

Role of APETALA2 transcription factors in regulating the mycorrhizal symbiotic Pi/H⁺ cotransport in *Lotus japonicus*

Abstract

Mutualism between plants and mycorrhizal fungi is a successful adaptive strategy for host plants to confront phosphate (Pi) deficiency. Mycorrhizal fungi deliver soluble inorganic Pi from remote soil regions to plant roots in exchange with carbon sources. Mycorrhizal Pi uptake is under the control of mycorrhiza-specific Pi transporter (MSPT) genes, markedly up-regulated by fungal colonization of root cortical cells. Although fundamental *cis*-regulatory elements including P1BS and CTTC motifs in the respective promoters have been described, the transcription factors (TFs) regulating the *MSPT* genes were unknown. Three *APETALA2* (*AP2*) genes were recently identified as mycorrhiza-induced TFs in *L. japonicus* (Xue et al., 2015). One of them, named CTTC MOTIF-BINDING TRANSCRIPTION FACTOR1 (CBX1) bound to a promoter fragment of *mycorrhiza-specific Pi transporter 4* (*LjPT4*) (Xue et al., submitted). Subsequently, CBX1 was hypothesized to be a candidate TF involved in the regulation of *LjPT4*. Therefore, the main objectives of this study are to decipher the role of CBX1 in mycorrhizal symbiosis and verify the CBX1 function in transcriptional regulation of *LjPT4*. It was attempted to elucidate CBX1 function in roots of *L. japonicus* *LORE1* insertion lines after six weeks post mycorrhizal inoculation. Compared with the wild type, the *cbx1* mutants did not exhibit difference at morphological or molecular level, which might be resulted from the redundant function gene, found later as CBX2. Based on the phylogenetic analysis, CBX1 and CBX2 belong to the WRINKLED (WRI)-like AP2 subfamily, members of which contain two imperfect AP2 DNA-binding domains. By *in vitro* assays, CBX1 and CBX2 bound the CTTC *cis*-regulatory element in the promoter of *LjPT4* and *LjHA1*. Dissection of nine-bp consensus CTTC motif revealed that the essential components for the CBX binding are composed of nTnTTGTnn. For the genuine interaction between CBX1 with the CTTC motif, the two AP2 DNA-binding domains including the N- or C- terminus are required. In *Arabidopsis* cells and *N. benthamiana* leaves, CBX1 and CBX2 transactivated the *LjPT4* promoter through the CTTC motif. Moreover, the mycorrhiza-inducible H⁺-ATPase (*LjHA1*), implicated in energizing nutrient uptake across the periarbuscular membrane (PAM) and required for Pi uptake across the PAM, is co-regulated with *LjPT4* by CBX1. The CBX-CTTC regulatory mechanism is conserved in different mycorrhizal host plant species. Interestingly, like WRI homologs, CBX1 physically interacted AW-box found in the promoter of *LjPT4* and de novo fatty

acid biosynthesis genes. This finding points to the role of CBX1 in the regulation of reciprocal exchange of Pi and lipids between host and fungi during AM symbiosis.

Zusammenfassung

Der Mutualismus zwischen Pflanzen und Mykorrhizapilzen ist eine erfolgreiche adaptive Strategie für die Wirtspflanze, um Phosphatmangel zu überwinden. Mykorrhizapilze liefern gelöstes anorganisches Phosphat (Pi) von weiter weggelegenen Bodenregionen, im Austausch gegen Photosyntheseprodukte, zu den Pflanzenwurzeln. Die Pi Aufnahme wird von Mykorrhiza spezifischen Pi Transportergenen (*MSPT*) kontrolliert, welche durch pilzliche Kolonisierung in den Cortezellen der Wurzel vermehrt exprimiert werden. Obwohl bedeutende *cis*-regulierende Elemente wie P1BS und CTTC Motive samt den dazugehörigen Promotern beschrieben wurden, sind die *MSPT* regulierenden Transkriptionsfaktoren (TF) unbekannt. Vor kurzem wurden drei *APETALA2* (*AP2*) Gene als durch Mykorrhiza induzierbare TF in *L. japonicus* identifiziert (Xue *et al.*, 2015). Eines dieser Gene ist ein sogenannter CTTC MOTIF-BINDING TRANSCRIPTION FACTOR (CBX1), welcher an ein Promoterfragment des mykorrhizaspezifischen Pi Transporter (*mycorrhiza-specific Pi transporter 4* (*LjPT4*)) bindet (Xue *et al.*, eingereicht). Als Folge dessen könnte CBX1 ein möglicher TF sein, der an der Regulation von *LjPT4* beteiligt ist. Deshalb beschäftigt sich das Hauptziel dieser Arbeit mit der Rolle von CBX1 in der Mykorrhizasymbiose und der Funktion von CBX1 in der transkriptionellen Regulation von *LjPT4*. Hierbei wurde die Funktion von CBX1 in Wurzeln von *L. japonicus* *LORE1* Insertionslinien sechs Wochen nach der Inokulation mit Mykorrhiza untersucht. Die *cbx1* Mutante wies keine Unterschiede auf morphologischer oder molekularer Ebene verglichen mit dem Wildtyp auf. Dies könnte durch ein redundantes Gen verursacht sein, welches sich später als CBX2 herausstellte. Basierend auf phylogenetischen Daten gehören CBX1 und CBX2 zu der WRINKLED (WRI) ähnlichen AP2 Subfamilie. Mitglieder dieser Familie enthalten zwei unvollständige AP2 DNA-bindende Domänen. Mittels eines *in vitro* Assay wurde gezeigt, dass CBX1 und CBX2 das CTTC *cis*-regulierende Element in der Promoterregion von *LjPT4* und *LjHA1* binden. Die Analyse des neun Bp langen CTTC Konsensussequenzmotivs weist daraufhin, dass essentielle Komponenten für die Bindung von CBX zusammengesetzt sind aus nTnTTGTnn. Für die Interaktion zwischen CBX1 mit dem CTTC Motiv werden die zwei AP2 DNA bindenden Domänen mit N- oder C-Terminus benötigt. In Arabidopsis Zellen und in *N. benthamiana* Blätter transaktivieren CBX1 und CBX2 den *LjPT4* Promoter durch das CTTC Motiv. Des Weiteren ist die durch Mykorrhiza induzierte H⁺-ATPase (*LjHA1*), welche an der Energieerzeugung für den Nährstofftransport sowie die Pi Aufnahme über die periarbuskuläre Membran (PAM) beteiligt ist, koreguliert mit *LjPT4* durch CBX1. Der CBX-CTTC

Regulationsmechanismus ist in unterschiedlichen Wirtspflanzenspezies der Mykorrhiza konserviert. Interessanterweise interagiert CBX1 mit der AW-Box in der Promoterregion von *LjPT4* und *de novo* Fettsäurebiosynthesegenen, wie Homologe von WRI. Dieses Ergebnis deutet auf eine Rolle von CBX1 in der Regulation des gegenseitigen Austausches von Pi und Lipiden zwischen Wirtspflanze und Pilz in der arbuskuläre Mycorrhizasymbiose (AM) hin.