



Original

Bacteria asociada a huevos de zoonematodo como agente potencial para el biocontrol de *Meloidogyne* spp. en tomate

Zoonematode Egg Associated Bacterium, as a potential agent for *Meloidogyne* spp. Biocontrol in Tomato

Ileana Sánchez Ortiz^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-7195-5758>

Rolando Morán Valdivia¹ <https://orcid.org/0000-0001-7722-5097>

Irene Alvarez Lugo¹ <https://orcid.org/0000-0003-4330-4381>

Idania Wong Padilla¹ <https://orcid.org/0000-0003-0908-7942>

Danalay Somontes Sánchez¹ <https://orcid.org/0000-0001-6885-094X>

Eulogio Pimentel Vázquez² <https://orcid.org/0000-0002-2836-352X>

Jesús Mena Campos² <https://orcid.org/0000-0002-2919-8124>

Marcia Rojas Badía³ <https://orcid.org/0000-0003-4958-1873>

¹ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Camagüey.. Camagüey. Cuba.

² Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de la Habana, Cuba.

³ Universidad de la Habana.

Autor para la correspondencia (email) ileana.sanchez@cigb.edu.cu

RESUMEN

Antecedentes: El objetivo de este estudio fue caracterizar la bacteria CIGBTb aislada de huevos de *Trichostrongylus* respecto a sus propiedades biocontroladoras de nematodos y sus posibles

Como citar (APA)

Sánchez Ortiz, I., Morán Valdivia, R., Alvarez Lugo, I., Wong Padilla, I., Somontes Sánchez, D., Pimentel Vázquez, E., Mena Campos, J., & Rojas Badía, M. (2020). Bacteria asociada a huevos de zoonematodo como agente potencial para el biocontrol de *Meloidogyne* spp. en tomate. *Revista de Producción Animal*, 32(1).



©El (los) autor (es), Revista de Producción Animal 2020. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Attribution-NonCommercial 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), asumida por las colecciones de revistas científicas de acceso abierto, según lo recomendado por la Declaración de Budapest, la que puede consultarse en: Budapest Open Access Initiative's definition of Open Access.

mecanismos de acción mediante ensayos en maceta, ensayos *in vitro* y la detección de sus atributos patogénicos.

Métodos: Se caracterizó la cepa por métodos moleculares y convencionales. La efectividad contra nematodos y el efecto sobre el crecimiento vegetal se evaluaron en macetas con *Solanum lycopersicum* plants var UC-8213. A los 40 días se determinó el índice de infestación, el número de agallas, la longitud y la masa de las ramas y las raíces y el número de huevos por masa. Se evaluó el efecto sobre la eclosión de huevos de *Haemonchus* spp. y *Meloidogyne* spp. *in vitro*. Se empleó ANOVA y prueba de Duncan para comparar los datos.

Resultados: *Sphingobacterium* sp. CIGBTb inhibió la eclosión de los huevos de *Haemonchus* spp. en un 100 % y de *Meloidogyne* spp. en un 87 %. También disminuyó significativamente el número de nódulos radiculares en *Solanum lycopersicum* en un 58 %, el número de huevos por masa en un 53 % y promovió el crecimiento de *Solanum lycopersicum* en 0,59 veces con respecto al control. No se encontraron informes de otras cepas de este género con actividad nematocida y estimulante del crecimiento vegetal simultáneamente.

Conclusiones: CIGBTb podría permitir el control biológico de nematodos al reducir no solo la eclosión de los huevos sino también el número de huevos por masa.

Palabras clave: control biológico, *Solanum lycopersicum*, Nematoda, *Sphingobacterium*, *Haemonchus* (Fuente: MeSH)

ABSTRACT

Background: The aim of this study was to characterize bacterium CIGBTb, isolated from eggs of *Tricostrongylus* due to its nematode bio-controlling activity, and possible action mechanisms, through pot and *in vitro* trials, and the detection of its pathogenic attributes.

Methods: The strain was characterized by molecular and conventional methods. Its effectiveness against nematodes and effect on plant growth were evaluated in pots containing *Solanum lycopersicum* plants var UC-8213. At 40 days, the infestation index, number of galls, stem and root length and mass, and the number of eggs per mass, were determined. The effects of *Haemonchus* spp. and *Meloidogyne* spp. on hatching were evaluated *in vitro*. ANOVA and Duncan test were used for data comparison.

Results: *Sphingobacterium* sp. CIGBTb inhibited hatching of *Haemonchus* spp. (100%) and *Meloidogyne* spp. (87%) eggs. The number of root knots and eggs per mass were significantly reduced in *Solanum lycopersicum* (58% and 53%, respectively). The growth of *Solanum lycopersicum* increased 0.59 times in relation to the control. No other reports were found on other strains of this gender with nematocidal activity, that could promote plant growth at the same time.

Conclusions: CIGBTb might allow for biological control of nematodes by not only reducing egg hatching, but also the number of eggs per mass.

Key words: biological control, *Solanum lycopersicum*, Nematoda, *Sphingobacterium*, *Haemonchus* (Source: MeSH)

Recibido: 3/6/2019

Aceptado: 10/12/2019



INTRODUCCIÓN

Meloidogyne spp. es el más dañino de todos los géneros de fitonematodos que atacan al tomate en las regiones tropicales y subtropicales y ocasiona pérdidas en el rendimiento estimadas de hasta un 30 % (Netscher y Sikora, 1990). En Cuba este nematodo, formador de nódulos (rkn), es además uno de los principales problemas fitosanitarios observados en los cultivos protegidos (Gómez, Rodríguez, Enrique, Miranda y González, 2009). Los compuestos químicos pueden controlar esta plaga más rápidamente y con mayor efectividad (Whitehead, 1997). Sin embargo, los daños causados al ecosistema, así como los efectos residuales han traído consigo un aumento del interés para hallar sustitutos más seguros.

En ese sentido, se promueve la aplicación de métodos novedosos y más selectivos para controlar *Meloidogyne* sp. La búsqueda de antagonistas microbianos naturales puede ofrecer nuevas alternativas para el control biológico de los nematodos. En Cuba varias especies microbianas, como *Pochonia chlamydosporia* (Manzanilla-López y Lopez-Llorca, 2017) y *Tsukamurella paurometabola* (Mena *et al.*, 2003), que se utilizan en diferentes cultivos han mostrado una gran eficacia para controlar este tipo de fitopatógeno bajo ciertas condiciones de manejo y tipos de suelo. Otros aislados (*Stenotrophomonas* sp. CIGB G1 y *Sphingobacterium* sp. CIGBTb) han demostrado alguna actividad contra zoonematodos en ensayos *in vitro* (Sánchez *et al.*, 2003) y han mostrado potencial como biocontroles (Sánchez *et al.*, 2018).

El género *Sphingobacterium* tiene una particularidad llamativa debido a su versatilidad ante diferentes condiciones ambientales. Se ha aislado: del suelo antártico, muestras clínicas, raíces de maíz, heces de ganado vacuno, suelos boscosos y cultivables, lodo activado, nematodos y tejidos de hojas de *Nicotiana tabacum* (Yabuuchi, Kaneko, Yano, Moss y Miyoshi, 1983; Shivaji *et al.*, 1992; Holmes, Owen y Hollis, 1982; Kim, Ten, Liu, Im y Lee, 2006; Mehnaz, Weselowski y Lazarovits, 2007; Zhang *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012). Aunque ha sido aislado de suelos con efectos represivos sobre los nematodos, existen pocos reportes sobre su aplicación para controlar el patógeno en tomate.

En concordancia, el objetivo de este estudio fue caracterizar la bacteria CIGBTb aislada de huevos de *Trichostrongylus* con relación a sus propiedades biocontroladoras sobre los nematodos

Como citar (APA)

Sánchez Ortiz, I., Morán Valdivia, R., Alvarez Lugo, I., Wong Padilla, I., Scomentes Sánchez, D., Pimentel Vázquez, E., Mena Campos, J., & Rojas Badía, M. (2020). Bacteria asociada a huevos de zoonematodo como agente potencial para el biocontrol de *Meloidogyne* spp. en tomate. *Revista de Producción Animal*, 32(1).



©El (los) autor (es), Revista de Producción Animal 2020. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Attribution-NonCommercial 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), asumida por las colecciones de revistas científicas de acceso abierto, según lo recomendado por la Declaración de Budapest, la que puede consultarse en: Budapest Open Access Initiative's definition of Open Access.

y sus posibles mecanismos de acción en pruebas en macetas e *in vitro*, así como la detección de sus propiedades patogénicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Bacterias

CIGBTb se aisló de huevos de *Tricostrongylus* spp. con una morfología alterada los cuales se desinfectaron con hibitane 0,5 % y fueron colocados en medio agar soya triptona (TSA). El aislado se crioconservó a -70 °C en la colección del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey, Cuba y su identificación se realizó con el sistema API 20NE y análisis de la secuencia del gen ARNr 16S (números de acceso GenBank: MG461604) obtenida por amplificación de PCR, mediante los cebadores universales 27 F y 1492R (Sánchez *et al.*, 2018). El análisis filogenético se realizó con el empleo del paquete informático MEGA, versión 6,06, después de alineamientos múltiples de datos con CLUSTAL - X (Thompson *et al.*, 1997). Las distancias evolutivas de la cepa CIGBTb se calcularon según el modelo de dos parámetros Kimura (Kimura, 1980), el agrupamiento se basó en el método de máxima probabilidad (Felsenstein, 1981). El análisis bootstrap (1 000 repeticiones) se empleó para evaluar la tipología del árbol (Felsenstein, 1985). La cepa para utilizar en los experimentos se creció en Caldo Soya Triptona (TSB) (Oxoid; 30 g l⁻¹) a 30 °C, durante 24 h, a 250 rpm, en una zaranda orbital.

El control positivo fue el nematocida Hebernem®, obtenido a partir de la bacteria C924 (depositado el 8 de agosto de 1995, según el Tratado de Budapest, en el Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holanda, con el número de depósito CBS 613,95).

Los huevos del nematodo *Haemonchus* sp. se colectaron de hembras adultas presentes en el abomaso de una oveja.

Los especímenes se lavaron con una solución de cloruro de sodio (0,9 %) y se desinfectaron con hibitane al 0,5 % durante un minuto. Luego se incubaron en caldo nutriente (Oxoid), a 37 °C durante 24 horas. Las muestras se tamizaron (300, 60 y 30 µm de diámetro, de manera consecutiva) y los huevos fueron retenidos en el tamiz de 30 µm. Luego, los huevos se desinfectaron con hibitane (0,5 %) durante 5 minutos e inmediatamente lavados dos veces en medio LB (8), diluido 1/10 con agua estéril destilada (LBD). La manipulación se llevó a cabo bajo condiciones asépticas. Los conteos de huevos y larvas se realizaron con un microscopio óptico (Olympus).

Meloidogyne spp. se recolectó de plantas de tomate en cultivos protegidos de la provincia de Ciego de Ávila, Cuba. La población de *Meloidogyne* spp. se propagó en plantas de *Solanum lycopersicum*, variedad UC-8 213, en el CIGB de Camagüey, Cuba. Las masas de huevos se

recolectaron de las raíces de *S. lycopersicum*. Los huevos fueron separados de las masas con hipoclorito de sodio (0,5%), y se sumergieron en agua destilada a 8⁰C, hasta la realización del ensayo. Luego se contaron a través de un microscopio binocular invertido (x40) Olympus CK 2. EL conteo de huevos por masa se realizó de la misma manera, pero en cada tratamiento se colocó una masa de huevos en tres pocillos de una placa de poliestireno. Luego los huevos se separaron y finalmente se contaron.

Ensayos en macetas

Se llenaron bolsas de nailon (8 cm de diámetro x 15 cm de profundidad) con 1 000 cm³ de sustrato (1:1 de arena estéril: sustrato estéril enriquecido (Terraplant). El sustrato se infestó con 1 500 huevos de *Meloidogyne* spp. colocados dentro de las bolsas, a 3 cm de profundidad.

Después de cinco días, se añadió 50 mL de cultivo de *Sphingobacterium* CIGBTb (10⁶ ufc/mL). El control positivo que se utilizó fue el nematicida Hebernem®, mientras que se utilizó el medio TSB como control negativo. Se empleó un diseño experimental completamente aleatorio, con diez réplicas para cada tratamiento. Las plantas de *Solanum lycopersicum* UC-8213 fueron trasplantadas a las macetas a los siete días. A los 40 días se determinó el índice de agallamiento, el número de nódulos por gramos de raíz, la altura de la planta, el peso de la raíz y la planta y el número de huevos por masa (Bridge y Page, 1980)

Bioensayo de inhibición de la eclosión de huevos

A cada uno de los 24 pocillos de una placa Petri se le adicionó aproximadamente de 90 a 100 huevos en 900 µL de agua y peptona, a 0,1 % (*Meloidogyne* spp.) en medio LB diluido 1/10 en agua (*Haemonchus*). Luego se adicionaron 100 µL de bacterias en un medio de agua/TBS y se probaron tres concentraciones de *Sphingobacterium* sp. CIGBTb (10⁸, 10⁷, 10⁶ ufc/mL). El control positivo fue Hebernem® en la misma concentración. El control negativo recibió 100 µL de una solución de agua/TBS. Se cubrió la placa y luego se incubó a 28 °C. El efecto nematicida se determinó con un microscopio binocular, por conteo de los J2s que no eclosionaron a las 72 h del tratamiento. Todos los tratamientos tuvieron tres réplicas. El por ciento de inhibición se calculó según la fórmula $PIH = [(C - T)/C] \times 100$, donde C es el por ciento de eclosión del control y T es el por ciento de eclosión del tratamiento.

Determinación de las enzimas extracelulares

El crecimiento en medio M9 suplementado con quitina coloidal (Shimahara y Takiguchi, 1988) indicó producción de quitinasa. Las quitosanasas se determinaron por el crecimiento del organismo en las placas, con Agar de Detección de Quitosanasas (ADQ) (Cheng y Li, 2000). Las proteasas se determinaron mediante cultivos en las placas con Agar Nutriente y 0,5 % de gelatina, seguido de detección con el reactivo de Frazier y la hidrólisis de caseína en medio agar nutriente con leche descremada al 1 % (VanDemark & Lee, 1991). El sistema Apizym fue empleado para

la detección de fosfatasa, esterasa, lipasa, glucuronidasa, galactosidasa, manosidasa, arilasas, glucosaminidasa- β -N-acetil, y fosfohidrolasa AS-BI Naftol.

Los microorganismos se inocularon en tubos que contenían 8 mL de caldo nutriente y se crecieron durante 12 h a 30 °C. Se colocó una tirilla embebida en acetato de plomo en la apertura del tubo (24). La reacción fue positiva cuando la tira se tornó oscura.

Análisis de datos

Se confirmó la normalidad de los datos con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se realizó un análisis de varianza (Rodríguez *et al.* (2005) a todos los datos ensayados para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos. Se compararon las medias según la prueba de Duncan ($P < 0,05$). Se empleó el software Statgraphics Plus, 5.0, para Windows.

RESULTADOS

CIGBTb mostró colonias amarillas, convexas y circulares después de dos días de incubación. Las células fueron Gram-negativas a la tinción, en forma de bacilos cortos, inmóviles y no formadores de esporas. El sistema API 20 NE identificó la cepa CIGBTb como *Sphingobacterium spiritivorum*. El análisis filogenético con las secuencias 16S de ARNr confirmó que este pertenece al género *Sphingobacterium*. El árbol filogenético de máxima probabilidad mostró que CIGBTb formó un grupo coherente con los miembros del género *Sphingobacterium*, así como una rama intragénero con *Sphingobacterium spiritivorum* NCTC 11386 (**Fig. 1**). Sin embargo, la cepa exhibió un valor de secuencia génica menor de 97 % (95,58 %), por lo tanto, no pertenece a esta especie.

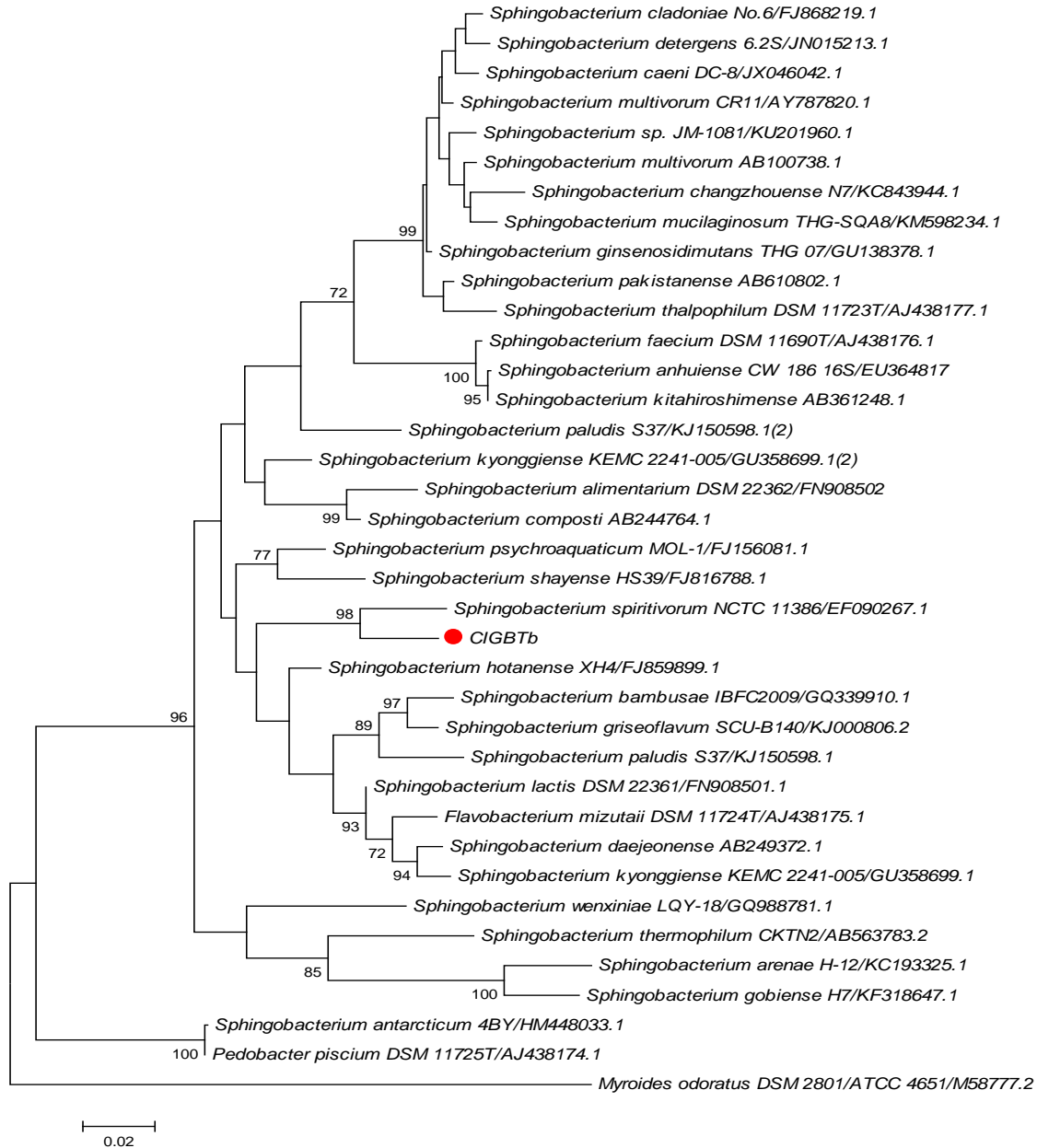


Fig. 1. Árbol filogenético según el método de máxima probabilidad basado en la secuencia de ARNr 16S. El árbol muestra la relación entre la cepa CIGBTb y algunos miembros representativos de la familia *Sphingobacteriaceae*. Los valores bootstrap (expresados en por cientos de 1 000 repeticiones) por encima de 70 % aparecen en los nódulos de las ramas. La barra representa 2 sustituciones por cada 100 nucleótidos.

El tratamiento *in vitro* con el empleo de *Sphingobacterium* sp. CIGBTb, a concentraciones de 10^8 ufc/mL provocó una inhibición de 87 % en la eclosión de los huevos de *Meloidogyne* sp. y 100 % de inhibición en la eclosión de los huevos de *Haemonchus* sp. (**Fig. 2**). Se observó una gran vacuolización y poca movilidad en las larvas que lograron emerger.

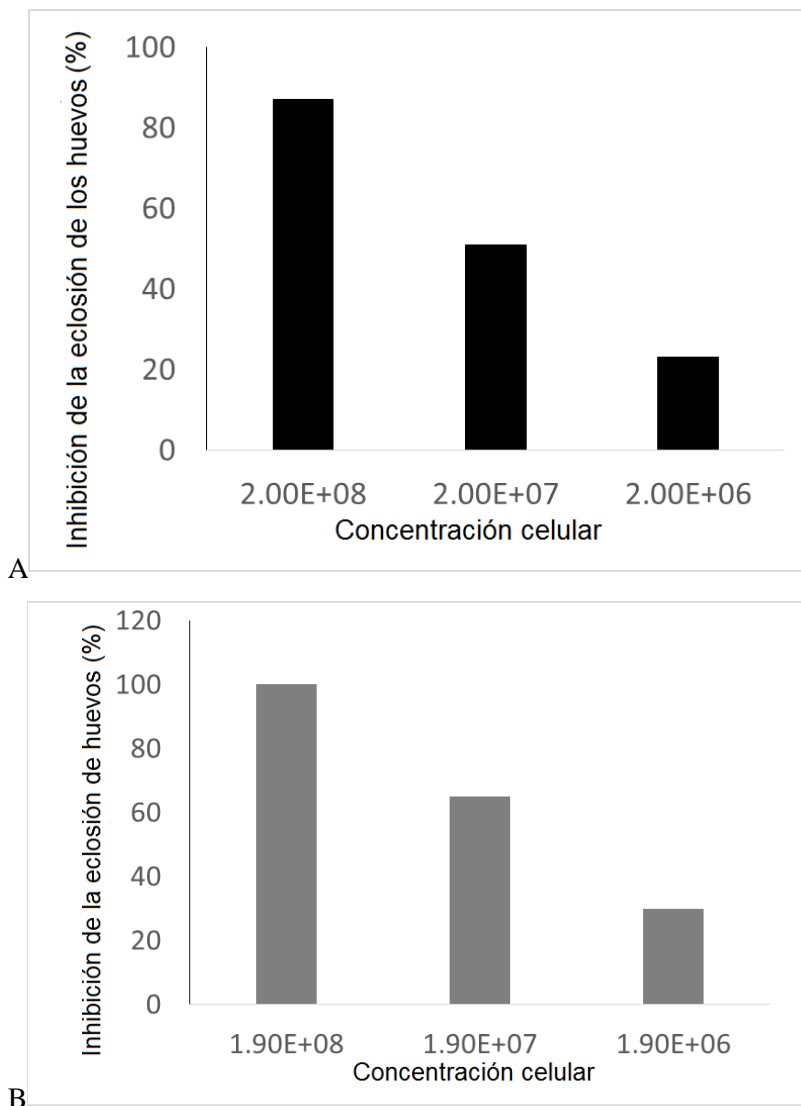


Fig 2. Inhibición en la eclosión de huevos de *Meloidogyne* spp (A) y *Haemonchus* spp (B) a diferentes concentraciones de *Sphingobacterium* CIGBTb

En las macetas, *Sphingobacterium* sp. CIGBTb redujo significativamente ($P < 0,05$) el índice de formación de agallas, de 5,3 a 2,9. No se observaron diferencias significativas en el control positivo. Por otra parte, *Sphingobacterium* sp. CIGBTb disminuyó significativamente las formaciones de agallas (58 %) en las raíces de *Solanum lycopersicum* (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de *Sphingobacterium* sp. CIGBTb en las raíces de *S. lycopersicum* UC-8213 infestado con *Meloidogyne* spp.

Tratamiento	Severidad de los nódulos	
	Índice de formación de nódulos	Nódulos/g de raíz
CIGBTb	2,9 ± 1,5 b	27,8 ± 4,8 b
Control	5,3 ± 1,2 a	47,8 ± 2,8 b

Letras diferentes representan diferencias significativas en la prueba de Duncan ($P < 0, 05$).

Una evaluación del número de huevos por masa, aislados de los diminutos nódulos que se formaron, mostró que *Sphingobacterium* sp. CIGBTb redujo el número de huevos en cada masa (53 %), mientras que no se observaron cambios en los controles (**Fig. 3**).

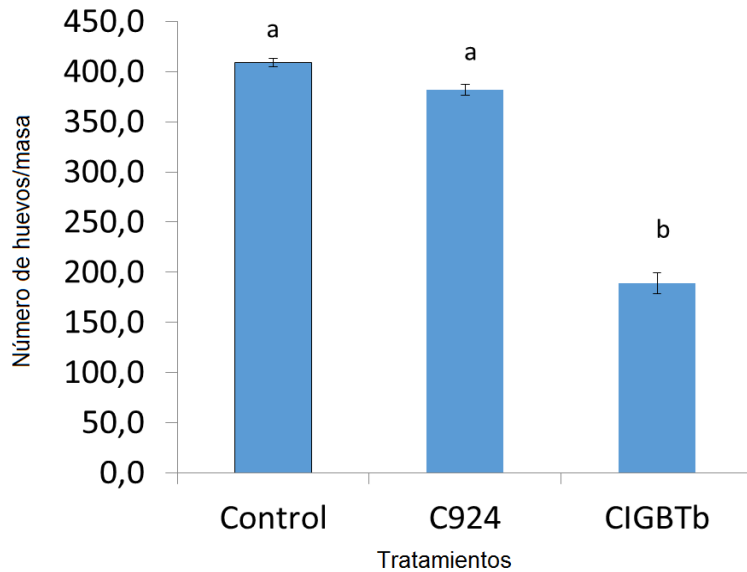


Fig 3. Número de huevos por masa en las plantas tratadas con caldo de soya triptona (control) *Sphingobacterium* sp. CIGBTb (CIGBTb) y Hebernem® (C924). Letras diferentes representan diferencias significativas en la prueba de Duncan ($P < 0,05$).

Una concentración de aproximadamente 10^5 ufc/mL, *Sphingobacterium* sp. CIGBTb también estimuló el crecimiento de *Solanum lycopersicum*. También aumentó el peso de la planta en 0,59 veces por encima del peso de las plantas del tratamiento control sin la bacteria (**Fig. 4**).

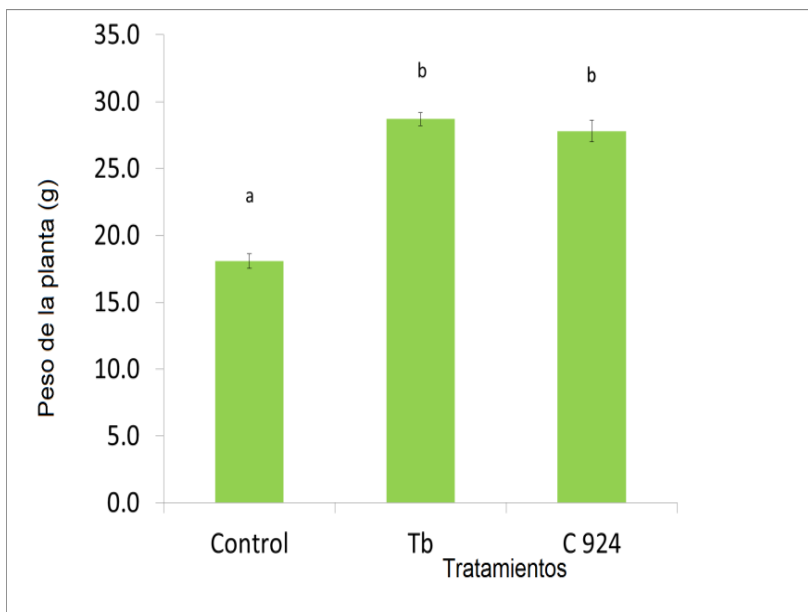


Fig 4. Peso de plantas de *S. lycopersicum* UC-8213 infestadas con *Meloidogyne* spp., 40 días después del tratamiento con caldo soya triptona (control), *Sphingobacterium* sp. CIGBTb (CIGBTb) y Hebernem® (C924)

Letras diferentes representan diferencias significativas en la prueba de Duncan ($P < 0, 05$).

El CIGBTb presentó varios posibles atributos de patogenicidad, como tripsina, esterases y enzimas lipasa estereasas. El sulfuro de hidrógeno y las proteasas extracelulares (con la gelatina y la caseína como sustratos) no fueron detectados mediante la prueba convencional y la cepa logró crecer lentamente en medio de cultivo mínimo con quitina y quitosano, aunque no se observó la formación de halo de hidrólisis. Además, los resultados ofrecidos por el sistema Apizym fueron positivos para la fosfatasa ácida y la fosfatasa alcalina, dos enzimas importantes para la solubilización de fósforo en el suelo por medio de las bacterias.

DISCUSIÓN

Anteriormente se había reportado el género *Sphingobacterium* como un componente de la rizosfera de vid con propiedades supresoras de nematodos (Vargas-Ayala, Rodríguez-Kábana, Morgan-Jones, McInroy, & Kloepper, 2000; Aballay, Mårtensson, & Persson, 2011). Estos últimos demostraron la efectividad de la cepa de *Sphingobacterium spiritivorum* 64 *in vitro*, así como otra cepa del género (*Sphingobacterium nematocida*) que se aisló en China durante un estudio sobre la diversidad de los organismos nematocidas endofíticos (Liu *et al.*, 2012). No obstante, existe poca información sobre los ensayos en maceta y los posibles mecanismos de acción de estos géneros de bacterias. Mena *et al.* (1996) patentó la cepa de *Sphingobacterium spiritivorum* C926 y demostró su efectividad para controlar *Radopholus similis* y *Meloidogyne incognita* en ensayos de campo y en macetas. Sin embargo, *Sphingobacterium* CIGBRTb no solo tiene actividad nematocida, sino que también estimula el crecimiento de plantas de tomate, posiblemente debido a la solubilización de los fosfatos del suelo, mediante la producción de fosfatasas ácidas y alcalinas, aunque otros mecanismos no han sido estudiados. Anteriormente se conocía la actividad estimuladora del crecimiento de las plantas por parte de *Sphingobacterium canadense* (Mehnaz *et al.*, 2007) y *Sphingobacterium pakistanense* (Ahmed *et al.*, 2014).

Existen varios mecanismos que utilizan las bacterias durante interacciones antagonistas con los nematodos. Uno de ellos es el papel que desempeñan las enzimas hidrolíticas, lo cual está bien documentado para una serie de organismos con actividad híperparasita (Chernin & Chet, 2002). En el caso de *Sphingobacterium* CIGBTb, la cepa tenía actividad quitinasa, quitosanasas, tripsina, esterasa y lipasa esterasa. Estos atributos patogénicos pudieran traer consigo cambios enzimáticos en las capas de quitina, las proteínas y otros lípidos que conforman la cubierta de los huevos y otras estructuras de *Meloidogyne* sp., y por consiguiente, facilitan la ocurrencia de parasitismo.

Existen varias cepas de *Sphingobacterium* que producen quitosanasas similares a *Mitsuaria* ChoA (Yun, Amakata, Matsuo, Matsuda, & Kawamukai, 2005) y esta cepa en particular pudiera ser parte de ellas. Además, CIGBTb libera esterases C4 y C8, como el *Sphingobacterium nematocida* (Liu *et al.*, 2012), que pudieran explicar la inhibición de la eclosión *in vitro* de huevos de *Meloidogyne* sp. Sin embargo, las larvas que logran emerger y parasitar las plantas de tomate en los ensayos de maceta no solo producen un bajo número de agallas, sino también que estas son más pequeñas, con menos huevos en las masas que el control. El silenciamiento de un gen de parasitismo, el 16D10, expresado en las células de las glándulas subventrales de *M. incognita* también provoca un efecto similar en *Arabidopsis*. Se produce una reducción sustancial del número de agallas entre 63 y 90 %, así como en el tamaño de las agallas (Huang, Allen, Davis, Baum y Hussey, 2006).

CONCLUSIONES

Los zoonematodos son una fuente apropiada para la búsqueda de biocontroladores de nematodos fitopatógenos. *Sphingobacterium* sp. CIGBTb aislado de huevos de *Tricostrongylus* sp. es una alternativa novedosa para el control biológico. La cepa reduce el número de huevos por masa, a diferencia del ingrediente activo de C924 del producto nematicida Hebernem®, que libera quitinasas y sulfuro de hidrógeno. Los resultados de este estudio corroboraron la efectividad del aislado nativo como antagonista, así como su potencial como biofertilizante de las plantas y control biológico del nematodo *Meloidogyne* sp., formador de nódulos en *Solanum lycopersicum*.

REFERENCIAS

- Aballay, E., Mårtensson, A., & Persson, P. (2011). Screening of rhizosphere bacteria from grapevine for their suppressive effect on *Xiphinema index* Thorne & Allen on *in vitro* grape plants. *Plant and Soil*, 347(1-2), 313-325. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-011-0851-6>
- Ahmed, I., Ehsan, M., Sin, Y., Paek, J., Khalid, N., Hayat, R., & Chang, Y. H. (2014). *Sphingobacterium pakistanensis* sp. nov., a novel plant growth promoting rhizobacteria isolated from rhizosphere of *Vigna mungo*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105(2), 325-333. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10482-013-0077-0>
- Bridge, J., & Page, S. (1980). Estimation of root-knot nematode infestation levels on roots using a rating chart. *International Journal of Pest Management*, 26(3), 296-298. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09670878009414416>

- Cheng, C. Y., & Li, Y. K. (2000). An *Aspergillus chitosanase* with potential for large-scale preparation of chitosan oligosaccharides. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 32(3), 197-203. <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1042/BA20000063>
- Chernin, L., & Chet, I. (2002). Microbial enzymes in the biocontrol of plant pathogens and pests. In *Enzymes in the Environment*. USA: CRC Press.
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.*, 17(6), 368-376. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01734359>
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4):783-91. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
- Gómez, L., Rodríguez, M., Enrique, R., Miranda, I. & González, E. (2009). Factores limitantes de los rendimientos y calidad de las cosechas en la producción protegida de hortalizas en Cuba. *Revista de Protección Vegetal*, 24(2), 117-122. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000200007
- Holmes, B., Owen, R., & Hollis, D. (1982). *Flavobacterium spiritivorum*, a new species isolated from human clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 32(2), 157-165. <https://doi.org/10.1099/00207713-32-2-157>
- Huang, G., Allen, R., Davis, E. L., Baum, T. J., & Hussey, R. S. (2006). Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(39), 14302-14306. <https://www.pnas.org/content/103/39/14302.short>
- Kim, K.-H., Ten, L. N., Liu, Q.-M., Im, W.-T., & Lee, S.-T. (2006). *Sphingobacterium daejeonense* sp. nov., isolated from a compost sample. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(9), 2031-2036. <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.64406-0>
- Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular Evolution*, 16(2):111-120. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01731581>
- Liu, J., Yang, L.-L., Xu, C.-K., Xi, J.-Q., Yang, F.-X., Zhou, F.,... Li, W.-J. (2012). *Sphingobacterium nematocida* sp. nov., a nematicidal endophytic bacterium isolated from tobacco. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(8), 1809-1813. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.033670-0>
- Manzanilla-López, R. H., & Lopez-Llorca, L. V. (Eds.). (2017). Perspectives in Sustainable Nematode Management Through *Pochonia chlamydosporia* Applications for Root and

- Rhizosphere. *Health. Springer.* <https://link.springer.com/book/10.1007%2F978-3-319-59224-4>
- Mehnaz, S., Weselowski, B., & Lazarovits, G. (2007). *Sphingobacterium canadense* sp. nov., an isolate from corn roots. *Systematic and applied microbiology*, 30(7), 519-524. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2007.06.002>
- Mena, J., De la Riva, G., Vázquez, R. P., Fernández, M., Coego, A., García, M., ... & Mencho, J. D. (1996). Nematocidic agent and method for the biocontrol of nematodes. World Intellectual Property International Bureau.
- Mena, J., Pimentel, E., Veloz, L., Hernández, A., León, L., Ramírez, Y.... Pujol, M. (2003). Aislamiento y determinación de cepas bacterianas con actividad nematocida. Mecanismo de acción de *C. paurometabolum* C-924 sobre nematodos. *Biotecnología Aplicada*, 20(4), 248-252. <http://elfoscientiae.cigb.edu.cu/PDFs/Biotecnol%20Apl/2003/20/4/BA002004-248252RP.pdf>
- Netscher, C., & Sikora, R. A. (1990). Nematode parasites of vegetables. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture., 237-283. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19901182756>
- Rodríguez, M. G., Sánchez, L., Gómez, L., Hidalgo, L., González, E., Gómez, M., ... & Hernández, R. (2005). Meloidogyne spp., plagas de las hortalizas: alternativas para su manejo en sistemas de cultivo protegido. (No. 2132). *Revista de Protección Vegetal*. <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=pubs.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=002045>
- Sánchez, I., Alvarez, I., Wong, I., Somontes, D., Basulto, R., Morán, R. ... Mena, J. (2018). Characterization of Cuban native bacteria isolated from nematodes as potential biological control agents for *Meloidogyne* spp., 33(1), 1-11. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522018000100004
- Sánchez, I., Mena, J., Coca, Y., Marín, M., Hernández, A., Olazábal A, Zamora, J. (2003). Acción in vitro de cepas bacterianas sobre *Haemonchus* spp. Informe Preliminar. *Rev. Salud Anim. l.*, 25(3), 145-148.
- Shimahara, K., & Takiguchi, Y. (1988). Preparation of crustacean chitin. *Methods Enzymo*, 161, 417-423. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)61049-4](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)61049-4)
- Shivaji, S., Ray, M., Rao, N. S., Saisree, L., Jagannadham, M., Kumar, G. S., ... Bhargava, P. M. (1992). *Sphingobacterium antarcticus* sp. nov., a psychrotrophic bacterium from the soils of Schirmacher Oasis, Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 42(1), 102-106. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-1-102>

- Thompson, J. D., Gibson T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24):4876-82. <https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>
- VanDemark, P. J., & Lee, J. J. (1991). Selected exercises from microbes in action: a laboratory manual of microbiology. WH Freeman.
- Vargas-Ayala, R., Rodríguez-Kábana, R., Morgan-Jones, G., McInroy, J. A. & Kloepper, J. W. (2000). Shifts in soil microflora induced by velvetbean (*Mucuna deeringiana*) in cropping systems to control root-knot nematodes. *Biological Control*, 17(1), 11-22. <https://pdfs.semanticscholar.org/8919/8d6b6db7ab2f617ce8a5fb2a60a932db63be.pdf>
- Whitehead, A. G. (1997). Plant-parasitic nematodes: their importance and control. *Plant Nematode Control*, 1-12. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19981700197>
- Yabuuchi, E., Kaneko, T., Yano, I., Moss, C. W., & Miyoshi, N. (1983). *Sphingobacterium* gen. nov., *Sphingobacterium spiritivorum* comb. nov., *Sphingobacterium multivorum* comb. nov., *Sphingobacterium mizutae* sp. nov., and *Flavobacterium indologenes* sp. nov.: Glucose-Nonfermenting Gram-Negative Rods in CDC Groups IIK-2 and IIB. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 33(3), 580-598. <https://doi.org/10.1099/00207713-33-3-580>
- Yun, C., Amakata, D., Matsuo, Y., Matsuda, H., & Kawamukai, M. (2005). New chitosan-degrading strains that produce chitosanases similar to ChoA of *Mitsuaria chitosanitabida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5138-5144. DOI: [10.1128/AEM.71.9.5138-5144.2005](https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5138-5144.2005)
- Zhang, J., Zheng, J.-W., Cho, B. C., Hwang, C. Y., Fang, C., He, J., & Li, S.-P. (2012). *Sphingobacterium wenxiniae* sp. nov., a cypermethrin-degrading species from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(3), 683-687. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.033118-0>

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

ISO: Diseño y supervisión de aislamiento e identificación de las cepas, diseño de experimentos *in vitro* e *in vivo* y redacción del manuscrito. RMV: Diseño, formulación y supervisión del experimento, redacción y revisión del manuscrito. IAL: Recolección de los datos experimentales y redacción del manuscrito. IWP: Recolección de los datos experimentales y redacción del manuscrito. DSS: Recolección de los datos experimentales *in vitro* y redacción del manuscrito. EPV: Diseño y supervisión del experimentos y redacción del manuscrito. JMC: Análisis

Sánchez Ortiz, Ileana., Morán Valdivia, Rolando., Alvarez Lugo, Irene., Wong Padilla, Idania., Somontes Sánchez, Danalay., Pimentel Vázquez, Eulogio., Mena Campos, Jesús., Rojas Badía, Marcia

estadístico de los datos y redacción del manuscrito, MRB, análisis estadístico de los datos y redacción del manuscrito.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existen conflicto de intereses.