

Silencing Late Elongated Hypocotyl in snapdragon affects scent emission

El silenciamiento de *Late Elongated Hypocotyl* en boca de dragón modifica la emisión de aromas

M.I. Terry*, M. Egea-Cortines, J. Weiss

Genética Molecular, Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, 30202 Cartagena. Spain

*marta.terry@edu.upct.es

Abstract

Organisms can anticipate periodic changes in their environment thanks to the circadian clock, a complex network of genes that form interlocked loops. Circadian clocks are also active in plants, regulating processes such as growth, development, flowering or scent emission in response to environmental cues. However, the role of the circadian clock in flower rhythms remains poorly understood. Here we analyzed the function of the clock gene *LATE ELONGATED HYPOCOYL (LHY)* concerning scent emission and profile in snapdragon (*Antirrhinum majus*). Silencing *LHY* modified the scent profile of snapdragon flowers.

Keywords: *Antirrhinum majus*; *LHY*; RNA interference; volatile organic compounds.

Resumen

Los organismos son capaces de anticipar los cambios periódicos en su ambiente gracias al reloj biológico, una compleja red de genes que establecen bucles interconectados. Los relojes circadianos también están activos en plantas, regulando procesos como el crecimiento, desarrollo, floración o la emisión de aromas en respuesta al ambiente. Sin embargo, el papel del reloj circadiano en los ritmos de las flores es poco conocido. En el presente trabajo, analizamos la función del gen de reloj *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* en la emisión y el perfil de aromas en boca de dragón (*Antirrhinum majus*). El silenciamiento de *LHY* modificó el perfil aromático de la flor de boca de dragón.

Palabras clave: *Antirrhinum majus*; ARN de interferencia; compuestos orgánicos volátiles; *LHY*.

1. INTRODUCCIÓN

Los organismos están sujetos a cambios periódicos en el ambiente, tales como la alternancia día-noche o las estaciones. Los seres vivos son capaces de anticiparse a estos cambios gracias al reloj biológico, el cual se compone de diversos genes que establecen una serie de bucles interconectados. El reloj circadiano juega un papel fundamental en el control de caracteres agronómicos como resistencia al frío, floración o acumulación de metabolitos de olor y sabor [1]. La generación de mutantes o transgénicas en plantas modelo permite identificar el papel del gen de interés en el desarrollo, floración o emisión de aromas, entre otros. La emisión de compuestos orgánicos volátiles (*VOCs* por sus siglas en inglés) tiene un papel importante ya que éstos pueden actuar como repelentes de herbívoros, antimicrobianos o como atrayentes de polinizadores, siendo los componentes principales del sabor. Además, su emisión varía a lo largo del día,

coincidiendo con la actividad de sus polinizadores [2]. Pese a que se conocen las rutas biosintéticas de estos compuestos, se desconoce qué papel desempeñan los genes del reloj en la regulación de la síntesis y emisión de aromas.

Por ello, el presente trabajo se centra en los efectos del gen reloj *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* en la emisión de aromas en la planta modelo boca de dragón (*A. majus*).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Transformación de *Antirrhinum*

Para silenciar el gen *AmLHY* se clonó un fragmento de 156 pares de bases del mismo, empleando el vector pHELLSGATE12 [3]. Para la transformación se usó la línea silvestre (o *wild-type*, WT) Sippe50 de boca de dragón.

2.2 Material vegetal y condiciones de cultivo

Se utilizaron cuatro grupos de plantas: silvestre y tres líneas transgénicas independientes de generación 2 (T2), denominadas *RNAi:AmLHY14*, *RNAi:AmLHY26* y *RNAi:AmLHY27*. Las líneas se cultivaron en los invernaderos de la Finca Experimental Tomás Ferro. Las plantas transgénicas se identificaron mediante PCR con cebadores específicos (*NPTII*, sentido: CCTGCTTGCCGAATATCATGGTGG, antisentido: CGAAATCTCGTGATGGCAGGTTGG) y de acuerdo al protocolo de la polimerasa (KAPABIOSYSTEMS). Las plantas se trasladaron a una cámara de cultivo días antes de la toma de muestras, donde fueron aclimatadas a un ciclo de 12 horas de luz a 23°C y 12 horas de oscuridad a 18°C. El inicio del día se definió como ZT0 (*Zeitgeber time*).

2.3 Expresión génica

Se tomaron hojas completamente desarrolladas de los cuatro grupos de plantas. Cada grupo se componía de 3-4 plantas. El tejido fue congelado en nitrógeno líquido y almacenado a -80°C hasta la posterior extracción de ARN. La extracción de ARN total se realizó según [4]. Para la síntesis de ADN complementario se procedió según lo indicado por el fabricante (Maxima Reverse Transcriptase, Thermo Scientific). Para la PCR a tiempo real o cuantitativa (qPCR) se empleó el sistema Mx3000P (Agilent Technologies) y SYBR Green Master Mix (Takara, Clontech), según los respectivos manuales. Como gen de referencia se usó *UBIQUITIN (AmUBI)*, sentido CCGATGGAAGTATATGTTTGG y antisentido CCAGTCTTACAAGACCTAGAAGCTC, los cebadores de *AmLHY* fueron TTAAGTCTCTCCGGCAACT (sentido) y TTGAAGTCACAAGCTGATTGC (antisentido). La expresión génica se calculó con el método $\Delta\Delta Ct$ [5].

2.4 Emisión de volátiles

La recolección de volátiles se realizó según lo descrito por [6], utilizando un desecador de vidrio. Cada réplica biológica constaba de una flor cortada de 2-3 días de edad. Se muestrearon 3-4 flores de los grupos de plantas silvestres y transgénicas. El muestreo se llevó a cabo cada 6 horas durante un ciclo de 24 horas. La cuantificación se desarrolló en base a protocolos publicados [7].

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La expresión de *AmLHY* fue significativamente inferior en las líneas transgénicas (t de Student $p < 0,05$, Fig. 1). El perfil, definido como el número de compuestos detectados y la contribución de cada uno de ellos, varió entre los distintos grupos de plantas. Las flores de las líneas de RNAi mostraron un perfil más complejo (datos no mostrados). En este trabajo se muestran cuatro VOCs comunes a todos los grupos de plantas: 3,5-dimetoxitolueno, acetofenona, metil benzoato y ocimeno. En la línea silvestre, la emisión de ocimeno y 3,5-dimetoxitolueno aumentó durante el día, la de metil benzoato aumentó durante la noche y la acetofenona se

mantuvo con pocas variaciones (Fig. 2A). Sin embargo, observamos una serie de diferencias entre silvestres y líneas RNAi. Primero, la emisión total, expresada como área/peso fresco, disminuyó en las líneas transgénicas. La contribución del 3,5-dimetoxitolueno disminuyó en las líneas *RNAi:AmLHY14* y *RNAi:AmLHY26* mientras que la proporción de acetofenona y ocimeno fue mayor en dichas líneas (Fig. 2B-2C). Por otro lado, la línea *RNAi:AmLHY27* mostró un perfil distinto, la proporción de 3,5-dimetoxitolueno y metil benzoato fue mayor mientras que presentó los niveles más bajos de acetofenona y ocimeno. Estudios previos sobre el silenciamiento de genes del reloj mostraron una alteración en la emisión de VOCs, incluyendo cambios en la cantidad emitida [8] y en el perfil aromático [9]. Estos cambios podrían alterar las interacciones con polinizadores, herbívoros e incluso planta-planta.

4. CONCLUSIONES

El silenciamiento de *AmLHY* modifica la complejidad del perfil aromático en las flores de boca de dragón así como la contribución de cada volátil al aroma.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido desarrollado bajo los proyectos Fundación Séneca 19398/PI/14 y BFU-2013-45148-R. Agradecemos a María José Roca la ayuda prestada en el manejo del GC-MS.

6. REFERENCIAS

- [1] Hoballah M.E., Stuurman J., Turlings T.C., Guerin P.M., Connetable S., Kuhlemeier C. 2005. The composition and timing of flower odour emission by wild *Petunia axillaris* coincide with the antennal perception and nocturnal activity of the pollinator *Manduca sexta*. *Planta*. 222(1): 141-150.
- [2] Egea-Cortines M., Ruiz-Ramon F., Weiss J. 2013. Circadian Regulation of Horticultural Traits: Integration of Environmental Signals. *Hortic. Rev.* 41: 1-46.
- [3] Helliwell C., Waterhouse P. 2003. Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. *Methods*. 30(4): 289-295.
- [4] Box M.S., Coustham V., Dean C., Mylne J.S. 2011. Protocol: A simple phenol-based method for 96-well extraction of high quality RNA from *Arabidopsis*. *Plant. Methods*. 7(1): 7.
- [5] Schmittgen, T.D., Livak, K.J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3(6): 1101.
- [6] Manchado-Rojo M., Delgado-Benarroch L., Roca M.J., Weiss J., Egea-Cortines M. 2012. Quantitative levels of *Deficiens* and *Globosa* during late petal development show a complex transcriptional network topology of B function. *Plant. J.* 72(2): 294-307.
- [7] Ruiz-Hernández V., Roca M.J., Egea-Cortines M., Weiss J. 2018. A comparison of semi-quantitative methods suitable for establishing volatile profiles. *Plant. Methods*. 14(1): 67.
- [8] Fenske M.P., Hazelton KDH., Hempton A.K., Shim J.S., Yamamoto B.M., Riffell J.A., Imaizumi T. 2015. Circadian clock gene *LATE ELONGATED HYPOCOTYL* directly regulates the timing of floral scent emission in *Petunia*. *P. Natl. Acad. Sci. USA*. 112(31): 9775-9780.
- [9] Terry M.I., Pérez-Sanz F., Díaz-Galián M., Pérez de los Cobos F., Navarro P.J., Egea-Cortines M., Weiss, J. 2019. The *Petunia* CHANEL Gene is a ZEITLUPE Ortholog Coordinating Growth and Scent Profiles. *Cells*. 8(4): 343.

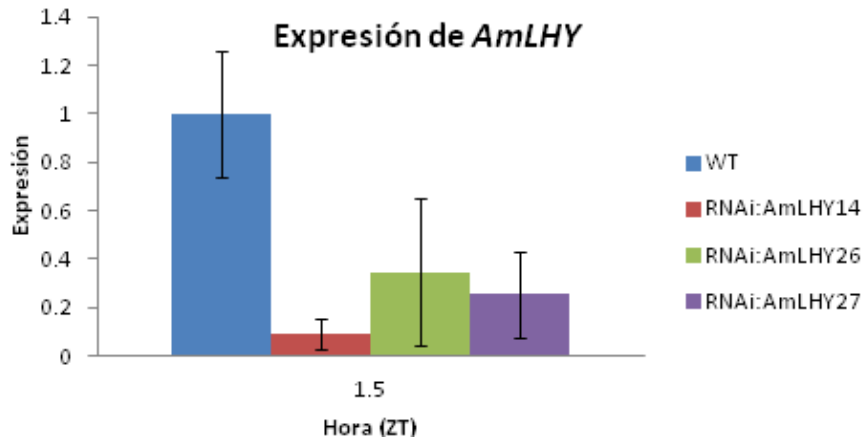


Figura 1. Expresión del gen *AmLHY* en plantas silvestres (WT) y líneas transgénicas (*RNAi:AmLHY14*, *RNAi:AmLHY26*, *RNAi:AmLHY27*).

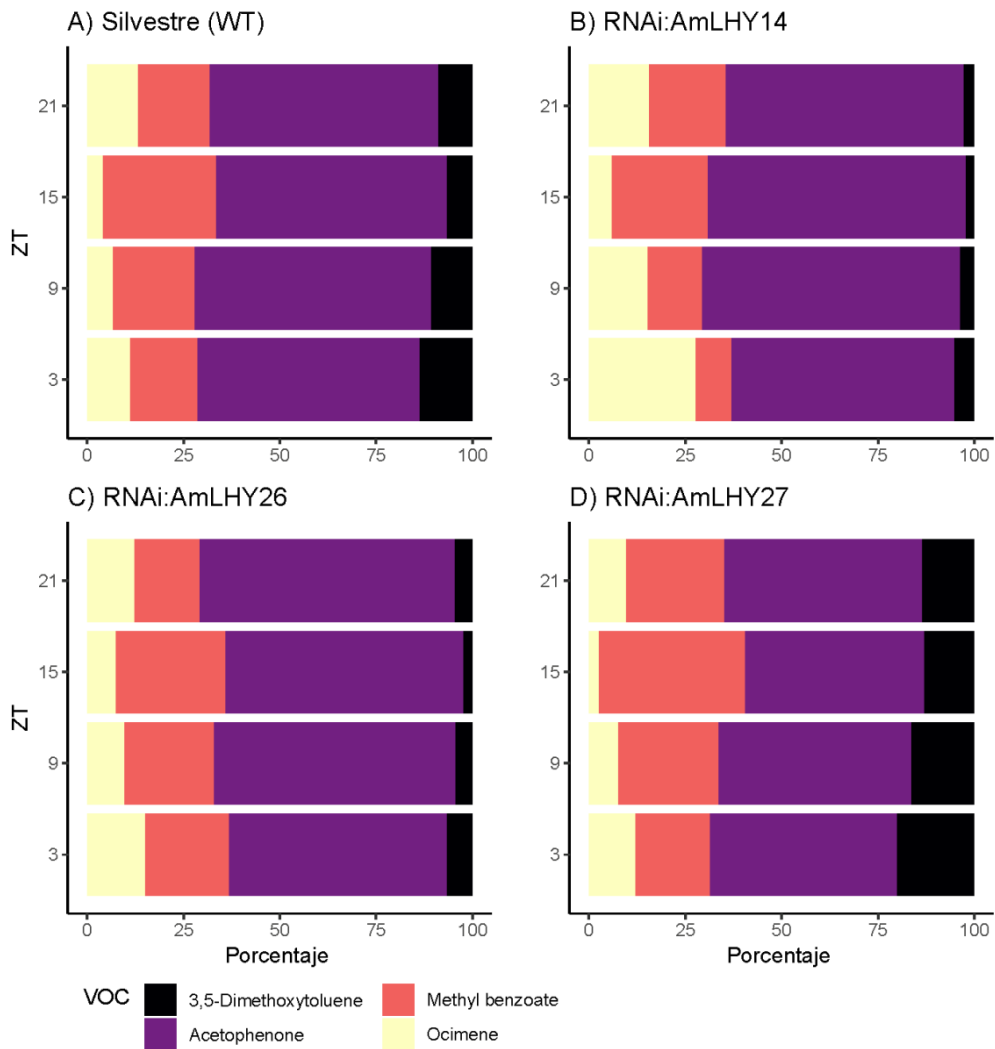


Figura 2. Perfil aromático a lo largo de 24 h en flores silvestres (A) y transgénicas de las líneas *RNAi:AmLHY14* (B), *RNAi:AmLHY26* (C), *RNAi:AmLHY27* (D).