

# Towards elucidating the role of the transcription factor PHR1 in the phosphate starvation response and the mycorrhizal symbiosis in the model legume *Lotus japonicus*

## Abstract

Phosphorus is an important macronutrient essential for plant growth. The bioavailability of inorganic phosphate (Pi), the form in which phosphorus is taken up by the plant, is usually low, forcing plants to optimize Pi uptake and utilization efficiency. Besides increasing the root surface area, secreting Pi mobilizing root exudates and inducing the expression of high affinity phosphate transporters, one way to enhance Pi uptake efficiency is symbiosis with soil fungi, forming the so called mycorrhiza. The establishment of the most common form, the arbuscular mycorrhiza (AM), is regulated by the Pi status of the plant. The transcription factors Phosphate Starvation Response 1 (PHR1) and, to a lesser extent, PHR1-like 1 (PHL1) are known as key regulators of the phosphate starvation response in plants. One aim of this work was to investigate whether PHR1 and PHL1 are also involved in the establishment of AM symbiosis. Since investigation of PHR1 and PHL1 impact on the establishment of AM symbiosis is not possible in the mycorrhizal non-host species *Arabidopsis thaliana*, the homologous genes were identified in the model legume *Lotus japonicus* by synteny and phylogenetic analyses. Furthermore, the function of the identified proteins was analyzed regarding their contribution to the phosphate starvation response and eventually their contribution to the establishment of AM symbiosis.

The *Lotus phr1* mutant lines display reduced shoot growth and decreased shoot phosphorus content under Pi sufficient conditions. Furthermore, the induction of phosphate starvation induced genes is impaired in *Lotus phr1*, indicating an impairment of the phosphate starvation response in *Lotus phr1* mutants. Additionally, primary root growth is affected in *Lotus phr1* lines irrespective of Pi regime. This growth phenotype is also reported in the *Arabidopsis phr1* mutant. These results indicate that *LjPHR1* and *AtPHR1* exhibit similar functions within the different plant species and that *LjPHR1* functions in the phosphate starvation response.

Based on the previous findings, the impact of *LjPHR1* on the establishment of AM symbiosis was investigated. Promoter analysis of mycorrhiza-regulated genes revealed, that frequently a single copy of the P1BS element is located adjacent to the CTTC element, which plays an important role in the regulation of mycorrhiza-specific genes like PT4. PHR1 is reported to require at least two binding motifs for proper regulatory function, thus it is likely that the CTTC element is this second motif in promoters of mycorrhiza-regulated genes. In this work, Yeast-2-Hybrid experiments revealed interaction of

LjPHR1 with LjCBX1, the transcription factor binding to the CTTC element. Based on this interaction, it is assumed that LjPHR1 influences the expression of mycorrhiza-regulated genes.

In summary, LjPHR1 was found to be involved in the phosphate starvation response in *Lotus japonicus* and the results of this work indicate, that this transcription factor is also involved in regulating AM symbiosis. Although further experiments are required to elucidate LjPHR1 function in AM symbiosis, this work already provides first information about the molecular connection between phosphate availability and AM symbiosis.

## Zusammenfassung

Phosphor ist ein wichtiger Makronährstoff für das Pflanzenwachstum. Die Bioverfügbarkeit von anorganischem Phosphat (Pi), der Form, in der Phosphor von der Pflanze aufgenommen wird, ist in der Regel niedrig und zwingt Pflanzen zur Optimierung ihrer Pi-Aufnahme- und Pi-Nutzungseffizienz. Neben der Vergrößerung der Wurzeloberfläche, der Sekretion von Pi-mobilisierenden Wurzelexsudaten und der Expression von hochaffinen Phosphattransportern, ist eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Pi-Aufnahme die Bildung einer Symbiose mit Bodenpilzen, die so genannte Mykorrhiza. Die Etablierung der häufigsten Form, der arbuskulären Mykorrhiza (AM), wird durch den Pi-Status der Pflanze reguliert. Die Transkriptionsfaktoren Phosphat Starvation Response 1 (PHR1) und in geringerem Ausmaß PHR1-like 1 (PHL1) sind als Schlüsselregulatoren der Phosphatmangelantwort in Pflanzen bekannt. Ein Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob PHR1 und PHL1 auch an der Etablierung der AM-Symbiose beteiligt sind. Die Untersuchung der Funktion von PHR1 und PHL1 in der Etablierung der AM-Symbiose ist in *Arabidopsis thaliana* nicht möglich, da diese Spezies keine Mykorrhiza ausbildet. Deshalb wurden die homologen Gene in der Modell-Leguminose *Lotus japonicus* durch Synteny- und phylogenetische Analysen identifiziert. Darüber hinaus wurde die Funktion der identifizierten Proteine hinsichtlich ihres Beitrags zur Phosphatmangelantwort und schlussendlich hinsichtlich ihres Beitrags zur Etablierung der AM-Symbiose analysiert.

Die *phr1*-Mutantenlinien in *Lotus japonicus* zeigen ein verringertes Sprosswachstum und einen verringerten Spross-Phosphorgehalt unter Bedingungen, in denen ausreichend Pi zur Verfügung steht. Zusätzlich weisen die *Lotus phr1* Mutanten eine verringerte Induktion von Phosphatmangel-induzierten Genen auf, was auf eine Beeinträchtigung der Phosphatmangelantwort in den *Lotus phr1* Mutanten hindeutet. Darüber hinaus ist das primäre Wurzelwachstum in den *Lotus phr1*-Linien unabhängig vom Pi-Regime beeinträchtigt. Ein ähnlicher Wachstumsphänotyp wurde auch für die *phr1*-Mutante in *Arabidopsis thaliana* publiziert. Diese Ergebnisse zeigen, dass *LjPHR1* und *AtPHR1* ähnliche Funktionen innerhalb der verschiedenen Pflanzenarten aufweisen und dass *LjPHR1* eine Rolle in der Phosphatmangelantwort spielt.

Basierend auf den oben genannten Ergebnissen wurde die Auswirkung von *LjPHR1* auf die Etablierung der AM-Symbiose untersucht. Die Promotoranalyse von Mykorrhiza-regulierten Genen zeigte, dass häufig eine einzige Kopie des P1BS-Elements neben dem CTTC-Element liegt, welches bei der Regulation von Mykorrhiza-spezifischen Genen wie PT4 eine wichtige Rolle spielt. Es wird angenommen, dass PHR1 mindestens zwei benachbarte Promotorelemente benötigt, um seine regulatorische Funktion auszuüben. Wahrscheinlich ist das CTTC-Element dieses zweite Element in den Promotoren von Mykorrhiza-regulierten Genen. In dieser Arbeit konnte mit Hilfe von Hefe-2-Hybrid-Experimenten gezeigt werden, dass *LjPHR1* mit *LjCBX1*, dem Transkriptionsfaktor, der an das CTTC-Element bindet, interagiert. Basierend auf dieser Interaktion wird angenommen, dass *LjPHR1* die Expression von Mykorrhiza-regulierten Genen beeinflusst.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass *LjPHR1* an der Phosphatmangelantwort in *Lotus japonicus* beteiligt ist und die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass dieser Transkriptionsfaktor auch eine Rolle in der Regulierung der AM-Symbiose spielt. Obwohl weitere Experimente zur Aufklärung der *LjPHR1*-Funktion in der AM-Symbiose erforderlich sind, liefert diese Arbeit bereits erste Aussagen über die molekulare Verknüpfung von Phosphatverfügbarkeit und AM-Symbiose.