



毛白杨半胱氨酸蛋白酶*PtoCPI*基因参与植物激素调控的叶片衰老

国洪丽, 陈梦圆, 范雅为, 刘涵, 孙蕾倩, 刘迪, 李慧, 王馨, 陆海*

北京林业大学生物科学与技术学院, 林木遗传育种全国重点实验室, 树木花卉育种生物工程国家林业和草原局重点实验室, 北京 100083

* 联系人, E-mail: luhai1974@bjfu.edu.cn

2023-04-07 收稿, 2023-08-05 修回, 2023-08-07 接受, 2023-08-09 网络版发表

国家自然科学基金(31971618)和国家重点研发计划(2021YFD2200101)资助

摘要 半胱氨酸蛋白酶在植物不同组织中的特异性表达发挥了多种功能. 本文探究了毛白杨半胱氨酸蛋白酶*PtoCPI*基因在激素诱导下参与叶片衰老的机制. 使用脱落酸(ABA)、茉莉酸甲酯(MeJA)、乙烯(ACC)对杨树叶片进行处理, 不同时间段后观察叶片表型、检测叶绿素含量以及*PtoCPI*基因相对表达量, 发现激素诱导后的叶片黄化加速, 叶绿素含量下降, 同时*PtoCPI*表达量上调, 而*ptocpl*突变体则延缓了叶片的衰老. 进一步对*PtoCPI*启动子元件分析发现, 其含有ABA、MeJA响应元件, 因此以相应的ABA、MeJA激素分别处理含*ProPtoCPI-GUS-pBI121*重组载体的转基因拟南芥幼苗, 并观察GUS染色差异和检测报告基因*GUS*的相对表达量. 结果显示, ABA诱导下GUS染色加深, *GUS*表达量上升. 综上所述, *PtoCPI*启动子可以通过响应ABA调控基因的表达, 从而使植物对外界胁迫作出反应, 引起叶片衰老, 该研究为进一步理解激素诱导植物半胱氨酸蛋白酶参与叶片衰老的机制提供了理论支持.

关键词 *PtoCPI* 基因, 启动子, 激素诱导, 功能分析

半胱氨酸蛋白酶(cysteine protease)是植物中重要的蛋白酶之一, 大多数植物半胱氨酸蛋白酶属于木瓜蛋白酶(C1)和豆科蛋白酶(C13)家族, 其中木瓜蛋白酶家族(C1)是所有半胱氨酸蛋白酶中研究最多功能最广泛的一类. C1A半胱氨酸蛋白酶根据其基因结构和系统发育关系被分为组织蛋白酶L型、B型、H型和F型^[1], C1A蛋白酶被报道参与植物中的多种蛋白水解和生理过程, 例如衰老、组织脱落、程序性细胞死亡、果实成熟、花粉发育以及种子和块茎中储存蛋白的动员^[1-4], 因此, 半胱氨酸蛋白酶对植物各阶段的生长发育具有极其重要的作用.

植物对非生物胁迫的反应包括生物化学调节、蛋白质调控、分子机制调控、翻译后修饰的改变以及信

号转导^[5]. 半胱氨酸蛋白酶由于其功能的多样性, 与这些生理过程相关的蛋白响应多种外界胁迫是植物生存所必需的. 植物激素(phytohormones)是在植物生长发育中起关键作用的小化学物质^[6]. 半胱氨酸蛋白酶作为蛋白水解酶的一大类, 外源激素对其起着直接或间接的诱导作用, 甘薯中的*SPCP2*基因可被脱落酸(ABA)、茉莉酸(JA)和乙烯(ETH)等诱导表达, 将*SPCP2*在拟南芥中过表达, 植株表现出对干旱和盐胁迫抗性的增强^[7]; 水杨酸(SA)在番茄细胞程序性死亡过程中诱导半胱氨酸蛋白酶活性, 与叶片相比, SA诱导的PCD与根中特定半胱氨酸蛋白酶的快速上调有关^[8]. 半胱氨酸蛋白酶在水分亏缺的耐受中也起一定作用, 如小麦幼苗中的*TaCP*基因经聚乙二醇(PEG)和氯化钠

引用格式: 国洪丽, 陈梦圆, 范雅为, 等. 毛白杨半胱氨酸蛋白酶*PtoCPI*基因参与植物激素调控的叶片衰老. 科学通报, 2024, 69: 431–438

Guo H L, Chen M Y, Fan Y W, et al. Involvement of cysteine protease *PtoCPI* gene in plant hormone-regulated leaf senescence in *Populus tomentosa* (in Chinese). Chin Sci Bull, 2024, 69: 431–438, doi: [10.1360/TB-2023-0318](https://doi.org/10.1360/TB-2023-0318)

(NaCl)处理后, 转录水平上调, 并且过表达*TaCP*的转基因拟南芥植株在缺水条件下比野生型拟南芥表现出更强的耐旱性和更高的CP活性^[9]。据报道, 在探究C1A半胱氨酸蛋白酶家族对大麦干旱的转录反应中, 发现4个相关基因在胁迫下发生上调^[10]; 在缺水的大麦叶中, 调节HvPap-1、HvPap-12和HvPap-16 C1A蛋白酶的表达和活性可增加其对于干旱的耐受性^[11]。

叶片衰老是植物发育的必要过程, 而最核心的反应便是蛋白质的分解代谢。研究发现, 半胱氨酸蛋白酶, 尤其是木瓜蛋白酶是参与叶片衰老过程中主要的蛋白水解酶^[12-14]。对8周龄的拟南芥单个叶片覆盖进行暗处理诱导叶片衰老, 结果显示, 许多半胱氨酸蛋白酶活性增加, 其中RD21A和AALP在衰老叶片中的活性最高, *aalp-1*和*rd21A-1/aalp-1*突变体出现衰老延迟的表型, 表明AALP可能正调控植物衰老^[15]。半胱氨酸蛋白酶基因*HvPap-1*可以响应黑暗和氮饥饿胁迫, 在大麦中过表达*HvPap-1*后可加速叶片衰老, 而抑制*HvPap-1*的表达, 则延缓叶片衰老^[16]。拟南芥衰老相关基因12(*At-SAG12*)编码一种半胱氨酸蛋白酶, 该蛋白酶参与叶绿体蛋白质的降解, 几乎只在衰老过程中表达^[17]。根据SAG的表达特性及突变体表型等, Li等人^[18]建立了叶衰老数据库(LSD: <https://bigd.big.ac.cn/lzd/>)。

除了已研究的SAG12和其他一些木瓜蛋白酶, 还有大量参与衰老调控的蛋白酶未被研究。因此, 为了验证半胱氨酸蛋白酶*PtoCPI*在激素胁迫下对叶片衰老的作用, 本研究对*PtoCPI*基因及其启动子进行外源激素的处理, 结果显示, *PtoCPI*基因响应脱落酸(ABA)诱导参与植物叶片衰老反应, 为研究半胱氨酸蛋白酶在杨树中的功能以及激素响应提供了一些理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

野生型741毛白杨(*Populus alba*×(*Populus davidiana*+*Populus simonii*)×*Populus tomentosa*): 在无菌组培室培养, 培养基为pH 5.8、含0.1 mg/L NAA的1/2MS固体培养基, 培养条件为光照14 h/黑暗10 h, 温度25°C。

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*): 将实验室前期保存的含有*ProPtoCPI-GUS*-pBI121重组载体的转基因拟南芥纯合种子点种于含1.5%蔗糖、0.5%肌醇和50 mg/L Kan抗性的1/2MS固体培养基中, 并置于人工气候培养箱自然生长, 培养条件为25°C、60%湿度、16 h光照和

23°C、60%湿度、8 h黑暗连续交替培养。

1.2 激素处理毛白杨叶片和拟南芥

取相同时期的野生型741毛白杨和*ptocp1*突变体叶片, 用打孔器裁成大小相同的叶盘(约1 cm²), 随机放入4个大培养皿中, 使得每个培养皿中有50~60片叶盘。1号培养皿中加入3 mol/L吗啉乙磺酸(2-morpholinoethanesulfonic acid, MES)缓冲液(作为空白对照), 2号培养皿加入用3 mol/L MES缓冲液配制的200 μmol/L脱落酸(ABA)溶液, 3号培养皿加入用3 mol/L MES缓冲液配制的200 μmol/L茉莉酸甲酯(MeJA)溶液, 4号培养皿加入用3 mol/L MES缓冲液配制的200 μmol/L乙烯(ACC)。诱导处理相应的时间段, 上述每个时间都取不同处理的叶盘进行拍照, 并将前叶盘用滤纸吸走多余的水分, 后用锡纸包裹, 标记好处理方式和处理时间, 放入液氮中快速冷冻, 保存于冰箱(-80°C), 进行叶片总RNA的提取。

从培养基上选取拟南芥幼苗, 随机放入3个小培养皿中, 每个培养皿中有30~40个幼苗。同理, 1号培养皿中加入3 mol/L MES缓冲液(作为空白对照), 2号培养皿加入用3 mol/L MES缓冲液配制的200 μmol/L脱落酸(ABA)溶液, 3号培养皿加入用3 mol/L MES缓冲液配制的200 μmol/L茉莉酸甲酯(MeJA)溶液。处理6 h后, 将部分幼苗取出, 用以进行GUS染色; 剩余幼苗用滤纸吸走多余的水分后裁剪下叶片, 再用锡纸包裹, 做好标记, 放入液氮中快速冷冻, 保存于冰箱(-80°C)。最终将所有低温冷冻保存的拟南芥叶片进行总RNA的提取。

1.3 毛白杨叶片叶绿素含量测定

将3 mL缓冲丙酮(80%丙酮和0.2 mol/L Tris-HCl, pH 7.0)加入含有100 mg叶盘组织的10 mL离心管中, 4°C避光孵育直至叶片完全无色, 15000 g离心10 min。在紫外可见分光光度计上分别测定663和645 nm下的吸光度, 每个重复分别测定3次, 取平均值。根据Porra等人^[19]的描述, 对样品中叶绿素浓度进行了测定, 计算公式如下: $Chla = 12.25A_{663.6} - 2.55A_{646.6}$, $Chlb = 20.31A_{646.6} - 4.91A_{663.6}$, $Chl(a+b) = 17.76A_{646.6} + 7.34A_{663.6}$ 。

1.4 *PtoCPI*启动子元件分析

利用PlantCARE和PLACE软件对*PtoCPI*启动子进行生物信息学预测分析, 根据分析结果统计整理响应ABA、MeJA的相关顺式作用元件, 并标注在原序列上。

1.5 拟南芥GUS组织化学染色

(1) 预处理. 夹取若干株经MES、ABA、MeJA溶液处理6 h后的拟南芥幼苗并置于2 mL的离心管内, 再加入-20℃预冷的90%丙酮至完全没过材料, 室温静置20~30 min.

(2) 染色. 将离心管内的丙酮弃掉, 先用蒸馏水对实验材料初步漂洗几次, 再用GUS染色液漂洗以尽可能去掉残留的丙酮, 最后加入一定体积的根据Berger等人^[20]改进的GUS染色工作液至完全没过实验材料; 随后在真空泵中避光抽真空30 min, 使染色液更好地渗透到植物组织.

(3) 洗脱. 用体积分数50%、70%、95%梯度的乙醇进行洗脱, 洗脱时将皿和离心管置于摇床轻摇, 每个梯度每次摇30 min左右, 其中95%的乙醇可延长洗脱时间, 直至叶片绿色完全去除.

(4) 观察. 待叶片自身背景色被乙醇去除后, 将材料放在白色滤纸背景下, 在解剖镜下观察染色结果.

1.6 实时荧光定量分析

用RNAprep Pure多糖多酚植物总RNA提取试剂盒和SuperReal PreMix Plus(SYBR Green)试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司)分别进行毛白杨和拟南芥叶片总RNA提取以及实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)分析. 均选择Actin作为内参基因, 用比较 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行数据分析. *PtoCPI*基因表达的qRT-PCR相关引物序列信息见表1, *PtoCPI*启动子驱动*GUS*表达的qRT-PCR相关引物序列信息见表2.

2 结果与分析

2.1 *PtoCPI*的表达受外源激素诱导

为了研究*PtoCPI*基因的表达是否受某些激素胁迫的影响, 分别用外源激素ABA、MeJA、ACC对毛白杨叶片进行处理, 其中以MES缓冲液作为对照. 对处理后的毛白杨叶盘拍照, 观察叶片生长状态, 测定叶绿素含量, 并提取叶片总RNA通过qRT-PCR检测*PtoCPI*基因的相对转录水平差异. 结果显示(图1(a)), 在处理至第2 d时, 所有激素诱导下的叶片均开始出现黄化的趋势. 与对照组相比, ABA处理下的叶片黄化程度最为显著, 其次是MeJA和ACC. 叶绿素含量测定结果显示(图1(b)), 相比于对照组, ABA处理3 d的叶片叶绿素含量明显下

表1 *PtoCPI*基因qRT-PCR检测相关引物

Table 1 Primers of *PtoCPI* gene expression detected by qRT-PCR

引物名称	引物序列(5'→3')
Actin 1	上游引物: AAAGTGAATGGTCTCCCTCCG 下游引物: GCATCATCACAACTCACTCTCCGA
PtoCPI	上游引物: CGCTGTTCTTCTCTGAAACG 下游引物: CAGTGGTGCTGAAAGTCCAG

表2 *GUS*基因qRT-PCR检测相关引物

Table 2 Primers of *GUS* gene expression detected by qRT-PCR

引物名称	引物序列(5'→3')
Actin 2	上游引物: CGTATGAGCAAGGAGATCAC 下游引物: CACATCTGTTGGAAGGTGCT
GUS	上游引物: TAACCACAAACCGTTCTACTT 下游引物: ACTGATACTCTTCACTCCACA

降, MeJA和ACC处理下, 叶绿素变化量无明显差异. 另外, qRT-PCR结果显示(图1(c)), 与对照组相比较, ABA、MeJA诱导后*PtoCPI*基因在6、12 h和3 d显著升高; ACC诱导后, *PtoCPI*基因在12 h显著升高. 综上所述, 在ABA、MeJA、ACC外源激素处理下, *PtoCPI*的转录受到了直接或间接的调控, 初步说明, *PtoCPI*可能参与外源激素诱导的植物叶片衰老过程.

为了进一步验证*PtoCPI*参与叶片衰老的作用, 对毛白杨*ptocpl*突变体的叶片进行相同浓度的激素处理(图1(d)). *ptocpl*突变体毛白杨为实验室保存的*PtoCPI*基因编辑敲除材料. 结果显示, 在MES处理10 d后, 野生型叶片出现轻微黄化, *ptocpl*突变体叶片无明显黄化; 在ABA、MeJA或ACC处理下的野生型叶片于第6 d出现明显的黄化表型, 而*ptocpl*突变体相对于野生型延缓了叶片衰老, 说明*PtoCPI*基因能够直接或间接响应ABA、MeJA或ACC诱导, 参与毛白杨叶片衰老.

2.2 *PtoCPI*启动子顺式作用元件分析

考虑到*PtoCPI*激素诱导的表达特性是启动子上相关顺式作用元件调控的结果, 利用PlantCARE和PLACE对*PtoCPI*启动子上的元件进行预测分析, 统计结果如图2(a), (b)所示, 其包含14个ABA响应元件, 2个MeJA响应元件, 未发现乙烯响应元件. 该结果暗示, *PtoCPI*的表达可能受ABA、MeJA直接调控, 而乙烯可能不直接调控*PtoCPI*基因的表达.

2.3 ABA、MeJA诱导报告基因*GUS*

为了进一步探究*PtoCPI*基因的激素诱导表达是否

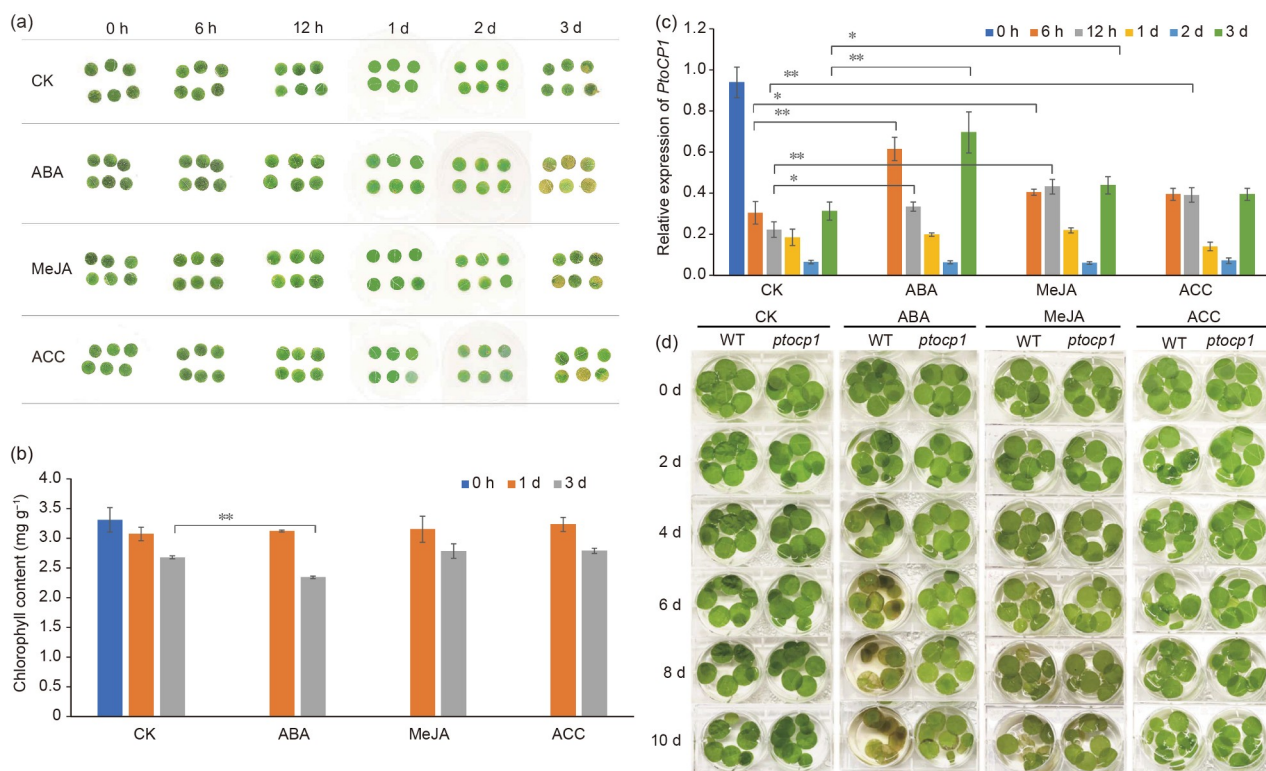


图 1 ABA、MeJA、ACC处理毛白杨叶片。(a) 激素诱导野生型毛白杨叶片。(b) 野生型毛白杨叶片叶绿素含量测定。(c) 野生型毛白杨叶片 *PtoCPI* 相对表达水平的qRT-PCR检测。(d) 激素诱导毛白杨 *ptocp1* 突变体叶片

Figure 1 ABA, MeJA, and ACC treatment of *Populus tomentosa* leaves. (a) Hormone induced wild-type *Populus tomentosa* leaves. (b) Determination of chlorophyll content in leaves of wild type *Populus tomentosa*. (c) qRT-PCR detection of the relative expression level of *PtoCPI* in leaves of wild type *Populus tomentosa*. (d) Hormone induced *ptocp1* mutant leaves in *Populus tomentosa*

是由启动子上的相应响应元件介导，利用实验室前期保存的转*ProPtoCPI*-GUS的转基因拟南芥进行ABA、MeJA诱导。

使用ABA和MeJA溶液浸泡处理相同时期的拟南芥幼苗，MES缓冲液作为对照组，对处理6 h后的转基因拟南芥进行GUS染色的同时，亦分别提取叶片总RNA通过qRT-PCR检测*GUS*报告基因的相对表达水平差异。GUS染色结果显示(图3(a))，与对照相比，ABA处理后的拟南芥GUS染色有一定程度的加深，MeJA处理下差别不明显。qRT-PCR检测*GUS*基因表达量(图3(b))，结果显示，ABA处理下表达量显著升高，而MeJA诱导下的表达量轻微升高。以上结果表明，ABA直接参与*PtoCPI*基因表达。

3 结果与讨论

植物激素对植物生长至关重要，协调许多发育过程，植物的生长发育依赖于植物激素介导的基因表达

调控。生长素(auxin, IAA)可诱导景天植物生长素反应因子4(*SaARF4*)的表达，过表达*SaARF4*可使侧根数量减少，导管直径减小，从而影响植物的抗逆能力^[21]。水杨酸(SA)诱导蛋白激酶(protein kinase, SIPK)，被称为植物胁迫反应的“主开关”，有报道，金属镉(Cd)胁迫下SA诱导小麦*SIPK*基因表达^[22]。水稻*PLA1*和*PLA2*基因分别编码细胞色素P450蛋白CYP78A11和RNA结合蛋白，调控叶片成熟和叶绿体发育。研究发现，赤霉素(GA)是促进*PLA1*和*PLA2*表达的主要植物激素，GA诱导*PLA1*和*PLA2*表达，GA抑制剂抑制*PLA1*和*PLA2*表达^[23]。*Pgb1*和*Pgb3*是一种大麦植物球蛋白(phytoglobin, Pgb)基因，在糊粉细胞中，GA与α-淀粉酶共同诱导*Pgb1*和*Pgb3*的表达，而脱落酸(ABA)消除了GA对α-淀粉酶与*Pgb1*和*Pgb3*表达的促进作用^[24]。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPKs)在植物生长发育以及激素和应激反应中发挥重要作用，通过MAPK级联向真核细胞传递信号。Wu等人^[25]揭示了杨树

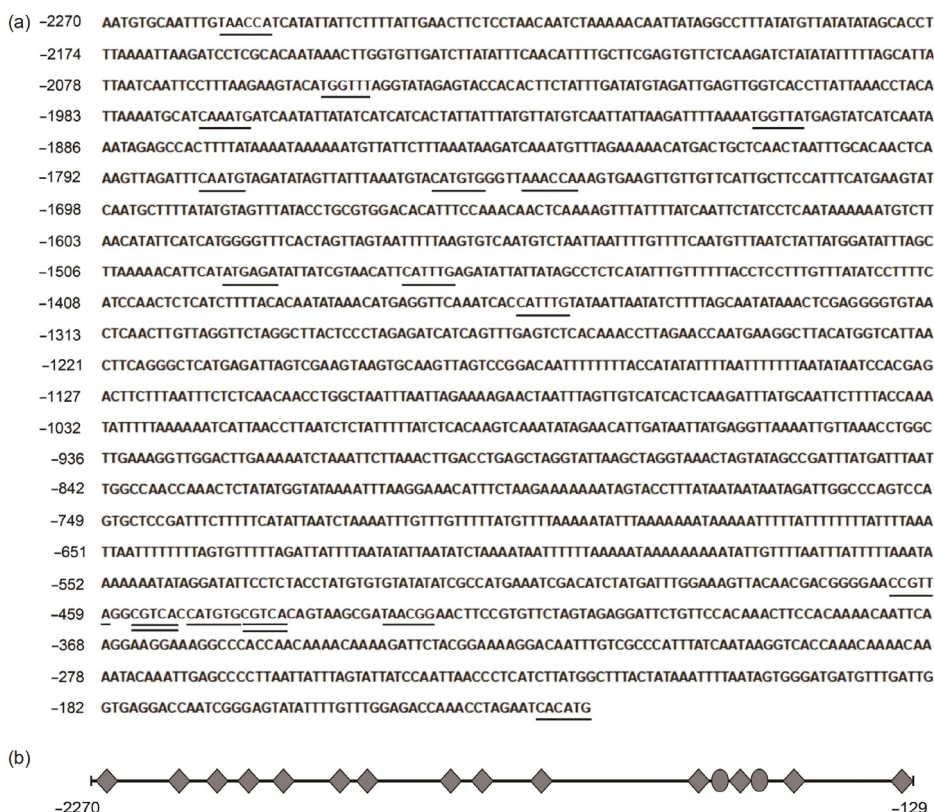


图2 *PtoCPI*启动子区域顺式作用元件分析。(a) *PtoCPI*启动子上响应ABA、MeJA顺式作用元件的碱基序列。单下划线代表ABA响应元件序列，双下划线代表MeJA响应元件序列。(b) *PtoCPI*启动子响应ABA、MeJA顺式作用元件的结构示意图。菱形代表ABA响应元件，椭圆形代表MeJA响应元件

Figure 2 Analysis of *cis*-elements in *PtoCPI* promoter region. (a) The base sequence of *PtoCPI* promoter in response to ABA and MeJA *cis*-elements. Single underline represents the ABA response elements sequence, and double underline represents the MeJA response elements sequence. (b) Schematic diagram of *PtoCPI* promoter responding to ABA and MeJA *cis*-elements. Diamond represents ABA response elements, and oval represents MeJA response elements

*PtMAPK3-1*受茉莉酸甲酯(MeJA)激素诱导，并参与MeJA诱导的抗氧化酶系统增强反应。石竹(*Dianthus caryophyllus* L.)是世界上最重要和最典型的乙烯敏感切花之一，利用构建的乙烯诱导石竹花瓣衰老转录组，筛选出关键转录因子之一*DcWRKY75*，发现乙烯处理能快速诱导石竹花瓣衰老，沉默*DcWRKY75*延缓乙烯诱导的康乃馨花瓣衰老^[26]。大量证据表明，激素可以直接或间接调控基因的表达，从而影响该基因的功能。

我们通过观察毛白杨叶片在ABA、MeJA和ACC不同时间段处理下的叶片表型、测定叶片叶绿素含量和检测*PtoCPI*基因的相对表达水平以及激素诱导*ptocpl*突变体的叶片表型，发现*PtoCPI*明显响应ABA诱导参与毛白杨叶片衰老。另外，对*PtoCPI*基因启动子元件进行预测分析，发现其上存在MeJA元件和大量

ABA响应元件，因此通过转基因拟南芥进一步对*PtoCPI*启动子进行相应激素处理，最终结果表明，ABA可以结合*PtoCPI*启动子来调控该基因的表达，使植物对外界胁迫作出反应，引起叶片加速衰老。但由于半胱氨酸蛋白酶功能的广泛性和复杂性，本实验中半胱氨酸蛋白酶*PtoCPI*参与的ABA叶片衰老的具体调控通路还有待于进一步探讨。半胱氨酸蛋白酶广泛参与植物中的多种蛋白水解和生理过程，本研究发现，*PtoCPI*启动子中除了广泛存在ABA诱导元件外，同时存在大量其他诱导元件，暗示该基因除了受ABA等激素诱导外，还受其他转录因子的诱导，对这些元件的进一步研究将有助于解释成熟叶片中该基因的高表达。该研究为进一步理解植物半胱氨酸蛋白酶参与叶片衰老的分子机制提供了理论支持。

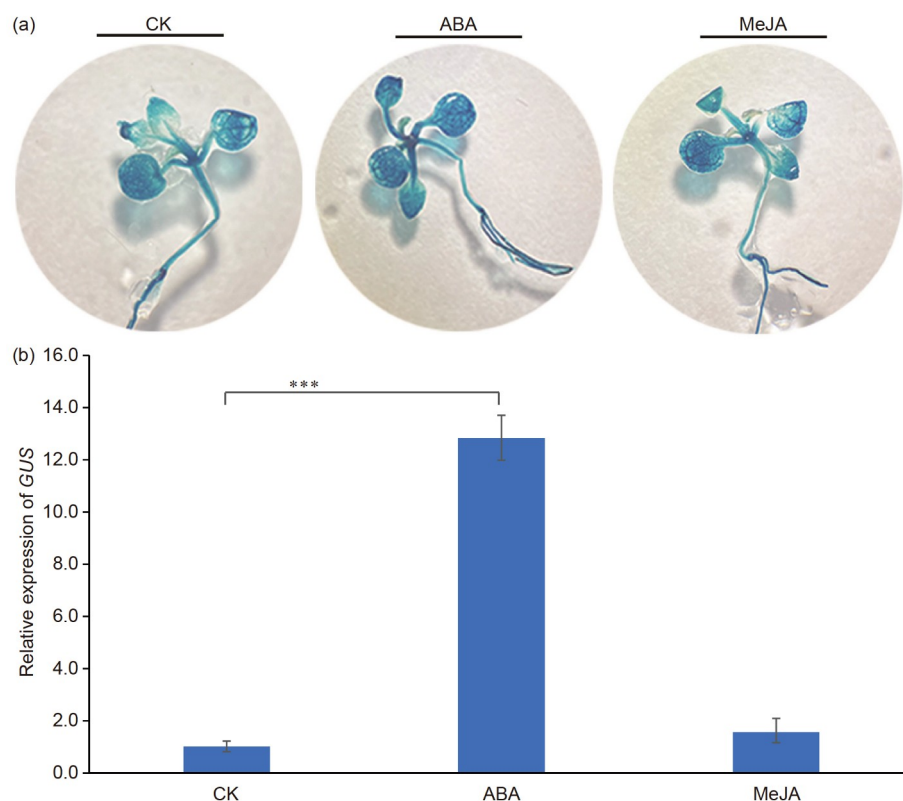


图 3 ABA、MeJA诱导*PtoCPI*启动子。(a) 转基因拟南芥GUS染色。(b) *GUS*相对表达水平的qRT-PCR检测

Figure 3 ABA and MeJA induced *PtoCPI* promoter. (a) Transgenic *Arabidopsis* GUS staining. (b) qRT-PCR detection of *GUS* relative expression level

参考文献

- Diaz-Mendoza M, Velasco-Arroyo B, González-Melendi P, et al. C1A cysteine protease-cystatin interactions in leaf senescence. *J Exp Bot*, 2014, 6: 3825–3833
- Tanaka H, Ishikawa M, Kitamura S, et al. The *AtNACK1/HINKEL* and *STUD/TETRASPORE/AtNACK2* genes, which encode functionally redundant kinesins, are essential for cytokinesis in *Arabidopsis*. *Genes Cells*, 2004, 9: 1199–1211
- Diaz I, Martinez M. Plant C1A cysteine peptidases in germination and senescence. In: Rawlings N D, Salvesen G, eds. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2013. 1852–1858
- Zhang D, Liu D, Lv X, et al. The cysteine protease CEP1, a key executor involved in tapetal programmed cell death, regulates pollen development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2014, 26: 2939–2961
- Wang X, Komatsu S. The role of phytohormones in plant response to flooding. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 6383
- Yu Z, Duan X, Luo L, et al. How plant hormones mediate salt stress responses. *Trends Plant Sci*, 2020, 25: 1117–1130
- Chen H J, Su C T, Lin C H, et al. Expression of sweet potato cysteine protease SPCP2 altered developmental characteristics and stress responses in transgenic *Arabidopsis* plants. *J Plant Physiol*, 2010, 167: 838–847
- Kovács J, Poór P, Szepesi Á, et al. Salicylic acid induced cysteine protease activity during programmed cell death in tomato plants. *Acta Biol Hung*, 2016, 67: 148–158
- Zang Q W, Wang C X, Li X Y, et al. Isolation and characterization of a gene encoding a polyethylene glycol-induced cysteine protease in common wheat. *J Biosci*, 2010 35: 379–388
- Gomez-Sanchez A, Gonzalez-Melendi P, Santamaria M E, et al. Repression of drought-induced cysteine-protease genes alters barley leaf structure and responses to abiotic and biotic stresses. *J Exp Bot*, 2019, 70: 2143–2155
- Velasco-Arroyo B, Diaz-Mendoza M, Gomez-Sanchez A, et al. Silencing barley cystatins HvCPI-2 and HvCPI-4 specifically modifies leaf responses to drought stress. *Plant Cell Environ*, 2018, 41: 1776–1790

- 12 Roberts I N, Caputo C, Criado M V, et al. Senescence-associated proteases in plants. *Physiol Plant*, 2012, 145: 130–139
- 13 Battelli R, Lombardi L, Picciarelli P, et al. Expression and localisation of a senescence-associated KDEL-cysteine protease from *Lilium longiflorum* tepals. *Plant Sci*, 2014, 214: 38–46
- 14 Wang H L, Zhang Y, Wang T, et al. An alternative splicing variant of PtRD26 delays leaf senescence by regulating multiple NAC transcription factors in *Populus*. *Plant Cell*, 2021, 33: 1594–1614
- 15 Pružinská A, Shindo T, Niessen S, et al. Major cys protease activities are not essential for senescence in individually darkened *Arabidopsis* leaves. *BMC Plant Biol*, 2017, 17: 4
- 16 Velasco-Arroyo B, Diaz-Mendoza M, Gandullo J, et al. HvPap-1 C1A protease actively participates in barley proteolysis mediated by abiotic stresses. *J Exp Bot*, 2016, 67: 4297–4310
- 17 Vatov E, Ludewig U, Zentgraf U. Disparate dynamics of gene body and *cis*-regulatory element evolution illustrated for the senescence-associated cysteine protease gene *SAG12* of plants. *Plants*, 2021, 10: 1380
- 18 Li Z, Zhang Y, Zou D, et al. LSD 3.0: A comprehensive resource for the leaf senescence research community. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48: 1069–1075
- 19 Porra R J, Thompson W A, Kriedemann P E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*, 1989, 975: 384–394
- 20 Berger N, Dubreucq B, Roudier F, et al. Transcriptional regulation of *Arabidopsis* *LEAFY COTYLEDON2* involves *RLE*, a *cis*-element that regulates trimethylation of histone H3 at lysine-27. *Plant Cell*, 2011, 23: 4065–4078
- 21 Xu D, Lu Z, Qiao G, et al. Auxin-induced *SaARF4* downregulates *SaACO4* to inhibit lateral root formation in *Sedum alfredii* hance. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 1297
- 22 Tajti J, Németh E, Glatz G, et al. Pattern of changes in salicylic acid-induced protein kinase (SIPK) gene expression and salicylic acid accumulation in wheat under cadmium exposure. *Plant Biol*, 2019, 21: 1176–1180
- 23 Mimura M, Nagato Y, Itoh J I. Rice *PLASTOCHRON* genes regulate leaf maturation downstream of the gibberellin signal transduction pathway. *Planta*, 2012, 235: 1081–1089
- 24 Nie X, Mira M, Igamberdiev A U, et al. Anaerobiosis modulation of two phytoglobins in barley (*Hordeum vulgare* L.), and their regulation by gibberellin and abscisic acid in aleurone cells. *Plant Physiol Biochem*, 2022, 182: 174–181
- 25 Wu J, Liang X, Lin M, et al. Comprehensive analysis of *MAPK* gene family in *Populus trichocarpa* and physiological characterization of *PtMAPK3-1* in response to MeJA induction. *Physiol Plant*, 2023, 175: e13869
- 26 Xu H, Luo D, Zhang F. DcWRKY75 promotes ethylene induced petal senescence in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Plant J*, 2021, 108: 1473–1492

Summary for “毛白杨半胱氨酸蛋白酶*PtoCPI*基因参与植物激素调控的叶片衰老”

Involvement of cysteine protease *PtoCPI* gene in plant hormone-regulated leaf senescence in *Populus tomentosa*

Hongli Guo, Mengyuan Chen, Yawei Fan, Han Liu, Leiqian Sun, Di Liu, Hui Li, Xin Wang & Hai Lu*

National Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Tree and Ornamental Plant Breeding and Biotechnology Laboratory of National Forestry and Grassland Administration, College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

* Corresponding author, E-mail: luhai1974@bjfu.edu.cn

Cysteine proteases, an important family of proteases, are expressed in different plant tissues and have various functions. This study explored the mechanism underlying the involvement of the cysteine protease *PtoCPI* gene in leaf senescence of *Populus tomentosa* under hormone induction. Initially, *poplar* leaves were treated with abscisic acid (ABA), methyl jasmonate (MeJA), and ethylene (ACC) for 0, 6 and 12 h, and 1, 2, or 3 d to observe leaf phenotypes, assess chlorophyll content, and measure relative expression of the *PtoCPI* gene. The results demonstrated that hormone-induced leaf yellowing was accelerated compared with the control group; the most significant leaf yellowing was observed under ABA treatment, followed by MeJA and ACC treatments. Chlorophyll content was significantly lower in leaves treated with ABA for 3 d compared with the control group; there was no significant difference in chlorophyll content between MeJA and ACC treatments. Furthermore, expression of the *PtoCPI* gene was significantly increased at 6 h, 12 h, and 3 d after induction with ABA and MeJA; induction with ACC led to a significant increase in *PtoCPI* gene expression at 12 h. Therefore, treatment with exogenous hormones (e.g., ABA, MeJA, and ACC) directly or indirectly regulates the transcription of *PtoCPI*, indicating its involvement in the induction of plant leaf senescence by exogenous hormones. Next, *ptocpl* mutant leaves of *P. tomentosa* were treated with the same concentrations of hormones. The results demonstrated that the *ptocpl* mutant exhibited delayed leaf senescence compared with the wild type, indicating that *PtoCPI* can directly or indirectly respond to ABA, MeJA, or ACC induction and participate in leaf senescence in *P. tomentosa*.

Further analysis of *PtoCPI* promoter elements revealed the presence of both MeJA response elements and a large number of ABA response elements. Therefore, transgenic Arabidopsis seedlings containing Pro*PtoCPI*-*GUS*-PBI121 recombinant vector were treated with the corresponding ABA and MeJA hormones. Subsequently, GUS histochemical staining and analysis of the relative expression of the reporter gene *GUS* were performed to determine whether the promoter had been induced. ABA treatment led to partial enhancement of GUS staining in Arabidopsis, but no significant effect was observed with MeJA treatment. Additionally, ABA treatment led to a significant increase in *GUS* expression, whereas MeJA treatment did not lead to a significant increase in *GUS* expression; thus, ABA is directly involved in *PtoCPI* gene expression. In conclusion, the *PtoCPI* promoter can regulate *PtoCPI* gene expression in response to ABA, enabling plants to respond to external stress and initiate leaf senescence. This study enhances the overall understanding of the mechanism by which plant cysteine proteases regulate hormone-induced leaf senescence.

***PtoCPI* gene, promoter, hormone treatment, functional analysis**

doi: [10.1360/TB-2023-0318](https://doi.org/10.1360/TB-2023-0318)