

水稻叶脉基因 *OsLVD1* 的鉴定及功能分析

邱一洁 齐飞扬 杜何为 黄敏* 李曼菲*

(长江大学 生命科学学院, 湖北 荆州 434025; *通信联系人, email: 2381615354@qq.com; mfli_maize@163.com)

Identification and Functional Analysis of the Rice Vein Development Gene *OsLVD1*

QIU Yijie, QI Feiyang, DU Hewei, HUANG Min*, LI Manfei*

(College of Life Sciences, Yangtze University, Jingzhou 434025, China; *Corresponding author, email: 2381615354@qq.com; mfli_maize@163.com)

Abstract: 【Objective】Photosynthesis is a major determinant of dry matter accumulation in rice, with chlorophyll content and vein density being critical for photosynthetic efficiency. Here, a rice gene regulating chlorophyll content and vein density, *OsLVD1*, was identified and functionally analyzed. 【Method】*OsLVD1* was identified based on homology to maize vein development genes, and its protein features, phylogeny, conserved motifs, and subcellular localization were analyzed bioinformatically. An *lvd1* mutant was generated using CRISPR/Cas9, with ZH11 as the wild type. Chlorophyll content, vein density, soluble sugar content, and major agronomic traits were examined. The expression of genes related to chlorophyll metabolism and vein development was analyzed by qRT-PCR. 【Result】*OsLVD1* encodes a nuclear-localized WRKY transcription factor, and the *lvd1* mutation caused a frameshift leading to premature termination. Compared with ZH11, the *lvd1* mutant showed reductions of 25.90%, 30.75%, and 27.05% in chlorophyll a, chlorophyll b, and total chlorophyll content, respectively, accompanied by increases in minor vein density and bulliform cell number. Plant height was reduced and growth duration was slightly delayed, whereas soluble sugar content, seed-setting rate, and thousand-grain weight were unaffected. qRT-PCR showed that the expression levels of chlorophyll biosynthesis genes *OsHEMA1* and *OsCHL1* were downregulated, while those of the chlorophyll degradation gene *OsNYC1* and the vein development gene *OsPIN1b* were upregulated in the *lvd1* mutant. *OsLVD1* was predominantly expressed in leaves, with the highest expression at the jointing stage. 【Conclusion】Loss of *OsLVD1* resulted in a “low chlorophyll–high vein density” phenotype, which may compensate for reduced photosynthesis by enhancing vein-mediated transport and water retention, thereby maintaining yield stability. This study demonstrates a novel role of *OsLVD1* in coordinating leaf pigment metabolism and vascular development in rice.

Keywords: *Oryza sativa*; *OsLVD1*; chlorophyll content; leaf vein density; WRKY transcription factor; photosynthesis

摘要: 【目的】光合作用决定水稻干物质积累, 叶绿素含量和叶脉密度与光合作用密切相关。本研究在水稻中鉴定调控叶绿素含量和叶脉密度的基因 *OsLVD1*, 并对其功能进行解析。【方法】通过玉米叶脉发育基因同源比对获得 *OsLVD1*, 并利用生物信息学分析其蛋白特性、系统发育关系、信号肽、跨膜结构域、保守结构域及亚细胞定位。通过 CRISPR 获得 *lvd1* 编辑株, 以野生型 ZH11 为对照, 测定叶绿素含量、叶脉密度、可溶性糖含量及株高、分蘖数、每穗粒数等主要农艺性状, 并通过 qRT-PCR 分析相关基因的表达水平。【结果】生物信息学分析表明, *OsLVD1* 编码 WRKY 家族转录因子, 定位于细胞核。*lvd1* 因移码突变导致蛋白提前终止。与 ZH11 相比, *lvd1* 叶绿素 a、叶绿素 b 和总叶绿素分别下降 25.90%、30.75% 和 27.05%, 剑叶小脉密度和泡状细胞数目增加。*lvd1* 株高降低且生育期略延迟, 但叶片可溶性糖、结实率、千粒重等均无显著差异。qRT-PCR 分析表明, *lvd1* 中叶绿素合成相关基因 *OsHEMA1* 和 *OsCHL1* 的表达显著下调, 而叶绿素降解基因 *OsNYC1* 及叶脉发育相关基因 *OsPIN1b* 表达上调。组织表达分析显示, *OsLVD1* 在叶片中高表达, 且在拔节期达到峰值。【结论】*OsLVD1* 功能缺失导致叶绿素含量降低、叶脉密度增加, 可能通过增加叶脉密度和改变泡状细胞发育补偿光合产物运输与水分保持, 从而维持产量稳定。本研究揭示 *OsLVD1* 在叶片色素代谢与维管系统发育中的新功能, 为光合结构优化提供理论基础。

关键词: 水稻; *OsLVD1*; 叶绿素含量; 叶脉密度; WRKY 转录因子; 光合作用

收稿日期: 2025-10-29; 修改稿收到日期: 2026-01-26。

基金项目: “十四五”国家重点研发计划资助项目(2025YFF1000200); 湖北洪山实验室重大项目(2022hszd029); 湖北省农业微生物产业发展重大专项(NYWSWZX2025-2027-13); 国家自然科学基金青年项目(32301910, Yz2025268)。

水稻(*Oryza sativa* L.)是全球重要的粮食作物之一,对亚洲、非洲和拉丁美洲等众多以水稻为主食的发展中国家的粮食安全具有至关重要的作用^[1]。叶脉维管束是植物整体维管组织系统的重要组成部分,也是叶片中承担输导与支撑功能的关键结构^[2],水稻叶片维管系统呈层级分布,由主脉(midrib)、大脉(large veins)和小脉(small veins)构成,主脉与大脉负责主要的输导和机械支撑,小脉参与叶肉细胞间物质交换与能量分配^[3]。每条叶脉均由木质部、韧皮部和维管束鞘组成^[4],其中木质部运输水分和矿质元素供光合作用,韧皮部转运光合同化物至植株各处,维管束鞘起支撑、运输与调控作用^[5]。叶脉结构及相关生理过程的异常会影响水稻生理活动与产量^[6],而叶片色素、叶脉结构和气体交换性质共同决定光能捕获与碳同化效率^[7]。因此,解析叶片色素水平与结构特征的耦合机制,对提升水稻光能利用效率、保障高产稳产具有重要理论与实践意义。

水稻叶脉的发育过程受多层级遗传调控网络的精细调节。在转录调控层面,LBD 转录因子被证实参与叶片形态建成中发挥重要作用。例如,水稻 *OsLBD3-7* 基因参与叶片卷曲的发育调控,其过表达会导致叶片向背面卷曲,并伴随泡状细胞的数量与体积显著下降,这表明 *OsLBD3-7* 可能通过影响泡状细胞的发育与叶片水分调节机制,从结构上介导叶片形态变化^[8]。在植物发育过程中,激素稳态与生理信号的协调同样不可或缺^[9]。*NAL1* 基因编码一个在质外体中发挥功能的蛋白,它通过维持生长素的极性运输能力,精确调控叶片形态,其突变体表现为叶片变窄与植株矮化^[10]。

这些精细的遗传调控机制共同决定了一个关键功能性状——叶脉密度,它是影响植物水分运输能力的重要结构性特征^[11]。叶脉密度作为一个核心结构性状,其生理功能已得到证实^[12]。Brodrick 和 Feild^[13]的研究明确指出,叶脉密度与叶片水力导度之间存在直接联系,密集的叶脉网络能够提升水分运输效率,进而促进气孔导度的提高,最终增加植物的最大光合速率。这一“结构-功能”关系在作物种质资源中得到了验证。例如,对水稻及其野生近缘种的比较分析证实,叶脉密度较高的基因型通常表现出更高的水分利用效率和光合能力,这与其更强的干旱胁迫适应性密切相关^[14]。

近年来,植物叶色突变体的研究日益广泛,其分子调控机制已得到较为深入的解析,尤其是在叶绿素生物合成、叶绿体发育及光合作用调控等方面均取得了显著进展^[15]。研究表明,增加叶脉密度能

够构建更高效的水分与光合产物运输体系,在一定程度上缓冲因叶肉功能受损(如叶绿素减少)而导致光合作用下降。例如,Caddell 等利用 CRISPR/Cas9 技术在水稻中编辑光捕获天线复合体相关基因(如 *TLA3*),结果显示适度降低叶绿素含量能够改善单位光能的利用效率,并优化冠层内光分布^[16];然而,在水稻中敲除 *OsCAOI*(叶绿素 a 氧化酶)会导致叶绿素 b 缺失和光系统结构不稳定,光合速率与产量显著下降^[17]。在大豆叶片褪绿突变体 *jym165* 研究中,也发现叶绿素含量显著下降虽改变了光吸收与能量分配,但光合效率和产量并未得到提升^[18]。这表明,植物在一定范围内能通过调节叶绿素水平或光捕获天线大小,实现光能分配优化,从而提高资源利用效率,但若叶绿素代谢或光系统结构遭到严重破坏,则会对光合与产量产生负面影响。

WRKY 转录因子家族是植物中特有的一类转录调控因子,广泛参与生长素^[19]、赤霉素^[20]、脱落酸^[21-22]和茉莉酸^[23]等激素通路的转录调控;其中,部分成员可通过调节下游结构基因的表达,影响叶片形态建成与维管分化^[24]。越来越多的研究表明,WRKY 家族成员在叶片发育及功能调控中发挥重要作用,包括参与叶片原基起始、叶肉细胞分化、叶片大小与形状调控等关键过程^[25],且与光合相关生理过程密切相关^[26]。在拟南芥中,AtWRKY23 作为生长素诱导型转录因子,通过调控生长素极性运输参与叶脉模式形成和维管分化^[27];WRKY53、WRKY12 等成员则在叶片衰老进程和叶肉细胞功能维持中发挥关键调控作用,并影响多种光合作用相关基因的表达^[28]。在水稻中,系统分析表明多个 *OsWRKY* 基因在叶片中具有较高表达水平,部分成员已被报道参与叶片形态建成、非生物胁迫适应及光合相关生理过程的调控^[29]。然而,现有研究主要集中于 WRKY 在叶片功能或光合调控中的作用,其在水稻叶脉发育中的功能尚缺乏直接的遗传学证据,WRKY 是否通过调控叶脉结构建成和叶脉密度进而协调叶脉-光合功能之间的关系仍有待深入解析。

我们在水稻中鉴定到了调控叶脉发育的基因 *OsLVD1*,该基因编码 WRKY 家族的一个转录因子。利用 CRISPR 技术对 *OsLVD1* 进行定向编辑,获得了一个稳定的突变体材料,命名为 *lvd1*(low chlorophyll and high vein density 1)。通过测定 *lvd1* 与 ZH11 的全生育期、叶绿素含量、叶脉密度以及成熟期的可溶性糖含量和产量相关性状,分析 *OsLVD1* 基因功能缺失后对水稻叶片结构与生长发

育的影响。结果表明, *OsLVD1* 基因参与调控水稻叶脉发育, 该研究为通过调控叶脉结构提升光合效率、增加作物产量提供了新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

野生型 ZH11(粳型常规水稻)及其 CRISPR 编辑株 *lvd1* 均购自百格基因科技(江苏)有限公司。

1.2 生育期调查方法

水稻生育期调查参照农业行业通用记载方法进行。各生育期以群体中约 50%植株达到相应形态学特征作为判定标准, 调查过程中每 2~3 d 进行一次田间观察并记录。

1.3 *OsLVD1* 蛋白理化性质分析

在国家水稻数据中心搜索得到 *OsLVD1* (LOC_Os01g14440)的蛋白序列和 CDS 序列。在 NCBI 网站进行比对, SMART 网站进行结构域的预测分析。使用 ProtParam 网站分析氨基酸数、分子量、理论等电点、带正负电荷的氨基酸残基、分子式、总原子数、不稳定系数、脂肪指数、亲疏水性。

1.4 *OsLVD1* 蛋白的结构和序列比对分析

OsLVD1 蛋白的二级结构预测采用 SOPMA 在线分析工具完成。将从国家水稻数据中心获取的 *OsLVD1* 蛋白全长氨基酸序列以 FASTA 格式输入 SOPMA 平台, 分析参数保持默认设置, 对蛋白中 α -螺旋、 β -转角、延伸链和无规卷曲等二级结构类型及其比例进行预测。

OsLVD1 蛋白的三级结构预测采用 SWISS-MODEL 在线同源建模平台完成。将 *OsLVD1* 氨基酸序列以 FASTA 格式提交至 SWISS-MODEL 服务器, 在自动建模模式下, 由系统自动比对同源模板并构建 *OsLVD1* 的三维结构模型。

1.5 *OsLVD1* 的系统发育树构建

为了探究 *OsLVD1* 在 WRKY 家族中的进化关系, 以 *OsLVD1*(LOC_Os01g14440)蛋白序列为查询序列, 利用 BLAST 在 NCBI 数据库中筛选获得不同物种的 WRKY1 直系同源蛋白序列。由于 *LVD1* 在基因结构和保守结构域上均与 WRKY 家族成员高度相似, 并在基因注释中被命名为 *OsWRKY1* (LOC_Os01g14440), 因此在系统发育分析中采用 WRKY1 命名以保持数据一致性。多序列比对及系统发育分析在 MEGA11 软件中完成, 并使用 EvolView 对系统发育树进行可视化与编辑。

1.6 *OsLVD1* 信号肽、跨膜结构域及保守结构域预测

OsLVD1 蛋白的全长氨基酸序列从国家水稻数据中心获取, 并以 FASTA 格式保存。将该氨基酸序列输入 SignalP 4.1 在线分析平台, 选择“Eukaryotes”分析模式, 其余参数采用默认设置, 对 *OsLVD1* 蛋白是否含有信号肽及其潜在剪切位点进行预测。随后, 将同一氨基酸序列以 FASTA 格式输入 TMHMM2.0 在线预测平台, 在默认参数条件下对 *OsLVD1* 蛋白的跨膜结构域进行预测, 根据预测结果判断其是否存在跨膜螺旋结构。

1.7 *OsLVD1* 蛋白亚细胞定位预测和染色体图谱绘制

将 *OsLVD1* 的氨基酸序列提交至 Predict Protein 和 CELLO 在线网站, 完成 *OsLVD1* 蛋白的亚细胞定位预测。在国家水稻数据中心获取 *OsLVD1* 基因序列及其在染色体上的起止位置, 确定该基因位于水稻 1 号染色体, 利用 TBtools 软件绘制该基因的染色体分布图谱。本研究用到的在线网站如表 1 所示。

1.8 *lvd1* 基因型鉴定

lvd1 在培养皿中进行发芽, 待幼苗生长至 3 cm 时, 移栽至塑料桶中, 每桶 10 株。移栽三周后取样并使用 CTAB 法^[30]进行 DNA 提取。通过 NCBI 数据库获取基因序列并设计基因特异性引物 *LVD1*-F(GGTGGACTTCTTCTCCGACG)和 *LVD1*-R(AGC GATCCATCCATGACCAC)。以基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 电泳检测后, 对 PCR 产物片段进行回收, 通过一代测序技术对编辑位点附近序列进行验证。验证后的 *lvd1* 编辑株用于后续研究^[31]。

1.9 ZH11 与 *lvd1* 中相关功能基因的表达分析

为分析 *OsLVD1* 突变对叶绿素代谢及叶脉发育相关通路的影响, 在相同生长条件下, 在拔节期采集 ZH11 和 *lvd1* 突变体的叶片组织。根据前期研究及功能注释结果, 筛选与叶绿素合成、叶绿素降解及叶脉发育相关的关键基因作为候选基因, 包括叶绿素合成相关基因 *OsHEMA1* (F: GCGGCTGACAA ATACTGTTGG; R: TCTGATGTCTCCCAGTAGCC T)和 *OsCHLI* (F: TCGAAGGTTCAAGTGCGGA; R: GATAGCCGCCTTCAATTGCC), 叶绿素降解相关基因 *OsNYC1* (F: CCTATGTTGAGCAGCAGCG GA; R: AGGAGCACCGTGGTAGTTCG)和 *OsPAO* (F: GCAAGGCCAACAAGATCCTC; R: CCTTGATG AACCTGGGCTCG), 叶脉发育相关基因 *OsPIN1b* (F: TTGTCAGATGCAGGGCTAGG; R: GTACTCCC

表 1 本研究使用的在线平台

Table 1. Online platforms used in the research

序号 No.	软件名称 Software name	网址 Website
1	国家水稻数据中心 National Rice Data Center	https://www.ricedata.cn/
2	NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
3	SMART	http://smart.embl.de/
4	ProtParam	https://web.expasy.org/protparam/
5	SOPMA	https://npsa-prabi.ibcp.fr/
6	SWISS-MODEL	https://swissmodel.expasy.org/
7	EvoView	http://evolgenius.info/
8	SignalP4.1	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/
9	TMHMM	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/
10	Predict Protein	https://www.predictprotein.org
11	Plant-mPLoc	http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/
12	CELLO	http://cello.life.nctu.edu.tw/

CTGAGCCCAATG), 进行实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)分析。每个基因在 ZH11 和 *lvd1* 中均设置 3 个生物学重复和 3 个技术重复。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算各基因在突变体中的相对表达量,并以 ZH11 为对照进行标准化处理。为后续表型分析和功能机制解析提供分子层面的依据。

1.10 *OsLVD1* 在不同生育期和组织中的表达分析

在苗期、拔节期和成熟期分别采集 ZH11 水稻的根、茎和叶组织,在成熟期额外采集稻穗作为研究材料,该幼穗取自幼穗分化期(拔节后剑叶刚露尖阶段,幼穗长度约 3~5 cm)。取样时剥除叶鞘,收集完整幼穗组织,用于后续 RNA 提取和基因表达分析。所有样品采集后立即置于液氮中速冻,并保存于-80℃冰箱备用。采用 Trizol 法提取各组织总 RNA,检测 RNA 的浓度和纯度,并通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性^[32]。取合格 RNA 样品,使用反转录试剂盒合成第一链 cDNA(HiScript III RT Supermix for qPCR, Vazyme)。

以合成的 cDNA 为模板,采用 qRT-PCR 检测 *OsLVD1* 在不同生育期和组织中的表达水平。设计特异性引物(F: GTGGACTTCTTCTCCGACGA; R: GGAAGAAGCTGCAACGAACA)进行 qRT-PCR 分析。选择水稻内参基因 *18srRNA* 作为标准化对照基因。每个样品设置 3 个生物学重复,每个生物学重复设置 3 个技术重复。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算 *OsLVD1* 的相对表达量,并以苗期叶组织的表达量作为标准进行归一化处理。qRT-PCR 数据以平均值 $\pm$ 标准差表示,每个样品包含 3 个生物学重复($n = 3$)。不同组织及不同生育时期之间的表达差异采用 GraphPad Prism 软件进行单因素方差分析(one-way

ANOVA),当方差分析结果显著时,进一步采用最小显著差异法(LSD)进行多重比较, $P < 0.05$ 表示差异显著。

1.11 叶绿素含量测定

于拔节期采集 *lvd1* 和 ZH11 叶片,采用丙酮-乙醇(1:1)混合液提取叶绿素^[33],利用紫外分光光度计测定吸光度,并计算叶绿素 a、叶绿素 b 及总叶绿素含量。

1.12 叶脉密度测定

取抽穗期 ZH11 和 *lvd1* 剑叶置于 FAA 固定液中,4℃下固定 24 h,用蒸馏水清洗干净。放入 70%的无水乙醇中,90℃水浴 10 min 后取出叶片,清水漂洗 2~3 次,放入盛有氯酸钠的烧杯中漂白 20 min 至透明,再用蒸馏水冲洗 2~3 次后放在滤纸上吸收多余水分^[34]。制作临时装片后在显微镜下观察,并统计 ZH11 和 *lvd1* 的叶脉数量^[35]。剑叶叶脉密度测定时,每个基因型随机选取不少于 10 株生长一致的植株,每株取 1 片完全展开的剑叶作为一个生物学重复,ZH11 和 *lvd1* 分别测定不少于 10 片叶片。

1.13 石蜡切片

为进一步观察 ZH11 和 *lvd1* 的叶脉结构。在抽穗期分别对 ZH11 和 *lvd1* 材料的剑叶中部约 5 mm 长进行取样固定,取剑叶的中间段,先用 FAA 固定液(70%乙醇 90 mL,冰醋酸 5 mL,37%甲醛 5 mL)固定,然后用乙醇脱水。经石蜡包埋后用切片机制作 8 μm 厚的横切面切片,进行甲苯胺蓝染色^[36],最后用显微镜观察。

1.14 可溶性糖含量分析

采用可溶性糖含量检测试剂盒(Solarbio,北京,中国)测定 ZH11 和 *lvd1* 叶片中的可溶性糖含量,具体操作步骤按照试剂盒说明书进行。

1.15 单穗产量统计

在水稻成熟期,于田间分别从 ZH11 与 *lvd1* 群体中随机选取 30 株生长一致、无病虫害植株,用于农艺性状测定。测定指标包括株高、穗长、粒长、粒宽、每穗粒数、结实率及千粒重等。其中,株高自土面至穗顶(不含芒);穗长自穗颈节至穗顶。

粒长和粒宽使用电子游标卡尺测定平均值;每穗粒数及结实率根据单株穗粒统计计算;千粒重采用烘干至恒重的籽粒(含水量约 13%)称量所得。

2 结果与分析

2.1 *OsLVD1* 蛋白的理化性质与结构预测分析

为分析 *OsLVD1* 蛋白的结构特征与理化性质,对其氨基酸序列进行了多种生物信息学预测。SMART 网站分析结果显示,该序列在第 300~360 位氨基酸区域含有典型的 WRKY 结构域(图 1-A)。ProtParam 分析结果表明,*OsLVD1* 蛋白由 583 个氨基酸组成,分子量为 60,502.43Da,理论等电点(pI)为 8.87。带负电荷的氨基酸残基(Asp+Glu)有 49 个,带正电荷的氨基酸残基(Arg+Lys)有 55 个。其分子式为 $C_{2549}H_{4117}N_{799}O_{847}S_{31}$,总原子数为 8643。不稳定系数为 55.13,表明该蛋白属于不稳定蛋白;脂脂族指数为 55.13,平均亲水性指数(GRAVY)为 -0.493,整体呈亲水性。亲水性分析显示,第 120 位氨基酸处亲水性最强(-3.222),第 532 位氨基酸处疏水性最强(2.422),进一步说明 *OsLVD1* 为亲水性蛋白(图 1-B)。

SOPMA 二级结构预测结果显示(图 1-C),*OsLVD1* 蛋白序列中 α 螺旋占比 20.58%(120 个),延伸链占比 5.83%(34 个),无 β 转角结构,其余为无规卷曲,占比 73.58%(429 个)。整体上 α 螺旋(蓝色)与无规则卷曲(紫色)比例较高,表明该蛋白可能具有较强的结构柔性和转录调控功能特征。为进一步验证其空间构象,利用 SWISS-MODEL 在线工具基于同源模板建立 *OsLVD1* 的三维结构模型(图 1-D)。所得模型的氨基酸空间排列与二级结构预测结果一致,说明所构建的三级结构模型具有较高的可靠性。

2.2 *OsLVD1* 信号肽、跨膜结构域预测

采用 SignalP 4.1 在线平台对 *OsLVD1* 蛋白的信号肽序列进行分析,发现其不存在信号肽和剪切位点,由此推测,*OsLVD1* 蛋白为胞内蛋白。使用在线平台 TMHMM 2.0 预测 *OsLVD1* 蛋白的跨膜结构

域,结果发现,*OsLVD1* 蛋白不存在跨膜结构域,也并未发现膜内的氨基酸序列,位于膜外,属于非膜蛋白。

2.3 *OsLVD1* 蛋白进化关系及序列结构

通过系统发育进化树对水稻 *LVD1* 蛋白进行聚类分析(图 1-E),结果显示,不同物种 WRKY1 蛋白可分为 A、B 和 C 三部分。A 类包括野生番茄 *SaWRKY1*、洋甘草 *GgWRKY1*、闽楠 *PbWRKY1*;B 类包括高粱 *SbWRKY1*、谷子 *SiWRKY1* 和玉米 *ZmWRKY1*;C 类包括小白菜 *BrWRKY1*、黄花蒿 *AaWRKY1*、闽楠 *PbWRKY1*、稷 *PmWRKY1*、水稻 *OsWRKY1*、毛竹 *PeWRKY1*。这一结果为后续 *OsLVD1* 的功能解析提供了分子进化层面的支持。

通过 DNAMAN 软件对不同物种的蛋白序列进行比对分析,结构域分析结果显示,在 N 端含有 WRKYGQK 七肽段序列的结构域,而在 C 端含有 1 个 C_2H_2 类型的锌指结构(图 1-F)。WRKY 结构域中序列高度保守,大部分蛋白含有核心的序列。

2.4 *OsLVD1* 蛋白的亚细胞定位预测和染色体定位

使用 *OsLVD1* 蛋白的氨基酸序列,在网站 Plant-mPLOC 进行亚细胞定位预测,结果表明,该蛋白定位在细胞核,可能以转录因子的形式在细胞核中调控基因表达。CELLO 网站预测结果同样表明该蛋白定位在细胞核中。从基因组数据库查询到该基因位于 1 号染色体上,依据该基因的序列起始位置和终止位置信息,用 TBtools 网站预测在染色体上的具体分布情况(图 1-G)。染色体定位结果为进一步探讨其与相邻基因的进化关系提供了依据。

2.5 *OsLVD1* 启动子顺式作用元件分析

对 *OsLVD1* 基因上游 2000 bp 作为启动子区域进行分析(表 2)。结果显示 *OsLVD1* 基因的启动子区域存在 22 个光响应顺式作用元件;20 个激素响应顺式作用元件,包括 13 个脱落酸响应顺式作用元件、4 个茉莉酸响应顺式作用元件、1 个生长素响应顺式作用元件和 2 个赤霉素响应顺式作用元件;2 个胁迫响应顺式作用元件,包括 1 个低温胁迫响应顺式作用元件和 1 个干旱诱导响应顺式作用元件;2 个生长发育响应顺式作用元件。这些结果表明,该基因可能参与植物的光响应、激素信号转导及逆境适应等生理过程。

2.6 *OsLVD1* 突变对叶绿素代谢及叶脉发育相关基因表达的影响

采用 qRT-PCR 分析了 ZH11 与 *lvd1* 植株中叶绿素代谢及叶脉发育相关基因的表达差异,结果如

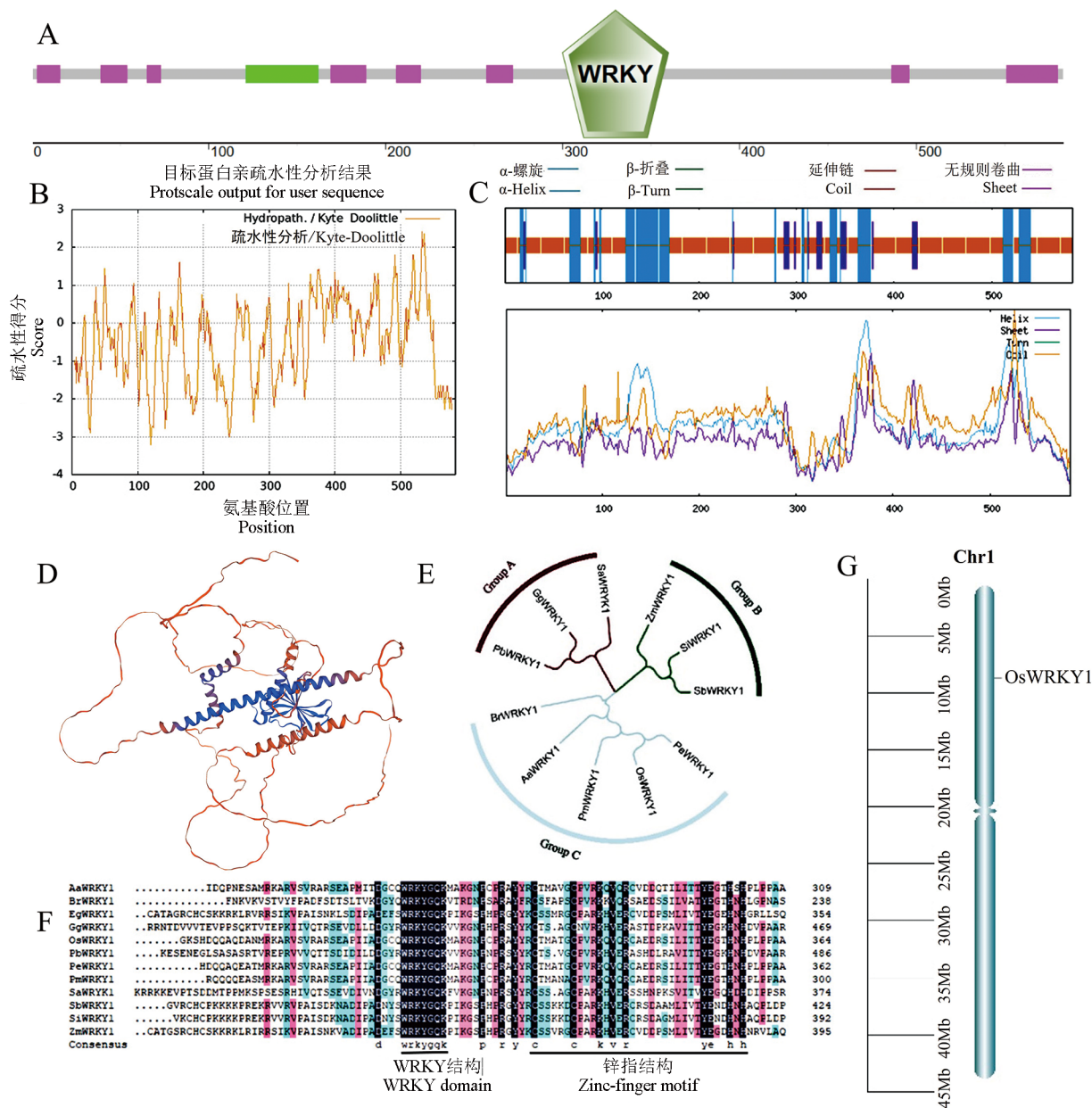


图 A 为 LVD1 蛋白结构域分析，该蛋白含多个低复杂度区域（紫色方块）、1 个保守结构区段（绿色方框）及 WRKY 保守结构域（绿色五边形）；图 B 为 LVD1 蛋白的疏水性分析，该蛋白主要为亲水蛋白；图 C 为 LVD1 蛋白的二级结构预测， α 螺旋（蓝色）与无规则卷曲（紫色）比例较高；图 D 为 OsLVD1 蛋白三级结构预测模型；图 E 为不同物种 WRKY1 蛋白的聚类分析；图 F 为含有 WRKY1 结构域的不同物种蛋白序列比对分析；图 G 为染色体定位分析。

A, Domain analysis of LVD1 protein, including multiple low-complexity regions (purple squares), one conserved segment (green box), and a WRKY conserved domain (green pentagon); B, Hydropobicity analysis of LVD1 protein, which is mainly hydrophilic; C, Secondary structure prediction of LVD1 protein, with high proportions of α -helix (blue) and random coil (purple); D, Predicted tertiary structure model of OsLVD1 protein; E, Phylogenetic analysis of WRKY1 proteins from different species; F, Multiple sequence alignment of WRKY1 domain-containing proteins from different species; G, Chromosomal localization analysis.

图 1 OsLVD1 蛋白的生物信息学分析

图 1. Bioinformatic analysis of the OsLVD1 protein

图 2-A 所示。与 ZH11 相比，*lvd1* 植株中叶绿素合成相关基因 *OsHEMA1* 的表达水平显著下调，与突变体叶绿素含量下降的表型一致。相反，叶绿素降解相关基因 *OsNYC1* 在 *lvd1* 中显著上调，而 *OsPAO*，表达量略有升高，但差异不显著。此外，叶脉发育相关基因 *OsPIN1b* 在 *lvd1* 植株中显著上调表达。

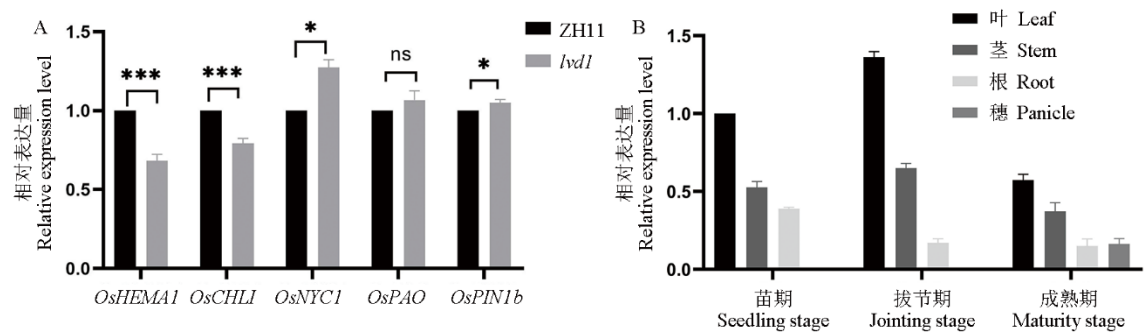
上述结果表明，*OsLVD1* 功能缺失可同时影响叶绿素代谢与叶脉发育相关基因的表达。

2.7 *OsLVD1* 在水稻不同组织和生育时期的表达特征

qRT-PCR 分析结果如图 2-B 所示，*OsLVD1* 在苗期、拔节期和成熟期的根、茎和叶中均可检测到

表 2 水稻 *OsLVD1* 基因启动子顺式作用元件
Table 2. *Cis*-acting elements of promoters of rice *OsLVD1* genes

元件类别 Element category	元件名称 Element name	核心序列 Core sequence	数量 Number	功能注释 Function annotation
光响应元件 Light-responsive elements	GT1-motif	GGTTAAT/GCTTAA	2	光响应 Light responsiveness
	G-Box	CACGTC/CACGAC	13	光响应 Light responsiveness
	BOX4	ATTAAT	1	光响应 Light responsiveness
	TCT-motif	TCTTAC	2	光响应 Light responsiveness
	Spl	GGCCGG	1	光响应 Light responsiveness
	AE-BOX	AGAAACTT	2	光响应 Light responsiveness
激素响应元件 Hormone-responsive elements	ATC-motif	AGTAATCT	1	光响应 Light responsiveness
	ABRE	ACGTG/CACGTG	13	脱落酸响应 Abscisic acid responsiveness
	TGACG-motif	TGACG	2	茉莉酸响应 MeJA responsiveness
	CGTCA-motif	CGTCA	2	茉莉酸响应 MeJA responsiveness
	TGA-element	AACGAC	1	生长素响应 Auxin responsiveness
	P-box	CCTTTTG	1	赤霉素响应 Gibberellin responsiveness
胁迫响应元件 Stress-responsive elements	TATC-box	TATCCCA	1	赤霉素响应 Gibberellin responsiveness
	LTR	CCGAAA	1	低温响应 Low-temperature responsiveness
	MBS	CAACTG	1	干旱诱导 Drought inducibility
生长发育相关元件 Growth and development-related elements	CAT-box	GCCACT	2	分生组织发育相关 Meristem expression and development



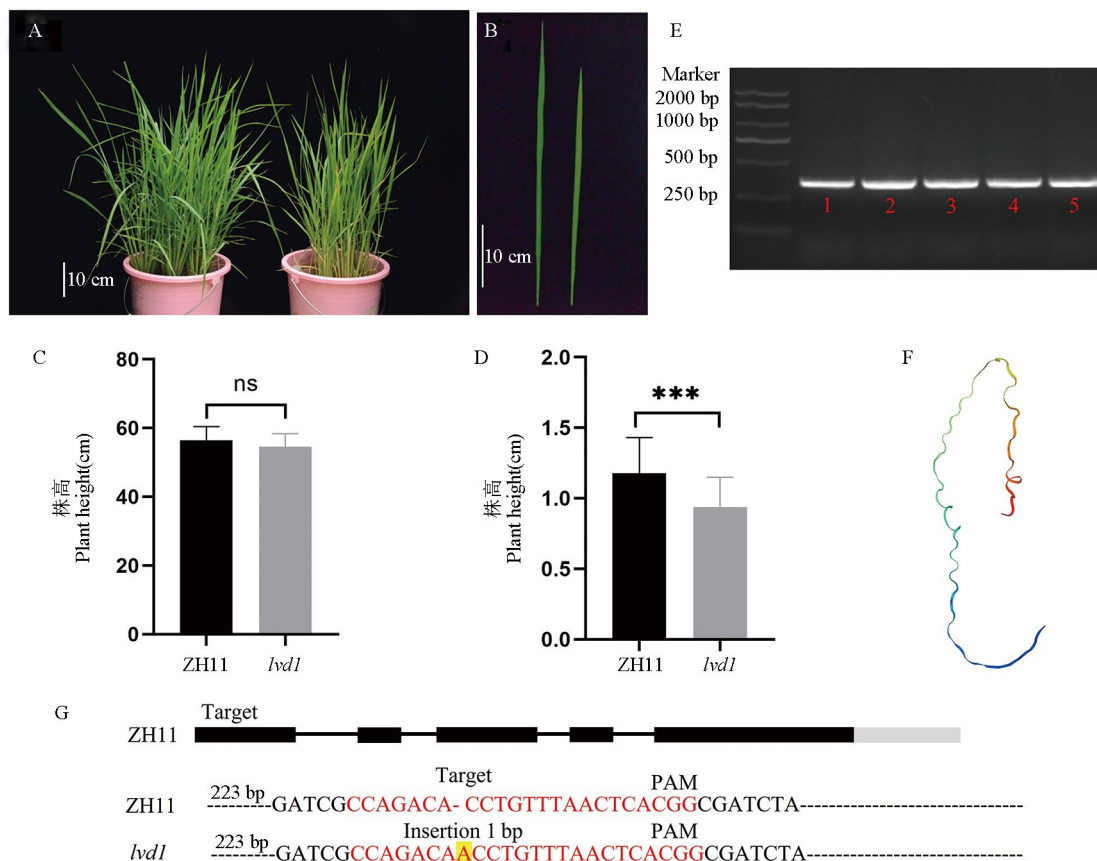
A: 在拔节期采集 ZH11 和 *lvd1* 突变体叶片, 采用 qRT-PCR 检测叶绿素合成相关基因 *OsHEMA1* 和 *OsCHLI*, 叶绿素降解相关基因 *OsNYC1* 和 *OsPAO*, 以及叶脉发育相关基因 *OsPIN1b* 的相对表达水平。各基因表达量以 ZH11 为对照进行标准化处理。B: qRT-PCR 分析 ZH11 在不同生育时期根、茎和叶中 *OsLVD1* 的相对表达水平。数据以平均值 $\pm$ 标准差表示 (mean $\pm$ SD, $n = 3$)。单因素方差分析和 LSD 多重比较检验差异显著性。
A, Relative expression levels of chlorophyll synthesis genes (*OsHEMA1*, *OsCHLI*), chlorophyll degradation genes (*OsNYC1*, *OsPAO*), and vein development gene (*OsPIN1b*) in leaves of ZH11 and *lvd1* mutant at jointing stage by qRT-PCR, with ZH11 as the control for normalization. B, Relative expression of *OsLVD1* in roots, stems, and leaves of ZH11 at different growth stages analyzed by qRT-PCR. Data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 3$). Significant differences were determined by one-way ANOVA and LSD multiple comparison test ($P < 0.05$).

图 2 *OsLVD1* 突变对相关基因表达及其组织表达特征的影响
Fig. 2. Effects of *OsLVD1* mutation on the expression of related genes and its tissue-specific expression pattern

表达。单因素方差分析结果表明, 不同器官间 *OsLVD1* 的表达水平存在显著差异。其中, 叶片中的表达量显著高于根和茎。在不同生育时期, *OsLVD1* 在叶片中的表达呈现明显的阶段性变化特征, 其在拔节期的表达水平显著高于苗期和成熟期。相比之下, *OsLVD1* 在根和茎中的表达水平整体较低, 且在不同生育时期之间差异不显著。综上, *OsLVD1* 主要在营养生长阶段的叶片中高表达, 提示其可能在叶片发育及相关生理过程的调控中发挥重要作用。

2.8 ZH11 与 *lvd1* 表型鉴定

图 3-A 为 ZH11 与 *lvd1* 植株的表型比较。与 ZH11 相比, *lvd1* 植株株高略有降低。进一步的叶片单体对比(图 3-B)显示, *lvd1* 植株剑叶叶宽明显减小, 叶色较浅。为验证上述表型差异, 对株高和剑叶宽度进行了定量统计分析。结果表明, ZH11 的株高为 56.44 ± 4.01 cm, *lvd1* 植株的株高为 54.56 ± 3.84 cm, 呈下降趋势, 但差异未达显著水平 (图 3-C), 而 ZH11 剑叶宽度为 1.18 ± 0.25 cm, *lvd1* 植株的剑叶宽度为 0.94 ± 0.21 cm, 差异显著(图 3-D)。



A: 拔节期 ZH11 (左) 和 *lvd1* (右) 植株整体形态比较; B: ZH11 (左) 与 *lvd1* (右) 植株剑叶形态比较; C: 拔节期 ZH11 与 *lvd1* 植株株高统计, 数据为平均值 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD, $n = 30$)。ns 表示差异不显著 ($P < 0.05$), 采用 t 检验进行统计分析; D: 拔节期 ZH11 与 *lvd1* 植株剑叶叶宽的统计 (mean $\pm$ SD, $n = 30$), ***表示差异显著 ($P < 0.05$), 采用 t 检验进行统计分析。E: 泳道 1~2 为 ZH11 基因组 DNA, 泳道 3~5 为 *lvd1* 基因组 DNA; F: *lvd1* 蛋白三级结构; G: *OsLVD1* 基因的 CRISPR 编辑位点及突变序列比对, 黄色高亮处表示 *lvd1* 中相较于野生型插入的 1 bp 碱基, PAM 序列以红色标示。

A, Overall morphology of ZH11 (left) and *lvd1* (right) plants at jointing stage; B, Flag leaf morphology of ZH11 (left) and *lvd1* (right) plants; C, Plant height of ZH11 and *lvd1* at jointing stage (mean $\pm$ SD, $n = 30$). ns, not significant ($P < 0.05$), analyzed by Student's t -test; D, Flag leaf width of ZH11 and *lvd1* at jointing stage (mean $\pm$ SD, $n = 30$). ***, Significant ($P < 0.05$) by Student's t -test; E, Genomic DNA PCR. Lanes 1-2, ZH11; Lanes 3-5: *lvd1*; F, Tertiary structure of *lvd1* protein; G, CRISPR editing sites and mutant sequence alignment of *OsLVD1*. Yellow highlight indicates a 1 bp insertion in *lvd1* compared with wild type; PAM sequence is marked in red.

图 3 ZH11 与 *lvd1* 表型鉴定

Fig. 3. Phenotypic characterization of ZH11 and *lvd1*

上述结果表明, *OsLVD1* 功能缺失对水稻植株株高及叶片形态产生了一定影响。

对水稻叶片进行 DNA 提取, 以基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 通过一代测序技术对编辑位点附近序列进行验证。电泳结果如图 3-E, 扩增片段长度为 453 bp。将扩增产物进行胶回收处理并进行测序分析, 结果显示该编辑靶点(CCAGACACCTGTTAACTCACGG)第 8 位插入 A 碱基, 造成移码突变导致翻译提前终止(图 3-G), 较正常 LVD1 蛋白少编码 504 个氨基酸, *OsLVD1* 蛋白质三级结构如图 3-F。*OsLVD1* 蛋白因提前终止而丧失正常功能, 进而影响叶片的发育与形态建成, 表现为株高降低、叶色变浅等表型差异。

2.9 ZH11 和 *lvd1* 植株的生育期统计

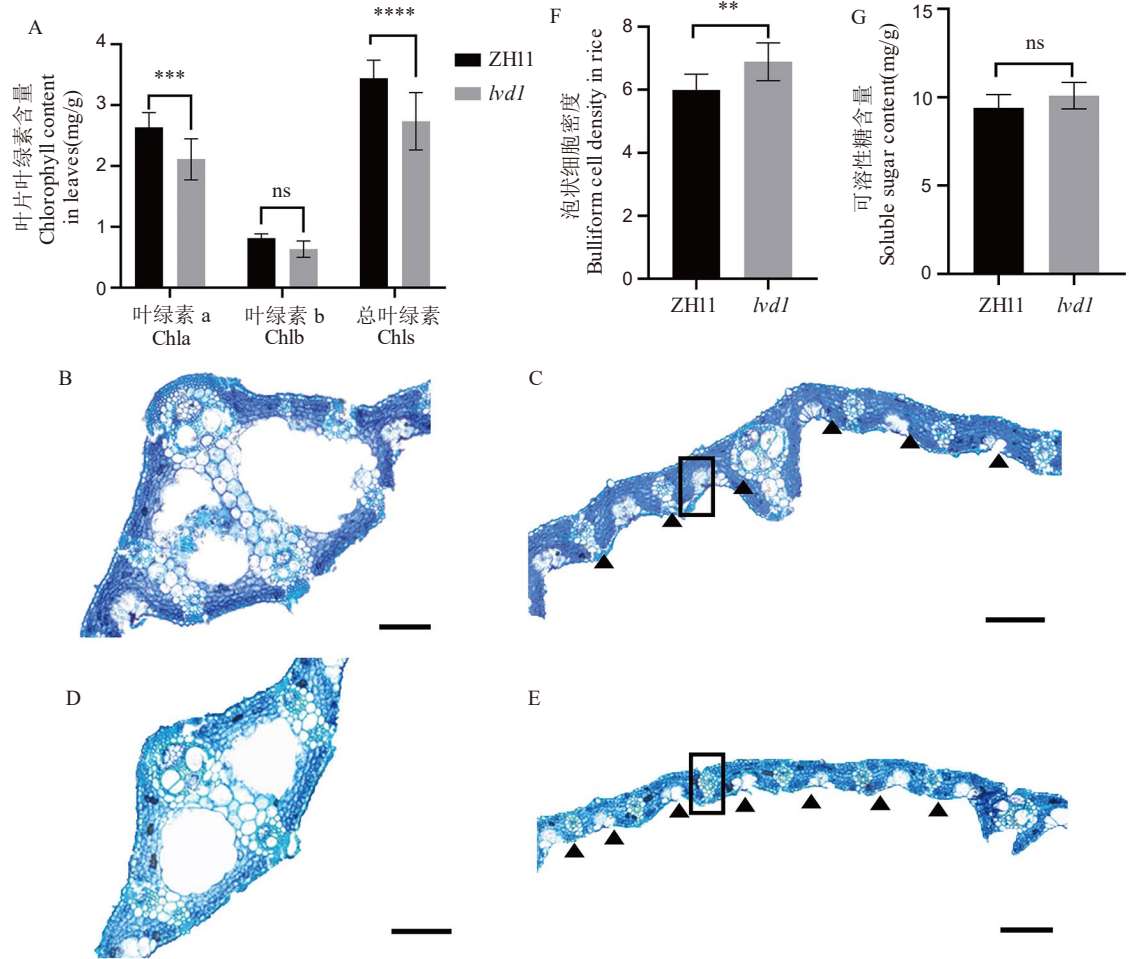
对 ZH11 和 *lvd1* 植株的全生育期进行统计, 如表 3, 包括出芽期、幼苗期、分蘖期、拔节期、抽穗期、扬花期、孕穗期、灌浆期、成熟期。ZH11 生育期为 155 d, *lvd1* 植株生育期为 161 d, 相较于 ZH11 而言, *lvd1* 植株从扬花期起至植株成熟, 整体生育期推迟 6 d 左右。该结果表明, *OsLVD1* 基因可能参与水稻生育进程的调控, 其功能缺失导致植株发育进程延缓、成熟期延后。

2.10 ZH11 和 *lvd1* 叶绿素含量测定

对拔节期 *lvd1* 植株和 ZH11 的叶片进行叶绿素含量分析(图 4-A)。*lvd1* 的总叶绿素、叶绿素 a、叶绿素 b 含量分别为 2.51 ± 0.28 mg/g、 1.95 ± 0.21

表 3 ZH11 及 *lvd1* 生育期统计表

Table 3. Statistical table of growth periods of ZH11 and <i>lvd1</i>										d
材料 Material	出芽期 Germination stage	幼苗期 Seedling stage	分蘖期 Tillering stage	拔节期 Jointing stage	孕穗期 Booting stage	抽穗期 Heading stage	扬花期 Anthesis stage	灌浆期 Grain filling stage	成熟期 Maturity stage	
ZH11	3.67±0.99	10.47±1.33	40.00±1.53	61.77±1.99	70.70±1.15	84.93±1.84	99.37±1.47	119.63±1.92	155.47±1.93	
<i>lvd1</i>	4.03±1.03	11.00±1.41	40.50±1.31	62.03±1.85	73.03±1.07	88.63±1.56	102.20±1.69	122.03±1.99	161.03±1.75	
P值 P value	0.856	0.14	0.21	0.60	6.65×10 ⁻⁹	5.47×10 ⁻⁸	4.74×10 ⁻⁷	3.63×10 ⁻⁵	1.13×10 ⁻¹¹	



A: 叶绿素含量测定; B-E: 剑叶石蜡切片观察, B,D为ZH11和*lvd1*中脉, C,E为ZH11和*lvd1*泡状细胞(黑色三角形), 黑色方框为小脉形态; 比例尺为400 μ m; F: ZH11和*lvd1*泡状细胞数量; G: ZH11和*lvd1*可溶性糖含量。数据以平均值 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD) 表示, ($n \geq 3$)。统计分析采用GraphPad Prism进行单因素方差分析, ns表示无显著差异, **, ***,和****分别表示 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 和 $P < 0.0001$ 。

A, Chlorophyll content measurement (chla: chlorophyll a, chlb: chlorophyll b, chls: total chlorophyll); B-E, Paraffin sections of flag leaves. B, D, midribs of ZH11 and *lvd1*; C, E, Bulliform cells of ZH11 and *lvd1* (marked by black triangles), with small veins indicated by black boxes. Scale bar; 400 μ m. F, Bulliform cell number in ZH11 and *lvd1*; G, Soluble sugar content measurement in ZH11 and *lvd1*. Data are presented as mean $\pm$ SD ($n \geq 3$). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA using GraphPad Prism, ns indicates no significant difference; **, ***, and **** indicate $P < 0.01$, $P < 0.001$, and $P < 0.0001$, respectively.

图 4 ZH11 与 *lvd1* 剑叶的生理及解剖特征比较

Fig. 4. Comparison of physiological and anatomical features of flag leaves between ZH11 and *lvd1*

mg/g、 0.57 ± 0.07 mg/g; ZH11 总叶绿素、叶绿素 a、叶绿素 b 含量分别为 3.44 ± 0.30 mg/g、 2.63 ± 0.24 mg/g、 0.82 ± 0.07 mg/g, 分别降低了 27.05%、25.90%、30.75%, 表明 *lvd1* 的叶绿素含量与 WT 相比显著下降。说明 *lvd1* 植株的叶绿素合成过程受到

影响, 可能导致光合作用能力降低, 进而影响植株的生长发育与叶片形成。

2.11 ZH11 和 *lvd1* 叶脉密度测定

对 ZH11 和 *lvd1* 植株的剑叶进行叶脉密度观察发现, 在相同视野范围内, *lvd1* 叶片的叶脉数量明

表 4 ZH11 和 *lvd1* 叶脉密度

Table 4. Leaf vein density of flag leaves of ZH11 and <i>lvd1</i>			mm ⁻²
材料 Material	大脉密度 Major vein density	小脉密度 Minor vein density	
ZH11	3.6 ± 0.5	21.0 ± 0.6	
<i>lvd1</i>	4.2 ± 0.4	22.9 ± 0.7	
<i>P</i> 值 <i>P</i> value	0.16	8.00 × 10 ⁻³	

显增多。结果显示，ZH11 的大脉密度为 3.6 ± 0.5，而 *lvd1* 为 4.2 ± 0.4，差异不显著；ZH11 的小脉密度为 21.0 ± 0.6，而 *lvd1* 为 22.9 ± 0.7，差异达到显著水平 (表 4)。综上，与 ZH11 相比，*lvd1* 的小脉密度显著增加，而大脉密度变化不显著。

2.12 *lvd1* 的解剖学结构观察

对 ZH11 和 *lvd1* 叶片进行石蜡切片，并用甲苯胺蓝染色以观察叶片的解剖结构。结果显示，与 ZH11 相比，*lvd1* 植株叶片的泡状细胞数量显著增加(图 4-C、E)。定量分析结果(图 4-F)表明，ZH11 与 *lvd1* 叶片的泡状细胞在相同视野下平均数量分别为 6.0 ± 0.5 和 6.9 ± 0.6，差异显著(*P* < 0.05)。此外，大脉和小脉的形态在 ZH11 与 *lvd1* 植株之间未见明显差异，中脉的形态在 ZH11(图 4-B)与 *lvd1*(图 4-D)之间也未见明显差异。

2.13 *lvd1* 可溶性糖含量变化

为明确 *OsLVD1* 基因功能缺失对水稻碳同化产物积累的影响，对 ZH11 和 *lvd1* 植株的剑叶可溶性糖含量进行了测定。结果显示(图 4-G)，ZH11 和 *lvd1* 剑叶的可溶性糖含量分别为 9.39 ± 0.77 mg/g 和 10.09 ± 0.75 mg/g，两者差异不显著(*P* > 0.05)。结果表明，*OsLVD1* 功能缺失后，水稻可能通过提高叶脉密度、增强光合产物输导等结构性补偿机制，维持了叶片碳水化合物代谢的动态平衡。

2.14 *lvd1* 产量性状统计

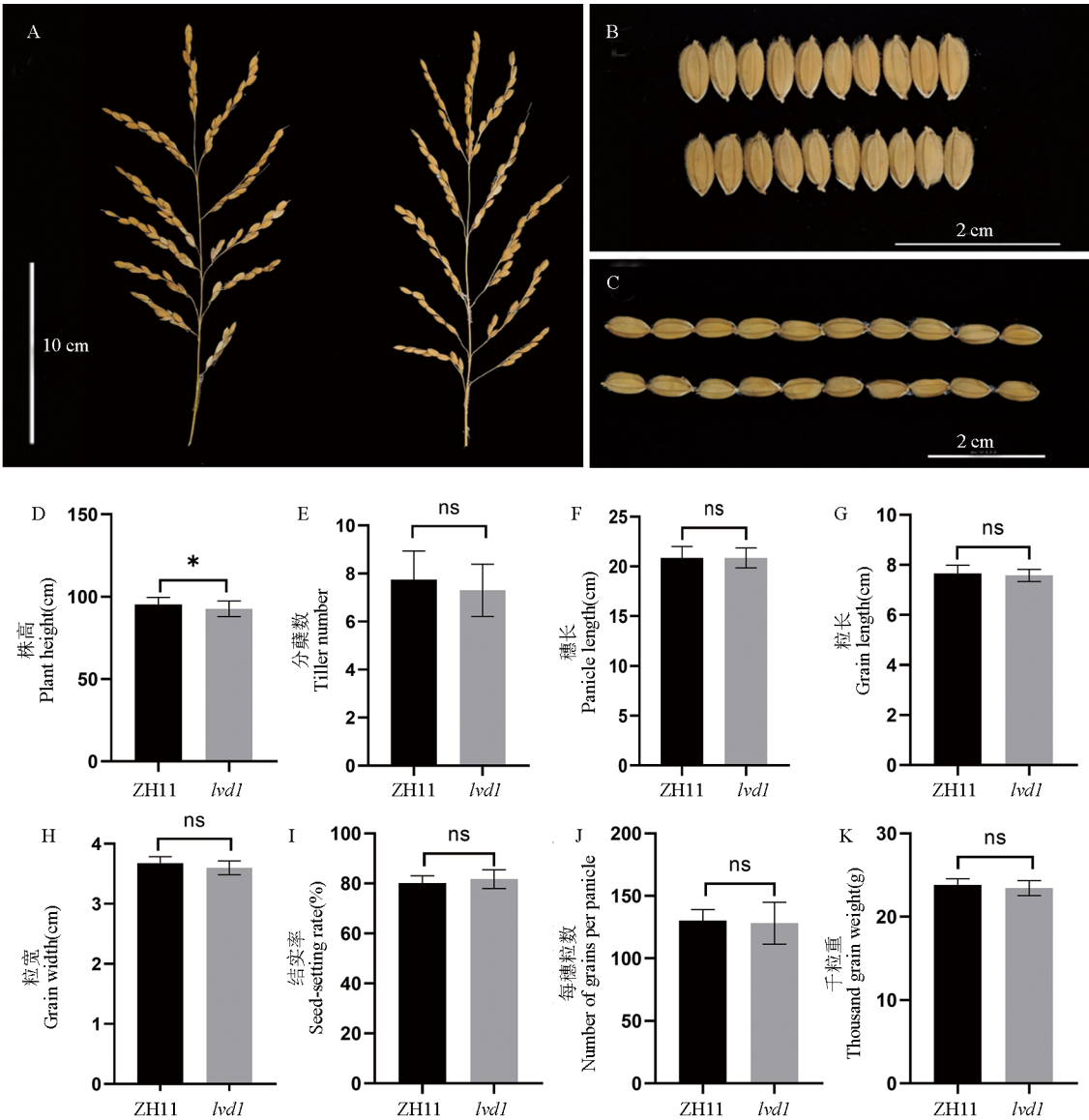
ZH11 与 *lvd1* 植株的穗型整体相似，未观察到明显的穗部形态差异(图 5-A)。在籽粒形态方面，*lvd1* 植株的粒长和粒宽 ZH11 相比差异不显著(图 5-B~C)。进一步对产量相关性状进行定量分析，*lvd1* 植株的株高为 92.63 ± 4.76 cm，显著低于 ZH11 的 95.30 ± 4.20 cm (图 5-D)，相比之下，ZH11 的分蘖数、穗长、粒长、粒宽、结实率、每穗粒数以及千粒重，两者之间差异均未达到显著水平(图 5-E~K)。上述结果表明，*OsLVD1* 功能缺失主要影响植株的营养生长高度，但对籽粒形成及产量构成因子的整体表现影响较小。

3 讨论

本研究通过对水稻 *lvd1* 突变体的系统分析，揭示了 *OsLVD1* 在叶片发育过程中协调叶绿素代谢与叶片结构建成的重要作用。与 ZH11 相比，*lvd1* 植株叶绿素含量显著下降，同时伴随叶脉密度升高和泡状细胞数量增加，形成了一种“低叶绿素含量-高叶脉密度-泡状细胞增加”的复合表型特征。生物信息学分析表明，*OsLVD1* 编码一类 WRKY 转录因子，其启动子区域富含光响应及多种激素响应顺式作用元件，提示该基因可能参与光信号与激素信号相关的转录调控过程。

本研究发现 *lvd1* 植株的叶绿素含量降低约 25%~30%，叶脉密度显著升高，同时泡状细胞数量明显增加。已有研究表明，在水稻及其他植物中，当光捕获能力或光合潜力受限时，植物可通过改变叶片维管结构等方式对光合受限状态作出一定程度的补偿。本研究中观察到的叶脉密度升高，可能有助于提高叶片水分和物质输导能力，从而在结构层面缓冲叶绿素下降带来的不利影响^[37]。结合基因表达分析结果，维管发育相关基因 *OsPIN1b* 在 *lvd1* 中显著上调，提示叶脉结构的重塑可能与生长素相关调控通路的改变有关，已有研究表明 PIN 家族介导的生长素极性运输在水稻叶脉分化和维管组织发育过程中发挥关键作用^[38]。因此，我们推测 *OsLVD1* 功能缺失后，叶绿素代谢受限可能触发叶片结构发育通路的协同调整，形成一种以叶脉密度和细胞结构改变为特征的补偿性发育响应。

lvd1 植株在营养生长阶段表现出一定程度的生长抑制，其成熟期产量构成因子及可溶性糖含量并未发生显著变化，表明该结构性补偿在一定程度上维持了碳同化产物的积累与产量稳定^[39]。综上，*OsLVD1* 在水稻中可能作为协调叶绿素代谢与叶片结构发育的关键调控因子，其功能缺失所引发的结构性补偿表型为理解叶片“低叶绿素含量-高叶脉密度-泡状细胞增加”的复合表型特征协同调控提



A: ZH11 (左) 与 *lvd1* (右) 的穗部形态; B: ZH11 (上) 与 *lvd1* (下) 籽粒长度比较; C: ZH11 (上) 与 *lvd1* (下) 籽粒宽度比较; D-K: ZH11 和 *lvd1* 株高, 分蘖数, 穗长, 粒长, 粒宽, 结实率, 每穗粒数, 千粒重。各农艺性状数据以平均值 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD) 表示 ($n = 30$)。ZH11 与 *lvd1* 植株间差异采用 GraphPad Prism 软件进行单因素方差分析, *表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著。

A, Panicle morphology of ZH11 (left) and *lvd1* (right); B, Grain length comparison of ZH11 (top) and *lvd1* (bottom); C, Grain width comparison of ZH11 (top) and *lvd1* (bottom); D-K, Plant height, tiller number, panicle length, grain length, grain width, seed-setting rate, grains per panicle, and 1000-grain weight of ZH11 and *lvd1*. Data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 30$). Differences between ZH11 and *lvd1* were analyzed by one-way ANOVA using GraphPad Prism; * indicates significant difference at $P < 0.05$.

图 5 ZH11 与 *lvd1* 水稻主要农艺性状比较

Fig. 5. Statistical analysis of agronomic traits of ZH11 and *lvd1* in field conditions

供了新的实验证据, 并为未来挖掘兼具较高叶脉密度与适宜叶绿素水平的优良等位基因指明了潜在研究方向。

参考文献:

[1] 李先德, 孙致陆, 赵玉菡. 全球粮食安全及其治理: 发展进程、现实挑战和转型策略[J]. 中国农村经济, 2022(6): 2-22.

Li X D, Sun Z L, Zhao Y H. Global food security and its governance: Development process, practical challenges and transformation strategies[J]. *Chinese Rural Economy*, 2022(6): 2-22. (in Chinese with English abstract)

[2] Jiang H, Cheng W, Chen C, Fang C, Zhan Y, Tao L, Yang Y, Huang X, Wu K, Fu X, Wu Y, Liu B, Ye Y. Mutation of rice SM1 enhances solid leaf midrib formation and increases methane emissions[J]. *Plant Science*, 2025, 350: 112312.

- [3] Tanaka Y, Adachi S, Yamamoto T. Effects of vein structure on photosynthetic characteristics in rice leaves[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2014, 55(2): 258-268.
- [4] 吴一苓, 李芳兰, 胡慧. 叶脉结构与功能及其对叶片经济谱的影响[J]. *植物学报*, 2022, 57(3): 388-398.
Wu Y L, Li F L, Hu H. The structure and function of leaf veins and their influence on leaf economic spectrum[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2022, 57(3): 388-398. (in Chinese with English abstract)
- [5] 钱杨, 孙洪刚, 董汝湘, 姜景民. 针叶树碳水化合物分配研究进展[J]. *林业科学*, 2018, 54(1): 141-153.
Qian Y, Sun H G, Dong R X, Jiang J M. Research progress of carbohydrates allocation in conifers[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2018, 54(1): 141-153. (in Chinese with English abstract)
- [6] 凌启鸿, 张洪程, 戴其根, 丁艳锋, 凌励, 苏祖芳, 徐茂, 阙金华, 王绍华. 水稻精确定量栽培理论与技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007.
Ling Q H, Zhang H C, Dai Q G, Ding Y F, Ling L, Su Z F, Xu M, Que J H, Wang S H. Theory and Techniques of Precision Quantitative Cultivation of Rice[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2007. (in Chinese)
- [7] Ambavaram M M R, Basu S, Krishnan A, Ramegowda V, Batlang U, Rahman L, Baisakh N, Pereira A. Coordinated regulation of photosynthesis in rice increases yield and tolerance to environmental stress[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 5302.
- [8] Li C, Zou X, Zhang C, Shao Q, Liu J, Liu B, Li H, Zhao T. *OsLBD3-7* overexpression induced adaxially rolled leaves in rice[J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0156413.
- [9] 张志良, 李小方. 植物生理学实验指导[M]. 5版. 北京: 高等教育出版社, 2016.
Zhang Z L, Li X F. Experimental Guidance for Plant Physiology[M]. 5th ed. Beijing: Higher Education Press, 2016. (in Chinese)
- [10] Qi J, Qian Q, Bu Q, Li S, Chen Q, Sun J, Liang W, Zhou Y, Chu C, Li X, Ren F, Palme K, Zhao B, Chen J, Chen M, Li C. Mutation of the rice narrow leaf1 gene, which encodes a novel protein, affects vein patterning and polar auxin transport[J]. *Plant Physiology*, 2008, 147(4): 1947-1959.
- [11] 李乐, 曾辉, 郭大立. 叶脉网络功能性状及其生态学意义[J]. *植物生态学报*, 2013, 37(7): 691-698.
Li L, Zeng H, Guo D L. Leaf venation functional traits and their ecological significance[J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2013, 37(7): 691-698. (in Chinese with English abstract)
- [12] Wright I J, Reich P B, Westoby M, Ackerly D D, Baruch Z, Bongers F, Cavender-Bares J, Chapin T, Cornelissen J H C, Diemer M, Flexas J, Garnier E, Groom P K, Gulias J, Hikosaka K, Lamont B B, Lee T, Lee W, Lusk C, Midgley J J, Navas M L, Niinemets Ü, Oleksyn J, Osada N, Poorter H, Poot P, Prior L, Pyankov V I, Roumet C, Thomas S C, Tjoelker M G, Veneklaas E J, Villar R. The worldwide leaf economics spectrum[J]. *Nature*, 2004, 428(6985): 821-827.
- [13] Brodribb T J, Feild T S. Leaf hydraulic architecture correlates with leaf physiology and climate[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(43): 18225-18230.
- [14] Ye M, Wu M, Zhang H, Zhang Z, Zhang Z. High leaf vein density promotes leaf gas exchange by enhancing leaf hydraulic conductance in *Oryza sativa* L. plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 693815.
- [15] 张萍, 柳梦林, 叶胜海, 翟荣荣, 朱国富, 叶靖, 张小明. 水稻叶色突变体研究进展[J]. *分子植物育种*, 2021, 19(17): 5712-5719.
Zhang P, Liu M L, Ye S H, Zhai R R, Zhu G F, Ye J, Zhang X M. Research progress of rice leaf color mutants[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19(17): 5712-5719. (in Chinese with English abstract)
- [16] Caddell D, Langenfeld N J, Eckels M J H, Zhen S, Klaras R, Mishra L, Bugbee B, Coleman-Derr D. Photosynthesis in rice is increased by CRISPR/Cas9-mediated transformation of two truncated light-harvesting antenna[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1050483.
- [17] Xiong J, Wen G, Song J, Liu X, Chen Q, Zhang G, Xiao Y, Liu X, Deng H, Tang W, Wang F, Lu X. Knockout of the chlorophyll a oxygenase gene *OsCAO1* reduces chilling tolerance in rice seedlings[J]. *Genes*, 2024, 15(6): 721.
- [18] Zhao Y, Zhu M, Gao H, Zhou Y, Yao W, Zhao Y, Zhang W, Feng C, Li Y, Jin Y, Xu K. Photosynthetic characteristics and genetic mapping of a yellow-green leaf mutant *jym165* in soybean[J]. *BMC Plant Biology*, 2024, 24(1): 1009.
- [19] Grunewald W, De Smet I, Lewis D R, Löffke C, Jansen L, Goeminne G, Vanden Bossche R, Karimi M, De Rybel B, Vanholme B, Teichmann T, Boerjan W, Van Montagu M C E, Gheysen G, Muday G K, Friml J, Beeckman T. Transcription factor WRKY23 assists auxin distribution patterns during *Arabidopsis* root development through local control on flavonol biosynthesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(5): 1554-1559.
- [20] Wang F, Zhang L, Cui L, Zhao Y, Huang Y, Jiang M, Cai Q, Lian L, Zhu Y, Xie H, Chen L, Xiao Y, Xie H, Zhang J. The *OsMAPK6-OsWRKY72* module positively regulates rice leaf angle through brassinosteroid signals[J]. *Plant Communications*, 2025, 6(3): 101236.
- [21] Liu S, Kracher B, Ziegler J, Birkenbihl R P, Somssich I E. Negative regulation of ABA signaling by WRKY33 is critical for *Arabidopsis* immunity towards *Botrytis cinerea* 2100[J]. *ELife*, 2015, 4: e07295.

- [22] Bakshi M, Oelmüller R. WRKY transcription factors: Jack of many trades in plants[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2014, 9(2): e27700.
- [23] Jiang Y, Liang G, Yang S, Yu D. WRKY57 transcription factor mediates jasmonate-induced leaf senescence in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2014, 26(1): 230-245.
- [24] Du P, Wang Q, Yuan D, Chen S S, Su Y N, Li L, Chen S, He X J. WRKY-OBE protein complex regulates the balance between growth and stress responses in plants[J]. *The EMBO Journal*, 2023, 42(1): e150234.
- [25] Li W, Pang S, Lu Z, Jin B. Function and mechanism of WRKY transcription factors in abiotic stress responses of plants[J]. *Plants (Basel)*, 2020, 9(11): 1515.
- [26] Miao Y, Laun T, Zimmermann P, Zentgraf U. Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis*[J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 55(6): 853-867.
- [27] Prát T, Hajnó J, Grunewald W, Vasileva M, Molnár G, Tejos R, Schmid M, Sauer M, Friml J. WRKY23 is a component of the transcriptional network mediating auxin feedback on PIN polarity[J]. *PLoS Genetics*, 2018, 14(1): e1007177.
- [28] Hinderhofer K, Zentgraf U. Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence[J]. *Planta*, 2001, 213(3): 469-473.
- [29] Xie Z, Zhang Z L, Zou X, Huang J, Ruas P, Thompson D, Shen Q J. Annotations and functional analyses of the Rice *WRKY* Gene superfamily reveal positive and negative regulators of abscisic acid signaling in aleurone cells[J]. *Plant Physiology*, 2005, 137(1): 176-189.
- [30] Porebski S, Bailey L G, Baum B R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1997, 15(1): 8-15.
- [31] 易浩昆, 罗堰木, 黄敏, 李曼菲, 杜何为. 水稻侧根发育突变体 *lrp1* 鉴定及表达分析[J]. *中国水稻科学*, 2026, 40(3): 302-311.
- Yi H K, Luo Y M, Huang M, Li M F, Du H W. Identification and expression analysis of rice lateral root development mutant *lrp1*[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2026, 40(3): 302-311.
- [32] 杜何为, 黄敏, 何凯. 水稻、玉米、小麦成熟种子总RNA的快速提取[J]. *分子植物育种*, 2015, 13(9): 2091-2094.
- Du H W, Huang M, He K. A method of rapid isolation of total RNA from mature seeds in rice, maize, and wheat[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2015, 13(9): 2091-2094. (in Chinese with English abstract)
- [33] Lichtenthaler H K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes[M]//Plant Cell Membranes. Amsterdam: Elsevier, 1987: 350-382.
- [34] 李会. 谷子核心种质叶脉性状全基因组关联分析[D]. 太谷: 山西农业大学, 2021.
- Li H. Genome-wide association analysis of leaf vein traits in foxtail millet core germplasm[D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2021. (in Chinese with English abstract)
- [35] 王迪. 水稻叶宽调控基因 *ZYI* 的图位克隆与功能分析[D]. 扬州: 扬州大学, 2021.
- Wang D. Map-based cloning and functional analysis of the rice leaf width regulatory gene *ZYI*[D]. Yangzhou, Yangzhou University, 2021.
- [36] 刘启明. *SHR* 基因在水稻和狗尾草维管束发育中的功能研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2023.
- Liu Q M. Functional analysis of *SHR* gene in the development of vascular bundles in rice and green foxtail[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2023. (in Chinese with English abstract)
- [37] Xiong D, Wang D, Liu X, Peng S, Huang J, Li Y. Leaf density explains variation in leaf mass per area in rice between cultivars and nitrogen treatments[J]. *Annals of Botany*, 2016, 117(6): 963-971.
- [38] Li Y, Zhu J, Wu L, Shao Y, Wu Y, Mao C. Functional divergence of PIN1 paralogous genes in rice[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2019, 60(12): 2720-2732.
- [39] Wójtowicz J, Jagielski AK, Mostowska A, Gieczewska KB. Compensation mechanism of the photosynthetic apparatus in *Arabidopsis thaliana chl* mutants[J]. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22(1):221.