植物遗传资源学报 2021，22（5）：1293-1303
Journal of Plant Genetic Resources DOI：10.13430/j.cnki.jpgr.20210310001

OsATG12 基因负调控水稻稻瘟病抗性

周　敏，胡方志，杜　强，王　琴，石伟杰，肖秀文，韩玲玲，陈秋红
（湖南农业大学农学院 / 水稻油菜抗病育种湖南省重点实验室，长沙 410128）

摘要：自噬途径广泛参与调控植物生长发育、营养物质的循环利用、多种生物与非生物逆境的耐受性，但其在水稻中功能研究还处在初始阶段。本研究克隆了水稻自噬相关基因 *OsATG12* 的全长 CDS，构建了 *OsATG12* 基因的超表达载体、基因编辑载体，进行水稻遗传转化后获得了相应的转基因水稻材料。对转基因材料进行阳性鉴定后获得了阳性转基因植株。对部分超表达转基因植株进行了 *OsATG12* 的表达量检测和繁种，获得了 *OsATG12* 超表达的转基因株系。对部分基因编辑转基因植株进行了靶位点基因型的检测和繁种，获得了 *atg12s* 突变体转基因株系。通过对这些转基因株系材料进行表型观察和稻瘟病抗性鉴定发现，*atg12s* 纯合移码突变体植株均不能正常结实，且对稻瘟病的抗性增强；而 *OsATG12* 超表达转基因植株对稻瘟病的抗性减弱，说明 *OsATG12* 基因负调控水稻对稻瘟病的抗性，这为揭示水稻自噬途径及自噬相关基因的功能提供了新思路。

关键词：水稻；自噬；*OsATG12*；稻瘟病抗性

OsATG12 Gene Negatively Regulates the Rice Blast Resistance

ZHOU Min，HU Fang-zhi，DU Qiang，WANG Qin，SHI Wei-jie，
XIAO Xiu-wen，HAN Ling-ling，CHEN Qiu-hong
（*College of Agronomy*，*Hunan Agricultural University/Hunan Provincial Key Laboratory of Rice and Rapeseed Breeding for Disease Resistance*，*Changsha 410128*）

Abstrast：Autophagy pathway is known to be widely involved in the regulation of growth and development，nutrient recycle，a variety of biotic or abiotic stresses tolerance in plant. However，the functional research of autophagy pathway in rice is still in its infancy. In this study，the full length CDS of rice autophagy-related gene *OsATG12* was cloned. The over-expressing vector and gene-editing vectors of *OsATG12* were constructed and transformed into rice，and corresponding transgenic rice materials were created. After positive identification of these transgenic materials，positive transgenic plants were obtained. Some over-expressing transgenic plants were tested for the expression level of *OsATG12* and were propagated，finally the transgenic lines over-expressing *OsATG12* were obtained. Some gene-editing transgenic plants were identified for the genotypes of target site and were propagated，finally we got the *atg12s* mutant lines. Through agronomic traits observation and rice blast resistance identification of these transgenic materials，it was found that *atg12s* homozygous mutant plants with frameshift mutations were more resistant to rice blast and produced aborted seeds，while *OsATG12* over-expressing plants showed weaker resistance to rice blast，which indicated that *OsATG12* negatively regulates the blast resistance of rice. This study provided new insights for revealing the functions of rice autophagy pathway and autophagy-related genes.

Key words：rice；autophagy；*OsATG12*；rice blast resistance

收稿日期：2021-03-10　**修回日期：**2021-04-08　**网络出版日期：**2021-05-13
URL：http：//doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20210310001
第一作者研究方向为水稻功能基因组学，E-mail：1277245661@qq.com；胡方志为共同第一作者
通信作者：陈秋红，研究方向为水稻遗传育种与功能基因组学，E-mail：cqh924@163.com
基金项目：国家自然科学基金（31401699）；湖南省自然科学基金（2017JJ3112）
Foundation projects：National Natural Science Foundation of China（31401699），Natural Science Foundation of Hunan Province（2017JJ3112）

细胞自噬是一种保守存在于真核生物细胞中的降解胞内物质或者细胞器的重要代谢途径，其对于维持胞内稳态至关重要。植物细胞自噬根据形态学观察区分，主要分为2种类型，微自噬（Microautophagy）和巨自噬（Macroautophagy）[1-2]。微自噬发生时，液泡膜下陷变形，直接包裹并吞噬细胞质，之后包裹体脱离液泡膜进入液泡中被酶解；巨自噬发生时，细胞会在胞质中起始形成一种双层膜结构的自噬小体，包裹需降解的目标物质，之后自噬小体被运输至液泡，自噬小体外膜与液泡融合，并向液泡中释放其内膜包裹的自噬小体，其包裹的物质最终在液泡中被降解。无论是在酵母细胞、哺乳动物细胞还是植物细胞中，巨自噬的分子调控机制都被研究得较深入，因此一般采用巨自噬代表自噬途径[3-4]。自噬的分子机制最早在酵母中被揭示，之后才在动物和植物中被研究[5]。至今，在酵母和拟南芥中都鉴定到参与自噬过程的 *ATG* 基因达40个以上，并且大部分酵母中的 *ATG* 基因都能在拟南芥中找到同源基因[5]，其中对自噬小体的扩展与闭合起必要作用的2个类泛素连接系统的成员被鉴定得最早、最全面，并且在酵母和拟南芥中保守存在，即 *ATG8* 连接系统（*ATG3*、*ATG4*、*ATG7*、*ATG8*）和 *ATG12* 连接系统（*ATG5*、*ATG7*、*ATG10*、*ATG12*、*ATG16*）[6-8]。这种类泛素化的过程首先是ATG8羰基端的精氨酸被半胱氨酸蛋白酶ATG4切除，暴露出ATG8的甘氨酸残基，之后在类泛素激活酶ATG7和类泛素结合酶ATG3的作用下，ATG8最终与一个磷脂酰乙醇胺分子（PE）连接形成ATG8-PE，参与自噬小体的延伸和完成过程，并定位到前自噬体结构位点上（PAS，preautophagosomal structure）。而自噬小体外膜的ATG8-PE可以再次被ATG4切开，将ATG8重新释放到细胞质中再利用；同样地，ATG12在ATG7和另一个类泛素结合酶ATG10的作用下与ATG5连接，并最终与ATG16二聚体连接形成ATG12-ATG5-ATG16复合体，该复合体被认为在ATG8-PE最终形成时发挥类泛素连接酶的作用[6,9]。

近年来，关于植物自噬分子机制及功能的相关报道逐渐增多，尤其以拟南芥为代表。在正常的生长发育环境中，植物自噬通常维持在一个基础水平，一旦出现逆境胁迫或者特殊的发育需要，植物自噬会被上调，帮助植物度过逆境或特殊发育时期，这说明自噬不管是对于植物正常的生长发育或是胁迫适应性都起着关键作用[10]。大量报道显示，大多数拟南芥 *atg* 突变体在正常生长条件下能完成其完整的生命周期，但均出现早衰及种子产量降低等现象[11]；在逆境条件下，则会表现出更极端的突变表型；并且在很多 *atg* 突变体中未能观察到自噬小体的存在，说明这些 *ATG* 基因参与植物的自噬过程，并且在植物中发挥相应的生物学功能。拟南芥 *atg12a/atg12b* 双突变体植株表现出早衰、对营养饥饿敏感及不能形成自噬小体的特征[12]。相较于野生型，拟南芥 *atg5*、*atg7* 或 *atg10* 突变体植株对氮、碳饥饿非常敏感，*atg5*、*atg7* 对高温胁迫更为敏感，*atg10* 和 *atg5* 突变体不能形成自噬小体[12-14]。大麦自噬与其表皮的细胞程序性死亡过程（PCD，programmed cell death）相关[14]。拟南芥 *ATG5* 和 *ATG7* 超表达植株相对于野生型植株表现出更高大且种子含油量更高的表型，并且植株中自噬小体的个数增加，对氧化逆境具有更大的耐受性[11]。番茄 *ATG5* 和 *ATG7* 的RNAi植株相对于野生型植株均不耐受高温逆境[15]。此外，有研究表明自噬途径参与调控植物先天免疫反应[16]。与野生型相比，拟南芥 *ATG6* 的RNAi株系接种带有无毒基因的丁香假单胞杆菌 *Pst*DC3000后，植株细菌生物量有所增加[17]；拟南芥 *atg7* 突变体植株中带有无毒基因的丁香假单胞杆菌 *Pto*DC3000的细菌生物量低于野生型植株[18]；拟南芥 *atg5*、*atg10* 及 *atg18*a 均对死体营养病原真菌的抗性下降或丧失，但是对带毒的半活体营养病原细菌丁香假单胞菌 *Pto*DC3000的抗性增强[19]。拟南芥 *atg5*、*atg7* 突变体接种腐生性病原菌灰葡萄孢后植株萎黄症状加重，真菌生长更快[20]。水稻中关于自噬的研究起步相对更晚。目前仅报道了几个具有体内生物学功能的相关基因 *OsATG7*、*OsATG9*、*OsATG8* 和 *OsATG10*。其中 *OsATG7* 为单拷贝基因，而 *OsATG8*、*OsATG9* 和 *OsATG10* 具有多个同源基因[21]。水稻 *atg7* 和 *atg9* 突变体植株的花粉粒中无法正常积累脂质和淀粉，花药不开裂，植株表现出雄性不育，并且无法观测到自噬小体的形成，这说明自噬在水稻生殖发育过程中发挥重要作用[22]；*atg7* 突变体还表现出对氮营养缺乏敏感[23]。*OsATG10b* 对于水稻氧化胁迫下细胞的存活至关重要[24]。*OsATG8a*、*OsATG8b*、*OsATG8c* 的过表达都能显著提高转基因水稻的自噬水平、有效分蘖数和产量；在正常氮栽培条件下，*OsATG8a* 的超表达显著增加植株氮吸收效率（NUpE）和氮利用效率（NUE）。*OsATG8c* 的过表达使植株变矮，在正常和次优氮营养条件下，NUpE和NUE都显著增

加[23,25-26]。上述 *ATG* 同源基因的研究证实水稻中同样存在保守的自噬途径，且功能相对保守。作为类泛素系统中的 *ATG12* 基因，其在水稻中仅有一个拷贝[21]，即 *OsATG12*，必然在水稻中发挥重要作用。胡方志等[1]对 *OsATG12* 基因的生物信息学分析表明，OsATG12 蛋白含有典型的 ATG12 蛋白功能结构域，但是 *OsATG12* 在水稻中发挥何种生物学功能至今未见报道。本研究利用超表达技术和基因编辑技术创制 *OsATG12* 基因的超表达和突变体转基因水稻材料，对这些转基因材料进行分子鉴定、表型观察及稻瘟病抗性鉴定，了解水稻自噬途径相关基因与水稻发育及先天免疫反应之间的关系，为水稻遗传育种研究提供新的理论支撑[27]。

1　材料与方法

1.1　试验材料

水稻遗传转化背景材料均为粳稻品种日本晴。超表达载体为 pCAMBIA1300s，由华中农业大学提供；基因编辑载体为 pYLCRISPR/Cas9-MTmono，由华南农业大学提供。稻瘟菌生理小种为 RO1-1，由本实验室保存。日本晴 cDNA 由实验室保存。GeneRuler 1 kb DNA Ladder、TRIzol、T_4 DNA ligase、DNase I（RNase-free）、反转录试剂盒 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 均购于 Thermo Scientific 公司；TB Green® Premix Ex Taq™（Tli RNaseH Plus）、LA Taq 酶购于 TaKaRa 公司；*TransStart® FastPfu* DNA Polymerase（含 2.5 mmol/L dNTPs）、*Trans*2K Plus DNA marker、pEASY®-Blunt Zero Cloning Kit、*Trans1*-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell 均购于北京全式金生物技术有限公司；胶回收试剂盒 HiPure Gel DNA Pure Micro Kit 购于广州美基生物科技有限公司；PCR 扩增试剂盒 2×M5 Taq HiFi PCR Mix 购于北京聚合美生物科技有限公司；琼脂糖购于 Invitrogen 公司；氯仿、无水乙醇、异丙醇、氯化钠等试剂均购于国药集团。

1.2　试验方法

1.2.1　超表达载体构建　以日本晴 cDNA 为模板，以引物 ATG12-F/R（表 1）进行 PCR 扩增获得

表 1　本研究所用引物
Table1　Primers of this study

名称 Name	序列（5′–3′）Sequence	功能 Function
ATG12-F	GGAATTCATGGCCGCGGTCGC	*OsATG12* 基因全长 CDS 的扩增
ATG12-R	CGGGATCCTCAGCCCCATGCC	
OsATG12-T1-F	GGCAGGTCGATTATCAACTCATC	*OsATG12* 基因编辑载体靶点 1 接头构建
OsATG12-T1-R	AAACGATGAGTTGATAATCGACC	
OsATG12-T2-F	GGCACAAATTCACCAGGATACAG	*OsATG12* 基因编辑载体靶点 2 接头构建
OsATG12-T2-R	GTTTAAGTGGTCCTATGTCCAAA	
U-F	GTCGGATCTCGCAAGAACAGTC	sgRNA 盒构建的第一轮扩增
gR-R	AGGATGTCTCAGTTTTACAGTGG	
Pps-GGR	AAAAACCATCAAAGATTAGGCG	sgRNA 盒构建的第二轮扩增
Pgs-GGL	CGCTCTCCCTATTGTGTTTCTA	
G12-OX-F	CGTAAGGGATGACGCACAAT	超表达转基因植株阳性鉴定
G12-OX-R	CTGTATCCTGGTGAATTTGTCGG	
atg12-T1-F	TTCGCCGACAAATTCACCAG	靶点 1 基因编辑转基因材料的基因型鉴定
atg12-T1-R	ACCAAGTCAGTATGCTACACCT	
atg12-T2-F	ATGGCTTGTAGAGGGTGGCA	靶点 2 基因编辑转基因材料的基因型鉴定
atg12-T2-R	ACGGATAGCACGGACATCAAA	
Cas9-F	ACCGCCACTCCATCAAGAAG	基因编辑转基因植株阳性鉴定（通用）
Cas9-R	AGCGGAAAGGATCGCCTTAG	
UBQQ-F	CGCAAGAAGAAGTGTGGTCA	*OsATG12* 基因的相对表达量检测
UBQQ-R	GGGAGATAACAACGGAAGCA	
G12-qRT-F	GCAGTGATGCCTTCGAGCTG	
G12-qRT-R	GTTGCCCGTCGATTCCAAAG	
gUBQ-F	TTCTGGTCCTTCCACTTTCAG	稻瘟菌相对生物量检测
gUBQ-R	ACGATTGATTTAACCAGTCCATGA	
Mopto2-F	ACGACCCGTCTTTACTTATTTGG	
Mopto2-R	AAGTAGCGTTGGTTTTGTTGGAT	

*OsATG12*基因全长CDS序列，连于克隆载体pEASY®-Blunt Zero Cloning vector后进行测序，测序正确的重组载体用于提供目的基因构建超表达载体。通过酶切连接的方式构建超表达载体pCAMBIA1300s-*OsATG12*，通过*Bam*H I、*Kpn*I双酶切验证阳性重组克隆，将阳性重组克隆质粒送至武汉天问生物科技有限公司进行农杆菌介导的水稻遗传转化。

1.2.2 基因编辑载体构建 利用在线工具CRISPR-P 2.0（http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/）分析*OsATG12*基因的gDNA序列，选取2处靶位点，设计靶点引物（表1）；将靶点上游引物1 μL（10 μmol/L）、下游引物1 μL（10 μmol/L）及0.5×TE 8 μL混匀，90 ℃加热30 s后冷却至室温制备靶点接头。之后配置边切边连构建sgRNA表达盒的反应体系：加入1 μL的靶点接头、1 μL的连接酶缓冲液（10×，含有10 mmol/L的ATP）、1 μL的酶切缓冲液（10×）、10 ng的U6a/U3m gRNA、0.25 μL的限制性内切酶*Bas*I（5U）、1 μL的T4 DNA连接酶，补充ddH_2O至10 μL；反应程序为：37 ℃ 5 min，20 ℃ 5 min，此两步循环5次。之后采用2轮PCR反应扩增sgRNA表达盒。2轮PCR反应体系分别见表2和表3。第1轮PCR反应程序为：95 ℃ 1 min；95 ℃ 10 s，60 ℃ 15 s，68 ℃ 20 s，此3步循环22次；72 ℃ 5 min。第2轮PCR反应程序为：95 ℃ 1 min；95 ℃ 10 s，58 ℃ 15 s，68 ℃ 20 s，此3步循环28次；72 ℃，5 min。电泳检测第2轮扩增产物。之后以表4的反应体系采用边切边连的方式将第2轮PCR扩增产物与基因编辑载体pYLCRISPR/Cas9-MTmono进行连接，构建*OsATG12*的基因编辑载体，反应程序为：37 ℃ 15 min；37 ℃ 5 min，10 ℃ 5 min，20 ℃ 5 min，此3步循环15次；16 ℃保存。转化大肠杆菌感受态细胞后涂布于抗性平板上，以M13F/M13R（表1）为引物进行菌落PCR初步鉴定阳性克隆，将阳性克隆抽提质粒后，以表5的反应体系进行酶切反应，验证阳性重组克隆，反应程序为37 ℃ 2 h。将阳性重组克隆送生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序，测序正确的质粒载体送至武汉天问生物科技有限公司进行农杆菌介导的水稻遗传转化。

1.2.3 转基因植株的阳性鉴定 采用CTAB法提取转基因水稻植株基因组DNA小样，根据表达载体及目的基因序列设计特异性扩增引物（表1），以转基因植株的DNA为模板进行常规PCR扩增，鉴定*OsATG12*超表达及基因编辑转基因植株是否为阳性转基因植株。

表2 sgRNA表达盒构建过程中的第1轮扩增反应体系

Table 2 First round amplification system for sgRNA expression cassette construction

成分 Composition	体积（μL） Volume
构建sgRNA表达盒的连接产物 Ligation products of the sgRNA expression cassette construction	2
10×KOD plus buffer	1.5
dNTPs（2 mmol/L）	2
U-F/接头右引物（2 μmol/L）或接头左引物/gR-R（2 μmol/L） U-F/right primer of adapter（2 μmol/L）or left primer of adapter/gR-R（2 μmol/L）	1.5/1.5或1.5/1.5
0.25 U KOD plus	0.25
ddH_2O	至总体积15

表3 sgRNA表达盒构建过程中的第2轮扩增反应体系

Table 3 Second round amplification system for sgRNA expression cassette construction

成分 Composition	体积（μL） Volume
dNTPs（2 mmol/L）	5
5×Fast Pfu Buffer	8
Pps-GGR+Pgs-GGL（10 μmol/L）	0.6+0.6
第一轮扩增产物 First round amplification products	2/2
Fast Pfu	0.8
ddH_2O	至总体积40

表4 基因编辑载体与第2轮扩增产物的酶切连接反应体系

Table 4 The enzyme digestion and ligation reaction system for gene editing vector and second round amplification products

成分 Composition	体积（μL） Volume	质量（ng） Mass
T_4 DNA ligase	1	
10×Buffer for T_4 DNA ligase（10 mmol/L ATP）	1.5	
10×Cutsmart buffer	1.5	
5U *Bas*I	0.5	
pYLCRISPR/Cas9-MTmono		60
第二轮扩增产物 Second round amplification products		20
ddH_2O	至总体积15	

表5 重组基因编辑载体酶切验证反应体系

Table 5 The enzyme digestion reaction system for recombinant gene editing vector verification

成分 Composition	体积（μL） Volume	质量（μg） Mass
10×Cutsmart Buffer	2	
*Asc*I	0.5	
质粒 Vector		1
ddH_2O	至总体积20	

1.2.4　水稻总 RNA 的抽提　取 50 mg 分蘖期水稻叶片样品于 2.0 mL 离心管（RNAase-free）中，加入液氮磨成粉后，加入 1 mL TRIzol 试剂，充分混匀，冰上放置 5 min 裂解细胞，4 ℃、10000 r/min 离心 10 min；吸取上清至 1.5 mL 离心管（RNase-free）中，加入氯仿 200 μL，充分混匀，冰上静置 5 min，4 ℃、10000 r/min 离心 10 min；取上清液至 1.5 mL 离心管（RNase-free）中，加入与上清液等体积的 4 ℃预冷的异丙醇，轻轻混匀，冰上静置 10 min，4 ℃、10000 r/min 离心 10 min；倒掉上清液，加入 500 μL 的 75% 乙醇，颠倒离心管数次后，4 ℃、10000 r/min 离心 10 min；倒掉上清液，室温风干 75% 乙醇，加入 DEPC 水溶解 RNA，溶液保存于 –80 ℃备用。

1.2.5　cDNA 第一链的合成　配置 DNA 消化反应体系，在 0.5 mL 离心管中加入 1 μg RNA、1 μL DNase I、1 μL 10×DNAse 缓冲液，加 DEPC 水至总体积 10 μL，混匀后 37 ℃反应 2 min，加入 1 μL 10 mmol/L 的 DTT 终止消化反应。配置反转录反应体系，在前面的消化反应体系中加入 1 μL 的 100 μmol/L Oligo（dT）^{18} 引物、1 μL 10 mmol/L dNTP 混合液、4 μL 5×RT 缓冲液和 1 μL 的反转录酶，补充 DEPC 水至总体积 20 μL，轻轻混匀，50 ℃保温 30 min 进行反转录反应，85 ℃保温 5 min 终止反转录反应，加入无菌水稀释反转录产物（cDNA）。

1.2.6　qRT-PCR 反应检测 *OsATG12* 基因的表达量　根据 *OsATG12* 基因及内参基因 *Ubiquitin* 的 cDNA 序列设计 qRT-PCR 引物（表 1）。配置 qRT-PCR 反应体系，在专用的 PCR 管中加入 2 μL cDNA 模板，0.2 μL 浓度为 10 μmol/L 的上游引物，0.2 μL 浓度为 10 μmol/L 的下游引物，5 μL TB Green® Premix Ex TaqTM（TliRNaseH Plus），最后加 ddH_2O 水补充至总体积 10 μL，用膜封盖后于 Step-One™荧光定量 PCR 仪（ABI）上进行 PCR 反应，扩增反应程序按照说明书进行设置。

1.2.7　转基因材料的表型观察　于 2019 年春季，挑选饱满、健壮的日本晴及 *OsATG12* 的突变体和超表达转基因株系材料的种子，进行浸种催芽，均匀播种于带泥的育苗盆中，将水稻苗培养至三叶一心期，期间进行阳性检测。将阳性转基因苗及日本晴植株移栽至湖南农业大学耘园基地，所有材料种植于同一块水稻田中，每个株系种植 40 株，以日本晴植株作为对照，观察整个生育期植株的茎、叶、叶鞘、穗的颜色与形态，在植株成熟后，从大田挖取整个植株，并取穗、小穗，观察表型，拍照。

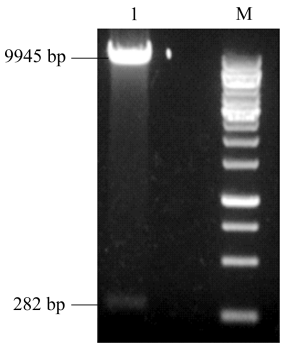
1.2.8　转基因材料的稻瘟病抗性鉴定（离体叶片划伤接种法）　准备正常生长的 3~5 叶期水稻植株；配置 0.1 mg/mL 苯并咪唑（保绿剂）并灭菌备用；用 2 mL 0.02% 吐温水（现配现用）将稻瘟菌（RO1-1）孢子浓度调至 5 ×10^5 个 /mL；剪取 7 cm 水稻倒二叶，用注射器在叶脉附近轻轻划伤（每片叶可划 2~3 处伤口，注意勿穿破叶片）；将叶片置于铺有滤纸的培养皿中，用棉条固定叶片两端的剪口（滤纸及棉条均用 0.1 mg/mL 苯并咪唑润湿）；吸取 5~10 μL 稻瘟病菌孢子滴于伤口处；密封培养皿，置于 26 ℃培养箱中黑暗培养 30 h 左右，之后转移至 26 ℃光照培养箱（14 h 光照 /10 h 黑暗）中培养 10 d 左右；观察水稻叶片发病情况，记录、拍照并取样。同时准确测量各水稻叶片的病斑长度（单位：cm），每个样品设置 3 次重复，取平均值。稻瘟菌相对生物量检测方法参照 Kawano 等[28]，具体操作方法为剪取叶片（含病斑）1 cm×3 cm（长 × 宽）区域，CTAB 法提取其 DNA，加适量 RNase I 消化 RNA 后测浓度，根据浓度将每个样品的 DNA 浓度稀释至一致，以 2 μL DNA 为模板，水稻泛素蛋白基因 *Ubiquitin* 为内参，进行 qRT-PCR 对稻瘟菌基因 *MoPot2* 进行相对定量，以此作为稻瘟菌的相对生物量，每个样品设置 3 次重复，引物见表 1。

1.2.9　数据统计与分析　利用 SPSS 软件进行数据的差异显著性分析。

2　结果与分析

2.1　*OsATG12* 超表达转基因水稻材料的创制与分子鉴定

酶切验证构建好的超表达载体 pCAMBIA1300s-*OsATG12*，结果表明，酶切后载体片段与对应的外源基因片段大小均符合预期（图 1）。将酶切正确的载体质粒进行测序，序列正确的载体送公司进行农杆菌介导的水稻遗传转化，获得相应转基因植株。采用 PCR 技术对转基因植株进行阳性检测，29 株 *OsATG12* 的超表达转基因苗中有 27 株阳性转基因苗（图 2）。随机选取 6 株（3、7、15、21、24、26）阳性转基因植株进行 qRT-PCR 反应，检测 *OsATG12* 基因的表达量。结果表明，与对照日本晴相比，3、7、15、21 及 26 号单株中 *OsATG12* 基因的表达量均明显升高，其中 3 号单株的表达量最高，约为日本晴的 117 倍；24 号单株中 *OsATG12* 基因的表达量与日本晴对比无明显差异（图 3）。故选取 T_0 代的 3、7 及 21 号单株进行繁种，作为下一步功能分析的试验材料。



M：GeneRuler 1 kb DNA Ladder；1：超表达载体 pCAMBIA1300s-*OsATG12*

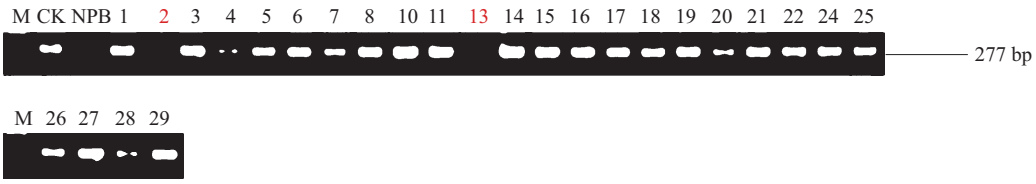
M：GeneRuler 1 kb DNA Ladder，1：Over-expressing vector pCAMBIA1300s-*OsATG12*

图 1 *OsATG12* 超表达载体的酶切验证

Fig.1 The restriction enzyme digestion of *OsATG12* over expression vector

2.2 *OsATG12* 基因编辑载体的构建及其转基因水稻材料的分子鉴定

2.2.1 *OsATG12* 基因编辑载体的构建及其转基因水稻材料的获得 采用 CRISPR-P 2.0 系统分析 *OsATG12* 基因序列，选取 2 处合适的位点（12T1 和 12T2）作为编辑靶位点（图 4）。2 个靶点都采用 U3 启动子驱动表达，制备靶点接头，进行两轮 PCR 反应构建 sgRNA 表达盒，回收第 2 轮扩增产物，采用边切边连法将 sgRNA 表达盒连接至基因编辑载体 pYLCRISPR/Cas9-MTmono 上。重组克隆采用限制性内切酶 *Asc* Ⅰ 进行酶切验证（图 5），9 号、10 号克隆均为阳性重组克隆，将阳性克隆质粒进行测序，将测序正确的质粒送公司进行水稻遗传转化，获取相应的转基因水稻材料。



M：*Trans*2K Plus DNA marker；CK：阳性对照；NPB：日本晴；1~29：T_0 代转基因单株；下同

M：*Trans*2K Plus DNA marker，CK：Positive control，NPB：Nipponbare，1-29：Single transgenic plants at T_0 generation，the same as below

图 2 PCR 检测 *OsATG12* 超表达转基因阳性植株

Fig.2 The positive identification of transgenic plants transformed with *OsATG12* over expression vector through PCR method

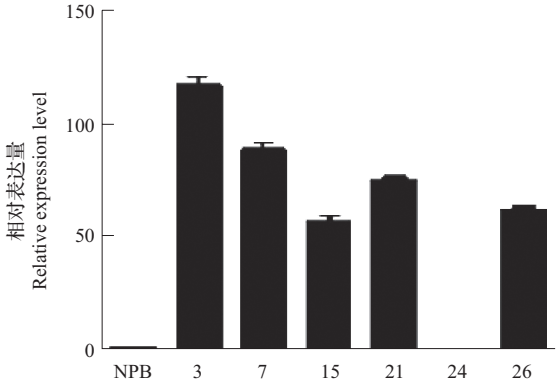


图 3 T_0 代超表达转基因植株中 *OsATG12* 基因的表达量

Fig.3 The expression level of *OsATG12* in transgenic plants at T_0 generation transformed by over expression vector

2.2.2 *OsATG12* 基因编辑转基因材料的分子鉴定 使用 PCR 技术对 T_0 代基因编辑转基因水稻材料进行阳性检测，2 个靶点的部分转基因植株的阳性检测结果见图 6A、B。选取其中部分阳性单株进行靶位点附近区域扩增及测序，测序结果表明，与对照 12T1 相比较，靶点 1 转基因材料中含有杂合突变基因型的单株有 12T1-19、12T1-21、12T1-23 和 12T1-26，纯合突变基因型的单株有 12T1-29 和 12T1-30，还有野生型未突变单株（图 6C）；与对照 12T2 相比较，靶点 2 转基因材料中含有双等位突变基因型的单株有 12T2-5、12T2-8、12T2-9、12T2-15 和 12T2-22，纯合突变基因型的单株有 12T2-1、12T2-2、12T2-11

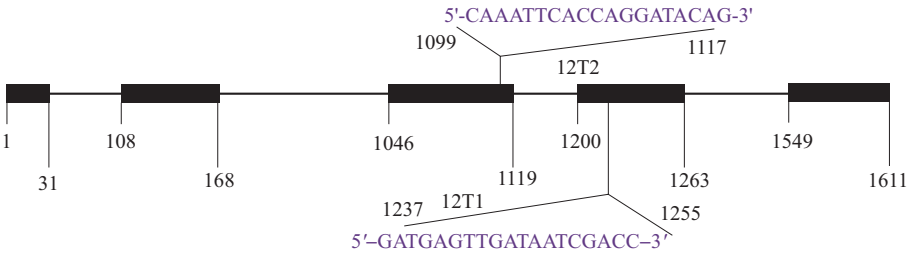
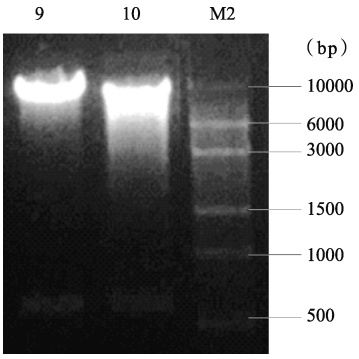


图 4 *OsATG12* 基因编辑靶位点位置及其序列

Fig.4 The location and sequence of gene editing targets for *OsATG12*

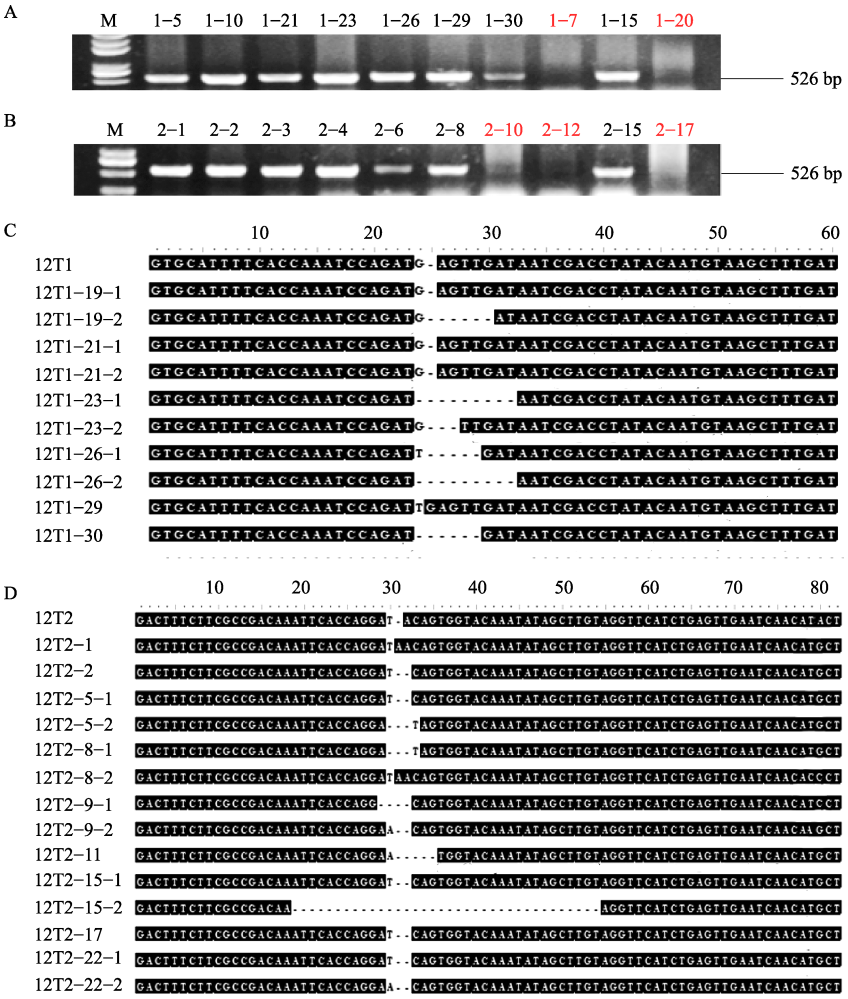


9、10：质粒 pYLCRISPR/Cas9-*OsATG12*-T1、质粒 pYLCRISPR/Cas9-*OsATG12*-T2；M2：GeneRuler 1 Kb DNA Ladder

9，10：Plasmid pYLCRISPR/Cas9-*OsATG12*-T1，Plasmid pYLCRISPR/Cas9-*OsATG12*-T2，M2：GeneRuler 1 Kb DNA Ladder

图 5　pYLCRISPR/Cas9-MTmono-*OsATG12* 质粒的酶切验证

Fig.5　The restriction enzyme digestion of pYLCRISPR/Cas9-MTmono-*OsATG12* plasmid



A：第 1 个靶点（12T1）部分转基因植株的阳性鉴定结果，1-5、1-10、1-21、1-23、1-26、1-29、1-30、1-7、1-15、1-20 为靶点 1 的转基因植株；B：第 2 个靶点（12T2）部分转基因植株的阳性鉴定结果，2-1、2-2、2-3、2-4、2-6、2-8、2-10、2-12、2-15、2-17 为靶点 2 的转基因植株；C：第 1 个靶点（12T1）转基因植株的基因型分析；D：第 2 个靶点（12T2）转基因植株的基因型分析；M：*Trans*2K Plus DNA marker

A：Partial results of positive identification of the first target（12T1）transgenic plants，1-5，1-10，1-21，1-23，1-26，1-29，1-30，1-7，1-15，1-20 are single transgenic plants of target 1，B：Partial results of positive identification of the second target（12T2）transgenic plants，2-1，2-2，2-3，2-4，2-6，2-8，2-10，2-12，2-15，2-17 are single transgenic plants of target 2，C：The genotype analysis of the first target（12T1）transgenic plants，D：The genotype analysis of the second target（12T2）transgenic plants，M：*Trans*2K DNA Marker

图 6　*OsATG12* 基因编辑转基因材料的分子鉴定

Fig.6　Molecular identification of gene editing transgenic material of *OsATG12*

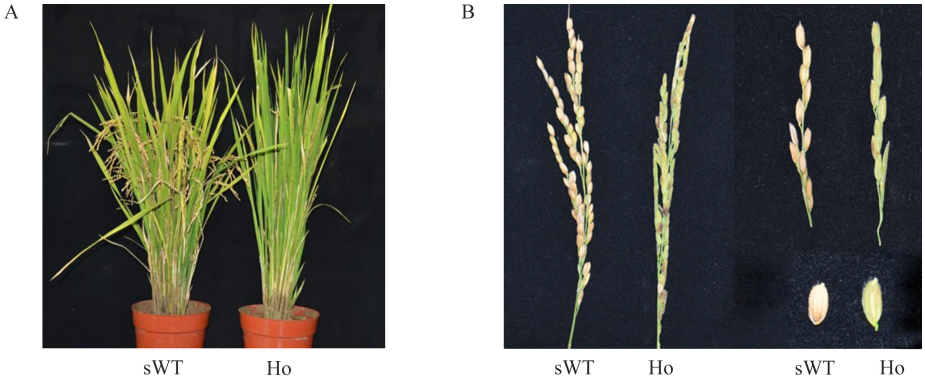
和 12T2-17，还有杂合突变基因型单株和野生型未突变单株（图 6D）。2 个靶点通过杂合突变体单株繁殖获得多个移码纯合突变体种子，这些种子发芽后即可作为后继 *OsATG12* 基因的功能缺失突变体 *atg12s*，用于 *OsATG12* 基因的功能分析。杂合突变体的后代单株用于功能分析前将通过测序确定基因型。同时 T_0 代的双等位突变体亦可作为 *OsATG12* 基因的功能缺失突变体 *atg12s*。

2.3 *atg12s* 突变体植株表型观测

田间观察多个 *atg12s* 突变体 T_1 代植株成熟期的表型发现，分离出的野生型植株能正常抽穗、开花、结实，但分离出的纯合突变体植株虽能抽穗开花，但抽穗期相对延迟且不能正常结实（图 7）。而分离出的杂合突变体植株与野生型植株表型一致，抽穗结实均正常。

2.4 *OsATG12* 超表达转基因株系的稻瘟病抗性鉴定

采用离体叶片划伤接种法对 *OsATG12* 超表达转基因株系 3-1、7-1、21-1 中的阳性植株及对照材料 NPB 进行稻瘟菌（生理小种 RO1-1）接种试验。接种 7 d 后表型见图 8A，进一步统计各株系的病斑

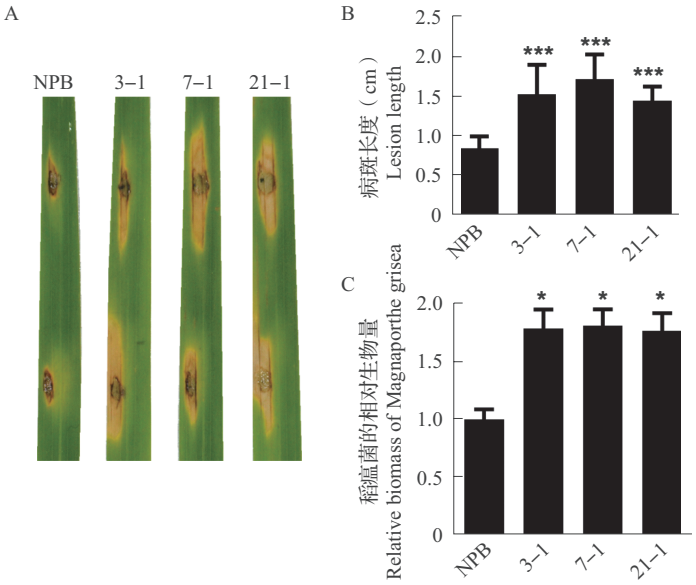


A：整株；B：穗和籽粒；sWT：野生型；Ho：纯合突变体

A：The whole plant，B：Panicles and grains，sWT：Wild type，Ho：Homozygous mutant

图 7 水稻 *atg12s* 突变体 T_1 代植株表型观察

Fig.7 The phenotype observation of *atg12s* plants at T_1 generation



A：*OsATG12* 超表达转基因株系接种稻瘟菌后的表型；B：病斑长度；C：稻瘟菌的相对生物量；NPB：日本晴（野生型对照）；3-1、7-1 和 21-1：来源于 T_0 代不同单株的 *OsATG12* 超表达转基因株系；* 表示 $P<0.05$，*** 表示 $P<0.001$，下同

A：The phenotype of transgenic lines overexpressing *OsATG12* after infected by Magnaporthe grisea，B：Lesion length，C：Relative biomass of Magnaporthe grisea，NPB：Nipponbare（WT，Control），3-1，7-1 and 21-1：Different lines derived from single transgenic plants overexpressing *OsATG12* of T_0 generation，* represents $P<0.05$，*** represents $P<0.001$，the same as below

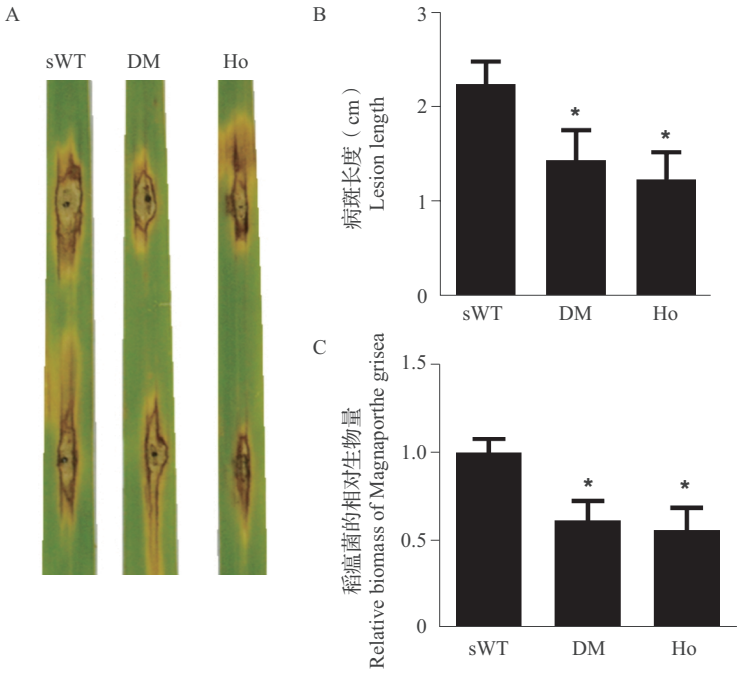
图 8 *OsATG12* 超表达转基因株系的稻瘟病抗性鉴定

Fig.8 Rice blast resistance identification of transgenic lines overexpressing *OsATG12*

长度发现，*OsATG12* 超表达转基因株系材料的病斑长度明显比对照日本晴长（图 8B）；取相同面积的病斑叶片提取 DNA 进行稻瘟菌相对生物量检测，结果表明，对照日本晴中的稻瘟菌生物量明显低于 *OsATG12* 超表达转基因株系材料中的生物量（图 8C）。以上结果说明，*OsATG12* 基因的过量表达降低了水稻对稻瘟病的抗性。

2.5　*atg12s* 突变体材料的稻瘟病抗性鉴定

采用离体叶片划伤接种法对 *atg12s* 纯合突变体、双等位突变体及分离出的野生型材料进行稻瘟菌（生理小种 RO1-1）接种试验，接种 7d 后表型见图 9A，进一步统计各材料的病斑长度发现，纯合突变体及双等位突变体材料的病斑长度均比野生型短（图 9B）；稻瘟菌相对生物量检测结果表明，纯合突变体及双等位突变体接种叶片中的稻瘟菌相对生物量明显低于野生型叶片中的相对生物量（图 9C）。以上结果表明，敲除 *OsATG12* 基因可以增强水稻对稻瘟病的抗性，这与超表达材料的接种结果相吻合。



A：*atg12s* 突变体材料接种稻瘟菌后表型；B：病斑长度；C：稻瘟菌的相对生物量；
sWT：分离的野生型材料；Ho：纯合突变体；DM：双等位突变体
A：The phenotype of *atg12s* mutant materials after infected by Magnaporthe grisea，B：Lesion length，C：Relative biomass of Magnaporthe grisea，sWT：Sibling wild type，Ho：Homozygous mutant，DM：Diallelic mutant

图 9　*atg12s* 突变体材料的稻瘟病抗性鉴定

Fig.9　Rice blast resistance identification of *atg12s* mutant materials

3　讨论

本研究构建了水稻 *OsATG12* 基因的超表达载体及基因编辑载体，经水稻遗传转化，分别获得相应的转基因植株，通过分子鉴定进一步获得 *OsATG12* 基因超表达的转基因植株及基因功能缺失的多个移码突变体 *atg12s*。田间表型观察发现，*OsATG12* 超表达转基因植株的农艺性状与野生型对照无明显差异，而 *atg12s* 突变体植株相对于野生型植株表现出抽穗期推迟、不育的表型。前人研究表明，水稻 *atg7* 和 *atg9* 突变体均表现出类似 *atg12s* 的抽穗期推迟及不育的表型，这说明水稻自噬在水稻的生殖发育过程中发挥重要作用，这与拟南芥及玉米中自噬途径功能有差异[22]。进一步分析水稻 *atg* 突变体植株不育的原因发现，自噬缺失突变体植株的花药发育存在缺陷，一是绒毡层不能够被正常溶解，花药不开裂；二是花药的缺陷最终导致不成熟花粉的形成，从而最终表现出不育的表型[22,29]。

自噬参与水稻之外其他植物物种免疫反应的研究早有报道，研究者发现被病原微生物侵染的 *ATG* 转基因植株可表现更抗病或更感病的表型，如沉默 *ATG8* 基因使木薯对细菌性萎蔫病菌更敏感[30]；沉默小麦中 *ATG6* 基因可以增强敏感系小麦对白粉菌的基础抗性，但也能削弱抗性系小麦（携带抗性基因 *Pm21*）对白粉菌的抗性[31]；拟南芥 *ATG5*、*ATG7* 过表达植株比野生型植株更抗黑斑病菌等[11]。本

研究用稻瘟病菌分别侵染 *OsATG12* 超表达植株和 *atg12s* 突变体植株，发现 *OsATG12* 超表达植株比野生型植株更感稻瘟病，*atg12s* 突变体植株比野生型植株更抗稻瘟病，说明 *OsATG12* 基因负调控水稻对稻瘟病的抗性。这是首次报道水稻自噬途径相关基因参与水稻先天免疫反应调控。植物先天免疫系统主要由病原相关分子模式（PAMPs，pathogen-associated molecular patterns）激发的免疫反应（PTI，PAMP-triggered immunity）和病原效应因子激发的免疫反应（ETI，effector-triggered immunity）组成[32]。植物遭受病原菌入侵时，其表面的模式识别受体（PRRs）会识别病原微生物的 PAMPs，随后将入侵信号迅速传递至胞内使植物启动基础免疫反应 PTI 加以应对[33]。PTI 能抵御绝大部分病原微生物的入侵，但会被少数病原微生物分泌的有毒效应因子干扰而使植物感病[34]；当植物 PTI 被病原微生物“突破”后，可激发次级免疫反应 ETI[35-36]，即利用植物进化出的与核苷酸结合的富含亮氨酸重复序列的抗性蛋白（NLR）或其他 R（Resistance）蛋白识别病原效应因子，诱发免疫反应，抑制病原微生物的繁殖蔓延，通常伴随着植物局部限制性的程序性细胞死亡，称为超敏反应（HR-PCD），使植物表现抗病[34,37]。有研究表明，在无毒细菌侵染植株时，自噬缺陷型突变体表现出席卷感染部位的蔓延性细胞死亡表型，并将这种不受限制的细胞死亡现象归因于自噬缺陷而导致的活性氧（ROS）的过度积累和增强的内质网（ER）应激[38]；而氧化胁迫和内质网应激又能诱导自噬的发生，说明植物自噬通过与这些物质和过程之间的正反馈调节来维持细胞内稳态[39-40]。有报道亦表明，不管是激活还是抑制 ROS 诱导的自噬都能够增强烟草对花叶病毒（TMV）的 HR-PCD[39,41]。但是自噬为何会在病原菌侵染植物时对植物产生促死亡作用，这一机制仍然不清楚。由于 *atg* 突变体植株还存在早衰表型，并且这些表型依赖于水杨酸（SA）信号，说明植物 SA 信号途径和自噬途径极有可能相互关联。进一步研究发现 SA 可以诱发自噬的发生，并构成负反馈回路，以调节 SA 依赖的衰老和 PCD 过程。SA 作为植物先天免疫系统的重要调控激素，其关键信号转导分子 NPR3 和 NPR4 被证实与 ATG8 互作，推测二者通过调节 ATG8-PE 和 ATG12-ATG5 连接系统来调节自噬的发生[42]。但 SA 信号与自噬如何在植物免疫过程中协作发挥调控作用仍然不清楚。植物中亦缺乏自噬成分与 NLR 蛋白的直接相互作用证据。但有研究表明，自噬可以介导直接选择性地降解病毒[42]。本研究虽然证明 *OsATG12* 基因负调控水稻对稻瘟病的抗性，但是 *OsATG12* 基因及水稻自噬途径调控水稻先天免疫反应的具体机制仍然未知，未来可以通过利用水稻自噬突变体 *atg7*、*atg9* 及 *atg12s* 来进行系统探索。

参考文献

[1] 胡方志，杜强，袁利花，韦鹏飞，苏莹，王志龙，陈秋红. 水稻 *OsATG12* 基因的克隆、表达及生物信息学分析. 分子植物育种，2019，17（24）：7979-7989
Hu F Z，Du Q，Yuan L H，Wei P F，Su Y，Wang Z L，Chen Q H. Cloning，expression and bioinformatics analysis of *OsATG12* gene in *Oryza sativa*. Molecular Plant Breeding，2019，17（24）：7979-7989

[2] Masclaux D C，Sabine D，Isabelle B，Cacas J L. Reserve lipids and plant autophagy. Journal of Experimental Botany，2020，（10）：10

[3] Reggiori F，Klionsky D J. Autophagic processes in yeast：mechanism，machinery and regulation. Genetics，2013，194（2）：341-361

[4] Yang Z，Klionsky D J. Mammalian autophagy：core molecular machinery and signaling regulation. Current Opinion in Cell Biology，2010，22（2）：124-131

[5] Su T，Li X，Yang M Y，Shao Q，Zhao Y X，Ma C L，Wang P P. Autophagy：an intracellular degradation pathway regulating plant survival and stress response. Frontiers in Plant Science，2020，11：164

[6] Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy：two ubiquitin-like systems. Nature Reviews Molecular Cell Biology，2001，2（3）：211-216

[7] Huang W P，Scott S V，Kim J，Klionsky D J. The itinerary of a vesicle component，Aut7p/Cvt5p，terminates in the yeast vacuole via the Autophagy/Cvt pathways. Journal of Biological Chemistry，2000，275（8）：5845-5851

[8] Kirisako T，Baba M，Ishihara N，Miyazawa K，Ohsumi M，Yoshimori T，Noda T，Ohsumi Y. Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. The Journal of Cell Biology，1999，147（2）：435-446

[9] Kim S H，Kwon C，Lee J H，Chung T. Genes for plant autophagy：functions and interactions. Molecules and Cells，2012，34，413-423

[10] Wang P，Mugume Y，Bassham D C. New advances in autophagy in plants：regulation，selectivity and function. Seminars in Cell & Developmental Biology，2018，80：113-122

[11] Minina E A，Moschou P N，Vetukuri R R，Sanchez V V，Cardoso C，Liu Q，Bozhkov P V. Transcriptional stimulation of rate-limiting components of the autophagic pathway improves plant fitness. Journal of Experimental Botany，2018，69（6）：1415-1432

[12] Chung T，Phillips A R，Vierstra R D. *ATG8* lipidation and *ATG8*-mediated autophagy in *Arabidopsis* require *ATG12* expressed from the differentially controlled *ATG12a* and *ATG12b* loci. The Plant Journal，2010，62：483-493

[13] Phillips A R, Suttangkakul A, Vierstra R D. The *ATG12*-conjugating enzyme ATG10 is essential for autophagic vesicle formation in *Arabidopsis thaliana*. Genetics, 2008, 178: 1339-1353

[14] Zhou J, Yu J Q, Chen Z X. The perplexing role of autophagy in plant innate immune responses. Molecular Plant Pathology, 2014, 15(6): 637-645

[15] Zhou J, Wang J, Yu J Q, Chen Z. Role and regulation of autophagy in heat stress responses of tomato plants. Frontiers in Plant Science, 2014, 5: 174

[16] Yang M, Ismayil A, Liu Y L. Autophagy in plant-virus interactions. Annual Review of Virology, 2020, 7(1): 403-419

[17] Patel S, Dineshkumar S P. Arabidopsis *ATG6* is required to limit the pathogen-associated cell death response. Autophagy, 2008, 4: 20

[18] Hofius D, Schultzlarsen T, Joensen J, Tsitsigiannis D I, Petersen N H T, Mattsson O, Jørgensen L B, Jones J D G, Mundy J, Petersen M. Autophagic components contribute to hypersensitive cell death in *Arabidopsis*. Cell, 2009, 137: 773-783

[19] Lenz H D, Haller E, Melzer E, Kober K, Wurster K, Stahl M, Bassham D C, Vierstra R D, Parker J E, Bautor J. Autophagy differentially controls plant basal immunity to biotrophic and necrotrophic pathogens. The Plant Journal, 2011, 66: 818-830

[20] Lai Z, Wang F, Zheng Z, Fan B, Chen Z. A critical role of autophagy in plant resistance to necrotrophic fungal pathogens. Plant Journal for Cell & Molecular Biology, 2011, 66: 953-968

[21] Xia K F, Liu T, Ou Y J, Wang R, Fan T, Zhang M Y. Genome-wide identification, classification, and expression analysis of autophagy-associated gene homologues in rice (*Oryza sativa* L.). DNA Research, 2011, 18: 363-377

[22] Kurusu T, Koyano T, Hanamata S, Kubo T, Noguchi Y, Yagi C. *OsATG7* is required for autophagy-dependent lipid metabolism in rice postmeiotic anther development. Autophagy, 2014, 10(5): 878-888

[23] Yu J, Zhen X, Li X, Li N, Xu F. Increased autophagy of rice can increase yield and nitrogen use efficiency (NUE). Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 584

[24] Shin J H, Yoshimoto K, Ohsumi Y, Jeon J S, An G. *OsATG10b*, an autophagosome component, is needed for cell survival against oxidative stresses in rice. Molecules and Cells, 2009, 27: 67-74

[25] Zhen X, Zheng N, Yu J, Bi C, Xu F. Autophagy mediates grain yield and nitrogen stress resistance by modulating nitrogen remobilization in rice. PLoS ONE, 2021, 16(1): e0244996

[26] Zhen X, Li X, Yu J, Xu F. *OsATG8c*-mediated increased autophagy regulates the yield and nitrogen use efficiency in rice. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(19): 4956

[27] 曹妮，季芝娟，曾宇翔，郑安福，方晶璟，王盛，吴凯雄，陈红，杨长登，梁燕. 定向改良超级早稻中早 39 稻瘟病抗性. 植物遗传资源学报, 2020, 21(4): 809-818
Cao N, Ji Z J, Zeng Y X, Zheng A F, Fang J J, Wang S, Wu K X, Chen H, Yang C D, Liang Y. Improving the blast resistance of super early-season rice variety Zhongzao39. Journal of Plant Genetic Resources, 2020, 21(4): 809-818

[28] Kawano Y, Akamatsu A, Hayashi K. Activation of a Rac GTPase by the NLR family disease resistance protein Pit plays a critical role in rice innate immunity. Cell Host Microbe, 2010, 7(5): 362-375

[29] Hanamata S, Kurusu T, Kuchitsu K. Roles of autophagy in male reproductive development in plants. Frontiers in Plant Science, 2014, 5: 00457

[30] Yan Y, Wang P, He C, Shi H. *MeWRKY20* and its interacting and activating autophagy-related protein 8 (MeATG8) regulate plant disease resistance in cassava. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 494(1-2): 20-26

[31] Yue J Y, Sun H, Zhang W, Pei D, He Y, Wang H Z. Wheat homologs of yeast *ATG6* function in autophagy and are implicated in powdery mildew immunity. BMC Plant Biology, 2015, 15: 95

[32] Chisholm S T, Coaker G, Day B, Staskawicz B J. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. Cell, 2006, 124(4): 803-814

[33] Ronald P C, Beutler B. Plant and animal sensors of conserved microbial signatures. Science, 2010, 330: 1061-1064

[34] Jones J D, Dangl J L. The plant immune system. Nature, 2006, 444: 323-329

[35] Tsuda K, Katagiri F. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. Current Opinion in Plant Biology, 2010, 13: 459-465

[36] Howden J M, Huitema E. Effector-triggered posttranslational modifications and their role in suppression of plant immunity. Frontiers in Plant Science, 2012, 3: 160

[37] Qi Y, Tsuda K, Glazebrook J, Katagiri F. Physical association of pattern-triggered immunity (PTI) and effector-triggered immunity (ETI) immune receptors in *Arabidopsis*. Molecular Plant Pathology, 2011, 12(7): 702-708

[38] Munch D, Rodriguez E, Bressendorff S, Park O K, Hofius D, Petersen M. Autophagy deficiency leads to accumulation of ubiquitinated proteins, ER stress, and cell death in *Arabidopsis*. Autophagy, 2014, 10: 1579-1587

[39] Han S, Wang Y, Zheng X, Jia Q, Zhao J, Bai F, Hong Y, Liu Y. Cytoplastic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases interact with ATG3 to negatively regulate autophagy and immunity in Nicotiana benthamiana. Plant Cell, 2015, 27: 1316-1331

[40] Henry E, Fung N, Liu J, Drakakaki G, Coaker G. Beyond glycolysis: GAPDHs are multi-functional enzymes involved in regulation of ROS, autophagy, and plant immune responses. PLoS Genetics, 2015, 11(4): e1005199

[41] Xu G, Wang S, Han S, Xie K, Wang Y, Li J, Liu Y. Plant Bax Inhibitor-1 interacts with ATG6 to regulate autophagy and programmed cell death. Autophagy, 2017, 13(7): 1161-1175

[42] Leary A Y, Savage Z, Tumtas Y, Bozkurt T O. Contrasting and emerging roles of autophagy in plant immunity. Current Opinion in Plant Biology, 2019, 52: 46-53