



Doctoral Thesis

## Identification, characterization and evolutionary patterns of floral fragrance genes in *Gymnadenia* and *Silene* species

**Author(s):**

Gupta, Alok

**Publication Date:**

2011

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006705946> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 19883

**IDENTIFICATION, CHARACTERIZATION, AND EVOLUTIONARY PATTERNS OF  
FLORAL FRAGRANCE GENES IN *GYMNADENIA* AND *SILENE* SPECIES**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

ALOK KUMAR GUPTA

MSc. (Biology), Dalhousie University, Canada

born on May 10, 1978

citizen of India

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Alex Widmer, examiner  
Prof. Dr. Florian P. Schiestl, co-examiner  
Prof. Dr. Eran Pichersky, co-examiner  
Prof. Dr. Enrico Martinoia, co-examiner

2011

## Summary

Plants release an array of chemical compounds that play a key role in mediating plant-insect interactions. Floral scents are chemically complex blends of low-molecular weight volatile organic compounds (VOCs) that not only attract pollinators but can also deter herbivores and ants from causing harm to the plants' reproductive structures. Though plants tend to synthesize and produce hundreds of volatile compounds, only a small subset of these are found to be perceived by pollinators and to elicit behavioral responses. Quantitative and qualitative variation in the emission of such scent compounds may be responsible for assortative flower-visitation and thereby, can drive reproductive isolation between co-flowering species. Knowledge of the genetic basis of scent production, the evolutionary processes shaping scent composition, and variation in this complex floral signal are essential for understanding the dynamics of plant-pollinator adaptations. Until recently, most studies on volatile-associated enzyme biochemistry and gene cloning have been conducted on a few model species, such as *Clarkia*, *Petunia*, *Antirrhinum*, and *Rosa*, while less progress has been made for non-model plants. As a result, to date, nothing is known about how scent is produced and regulated in lepidoptera-pollinated *Gymnadenia* and *Silene* species at the molecular level, where floral scent has a key role in ensuring pollination.

The aims of this thesis were to elucidate the molecular basis of scent synthesis in fragrant *Gymnadenia* (Orchidaceae) and *Silene* (Caryophyllaceae) species, and to study the evolutionary patterns of scent-specific genes in these focal species.

As a first step (Chapter I), a benchmark *Gymnadenia odoratissima* sequence resource of 3,456 expressed sequence tags (ESTs) was developed for the identification of floral and especially floral scent-related genes. The floral EST sequences of putative *eugenol synthase* genes were

further used to obtain full-length cDNAs encoding *G. odoratissima* eugenol synthase1 (GoEGS1), *G. odoratissima* eugenol synthase 2 (GoEGS2), *G. conopsea* eugenol synthase1 (GcEGS1), *G. conopsea* eugenol synthase 2 (GcEGS2), *G. densiflora* (iso)-eugenol synthase1 (GdIEGS1) and *G. densiflora* (iso) eugenol synthase2 (GdIEGS2). Results of the biochemical analyses illustrate that most of the identified *Gymnadenia* NADPH-dependent enzymes in this study catalyze the formation of eugenol, except GdIEGS1 and GdIEGS2 that catalyze the formation of eugenol and trace amounts of isoeugenol. To date, no such NADPH-dependent enzyme has been characterized that is responsible for the formation of a mixture of phenylpropene regio-isomers. Furthermore, our evolutionary analysis suggests that a switch from production of one (eugenol) to two compounds (eugenol and isoeugenol) evolved under relaxed purifying selection.

In the second step (Chapter II), to identify and characterize scent-related genes in *Silene latifolia*, we generated 3,072 floral ESTs. Quantitative differences in the emission of phenylacetaldehyde (PAA) contribute to reproductive isolation between *S. latifolia* and the closely related species *S. dioica*. Therefore, to shed light on the genes responsible for the production of PAA, the full-length cDNAs putatively encoding *phenylacetaldehyde synthase* (PAAS) genes were isolated for *S. latifolia* (*SIPAAS1* and *SIPAAS2*) and *S. dioica* (*SdPAAS1* and *SdPAAS2*). Our results show that *SdPAAS1* and *SdPAAS2* are under relaxed purifying selection, and that *SIPAAS1* and *SdPAAS2* are responsible for the formation of PAA.

In the final step (Chapter III), *S. latifolia* EST sequences (from Chapter II) served as the basis for the identification of putative *S. latifolia* *guaiacol O-methyltransferase* genes. The full-length cDNAs putatively encoding *guaiacol O-methyltransferase* genes were obtained from *S. latifolia* (*SIGOMT1* and *SIGOMT2*) and *S. dioica* (*SdGOMT1* and *SdGOMT2*). Our biochemical analyses

show that only *SIGOMT1* is responsible for veratrole formation in *S. latifolia* and the other identified genes, *SIGOMT2*, *SdGOMT1*, and *SdGOMT2* were not accountable for veratrole synthesis. In addition, evolutionary analysis shows that *SIGOMT1* and *SIGOMT2* are under positive selection, whereas *SdGOMT1* and *SdGOMT2* show no evidence of selection. So far, no such plant enzyme that is responsible for veratrole formation has been identified and characterized.

The thesis presented here provides the foundations of two new plant systems, *Silene* and *Gymnadenia*, for scent-molecular research. In addition, functionally characterized fragrance genes and their evolutionary patterns are relevant for understanding pollinator-mediated selection on floral scent variation and thereby, expand our knowledge of traits that contribute to reproductive isolation among closely related plant species.

## Zusammenfassung

Pflanzen produzieren eine Reihe chemischer Verbindungen, die eine wichtige Rolle in der Interaktion zwischen Pflanzen und Insekten spielen. Blütendüfte bestehen aus einem Gemisch verschiedener flüchtiger organischer Verbindungen (VOCs) niederen Molekulargewichts, die nicht nur Bestäuber anlocken, sondern auch Schäden an den reproduktiven Blütenstrukturen durch Pflanzenfresser und Ameisen verhindern. Obwohl Pflanzen zumeist hunderte VOCs produzieren, können nur wenige tatsächlich von Bestäubern wahrgenommen werden und Verhaltensreaktionen auslösen. Quantitative und qualitative Variation in der Emission solcher Verbindungen kann zu assortativer Paarung führen und somit zur reproduktiven Isolation zwischen gleichzeitig blühenden Pflanzenarten beisteuern. Wissen um die genetische Basis der Duftstoffproduktion, die Variation dieses komplexen Blütensignales, sowie die evolutionären Prozesse, die Duftzusammensetzungen formen, sind essentiell für unser Verständnis der Dynamik von pflanzlichen Anpassungen an ihre Bestäuber. Bis vor kurzem wurden die Biochemie von VOC-produzierenden Enzymen und deren Gene lediglich in wenigen Modellsystemen wie *Clarkia*, *Petunia*, *Antirrhinum* und *Rosa* untersucht. Wie für die Bestäubung wichtige Blütendüfte hingegen in Schmetterlings-bestäubten *Gymnadenia*- und *Silene*-Arten auf molekularer Ebene produziert und reguliert werden, ist weitgehend unbekannt.

Die Ziele dieser Dissertation sind die Aufklärung der molekularen Basis der Duftstoffsynthese in *Gymnadenia* (Orchidaceae) and *Silene* (Caryophyllaceae) Species, sowie der evolutionären Muster in den zugehörigen Duftstoffgenen.

In Kapitel I wurde eine 3,456 Expressed Sequence Tags (ESTs) umfassende Sequenzressource für *Gymnadenia odoratissima* für die Identifikation von blütenspezifischen und besonders Duftstoff-relevanten Gene erarbeitet. Die EST Sequenzen putativer Eugenol Synthase Gene

wurde verwendet, um die kompletten cDNAs für *G. odoratissima* Eugenol Synthase 1 (GoEGS1), *G. odoratissima* Eugenol Synthase 2 (GoEGS2), *G. conopsea* Eugenol Synthase 1 (GcEGS1), *G. conopsea* Eugenol Synthase 2 (GcEGS2), *G. densiflora* (Iso-)Eugenol Synthase 1 (GdIEGS1) und *G. densiflora* (Iso)Eugenol synthase 2 (GdIEGS2) zu erlangen. Biochemische Analysen zeigen, dass die meisten *Gymnadenia* Enzyme die NADPH-abhängige Formation von Eugenol katalysieren. Lediglich GdIEGS1 und GdIEGS2 katalysieren die Produktion von Eugenol und Spuren von Isoeugenol. Dies ist die erste Charakterisierung solcher NADPH-abhängiger Enzyme, die ein Gemisch an Phenylpropen Regioisomeren herstellen können. Desweiteren legt meine evolutionäre Analyse nahe, dass der Wechsel von der Produktion einer Substanz (Eugenol) zur Produktion zweier Substanzen (Eugenol und Isoeugenol) unter relaxierter purifizierender Selektion stattfand.

In Kapitel II wurden Duftstoffgene in *Silene latifolia* aus 3,072 blütenspezifischen ESTs identifiziert und charakterisiert. Quantitative Unterschiede in der Emission von Phenylacetaldehyd (PAA) tragen zur reproduktiven Isolation zwischen den naheverwandten Arten *S. latifolia* und *S. dioica* bei. Komplette cDNA Sequenzen für eine putative Phenylacetaldehyd Synthase (PAAS) wurden von *S. latifolia* (SIPAAS1 und SIPAAS2) und *S. dioica* (SdPAAS1 und SdPAAS2) isoliert. Meine Resultate zeigen, dass relaxierte purifizierende Selektion auf *SdPAAS1* und *SdPAAS2* wirkt, und dass SIPAAS1 und SdPAAS2 für die Synthese von PAA verantwortlich sind.

Im letzten Kapitel (Kapitel III) wurden *S. latifolia* EST Sequenzen (von Kapitel II) für die Identifikation putativer *S. latifolia* *Guaiacol O-Methyltransferase* Gene herangezogen. Komplette cDNAs, die putativ für Guaiacol O-Methyltransferase codieren, wurden von *S. latifolia* (SIGOMT1 und SIGOMT2) und *S. dioica* (SdGOMT1 und SdGOMT2) isoliert. Meine

biochemische Analysen zeigen, dass von den identifizierten Genen einzig SIGOMT1 für die Produktion von Veratrol in *S. latifolia* verantwortlich ist. Darüberhinaus zeigte die evolutionäre Analyse, dass *SIGOMT1* und *SIGOMT2* unter positiver Selektion stehen, während es bei *SdGOMT1* and *SdGOMT2* keine Indizien für Selektion gab. Bisher war kein pflanzliches Enzym bekannt, das Veratrol produzieren kann.

Diese Dissertation präsentiert die Grundlagen für die molekulare Erforschung der Duftstoffproduktion in zwei neuen Pflanzensystemen, *Silene* und *Gymnadenia*. Funktionell charakterisierte Duftstoff-Gene und ihre evolutionären Muster sind außerdem wichtig für das Verständnis von Bestäuber-vermittelter Selektion auf Blütendüfte, und erweitern somit unser Wissen um Merkmale, die zur reproduktiven Isolation zwischen nahe verwandten Arten beitragen.