

BIỂU HIỆN CỦA PROTEIN FIT TRONG CÁC ĐIỀU KIỆN SẮT (Fe) KHÁC NHAU KẾT HỢP VỚI STRESS OXY HÓA TRÊN CÂY ARABIDOPSIS

Vũ Thị Thúy Hằng¹, Phan Thi Thu Hiền², Lê Thị Tuyết Châm^{1*}

¹Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2

*Tác giả liên hệ: lttcham@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 21.08.2023

Ngày chấp nhận đăng: 05.01.2024

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm đánh giá sự biểu hiện của protein FIT (Fer-Like Fe Deficiency-Induced Transcription Factor) trong các điều kiện sắt (Fe) khác nhau kéo dài 8 và 10 ngày kết hợp với stress oxy hóa. Nghiên cứu trước đã cho thấy cây sinh trưởng trong điều kiện thiếu Fe kéo dài 10 ngày, sự biểu hiện của FIT ở mức phiên mã bị ức chế so với cây sinh trưởng trong 8 ngày ở cùng điều kiện. Trong thí nghiệm này, mức độ biểu hiện của protein FIT được đánh giá bằng kỹ thuật Western Blot trên cây *Arabidopsis* chuyển gen biểu hiện FIT liên tục 8 và 10 ngày tuổi. Kết quả biểu hiện protein FIT được định lượng bằng phần mềm ImageJ. Kết quả cho thấy trong điều kiện thiếu và thừa Fe, sự biểu hiện của protein FIT ở cây 10 ngày tuổi thấp hơn cây 8 ngày tuổi, ngược lại với điều kiện đủ Fe. Khi xử lý stress oxy hóa bằng peroxyt (H_2O_2) mức độ biểu hiện của FIT tăng lên ngoại trừ trong điều kiện thiếu Fe 8 ngày. Kết quả này là tiền đề cho nghiên cứu tiếp theo về cơ chế hoạt động của FIT liên quan đến các điều kiện có hàm lượng Fe khác nhau.

Từ khóa: *Arabidopsis*, định lượng protein, FIT Ox, hàm lượng Fe khác nhau, yếu tố phiên mã FIT.

Expression of FIT Protein in Response to Different Iron (Fe) Levels and Oxidative Stress in Arabidopsis

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the expression of FIT (FER-LIKE FE DEFICIENCY-INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR) at translational level under different iron (Fe) conditions prolonged 8 and 10 days associated with oxidative stress. This study assessed the expression of FIT at the translational level using the Western Blot technique in transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing FIT for 8 and 10 days. FIT protein contents will be quantified using ImageJ software. The results showed that under Fe deficiency and excess conditions, the expression of FIT protein in 10-day-old plants was lower than in 8-day-old plants, in contrast to Fe-sufficient conditions. Under oxidative stress conditions, the expression of FIT increased except in the condition of Fe deficiency for 8 days. This result helps to complement the further study of the mechanism of FIT under conditions containing different Fe content.

Keywords: *Arabidopsis*, FIT, FIT overexpression, protein quantification, Fe level, oxidative stress.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

FIT (Fer-Like Iron Deficiency-Induced transcription Factor) là yếu tố phiên mã tương đồng với yếu tố phiên mã FER có chức năng điều hòa thiết yếu cho quá trình hấp thụ Fe (Colangelo & Guerinot, 2004; Jakoby & cs., 2004; Yuan & cs., 2005). FIT được kích hoạt khi thiếu sắt cùng với một số yếu tố phiên mã có cấu

trúc dạng bHLH (Zhang & cs., 2015; Li & cs., 2016; Liang & cs., 2017) và protein kinase liên quan đến quá trình phosphoryl hóa ở vị trí Ser271/272 của chính nó (Gratz & cs., 2019). FIT sẽ không thể điều hòa quá trình thu nhận sắt một mình, thông thường nó hoạt động trong phức hợp cùng với một thành viên của phân nhóm yếu tố phiên mã bHLH Ib như bHLH039 (Yuan & cs., 2008; Wang & cs., 2013). Hơn nữa,

FIT còn tương tác với các yếu tố phiên mã khác để điều chỉnh hoạt động của mình như các yếu tố tham gia các con đường dẫn tín hiệu liên quan đến hormone etylen và stress phi sinh học như stress oxy hóa, stress thiếu Fe (Lingam & cs., 2011; Le & cs., 2016; Cui & cs., 2018; Gratz & cs., 2019; 2020). Do đó, FIT đóng vai trò như một trung tâm điều hòa trong các tế bào rễ để nhận biết các tín hiệu bên ngoài và bên trong sau đó điều chỉnh quá trình thu nhận sắt trong quá trình sinh trưởng (Schwarz & Bauer, 2020; Kanwar & cs., 2021).

Ở thực vật, thiếu Fe có thể được phát hiện bằng sự thay đổi màu sắc của lá. Lá màu vàng nhạt là một triệu chứng thiếu Fe (-Fe) điển hình, bản lá có màu từ nhạt đến vàng, đặc biệt rõ rệt ở các lá non nhỏ. Sự phân hóa lục lạp và sinh tổng hợp diệp lục, các quá trình phụ thuộc vào Fe đều bị tổn hại khi lá chuyển màu vàng nhạt. Điều này dẫn đến thực vật sinh trưởng và phát triển kém (Rakesh & cs., 2021). Quá trình tái huy động Fe có thể diễn ra ở những lá già hơn (Avila-Ospina & cs., 2014). Trong khi đó, dấu hiệu của thực vật thừa sắt là khi lá có màu nâu đồng, đây cũng là một dấu hiệu của ngộ độc Fe. Khi Fe dư thừa sẽ gây hại cho cây và Fe tự do sẽ phản ứng với oxy để sản sinh các loại gốc tự do (ROS - Reactive oxygen Species) thường xuất hiện sau khi cây bị stress như stress oxy hóa (Tanaka & cs., 1966; Le & cs., 2019). Trong điều kiện như vậy, các tế bào có cơ chế dựa trên các hợp chất chống oxy hóa và enzyme để bảo vệ khỏi các tác động của các loại gốc tự do khác nhau được sinh ra. Các gốc tự do này gây tổn hại cho các phân tử sinh học, đồng thời gây ra đột biến ADN và protein bị lỗi (Le & cs., 2019).

Theo nghiên cứu của Le & cs. (2016), sự biểu hiện của gen FIT ở cấp độ phiên mã được tăng lên trong điều kiện thiếu sắt, thậm chí khi giai đoạn thiếu Fe lên đến 8 ngày (giai đoạn này hàm lượng H₂O₂ cũng được tăng cao như khi cây bị stress oxy hóa). Tuy nhiên, khi sự thiếu sắt kéo dài đến 10 ngày, sự biểu hiện này bị ức chế (Le & cs., 2016). Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của các liều lượng Fe khác nhau và stress oxy hóa đến sự tổng hợp protein FIT được đánh giá trong các dòng *Arabidopsis* chuyển gen FIT

biểu hiện liên tục. Mục tiêu của nghiên cứu nhằm xem xét mức độ biểu hiện của protein FIT trong các điều kiện thiếu Fe và thừa Fe kéo dài 8 và 10 ngày. Từ đó có thể nghiên cứu tiếp cơ chế hoạt động của protein FIT trong các điều kiện có hàm lượng Fe khác nhau.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Thí nghiệm phân tích được thực hiện trên dòng chuyển gen FIT biểu hiện liên tục ở thể hệ T5. Cây chuyển gen mang gen cấu trúc FIT - HA và được gắn phía sau của promoter CaMV35S (p2xCaMV35S::HA₃-FIT) được cung cấp từ nghiên cứu của Meiser & cs. (2011) (Hình 1). Hạt cây chuyển gen T5 được TS. Meiser tạo ra, nhân dòng và cung cấp cho phòng thí nghiệm Thực vật học, Đại học Tổng hợp Saarland, CHLB Đức.

Điều kiện sinh trưởng: Hạt T5 của cây chuyển gen trước khi đặt trên môi trường Hoagland, được khử trùng bề mặt như sau: Hạt *Arabidopsis* được trộn cùng với dung dịch 6% NaOCl, để trong 8 phút, sau đó được rửa lại với nước cất 5 lần (Brumbarova & cs., 2016). Hạt sau khi khử trùng được đặt trên các đĩa thạch Hoagland 8 và 10 ngày trong các buồng sinh trưởng (CLF Plant Climatics, Đức) ở nhiệt độ 21°C/19°C, tương ứng 16 giờ ánh sáng/8 giờ tối (điều kiện ngày dài).

Xử lý stress các điều kiện Fe khác nhau được lặp lại 3 lần, mỗi công thức 30 cây, đối chứng âm là cây kiểu dại (Wild-type) không chuyển gen.

Điều kiện thiếu Fe: hạt cây *Arabidopsis* chuyển gen được đặt trên đĩa thạch Hoagland không chứa Fe (- Fe), nhưng có chứa 50µm ferrozine (Le & cs., 2016).

Điều kiện đủ Fe: hạt cây *Arabidopsis* chuyển gen được đặt trên đĩa thạch Hoagland bổ sung 50µm Fe (EDTA-Fe) (Le & cs., 2016).

Điều kiện dư thừa Fe: hạt cây *Arabidopsis* chuyển gen được đặt trên đĩa thạch Hoagland có chứa 200µm Fe (Le & cs., 2016).

Xử lý stress oxy hóa: Cây chuyển gen 8 và 10 ngày tuổi sinh trưởng trong điều kiện Fe khác nhau tiếp tục được chuyển vào dung dịch môi trường Hoagland có bổ sung H_2O_2 20mm trong 1 giờ. Sau đó toàn bộ mẫu cây xử lý được rửa lại bằng nước cất và thu mẫu trong N_2 lỏng để cho những phân tích tiếp theo. Điều kiện không xử lý stress oxy hóa: các cây sinh trưởng trong các điều kiện Fe khác nhau sẽ được ngâm với môi trường Hoagland tương ứng trong 1 giờ. Sau đó các mẫu cây được thu lại trong N_2 lỏng để làm đối chứng âm. Mỗi công thức thí nghiệm bao gồm 30 cây, được lặp lại 3 lần (Le & cs., 2016).

Thành phần môi trường Hoagland như sau: 0,1875mm $MgSO_4 \times 7 H_2O$, 0,125mm KH_2PO_4 , 0,3125mm KNO_3 , 0,375mm $Ca(NO_3)_2$, 12,5 μ m KCl, 12,5 μ m H_3BO_3 , 2,5 μ m $MnSO_4 \times H_2O$, 0,5 μ m $ZnSO_4 \times 7 H_2O$, 0,375 μ m $CuSO_4 \times 5 H_2O$, 0,01875 μ m $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4 H_2O$, pH = 6,0 (Le & cs., 2016).

2.2. Tách chiết protein tổng số

Cây Arabidopsis 8 và 10 ngày tuổi (30 cây cho 1 lần lặp lại) sau khi sinh trưởng trên các môi trường có liều lượng Fe khác nhau và được xử lý stress oxy hóa được thu và nghiền trong N_2 lỏng. Protein tổng số sau đó được tách chiết bằng dung dịch đệm SDG (62mm Tris-HCl, pH 8,6, 2,5% SDG, 2% DTT, 10% glycerol) (Le & cs., 2016). Mẫu chứa 5mg protein được phân tách bằng điện di 12% SDS-PAGE. Sau khi điện di xong, protein sẽ được chuyển lên màng Protran nitrocellulose (Schleicher & Schuell, Cole Parmer, Đức) và nhuộm với thuốc nhuộm Ponceau S (Sigma-Aldrich, Đức) để làm đối chứng.

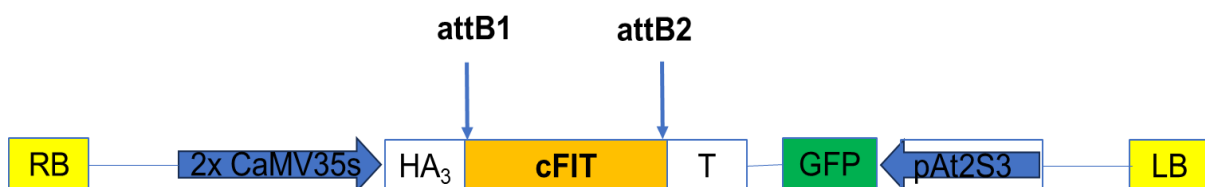
2.3. Kỹ thuật Western Blot

Phương pháp được tiến hành như mô tả trong nghiên cứu của Le & cs. (2016). Màng nitrocellulo được xử lý trong 1 giờ với dung dịch sữa 5% (Roth, Đức) được hòa tan trong dung dịch đệm TBS-T (20mm Tris-HCl, pH 7,4; 180mm NaCl và 0,1 % Tween 20). Sau khi xử lý, màng được ủ 1 giờ trong dung dịch pha loãng của kháng thể sơ cấp trong TBS-T chứa 2,5% sữa. Sau khi rửa ba lần bằng dung dịch đệm TBS-T, mỗi lần 15 phút, màng chuyển sẽ được ủ trong dung dịch pha loãng của kháng thể thứ cấp trong TBS-T chứa 2,5% sữa. Màng sau đó được tiếp tục rửa ba lần bằng dung dịch đệm TBS-T, mỗi lần 15 phút, trước khi phát hiện bằng hệ thống phát quang hóa học.

Để phát hiện protein FIT, màng chuyển được ủ với kháng thể sơ cấp đơn dòng ái lực cao HA (pha loãng 1:1000, Roche). Kháng thể sơ cấp sau đó được phát hiện bằng kháng thể thứ cấp anti-rat IgG (pha loãng 1:10000, Sigma-Aldrich) có gắn enzyme horseradish peroxydase. Tín hiệu được phát hiện dựa trên việc sử dụng phát quang hóa học (Bộ ECL, Amersham, Hoa Kỳ). Phim phát hiện phát quang hóa học được sử dụng từ Amersham (Hoa Kỳ).

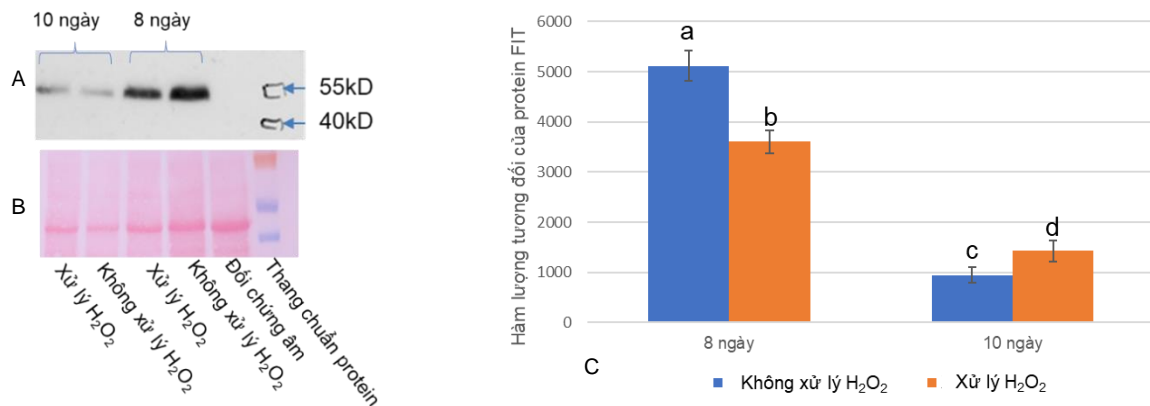
2.4. Phân tích kết quả

Định lượng protein được tính toán bằng phần mềm ImageJ (Abramoff & cs., 2004) và được chuẩn hóa so với bản nhuộm protein bằng thuốc nhuộm Ponceau S. Số liệu được phân tích phương sai ANOVA bằng phần mềm IRRISTAT 5.0. Các giá trị trung bình của hàm lượng protein được so sánh cặp đôi dựa vào giá trị $LSD_{0,05}$.



Nguồn: Meiser & cs. (2011).

Hình 1. Cấu trúc HA₃-FIT dưới sự điều hòa của promoter 2x CaMV35s được biến nạp vào Arabidopsis



Ghi chú: Đối chứng âm: Sử dụng cây không chuyển gen; A: Kết quả Wesstern Blot; B: Hình ảnh nhuộm màng chuyển bằng Ponceau S; C: Đồ thị định lượng sự biểu hiện của protein FIT được tính trên phần mềm Image J. Các chữ cái khác nhau trên mỗi cột cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Hình 2. Biểu hiện của protein FIT trên cây *Arabidopsis* 8 và 10 ngày tuổi trong điều kiện thiếu sắt

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả biểu hiện của protein FIT trong điều kiện thiếu sắt (-Fe)

Đánh giá sự biểu hiện của protein FIT được thực hiện trên cây chuyển gen *FIT* biểu hiện liên tục (35S::*At FIT*::HA₃) trong điều kiện thiếu Fe trình bày trong hình 2. Kết quả cho thấy trong điều kiện thiếu Fe, sự biểu hiện của protein FIT với kích thước mong đợi là 55kD ở giai đoạn 8 ngày, cao hơn có ý nghĩa thống kê so với giai đoạn 10 ngày cả trong điều kiện có xử lý H₂O₂ hoặc không xử lý H₂O₂ (Hình 2A, C). Nghiên cứu trước của Le & cs. (2016) đã đánh giá sự biểu hiện của gen *FIT* trong điều kiện Fe khác nhau kéo dài từ 6-10 ngày và cho thấy sự khác biệt về mức độ biểu hiện của gen *FIT* ở 8 ngày và 10 ngày. Kết quả biểu hiện protein FIT ở thí nghiệm này tương ứng với sự biểu hiện ở cấp độ phiên mã của gen *FIT* ở cây 8 ngày tuổi cao hơn 10 ngày tuổi như trong công bố của Le & cs. (2016) và cũng tương đồng với kết quả protein FIT luôn biểu hiện ở mức dịch mã trên cây chuyển gen *FIT* biểu hiện liên tục (FIT Ox) trong nghiên cứu của Meiser & cs. (2011). Tuy nhiên, trong điều kiện có xử lý H₂O₂, sự biểu hiện của protein FIT ở cây 8 ngày và 10 ngày tuổi được định lượng cho thấy sự khác biệt

(Hình 2C). Ở cây 8 ngày tuổi, dựa vào giá trị định lượng protein biểu hiện sự biểu hiện của protein FIT khi xử lý stress oxy hóa giảm xuống 19% so với điều kiện không xử lý. Ngược lại ở cây 10 ngày tuổi, sự biểu hiện của protein FIT được định lượng khi xử lý stress oxy hóa lại tăng hơn 33% so với trong điều kiện không xử lý H₂O₂ (Hình 2C). Dường như H₂O₂ làm ức chế sự biểu hiện của protein FIT ở giai đoạn 8 ngày nhưng lại được kích hoạt ở giai đoạn 10 ngày. Điều này dường như ngược lại với sự biểu hiện của gen *FIT* ở cấp độ phiên mã bị ức chế bởi H₂O₂ ở cả giai đoạn 8 ngày và 10 ngày (Le & cs., 2016). Tuy mức độ biểu hiện FIT dưới tác động của H₂O₂ trong 10 ngày tăng hơn so với không xử lý H₂O₂ nhưng mức độ này vẫn nhỏ hơn mức biểu hiện của 8 ngày (Hình 2A & C). Như vậy, khi cây thiếu sắt 10 ngày, yếu tố phiên mã FIT đều bị ức chế ở cả cấp độ phiên mã và dịch mã

3.2. Kết quả biểu hiện của protein FIT trong điều kiện đủ Fe (50 μ M Fe)

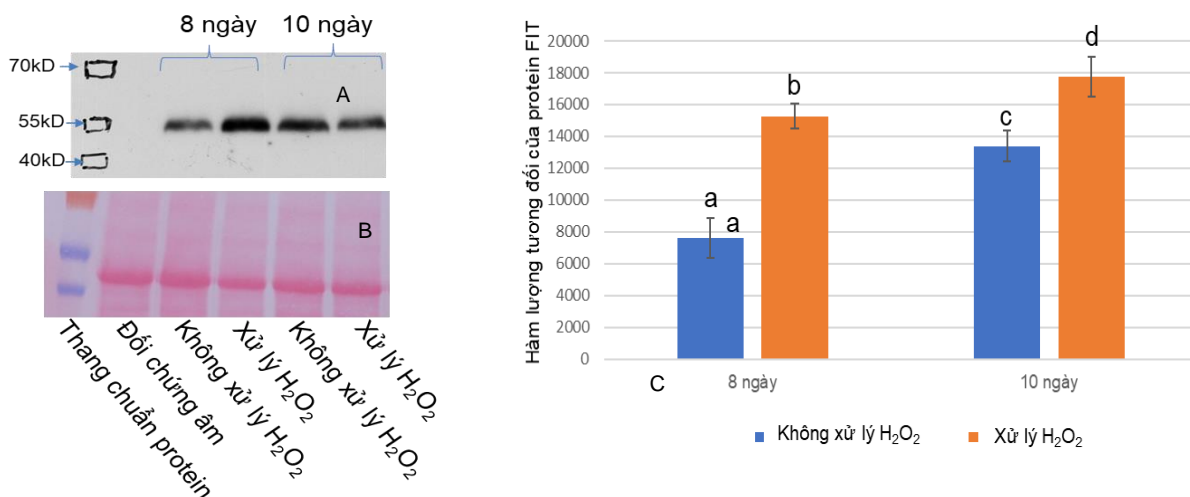
Trong điều kiện đủ Fe, sự biểu hiện của protein FIT với kích thước mong đợi là 55kDa trên cây 8 ngày và 10 ngày được thể hiện trong hình 3. Kết quả này tương đồng với kết quả của Meiser & cs. (2011) đã cho thấy hàm lượng FIT tăng cao trên cây chuyển gen *FIT* biểu hiện liên

tục (FIT Ox) ngay cả trong điều kiện đủ Fe. Ở điều kiện này protein FIT được biểu hiện ở giai đoạn 10 ngày cao hơn giai đoạn 8 ngày (Hình 3A, C). Và Meiser & cs. (2011) cũng cho rằng đó là các dạng FIT bất hoạt, sau đó có thể bị phân hủy thông qua các tín hiệu Nitric oxyde và Etylen. Nhưng khi xử lý cây chuyển gen FIT biểu hiện liên tục này với H₂O₂ 20mm trong 1 giờ thì protein FIT biểu hiện ở 10 ngày thậm chí còn cao hơn 8 ngày. Như vậy cũng giống với điều kiện thiếu Fe ở trên ở giai đoạn 8 và 10 ngày, H₂O₂ đều làm tăng sự biểu hiện của protein FIT (Hình 3A, C) và cũng tương tự với công bố của Le & cs., (2016). Trong điều kiện đủ Fe 10 ngày và có thêm xử lý H₂O₂ thì hàm lượng protein ZAT12 cũng tăng cao tương đồng với hàm lượng của FIT (yếu tố phiên mã tương tác với ZAT12) như ở trong thí nghiệm này. Protein ZAT12 tương tác protein FIT thông qua motif EAR của chính nó. Sự hình thành các phức hợp FIT-ZAT12 như vậy có thể làm giảm hàm lượng FIT có sẵn cho các tương tác protein-protein khác kích hoạt FIT (Lingam & cs., 2011). Còn sự tương tác giữa FIT-ZAT12 dẫn đến giảm mức độ phiên mã FIT ở giai đoạn 10 ngày (Le & cs., 2016). Việc ức chế sự hấp thụ quá nhiều Fe của ZAT12 thông qua FIT có thể cho phép cây trồng ngăn chặn tác động có hại của dư

thừa Fe. Đồng thời, nhóm protein FIT không hoạt động nhưng có sẵn sẽ được duy trì như một bản lưu trong trường hợp điều kiện thiếu Fe phát sinh (Meiser & cs., 2011).

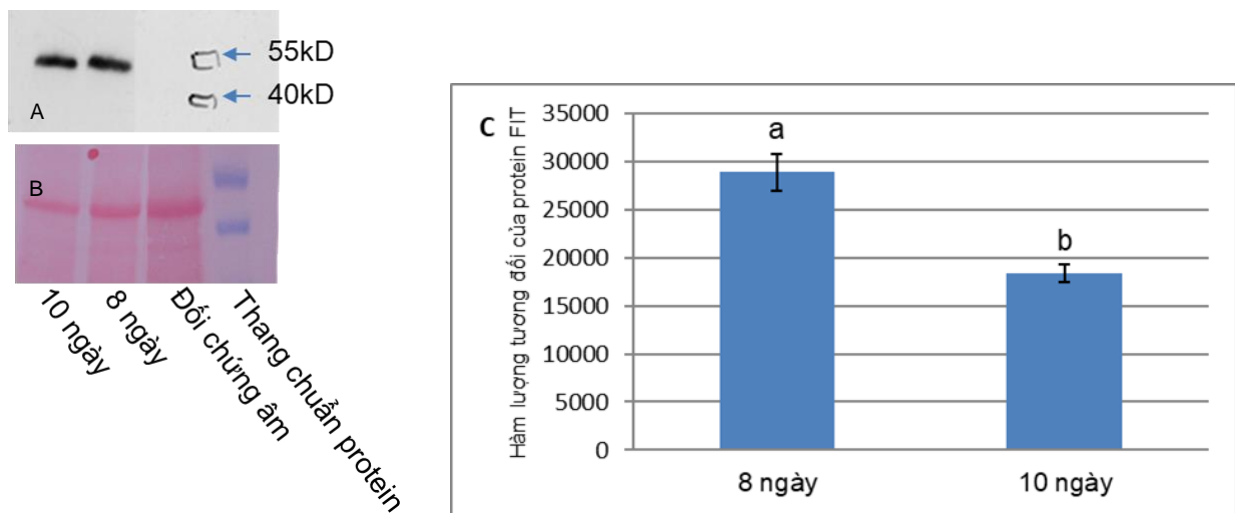
3.3. Kết quả biểu hiện của protein FIT trong điều kiện thừa sắt (100iM Fe)

Điều kiện thừa sắt có thể gây stress oxy hóa do cây hấp thụ nhiều Fe. Khi quá nhiều Fe tự do trong tế bào, chúng sẽ sản sinh ra các gốc tự do (ROS) gây hại cho tế bào (Le & cs., 2019). Khi hạt cây được đặt trên môi trường Hoagland có bổ sung 100µm Fe-EDTA 8 ngày và 10 ngày để phân tích sự biểu hiện protein FIT. Kết quả được trình bày trong hình 4. Kết quả cho thấy sự biểu hiện của protein FIT ở 8 ngày cao hơn 10 ngày (Hình 4 A, C). Điều này giống với sự biểu hiện của protein FIT trong điều kiện thiếu Fe. Trong điều kiện thiếu Fe cũng đã được chứng minh kích thích sản sinh H₂O₂ trên Arabidopsis (Le & cs., 2016) và trên hướng dương (Ranieri & cs., 2001) và ngô (Sun & cs., 2007). Như vậy, dường như kết quả giống nhau về sự biểu hiện FIT ở 8 và 10 ngày trong điều kiện thiếu và thừa sắt có sự tác động của H₂O₂.



Ghi chú: Đối chứng âm: Sử dụng cây không chuyển gen; A: Kết quả Wesstern Blot; B: Hình ảnh nhuộm màng chuyển bằng Ponceau S; C: Đồ thị định lượng sự biểu hiện của protein FIT được tính trên phần mềm Image J. Các chữ cái khác nhau trên mỗi cột cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Hình 3. Biểu hiện của protein FIT trên cây Arabidopsis 8 và 10 ngày tuổi trong điều kiện đủ sắt



Ghi chú: Đối chứng âm: Sử dụng cây không chuyển gen; A: Kết quả Wesstern Blot; B: Hình ảnh nhuộm màng chuyển bằng Ponceau S; C: Đồ thị định lượng sự biểu hiện của protein FIT được tính trên phần mềm Image J. Các chữ cái khác nhau trên mỗi cột cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Hình 4. Biểu hiện của protein FIT trên cây *Arabidopsis* 8 và 10 ngày tuổi trong điều kiện thừa sắt

4. KẾT LUẬN

Sự biểu hiện của protein FIT khác nhau tùy thuộc vào liều lượng Fe khác nhau kết hợp với stress oxy hóa. Tại điều kiện thiếu Fe và thừa Fe, sự biểu hiện của protein FIT ở 10 ngày thấp hơn 8 ngày, ngược lại với điều kiện cây sinh trưởng đủ Fe. Và khi xử lý H_2O_2 , trong điều kiện đủ và thiếu Fe, mức độ biểu hiện của FIT tăng lên, ngoại trừ trong điều kiện thiếu Fe 8 ngày thì mức độ biểu hiện này bị giảm xuống. Kết quả này giúp hoàn thiện cơ chế hoạt động của yếu tố phiên mã FIT trong các điều kiện có liều lượng Fe khác nhau và có xảy ra stress oxy hóa. Từ đó cung cấp cho những nghiên cứu tiếp theo về cơ chế điều hòa quá trình hấp thụ Fe đáp ứng nhu cầu của cây *Arabidopsis* nhưng tránh việc hấp thụ quá nhiều Fe.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abramoff M.D., Magelhaes P.J. & Ram S.J. (2004). Image processing with ImageJ. *Biophot Int.* 11: 36-42.
- Avila-Ospina L., Moison M., Yoshimoto K. & Masclaux-Daubresse C. (2014). Autophagy, plant senescence, and nutrient recycling. *J. Exp. Bot.* 65: 3799-3811.
- Brumbarova T., Le T.T.C. & Bauer P. (2016). Hydrogen Peroxyde Measurement in Arabidopsis Root Tissue Using Amplex Red. *Bio-protocol.* 6(21): e1999.
- Colangelo E.P. & Gueriot M.L. (2004). The essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response. *Plant Cell.* 16: 3400-3412.
- Cui Y., Chen C.L., Cui M., Zhou W.J., Wu H.L. & Ling H.Q. (2018). Four IVa 969 bHLH Transcription Factors Are Novel Interactors of FIT and Mediate JA Inhibition 970 of Iron Uptake in Arabidopsis. *Mol. Plant.* 11: 1166-1183.
- Gratz R., Manishankar P., Ivanov R., Köster P., Mohr I., Trofimov K., Steinhörst L., Meiser J., Mai H.J., Drerup M., Arendt S., Holtkamp M., Karst U., Kudla J., Bauer P. & Brumbarova T. (2019). CIPK11-Dependent Phosphorylation Modulates FIT Activity to Promote Arabidopsis Iron Acquisition in Response to Calcium Signaling. *Dev Cell.* 48: 726-740.e10.
- Gratz R., Brumbarova T., Ivanov R., Trofimov K., Tünnermann L., Ochoa-Fernandez R., Blomeier T., Meiser J., Weidtkamp-Peters S., Zurbriggen M.D. & Bauer P. (2020). Phospho-mutant activity assays provide evidence for alternative phosphoregulation pathways of the transcription factor ferlike iron deficiency-induced transcription factor. *New Phytol.* 225:250-267.
- Jakoby M., Wang H.Y., Reidt W., Weisshaar B. & Bauer P. (2004). FRU (BHLH029) is required for

- induction of iron mobilization genes in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett. 577: 528-534.
- Kanwar P., Baby D. & Bauer P. (2021). Interconnection of iron and osmotic stress 1024 signaling in plants: is FIT a regulatory hub to cross-connect abscisic acid 1025 responses? Plant Biol. 23: 31-38.
- Le C.T.T., Brumbarova T., Ivanov R., Stoof C., Weber E., Mohrbacher J., Fink-Straube C. & Bauer P. (2016). Zinc Finger Of Arabidopsis Thaliana12 (ZAT12) interacts with Fer-Like Iron Deficiency-Induced Transcription Factor (FIT) linking iron deficiency and oxydative stress responses. Plant Physiol. 170: 540-557.
- Le C.T.T., Brumbarova T. & Bauer P. (2019). The interplay of ROS and iron signaling in plants. In: Panda SK, Yamamoto YY, eds, Redox homeostasis in plants, from signaling to stress tolerance. Cham: Springer. pp. 43-66.
- Li X., Huimin Z., Gang L. & Diqiu Y. (2016). Two bHLH Transcription Factors, bHLH34 and bHLH104, Regulate Iron Homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 170: 2478-2493.
- Liang G., Zhang H., Li X., Ai Q. & Yu D. (2017). bHLH transcription factor bHLH115 regulates iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. J. Exp. Bot. 68: 1743-1755.
- Lingam S., Mohrbacher J., Brumbarova T., Potuschak T., Fink-Straube C., Blondet E., Genschik P. & Bauer P. (2011). Interaction between the bHLH transcription factor FIT and ETHYLENE INSENSITIVE3/ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 reveals molecular linkage between the regulation of iron acquisition and ethylene signaling in Arabidopsis. Plant Cell. 23 :1815-29.
- Meiser J., Lingam S. & Bauer P. (2011). Posttranslational regulation of the iron deficiency basic helix-loop-helix transcription factor FIT is affected by iron and nitric oxyde. Plant Physiol. 157: 2154-2166.
- Ranieri A., Castagna A., Baldan B. & Soldatini G.F. (2001). Iron deficiency differently affects peroxydase isoforms in sunflower. J. Exp. Bot. 52: 25-35.
- Schwarz B. & Bauer P. (2020). FIT, a regulatory hub for iron deficiency and stress 1149 signaling in roots, and FIT-dependent and -independent gene signatures. J. Exp. Bot. 71: 1694-1705.
- Sun B., Jing Y., Chen K., Song L., Chen F. & Zhang L. (2007). Protective effect of nitric oxyde on iron deficiency-induced oxydative stress in maize (*Zea mays*). J. Plant Physiol. 164: 536-543.
- Tanaka A., Loe R. & Navasero S. (1966) Some mechanisms involved in the development of iron toxicity symptoms in the rice plant. Soil Sci. Plant Nutr. 12: 32-38.
- Wang H.Y., Klatter M., Jakoby M., Baumlein H., Weisshaar B. & Bauer P. (2007). Iron deficiency-mediated stress regulation of four subgroup Ib BHLH genes in *Arabidopsis thaliana*. Planta. 226: 897-908.
- Wang N., Cui Y., Liu Y., Fan H., Du J., Huang Z., Yuan Y., Wu H. & Ling H.Q. (2013). Requirement and functional redundancy of Ib subgroup bHLH proteins for iron deficiency responses and uptake in *Arabidopsis thaliana*. Mol. Plant. 6: 503-513.
- Yuan Y.X., Zhang J., Wang D.W. & Ling H.Q. (2005). AtbHLH29 of *Arabidopsis thaliana* is a functional ortholog of tomato FER involved in controlling iron acquisition in strategy I plants. Cell Res. 15: 613-621.
- Yuan Y., Wu H., Wang N., Li J., Zhao W., Du J., Wang D. & Ling H.Q. (2008). FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in Arabidopsis. Cell Res. 18: 385-397.
- Zhang J., Liu B., Li M., Feng D., Jin H., Wang P., Liu J., Xiong F., Wang J. & Wang H.B. (2015). The bHLH Transcription Factor bHLH104 Interacts with IAA-LEUCINE RESISTANT3 and Modulates Iron Homeostasis in Arabidopsis. The Plant Cell. 27: 787-805.