

VU Research Portal

Physiological and genetic control of anthocyanin pigmentation in different species

Povero, G.

2011

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Povero, G. (2011). *Physiological and genetic control of anthocyanin pigmentation in different species*.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Samenvatting

Hogere planten vertonen een grote morfologische diversiteit en kunnen enorm verschillen in afmetingen, lichaamsopbouw, de vorm en aantal van verschillende organen, kleuren. Het is duidelijk dat variatie tijdens evolutie ontstaat door mutatie(s) en selectie, maar de moleculaire details hoe morfologische variatie ontstaat is veel minder duidelijk en onderwerp van debat. Ontstaat morfologische variatie door mutaties in enkele (master) genen met groot effect, of door vele mutaties in meerder gene met elk klein effect? Betreft dit vooral mutaties in de eiwit-coderende sequenties, of bij voorkeur veranderingen in regulatoire elementen van genen?

Variatie in pigmentatiepatronen zijn om praktische redenen een aantrekkelijk systeem om de moleculaire basis van het ontstaan van morfologische diversiteit te bestuderen, omdat ze makkelijk zijn te detecteren en reeds de nodig kennis is verkregen over de genetische regulatie van pigmentatie in een aantal verschillende soorten.

De pigmenten die de meeste bloemen, vruchten en soms ook ander planten organen kleuren zijn anthocyanen. Dit zijn simpele fenylpropanoïden die behoren tot de superfamilie van flavonoiden. Anthocyanen worden gesynthetiseerd middels een korte biosynthese route bestaande uit ca 20 opeenvolgende reacties. Veel van de "structurele" anthocyaan genen die coderen voor de enzymen van de route zijn geïdentificeerd in een breed spectrum van bloeiende planten (*Angiospermae*). De transcriptie van deze structurele gene wordt geactiveerd door een breed geconserveerd trio van eiwitten die behoren tot de families van MYB en de Helix-Loop Helix (HLH) transcriptie regulators, en een WD40-repeat eiwit. Genetisch onderzoek aan een aantal soorten, met name petunia, leeuwenbek (*Antirrhinum majus*), maïs en *Arabidopsis* wees uit dat het patroon waarin anthocyaan pigmenten accumuleren in de plant, wordt gedicteerd door het expressiepatroon van de MYB en HLH regulator. D.w.z. de expressie van de MYB en HLH regulators is in soorten beperkt tot weefsels die zijn gepigmenteerd en variatie in pigmentatie patronen tussen soorten correleert correspondeert met variatie in de expressiepatroon van de MYB en HLH regulators. Bovendien is ectopische expressie van de MYB en HLH regulators in transgene planten voldoende is om de anthocyaan route te activeren in weefsels die normaal niet zijn gepigmenteerd. Dit suggereert dat de divergentie van pigmentatie patronen tijdens evolutie mogelijk is ontstaan door veranderingen in de expressie patronen van deze regulators. De genetische veranderingen die ten grondslag liggen aan de divergentie van MYB en HLH expressiepatronen zijn echter onbekend. Teneinde hier inzicht in te krijgen hebben we getracht de essentiële genetische verschillen te identificeren die ten grondslag liggen aan de divergentie van pigmentatie patronen binnen 1 soort (tomaat) en vervolgens tussen verschillende soorten, die meer of minder aan elkaar zijn verwant.

De hoofdstukken 1 en 2 geven een overzicht van de huidige (literatuur)kennis met betrekking op de regulatie van anthocyaan synthese in tomaat en cultivars met verschillende pigmentatie patronen die door klassieke veredeling zijn verkregen. Hoofdstuk 2 geeft een vergelijkend overzicht van de genetische regulatie van de anthocyaan route in verschillende soorten, zoals leeuwenbek, *Arabidopsis* en petunia.

Hoofdstuk 3 presenteert experimenteel werk waaruit blijkt dat zowel hormonen (gibbereline, jasmonaat en abscisinezuur) als sucrose een rol spelen in de regulatie van pigmentatie patronen. Dit impliceert dat de pigmentatie zelfs in genetisch identiek individuen kan verschillen (tot op zeker hoogte) als gevolg van verschillen in omgevingsfactoren.

De meeste vruchten, bladeren en stengels van de meeste commerciële tomaten cultivars zijn niet gepigmenteerd door anthocyanen (de rode kleur van tomaten wordt veroorzaakt door carotenen, niet door anthocyanen). In sommige tomatenvariëteiten, genaamd *Sunblack*, vertonen zowel de vruchten als stengels en bladeren een intense paarse kleur. Het afwijkende

pigmentatiepatroon van *Sunblack* vergeleken commerciële cultivars wordt veroorzaakt door een recessief allel op het *Atroviolacea* (*Atv*) locus en een dominant allel op *Anthocyanin fruit*. Hoofdstuk 4 beschrijft een genoombrede analyse van genexpressie profielen in *Aft*, *atv* en *Aft atv* tomatenlijnen en, als controle, een ongekleurde cultivar. Dit liet zien dat de expressie van een reeks van structurele anthocyaan genen sterk was opgereguleerd in *Aft*, *atv* en *Atft atv* lijnen, zoals verwacht, en dat *Aft* en *atv* de expressie van een reeks van additionele genen activeert dan wel inhibeert. Voor de meeste genen bleek bovendien bleken het dominant *Aft* en het recessieve *atv* allel een synergistisch effect te hebben.

De observatie dat ectopische synthese veranderingen vereist in de expressie van tenminste 2 genen, i.c. de MYB en de HLH regulator, lijkt in tegenspraak met het gegeven dat 1 dominant allel in tomaat, *Aft*, voldoende is voor pigmentatie van de vrucht. In Hoofdstuk 6 hebben we beschikbare mutanten gebruikt van petunia, een naaste verwant van tomaat, om de hypothese te testen dat de MYB partner als "masterregulator" van de anthocyaanroute opereert en in staat is om tevens de expressie van zijn HLH partner te activeren. We tonen aan dat het *ANTHOCYAAN 4* (*AN4*) van petunia codeert voor een MYB eiwit dat essentieel is voor de expressie van zijn HLH partner AN1 in helmknoppen, en dat ectopische expressie van AN4, of het nauw verwante gen AN2, voldoende is voor ectopische activatie van AN1 en daarmee tevens de synthese van anthocyanen.

De feit dat in petunia de MYB als master-regulator anthocyaan synthese werkt, suggereerde dat het *Aft* locus van tomaat mogelijk een homoloog is van *AN2* en *AN4*. In hoofdstuk 5 beschrijven we de karakterisering van regio van ca. 20 kb in het tomaten genoom waarin drie MYB genen (*SIAN2*, *SIANT1*, *SIANT1-like*) liggen die nauw verwant zijn aan *AN2/AN4* en die in kruisingen co-segregeert met *Aft*. Net als in petunia blijkt constitutieve expressie van de MYB factor, *SIAN2* of *SIANT1*, voldoende voor ectopische expressie van de HLH partner *SIAN1*, en activatie van de anthocyaan route in bladeren, stengels en vruchten. Dit onderschrijft dat de MYB factor ook in tomaat als master-regulator werkt. Bovendien bleek dat in *Aft* lijnen de expressie van *SIAN2* en in iets mindere mate van *SIANT1* is sterk is verhoogd. Experimenten met transgene planten lieten zien dat de verhoging van *SIAN2* expressie in *Aft* een gevolg is van een verschil in het *SIAN2^{Aft}* allel, en dat de verhoogde expressie van *SIAN2* voldoende is om de ectopische activatie van *SIANT1* te verklaren. We concluderen daarom dat het *Aft* locus identiek is aan *SIAN2* en dat de pigmentatie van de vrucht in *Aft* lijnen een gevolg is van een verandering in dit gen zelf, waarschijnlijk in een cis-regulatorische sequentie.

Om te onderzoeken in hoeverre veranderingen in regulatorische sequenties van de MYB heeft bijgedragen aan de divergentie van pigmentatiepatronen tussen soorten, is een groot scala aan transgene tomaat, petunia en Arabidopsis planten gegenereerd en homologe MYB gene de complete genen, inclusief flankerende regulatorische sequenties, dan wel onderdelen van deze genen gewisseld tussen deze soorten. De eerste resultaten wijzen er op dat de verschillen in de expressiepatronen van deze genen in hun eigen gastheer, voor een groot deel worden veroorzaakt door vooralsnog onbekende veranderingen in het stroomopwaartse regulatorische netwerk, en verandering in cis-regulatorische elementen van deze MYB gene relatief weinig heeft.

De anthocyaan biosynthese vormen niet alleen een handig modelsysteem om fundamenteel wetenschappelijk vragen te bestuderen maar is ook van direct praktisch belang voor de veredeling van voedselgewassen. Anthocyanen zijn de afgelopen jaren in de schijnwerper gekomen als belangrijke componenten van ons dieet, vanwege hun anti-virale, anti-allergene, anti-inflammatoire en anti-oxidant eigenschappen. Het is eenvoudig is om middels transgenese nieuwe cultivars te ontwikkelen met verhoogde anthocyaan inhoud, maar vanwege problemen met de publieke acceptatie van transgene planten is dit geen zeker voor voedselgewassen voorlopig geen levensvatbare strategie. Klassieke veredeling kan dan een uitweg bieden, mist voldoende kennis over relevante genetische factoren, zoals hier beschreven, voor handen is.