

Het wonder van de wortelknobbelaaltjes:

de unieke moleculaire interacties tussen een obligate parasiet en haar waardplanten

Erwin Roze¹, Justyna Jupovicz², Aska Goverse¹, Hans Helder¹, Jaap Bakker¹ en Geert Smant¹

¹ Laboratorium voor Nematologie, Wageningen Universiteit, Postbus 8123, 6700 ES Wageningen;

² Department of Botany, Warsaw Agricultural University, Nowoursynowska 159, Building 37, 02776 Warsaw, Poland

Inleiding

Wortelknobbelaaltjes (*Meloidogyne* spp.) behoren tot de meest geavanceerde parasieten onder de ziekteverwekkers van planten. Ze onderscheiden zich van veel obligaat biotrofe pathogenen door hun brede waardplantenreeks. Sommige wortelknobbelaaltjes (bijv. *M. chitwoodi*) parasiteren zelfs honderden verschillende plantensoorten, zowel monocotylen als dicotylen. Veel van deze polyfage wortelknobbelaaltjes zijn ware kosmopolieten en alle belangrijke voedselgewassen in de wereld worden bedreigd door wortelknobbelaaltjes (Williamson en Hussey, 1996). Doordat wortelknobbelaaltjes obligaat biotroof zijn is het, net als in moderne oorslogsvoering, van levensbelang zo lang mogelijk de afweerreacties van de vijand (in dit geval de waardplant) te omzeilen. Het zijn dan ook unieke dieren die uitblinken in veelzijdigheid en die zich op uitzonderlijke wijze hebben aangepast aan een lang leven in de waardplant. In de eerste plaats onderscheiden wortelknobbelaaltjes zich van veel andere nematoden door hun vermogen om vrijwel onopgemerkt over relatief lange afstanden door de weefsels van hun waardplanten te kruipen. Eenmaal gevestigd in het wortelstelsel onttrekken ze vervolgens gedurende enkele weken voedingsstoffen aan de plant via speciaal daarvoor aangelegde voe-

dingsstructuren – de reuzecellen. Ten slotte kunnen ze zich, al naar gelang de omstandigheden dat vereisen, op allerlei manieren voortplanten: geslachtelijk (amphimixis), ongeslachtelijk (mitotische of meiotische parthenogenese) of combinaties van diverse vormen van voortplanting (facultatief meiotische parthenogenese). De laatste jaren zijn door de toepassing van moleculaire technieken een aantal bijzondere ontdekkingen gedaan die betrekking hebben op deze aanpassingen. In dit artikel zullen we zoveel als mogelijk is binnen de gegeven ruimte ingaan op deze ontwikkelingen met een nadruk op de genen, die direct betrokken zijn bij de parasitaire levensstijl van de nematode.

De parasitaire cyclus van wortelknobbelaaltjes bestaat globaal uit twee fasen: de migratiefase en de voedingsfase. Tijdens de migratiefase bewegen de nematoden door de rhizosfeer en vervolgens door weefsels van de waardplant zelf op zoek naar een plek in de wortel om een reuzecel te vormen. De voedingsfase begint op het moment dat een geschikte plantencel door de nematode wordt omgevormd tot een reuzecel en de nematode zijn lichaamswandspieren, en daarmee het vermogen om verder te migreren, afbreekt. Deze twee fasen zijn gebruikt als indeling voor dit artikel waarbij telkens is toegelicht

op welke wijze genen in de nematode en in de waardplant een rol spelen.

De migratiefase

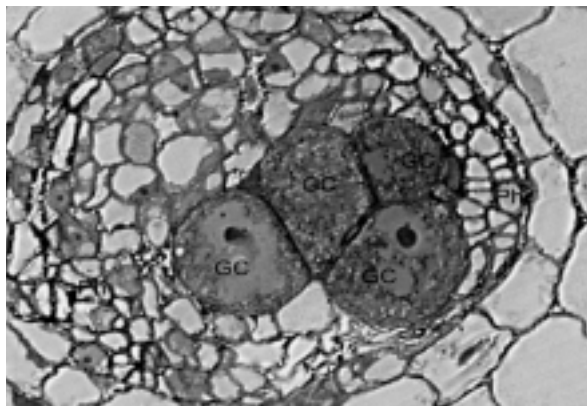
De migratiefase begint op het moment dat het tweede juveniele stadium uit het ei komt en, aangehouden door geur- en smaakstoffen die uit de wortels van waardplanten lekken, op zoek gaat naar een vitale waardplant. Na een korte reis door de rhizosfeer, penetreren deze juvenielen vervolgens de epidermis van een wortel ter hoogte van de strekkingszone (Wyss, 2002). Deze penetratie gebeurt door met een uitgesproken fanatisme met de mondstekel (stylet) een bres te slaan in de uitwendig celwanden precies op het grensvlak van twee epidermiscellen. De mondstekel wordt hierbij via een geleidering ongeveer 150 keer per minuut krachtig uit de mondholte gedreven. Via de epidermis migreert de nematode intercellulair, dat wil zeggen tussen de cellen door, door de cortex in de richting van de worteltop. In het wortelmeristeem maakt de nematode een U-bocht om de centrale cilinder binnen te gaan. Eenmaal in de centrale cilinder, migreert de nematode basipetaal door de centrale cilinder tot het een competente plantencel vindt die kan worden omgevormd tot een reuzecel. Bij-

ARTIKEL

zonder aan deze intercellulaire migratie van wortelknobbelaaltjes is dat het geen waarneembare schade tot gevolg heeft voor de cellen waarlangs de nematode glijdt. Vastbesloten, maar subtiel, beweegt het aaltje zich door de wortel. De middenlamel tussen de celwanden van naburige cellen wordt losgemaakt door pulsaties van de mondstekel, waarna de cellen uit elkaar worden geduwd om te kunnen passeren. Dit in tegenstelling tot veel andere nematoden, zoals de wortellesieaaltjes, die zich schijnbaar niet om de schade die migratie veroorzaakt bekommeren, maar dwars door celwanden en cellen heengaan, waarbij ze een spoor van vernielingen achterlaten.

Celwanden ontstaan uit polymeren van koolhydraten, eiwitten, en aromatische verbindingen (Carpita en Gibeaut, 1993). Deze polymeren zijn georganiseerd als een cellulose/hemicellulose netwerk dat is ingebed in een matrix van pectine. De exacte polymeersamenstelling van een celwand varieert per plantensoort, weefsel, en ontwikkelingsstadium van een cel. Lange tijd werd gedacht dat uitsluitend de gerichte inslagen van de mondstekel op de middenlamel in de celwanden de intercellulaire migratie van wortelknobbelaaltjes mogelijk maakten. Uit onderzoek van de laatste vijf jaar blijkt echter dat wortelknobbelaaltjes beschikken over een uitgebreid arsenaal aan celwand-afbrekende enzymen en andere celwand-modificerende eiwitten. Ze scheiden via hun mondstekel diverse varianten van cellulase (Rosso *et al.*, 1999), xylanase (Dautova *et al.*, 2001), pectaat lyase (Doyle en Lambert, 2002), en polygalacturonase (Jaubert *et al.*, 2002) uit, die gezamenlijk de afbraak van alle bekende polymeren in de celwand van planten katalyseren. De intercellulaire migratie van wortelknobbelaaltjes is dientengevolge het resultaat van de fysieke slagkracht van de mondstekel gecom-

Figuur 1. Lichtmicroscopische opname van een dwarsdoorsnede van de wortel een aardappel geïnfecteerd met Meloidogyne chitwoodi achttien dagen na infectie (Ph=floem; Pd=; GC= reuzecel).



bineerd met de enzymatische bewerking van de celwand door het complexe mengsel van uitgescheiden enzymen.

Celwandafbraak door nematoden is om drie redenen een opmerkelijk proces. Ten eerste bestond er tot voor kort in de biologie het dogma dat dieren niet zonder de hulp van endosymbiotische bacteriën en schimmels celwanden kunnen afbreken. Met de vondst van celwandafbrekende enzymen in nematoden bleek voor het eerst dat dit standpunt onjuist was. Nematoden hebben zelf genen die coderen voor deze enzymen, en zijn hiervoor niet afhankelijk van endosymbionten in het spijsverteringskanaal. Het tweede opmerkelijke feit bij de celwandafbrekende enzymen van nematoden is de overeenkomst die ze vertonen met bacteriële enzymen. Bij sommige klassen van celwandafbrekende enzymen (bijv. xylanase) is er duidelijk onderscheid tussen prokaryotische (bacteriële) en eukaryotische (schimmels en planten) varianten. Nematoden zijn als eukaryoten meer verwant met schimmels en planten dan met bacteriën, maar niettemin lijken de enzymen van nematoden het meest op de prokaryotische varianten. Dit heeft geleid tot de hypothese dat een verre voorouder van de huidige wortelknobbelaaltjes dit soort genen van bacteriën heeft verkregen via horizontale genoverdracht. Tot slot produceren wortelknobbelaaltjes naast 'klassieke' celwandafbrekende enzymen ook zogenaamde expansi-

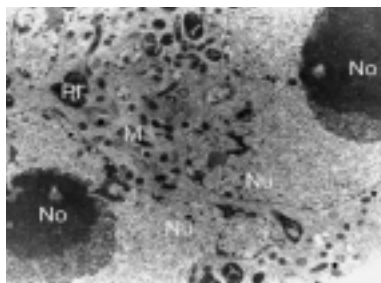
nes (Pers. Commun., E. Roze), die volgens een nog onbekend mechanisme de niet-covalente interacties tussen celwandpolymeren verstoren. Expansines zijn beschreven als een unieke groep van celwandmodificerende eiwitten die uitsluitend in het plantenrijk voor zouden komen (Cosgrove, 2000). Met de vondst van expansines in cysten- en wortelknobbelaaltjes, dus buiten het plantenrijk, zorgden de nematoden nogmaals voor een verrassing onder plantenwetenschappers (Qin *et al.*, 2004).

De voedingsfase

Wortelknobbelaaltjes voeden zich uitsluitend aan planten via reuzencellen. De nematoden induceren de vorming van reuzencellen door stoffen te injecteren in competente parenchymatische cellen in de vaatbundel van een waardplant (Wyss, 2002). Een van de eerst meetbare veranderingen in de reuzencel is de reactivering van de mitotische celcyclus – een serie van subcellulaire voorbereidingen op een celdeling (Gheysen en Fenoll, 2002). Bij reuzencellen verlopen deze voorbereidingen, inclusief het verdubbelen van de chromosomen, tot en met de kerndeling. Kort voordat de cel dan zou overgaan tot het splitsen in twee dochtercellen volgt een kortsluiting en begint de cel zich opnieuw voor te bereiden op een celdeling. Het resultaat een serie kerndelingen zonder dat de cel splitst is een meerkernig cytoplas-

ma. Omdat het aantal chromosomen in een reuzencel exponentieel toeneemt en de rest van subcellulaire machinerie zich navenant uitbreidt ontstaat het karakteristieke uiterlijk van een reuzecel. Onder de invloed van wortelknobbelaaltjes krijgen reuzecellen een vergelijkbare fysiologische status in de plant als die van andere metabolische sinks zoals het endosperm van zaden (Grundler en Bockenhoff, 1997). Assimilaten van de fotosynthese worden vanuit de bovengrondse delen actief naar de reuzencellen getransporteerd. De wortelknobbelaaltjes voeden zich gedurende enkele weken aan het cytoplasma van zes tot twaalf reuzencellen, die rondom de kop zijn aangelegd, alvorens ze tot reproductie overgaan.

Uit het moleculair onderzoek van de afgelopen jaren blijkt dat de expressiepatronen van tientallen genen in de waardplant veranderen tijdens de vorming van de reuzencellen (voor een gedetailleerd overzicht, zie Gheysen en Fenoll, 2002; De Almeida-Engler *et al.*, 2004). De expressieniveaus van bijvoorbeeld meer dan vijftig celcyclus-genen nemen toe bij reuzencel vorming. Het gebruik van specifieke remmers van de celcyclus heeft aangetoond dat dit een essentieel onderdeel is bij de transformatie van een gewone cel naar een reuzencel (De Almeida-Engler *et al.*, 1999). Daarnaast lijkt een scala aan andere metabolische en moleculaire processen betrokken bij de inductie van reuzencellen. Zo zijn er wond-, stress- en afweerreacties, modificaties van celwanden, regulatie van transcriptie en auxine-responsen. Het is vooralsnog niet duidelijk welke van deze processen essentiële stappen vertegenwoordigen in het ontstaan van reuzencellen en wat gezien moet worden als een neveneffect. Het onderzoek richt zich momenteel op het vaststellen van oorzakelijke verbanden tussen



Figuur 2. Detailopname met behulp van een transmissie elektronmicroscop van het meerkernig cytoplasma van een reuzecel van M. chitwoodi in aardappel achttien dagen na infectie (Gc= reuzecel; M= mitochondria; Pl= plastiden; Nu= nucleus; No= nucleolus).

genexpressiepatronen en de fundamentele metabolische processen die ten grondslag liggen aan reuzencelvorming, bijvoorbeeld via het silencen van genen. Aanvankelijk veronderstelde men dat wortelknobbelaaltjes hooguit enkele stoffen in de voorlopercel van de reuzecel zouden injecteren om het proces op gang te brengen. De verwachting was dan ook dat sterke aanwijzingen voor het belang van individuele moleculaire processen in de waardplant bij de vorming van reuzencellen zouden kunnen komen uit het onderzoek naar de identiteit van de stoffen die door wortelknobbelaaltjes in de plant worden gespoten (Williamson en Hussey, 1996). Echter, door de toepassing van een reeks complementaire onderzoeksmethoden zijn inmiddels al meer dan vijftig verschillende genen geïdentificeerd waarvan het vermoeden bestaat dat ze voor eiwitten coderen die vanuit de slokdarmklieren via de mondstekel worden uitgescheiden in de plant (Smant *et al.*, 2003; Davis *et al.*, 2004). De DNA sequenties van deze genen kunnen na identificatie van homologe sequenties in andere organismen informatie opleveren over de functie die ze zouden kunnen hebben in de plant. Opmerkelijk genoeg heeft meer dan 70% van deze genen in wortelknobbelaaltjes geen

significante overeenkomsten met andere al gekarakteriseerde genen in databases (Huang *et al.*, 2003; Davis *et al.*, 2004). Enerzijds geeft dit aan hoe uniek wortelknobbelaaltjes zijn, maar anderzijds bemoeilijkt dit gebrek aan aanwijzingen de functionele analyse van deze genen aanzienlijk. De grote diversiteit in de overige genen die wel kunnen worden geclassificeerd op basis van sequentie-homologie versterkt het beeld dat meerdere moleculaire, en dus metabolische, processen in de plant gelijktijdig beïnvloed worden door de nematoden. Ook hier zal een case-to-case benadering met betrekking tot het relatieve belang van de individuele stoffen in de secreties van nematoden moeten uitwijzen welke processen essentieel zijn bij de inductie van reuzencelvorming, en welke bijvoorbeeld van belang zijn bij het onderdrukken van afweerreacties.

Tot slot

De belangrijkste ontwikkeling in de kennis van het parasitisme van wortelknobbelaaltjes in de laatste jaren is dat de complexiteit van de moleculaire interacties al onze voorstellingen uit het verleden overstijgt. Een veelvoud van processen in de plant worden door wortelknobbelaaltjes gemanipuleerd, waarbij ze gebruik maken van een zeer uitgebreid arsenaal aan moleculaire werktuigen. Wortelknobbelaaltjes zijn ook uniek, omdat deze complexiteit niet het resultaat is van co-evolutie tussen één enkele gastheer zijn parasiet, zoals bij specialisten als de cystenaaltjes het geval is, maar dat de polyfage parasiet dit wonder kan laten voltrekken in honderden verschillende niet-verwante gastheren.

Literatuurlijst op www.knpv.org