

TESIS DOCTORAL

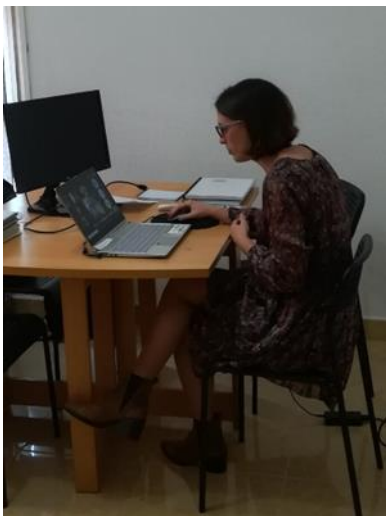
“Epigenetic changes in galls induced by the nematode *Meloidogyne javanica* in *Arabidopsis*”

DOCTORANDO: Dña. Ana Cláudia Pereira da Silva, del Grupo de Biotecnología y Biología Molecular de Plantas, del Área de Fisiología Vegetal, Departamento de Ciencias Ambientales, Universidad de Castilla- La Mancha.

DIRECTORA: Dra. Carolina Escobar Lucas.

CODIRECTORA: Dra. Carmen Fenoll Comes

FECHA Y LUGAR DE LECTURA: 2 de noviembre de 2020, online.



Fotografía del acto de lectura y defensa. La doctoranda, Ana Cláudia Pereira da Silva, en la lectura y defensa de su tesis, a través de medios telemáticos. El tribunal que evaluó la tesis estaba constituido por: Dr. Lee Robertson (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Madrid, España), Dra. Virginia Ruiz Ferrer (Universidad de Castilla-La Mancha, España) y Dra. Sara López Gomollón (Universidad de Cambridge, Reino Unido). La tesis fue calificada con Sobresaliente Cum Laude

RESUMEN

Los nematodos formadores de agallas, *Meloidogyne* spp., son parásitos obligados de las plantas, siendo capaces de parasitar a una gran variedad de especies de plantas hospedadoras, ya que son polívoros, lo que supone una amenaza para la producción agrícola. Estos nematodos inducen la formación un pseudoórgano, la agalla, a partir del tejido vascular de la raíz existente, donde varias células se transforman en células gigantes (CGs), con una alta actividad metabólica,

que el nematodo explota como un sitio permanente de alimentación. En la última década, estudios transcriptómicos combinados con análisis funcionales, han permitido comprender mejor los mecanismos que subyacen a la formación de las CGs. Entre estos estudios se incluyen los realizados en dos huéspedes diferentes: *Arabidopsis* y tomate. En ambos casos se ha observado una represión masiva de la expresión génica durante la formación de estas estructuras. Aunque aún queda mucho por explorar, varios trabajos posteriores han propuesto que esta represión génica podría estar mediada por mecanismos epigenéticos, entre otros, a través de pequeños RNAs (sRNAs). Los resultados más recientes han mostrado una acumulación masiva y diferencial de sRNAs de 24 nucleótidos (nt), que pueden participar en mecanismos epigenéticos como la metilación del DNA dirigida por RNA (RdDM) en los estadios iniciales del desarrollo de las agallas. Además, los pequeños RNAs interferentes asociados a zonas repetitivas del genoma (rasiRNAs) estaban enriquecidos en estos estadios tempranos de la formación de las agallas complementando fundamentalmente con retrotransposones, cuyos miembros principales estaban reprimidos. Estos hechos sugieren, por tanto, una implicación de mecanismos epigenéticos mediados por RdDM, durante la formación de las agallas. En esta tesis y, teniendo en cuenta estos resultados previos, hemos decidido estudiar en profundidad los cambios de metilación del DNA que se producen en las agallas formadas durante la interacción entre *Meloidogyne javanica* con *Arabidopsis thaliana* como planta huésped.

En primer lugar, hemos desarrollado y optimizado dos protocolos para facilitar el estudio de la interacción nematodo-planta. Con el fin de correlacionar los cambios epigenéticos a nivel de metilación del ADN y los cambios en el transcriptoma en una misma muestra biológica, hemos desarrollado y descrito un método que permite la extracción y purificación simultánea de DNA genómico y RNA total a partir de la misma muestra con calidad suficiente para la posterior construcción y secuenciación de bibliotecas. Puesto que en nematología y otras áreas de investigación se emplean de forma rutinaria para inferir el papel de genes específicos, mutantes de pérdida de función o sobreexpresión que muestran fenotipos radiculares pleiotrópicos, hemos desarrollado también una metodología detallada para evaluar, con la mínima interferencia, las diferencias en la infectividad de los nematodos en genotipos que presentan alteraciones fenotípicas en la arquitectura de las raíces.

Utilizando estos métodos, hemos estudiado los cambios que ocurren en el metiloma y en el transcriptoma de agallas inducidas por *M. javanica* en *A. thaliana*. Hemos observado una hipermetilación generalizada en las agallas desarrolladas a tiempos tempranos (3 días post infección, dpi) en comparación con el tejido equivalente de raíces control no infectadas, tanto

en *A. thaliana* como en tomate. Sin embargo, en etapas posteriores (14 dpi), no se observaron cambios significativos en el metiloma. Curiosamente, hemos observado que la hipermetilación de las células gigantes respecto a otros tejidos dentro de la agalla y a las muestras no infectadas parece estar contribuyendo en gran medida a la hipermetilación generalizada descrita anteriormente en la agalla. Se identificaron varias Regiones Diferencialmente Metiladas (DMR) a 3 y 14 dpi, así mismo, la metilación en el contexto CHH fue abundante y significativa en agallas, localizada preferentemente en las regiones promotoras en las DMRs. En el primer estadio (3 dpi), la mayoría de las DMR se superponían a elementos transponibles (TEs), situados principalmente en las regiones pericentroméricas de los cromosomas. Además, utilizamos bibliotecas de siRNA de estudios anteriores para ver cómo éstos se distribuían a lo largo de las diferentes regiones cromosómicas y evaluar si coincidían con las DMR. Los siRNA de 24 nt se acumularon, principalmente, en las DMR superpuestas a TEs, genes y promotores, seguidos de siRNA de 22 nt. Además, los rasiRNAs exclusivos de agallas (eGall-rasiRNAs), que previamente se había demostrado que se acumulaban en las regiones pericentroméricas de los cromosomas de *Arabidopsis*, se acumularon preferencialmente en DMRs superpuestas a TEs, mientras que los “non-rasiRNA” exclusivos de agallas (eGall-non-rasiRNAs) coincidían principalmente con secuencias génicas y de promotores. El transcriptoma de las agallas también reveló una correlación con genes y promotores que se superponen a DMRs, entre los que se encuentran miembros de familias de factores de transcripción y proteínas que participan en procesos epigenéticos, así como en procesos celulares básicos. El estudio de una colección de mutantes, de las principales metilasas descritas en *Arabidopsis* (CMT3, DRM1/2, MET1) reveló la implicación de metilasas tanto de mantenimiento como implicadas en la metilación *de novo* mediada por RdDM en los cambios epigenéticos que se producen durante el desarrollo de las agallas/células. Este proceso podría ser esencial para la estabilidad de los TEs y, por lo tanto, para el mantenimiento de la integridad del genoma durante los procesos de diferenciación celular, mitosis con citocinesis incompleta y endoreduplicación, que tienen lugar en las agallas y células gigantes.

Publicaciones derivadas de la tesis:

SILVA, A.C., RUIZ-FERRER, V., MARTÍNEZ-GÓMEZ, A., BARCALA, M., FENOLL, C. & ESCOBAR, C. 2019. All in one high quality genomic DNA and total RNA extraction from nematode induced galls for high throughput sequencing purposes. *Frontiers in Plant Science*, 10: 657.

OLMO, R*., **SILVA, A.C.***, DÍAZ-MANZANO, F.E., CABRERA, J., FENOLL, C. & 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 signalling.

In: Dandekar, T. & Naseem, M. (eds.) *Auxins and Cytokinins in Plant Biology. Methods in Molecular Biology*, vol 1569. Humana Press, New York, NY.

*Igual contribución

Contribuciones en publicaciones como co-autora durante la tesis doctoral:

RADAKOVIC, Z.C., ANJAM, M.S., ESCOBAR, E., CHOPRA, D., CABRERA, J., **SILVA, A.C.**, ESCOBAR, C., SOBCZAK, M., GRUNDLER, F.M.W. & SIDDIQUE, S. 2018. Arabidopsis HIPP27 is a host susceptibility gene for the beet cyst nematode *Heterodera schachtii*. *Molecular Plant Pathology*, 19: 1917-1928.

DÍAZ-MANZANO, F.E., CABRERA, J., RIPOLL, J., DEL OLMO, I., ANDRÉS, M.F., **SILVA, A.C.**, BARCALA, M., SÁNCHEZ, M., RUÍZ-FERRER, V., DE ALMEIDA-ENGLER, J., YANOFSKY, M.F., PIÑEIRO, M., JARILLO, J.A., FENOLL, C. & ESCOBAR, C. 2018. A role for the gene regulatory module microRNA172/TARGET OF EARLY ACTIVATION TAGGED 1/FLOWERING LOCUS T (miRNA172/TOE1/FT) in the feeding sites induced by *Meloidogyne javanica* in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 217: 813-827.

MEDINA, C., DA ROCHA, M., MAGLIANO, M., RATPOPOULO, A., REVEL, B., MARTEU, N., MAGNONE, V., LEBRIGAND, K., CABRERA, J., BARCALA, M., **SILVA, A.C.**, MILLAR, A., ESCOBAR, C., ABAD, P., FAVERY, B. & JAUBERT-POSSAMAI, S. 2017. Characterization of microRNAs from *Arabidopsis* galls highlights a role for miR159 in the plant response to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *New Phytologist*, 216: 882-896.