

# **‘Green revolution’ genes encode mutant gibberellin response modulators**

**Jinrong Peng<sup>\*</sup>, Donald E. Richards<sup>\*</sup>, Nigel M. Hartley,  
George P. Murphy, Katrien M. Devos, John E. Flintham,  
James Beales, Leslie J. Fish, Anthony J. Worland,  
Fatima Pelica, Duraialagaraja Sudhakar†, Paul Christou,  
John W. Snape, Michael D. Gale & Nicholas P. Harberd**

NATURE | VOL 400 | 15 JULY 1999 | 4



Food and Agriculture  
Organization of the  
United Nations

## **FAO's Strategic Objective 1: Help eliminate hunger, food insecurity and malnutrition**



# Biodiversità come fonte di nuove specie agrarie

*Inventario delle specie vegetali:*

***a) attualmente conosciute***

- 10.000 cereali
- 18.000 leguminose
- 1.500 funghi commestibili
- 60.000 specie medicinali
- 3.000 specie con poteri contraccettivi
- 2.000 specie con poteri insetticidi
- 3.000 specie di frutta tropicali

***b) coltivate su scala commerciale***

- \* 4 specie di frutta tropicale (banana, mango, ananas e papaya)
- \* 7 cereali (frumento, riso, mais, sorgo, segale, avena)
- \* 6 leguminose (fagiolo, pisello, soia, arachide, erba medica, trifogli)

# **Biodiversità come fonte di nuove specie agrarie**

*Con approccio trasversale:*

- **Specie dotate di parti eduli (radici, foglie, fusto, semi, frutti) e già in qualche modo utilizzate: 20.000**
- **Specie attualmente capaci di alimentare l'umanità: 22 (frumento, mais e riso = 2/3, in termini calorici, della produzione alimentare mondiale)**
- **Specie portate a buon livello di progresso agronomico: 100**

# Domesticazione, cerealicoltura nativa e “civiltà indigene” 1.

## **Cerealicoltura nativa**

- Per frumento, orzo e segale, nasce con l'agricoltura circa 10.000 anni fa nella “mezzaluna fertile”, nel bacino tra Tigri ed Eufrate.
- Analoghe evoluzioni per il riso, nel subcontinente indiano, e per il mais nelle Americhe, dal Messico al Perù, anche se in epoche successive.

## **Domesticazione preferenziale dei cereali**

- legata anche ad alcune loro caratteristiche.
- La facile conservazione delle cariossidi favorisce la costituzione di insediamenti umani e lo stabilirsi di una società. L'Australia, unico continente a non aver ospitato una “civiltà indigena”, è anche l'unico a non aver avuto una cerealicoltura nativa.

# Domesticazione, cerealicoltura nativa e “civiltà indigene” 2.

## **Tra le caratteristiche che hanno favorito la domesticazione:**

- una maggior plasticità genetica (più vasta generazione di variabilità genetica),
- un migliore adattamento alla variabilità ambientale,
- una più rapida risposta alla selezione umana, e quindi
- una più rapida utilizzabilità delle specie
- **nei cereali**, particolarmente significativa la perdita del carattere **“shattering”**
- In epoche seguenti alla domesticazione, tuttavia, e fino al moderno miglioramento genetico (anni 20-30-40), rese produttive delle specie domesticate per lo più costanti

# Come elevare la produzione di cibo

---

- In teoria, due vie percorribili:
  - estensione della superficie coltivabile
  - incremento della produttività (*produzione per ettaro*)
- Prima opzione da tempo non più praticabile. La superficie mondiale di terre arabili si sta in realtà riducendo, a causa di diversi fattori, quali:
  - urbanizzazione sempre più estesa (case, strade, canali, ecc.)
  - desertificazione;
  - erosione
  - degrado dei suoli (salinizzazione, mineralizzazione, ecc.)
- L'acquisizione di altre terre agricole mediante deforestazione è improponibile (non sostenibile)
- Ineluttabilmente, la sola via per incrementare, come necessario, la produzione di alimenti è quella di accrescere la produttività delle specie agrarie.

## I FONDAMENTI DEL PROGRESSO PRODUTTIVO 1.

- Dopo secoli di stasi, a partire dagli anni '30-'40 la produttività delle più importanti specie domestiche ha fatto registrare incrementi considerevoli, che continuano ancora.
- Essi sono ascrivibili a progressi paralleli nella genetica e nelle agro-tecnologie.
- Concentrazione su una delle tre principali specie di cereali (2/3 del fabbisogno calorico dell'umanità): il frumento



## I FONDAMENTI DEL PROGRESSO PRODUTTIVO 2.

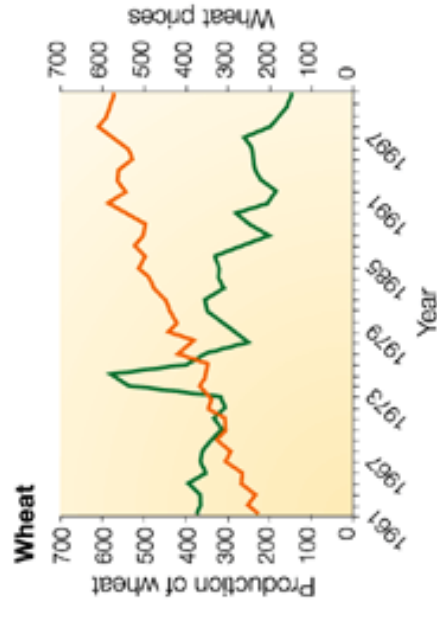
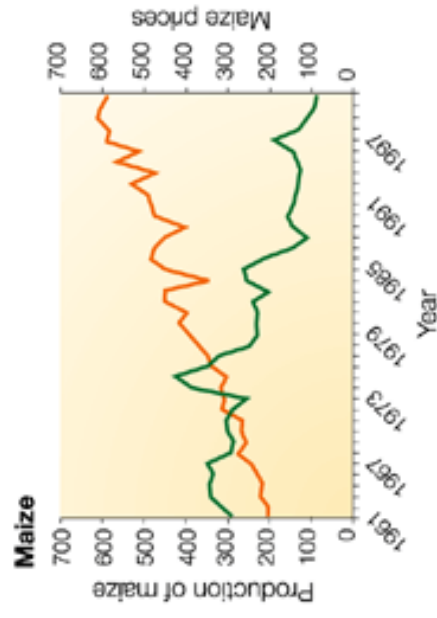
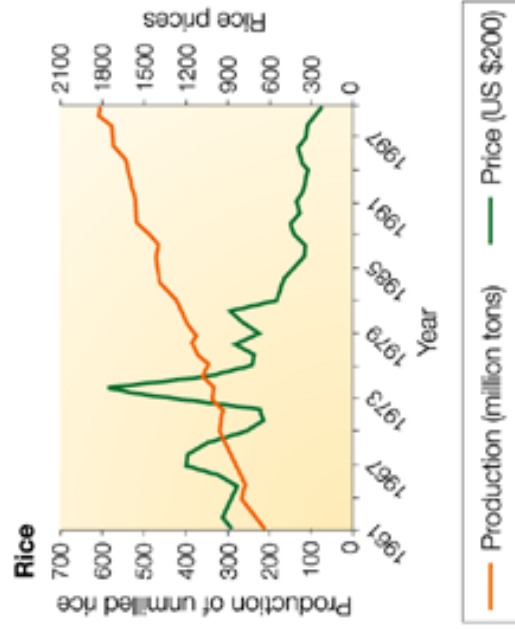
- La selezione genetica presuppone l'esistenza e disponibilità di variabilità genetica, o "biodiversità", di opportuna qualità.
- I fenotipi (genotipi) più idonei vengono scelti ("selezionati") per la riproduzione.
  - Nel passato, tale selezione era esercitata da parte degli agricoltori.
  - Successivamente, è stata praticata da parte di figure più specializzate, i genetisti agrari, che dopo tentativi ripetuti e più o meno laboriosi, giungono a costituire nuove forme ("varietà") migliorate, coltivate con più successo dagli agricoltori.

## PROGRESSO PRODUTTIVO NEI FRUMENTI 1.

- N. Strampelli, genetista italiano, introduce negli anni '20 la varietà di frumento giapponese Akagomuki, e la ibrida con diverse varietà italiane ed europee.
- Akagomuki “porta in dote” geni per bassa taglia e per fotoinsensibilità. Effetti positivi su resistenza all'allettamento e sulla precocità di maturazione.
- Il grano “Ardito”, capostipite di una serie di nuove varietà.
- Aumenti di produttività di quasi il 100% e affrancamento da onerosissime importazioni (“Battaglia del Grano”)

## PROGRESSO PRODUTTIVO NEI FRUMENTI 2.

- Nel secondo dopoguerra, l'americano Borlaug in Messico introduce nei programmi di ibridazione e miglioramento dei frumenti un'altra serie di geni per bassa taglia, ancora di origine giapponese ("Norin 10" ed altri).
- Le varietà a taglia bassa che ne derivano sono **ad un tempo resistenti all'allettamento e alle ruggini.**
- Risultati: 1 kg di azoto somministrato, che determinava un incremento produttivo di **3 kg**. nelle vecchie varietà, ne determina uno di **10 kg** nelle nuove varietà.



# LA “RIVOLUZIONE VERDE” 1.

---

- Le nuove varietà che scaturiscono dal lavoro di Borlaug ed altri danno l'avvio alla cosiddetta “**rivoluzione verde**”, che si espande negli anni '60 in Asia, America Latina, Vicino Oriente, su una superficie di più di 25 milioni di ettari (1886).
- Tale espansione, tuttavia, è condizionata dalla disponibilità di una serie di fattori, quali:
  - acqua per irrigazione
  - capacità professionale
  - capitali per l'acquisto di mezzi di produzione
  - terre fertili
- La frequente indisponibilità di uno o più di tali fattori limita l'ulteriore espansione della rivoluzione verde.

# Norman Borlaug



# Dwarf Wheat



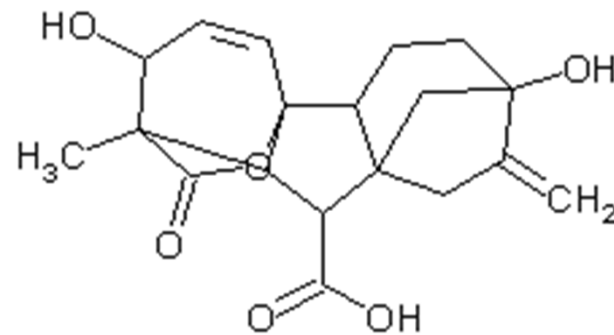
99% of wheat grown worldwide

**Gibberelline**



# *Gibberella fujikuroi*

- Fungo agente causale del “BAKANAE” = crescita incontrollata del germoglio di riso
- gibberelline** prodotte dal fungo sono la causa dei sintomi



Gibberellic Acid

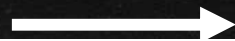
# Effetti delle gibberelline

- Promuovono la germinazione dei semi
- Stimolano l'accrescimento del fusto in piante nane e a rosetta
- Stimolano la divisione e distensione cellulare (aumentano l'estensibilità della parete)
- Regolano la transizione della fase giovanile ad adulta
- Influiscono sulla formazione dei fiori
- Promuovono la fruttificazione

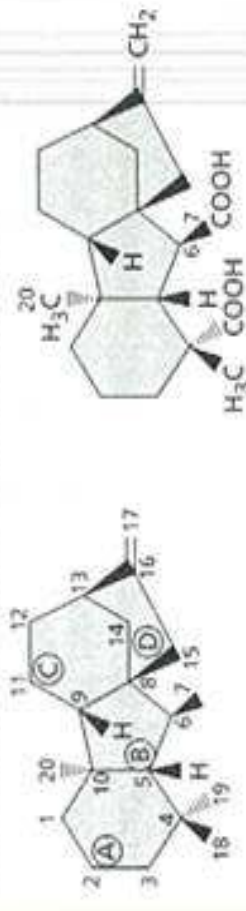
## Rice leaf sheath bioassay for gibberellin



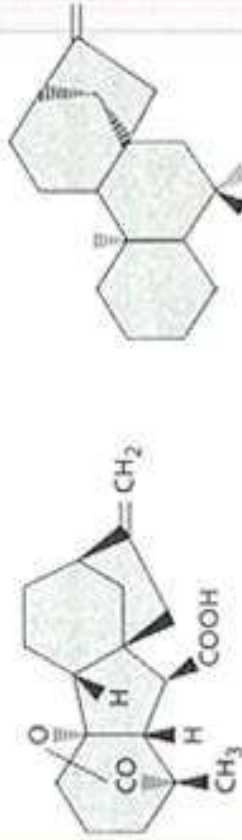
Increasing GA<sub>3</sub> concentration



STRUTTURE DI GIBBERELLINE RAPPRESENTATIVE



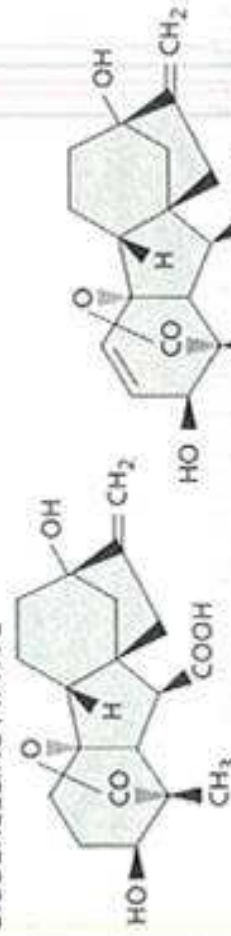
(A) Struttura *ent*-gibberellanica (B) GA<sub>12</sub> (una C<sub>20</sub>-gibberellina)



(C) GA<sub>9</sub> (una C<sub>19</sub>-gibberellina)

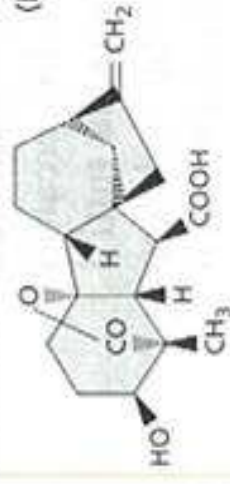
(D) *ent*-Kaurene

GIBBERELLINE ATTIVE



(E) Gibberellina A<sub>1</sub> (GA<sub>1</sub>)

(F) Acido gibberellico (GA<sub>3</sub>)



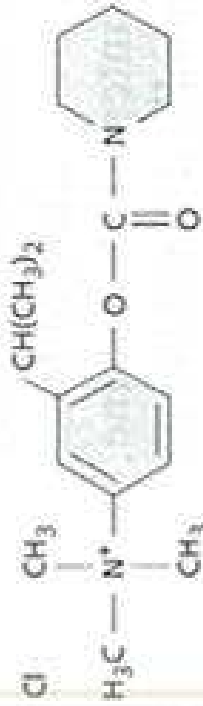
(G) Gibberellina A<sub>4</sub> (GA<sub>4</sub>)

**GIBBERELLINE INATTIVE**

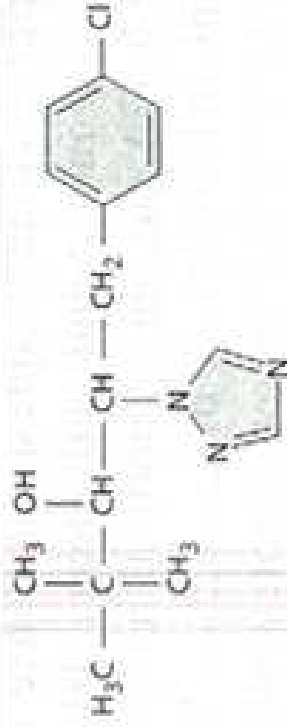


**(H) GA<sub>29</sub> (inattive tramite ossidrilazione del C2)**

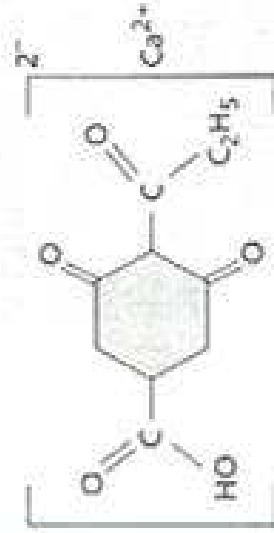
**INIBITORI DELLA SINTESI DELLE GIBBERELLINE**



**(I) AMO-1618**

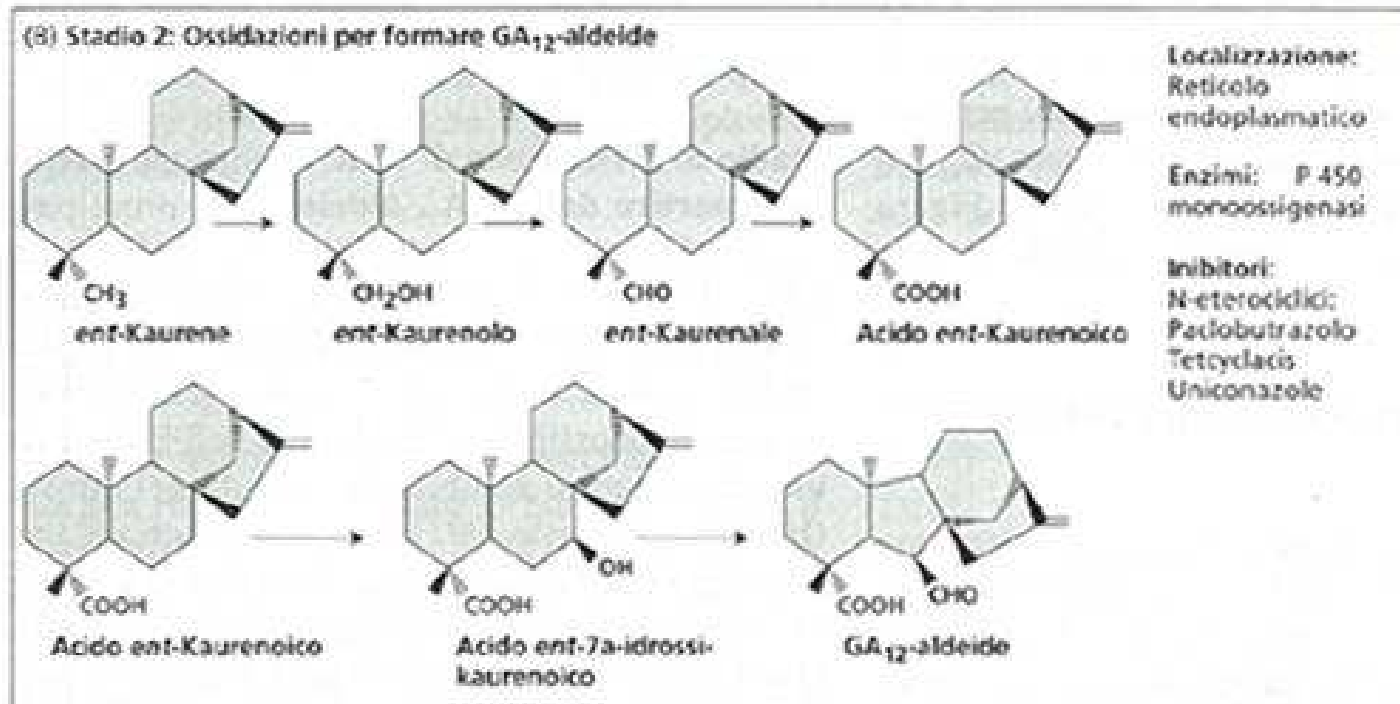
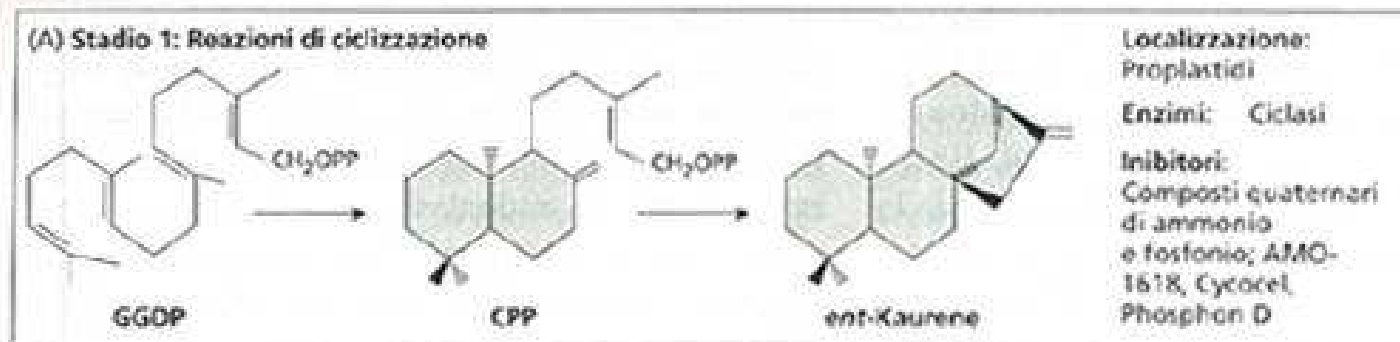


**(J) Paclobutrazolo (Bonzi)**

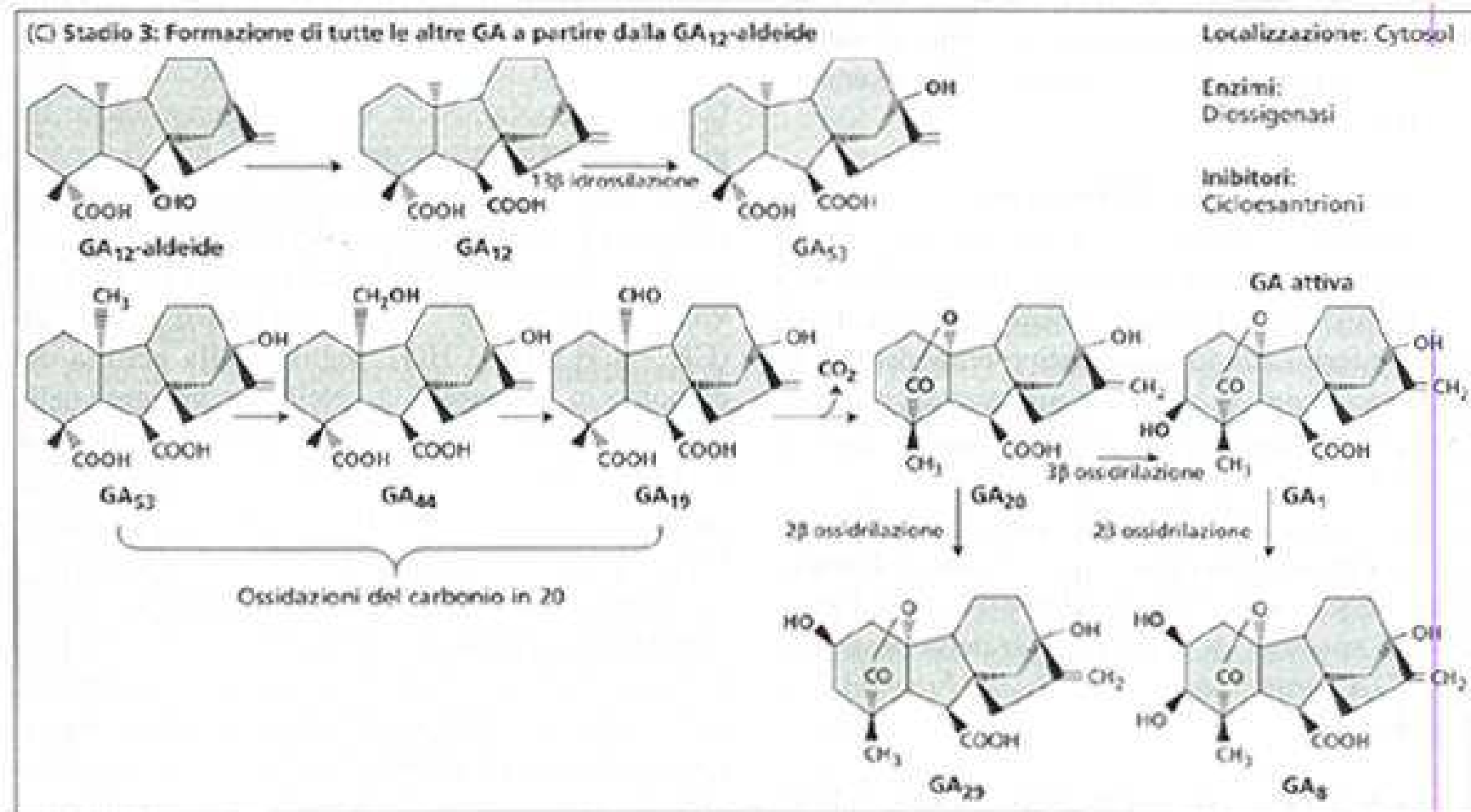


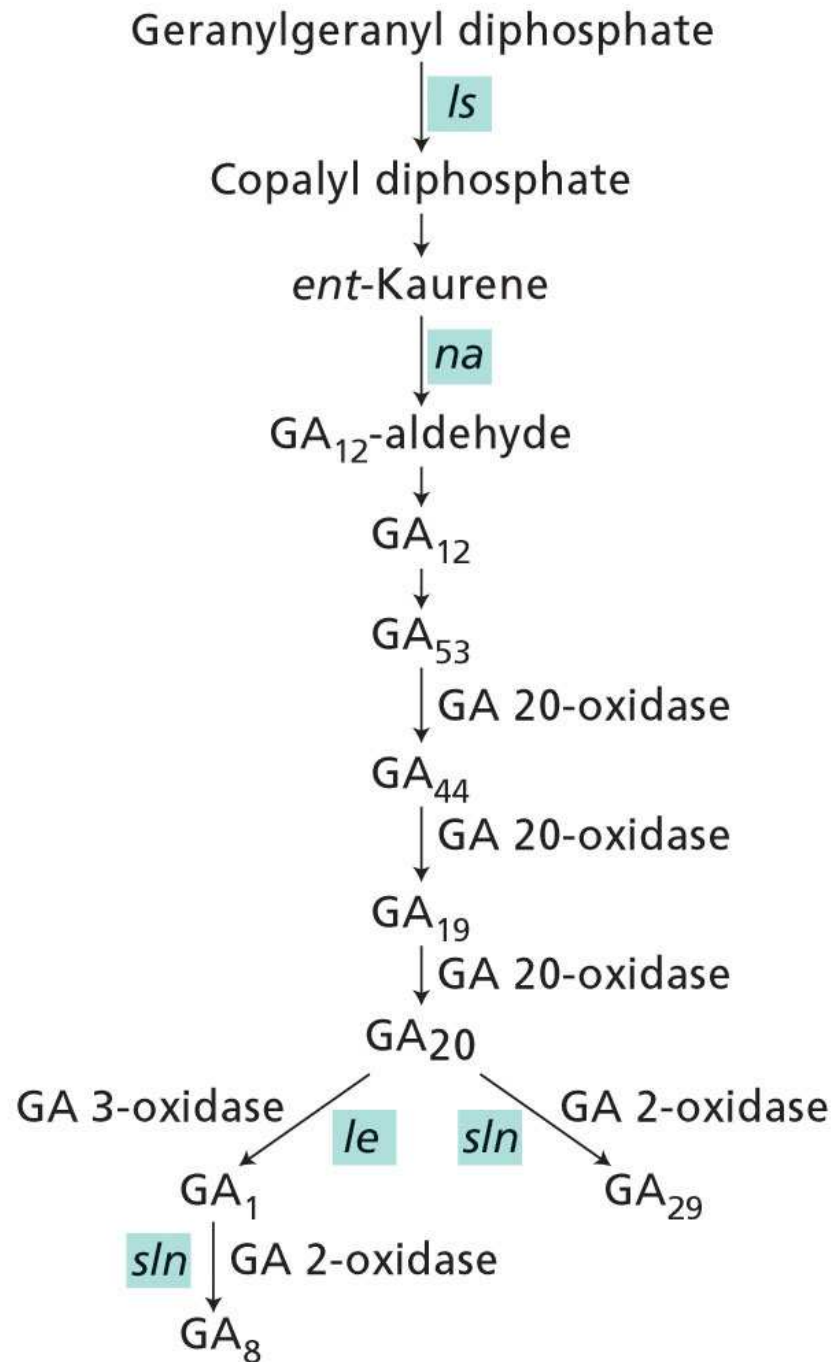
**(K) BX-112 (proexadione-calcio)**

# Biosintesi delle gibberelline (in tessuti in crescita)



# Biosintesi delle gibberelline (in tessuti in crescita)

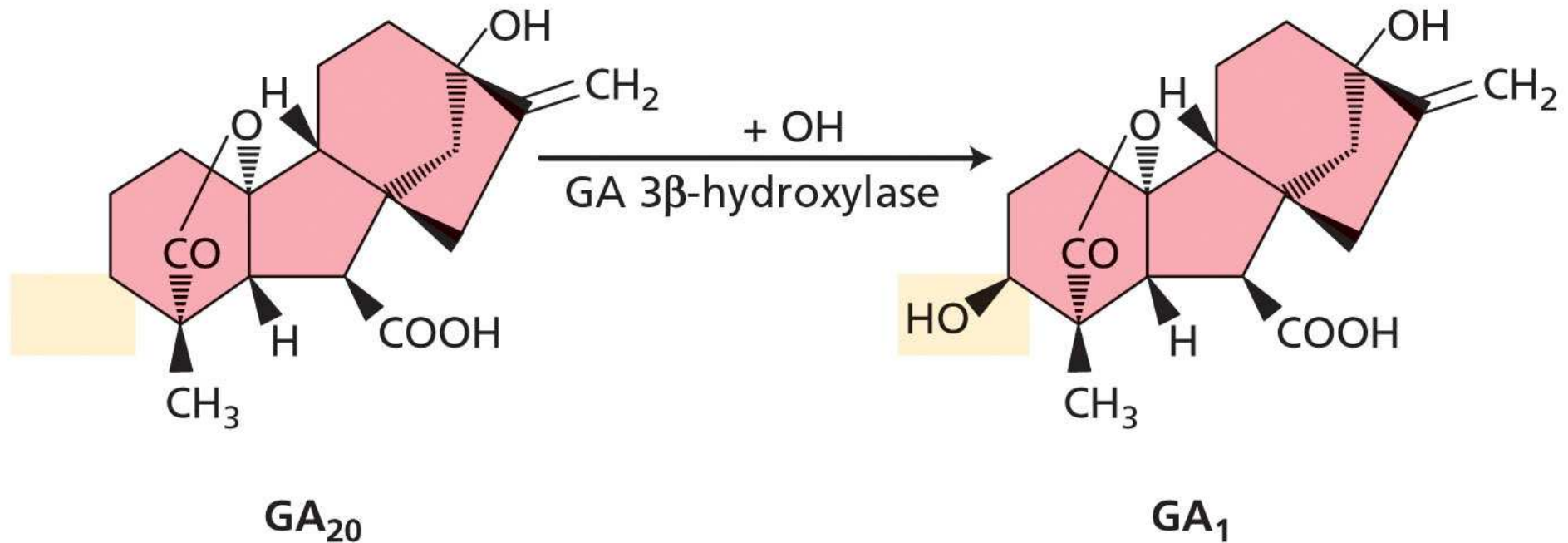




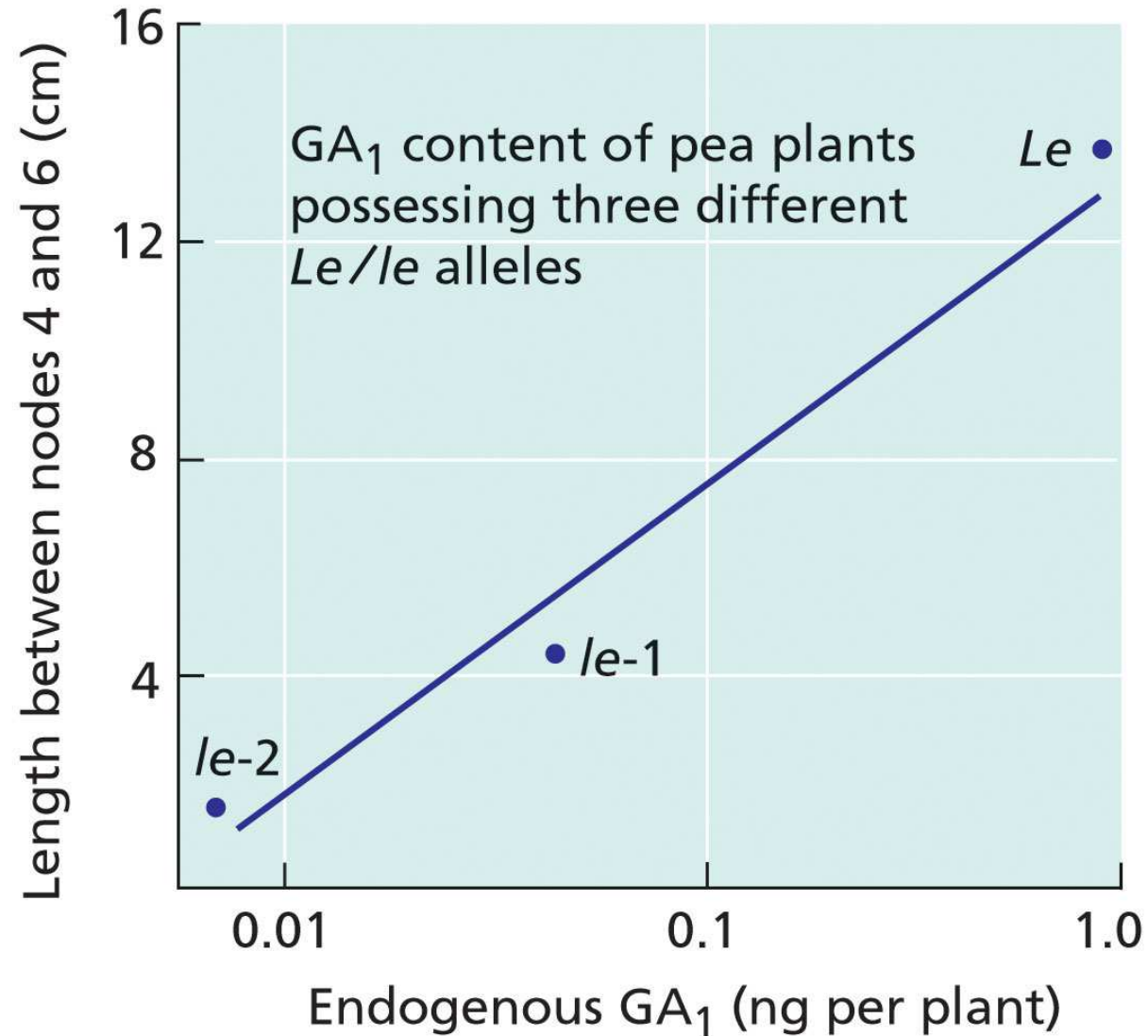
PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 20.7 © 2002 Sinauer Associates, Inc.



# GA<sub>1</sub>, THE BIOLOGICALLY ACTIVE GIBBERELLIN, IS SYNTHESIZED FROM GA<sub>20</sub>



# GA<sub>1</sub> LEVELS CORRELATE WITH INTERNODE LENGTH



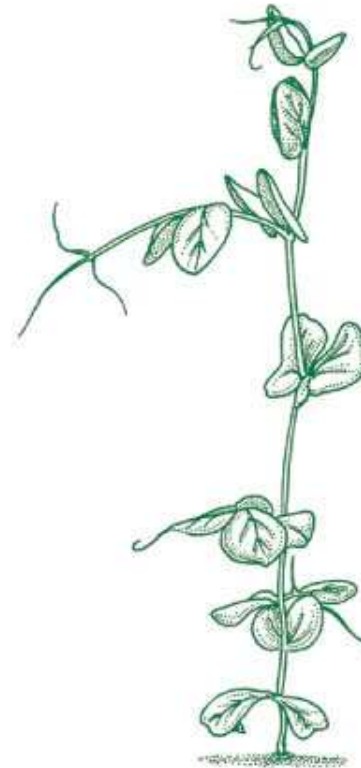
# Phenotypes and genotypes of peas with different gibberellin levels



Ultradwarf:  
no GAs  
*nana*

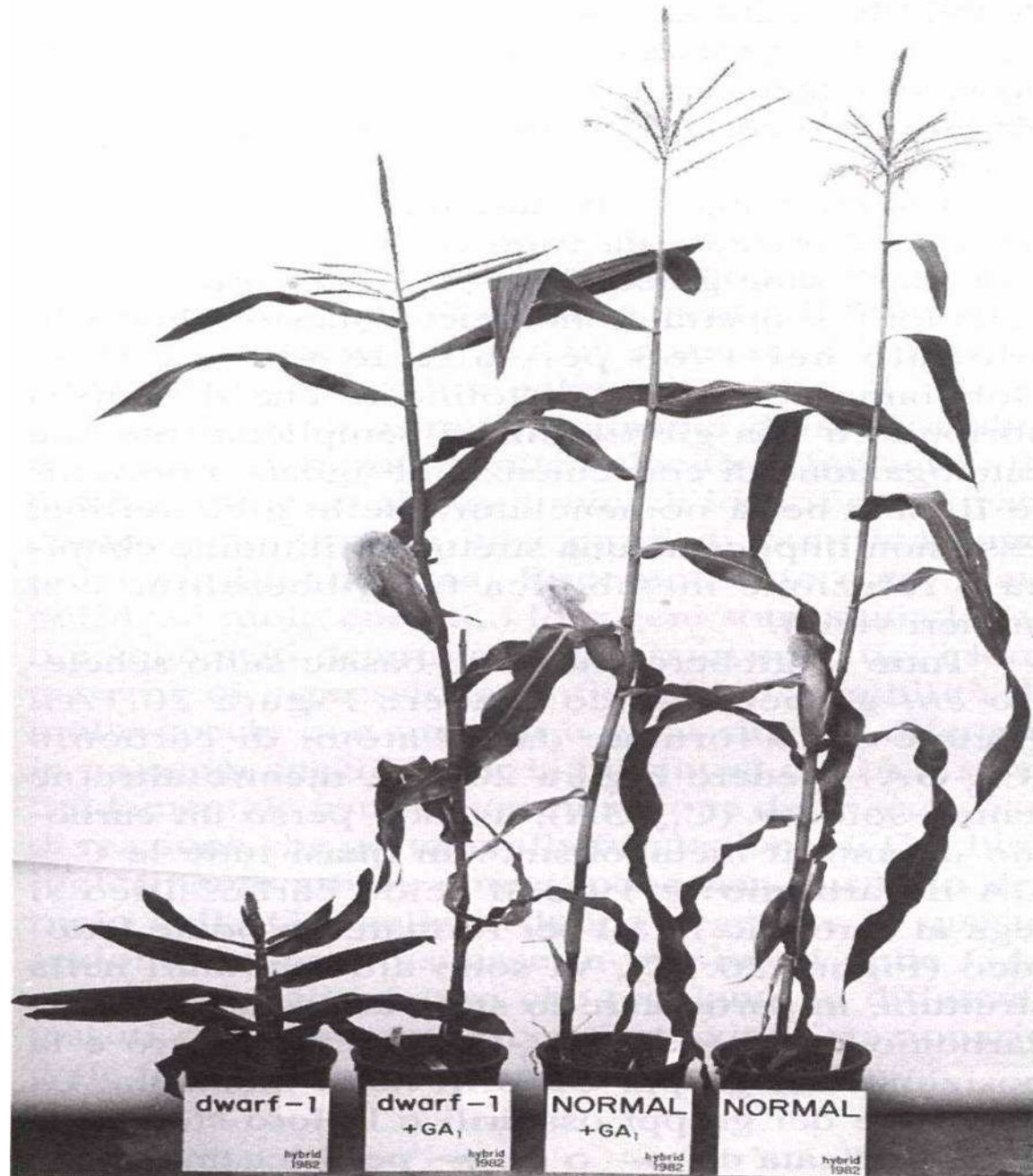


Dwarf:  
contains  
 $GA_{20}$   
*Na le*



Tall:  
contains  
 $GA_1$   
*Na Le*

L'aggiunta di gibberellina ripristina il fenotipo normale in mutanti nani di riso



# Regolazione della biosintesi

**1. Fotoperiodo** (la concentrazione di GA<sub>20</sub> aumenta con il fotoperiodo)

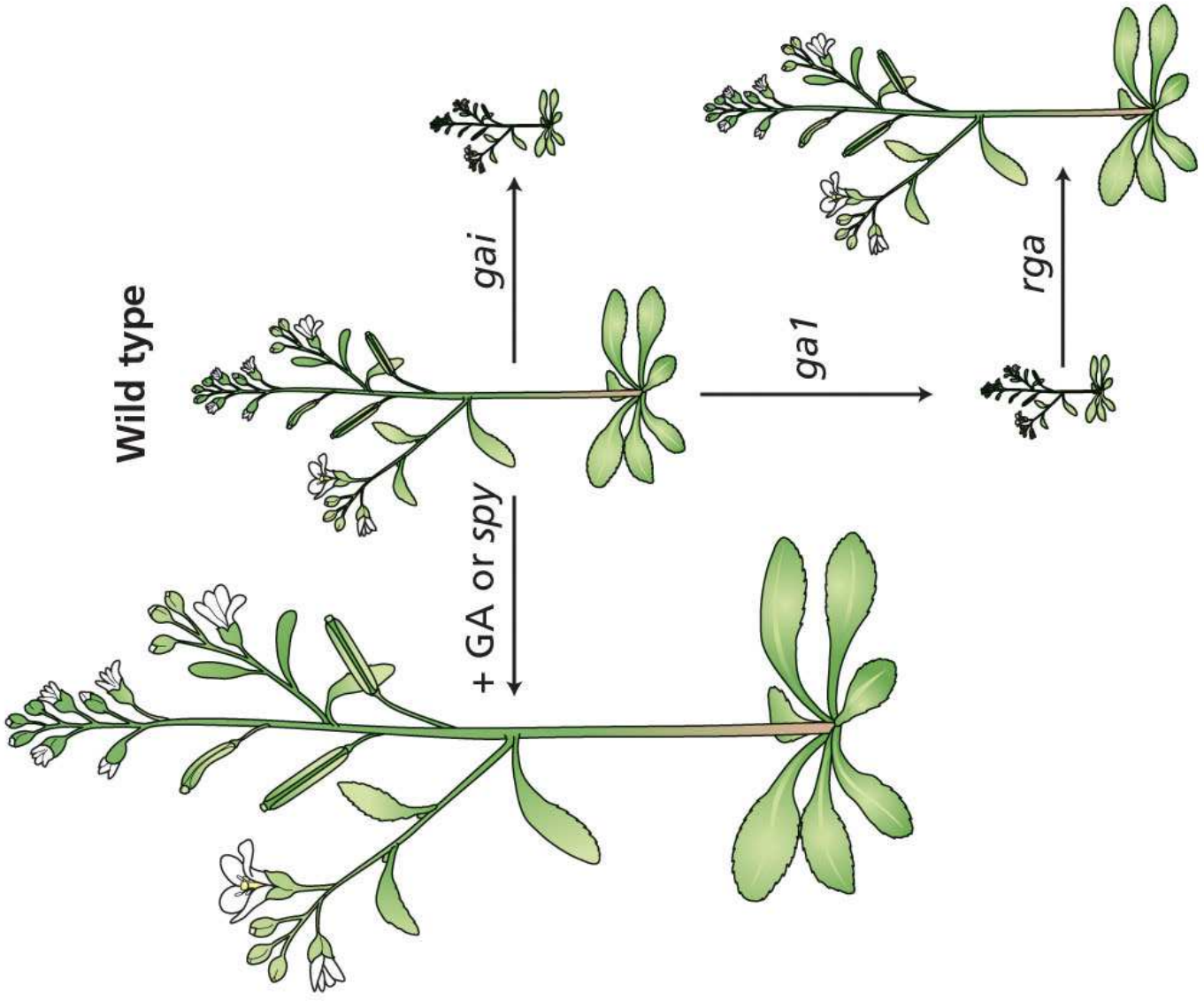
**2. Temperatura** (le GA possono sostituirsi al freddo nell'induzione della fioritura)

(apice) ac. *ent*-kaurenoico + freddo → GA<sub>9</sub> (+attiva)

**3. Controllo da GA:** le GA sembrano in grado di reprimere la propria sintesi (repressore della trascrizione?) -> feedback negativo

# Mutanti di *Arabidopsis* con difetti nella percezione/trasduzione delle gibberelline

1. *Gibberellin-insensitive* (nani)
2. Soppressori di mutazioni nella sintesi delle gibberelline (doppi mutanti hanno aspetto WT)
3. Mutanti con risposte costitutive alle gibberellin (“*slender*” = allungati)



Wild type

*gai*

+ GA or spy

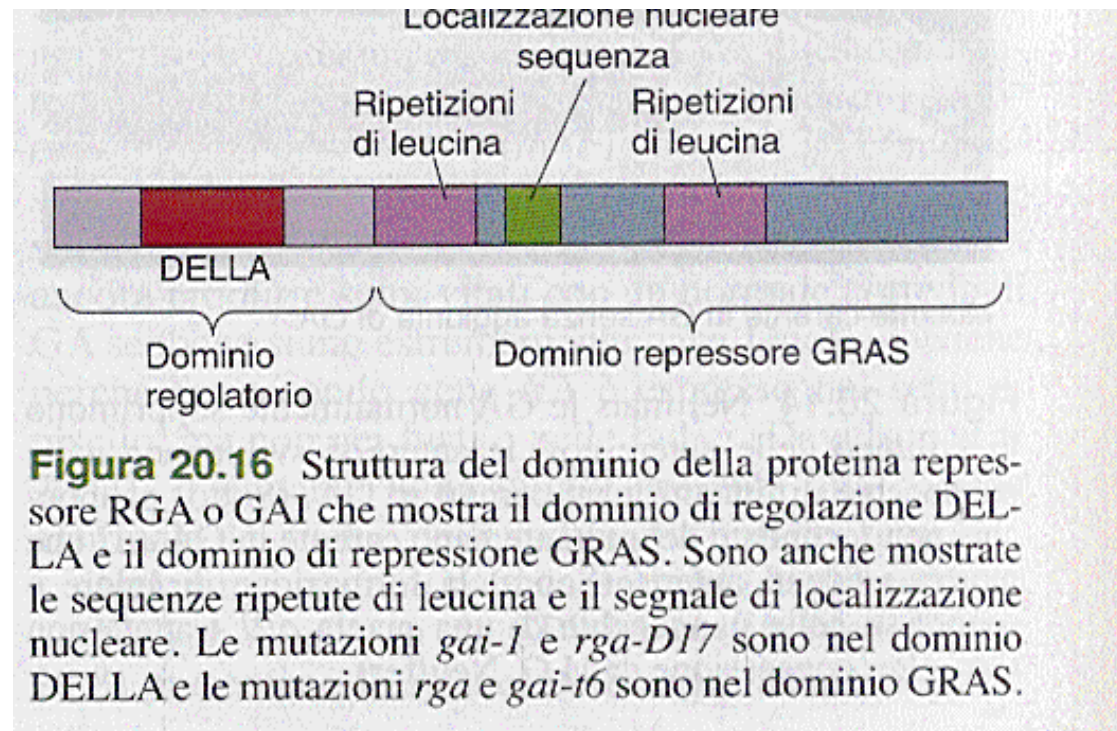
*ga1*

*rga*



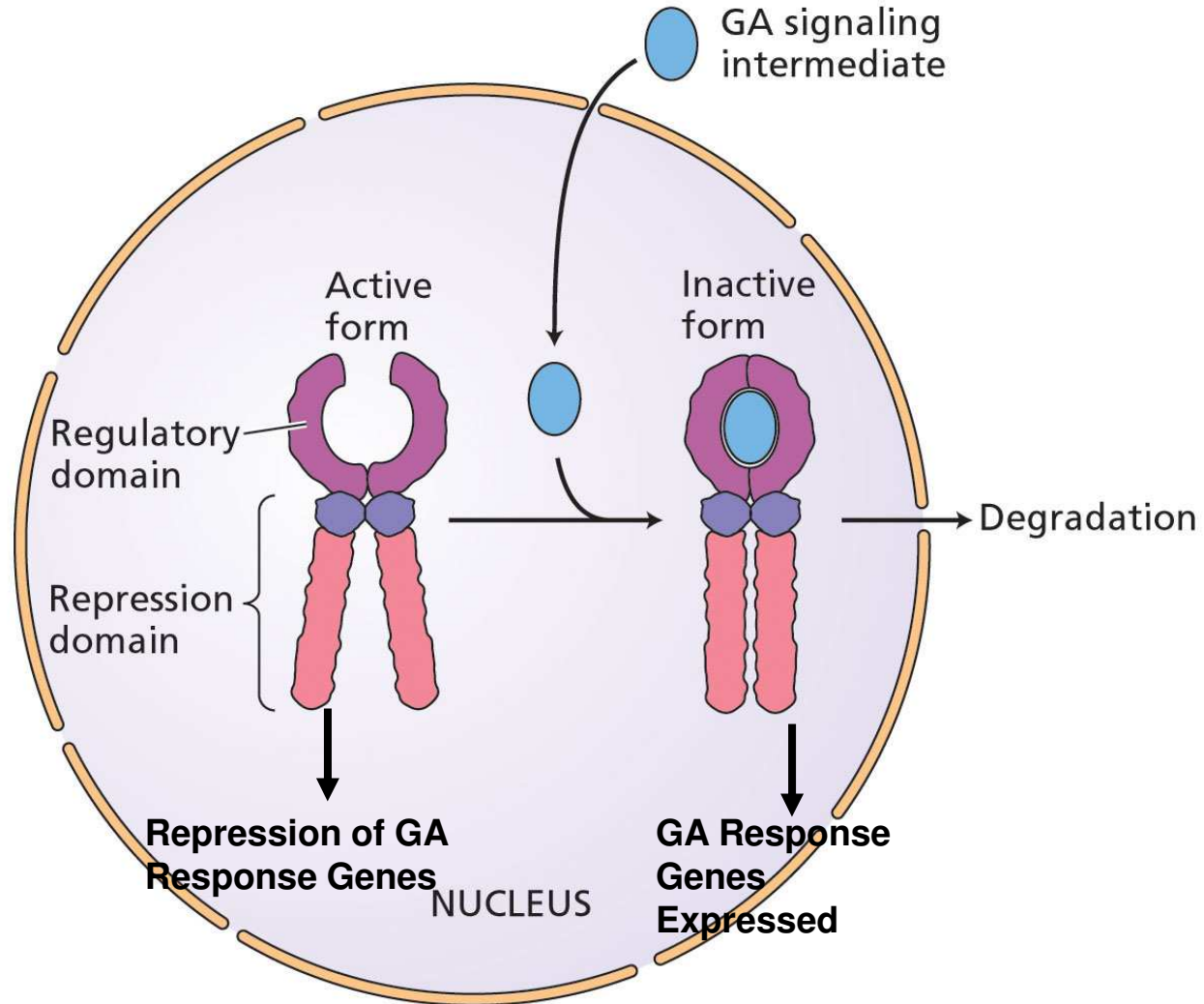
# TRASDUZIONE DELLE GIBBERELLINE

Proteine con dominio DELLA sono regolatori negativi di risposte alle GA

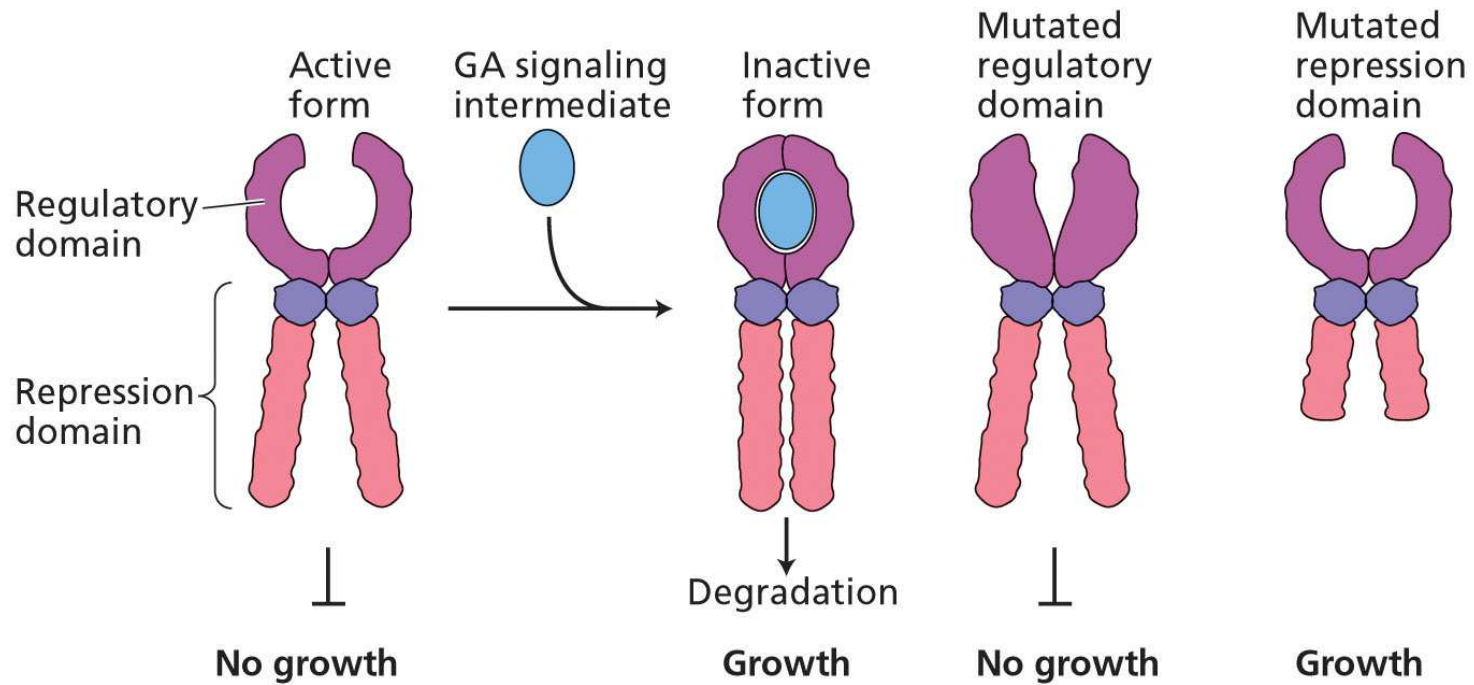


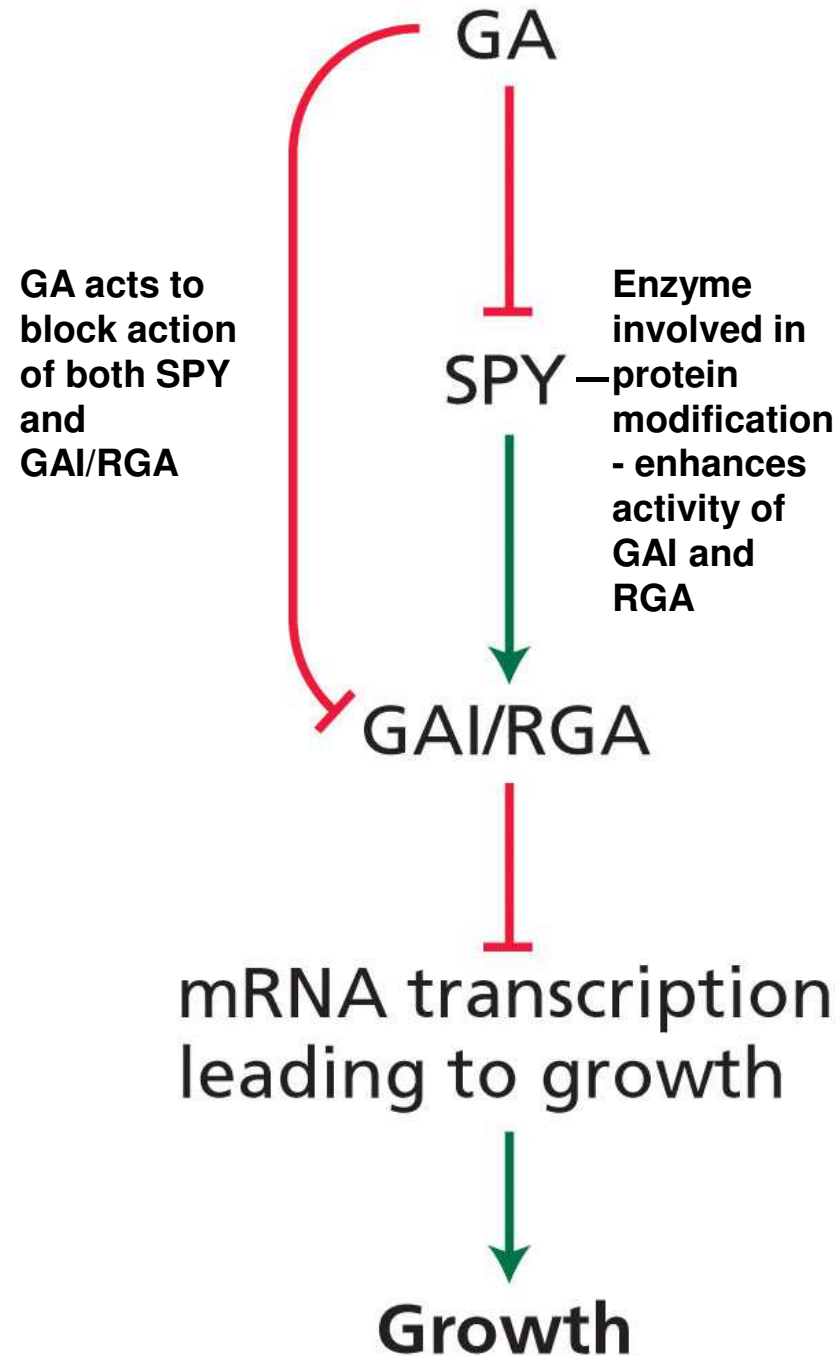


# GAI and RGA are related repressor proteins

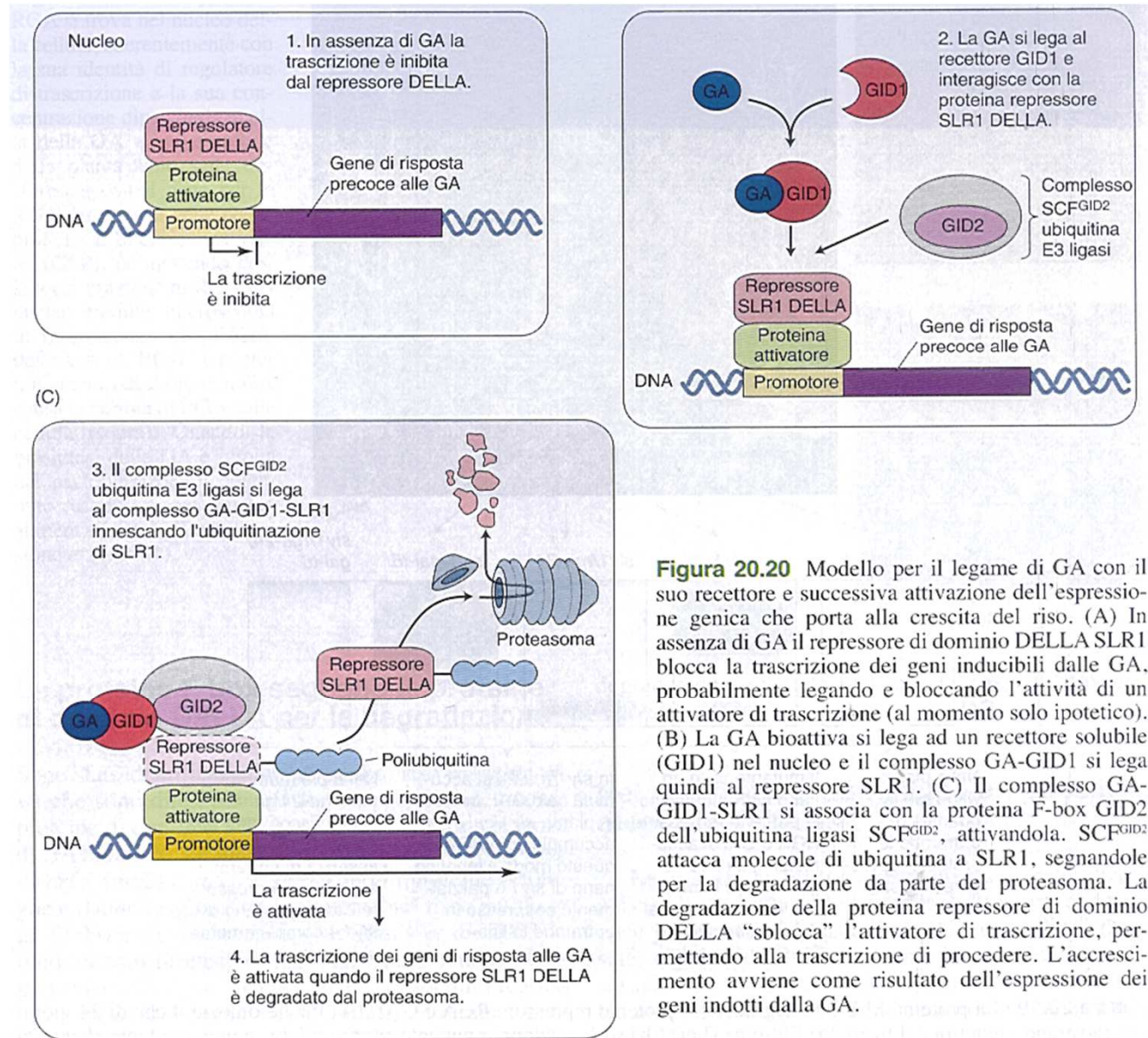


# DIFFERENT TYPES OF MUTATIONS OF GAI AND RGA REPRESSORS AFFECT GROWTH DIFFERENTLY





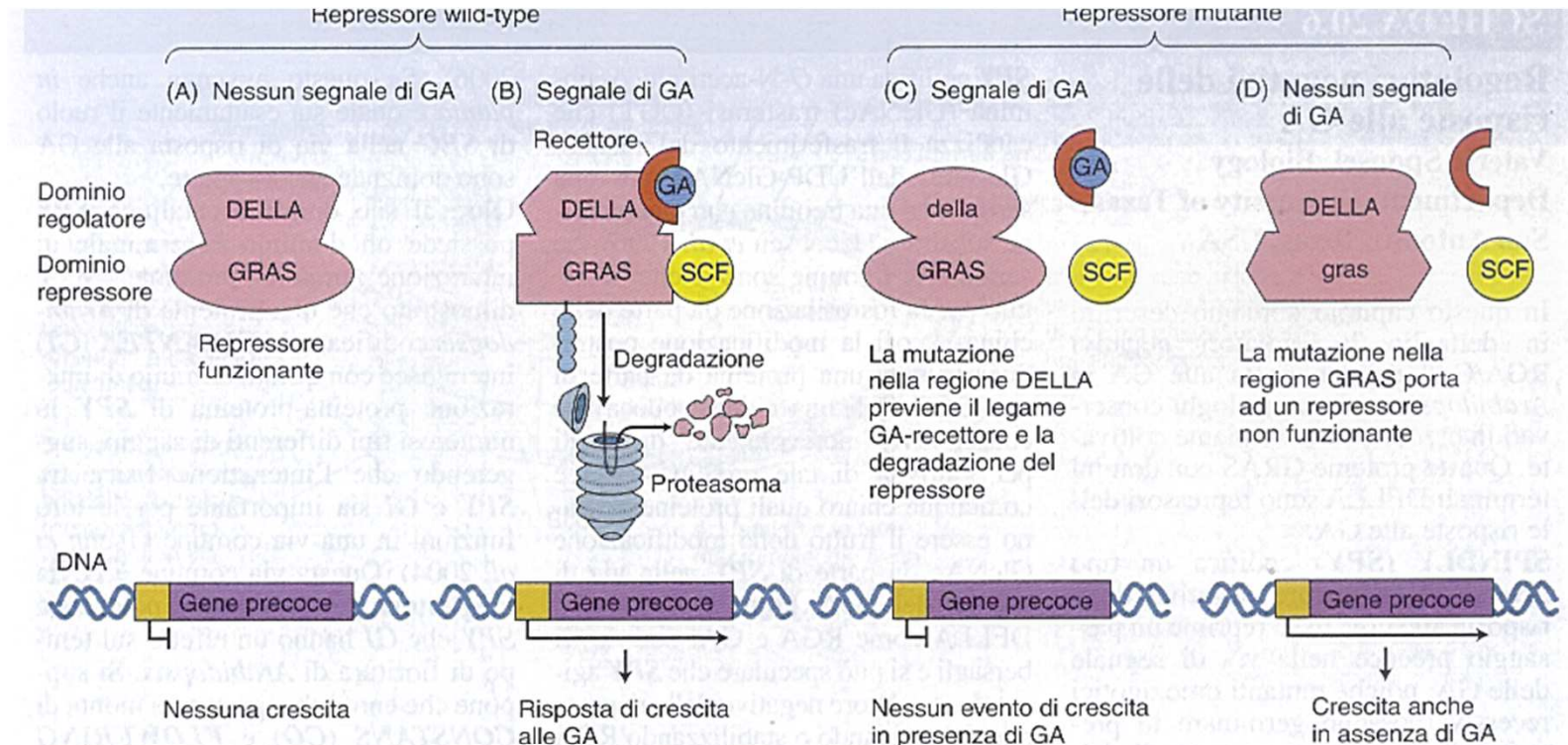
GID1 (possibile recettore) di riso interagisce con GA attive. Il complesso lega il repressore SLR1 GA-GID1-SLR1 interagisce con GID2 componente F-box del complesso SCF ubiquitin ligasi per la degradazione proteosomica di SLR1



**Figura 20.20** Modello per il legame di GA con il suo recettore e successiva attivazione dell'espressione genica che porta alla crescita del riso. (A) In assenza di GA il repressore di dominio DELLA SLR1 blocca la trascrizione dei geni inducibili dalle GA, probabilmente legando e bloccando l'attività di un attivatore di trascrizione (al momento solo ipotetico). (B) La GA bioattiva si lega ad un recettore solubile (GID1) nel nucleo e il complesso GA-GID1 si lega quindi al repressore SLR1. (C) Il complesso GA-GID1-SLR1 si associa con la proteina F-box GID2 dell'ubiquitina ligasi SCF<sup>GID2</sup>, attivandola. SCF<sup>GID2</sup> attacca molecole di ubiquitina a SLR1, segnandole per la degradazione da parte del proteasoma. La degradazione della proteina repressore di dominio DELLA "sblocca" l'attivatore di trascrizione, permettendo alla trascrizione di procedere. L'accrescimento avviene come risultato dell'espressione dei geni indotti dalla GA.



# Regolazione dell'accrescimento in varie condizioni

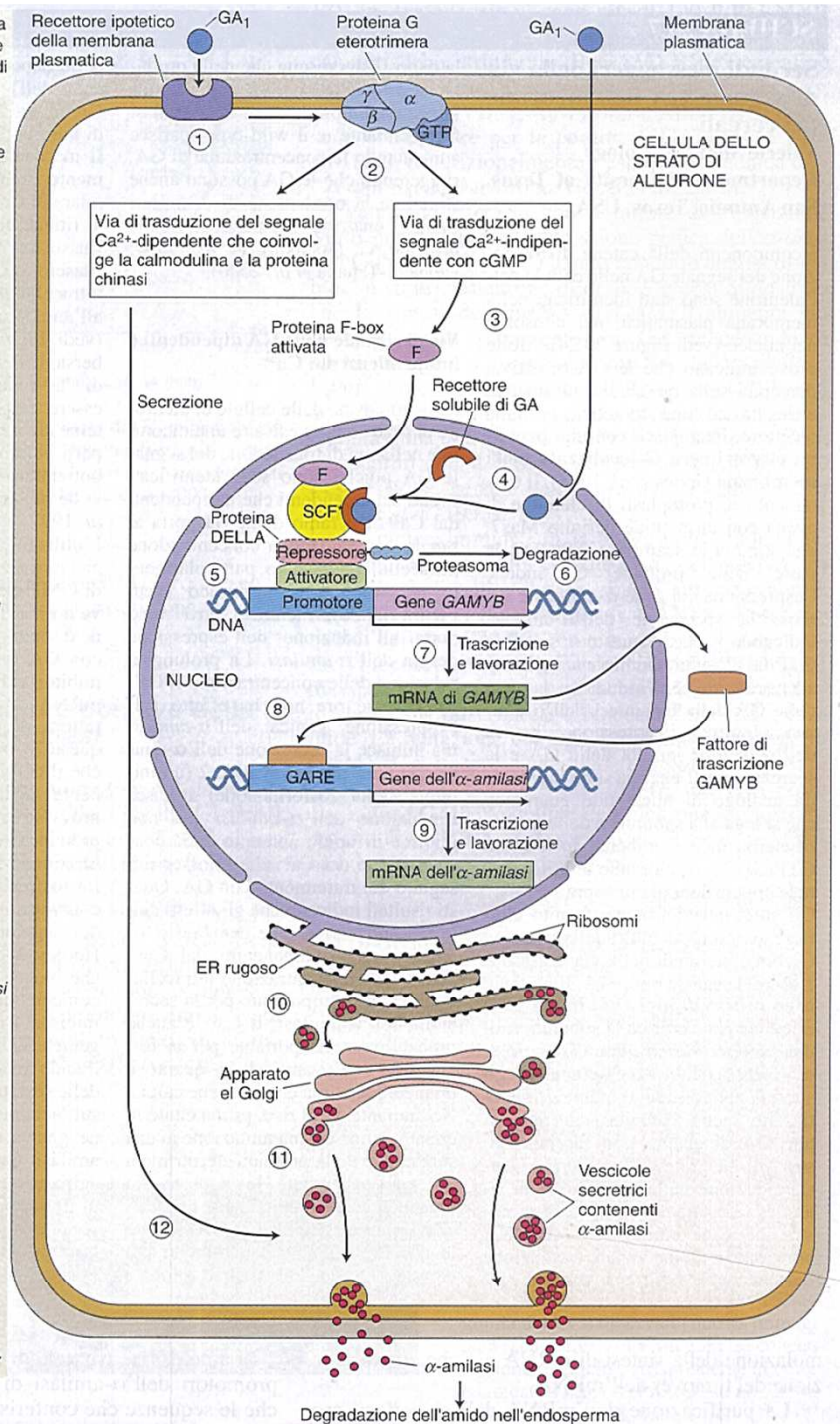


**Figura 20.21** Il modello ricorrente della via di segnale delle GA durante l'accrescimento implica le interazioni fra il recettore della GA, un complesso ubiquitina ligasi SCF e una proteina repressore di dominio DELLA. Le proteine di repressione di GA (GAI/RGA/SRL1/SLN1) contengono due domini: il dominio regolatore (DELLA) e il dominio repressore (GRAS). (A) Il dominio GRAS della proteina repressore è attivo in assenza di GA, esso blocca l'espressione di geni precoci indotti dalle GA e porta a pianticelle nane. (B) La GA legata al suo recettore si lega alla proteina repressore e ne facilita l'associazione con il complesso dell'ubiquitina ligasi SCF. La proteina repressore è così segnata per l'ubiquitinazione e la degradazione da parte del proteasoma 26S. La distruzione della proteina repressore permette l'espressione dei geni precoci indotti dalle GA e la crescita della pianticella. (C) Una mutazione nel dominio regolatore DELLA previene il suo legame con il complesso recettore-GA. Di conseguenza il repressore non può essere degradato e il mutante è un nano insensibile alla GA. (D) La mutazione nel dominio GRAS porta ad un repressore che non funziona, così le pianticelle crescono

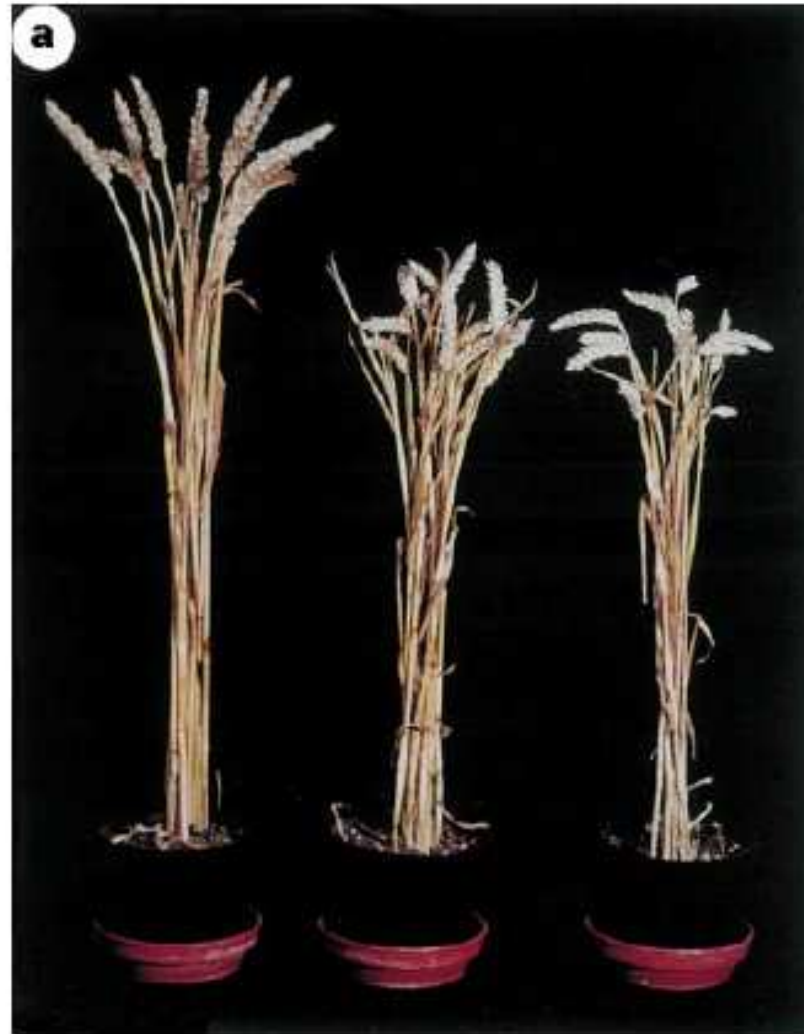


## Modello per induzione di sintesi dell'alfa amilasi da GA in orzo

1. La GA<sub>1</sub> dell'embrione si lega prima ad un ipotetico recettore di membrana sulla superficie di una cellula dell'aleurone.
2. Il complesso cellula-GA di superficie-recettore interagisce con una proteina eterotrimerica G, dando inizio a due catene separate di trasduzione del segnale.
3. Una via calcio-indipendente che coinvolge cGMP e molte altre componenti porta alla attivazione di una proteina F-box, che è parte di un complesso SCF-ubiquitina ligasi.
4. La GA<sub>1</sub> può anche entrare direttamente nella cellula e legarsi ad una proteina recettore alternativa, localizzata principalmente nel nucleo.
5. La proteina F-box attivata si lega ad un dominio repressore DELLA che blocca la trascrizione di un gene GAMYB. Il dominio repressore DELLA può bloccare l'attività di un attivatore di trascrizione.
6. Il repressore è degradato dal complesso SCF-ubiquitina ligasi.
7. La degradazione del repressore permette l'espressione di GAMYB e di altri geni precoci di risposta.
8. La proteina GAMYB neosintetizzata entra nel nucleo e si lega ai promotori di  $\alpha$ -amilasi e di geni che codificano altri enzimi idrolitici.
9. E' attivata la trascrizione di questi geni.
- 10- L' $\alpha$ -amilasi e le altre idrolasi sono sintetizzate nell'ER rugoso.
11. Le proteine sono secrete dal Golgi.
12. La via di secrezione richiede la stimolazione da parte delle GA di una via calcio-calmodulina dipendente.



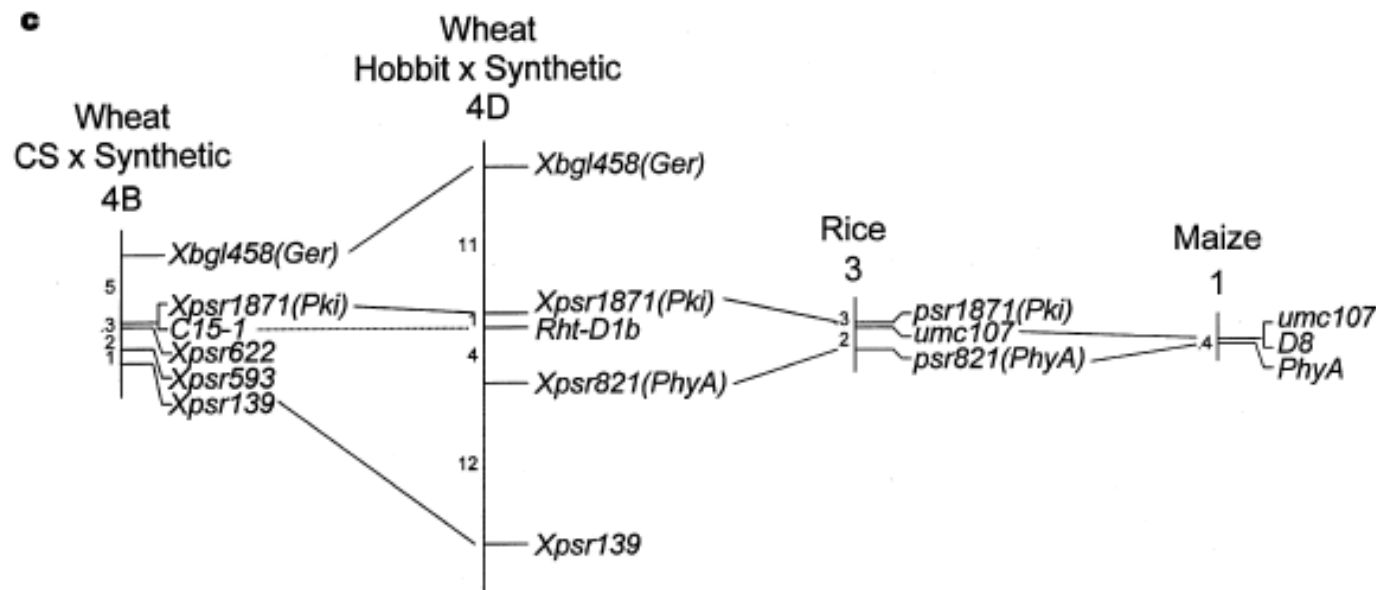
# Linee quasi-isogeniche di frumento



*Rht-B1b e D1b:*  
semi-dominanti

Control      *Rht-B1b*      *Rht-D1b*  
(var. Mercia) (semi-nano) (semi-nano)

# Un gene omologo a *GAI* mappa al locus *Rht-1*



**Figure 1** cDNA C15-1 maps to the *Rht-1* locus. **a**, Near-isogenic dwarf wheat lines: left, tall control (var. Mercia); centre, semi-dwarf *Rht-B1b*; right, semi-dwarf *Rht-D1b*. **b**, Gel-blot hybridization of C15-1 with *Dra*I-digested DNA from wheat lines lacking individual group 4 chromosomes (nullisomic 4A-tetrasomic 4D, N4AT4D; nullisomic 4B-tetrasomic 4D, N4BT4D; nullisomic 4D-tetrasomic 4B, N4DT4B), and euploid control (all var. Chinese Spring). Hybridizing fragments were assigned to chromosomes (4A, 4B and 4D) as shown. **c**, Partial linkage maps of wheat chromosomes 4B (ref. 26) and 4D, rice chromosome 3 (ref. 28), and maize

chromosome 1 (ref. 29) showing the colinearity between regions containing C15-1, *Rht-D1b* and *D8-1*. A putative maize *d8* genomic fragment (see text) also displayed tight linkage with *umc107* (not shown). Wheat 4B data are from the F<sub>2</sub> of a Chinese Spring (CS) × Synthetic cross. Wheat 4D data are from the F<sub>2</sub> of a Hobbit (contains *Rht-D1b*) × Synthetic cross; segregation for *Rht-D1b* was assayed by seedling responses to gibberellin<sup>2</sup>. Map distances are in centimorgans (cM).





**a**

GAI  
gai  
GAI

NGMDELLAVLGKVKRSSEMADVAQKLEQLEVMMSNVQEDDLSQLATETVHYNPAELYTWLDSMLTD  
NGM DVAQKLEQLEVMMSNVQEDDLSQLATETVHYNPAELYTWLDSMLTD  
NGMDELLAVLGKVKRSSEMADVAQKLEQLEVMMSNVQEDDLSQLATETVHYNPAELYTWLDSMLTD

I

II

d8  
D8-Mp1  
D8-1  
D8-2023  
d8

EEDVDELLAALGKVKRSSDMADVAQKLEQLENAMGMGGVGGAGATADDGFVSHLATDTVHYNPSDLSWVESMLS  
EEDVDELLAALGKVKRSSDNAG LEQLEMAMGMGGVGGAGATADDGFVSHLATDTVHYNPSDLSWVESMLS  
EEDVDELLAALGKVKRSSDMADVAQKLEQLEMAMGMGGVGGAGATADDGFVSH LSSWVESMLS  
EEDVDELLAALGKVKRSSDMADVAQKLEQLEMAMGMGGVGGAGATADDGFVSHLATDTVHYNPSDLSWVESMLS

I

II

Rht-B1a  
Rht-B1b  
Rht-D1b  
Rht-D1a

GEEVDELLAALGKVKRSADMADVAQKLEQLEMAMGMGGVGGAGAAPDDSFATHLATDTVHYNPTDLSWVESMLS  
GEEVDELLAALGKVKRSADMADVAQKLE\* MAMNGGVGAGAAPDDSFATHLATDTVHYNPTDLSWVESMLS  
GEEVDELLAALGKVKRSADMADVAQKLE\* MAMNGGVGAGAAPDDSFATHLATDTVHYNPTDLSWVESMLS  
GEEVDELLAALGKVKRSADMADVAQKLEQLEMAMGMGGVGGAGAAPDDSFATHLATDTVHYNPTDLSWVESMLS

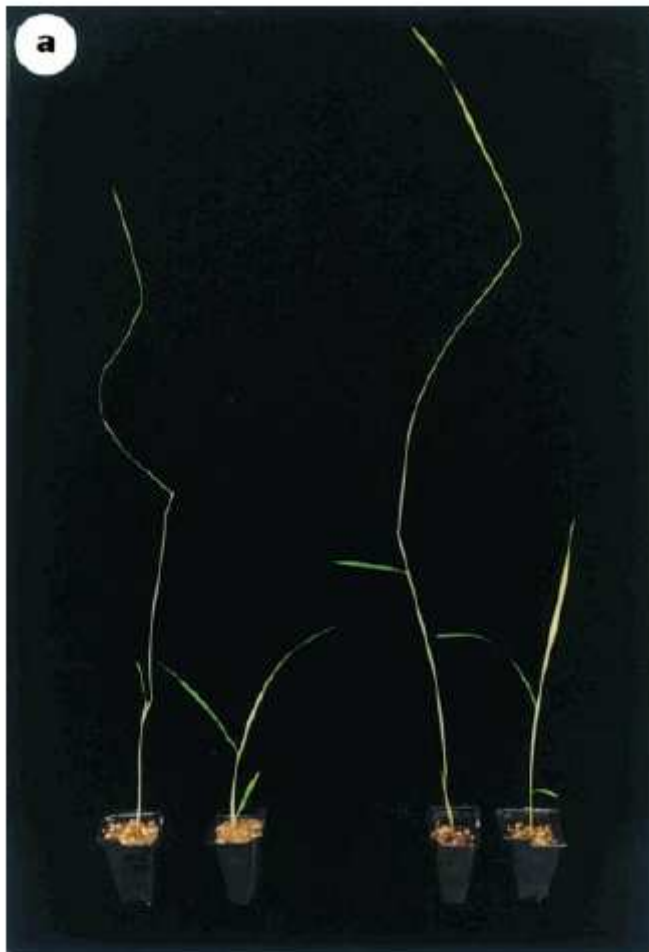
I

II

**Figure 3** Dominant mutant alleles encode proteins with mutant N termini. **a**, N-terminal segments of predicted proteins encoded by mutant alleles *gai*, *D8-1*, *D8-2023*, *D8-Mp1*, *Rht-B1b* and *Rht-D1b* are compared with those of their respective wild-type alleles (*GAI*, *d8*, *Rht-B1a* and *Rht-D1a*). For each locus, the wild-type sequence is shown above and below the mutant sequence(s). Differences between wild-type and mutant sequences (deletions and substitutions) are highlighted in white, the position of translational stop codons is represented by an asterisk, and the previously identified highly conserved regions I and II (Fig. 2a) are shown. All mutations alter the N-terminal region of their encoded proteins, and affect regions I and/or II. D8-2023 also carries a 6-bp deletion that removes one G and one A residue from 510GAGA513, and a nucleotide substitution that converts the *Rht-B1g* samples.

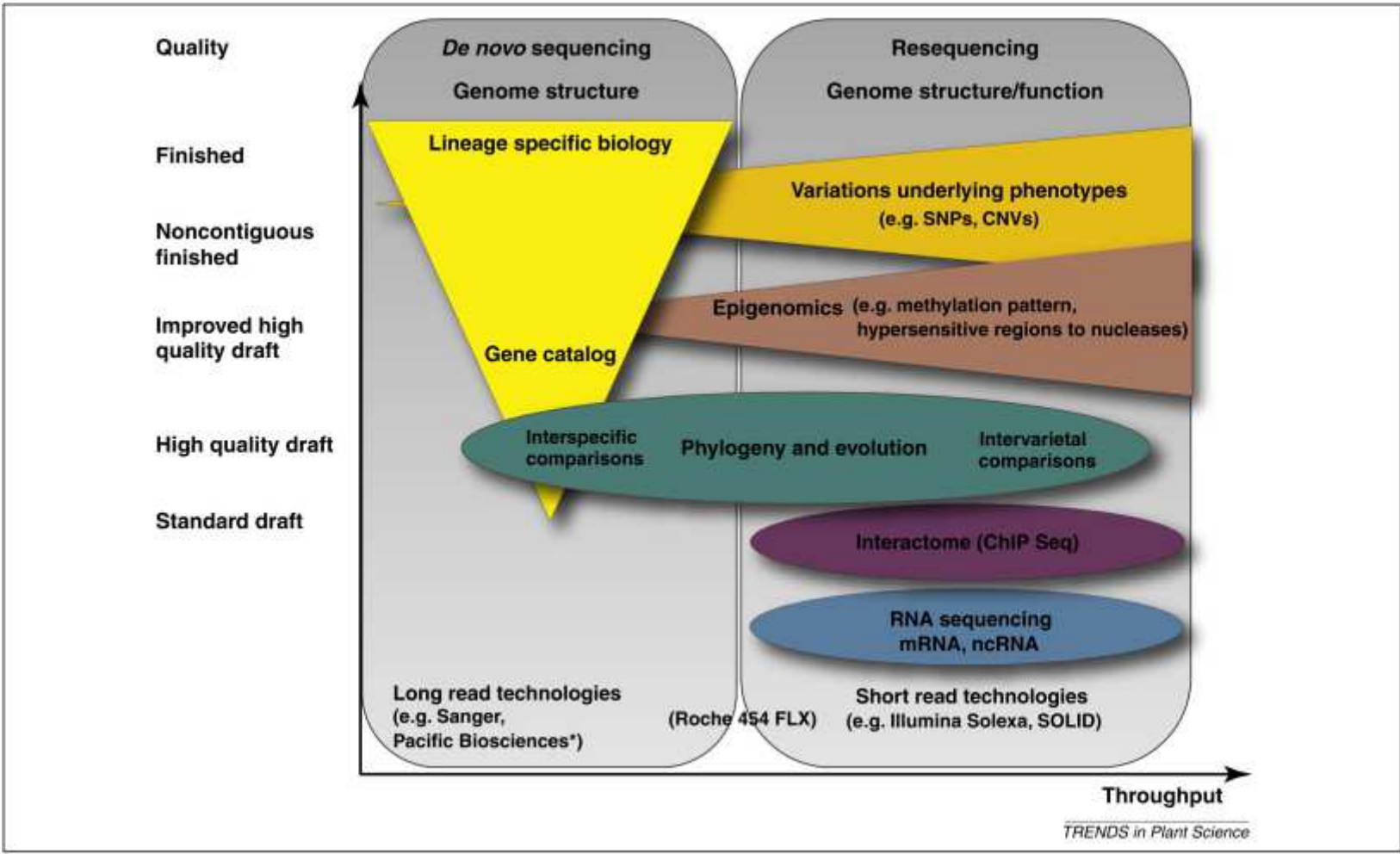
T519 to A519 (with respect to d8 sequence; Fig. 2a, and data not shown). Because these altered residues are poorly conserved in *GAI/RGA/Rht-D1a/d8*, these changes are considered not to be of phenotypic significance. In wheat, Q64 of *Rht-B1a* is equivalent to Q62 of *Rht-D1a*, owing to a difference of two amino-acid residues in a poorly conserved N-terminal region (see text; data not shown). *gai* was isolated following X-irradiation mutagenesis<sup>47</sup>; all other mutant alleles shown are of spontaneous origin<sup>48,7</sup>. **b**, Gel-blot hybridization of C15-1 with *Bam*HI-digested DNA from *Rht-B1a* (var. Mercia), *Rht-B1b* (Mercia near-isogenic line) and two *Rht-B1g* homozygotes. A hybridizing 2.5-kb *Bam*HI fragment (assigned to chromosome 4B by nullisomic-tetrasomic analysis; data not shown) is missing in the *Rht-B1g* samples.

**Piante di riso che esprimono il gene *GAI* di *Arabidopsis* sono nane**



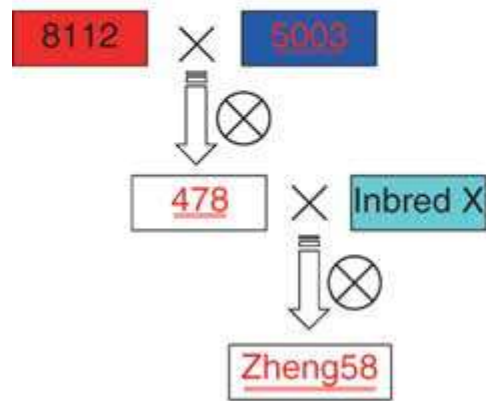
# **GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDIES (GWAS)**

Resequencing di genomi di specie coltivate -> marcatori (SNPs, indels, presenza/assenza di geni espressi)

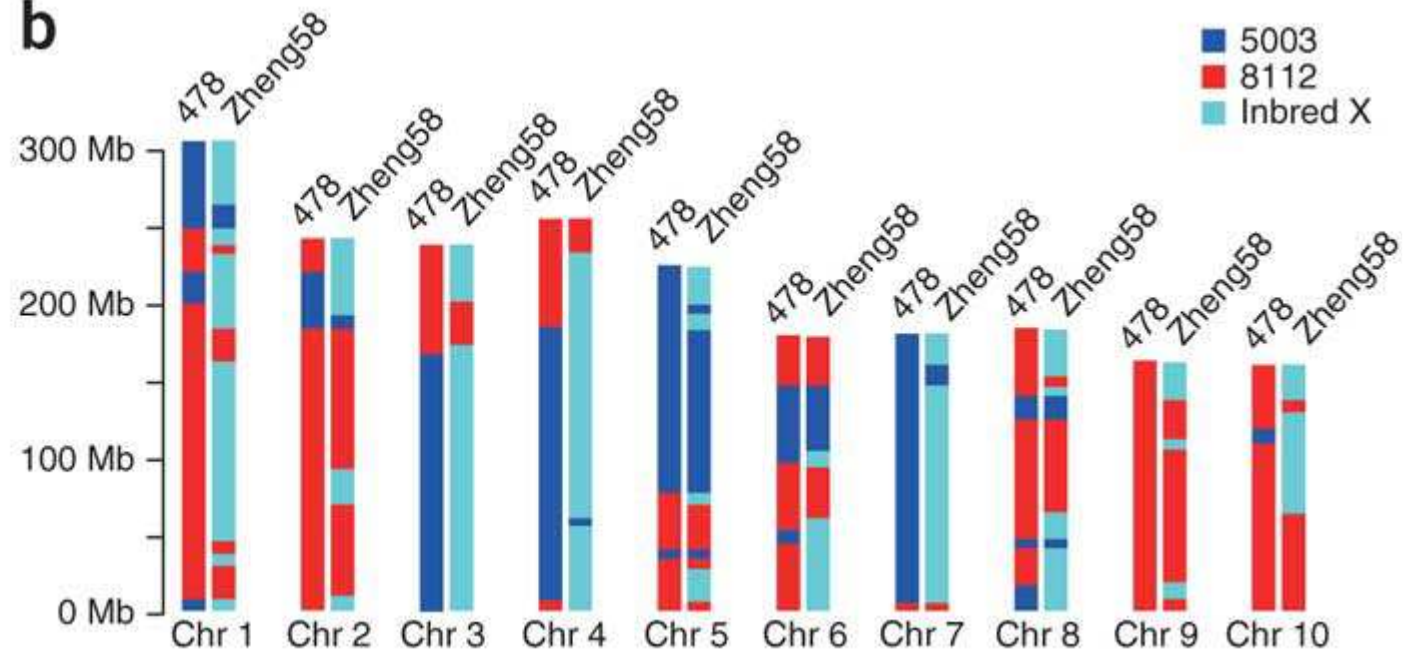


## 6 RILs da elite cultivar di mais

**a**



**b**

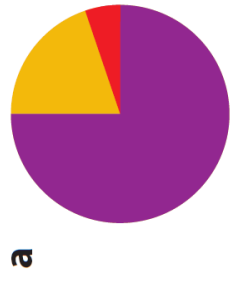


1.2 milioni SNPs

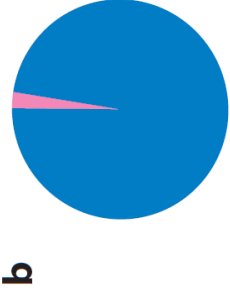
>30000 indels

Centinaia di geni presenti/assenti

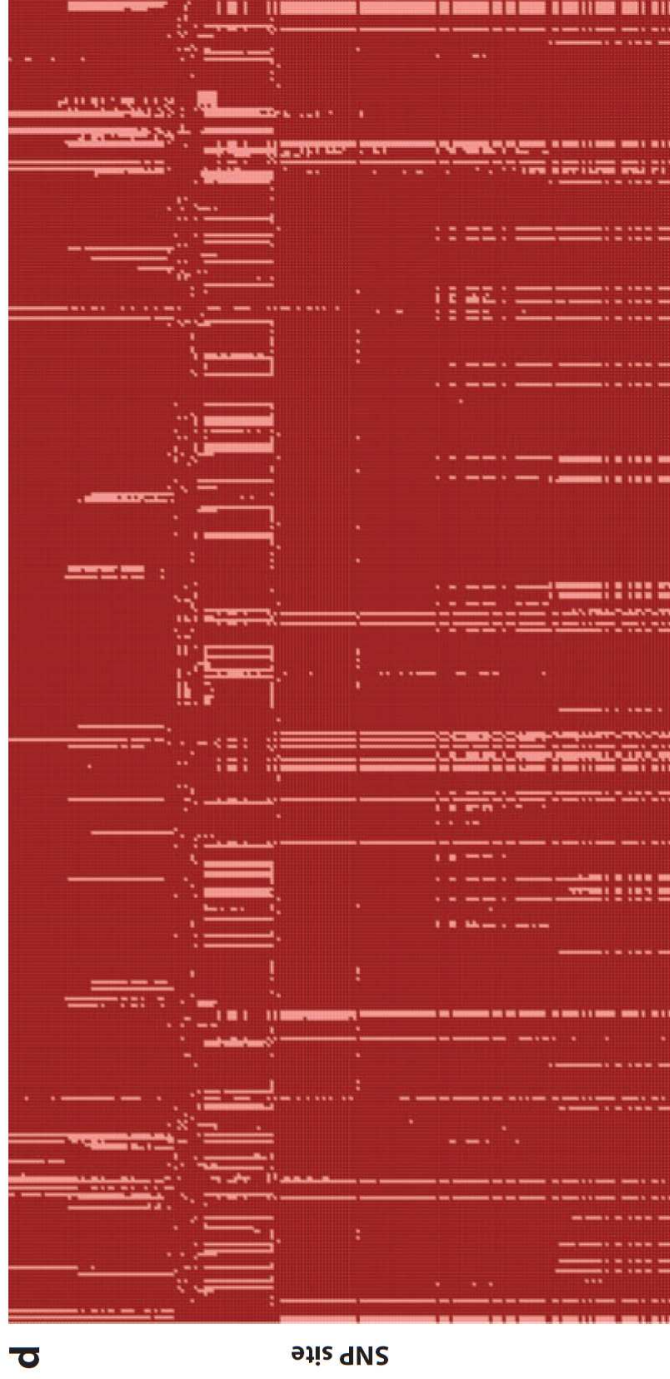
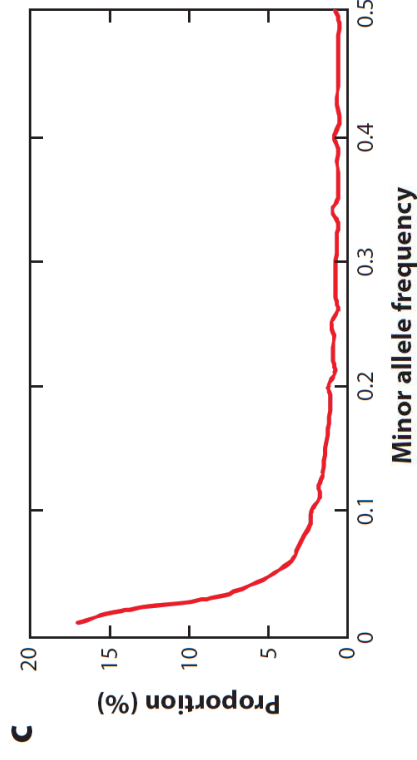




- SNPs
- Small insertions or deletions
- Structural variants



- Variants in coding regions
- Variants in noncoding regions



# HIGH-THROUGHPUT GENOTYPING

**Table 1** Five high-throughput genotyping methods

	Microarray-based genotyping	Sequencing-based genotyping	Genotyping by sequencing	RNA-seq-based genotyping	Exon-sequencing-based genotyping
Preliminary requirement	Comprehensive SNPs available	None	A suitable restriction enzyme	None	Exon array developed
Density	Alterable	Alterable	Modest	Modest	Modest
Cost	Alterable	Alterable	Low	High	High
Experimental workload	Low	Medium	Medium	High	High
Marker distribution	Well distributed	Well distributed	Not well distributed	Not well distributed	Not well distributed
Application	Most species	Most species	Species with a large genome size	Species with a large genome size	Species with a large genome size
Additional uses	None	Identifying novel mutation variants	None	Identifying novel mutation variants and eQTL analysis	Identifying novel mutation variants

Abbreviations: eQTL, expression quantitative trait locus; SNP, single-nucleotide polymorphism.



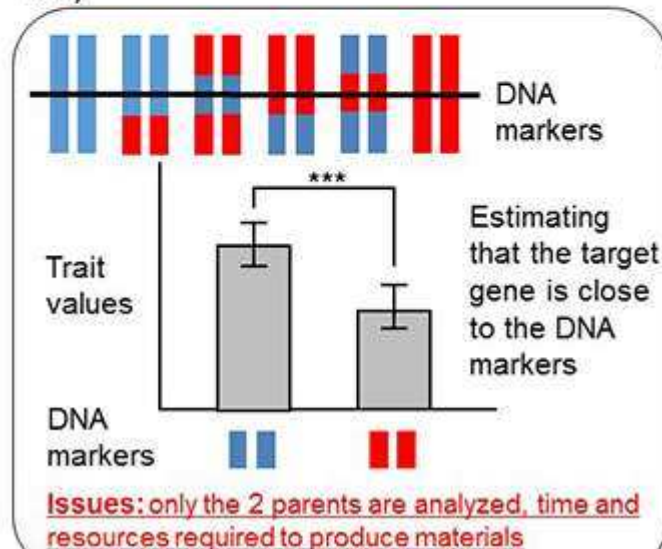
# GWAS IN CROP PLANTS

Identifying genes with significant traits for agriculture

QTL: Quantitative Trait Loci

QTL analysis

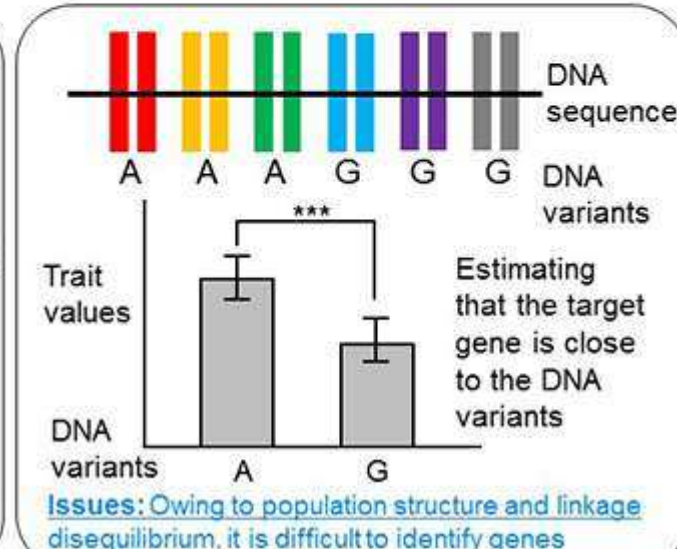
Materials: Crossed-population between 2 cultivars (F<sub>2</sub>, recombinant inbred lines etc)



Genome-wide Association Study: GWAS

GWAS analysis

Materials: a variety of plants



# GWAS NELLE SPECIE VEGETALI

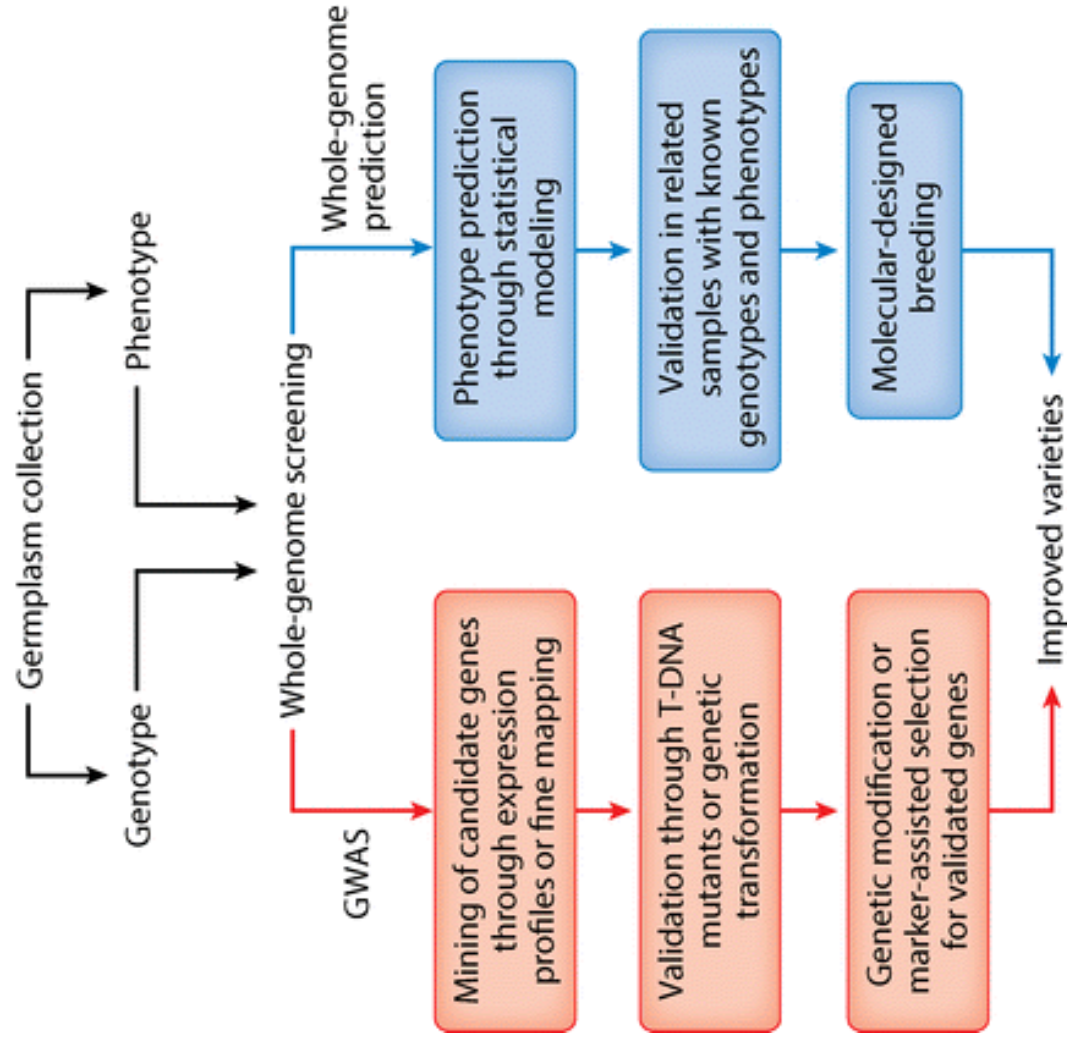
Una singola popolazione di varietà diverse (preferibilmente omozigoti) è genotipizzata una sola volta e sottoposta ad analisi di fenotipizzazione multiple (meno costoso che in uomo)

Principali modelli: mais (maggiore diversità – a volte risoluzione a livello di singolo gene) e riso (genoma piccolo)

Comunque anche in mais servono decine di milioni di SNPs -> costi elevati perché genoma di grandi dimensioni

Richiede elevata potenza di calcolo

GWAS è stato applicato con successo in varie specie (miglio, Brassica napus, orzo)



**AR** Huang X, Han B. 2014. Annu. Rev. Plant Biol. 65:531–51

# **PIANTE MODELLO E BIOENERGIA**

# Plants: a significant proportion of the biomass on Earth



Credit: Don Deering, NASA/LBA Project

**“Energy can be obtained from biomass with a decisively positive energy balance and ... impact on sustainability and security”**

(Lynd et al., 2008. Nature Biotechnology, 26:2)



# Biotechnology Journal

Healthcare • Nutrition •  
Biosafety

12/2007

Energy Production  
Biofuel  
Biorefineries  
Sustainable Resources



Food vs Fuel

[www.biotechnology-journal.com](http://www.biotechnology-journal.com)



1007  
BIOLOGY  
1007

WILEY-VCH

# Bioethanol Production

First generation:

from plants rich in starch or sucrose

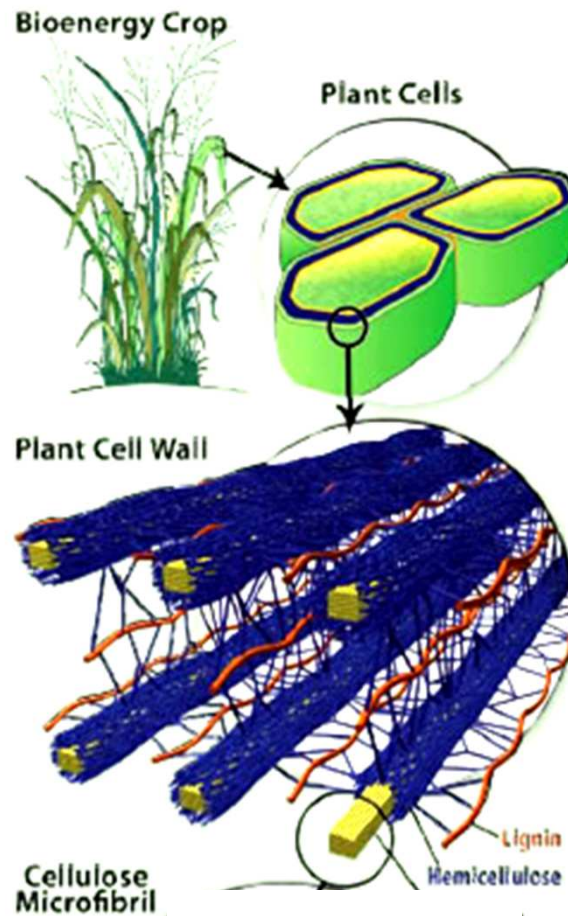
Sugar cane



Corn



Second generation:  
from lignocellulosic biomass



*Miscanthus*



*Sorghum*



Straw



Recycled paper





## Cellulosic vs corn ethanol

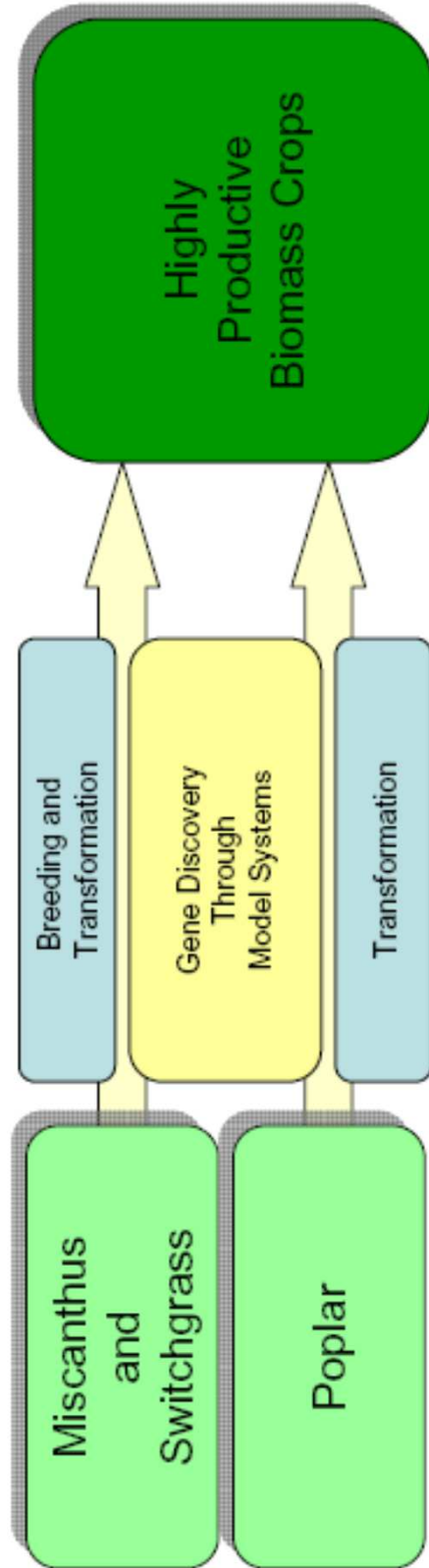
Cellulosic biomass is preferred to corn ethanol, because it requires fewer inputs, and is accompanied by less soil erosion and improved soil fertility.

Today corn is easier and less expensive to process into ethanol in comparison to cellulosic ethanol.

The "Ideal" Biomass Crop?	Corn	Short-Rotation Coppice*	Perennial Grass
C4 photosynthesis	★		★
Long canopy duration		★	★
Recycles nutrients to roots			★
Clean burning			★
Low input		★	★
Sterile (noninvasive)	N/A	(★)	<i>M.g.**</i>
Winter standing		★	★
Easily removed	★		★
High water-use efficiency			★
No known pests or diseases			<i>M.g.</i>
Uses existing farm equipment	★		★

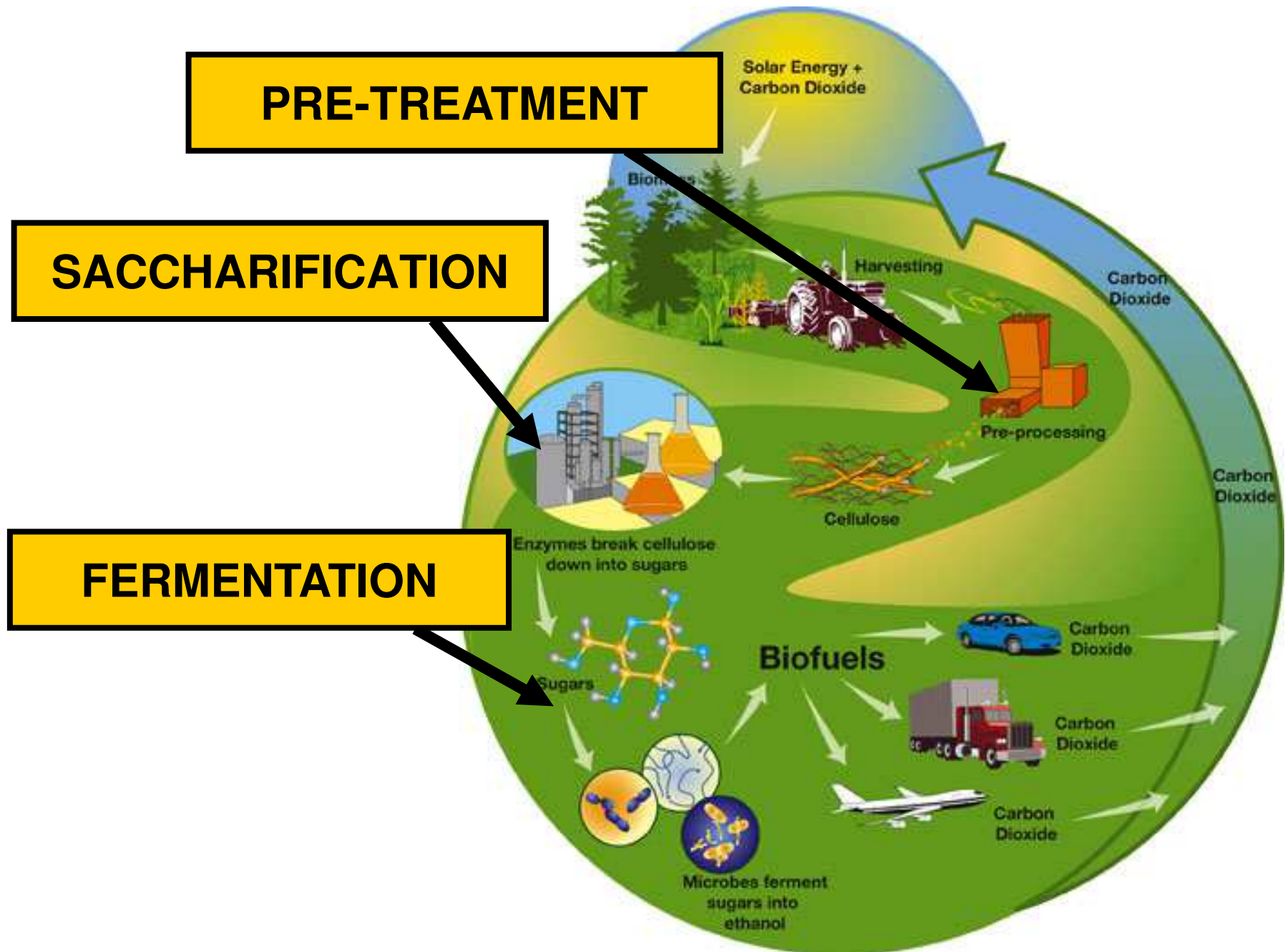
\* Coppice is a grove of densely growing small trees pruned to encourage growth

\*\* *Miscanthus giganteus*



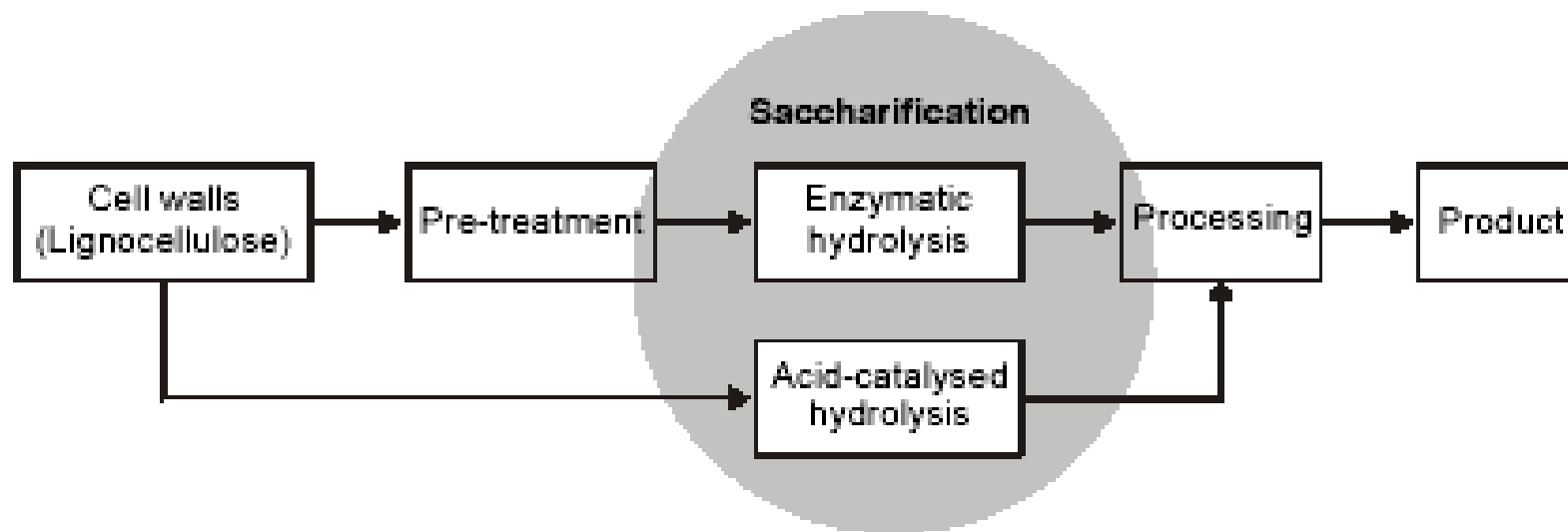
## Plant Science Biofuel Research Targets

- **Quantity**
  - Biomass productivity can be enhanced.
- **Quality**
  - Biomass saccharification efficiency can be enhanced.
- **Sustainability**
  - Low cost, environmentally sound production schemes will require optimized mineral and water-use efficiency.
- **Durability**
  - For optimized yields biofuel crops must be resistant to pests and pathogens.
- These factors are intimately interconnected



source: US DOE

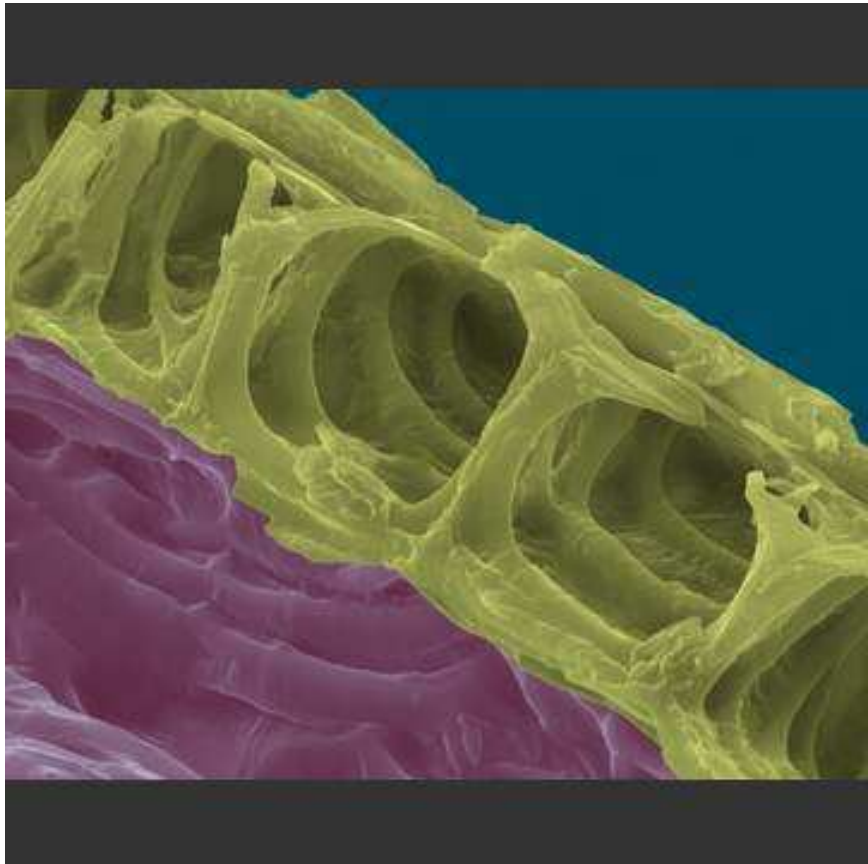
# Saccharification



- **Enzymatic hydrolysis is currently considered the most promising, environmentally friendly technology available for biorefining (Ogier JC et al., 1999, Yu and Zhang, 2004)**

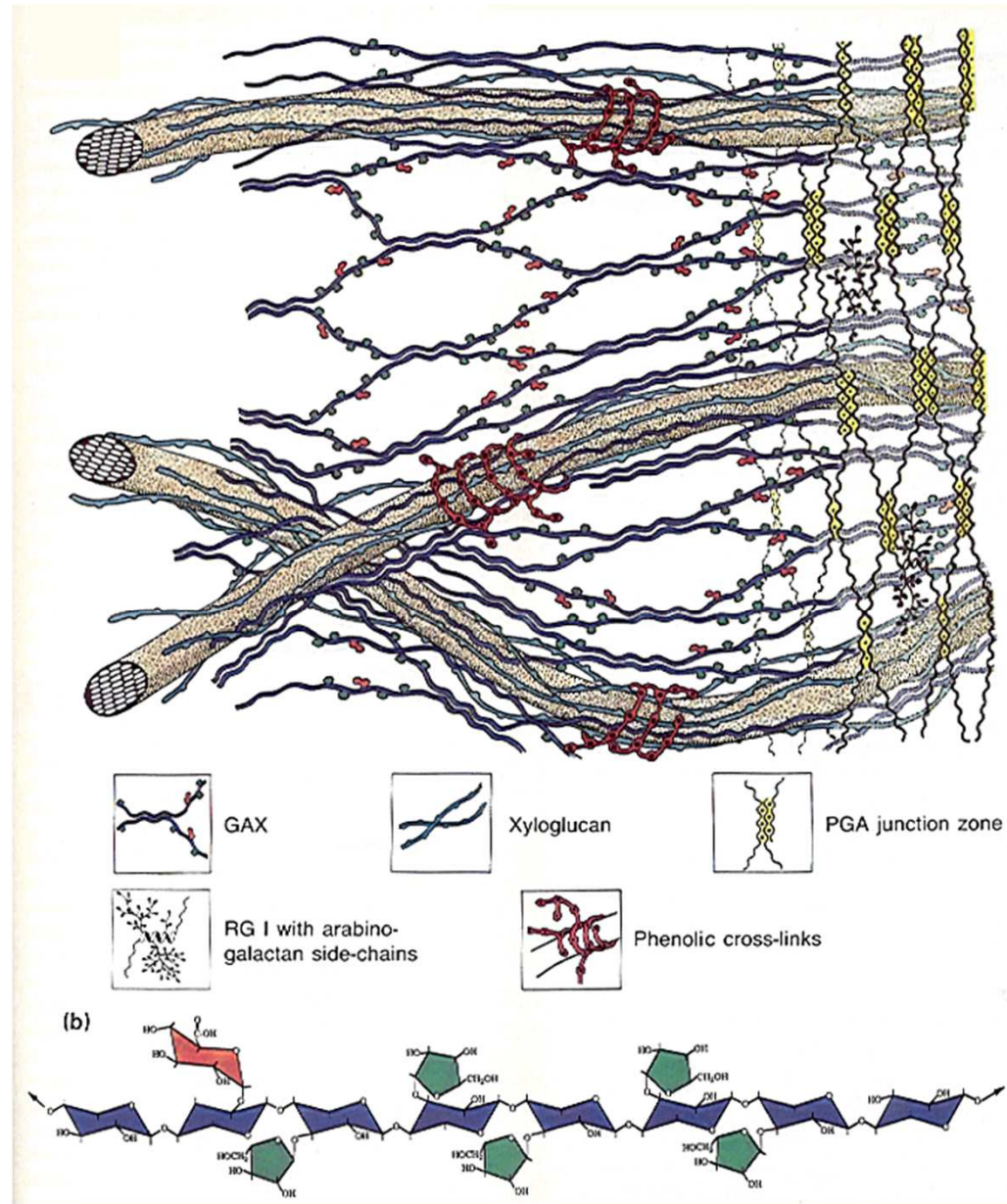


# Cell walls are made to resist deconstruction





# The plant cell wall

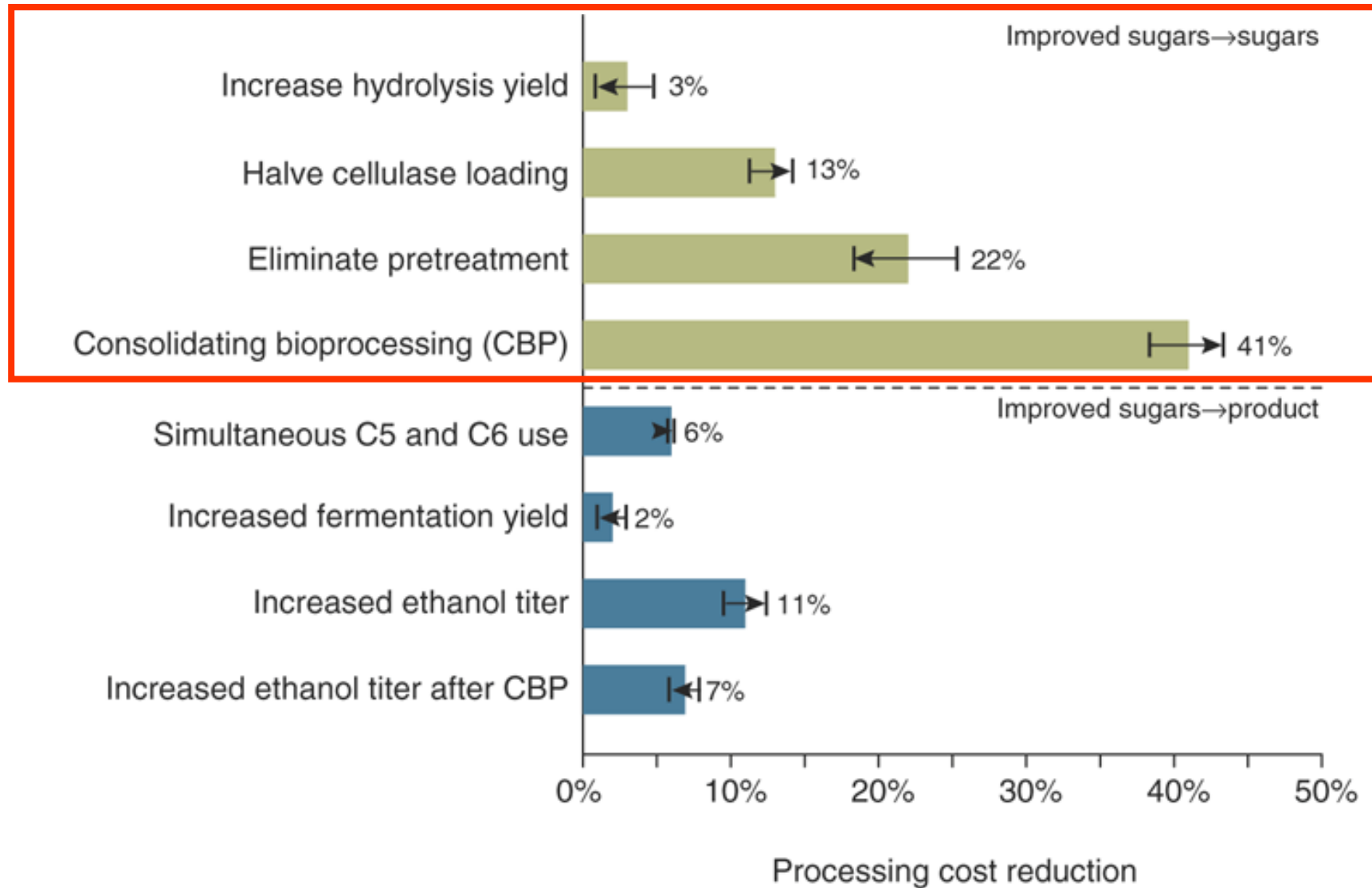


# Cell walls are recalcitrant to enzymatic hydrolysis

Recalcitrance of cell walls to enzymatic hydrolysis due to:

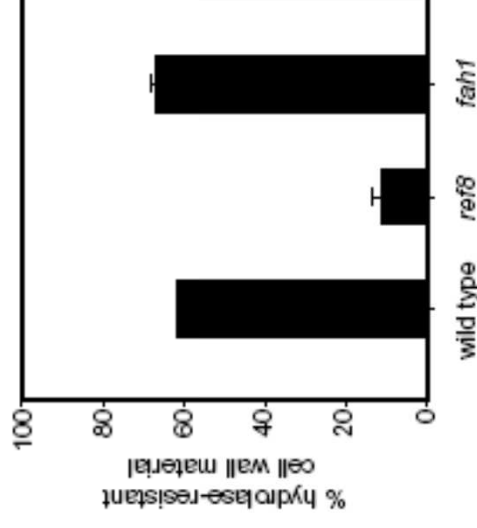
- **heterogeneity and complexity** of cell wall structural components
- presence of **inhibitors** of microbial enzymes
- **degree of lignification**

# Reduction in processing costs for various technological advances.



The components of cell wall polymers can be manipulated to improve saccharification

- **Fundamental Deliverable:**
  - Genes involved in cell wall biosynthesis
- **Applied Deliverable:**
  - Biomass crops whose cell walls are easily converted to fermentable sugars BUT are not susceptible to pathogens

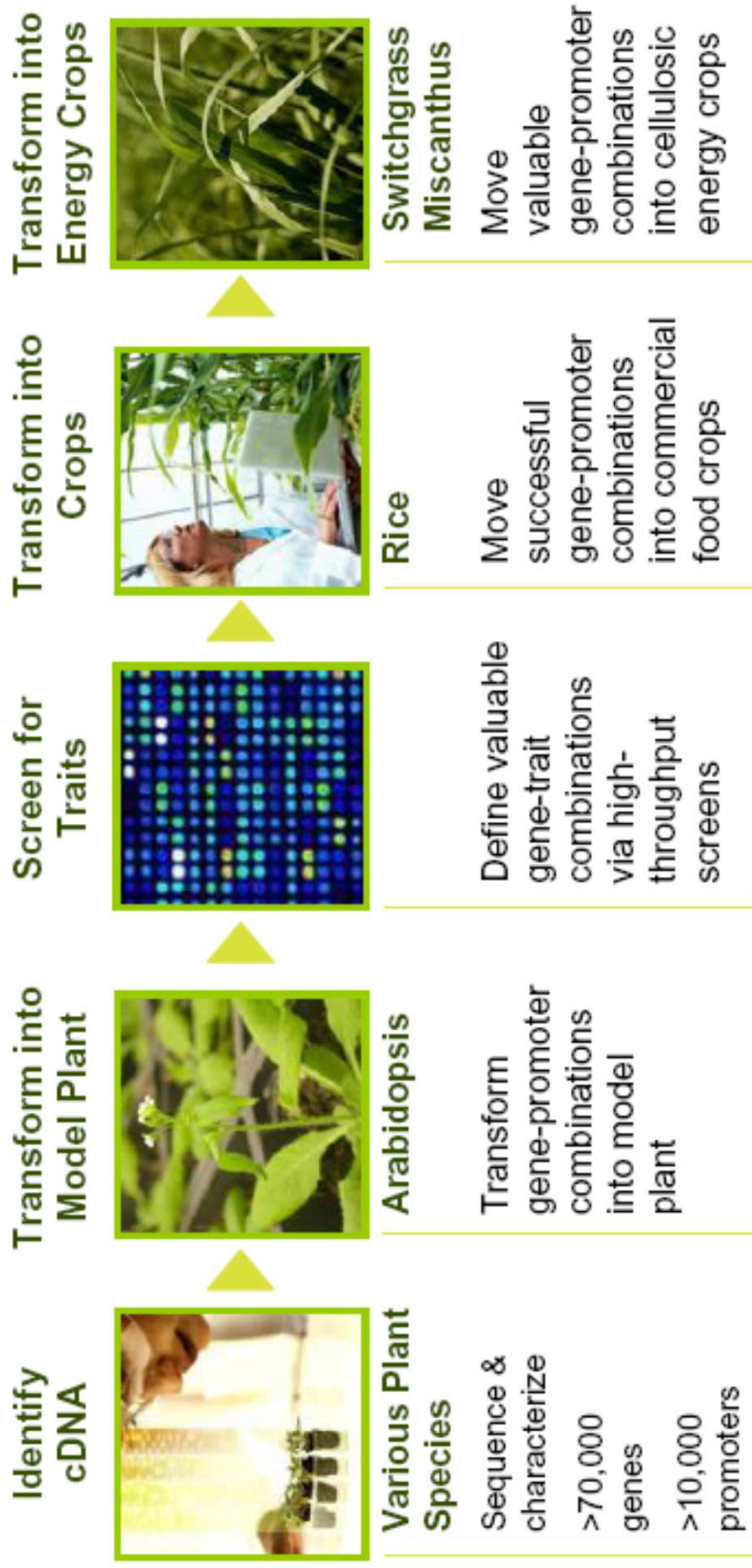


# **Approaches to increase saccharification efficiency through plant genetic engineering**

- lowering lignin composition (though lignin is required for mechanical strength)
- weakening cross-linkages between wall components
- altering the levels or the degree of modification of cell wall polymers

Biofuel crop improvement can be accomplished in two ways

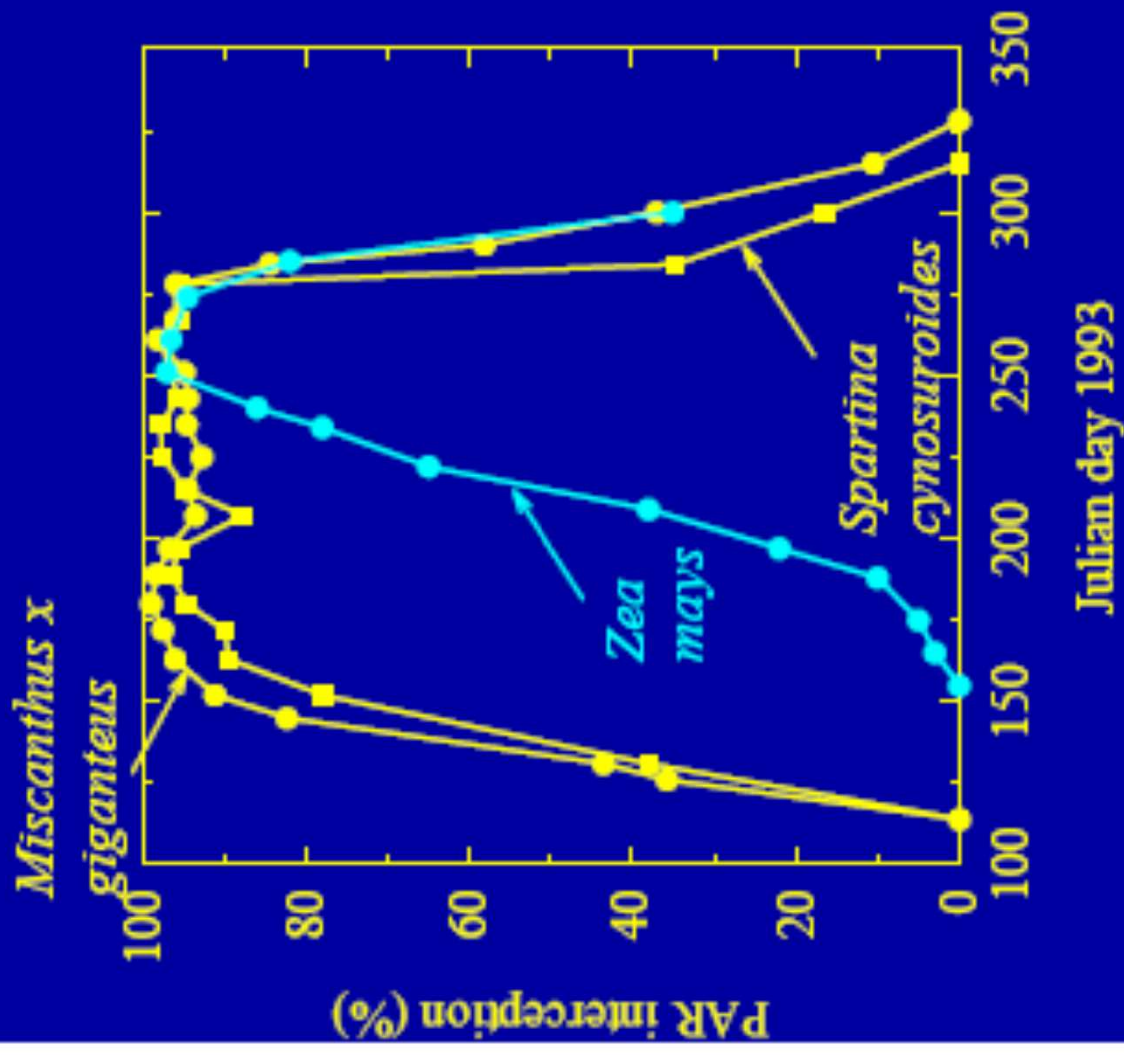
- **Breeding**
  - slow
  - complex in polyploid grasses
- **Plant transformation**
  - fast
  - valuable for adding a small number of high-impact target genes
  - some public concerns





***Miscanthus x giganteus***





## ***Panicum virgatum* L. (“switchgrass”)**

Una tra le specie predominanti nelle praterie nordamericane, proposta negli USA come specie erbacea principale per la produzione futura di biocarburanti per:

- 1) alta resa
- 2) natura perenne
- 3) capacità di stabilirsi a partire da seme,
- 4) adattabilità ad ambienti marginali





Crop	Product Attributes	Yield (t/acre)	Region
Forage Sorghum	Photoperiod sensitive tall, thick stem and/or short, small stem, BMR	10 -- SE 8 -- SP/MW	MW marginal/ SP/SE
Sweet sorghum	Non-cellulosic, combine with grain process	25 wet	Upper gulf coast
Miscanthus	Seed propagated high biomass	10-15 (SE)	MW/SE
Miscane	Mis/sugar cane cross, cold tolerant, 4-6 m height	10-15, seed propagated	Upper SE
Energy Cane	Biomass, low sugar	Same, costly propagation	SE/S. TX
Switchgrass	Perennial, seed propagated,	5 - 8	MW/SE

# Tools to impact rapid domestication of new energy crops



- High efficiency sequencing
    - ~ Lumina, 454, ABI
    - ~ Marker ID
    - ~ Dramatically reduces time to develop dense marker maps to accelerate marker-assisted breeding
  - Efficient transfer of developed traits
    - ~ Inherent yield (e.g., photosynthetic capacity)
    - ~ Water use efficiency
    - ~ Nutrient use efficiency
    - ~ Drought tolerance
    - ~ Disease resistance
- Yield Stability**

*Journal of Experimental Botany*

doi:10.1093/jxb/ers319

This paper is available online free of all access charges (see [http://jxb.oxfordjournals.org/open\\_access.html](http://jxb.oxfordjournals.org/open_access.html) for further details)

Journal of  
Experimental  
Botany  
[www.jxb.oxfordjournals.org](http://www.jxb.oxfordjournals.org)

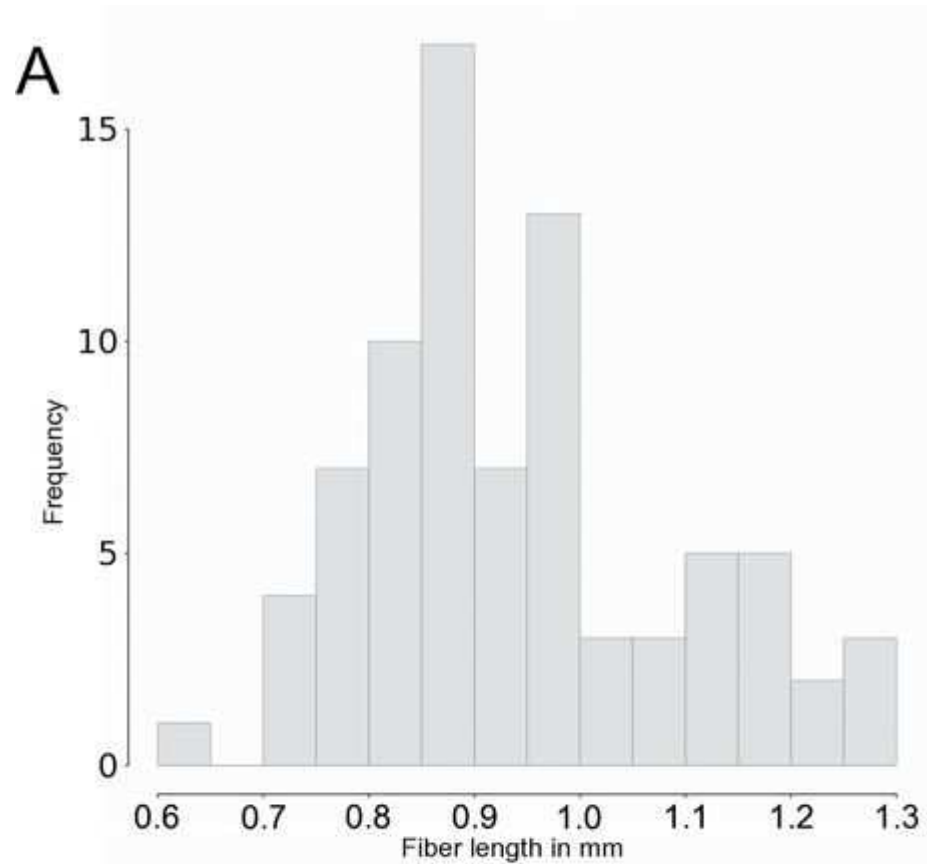
RESEARCH PAPER

# Identification of quantitative trait loci controlling fibre length and lignin content in *Arabidopsis thaliana* stems

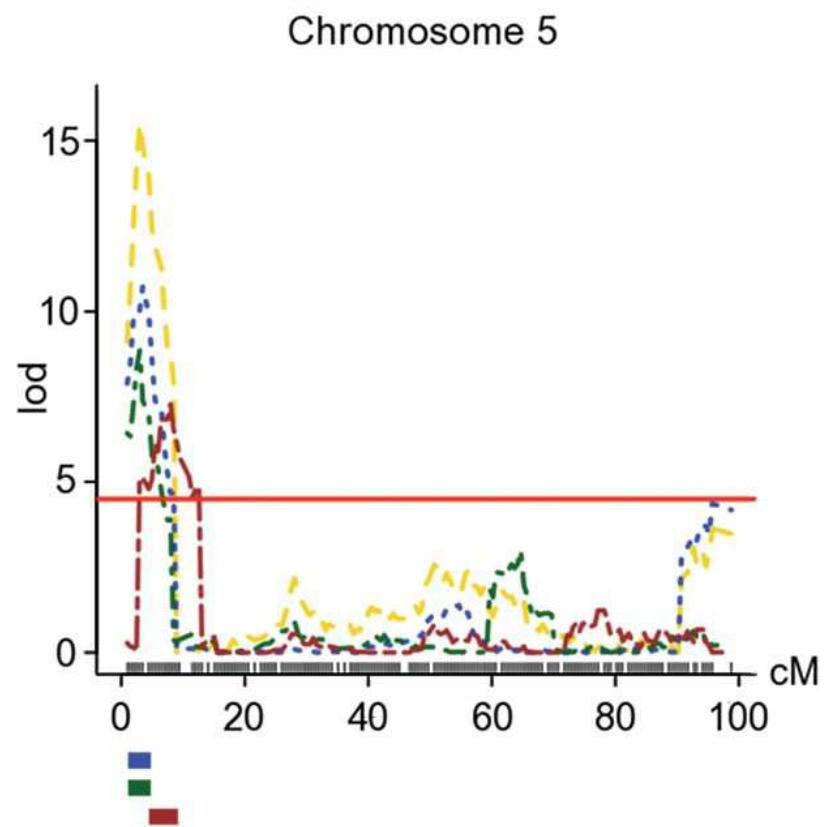
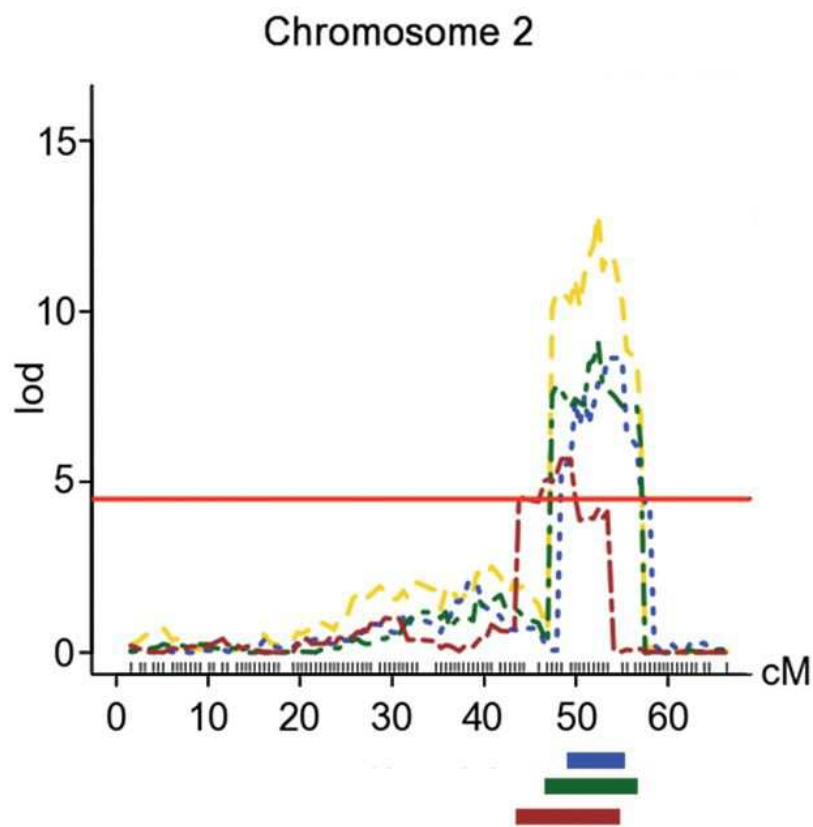
Arnaud Capron<sup>1</sup>, Xue Feng Chang<sup>2</sup>, Hardy Hall<sup>3</sup>, Brian Ellis<sup>3</sup>, Rodger P. Beatson<sup>2</sup> and Thomas Berleth<sup>1,\*</sup>



# Distribuzione normale delle fibre nello stelo di RILs di Arabidopsis

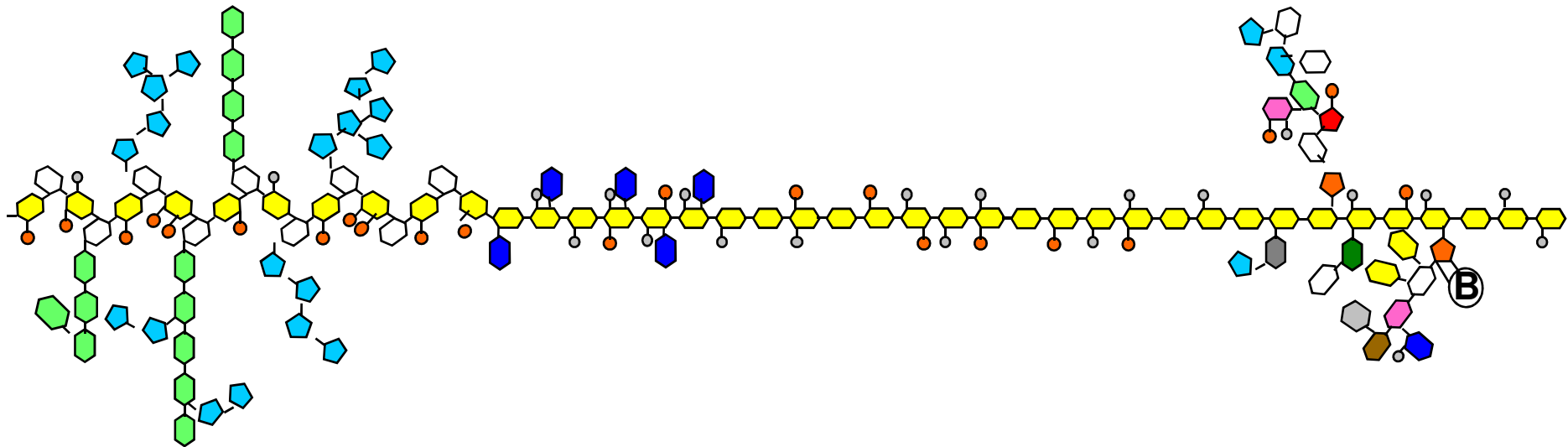


# Distribuzione del LOD score sul cromosoma 2 e 5



# Pectina

Rhamnogalacturonan I Xylogalacturonan Homogalacturonan Rhamnogalacturonan II



⬡ = D-Galacturonic acid

⬡ = L-Arabinose

⬡ = D-Apiose

⬡ = O-Acetyl

⬡ = L-Rhamnose

⬡ = D-Galactose

⬡ = L-Fucose

⬡ = O-Methyl

⬡ = D-Glucuronic acid

⬡ = L-Aceric acid

⬡ = D-Xylose

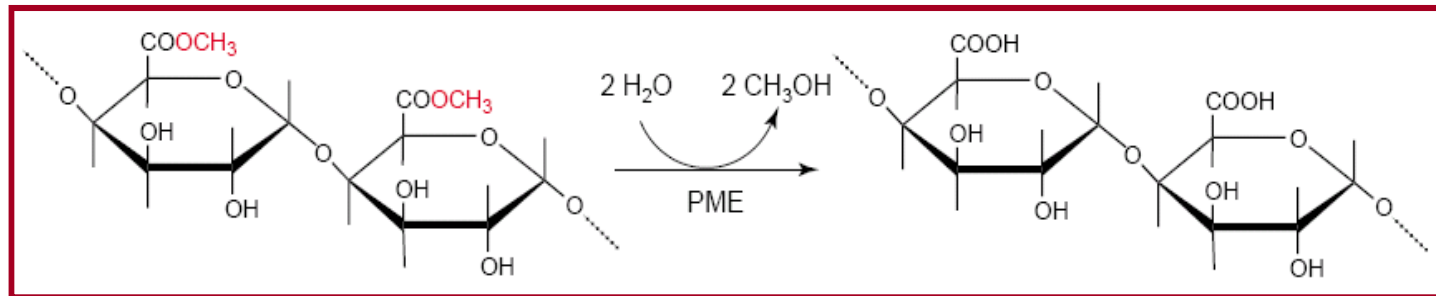
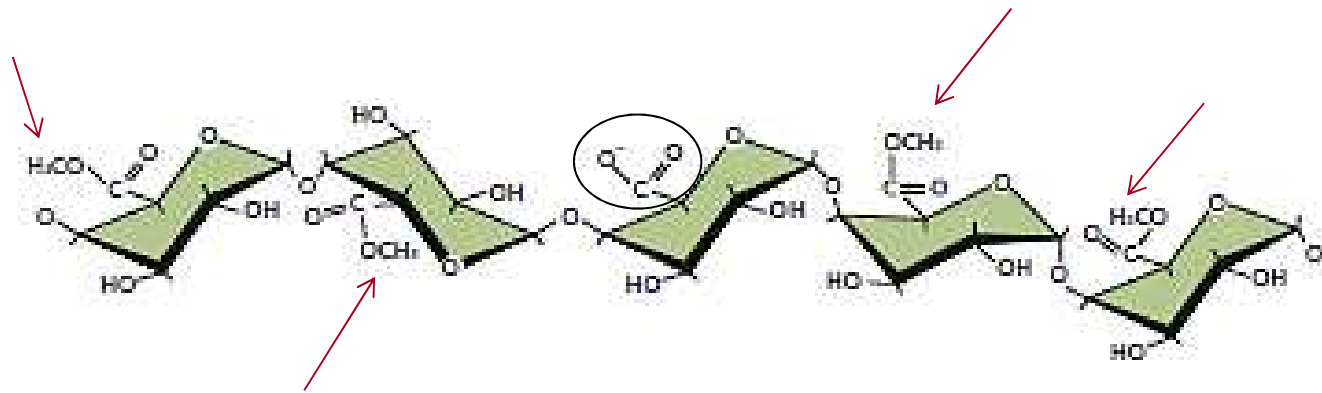
Ⓟ = Borate

⬡ = Kdo

⬡ = D-Dha

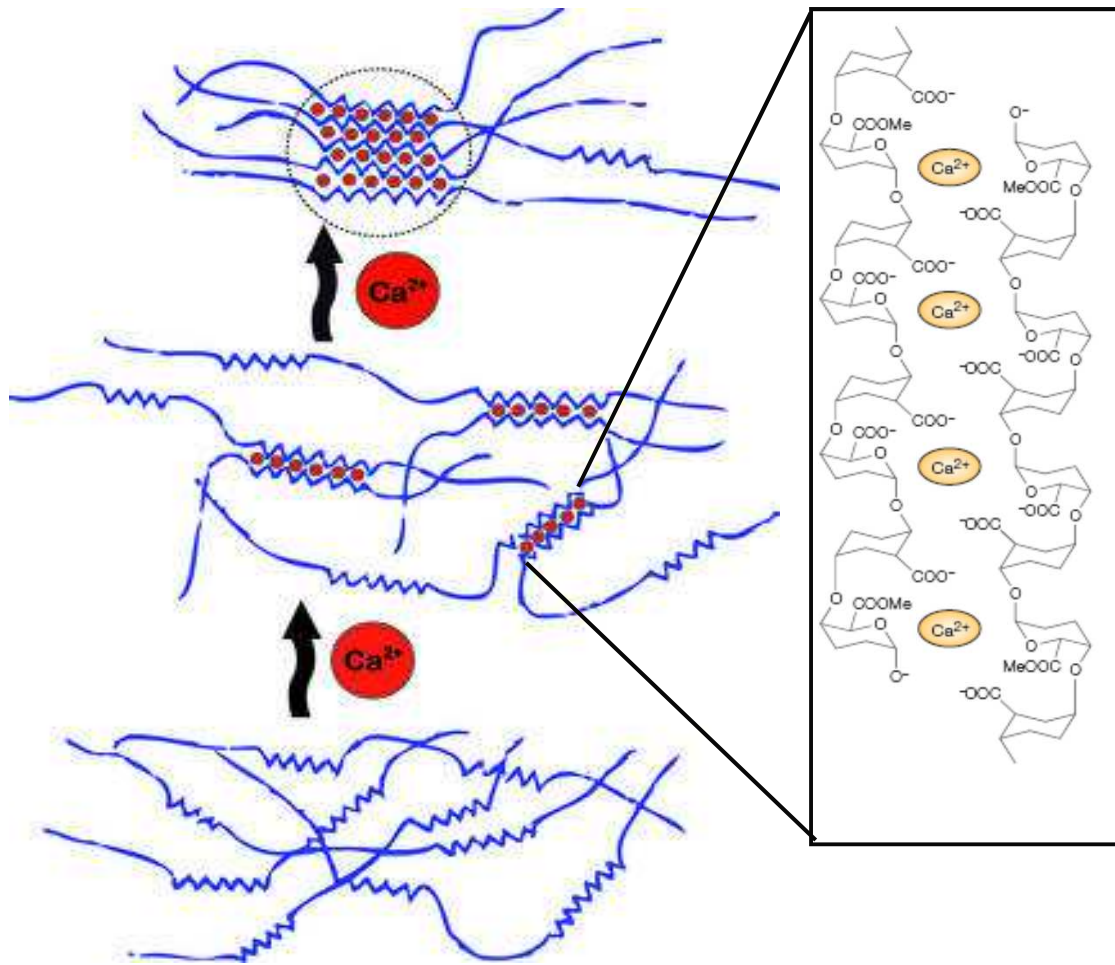
⬡ = L-Galactose

# Omogalatturonano





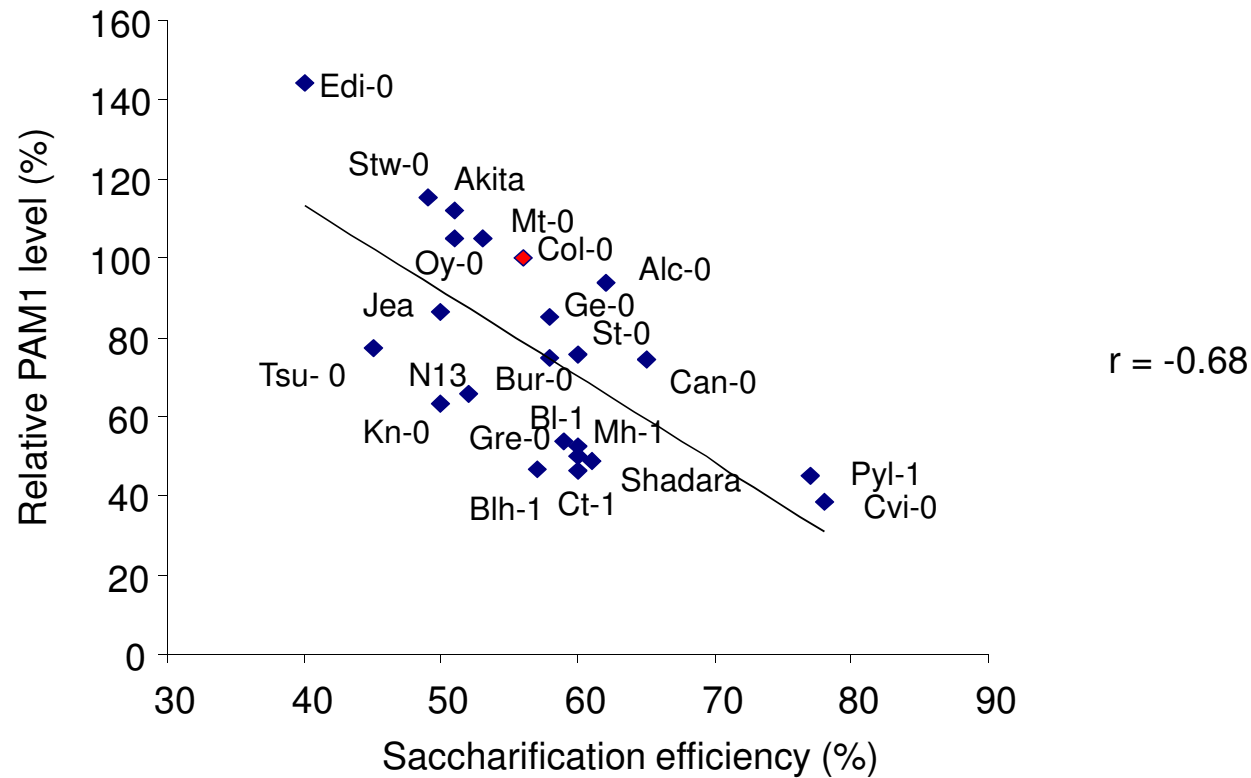
# L'HG de-esterificato forma «egg-boxes» in presenza di calcio





# Alta saccarificabilità di piante con ridotto contenuto di JHG de-esterificato

Collection of 24 ecotypes that maximizes the diversity present among a worldwide set of 265 accession of *A. thaliana* (McKhann et al., (2004) Plant journal 38:193-202)

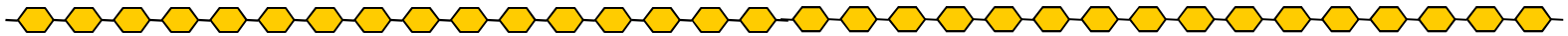


**Demethylesterified HGA is a quantitative trait for the identification of natural variants with high saccharification efficiency**



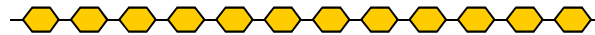
# Poligalatturonasi (PG) secrete dai patogeni degradano completamente l'HG

HG



oligogalatturonidi  
(OG)

$10 < n < 14$



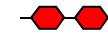
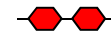
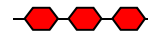
PG



PG

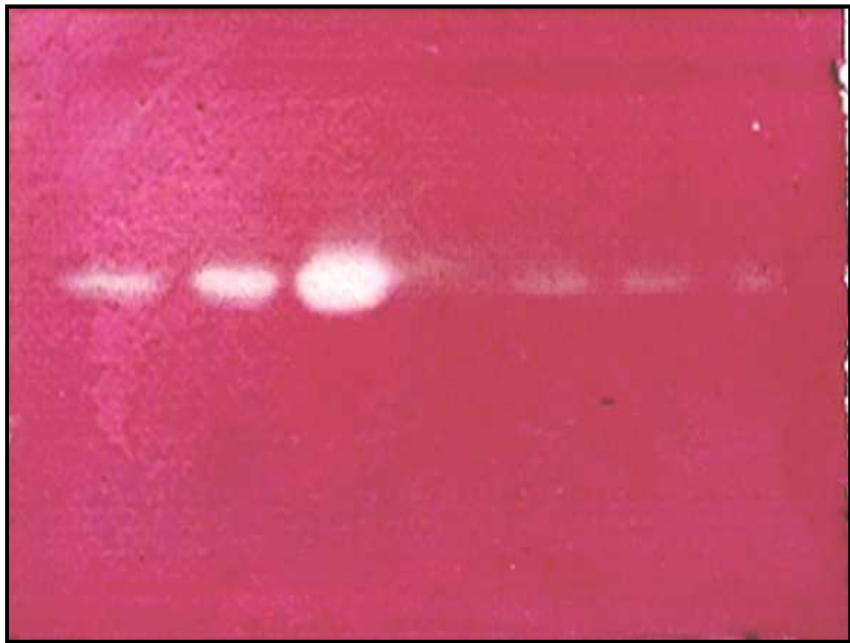


Tri-, di-, mono-  
galatturonidi



# Espressione in pianta di una PG di *Aspergillus niger* con ridotta attività

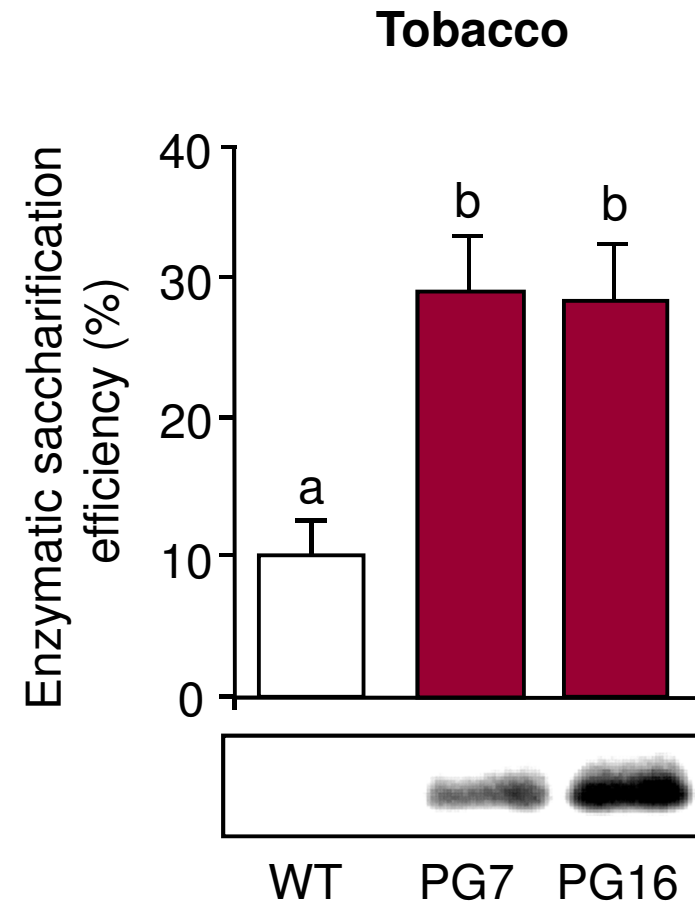
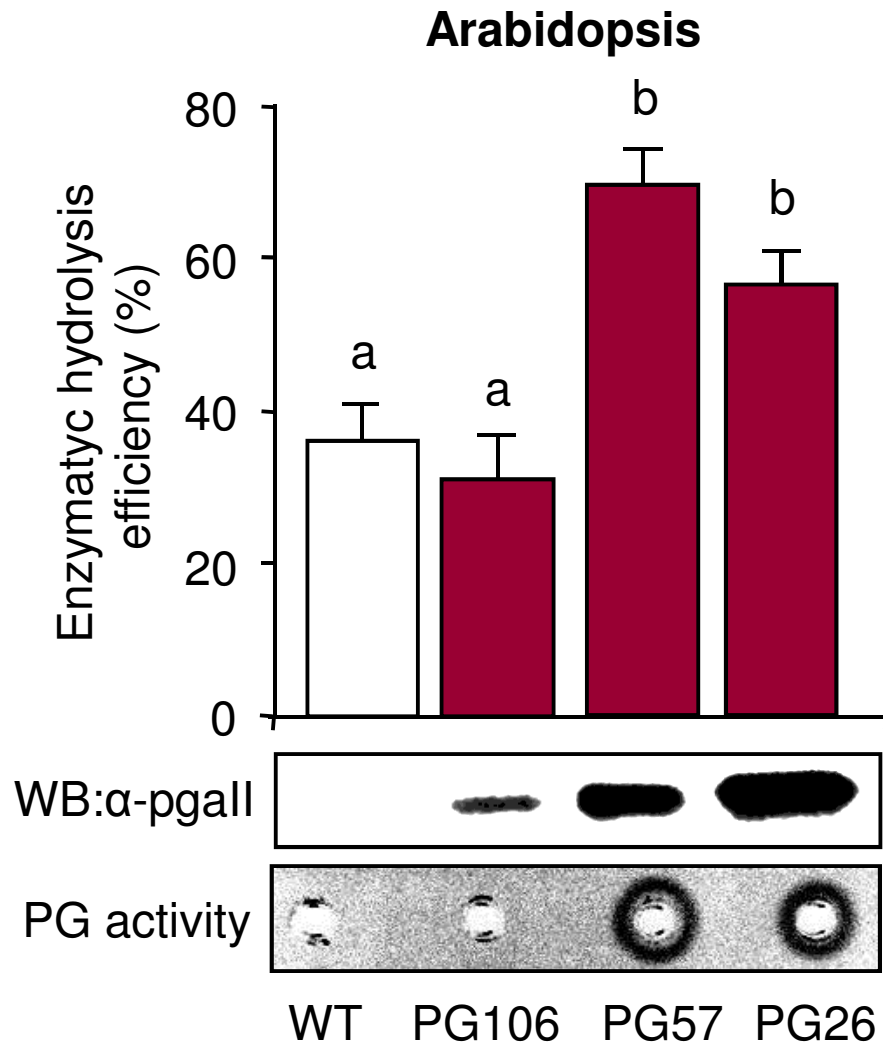
AnPGII nativa                      AnPGII mutata  
-----                                      -----  
2    4    10                      25    25    25    ng di proteina



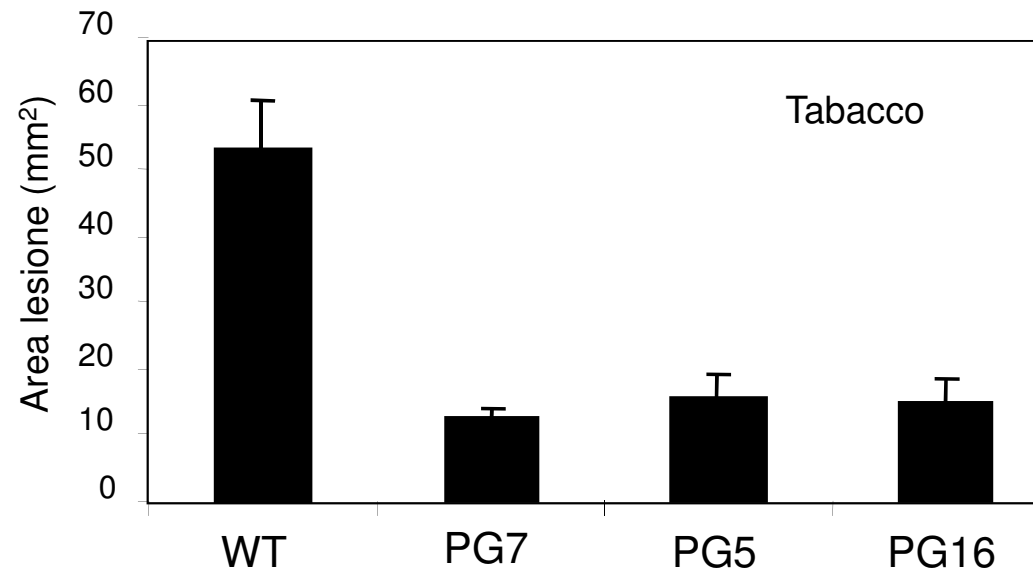
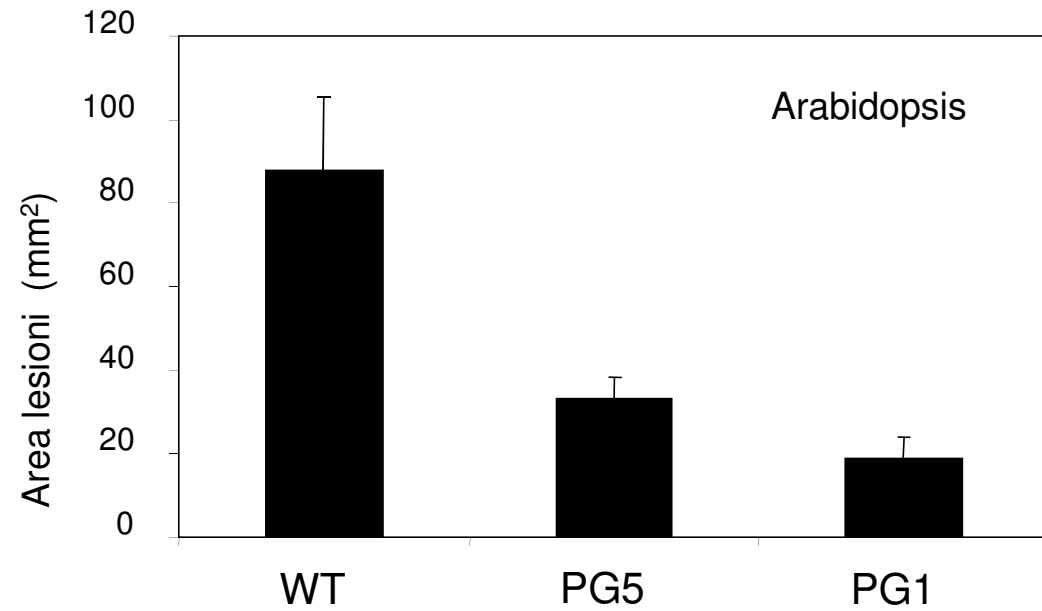
PG mutata = 25 RGU/mg  
PG nativa = 2000 RGU/mg

Isoelettrofocalizzazione

# Le piante PG mostrano aumentata efficienza di saccarificazione



## Le piante PG sono resistenti a *B. cinerea*





## Piante transgeniche che esprimono una PG fungina hanno crescita ridotta



WT

PG5

PG1



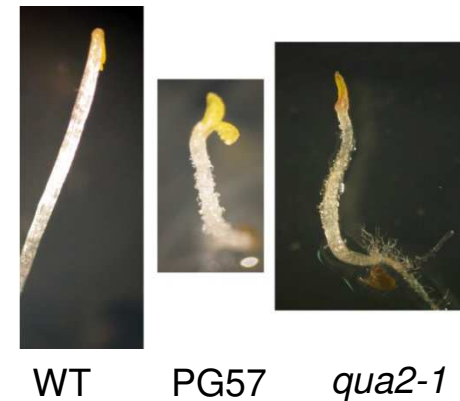
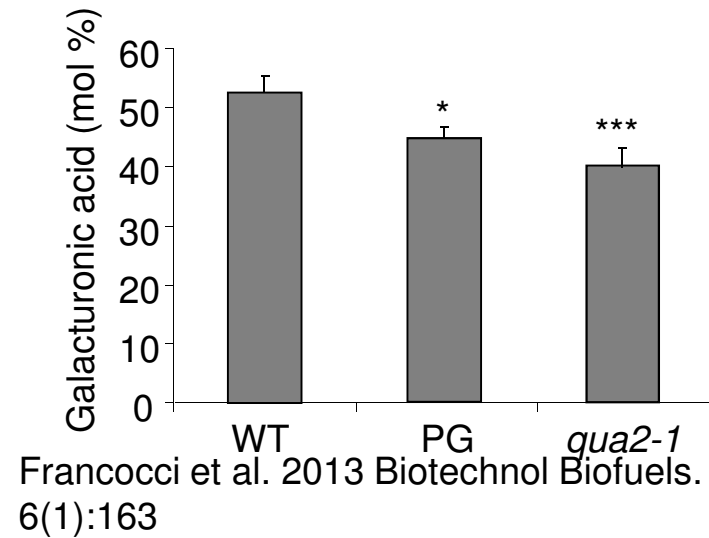
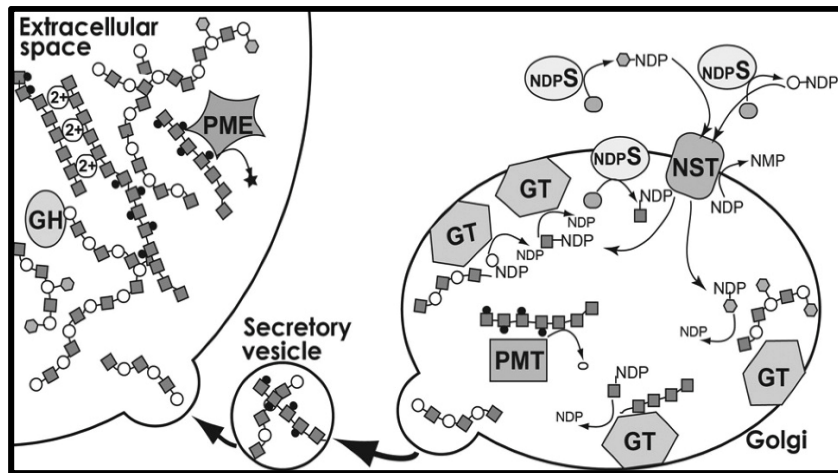
WT

PG5

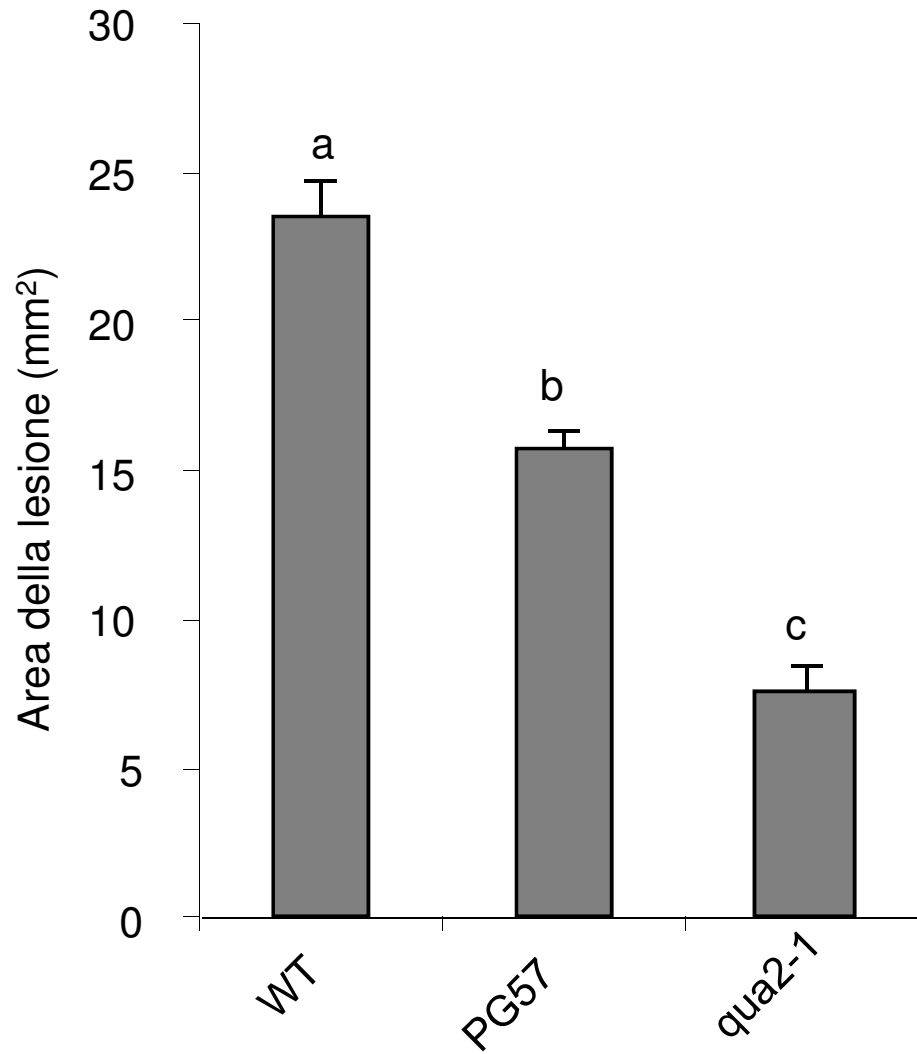
PG7

PG16

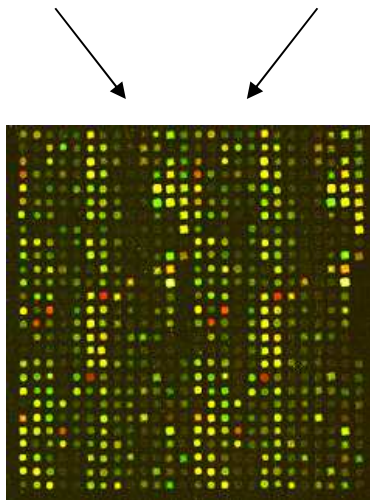
# The *quasimodo2-1* mutant has defects similar to those of PG plants



## *quasimodo2* è resistente a *B. cinerea*



# Microarray analysis of PG plants



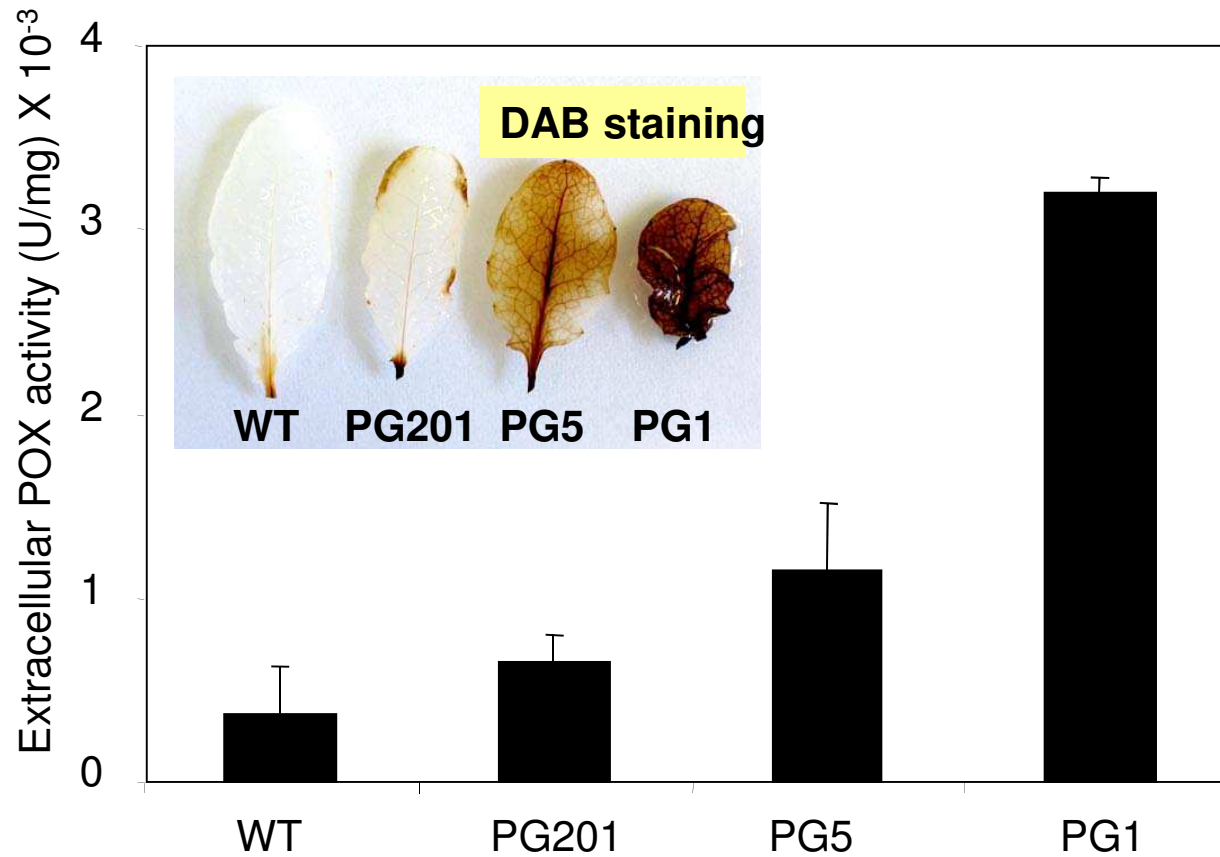
Genes differentially expressed in both 35S:AnPGII #57 and #26 plants, compared to the WT<sup>a</sup>.

#57 <sup>b</sup>	#26 <sup>b</sup>	AGI code	Annotation
3.3	2.4	At1g77510	PDI-LIKE 1-2 (AtPDIL1-2) protein disulfide isomerase
2.8	3.0	<b>At1g76930</b>	<b>EXTENSIN 4 (AtEXT4)</b>
2.8	2.9	At1g76960	unknown protein
2.7	2.7	<b>At5g64120</b>	<b>apoplastic peroxidase AtPRX71/PER71</b>
2.4	1.6	<b>At4g02330</b>	<b>AtPMEPCRB pectinesterase</b>
2.4	2.3	At1g21520	unknown protein
2.2	2.4	At1g08450	CALRETICULIN 3 (CRT3)
2.1	1.9	At5g50460	protein transport protein SEC61 gamma subunit
2.1	1.9	At1g30720	RetOx-like FAD-binding domain-containing protein
1.8	1.8	At4g21620	glycine-rich protein
1.7	1.4	At3g62600	AtERDJ3B; functions in unfolded protein binding
1.5	1.4	At1g19380	unknown protein
1.4	1.4	<b>At1g08830</b>	<b>COPPER/ZINC SUPEROXIDE DISMUTASE 1 (CSD1)</b>
1.4	2.2	At2g38870	serine-type endopeptidase inhibitor
1.3	1.5	At1g72070	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein
1.3	1.7	At1g71697	CHOLINE KINASE 1 (ATCK1)
-2.1	-1.6	At3g52500	aspartyl protease
-1.9	-1.6	At3g47340	GLUTAMINE-DEPENDENT ASPARAGINE SYNTHASE 1 (ASN1)
-1.7	-1.4	At3g15570	phototropic-responsive NPH3 family protein
-1.6	-1.7	At1g25550	MYB family transcription factor

<sup>a</sup> Differentially expressed transcripts were identified using Limma R package using a False Discovery Rate < 0.05 and module of logged fold change (FC) on base 2  $|\text{Log}_2\text{FC}| \geq 1.0$ .

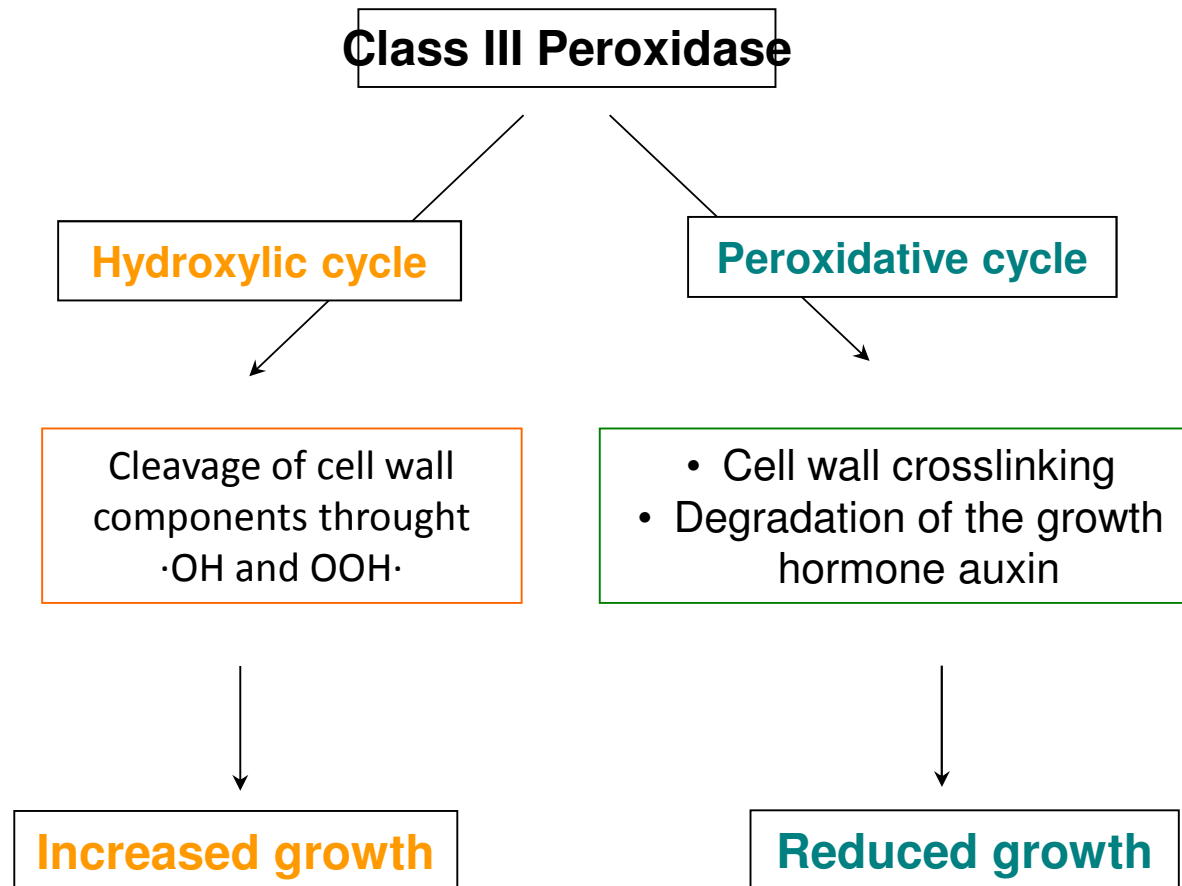
<sup>b</sup>  $\text{Log}_2\text{FC}$  of the expression in the transgenic line compared to the WT.

# Le piante PG hanno elevati livelli di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e di attività perossidasi

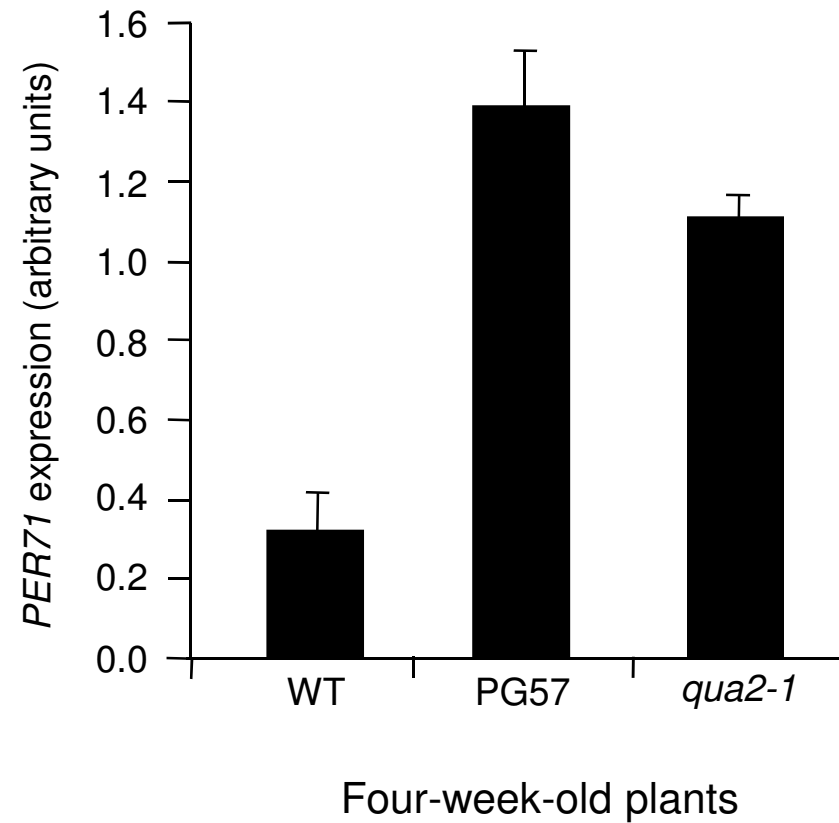


Ferrari *et al.*, 2008. *Plant Physiol.*

# Perossidasi di Classe III

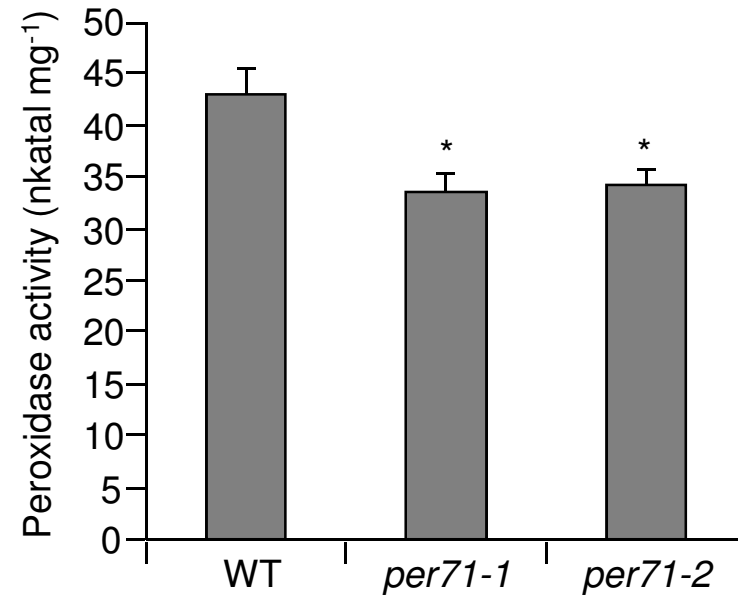
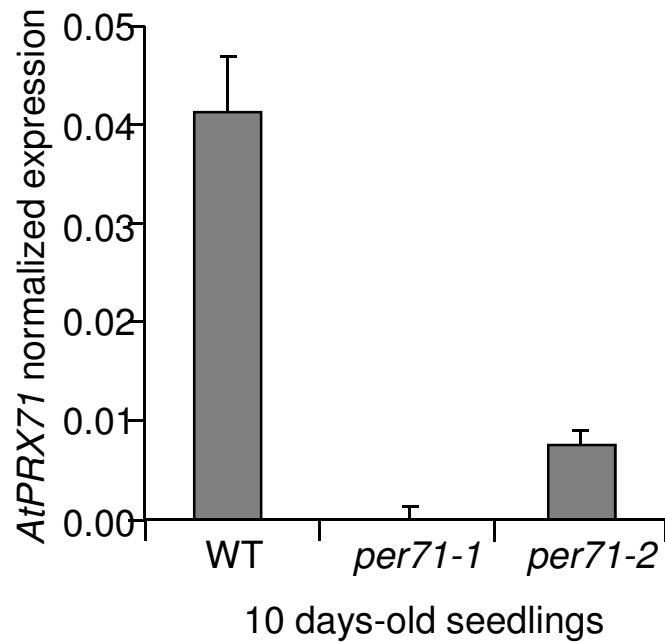
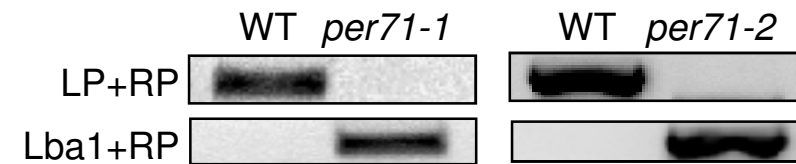
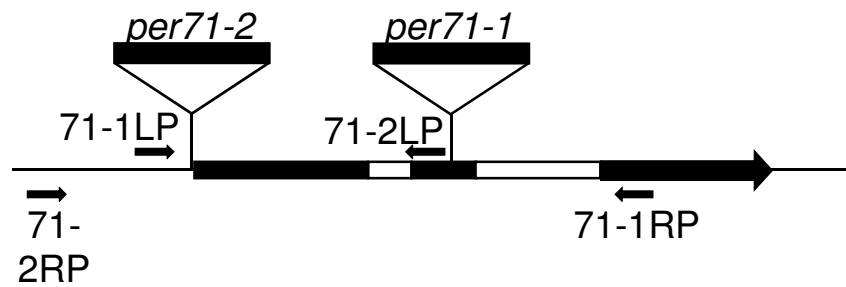


# ELEVATA ESPRESSIONE DI *PER71* IN PIANTE PG E *qua2-1*





## Due mutanti inserzionali *per71*



# I mutanti *per71* mostrano aumentata biomassa

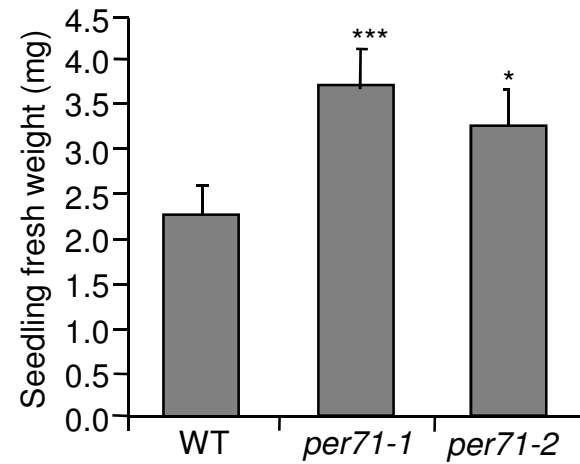
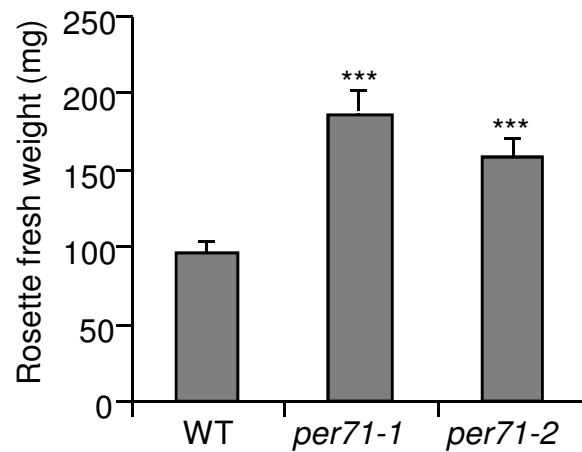
Three-week-old plants grown on soil



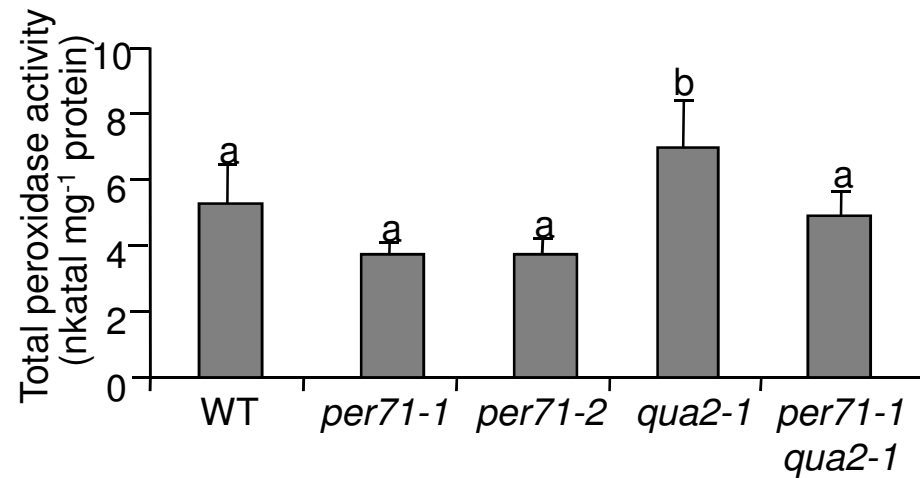
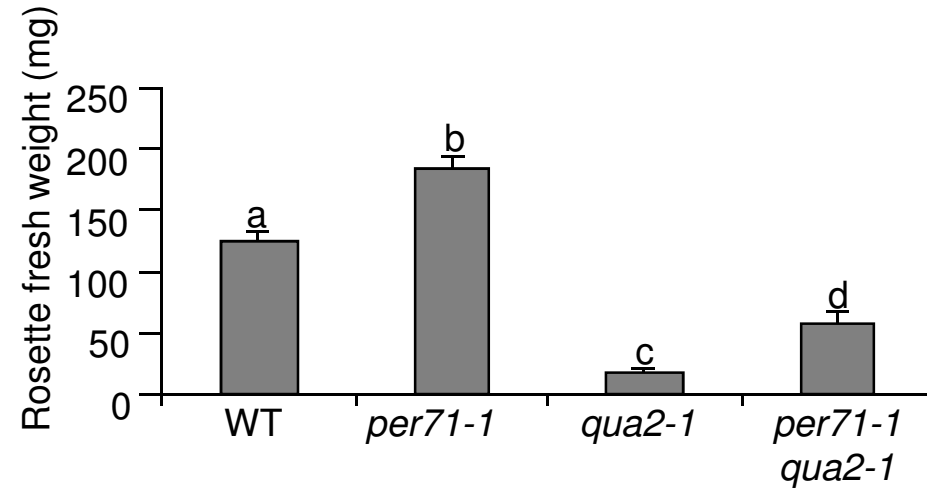
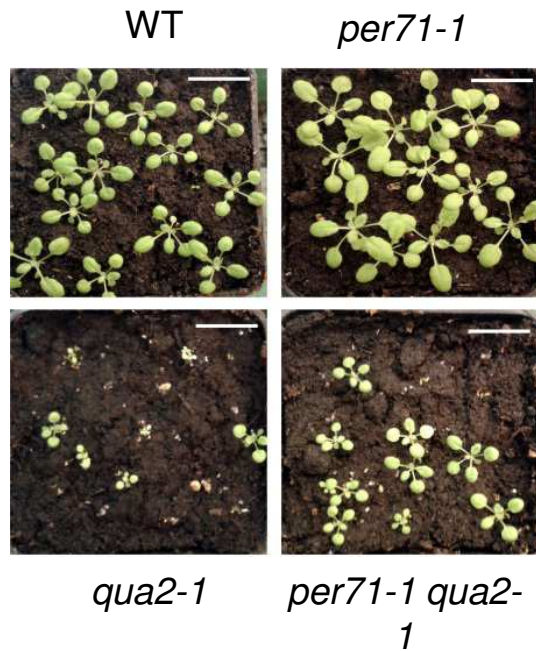
WT

*per71-1*

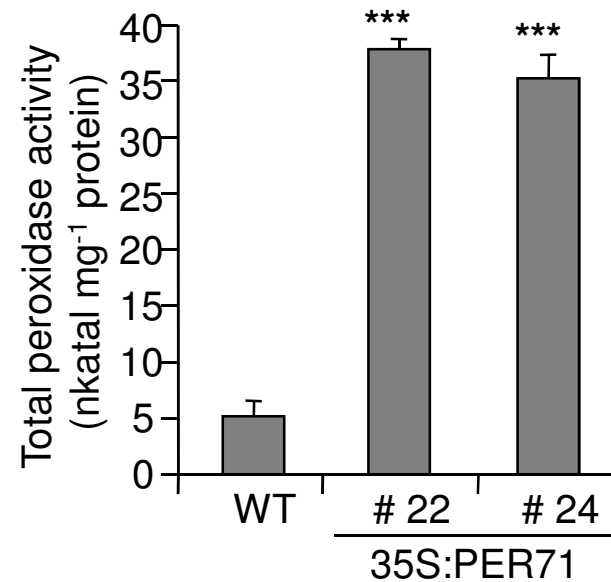
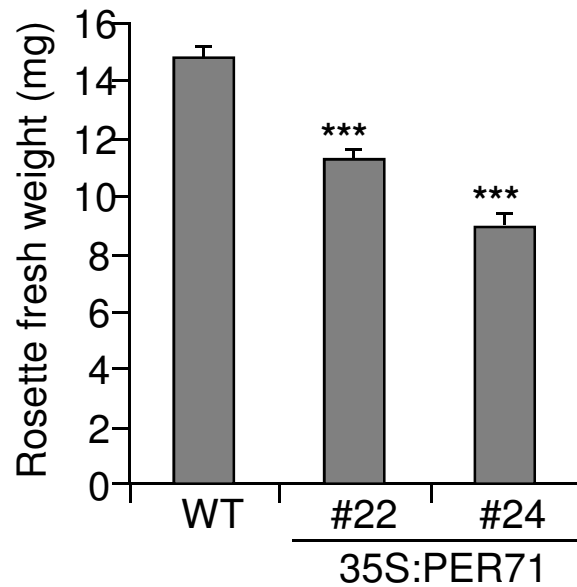
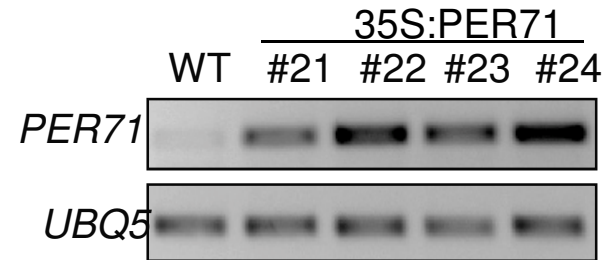
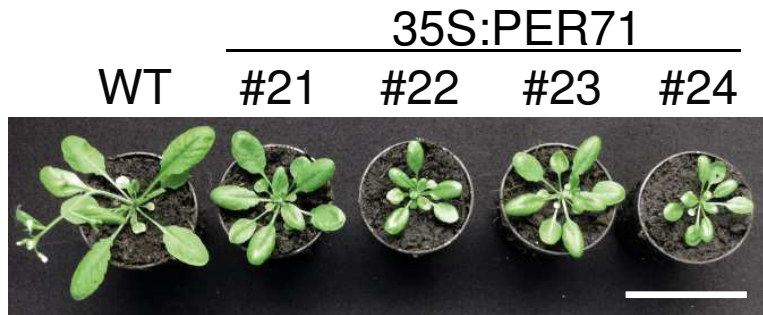
*per71-2*



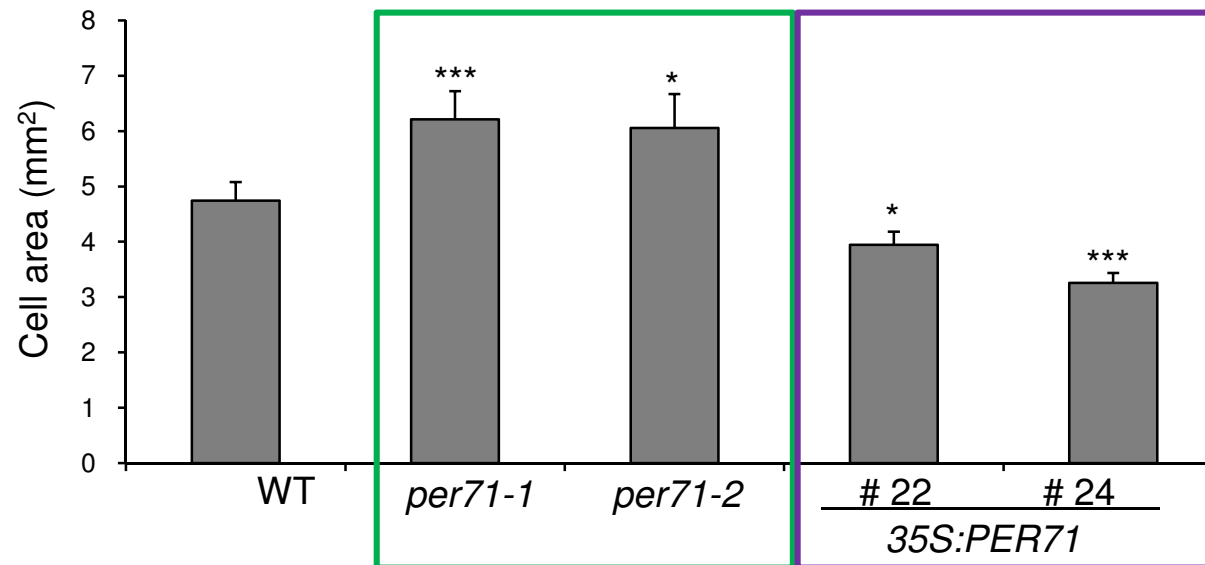
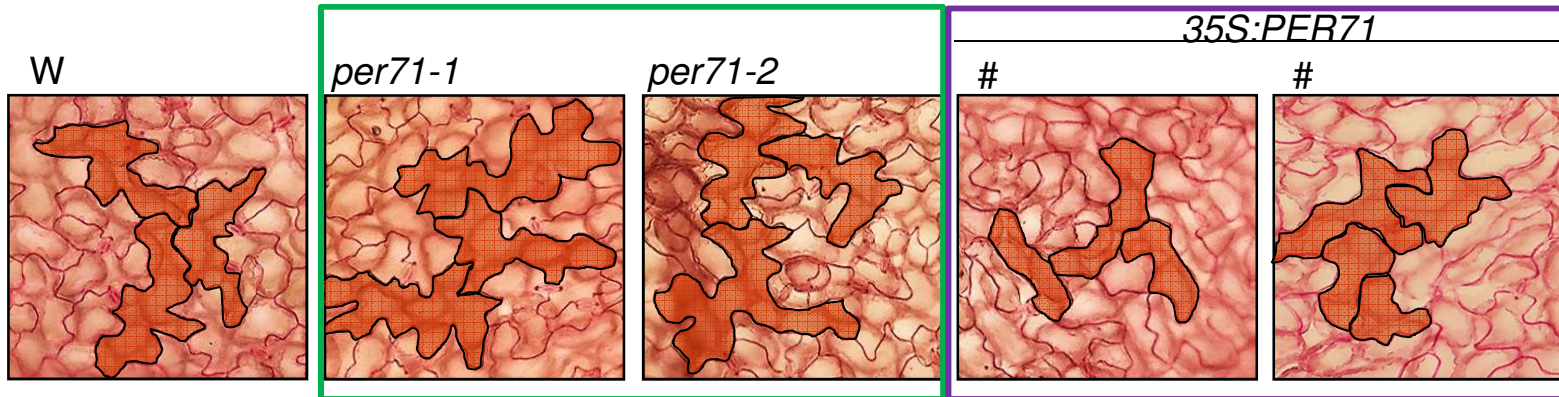
# *PER71* contribuisce alla ridotta crescita del mutante *qua2-1*



# La sovraespressione di *PER71* limita la crescita



# PER71 regola negativamente l'espansione cellulare



# PER71 promuove l'accumulo di ROS nelle foglie



WT    *qua2-1*    *per71-1*    *per71-1*  
*qua2-1*



WT    35S:PER71  
#22    #24

**DAB staining**

# Possibile ruolo di PER71 nell'inibizione della crescita in risposta a danno di parete

