



大刍草稀有等位基因促进玉米密植高产

刘杰, 严建兵*

华中农业大学, 作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 密植是提高作物单位面积产量、促进粮食增产的重要途径之一。叶夹角是影响玉米(*Zea mays*)密植的关键因子。中国农业大学田丰课题组最近克隆了2个调控玉米叶夹角的数量性状位点(QTL)——*UPA1*和*UPA2*, 揭示了这2个位点的功能基因(*brd1*和*ZmRAVL1*)通过油菜素内酯(BR)信号通路调控叶夹角。*UPA2*位于*ZmRAVL1*上游9.5 kb, 可与DRL1蛋白结合。另一个影响玉米叶夹角的蛋白LG1可以激活*ZmRAVL1*的表达; DRL1蛋白与LG1蛋白直接互作抑制LG1对*ZmRAVL1*的激活表达。玉米祖先种大刍草(*teosinte*)的*UPA2*位点序列与DRL1蛋白结合能力更强, 导致大刍草*ZmRAVL1*的表达受到更强的抑制, 下调表达的*ZmRAVL1*进一步使下游基因*brd1*的表达下调, 进而降低叶环区的内源BR水平, 导致叶夹角变小。将大刍草的*UPA2*等位基因导入到玉米中或对玉米中*ZmRAVL1*进行基因编辑, 在密植条件下均可显著提高玉米产量。上述发现为高产玉米品种的分子育种改良提供了重要理论基础和基因资源。

关键词 玉米, 密植, 产量, *UPA1*, *UPA2*

刘杰, 严建兵 (2019). 大刍草稀有等位基因促进玉米密植高产. 植物学报 54, 554–557.

玉米(*Zea mays*)种植密度的增加是玉米增产的重要途径之一。美国玉米的种植密度由20世纪30年代的35 000株·hm⁻²提高到了21世纪初的80 000株·hm⁻² (Lee and Tollenaar, 2007); 中国玉米的种植密度在最近10年也有显著增加, 以黄淮海夏玉米主产区为例, 由2005年的58 200株·hm⁻²增加到2016年的62 100株·hm⁻² (明博等, 2017)。叶夹角是影响玉米种植密度的重要因素, 已有多项研究克隆了控制玉米叶夹角的基因, 包括*lg1* (*liguleless1*) (Moreno et al., 1997)、*lg2* (Walsh et al., 1998)、*ZmTAC1* (Ku et al., 2011)、*ZmCLA4* (Zhang et al., 2014)、*na2* (*nana plant2*) (Best et al., 2016)、*drl1* (*drooping leaf 1*)和*drl2* (Strable et al., 2017)。*lg1*编码含SBP结构域的蛋白, 该基因突变体的叶舌和叶耳缺失、叶片直立;*lg2*编码bZIP转录因子;*ZmTAC1*是水稻(*Oryza sativa*)中控制叶夹角基因*OsTAC1* (Yu et al., 2007)的同源基因;*ZmCLA4*是水稻中*OsLAZY1* (Li et al., 2007)的同源基因, 通过影响向重力性调控叶夹角;*na2*编码油菜素内酯(brassinosteroid, BR)生物合成途径的关键酶, 是拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中

DWARF1 (Choe et al., 1999)的同源基因; *drl1*和*drl2*均编码YABBY家族转录因子, 且*drl2*可以增强*drl1*的作用。

*lg1*和*lg2*双突变体的遗传分析表明, 这2个基因位于同一条叶发育途径, 但是发挥不同功能, 且*lg2*发挥作用早于*lg1* (Harper and Freeling, 1996)。*na2*调控BR合成, 而BR则可能调控*drl1*和*drl2*的活性 (Strable et al., 2017), 表明这3个基因可能通过BR相关途径来调控叶夹角。上述研究结果表明, BR信号途径在调控玉米叶夹角中有非常重要的作用, 但这3个基因参与BR途径的具体方式以及它们之间是如何互作的仍然不清楚。

玉米和大刍草(*teosinte*)均属于玉蜀黍属(*Zea*), 除玉米外, 该属的其它7个亚种统称为大刍草, 其中*Z. mays ssp. parviglumis*是玉米的直接祖先种。最近, 田丰课题组利用大刍草(CIMMYT accession 8759, 属于*Z. mays ssp. parviglumis*)和玉米自交系W22杂交构建的BC₂S₃群体, 定位了12个控制叶夹角的QTLs, 并对其中2个效应最大的QTLs——*UPA1* (*Upright Plant Architecture1*)和*UPA2*进行了精细定

收稿日期: 2019-07-08; 接受日期: 2019-07-16

* 通讯作者。E-mail: yjianbing@mail.hzau.edu.cn

位。*UPA1*被定位到223 kb区间内, 该区间仅包含1个参与BR合成途径的基因(*brassinosteroid C-6 oxidase1, brd1*); *UPA2*则被定位到240 bp非编码区间内, 该区间位于*ZmRAVL1* (B3结构域转录因子)上游9.5 kb。功能验证结果表明, 相比对照材料, *ZmRAVL1*的RNAi和CRISPR/Cas9敲除植株叶夹角变小, 而超表达植株叶夹角变大; *brd1*的超表达植株具有更大的叶夹角(Tian et al., 2019)。

*ZmRAVL1*的功能位点是位于*UPA2*内的2个碱基插入缺失(2 bp InDel), 这2个碱基的插入缺失位于1个可被C₂C₂结合的motif (AGTGTG)中, 而*drl1*和*drl2*编码的YABBY转录因子可以识别这个motif。因此, 研究人员通过凝胶迁移(electrophoretic mobility shift assays, EMSA)和ChIP-qPCR实验, 发现含有2 bp插入的大刍草等位基因比玉米等位基因具有与DRL1蛋白更强的结合能力。

在*lg1*和*lg2*的双突变体中, *ZmRAVL1*的表达显著下调; 而在*ZmRAVL1*的敲除植株中, *lg1*和*lg2*的表达没有改变, 这说明*ZmRAVL1*位于*lg1*和*lg2*所在途径的下游; 而*ZmRAVL1*的启动子区存在2个GTAC的motif, 这种motif可以被SBP蛋白识别, 研究人员据此推测LG1蛋白可以结合*ZmRAVL1*的启动子区, 进而调控其表达。通过酵母单杂交、EMSA和ChIP-qPCR等技术手段, 研究人员进一步证实了这一推测, 表明LG1直接调控*ZmRAVL1*的表达。

DRL1结合远距离(9.5 kb)含AGTGTG的motif, 而LG1结合近距离(启动子区)含GTAC的motif, 那么这2个蛋白之间是否存在互作? 研究人员利用酵母双杂交及荧光素酶互补实验(firefly luciferase complementation imaging assay, LCI)在体外和体内均证实DRL1和LG1这2个蛋白间存在直接互作。此外, 玉米原生质体的瞬时表达分析证实, 相比玉米等位基因, *UPA2*的大刍草等位基因驱动的荧光素酶活性低; 单独表达LG1可以提高*UPA2*的大刍草和玉米等位基因驱动的荧光素酶活性; 单独表达DRL1则抑制*UPA2*的大刍草和玉米等位基因驱动的荧光素酶活性; 而LG1和DRL1共表达则会抑制LG1对*ZmRAVL1*的激活作用。综上, DRL1蛋白可与LG1蛋白直接互作, 且两者间的互作会抑制LG1对*ZmRAVL1*的表达激活作用。

在*UPA1*的近等基因系中, *brd1*的表达量越高,

叶夹角越大, *brd1*超表达材料也进一步证实了这一结果, 表明*brd1*通过表达量的改变调控叶夹角。在*ZmRAVL1*的敲除突变体中, *brd1*的表达量显著下调; 而在*brd1*的超表达材料中, *ZmRAVL1*的表达没有改变, 表明*brd1*位于*ZmRAVL1*下游。*ZmRAVL1*编码含B3结构域的转录因子, 此类转录因子可以结合E-box motif (CANNTG) (Je et al., 2010), 而*brd1*的启动子区含有5个此类motif, 酵母单杂交、EMSA、ChIP-qPCR及原生质体瞬时表达等实验均证实*ZmRAVL1*蛋白可以结合*brd1*的启动子区, 进而调控*brd1*基因的表达。*brd1*超表达植株的内源BR水平显著升高, 而*ZmRAVL1*敲除植株则显著降低。

Tian等(2019)的研究进一步明晰了玉米叶夹角的调控途径(图1)。LG1激活*ZmRAVL1*的表达, DRL1抑制*ZmRAVL1*的表达, DRL1与LG1蛋白互作抑制LG1对*ZmRAVL1*的激活作用。*ZmRAVL1*调控下游*brd1*的表达, 而*brd1*通过调控BR的合成调控玉米叶夹角大小。综合来看, 仍有几个问题亟待解决: (1) *lg2*与*lg1*位于同一个调控途径, 且*lg2*发挥功能早于*lg1*, 它们之间如何相互作用仍不清楚; (2) LG1与DRL1的互作机制比较清晰, DRL2作为DRL1的增强子, 可以增强DRL1的作用, 但DRL2如何影响DRL1以及是否与LG1之间存在互作, 仍然未知; (3) *ZmTAC1*和*ZmCLA4*通过何种途径调控叶夹角以及是否与其它基因之间存在相互作用, 也是一个值得探讨的话题。

*UPA1*和*UPA2*的克隆不仅清晰地解析了玉米叶夹角调控途径的遗传机理, 而且在实际生产应用上也有巨大价值。将大刍草的*UPA2*等位基因导入玉米杂交种(农大108)中, 可以在高密植条件下(10 500株·hm⁻²)显著增产; 对*ZmRAVL1*进行遗传操作(CRISPR/Cas9和RNAi), 也可以显著改良玉米株型, 并提高玉米耐密植程度(Tian et al., 2019)。

田丰课题组这项研究是玉米功能基因组研究的重大进展之一, 该研究不但清晰展示了玉米叶夹角的分子调控网络, 也对玉米的密植高产育种具有直接指导意义, 是理论研究指导育种应用的最佳范例之一。值得指出的是, 通过对大量农家种和栽培玉米品种进行测序分析, 结果表明减小叶夹角的含2 bp插入的*UPA2*等位基因在农家种和栽培种中均不存在, 在大刍草群体中的比例也非常低(4.4%), 暗示这个优良等位基因在驯化过程中并没有被选择利用。这一发现也

提醒我们,野生大刍草群体中可能存在大量在玉米驯化和选择过程中被丢失的有利等位变异,这是未来作物遗传改良应予以重视的一个方向。

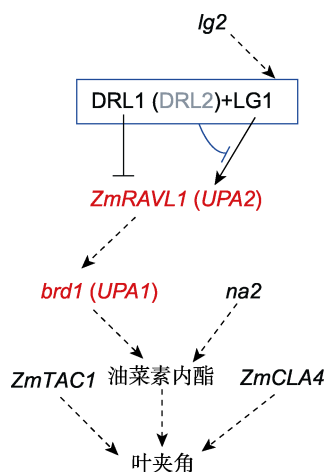


图1 玉米叶夹角的调控途径

*Ig2*调控*Ig1*,但具体机制未知。*LG1*激活*ZmRAVL1*的表达,*DRL1*抑制*ZmRAVL1*的表达,*DRL1*与*LG1*蛋白互作抑制*LG1*对*ZmRAVL1*的激活作用(*DRL2*可能具有与*DRL1*类似的功能)。*ZmRAVL1*调控下游*brd1*的表达,*brd1*和*nana plant2 (na2)*都参与油菜素内酯(brassinosteroid, BR)的生物合成。这些基因均通过BR途径调控玉米叶夹角形成。实线表示机制已被阐明,虚线表示机制未知。

Figure 1 A proposed pathway regulating the leaf angle in maize

Ig2 regulates *Ig1* with an unknown mechanism. *LG1* and *DRL1* activates and represses the expression of *ZmRAVL1*, respectively. The *DRL1-LG1* complex represses the *LG1*-activated *ZmRAVL1* expression (*DRL2* may have a similar function as *DRL1*). *ZmRAVL1* regulates the expression of *brd1*, which, together with *nana plant2 (na2)*, are involved in the biosynthesis of brassinosteroid (BR) and eventually regulate leaf angle. Solid and dash lines indicate the clear and unclear regulatory mechanism, respectively.

参考文献

明博, 谢瑞芝, 侯鹏, 李璐璐, 王克如, 李少昆 (2017). 2005–2016年中国玉米种植密度变化分析. 中国农业科学 50, 1960–1972.

Best NB, Hartwig T, Budka J, Fujioka S, Johal G, Schulz B, Dilkes BP (2016). *nana plant2* encodes a maize ortholog of the *Arabidopsis* brassinosteroid biosynthesis gene *DWARF1*, identifying developmental interactions between brassinosteroids and gibberellins. *Plant Physiol* 171, 2633–2647.

Choe S, Dilkes BP, Gregory BD, Ross AS, Yuan H, Nouguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Tanaka A, Yoshida S, Tax FE, Feldmann KA (1999). The *Arabidopsis dwarf1* mutant is defective in the conversion of 24-methylene-cholesterol to campesterol in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol* 119, 897–907.

Harper L, Freeling M (1996). Interactions of *liguleless1* and *liguleless2* function during ligule induction in maize. *Genetics* 144, 1871–1882.

Je BI, Piao HL, Park SJ, Park SH, Kim CM, Xuan YH, Park SH, Huang J, Do Choi Y, An G, Wong HL, Fujioka S, Kim MC, Shimamoto K, Han CD (2010). *RAV-Like1* maintains brassinosteroid homeostasis via the coordinated activation of *BR11* and biosynthetic genes in rice. *Plant Cell* 22, 1777–1791.

Ku L, Wei X, Zhang S, Zhang J, Guo S, Chen Y (2011). Cloning and characterization of a putative *TAC1* ortholog associated with leaf angle in maize (*Zea mays* L.). *PLoS One* 6, e20621.

Lee EA, Tollenaar M (2007). Physiological basis of successful breeding strategies for maize grain yield. *Crop Sci* 47, S202–S215.

Li P, Wang Y, Qian Q, Fu Z, Wang M, Zeng D, Li B, Wang X, Li J (2007). *LAZY1* controls rice shoot gravitropism through regulating polar auxin transport. *Cell Res* 17, 402–410.

Moreno MA, Harper LC, Krueger RW, Dellaporta SL, Freeling M (1997). *liguleless1* encodes a nuclear-localized protein required for induction of ligules and auricles during maize leaf organogenesis. *Genes Dev* 11, 616–628.

Strable J, Wallace JG, Unger-Wallace E, Briggs S, Bradbury PJ, Buckler ES, Vollbrecht E (2017). Maize YABBY genes *drooping leaf1* and *drooping leaf2* regulate plant architecture. *Plant Cell* 29, 1622–1641.

Tian J, Wang C, Xia J, Wu L, Xu G, Wu W, Li D, Qin W, Han X, Chen Q, Jin W, Tian F (2019). Teosinte ligule allele narrows plant architecture and enhances high-density maize yields. *Science* 365, 658–664.

Walsh J, Waters CA, Freeling M (1998). The maize gene *liguleless2* encodes a basic leucine zipper protein involved in the establishment of the leaf blade-sheath boundary. *Genes Dev* 12, 208–218.

Yu B, Lin Z, Li H, Li X, Li J, Wang Y, Zhang X, Zhu Z, Zhai W, Wang X, Xie D, Sun C (2007). *TAC1*, a major quantitative trait locus controlling tiller angle in rice. *Plant J* 52, 891–898.

Zhang J, Ku LX, Han ZP, Guo SL, Liu HJ, Zhang ZZ, Cao LR, Cui XJ, Chen YH (2014). The *ZmCLA4* gene in the

qLA4-1 QTL controls leaf angle in maize (*Zea mays* L.). *J Exp Bot* **65**, 5063–5076.

A Teosinte Rare Allele Increases Maize Plant Density and Yield

Jie Liu, Jianbing Yan*

National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Increasing plant density is an important approach to boost crop yield, and leaf angle is one of the key factors affecting plant density. Recently, Feng Tian's lab from China Agricultural University cloned and characterized two major QTLs (*UPA1* and *UPA2*) regulating leaf angle in maize. The underlying genes are *brd1* and *ZmRAVL1*, respectively, and both of them are involved in the brassinosteroid (BR) pathway to regulate leaf angle. *UPA2* is located 9.5 kb upstream of *ZmRAVL1* and is bound by DRL1. LG1, another leaf angle protein, directly activates the expression of *ZmRAVL1*. DRL1 and LG1 physically interact and the resulting complex in turn represses the LG1-activated expression of *ZmRAVL1*. The teosinte allele of *UPA2* has a higher binding affinity with DRL1, resulting in the reduced *ZmRAVL1* expression, which consequently down-regulates the *brd1* expression and leads to the decreased brassinosteroid level, thereby reducing the leaf angle. The introgression of *UPA2* teosinte allele into maize and the manipulation of *ZmRAVL1* significantly increase maize yield with increased plant density. These findings have paved a new avenue for molecular breeding of high-yield maize varieties.

Key words maize, plant density, yield, *UPA1*, *UPA2*

Liu J, Yan JB (2019). A teosinte rare allele increases maize plant density and yield. *Chin Bull Bot* **54**, 554–557.

* Author for correspondence. E-mail: yjianbing@mail.hzau.edu.cn

(责任编辑: 朱亚娜)