

以共表現網絡分析 *LIER* 基因影響 缺鐵逆境之轉錄組改變

楊秋鈴¹⁾ 陳彥銘²⁾ 潘怡君³⁾

關鍵字：*LIER*、轉錄組、缺鐵、光合作用、免疫。

摘要：鐵是參與光合作用以及植物的代謝途徑之催化功能所需的微量營養元素，缺鐵影響植物體內生理系統間的動態平衡，導致新葉嚴重黃化並降低光合作用效率。*LIER* (*Light, Iron and Ethylene Regulator*) 為缺鐵逆境下顯著提升表現的轉錄因子，在缺鐵逆境下的功能未知。本研究利用阿拉伯芥敲除突變株 *lier* 及次世代定序 (Next Generation Sequence, NGS)，分析 72 小時缺鐵下 *LIER* 調控的顯著差異表現基因 (Differential Expression Genes, DEG)，並以共表現網絡比較轉錄組之間的改變，以探討 *LIER* 基因對植物生理功能與系統間平衡的影響。GO (Gene Ontology) 功能及網絡分析的結果顯示 *LIER* 身為免疫與防禦基因群的一員，調控其他包含光合作用和免疫基因。同時，在 *lier* 中，80% 的缺鐵反應基因的表現不受到缺鐵逆境調控，顯示 *LIER* 基因是影響植物缺鐵轉錄的重要關鍵基因。本研究提供了缺鐵 72 小時的基因轉錄調控模式，並支持 *LIER* 是參與協調光反應、缺鐵反應及免疫系統平衡的中間轉錄因子。

前 言

鐵是植物體中構成光合作用電子傳遞鏈蛋白重要的輔因子 (co-factor)，且參與氧化還原酵素反應 (Marschner, 2011)，目前已經鑑定出植物體中吸收及感應鐵離子的基因和蛋白 (Grillet *et al.*, 2018; Kobayashi *et al.*, 2013; Kobayashi and Nishizawa, 2015)。但植物如何在感應缺鐵逆境後，調控植株中鐵離子的動態平衡尚未被清楚的研究 (Rodríguez-Celma *et al.*, 2019)。Schmidt 及 Buckhout 在 2011 年歸納出 92 個植物缺鐵反應基因並稱之為「Ferrome」，

-
- 1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。
 - 2) 國立中興大學園藝系助理教授。
 - 3) 國立中興大學園藝系助理教授，通訊作者。

這群基因在缺鐵逆境下藉由基因轉錄或轉譯後修飾功能維持鐵的動態平衡，包含了重新分配陽離子的營養元素、增加金屬陽離子在植物體中的累積、調整次級代謝物及其分泌等功能。另外有 14% 的 ferrome 位於根部的質體 (plastid) 中 (Schmidt and Buckhout, 2011)，然而質體在缺鐵反應中的重要性尚未被研究清楚。而植物在缺鐵後會降低光合作用相關基因之表現 (Rodríguez-Celma *et al.*, 2013)，但植物缺鐵逆境下，如何進行體內鐵離子的動態平衡，進而影響葉綠體及造成葉片黃化的機制尚未釐清。

本實驗室先前發現的 *LIER* (*Light, Iron and Ethylene Regulator*) 轉錄因子在缺鐵逆境下顯著的提升表現，且高光逆境處理降低其表現量，指出 *LIER* 在光反應及缺鐵逆境下有潛在的影響，但並未有相關文件指出 *LIER* 與植物缺鐵調控反應的機制。在本研究中以次世代定序 (Next Generation Sequence, NGS) 的方式探討模式植物阿拉伯芥 *LIER* 轉錄因子在缺鐵逆境中所影響的基因網絡，進一步推測 *LIER* 轉錄因子參與缺鐵逆境下可能影響的生理過程。

材料與方法

一、植物栽培、處理及樣品收集

本研究使用阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana* Colombia) 野生型 (WT) 植株及敲除突變株 (*lier*) 培養於含鐵水耕液 (ES) 10 天，再分別進行含鐵 (ES) 或缺鐵 (FE) 處理三天。水耕液含有 [KNO₃ (5 mM)、MgSO₄ (2 mM)、Ca(NO₃)₂ (2 mM)、KH₂PO₄ (2.5 mM)、H₃BO₃ (70 μM)、MnCl₂ (14 μM)、ZnSO₄ (1 μM)、CuSO₄ (0.5 μM)、NaCl (10 μM)、Na₂MoO₄ (0.2 μM)、MES (4.7 mM)、pH5.5] (Rodríguez-Celma *et al.*, 2013)，含鐵處理 (ES) 於水耕液中添加 FeEDTA (40 μM)，缺鐵處理 (FE) 於水耕液中添加 100 μM ferrozine (3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine sulfonate) 以螯合殘餘的鐵離子。經過三天 ES 或是 FE 處理之植株分別收集根部與地上部做為樣品，每一個處理 2 重複。

二、RNA-Seq

樣品經過 RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) 抽取 total RNA (Rodríguez-Celma *et al.*, 2013)，取等量 10 μg RNA 溶於之 15 μl，依照 Illumina 標準流程製作 cDNA library，進行 TruSeq Stranded RNA, Poly-A 處理，委託中央研究院新世代基因體定序核心實驗室利用 HiSeq Rapaid 進行 Paired End 2×100 定序，16 個樣品的總數據量 270 M，以所得資料析出 RPKM (Reads Per Kilobase per Million mapped reads) 值、t-test 與 z-test 之 p-value。

三、生物資訊處理

(一) DEG 資料的篩選、重疊情況與分群 (cluster)

缺鐵逆境下 *LIER* 影響的生理反應之 DEG 篩選：計算 WT 及 *lier* 植株之缺鐵 (FE 培養基) 與有鐵 (ES 培養基) 處理的比值，Z-test 統計下 p-value < 0.05 之基因，其比值變化

量大於 2 倍 ($\log_2(\text{FC}) > 1$ 或 < -1) 者。所挑選顯著差異表現基因 (DEG)，資料顯著差異表現量 $\log_2(\text{FC})$ 值呈現。

計算 DEG 重疊數量使用「Calculate and draw custom Venn diagrams」網站 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)，貼上目標 DEG 之 AGI code 列表，按「Submit」輸出所繪製的文氏圖，計算重疊的 DEG 數量，並分為地上部及根部兩部分，比較 WT 及 *lier* 提升或降低的顯著差異表現，各自區分出 WT 及 *lier* 單獨或共同表現的 DEG，將地上部結果分為 S-X 組，根部結果分為 M-R 組。不同表現模式的 DEG 數量計算以 excel 中公式「=COUNTIF(目標欄位,CONCATENATE(">=",0))」計算提升表現的基因、「=COUNTIF(目標欄位,CONCATENATE("<=",0))」計算提降低表現的基因，並以計算結果繪製 DEG 數量之長條圖。

(二)GO annotation 分析

列出顯著 GO annotation 的方式為，以 GObu 軟體 (Lin *et al.*, 2006)，載入 Arabidopsis.TAIR10.tree 資料庫 (<https://www.arabidopsis.org/index.jsp>, TAIR) 為對照來源，以「FastInput」載入目標 DEG 清單，使用「MultiView」分析 molecular function、biological process 及 cellular component 資料，使用 TopGO eilm method (PMID: 16606683) 分析，並篩選 elim 值 < 0.05 為顯著，以基因數量 (cnts) 排列前 3 者列表呈現。

(三)視覺化 DEG 共表現網絡圖

使用 MACCU 軟體建立 DEG 共表現網絡，係數以 Pearson's coefficient 在 0.6 做共表現計算，接著將此共表現網絡輸入 Cytoscape 軟體 (ver. 3.7.1 <http://www.cytoscape.org/>)，並且輸入整理好的 AGI code 對照 $\log_2(\text{FC})$ 表現量表格、Gene symbol 資料庫及 Gene Description 資料庫 (資料庫來源：<https://www.arabidopsis.org/index.jsp>, TAIR)。

四、以 ICP-OES 測量植物體金屬元素含量

以 WT 及 *lier* 種植於材料方法一所敘述的 ES 水耕液配方中，取 18 天大之植株處理高光照 (H: $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 及低光照 (L: $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 的含鐵 (ES, $40 \mu\text{M FeEDTA}$) 或缺鐵 (FE, $0 \mu\text{M FeEDTA}$) 水耕液，以中光照 (M: $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 為對照組，培養 72 小時後收集地上部組織，以 1% HCl 潤洗去除殘餘介質，再以 ddH₂O 潤洗 3 次以上，置於 100 °C 殺菁 1 小時並以 70 °C 乾燥 3 天。ICP-OES (inductively coupled plasma optical emission spectrometry) 樣品前處理使用 CEM MARS 高壓反應消化瓶 (15 ml)，每瓶加入 5 ml ddH₂O 及 5 ml Tracepur HNO₃ 以密閉式微波加速反應系統 (微波消化儀) CLEAN-40 program 預先酸洗，使用微量天平秤量樣品約 0.1 g/每個，置入消化瓶底、秤取標準品 tomato leaves 1573a (NIST1573A, Sigma-Aldrich) 約 0.02 g/每個，加入 5 ml HNO₃ 及 2 ml ddH₂O 以密閉式微波加速反應系統 LEAF-40 program 進行硝化。硝化後母液經稀釋後由中研院葉國楨實驗室代為上機。數據統計方式以 SPSS20 軟體進行 one-way ANOVA 檢定，取用 Tukey HSD 檢定法並選取 p-value < 0.05 為具有顯著性。

結 果

一、缺鐵逆境下 *LIER* 影響的 DEG 之分布概況

為了找出 *LIER* 轉錄因子在缺鐵逆境下所影響的基因，觀察 WT 及 *lier* 在地上部及根部資料的 DEG 重疊情況，其中地上部多數 DEG 只在 WT 表現，有 567 個 DEG (圖 1A)；而根部多數 DEG 在 WT 及 *lier* 重疊，共有 144 個 DEG (圖 1B)。進一步觀察在 WT 及 *lier* 中的 DEG，以「只有在 WT 中有表現的 DEG」與「只有在 *lier* 中有表現的 DEG」視為在缺鐵逆境中受到 *LIER* 影響的基因。只在 WT 降低表現的 408 個佔了最大數 (圖 1C)，指出缺鐵逆境下 *LIER* 影響的基因大部分位於地上部，而根部中多數 DEG 在 WT 及 *lier* 皆有 (圖 1D)，顯示這些重疊的 DEG 在根部缺鐵逆境下不受到 *lier* 敲除的影響。並且在 WT 及 *lier* 中有不同調控表現的基因數量在地上部只有 1 個，根部只有 1 個，指出大部分的 DEG 在 WT 及 *lier* 中有同樣的調控模式 (圖 1C、D、E)。觀察到 *LIER* 影響的多數 DEG 位於地上部，而根部多數 DEG 集中在 WT 及 *lier* 皆有表現，則 *LIER* 影響不大。

二、缺鐵逆境下 *LIER* 影響光合作用及防禦反應的轉錄表現

為了找出 *LIER* 在缺鐵之下主要所影響的生理功能，分析 WT 及 *lier* 之中的 DEG 並觀察缺鐵逆境下 *LIER* 的影響，將 *LIER* 調控的 DEG 依照調控模式及組織部位進行分組，如圖 1C 及圖 1D 所示，使用 GOBU 軟體並篩選顯著性差異在 $\text{elim} < 0.05$ 以下的 GO term，挑選 DEG 數量較多的 S、T、Q 組列出基因數量最多的前三者 (表 1、2)。

地上部在缺鐵之下，*LIER* 在主要所影響的生理功能為僅在 WT 中提升表現的 S 組及降低表現的 T 組，僅在 WT 中提升表現的 DEG 有 12 個參與「tetrapyrrole binding」功能，27 個參與「photosynthesis」、24 個參與「translation」過程；WT 降低表現的 DEG 中，75 個參與「ion binding」功能，47 個參與「defense response」、42 個參與「cellular nitrogen compound biosynthetic process」過程。以地上部 WT 特有的 DEG 則表示阿拉伯芥在 *LIER* 基因存在所影響的缺鐵逆境反應 DEG，其中「tetrapyrrole binding」、「photosynthesis, light reaction」、「translation」相關的功能或過程被顯著提升，而「ion binding」及「defense response」相關的功能或過程被顯著降低 (表 1)。而在根部缺鐵之下，在 Q 組中 WT 及 *lier* 皆提升表現的 DEG 中，有 21 個參與「ion binding」功能，13 個參與「ion transport」、12 個參與「cellular response to iron ion」過程。觀察到根部面臨缺鐵逆境時，「ion binding」及「ion transport」相關的功能或過程在 WT 及 *lier* 被顯著提升 (表 2)。在這些功能分析中，顯示 *LIER* 轉錄因子在面臨 72 小時缺鐵逆境後，多數影響的 DEG 位於地上部，影響的功能包含參與促進轉錄、提升光合作用及光反應、促進葉綠素結合，並降低植物防禦反應及訊號傳遞功能。

為了觀察缺鐵逆境下 *LIER* 轉錄因子所影響的轉錄表現之間的關係，將缺鐵之下的 WT 及 *lier* 所有的 DEG 進行共表現網絡的呈現，並且從表 1 及表 2 顯著的基因功能中挑出多數 DEG 影響的光合作用及防禦功能：「tetrapyrrole binding」、「photosynthesis, light reaction」、「translation」屬於「ribosome, photosynthesis, chlorophyll biosynthesis」，「defense response」

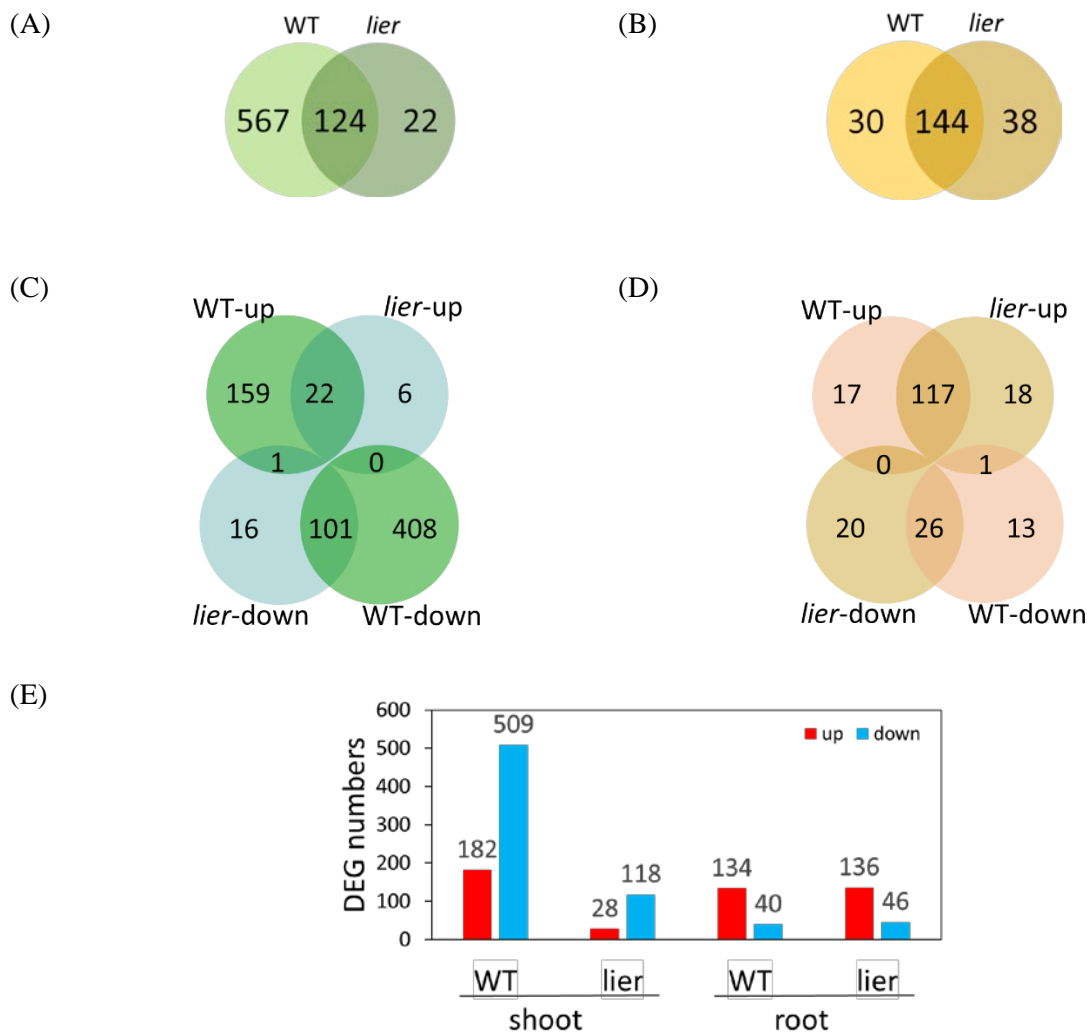


圖 1. 缺鐵逆境下 WT 及 *liar* 轉殖株之 DEG 數量。(A) 地上部及 (B) 根部之 DEG 重疊數量，(C) 地上部及 (D) 根部之提升表現及降低表現 DEG 數量，(E) WT 及 *liar* 植株中受缺鐵誘導及抑制的 DEG 數量。

Fig. 1. Numbers of DEG in WT and *liar* plant under iron-deficiency.(A) Shoot and (B) root DEG overlapping numbers, up- and down-regulation DEG numbers of (C) shoot and (D) root, and (E) the up- and down-regulation DEG in WT and *liar*.

表 1. 僅在 WT 地上部表現之 GO 分析。

Table 1. GO annotation of the DEG regulated in WT shoot-only.

Line	DEG regulation	Genes in group	Term type	Term name	cnt	GO ID
WT	up	159	C	chloroplast	59	GO:0009507
			C	chloroplast thylakoid membrane	27	GO:0009535
			C	ribosomal subunit	18	GO:0044391
			F	oxidoreductase activity	24	GO:0016491
			F	tetrapyrrole binding	12	GO:0046906
			F	triplet codon-amino acid adaptor activity	12	GO:0030533
			P	photosynthesis	27	GO:0015979
			P	translation	24	GO:0006412
			P	oxidation-reduction process	19	GO:0055114
WT	down	408	C	endomembrane system	71	GO:0012505
			C	plasma membrane	44	GO:0005886
			C	intrinsic component of membrane	20	GO:0031224
			F	ion binding	75	GO:0043167
			F	oxidoreductase activity	52	GO:0016491
			F	kinase activity	37	GO:0016301
			P	response to stress	108	GO:0006950
			P	defense response	47	GO:0006952
			P	cellular nitrogen compound biosynthetic process	42	GO:0044271

C：細胞部位，F：分子功能，P：生物途徑，cnt：DEG 數量。

C: cellular component, F: molecular function, P: biological process, cnt: count of DEG.

屬於「immune, defense, response to chitin and wounding」，並且「ion binding」中多數 DEG 同時身為「Ferrome」的一員，因此屬於「Ferrome」（圖 2A）。在缺鐵逆境下 WT 的地上部展現了大群的基因被抑制表現，包含「immune, defense, response to chitin and wounding」基因群，且有一小群「ribosome, photosynthesis, chlorophyll biosynthesis」基因被顯著提升表現；而 *lier* 的地上部中只有少數「immune, defense, response to chitin and wounding」基因

被調控，且 WT 及 *lier* 根部可以觀察到大部分「Ferrome」被提升表現（圖 2C）。顯示缺鐵逆境下，*LIER* 基因的存在影響了大多數的「immune, defense, response to chitin and wounding」基因及部分「ribosome, photosynthesis, chlorophyll biosynthesis」基因。

三、*LIER* 轉植株在缺鐵及高光逆境下的外表型及地上部鐵含量

由於在 *LIER* 的缺鐵調控網絡中發現與光合作用及葉綠素生合成相關的 DEG，試將 WT 及 *lier* 進行不同光強度及 ES 或 FE 水耕液處理，檢測 *LIER* 基因在不同光度之下是否對地上部鐵的累積造成影響。在高光照射之下，含鐵或缺鐵處理的 WT 及 *lier* 之地上部鐵濃度皆較中光照射低；而在低光缺鐵處理下 *lier* 於含鐵及缺鐵處理下無顯著差異，顯示 *LIER* 轉錄因子在低光下影響缺鐵逆境中地上部的鐵含量，但在中光及高光缺鐵逆境下對地上部的鐵含量無顯著影響（圖 3）。

而在植株外表型的方面，相對中光處理，高光處理之下缺鐵植株皆較含鐵植株偏黃，且含鐵處理顏色濃綠，植株葉背顏色偏紫；而低光處理植株地上部皆較中光處理小，WT 及 *lier* 的缺鐵植株與含鐵植株外表型並無顯著差異（圖 4）。外表型的結果顯示，在高光逆境之下的缺鐵處理，較中光及低光顯著的影響阿拉伯芥葉片的顏色（圖 4）。

表 2. WT 及 *lier* 根部重疊的提升表現 DEG 之 GO 分析。

Table 2. GO annotation of up-regulation DEG in both WT and *lier* root.

Line	DEG regulation	Genes in group	Term type	Term name	cnt	GO ID
WT ∩ <i>lier</i>	up	117	C	plasma membrane	14	GO:0005886
			C	intrinsic component of membrane	8	GO:0031224
			C	external encapsulating structure	5	GO:0030312
			F	ion binding	21	GO:0043167
			F	cofactor binding	4	GO:0048037
			F	dioxygenase activity	4	GO:0051213
			P	response to oxidative stress	16	GO:0006979
			P	ion transport	13	GO:0006811
			P	cellular response to iron ion	12	GO:0071281

C：細胞部位，F：分子功能，P：生物途徑，cnt：DEG 數量，∩：交集。

C: cellular component, F: molecular function, P: biological process, cnt: count of DEG, ∩: intersection.

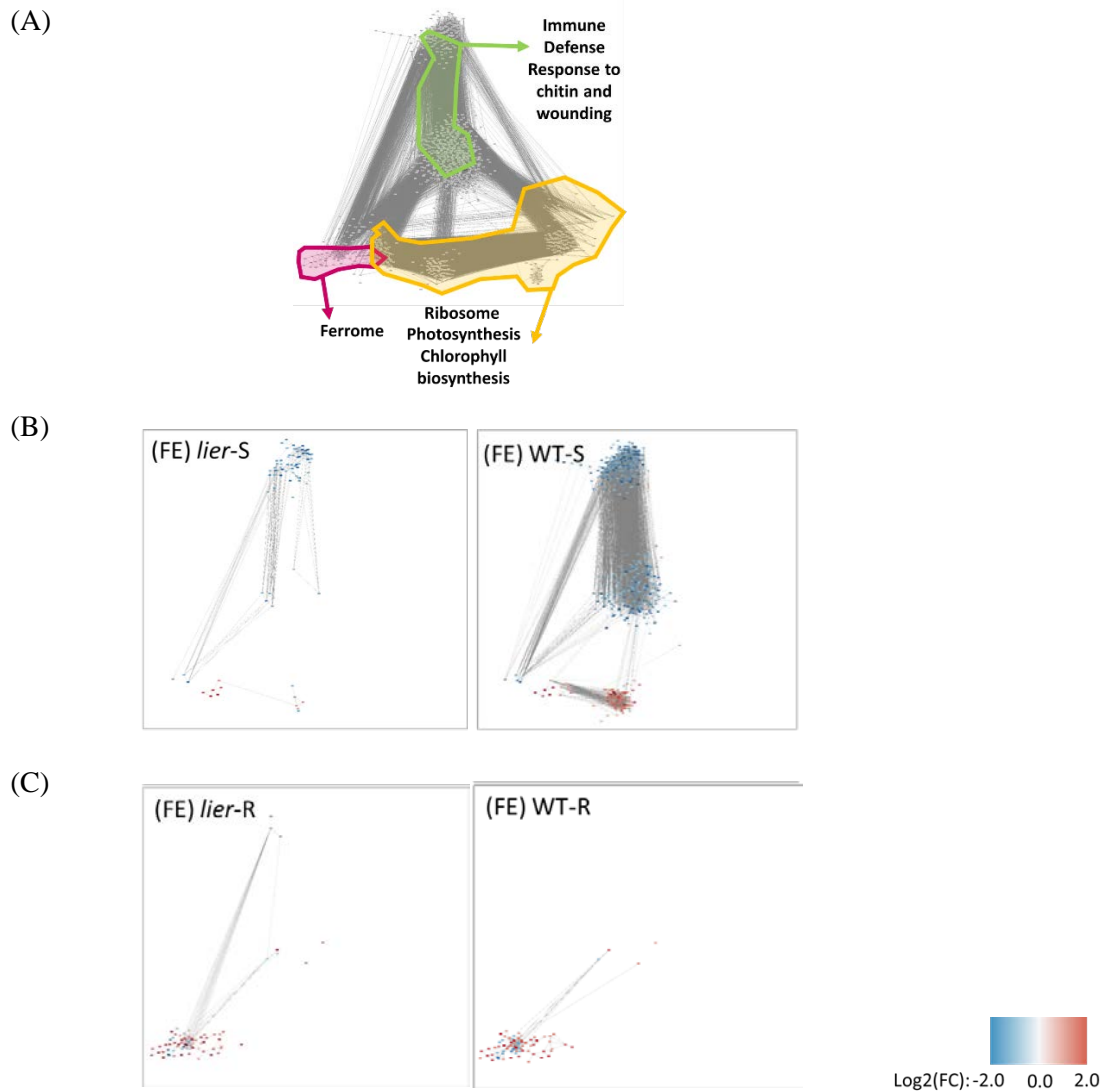


圖 2. 缺鐵逆境下 WT 及 *lier* 的共表現網絡及 DEG 表現模式。(A) WT 及 *lier* 轉植株共表現網絡中的功能分組，以及缺鐵逆境下 WT 及 *lier* 之(B)地上部、(C)根部 DEG 調控模式。S：地上部，R：根部。

Fig. 2. Co-expression network and DEG expression pattern of WT and *lier* under iron-deficiency.(A) Functional groups of WT and *lier* DEG the co-expression network. The expression pattern of the WT and *lier* DEG in (B) shoot and (C) root. S: shoot, R: root.

綜上所述，本研究結果顯示，*LIER* 基因雖在缺鐵逆境下影響光合作用及防禦反應的轉錄表現，但在中光缺鐵逆境下不影響鐵在地上部的含量，實際作用的生理途徑有待更進一步的實驗探討。

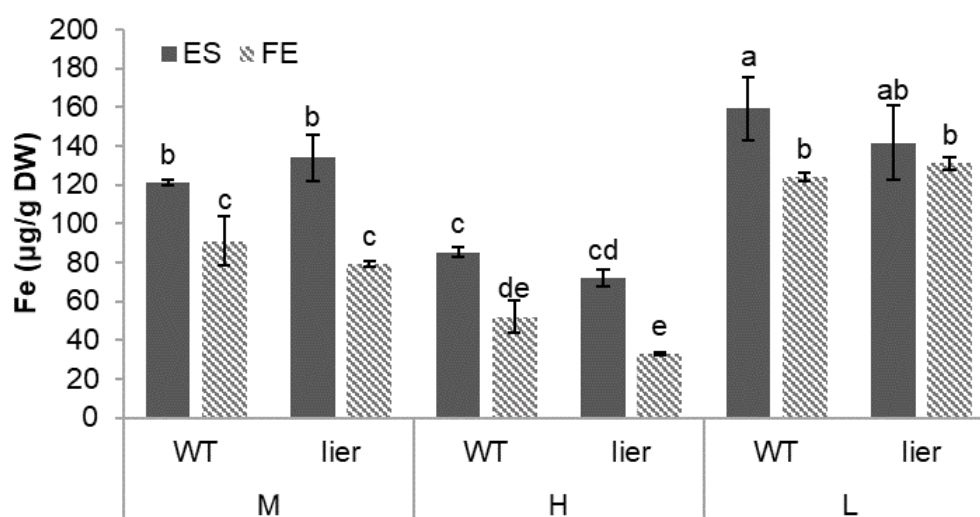


圖 3. WT 及 *lier* 轉植株在不同光度下處理缺鐵之地上部鐵含量。ES：對照組，Fe：缺鐵處理，H：高光處理 ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)，M：中光處理 ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)，L：低光處理 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)。顯著性差異以 One-way ANOVA 計算，根據 Tukey's honest significant difference (HSD) 檢驗在 $t\text{-test } P < 0.05$ 為顯著，以英文字母「a」到「e」標記。

Fig. 3. Iron content of WT and *lier* plants under differential light intensity and iron-deficiency. ES: control, FE: iron-deficiency treatment, H: high light treatment ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), M: control ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), L: low light treatment ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). The significant differences was calculated by One-way ANOVA according to Tukey's honest significant difference (HSD) test at $P < 0.05$, noted with lowercase english letters from "a" to "e".

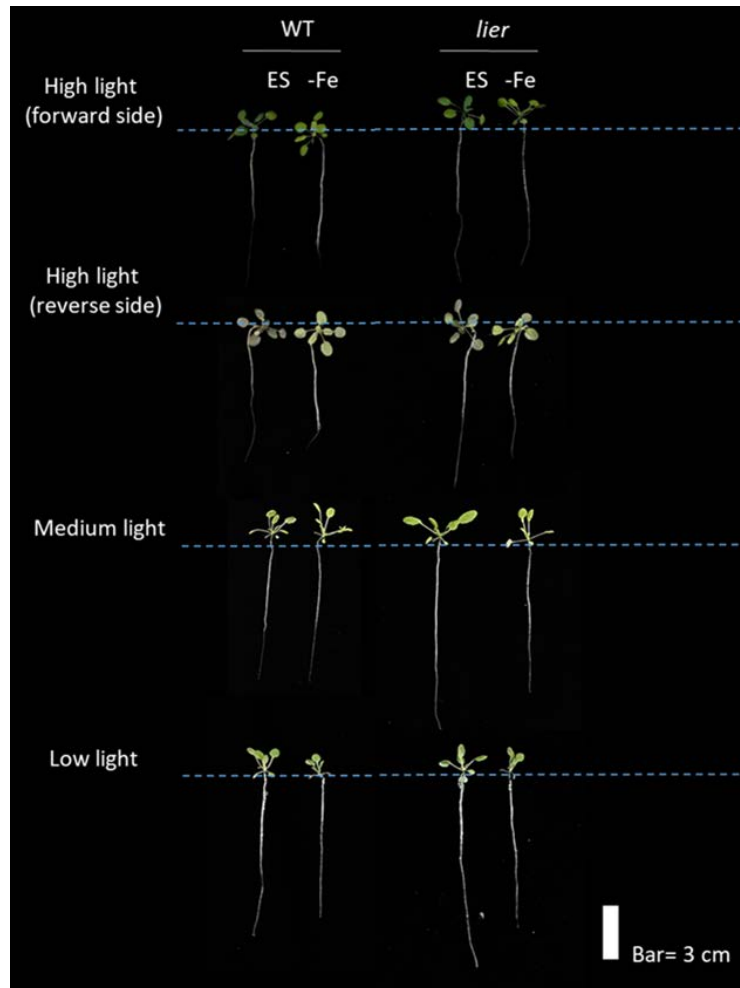


圖 4. WT 及 *ller* 轉殖株在高光或低光下處理缺鐵之植株外表型。ES：對照組，-Fe：缺鐵處理。Bar 為 3 cm。

Fig. 4. Phenotype of WT and *ller* plants under high or low light intensity with iron-deficiency treatment. ES: control, -Fe: iron-deficiency treatment. Bar = 3 cm.

討 論

在 WT 及 *lier* 篩選出來的缺鐵逆境 DEG 中，地上部 DEG 多數在 WT 才有顯著差異表現，以只在 WT 降低表現的 408 個佔了最大數 (圖 1C)，表示在失去 *LIER* 基因的植株中，許多缺鐵反應基因反而不受到缺鐵調控 (圖 2)，顯示 *LIER* 為缺鐵反應下必須的功能性基因。而根部 DEG 多數在 WT 及 *lier* 兩者之間皆有 (圖 2C)，指出缺鐵逆境下 *LIER* 轉錄因子並不影響大部分根部缺鐵反應基因。而分析地上部 WT 特有的 DEG 功能則顯示 *LIER* 在缺鐵逆境下影響地上部光合作用、tetrapyrrole 的結合、植物防禦反應及訊號傳遞功能 (表 1、2)，但不影響中光缺鐵逆境下的地上部鐵含量 (圖 3)，在共表現網絡中觀察到 *LIER* 在植株中主要影響免疫基因群的表現，並且這些免疫及防禦相關功能 DEG 的降低表現伴隨著一些核醣體、光合作用及葉綠素合成的相關基因提升表現 (圖 2A、B)。在光反應與植物免疫的研究文獻中，Karpinski (2013) 討論了植物免疫與光馴化之間的關聯，光強度變化超過植物光合作用所需時，過量的能量啟發光抑制效應及產生過量 ROS，造成葉片細胞死亡 (Karpinski *et al.*, 2013)，植物遭受高光逆境下引發的系統性免疫稱之為系統性所需馴化反應 (Systemic Acquired Acclimation, SAA)，是由局部葉片曝露於高光逆境下引發整體植株產生的馴化反應，並且能因此預馴化 (preacclimate) 蔭葉 (shaded leaves) (Rossel *et al.*, 2007)，而缺鐵逆境下如何引發光合作用與免疫防禦相關基因產生調控是值得更進一步研究的探討，而 *LIER* 可能是參與其中的一個關鍵調控基因。

在 *LIER* 轉植株處理不同光度的實驗中，在低光缺鐵處理下 *lier* 在含鐵處理及缺鐵處理下的地上部鐵含量並無顯著差異 (圖 3)，指出 *LIER* 受光度影響；而在高光、中光缺鐵處理下地上部鐵離子濃度在 WT 及 *lier* 植株之間並無太大的差異 (圖 3)，另外其外表型在高光、中光及低光皆沒有顯著的差異 (圖 4)，但由於 *LIER* 在缺鐵逆境下仍影響了多數 DEG 的反應 (圖 1、2)，且參與光合作用及免疫防禦反應的相關功能 (表 1、2)，因此顯示光強度與 *LIER* 之間有其他的關聯，*LIER* 在缺鐵逆境下雖不影響地上部鐵在植株中的含量，但可能參與光反應與缺鐵逆境的 ROS 平衡系統，有待更進一步的實驗證實光強度與缺鐵逆境如何影響 *LIER* 轉錄因子及其他缺鐵反應基因。

以往認為植物在遭受生物逆境時，啟發免疫基因抵抗外來生物侵害，然而對免疫基因之調控機制鮮為人知，特別是營養缺乏逆境之下。另外，在 *LIER* 調控之基因網絡中許多關鍵 DEG 的功能未知，在網絡中展現的重要性及顯著表現使這些關鍵 DEG 值得更進一步詳細研究。本論文在缺鐵逆境下免疫基因受到調控的基因組已有初步概略性的研究，期待未來可以揭露免疫基因在營養元素缺乏逆境下的詳細調控機制，在植物非生物逆境之抗性耐性研究上有更進一步的機制探討。

参 考 文 献

- Grillet, L., P. Lan, W. Li, G. Mokkaipati, and W. Schmidt. 2018. *IRON MAN* is a ubiquitous family of peptides that control iron transport in plants. *Nat. Plants* 4: 953-963.
- Karpiński, S., M. Szechyńska-Hebda, W. Wituszyńska, and P. Burdiak. 2013. Light acclimation, retrograde signalling, cell death and immune defences in plants. *Plant Cell Environ.* 36: 736-744.
- Kobayashi, T., S. Nagasaka, T. Senoura, R. N. Itai, H. Nakanishi, and N. K. Nishizawa. 2013. Iron-binding haemerythrin RING ubiquitin ligases regulate plant iron responses and accumulation. *Nat. Commun.* 4(2792): 1-12.
- Kobayashi, T. and N. K. Nishizawa. 2015. Intracellular iron sensing by the direct binding of iron to regulators. *Front. Plant Sci.* 6(155): 1-4.
- Lin, W. D., Y. C. Chen, J. M. Ho, and C. D. Hsiao. 2006. GOBU: toward an integration interface for biological objects. *J. Inf. Sci. Eng.* 22: 19-29.
- Marschner, H. 2012. Marschner's mineral nutrition of higher plants. 3rd ed. Academic press, USA. 651 pp.
- Rodríguez-Celma, J., I. C. Pan, W. D. Li, P. D. Lan, T. J. Buckhout, and W. Schmidt. 2013. The transcriptional response of *Arabidopsis* leaves to Fe deficiency. *Front. Plant Sci.* 4(276): 1-10.
- Rodríguez-Celma, J., H. Chou, T. Kobayashi, T. A. Long, and J. Balk. 2019. Hemerythrin E3 ubiquitin ligases as negative regulators of iron homeostasis in plants. *Front. Plant Sci.* 10(98): 1-7.
- Rossel, J. B., P. B. Wilson, D. Hussain, N. S. Woo, M. J. Gordon, O. P. Mewett, K. A. Howell, J. Whelan, K. Kazan, and B. J. Pogson. 2007. Systemic and intracellular responses to photooxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 4091-4110.
- Schmidt, W. and T. J. Buckhout. 2011. A hitchhiker's guide to the *Arabidopsis* ferrome. *Plant Physiol. Bioch.* 49: 462-470.

Functional Study of *LIER* in Response to Iron Deficiency by Using Co-expression Network

Chiu-Ling, Yang ¹⁾ Yen-Ming, Chen ²⁾ I-Chun, Pan ³⁾

Key words: *LIER*, Transcriptome, Iron-deficiency, Photosynthesis, Immune.

Summary

Iron is an essential micro-nutrition for photosynthesis and catalysis function of metabolism pathway in the plant. Iron deficiency affects the homeostasis of biological systems in the plant, and causes serious young-leaves chlorosis symptom and low-photosynthesis efficiency. *LIER* (*Light, Iron and Ethylene Regulator*), an unknown-function transcription factor, was significantly up-regulated under iron-deficiency. By using Next Generation Sequence (NGS) methods, *Arabidopsis* knock-out mutant *lier* was applied to observe the differential expression genes (DEG) regulated by *LIER* at 72 hr of iron-deficiency. The co-expression networks of WT and *lier* DEG were generated to demonstrate the function of *LIER* gene on the iron homeostasis balance in plant. The GO (Gene Ontology) analysis and networks results showed that *LIER* belonged to a group of immune and defense genes, and they regulated a set of photosynthesis genes. Besides, 80% of iron-deficiency responded DEG did not being regulated in *lier* plant, showed that *LIER* was a key factor affecting the transcriptome under iron-deficiency. This study provided a global pattern of 72 hr iron-deficiency response and indicated that *LIER* was an intermediary coordinating light, iron deficiency response, and immune systematically homeostasis.

1) Student in M.S. program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Assistant Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

3) Assistant Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

Corresponding author.

