



Doctoral Thesis

**Root-secreted phosphomonoesterases mobilizing phosphorus
from the rhizosphere
A molecular physiological study in *Solanum tuberosum***

Author(s):

Zimmermann, Philip

Publication Date:

2003

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004583500> →

Rights / License:

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

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 15027

**Root-secreted phosphomonoesterases
mobilizing phosphorus from the rhizosphere**

A molecular physiological study in *Solanum tuberosum*

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
DOCTOR OF SCIENCES

presented by

PHILIP ZIMMERMANN

Dipl. Ing. Agronom, ETH Zurich
born January 31st, 1974
from Charmoille, JU

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Emmanuel Frossard, examiner
Prof. Dr. Nikolaus Amrhein, co-examiner
Dr. Marcel Bucher, co-examiner
Dr. Markus Wyss, co-examiner

2003

Abstract

Phosphorus (P) is one of the most limiting plant nutrients in crop production worldwide. Owing to the strong reactivity of phosphates with soil minerals, P is largely unavailable to plants. Furthermore, P is exported from the field in the harvested products. The addition of P fertilizers to sustain crop production is thus required. However, not only are natural resources of P for the production of fertilizers limited and non-renewable, but also, the excessive use of P in high-input agricultural systems has resulted in environmental pollution. Low-input systems, in contrast, use low amounts of P fertilizers and crop production depends on the amount of available P in the soil, on the efficiency of their cropping system and on the plant genotypes used.

This thesis deals with increasing the ability of crop plants to mobilize soil P to improve crop production. The specific objective was to study, on the one hand, the plant's natural responses to P deficiency, and, on the other hand, to engineer a crop plant for improved mobilization of P from soils. Between 30 and 65% of P in soils is in organic form and largely unavailable for plant uptake. This work therefore focused specifically on the study of phosphatases secreted from plant roots and on engineering the secretion of phytase from roots by expressing a phytase gene in root hairs of potato.

Three cDNAs encoding polypeptides belonging to the family of purple acid phosphatases (PAP) were isolated from *Solanum tuberosum*, and the expression of the corresponding genes was characterized. StPAP1 was shown to be expressed in roots, stems, leaves, flowers and stolons, and did not respond to P deprivation. Both StPAP2 and StPAP3 were induced by P starvation and expressed mainly in roots, with StPAP3 being additionally expressed in stem. Based on sequence analysis, all three PAPs are predicted to be secretory proteins. The precise function of these genes could not be elucidated within the frame of this work. However, the data obtained suggests that StPAP2 and StPAP3 contribute to the phosphatase activity in potato root exudates and therefore presumably function in the mobilization of P from organic P sources in the rhizosphere.

The expression of a synthetic phytase in root hairs of potato resulted in a more than 50-fold increased phytase activity in root exudates. The recombinant phytase showed high thermostability and was able to degrade extraradical phytic acid to lower inositol phosphates. In a soil-quartz substrate to which phytate had been added, transgenic plants secreting the synthetic phytase exhibited a 40% higher P concentration in the leaves, were on average 20% taller, but in our experimental conditions did not have a significantly higher biomass production. From the data obtained we cannot conclude whether phytate availability in soils or phytase activity in the rhizosphere is the limiting step in the mobilization of P from soil phytate for plant uptake. These issues are discussed in the light of our observations.

Résumé

Le phosphore (P) est un des éléments nutritifs végétaux les plus limitants pour la production agricole mondiale. En raison de la forte adsorption des phosphates aux éléments minéraux du sol, le P est largement indisponible pour le prélèvement par les plantes. Par conséquent, la fertilisation en phosphates est essentielle pour une production agricole soutenue. Non seulement les réserves en P naturel sont limitées, mais l'utilisation excessive de P dans les systèmes de production intensive cause des problèmes de pollution environnementale. Par contre, les systèmes de production extensifs n'ont souvent pas les moyens de se procurer les fertilisants P nécessaires, ce qui les rend davantage dépendants de la capacité de leurs cultures à prélever le P présent dans leurs sols.

Le concept de cette thèse est d'augmenter la capacité des plantes à mobiliser le P du sol afin d'améliorer la production végétale. L'objectif spécifique est, d'une part, d'étudier les réponses naturelles de la plante à une carence en P, et d'autre part, de créer une plante transgénique capable de mobiliser davantage de P du sol. 30-65% du P dans le sol est sous forme organique (Po), dont une partie, telle les inositols phosphates (phytates), n'est pas disponible pour le prélèvement par les plantes. Le travail présenté a donc porté surtout sur l'étude de phosphatases sécrétées par les racines et sur l'augmentation de la sécrétion de phytase par les racines en exprimant un gène de phytase dans le poil absorbant des racines de pommes de terre.

Trois gènes de pomme de terre codant pour des polypeptides appartenant à la famille des phosphatases acides pourpres (PAP) furent isolés et caractérisés au niveau de leur expression dans la plante. Il s'avère que *StPAP1* est exprimée dans les racines, feuilles, fleurs et stolons, et qu'elle ne réagit pas à l'apport de P. *StPAP2* et *StPAP3*, par contre, sont exprimées en conditions de carence en P principalement dans les racines (*StPAP2* et 3) et dans la tige (*StPAP3*). L'analyse des séquences d'acides aminés suggère que les trois gènes contiennent un signal de sécrétion, et que *StPAP2* pourrait avoir un signal d'ancrage dans la membrane par GPI. La fonction précise de ces gènes ne fut pas possible dans le cadre du travail présenté. Néanmoins, les données obtenues permettent de supposer que *StPAP2* et *StPAP3* jouent un rôle dans l'activité phosphatasique des sécrétions racinaires et par conséquent dans la mobilisation de P du P organique dans la rhizosphère.

L'expression d'une phytase synthétique dans le poil absorbant des racines de pomme de terre produisit une activité de phytase plus de 50 fois plus élevée dans les exsudats racinaires. La phytase synthétique montra une grande thermo-stabilité et fut capable de dégrader l'inositol hexakisphosphate en formes réduites d'inositols phosphates. Dans un substrat composé de sol et de quartz contenant de la phytate, les plantes transgéniques sécrétant une phytase artificielle purent prélever davantage de P, étaient 20% plus grandes, mais dans nos conditions expérimentales n'accumulèrent pas davantage de biomasse. Sur la base de ces données, il n'est pas possible de déterminer si la mobilisation de P des phytates d'un sol naturel est limitée par la disponibilité des phytates ou par la quantité de l'enzyme de phytase. Néanmoins, certains aspects sont discutés sur la base des résultats obtenus.

Zusammenfassung

Phosphor (P) ist weltweit einer der am meisten limitierenden essentiellen Pflanzennährstoffe in der landwirtschaftlichen Pflanzenproduktion. Aufgrund des starken Bindungsvermögens von Phosphaten an Bodenelemente ist er nur in geringen Mengen für die Pflanzenaufnahme verfügbar. Demzufolge ist eine P Düngung zur Aufrechterhaltung der Pflanzenproduktion unentbehrlich. Die natürlichen Ressourcen zur Herstellung von P Dünger sind aber begrenzt. Zudem hat der übermässige Gebrauch dieser Ressourcen in den intensiven landwirtschaftlichen Systemen zu Umweltbelastungen beigetragen. In vielen anderen Gebieten werden hingegen nur sehr wenige P Dünger verwendet, und diese Gebiete sind daher stärker vom P Gehalt ihrer Böden, des Anbausystems, sowie der verwendeten Genotypen der Kulturpflanzen abhängig.

Die vorgelegte Arbeit basiert auf dem Konzept einer Vergrösserung der Fähigkeit landwirtschaftlich nutzbarer Pflanzen, Boden P zu mobilisieren, und damit zur Verbesserung der Produktion und somit zur Linderung der Abhängigkeit von externen P Quellen beizutragen. Das Ziel war einerseits, die natürlichen biologischen Reaktionen von Pflanzen auf P Mangel zu studieren, und andererseits, eine Pflanze mit erhöhter P-Mobilisierungsfähigkeit durch gentechnische Methoden zu erzeugen. Da der Boden 30-65% des P in organischer Form enthält, wovon ein wesentlicher Teil in Form von Phytat nicht pflanzenverfügbar ist, wurde diese Arbeit auf die Untersuchung der von Wurzeln ausgeschiedenen Phosphatasen sowie auf die Erzeugung transgener Pflanzen mit erhöhter Sekretion von Phytase in den Wurzeln ausgerichtet.

Drei cDNAs aus Kartoffel, die für Polypeptide kodieren, die der Familie der purpuren sauren Phosphatasen (PAP) angehören, wurden isoliert und auf Expressionsebene charakterisiert. *StPAP1* wird in Wurzeln, Stengeln, Blättern, Blüten sowie Stolonen exprimiert und reagierte nicht auf Änderungen der P Konzentration im Nährmedium. *StPAP2* und *StPAP3* wurden hingegen unter P Mangel stark induziert und waren vor allem in den Wurzeln exprimiert. *StPAP3* war zusätzlich noch im Stengel stark exprimiert. Die Analyse der Aminosäuresequenzen ergab, dass alle drei PAPs eine mögliche Sekretionssignalsequenz aufweisen und dass *StPAP2* eine Signalsequenz für GPI Verankerung in der Membran haben könnte. Die genaue Funktion dieser drei Gene konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt werden, doch die erhaltenen Resultate lassen auf eine mögliche Funktion von *StPAP2* und *StPAP3* in der P-Mobilisierung von organischem P in der Rhizosphäre schliessen.

Die Expression einer synthetischen Phytase in Wurzelhaaren der Kartoffel ergab eine mehr als 50-fache Erhöhung der Phytaseaktivität in den Wurzelexudaten. Die rekombinante Phytase zeigte eine ausgesprochen hohe Hitzestabilität und konnte Phytinsäure degradieren. Die Phytase sezernierenden transgenen Pflanzen, die auf einem Bodensubstrat mit Phytatzusatz angezogen wurden, hatten 40% mehr P in den Blättern als Wildtyp Pflanzen. Der Spross war 20% höher als beim Wildtyp, aber die gesamte Biomasse war in diesem Experiment statistisch nicht signifikant unterschiedlich. Diesen Daten kann nicht entnommen werden, ob in einem natürlichen Boden die Verfügbarkeit des Phytats oder die Menge an Phytase für die Mobilisierung von P aus Phytat limitierend wirken. Abschliessend werden mögliche Hypothesen diskutiert.
