



La rivoluzione verde



Sviluppo di varietà seminane carenti in GA o nella risposta a GA

Genetista agrario Norman Borlaug Premio Nobel per la pace nel 1970 per l'introduzione di varietà di grano semi nane ad alta resa

GIBBERELLINE

Insieme di composti definiti in base alla loro struttura chimica e non rispetto alla loro attività biologica

note 136 gibberelline
poche biologicamente attive

scoperta

BAKANAE

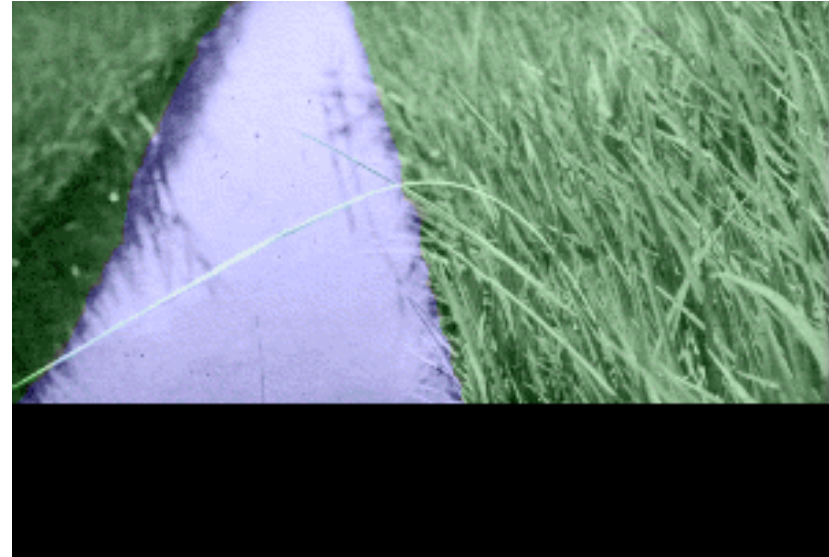
(piantina sciocca)

malattia del riso diffusa in

asia causata dal fungo

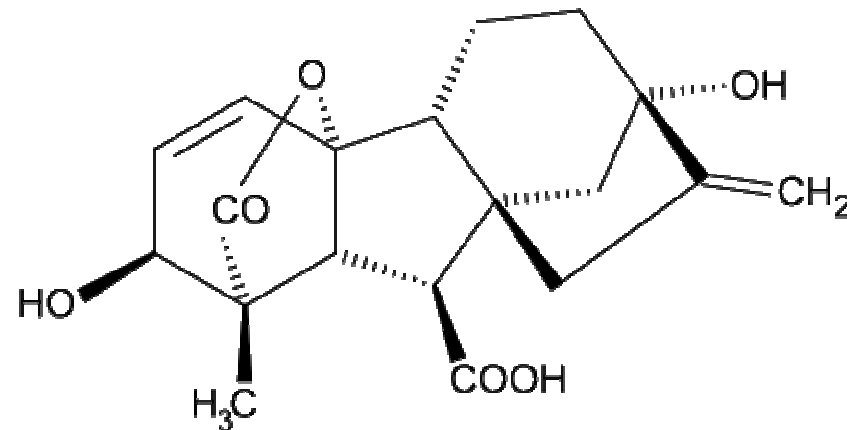
Gibberella fujikuroi

(*Fusarium moniliforme*)



- **1930** (Giappone) Isolamento da brodi di coltura del fungo di cristalli impuri di due composti attivi; uno fu chiamato **GA A**
- **1950** (USA, GB) Struttura acido gibberellico (GA_3), isolato da brodi di coltura del fungo
- **1950** (Giappone) dalla GA A isolate e caratterizzate , GA_1GA_2 , GA_3
- **1958** Identificazione e purificazione nelle piante (GA_1)

GA₃ fu prodotta mediante fermentazione di
Gibberella fujikuroi per scopi di sperimentazione e
successivamente per applicazioni agronomiche e
in orticoltura



GA₃

ATTUALMENTE SONO NOTE 136 GIBBERELLINE

(12 presenti solo in *G. fujikuroi*)

NOMENCLATURA: GA_x , a seconda dell'ordine cronologico della scoperta

PRIMI STUDI SULL'ATTIVITA' DELLE GIBBERELLINE

effetto GA_3 sulla crescita dello
stelo floreale del cavolo
(condizioni sd non induttive)



effetto di GA_1 su mais nano



EFFETTI FISIOLOGICI DELLE GIBBERELLINE

- stimolano la crescita del fusto in piante nane e a rosetta (GA_1 , GA_3 , Ga_4 , GA_7)



effetto di GA_3 sull'allungamento
del fusto di piante nane di pisello

➤ regolano la transizione dalla fase giovanile ad adulta

(A) Abete bianco

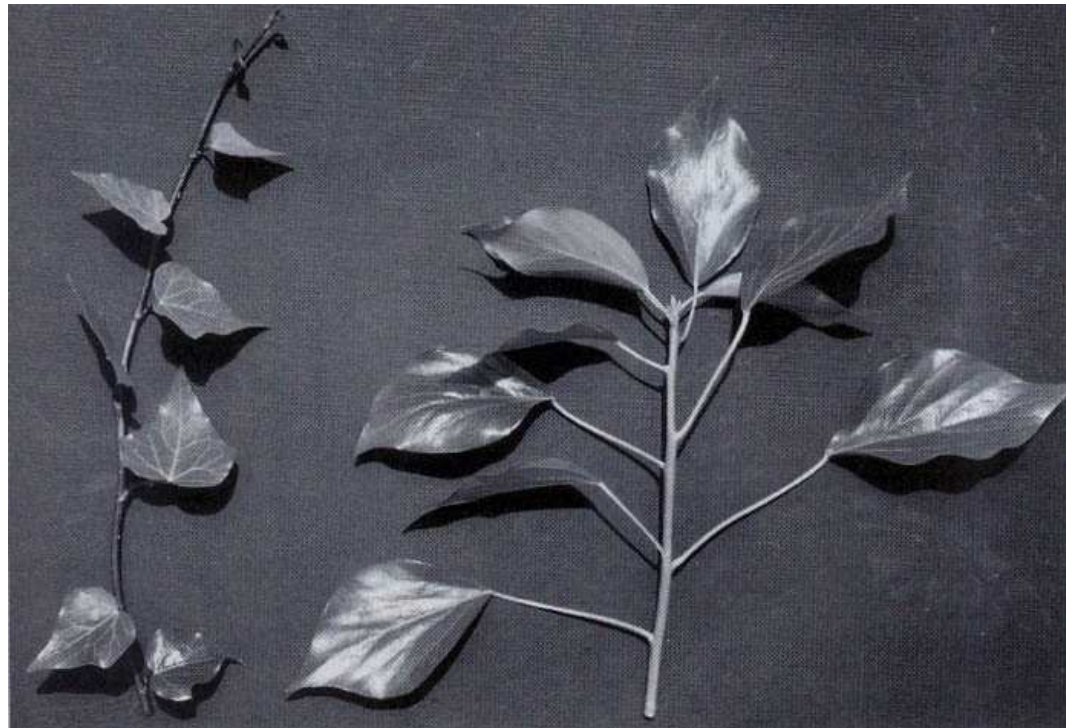


(C) Pianticella di sequoia gigante



L'applicazione di GA4+GA7 induce conifere giovanili ad entrare in fase riproduttiva producendo coni precocemente

nell'edera effetto opposto



➤Influiscono sulla formazione dei fiori e sulla determinazione del sesso

Nel mais le GA sopprimono la formazione degli stami portando alla formazione di **fiori femminili (pistillati)**

Nelle dicotiledoni (spinacio) hanno effetto opposto

Piante monoiche (mais) fiori unisessuali sullo stesso individuo: si formano per aborto selettivo di primordi di stami o di pistilli (fiori femminili o maschili)

Pennacchio: fiore maschile, stame

Spiga: fiore femminile, pistillo

Nel mais le GA sopprimono la formazione delle antere

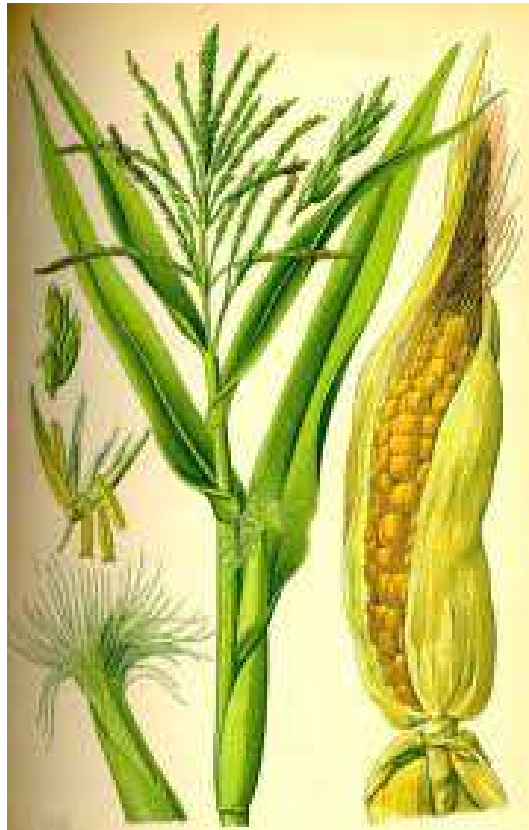


FIGURE 20.3 Anthers develop in the ears of a gibberellin-deficient dwarf mutant of corn (*Zea mays*). (Bottom) Unfertilized ear of the dwarf mutant *an1*, showing conspicuous anthers. (Top) Ear from a plant that has been treated with gibberellin. (Courtesy of M. G. Neuffer.)

➤ Promuovono la fruttificazione e la partenocarpia



L'applicazione di GA promuove la fruttificazione cioè l'accrescimento del frutto in seguito all'impollinazione (pero)

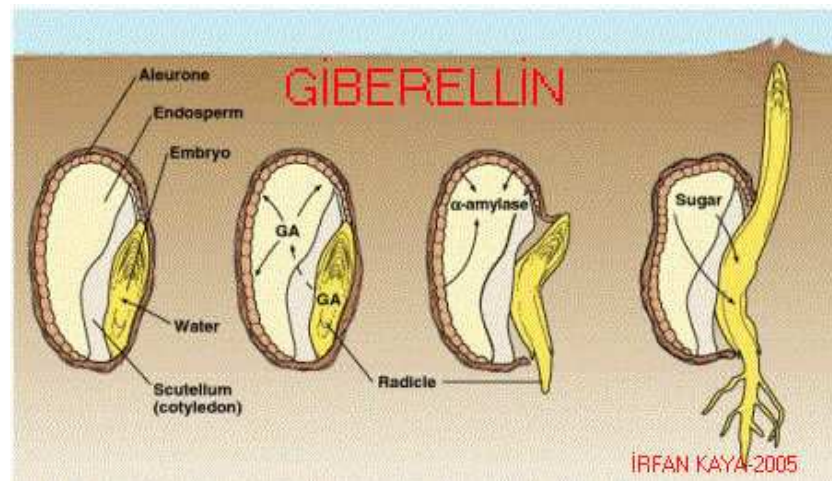
La fruttificazione indotta da GA può avvenire anche in assenza di impollinazione portando alla formazione di frutti senza semi (uva)

➤ Promuovono la germinazione dei semi (interruzione della dormienza)

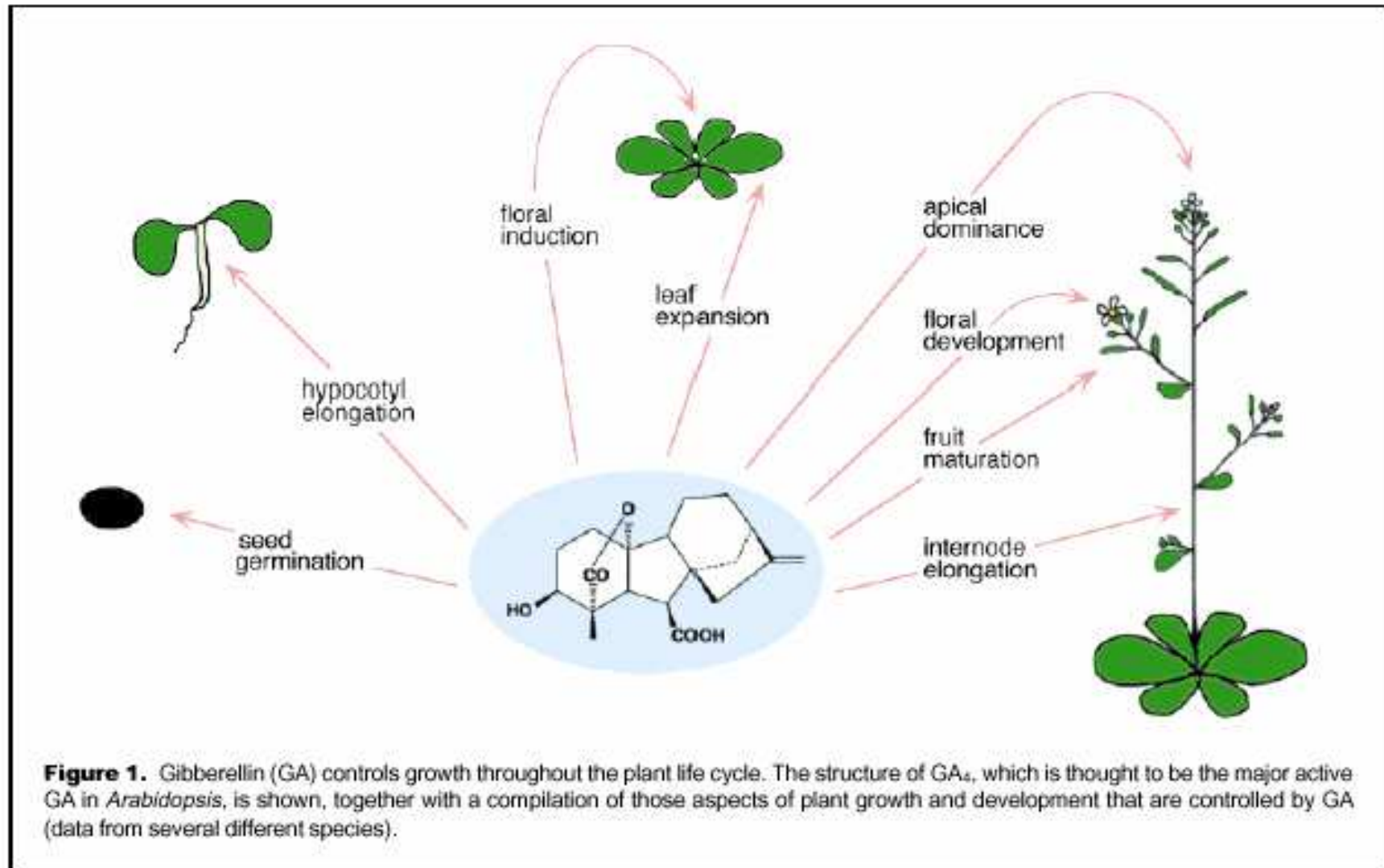
mutanti carenti di GA hanno semi abortiti

In semi che richiedono luce o vernalizzazione per germinare, le GA possono indurre la germinazione in assenza di stimolo ambientale

Nei cereali le GA inducono la produzione di α -amilasi per la degradazione dell'amido dell'endosperma



Le GA controllano la crescita durante l'intero ciclo vitale della pianta

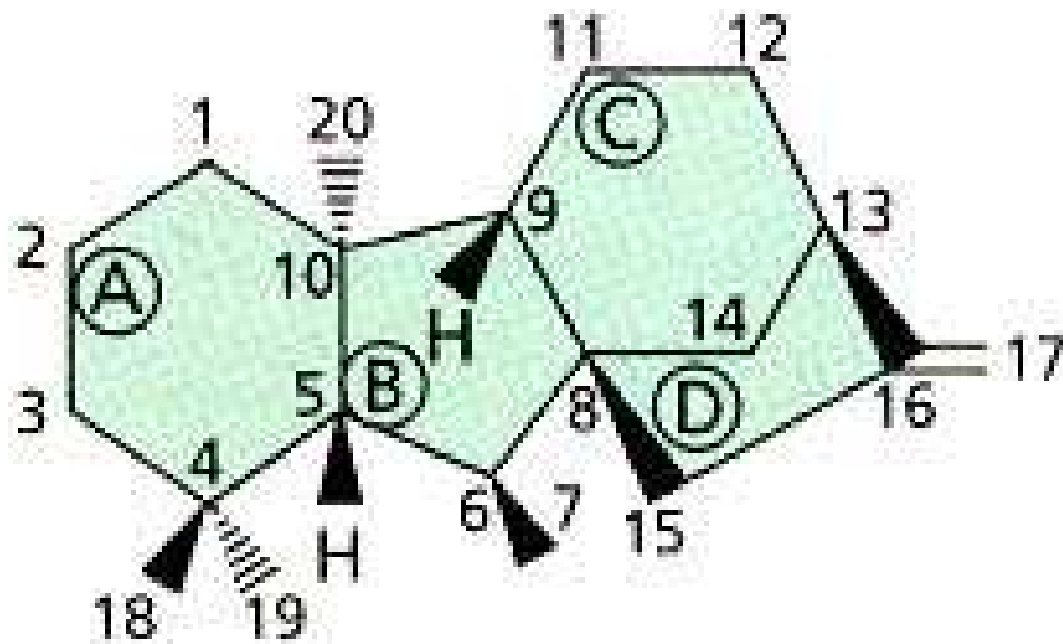


APPLICAZIONI COMMERCIALI

- Produzione di frutti
(aumento lunghezza del picciolo in uva priva di semi;
forma mele Delicious)
- Produzione di malto da orzo (birra)
- Aumento rese canna da zucchero
- Allevamento vegetale (conifere)

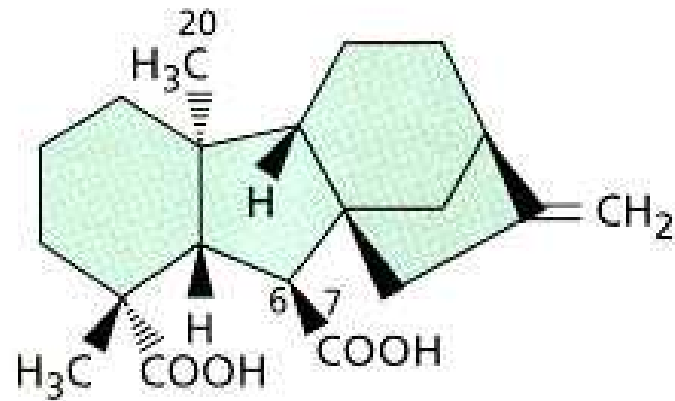


STRUTTURA BASE DELLE GIBBERELLINE

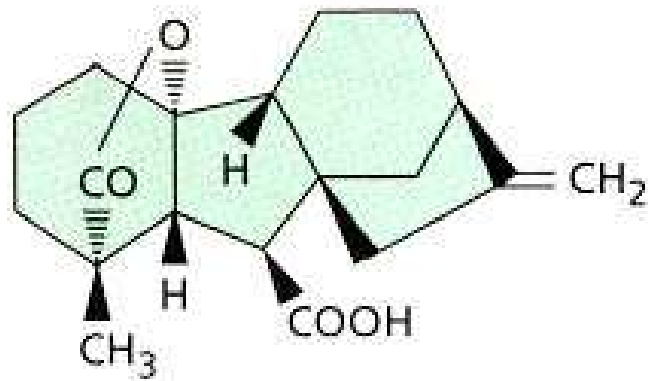


scheletro *ent*-gibberellanico

Le gibberelline contengono 19 o 20 atomi di carbonio

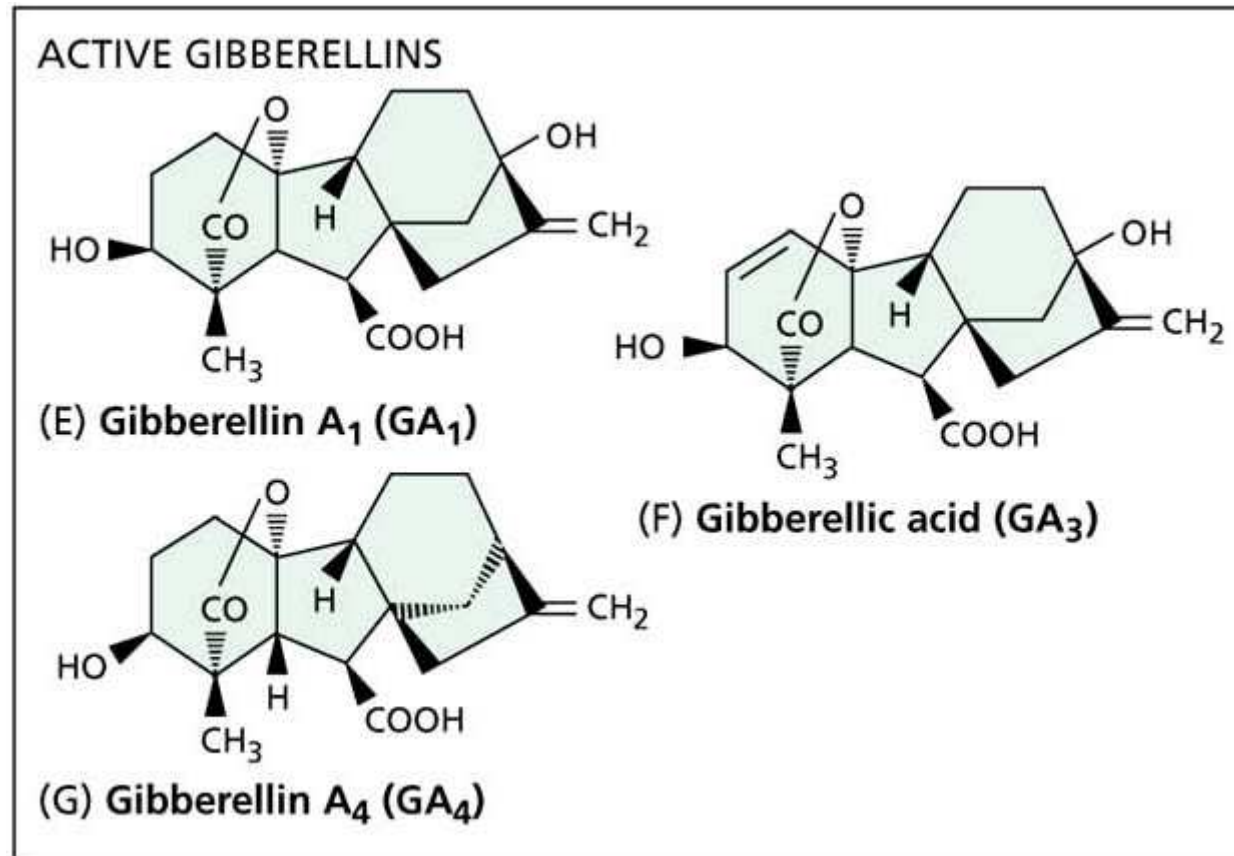


GA₁₂
(C₂₀)



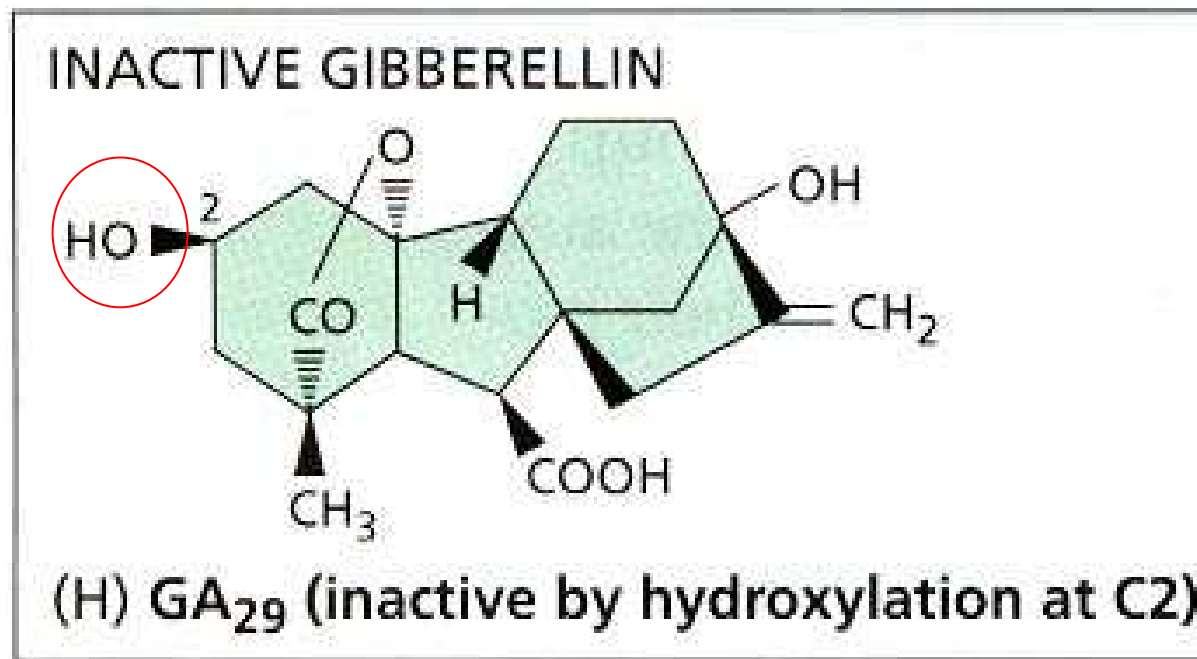
GA₉
(C₁₉)

DIFFERENZE NEL NUMERO E NELLA POSIZIONE DI -OH



idrossilazioni in C3 e in C13

l'idrossilazione in 2 β abolisce l'attività biologica



BIOSINTESI

Le GA sono degli acidi diterpenici tetraciclici, si formano da una via dei terpenoidi

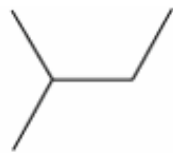
Diterpeni = 20 atomi di C

Le gibberelline come tutti i terpeni vengono sintetizzate a partire dall'isopentenil pirofosfato (IPP)

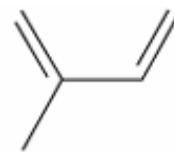
Esistono due vie per la formazione dell'IPP:

- attraverso l'acido mevalonico (citosol)
- attraverso la gliceraldeide 3-fosfato e il piruvato (plastidi)

TUTTI I TERPENOIDI DERIVANO DA UN LEGAME
RIPETITIVO DI UNA UNITA' A 5 ATOMI DI CARBONIO
RAMIFICATA BASATA SULLA STRUTTURA
DELL'ISOPENTANO



Isopentane



Isoprene



Head-to-tail

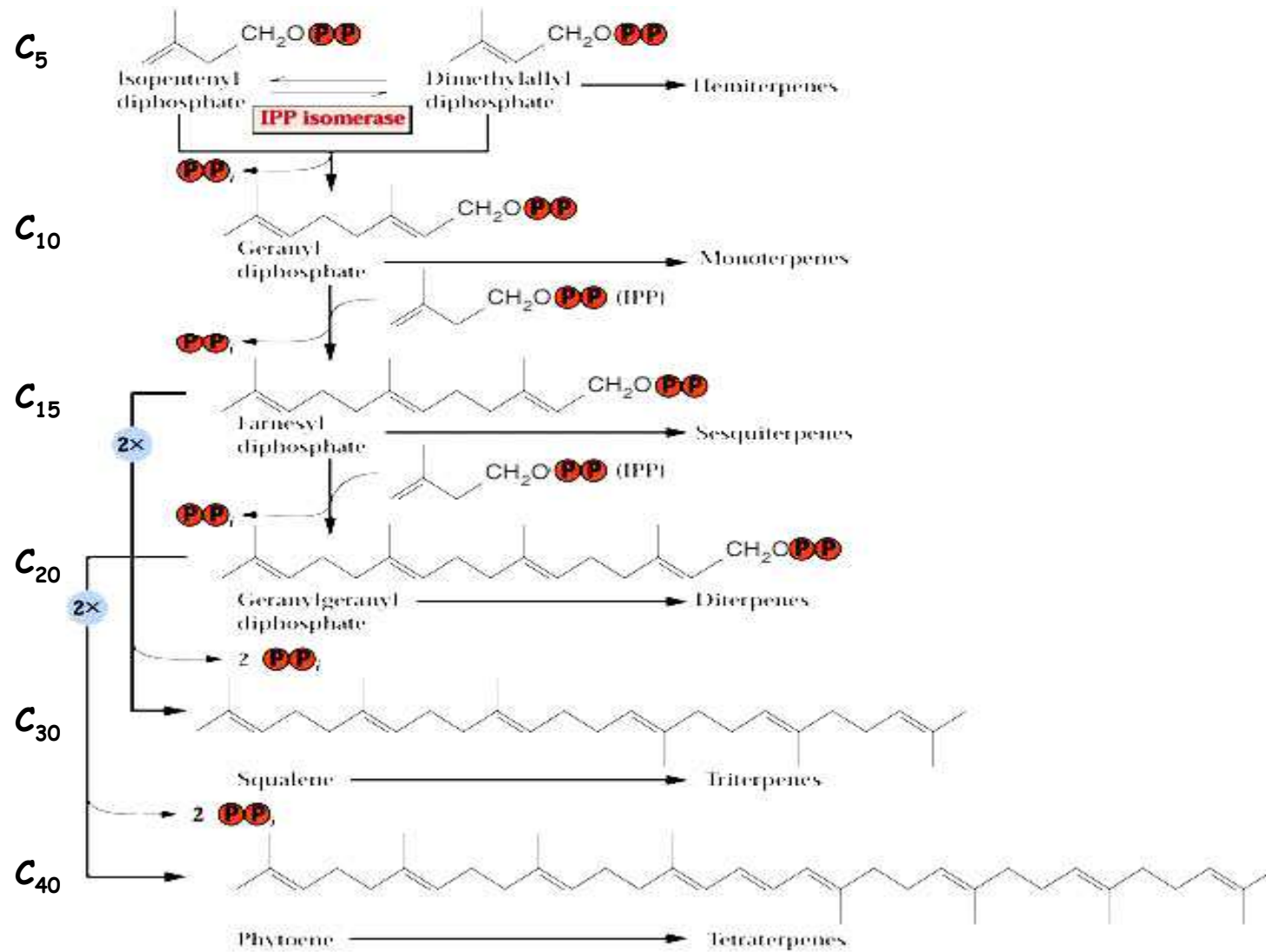


Head-to-head

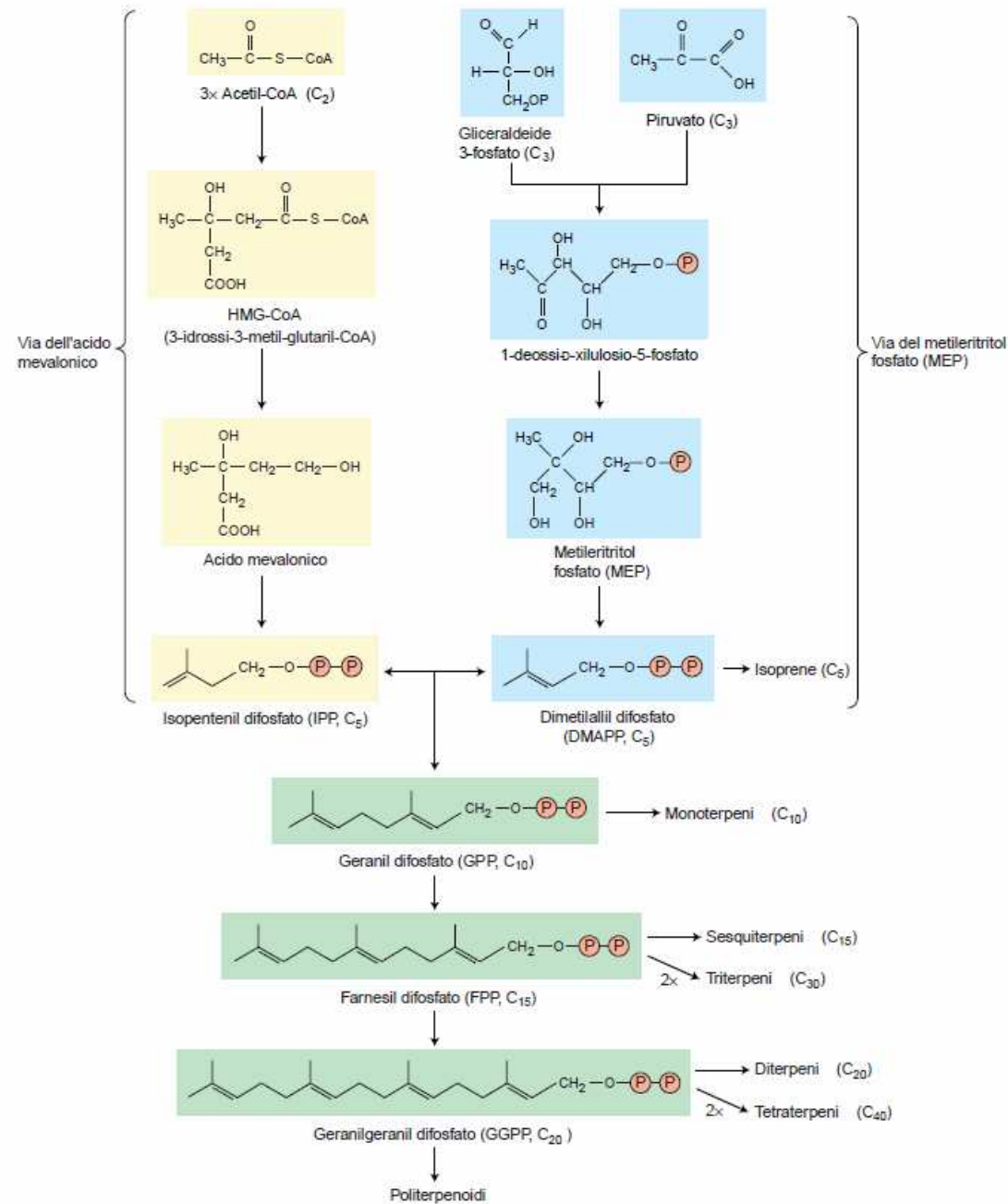


Head-to-middle

SINTESI DEI TERPENI DALL'UNITA' BASE IPP

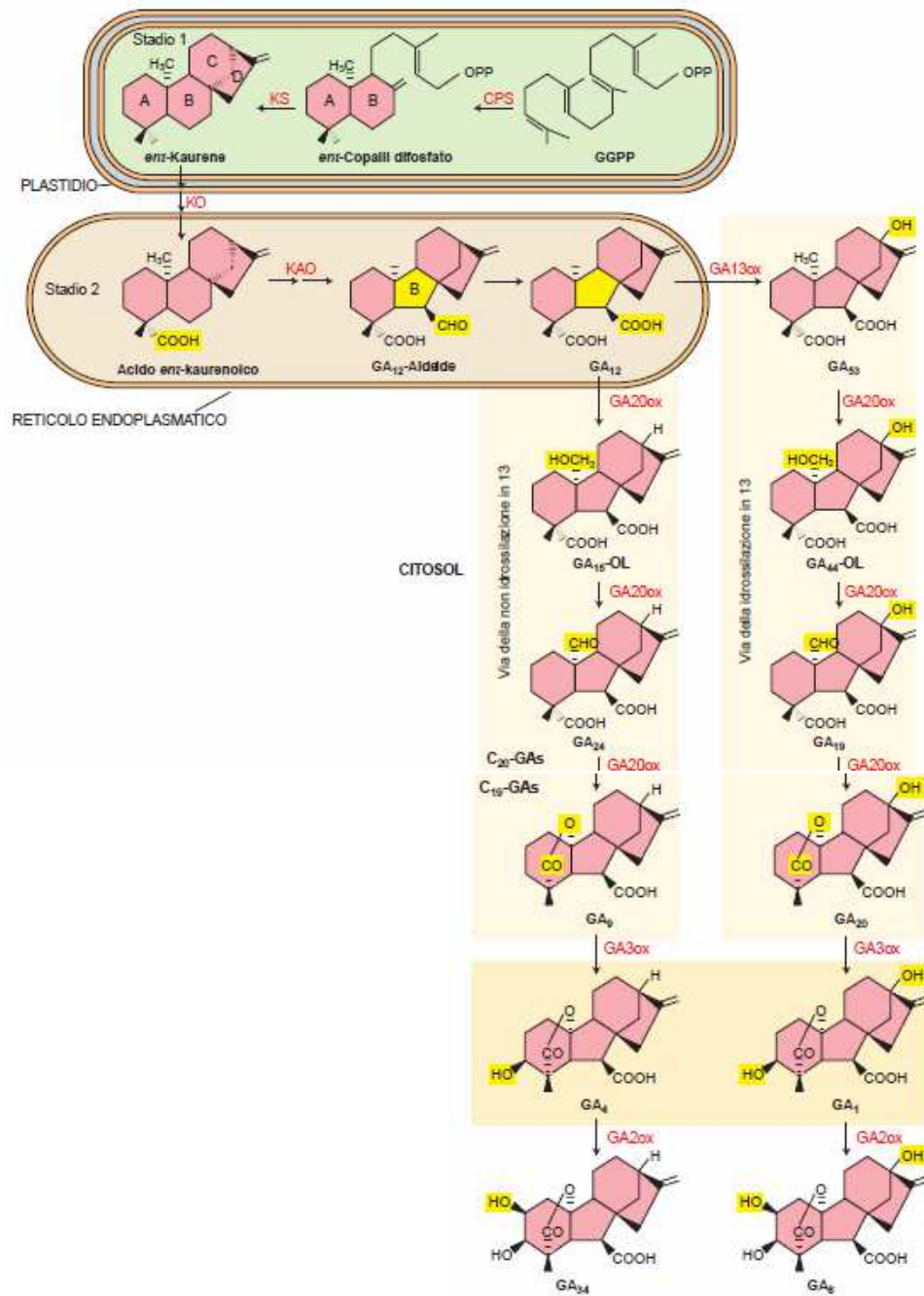


Vie di biosintesi dell'IPP

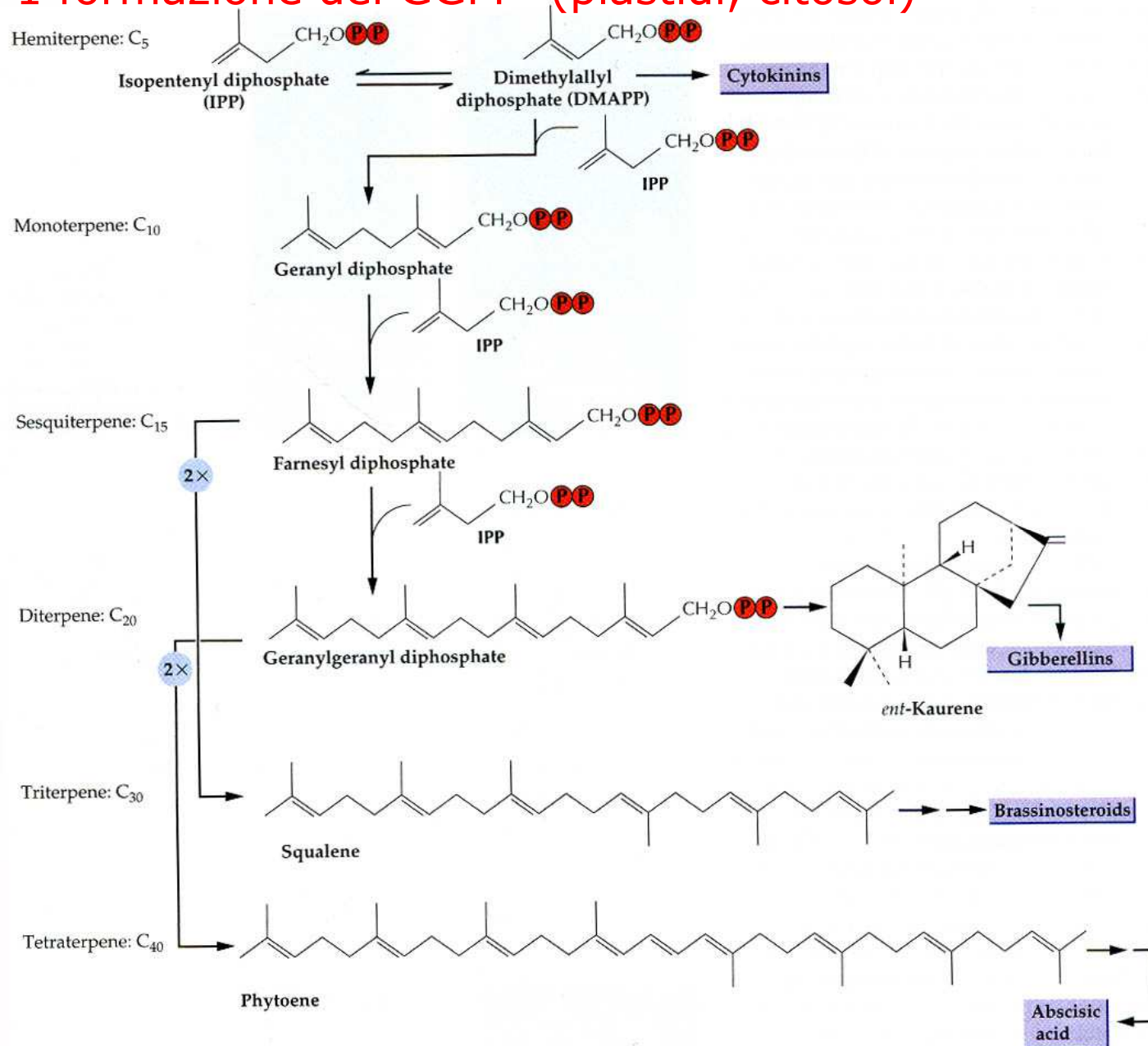


La via biosintetica delle GA dall'IPP può essere divisa in 3 stadi:

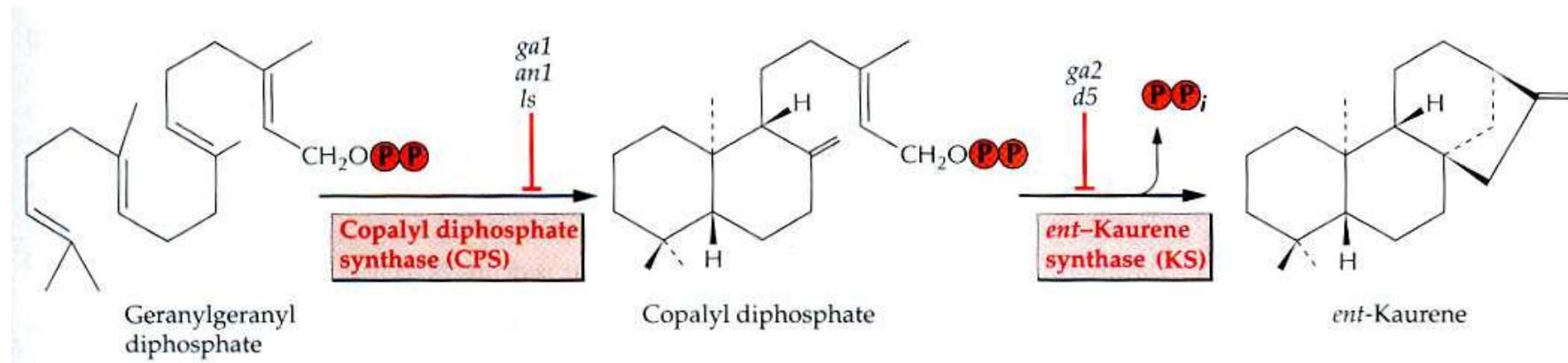
- 1) **PLASTIDI:** 4 IPP formano il precursore lineare a 20 C geranylgeranyl PP (GGPP) poi ciclizzato ad ent-kaurene
- 2) **ER:** ent-kaurene convertito nella prima gibberellina: la GA₁₂ aldeide
- 3) **CITOSOL:** GA₁₂ aldeide convertita in altre GA a 20 atomi e poi GA a 19 atomi fino alle GA bioattive (idrossilazioni)



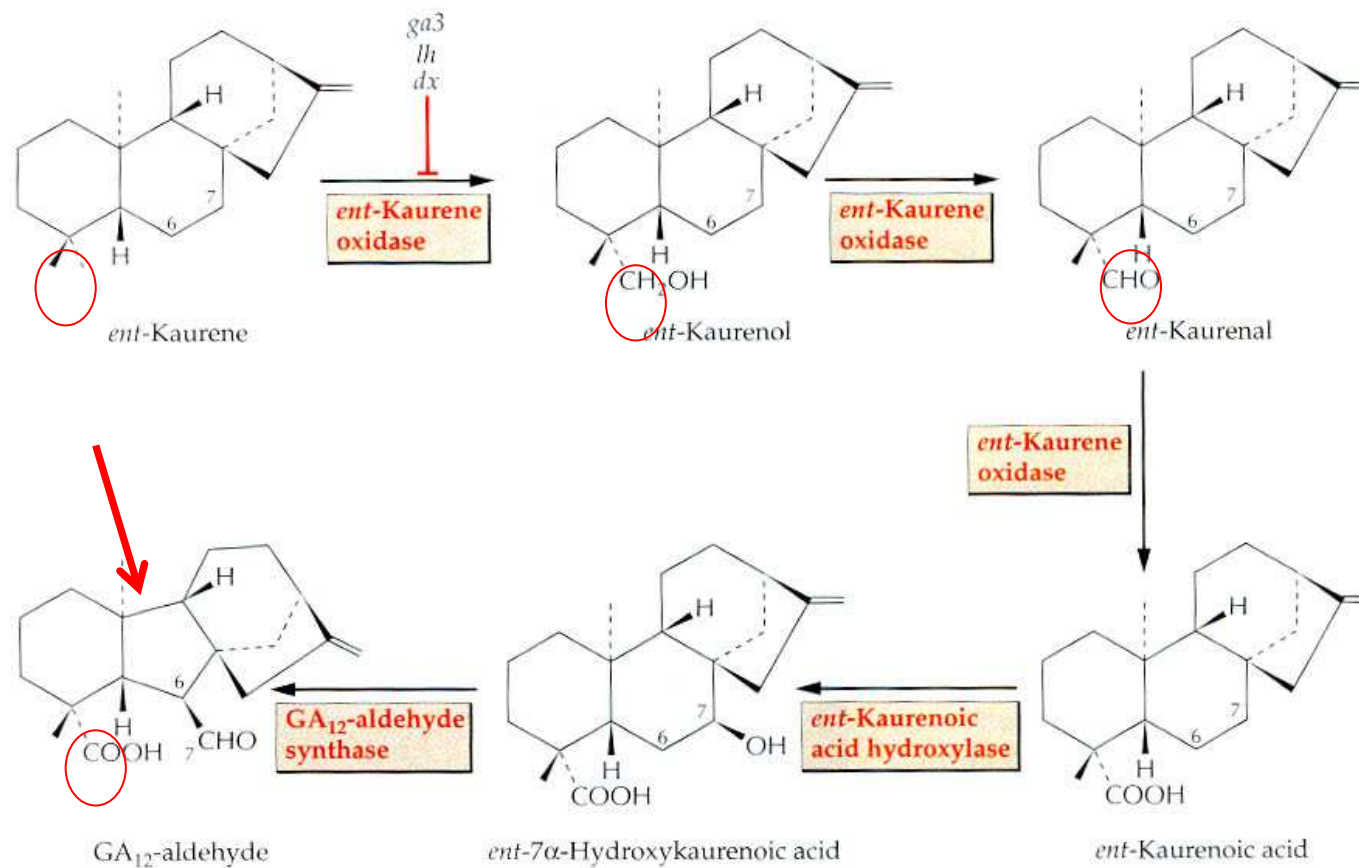
Stadio 1 formazione del GGPP (plastidi, citosol)



Stadio 1 REAZIONI DI CICLIZZAZIONE (plastidi)

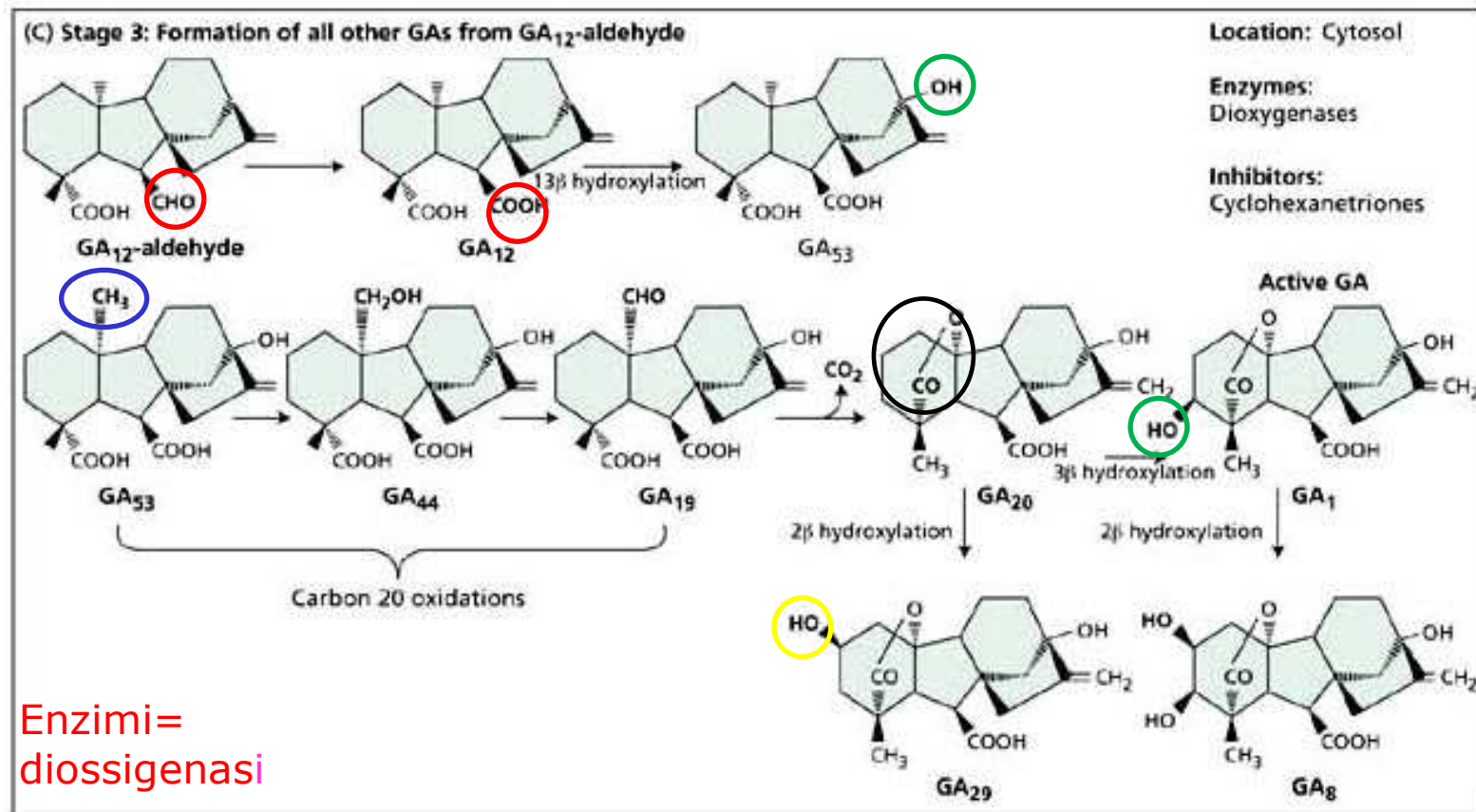


Stadio 2 OSSIDAZIONI (reticolo endoplasmatico)

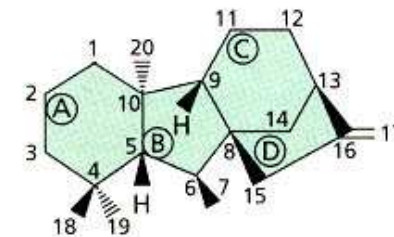


- un gruppo metilico (C19) viene ossidato ad acido carbossilico
- l'anello B si contrae (da 6 a 5 atomi di C)
- enzimi coinvolti=P450 monossigenasi

Stadio 3 FORMAZIONE DI TUTTE LE GIBBERELLINE A PARTIRE DALLA GA₁₂ ALDEIDE (citosol)



- ossidazione C7 (da GA₁₂ aldeide a GA₁₂)
- idrossilazioni C13 e C3
- ossidazioni C20
- perdita atomo di C
- idrossilazione C2 (inattivazione)



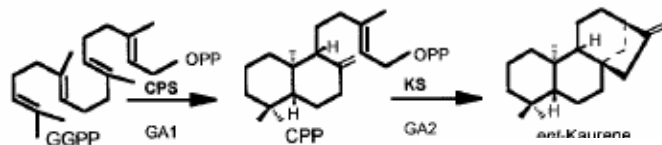
Stadio 3 (citosol): Diossigenasi:

GA20 ossidasi: catalizza l'ossidazione del C20
(mutante *ga5*)

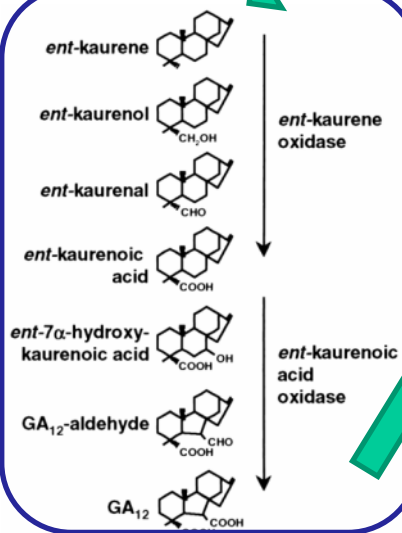
GA3 ossidasi: catalizza idrossilazioni in 3
(mutante *ga4*)

GA2 ossidasi: catalizza l'idrossilazione in 2 (disattivante)
(mutante *slender*)

GA 13 ossidasi: catalizza l'idrossilazione in 13

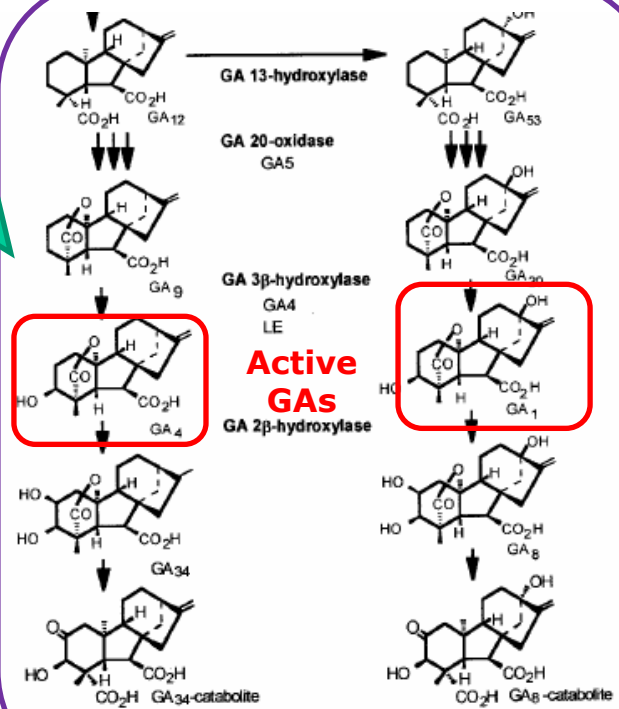


1 - proplastidi

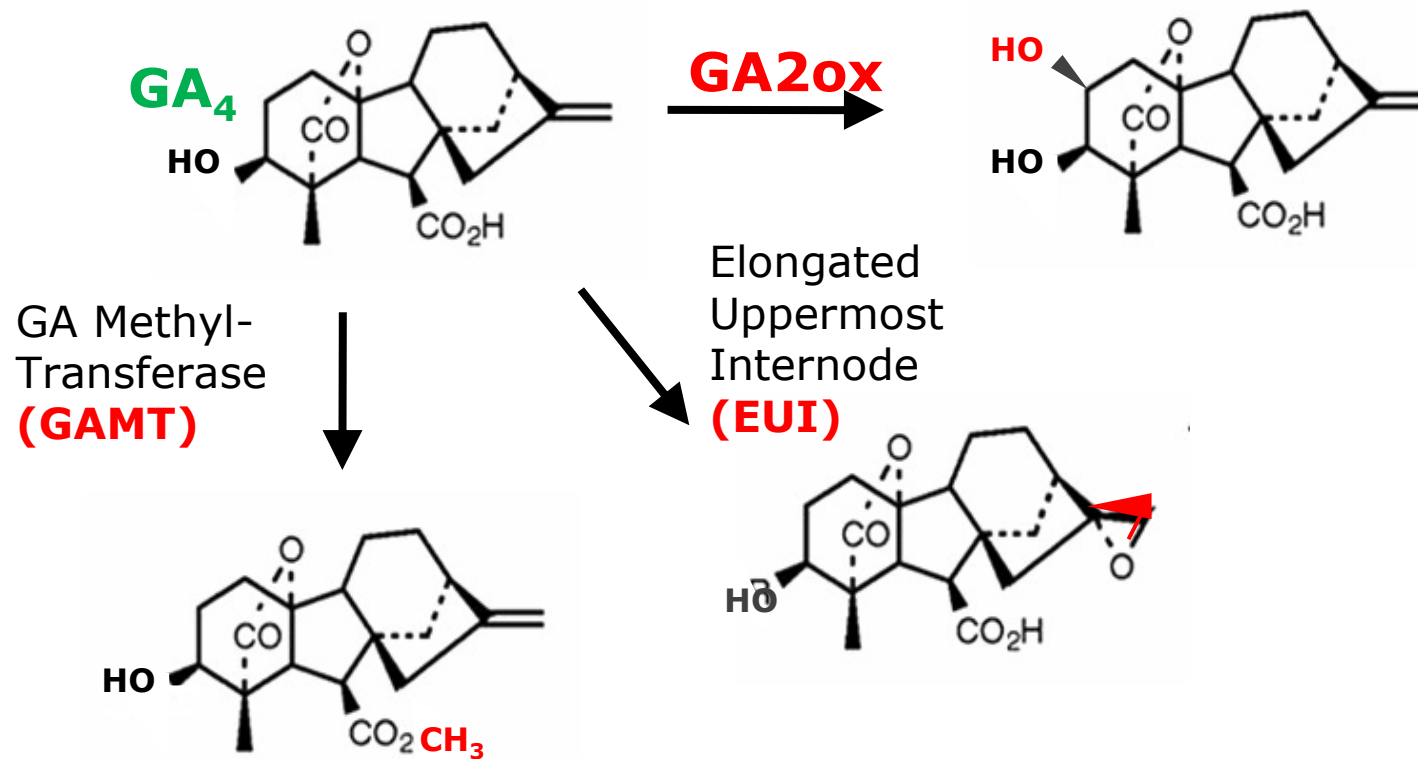


2 - ER

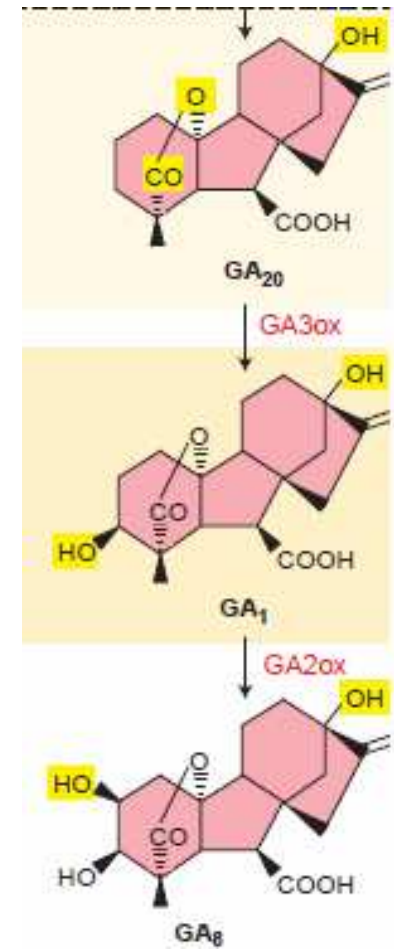
3 - citoplasma



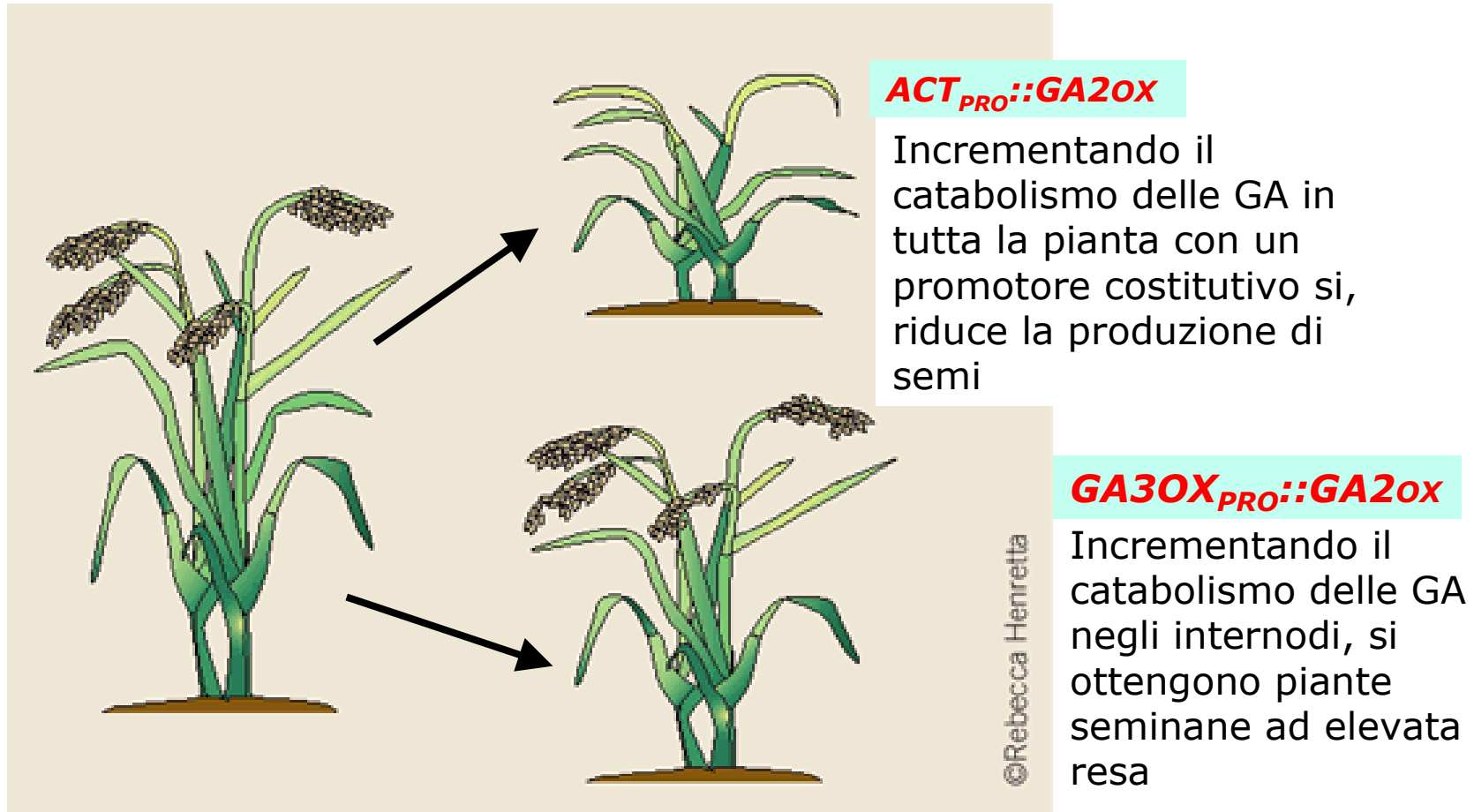
REAZIONI DISATTIVANTI



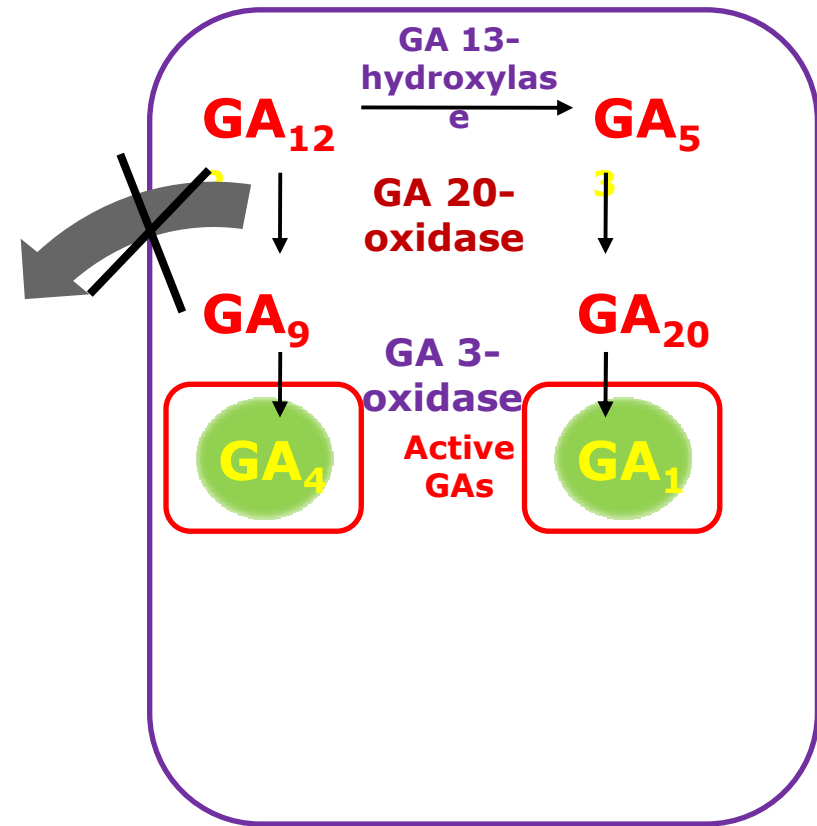
Piante di mais che sovraesprimono il gene della GA2ox



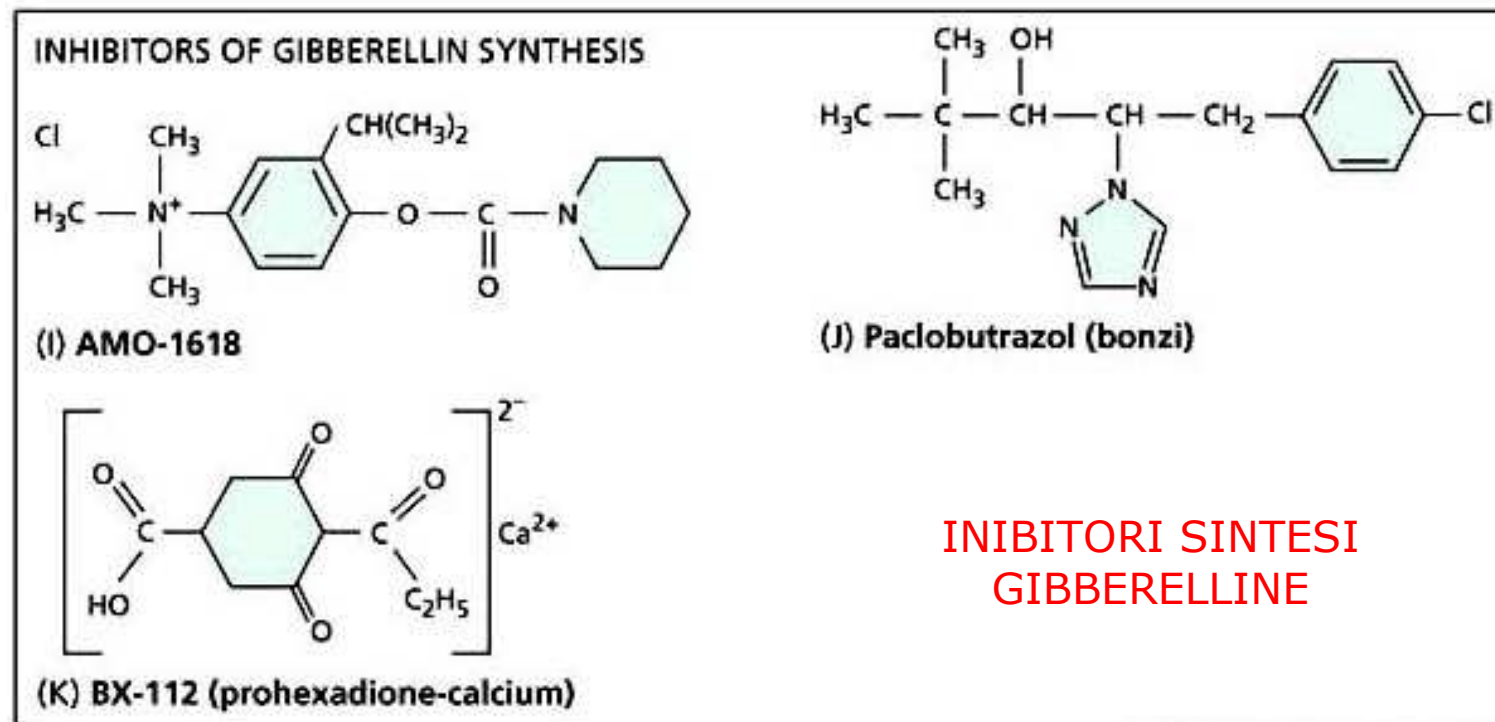
La manipolazione tessuto specifica dei livelli di GA
Può essere utilizzata per migliorare la crescita e la resa



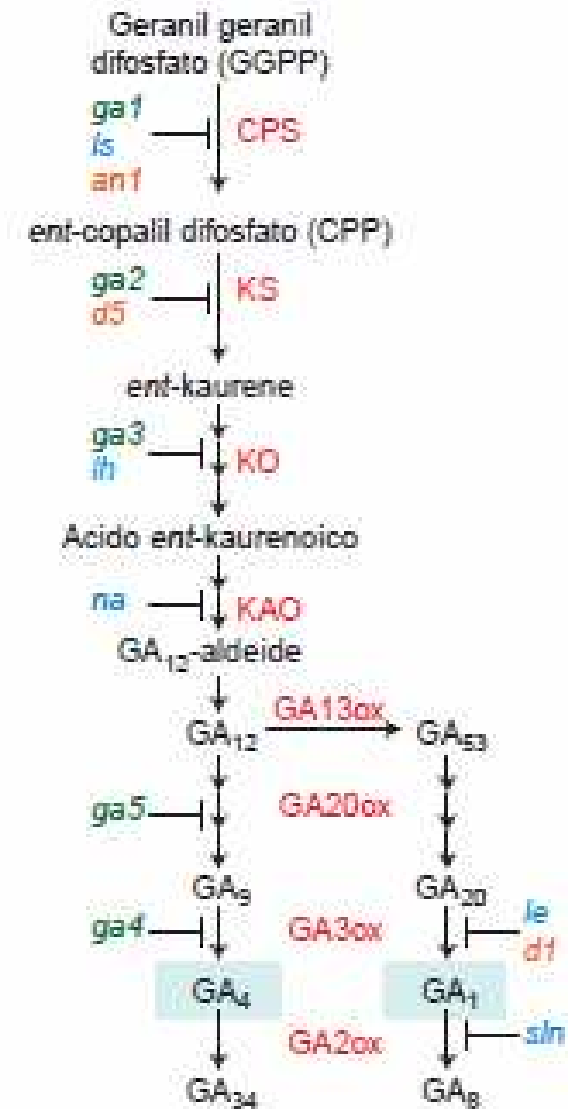
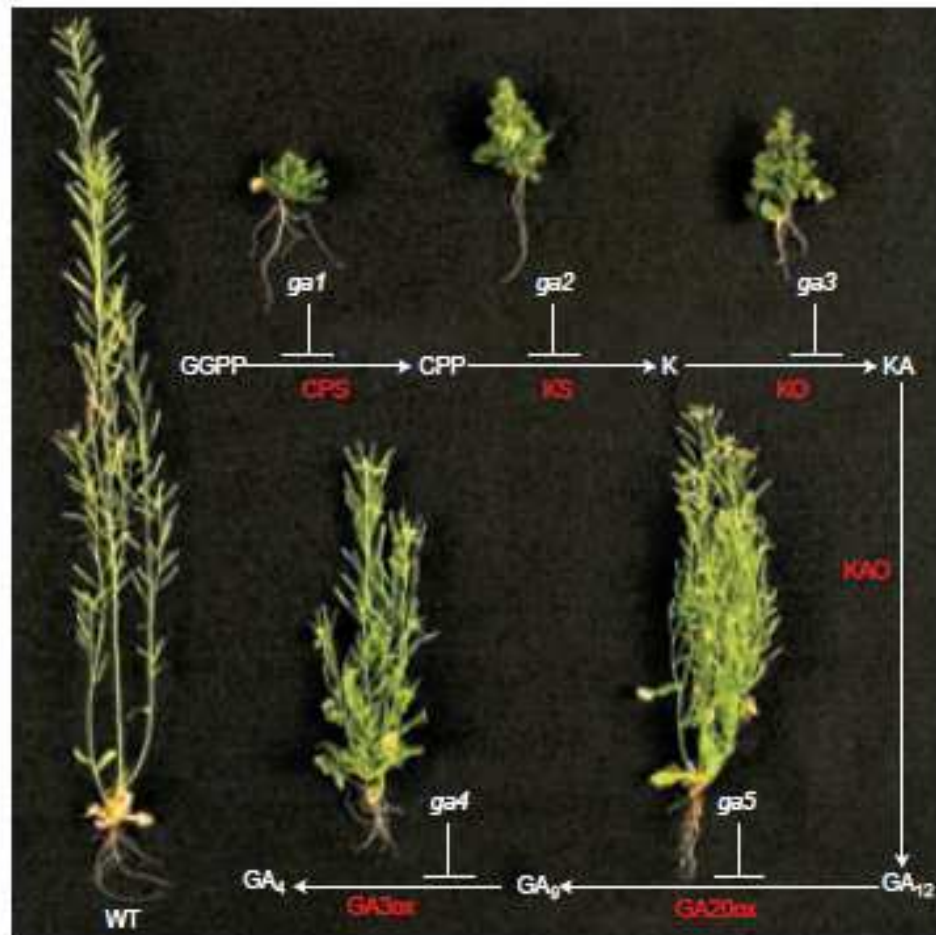
la varietà di riso seminana *sd1* è mutata nel gene GA20ox espresso nei germogli ma non nei tessuti riproduttivi, determinando un aumento della produzione dei semi



La via biosintetica è stata chiarita grazie all'uso di **inibitori della biosintesi di GA** e alla individuazione di **mutanti biosintetici**



mutanti biosintetici



La maggior parte delle gibberelline sono dei precursori di quelle biologicamente attive

Nella maggior parte delle piante
le gibberelline attive sono GA_1 e GA_4

Altre GAs attive:

GA_3

GA_7
(*Arabidopsis*, cetriolo)

GA_9

La biosintesi di GA avviene in molti tessuti e in tutti gli stadi di vita della pianta

(A) Pianticella di 5 giorni



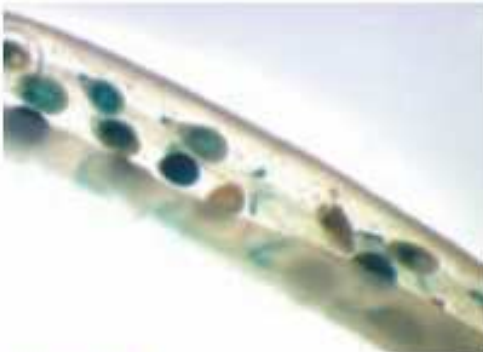
(B) Pianticella di 3 settimane



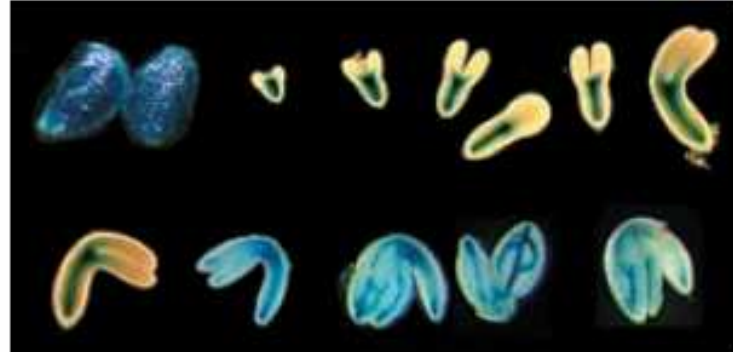
(C) Fiore aperto



(D) Siliqua matura con semi



(E) Embrioni in sviluppo



Gene reporter: GA1::GUS

GA1 codifica per il promotore di CPS il primo enzima nella biosintesi delle GA

Omeostasi dei livelli di GA

Le GA reprimono la sintesi di geni della propria biosintesi (Ga20ox, Ga3ox: feedback negativo)

Le GA promuovono la sintesi di GA2 ox che inattiva le GA (feedback positivo)

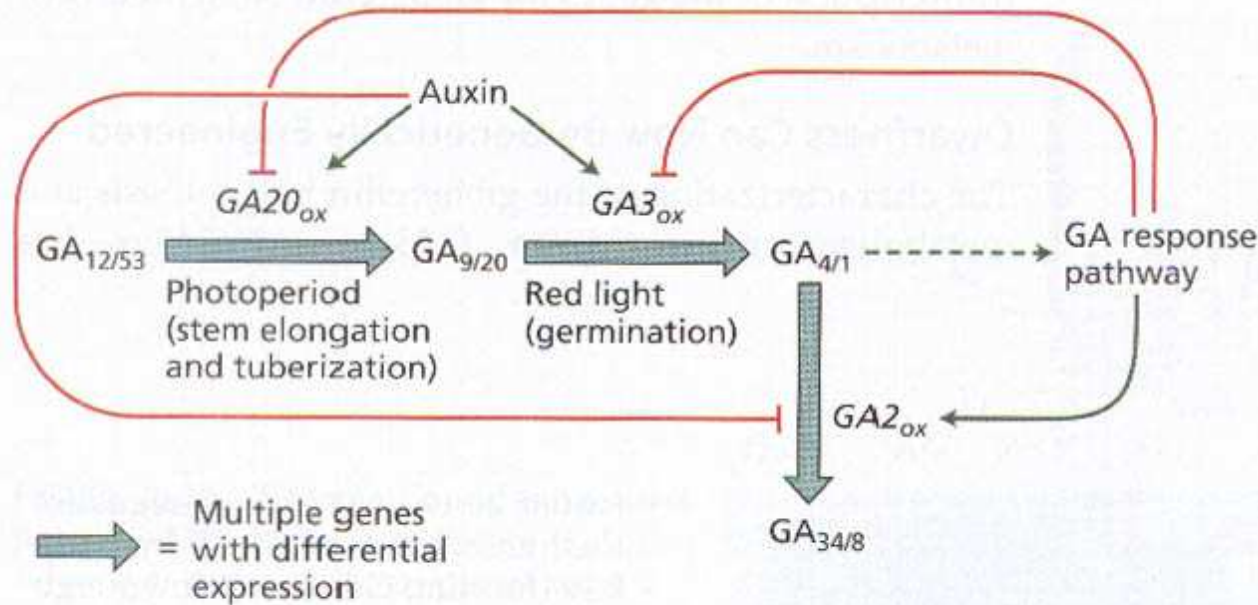
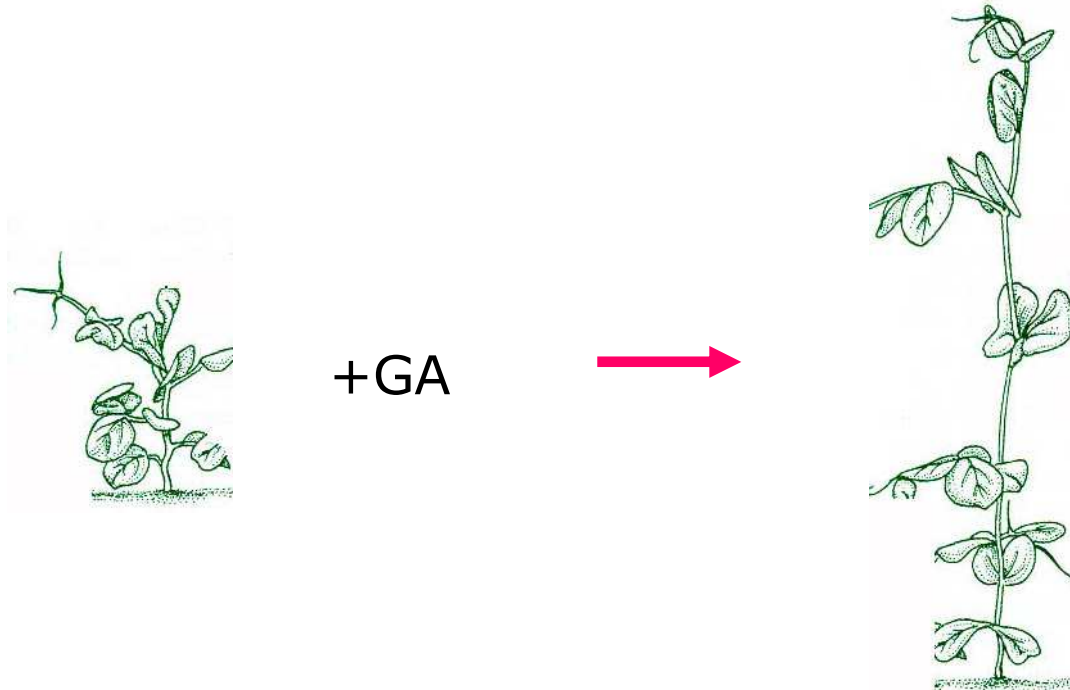


FIGURE 20.21 The pathway of gibberellin biosynthesis showing the identities of the genes for the metabolic enzymes and the way that their transcription is regulated by feedback, environment, and other endogenous hormones.

Studi iniziali effettuati somministrando a piante nane GA esogene (GA3)



Le gibberelline sono dei regolatori di crescita naturali?

Le piante alte hanno più GAs delle piante nane?

MUTANTI DI PISELLO *le*

Purificazione GA (HPLC, GC-MS)

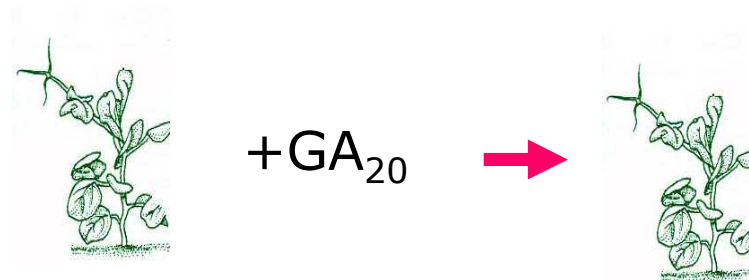
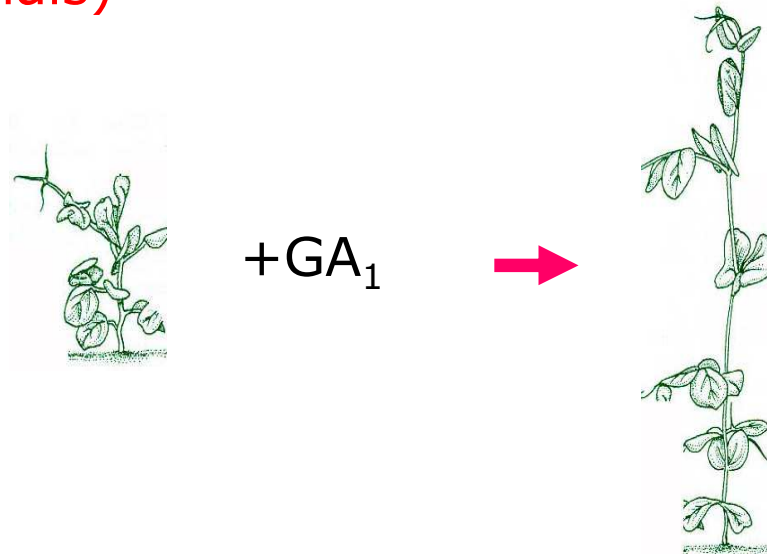


le

Le

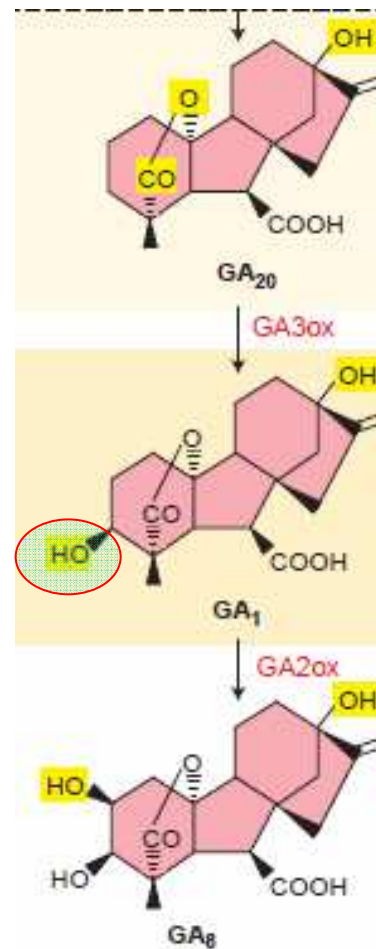
Le piante *Le* hanno un contenuto maggiore di GA₁ rispetto alle piante *le*

GA_1 è la sola gibberellina attiva nell'allungamento del fusto (pisello, mais)



Le piante le rispondono a GA_1 , ma non a GA_{20}

Il gene *Le* codifica per una GA3 ox che converte la GA₂₀ in GA₁

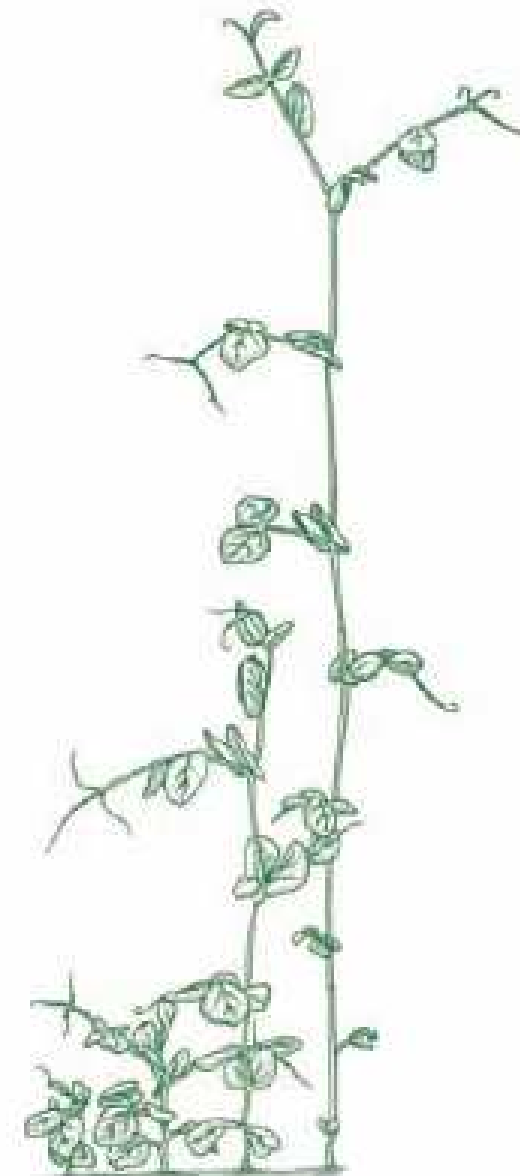
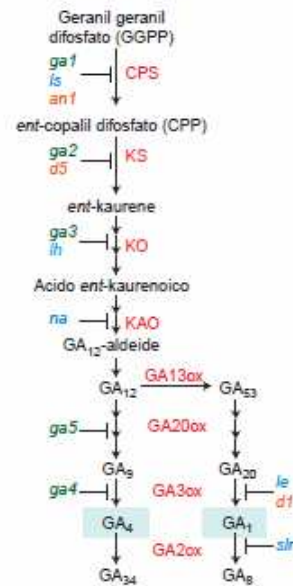


Nei mutanti *le* l'enzima è mutato in un singolo aa ed è meno efficiente: **riduzione dei livelli di GA₁**

La lunghezza del fusto è correlata alla quantità di GA attiva :

Esistono dei mutanti di pisello *na* (*nana*) molto più bassi dei mutanti *le*

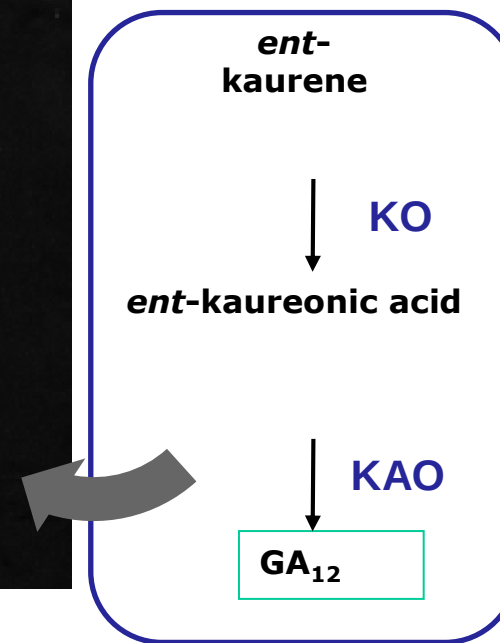
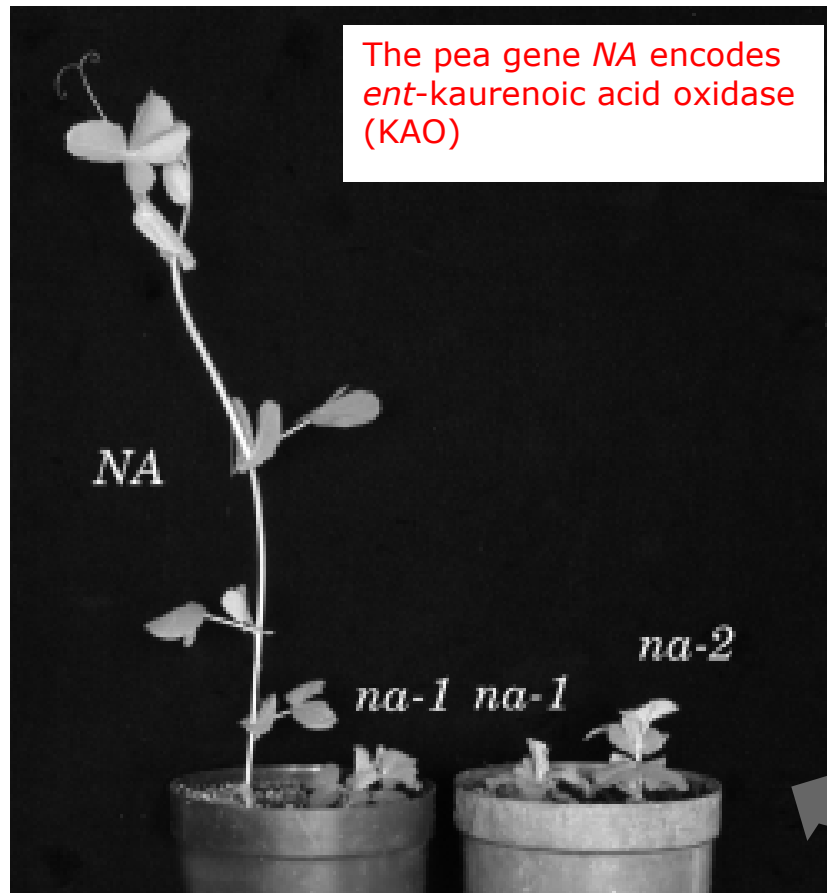
Sono incapaci di convertire l'ent-kaurene in GA₁₂-aldeide



Ultra-nano: nessuna GA nana	Nano: contiene GA ₂₀ e tracce di GA ₁ Nale	Alto: contiene GA ₁ NALE	Standard: contiene più GA ₁ NALE più
na	Nale	NALE	sln

I mutanti slender (*sln*) sono alti anche se trattati con inibitori della biosintesi delle GA

Il gene di pisello *LH*
codifica per l'*ent-kaurene*
ossidasi (KAO)



- Fattori ambientali come luce, fotoperiodo e temperatura che influenzano lo sviluppo delle piante, alterano i livelli di gibberelline
- L'effetto è dovuto alla alterazione della trascrizione di geni codificanti per enzimi della via di biosintesi delle gibberelline

GERMINAZIONE DI SEMI FOTOBLASTICI

(germinano al buio per aggiunta di GA_1)

luce $\longrightarrow$ $\uparrow$ **GA3ox** $\longrightarrow$ $\uparrow$ **GA₁** $\longrightarrow$ **germinazione**

DEEZIOLATURA DEI GERMOGLI

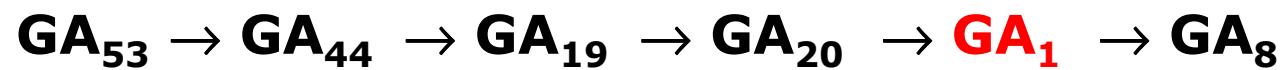
$\downarrow$ **GA3ox**; $\uparrow$ **GA2 ox** ; $\longrightarrow$ $\downarrow$ **GA₁** $\longrightarrow$ **Inibizione
crescita del fusto**

FIORITURA : FOTOPERIODO



I livelli di 13-OH GAs
Sono molto bassi

Condizioni di giorno lungo attivano la via



formazione di tuberi nelle patate: fotoperiodo (promossa da condizioni di giorno corto)



Giorno corto → ↓ GA20 ox → ↓ GA1

- La deeziolatura
- La germinazione dei semi fotoblastici
- La crescita fotoperiodica delle piante a rosetta

Sono fenomeni sotto controllo del fitocromo

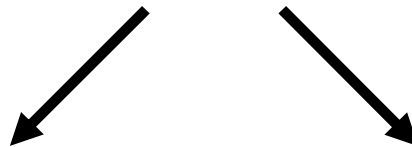
Molti effetti del fitocromo avvengono mediante cambiamenti nei livelli di GA

TEMPERATURA

Alcune piante richiedono basse temperature per germinare (stratificazione) e per fiorire (vernalizzazione)

Le gibberelline possono sostituire il trattamento a basse temperature per produrre questi effetti

fioritura di *Thalapsi arvense*



SENZA TRATTAMENTO A
BASSE TEMPERATURE

**alti livelli di acido
ent-kaurenoico**

CON TRATTAMENTO A
BASSE TEMPERATURE

**alti livelli di GAs
(principalmente GA₉)**

Regolazione della biosintesi delle Gibberelline

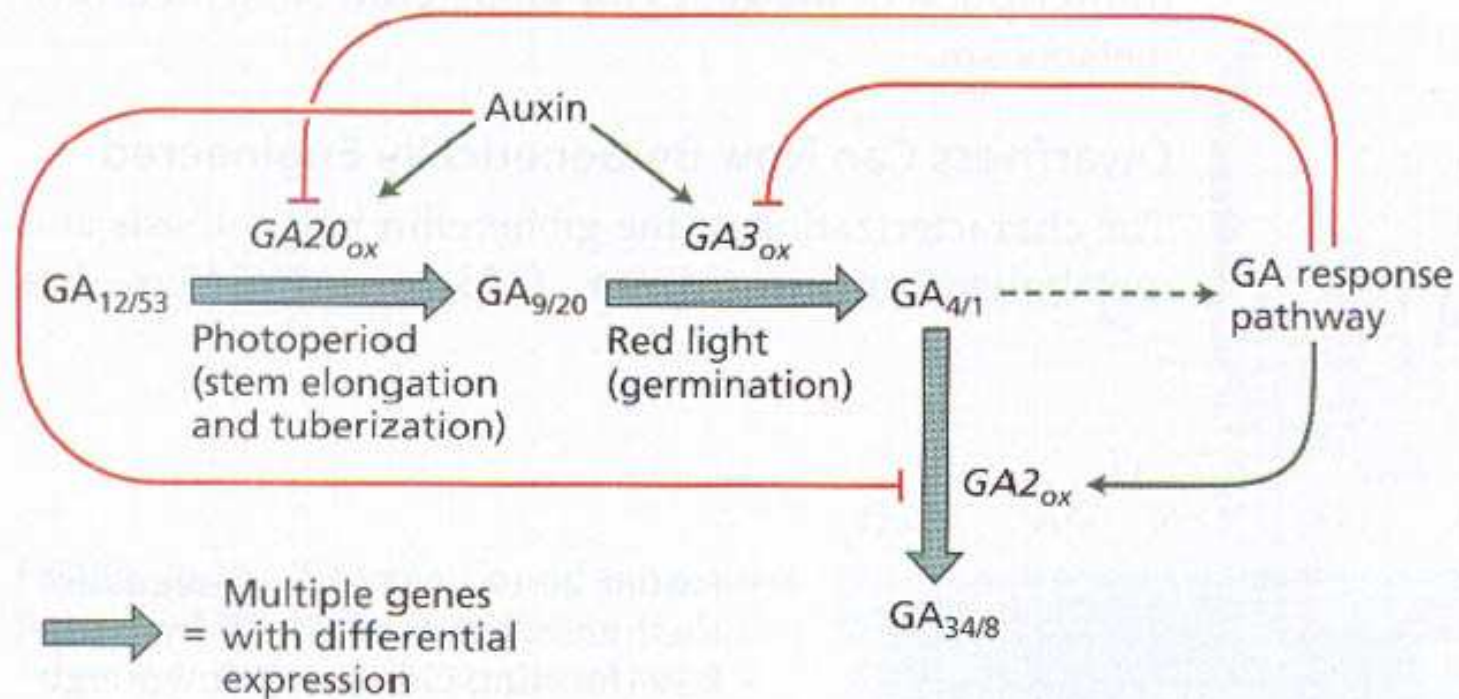
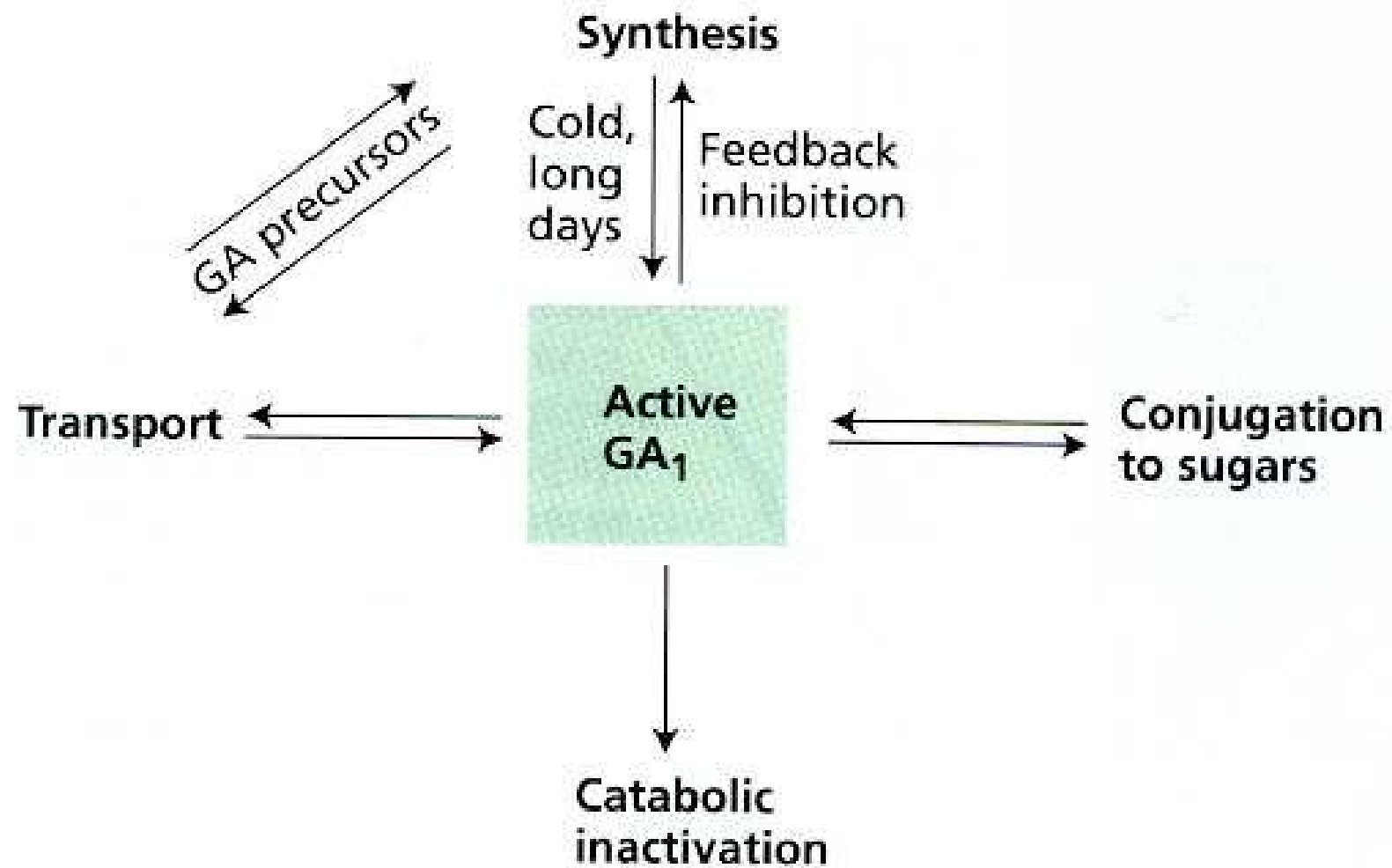


FIGURE 20.21 The pathway of gibberellin biosynthesis showing the identities of the genes for the metabolic enzymes and the way that their transcription is regulated by feedback, environment, and other endogenous hormones.

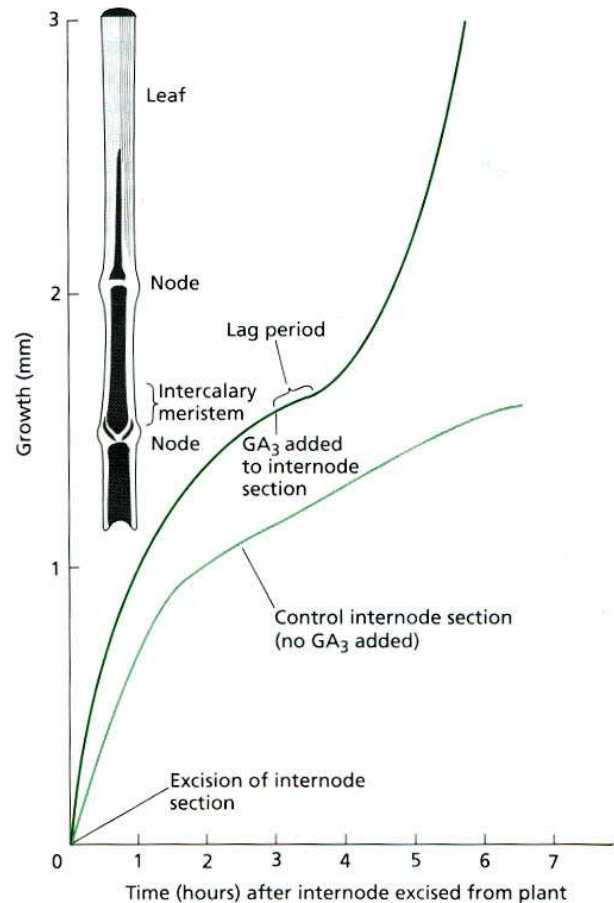


Meccanismo di azione delle gibberelline

- Promozione della crescita del fusto
(meristema intercalare del riso di acqua profonda)
- Degradazione dell'amido nell'endosperma
(germinazione dei cereali)

PROMOZIONE CRESCITA DEL FUSTO

(allungamento internodo superiore del riso di acqua profonda)

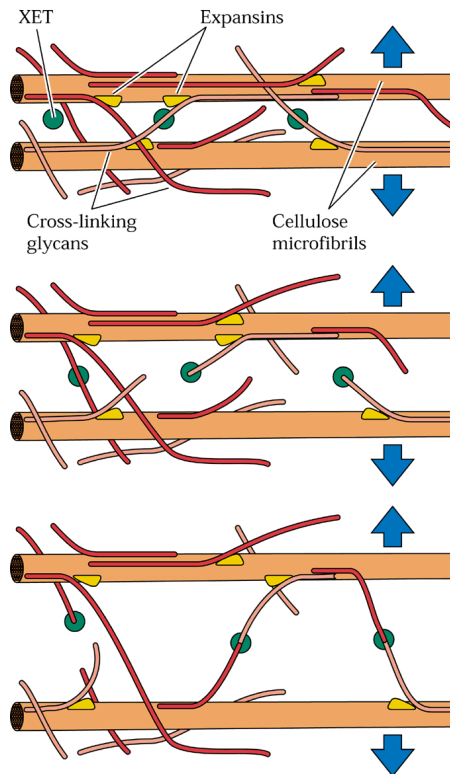


- aumento estensibilità parete cellulare
- no acidificazione apoplasto (auxina)
- Lag time da 40 min a 3 ore
- Effetto additivo con IAA

Le GA stimolano sia l'espansione che la divisione cellulare

ESPANSIONE

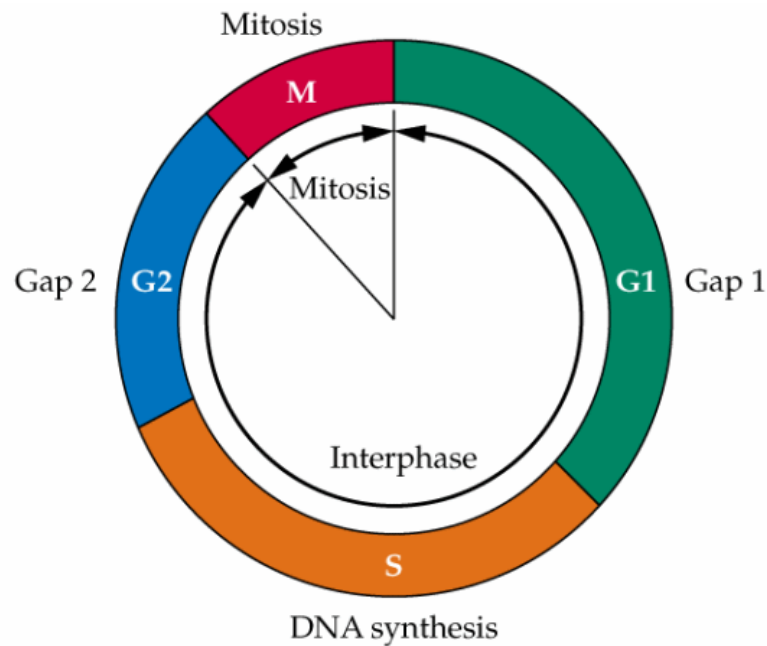
- aumento dei livelli di XTH xiloglucano endotransglicosidasi /idrolasi
- aumento dei livelli di OsEXP4 (espansina)



Antis. OsEXP4 Contr Senso OseXP4

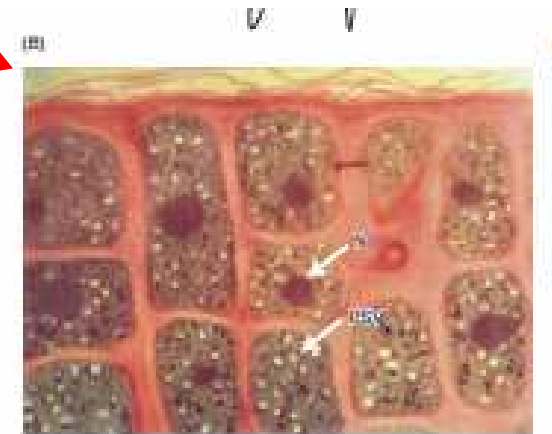
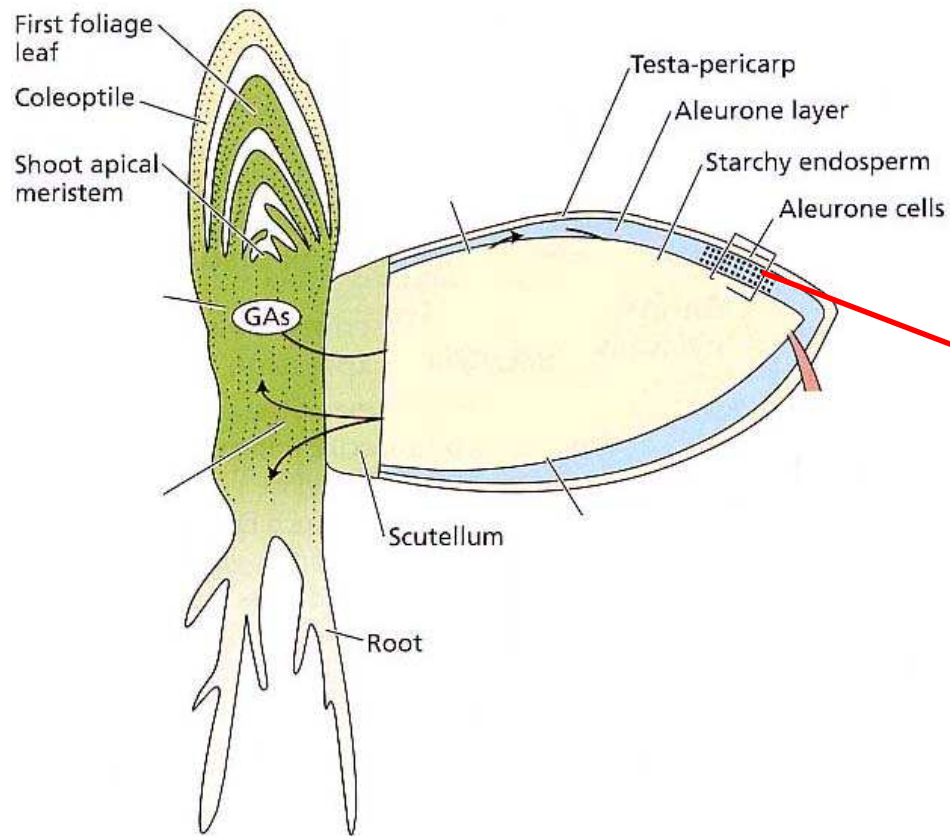
DIVISIONE CELLULARE

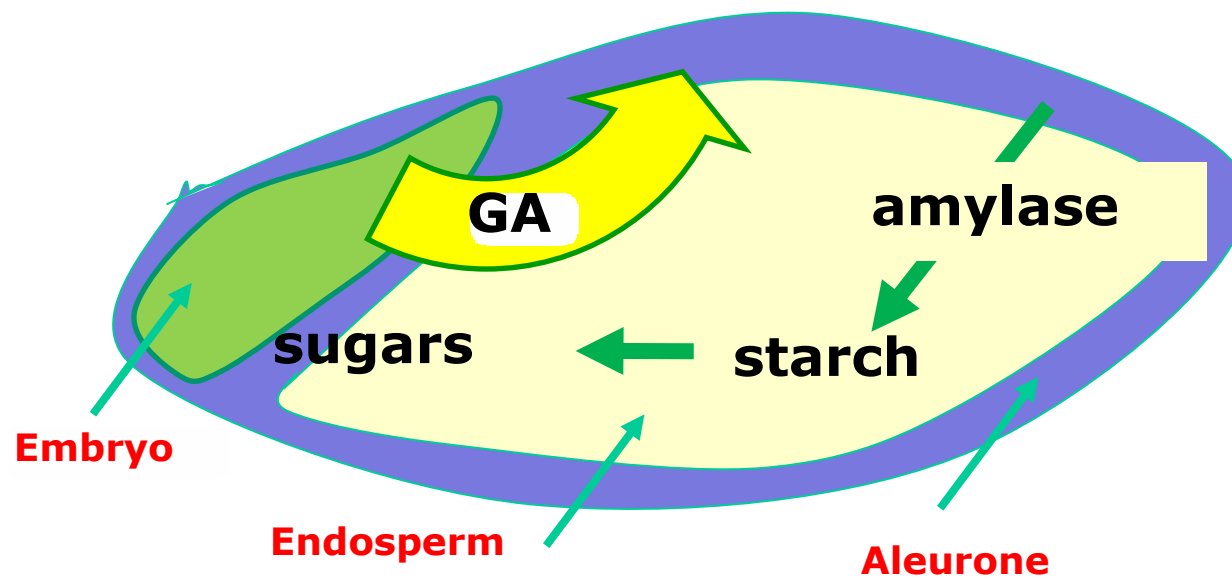
In nuclei isolati da piante di riso sommerse GA attiva la transizione dalla fase G1 alla fase S (aumento mitosi)

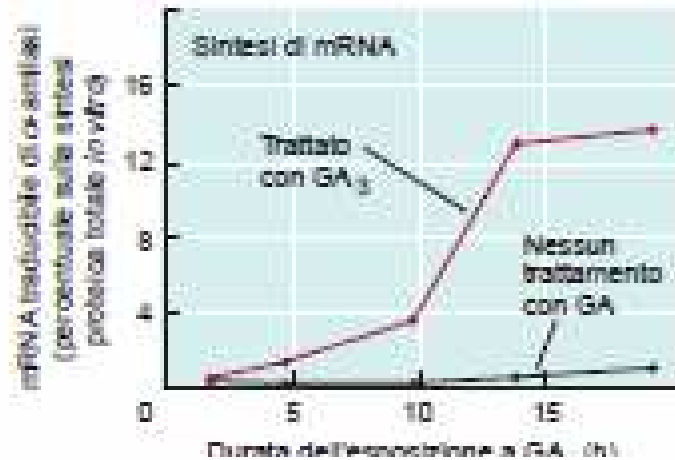


Le GA stimolano l'espressione di varie protein kinasi ciclina dipendenti (CDK) che regolano il ciclo cellulare

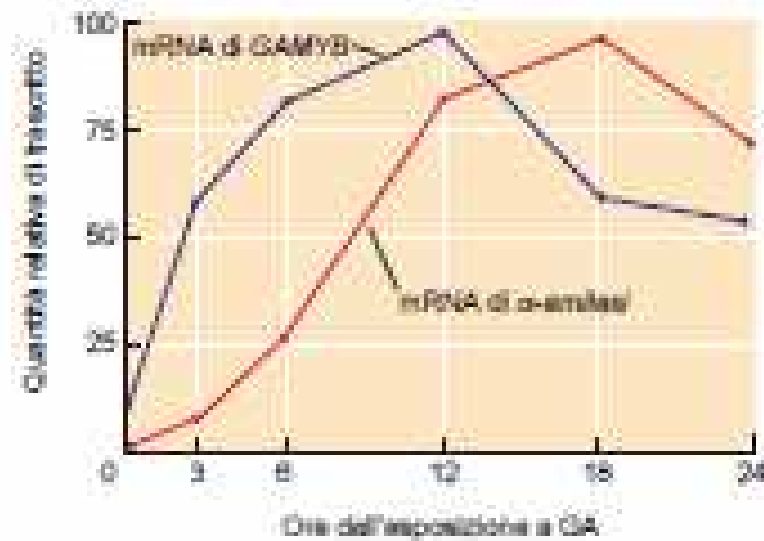
Degradazione dell'amido nell'endosperma (germinazione dei cereali)





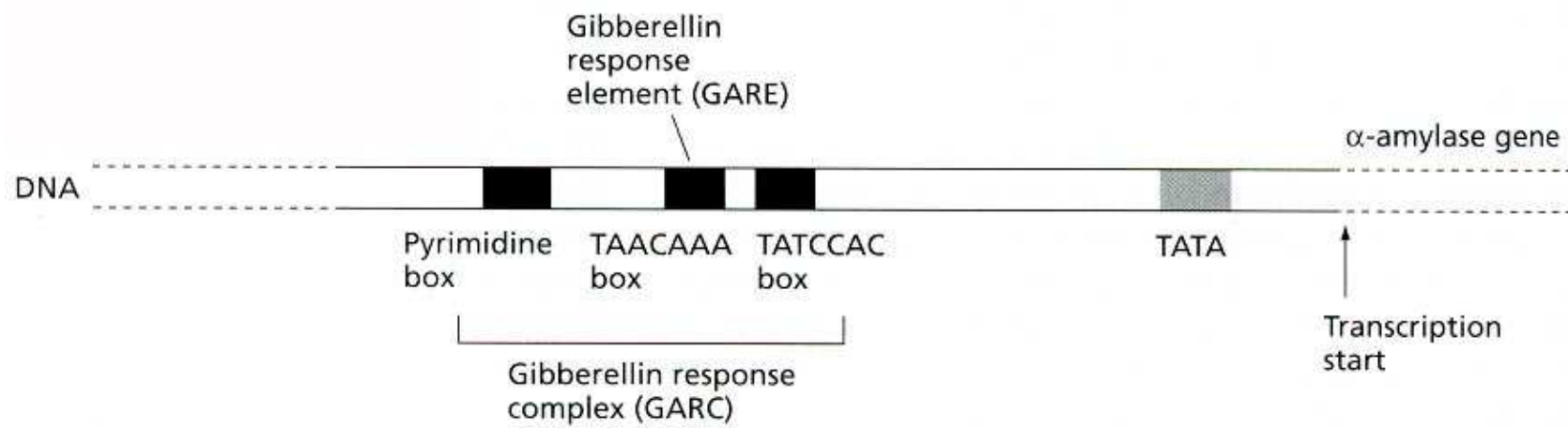


Le GA inducono la trascrizione dell'mRNA dell' α amilasi



L'aumento dell'mRNA dell' α amilasi è Preceduto dall'aumento dell' mRNA del fattore di trascrizione GAMYB

GAMYB si lega alle sequenze GARE (TAACAAA) nel promotore di geni indotti da gibberelline (α amilasi)



TRASDUZIONE DEL SEGNALE

Mutanti di risposta alle GA

I **mutanti di risposta** alle GA hanno consentito di individuare componenti della via di trasduzione del segnale delle GA

Mutanti GA deficienti (biosintetici):

ridotti livelli di GA, fenotipo nano; sensibili all'applicazione di GA esogene . Es. ***ga1***

MUTANTI DI RISPOSTA:

Mutanti nani GA insensibili

(recessivi: Es ***gai***)

Mutanti con risposta costitutiva alle GA

(dominanti: Es: slender rice 1 (***slr1***); ***sln1*** (orzo) fenotipo slanciato anche se cresciute con inibitori della biosintesi di GA;

In arabidopsis ***rga***

ga1-



Figure 2. The effect of gibberellin (GA) application on a GA-deficient mutant. Plants homozygous for *ga1-3* (*left*) are dwarfed and have small, dark green rosette leaves. Regular treatment with GA₄ results in tall, paler green plants with an increased leaf size (*right*). GA₄-treated *ga1-3* plants resemble untreated wild-type plants.

gai

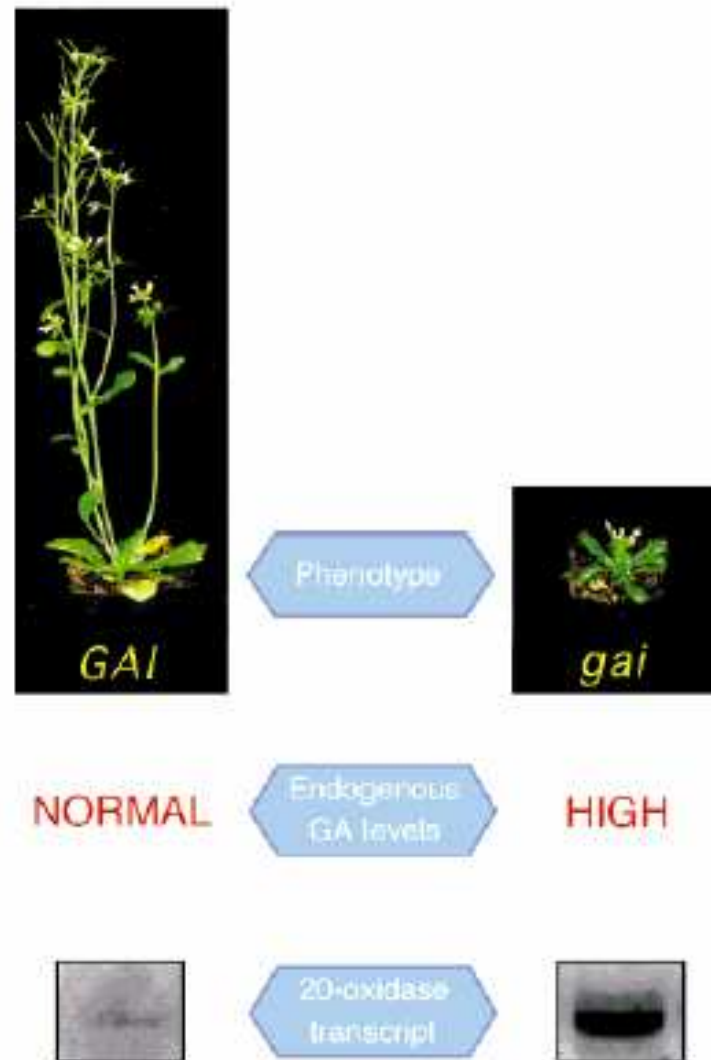
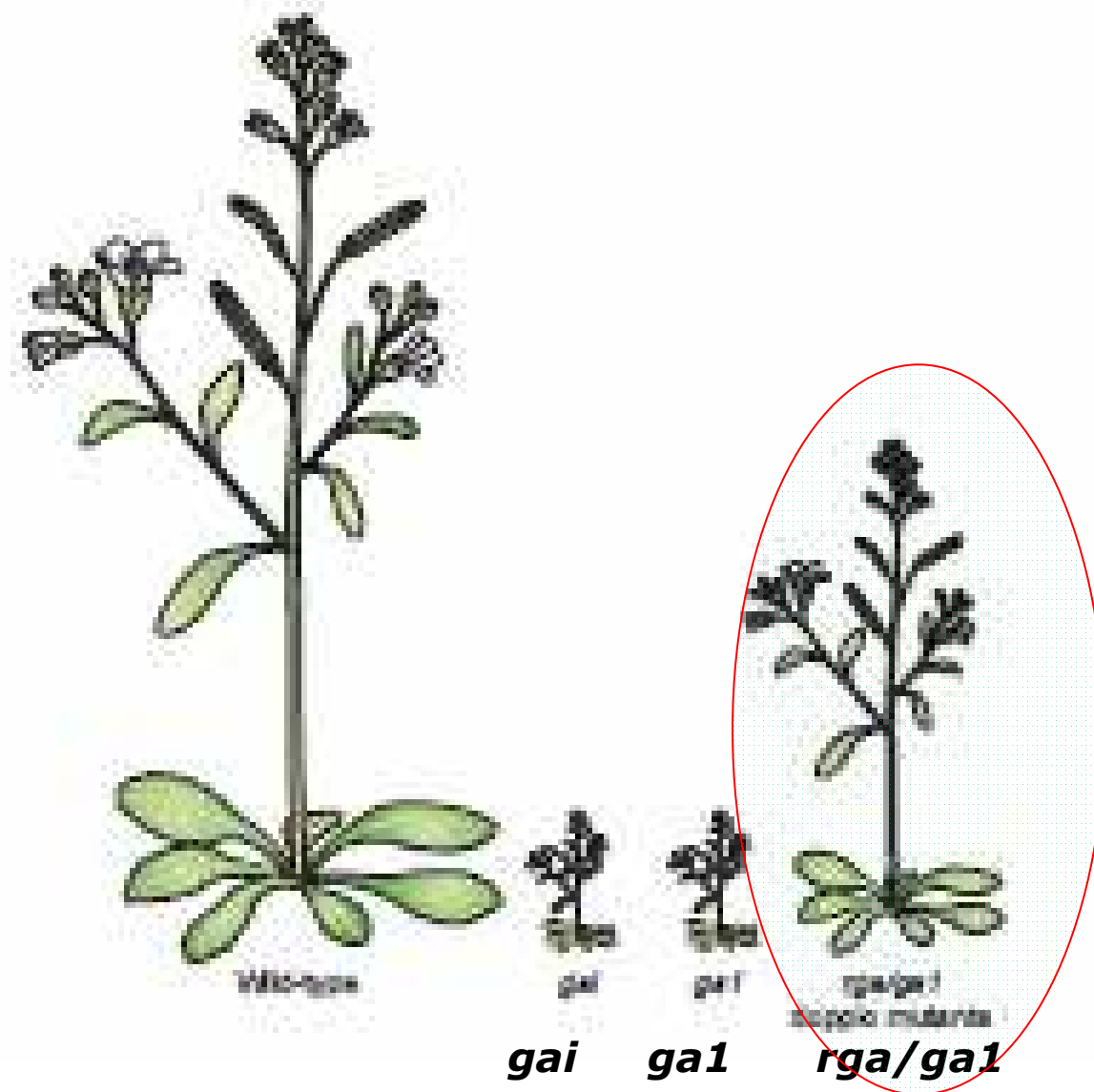


Figure 3. *gai* confers a dwarf phenotype that mimics that due to GA deficiency. The wild-type control (*GAI*, left) is tall, whilst the *gai* mutant (right) is dwarfed. However, *gai* mutants have elevated endogenous GA levels and higher than normal levels of 20-oxidase transcripts.

Doppio mutante ***rga/ga1***

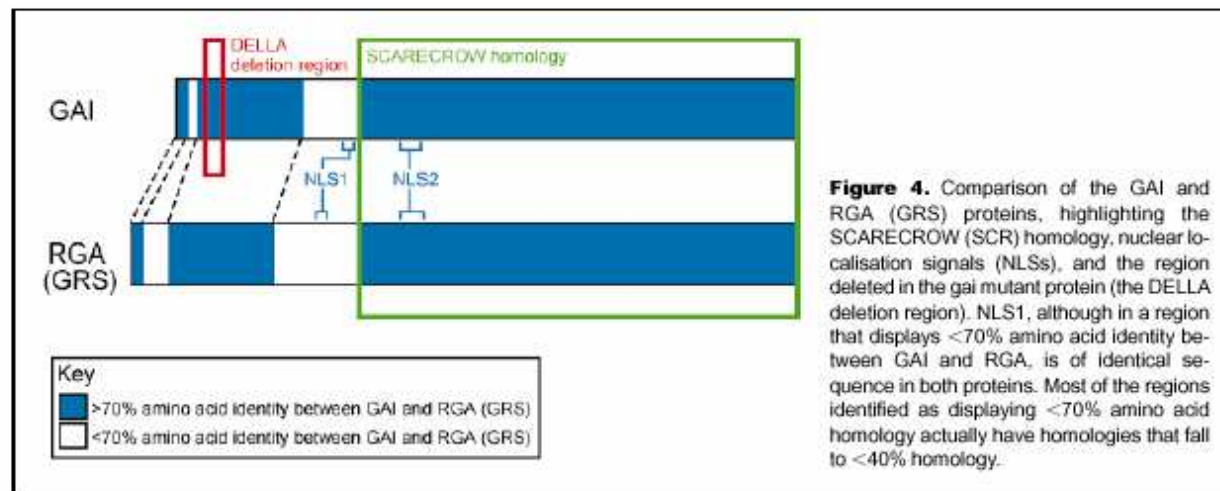


Arabidopsis:

**La mutazione *rga* ripristina il fenotipo alto
nel mutante biosintetico nano *ga1***

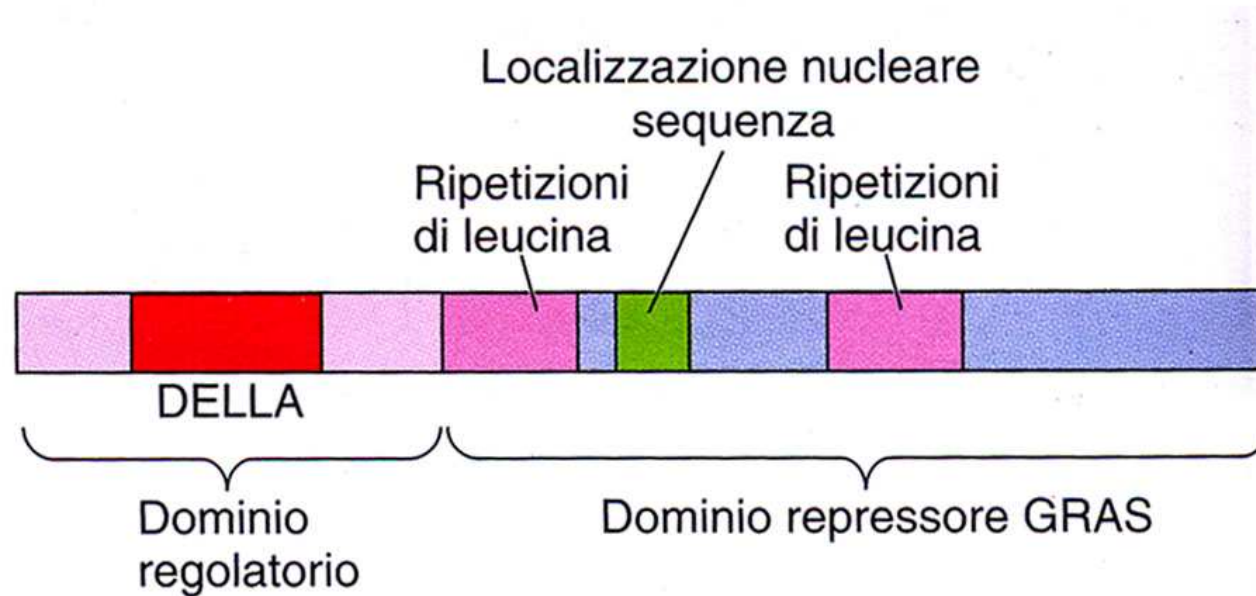
Nonostante i fenotipi opposti *GAI* e *RGA* sono geni strettamente correlati (82% identità)

Entrambi fattori di trascrizione della famiglia GRAS



GAI/RGA agiscono come repressori della via attivata dalle GA

Famiglia GRAS (proteine DELLA)



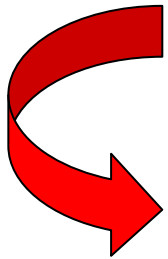
Il dominio DELLA (aspartico, glutammico, leucina, leucina, alanina) regola la stabilità della proteina (proteosoma)

In arabidopsis 5 membri

In riso e orzo 1

Rivoluzione verde : anni 70'

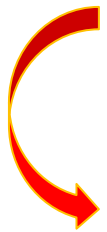
Mutazione nei cereali del gene *rht* (reduced height)



mutazione *gai*

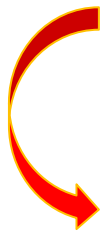
Mutazioni sullo stesso gene possono produrre fenotipi opposti

La mutazione ***gai*** riguarda la delezione della regione **DELLA** nel dominio regolativo del gene *GAI*: il repressore non viene degradato



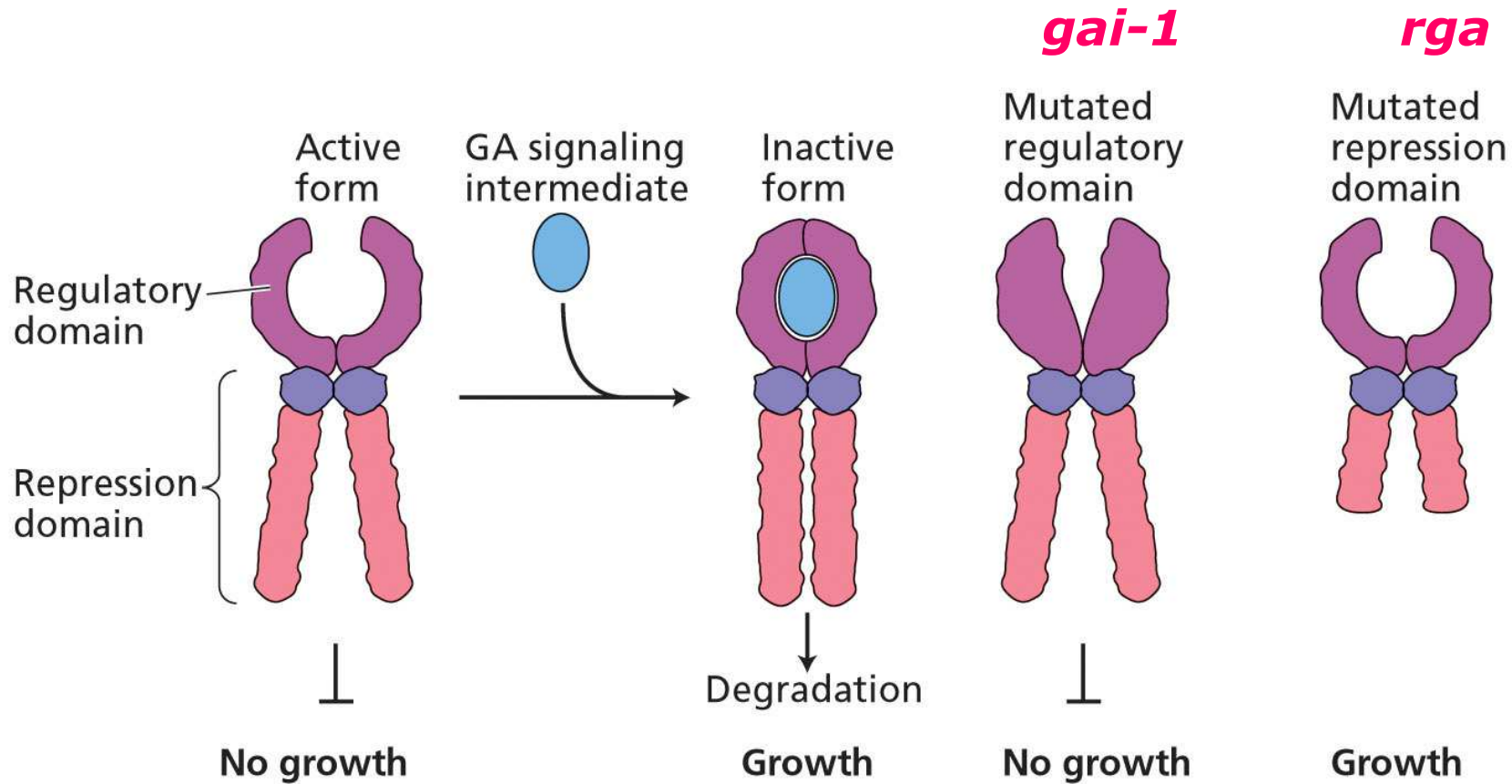
Fenotipo nano

La mutazione ***rga*** riguarda il dominio funzionale del repressore: il repressore non funziona



Fenotipo alto

Mutazioni su domini diversi hanno effetti diversi



PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 20.28 © 2002 Sinauer Associates, Inc.

nano

alto

Nei cereali isolati i mutanti *slender* simili
al mutante *rga* di *Arabidopsis*

I geni *SLENDER* sono ortologhi di *RGA* e appartengono
alla famiglia di fattori di trascrizione GRAS

GRAS = (Gai; Rga; Scr): tutti contengono il dominio
DELLA

Riso: slender rice 1 (***slr1***)

Orzo: slender 1 (***sln1***)

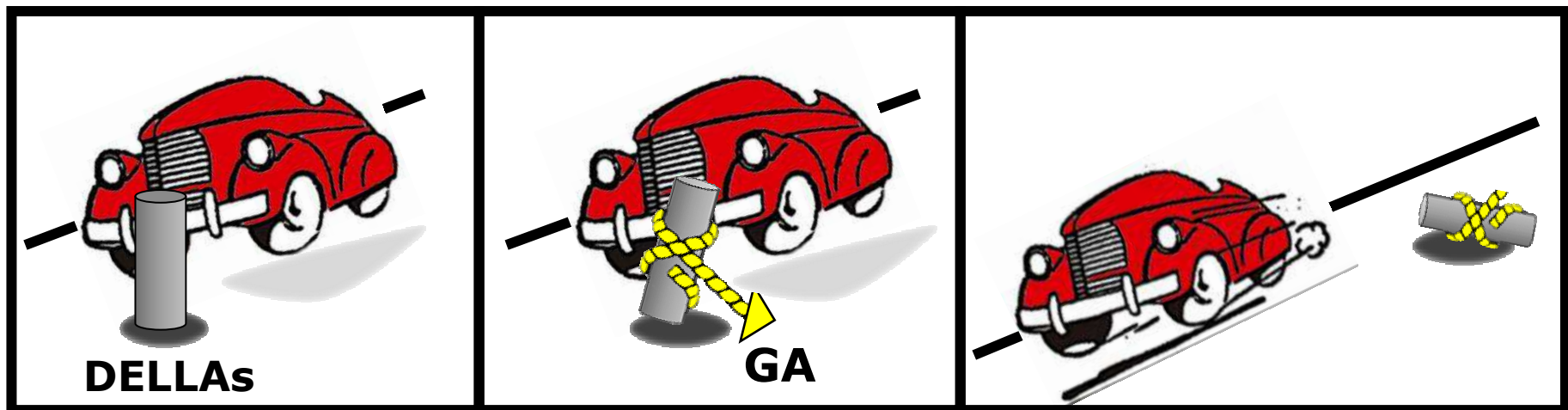
Anche in questo caso si possono avere mutazioni che producono fenotipi opposti



sln 1c
mutazione nel
domino di repressione
GRAS

sln 1d
mutazione
nel domino
DELLA

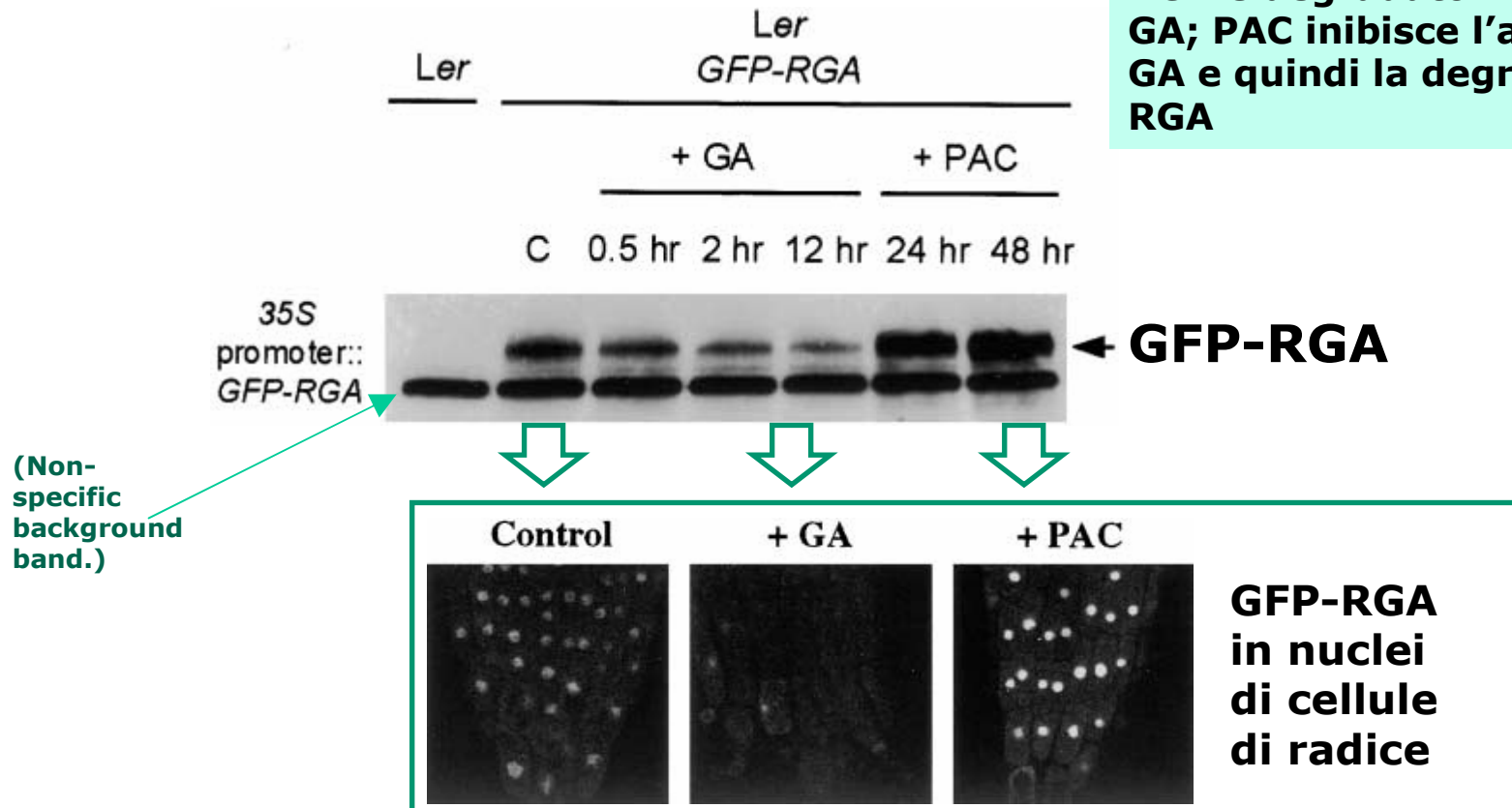
COME AGISCONO LE GA?



Le GA inattivano I repressori
della crescita DELLA

Le GA inducono la degradazione delle proteine DELLA (repressori GRAS)

RGA è degradato in presenza di GA; PAC inibisce l'accumulo di GA e quindi la degradazione di RGA



Quale è la via di degradazione dei repressori GRAS regolata dalle GA?

Identificati geni ortologhi **gid2** (riso) e **sly1** (sleepy)(arabidopsis)

Codificano proteine F-box componenti dei complessi

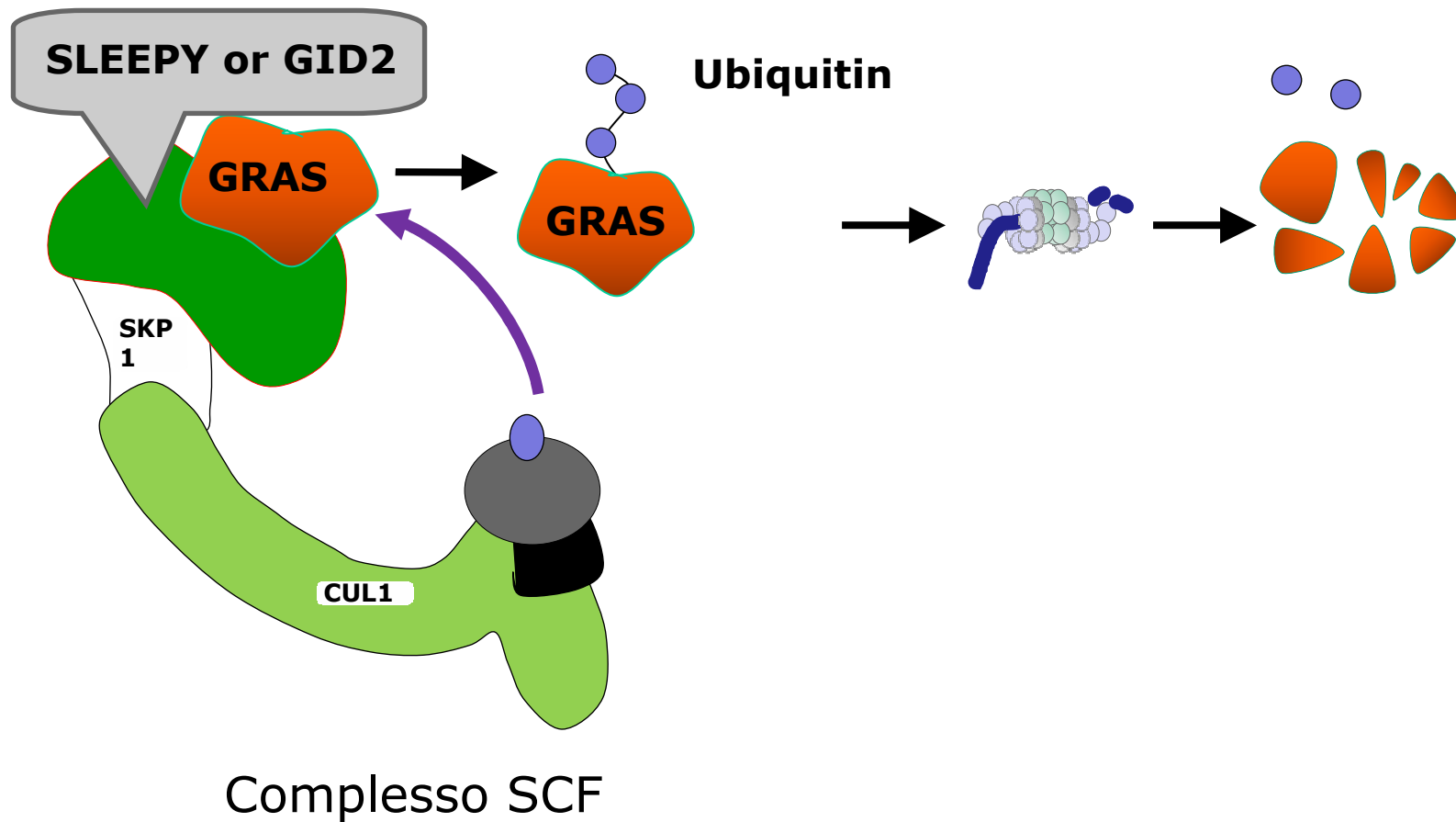
E3-ubiquitina ligasi

Le mutazioni sono recessive e danno luogo ad un fenotipo nano

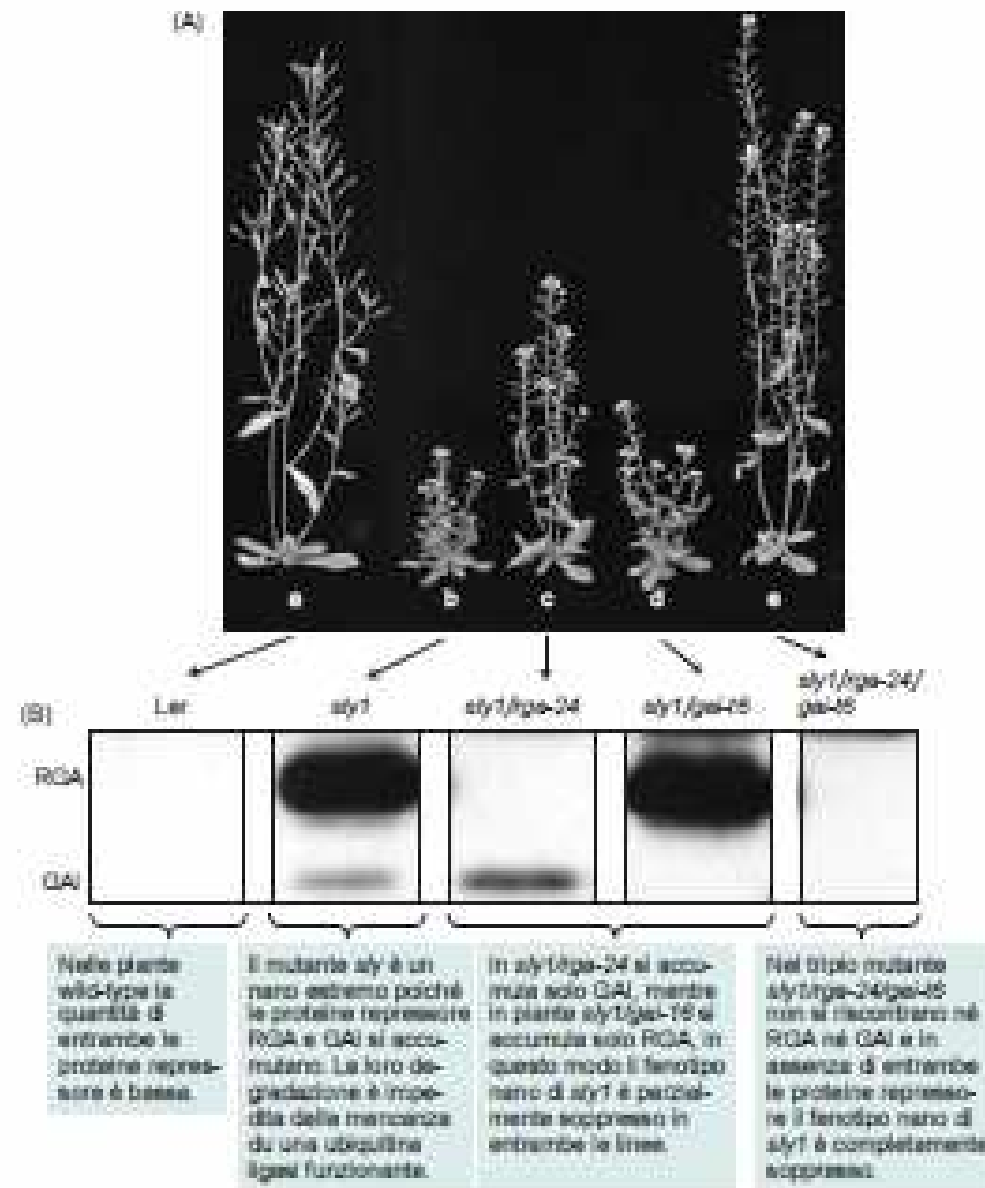
GID2 in riso segnala per la degradazione il repressore GRAS:SLR1

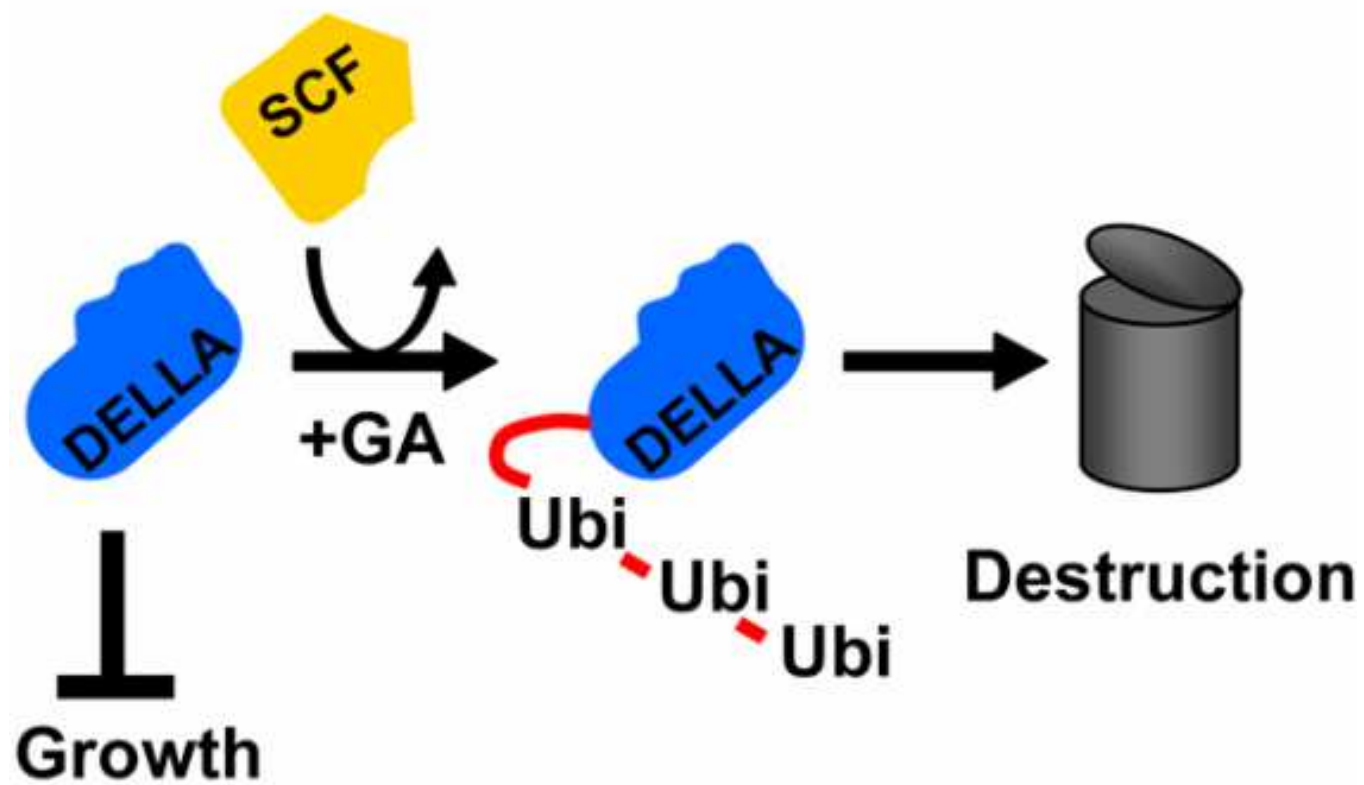
SLY1 in arabidopsis segnala per la degradazione i repressori GRAS: RGA e GAI

GID2 (riso) o SLY (arabidopsis) inducono la degradazione dei repressori GRAS mediante la via del proteosoma



SLY determina la degradazione di GAI e di RGA





Quale è il bersaglio delle GA?

Nel riso la mutazione recessiva *gid1* produce piante nane insensibili a GA

GID1 lega GA $\implies$ RECETTORE

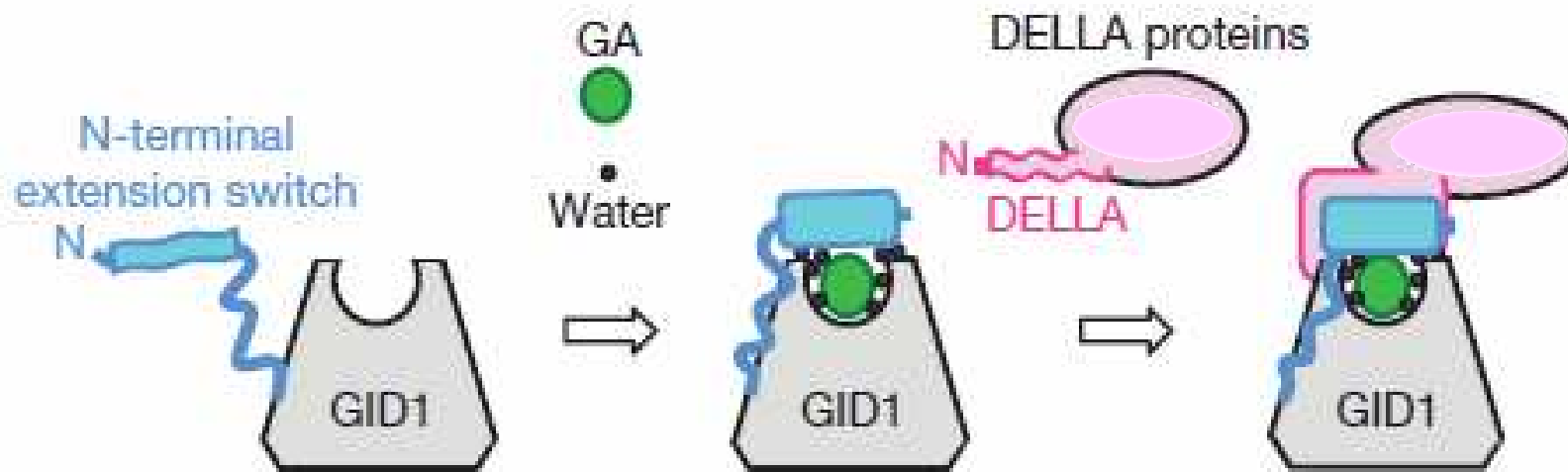
(diverso strutturalmente da GID2: omologia con lipasi)

GID1 interagisce con SLR1 solo in presenza di GA

(SLR1 =repressore GRAS di riso)

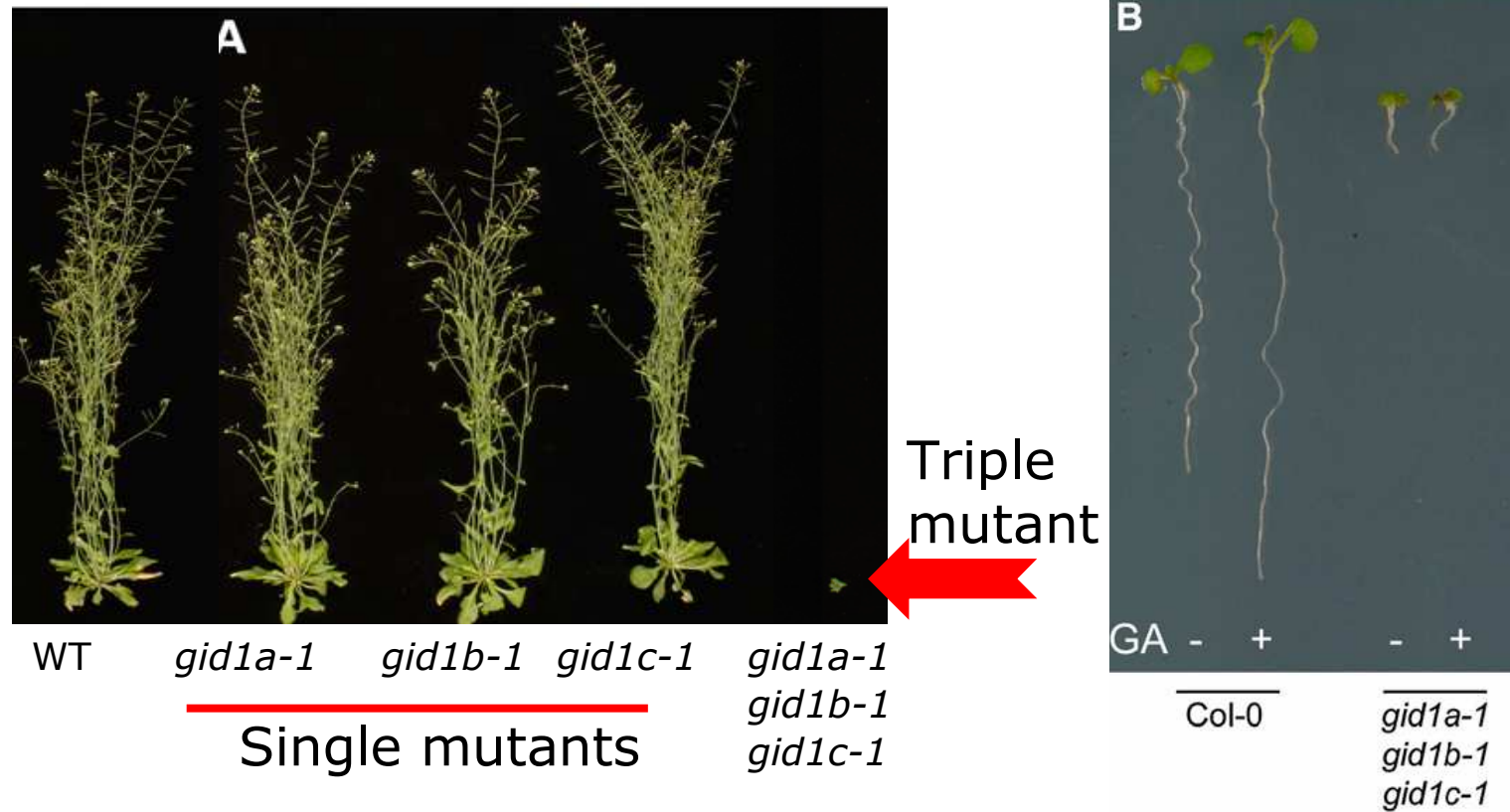
Quando GID1 lega le GA è in grado di legare i repressori GRAS (in riso SLR1)

(Il dominio DELLA è necessario per il legame GID1/SLR1)

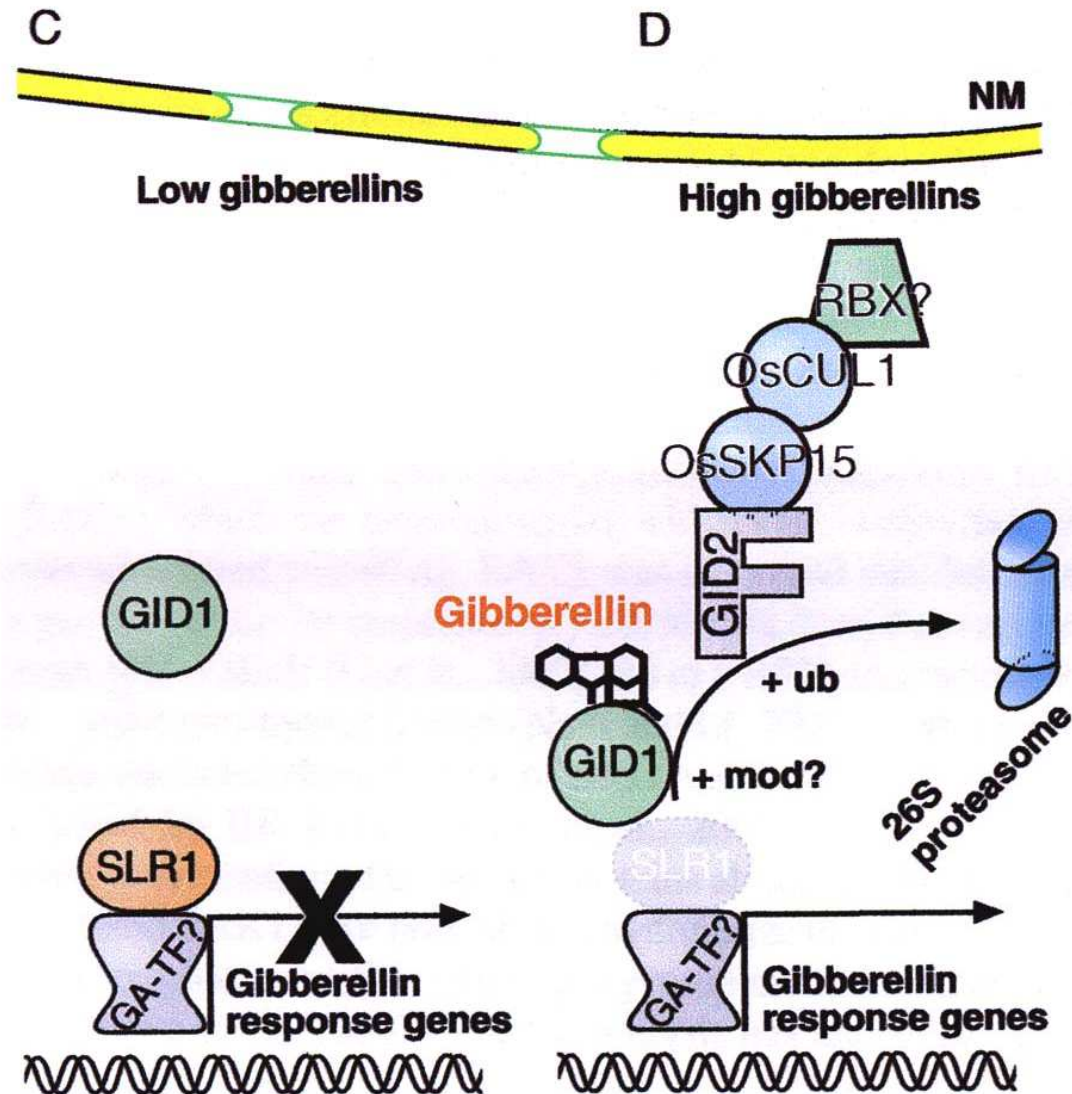


e di associarsi alla proteina F box (GID2) del complesso SCF segnalando Il repressore GRAS SLR1 per la degradazione

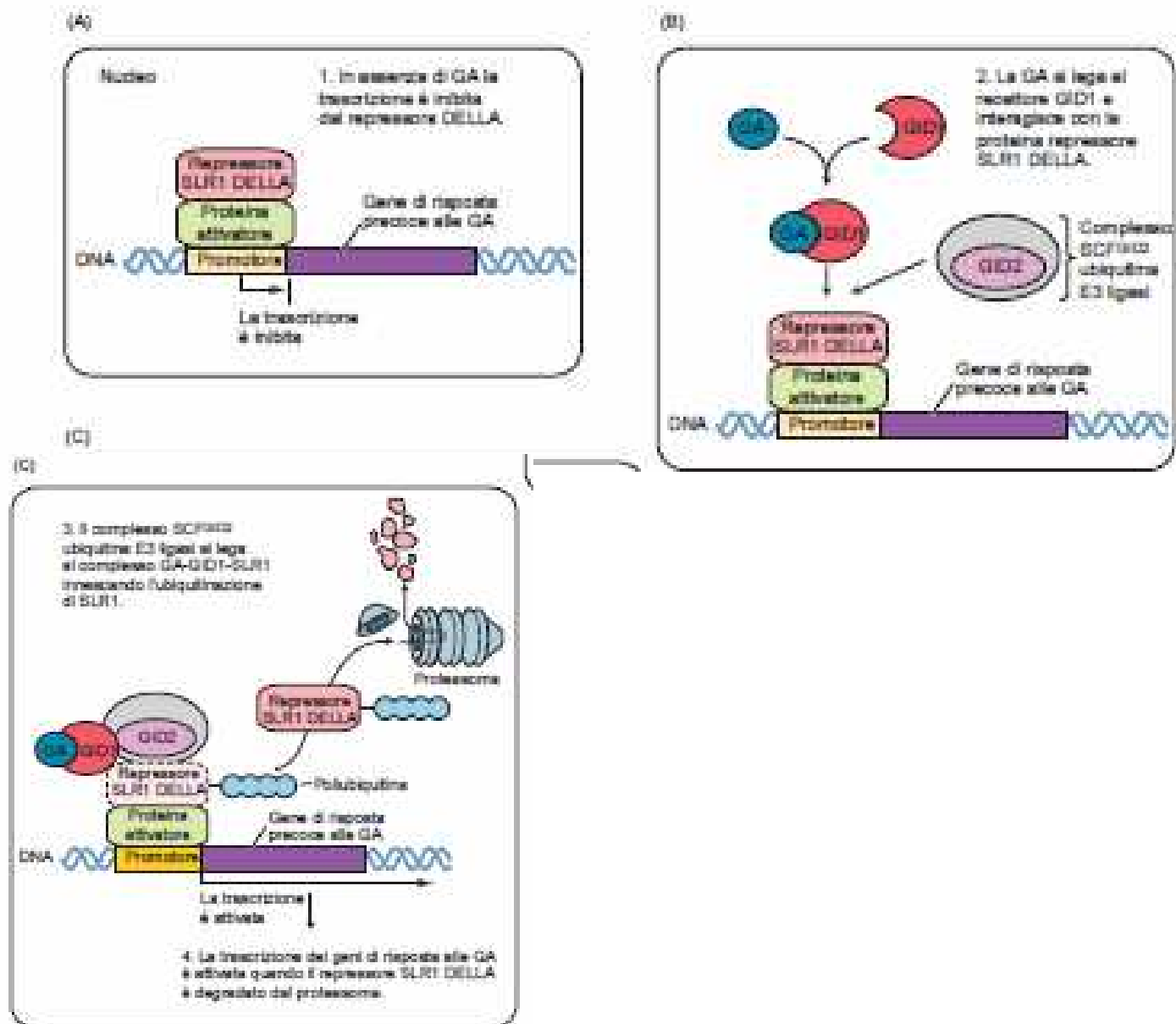
In arabidopsis ci sono tre geni ortologhi di GID1

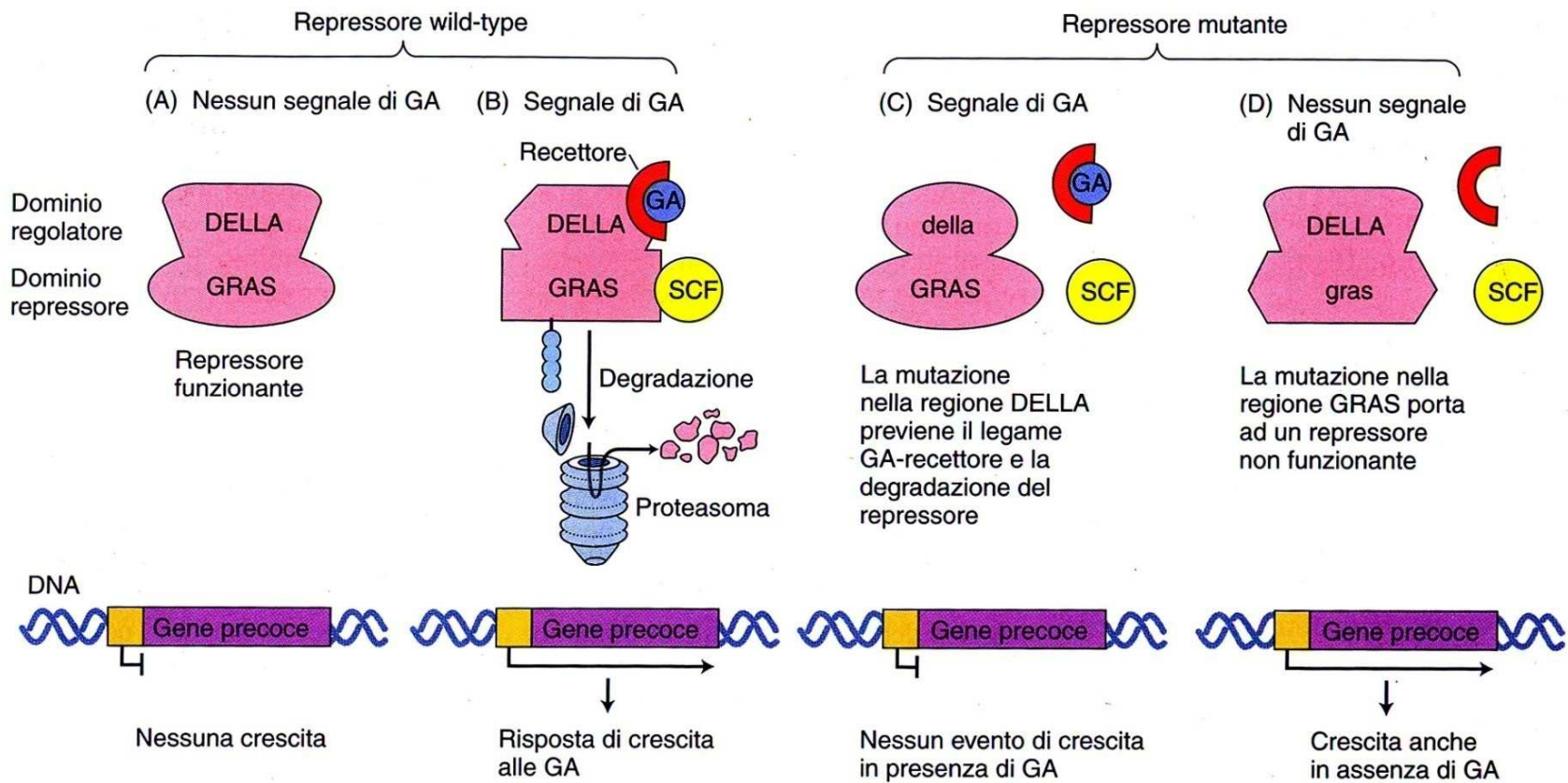


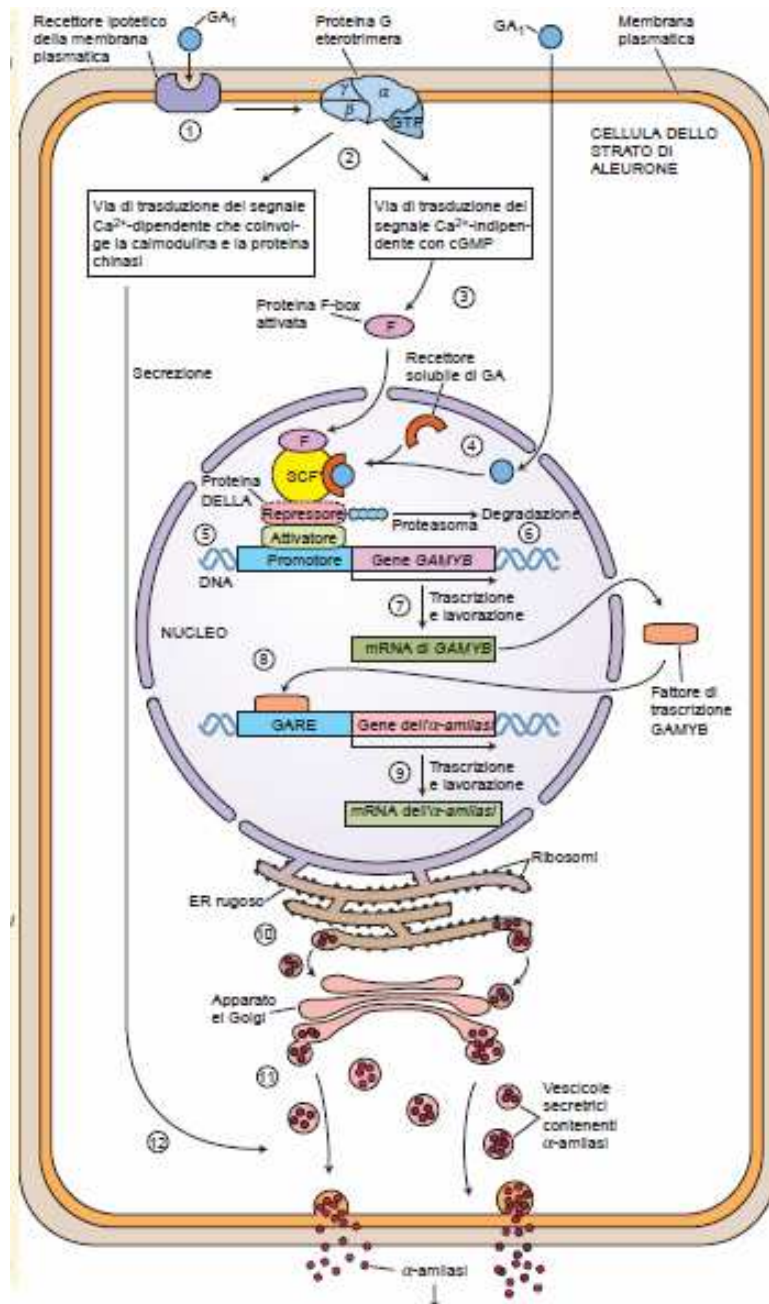
Meccanismo di azione delle GA nel riso



Modello del meccanismo di azione delle GA







Nel'aleurone SNL1
degradato entro due ore
dell'applicazione di GA