

特约综述



我们主要研究植物PI3KC3蛋白复合体的独特组成及不同复合体对液泡蛋白分选、分泌、细胞自噬以及相应的植物发育、抗逆过程的调控。同时, 我们也以遗传、生化方法寻找并研究植物自噬的新调控基因。

<http://sky.nankai.edu.cn/teacher.asp?id=gongqq>

细胞自噬在植物碳氮营养中作用的研究进展

任晨霞 龚清秋*

(南开大学生命科学学院, 天津 300071)

摘要 自噬(autophagy)是真核生物细胞通过形成自噬体, 回收利用胞内物质, 维持细胞健康的高通量亚细胞降解途径。随着酵母和动物自噬研究的深入, 植物自噬也受到越来越多的关注。近期的研究揭示了植物自噬的基本机制及其生理意义, 也发现了植物特有的自噬形式与自噬相关基因。该文主要综述了自噬在植物碳、氮营养中的作用。

关键词 植物细胞; 自噬; 转录调控; 碳; 氮

Progress on the Involvement of Plant Autophagy in Carbon and Nitrogen Utilization

Ren Chenxia, Gong Qingqiu*

(School of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract Autophagy is a bulk degradation pathway of eukaryotic cells that contributes to nutrient recycling and health maintenance. Similar to studies in yeasts and animals, autophagy has become an important topic in plant biology. Recent studies have established the basic mechanism of plant autophagy, and the multifaceted functions of autophagy in plant life have been revealed. Moreover, unique forms of plant autophagy and new genes have been discovered. This article reviews recent findings on the involvement of autophagy in plant carbon and nitrogen utilization.

Key words plant cells; autophagy; transcriptional regulation; carbon; nitrogen

国家自然科学基金(批准号: 30970251)、天津市应用基础及前沿技术研究的计划(批准号: 11JCZDJC16400)和中央高校基本科研业务费专项基金资助的课题

*通讯作者。Tel: 022-23503914, E-mail: gongq@nankai.edu.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30970251), the Tianjin Research Program of Applied Basic and Cutting-edge Technologies (Grant No.11JCZDJC16400) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities

*Corresponding author. Tel: +86-22-23503914, E-mail: gongq@nankai.edu.cn

网络出版时间: 2014-03-31 16:37 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.04.9002.html>

前言

自噬是真核生物细胞的一条高通量蛋白降解途径^[1-3]。在这一途径中, 废弃或受损的蛋白和细胞器首先被一片膜结构(phagophore)包围, 并通过膜的延展形成自噬前体(pre-autophagosomal structure, PAS)。随后, 自噬前体成熟为被称作自噬体(autophagosome)的双层膜囊泡。最终, 自噬体的外膜与溶酶体或液泡融合, 内膜及其内含物进入溶酶体或液泡被降解, 以氨基酸等形式被重新释放到细胞质中^[4]。自上世纪九十年代以来, Ohsumi与Klionsky等实验室通过遗传研究已在芽殖酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中确定了三十多个自噬基因(autophagy related genes, ATG), 它们分别参与自噬的启动、自噬体的成核、延展、成熟及与液泡的融合等过程。其中, 约半数编码自噬核心机制蛋白。这些自噬核心机制蛋白可进一步分成四类: (1)ATG1/unc-51-like kinase(ULK)激酶及其调控蛋白; (2)VPS34/PI3KC3激酶复合体 I(自噬调控复合体); (3)Atg9/mAtg9循环调控复合体; (4)类泛素蛋白Atg12、Atg8/LC3及其耦联系统^[4-7]。

作为一种基本的细胞生物学过程, 自噬在进化中高度保守。多数酵母自噬基因都能在高等植物中找到其同源基因^[8-10]。过去十年间, 在植物自噬机制研究方面, 国内外同行对ATG8-PE与ATG5-ATG12两个自噬耦联系统进行了功能验证, 通过酵母突变体回补、重组蛋白生化功能验证^[11-12]、ATG8与ATG12耦联系统的体外重构^[13]、ATG12晶体结构解析^[14]、ATG7-ATG3复合体晶体结构解析^[15]等工作, 发现两个耦联系统的运转方式与酵母基本相同。近期, TOR与ATG1激酶复合体参与自噬调控的功能也得到了证实。Bassham实验室研究发现, TOR(target of rapamycin)对自噬有负调控作用, RNA干扰TOR基因后, 依赖于ATG18的自噬过程持续发生^[16]。Vierstra实验室研究表明, ATG1/ATG13复合体能够启动自噬, 其蛋白水平也受到自噬调节^[17]。此外, 与动物中一致, 植物自噬体组装也被认为起始于内质网^[18]。最新的研究也确认了植物中过氧化物酶体自噬(pexophagy)的存在^[19]。

近期的研究逐渐揭示了自噬在多种植物生理过程中的重要作用^[1-2, 20-24]。其中, 较为直观的是自噬在营养循环利用中的作用, 例如碳、氮缺失和叶片衰老条件下营养物质的重新分配^[20-21, 25]。本文即对

近期发现的植物自噬在碳、氮营养中的作用作一简要概括。

1 营养缺陷对植物自噬相关基因转录水平的调控

与酵母不同, 相当一部分植物自噬相关基因明显受到转录调控。例如, 对水稻进行硝酸盐/铵盐等氮素处理, 氯化钠、干旱、冷、黑暗等非生物胁迫处理, 以及生长素、细胞分裂素、脱落酸、赤霉素等激素处理, 都可检测到多个自噬同源基因的转录本水平变化^[26]。RNA干扰拟南芥TOR基因后, 转基因植株中*AtATG18a*和*AtATG9*转录水平高于野生型^[16]。拟南芥悬浮细胞中, *ATG3*、*ATG4a*、*ATG4b*、*ATG7*以及*ATG8a-ATG8i*均会在缺碳处理时出现转录本的瞬时积累^[27]。拟南芥离体叶片黑暗处理后, *ATG7*和*ATG8*的转录本水平显著上升^[28]。烟草的自噬相关基因*ATG6*、*ATG7*、*ATG9*和*VPS34*在每一个光周期的黑暗阶段开始后都会有明显的转录上调^[29]。

此外, 多基因编码的植物自噬相关蛋白, 其转录水平变化往往不相同。例如, 拟南芥的ATG18由八个同源基因*ATG18a-h*编码。其中, *ATG18a-d*在所有器官中均有表达, *ATG18f-h*在特定组织表达, 而所有组织均检测不到*ATG18e*的表达。缺碳和缺氮条件下, *ATG18a*、*f*、*g*、*h*这四个基因的转录水平升高, *ATG18a*上调最明显^[30]。与此类似, 拟南芥基因组中有九个ATG8同源基因, 它们编码的ATG8s与酵母ATG8的序列相似度均高达70%, 其C-末端均具有ATG4加工位点即Gly残基, 其中ATG8h和ATG8i的C-末端以Gly结尾。九个ATG8在不同的组织器官中均有表达。将5周大的拟南芥植株分别缺氮处理1, 3, 6, 12 h后, *ATG8a-i*的表达水平均有所上升, 但是变化模式各不相同^[11]。此外, 我们在大豆基因组中找到十一个ATG8同源基因, 其中GmATG8b~c、e~g的转录明显受到缺氮诱导^[31]。

植物中多个自噬相关蛋白由多基因编码, 以及植物自噬相关基因的转录水平具有组织器官特异性并受到包括营养缺陷在内的外界条件调控的事实, 暗示与单细胞真核生物相比, 植物扩展了对自噬的调控层面以适应个体发育以及应对复杂环境的需求。

2 碳、氮缺失与植物自噬检测

营养限制是引发细胞自噬的经典实验条件。在

酵母中, 一些必需营养因子, 例如氮、碳、氨基酸、核苷酸以及硫元素的缺乏, 都可以引发自噬, 其中氮缺失是最常用的条件^[32]。在植物中, 碳、氮缺失也都可以引发细胞自噬^[25,33]。目前已确认的植物自噬基因突变体, 对缺碳、缺氮的耐受度都显著低于野生型, 并具有生长受阻及在恢复碳、氮供应后不能恢复生长的表型^[17,25,34-37]。如图1所示, 自噬突变体 *atg2* 对缺碳和缺氮的耐受度显著降低。目前, 缺碳、缺氮处理及恢复已成为国际同行广泛接受的、从生理水平确认自噬缺陷突变体的基本方法。

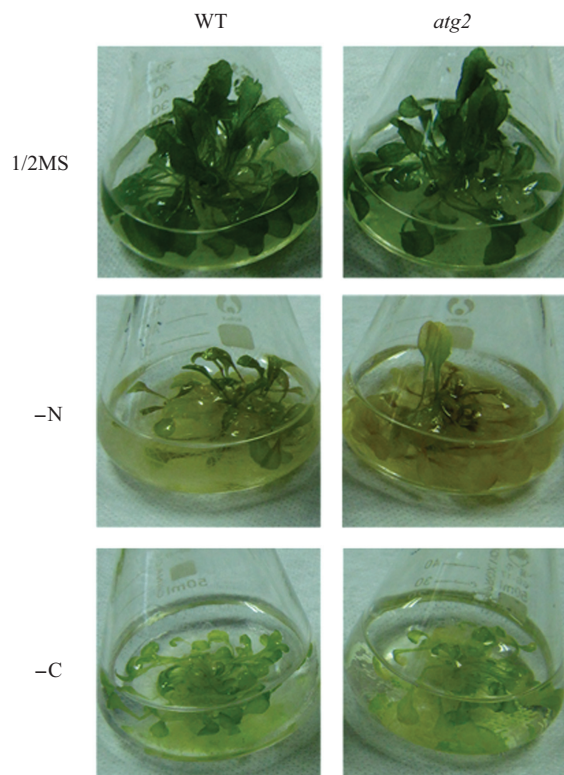
在碳饥饿或氮饥饿时, 以指示自噬的标记GFP-ATG8结合液泡H⁺ATPase抑制剂处理, 或直接以单丹磺酰戊二胺(monodansylcadaverine, MDC)等酸性小泡示踪染料处理^[38], 可在植物的叶片、根和下胚轴细胞中观察到自噬小体的积累^[17,28,30,35,37]。在自噬相

关的突变体细胞中, 则不能或很少观察到ATG8标记的自噬小体在液泡中积累^[17,25,34-37]。碳、氮饥饿处理后, 以相应的抗体也可检测到自噬基因编码蛋白的积累^[17,25]。通过尿素-SDS-PAGE胶分离蛋白样品, 可以在后续的免疫印迹中检测ATG8与ATG8-PE的相对水平变化(ATG8-PE相对ATG8迁移较快, 会出现在胶的前端), 由此判断自噬体形成的相对强度^[25,39]。

3 植物通过细胞自噬应对碳饥饿

植物依靠光合作用获得生命活动所需的物质和能量。黑暗条件下, 光反应不再进行, 但植物仍然需要营养来维持细胞的基本结构与功能。此时, 叶片淀粉的降解便为细胞的夜间活动提供了能量来源。除了经典的淀粉降解途径外, 王燕等^[29]的研究表明, 细胞自噬也能够作用于部分叶片淀粉的降解。Yoshimoto等^[11]证明, 自噬在拟南芥根细胞可以低水平、组成型地发生, 缺蔗糖培养时自噬增强。分别将野生型和 *atg13a atg13b* 双突变体在含蔗糖的培养基上长日照培养之后转到黑暗条件下生长不同的时间段, 然后再恢复长日照, *atg13a atg13b* 双突变体恢复的存活率低于野生型^[17]。短日照土培到六周大的 *atg5*、*atg7*、*atg10*, 经过不同时间的黑暗处理, 恢复光照后的存活率均低于野生型^[40]。在长时间黑暗条件下, 拟南芥叶片中游离氨基酸水平会提高^[40], 这可能与自噬水平升高有关。

Ishida实验室最近证实, 自噬可以在晚间为植物提供能量^[41]。长日照条件下, 自噬突变体 *atg5-1*、*atg2-1*、*atg10-1* 的生长情况与野生型无明显区别, 而在短日照条件下这些突变体的生长速率明显低于野生型, 与淀粉含量异常突变体的表型相似。拟南芥淀粉过度积累(*starch-excess1*, *sex1-1*)和淀粉产生缺陷的突变体(*phosphoglucomutase*, *pgm*; *ADP-glucose pyrophosphorylase1*, *adg1*)与 *atg5* 的双突变体在短日照条件下均出现比单突变体更明显的早衰表型, 而淀粉产生与自噬缺陷的双突变体 *pgm atg5* 和 *adg1 atg5* 的表型要比淀粉过度积累与自噬缺陷的双突变体 *sex1 atg5* 严重。这说明自噬对于维持 *pgm* 和 *adg1* 的生命活动起重要作用。从转录水平来看, 淀粉产生缺陷的单突变体中ATG8基因家族中的ATG8e、ATG8f和ATG8h的转录水平约是野生型和 *atg5* 的两倍。淀粉产生缺陷突变体 *pgm* 中游离氨基酸总量是野生型的2.3倍, 支链氨基酸和芳香族氨基酸水平



野生型拟南芥和自噬突变体 *atg2* 在营养丰富的液体培养基中生长10 d后, 分别转移到营养丰富培养基、缺氮培养基、缺糖培养基中继续培养(缺糖处理的样品同时黑暗培养), 7 d后观察记录, 可见 *atg2* 对碳氮缺失耐受性较低。

Arabidopsis seedlings were grown for 10 days on 1/2MS liquid medium and then transferred to 1/2MS, nitrogen-deficient (-N) or sucrose-deficient (-C) medium for an additional week before photographing. *atg2* is less tolerant to either -N or -C stress.

图1 野生型和自噬突变体 *atg2* 响应碳、氮缺失的表型

Fig.1 Sensitivity of wild-type (WT) Col-0 and homozygous *atg2* to N starvation and C starvation

显著高于野生型, 而双突变体*pgm atg5*中的这种情况有部分减弱, 由此可初步确定突变体*pgm*中的部分游离氨基酸来自于自噬。在异养生物中, 蛋白质是重要的呼吸底物。在糖类缺乏的条件下, 氨基酸也可以为植物提供部分呼吸底物^[42]。突变体*pgm*中氨基酸代谢相关基因的表达水平高于野生型, 说明缺碳严重的植物会加强自噬途径为细胞提供氨基酸来源, 氨基酸进一步代谢为呼吸底物。而在*pgm atg5*双突变体中部分氨基酸代谢的中间产物, 如4-甲基-2-氧代戊酸、3-甲基-2-氧代戊酸、酵母氨酸、2-氨基己二酸等有机酸的含量因缺少来源于自噬的氨基酸底物而低于*pgm*单突变体^[41]。因此, 自噬对植物的碳代谢过程确实起到一定的作用, 在糖利用受限时为植物提供呼吸底物来维持能量水平。

3.1 缺碳条件下自噬参与叶绿体组分的降解

3.1.1 缺碳条件下自噬依赖的淀粉降解 白天, 植物进行光合作用, 积累淀粉; 夜间则降解淀粉以提供碳源, 保证夜间的正常生长。非常有趣的是, 植物能够根据黑夜的长度变化准确调整淀粉降解的速率^[43]。淀粉降解的经典途径是在叶绿体中通过可逆淀粉磷酸酶和葡聚糖水解酶实现的, 而新近发现的淀粉自噬降解途径揭示了植物细胞自噬对淀粉降解的特殊贡献^[29]。王燕等^[29]通过对自噬体的定量统计发现, 黑暗周期的前四小时, 正常植物细胞中自噬水平会上升, 黑暗周期结束时自噬降到基础水平。当通过病毒诱导的基因沉默系统在烟草上实现*ATG6*基因的下调时, 细胞自噬功能受损, 进而导致了黑暗结束时叶片淀粉的残留。拟南芥自噬突变体*atg2*、*atg5*和*atg9*的幼苗和成株在光周期黑暗结束时, 淀粉含量均高于野生型。在黑暗周期中, 可在烟草叶肉细胞的叶绿体周围和液泡内观察到不同降解程度的淀粉颗粒: 既有双层膜或单层膜包被的淀粉颗粒, 也有完整的淀粉颗粒, 还有几乎降解完的淀粉颗粒。用黄色荧光蛋白标记淀粉合酶(*granule-bound starch synthase I:GBSSI-YFP*)可以很好地示踪细胞内的淀粉颗粒。正常细胞中可以观察到CFP-ATG8f与GBSSI-YFP共定位, 并且CFP-ATG8f会包裹GBSSI-YFP标记的淀粉颗粒。而病毒诱导基因沉默*ATG6*的细胞, 其液泡中淀粉颗粒明显少于野生型, 表明淀粉确实可通过自噬进入液泡降解。遗传实验显示, 淀粉的经典降解途径与自噬降解途径是相互独立的协同过程。自噬途径降解的淀粉颗粒比叶绿体中的要

小, 推测可能是叶绿体中降解不完全的淀粉颗粒。

3.1.2 缺碳条件下自噬依赖的叶绿体蛋白降解 植物在营养生长阶段, 大部分氮素和其他营养物质会分配给叶片, 在C3植物叶片中, 75%~80%的氮主要以光合相关蛋白, 如核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(RuBisCO)等形式存在于叶绿体中^[44]。在衰老小麦^[45]、大豆^[46]和烟草^[47]的叶片中都发现有包含有RuBisCO的双层膜小体(RuBisCO containing bodies, RCBs), 其内容物最终会进入降解液泡(lytic vacuole)。自噬相关基因*ATG5*突变后, RCBs不能在液泡中积累。RCBs的形成可能代表一种植物特有的自噬过程^[48]。

RCBs的积累受碳水平与光合产物调控。黑暗条件下, 在不含蔗糖的培养基中孵育离体叶片, 用液泡H⁺-ATPase抑制剂伴刀豆球蛋白素A(concanamycin A, 下文简称CA)处理后, 在激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)下可以观察到大量RCBs。在光下孵育或者培养基中加入蔗糖、葡萄糖或果糖则会抑制RCBs的产生。相对的, 在缺氮条件下孵育叶片不会引发RCBs的积累。分别在正常光周期黑暗结束的时候、延长黑暗后、正常光周期光照结束的时候, 摘除拟南芥第四片莲座叶并进行黑暗孵育, 同时检测碳水化合物含量和RCBs量, 发现光照结束的时候摘除的叶片碳水化合物含量最高, RCBs含量低; 而延长黑暗后摘除的叶片中碳水化合物含量最低, RCBs含量高。在叶片延展、成熟和早期衰老阶段, 叶片黑暗处理后RCBs的数量增加。碳水化合物决定RCBs的产生, 淀粉是其中一个重要影响因素。不能积累淀粉的突变体*pgm-1*和*adg*中叶片中RCBs显著高于野生型。在淀粉积累过多突变体*sex1-1*和*maltose excess1(mex1-3)*中, 各个时期RCBs的积累均低于野生型。缺氮处理过的植物会检测到淀粉、蔗糖、葡萄糖和果糖的快速积累, 而很少检测到RCBs^[48], 进一步说明RCBs是植物响应碳水平的一种特殊自噬形式。

3.2 缺碳条件下自噬依赖的叶绿体降解

黑暗处理拟南芥野生型和自噬突变体*atg4a atg4b-1*叶片发现, 野生型的叶绿体变小, 数量减少, 而*atg4a atg4b-1*叶绿体也变小, 但数量不变。在黑暗处理过的野生型叶肉细胞的液泡内除了可以观察到大量降解RuBisCO的自噬体外, 还可看到直径达3~4 μm的含部分叶绿体的结构, 但是在自噬突变体*atg4a*

*atg4b-1*液泡中二者都观察不到^[49]。因此, 在饥饿条件下, 植物细胞不仅以自噬降解淀粉与叶绿体蛋白, 还可能通过自噬降解一部分叶绿体来维持基本生命活动。然而, 叶绿体降解是否具有选择性, 其机制是否特异, 还有待研究。

3.3 与碳水平相关的自噬新基因的发现

Galili实验室通过cDNA文库筛选, 发现了两个拟南芥ATG8f的互作蛋白^[50], ATG8f相互作用蛋白ATI1和ATI2(ATG8 interacting protein 1 and 2)。ATI1和ATI2都是植物特有的蛋白。在正常培养条件下, ATI1和ATI2在胞质中与内质网部分共定位。多种胁迫条件都可以诱导ATI1转录上调。在缺碳条件下, ATI1和ATI2会定位于一种新识别的球形复合体上, 并沿着内质网系统移动, 最终进入液泡降解。含有ATI1的小体与高尔基体、线粒体、过氧化物酶体无明显共定位, 缺碳条件下也仅有个别含有ATI1的小体和GFP-ATG8f标记的典型的自噬体共定位。作者推测ATI代表的这种特殊形式的自噬可能与脱落酸(ABA)信号转导有关。ABA是维持种子休眠、防止提早萌发的主要植物激素^[51]。干种子中ABA水平最高, 在种子吸胀萌发过程中ABA水平逐渐下降^[52]。ATI基因的转录本水平与ABA的积累水平呈正相关关系, 在干种子中的表达水平最高, 种子吸胀萌发过程中降低。与野生型相比, *ati1 ati2* RNAi双突变体的萌发对外源ABA更敏感。因此, 种子萌发过程中对抑制萌发的物质的降解, 可能是由这种特殊的自噬形式介导的。

4 植物细胞自噬参与氮素的再利用

氮是所有有机体生活所必需的营养物质, 是许多大分子(如蛋白质、核酸、叶绿素等)生物合成所必需的原料, 也是植物生长发育和产量形成的重要决定因素。自噬对于植物在逆境条件下合理利用氮素以及植物整体水平分配氮素这两个过程都具有非常重要的作用。

如前所述, 拟南芥自噬相关突变体*atg5*、*atg7*、*atg10*和*atg13a atg13b*等对缺氮的耐受力均明显低于野生型^[17,37], 表明自噬在缺氮条件下参与维持植物的生命活动。与此相对应, 异位表达ATG8同源基因*GmATG8c*, 能够提高大豆愈伤组织以及转基因拟南芥对低氮的耐受力。组成型表达*GmATG8c*的转基因拟南芥提前进入生殖生长, 产量得到提高^[31]。组

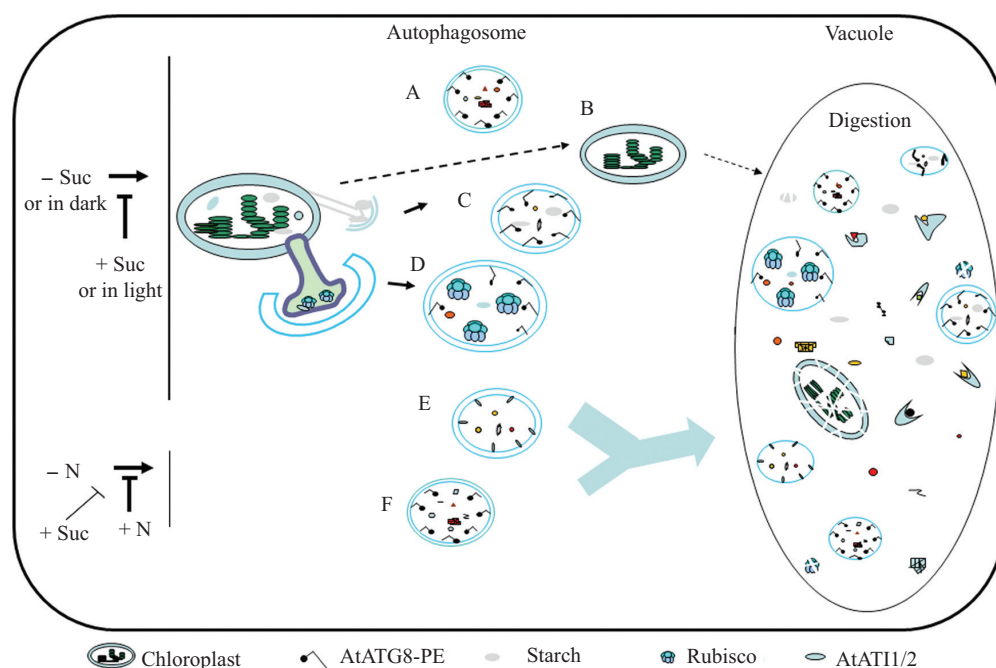
成型表达*AtAtg8f*也可以促进拟南芥的生长, 并提高转基因植物对氮缺失的耐受性^[53]。

植物对氮素的利用包括吸收、转运、同化和再利用过程。其中, 氮素的再利用对于产量形成十分关键。Guiboileau等^[55]利用同位素标记氮研究了拟南芥整体水平的氮循环和利用的情况。种子成熟过程中, 莲座叶在营养生长阶段同化的氮素会被再分配到种子中, 因此种子中¹⁵N的相对含量与收获指数的比值可以指示氮素利用效率(nitrogen use efficiency, NUE)。自噬突变体(*atg5-1*、*atg9-2*和*ATG18a* RNAi株系)^[25,35,54]在足氮(10 mmol/L硝酸盐)条件下将氮再分配到种子中的能力(即NUE), 均低于野生型。在低氮(2 mmol/L硝酸盐)条件下, 自噬突变体氮的NUE则显著低于野生型^[55]。数据分析显示, 自噬对氮素再利用的贡献大约为50%^[55]。

此外, 由于自噬突变体无法有效回收利用营养组织中的蛋白质和其他含氮资源, 其叶片中细胞老化废物的积累会促进细胞过早死亡, 影响来自其他途径的氨基酸产生, 最终进一步降低氮素利用效率。例如, 在自噬突变体*atg5-2*中过表达细菌的水杨酸羟化酶NahG, 或者将水杨酸(SA)合成缺陷突变(*sid2*)引入*atg5-2*中, *atg5-2*的叶片早衰表型均得到了抑制, 同时NUE也得到部分回补^[55]。植物自噬与其他碳氮代谢途径是否存在交互作用, 其具体机制为何, 还有待研究。

5 小结与展望

植物需要持续的营养供给为其生长、代谢和存活提供必要的能量。光合作用和碳代谢是植物细胞内多种生化过程的主要能量来源。缺碳时, 植物细胞能够通过自噬, 降解光合产物、光合蛋白甚至部分叶绿体, 为细胞提供部分呼吸作用的底物和合成新的胞内物质的原料。缺氮时, 植物细胞回收利用胞内物质以减少能耗, 并提供合成新物质的原料, 从而维持基本的生命活动。碳代谢和氮代谢是紧密相连的, 植物通过细胞自噬应对碳、氮缺失, 并可能部分通过自噬调控二者的平衡。植物中由缺氮引发的自噬能够被外加的糖或者光照培养所抑制, 以及缺碳和缺氮条件下植物细胞中不同自噬相关基因转录水平变化不同的现象, 都说明植物自噬不仅与碳、氮水平直接相关, 而且受到复杂、精细的调控。本文阐述了自噬在植物循环利用氮素方面的作用以及



A、F: 经典途径的自噬; B: 碳缺失时自噬依赖的叶绿体降解; C: 黑暗时, 叶绿体中部分淀粉通过自噬降解; D: 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶等叶绿体蛋白质通过特殊形式的自噬降解; E: 与 $AT11/2$ 相关的自噬形式。

A,F: classic autophagy pathway; B: autophagy-dependent degradation of chloroplast by a yet unknown way in darkened leaves; C: degradation of starch by autophagy in dark; D: degradation of RuBisCO and possibly other stromal proteins via RCBs (RuBisCO containing bodies) in darkened leaves; E: the $AT11/2$ -related plant specific autophagy pathway.

图2 拟南芥细胞自噬模型

Fig.2 Different types of autophagy in *Arabidopsis*

一些植物特有的响应低碳的自噬形式(图2)。进一步探究植物自噬如何具体响应碳、氮饥饿, 以及如何与其他代谢与信号过程相协调, 不仅有助于建立植物特有的自噬调控机制, 研究结果也将有望应用于农业生产, 为农作物产量和品质的提高作出贡献。

参考文献 (References)

- Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 2004; 6(4): 463-77.
- Bassham DC, Laporte M, Marty F, Moriyasu Y, Ohsumi Y, Olsen LJ, *et al.* Autophagy in development and stress responses of plants. *Autophagy* 2006; 2(1): 2-11.
- Bassham DC. Function and regulation of macroautophagy in plants. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793(9): 1397-403.
- Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011; 27: 107-32.
- Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: Core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 2007; 9(10): 1102-9.
- Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: Lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10(7): 458-67.
- Izumi M, Hidema J, Ishida H. Deficiency of autophagy leads to significant changes of metabolic profiles in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav* 2013; doi: 10.4161/psb.25023.
- Li F, Vierstra RD. Autophagy: A multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling. *Trends Plant Sci* 2012; 17(9): 526-37.
- Liu Y, Bassham DC. Autophagy: Ppathways for self-eating in plant cells. *Annu Rev Plant Biol* 2012; 63: 215-37.
- Zhou J, Wang J, Cheng Y, Chi YJ, Fan B, Yu JQ, *et al.* NBR1-mediated selective autophagy targets insoluble ubiquitinated protein aggregates in plant stress responses. *PLoS Genet* 2013; 9(1): e1003196.
- Yoshimoto K, Hanaoka H, Sato S, Kato T, Tabata S, Noda T, *et al.* Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. *Plant Cell* 2004; 16(11): 2967-83.
- Chung T, Phillips AR, Vierstra RD. ATG8 lipidation and ATG8-mediated autophagy in *Arabidopsis* require ATG12 expressed from the differentially controlled ATG12A and ATG12B loci. *Plant J* 2010; 62(3): 483-93.
- Fujioka Y, Noda NN, Fujii K, Yoshimoto K, Ohsumi Y, Inagaki F. *In vitro* reconstitution of plant Atg8 and Atg12 conjugation systems essential for autophagy. *J Biol Chem* 2008; 283(4): 1921-8.
- Suzuki NN, Yoshimoto K, Fujioka Y, Ohsumi Y, Inagaki F. The crystal structure of plant ATG12 and its biological implication in autophagy. *Autophagy* 2005; 1(2): 119-26.
- Yamaguchi M, Matoba K, Sawada R, Fujioka Y, Nakatogawa H, Yamamoto H, *et al.* Noncanonical recognition and UBL loading of distinct E2s by autophagy-essential Atg7. *Nat Struct Mol Biol* 2012; 19(12): 1250-6.

- 16 Liu Y, Bassham DC. TOR is a negative regulator of autophagy in *Arabidopsis thaliana*. PLoS One 2010; 5(7): e11883.
- 17 Suttangkakul A, Li F, Chung T, Vierstra RD. The ATG1/ATG13 protein kinase complex is both a regulator and a target of autophagic recycling in *Arabidopsis*. Plant Cell 2011; 23(10): 3761-79.
- 18 Honig A, Avin-Wittenberg T, Galili G. Selective autophagy in the aid of plant germination and response to nutrient starvation. Autophagy 2012; 8(5): 838-9.
- 19 Farmer LM, Rinaldi MA, Young PG, Danan CH, Burkhardt SE, Bartel B. Disrupting autophagy restores peroxisome function to an *Arabidopsis* lon2 mutant and reveals a role for the LON2 protease in peroxisomal matrix protein degradation. Plant Cell 2013; 25(10): 4085-100.
- 20 Toyooka K, Moriyasu Y, Goto Y, Takeuchi M, Fukuda H, Matsuoka K. Protein aggregates are transported to vacuoles by a macroautophagic mechanism in nutrient-starved plant cells. Autophagy 2006; 2(2): 96-106.
- 21 Hofius D, Schultz-Larsen T, Joensen J, Tsitsigiannis DI, Petersen NH, Mattsson O, *et al.* Autophagic components contribute to hypersensitive cell death in *Arabidopsis*. Cell 2009; 137(4): 773-83.
- 22 Liu Y, Schiff M, Czymbek K, Tallóczy Z, Levine B, Dinesh-Kumar SP. Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. Cell 2005; 121(4): 567-77.
- 23 Shin JH, Yoshimoto K, Ohsumi Y, Jeon JS, An G. OsATG10b, an autophagosome component, is needed for cell survival against oxidative stresses in rice. Mol Cell 2009; 27(1): 67-74.
- 24 Xiong Y, Contento AL, Nguyen PQ, Bassham DC. Degradation of oxidized proteins by autophagy during oxidative stress in *Arabidopsis*. Plant Physiol 2007; 143(1): 291-9.
- 25 Thompson AR, Doelling JH, Suttangkakul A, Vierstra RD. Autophagic nutrient recycling in *Arabidopsis* directed by the ATG8 and ATG12 conjugation pathways. Plant Physiol 2005; 138(4): 2097-110.
- 26 Xia K, Liu T, Ouyang J, Wang R, Fan T, Zhang M. Genome-wide identification, classification, and expression analysis of autophagy-associated gene homologues in rice (*Oryza sativa* L.). DNA Res 2011; 18(5): 363-77.
- 27 Rose TL, Bonneau L, Der C, Marty-Mazars D, Marty F. Starvation-induced expression of autophagy-related genes in *Arabidopsis*. Biol Cell 2006; 98(1): 53-67.
- 28 Doelling JH, Walker JM, Friedman EM, Thompson AR, Vierstra RD. The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in *Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem 2002; 277(36): 33105-14.
- 29 Wang Y, Yu B, Zhao J, Guo J, Li Y, Han S, *et al.* Autophagy contributes to leaf starch degradation. Plant Cell 2013; 25(4): 1383-99.
- 30 Xiong Y, Contento AL, Bassham DC. AtATG18a is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in *Arabidopsis thaliana*. Plant J 2005; 42(4): 535-46.
- 31 Xia T, Xiao D, Liu D, Chai W, Gong Q, Wang NN. Heterologous expression of ATG8c from soybean confers tolerance to nitrogen deficiency and increases yield in *Arabidopsis*. PLoS One 2012; 7(5): e37217.
- 32 Takeshige K, Baba M, Tsuboi S, Noda T, Ohsumi Y. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. J Cell Biol 1992; 119(2): 301-11.
- 33 Moriyasu Y, Ohsumi Y. Autophagy in tobacco suspension-cultured cells in response to sucrose starvation. Plant Physiol 1996; 111(4): 1233-41.
- 34 Doelling JH, Walker JM, Friedman EM, Thompson AR, Vierstra RD. The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in *Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem 2002; 277(36): 33105-14.
- 35 Hanaoka H, Noda T, Shirano Y, Kato T, Hayashi H, Shibata D, *et al.* Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an *Arabidopsis* autophagy gene. Plant Physiol 2002; 129(3): 1181-93.
- 36 Xiong Y, Contento AL, Bassham DC. AtATG18a is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in *Arabidopsis thaliana*. Plant J 2005; 42(4): 535-46.
- 37 Phillips AR, Suttangkakul A, Vierstra RD. The ATG12-conjugating enzyme ATG10 is essential for autophagic vesicle formation in *Arabidopsis thaliana*. Genetics 2008; 178(3): 1339-53.
- 38 Contento AL, Xiong Y, Bassham DC. Visualization of autophagy in *Arabidopsis* using the fluorescent dye monodansylcadaverine and a GFP-AtATG8e fusion protein. Plant J 2005; 42(4): 598-608.
- 39 Chung T, Suttangkakul A, Vierstra RD. The ATG autophagic conjugation system in maize: ATG transcripts and abundance of the ATG8-lipid adduct are regulated by development and nutrient availability. Plant Physiol 2009; 149(1): 220-34.
- 40 Usadel B, Blasing OE, Gibon Y, Retzlaff K, Höhne M, Günther M, *et al.* Global transcript levels respond to small changes of the carbon status during progressive exhaustion of carbohydrates in *Arabidopsis rosettes*. Plant Physiol 2008; 146(4): 1834-61.
- 41 Izumi M, Hidema J, Makino A, Ishida H. Autophagy contributes to nighttime energy availability for growth in *Arabidopsis*. Plant Physiol 2013; 161(4): 1682-93.
- 42 Araujo WL, Tohge T, Ishizaki K, Leaver CJ, Fernie AR. Protein degradation—an alternative respiratory substrate for stressed plants. Trends Plant Sci 2011; 16(9): 489-98.
- 43 Smith AM, Stitt M. Coordination of carbon supply and plant growth. Plant Cell Environ 2007; 30(9): 1126-49.
- 44 Makino A, Osmond B. Effects of nitrogen nutrition on nitrogen partitioning between chloroplasts and mitochondria in pea and wheat. Plant Physiol 1991; 96(2): 355-62.
- 45 Chiba A, Ishida H, Nishizawa NK, Makino A, Mae T. Exclusion of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from chloroplasts by specific bodies in naturally senescing leaves of wheat. Plant Cell Physiol 2003; 44(9): 914-21.
- 46 Otegui MS, Noh YS, Martinez DE, Vila Petroff MG, Staehelin LA, Amasino RM, *et al.* Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of *Arabidopsis* and soybean. Plant J 2005; 41(6): 831-44.
- 47 Prins A, van Heerden PD, Olmos E, Kunert KJ, Foyer CH. Cysteine proteinases regulate chloroplast protein content and composition in tobacco leaves: A model for dynamic interactions with ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) vesicular bodies. J Exp Bot 2008; 59(7): 1935-50.
- 48 Ishida H, Yoshimoto K, Izumi M, Reisen D, Yano Y, Makino A, *et al.* Mobilization of rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagic process. Plant Physiol 2008; 148(1): 142-55.
- 49 Wada S, Ishida H, Izumi M, Yoshimoto K, Ohsumi Y, Mae T,

- et al.* Autophagy plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves. *Plant Physiol* 2009; 149(2): 885-93.
- 50 Honig A, Avin-Wittenberg T, Ufaz S, Galili G. A new type of compartment, defined by plant-specific Atg8-interacting proteins, is induced upon exposure of *Arabidopsis* plants to carbon starvation. *Plant Cell* 2012; 24(1): 288-303.
- 51 Bewley JD. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 1997; 9(7): 1055-66.
- 52 Braybrook SA, Harada JJ. LECs go crazy in embryo development. *Trends Plant Sci* 2008; 13(12): 624-30.
- 53 Slavikova S, Ufaz S, Avin-Wittenberg T, Levanony H, Galili G. An autophagy-associated Atg8 protein is involved in the responses of *Arabidopsis* seedlings to hormonal controls and abiotic stresses. *J Exp Bot* 2008; 59(14): 4029-43.
- 54 Contento AL, Xiong Y, Bassham DC. Visualization of autophagy in *Arabidopsis* using the fluorescent dye monodansylcadaverine and a GFP-AtATG8e fusion protein. *Plant J* 2005; 42(4): 598-608.
- 55 Guiboileau A, Yoshimoto K, Soulay F, Bataillé MP, Avicé JC, Masclaux-Daubresse C. Autophagy machinery controls nitrogen remobilization at the whole-plant level under both limiting and ample nitrate conditions in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 2012; 194(3): 732-40.