

The influence of P nutrition on the root metabolism in *Lotus japonicus* (REGEL)K. LARSEN: An approach at transcriptional level

Doctoral Thesis

Author(s):

Keller, Sabina Yolanda

Publication date:

2003

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004632393>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

Diss. ETH No. 15280

The influence of P nutrition on the root metabolism in

Lotus japonicus (REGEL) K. LARSEN:

An approach at transcriptional level

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
ZÜRICH
for the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by

Sabina Yolanda Keller
Dipl. Natw. ETH-Zürich

born January 1, 1973
citizen of Zürich and Wetzikon (ZH)

accepted on the recommendation of:
PROF. DR. E. FROSSARD
examiner

DR. U. A. HARTWIG, PD DR. C. SAUTTER & DR. M. K. UDVARDI
co-examiners

2003

Summary

P deficiency is considered to be the major limiting factor for legume growth and symbiotic nitrogen fixation (SNF). The aim of this study was to investigate the effect of P deficiency at the level of root gene transcription. To monitor the influence of P nutrition on N and C metabolism, also in respect of its inhibitory effect to nodulation and SNF, the model legume *Lotus japonicus* was chosen.

In this study, for the first time a *L. japonicus* root transcriptome analysis has been performed with the aim to compare gene expression between P deficient and P supplied roots.

In the first approach, plants were grown in two treatments: without P and with a P supply sufficient for nodulation. Root cDNA obtained from these plants was hybridized to 5,300 cDNA clones of an expressed sequence tag (EST) library of *L. japonicus* nodule tissue. 106 genes were found to be only expressed under either the sufficient or the P deficient conditions. For each of these ESTs a homology search was performed. Among the homologous genes there were enzymes involved in signaling, in carbon and fatty acid metabolism. An increase of the expression of enzymes involved in C metabolism suggested a high production of carboxylic acids, presumably destined for root exudation to solubilize soil-bound P. Genes involved in ethylene signaling were up-regulated under P deficiency, indicating an increased ethylene level. This suggests adaptive changes of cell development due to P deficiency as ethylene is reported to induce root hair growth, root elongation and the induction of stress genes. Another interesting finding in the P deficient roots was an up-regulation of genes that are related with drought stress. In general, many effects of P deficiency that had been earlier reported in physiological studies were found to be regulated at the transcriptional level.

The second part of the study focused on the effects of P deficiency on plant growth and on alterations in N and C metabolism. The influence of P and N availability was investigated in respect of its effects on biomass production, N metabolite regulation and SNF. Plants were grown under 2 levels of N combined with 6 different levels of P, to investigate the interaction of N and P nutrition on

root and nodule growth, and to identify the range in which P limits nodulation and SNF. The influence of P deficiency on N regulation was investigated by monitoring the expression of root genes in plants grown in two P treatments. Results obtained from cDNA array analysis were confirmed by real-time RT-PCR. Since asparagine is the main molecule for N transport in *L. japonicus*, its root concentration was measured by an enzymatic assay. Alterations in biomass production known under P deficiency were confirmed. Root growth was less impaired than shoot growth in P deficient plants. As expected, no nodulation occurred under severe P deficiency. In the nodulated plants, no N derived from symbiosis (Ndfs) was detectable by the isotope dilution method, neither in the roots nor in the shoots. But in nodules of a medium and a high P treatment Ndfs was found, with a maximum of 31%. Thus, either transport from nodules to roots and shoots was impaired, or the concentration of fixed N was below the detection limit due to a dilution effect. An accumulation of asparagine in the root tissue of P deficient plants was measured. This finding, together with the significantly decreased expression of a gene encoding for asparagine synthetase under P deficiency suggests a feedback regulation of asparagine synthetase by asparagine in *L. japonicus*. Genes of some key enzymes of C metabolism were also significantly up-regulated under P deficiency. Results from this experiment confirm the importance of P supply on legume growth, and provide new insight into the regulation of root gene expression involved in N and C metabolism under P deficiency.

This study provides new insight into the effect of P deficiency on the root metabolism of *L. japonicus* at transcriptional level.

Zusammenfassung

P Mangel gilt als wichtigster limitierender Faktor für das Wachstum von Leguminosen und die symbiotische Stickstoff-Fixierung (SNF). Das Ziel dieser Studie war, die Wirkung von P Mangel in Wurzeln auf der Ebene der Gen-Transkription zu untersuchen. die Modell-Leguminose *Lotus japonicus* wurde gewählt, um den Einfluss der P Ernährung auf den N- und C-Metabolismus zu untersuchen, auch im Hinblick auf die limitierende Wirkung für die Wurzelknöllchenbildung und die SNF.

In dieser Studie wurde zum ersten Mal eine Transkriptom-Analyse in den Wurzeln von *L. japonicus* durchgeführt mit dem Ziel, die Gen-Expression von P versorgten und P limitierten Wurzeln zu vergleichen.

Im ersten Ansatz wurden die Pflanzen in zwei Verfahren angezogen: ohne P, und mit einer P-Versorgung, die für die Wurzelknöllchenbildung genügte. Die aus diesen Pflanzen erhaltene Wurzel-cDNA wurde mit 5300 cDNA Klonen hybridisiert, die aus einer expressed sequence tag (EST) Bibliothek von *L. japonicus* Knöllchengewebe stammten. 106 Gene wurden ausschliesslich unter P-Mangel oder unter genügender P-Versorgung exprimiert. Für all diese ESTs wurde nach Homologien gesucht. Unter den gefundenen homologen Genen waren Enzyme, die in die Signaltransduktion, den C- und Fettsäure-Metabolismus involviert sind. Die erhöhte Expression von Enzym-Genen des C-Metabolismus lässt vermuten, dass viele Carboxy-Säuren produziert wurden, die wahrscheinlich zur Wurzel-Ausscheidung bestimmt waren, um so im Boden gebundener P verfügbar zu machen. Gene, die in der Signaltransduktion von Ethylen eine Rolle spielen, waren unter P-Mangel exprimiert, was auf einen erhöhten Ethylen-Spiegel schliessen lässt. Dies deutet auf durch P-Mangel ausgelöste Anpassungen der Zell-Entwicklung hin. Ethylen ist bekannt für das Inizieren von Wurzelhaarwachstum, Wurzellängenwachstum und die Induktion von Stress-Genen. Eine weitere interessante Entdeckung in den Wurzeln mit P-Mangel war, dass Gene exprimiert waren, deren Expression unter Trockenstress bekannt ist.

Im Allgemeinen konnte gezeigt werden, dass viele Wirkungen von P Mangel, die in früheren physiologischen Studien beschrieben wurden, auf transkriptioneller Ebene reguliert sind.

Der zweite Teil dieser Studie befasste sich mit der Wirkung von P-Mangel auf das Pflanzenwachstum und auf Veränderungen im C- und N-Metabolismus. Der Einfluss der P- und N-Verfügbarkeit auf die Biomassenproduktion, Regulation von N-Metaboliten und SNF wurde untersucht. Die Pflanzen wuchsen in 2 unterschiedlichen N Stufen zusammen mit 6 verschiedenen P Stufen, um die Wechselwirkung zwischen N- und P-Versorgung auf das Wurzel- und Wurzelknöllchenwachstum zu untersuchen, und um den Bereich zu ermitteln, in dem P-Mangel die Wurzelknöllchenbildung und die SNF limitiert. Der Einfluss von P-Mangel auf die N Regulation wurde über die Expression von Wurzel-Genen von Pflanzen, die in zwei P-Verfahren gewachsen waren untersucht. Die von der cDNA Array-Analyse erhaltenen Resultate wurden mittels real-time RT-PCR bestätigt. Weil Asparagin das hauptsächliche Molekül für den N-Transport in *L. japonicus* darstellt, wurde die Asparaginkonzentration in den Wurzeln in einem Enzym-Verfahren gemessen. Veränderungen in der Biomassenproduktion, die für P-Mangel bekannt sind, konnten bestätigt werden. Das Wurzelwachstum war weniger beeinträchtigt als das Triebwachstum in den Pflanzen mit P-Mangel. Wie erwartet wurden unter schwerem P-Mangel keine Wurzelknöllchen gebildet. In den Pflanzen mit Wurzelknöllchen konnte weder in den Wurzeln noch in den Trieben N aus der symbiotischen N Fixierung (Ndfs) mittels der Isotopenverdünnungsmethode nachgewiesen werden. Jedoch wurde Ndfs in den Wurzelknöllchen eines mittleren und eines hohen P Verfahrens gefunden, mit einem Maximum von 31%. Demnach war entweder der Transportfluss von den Wurzelknöllchen zu den Wurzeln und Trieben behindert, oder die Konzentration von fixiertem N lag wegen eines Verdünnungseffekts unter der Nachweisgrenze. In den Wurzeln von Pflanzen mit P-Mangel wurde eine Anreicherung von Asparagin gemessen. Zusammen mit der signifikant schwächeren Expression von Asparagin Synthetase lässt dies vermuten, dass unter P-Mangel Asparagin Synthetase in *L. japonicus* von Asparagin feedback-reguliert wird. Gene von einigen Schlüsselenzymen des C-Metabolismus waren unter P-Mangel auch signifikant höher exprimiert. Die Resultate dieses Experiments bekräftigen die Bedeutung der P Versorgung für

das Wachstum der Leguminosen, und geben neue Erkenntnisse über die Regulation von Genen des N- und C-Metabolismus der Wurzeln unter P-Mangel.

Diese Studie gibt neue Einblicke auf transkriptioneller Ebene in die Auswirkungen von P-Mangel auf den Metabolismus in den Wurzeln von *L. japonicus*.