

Effect of silencing *PhZTL* in scent emission in Petunia (*Petunia x hybrida*)

Efecto del silenciamiento de *PhZTL* en la emisión de aromas en petunia (*Petunia x hybrida*)

M.I. Terry^{1*}, M. Egea-Cortines¹, J. Weiss¹

¹Genética Molecular, Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, 30202 Cartagena, Spain.

*marta.terry@edu.upct.es

Abstract

Organisms can anticipate to periodic changes in their environment thank to the circadian clock, a complex network of genes that form interlocked loops. Circadian clocks are also active in plants, regulating processes such as flower opening or scent emission in response to the environment. However, the role of the circadian clock in flower rhythms remains poorly understood. Here we analyzed the role of the clock gene *ZEITLUPE (ZTL)* in scent emission in petunia. Silencing *ZTL* altered the rhythmic emission of some organic compounds and also modified the scent profile of petunia flowers.

Keywords: Circadian clock; floral odor; rhythm; volatile organic compounds.

Resumen

Los organismos son capaces de anticiparse a los cambios cíclicos en su ambiente gracias al reloj biológico, un complejo red de genes que establecen bucles interconectados. Relojes circadianos también están activos en plantas, regulando procesos como la apertura de las flores o la emisión de aromas en respuesta al ambiente. Sin embargo, el papel del reloj circadiano sobre los ritmos de las flores es poco conocido. En el presente trabajo, analizamos el papel del gen reloj *ZEITLUPE (ZTL)* en la emisión de aromas en petunia. El silenciamiento de *ZTL* alteró el ritmo de emisión de algunos compuestos y también modificó el perfil aromático de la flor de petunia.

Palabras clave: Aroma floral; compuestos orgánicos volátiles; reloj circadiano; ritmo.

1. INTRODUCCIÓN

Los organismos están sujetos a cambios cíclicos en el ambiente, como la alternancia día-noche. Los seres vivos son capaces de anticiparse a estos cambios periódicos gracias al reloj biológico, que consta de diversos genes que establecen una serie de bucles. Estos relojes han sido ampliamente estudiados en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. En esta planta se ha propuesto un modelo de reloj, el cual está formado por tres bucles llamados central, de la mañana y de la tarde. Los genes que forman parte de este sistema (como *LHY* o *TOC1*) pueden actuar como activadores o represores de otros elementos del reloj [1]. Como resultado de estas interacciones, muchos de estos genes y las proteínas que codifican varían a lo largo del día.

En los últimos años, se han caracterizado relojes biológicos en otras especies de plantas con interés agronómico u ornamental, como el arroz (*Oriza sativa*) pero también en otras especies modelo, como la solanácea *Nicotiana attenuata*. Existen otras solanáceas con interés en investigación, como Petunia (*Petunia spp.*) que posee además interés como ornamental. En esta

especie se han realizado diversos estudios relacionados con la síntesis de pigmentos y compuestos orgánicos volátiles o con la emisión de aromas [2]. La emisión de compuestos orgánicos volátiles (VOCs por sus siglas en inglés) ha adquirido una especial relevancia ya que éstos desempeñan funciones tales como repeler herbívoros o atraer polinizadores, lo cual juega un papel importante en la polinización y en la producción. Además, se sabe que estos VOCs pueden variar a lo largo del día. 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, en el presente estudio se abordará el estudio del efecto del gen reloj *ZEITLUPE* (*PhZTL*), que codifica una proteína que controla la degradación de *TOC1* y *PRR5* además de intervenir en la floración y en la emisión de volátiles en flores de petunia.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Transformación de petunia

Para silenciar el gen *PhZTL* se clonó un fragmento de 255 pb del mismo, empleando el vector pHELLSGATE12 [3]. Para la transformación se usó la línea silvestre (o *wild-type*, WT) W115 o Mitchell.

2.2 Material vegetal y condiciones de cultivo

Las plantas (tres por cada uno de los siguientes grupos: W115 y dos líneas transgénicas independientes de generación 2 o T2, denominadas *RNAi:ZTL3* y *RNAi:ZTL10*), crecieron en los invernaderos de la Finca Experimental Tomás Ferro. Para seleccionar las plantas transgénicas se realizó una PCR con cebadores específicos (*NPTII*, sentido: CCTGCTTGCCGAATATCATGGTGG, antisentido: CGAAATCTCGTGATGGCAGGTTGG) y de acorde 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 días cortos (8 horas de luz y 23°C, 16 horas de oscuridad a 18°C). El inicio del día se definió como ZT 0 (*Zeitgeber time*).

2.3 Expresión génica

Se tomaron pétalos de flores de 2-3 días de edad cada 6 horas durante un ciclo de 24h. El tejido fue congelado inmediatamente 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 ADNc (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, con las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial de 95°C durante 30" seguida de 40 ciclos a 95°C durante 5", 60°C 20" y 72°C 15". Como genes de referencia se usaron *EF1α* y *CYP* [5] y las siguientes secuencias de *PhZTL* sentido TGCATCTGTTGGCTCTGTTT y antisentido CCCCAACCAATCTCTTAGC. La expresión génica se calculó con el programa REST 2008 (<http://www.gene-quantification.de/rest-2008.html>).

2.4 Emisión de volátiles

La recolección de volátiles se realizó según lo descrito por [6], utilizando un recipiente de cristal en lugar de uno plástico y una flor cortada de 2-3 días por cada réplica biológica. El muestreo se llevó a cabo cada 3 horas durante un ciclo de 24 horas en las mismas condiciones descritas en el apartado anterior. Para representar los datos de los compuestos seleccionados, se dividió el área integrada de cada pico por el peso en fresco de la flor. Además, se usó la librería "MetaCycle" [7] (R v.3.2.2) para detectar ritmos en la emisión de volátiles.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La expresión de *ZTL* en pétalo fue menor en ambas líneas bajo días cortos (Fig. 1A).

Por otro lado, seleccionamos 13 VOCs para su posterior análisis (no se muestran todos). Dichos compuestos pertenecían a la ruta de los fenilpropanoides y bencenoides; la mayoría aumentaron su emisión durante la noche (benzoato de metilo, Fig. 1B) [4], y está sincronizada a la actividad de sus polinizadores [8]. Sin embargo, observamos una serie de diferencias entre silvestres y líneas RNAi. Primero, algunos de estos compuestos, como el alcohol bencílico, adelantaron su máximo o pico de emisión respecto al silvestre, mientras que otros, como el acetato de bencilo, retrasaron este máximo (tabla 1). Por otro lado, el periodo (definido con el tiempo transcurrido entre dos picos, es decir, un ciclo completo) para algunos compuestos, como el acetato de bencilo, fue mayor en las plantas transgénicas (24h) comparado con las silvestres (21h). Además, el perfil aromático, definido como la contribución de cada compuesto individual al aroma, también varió; así la proporción de benzaldehído emitida por las flores *RNAi:ZTL* aumentó un 11% pero el fenilacetaldehído descendió ligeramente, entre 3-4%, en las líneas transgénicas (Fig. 1C). Estudios previos sobre el silenciamiento de genes reloj mostraron una alteración de los ritmos de apertura de las flores y la emisión de VOCs [9,10]. Sin embargo, dichos estudios no analizaron los posibles cambios en el perfil aromático; dichos cambios podrían alterar las interacciones con polinizadores, herbívoros incluso planta-planta.

4. CONCLUSIONES

El silenciamiento de *PhZTL* en petunia parece alterar tanto el ritmo de emisión de ciertos compuestos volátiles como la cantidad emitida, modificando al perfil aromático típico de esta especie.

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] Pokhilko A., Fernández A.P., Edwards K.D., Southern M.M., Halliday K.J., Millar A.J. 2012. The clock gene circuit in Arabidopsis includes a repressilator with additional feedback loops. *Mol. Sys. Biol.* 8(1): 574.
- [2] Kolosova N., Gorenstein N., Kish C.M., Dudareva N. 2001. Regulation of circadian methyl benzoate emission in diurnally and nocturnally emitting plants. *Plant. Cell.* 13(10): 2333-2347.
- [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] Mallona I., Lischewski S., Weiss J., Hause B., Egea-Cortines M. 2010. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida*. *BMC. Plant. Biol.* 10(1): 4.
- [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] Wu G., Anafi R.C., Hughes M.E., Kornacker K., Hogenesch J.B. 2016. MetaCycle: an integrated R package to evaluate periodicity in large scale data. *Bioinformatics.* 32(21): 3351-3353.

[8] 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.

[9] Fenske M.P., Hazelton K.D.H., 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.

[10] Yon F., Joo Y., Cortés Llorca L., Rothe E., Baldwin I.T., Kim S.G. 2016. Silencing *Nicotiana attenuata* LHY and ZTL alters circadian rhythms in flowers. *New. Phytol.* 209(3): 1058-1066.

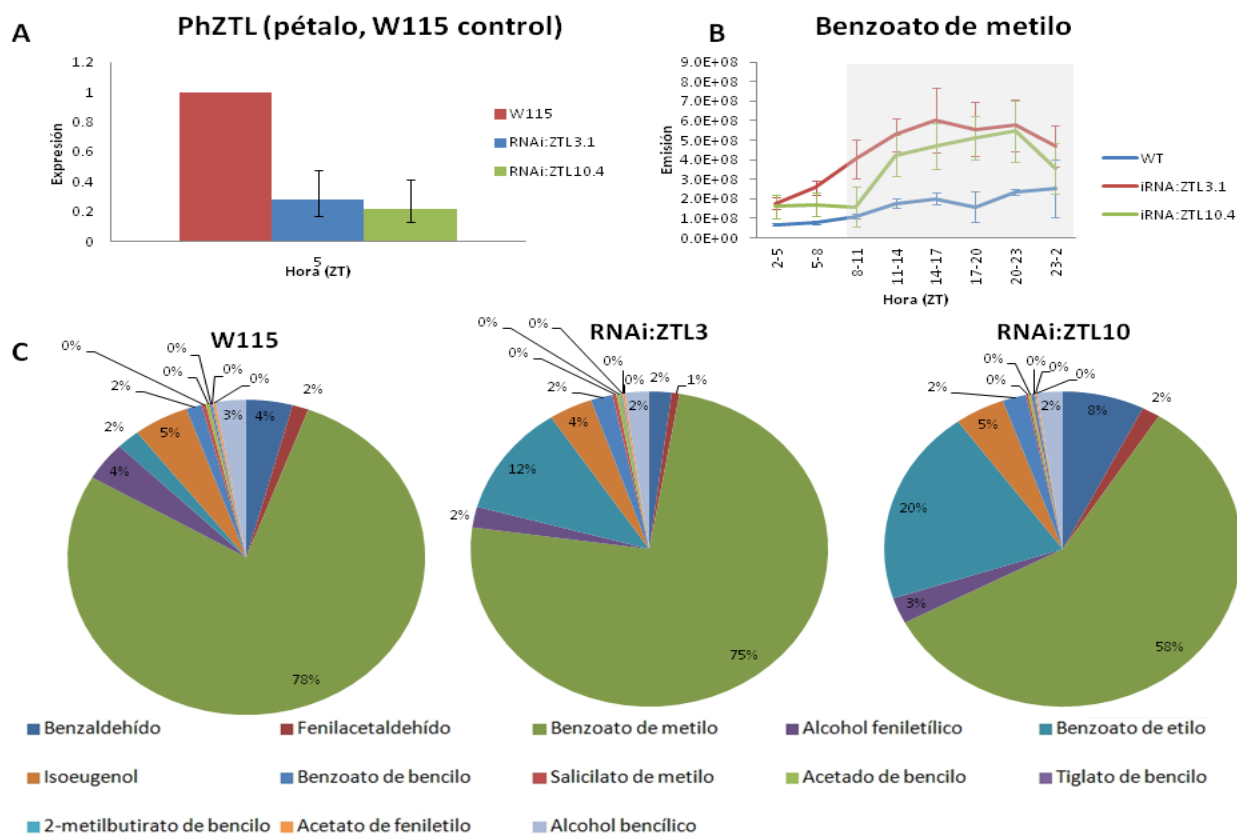


Figura 1. A) Expresión de *PhZTL* en pétalo de petunia. B) Emisión del benzoato de metilo a lo largo de 24h. C) Perfil aromático, representando la emisión total en 24 h.

Tabla 1. Detección de ritmos de dos de los volátiles analizados con MetaCycle. W115 es el silvestre, RNAi:ZTL3 y 10 son líneas transgénicas. Un valor $P < 0,05$ indica que el compuesto mostró una emisión rítmica. La fase se define como el punto (en horas) con la máxima emisión.

Volátil	Parámetro	W115	RNAi:ZTL3	RNAi:ZTL10
Alcohol bencílico	Valor P	4,07e-05	6,71e-03	4,07e-05
	Fase	21,5	20	20
Benzoato de bencilo	Valor P	0.00	0.02	0.00
	Fase	15,5	17	17