

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00397

水稻 *Dwarf1* 移码突变的新突变体鉴定

陈华夏, 周成博, 邢永忠

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 国家植物基因中心(武汉), 武汉 430070

摘要: 从一批水稻品种“中花 11”组织培养苗里分离到一个矮化突变株“C6PS”, 它的 T_2 代群体株高呈现 3:1 分离。利用该群体矮化单株与“珍汕 97”、“牡丹江 8”构建 2 个 F_2 群体 F_2 (CZ)、 F_2 (CM), 两个群体中高株与矮株均呈现 3:1 分离, 证明该性状变异为单基因控制。“C6PS”表现型与已经报道的*Dwarf1* 隐性突变体“*d1*”相似, 以 *D1* 附近标记 RM430 检测 F_2 (CZ) 群体基因型, 结果显示群体表型与 RM430 基因型呈极显著相关($P=0.0001$), 将该基因初步定位于*Dwarf1* 附近。对“C6PS”及“中花 11”进行*D1* 序列分析显示, 突变株中*D1* 基因在其第九个外显子与第九个内含子的剪接位点上发生 6 个碱基的缺失, 根据缺失两侧序列设计 C6PS-D1L/R 标记, 在 T_2 代群体该标记与表型呈现共分离, 表明“C6PS”是一种新的*Dwarf1* 突变体。cDNA 测序显示突变体*d1* 基因转录产物发生 26 个碱基的缺失, 导致移码产生终止突变, 从而无法翻译出有功能的 G α 蛋白, 因此, 它是一个 G α 功能缺失突变体。叶倾斜度检测显示“C6PS”对油菜素内酯响应比野生型“中花 11”弱。

关键词: 水稻; 矮化突变株; G α 蛋白; 终止突变; 油菜素内酯

A new rice *dwarf1* mutant caused by a frame-shift mutation

CHEN Hua-Xia, ZHOU Cheng-Bo, XING Yong-Zhong

National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, National Plant Gene Research Center (Wuhan), Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract: A dwarf mutant C6PS, which has the similar phenotype as the recessive mutant *Dwarf1* (*d1*), was produced from tissue-cultured plants of Zhonghua 11. In its progeny (T_2), the ratio of tall to dwarf plants was in agreement with the expected segregation ratio (3:1) of a single Mendelian inheritance gene, which indicated that the variation of plant height is caused by a single gene. To locate the mutation, C6PS was crossed with Zhenshan 97 and Mudanjiang 8 for producing two F_2 populations of F_2 (CM) and F_2 (CZ), respectively. The plant height in each F_2 population also showed the same segregation pattern as that in T_2 generation. SSR marker RM430 closely linked to *Dwarf1* was preferentially used to genotype the F_2 (CZ) population because C6PS showed the similar phenotype to *d1* mutant. RM430 was significantly associated with plant height, which indicated that the mutant gene might be *D1*. Comparative sequencing of *D1* between C6PS and Zhonghua 11 showed a 6 bp deletion occurred in the splice site of its ninth exon. The marker C6PS-D1L/R designed on the 6 bp deletion was co-segregated with plant height in T_2 generation. The results indicated that C6PS was a new mutant of *D1*. This mutation led to a 26 bp deletion of the transcript and resulted in a frame-shift mutation and a premature stop codon in

收稿日期: 2010-09-30; 修回日期: 2010-12-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30971749)和国家 973 项目(编号: 2010CB125901)及转基因生物新品种培育重大专项(编号: 2008ZX08009-001)资助

作者简介: 陈华夏, 硕士, 研究方向: 遗传学。E-mail: chenhuaxia@webmail.hzau.edu.cn

周成博, 学士, 研究方向: 遗传学。E-mail: zhouchengbo@mail.hzau.edu.cn

陈华夏和周成博同为第一作者。

通讯作者: 邢永忠, 博士, 博士生导师, 研究方向: 分子遗传学。E-mail: yzxing@mail.hzau.edu.cn

C6PS, which could not translate the functional $G\alpha$ protein. *C6PS* was weakly sensitive to Brassinolide based on the leaf inclination angle test.

Keywords: rice; dwarf mutant; $G\alpha$ protein; premature stop; Brassinolide

水稻植株高度直接影响水稻产量,合适的株高能显著减少植株倒伏,增加收获指数,上世纪 60 年代由 *sd1*^[1]引领的“绿色革命”,就是通过半矮化育种而实现的。目前,适当地增加株高则是新一轮的育种目标之一。矮化突变体是研究植物生长和发育调控的理想材料,目前,发现的水稻矮秆突变体多达 80 多种,包括小粒矮秆、半矮化矮秆、多蘖矮秆等。而小粒矮秆突变体因为其株高变化显著,且极显著影响了粒型叶片夹角等性状而备受关注,后来的研究更是发现,该类突变体不同于大多数与赤霉素信号途径相关的矮化突变体,小粒矮秆突变体更多的与油菜素内酯相关,这类矮化突变体是研究油菜素内酯信号途径不可或缺的好材料。

水稻中最早发现的小粒矮秆突变体“*d1*”是 *Dwarf 1(D1)*基因发生隐性突变而出现的自然突变体,表现为植株矮小、叶形紧凑、小而圆的种子^[2]。随后,*d1*突变体被证明是由于 *D1* 基因(即 *RGAI*)发生碱基缺失突变不能表达有功能 G 蛋白 α 亚基^[3]。水稻中这类由于 *RGAI* 单基因突变引起的突变体称为 *d1* 突变体^[4]。迄今报道的 *d1* 突变体有 20 余种^[5]。随着 *d1* 突变体的深入研究,对水稻 G 蛋白的功能也逐渐明确。异三聚体 GTP-结合蛋白(G 蛋白)存在于多种真核生物中^[6],由 G 蛋白 α 亚基($G\alpha$), G 蛋白 β 亚基($G\beta$)和 G 蛋白 γ 亚基($G\gamma$)3 个亚基构成。在通常状态下,这 3 个亚基结合在一起,直到一个配基被 G 蛋白偶联受体(GPCR)检测到。GPCR 发挥其鸟苷转移因子的作用,将 $G\alpha$ -GDP 转化为 $G\alpha$ -GTP。被激活的 $G\alpha$,即 $G\alpha$ -GTP 随后与 $G\beta\gamma$ 二聚体分离,分别作用于下游效应蛋白,调控相应的信号转导途径。这个过程结束后,与 $G\alpha$ 结合的 GTP 被水解为 GDP, $G\alpha$ 重新与 $G\beta\gamma$ 二聚体结合构成未被激活的 G 蛋白复合物^[5]。在水稻中, $G\alpha$ 与 $G\beta$ 均为单拷贝基因分别由 *RGAI*^[7] 与 *RGB1*^[8] 编码, $G\gamma$ 由 *RGG1* 与 *RGG2*^[9] 两个基因编码。 $G\alpha$ 参与 3 个信号途径—激素应答^[10,21], 抗病反应^[11~13] 及光信号途径^[14]。最初 *d1* 突变体被认为是赤霉素(GA)不敏

感突变体,与野生型相比, *d1* 突变植株需要更高浓度的(约 1 000 倍)的 GA 处理才能诱导节间伸长反应,且 *d1* 突变植株中 α 淀粉酶受 GA 诱导的程度及 GA 诱导的转录因子的 *OsGAMYB* 的表达量均低于野生型植株,而 *d1* 突变植株 GA 诱导的第二叶鞘伸长反应与野生型相似,且 *d1* 突变植株糊粉层中 α 淀粉酶的表达会被高浓度 GA 诱导,推测 $G\alpha$ 参与的是一条较敏感的 GA 信号途径^[10]。后续研究发现, *d1* 突变植株具有与油菜素甾醇(BR)缺陷型突变体相似的表型,具有特异性缩短的第二节间与直立的叶^[15]。 *d1* 植株表现为对 BR 弱敏感性。而 BR 的人工合成化合物 24-epiBL 对 *d1*、T65d1、T65d1/*d61-7* 等突变体诱导实验表明水稻 $G\alpha$ 影响 BR 信号途径^[15]。

d1 突变体对研究水稻 $G\alpha$ 蛋白参与激素应答起到了至关重要的作用。我国有“中花 11”的 T-DAN 插入突变体库(<http://rmd.ncpgr.cn/>),寻找“中花 11”来源的自然突变体有助于构建同一背景下的双突变或多突变材料,方便水稻植株高度等性状变异的分子机理解析。本研究从一批水稻品种“中花 11”组织培养苗里鉴定到一个新的矮化突变体“*C6PS*”。“*C6PS*”具有典型的 *d1* 突变株表型,即植株矮化,直立且宽而深绿的叶子,紧凑的穗,短而圆的种子^[2]。由突变体“*C6PS*”表型出发,构建该突变体与牡丹江 8、珍汕 97 的 F_2 群体,辅以 *D1* 基因序列分析,发现“*C6PS*”是一种新的 *Dwarf1* 突变体,“*C6PS*”的 *D1* 基因在其第九个外显子与第九个内含子的剪接位点上发生 6 个碱基的缺失,导致移码产生终止突变,从而无法翻译出有功能的 $G\alpha$ 蛋白。*C6PS* 的鉴定为研究水稻 $G\alpha$ 蛋白的功能提供了新的材料。

1 材料和方法

1.1 材料

2006 年夏天于武汉种植 30 个“中花 11”的组织培养苗 T_1 代家系,分离得到 1 个植株高度出现明显分离的家系 PS1-12,将矮化植株命名为矮化突变体

“C6PS”。2007年武汉6月对PS1-12家系的12株进行后代测验,每单株后代种植20株 T_2 。选取 T_2 代矮化植株与“牡丹江8”、“珍汕97”分别杂交得到杂种 F_1 ,再自交,获得各自组合的 F_2 群体: F_2 (CM)和 F_2 (CZ)。

1.2 方法

1.2.1 田间试验和表型鉴定

2008年5月,种植了一个含有277株的 T_2 代群体,在抽穗1周后选取野生型与矮化突变型植株各10株,测量各节间的长度及穗长。同时,种植两个 F_2 群体 F_2 (CM)和 F_2 (CZ),在抽穗一周后测量株高。

参考Wada等^[16]方法剪取野生型和突变型植株的第二叶节部位,在黑暗条件下,将剪取部位放在20 μ mol/L 24-epiBL溶液里浸泡3 d,检测叶夹角的变化。

1.2.2 DNA抽提和标记分析

利用CTAB法^[17]抽提水稻叶片中的DNA。选取 $D1$ 基因附近的简单序列重复(SSR)标记来检测 F_2 (CM)和 F_2 (CZ)群体叶片DNA样品。对候选基因 $D1$ 进行比较测序,根据测序的结果,设计出1对可检测缺失的SSR标记C6PS-D1L/R,利用改进的PAGE胶显带方法^[18]检测277株 T_2 单株的群体,验证 $d1$ 表型与该突变的共分离。

表1 用于C6PS和中花11的*dwarf1*比较测序引物

引物名称	引物序列(5' 3')
D1	TGTATGTGAAGAGGACGCTG
D2	ATGGGTAGTTTGTGGTCTAG
D3	CACAACTACCCATAGTCAC
D4	CGTTGACGTCTAGATCTCAG
D5	CCGTCAGATGTGAAGCCGAC
D6	GCGTACGGATTATGATTCTC
D7	GTTCTCAATGTGGATCCATC
D8	GGATAATCCAACCTGCCATC
D9	TCACCAGTTTCACACTGTAC
D10	TTGTCGTTCTGTACATAG
D11	TTTAGGTAATCTGCTGACAC
D12	CTGCTCTGGAAGTAGAGCTC
D13	GCCTGCTCTTTGTACCAATG
D14	TGTATACTACGGTGGACCAG

1.2.3 RNA抽提与反转录

叶片组织样品在液氮中进行研磨后,采用酚-异硫氰酸法提取叶片中的RNA,采用SuperScript® III First Strand Synthesis Kit试剂盒(Invitrogen)反转录得到cDNA样品,-20℃保存备用。

1.2.4 序列测定与比对

根据*Dwarf1*基因组的序列设计14条测序引物(表1)分别扩增“中花11”与“C6PS”中 $D1$ 的等位序列。扩增产物经过SAP与Exo I消化后,以Dye Terminator循环进行单引物延伸,得到被标记的扩增产物,经3M醋酸钠沉淀,70%乙醇洗涤后晾干,再经甲酰胺96℃处理3 min得到可以直接用于测序的样品,采用ABI PRISM 3730测序系统(ABI, USA)进行测序。

利用Ishikawa等^[3]分离*RGAI*的cDNA时所用引物cGSL/R(5'-GACGTCAACGTGCTTCCTGG-3'/5'-AAAGATCAATCAATGGTCCACG-3')进行cDNA测序。对于一些难以得到直接用于测序的扩增产物的基因组片段,则采用DNA回收试剂盒(Fermentas公司的Silica Bead DNA Gel Extraction Kit)从琼脂糖凝胶中回收所需要的片段,将回收产物连接到T-easy载体上(Promega)进行测序。使用Sequencher 4.0软件进行序列的拼接和比对。

2 结果与分析

2.1 C6PS突变体表型

“C6PS”突变株叶片直立、宽而深绿,穗型紧凑,粒型短而圆(图1)。与野生型“中花11”相比,“C6PS”植株明显变矮,株高不到40 cm,只有野生型株高的40%, t 测验表明,野生型“中花11”株高比“C6PS”显著高($P<0.0001$)(表2)。比较“C6PS”植株和野生型“中花11”植株的节间数,发现“C6PS”的节间数为3,比野生型减少一个节间,且第二节间特异性缩短,只有0.3 cm长,只有野生型第二节间长度的1.5%。 t 测验-表明两者的穗长也存在显著差异($P<0.001$)“C6PS”的这些表型特征与 $d1$ 突变植株表型非常相似。它很可能是*dwarf1*的一种突变体。

2.2 “C6PS”突变体的遗传分析

在277个单株的 T_2 群体中,214株表现为野生型



图 1 “中花 11”与“C6PS”植株比较
A: 成熟期单株; B: 主茎穗; C: 粒型。

表 2 野生型中花 11 与突变体 C6PS 株高比较

	ZH11	C6PS
第一节间长 (cm)	39.5	24.2
第二节间长 (cm)	20.5	0.3
第三节间长 (cm)	9.5	3
第四节间长 (cm)	2.5	0
穗长 (cm)	23	11
株高 (cm)	95	38.8

特点(高株, 披散), 63 株为 *d1* 突变表型即矮化, 直立, 宽且深绿的叶子, 紧凑的穗, 短圆的种子。其株高分离比为 3 高:1 矮($\chi^2=0.69, P=0.40$)。突变体与珍汕 97 及牡丹江的 F_1 杂种株高分别为 87.2 ± 5.2 cm($n=5$)和 84 ± 5.2 cm($n=4$)厘米, 接近珍汕 97 的 90 厘米和牡丹江 8 的 85 厘米株高, 表明“C6PS”中 *D1* 的突变基因型是隐性基因型。 F_2 (CM) 和 F_2 (CZ) 群体分别含有 69 和 75 个单株, 他们的株高变异呈现双峰分布(图

2), 高株和矮株分离比均符合单基因孟德尔分离比 3:1($\chi^2=0.07, P=0.80$; $\chi^2=1.50, P=0.22$), 进一步表明这个群体的株高变异是受隐性单基因控制的。选取遗传背景差异较大的组合 F_2 (CZ) 寻找突变基因。由于“C6PS”突变体与 *d1* 突变表型类似, 首先以 *D1* 基因附近的(SSR)标记RM430 检测 F_2 (CZ) 群体基因型, 单标记分析结果显示, 群体表型与RM430 基因型呈极显著相关($P=0.0001$), 于是将该基因初步定位于 *D1* 附近。

2.3 突变体 *d1* 的序列分析

为了证实是 *D1* 基因发生了突变导致“C6PS”突变表型, 对“中花 11”与“C6PS”中 *D1* 基因(LOC_Os05g26890)进行测序。测序包括 *D1* 的全长 DNA 序列及前端 2 790 bp 的启动子区段共 6 430 bp。序列比对发现, “C6PS”与“中花 11”相比存在 6 个碱基的缺失(图 3B)。与“日本晴”*D1* 的 DNA 及 cDNA

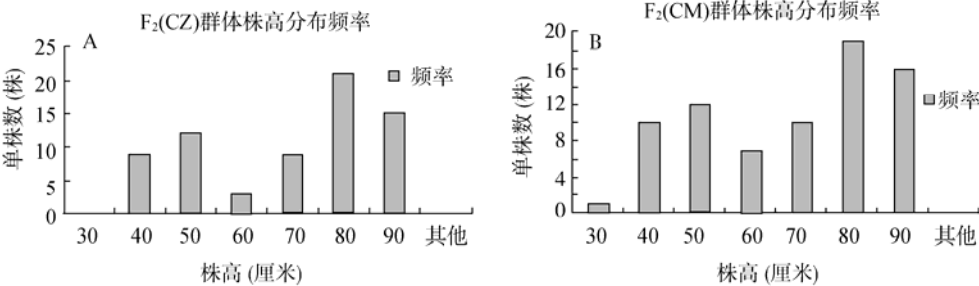


图 2 F_2 (CM)和 F_2 (CZ)群体株高频率分布图
A: F_2 (CM)群体; B: F_2 (CZ) 群体。

比对可知, 该缺失发生在第九个外显子与第九个内含子的剪接位点处(图 3A、3B)。

根据测序结果在“*C6PS*”基因组序列 6 bp 缺失位点的两端, 即离起始位点 2 773 bp 和 2 928 bp 处分别设计引物 C6PS-D1L/R (5'-TGTATGATGTAGGAGGCCAG-3', 5'-AGCCTATGAGAAGAACTTAG-3'), 其在野生型与突变型中的 PCR 扩增产物长度差异可以通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)观察到, 对 277 株 T_2 植株进行基因型鉴定, 基因型与表型完全共分离。如图 4 所示 PAGE 检测的部分单株结果, 显示编号为 4、5、10、11、14、15、19、20、27、28、39、40、49、68、69、70、73 等 17 个植株标记基因型均为突变亲本“*C6PS*”带型, 而这些植株的表型均为 *d1* 突变型, 而其余单株基因型为杂合型或纯合野生型, 表型均为野生型。以上结果进一步证实: 277 株的 T_2 代中所有矮化植株均携带 6 bp 缺失的突变 *d1*, 即“*C6PS*”是由于 *D1* 的突变而造成的。

cDNA 测序结果比对发现, “中花 11”中 *D1* 的

cDNA 序列与“日本晴”中相应的序列一致。而在“*C6PS*”中剪切位点发生了改变(图 3C), 与野生型相比剪切位点前移了 26 个碱基, 使得其 cDNA 与野生型相比缺失了 26 个碱基, 这 26 bp 的缺失发生在第一个效应因子结合域 EBR(1)后, 造成了移码突变, 且在该处产生终止密码子, 导致翻译出的 $G\alpha$ 蛋白缺少效应因子结合域 EBR(2), EBR(3)以及整个受体结合域 RBR(图 5), 从而导致该突变植株中 G 蛋白 α 亚基缺乏行使功能所必须的重要结合域。因而, “*C6PS*”是 $G\alpha$ 功能丧失突变体。

2.4 “*C6PS*”突变体的功能分析

利用 24-epiBL 浸泡叶片检测“*C6PS*”对 24-epiBL 的敏感性。结果显示, 经过 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 24-epiBL 处理, “*C6PS*”的叶倾斜程度略小于野生型“中花 11”(图 6), 处理前“*C6PS*”的叶夹角为 4° , 处理后为 110° , 而“中花 11”处理前叶夹角为 13° , 处理后为 120° 。

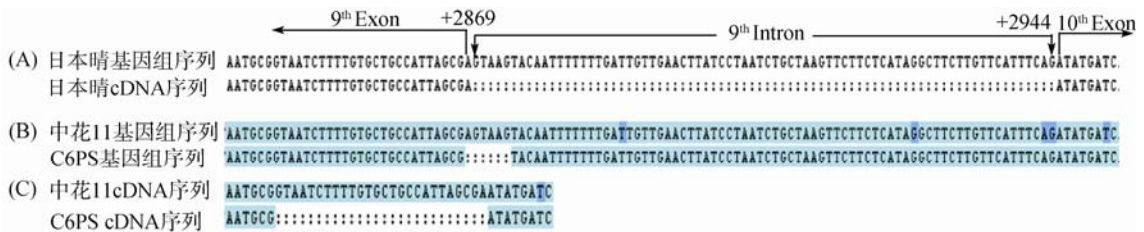


图 3 “*C6PS*”的 *D1* 突变区段与野生型“中花 11”对应区段序列比较

(A): 日本晴基因组 DNA 及 cDNA 序列, (B): “中花 11”与“*C6PS*”突变区段基因组 DNA; (C): 与对应 cDNA 序列比较。

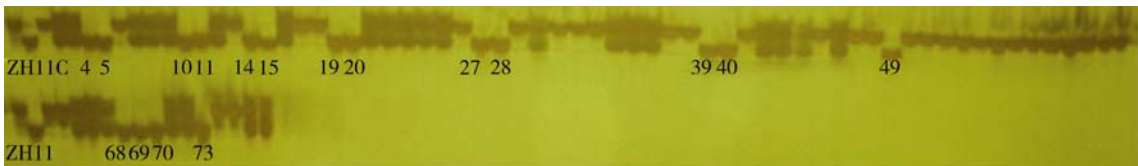


图 4 *C6PS*-D1L/R 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测

ZH11: 中花 11; C: *C6PS*; 第一排, 点样孔 3~64: 277 植株中编号 1~62 的植株; 第二排, 点样孔 3~17: 277 植株中编号 63~77 的植株。

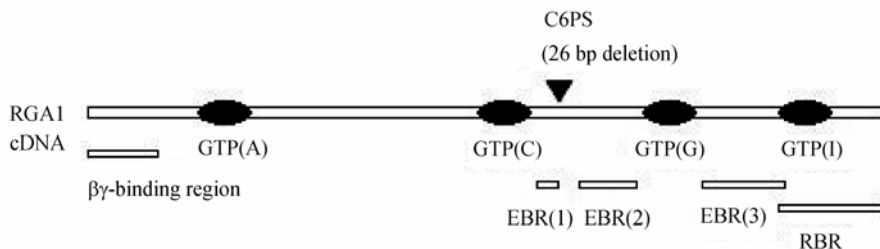


图 5 “*C6PS*”中编码 G 蛋白 α 亚基的结构域突变位点

$\beta\gamma$ -binding region: $\beta\gamma$ 结合域; 4 个 GTP 结合域(A, C, G, 和 I); EBR: 3 个效应因子结合域; RBR: 受体结合域。

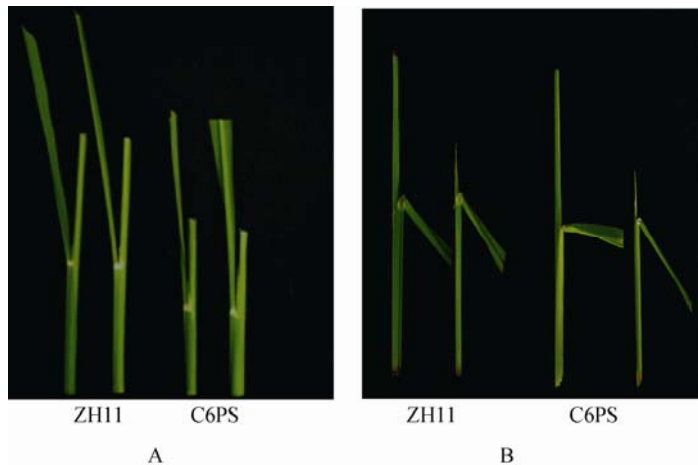


图 6 叶倾斜度检测

A: 处理前; B: 处理后。

3 讨论

G蛋白信号系统广泛存在于哺乳动物、植物与黏菌中。其中哺乳动物中的G蛋白信号系统一直是研究的热点。人体G蛋白缺陷会引起多种严重的疾病,因而目前上市的药品的三分之一甚至一半都是作用于G蛋白介导的信号转导途径^[19]。而在本世纪初,随着水稻与拟南芥基因组测序的完成,植物G蛋白的功能渐渐为人们熟知,其重要性也开始显现出来。

作为真核生物,植物与哺乳动物均为多细胞生物,且具有共同的G蛋白效应因子,拟南芥基因组序列分析显示一些基因与哺乳动物中相应基因的同源性甚至高于线虫、酵母等模式生物,因此植物G蛋白缺失突变体中细胞过程变化的理论研究能帮助我们了解哺乳动物G蛋白信号途径。其次,哺乳动物的G蛋白系统较为复杂,目前已在其中鉴定出至少 16 个G α 编码基因,5 个G β 编码基因,6 个G γ 编码基因^[3]。这使得我们很难获得G蛋白亚基完全缺失的动物突变体,而获得这种类型的植物突变体要容易的多。另外,一些人体GPCR是植物的次生代谢物。可以预测,随着植物新陈代谢研究的进展,更多有药用价值的植物产生GPCRs将会被发现^[20]。

水稻中 20 多种 $d1$ 突变株具有相似的表型,然而它们的 $D1$ 基因发生突变位点均不相同,这些不同变异可能会导致一些在表型上不容易观察到的差异。例如,两个常用的 $d1$ 突变体,“ $DK22$ ”与“ $T65d1$ ”正常生长表现为宽而深绿的叶片、穗紧凑、短圆种子,但

是在暗条件下表现出不一致的光形态构成。“ $DK22$ ”,由于G α -GTP(A)后区段碱基突变得到的自然突变体,在黑暗中表现出与野生型相同的节间伸长,而由于G α -GTP(G)后区段 2 个碱基缺失导致移码突变的“ $T65d1$ ”在暗条件下节间却不伸长^[15]。新鉴定出来的 $d1-4$ 等位基因G α -GTP(A)结构域中单碱基突变导致单个氨基酸突变,而 $d1-8$ 中 G α -EBR(3)结构域中碱基缺失导致单个氨基酸缺失变化,但Western杂交显示“ $d1-4$ ”植株质膜上有G α 累积,而“ $d1-8$ ”植株质膜上未检测到G α ^[4]。这些结果表明新的 $d1$ 等位基因的发现及研究会促进我们对G α 构象的了解,从而揭示其与效应因子相互作用参与信号转导的精细机制。

本研究中我们分离出一个新突变位点的 $d1$ 突变体“ $C6PS$ ”。测序结果显示该突变体在G α -GTP(C)之后区段发生移码突变从而导致终止密码子产生,导致G蛋白 α 亚基缺乏行使功能所必须的重要结合域,与“ $DK22$ ”中 $d1$ 突变表型相似。在Wang等^[21]的进行的叶倾斜度检测实验中,100 nmol/L 浓度 24-epiBL 处理下,“ $DK22$ ”的叶张角为 109°,对照“日本晴”野生型叶张角达 165°,两者相差 56°,说明“ $DK22$ ”对BL敏感性较野生型弱。而在我们的实验中采用高 200 倍浓度(20 μ mol/L)的 24-epiBL 处理,处理后的“ $C6PS$ ”叶夹角为 110°,与“中花 11”野生型的 120°差别不大。从 24-epiBL 处理后叶片倾斜程度来看,“ $C6PS$ ”与“ $DK22$ ”一样,虽然对BL响应,但是较野生型程度弱。因而,该等位型可能是 $d1$ 的一个轻微突变等位,即“ $C6PS$ ”中G α 没有完全丧失功能。当然,

两者遗传背景差异也可能是造成该现象的原因。“*DK22*”突变体来自于“日本晴”，而“*C6PS*”则是“中花 11”背景。目前，超过 10 万独立单株的“中花 11”背景的突变体已经创建完毕(<http://rmd.ncpgr.cn/>)，而尚无“中花 11”背景的*d1* 突变体报道。本研究发现的新的*d1* 突变体亦是“中花 11”背景，这为我们在同一背景下利用多突变体研究水稻株高及油菜素类酯途径提供了理想材料。同时本研究中对“*C6PS*”突变体创建的功能标记也为鉴定这种新的*D1* 等位基因型提供了简便、有效的工具。

参考文献(References):

- [1] Sasaki A, Ashikari M, Ueguchi-Tanaka M, Itoh H, Nishimura A, Swapan D, Ishiyama K, Saito T, Kobayashi M, Khush GS, Kitano H, Matsuoka M. Green revolution: A mutant gibberellin-synthesis gene in rice. *Nature*, 2002, 416(6882): 701–702. [\[DOI\]](#)
- [2] Ashikari M, Wu JZ, Yano M, Sasaki T, Yoshimura A. Rice gibberellin-insensitive dwarf mutant gene *Dwarf 1* encodes the α -subunit of GTP-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(18): 10284–10289. [\[DOI\]](#)
- [3] Fujisawa Y, Kato T, Ohki S, Ishikawa A, Kitano H, Sasaki T, Asahi T, Iwasaki Y. Suppression of the heterotrimeric G protein causes abnormal morphology, including dwarfism, in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(13): 7575–7580. [\[DOI\]](#)
- [4] Oki K, Inaba N, Kitano H, Takahashi S, Fujisawa Y, Kato H, Iwasaki Y. Study of novel *d1* alleles, defective mutants of the α subunit of the heterotrimeric G-protein in rice. *Genes Genet Syst*, 2009, 84(1): 35–42. [\[DOI\]](#)
- [5] Perfus-Barbeoch L, Jones AM, Assmann SM. Plant heterotrimeric G protein function: insights from *Arabidopsis* and rice mutants. *Curr Opin Plant Biol*, 2004, 7(6): 719–731. [\[DOI\]](#)
- [6] Assmann SM. Plant G Proteins, Phytohormones, and plasticity: Three questions and a speculation. *Sci STKE*, 2004, 264: re20. [\[DOI\]](#)
- [7] Ishikawa A, Tsubouchi H, Iwasaki Y, Asahi T. Molecular cloning and characterization of a cDNA for the α subunit of a G protein from rice. *Plant Cell Physiol*, 1995, 36(2): 353–359. [\[DOI\]](#)
- [8] Ishikawa A, Iwasaki Y, Asahi T. Molecular cloning and characterization of a cDNA for the β subunit of a G protein from rice. *Plant Cell Physiol*, 1996, 37(2): 223–228. [\[DOI\]](#)
- [9] Kato C, Mizutani T, Tamaki H, Kumagai H, Kamiya T, Hirobe A, Fujisawa Y, Kato H, Iwasaki Y. Characterization of heterotrimeric G protein complexes in rice plasma membrane. *Plant J*, 2004, 38(2): 320–331. [\[DOI\]](#)
- [10] Ueguchi-Tanaka M, Fujisawa Y, Kobayashi M, Ashikari M, Iwasaki Y, Kitano H, Matsuoka M. Rice dwarf mutant *d1*, which is defective in the α subunit of the heterotrimeric G protein, affects gibberellin signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(21): 11638–11643. [\[DOI\]](#)
- [11] Suharsono U, Fujisawa Y, Kawasaki T, Iwasaki Y, Satoh H, Shimamoto K. The heterotrimeric G protein α subunit acts upstream of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(20): 13307–13312. [\[DOI\]](#)
- [12] Lieberherr D, Thao NP, Nakashima A, Umemura K, Kawasaki T, Shimamoto K. A sphingolipid elicitor-inducible mitogen-activated protein kinase is regulated by the small GTPase OsRac1 and heterotrimeric G-protein in rice. *Plant Physiol*, 2005, 138(3): 1644–1652. [\[DOI\]](#)
- [13] Assmann SM. G Protein regulation of disease resistance during infection of rice with rice blast fungus. *Sci STKE*, 2005, 310: cm13. [\[DOI\]](#)
- [14] Iwasaki Y, Fujisawa Y, Kato H. Function of heterotrimeric G protein in gibberellin signaling. *Plant Growth Regul*, 2003, 22(2): 126–133. [\[DOI\]](#)
- [15] Oki K, Inaba N, Kitagawa K, Fujioka S, Kitano H, Fujisawa Y, Kato H, Iwasaki Y. Function of the α subunit of rice heterotrimeric G protein in brassinosteroid signaling. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50(1): 161–172. [\[DOI\]](#)
- [16] Wada K, Marumo S, Ikekawa N, Morisaki M, Mori K. Brassinolide and Homobrassinolide promotion of lamina inclination of rice seedling. *Plant Cell Physiol*, 1981, 22(2): 323–325. [\[DOI\]](#)
- [17] Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Res*, 1980, 8(19): 4321–4326. [\[DOI\]](#)
- [18] 张玉山, 白旭峰. 一种简单快速高分辨率的PAGE胶显带方法. *遗传*, 2008, 30(2): 251–254. [\[DOI\]](#)
- [19] Jones AM, Assmann SM. Plants: the latest model system for G-protein research. *EMBO Rep*, 2004, 5(6): 572–578. [\[DOI\]](#)
- [20] Assmann SM. G Proteins go green: A plant G protein signaling FAQ sheet. *Science*, 2005, 310(5745): 71–73. [\[DOI\]](#)
- [21] Wang L, Xu YY, Ma QB, Li D, Xu ZH, Chong K. Heterotrimeric G protein α subunit is involved in rice brassinosteroid response. *Cell Res*, 2006, 16(12): 916–922. [\[DOI\]](#)