



IDENTIFICATION OF EFFECTING PROTEINS BY MALDI TOF/TOF MASS SPECTROMETRY OF THE ROOT-KNOT NEMATODE *Meloidogyne javanica* †

[IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EFECTORAS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI TOF/TOF DEL NEMATODO AGALLADOR DE LA RAÍZ *Meloidogyne javanica*]

José Córdova-Campos^{1,2*}, Pedro G. Calle-Ulfe^{2,+}, Erick Suarez-Peña¹, Sandra Mendez-Farroñan³, David Lindo-Seminario³, Savina Gutiérrez-Calle⁴, Arturo Morales-Pizarro⁵, Virna Cedeño-Escobar⁶, Eric Mialhe-Matonnier⁶ and Carlos Condemarin-Montealegre⁴

¹ Estación Experimental Los Cedros. Dirección de supervisión y monitoreo de estaciones experimentales (DESME). Instituto Nacional de innovación Agraria (INIA), Km 12 Panamericana Norte, Tumbes. Perú. E-mails: stalyva16@gmail.com, esupeantonio@gmail.com

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

³ 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-mail: delindoseminari@gmail.com.pe, sandrajmfar@gmail.com

⁴ Biotecoop. Calle Vilcanota 2263, Villa María del Triunfo, Lima, Perú. E-mails: ccondemarin@gmail.com, savina.gutierrez@gmail.com

⁵ Universidad Nacional de Piura, Campus Universitario s/n. Urb. Miraflores. Piura, Perú. E-mail: dmoralesp@unp.edu.pe

⁶ Inca Biotec S.A.C. Calle Filipinas 212, Tumbes, Perú. E-mails: virna.cedenoescobar@gmail.com, ericmialhe@yahoo.fr

* Corresponding author

SUMMARY

Background: The main problem in grapevine cultivation is root-attachment nematodes cause serious yield problems in most crops worldwide. Through their different infection mechanisms these nematodes synthesize and secrete a mixture of protein-based effectors that they use to penetrate the root, migrate and develop into giant root feeding cells in host plants. The use of new molecular tools such as MALDI TOF/TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight) mass spectrometry and PCR (Polymerase Chain Reaction) technique have allowed us to know these proteins and genes in different microorganisms. **Objective:** To characterize the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by sequencing the 18S rRNA gene from infected root samples and the effector proteins of juvenile (J2) and adult (J4) stage of *M. javanica* by MALDI TOF/TOF shotgun proteomics dual mass spectrometry. **Methodology:** Infected roots of grapevine crop were collected to extract fresh galls and J2 of *M. javanica*, then inoculated on tomato plants. J4 of *M. javanica* were used for genomic DNA extraction and sequencing at the 18S rRNA gene level. The J2 and J4 stages of *M. javanica* were disinfected with sodium hypochlorite (0.5%) and sterile distilled water for protein extraction and analysis with MALDI-TOF/TOF. Finally, the sequences obtained were processed with ProteinPilot™ and Protein BLAST software for the identification of effector proteins of *M. javanica*. **Results:** The nematode *M. javanica* was molecularly identified by PCR amplification of the 18S rDNA gene *M. javanica* with an identity percentage of 98% from infected root samples and by MALDI TOF/TOF mass spectrometry, effector protein sequences were identified such as: Beta-1,4-endoglucan and polygalaturonase, identified from J2, and expansin B2, CLAVATA3/ESR, Pectate lyase and Chorismato mutase from J4, involved in the different infection processes. In

† Submitted August 19, 2022 – Accepted December 7, 2022. <http://doi.org/10.56369/tsaes.4518>



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

ISSN: 1870-0462.

ORCID = José Córdova-Campos: <https://orcid.org/0000-0002-5891-4679>; Erick Antonio Suarez-Peña: <https://orcid.org/0000-0003-0137-8251>; Sandra Mendez-Farroñan: <https://orcid.org/0000-0002-5214-8993>; David Lindo-Seminario: <http://orcid.org/0000-0002-8767-5304>; Carlos Condemarin-Montealegre: <https://orcid.org/0000-0001-7770-4493>; Savina Gutiérrez-Calle: <https://orcid.org/0000-0003-1077-9153>; Arturo Morales-Pizarro: <https://orcid.org/0000-0003-3966-6689>; Eric Mialhe-Matonnier: <https://orcid.org/0000-0002-7952-6907>

addition, we were able to identify 49 nematode non-effector proteins in both stages related to conserved biological development. **Implications:** The results indicate the existence of effector proteins related to root gill formation. **Conclusions:** This study confirms that dual mass spectrometry methodology provides in a rapid and reproducible way a proteomic profile that the galls nematode synthesizes to infect root cells and that can be used in other types of pathogens.

Key words: proteomics; nematodes; peptide profiling.

RESUMEN

Antecedentes: La principal problemática del cultivo de vid son los nematodos agalladores de la raíz causan serios problemas en el rendimiento en la mayoría de cultivos en todo el mundo. A través de sus diferentes mecanismos de infección estos nematodos sintetizan y secretan una mezcla de efectores a base de compuestos proteicos que utilizan para penetrar la raíz, migrar y desarrollarse en células gigantes de alimentación radicular en las plantas hospedadas. El uso de nuevas herramientas moleculares como la espectrometría de masas MALDI TOF/TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight) y la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) han permitido conocer estas proteínas y genes en diferentes microorganismos. **Objetivo:** Caracterizar al nematodo agallador de la raíz *Meloidogyne javanica* mediante la secuenciación del gen ARNr 18S a partir de muestras radiculares infectadas y las proteínas efectoras de juveniles (J2) y adultas (J4) estadio de *M. javanica* mediante la espectrometría doble masa MALDI TOF/TOF de tipo shotgun proteomics. **Metodología:** Las raíces infectadas del cultivo de vid fueron colectadas para extraer agallas y J2 frescos de *M. javanica*, posteriormente se inocularon en plantas de tomate. Se utilizaron J4 de *M. javanica* para la extracción del ADN genómico y su secuenciamiento a nivel del gen ARNr 18S. Los estadios J2 y J4 de *M. javanica*, se desinfectaron con hipoclorito de sodio (0,5%) y agua destilada estéril, para la extracción y análisis de proteínas con MALDI-TOF/TOF. Por último, las secuencias obtenidas fueron procesadas con los softwares ProteinPilot™ y Protein BLAST para la identificación de proteínas efectores de *M. javanica*. **Resultados:** Se identificó molecularmente, a través de la amplificación por PCR del gen ADNr 18S al nemátodo *M. javanica* con un porcentaje de identidad de 98% a partir de muestras radiculares infectadas y mediante espectrometría de masas MALDI TOF/TOF, se identificaron secuencias proteicas efectoras tales como: Beta-1,4-endoglucanas y polygalaturonasa, identificadas a partir de J2, y la expansin B2, CLAVATA3/ESR, Pectato lyasa y Chorismato mutasa a partir de J4, involucradas en los diversos procesos de infección. Además, se lograron identificar 49 proteínas no efectoras del nematodo en ambos estadios relacionadas al desarrollo biológico conservado. **Implicaciones:** Los resultados indican la existencia de proteínas efectoras relacionadas a la formación de agallas de la raíz. **Conclusiones:** Este estudio confirman que la metodología de espectrometría de doble masa proporciona de una forma rápida y reproducible un perfil proteómico que el nematodo agallador sintetiza para infectar las células radiculares y que puede ser usado en otros tipos de patógenos.

Palabras clave: proteómica; nematodos; perfiles peptídicos.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de vid (*Vitis vinifera* L.) es uno de los sistemas agrícolas frutícolas más extensos del mundo. Según el departamento de Agricultura de los EE. UU, la producción mundial de uva de mesa llegó a 21,0 millones de toneladas en el 2015. En el Perú, la producción anual es de 0,51 millones de toneladas: siendo la Región Piura, la segunda mayor productora de uva de mesa. Sin embargo, los mayores problemas para la productividad y rentabilidad de los viñedos son las enfermedades como el oídio (Bendezú y Alvarez, 2012), mildiu, podredumbre del racimo, las enfermedades del tronco (Rodríguez et al., 2015; Pizarro et al., 2022; Morales-Pizarro et al., 2022) y nematodos parásitos de las raíces. Muchos de estos nematodos son ectoparásitos y endoparásitos migratorios (Perry y Moens, 2011).

Los nematodos agalladores de la raíz (en inglés, *Root-knot nematode*: RKN) del género *Meloidogyne*, son considerados como uno de los grupos de fitoparásitos más perjudiciales y económicamente importantes en el

mundo (Chitwood, 2003; Jones et al., 2006; Lilley et al., 2007). El ciclo de vida de los RKN ha sido ampliamente documentado. Este implica cuatro estadios: huevo (J1), segundo juvenil (J2), tercer juvenil (J3), hembra adulta (J4). La primera muda se desarrolla dentro del huevo, luego eclosiona a J2 y se libera en el suelo. Cada J2 busca una nueva raíz, el cual penetra y migra intercelularmente entre las células de la raíz hasta alcanzar el cilindro vascular de la planta y formar el sitio de alimentación que provee los nutrientes necesarios para su desarrollo (Davis et al., 2000; Agrios 2005; Lilley et al., 2007; Baun et al., 2007; Abad et al., 2008; Abad y Williamson 2010; Mitchum et al., 2013; Lindo-Seminario et al., 2022).

La formación del sitio de alimentación es mediada por la secreción de un conjunto de proteínas efectoras que se originan dentro de las células de las glándulas faríngeas del nematodo y son depositadas en el citoplasma de la célula vegetal a través del estilete del nematodo, utilizándolas para modificar la estructura de la pared celular vegetal, imitar la actividad de las proteínas del hospedero, alterar la señalización de las

auxinas, subvertir la señalización de defensa y la respuesta inmune. De esta manera, inicia y mantiene el desarrollo del sitio de alimentación en los hospederos susceptibles (Baum *et al.*, 2007; Davis *et al.*, 2008; Gheysen y Mitchum, 2011; Hewezi, 2015; Mitchum *et al.*, 2013).

La mezcla de proteínas secretadas consiste en una amplia variedad de enzimas que degradan la celulosa, hemi-celulosa o pectina (Abad *et al.*, 2008), tales como beta-1,4-endoglucanasa (Smant *et al.*, 1998), pectinasa (Popeijus *et al.*, 2000), expansina (Qin *et al.*, 2004) y enzimas de desintoxicación que pueden ser capaces de degradar la señalización ROS en las plantas (Bellafiore *et al.*, 2008). También se reportan a proteínas que se unen a los componentes de la pared celular para activar o acelerar el proceso de la digestión, como las proteínas de unión a celulosa y expansinas (Qin *et al.*, 2004). Entre otras proteínas que destacan son las chaperonas que pueden estar implicadas en la secreción de otras proteínas como la tiorredoxina, glutatión peroxidasa, ciclofilinas y la proteína disulfuro-isomerasa (PDI) (Bellafiore *et al.*, 2008). Estas PDIs participan en la polimerización de filamentos de actina, la expresión génica, las interacciones célula a célula y en las funciones de receptor (Tabb *et al.*, 1998). Las ciclofilinas están asociadas con el tráfico de proteínas, plegamiento de proteínas, remodelación de la cromatina y la actividad chaperona (Jones *et al.*, 2006). Otras proteínas efectoras imitan proteínas del huésped, permitiendo la reducción de la defensa de la planta y consecuentemente su infección (Mitchum *et al.*, 2012). Ejemplos de tal mimetismo molecular corresponden a proteínas efectoras con un dominio C-terminal conservado, que es similar a la proteína CLAVATA 3 de la planta (Mitchum *et al.*, 2013) y la proteína efectora 19C07 que sirve para interactuar con las auxinas en la membrana plasmática de la planta (Lee *et al.*, 2011).

Diferentes metodologías y tecnologías han sido utilizadas para estudiar las interacciones nematodo-planta a nivel molecular e identificar los efectores secretados. Los efectores han sido identificados mediante la secuenciación de genómica (Abad *et al.*, 2008, Opperman *et al.*, 2008 y Cotton *et al.*, 2014), análisis transcriptómicos de células de las glándulas esofágicas (Wang *et al.*, 2001); y RT-PCR para analizar secuencias de ADNc de *M. chitwoodi* (Roze *et al.*, 2008).

Recientemente, la técnica de espectrometría de masas MALDI TOF/TOF (del inglés *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization double Time of Flight*) ha sido utilizada ampliamente para estudiar diferentes tipos de moléculas, incluyendo proteínas, péptidos, lípidos y

moléculas pequeñas tales como metabolitos endógenos (Genperline y Li, 2014).

El objetivo del presente estudio estuvo enfocado en la amplificación por PCR usando los cebadores SSU18A y SSU26R para confirmar la identificación de *M. javanica* como el responsable de la infección en las muestras de vid realizadas. El propósito central está enfocado en la identificación y caracterización de proteínas, en particular de tipo efectores que son secretados al inicio de la infección en J2 en comparación con J4, que mantiene el sitio de alimentación del nematodo agallador mediante MALDI TOF/TOF. Esta rápida y poderosa técnica es usada por primera vez en nematodos patógenos que complementa al estudio de los demás estudios ómicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestra, ubicación y mantenimiento

El área de muestreo de plantas de uva de mesa variedad Red Globe de patrón Freedom con raíces altamente infectadas de nematodos agalladores estuvo ubicada en el sector 16 de la empresa productora Ecosac Agrícola SAC (5° 7' 6.45" y 80° 35' 53.13"), localizada en el caserío de Chapairá, distrito de Castilla, provincia de Piura, Región de Piura. Cada muestra de raíces infectadas se colocó en bolsas de polietileno, para luego ser transportadas al laboratorio, en una caja térmica acondicionada con gel pack a 10 °C para su posterior análisis.

Los diferentes estadios del nematodo (J1, J2 y J4) se aislaron a partir de las agallas más grandes, de acuerdo con el método de Hussey y Barker (1973) y ligeramente modificado por Condemarín *et al.*, (2018) y Lindo-Seminario *et al.* (2022). Brevemente, cada agalla se lavó varias veces hasta retirar la arena y residuos externos, se desinfectó con lejía comercial al 1% por 5 min para luego enjuagar varias veces con agua destilada estéril. Luego cada agalla grande (10 g aprox.) se cortó en pequeños fragmentos de 0,5 cm y se trituraron usando una licuadora a mínima velocidad por 10 s. La masa de tejidos licuados se vertió en un contenedor de vidrio y se enjuagó vigorosamente con lejía comercial al 1 % durante 5 min., para romper la matriz gelatinosa y liberar J1. Rápidamente, dentro de un sumidero, se vertió la suspensión de J1 en un sistema de tamices, enjuagando con agua corriente. Con el uso de una piseta y una suave corriente de agua se colectaron los J1 a partir del tamiz de 38 µm en un tubo de polipropileno de 50 mL para luego almacenarlo a 4 °C, para su posterior utilidad.

Para el aislamiento de J2, se colocó una cesta de nylon sobre una placa Petri de 10 cm de diámetro, con una distancia de 1 cm entre la cesta y la base de la placa;

sobre la cesta se colocó una hoja de papel absorbente comercial y se vertió una parte de la colecta de la suspensión J1 (40 mL aprox.). Los J2 frescos se colectaron entre el segundo y cuarto día de eclosión.

Por otro lado, J4 se aislaron manualmente a partir del interior de las agallas usando bisturí y estiletes estériles con la ayuda de un estereoscopio. Cada estadio del nematodo se desinfectó con lejía comercial al 0,5 % por 10 min., se enjuagó cinco veces con agua estéril y se corroboró su asepsia colocándolos en placas Petri con medio de cultivo Luria Bertani (LB) por 72 h, hasta comprobar que ningún microorganismo crezca.

El mantenimiento de nematodos se realizó en plantas de tomate. Mensualmente, se aplicaron mil individuos de J2 en plantas de tomates de tres semanas de edad, sembrados en potes de plástico conteniendo 500 g de sustrato premix Sunshine #8 (Sunshine Sun Gro Horticulture, Bellevue, WA). Las plantas se regaron cada semana y se fertilizaron cada 15 días, utilizando solución nutritiva hidropónica comercial La Molina bajo condiciones de invernadero.

Identificación molecular del nematodo agallador de la raíz mediante PCR

Para la extracción de ADN se tomaron cinco J2 de *M. javanica* (desinfectadas como anteriormente fue descrito), depositándolas en un tubo de 0,2 mL que contiene NaOH a 0,25 M por 16 h y después se incubó a 95 °C por 3 min., luego se adiciona 4 µL de HCL, 10 µL de buffer Tris-HCL a 0,5 M con pH 8,0 y 5 µL de Triton X-100 al 2 %, inmediatamente se incubó a 94 °C por 3 minutos y luego mantenerlo a -20° C, hasta realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las reacciones con un volumen final de 25 µL contiene: 2,25 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 1,3 unidades de ADN polimerasa, 75 ng de primers SSU18A (AAAGATTAAGCCATGCATG) y SSU26R (CATTCTTGCAAATGCTTTTCG) (Blaxter *et al.*, 1998). Las condiciones de los ciclos de la PCR fueron: primer ciclo de 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos (94°C por 1 minutos y 30 s, 68 °C por 2 minutos), 68 °C por 1 minuto. El producto de PCR se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % y las bandas se visualizaron por tinción con bromuro de etidio, en un transiluminador UV. El producto de PCR fue enviado secuenciar a un proveedor de servicios Macrogen Co. Ltd. (South Korea).

Extracción de proteínas de J2 y J4

A partir de las plantas de tomate infectadas con nematodos, se extrajo 25 mil J2 y 500 J4, las cuales fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 0,5 %

por 10 min y se lavaron cinco veces con agua destilada estéril.

El contenido de nematodos se dejó sedimentar, para descartar el sobrenadante y se procedió a la extracción de proteínas agregando 100 µL de buffer de extracción (8 M de urea, 20 mM de 1,4-Dithiothreitol (DTT), 100 mM de Tris, 0,75 mM de Fluoruro de Fenil metanosulfonilo (PMSF) y 4% de 3-[(3-Colamidopropil) dimethylammonio]-1-propanosulfonato hidratado (CHAPS) a pH = 8, subsecuentemente se procedió a sonicar por 10 min y luego se incubó en hielo por 30 min, siendo homogenizada ligeramente cada 15 min. y se centrifugó (Centurion Scientific Ltd, UK) a 3 800 rpm durante 15 min., a 4 °C (Cañuelo y Peragón, 2013). El sobrenadante fue utilizado para el análisis proteómico de J2 en digestión en solución y J4 en SDS PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico).

Separación y digestión de proteínas en electroforesis en gel unidimensional de J2 y J4

Se procedió a la preparación del gel de separación al 12%, siguiendo el protocolo de Leammli (1970) con ligeras modificaciones. Se depositaron 30 µL de proteínas, mezclado con 20 µL de buffer de corrida, para posteriormente incubarlo en baño seco a 95 °C por 5 min., se enfrió y se depositó en pozos del gel, sometiénolas a un campo eléctrico de 90 V, 50 A durante 3 h. En la digestión de proteínas se modificó ligeramente del protocolo de Sebastiana *et al.* (2013). Brevemente, cada banda seleccionada y separada se agregó 100 µL de bicarbonato de amonio a 100 mM más acetonitrilo a un volumen 1:1, la mezcla se incubó con agitación ocasional por 30 min., transcurrido el tiempo se eliminó la solución y se adicionó 100 µL de acetonitrilo al 100 %. El contenido se incubó a temperatura ambiente hasta que las piezas de gel se tornaron blancas. Posteriormente se agregó buffer tripsina a 13 ng/µL a 4 °C durante 2 h, después se incubó a 37 °C por 4 h. Seguidamente se adicionó 50 µL de buffer de extracción (5 % ácido fórmico/acetonitrilo a una proporción 1:2 en volumen) y se incubó a 37 °C por 15 min con agitación ocasional. Posteriormente se centrifugó a 800 rpm por 1 min., y se tomó una alícuota de 10 µL y se llevó a sonicar por 5 min., y luego se procedió a secar. Luego se adicionó 2 µL de TFA al 0,1% en agua grado HPLC y 2 µL de matriz CHCA (α-cyano-4-hidroxicinámico acid) a 10 mg/mL, después se homogenizó y se depositó 1 µL de la muestra por duplicado en la placa Opti ToF, para su análisis por MALDI-TOF/TOF (5800, AB SCIEX System).

Digestión en solución de proteínas extraídas de J2 y J4

Tomamos 10 μL de la solución de proteínas extraídas a partir de J2 y se incubó a 30 °C durante 1 min., para luego adicionar 5 μL de DTT a 45 mM y se incubó a 60 °C durante 5 min.; 5 μL de IAA a 100 mM por 30 min a temperatura de ambiente y en oscuridad. Luego se agregó 2 μL de tripsina (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), completando el contenido a 100 μL con agua HPLC. El contenido se incubó a 37 °C durante 4 h, después se detuvo la digestión agregando 5 μL de TFA al 10%. Se mezcló 1 μL de TFA al 0,1% en agua grado HPLC y 1 μL de matriz CHCA, para depositar en la placa Opti Tof.

Análisis de proteínas J2 y J4 por espectrometría de masas

La identificación de proteínas se obtuvo a partir de un sistema analizador proteómico MALDI-TOF/TOF (5800, AB SCIEX System), Los espectros fueron captados en modo MS, reflector positivo con un láser Nd: YAG de 349 nm con una intensidad de laser 2800 y una velocidad de 600 $\mu\text{m}/\text{s}$, 750 disparos dentro de un rango de masas entre 800-4000 m/z, y procesados en el software ProteinPilot™ (V. 4.0 software (Sciex).); para la calibración del equipo se utilizó un kit Mass Standards AB SCIEX TOF/TOF™ Instruments. Las secuencias no detectadas por el programa ProteinPilot™, fueron analizadas mediante Protein BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

RESULTADOS

Identificación molecular del nematodo agallador de la raíz

Los resultados de la extracción de ADN genómico de nematodos agalladores de raíces de muestras de raíces infestadas en plantas de uva, mostraron una secuencia de 843 nucleótidos del gen 18S ARNr, con una

similitud del 98% y un Query cover de 99% para la accesión KP901063.2 de *M. javanica* aislada de pastos, en Carolina del Norte, EE. UU., por Ye *et al.* (2015).

Tabla 1. Identificación molecular del nematodo *M. javanica* mediante la amplificación de la cadena de la polimerasa del gen ADNr 18s.

Especie	Query cover	Identidad	No de Accesión del Gen Bank
<i>M. javanica</i>	99%	98%	KP901063.2

Identificación de proteínas de J2 y J4 de *M. javanica* usando MALDI TOF/ TOF.

Se procesaron repetidas muestras de diferentes individuos para optimizar los resultados, sin embargo, las muestras de proteínas espoteadas de J4 en digestión en solución y las muestras de J2 por gel no mostraron los espectros para ser analizados en el presente trabajo. Los datos espectrómetro de masas MALDI TOF/TOF revelaron 47 proteínas presentes en J4, según Protein BLAST, mostrando a: ASU, kinasa 7, kinasa 1, expansin B2, kinasa, cisteína, cisteína tipo catepsina 1, proteína de colágeno, actin, proteína de shock térmico 70, Sup-17, CAEBREM, CELE, FAM43A, aminoacidopeptidase N, péptido 11 tipo FMRF amide, dual oxidasa, CLAVATA3/ESR, guanilil ciclasa, acetilcolinesterasa 1, proteína de esperma principal, posible precursor de proteína avilurencia, S9A/B/C, pectato liasa unc-87, DAF-16/FOXO, nucleasa, sidekick-1, fosfolipasa D, proteína del dominio al pH, CBR-RPL-2, ZC3H3, proteína clase X de receptor serpentina, proteína hipotética T14E8.9, proteína hipotética W09B6.2, proteína 11 secretora localizada en las glándulas esofágica, proteína 21 secretora de las células de las glándulas esofágicas, Chorismate mutase (Tabla 2).

Tabla 2. Identificación de proteínas efectoras de J4 de *M. javanica*, mediante MALDI TOF-TOF.

Mejor secuencia	Prec m/z	Nombre de la proteína	Identidad	N° de Accesión del Gen Bank
ATGAMLTYLKCPGSIK	1754.79	Expansin B2 [<i>G. rostochiensis</i>]	100%	ACV31260.1
TGISPAGPDTRHHQDTTLEQEK	2574.16	CLAVATA3/ESR-like protein [<i>G. pallida</i>]	100%	AIG22062.1
SCGDCGEQGHR	1288.61	Pectate lyase [<i>M. incognita</i>]	75%	AAQ09004.1
DALKAMVKGKDLCPAC	1776.8	Chorismate mutase [<i>M. incognita</i>]	94%	AAR37373

De las 47 proteínas, cuatro mostraron homología a proteínas efectoras de nematodos (Tabla 3a, Tabla 3b y Tabla 3c), estas proteínas son: *ExpansinB2* de *G. rostochiensis* con precursor masa/carga (m/z) de 1754.792 (ATGAMLTYLKCPGSIK), CLAVATA3/ESR-like de *G. pallida* con precursor m/z= 2574.1641 (TGISPAGPDTRHHQDTTLEQEKR), Pectate lyase de *M. incognita* con precursor m/z= 1288.606 (SCGDCGEQGHKR) y Chorismato mutasa 2 de *M. incognita* con precursor m/z= 1776.798 (DALKAMVKGKDLCPAC). Las relaciones de masas/cargas de cada proteína mencionada se presentan en la Figura 1. Estas proteínas fueron extraídas de los spots de electroforesis SDS-PAGE unidimensional.

En J2 de *M. javanica* nematodo, los datos mostraron 13 proteínas que presentaron de 10 a 29 aminoácidos

(Tabla 4), tales como: Acetil-CoA, aciltransferasa, papilín, Beta-1,4-endoglucanasa, unc-13, proteína tipo LETM1, proteína hipotética CAEBREN, proteína hipotética ANCDUO, polygalacturonasa, proteína hipotética WUBG, proteína hipotética CBG, proteína no caracterizada CELE, proteína hipotética CRE.

De las 13 proteínas, tres son proteínas efectoras (Tabla 5a y Tabla 5b), tales como: Beta-1,4-endoglucanasa de *M. incognita* con precursor m/z = 1657.824 (RDFMKTQNNGITGC) y otra beta-1,4-endoglucanasa de *Heterodera glycines* con precursor m/z = 2574.164 (RGAMGVDVDEGGYLSDANTAYNLMVAV), polygalacturonasa de *M. incognita* con precursor m/z = 1045.577 (ASNAIDELGR), los precursores se muestran en la Figura 2.

Tabla 3. Identificación de proteínas no efectoras de hembras adultas de *M. javanica* en electroforesis unidimensionales.

Mejor secuencia	Descripción	Identidad	Nº de Accesoión
AGNYPDLLIGTDSSQR	Inactive tyrosine-protein kinase 7 [<i>Trichinella nativa</i>]	100%	KRZ52093.1
DDAPVGDDAESKERR	S-phase kinase-associated protein 1 [<i>Globodera rostochiensis</i>]	100%	AHW98770.1
AGDGYVERHCRR	Protein tyrosine kinase [<i>Ancylostoma ceylanicum</i>]	100%	ERG81778.1
EPLGLCAEDKFMANKQMGSF	Hypothetical protein ASU_10431 [<i>Ascaris suum</i>]	92%	ERG81284.1
EQSQRDKMMAAEKR	Hutative cysteine proteinase [<i>Heterodera glycines</i>]	100%	AAL78220.1
TPTERMSALRQMIER	Cathepsin L-like cysteine proteinase [<i>Heterodera glycines</i>]	100%	AAS84611.1
AGGSYAGGGGGGGYR	Nematode cuticle collagen and Collagen triple helix repeat	100%	CDJ89430.1
AGDAGAPGPAGRPGPAGPPG	Putative cuticle collagen [<i>Toxocara canis</i>]	100%	KHN72671.1
AGQAEIVYIDYGNR	Tudor Staphylococcal Nuclease homolog [<i>C. elegans</i>]	100%	NP_494839.1
FGKRMPQVLR	FMRFamide-related peptide FLP-18 precursor [<i>M. incognita</i>]	100%	AAW564.1
SYELPDGQVITVGNR	Actin 1 [<i>Heterodera glycines</i>]	100%	AAG47837.2
NQVAMNPSNTVFDAR	Heat shock protein 70 [<i>Meloidogyne enterolobii</i>]	100%	AHG55039.1
KDMSSNPRALR	Heat shock 70 kDa protein [<i>Trichinella papuae</i>]	100%	KRZ69868.1
ASGFSDNASEKPLRIR	Sup-17 [<i>Pristionchus pacificus</i>]	100%	KKA69458.1
DNKRRKEEESKAKRE EEEQR	Hypothetical protein CAEBREN_22347 [<i>C. brenneri</i>]	100%	EGT39498.1
AFKELFKECQEGIR	Hypothetical protein CAEBREN_29332 [<i>C. brenneri</i>]	100%	EGT44262.1
QSQANLVMRSLQER	Protein FAM43A [<i>Trichinella pseudospiralis</i>]	100%	KRY87214.1
NTTMVGTLPKNKR	Aminopeptidase N [<i>Trichinella zimbabwensis</i>]	100%	KRZ06210.1

Mejor secuencia	Descripción	Identidad	Nº de Accesoión
WRLQRRALMDNSRGGVDEDAG	FMRFamide-like peptide 11 [<i>Radopholus similis</i>]	100%	ABU94332.1
NDKGNLISMSQNAQR	Nuclear localized Metal Responsive [<i>C. elegans</i>]	100%	NP_498627.1
AQHLLGFRDEMGMFVMR	DAF-16/FOXO Controlled, germline Tumor affecting [<i>C. elegans</i>]	100%	NP_508979.2
AGQAEIVYIDYGNR	Tudor Staphylococcal Nuclease homolog [<i>C. elegans</i>]	100%	NP_494839.1
AGYIDGFKEGTSSR	Protein sidekick-1 [<i>Ascaris suum</i>]	100%	ERG87344.1
DSFVAYMDPRTEEIR	PhosphoLipase D [<i>C. elegans</i>]	87%	NP_494939.1
AGQASNPPGTIAGGSER	PH domain protein [<i>Ancylostoma duodenale</i>]	100%	KIH55157.1
GASKLRPLDYAER	CBR-RPL-2 protein [<i>C. briggsae</i>]	100%	XP_002638552.1
CEDKASEVDEMERR	Zinc finger cch domain-containing protein 3 [<i>Ascaris suum</i>]	93%	ERG85554.1
CSMKKISNRTEALYASR	Serpentine Receptor, class X [<i>C. elegans</i>]	100%	NP_505423.1
GAPMNQPTSTQKPKVV	Hypothetical protein T14E8.3 - <i>Caenorhabditis elegans</i>	100%	T16876
DHPVEIVQKMETRR	Hypothetical protein W09B6.2 - <i>Caenorhabditis elegans</i>	100%	T32410
ASKANPENGELYGGGKR	Unnamed protein product [<i>Haemonchus contortus</i>]	88%	CDJ84323.1
IDKYDKKRADEAAR	Esophageal gland-localized secretory protein 11 [<i>Heterodera glycines</i>]	100%	AJR19779.1
MNSVKEIDREIEGR	Putative esophageal gland cell secretory protein 21 [<i>M. incognita</i>]	100%	AAN08587.1

DISCUSIÓN

En este estudio, los nematodos que afectan a los cultivos de uva de la empresa Ecosac Agrícola SAC fueron identificados y caracterizados molecularmente a partir de la secuencia del gen marcador 18S mostrando un 98% de homología y un Query cover de 99% para el nematodo agallador de la raíz *M. javanica* según la base de datos del GenBank, gracias a los estudios previos de Floyd *et al.*, (2002) y Nakaewa *et al.*, (2013) mediante la secuenciación de productos de amplificación por PCR usando los cebadores SSU18A y SSU26R. De esta manera, las muestras de nematodos tomadas de campo e infectadas en plantas sanas es un método simple de demostración de parasitismo y la obtención de mayor número de muestras necesarias para las pruebas de identificación molecular. Así, nuestros resultados ratifican que las secuencias de estos cebadores son altamente conservadas entre los nematodos agalladores radiculares y que la amplificación de PCR y el resultado de su secuencia descrito aquí es un método simple, rápido y confiable para la identificación general de este grupo de nematodos.

Por otro lado, la capacidad de ataque de los nematodos depende de J2 al lograr penetrar la raíz y vencer las

primeras barreras del hospedero. El J2 migra intracelularmente a través de la inyección, vía estilete, de enzimas degradadoras de la pared celular (Favery *et al.*, 2016). Luego de migrar, estos parásitos escogen y transforman cinco a ocho células continuas del tejido vascular en células gigantes hipertrofiadas y establecen su infección mediante la secreción intracelular. Esta secreción es un complejo de proteínas o efectores que modulan, mimetizan y a la vez bloquean algunas proteínas de defensa de la planta (Hewezi, 2015), que son necesarias para desarrollar y mantener el sitio de alimentación que posteriormente evoluciona en agallas de hospederos susceptibles. En este estudio, la identificación de estos efectores a partir de las muestras de nematodos J2 y J4, fueron primero extraídos tanto en solución como en geles unidimensionales que posteriormente coprecipitan en una matriz de analito o spot que se ionizan suavemente mediante el pulso de uno a varios laser. Los compuestos son fragmentados y viajan dentro un campo eléctrico del espectrómetro de masas y se registran en un detector midiendo la relación masa-carga produciendo los espectros que son analizados por el software Data Explorer del MALDI, version 3.5 (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany). Los spots con espectros de mayor carga son nuevamente disparados con láser para un segundo vuelo e ionizados

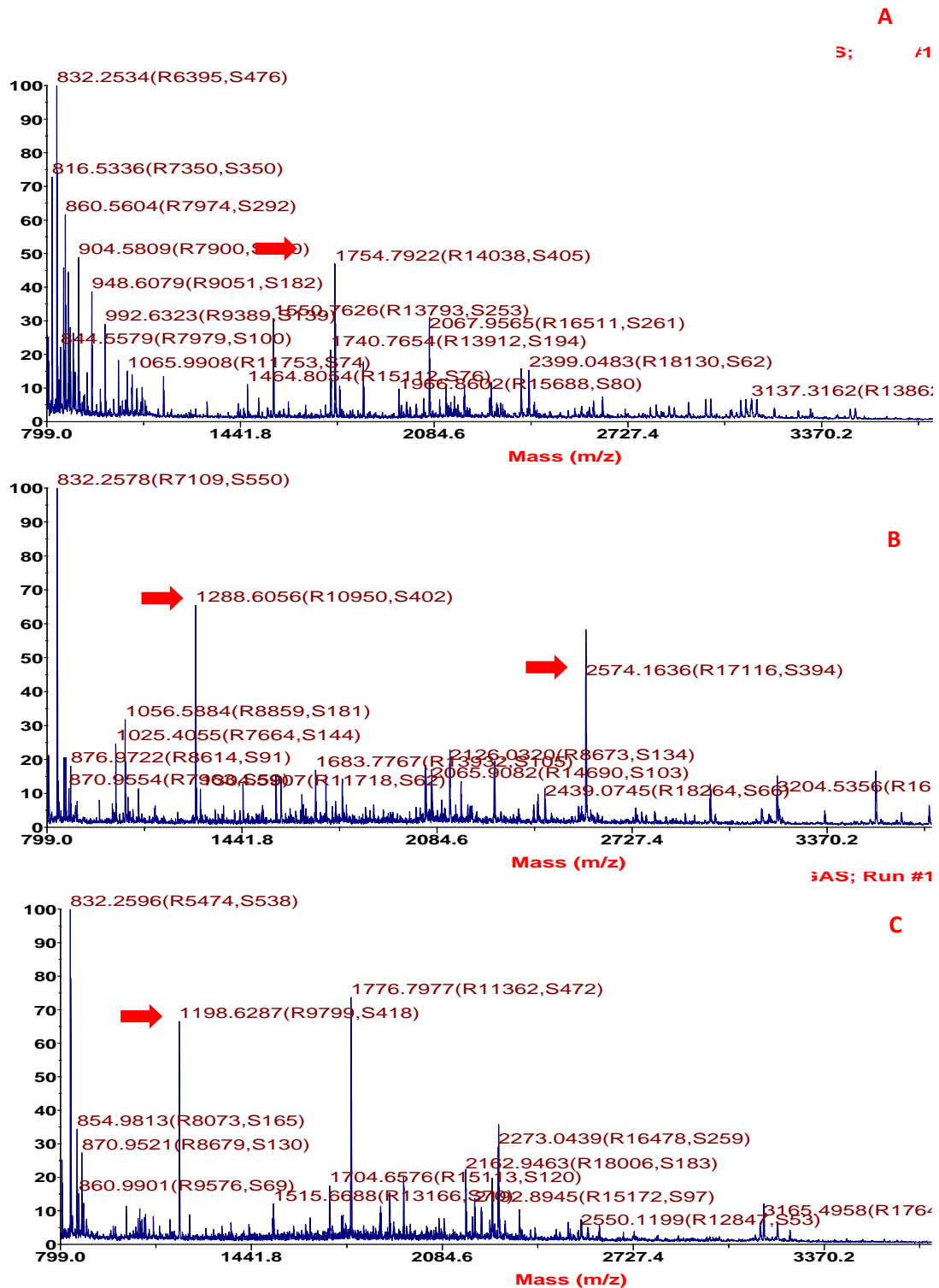


Figura 1. Se muestran los precursores M/Z de los aminoácidos identifican. (C) En la flecha de color rojo indica el espectro M/Z (1776.7977) de la secuencia que identificó la proteína chorismato mutasa de *M. incognita*.

Tabla 4. Identificación de proteínas efectoras mediante MALDI TOF/TOF a partir de J2 de *M. javanica* procesadas en digestión en solución.

Mejor secuencia	Prec m/z	Nombre	Identidad	Nº de Accesoión
RDFMKTQNNGITGC	1657.82	Beta-1,4-endoglucanase (<i>M. incognita</i>)	100%	AAK21883.2
RGAMGVDVDEGGYLS DANTAYNLMVAV	2574.16	Beta-1,4-endoglucanase [<i>H. glycines</i>]	100%	AAC48327.1
ASNAIDELGR	1045.58	Polygalacturonase <i>M. incognita</i> PE=25V	100%	AAM28240.1

Tabla 5. Identificación de proteínas no efectoras a partir de J2 de *M. javanica* procesadas en digestión en solución.

Mejor secuencia	Descripción	Identidad	Nº de Accesoión
AGISPSEIDETMVGCVLTSCHGQN IAR	acetyl-CoA acyltransferases family protein [<i>Brugia malayi</i>]	100%	XP_001895827.1
GAFESWYYEVATGSCVTFKYTG CGGNANR	Papilin [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	97%	NP_505017.1
CRELLSADCLQRAAEKSTKHGE ADR	Phorbol ester/diacylglycerol-binding protein unc-13 [<i>C. elegans</i>]	100%	NP_001021873.1
ADDKQIASEGGVEALSTIDLQQA CRAR	LETM1-like protein [<i>Necator americanus</i>]	100%	XP_013294749.1
LKTAELYDYRTDSWTEIANMQQ AR	Hypothetical protein CAEBREN_00595 [<i>C. brenneri</i>]	100%	EGT36186.1
AANADAASKNTNGSGGGGTSM DVRPAPLNGK	Hypothetical protein ANCDUO_05048 [<i>Ancylostoma duodenale</i>]	100%	KIH64640.1
DGKEIERQSDSNMIIANDGSLIIS AAR	Hypothetical protein WUBG_08621 [<i>Wuchereria bancrofti</i>]	100%	EJW80468.1
MMDPRVLQQMGGMGGLQNMM QQMAR	Hypothetical protein CBG16436 [<i>C. briggsae</i>]	100%	XP_002647138.1
QLLHTREGATLQASYEDEEDAY HAR	Uncharacterized protein CELE_ZK524.2 [<i>C. elegans</i>]	100%	NP_001250502.1
APDQSVAISTIK	Hypothetical protein CRE_13345 [<i>C. remanei</i>]	100%	XP_003107561.1

que luego son detectados, creando la secuencia de péptidos. Estos péptidos de secuencia corta son asignados a una base de datos conocida (Mann *et al.*, 2001). Los resultados del espectrómetro de masas generaron una lista de 90 secuencias peptídicas (mayores a 10 péptidos) asignadas según la base de datos de ProteinBank. Sin embargo, ninguna secuencia coincidió (*match*) con la base de datos de UniProt, usando la herramienta ProteinPilot™ versión 4.0 (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany).

Dentro de los péptidos asignados, la proteína *Expansin B2* fue detectada en J4 de *M. javanica*, con una identidad del 100% a *G. rostochiensis* y coincide con la variabilidad de la familia de esta proteína observada en nematodos del quiste (Stare *et al.*, 2012; Quin *et al.*, 2004). Además, Popeijos *et al.*, (2000) reportaron su presencia a nivel del J4 de *M. javanica* y *P. penetrans* (Vieira y Nemchinov, 2020), los que determinaron la función de esta proteína es similar a la *Expansin* de la planta y que apoyan la hipótesis de origen procariótico a través de la transferencia horizontal de genes necesarios para la infección (Kudla *et al.*, 2005).

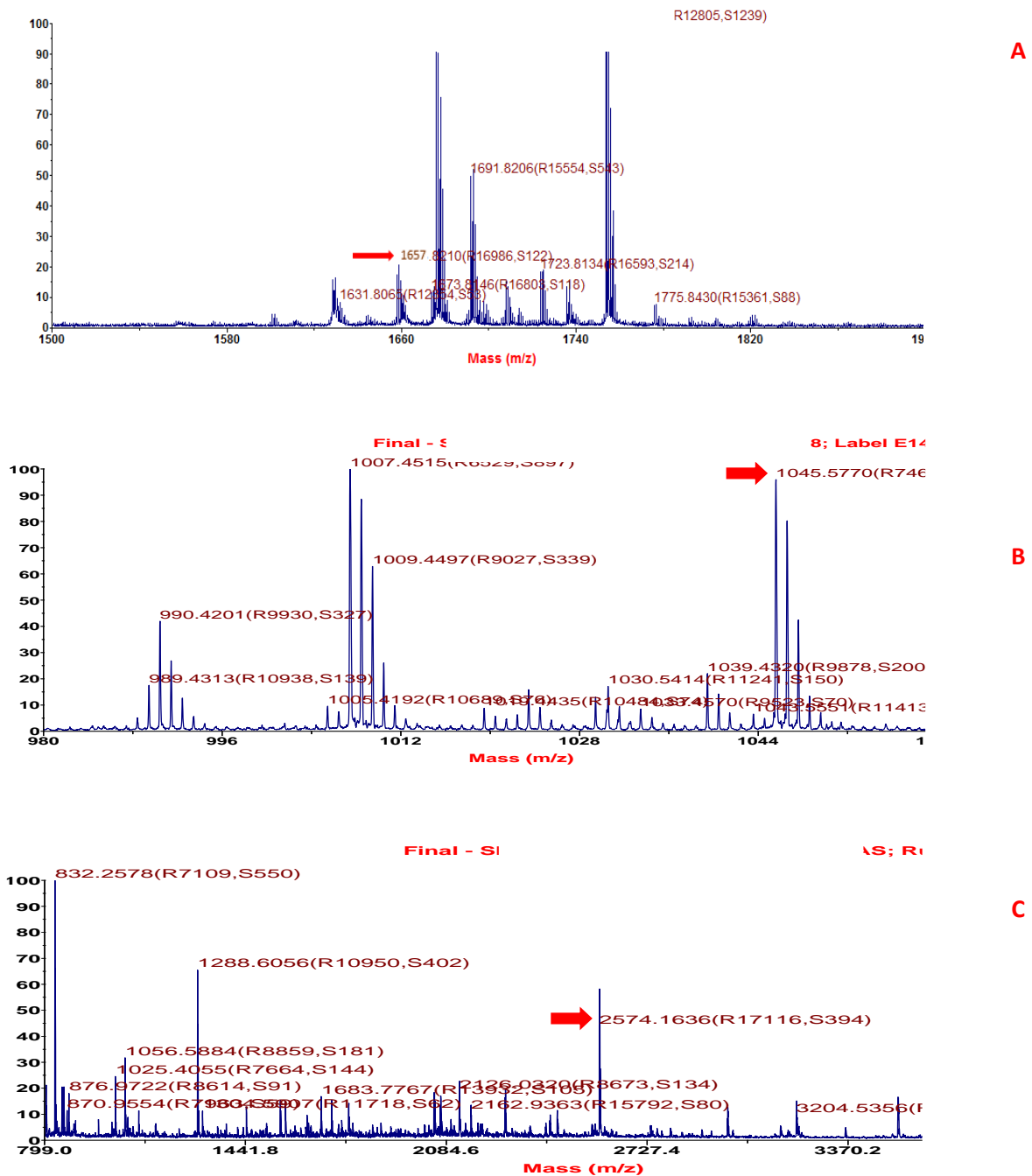


Figura 2. Se muestran los espectros M/Z de los aminoácidos que identificaron las proteínas efectoras mediante espectrometría de masas MALDI TOF/TOF extraídas a partir del segundo estadio juvenil de *M. javanica*, procesadas en digestión en solución: (A) La flecha de color rojo indica el espectro (1657.824) de la secuencia que identificó a la proteína Beta-1,4-endoglucanasa de *M. incognita*. (B) La flecha de color rojo indica el espectro M/Z (2574.1636) de la secuencia que se alineó a la proteína Beta-1,4-endoglucanasa de *Heterodera glycines* (D) En la flecha de color rojo indica el espectro M/Z (1045.577) de la secuencia que identificó la proteína Polygalacturonasa de *M. incognita*.

En las plantas, hay un diverso grupo de señales peptídicas que cumple diferentes y compartidas funciones fisiológicas como las CLAVATA3/ESR (CLE) (Goad *et al.*, 2017). Asimismo, muchos patógenos sintetizan muchas de estas señales peptídicas de similar estructura como una estrategia

evolutiva para mimetizar y burlar el sistema inmune del hospedero y facilitar el parasitismo (Drayman *et al.*, 2013). Los nematodos de varios géneros como *Meloidogyne* sintetizan también estos péptidos ligandos como mecanismo de señal y fueron detectados en este trabajo como CLE like-protein con

homología a *G. pallida*. Además, Lu *et al.*, (2008) mostraron que las proteínas CLE en los diferentes estadios del nematodo *G. rostochiensis* y conserva similares funciones en *Arabidopsis* y raíces de papa a través de la sobreexpresión de estas proteínas. Igualmente, Guo *et al.*, (2015), basaron su estudio silenciando proteínas CLE, confirmando la importancia de estas en el desarrollo de la infección provocando una reducción en el parasitismo de *H. glycines* en plantas de soya. Asimismo, para establecer el parasitismo en las células radiculares, estas proteínas efectoras son vertida por el estilete a las células atrofiadas como la *Chorismate mutase* involucrada en el mantenimiento del sitio de alimentación, que de acuerdo con Painter y Lamber (2003), reportaron que esta enzima presenta altos niveles de expresión a dos días de iniciado la infección por lo que estaría involucrada en el inicio del parasitismo en juveniles de *M. javanica* y bajos niveles de expresión en infección tardía en *M. arenaria* (Long *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2013). En otros nematodos como *H. glycines*, presentan diferentes factores de virulencia que les permite parasitar ciertas variedades de soya resistentes (Bekal *et al.*, 2003) de la misma forma que *G. rostochiensis* (Lu *et al.*, 2008). Doyle y Lamber (2003), han logrado definir que esta enzima actúa en la alteración del desarrollo en las plantas.

La pared celular de las plantas es una estructura rígida y flexible conformada por una red intrincada de polisacáridos de celulosa y pectina como mecanismo de resistencia al ataque de patógenos (Underwood, 2012). Para romper esta estructura, coevolutivamente estos patógenos vegetales microbianos interactúan con una serie de receptores de la planta para reconocer y luego desplegar una serie de compuestos o factores de virulencia para superar el sistema inmune y lograr la infección (Jones y Dangl, 2006; Bellincampi *et al.*, 2014). Los nematodos agalladores de la raíz también desarrollan estos factores de virulencia, enzimas o efectores para degradar la pared celular. En este estudio, detectamos varias de estos compuestos en muestras de nematodos J2 mediante digestión en solución, como la enzima *Pectate lyase* que se expresa en la glándula esofágica subventral, en base con un 75% de similitud peptídica a *M. incognita* (Huang *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2011). Esta enzima abarca regiones altamente conservadas en nematodos agalladores de plantas, así como en bacterias y hongos a través de la caracterización del gen de *pectate lyase Mg-PEL1* del nematodo agallador del arroz, *M. graminicola* (Chen *et al.*, 2021), con resultados similares en *M. javanica* (Doyle y Lamber, 2002). Asimismo, especies de *H. glycines* (Bakhietia *et al.*, 2007) poseen este tipo de enzima y tienen una alta homología con el hospedero y pueden romper los componentes esenciales de la pared celular de la planta durante la migración del nematodo a través del

apoplasma hacia el tejido vascular. Para superar la rígida composición de la pared celular es necesaria otras enzimas como *Beta-1,4-endoglucanase*, detectada en este estudio con similitudes completas a las accesiones AAK21883.2 y AAC48327.1 que corresponden a *M. incognita* y *H. glycines* respectivamente. Estos resultados coinciden con Wang y Knap (1999 y Hu *et al.*, (2013) que reportaron la presencia *Beta-1,4-endoglucanase* a nivel del segundo estadio de *M. javanica*, como en los resultados con *M. incognita* (Bellafiore *et al.*, 2008). Además, Yang *et al.*, (2001) identificaron esta enzima en otra especie de nematodo como *H. glycines*, lo mismo que en *G. tabacum* (Goellner *et al.*, 2000) reportaron que la expresión de esta enzima está involucrada en los pasos iniciales de la infección. Por último, la enzima *Poligalacturonase* con accesión AAM28240.1 con similitud a *M. incognita* es identificado en este estudio. Del mismo modo, este efector y las anteriores descritas: *Pectate lyase* y *Beta-1,4-endoglucanase* cumplen la misma función de penetrar, migrar dentro de la raíz del hospedero y establecer la interacción planta-patógeno.

Identificamos otras XX proteínas que no están relacionadas como efectores para fitopatógenos, y que de acuerdo con Bellafiore *et al* (2008), son parte de las funciones biológicas conservadas de cada individuo. La mayoría de estas proteínas fueron a partir de muestras de nematodos adultos J4 mediante la técnica de separación en geles unidimensionales. Sin embargo, en muestras J2 no se observaron bandas en estos geles a pesar de la cantidad de individuos testeados, por lo que es necesaria una mayor cantidad de muestras a evaluar. Estos resultados confirman la robustez de la espectrometría de masas en la detección y caracterización de compuestos peptídicos, el uso de la base de datos y forma más amigable de la bioinformática para la obtención de la enorme información de múltiples péptidos con la finalidad de conocer el rol funcional de estos compuestos de manera rutinaria en diferentes tipos de muestras empleando pocos días de trabajo en laboratorio.

CONCLUSIONES

Las secuencias de los cebadores SSU18A y SSU26R son altamente conservadas para la identificación molecular de nematodos agalladores radiculares de una forma simple, rápida y confiable. Los espectros obtenidos mediante la técnica analítica de espectrometría de masas MALDI TOF/TOF basados en *shotgun proteomics*, han generado e identificado perfiles peptídicos de funciones biológicas conservadas y relacionados a proteínas efectoras del nematodo agallador de la raíz *M. javanica* como *Beta-1,4-endoglucanase* y *Polygalaturonase* a partir de J2, así como *Expansin B2*, *CLAVATA3/ESR*, *Pectate lyase*

y *Chorismato mutase* a partir de J4, de una forma fácil y menos laboriosa que otras tecnologías.

Agradecimientos

Agradecemos a Concytec/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). **J. Córdova-Campos** - Formal analysis, Conceptualization, methodology, Writing – review & editing., **Pedro G. Calle-Ulfe** – Conceptualization, Validation, **E. Suarez-Peña** – Conceptualization, Validation., **S. Mendez-Farroñan** – Conceptualization, Validation, **D. Lindo-Seminario** – Validation, Methodology, Editing., **S. Gutiérrez-Calle** - Methodology, Writing – review & editing, editing., **A. Morales-Pizarro** - Conceptualization, Supervision., **Virna Cedeño-Escobar** - Conceptualization, Supervision., **E. Mialhe-Matonnier** - Conceptualization, Supervision., **C. Condemarín-Montealegre** - Methodology, Writing – review & editing, editing.

REFERENCIAS

- Abad, P., and Williamson, V. M., 2010. Plant nematode interaction: a sophisticated dialogue. *Advances in Botanical Research*, 53, pp. 147-192. [http://doi.org/10.1016/S0065-2296\(10\)53005-2](http://doi.org/10.1016/S0065-2296(10)53005-2).
- Abad, P., Gouzy, J., Aury, J. M., Castagnone-Sereno, P., Danchin, E. G., Deleury, E., and Caillaud, M. C., 2008. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature Biotechnology*, 26(8), pp. 909-915. <http://doi.org/10.1038/nbt.1482>.
- Agrios, G. N., 2005. Plant pathology. New York: Elsevier Academic Press. <http://doi.org/10.2307/4442935>.
- Baum, T. J., Hussey, R. S., and Davis, E. L., 2007. Root-knot and cyst nematode parasitism genes: the molecular basis of plant parasitism. In Genetic engineering (pp. 17-43). Springer US. http://doi.org/10.1007/978-0-387-34504-8_2.
- Bellaifiore, S., Shen, Z., Rosso, M. N., Abad, P., Shih, P., and Briggs, S. P., 2008. Direct identification of the *Meloidogyne incognita* secretome reveals proteins with host cell reprogramming potential. *PLoS Pathogens*, 4(10), pp. e1000192. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000192>.
- Bellincampi, D., Cervone, F., and Lionetti, V., 2014. Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science*, 5, pp. 228.
- Bendezú, M. V., and Alvarez, L. A., 2012. The perfect stage of powdery mildew of grapevine caused by *Erysiphe necator* found in Peru. *Plant Disease*, 96(5), pp. 768-768. <http://doi.org/10.1094/PDIS-11-11-0985>.
- Blaxter, M. L., De Ley, P., Garey, J. R., Liu, L. X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., and Vida, J. T., 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*, 392(6671), pp. 71-75. <http://doi.org/10.1038/32160>.
- Cañuelo, A., and Peragón, J., 2013. Proteomics analysis in *Caenorhabditis elegans* to elucidate the response induced by tyrosol, an olive phenol that stimulates longevity and stress resistance. *Proteomics*, 13(20), pp. 3064-3075. <http://doi.org/10.1002/ps.201200579>.
- Chen, J., Li, Z., Lin, B., Liao, J., and Zhuo, K., 2021. A *Meloidogyne graminicola* pectate lyase is involved in virulence and activation of host defense responses. *Frontiers in Plant Science*, 12, 401.
- Chitwood, D. J., 2003. Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture–Agricultural Research Service. *Pest Management Science*, 59(6-7), pp. 748-753. <http://doi.org/10.1002/ps.684>.
- Cotton, J. A., Lilley, C. J., Jones, L. M., Kikuchi, T., Reid, A. J., Thorpe, P., and Eves-van den Akker, S., 2014. The genome and life-stage specific transcriptomes of *Globodera pallida* elucidate key aspects of plant parasitism by a

- cyst nematode. *Genome biology*, 15(3), pp. R43. <http://doi.org/10.1186/gb-2014-15-3-r43>.
- Condemarín Montealegre, C., Oyola Medina, M., Mialhe, E., Quiimi 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), 515-528.
- Davis, E. L., Hussey, R. S., Baum, T. J., Bakker, J., Schots, A., Rosso, M. N., and Abad, P., 2000. Nematode parasitism genes. *Annual Review of Phytopathology*, 38(1), pp. 365-396. <http://doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.365>.
- Davis, E. L., Hussey, R. S., Mitchum, M. G., and Baum, T. J., 2008. Parasitism proteins in nematode-plant interactions. *Current opinion in plant biology*, 11(4), 360-366. <http://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.04.003>.
- Doyle, E. A., and Lambert, K. N., 2002. Cloning and characterization of an esophageal-gland-specific pectate lyase from the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(6), pp. 549-556. <http://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.6.549>.
- Doyle, E. A., and Lambert, K. N., 2003. *Meloidogyne javanica* chorismate mutase 1 alters plant cell development. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(2), pp. 123-131. <http://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.2.123>.
- Drayman, N., Glick, Y., Ben-nun-Shaul, O., Zer, H., Zlotnick, A., Gerber, D., and Oppenheim, A., 2013. Pathogens use structural mimicry of native host ligands as a mechanism for host receptor engagement. *Cell Host & Microbe*, 14(1), pp. 63-73.
- Floyd, R., Abebe, E., Papert, A., and Blaxter, M., 2002. Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular Ecology*, 11(4), pp. 839-850. <http://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01485.x>.
- Gheysen, G., and Mitchum, M. G., 2011. How nematodes manipulate plant development pathways for infection. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(4), pp. 415-421. <http://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03.012>.
- Goad, D. M., Zhu, C., and Kellogg, E. A., 2017. Comprehensive identification and clustering of CLV3/ESR-related (CLE) genes in plants finds groups with potentially shared function. *New Phytologist*, 216(2), pp. 605-616.
- Guo, X., Chronis, D., De La Torre, C. M., Smeda, J., Wang, X., and Mitchum, M. G., 2015. Enhanced resistance to soybean cyst nematode *Heterodera glycines* in transgenic soybean by silencing putative CLE receptors. *Plant Biotechnology Journal*, 13(6), pp. 801-810. <http://doi.org/10.1111/pbi.12313>.
- Hewezi, T., 2015. Cellular signaling pathways and posttranslational modifications mediated by nematode effector proteins. *Plant Physiology*, 169(2), pp. 1018-1026. <http://doi.org/10.1104/pp.15.00923>.
- Hu, L., Cui, R., Sun, L., Lin, B., Zhuo, K., and Liao, J., 2013. Molecular and biochemical characterization of the β -1, 4-endoglucanase gene Mj-eng-3 in the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Experimental Parasitology*, 135(1), 15-23. <http://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.05.012>.
- Huang, G., Dong, R., Allen, R., Davis, E. L., Baum, T. J., and Hussey, R. S., 2005. Developmental expression and molecular analysis of two *Meloidogyne incognita* pectate lyase genes. *International Journal for Parasitology*, 35(6), pp. 685-692. <http://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.01.006>.
- Hussey, R. S. and Barker, K. R., 1973. Histopathology of nodular tissues of legumes infected with certain nematodes. *Phytopathology*, 66(7), pp. 851-855. <http://doi.org/10.1094/Phyto-66-851>.
- Jones, A. M., Thomas, V., Bennett, M. H., Mansfield, J., and Grant, M., 2006. Modifications to the Arabidopsis defense proteome occur prior to significant transcriptional change in response to inoculation with *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiology*, 142(4), 1603-1620. <http://doi.org/10.1104/pp.106.086231>.
- Kudla, U., Qin, L., Milac, A., Kielak, A., Maissen, C., Overmars, H., and Helder, J., 2005. Origin, distribution and 3D-modeling of Gr-EXPB1, an expansin from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *FEBS Letters*, 579(11), pp. 2451-2457.
- Lee, C., Chronis, D., Kenning, C., Peret, B., Hewezi, T., Davis, E. L., and Mitchum, M. G., 2011. The

- novel cyst nematode effector protein 19C07 interacts with the Arabidopsis auxin influx transporter LAX3 to control feeding site development. *Plant Physiology*, 155(2), pp. 866-880. <http://doi.org/10.1104/pp.110.167197>.
- Lilley, C. J., Bakhetia, M., Charlton, W. L., and Urwin, P. E., 2007. Recent progress in the development of RNA interference for plant parasitic nematodes. *Molecular Plant Pathology*, 8(5), 701-711. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00422.x>.
- Lin, B., Zhuo, K., Wu, P., Cui, R., Zhang, L. H., and Liao, J., 2013. A novel effector protein, MJ-NULG1a, targeted to giant cell nuclei plays a role in *Meloidogyne javanica* parasitism. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(1), pp. 55-66.
- Long, H., Wang, X., Xu, J. H., and Hu, Y. J., 2006. Isolation and characterization of another cDNA encoding a chorismate mutase from the phytoparasitic nematode *Meloidogyne arenaria*. *Experimental parasitology*, 113(2), 106-111.
- Lu, S. W., Chen, S., Wang, J., Yu, H., Chronis, D., Mitchum, M. G., and Wang, X., 2009. Structural and functional diversity of CLAVATA3/ESR (CLE)-like genes from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(9), pp. 1128-1142. <http://doi.org/10.1094/MPMI-22-9-1128>.
- Lindo-Seminario, D., Mendez-Farroñan, S., Cantavventura, J., Córdova-Campos, J., Condemarín-Montealegre, C., Gutiérrez-Calle, S., Morales-Pizarro, A., and Mialhe-Matonnier, E., 2022. Endosymbiont microbiota of *Meloidogyne javanica* adult female infected by *Pasteuria penetrans*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 25, pp. 132. <http://dx.doi.org/10.56369/tsaes.4341>
- Mann, M., Hendrickson, R. C., and Pandey, A., 2001. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annual Review of Biochemistry*, 70(1), 437-473.
- Mitchum, M. G., Hussey, R. S., Baum, T. J., Wang, X., Elling, A. A., Wubben, M., and Davis, E. L., 2013. Nematode effector proteins: an emerging paradigm of parasitism. *New Phytologist*, 199(4), pp. 879-894. <http://doi.org/10.1111/nph.12323>.
- Mitchum, M. G., Wang, X., Wang, J., and Davis, E. L., 2012. Role of nematode peptides and other small molecules in plant parasitism. *Annual Review of Phytopathology*, 50, pp. 175-195. <http://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-173008>.
- Morales Pizarro, A., Javier Alva, J., Álvarez, L. A., Peña Castillo, R., Chanduvi García, R., Granda Wong, C. A., Mayta-Obos, R., Lindo-Seminario, D., and Condori Pacsi, S., 2022. Control *in vivo* de *Phaeoacremonium parasiticum* con antagonistas nativos Bacillus, Trichoderma y actinomicetos y su efecto promotor de crecimiento en Vid. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 25(3), pp. 116. <http://dx.doi.org/10.56369/tsaes.4232>.
- Nakaewa, R., Kiggundu, A., Talwana, H., Namaganda, J., Lilley, C., Tushemereirwe, W., and Atkinson, H., 2013. Nematode 18S rRNA gene is a reliable tool for environmental biosafety assessment of transgenic banana in confined field trials. *Transgenic Research*, 22(5), pp. 1003-1010. <http://doi.org/10.1007/s11248-013-9712-9>.
- Opperman, C. H., Bird, D. M., Williamson, V. M., Rokhsar, D. S., Burke, M., Cohn, J., and Houfek, T. D., 2008. Sequence and genetic map of *Meloidogyne hapla*: A compact nematode genome for plant parasitism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(39), pp. 14802-14807. <http://doi.org/10.1073/pnas.0805946105>.
- Painter, J. E., and Lambert, K. N., 2003. *Meloidogyne javanica* chorismate mutase transcript expression profile using real-time quantitative RT-PCR. *Journal of Nematology*, 35(1), pp. 82. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19265979/>
- Perry, R. N., and Moens, M., 2011. Introduction to plant-parasitic nematodes; modes of parasitism. In *Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions* (pp. 3-20). Springer Netherlands. <http://doi.org/10.1007/978-94-007-0434-3>
- Pizarro, D. A. M., Alva, J. J., Álvarez, L. A., Obos, R. M., Ancocota, R. A., Castillo, R. P., Chanduvi, G. R., and Seminario, D. L., 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), pp. 086.
<http://dx.doi.org/10.56369/tsaes.4206>
- Popeijus, H., Overmars, H., Jones, J., Blok, V., Goverse, A., Helder, J., and Smant, G., 2000. Enzymology: degradation of plant cell walls by a nematode. *Nature*, 406(6791), pp. 36-37.
<http://doi.org/10.1038/35017641>.
- Qin, L., Kudla, U., Roze, E. H., Goverse, A., Popeijus, H., Nieuwland, J., and Bakker, J., 2004. Plant degradation: a nematode expansin acting on plants. *Nature*, 427(6969), pp. 30-30.
<http://doi.org/10.1038/427030a>.
- Rodríguez-Gálvez, E., E. Maldonado., and A. Alves., 2015. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* causing dieback of table grapes in Peru. *European Journal of Plant Pathology*, 141(3), pp. 477-489.
- Roze, E., Hanse, B., Mitreva, M., Vanholme, B., Bakker, J., and Smant, G., 2008. Mining the secretome of the root-knot nematode *Meloidogyne chitwoodi* for candidate parasitism genes. *Molecular Plant Pathology*, 9(1), pp. 1-10. <http://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00435.x>.
- Sebastiana, M., Figueiredo, A., Monteiro, F., Martins, J., Franco, C., Coelho, A. V., and Ferreira, S., 2013. A possible approach for gel-based proteomic studies in recalcitrant woody plants. *SpringerPlus*, 2(1), pp. 210.
<http://doi.org/10.1186/2193-1801-2-210>.
- Stare, B. G., Lamovšek, J., Širca, S., and Urek, G., 2012. Assessment of sequence variability in putative parasitism factor, expansin (expB2) from diverse populations of potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 79, pp. 49-54.
- Smant, G., Stokkermans, J. P., Yan, Y., De Boer, J. M., Baum, T. J., Wang, X., and Helder, J., 1998. Endogenous cellulases in animals: isolation of β -1, 4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(9), pp. 4906-4911.
<http://doi.org/10.1073/pnas.95.9.4906>
- Tabb, J. S., Molyneaux, B. J., Cohen, D. L., Kuznetsov, S. A., and Langford, G. M., 1998. Transport of ER vesicles on actin filaments in neurons by myosin V. *Journal of Cell Science*, 111(21), pp. 3221-3234.
<http://doi.org/10.1242/jcs.111.21.3221>.
- Underwood, W., 2012. The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion. *Frontiers in plant science*, 3, pp. 85.
- Vieira, P., and Nemchinov, L. G., 2020. An Expansin-like candidate effector protein from *Pratylenchus penetrans* modulates immune responses in *Nicotiana benthamiana*. *Phytopathology*, 110(3), pp. 684-693.
- Vieira, P., Danchin, E. G., Neveu, C., Crozat, C., Jaubert, S., Hussey, R. S., and Rosso, M. N. 2011. The plant apoplast is an important recipient compartment for nematode secreted proteins. *Journal of Experimental Botany*, 62(3), pp.1241-1253.
- Wang, X., Allen, R., Ding, X., Goellner, M., Maier, T., de Boer, J. M., and Davis, E. L., 2001. Signal peptide-selection of cDNA cloned directly from the esophageal gland cells of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(4), pp. 536-544.
<http://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.4.536>