

Synthetic reconstruction of a mutualistic root-fungus
symbiosis in genetically modified *Arabidopsis*
thaliana



Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Hang Lu

Köln, accepted in the year 2025

Abstract

Most land plants form beneficial symbiotic associations with arbuscular mycorrhizal (AM) fungi, supporting the sustainability of terrestrial ecosystems. Nowadays an increasing number of genes essential for establishing AM associations have been identified, but the fundamental building blocks of AM symbiosis remain to be fully understood. A hallmark of this widespread and ancient symbiosis is reciprocal nutrient exchange, where AM fungi supply mineral nutrients to their plant hosts in return for fixed carbon. Bidirectional nutrient exchange, as described by biological market theory, is likely a key factor stabilizing plant-AM fungi interactions. *Arabidopsis thaliana*, naturally an AM non-host due to the evolutionary loss of key genes, provides a unique system to study AM-like traits through its interaction with *Colletotrichum tofieldiae* (Ct).

This project hypothesized that incorporating AM-associated nutrient exchange traits into the AtCt system could enhance symbiotic efficiency and improve plant performance under stress. Two *Lotus japonicus* AM-specific proteins, phosphate transporter LjPT4 and glycerol-3-phosphate acyltransferase LjRAM2, which mediate host phosphate uptake and fatty acid efflux, respectively, were expressed in *A. thaliana*.

Heterologous expression of *LjPT4* was detected in transgenic *Arabidopsis* plants, and *LjPT4* was localized to the plasma membrane. While *LjPT4* expression rescued the growth deficiency of a yeast mutant lacking phosphate transporters, it maintained the phosphate uptake ability of the *Arabidopsis* host. Surprisingly, ectopic expression of *LjPT4* in *A. thaliana* induced a phosphate starvation-like response under phosphate-sufficient conditions, characterized by modified root architecture and induction of phosphate starvation marker genes shown by RNA-seq. These findings suggest a novel sensing and

Abstract

signaling role for LjPT4, further supported by increased root sensitivity to the phosphate analog phosphite. Ct colonization rescued these phosphate starvation-like responses, potentially via post-translational reduction of LjPT4 protein levels. Future research involving ectopic expression of *LjPT4* in phosphate starvation response-deficient *Arabidopsis* mutants could further elucidate LjPT4's role in signaling pathways and the significance of PSR in AtCt interactions.

LjRAM2, known for its role in cutin biosynthesis via beta-monoacylglycerol production, effectively complemented the developmental phenotype of the *Arabidopsis gpat6* mutant. Transgenic *LjRAM2* expression significantly increased cutin monomer content and enhanced tolerance to salinity stress without negatively impacting overall plant growth. Furthermore, altered lipid profiles were observed in Ct extraradical hyphae colonizing *LjRAM2*-expressing *Arabidopsis*, implying potential lipid transfer between host and fungus. Nevertheless, Ct-mediated phosphate allocation remained unchanged, pointing to limited dynamic coupling in reciprocal nutrient exchange in AtCt interaction.

Collectively, these findings highlight the distinct potentials of LjPT4 and LjRAM2 in reconstructing AM-like traits within a non-host context. Such targeted investigations will not only enhance our mechanistic understanding of plant–fungal symbioses but also facilitate the practical engineering of AM-like traits to improve crop resilience and productivity in non-mycorrhizal agricultural systems.

Zusammenfassung

Die meisten Landpflanzen bilden vorteilhafte Symbiosen mit arbuskulären Mykorrhiza-(AM)-Pilzen, die zur Nachhaltigkeit terrestrischer Ökosysteme beitragen. Zwar wurden zahlreiche für die AM-Symbiose essenzielle Gene identifiziert, doch die zentralen molekularen Grundlagen sind noch nicht vollständig verstanden. Ein Merkmal dieser weit verbreiteten, evolutionär alten Symbiose ist der reziproke Nährstoffaustausch: AM-Pilze liefern Mineralstoffe an die Pflanze und erhalten im Gegenzug fixierten Kohlenstoff. Solch bidirekionaler Austausch, wie im Konzept des „biologischen Markts“ beschrieben, stabilisiert wahrscheinlich die Pflanze–Pilz-Interaktion. *Arabidopsis thaliana*, ein natürlicher AM-Nichtwirt aufgrund des Verlusts symbioserelevanter Gene, bietet ein Modell zur Untersuchung AM-ähnlicher Merkmale in der Interaktion mit *Colletotrichum tofieldiae* (Ct).

In diesem Projekt wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Integration von AM-assoziierten Nährstoffaustauschmerkmalen in das AtCt-System die Symbioseeffizienz erhöhen und die Pflanzenleistung unter Stress verbessern könnte. Zwei AM-spezifische Proteine aus *Lotus japonicus*, der Phosphattransporter LjPT4 und die Glycerol-3-phosphat-Acyltransferase LjRAM2, welche den Phosphataufnahmeprozess bzw. den Fettsäureexport im Wirt regulieren, wurden heterolog in *A. thaliana* exprimiert.

Die heterologe Expression von *LjPT4* konnte in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen nachgewiesen werden, wobei *LjPT4* an der Plasmamembran lokalisiert war. Obwohl *LjPT4* die Wachstumsdefizienz einer Hefe-Mutante ohne funktionelle Phosphattransporter ausgleichen konnte, wurde die Phosphataufnahme in *Arabidopsis* nicht erhöht. Unerwarteterweise löste die ektopische Expression von *LjPT4* unter phosphatreichen Bedingungen eine

Phosphatmangel-ähnliche Antwort aus, die durch veränderte Wurzelarchitektur und die Induktion typischer Marker-Gene (laut RNA-seq) gekennzeichnet war. Diese Befunde deuten auf eine neue Rolle von LjPT4 in der Wahrnehmung und Signalweiterleitung von Phosphat hin, was zusätzlich durch eine erhöhte Sensitivität der Wurzeln gegenüber Phosphit – einem Phosphatanalogen – gestützt wird. Interessanterweise konnte die Ct-Kolonisierung diese Phosphatmangel-ähnliche Antwort teilweise aufheben, vermutlich durch eine posttranskriptionale Reduktion der LjPT4-Proteinmenge. Weitere Untersuchungen mit PSR-defizienten *Arabidopsis*-Mutanten könnten die Signalfunktion von LjPT4 und die Rolle der PSR in der AtCt-Symbiose weiter klären.

LjRAM2, bekannt für seine Rolle in der Cutinbiosynthese über die Bildung von β -Monoacylglycerolen, konnte erfolgreich den Entwicklungsdefekt der *gpat6*-Mutante von *Arabidopsis* ausgleichen. Die transgene Expression von *LjRAM2* führte zu einer signifikanten Erhöhung der Cutinmonomer-Gehalte sowie zu einer verbesserten Salztoleranz, ohne das Gesamtwachstum negativ zu beeinflussen. Darüber hinaus wurden veränderte Lipidprofile in den extraradikalen Hyphen von Ct beobachtet, die *LjRAM2*-exprimierende *Arabidopsis* kolonisierten, was auf einen möglichen Lipidtransfer zwischen Pflanze und Pilz hindeutet. Dennoch blieb die pilzvermittelte Phosphatversorgung unverändert, was auf eine begrenzte dynamische Kopplung im reziproken Nährstoffaustausch hinweist.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse das unterschiedliche Potenzial von LjPT4 und LjRAM2 zur Rekonstruktion AM-ähnlicher Eigenschaften in einem Nichtwirtsystem. Solche gezielten Untersuchungen tragen nicht nur zum besseren Verständnis pflanzlich-fungaler Symbiosen bei, sondern könnten auch die gezielte Entwicklung AM-ähnlicher Merkmale zur Verbesserung der

Zusammenfassung

Stressresilienz und Produktivität nicht-mykorrhizaler Nutzpflanzen ermöglichen.