



植物遗传资源学报
Journal of Plant Genetic Resources
ISSN 1672-1810, CN 11-4996/S

《植物遗传资源学报》网络首发论文

题目：一种新型水稻穗叶类病斑突变体 *pls1* 的基因克隆和功能分析
作者：韩沛洁, 李飞, 叶春, 盛怡乐, 孙红正, 李俊周, 杜彦修
DOI: 10.13430/j.cnki.jpgr.20241209001
收稿日期: 2024-12-09
网络首发日期: 2025-02-28
引用格式: 韩沛洁, 李飞, 叶春, 盛怡乐, 孙红正, 李俊周, 杜彦修. 一种新型水稻穗叶类病斑突变体 *pls1* 的基因克隆和功能分析[J/OL]. 植物遗传资源学报. <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20241209001>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

一种新型水稻穗叶类病斑突变体 $pls1$ 的基因克隆 和功能分析

韩沛洁, 李飞, 叶春, 盛怡乐, 孙红正, 李俊周, 杜彦修

(河南农业大学农学院/河南省水稻分子育种与高效生产重点实验室, 郑州 450046)

摘要: 水稻类病斑突变体在研究水稻细胞程序性死亡和广谱抗病性中具有重要作用, 已报道的水稻类病斑主要发生在叶片上和少量发生在颖壳上。本研究中首次报道了水稻的一种穗叶类病斑突变体 $pls1$ (*panicle and leaf spot 1*), 其从三叶期叶片开始出现红褐色斑点, 随生育进程扩大, 并扩展到其他器官, 与以往报道的水稻类病斑突变体不同的是 $pls1$ 抽穗后稻穗枝梗和颖壳逐渐产生红褐色病斑, 成熟期稻穗干枯, 严重影响产量, 是一种新类型的水稻类病斑。图位克隆结合全基因组重测序发现 $pls1$ 突变体产生了 173403 bp 的大片段缺失, 导致 7 个基因缺失和 1 个基因启动子缺失。基因功能预测和数据库基因表达数据证实 $PLS1$ 编码色胺 5-羟化酶 (*Os12g0268000*)。 $pls1$ 突变体叶片中活性氧 H_2O_2 、OFR 过量积累和抗氧化系统相关酶 SOD、POD、APX、CAT 和 GR 活性提高, 发生细胞程序性死亡和叶绿体降解, 降低光合能力。褪黑素在植物耐盐性中起重要作用。进一步的功能分析发现, 缺失 $PLS1$ 会显著抑制水稻中褪黑素合成相关酶基因 *OsTDC1*, *OsTDC3*, *OsSNAT1*, *OsASMT1* 和 *OsCOMT* 的表达, 进而导致 $pls1$ 突变体的耐盐性下降。综上, 穗叶类病斑突变体 $pls1$ 是一种新类型的水稻类病斑突变体, 将为水稻类病斑研究提供新的种质材料; 耐盐性的分析揭示了色胺 5-羟化酶的新功能, 为研究其在细胞程序性死亡和耐盐性中的机制提供了新视角。

关键词: 水稻; 穗叶类病斑; $pls1$; 褪黑色素; 耐盐性

Gene Cloning and Functional Analysis of a New Type of Panicle and Leaf Spot Mutant $pls1$ in Rice

HAN Peijie, LI Fei, YE Chun, SHENG Yile, SUN Hongzheng, LI Junzhou, DU Yanxiu

(College of Agriculture, Henan Agricultural University/ Key Laboratory of Molecular Breeding and Efficient Production of Rice in Henan Province, Zhengzhou 450046)

Abstract: Rice lesion mimic mutants play a crucial role in studying programmed cell death and broad-spectrum disease resistance in rice. In this study, we first report a novel *panicle and leaf spot1* mutant (*panicle and leaf spot 1*, $pls1$), which develops

收稿日期: 2024-12-09

第一作者研究方向为水稻分子生理, E-mail:Hpj290125@163.com; 李飞为共同第一作者

通信作者: 杜彦修, 研究方向为水稻遗传育种, E-mail: duyanxiu@henau.edu.cn

基金项目: 河南省自然科学基金 (232300421156); 河南省科技攻关项目 (242102111137); 河南省高等学校重点科研项目 (23A210027); 河南省现代农业产业技术体系项目 (HARS-22-03-G3); 河南省重点研发专项 (231111110500)

Foundation projects: Natural Science Foundation of Henan (232300421156); Henan Science and Technology Research Project (242102111137); Key Scientific Research Projects of Colleges and Universities in Henan Province (23A210027); Modern Agricultural Industry Technology System Projects of Henan, China (HARS-22-03-G3); Key R&D projects of Henan, China (231111110500)

reddish-brown spots on leaves starting from the three-leaf stage, expanding with plant growth and affecting other organs. Unlike previously reported rice lesion mimic mutants, *pls1* exhibits reddish-brown lesions on the panicle branches and glumes after heading, and the panicles dry up at maturity, severely affecting yield. This represents a new type of rice lesion mimic. The combination of map-cloning and whole genome resequencing revealed that the *pls1* mutant produced a large deletion of 173403 bp, resulting in 7 gene deletions and 1 gene promoter deletion. Gene function prediction and gene expression data in database confirm that PLS1 encodes tryptamine 5-hydroxylase (*Os12g0268000*). The *pls1* mutant leads to excessive accumulation of reactive oxygen species (ROS), programmed cell death, and chloroplast degradation, reducing photosynthetic capacity. Melatonin plays an important role in plant salt tolerance. Further functional analysis showed that the loss of *PLS1* significantly inhibits the expression of melatonin synthesis related enzyme genes *OsTDC1*, *OsTDC3*, *OsSNATI*, *OsASMT1*, and *OsCOMT* in rice, resulting in decreased salt tolerance of the *pls1* mutant. In summary, the panicle and leaf spot mutant *pls1* is a new type of rice lesion mimic mutant, providing new germplasm for studying the mechanisms related to rice lesion mimics. The analysis of salt tolerance reveals a new function of tryptamine 5-hydroxylase, offering a new perspective for studying its mechanisms in programmed cell death and salt tolerance.

Key words: rice; panicle and leaf spot; *pls1*; melanin; salt tolerance

类病斑 (LM, lesion mimic) 是在没有生物或非生物胁迫的情况下, 植物叶和叶鞘上自发产生, 由细胞程序性死亡 (PCD, programmed cell death) 引起的各种病斑。根据PCD起始或抑制机制, LM分为初始 (或局部) 型和扩散型^[1]。在水稻中, 类病斑突变体 (LMM, lesion mimic mutant) 通常被称为斑点叶 (*spl*, *spotted leaf*) 突变体, 其特征是在叶上形成红棕色点状斑^[2]。自1960年代中期在水稻中报道了第一个类病斑突变体 *sekiguchi lesion* (*sl*) 以来, 研究人员已经在玉米、水稻、小麦和拟南芥等物种中确定了一系列LMM^[1, 3-4]。迄今为止水稻中已鉴定出70多个LMM, 其中一些基因已被克隆, 这些基因主要参与脂质代谢、基因转录调控、叶绿素代谢和植物防御反应^[5]。水稻中首个克隆的LM基因是 *SPL7* (*spotted leaf 7*), 其单碱基的突变引起了蛋白质功能的改变, 并最终导致斑点叶表型^[6-7]。在水稻中抑制 *APIP5* 表达能够引起PCD, 产生LM表型^[8]。 *RLIN1* (*rice lesion initiation 1*) 编码参与四吡咯生物合成途径的粪卟啉原III氧化酶, *rlin1* 突变体表现出LM表型^[9]。水稻脂肪酸脱氢酶基因 *OsSSI2* (*suppressor of salicylate insensitivity 2*) 突变, 降低了体内油酸水平, 增加了硬脂酸水平, 导致LM表型产生^[10]。锌指蛋白 *OsLSD1* (*lesion simulating disease 1*) 对PCD过程具有拮抗作用, 抑制 *OsLSD1* 表达会产生LM表型, 并且使防御相关基因的表达上调^[11]。除了上述调控途径外, 水稻LM基因还参与调控植物的离子转运和活性氧ROS (reactive oxygen species) 系统。ROS被认为在植物发育中发挥着双重作用, 它既是参与植物生长和发育的重要信号分子, 也是有氧代谢的有毒副产物^[12-13]。破坏ROS产生和清除之间的平衡会导致氧化爆发, 从而启动细胞死亡信号并导致PCD, 进而产生LM^[14]。水稻斑点叶基因 *SPL5* (*spotted leaf 5*) 突变, 导致积累过量的超氧阴离子和过氧化氢, 使突变体出现LM表型^[15]。水稻 *SPL4* 通过抑制叶片发育中的ROS积累, 在叶片衰老中发挥重要作用^[16]。水稻E3泛素连接酶基因 *SPL11*

(*spotted leaf 11*), 负向调节PCD, 该基因突变导致斑点叶的产生^[2, 17]。

廖海丽等对水稻LM类型和机制的最新研究进展进行了全面和翔实的综述, 发现目前没有穗部枝梗出现类病斑的报道^[18]。本研究鉴定了一种新型的水稻LMM——穗叶同时出现类病斑的突变体*pls1* (*panicle and leaf spot 1*), 这种穗部、特别是枝梗出现LM的突变体未见报道。田间调查了*pls1*突变体对农艺性状的影响, 并通过图位克隆结合全基因组测序的方法获得了控制该性状的基因*PLS1*, 随后又分析了*PLS1*产生LM的机制和其耐盐性的功能。这些研究结果将为研究水稻LM提供新材料和新视角。

1 材料与方法

1.1 试验材料和表型调查

试验材料包括野生型日本晴 (Nipponbare, NIP)、类病斑突变体 *pls1* 和杂交亲本蜀恢 527 (籼稻), 以及 NIP×*pls1* 和蜀恢 527×*pls1* 的 F₁、F₂ 群体, 其中 *pls1* 由 NIP 通过钴⁶⁰ 辐射获得。所有材料均种植于河南省郑州市河南农业大学科技园区, 试验材料于五月中旬育秧, 六月中旬单棵移栽大田, 株距 13 cm, 行距 30 cm, 每行 12 株, 野生型 NIP 和 *pls1* 突变体各种 10 行, 常规大田水肥管理, 于十月中旬收获。

对野生型 NIP 和 *pls1* 突变体全生育期观察, 记录类病斑出现时间、位置和大小等。在成熟期, 随机选取野生型 NIP 和 *pls1* 突变体种植材料中心位置各 15 棵单株进行调查, 测定株高、有效分蘖数、结实率和千粒重等数据。

1.2 基因定位

利用均匀分布在 12 条水稻染色体上的 InDel 引物 (本实验室保存) 和 712 株 F₂ 类病斑植株进行基因定位。初步确认目标基因在染色体位置后, 在作图区间内进一步开发新的 InDel 标记, 并进行精确定位。使用 2×CTAB 法从样品中提取基因组 DNA, 并将突变体 *pls1* 的基因组 DNA 送往华大基因 (深圳华大基因股份有限公司, 深圳, 中国) 进行全基因组重测序。本实验用的 PCR 反应体系为 10 μL: 2×EasyTaq[®] PCR SuperMix (Transgen, Cat. No. AS111) 5 μL, 左右引物各 0.5 μL, 模板 DNA 为 0.5 μL, 无菌水 3.5 μL。PCR 程序: 预变性 95°C 5 min, 变性 95°C 30 s, 退火 55°C 30 s, 延伸 72°C 30 s, 重延伸 72°C 5 min, 延伸速率为 1 kb/min 计算, 16°C 结束程序保存, 变性-退火-延伸为 32 个循环。所有精细定位标记均列于表 1 中。

表 1 本研究精细定位使用的 InDel 分子标记及 qRT-PCR 引物

Table 1 InDel molecular markers and qRT-PCR primers used for fine mapping in this study.

名称	正向引物序列 (5' -3')	反向引物序列 (5' -3')
Names	Forward primer sequence (5' -3')	Reverse primer sequence (5' -3')
ID05256	TTCTGACCTTCGACTTGTTT	GCCAGTTGAAGTGAATTGAT
ID05387	TTTTTAGGCATTGGCATATT	GTATGTTGTTTCTTCTCGCC
ID05487	CAGTTGCAGTAGTGTGGTG	AATTTTCTGTGGCATTTTGT
ID05578	GTCATTAAC TCGGTGGAGC	TTAATCACGTGCTAATGGAC

ID05634	TAGGACATACTCCCTTCGTC	GGTGTTAAAGCGTGAGTGAT
ID05700	CAGCATCTAGCAACCATTCT	AAAAGGGCACTAATCAAGTT
ID05975	CGGAGGGAGAATTTTACATA	GTTCTGTGATTATTTGGCCT
ID06001	AGGACACGGTCTTCAAAAA	CCCTCCGGACTGATAATACT
ID06050	CTTTCTAGCTAAACATCCCG	CCGCCATTTATGTCTTATTT
ID06078	CTTTGCCAAAATGTAGCTGT	ACCCGTCGACAGTATGTTAC
ID06115	GGCATGATTTTGTGATGTAA	CTTATTGATTTACAGCCAA
ID06192	TTCACGGATTTAGTTTCCAC	GGCCTCTCTATATATGGTGC
OsTDC3	CAAGACCGAAAGGCTTACGTG	CTACTTGTCTTCTCCGGCGTCG
OsTDC1	AACAAGACCGGAAGGCGTACG	CAGGAAGAGCATCACGTGCGGA
OsTDC2	GTGCCTCCCACTTCTGACCATG	CGTGTGCTCTCTGTAAGTGG
OsT5H	GCCAGCTTGCTCTACCACTTCG	TCTTCTGACGGCGACGAAGAG
OsSNAT1	GAACCTTTGCCCGAGGAACTAG	CCTTGTGCGATAAAGCTTGGAG
OsASMT1	CGGTGCAAGGAGGCAATCTCAG	TTGATCGAACACCCAGCACCGG
OsCOMT	GCTCAAGAACTGCTACGACGCG	GGCGAGCATGATCATGTGACG
OsZIP18	GAGGTGAAGGTGAAGGACTTGG	TTGACCCTCTCCACTAGCAGTG
OsActin	GGAAGTACAGTGCTGGATTGGAG	TCTTGGCTTAGCATTCTTGGGT
PLS1	GACCGAGCCAAATTAGCCACG	CCAGAACACTGCTAATGGCCTG

1.3 叶绿素含量和叶绿素荧光参数测定

在开花期，选择 5 株生长活力相对均匀的野生型和突变体，剪取剑叶进行叶绿素含量分析。称取 0.1 g 叶组织切成片，浸泡在 25 mL 的 1:1 乙醇:丙酮溶液中。将所有样品的 3 个重复进行暗反应 24 小时，期间摇动混匀数次。用分光光度计测量 663 nm、645 nm 和 470 nm 处的吸光度值，计算光合色素含量，并通过 Student T 检验进行统计分析。同样选取生长活力相对均匀的野生型和突变体的剑叶进行叶绿素荧光参数测定，样品进行 30 min 暗处理，以保证光系统 II 的光反应中心充分开放和后续荧光参数测量的准确性。将待测叶片固定在植物荧光成像检测拍摄平台 (Heinz Walz GmbH, Imaging-PAM, Germany)。每个样品位于距叶尖 2、4、6、8 和 10 cm 处，分别选定 5 个测试区域，用于数据采集软件 (ImagingWin v2.0 m, Walz) 记录。

1.4 组织化学分析

按照试剂商 (苏州科铭生物科技有限公司, 苏州, 中国) 的说明书分析开花期 NIP 和 *pls1* 剑叶中氧自由基 (OFR)、丙二醛 (MDA)、H₂O₂ 含量、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD)、抗坏血酸过氧化物酶 (APX)、过氧化氢酶 (CAT) 和谷胱甘肽还原酶 (GR) 活性。使用台盼蓝染色检测 PCD^[19]。

1.5. 电子显微镜观察

取孕穗后期 NIP 和 *pls1* 植株的剑叶，并用 3% 戊二醛混合溶液预固定。随后，将样品固定在 1% 四氧化钨中，以不同丙酮浓度系列脱水，在 Epox 812 中浸润 4 小时，然后包埋^[19]。切片用亚甲蓝染色，超薄切片

用金刚石刀切割，用乙酸铀酰和柠檬酸铅染色，使用透射电子显微镜（Hitachi, H-600IV, Japan）观察拍摄切片。

1.6 RNA 提取和基因表达分析

按照试剂盒说明书，使用 TRIzol 试剂（Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）提取 7 叶期 NIP 和 *pls1* 突变体叶片总 RNA，然后使用逆转录酶（Promega, Madison, WI, USA）进行逆转录。qRT-PCR 基因特异性引物列于表 1。使用三个生物学重复求平均值获得最终结果。本实验采用的 PCR 反应体系为 10 μ L：2 \times SYBR Green PCR Master Mix（TOYOBO, Cat. No. QPK-201）5 μ L，左右引物各 0.5 μ L，模板 cDNA 1 μ L，无菌水 3 μ L。每个样品重复三次。qRT-PCR 程序如下：预变性 95 $^{\circ}$ C 1 min，变性 95 $^{\circ}$ C 20 s，退火 60 $^{\circ}$ C 1 min，变性-退火为 40 个循环，使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算基因相对表达水平^[20]。

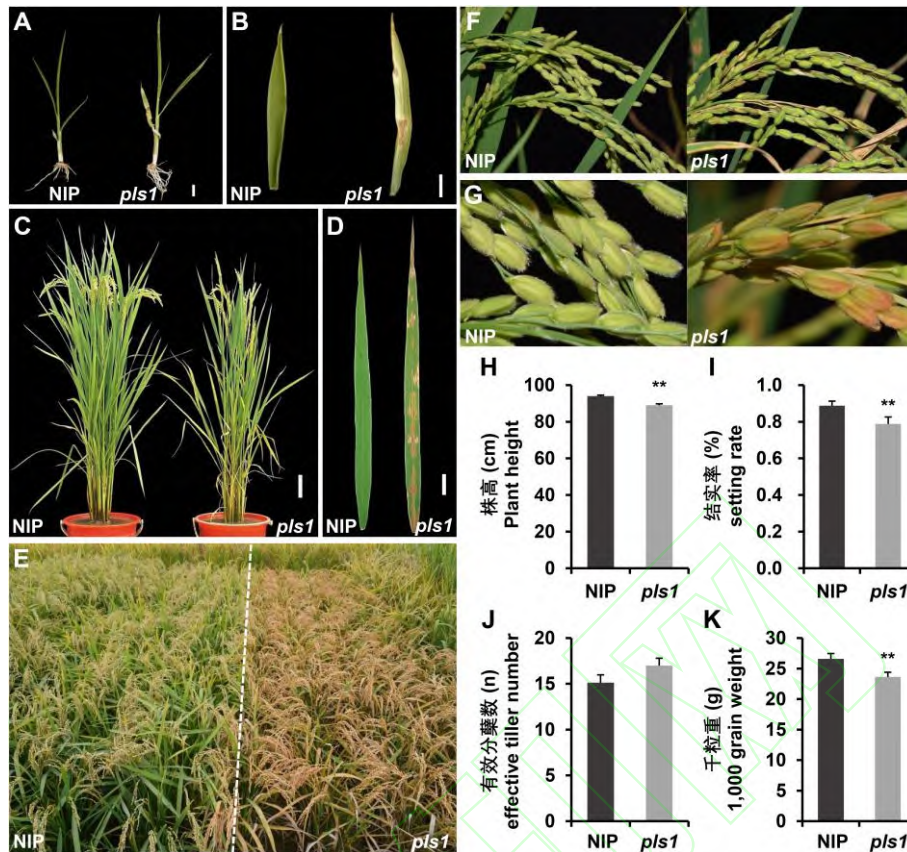
1.7 盐胁迫分析

水稻种子经 10% NaClO 消毒浸种后转至 28 $^{\circ}$ C 人工黑暗培养箱催芽 2 d。种子萌发后，选取露白一致的种子，将其种植在气候室中的下部剪开的 96 孔板上，生长条件为 28 $^{\circ}$ C，12 小时光照/12 小时黑暗，光照强度 30000 Lux；播种后 1/4 水稻全营养液培养 4 天，换 1/2 水稻全营养液培养 4 天，转全水稻全营养液培养 14 天，对水稻幼苗进行盐胁迫，共胁迫培养 7 天，之后改为正常水稻全营养液恢复培养 9 天后统计分析幼苗存活率。每个材料播种 16 棵，3 次重复。前期对 NIP 和 *pls1* 突变体进行了 150 和 200 mmol/L NaCl 的两个盐浓度胁迫处理比较，150 mmol/L NaCl 可显著区分 NIP 和 *pls1* 突变体盐敏感表型，本研究采用 150mmol/L NaCl 进行盐胁迫分析。

2 结果与分析

2.1 *pls1* 突变体表型特征

本研究通过钴⁶⁰辐射粳稻品种 NIP，获得了一个新型的水稻类病斑突变体，与以往报道的水稻叶片类病斑突变体不同，该突变体叶、穗部枝梗和颖壳均出现红褐色类病斑，将其命名为穗叶类病斑突变体 1 (*pls1*, *panicle and leaf spot 1*)。大田调查发现，*pls1* 突变体在三叶期从最下部老叶开始出现红褐色斑点（图 1A, B）。随着植株生长发育，斑点逐渐扩展，最后连成片至叶片枯黄，同时扩展至叶鞘，抽穗后枝梗、颖壳逐渐出现褐色，特别是枝梗快速变褐色死亡，导致成熟期稻穗干枯，严重影响产量（图 1C-G）。与野生型 NIP 相比，*pls1* 突变体表现出早衰，其株高、结实率和千粒重显著降低，但有效穗数不受影响（图 1H-K）。



A: 三叶期NIP和*pls1*突变体植株, scale=2 cm; B: 三叶期类病斑叶片, scale=1 cm; C: NIP和*pls1*突变体灌浆期植株, scale=8 cm; D: 灌浆期类病斑叶片, scale=1.5 cm; E: NIP和*pls1*突变体灌浆期大田植株表型; F-G: 灌浆期NIP和*pls1*突变体的穗部枝梗 (F) 和颖壳 (G) 表型对比; H-K: NIP和*pls1*突变体成熟期株高(H)、结实率(I)、有效分蘖数(J)和千粒重(K)。**表示 $P < 0.01$

A: NIP and *pls1* mutant plant at the three leaf stage, scale=2 cm; B: Lesion mimic leaf at three-leaf stage, scale=1 cm; C: NIP and *pls1* mutant plant during grain filling stage, scale=8 cm; D: Lesion mimic leaf at grain filling stage, scale=1.5 cm; E: Field Phenotype of NIP and *pls1* mutant during grain filling stage; F-G: Comparison of the panicle branches and glume phenotypes between NIP (F) and *pls1* mutant (G) during grain filling stage; H-K: plant height (H), seed setting rate (I), effective tiller number (J), and 1000-grain weight (K) at maturity stage. **indicating $P < 0.01$ level

图1 *pls1*突变体的表型和农艺性状分析

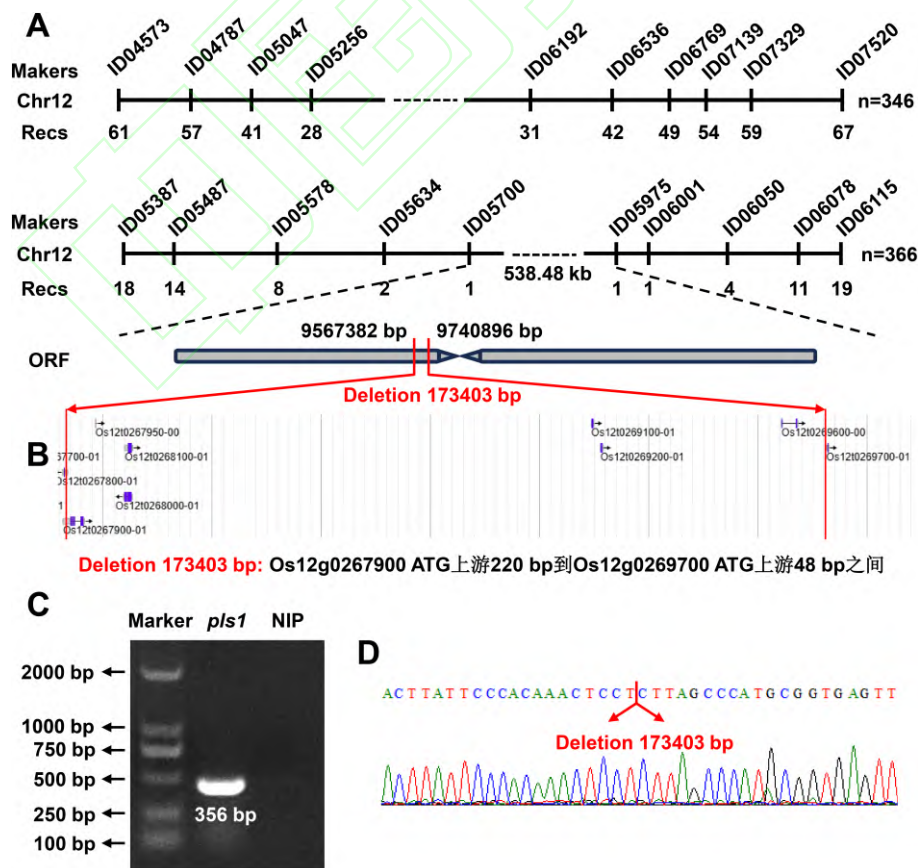
Fig. 1 Analysis of phenotypic and agronomic traits of *pls1* mutant

2.2 *pls1* 突变体的遗传分析与基因克隆

为研究 *pls1* 的遗传特性和克隆该基因, 将 *pls1* 突变体分别与 NIP 和蜀恢 527 进行杂交构建 F_1 和 F_2 群体。两个杂交的 F_1 植株均表现出正常叶片和稻穗, 没有出现类病斑。*pls1* × NIP 的 F_2 群体正常和类病斑植株分离比为 3 : 1 ($\chi^2=0.75$), 这表明 *pls1* 突变体表型是由单个隐性核基因突变引起的。

为扩大作图群体中单株间 DNA 的多态性, 利用 *pls1* × 蜀恢 527 杂交产生的 F_2 群体对目标基因进行图位克隆。基因初步定位显示 *pls1* 定位在 12 号染色体上分子标记 ID04573 和 ID07520 之间 (图 2A)。随后的精细定位将定位区间缩小到标记 ID05700 和 ID05975 之间的 538.48 kb 区域, 但无法再获得更近的分子标记,

基于此推测在 ID05700 和 ID05975 两个标记间存在大片段缺失。随后对 *pls1* 突变体进行了全基因组重测序，并与 NIP 基因组进行对比，发现 *pls1* 突变体在第 12 染色体 9567382~9740896 之间产生了 173403 bp 缺失(图 2B)，随后设计了跨缺失区域的 356 bp 片段特异扩增引物，经 PCR 扩增、测序验证了这一结果(图 2C,D)。进一步对缺失片段中包含的基因进行分析发现该区域包含 8 个预测的 ORF。173403 bp 片段的缺失导致 *Os12g0267900*、*Os12g0267950*、*Os12g0268000*、*Os12g0268100*、*Os12g0269100*、*Os12g0269200* 和 *Os12g0269600* 这 7 个基因全部缺失，而第 8 个基因 *Os12g0269700* 缺失了部分启动子(图 2D)。RAP-DB 网站基因功能预测显示 *Os12g0269100*、*Os12g0269200* 和 *Os12g0269600* 和 *Os12g0269700* 四个基因均编码醇溶蛋白，*Os12g0267900* 编码功能未知的锌指蛋白，*Os12g0267950* 为功能未知的非编码转录本，*Os12g0268000* 编码色胺 5-羟化酶，*Os12g0268100* 编码假定的蛋白，因此候选基因在 *Os12g0268000*、*Os12g0267900*、*Os12g0267950* 和 *Os12g0268100* 之中。已报道 *Os12g0268000* 被命名为 *OsSL*(Sekiguchi lesion)/*ELLI*(*Early lesion leaf 1*)/*OsT5H*(*Tryptamine 5-hydroxylase*)，突变以后出现与 *pls1* 突变体叶片类病斑一样的表型，但没有穗部类病斑^[21-24]。由于这 4 个基因在 *pls1* 突变体中缺失，无法利用荧光定量 PCR 技术分析它们在 *pls1* 突变体中的表达量，于是查询了多个水稻基因表达数据库，发现 *Os12g0267950* 在数据库中没有表达数据，而 *Os12g0267900* 和 *Os12g0268100* 在叶片和稻穗表达量较低，只有 *Os12g0268000* 在叶片和稻穗中较其他器官有较高的表达量(数据未展示)，因此确认 *PLS1* 就是 *Os12g0268000*，并且发现了 *Os12g0268000* 的新功能，其缺失不仅引起叶片出现类病斑也导致稻穗出现类病斑。



A: *pls1* 突变体目的基因精细定位。数字代表交换单株; B: *pls1* 突变体重测序突变区域模式图; C: *pls1* 突变体缺失区域电泳分析; D: *pls1* 突变体缺失突变位

点的测序峰图

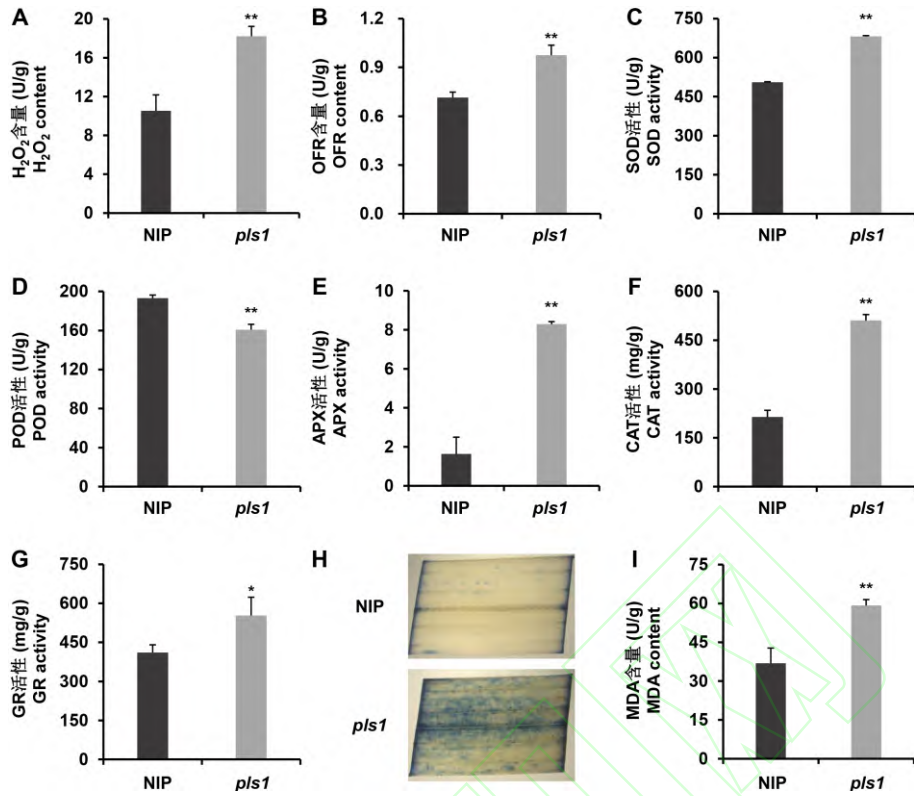
A: Fine mapping of the target gene of *pls1* mutant. The number represents the exchange of individual plants; B: *pls1* mutation Re-sequencing mutation region pattern map; C: Electrophoretic analysis of deletion regions in *pls1* mutant; D: Sequencing chromatograms of *pls1* mutant with missing mutation sites

图 2 *PLS1* 基因克隆

Fig. 2 The Positional cloning of *PLS1*

2.3 *PLS1* 的缺失造成水稻中 ROS 过量积累

前人研究表明，ROS的过量积累与LMM的PCD发生关系密切，而 H_2O_2 和 O^{2-} 是ROS的主要成分。因此，分析了NIP和*pls1*突变体叶片中的 H_2O_2 和氧自由基OFR（oxygen free radical）含量，结果显示*pls1*突变体中的 H_2O_2 和OFR含量均显著增加（图3A, B），这表明*pls1*突变体叶片中的ROS比野生型积累更多。当植物体内的ROS含量增加时，植物体内抗氧化系统酶的活性都会发生变化。植物抗氧化系统中的主要酶超氧化物歧化酶SOD（SOD, superoxide dismutase）、过氧化物酶POD（POD, peroxidase）、抗坏血酸过氧化酶APX（APX, ascorbate peroxidase）、过氧化氢酶CAT（CAT, catalase）和谷胱甘肽还原酶GR（GR, gluathione reductase）的功能是清除ROS，防止其损害细胞。对野生型和*pls1*突变体叶片中的抗氧化酶SOD、POD、APX、CAT和GR活性进行分析发现，与野生型相比*pls1*突变体中的这5个酶的活性均显著增加（图3C-G）。为了确认*pls1*突变体叶片中的细胞是否发生程序性死亡，随后进行了台盼蓝染色，结果显示在*pls1*突变体叶片中观察到大量蓝色染色斑点，而在NIP中几乎没有检测到蓝色染色（图3H），表明*pls1*突变体叶片中发生大量的细胞凋亡。进一步测定细胞膜损伤指标丙二醛MDA（MDA, malondialdehyde）的水平，结果显示*pls1*突变体中MDA含量显著增加（图3I）。以上结果表明，*PLS1*缺失造成水稻中ROS过量积累导致了PCD，并诱导了ROS抗氧化系统酶活性的显著增加。



A-B: NIP和*pls1*突变体叶片H₂O₂ (A)和OFR (B)含量; C-G: NIP和*pls1*突变体叶片SOD (C)、POD (D)、APX (E)、CAT (F)和GR (G)活性分析; H: NIP和*pls1*突变体叶片胎盼蓝染色; I: NIP和*pls1*突变体叶片MDA含量。*表示 $P < 0.05$; **表示 $P < 0.01$

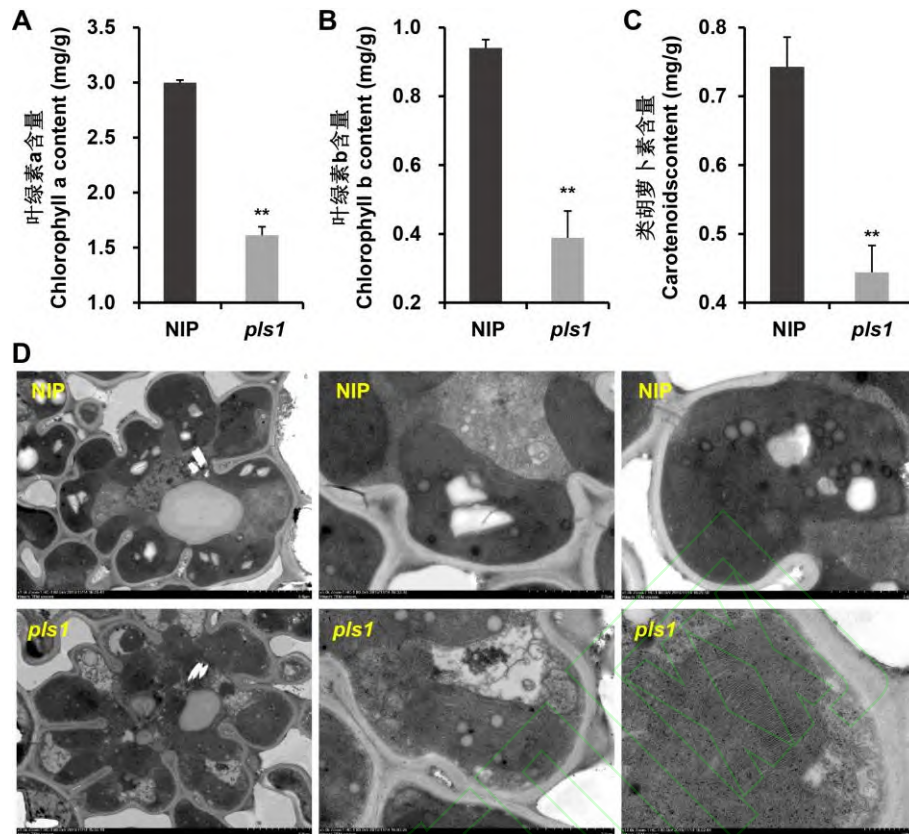
A-B: The content of H₂O₂ (A) and OFR (B) in NIP and *pls1* mutant leaves; C-G: Analysis of SOD (C), POD (D), APX (E), CAT (F), and GR (G) activities in NIP and *pls1* mutant leaves; H: Trypan blue staining of NIP and *pls1* mutant leaves; I: The content of MDA in NIP and *pls1* mutant leaves. *indicating $P < 0.05$ level; **indicating $P < 0.01$ level

图3 NIP和*pls1*突变体的ROS积累和抗氧化酶活性分析

Fig. 3 ROS accumulation and antioxidant enzyme activity analysis of NIP and *pls1* mutant

2.4 *PLS1* 缺失导致水稻叶绿体降解和光合能力减弱

由于*pls1*突变体叶片出现类病斑，因此测量了*pls1*突变体和野生型NIP植株叶片中的叶绿素含量。结果显示，*pls1*突变体中的叶绿素a、b和类胡萝卜素含量显著低于NIP（图4A-C）。PCD通常与细胞器损伤有关。本研究通过透射电子显微镜观察叶绿体超微结构，发现与NIP相比，*pls1*突变体叶绿体片层稀疏，噬蚀体增加，淀粉颗粒减少（图4D）。这些结果表明，叶绿体降解与*PLS1*缺失导致的类病斑发生有关。



A-C: NIP和*pls1*突变体叶片叶绿素(A)、b(B)和类胡萝卜素(C)含量; D: NIP和*pls1*突变体叶绿体透射电子显微镜观察, scale=2 μ m。**表示 $P < 0.01$

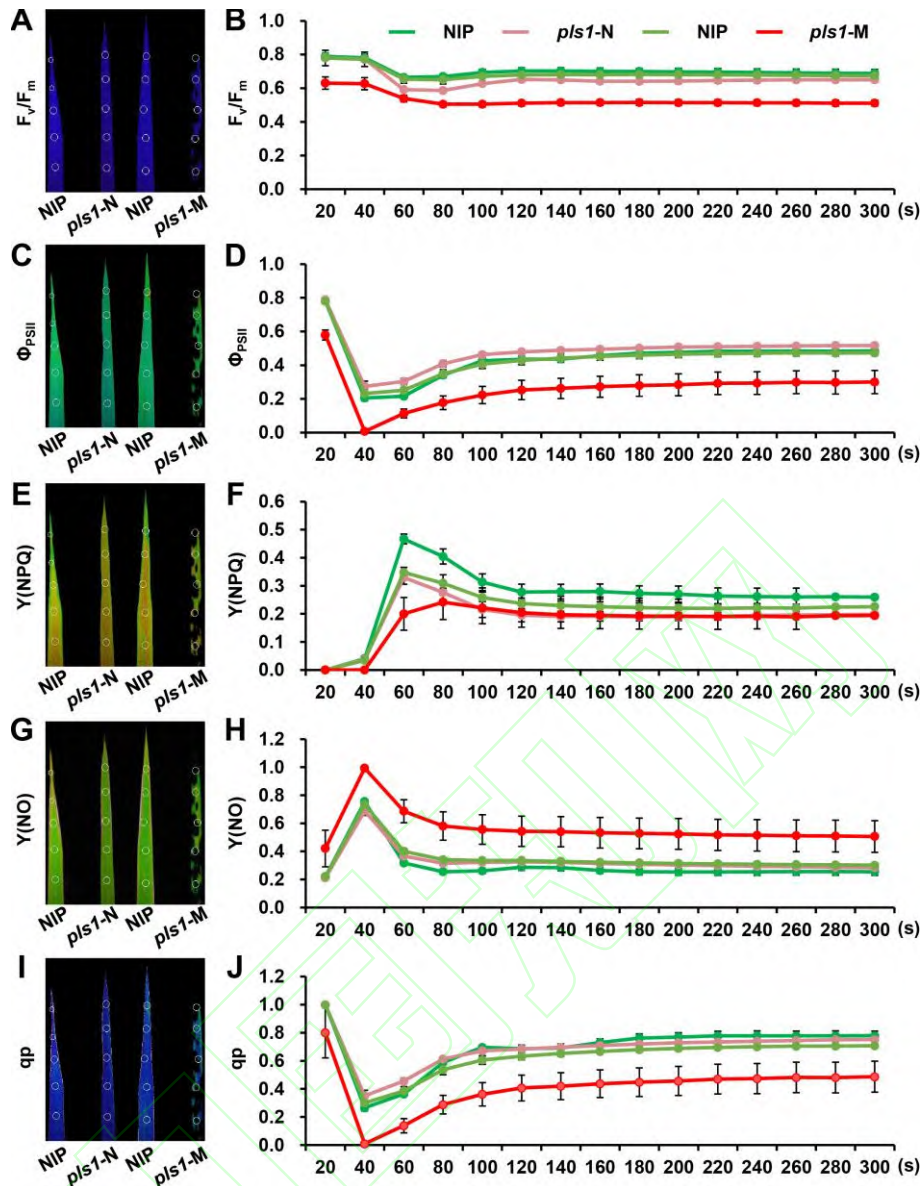
A-C: The content of chlorophyll a (A), b (B), and carotenoid (C) in NIP and *pls1* mutant leaves; D: Observation of NIP and *pls1* mutant chloroplasts. scale=2 μ m

**indicating $P < 0.01$ level

图4 NIP和*pls1*突变体色素含量分析和叶绿体观察

Fig. 4 Analysis of pigment content and observation of chloroplasts in NIP and *pls1* mutant

基于*pls1*突变体类病斑造成的叶绿体降解, 本研究采用植物荧光活体成像系统分析了NIP和*pls1*突变体开花期剑叶的叶绿素荧光参数。结果表明, *pls1*突变体具有类病斑的叶片(*pls1*-M)的最大光合效率(F_v/F_m)和实际光合效率(Φ_{PSII})相对于NIP叶片和*pls1*突变体正常叶片(*pls1*-N)光合效率均降低(图5A-D), 表明*pls1*突变体类病斑造成的叶绿体降解降低了*pls1*突变体的光合能力。Y(NPQ) (quantum yield of photochemical quenching) 是光保护的重要指标, 在*pls1*突变体类病斑的叶片中也处于降低趋势(图5E,F), 这表明*pls1*突变体的光强过剩。Y(NO) (quantum yield of non-photochemical quenching) 是光损伤的重要指标, 在*pls1*突变体类病斑叶片中则处于增加趋势(图5G,H), 这表明*pls1*突变体不足以将吸收的光能完全消耗掉。同时, *pls1*突变体类病斑叶片中光合作用引起的荧光淬灭参数qP (photochemical quenching) 的下降(图5I,J), 也反映了*pls1*突变体的光合活性降低。这些结果表明, *PLS1*缺失突变导致叶绿体降解并抑制水稻的光合作用。



A-B: NIP和*pls1*突变体叶片 F_v/F_m 分析; C-D: NIP和*pls1*突变体叶片 Φ_{PSII} 分析; E-F: NIP和*pls1*突变体叶片 $Y(NPQ)$ 分析; G-H: NIP和*pls1*突变体叶片 $Y(NO)$ 分析; I-J: NIP和*pls1*突变体叶片 qp 分析

A-B: Analysis of F_v/F_m in NIP and *pls1* mutant leaves; C-D: NIP and *pls1* mutant leaf Φ_{PSII} analysis; E-F: NIP and *pls1* mutant leaf $Y(NPQ)$ analysis; G-H: Analysis of $Y(NO)$ in NIP and *pls1* mutant leaves; I-J: qp analysis of NIP and *pls1* mutant leaves

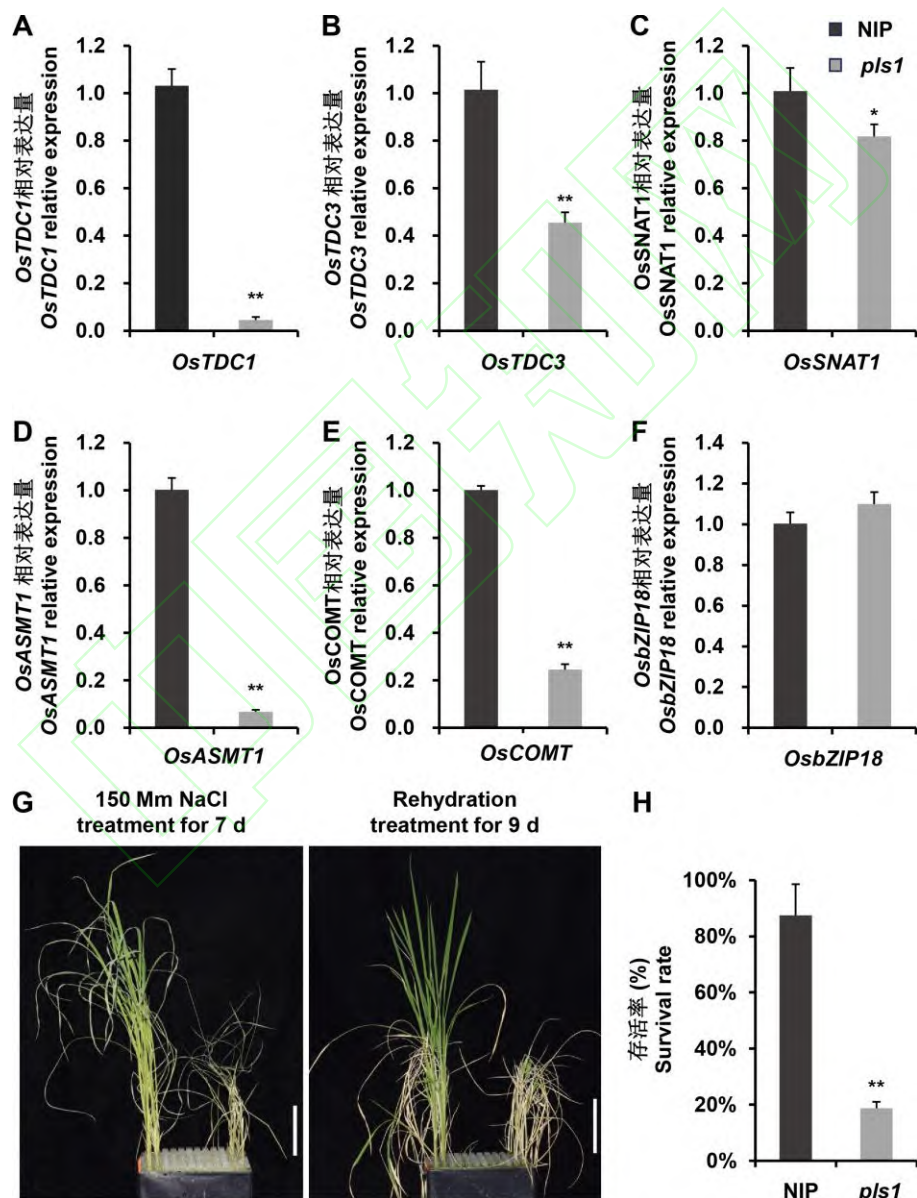
图5 NIP和*pls1*突变体光合作用分析

Fig. 5 Photosynthesis analysis of NIP and *pls1* mutant

2.5 *PLS1* 缺失抑制 *pls1* 突变体中褪黑素合成相关酶基因的表达并降低其耐盐性

植物褪黑素可以增强植物抗氧化酶活性, 有效清除ROS, 保护细胞和组织免受氧化应激^[25]。色胺5-羟化酶是催化色胺转化合成褪黑素的关键中间体血清素的关键酶。因此, 本研究分析了*pls1*突变体中*PLS1*缺失对褪黑素合成相关酶基因表达的影响, 这些酶包括色氨酸脱羧酶OsTDC1 (TDC1, tryptophan decarboxylase 1) 与OsTDC3 (TDC3, tryptophan decarboxylase 3)、血清素N-乙酰转移酶OsSNAT1 (SNAT1, serotonin

N-acetyltransferase-1)、乙酰血清素O-甲基转移酶OsASMT1(ASMT1, acetylserotonin O-methyltransferase 1)、咖啡酸3-O-甲基转移酶OsCOMT (COMT, caffeic acid 3-O-methyltransferase) 以及血清素正调节因子OsZIP18。结果表明,褪黑素合成关键酶基因*OsTDC1*, *OsTDC3*, *OsSNAT1*, *OsASMT1*和*OsCOMT*均表达显著下调,而血清素正调节因子*OsZIP18*则略微上调(图6A-F)。褪黑素在植物耐盐性中起着重要作用,于是进一步评估了*pls1*突变体和NIP水稻植株的耐盐性。如图6G所示,150 mmol/L NaCl胁迫处理一周后,与野生型相比,*pls1*突变体整体表现为叶片干卷的盐敏感表型(图6G),复水处理9天后,野生型存活率显著大于*pls1*突变体(图6H)。这些结果表明,PLS1的缺失,抑制了褪黑素合成相关酶基因的表达,这可能造成了*pls1*突变体中褪黑素含量下降,进而导致了*pls1*突变体的盐敏感表型。



A-F: NIP和*pls1*突变体中*OsTDC1* (A), *OsTDC3* (B), *OsSNAT1* (C), *OsASMT1* (D), *OsCOMT* (E)和*OsbZIP18* (F)基因相对表达量分析。G: NIP和*pls1*突变体耐盐性分析; scale=5 cm。H: NIP和*pls1*突变体盐胁迫后存活率对比。*表示 $P<0.05$; **表示 $P<0.01$

A-F: Relative expression analysis of *OsTDC1* (A), *OsTDC3* (B), *OsSNAT1* (C), *OsASMT1* (D), *OsCOMT* (E), and *OsbZIP18* (F) in NIP and *pls1* mutants. G: Salt

tolerance analysis of NIP and *pls1* mutants. scale=5 cm; H: Comparison of survival rates between NIP and *pls1* mutant after salt stress. *indicating $P < 0.05$ level;

**indicating $P < 0.01$ level

图6 褪黑素合成相关酶基因的表达量分析及*pls1*突变体耐盐性分析

Fig. 6 Expression level analysis of melatonin related synthase genes and salt tolerance analysis of *pls1* mutant

3 讨论

本研究中, 穗叶类病斑突变体*pls1*从三叶期叶片开始出现红褐色类病斑, 随着水稻生育进程病斑逐渐扩大, 并扩散到整个植株和穗子, 特别是稻穗枝梗出现类病斑 (图1)。已报道的类病斑突变体虽有颖壳出现类病斑, 例如*scyl2-1*和*glmm1* (*glume lesion mimics mutant 1*), 但没有枝梗类病斑这一类型^[18,26-27], 因此*pls1*是一个新型的水稻穗叶类病斑突变体, 这将为研究水稻类病斑的机制提供新材料。扩散型类病斑突变体*lmes5* (*lesion mimic and early senescence 5*) 分蘖期叶片和叶鞘上出现坏死斑点, 类病斑随着生长扩散到整株, 进而植物表现出过早衰老^[28], *pls1*突变体类病斑发生与*lmes5*突变体类似, 因此也属于扩散型类病斑突变体。这类突变体因为早衰而对产量影响严重, 例如*lmes* (*lesion mimic and early senescence*) 突变体其营养生长过程中自发产生类病斑, 并且开花后加速衰老^[19]。*lmes1* (*lesion mimic and early senescence 1*) 突变体表现出籽粒灌浆不良, 圆锥花序较小, 种子较少^[29]。*pls1*突变体也有早衰现象, 特别由于枝梗出现类病斑, 稻穗最终干枯, 严重影响了千粒重 (图1E, K)。

全基因组重测序可以快速鉴定基因^[30]。本研究通过图位克隆结合全基因组重测序获得了*pls1*位点突变情况, 发现*pls1*突变体出现了大片段缺失导致7个基因缺失和1个基因的启动子缺失 (图2B-D)。在缺失的基因中, 已报道*Os12g0268000*编码编码色胺5-羟化酶, 被命名为*OsSL/ELL1/OsT5H*, 已有多篇文献报道其突变引起关口型叶片类病斑^[21-24,31], 本研究中*pls1*突变体叶片病斑类型与*sl/ell1*一致, 因此, 确认*PLS1*即为*OsSL/ELL1/OsT5H*。然而, *OsSL/ELL1/OsT5H*相关的文献均没有报道它们的突变引起穗部出现类病斑^[21-24,31], *PLS1*突变引起穗部、特别是枝梗类病斑的新功能, 值得进一步深入研究。

在没有生物和非生物胁迫的情况下, LMM自发发生坏死病变, 通常与HR (HR, hypersensitivity) 和PCD有关。ROS是植物中PCD和防御反应的重要信号分子和关键调节因子^[32]。类病斑突变体中H₂O₂是ROS积累的典型特征^[33]。在本研究中, *pls1*突变体叶片中H₂O₂、OFR显著积累 (图3A, B), 这导致*pls1*突变体中的细胞发生程序性死亡 (图3H)。*pls1*植株体内的抗氧化系统酶SOD、POD、APX、CAT和GR活性被显著诱导激活, 这表明*pls1*突变体处于ROS毒性胁迫时, 保护系统并没有完全失去功能。叶绿体作为重要的细胞器, 在类病斑的形成和持续发展过程中很容易被破坏和降解^[19]。*pls1*突变体叶片中的叶绿素含量显著降低 (图4A-C), 进一步透射电子切片实验观察到*pls1*突变体的叶绿体结构被破坏 (图4D)。叶绿体是光合作用的场所^[34], 叶绿素荧光参数分析显示*pls1*突变体的光合能力降低 (图5)。这些结果表明, *PLS1*缺失突变产生的类病斑导致了水稻叶绿体降解和光合能力下降。

盐胁迫严重影响作物产量。已有研究表明植物褪黑素可以提高对盐胁迫在内的多种非生物胁迫的抵抗力^[35]。色胺羟化酶可以催化色胺生成血清素，血清素再经过催化酶SNAT，ASMT和COMT催化最终生成褪黑素^[36]。*pls1*突变体中褪黑素合成相关酶基因*OsTDC1*，*OsTDC3*，*OsSNAT1*，*OsASMT1*和*OsCOMT*表达均显著下调（图6A-F），这表明*PLS1*缺失可能抑制了褪黑素的合成。野生型和*pls1*突变体耐盐性分析证实了*pls1*突变体耐盐性下降（图6G,H）。因此，推测*PLS1*的缺失导致褪黑素合成相关酶基因表达下降，影响了褪黑素的合成，导致水稻耐盐性下降。*OsSL/ELL1/OsT5H*未见报道其调控水稻耐盐性^[21-24,31]，在本研究中*PLS1*表现出影响水稻耐盐性，这将为全面认识*OsSL/ELL1/OsT5H/PLS1*的功能提供新视角。

参考文献:

- [1] Lorrain S, Vaillieu F, Balagué C, Roby D. Lesion mimic mutants: Keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? Trends in Plant Science, 2003, 8(6): 263-271
- [2] Yin Z, Chen J, Zeng L, Goh M, Leung H, Khush G S, Wang G L. Characterizing rice lesion mimic mutants and identifying a mutant with broad-spectrum resistance to rice blast and bacterial blight. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2000, 13(8): 869-876
- [3] Liu G, Wang L, Zhou Z, Leung H, Wang G L, He C. Physical mapping of a rice lesion mimic gene, *Sp11*, to a 70-kb segment of rice chromosome 12. Molecular Genetics and Genomics, 2004, 272: 108-115
- [4] 温晓兰, 胡人月, 张博文, 姚丹好, 彭文涛, 万小能, 王秀媛, 袁军海, 刘小粉, 孙果忠. 小麦类病斑突变体*lm452*的生理和遗传特性分析. 植物遗传资源学报. 2023, 24(4): 984-992
Wen X L, Hu R Y, Zhang B W, Yao D Y, Peng W T, Wan X N, Wang X Y, Yuan J H, Liu X F, Sun G Z. Physiological and genetic analysis of a wheat lesion mimic mutant *lm452*. Journal of Plant Genetic Resources. 2023, 24(4): 984-992
- [5] Yan J J, Fang Y X, Xue D W. Advances in the genetic basis and molecular mechanism of lesion mimic formation in rice. Plants, 2022, 11(16): 2169
- [6] Yamanouchi U, Yano M, Lin H, Ashikari M, Yamada K. A rice spotted leaf gene, *Sp17*, encodes a heat stress transcription factor protein. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002, 99(11): 7530-7535
- [7] Hoang T V, Vo K T X, Rahman M M, Choi S H, Jeon J S. Heat stress transcription factor *OsSPL7* plays a critical role in reactive oxygen species balance and stress responses in rice. Plant Science, 2019, 289: 110273
- [8] Wang R Y, Ning Y S, Shi X T, He F, Zhang C Y, Fan J B, Jiang N, Zhang Y, Zhang T, Hu Y J, Bellizzi M, Wang G L. Immunity to rice blast disease by suppression of effector-triggered necrosis. Current Biology, 2016, 26(18): 2399-2411
- [9] Sun C H, Liu L C, Tang J Y, Lin A H, Zhang F T, Fang J, Zhang G F, Chu, C C. RLIN1, encoding a putative coproporphyrinogen III oxidase, is involved in lesion initiation in rice. Journal of Genetics and Genomics, 2011, 38(1): 29-37
- [10] Jiang, C J, Shimono M, Maeda S, Inoue H, Mori M, Hasegawa M, Sugano S, Takatsuji H. Suppression of the rice fatty-acid desaturase gene *OsSSI2* enhances resistance to blast and leaf blight diseases in rice. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2009, 22(7): 820-829

- [11] Wang L J, Pei Z Y, Tian Y C, He C Z. OsLSD1, a rice zinc finger protein, regulates programmed cell death and callus differentiation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2005, 18(5): 375-384
- [12] Mhamdi A, Breusegem F V. Reactive oxygen species in plant development. *Development*, 2018, 145(15): dev164376
- [13] Waszczak C, Carmody M, Kangasjärvi J. Reactive oxygen species in plant signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 2018, 69(1): 209-236
- [14] Choudhary A, Kumar A, Kaur N. ROS and oxidative burst: Roots in plant development. *Plant Diversity*, 2020, 42(1): 33-43
- [15] Jin B, Zhou X R, Jiang B L, Gu Z M, Zhang P H, Qian Q, Chen X F, Ma B J. Transcriptome profiling of the *sp15* mutant reveals that *SPL5* has a negative role in the biosynthesis of serotonin for rice disease resistance. *Rice*, 2015, 8: 1-10
- [16] Ke S W, Liu S H, Luan X, Xie X M, Hsieh T F, Zhang X Q. Mutation in a putative glycosyltransferase-like gene causes programmed cell death and early leaf senescence in rice. *Rice*, 2019, 12: 1-14
- [17] Zeng L R, Qu S H, Bordeos A, Yang C W, Baraoidan M, Yan H Y, Xie Q, Nahm B H, Leung H, Wang G L. *Spotted leaf11*, a negative regulator of plant cell death and defense, encodes a U-box/armadillo repeat protein endowed with E3 ubiquitin ligase activity. *The Plant Cell*, 2004, 16(10): 2795-2808
- [18] 廖海丽, 刘剑斌, 梁毅, 肖贵, 梁金清, 袁炜蓉, 易兆峰, 吴俊. 水稻类病斑突变体及其发生机制研究进展. *杂交水稻*, 2024, 39(5): 1-12.
- Liao L H, Liu J B, Liang Y, Xiao G, Liang J Q, Yuan W R, Yi Z F, Wu J. Research advances in rice lesion mimic mutants and their occurrence mechanisms. *Hybrid Rice*, 2024, 39(5): 1-12
- [19] Matin M N, Saief S A, Rahman M M, Lee D H, Kang H, Lee D S, Kang S G. Comparative phenotypic and physiological characteristics of *spotted leaf 6 (spl6)* and *brown leaf spot2 (bl2)* lesion mimic mutants (LMM) in rice. *Molecules and Cells*, 2010, 30: 533-543.
- [20] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [21] Cui Y J, Peng Y L, Zhang Q, Xia S S, Ruan B P, Xu Q K, Yu X Q, Zhou T T, Liu H, Zeng D L, Zhang G H, Gao Z Y, Hu J, Zhu L, Shen L, Guo L B, Qian Q, Ren D Y. Disruption of *EARLY LESION LEAF 1*, encoding a cytochrome P450 monooxygenase, induces ROS accumulation and cell death in rice. *The Plant Journal*, 2021, 105(4), 942-956
- [22] Fujiwara T, Maisonneuve S, Isshiki M, Mizutani M, Chen L T, Wong H L, Kawasaki T, Shimamoto K. Sekiguchi lesion gene encodes a cytochrome P450 monooxygenase that catalyzes conversion of tryptamine to serotonin in rice. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(15): 11308-11313
- [23] Lu H P, Luo T, Fu H W, Wang L, Tan Y Y, Huang J Z, Wang Q, Ye G Y, Gatehouse A M R, Lou Y G, Shu Q Y. Resistance of rice to insect pests mediated by suppression of serotonin biosynthesis. *Nature plants*, 2018, 4(6): 338-344
- [24] Sun Y Y, Wang B, Ren J X, Zhou Y T, Han Y, Niu S Y, Zhang Y Y, Shi Y H, Zhou J J, Yang C K, Ma X M, Liu X Q, Luo Y H, Jin C, Luo J. OsbZIP18, a positive regulator of serotonin biosynthesis, negatively controls the UV-B tolerance in rice. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(6): 3215

- [25] Zhang N, Sun Q Q, Zhang H J, Cao Y Y, Weeda S, Ren S X, Guo Y D. Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(3): 647-656
- [26] Yao Y, Zhou J H, Cheng C, Niu F A, Zhang A P, Sun B, Tu R J, Wan J N, Li Y, Huang Y W, Xie K Z, Dai Y T, Zhang H, Hong J H, Pan X H, Zhu J J, Zhou H, Liu Z H, Cao L M, Chu H W. A conserved clathrin-coated vesicle component, *ossy12*, regulates plant innate immunity in rice. *Plant, Cell and Environment*, 2022, 45(2), 542-555
- [27] 徐欢, 周涛, 孙悦, 王木妹, 杨亚春, 马卉, 李浩, 徐大伟, 周海, 杨剑波. 水稻颖壳类病斑突变体 *glmm1* 的鉴定与基因定位. *中国水稻科学*, 2023, 37(5), 497-506
- Xu H, Zhou T, Sun Y, Wang M M, Yang Y C, Ma B, Li H, Xu D W, Zhou H, Yang J B. Characterization and gene mapping of a glume lesion mimic mutant *glmm1* in rice. *Chinese Journal of Rice Science*, 2023, 37(5), 497-506
- [28] Li Z, Zhang Y X, Liu L, Liu Q E, Bi Z Z, Yu N, Cheng S H, Cao L Y. Fine mapping of the *lesion mimic and early senescence 1 (Imes1)* in rice (*Oryza sativa*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 2014, 80: 300-307
- [29] Yun H, Cai L L, Du D, Guo Y X, Sun H, Zhong X L, Peng X M, Dai J C, Zhang C W. Fine mapping and phenotype assessment of the novel lesion mimic and early senescence *Imes5* mutant in rice. *Euphytica*, 2022, 218(4): 45
- [30] Zegeye W A, Zhang Y X, Cao L Y, Cheng S H. Whole genome resequencing from bulked populations as a rapid QTL and gene identification method in rice. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(12): 4000
- [31] Tian D G, Yang F, Niu Y Q, Lin Y, Chen Z J, Li G, Luo Q, Wang F, Wang M. Loss function of SL (sekiguchi lesion) in the rice cultivar Minghui 86 leads to enhanced resistance to (hemi) biotrophic pathogens. *BMC Plant Biology*, 2020, 20: 1-14
- [32] Herrera-Vásquez A, Salinas P, Holuigue L. Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression. *Frontiers in plant Science*, 2015, 6: 171
- [33] Woo H R, Masclaux-Daubresse C, Lim P O. Plant senescence: How plants know when and how to die. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(4): 715-718
- [34] Wu S W, Kumar R, Iswanto A B B, Kim J Y. Callose balancing at plasmodesmata. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(22): 5325-5339
- [35] Yan F Y, Wei H M, Ding Y F, Li W W, Lin Chen, Ding C Q, Tang S, Jiang Y, Liu Z H, Li G H. Melatonin enhances Na^+/K^+ homeostasis in rice seedlings under salt stress through increasing the root H^+ -pump activity and Na^+/K^+ transporters sensitivity to ROS/RNS. *Environmental and Experimental Botany*, 2021, 182: 104328
- [36] Wang K X, Xing Q F, Ahammed G J, Zhou J. Functions and prospects of melatonin in plant growth, yield, and quality. *Journal of Experimental Botany*, 2022, 73(17): 5928-5946