

Mecanismos de interacción planta-nematodos fitoendoparásitos: presente y futuro

Carolina Escobar (Facultad de Ciencias Ambientales y Bioquímica, Universidad de Castilla-La Mancha, Toledo, Spain. Corresponding author e-mail: Carolina.escobar@uclm.es).

Los nematodos sedentarios endoparásitos han evolucionado en el orden *Tylenchida*. EL ciclo de vida comienza con el estadio de vida libre J_2 que penetra en las raíces de las plantas, migrando a través de los tejidos. En el caso de los formadores de quistes (*Globodera* y *Heterodera* spp.), su migración es intracelular, mientras que los formadores de agallas (*Meloidogyne* spp.) migran intercelularmente hasta establecerse y perder su movilidad dentro de la planta. Utilizan una estrategia sutilmente elaborada para alimentarse desarrollando estructuras especializadas de alimentación cerca de los haces vasculares, a partir de tipos celulares aún no firmemente identificados. Ambos grupos inducen la formación de células especializadas en las raíces que constituyen sus sitios de alimentación, células gigantes (CGs) y sincitios (revisado en SOBczAK y GOLINOWSKI, 2011; JONES y GOTO, 2011) con ontogénias diferentes. Para establecer estos sitios de alimentación, los nematodos secretan efectores con las que modifican a nivel molecular y fisiológico las células precursoras. Hasta el momento, se ha progresado notablemente en la identificación de proteínas efectoras secretadas a través de su estilete desde sus glándulas faríngeas involucradas en los procesos de invasión, migración, y establecimiento (ABAD y WILLIAMSON, 2010). Algunas secreciones son de especial interés ya que mimetizan proteínas de la planta con funciones en el control de la diferenciación y proliferación de células de meristemos y/o haces vasculares como los péptidos tipo CLE (WANG *et al.*, 2005; HUANG *et al.*, 2006). Sin embargo, las interacciones *in vivo* con moléculas de las células vegetales que presumiblemente conducen a esos cambios moleculares tan profundos, son prácticamente desconocidas. Por tanto, elucidar las cascadas de transducción de señales implicadas es crucial para entender esta compleja interacción, campo actual de intensa investigación.

Las descripciones de la interacción planta-nematodo hasta mediados del siglo XX se basaban en observaciones al microscopio óptico de los tejidos infectados tales como secciones de agallas (Figura 1; CHRISTIE 1936; KOSTOFF y KENDALL 1930). Esto fue seguido por el uso del microscopio electrónico para estudios ultra-estructurales, así como medidas de metabolitos y actividades proteicas, lo que aportó datos morfológicos y bioquímicos más precisos acerca del proceso de infección. Pero no es hasta la década de los 80 cuando, con el desarrollo de la ingeniería genética, se impulsa notablemente el estudio de la interacción planta-patógeno a nivel genético-molecular.

Son muchas y variadas las técnicas utilizadas desde entonces para el estudio de las variaciones en la expresión génica como resultado de la interacción planta-nematodo. Entre otras, mencionar, *RACE* (*Rapid Amplification of cDNA Ends*), *differential display* (huellas digitales genéticas de RNA), hibridación *in situ*, *cDNA-AFLP* (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) o la construcción de librerías de cDNA y por último microordenamientos de ADN y escasamente técnicas de secuenciación masiva (revisado en ESCOBAR *et al.*, 2008; 2011). La

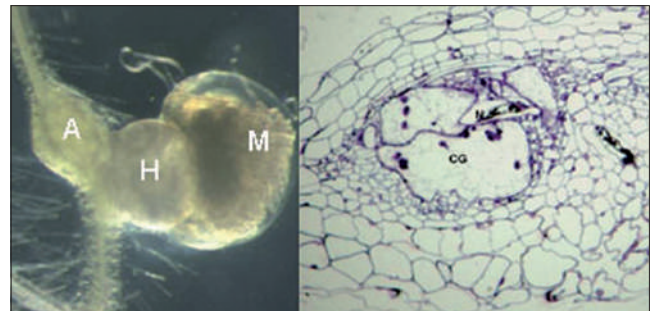


Figura 1. Agalla de *M. javanica* al final del ciclo vital en raíces de *Arabidopsis*, izquierda; sección de agalla de 7 días post-infección teñida con toluidina, derecha. A, agalla, H, hembra en estadio J_4 , M, masa de huevos, CG, célula gigante. Cedida por Marta Barcala.



Figura 2. Sección de 10 μ m en Araldita® de agallas de tabaco expresando GUS (precipitado azul) bajo el promotor *HaHSP17.7* (BARCALA *et al.*, 2008). CG, célula gigante.

posibilidad de amplificación de los transcritos mediante PCR supuso un avance espectacular porque permitió usar material enriquecido en los sitios de alimentación, de los que se obtenía poca cantidad de ARN.

Otros análisis de la interacción han estado centrados en la caracterización de patrones de activación de promotores y la identificación de escasas regiones reguladoras, basado en trampas de promotores o el análisis de fusiones de estos

promotores a genes delatores como los que codifican β -glucuronidasa (GUS; Figura 2), green fluorescent protein (GFP) (revisado en BARCALA *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009) y luciferasa (LUC) (GOVERSE *et al.*, 2000).

Ya en los últimos años, el uso de técnicas punteras de biología celular y molecular que involucraron el aislamiento de células individuales, como la microdissección por láser (Figura 3; BARCALA *et al.*, 2011), o la microaspiración, combinado con análisis holísticos de la expresión génica (microordenamientos de ADN, huellas digitales genéticas de ADN, construcción de librerías), ha supuesto un avance importante en el conocimiento de los cambios dramáticos de expresión génica que tienen lugar específicamente en los sincitios y en CGs (WANG *et al.*, 2003; RAMSAY *et al.*, 2004; FOSU-NYARKO *et al.*, 2009; ITHAL *et al.*, 2007; KLINK *et al.*, 2005; SZAKASITS *et al.*, 2009; PORTILLO *et al.*, 2009; BARCALA *et al.*, 2010). Se ha podido demostrar el enorme efecto de dilución de los transcritos específicos de CGs en las agallas completas tanto en *Arabidopsis* como en tomate (BARCALA *et al.*, 2010; PORTILLO *et al.*, inédito). Así mismo, se han establecido diferencias substanciales en la expresión de genes específicamente en CGs en comparación con la agalla total, como por ejemplo la represión masiva de genes en CGs, de los cuales una gran parte están relacionados con mecanismos de defensa, que por el contrario son inducidos en agallas completas (BARCALA *et al.*, 2010). Lo que concuerda con la identificación de factores de patogenicidad posiblemente implicados en la supresión de las defensas de la planta (DOYLE y LAMBERT, 2003; JAUBERT *et al.*, 2005). En sincitios aislados también se ha demostrado que comparten pocos genes comunes con trozos de raíz infectados, que se habían venido utilizando comúnmente para análisis de expresión (ITHAL *et al.*, 2007). Sin embargo, diferencias en las variaciones de expresión génica inducidas por ambos tipos de nematodos empiezan a vislumbrarse, así por ejemplo, la mayoría de los genes implicados en rutas del metabolismo secundario como los fenilpropanoides, aparecen inducidos en sincitios y reprimidos en CGs. Por el contrario, otros genes implicados en respuestas generales de defensa como herida o patógenos se encuentran reprimidos en ambos tipos de sitios de alimentación, así como genes modificadores de la pared y de control de ciclo celular, inducidos en ambos casos (Figura 3).

Otro campo de interés ha sido el estudio de la funcionalidad de genes mediante genética inversa, ya que las primeras aproximaciones de genética directa no han sido válidas nada más que para la identificación y clonaje de genes de resistencia, como por ejemplo el *Mi* para el caso de *Meloidogyne spp.* (MILLIGAN *et al.*, 1998). Con el uso de técnicas de RNA antisentido o de plantas mutantes en el gen de interés, así como de RNA interferente expresado *in planta* para factores de patogenicidad, se ha podido determinar la funcionalidad de un grupo de genes implicados en la interacción (revisado en GHEYSEN y MITCHUM, 2009). Es importante mencionar que uno de los grandes avances en este sentido constituyó el uso de *Arabidopsis thaliana* como modelo genético-molecular para el estudio de la interacción, que permitió además el seguimiento del proceso

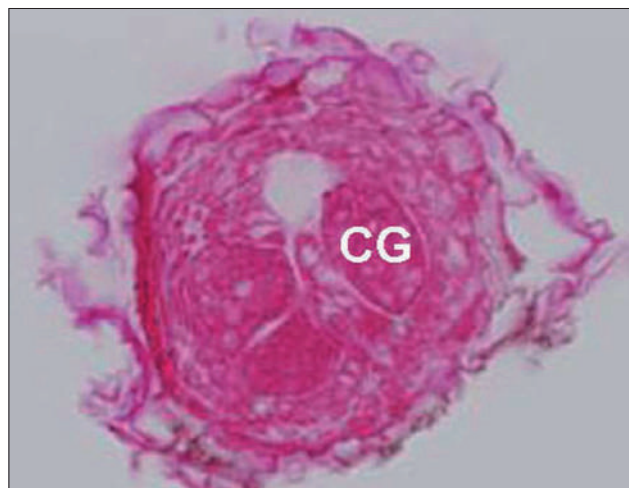


Figura 3. Criosección de agalla de *Arabidopsis* 3 días post infección teñida con eosina y montada en glicerol. A partir de criosecciones se aislaron posteriormente las CGs por microdissección por láser (BARCALA *et al.*, 2010; 2011). CG, célula gigante.

de penetración y establecimiento del nematodo *in vivo*, por las características de las raíces finas y translúcidas con pocas capas de células de esta especie de planta (en GHEYSEN y FENOLL, 2011).

En conclusión, el entendimiento de los procesos de diferenciación tempranos de las células de alimentación de los nematodos fitoendoparásitos más extendidos, requerirá la combinación de estrategias utilizando marcadores moleculares que permitan identificar las células precursoras indistinguibles morfológicamente del resto. Así mismo, será necesario ahondar en el estudio de posibles mecanismos de silenciamiento génico que pudiesen estar mediando la masiva represión de genes detectada en CGs en tiempos tempranos de infección. Esta profunda reprogramación génica que tienen lugar específicamente en los sincitios y en CGs son el resultado del intercambio sutil de señales entre el nematodo y las células de la planta donde se establece, que se evidencia como otro de los retos de la investigación en los próximos años.

Por último, el descubrimiento de las estrategias concretas utilizadas por nematodos polífagos como los del género *Meloidogyne spp.* para formar similares sitios de alimentación en tipos de plantas muy distintas, bien cascadas de señalización similares o parecidas, o bien rutas alternativas paralelas con distintas redes génicas, podría también ser posible ayudado de las nuevas técnicas de secuenciación masiva, empleada aún escasamente (HEWEZI *et al.*, 2008) mediante la comparación de transcriptomas de CGs en grupos diferentes de plantas.

BIBLIOGRAFÍA

- ABAD, P. & WILLIAMSON V. 2010. *Plant nematode interaction: a sophisticated dialogue*. Adv Bot Res. 53:148–192
- BARCALA, M., GARCÍA, A., CUBAS, P., ALMOGUERA, C., JORDANO, J., FENOLL, C y ESCOBAR, C. 2008. *Distinct heat-shock element arrangements that mediate the heat shock, but not the late-embryogenesis induction of small heat-shock proteins, correlate with promoter activation in root-knot nematode feeding cells*. Plant Molecular Biology. 56: 151-164.
- BARCALA, M.; GARCÍA, A.; CABRERA, J.; CASSON, S.; LINDSEY, K.; FAVERY, B.; GARCÍA-CASADO, G.; SOLANO, R.; FENOLL, C y ESCOBAR, C. 2010. *Early transcriptomic events in microdissected Arabidopsis nematode-induced giant cells*. Plant Journal. 61:698- 712.

- BARCALA, M.; FENOLL, C. y ESCOBAR, C.** 2011. *Laser microdissection of cells and isolation of high-quality RNA after cryosectioning*. Humana Press, Methods in Molecular Biology (In press).
- CHRISTIE, J. R.** 1936. *Development of root-knot nematode galls*. Phytopathology. 26:1-22.
- DOYLE, E. A & LAMBERT, K. N.** 2003. Meloidogyne javanica chorismate mutase 1 alters plant cell development. Mol Plant Microbe Interact 16:123-131
- ESCOBAR, C.; SIGAL, B. & MITCHUM, M.** 2011. *Transcriptomic and Proteomic Analysis of the Plant Response to Nematode Infection*. In: Jones, Fenoll & Geysen (Eds.) Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions. Springer, ISBN 978-94-007-0433-6. 157-173.
- FOSU-NYARKO, J.; JONES, M. G. & WANG Z.** 2009. *Functional characterization of transcripts expressed in early-stage Meloidogyne javanica-induced giant cells isolated by laser microdissection*. Mol Plant Pathol 10:237-248
- GHEYSEN, G & MITCHUM, M. G.** 2009. *Molecular insights in the susceptible plant response to nematode infection*. In: Berg RH, Taylor CG (eds) Cell biology of plant nematode parasitism. Plant cell Monographs. Springer, New York. 45-82.
- GHEYSEN, G. & FENOLL, C.** 2011. *Arabidopsis as a Tool for the Study of Plant-Nematode Interactions*. In: Jones, Fenoll & Geysen (Eds.) Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions. Springer, ISBN 978-94-007-0433-6. 139-156.
- GOVERSE, A.; DE ALMEIDA-ENGLER, J. A.; VERHEES, J.; VAN DER KROL, S.; HELDER, J. H. & GHEYSEN G.** 2000. *Cell cycle activation by plant parasitic nematodes*. Plant Mol Biol 43:747-761
- HUANG, G.; ALLEN, R.; DAVIS, E. L.; BAUM, T. J. & HUSSEY, R. S.** 2006. *Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene*. Proc Natl Acad Sci USA 103:14302-14306
- ITHAL, N.; RECKNOR, J.; NETTLETON, D.; MAIER, T.; BAUM, T. J. & MITCHUM, M. G.** 2007. *Developmental transcript profiling of cyst nematode feeding cells in soybean roots*. Mol Plant Microbe Interact 20:510-525.
- JAUBERT, S.; MILAC, A. L.; PETRESCU, A. J.; DE ALMEIDA-ENGLER, J.; ABAD, P. & ROSSO, M. N.** 2005. *In planta secretion of a calreticulin by migratory and sedentary stages of root-knot nematode*. Mol Plant Microbe Interact. 18:1277-1284
- JONES, M. G. K. & GOTO, D. B.** 2011. *Root-knot Nematodes and Giant Cells*. In: Jones, Fenoll & Geysen (Eds.) Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions. Springer, ISBN 978-94-007-0433-6. 83-100.
- KLINK, V.; ALKHAROUF, N.; MACDONALD, M. & MATTHEWS, B.** 2005. *Laser capture microdissection (LCM) and expression analyses of Glycine max (soybean) syncytium containing root regions formed by the plant pathogen Heterodera glycines (soybean cyst nematode)*. Plant Mol Biol 59:965-979
- KOSTOFF, D. & KENDALL, J.** 1930. *Cytology of nematode galls on Nicotiana roots*. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitologie und Infektionskrankheiten und Hygiene. 2 Naturwissenschaftliche Abteilung. Mikrobiologie der Landwirtschaft, der Technologie und des Umweltschutzes.:86-91.
- LI, Y.; FESTER, T. & TAYLOR, C. G.** 2009. *Transcriptomic analysis of nematode infestation*. In: Howard R, Christopher GT (eds) Cell biology of plant nematode parasitism. Springer-Verlag, Berlin. 189-220.
- MILLIGAN, S. B.; BODEAU, J.; YAGHOUBI, J.; KALOSHIAN, I.; ZABEL, P. & WILLIAMSON, V. M.** 1998. *The root-knot nematode resistance gene Mi from tomato is a member of leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes*. Plant Cell 10:1307-1319
- PORTILLO, M.; LINDSEY, K.; CASSON, S.; GARCÍA-CASADO, G.; SOLANO, R.; FENOLL, C. y ESCOBAR, C.** 2009. *Isolation of RNA from laser-capture microdissected Giant Cells at early differentiation stages suitable for differential transcriptome análisis*. Molecular Plant Pathology 10: 523- 535.
- RAMSAY, K.; WANG, Z.; JONES, M. G. K.** 2004. *Using laser capture microdissection to study gene expression in early stages of giant cells induced by root-knot nematodes*. Mol Plant Pathol 5:587-592
- SOBCZAK, M. & GOLINOWSKI, W.** 2011. *Cyst Nematodes and Syncytia*. In: Jones, Fenoll & Geysen (Eds.) Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions. Springer, ISBN 978-94-007-0433-6.61-82
- SZAKASITS, D.; HEINEN, P.; WIECZOREK, K.; HOFMANN, J.; WAGNER, F.; KREIL, D. P.; SYKACEK, P.; GRUNDLER, F. M. & BOHLMANN, H.** 2009. *The transcriptome of syncytia induced by the cyst nematode Heterodera schachtii in Arabidopsis roots*. Plant J 57:771-784.
- WANG, Z.; POTTER, R. H.; JONES, M. G. K.** 2003. *Differential display analysis of gene expression in the cytoplasm of giant cells induced in tomato roots by Meloidogyne javanica*. Mol Plant Pathol 4:361-371.
- WANG, X. H.; MITCHUM, M. G.; GAO, B. L.; LI, C. Y.; DIAB, H.; BAUM, T. J.; HUSSEY, R. S. & DAVIS, E. L.** 2005. *A parasitism gene from a plant-parasitic nematode with function similar to CLAVATA3/ESR (CLE) of Arabidopsis thaliana*. Mol Plant Pathol 6:187-191