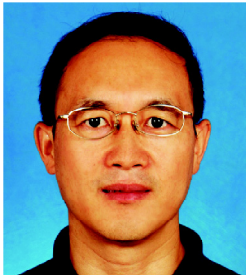


特约综述



我们主要运用分子细胞生物学和遗传学的手段研究植物与病原微生物的相互作用,特别是植物病毒病理和植物抗病毒分子机制。目前我们主要关注细胞自噬、蛋白与蛋白相互作用以及小RNA在植物病毒病理和植物抗病毒中的作用机制。此外,我们也从事用基因工程的手段获得抗重要病毒作物的研究。

<http://life.tsinghua.edu.cn/faculty/faculty/309.html>

植物细胞自噬研究进展

王 燕 刘玉乐*

(清华大学生命科学学院, 北京 100084)

摘要 细胞自噬是真核生物中进化保守的对细胞内物质进行周转的重要过程,该过程中一些损坏的蛋白或细胞器被双层膜结构的自噬小泡包裹后送入溶酶体(动物)或液泡(酵母和植物)中进行降解并得以循环利用。植物中通过序列比对鉴定了诸多自噬相关基因并分离到了部分细胞自噬功能缺陷的突变体,这些研究均推进了我们对植物细胞自噬机制和功能的了解。本文主要综述了植物细胞自噬分子机制和生理功能的研究进展。

关键词 细胞自噬; 植物; *ATG* 基因; 分子机制; 生理功能

植物生存过程中会不断地遭遇营养缺乏等环境因素的胁迫,细胞内完善的蛋白降解机制对于维持细胞稳态和应对不利环境是非常必须的^[1-3]。植物体内主要存在两条蛋白降解途径:一条是泛素/26S蛋白酶体途径,该途径能够对细胞内一些短周期的、具有调控功能或结构异常的蛋白进行特异性的降解^[4];另外一条主要的蛋白降解途径是细胞自噬,它能够对细胞内长寿命的蛋白或者功能异常的细胞器如功能受损的线粒体、过氧化物酶体等进行大批量的降解,其降解蛋白的效率要远远高于泛素/蛋白酶体途径。细胞自噬主要有两种形式:微自噬(microautophagy)和巨自噬(macroautophagy)^[5]。微自噬是指溶酶体或者液泡内膜直接内陷将底物包裹并降解的过程;而在巨自噬过程中,底物蛋白被一种双层膜的结构包裹后形成直径约400-900纳米大小的自噬小泡(autophagosome)^[6],接着自噬小泡的外膜与溶酶体膜或者液泡膜融合,使带有内层膜、包裹底物的泡状结构进入溶酶体或者液泡中,并最终在一系列水解酶的作用下被降解,我们将这种进入溶酶体或

者液泡腔中的泡状结构称为自噬小体(autophagic body)^[5]。两种形式的细胞自噬在植物中均有发现。微自噬多在种子成熟时储藏蛋白的沉积或萌发时储藏蛋白的降解中起作用^[7-9]。而巨自噬作为一种更主要更普遍的自噬形式(后文中均将其称为细胞自噬)参与到很多生命活动中,早期的研究发现营养缺乏条件下培养的细胞有自噬现象^[10-12],而后在植物的免疫反应、叶片衰老及环境胁迫应答中发现细胞自噬也参与其中^[13-17]。作为真核生物界保守的蛋白降解机制,细胞自噬在植物中的研究也逐渐深入,本文主要就近些年来细胞自噬在植物中分子机制及其生理功能的研究进行综合阐述。

1 植物细胞自噬的分子机制

对于细胞自噬分子机制的了解最初主要来源于酵

国家重大科学研究计划(No.2011CB910100)资助项目

* 通讯作者。Tel: 010-62794013, E-mail: yuleliu@mail.tsinghua.edu.cn

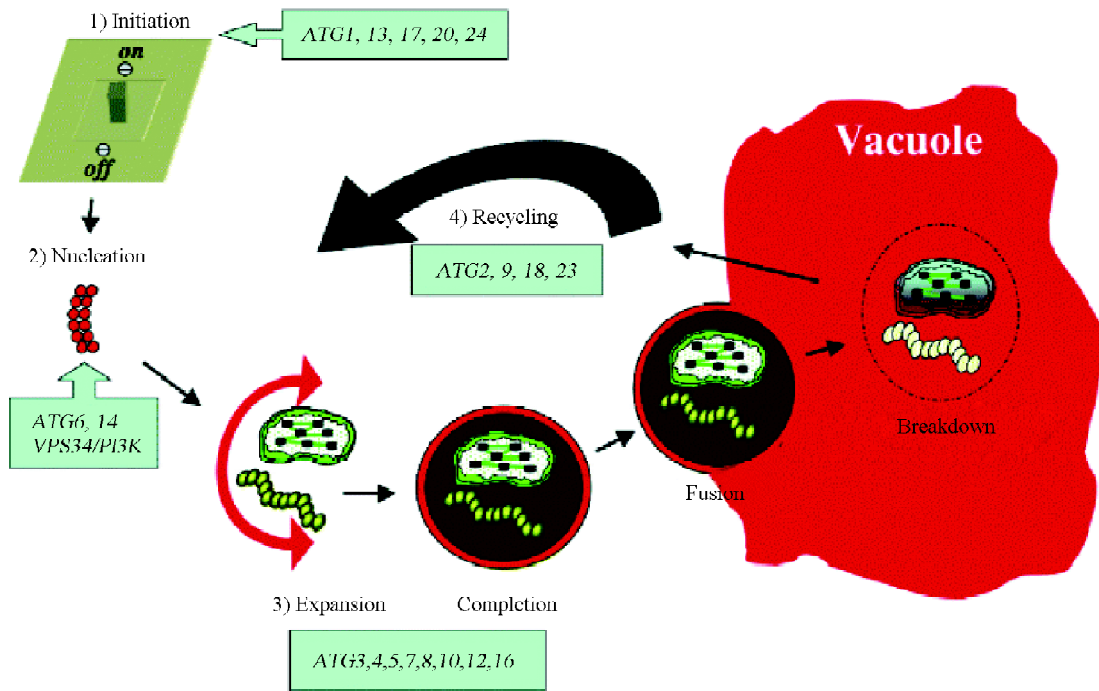


Fig.1 Schematics of steps involved in macroautophagy^[32]

母的研究。通过对芽殖酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中自噬突变体的大规模筛选,一批自噬相关基因(AuTophagy-related gene, 简称ATG基因)被分离出来^[18,19]。目前在酵母中已鉴定30余个ATG基因,这些基因的编码产物参与自噬小泡形成的各个过程,包括自噬的诱导、小泡的成核、延伸、成熟及与液泡的融合等(具体过程见Fig.1)。根据ATG蛋白参与的过程,可以将其分为几个功能组:PI3K复合体、与泛素结合相似的ATG8、ATG12蛋白复合体、ATG9复合体、ATG1复合体及SNARE复合体^[20-24]。对已有模式生物基因组序列的比较分析显示,动物和植物中均有发现酵母ATG基因的同源基因,暗示细胞自噬过程在真核生物中进化保守^[25-31]。

1.1 植物ATG基因

拟南芥中已发现30多个ATG基因(Table1)。与酵母的单拷贝基因不同(*TOR*除外,酵母*TOR*有两个拷贝),植物基因组中部分自噬基因存在多拷贝现象,如拟南芥中ATG8存在9个不同的拷贝,ATG18也8个拷贝。研究表明,AtATG8在拟南芥中所有器官中都有表达,根、花、角果中表达较高,并且在不同的发育阶段皆有表达,但不同的同源基因可能在不同的器官或发育阶段起作用^[3,33];除了与时空上的表达存在差异外,不同的AtATG8在应对黑暗胁迫和营养缺乏时的表达也不尽相同^[34]。对AtATG18的研究表

明,AtATG18不同拷贝的基因在植物器官中表达不同,其中AtATG18 a, b, c, d在所有器官中均有表达,AtATG18 f, g, h的表达局限在特定器官中,而AtATG18e在所有位置均无表达。在应对蔗糖、氮饥饿时,仅有AtATG18 a, f, g, h的表达受诱导升高,在黑暗处理时,仅有AtATG18a的表达升高^[35]。另外,植物中还保留了在高等动物进化过程中被摒弃的ATG13基因^[32],酵母中该基因编码的蛋白与ATG1的结合和分离对细胞自噬的起始过程非常关键,而在人类、果蝇、线虫中进化出了不依赖ATG13的自噬起始途径。植物ATG13同源基因是否保留了其在自噬过程中的作用将有待研究。

虽然多数植物ATG基因与酵母ATG基因序列有较高的相似度,但功能互补实验表明大部分植物ATG基因并不能互补其在相应酵母缺陷体中的表型。已报道的能够在酵母中实现功能互补的植物ATG基因只有AtATG4、AtATG6和AtATG8和NbATG6^[28,37,38]。尽管如此,近年来对植物自噬机制的研究证实了大部分ATG基因功能保守^[3,28,39]。

除了拟南芥、烟草外,水稻、玉米等作物中也相继报道了ATG基因的发现,并对其功能进行了研究。水稻(*Oryza sativa* L.)中OsATG8的C端能够在酵母中正常剪切,并且OsATG8与OsATG4互作^[40];OsATG10b突变后会导致水稻对高盐和甲基紫精

Table 1 Arabidopsis proteins potentially involved in autophagy^[36]

Protein complexes	Proteins	Gene accession numbers	Functions and characteristics in yeast
PI3K complex			Autophagosome formation
	ATG6	At3g61710	VPS30
	VPS15	At4g29380	Protein kinase
	VPS34	At1g60490	PI3K
Ubiquitin-like conjugation (ATG12)			Conjugation of ATG12 and ATG5
	ATG5	At5g17290	Target for ATG12 conjugation
	ATG7	At5g45900	E1 conjugating enzyme for ATG12 conjugation
	ATG10	At3g07525	E2 conjugating enzyme for ATG12 conjugation
	ATG12	At1g54210 (12a), At3g13970 (12b)	Ubiquitin-like modifier, ATG5 and ATG10 interaction
Ubiquitin-like conjugation (ATG8)			Conjugation of ATG8 to phosphatidylethanolamine
	ATG3	At5g61500	E2 conjugating enzyme for ATG8 conjugation
	ATG4	At2g44140 (4a), At3g59950 (4b)	Cysteine protease
	ATG7	At5g45900	E1 conjugating enzyme for ATG8 conjugation
	ATG8	At4g21980 (8a), At4g04620 (8b) At1g62040 (8c), At2g05630 (8d) At5g05150 (8e), At4g16520 (8f) At3g60640 (8g), At3g06420 (8h) At3g15580 (8i)	Ubiquitin-like modifier, ATG3 interaction
ATG9 complex			Membrane recruitment to autophagosome
	ATG9	At2g31260	Integral membrane protein
	ATG2	At3g19190	
	ATG18	At3g62770 (18a), At4g30510 (18b) At2g40810(18c), At3g56440(18d) At5g05150 (18e), At5g54730 (18f) At1g03380 (18g), At1g54710 (18h)	Function for ATG2 localization ATG9 recycling from PAS
ATG1 complex			Initiation of autophagy
	TOR	At1g50030	Protein kinase, negative regulator of autophagy
	ATG1	At1g49180 (1a), At2g37840 (1b) At3g53930 (1c), At3g61960 (1d)	Serine/threonine kinase
	ATG13	At3g18770 (13a), At3g49590 (13b)	Phosphoprotein
	ATG20	At5g06140	
SNARE			Fusion of autophagosome with the vacuole
	VTI12	At1g26670	

(methyl viologen, 简称 MV, 能够造成植物的光氧化胁迫)敏感和氧化蛋白的积累, 暗示 *OsATG10b* 在水稻的氧化胁迫中起作用^[41]。玉米 (*Zea mays* L.) 中 *ATG8* 有 5 个拷贝 (*ZmATG8 a-e*), *ATG8*- 磷脂酰乙醇胺复合体 (*ATG8-PE*) 的数量在缺氮或衰老叶片中升高, 表明 *ZmATG8* 功能复合体在营养循环利用中起作用^[42]。

1.2 植物的细胞自噬途径

近二十年来, 在高等植物和低等植物中均有发现细胞自噬途径基因的存在, 这表明自噬是一种普遍存在的、保守的生命过程。对拟南芥基因组的分析发现, 酵母中参与细胞自噬的关键功能基因在拟南芥中均存在^[3,16,27,28,33,37,39,43-45], 尤其是与泛素结合途径类似的 *ATG8*、*ATG12* 蛋白复合体的组成基因在拟南芥

中都有同源基因的存在, 暗示着植物中存在着与酵母类似的细胞自噬机制。

1.2.1 细胞自噬的诱导 在酵母中 *ATG1/ATG13* 复合体与 *TOR* (*Target Of Rapamycin*, 雷帕霉素靶标) 共同作用于自噬的诱导。当 *TOR* 感受到外界的饥饿信号时, 其对 *ATG13* 的磷酸化就会消失, 从而解除对 *ATG13* 的抑制, *ATG1/ATG13* 复合体形成, 细胞自噬得以诱导^[46]。拟南芥中也发现了 *TOR* 的存在, 但其突变后会导致胚胎致死, 并且 *AtTOR* 对雷帕霉素不响应, 从而一度阻碍了对其在细胞自噬调控方面的研究^[47]。然而最新的研究发现, 在 *AtTOR* 被下调表达的 *RNAi-AtTOR* 植株中, 自噬小体的数量增加, 一些自噬相关基因的表达在 *RNAi-AtTOR* 中被上调, 并且该

种细胞自噬的组成性激活依赖于 *AtATG18a*, 表明 *TOR* 在拟南芥中也能够负向调控细胞自噬的发生^[48]。拟南芥中存在着两个 *ATG13* 同源基因, 但均只有非常少的序列与酵母中 *ATG13* 基因相似, 因此不能确定是否是真的同源基因。 *ATG1* 在拟南芥中有三个, 尚没有对于它们互作蛋白及细胞定位的研究^[22]。

1.2.2 泡状结构的成核 酵母的研究表明成核过程需要 PI3K 复合体 I 的参与, 包含 PI3K/VPS34、VPS15、ATG6/VPS30 及 ATG14^[49-51]。拟南芥中却没有发现编码 ATG14 的同源基因, 有可能其他的蛋白在执行这个功能, 但尚不清楚^[22]。研究者在拟南芥和烟草中沉默 *ATG6/VPS3* 后, 植株在免疫反应中不能产生自噬小泡, 说明该基因确实与自噬相关^[13,52]。

1.2.3 自噬小泡的形成 该过程中, 两条类泛素化的蛋白结合途径对自噬小泡的形成是必须的: 一条是 ATG8-PE 结合途径, 另外一条则是 ATG12-ATG5 结合途径(Fig.2)。两条途径在许多生物中都有较深入的研究, 也是目前细胞自噬过程在植物中研究最清楚的部分。已知 ATG8 在与磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, 简称 PE)结合后方可进入自噬小泡的膜层。在 ATG8-PE 形成的过程中, 先是 ATG4 对 ATG8 的 C 端进行剪切, 露出甘氨酸残基, 接着在具有泛素活化酶 E1 活性的 ATG7 的作用下, ATG7 的半胱氨酸残基和 ATG8 的甘氨酸残基形成硫

酯键, 之后 ATG8 又被转移到具有泛素交联酶 E2 活性的 ATG3 上, 并最终与磷脂酰乙醇胺 PE 的头基结合^[53]。这种膜结合形式的 ATG8 对于小泡的增大很重要, 当其不存在时细胞内会形成很多小的自噬泡^[54]。 ATG12-ATG5 结合途径与 ATG8-PE 结合类似, ATG12 先与 ATG7 结合, 后经 ATG10(具有泛素交联酶 E2 活性)转移到靶标蛋白 ATG5 上, 形成 ATG12-ATG5 复合体^[25], 该复合体与 ATG16 结合后可形成四聚体。而关于该复合体的功能一直不是很清楚, 这两年的研究表明, 其可能作为一种 E3 类似连接酶促进 ATG8-PE 的结合^[45,55,56]。

拟南芥中对这两条类泛素化蛋白结合途径的研究已比较清楚, 结果表明这两蛋白结合途径与酵母中类似。拟南芥 *Atatg7-1* 突变体的表型能够被原有的 *AtATG7* 互补, 但却不能被突变了半胱氨酸的 *AtATG7C/S* 互补, 这表明 *AtATG7* 行使功能的机制确实类似泛素活化酶 E1^[27]。在拟南芥中, 将九个不同的 ATG8 蛋白(*AtATG8a-i*)与 ATG4a 在酵母双突变体 *atg4atg8* 中表达后提取蛋白均有检测到剪切后的 ATG8 蛋白的存在, 表明拟南芥的 ATG8 与酵母中一样, 均能在 ATG4 的作用下实现对其 C 端的剪切。对拟南芥 ATG8 中的甘氨酸进行替换后, 氮饥饿条件下无法在液泡中检测到 ATG8-GFP 的存在, 暗示着拟南芥 ATG8 中的甘氨酸残基对于该蛋白在自噬中的作

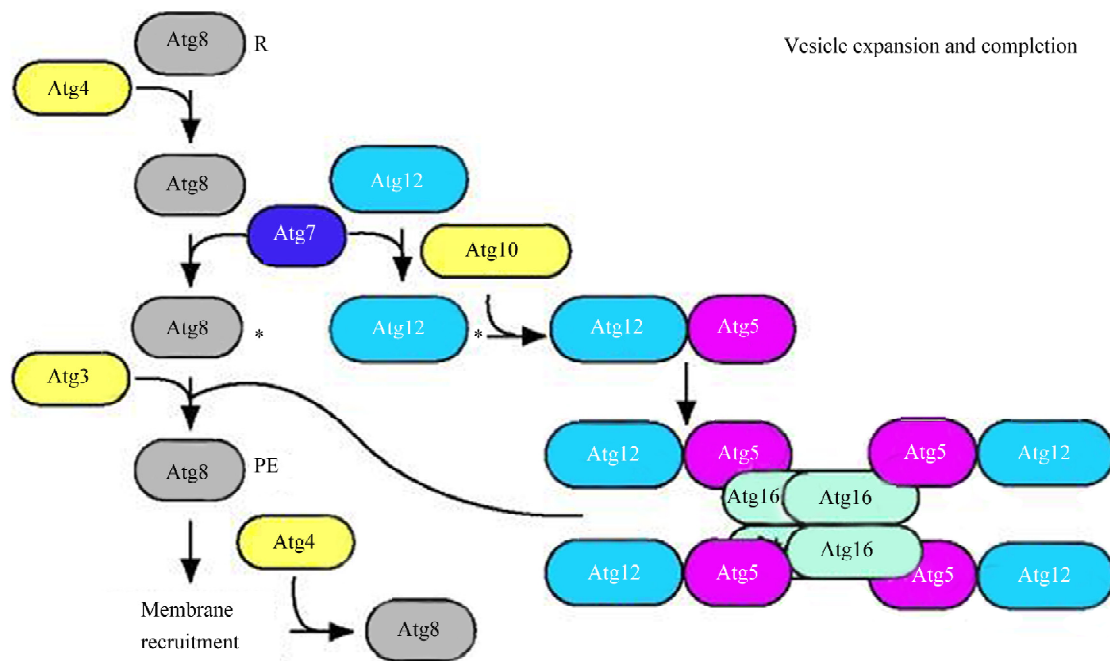


Fig.2 Vesicle expansion and completion^[57]

用是非常重要的, 这点也与酵母一致。另外在拟南芥双突变体 *Atatg4a4b-1* 中, 不能检测到结合 PE 形式的 ATG8, 说明 AtATG4 确实具有剪切活性^[3]。上述研究表明拟南芥中 ATG8-PE 结合途径与酵母相同。通过对拟南芥突变体 *Atatg5-1*、*Atatg7-1* 和 *Atatg10-1* 中 ATG12-ATG5 复合体的检测发现, 不管是靶标蛋白 AtATG5、E1 类似酶 AtATG7 或者 E2 类似酶 AtATG10 的缺失都不能形成 ATG12-ATG5 功能复合体, 从而使细胞自噬受阻^[44]。ATG12-ATG5 功能复合体形成受阻的突变体(如 *atg12a-latg12b-1*、*atg5-1*、*atg10-1*) 中 ATG8-PE 的形成也受阻, 说明 ATG12-ATG5 复合体 ATG8-PE 的形成是必需的^[45]。关于植物中 ATG16 是否也像酵母中一样参与到 ATG12-ATG5-ATG16 大复合体中, 现在不清楚。Fujioka 等利用拟南芥 ATG7、ATG3 体外成功的重建了 ATG8-PE 的形成, 在加入 ATG4a、ATG4b 后也能使复合体分离; 同时利用拟南芥 ATG7、ATG10 重建了 ATG12-ATG5 复合体的形成^[56]。该实验更加进一步的证实了植物中存在着与酵母相同或相似的蛋白结合机制。

除了以上两条蛋白结合途径作用于自噬小泡的形成外, ATG9 复合体也参与到自噬小泡的形成中, 其功能有可能是为自噬小泡提供膜来源。酵母中的研究表明, ATG9 是一个跨膜蛋白, 与 ATG2 和 ATG18 结合能够将其从 PAS 上释放出来, 从而得以循环, 有人推测 ATG9 能够为自噬小泡的形成提供膜来源^[58]。拟南芥中 *Atatg9-1* 有 *atg* 突变体普遍存在的表型如早衰等^[28], 突变体 *Atatg2-1* 和 *AtATG18a RNAi* 植株均不能形成自噬小泡^[35,43], 这些研究表明 ATG9 复合体在植物细胞自噬中起作用, 但具体的分子机制尚不清楚。

1.2.4 自噬小泡与液泡的融合 成熟的自噬小泡最终会与液泡融合, 释放自噬小体到液泡中。酵母中的研究表明该过程需要 SNARE (soluble n-ethylmaleimide-sensitive factor adaptor protein receptor) 复合体的参与, 包括 v-SNARE (vesicle-SNARE) 蛋白 VTI1、VAM3 syntaxin (VAM3 编码的突触融合蛋白) 和 YKT7 (Rab 家族的一种小 GTP 结合蛋白)^[21]。酵母 *VTI1* 在植物中有 *VTI11*、*VTI12*、*VTI13* 三个同源基因, *vti12* 突变体表现出典型的自噬缺陷突变体表型, 如对营养缺陷敏感、早衰等, 暗示 VTI12 涉及细胞自噬^[39]。最近的研究发现, 酵母 YKT7 在拟南芥中的同源基因 RabG3b 参与植物管状分子形成过程中的细胞自噬, 其 RNA 干扰株系 *RabG3bRNAi* 表现细胞自噬缺陷^[59]。

1.3 植物细胞自噬机制并非与酵母完全一致

植物作为多细胞的高等生物, 其生命活动远远复

杂于单细胞的真核生物酵母。即便科学家们以酵母的研究为导向, 在动植物中均发现了细胞自噬的存在, 并且其生物过程和功能有很多保守的地方, 但不能否认植物与酵母的细胞自噬的存在着差异。这可以从一些现有的研究结果中得到暗示。

(1) 本世纪初, 通过序列比对的方法, 在拟南芥中的 ATG 同源基因相继被鉴定出来^[27,28]。与酵母已知的 ATG 基因相比, 虽然大部分的同源基因都已在植物中找到, 但还是有几个 ATG 基因并未在拟南芥中找到, 如 *ATG11*、*ATG14*、*ATG17*、*ATG19*、*ATG29* 和 *ATG31*。在酵母中, ATG11 和 ATG19 被证明是在 CVT 途径中负责货物的筛选, 而在植物中尚未发现 CVT 途径的存在, 因此没有其同源基因并不奇怪。ATG14 是 PI3K 复合体 I 的组分, 参与到自噬小泡的成核过程, 在植物中却没有发现其同源基因, 其功能有可能已被其他的基因取代。最近的研究表明, 酵母中 ATG17-ATG29-ATG31 以复合体的形式作用于 PAS 的形成中^[60], 而在植物中尚没有存在 PAS 结构的明确证据。

(2) 在植物中保留下来并已被鉴定的 ATG 基因中, 有一些存在多个同源基因的情况, 除了上文中提到的 *ATG8* 和 *ATG18* 以外, *ATG1*、*ATG4*、*ATG12*、*ATG13* 也存在多个基因位点, 其中 *ATG1* 有 4 个而另外三个基因也存在 2 个基因位点。植物中为何存在多基因位点现象, 至今仍不清楚。对有些基因来说, 多位点在特定的情形下有可能是功能的冗余, 如 *AtATG4a* 和 *AtATG4b* 在敲掉其中的任何一个后, 都不会阻滞它对 ATG8 的正常的剪切^[3]; *AtATG12a*、*AtATG12b* 在其中一个被敲除后, 都还能形成正常的 ATG12-ATG5 复合体, 并且也不会出现典型的 *atg* 突变体的表型(如早衰、对碳源、氮源缺乏的敏感等)^[45]。但对 *ATG8*、*ATG18* 及 *ATG12* 的研究发现, 这些基因的不同拷贝在植物中的时空表达存在差异^[3,35,5], 暗示这些同源基因有可能在不同的植物组织, 不同的发育阶段及遭遇不同的环境胁迫时起着不同的作用。由此推测, 与酵母自噬基因的单拷贝不同, 植物细胞自噬在不同的情况下有可能采用不同的基因来执行功能。

(3) 细胞自噬一般维持在一个非常低的水平上, 但当细胞遭遇不良环境时会被大量的诱导, 这在酵母、动物、植物中已被证实。但对拟南芥根尖细胞的研究表明细胞自噬在根尖细胞中组成性表达^[43,61]。突变体 *atatg9-2* 中细胞自噬并未被完全阻滞, 与野生型相比仅有一定程度的降低, 这表示 *ATG9* 对自噬小泡

的形成并非是必须的(至少在根尖细胞中是这样)。而对酵母 *atg9* 突变体的研究却表明, *ATG9* 突变后自噬小泡就不能正常形成^[43]。由此说明 *ATG9* 参与细胞自噬的机制在酵母和植物中有所差异。

(4) 酵母中的研究表明, 自噬小泡的外膜与液泡膜融合后, 带有内膜的小泡进入到液泡当中, 我们称该种结构为自噬小体(*autophagic body*)。植物中自噬小泡除了能与液泡融合外, 还能与另外一种类似溶酶体的小型酸性细胞器融合形成自噬溶酶体(*autolysosome*, 与动物中类似)。这种结构最初在经蔗糖饥饿处理的烟草细胞中发现^[12], 之后在E64D(一种半胱氨酸蛋白酶抑制剂)处理后的大麦和拟南芥的根尖细胞中, 也发现自噬溶酶体的存在^[43,62]。因此在植物中有可能存在着两种不同的自噬融合途径, 可能因物种、细胞类型、或者细胞的处境的不同而决定哪种融合途径起主要作用, 而这与酵母中的融合途径存在差异^[23]。

随着对植物细胞自噬更加深入的研究, 其发生机制中的许多疑问都会慢慢解开。在了解其功能、机制保守的同时, 越来越多的差异也会慢慢的被认识, 这将有利于我们更好的解读植物生命活动的奥秘。

2 植物细胞自噬的生理功能

细胞自噬是细胞内物质的一种降解途径, 降解后的分子能在细胞的生命活动中被循环利用, 因而, 细胞自噬也是一种物质循环利用途径。酵母、动物、植物中的研究都发现营养缺陷条件下的细胞能够激活自噬, 降解细胞内物质以维持细胞稳态。对于单细胞的酵母来说, 这可谓是细胞自噬主要的功能。但在动植物中的研究表明, 除了帮助细胞应对营养缺乏以外, 细胞自噬也参与到其他很多重要的生命过程中。例如, 在动物中细胞自噬涉及免疫反应、肿瘤形成、神经退行性疾病、程序化细胞死亡及衰老过程等。植物中对细胞自噬的认识曾经长时间停留在形态学的观察上。近十年来, 随着酵母 *ATG* 同源基因在植物中的发现及反向遗传学的应用, 细胞自噬在植物中的生理功能开始被认识。研究表明, 细胞自噬在植物中也扮演着多功能的角色, 参与到生长发育、衰老及对生物、非生物胁迫的应答等过程中。

2.1 营养物质循环利用

与酵母一样, 植物细胞在营养(如碳源、氮源、蔗糖)缺乏条件下也能激活细胞自噬。水稻(*Oryza sativa*)细胞在缺乏蔗糖的情况下, 能将细胞内的物质如淀粉体

运入液泡中降解^[10]。洋桐槭(*Acer pseudoplatanus*)悬浮培养细胞在经蔗糖缺乏诱导后, 细胞质中出现了双层膜结构的自噬小泡并最终进入液泡^[11]。同样的饥饿处理下, 烟草(*Nicotiana tabacum*)悬浮细胞中也出现了自噬溶酶体结构^[12]。另外一组研究人员在蔗糖饥饿处理的拟南芥细胞中发现了自噬小泡, 并根据自噬小泡所处的降解阶段对其进行了分类, 将这些不同阶段联系起来恰好反映了整个细胞自噬的过程: 双层膜泡形成, 与液泡融合及进入液泡中最终被降解。另外对 *ATG8-PE* 形成途径中相关 *ATG* 基因的 RT-PCR 结果显示, *ATG8-PE* 途径相关基因的表达量在经饥饿处理后会上升以此应对饥饿条件^[63]。对自噬基因突变体的表型分析更加确认了细胞自噬在营养循环利用中的作用。目前已知的拟南芥 *ATG* 基因中, 已有的突变体或表达下调的 RNAi 植株包括: *apg9-1* 或 *atatg9-2*、*apg7-1*、*atg4a4b-1*、*atg5-1* 或 *atg5-3*、*atatg2*、*atg10-1*、*AtATG6/atatg6* 或 *AtATG6-AS*、*AtATG18a* RNAi、*atg12a-latg12b-1*, 涉及九个 *ATG* 基因^[3,27,28,33,35,37,43-45,52,64,65]。对这些突变体表型(相关突变体研究中没有提及 *atatg9-2*、*atg5-3* 的发育表型)的分析显示, 它们都有着相似的表型, 如在碳源、氮源缺乏情况下叶片黄化、衰老加快, 开花结实减少等, 即便恢复其正常的生长条件, 表型也很难恢复到野生型的状况。这些结果表明, 细胞自噬在营养缺乏的情况下对植物生存是必需的, 它通过降解体内物质补充给饥饿的细胞, 使营养循环利用, 细胞维持稳态, 从而帮助植物度过饥饿难关。

2.2 植物生长发育

大多数拟南芥 *atg* 突变体除有早衰现象外在整个植物生长期中没有明显的发育异常^[3,27,28,33,35,37,44,45,52,64,65], 但多伴随开花数减少及结实减少等。拟南芥 *ATG6* 基因突变后有严重的发育异常表型, 如生长缓慢、植株矮小、早衰、开花结实减少等, 另外花粉的萌发也受影响, 因此导致该基因的纯合突变体无法得到^[37,52,64,65]。但由于在其它 *atg* 突变体没有花粉萌发缺陷, 加之其所在的 *PI3K* 复合体被证明在液泡的运输中起作用, *PI3K* 突变也导致花粉不能萌发, 因此拟南芥 *ATG6* 缺陷植物的花粉萌发异常可能与细胞自噬功能的缺陷无关。

小麦中的研究表明细胞自噬在小花发育过程中起作用^[66]。小麦中的部分小花在发育过程中会败育, 研究者在败育小花的子房组织切片中观察到了不同降解阶段的自噬小泡和典型的细胞死亡表征如染色

质固缩、细胞核消失,同时检测到了 *ATG4*、*ATG8* 基因及死亡相关基因的高表达,由此他们推测细胞自噬有可能参与到败育小花的程序化细胞死亡中。但需要谨慎的是:小花败育的程序化细胞死亡过程中激活了细胞自噬,但这种自噬的存在可能是促进死亡但也有可能是抑制死亡,最终的结果与表面的现象间并无明确的因果关系。研究者对大牵牛花(Japanese Morning Glory)花瓣衰老的研究表明细胞自噬可能在衰老的过程中起调控作用^[67-69]。Yamada 等在衰老阶段的花瓣中检测到 *ATG4*、*ATG8*、*VPS34* 表达会上升,而加入 *VPS34* 抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 简称 3-MA)后,衰老进程会加快,暗示细胞自噬的存在一定程度上延缓了花瓣衰老的进程^[67]。之后的研究中发现细胞自噬会受 *PSR26* 的调控,该基因沉默后会使得花瓣衰老加快,自噬小泡形成减少,而在野生型中,自噬小泡的数量较多,衰老也较慢^[68]。综合这些实验结果表明细胞自噬会在花瓣衰老过程中被激活并能延缓衰老进程。

细胞自噬可能与根的发育有关。在 *atg* 突变体中, *atg4a4b-1* 的侧根发育在氮源缺乏条件下受抑制,主根的伸长也会变慢^[3],而在 *apg7-1* 突变体、*AtATG6/atatg6* 中根的生长也会变慢^[27,64],由此可知细胞自噬可能在根的发育中起作用。之后的研究中发现细胞自噬在拟南芥根中组成型表达^[43],而且伸长区(the elongation zone)和分化区(the differentiation zone)中自噬小体的数量要远远高于根尖分生组织中^[61],因此细胞自噬可能与根尖细胞生长及分化如根毛细胞的形成有关。

细胞自噬与木质部管状分子的形成有关。在 *atg5-1* 及 *RabG3bRNAi* 植株中,细胞自噬功能缺陷导致管状分子的形成受阻,另外,在正常的管状分子分化过程中 *ATG6*、*ATG8g*、*ATG18h* 和 *VPS34* 表达上调,由此说明细胞自噬涉及木质部管状分子的形成^[59]。

除此之外,在种子萌发过程中也发现细胞自噬参与。研究者在萌发的黑吉豆(*Vigna mungo*)子叶组织切片中观察到微自噬及巨自噬两种形式的自噬,前者作用于淀粉粒(starch granule)的降解,后者则作用于胞质及线粒体的降解^[70]。

2.3 植物免疫

植物为抵抗外来病原的侵染,在进化过程中形成了两道免疫防线。第一道防线是基础防线,主要通过病原体相关分子模式MAMPs(Microbe Associated Molecular Patterns, 如真菌的几丁质及细菌的鞭毛蛋

白等)的识别启动抗性反应,如细胞壁加厚、具有杀菌作用的物质的合成等^[71]。另外一道防线是基于植物体内R基因对病原无毒因子Avr的特异性识别引发的信号传导和抗性反应,该种抗性反应中最主要、最明显的表征是在病原侵染点诱导超敏反应HR PCD (Hypersensitive Response Programmed Cell Death, 一种程序性细胞死亡),通过杀死侵染部位的细胞将病原菌限制在入侵部位,阻止病原向植物未受侵染部位扩散^[72]。

细胞自噬参与植物免疫应答的证据最先源于刘玉乐等的研究^[13]。Liu 等通过对 *NV* 烟草 -TMV 系统的HR PCD的研究发现,正常烟草植株中的抗病反应可以激活细胞自噬活性,且这种细胞自噬依赖于 *Beclin 1(ATG6/VPS30/beclin 1* 在烟草中的同源基因)的功能。在自噬相关基因 *Beclin 1* 沉默的烟草细胞中几乎不能产生自噬小泡,HR也不能有效的被限制在 TMV 侵染部位,而是扩散到未受侵染的细胞及叶片(Fig. 3),而在死亡扩散的上部叶片中检测不到病毒的存在,说明这种细胞死亡扩散表型不是由于病毒的扩散导致的。对其它 *ATG* 基因 *PI3K/VPS34*、*ATG3*、*ATG7* 进行 RNAi 沉默也得到了类似的结果。进一步的研究表明细胞自噬不仅在 R 基因介导的抗病毒反应中限制病原诱导的细胞死亡,而且在R基因介导的抗细菌、真菌反应以及在非寄主抗性中也能限制病原诱导的细胞死亡,即:细胞自噬在植物抗病反应中负向调控病原诱导的细胞死亡^[13]。这一结果在拟南芥中也被证实^[52], *ATG6* 沉默的拟南芥 *AtATG6-AS* 植株以及 *atg2* 和 *atg5* 突变体中也出现了HR 不受控制的现象。另外,由致病性丁香假单胞菌 DC3000 侵染产生的细胞死亡在 *ATG6* 沉默的植物上也不受控制,说明细胞自噬在病害死亡(disease-associated cell death)中也有调控作用^[52]。

细胞自噬参与植物免疫应答是该领域研究的一项重大发现,但对于细胞自噬负调控HR PCD的机制尚不清楚。Yoshimoto 等的研究加深了对细胞自噬调控 HR PCD 机制的了解。他们发现自噬突变体 *atg5* 中水杨酸SA的积累要远远超出野生型植株中的正常含量;通过构建细胞自噬和 SA 生成或信号传导的双突变体(*atg5 sid2*、*atg5npr1*、*atg2sid2*、*atg2npr1*),他们发现这些双突变体均不会出现细胞死亡扩散的表型,说明 SA 在细胞自噬调控的细胞死亡中起作用,并且这种表型依赖于 SA 信号传导蛋白 NPR1 传导途径。对 *atg5*、*atg2*、*atg5*、*sid2*、

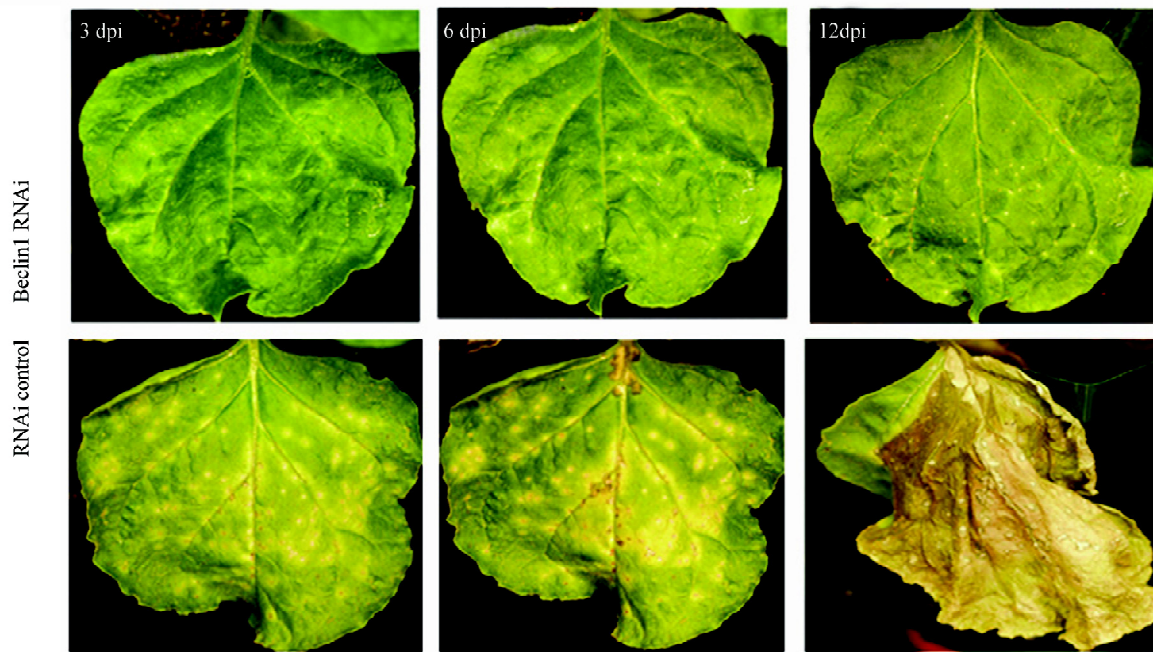


Fig.3 Beclin 1 is required to limit the spread of HR-PCD induced by TMV^[13,32]

atg5npr1、*atg2sid2*、*atg2npr1*、野生型等植株叶片中的活性氧(Reactive oxidative species, 简称 ROS)水平进行测量发现,胞内ROS的产生与SA信号相关,并且细胞自噬能够负调控胞内的ROS水平。根据上述结果,作者提出了一种自然衰老或免疫反应HR-PCD调控机制的模型,即SA可以通过诱导胞内ROS水平的升高和依赖于NPR1的信号传递介导细胞的死亡,细胞自噬则能够通过负向调控ROS和SA水平来控制细胞死亡的区域,使其限制在受侵染部位,不发生过度的、不受控制的死亡现象。另外,含有无毒因子的丁香假单胞菌DC3000(*Pst-avrRpm1*)侵染拟南芥突变体*atg5*后,死亡扩散表型在较老的叶片中(7~8周生长期)明显而在生长期较短(3~4周)或较幼小的叶片中不明显,说明该种死亡的扩散与植物或叶片的年龄有关,这个发现使得Hofius等看似相悖的实验结果^[73]得以解释。Hofius等在实验中采用的植物生长期在3~4周左右,而此时*Atatg*体内的SA水平尚没有大幅度的升高,也就无法观察到细胞死亡的扩散^[2,74]。

另外,对丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)或者烟蚜(*Myzus persicae*)侵染后的植物做芯片分析显示,有些*AtATG*基因在该侵染过程中表达上调,也有很多*AtATG*基因在PCD中的表达上调^[32,75],暗示着细胞自噬可能在植物免疫反应中起作用。拟南芥中

RNAi和突变体的研究显示细胞自噬也参与植物对细菌的基础抗性^[2,74]。

2.4 植物的衰老

植物衰老的过程实际上是一次营养再分配的过程,植物体衰老部位的物质降解后会重新分配到新生组织或果实、种子中循环利用。近些年来的研究表明细胞自噬参与到植物衰老过程中。

拟南芥已有的*atg*突变体在营养缺陷或离体黑暗处理下均呈现叶片黄化、蛋白总量下降、衰老相关基因启动等的早衰现象,即便在正常的营养条件下也有早衰的发生^[3,27,28,33,35,44,45,52],暗示着细胞自噬可能在植物自然衰老过程中起着一定的作用。对拟南芥、小麦衰老叶片的转录组进行分析的结果显示,在衰老相关基因*SAGs*(Senescence Associated Genes)中均有发现自噬相关基因的存在,这也说明细胞自噬参与叶片的衰老过程^[76,77]。

植物衰老最典型的外部特征就是叶片的衰老黄化,这是由于叶绿素含量下降、叶绿体发生降解的缘故。越来越多的研究表明叶片衰老过程中的叶绿体降解机制涉及细胞自噬。早在1982年,Wittenbach等^[78]研究黑暗诱导的小麦衰老叶片时发现,随着叶绿素含量的下降、Rubisco(Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase,核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶)蛋白活性的降低,叶绿体的数量

也会减少,并且在液泡中发现了被吞噬的叶绿体,由此说明叶绿体的降解是一个有序的过程。之后在各种形式的衰老中均观察到了叶绿体数量变少的现象^[79-82],由此推测衰老的植物细胞内存在着一种可以整体降解叶绿体的机制。对 Rubisco 蛋白降解的研究发现,该蛋白的降解速度要远远快于叶绿体数量减少的速度^[79,80];免疫电镜的观察结果显示在自然衰老的小麦叶片中存在着一种包含 Rubisco 蛋白的圆形结构 RCBs (Rubisco-Containing Bodies),该结构直径约 0.4~1.2 μm ,具双层膜,在胞质中的 RCBs 外围还被其他膜结构包裹^[83],综合这些研究结果,暗示着细胞内存在着一种在叶绿体完整的情况下对 Rubisco 蛋白进行降解的机制。细胞自噬作为细胞内一种重要的蛋白降解机制很有可能参与到了叶绿体和叶绿体蛋白降解过程中从而实现了对营养物质的循环利用。

Ishida等近两年的研究表明细胞自噬确实参与到了叶片衰老中 Rubisco 蛋白和叶绿体的降解过程。通过对离体叶片进行黑暗处理并加入 concanamycin A (一种液泡膜 H^+ -ATP 酶的抑制剂,能够通过升高液泡内 pH 值阻断自噬小体的降解),研究者在液泡中观察到了叶绿体基质蛋白的积累,免疫电镜的结果证明该种在液泡腔中积累的基质蛋白结构即为 RCBs,并且 RCBs 能够与 ATG8 标记的自噬小体重叠,而在自噬功能缺陷突变体 *atg5-1* 的液泡中没有观察到 RCBs 的积累,由此说明 Rubisco 蛋白能够通过依赖于 ATG 基因的细胞自噬途径将其运入液泡中进行降解^[41]。另外,研究者通过对植物非离体叶片进行个别黑暗处理 (Individually Darkened Leaves,简称 IDLs) 实现了对野生型和自噬功能缺陷突变体 *atg4a4b-1* 衰老的诱导,两种植株的衰老速度经检测无明显差异,但在相同的衰老速度背景下,叶绿体的大小和数量的改变存在着很大的差异。在野生型植株叶片中,随着衰老的诱导,叶绿体的体积变小,叶绿体的数量在衰老后期急剧下降,在 concanamycin A 处理后的叶片液泡中能够检测 RCBs 和叶绿体的积累,而在突变体中均没有观察到上述现象,从而证明细胞自噬能作用于叶绿体的整体降解^[15]。综上研究结果,说明在衰老的叶片细胞中,至少是在 IDLs 中,存在着两种依赖于细胞自噬降解叶绿体的途径:一种是通过 RCBs 的降解对叶绿体内的蛋白进行逐步降解;另外一种是通过自噬小泡直接包裹叶绿体进行降解^[84]。

需要注意的是,尽管细胞自噬参与衰老叶片中叶绿体的降解,但并不是唯一的降解途径。拟南芥自

噬突变体的叶绿体及叶绿体相关蛋白的降解并没有被阻断^[15,22],说明除细胞自噬外还存在着其他的蛋白降解途径参与衰老过程中叶绿体的降解。另外,细胞自噬参与植物衰老也有可能是通过参与衰老不同过程来实现的,如衰老的诱导、调控等,因此更细致的研究还有待进行。

2.5 氧化胁迫

活性氧(Reactive oxidative species,简称 ROS)对细胞有毒害作用,能够氧化细胞内的蛋白、脂类、碳水化合物及 DNA 等从而导致细胞的死亡^[85]。细胞内主要通过两条大分子降解途径对氧化的蛋白等进行清除:一条是泛素化途径,另一条则是细胞自噬途径。细胞自噬清除细胞内氧化蛋白的这一功能在植物中已经被证实^[16,86]。通过对拟南芥根尖外源添加 H_2O_2 或 MV(甲基紫精,能够产生活性氧),研究者在根中发现了自噬小泡的存在,说明氧化胁迫能够诱导细胞自噬,而在 *AtATG18a* RNAi 植株中,自噬的产生会大大降低,氧化蛋白的积累高出野生型植株,对氧化蛋白降解的速度也降低,并且在液泡中检测不到氧化蛋白的存在(在野生型中能检测到),由此可知细胞自噬能够在氧化胁迫时激活并且作用于胞内氧化蛋白的降解^[16]。即使在不加 H_2O_2 或 MV 诱导的情况下,*AtATG18a* RNAi 植株中检测到的氧化蛋白的量也要多于野生型,体内 ROS 水平高于正常,这暗示着细胞自噬在正常的情况下也作用于氧化蛋白的降解,主要负责细胞内自身产生的 ROS 胁迫^[86]。除拟南芥外,水稻中的研究也证实了细胞自噬在氧化胁迫中的作用^[41]。另外,拟南芥 *atg2*、*atg5* 突变体 DAB 染色的结果表明自噬功能缺陷导致细胞体内 ROS 水平上升,进一步证实细胞自噬能负向调控体内 ROS 的产生^[74]。

2.6 高盐及干旱胁迫

高盐及干旱胁迫是植物生长过程中最常遭遇的两种环境胁迫。与高盐造成的离子胁迫不同,干旱会导致植物的渗透胁迫^[87],但两种胁迫都能够对细胞造成氧化损伤,造成 ROS 和氧化蛋白的积累^[88]。根据上述细胞自噬有清除氧化蛋白、调控 ROS 水平的作用来推测,细胞自噬很可能与高盐及干旱的胁迫应答有关。之前的研究中,已有报道某些 ATG 基因,如拟南芥的 *AtATG8* 及水稻的 *OsATG10b* 参与到对盐胁迫或渗透胁迫的反应中^[41,89]。更加直接、充分的证据则是来自 Bassham DC 课题组的研究。承接课题组自噬在氧化胁迫中的研究,他们发现高盐及渗透胁迫也能够激活细胞自噬,*AtATG18a* 的表达也会被诱

导上升,自噬功能缺陷的 *AtATG18a* RNAi 植株对这两种胁迫敏感。考虑到 ROS 有可能在高盐和渗透胁迫中诱导细胞自噬,他们通过施加 NADPH 氧化酶抑制剂来阻断体内 ROS 的产生,结果确实阻断了高盐胁迫中细胞自噬的激活,而对于渗透胁迫则无相关作用,由此看来植物体内存在着依赖和不依赖于 NADPH 氧化酶两条途径调控细胞自噬的产生^[17]。

结语

细胞自噬作为细胞内的一种重要的蛋白降解机制,对于植物适应外界环境胁迫,维持体内稳态都非常重要。已知的细胞自噬在植物中的作用:如应对外界的非生物胁迫和生物胁迫及对植物体生长发育、衰老的影响等都直接关系着植物体的生长质量和产量,因此对作物的大田生产非常关键。目前对植物细胞自噬分子机制的研究已有较大的进展,但尚有诸多问题没有解答,有待进一步研究。随着对其分子机制了解的加深,必将能使细胞自噬更好的服务和指导我们的农业生产。

参考文献(References)

- Vierstra RD. Proteolysis in plants: mechanisms and functions. *Plant Mol Biol* 1996; 32 (1-2): 275-302.
- Yoshimoto K, Takano Y, Sakai Y. Autophagy in plants and phytopathogens. *FEBS Lett* 2010; 584 (7): 1350-8.
- 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.
- Smalle J, Vierstra RD. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol* 2004; 55: 555-90.
- Klionsky DJ, Ohsumi Y. Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15: 1-32.
- Takehige 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.
- Matile P. The lytic compartment of plant cells. In *Cell Biology Monographs* 1975; 1: 1-175.
- Van der Wilden W, Herman EM, Chrispeels MJ. Protein bodies of mung bean cotyledons as autophagic organelles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77 (1): 428-32.
- Herman EM, Baumgartner B, Chrispeels MJ. Uptake and apparent digestion of cytoplasmic organelles by protein bodies (protein storage vacuoles) in mung bean cotyledons. *Eur J Cell Biol* 1981; 24 (2): 226-35.
- Chen MH, Liu LF, Chen YR, Wu HK, Yu SM. Expression of alpha-amylases, carbohydrate metabolism, and autophagy in cultured rice cells is coordinately regulated by sugar nutrient. *Plant J* 1994; 6 (5): 625-36.
- Aubert S, Gout E, Bigny R, Marty-Mazars D, Barrieu F, Alabouvette J, *et al.* Ultrastructural and biochemical characterization of autophagy in higher plant cells subjected to carbon deprivation: control by the supply of mitochondria with respiratory substrates. *J Cell Biol* 1996; 133 (6): 1251-63.
- Moriyasu Y, Ohsumi Y. Autophagy in Tobacco Suspension-Cultured Cells in Response to Sucrose Starvation. *Plant Physiol* 1996; 111 (4): 1233-41.
- Liu Y, Schiff M, Czymmek K, Tallozy Z, Levine B, Dinesh-Kumar SP. Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell* 2005; 121 (4): 567-77.
- 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.
- 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.
- 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.
- Liu Y, Xiong Y, Bassham DC. Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. *Autophagy* 2009; 5 (7): 954-63.
- Tsukada M, Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 1993; 333 (1-2): 169-74.
- Thumm M, Egner R, Koch B, Schlumpberger M, Straub M, Veenhuis M, *et al.* Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 1994; 349 (2): 275-80.
- Kwon SI, Park OK. Autophagy in Plants. *Journal of Plant Biology* 2008; 51 (5): 313-20.
- Thompson AR, Vierstra RD. Autophagic recycling: lessons from yeast help define the process in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2005; 8 (2): 165-73.
- 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. Plant autophagy-more than a starvation response. *Curr Opin Plant Biol* 2007; 10 (6): 587-93.
- Bassham DC. Function and regulation of macroautophagy in plants. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793 (9): 1397-403.
- Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, Tanaka Y, Ishii T, George MD, *et al.* A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* 1998; 395 (6700): 395-8.
- Thumm M, Kadowaki T. The loss of *Drosophila* APG4/AUT2 function modifies the phenotypes of cut and Notch signaling pathway mutants. *Mol Genet Genomics* 2001; 266 (4): 657-63.
- 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.
- 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.
- 29 Juhasz G, Csikos G, Sinka R, Erdelyi M, Sass M. The *Drosophila* homolog of Atg1 is essential for autophagy and development. *FEBS Lett* 2003; 543 (1-3): 154-8.
- 30 Melendez A, Talloczy Z, Seaman M, Eskelinen EL, Hall DH, Levine B. Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science* 2003; 301 (5638): 1387-91.
- 31 Otto GP, Wu MY, Kazgan N, Anderson OR, Kessin RH. Macroautophagy is required for multicellular development of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem* 2003; 278 (20): 17636-45.
- 32 Seay M, Patel S, Dinesh-Kumar SP. Autophagy and plant innate immunity. *Cell Microbiol* 2006; 8 (6): 899-906.
- 33 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.
- 34 Slavikova S, Shy G, Yao Y, Glozman R, Levanony H, Pietrokovski S, *et al.* The autophagy-associated Atg8 gene family operates both under favourable growth conditions and under starvation stresses in Arabidopsis plants. *J Exp Bot* 2005; 56 (421): 2839-49.
- 35 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.
- 36 Kwon SI, Park OK. Autophagy in Plants. *Journal of Plant Biology* 2008; 51 (5): 313-20.
- 37 Fujiki Y, Yoshimoto K, Ohsumi Y. An Arabidopsis homolog of yeast ATG6/VPS30 is essential for pollen germination. *Plant Physiol* 2007; 143 (3): 1132-9.
- 38 Ketelaar T, Voss C, Dimmock SA, Thumm M, Hussey PJ. Arabidopsis homologues of the autophagy protein Atg8 are a novel family of microtubule binding proteins. *FEBS Lett* 2004; 567 (2-3): 302-6.
- 39 Surpin M, Zheng H, Morita MT, Saito C, Avila E, Blakeslee JJ, *et al.* The VTI family of SNARE proteins is necessary for plant viability and mediates different protein transport pathways. *Plant Cell* 2003; 15 (12): 2885-99.
- 40 Su W, Ma H, Liu C, Wu J, Yang J. Identification and characterization of two rice autophagy associated genes, OsAtg8 and OsAtg4. *Mol Biol Rep* 2006; 33 (4): 273-8.
- 41 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 Cells* 2009; 27 (1): 67-74.
- 42 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.
- 43 Inoue Y, Suzuki T, Hattori M, Yoshimoto K, Ohsumi Y, Moriyasu Y. AtATG genes, homologs of yeast autophagy genes, are involved in constitutive autophagy in Arabidopsis root tip cells. *Plant Cell Physiol* 2006; 47 (12): 1641-52.
- 44 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.
- 45 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.
- 46 Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol* 2000; 150 (6): 1507-13.
- 47 Menand B, Desnos T, Nussaume L, Berger F, Bouchez D, Meyer C, *et al.* Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99 (9): 6422-7.
- 48 Liu Y, Bassham DC. TOR is a negative regulator of autophagy in Arabidopsis thaliana. *PLoS One* 2010; 5 (7): e11883.
- 49 Kametaka S, Okano T, Ohsumi M, Ohsumi Y. Apg14p and Apg6/Vps30p form a protein complex essential for autophagy in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1998; 273 (35): 22284-91.
- 50 Kihara A, Kabeya Y, Ohsumi Y, Yoshimori T. Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep* 2001; 2 (4): 330-5.
- 51 Kihara A, Noda T, Ishihara N, Ohsumi Y. Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 2001; 152 (3): 519-30.
- 52 Patel S, Dinesh-Kumar SP. Arabidopsis ATG6 is required to limit the pathogen-associated cell death response. *Autophagy* 2008; 4 (1): 20-7.
- 53 Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, *et al.* A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 2000; 408 (6811): 488-92.
- 54 Abeliovich H, Dunn WA, Jr., Kim J, Klionsky DJ. Dissection of autophagosome biogenesis into distinct nucleation and expansion steps. *J Cell Biol* 2000; 151 (5): 1025-34.
- 55 Hanada T, Noda NN, Satomi Y, Ichimura Y, Fujioka Y, Takao T, *et al.* The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J Biol Chem* 2007; 282 (52): 37298-302.
- 56 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.
- 57 Klionsky DJ. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci* 2005; 118 (Pt 1): 7-18.
- 58 Nair U, Klionsky DJ. Molecular mechanisms and regulation of specific and nonspecific autophagy pathways in yeast. *J Biol Chem* 2005; 280 (51): 41785-8.
- 59 Kwon SI, Cho HJ, Jung JH, Yoshimoto K, Shirasu K, Park OK. The Rab GTPase RabG3b functions in autophagy and contributes to tracheary element differentiation in Arabidopsis. *Plant J* 2010.
- 60 Kabeya Y, Noda NN, Fujioka Y, Suzuki K, Inagaki F, Ohsumi Y. Characterization of the Atg17-Atg29-Atg31 complex specifically required for starvation-induced autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 389 (4): 612-5.
- 61 Yano K, Suzuki T, Moriyasu Y. Constitutive autophagy in

- plant root cells. *Autophagy* 2007; 3 (4): 360-2.
- 62 Moriyasu Y, Hattori M, Jauh GY, Rogers JC. Alpha tonoplast intrinsic protein is specifically associated with vacuole membrane involved in an autophagic process. *Plant Cell Physiol* 2003; 44 (8): 795-802.
- 63 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.
- 64 Qin G, Ma Z, Zhang L, Xing S, Hou X, Deng J, *et al.* *Arabidopsis* AtBECLIN 1/AtAtg6/AtVps30 is essential for pollen germination and plant development. *Cell Res* 2007; 17 (3): 249-63.
- 65 Harrison-Lowe NJ, Olsen LJ. Autophagy Protein 6 (ATG6) is Required for Pollen Germination in *Arabidopsis thaliana*. *Autophagy* 2008; 4 (4).
- 66 Ghiglione HO, Gonzalez FG, Serrago R, Maldonado SB, Chilcott C, Cura JA, *et al.* Autophagy regulated by day length determines the number of fertile florets in wheat. *Plant J* 2008; 55 (6): 1010-24.
- 67 Yamada T, Ichimura K, Kanekatsu M, van Doorn WG. Homologs of genes associated with programmed cell death in animal cells are differentially expressed during senescence of *Ipomoea nil* petals. *Plant Cell Physiol* 2009; 50 (3): 610-25.
- 68 Shibuya K, Yamada T, Suzuki T, Shimizu K, Ichimura K. InPSR26, a putative membrane protein, regulates programmed cell death during petal senescence in Japanese morning glory. *Plant Physiol* 2009; 149 (2): 816-24.
- 69 Shibuya K, Yamada T, Ichimura K. Autophagy regulates progression of programmed cell death during petal senescence in Japanese morning glory. *Autophagy* 2009; 5 (4): 546-7.
- 70 Toyooka K, Okamoto T, Minamikawa T. Cotyledon cells of *Vigna mungo* seedlings use at least two distinct autophagic machineries for degradation of starch granules and cellular components. *J Cell Biol* 2001; 154 (5): 973-82.
- 71 Hayward AP, Tsao J, Dinesh-Kumar SP. Autophagy and plant innate immunity: Defense through degradation. *Semin Cell Dev Biol* 2009; 20 (9): 1041-7.
- 72 Seay M, Hayward AP, Tsao J, Dinesh-Kumar SP. Something old, something new: plant innate immunity and autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol* 2009; 335: 287-306.
- 73 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.
- 74 Yoshimoto K, Jikumaru Y, Kamiya Y, Kusano M, Consonni C, Panstruga R, *et al.* Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2009; 21 (9): 2914-27.
- 75 Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W. GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* 2004; 136 (1): 2621-32.
- 76 GUO Y, CAI Z, GAN S. Transcriptome of *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant, Cell and Environment* 2004; 27: 521-49.
- 77 Gregersen PL, Holm PB. Transcriptome analysis of senescence in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biotechnol J* 2007; 5 (1): 192-206.
- 78 Wittenbach VA, Lin W, Hebert RR. Vacuolar localization of proteases and degradation of chloroplasts in mesophyll protoplasts from senescing primary wheat leaves. *Plant Physiol* 1982; 69 (1): 98-102.
- 79 Mae T, Kai N, Makino A, Ohira K. Relation between ribulose biphosphate carboxylase content and chloroplast number in naturally senescing primary leaves of wheat. *Plant Cell Physiol* 1984; 25: 333-36.
- 80 Ono K, Hashimoto H, Katoh S. Changes in the number and size of chloroplasts during senescence of primary leaves of wheat grown under different conditions. *Plant Cell Physiol* 1995; 36: 9-17.
- 81 Kura-Hotta M, Hashimoto H, Satoh K, Katoh S. Quantitative determination of changes in the number and size of chloroplasts in naturally senescing leaves of rice seedlings. *Plant Cell Physiol* 1990; 31: 33-38.
- 82 Inada N, Sakai A, Kuroiwa H, Kuroiwa T. Three-dimensional analysis of the senescence program in rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles. Investigations of tissues and cells by fluorescence microscopy. *Planta* 1998; 205 (2): 153-64.
- 83 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.
- 84 Ishida H, Wada S. Autophagy of whole and partial chloroplasts in individually darkened leaves: a unique system in plants? *Autophagy* 2009; 5 (5): 736-7.
- 85 Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 2004; 9 (10): 490-8.
- 86 Xiong Y, Contento AL, Bassham DC. Disruption of autophagy results in constitutive oxidative stress in *Arabidopsis*. *Autophagy* 2007; 3 (3): 257-8.
- 87 Zhu JK. Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Curr Opin Plant Biol* 2001; 4 (5): 401-6.
- 88 Tsugane K, Kobayashi K, Niwa Y, Ohba Y, Wada K, Kobayashi H. A recessive *Arabidopsis* mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *Plant Cell* 1999; 11 (7): 1195-206.
- 89 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.

Progress in Plant Autophagy

Yan Wang , Yu-Le Liu*

(*School of Life Science, Tsinghua University, Beijing 100084, China*)

Abstract Autophagy is an important process for the turnover of cytoplasmic components, during which damaged proteins and organelles are engulfed in double membrane vesicles called autophagosomes and delivered into lysosomes (in mammal) or vacuoles (in yeast/plant) for degradation and recycling. Autophagy is conserved in higher eukaryotes including plants. The identification of ATG genes in plants based on sequence alignment and isolation of autophagy-defective plants both contributed to our understanding of the molecular mechanisms and the role of autophagy in plants. In this review, we focus mainly on the research progress on the mechanisms and the physiological roles of plant autophagy

Key words autophagy; plant; ATG gene; molecular mechanism; physiological role

This work was supported by National Basic Research Program of China (No.2011CB910100)

* Corresponding author. Tel: 86-10-62794013, E-mail: yuleliu@mail.tsinghua.edu.cn