



## UvA-DARE (Digital Academic Repository)

### The role of rhizosphere signalling in the plant-cyst nematode interaction

Vlaar, L.E.

**Publication date**  
2022

[Link to publication](#)

#### **Citation for published version (APA):**

Vlaar, L. E. (2022). *The role of rhizosphere signalling in the plant-cyst nematode interaction*. [Thesis, fully internal, Universiteit van Amsterdam].

#### **General rights**

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

#### **Disclaimer/Complaints regulations**

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

# Summary

In **Chapter 1** of my thesis I introduce the phenomenon of rhizosphere signalling, specifically between plants and cyst nematodes. To that end, I give background on the phylum of the Nematoda and the plant-parasitic nematodes therein, specifically the cyst nematodes. In cyst nematodes, hatching is highly dependent on host presence, and consequently a crucial event in the lifecycle that can be targeted to reduce the negative impact of these parasites on agriculture. Therefore, I introduce the eclepins, which are triterpenoid metabolites that are exuded into the rhizosphere, and that are known for their hatch inducing potency on the parasitic cyst nematodes of the genera *Heterodera* and *Globodera*. One of them, called solanoeclepin A (solA), has been isolated from potato root exudate and can initiate the hatch of Potato Cyst Nematodes (PCN).

From an evolutionary standpoint, a beneficial effect of solA would be expected for the plant, since it is unlikely that it produces a compound that only has a negative effect (that is, PCN hatching). To unravel this beneficial effect, in **Chapter 2** I analyse the transcriptome of two plant species, tomato (*Solanum lycopersicum*) and Arabidopsis seedlings grown *in vitro*, in response to treatment with solA. RNAseq analysis showed that solA downregulates the immune and hypoxia response, as well as ethylene biosynthesis and signalling, and promotes growth. This response was particularly strong under N and P deficiency, in Arabidopsis. Hence, solA induces changes in gene expression in a species in which it is not produced (as far as we know). These results may suggest that solA prepares the plant for colonization by microorganisms, possibly playing a role in nutrient uptake. Furthermore, the change in hypoxia response and ethylene signalling and growth stimulation point toward the induction of an altered root architecture, possibly further improving the plant's ability to recruit beneficial microbes and absorb nutrients.

To make the link between plant signalling and hatching/dauer exit in PCN, in **Chapter 3** I contributed to the development of an analytical method for the detection of solA in root exudates. Despite its discovery now almost 30 years ago, the low concentration of solA in potato root exudate has hindered progress in fully understanding its hatching inducing activity and exploitation in the control of PCN. Therefore, we decided to establish a highly sensitive analytical method for the detection of solA in root exudates. In this Chapter I describe the efficient single-step extraction and UPLC-MS/MS based analysis for rapid determination of solA in sub-nanomolar concentrations in tomato root exudate. This method was subsequently used to analyse solA production in different tomato cultivars and related solanaceous species, including the trap crop *Solanum sisymbriifolium*. Hatching assays with PCN, *Globodera pallida*, with root exudates of tomato genotypes revealed a significant positive correlation between solA concentration and hatching activity. The results demonstrate that there is natural variation in solA production within solanaceous species and that this affects PCN hatching.

In addition to solA, there are indications that hatching of PCN is also induced by other compounds in the root exudate of plant host species, called hatching factors (HF, induce hatching independently; for example solA) or hatching stimulants (HS, enhance hatching activity of HF). In **Chapter 4**, I use a metabolomics approach, aiming at the detection of unknown HF and HS for PCN in potato. Hereto, root exudates of 20 potato cultivars were used for PCN hatching assays, solA analysis and untargeted metabolomics. The data were

subsequently analysed using machine learning (Random Forest feature selection) and Pearson's correlation analysis. Several metabolic features in the root exudate displayed a correlation with hatching and, interestingly, also with solA content. One of these is a compound of mass 526.18 that scored higher for hatch prediction than solA in both data integration methods. This compound's involvement in hatch stimulation was confirmed by fractionation of three representative root exudates and hatching assays thereof. Since it elutes close to solA on LC-MS and shares MS fragments with solA, I suspect this compound has a structure similar to solA. Therefore, it was coined solanoeclepin B (solB).

In **Chapter 5**, I review the literature on hypobiosis in nematodes and the link with hatching in PCN. Nematodes, or roundworms, are presumably the most abundant metazoa on Earth and can even be found in some of the most hostile environments of our planet. Various types of hypobiosis have evolved to adapt the nematode's life cycles to such harsh environmental conditions. The five most distal major clades of the phylum Nematoda (Clades 8-12) formerly referred to as the Secernentea, contain many economically relevant parasitic nematodes. In this group, a special type of hypobiosis, dauer, has evolved. The dauer signalling pathway, which culminates in the biosynthesis of dafachronic acid (DA), is intensively studied in the free-living nematode *Caenorhabditis elegans* and it has been hypothesized that the dauer stage may have been a prerequisite for the evolution of a wide range of parasitic lifestyles among other nematode species. Biosynthesis of DA is not specific for hypobiosis, but if it results in exit of the hypobiotic state, it is one of the main criteria to define certain behaviour as dauer. Within Clades 9 and 10, the involvement of DA has been validated experimentally and dauer is therefore generally accepted to occur in those Clades. However, for other clades, such as Clade 12, this has hardly been explored. Within this clade reside the cyst nematodes, which end their hypobiosis through hatching. Because of the importance of hatching for management of these pests, the dauer hypothesis should be tested for this clade as well. In this chapter, I provide clarity on the nomenclature associated with hypobiosis and dauer across different nematological subfields. I discuss evidence for dauer-like stages in Clades 8 to 12 and support this with a meta-analysis of available genomic data. Furthermore, I discuss indications for the presence of a simplified dauer signalling pathway in parasitic nematodes. Finally, I zoom in on the host cues that induce exit from the hypobiotic stage and introduce two hypotheses on how these signals might feed into the dauer signalling pathway for plant-parasitic nematodes, thereby regulating hatching.

In **Chapter 6**, I test the hypotheses from Chapter 5 on cyst nematodes of the genera *Heterodera* and *Globodera* – such as the PCN species, *Globodera pallida* and *Globodera rostochiensis*. Their hypobiotic phase can last up to decades depending on the presence of a host and resembles the infective stage of several animal-parasitic nematodes, such as *Strongyloides stercoralis*, in several ways: it serves as a survival strategy in case of host absence; it is a non-feeding, non-ageing stage; and it ends by perception of a host-derived cue. However, despite the similarities it is unknown whether the molecular signalling pathways involved are similar in these phylogenetically distant nematodes. In this chapter, I use RNAseq to show that the HF solA and potato root exudate induce transcriptional changes in the dauer signalling pathway of PCN. Furthermore, I show that PCN hatching, which marks the end of the hypobiotic stage, is inhibited through chemical inhibition of the dauer signalling pathway. Lastly, through enzymatic assays using PCN homologues of DAF-9, the key biosynthetic enzyme in the production of DA, I show that PCN species can synthesize DA. Thus, I provide evidence that the dauer signalling pathway underlies the regulation of hypobiosis in PCN.

In **Chapter 7**, I discuss that my thesis provides new insights into rhizosphere signalling between plant, nematode and potentially microorganisms. Moreover, the findings on the PCN hatching mechanism are relevant for the development of new management and control methods, such as the development of synthetic HF that can induce a suicide hatch. Furthermore, since in this thesis it was shown that solA potentially stimulates the colonization of beneficial microorganisms in plants it is not produced by (Chapter 2), I discuss whether solA or a synthetic analogue can be used in agriculture for the induction of interspecific facilitation under nutrient stress. In this strategy, solA or its analogue would be applied on crops to support plant performance, especially under suboptimal nutritional conditions.



# Samenvatting

In **Hoofdstuk 1** van mijn thesis introduceer ik het fenomeen rhizosfeersignalering tussen planten en cystenaaltjes. Daartoe schets ik de achtergrond van het fylum Nematoda en de plant-parasitaire nematoden daarin, specifiek de cystenaaltjes. In cystenaaltjes is het uitkomen van het ei afhankelijk van de aanwezigheid van een gastheer en is dus een cruciale gebeurtenis in de levenscyclus, die kan worden gemanipuleerd om de negatieve invloed van deze plaag te reduceren. Door, bijvoorbeeld, de larven te stimuleren om uit hun ei te komen als er geen gastheer aanwezig is, zullen de larven snel doodgaan door voedseltekort, de zogenaamde 'zelfmoord-hatch'. Daarom introduceer ik de eclepinen, een groep van triterpenoïde metabolieten, die worden uitgescheiden in de rhizosfeer en die bekend staan om hun stimulerende werking op het uitkomen van de eieren van parasitaire cystenaaltjes van de genera *Heterodera* en *Globodera*. Eén daarvan, solanoeclepin A (solA), is geïsoleerd uit aardappel wortelxudaat en kan het uitkomen van eieren van aardappelcystenaaltjes (PCN) stimuleren.

Vanuit een evolutionair standpunt is het te verwachten dat solA ook een positief effect heeft op de plant, omdat het niet waarschijnlijk is dat een plant een stof produceert die alleen maar negatieve effecten (het uitkomen van zijn parasieten) voor zichzelf heeft. Om erachter te komen wat dit gunstige effect is, analyseer ik in **Hoofdstuk 2** de transcriptionele reactie tegen een behandeling met solA van twee plantensoorten, zaailingen van tomaat (*Solanum lycopersicum*) en Arabidopsis die *in vitro* gegroeid zijn. RNAseq analyse laat zien dat solA de immuun- en hypoxiarespons remt, net als de biosynthese en signalering van ethyleen, en dat het de groei stimuleert. Deze respons was vooral sterk tijdens N en P tekorten in Arabidopsis. Dus solA induceert veranderingen in genexpressie in een plantensoort waar het niet door wordt geproduceerd (voor zover bekend). Deze resultaten zouden kunnen impliceren dat solA de plant klaarstoomt voor kolonisatie door micro-organismen, die een rol zouden kunnen spelen bij het opnemen van voedingsstoffen uit de bodem. Verder wijzen de veranderingen in hypoxiarespons, ethyleensignalering en groei stimulatie op het ontwikkelen van een veranderde wortelarchitectuur, wat daarbij mogelijk verder het vermogen van de plant om gunstige microben te rekruteren en nutriënten te absorberen, verbetert.

Om de link te leggen tussen plantensignalering en het uit het ei komen/het beëindigen van dauer in PCN, heb ik in **Hoofdstuk 3** bijgedragen aan de ontwikkeling van een analytische methode voor de detectie van solA in wortelxudaten. Ondanks dat de ontdekking van solA nu bijna 30 jaar geleden is, is er nog niet veel vooruitgang in het begrijpen van de stimulerende werking op het uitkomen van nematodeneieren en het exploiteren ervan voor het in toom houden van de PCN plaag. Dit werd vooral veroorzaakt door de lage concentraties waarin de metaboliet voorkomt in wortelxudaten, en daarom hebben we een zeer sensitieve analytische methode ontwikkeld voor de detectie van solA in die wortelxudaten. In dit hoofdstuk beschrijf ik de efficiënte eenstapszuivering en UPLC-MS/MS analyse voor kwantificatie van solA in sub-nanomolaire concentraties in tomaat wortelxudaat. De methode wordt verder gebruikt om de solA productie in een aantal teeltvariëteiten van tomaat en verwante soorten, inclusief de vangplant *Solanum sisymbriifolium*, te meten. Ei-uitkomsttesten met PCN, *Globodera pallida*, met wortelxudaten van tomaat genotypen lieten een significante positieve correlatie zien tussen de concentratie van solA en het percentage van eieren dat uitkomt. De resultaten demonstreren

dat er natuurlijke variatie is in de productie van solA binnen de nachtschadesoorten, en dat dit de hoeveelheid larven die uit hun ei komt beïnvloedt.

Behalve solA zijn er aanwijzingen dat het uitkomen van PCN eieren ook door andere stoffen uit gastheer-wortellexudaat wordt beïnvloed. Deze stoffen worden 'hatching factors' (HFs, stimuleren onafhankelijk het uitkomen van eieren, bijvoorbeeld solA) of 'hatching stimulants' (HSs, vergroten de stimulerende werking van HFs). In **Hoofdstuk 4** gebruik ik metabolomics om onbekende HFs en HSs voor PCN te detecteren. Hiervoor gebruik ik wortellexudaten van 20 aardappelvariëteiten voor solA kwantificatie, PCN ei-uitkomsttesten en ongerichte metabolomics. De data werd vervolgens geanalyseerd met 'machine learning' (Random Forest feature selection) en Pearson's correlatieanalyse. Verscheidene metabole kenmerken in de wortellexudaten correleerden met het uitkomen van PCN eieren en, interessant genoeg, ook met de hoeveelheid solA. Eén van deze kenmerken is een stof met massa 526.18, die in beide data integratiemethoden hoger scoorde voor het voorspellen van de hoeveelheid eieren die uitkomen dan solA. De betrokkenheid van deze stof in het stimuleren van het uitkomen van PCN eieren werd bevestigd door de fractionatie van drie representatieve wortellexudaten en ei-uitkomsttesten daarvan. Omdat deze stof dichtbij solA elueert op de LC-MS en verscheidene MS-fragmenten met solA overeenkomen, verwacht ik dat deze stof een structuur heeft die lijkt op die van solA.

In **Hoofdstuk 5** bespreek ik de literatuur omtrent hypobiose in nematoden en de link met het uitkomen van PCN eieren. Nematoden, ook wel rondwormen genoemd, zijn vermoedelijk de meest veelvoorkomende metazoa ter aarde en komen zelfs voor in de meest vijandige omgevingen van de planeet. Verschillende typen van hypobiose zijn geëvolueerd om de levenscyclus van de nematode aan te passen aan deze wrede omgevingen. De vijf meest distale kladen van het fylum Nematoda (Kladen 8-12), de vroegere Secernentea, bevatten veel economisch relevante parasitaire nematodensoorten. In deze groep is een speciaal type hypobiose, dauer, geëvolueerd. Het dauer signaalpad, dat culmineert in de biosynthese van dafachronic acid (DA), is intensief bestudeerd in het vrijlevende modelorganisme *Caenorhabditis elegans*, en het wordt verondersteld dat dauer een startpunt is geweest voor het ontwikkelen van verschillende parasitaire levensstijlen in andere nematodensoorten. De biosynthese van DA is niet specifiek voor hypobiose, maar als het resulteert in het verlaten van de hypobiose is het een van de belangrijkste criteria om bepaald gedrag te definiëren als dauer. Binnen Klade 9 en 10 is de betrokkenheid van DA experimenteel aangetoond en daarom is het algemeen geaccepteerd dat dauer binnen deze Kladen voorkomt. Echter, voor andere Kladen, zoals Klade 12, is dit niet onderzocht. Binnen deze Klade vallen de cystenaaltjes, die hun hypobiose beëindigen door uit het ei te komen. Omdat het uitkomen van de eieren belangrijk is voor het in toom houden van deze plaag, is het belangrijk dat de dauer hypothese ook in deze Klade wordt getest. In dit hoofdstuk geef ik duidelijkheid over de nomenclatuur omtrent hypobiose en dauer in de diverse deelonderwerpen van de nematologie. Ik bediscussieer het bewijs voor een dauer-achtige fase in de Kladen 8 tot 12 en ik ondersteun dit met een meta-analyse van beschikbare genomdata. Verder bediscussieer ik indicaties voor de aanwezigheid van een versimpeld dauer signaalpad in parasitaire nematoden. Tenslotte zoom ik in op de gastheersignalen die dauer beëindiging induceren, en introduceer ik twee hypothesen over hoe deze signalen zouden kunnen integreren in het dauer signaalpad van plant-parasitaire nematoden, waarbij het uit het ei komen gereguleerd wordt.

In **Hoofdstuk 6** test ik de hypothesen uit Hoofdstuk 5 op cystenaaltjes van de genera *Heterodera* en *Globodera*, zoals de PCN soorten *Globodera pallida* en *Globodera rostochiensis*. Hun hypobiose kan tot wel tientallen jaren duren, afhankelijk van de aanwezigheid van een

gastheer, en lijkt sterk op de besmettelijke fase van een aantal dier-parasitaire nematoden, zoals *Strongyloides stercoralis*, op verschillende manieren: het dient als een overlevingsstrategie voor het geval een gastheer afwezig is; het is een fase waarin de larve niet eet of verouderd; en het wordt beëindigd door de perceptie van een signaal afkomstig van de gastheer. Echter, ondanks de overeenkomsten is het onbekend of de betrokken moleculaire signaalpaden op elkaar lijken in deze fylogenetisch niet sterk verwante nematoden. In dit hoofdstuk gebruik ik RNAseq om aan te tonen dat solA en aardappel wortelxudaat transcriptionele veranderingen induceren in het dauer signaalpad van PCN. Verder laat ik zien dat het uitkomen van PCN eieren, wat het einde van de hypobiose markeert, wordt geremd door chemische remmers van het dauer signaalpad. Tenslotte laat ik zien dat PCN soorten DA kunnen synthetiseren, door middel van enzymtesten met PCN homologen van DAF-9, wat het belangrijkste enzym voor de biosynthese van DA is. Op deze manier geef ik bewijs dat het dauer signaalpad ten grondslag ligt aan de regulatie van hypobiose in PCN.

In **Hoofdstuk 7** bespreek ik dat mijn proefschrift nieuwe inzichten verschaft in rhizosfeersignalering tussen planten, nematoden en mogelijk ook micro-organismen. Bovendien zijn de bevindingen van de mechanismen van het uitkomen van PCN eieren relevant voor de ontwikkeling van nieuwe methoden, zoals de ontwikkeling van synthetische HFs die een zelfmoord-hatch kunnen induceren. Verder, omdat in dit proefschrift wordt gesuggereerd dat solA mogelijk de kolonisatie van de plant door gunstige microben stimuleert (Hoofdstuk 2), bespreek ik of solA, of een synthetische analoog, gebruikt kan worden in de landbouw voor het stimuleren van 'interspecific facilitation' tijdens voedseltekorten. In deze strategie wordt solA, of zijn analoge stof, toegepast op waardplanten om de plantopbrengst te verbeteren, specifiek tijdens suboptimale voedingscondities.





# List of publications

- **Vlaar, L.E;** Galland, M.D; Dong, L; Rahimi, M; Bouwmeester, H.J. (2022). Solanoeclipin A induces immune response under N and P starvation in Arabidopsis and tomato. Submitted to Plant-Environment Interactions.
- Guerrieri, A.\*; Floková, K.\*; **Vlaar, L.E.\*;** Schilder, M.L; Kramer, G; Chojnacka, A; van Dijk, Y.R; Bouwmeester, H.J; Dong, L. UPLC-MS/MS analysis and biological activity of the potato cyst nematode hatching stimulant, solanoeclipin A, in the root exudate of *Solanum* spp. *Planta*. 254(6): 112 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03766-2>
- **Vlaar, L.E;** Thiombiano, B; Abedini, D; Schilder, M; Yang, Y; Dong, L. (2022). A combination of metabolomics and machine learning results in the identification of a new cyst nematode hatching factor. Submitted to *Metabolites*.
- **Vlaar, L.E;** Bertran, A; Rahimi, M; Dong, L; Kammenga, J.E; Helder, J; Goverse, A; Bouwmeester, H.J. On the role of dauer in the adaptation of nematodes to a parasitic life style. *Parasites & Vectors* **14**, 554 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04953-6>
- **Vlaar, L.E;** Rahimi, M; Bertran, A; Bleeker, J; Floková, K; Goverse, A; Bouwmeester, H.J (2022) The dauer signalling pathway is conserved in *Globodera* spp. and plays a role in hatching. In preparation
- Radoeva, T; Lokerse, A.S; Llavata-Peris, C.I; Wendrich, J.R; Xiang, D; Liao, C-Y; **Vlaar, L.E;** Boekschoten, M; Hooiveld, G; Datla, R; Weijers, D. (2019) A robust auxin response network controls embryo and suspensor development through a basic Helix Loop Helix transcriptional module. *Plant Cell* 31:52-67 2019. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00518>