

阿拉伯芥 LIER 轉錄因子參與缺鐵系統性反應

黃于庭¹⁾ 潘怡君²⁾

關鍵字：阿拉伯芥、缺鐵逆境、缺鐵反應基因

摘要：鐵是植物的必要微量元素，缺鐵環境下許多缺鐵反應基因會受到誘導表現以幫助維持植物體內的鐵平衡。本研究發現阿拉伯芥的轉錄因子 Light, Iron and Ethylene Regulator (LIER) 為調控植物缺鐵反應的關鍵因子，缺乏 *LIER* 基因的植株葉片中鐵離子含量增加，並影響阿拉伯芥缺鐵時的葉綠素含量。此外，LIER 影響 *basic helix-loop-helix (bHLH)* 38、*bHLH39*、*bHLH101* 及其他多個缺鐵反應基因表現，並改變部分缺鐵反應基因在缺鐵逆境下的反應。

前 言

鐵 (Fe) 是地殼中豐富度第四高的元素，也是植物維持生長反應必需的微量元素 (Bould and Hewitt, 1963)。作為一種過渡金屬，鐵離子可以以三價鐵 (Fe^{3+}) 和亞鐵 (Fe^{2+}) 兩種形式存在 (Rains, 1976)，這使鐵具有易接收、給予電子之催化特性，因此鐵可作為酶的輔因子幫助植物中各項電子傳遞及氧化還原反應，是植物進行呼吸作用、葉綠素生合成的必要成分 (Kobayashi *et al.*, 2019; Marschner, 2011; Mori, 1999)。植物由根部吸收土壤中的鐵，雖然鐵在地球土壤中含量豐富，但鐵在中性及鹼性土壤中溶解度極低 (Ma and Nomoto, 1996; Mori, 1999)，以氧化鐵 (Fe_2O_3) 等不可溶的三價鐵形式存在 (Skinner, 1979)，且與其他陰離子結合性高，使植物吸收鐵的有效利用率低 (Marschner *et al.*, 1986; Verbon *et al.*, 2017)。

當植物遭遇缺鐵逆境，其中受缺鐵影響表現的基因稱之為「缺鐵反應基因」。Fe-

1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。

2) 國立中興大學園藝學系副教授，通訊作者。

deficiency Induced Transcription Factor (FIT) 是已知調節阿拉伯芥鐵吸收和維持鐵平衡的主要轉錄因子，缺鐵逆境誘導 *FIT* 基因表現並透過 FIT 促進植物根部鐵吸收基因 *iron-regulated transporter1 (IRT1)*、*ferric reduction oxidase 2 (FRO2)* 之作用 (Colangelo and Gueriot, 2004)。Basic helix-loop-helix (bHLH) Ib 亞族的四個轉錄因子基因 (*bHLH38*、*bHLH39*、*bHLH100*、*bHLH101*) 在阿拉伯芥根與葉中皆受缺鐵誘導表現，顯示其參與植物體內鐵平衡之調控 (Wang *et al.*, 2007)。bHLH Ib 亞族四個蛋白不受 FIT 轉錄因子調控，並具有與 FIT 共同調控植物鐵吸收的重要功能，因為 FIT 必須與 bHLH Ibs 相互作用形成異源二聚體 (heterodimer) 才具有誘導鐵吸收基因表現之作用 (Wang *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2008)，因此 bHLH Ibs 是調控阿拉伯芥缺鐵反應的重要轉錄因子家族。至今已有許多探討缺鐵逆境影響植物基因表現的研究，Schmidt 及 Buckhout 在 2011 年整理出一組有力地反映阿拉伯芥缺鐵時轉錄反應的轉錄本，並稱這群關鍵的缺鐵反應基因為「Ferrome」(Schmidt and Buckhout, 2011)。其中包含前述提到的 *FIT*、*bHLH Ibs* 等基因，以及下列基因：*Nicotianamine Synthase 4 (NAS4)* 是一種菸鹼醯胺合成酶基因，菸鹼醯胺是植物鐵載體的前體，在茄科植物的鐵平衡中發揮作用 (Schmiedeberg *et al.*, 2003)。*NAS4* 被認為和鐵在細胞間的運移有關，在阿拉伯芥根與葉中皆受缺鐵誘導並提高將近 3 倍之基因表現 (Klatte *et al.*, 2009; Long *et al.*, 2010)。細胞色素 P450 (cytochrome P450 superfamily, CYP) 是包含血紅素的單加氧酶 (monooxygenase) 家族，在動植物中普遍存在 (Nelson *et al.*, 1996)。阿拉伯芥的根中的 *CYP82C3*、*CYP82C4* 基因在缺鐵情況下提升表現，且 *CYP82C3*、*CYP82C4* 對缺鐵的反應受到 FIT 調控 (Colangelo and Gueriot, 2004)。*CYP82C4* 與 *IRT1*、*FIT* 以及植物中已知與吸收/運輸金屬相關的基因有高度相關性，缺乏 *CYP82C4* 可能會使植株產生“鐵飢餓”效應 (Murgia *et al.*, 2011)。*FER1* (Ferritin-1) 是一種植物鐵蛋白並具有儲存鐵的功能，其基因在缺鐵時受到轉錄因子 POPEYE 的抑制 (Long *et al.*, 2010; Tissot *et al.*, 2019)。*FER1* 的 mRNA 轉錄豐度在缺鐵時增加，且和葉綠體的鐵平衡有關 (La Fontaine *et al.*, 2002; Long *et al.*, 2008)。而對阿拉伯芥進行過量鐵或缺鐵處理，發現過量鐵誘導 *AtFer1* 基因表現，缺鐵則抑制 *AtFer1* 基因表現 (Duc *et al.*, 2009; Murgia *et al.*, 2011)。*Respiratory burst oxidase homolog D (RBOHD)* 屬於阿拉伯芥的 RBOH 家族，屬於 NADPH 氧化酶 (Torres and Dangl, 2005)，缺鐵時阿拉伯芥根中的 *RBOHD* 基因表現升高 (Zhai *et al.*, 2018)。*Plant U-BOX 23 (PUB23)* 為 U-box 型 E3 蛋白連接酶之基因，和蛋白質轉譯後修飾中的泛素化有關。研究顯示 *PUB23* 受 FIT 調控 (Mai *et al.*, 2016)，並且在缺鐵時被誘導表現 (Schmidt and Buckhout, 2011; Yang *et al.*, 2010)。

鐵也是植物葉綠素生合成的必要元素，甲基赤藓糖醇 4-磷酸 (methylerythritol 4-phosphate, MEP) 途徑是植物類萜生合成的重要途徑，所有類萜物質的常見前體可通過 MEP 途徑產生 (Grotewold, 2006)。植物中的葉綠素即是由 MEP 途徑在質體中合成的光合

色素 (Simpson *et al.*, 2016)，因此 MEP 途徑相關基因之表現可做為了解植物缺鐵逆境對其葉綠素生合成影響之參考。1-脫氧木酮糖-5-磷酸合成酶 (deoxyxylulose 5-phosphate synthase, DXS) 是 MEP 途徑上的第一個作用酶，為主要控制 MEP 途徑通量的酵素 (Cordoba *et al.*, 2009; Rodríguez-Concepción and Boronat, 2015)。2-C-甲基-D-赤藓糖醇 4-磷酸胞苷轉移酶 (2-C-methyl-d-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase, MCT) 催化 MEP 途徑上第三個反應 (Phillips *et al.*, 2008)。香葉基香葉基焦磷酸 (geranylgeranyl diphosphate, GGPPS) 是 MEP 途徑上許多與光合色素以及電子傳遞鏈的成分如葉醌和質體醌的前體，由 GGPP 合成酶 (GGPP synthase, GGPS) 生合成。阿拉伯芥 GGPPS 家族包含五個成員：AtGGPPS1、AtGGPPS2、AtGGPPS3、AtGGPPS4 和 AtGGPPS11 (Barja and Rodríguez-Concepción, 2021)。其中 *GGPPS11* 可能是 GGPP 合成之關鍵基因，AtGGPPS11 蛋白被發現會與番茄紅素合成酶 (phytoene synthase) 和香葉基香葉基還原酶 (geranylgeranyl reductase) 等相互作用，這些酶可利用 GGPP 促成光合作用相關類萜的生成 (Ruiz-Sola *et al.*, 2016)。

實驗室先前研究發現阿拉伯芥中 Light, Iron and Ethylene Regulator (*LIER*) 轉錄因子在植物受缺鐵逆境下被快速誘導表現，並具有影響植物缺鐵反應之可能性 (楊秋鈴, 2019)，本實驗以阿拉伯芥 Columbia (Col-0) 植株與缺乏 *LIER* 基因的突變株作為研究材料並進行缺鐵處理，探討 *LIER* 基因對植株生長、缺鐵反應基因表現之影響，對 *LIER* 基因的了解可幫助我們拓展對植物應對缺鐵逆境系統性反應的認知。

材料與方法

一、試驗材料種植

本研究使用阿拉伯芥野生型 Col-0 (WT) 與 *LIER* 基因敲除突變株 (*lier*)，*lier* 突變株由向 SALK (Salk Institute for Biological Studies) 訂購取得。

阿拉伯芥種子以含有界面活性劑 (Tween 20, Panreac Sintesis, Spanish) 之 1% 漂白水 (Clorox, USA) 溶液震盪 (150 rpm) 清洗滅菌 20 分鐘，於無菌操作台內用無菌水反覆多次搖晃清洗，完畢後將種子浸於無菌水中，放置於 4°C 冰箱 2 天以打破休眠。種子直接播種於培養基，或在有 96 孔之保麗龍板中注添加 10 g/L Agargel (Sigma, USA) 之培養基，每個孔洞播種 1-2 顆種子，並放置於 300 ml 培養液上進行水耕栽培。

種植之介質使用 ES 培養液，其組成為：5 mM KNO₃ (Riedel-de Haën, Germany)、2 mM MgSO₄ (Merck, USA)、2 mM Ca(NO₃)₂ (Merck, USA)、2.5 mM KH₂PO₄ (Panreac, Spain)、70 μM H₃BO₃ (Pharmacia Biotech, Sweden)、14 μM MnCl₂ (Merck, USA)、1 μM ZnSO₄ (Merck, USA)、0.5 μM CuSO₄ (Merck, USA)、10 μM NaCl (Panreac, Spain)、0.2 μM Na₂MoO₄ (Merck,

USA)、40 μ M Fe-EDTA (Sigma, USA)、4.7 mM MES (Bio basic Inc., Canada), 調整 pH 值到 5.7 (Rodríguez-Celma *et al.*, 2013), 或者種植於以 ES 培養液配方加入 7 g/L Agargel (Sigma, USA) 與 43.8 mM sucrose (Sigma, USA) 之 ES 固體培養基。

植物種植於 22°C、90 μ mol \cdot m⁻² \cdot s⁻¹ 持續光照之恆溫生長箱, 以水耕種植之植株每 3 天換一次培養液。

二、缺鐵處理

10 天大之 Col-0、*lier* 植株分別置於含鐵的培養基 (ES), 或含 0 μ M Fe-EDTA, 並且添加 100 μ M ferrozine (3-[2-pyridyl]-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine sulfonate; Sigma, USA) 鐵離子螯合劑的 ES 缺鐵培養基 (-Fe) 進行缺鐵處理。收取置放於 22°C 恆溫生長箱正常光照下處理 3 天之阿拉伯芥葉片 (每個處理二重複, 每個樣品 0.05-0.1g) 以進行植物植物缺鐵逆境之基因表現分析; 光合效率、葉綠素含量及鐵含量分析之樣品以水耕栽培方式處理缺鐵 3 天後進行檢測分析或採收。

三、RNA 萃取

將樣品置於研鉢中加入液態氮以杵研磨成細粉狀, 於抽風櫃加入 1 ml TRIzol (Invitrogen, USA) 攪拌, 靜置 5 分鐘待液體回溫後吸取至微量離心管中, 並加入 200 μ l 三氯甲烷 (Chloroform; Honeywell, USA), 震盪 15 秒後室溫靜置 3 分鐘, 以 4°C、12000 xg 之轉速離心 15 分鐘, 取其上清液。加入與上清液等量之異丙醇 (Isopropanol; Merck, USA) 輕微搖晃均勻後於-20°C 靜置 30 分鐘。以 4°C、12000 xg 之轉速離心 10 分鐘後倒去上清液, 加入 1 ml 75% 乙醇 (台酒, Taiwan) 並以 4°C、7500 xg 之轉速離心 5 分鐘, 倒去上清液並以微量吸管吸去液體, 靜置待自然風乾後留下片狀沉澱物 (pellet), 加入 20 μ l DEPC 水 (以 diethyl pyrocarbonate [Cyrusbioscience, Taiwan] 添加於去離子水中以去除其中 RNase 活性, 並經高溫高壓滅菌) 回溶, 即得萃取之 RNA 溶液, 置於-80°C 儲藏。

四、反轉錄聚合酶連鎖反應 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

定量 1 μ g 之 RNA 以 HiScript ITM First Strand cDNA Synthesis Kit (BIONOVAS, Canada) 進行 RT-PCR: 加入 10 μ l 2X fast premix 與 2 μ l Primer mix, 並以 DEPC 水補足至總反應體積 19 μ l, 以 PCR 熱循環儀 (Biometra Tone, Analytik Jena, Germany) 進行 PCR 反應, 反應流程為 65°C 5 分鐘, 取出置於冰上降溫 1 分鐘後, 再加入 1 μ l HiScript I Reverse Transcriptase (200U) 進行反轉錄, 反應流程為 42°C 30 分鐘、85°C 5 分鐘, 即得反轉錄 DNA (complementary DNA, cDNA) 樣品。

五、即時聚合酶鏈式反應 (Quantitative real-time polymerase chain reaction, real-time PCR; qPCR) 分析方法

取內含 50ng 當量之 cDNA 樣品, 以 iQTM SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, USA) 方法配製 qPCR 反應溶液: 加入 10 μ l iQTM supermix (2x)、300nM 欲測基因之正向引子

(forward primer) 和反向引子 (reverse primer)，以無菌水補足至總反應體積 20 μ l，注入 qPCR 反應專用之 96 孔盤或八連排反應管，封膜或封蓋後以即時定量聚合酶鏈鎖反應儀 CFX Connect™ (Bio-Rad, USA) 進行 qPCR 反應，依反應溶解曲線之結果確認引子之專一性，以擴增曲線結果之 Ct value (threshold cycle, 或稱 Cq value) 作計算，EF1 α 做為參考基因 (reference gene)，並依 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 計算法分析所測量基因在樣品中之相對基因表現量。

六、鐵離子含量檢測方法

本實驗以電感耦合電漿體光學發射光譜法 (Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy, ICP-OES) 測定阿拉伯芥葉片中的鐵元素含量，實驗方法參考中央技術研究院葉國禎博士與中興大學土壤環境系劉雨庭博士實驗室之分析方法。18 天大 WT 與 *lier* 植株缺鐵處理 3 天後採收葉片，先以 1% HCl 潤洗去除植株沾黏的介質，再以 ddH₂O 潤洗三次，以硫化紙包覆後置於 100°C 殺菁 1 小時，並於 70°C 烘乾 3 天。秤量 0.1g 烘乾葉片、葉片標準品 tomato leaves 1573a (NIST1573A, Sigma-Aldrich, USA) 0.02g，置入消化管。於抽風櫃在消化管中加入 5 ml HNO₃、2 ml H₂O₂。震盪均勻後蓋上蓋子，靜置 14-16 小時 (overnight) 作預先消化之步驟。消化管依順序對稱插入乘載盤，放入微波消化器 (Mars 5 Digestion Oven, CEM, USA) 進行消化。消化後之樣品置於抽風櫃靜置降溫，在開蓋觀察無冒煙情形後，加入 ddH₂O 定量溶液總體積，倒入前端裝有 0.22 μ m 濾膜 (Merck Milipore, Germany) 之針筒並注入新的離心管中，以感應耦合電漿放射光譜儀 (ICP-optical emission spectrometry, ICP-OES) (PerkinElmer, UK) 分析鐵離子含量 (Liu *et al.*, 2006; Shanmugam *et al.*, 2011)。

七、光合效率檢測方法

18 天大 WT 與 *lier* 植株以水耕方式缺鐵處理 3 天後，使用葉片夾進行遮光暗期處理 20 分鐘後，以便攜式調製螢光儀 (PAM-2100, WALZ, Germany) 測量葉片之最大光合效率 (Fv/Fm)。

八、葉綠素檢測方法

秤取樣品 (阿拉伯芥小苗 3-5 棵，約 0.1g) 置於 1.5 ml 離心管中，加入液態氮，迅速地以研磨棒將樣品磨成粉末狀，加入 1 ml 100% DMF (N,N-dimethylformamide; Fluka, Germany) 後在黑暗環境靜置 30-60 分鐘，再離心 5-10 分鐘 (4°C, 12,000 rpm)。吸取上清液，平均分配 (500 μ l) 至新的 2 個 1.5 ml 離心管中，再加入 300 μ l 100% DMF 後以研磨棒研軋，將 1.5 ml 離心管中剩下的色素完全萃取，再加入 700 μ l 100% DMF，離心 5-10 分鐘 (4°C, 12,000 rpm)。吸取上清液，並平均分配至已有 500 μ l 液體的 2 個 1.5 ml 離心管中，使最終體積為 1 ml/tube (一管於 4°C 保存，一管用於測量)。將 1 ml 所萃取葉綠素溶液吸至於 10 mm 容積的石英比色管中，並利用 DS-11⁺ Spectrophotometer (DeNovix, USA)，以波長 664、647 nm 檢測其吸光值 (Zhang and Huang, 2013)。

結 果

一、*LIER* 基因影響阿拉伯芥葉片鐵離子含量

為了瞭解 *LIER* 是否影響植株的鐵平衡，收取 WT 與 *lier* 突變株缺鐵處理 3 天之葉片並檢測鐵離子含量。結果顯示缺鐵處理使 WT 葉片中鐵離子含量減少 33.2%、*lier* 突變株葉片中鐵離子含量減少 31.6%，兩者比例相近。而無論在一般或缺鐵條件下，*lier* 之葉片鐵離子含量皆顯著高於 WT，*lier* 控制組葉片為 Col-0 的 1.33 倍，缺鐵處理組為 1.36 倍。實驗結果顯示 *LIER* 基因可能影響阿拉伯芥對鐵的吸收、或鐵在葉片組織間的儲運，進而影響葉片的鐵含量 (圖 1)。

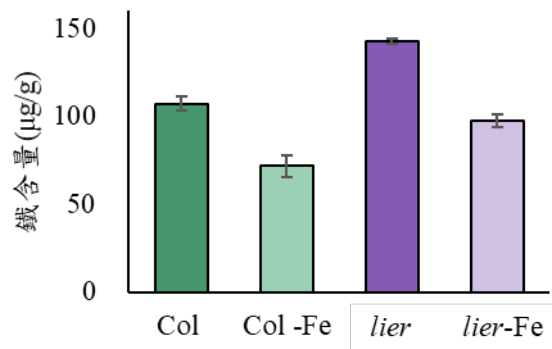


圖 1. 18 天大 Col-0 與 *lier* 突變株缺鐵處理 3 天後之葉片鐵離子含量。

Fig. 1. Leaves iron contents of 18-day-old Col-0 and *lier* seedlings treated with iron-deficiency for 3 days.

二、*LIER* 基因對缺鐵反應基因差異調控

為了進一步瞭解 *LIER* 是否會調控植物的缺鐵反應基因，收取 10 天大 WT 與 *lier* 突變株缺鐵處理 3 天之葉片並檢測基因表現。結果顯示缺鐵處理抑制 *LIER* 基因表現，而突變 *LIER* 基因對缺鐵反應基因之影響不盡相同。bHLH38、bHLH39、bHLH100、bHLH101 是調控植物缺鐵反應重要的轉錄因子，突變 *LIER* 基因使 *bHLH39*、*bHLH101* 基因表現提升，在缺鐵處理下又更加提升，顯示一般植株中 *LIER* 會抑制 *bHLH39*、*bHLH101* 基因對缺鐵的反應，而 *bHLH39*、*bHLH101* 轉錄因子與 FIT 共同調節鐵吸收基因 *IRT1*、*FRO2* 等表現，可能進而影響植物對鐵的吸收。其他關鍵缺鐵反應基因包含 *NAS4*、*CYP82C3*、*CYP82C4*、

FER1、*RBOHD*、*PUB23* 在 *lier* 突變株中皆比 *lier* 有更高的基因表現，顯示缺乏 *LIER* 基因會提升缺鐵反應基因表現，*LIER* 基因在一般情況下可能為植物缺鐵反應的抑制因子。WT 中大部分所測之缺鐵反應基因皆受到缺鐵逆境誘導，唯 *FER1*、*RBOHD*、*PUB23* 在缺鐵處理下顯著降低表現，*lier* 突變株中缺鐵也抑制 *FER1*、*RBOHD* 基因表現，但 *PUB23* 無明顯差異；而 WT 中 *CYP82C3* 對缺鐵沒有明顯反應，但在 *lier* 中則顯著受到缺鐵抑制，顯示 *LIER* 對缺鐵反應基因的調控具差異性，並且影響其對缺鐵逆境的反應 (圖 2)。

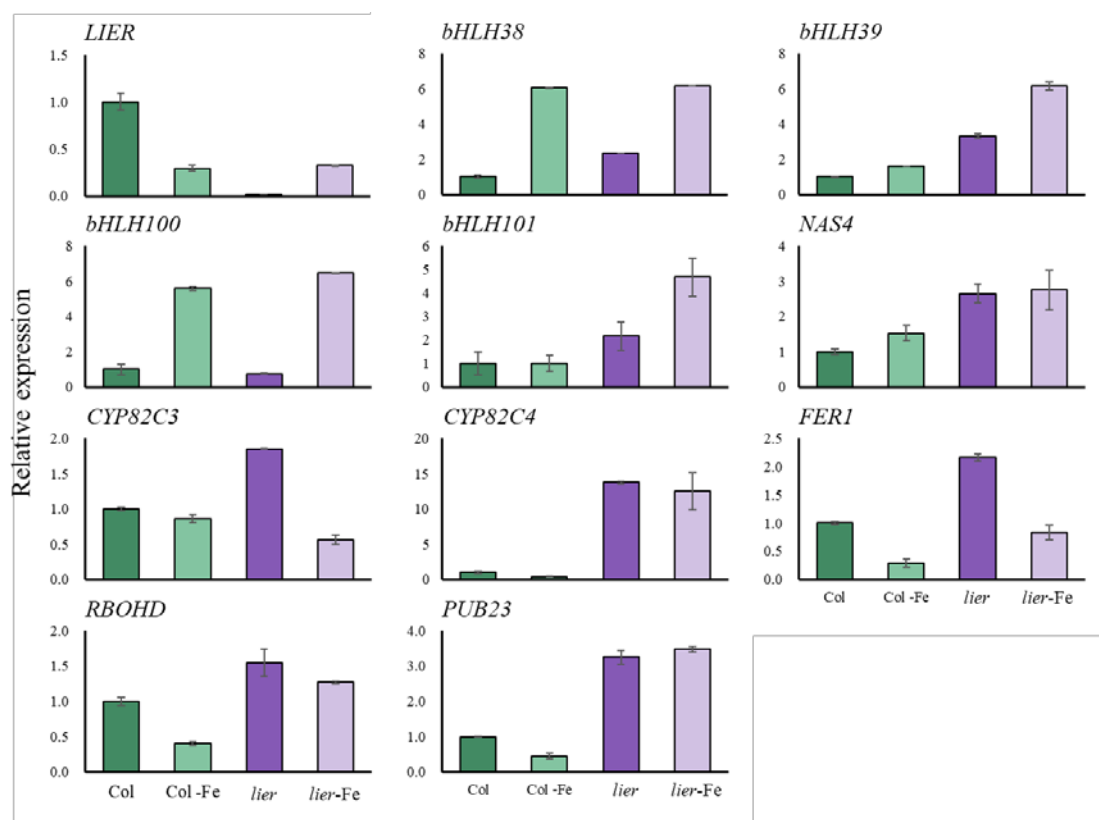


圖 2. 10 天大 Col-0 與 *lier* 突變株缺鐵處理 3 天後，葉片之 *LIER* 與缺鐵反應相關基因之相對基因表現量。

Fig. 2. The relative expression of *LIER* and iron-deficiency response related genes in the leaves of 10-day-old seedlings of the Col-0 and *lier* mutant line treated with iron-deficiency for 3 days.

三、*LIER* 基因對光合效率及葉片葉綠素含量之影響

為了瞭解 *LIER* 基因對實際生理反應的影響，將 WT 與 *lier* 突變株處理缺鐵並測量植株的光合作用效率，以最大光化學量子產量 (Fv/Fm) 表示 (圖 3)。實驗結果顯示突變 *LIER* 基因和缺鐵處理對植株之 Fv/Fm 值無顯著影響；但進一步測量葉片中的葉綠素含量發現缺鐵處理使 WT 中葉綠素含量降低，但是 *lier* 植株缺鐵處理的葉片葉綠素含量下降幅度較不明顯，顯示 *LIER* 基因可能藉由調控阿拉伯芥對缺鐵的反應，影響其葉綠素含量 (圖 4)。

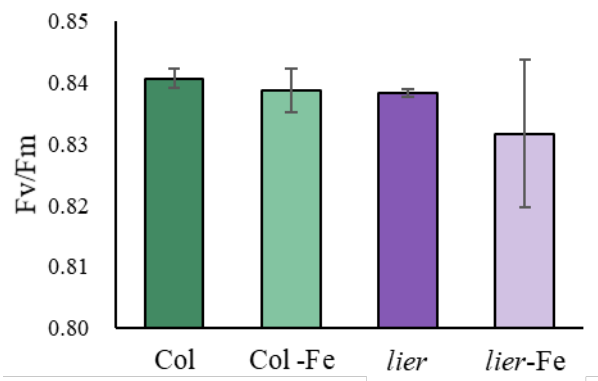


圖 3. 18 天大 Col-0 與 *lier* 突變株缺鐵處理 3 天後，葉片之最大光化學量子產量 (Fv/Fm)。
Fig. 3. Maximal photochemical efficiency (Fv/Fm) of leaves of 18-day-old seedlings of the Col-0 and *lier* mutant line treated with iron-deficiency for 3 days.

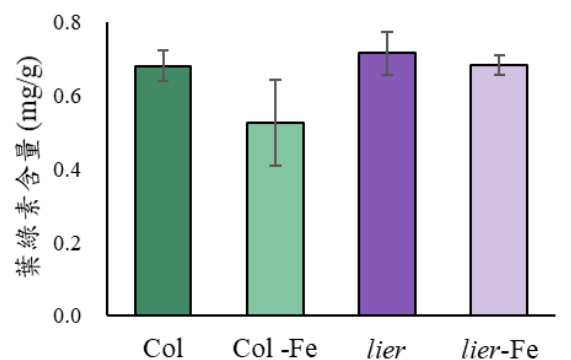


圖 4. 10 天大 Col-0 與 *lier* 突變株缺鐵處理 3 天後，葉片之總葉綠素含量。
Fig. 4. Total chlorophyll content in leaves of 10-day-old seedlings of the Col-0 and *lier* mutant line treated with iron-deficiency for 3 days.

四、*LIER* 對 MEP 途徑基因差異調控

接下來將 10 天大 WT 與 *lier* 突變株處理缺鐵，檢測植株葉片中 MEP 途徑基因表現，瞭解 *LIER* 是否會影響植物的葉綠素合成及對缺鐵逆境的反應。結果顯示缺鐵處理抑制 MEP 途徑上的重要基因 *DXS* 表現，而突變 *LIER* 基因使植株中的 *DXS* 基因表現提升，表明 *LIER* 基因可能會抑制 *DXS* 基因表現。*MCT* 為 MEP 途徑上第三個作用酶基因，意外地與 *DXS* 基因的表現不一致，突變 *LIER* 基因抑制 *MCT* 基因表現，而缺鐵處理抑制 Col-0 中 *MCT* 基因表現，但在 *lier* 植株中則無顯著差異。*GGPPS* 是葉綠素前體 *GGPP* 之合成酶，由實驗結果可看到四個 *GGPP* 合成酶基因中 *GGPPS1*、*GGPPS3*、*GGPPS4* 皆受缺鐵誘導表現，突變 *LIER* 基因則強烈誘導 *GGPPS3*、*GGPPS4* 基因表現，*lier* 突變株中 *GGPPS3*、*GGPPS4* 在缺鐵時基因表現反而降低，顯示 *LIER* 可能影響兩者對缺鐵的反應。(圖 5)。

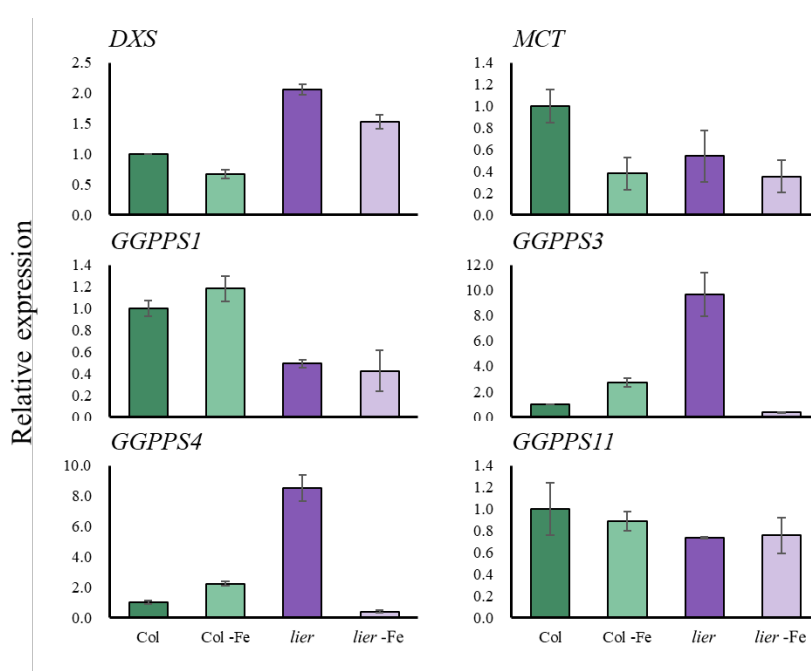


圖 5. 10 天大 Col-0 與 *lier* 突變株缺鐵處理 3 天後，葉片之葉綠素合成相關基因之相對基因表現量。

Fig. 5. The relative expression of chlorophyll biosynthesis related genes in the leaves of 10-day-old seedlings of the Col-0 and *lier* mutant line treated with iron-deficiency for 3 days.

討 論

實驗結果顯示缺乏 *LIER* 基因導致葉片鐵離子含量增加 (圖 1)，且 *lier* 中的缺鐵反應基因 *bHLH39*、*bHLH101*、*CYP82C3*、*CYP82C4*、*NAS4*、*FER1*、*PUB23*、*RBOHD* 皆比 WT 中基因表現提升 (圖 2)，前人提到 *bHLH38*、*bHLH39*、*bHLH100*、*bHLH101* 轉錄因子與 FIT 共同調節鐵吸收基因表現，*bHLH* *Ibs* 的增加會促進植物對鐵的吸收 (Kurt and Filiz, 2018)；*CYP82C3*、*CYP82C4* 為缺鐵時受 FIT 誘導調控之下游基因 (Colangelo and Guerinot, 2004)；*NAS4* 是轉運鐵從根經由韌皮部到植物匯集部的關鍵基因，受缺鐵誘導表現 (Klatte *et al.*, 2009)；*FER1* 是植物鐵蛋白基因，鐵蛋白具儲存鐵之功能，而缺鐵抑制 *FER1* 表現 (Duc *et al.*, 2009)；*PUB23*、*RBOHD* 也是已知受缺鐵誘導的基因，被 Schmidt 及 Buckhout 一起歸總為關鍵的缺鐵反應基因，並以「Ferrome」稱之 (Schmidt and Buckhout, 2011)。總結以上結果顯示缺少 *LIER* 基因可能會使阿拉伯芥即使在正常條件下也產生鐵逆境的感應並誘發植株的缺鐵反應，使許多缺鐵反應基因大量表現，促進植物對鐵的吸收、儲存或運移，進而造成 *lier* 突變株葉片中鐵離子含量增加之現象。

CYP82C3、*CYP82C4*、*PUB23*、*RBOHD* 皆為阿拉伯芥根中受缺鐵誘導的基因 (Colangelo and Guerinot, 2004; Yang *et al.*, 2010; Zhai *et al.*, 2018)，而在本實驗中缺鐵逆境降低 *CYP82C3*、*CYP82C4*、*PUB23*、*RBOHD* 在葉片中的基因表現 (圖 2)。*CYP82C4* 為 FIT 下游相關基因，與鐵的吸收與運輸有關；*PUB23* 與 *RBOHD* 與之活性氧之反應有關，顯示植物根部與葉部對鐵的吸收運輸及活性氧訊號調控機制可能有所不同。

前人的實驗結果顯示過表現 *DXS* 基因的胡蘿蔔 (*Daucus carota* L.) 根與葉上的葉綠素及類胡蘿蔔素增加，研究者推測 *DXS* 可能藉由增加 MEP 途徑上的前體供應，以及伴隨類胡蘿蔔素增加而提升植物中光氧化損傷保護作用，導致葉片中葉綠素含量的增加 (Simpson *et al.*, 2016)，而本實驗所測之 MEP 途徑基因中以 *DXS* 與葉綠素含量的表現模式最相近，在缺鐵時 *lier* 中相對於 WT 增加 (圖 4、圖 5)，顯示 *DXS* 的基因表現可作為缺鐵逆境對植物 MEP 途徑及葉綠素生合成影響的參考。

本實驗指出 *LIER* 可以誘發阿拉伯芥產生缺鐵反應，並增加葉片中的鐵離子含量，但仍不清楚其作用方式，是透過對鐵在植體內的轉運或是影響植株對鐵的吸收，未來可進一步釐清。此外，*LIER* 基因增加葉片鐵含量與植株缺鐵時的葉綠素生合成，但對光合作用則無顯著影響 (圖 3)，關於增加的鐵是以什麼形式存在、為何無法有效增進植株的光合效率等層面也有待進一步研究。

参 考 文 献

- Barja, M. V. and M. Rodriguez-Concepcion. 2021. Plant geranylgeranyl diphosphate synthases: every (gene) family has a story. *aBIOTECH*: 1-10.
- Bould, C. and E. Hewitt. 1963. Mineral nutrition of plants in soils and in culture media. In: *Inorganic Nutrition of Plants*, F.C. Steward (ed), Elsevier. pp.15-133:.
- Colangelo, E. P. and M. L. Guerinot. 2004. The essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response. *Plant Cell* 16: 3400-3412.
- Duc, C., F. Cellier, S. Lobreaux, J. F. Briat, and F. Gaymard. 2009. Regulation of iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana* by the clock regulator time for coffee. *J. Biol. Chem.* 284: 36271-36281.
- Grotewold, E. 2006. The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 761-780.
- Klatte, M., M. Schuler, M. Wirtz, C. Fink-Straube, R. Hell, and P. Bauer. 2009. The analysis of *Arabidopsis* nicotianamine synthase mutants reveals functions for nicotianamine in seed iron loading and iron deficiency responses. *Plant Physiol.* 150: 257-271.
- Kobayashi, T., T. Nozoye, and N. K. Nishizawa. 2019. Iron transport and its regulation in plants. *Free Radical Bio. Med.* 133: 11-20.
- La Fontaine, S., J. M. Quinn, S. S. Nakamoto, M. D. Page, V. Gohre, J. L. Moseley, J. Kropat, and S. Merchant. 2002. Copper-dependent iron assimilation pathway in the model photosynthetic eukaryote *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot. Cell* 1: 736-757.
- Liu, Y. T., M. K. Wang, T. Y. Chen, P. N. Chiang, P. M. Huang, and J. F. Lee. 2006. Arsenate sorption on lithium/aluminum layered double hydroxide intercalated by chloride and on gibbsite: sorption isotherms, envelopes, and spectroscopic studies. *Environ. Sci. Technol.* 40: 7784-7789.
- Long, J. C., F. Sommer, M. D. Allen, S. F. Lu, and S. S. Merchant. 2008. FER1 and FER2 encoding two ferritin complexes in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts are regulated by iron. *Genetics* 179: 137-147.
- Long, T. A., H. Tsukagoshi, W. Busch, B. Lahner, D. E. Salt, and P. N. Benfey. 2010. The bHLH transcription factor POPEYE regulates response to iron deficiency in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 22: 2219-2236.
- Ma, J. F. and K. Nomoto. 1996. Effective regulation of iron acquisition in graminaceous plants. The role of mugineic acids as phytosiderophores. *Physiol. Plantarum* 97: 609-617.
- Mai, H. J., S. Pateyron, and P. Bauer. 2016. Iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana*:

- transcriptomic analyses reveal novel FIT-regulated genes, iron deficiency marker genes and functional gene networks. *BMC Plant Biol.* 16: 1-22.
- Marschner, H. 2011. *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. 2nd ed. Academic Press, London. 672pp.
- Marschner, H., V. Römheld, and M. Kissel. 1986. Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. *J. Plant Nutr.* 9: 695-713.
- Mori, S. 1999. Iron acquisition by plants. *Current opinion in plant biology* 2: 250-253.
- Murgia, I., D. Tarantino, C. Soave, and P. Morandini. 2011. Arabidopsis CYP82C4 expression is dependent on Fe availability and circadian rhythm, and correlates with genes involved in the early Fe deficiency response. *J. Plant Physiol.* 168: 894-902.
- Nelson, D. R., L. Koymans, T. Kamataki, J. J. Stegeman, R. Feyereisen, D. J. Waxman, M. R. Waterman, O. Gotoh, M. J. Coon, and R. W. Estabrook. 1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6: 1-42.
- Phillips, M. A., P. León, A. Boronat, and M. Rodríguez-Concepción. 2008. The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources. *Trends Plant Sci.* 13: 619-623.
- Rains, D. 1976. Mineral metabolism. In: *Plant biochemistry*, 3rd ed. Bonner and Varner (eds), Elsevier. 561-597.
- Rodríguez-Celma, J., I. 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.
- Rodríguez-Celma, J., W.-D. Lin, G.-M. Fu, J. Abadia, A.-F. López-Millán, and W. Schmidt. 2013. Mutually exclusive alterations in secondary metabolism are critical for the uptake of insoluble iron compounds by Arabidopsis and *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 162: 1473-1485.
- Rodríguez-Concepción, M. and A. Boronat. 2015. Breaking new ground in the regulation of the early steps of plant isoprenoid biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 25: 17-22.
- Ruiz-Sola, M. Á., D. Coman, G. Beck, M. V. Barja, M. Colinas, A. Graf, R. Welsch, P. Rütimann, P. Bühlmann, and L. Bigler. 2016. Arabidopsis GERANYLGERANYL DIPHOSPHATE SYNTHASE 11 is a hub isozyme required for the production of most photosynthesis-related isoprenoids. *New Phytol.* 209: 252-264.
- Schmidt, W. and T. J. Buckhout. 2011. A hitchhiker's guide to the Arabidopsis ferrome. *Plant Physiol. Bioch.* 49: 462-470.
- Schmiedeberg, L., C. Krüger, U. W. Stephan, H. Bäumlein, and R. Hell. 2003. Synthesis and proof-of-function of a [14C]-labelled form of the plant iron chelator nicotianamine using

- recombinant nicotianamine synthase from barley. *Physiol. Plantarum* 118: 430-438.
- Shanmugam, V., J. C. Lo, C. L. Wu, S. L. Wang, C. C. Lai, E. L. Connolly, J. L. Huang, and K. C. Yeh. 2011. Differential expression and regulation of iron-regulated metal transporters in *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis thaliana*—the role in zinc tolerance. *New Phytol.* 190: 125-137.
- Simpson, K., L. F. Quiroz, M. Rodríguez-Concepción, and C. R. Stange. 2016. Differential contribution of the first two enzymes of the MEP pathway to the supply of metabolic precursors for carotenoid and chlorophyll biosynthesis in carrot (*Daucus carota*). *Front. Plant Sci.* 7: 1344.
- Skinner, B. J. 1979. Earth resources. *P. Natl. Acad. Sci.* 76: 4212-4217.
- Tissot, N., K. Robe, F. Gao, S. Grant-Grant, J. Boucherez, F. Bellegarde, A. Maghiaoui, R. Marcelin, E. Izquierdo, and M. Benhamed. 2019. Transcriptional integration of the responses to iron availability in *Arabidopsis* by the bHLH factor ILR3. *New Phytol.* 223: 1433-1446.
- Torres, M. A. and J. L. Dangel. 2005. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 397-403.
- Verbon, E. H., P. L. Trapet, I. A. Stringlis, S. Kruijs, P. A. H. M. Bakker, and C. M. J. Pieterse. 2017. Iron and Immunity. *Annu. Rev. Phytopathol.* 55: 355-375. doi: 10.1146/annurev-phyto-080516-035537
- Wang, H. Y., M. Klatte, M. Jakoby, H. Bäumlein, B. Weisshaar, and P. Bauer. 2007. Iron deficiency-mediated stress regulation of four subgroup Ib BHLH genes in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 226: 897-908.
- Wang, N., Y. Cui, Y. Liu, H. Fan, J. Du, Z. Huang, Y. Yuan, H. Wu, and H. Q. Ling. 2013. Requirement and functional redundancy of Ib subgroup bHLH proteins for iron deficiency responses and uptake in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant* 6: 503-513.
- Yang, T. J., W. D. Lin, and W. Schmidt. 2010. Transcriptional profiling of the *Arabidopsis* iron deficiency response reveals conserved transition metal homeostasis networks. *Plant Physiol.* 152: 2130-2141.
- Yuan, Y., H. Wu, N. Wang, J. Li, W. Zhao, J. Du, D. Wang, and H. Q. Ling. 2008. FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in *Arabidopsis*. *Cell Res.* 18: 385-397.
- Zhai, L., C. Sun, Y. Feng, D. Li, X. Chai, L. Wang, Q. Sun, G. Zhang, Y. Li, and T. Wu. 2018. At ROP 6 is involved in reactive oxygen species signaling in response to iron-deficiency stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 592: 3446-3459.

The Regulation of Arabidopsis LIER Transcription Factor in Iron Deficiency Systematic Response

Yu-Ting Huang¹⁾ I-Chun Pan²⁾

Key words: Arabidopsis, Iron-deficiency stress, Iron-deficiency response genes

Summery

Iron is an essential micronutrient in plants. A series of iron-deficiency response genes will be induced to help maintain the iron homeostasis in plants under iron deficiency condition. In this study, we found that the transcription factor Light, Iron and Ethylene Regulator (LIER) of Arabidopsis is a key factor in regulating the iron deficiency response of plants. The iron content in the leaves of plants lacking the *LIER* gene increases and affects the chlorophyll content of Arabidopsis under iron deficiency. In addition, *LIER* affects the expression of *basic helix-loop-helix (bHLH) 38*, *bHLH39*, *bHLH101* and several iron deficiency-responsive genes, and changes the response of some iron-deficiency genes under iron-deficient stress.

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

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

Corresponding author.