

## Abstract

P is one of the least available plant macronutrients in natural soils and P deficiency strongly affects plant productivity and fitness. A widely formed adaptation of plants to counter P deficiency is the formation of AMS with AMF from the phylum Glomeromycota. A key aspect of this symbiosis is the formation of a ‘Symbiosome’, the symbiotic interface where exchange of nutrients takes place. AM formation results from complex interaction between the symbionts. Here a cellular re-programming of roots as a result of signal perception and cell-to-cell signaling enables accommodation of AMF and hence symbiosome formation. Although much is known about signaling events leading up to the establishment of symbiosis in plants, little is known about the signaling events that occur at this symbiotic interface. Recently lysophosphatidylcholine (LPC) produced by the action of phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) on the plasma membrane associated phosphatidylcholine (PC) was identified as a signal for the activation of AM-specific expression of phosphate transporter (PT) genes *StPT3* and *StPT4* and their orthologs in tomato (Rausch *et al.*, 2001; Drissner *et al.*, 2007). It was also shown that plant P status acts as a modulator of LPC signaling at the symbiotic interface in tomato (Nagy *et al.*, 2009). This work provides new insights into the chemical diversity of LPC species, and provides evidence for their plant and/or fungal derived chemical origin.

This work describes the quantitative mass spectrometric analysis by ESI-MS/MS of the chemical diversity of mycorrhizal signal LPC(s) under non-mycorrhizal and mycorrhizal conditions in *Lotus japonicus* and three other plant species. Results demonstrated that chemical diversity of LPC(s) is both intra- (within a given plant species) and inter- (between different plant species) specific. The relative amounts of very long chain unsaturated (VLC-unsat) LPC species were significantly higher in a mycorrhiza specific manner in the AMS of plants, uniquely though involving only *Glomus intraradices*. Infiltration of non-mycorrhizal *Lotus* roots with commercially available LPC from soybean led to an increase of transcripts encoding PTs *LjPT3* and *LjPT4* albeit with inherent variation suggesting molecular function of LPC(s) *in-planta*. Data from further comparative transcriptome analysis (RNA-Seq) and the corresponding measurements of chemical diversity of LPC(s) under different plant P status, suggested that mycorrhiza formation triggers the expression of genes encoding proteins involved in lipid metabolism. While addition of P<sub>i</sub> systematically represses not only (a) the development of AMS

and the PT gene expression, but also (b) completely represses the activity of many proteins involved in the metabolism of lipids and (c) LPC abundance. Overall, this aspect of the study clearly indicates the existence of synergistic symbiotic responses between the symbionts, even at the level of lipid metabolism and regulation.

Furthermore, two PLA<sub>2</sub>-like candidate genes of *L. japonicus*, i.e. *LjPLP2* and *LjsPLA<sub>2</sub>-2* and their corresponding proteins, were described by a functional genomics approach. Purified recombinant proteins of PLP2 and sPLA<sub>2</sub>-2 both exhibit PLA<sub>2</sub> activity *in-vitro*, hydrolyzing PC and generating measurable amounts of LPCs. Constitutive over-expression *in-planta* resulted in (a) reduced root/shoot ratio under mycorrhizal conditions but generated (b) similar amounts of LPCs *in-planta* under both non-mycorrhizal and mycorrhizal conditions in comparison to wild-type. Nonetheless, further studies on the RNAi knock-down plants under non-mycorrhizal and mycorrhizal conditions are needed to evaluate the biological role(s) of *Lotus* PLA<sub>2</sub>-like genes in AMS.

## Zusammenfassung

Phosphat (P) gilt als eines der am schwersten zugänglichen Makronährelemente für Pflanzen in nativen Böden. Eine Defizienz in der Phosphatversorgung wirkt sich stark auf die Produktivität und Fitness der Pflanzen aus. Eine weit verbreitete Anpassung von Pflanzen einer mangelhaften Phosphatversorgung entgegenzuwirken, ist die Ausbildung einer arbuskulären Mykorrhizasymbiose (AMS) mit einem arbuskulären Mykorrhizapilz (AMF) aus dem Phylum der Glomeromycota. Ein zentraler Aspekt dieser Symbiose ist die Bildung eines „Symbiosoms“, die symbiotische Schnittstelle, an welcher der Austausch der Nährstoffe stattfindet. Die Entstehung der arbuskulären Mykorrhiza ist bedingt durch eine komplexe Interaktion zwischen beiden Symbionten. Eine zelluläre Reprogrammierung der Wurzeln durch Zell-Zell-Kommunikation sowie Signalerkennung ermöglicht die Aufnahme des AMF und somit die Ausbildung des Symbiosoms. Während viel über die Signalwege bekannt ist, die zu einer Etablierung der AMS führen, ist über die Signalwege am Symbiosom selbst wenig bekannt. Kürzlich konnte jedoch Lysophosphatidylcholin (LPC), das durch die Umsetzung des Membranbestandteils Phosphatidylcholin (PC) mit Hilfe der Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) gebildet wird, als Signalmolekül identifiziert werden. In Tomatenpflanzen führt das LPC-Signal zu einer AM-spezifischen Genexpression der Phosphattransporter (PT) *StPT3*, *StPT4* und deren Orthologe. Diese LPC-Signalgebung kann durch den P-Versorgungszustand der Pflanze moduliert werden. Diese Arbeit liefert neue Einblicke in die chemische Diversität sowie Hinweise auf einen pflanzlichen bzw. pilzlichen Ursprung der LPC-Spezies.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von quantitativen massenspektrometrischen Analysen durch ESI-MS/MS die chemische Diversität von LPC-Spezies unter AM und nicht-AM Bedingungen in *Lotus japonicus* und drei weiteren Pflanzenarten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die chemische Diversität von LPC-Spezies nicht nur inter- (zwischen verschiedenen Pflanzenspezies) sondern auch intraspezifisch (innerhalb einer Pflanzenspezies) ist. Der relative Gehalt an langkettigen, ungesättigten LPC-Spezies war in Abhängigkeit der Mykorrhizierung ausschließlich durch *Glomus intraradices* signifikant höher. Die Infiltration von nicht-mykorrhizierten *L. japonicus* Wurzeln mit kommerziell erhältlichem LPC der Sojabohne führte tendenziell zu einer Induktion der Genexpression der PT *LjPT3* und *LjPT4*. Dies weist auf eine molekulare Funktion von LPC *in-planta* hin. Daten aus

weiterführenden Transkriptomanalysen (RNA-seq) sowie korrespondierenden LPC-Bestimmungen in Abhängigkeit verschiedener P-Versorgungszustände der Pflanzen deuten auf eine Induktion der Expression von Genen aus dem Lipidstoffwechsel hin. Die Zugabe von P reprimierte gezielt nicht nur (a) die Entwicklung der AMS und die PT Genexpression sondern reprimierte auch (b) vollständig die Aktivität von verschiedenen Proteinen im Lipidstoffwechsel sowie (c) das Vorkommen von LPC. Die vorliegenden Ergebnisse weisen deutlich auf die Existenz einer synergistischen symbiotischen Antwort zwischen den Symbionten auch auf der Ebene des Lipidstoffwechsels und dessen Regulation hin.

Desweiteren wurde die Funktion von zwei PLA<sub>2</sub>-ähnlichen Kandidatengen, *LjPLP2* und *LjsPLA<sub>2</sub>-2*, sowie den entsprechenden Proteinen in einem funktionellen genomischen Ansatz charakterisiert. Rekombinantes Protein von PLP2 als auch sPLA<sub>2</sub>-2 zeigte *in-vitro* eine PLA<sub>2</sub> Aktivität. Die konstitutive Überexpression der Kandidaten *in-planta* führte einerseits zu einem (a) verminderten Wurzel/Spross Verhältnis unter AM Bedingungen, jedoch auch (b) zu gleichen LPC-Gehalten unter AM und nicht-AM Bedingungen im Vergleich zum Wildtyp. Weitere Untersuchungen an Hand von RNAi *knock-down* Pflanzenlinien unter AM und nicht-AM Bedingungen sind jedoch notwendig um die biologische Rolle der PLA<sub>2</sub>-ähnlichen Genen in *L. japonicus* in der AMS weiter zu entschlüsseln.