

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2013.00626

## 水稻矮秆脆性突变体 *dbc1* 的鉴定与基因定位

桑贤春 杜川 王晓雯 杨正林 凌英华 赵芳明 李云峰 何光华\*

西南大学水稻研究所 / 转基因植物与安全控制重庆市重点实验室 / 南方山地农业教育部工程研究中心, 重庆 400716

**摘要:** 利用 EMS 诱变籼型水稻恢复系缙恢 10 号, 获得一个稳定遗传的矮化脆性突变体 *dbc1*, 苗期即表现矮化、叶片变脆, 一直保持到成熟。与原始亲本相比, 突变体的各节间均显著缩短, 株高仅 58.93 cm, 略有包穗, 属于 dn 型矮化变异, 对赤霉素的敏感性显著下降, 有效穗、千粒重和结实率无明显变化, 穗长、穗粒数和实粒数则极显著下降。进一步分析发现, *dbc1* 的茎秆和叶片的载荷强度极显著下降, 纤维素含量无变化, 木质素含量则略有下降, 差异达显著水平。遗传分析表明该性状受 1 对隐性核基因调控, 利用 886 株西农 1A/*dbc1* 的 F<sub>2</sub> 变异单株, 最终把 *DBC1* 基因定位在第 2 染色体 SSR 标记 RM13943 和 RM13952 之间, 物理距离仅 197 kb, 含有 52 个注释基因。这为下一步调控基因的克隆和 *dbc1* 材料的育种应用奠定了基础。

**关键词:** 水稻; 矮秆; 脆性; 赤霉素钝感; 基因定位

## Identification and Gene Mapping of Dwarf and Brittle Culm Mutant *dbc1* in *Oryza sativa*

SANG Xian-Chun, DU Chuan, WANG Xiao-Wen, YANG Zheng-Lin, LING Ying-Hua, ZHAO Fang-Ming, LI Yun-Feng, and HE Guang-Hua\*

Rice Research Institute of Southwest University / Chongqing Key Laboratory of Application and Safety Control of Genetically Modified Crops / Engineering Research Center of South Upland Agriculture, Ministry of Education, Chongqing 400716, China

**Abstract:** One dwarf and brittle culm mutant *dbc1* was identified from the progeny of restorer line Jinhui10 which seeds were treated by ethyl methanesulfonate (EMS). From the seedling stage to the mature stage, *dbc1* showed obvious characteristics of dwarfism and frangibility. In detail, the mutant shortened each internode with a plant height of 58.93 cm, belonging to the dn type of dwarfism mutation. Treated by GA<sub>3</sub>, the *dbc1* showed more insensitive compared with its original parent Jinhui10. One thousand grain weight, seed-setting rate, and tiller numbers did not change while panicle length, grain number per panicle and full grain number decreased significantly in the mutant. Further analysis showed that mechanical strengths declined significantly in the mutational leaf blades and culms. Interestingly, cellulose content was not changed and lignin content slightly decreased compared with those of wild type, with a significant difference at  $P < 0.05$  between them. Genetic analysis indicated that the mutation was controlled by one recessive nuclear gene. In this paper, *DBC1* gene was finally mapped between SSR markers RM13943 and RM13952 on chromosome 2 based on 886 F<sub>2</sub> mutational plants of Xinong1A/*dbc1*. In the restricted region, the physical distance was 197 kb and contained 52 annotated genes. These results provide a foundation for *DBC1* gene cloning and its application in the molecular breeding.

**Keywords:** Rice (*Oryza sativa*); Dwarf; Brittle culms; Gibberellins-insensitive; Gene mapping

茎秆不仅支撑着叶片和稻穗, 而且是植株生长所需养料和水分输送的通道, 是水稻株型的重要组成部分。研究茎秆发育机理对于从分子水平进行株型改良, 进而提高单产和品质具有重要的意义。一般来说, 茎秆性状包括植株高度、机械强度、形状

及分枝多寡等, 其中株高和机械强度尤为重要的。

株高是水稻重要的农艺性状之一, 半矮秆基因 *sd-1* 的应用极大提高了水稻单产, 在“绿色革命”中起到了关键性的作用。目前, 在水稻中至少鉴定了 80 多个矮秆突变体, 包括小粒矮秆、畸形矮秆、半

本研究由国家转基因生物新品种培育科技重大专项(2011ZX08001-002)和重庆市科技攻关计划项目(CSTC2012GGc80002)资助。

\* 通讯作者(Corresponding author): 何光华, E-mail: hegh@swu.edu.cn

第一作者联系方式: E-mail: sangxianchun@163.com

Received(收稿日期): 2012-09-03; Accepted(接受日期): 2012-11-16; Published online(网络出版日期): 2013-01-04.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20130104.1735.018.html>

矮秆和多蘖矮秆等性状<sup>[1]</sup>。但生产上大面积应用的籼稻品种, 株高仍主要由 *SD-1* 基因调控, 该类型材料具有抗旱性差、光合效率低等缺陷, 同时, 单一遗传也潜伏着巨大的生产风险<sup>[2]</sup>。因此, 新矮源的鉴定对水稻生产具有重要的意义。矮化性状一般与赤霉素(GA)、油菜素内酯(BR)等激素的生物合成和信号传导相关<sup>[3]</sup>。因此, 鉴定新的矮秆调控基因对了解植物生长发育的调控过程、揭示矮化分子机制也具有重要的意义。

脆性是一种易于鉴别的形态性状, 一般表现为机械强度下降、植株受压易断裂。茎秆机械强度的改变对水稻抗倒伏性和环境适应性具有重要的影响, 目前, 在水稻中已经鉴定了十几个脆性突变体, 其中, 至少 11 个调控基因得到了克隆。脆性调控基因的克隆为从分子水平了解植物细胞壁的形成奠定了基础。脆性突变通常影响水稻纤维素和木质素的含量, 营养成分的改变, 适口性的增加使其有望发展成为一种新型饲料<sup>[4]</sup>。然而, 目前报道的脆性变异普遍存在农艺性状差、叶片披垂、茎秆机械强度过低等缺陷, 制约了“谷草两用”水稻的选育。

我们利用 EMS 处理优良籼型水稻恢复系缙恢 10 号, 获得了一个株高变矮、茎秆适度变脆的矮化脆性突变体 *dbc1*。本文进行了表型鉴定、理化分析和基因定位等研究, 结果不仅为水稻矮化脆性调控基因 *DBC1* 的克隆和功能分析奠定了基础, 而且为“谷草两用”水稻品种的培育提供了新材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以 EMS 诱变晚籼恢复系缙恢 10 号, 从其后代中鉴定出 1 个矮化脆性突变体 *dbc1*, 连续种植 5 代, 均表现同一表型。配制 *dbc1*/中花 11 和西农 1A/*dbc1* 杂交组合, 利用其  $F_1$  和  $F_2$  群体进行遗传分析, 并利用西农 1A/*dbc1* 的  $F_2$  群体进行基因定位。

### 1.2 测定项目与方法

1.2.1 主要农艺性状鉴定 田间种植 *dbc1* 和缙恢 10 号, 成熟期选择中间 10 株, 测量株高、节间长、穗茎长及穗长。同时, 调查有效穗数、平均穗长、穗粒数、实粒数、千粒重等主要农艺性状。

1.2.2 机械强度测定 成熟期分别取突变体和野生型的倒二节间及倒二叶, 利用岛津材料万能试验机 AG22000A 检测载荷强度<sup>[5]</sup>。

1.2.3 纤维素和木质素含量测定 灌浆期分别取突变体和野生型植株的倒二节间, 测量纤维素和木

质素的含量。参照 Updegraff<sup>[6]</sup>测定纤维素含量。取分离的细胞壁粉末 100 mg, 加 67%硫酸(V/V)溶解纤维素及萘酮溶液, 置沸水浴 16 min, 冰浴 10 min, 室温 5 min, 用分光光度计测定 620 nm 处溶液的吸光值, 重复 3 次。采用巯基乙酸法<sup>[7]</sup>测定木质素含量。取分离的细胞壁粉末 15 mg, 放入 2.5 mL 离心管, 加 0.3 mL 巯基乙酸及 1.5 mL 2 mol L<sup>-1</sup> HCl, 95℃下水解 4 h。冷却到室温, 15 000×g 离心 15 min, 水洗 3 次, 留沉淀。将沉淀在 1.5 mL 0.5 mol L<sup>-1</sup> 的 NaOH 中处理 16 h, 20℃下振荡提取木质素巯基乙酸(lignothioglycolic acid, LTGA)。15 000×g 离心 15 min 后获得上清液, 以 2 mL 水洗 2 次, 分别离心。合并上清液, 放入离心管, 加 0.4 mL 浓盐酸, 混匀, 4℃放置 4 h, 沉淀 LTGA, 15 000×g 离心 20 min, 留沉淀。将沉淀溶解在 1 mL 0.5 mol L<sup>-1</sup> 的 NaOH 中, 以 NaOH 为空白对照, 在 280 nm 处测定光吸收值, 以每毫克细胞壁吸光值表示木质素的相对含量。重复实验 3 次。

1.2.4 叶绿素含量测定 参照 Lichtenthaler<sup>[8]</sup>方法开花期测定突变体和缙恢 10 号的叶绿素含量, 测定部位为剑叶、倒二、倒三和倒四叶。

1.2.5 赤霉素反应 分别用清水及 1.00、0.10 和 0.01 mg g<sup>-1</sup> 的 GA<sub>3</sub> 处理 *dbc1* 和缙恢 10 号的种子, 30℃下培养 14 d, 测量株高, 即基部到叶尖的距离。在拔节期, 分别喷施水和 1.00、0.10 和 0.01 mg g<sup>-1</sup> 的 GA<sub>3</sub>, 10 d 后测量 *dbc1* 和野生型的株高, 计算增长量。增长量为喷施后长度减去喷施前长度, 株高仍为基部到叶尖的距离。

### 1.3 遗传图谱的构建

定位群体中, 具有 *dbc1* 带型的单株记为 B, 具有西农 1A 带型的单株记为 A, 具有  $F_1$  带型的单株记为 H。根据公式 $[(H+2A)/2n] \times 100$  计算遗传距离并构建连锁图谱, 其中  $H$  表示定位群体中出现杂合体带型单株的数量,  $A$  表示出现正常株带型的单株数,  $n$  表示用于定位的隐性群体总株数。

### 1.4 基因定位

利用 BSA 法筛选连锁标记<sup>[9]</sup>。从  $F_2$  群体中选取 10 株正常和 10 株突变株, 剪取等量叶片, 构建正常基因池和突变基因池, 进行连锁标记筛选。采用改良的 CTAB 法提取亲本和基因池 DNA, 采用碱煮法<sup>[10]</sup>提取定位单株 DNA。

SSR 引物序列参照 <http://www.gramene.org/>。PCR 总体积 12.5 μL, 包括 1.25 μL 的 10×PCR buffer,

0.75  $\mu\text{L}$  的 25 mmol  $\text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ , 0.5  $\mu\text{L}$  的 2.5 mmol  $\text{L}^{-1}$  dNTPs, 8.0  $\mu\text{L}$  的 ddH<sub>2</sub>O, 1.0  $\mu\text{L}$  的 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  引物, 1.0  $\mu\text{L}$  的模板 DNA 和 0.1  $\mu\text{L}$  的 5 U  $\mu\text{L}^{-1}$  *Taq* DNA 聚合酶。PCR 程序为 94℃ 预变性 3 min 后, 94℃ 变性 20 s、56℃ 退火 20 s、72℃ 复性 40 s, 35 个循环, 最后再 72℃ 延伸 7 min。PCR 产物经 10% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 以快速银染法染色观察。

2 结果与分析

2.1 突变体表型鉴定

田间种植条件下, *dbc1* 突变体从苗期开始即表现矮化、叶色浓绿、叶片上举, 一直持续到成熟, 同时茎秆和叶片略脆(图 1)。进一步分析发现, *dbc1* 的穗长、穗颈长、倒一至倒四节间均显著变短。与剑叶叶鞘长相比, 穗颈长缩短更为严重, 导致 *dbc1* 轻微包穗(表 1)。与野生型相比, *dbc1* 突变体的叶绿素含量略有升高, 但未达到显著差异水平。突变体的有效穗、千粒重和结实率无显著变化, 但穗长、穗粒数和实粒数极显著降低(表 2)。

2.2 赤霉素敏感性分析

在 0.01 mg  $\text{g}^{-1}$  的 GA<sub>3</sub> 处理下, *dbc1* 的株高与清

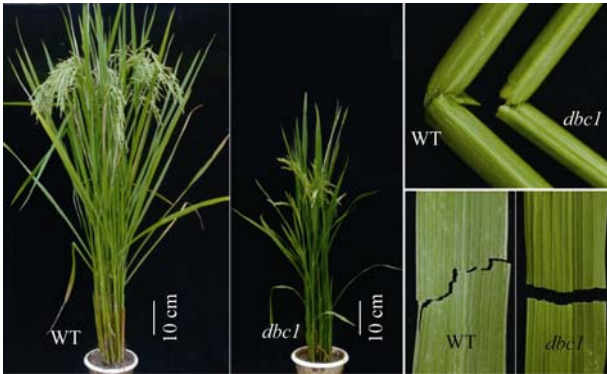


图 1 突变体 *dbc1* 和野生型表型(WT)  
Fig. 1 Phenotype of the *dbc1* mutant and the wild type (WT)  
A: 灌浆期野生型(WT)植株; B 灌浆期突变体 *dbc1* 植株; C 和 D : 突变体易折断的茎和叶。

A: Plant phenotype of wild type in grain filling stage; B: Plant phenotype of mutant *dbc1* in grain filling stage; C and D: Brittle culm and leaf of *dbc1* mutant.

水处理的对照相比无显著变化; 在 0.10 mg  $\text{g}^{-1}$  的 GA<sub>3</sub> 处理下, 株高差异达显著水平; 在 1.00 mg  $\text{g}^{-1}$  的 GA<sub>3</sub> 处理下, 则达极显著水平。而野生型缙恢 10 号, 在 3 种浓度处理下, 株高与对照的差异均达极显著水平(图 2)。田间种植情况下, 在拔节期分别用 0.01、0.10 和 1.00 mg  $\text{g}^{-1}$  的 GA<sub>3</sub> 处理 *dbc1* 和缙恢

表 1 *dbc1* 突变体和野生型的节间长度、株高、穗长等形态性状  
Table 1 Morphological traits of internode length, plant height, panicle length and so on of the *dbc1* mutant and wild type

性状 Trait	野生型 Wild type (Jinhui 10)	<i>dbc1</i>
株高 Plant height (cm)	109.10	58.93**
穗长 Panicle length (cm)	27.02	19.18**
穗茎长 Panicle neck length (cm)	35.25	13.91**
剑叶叶鞘长 Flag leaf sheath length (cm)	32.29	23.80**
包穗程度 Level of sheathed panicle	-2.96	9.89**
倒一节间 First internodes length (cm)	14.42	6.20**
倒二节间 Second internodes length (cm)	12.86	6.04**
倒三节间 Third internodes length (cm)	10.74	5.20**
倒四节间 Fourth internodes length (cm)	5.24	3.81*

\*和\*\*分别表示在 0.05 和 0.01 水平上差异显著。  
\* and \*\* represent the significant differences at  $P<0.05$  and  $P<0.01$ , respectively.

表 2 *dbc1* 突变体与野生型缙恢 10 号的农艺性状  
Table 2 Agronomic traits of *dbc1* mutant and Jinhui 10

材料 Material	有效穗 Panicle number per plant	平均穗长 Panicle length (cm)	穗粒数 Spikelet number per panicle	实粒数 Filled grains per panicle	千粒重 1000-grain weight (g)	结实率 Seed-setting rate (%)
缙恢 10 号 Jinhui 10	19.30	25.14	227.60	147.80	25.50	64.94
<i>dbc1</i>	20.20	19.18**	82.66**	53.06**	25.62	64.19

\*和\*\*分别表示在 0.05 和 0.01 水平上差异显著。  
\* and \*\* represent the significant differences at  $P<0.05$  and  $P<0.01$ , respectively.

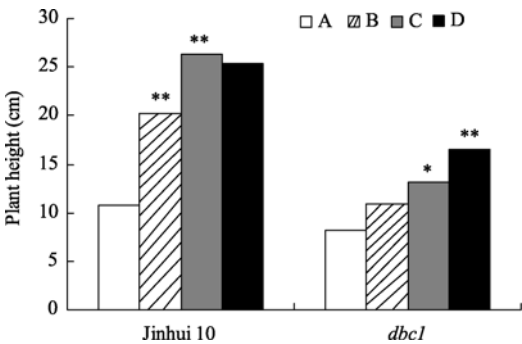


图 2 *dbc1* 对 GA<sub>3</sub> 的敏感性分析  
Fig. 2 *dbc1* mutant responding to different density treatment of gibberellin

A: 清水处理的对照; B: 0.01 mg g<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> 处理; C: 0.10 mg g<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> 处理; D: 1.00 mg g<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> 处理。\*和\*\*分别表示在 0.05 和 0.01 水平上差异显著。

A: treated with water; B: treated by 0.01 mg g<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>; C: treated by 0.10 mg g<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>; D: treated by 1.00 mg g<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>; \* and \*\* represent the significant differences at *P*<0.05 and *P*<0.01, respectively.

10 号, 也得到了类似的结果。表明 *dbc1* 突变体对 GA<sub>3</sub> 的敏感程度下降。

2.3 机械强度、木质素和纤维素分析

*dbc1* 突变体的茎秆和叶片变脆, 载荷强度均极显著下降, 分别为野生型的 55.71%和 74.88% (图 3)。与野生型相比, *dbc1* 的纤维素含量无显著变化, 木质素含量则下降 6.3%, 差异达显著水平(图 4)。

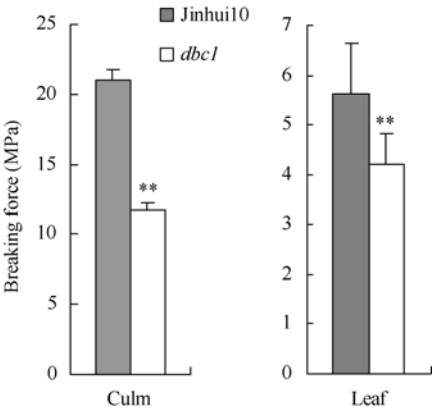


图 3 突变体和野生型物理特性  
Fig. 3 Physical properties of wild type and *dbc1* mutant plants

\*\*表示在 0.01 水平差异显著。

\*\* represents the significant difference at *P*<0.01.

2.4 遗传分析

西农 1A/*dbc1* 和中花 11/*dbc1* 的 F<sub>1</sub> 群体均正常, F<sub>2</sub> 群体中分离出野生和突变两种植株类型, 且符合 3 : 1 分离比(表 3), 表明该 *dbc1* 的突变性状受 1 对隐性核基因控制。

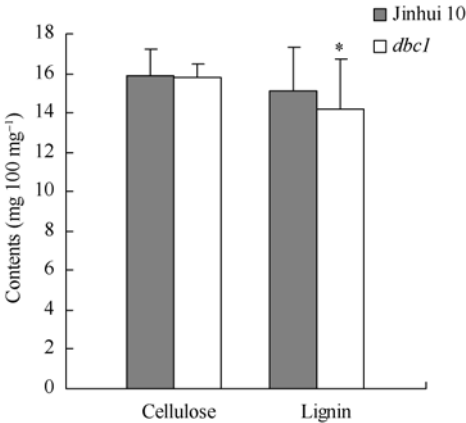


图 4 野生型和 *dbc1* 突变体的纤维素及木质素含量  
Fig. 4 Cellulose and lignin content in wild type and *dbc1* mutant

\*\*表示在 0.01 水平差异显著。

\*\* represents the significant difference at *P*<0.05.

2.5 基因定位

首先利用平均分布在水稻 12 条染色体上的 400 对 SSR 引物分析西农 1A 和 *dbc1* 之间的多态性, 然后再利用 96 对差异引物筛选正常基因池和突变基因池, 结果发现第 2 染色体上的 SSR 引物 RM1342 和 RM5460 在基因池间表现多态性, 进一步利用 70 个 F<sub>2</sub> 变异单株进行验证, 初步将 *DBC1* 基因定位在 RM1342 和 RM5460 之间, 遗传距离分别为 9.85 cM 和 13.85 cM (图 5-A)。

在初步定位的范围内, 进一步合成 SSR 引物, 最终利用 886 株西农 1A/*dbc1* 的 F<sub>2</sub> 突变单株将 *DBC1* 基因定位在 SSR 标记 RM13943 和 RM13952 之间, 遗传距离分别为 0.1 cM 和 1.6 cM, 物理距离为 197 kb。根据 <http://www.gramene.org/> 网站, 在该定位区间内, 有 52 个注释基因(图 5-B)。

3 讨论

赤霉素对植物生长发育具有重要的调节作用, 可诱导 α 淀粉酶形成、节间伸长以及种子萌发等, 是

表 3 *dbc1* 突变体的遗传分析  
Table 3 Genetic analysis of the *dbc1* mutant

组合名称 Combination	F <sub>2</sub> 群体株数 Total number	正常株数 Wild type number	突变株数 Mutants number	理论值 Theory value	卡方值 χ <sup>2</sup> <sub>0.05</sub> =3.84
西农 1A/ <i>dbc1</i> Xinong 1A/ <i>dbc1</i>	3066	2720	886	3:1	1.56
<i>dbc1</i> /中花 11 <i>dbc1</i> /Zhonghua 11	292	214	78	3:1	2.93

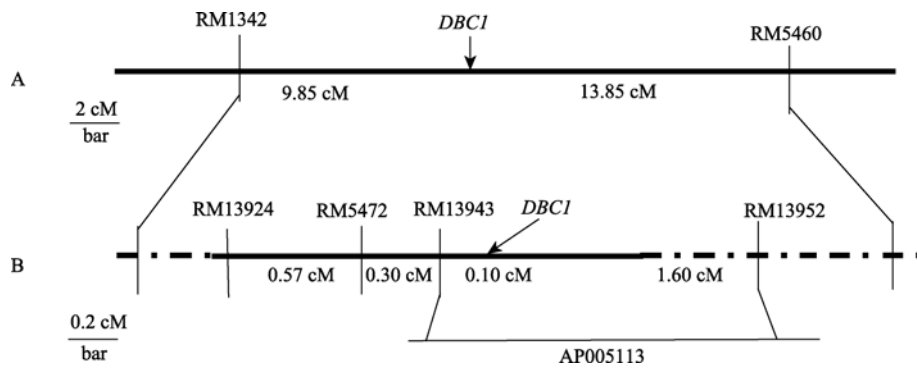


图 5 *DBC1* 基因在第 2 染色体上的分子定位  
Fig. 5 *DBC1* gene mapping on chromosome 2

植物体内重要的激素之一<sup>[11]</sup>。半矮秆表型在 20 世纪 60 年代引发了绿色革命,使水稻产量创造了新高。近几年,通过对水稻、拟南芥、玉米、小麦等矮秆性状的研究,赤霉素生物合成代谢的关键基因均已克隆,调控途径也已基本清晰<sup>[12-15]</sup>,但赤霉素信号转导途径的分子机制还不清晰<sup>[16-19]</sup>,主要原因之一是相关突变体的匮乏。

*dbc1* 突变体各节间均匀缩短,属于 dn 型矮化变异。在低浓度  $GA_3$  ( $0.01 \text{ mg g}^{-1}$ ) 处理下,野生型株高与清水对照相比,差异达极显著水平,而突变体株高虽略有增加,但与对照相比,差异未达到显著水平;在高浓度  $GA_3$  处理下,才达到极显著差异水平,表明 *dbc1* 对  $GA_3$  敏感程度降低。

不少植物突变体表现出基因的多效性,如多穗矮秆突变体 *tddl(t)*,分别影响水稻的株高和分蘖数;窄叶白化突变体 *null1*,则同时影响水稻的叶色和叶型<sup>[20-21]</sup>。我们发现的 *dbc1* 突变体,除株高显著降低外,还表现为茎秆变脆。脆性变异涉及复杂的理化过程,一般表现为木质素和纤维素含量下降,细胞壁结构异常。因此,克隆脆性调控基因对于研究植物细胞壁、茎秆机械强度等的形成具有重要的意义。目前,在水稻中至少报道了 18 个脆性突变体<sup>[22]</sup>,其中,11 个调控基因得到了克隆,分别为 *BC1*、*BC3*、*BC10*、*BC11*、*BC12*、*BC14*、*BC15*、*FC1*、*OsCesA4*、*OsCesA7* 和 *OsCesA9*<sup>[23-25]</sup>。与野生型相比,*dbc1* 突变体的纤维素含量没有变化,木质素含量显著下降,推测 *DBC1* 可能同时与赤霉素信号传导途径和木质素生物合成相关。利用 SSR 等分子标记,最终将调控基因定位在第 2 染色体上物理距离约 197 kb 的范围内。在定位区间,有 1 个基因编码含有糖基转移酶 8 区域(glycosyltransferase 8 domain)的蛋白。糖基转移酶是植物细胞壁多聚糖和糖蛋白合成所必需的最

大的酶家族之一,*BC10* 就属于该类基因,通过调节细胞壁纤维素合成和阿拉伯半乳聚糖蛋白含量控制水稻植株的机械强度<sup>[26]</sup>。但该基因是否为 *dbc1* 的候选基因,尚需进一步研究。

脆性水稻与普通水稻相比,秸秆易碎,降解速度快,利于秸秆还田<sup>[27]</sup>。但目前报道的脆性突变体,除机械强度下降外,一般还伴随植株矮化、分蘖减少、叶片略披垂等性状,不利于脆性变异在谷秆两用水稻培育中的应用<sup>[28]</sup>。我们报道的 *dbc1* 突变体,植株表现为半矮化、适度脆性,与野生型相比,有效分蘖数、千粒重和结实率均无明显变化。因而,*dbc1* 是一个优良的育种材料,具有潜在的应用价值。

#### 4 结论

获得 1 个矮化脆性突变体 *dbc1*,它对赤霉素的敏感性降低,倒一至倒四节间均显著变短,且有一定的包穗现象,穗长、穗粒数和实粒数极显著下降,有效穗、千粒重和结实率则无明显变化。*dbc1* 茎秆和叶片的机械强度极显著下降,与野生型相比,纤维素含量无变化,木质素含量显著降低。该性状受 1 对隐性核基因调控,该基因被定位在第 2 染色体 SSR 标记 RM13943 和 RM13952 之间 197 kb 的物理范围内。

#### References

- [1] Hu J(胡江), Zeng D-L(曾大力), Zhang G-H(张光恒), Guo L-B(郭龙彪), Dong G-J(董国军), Gao Z-Y(高振宇), Hu X-M(胡兴明), Zhu L(朱丽), Liu J(刘坚), Qian Q(钱前). Genetic analysis and gene mapping of a new mutant of dwarf and disproportionate uppermost-internode (*ddul*) in rice. *Chin J Rice Sci* (中国水稻科学), 2009, 23 (3): 252–256 (in Chinese with English abstract)
- [2] Liang G H, Cao X Y, Sui J M, Zhao X Q, Yan C J, Yi C D, Gu M H. Fine mapping of a semidwarf gene *sd-g* in indica rice (*Oryza sativa* L.). *Chin Sci Bull*, 2004, 49(9): 900–904

- [3] Zhang F-T(张帆涛), Fang J(方军), Sun C-H(孙昌辉), Li R-B(李润宝), Luo X-D(罗向东), Xie J-K(谢建坤), Deng X-J(邓晓建), Chu C-C(储成才). Characterization of a rice dwarf and twist leaf 1 (*dtl1*) mutant and fine mapping of *DTL1* gene. *Hereditas* (Beijing) (遗传), 2012, 34(1): 79–86 (in Chinese with English abstract)
- [4] Wei C-X(韦存虚), Xie P-S(谢佩松), Zhou W-D(周卫东), Chen Y-F(陈义芳), Yan C-J(严长杰). Anatomical structure and chemical features of leaf in brittle mutant of rice. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2008, 34(8): 1417–1423 (in Chinese with English abstract)
- [5] Li Y, Qian Q, Zhou Y, Yan M, Sun L, Zhang M, Fu Z, Wang Y, Han B, Pang X, Chen M. *BRITTLE CULM 1*, which encodes a COBRA-like protein, affects the mechanical properties of rice plants. *Plant Cell*, 2003, 15: 2020–2031
- [6] Updegraff D M. Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Anal Biochem*, 1969, 32: 420–424
- [7] Musel G, Schindler T, Bergfeld R, Ruel K, Jacquet G, Lapierre C, Speth V, Schopfer P. Structure and distribution of lignin in primary and secondary cell walls of maize coleoptiles analyzed by chemical and immunological probes. *Planta*, 1997, 201: 146–159
- [8] Lichtenthaler H K. Chlorophylls and carotenoids pigments of photosynthetic biomenbranes. *Meth Enzymol*, 1987, 48: 350–382
- [9] Michelmore R M, Papan I, Kesseli R V. Identification of marks linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect marks in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 9828–9832
- [10] Sang X-C(桑贤春), He G-H(何光华), Zhang Y(张毅), Yang Z-L(杨正林), Pei Y(裴炎). The simple gain of templates of rice genomes DNA for PCR. *Hereditas* (Beijing) (遗传), 2003, 25(6): 705–707 (in Chinese with English abstract)
- [11] Davies P J, ed. Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995. pp 13–38
- [12] Sakamoto T, Miura K, Itoh H, Tatsumi T, Ueguchi-Tanaka M, Ishiyama K, Kobayashi M, Agrawal G, Takeda S, Abe K, Miyao A, Hirochika H, Kitano H, Ashikari M, Matsuoka M. An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutant in rice. *Plant Physiol*, 2004, 134: 1642–1653
- [13] Monna L, Kitazawa N, Yoshino R, Suzuki J, Masuda H, Maehara Y, Tanji M, Sato M, Nasu S, Minobe Y. Positional cloning of rice semi-dwarfing gene, *sd-1*: rice “green revolution gene” encodes a mutant enzyme involved in gibberellin synthesis. *DNA Res*, 2002, 9: 11–17
- [14] Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Sentoku N, Kitano H, Matsuoka M. Cloning and functional analysis of two gibberellin 3B-hydroxylase genes that are differently expressed during the growth of rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(15): 8909–8914
- [15] Itoh H, Tatsumi T, Sakamoto T, Otomo K, Toyomasu H, Ashikari M, Ichihara S, Matsuoka M. A rice semi-dwarf gene, *Tan-Ginbozu (D35)*, encodes the gibberellin biosynthesis enzyme, ent-kaurene oxidase. *Plant Mol Biol*, 2004, 54: 533–547
- [16] Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, Itoh H, Katoh E, Kobayashi M, Ghosh T, C. Hising Y, Kitano H, Yamaguchi I, Matsuoka M. Gibberellin insensitive *Dwarf1* encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature*, 2005, 437: 693–698
- [17] Itoh H, Ueguchi Tanaka M, Sato Y, Ashikari M, Matsuoka M. The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of SL ENDER rice in nuclei. *Plant cell*, 2002, 14: 57–70
- [18] Ashikari M, Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Akie S, Kenji G, Hidemi K, Makoto M. Gibberellin signal transduction in rice. *J Plant Growth Regul*, 2003, 22: 141–151
- [19] Ikeda A, Ueguchi Tanaka M, Sonoda Y, Kitano H, Koshioka M, Futsuhara Y, Matsuoka M, Yamaguchi J. Slender rice, a constitution gibberellin response mutant, is caused by a null mutation on of the *SLR1* gene, an ortholog of the height-regulating gene *GAI/RGA/RHT/D8*. *Plant Cell*, 2001, 13: 999–1010
- [20] Gao Z-Y(高振宇), Liu X-H(刘晓辉), Guo L-B(郭龙彪), Liu J(刘坚), Dong G-J(董国军), Hu J(胡江), Han B(韩斌), Qian Q(钱前). Identification of a novel tillering dwarf mutant and fine mapping of the *tddl(t)* gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Chin Sci Bull* (科学通报), 2009, 54(9): 1238–1243 (in Chinese)
- [21] Wang F(王峰), Tang Y-Q(唐彦强), Miao R-L(苗润隆), Xu F-F(徐芳芳), Lin T-T(林婷婷), He G-H(何光华), Sang X-C(桑贤春). Identification and gene mapping of a narrow and upper-albino leaf mutant in rice (*Oryza sativa* L.). *Chin Sci Bull* (科学通报), 2012, 57(22): 2066–2071 (in Chinese)
- [22] Crowell E F, Gonneau M, Stierhof Y D, Höfte H, Vernhettes S. Regulated trafficking of cellulose synthases. *Curr Opin Plant Biol*, 2010, 13: 700–705
- [23] Zhang B C, Zhou Y H. Rice brittleness mutants: A Way to open the ‘BlackBox’ of monocot cell wall biosynthesis. *J Integr Plant Biol*, 2011, 53 (2): 136–142
- [24] Wu B, Zhang B, Dai Y, Zhang L, Shang-Guan K, Peng Y, Zhou Y, Zhu Z. Brittle Culm15 encodes a membrane-associated chitinase-like protein required for cellulose biosynthesis in rice. *Plant Physiol*, 2012, 159(4): 1440–1452
- [25] Zhang B C, Liu X L, Qian Q, Liu L F, Dong G J, Xiong G Y, Zeng D L, Zhou Y H. Golgi nucleotide sugar transporter modulates cell wall biosynthesis and plant growth in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(12): 5110–5115
- [26] Zhou Y H, Li S B, Qian Q, Zeng D L, Zhang M, Guo L B, Liu X L, Zhang B C, Deng L W, Liu X F, Luo G Z, Wang X J, Li J Y. BC10, a DUF266-containing and Golgi-located type II membrane protein, is required for cell-wall biosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant J*, 2009, 57: 446–462
- [27] Wang C-L(王川丽), Wang L-Q(王令强), Mou T-M(牟同敏). Characterization and gene mapping of a brittle culm mutant *nbc1(t)* in rice. *J Huazhong Agric Univ* (华中农业大学学报), 2012, 31(2): 159–164 (in Chinese with English abstract)
- [28] Zhang S-J(张水金), Zheng Y(郑轶), Zhu Y-S(朱永生), Yang D(杨东), Tu S-H(涂诗航), Zhou P(周鹏), Zheng J-T(郑家团), Huang T-X(黄庭旭). Advance in research on brittleness mutant of rice. *Fujian J Agric Sci* (福建农业学报), 2011, 26(5): 895–898 (in Chinese with English abstract)