

‘Green revolution’ genes encode mutant gibberellin response modulators

**Jinrong Peng^{*}, Donald E. Richards^{*}, 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 | 7



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.

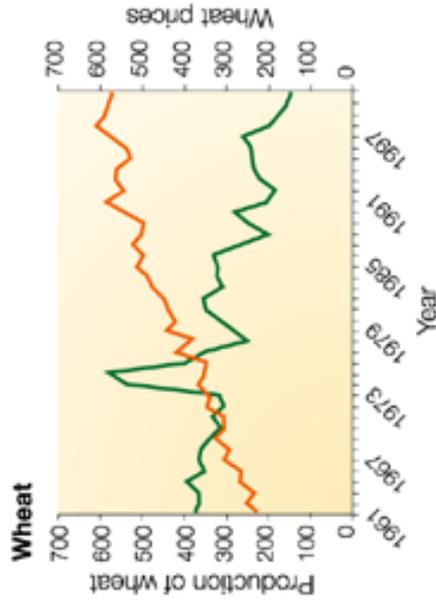
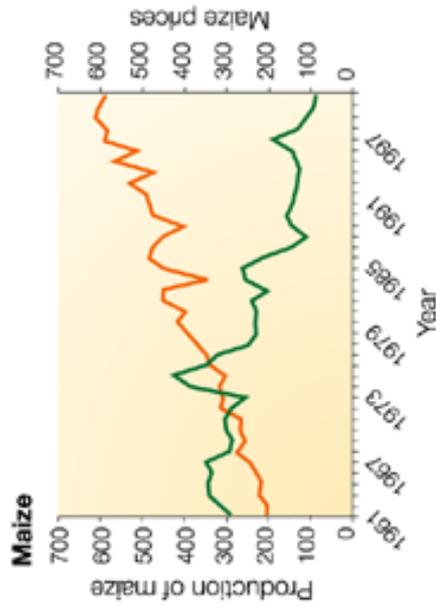
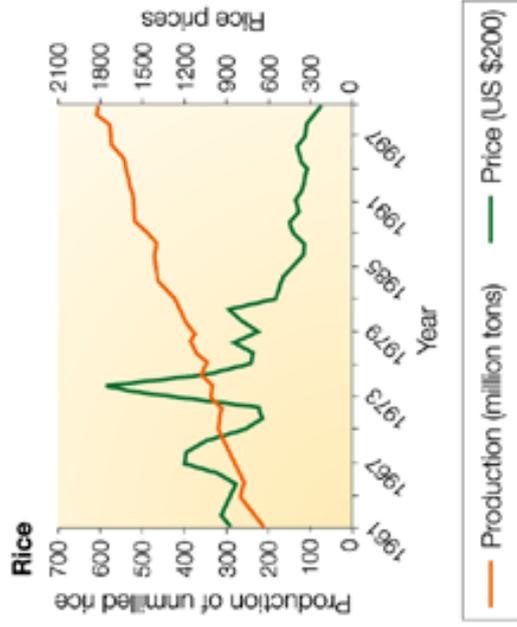
- La selezione genetica presuppone l'esistenza e disponibilità di variabilità genetica, o "biodiversità", di opportuna qualità.
- I fenotipi (genotipi) più idonei vengono scelti ("selezionati") per la riproduzione.
 - Nel passato, tale selezione era esercitata da parte degli agricoltori.
 - Successivamente, 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.



— Production (million tons) — Price (US \$200)

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

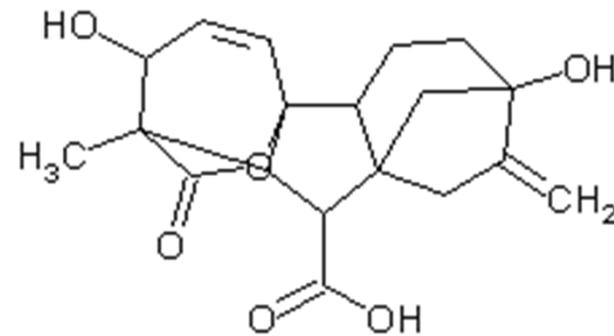


99% of wheat grown worldwide

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

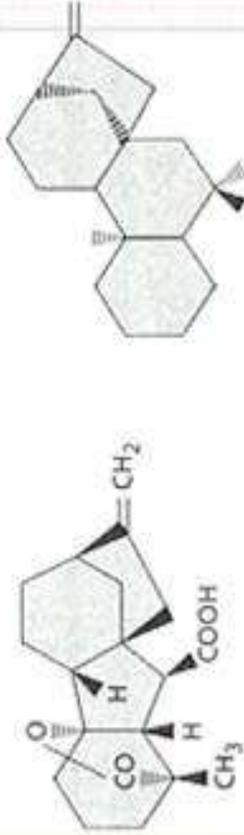
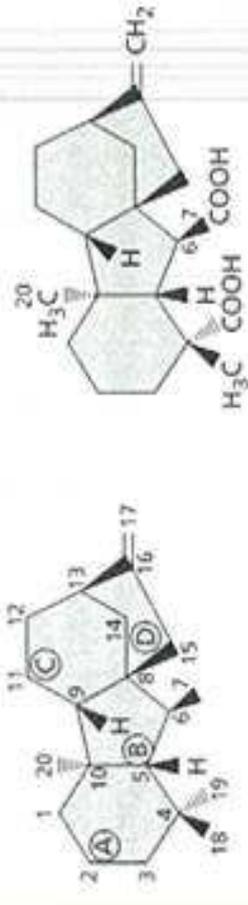
Rice leaf sheath bioassay for gibberellin



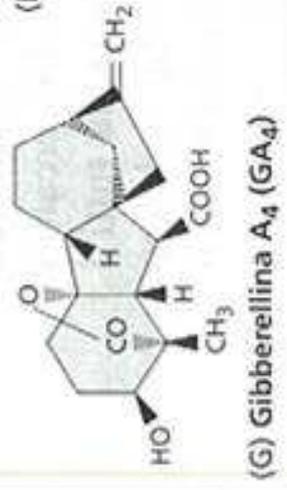
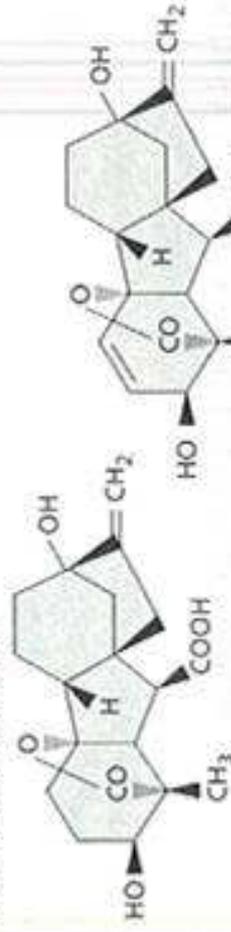
Increasing GA_3 concentration



STRUTTURE DI GIBBERELLINE RAPPRESENTATIVE



GIBBERELLINE ATTIVE



GIBBERELLINE INATTIVE

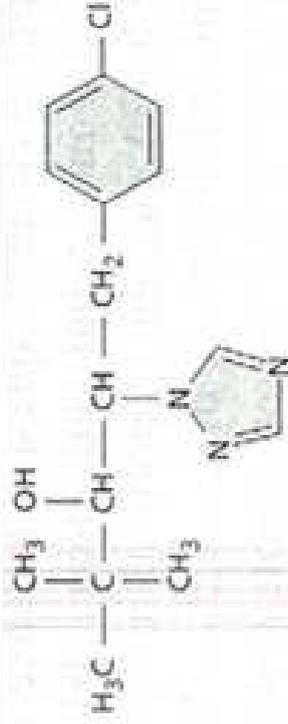


(H) GA₂₉ (inattive tramite ossidrilazione del C2)

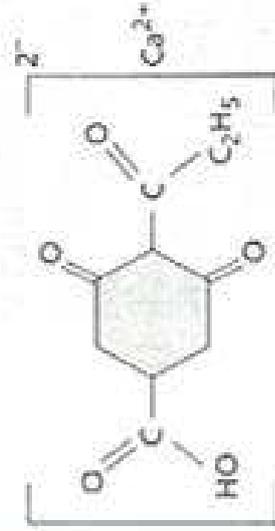
INIBITORI DELLA SINTESI DELLE GIBBERELLINE



(I) AMO-1618

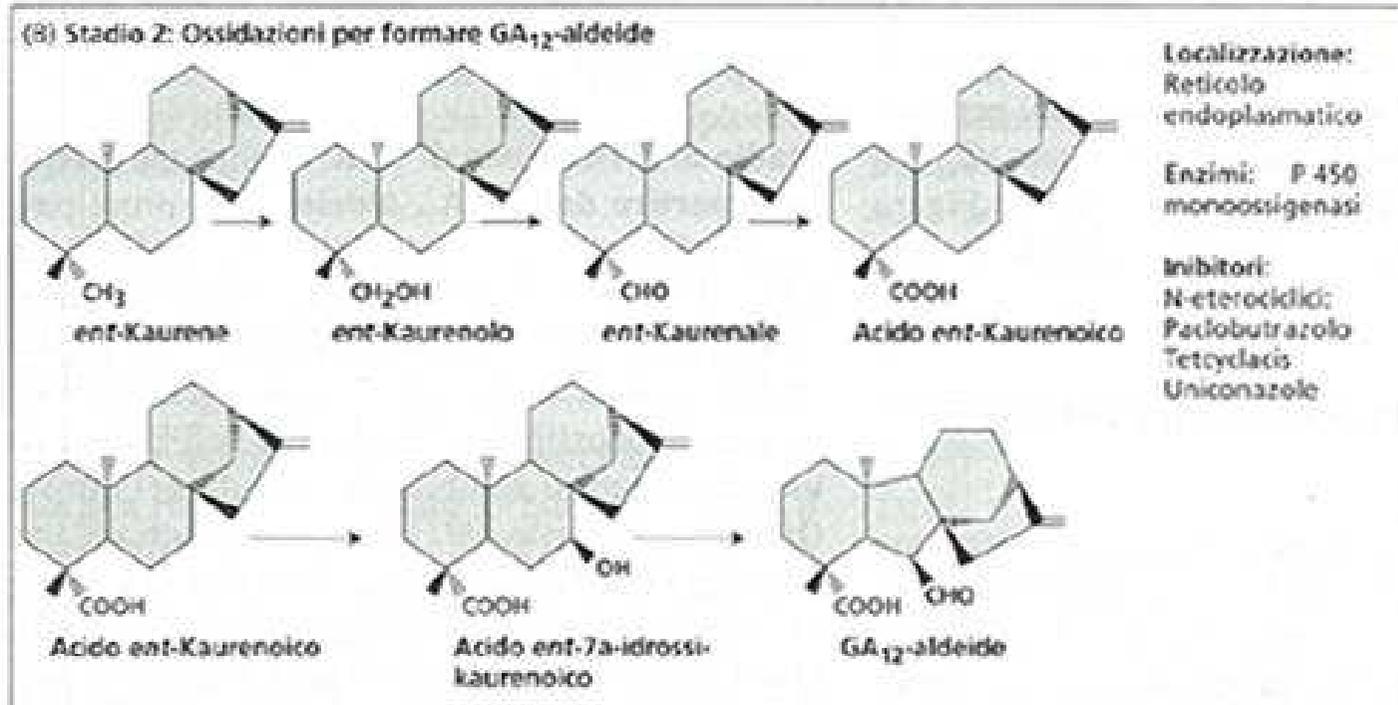
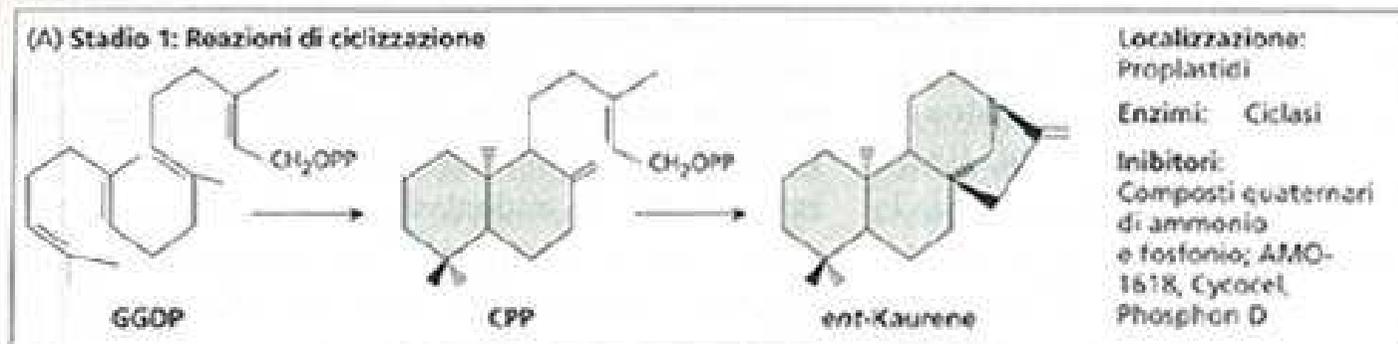


(J) Paclobutrazolo (Bonzi)

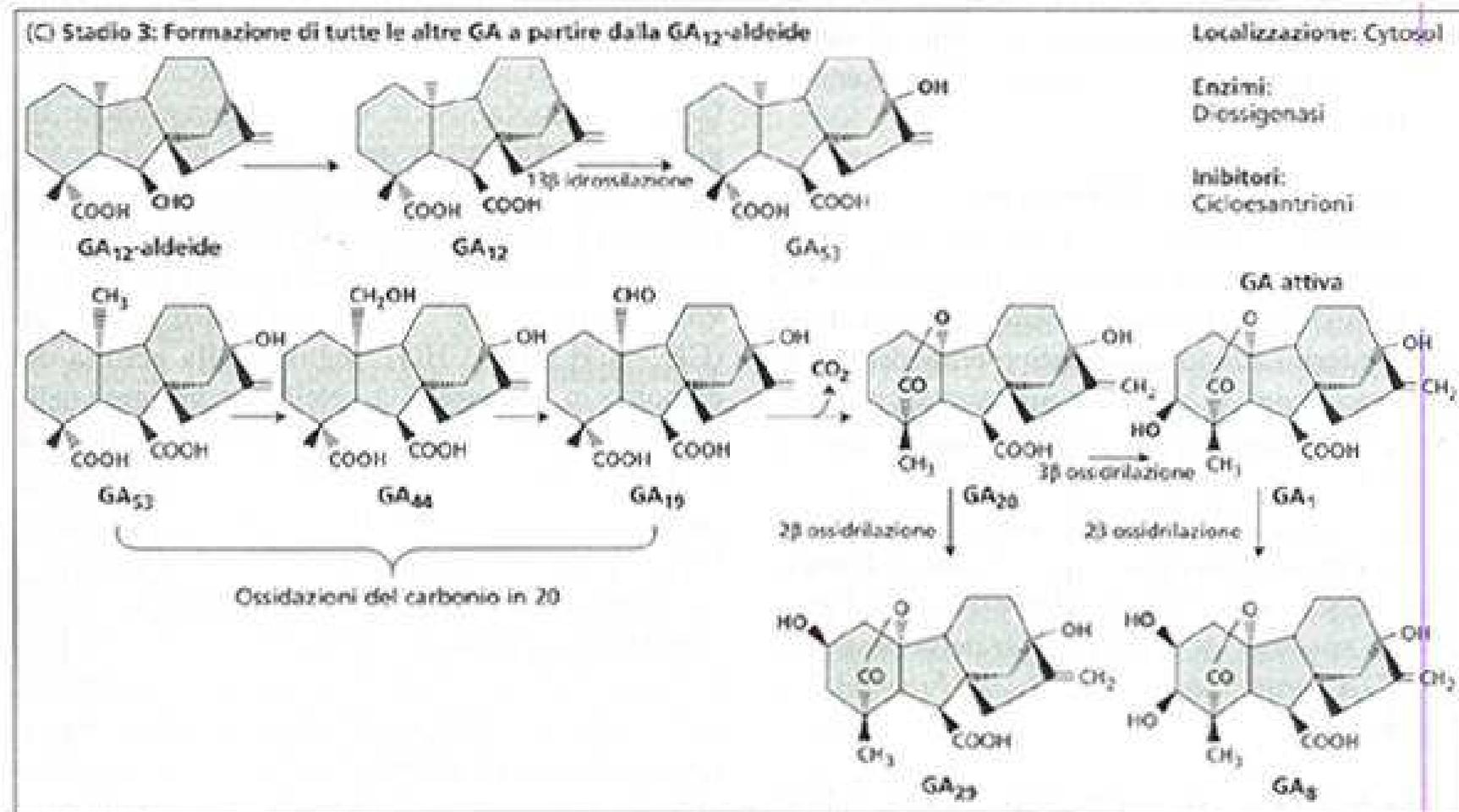


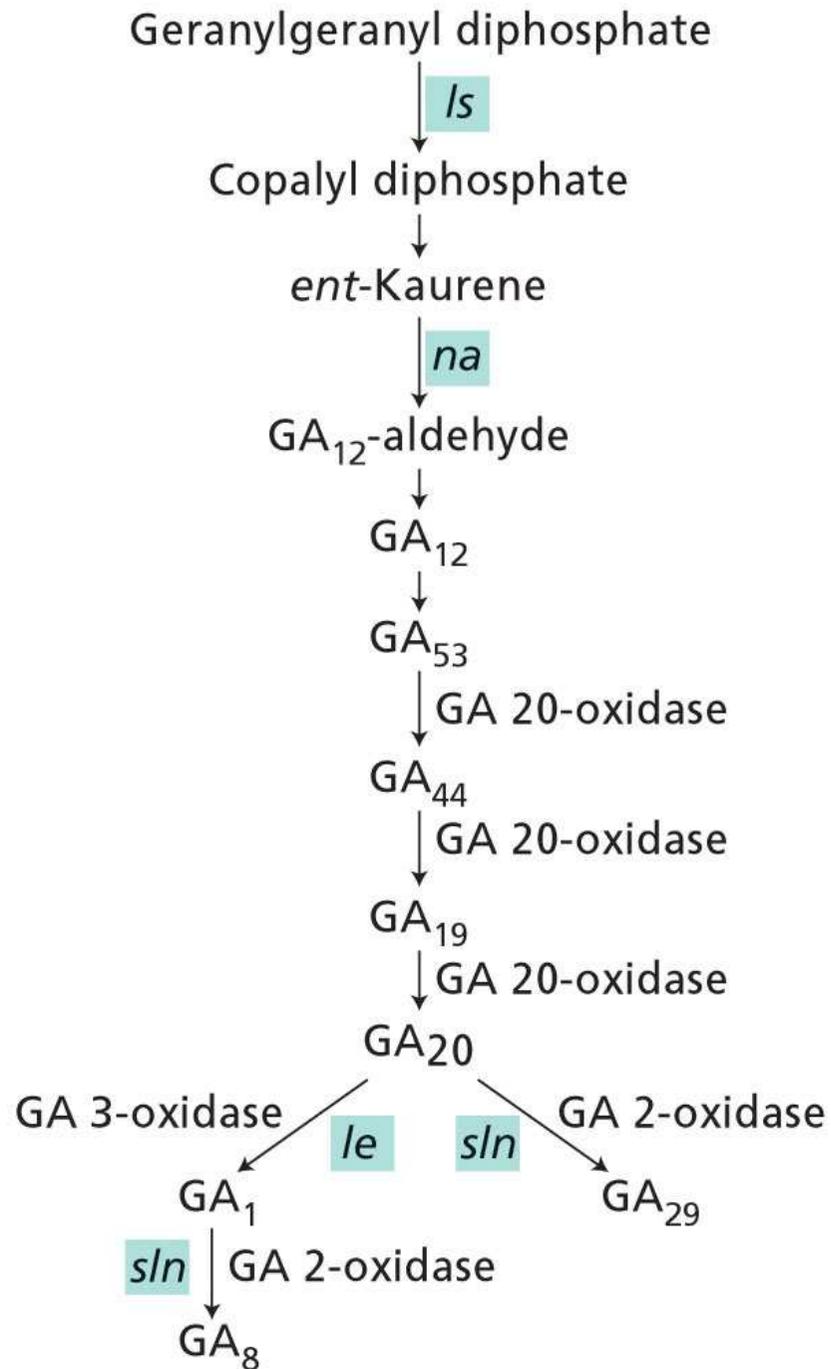
(K) BX-112 (proexadione-calcio)

Biosintesi delle gibberelline (in tessuti in crescita)



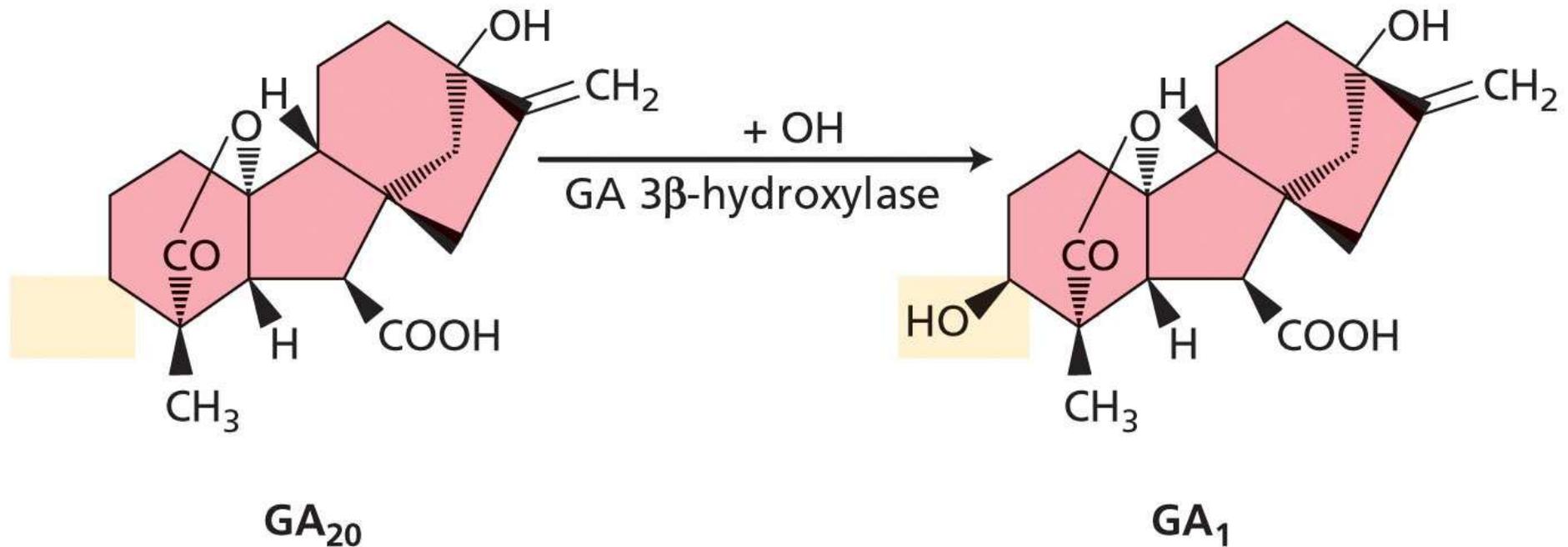
Biosintesi delle gibberelline (in tessuti in crescita)



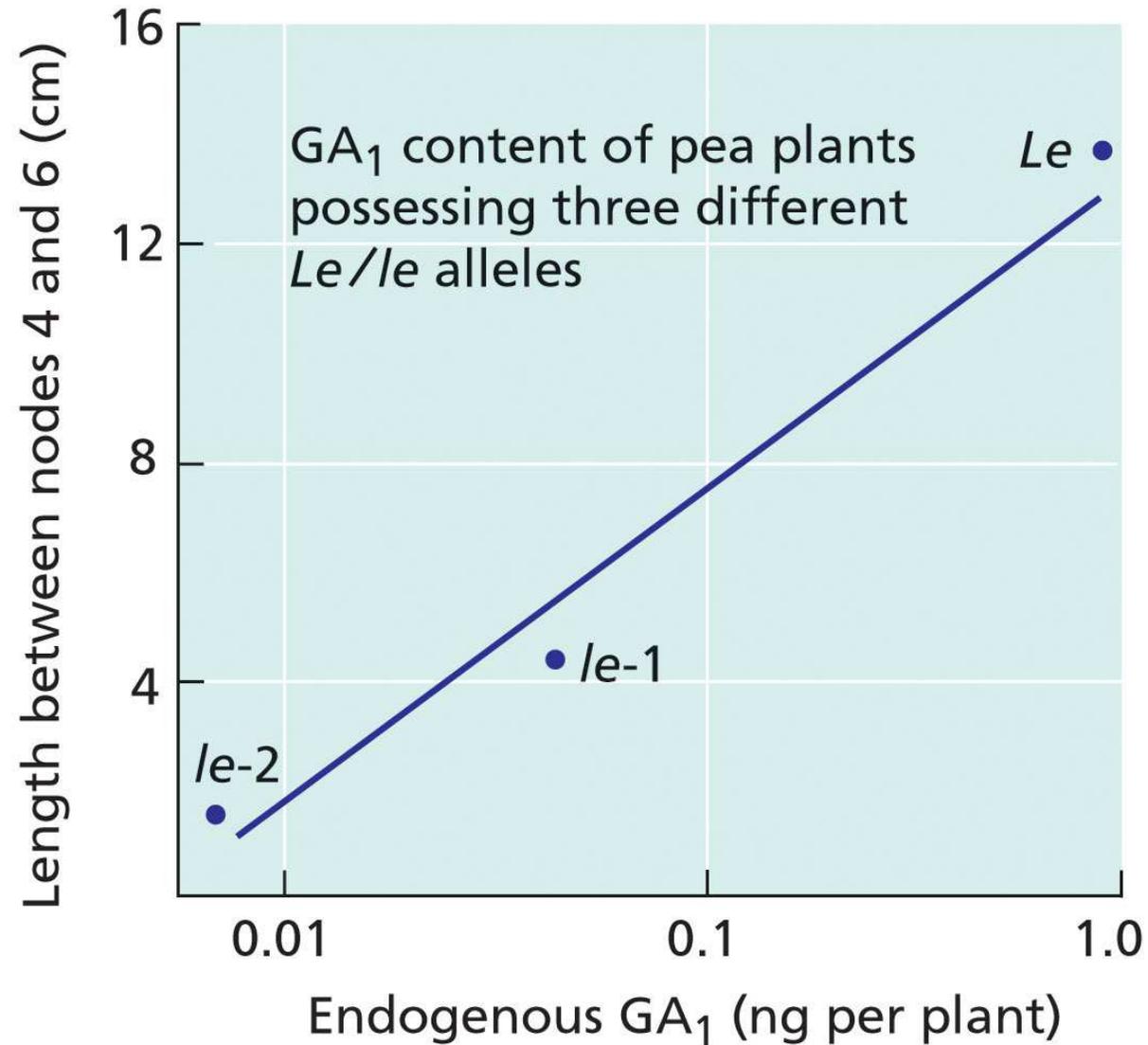


PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 20.7 © 2002 Sinauer Associates, Inc.

GA₁, THE BIOLOGICALLY ACTIVE GIBBERELLIN, IS SYNTHESIZED FROM GA₂₀



GA₁ LEVELS CORRELATE WITH INTERNODE LENGTH



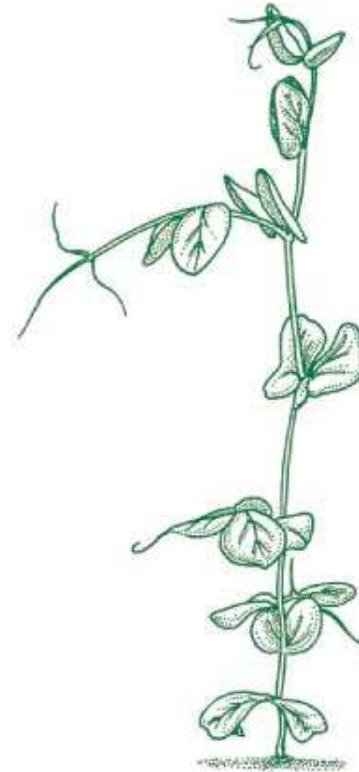
Phenotypes and genotypes of peas with different gibberellin levels



Ultradwarf:
no GAs
nana

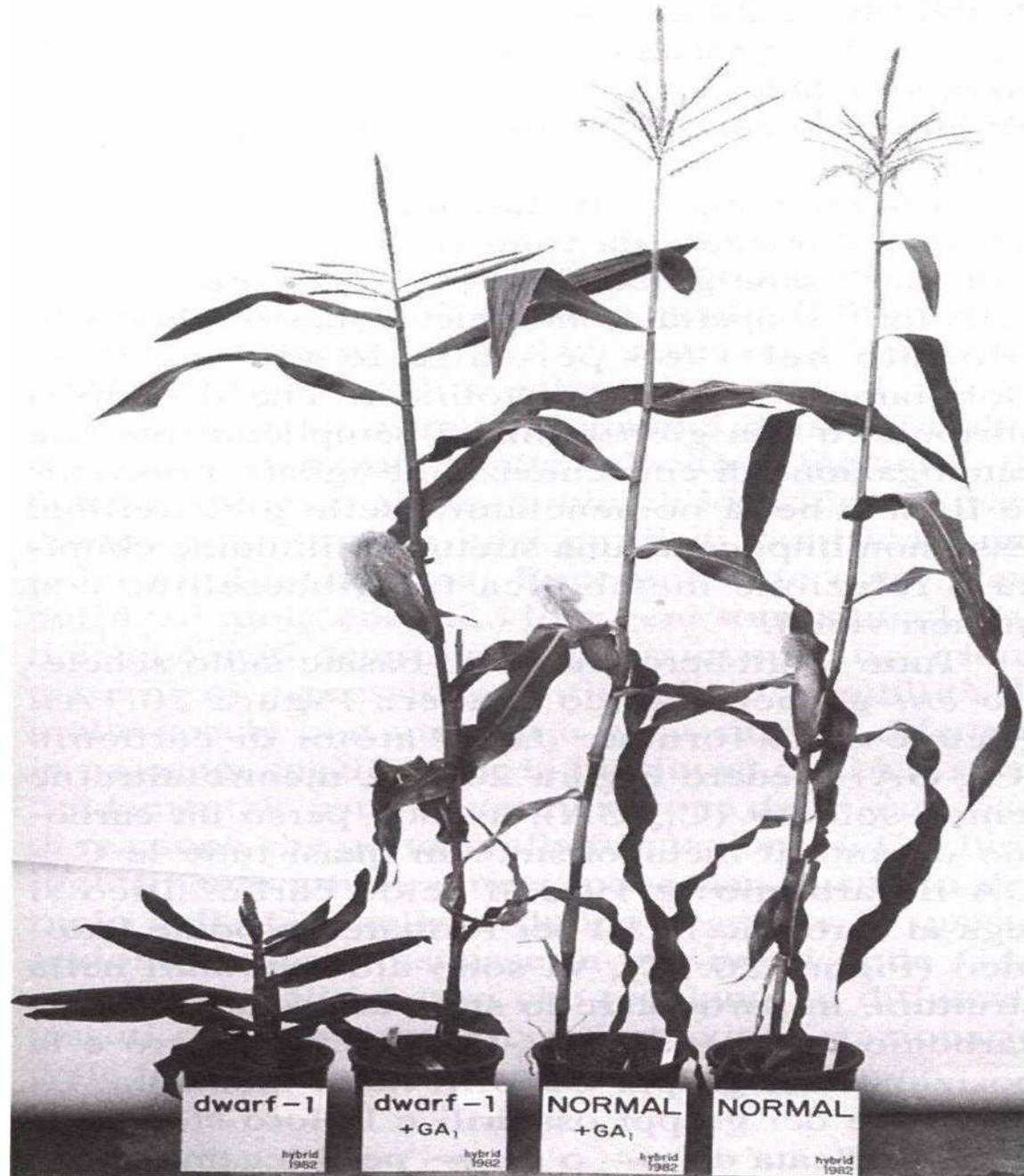


Dwarf:
contains
 GA_{20}
Na le



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 GA₂₀ aumenta con il fotoperiodo)

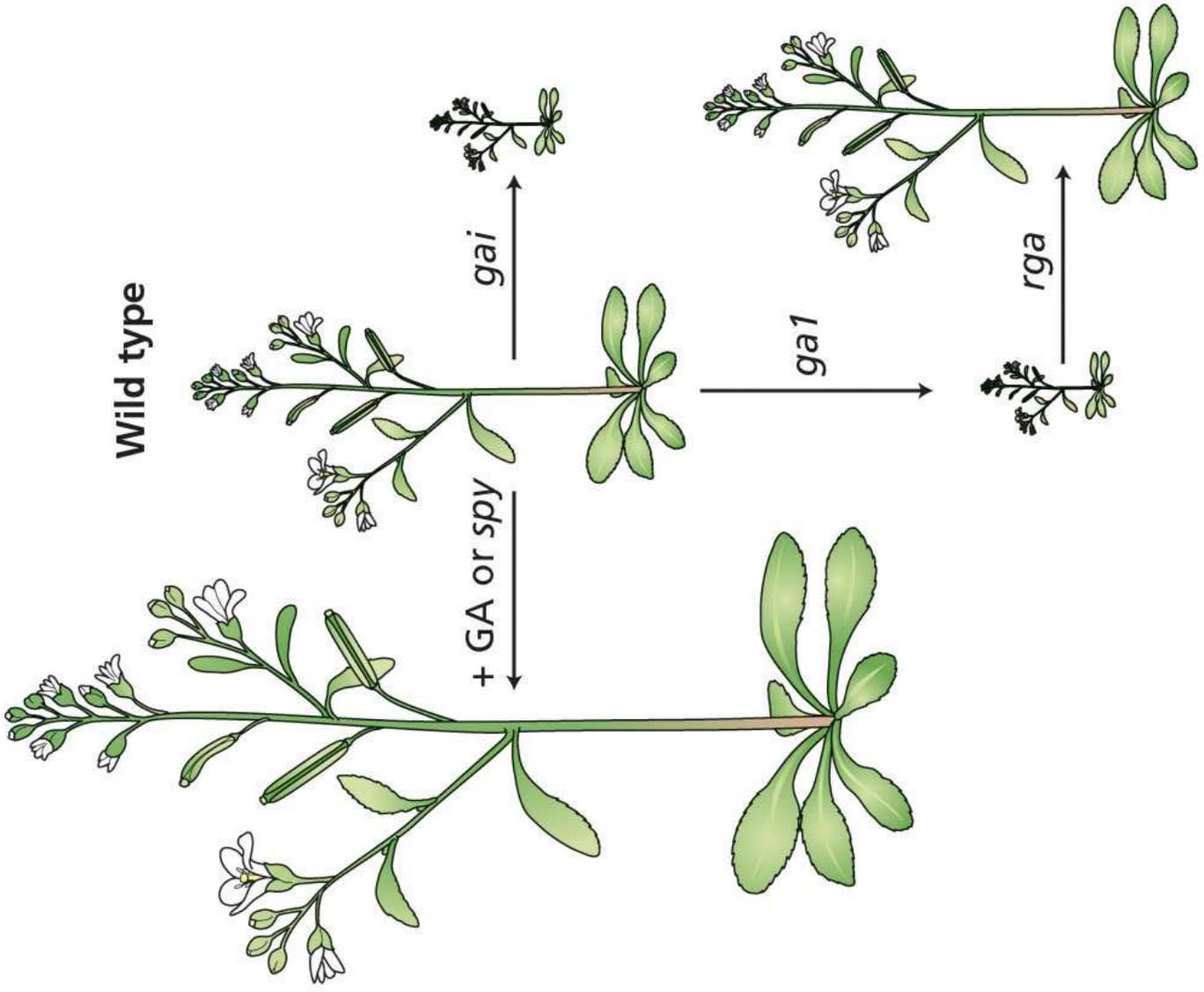
2. Temperatura (le GA possono sostituirsi al freddo nell'induzione della fioritura)

(apice) ac. *ent*-kaurenoico + freddo → GA₉ (+attiva)

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

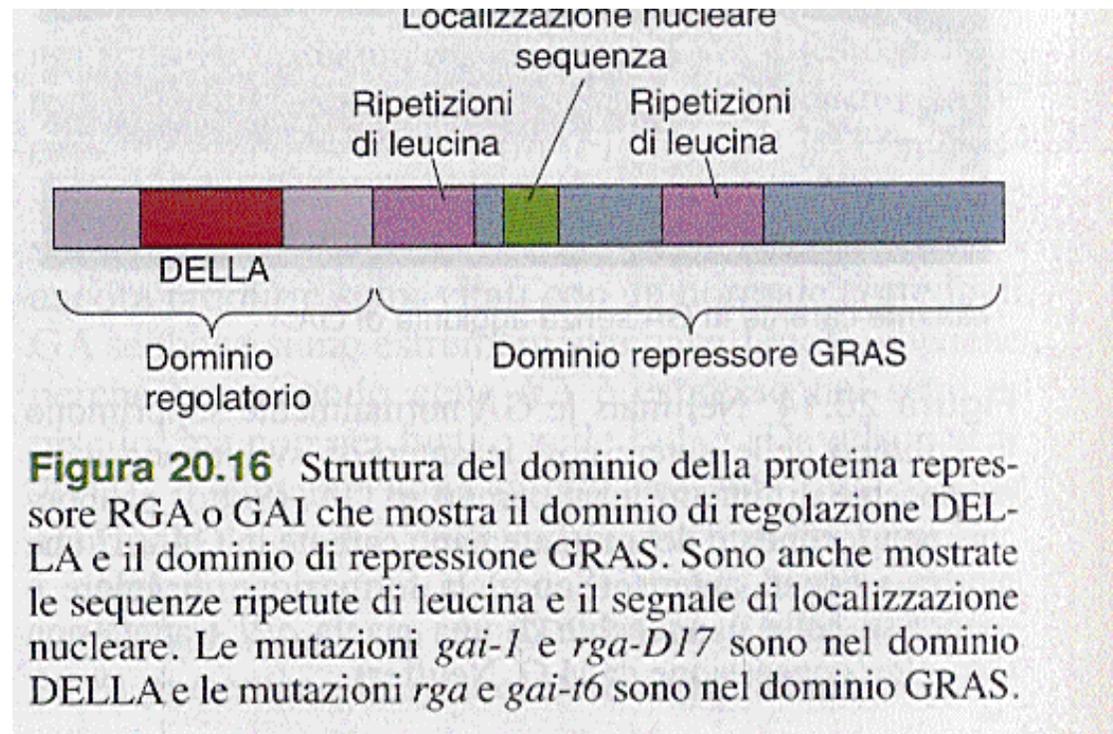
Mutanti di *Arabidopsis* con difetti nella percezione/trasduzione delle gibberelline

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)

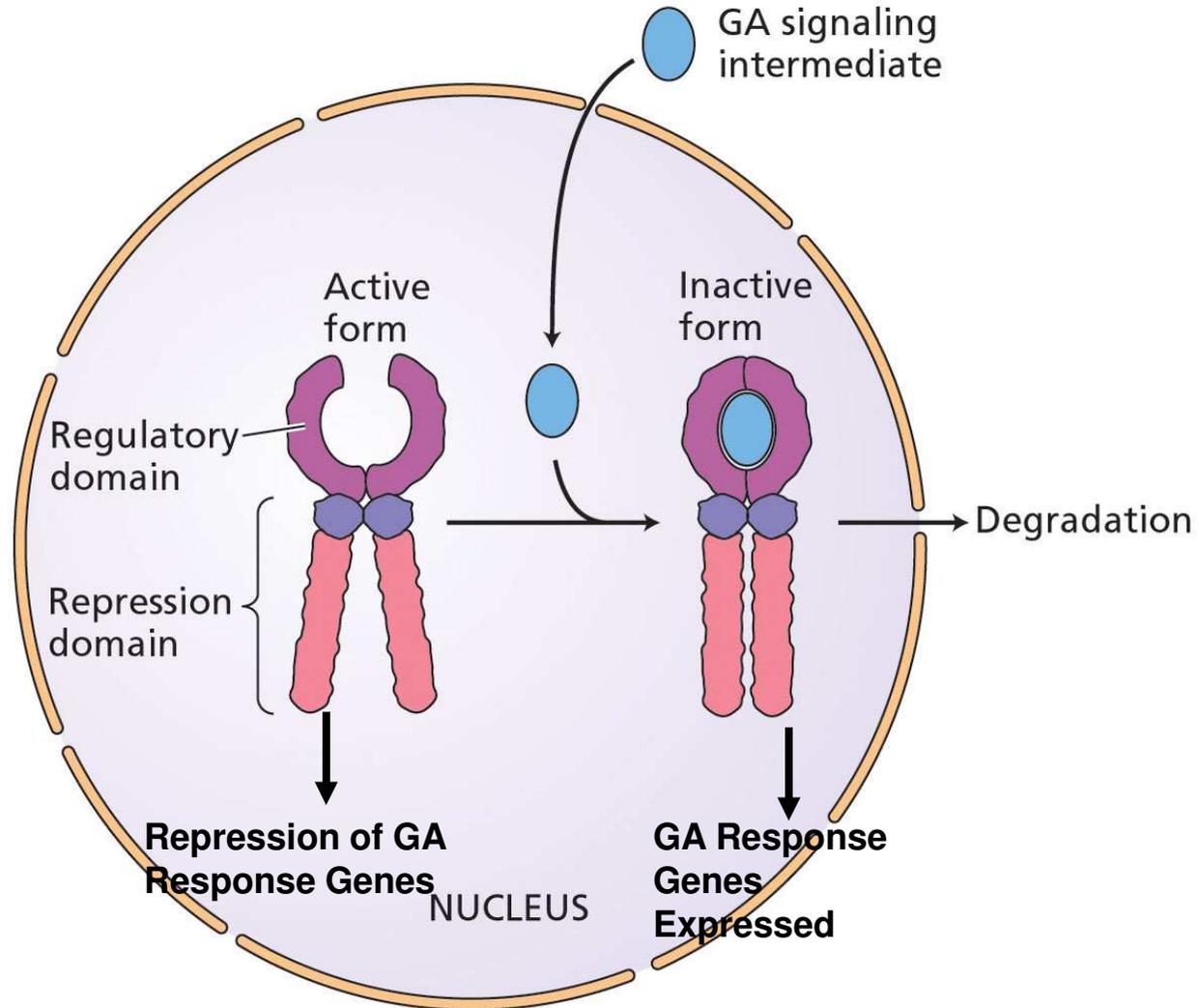


TRASDUZIONE DELLE GIBBERELLINE

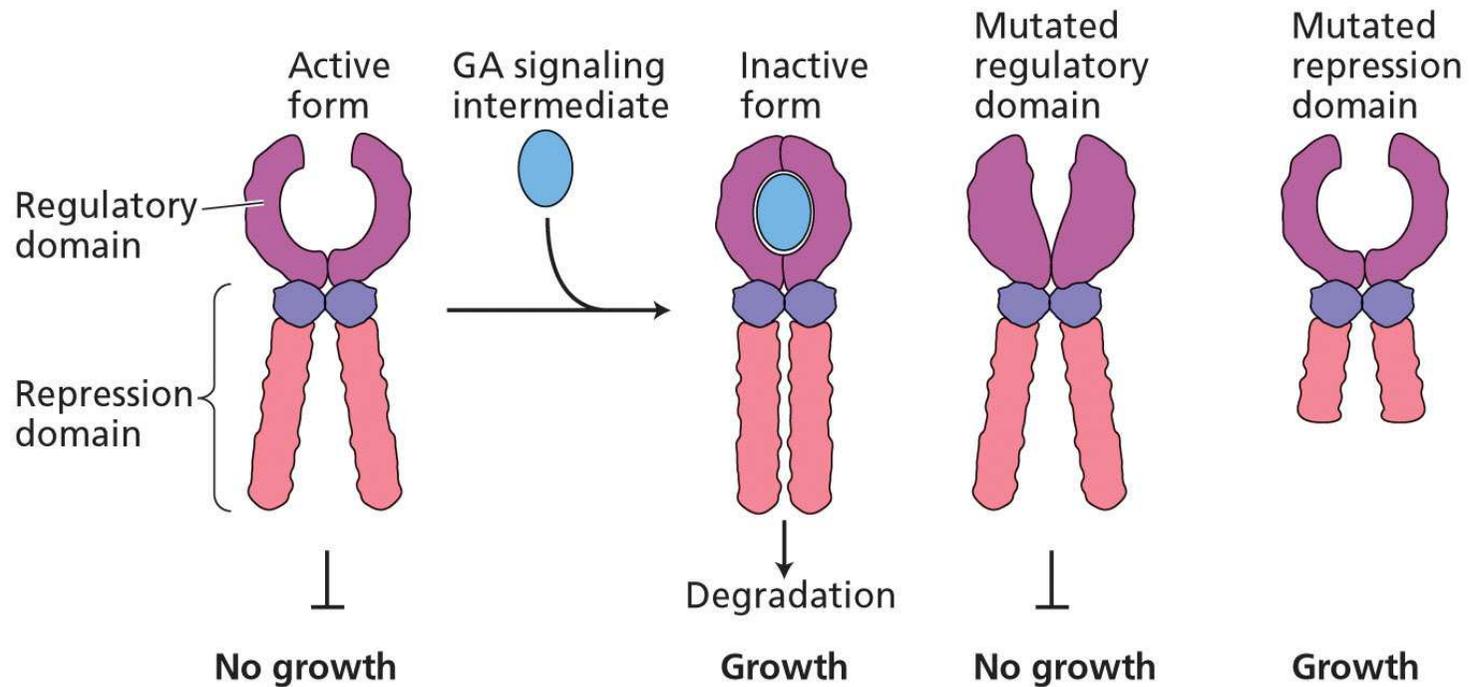
Proteine con dominio DELLA sono regolatori negativi di risposte alle GA

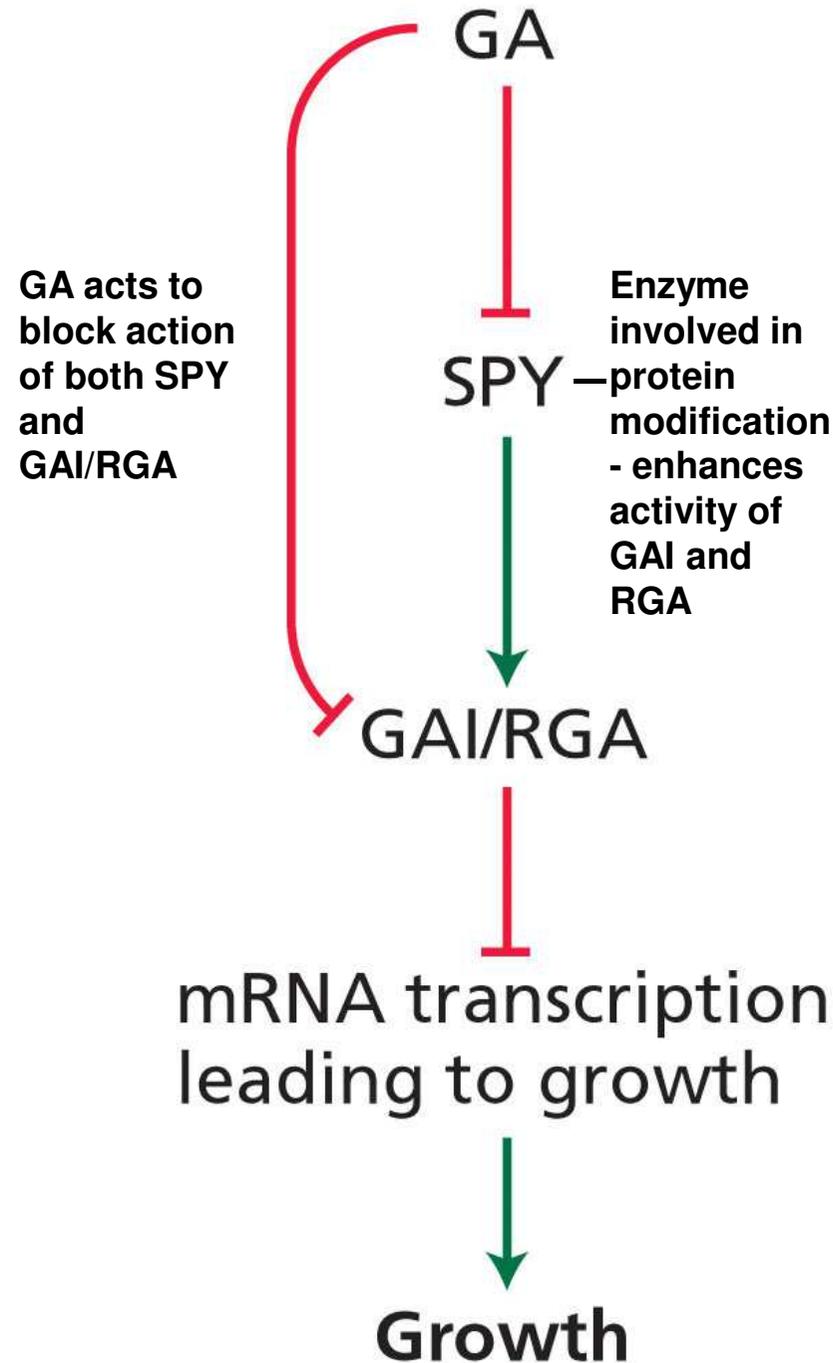


GAI and RGA are related repressor proteins



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

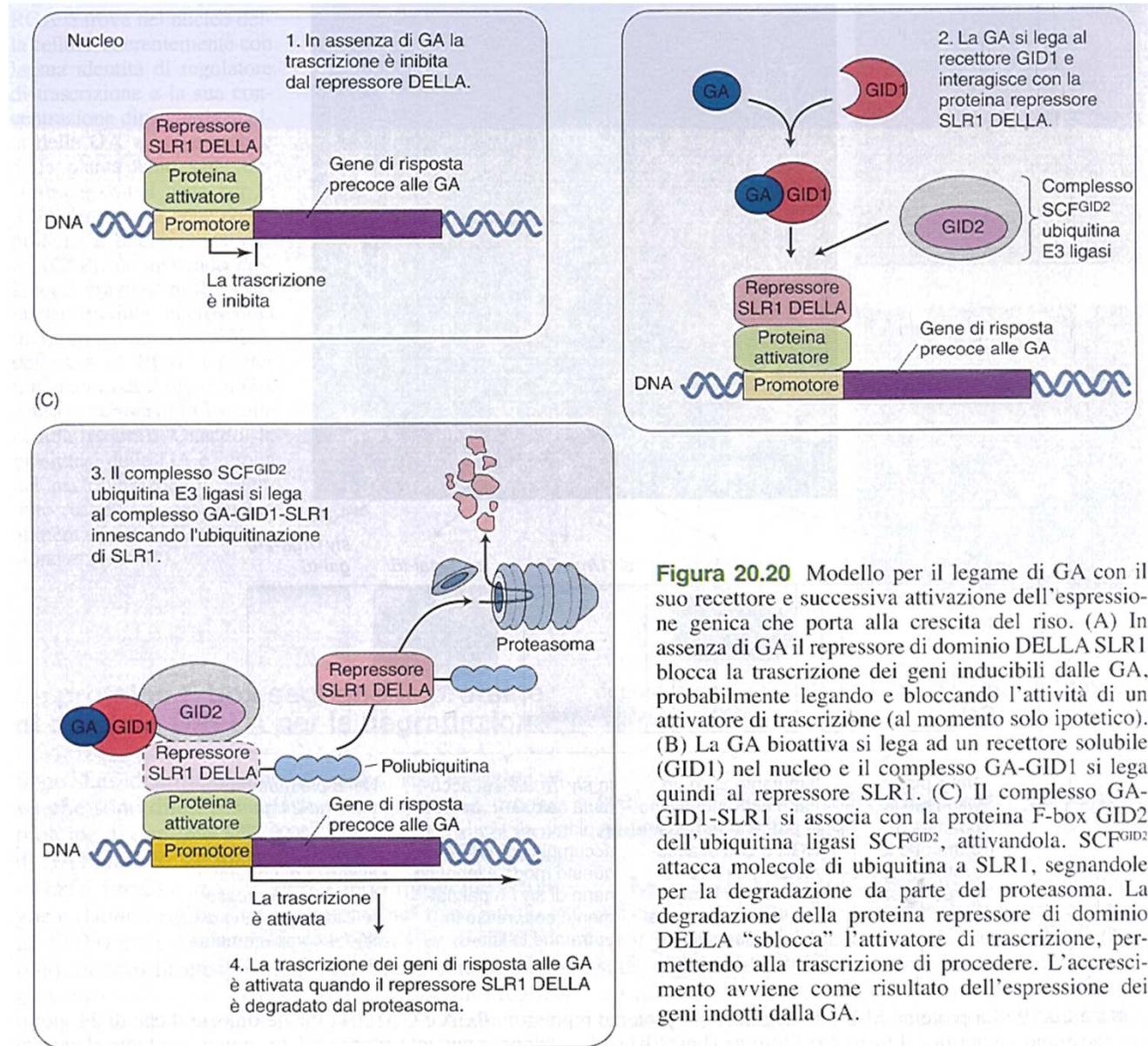


Figura 20.20 Modello per il legame di GA con il suo recettore e successiva attivazione dell'espressione genica che porta alla crescita del riso. (A) In assenza di GA il repressore di dominio DELLA SLR1 blocca la trascrizione dei geni inducibili dalle GA, probabilmente legando e bloccando l'attività di 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^{GID2}, attivandola. SCF^{GID2} 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

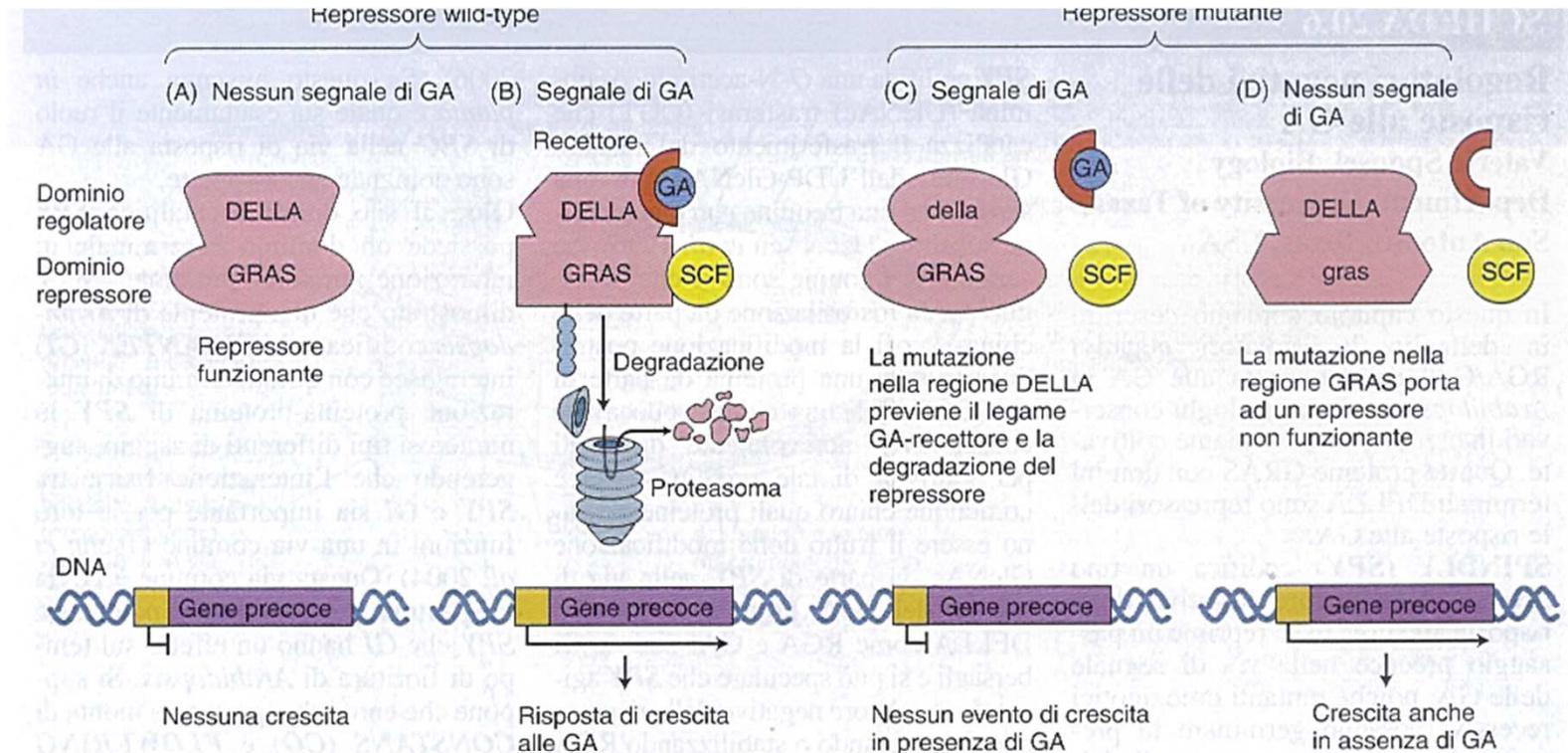
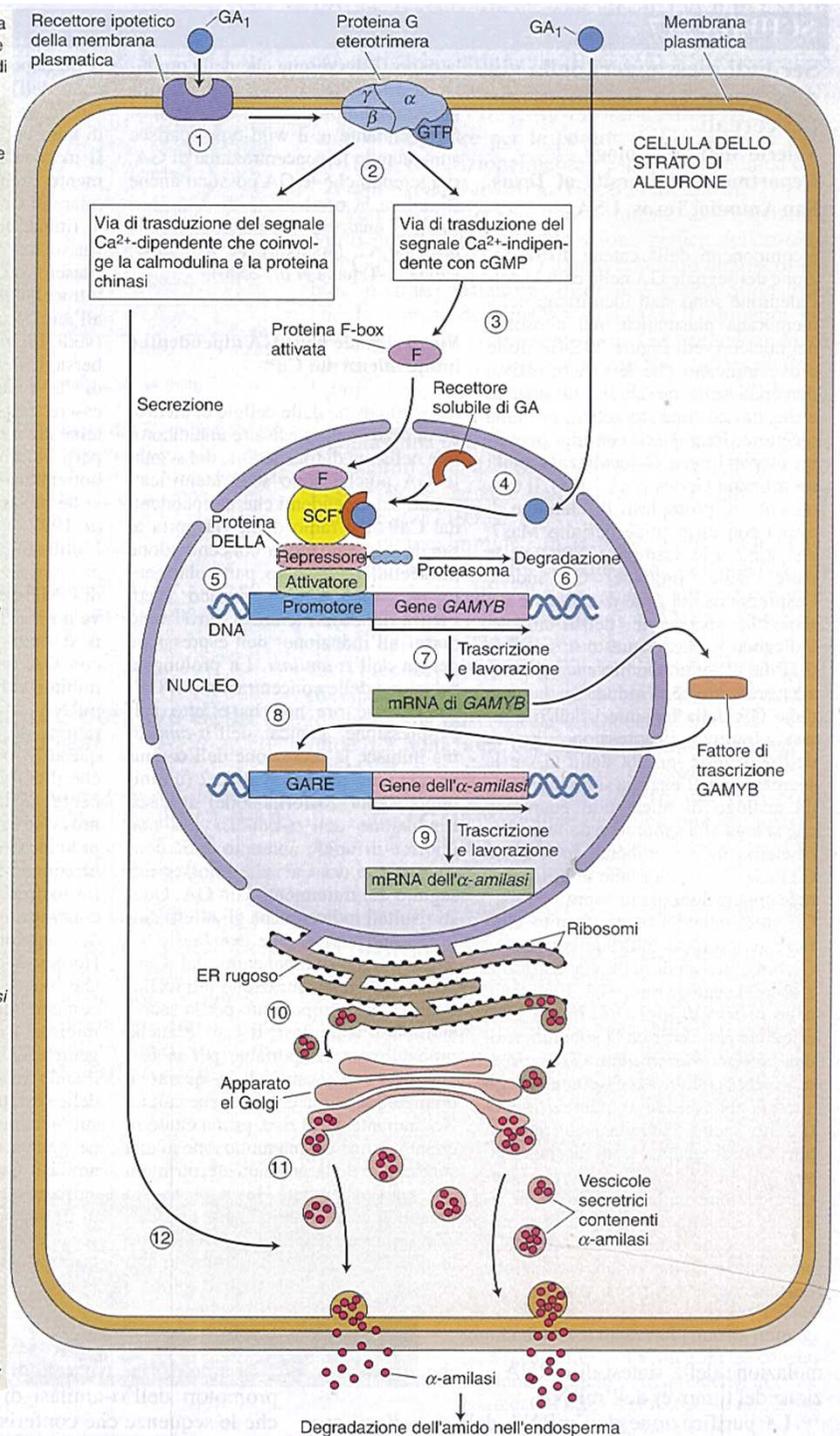


Figura 20.21 Il modello ricorrente della via di segnale delle GA durante l'accrescimento implica le interazioni fra il recettore della GA, un complesso ubiquitina ligasi SCF e una proteina repressore di dominio DELLA. Le proteine di repressione di GA (GAI/RGA/SRL1/SLN1) contengono due domini: il dominio 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 GA₁ 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 GA₁ 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 α -amilasi e di geni che codificano altri enzimi idrolitici.
9. E' attivata la trascrizione di questi geni.
- 10- L' α -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*

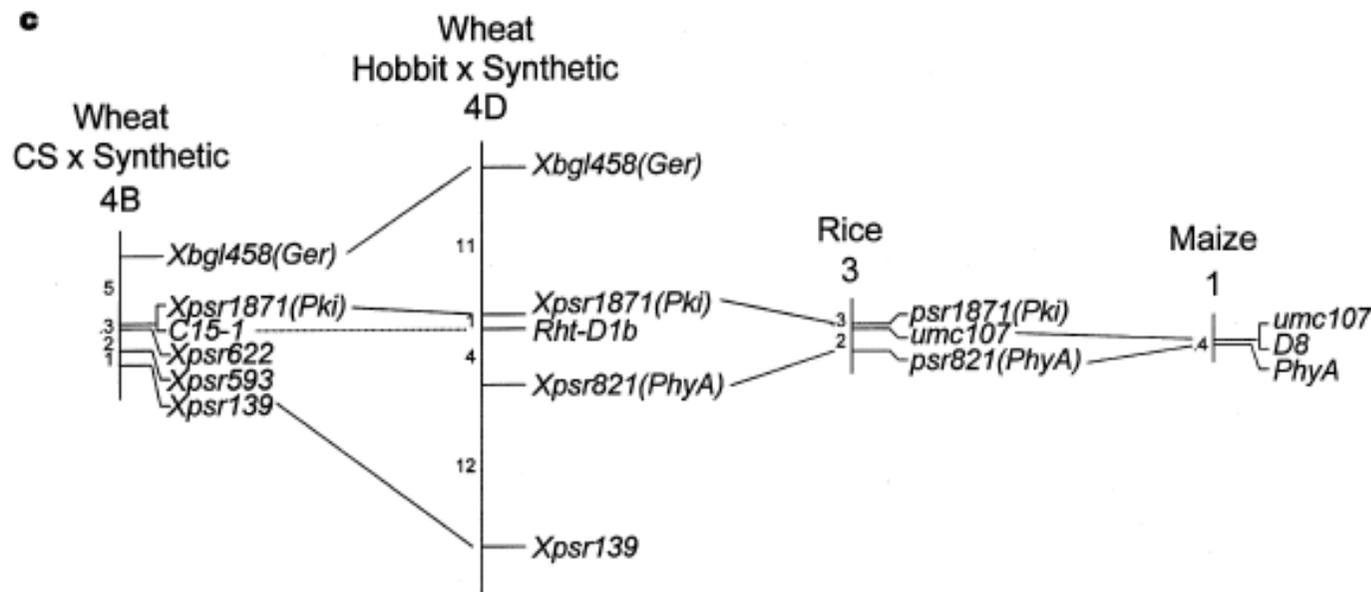


Figure 1 cDNA C15-1 maps to the *Rht-1* locus. **a**, Near-isogenic dwarf wheat lines: left, tall control (var. Mercia); centre, semi-dwarf *Rht-B1b*; right, semi-dwarf *Rht-D1b*. **b**, Gel-blot hybridization of C15-1 with *Dra*I-digested DNA from wheat lines lacking individual group 4 chromosomes (nullisomic 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 F₂ of a Chinese Spring (CS) × Synthetic cross. Wheat 4D data are from the F₂ of a Hobbit (contains *Rht-D1b*) × Synthetic cross; segregation for *Rht-D1b* was assayed by seedling responses to gibberellin². Map distances are in centiMorgans (cM).

a

GAI
gai
GAI

NGMDELLAVLGKVRSSSEMADVAQKLEQLEVMMSNVQEDDLSQLATETVHYNPAELYTWLDSMLTD
NGM DVAQKLEQLEVMMSNVQEDDLSQLATETVHYNPAELYTWLDSMLTD
NGMDELLAVLGKVRSSSEMADVAQKLEQLEVMMSNVQEDDLSQLATETVHYNPAELYTWLDSMLTD

I

II

d8
D8-Mp1
D8-1
D8-2023
d8

EEDVDELLAALGKVRSSDNADVAQKLEQLEMANMGMGGVGGAGATADDGFVSHLATDTVHYNPSDLSWVESMLS
EEDVDELLAALGKVRSSDNAG LEQLEMAMGMGGVGGAGATADDGFVSHLATDTVHYNPSDLSWVESMLS
EEDVDELLAALGKVRSSDNADVAQKLEQLEMAMGMGGVGGAGATADDGFVSH LSSWVESMLS
EEDVDELLAALGKVRSSDNADVAQKLEQLEMAMGMGGVGGAGATADDGFVSHLATDTVHYNPSDLSWVESMLS

I

II

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

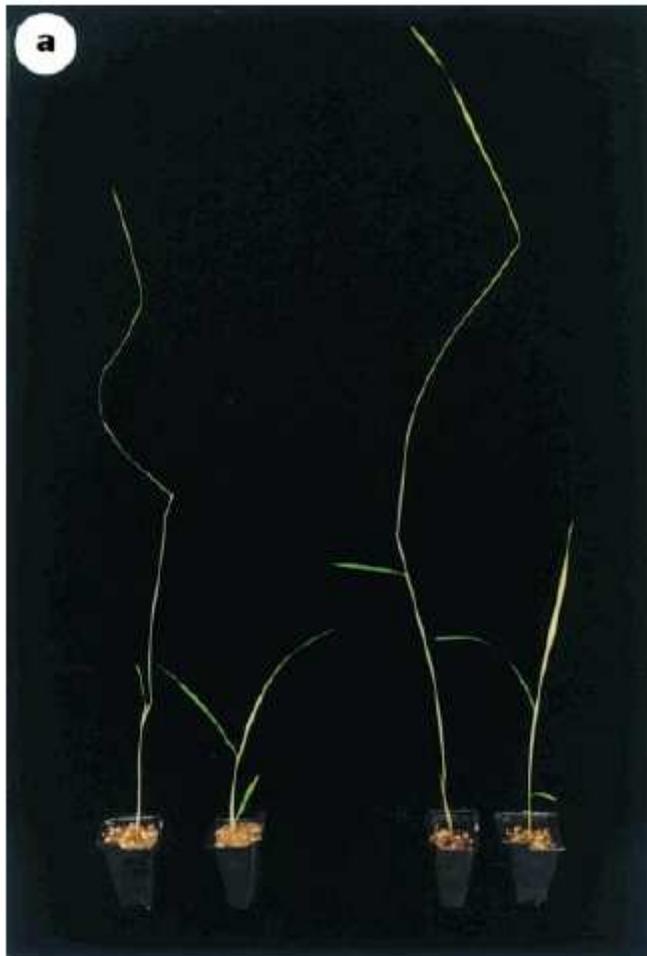
GEEVDELLAALGKVRASDMADVAQKLEQLEMAMNGMGVGGAGAAPDDSFATHLATDTVHYNPTDLSWVESMLS
GEEVDELLAALGKVRASDMADVAQKLE* MAMNGGVGAGAAPDDSFATHLATDTVHYNPTDLSWVESMLS
GEEVDELLAALGKVRASDMADVAQKLE* MAMNGGVGAGAAPDDSFATHLATDTVHYNPTDLSWVESMLS
GEEVDELLAALGKVRASDMADVAQKLEQLEMAMNGMGVGGAGAAPDDSFATHLATDTVHYNPTDLSWVESMLS

I

II

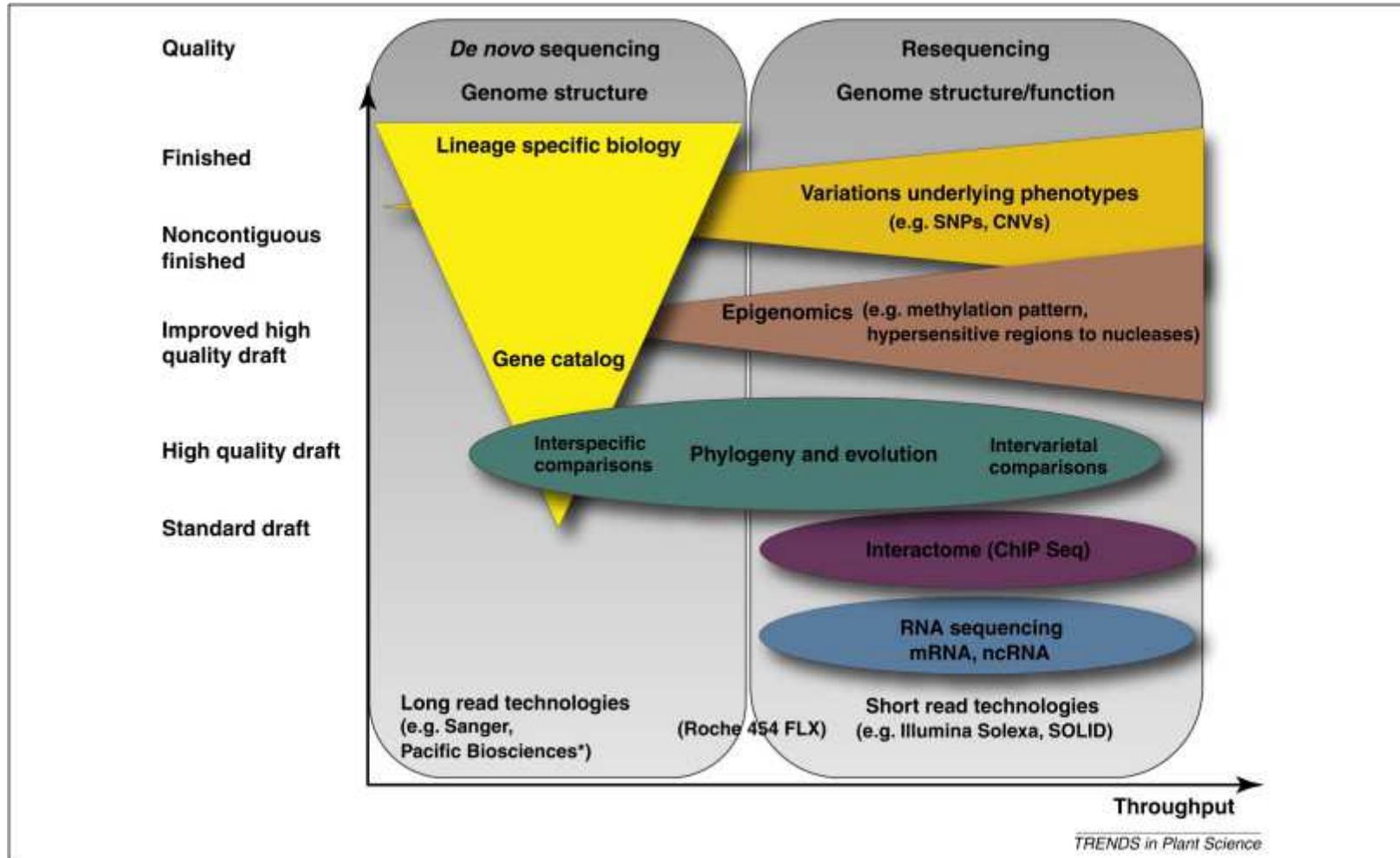
Figure 3 Dominant mutant alleles encode proteins with mutant N termini. **a**, N-terminal segments of predicted proteins encoded by mutant alleles *gai*, *D8-1*, *D8-2023*, *D8-Mp1*, *Rht-B1b* and *Rht-D1b* are compared with those of their respective wild-type alleles (*GAI*, *d8*, *Rht-B1a* and *Rht-D1a*). 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.

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



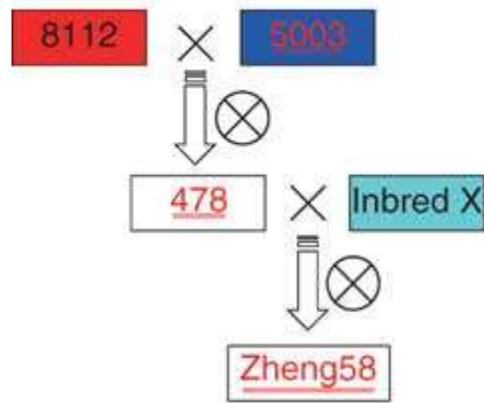
GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDIES (GWAS)

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

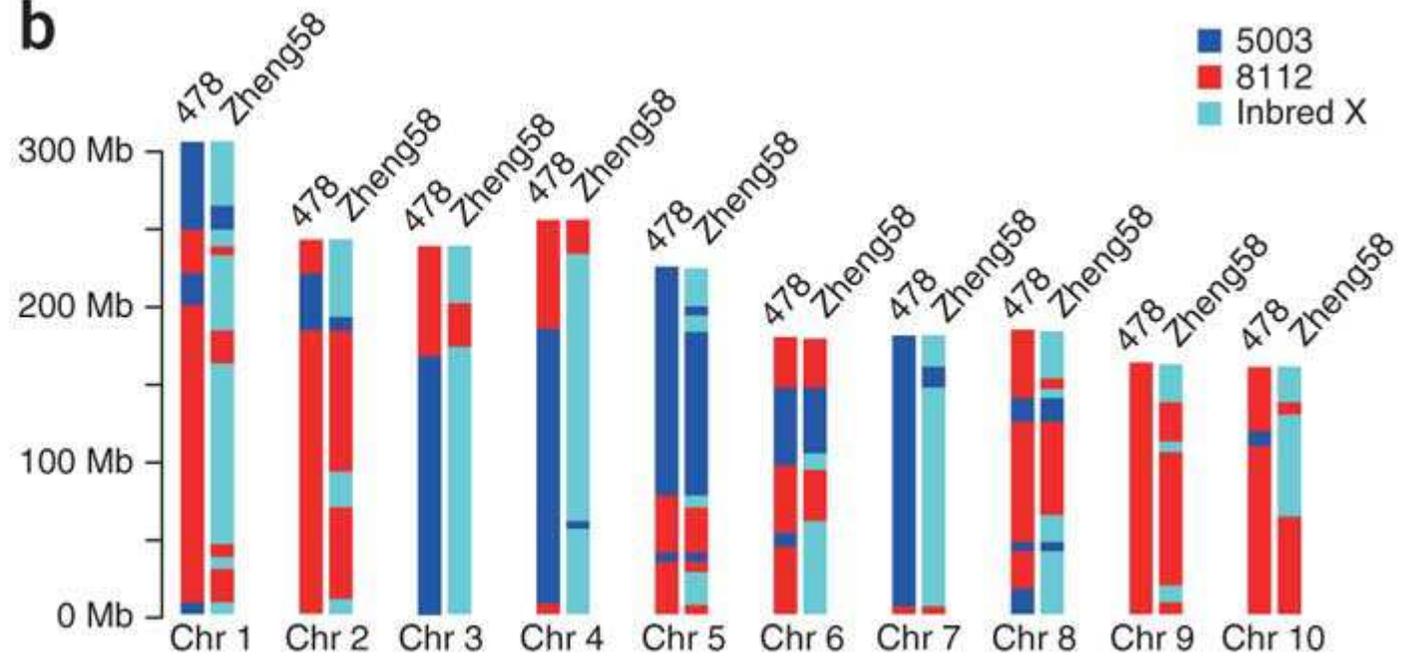


6 RILs da elite cultivar di mais

a



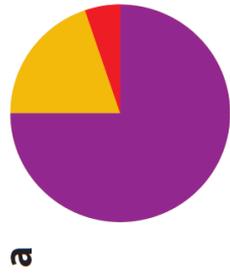
b



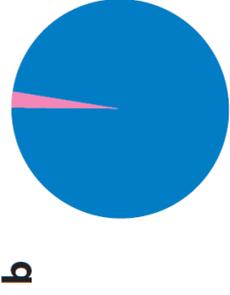
1.2 milioni SNPs

>30000 indels

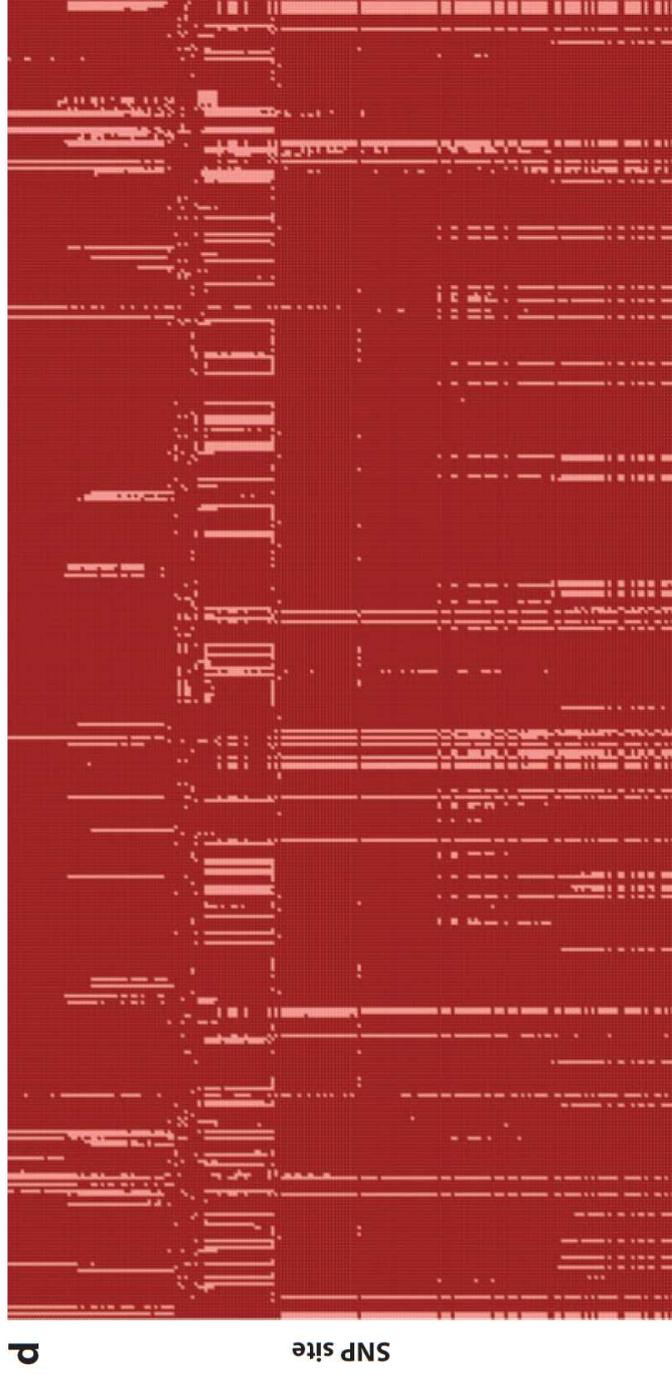
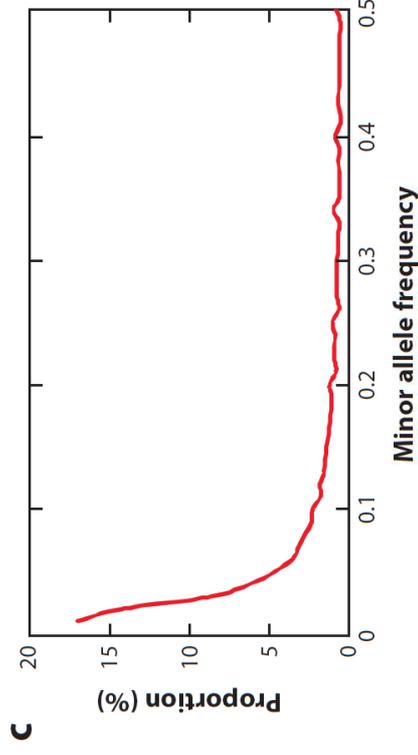
Centinaia di geni presenti/assenti



- SNPs
- Small insertions or deletions
- Structural variants



- Variants in coding regions
- Variants in noncoding regions



Foxtail millet inbred line

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.

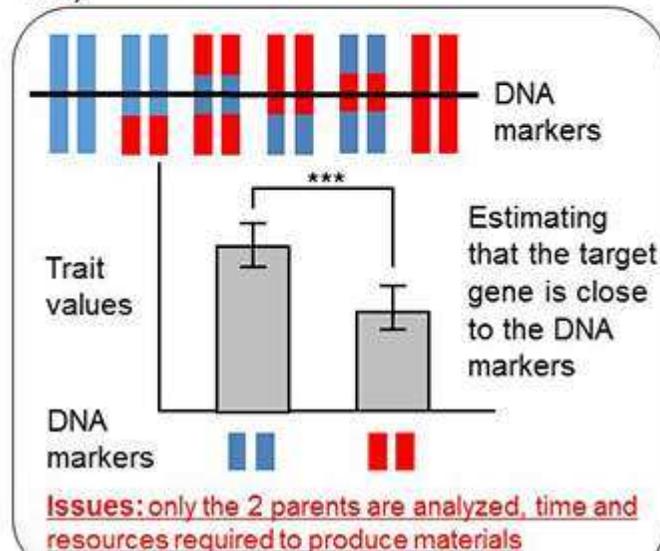
GWAS IN CROP PLANTS

Identifying genes with significant traits for agriculture

QTL: Quantitative Trait Loci

QTL analysis

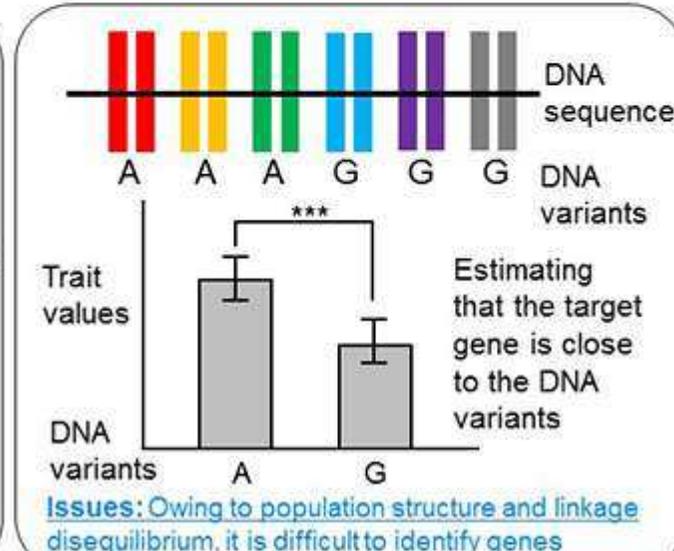
Materials: Crossed-population between 2 cultivars (F₂, recombinant inbred lines etc)



Genome-wide Association Study: GWAS

GWAS analysis

Materials: a variety of plants



GWAS NELLE SPECIE VEGETALI

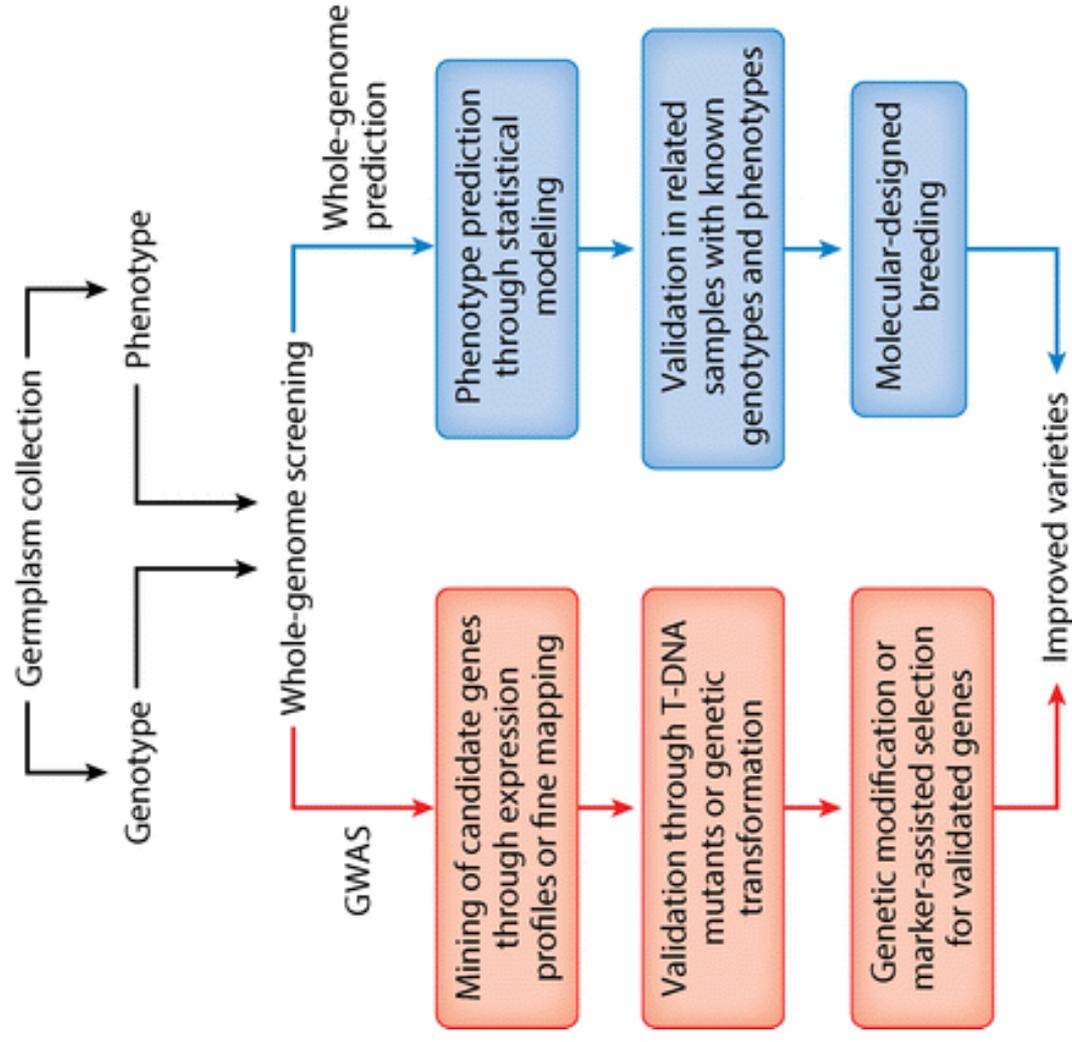
Una singola popolazione di varietà diverse (preferibilmente omozigoti) è genotipizzata una sola volta e sottoposta ad analisi di fenotipizzazione multiple (meno costoso che in uomo)

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