

# Analysing new gene functions in arbuscular mycorrhizal symbiosis with regard to putative regulation by the transcription factor CBX1

## Abstract

Arbuscular mycorrhizal symbiosis (AMS) is a mutualistic and widespread relationship between plants and fungi that is thought to have enabled the transition of plants from aquatic to terrestrial habitats about 460 million years ago. The main benefit of this endosymbiosis is seen in the improved nutrition of both the plant host and the symbiotic fungi through mutual nutrient exchange, which takes place at the interface of finely branched fungal structures within the inner cortical cells of plants, called arbuscules. The AP2 transcription factor CBX1 directly controls the expression of genes involved in nutrient exchange by binding to the evolutionary conserved CTTC *cis*-regulatory elements in DNA. In *Lotus japonicus*, CBX1 regulates the expression of the symbiotic phosphate transporter *PT4* and the coupled H<sup>+</sup>-ATPase *HA1*, which facilitate phosphate uptake across the periarbuscular membrane. Based on the additional targeting of genes related to lipid metabolism, CBX1 is also thought to be involved in symbiotic carbon supply to the arbuscular mycorrhizal fungus.

In this study, we aimed to expand our understanding of the regulatory pathway underlying AM symbiosis and investigated novel gene functions by focusing on three putative CBX1 target genes: *CHI*, *DFR* and *ABCB*. *CHI* and *DFR* are predicted to encode bottleneck enzymes of flavonoid biosynthesis, a metabolism upregulated by mycorrhization. However, our data suggest that neither gene is regulated by AMS or CBX1, while *DFR* may be regulated by the CBX1 paralogue CBX2. In contrast, we demonstrate that *ABCB*, encoding a subfamily B ABC transporter, is transcriptionally regulated by mycorrhization, and expressed in arbuscule-containing and neighboring cells. Moreover, we show that *ABCB* is directly activated by CBX1 through binding to CTTC motifs in its promoter. Together with a phylogenetic analysis showing the conservation of *ABCB* in AMS-capable angiosperm families, our data emphasize a role for *ABCB* in the mutualistic endosymbiosis. Furthermore, metabolic profiling of *ABCB*-defective mutants shows an effect on the lipid profile of plants and suggests an (in)direct involvement of *ABCB* in lipid metabolism during AMS. Finally, we show that despite the absence of a mycorrhizal phenotype in *cbx1* mutants, these plants exhibit reduced phosphorus levels and a severe accumulation of flavonoids, galacto- and storage lipids.

## Kurzzusammenfassung

Die Arbuskuläre Mykorrhiza-Symbiose (AMS) ist eine weit verbreitete, wechselseitige Beziehung zwischen Pflanzen und Pilzen, die vermutlich den Übergang der Pflanzen von aquatischen zu terrestrischen Lebensräumen vor etwa 460 Millionen Jahren ermöglicht hat.

Der Hauptnutzen dieser Endosymbiose wird in der verbesserten Ernährung sowohl des Pflanzenwirts als auch der symbiotischen Pilze durch den gegenseitigen Austausch von Nährstoffen gesehen, der an der Schnittstelle der fein verzweigten Pilzstrukturen innerhalb der inneren Rindenzellen der Pflanzen, den Arbuskeln, stattfindet. Der AP2-Transkriptionsfaktor CBX1 steuert direkt die Expression von Genen, die am Nährstoffaustausch beteiligt sind, indem er an die evolutionär konservierten CTTC *cis*-Regulierungselemente in der DNA bindet. In *Lotus japonicus* reguliert CBX1 die Expression des symbiotischen Phosphattransporters *PT4* und der gekoppelten H<sup>+</sup>-ATPase *HA1*, die die Phosphataufnahme durch die periarbuskuläre Membran ermöglicht. Aufgrund der zusätzlichen Steuerung von Genen, die mit dem Lipidstoffwechsel zusammenhängen, wird angenommen, dass CBX1 auch an der symbiotischen Kohlenstoffversorgung des arbuskulären Mykorrhizapilzes beteiligt ist.

In dieser Studie wollten wir unser Verständnis des der AM-Symbiose zugrundeliegenden Regulationsweges erweitern und neue Genfunktionen untersuchen, indem wir uns auf drei mutmaßliche CBX1-Zielgene konzentrierten: *CHI*, *DFR* und *ABCB*. *CHI* und *DFR* sollen für Engpassenzyme der Flavonoid-Biosynthese kodieren, einem Stoffwechsel, der durch Mykorrhiza hochreguliert wird. Unsere Daten deuten jedoch darauf hin, dass keines der beiden Gene durch AMS oder CBX1 reguliert wird, während *DFR* möglicherweise durch das CBX1-Paralog CBX2 kontrolliert wird. Im Gegensatz dazu zeigen wir, dass *ABCB*, das für einen ABC-Transporter der Unterfamilie B kodiert, durch Mykorrhizierung transkriptionell reguliert und in Arbuskel-enthaltenden und benachbarten Zellen exprimiert wird. Darüber hinaus zeigen wir, dass *ABCB* direkt von CBX1 durch Bindung an CTTC-Motive in seinem Promotor aktiviert wird. Zusammen mit einer phylogenetischen Analyse, die die Erhaltung von *ABCB* in AMS-fähigen Angiospermenfamilien zeigt, unterstreichen unsere Daten eine Rolle von *ABCB* in der mutualistischen Endosymbiose. Darüber hinaus zeigt die metabolische Profilanalyse von *ABCB*-defekten Mutanten eine Auswirkung auf das Lipidprofil der Pflanzen und deutet auf eine (in)direkte Beteiligung von *ABCB* am Lipidstoffwechsel während der AMS hin. Schließlich zeigen wir, dass trotz des Fehlens eines Mykorrhiza-Phänotyps in *cbx1*-Mutanten diese Pflanzen reduzierte Phosphorwerte und eine starke Anhäufung von Flavonoiden, Galakto- und Speicherlipiden aufweisen.