

TESIS DOCTORAL

“Estudio de la expresión y función de genes cruciales asociados a procesos de desarrollo postembrionario durante la organogénesis *de novo* de agallas y células gigantes inducidas por *Meloidogyne* spp. en *Arabidopsis*”

DOCTORANDO: D^a Rocío Olmo López, del Grupo de Biotecnología y Biología Molecular de Plantas (GBBMP), del Área de Fisiología Vegetal, Departamento de Ciencias Ambientales, Universidad de Castilla- La Mancha (UCLM).

DIRECTOR: Dra. Carolina Escobar Lucas.

CODIRECTOR: Dr. Javier Cabrera Chaves

FECHA Y LUGAR DE LECTURA: 18 de febrero de 2020, Facultad de Ciencias Ambientales y Bioquímica, UCLM, Toledo.

RESUMEN

Los nematodos formadores de agallas (*Root-knot nematodes*, RKN) del género *Meloidogyne* parasitan múltiples especies de plantas e inducen la formación de agallas en sus raíces al alterar la maquinaria celular de la planta. *Meloidogyne* es un género de nematodos fitoendoparásitos que produce importantes pérdidas económicas en la agricultura. Estos nematodos inducen el desarrollo de células especiales de alimentación, denominadas células gigantes (CGs), contenidas en las agallas y que son la fuente de nutrientes para el nematodo. Las CGs inducidas por los RKNs constituyen un sistema biológico sorprendente que sólo se forma durante la interacción entre estos dos organismos eucariotas. Todavía no se han elucidado los mecanismos a través de los cuales el nematodo es capaz de establecerse en la raíz e inducir la formación de este nuevo órgano y, así, completar su ciclo vital.

En este contexto, el tema principal de la investigación es profundizar en el conocimiento de las vías de regulación paralelas y divergentes durante el desarrollo de agallas y/o CGs con procesos de desarrollo postembrionario, como la formación de raíces laterales (RLs) o de callos. Para ello ha sido necesario establecer y optimizar diversos protocolos. En un primer lugar hemos desarrollado un sistema simple y eficiente para la amplificación y mantenimiento de manera prolongada de poblaciones de nematodos del género *Meloidogyne* en un cultivo *in vitro* monoaxénico de raíces de pepino. Además, para poder estudiar los mecanismos moleculares implicados en la formación de agallas y CGs desarrollamos dos métodos. El primero consiste en un protocolo estandarizado para evaluar las tasas de infección y/o reproducción de los RKNs y los nematodos formadores de quistes (*Heterodera* y *Globodera* spp.) en mutantes de *Arabidopsis thaliana* con alteraciones en el desarrollo de RLs relacionadas con la señalización de auxinas y citoquininas. El segundo método nos permite fenotipar mediante microscopia confocal de forma rápida, reproducible y fiable las CGs en cualquier etapa de su desarrollo y obtener parámetros cuantitativos de su área y/o volumen, así como su reconstrucción tridimensional, para así poder determinar variaciones morfométricas durante su desarrollo. También, se consiguió estudiar las agallas inducidas en otras especies vegetales, como pepino, así como de

otras interacciones bióticas, como los sincitios formados por *Heterodera* spp. o los nódulos desarrollados por *Rhizobium* spp.

Nuestro interés por investigar las células precursoras o células madre de las CGs y otros tejidos de la agalla, nos llevó a demostrar por primera vez que *M. javanica* es capaz de infectar y completar su ciclo vital en un cultivo *in vitro* de explantes de hojas de *Arabidopsis*. Para ello desarrollan de forma ectópica CGs funcionales y con similares características a aquellas que forman en las agallas de raíz. Además, determinamos que genes marcadores de raíz lateral están activados y son cruciales para el desarrollo de CGs en las hojas.

Por último, se analizaron los paralelismos y divergencias existentes entre la formación de RLs, de callos y la inducción de agallas por *M. javanica* en *Arabidopsis*. En este contexto hemos estudiado la participación de genes reguladores clave del meristemo apical de la raíz, como son *SHORT-ROOT (SHR)*, *SCARECROW (SCR)*, *SCHIZORIZA (SCZ)* y *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5 (WOX5)*, y genes implicados en las vías de transducción críticas durante las primeras etapas de la formación de las RLs, como son *ABERRANT LATERAL ROOT FORMATION 4 (ALF4)*, *SOLITARY ROOT (SLR/IAA14)*, *BONDELOS (BDL/IAA12)*, *INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 28 (IAA28)*, *AUXIN RESPONSE FACTOR 5 (ARF5)*, *GATA TRANSCRIPTION FACTOR 23 (GATA23)*, *S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN 2 (SKP2B)* y *HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER PROTEIN 6 (AHP6)* en la formación de agallas. Estos genes se inducen y la mayoría son funcionales en las agallas inducidas por *M. javanica* en *Arabidopsis*. Sin embargo, otros genes implicados en el desarrollo de RLs como *AUXIN RESPONSE FACTORS 7 y 19 (ARF7 y ARF19)* no presentan un papel crucial. Por tanto, la formación de agallas en sus etapas iniciales presenta importantes similitudes con el programa de desarrollo de las RLs y a su vez con el de callos, compartiendo, al menos parcialmente, rutas de transducción de señales comunes en ambos procesos de generación de nuevos órganos.

Además, nuestros resultados indican que los nematodos inducen la formación de agallas regulando localmente el balance de auxinas y citoquininas posiblemente mediante la acción del gen *AHP6*. En conclusión, la activación de programas de desarrollo de nueva organogénesis que inducen pluripotencia de manera temporal, posiblemente determina identidades meristemáticas en las células vasculares de la raíz que son suficientes para iniciar la formación de una agalla (Figura 1). Profundizando en las bases moleculares de esta interacción podremos llegar a desarrollar posibles herramientas biotecnológicas para el control de los RKNs.

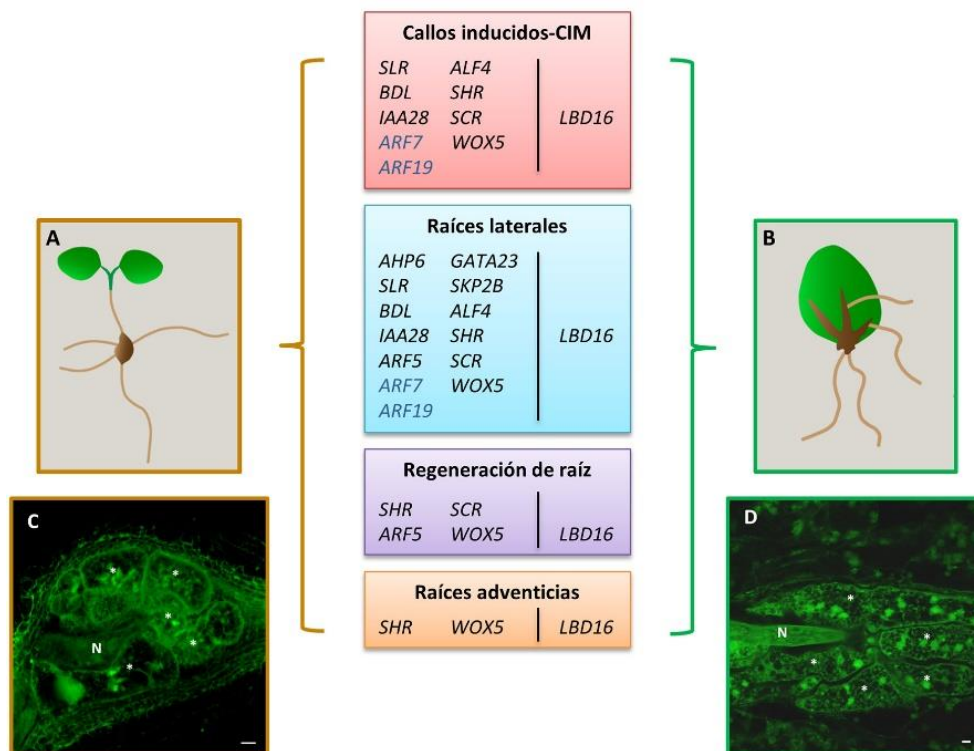


Figura 1. Genes representativos de los programas de desarrollo postembrionario en *Arabidopsis* alterados durante la formación de agallas por RKNs. (A) Ilustración de una agalla inducida una en raíz de *Arabidopsis* por *M. javanica*. (B) Ilustración de callo inducido en un explante de hoja de *Arabidopsis* por *M. javanica*. (C-D) Imágenes representativas de CGs tomadas por microscopía confocal tras un proceso de fijación con glutaraldehído combinado con clarificación con BABB. (C) CGs dentro de agalla desarrollada por *M. javanica* en la raíz de *Arabidopsis* de 14 días post-infección. (D) CGs dentro de callo/agalla desarrollada por *M. javanica* en hoja de *Arabidopsis* de 30-40 días post-inoculación. Cuadros centrales: genes característicos del desarrollo de callos inducidos-CIM (rojo), raíces laterales (azul), regeneración de raíz (morado) y raíces adventicias (naranja) que durante esta tesis hemos demostrado que están implicados en el proceso de desarrollo de la agalla/CGs, tanto en raíz (parte izquierda de los recuadros) como en hoja (parte derecha), en color negro. En azul, genes estudiados y que no han mostrado estar implicados en la formación de agallas. Asteriscos blancos: CGs. N: nematodo. Barras de escala: 50 μm (D) y 20 μm (C).

Publicaciones derivadas de la tesis:

- **Olmo, R.,** Cabrera, J., Díaz-Manzano, F. E., Ruiz-Ferrer, V., Barcala, M., Takashi, I., *et al.* (2020). Root-knot nematodes induce gall formation by recruiting developmental pathways of post-embryonic organogenesis and regeneration to promote transient pluripotency. *New Phytol* 227:200-215. doi: 10.1111/nph.16521
- **Olmo, R.,** Cabrera, J., Fenoll, C., and Escobar, C. (2019). A role for *ALF4* during gall and giant cell development in the biotic interaction between *Arabidopsis* and *Meloidogyne* spp. *Physiol. Plant.* 165:17-28. doi: 10.1111/ppl.12734.
- Cabrera, J., **Olmo, R.,** Ruiz-Ferrer, V., Abreu, I., Hermans, C., Martínez-Argudo, I., *et al.* (2018). A phenotyping method of giant cells from root-knot nematode feeding sites by confocal microscopy highlights a role for *CHITINASE-LIKE 1* in *Arabidopsis*. *Int. J. Mol. Sci.* 19. doi: 10.3390/ijms19020429.

- **Olmo, R.**, Silva, A. C., Díaz-Manzano, F. E., Cabrera, J., Fenoll, C., and Escobar, C. (2017). “A standardized method to assess infection rates of root-knot and cyst nematodes in *Arabidopsis thaliana* mutants with alterations in root development related to auxin and cytokinin signaling,” in *Auxins and Cytokinins in Plant Biology. Methods in Molecular Biology*, eds. T. Dandekar and M. Naseem (New York, NY: Humana Press), 73–81. doi: 10.1007/978-1-4939-6831-2_5.
- **Olmo, R.**, Cabrera, J., Moreno-Risueno, M. A., Fukaki, H., Fenoll, C., and Escobar, C. (2017). Molecular transducers from roots are triggered in Arabidopsis leaves by root-knot nematodes for successful feeding site formation: A conserved post-embryogenic *de novo* organogenesis program? *Front. Plant Sci.* 8. doi: 10.3389/fpls.2017.00875.
- Díaz-Manzano, F. E., **Olmo, R.**, Cabrera, J., Barcala, M., Escobar, C., and Fenoll, C. (2016). Long-term *in vitro* system for maintenance and amplification of root-knot nematodes in *Cucumis sativus* roots. *Front. Plant Sci.* 7, 124. doi: 10.3389/fpls.2016.00124.



Fotografía del acto de lectura y defensa. El Tribunal estuvo constituido por: Dra. María Fe Andrés Yeves; Dr. Juan Carlos del Pozo Benito y Dra. Virginia Ruiz Ferrer. Directores de la Tesis Doctoral Dra. Carolina Escobar Lucas y Dr. Javier Cabrera Chaves junto con su autora, Rocío Olmo López. La Tesis fue calificada con Sobresaliente *Cum Laude*.