

# Functional characterization of the E2 conjugase-like protein PHO2 in phosphate starvation and mycorrhizal symbiosis in *Lotus japonicus*

## Abstract

Low soil phosphate (Pi) availability can be overcome by various plant strategies including formation of the arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis. It is assumed that transcriptional regulation of AM genes is likely to be cooperatively regulated by the mycorrhizal signaling pathway and by the Pi status of the host plant. The molecular mechanisms underlying this process are currently not fully understood. In *Arabidopsis thaliana*, a non-host species to AM fungi, PHO2 mRNA is targeted by miR399 and downstream of PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1 (PHR1) in the Pi starvation signaling pathway (Bari et al., 2006). To investigate the influence of PHO2 on the establishment of mycorrhizal symbiosis, experiments have to be performed in a mycorrhizal host-plant species *Lotus japonicus*. There are two orthologues of AtPHO2 identified in *Lotus* named LjPHO2-1 and LjPHO2-2 having a conserved UBC domain as in AtPHO2. Similar to AtPHO2, LjPHO2-1 gene is expressed more in roots under high Pi (+Pi). The expression profile of LjPHO2-1 showed elevated transcript levels in mycorrhizal root tissues relative to non-mycorrhizal plants. Under Pi-replete condition, like *atpho2*, LORE1a insertional knockout mutant *ljpho2-1-1* and *ljpho2-1-2* over-accumulate Pi in their shoot. The *ljpho2-1* mutant lines display reduced shoot biomass and altered root/shoot ratio irrespective of Pi regime. Moreover, the overall root architecture including the primary root length is affected in *ljpho2-1* lines irrespective of the Pi regime. These results indicate that LjPHO2-1 has a function in the Pi starvation response. Moreover, in a soil/sand system, average root and shoot fresh weight and primary root length of mycorrhizal *ljpho2-1* mutant lines are reduced when compared with mycorrhizal Gifu-129 irrespective of the Pi regime.

Two closely located conserved cis-acting element MYCS (or CTTC) and PHR1 binding site (P1BS) are identified in promoter region and involved in the regulation of mycorrhiza-activated phosphate transporters in eudicot species (Karandashov et al., 2004). The CTTC motif is the binding site of CTTC MOTIF-BINDING TRANSCRIPTION FACTOR1 (LjCBX1) and it plays a role in regulation of mycorrhiza-dependent genes for instance LjPT4 and LjLPD1 (Li Xue and Lompong Klinnawee, unpublished). Besides LjCBX1, mycorrhiza marker genes LjPT4, LjLPD1, LjVAY1, LjRAM1 were down-regulated in *ljpho2-1* mycorrhizal roots relative to Gifu-129 under

–Pi conditions, whereas *LjBCP1* remained expressed similarly to Gifu-129. There is a reverse in expression pattern of *LjCBX1*, *LjLPD1*, *LjVAY1*, *LjRAM1* except of *LjPT4* under mycorrhizal +Pi condition in Gifu-129 and *ljpho2-1*.

There is no obvious mycorrhization phenotype observed under –Pi condition rather there are more arbuscles in *ljpho2-1* mutant when compared with Gifu-129 probably due to higher accumulation of P. Whereas under Pi repletion and +Pi condition, there is reduced total colonization in *ljpho2-1* mutant when compared with Gifu-129. In sum, our data propose a function of *LjPHO2* in the regulation of the Pi starvation response and the regulation of AM symbiosis in *Lotus japonicus*.

## Zusammenfassung

Eine niedrige Verfügbarkeit von Phosphat (Pi) im Boden kann von Pflanzen durch verschiedene Strategien, einschließlich der Bildung arbuskulärer Mykorrhiza (AM) -Symbiose, überwunden werden. Es wird angenommen, dass die Regulation der Transkription von AM-Genen wahrscheinlich sowohl durch den Mykorrhiza-Signalweg als auch durch den Pi-Status der Wirtspflanze reguliert wird. Die molekularen Mechanismen, die diesem Prozess zugrunde liegen, sind derzeit noch nicht vollständig verstanden. In *Arabidopsis thaliana*, einer Nicht-Wirtsspezies für AM-Pilze, wird die PHO2-mRNA von miR399 reguliert und steht stromabwärts von PHOSPHAT STARVATION RESPONSE 1 (PHR1) im Pi-Mangel-Signalweg (Bari et al., 2006). Um den Einfluss von PHO2 auf die Mykorrhizasymbiose zu untersuchen, müssen Experimente an einer Mykorrhiza-Wirtspflanze wie *Lotus japonicus* durchgeführt werden. Es gibt zwei Orthologe von AtPHO2 in *Lotus*, genannt LjPHO2-1 und LjPHO2-2, die eine konservierte UBC-Domäne wie AtPHO2 besitzen. Ähnlich wie bei AtPHO2 wird das LjPHO2-1-Gen mehr in Wurzeln mit hohem Pi-Status (+Pi) exprimiert. Das Expressionsprofil von LjPHO2-1 zeigte erhöhte Transkriptmengen in mykorrhiziertem Wurzelgewebe im Vergleich zu nicht-mykorrhizierten Pflanzen. Unter Bedingungen, in denen Pi ausreichend zur Verfügung steht, akkumulieren die LORE1a-Insertions-Knockout-Mutanten *ljpho2-1-1* und *ljpho2-1-2* Pi in ihrem Spross, genau wie *atpho2*. Die *ljpho2-1*-Mutantenlinien zeigen eine reduzierte Sprossbiomasse und ein verändertes Wurzel / Spross-Verhältnis, unabhängig vom Pi-Regime. Darüber hinaus wird die gesamte Wurzelarchitektur, einschließlich der primären Wurzellänge, in *ljpho2-1*-Linien unabhängig vom Pi-Regime beeinflusst. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass LjPHO2-1 eine Funktion in der Phosphat-Mangelantwort hat. Darüber hinaus sind in einem Erde / Sand-System sowohl das durchschnittliche Wurzel- als auch das durchschnittliche Spross-Frischgewicht und die primäre Wurzellänge der mykorrhizierten *ljpho2-1*-Mutantenlinien im Vergleich zu mykorrhiziertem Gifu-129 unabhängig vom Pi-Regime reduziert.

Zwei benachbarte, konservierte cis-wirkende Elemente, MYCS (oder CTTC) und P1BS, sind in der Promotorregion identifiziert und an der Regulierung von Mykorrhiza-aktivierten Phosphattransportern in Eudicot-Spezies beteiligt (Karandashov et al., 2004). Das CTTC-Element ist die Bindungsstelle von CTTC MOTIF-BINDING TRANSCRIPTION FACTOR1 (LjCBX1) und spielt eine Rolle bei der Regulation von Mykorrhiza-abhängigen Genen, zum Beispiel *LjPT4* und *LjLPD1* (Li Xue und Lompong Klinnawe, unveröffentlicht). Neben *LjCBX1* waren die Mykorrhiza-Markergene *LjPT4*, *LjLPD1*, *LjVAY1* und *LjRAM1* in mykorrhizierten Wurzeln von *ljpho2-1* im Vergleich zu Gifu-129 unter -Pi-Bedingungen herunterreguliert, während die Expression von *LjBCP1* ähnlich wie die in Gifu-129 blieb. Es gibt ein umgekehrtes Expressionsmuster von *LjCBX1*, *LjLPD1*, *LjVAY1*, *LjRAM1*, aber nicht von *LjPT4*, unter mykorrhizierter +Pi-Bedingung in Gifu-129 und *ljpho2-1*.

Es gibt keinen offensichtlichen Mykorrhizationsphänotyp unter -Pi-Bedingung, eher gibt es mehr Arbuskeln in der *ljpho2-1*-Mutante im Vergleich zu Gifu-129, wahrscheinlich aufgrund einer höheren Akkumulation von P. Zusätzlich wurde in *ljpho2-1* unter Pi-Wechsel- und +Pi-Bedingungen in Relation zu Gifu ein signifikant vermindertes Kolonisierungsniveau beobachtet. Zusammenfassend deuten unsere Daten eine Funktion von LjPHO2 in der Regulation der Pi-Mangelantwort und der Regulation der AM-Symbiose in *Lotus japonicus* an.