

The proteomic study of the Ultraviolet-C irradiation effect for *Vigna radiata*

利用蛋白質體學方法研究 UV-C 照射對綠豆生長之影響

Yi-Shan Lu¹⁾ Ming-Hui Yang²⁾ Chi-Yu Lu³⁾ Wan-Chi Tsai⁴⁾

盧奕珊

楊明慧

呂濟宇

蔡婉琪

Yu-Chang Tyan⁵⁾ Yu-Ching Hsu⁶⁾ Ching-Wen Kuo⁶⁾ Yu-Chun Liu⁶⁾

田育彰

許幼青

郭淨紋

劉育君

Abstract

Ultraviolet-C (UV-C) is high-energy non-ionized radiation in solar. Plants can not avoid UV-C irradiation in the environment. In this study, the *Vigna radiata* was exposed to UV-C irradiation, and applied with exogenous Vitamin C. The concentrations of malondialdehyde, flavonoids and the DPPH radical scavenging activity were measured by ELISA. To enhance our understanding the of *Vigna radiata* proteome,

the proteins were analyzed using proteomic approaches followed by peptide fragmentation patterning. The experimental results showed that exogenous Vitamin C was induced the lateral root development. After exposure to UV-C irradiation, the concentration of malondialdehyde and the DPPH radical scavenging activity were down-regulated. The concentration of flavonoids was up-regulated. In this study, three proteins related to non-ionized radiation damage and five proteins related to apply exogenous

-
- 1) Undergraduate Student, Dept. of Medical Imaging and Radiological Sciences, Kaohsiung Medical University, Kaohsiung, Taiwan. 高雄醫學大學醫學影像暨放射科學系學生。
 - 2) Instrument Technology Research Center, National Applied Research Laboratories, Hsinchu, Taiwan. 國家實驗研究院儀器科技研究中心。
 - 3) Associate Professor, Dept. of Biochemistry, College of Medicine, Kaohsiung Medical University, Kaohsiung, Taiwan. 高雄醫學大學醫學系生物化學科副教授。
 - 4) Assistant Professor, Dept. of Medical Laboratory Science and Biotechnology, Kaohsiung Medical University, Kaohsiung, Taiwan. 高雄醫學大學醫學檢驗生物技術學系助理教授。
 - 5) Associate Professor, Dept. of Medical Imaging and Radiological Sciences, Kaohsiung Medical University, Kaohsiung, Taiwan, Corresponding author. yctyan@kmu.edu.tw
高雄醫學大學醫學影像暨放射科學系副教授，通訊作者。
 - 6) Office of Research and Development, Kaohsiung Medical University, Kaohsiung, Taiwan.
高雄醫學大學研究發展處。

Vitamin C were identified. Those proteins may affect the plant growth and development metabolism.

Key words: Proteomics, Ultraviolet-C, *Vigna radiata*

摘要

紫外光 (UV-C) 存在於太陽輻射中為高能量非游離輻射，為植物生長環境中不可避免之逆境。本研究以 UV-C 照射綠豆，並添加外源性抗氧化劑維他命 C，觀察 UV-C 照射之綠豆其植株生長情形、脂質過氧化、類黃酮化合物含量及自由基清除能力。利用蛋白質體學研究方法探討綠豆接受 UV-C 照射後其蛋白質變化情形，比對植物蛋白質序列資料庫後，發現 UV-C 照射傷害可能誘導不同蛋白質表現；以此探討非游離輻射傷害對植物蛋白質之影響。結果顯示 UV-C 照射種子其植株發育不佳、脂質過氧化情形較低、類黃酮化合物含量提高，自由基清除能力下降，添加外源性維他命 C 則可促進側根生成；由差異性蛋白質比較中發現 3 個與 UV-C 傷害相關蛋白質、5 個與添加外源性維他命 C 相關蛋白質，這些蛋白質可能參與植物生長發育調控與代謝並對抗 UV-C 對植物生長之影響。

關鍵詞：蛋白質體、紫外線、綠豆

前言

自然界中存在許多輻射，輻射分為游離輻射與非游離輻射，紫外光 (Ultraviolet-C, UV-C)

屬於非游離輻射，其與紅外光及可見光組成太陽輻射。紫外光佔太陽輻射中的 10%，又可依其波長細分為 UV-A (320~400 nm)、UV-B (280~320 nm) 及 UV-C (小於 280 nm)⁽¹⁷⁾。太陽輻射經由臭氧層的過濾到達地面，其中以 UV-A 含量最多，其次為 UV-B，UV-C 因其波長短僅在高山、極地等較特殊區域能被測量，一般於穿透臭氧層時被吸收而無法到達地面。然而近十年來由於臭氧層損耗擴大也使 UV-C 穿透到達地面的機率大增，2009 年 de Cárcer 等人在馬德里地區量測到低強度 UV-C，顯然 UV-C 已可穿透臭氧層到達地表⁽¹⁰⁾。近年來臭氧層越來越稀薄，使到達地面的紫外線增強對陸地的生態系造成影響，造成原本於臭氧層保護下的生物接受到更多的紫外光照射。

植物必須在固定地方生長因此無法避免自然環境所造成的傷害，紫外光激發水分子使植物產生擁有強氧化力之活性氧 (Reactive Oxygen Species; ROS)，ROS 會攻擊大分子物質，導致細胞成分嚴重損壞、DNA 損傷和突變，因而產生無法挽回的代謝紊亂和細胞死亡⁽²⁴⁾。為了繁衍後代延續生命植物必須抵抗不利於生長與繁衍的眾多因素。生長環境中非游離輻射紫外光增強，對植物細胞的核酸、蛋白質及脂質均有影響，植物體藉由誘導植物激素改變植物的生理狀況⁽²³⁾，抑制植物生長導致產量嚴重減少造成經濟上損失⁽¹³⁾。

維他命 C (Vitamin C) 又稱抗壞血酸 (Ascorbic acid; AsA) 為小分子水溶性維他命，是一種富含於植物中具有抗氧化作用的物質。植物會自行產生內源性維他命 C 來協助對抗於逆境中植物體內產生的 ROS，也影響植物細胞

週期和細胞伸長的重要因子⁽¹¹⁾。外源性維他命 C 可溶於水中藉由植物根部吸收，目前研究多於添加外源性維他命 C 可協助植物對抗鹽害及乾旱逆境情形^(4, 32)。

基因所表現的蛋白質扮演調控生物體中生理功能的重要角色，目前蛋白質體學為一種獲得生物資訊有效方法，應用蛋白質體研究探討植物於逆境中蛋白質的變化，比較紫外光 UV-B 照射對缺乏類黃酮化合物品種的影響，缺乏類黃酮化合物品種較易受紫外光傷害^(7, 45)。紫外光 UV-B 照射後大麥幼苗表皮組織中蛋白質組分析中，發現一些初級的應激反應、誘導逆境蛋白質產生及類黃酮化合物合成⁽²⁵⁾。先前研究中已提出運用二維電泳探討朝鮮薊接受紫外光 UV-C 照射後差異性蛋白質的調控變化⁽¹⁴⁾、分析水稻及甜菜在乾旱逆境下蛋白質調控情形^(9, 46)、分析鹽害情況下水稻根部及菸草蛋白質調控情形^(22, 38)及阿拉伯芥與水稻在寒害的情況下會分泌之差異性蛋白等^(5, 8)均有相關報導。

本實驗藉由蛋白質體學的方式探究植物接受紫外光 UV-C 照射後相關蛋白質。目前研究紫外光輻射照射對植物生長變化之影響主要為 UV-B 照射，因臭氧層越來越稀薄 UV-C 穿透越來越多且 UV-C 較 UV-B 有更大的能量能夠破壞化學鍵引起光化學反應。當植物接受 UV-C 照射後其反應尚不清楚，因此本研究目的為探討綠豆接受 UV-C 照射後蛋白質變化情形。

材料與方法

一、植物照射

挑選外表完整及大小相似之綠豆 (*Vigna*

radiata)。浸泡於二次蒸餾水中 12 小時使種皮破裂。採隨機分配種植於直徑 15 公分培養皿中，每日以二次蒸餾水維持生長所需水分。培養皿依據不同生長條件分為四組。第一組日光照射 9 小時作為正常組植株。第二組日光照射 9 小時每天添加 1 ml 濃度為 5 ng/ml 之維他命 C。第三組置入紫外光照射箱 (UVItec Limited CV 006 ; 25cm × 20cm) 使用紫外光 UV-C (UVItec Limited LF-204.LS. Lamp, 115V、60Hz、8W、254 nm, Cambridge, UK) 藉由定時器控制照射時間 9 小時。第四組置入紫外光照射箱使用 UV-C 照射 9 小時每天添加 1 ml 濃度為 5 ng/ml 之維他命 C。根據儀器公司提供距離 UV 燈管 15 cm 處其照射強度為 265 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 。每日紀錄植株高度且翻動綠豆使其均勻接受 UV-C 照射，控制組與實驗組三天後生長產生明顯差異時收集植物組織樣本，樣本保存於 -80 °C 冰箱。

二、樣本蛋白質萃取

取出保存於 -80 °C 冰箱之植物組織樣本置於研鉢中，以液態氮將 100 mg 植物組織研磨成細粉狀。使用蛋白質萃取液 A (M-PER[®] mammalian, Thermo Scientific, Rockford, IL USA) 及蛋白質萃取液 B (1% NP40 500 μl 、150 mM NaCl 0.44 g、50 mM Tris 0.31 g、50 ml 二次蒸餾水) 萃取蛋白質，並加入胛肽水解酵素抑制劑 (Complete[™] Mini; Roche, Laval, QC, Canada) 抑制水解酵素活性。使用超音波均質機破碎細胞，條件為 Strength 37%、Pluse 8 秒、Stop 2 秒、30 min。於 4 °C 冰箱中以震盪機 200 rpm 一晚，接著以 3000 rpm、4 °C 離心 10 min，取其上清液靜置於 4 °C 冰箱待其細胞碎片完全

沉澱後，抽出上清液通過孔徑為 0.8 nm 過濾膜後分裝保存於 -80°C 冰箱。

三、脂質過氧化測定

測定綠豆脂質過氧化產物丙二醛 (Malondialdehyde; MDA) 含量，採用 TBARS Assay kit (Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay Kit, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)。取 100 μ l 之各組植物組織萃取液與 100 μ l 的 SDS Solution 混和均勻，添加 4 ml Color Reagent 反應，持續煮沸 1 小時後置於冰上 10 分鐘終止反應，離心 1600 \times g 10 分鐘，靜置於室溫中 30 分鐘，以 ELISA Reader (MULTISKAN EX, Thermo, Germany) 波長條件為 520 nm 測量其吸光值。

四、類黃酮含量測定

測定植物組織萃取液內類黃酮 (Flavonoids) 含量，採用 AlCl₃ (Aluminum Chloride, 563919, Aldrich, Saint Louis, MO, USA) 與植物進行呈色反應，此反應物呈黃色在波長 450nm 有較大吸光值。取 2% (w/v) AlCl₃ 甲醇溶液 100 μ l 與植物樣本萃取液 100 μ l 反應 10 分鐘，以 ELISA reader 波長條件為 450 nm 測量其吸光值。其標準曲線採用 Rutin (Rutin trihydrate, 84082, Sigma, Saint Louis, MO, USA) 作為標準品，分別做 6.25、12.5、25、50、62.5、125、250 μ g/ml ($r^2 = 0.99$)⁽³⁵⁾。

五、DPPH 自由基清除率測定

測定植物組織萃取液之 DPPH 自由基清除率，採用新鮮配製 0.5 μ M DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, 44150-MD, Alfa Aesar, Lancashire, UK) 乙醇溶液。各組植物組織萃取液與 0.5 μ M DPPH 乙醇溶液於室溫下避光反應

30 分鐘，取乙醇作為對照組。以 ELISA reader 波長條件為 520 nm 測量其吸光值，實驗進行 5 重複。DPPH 自由基清除率以下列公式計算：

$$\text{DPPH 自由基清除率} = \left(1 - \frac{A_i}{A_0}\right) \times 100\%$$

A_i 是實驗組吸光值、A₀ 是對照組吸光值⁽⁴¹⁾。

六、蛋白質濃度測定

採用 Quant-iT™ 蛋白質定量分析 (Quant-iT™ Protein Assay Kit, Invitrogen, Grand Island, NY, USA) 測定樣本內蛋白質濃度，將 Quant-iT™ Reagent 與 Quant-iT™ Buffer 以 1:200 之比例稀釋成 Quant-iT™ Working Solution。標準溶液配製以 Working Solution 190 μ l 加入 Standard kit 各 10 μ l 配製為每管 200 μ l 之標準溶液；樣本溶液配製以 Working Solution 180-199 μ l 加入樣本溶液 1-20 μ l，每管樣本分析液容量為 200 μ l。室溫中靜置 15 分鐘後以二重複測定樣本蛋白質濃度。

七、蛋白質質譜分析

以 25 mM Ammonium bicarbonate (09830, Fluka, Saint Louis, MO, USA) 配製 1M Dithiothreitol (DTT, 70726, USB Corporation, Cleveland, OH, USA) 及 1 M Iodoacetamide (IAA, 19333-30-3, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) 備用。每組樣本中各取 100 μ l 至 1.5 ml 離心管中，各加入 10 μ l 1 M DTT 在 37 °C 水浴中混合作用三小時，再加入 25 μ l 1 M IAA 於室溫下避光反應 30 分鐘，接著進行胰蛋白酶水解作用加入 0.1 μ g/ μ l 胰蛋白酶 (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, V5280, Promega, Madison, WI, USA) 在 37 °C 水浴中作用 12 個小時以上，隨後加入 2 μ l 甲

酸 (Formic Acid) 終止胰蛋白酶水解作用。

本實驗使用液相層析串聯式質譜儀 (RP-nano-UPLC-ESI-MS/MS) 做蛋白質胜肽的分析，胺基酸片段經由 nano-UPLC System 搭配 Ion Trap Mass Spectrometer (LTQ Orbitrap Discovery Hybrid FTMS, Thermo, Germany) 使用 400 nL/min 流速做分離，2 μ L 的胜肽溶液加入備製管柱 (Symmetry C18, 5 μ m, 180 μ m \times 20 mm)，移動相為一個線性梯度從 99% 的 Buffer A (100% D.I. Water/0.1% Formic Acid) 至 85% 的 Buffer B (100% Acetonitrile/0.1% formic acid) 以 400 nL/min 的流速持續 100 分鐘，樣本經由 C18 Microcapillary Column (BEH C18, 1.7 μ m, 75 μ m \times 100 mm) 微細管柱分離，分離後的胜肽經由 2.1 kV 電噴灑游離進入 ESI-MS/MS。串聯式質譜儀碰撞能量設定於 35 %，全掃描質量範圍定於 400-2000 M/Z 執行四次子離子掃描。

八、資料庫數據檢索

將串聯式質譜儀 (LC/MS/MS) 所得之數據資料，利用 Mascot 分析軟體 (Matrix Science, Version 2.2.1, London, UK) 比對植物蛋白質序列資料庫 (Swiss-Port)，不同的蛋白質經過水解後會產生其獨特的胜肽片段，本研究使用胰蛋白酶切割蛋白質 Arginine (R) 及 Lysine (K) 的 C 端，比對資料庫中已知序列蛋白質經由蛋白酶水解後產生的胜肽質量鑑定其蛋白質身份，並比較控制組與實驗組其差異選擇出特异性蛋白質。

UniProt 資料庫整合 Swiss-Prot、TrEMBL 和 PIR-PSD 三大數據庫的數據而成。於 UniProt 網站 (UniversalProtein, <http://www.uniprot.org/>)

搜尋特异性蛋白質，利用 Protein knowledgebase (UniProtKB) 取得特异性蛋白質的生物功能、亞細胞定位、分子功能等信息⁽³⁹⁾。

九、統計方法

實驗數據統計分析採用 t 檢定，當 P 值小於 0.05 則認定為有顯著差異。

結果與討論

一、植物生長情形

觀察綠豆接受不同照射及處理後其形態變化，其中第二、四組有明顯的側根生長。綠豆種植後即接受 UV-C 照射，隔日即為量測日第一日，從綠豆植株生長長度趨勢發現，第一組植株生長速度較為快速，第二日已較其他組有明顯增長其植株長度為 3.24 \pm 0.38 公分至第三日植株長度可達 3.5 \pm 0.3 公分，但其個體間生長差異較大。第二組生長情形較第一組緩慢至第三日植株長度為 2.46 \pm 0.17 公分。第三、四組生長趨勢均緩慢且生長趨勢平緩，第三日植株長度分別為 2.01 \pm 0.12 公分及 2.155 \pm 0.13 公分如圖 1。本實驗中植株高度顯示 UV-C 抑制植物生長，添加外源性維他命 C 之組別在綠豆根部處可觀察到側根明顯生長，植物生長期間添加外源性維他命 C 會使得側根發育良好增加植物根部表面積。當植物接受非生物性脅迫時為彌補生長發育受不理想條件之影響，藉由側根發育增加根部表面積，攝取足夠植物生長之水分及養份⁽³⁶⁾。而 UV-C 照射且添加維他命 C 組也略高於 UV-C 照射組，顯示植物生長階段添加外源性維他命 C 會使自由基清除率增加，因此添加外源性維他命 C 可提高植物抗氧化能力，且促使植物側根成長。

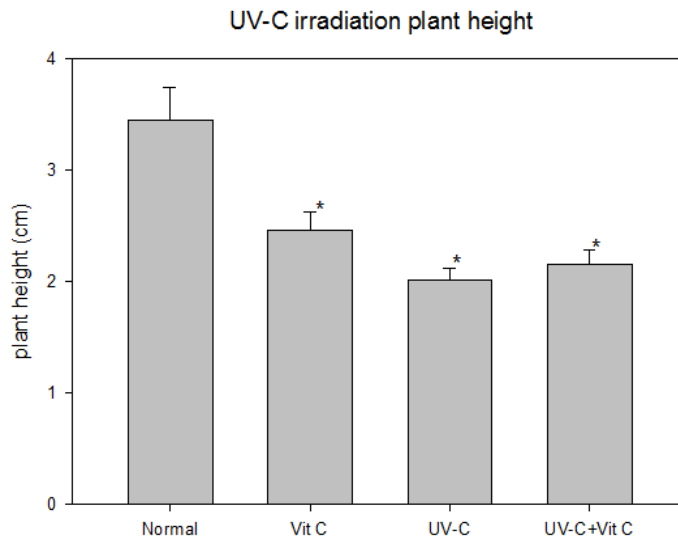


圖 1. 綠豆照射後三天植株生長高度。維他命 C 添加組、UV-C 照射組及 UV-C 照射+維他命 C 組均與正常組植株在生長方面有顯著差異。*代表有顯著差異 P < 0.05。

Fig. 1. The heights of *Vigna radiata* with/without UV-C irradiation after three days. Compared with the control group, the plant heights showed significant differences after vitamin C addition, UV-C irradiation only and UV-C irradiation with added vitamin C. * Represents a significant difference P < 0.05.

二、脂質過氧化含量、類黃酮化合物含量及自由基清除率

脂質過氧化形成原因眾多，一般認為是當植物受到非生物性的脅迫時所導致。脂質過氧化產物為丙二醛 (MDA)，測定植物中丙二醛含量即可表示植物中脂質過氧化程度。實驗結果顯示丙二醛含量第二組較第一組略低、第四組高於第三組，推測可能原因是 UV-C 過度照射抑制了 MDA 的生成，而維他命 C 又提供抗氧化能力對抗 UV-C 因此造成第四組 MDA 上升(表 1)。類黃酮化合物是高等植物的次級代謝產物，類黃酮化合物含量第一組 138.5±1.32 µg/ml；

第二組 159.9±2.86 µg/ml；第三組 185.3±2.8 µg/ml；第四組 178.9±2.3 µg/ml，在第二至四組類黃酮化合物均為提高，當植物內類黃酮化合物含量提高其抗氧化能力便會增加⁽³⁷⁾，此抗氧化力可能來自於添加的維他命 C (第二組)或是植物自體抗氧化抵抗 UV-C 而生(第三組)。DPPH 自由基清除率測定，第一組 55.2±1.2%；第二組 56.3±0.3%；第三組 46.5±1.6%；第四組 49.3±1.8%。實驗結果顯示在 UV-C 照射下自由基清除率會比較差，可能的原因是 UV-C 造成高濃度自由基，因此植物自體來不及清除所造成。

表 1. 綠豆接受不同處理後丙二醛含量、類黃酮化合物含量及自由基清除率。

Table 1. The concentrations of malondialdehyde, flavonoids and the DPPH radical scavenging activity of *Vigna radiata* with different treatment were measured by ELISA.

	第一組	第二組	第三組	第四組
	正常組	添加外源性維他命 C 組	UV-C 照射組	UV-C 照射 + 維他命 C 組
丙二醛含量 (μ mole)	25.8±0.59	25.2±0.99	8.9±0.25*	14±2.6*
類黃酮化合物含量 (μ g/ml)	138.5±1.32	159.9±2.86*	185.3±2.8*	178.9±2.3*
自由基清除率 (%)	55.2±1.2	56.3±0.3	46.5±1.6*	49.3±1.8*

*代表顯著差異 $P < 0.05$

以脂質過氧化含量、類黃酮化合物含量及自由基清除率方面探討添加外源性維他命 C 及 UV-C 照射對植物之影響。植物細胞膜主要由磷脂質與醣脂質構成含有不飽和脂肪酸，接受 UV 光照射後產生氧化作用會破壞脂肪酸結構造成脂質過氧化⁽²³⁾產生丙二醛，先前文獻中提出當植物接受 UV-B 波長照射後脂質過氧化程度會提高⁽²⁸⁾。在 UV-C 照射結果中發現第三組丙二醛含量及自由基清除率低於第四組、而類黃酮化合物含量第三組高於第四組，有文獻指出豌豆在 UV-C 照射後，內源性多胺類濃度增加使細胞膜穩定，減少細胞膜的損傷⁽²⁶⁾且能清除自由基減少脂質過氧化程度⁽⁴⁷⁾，因而當植物接受 UV-C 照射後丙二醛含量較第一組少。類黃酮化合物為植物體內吸收紫外光之化合物，文獻中提出當植物接受紫外線照射後其體內類黃酮含量上升^(20,44)。本研究中 UV-C 照射組類黃酮含量較高而自由基清除率卻低於 UV-C 照射添加維他命 C 組，推測為內源性維他命 C 減少，文獻中曾提出經由 UV-C 照射新鮮芒果，其維他命 C 及 β -胡蘿蔔素減少導致自由基清除率較低⁽²¹⁾及照射生長中的豌豆其維他命 C 含

量也顯著減少，因 UV-C 照射逆境下植物為抵抗紫外線，主要致力於合成類黃酮化合物等二次代謝物，而減少合成內源性維他命 C⁽³¹⁾。

維他命 C 屬水溶性抗氧化物，添加外源性維他命 C 組別之自由基清除率略高於正常組，文獻指出添加外源性維他命 C 使得自由基清除率上升⁽⁶⁾，係利用其分子上的 OH· 和自由基作用，OH· 會釋放出一個 H^+ 及一個電子，自由基得到電子後成為較穩定的化合物，若外源性維他命 C 濃度過高會將 Fe^{3+} 還原成 Fe^{2+} ，反而造成過多 OH· 產生⁽¹⁵⁾。實驗結果中第二組之自由基清除率略高於第一組，而第四組也略高於第三組，顯示植物生長階段添加外源性維他命 C 有助於增加自由基清除率。

三、蛋白質濃度測定與質譜分析

各組蛋白質濃度測定如下：第一組 0.362 μ g/ μ l；第二組 0.377 μ g/ μ l；第三組 0.421 μ g/ μ l；第四組 0.412 μ g/ μ l。蛋白質經質譜分析後，利用 Mascot 軟體資料比對分析，第一組共發現 148 個蛋白質其中有 22 個為高特异性蛋白，第二組共發現 129 個蛋白質其中有 25 個為高特异性蛋白，第三組共發現 123 個蛋白質其中有

17 個為高特異性蛋白，第四組共發現 77 個蛋白質其中有 19 個為高特異性蛋白，接著將高特異性蛋白質交互比對尋找相關性蛋白質，UV-C 照射相關蛋白質有 3 個，如表 2；添加外源性維他命 C 相關蛋白質有 5 個，如表 3。

蛋白質質譜分析中發現高特異性蛋白中 DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 9、Water stress-inducible protein Rab21 及 Floral homeotic protein AGAMOUS 僅出現於接受 UV-C 照射之組別。

DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 9 為乾旱、寒害及鹽害逆境相關蛋白質⁽²⁷⁾，推測 UV-C 照對植物來為一種相似之非生物性逆境，誘發與逆境相關之蛋白質，文獻中指出植物反應乾旱逆境時亦能發揮保護植物免於紫外光傷害⁽³⁾。Water stress-inducible protein Rab21 為一

反應水分對植物刺激之蛋白質⁽³⁴⁾，當植物在正常萌發的條件下此蛋白質會磷酸化並降解⁽¹⁶⁾，本研究中 UV-C 照射之植物蛋白質分析中發現，顯示此蛋白質並未正常磷酸化並降解，可能導致 UV-C 照射之植物生長發育緩慢原因之一。Phosphopantetheine adenyltransferase 雖非高特性蛋白，但其與 Coenzyme A (CoA) 合成相關，CoA 是植物許多生物合成、生物降解、能量代謝重要的因子，此蛋白質在 UV-C 照射後呈上調節，增加 4'-phosphopantothenate 產生 Dephospho-CoA (dPCoA) 及 Pyrophosphate，當植物中增加此蛋白質有助於植物對抗逆境⁽³⁷⁾。

第三、四組均出現 Floral homeotic protein AGAMOUS，為一控制植物雌蕊及雄蕊的發展、細胞分化、葉子的發育之蛋白質^(12,19)，文獻中植物照射 UV-C 較未照射開花時間提早

表 2. 紫外線 UV-C 相關蛋白質胜肽序列。

Table 2. The three unique proteins identified by the higher confidence level (at least three unique peptide sequences matched) with significant difference between UV-C irradiation and control group in this study.

Title	No	Name	MW (KDa)	Score	Queries	PI	Sequence	Peptide
1	Q9LUW6	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 9	63570	25	4	9.44	11%	R.SSFGGFGSNDGK.R+Deamidated(NQ); Phospho(ST) K.SLPSNSSPFGVKVR.D R.SGGGGYGSYGSSSGR.S+3Phospho(ST); 2Phospho(Y) R.SGGGSYGGYGGSSGRSGGGGGSYGGSSSR.Y+5Phospho(ST); 2Phospho(Y)
2	A2ZDX9	Water stress-inducible protein Rab21	17315	22	4	9.19	38%	R.SGSSSSSEDDGMGGR.R+3Phospho(ST) K.TGGVLQRSGSSSSSEDDGMGGR.R+Deamidated(NQ); Oxidation(M); 6 Phospho(ST) K.GEQQHAMGGTGGAYGQQGHGTGMTTGTGAHGTTT TDTGEK.K+4Deamidated(NQ); Oxidation(M); 10Phospho(ST) K.GEQQHAMGGTGGAYGQQGHGTGMTTGTGAHGTTT TDTGEKK.G+2Deamidated(NQ); Oxidation(M); 9Phospho(ST); Phospho(Y)
3	Q40168	Floral homeotic protein AGAMOUS	28706	19	3	9.53	19%	K.IEKGISKIR.A K.RIENTTNRQVTFCK.R+Carboxymethyl(C); Deamidated(NQ); Phospho(ST) R.NMLGESLAALSLR.D+Deamidated(NQ); Phospho(ST)

表 3. 維他命 C 相關蛋白質胜肽序列。

Table 3. The five unique proteins identified by the higher confidence level (at least three unique peptide sequences matched) with significant difference between added exogenous Vitamin C and control group in this study.

Title	No	Name	MW (KDa)	Score	Queries	PI	Sequence	Peptide
1	O22131	LOB domain-containing protein 18	27201	34	6	8.20	34%	- <u>M</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>P</u> G <u>A</u> <u>C</u> <u>K</u> .F+Carboxymethyl(C); Deamidated(NQ); Oxidation(M); 2 Phospho(ST) M. <u>S</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>P</u> G <u>A</u> <u>C</u> <u>K</u> .F+2 Carboxymethyl(C); 4 Phospho(ST) - <u>M</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>P</u> G <u>A</u> <u>C</u> <u>K</u> .F + Carboxymethyl(C); Deamidated(NQ); Oxidation(M); 3 Phospho(ST) - <u>M</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>P</u> G <u>A</u> <u>C</u> <u>K</u> .F+Carboxymethyl(C); Deamidated(NQ); 5 Phospho(ST) - <u>M</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>P</u> G <u>A</u> <u>C</u> <u>K</u> .F+Carboxymethyl(C); Oxidation(M); 7 Phospho(ST) - <u>M</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>P</u> G <u>A</u> <u>C</u> <u>K</u> FLR.R + Carboxymethyl(C); 2 Phospho (T) R.NGMRVVIELKR.G+Oxidation(M) R.FPLTDPLCRLRR.T - <u>M</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>C</u> <u>H</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>P</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>R</u> .L+2 Deamidated(NQ); Oxidation(M); 6 Phospho(ST)
2	Q9CAF6	Probable DNA gyrase subunit A	104472	28	3	6.47	5%	R.NGMRVVIELKR.G+Oxidation(M) R.FPLTDPLCRLRR.T - <u>M</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>C</u> <u>H</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>P</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>R</u> .L+2 Deamidated(NQ); Oxidation(M); 6 Phospho(ST)
3	P08927	RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta, chloroplastic	62945	32	3	5.85	8%	K.LVRQAAAK.T+Deamidated(NQ) K.LIAK <u>N</u> AGVNGSVVSEK.V+2 Deamidated(NQ); Phospho(ST) M.ASTFSATTSNCNLSSAAISSFPLAAGK.R+Carboxymethyl(C); 7 Phospho(ST)
4	P43401	EC protein homolog	7700	20	12	7.37	53%	R.A <u>N</u> C <u>S</u> C <u>G</u> A <u>S</u> C <u>N</u> C <u>A</u> S <u>C</u> A <u>S</u> A.-+Carboxymethyl(C); 2Deamidated(NQ); Phospho(ST) R.A <u>N</u> C <u>S</u> C <u>G</u> A <u>S</u> C <u>N</u> C <u>A</u> S <u>C</u> A <u>S</u> A.-+2Deamidated(NQ); 2 Phospho(ST) R.RA <u>N</u> C <u>S</u> C <u>G</u> A <u>S</u> C <u>N</u> C <u>A</u> S <u>C</u> A <u>S</u> A.-+2Carboxymethyl(C) R.A <u>N</u> C <u>S</u> C <u>G</u> A <u>S</u> C <u>N</u> C <u>A</u> S <u>C</u> A <u>S</u> A.-+4Carboxymethyl(C); Phospho(ST) R.A <u>N</u> C <u>S</u> C <u>G</u> A <u>S</u> C <u>N</u> C <u>A</u> S <u>C</u> A <u>S</u> A.-+3Carboxymethyl(C); Deamidated(NQ); 2 Phospho(ST) R.A <u>N</u> C <u>S</u> C <u>G</u> A <u>S</u> C <u>N</u> C <u>A</u> S <u>C</u> A <u>S</u> A.-+5Carboxymethyl(C); 2Deamidated(NQ); Phospho(ST) R.RA <u>N</u> C <u>S</u> C <u>G</u> A <u>S</u> C <u>N</u> C <u>A</u> S <u>C</u> A <u>S</u> A.-+3Carboxymethyl(C); Phospho(ST) R.RA <u>N</u> C <u>S</u> C <u>G</u> A <u>S</u> C <u>N</u> C <u>A</u> S <u>C</u> A <u>S</u> A.-+3Carboxymethyl(C); Phospho(ST) R.RA <u>N</u> C <u>S</u> C <u>G</u> A <u>S</u> C <u>N</u> C <u>A</u> S <u>C</u> A <u>S</u> A.-+2Carboxymethyl(C); Deamidated(NQ); 2 Phospho(ST) R.A <u>N</u> C <u>S</u> C <u>G</u> A <u>S</u> C <u>N</u> C <u>A</u> S <u>C</u> A <u>S</u> A.-+4Carboxymethyl(C); 3Phospho(ST) R.ENRRANCSGASCNCA <u>S</u> A <u>S</u> A.-+Carboxymethyl(C); 3Phospho(ST) R.EHTTCGGEHCES <u>P</u> CTCGR.A+3Carboxymethyl(C); 4Phospho(ST) R.CSDMRLNSCHSACK.S+Deamidated(NQ); Oxidation(M); 2Phospho(ST) K.VCLVLLFLVGGTTSANLR.L+Deamidated(NQ); Phospho(ST) K.SNPPQCRCSMDRLNSCHSACK.S+3Carboxymethyl(C); Oxidation(M); 2Phospho(ST) - <u>M</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>C</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>K</u> .L K.SDHQHSNDDESSKPCDCQCACTKSNPPQCRCSMDR.L+3 Carboxymethyl(C); 3Deamidated(NQ); Oxidation(M); 2Phospho(ST)
5	P01055	Bowman-Birk type proteinase inhibitor	12083	37	5	5.82	63%	R.CSDMRLNSCHSACK.S+Deamidated(NQ); Oxidation(M); 2Phospho(ST) K.VCLVLLFLVGGTTSANLR.L+Deamidated(NQ); Phospho(ST) K.SNPPQCRCSMDRLNSCHSACK.S+3Carboxymethyl(C); Oxidation(M); 2Phospho(ST) - <u>M</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>C</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>K</u> .L K.SDHQHSNDDESSKPCDCQCACTKSNPPQCRCSMDR.L+3 Carboxymethyl(C); 3Deamidated(NQ); Oxidation(M); 2Phospho(ST)

(33) . 本研究綠豆僅種植三天即停止生長並未種植至開花，但其蛋白質分析中發現此蛋白質是與花器官早期發展之轉錄因子相關且涉及控制花器官特徵，顯示 UV-C 刺激下誘發植物提早開花，並可能為植物在逆境下為延續後代必須提早開花結果。

第二、四組中鑑定出 LOB domain-containing protein 18、RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta、Bowman-Birk type proteinase inhibitor、EC protein homolog 及 Probable DNA gyrase subunit A 蛋白質。LOBD (Lateral Organ Boundaries Domain) 基因家族為植物特有基因，調節側邊的分生組織發展並參與調節花青素與氮代謝 (41)。LOBD 蛋白質參與胚、根、葉及花的發育多與側根生長與發育相關 (17)，第二、四組側根發育良好，蛋白質質譜分析中 LOB domain-containing protein 18 呈上調節，推測在正常情況下添加外源性維他命 C 於供給綠豆的水分中會誘發綠豆側根生長之蛋白質。Probable DNA gyrase subunit A 此蛋白酶與 DNA 拓撲異構酶之 ATP 水解活動有相關性，DNA 拓撲異構酶主要作用為使 DNA 拓撲結構展開有利於細胞進行 DNA 複製，由此推測添加外源性維他命 C 或可刺激 DNA 進行複製促進植物生長發育 (42)。Bowman-Birk type proteinase inhibitor 為發展中種子及植物受傷組織中常見的蛋白酶，植物於非生物性逆境的情況下會誘發此蛋白質保護植物，主要能調控種子發芽與休眠過程、保護植物免於輻射線傷害、參與細胞死亡過程及防禦草食動物、病原體和昆蟲 (40)。RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta 存在於葉綠體中為一種伴護蛋白

(Chaperone) 屬修復蛋白質，其功能為協助其他蛋白質正確折疊、協助蛋白質產生正確構形、導正蛋白質錯誤摺疊，可協助逆境中植物的生長與發育，於臭氧的刺激下黃豆葉子之蛋白質 (1)、鹽害逆境下黃豆蛋白質 (2) 與在熱刺激及乾旱的逆境下小麥蛋白質 (29) 分析中均呈上調節。本研究中添加外源維他命 C 可能造成水分滲透壓力不同，形成滲透逆境誘發此種逆境蛋白質適應滲透壓力 (44)。EC protein homolog 其半胱胺酸序列分布能夠結合豐富的鋅，可由脫落酸 (Abscisic acid ; ABA) 誘導產生，運輸供胚胎發育及萌芽過程所需鋅離子至新生蛋白質中，協助植物萌芽與發育 (30) 此蛋白質於第二組中呈上調節，卻未出現於第四組中，推測與外源性維他命 C 濃度有相關性。添加外源性維他命 C 濃度過高時會將 Fe^{3+} 還原成 Fe^{2+} 產生過多 OH· 自由基 (45)，自由基增加造成植物逆境壓力，因而產生 EC protein homolog 協助植物生長。而 UV-C 照射會降低植物自行合成維他命 C 濃度 (29)，UV-C 照射中添加外源性維他命 C 可補充 UV-C 照射減少之維他命 C 含量，使植物與正常發育情形較接近，所以未出現此蛋白。

結論

植物種子經由 UV-C 照射後之蛋白質變化仍少有研究，本次研究中以串聯式質譜儀 (LC/MS/MS) 所得之數據資料，利用 Mascot 分析軟體比對植物蛋白質序列資料庫 (Swiss-Port)，發現植物產生許多相應蛋白質以對抗 UV-C 照射所造成不利生長之逆境，大多為與植物生長發育受阻相關蛋白質，但許多植物蛋白質功能仍未清楚了解其作用機制尚待更多的

研究探討。

謝誌

本研究感謝國科會與中山高醫跨校研究中心提供研究經費。

參考文獻

1. Ahsan, N., Y. Nanjo, H. Sawada, Y. Kohno and S. Komatsu. 2010. Ozone stress-induced proteomic changes in leaf total soluble and chloroplast proteins of soybean reveal that carbon allocation is involved in adaptation in the early developmental stage. *Proteomics* 10(14): 2605-2619.
2. Alam, I., S. A. Sharmin, K. H. Kim, Y. G. Kim, J. J. Lee, J. D. Bahk and B. H. Lee. 2011. Comparative proteomic approach to identify proteins involved in flooding combined with salinity stress in soybean. *Plant soil*. 346(1-2): 45-62.
3. Alexieva, V., I. Sergiev, S. Mapelli and E. Karanov. 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell Environ*. 24(12): 1337-1344.
4. Athar, H.-u.-R., A. Khan and M. Ashraf. 2008. Exogenously applied ascorbic acid alleviates salt-induced oxidative stress in wheat. *Environ. Exp. Bot*. 63(1-3): 224-231.
5. Bae, M. S., E. J. Cho, E. Y. Choi and O. K. Park. 2003. Analysis of the Arabidopsis nuclear proteome and its response to cold stress. *Plant J*. 36(5): 652-663.
6. Burguieres, E., P. McCue, Y. I. Kwon and K. Shetty. 2007. Effect of vitamin C and folic acid on seed vigour response and phenolic-linked antioxidant activity. *Bioresour. Technol*. 98(7): 1393-1404.
7. Casati, P., X. Zhang, A. L. Burlingame and V. Walbot. 2005. Analysis of leaf proteome after UV-B irradiation in maize lines differing in sensitivity. *Mol. Cell Proteomics* 4: 1673-1685.
8. Cui, S., F. Huang, J. Wang, X. Ma, Y. Cheng and J. Liu. 2005. A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. *Proteomics* 5(12): 3162-3172.
9. Dani, V., W. J. Simon, M. Duranti and R. R. Croy. 2005. Changes in the tobacco leaf apoplast proteome in response to salt stress. *Proteomics* 5(3): 737-745.
10. de Cárcer, I. A., H. Dántoni, M. Barboza-Flores, V. Correcher and F. Jaque. 2009. KCl: Eu²⁺ as a solar UV-C radiation dosimeter. Optically stimulated luminescence and thermoluminescence analyses. *J. Rare Earth* 27(4): 579-583.
11. Dehghan, G., L. Rezazadeh and G. Habibi. 2011. Exogenous ascorbate improves antioxidant defense system and induces salinity tolerance in soybean seedlings. *Acta Biologica Szegediensis* 55(2): 261-264.
12. Doyle, M. R. and R. M. Amasino. 2009. A single amino acid change in the enhancer of

- zeste ortholog CURLY LEAF results in vernalization-independent, rapid flowering in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 151(3): 1688-1697.
13. Du, H., Y. Liang, K. Pei and K. Ma. 2011. UV radiation-responsive proteins in rice leaves: a proteomic analysis. *Plant Cell Physiol.* 52(2): 306-316.
 14. Falvo, S., M. Di Carli, A. Desiderio, E. Benvenuto, A. Moglia, T. America, S. Lanteri and A. Acquadro. 2012. 2 - D DIGE analysis of UV - C radiation - responsive proteins in globe artichoke leaves. *Proteomics* 12(3): 448-460.
 15. Fang, Y. Z., S. Yang and G. Wu. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18(10): 872-879.
 16. Farinha, A. P., S. Irar, E. de Oliveira, M. M. Oliveira and M. Pagès. 2011. Novel clues on abiotic stress tolerance emerge from embryo proteome analyses of rice varieties with contrasting stress adaptation. *Proteomics* 11(2): 2389-2405.
 17. Frohnmeyer H and D. Staiger. 2003. Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. *Plant Physiol.* 133: 1420-1428.
 18. Feng, Z., J. Zhu, X. Du and X. Cui. 2012. Effects of three auxin-inducible LBD members on lateral root formation in Arabidopsis thaliana. *Planta* 236(4): 1227-1237.
 19. Gómez-Mena, C., S. de Folter, M. M. Costa, G. C. Angenent and R. Sablowski. 2005. Transcriptional program controlled by the floral homeotic gene AGAMOUS during early organogenesis. *Development* 132(3): 429-438.
 20. Germ, M., V. Stibilj, S. Kreft, A. Gaberščik and I. Kreft. 2010. Flavonoid, tannin and hypericin concentrations in the leaves of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) are affected by UV-B radiation levels. *Food Chem.* 122(3): 471-474.
 21. González - Aguilar, G. A., M. A. Villegas - Ochoa, M. Martínez-Téllez, A. Gardea and J. F. Ayala - Zavala. 2007. Improving Antioxidant Capacity of Fresh-Cut Mangoes Treated with UV-C. *J Food Sci.* 72(3): S197-202.
 22. Hajheidari, M., M. Abdollahian-Noghabi, H. Askari, M. Heidari, S. Y. Sadeghian, E. S. Ober and G. Hosseini Salekdeh. 2005. Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. *Proteomics* 5(4): 950-960.
 23. Hollosy, F. 2002. Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron* 33(2): 179-197.
 24. Karuppanandian, T., J. C. Moon, C. Kim, K. Manoharan and W. Kim. 2011. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Aust. J. Crop. Sci.* 5: 709-725.
 25. Kaspar, S., A. Matros and H. P. Mock. 2010. Proteome and Flavonoid Analysis Reveals

- Distinct Responses of Epidermal Tissue and Whole Leaves upon UV-B Radiation of Barley (*Hordeum vulgare* L.) Seedlings. *J. Proteome Res.* 9(5): 2402-2411.
26. Katerova, Z. I., and D. Todorova. 2009. Endogenous polyamines lessen membrane damages in pea plants provoked by enhanced ultraviolet-C radiation. *Plant Growth Regul.* 57(2): 145-152.
27. Kim, J. S., K. A. Kim, T. R. Oh, C. M. Park and H. Kang. 2008. Functional characterization of DEAD-box RNA helicases in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. *Plant Cell Physiol.* 49(10): 1563-1571.
28. Kramer G. F., H. A. Normana, D. T. Krizek and R. M. Mirecki. 1991. Influence of UV-B radiation on polyamines, lipid peroxidation and membrane lipids in cucumber. *Phytochemistry* 30(7): 2101-2108.
29. Laino, P., D. Shelton, C. Finnie, A. M. De Leonardis, A. M. Mastrangelo, B. Svensson, D., Lafiandra and S. Masci. 2010. Comparative proteome analysis of metabolic proteins from seeds of durum wheat (cv. Svevo) subjected to heat stress. *Proteomics* 10(12): 2359-2368.
30. Leszczyszyn, O. I., R. Schmid and C. A. Blindauer. 2007. Toward a property/function relationship for metallothioneins: Histidine coordination and unusual cluster composition in a zinc - metallothionein from plants. *Proteins* 68(4): 922-935.
31. Liu, W. and Q. Yang. 2012. Effects of Supplemental UV-A and UV-C Irradiation on Growth, Photosynthetic Pigments and Nutritional Quality of Pea Seedlings. *Acta Hort.* 956: 657-663.
32. Majer, C. and F. Hochholding. 2011. Defining the boundaries: structure and function of LOB domain proteins. *Trends Plant Sci.* 16(1): 47-52.
33. Martínez, C., E. Pons, G. Prats and J. León. 2004. Salicylic acid regulates flowering time and links defence responses and reproductive development. *Plant J.* 37(2): 209-217.
34. Mundy, J. and N. H. Chua. 1988. Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO J.* 7(8): 2279-2286.
35. Nickavar, B. and N. Esbati. 2012. Evaluation of the antioxidant capacity and phenolic content of three *Thymus* Species. *J Acupunct. Meridian Stud.* 5(3): 119-125.
36. Olmos, E., G. Kiddle, T. Pellny, S. Kumar and C. Foyer. 2006. Modulation of plant morphology, root architecture, and cell structure by low vitamin C in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 57(8): 1645-1655.
37. Rubio, S., L. Whitehead, T.R. Larson, I.A. Graham and P. L. Rodriguez. 2008. The coenzyme A biosynthetic enzyme phosphopantetheine adenyltransferase plays a crucial role in plant growth, salt/osmotic

- stress resistance, and seed lipid storage. *Plant physiol.* 148(1): 546-556.
38. Salekdeh, G. H., J. Siopongco, L. J. Wade, B. Ghareyazie and J. Bennett. 2002. Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics* 2(9): 1131-1145.
39. Schneider, M., M. Tognolli and A. Bairoch. 2004. The Swiss-Prot protein knowledgebase and ExPASy: providing the plant community with high quality proteomic data and tools. *Plant Physiol. Biochem.* 42(12): 1013-1021.
40. Shan, L., C. Li, F. Chen, S. Zhao and G. Xia. 2008. A Bowman - Birk type protease inhibitor is involved in the tolerance to salt stress in wheat. *Plant Cell Environ.* 31(8): 1128-1137.
41. Sharma, S. K. and A. P. Singh. 2012. In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of *Nardostachys jatamansi* DC. *J Acupunct. Meridian Stud.* 5(3): 112-118.
42. Shuai B., C. G. Reynaga-Peña and P. S. Springer. 2002. The lateral organ boundaries gene defines a novel, plant-specific gene family. *Plant Physiol.* 129(2): 747-761.
43. Wang, J. C. 1996. DNA topoisomerases. *Annu Rev. Biochem.* 65:635-692.
44. Winkel-Shirley, B. 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin. Plant Biol.* 5(3): 218-223.
45. Xu, C., J. H. Sullivan, W. M. Garrett, T. J. Caperna and S. Natarajan. 2008. Impact of solar ultraviolet-B on the proteome in soybean lines differing in flavonoid contents. *Phytochemistry* 69(1): 38-48.
46. Yan, S., Z. Tang, W. Su and W. Sun. 2005. Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. *Proteomics* 5(1): 235-244.
47. Zacchini, M. and M. de Agazio. 2004. Spread of oxidative damage and antioxidative response through cell layers of tobacco callus after UV-C treatment. *Plant Physiol. Biochem.* 42(5): 445-450.
48. Zhou, G., L. T. Yang, Y. R. Li, C. L. Zou, L. P. Huang, L. H. Qiu, X. Huang and M. K. Srivastava. 2012. Proteomic analysis of osmotic stress-responsive proteins in sugarcane leaves. *Plant Mol. Biol. Rep.* 30(2): 349-359.

Received: December 31, 2012.

Accepted: February 19, 2013.