

## الگوی بیان پروتئین های برگ برنج در شرایط کمبود فسفر

سپیده ترابی<sup>۱</sup> و سید قاسم حسینی سالکده<sup>۲\*</sup>

۱، استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج، ۲، استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۱۹ - تاریخ تصویب: ۹۱/۵/۳)

### چکیده

فسفر یکی از پیش ماده‌های ضروری گیاه در سوخت و ساز انرژی، سنتز نوکلئوتیک اسیدها و غشاء می‌باشد. به منظور شناسایی مکانیزم‌های مولکولی درگیر در سازگاری برنج به کمبود فسفر از راهکار پروتئومیکس برای مقایسه ژنوتیپ حساس Nipponbare و لاین ایزوژنیک مقاوم به کمبود فسفر، NIL6-4 استفاده شد. این آزمایش با استفاده از طرح کاملاً تصادفی با دو تیمار ۱ و ۱۰۰ میلی مولار پتاسیم دی هیدروژن فسفات در سه تکرار انجام گردید. پروتئین‌ها برگ پرچم استخراج شده و بوسیله الکتروفورز دو بعدی آنالیز گردیدند. در حدود ۸۷۵ نقطه پروتئینی به طور تکرارپذیر بر روی ژل‌های 2-DE شناسایی شدند که از این تعداد ۶۵ نقطه به طور معنی‌داری به شرایط کمبود فسفر در مقایسه با شرایط نرمال پاسخ دادند. آنالیز طیف سنجی جرمی پروتئین‌های پاسخ دهنده منتج به شناسایی ۴۳ پروتئین گردید که این پروتئین‌ها در مکانیزم‌های دخیل در سازگاری به کمبود فسفر شامل فتوسنتز، مکانیزم‌های دفاعی، متابولیسم ثانویه، چرخه TCA، رونویسی، سنتز پروتئین، متابولیسم فسفر شرکت دارند. این پروتئین‌ها ممکن است در شناسایی تغییر غلظت فسفر خارجی و سازگاری با کمبود فسفر نقش مهمی داشته باشند.

### واژه‌های کلیدی: بررسی پروتئوم، کمبود فسفر، برنج

#### مقدمه

مشکل کمبود فسفر در دنیا وجود دارد. اول اینکه فسفر قابل دسترس زیستی بسیار محدود می‌باشد و اکثر فسفر موجود در خاک بصورت آلی می‌باشد و از باقیمانده‌های گیاهان و حیوانات مشتق می‌گردد (Vance et al., 2003, Hammond et al., 2004). دوم اینکه pH بهینه برای جذب فسفر در گیاه ۵-۴/۵ می‌باشد در حالیکه اکثر خاکها اسیدی و یا قلیایی می‌باشند و به این علت فسفر به یونهای  $Al^{+3}$  و  $Fe^{+2}$  در خاکهای اسیدی و به یون  $Ca^{+2}$  در خاکهای قلیایی متصل می‌گردد و به این علت به صورت غیر قابل دسترس برای گیاه می‌شود. و دلیل سوم این است که

فسفر یکی از ۱۷ عنصر ضروری برای رشد گیاه می‌باشد. این عنصر ۰/۵٪ تا ۰/۵ درصد وزن خشک گیاه را شامل می‌شود. فسفر اهمیت زیادی در پروسه‌هایی مانند تولید انرژی، سنتز نوکلئوتیک اسیدها، فتوسنتز، گلایکولیز، تنفس، سنتز و پایداری غشاء، فعال‌سازی و غیرفعال‌سازی آنزیم‌ها، فعالیت‌های Redox، انتقال پیام، متابولیسم کربوهیدرات‌ها و تثبیت نیتروژن دارد (Raghothama et al., 2005. Vance et al., 2003). علیرغم اینکه مقدار محتوای فسفر در خاک ppm ۲۰۰۰-۵۰۰ می‌باشد لیکن دلایل زیادی مبنی بر

برای اندازه گیری فاکتورهای فیزیولوژیک و آزمایش‌های مربوط به پروتئومیکس صورت گرفت. نمونه‌های مربوط به آزمایشگاه به سرعت بعد از برداشت در نیتروژن مایع منجمد شده و به فریزر ۸۰- منتقل شدند و کلیه اندازه گیری‌های مربوط به فاکتورهای فیزیولوژی از جمله تعداد پنجه، طول اندام هوایی و وزن تر اندام هوایی بالا فاصله بعد از نمونه‌گیری محاسبه گردید و سپس این نمونه‌ها برای اندازه گیری وزن خشک اندام هوایی و اندازه گیری فسفر برگ پرچم برای مدت ۴۸ ساعت به آون ۷۰ درجه سانتی گراد منتقل گردیدند. اندازه گیری فسفر کل نیز به روش بری و همکارانش (Bary et al., 1945) انجام گردید.

استخراج پروتئین از بافت برگ پرچم بر اساس روش دامروال و همکاران (Damerval et al., 1986) با اندکی تغییر انجام شد. برای جداسازی پروتئین‌ها از الکتروفورز دو بعدی استفاده شد. در بعد اول از ژل‌های IPG با PH 4-7 استفاده شد. این ژل به مدت ۱۴ ساعت با بافر آبدی در سینی‌های مخصوص آبدی شدند. سپس ژل‌ها برای انجام بعد اول الکتروفورز به دستگاه IEF منتقل شدند. در مرحله بعد دوم ژل‌های IPG به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰ میلی لیتر بافر متعادل کننده قرار گرفتند. جداسازی پروتئین‌ها بر اساس وزن مولکولی در بعد دوم بوسیله SDS-PAGE و در صفحات عمودی ژل اکریلامید صورت گرفت و آنالیز نقاط با استفاده از نرم افزار 4 Melani انجام گرفت و بعد از تجزیه آماری، نقاطی که در سطح پنج درصد معنی‌دار بودند و Induction Factor (IF) آن‌ها از ۱/۵ بالاتر بود برای آنالیز اسپکترومتری جرمی با دستگاه طیف سنج جرمی انتخاب شدند. شناسایی نقاط با دستگاه MALDI-TOF/TOF-MS انجام گرفت.

## نتایج و بحث

### آنالیز داده‌های فیزیولوژی

کمبود فسفر سبب تغییر در تعداد زیادی از صفات فیزیولوژیکی، از جمله وزن تر اندام هوایی، ارتفاع بوته و وزن خشک اندام هوایی گیاه (شکل ۱) شده است. نتایج نشان داد که در شرایط کمبود فسفر وزن تر اندام هوایی، وزن خشک اندام هوایی و ارتفاع بوته در مقایسه با

غلظت فسفر در سلول‌های گیاهی ۲۰۰۰ برابر محلول خاک می باشد بنابراین گیاه برای جذب فسفر نیاز به انتقال فعال دارد (Vance et al., 2003).

گیاهان مکانیزم‌های زیادی برای سازگاری به فسفر کم قابل دسترس در خود توسعه داده‌اند که شامل راندمان جذب فسفر و راندمان استفاده فسفر درونی 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. تکنیک پروتئومیکس نشان داده است که یک روش قدرتمندی در نشان دادن مکانیزم‌های مولکولی دخیل در سازگاری گیاه به استرس و کمبود مواد غذایی می‌باشد (Salekdeh et al., 2007). پروتئومیکس می‌تواند با مقایسه یک ژنوتیپ حساس و مقاوم به تنش، ژن‌هایی که عامل مقاومت در رقم مقاوم می‌باشد را شناسایی نماید. ولی مشکلی که وجود دارد این است که گاهی این ژن‌ها که به عنوان ژن‌های مقاوم شناسایی می‌شوند ناشی از اثر متقابلی است که آن ژن با زمینه ژنتیکی آن رقم دارد. بنابراین برای حل این مشکل استفاده از لاین‌های ایزوژنیک<sup>۱</sup> توصیه شده است.

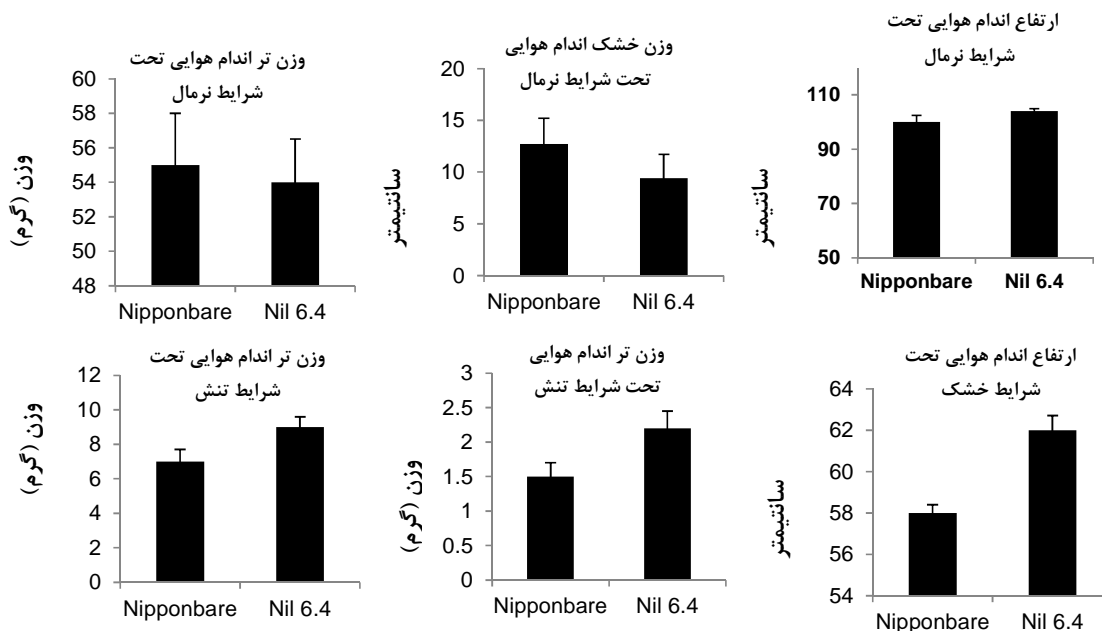
براین اساس در این تحقیق هدف شناسایی ژن‌های کاندید متحمل به کمبود فسفر در برگ برنج در ژنوتیپ حساس Nipponbare و لاین مقاوم ایزوژنیک آن با استفاده از راهکار پروتئومیکس می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

مواد گیاهی شامل یک ژنوتیپ حساس با نام Nipponbare و یک ایزوژنیک لاین (NIL 6-4) که بوسیله انتقال QTL اصلی PUP1 از ژنوتیپ Kasalath، مقاوم به کمبود فسفر گردیده است، می‌باشد. آزمایش در قالب فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با دو سطح فسفر نرمال (۱۰۰mM) و تنش (۱mM) و دو ژنوتیپ و سه تکرار در گلخانه پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی و بر اساس روش کشت یوشیدا و همکاران (Yoshida et al., 1976) اجرا گردید و نمونه‌گیری در سه مرحله ۵۰، ۸۰ و ۴۰ روزگی از بافت برگ پرچم به طور جداگانه

1. Near Isogenic Line (NIL)

شرایط نرمال کاهش معنی داری پیدا کرده است که این کاهش در Nipponbare بیشتر از NIL6-4 بوده است.

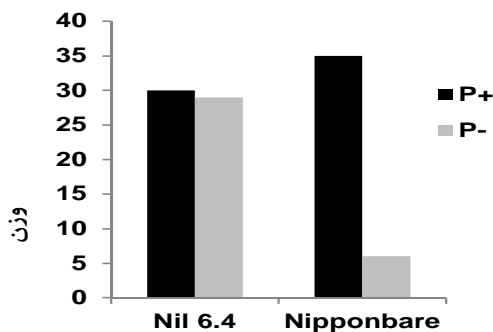


شکل ۱- اثر کمبود فسفر بر صفات فیزیولوژیکی در مرحله ۸۰ روزگی در دو ژنوتیپ حساس (Nipponbare) و متحمل (Nil6.4) برنج

شرایط کمبود فسفر نسبت به نرمال نشان داد (شکل ۲). که این مسئله نشان می دهد رقم مقاوم در کمبود فسفر مکانیزم هایی را اعمال می کند که محتوای فسفر اندام هوایی خود را ثابت نگه دارد.

**محتوای فسفر برگ پرچم**

نتایج نشان می دهد که محتوای فسفر کل اندام هوایی رقم NIL6-4 در ۸۰ روزگی و در شرایط نرمال و تنش اختلاف معنی دار پیدا نکرده است ولی در رقم Nipponbare کاهش معنی داری در محتوای فسفر در



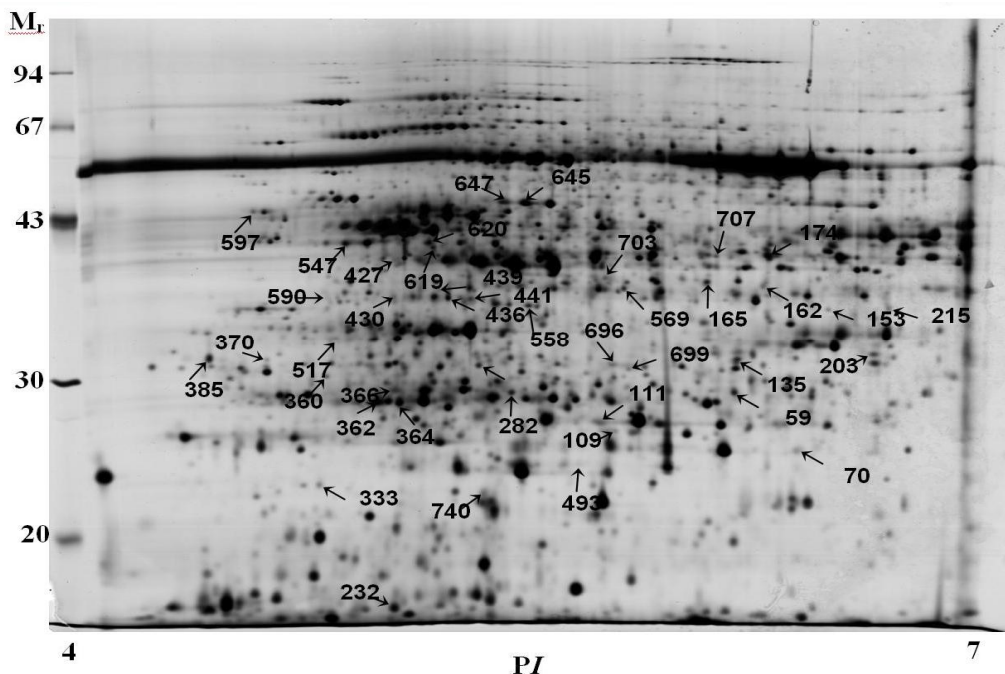
شکل ۲- مقایسه محتوای فسفر اندام هوایی در برگ پرچم در شرایط نرمال (P+) و تنش (P-) در دو رقم حساس (Nipponbare) و متحمل (Nil6.4) به کمبود فسفر

شد و آزمون معنی داری نقاط با استفاده از نرم افزار 2.9 SASS انجام گردید. در حدود ۸۷۵ نقطه پروتئینی تکرارپذیر بر روی ژل های 2-DE تعیین شدند (شکل

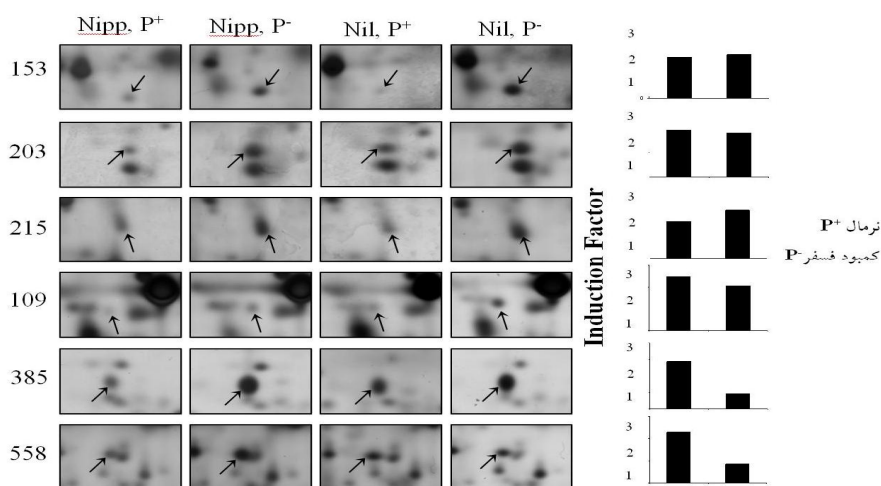
**جداسازی پروتئین بوسیله الکتروفورز دو بعدی**

آنالیز درصد حجمی نقاط پروتئینی ژل های دو بعدی اسکن شده بوسیله نرم افزار Melanie 4 تخمین زده

۳. از این تعداد ۶۵ نقطه به طور معنی داری به شرایط کمبود فسفر در مقایسه با شرایط نرمال پاسخ دادند. تجزیه و تحلیل طیف سنجی جرمی پروتئین منجر به شناسایی ۴۳ پروتئین گردید (جدول ۱).



شکل ۳- ژل 2-D رنگ آمیزی شده با نیترات نقره پروتئین استخراج شده از برگ Nipponabre در بعد اول ۱۵۰ میکرو گرم از پروتئین بر روی نوار ۱۸ IPG سانتی متری با شیب خطی pH 4-7 ریخته شد. در بعد دوم از زل ۱۲ درصد SDS-PAGE استفاده گردید. فلش ها پروتئین های شناسایی شده با MS را نشان می دهد.

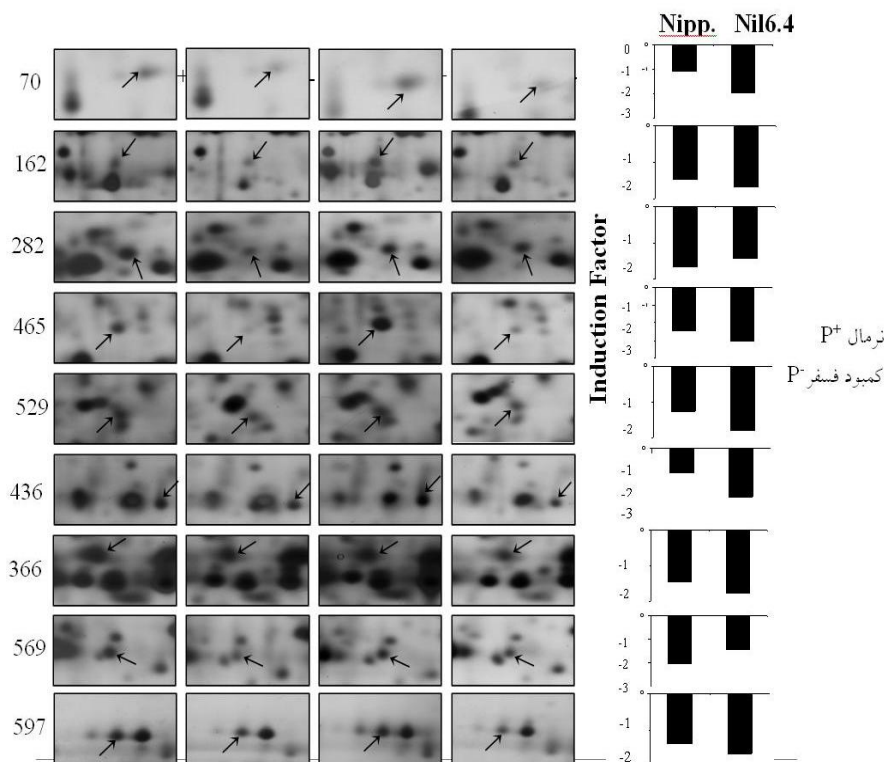


شکل ۴- تعدادی از نقاطی که بیان آنها تحت شرایط کمبود فسفر در ژنوتیپ های حساس و مقاوم برنج افزایش بیان یافته است

که از این تعداد ۶ پروتئینی که بیانش افزایش یافته مانند روبیسکو (نقاط ۲۰۳،

Putative fruit protein، ترانسپوزون پروتئین<sup>۹</sup>، putative، Mutator sub-class، پروتئین متصل شده به اسید نوکلئید<sup>۱۰</sup>، پروتئین فرضی<sup>۱۱</sup>، فروکتوز بیس فسفات آلدولاز<sup>۱۲</sup>، زیر واحد بتا سنتز ATP<sup>۱۳</sup>، اسید فسفاتاز<sup>۱۴</sup>، پروتئین ریبوزومی ۳۰S<sup>۱۵</sup>، translational elongation factor Tu، پروتئین ناشناخته، پروتئین PrMC3، PPR، پروتئین باند شده به GTP (شکل ۵).

۲۱۵، ۱۵۳، ۱۰۹)، پروتئین ریبوزومی کلروپلاست<sup>۲</sup> (نقطه ۶۱۹) و یک پروتئین ناشناخته (نقطه ۴۹۳) می باشند (شکل ۴). بعلاوه ۲۱ پروتئین با بیان کاهش یافته<sup>۳</sup> شناسایی گردید مانند گلوکاتئینون اس-ترانسفراز<sup>۴</sup>، روبیسکو<sup>۵</sup>، فریتین<sup>۶</sup>، drought-induced S-like، ribonuclease، پروتئین ریبوزومی اختصاصی پلاستید<sup>۷</sup>، پروتئین پیچیده مقاومت<sup>۸</sup>،



شکل ۵ - - تعدادی از پروتئین هایی که بیان آنها تحت شرایط کمبود فسفر در دو رقم حساس و مقاوم برنج کاهش یافته است.

1. Rubisco LS
2. Putative chloroplast ribosomal protein L1
3. Down-regulate
4. Glutathion S-transferase
5. Rubisco LS
6. Ferritin
7. Putative plastid-specific ribosomal protein 2
8. Putative resistance complex protein
9. transposon protein
10. Putative nucleic acid-binding protein
11. Hypothetical protein
12. Fructose-bisphosphate aldolase
13. ATP synthase subunit beta
14. Putative acid phosphatase
15. 30S ribosomal protein S1

جدول ۱- پروتئین‌های شناسایی شده با اسپکترومتری جرمی

ID نقاط (الف)	IF <sup>b</sup>		اسم پروتئین	شماره وارد شده (ج)	امتیاز%/درصد پوشاندگی (د)	P/MW تئوری <sup>و</sup>	P/Mw آزمایشی <sup>ز</sup>
	Nipp.	6.4					
پروتئین‌هایی که در هر دو رقم تنها به کمبود فسفر پاسخ داده اند (T <sup>+</sup> )							
۱۰۹	۲/۴۷	۲/۰۴	Rubisco LS	Q0JIM0	۸۲.۵۵%	۸/۲۴.۲۲	۵/۷۴.۱۹
۱۵۳	۱/۸۶	۱/۹۷	Rubisco LS	P0C512	۱۴۴.۴۰%	۶/۲۲.۵۳	۶/۴۲.۳۵
۱۶۲	-/۶۸	-/۵۹	glutathione S-transferase GSTF14	Q6QN20	۸۸.۴۴%	۷/۷۷.۳۱	۶/۲۲.۳۷
۲۰۳	۲/۰۹	۱/۹۸	Rubisco LS	Q6QN20	۱۳۴.۳۳%	۷/۷۷.۳۱	۶/۵۶.۳۲
۲۱۵	۱/۷	۲/۲۳	Rubisco LS	Q6QN20	۱۳۴.۳۳%	۷/۷۷.۳۱	۶/۶۱.۳۵
۲۳۲	-/۴۱	-/۸۳	Rubisco LS	P0C512	۱۳۸.۳۱%	۶/۱۳.۵۳	۵/۰۳.۱۴
۲۵۲	-/۵۹	-/۷	Ferritin	Q8LK80	۱۷۵.۵۶%	۵/۴۷.۲۷	۵/۴۱.۲۷
۳۳۳	۱/۷۴	۱/۲۱	unknown protein	Q6YSF1	۶۲.۶۴%	۴/۲۱.۱۳	۴/۷۹.۱۶
۳۶۲	-/۴۱	-/۴	drought-induced S-like ribonuclease	Q8RYA7	۹۹.۵۱%	۵/۲۵.۲۸	۴/۹۸.۲۴
۳۶۴	-/۷۳	-/۶۶	Putative plastid-specific ribosomal protein 2	Q6H443	۱۱۶.۶۲%	۸/۵۳.۲۶	۵/۰۴.۲۴
۳۶۶	-/۶۸	-/۵	putative resistance complex protein I2C-2	Q7F1B2	۵۸.۲۱%	۶/۴۱.۱۴	۵/۰۳.۲۷
۳۷۰	-/۸۴	-/۵۷	Putative fruit protein	Q6Z6B5	۸۵.۴۳%	۵/۴۴.۲۰	۴/۶۳.۳۱
۴۲۷	-/۳۱	-/۲۷	transposon protein, putative, Mutator sub-class	Q2R005	۷۰.۱۶%	۶/۸۳.۱۸	۵/۰۳.۳۹
۴۳۰	-/۶۵	-/۵۸	Putative nucleic acid-binding protein	Q650W6	۶۶.۲۷%	۴/۴۱.۲۵	۵/۰۳.۳۶
۴۳۹	-/۶۷	-/۵۵	Hypothetical protein	Q8S6L0	۶۳.۹۸%	۱۰/۹.۸۰	۵/۱۷.۳۷
۴۶۵	-/۴۱	-/۳۲	Fructose-bisphosphate aldolase	Q2RA00	۱۰۴.۳۷%	۶/۰۷.۴۱	۵/۳.۳۱
۴۹۳	۲/۱	۲/۴۴	Putative uncharacterized protein	Q6Z5I6	۶۹.۸۸%	۱۱/۵۲.۱۳	۵/۶۲.۱۷
۵۲۹	-/۷۹	-/۵۵	ATP synthase subunit beta	Q2QW50	۹۵.۳۷%	۵/۵۶.۴۴	۵/۰۶.۳۱
۵۶۹	-/۴۹	-/۷	Putative acid phosphatase	Q9LG77	۱۱۲.۳۶%	۶/۳۳.۳۳	۵/۷۷.۳۷
۵۹۷	-/۷۳	-/۶۱	30S ribosomal protein S1	Q10MB3	۷۳.۳۰%	۴/۶۶.۴۱	۴/۵۸.۴۴
۶۱۹	۱/۶۲	۱/۷۷	Putative chloroplast ribosomal protein L1	Q60E59	۶۶.۳۲%	۶/۸۶.۳۸	۵/۱۶.۴۰
۶۴۷	-/۵۲	-/۵۳	translational elongation factor Tu	Q8W2C3	۸۳.۲۹%	۶/۱۹.۵۰	۵/۳۸.۴۶
۷۰۳	-/۵۶	-/۴۷	Putative uncharacterized protein	Q0J0K2	۵۹.۲۶%	۹/۳۲.۱۸	۵/۷.۳۸
۷۴۰	-/۵۵	-/۷۳	Hypothetical protein	Q0JBZ3	۶۷.۲۹%	۶/۰۳.۹۲	۵/۳۲.۱۶
پروتئین‌هایی که در دو رقم متفاوت بودند (G <sup>+</sup> )							
۱۷۴	-/۸۶	-/۶۸	Putative uncharacterized protein	Q7X8A1	۷۹.۲۹%	۷/۶۲.۴۳	۶/۳۳.۳۹
۳۶۰	S	-/۷۵	PPR protein	Q769C9	۶۷.۲۰%	۶/۱۸.۸۹	۴/۸۲.۳۰
پروتئین‌هایی که اثر متقابل آنها معنی دار گردید (GT <sup>+</sup> )							
۱۶۵	-/۶۶	-/۸۶	putative PrMC3	Q69Y17	۷۷.۴۶%	۵/۶۱.۳۴	۶/۲۲.۳۷
پروتئین‌هایی که هم در ژنوتیپ هم به کمبود فسفر و هم در اثر متقابل معنی دار گردید (G/T/GT <sup>+</sup> )							
۷۰	-/۹۲	-/۵۱	Putative GTP-binding protein	Q84TX8	۶۸.۲۶%	۱۰/۱۲.۶۳	۴/۶۳.۳۱
۷۰۷	-/۵۳	-/۹۳	aldo/keto reductase family-like protein	Q8GSK5	۵۷/۳۲%	۸/۵۱.۴۰	۶/۰۶.۴۰
پروتئین‌هایی که به کمبود فسفر و اثر متقابل پاسخ داده اند (T/TG <sup>+</sup> )							
۱۱۱	-/۷۴	-/۳۴	Leucine Rich Repeat family protein, expressed	Q2R1N9	۶۸.۲۱%	۵/۸۷.۱۴	۵/۶۸.۲۰
۴۳۶	-/۹۶	-/۴۸	putative thiamine biosynthesis protein	Q8GVQ3	۱۰۷.۴۹%	۵/۴۴.۳۷	۵/۲.۳۶
۶۴۵	-/۸۶	-/۵۹	translational elongation factor Tu	Q8W2C3	۱۳۹.۴۸%	۶/۱۹.۵۰	۴/۶۳.۳۱
۶۹۶	-/۹۱	-/۳۱	putative chitinase	Q5WMX0	۷۸.۳۱%	۶/۰۸.۳۲	۵/۷۳.۳۱
پروتئین‌هایی که بین دو ژنوتیپ و در اثر متقابل معنی دار می باشند (G/GT <sup>+</sup> )							
۵۹۰	-/۶۵	۱/۱۷	roothairless 1, putative, expressed	Q10GJ4	۶۰.۲۵%	۵/۶۷.۹۶	۵/۲.۸۶
پروتئین‌هایی که تنها اثر متقابل آن‌ها معنی دار گردید (TG <sup>+</sup> )							
۳۸۵	۲/۸۷	-/۹۴	putative myosin	Q9FVX8	۶۶.۲۱%	۵/۰۲.۱۰	۴/۴۴.۳۲
۴۳۶	-/۹۶	-/۴۸	putative thiamine biosynthesis protein	Q8GVQ3	۱۰۷.۴۹%	۵/۴۴.۳۷	۵/۲.۳۶
۴۴۱	۲/۴۲	-/۸۱	putative tyrosine phosphatase	Q9LKK3	۶۵.۳۲%	۶/۷۳.۲۷	۵/۲۸.۳۶
۶۲۰	۱/۲۱	-/۶۱	Putative peroxidase	Q6K4J4	۷۳.۲۶%	۵/۰۶.۳۹	۴/۹۵.۳۲
۵۵۸	۲/۲۹	-/۸۵	Glyoxalase	Q0J7H9	۱۵۹.۵۱%	۵/۵۱.۳۲	۵/۴۵.۳۵

الف- شماره مربوط به ژل دو بعدی در روی شکل

ب- نسبت وفور پروتئین‌ها در طول کمبود فسفر (P1) در مقایسه با شرایط کنترل (P100).

ج- Accession number در Swiss-prot

د- امتیاز در Mascot/درصد همپوشانی توالی

و- pI و وزن مولکولی تئوری، ه- pI آزمایش و وزن مولکولی آزمایش

### Translational elongation factor Tu

بیان این پروتئین (۶۴۷) با وزن مولکولی 46 KD تحت شرایط کمبود فسفر کاهش پیدا کرده است. EF-TU در اتصال و انتقال آمینواسیل tRNA به مکان آمینو اسیل ریبوزوم نقش دارد که این مسئله می تواند به علت کاهش مقدار نوکلئوتید RNA باشد (Salekdeh et al., 2002).

### زیر واحدهای رابیسکو<sup>۱۱</sup>

زیر واحدهای بزرگ و کوچک رابیسکو (۵۴ و ۱۴ کیلو دالتون) پروتئین هایی با فراوانی بالا در برگ های می باشند. که در نتایج آزمایشات ما نقاط ۱۰۹، ۱۵۳، ۲۰۳ و ۲۱۵ افزایش بیان رابیسکو را تحت شرایط تنش نشان می دهد و پروتئین ۲۳۲ کاهش این پروتئین را در این شرایط نشان می دهد. به علاوه زیر واحد بزرگ رابیسکو می تواند بوسیله تولید ROS شکسته شود (Salekdeh et al., 2002).

### گلوکاتینون اس- ترانسفراز<sup>۱۲</sup>

گیاهان مکانیزم های دفاعی مؤثری را بر علیه خسارات ناشی از رادیکال های آزاد در زمان تنش از خود اعمال می نمایند. یکی از آنها GST ها می باشند (Galléi Á. et al., 2005). در این تحقیق پروتئین ۱۶۲ به عنوان گلوکاتینون اس- ترانسفراز یا (GST) شناخته شده است که GST ها آنزیم های دایمرکی هستند که حمله نوکلئوفیلیک را بوسیله آنیون تیپولیت<sup>۱۲</sup>، گلوکاتینون تری پپتید در مراکز الکتروفیلیک مولکول های هیدروفوبیک کاتالیز می کنند (Mannervik et al., 1988) و در نهایت سبب از بین رفتن رادیکال های آزاد و خسارات ناشی از آن می شود ولی نتایج ما کاهش این پروتئین را در شرایط تنش نشان می دهد (Gronwald et al., 1998).

### ATP سنتتاز<sup>۱۳</sup>

پروتئین ۵۲۹ به عنوان یک ATP سنتتاز یکی از آنزیم های کاملاً غشائی می باشد که سبب ساختن ATP می گردد. که نتایج ما کاهش این پروتئین را در هر دو رقم به خصوص NIL6-4 نشان می دهد.

### اسید فسفاتاز<sup>۱۴</sup>

پروتئین ۵۶۹ در طیف سنجی جرمی، اسید فسفاتاز نامگذاری گردید. اسید فسفاتازها آنزیم های

این پروتئین ها در مسیرهای سازگاری کمبود فسفر شامل ازبین بردن اکسیژن فعال، فتوسنتز، چرخه TCA<sup>۱</sup>، نسخه برداری، انتقال و سنتز پروتئین، متابولیسم فسفر دخیل می باشند.

### پروتئین های شناسایی شده

### فروکتوز بیس فسفات آلدولاز<sup>۱۶</sup>

این آنزیم یکی از آنزیم های دخیل در متابولیسم کربن می باشد که سبب شکسته شدن فروکتوز ۱۶-۶ بیس فسفات<sup>۱۶</sup> به گلیسر آلدئید ۳- فسفات<sup>۱۸</sup> و دی هیدروکسی استون فسفات<sup>۱۹</sup> می شود. بیان این آنزیم تحت شرایط کمبود فسفر در هر دو ژنوتیپ کاهش پیدا کرده است. همانطور که می دانیم فعالیت این آنزیم یک مرحله اولیه در مسیر گلیکولیز می باشد و محصول آن تولید ATP و اسید پیروات است (O'Rourke et al., 2007). کاهش مقدار این آنزیم می تواند به دو صورت قابل توجه باشد، اول اینکه ذخایر انرژی حاصل از فتوسنتز کافی بوده است و نیازی به شکستن گلوکز برای تولید انرژی نمی باشد و دیگر اینکه کمبود فسفر باعث کاهش این آنزیم شده است و آن به علت وجود فسفر در ساختار این آنزیم می باشد که مورد دوم متحمل تر به نظر می رسد (Salekdeh et al., 2002).

### (S-like RNase) drought-inducel S-like ribonuclease

پروتئین ۳۶۲ به عنوان drought-inducel S-like ribonuclease شناسایی گردید، این پروتئین عضوی از خانواده RNase می باشد که در خود سازگاری گیاه نقش دارند. بیان این پروتئین تحت شرایط کمبود فسفر کاهش یافته است (Taylor et al., 1993). جان واساکی و همکاران (۲۰۰۶) با آنالیز ترانسکریپتومیکس<sup>۲۰</sup> تغییرات متابولیکی ایجاد شده بوسیله کمبود فسفر در برگ برنج را مشاهده کردند.

که مقدار بیان S-like RNase تحت شرایط کمبود فسفر افزایش یافته است که می تواند به علت این باشد که گیاه سعی در تولید نوکلئوتیدهای مرفومریک دارد که به عنوان سوپسترا برای فسفاتاز استفاده می شود (Wasaki et al. 2006). ولی نتایج ما عکس این مسئله را نشان داد و این می تواند به علت وجود فسفر در ساختار این پروتئین باشد.

کرده است ولی در رقم مقاوم (NIL6.4) این کاهش معنی دار نبوده است. فریتین پروتئینی می‌باشد که در پلاستید مکان یابی شده است و سبب ذخیره آهن به شکل غیر آسیب رسان و قابل دسترسی زیستی می‌گردد. به علاوه تحقیقات نشان داده است که مواد غذایی آهن بوسیله ناقلین خاصی از موجودات جذب می‌گردند و تا زمانی که نیاز به استفاده آنها نمی‌باشد به ذخایر پروتئینی مانند فریتین و متالوتئونین<sup>۲۰</sup> متصل می‌شود. به علاوه کمبود فسفر سبب تغییر ذخایر آهن از واکوئل به کلروپلاست می‌گردد و تغییرات مولکولی زیادی مرتبط با این پروسه فیزیولوژیکی ظاهر می‌گردد. فریتین پروتئینی می‌باشد که مسئول تجمع آهن در کلروپلاست می‌باشد و پروتئینی است که سبب حمایت سلول بر ضد آهن بیوالنت آزاد اضافی و خسارات ناشی از رادیکالهای آزاد می‌گردد. افزایش این پروتئین سبب تحمل بیشتر گیاه به استرس های اکسیداتیو می‌گردد (Hegedús et al., 2002).

ولی برای تشکیل هسته فریتین یک واکنشی باید بین آهن و فسفات ایجاد شود تا این ترکیب امکان پذیر باشد. بنابراین با کاهش فسفر تشکیل هسته فریتین نیز کاهش می‌یابد (Azzam et al., 1985). بنابراین در رقم حساس (Nipponbore) کاهش فسفر سبب ایجاد خسارات ناشی از آهن آزاد نیز می‌گردد.

#### پروتئین متصل شونده به GTP<sup>31</sup>

به طور کلی دو سیستم برای ناقلین موجود می‌باشد. یکی ناقلین با Km بالا و دیگری ناقلین با Km پایین. ناقلین با Km پایین مانند ناقلین PHO تحت شرایط کمبود فسفر بیان شان افزایش می‌یابد. تحقیقات نشان می‌دهد که سنتز و فعالیت ناقل PHO84 بوسیله پروتئین متصل شونده به GTP تنظیم می‌گردد که این ژن بلافاصله در بالادست PHO84 قرار دارد (Masanoribun-ya et al., 1992) و به عنوان تنظیم گر محسوب می‌گردد. به علاوه اخیراً ژن ناقل فسفر با ترکیب پذیری بالای دیگری به نام PHO89 نیز شناسایی گردید که دارای همان توالی بالادست می‌باشد (Raghothama et al., 1999) در تحقیق حاضر پروتئین ۷۰ که به عنوان پروتئین متصل شونده به GTP شناسایی شده است در رقم مقاوم (NIL 6-4) به شدت

Ubiquitous هستند که در گیاهان و سایر ارگانیسم ها شناسایی شده اند. این آنزیم ها در انتقال انرژی و تنظیم متابولیسم، انتقال مجدد فسفر در سلولهای گیاه نقش دارند. اما نقش آنها در گیاه، سازگاری به دسترسی کم فسفر می‌باشد (Xiaolong et al., 2001; Duff et al., 1994). اسید فسفاتازها در گیاه در ارگانهای زیادی از جمله واکوئل ها، کلروپلاستها، غشاء، دیواره سلولی، گلژی و سیتوپلاسم وجود دارند (Duff et al., 1994; Olmos & Hellin, 1997). در آزمایش ما بیان این پروتئین در رقم حساس (Nipponbare) کاهش پیدا کرده است. ولی در رقم مقاوم این کاهش بیان معنی دار نمی‌باشد.

#### تیروزین فسفاتاز<sup>26</sup>

پروتئین ۴۴۱ به عنوان تیروزین فسفاتاز در رقم مقاوم NIL.6-4 تغییر حاصل نکرده است ولی در رقم حساس بیشتر از ۲ برابر در شرایط تنش افزایش یافته است. این پروتئین در انتقال پیام و آنتی اکسیدانها دخیل می‌باشد و ممکن است مسئول تغییرات عمل برگ باشد (Zhao et al., 2007).

#### گلای اوگزالاز<sup>۲۷</sup>

پروتئین ۵۵۸ که گلای اوگزالاز شناسایی گردیده است آنزیمی است برای سم زدائی متیل گلای اوگزال<sup>۲۸</sup> که اساساً به عنوان یک محصول فرعی متابولیسم کربوهیدرات و لیپید مهم می‌باشند. متیل گلای اوگزال یک ترکیب سمی سیتوپلاسمی می‌باشد که مانع رشد می‌شود و با DNA و پروتئین واکنش می‌دهد و تغییرات کروماتید خوهری را نیز افزایش می‌دهد (Thornalley et al., 1990). بنابراین تولید بیشتر گلای اوگزالاز سبب کاهش سمیت متیل گلای اوگزال در سلول می‌گردد (Paulus et al., 1993; Espartero et al., 1995). این پروتئین در رقم حساس به شدت افزایش بیان از خود نشان داده است ولی در رقم مقاوم تغییر خاصی نداشته است. مطمئناً به علت وجود مکانیزم های دیگری است که مانع زیاد شدن متیل گلای اوگزال گردیده است.

#### فریتین<sup>۲۹</sup>

پروتئین ۲۵۲ به عنوان فریتین شناسایی گردیده است و بیان آن در رقم حساس به شدت کاهش پیدا



پروتئین در راندمان بیشتر پروسه و ترجمه زیر واحدهای کاتالیک ژن کربوکسیداز فسفات ریبولوز ضروری می باشد و عنصر کلیدی در پروسه فتوسنتز می باشد (Ratricia et al., 2006).

به انضمام اینکه به نظر می رسد این پروتئین در جلوگیری از نرعقیمی نیز نقش دارد. در برنج، نر عقیمی سیتوپلاسمی در اثر جابجایی سیتوپلاسم برنج japonica با indica اتفاق می افتد (Akagi. et al., 2004) در آزمایش حاضر نیز نقطه ۳۶۰ به عنوان پروتئین PPR شناسایی شده است. این نکته مهم می باشد که این پروتئین جزء پروتئین هایی می باشد که به فسفر پاسخ نداده است. بلکه نحوه بیان آن بین دو ژنوتیپ کاملاً متفاوت می باشد. نتایج ما وجود PPR را در هر دو شرایط نرمال و استرس NIL-6.4 نشان می دهد. ولی در شرایط نرمال Nipponbare وجود ندارد و تنها در شرایط تنش ظاهر می شود و اینطور به نظر می رسد که برای جلوگیری از نرعقیمی گیاه حساس تحت شرایط تنش بیان می شود.

#### Putative pr MC3

از نظر نوع فعالیت، این پروتئین (۱۶۵) هیدرولیز باندهای مختلف مانند C-O ، C-N ، C-C و باندهای فسفوریک آن هیدریک<sup>۳۷</sup> را کاتالیز می کند و از نظر پروسه متابولیکی نه تنها سبب تبدیل مولکولها کوچک می شود بلکه در پروسه مولکولهای بزرگ از جمله تغییر DNA، همانند سازی آن و سنتز پروتئین و از بین رفتن پروتئین نیز دخیل می باشد و به طور کلی سبب رشد سلول می گردد. بیان این پروتئین در نتایج آزمایش ما در رقم حساس به طور معنی داری کاهش پیدا کرده است ولی در رقم مقاوم تغییر حاصل نگردیده است (Ollis et al., 1992).

#### خانواده آلدو/کتورداکتاز<sup>۳۸</sup>

نقطه ۷۰۷ در طیف سنجی جرمی به عنوان آلدو/کتو رداکتاز شناسایی شد خانواده آنزیم های آلدو/کتو رداکتاز شامل:

آلدئیدرداکتاز<sup>۳۹</sup>

آلدوزرداکتاز<sup>۴۰</sup>

کتورداکتاز<sup>۴۱</sup>

کاهش یافته است ولی در رقم حساس کاهش معنی داری نداشته است.

#### Putative plastid-specific ribosomal protein

این پروتئین (۳۶۴) یک موتیف شناسایی RNA و در حقیقت فاکتوری برای پیرایش RNA می باشد که در نتایج این آزمایش بیان آن در رقم مقاوم (NIL 6-4) تحت شرایط کمبود فسفر کاهش معنی داری یافته است. ولی در رقم حساس (Nipponbare) این کاهش معنی دار نبوده است (Query et al., 2004. Kielkopf. et al., 1989).

#### Putative fruit protein

این پروتئین (۳۷۰) دارای دو دامین<sup>۳۲</sup> می باشد.

- ۱- اکسیدورداکتاز وابسته به دامین متصل شونده به <sup>۳۳</sup>FAD
- ۲- اکسیدورداکتاز وابسته به دامین متصل شونده به <sup>۳۴</sup>NAD

که باعث فعالیت اکسیداسیون و احیاء این پروتئین می گردد. در حقیقت به عنوان یک سوپسترای بخشنده هیدروژن یا الکترون می شود و به این ترتیب اکسید می گردد و در مقابل سوپسترای دیگری پذیرنده این الکترون یا هیدروژن می گردد و احیاء می شود (Marchler-Bauer et al., 2007.2005,2004). مقدار این پروتئین در آزمایش ما در رقم مقاوم (NIL6-4) به شدت کاهش یافته است ولی در رقم حساس تغییر خاصی پیدا نکرده است.

#### پروتئین 30S ریبوزومی<sup>۳۵</sup>

پروتئین ۵۹۷ که به عنوان پروتئین 30S ریبوزومی شناسایی گردیده است. دارای دامین متصل شونده به RNA می باشد که محدوده وسیعی از RNA ها را در بر می گیرد. این پروتئین از نظر ساختمانی بسیار مشابه پروتئین شوک سرمایی<sup>۳۶</sup> می باشد که به نوکلئوتیدها وصل می گردد. این پروتئین در رقم مقاوم (NIL6-4) کاهش معنی داری از خود نشان داده است. ولی در رقم حساس (Nipponbare) تغییری نکرده است.

#### PPR Protein

نقطه ۳۶۰ به عنوان پروتئین PPR شناسایی شده است. PPR یا Pentatricopeptid Repeat نقش ضروری در تنظیمات پس از رونویسی در طول توسعه کلروپلاست و پایداری RNA دارد. به علاوه بر روی بیان تعدادی از ژنهای کلروپلاست نیز تأثیر می گذارد. این

حتی در رشد لوله گرده و رشد و توسعه ریشه نیز مؤثر می‌باشند. بیان این پروتیین در شرایط تنش در رقم مقاوم به شدت کاهش یافته است ولی در رقم حساس تغییری نیافته است.

#### بیوسنتز تیامین<sup>۴۷</sup>

پروتیین ۴۳۶ که به عنوان بیوسنتز تیامین شناخته شد آزمایشی برای بیوسنتز تیامین می‌باشد که بیان این آنزیم در رقم NIL-6.4 به شدت کاهش یافته است ولی در رقم Nipponbare اختلاف معنی داری پیدا نکرده است. تیامین یا ویتامین B<sub>1</sub> یک ترکیب ضروری همه سلولها می‌باشد و به عنوان یک کوفاکتور برای دو آنزیم دخیل در TCA می‌باشد:

#### پیرووات دهیدروژناز<sup>۴۸</sup>

#### $\alpha$ -کتوگلو تاربت دهیدروژناز<sup>۴۹</sup>

گیاهان قادر به سنتز این ویتامین می‌باشند علیرغم اینکه حیوانات و انسان قادر به سنتز آن نمی‌باشند. تیامین پیروفسفات<sup>۵۰</sup> فرم فعال ویتامین و یک کوفاکتور برای مسیر پنتوز فسفات<sup>۵۱</sup> آنزیم و ترنس کتولاز<sup>۵۲</sup> برای ترکیبات آنزیمی TCA می‌باشد. همچنین در سلولهای گیاهان تیامین یک کوفاکتور برای آیزوایمهای مکان یابی شده در پلاستید به نام پیرووات دهیدروژناز<sup>۵۳</sup> و ترنس کتولاز می‌باشد. کمبود این ویتامین سبب اختلال متابولیسم کربوهیدراتها و افزایش غلظت پیرووات می‌شود.

#### نتیجه گیری کلی

تحقیقات ما در این بخش چشم اندازی از تعداد زیادی از پروتئین های دخیل در کمبود فسفر را بر ما گشود. نتایج مرفولوژی اندامهای هوایی نشان داد که بین رقم مقاوم (NIL-6.4) با گیاه حساس (Nipponbare) اختلاف معنی داری وجود ندارد و تنها این اختلاف در ریشه ارقام مذکور وجود دارد بطوریکه نتایج آنالیز نقاط موجود در ژل های دو بعدی ریشه نیز نتایج کارهای مورفولوژی را تایید نمود (Torabi et al., 2009). در این تحقیق مشاهده شد تنها سه پروتئین وجود دارد که نه تنها به کمبود فسفر پاسخ معنی داری نشان دادند بلکه بین دو ژنوتیپ نیز متفاوت بودند و سایر پروتئین ها تنها به کمبود فسفر پاسخ دادند این نتایج و نتایج حاصل از کارهای ترابی و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی همین

اکسیدورداکتاز<sup>۵۴</sup> های سیتو سلولی می‌باشند. که احیاء و ابسته به NAD(P)H ترکیبات کربونیل مانند هورمونهای استروئیدی، قندها، آلوئیدها و کتون ها را کاتالیز می‌کنند (Seery. et al., 1998. Morita et al., 2007).

به علاوه تحقیقات نشان داده است که این آنزیم می‌تواند گیاهان را بر ضد لیپیدپراکسیداسیون<sup>۵۵</sup> تحت شرایط تنش خشکی و شیمیایی حفاظت نماید. به طوری که تولید لیپیدپراکسیداسیون را کاهش می‌دهد (Oberschall et al., 2000). همچنین این پروتیین جزء پروتیین های القاء شونده بوسیله اکسین می‌باشند (NCBi) پس کاهش آن نشان دهنده کاهش اکسین نیز می‌تواند باشد (Hegedús et al., 2002). 4- hydroxynon 2-enah (HNE) دارای ساختار لیپیدآلدئید<sup>۵۶</sup> می‌باشند و به شدت سمی هستند. سبب خسارات سلولی شدیدی می‌گردند. سم زدائی HNE ممکن است بوسیله GST یا فعالیت آلدوز/آلدئید رداکتاز<sup>۵۷</sup> صورت گیرد (Bona et al., 2007) حال با توجه به نتایج این آزمایش که نشان می‌دهد این پروتیین در رقم حساس (Nipponbare) کاهش یافته است در صورتیکه در رقم مقاوم (NIL-6.4) بیان آن تغییر معنی داری پیدا نکرده است. این طور می‌توان نتیجه گرفت که رقم حساس پتانسیل کمتری برای سم زدائی از سلول می‌باشد.

#### خانواده غنی از لوسین<sup>۵۸</sup> (LRR)

این پروتیین (۱۱۱) دارای یک خانواده بزرگ و گسترده ای می‌باشد که در گیاهان، حیوانات، قارچها و باکتریها پیدا شده است و دارای دامین تکراری غنی از لوسین می‌باشد که از موتیف تکراری غنی از لوسین تشکیل شده است. توالی این موتیف یک کلید شناسایی عمل این پروتیین می‌باشد. که سبب متعادل شدن اثر متقابل پروتیین- پروتیین می‌شود و فعالیت تشخیصی و اتصال اختصاصی در پروتیین ها را دارد. در گیاهان، پروتیین LRR فعالیت های متنوعی در انتقال سیگنال انجام می‌دهد آنها در مسیرهای مرتبط با دفاع گیاه و توسعه آن شرکت می‌کنند و گاهی در مواجهه با پاسخهای خاص محیطی یا هورمونی مانع از بین رفتن پروتیین های خاصی می‌گردد.

ارقام ماهیت مقاومت در رقم NIL-6.4 را بیشتر آشکار می سازد و اینطور می توان نتیجه گرفت که رقم مقاوم احتمالاً دارای مکانیزم هایی در ریشه می باشد که سبب تحمل بیشتر فسفر می گردد.

## REFERENCES

1. kagi H., Nakamura A., Yokahashi Y., Mori K., Fujimura T. (2004). Positional cloning of rice Rf-1 gene, a restorer of BT-type cytoplasmic male sterility that encodes a mitochondria targeting PPR protein. *Theor Appl Genet* 108,1449-1457.
2. Attila Hegedûs I., Erdeil S., Janda T., Szalai J., Dudits D. (2002). Effects of low temperature stress on ferritin or aldose reductase overexpressing transgenic tobacco plants. *Proceedings of the 7th Hungarian Congress on Plant Physiology*.
3. Mansour Azzam N., Thompson C., Theil J. E. C., Chasteen N. D., and Sayers D. E. (1985). Fe(III) \*ATP Complexes. 260(13),7975-7979.
4. Bona E., Marsano F., Cavaletto M. and Berta G. (2007) Proteomic characterization of copper stress response in Cannabis sativa roots. *Proteomics* 7, 1121–1130.
5. Bray R.H. and Kurtz L.T. (1945). Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil Sci*, 59, 39-45.
6. Demerval C., de Vienne D., Zivy M and Thiellement H (1986). Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*: 7, 52-54
7. Duff S.M.G, Sarath G, Plaxton W.C. (1994) The role of acid phosphatase in plant phosphorus metabolism. *Physiologia Plantarum*, 90,1275–1278.
8. Espartero, J., Sanchez-Aguayo, I., Pardo, J. M. (1995) Molecular characterization of glyoxalase-I from a higher plant; upregulation by stress. *Plant Mol. Bio*, 29, 1223–1233.
9. Gallé A., Csiszár J., Secenji M., Tari I., Györgyey J., Dudits D., Erdei L. (2005) Changes of glutathione S-transferase activities and gene expression in Triticum aestivum during polyethylene-glycol induced osmotic stress. *Acta Biologica Szegediensis*. 49(1-2), 95-96.
10. Gronwald J. W., Kathryn L. Plaisance (1998) Isolation and Characterization of Glutathione S-Transferase Isozymes from Sorghum. *Plant Physiol*, 117, 877–892.
11. Hammond, J. P., Broadley M. R., White P. J., (2004). Genetic Responses to Phosphorus Deficiency. *Annals of Botany*. 94, 323-332.
12. Hegedûs A., Erdeil S., Janda T., Szalai J., Dudits D., Horvath G. (2002). Effects of low temperature stress on ferritin or aldose reductase overexpressing transgenic tobacco plants. *Proceedings of the 7th Hungarian Congress on Plant Physiology*.
13. Kielkopf C.L., Lucke S., Green M.R. (2004). U2AF homology motifs: protein recognition in the RRM world. *Genes Dev*. 18 1513-1526.
14. Mannervik B, Danielson UH (1988). Glutathione transferases—structure and catalytic activity. *CRC Crit Rev Biochem*. 23, 283–337.
15. Marchler-Bauer A et al. (2005). CDD: a Conserved Domain Database for protein classification., *Nucleic Acids Res*. 33(D)192-196.
16. Marchler-Bauer A et al. (2007). CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis., *Nucleic Acids Res*. 35(D)237-240.
17. Marchler-Bauer A, Bryant SH (2004). CD-Search: protein domain annotations on the fly., *Nucleic Acids Res*.32(W)327-331.
18. Masanoribun-ya, Satoshiharashima, Yasuji Oshima (1992). Putative GTP-Binding Protein, Gtr1, Associated with the Function of the Pho84 Inorganic Phosphate Transporter in Saccharomyces cerevisiae. *Molecular and Cellular Biology*, 2958-2966
19. Morita H., Mizuuchi Y., Abe T., Kohno T., Noguchi H., and Abe I., (2007). Cloning and Functional Analysis of a Novel Aldo-Keto Reductase from *Aloe arborescens*. *Biol. Pharm. Bull*. 30(12) 2262–2267.
20. Oberschall A, Deak M., Torok K., Sass L., Vass I., Kovacs I., Feher A., Dudits D., Horvath GV. (2000). A novel aldose/aldehyde reductase protects transgenic plants against lipid peroxidation under chemical and drought stresses. *The Plant Journal* 24, 437- 446.
21. Ollis DL, Cheah E., Cygler M., Dijkstra B., Frolow F., Franken SM., Harel M., Remington SJ., Silman I., Schrag J., Sussman JL., Verschuere KHG. A., Goldman. (1992). The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng*, 5:197-211.
22. Olmos E, Hellin E., (1997). Cytochemical localization of ATPase plasma membrane and acid

- phosphatase by cerium-based method in a salt-adapted cell line of *pisum sativu*. *Journal of Experimental Botany* 48, 1529-1535.
23. O'Rourke Jamie A, Charlson D. V, Gonzalez D. O, Vodkin L. O, Graham M. A, Cianzio S. R, Grusak M. A, Shoemaker R. C, (2007). Microarray analysis of iron deficiency chlorosis in near-isogenic soybean lines. *BMC Genomics* , 8, 476.
  24. Paulus, C., Knollner, B., Jacobson, H. (1993) Physiological and biochemical characterization of glyoxalase I, a general marker for cell proliferation, from a soybean cell suspension. *Planta* 189, 561–566.
  25. Query C.C., Bentley R.C., Keene J.D. (1989) A common RNA recognition motif identified within a defined U1 RNA binding domain of the 70K U1 snRNP protein. *Cell* 57, 89-101.
  26. Raghothama K. G., (1999). Phosphate acquisition. *Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 665–93.
  27. Raticia L., Ramos M. G., Cuevara-Garcia, Gutierrez-Nava M.L., (2006). Chloroplast development in plants and the role of RNA binding proteins. *Meeting of International Research Scholars*.
  28. Salekdeh G.H., Siopongco J., Wade L. J., Ghareyazie B., Bennett J., (2002) Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics* , 2, 1131–1145.
  29. Salekdeh, G. H., Komatsu, S., (2007). Crop proteomics: aim at sustainable agriculture of tomorrow. *Proteomics*. 7, 2976-2996.
  30. Seery L.T., Nestor P.V., FitzGerald G.A., (1998). Molecular Evolution of the Aldo-keto Reductase Gene Superfamily. *J Mol Evol* 46, 139–146.
  31. Singla-Pareek, S. L., Reddy M. K. and Sopory S. K., (2003). Genetic engineering of the glyoxalase pathway in tobacco leads to enhanced salinity tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 14672-14677.
  32. Taylor C. B., Bariola P. A., Delcardaybt S. B., Rainest R. T., Green A. P. J., (1993). A senescence-associated RNase of Arabidopsis that diverged from the S-RNases before speciation. *Plant Biology*. 90,5118-5122.
  33. Thornalley, P. J. (1990). The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem. J.* 269(1), 1–11.
  34. 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.
  35. Vance C.P., Uhde-stone C., Allan D. L., (2003). Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New physiologist*, 157, 423-447.
  36. Wasaki Jun , Shinano T., Onishi K., Yonetani R., Yazaki J., Fujii F., Shimbo K., Ishikawa M., Shimatani Z., Nagata Y., Hashimoto A., Ohta T., Sato Y., Miyamoto C., Honda S., Kojima K., Sasaki T., Kishimoto N., Kikuchi S. and Osaki M., (2006). Transcriptomic analysis indicates putative metabolic changes caused by manipulation of phosphorus availability in rice leaves. *Journal of Experimental Botany*. 57(9), 2049-2059.
  37. Xiaolong Yan, Hong Liao, Trull Melanie C., Beebe Steve E., and Lynch Jonathan P., ( 2001). Induction of a Major Leaf Acid Phosphatase Does Not Confer Adaptation to Low Phosphorus Availability in Common Bean. *Plant Physiol*, 125(4), 1901–1911.
  38. Zhao Caifeng, Bingran Zhao, Yan Ren, Wei Tong, Jingqiang Wang, Kang Zhao, Shaokun Shu, Ningzhi Xu, and Siqi Liu, (2007). Seeking Transformation Markers: An Analysis of Differential Tissue Proteomes on the Rice Germplasm Generated from Transformation of *Echinochloa crusgalli* Genomic DNA. *Journal of Proteome Research*, 9, 4
  39. Yoshida S, Forno D, Cock J.H, Gomez K.A. *Laboratory Manual for the Physiological studies of Rice*. Los Banos Filipinas (1976).