



*The Biochemistry and Genetics of Floral Scent Production as Part of the
Petunia Pollination Syndrome*

N.F.B.M. Shaipulah

SAMENVATTING

Bloemgeur speelt een belangrijke rol in de bestuiving van Petunia. Door specifieke geurstoffen af te geven trekken de bloemen bepaalde bestuivers aan en zodoende draagt de bloemgeur aanzienlijk bij aan de efficiëntie van bestuiving en het succes van reproductie. Geurende Petunia bloemen produceren voornamelijk vluchtige Benzoaten en Fenyylpropanoïden (in het Engels FVBPs). Het tijdstip waarop deze vluchtige stoffen worden afgegeven valt samen met de activiteit van de bestuiver, waardoor dit een ideaal model is om de rol van bloemgeur in relatie tot bestuiving te onderzoeken. Biochemisch onderzoek en de onderliggende genetica naar de geur van Petunia heeft een sterke ontwikkeling doorgemaakt. Zo zijn er veel biosynthetische stappen gekarakteriseerd en is er een voorlopige Petunia genoom sequentie gepubliceerd. Dit proefschrift geeft nieuwe inzichten in de biosynthese van vluchtige stoffen door Petunia bloemen en in de interactie met de andere metabolische routes. Hoewel de biosynthese voor de productie van benzoëzuur via de β -oxidatieve route volledig is gekarakteriseerd, is die voor de fenyylpropeen route, die leidt tot de productie van (iso)eugenol, nog niet het geval (**Hoofdstuk 2 en 3**). Verder beschrijf ik de ritmische regulatie van de productie van vluchtige stoffen in wilde en gecultiveerde Petunia's (**Hoofdstuk 4 en 5**).

De vluchtige C_6-C_3 -verbindingen Isoeugenol en Eugenol in Petunia bloemen worden vanuit hetzelfde intermediair, vanuit dezelfde biochemische route, gemaakt als de anthocyanen (kleur) en deze zouden zodoende een competitie kunnen aangaan. In **Hoofdstuk 2** karakteriseren we het caffeoyl-CoA O-methyltransferase 1 (CCoAOMT1) gen van *P.hybrida* cv. Mitchell, welke caffeoyl-CoA methyleert naar feruloyl-CoA, een intermediair voor zowel de (iso-)eugenol als de lignine biosynthese. Reductie van *CCoAOMT1* expressie (RNAi) resulteert niet alleen in de afname van eugenol productie, maar ook tot de accumulatie van anthocyanen in bloemen maar ook in stengels en bladeren. Transgene RNAi planten hebben roze bloemen en paarse bladeren, ondanks het feit dat *P.hybrida* cv. Mitchell bloemen geen functioneel ANTHOCYANIN 2 (AN2) gen hebben, de sleutel-activator van de anthocyaan biosynthese. Door cafeïnezuur aan de bloem van *P.hybrida* cv. Mitchell te voegen, laten we zien dat dit metaboliet de expressie van *PURPLE HAZE* (PHZ) in bloembladeren induceert. Dit suggereert dat deze transcriptie factor de anthocyaan biosynthese in transgene *CCoAOMT1*-RNAi planten activeert. Onze resultaten wijzen erop dat verstoring van cafeïnezuur- of caffeoyl-CoA-niveaus in *CCoAOMT1*-RNAi planten leidt tot de activering van PHZ en vervolgens tot accumulatie van anthocyanen. In dit hoofdstuk tonen we de rol aan van *CCoAOMT1* in de fenyylpropeen biosynthese en laten we zien dat er een metabole verbinding is tussen geur en kleur.

In **Hoofdstuk 3** beschrijven we de *CCoAOMT* genfamilie in petunia. *CCoAOMT1*, *CCoAOMT2* and *CCoAOMT3* in Petunia zijn allemaal in staat om de methylering van caffeoyl CoA tot feruloyl CoA te katalyseren. De reductie van *CCoAOMT3* in *P.hybrida* cv. Mitchell resulteert niet in afname van de interne niveaus en emissie van (iso)eugenol en ook niet in de accumulatie van anthocyanen in bloemen zoals in *CCoAOMT1*-RNAi planten. Om de rol van *CCoAOMT3* in een andere genetische achtergrond te onderzoeken, werd een *P.hybrida* cv.

Mitchell *CCoAOMT3* RNAi construct getransformeerd naar *P.hybrida* cv. V26, welke paarse en geurende bloemen heeft. In transgene RNAi planten waren de interne niveaus en de emissie van (iso)eugenol lager, in vergelijking met de wild type *P.hybrida* cv. V26. De *P.hybrida* cv. V26 *CCoAOMT3*-RNAi planten waren korter en hadden meer stengels dan het wild type. Dit suggereert dat de reductie van *CCoAOMT3* expressie ook invloed heeft op de lignine biosynthese in *P.hybrida* cv. V26. Aangezien de transgene *CCoAOMT3*-RNAi planten in *P.hybrida* cv. Mitchell en in *P.hybrida* cv. V26 geen effect laten zien op de anthocyaan biosynthese, concluderen we dat *CCoAOMT1* en *CCoAOMT3* verschillende biochemische functies hebben.

P.hybrida cv. Mitchell geeft alleen geurstoffen af gedurende de nacht en deze emissie is gereguleerd door een biologische klok. Een R2R3-MYB transcriptie factor, *ODORANT1* (*ODO1*), reguleert de transcriptie van *5-enolpyruvylshikimate-3-phosphatesynthase* (*EPSPS*) in de shikimaat route en deze reguleert de metabolische flux in de fenylpropanoïden route. Op de promotor van *ODO1* liggen, naast de belangrijke MYB bindingsplaatsen (MBS), twee zogeheten Avond Elementen (EEs). Deze motieven liggen direct naast de MBSs hetgeen suggereert dat een klokcomponent de expressie van *ODO1* in de avond reguleert. Het is bekend dat EEs bindingsplaatsen zijn voor LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY) welke de expressie van genen in de ochtend onderdrukken. Interessant is dat de geurende *P.hybrida* cv. V26 maar één EE heeft in de *ODO1* promotor en de bloemen geven de geurstoffen dan ook eerder af. Om de rol van EEs te bestuderen, werd 1,6kbp van de *ODO1* promotor van *P.hybrida* cv. V26 gekoppeld aan een functionele GFP- *ODO1* fusie en getransformeerd naar *P.hybrida* cv. Mitchell (**Hoofdstuk 4**). Zoals verwacht, resulteerde de afwezigheid van een EE in de *ODO1* promotor in een vroegere expressie van *ODO1* en vroegere emissie van geurstoffen in transgene lijnen. Bovendien was de emissie van benzaldehyde hoger door transgene planten dan door wildtype *P.hybrida* cv. Mitchell. Soortgelijk resultaten werden verkregen wanneer beide EEs in de *P.hybrida* cv. Mitchell *ODO1* promotor werden gemuteerd. Onze bevindingen suggereren dat de metabolieten stroom wordt omgeleid van de nog niet actieve β -oxidatieve naar de non- β -oxidatieve route waardoor meer benzaldehyde wordt geproduceerd. De EEs in de *ODO1* promotor bepalen blijkbaar de expressie van *ODO1* in de avond maar niet het ritme van *ODO1*. De kwantificering van organische zuren / CoA-esters en het meten van interne vluchtige stoffen zouden moeten worden gedaan om te bewijzen dat de non- β -oxidatieve route inderdaad betrokken is bij geurstof productie in *Petunia*'s.

De bloem-specifieke vluchtige stoffen van *P.axillaris* and *P.integrifolia* verschillen als onderdeel van hun strategie om verschillende bestuivers aan te trekken. De paarse bloemen van *P.integrifolia* verspreiden minder geur en worden voornamelijk bestoven door hommels gedurende de dag. Bloemen van *P.axillaris* geven 's nachts een grote hoeveelheid geurstoffen af en worden bestoven door nachtvlinders. Natuurlijke kruisingen tussen *P.axillaris* and *P.integrifolia* zijn tot nu toe nog niet gevonden in de natuur, alhoewel bestuiving met de hand wel nakomelingen oplevert. In **Hoofdstuk 5** hebben we een recombinante inteelt lijnen (RILs) populatie van *P.axillaris* x *P.integrifolia* gebruikt om de genetische loci te identificeren die betrokken zijn bij de productie van isoeugenol en benzylbenzoaat *overdag*. Voor de QTL analyse hebben we planten geselecteerd die een hogere productie van deze vluchtige stoffen in de ochtend hadden. Een QTL werd alleen geïdentificeerd voor de vroege benzylbenzoate productie. De geselecteerde RIL planten produceerden niet alleen meer benzylbenzoate in de ochtend, maar ook meer benzaldehyde in vergelijking met *P.axillaris*. Er bleken twee zeer voor de hand liggende kandidaat genen te liggen binnen deze QTL op chromosoom II: benzoyl-

CoA:benzylalcohol / 2-phenylethanol benzoyltransferase 1 en 2 (*BPBT1* en *BPBT2*). *BPBT* codeert voor een enzym dat benzylbenzoaat en fenylethylbenzoaat synthetiseert. Echter, de transcriptieniveaus van *BPBT* verschillen niet tussen de RILs en *P.axillaris* tussen 5:00 en 8:00 's ochtends. Onze resultaten kunnen het effect van de vroeger benzylbenzoaat productie dus niet verklaren. Daarvoor zou wellicht een compleet time-course experiment nodig. Tot zo ver mogen we alleen concluderen dat een geurgen, gelokaliseerd op chromosoom II, waarschijnlijk een groot effect heeft op de accumulatie van benzylbenzoaat overdag.