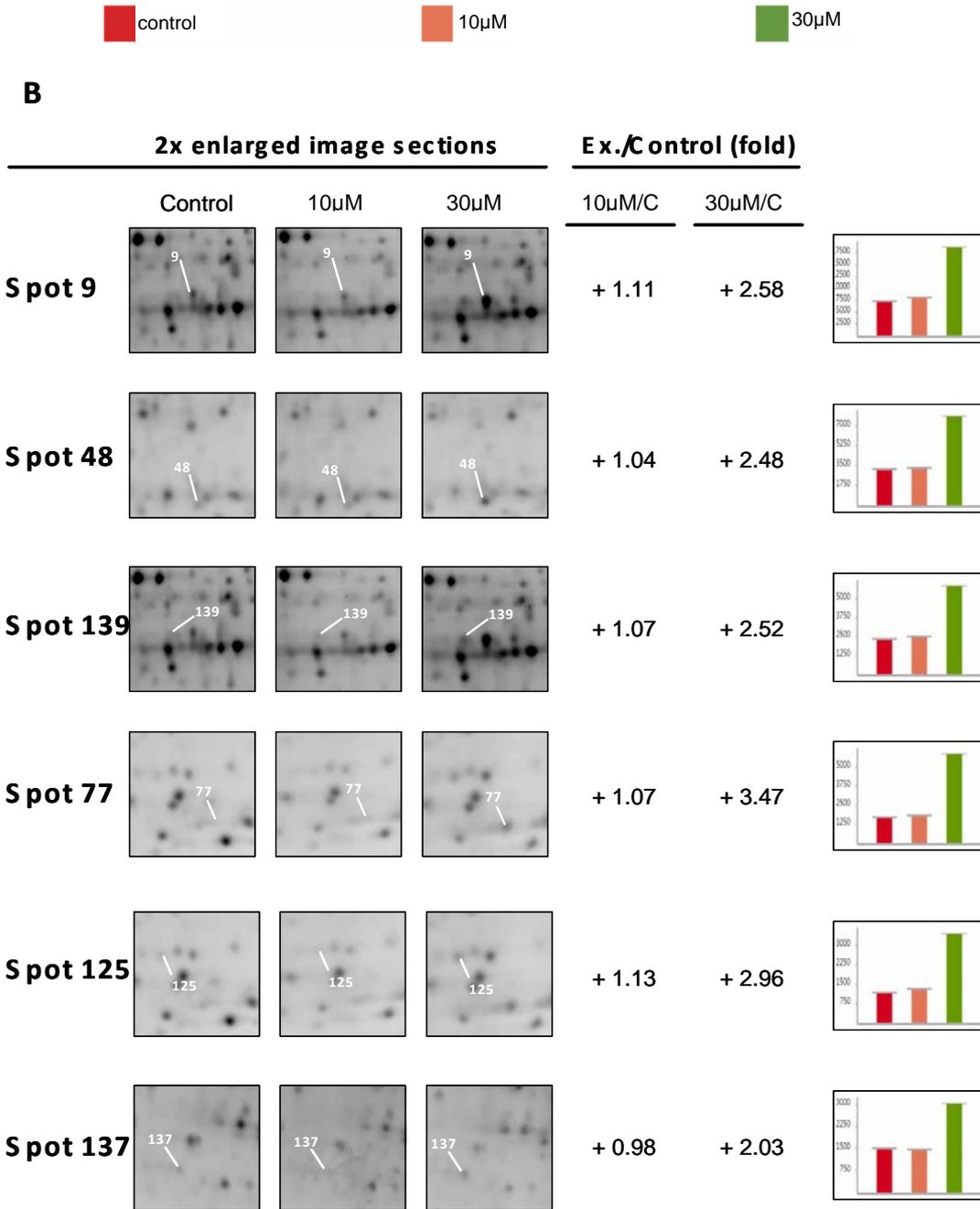


圖 2. 不同濃度鎘處理後之上調蛋白差異表現圖 (Ex.: CdCl₃ 處理)

Fig 2. The upregulation of proteins after different concentration of Cd treatments on rapes. (Ex.: The treatments of CdCl₃)

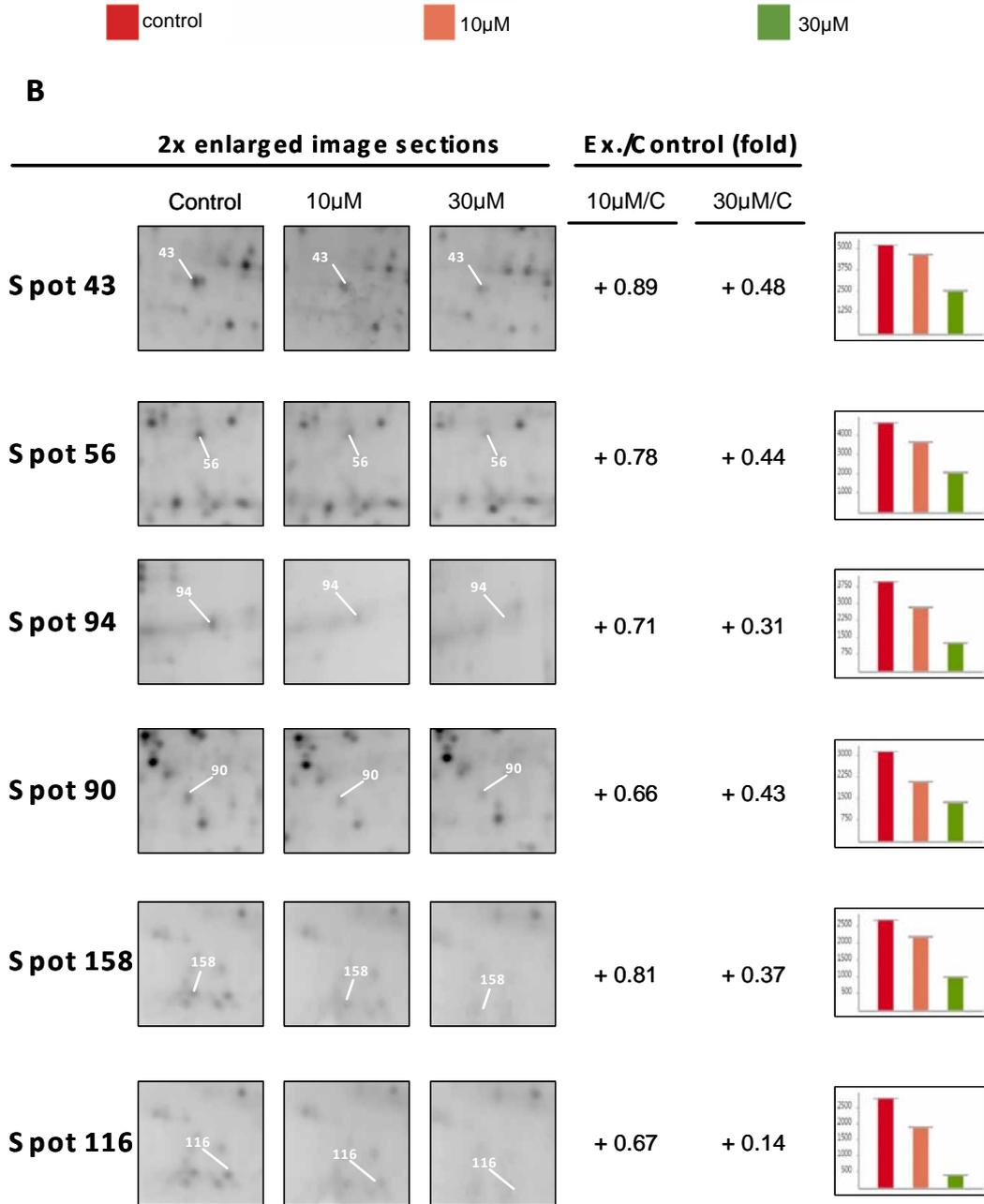


圖 3. 不同濃度鎘處理後之下調蛋白差異表現圖 (Ex.: CdCl₃ 處理)

Fig 3. The downregulation of proteins after different concentration of Cd treatments on rapes. (Ex.: The treatments of CdCl₃)

利用 MASCOT 搜尋引擎，於 NCBI nr database 中進行搜尋結果(表 1)顯示，12 個蛋白質當中，6 個屬於結構蛋白，4 個為假說蛋白，2 個則為未知蛋白；其功能有 2 個與細胞代謝過程中的醣解路徑有關，3 個則與呼吸作用中的三羧酸循環 (TCA cycle) 有關，此牽涉到有機酸及能量的產生，2 個與根的抗氧化能力，以及 1 個與根型態的維持有關，此應為油菜處於高鎘濃度中仍能正常生長，並進而將鎘自根傳輸至地上部的原因^(6, 7, 17, 26, 28)。

表 1. 不同鎘濃度處理後油菜莖中具差異表現之蛋白質的鑑定

Table 1. Identification of the stem proteins isolated from rape under different concentration of Cd treatments by liquid chromatography-mass spectrometry analysis.

No.	Accession	No. Protein Description	MOWSE score	Experimental Mr / pI	Theoretical Mr / pI	Highly expressed in
9	gi 17939849	mitochondrial F1 ATP synthase beta subunit [Arabidopsis thaliana]	243		63.56 / 6.52	30µM CdCl ₃
	gi 3893822	ATPase beta subunit [Nicotiana sylvestris]	184	52.05 /	59.60 / 5.73	
	gi 2116558	F1 ATPase [Pisum sativum]	110	5.66	60.28 / 6.63	
	gi 149384751	ATP synthase beta chain [Heterogonium pinnatum]	73		24.25 / 5.52	
	gi 13236786	ATP synthase beta subunit [Burretiokentia hapala]	72		53.75 / 5.21	
43	gi 15228194	SBPASE (sedoheptulose-bisphosphate); phosphoric ester hydrolase/ sedoheptulose-bisphosphatase [Arabidopsis thaliana]	83	38.95 / 4.91	42.79 / 6.17	control
48	gi 15224582	GSTF10 (HALIANA GLUTATHIONE S-TRANSFERASE PHI 10); copper ion binding / glutathione binding / glutathione transferase [Arabidopsis thaliana]	104	24.73 / 5.36	24.22 / 5.49	30µM CdCl ₃
56	gi 7488556	hypothetical protein - wild cabbage (fragment)	85		29.01 / 4.94	control
	gi 27362906	putative lactoylglutathione lyase-like protein [Capsella rubella]	82	30.28 / 5.33	5.90 / 5.04	
	gi 159463262	predicted protein [Chlamydomonas reinhardtii]	48		118.17 / 9.04	
77	gi 31790095	glutathione S-transferase 2 [Brassica juncea]	128	24.07 /	24.28 / 5.66	30µM CdCl ₃
	gi 1402898	gst6 [Arabidopsis thaliana]	89	6.03	23.75 / 6.08	
90	gi 5730139	ferredoxin-NADP+ reductase [Arabidopsis thaliana]	91	33.25 /	40.48 / 8.66	control
	gi 61969078	putative ferredoxin-NADP reductase [Solanum peruvianum]	43	5.70	35.44 / 7.71	
94	gi 205830697	RecName: Full=Unknown protein 18	63		1.39 / 5.80	control
	gi 6911142	putative glycine-rich RNA binding protein 1 [Catharanthus roseus]	52	52.45 /	14.27 / 8.71	
	gi 6911144	putative glycine-rich RNA binding protein 3 [Catharanthus roseus]	46	6.59	16.76 / 7.82	
	gi 166700	Fe-superoxide dismutase [Arabidopsis thaliana]	44		25.41 / 6.30	
116	gi 1498198	2-Cys peroxiredoxin basI [Arabidopsis thaliana]	54	21.31 / 4.85	28.97 / 8.76	control
125	gi 147773763	hypothetical protein [Vitis vinifera]	50	27.20 / 5.84	41.03 / 9.55	30µM CdCl ₃
137	gi 158512869	RecName: Full=Fructokinase-1; AltName: Full=Fructokinase I; AltName: Full=OsFKI	133		34.88 / 5.14	30µM CdCl ₃
	gi 118481612	unknown [Populus trichocarpa]	120	37.20 / 4.87	35.54 / 4.94	
	gi 15221364	pfkB-type carbohydrate kinase family protein [Arabidopsis thaliana]	96		37.95 / 5.51	
139	gi 17939849	mitochondrial F1 ATP synthase beta subunit [Arabidopsis thaliana]	219	51.78 /	63.56 / 6.52	30µM CdCl ₃
	gi 2116558	F1 ATPase [Pisum sativum]	52	5.56	60.28 / 6.63	
158	gi 11119229	2-Cys peroxiredoxin [Brassica napus]	128	21.45 /	29.71 / 5.81	control
	gi 1498198	2-Cys peroxiredoxin basI [Arabidopsis thaliana]	77	4.71	28.97 / 8.76	
	gi 1076722	hypothetical protein - barley (fragment)	47		27.42 / 5.87	

三、醣解作用的增進

隨著水耕液中鎘濃度的增加，油菜莖內的 phosphoric ester hydrolase 逐漸向下調節 (downregulation)，此現象使得澱粉水解的機會大增，於分解成蔗糖後，Fructokinase-1 進一步負責將蔗糖水解成葡萄糖與果糖。推測在細胞呼吸過程中，這些醣類方能夠提供能量將鎘自根傳輸至莖，Chen and Lin (2010) 在探討鳳梨根尖耐鋁機制⁽⁶⁾，以及 Chen 等人(2009) 在探討番茄耐鹽蛋白時⁽⁷⁾，均發現某些與澱粉水解有關的蛋白隨著這些逆境而提昇，例如 fructose-bisphosphate aldolase 及 aldolase C-1 等；另一方面，Chen 及 Lin (2010) 也同時發現 cytosolic phosphoglycerate kinase 1 及 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) 這兩個蛋白的向上調節 (upregulation) 促使 Glyceraldehyde-3-phosphate (G-3-P) 加速轉化為丙酮酸 (pyruvate)，丙酮酸被轉化為乙醯輔酶 A (Acetyl CoA)，乙醯輔酶 A 便可進入三羧酸循環，至於 Li 等人(2009)在番茄的缺鐵逆境研究中也發現某些蛋白扮演此方面功能⁽¹⁶⁾，然而本試驗並無發現類似功能的蛋白，雖然如此，並不影響下一階段之三羧酸循環。

四、三羧酸循環的增進 (TCA cycle)

Mitochondrial F1 ATP synthase beta subunit 隨著水耕液中鎘濃度的提高而向上調節，ATP/citrate lyase, ferredoxin-NADP⁺ reductase 及 sedoheptulose-bisphosphatase 則向下調節，事實上這對於三羧酸循環的促進是有利的，於阿拉伯芥及甘蔗的研究中亦有類似情形發生^(17, 26)。Bansal 等人 (2002)認為，一旦三羧酸循環過程被促進，nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)及 flavin adenine dinucleotide (FADH₂) 便會大量產生⁽²⁾；NADH 及 FADH₂ 主要在於驅動氧化磷酸化反應，此反應可將還原態的 NADH 及 FADH₂ 氧化，並將高能磷酸鍵轉移至 adenosine diphosphate (ADP) 以形成 adenosine triphosphate (ATP)，因此有較多能量的儲存及供應以抵禦逆境，本研究中，因 ATP/citrate lyase 及 ferredoxin-NADP⁺ reductase 的降低，應可使 ATP 及 NADPH 大量累積，亦促使 ADP 轉換為 ATP 之過程被促進，進一步使有機酸，如琥珀酸、蘋果酸及檸檬酸等之形成也因此被促進，而這些有機酸正好可利用螯合作用將鎘自根帶動至莖。Canny 及 McCully (1988)認為玉米經鎘的刺激後於莖內可偵測到大量的有機酸⁽³⁾，而 Nakamura 等人(2008)則認為，油菜經鎘刺激後之所以莖內的有機酸無法大幅度提昇，乃因其體內已有足夠的有機酸來運送鎘⁽¹⁹⁾。

五、根型態的維護

倘使植物受到鎘的毒害，典型的症狀是根生長受到抑制，並進一步影響地上部的成長，本試驗發現，經過不同鎘濃度處理之油菜均無任何毒害症狀發生，顯示並無受到鎘的毒害。隨著鎘處理濃度的增加，油菜莖內 glutathione reductase, superoxide dismutase 及 2-Cys peroxiredoxin 的濃度隨之增加，此三種蛋白質的形成推測除了與細胞壁多醣類合成及作物根的彈性有關外^(1, 10)，最重要的是能使作物處於逆境時，根免於受到氧化，因此可維護根的細胞結構⁽²⁸⁾。另外，它同時與根伸長之促進有關⁽¹³⁾，因此應可解釋上述三種蛋白質的上調在油菜處於鎘濃度高的環境時，其根的生長不受影響的原因。

六、未知功能的蛋白質

除了上述 8 種被鑑定的蛋白質外，尚有 4 個蛋白之種類及特性尚未被確認，因此其於鎘的復育中所扮演角色有待進一步探究。

結論

隨著水耕液中鎘濃度的提高，油菜除了產生一些蛋白質來負責抗氧化及根型態的維護之外，且經由醱解作用及三羧酸循環的增進產生較多的能量(ATP)及有機酸來傳輸鎘以及免除鎘對植物的毒害。本研究顯示，大部分蛋白質的改變與有機酸及能量的產生有密切關聯；另外，對於根尖氧化傷害的降低以及根型態的維持也扮演著重要的角色，此可做為改進鎘污染農地植生復育進一步研究之參考。

參考文獻

1. Ardila, F. J. and J. S. Tandecarz. 1992. Potato tuber UDP-glucose: Protein transglucosylase catalyzes its own glucosylation. *Plant Physiol.* 99: 1342-1347.
2. Bansal, P., P. Sharma, and V. Goyal. 2002. Impact of lead and cadmium on enzyme of citric acid cycle in germinating pea seeds. *Bio. Plant.* 45: 125-127.
3. Canny, M. J. and M. E. McCully. 1988. The xylem sap of maize roots: its collection, composition and formation. *Aust. J. Plant Physiol.* 15: 557-566.
4. Cataldo, D. A., T. R. Garland and R. E. Wildung. 1983. Cadmium uptake kinetics in intact soybean plants. *Plant Physiol.* 73: 844-848.
5. Chaney, R. L. M. Malik, Y. M. Li. 1997. Phytoremediation of soil metals. *Curr. Opin. Biotech.* 8: 279-284.

6. Chen, J. H. and Y. H. Lin. 2010. Effect of aluminum on variations in the proteins in pineapple roots. *Soil Sci. Plant Nutr.* 56: 438-444.
7. Chen, S., N, Gollop and B, Heuer. 2009. Proteomic analysis of salt-stressed tomato (*Solanum lycopersicum*) seedlings: effect of genotype and exogenous application of glycinebetaine. *J. Exp. Bot.* 60: 2005–2019.
8. Delhaize, E., P.R. Ryan, and P. J. Randall. 1993. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) II Aluminum stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiol.* 103: 695–702.
9. Florijin, P. J. M. L. Van Beusichem. 1993. Uptake and distribution of cadmium in maize inbred lines. *Plant Soil.* 150: 25–32.
10. Galen, C., J. J. Rabenold, and E. Liscum. 2007. Functional ecology of a blue light photoreceptor: effects of phototropin-1 on root growth enhance drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 173: 91–99.
11. Gorg, A., W. Postel, and S. Gunther. 1988. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis.* 9: 531-546.
12. Hernandez LE, Carpena-Ruiz R, Garate A 1996: Alterations in the mineral nutrition of pea seedlings exposed to cadmium. *J. Plant Nutri.*, 19, 1581–1598.
13. Horemans, N., C. H. Foyer, and H. Asard. 2000. Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. *Trends Plant Sci.*, 5: 263–267.
14. Konish, S., S. Miyamoto, T. Taki. 1985. Stimulatory effect of aluminum on tea plants grown under low and high phosphorus supply. *Soil Sci. Plant Nutr.* 31: 361–368.
15. Larsson, E. H. J. F. Bornman and H. Asp. 1998. Influence of UV-B radiation and Cd²⁺ on chlorophyll fluorescence, growth and nutrient content in *Brassica napus*. *J. Exp. Bot.* 49: 1031–1039.
16. Li, J., X. D. Wu, S. T. Hao, X. J. Wang and H. Q. Ling. 2008. Proteomic response to iron deficiency in tomato root. *Proteomics.* 8: 2299–2311.
17. Lopez-Millan, A. F., F. Morales, A. Abadia, and J. Abadia. 2000. Effects of iron deficiency on the composition of the leaf apoplastic fluid and xylem sap in sugar beet. Implications for iron and carbon transport. *Plant Physiol.* 124: 873–884.
18. McLaughlin, M. J., D. R. Parker and J. M. Clarke. 1999. Metals and micronutrients – food safety issues. *Field Crops Res.* 60: 143–163.

19. Nakamura, S., C. Akiyama, T. Sasaki, H. Hattori and M. Chino. 2008. Effect of cadmium on the chemical composition of xylem exudate from oilseed rape plants (*Brassica napus* L.). *Soil Sci. Plant Nutr.* 54:118-127.
20. Obata, H., M. Umebayashi. 1997. Effects of cadmium on mineral nutrient concentration in plants differing in tolerance for cadmium. *J. Plant Nutr.* 20: 97-105.
21. Palmer, C., S. Warwick and W. Keller. 2001. Brassicaceae (Cruciferae) family, plant biotechnology and phytoremediation. *Int. J. Phytoremediation*, 3: 245-287.
22. Raskin, I., R. D. Smith, D. E. Salt. 1994. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 221-226.
23. Salt, D. E. R. C. Prince, I. J. Pickering and I. Raskin. 1995. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiol.* 109: 1427-1433.
24. Shah, K. and R. S. Dubey. 1995. Effect of cadmium on RNA level as well as activity and molecular forms of ribonuclease in growing rice seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* 33: 577-584.
25. Tanaka, K., S. Fujimaki, T. Fujiwara, T. Yoneyama and H. Hayashi. 2007. Quantitative estimation of the contribution of the phloem in cadmium transport to grains in rice plants (*Oryza sativa* L.). *Soil Sci. Plant Nutr.* 53: 72-77.
26. Thimm, O., B. Essigmann, S. Kloska, and T. Altmann. 2001. Response of *Arabidopsis* to iron deficiency stress as revealed by microarray analysis. *Plant Physiol.* 127: 1030-1043.
27. Walker, J. M. 2002. *The Protein Protocols Handbook*, Humana Press, Totowa
- Wallace, S. W. and I. C. Anderson. 1984. Aluminum toxicity and DNA synthesis in wheat roots. *Agron.* 76: 5-8.
28. Zhou, S., P. Sauve and T. W. Thannhauser. 2009. Proteome changes induced by aluminium stress in tomato roots. *J. Exp. Bot.* 60: 1849-1857.