

鹽分對番茄根部有機酸及蛋白質表現之影響

林永鴻¹

摘 要

番茄為耐鹽性作物，然而其耐鹽生理至今尚未完全被確認，本研究乃探討番茄生長於不同氯化鈉(NaCl)濃度之環境中，有機酸及蛋白質的變化情形，做為改進高鹽分環境中作物栽培之參考。分別將番茄苗種植於含0, 0.25%及0.5% NaCl之水耕環境中，二週後抽取根進行有機酸及蛋白質分析，以瞭解鹽分對根部有機酸及蛋白質的影響。結果顯示，在高鹽環境(0.5% NaCl)中，與含0%及0.25% NaCl處理之番茄的根比較，草酸、蘋果酸及延胡索酸明顯較高，且有10種蛋白質具明顯表現，9種蛋白質則受到抑制，在明顯表現的蛋白質中，P69C, Cytochrome P450 proteins, Luciferin protein, phototropin-1及Retrotransposon gag protein對高鹽分逆境的抵禦能力及根生長的促進具正面效應，因此使番茄的根生長不會受到抑制，而ATP synthase beta subunit protein因促進根呼吸之TCA cycle過程中能量的形成，促使檸檬酸及琥珀酸加速轉化成蘋果酸、延胡索酸及草酸而使得這三種有機酸大量累積，進而將鈉離子排除於根外，至於在0.5%NaCl環境中受到抑制的蛋白之中，TNF receptor-associated factor(ISS)及pr1-like protein較不含NaCl及含0.25% NaCl處理之含量低，然而因其機制未明，值得進一步的探討。本試驗至少證實，番茄根生長在不同NaCl濃度的環境中，其根部產生的有機酸及蛋白質是不同的，至於這些有機酸及蛋白質的耐鹽機制則有待進一步的研究。

關鍵詞：番茄、耐鹽性、生理、有機酸、蛋白質

前 言

全世界約有 $9.6 \times 10^8 \text{ Km}^2$ 的鹽分地，且其面積正以每年 10^5 Km^2 的速率增加⁽³⁴⁾，鹽分地主要是因地下水位過高、海風攜入鹽分與長期乾旱所造成，其鹽分主要以氯化鈉為主⁽¹⁾。番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)一般可耐受電導度值4-6 mmhos/cm的土壤環境⁽²⁾，Katerji等(2001)曾以番茄、大豆、玉米、小麥、馬鈴薯、甜菜、向日葵、蠶豆進行耐鹽性試驗，發現番茄是最具耐鹽性的作物⁽²¹⁾，即使環境中NaCl濃度高達0.5%仍可正常生長⁽²⁰⁾，而

¹高雄區農業改良場助理研究員

栽培種小果番茄又比大果番茄更具耐鹽性⁽³¹⁾。植物生長於高鹽環境中，多少具有本身的耐鹽特性，當耐鹽的植物處於高鹽環境中，其生長(株高)反而有顯著的促進，可能因為鹽分中的鈉是耐鹽作物的必需元素⁽⁶⁾，亦可能因耐鹽植物透過加速生長來降低體內鹽分的濃度所致^(7, 27)；另外，諸多學者認為植物內離層酸(ABA)的產生與耐高鹽分逆境有關^(16, 22, 39)，此可能因離層酸誘導產生耐鹽蛋白而使植物具耐鹽性^(9, 11, 33)。根為鹽分進入植物的第一道關卡，在高鹽環境中，鹽分對耐鹽作物根生理的影響鮮少被研究，因此本研究乃以番茄為材料，探討其栽培於不同NaCl濃度之水耕環境中，有機酸及蛋白質的變化情形，做為改進鹽分地中作物栽培的參考。

材料與方法

一、番茄苗的栽種

選取健康番茄苗(聖女)，種植於之栽種盆(內徑15cm,高20cm)，內含1 L水耕液，水耕液採Konishi(1985)之修正配方⁽²³⁾，組成分如下，以mM濃度配製：1.10 (NH₄)₂SO₄，0.35 Ca(NO₃)₂，1.0 Na₂HPO₄，0.51 K₂SO₄，0.35 CaCl₂，1.00 MgSO₄；以μM濃度配製：6.3 Fe-EDTA，9.3 H₃BO₃，18.0 MnSO₄，1.5 ZnSO₄，0.4 CuSO₄，0.5 Na₂MoO₄，將植株移入生長箱(日夜溫及相對濕度分別為27°C，23°C及65%，85%)，每隔2小時曝氣10分鐘，兩天更換水耕液一次。1週後，將番茄苗移至含不同NaCl濃度(0, 0.25%及0.5%)之水耕液中，每處理種植30株，各三重複，栽培條件同上，2週後採取各處理的根，置入液態氮中保存。二、番茄根有機酸及蛋白質的抽取(Delhaize et al.,1993)

將保存的根放入研鉢中，並加入1 ml 0.6 N HClO₄進行研磨，以15000G離心5分鐘，取0.9 mL上清液加入80 μL K₂CO₃ (69 g/100 mL)，以15000G離心5分鐘，取上清液加入0.85 mL去離子水，待分析有機酸。此外，採取不同處理之根，置於Eppendoff內，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。

三、有機酸分析

根據Jin et al.(2008)的方法⁽¹⁹⁾，簡述如下，以高效液相層析儀(Shimatzu, LC 10A)分析，條件如下，流動相50 mM HClO₄ (Merck,70~72%)，流速1 ml/min；層析管柱(Shodex RSpak KC 811,Japan)兩支，管柱溫度45°C；進樣體積5 μl；以refractive index detector (RID)偵測草酸(oxalic acid)、檸檬酸(citric acid)、蘋果酸(malic acid)、琥珀酸(succinic acid)及延胡索酸(fumaric acid)，並測定各有機酸含量。

四、蛋白質分析與身分鑑定

(一)二維電泳(Two-dimensional electrophoresis)

取 400 μ g 蛋白質樣品，溶解於緩衝液 (8M urea, 2% CHAPS, 0.5% IPG buffer and 7 mM DTT)後，置於 13 cm(the medium format 2-DE)IPG膠條 (pH4-7 線性分布)，以 IPGphor II system(GE Healthcare, Piscataway, NJ)進行一維電泳，設定電壓 60,000–75,000 voltage-hours。以 SDS 緩衝液來平衡完成電泳之膠條，接著以 12.5% SDS-PAGE 進行第二維之分子量差異電泳 (15)。

(二)蛋白質膠染色方法(Protein gel staining and image analysis)

二維電泳膠片以 SYPRO Ruby gel stain kit 染色，染色膠片以 CCD 照相系統 (Perkin Elmer, MA)以激發 (488 nm)及放射 (610 nm)之波長擷取影像，影像則利用 Phoretix 2D Elite 軟體計算分子量。

(三)MS樣品製備⁽³⁸⁾

徒手切下直徑約 1mm 的膠條，蛋白質點以 MS-grade Trypsin Gold 於 37 °C 中 8 小時以分解蛋白質，接著加入 10 μ L 超純水以及 20 μ L 0.1% TFA，以真空濃縮機濃縮 (25°C)，然後以 1 μ L 之 5% ACN 內含 0.5% TFA 之溶劑進行溶解。

(四)使用 ESI-MS/MS 鑑定蛋白質身分

使用質譜儀(MicroMass Q-TOF 2,UK)測定，分析數據使用 MASCOT 搜尋引擎(www.matrixscience.com)進行搜尋並與資料庫進行比對，搜尋條件及資料庫如下：NCBI nr; Taxonomy; green plant; enzyme; trypsin; fixed modification; carbamido -methylation; variable modification; methionine oxidation; peptide tolerance, 0.3 Da; MS/MS tolerance, 0.3 Da; allowance of one missed cleavage。

(五)統計分析

利用 Windows SPSS 10.0 統計數據並進行變異數分析，使用最小顯著差異及鄧肯氏測驗來區別處理間的差異，在 $p < 0.05$ 時視為顯著。

結果與討論

表 1 顯示，以草酸、蘋果酸及延胡索酸而言，隨著水耕液中 NaCl 濃度提高，番茄根分泌的此三種酸的濃度漸次提高，當水耕液中 NaCl 濃度高達 0.5% 時，其根中草酸含量為無 NaCl 處理的 3 倍高，蘋果酸為 3 倍，延胡索酸甚至高達 5-6 倍。至於檸檬酸及琥珀酸則不論有無 NaCl 處理，其差異均不大。因此草酸、蘋果酸及延胡索酸的臘兩產生可能與番茄的耐鹽性有關。

表 1. 不同 NaCl 濃度處理後番茄根之各種有機酸含量

Table 1. Organic acid concentrations of tomato roots after treatment of different NaCl concentrations.

Organic acids	Oxalic acid	Citric acid	Malic acid	Succinic acid	Fumaric acid
NaCl conc	----- (nmol/h.g root FW) -----				
0 %	7.1 ^{b*}	5.1 ^a	10.3 ^c	3.0 ^a	4.2 ^c
0.25 %	9.2 ^b	4.5 ^a	22.6 ^b	2.5 ^a	11.3 ^b
0.5 %	14.5 ^a	5.4 ^a	34.9 ^a	2.1 ^a	21.6 ^a

*The same letter in the same column indicates no significant difference at 0.05 level according to Duncan's multiple range test.

番茄經三種不同濃度 NaCl 處理後，其 SDS-PAGE 的圖形均相似，而且可分離出約 81 個蛋白質點(spot) (圖 1)，當中有些蛋白質點具明顯表現，而有些則顯著受到抑制。將 SDS-PAGE 圖分隔成三個區域進行比較(圖 2)，並選取具明顯差異表現的 8 個蛋白質點進行身份鑑定，由表 2 得知，因高濃度 NaCl 處理 (0.5% NaCl)而具明顯表現的蛋白質有 10 種(spot 1~5)，有 9 種蛋白質則是明顯受到抑制(spot6~8)。在明顯表現的蛋白質當中，有一種未知蛋白(unknown protein)，兩種預測的蛋白(predicted protein)，分別自 *populus trichocarpa* 及 *Micromonas* sp. Rcc299 比對而得，一種為假說蛋白(hypothetical protein)自 *Sorghum bicolor* 比對而得，而有 6 種蛋白身份被鑑定，分別為 p69C protein、cytochrome P450、ATP synthase beta subunit、Leucine-rich repeat、phototropine-1 及 Retrotransposon gag protein。另外，在 0.5% NaCl 處理較無 NaCl 及 0.25% NaCl 處理受到明顯抑制的有一種未知的蛋白(unknown protein)，一種預測的蛋白自 *Ostroococcus* CCE 9901 比對而得，五種假說蛋白分別自 *Vitis vinifera*, *Osl_38149*, *Oryza sativa* Indica Group, *Oryza sativa* Japonica Group 及 *Zea mays* 比對而得，而有兩種蛋白質身份被鑑定，分別為 TNF receptor-associated factor(ISS)及 pr1-like protein OSI-38149。

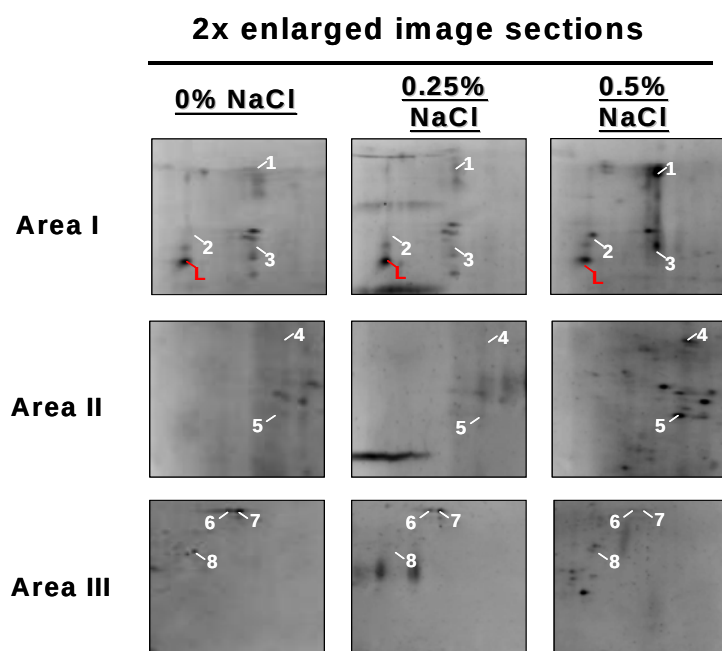


圖 1.不同 NaCl 濃度處理番茄根蛋白質之 2D SDS-PAGE 圖

Fig 1. 2D SDS-PAGE plate for proteins of tomato roots after treatment of different NaCl concentrations.

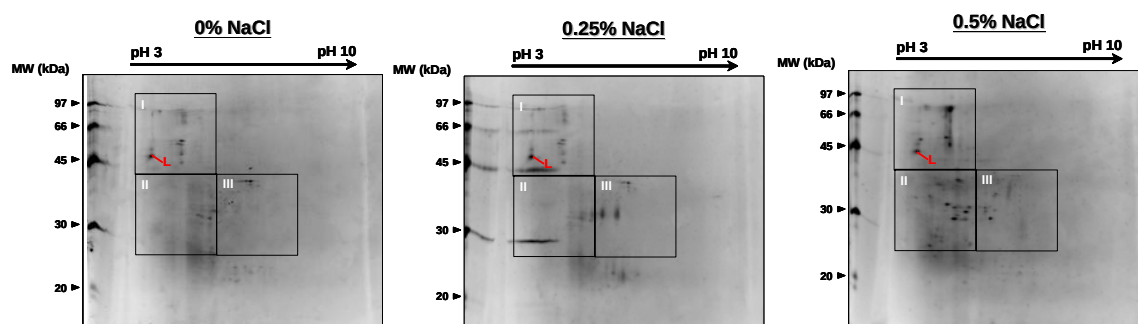


圖 2. 不同 NaCl 處理後番茄根蛋白質於 SDS-PAGE 圖中不同區域之蛋白質分佈

Fig 2. Protein distribution in different areas of the SDS-PAGE plate after treatment of different NaCl concentrations.

表 2.不同 NaCl 處理後番茄根之蛋白質的身份鑑定

Table 2. Identifications of proteins from tomato roots after treatment of different NaCl concentrations.

Spot	Accession No.	Protein Description	MOWSE score	Theoretical M _r / pI	Highly expressed in
1	gi 116787836	unknown [Picea sitchensis]	50	43.5/8.97	0.5% NaCl
2	gi 3183979	P69C protein [Solanum lycopersicum]	52	80.8/8.50	0.5% NaCl
	gi 255553639	cytochrome P450, putative [Ricinus communis]	46	58.7/8.94	
3	gi 224105443	predicted protein [Populus trichocarpa]	53	12.1/8.84	0.5% NaCl
	gi 255085016	predicted protein [Micromonas sp. RCC299]	53	54.7/5.61	
	gi 7706850	ATP synthase beta subunit [Androcymbium ciliolatum]	49	50.3/5.09	
4	gi 124359469	Leucine-rich repeat, plant specific [Medicago truncatula]	48	46.7/5.01	0.5% NaCl
5	gi 151176133	phototropin-1 [Solanum lycopersicum]	55	115.7/8.35	0.5% NaCl
	gi 242080053	hypothetical protein SORBIDRAFT_07g028173 [Sorghum bicolor]	49	35.4/9.75	
	gi 89179399	Retrotransposon gag protein [Asparagus officinalis]	49	106.0/9.44	
6	gi 147804859	hypothetical protein [Vitis vinifera]	63	168.6/9.00	0% NaCl
	gi 145346954	predicted protein [Ostreococcus lucimarinus CCE9901]	51	117.6/4.78	
	gi 255640268	unknown [Glycine max]	42	39.9/4.79	
7	gi 116057152	TNF receptor-associated factor (ISS) [Ostreococcus tauri]	47	162.7/6.53	0% NaCl
	gi 147806268	hypothetical protein [Vitis vinifera]	46	54.7/5.88	
	gi 218186751	hypothetical protein OsI_38149 [Oryza sativa Indica Group]	42	401.8/5.00	
8	gi 53792104	pr1-like protein [Oryza sativa Japonica Group]	58	37.2/10.27	0% NaCl
	gi 147801039	hypothetical protein [Vitis vinifera]	54	51.8/5.22	
	gi 226509154	hypothetical protein LOC100279626 [Zea mays]	48	67.8/6.35	

植物根中有機酸的大量產生已被證實為作物根的耐逆境機制之一^(10, 24)，而根受逆境時有機酸的大量產生則與特殊蛋白質的表現有關⁽³⁰⁾。本試驗隨著NaCl濃度提高，草酸、蘋果酸及延胡索酸大量產生(表 1)。Le Van and Masuda(2004)曾以不同品系的鳳梨進行耐鋁特性研究，發現在高鋁濃度環境中，耐鋁鳳梨(Cayenne)根尖產生的蘋果酸及琥珀酸較不耐鋁鳳梨(Soft Touch)高，其根尖產生的 23 kD蛋白質也較不耐鋁者高，因此認為這些物質應與其耐鋁特性有關⁽²⁵⁾。Na與Al同為金屬離子，Na濃度過高可能與Al毒害逆境類似。Witzel *et al.* (2009)曾以裸麥(barley)進行根部耐鹽試驗，發現對活性氧的去氧化能力之兩種蛋白在耐鹽品系是較充足的⁽³⁷⁾。本研究顯示，在幾個最明顯表現的蛋白質中，Tornero *et al.* (1996)認為P69C protein (spot 2)的產生可增進番茄的根對病害的抵抗能力⁽³⁵⁾，本試驗則發現番茄根分泌的P69C protein同時具有耐鹽功能；番茄體內芸苔素內酯 (brassinosteroids)的形成在根與莖的伸長過程中扮演重要角色，而在高鹽濃度處理時，Cytochrome P450(spot 2)的大量產生可能因增進了芸苔素內酯的生合成而增強番茄根的耐鹽性，進而使其根的生長不受影響⁽²⁶⁾，本試驗中番茄的根在0.5% NaCl處理時，根分泌的Cytochrome P450 明顯較不含及含 0.25% NaCl者增加，與其實驗相同。Zhou *et al.* (2009)曾研究番茄耐鹽蛋白，結果發現，當番茄處於高鹽濃度中，存在於液泡中的ATP synthase含量會增加⁽⁴¹⁾，另外，Chen *et al.* (2009)的試驗顯示，水稻生長在高鹽環境中 2 小時，其根尖粒腺體(mitochondria)中的ATP synthase含量會降低，因此造成其粒腺體的完整性(integrity)降低⁽⁸⁾，本試驗中，番茄生長於 0.5% NaCl中，其根並不受傷害，且ATP synthase beta subunit (spot 3)較不含及含 0.25% NaCl之處理增加，ATP synthase beta subunit為根呼吸作用之檸檬酸循環(TCA cycle)中產生ATP之重要的蛋白質之一，因此ATP synthase beta subunit的大量形成有可能促使了TCA cycle中，檸檬酸及琥珀酸加速轉化成蘋果酸、延胡索酸及草酸，而使得這三種有機酸大量的累積，此與Li等(2008)⁽²⁶⁾研究關於番茄於缺鐵逆境中根蛋白質的變化相類似，他們證實 isocitrate dehydrogenase(NADP1), aconitase, succinyl CoA ligase 及 succinate dehydrogenase 可促進檸檬酸循環(TCA cycle)的進行，因而改善番茄的鐵缺乏逆境。Leucine-rich repeat與阿拉伯芥(*Arabidopsis thaliana*)，牧草 (*Lolium perenne* L.)及豆類 (*Phaseolus vulgaris* L.)的抗病機制有關^(12,13,18)，Leucine-rich repeat的存在可提昇水稻體內氮的利用效率⁽⁵⁾，因此番茄的根於高鹽濃度時Leucine-rich repeat的明顯表現可能因增進了根中氮的同化效率而使其生長不受抑制；Phototropin-1 與植物的光合效率、氣孔開閉以及葉

的伸展能力有關⁽³⁾，有學者認為，phototropin-1 的產生與煙草及阿拉伯芥根的柔軟度(plasticity)及耐旱性有關^(14, 17)，因此番茄可能將地上部合成的 phototropin-1 傳輸至地下部而使根在高鹽環境中受到保護。Retrotransposon gag protein則與小麥 (wheat)、甘藷 (sweet potato)及水稻的抗環境逆境有關^(4, 28, 29, 40)，本試驗中，則顯示Retrotransposon gag protein應與番茄根的耐鹽性有關。TNF receptor-associated factor (ISS)及pr1-like protein與植物根的抗病性有關⁽³²⁾，然而為何番茄的根以 0.5%NaCl處理時，此兩種蛋白質較不含NaCl及含 0.25% 處理NaCl反而受到抑制，則尚需進一步的探討。

隨著 NaCl 濃度提高，番茄根三種有機酸大量產生，其過程應是受到高鹽環境中某些蛋白質的顯著表現而促進。以 0.5% NaCl 處理時，明顯表現的 10 種蛋白質中，已確認 6 種的身份，而有 4 種尚無法確認其身份；另外，9 種受抑制的蛋白質中，則僅 2 種已確認身份，尚有 7 種無法確認。本研究證實，番茄的根在高鹽濃度中，有機酸及蛋白質的表現與無鹽或低鹽濃度是不同的，可做為改進鹽分地中作物栽培的參考。

參考文獻

1. 王百祿、楊柏椿、張王鑽、姚財寶. 1989. 海水倒灌蔗田土壤淋洗之研究。台灣糖業研究所研究彙報. 124:13-21.
2. 陳仁炫. 1993. 鹽害土壤的問題及其改良對策. 農業世界. 116:71-87.
3. Aihara, Y., R. Tabata, T. Suzuki., K. Shimazaki, and A. Nagatani. 2008. Molecular basis of the functional specificities of phototropin 1 and 2. Plant J. 56: 364-75.
4. Ansari, K. I., S. Walter, J. M. Brennan., M. Lemmens., S. Kessans., A. McGahern., D. Egan., and F. M Doohan. 2007. Retrotransposon and gene activation in wheat in response to mycotoxigenic and non-mycotoxigenic-associated Fusarium stress. Theor Appl Genet. 114: 927-937.
5. Beatty, P. H., A. K. Shrawat., R. T. Carroll., T. Zhu., A. G. Good. 2009. Transcriptome analysis of nitrogen-efficient rice over-expressing alanine aminotransferase. Plant Biotech. J. 7: 562-576.
6. Brownell, P. E. 1965. Sodium as an essential micronutrient for a hibber plant (*Atriplex vesicaria*). Plant Physiol. 40: 460-468.
7. Brownell, P. E., C. J. Crossland, 1972. The requirement for sodium as a micronutrient by species having C4 diacboxylic photosynthetic pathway. Plant Physiol. 49: 794-797.

8. Degenhardt, B., H. Gimmmler. 2000. Effect of alkaline and saline substrates on ABA contents, distribution and transport in plant roots. *Plant Soil*. 225:83-94.
9. Chen X., Y. Wang., J. Li., A. Jiang., Y. Cheng, and W. Zhang. 2009. Mitochondrial proteome during salt stress-induced programmed cell death in rice. *Plant Physiol Biochem*. 47: 407-415.
10. 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 species. *Plant Physiol*. 103:695-702.
11. Dhingra, H. R., T. M. Varghese. 1985. Effect of growth regulators on the in vitro germination and tube growth of maize(*Zea mays* L.) pollen from plants raised under sodium chloride salinity. *New Physiol*. 100:563-569.
12. Dracatos, P. M., N. O. Cogan., T. I. Sawbridge., A. R. Gendall., K. F. Smith., G. C. Spangenberg., J. W. Forster. 2009. Molecular characterisation and genetic mapping of candidate genes for qualitative disease resistance in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *BMC Plant Biol*. 9: 62.
13. Farina A., V. Rocchi., M. Janni., S. Benedettelli., G. De Lorenzo, and R. D'Ovidio. 2009. The bean polygalacturonase-inhibiting protein 2 (PvPGIP2) is highly conserved in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm and related species. *Theor Appl Genet*. 118: 1371-1379.
14. Galen C., J. J. Rabenold, E. Liscum. 2007. Light-sensing in roots. *Plant Signal Behav*. 2:106-108.
15. Gorg A., W. Postel., S. Gunther. 1988. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 9: 531-546.
16. Hanson, A. D., A. M. May. 2001. Localization in chloroplasts. *Pro Natl. Acad Sci*. 82: 3678.
17. Hemm, M. R., S. D. Rider., J. Ogas., D. J. Murry, and C. Chapple. 2004. Light induces phenylpropanoid metabolism in Arabidopsis roots. *Plant J*. 38:765-78.
18. Hubert, D. A., Y. He., B. C. McNulty., P. Tornero., J. L. Dangl. 2009. Specific Arabidopsis HSP90.2 alleles recapitulate RAR1 cochaperone function in plant NB-LRR disease resistance protein regulation. *Proc*

- Natl Acad Sci. 106: 9556-9563.
19. Jin, F., J., A. Cao, A., Kishita, H. Enomoto, And T, Moriya. 2008. Oxidation reaction of high molecular weight dicarboxylic acids in sub- and supercritical water. *J. Supercrit Fluids*. 44:331-340.
 20. Kalamaki, M. S., D. Alexandrou., D. Lazari., G. Merkouropoulos., V. Fotopoulos., I. Pateraki., A. Aggelis., A. Carrillo-López., M. J. Rubio-Cabetas, and A. K. Kanellis. 2009. Over-expression of a tomato N-acetyl-L-glutamate synthase gene (SINAGS1) in *Arabidopsis thaliana* results in high ornithine levels and increased tolerance in salt and drought stresses. *J Exp Bot*. 60:1859-1871.
 21. Katerji, N., J. W. van Hoorn., A. Hamdy., and M. Mastrorilli. 2001. Salt tolerance of crops according to three classification methods and examination of some hypothesis about salt tolerance. *Agricul. Water Management*. 47:1-8.
 22. Kavikishor, P. B. 1999. Salt stress in cultured rice cells: effect of praline and a abscisic acid . *Plant Cell Envi*. 12:629.
 23. Konish, S., S. Miyamoto and T. Taki. 1985. Stimulatory effect of aluminum on tea plants grown under low and high phosphorus supply. *Soil Sci. Plant Nutr*. 31:361-368.
 24. Larsen, P. B., J. Degenhardt, C. Y. Tai, L. M. Stenzler, S. H. Howell and L.V. Kochain. 1998. Aluminum-resistant *arabidopsis* mutants that exhibit altered patterns of aluminum accumulation and organic acid release from roots. *Plant Physiol*. 117:9-18.
 25. Le Van, H., T. Masuda. 2004. Physiology and biological studies on aluminum tolerance in pineapple. *Aust. J. Soil Res*. 42:699-707.
 26. Li, J, X. D. Wu., S. T. Hao., X. J. Wang., H. Q. Ling. 2008. Proteomic response to iron deficiency in tomato root. *Proteomics*. 8:2299-2311.
 27. Mandak, B., P. Pysek. 1999. Effects of plant density and nutrient levels on fruit polymorphism in *Artiplex Sagittata*. *Oecologia*. 119: 63-72.
 28. Mathew, S. J., D. Haubert., M. Krönke, and M. Leptin. 2009. Looking beyond death: a morphogenetic role for the TNF signalling pathway. *J Cell Sci*. 122:1939-1946.
 29. Rico-Cabanas, L. and J. A. Martínez-Izquierdo. 2007. CIRE1, a novel transcriptionally active Ty1-copia retrotransposon from *Citrus sinensis*. *Mol Genet Genomics*. 277:365-377.
 30. Ryan, P. R., E. Delhaize, and P. J. Randall. 1995a. Characterization of

- Alstimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. *Planta* 196, 103–110.
31. Sanchis, A., F. Botell., J. Costa., and F. Nuez. 1991. Relation between yield components and salinity tolerance in tomato. *Tomato Genetics and Cooperative*. 41:43.
 32. Santamaria, M., C. J. Thomson., N. D. Read, and G. J. Loake. 2001. The promoter of a basic PR1-like gene, AtPRB1, from *Arabidopsis* establishes an organ-specific expression pattern and responsiveness to ethylene and methyl jasmonate. *Plant Mol Biol*. 47:641-652.
 33. Singh, N. K., P. M. Haseguwa.1987. Protein associate with adaptation of cultured tobacco cells to NaCl. *Plant Physiol*. 79: 126-137.
 34. Szabolcs I. 1989. Salt-affected soils. Boca Raton: CRC press Inc.
 35. Tornero P., V. Conejero., P. Vera. 1996. Primary structure and expression of a pathogen-induced protease (PR-P69) in tomato plants: similarity of functional domains to subtilisin-like endoproteases. *Proc Natl Acad Sci* . 93:6332–6337.
 36. Tornero P., V. Conejero, and P. Vera. 1997. Identification of a new pathogen-induced member of the subtilisin-like processing protease family from plants. *J Biol Chem*. 272:14412 – 14419.
 37. Witzel, K., A.Weidner., G. K. Surabhi., A. Börner. And H. P. Mock. 2009. Salt stress-induced alterations in the root proteome of barley genotypes with contrasting response towards salinity. *J Exp Bot*. 60: 3545-3557.
 38. Walker, J. M., 2002. *The Protein Protocols Handbook*, Humana Press, Totowa.
 39. Wyn Jones, R. G.. and R. Storey. 1978. Salt stress and comparative physiology in the gramineae. II. Glycinebetaine and praline accumulation in two salt and water stressed barley cultivars. *Aust. J. Plant Physiol*. 5: 817-829.
 40. Yamashita, H., M. Tahara. 2006. A LINE-type retrotransposon active in meristem stem cells causes heritable transpositions in the sweet potato genome. *Plant Mol Biol*. 61:79-94.
 41. Zhou, S., R. Sauvé. and T. W. Thannhauser. 2009. Proteome changes induced by aluminium stress in tomato roots. *J Exp Bot*. 60:1849-1857.