

拟南芥 T-DNA 插入株系 SALK_037453 叶发育突变位点的鉴定和分析

司旭阳, 李文静, 张洪艳, 张 科, 潘延云

(河北农业大学 河北省植物生理与分子病理学重点实验室, 河北 保定 071000)

摘要: 对来自 Salk 库的拟南芥 T-DNA 插入突变体 SALK_037453 的表型分析发现, 该突变体株系因莲座叶叶柄较短而呈现聚集表型。遗传分析和 PCR 检测显示, SALK_037453 突变体的表型与网站提供的 T-DNA 插入位点所在基因不连锁, 应是由另外的未知插入位点的 T-DNA 引起的。为了寻找该位点, 鉴定导致莲座叶聚集表型的基因, 本研究利用 TAIL-PCR 的方法, 鉴定出与突变表型连锁的 T-DNA 插入位点, 位于基因 *At4G39400* (*AtBR11*) 和 *At4G39403* (*AtPLS*) 之间。进一步利用 qRT-PCR 的方法检测, 发现该位点由于 T-DNA 的插入, 同时影响了 *AtBR11* 和 *AtPLS* 的转录水平的表达。该研究为探索叶发育的过程提供了新的候选基因, 并为进一步阐明 *AtBR11* 和 *AtPLS* 的生物学功能提供了新材料。

关键词: SALK_037453; TAIL-PCR; 叶发育; 基因表达

中图分类号: Q943.2

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

文献标志码: A



Identification and analysis of leaf development mutation sites in *Arabidopsis* T-DNA insertion line SALK_037453

SI Xuyang, LI Wenjing, ZHANG Hongyan, ZHANG Ke, PAN Yanyun

(Key Laboratory of Hebei Province for Plant Physiology and Molecular Pathology,
Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China)

Abstract: An *Arabidopsis* T-DNA insertion mutant SALK_037453 from the Salk library showed short petioles and defective leaf development. The genetic analysis and PCR detection showed that the phenotype of the Salk_037453 mutant was not linked to the insertion site provided by the website and should be caused by another T-DNA at an unknown insertion site. In order to find this site and identify the genes that cause the rosette leaf aggregation phenotype, TAIL-PCR was used to identify the sites and it was found that the T-DNA located between the two genes, *At4G39400* (*AtBR11*) and *At4G39403* (*AtPLS*). Furthermore, real-time PCR results showed that transcription level of the both genes had changed due to the inserted T-DNA. This study provides new candidate genes for exploring the process of leaf development and provides new materials for further elucidating the biological functions of *AtBR11* and *AtPLS*.

Keywords: SALK_037453; TAIL-PCR; leaf development; gene expression

收稿日期: 2020-03-01

基金项目: 河北省自然科学基金项目(C2017204095); 河北省高等学校科学技术研究项目(ZD2017039)。

第一作者: 司旭阳(1993-), 女, 河北邢台人, 硕士研究生, 主要从事植物细胞生物学研究。E-mail: sixuyanglove@163.com

通信作者: 潘延云(1963-), 女, 河北保定人, 博士, 教授, 主要从事植物分子细胞生物学研究。E-mail: pyycell@163.com

张 科(1987-), 男, 河北邯郸人, 博士, 讲师, 主要从事作物抗逆生理及衰老调控研究。

E-mail: zhangke0126@163.com

本刊网址: <http://hauxb.hebau.edu.cn:8080/CN/volumn/home.shtml>

基因突变是研究基因功能的最重要策略之一^[1-2]。突变体可以通过网站 T-DNA Express (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/T-DNA-Express>) 订购。但是, 通过转基因技术获得的 T-DNA 插入基因组的拟南芥, 插入的 T-DNA 拷贝数未必是 1 个, 而网站提供的信息只是其中 1 个的 T-DNA 插入位点。目标基因的突变体的表型是否与该基因连锁, 则需要进一步证实^[3-5]。

肌醇磷脂依赖的磷脂酶 C (PI-PLC) 是肌醇磷脂信号系统中的关键酶之一, 拟南芥中有 9 个不同的亚型, 不同的亚型可能具有不同的生物学功能^[6-7]。本实验室为研究拟南芥 *AtPLC3* 亚型的功能, 购得 2 株 T-DNA 插入 *AtPLC3* 不同位点的突变体 SALK_037453 (本室命名为 *atplc3-1*) 和 SALK_054406 (本室命名为 *atplc3-2*), 网站给的基因注释显示, 这 2 个突变体的 T-DNA 均分别插入到 *AtPLC3* 基因的不同的外显子区域。表型分析发现, 这 2 个突变体具有不同的表型, 其中 *atplc3-1* 具有叶发育缺陷的表型, 而 *atplc3-2* 却无此表型, 意味着 *atplc3-1* 的表型可能与 *AtPLC3* 基因不连锁, 即 SALK_037453 突变体中可以存在其他的 T-DNA 插入位点。拟南芥莲座叶的“聚集”是发育表型之一, 为了确认造成该发育异常的突变基因, 本研究利用 TAIL-PCR 的方法, 分析鉴定 SALK_037453 突变株中其他 T-DNA 插入位点的基因序列, 并确认该突变位点与叶发育表型的相关性, 将为基因转录表达调控提供新的调控序列, 并为拟南芥叶片发育机制的研究提供新的候选基因和突变体材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料及试剂

野生型拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 生态型为 *Columbia* (Col), 本实验室保存, SALK_037453 和 SALK_054406 购自 Salk Institute Genomic Analysis Laboratory。dNTP 和 Taq DNA 聚合酶为 TaKaRa 公司产品; 植物 RNA 快速提取试剂盒来自 Aidlab, 反转录试剂盒以及荧光定量试剂和其他用品来自 Vazyme; 测序由华大生物工程 (北京) 有限公司完成。

1.2 拟南芥的种植及基因组 DNA 的提取

将拟南芥的种子表面灭菌后播种在 1/2 MS 培养基, 冰箱 4 ℃ 放置 3 d 后, 在 22 ℃ 16 h 光照和 8 h 黑暗条件下培养。待幼苗长出真叶后移栽到土培

培养基 (营养土: 蛭石 = 1: 3) 中培养。

剪取拟南芥幼苗叶片, 以 CTAB 法提取基因组 DNA, 用于突变体纯合植株的鉴定和 TAIL-PCR 分析。

1.3 拟南芥突变体纯合体的 PCR 鉴定

以 1 μL 拟南芥突变体基因组 DNA 为模板, 选取 T-DNA 插入位点两侧的基因序列设计引物 (LB 和 RB), 利用 T-DNA 左臂引物 LBb1.3 与 LB 引物进行 PCR, 鉴定 T-DNA 插入突变纯合体。如果只有 LB 和 LBb1.3 能扩增出目的条带, 则为 T-DNA 插入纯合体。PCR 鉴定引物见表 1。

表 1 突变体 PCR 鉴定引物

Table 1 Primers for mutant PCR identification

引物名称 Primer name	序列 5' - 3' Sequence 5' - 3'
LB	TACAAGCCGGGTCAGGGATA
RB	CAGGCGAAGGTCCATTCT
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTCGGAAC

1.4 RT-PCR 反应

取生长 10 d 的拟南芥幼苗, 根据试剂盒说明提取 RNA, 反转录成 cDNA 作为扩增的模板, RT-PCR 的引物见表 2。

表 2 RT-PCR 引物序列

Table 2 Primers for RT-PCR

引物名称 Primer name	序列 5' - 3' Sequence 5' - 3'
<i>AtPLC3</i> F	CGCTACCTCTTCAGCGATACC
<i>AtPLC3</i> R	CGTACCCACATCCACCATTC
<i>Actin7</i> F	AGGCACCTCTTAACCTAAAGC
<i>Actin7</i> R	GGACAACGGAATCTCTCAGC

1.5 TAIL-PCR 扩增 T-DNA 旁侧序列

T-DNA 的序列见 <http://signal.salk.edu/cgi-bin/T-DNA-Express>, 根据 T-DNA 序列设计 TAIL-PCR 反应的特异性引物见表 3。另外 3 条随机引物见表 4。TAIL-PCR 反应体系和反应条件参考文献 [8]。TAIL-PCR 获得的 DNA 片段进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 将大小合适的条带送测序公司测序。

表 3 TAIL-PCR 反应的特异性引物序列

Table 3 Specific primer for TAIL-PCR reaction

特异性引物 Specific primer	序列 5' - 3' Sequence 5' - 3'
LBb1.1	GCATGACGTTATTTATGAGATGGGT
LBb1.2	TCCTTCGCTTTCTTCCCTTC
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTCGGAAC

表 4 TAIL-PCR 反应的随机兼并引物序列
Table 4 Random annexation primer sequence for TAIL-PCR reaction

随机兼并引物 Random annexation primers	序列 5'-3' Sequence 5'-3'
AD1.1	(AGCT) TCGA(G/C)T(A/T)T(G/C) G(A/T)GTT
AD1.2	NGTCGA(G/C)(A/T)GANA(A/T)GAA
AD1.3	(A/T)GTGNAG(A/T)ANCA(ANCA)
AD1.4	AG(A/T)GNAG(A/T)ANCA(A/T)AGG

1.6 顺式作用元件分析

用 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) 和 Plant CARE (<http://bioinformatics.ps.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 2 个数据库分析序列的顺式作用元件。

1.7 实时定量 PCR 检测 *AtBR11* 和 *AtPLS* 基因的表达

选取生长 28 d 的幼苗, 利用 EASYspin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒提取总 RNA, 进一步利用 HiScript® III Reverse Transcriptase 反转录为 cDNA, 用于实时定量 PCR 的检测。实时定量 PCR 的引物为: *AtBR11-F*: 5' TGTCTCTGAGCTGGTTTCGCT 3' *AtBR11-R*: 5' AGAGCCTAAGCTCGAAGGGA 3' *AtPLS-F*: 5' GGAACACGAAATCCGAAGAGC 3' *AtPLS-R*: 5' CGCCAACATCACCACAACAAG 3'; 内参基因引物: *Actin2-F*: 5' CGTACAACCGGTAT-TGTGCT 3'; *Actin2-R*: 5' GATGTCTCTTACAATTT-CCCGCT 3', qRT-PCR 条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 10 s; 60 °C 30 s (40 个循环)。

2 结果与分析

2.1 SALK_037453 突变体中未知序列的 T-DNA 插入造成叶片发育缺陷

获得 SALK_037453 和 SALK_054406 突变体后, 利用方法 1.3 鉴定和筛选 2 种突变体的纯合体。结果显示, 与网站提供的注释相同, SALK_037453 的 T-DNA 插入到第 4 个外显子区, 破坏了 *AtPLC3* 基因的结构, 命名为 *atplc3-1*, SALK_054406 的 T-DNA 插入到第 3 个外显子区, 命名为 *atplc3-2* (图 1A); RT-PCR 分析显示, 2 个不同位点的插入均破坏了 *AtPLC3* 基因的转录表达 (图 1B)。

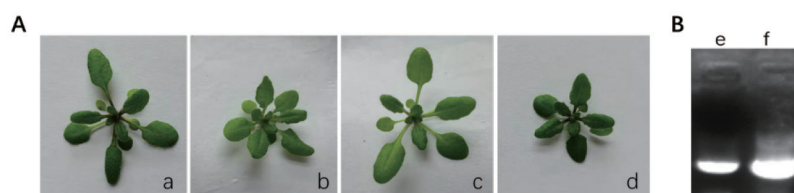
进一步对 2 种突变体进行培养和表型观察, 结果发现, *atplc3-1* 表现出莲座叶聚集的发育表型, 而 *atplc3-2* 与野生型拟南芥相同 (图 2A)。该表型可能不是由于 *AtPLC3* 基因的表达缺失引起的, *atplc3-1* 中可能还存在其他位点的 T-DNA 插入, 进而导致某未知基因的突变, 引起了该叶发育缺陷的表型。为了进一步确认该结论, 首先将 *plc3-1* 与 Col 杂交, 发现在 F₂ 代中无 T-DNA 插入的 *AtPLC3* 植株 (命名为 SALK_037453X) 中有相同的叶发育缺陷表型 (图 2A), 并且利用 T-DNA 引物序列对 SALK_037453X 的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 获得阳性结果 (图 2B)。证实 SALK_037453X 中存在其他的 T-DNA 插入位点, 并且该插入可能影响了某未知基因的功能, 从而对叶片发育造成影响。因此利用 TAIL-PCR 检测新的插入位点, 将新插入位点命名为 X。



注: A: 外显子用实框表示; T-DNA 插入的位置由三角形表示。

图 1 SALK_037453 (*atplc3-1*) 和 SALK_054406 (*atplc3-2*) 的 T-DNA 插入位点 (A) 及 *AtPLC3* 基因的表达 (B)

Fig.1 T-DNA insertion sites of SALK_037453 (*atplc3-1*), SALK_054406 (*atplc3-2*) (A) and the expression of *AtPLC3* gene (B)



注: a 为 Col 的野生型植株; b 为 *atplc3-1*; c 为 *atplc3-2*; d 为 SALK_037453X; e 为 SALK_037453X 中的 T-DNA; f 为 *atplc3-1* 中的 T-DNA (阳性对照)。

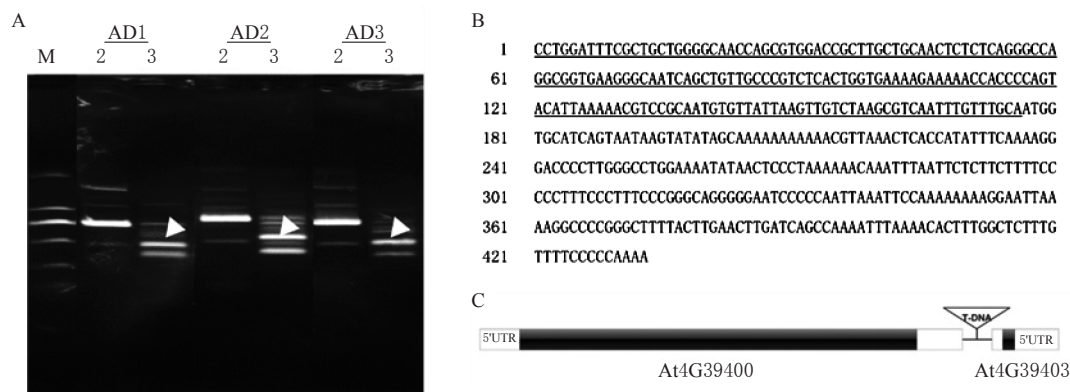
图 2 SALK_037453 (*atplc3-1*), SALK_054406 (*atplc3-2*) 和 SALK_037453X 的叶发育表型 (A) 及 T-DNA 序列检测 (B)

Fig.2 Leaf development phenotypes of SALK_037453 (*atplc3-1*), SALK_054406 (*atplc3-2*) and SALK_037453X (A) and the detection of T-DNA sequence (B)

2.2 利用 TAIL-PCR 捕获 SALK_037453X 中未知 T-DNA 插入位点 X

本试验中以 SALK_037453X 拟南芥基因组 DNA 为模板, 利用 TAIL-PCR 技术以 3 个 T-DNA 序列中的特异引物和 4 个随机兼并引物扩增 T-DNA 侧翼序列, 发现特异引物分别与 AD1, AD2, AD3 组合条件下可以获得清晰的条带, 且比第 2 轮小

300 bp (图 3A), 符合 TAIL-PCR 的要求。切下符合要求的 3 个 (图 3A 中箭头所指) 条带并送测序, 比对后发现 3 条带的序列是相同的, 进一步在拟南芥基因组中 BLAST, 获得了 T-DNA 插入的 X 位点两侧区域的碱基序列 (图 3B), 该序列位于基因 At4G39400 (AtBRI1) 和 At4G39403 (AtPLS) 之间, 属于基因的调控区 (图 3C)。



注: A. TAIL-PCR 条带; M: 2000 marker; 2,3 代表第 2,3 轮程序; B. TAIL-PCR 条带的碱基序列。下划线为 T-DNA 序列; C. T-DNA 插入的 X 位点的位置。黑框代表外显子, 白框为 UTR 区, T-DNA 插入到 2 个基因的调控区。

图 3 SALK_037453X 中 T-DNA 插入的序列

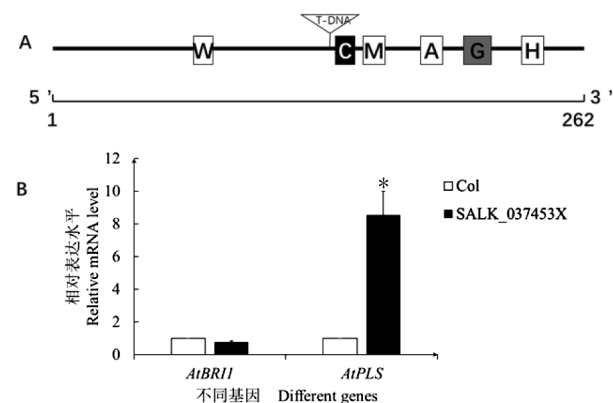
Fig.3 Sequence of T-DNA insertion in SALK_037453X

获得 X 位点的序列后, 进一步通过遗传杂交结合 PCR 检测的方法获取仅有 X 位点 T-DNA 插入的 SALK_037453X 的纯合体, 即 SALK_037453X 中的 T-DNA 只有 1 个拷贝, 且插入在 X 位点, 并观察表型。结果显示 SALK_037453X 纯合体也呈现莲座叶聚集表型 (图 2A), 证实该突变表型仅由 T-DNA 在 X 位点的插入造成的。

2.3 T-DNA 在 X 位点的插入突变影响其上下游基因的表达水平

进一步分析 X 位点所在的序列。X 位点的 T-DNA 插入在 2 个基因的间区, 对上下游基因的结构均未造成破坏 (图 3C)。而 2 个基因之间的正常序列仅 262 bp, 既是 At4G39400 的 3' 调控区, 也是 At4G39403 基因的 3' 调控区。利用 PLACE 和 Plant CARE 对该序列进行了生物信息学分析, 结果显示, 该 262 bp 的序列中, 具有多种调控元件, 包括多种胁迫响应元件以及转录增强子等调控序列 (表 5)。T-DNA 序列插入的位点在转录增强子 CAAT box 的上游 (图 4A), 由此, 4.5 kb 长的 T-DNA 不仅使得 2 个基因之间的调控区域大大增长, 且造成了上游基因 At39400 远离了该 CAAT box。进一步利用荧光定量 PCR 检测了 SALK_037453X

中 At4G39400 (AtBRI1) 和 At4G39403 (AtPLS) 基因的转录水平的表达, 发现与野生型拟南芥相比, SALK_037453X 中 AtBRI1 基因表达下调了 22.9%, 而 AtPLS 基因表达上调了 8 倍 (图 4B)。



注: A: X 位点序列分析。调控元件的相对位置用大写字母表示, 详见表 5, 倒三角表示 T-DNA 插入位置, 激素反应顺式元件为灰色框, 应激反应顺式元件为白色框, 增强子元件为黑色框。

图 4 X 位点的序列分析 (A) 及 T-DNA 插入后对上下游基因表达的影响 (B)

Fig.4 Sequence analysis of X locus (A) and the effect of upstream and downstream gene expression after T-DNA insertion (B)

表 5 SALK_037453X 顺式元件分析
Table 5 Cis-element analysis of SALK_037453X

类别 Class	符号 Symbol	顺式作用元件 Cis-element	序列 * Sequence*	功能 Function
转录元件	C	CAAT box	CAAT	启动子和增强子区域共有顺式作用元件
植物激素响应	G	GARE	TAACRWR	赤霉素反应元件
胁迫响应	H	HSE	CCAAT	热激反应元件
	A	GT-1	GRWAAW	光响应元件
	M	MBS	CNGTTR	MYB 结合位点参与干旱诱导
	W	W box	TGAC	WRKY 蛋白特异性结合位点, 参与病原体应答反应

注: *N—A, C, G or T; R—A or G; W—A or T。

3 结论与讨论

叶片是植物的重要器官, 植物叶片发育机制的阐明是以对所有参与叶片发育的基因功能的了解为基础的。尽管利用正向遗传学已经产生了大量的拟南芥叶片发育受损突变^[9], 但反向遗传学成为继拟南芥基因组测序之后的首选方法^[10]。研究人员进行了大规模的表型研究, 通过正向和反向的遗传筛选, 鉴定出数百个参与叶片发育的拟南芥突变体, 提高了对叶发育过程的认识^[11-13]。但是, 目前鉴定的叶发育相关基因在基因组中尚未饱和, 仍需要发掘更多的参与叶片发育的基因, 以及对已知基因的功能做更深入的分析。为此 Wilson-Sánchez 等将已知数据存档在一个名为 PhenoLeaf 的在线数据库 (<http://genetics.umh.es/PhenoLeaf>) 中^[14]。

拟南芥叶的发育表型分为莲座叶表型、叶片表型、叶缘和叶柄表型等几个方面; 其中莲座叶有大小、聚集和疏松等不同表型^[14]。本研究从 Salk 网站获得的突变体 SALK_037453 的莲座叶即为聚集型表型。网站信息及 RT-PCR 结果均显示, SALK_037453 突变体是 *AtPLC3* 基因表达缺陷突变体, 尽管 *AtPLCs* 家族的基因参与了拟南芥生长发育和胁迫应答等多方面的生理过程^[15], 但是本研究的遗传分析结果显示, SALK_037453 的莲座叶聚集的表型不是由于 *AtPLC3* 基因表达缺失造成, 而是由该突变体中还有一段 T-DNA 插入到了 *At4G39400* (*AtBRI1*) 和

At4G39403 (*AtPLS*) 2 个基因之间引起的。

At4G39400 编码的基因 *AtBRI1* (其他还有文献命名为 *BIN1*, *CABBAGE2*, *CBB2*, *DWARF2*, *DWF2* 等) 编码质膜定位的富含亮氨酸的受体激酶, 其配体是油菜素内酯。*AtBRI1* 与配体结合后激酶结构域被磷酸化从而激活。油菜素内酯是重要的植物激素之一, 而油菜素内酯信号途径在调控植物多种发育和应答反应中发挥着重要的作用^[16]。作为该信号途径的受体, *AtBRI1* 被广泛关注, 迄今有该基因不同部位被破坏的多种突变体被用于对该受体作用机制的研究^[17-19], 而其表达缺失的突变表型之一就是形成聚集型的莲座叶^[20], 本试验获得的 SALK_037453X 莲座叶的突变表型, 即与该突变体中 *AtBRI1* 基因的表达下调相关。而且其表达下调是由于该基因的 3' 调控区引起的, 这为目前对该基因功能的阐释提供了新的材料。

At4G39403 编码 1 个 36 个氨基酸的短肽, 被命名为 *Arabidopsis thaliana* *POLARIS*, 简称为 *AtPLS*。*AtPLS* 是根系和叶脉的正常发育所必需的, 并且参与了乙烯、生长素等激素对植物的调节反应, 但其作用的机制尚不清楚^[20-21]。无论是乙烯还是生长素, 对植物生长发育的调控都是非常重要的, 而本研究获得的 SALK_037453X 突变体, 是 *AtPLS* 转录水平上升 8 倍之多的超表达体, 据目前对 *AtPLS* 功能的了解, 该变化引起叶发育的变化也是有理论依据的。因此, SALK_037453X 突变体材料对于深入研究 *AtPLS* 的功能具有重要的价值。

基因组计划完成后, 人们发现基因组序列中除了编码蛋白的基因外, 还有大量的非编码蛋白的基因及更多的未知功能的序列。因此之后启动了“DNA 元件百科全书”计划 (Encyclopedia of DNA Elements, ENCODE)。ENCODE 计划的研究对象除了编码蛋白基因外, 还有非编码蛋白基因和调控区域等 DNA 元件。多年来, 该计划确定了许多之前不为人知的 DNA 转录启动位点, 并提出调控区域也有可能位于 DNA 转录启动位点的下游等新观点。本研究获得的 SALK_037453X 突变体, T-DNA 的插入改变了 2 个基因之间的调控区域的结构, 从而导致 2 个基因的表达均发生变化, 暗示了 2 个基因之间的 262 个碱基中, 存在着重要的调控基序。因此该突变体也为调控序列的研究提供了新的材料。

参考文献:

- [1] O' Malley R C, Barragan C C, Ecker J R. A user' s guide to the *Arabidopsis* T-DNA insertion mutant collections [J] . Methods Mol Biol, 2015, 1284:323–342.
- [2] O' Malley R C, Ecker J R. Linking genotype to phenotype using the *Arabidopsis* unimutant Collection [J] . Plant J, 2010, 61(6):928–940.
- [3] Rodríguez M C, Wawrzyńska A, Sirko A. Intronic T-DNA insertion in *Arabidopsis* NBR1 conditionally affects wild-type transcript level [J] . Plant Signal Behav, 2014, 9(12):e975659.
- [4] Frank U, Kublik S, Mayer D, et al. A T-DNA mutant screen that combines high-throughput phenotyping with the efficient identification of mutated genes by targeted genome sequencing [J] . BMC PLANT BIOL, 2019, 19(1):539.
- [5] Jupe F, Rivkin A C, Michael T P, et al. The complex architecture and epigenomic impact of plant T-DNA insertions [J] . PLoS Genet, 2019, 15(1):e1007819.
- [6] Pokotylo I, Kolesnikov Y, Kravets V, et al. Plant phosphoinositide-dependent phospholipases C: variations around a canonical theme [J] . Biochimie, 2014, 96:144–157.
- [7] Singh A, Bhatnagar N, Pandey A, et al. Plant phospholipase C family: Regulation and functional role in lipid signaling [J] . Cell Calcium, 2015, 58(2):139–146.
- [8] 田蕾, 郭妍君, 任丽, 等. 利用 TAIL-PCR 技术分析拟南芥 *Atlg52910* 突变体插入位点的侧翼序列 [J] . 中国野生植物资源, 2016, 35(4):23–25.
- [9] Serrano-Cartagena J, Robles P, Ponce M R, et al. Genetic analysis of leaf form mutants from the *Arabidopsis* Information Service collection [J] . Mol Gen Genet, 1999, 261:725–739.
- [10] Lloyd J, Meinke D A. comprehensive dataset of genes with a loss-of-function mutant phenotype in *Arabidopsis* [J] . Plant Physiol, 2012, 158(3):1115–1129.
- [11] Ajjawi I, Lu Y, Savage L J, et al. Large-scale reverse genetics in *Arabidopsis*: case studies from the Chloroplast 2010 Project [J] . Plant Physiol, 2010, 152(2):529–540.
- [12] Myouga F, Akiyama K, Motohashi R, et al. The Chloroplast Function Database: a large-scale collection of *Arabidopsis* Ds/Spm- or T-DNA tagged homozygous lines for nuclear-encoded chloroplast proteins, and their systematic phenotype analysis [J] . Plant J, 2010, 61(3):529–542.
- [13] Myouga F, Akiyama K, Tomonaga Y, et al. The Chloroplast Function Database II: a comprehensive collection of homozygous mutants and their phenotypic/genotypic traits for nuclear-encoded chloroplast proteins [J] . Plant Cell Physiol, 2013, 54(2):e2.
- [14] Wilson-Sánchez D, Rubio-Díaz S, Muñoz-Viana R, et al. Leaf phenomics: a systematic reverse genetic screen for *Arabidopsis* leaf mutants [J] . Plant J, 2014, 65(5):878–891.
- [15] Zhang Q, van Wijk R, Shahbaz M, et al. *Arabidopsis* Phospholipase C3 is Involved in Lateral Root Initiation and ABA Responses in Seed Germination and Stomatal Closure [J] . Plant Cell Physiol, 2018, 59(3):469–486.
- [16] Yang B J, Lin W H, Fu F F, et al. Receptor-like protein ELT1 promotes brassinosteroid signaling through interacting with and suppressing the endocytosis-mediated degradation of receptor BRI1 [J] . Cell Res, 2017, 27(9):1182–1185.
- [17] Holzwart E, Wanke F, Glöckner N, et al. A mutant allele uncouples the brassinosteroid-dependent and independent functions of BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 [J] . Plant Physiol, 2019, 182(1):669–678.
- [18] Chao S, Kan Y, Jian Ting H, et al. Scanning for New BRI1 Mutations via TILLING Analysis [J] . Plant Physiol, 2017, 174(3):1881–1896.
- [19] Zhang X, Zhou L, Qin Y, et al. A Temperature-Sensitive Misfolded bril-301 Receptor Requires Its Kinase Activity to Promote Growth [J] . Plant Physiol, 2018, 178(4):1704–1719.
- [20] Casson S A, Chilley P M, Topping J F, et al. The *POLARIS* Gene of *Arabidopsis* Encodes a Predicted Peptide Required for Correct Root Growth and Leaf Vascular Patterning [J] . The Plant Cell, 2002, 14(8):1705–1721.
- [21] Chilley P M, Casson S A, Tarkowski P, et al. The *POLARIS* peptide of *Arabidopsis* regulates auxin transport and root growth via effects on ethylene signaling [J] . The Plant Cell, 2006, 18(11):3058–3072.

(编辑: 李 川)