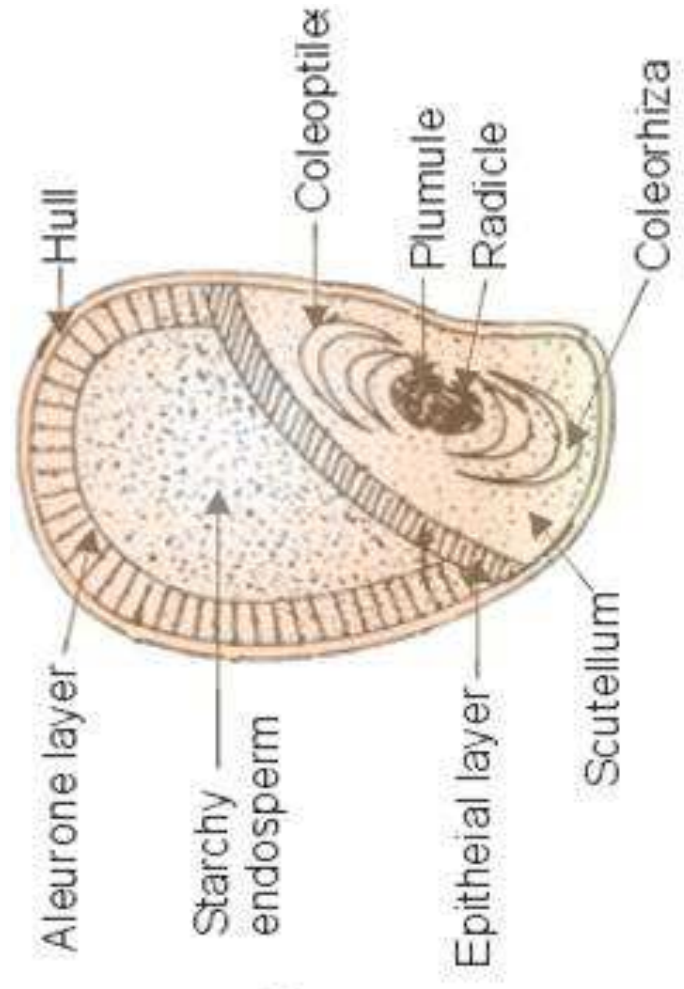


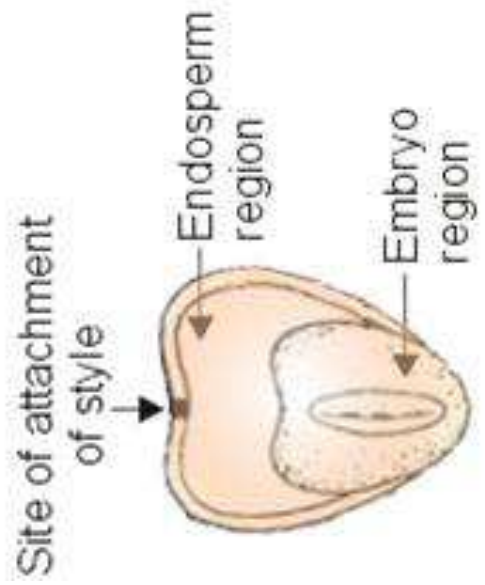
# Gene duplication confers enhanced expression of 27-kDa $\gamma$ -zein for endosperm modification in quality protein maize

Hongjun Liu<sup>a,1</sup>, Junpeng Shi<sup>b,1</sup>, Chuanlong Sun<sup>a</sup>, Hao Gong<sup>c</sup>, Xingming Fan<sup>d</sup>, Fazhan Qiu<sup>e</sup>, Xuehui Huang<sup>c</sup>, Qi Feng<sup>c</sup>, Xixi Zheng<sup>a</sup>, Ningning Yuan<sup>a</sup>, Changsheng Li<sup>a</sup>, Zhiyong Zhang<sup>a</sup>, Yiting Deng<sup>a</sup>, Jiechen Wang<sup>a</sup>, Guangtang Pan<sup>f</sup>, Bin Han<sup>c</sup>, Jinsheng Lai<sup>b</sup>, and Yongrui Wu<sup>a,2</sup>

[www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1601352113](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1601352113)



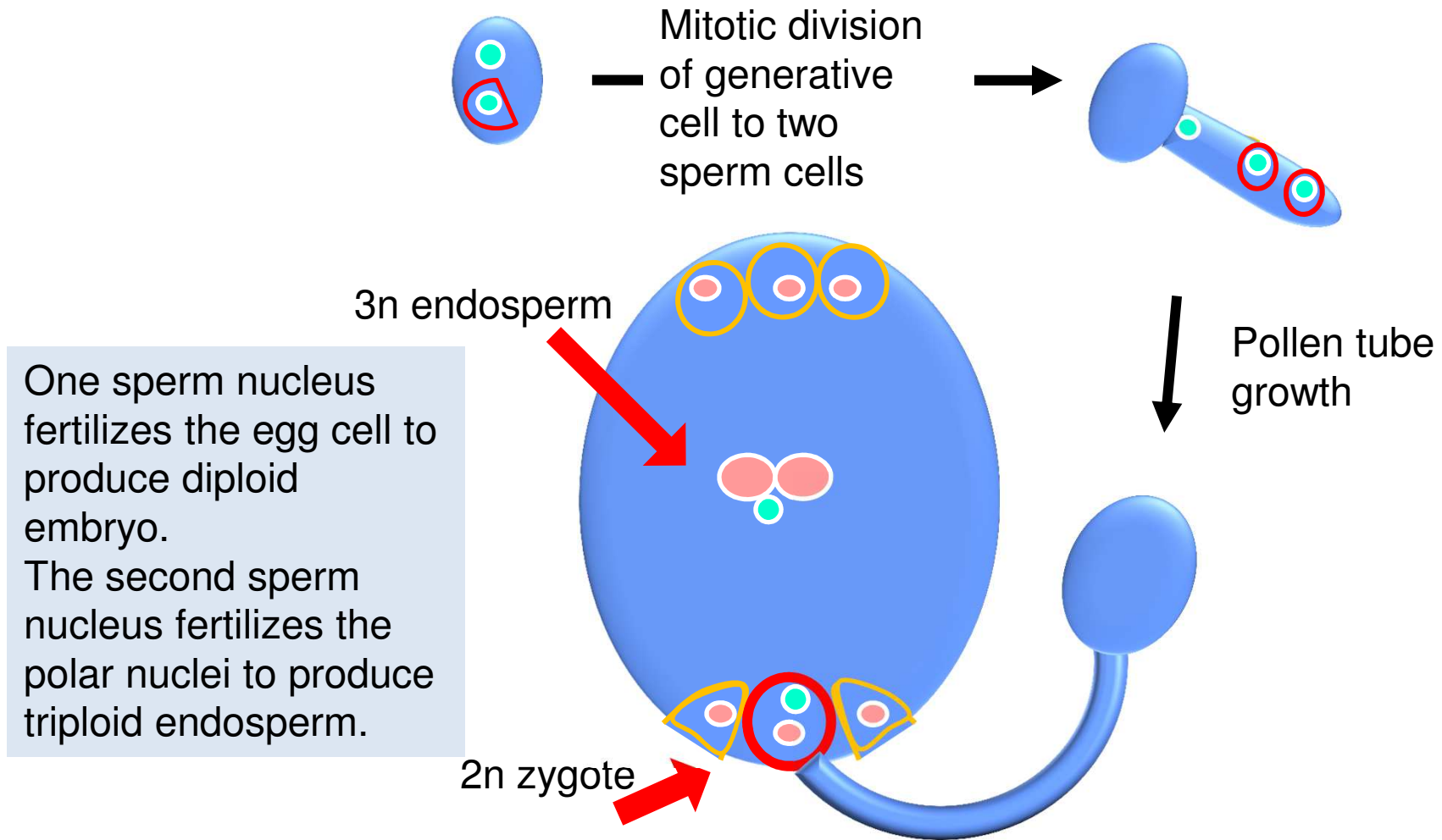
L.S. Of maize seed

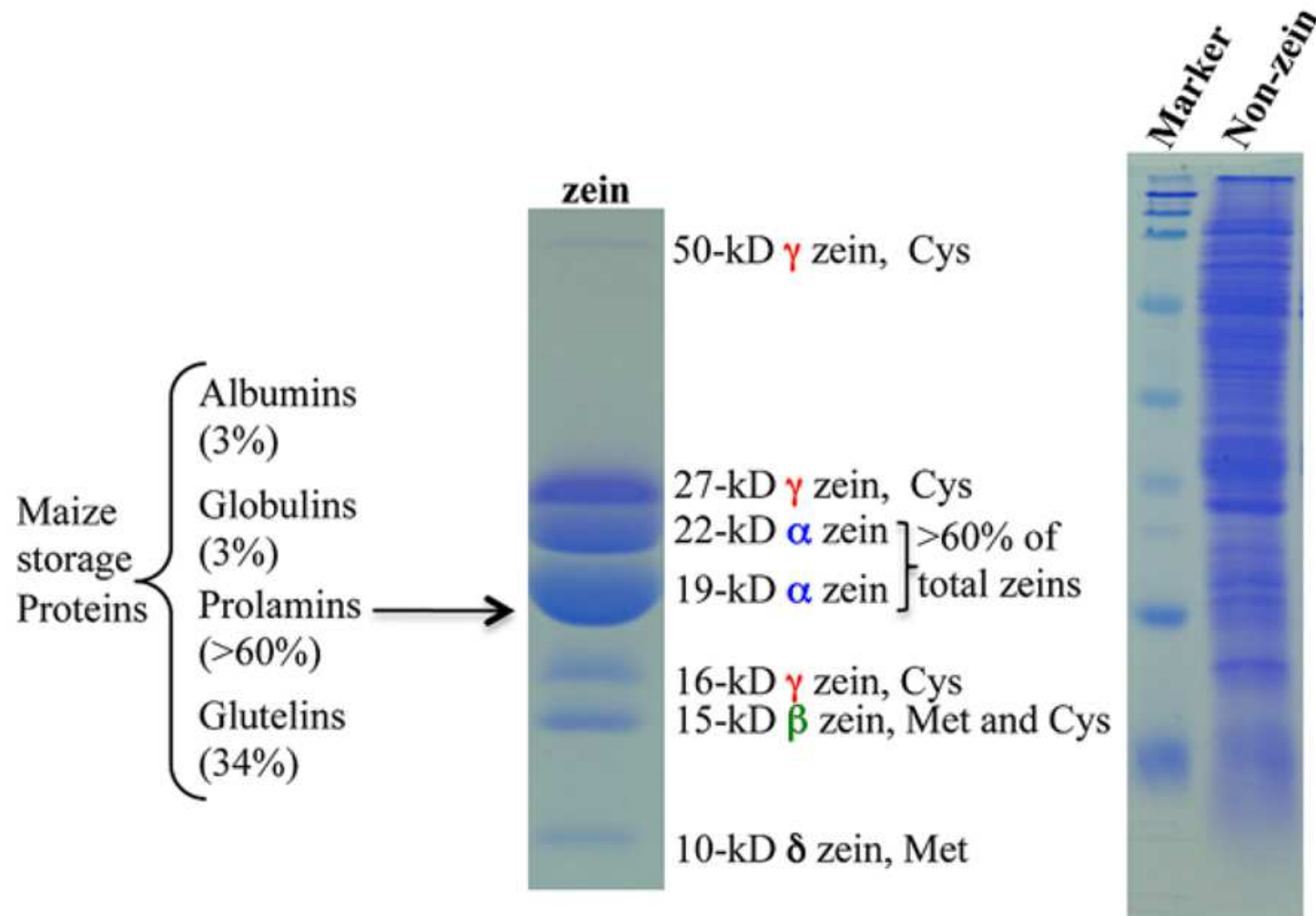


Maize grain

## Structure of maize seed

# Double Fertilization

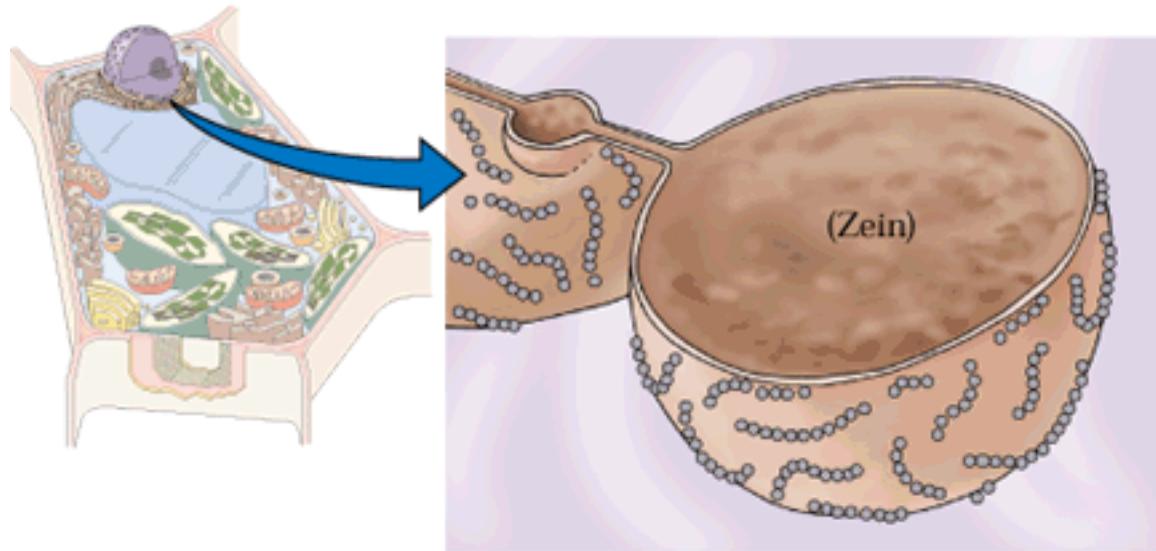




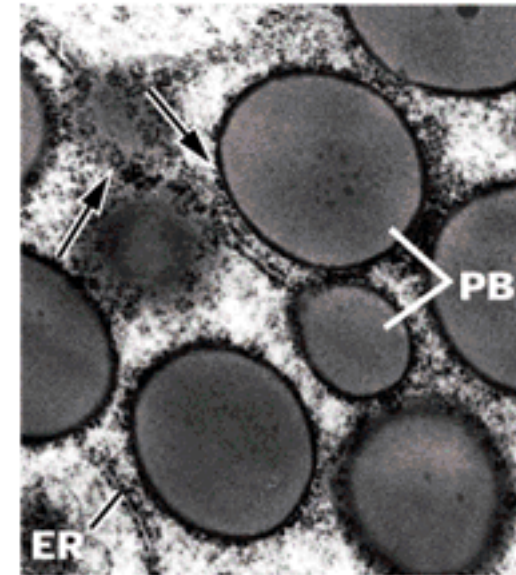
Maize seeds contain ~10% proteins and ~70% of them are classified as storage proteins ([Flint-Garcia et al., 2009](#)). Based on their solubility in different solvents, endosperm proteins are divided into four groups: albumins, globulins, glutamines, and prolamins. The latter, called zeins, make up > 60% of total proteins.

# CORPI PROTEICI

(A)



(B)



- Proteine di bassa qualità (principalmente **zeine**, povere in Lys e Trp)
- Mutazione *opaque2* (*op2*) migliora la qualità delle proteine, riducendo le zeine ed aumentando altre proteine, ma causa endosperma farinoso
- *o2 modifiers*: QTL che modificano l'endosperma delle piante *o2*, rendendolo più duro e vitreo (Quality Protein Maize, QPM)



The Plant Cell, Vol. 4, 689–700, June 1992 © 1992 American Society of Plant Physiologists

## **Opaque-2 Is a Transcriptional Activator That Recognizes a Specific Target Site in 22-kD Zein Genes**

**Robert J. Schmidt,<sup>1</sup> Mariena Ketudat, Milo J. Aukerman, and Gisela Hoschek**

Department of Biology, 0116, and Center for Molecular Genetics, University of California at San Diego, La Jolla, California 92093

## Dati di letteratura

- Sette loci *o2 modifiers* su 6 cromosomi
- *o2 modifier1* (vicino al locus della gamma-zeina da 27Kd) ha l'effetto maggiore
- Aumentano mRNA e proteine per gamma-zeina da 27Kd
- Livelli gamma-zeina correlano con effetto sul fenotipo dell'endosperma
- Silenziamento delle gamma-zeine o delezione del locus corrispondente alla 27KDa gamma-zeina aboliscono l'effetto degli *o2 modifier* sull'endosperma
- L'espressione della 27-kDa gamma-zeina è regolata dal fattore di trascrizione prolamine-box binding factor (PBF); soppressione dell'espressione di PBF tramite RNAi riduce l'espressione della 27-kDa gamma-zeina



QUALE E' LA BASE GENETICA DEGLI EFFETTI DEL  
QTL *op2 modifier1*?

# RISULTATI

## 1. REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE DELLA 27-Kda gamma-ZEIN in QPM

a) Incroci reciproci tra una linea QPM K0326Y (con QTL  $q\gamma 27$ , che regola positivamente i livelli di 27KD-gamma zeina) ed una linea senza questo QTL (chiamata B73) -> si ottengono quattro genotipi:

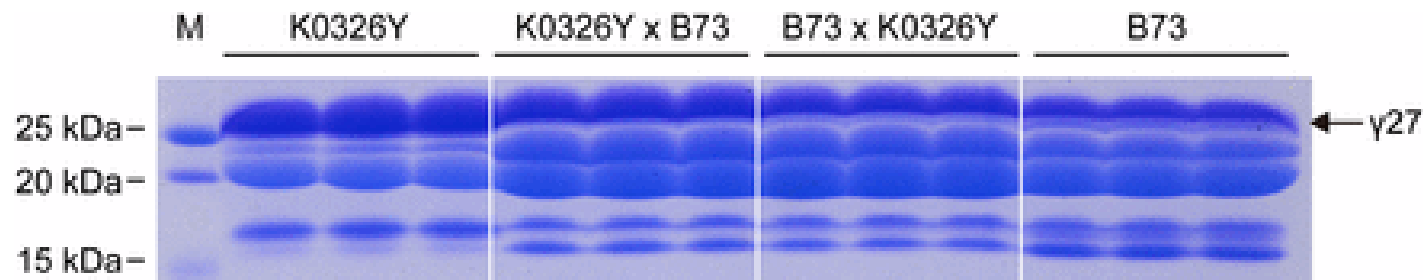
K0326Y QPM -> 3 copie di  $q\gamma 27$  (due materne ed una paterna)

K0326Y QPM x B73-> 2 copie di  $q\gamma 27$  (solo le due materne)

B73 X K0326Y QPM -> 1 copie di  $q\gamma 27$  (solo la copia paterna)

B73-> 0 copie di  $q\gamma 27$

-> livelli di gamma-zeina misurati tramite SDS-PAGE correlano con copie di  $q\gamma 27$



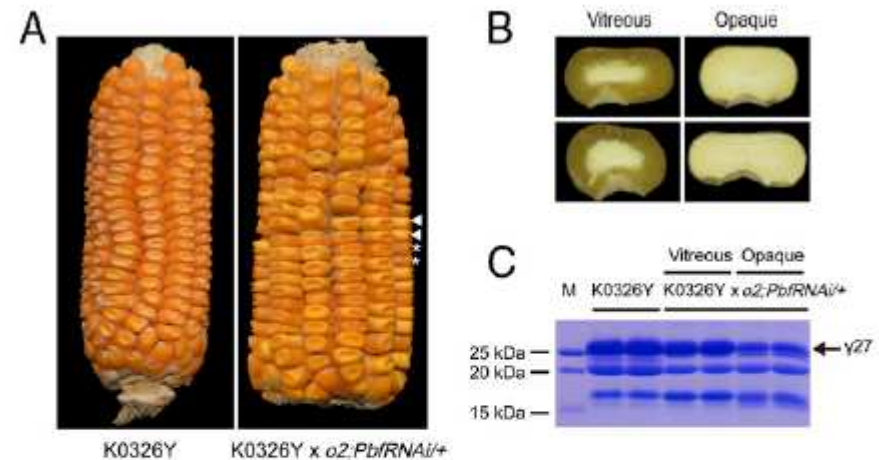
# RISULTATI

## 1. REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE DELLA 27-Kda gamma-ZEIN in QPM

b) Introggressione del costrutto PbfRNAi in una linea o2 tramite ripetuti back-cross -> linea *PbfRNAi/+ o2* (omozigote per *o2*, eterozigote per il costrutto RNAi), poi incrociata con K0326Y QPM:

-> metà della progenie ha il gene per il silenziamento di PBF, mostra riduzione di 27-kDa gamma-zeina ed ha fenotipo opaque

Ne consegue che q $\gamma$ 27 agisce a valle di PBF



**Fig. 1.** Silencing of *Pbf* in QPM. (A) Ear phenotypes of K0326Y and K0326Y  $\times$  o2;*PbfRNAi/+*. In K0326Y  $\times$  o2;*PbfRNAi/+*, half of the progeny inherited the *PbfRNAi* transgene and expressed a reduced level of 27-kDa  $\gamma$ -zein and exhibited an opaque phenotype. Two representative vitreous and opaque seeds are indicated by asterisks and arrowheads. (B) Truncated seed phenotypes. The left two seeds not inheriting the *PbfRNAi* are vitreous, whereas the right two positive seeds are opaque. (C) The seeds inheriting the *PbfRNAi* expressed a decreased level of 27-kDa  $\gamma$ -zein. The 27-kDa  $\gamma$ -zein is indicated by the arrow.

# RISULTATI

## 1. REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE DELLA 27-Kda gamma-ZEIN in QPM

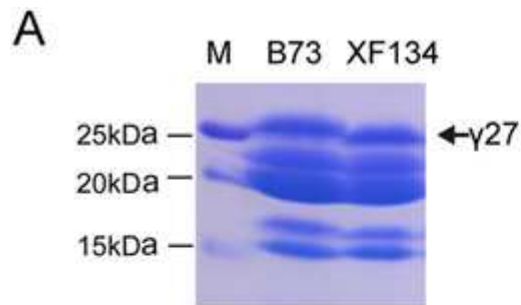
c) Linea XF134: è una inbred line che ha un polimorfismo del gene per la 27kDa-gamma-zeina, risultante in un gene più corto di 18 bp rispetto a quello della linea B73

Incrocio XF134xK0326Y QPM:

- se  $q\gamma 27$  agisce in trans sull'espressione della zeina, ci si attende un rapporto 2:1 nei livelli di cDNA dei due alleli nella progenie

Invece, si osserva un rapporto più alto (prevale l'allele di K0326Y)

- Se ne deduce che  $\gamma 27$  agisce in cis preferenzialmente sull'allele QPM, rispetto a quello di XF134



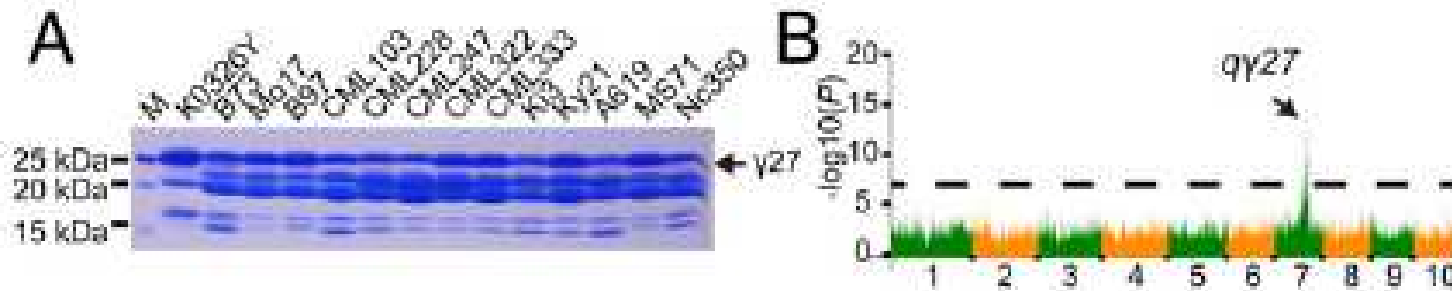
**C**

	Expectation rate	$\gamma 27$ from Female	$\gamma 27$ from Male	Actual rate	$\chi^2$ <sup>a</sup>	Fit expectation rate
B73 x XF134	2:1	346	181	≈2:1	0.24	Yes
K0326Y x XF134	2:1	425	100	≈4:1	48.0	No
Mo17 x XF134	2:1	156	30	≈4:1	24.8	No
XF134 x Mo17	2:1	130	135	≈1:1	37.0	No

# RISULTATI

## 2. CLONAGGIO DI $\gamma$ 27

- Misurazione dei livelli di gamma-zeina 27kDa in 492 inbred lines e «genome-wide association study» (GWAS) -> singolo picco principale sul cr. 7 vicino al locus della 27 kDa-gamma-zeina, corrispondente anche alla regione  $o2$

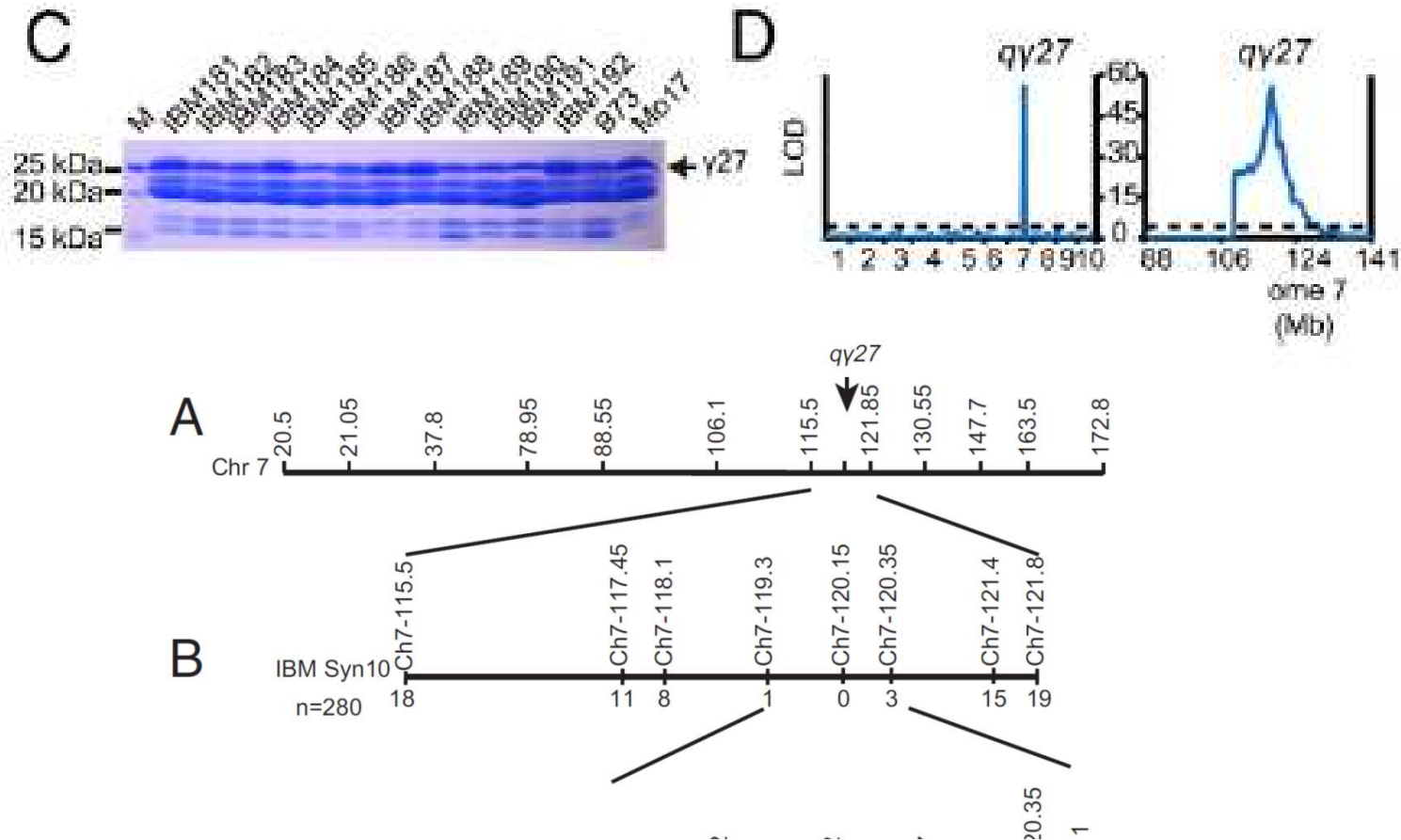


Se ne conclude che esiste un singolo QTL principale per l'espressione di questa zeina, che è stato selezionato nel mais QPM

# RISULTATI

## 2. CLONAGGIO DI $q\gamma 27$

- Mo17: elevati livelli di 27kDa-gamma-zein -> utilizzo di una popolazione doppio aploide B73xMo17 (IBM Synthetic 10 DH) per mappare ulteriormente il QTL -> stessa regione di *o2 modifier1*



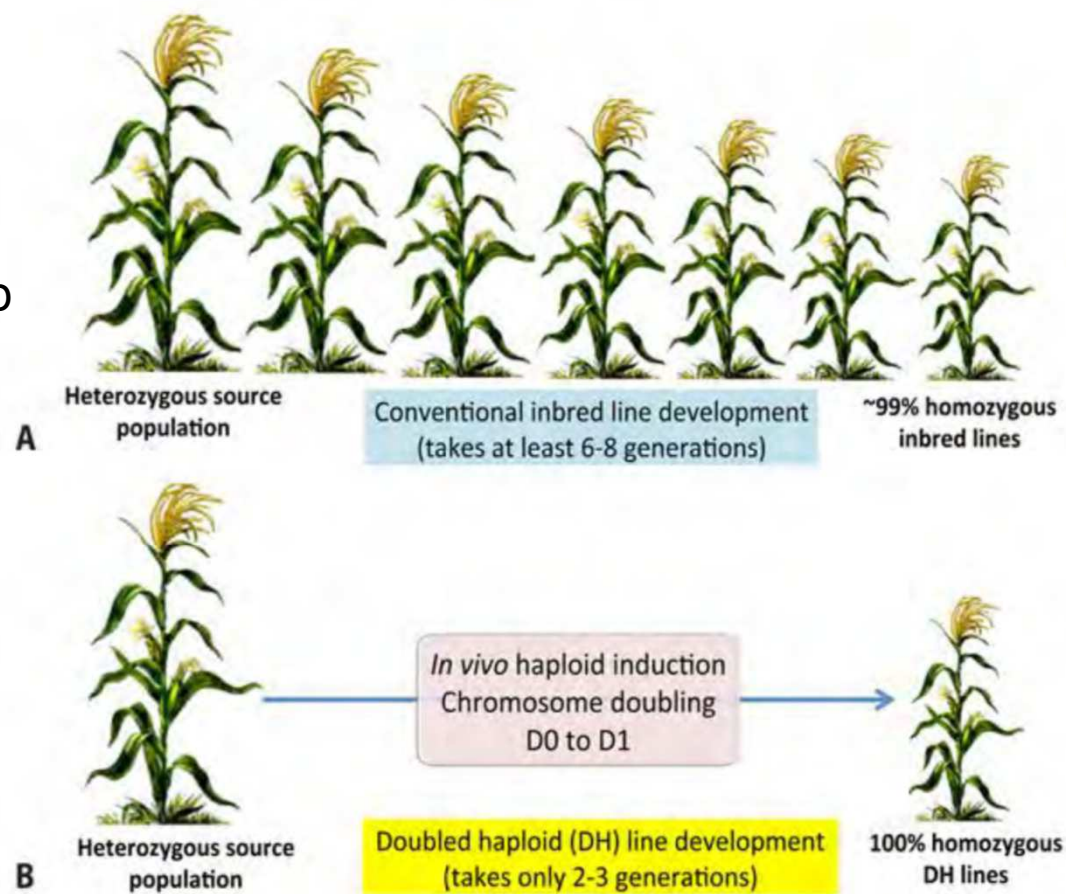
-> utilizzo di Mo17 (genoma in corso di sequenziamento) per la mappatura fine di  $q\gamma 17$

# Linee doppio aploidi

Doppio aploide: genotipo in cui una linea aploide ha subito un raddoppiamento, artificialmente (con inibitori mitotici) o naturalmente indotto, del corredo cromosomico.

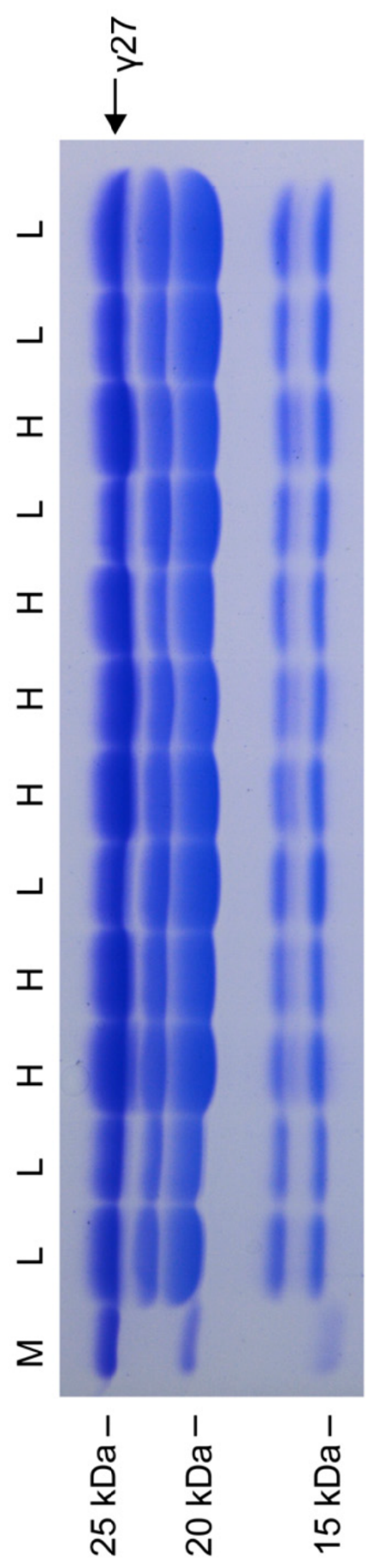
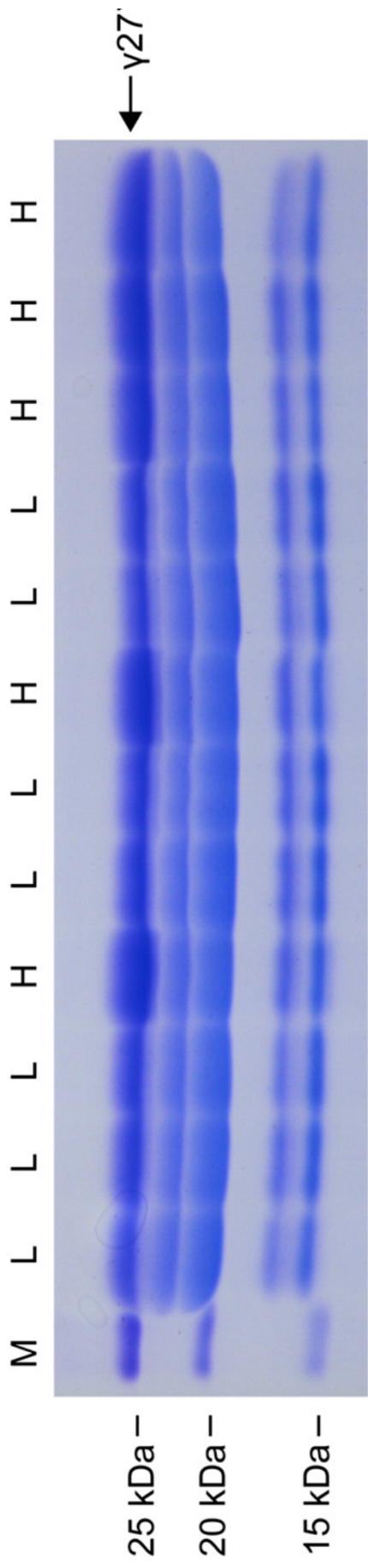
Permettono di ottenere linee completamente omozigoti in poche generazioni.

Si ottengono incrociando linee diploidi con linee “haploid inducers”, che danno luogo ad una frazione di progenie aploide per fertilizzazione anomala



**Figure 1.** Number of generations to reach genetic purity (homozygosity) through: (A) conventional inbreeding; (B) doubled haploid technology.





- **Mappatura di  $q\gamma 27$**

Generazione di una popolazione  $F_1BC_1$  tra Mo17 e B73 per mappare finemente il QTL:

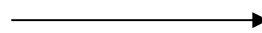
Mo17 x B73



$F_1$  x B73

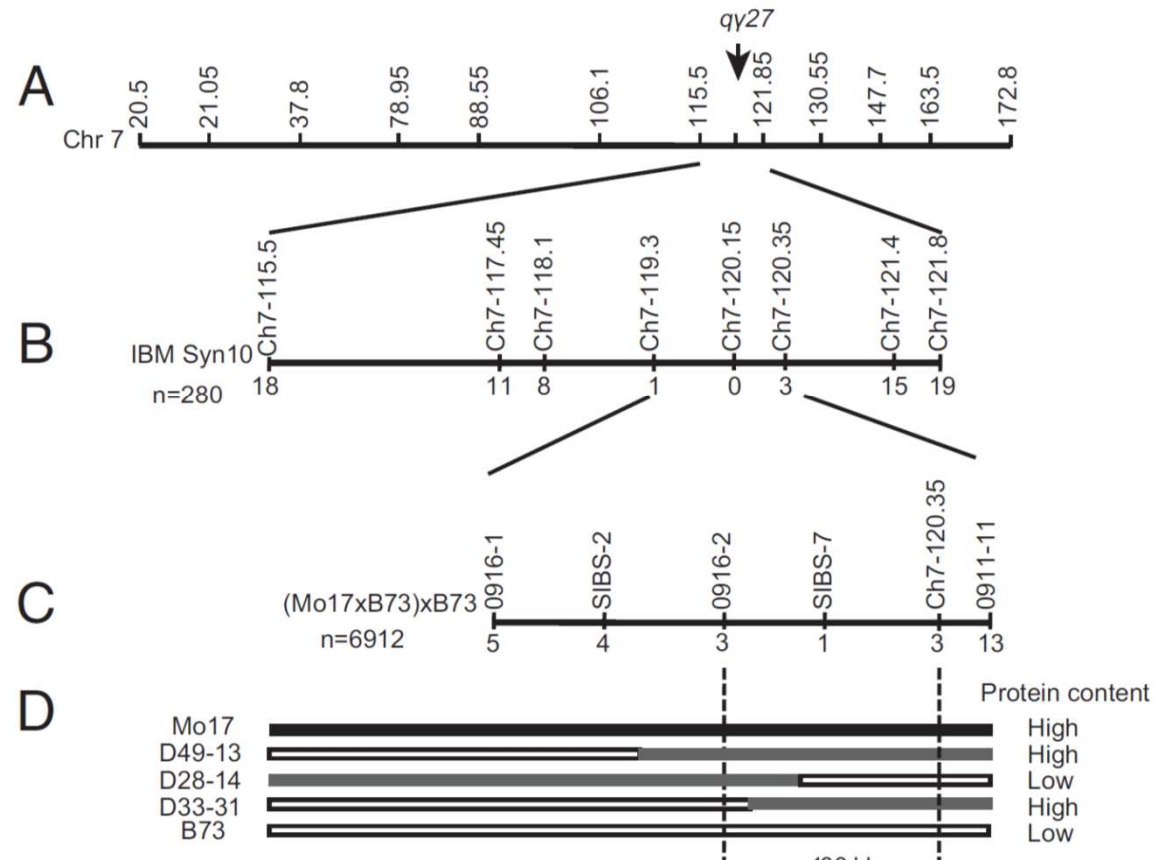


6912 individui  $F_1BC_1$



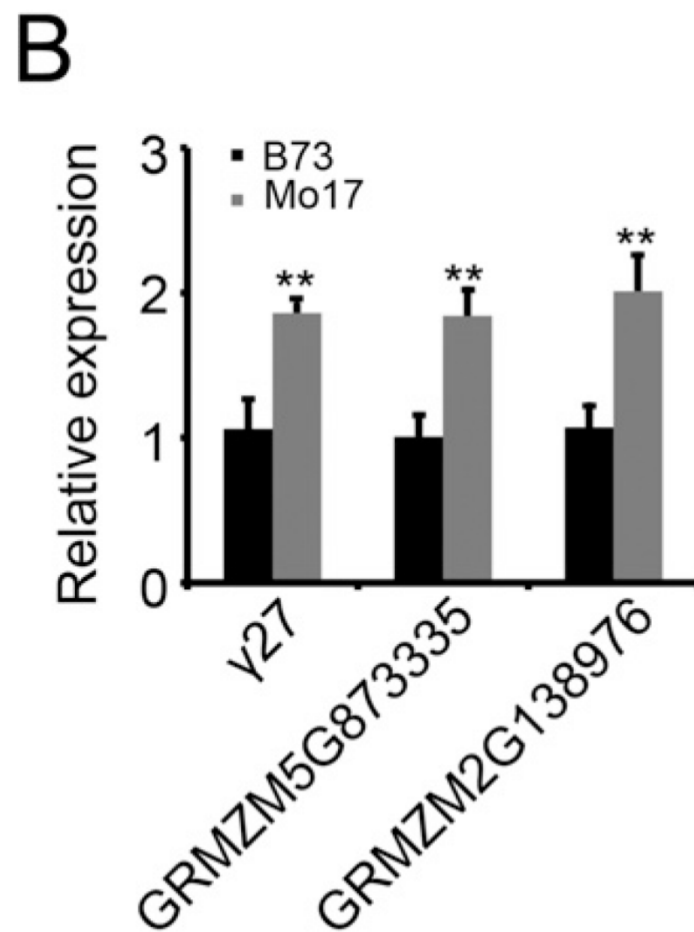
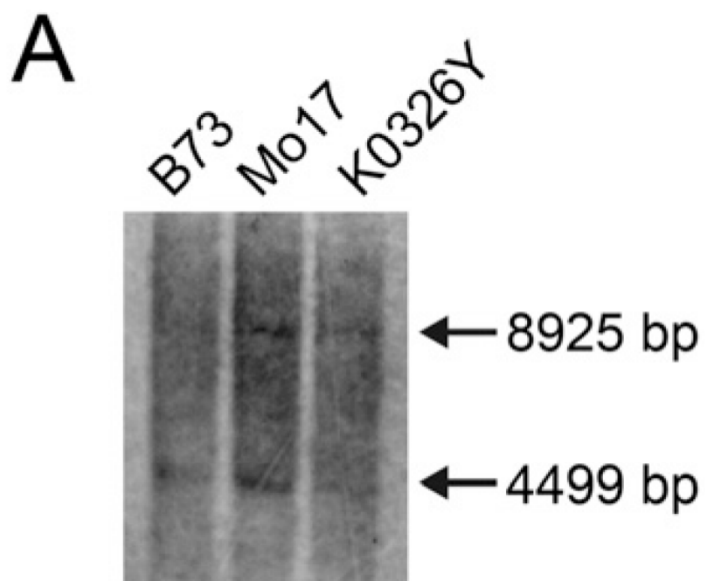
Estrazione DNA e  
proteine

Basandosi sulla sequenza del genoma di B73, il QTL mappa in una regione di circa 100

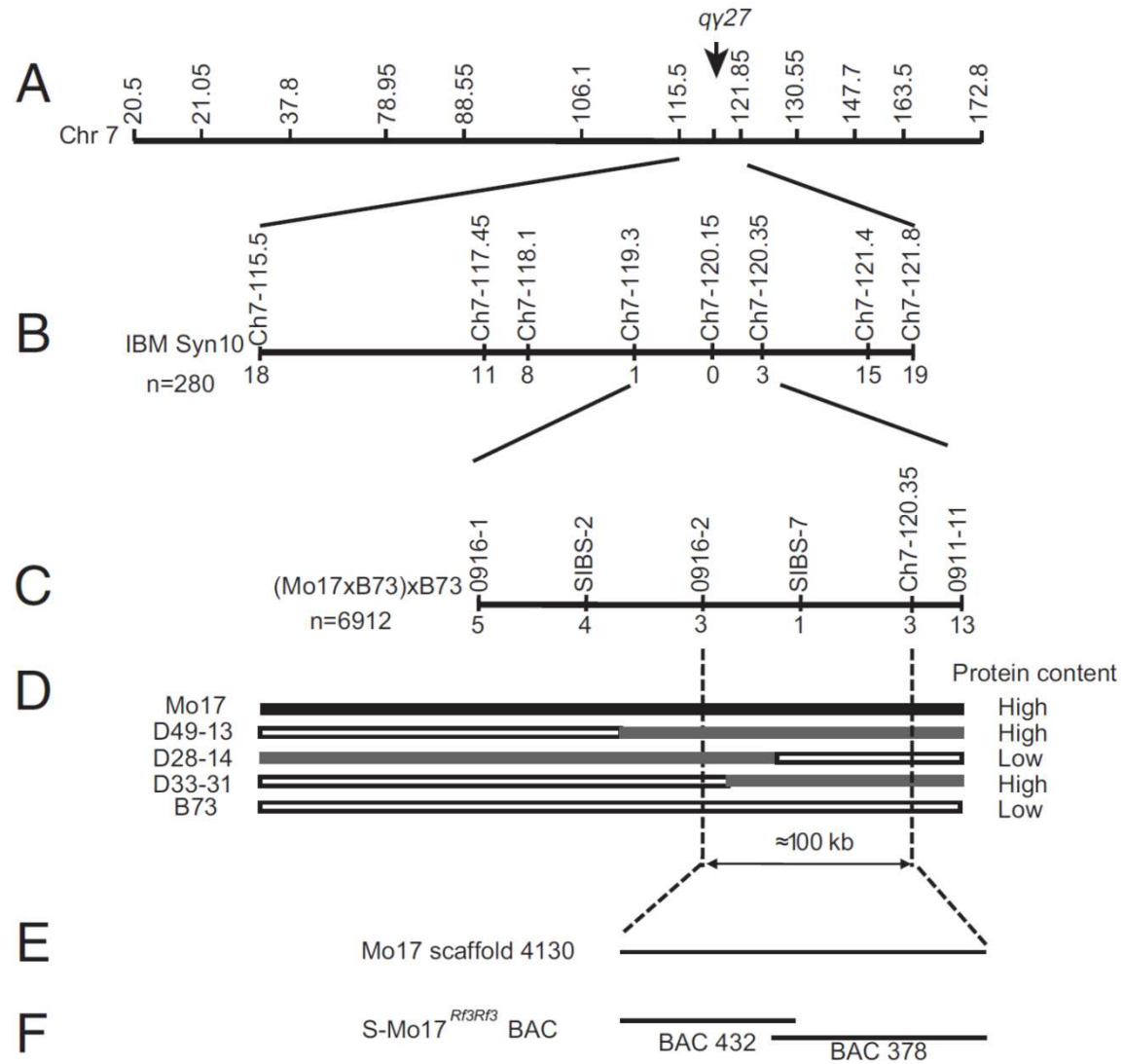


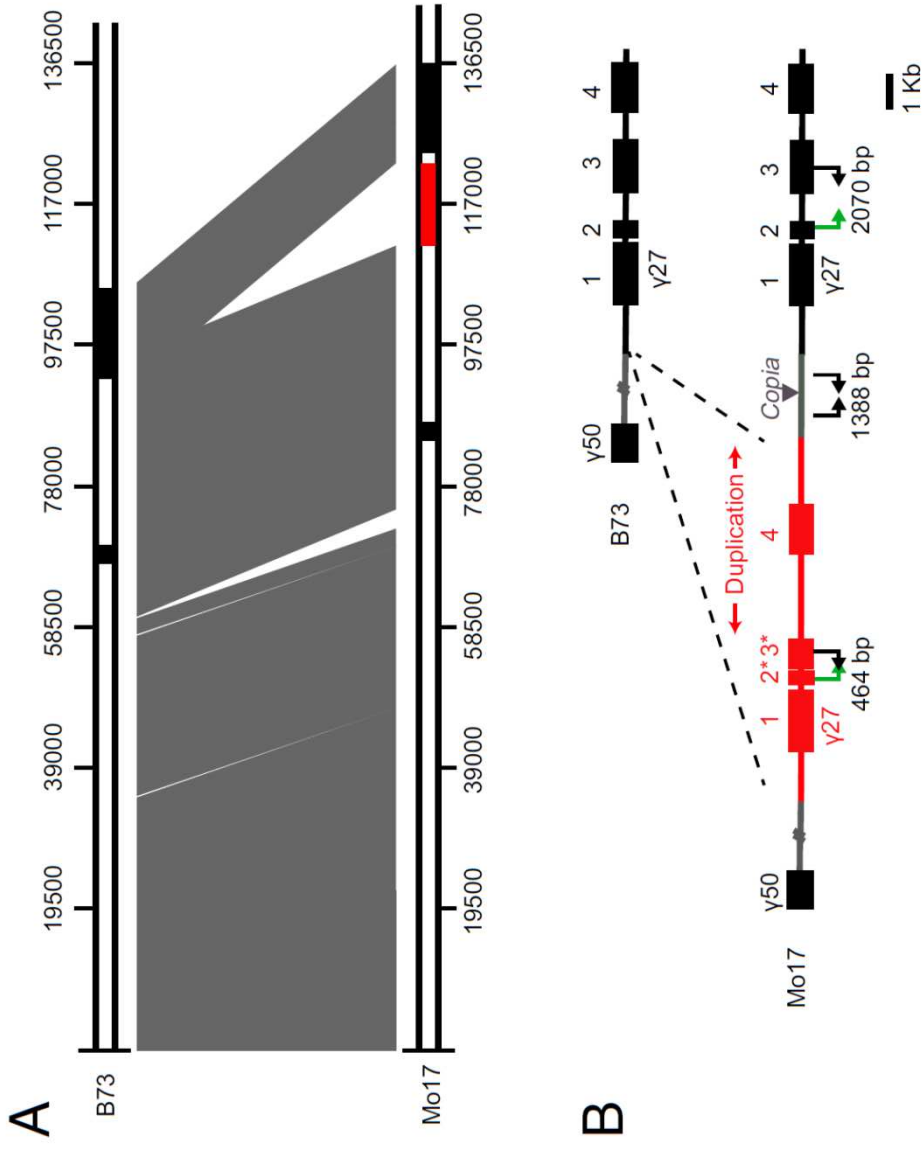
B73 non possiede il QTL. Però il genoma di Mo17 è in corso di sequenziamento -> utilizzati i dati sul genoma di Mo17 per identificare una duplicazione della regione contenente il gene per la 27kDa-gamma-zeina oltre ad altri due geni.

Duplicazione confermata per Southern blot e accompagnata dal raddoppio dell'espressione dei tre geni nella regione, anche in K0326Y



Utilizzando una libreria di BAC di Mo17, è stata identificata la stessa duplicazione genica





**Fig. 4.** Sequence alignment of the two haplotypes of B73 and Mo17. (A) The contiguous sequence of the Mo17- $\gamma$ 27 locus determined in this study was aligned with B73 orthologous region. The small and long black bars indicate the 50-kDa and 27-kDa  $\gamma$ -zein locus, respectively. The red bar in Mo17 represents the duplicated fragment of the 27-kDa  $\gamma$ -zein locus. Sequence homology between the two inbreds is connected by vertical gray areas. Scale markers for both contiguous sequences are indicated. (B) Gene duplication of the 27-kDa  $\gamma$ -zein locus in Mo17. The solid boxes represent genes. Compared with B73, the duplicated region is illustrated in red. Genes 1, 2, 3, and 4 represent the 27-kDa  $\gamma$ -zein gene, GRMZM2G565441, GRMZM2G138976, and GRMZM5G873335, respectively.

# Inoltre...

- CM105, CM105o2, CM105Mo2: linee quasi isogeniche, ma solo l'ultima è QPM - > solo questa mostra la stessa duplicazione
- Altre 36 linee QPM testate: tutte contengono la duplicazione
- Tra le 492 linee inbred usate per la GWAS, le 97 che hanno maggiori livelli di 27kDa-gamma zeina hanno tutte la duplicazione
- Analisi di accessioni naturali: la maggior parte contiene la duplicazione (precede quindi la domesticazione del mais) -> duplicazione instabile (spesso si hanno riarrangiamenti in linee inbred che portano a ridotta espressione della zeina)

