

· 研究论文 ·

拟南芥金属蛋白酶FtSH4通过生长素与活性氧调控叶片衰老

张盛春, 李清明, 阳成伟*

华南师范大学生命科学学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广州 510631

摘要 植物金属蛋白酶FtSH基因家族在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中有12个成员, 目前各基因的功能还不清楚。该文利用细胞生物学和遗传学方法初步分析了拟南芥FtSH4在叶片衰老中的功能。*ftsh4-4*突变体叶片中H₂O₂含量及细胞死亡率增加, 叶绿素含量降低; 此外, 突变体中过氧化物酶基因表达上调, 过氧化物酶活性增加, 出现早衰表型。外源抗氧化剂AsA、内源和外源生长素能够通过降低*ftsh4-4*体内H₂O₂含量、过氧化物酶基因的表达及过氧化物酶活性, 恢复*ftsh4-4*叶片的衰老表型。*ftsh4-4*突变体中生长素响应因子基因ARF2和ARF7上调表达, 外源生长素和抗氧化剂能够降低ARF2和ARF7的表达, 并且ARF2突变能够降低*ftsh4-4*的H₂O₂含量并恢复其早衰表型。以上结果表明, FtSH4基因通过生长素与活性氧在调控植物叶片衰老中起重要作用。

关键词 FtSH4, 拟南芥, 活性氧, 生长素, 叶片衰老

张盛春, 李清明, 阳成伟 (2017). 拟南芥金属蛋白酶FtSH4通过生长素与活性氧调控叶片衰老. 植物学报 52, 453–464.

植物叶片衰老是一种依赖年龄的细胞程序性退化和降解过程, 能够引起植物体内的代谢紊乱并最终导致植物器官或整株死亡(Lim et al., 2007)。植物叶片在衰老过程中, 由于细胞质膜和液泡膜以及叶绿体等细胞器发生瓦解, 破坏了细胞的内稳态, 最终导致衰老叶片细胞死亡。叶片衰老相关代谢变化包括叶绿素降解、叶片黄化, 还有蛋白质、脂质、核酸以及其它生物大分子的水解(Ren et al., 2010; Watanabe et al., 2013)。叶片衰老以依赖年龄的方式进行, 属于程序性细胞死亡的一种, 受到各种外部环境因素和内部因素的诱导(Guo and Gan, 2012)。影响植物叶片衰老的内部因素包括各种植物激素、植物体内的氧化还原状态以及依赖年龄的内源发育信号(Lim et al., 2007)。

植物激素是叶片衰老的重要调节者, 改变植物体内的激素信号会导致叶片衰老表型发生变化(Li et al., 2012)。植物激素可诱导或抑制叶片衰老, 乙烯(ethylene)、茉莉酸(JA)、脱落酸(ABA)和水杨酸(SA)可促进叶片衰老; 而生长素(auxin)、赤霉素(GA)和细胞分裂素(CKs)则延缓叶片衰老(Jibrán et al., 2013)。虽然已知生长素作为调控植物生长发育的重要激素参与叶片衰老调控, 但是相关的分子机制仍不清楚。有限

的研究表明, 模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中, 生长素响应因子ARF2和ARF7参与植物衰老调控(Ellis et al., 2005; Okushima et al., 2007)。活性氧(reactive oxygen species, ROS)的积累是植物细胞应对各种生物和非生物胁迫以及自然衰老过程做出的响应, 自然状态下的衰老及环境胁迫诱导的衰老过程均会产生大量的ROS (Apel and Hirt, 2004)。其中, H₂O₂ (hydrogen peroxide)被认为是调控细胞程序性死亡的信号中介, 衰老叶片中H₂O₂含量明显增加(Zimmermann et al., 2006; Queval et al., 2007), 许多叶片衰老调控基因(如WRKY53和SAG21)的表达均受H₂O₂的诱导(Zentgraf et al., 2010; Salleh et al., 2012)。ROS信号能够与植物激素信号形成复杂的调控网络, 在调控植物生长发育、衰老以及环境应答等过程中起重要作用(Mittler et al., 2011)。如ROS信号与ABA和乙烯等激素相互作用调控正常及逆境胁迫条件下的植物叶片衰老过程(Wang and Song, 2008; Chen et al., 2012); 与生长素相互作用调控植物主根和侧根生长、种子萌发以及金属胁迫响应等过程(He et al., 2012; Yuan et al., 2013)。但是ROS如何与生长素相互作用调控植物叶片衰老的分子机制尚不清楚。

收稿日期: 2017-03-09; 接受日期: 2017-05-06
基金项目: 国家自然科学基金(No.31370350, No.31271471)
* 通讯作者。E-mail: yangchw@sncu.edu.cn

植物中FtSH (filamentation temperature sensitive H)等ATP依赖的金属蛋白酶在植物生长发育过程中,尤其是维持叶绿体和线粒体膜蛋白的完整性方面起重要作用(Nolden et al., 2005)。拟南芥基因组共编码12个FtSH蛋白(Garcia-Lorenzo et al., 2006),其中有8个定位在叶绿体(FtSH1、2、5-9和12),3个定位在线粒体中(FtSH3、4和10),FtSH11同时存在于叶绿体和线粒体中(Kolodziejczak et al., 2002)。我们前期的研究表明,线粒体*FtSH4*基因突变会导致H₂O₂大量积累(Zhang et al., 2014),叶片出现早衰表型(Zhang et al., 2017)。本研究表明,H₂O₂清除剂和生长素能延缓*ftsh4*突变体的早衰表型,提示该基因可能在H₂O₂与生长素调控叶片衰老过程中发挥重要作用。本研究通过细胞生物学和遗传学等方法,在前期研究的基础上,进一步对线粒体*FtSH4*通过生长素与H₂O₂调控叶片衰老的分子机制进行了深入研究。

1 材料与方法

1.1 植物材料与处理

拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)哥伦比亚野生型及相关突变体(Col-0、*ftsh4-4*基因插入突变体、*arf2-8*基因插入突变体、*ftsh4-4*互补植株以及*FtSH4*过量表达植株),均购于美国ABRC拟南芥突变体中心或者构建于本实验室。拟南芥种子先用70%乙醇溶液表面消毒30秒后,加入10%次氯酸钠消毒10分钟,无菌水冲洗4-5次后均匀播种于MS平板或者吸水纸上。4°C保湿黑暗冷藏3天打破休眠后,移至拟南芥培养室中培养,培养温度为(22±2)°C,光周期为16小时光照/8小时黑暗,光照强度为120-150 μmol·m⁻²·s⁻¹。黑暗培养利用锡箔纸包好后遮光置于培养室。

用10 μmol·L⁻¹的吲哚乙酸(indole acetic acid, IAA)或者30 mg·L⁻¹的抗坏血酸(ascorbic acid, AsA)溶液喷洒2周龄大小的拟南芥植株。每3天处理1次,连续处理2周,对植株衰老表型进行拍照。

1.2 叶绿素含量测定

叶绿素含量测定参照Arnon (1949)的方法并略有改动。选取长日照条件下不同生长时期(3、4和5周)的野生型(WT)、*ftsh4-4*、*FtSH4*过量表达(OV#9)和*ftsh4-4*互补(HB)植株莲座叶(第6、7片莲座叶),每份

材料快速称取0.1 g (至少设置3组重复),加2 mL预冷的80%丙酮研磨后,置于10 mL刻度试管中,再加预冷的80%丙酮至10 mL,加塞置4°C避光条件下浸提12-24小时,至叶片全部褪绿为止,此液即为叶绿素提取液。取光径为1 cm的比色杯,加入3 mL叶绿素提取液,以80%丙酮作为对照,分别于663 nm及645 nm波长下测定吸光度(A值)。将测定得到的吸光度A₆₆₃、A₆₄₅值带入以下公式,计算出叶绿素a、b及叶绿素总含量。

$$\text{Chla (mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{ FW)}=1.27A_{663}-0.269A_{645};$$

$$\text{Chlb (mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{ FW)}=2.29A_{645}-0.468A_{663};$$

$$\text{Chl (mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{ FW)}=\text{Chla}+\text{Chlb}.$$

1.3 相对电导率测定

称取0.1 g不同基因型植株的莲座叶(第6、7片莲座叶,至少设置3组重复),用超纯水冲洗叶片表面,以除去表面黏附的电解质。将叶片用剪刀剪成约1 mm的小条,放入三角瓶中,加入10 mL超纯水,保鲜膜封口;将三角瓶置于25°C的摇床中振荡温育2-3小时,转速为每分钟180转;利用奥立龙便携式纯水电导率仪(Thermoorion320C-06A,美国)测定上述溶液电导率C₁;将测完的溶液用保鲜膜重新封口,沸水浴20分钟,冷却至室温,测定电导率C₂;超纯水的电导率为C₀;计算相对电导率: $\eta=(C_1-C_0)/(C_2-C_0)\times 100\%$ 。

1.4 过氧化物酶活性测定

称取0.1 g不同基因型植株的莲座叶(第6、7片莲座叶,至少设置3组重复);加入0.5 mL酶提取缓冲液(现配现用,提前预冷),在冰上充分研磨,将研好的匀浆吸入1.5 mL EP管中,再加入0.5 mL酶提取缓冲液冲洗研钵,并将洗液全部转移至EP管中;将研好的匀浆于4°C下12 000×g离心20分钟;取等量上清,即为POD粗提液,4°C保存备用。测定470 nm处OD值。以植物组织样品(鲜重)每分钟内A₄₇₀处变化0.01为1个POD活性单位(U),表示单位为ΔOD₄₇₀/(g·min)。计算公式:

$$\Delta\text{OD}_{470} = \frac{\Delta A_{470} \times V_s}{W \times V_0 \times 0.01 \times t}$$

其中,ΔA₄₇₀为反应时间内吸光值的变化;W为所称样品重(g);t为反应时间(min);V_s为提取酶液总体积

(mL); V_0 为测定时取用酶液体积(mL)。

1.5 乳酚-台盼蓝染色

将10 mL乳酸、10 mL甘油、10 g苯酚及20 mg台盼蓝溶于10 mL蒸馏水中配置成染色液;取拟南芥离体莲座叶(第6、7片莲座叶),浸入上述溶液中,沸水浴约1–2分钟;用水合氯醛溶液(2.5 g水合氯醛溶于1 mL蒸馏水)进行脱色,至叶片无台盼蓝浮色(未染上色的区域近无色)即可;用显微镜观察细胞着色情况并拍照。

1.6 DAB染色

配制50 mmol·L⁻¹ Tris溶液,用醋酸调pH值至3.8,将二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)溶于该溶液,配制成浓度为1 mg·mL⁻¹的染色液。将叶片浸入上述染色液中,于25°C避光条件下静置24小时。将染好色的材料用80%乙醇,沸水浴10分钟脱色。将脱色的叶片展开并拍照。

1.7 实时荧光定量PCR检测基因表达

取野生型和上述各种突变体植株以及各种处理前后植株的第5、6片莲座叶,利用TRIzol试剂提取RNA后,用DNase I处理总RNA以消除基因组DNA污染,定量后取相同量的RNA按TAKARA反转录试剂盒(Cat No.D6210A)说明书将RNA反转录成cDNA第1链。将所得第1链稀释100–200倍作为定量PCR反应模板,利用TAKARA SYBR GREEN 试剂盒(Cat No.DRR081A)进行实时荧光定量检测;利用美国Applied Biosystems公司7300 Real Time PCR扩增仪进行定量实验,利用实时荧光定量PCR反应(Quantitative Realtime PCR)检测PER34 (At3g49120)、PER33 (At3g49110)、PER37 (At4g08770)、ARF2 (At5g62000)、ARF7 (At5g20730)、SAG12 (At5g45890)、SAG13 (At2g29350)、SAG101 (At5g14930)、SEN1 (At4g35770)和SEN4 (At4g30270)基因的表达。引物设计采用Beacon Designer 7.0软件,引物序列见表1。

利用7300仪器系统自带软件(SDS V1.3)对数据进行统计分析,以UBQ10 (At4g05320)为对照进行数据分析,得出目的基因的相对表达量。实验进行3次生物学重复,每次生物学重复设3次技术重复。

表1 引物序列

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'–3')
PER33F	TCTTCTCCATCACTTCTTCTTA
PER33R	ATCCTCCAACACATATTCTCTA
PER37F	CGCCAACACTCTTTGACAACAAG
PER37R	ACTCATCCTTATCATTGCCTTCGC
ARF2F	AATATAGCACCTTCATCTCCT
ARF2R	ATCACACTCTACACTCTCAG
ARF7F	GCTAATGCTAATAACAGTCCTT
ARF7R	TCCACATTCTTCAGTCTCAA
SAG12F	ATGATGAGCAAGCACTGATGAAGG
SAG12R	TCCGTTAGTAGATTCCGCCGTATCC
SAG13F	GCGACAACATAAAGGACGAAGCTCTG
SAG13R	GAAGACAAAGAAATGCCACAAGCG
SAG101F	GGGATGAGAGACGATGTGAGAGAG
SAG101R	CGGGTGTTTCATAAACTCGGTCAAG
SEN1F	GGACATCCGACTAGAGCCATCAAC
SEN1R	ATCGCCGTGAAGCCAGCAG
SEN4F	AACCGCCAATTTCCACACTTACTC
SEN4R	CTCTTGTTGCCAATCGTCTGCTG
UBQ10F	CCGACTACAACATTTCAGAAG
UBQ10R	TATCAATGGTGTTCAGAAGTCT

1.8 数据分析

使用统计软件SPSS10.0对数据进行t-检验(Student's t-test), * 表示平均值之间差异显著($P<0.05$), ** 表示平均值之间差异极显著($P<0.01$), 误差线表示平均值之间的标准差。

2 结果与分析

2.1 FtSH4参与H₂O₂介导的植物叶片衰老

长日照条件下,生长4周的FtSH4基因T-DNA插入突变体ftsh4-4植株与野生型(WT)相比,莲座叶表现出明显的早衰表型,而ftsh4-4突变体互补植株(FtSH4-ftsh4-4, HB)能够完全恢复其早衰表型,FtSH4过表达植株(OV#9)生长情况与WT基本一致(图1A)。长日照条件下不同生长时期(3、4和5周)不同FtSH4基因型植株莲座叶中叶绿素含量以及相对电导率的测定结果显示,长日照条件下生长4周时,ftsh4-4突变体中叶绿素含量开始明显下降(图1B),相对电导率明显上升(图1C)。前期研究表明,ftsh4-4突变体中H₂O₂积累明显升高,外源FtSH4基因能够降低ftsh4-4突变体高含量H₂O₂的积

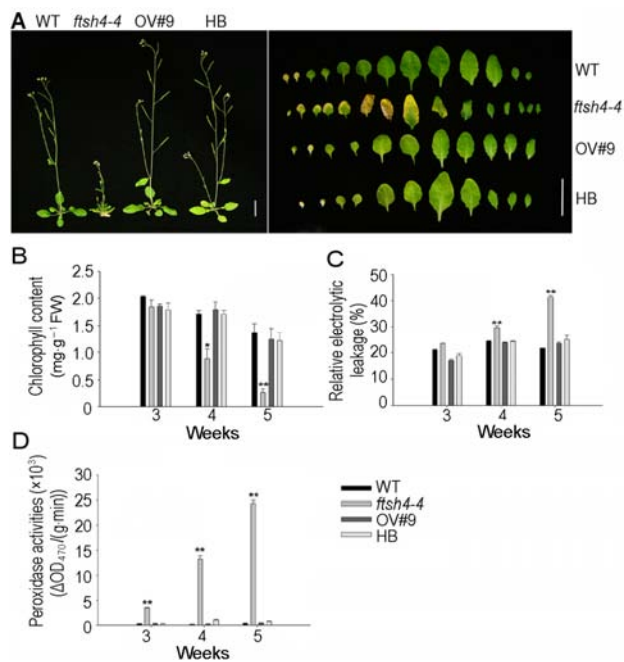


图1 *FtSH4*突变导致拟南芥叶片早衰

(A) *ftsh4-4*突变体表现出衰老表型(Bar=1 cm); (B) *ftsh4-4*突变体叶绿素含量降低; (C) *ftsh4-4*突变体相对电导率增加; (D) *ftsh4-4*突变体过氧化物酶活性增加。* 表示差异显著($P < 0.05$); ** 表示差异极显著($P < 0.01$) (Student's *t*-test)。

Figure 1 *FtSH4* mutation causes leaf senescence of Arabidopsis

(A) The phenotype of premature senescence observed in the *ftsh4-4* mutant (Bar=1 cm); (B) The chlorophyll content decreased in *ftsh4-4* mutant; (C) The relative electrolytic leakage increased in *ftsh4-4* mutant; (D) The peroxidase activities increased in *ftsh4-4* mutant. * indicates significant difference at $P < 0.05$; ** indicates significant difference at $P < 0.01$ (Student's *t*-test).

累, 并且 *ftsh4-4*突变体中过氧化物酶基因 *PRX33*、*PRX34*和 *PRX37*的表达均明显高于WT (Zhang et al., 2014)。为了进一步确定 *FtSH4*与 H_2O_2 的关系, 我们检测了长日照条件下不同生长时期(3、4和5周)不同 *FtSH4*基因型植株莲座叶中过氧化物酶的活性。结果显示, *ftsh4-4*突变体中过氧化物酶活性明显高于WT、OV#9和HB植株; 相比同期WT植株, 3、4和5周龄 *ftsh4-4*突变体中过氧化物酶活性分别增加了约10倍、36倍和62倍(图1D)。以上结果表明, *FtSH4*突变能够诱导 H_2O_2 大量积累, 并且可能通过上调过氧化物酶的活性参与对 H_2O_2 的调控, 进而影响叶片衰老。

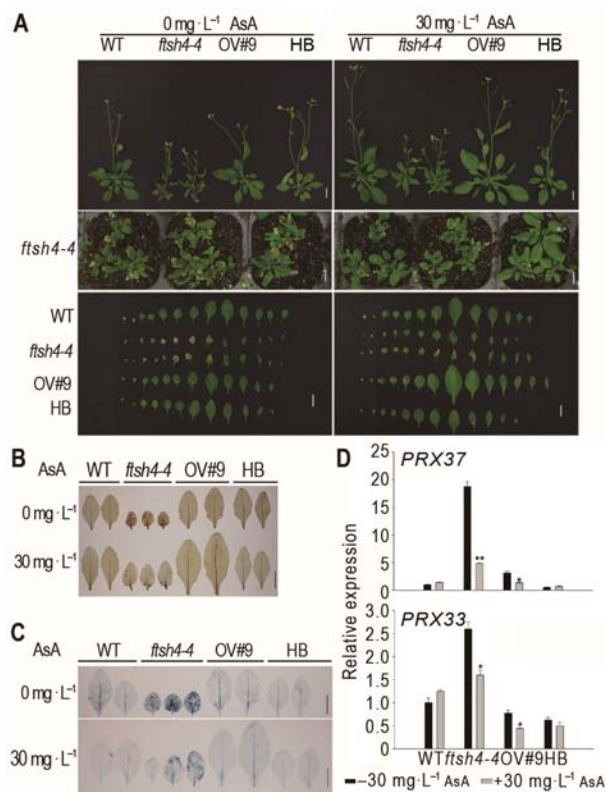


图2 外源抗氧化剂AsA能恢复拟南芥 *ftsh4-4*突变体叶片衰老表型

(A) 外源AsA处理能恢复 *ftsh4-4*突变体早衰表型(Bar=1 cm); (B) 外源AsA处理能降低 *ftsh4-4*突变体中 H_2O_2 含量(Bar=1 cm); (C) 外源AsA处理能减少 *ftsh4-4*突变体中细胞死亡数目(Bar=1 cm); (D) 外源AsA处理能降低 *ftsh4-4*突变体中过氧化物酶基因的表达。* 表示差异显著($P < 0.05$); ** 表示差异极显著($P < 0.01$) (Student's *t*-test)。

Figure 2 Exogenous AsA rescued the leaf senescence phenotype of Arabidopsis *ftsh4-4* mutant

(A) Exogenous AsA rescued the leaf senescence phenotype of *ftsh4-4* mutant (Bar=1 cm); (B) Exogenous AsA reduced the H_2O_2 level of *ftsh4-4* mutant (Bar=1 cm); (C) Exogenous AsA reduced the cell death of *ftsh4-4* mutant (Bar=1 cm); (D) Exogenous AsA reduced the expression of peroxidase genes in *ftsh4-4* mutant. * indicates significant difference at $P < 0.05$; ** indicates significant difference at $P < 0.01$ (Student's *t*-test).

2.2 外施抗氧化剂能恢复 *ftsh4-4*突变体叶片早衰表型

为了进一步确定 *FtSH4*突变后的早衰表型是由于 H_2O_2 含量升高导致细胞死亡而引起的, 我们又进行了外施 H_2O_2 清除剂处理实验。用 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AsA溶液处理2周龄拟南芥植株, 2周后能明显延缓 *ftsh4-4*突变体的早衰表型(图2A)。对植株莲座叶进行DAB染色,

发现AsA处理后 *ftsh4-4* 突变体中H₂O₂含量明显比未处理植株少, 而WT、OV#9和HB植株处理前后则没有明显差异(图2B)。同时, 乳酚-台盼蓝染色结果显示, AsA处理后 *ftsh4-4* 突变体中细胞死亡数量明显减少(图2C)。以上结果表明, *ftsh4-4* 突变体早衰表型是由于H₂O₂含量升高进而导致细胞死亡所引起的。我们进一步利用qRT-PCR分析了过氧化物酶基因在AsA处理前后植株莲座叶中的表达情况, 发现处理后 *PRX-33*和 *PRX37*在 *ftsh4-4* 突变体中的表达分别下调了38.5%和74.3%(图2D)。以上结果表明, *FtSH4*通过介导 *PRX33*和 *PRX37*等过氧化物酶基因的表达来影响H₂O₂含量, 进而参与调控植物叶片衰老过程。

2.3 生长素能恢复 *ftsh4-4* 突变体叶片早衰表型

前期研究表明, 与野生型相比, *ftsh4-4* 突变体中IAA含量减少(Zhang et al., 2014)。为了验证 *ftsh4-4* 突变体的早衰表型是否是由植物体内IAA含量减少所引起的, 我们利用外源生长素处理 *ftsh4-4* 突变体。结果发现, 外源生长素能明显延缓 *ftsh4-4* 突变体的早衰表型(图3A)。对IAA处理2周后的莲座叶进行乳酚-台盼蓝染色, 结果显示, 10 μmol·L⁻¹ IAA处理后 *ftsh4-4* 突变体中细胞死亡数目明显比未处理植株少, 而WT、OV#9和HB植株处理前后没有明显差异(图3B)。结果表明生长素在 *FtSH4* 介导的植物叶片衰老调控中发挥重要作用。

为了进一步确定 *ftsh4-4* 突变体表现出的早衰表型是由IAA含量减少引起的, 我们构建了 *iaaM-ftsh4-4* 转基因植株(Zhang et al., 2014)。*iaaM* 编码色氨酸单加氧酶(IAAM), IAAM是生长素合成途径吲哚乙酰胺途径中的关键酶, 能催化色氨酸转化为吲哚乙酰胺(IAM), 随后IAM再通过吲哚乙酰胺水解酶(IAAH)水解成IAA (Camilleri and Jouanin, 1991; Romano et al., 1995)。与 *ftsh4-4* 突变体相比, *iaaM-ftsh4-4* 转基因植株中内源IAA含量增加(Zhang et al., 2014)。*iaaM-ftsh4-4* 能恢复 *ftsh4-4* 突变体的叶片早衰表型, 表现出与WT一致的表型(图4A)。对4周龄拟南芥植株莲座叶进行乳酚-台盼蓝染色, 结果显示, 与 *ftsh4-4* 突变体相比, *iaaM-ftsh4-4* 转基因植物细胞死亡数目明显减少(图4B), 并且 *iaaM-ftsh4-4* 植株的叶绿素含量(图4C)及相对电导率(图4D)等衰老生理指标均恢复到与野生型相同的正常水平。我们还利用qRT-

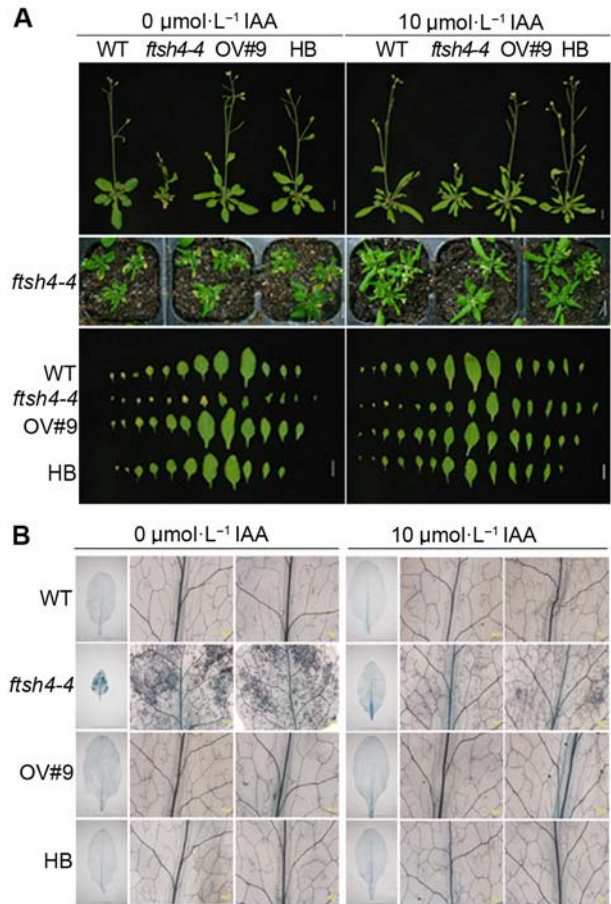


图3 外源生长素(IAA)能恢复拟南芥 *ftsh4-4* 突变体早衰表型
(A) 外源IAA处理能恢复 *ftsh4-4* 突变体早衰表型(Bar=1 cm);
(B) 外源IAA处理能减少 *ftsh4-4* 突变体中细胞死亡数目

Figure 3 Exogenous IAA restored the leaf senescence phenotype of Arabidopsis *ftsh4-4* mutant
(A) Exogenous IAA restored the leaf senescence phenotype of *ftsh4-4* mutant (Bar=1 cm); (B) Exogenous IAA reduced the cell death of *ftsh4-4* mutant

PCR检测了生长4周的WT、*ftsh4-4*和 *iaaM-ftsh4-4* 植株莲座叶中衰老相关标记基因 *SAG12*、*SAG13*、*SAG101*、*SEN1*及 *SEN4*的表达水平, 发现与WT相比, *ftsh4-4* 突变体植株莲座叶中 *SAG12*、*SAG13*、*SEN1*及 *SEN4*表达量分别增加了440倍、4.2倍、3.7倍和1.3倍, 而 *iaaM-ftsh4-4* 能明显将 *ftsh4-4* 突变体中 *SAG12*、*SAG13*、*SEN1*及 *SEN4*的表达水平降低到WT水平(图4E)。以上结果表明, 增加内源生长素含量能恢复 *ftsh4-4* 突变体的早衰表型, 即 *ftsh4-4* 突变体表现出的早衰表型确实是由于IAA含量减少引起的。

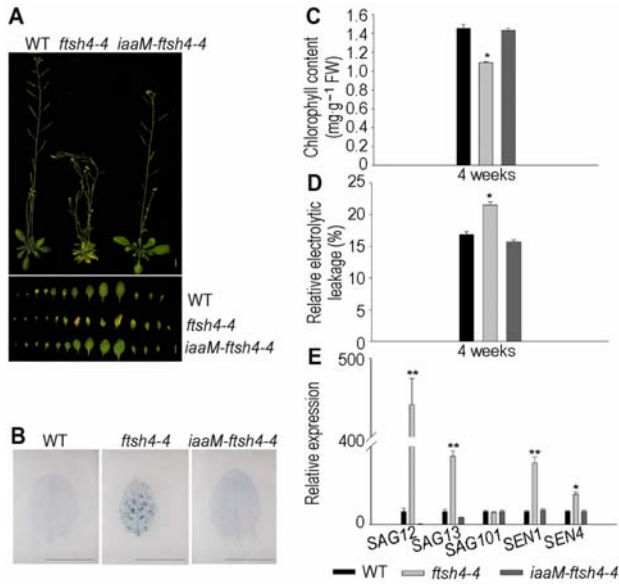


图4 增加内源生长素含量能恢复拟南芥 *ftsh4-4* 突变体早衰表型 (A) 增加内源 IAA 含量能恢复 *ftsh4-4* 突变体早衰表型 (Bar=1 cm); (B) *iaaM-ftsh4-4* 中细胞死亡数目减少 (Bar=1 cm); (C) *iaaM-ftsh4-4* 中叶绿素含量恢复到 WT 水平; (D) *iaaM-ftsh4-4* 中相对电导率恢复到 WT 水平; (E) 内源激素降低 *ftsh4-4* 突变体中衰老基因 *SAG12*、*SAG13*、*SAG101*、*SEN1* 及 *SEN4* 的表达。* 表示差异显著 ($P<0.05$); ** 表示差异极显著 ($P<0.01$) (Student's *t*-test)。

Figure 4 Increasing endogenous IAA restored the leaf senescence phenotype of Arabidopsis *ftsh4-4* mutant

(A) Increasing endogenous IAA restored the leaf senescence phenotype of *ftsh4-4* mutant (Bar=1 cm); (B) Cell death decreased in *iaaM-ftsh4-4* (Bar=1 cm); (C) The chlorophyll content of *iaaM-ftsh4-4* transgenic line restored to the wild type level; (D) The relative electrolytic leakage of *iaaM-ftsh4-4* transgenic line restored to the wild type level; (E) Endogenous IAA decreased the expression of senescence-associated genes *SAG12*, *SAG13*, *SAG101*, *SEN1* and *SEN4* in *ftsh4-4* mutant. * indicates significant difference at $P<0.05$; ** indicates significant difference at $P<0.01$ (Student's *t*-test).

2.4 ARF2参与FtSH4介导的植物叶片衰老过程

为了分析 *ftsh4-4* 突变体出现的早衰表型是否与生长素响应因子 ARF 有关, 我们利用 qRT-PCR 技术检测了 *ARF2* 和 *ARF7* 在 *ftsh4-4* 突变体莲座叶中的表达变化。在 3 周龄植物中, *ARF2* 和 *ARF7* 在 *ftsh4-4* 中的表达明显比 WT 高 (图 5A)。为了进一步探明 *ftsh4-4* 突变体的早衰表型是否是由于 *ARF2* 和 *ARF7* 表达异常所致, 我们检测了 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA 和 $30 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AsA 处理后

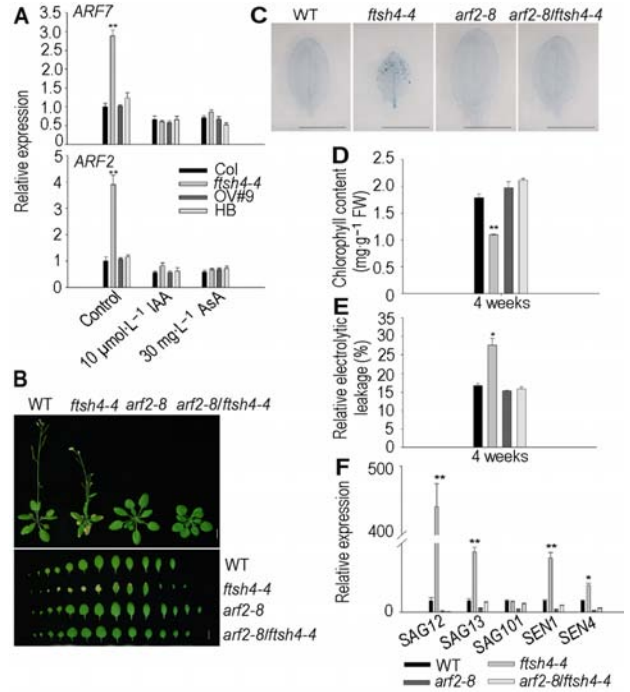


图5 ARF2参与FtSH4介导的拟南芥叶片衰老过程

(A) 生长素响应因子基因 *ARF2* 和 *ARF7* 在 *ftsh4-4* 中上调表达并受外源 IAA 和 AsA 抑制; (B) *ARF2* 突变抑制了 *ftsh4-4* 的叶片衰老 (Bar=1 cm); (C) *ARF2* 突变使 *ftsh4-4* 中细胞死亡数目减少 (Bar=1 cm); (D) *ARF2* 突变使 *ftsh4-4* 中叶绿素含量增加; (E) *ARF2* 突变使 *ftsh4-4* 中相对电导率降低; (F) *ARF2* 突变使 *ftsh4-4* 中衰老相关标记基因 *SAG12*、*SAG13*、*SAG101*、*SEN1* 及 *SEN4* 下调表达。* 表示差异显著 ($P<0.05$); ** 表示差异极显著 ($P<0.01$) (Student's *t*-test)。

Figure 5 ARF2 is involved in FtSH4-mediated leaf senescence of Arabidopsis

(A) The expression levels of *ARF2* and *ARF7* increased in the *ftsh4-4* and were inhibited by the exogenous IAA and AsA; (B) *ARF2* mutation rescued the leaf senescence of *ftsh4-4* mutant (Bar=1 cm); (C) *ARF2* mutation reduced the cell death of *ftsh4-4* mutant (Bar=1 cm); (D) *ARF2* mutation increased the chlorophyll content of *ftsh4-4* mutant; (E) *ARF2* mutation reduced the relative electrolytic leakage of *ftsh4-4* mutant; (F) *ARF2* mutation reduced the expression of senescence-associated genes *SAG12*, *SAG13*, *SAG101*, *SEN1* and *SEN4*. * indicates significant difference at $P<0.05$; ** indicates significant difference at $P<0.01$ (Student's *t*-test).

不同 *FtSH4* 基因型植株莲座叶中 *ARF2* 和 *ARF7* 的表达变化。结果表明, IAA 或者 AsA 处理后, *ftsh4-4* 突变体莲座叶中 *ARF2* 和 *ARF7* 的表达与其它基因型植物相比没有明显差异 (图 5A)。由此推测, 生长素响应因子基因 *ARF2* 和 *ARF7* 可能参与了 *FtSH4* 介导的植物

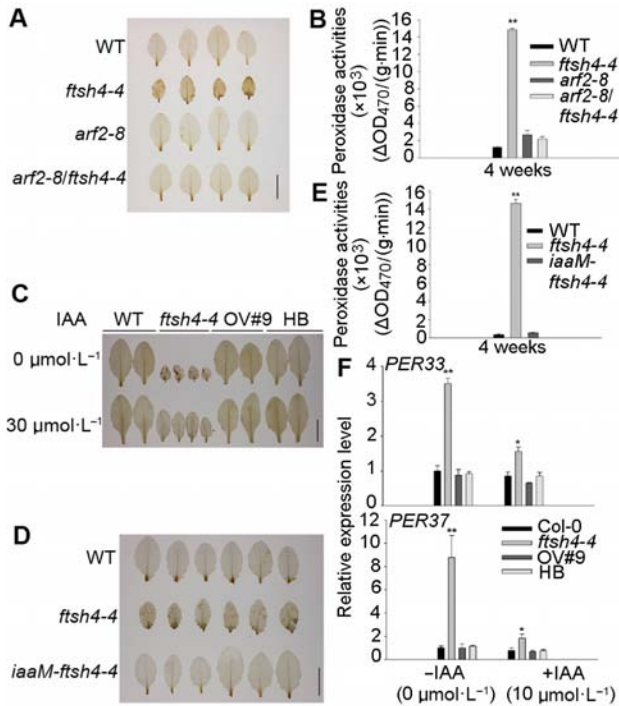


图6 生长素处理降低拟南芥 *ftsh4-4* 突变体中 H_2O_2 含量和过氧化物酶活性

(A) *ARF2* 突变使 *ftsh4-4* 中 H_2O_2 含量减少 (Bar=1 cm); (B) *ARF2* 突变使 *ftsh4-4* 中过氧化物酶活性降低; (C) 外施生长素能降低 *ftsh4-4* 突变体中 H_2O_2 含量 (Bar=1 cm); (D) 增加内源生长素含量能降低 *ftsh4-4* 突变体中 H_2O_2 含量 (Bar=1 cm); (E) 增加内源生长素含量能降低 *ftsh4-4* 突变体中过氧化物酶活性; (F) 外源生长素处理降低 *ftsh4-4* 突变体中过氧化物酶基因的表达。* 表示差异显著 ($P<0.05$); ** 表示差异极显著 ($P<0.01$) (Student's *t*-test)。

Figure 6 IAA treatment reduces the H_2O_2 level and peroxidase activities of Arabidopsis *ftsh4-4* mutant

(A) *ARF2* mutation reduced the H_2O_2 level of *ftsh4-4* mutant (Bar=1 cm); (B) *ARF2* mutation reduced the peroxidase activities of *ftsh4-4* mutant; (C) Exogenous IAA rescued the H_2O_2 level of *ftsh4-4* mutant (Bar=1 cm); (D) Increasing endogenous IAA reduced the H_2O_2 level of *ftsh4-4* mutant (Bar=1 cm); (E) Increasing endogenous IAA reduced the peroxidase activities of *ftsh4-4* mutant; (F) Exogenous IAA reduced the peroxidase genes expression of *ftsh4-4* mutant. * indicates significant difference at $P<0.05$; ** indicates significant difference at $P<0.01$ (Student's *t*-test).

叶片衰老过程。

为了明确生长素响应因子基因是否确实参与 *FtSH4* 介导的植物叶片衰老过程, 我们进一步构建了

arf2 和 *ftsh4-4* 的双突变体 *arf2-8/ftsh4-4* 并对其衰老表型进行了分析。结果发现 *arf2-8/ftsh4-4* 双突变体能恢复 *ftsh4-4* 的早衰表型 (图5B); 对长日照条件下生长4周的WT、*ftsh4-4*、*arf2-8* 及 *arf2-8/ftsh4-4* 植株莲座叶进行乳酚-台盼蓝染色, 发现 *arf2-8/ftsh4-4* 双突变体中细胞死亡数目明显比 *ftsh4-4* 少 (图5C)。叶绿素含量及相对电导率测定结果显示, *arf2-8* 能够将 *ftsh4-4* 突变体中叶绿素含量 (图5D) 和相对电导率 (图5E) 恢复到WT水平。为了进一步确定 *arf2-8* 确实恢复了 *ftsh4-4* 早衰表型, 我们利用qRT-PCR检测了长日照条件下生长4周的WT、*arf2-8*、*ftsh4-4* 及 *arf2-8/ftsh4-4* 植株莲座叶中衰老相关基因 *SAG12*、*SAG13*、*SAG101*、*SEN1* 及 *SEN4* 的表达水平, 结果显示, *arf2-8/ftsh4-4* 中 *SAG12*、*SAG13*、*SEN1* 及 *SEN4* 的表达量降低至WT水平 (图5F), 这表明生长素响应因子基因 *ARF2* 确实参与了 *FtSH4* 介导的植物叶片衰老过程。

2.5 生长素通过 *ARF2* 和 H_2O_2 调控 *ftsh4-4* 突变体叶片衰老

为了探究 *ARF2* 是否通过 H_2O_2 介导了 *FtSH4* 对叶片衰老的调控, 我们分析了 *arf2-8/ftsh4-4* 双突变体中 H_2O_2 含量。对4周龄植株进行DAB染色, 结果显示, 与 *ftsh4-4* 突变体相比, *arf2-8/ftsh4-4* 双突变体中 H_2O_2 含量明显减少 (图6A)。同时, WT、*ftsh4-4*、*arf2-8* 及 *arf2-8/ftsh4-4* 植株过氧化物酶活性检测结果表明, 相比同期WT植株, *ftsh4-4* 突变体中过氧化物酶活性增加了约41倍, 而 *arf2-8/ftsh4-4* 双突变体中过氧化物酶活性与WT基本一致 (图6B)。这表明 *ARF2* 可能通过 H_2O_2 介导 *FtSH4* 对叶片衰老的调控。

为了进一步研究生长素能否调控 *ftsh4-4* 突变体中的 H_2O_2 含量, 我们又检测了外源IAA处理后 *ftsh4-4* 突变体植株中 H_2O_2 的含量变化。DAB染色结果显示, 外施生长素能明显降低 *ftsh4-4* 突变体中的 H_2O_2 含量 (图6C)。同时也检测了 *iaaM-ftsh4-4* 转基因植株中 H_2O_2 的含量变化, DAB染色结果表明, 增加内源生长素含量也能明显降低 *ftsh4-4* 突变体中 H_2O_2 含量 (图6D)。*iaaM-ftsh4-4* 转基因植株过氧化物酶活性检测结果表明, 相比同期WT植株, *ftsh4-4* 突变体中过氧化物酶活性增加了约35.7倍, 而 *iaaM-ftsh4-4* 转基因植株中过氧化物酶活性基本与WT植株一致 (图6E)。此

外,我们还分析了过氧化物酶基因 *PRX33*和*PRX37*的表达,发现IAA处理能明显降低 *ftsh4-4*突变体中 *PRX33*和*PRX37*的表达水平(图6F),处理后 *PRX33*和*PRX37*在 *ftsh4-4*突变体中的表达分别下调了32.4%和58.3%。以上结果进一步确定了生长素能够通过降低 *ftsh4-4*突变体中 H_2O_2 的含量以及过氧化物酶的活性来调控叶片衰老。

3 讨论

目前,关于拟南芥FtSH蛋白酶功能的研究主要集中在定位于叶绿体的FtSH蛋白,而线粒体定位的FtSH蛋白酶的具体功能及其分子机制还不清楚。*FtSH1*通过清除D1片段调节光系统II的降解(Malnoe et al., 2014)。*FtSH2*和*FtSH5*参与类囊体蛋白质的降解及质体发育过程,2个基因的功能缺失会引起光保护机制的破坏和内囊体的发育异常,并导致叶斑表型(Sakamoto et al., 2002)。*FtSH8*和*FtSH1*分别与*FtSH2*和*FtSH5*存在功能冗余,且FtSH2/FtSH8以及FtSH5/FtSH1形成的复合体参与了光系统II反应中心蛋白D1的降解(Kato et al., 2009)。2个不同的*ftsh11*突变体均表现出热敏感,表明*FtSH11*可能在应对高温胁迫中发挥重要作用(Chen et al., 2006)。相比其它类型的FtSH蛋白,FtSH2、3、5、10、11在植物生长发育及对环境的适应性中表现出更为重要的作用(Wagner et al., 2011)。线粒体定位的FtSH3和FtSH10通过影响氧化磷酸化途径中相关复合体的活性来调控植物的正常发育(Piechota et al., 2010)。在短日照条件下,线粒体定位的FtSH4蛋白酶缺失突变体 *ftsh4-1*中ROS (H_2O_2)含量增加,造成拟南芥莲座叶形态发生改变(Gibala et al., 2009),并且*FtSH4*能够通过影响过氧化物酶的积累来调控生长素的体内平衡,进而调控拟南芥的株型(Zhang et al., 2014)。

本研究表明, *FtSH4*基因插入突变体 *ftsh4-4*在长日照条件下具有早衰表型,且其叶片早衰表型能够被外源生长素所抑制,提示FtSH4可能通过生长素正调控植物叶片衰老过程。生长素在调控植物叶片衰老中的功能一直存在争议。有研究认为,生长素能促进植物叶片衰老。例如,大豆(*Glycine max*)中衰老相关受体类激酶(GmSARK)的表达受到生长素的诱导, Gm-SARK在拟南芥中过量表达能够诱导植物叶片早衰,

生长素缺失突变体能延缓GmSARK过量表达植株的早衰表型(Xu et al., 2011);拟南芥中受生长素诱导表达的基因SAUR36能够促进植物叶片衰老, SAUR-36在衰老叶片中表达明显升高,其功能缺失突变体表现出衰老延缓表型,而过量表达植株则表现出早衰表型(Hou et al., 2013)。另有研究则认为,生长素能够抑制植物叶片衰老。例如,拟南芥黄素单氧合酶基因YUCCA6过量表达植株35S:YUC6和激活突变体 *yuc6-1D*植株中自由生长素含量增加,能够延缓黑暗诱导的叶片衰老,降低衰老相关标记基因SAG12的表达(Kim et al., 2011); SAUR39过量表达能导致植物体内生长素含量减少并且表现出早衰表型(Kant et al., 2009);拟南芥生长素响应因子ARF2缺失突变体的莲座叶表现出衰老延缓表型(Ellis et al., 2005; Lim et al., 2010)。此外,生长素响应因子基因ARF1、ARF7以及ARF19也可促进叶片衰老(Li et al., 2012)。本研究表明,在 *ftsh4-4*突变体中突变ARF2后能够恢复 *ftsh4-4*的早衰表型,表明 *ftsh4-4*的叶片早衰表型也是由于高水平表达ARF2造成的。

植物通过各种机制调控体内IAA的平衡,如生长素的生物合成、降解和转运以及IAA的氧化(Meudt and Gaines, 1967; Woodward and Bartel, 2005)。许多研究认为,ROS是植物及其它生物不同代谢过程中的重要信号分子,可与植物激素及其它信号分子相互作用,参与病原体防御、非生物胁迫耐受、气孔调节、发育、生长以及细胞增殖等代谢过程(Blomster et al., 2011; Suzuki et al., 2011; Sierla et al., 2013)。生物/非生物胁迫能诱导植物体ROS的产生,增加的ROS能改变体内生长素平衡,进而导致植株株型发生变化(Potters et al., 2007)。ROS不仅可通过调节参与生长素合成的相关酶活性来影响生长素的体内平衡,同时也可以通过依赖 H_2O_2 产生的过氧化物酶氧化降解生长素(Ljung et al., 2002)。植物过氧化物酶具有生长素氧化酶活性,能够催化IAA与氧分子发生氧化反应,从而氧化IAA (Savitsky et al., 1999)。另外, H_2O_2 也能够氧化植物体内的IAA,催化其降解,进而扰乱植物体内生长素的稳态平衡(Gazarian et al., 1998);同时, H_2O_2 能够通过激活拟南芥中特殊的促分裂原活化蛋白激酶ANP1来抑制生长素活性(Kovtun et al., 2000);而且 H_2O_2 能够以依赖蛋白酶体的方式调节MAPK级联信号,降低生长素信号途径相关

基因的表达,从而负调控植物生长素信号途径(Nakagami et al., 2006)。拟南芥 *ntral/ntrbl/cad2* 三突变体中 ROS 清除剂硫氧还蛋白和谷胱甘肽的含量降低, ROS 含量升高, 内源生长素含量减少且表现出生长素缺陷相关表型(Bashandy et al., 2010)。外源 ROS 处理能短暂地抑制拟南芥中的生长素信号, 且引发胁迫诱导的表型响应(Blomster et al., 2011)。拟南芥线粒体产生的 ROS 能介导 ABA 和生长素相互作用, 调控主根生长和种子萌发(He et al., 2012)。*ftsh4-4* 突变体中有大量的 H₂O₂ 积累, 过氧化物酶相关基因 *PRX33* 及 *PRX37* 的表达明显上调且过氧化物酶活性明显增强, 外施抗氧化剂能够抑制 *ftsh4-4* 突变体中的早衰表型。结合外源或者内源生长素均能恢复 *ftsh4-4* 的衰老表型, 暗示外源抗氧化剂可能是通过降低突变体内的 ROS 含量及过氧化物酶的活性, 进而恢复 *ftsh4-4* 体内的生长素水平并抑制 *ftsh4-4* 叶片的衰老。也有研究显示, 植物氧化胁迫相关基因的表达受到生长素的调控(Huang et al., 2008), 生长素能够调节植物体内抗氧化酶的含量(Joo et al., 2001)。本研究还表明, 外源生长素处理或者提高内源生长素后不仅恢复了 *ftsh4-4* 突变体的表型, 而且降低了 *ftsh4-4* 突变体植株中 H₂O₂ 含量以及过氧化物酶活性, 暗示着生长素在维持植物体内氧化还原平衡中可能也起重要作用。生长素如何调控植物体内 ROS 的含量是一个非常有趣的科学问题。在 *ftsh4-4* 中, 由于 *ARF2* 突变能够降低 *ftsh4-4* 的 H₂O₂ 含量, 因此生长素很有可能是通过诸如 *ARF2* 等生长素响应因子来调控植物体内的 ROS 含量。

结合本研究以及已报道的 ROS 和生长素相互作用的相关研究结果, 我们推测在 *ftsh4-4* 突变体中, ROS 和生长素两者之间很有可能形成一个调节环, 即 *FtSH4* 的突变导致植物体内 ROS 含量的升高, ROS 能够通过诱导过氧化物酶的产生来抑制生长素的合成, 导致生长素含量的降低以及生长素响应因子表达量的升高, 从而诱导植物的叶片衰老; 同时, 高水平表达的生长素响应因子基因 *ARF2* 等能够进一步促进 ROS 的产生, 外源生长素能够通过抑制 *ARF2* 的表达来抑制 ROS 的含量, 进而抑制植物的叶片衰老。在后续研究中, 可利用蛋白质组学方法发现 *FtSH4* 的相互作用蛋白及靶蛋白, 将为解析 *FtSH4* 在调控叶片衰老中的功能提供更多线索; 同时, 深入研究生长素响应

因子在 ROS 信号途径中的功能将为详细阐明生长素和 ROS 相互作用调控植物生长发育的分子机制提供坚实的理论支撑。

参考文献

- Apel K, Hirt H (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**, 373–399.
- Arnon DI (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* **24**, 1–15.
- Bashandy T, Guilleminot J, Vernoux T, Caparros-Ruiz D, Ljung K, Meyer Y, Reichheld JP (2010). Interplay between the NADP-linked thioredoxin and glutathione systems in Arabidopsis auxin signaling. *Plant Cell* **22** 376–391.
- Blomster T, Salojarvi J, Sipari N, Brosche M, Ahlfors R, Keinanen M, Overmyer K, Kangasjarvi J (2011). Apoplastic reactive oxygen species transiently decrease auxin signaling and cause stress-induced morphogenic response in Arabidopsis. *Plant Physiol* **157**, 1866–1883.
- Camilleri C, Jouanin L (1991). The TR-DNA region carrying the auxin synthesis genes of the *Agrobacterium rhizogenes* agropine-type plasmid pRiA4: nucleotide sequence analysis and introduction into tobacco plants. *Mol Plant Microbe Interact* **4**, 155–162.
- Chen GH, Liu CP, Chen SC, Wang LC (2012). Role of *ARABIDOPSIS A-FIFTEEN* in regulating leaf senescence involves response to reactive oxygen species and is dependent on *ETHYLENE INSENSITIVE2*. *J Exp Bot* **63**, 275–292.
- Chen JP, Burke JJ, Velten J, Xin ZU (2006). FtSH11 protease plays a critical role in Arabidopsis thermotolerance. *Plant J* **48**, 73–84.
- Ellis CM, Nagpal P, Young JC, Hagen G, Guilfoyle TJ, Reed JW (2005). *AUXIN RESPONSE FACTOR1* and *AUXIN RESPONSE FACTOR2* regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **132**, 4563–4574.
- Garcia-Lorenzo M, Sjodin A, Jansson S, Funk C (2006). Protease gene families in *Populus* and Arabidopsis. *BMC Plant Biol* **6**, 30.
- Gazarian IG, Lagrimini LM, Mellon FA, Naldrett MJ, Ashby GA, Thorneley RN (1998). Identification of skatolyl hydroperoxide and its role in the peroxidase-catalysed oxidation of indol-3-yl acetic acid. *Biochem J* **333**, 223–232.
- Gibala M, Kicia M, Sakamoto W, Gola EM, Kubrakiewicz

- J, Smakowska E, Janska H** (2009). The lack of mitochondrial AtFtsH4 protease alters Arabidopsis leaf morphology at the late stage of rosette development under short-day photoperiod. *Plant J* **59**, 685–699.
- Guo Y, Gan SS** (2012). Convergence and divergence in gene expression profiles induced by leaf senescence and 27 senescence-promoting hormonal, pathological and environmental stress treatments. *Plant Cell Environ* **35**, 644–655.
- He J, Duan Y, Hua D, Fan G, Wang L, Liu Y, Chen Z, Han L, Qu LJ, Gong Z** (2012). DEXH box RNA helicase-mediated mitochondrial reactive oxygen species production in Arabidopsis mediates crosstalk between abscisic acid and auxin signaling. *Plant Cell* **24**, 1815–1833.
- Hou K, Wu W, Gan SS** (2013). *SAUR36*, a small auxin up RNA gene, is involved in the promotion of leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Physiol* **161**, 1002–1009.
- Huang YC, Chang YL, Hsu JJ, Chuang HW** (2008). Transcriptome analysis of auxin-regulated genes of *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **420**, 118–124.
- Jibrán R, Hunter DA, Dijkwel PP** (2013). Hormonal regulation of leaf senescence through integration of developmental and stress signals. *Plant Mol Biol* **82**, 547–561.
- Joo JH, Bae YS, Lee JS** (2001). Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiol* **126**, 1055–1060.
- Kant S, Bi YM, Zhu T, Rothstein SJ** (2009). *SAUR39*, a small auxin-up RNA gene, acts as a negative regulator of auxin synthesis and transport in rice. *Plant Physiol* **151**, 691–701.
- Kato Y, Miura E, Ido K, Ifuku K, Sakamoto W** (2009). The variegated mutants lacking chloroplastic FtsHs are defective in D1 degradation and accumulate reactive oxygen species. *Plant Physiol* **151**, 1790–1801.
- Kim JI, Murphy AS, Baek D, Lee SW, Yun DJ, Bressan RA, Narasimhan ML** (2011). *YUCCA6* over-expression demonstrates auxin function in delaying leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **62**, 3981–3992.
- Kolodziejczak M, Kolaczowska A, Szczesny B, Uranko A, Knorpp C, Kieleczawa J, Janska H** (2002). A higher plant mitochondrial homologue of the yeast m-AAA protease-molecular cloning, localization, and putative function. *J Biol Chem* **277**, 43792–43798.
- Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen J** (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 2940–2945.
- Li Z, Peng J, Wen X, Guo H** (2012). Gene network analysis and functional studies of senescence-associated genes reveal novel regulators of Arabidopsis leaf senescence. *J Integr Plant Biol* **54**, 526–539.
- Lim PO, Kim HJ, Nam HG** (2007). Leaf senescence. *Annu Rev Plant Biol* **58**, 115–136.
- Lim PO, Lee IC, Kim J, Kim HJ, Ryu JS, Woo HR, Nam HG** (2010). Auxin response factor 2 (ARF2) plays a major role in regulating auxin-mediated leaf longevity. *J Exp Bot* **61**, 1419–1430.
- Ljung K, Hull AK, Kowalczyk M, Marchant A, Celenza J, Cohen JD, Sandberg G** (2002). Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **49**, 249–272.
- Malnoe A, Wang F, Girard-Bascou J, Wollman FA, de Vitry C** (2014). Thylakoid FtsH protease contributes to photosystem II and cytochrome b6f remodeling in *Chlamydomonas reinhardtii* under stress conditions. *Plant Cell* **26**, 373–390.
- Meudt WJ, Gaines TP** (1967). Studies on the oxidation of indole-3-acetic acid by peroxidase enzymes. I. Colorimetric determination of indole-3-acetic acid oxidation products. *Plant Physiol* **144**, 118–128.
- Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, Gollery M, Shulaev V, Van Breusegem F** (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci* **16**, 300–309.
- Nakagami H, Soukupova H, Schikora A, Zarsky V, Hirt H** (2006). A mitogen-activated protein kinase kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in Arabidopsis. *J Biol Chem* **281**, 38697–38704.
- Nolden M, Ehse S, Koppen M, Bernacchia A, Rugarli EI, Langer T** (2005). The m-AAA protease defective in hereditary spastic paraplegia controls ribosome assembly in mitochondria. *Cell* **123**, 277–289.
- Okushima Y, Fukaki H, Onoda M, Theologis A, Tasaka M** (2007). ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of *LBD/ASL* genes in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 118–130.
- Piechota J, Kolodziejczak M, Juszczak I, Sakamoto W, Janska H** (2010). Identification and characterization of high molecular weight complexes formed by matrix AAA proteases and prohibitins in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **285**, 12512–12521.
- Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Palme KJ, Jansen MA** (2007). Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends Plant Sci* **12**, 98–105.
- Queval G, Issakidis-Bourguet E, Hoeberichts FA, Van-**

- dorpe M, Gakiere B, Vanacker H, Miginiac-Maslow M, Van Breusegem F, Noctor G** (2007). Conditional oxidative stress responses in the Arabidopsis photorespiratory mutant *cat2* demonstrate that redox state is a key modulator of daylength-dependent gene expression, and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H₂O₂-induced cell death. *Plant J* **52**, 640–657.
- Ren G, Zhou Q, Wu S, Zhang Y, Zhang L, Huang J, Sun Z, Kuai B** (2010). Reverse genetic identification of CRN1 and its distinctive role in chlorophyll degradation in Arabidopsis. *J Integr Plant Biol* **52**, 496–504.
- Romano CP, Robson PR, Smith H, Estelle M, Klee H** (1995). Transgene-mediated auxin overproduction in Arabidopsis: hypocotyl elongation phenotype and interactions with the *hy6-1* hypocotyl elongation and *axr1* auxin-resistant mutants. *Plant Mol Biol* **27**, 1071–1083.
- Sakamoto W, Tamura T, Hanba-Tomita Y, Murata M** (2002). The *VAR1* locus of Arabidopsis encodes a chloroplastic FtsH and is responsible for leaf variegation in the mutant alleles. *Genes Cells* **7**, 769–780.
- Salleh FM, Evans K, Goodall B, Machin H, Mowla SB, Mur LA, Runions J, Theodoulou FL, Foyer CH, Rogers HJ** (2012). A novel function for a redox-related LEA protein (SAG21/AtLEA5) in root development and biotic stress responses. *Plant Cell Environ* **35**, 418–429.
- Savitsky PA, Gazaryan IG, Tishkov VI, Lagrimini LM, Ruzgas T, Gorton L** (1999). Oxidation of indole-3-acetic acid by dioxygen catalysed by plant peroxidases: specificity for the enzyme structure. *Biochem J* **340**, 579–583.
- Sierla M, Rahikainen M, Salojarvi J, Kangasjarvi J, Kangasjarvi S** (2013). Apoplastic and chloroplastic redox signaling networks in plant stress responses. *Antioxid Redox Signal* **18**, 2220–2239.
- Suzuki N, Miller G, Morales J, Shulaev V, Torres MA, Mittler R** (2011). Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Curr Opin Plant Biol* **14**, 691–699.
- Wagner R, Aigner H, Pruzinska A, Jankanpaa HJ, Jansson S, Funk C** (2011). Fitness analyses of *Arabidopsis thaliana* mutants depleted of FtsH metalloproteases and characterization of three FtsH6 deletion mutants exposed to high light stress, senescence and chilling. *New Phytol* **191**, 449–458.
- Wang P, Song CP** (2008). Guard-cell signaling for hydrogen peroxide and abscisic acid. *New Phytol* **178**, 703–718.
- Watanabe M, Balazadeh S, Tohge T, Erban A, Gialalisco P, Kopka J, Mueller-Roeber B, Fernie AR, Hoefgen R** (2013). Comprehensive dissection of spatiotemporal metabolic shifts in primary, secondary, and lipid metabolism during developmental senescence in Arabidopsis. *Plant Physiol* **162**, 1290–1310.
- Woodward AW, Bartel B** (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot* **95**, 707–735.
- Xu F, Meng T, Li P, Yu Y, Cui Y, Wang Y, Gong Q, Wang NN** (2011). A soybean dual-specificity kinase, GmSARK, and its Arabidopsis homolog, AtSARK, regulate leaf senescence through synergistic actions of auxin and ethylene. *Plant Physiol* **157**, 2131–2153.
- Yuan HM, Liu WC, Jin Y, Lu YT** (2013). Role of ROS and auxin in plant response to metal-mediated stress. *Plant Signal Behav* **8**, e24671.
- Zentgraf U, Laun T, Miao Y** (2010). The complex regulation of *WRKY53* during leaf senescence of *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Cell Biol* **89**, 133–137.
- Zhang S, Wu J, Yuan D, Zhang D, Huang Z, Xiao L, Yang C** (2014). Perturbation of auxin homeostasis caused by mitochondrial *FtSH4* gene-mediated peroxidase accumulation regulates Arabidopsis architecture. *Mol Plant* **7**, 856–873.
- Zhang S, Li C, Wang R, Chen Y, Shu S, Huang R, Zhang D, Xiao S, Yao N, Li J, Yang CW** (2017). The mitochondrial protease FtSH4 regulates leaf senescence via WRKY-dependent salicylic acid signal. *Plant Physiol* **173**, 2294–2307.
- Zimmermann P, Heinlein C, Orendi G, Zentgraf U** (2006). Senescence-specific regulation of catalases in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Cell Environ* **29**, 1049–1060.

Arabidopsis Metalloprotease FtSH4 Regulates Leaf Senescence Through Auxin and Reactive Oxygen Species

Shengchun Zhang, Qingming Li, Chengwei Yang*

Guangdong Provincial Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

Abstract The plant metalloproteinases FtSH gene family has 12 members in Arabidopsis, and their functions are still unclear. In the present study, we analyzed the function of *FtSH4* on leaf senescence using cell biology and genetics methods. The *ftsh4-4* mutant displayed a premature leaf senescence phenotype with increased H₂O₂ content and cell death rate, decreased chlorophyll content, increased peroxidase gene expression and peroxidase activity. The *ftsh4-4* leaf senescence phenotype could be rescued by applying the exogenous antioxidant AsA and endogenous or exogenous auxin by decreasing H₂O₂ content, peroxidase gene expression level and peroxidase activity. The expression of auxin response factor genes *ARF2* and *ARF7* was increased in the *ftsh4-4* mutant and was reduced by exogenous auxin or AsA. Moreover, H₂O₂ content and the senescence phenotype of *ftsh4-4* could be rescued by the *arf2-8* mutant. These results indicate that *FtSH4* gene plays an important role in the regulation of leaf senescence through auxin and reactive oxygen species.

Key words FtSH4, Arabidopsis, reactive oxygen species, auxin, leaf senescence

Zhang SC, Li QM, Yang CW (2017). Arabidopsis metalloprotease FtSH4 regulates leaf senescence through auxin and reactive oxygen species. *Chin Bull Bot* **52**, 453–464.

* Author for correspondence. E-mail: yangchw@scnu.edu.cn

(责任编辑: 朱亚娜)