

朱晓洁, 王贤杰, 杨明康, 等. 异源过表达蒺藜苜蓿 *MtATG7* 基因促进拟南芥抵抗碳氮饥饿胁迫 [J]. 华南农业大学学报, 2023, 44(5): 810-817.
ZHU Xiaojie, WANG Xianjie, YANG Mingkang, et al. Heterologous overexpression of *MtATG7* gene from *Medicago truncatula* promotes resistance to carbon and nitrogen starvation in *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of South China Agricultural University, 2023, 44(5): 810-817.

异源过表达蒺藜苜蓿 *MtATG7* 基因促进 拟南芥抵抗碳氮饥饿胁迫

朱晓洁¹, 王贤杰¹, 杨明康¹, 黄巍^{1,2}, 陈亮^{1,2}

(1 华南农业大学 生命科学学院, 广东 广州 510642; 2 岭南现代农业科学与技术广东省实验室, 广东广州 510642)

摘要:【目的】真核生物通过保守的自噬途径降解错误折叠的蛋白质或受损细胞器, 实现对营养物质的循环再利用。本文旨在解析苜蓿自噬基因在植物应对营养胁迫中发挥的功能, 为指导苜蓿的选育和改良提供参考。【方法】以自噬途径的关键限速基因 *ATG7*(Autophagy-related gene 7) 为切入点, 分析 *ATG7* 氨基酸序列在不同植物中的相似性。利用蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula* 的 *MtATG7* 基因过表达载体转化拟南芥植株, 获得异源过表达植株 *35S::MtATG7* 和互补拟南芥突变体的 *atg7/35S::MtATG7* 植株, 并对其抗胁迫表型和自噬活性进行分析。【结果】在碳饥饿条件下, *atg7/35S::MtATG7* 能够挽救 *atg7* 突变体叶片早衰的表型; 恢复到正常生长条件以后, *35S::MtATG7* 和 *atg7/35S::MtATG7* 植株存活率和野生型相比都显著提高。GFP-ATG8e 的剪切试验表明, *atg7/35S::MtATG7* 能够恢复 *atg7* 突变体的自噬降解活性。在氮饥饿条件下过表达 *MtATG7* 同样能够减缓拟南芥叶片的衰老速度。【结论】异源过表达 *MtATG7* 能增强拟南芥碳氮饥饿抗性的生物学功能, 本研究为进一步利用 *MtATG7* 基因改良苜蓿农艺性状提供了理论依据。

关键词: 细胞自噬; *MtATG*; 缺碳胁迫; 缺氮胁迫; 蒺藜苜蓿; 拟南芥; 异源过表达

中图分类号: S541; Q945

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2023)05-0810-08

Heterologous overexpression of *MtATG7* gene from *Medicago truncatula* promotes resistance to carbon and nitrogen starvation in *Arabidopsis thaliana*

ZHU Xiaojie¹, WANG Xianjie¹, YANG Mingkang¹, HUANG Wei^{1,2}, CHEN Liang^{1,2}

(1 College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2 Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】Eukaryotes use autophagy pathway to recycle nutrients by degrading misfolded proteins or damaged organelles. This study aims to analyze the function of *Medicago* autophagy genes in plant response to nutritional stress, and provide a reference for the breeding and improvement of *Medicago*. 【Method】We focused on the *ATG7* gene (Autophagy-related gene 7), which serves as the rate-limiting gene in the autophagy pathway, and investigated the similarities of *ATG7* amino acid sequences among different plant species. The overexpression vector of *Medicago truncatula* *MtATG7* gene was transformed to *Arabidopsis*

收稿日期: 2022-07-17 网络首发时间: 2023-08-28 08:54:17

首发网址: <https://link.cnki.net/urlid/44.1110.S.20230825.1011.004>

作者简介: 朱晓洁, 硕士研究生, 主要从事植物自噬功能和调控机制相关研究, E-mail: 839692579@qq.com; 通信作者: 陈亮, 副教授, 博士, 主要从事植物自噬功能和调控机制相关研究, E-mail: chenliang@scau.edu.cn

基金项目: 广东省自然科学基金 (2021A1515012148); 岭南现代农业科学项目 (NZ2021001); 广州市科技计划 (202102020907)

thaliana, to generate the heterologous overexpression lines 35S::*MtATG7* and the complementary lines *atg7/35S*::*MtATG7*. The plant resistance to stress and autophagic activity were analyzed. 【Result】 Under carbon starvation, *atg7/35S*::*MtATG7* rescued the phenotype of premature leaf senescence of *atg7* mutant, and the survival rates of 35S::*MtATG7* and *atg7/35S*::*MtATG7* plants were significantly higher than that of wildtype. GFP-ATG8e cleavage assay suggested that *atg7/35S*::*MtATG7* restored the deficiency of autophagic degradation activity in *atg7* mutants. Under nitrogen starvation, overexpression of *MtATG7* also slowed down the senescence rate of *A. thaliana* leaves. 【Conclusion】 Heterologous overexpression of *MtATG7* can enhance the resistance of *A. thaliana* under carbon and nitrogen starvation, which provides a theoretical basis for further improving *Medicago* agronomic traits by using *MtATG7* gene.

Key words: Autophagy; *MtATG7*; Carbon starvation; Nitrogen starvation; *Medicago truncatula*; *Arabidopsis thaliana*; Heterologous overexpression

自噬是真核生物体内一种重要的分解代谢过程。错误折叠的蛋白或受损的细胞器被自噬体包裹运输至液泡,在液泡腔中被水解酶降解^[1]。分解产物会被储存于液泡,或被运输回细胞质中重复利用^[2]。在模式植物拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中,现已鉴定到大约 40 个自噬相关基因 *ATGs*(Autophagy-related genes),且大部分 *ATGs* 对自噬体的形成是必需的^[3-4]。

研究发现,过表达 *ATGs* 可以增强植物的环境适应性。自噬作为物质循环途径之一,对氮素的再利用和营养饥饿的抵抗至关重要。过表达 *AtATG8a*、*AtATG8e*、*AtATG8f* 和 *AtATG8g* 的拟南芥植株氮素再活化能力增强,转基因植株中有更多的氮素从衰老叶片中活化并运输到种子中,从而使种子的蛋白质含量显著提高^[5]。拟南芥中异源过表达水稻 *OsATG8b* 或苹果 *MdATG18a* 均可以增强拟南芥对氮饥饿或碳饥饿的耐受性^[6-8]。自噬过程也是植物抗旱、抗盐的关键途径之一。在干旱条件下,过表达 *MdATG18a* 和 *MdATG8i* 的苹果植株,以及异源过表达香蕉 *MaATG8f* 的拟南芥植株,都表现出更强的耐干旱能力,而且在这些过表达植株中,光合效率提高,可溶性糖和氨基酸的积累量明显增加^[9-11]。在高盐环境下,过表达 *MdATG10* 苹果植株的根系具有更强的水分吸收能力,植株能够保持较高的光合效率从而维持生长^[12]。除此之外,过表达 *MdATG18a* 的苹果植株不仅对碱性和高温等不良环境的耐受力增强,而且对斑褐病的免疫力也明显提高^[13-15]。

自噬相关蛋白 *ATG7* 通过催化 *ATG8-ATG3* 偶联物的形成激活 *ATG8* 的脂化作用,被认为是自噬过程中的关键限速因子之一^[16]。*atg7* 缺失突变体不能形成自噬体,在碳/氮饥饿条件下生长受

阻,叶片早衰,繁殖能力下降^[2,17]。过表达 *AtATG7* 的拟南芥植株自噬活性显著提高,转基因植株不仅具有衰老延缓、生物量和产量提高、种子含油量增加等优势,而且对病原菌的抗性也明显增强^[16]。

苜蓿 *Medicago* spp. 是一种广泛种植的饲料作物,同时也是豆科模式植物之一^[18]。通过过表达苜蓿 *ATGs* 使自噬活性水平提高,是改善苜蓿农艺性状的一种潜在手段。然而苜蓿 *ATGs* 的生物学功能是否保守,以及其对植物的抗逆能力是否有促进作用在很大程度上仍然未知。本文以蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula* 中关键的自噬相关基因 *MtATG7* 为研究对象,构建拟南芥异源过表达 *MtATG7* 的稳定遗传植株,并在碳/氮饥饿条件下进行表型分析。本研究旨在为利用 *MtATG7* 基因改良苜蓿和其他植物的农艺性状提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料与培养条件

拟南芥生态型为 Columbia,拟南芥 T-DNA 插入的自噬功能缺陷突变体 *atg7-3*(SAIL_11_H07) 和 *GFP-ATG8e* 植株为 Chen 等保存^[19],通过杂交得到 *atg7-3*×*GFP-ATG8e* 纯和植株,构建 35S::*MtATG7-NOS* 过表达载体,通过农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 介导侵染 Col、*atg7-3*、*atg7-3*×*GFP-ATG8e* 的过表达株系获得 *MtATG7-ox*、*atg7/MtATG7*、*MtATG7/atg7-3/GFP-ATG8e* 转基因植株。

蒺藜苜蓿生态型为 A17。

培养条件:光暗周期为 16 h 光照/8 h 黑暗,温度为 22 ℃,光照强度为 120 μmol·m⁻²·s⁻¹。

1.2 植物表达载体构建及拟南芥遗传转化

以蒺藜苜蓿 cDNA 为模板,利用常规 PCR 方

法扩增 *MtATG7* 基因的编码序列 (2097 bp)。分别在上、下游引物中引入 *Bam*HI 和 *Pst*I 的酶切位点, 通过 *Bam*HI/*Pst*I 双酶切插入到双元表达载体 pCambia1300, 使用无缝克隆试剂盒 (金沙生物, SC612) 进行连接, 完成携带 35S::*MtATG7* 的植物表达载体构建。使用农杆菌 GV3101 介导的花序

浸泡法^[20]转化拟南芥 Col-0、*atg7-3* 和 *atg7-3*×*GFP-ATG8e* 植株。将转基因拟南芥 T0 代种子在含有 25 mg/L 潮霉素的筛选培养基上经过 3 代筛选获得 6 个纯合株系, 选取 2 个代表株系用于后续试验。所有构建均经测序验证正确, 构建引物信息见表 1。

表 1 PCR 特异性引物序列
Table 1 Specific primers used for PCR

引物类型 Primer type	引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence
目的基因引物 Target gene primer	MtATG7-F	gaacacgsggggactGGATCCATGGCTTTGCTCCAATTTAT
	MtATG7-R	AATGTTTGAACGATCTGCAGTCATATTTCAAAACAATCTT
自噬突变体鉴定引物 Autophagy mutant identification primer	atg7-F	TCTCTTGTTGGTCAAGCCTC
	atg7-R	CATTGTTGGTCTAGAGTTTCG
	LB1	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTT

1.3 *MtATG7* 基因的生物信息学分析

通过 Phytozomev13 网站 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) 查询不同物种中 *ATG7* 基因的氨基酸序列, 利用 Pfam 数据库 (<http://pfam.xfam.org/search/sequence>) 分析不同物种 *ATG7* 基因的保守基序; 利用 MEGA11 软件构建系统发育树。

1.4 缺碳胁迫处理和存活率测定

缺碳处理: 将在 1/2MS 培养基平板上生长 11 d 的拟南芥幼苗, 转移至无糖 1/2MS 培养基平板上, 并放置于黑暗环境下培养使植物不能进行光合作用, 继续培养 9 d 后进行表型观察和拍照。缺碳存活率的测定: 将土中生长 3 周的拟南芥植株转移至黑暗条件下培养 7 d, 随后转移到正常生长条件下恢复 8 d, 统计植株存活率。试验经 3 次生物学重复。

1.5 缺氮胁迫处理

拟南芥幼苗在正常 1/2MS 培养基平板上生长 11 d 后, 转移至缺氮 1/2MS 培养基平板上, 继续培养 7 d 后进行表型观察和拍照。

1.6 叶绿素含量的测定

取适量拟南芥幼苗称量鲜质量, 加入 2 mL N,N-二甲基甲酰胺 (N,N-Dimethylformamide, DMF), 4 ℃ 遮光提取 2 d, 每个样品设 3 个生物学重复。按以下公式计算叶绿素含量: 叶绿素浓度=20.21×*D*_{645 nm}+8.02×*D*_{663 nm}, 叶绿素含量=叶绿素浓度×提取液体积×稀释倍数/样品鲜质量。

1.7 蛋白提取及 Western blot 检测自噬活性

取适量 2 周龄的拟南芥幼苗, 整株取样至 2 mL 离心管中, 经液氮速冻后, 用均质破碎仪研磨

样品。加入 200 μL RIPA Buffer 并充分振荡混匀, 4 ℃ 放置 10 min; 4 ℃、12 000 r·min⁻¹ 离心 30 min, 吸取上清。蛋白溶液经 95 ℃ 加热 5 min 后, 使用变性聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 进行电泳分离。使用 PVDF 膜, 在 4 ℃ 条件下恒电流 200 mA 转膜 120 min。将膜置于质量分数为 5% 的脱脂奶粉中封闭 1 h, 然后使用 Anti-GFP(Invitrogen A11122) 抗体 4 ℃ 孵育过夜。1×TBST 洗膜 3 次后孵育二抗 2 h。1×TBST 溶液重复洗膜 3 次, 将 PVDF 膜放至干净的培养皿中, 用显色液试剂盒进行显色后, 使用化学发光成像仪拍照保存。

1.8 数据统计分析

试验所得数据使用统计软件 SPSS 19.0 进行分析, 其中叶绿素含量测定数据 *n*=8, 存活率数据 *n*=3, 样品之间差异采用单因素方差分析和 LSD 多重比较方法进行统计检验, *P*<0.05 视为差异显著, 数据用平均值±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 *ATG7* 蛋白结构在植物中高度保守

为了解蒺藜苜蓿 *MtATG7* 的进化特征和生物学功能, 本研究对 *MtATG7* 的氨基酸序列与拟南芥等其他植物的同源基因构建了系统发育树, 并分析了 *MtATG7* 及其同源基因的序列相似性。结果表明, 在分析的 15 种植物中, 蒺藜苜蓿的 *ATG7* 与红车轴草 *Trifolium pratense*、鹰嘴豆 *Cicer arietinum* 的 *ATG7* 亲缘关系最近, 与模式植物拟南芥的亲缘关系相对较远。利用 Pfam 数据库中对

ATG7 的氨基酸序列进行结构域分析,发现在所有 15 种植物中都具有典型的 ATG7 特征结构域,说

明 ATG7 的功能很可能是高度保守的 (图 1)。

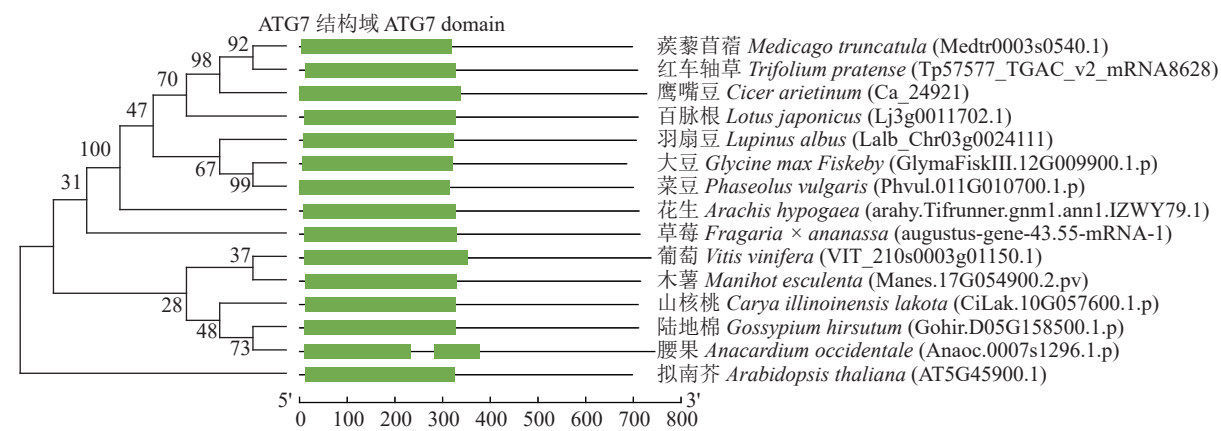


图 1 不同植物 ATG7 基因的系统发育树分析和保守结构域预测

Fig. 1 Phylogenetic tree analysis and domain prediction of ATG7 gene from different species

2.2 MtATG7 基因的克隆及异源过表达植株的遗传转化

根据 *MtATG7* 的 DNA 序列设计 PCR 引物,以蒺藜苜蓿的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增 (表 1)。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后得到约 2 000 bp 的特异条带,与 2 097 bp 的 *MtATG7* 编码序列长度吻合,说明 *MtATG7* 基因扩增成功 (图 2A)。进一步使

用无缝克隆方法,将 *MtATG7* 序列连接到表达载体上,构建了 35S::*MtATG7* 二元过表达载体 (图 2B)。在农杆菌介导下,通过花序浸泡法分别侵染拟南芥野生型 (Col)、*atg7-3* 和 *atg7-3/GFP-ATG8e* 植株,获得了多个独立的过表达株系,包括 *MtATG7-OX*、*atg7/MtATG7* 和 *atg7-3/MtATG7/GFP-ATG8e* 植株。每个基因型植株挑选两个纯合的株系进行后续试验。

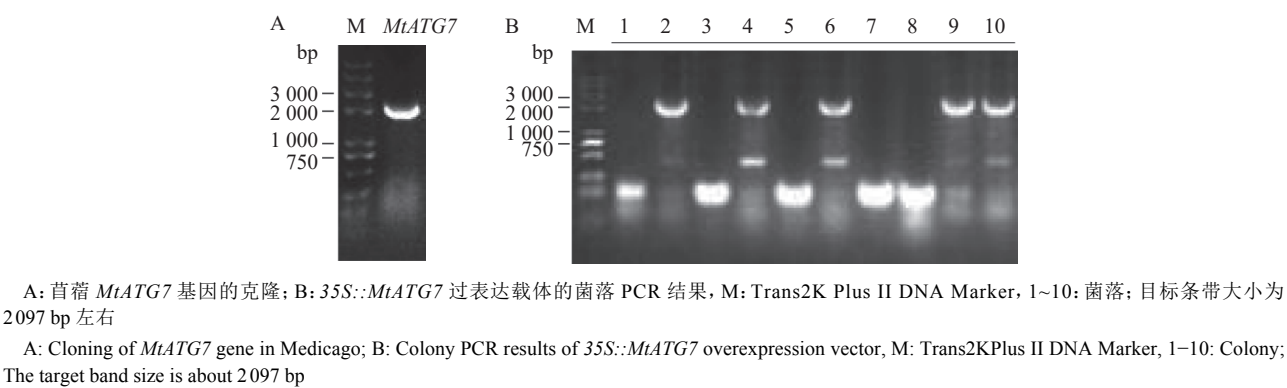


图 2 MtATG7 过表达载体的构建

Fig. 2 Construction of *MtATG7* overexpression vector

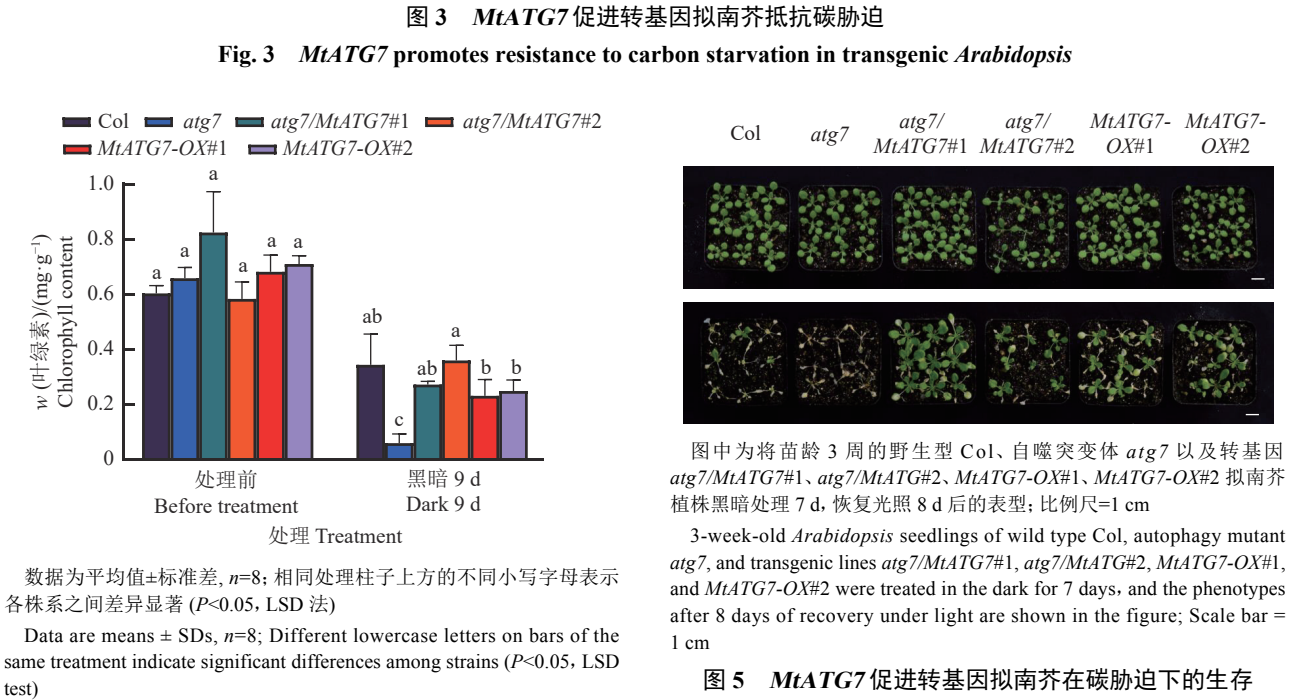
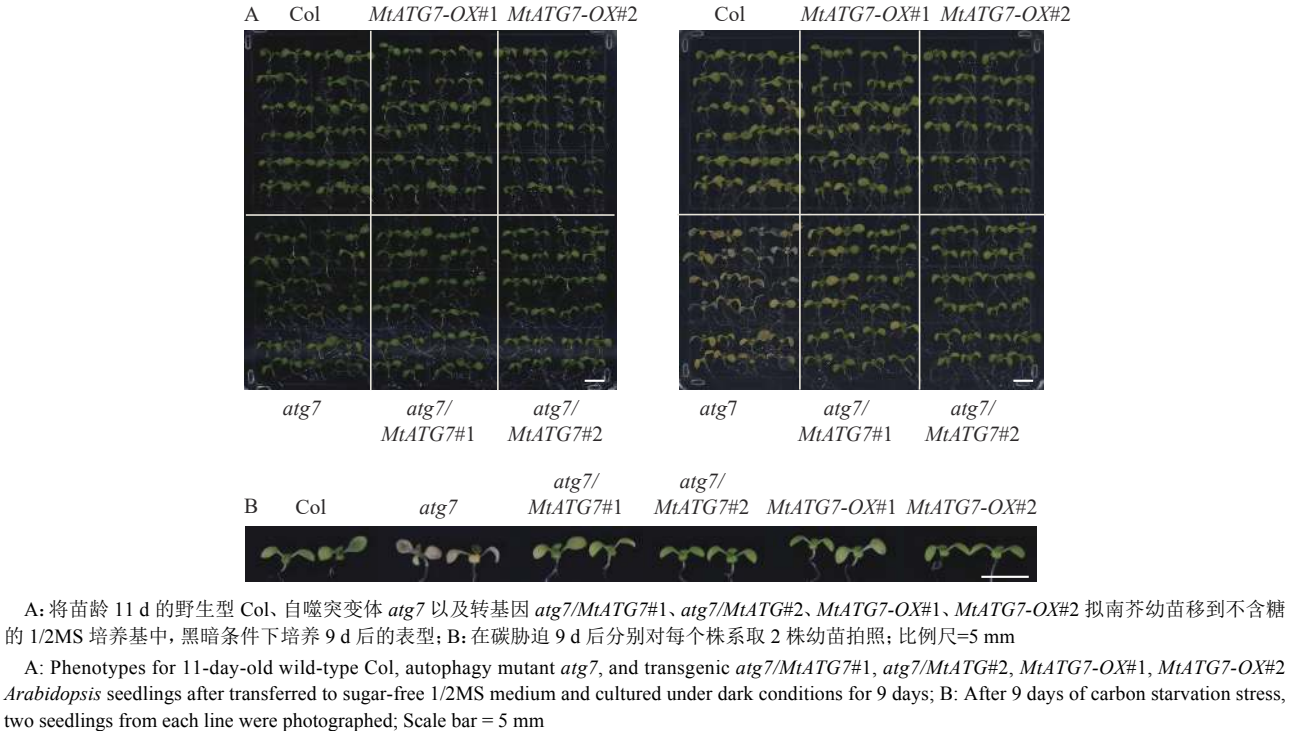
2.3 过表达 MtATG7 减缓拟南芥叶片在碳饥饿胁迫下的衰老速率

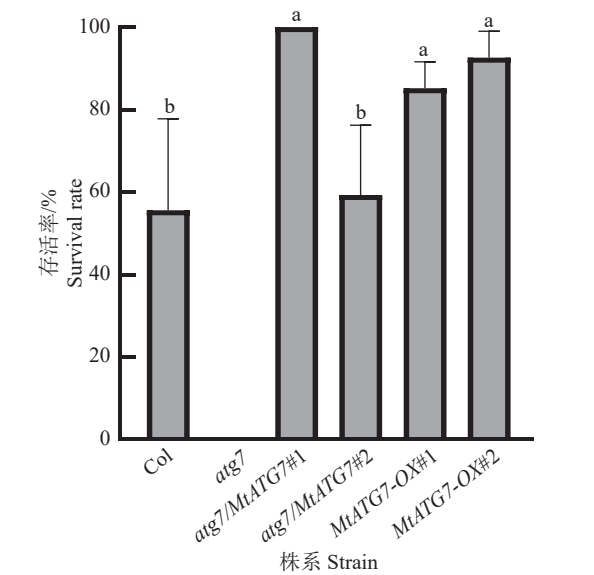
将苗龄 11 d 的转基因植株转移至无糖培养基上,并放置在黑暗环境下培养,使植物光合作用停止并产生碳饥饿。在缺碳胁迫条件下,*atg7* 幼苗的叶片明显变黄并伴随白化现象,但野生型 Col 与互补植株 *atg7/MtATG7*#1, *atg7/MtATG7*#2 的叶片仍呈现绿色,说明 *MtATG7* 能够挽救 *atg7* 突变体的生长缺陷表型 (图 3A、3B)。过表达植株 *MtATG7-OX*#1 和 *MtATG7-OX*#2 和野生型的叶片一样都保

持相对嫩绿。对缺碳胁迫前后的幼苗进行叶绿素含量的测定,结果显示缺碳胁迫后,*atg7* 突变体的叶绿素含量和野生型相比显著下降,但异源转基因的 *atg7/MtATG7* 植株和 *atg7* 突变体相比叶绿素含量明显提高 (图 4)。该结果表明 *MtATG7* 能够互补 *AtATG7* 抵抗碳饥饿胁迫的生物学功能。

2.4 过表达 MtATG7 基因提高拟南芥在碳饥饿胁迫下的存活率

将苗龄 3 周的拟南芥转移到黑暗条件下处理 7 d,探究过表达 *MtATG7* 对拟南芥碳饥饿胁迫存





统计各株系在恢复光照 8 d 后的存活率; 柱子上方的不同小写字母表示各株系之间差异显著 ($P<0.05$, LSD 法)

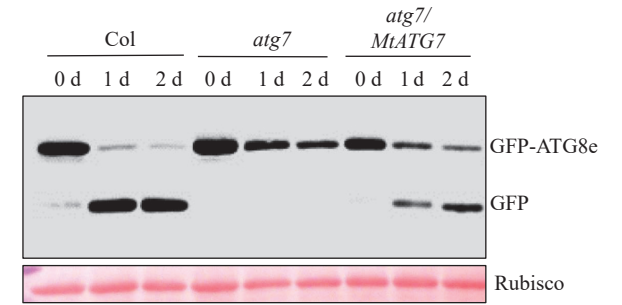
The survival rate of each strain after 8 days of light recovery are calculated; Different lowercase letters on bars indicate significant differences among strains ($P<0.05$, LSD test)

图 6 碳胁迫后的拟南芥幼苗的存活率

Fig. 6 Survival of *Arabidopsis* seedlings after carbon stress

并检测 GFP-ATG8e 蛋白的剪切活性。结果显示 *atg7* 突变体在碳饥饿胁迫下, 不能产生正常的游离的 GFP 条带, 而转基因的 *atg7/MtATG7/GFP-ATG8e* 植株的 GFP-ATG8 剪切活性能够恢复到接近 Col 的水平 (图 7)。以上结果表明, *MtATG7* 能够

互补拟南芥内源 *AtATG7* 的功能, 自噬活性的恢复很可能是碳饥饿胁迫耐受性提高的原因。



免疫印迹试验检测拟南芥 *GFP-ATG8e*、*atg7-3/GFP-ATG8e* 以及转基因 *MtATG7/atg7-3/GFP-ATG8e* 的 GFP 剪切活性; 上样量对照为丽春红染色的 Rubisco 蛋白

Western blot was used to detect the GFP cleavage activities of *GFP-ATG8e*, *atg7-3/ATG8e* and *MtATG7/atg7-3/ATG8e*; Rubisco protein with ponceau staining was used as the loading control

图 7 *MtATG7* 使拟南芥 *atg7* 突变体的自噬活性恢复

Fig. 7 *MtATG7* restores autophagy activity of *atg7* mutant in *Arabidopsis*

2.6 过表达 *MtATG7* 抑制氮饥饿导致的叶片变黄

将苗龄 11 d 的 *MtATG7* 过表达植株转移至缺氮培养基上培养, 结果表明, 在缺氮处理后 *atg7* 和野生型相比叶片明显变黄, 叶绿素含量下降 (图 8、9)。而互补植株 *atg7/MtATG7* 的叶绿素含量和野生型相近, 说明 *MtATG7* 能够挽救 *atg7* 突变体的缺陷表型 (图 9)。其中 *atg7/MtATG7#1* 和 *MtATG7-OX#1* 两个株系在缺氮处理后, 几乎所有

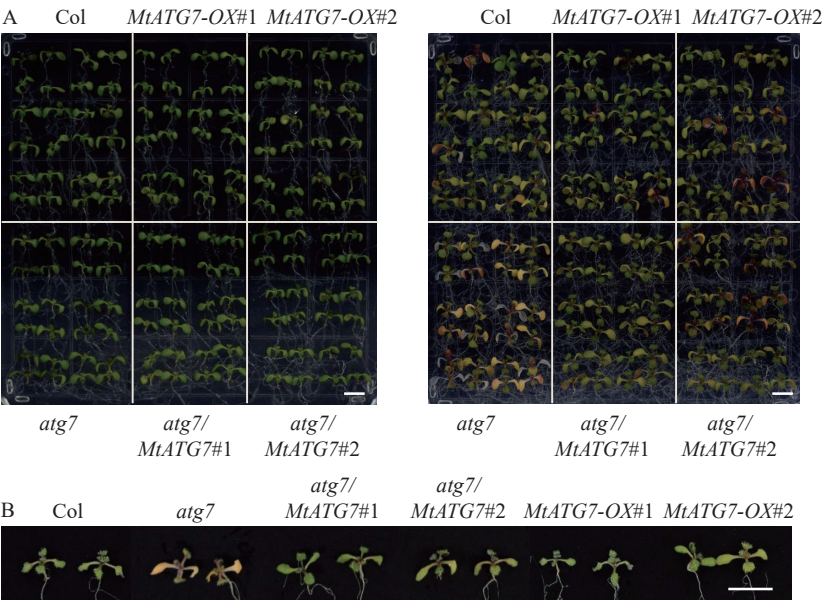


图 8 *MtATG7* 促进转基因拟南芥抵抗氮胁迫

Fig. 8 *MtATG7* promotes resistance to nitrogen starvation in transgenic *Arabidopsis*

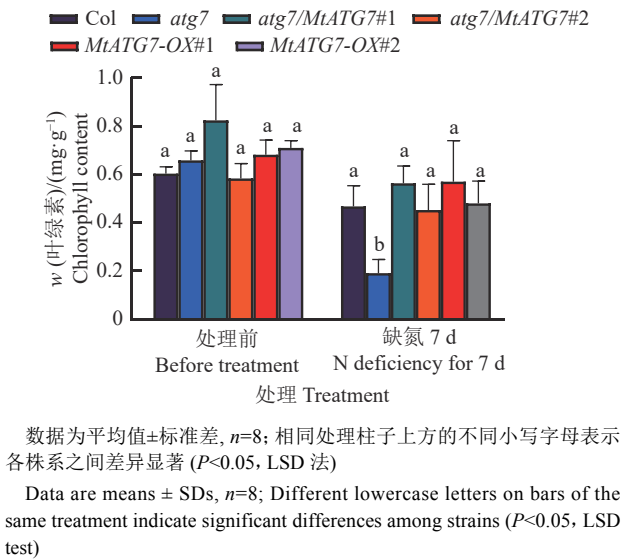


图 9 氮胁迫前后的拟南芥幼苗叶绿素含量

Fig. 9 Chlorophyll content of *Arabidopsis* seedlings before and after N stress

植株的叶片仍然保持绿色, 而野生型已有少量植株开始发紫 (图 8A、8B)。叶绿素测量结果也表明, *atg7/MtATG7#1*和 *MtATG7-OX#1* 两个株系的叶绿素含量和野生型相比有轻微增加 (图 9)。

3 讨论与结论

碳元素是糖类物质和蛋白质分子的基础, 对植物体内能量和物质的稳态至关重要。一方面, 植物遭受短期碳饥饿时, 细胞自噬能够降解储存于叶片中的瞬时淀粉, 为细胞提供额外的能量以渡过逆境^[21]; 另一方面, 在长期碳饥饿时, 细胞自噬能够降解叶绿体及其中的蛋白质, 维持重要组织的氨基酸供应, 从而提高植物的生存能力^[22]。氮元素是氨基酸、核苷酸、叶绿素的重要组成成分, 也是植物生存所必需的元素之一。在低氮条件下, 细胞自噬能够将衰老叶片中的氮素分解再活化, 使之能够被运输至新生叶片, 实现生长发育效率的最大化; 同时氮素的再活化也是种子成熟的关键步骤之一^[23]。

本研究发现 *MtATG7* 蛋白具有保守的 *ATG7* 特征结构域, 异源过表达 *MtATG7* 能够改善 *atg7* 突变体在碳/氮饥饿条件下的叶片早衰性状, 而且在缺氮胁迫下 *MtATG7* 过表达植株的存活率显著提高, 从野生型的 55.5% 提高至 85.2%~92.6%。缺碳条件下, *MtATG7* 能够使 *atg7* 突变体的自噬剪切活性恢复, 说明 *MtATG7* 能够参与拟南芥自噬途径的调控。ATG7 是植物自噬过程的限速酶之一, 在自噬过程中分别和 ATG12、ATG8 结合, 激活 ATG8 的脂化过程^[24], 因此 *MtATG7* 很可能通过提高植物自噬水平, 使碳/氮饥饿的耐受能力提高。在

拟南芥中, *ATG7* 和许多叶片衰老标记基因, 例如 *MYB2*、*NAP*、*SAG12*、*NYE1* 的表达存在明显关联性, 表明 *ATG7* 也是植物叶片衰老调控的枢纽之一^[25]。在碳/氮饥饿条件下, *MtATG7* 过表达植株叶绿素含量下降的速度减慢, 该结果暗示 *MtATG7* 还可能通过抑制衰老相关基因的表达, 使植物叶片的衰老延迟。

虽然 *MtATG7* 基因在参与自噬过程当中具有保守性, 但是在不同植物中, 自噬途径所影响的生理过程仍然存在特殊性。例如在正常生长条件下, 自噬途径的缺失对拟南芥生长和繁殖几乎没有影响; 但是在水稻和烟草中, 自噬途径受阻会导致其育性明显降低, 结实率下降, 同时水稻的抽穗时间明显延迟^[26-27]。因此过表达 *MtATG7* 基因在苜蓿和拟南芥中对抗逆性状的影响是否存在差异, 是今后值得探究的课题。

参考文献:

[1] LIU Y, BASSHAM D C. Autophagy: Pathways for self-eating in plant cells[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2012, 63: 215-237.

[2] MARSHALL R S, VIERSTRA R D. Autophagy: The master of bulk and selective recycling[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2018, 69: 173-208.

[3] MARION J, LE BARS R, BESSE L, et al. Multiscale and multimodal approaches to study autophagy in model plants[J]. *Cells*, 2018, 7(1): 5. doi: 10.3390/cells7010005.

[4] 张鸿哲, 朱璐, 左泽远, 等. 拟南芥 ATGs 在发育和非生物胁迫中的表达特征和功能分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(6): 2671-2682.

[5] CHEN Q, SOULAY F, SAUDEMONT B, et al. Overexpression of *ATG8* in *Arabidopsis* stimulates autophagic activity and increases nitrogen remobilization efficiency and grain filling[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2019, 60(2): 343-352.

[6] ZHEN X, XU F, ZHANG W, et al. Overexpression of rice gene *OsATG8b* confers tolerance to nitrogen starvation and increases yield and nitrogen use efficiency (NUE) in *Arabidopsis*[J]. *PLoS One*, 2019, 14(9): e0223011.

[7] 甄晓溪, 刘浩然, 李鑫, 等. 异源过表达 *OsATG8b* 基因提高转基因拟南芥的氮/碳胁迫耐受性和产量[J]. *植物学报*, 2019, 54(1): 23-36.

[8] SUN X, JIA X, HUO L, et al. *MdATG18a* overexpression improves tolerance to nitrogen deficiency and regulates anthocyanin accumulation through increased autophagy in transgenic apple[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2018, 41(2): 469-480.

[9] SUN X, WANG P, JIA X, et al. Improvement of drought tolerance by overexpressing *MdATG18a* is mediated by modified antioxidant system and activated autophagy in transgenic apple[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018,

16(2): 545-557.

[10] JIA X, MAO K, WANG P, et al. Overexpression of *Md-ATG8i* improves water use efficiency in transgenic apple by modulating photosynthesis, osmotic balance, and autophagic activity under moderate water deficit[J]. *Horticulture Research*, 2021, 8: 81. doi: 10.1038/s41438-021-00521-2.

[11] LI B, LIU G, WANG Y, et al. Overexpression of banana *ATG8f* modulates drought stress resistance in *Arabidopsis*[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(12): 814. doi: 10.3390/biom9120814.

[12] HUO L, GUO Z, JIA X, et al. Increased autophagic activity in roots caused by overexpression of the autophagy-related gene *MdATG10* in apple enhances salt tolerance[J]. *Plant Science*, 2020, 294: 110444. doi: 10.1016/j.plantsci.2020.110444.

[13] LI Y, LIU C, SUN X, et al. Overexpression of *MdATG18a* enhances alkaline tolerance and GABA shunt in apple through increased autophagy under alkaline conditions[J]. *Tree Physiology*, 2020, 40(11): 1509-1519.

[14] HUO L, SUN X, GUO Z, et al. *MdATG18a* overexpression improves basal thermotolerance in transgenic apple by decreasing damage to chloroplasts[J]. *Horticulture Research*, 2020, 7: 21. doi: 10.1038/s41438-020-0243-2.

[15] SUN X, HUO L, JIA X, et al. Overexpression of *Md-ATG18a* in apple improves resistance to *Diplocarpon mali* infection by enhancing antioxidant activity and salicylic acid levels[J]. *Horticulture Research*, 2018, 5: 57. doi: 10.1038/s41438-018-0059-5.

[16] MININA E A, MOSCHOU P N, VETUKURI R R, et al. Transcriptional stimulation of rate-limiting components of the autophagic pathway improves plant fitness[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(6): 1415-1432.

[17] DOELLING J H, WALKER J M, FRIEDMAN E M, et al. The *APG8/12*-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(36): 33105-33114.

[18] PECRIX Y, STATON S E, SALLET E, et al. Whole-genome landscape of *Medicago truncatula* symbiotic genes[J]. *Nature Plants*, 2018, 4(12): 1017-1025.

[19] CHEN L, LIAO B, QI H, et al. Autophagy contributes to regulation of the hypoxia response during submergence in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Autophagy*, 2015, 11(12): 2233-2246.

[20] CLOUGH S J, BENT A F. Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Journal*, 1998, 16(6): 735-743.

[21] WANG Y, YU B, ZHAO J, et al. Autophagy contributes to leaf starch degradation[J]. *The Plant Cell*, 2013, 25(4): 1383-1399.

[22] WADA S, ISHIDA H, IZUMI M, et al. Autophagy plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves[J]. *Plant Physiology*, 2009, 149(2): 885-893.

[23] LI F, CHUNG T, PENNINGTON J G, et al. Autophagic recycling plays a central role in maize nitrogen remobilization[J]. *The Plant Cell*, 2015, 27(5): 1389-1408.

[24] YOSHIMOTO K, TAKANO Y, SAKAI Y. Autophagy in plants and phytopathogens[J]. *FEBS Letters*, 2010, 584(7): 1350-1358.

[25] REN C, LIU J, GONG Q. Functions of autophagy in plant carbon and nitrogen metabolism[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 301. doi: 10.3389/fpls.2014.00301.

[26] KURUSU T, KOYANO T, HANAMATA S, et al. *Os-ATG7* is required for autophagy-dependent lipid metabolism in rice postmeiotic anther development[J]. *Autophagy*, 2014, 10(5): 878-888.

[27] ZHAO P, ZHOU X M, ZHAO L L, et al. Autophagy-mediated compartmental cytoplasmic deletion is essential for tobacco pollen germination and male fertility[J]. *Autophagy*, 2020, 16(12): 2180-2192.

【责任编辑 庄 延】