



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Molecular and biochemical studies of fragrance biosynthesis in rose

Sun, P.

Publication date

2017

Document Version

Other version

License

Other

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Sun, P. (2017). *Molecular and biochemical studies of fragrance biosynthesis in rose*. [Thesis, fully internal, Universiteit van Amsterdam].

General rights

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Disclaimer/Complaints regulations

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

Abstract

Roses are one of the most popular ornamental plants, whose volatiles are not only involved in environmental interactions but also widely used for industries. Chapter 1 describes the cultivation history of roses, usages of rose fragrance, knowledge on the biosynthesis of rose scent compounds, as well as non-canonical biosynthesis pathways of other plant volatiles. Experimental chapters (Chapter 2 and 3) analyse the functions of two genes expressed in rose petals, both encoding Nudix hydrolase 1 (NUDX1) protein. *NUDX1-1* gene (named *RhNUDX1* in the publication) was first discovered by comparing the transcriptomes of two rose cultivars, the scented *Rosa x hybrida* cv. 'Papa Meilland' (PM) and the unscented *R. x hybrida* cv. 'Rouge Meilland' (RM). *RhNUDX1-1* was only expressed in scented PM and its expression exhibited a positive correlation with the monoterpenoid production in petals, especially geraniol. When studying a rose progeny of *R. chinensis* cv. 'Old Blush' (OB) and *R. x wichurana* (Rw), an orthologous gene *RcNUDX1-1a* was found in OB, whose expression also had positive correlation with geraniol emission. A paralogous gene in Rw, *RwNUDX1-2*, was discovered and it was shown that its expression displayed a correlation with the sesquiterpenoid production, especially *E,E*-farnesol. A series of *in vitro* and *in vivo* assays as well as correlation analyses verified the function of *RhNUDX1-1*, which hydrolysed geranyl diphosphate (GPP) to geranyl monophosphate (GP). The transformation of GP into geraniol is supposed to be processed by an, as yet, unidentified phosphatase. The prediction of the localisation together with green fluorescent protein (GFP) fusion experiments revealed that *RhNUDX1-1* was located in the cytosol. A series of approaches (QTL analyses, enzymatic assays and transient expression studies) were also applied to *RwNUDX1-2*, demonstrating its function in the production of *E,E*-farnesol. Mapping of *RwNUDX1-2* and subcellular localization of the protein are still under investigation. Furthermore, protein crystallography and protein modelling illustrated the NUDX1-substrate interaction and proposed several residues that may be important for substrate recognition, although further experimental and computational data are required to gain more insight into the enzymatic mechanism. Collectively, these data revealed an alternative pathway for the biosynthesis of terpenoids, especially geraniol and *E,E*-farnesol, in rose, via the hydrolysis of prenyl diphosphates by NUDX1 enzymes.

Transcriptional regulation of *RcNUDX1-1a* or *RwNUDX1-2* probably plays an important role in the scent production by rose petals. Therefore, three promoters, pOB1a (promoter of *RcNUDX1-1a*), pOB1b (promoter of *RcNUDX1-1b*, not expressed in rose petals), pRw (promoter of *RwNUDX1-2*) were cloned and tested (Chapter 4). In addition, two transcription factors (TFs), RcbHLH79 (OB TF) and RwbHLH79 (Rw TF) candidates were chosen via RNA-Seq analysis as their expression correlated with expression of *RcNUDX1-1a* or *RwNUDX1-2*, respectively (Chapter 5). Using transient expression assays with a reporter gene, β -glucuronidase (GUS) in rose petals, it was shown that all three promoters could drive the expression of GUS, suggesting that all of them are active. However, quantification of promoter activities is still needed. OB TF and Rw TF were introduced into *Nicotiana benthamiana* leaves together with the promoters driving GUS, to determine if they were able to activate these promoters. However, no significant transactivation was detected in any promoter-TF combination. The expression of the TF in the progeny was also analysed but, due to the similarity of the sequences of family members, no conclusive data were obtained. Transcriptomes of the petals four roses, two of which produce geraniol but not *E,E*-farnesol and two that produce *E,E*-farnesol but not geraniol, were analysed (Chapter 5) and this resulted in a list of putative scent-related genes and transcription factors for further study.

Résumé

La rose est l'une des plantes ornementales les plus populaires, dont les composés volatils sont non seulement impliqués dans les interactions des fleurs avec l'environnement au sens large, mais aussi largement utilisés dans l'industrie des arômes et parfums. Le chapitre 1 décrit l'histoire de la culture de la rose, les usages de son parfum, les connaissances actuelles sur la biosynthèse des composés de ce parfum, ainsi que les voies de biosynthèse des composés volatils qui ont été récemment élucidées chez différentes plantes. Les chapitres expérimentaux 2 et 3 analysent les fonctions de deux gènes exprimés dans les pétales de rose. Ils codent pour des protéines Nudix hydrolase 1 (NUDX1). Le gène *NUDX1-1* (nommé *RhNUDX1* dans la publication) a été découvert en comparant les transcriptomes de deux cultivars de rose, *Rosa x hybrida* cv. 'Papa Meilland' (PM) très parfumé et *R. x hybrida* cv. 'Rouge Meilland' (RM), dépourvu de parfum. Le gène *RhNUDX1-1* n'est exprimé que chez PM et son expression est corrélée avec la production de monoterpènes dans les pétales, en particulier de géraniol. Lors de l'étude d'une descendance issue du croisement de *R. chinensis* cv. 'Old Blush' (OB) et de *R. x wichurana* (Rw), le gène orthologue *RcNUDX1-1a*, présentant la même fonction, a été caractérisé chez OB. Un gène paralogue, *RwNUDX1-2*, a été découvert chez Rw et il a été démontré que son expression présentait une corrélation avec la production sesquiterpènes, en particulier de *E,E*-farnesol. Une série d'analyses *in vitro* et *in vivo* ainsi qu'une analyse de corrélation ont permis de vérifier la fonction de *RhNUDX1-1*, qui hydrolyse le géranyl diphosphate (GPP) en géranyl monophosphate (GP). Une phosphatase non identifiée pourrait catalyser la transformation du GP en géraniol. Des expériences de fusion avec la Green Fluorescent Protein (GFP), suivies de transformation transitoire de feuilles de tabac, ont révélé que *RhNUDX1-1* était localisée dans le cytoplasme. Les mêmes approches (analyses QTL, essais enzymatiques et expression transitoire) ont également été appliquées à *RwNUDX1-2*, démontrant sa fonction dans la production de *E,E*-farnesol. La cartographie de *RwNUDX1-2* et la localisation subcellulaire de la protéine sont encore à l'étude. De plus, la cristallographie des protéines et la modélisation ont été employées pour étudier le mécanisme de l'interaction NUDX1-substrat et les acides aminés potentiellement importants pour la reconnaissance du substrat. Collectivement, ces données révèlent une voie alternative pour la biosynthèse des terpènes, en particulier le géraniol et *E,E*-farnesol, via l'hydrolyse des prényl diphosphates par les enzymes NUDX1.

Nos résultats montrent que la production de composés volatils dans les pétales est fortement corrélée avec l'expression des gènes des voies de biosynthèse. Par conséquent, la régulation transcriptionnelle de *RcNUDX1-1a* et *RwNUDX1-2* joue probablement un rôle important dans la production de parfum. Les promoteurs de *RcNUDX1-1a*, *RcNUDX1-1b*, et *RwNUDX1-2* et deux facteurs de transcription (FT), *RcbHLH79* (OB TF) et *RwbHLH79* (Rw TF) ont ainsi été isolés et testés (Chapitre 4). Les FT candidats ont été choisis lors d'une analyse RNA-Seq (Chapitre 5). En utilisant des tests d'expression transitoire avec le gène rapporteur GUS (β -glucuronidase) dans les pétales de rose, il a été montré que les trois promoteurs pouvaient entraîner l'expression de GUS. Les deux FT ont ensuite été introduits dans des feuilles de tabac avec les promoteurs testés, pour voir s'ils étaient capables d'activer ces promoteurs. Aucune transactivation significative n'a été détectée, même si *Rw TF* semblait pouvoir activer une construction témoin (promoteur du gène de la tomate *TPS5*). L'expression de ces deux FT dans la descendance a également été analysée mais, en raison de la similarité des séquences, aucune amorce spécifique n'a pu être obtenue. Les transcriptomes de quatre cultivars de rose, dont deux produisent du géraniol mais pas de *E,E*-farnesol et deux autres produisent du *E,E*-farnesol mais pas de géraniol, ont été analysés (Chapitre 5) et ont abouti à une liste de FT putatifs pour une étude plus approfondie.

Samenvatting

De roos is een van de meest populaire sierplanten, zowel voor in de tuin als in de vaas. De geurstoffen die de bloemen produceren zijn niet alleen zeer belangrijk voor de parfumindustrie, maar spelen ook een rol in het aantrekken van bestuivers. Hoofdstuk 1 beschrijft de geschiedenis van de teelt van rozen, het gebruik van de geurstoffen van rozen, de algemene kennis van de biosynthese routes van deze geurstoffen en de speciale routes voor de biosynthese van vluchtige stoffen in andere planten. De experimentele hoofdstukken 2 en 3 beschrijven de functionele analyse van twee genen betrokken bij de productie van rozengeur. Deze genen coderen voor twee varianten van het Nudix hydrolase 1 eiwit (NUDX1-1 en NUDX1-2). Door vergelijking van de transcriptomen van twee rozen cultivars, de geurende *Rosa x hybrida* cv. 'Papa Meilland' (PM) en de niet-geurende *R. x hybrida* cv. 'Rouge Meilland' (RM) werden deze genen ontdekt. *RhNUDX1-1* komt alleen tot expressie in de geurende PM en de expressie heeft een sterke positieve correlatie met de productie van vluchtige monoterpene in bloemblaadjes, in het bijzonder met geraniol. Bij het bestuderen van een kruising tussen *R. chinensis* cv. 'Old Blush' (OB) en *R. x wichurana* (Rw), werd een ortholoog van *RhNUDX1-1* ontdekt: *RcNUDX1-1a*, waarvan de expressie ook sterk correleerde met geraniol productie. Door middel een serie enzymatische assays, zowel *in vitro* als *in vivo*, is aangetoond dat *RhNUDX1-1* de hydrolyse van geranyl-difosfaat (GPP) naar geranyl-monofosfaat katalyseert. De conversie van GP naar geraniol wordt zeer waarschijnlijk bewerkstelligd door een nog nader te identificeren fosfatase. Lokalisatie experimenten, waarbij het *RhNUDX1-1* werd gefuseerd met het groene fluorescente eiwit GFP, laten zien dat het eiwit zich in het cytosol bevindt. In *R. x wichurana* (Rw) werd een paraloog ontdekt: *RwNUDX1-2*. De expressie van dit gen vertoonde een sterke correlatie met de productie van vluchtige sesquiterpenen, in het bijzonder met *E,E*-farnesol. Voor *RwNUDX1-2* werden door middel van een QTL analyse en enzymatische assays genoeg aanwijzingen verzameld om te postulieren dat dit enzym een rol speelt in de productie van *E,E*-farnesol. Aan de genetische kartering van *RwNUDX1-2* en de cellulaire lokalisatie van het enzym wordt nog verder gewerkt. In Hoofdstuk 3 worden de resultaten van kristallografie van het recombinante NUDX eiwit en eiwit modellering gepresenteerd. Hieruit blijkt dat er bepaalde aminozuren belangrijk zijn voor herkenning van het substraat. Additionele experimenten zijn nodig om meer inzicht te krijgen in het reactiemechanisme. Deze data tezamen tonen aan dat de biosynthese van terpenen in rozen, in het bijzonder die van geraniol en *E,E*-farnesol, via de hydrolyse van prenyl difosfaten verloopt door een nieuwe groep van eiwitten: NUDX1 enzymen.

Om de transcriptionele regulatie van de NUDX1 genen beter te kunnen bestuderen zijn drie promotoren gekloneerd: pOB1a (promotor van *RcNUDX1-1a*), pOB1b (promotor van *RcNUDX1-1b* die niet tot expressie komt) en pRw (promotor van *RwNUDX1-2*). Bovendien zijn twee transcriptiefactoren geselecteerd uit een RNA-Seq analyse, RcbHLH79 (OB TF) en RwbHLH79 (Rw TF), waarvan de expressie respectievelijk een sterke correlatie vertoonde met de expressie van *RcNUDX1-1a* en *RwNUDX1-2*. In Hoofdstuk 4 worden transiente expressie studies met de drie promotoren, die het gen β -glucuronidase (GUS) aansturen, gepresenteerd. In de bloemblaadjes van rozen blijken alle promotoren actief te zijn. Een kwantitatieve analyse van de promotor-sterkte zou nog een keer moeten gebeuren. De twee transcriptiefactoren zijn getest in *Nicotiana benthamiana*, ook met transiente expressie studies, maar beide waren niet in staat om de NUDX1 promotoren in het bladweefsel te activeren. Dit experiment zou nog een keer in rozen bloemblaadjes uitgevoerd moeten worden. Uit de RNA-Seq analyse in Hoofdstuk 5 zijn ook een aantal genen geselecteerd die mogelijk te maken hebben met de biosynthese van geur moleculen. Deze kunnen een bron van nieuwe kennis over de geurstof biosynthese in rozen worden.