



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

The biochemistry and genetics of floral scent production as part of the petunia pollination syndrome

Shaipulah, N.F.M.

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Shaipulah, N. F. M. (2018). The biochemistry and genetics of floral scent production as part of the petunia pollination syndrome

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: <http://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.

SUMMARY

Floral scent plays a major role in pollinator discrimination in the *Petunia* genus. By providing specific signals to targeted pollinators, floral scent can significantly contribute to the plant pollination efficiency and reproductive success. Fragrant petunias mostly emit floral volatile benzenoids /phenylpropanoids (FVBP) from their petals, and time of emission coincides with foraging behavior of the preferred pollinators, thus making it an ideal model for investigating the role of scent as part of a pollination syndrome. Research on the biochemistry and genetics of petunia scent has developed intensively, with many biosynthetic steps being characterized and a draft petunia genome that is publicly available. This thesis has added novel insight in the biosynthesis of floral volatiles and the interaction with other metabolic pathways. Although biosynthesis of benzoic acid via β -oxidative pathway in petunia has been fully elucidated, the set of genes involved in the phenylpropene pathway that leads to (iso)eugenol production is not yet complete (Chapter 2 and 3). Furthermore, I have described the regulation of rhythmic volatile production in wild and cultivated petunias (Chapter 4 and 5).

The volatile C_6 - C_3 compounds isoeugenol and eugenol in petunia flowers are supposed to share the biochemical precursor pathway with color (anthocyanin) biosynthesis and could compete for the same precursor. In **Chapter 2**, we characterized a caffeoyl-CoA *O*-methyltransferase 1 (CCoAOMT1) from *P.hybrida* cv. Mitchell petal limbs, which methylates caffeoyl-CoA to feruloyl-CoA, a precursor for both (iso-)eugenol and lignin biosynthesis. Downregulation of *CCoAOMT1* not only reduced eugenol production, but also led to the accumulation of anthocyanin in flowers and vegetative tissues. Our transgenic RNAi plants have pink flowers and purple leaves, despite of the fact that *P.hybrida* cv. Mitchell flowers lack of functional ANTHOCYANIN 2 (AN2), the key-activator of anthocyanin biosynthesis. By feeding the flowers with caffeic acid, we showed that in *P.hybrida* cv. Mitchell this metabolite can induce the expression of *PURPLE HAZE* (*PHZ*) in petals, suggesting that this transcription factor activates the anthocyanin biosynthesis in transgenic *CCoAOMT1*-RNAi plants. Therefore our results indicate that perturbation of caffeic acid or caffeoyl-CoA levels in *CCoAOMT1*-RNAi lines leads to the activation of *PHZ* and subsequently anthocyanin accumulation. In this chapter, we demonstrate the role of CCoAOMT1 in phenylpropene biosynthesis and reveal a metabolic connection between scent and color.

In **Chapter 3** we have described the *CCoAOMT* gene family of petunia: *CCoAOMT1*, *CCoAOMT2* and *CCoAOMT3* all of them are able to catalyze methylation of caffeoyl CoA to form feruloyl CoA. Silencing of *CCoAOMT3* in *P.hybrida* cv. Mitchell neither reduced internal (iso)eugenol levels or emission, nor did it results in accumulation of anthocyanins in flowers, as has been reported in *CCoAOMT1*-RNAi lines. To investigate the role of *CCoAOMT3* in a different genetic background, we transformed the *P.hybrida* cv. Mitchell *CCoAOMT3* RNAi constructs to the purple flowered fragrant *P.hybrida* cv. V26. Both internal levels and emission of (iso)eugenol were lower in transgenic RNAi plants, compared to wild type *P.hybrida* cv. V26. Transgenic plants of *P.hybrida* cv. V26 were shorter and bushier than wild type, suggesting that the downregulation of *CCoAOMT3* also has impact on lignin biosynthesis in *P.hybrida* cv. V26. Since both transgenic RNAi lines of *P.hybrida* cv. Mitchell and *P.hybrida*

cv. V26 did not show any effect on anthocyanin biosynthesis, we concluded that CCoAOMT1 and CCoAOMT3 have different physiological functions.

P.hybrida cv. Mitchell emits the FVBP during the night and emission is regulated by a circadian clock. An R2R3-MYB transcription factor, ODORANT1 (ODO1) regulates the transcript levels of *5-enolpyruvylshikimate-3-phosphatesynthase* (EPSPS) in shikimate pathway and in turn affects the metabolic flow in the phenylpropanoid pathway. In addition to the importance of MYB binding sites (MBS), two Evening Elements (EEs) motif are located directly downstream of the MBS in the ODO1 promoter, suggesting that a clock component could be involved in regulating evening expression of *ODO1*. EEs are known as binding sites of LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY) that inhibits morning expression of genes. Interestingly, another fragrant petunia cultivar, *P.hybrida* cv. V26 only has one EE in *ODO1* promoter, and earlier emission of FVBP by its flowers. To test the role of EEs, 1.6kbp of the *ODO1* promoter of *P.hybrida* cv. V26 was fused to a functional GFP-ODO1 and stably transformed to *P.hybrida* cv. Mitchell (**Chapter 4**). Indeed, the absence of one EE in *ODO1* promoter resulted in earlier expression of *ODO1* and subsequently earlier emission of FVBP in transgenic lines. Moreover, benzaldehyde emission was higher in transgenic lines than wild type *P.hybrida* cv. Mitchell. A similar phenotype was obtained when both EEs in *P.hybrida* cv. Mitchell *ODO1* promoter were mutated, fused to a functional GFP-ODO1 and stably transformed to *P.hybrida* cv. Mitchell. Our finding suggests that the flux may be redirected from the, not yet active, β -oxidative to the non- β -oxidative pathway to produce more benzaldehyde. Furthermore, EEs of *ODO1* promoter are more likely to determine the evening expression of *ODO1* than the rhythmicity of *ODO1*. Quantification of organic acids/CoA esters and internal volatiles should be performed in future experiments to confirm the involvement of the non- β -oxidative pathway in petunia FVBP production.

The floral volatile bouquets of *P.axillaris* and *P.integrifolia* are different, as part of their pollination syndromes. The purple *P.integrifolia* flowers are less fragrant and are primarily pollinated by (bumble) bees during the day. *P.axillaris* flowers emit a copious amount of benzenoid/phenylpropanoid at night and are pollinated by hawkmoths. Natural hybrids of *P.axillaris* and *P.integrifolia* have not been found in sympatric populations, although hand pollination between these species can produce fertile offsprings. In **Chapter 5**, we used a recombinant inbred lines (RILs) population of *P.axillaris* x *P.integrifolia* to determine the genetic loci that are involved in day-time production of isoeugenol and benzylbenzoate. We identified RILs with high volatile production in the morning for QTL analysis. A single QTL has been identified for benzylbenzoate production. The selected RILs not only produced higher benzylbenzoate in the morning, but also higher benzaldehyde levels than *P.axillaris*. We detected two possible candidate genes underlying this QTL, *benzoyl-CoA:benzylalcohol/2-phenylethanol benzoyltransferase 1* and *2* (*BPBT1* and *BPBT2*). *BPBT* encodes an enzyme that synthesizes benzylbenzoate and phenylethylbenzoate from benzoyl-CoA and benzylalcohol in petunia petals. However, transcript levels of *BPBT* were not different in RILs and *P.axillaris* at 5:00 h and 8:00 h. These results cannot explain the large effect of earlier production of benzylbenzoate on chromosome II, thus full time courses of *BPBT* expression are needed in future experiments. Therefore, we conclude that a FVBP gene likely underlies the large effect on day-time benzylbenzoate accumulation on chromosome II and further analysis needs to be conducted to identify the causal gene.

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 Fenylpropanoïden (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 fenylpropeen 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 fenylpropeen 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 benzybenzoaat 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 benzybenzoaat 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 benzybenzoaat overdag.

RINGKASAN

Bau bunga memainkan peranan yang penting bagi mendiskriminasi agen pendebungaan di kalangan spesies petunia. Bunga mengeluarkan isyarat khusus kepada pendebunga sasaran dan seterusnya menjadi penyumbang kepada keberkesanan pendebungaan dan pembiakan tumbuhan. Kebanyakan bunga petunia mengemisi sebatian benzenoid/phenylpropanoid (FVBP) daripada kelopak bunga, dan waktu emisi berkait rapat dengan kelakuan mencari makanan oleh agen pendebungaan. Oleh itu, petunia merupakan model yang ideal untuk mengkaji peranan bau bunga sebagai sebahagian sindrom pendebungaan. Kajian biokimia dan genetik ke atas bau bunga petunia telah berkembang secara pesat, di mana kebanyakan gen benzenoid/phenylpropanoid telah dicirikan dan kerangka genom telah diterbitkan. Tesis ini mengemukakan pencirian baru dalam biosintesis phenylpropanoid meruap dan interaksi dengan laluan metabolik yang lain. Walaupun biosintesis asid benzoik (BA) melalui lintasan β -oxidatif dalam petunia telah sepenuhnya dicirikan, gen set yang terlibat dalam penghasilan (iso)eugenol masih tidak lengkap (Bab 2 dan 3). Tambahan lagi, tesis ini juga menghuraikan pengawalaturan dalam penghasilan ritma bau dalam petunia liar dan kultivar (Bab 4 dan 5).

Isoeugenol dan eugenol merupakan sebatian C_6-C_3 dalam lintasan phenylpropanoid. Sebatian ini dikatakan berkongsi prekursor bersama biosintesis antosianin dan bersaing untuk prekursor yang sama. Dalam **Bab 2**, caffeoyl-CoA O-methyltransferase telah dicirikan daripada bunga *P.hybrida* cv. Mitchell. CCoAOMT1 memangkinkan caffeoyl-CoA kepada feruloyl-CoA, prekursor untuk biosintesis (iso)eugenol dan lignin. Pengawalaturan-rendah *CCoAOMT1* (*CCoAOMT1*-RNAi) bukan sahaja mengurangkan penghasilan eugenol, malah menyebabkan antosianin terkumpul di dalam bunga dan tisu vegetative. Bunga transgenik *CCoAOMT1*-RNAi berubah kepada merah jambu manakala daun bertukar kepada warna ungu. *P.hybrida* cv. Mitchell jenis liar kekurangan fungsi aktif ANTHOCYANIN2 (AN2), pengaktif kepada biosintesis antosianin dan ini mengakibatkan bunga *P.hybrida* cv. Mitchell tidak menghasilkan pigmen. Ujikaji penyuaipan bunga dengan kafeik asid telah menunjukkan metabolik ini dalam *P.hybrida* cv. Mitchell mampu mengaruh pengekspresan *PURPLE HAZE* (*PHZ*) dalam bunga, seterusnya faktor transkripsi ini mampu mengaktifkan biosintesis antosianin dalam tumbuhan transgenik *CCoAOMT1*-RNAi. Hasil dapatan ini menunjukkan perubahan dalam fluks oleh asid kafeik/ caffeoyl-CoA dalam transgenik *CCoAOMT1*-RNAi mendorong kepada pengaktifan *PHZ* dan kemudiannya mengaruh kepada pengumpulan antosianin. Dalam bab ini, peranan *CCoAOMT1* dalam biosintesis phenylpropene telah ditunjukkan dan hubungan metabolik antara bau dan warna dalam fisiologi tumbuhan dibincangkan.

Dalam **Bab 3**, homolog kepada CCoAOMT1; CCoAOMT2 dan CCoAOMT3 juga berkeupayaan memangkinkan caffeoyl-CoA kepada feruloyl-CoA. Pengawalaturan-rendah gen *CCoAOMT3* dalam *P.hybrida* cv. Mitchell tidak memberi perubahan kepada aras storan meruap dan emisi (iso)eugenol. Transgenik *CCoAOMT3*-RNAi tidak menunjukkan pengumpulan pigmentasi dalam bunga seperti dilaporkan dalam transgenik *CCoAOMT1*-RNAi. Bagi menyelidik peranan *CCoAOMT3* dalam latar belakang genetik yang berbeza, pemindahan konstruk *CCoAOMT3*-RNAi *P.hybrida* cv. Mitchell kepada *P.hybrida* cv. V26 telah dijalankan. Bunga *P.hybrida* cv. V26 (jenis liar) berwarna ungu dan mengemisi komposisi meruap yang sama seperti *P.hybrida* cv. Mitchell. Aras storan meruap dan emisi (iso)eugenol lebih rendah

dalam transgenik *CCoAOMT3*-RNAi berbanding tumbuhan kawalan *P.hybrida* cv. V26. Tumbuhan transgenik juga menunjukkan saiz pokok yang lebih rendah dan rimbun berbanding jenis liar, menunjukkan pengawalaturan-rendah *CCoAOMT3* mungkin memberi kesan kepada biosintesis lignin dalam *P.hybrida* cv. V26. Kedua-dua transgenik tumbuhan *CCoAOMT3*-RNAi *P.hybrida* cv. Mitchell dan *P.hybrida* cv. V26 tidak menunjukkan sebarang kesan ke atas biosintesis antosianin, oleh itu dapat dirumuskan bahawa *CCoAOMT1* dan *CCoAOMT3* mempunyai fungsi fisiologi yang berbeza.

P.hybrida cv. Mitchell mengemisi FVBP pada waktu malam dan emisi dikawalatur oleh jam sirkadian. Faktor transkripsi R2R3 MYB, ODORANT1 (ODO1) mengawalatur aras transkrip *5-enolpyruvylshikimate-3-phosphatesynthase* (*EPSPS*) dalam lintasan shikimat dan seterusnya mempengaruhi aliran metabolik dalam lintasan phenylpropanoid. Promoter *ODO1* bukan sahaja mempunyai tapak pengikatan MYB (MBS), tetapi ia juga mempunyai 2 motif “Evening Elements” (EEs) yang terletak di hiliran MBS. Elemen ini mungkin terlibat dalam pengawalaturan ekspresi *ODO1* pada waktu petang. EEs dikenali sebagai tapak pengikatan LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY) di mana LHY berperanan merencat pengekspresan gen pada waktu pagi. Sebaliknya, *P.hybrida* cv. V26 mempunyai satu EE dalam promoter *ODO1* dan bunga mengemisi bau pada waktu petang. Bagi menguji peranan EEs, 1.6 kbp promoter *ODO1* daripada *P.hybrida* cv. V26 telah dilakur dengan konstruk GFP-ODO1 dan ditransformasi secara stabil kepada *P.hybrida* cv. Mitchell (**Bab 4**). Ternyata kekurangan satu EE dalam promoter *ODO1* menyebabkan ekspresi *ODO1* dan emisi FVBP berlaku lebih awal dalam tumbuhan transgenik berbanding dengan *P.hybrida* cv. Mitchell. Tambahan pula, aras emisi benzaldehyde lebih tinggi dalam transgenik tumbuhan berbanding dengan *P.hybrida* cv. Mitchell jenis liar. Fenotip yang sama juga diperolehi apabila mutasi kedua-dua EE dijalankan dan ditransformasi kepada *P.hybrida* cv. Mitchell. Hasil dapatan daripada eksperimen ini mencadangkan bahawa aliran fluks boleh terjadi daripada lintasan β -oksidatif kepada non- β -oksidatif dan seterusnya meningkatkan aras emisi benzaldehyde. EEs dalam *ODO1* promoter cenderung menentukan ekspresi *ODO1* pada waktu petang, tetapi EEs tidak berperanan dalam menentukan ritma transkrip *ODO1*. Aras asid organik/ CoA-ester dan storan meruap perlu diukur dalam eksperimen akan datang bagi memastikan penglibatan lintasan non- β -oksidatif dalam penghasilan FVBP petunia.

P.axillaris dan *P.integrifolia* mempunyai komposisi FVBP yang berbeza dan disarankan sebagai sebahagian daripada sindrom pendebungaan. Bunga *P.integrifolia* berwarna ungu dan menghasilkan jumlah sebatian FVBP yang lebih rendah berbanding *P.axillaris*. Bunga *P.axillaris* pula mengemisi sebatian FVBP yang tinggi pada waktu malam. Lebah (bumble bee) dan rama-rama malaman masing-masing merupakan agen pendebungaan kepada *P.integrifolia* dan *P.axillaris*. Kacukan *P.axillaris* dan *P.integrifolia* tidak pernah dijumpai dalam populasi simpatrik walaupun pendebungaan tangan berjaya menghasilkan progeni yang subur. Dalam **Bab 5**, galur biakbaka rekombinan (RILs) daripada induk *P.axillaris* x *P.integrifolia* digunakan bagi menentukan lokus genetik yang terlibat dalam penghasilan bau yang tinggi pada waktu pagi. Satu QTL telah dikenalpasti dalam penghasilan sebatian benzylbenzoate. RILs terpilih tidak hanya menghasilkan aras benzylbenzoate yang lebih tinggi pada waktu pagi, malah turut menghasilkan aras benzaldehyde yang lebih tinggi berbanding *P.axillaris*. Dua gen calon telah dikenalpasti pada kedudukan QTL ini, iaitu *benzoyl-CoA:benzylalcohol/2-phenylethanol benzoyltransferase 1* dan 2 (*BPBT1* dan *BPBT2*). Gen *BPBT* mengkod enzim yang memungkinkan penghasilan benzylbenzoate dan phenylethylbenzoate daripada benzoyl-CoA dan benzylalcohol/phenylethylalcohol. Walaubagaimanapun, aras transkrip *BPBT* tidak berbeza

antara RILs dan *P.axillaris* pada jam 5.00 h dan 8.00 h. Hasil dapatan ini tidak dapat membuktikan kesan besar kepada penghasilan benzylbenzoate pada waktu pagi pada kromosom II, oleh itu kajian saringan ekspresi *BPBT* pada setiap selang masa perlu dijalankan. Kajian ini membuktikan gen *FVBP* mungkin memberi kesan besar kepada pengumpulan benzylbenzoate pada waktu siang pada kromosom II, oleh yang demikian, analisis lanjutan perlu dijalankan bagi mengenalpasti gen penyebab ini.

ACKNOWLEDGEMENT/ PENGHARGAAN

Assalamualaikum w.b.t

Alhamdulillah syukur ke hadirat Illahi dengan limpah kurnia NYA, saya dapat menyiapkan tesis PhD ini dengan jayanya. Dugaan dan cabaran yang hadir hampir mematahkan semangat saya, namun dengan izin NYA saya terus melangkah bersama-sama sokongan mereka yang sentiasa di hati saya.

First of all, I would like to express this gratitude to my supervisors, Rob Schuurink and Michel Haring for helping me to complete this thesis. Rob, you are really thoughtful, who always support and inspire me to keep going through this journey. I really appreciate everything you have taught me and the patience you treated since the beginning. Michel, thanks for the constructive comments on my thesis writing and encouragement you have provided me. I'm grateful to both of you for giving me the opportunity to work in UvA and have enjoyed my time under your supervision. I honestly can't thank you enough for your kindness and support.

To Michel de Vries and Ringo, thank you for being patience with me (restocking qPCR kit and Trizol®) and forgive me for the mess in lab freezer. My PhD journey in Amsterdam was begun with these wonderful people: Alessandra, Alex, Arjen, Carlos, Dorota, Eleni, Lisa, Maaike, Petra B, Rossana, Silke and Steven. Ale, I missed the old days to have you next to me in the lab. Maaike, I'm very glad to know you and we managed to finish the PhD, finally...Yeay!!! Not to forget whom with me half of my journey; Ahmed, Aldana, Aleksandra, Jiesen, Marc, Paula, Pulu, Qian Qian, Ruy, and Xavi. I'm very grateful to have friends like you. Qian Qian, I won't forget our friendship and please keep in touch. "Sophia" is not suit with you. Jiesen, thank you for being there and lend me your ears during my stressful day. All the best in your PhD (and you really can cook!). Paula, thanks a lot for helping me to translate the summary into Dutch. Netherlands was the first place I went abroad alone and the culture was completely different, but your love and kindness made me feel less homesick...THANK YOU. A very big appreciation to Ludek, Harold and Thijs for taking cares my petunias and cleaning the chambers. To my students, Xinyi and Joost, you made my life easier and I could sleep longer. Hope I can see all of you again in future and keep in touch.

Hari pertama menjejakkan kaki di Schipol (bersama Norasmah) pada 1 Jun 2011, kami disambut oleh Dayah. Terima kasih kerana bersusah payah menyambut kami dari Leiden. Tidak dilupakan penghargaan ini untuk Kak Ron yang menjenguk Iza dan memperkenalkan Iza dengan Albert Heijn. Kehidupan di Amsterdam bermula dengan huluran persahabatan daripada Azizi dan Ali. Disaat sahabatmu kecewa dengan lab result, kalian tak kisah menambah kalori di KFC (sijil "haram" bermula 2013, so jangan kecam). Pengalaman di Amsterdam tidak akan sempurna tanpa kehadiran Amsterdammers: Syahir, Shila, Huzaimi, Zul Ali, Nisa, Sabrina, Fuzyma dan Zul dan famili. Memori bersama kalian menikmati sushi? dan makan-makan di Javastraat tidak akan Iza lupakan. Tahniah kepada Dr. Syahir dan good luck untuk Shila dan Huzaimi.

Rakan-rakan di Rotterdam: Uncle Joe, Najmi, Hariz, Kak Siti dan family, Izza dan Fatty, persahabatan kita tidak akan bermula tanpa Ali. Thanks to Uncle Joe for letting me stay at your house and treating me like part of family. Huda, Aniey dan Su, walaupun agak terlewat perkenalan kita tetapi kalian tidak pernah jemu memberi kata-kata peransang kepada Iza. Terima kasih yang tak terhingga juga untuk rakan-rakan seperjuangan dari Wageningen,

Utrecht, Leiden dan Delft yang sentiasa menyokong antara satu sama lain. Dan semestinya untuk Yana dan Yus, tolong jangan ulang kejadian di Bintai, OK? BF.F, thank you for staying even though you have every reason to leave.

Setinggi penghargaan kepada penaja Kementerian Pengajian Tinggi Malaysia dan Universiti Malaysia Terengganu kerana memberi peluang untuk saya melanjutkan pengajian PhD di Netherlands. Ucapan terima kasih juga ditujukan kepada rakan-rakan di UMT; Jabatan Sains Biologi (2007-2011) dan PPSMS (2016 – sekarang) atas sokongan yang diberikan, terutamanya kepada Dr. Faridah dan PM Dr. Wahizatul Afzan untuk sokongan dan pertimbangan bagi menyiapkan tesis ini. Kenangan yang tidak akan dilupakan semasa menyiapkan proposal PhD dan cabaran pada tahun 2010-2011 bersama Kak Zalipah, Norasmah, Siti Mariam dan Kak Suzana. Terima kasih atas doa kalian. Tak lupa kepada lunchmate (baharu), Juliani terima kasih kerana sentiasa memberi kata-kata semangat kepada Kak Iza.

Ternyata, tanpa sokongan moral dan kasih-sayang daripada Ummy, Hajah Latifah Abd Rahman Azmi dan adik-adik: Abg Ngah, Cho, Teh, Chik, Bade dan Bihah, tidak mungkin Kak Long dapat mengharungi semua ini. Terima kasih daun keladi, dapat bonus belanja lagi. Perjalanan ini tidak akan bermula tanpa kepercayaan daripada Abah, alahyarham M.Shaipulah bin Awang Ibrahim yang menjadi orang pertama meletakkan 200% keyakinan untuk Kak Long menyambung pengajian PhD. Walaupun Abah tidak dapat menyaksikan kejayaan ini, Kak Long tidak akan putus mendoakan syurga untuk Abah di “sana”.

Untuk sesiapa yang membaca titipan terakhir ini, mohon untuk sedekahkan Al-Fatihah untuk abah saya, alahyarham M.Shaipulah bin Awang Ibrahim dan sahabat baik saya, alahyarham Mohd Ali bin Md Salim...AL-FATIHAH.

“Just because the process hurts doesn't mean the results won't be beautiful. - anonymous”