

自噬及其调控果蔬作物胁迫响应及衰老的研究进展

赵修明[#], 闵德栋[#], 张新华^{*}, 李富军, 李晓安

山东理工大学农业工程与食品科学学院, 山东淄博255000

[#]并列第一作者

^{*}通信作者(zxh@sdut.edu.cn)

摘要: 自噬是存在于真核生物体内的一种进化高度保守的细胞代谢途径。从酵母细胞到哺乳动物都依赖自噬来降解体内受损器官、组织等进行养分循环以维持细胞稳态以及适应环境变化。近年来, 自噬在调控果蔬作物胁迫响应及衰老中的作用受到了人们广泛的关注。本文阐述了自噬(主要是巨自噬)的形成及检测方法, 概括总结了自噬在果蔬作物响应外界环境胁迫及衰老中的作用及自噬的调控因子, 以期是自噬调控果蔬作物胁迫响应及衰老的研究提供参考。

关键词: 自噬; 果蔬; 胁迫; 衰老; 研究进展

Research progress of autophagy and its regulation on the stress response and senescence of fruits and vegetables

ZHAO Xiuming[#], MIN Dedong[#], ZHANG Xinhua^{*}, LI Fujun, LI Xiaolan

School of Agricultural Engineering and Food Science, Shandong University of Technology, Zibo, Shandong 255000, China

[#]Co-first authors

^{*}Corresponding author (zxh@sdut.edu.cn)

Abstract: Autophagy is a highly conserved cellular metabolic pathway in eukaryotes. From yeast cells to mammals, autophagy is used to degrade damaged organs and tissues in order to maintain cell homeostasis and adapt to environmental changes. In recent years, the role of autophagy in regulating the stress response and senescence of fruits and vegetables has attracted extensive attention. This paper describes the formation and detection methods of autophagy (mainly macroautophagy), summarizes the role of autophagy in the response to environmental stress and senescence of fruits and vegetables and its regulatory factors, so as to provide reference for the research of autophagy in regulating stress response and senescence of fruits and vegetables.

Key words: autophagy; fruit and vegetables; stresses; senescence; research progress

近年来, 我国果蔬产业得到迅速发展, 栽培面积不断扩大。据国家统计局统计分析, 截至2019年我国蔬菜和水果的种植面积分别为 $2.1 \times 10^7 \text{ hm}^2$ 和 $1.2 \times 10^7 \text{ hm}^2$, 产量分别为7.21和2.74亿吨, 我国已成为世界上最大的果蔬生产国。果蔬作为人类补充维生素、膳食纤维以及其他微量元素的重要来源, 成为了人类生活中不可或缺的宝贵食品(刘汝婧等

2020)。但果蔬在生长发育过程中会面临多种胁迫, 如干旱、高盐、高温、低温和病原微生物的侵染等, 这些逆境条件会严重制约果蔬作物的生长发育,

收稿 2021-03-17 修定 2021-07-08

资助 国家自然科学基金(31772024)和山东省自然科学基金重点项目(ZR2020KC011)。

导致果实产量和品质降低。针对这些逆境胁迫,植物在进化过程中形成了多种防御机制,其中自噬(autophagy)是广泛存在于真核生物体内的一种细胞自我降解机制,是细胞进行自我保护的一种重要调节方式(Romanazzi等2016)。通过自噬调节,能够清除有缺陷的蛋白和细胞器,实现物质的再利用和某些细胞器的更新,在果蔬作物的生长发育和逆境胁迫响应中发挥重要作用(刘沁松等2018)。

目前已经鉴定到3种不同的自噬类型,包括:(1)微自噬(microautophagy),又称小自噬,常发生在种子萌发时期,萌发过程中种子因为无法从外界吸收蛋白质等养分,需要通过溶酶体将自身储藏蛋白以自噬形式进行降解供萌发所需(Michaeli等2015; Lai等2011)。(2)分子伴侣介导的自噬,针对细胞内需要清除的细胞器、异常蛋白、蛋白复合体多余亚单位以及入侵的病原菌等,由特定的分子伴侣与其结合并进入溶酶体进行降解(Han等2011; Wang等2017a)。(3)巨自噬(macroautophagy),是植物中研究最广泛最深入的一种类型。该自噬过程是在自噬相关蛋白及其他胞内蛋白的调控下,细胞内形成具有双层膜结构的自噬小体(autophagosome)包裹受损的细胞器、变性蛋白及外源微生物等,转运到溶酶体中与其融合形成自噬溶酶体(autolysosome),最终将受损蛋白等降解,为细胞提供养分。整个过程既可以是选择性的,又可以是非选择性的(Simo等2016; 王玉2017)。本文以巨自噬为介绍对象,综述了自噬的形成及检测方法、自噬在果蔬作物胁迫响应及衰老中的调控作用及关键的调控因子。

1 自噬的形成及检测方法

1.1 自噬的形成

自噬的典型特征是形成具有双层膜结构的自噬小体(autophagosome)。在自噬发生过程中,自噬体包裹细胞内的组分,与溶酶体或液泡融合,最终在一系列水解酶的作用下降解,从而产生养分回补自身的营养循环途径(Richar等2018)。自噬由一系列进化保守的自噬相关基因(*autophagy-related genes*, *ATGs*)驱动,根据*ATGs*的功能,其可以分为四个核心功能组:ATG1/13激酶复合体、磷脂酰肌醇

3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)复合体、ATG9/2/18跨膜复合体和ATG8/12复合体(Mizushima等2011; Shibutani等2014)。

在胁迫条件下,会诱导果蔬体内自噬的发生(图1),在此过程中,ATG1激酶及其调节蛋白ATG13被雷帕霉素靶蛋白(target of rapamycin, TOR)磷酸化,然后与支架蛋白ATG11和相关蛋白ATG101结合形成复合体(Suttangkakul等2011);激活的ATG1/13复合物促进ATG9介导的脂质传递到发育中的吞噬体,ATG2/18在此过程中发挥协同作用,在空泡蛋白34 (vacuolar protein sorting 34, VPS34)、PI3K以及ATG14和ATG6在内的蛋白复合物作用下共同促进膜的延伸及囊泡成核。ATG7/10作为类泛素酶类参与ATG5/12/16共轭复合物的形成,共轭复合物与ATG3/4/7促进ATG8与磷脂酰乙醇胺(PE)结合,并锚定到自噬体内膜及外膜上,促进自噬体的延伸及扩展(Zhuang等2017)。最终在多种复合体及膜物质的作用下,包裹细胞组分的自噬体最终形成,其外层膜与液泡膜融合后,将待降解的内部物质释放到液泡中,并在液泡水解酶的作用下逐渐降解,营养物质被回收供其他组织(或细胞)使用(Fengsrud等2000)。

1.2 植物中自噬的检测方法

1.2.1 荧光染色

使用外源染色物质能够方便快捷地检测自噬的形成。单丹磺酰尸胺(MDC)是观察植物细胞自噬体活性常用到的外源染色剂,是一种能够穿过生物膜并在如自噬体这种酸性腔室中集中的弱碱,能够特异性标记自噬小体、自噬体以及自噬溶酶体等结构(Contento等2010)。但是MDC染色能力较强,无法分析自噬从自噬小体到自噬溶酶体的整个形成过程(Mizushima等2004)。

1.2.2 透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)

相比于荧光显微镜,TEM分辨率更高,可以直观阐明自噬各个周期的形态特征,为自噬研究提供更加直观有效的信息,因此TEM也是自噬检测中最经典的方法(Mitou等2009)。但是TEM检测样品制备难度和复杂程度大,无法精准追踪自噬形成的生命周期。并且由于自噬溶酶体与溶酶体、

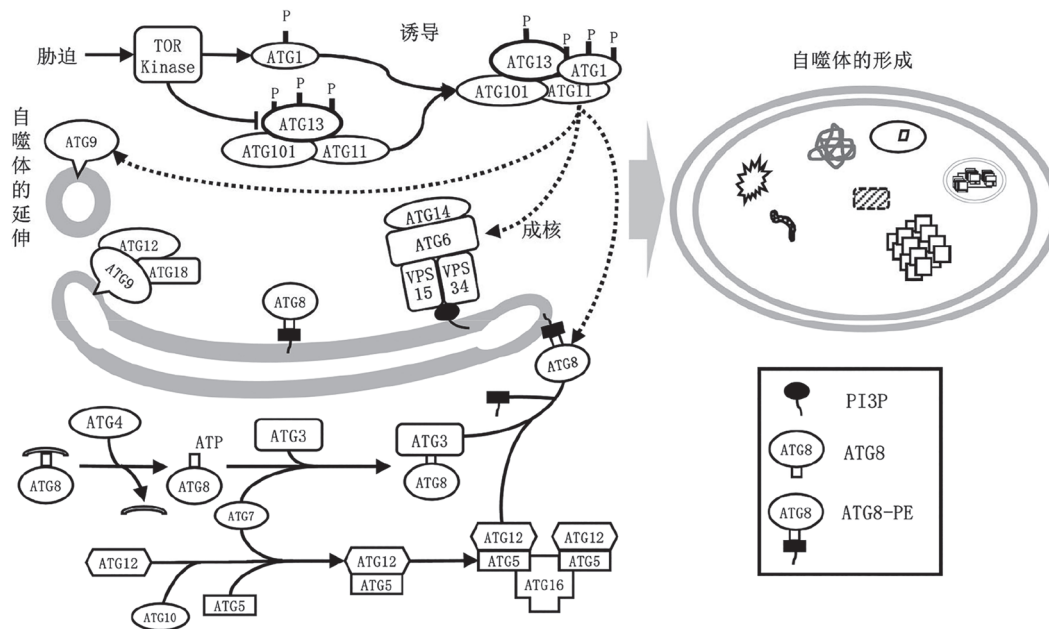


图1 胁迫诱导植物自噬形成的示意图

Fig. 1 Schematic diagram of autophagy induced by stress in plants

参考Marshall等(2018)文献并做修改。

液泡形态结构相似, 利用TEM观察到的数据需依靠专业人士来进行解释(Eskelinen等2008)。

1.2.3 ATG8的追踪与检测

ATG8是自噬形成过程中的核心组成部分, 并且在自噬的整个生命周期中具有定位于自噬体的独特特征, 因此ATG8成为追踪自噬从吞噬细胞扩张的早期阶段到最终液泡内降解的理想标记物(Mitou等2009)。利用共聚焦显微镜观测ATG8与绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)融合体GFP-ATG8通常被用于检测细胞的自噬(Marion等2017)。在正常情况下, 通常观测到大量弥漫性荧光定位于细胞质中; 当自噬激活时, 能够观测到大量点状荧光结构, 点状结构的数量与自噬活性呈正相关(Slobodkin等2013)。另外GFP-ATG1、GFP-ATG13和GFP-ATG11也可以与ATG8共定位, 可以被用作ATG8标记蛋白的替代品(Li等2012)。

ATG8与PE结合形成酯化的ATG8-PE, 是自噬膜延伸中的关键过程。变性凝胶蛋白电泳(SDS-PAGE)结果显示, ATG8蛋白分子量从18 kDa (游离形式)转化为16 kDa (脂化形式的ATG8-PE) (Nair等

2012)。因此, 使用抗ATG8抗体进行免疫印迹分析游离ATG8和ATG8-PE也成为检测自噬的方法之一。

2 自噬在果蔬作物胁迫响应及衰老中的调控作用

2.1 自噬与果蔬的非生物胁迫响应

2.1.1 渗透胁迫

渗透胁迫包括干旱胁迫和高盐胁迫, 是严重影响植株生长发育的环境胁迫(Chaves等2009)。与干旱导致的渗透胁迫不同, 高盐胁迫既能够导致渗透胁迫也能够导致离子胁迫(Zhu等2001)。这两种胁迫均能够导致植物细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的积累, 造成氧化损伤(Han等2011)。自噬在清除氧化损伤蛋白和调节ROS水平中发挥关键调控作用, 表明自噬可能参与果蔬的渗透胁迫反应(Wang等2017a; Han等2011)。

研究表明干旱处理能够诱导番茄(*Solanum lycopersicum*) *SlATGs*表达, 促进自噬体的形成。进一步研究发现*SlATG10*及*SlATG18*沉默会抑制番茄植株中自噬体的形成, 降低植株耐旱性(Wang

等2015)。另外, Zhu等(2018)研究发现*SLATG8d*和*SLATG18h*沉默也能够导致番茄植株产生严重的干旱症状。在苹果(*Malus pumila*)中超表达*MdATG18a*能够显著激活植株自噬活性, 从而降解蛋白质聚集, 提高抗氧化能力, 缓解氧化损伤, 增强植株耐旱性(Sun等2018b)。Li等(2019a)研究发现在香蕉(*Musa nana*)中存在10个*MaATG8s*响应干旱胁迫, 在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中异源超表达*MaATG8f*, 可以激活抗氧化相关酶活性, 抑制ROS积累, 同时调控脱落酸的合成代谢, 缓解干旱胁迫损伤。

全球有超8亿hm²土地遭受盐胁迫(Yang等2018), 严重影响果蔬产量。诱导果蔬自身耐盐性是拓展果蔬种植范围及提高果蔬产量的重要措施。Huo等(2020a)研究发现盐胁迫会诱导苹果根茎叶中*MdATG10*的表达, 尤其是在根部。而且*MdATG10*过表达会减轻高盐胁迫导致的苹果植株氧化损伤、降低Na⁺的积累, 缓解了高盐胁迫对根系生长及活性的损害。Huo等(2020b)还发现*MdATG8i*超表达也可以抑制ROS的产生, 并促进精氨酸及多胺的积累, 缓解盐胁迫对光合能力的损伤, 提高苹果植株耐盐性。Zhang等(2020)指出外源亚精胺(spermidine, Spd)处理可以通过激活ATGs的表达和自噬体的形成, 参与调控黄瓜(*Cucumis sativus*)的耐盐性; 而沉默ATG4和ATG7会降低Spd诱导的黄瓜耐盐性。上述结果表明, 自噬在多种果蔬作物的耐盐性中发挥关键调控作用。

2.1.2 热胁迫

随着全球温度的不断升高, 在世界范围内, 热胁迫成为限制果蔬生产的主要非生物胁迫因素之一(Wilson等2014)。热应激会导致内质网内蛋白质的错误折叠及变性, 激活自噬发生(Avin等2019; Li等2020)。在番茄株系中, 热胁迫显著提高了*SLATGs*的表达水平。与对照组株系相比, *SLATG5*及*SLATG7*沉默株系的自噬活性及热休克蛋白(heat shock protein, HSPs)基因的表达水平降低了, 不可溶性蛋白的积累被促进, 光合作用能力被降低, 耐热性被抑制(Zhou等2014)。同时, Xu等(2016)发现褪黑素诱导的自噬活性升高与番茄植株耐热性密切相关(Xu等2016); 在辣椒(*Capsicum annuum*)中, 高温胁迫

诱导*CaATGs*的表达, 且耐高温株系中的*CaATGs*表达水平及自噬体数量均高于温敏型株系, 表明自噬与植株耐热性有关; 在苹果中, *MdATG18*超表达增强了植株抗氧化及光合作用能力, 减轻了叶绿体损伤, 在苹果的热胁迫响应过程中发挥关键调控作用(Huo等2020c)。

2.1.3 营养饥饿

自噬循环过程有助于在营养缺乏条件下重新调动营养物质, 为植物的生存提供氨基酸、脂肪酸和糖等物质(Signorelli等2019)。例如, Sun等(2020)研究发现在氮饥饿条件下, *MdATG18a*超表达增强苹果植株自噬活性, 加速淀粉降解, 促进可溶性糖的积累, 增强株系氮缺乏耐受性; Huo等(2020d)报道, 与野生型相比, 过表达*MdATG9*诱导了苹果愈伤组织中*MdATGs*的转录水平, 同时含有较高含量的糖及游离的氨基酸, 增强了其氮缺乏耐受性; Wang等(2018)研究表明, 外源油菜素内酯(brassinosteroid, BR)处理能够显著诱导番茄植株中*SLATGs*表达及自噬体积累, 提高自噬活性, 降低了氮饥饿条件下不可溶性蛋白的积累, 增强株系氮缺乏耐受性, 表明BR诱导的自噬在番茄植株响应氮饥饿调控中发挥重要作用。Wang等(2016)发现, 营养饥饿能够显著诱导*MdATG8i*的转录, 且异源超表达*MdATG8i*的拟南芥株系与野生型相比, 在缺氮及碳条件下能呈现较好的生长状态; 拟南芥中异源超表达*MdATG7*也存在类似的现象(Wang等2017b)。

2.1.4 氧化应激

干旱、高盐、高温及营养缺乏等非生物胁迫均会导致果蔬作物ROS积累, 而过量的ROS会使植物细胞处于氧化应激状态, 对细胞内的脂质、蛋白质、核酸等物质造成损伤(Li等2020)。但是自噬能够降解氧化蛋白, 而且随着自噬活性的提高, 抗氧化酶及抗氧化物质被激活, 从而抑制ROS的过度积累, 缓解氧化损伤(Xiong等2007)。植物过氧化物酶体是ROS主要的产生来源, 在拟南芥ATGs突变体的保卫细胞中过氧化物酶体的数量和聚焦性增加, 但这些过氧化物酶体表现出过氧化氢酶活性降低, H₂O₂含量升高, 表明细胞自噬在ROS稳态中起着重要的作用(Yamauchi等2019; Su等2020)。Üstün等(2017)指出ROS水平升高能够破坏ATG3与

甘油醛-3磷酸脱氢酶的结合,从而激活自噬调控ROS的水平。ROS也能够作为信号分子诱导番茄幼苗根尖细胞自噬,消除细胞内ROS过度积累以维持细胞生存(Zhou等2018)。在成熟的辣椒果实中,自噬标记物会随着氧化受损的过氧化物酶体等细胞器活性的变化而变化,表明自噬在细胞器循环、代谢变化以及氧化受损中发挥着重要作用(Lopez-Vidal等2020)。

2.2 自噬在果蔬响应生物胁迫中的作用

在生长发育及贮运过程中,果蔬作物非常容易遭受病原菌的侵染,严重影响果蔬作物的生长及产品的质量。但在长期的进化过程中,果蔬自身已经发展了各种抵御病原菌入侵的机制。其中大量研究表明,自噬在果蔬作物应对生物胁迫中发挥关键调控作用。例如,通过自噬抑制剂3-甲基腺素(3-methyladenine, 3-MA)处理五叶期香蕉根并接种尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*),结果显示3-MA处理导致香蕉叶片中自噬小体的数量显著减少,同时香蕉植株的病症更加严重,表明自噬在调控香蕉植株*F. oxysporum*抗性中发挥关键作用(Wei等2017)。苹果双壳菌(*Diplocarpon mali*)侵染苹果叶片显著诱导*MdATG18a*的表达水平,而且*MdATG18a*超表达能够提高苹果叶片中水杨酸(salicylic acid, SA)含量,降低H₂O₂含量,抑制苹果褐斑病(brown spot)的发生(Sun等2018a)。CaCl₂处理能够显著诱导梨(*Pyrus bretschneideri*)叶片中的自噬活性,促进SA的积累及抗氧化活性,提高植株对葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)的抗性,而*PbrATG5*沉默降低了植株对葡萄座腔菌的抗性(Sun等2020);另外, Sun等(2021)还指出*PbrATG8c*沉默也显著降低了梨植株对葡萄座腔菌的抗性,导致梨叶片病症加剧。

2.3 自噬在调控果蔬作物成熟衰老中的作用

大量研究表明自噬不仅参与果蔬作物应对外界环境的胁迫,在果蔬作物植株及叶片的生长及衰老中也发挥关键调控作用(Hanamata等2014)。例如,在苹果叶片衰老过程中*MdATG18a*的表达显著上调(Wang等2014),而且在拟南芥中异源表达苹果的*ATG8i*基因时,在衰老叶片中*ATG8i*的表达增强尤为明显,并且促进了叶片的衰老过程(Wang

等2016)。王玉(2017)指出*SIMAPK12*和*SLATG6*相互作用,调控自噬活性,影响花粉发育过程中绒粘层细胞ROS的动态平衡,调控绒粘层的降解,进而影响花粉和果实的生长。另外,近年来研究表明,自噬在果蔬的成熟衰老过程也发挥了重要的调控过程。Deng等(2019)利用羟氯喹(hydroxychloroquine)抑制红枣(*Ziziphus jujuba*)的自噬作用,可以通过调控果实的呼吸作用以及提高抗氧化能力延缓果实的衰老,表明自噬介导红枣采后衰老过程;成熟的辣椒及葡萄(*Vitis vinifera*)果实中ATGs转录水平明显高于未成熟的果实(Lopez-Vidal等2020; Ghan等2017)。在竹笋采后衰老过程中有24个ATGs表达上调,其中ATG8/9/18上调尤为明显,研究结果指出可以通过ATGs的表达进行调控竹笋的货架期(Li等2019b)。

3 自噬信号通路的调控因子

自噬的发生过程受到多种因素的调控,解析自噬信号通路的调控因子,充分理解控制自噬过程的复杂调控因子网络将有助于通过控制果蔬的自噬活性来改善果蔬的生长发育及胁迫响应(Yang等2019)。

3.1 蛋白因子——TOR

TOR是真核生物中进化保守的多功能蛋白因子,在自噬诱导过程中发挥重要负向调控作用(Gou等2019)。在植物中大量研究表明,抑制TOR表达会诱导大量ATGs的表达,激活自噬,然而过表达TOR会显著抑制外界环境胁迫诱导的自噬活性升高(Avin等2019)。但是,当前对于TOR在调控果蔬植株自噬活性,以及参与果蔬生长发育、衰老及响应外界环境胁迫中的作用研究比较少。王玉(2017)在番茄中筛选到与拟南芥高度同源的TOR,并利用CRISPR/Cas9技术构建突变体*tor*,结果发现,相比野生型植株, TOR突变提高番茄植株自噬活性,提高坐果率及坐果数量,增加番茄果实的产量,表明TOR通过负向调控自噬,参与果蔬的生长发育。

3.2 信号分子

植物激素在植物生长发育、次生代谢及响应外界环境胁迫中发挥重要调控作用(Checker等2018)。

研究表明,植物激素可以通过诱导自噬活性,调控果蔬抗性。如,乙烯通过调控转录因子乙烯响应因子5 (ethylene response factor 5, ERF5),调控番茄植株的自噬活性(Zhu等2018); BR通过激活转录因子BZR1 (brassinazole-resistant 1),调控番茄SLATGs的转录水平及自噬活性,提高其氮饥饿抗性(Wang等2018)。

钙离子(Ca^{2+})作为第二信使,在植物响应生物及非生物胁迫中发挥重要作用(Aldon等2018)。Sun等(2020)研究发现,外源 CaCl_2 处理能够显著提高梨自噬活性,增强梨植株病原菌抗性,同时外源 CaCl_2 处理极大缓解了*PbrATG5*沉默导致的梨植株自噬活性及抗病性的下降,表明 Ca^{2+} 在调控自噬介导的植株抗性中发挥正向调控作用。

H_2O_2 也可以作为信号分子调控植物的生长发育和逆境响应(田延臣2018)。Zhang等(2020)研究指出,外源Spd处理能够促进黄瓜叶片及根中ATGs的表达及自噬体的积累,同时诱导了呼吸爆发氧化酶(respiratory burst oxidase)同源基因的表达和 H_2O_2 的积累;然而, H_2O_2 清除剂或NADPH氧化酶抑制剂处理减少了Spd诱导的 H_2O_2 积累,同时Spd诱导的植株自噬活性及盐胁迫耐性也显著降低,表明 H_2O_2 参与了Spd诱导的自噬活性调控过程。

3.3 转录因子

在果蔬植株响应生物及非生物胁迫过程中,ATGs转录水平均呈上升趋势,表明自噬在响应外界环境胁迫时受转录调控(Avin等2019)。转录因子对调控ATGs的表达,激活自噬活性,提高植株抗性至关重要。

最近在番茄中的研究表明,转录因子HsfA1a可以靶向调控SLATG10和SLATG18f的表达(Wang等2015)。在干旱条件下,SLATG10和SLATG18f的表达及自噬活性随HsfA1a的过表达而上调,进而增强番茄植株抗旱性;并且随HsfA1a的沉默而下调,表明HsfA1a在调控番茄植株耐旱性中发挥正向调控作用(Wang等2015)。干旱胁迫能够显著诱导ERF5的表达,同时SIERF5超表达能够显著提高番茄植株的抗旱性(Pan等2012); Zhu等(2018)进一步研究发现,转录因子SIERF5能够与SLATG8d和SLATG18h靶向结合,激活其转录水平,提高自噬活性,进而

调控植株抗旱性。在番茄植株响应氮饥饿时, BR信号通路核心转录因子BZR1能够靶向结合SLATG2和SLATG6,正向调控其转录水平,提高自噬活性(Wang等2018)。在香蕉植株响应病原菌侵染时,转录因子MaWRKY24能够靶向结合MaATG8f和MaATG8g启动子,调控其表达水平,诱导转录活性(Lai等2011)。

4 展望

综上所述,自噬作为一种细胞高度保守的自我降解机制,参与多种果蔬作物的胁迫响应过程,在促进植物生长发育、提高植物抗性以及维持细胞正常稳态等方面发挥着重要作用。然而,自噬在果蔬作物中的调控机制还缺乏深入研究。在今后的研究中应进一步利用病毒诱导基因沉默、CRISPR/Cas9基因编辑等技术,深入挖掘自噬信号途径中的关键基因及调控因子,并结合现代分子生物学技术在更广泛的果蔬作物中构建自噬调控网络体系,为改良果蔬作物的品质、提高果蔬作物的抗性提供重要参考。

参考文献(References)

- Aldon D, Mbengue M, Mazars C, et al (2018). Calcium signalling in plant biotic interactions. *Int J Mol Sci*, 19: 665
- Avin WT (2019). Autophagy and its role in plant abiotic stress management. *Plant Cell Environ*, 42 (3): 13404
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annu Bnt-London*, 103 (4): 551–560
- Contento AL, Xiong Y, Bassham DC (2010). Visualization of autophagy in *Arabidopsis* using the fluorescent dye monodansylcadaverine and a GFP-AtATG8e fusion protein. *Plant J*, 42 (4): 598–608
- Deng BL, Guo MX, Liu HX, et al (2019). Inhibition of autophagy by hydroxychloroquine enhances antioxidant nutrients and delays postharvest fruit senescence of *Ziziphus jujuba*. *Food Chem*, 296: 56–62
- Eskelinen EL (2008). To be or not to be? Examples of incorrect identification of autophagic compartments in conventional transmission electron microscopy of mammalian cells. *Autophagy*, 4 (2): 257–260
- Fengsrud M, Erichsen ES, Berg TO, et al (2000). Ultrastructural characterization of the delimiting membranes of isolated autophagosomes and amphisomes by freeze-fracture electron microscopy. *Eur J Cell Biol*, 79 (12): 871–882

- Ghan R, Petereit J, Tillett RL, et al (2017). The common transcriptional subnetworks of the grape berry skin in the late stages of ripening. *BMC Plant Biol*, 94 (17): 21
- Gou WT, Li X, Guo SY, et al (2019). Autophagy in plant: a new orchestrator in the regulation of the phytohormones homeostasis. *Int J Mol Sci*, 20: 2900
- Han SJ, Yu BJ, Wang Y, et al (2011). Role of plant autophagy in stress response. *Protein Cell*, 2 (10): 784–791
- Hanamata S, Kurusu T, Kuchitsu K (2014). Roles of autophagy in male reproductive development in plants. *Front Plant Sci*, 5: 457
- Huo LQ, Guo ZJ, Jia X, et al (2020a). Increased autophagic activity in roots caused by overexpression of the autophagy-related gene *MdATG10* in apple enhances salt tolerance. *Plant Sci*, 294: 110444
- Huo LQ, Guo ZJ, Wang P, et al (2020b). *MdATG8i* functions positively in apple salt tolerance by maintaining photosynthetic ability and increasing the accumulation of arginine and polyamines. *Environ Exp Bot*, 17: 103989
- Huo LQ, Guo ZJ, Zhang ZJ, et al (2020d). The apple autophagy-related gene *MdATG9* confers tolerance to low nitrogen in transgenic apple callus. *Front Plant Sci*, 11: 423
- Huo LQ, Sun X, Guo ZJ, et al (2020c). *MdATG18a* overexpression improves basal thermotolerance in transgenic apple by decreasing damage to chloroplasts. *Hortic Res*, 7: 21
- Lai ZB, Wang F, Zheng ZY, et al (2011). A critical role of autophagy in plant resistance to necrotrophic fungal pathogens. *Plant J*, 66 (6): 953–968
- Li B, Liu GY, Wang YQ, et al (2019a). Overexpression of banana *ATG8f* modulates drought stress resistance in *Arabidopsis*. *Biomolecules*, 9: 814
- Li FQ, Vierstra RD (2012). Autophagy: a multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling. *Trends Plant Sci*, 17 (9): 526–537
- Li XY, Xie LH, Zheng HF, et al (2019b). Transcriptome profiling of postharvest shoots identify PheNAP2 and PheNAP3 promoted shoot senescence. *Tree Physiol*, 39 (12): 2027–2044
- Li YF, Lin YN, Li X, et al (2020). Autophagy dances with phytohormones upon multiple stresses. *Plants-Basel*, 9 (8): 1038
- Marion J, Bars RL, Satiat-JB, et al (2017). Optimizing CLEM protocols for plants cells: GMA embedding and cryosections as alternatives for preservation of GFP fluorescence in *Arabidopsis* roots. *J Struct Biol*, 198 (3): 196–202
- Marshall RS, Vierstra RD (2018). Autophagy: the master of bulk and selective recycling. *Annu Rev Plant Biol*, 69: 173–208
- Michaeli S, Galili G, Genschik P, et al (2015). Autophagy in plants—What's new on the menu? *Trends Plant Sci*, 2 (21): 134–144
- Mitou G, Budak H, Gozuacik D (2009). Techniques to study autophagy in plants. *Int J Genomic*, 14: 451357
- Mizushima N (2004). Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, 36 (12): 2491–2502
- Mizushima N, Yoshinori T, Ohsumi Y, et al (2011). The role of ATG proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 27: 1–26
- Pan Y, Seymour GB, Lu C, et al (2012). An ethylene response factor (ERF5) promoting adaptation to drought and salt tolerance in tomato. *Plant Cell Rep*, 31: 349–360
- Romanazzi G, Sanzani SM, Bi Y, et al (2016). Induced resistance to control postharvest decay of fruit and vegetables. *Postharvest Biol Tec*, 122: 82–94
- Shibutani ST, Yoshimori T (2014). A current perspective of autophagosome biogenesis. *Cell Res*, 24: 58–68
- Signorelli S, Tarkowski LP, Ende WVD, et al (2019). Linking autophagy to abiotic and biotic stress responses. *Trends Plant Sci*, 24 (5): 413–430
- Slobodkin MR, Elazar Z (2013). The *Atg8* family: multifunctional ubiquitin-like key regulators of autophagy. *Essays Biochem*, 55 (1): 51–64
- Su T, Li XZ, Yang MY, et al (2020). Autophagy: an intracellular degradation pathway regulating plant survival and stress response. *Front Plant Sci*, 28 (2): 11
- Sun X, Huo LQ, Jia X, et al (2018a). Overexpression of *MdATG18a* in apple improves resistance to *diplocarpon mali* infection by enhancing antioxidant activity and salicylic acid levels. *Hortic Res*, 5 (1): 57
- Sun X, Pan B, Wang Y, et al (2020). Exogenous calcium improved resistance to botryosphaeria dothidea by increasing autophagy activity and salicylic acid level in pear. *Mol Plant Microbe In*, 50: 210095
- Sun X, Pan BS, Xu WY, et al (2021). Genome-wide identification and expression analysis of the pear autophagy-related gene *PbrATG8* and functional verification of *PbrATG8c* in *Pyrus bretschneideri* Rehd. *Planta*, 253 (2): 1–14
- Sun X, Wang P, Jia X, et al (2018b). Improvement of drought tolerance by overexpressing *MdATG18a* is mediated by modified antioxidant system and activated autophagy in transgenic apple. *Plant Biotechnol J*, 16 (2): 545–557
- Suttangkakul A, Li F, Chung T, et al (2011). The ATG1/ATG13 protein kinase complex is both a regulator and a target of autophagic recycling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 23 (10): 3761–3779
- Tian YC (2018). Hydrogen peroxide oxidation of *BZR1* positively regulates brassinolide signal transduction (dissertation). Jinan: Shandong University (in Chinese with English abstract) [田延臣(2018). 过氧化氢氧化BZR1正

- 向调控油菜素内酯信号转导(学位论文). 济南: 山东大学]
- Üstün S, Hafren A, Hofius D (2017). Autophagy as a mediator of life and death in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 40: 122–130
- Wang P, Sun X, Jia X, et al (2016). Characterization of an autophagy-related gene *MdATG8i* from apple. *Front Plant Sci*, 7: 720
- Wang P, Sun X, Wang N, et al (2017b). Ectopic expression of an autophagy-associated *MdATG7b* gene from apple alters growth and tolerance to nutrient stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Tiss Org*, 128 (1): 1–15
- Wang P, Sun X, Yue ZY, et al (2014). Isolation and characterization of *MdATG18a*, a *WD40*-repeat autophagy-related gene responsive to leaf senescence and abiotic stress in *malus*. *Sci Hortic Amsterdam*, 165: 51–61
- Wang Y (2017). Role of autophagy and its regulatory mechanism in tomato growth, development and stress response (dissertation). Hangzhou: Zhejiang University (in Chinese with English abstract) [王玉(2017). 番茄生长发育和逆境响应中自噬的作用及其调控机制(学位论文). 杭州: 浙江大学]
- Wang Y, Cai SY, Yin LL, et al (2015). Tomato HsfA1a plays a critical role in plant drought tolerance by activating *ATG* genes and inducing autophagy. *Autophagy*, 11 (11): 2033–2047
- Wang Y, Cao JJ, Wang KX, et al (2018). BZR1 mediates brassinosteroid-induced autophagy and nitrogen starvation tolerance in tomato. *Plant Physiol*, 179 (2): 671–685
- Wang Y, Zhou J, Yu JQ (2017a). The critical role of autophagy in plant responses to abiotic stresses. *Front Agr Sci Eng*, 4 (1): 28–36
- Wei YX, Liu W, Hu W, et al (2017). Genome-wide analysis of autophagy-related genes in banana highlights *MaATG8s* in cell death and autophagy in immune response to *Fusarium wilt*. *Plant Cell Rep*, 22 (4): 1237–1250
- Wilson RA, Sangha MK, Banga SS, et al (2014). Heat stress tolerance in relation to oxidative stress and antioxidants in *Brassica juncea*. *J Environ Biol*, 35 (2): 383–387
- Xiong Y, Contento AL, Nguyen PQ, et al (2007). Degradation of oxidized proteins by autophagy during oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 143 (1): 291–299
- Xu W, Cai SY, Zhang Y, et al (2016). Melatonin enhances thermotolerance by promoting cellular protein protection in tomato plants. *J Pineal Res*, 61 (4): 457–469
- Yamauchi S, Mano S, Oikawa K, et al (2019). Autophagy controls reactive oxygen species homeostasis in guard cells that is essential for stomatal opening. *Proc Natl Acad Sci USA*, 116 (38): 19187–19192
- Yang MK, Bu F, Huang W, et al (2019). Multiple regulatory levels shape autophagy activity in plants. *Front Plant Sci*, 10:532
- Yang YQ, Guo Y (2018). Unraveling salt stress signaling in plants. *J Int Plant Biol*, 60 (9): 796–804
- Zhang YM, Wang Y, Wen WX, et al (2020). Hydrogen peroxide mediates spermidine-induced autophagy to alleviate salt stress in cucumber. *Autophagy*, 29 (11): 1–15
- Zhou J, Wang J, Yu JQ, et al (2014). Role and regulation of autophagy in heat stress responses of tomato plants. *Front Plant Sci*, 5: 174
- Zhou SM, Hong Q, Li Y, et al (2018). Autophagy contributes to regulate the ROS levels and PCD progress in TMV infected tomatoes. *Plant Sci*, 269: 12–19
- Zhu JK (2001). Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Curr Opin Plant Biol*, 4 (5): 401–406
- Zhu T, Zou LJ, Li Y, et al (2018). Mitochondrial alternative oxidase-dependent autophagy involved in ethylene-mediated drought tolerance in *Solanum lycopersicum*. *Plant Biotechnol J*, 4 (4): 2063–2076
- Zhuang XH, Chung KP, Cui Y, et al (2017). *ATG9* regulates autophagosome progression from the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 114 (3): E426