



ENDOSYMBIONT MICROBIOTA OF *Meloidogyne javanica* ADULT FEMALE INFECTED BY *Pasteuria penetrans* †

[MICROBIOTA ENDOSIMBIONTE DE HEMBRAS ADULTAS DE *Meloidogyne javanica* INFECTADO POR *Pasteuria penetrans*]

David Lindo-Seminario^{1,2*}, Sandra Mendez-Farroñan^{1,2},
Jorge Canta-Ventura¹, José Córdova-Campos²,
Carlos Condemarín-Montealegre³, Savina Gutiérrez-Calle³,
Arturo Morales-Pizarro⁴ and Eric Mialhe-Matonnier⁵

¹ Estación Experimental Agraria Vista Florida. Subdirección de Recursos Genéticos de la Dirección de Recursos Genético y Biotecnología. Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Av. Pícsi, Lambayeque. Perú. E-mails: delindoseminari@gmail.com.pe*, sandrajmfar@gmail.com, jorgecantav@gmail.com

² Universidad Nacional de Tumbes. Av. Universitaria s/n, Tumbes, Perú. E-mails: stalyva16@gmail.com

³ Biotecoop. Calle Vilcanota 2263, Villa María del Triunfo, Lima, Perú. E-mails: ccondemarin@gmail.com, savina.gutierrez@gmail.com

⁴ Universidad Nacional de Piura, Campus Universitario s/n. Urb. Miraflores. Piura, Perú. E-mails: dmoralesp@unp.edu.pe

⁵ Inca Biotec S.A.C. Calle Filipinas 212, Tumbes, Perú. E-mails: ericmialhe@yahoo.fr

* Corresponding author

SUMMARY

Background: *Pasteuria penetrans* is a nonculturable bacterium that obligately parasitizes several species of phytopathogenic nematodes. Unknown endogenous female, plant or microbial reproductive factors are indispensable for multiplication and endospore formation of *P. penetrans*. **Objective:** To characterize *P. penetrans* endospores by 16S rRNA gene sequencing in samples from infected adult female *Meloidogyne javanica* and microbiota of infected and uninfected adult female *M. javanica* with *P. penetrans* by high-throughput sequencing of the V4 hypervariable region of the 16S rRNA gene. **Methodology:** Infected roots were collected from grapevines; fresh infective juvenile nematodes (J2) were extracted for *P. penetrans* endospore fixation and inoculation into tomato plants. Genomic and metagenomic DNA from infected and uninfected adult females of *M. javanica* was extracted for sequencing by sequencing the V4 region of the 16S rRNA gene of *P. penetrans* and its bacterial microbiome. The generated sequences were processed using bioinformatics software for analyses of alpha and beta diversity indices of the bacterial microbiome. **Results:** An amplicon of 550 base pairs with 98% identity and homology to *P. penetrans* was obtained. The taxonomic profile revealed the highest bacterial diversity and richness in the microbiota related to infected adult females, with *Proteobacteria* occurring in both samples between 45 and 83%, followed by *Firmicutes*, *Actinobacteria* and *Bacteroidetes* with 19, 11 and 8% respectively at the phylum level. Likewise, the most abundant genera associated with the native microbiota of the adult nematode were identified as *Pseudomonas*, *Flavobacterium* and *Chitinophaga* at 82.5, 15 and 2%, respectively. In infected females, *Paenibacillus*, *Pasteuria*, *Pseudomonas* and *Streptomyces* were recorded with 45, 7, 6 and 5% respectively, the most abundant. **Implications:** The results suggest the existence of bacterial genera in infected *M. javanica* females involved in the in vivo development of *P. penetrans* endospores. **Conclusions:** This would reveal a reduction of *Pseudomonas*

† Submitted April 25, 2022 – Accepted August 11, 2022. <http://doi.org/10.56369/tsaes.4341>



Copyright © the authors. Work licensed under a CC-BY 4.0 License. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

ISSN: 1870-0462.

ORCID = David Lindo-Seminario: <https://orcid.org/0000-0002-8767-5304>; Sandra Mendez-Farroñan: <https://orcid.org/0000-0002-5214-8993>; Jorge Canta-Ventura: <https://orcid.org/0000-0003-4269-9262>; José Córdova-Campos: <https://orcid.org/0000-0002-5891-4679>; Carlos Condemarín-Montealegre: <https://orcid.org/0000-0001-7770-4493>; Savina Gutiérrez-Calle: <https://orcid.org/0000-0003-1077-9153>; Eric Mialhe-Matonnier: <https://orcid.org/0000-0002-7952-6907>; Arturo Morales-Pizarro: <https://orcid.org/0000-0003-3966-6689>

dominance favoring the colonization of different bacteria that cohabit with *P. penetrans*, being this change in the microbial composition a possible factor that favors the multiplication of *P. penetrans* endospores within the host.

Key words: High throughput sequencing; root-knot nematode; biological control; bacteria.

RESUMEN

Antecedentes: *Pasteuria penetrans* es una bacteria no cultivable que parasita obligadamente a varias especies de nemátodos fitopatógenos. Factores endógenos reproductivos femeninos, vegetales o microbianos desconocidos son indispensables para la multiplicación y formación de endosporas de *P. penetrans*. **Objetivo:** Caracterizar las endosporas de *P. penetrans* mediante la secuenciación del gen 16S ARNr en muestras de hembras adultas de *Meloidogyne javanica* infectadas y microbiota de hembras adultas de *M. javanica* infectadas y no infectadas con *P. penetrans* mediante secuenciamiento de alto rendimiento de la región hipervariable V4 del gen 16S ARNr. **Metodología:** Se colectaron las raíces infectadas de viñedos, se extrajo nemátodos juveniles (J2) infectivos frescos para fijación de endosporas de *P. penetrans* y su inoculación en plantas de tomate. El ADN genómico y metagenómico de hembras adultas de *M. javanica* infectadas y no infectadas se extrajo para su secuenciamiento a partir de la región V4 del gen 16S ARNr de *P. penetrans* y su microbioma bacteriano. Las secuencias generadas fueron procesadas mediante software bioinformáticos para los análisis de índices de alfa y beta diversidad del microbioma bacteriano. **Resultados:** Se obtuvo un amplicón de 550 pares de bases con 98% identidad y homología a *P. penetrans*. El perfil taxonómico reveló la mayor diversidad y riqueza bacteriana en la microbiota relacionada a hembras adultas infectadas, siendo *Proteobacteria* la que se presentó en ambas muestras entre 45 al 83%, seguido de Firmicutes, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes* con 19, 11 y 8% respectivamente a nivel de filo. Asimismo, se identificó géneros más abundantes asociados a la microbiota nativa del nemátodo adulto tales como *Pseudomonas*, *Flavobacterium* y *Chitinophaga* al 82,5, 15 y 2% respectivamente. En las hembras infectadas se registró a *Paenibacillus*, *Pasteuria*, *Pseudomonas* y *Streptomyces* con el 45, 7, 6 y 5% respectivamente, los más abundantes. **Implicaciones:** Los resultados sugieren la existencia géneros bacterianos en hembras de *M. javanica* infectadas involucrados en el desarrollo in vivo de endosporas de *P. penetrans*. **Conclusiones:** Esto revelaría una reducción del dominio de *Pseudomonas* favoreciendo la colonización de diferentes bacterias que cohabitan con *P. penetrans*, siendo este cambio en la composición microbiana un posible factor que favorece la multiplicación de endosporas de *P. penetrans* dentro del hospedero.

Palabras clave: secuenciamiento de alto rendimiento; nematodo agallador; control biológico; bacteria.

INTRODUCCIÓN

Los nemátodos del género *Meloidogyne* son considerados como los más perjudiciales en la mayoría de plantas cultivadas (banano, uva, tomate, entre otras); causando pérdidas económicas que superan los 100 billones de dólares anuales en el mundo (Jones *et al.*, 2013). Siendo los tratamientos químicos frecuentes para el control de estos patógenos debido a su poca especificidad, por lo que es necesario nuevas alternativas de control que sean amigables con el medio ambiente (Li *et al.*, 2015). El potencial uso de microorganismos nativos como agentes controladores biológicos supresores de nemátodos es de prioridad agrícola en el Perú.

Entre estos microorganismos nativos de suelo agrícola se encontró una bacteria Gram positiva, *Pasteuria penetrans*, formadora de endosporas capaces de tolerar diversos factores abióticos y bióticos, sin afectar su viabilidad (Giannakou *et al.*, 2015). Estas bacterias son parásitos de muchas especies de nemátodos fitopatógenos se les considera como importantes agentes

biocontroladores (Kokalis-Burelle, 2015; Chen *et al.*, 2000; Morales-Pizarro *et al.*, 2022). En condiciones naturales, esta bacteria sólo puede completar su ciclo de vida dentro de un nemátodo hospedero. La infección se inicia cuando las endosporas de *P. penetrans* se fijan en cualquier parte de la cutícula de los nemátodos juveniles cuando estos migran a través del suelo en busca de una raíz hospedera sin causarles ningún daño (Chen y Dickson, 1998). El número de endosporas adheridas varía de uno a varias decenas (Davies *et al.*, 1988). Aproximadamente, un número máximo de diez de estas endosporas adheridas limita la capacidad del nemátodo para penetrar la raíz hospedera (Brown y Smart *et al.*, 1985). Una vez que el nemátodo ingresa a la planta y establece un sitio de alimentación permanente dentro del sistema vascular radicular, la bacteria produce un tubo de germinación que penetra en la cutícula y luego crece vegetativamente dentro del cuerpo del nemátodo. Esta bacteria afecta principalmente el sistema reproductor y anula la formación de huevos del nemátodo, llegando a producir 2×10^6 esporas que se liberan en el suelo cuando la cutícula del nemátodo se rompe (Davies, 2009; Timper *et al.*,

2016). Sin embargo, a pesar de su enorme potencial como agente controlador, su naturaleza dependiente de su hospedero complica su producción masiva. Durante las últimas décadas muchos estudios se enfocaron en cultivar *in vitro* a *Pasteuria* con reducido éxito (Bishop *et al.*, 1991). Aunque las primeras pruebas de cultivo *in vitro* fueron con nemátodos del género *Belonolaimus*, esto aperturó su valor como bionemática en algunas especies de nematodos (Luc *et al.*, 2010).

La caracterización molecular del género *Pasteuria*, se basó principalmente en la identificación a partir de genes marcadores como 16S ARNr (Atibalentja *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2004; Noel *et al.*, 2005; Nong *et al.*, 2007). Esto ha permitido diferenciar poblaciones geográficamente distintas de *P. penetrans* que muestran diversos grados de especificidad y virulencia, permitiendo una mayor comprensión de la variación genética entre las poblaciones de *Pasteuria* (Davies, 2009; Mauchline *et al.*, 2011).

Pasteuria, *Pseudomonas*, *Bacillus*, entre otros microorganismos en el suelo y en la rizosfera regulan la población de los nemátodos fitoparásitos. Las bacterias han interactuado con nemátodos durante su historia evolutiva. Estas interacciones pueden ser positivas (mutualista) o negativas (patógenos/parásitos), transitorias o permanentes (simbiótica), como interacción benéfica a largo plazo (Murfin *et al.*, 2012). Existe amplia información sobre la comunidad endobacteriana nativa o microbiota bacteriana reportada en diversas especies de nemátodos de vida libre, como es el caso de *Caenorhabditis elegans* (Félix y Braendle, 2010; Dirksen *et al.*, 2016; Niu *et al.*, 2016), *Acrobeloides maximus* (Baquiran *et al.*, 2013), y en nemátodos fitopatógenos como *Bursaphelenchus xylophilus* (Tian *et al.*, 2015; He *et al.*, 2016), *Meloidogyne incognita* (Cao *et al.*, 2015) y *Xiphinema americanum*-group (Orlando *et al.*, 2016).

Recientes estudios sobre la microbiota intestinal y salud del hospedero basadas en la secuenciación de alto rendimiento de ADN, han permitido el estudio de bacterias sin el cultivo previo (Brown, 2018). Con ello al acceso de datos disponibles públicamente que aumentado el conocimiento de la microbiota en muchas especies y ambientes (Walker *et al.*, 2014).

El objetivo del presente estudio fue identificar a nivel taxonómico la especie *P. penetrans* mediante técnicas moleculares de PCR a partir de hembras adultas infectadas de *M. javanica*. Al mismo

tiempo, caracterizar por primera vez la microbiota de hembras del nemátodo agallador de la raíz, *M. javanica*, en relación con la infección por *P. penetrans* mediante secuenciamiento de alto rendimiento de la región V4 del gen 16S ARNr.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo y mantenimiento de nemátodos

Plantas de uva mesa de variedad “Freedom” fueron seleccionadas por albergar una alta incidencia de nematodos. Se excavó una calicata de 50 cm para la colectar de raíces infectadas de los viñedos de la empresa Ecosac Agrícola S.A.C., caserío Chapairá, distrito de Castilla, provincia de Piura, región de Piura.

Luego se extrajeron los diferentes estadios del nemátodo (huevo, juvenil y hembra adulta) de *M. javanica* en las agallas (> 3.0 g), para ello, se utilizó la metodología modificada según Barker y Hussey (1976), que consistió en enjuagar, cortar, licuar y tamizar las agallas hasta obtener una suspensión homogénea de huevos de nematodos libre de residuos externos. Seguido se utilizó la metodología de Condemarín *et al.* (2018) para la desinfección y colecta de nemátodos juveniles (J2) infectivos frescos del segundo y cuarto día de eclosión con 72 horas de asepsia.

Para el mantenimiento *in vivo* de estos nematodos aislados se realizó en base a trabajos previos de infección de nemátodos en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. var. Rio Grande). Para esto, 1000 individuos de J2 fueron aplicados en plantas de tomate de tres semanas de edad sembrados en potes de plástico conteniendo 500 g sustrato Premix Sunshine #8 (Sunshine Sun Gro Horticulture, Bellevue, WA). Cada planta se regó cada semana y se fertilizó cada 15 días utilizando solución nutritiva hidropónica “La Molina” bajo condiciones de invernadero. La colecta de raíces infectadas se realizó a los 50 días después de la inoculación con nematodos. A partir de las raíces colectadas, se aislaron los huevos y juveniles siguiendo los procedimientos anteriores.

Fijación de endosporas en nemátodos juveniles

Se estandarizó una nueva metodología de fijación de endosporas de *Pasteuria* en nemátodos J2 no infectados, a partir de la selección de muestras de suelo cultivado de vid con la mayor presencia de nematodos atacados por endosporas a su cutícula. En un gramo de suelo dispuesto en un tubo de polipropileno de 50 ml, se agregaron 10 ml de agua

destilada y una suspensión de 5 mil J2 frescos y se agitó durante un minuto. Se comprobó que el 100% de nematodos tenía la presencia de endosporas en su cutícula.

Fuente de endosporas de *Pasteuria*

Los J2s con las esporas fijadas a cutícula se inocularon en plantas de tomate de tres semanas de edad siguiendo el procedimiento anterior. Ocho semanas después se aislaron individualmente las hembras adultas de *M. javanica* infectadas para luego ser colocadas en microtubos de polipropileno de 1.5 ml con 1 ml de agua destilada estéril para ser esterilizados y almacenados posteriormente a -20 °C (Davies y Redden, 1997). Según la metodología de Chen *et al.* (1997), para incrementar y conservar el stock de *Pasteuria*, una parte de las hembras adultas se trituraron liberándose las endosporas; se mezcló con un volumen de nematodos juveniles frescos sanos (5000 J2/ml) de *M. javanica* en microtubos de polipropileno (1.5 ml) y se centrifugó durante 5 min a 10.000 g (Hewlett y Dickson, 1993). La mezcla se examinó usando un microscopio invertido (400X) y se comprobó la adherencia de las endosporas a la cutícula de los nematodos.

Esterilización superficial de *M. javanica*

La esterilización de las hembras adultas de *M. javanica* se realizó con hipoclorito de sodio al 1.5% durante 10 minutos para luego enjuagar suavemente por tres veces con agua destilada estéril. Se agregó alcohol al 70% durante 3 min y se lavaron tres veces con 1 ml de agua destilada estéril centrifugando a 1400 g por 5 minutos. Luego se resuspendió con 500 µl de agua destilada estéril para suspender los nematodos (aproximadamente 50 individuos) y colocarlos en placas Petri de vidrio de 6 cm de diámetro y microtubos de 1.5 ml con AN (Agar Nutritivo) y LB (Luria-Bertani) respectivamente. Las placas y microtubos se incubaron a 28 °C durante 96 horas para verificar la ausencia de crecimiento bacteriano.

Extracción de ADN genómico de *P. penetrans*

Se extrajo el ADN de *P. penetrans* a partir hembras adultas de *M. javanica* infectadas estériles según el protocolo de Anderson et al. (1999) con modificaciones. Brevemente, se tomaron 20 hembras adultas de *M. javanica* llenas de endosporas en 500 µl de agua destilada estéril y se maceraron para liberar las endosporas. Luego, 160 µl de suspensión de endosporas se lisaron con 160 µl de fenol saturado con 10 mM de Tris-HCl en pH

8.0 y 160 µl de volumen equivalente de perlas de Braun Glasperlen (0,1 mm de diámetro) con agitación vigorosa. Luego se centrifugó a 24600 g durante 10 minutos y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. El ADN liberado se precipitó en 30 µl de acetato de sodio 3M (pH 5.6), seguido de 300 µl de isopropanol. La mezcla se colocó sobre hielo durante 30 minutos para precipitar del ADN. El ADN recuperado por centrifugación a 24600 g durante 15 minutos se dejó secar al ambiente; por último, se resuspendió el ADN genómico en 20 µl de tampón TE (0.01 M Tris, 0.001 M EDTA, pH 8.0) y se incubó a 65 °C durante 15 minutos con ARNasa. El ADN extraído fue utilizado para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Amplificación del gen 16S ARNr de *P. penetrans*

La técnica de PCR se utilizó para la amplificación del fragmento de 550 pb del gen 16S ARNr de *P. penetrans* (Duan *et al.*, 2003), usando cebadores específicos 617F/1166R a partir del ADN extraído anteriormente. Las reacciones de PCR tuvieron un volumen final de 25 µl usando las siguientes concentraciones: 5 ng de ADN muestra, 10X buffer de PCR (200mM Tris-HCL, pH 8.4, 500 nM KCl), 2.5 nM de Mgcl₂, 0.3 µM de suero Bovino Albúmina, 0,25 nM dNTPs, 15 pM de cada primers, 0,5 unidades de ADN Taq polimerasa y 12.8 µl de agua destilada. Los ciclos de amplificación tuvieron las siguientes condiciones: 95 °C durante 5 minutos, 95 °C durante 1 minuto, 56 °C durante 45 segundos, 72 °C durante 1 minuto durante 35 ciclos, seguido por 72 °C durante 5 minutos. Finalmente, 8 µl de cada producto de PCR fueron migrados en gel de agarosa al 1.5%, 75 voltios por 30 minutos y se visualizó mediante la tinción con bromuro de etidio (0.5 mg/ml) en un transiluminador UV (Cleaver Scientific).

Extracción de ADN y secuenciamiento masivo

Se extrajo el ADN de 3 hembras adultas previamente esterilizadas de *M. javanica* infectadas y 3 hembras adultas no infectadas con *P. penetrans* como control, siguiendo las indicaciones del Kit de aislamiento de ADN PowerSoil® (MoBio, CA, USA). Para estudiar la diversidad y riqueza de las bacterias asociadas a la microbiota endosimbiótica de ambas muestras fueron enviadas a Mr.DNA (www.mrdnalab.com, Shallowater, TX, EE. UU) para ser procesadas y generar el secuenciamiento masivo. Se amplificó la región hipervariable V4 del gen 16S ARNr mediante los cebadores 515f/806r (Caporaso *et al.*, 2011). La reacción de PCR se realizó con el Kit mix HotStarTaq Master Plus (Qiagen, EE.UU.) bajo

condiciones de amplificación fueron; 94 °C durante 3 min, seguido de 28 ciclos de 94 °C durante 30 s, 53 °C durante 40 s y 72 °C durante 1 min, elongación a 72 °C durante 5 min y la secuenciación se realizó mediante la plataforma de secuenciación *Ion Torrent PGM Personal Genome Machine* (PGM).

Análisis y procesamiento de secuencias

Las secuencias generadas por Ion Torrent PGM, fueron procesadas y analizadas utilizando el software bioinformático QIIME versión 1.9.1 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology - <http://qiime.org>) (Caporaso *et al.*, 2011), siguiendo la metodología propuesta por Rojas-Jaime *et al.* (2021, 2022) con modificaciones a la base datos SILVA v128 (<https://www.arb-silva.de/>) (Bokulich *et al.*, 2013; Edgar *et al.*, 2011).

Los índices de alfa y beta diversidad fueron utilizados para asignar las Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs por sus siglas en inglés) finales en base a su riqueza (Chao1), diversidad (Shannon) y estructura de las comunidades bacterianas (diagrama de Venn) en ambas muestras utilizando Rstudio v. 3.2.3. (Vegan v2.5.7, ggplot2 v3.3.3, phyloseq v1.34.0) (RStudio Team, 2015).

RESULTADOS

Caracterización molecular de *P. penetrans*

Los resultados de la caracterización molecular de la bacteria formadora de endosporas que parasita al nematodo agallador, mostró un producto de amplificación de 550 pares de bases (pb) del gen 16S ARNr (Figura 1. Línea 3-6), con una secuencia

del 98% de identidad y homología a *P. penetrans* según la base de datos del BLAST-NCBI (Refseq - National Center for Biotechnology Information) usando los cebadores específicos 617f/1116r, en base a la estandarización experimental de infección y reinfección de esta bacteria en J2 empleando plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Rio Grande).

Análisis y procesamiento de datos de secuenciamiento

Los resultados del secuenciamiento por IonTorrent generaron un total de 114 880 secuencias crudas de bacterias relacionadas a hembras adultas de *M. javanica* infectadas (47 912) y no infectadas (66 968) por *P. penetrans*, con una longitud de lectura promedio de 250 bp (Tabla 1). Seguido las secuencias crudas fueron filtradas con los puntajes de calidad para la curación de datos, se retuvieron 12,852 secuencias con alta calidad con un promedio de 6 426 secuencias en ambas muestras, reveló que alrededor del 70% de las secuencias generadas por IonTorrent, presentaron bajos puntajes de calidad y afectarían los análisis de los datos (Tabla 1).

En las secuencias con alta calidad se identificó 220 OTUs representativos (>0.005%) con una identidad > 97% al gen ARNr 16S bacterianos empleado en el programa de acceso abierto QIIME. A nivel de muestra las hembras adultas infectadas consiguieron altos índices de riqueza y diversidad con 165 OTUs, contrario en las hembras adultas no infectados con 55 OTUs, indicando que la patogenicidad de *P. penetrans* incrementó la diversidad de bacterias (Figura 2A).

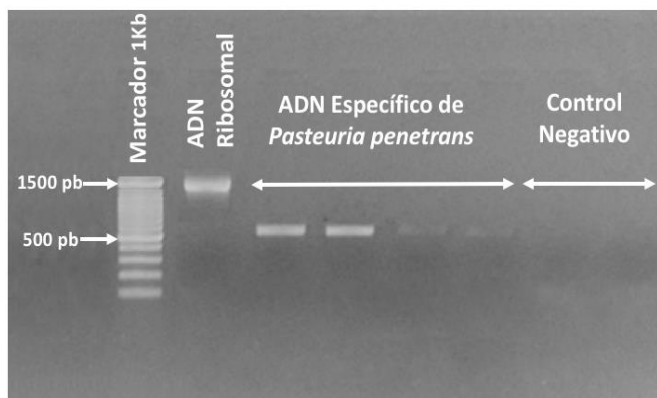


Figura 1. Amplificación del ADN genómico de *P. penetrans* a partir de hembras adultas de *M. javanica* infectadas: Línea 1) Marcador molecular de 1KB; Línea 2) Amplicón del gen 16S ARNr bacteriano con cebadores 27F y 1492R, Línea 3-6) Detección del gen *P. penetrans* con cebadores 617F y 1166R y controles negativos (Línea 7-8).

Con las curvas de rarefacción de las bacterias asociadas en *M. javanica*, se identificó la mayor diversidad bacteriana en hembras adultas infectadas que en las hembras adultas no infectadas (Figura 2B).

Tabla 1. Número total de secuencias con alta calidad en las muestras de *M. javanica* infectadas y no infectadas con *P. penetrans*, a partir del producto del secuenciamiento IonTorrent y 97% identificación.

| Muestras | Secuencias brutas | Secuencias alta calidad |
|---------------|-------------------|-------------------------|
| Infectados | 47912 | 5546 |
| No infectados | 66968 | 7306 |
| Total | 114880 | 12852 |

Con los índices de diversidad Chao1 para la riqueza y Shannon-Weaver para la diversidad. Se observó una mayor riqueza de las bacterias asociadas fue en hembras adultas infectadas con un índice Chao1 promedio= 158.64; contrario a hembras adultas no infectadas con índice de Chao1 promedio= 54.03. Así mismo, los índices de Shannon-Weaver mostraron una mayor diversidad de bacterias asociadas en hembras adultas infectadas; contrario

a hembras adultas no infectadas, indicando que existe un 100% de cobertura en el secuenciamiento y aprobando que los métodos de muestreo y procesamiento de datos fueron razonables, fiables e idóneos para representar la estructura de las comunidades bacterianas (Tabla 2).

Composición de las bacterias a nivel de phylum

La comunidad bacteriana endosimbiontes en hembras adultas infectadas y no infectadas mostró un número de OTUs muy diferente a nivel de phylum. Entre ellos, el phylum más dominante en hembras adultas control fue *Proteobacteria* con 82.76%, seguido de *Bacteroidetes* 9.9%, *Spirochaetae* 0.9%, *Verrucomicrobia* 0.2% y *Gemmatimonadetes* 0.09% indicando una menor riqueza. Contrario en hembras adultas infectadas revelaron la mayor riqueza de phylum *Proteobacteria* con 45.76%, seguido de *Firmicutes* (28.0%), *Actinobacteria* 15.3%, *Bacteroidetes* 4.5%, *Planctomycetes* 4.3% y otros menores al 1% (Figura 3A).

Composición de las bacterias a nivel de género

El número total de OTUs identificados fue de 220 entre las dos muestras a nivel género mediante el secuenciamiento de la región V4 del gen 16S ARNr. 165 géneros de bacterias en hembras adultas

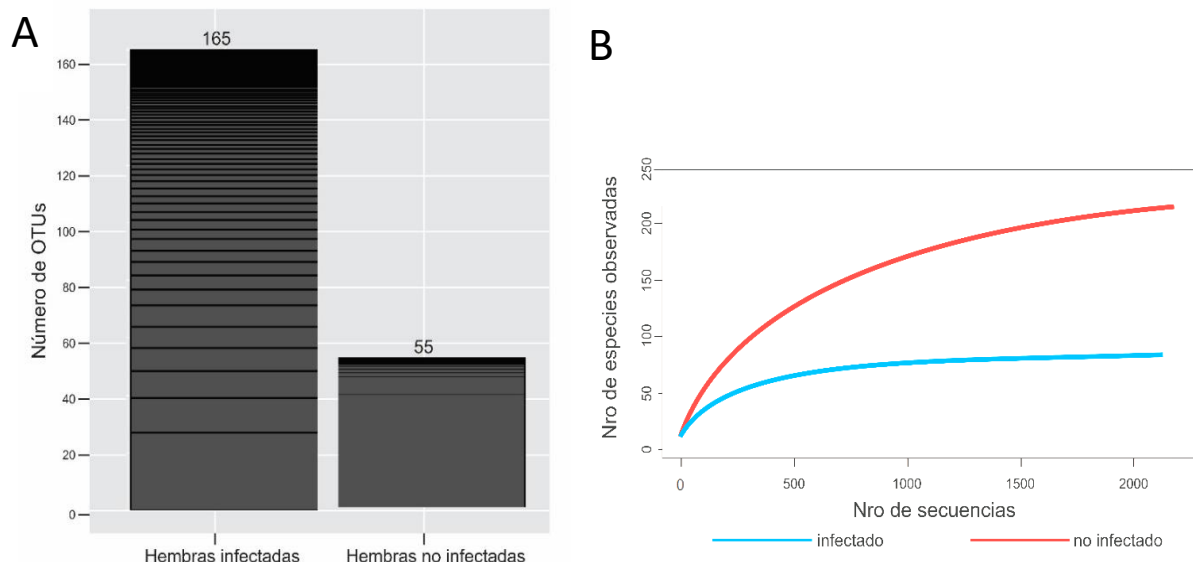


Figura 2. Índices de diversidad. A. En hembras adultas de *M. javanica* infectadas con *P. penetrans* reveló una mayor diversidad microbiana en comparación con 55 OTUs identificados en hembras adultas control. B. Relación de número de OTUS con el número de secuencias analizadas mostró que las hembras adultas infectadas alcanzaron un número mayor con 2350 secuencias y en las muestras control con 2300 secuencias, en tanto se obtuvo 218 especies en hembras adultas infectadas y 89 en las muestras control con un 97% de identificación.

Tabla 2. Los índices de diversidad (Chao1 y Shannon) de ambas muestras.

| Muestras | No Infectado | Infectado |
|---------------|--------------|-----------|
| Media Chao1 | 54.03 | 158.64 |
| Media Shannon | 3.47 | 5.85 |

infectadas fueron identificados y ordenados por su abundancia, entre los principales OTUs dominantes fueron *Paenibacillus*, *Pasteuria*, *Pseudomonas* y *Streptomyces* al 45%, 7%, 6% y 5% respectivamente (Figura 5). En comparación con los 55 géneros de bacterias en hembras adultas no infectadas que fueron identificados y ordenados por su abundancia como: *Pseudomonas*, *Flavobacterium* y *Chitinophaga* al 82,5%, 15% y 2% respectivamente (Figura 3B).

Identificación de la microbiota núcleo

El análisis comparativo entre la microbiota núcleo (MN) y microbiota única (MU) reveló 190 géneros presentes en ambas muestras, 30 (15.8%) de ellos conforman la MN, los mismos que corresponden al Orden *Alphaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*. Cabe mencionar que la MN es considerada si hay más de 10 géneros en dos o más muestras. Así mismo, se identificaron 125 (65.8%) y 35 (18.4%) géneros correspondientes a la MU en los individuos de *M. javanica* infectados y no infectados con *P. penetrans* respectivamente (Figura 4).

DISCUSIÓN

En el presente estudio, analizamos los cambios de la información taxonómica bacteriana endosimbionte de hembras adultas del nemátodo agallador de la raíz, *M. javanica* infectadas con esporas de *P. penetrans* mediante herramientas de secuenciación masivo de ADN en comparación con muestras de hembras adultas no infectadas como control.

Creamos una infección inducida en juveniles J2 frescamente eclosionados con muestras de suelo con alta frecuencia de nemátodos con endosporas adheridas a la cutícula. Los nemátodos con las esporas fijadas siguieron con el proceso de infección en plantas de tomate hasta el desarrollo de hembras adultas.

Los resultados de este estudio demuestran la ventaja del secuenciación masivo en su capacidad de identificar a *P. penetrans* y otras bacterias simbióticas no reportadas. La

estandarización experimental del hiperparasitismo permitió identificar taxonómicamente a *P. penetrans* mediante la amplificación de una porción del gen 16S ARNr con primers específicos (617F/1116R) diseñados por Duan *et al.* (2003), obteniendo resultados similares de la secuencia con 550 pb con alto nivel identificación y homología al 98% con otras secuencias de *Pasteuria* reportadas (Ebert *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 1999; Atibalentja *et al.*, 2000;), comprobando nuevamente que las secuencias de estos cebadores son altamente conservadas para esta especie.

A pesar de que *P. penetrans* es un excelente controlador biológico de nemátodos del género *Meloidogyne*, no crece en medios de cultivo comerciales, por lo que necesita del metabolismo obligado de su huésped, dificultando su masificación *in vitro* a gran escala. Aunque, se pudo cultivar *in vitro* a *P. penetrans* de manera limitada tanto a nivel vegetativo como endosporas, no creció su suficiente para su escalamiento (Schaff *et al.*, 2011). Los resultados de este estudio muestran una comunidad bacteriana simbiótica que coloniza al estadio adulto que podría ser parte de la reproducción de esta bacteria. Esta microbiota nativa en la muestra control obtuvo un claro dominio de *Pseudomonas*, seguido en baja proporción: *Flavobacterium* y *Chitinophaga* entre otras. Otros géneros han sido detectados en hembras adultas de *M. incognita* publicado por Cao *et al.* (2015) con *Acidovorax* y *Agrobacterium* como los más abundantes. Estos resultados taxonómicos desiguales, a pesar de ser especies muy cercanas, son debido a un distinto tipo de secuenciador, base de datos y pipeline usados. Esta diversidad de bacterias relacionadas a estos nemátodos patógenos de plantas, difiere de las pocas bacterias como *Cardinium*, *Wolbachia* y *Xiphinematobacter* descritas por Brown (2018). Estos géneros no han sido identificados en este estudio en ambas muestras a diferencia de *Burkholderia* encontrado en hembras no infectadas. Igualmente, corroboramos con los resultados del microbioma encontrado en especies de *G. rostochiensis* junto a otros géneros como *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Devosia*, entre otros (Oro *et al.*, 2020). De esta forma, posiblemente esta microbiota juega un rol muy importante en el metabolismo del nemátodo como en otros nemátodos del suelo (Dirksen *et al.*, 2016). Por otro lado, funciones ecológicas de una microbiota externa son asociadas con la inducción de defensa de las plantas por algunas especies de bacterias y hongos que fueron adheridos a su cutícula a momento que J2 migra a buscar un hospedero (Elhady *et al.*, 2017).

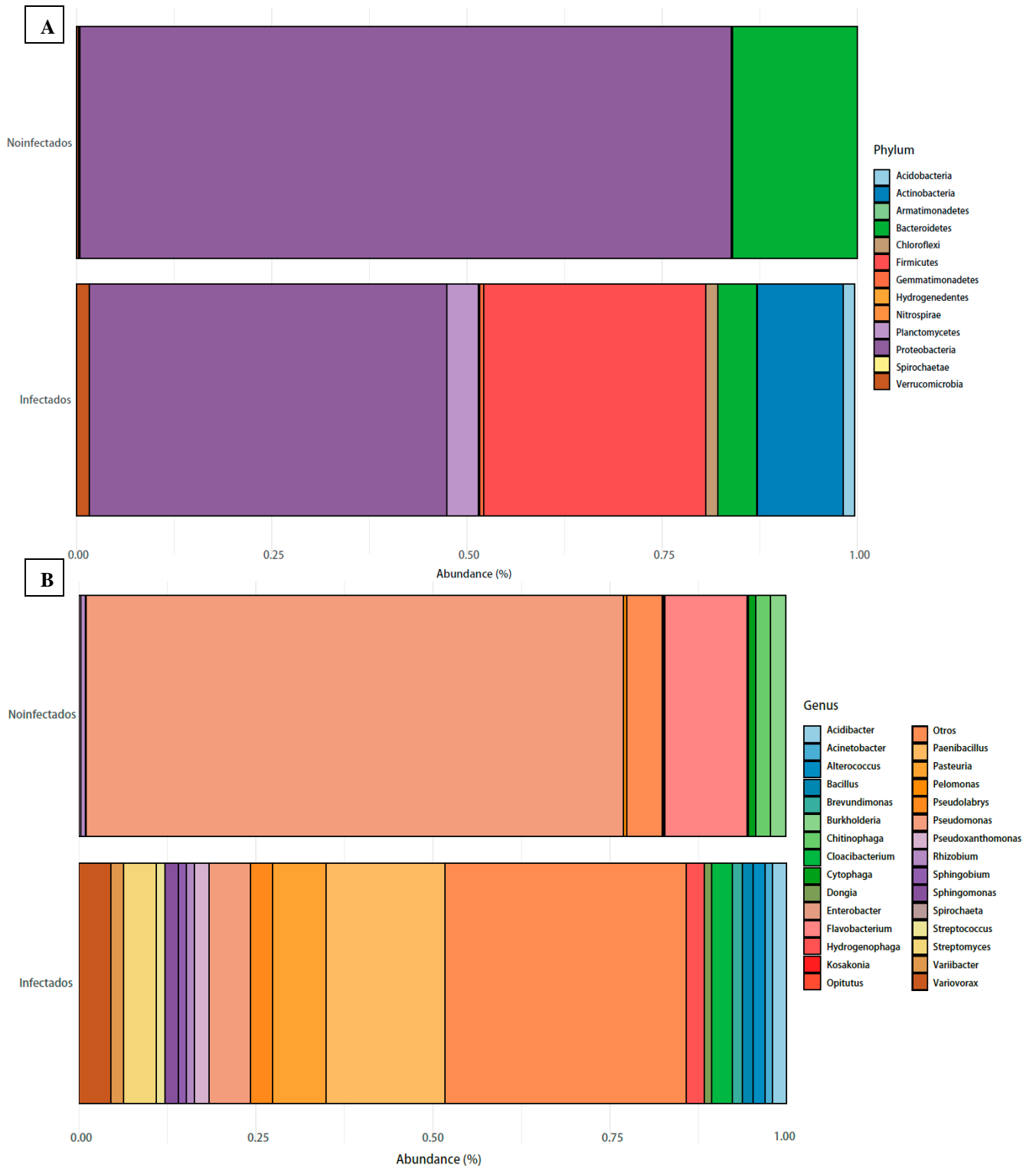


Figura 3. Gráfico de barras apiladas que muestran el cambio en porcentaje de la composición bacteriana en hembras adultas de *M. javanica* infectadas por *P. penetrans* en comparación con el control. A) A nivel de phylum mostrando a *Proteobacteria* como la más abundante en ambas muestras. B) A nivel de género muestra que *Pseudomonas* reduce su abundancia en las muestras de hembras adultas infectadas.

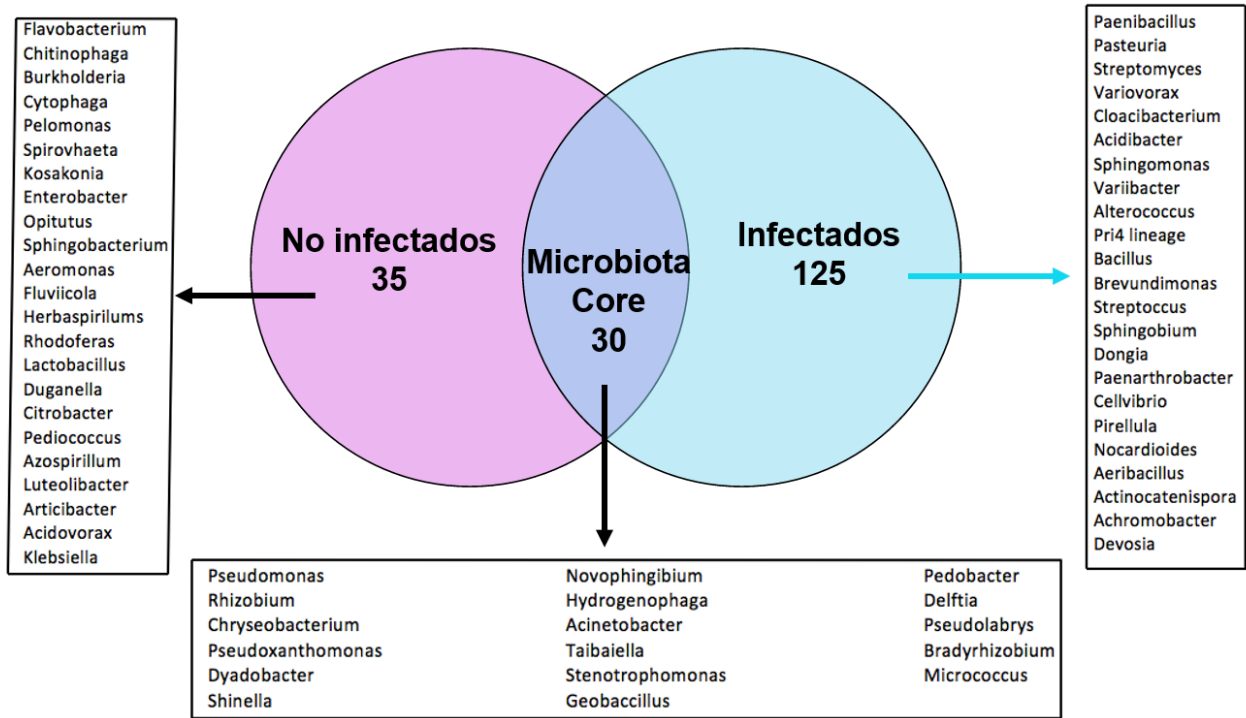


Figura 4. Diagrama de Venn muestra una mayor comunidad bacteriana única en las muestras de hembras infectadas en comparación con el control, en tanto que la microbiota núcleo muestra una comunidad compartida en ambas muestras de hembras adultas de *M. javanica* infectadas y no infectadas por *P. penetrans*.

En individuos de hembras adultas infectadas, reportamos un total de 125 géneros y 35 géneros en las muestras no infectadas, con un total de 30 géneros en la microbiota núcleo. Esta alteración no implica que *Pasteuria* sea el más abundante y significativamente reduce el dominio de *Pseudomonas* en las hembras infectadas favoreciendo la colonización de *Paenibacillus*, *Streptomyces* como otras bacterias que cohabitan con *Pasteuria*. Posiblemente, las interacciones de estas bacterias proporcionan ciertos compuestos, que, en conjunto con otros factores internos del nematodo, optimizan el desarrollo y proliferación de las endosporas. Asimismo, la presencia del género *Paenibacillus* es altamente reportado en microbiotas de muchos metazoos atribuidas a funciones patológicas como en los estadios tempranos de larvas de abejas (Daisley et al., 2020). A nivel de phylum, en hembras adultas no infectadas fueron *Proteobacteria*, seguido de *Bacteroidetes*, *Spirochaetae*, *Verrucomicrobia* y *Gemmatimonadetes*. En hembras adultas infectadas, a pesar de los cambios en el microbioma, reveló que *Proteobacteria* mantiene su mayor presencia, seguido de *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y *Planctomycetes*. Estos cambios en la estructura del microbioma coinciden con la producción de dos proteasas que

B. nematocida B16 libera al interior del intestino del nematodo *C. elegans* conllevando a la muerte (Niu, et al., 2016), mostrado asimismo mayor riqueza taxonómica en los individuos no infectados y comparten muchas de las especies para ambas muestras. Además, el trabajo de Zhang et al. (2017), menciona cambios en la microbiota de *C. elegans*, cuando fue alimentado con diferentes suplementos alimentos. Por otro lado, a nivel funcional, transcritos potencialmente involucrados en la inmunidad innata, señalización, respuesta al estrés son reducidos causados en el inicio de la infección con *P. penetrans* en *M. incognita* (Phani et al., 2018). Otros nematodos patógenos de plantas como *Bursaphelenchus xylophilus* (Xiang et al., 2015), *Heterodera glycines* “Nematodo del quiste” (Nour et al., 2003), *Radopholus similis* (Haegeman et al., 2009), *Globodera pallida* (Eberlein et al., 2016), han descrito una microbiota intestinal mediante herramientas de secuenciación masiva que probablemente estén relacionados con la alimentación, hábitat, virulencia y reproducción en su hospedero.

CONCLUSIONES

Mediante el uso de cebadores específicos (617F/1116R), amplificamos una región del gen

16S ARNr obteniendo una secuencia que obtuvo una homología y similitud del 98% con *P. penetrans* en muestras de hembras adultas de *M. javanica* infectadas, demostrando que estos cebadores son altamente conservados en géneros de *Pasteuria*. Además, este estudio aporta la primera descripción y comparación de la comunidad bacteriana de hembras adultas infectadas y no infectadas de *M. javanica* con *P. penetrans*, identificando cambios importantes en la diversidad y riqueza de los géneros bacterianos, mediante el uso de nuevas técnicas de secuenciación masiva de ADN, amplificando la región V4 del gen 16S ARNr. Estas bacterias endosimbióticas del nematodo cohabitan y probablemente favorezcan el crecimiento de *P. penetrans* junto a otros factores internos del nematodo para lograr replicarse dentro de su hospedero. Nuevas investigaciones a nivel químico para identificar los procesos metabólicos y fisiológicos de la microbiota son necesarias para poder aclarar la reproducción de esta bacteria en el control de nematodos.

Agradecimientos

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (Concytec) del Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (Fondecyt), por su contribución para el financiamiento del presente manuscrito, así como a los técnicos de la empresa IncaBiotec por su aporte invaluable y oportuno en el laboratorio.

Funding. This research was funded by Ciencia Activa grant from Concytec in collaboration with the Universidad Nacional de Tumbes and Inca Biotec.

Conflict of interest. All authors declare not having any conflict of interest in this article that has affected the performance of the same.

Compliance with ethical standards. Do not apply

Data availability. Data is available with the corresponding author upon reasonable request.

Author contribution statement (CRediT). **D. Lindo-Seminario** - Formal analysis, Conceptualization, methodology, Writing – review & editing., **S. Mendez-Farroñan** - Conceptualization, Editing., **J. Canta-Ventura** – Conceptualization, Validation, **J. Córdova-Campos** – Validation, Methodology, Editing., **C. Condemarín-Montealegre** - Methodology, Writing – review & editing, editing., **S. Gutiérrez-**

Calle - Methodology, Writing – review & editing, editing., **E. Mialhe-Matonnier** - Writing – review & editing., **A. Morales-Pizarro** - Conceptualization, Supervision.

REFERENCIAS

- Anderson, J. M., Preston, J. F., Dickson, D. W., Hewlett, T. E., Williams, N. H., and Maruniak, J. E., 1999. Phylogenetic analysis of *Pasteuria penetrans* by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *Journal of Nematology*. 31(3), pp. 319-25. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19270903/>
- Atibalentja, N., Noel, G. R., and Domier, L. L., 2000. Phylogenetic position of the North American isolate of *Pasteuria* that parasitizes the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*, as inferred from 16S rDNA sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(2), pp. 605-613. <http://doi.org/10.1099/00207713-50-2-605>
- Baquiran, J. P., Thater, B., Sedky, S., De Ley, P., Crowley, D., and Orwin, P. M., 2013. Culture-independent investigation of the microbiome associated with the nematode *Acrobeloides maximus*. *PLoS One*, 8(7), pp. e67425. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0067425>
- Barker, K. R., and Hussey, R. S., 1976. Histopathology of nodular tissues of legumes infected with certain nematodes. *Phytopathology*, 66(7), pp. 851-855. <http://doi.org/10.1094/Phyto-66-851>
- Bekal, S., Borneman, J., Springer, M. S., Giblin-Davis, R. M., and Becker, J. O., 2001. Phenotypic and molecular analysis of a *Pasteuria* strain parasitic to the sting nematode. *Journal of Nematology*, 33(2-3), pp. 110. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19266005/>
- Bishop, A. H., and Ellar, D. J., 1991. Attempts to culture *Pasteuria penetrans* in vitro. *Biocontrol Science and Technology*, 1(2), pp. 101-114. <http://doi.org/10.1080/09583159109355190>
- Bokulich, N. A., Subramanian, S., Faith, J. J., Gevers, D., Gordon, J. I., Knight R., Mills D.A. and Caporaso, J.G., 2013. Quality-

- filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature Methods*. Enero de 2013; 10(1), pp. 57-59. <http://doi.org/10.1038/nmeth.2276>
- Brown, A. M., 2018. Endosymbionts of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, 56, pp. 225-242. <http://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-045824>
- Brown, S. M., and Smart Jr, G. C., 1985. Root penetration by *Meloidogyne incognita* juveniles infected with *Bacillus penitans*. *Journal of Nematology*, 17(2), pp. 123. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19294069/>
- Cao, Y., Tian, B., Ji, X., Shang, S., Lu, C., and Zhang, K., 2015. Associated bacteria of different life stages of *Meloidogyne incognita* using pyrosequencing-based analysis. *Journal of Basic Microbiology*, 55(8), pp. 950-960. <http://doi.org/10.1002/jobm.201400816>
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer N., and Knight, R., 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(1), pp. 4516-4522. <http://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>
- Chen, S. Y., Charnecki, J., Preston, J. F., and Dickson, D. W., 2000. Extraction and Purification of *Pasteuria* spp. endospores. *Journal of Nematology*, 32(1), pp. 78-84. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19270952/>
- Chen, Z. X., and Dickson, D., 1998. Review of *Pasteuria penitans*: biology, ecology, and biological control potential. *Journal of Nematology*, 30(3), pp. 313. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19274225/>
- Chen, Z. X., Dickson, D. W., Mitchell, D. J., McSorley, R., and Hewlett, T., 1997. Suppression mechanisms of *Meloidogyne arenaria* race 1 by *Pasteuria penitans*. *Journal of Nematology*, 29(1), pp. 1. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19274127/>
- Condemarin Montealegre, C., Oyola Medina, M., Mialhe, E., Quimi Mujica, J., Astudillo Urbina, S., Gutierrez Calle, S., ... and León Temple, G., 2018. Efecto de bacterias nativas del suelo cultivado y prístino sobre el control del nematodo agallador radicular, *Meloidogyne javanica*. en condiciones in vitro y producción de biomasa. *Arnaldoa*, 25(2), pp. 515-528. <http://doi.org/10.22497/arnaldoa.252.25211>
- Daisley, B. A., Pitek, A. P., Chmiel, J. A., Al, K. F., Chernyshova, A. M., Faragalla, K. M., ... and Reid, G., 2020. Novel probiotic approach to counter *Paenibacillus larvae* infection in honey bees. *The ISME Journal*, 14(2), pp. 476-491. <http://doi.org/10.1038/s41396-019-0541-6>
- Davies, K. G., 2009. Understanding the Interaction Between an Obligate Hyperparasitic Bacterium, *Pasteuria penitans* and its Obligate Plant-Parasitic Nematode Host, *Meloidogyne* spp. *Advances in parasitology*, 68, pp. 211-245. [http://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)00609-X](http://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)00609-X)
- Davies, K. G., and Redden, M., 1997. Diversity and partial characterization of putative virulence determinants in *Pasteuria penitans*, the hyperparasitic bacterium of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Journal of Applied Microbiology*, 83(2), pp. 227-235. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.00223.x>
- Davies, K. G., Kerry, B. R., and Flynn, C. A., 1988. Observations on the pathogenicity of *Pasteuria penitans*, a parasite of root-knot nematodes. *Annals of Applied Biology*, 112(3), pp. 491-501. <http://doi.org/10.1111/jam.13345>
- Dirksen, P., Marsh, S. A., Braker, I., Heitland, N., Wagner, S., Nakad, R., and Schulenburg, H., 2016. The native microbiome of the nematode *Caenorhabditis elegans*: gateway to a new host-microbiome model. *BMC biology*, 14(1), pp. 14:38. <http://doi.org/10.1186/s12915-016-0258-1>
- Duan, Y. P., Castro, H. F., Hewlett, T. E., White, J. H., and Ogram, A. V., 2003. Detection and characterization of *Pasteuria* 16S

- rRNA gene sequences from nematodes and soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(1), pp. 105-112. <http://doi.org/10.1099/ijs.0.02303-0>
- Duponnois, R., and Mateille T., 1999. Beneficial effects of *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas mendocina* for biocontrol of *Meloidogyne incognita* with the endospore-forming bacterium *Pasteuria penetrans*. *Nematology*, 1(1), pp. 95-101. <http://doi.org/10.1163/156854199507901>
- Eberlein, C., Heuer, H., Vidal, S., and Westphal, A., 2016. Microbial communities in *Globodera pallida* females raised in potato monoculture soil. *Phytopathology*, 106(6), pp. 581-590. <http://doi.org/10.1094/PHYTO-07-15-0180-R>
- Ebert, D., Rainey, P., Embley, T. M., and Scholz, D., 1996. Development, life cycle, ultrastructure and phylogenetic position of *Pasteuria ramosa* Metchnikoff 1888: rediscovery of an obligate endoparasite of *Daphnia magna* Straus. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 351(1348), pp. 1689-1701. <http://doi.org/10.1098/rstb.1996.0151>
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., and Knight, R., 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27(16), 2194-2200.38. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>
- Elhady, A., Giné, A., Topalovic, O., Jacquiod, S., Sørensen, S. J., Sorribas, F. J., and Heuer, H., 2017. Microbiomes associated with infective stages of root-knot and lesion nematodes in soil. *PloS One*, 12(5), pp. e0177145. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0177145>
- Félix, M. A., and Braendle, C., 2010. The natural history of *Caenorhabditis elegans*. *Current biology*, 20(22), pp. R965-R969. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2010.09.050>
- Giannakou, I. O., Pembroke, B., Gowen, S. R., and Douloumpaka, S., 1999. Effects of fluctuating temperatures and different host plants on development of *Pasteuria penetrans* in *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology*, 31(3), pp. 312. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19270902/>
- Haegeman, A., Vanholme, B., and Gheysen, G., 2009. Characterization of a putative endoxylanase in the migratory plant-parasitic nematode *Radopholus similis*. *Molecular Plant Pathology*, 10(3), pp. 389-401. <http://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00539.x>
- He, L. X., Wu, X. Q., Xue, Q., and Qiu, X. W., 2016. Effects of endobacterium (*Stenotrophomonas maltophilia*) on pathogenesis-related gene expression of pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) and pine wilt disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), pp. 778. <http://doi.org/10.3390/ijms17060778>
- Hewlett, T. E., and Dickson, D., 1993. A centrifugation method for attaching endospores of *Pasteuria* spp. to nematodes. *Journal of Nematology*, 25(4S), pp. 785. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19279840/>
- Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G., and Perry, R. N., 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 14(9), pp. 946-961. <http://doi.org/10.1111/mp.12057>
- Kokalis-Burelle, N., 2015. *Pasteuria penetrans* for control of *Meloidogyne incognita* on tomato and cucumber, and *M. arenaria* on snapdragon. *Journal of Nematology*, 47(3), pp. 207. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26527842/>
- Li, J., Zou, C., Xu, J., Ji, X., Niu, X., Yang, J., Huang, Z. and Zhang, K. Q., 2015. Molecular mechanisms of nematode-nematophagous microbe interactions: basis for biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review Phytopathology*, pp. 53, pp. 67-95. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120336>

- Luc, J. E., Crow, W. T., McSorley, R., and Giblin-Davis, R. M., 2010. Suppression of *Belonolaimus longicaudatus* with *in vitro* produced *Pasteuria* sp. Endospores. *Nematropica*, pp. 217-225. <https://journals.flvc.org/nematropica/article/view/76260>
- Mauchline, T. H., Knox, R., Mohan, S., Powers, S. J., Kerry, B. R., Davies, K. G., and Hirsch, P. R., 2011. Identification of new single nucleotide polymorphism-based markers for inter-and intraspecies discrimination of obligate bacterial parasites (*Pasteuria* spp.) of invertebrates. *Applied and environmental microbiology*, 77(18), pp. 6388-6394. <http://doi.org/10.1128/AEM.05185-11>
- Morales-Pizarro, A., Javier-Alva, J., Álvarez, L., and Lindo-Seminario, D., 2022. Isolation, identification and *in vitro* evaluation of native isolates of *Bacillus*, *Trichoderma* and *Streptomyces* with potential for the biocontrol of grapevine trunk fungi. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 25(2). <http://doi.org/10.56369/tsaes.4206>
- Murfin, K. E., Chaston, J., and Goodrich-Blair, H., 2012. Visualizing bacteria in nematodes using fluorescent microscopy. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 68, pp. 4298. <http://doi.org/10.3791/4298>
- Niu, Q., Zhang, L., Zhang, K., Huang, X., Hui, F., Kan, Y., and Yao, L., 2016. Changes in intestinal microflora of *Caenorhabditis elegans* following *Bacillus* nematocida B16 infection. *Scientific Reports*, 6(1), pp. 1-11. <http://doi.org/10.1038/srep20178>
- Noel, G. R., Atibalentja, N. D. E. M. E., and Domier, L. L., 2005. Emended description of *Pasteuria nishizawae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(4), pp. 1681-1685. <http://doi.org/10.1099/ijs.0.63174-0>
- Nong, G., Chow, V., Schmidt, L. M., Dickson, D. W., and Preston, J. F., 2007. Multiple-strand displacement and identification of single nucleotide polymorphisms as markers of genotypic variation of *Pasteuria penetrans* biotypes infecting root-knot nematodes. *FEMS microbiology ecology*, 61(2), pp. 327-336. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00340.x>
- Nour, S. M., Lawrence, J. R., Zhu, H., Swerhone, G. D., Welsh, M., Welacky, T. W., and Topp, E., 2003. Bacteria associated with cysts of the soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), pp. 607-615. <http://doi.org/10.1128/AEM.69.1.607-615.2003>
- Orlando, V., Chitambar, J. J., Dong, K., Chizhov, V. N., Mollov, D., Bert, W., and Subbotin, S. A., 2016. Molecular and morphological characterisation of *Xiphinema americanum*-group species (Nematoda: Dorylaimida) from California, USA, and other regions, and co-evolution of bacteria from the genus *Candidatus Xiphinematobacter* with nematodes. *Nematology*, 18(9), pp. 1015-1043. <http://doi.org/10.1163/15685411-00003012>
- Oro, V., Knezevic, M., Dinic, Z., and Delic, D., 2020. Bacterial microbiota isolated from cysts of *Globodera rostochiensis* (Nematoda: Heteroderidae). *Plants*, 9(9), pp. 1146. <http://doi.org/10.3390/plants9091146>
- Phani, V., Shivakumara, T. N., Davies, K. G., and Rao, U., 2018. Knockdown of a mucin-like gene in *Meloidogyne incognita* (Nematoda) decreases attachment of endospores of *Pasteuria penetrans* to the infective juveniles and reduces nematode fecundity. *Molecular plant pathology*, 19(11), pp. 2370-2383. <http://doi.org/10.1111/mpp.12704>
- Rojas-Jaimes, J., Lindo-Seminario, D., Correa-Núñez, G., Diringer, B., 2021. Characterization of the bacterial microbiome of *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus collected from *Pecari tajacu* "Sajino" Madre de Dios, Peru. *Scientific Reports* - *Nature*. <http://doi.org/10.1038/s41598-021-86177-3>
- Rojas-Jaimes, J., Lindo-Seminario, D., Correa-Núñez, G., Diringer, B., 2022. Characterization of the bacterial

- microbiome of *Amblyomma scalpturatum* and *Amblyomma ovale* collected from *Tapirus terrestris* “Tapir” and *Amblyomma sabanerae* collected from *Chelonoidis denticulate* “Motelo”, Madre de Dios-Peru. *BMC Microbiology*. <http://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1466428/v2>
- RStudio Team. RStudio: Integrated Development Environment for R [Internet]. Boston, MA., 2015. Available from: <http://www.rstudio.com/>
- Schaff, J.E., Mauchline, T.H., Opperman, C.H., and Davies K.G., 2011. Exploiting Genomics to Understand the Interactions Between Root-Knot Nematodes and *Pasteuria penetrans*. En: Davies K, Spiegel Y, editores. *Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes: Building Coherence between Microbial Ecology and Molecular Mechanisms* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 91-113. (Progress in Biological Control). http://doi.org/10.1007/978-1-4020-9648-8_4
- Schmidt, L. M., Preston, J. F., Nong, G., Dickson, D. W., and Aldrich, H. C., 2004. Detection of *Pasteuria penetrans* infection in *Meloidogyne arenaria* race 1 in planta by polymerase chain reaction. *FEMS microbiology ecology*, 48(3), pp. 457-464. <http://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.03.011>
- Tian, X. J., Wu, X. Q., Xiang, Y., Fang, X., and Ye, J. R., 2015. The effect of endobacteria on the development and virulence of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Nematology*, 17(5), pp. 581-589. <http://doi.org/10.1163/15685411-00002892>
- Timper, P., Liu, C., Davis, R. F., and Wu, T., 2016. Influence of crop production practices on *Pasteuria penetrans* and suppression of *Meloidogyne incognita*. *Biological control*, 99, pp. 64-71. <http://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.04.013>
- Walker, A. W., Duncan, S. H., Louis, P., and Flint, H. J., 2014. Phylogeny, culturing, and metagenomics of the human gut microbiota. *Trends in microbiology*, 22(5), pp. 267-274. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2014.03.001>
- Xiang, Y., Wu, X. Q., and Zhou, A. D., 2015. Bacterial diversity and community structure in the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* with different virulence by high-throughput sequencing of the 16S rDNA. *PLoS One*, 10(9), pp. e0137386. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0137386>
- Zhang, F., Berg, M., Dierking, K., Félix, M. A., Shapira, M., Samuel, B. S., and Schulenburg, H., 2017. *Caenorhabditis elegans* as a model for microbiome research. *Frontiers in microbiology*, 8, pp. 485. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00485>