

## Búsqueda y aislamiento de hongos nematófagos vs *Meloidogyne* spp. en el norte de Sinaloa, México\*

### Search and isolation of nematophagous fungi vs *Meloidogyne* spp. in northern Sinaloa, Mexico

Juan Fernando Sánchez Portillo<sup>1§</sup>, Gabriel Antonio Lugo García<sup>1</sup>, Manuel Mundo Ocampo<sup>2</sup>, Álvaro Reyes Olivas<sup>1</sup>, Irma De Ley Tandingan<sup>3</sup> y J. Ole Becker<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Sinaloa- Escuela Superior de Agricultura del Valle del Fuerte. Calle 16 y Av. Japaraqui, Juan José Ríos, Ahome, Sinaloa, C. P. 81110, Tel: 68 78 96 09 08. (gabriel\_lugo9010@hotmail.com). <sup>2</sup>Lab. de Nematología Agrícola- CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa, Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250, Guasave, Sinaloa C. P. 81101, Tel. 68 71 58 52 81. (manuel.mundo@ucr.edu). <sup>3</sup>Universidad de California- Department of Nematology, 900 University Ave. 92521, Tel. 909 787 2691. (irma.deley@ucr.edu; obecker@ucr.edu). <sup>§</sup>Autor para correspondencia: sanchezjfer@gmail.com.

#### Resumen

La producción de diversos cultivos hortícolas en el norte de Sinaloa, está siendo limitada por el ataque del “nematodo nodulador” *Meloidogyne* spp. La búsqueda de alternativas para el manejo de este fitoparásito surge como respuesta a esta problemática, entre éstas el aislamiento e identificación de hongos nematófagos nativos del Valle del Fuerte. El objetivo de la presente investigación fue identificar hongos nematófagos existentes en suelos donde se producen cultivos en condiciones protegidas y susceptibles a *Meloidogyne* spp. El estudio se realizó de enero 2013 a julio 2014 en cuatro zonas productoras de chile c.v. Lorca Bell Pepper del Valle del Fuerte, donde se recolectaron muestras de suelo, las cuales fueron procesadas mediante el método de espolvoreado en placa (agua-agar). Para purificar y seleccionar hongos nematófagos, los aislamientos se transfirieron a placas con agar harina de maíz, identificándose las estructuras morfológicas para el diagnóstico a nivel género. Se identificaron a los generos: *Dactylella*, *Arthrobotrys* y *Nematoctonus*.

**Palabras clave:** *Dactylella*, *Arthrobotrys*, *Nematoctonus*, hongos nematófagos.

#### Abstract

Production of various horticultural crops in northern Sinaloa, is being limited by the attack of “root-knot nematode” *Meloidogyne* spp. The search for alternatives to manage this plant parasite rises as response to this problem; among the solutions is isolation and identification of native nematophagous fungi from Valle del Fuerte. The aim of this research was to identify existing nematophagous fungi in soils where crops are grown under protected conditions and susceptible to *Meloidogyne* spp. The study was conducted from January 2013 to July 2014 in four producing areas of pepper c.v. Bell Pepper from Valle del Fuerte, where soil samples were collected, which were processed through the sprinkling plate method (water-agar). To purify and select nematophagous fungi, isolates were transferred to plates with agar cornmeal, identifying morphological structures for diagnostic at genus level. Identified genres were: *Dactylella*, *Arthrobotrys* and *Nematoctonus*.

**Keywords:** *Dactylella*, *Arthrobotrys*, *Nematoctonus*, nematophagous fungi.

\* Recibido: junio de 2016  
Aceptado: septiembre de 2016

## Introducción

El control biológico de nematodos a través de hongos nematófagos es una alternativa prometedora para el manejo de los parásitos de las plantas (Duponnois *et al.*, 2001; Sorbo *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2007). Por tanto se han realizado estudios extensos de su taxonomía, filogenia, biología y ecología (Cooke 1963; Kerry 1987; Sayre y Walter 1991; Sikora 1992; Morton *et al.*, 2004; Dong y Zhang 2006). Son considerados un grupo importante de microorganismos del suelo que pueden suprimir las poblaciones de nematodos parásitos de las plantas y animales. Se clasifican cuatro grupos de manera general en base a los mecanismos de ataque a los nematodos a) trapeo de nematodos: estos utilizan mecánicamente nódulos o hifas adhesivas, pertenecen a un grupo de ascomicetos asexuales con especies definidas por su tipo de dispositivos de captura (Scholler *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2005; Yang y Liu, 2006; Yang *et al.*, 2007); b) hongos endoparásitos usando sus esporas; c) los hongos que utilizan las puntas de sus hifas para invadir hembras y huevecillos; y d) hongos productores de toxinas que inmovilizan a los nematodos (Kendrick, 2001; Liu *et al.*, 2009).

El control químico sigue utilizándose como la opción más rápida para enfrentar los problemas fitosanitarios. Sin embargo, la implicación ambiental es un tema muy discutido actualmente, y ante este panorama, el control biológico, surge como una alternativa promisoriosa en el control de patógenos y plagas incluidos los nematodos fitoparásitos. Los hongos nematófagos son habitantes del suelo que utilizan sus esporas o micelio para infectar nematodos vermiformes. Se les encuentra en diferentes tipos de sustratos y son capaces de sobrevivir en condiciones climáticas o nutricionales extremas en diferentes regiones geográficas del mundo (Gray y Soh, 1989). Su abundancia varía de 1, 8 y 150 propágulos por gramo de suelo y esto obedece principalmente a la cantidad de materia orgánica, contenido de agua, tipo de suelo, temperatura y presencia de nematodos hospederos (Persmark y Jansson, 1997).

Los antagonistas de estos nematodos han sido localizados en un amplio rango de organismos que incluyen hongos, bacterias, virus, plantas, protozoarios, turbelarios, tardígrados, ácaros e inclusive otros nematodos. Jansson y Lopez-Llorca (2001) afirman que de una a cinco especies de estos microorganismos son recuperadas de una muestra de suelo. Dentro de este amplio grupo de hongos nematófagos, los más importantes en la regulación de poblaciones

## Introduction

Biological control of nematodes through nematophagous fungi is a promising alternative for the management of plant parasites (Duponnois *et al.*, 2001, Sorbo *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2007). Therefore have been conducted extensive studies of their taxonomy, phylogeny, biology and ecology (Cooke 1963; Kerry 1987; Sayre and Walter 1991; Sikora 1992; Morton *et al.*, 2004; Dong and Zhang 2006). This are considered an important group of soil microorganisms that can suppress parasitic nematode populations of plants and animals. Four groups were classified overall based on the mechanisms of attack to nematodes a) trapping nematodes: these use mechanically nodules or adhesive hyphae, belong to a group of asexual ascomycete with defined species by its type of capture devices (Scholler *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2005; Yang and Liu, 2006; Yang *et al.*, 2007); b) endoparasitic fungi using its spores; c) fungi that use the tips of their hyphae to invade females and eggs; and d) fungi producing toxins that immobilizes nematodes (Kendrick, 2001; Liu *et al.*, 2009).

Chemical control is still used as the fastest option to address phytosanitary problems. However, the environmental implication is currently a hot topic and in this scenario, biological control, emerges as a promising alternative in controlling pathogens and pests including plant parasitic nematodes. Nematophagous fungi are soil residents that use their spores or mycelium to infect worm-like nematodes. They are found in different types of substrates and are able to survive in extreme climatic or nutritional conditions in different geographic regions of the world (Gray and Soh, 1989). Its abundance varies from 1, 8 and 150 propagules per gram of soil and this is mainly due to the amount of organic matter, water content, soil type, temperature and presence of host nematodes (Persmark and Jansson, 1997).

Antagonists of these nematodes have been located in a wide range of organisms including fungi, bacteria, viruses, plants, protozoa, turbellaria, tardigrades, mites and even other nematodes. Jansson and López-Llorca (2001) state that one to five species of these microorganisms are recovered from a soil sample. Within this broad group of nematophagous fungi, the most important in the regulation of nematode populations are some species of the genera: *Arthrobotrys*, *Dactylella*, *Dactylellina*, *Gamsylella*, *Drechslerella*, *Monacrosporium*, *Monacrosporiella*, *Nematoctonus*,

de nematodos son algunas especies de los géneros: *Arthrobotrys*, *Dactylella*, *Dactylellina*, *Gamsylella*, *Drechslerella*, *Monacrosporium*, *Monacrosporiella*, *Nematoctonus*, *Stylopage*, *Stropharia*, *Didymo zoophaga* (Chen and Dickson, 2004). Desde la descripción de *Arthrobotrys oligospora* por (Zopf, 1988), se han realizado muchos estudios acerca de la taxonomía, ecología y fisiología de estos hongos. Más de 200 especies de hongos nematófagos han sido descritas; un grupo con un alto potencial para ser usadas como agentes de control biológico para la supresión de nematodos fitoparásitos (Qadri, 1989; Qadri y Seleh, 1990; De Leij y Kerry, 1991; Khan y Akram, 2000; Kerry, 2000). El presente estudio contribuye al conocimiento de hongos en nematófagos y el primer reporte de varios aislamientos, obtenido en el norte de Sinaloa, como una alternativa el manejo integrado del nematodo formador de nódulos en raíz *Meloidogyne* spp.

## Materiales y métodos

### Zona de estudio

Se muestrearon cuatro regiones productoras de chile Bell Pepper cv Lorca (*Capsicum annuum* L.) ubicadas en el Valle del Fuerte, Sinaloa (Figura 1). Las muestras de suelo fueron colectadas de la rizosfera en áreas naturalmente infestadas por el complejo de especies de *Meloidogyne*, durante el ciclo agrícola 2013-2014 primavera verano y otoño invierno, el cultivo a muestrear se determinó por dos factores, 1) producción bajo condiciones de invernadero casa sombra; y 2) productores cooperantes para realizar y seleccionar los sitios de muestreo, cada muestra compuesta consistió de 2.5 kg. de suelo, las etapas de muestreo en el cultivo fueron en los estados de desarrollo a los (0-30 ddt) inicial, (60 y 90 ddt-madurez de fruto) intermedio y (120 ddt-cosecha) final del cultivo en las regiones de los Ejidos: Las Panguitas (25° 54' 56.65" latitud norte 108° 50' 16.70" longitud oeste), Campo 35 (25° 49' 32.02" latitud norte 108° 54' 20.77" longitud oeste), Jiquilpan (25° 47' 41.4" latitud norte 108° 55' 52.8" longitud oeste) y Estación Bamoa (25° 50' 11.33" latitud norte 108° 54' 37.2" longitud oeste), en condiciones protegidas cuyos sitios agrícolas se encontraron establecidos con chile cv Lorca Bell Pepper susceptible a *Meloidogyne* spp. Con el fin de obtener un mayor número de aislamientos de hongos nematófagos en los sitios muestreados, se procesaron bajo dos métodos por separado embudo de Baermann y tamizado de Cobb.

*Stylopage*, *Stropharia*, *Didymo zoophaga* (Chen and Dickson, 2004). From the description of *Arthrobotrys oligospora* by (Zopf, 1988), there have been many studies on the taxonomy, ecology and physiology of these fungi. More than 200 species of nematophagous fungi have been described; a group with a high potential to be used as biological control agents to suppress plant parasitic nematodes (Qadri, 1989; Qadri and Seleh, 1990; De Leij and Kerry, 1991, and Akram Khan, 2000; Kerry, 2000). This study contributes to the knowledge of fungi in nematophagous and the first report of several isolates, obtained in northern Sinaloa, as an alternative to the integrated management of the root knot nematode *Meloidogyne* spp.

## Materials and methods

### Study area

Four producing regions of Bell Pepper cv Lorca (*Capsicum annuum* L.) located in the Valle del Fuerte, Sinaloa (Figure 1) were sampled. Soil samples were collected from the rhizosphere in areas naturally infested with *Meloidogyne* species during the agricultural cycle spring-summer and autumn-winter 2013-2014, the crop to be sampled was determined by two factors: 1) production under greenhouse conditions; and 2) cooperating farmers to make and select sampling sites, each composite sample consisted of 2.5 kg of soil; crop sampling stages were in the developmental stages at (0-30 ddt) initial, (60 and 90 ddt- fruit maturity) intermediate and (120 ddt-harvest) end of the crop in the regions from Ejidos: the Panguitas (25° 54' 56.65" north latitude, 108° 50' 16.70" west longitude), Campo 35 (25° 49' 32.02" north latitude 108° 54' 20.77" west longitude), Jiquilpan (25° 47' 41.4" north latitude, 108° 55' 52.8" west longitude) and Estacion Bamoa (25° 50' 11.33" north latitude 108° 54' 37.20" west longitude), under protected conditions whose agricultural sites had established pepper cv Lorca Bell Pepper susceptible to *Meloidogyne* spp. In order to obtain a greater number of isolates from nematophagous fungi at the study sites, these were processed under two separate methods Baermann funnel and Cobb sieving.

### Sampling procedure

In total 20 field visits were conducted. For the isolation of parasitized larvae and nematophagous fungi from soil, were delimited in each greenhouse for each region, areas identified with root-knot nematode problems, within which



**Figura 1. Sitios de muestreo para la identificación de hongos nematófagos de las regiones productoras chile cv Lorca Bell Pepper en el Valle del Fuerte, Sinaloa (fuente: google earth® 2015).**

**Figure 1. Sampling sites for identification of nematophagous fungi from producing regions of pepper cv Lorca Bell Pepper in Valle del Fuerte, Sinaloa (source: google earth® 2015).**

### Procedimiento de muestreo

En total se realizaron 20 visitas de campo. Para el aislamiento de larvas parasitadas y hongos nematófagos del suelo, se delimitaron en cada malla sombra para cada región, áreas reconocidas con problemas del nematodo agallador, en cuyo interior se seleccionaron dos áreas de muestreo de 140 m<sup>2</sup>, separadas entre si por una distancia de 1.6 m, reconocidas como altamente infestadas; es decir cada área consistió de 28 m de longitud por 5 m ancho. En cada región y área determinada se muestreó con la ayuda de una barrena modelo LS Soil Sampler de 91.4cm con un tubo de muestreo de 27.5 cm se colectaron 25 submuestras en zig-zag dentro del área con problema del nematodo agallador, a una profundidad de 25 cm, obteniendo en promedio de 2 a 2.5 kg de suelo por muestra compuesta almacenadas en bolsas de polietileno en el interior de una hielera debidamente etiquetadas y trasladadas al Laboratorio de Nematología de la Escuela Superior de Agricultura del Valle del Fuerte de la Universidad Autónoma de Sinaloa, para procesarlas. Se determinaron las coordenadas geográficas en cada invernadero tipo casa sombra mediante un geoposicionador marca Etrex®, Garmin.

### Recolecta de nematodos

Se recolectaron muestras de suelo de la raíz del cultivo de chile c.v. Lorca Bell Pepper dentro áreas naturalmente infestadas por el complejo de especies de *Meloidogyne*, durante el ciclo primavera verano. Las muestras de suelo

two sampling areas of 140 m<sup>2</sup> were selected, separated from each other by a distance of 1.6 m, recognized as highly infested; i.e. each area consisted of 28 m long and 5 m wide. In each region and specific area was sampled with the help of an auger model LS Soil sampler of 91.4cm with a sampling tube of 27.5 cm, 25 sub-samples were collected in zig-zag in the area recognized with root-knot nematode problems, at a depth of 25 cm, obtaining an average of 2 to 2.5 kg of soil per composed sample stored in polyethylene bags inside a cooler properly labeled and transferred to Nematology Laboratory of the Escuela Superior de Agricultura del Valle del Fuerte from the Autonomous University of Sinaloa, for processing. The geographical coordinates of each greenhouse were determined through a GPS Etrex®, Garmin.

### Nematode collection

Soil samples from the root of pepper cv. Lorca Bell Pepper were collected within naturally infested areas by *Meloidogyne* species, during the spring-summer cycle. Soil samples were collected at fruit maturity (60 and 90 days after transplantation) and end of harvest (120 days), with the help of an auger model LS Soil Sampler, 25 sub-samples were collected in zig-zag within the problem area of root-knot nematode at a depth of 25 cm, obtaining an average of 2 to 2.5 kg of soil per composite sample. The method used for extraction of parasitized nematode larvae was Baermann funnel modified according to (Christie and Perry, 1951) consists in suspending soil in a given volume of water, and after a short rest period, the suspension is poured on a superimposed set of sieves of 100 and 400 mesh Duves®. The soil retained in the finest sieve is transferred to a cylinder with fabric bottom, which subsequently is placed in the funnel. After 24 to 48 h, all active forms of nematodes have passed through the cloth or paper and can be collected in a small volume of water when removing the mohr clamp from the hose and then proceeded to observation under a compound microscope Nikon Eclipse E200, nematodes that showed parasitism were collected with the help of a micropipette 10 to 100 µL Eppendorf, and place on plates with medium water-agar 5g L<sup>-1</sup> (AA) (Barron, 1977).

### Fungi collection

Soil samples were collected from the root of pepper c.v. Lorca Bell Pepper within areas naturally infested with *Meloidogyne* species at a depth of 25 cm during the fall-winter cycle (O-I) during initial maturity (0 and 30 days after transplantation) and intermediate (60 days), with the aid of an auger model LS soil sampler, 25 sub-samples were



fueron recolectadas en la etapa de madurez del fruto (60 y 90 días después del trasplante) y final de cosecha (120 días), con la ayuda de una barrena modelo LS Soil Sampler se colectaron 25 submuestras en zig-zag dentro del área con problema del nematodo agallador, a una profundidad de 25 cm, obteniendo en promedio de 2 a 2.5 kg de suelo por muestra compuesta. El método utilizado para la extracción de larvas parasitadas de nematodos fue el embudo de Baermann modificado según (Christie y Perry, 1951) consiste en suspender el suelo en un determinado volumen de agua, y después de un corto período de reposo, la suspensión se vierte sobre un juego superpuesto de tamices de 100 y 400 mallas Duves®. El suelo retenido en el tamiz más fino, se transfiere a un cilindro con fondo de tela, que posteriormente se coloca en el embudo. Después de 24 a 48 h, todas las formas activas de nematodos han pasado a través de la tela o papel y pueden ser recogidas en un pequeño volumen de agua al retirar la pinza mohr de la manguera y posterior se observaron bajo un microscopio compuesto marca Nikon Eclipse E200, los nematodos que demostraron parasitismo se colectaron con la ayuda de una micropipeta 10 a 100 µL eppendorf®, y se colocaron en placas con medio agua-agar 5 g L<sup>-1</sup> (A-A) (Barron, 1977).

### Recolecta de hongos

Se recolectaron muestras de suelo de la raíz del cultivo de chile c.v. Lorca Bell Pepper dentro áreas naturalmente infestadas por el complejo de especies de *Meloidogyne*, a una profundidad de 25 cm, durante el ciclo otoño invierno (O-I), en la etapa de madurez del inicial (0 y 30 días después del trasplante) e intermedio (60 días), con la ayuda de una barrena modelo LS Soil Sampler se colectaron 25 submuestras en zig-zag dentro del área con problema del nematodo agallador, a una profundidad de 25 cm, obteniendo en promedio de 2 a 2.5 kg de suelo por muestra compuesta, debidamente etiquetadas se trasladaron al Laboratorio de Nematología. El método utilizado fue el tamizado de Cobb (Staniland, 1954); es decir, cada muestra de suelo, se homogenizó con agua en una cubeta de 19 L, después el volumen de suelo se depositó en otra cubeta pasando a través del tamiz de 80 mallas Duvesa®, desechándose el sedimento y lo obtenido en el tamiz para eliminar piedras y materia orgánica de gran tamaño difícil de manipular en cajas de Petri, posteriormente se hizo pasar el sobrenadante a través del tamiz de 200 mallas Duvesa®, el material retenido en el tamiz fue recolectado con la ayuda de una piceta Cienceware®, a un vaso de precipitados de 500 ml Pyrex®, eliminando la mayor cantidad de agua a través de un

collected in zig-zag within the problem area of root-knot nematode, at a depth of 25 cm, obtaining an average of 2 to 2.5 kg of soil per composed sample, properly labeled were transported to the Nematology Laboratory. The method used was Cobb sieving (Staniland, 1954); i.e., each soil sample was homogenized with water in a 19 L bucket, then the soil volume was deposited in another bucket passing through a 80 mesh screen Duvesa®, discarding the sediment and that obtained in the sieve to remove stones and organic matter of great size difficult to handle in petri dishes, then the supernatant was passed through a 200 mesh screen Duvesa®, the material retained on the sieve was collected with the help of a wash bottle Cienceware®, to a beaker of 500 ml Pyrex®, removing as much water through a 500 mesh screen Duvesa® and with a spatula a striated with 1 g of sieved soil was performed on water-agar plates 5 g L<sup>-1</sup> (AA).

### Isolation of nematophagous fungi

This phase was carried out in the Nematology Laboratory at the Escuela Superior de Agricultura del Valle del Fuerte. Soil samples were processed through the "sprinkling plate" method described by Barron (1977) for the isolation of nematophagous fungi. The technique consisted on using for each sampling area, five replications placing in Petri dishes of 9 cm diameter water-agar (A-A) and 1 g of the sieved soil sample. With the help of a spatula a striate was performed in a plate (A-A). The plates were incubated at room temperature (27-30 °C) and fluorescent light. From the fourth day of incubation, plates were observed daily with a stereomicroscope Labomed Luxeo 4Z®, in search for hyphae, conidia, spores or parasitized nematodes (Figure 2).

The observations were made for another week in order to increase the possibility of finding some fungal structure. Once observed the possibility of presence of nematophagous fungi, it proceeded to its isolation and purification. With the help of a micropipette 10 to 100 µL Eppendorf and observed under a compound microscope, conidia, mycelium or parasitized nematodes were taken and placed on medium cornmeal agar (CMA) (corn-meal-agar) Bbl™ 17 g L<sup>-1</sup>, chloramphenicol Vixim® 0.1% (w/v) (Nuñez, 2002a), to prevent bacteria growth, additionally another specific medium CMA 17 g L<sup>-1</sup> was prepared plus reagent rose bengal Faga-lab® to .5 g L<sup>-1</sup>, according to that described by (Perez *et al.*, 2007) for the specific growth *Pochonia chlamydosporia*. The samples were incubated at room temperature (27 to 30 °C) and one week after fungal growth was compared to growth

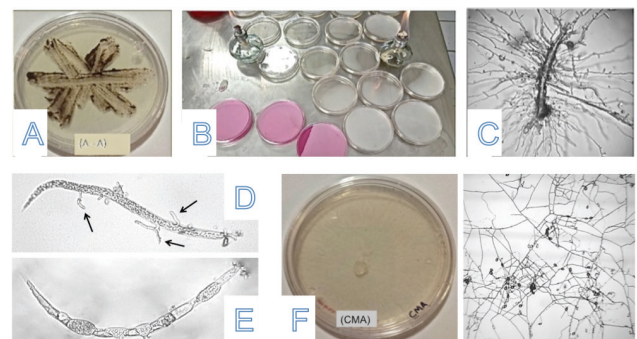
tamiz de 500 mallas Duvesa® y con la ayuda de una espátula se realizó un estriado con 1 g de suelo tamizado en las placas de agua-agar 5 g L<sup>-1</sup> (A-A).

### Aislamiento de hongos nematófagos

Esta fase se llevó a cabo en el Laboratorio de Nematología en la Escuela Superior de Agricultura Valle del Fuerte. Las muestras de suelo se procesaron mediante el método de “espolvoreado en placa” descrito por Barrón (1977) para el aislamiento de hongos nematófagos. La técnica consistió en utilizar por cada área de muestreo, cinco repeticiones colocando en cajas Petri de 9 cm de diámetro con agua-agar (A-A) y 1 g de la muestra de suelo tamizado. Con la ayuda de una espátula se realizó un estriado en la placa (A-A). Las cajas se incubaron a temperatura ambiente (27-30 °C) y luz fluorescente. A partir del cuarto día de incubación las cajas se observaron diariamente con un microscopio estereoscópico Labomed Luxeo 4Z®, en busca de hifas, conidios, esporas o nematodos parasitados (Figura 2).

Las observaciones se realizaron por una semana más con el fin de aumentar la posibilidad de encontrar alguna estructura fúngica. Una vez observada la posibilidad de presencia de hongos nematófagos, se procedió a su aislamiento y purificación. Con la ayuda de una micropipeta de 10 a 100 µL eppendorf® y la observación bajo un microscopio compuesto, se tomaron conidios, micelio o nematodos parasitados y se colocaron en medio agar harina de maíz (CMA) (cornmeal-agar) Bbl™ 17 g L<sup>-1</sup>, con cloramfenicol Vixim® al 0.1% (p/v) (Núñez, 2002a), para evitar el crecimiento de bacterias, adicionalmente se preparo otro medio específico CMA 17 g L<sup>-1</sup> más el reactivo rosa de vengala Faga-lab® al 5 g L<sup>-1</sup>, de acuerdo a lo descrito por (Peréz *et al.*, 2007) para el crecimiento específico de *Pochonia chlamydosporia*. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente (27° a 30C) y una semana después se verificó el crecimiento de los hongos respecto a los crecimientos en medio (CMA + rosa de vengala) no se observo crecimiento alguno; sin embargo, en las placas con medio agua-agar se observó crecimiento de micelio, las colonias obtenidas fueron transferidas en medio (CMA + cloramfenicol Vixim® al 0.1% (p/v) (Núñez, 2002) para su purificación y posteriormente en medio CMA 17 g L<sup>-1</sup>, sin antibiótico para su replicación. Los hongos identificados se conservaron en tubos de ensaye de 20 ml KIMAX®, con medio CMA inclinado y aceite mineral Faga-lab® a 4 °C para su posterior utilización en pruebas patogenicidad (Kerry, 2001). Los tiempos de aparición de hongos nematófagos varían considerablemente, y con el fin de recuperar la mayoría

in medium (CMA + rose bengal) was verified and no growth was observed; however in plates with water-agar mycelium growth was observed, these colonies were transferred into medium (CMA + chloramphenicol Vixim® 0.1% (w / v) (Núñez, 2002) for purification and then in medium CMA 17 g L<sup>-1</sup>, without antibiotic for replication. The identified fungi were stored in test tubes of 20 ml KIMAX®, with sloping CMA and mineral oil Faga-Lab® at 4 °C for later use in pathogenicity tests (Kerry, 2001). The times of appearance of nematophagous fungi vary considerably, and in order to recover most of the species in a particular sample, the plates must be examined daily for up to ten days to make sure to find potential nematophagous fungi in the soil including slow growth (Barron, 1978).



**Figura 2.** A) Estriado en placa (agua-agar); B) Dos tipos de medios específicos para el estriado; C) Nematodo de vida libre parasitado; D-E) Larvas de *Meloidogyne* spp., parasitadas; y F) Crecimiento de hongo *Dactylella* en medio específico agar-harina de maíz (CMA).

**Figure 2.** A) Striate plate (water-agar); B) two types of specific media for striate; C) free living nematode parasitized; D-E) *Meloidogyne* spp larvae, parasitized; and F) *Dactylella* fungus growth in specific medium-cornmeal agar (CMA).

### Identifying nematophagous fungi

Semipermanent mountings were prepared by sample between two glasses (Kohlmeyer and Kohlmeyer, 1972; Connell and Padgett, 1988), which consist placing on each slide Fisherfinest (25 x 75 x 1 mm) a thin section of agar containing the fungal structures of each isolated fungal covered by slides Fisherfinest® superslip (24 x 50 mm) (Shepherd, 1995). Preparations and identifications of nematophagous fungi were studied by direct observation under a compound microscope Nikon Eclipse E200 at different magnifications because some structures are accessible in minor magnification, structures like growing mycelium, conidiophores and conidial were compared, trapping structures was only possible to observe

de las especies en una muestra en particular, las placas deben ser examinadas diariamente durante un máximo de diez días para asegurar encontrar los posibles hongos nematófagos del suelo incluyendo los de crecimiento lento (Barron, 1978).

### Identificación de hongos nematófagos

Se prepararon montajes semipermanentes por el método muestra entre dos vidrios (Kohlmeyer y Kohlmeyer, 1972; Connell y Padgett, 1988), la cual consiste colocar en cada portaobjetos Fisherfinest® (25 x 75 x 1 mm) se agregó una delgada sección de agar que contiene las estructuras fúngicas de cada uno de los hongos aislados cubierto por cubreobjetos Fisherfinest® superslip (24 x 50 mm) (Shepherd, 1995). Las preparaciones e identificaciones de hongos nematófagos se estudiaron por observación directa en un microscopio compuesto marca Nikon Eclipse E200 a diferentes aumentos debido a que algunas estructuras son accesibles en aumentos menores, se compararon estructuras como son: micelio en crecimiento, conidióforos y conidios, las estructuras de trampeo solo fue posible observarlas al momento de transferir y purificar los hongos colectados en placas en medio agar-harina de maíz sin antibiótico (CMA) y agregarles nematodos fitoparasitos y "vida libre", la toma de microfotografías se realizó con el microscopio de contraste de interferencia Nomarski en el Laboratorio de la Universidad de California Campus Riverside.

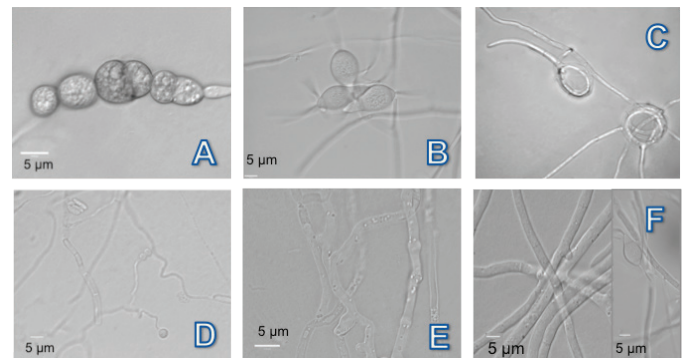
La identificación taxonómica de los hongos nematófagos se realizó mediante la utilización de las claves propuestas por (Cooke y Godfrey, 1964; Barnett y Hunter, 1998). La cual depende de (conidios forma, septos y tamaño) y la presencia o ausencia de clamidosporas (Drechsler, 1937). La colección de hongos nematófagos identificados se encuentra depositada en el Laboratorio de Nematología de la Escuela Superior de Agricultura del Valle del Fuerte. Se conservan en tubos de ensayo de 20 ml KIMAX®, con medio CMA inclinado y aceite mineral Faga-lab® a 4 °C, técnica que disminuye la deshidratación del medio, retarda la actividad metabólica y reduce la posibilidad de infección por ácaros (Jong y Atkins, 1985).

### Resultados y discusión

Se obtuvieron 15 aislamientos de hongos asociados al cultivo de chile Bell Pepper de cuatro zonas productoras del Valle del Fuerte, 14 fueron identificados y uno más se clasificó como micelio estéril ya que no produjo estructuras de

when transferring and purifying fungi collected in plates with cornmeal agar without antibiotic (CMA) and add plant parasitic nematodes and "free living", taking micrographs with differential interference contrast microscopy Nomarski in the Laboratory from the University of California Riverside Campus.

Taxonomic identification of nematophagous fungi was performed using the codes proposed by (Cooke and Godfrey, 1964; Barnett and Hunter, 1998); which depends on conidia form, septa and size and presence or absence of chlamydo spores (Drechsler, 1937). The collection of nematophagous fungi identified is deposited in the Nematology Laboratory of the Escuela Superior de Agricultura del Valle del Fuerte. Preserved in test tubes 20 ml KIMAX®, with sloping CMA medium and mineral oil Faga-Lab® at 4 °C, technique that decreases medium dehydration, slows down metabolic activity and reduces the possibility of infection by mites (Jong and Atkins, 1985).



**Figura 3. Microfotografías de hongos nematófagos aislados de suelo de zonas productoras de chile Bell Pepper en el Valle del Fuerte, Sinaloa. A - C) Clamidosporas, conidios y anillos no constrictores de *Dactylella*; D y E) Nódulos y micelio adhesivo de *Nematoctonus* e incisivo; y F) Red de hifas y conidio de *Arthrobotrys*.**

**Figure 3. Photomicrographs of nematophagous fungi isolated from soil of producing areas of Bell Pepper in the Valle del Fuerte, Sinaloa. A-C) *Dactylella* chlamydo spores, conidia and not constrictors rings; D and E) *Nematoctonus* nodules and adhesive mycelium; and F) *Arthrobotrys* hyphae network and conidia.**

### Results and discussion

15 isolates of fungi associated with the cultivation of Bell Pepper from four producing areas of Valle del Fuerte were obtained, 14 were identified and one more was classified



reproducción que facilitaran su identificación, se aislaron 11 géneros, basado en sus descripciones microscópicas y aspectos morfológicos como fitoparásitos. El género aislado con mayor frecuencia fue *Fusarium*, con 25%, seguido de *Phytophthora*, 19%, *Sclerotinia*, 13%, *F. oxysporum* 9%, *Pythium*, 8%, *Aspergillus*, 6%, *Trichoderma*, 5%, *Fusarium moniliforme* 5%, *Corynespora*, 5%, *Geotrichum*, 3%, *Rhizoctonia*, 2%. Algunos de estos géneros como *Fusarium*, *Sclerotinia* y *Phytophthora*, son considerados patógenos del cultivo sin acción deletérea sobre nematodos. Con respecto al manejo de nematodos fitopatógenos, los hongos nematófagos asociados a suelos infestados por *Meloidogyne* spp., se aislaron tres géneros basado en sus descripciones microscópicas y aspectos morfológicos, el género más frecuente aislado e identificado fue *Dactylella*, 11%, *Arthrobotrys*, 5% y *Nematoctonus*, 4%. En el ejido Las Panguitas fue donde se presentó el mayor número de hongos aislados (57%), seguida del "Campo 35" (21%), Jiquilpan con (12%) y Estación Bamoá con el 10%. Adicionalmente al porcentaje de hongos nematófagos obtenidos de los sitios Las Panguitas y "Campo 35" se han adoptado prácticas culturales como la rotación de cultivos al término de la cosecha, con pastos forrajeros, crotalaria y rábano. Por su parte (Velasco, 2002), encontró que la adición de materia orgánica mejora considerablemente las propiedades del suelo.

Al incorporar abonos orgánicos se ha registrado un efecto positivo en las poblaciones de bacterias, actinomicetos y hongos benéficos estos resultados coinciden con lo reportado por otros autores (Sánchez *et al.*, 1987; Álvarez-Solís *et al.*, 1992). (Hajieghrari *et al.*, 2008) confirmaron que el pH, la temperatura y materia orgánica son parámetros clave en el crecimiento, esporulación y la capacidad saprófita de los hongos. Otros trabajos reportados (Capstick *et al.*, 1957; Giurma y Cooke, 1972) afirman que los nematodos que viven en suelos normalmente serán colonizados por hongos parásitos, por lo tanto, se pueden aislar mediante la extracción de los nematodos del suelo y transferidos en agar a bajas concentraciones. En estudios previos (Hidalgo *et al.*, 2000; Flores *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2007; Flores *et al.*, 2008; Franco *et al.*, 2009) han obtenido aislamientos de hongos nematófagos con un alto potencial de parasitismo promisorios al reducir las agallas en raíces de jitomate (Huang *et al.*, 2004; Gan *et al.*, 2007) confirman que las quitinasas en hongos nematófagos degradan los componentes quitinolíticos en los huevecillos de los nematodos de la raíz.

Estos aislados son semejantes al trabajo obtenido por (Verdejo *et al.*, 2002), encontraron *Dactylella* ovi-parasítica, *Pochonia chlamydosporium* y *P. catenulatum*, asociados a masas de huevos de *Meloidogyne* spp. (Nuñez, 2002)

as sterile mycelium since it did not produce reproductive structures that facilitate their identification, 11 genera were isolated, based on its microscopic descriptions and morphological aspects like plant parasitic. The most isolated genus was *Fusarium*, with 25%, followed by *Phytophthora*, 19%, *Sclerotinia*, 13%, *F. oxysporum* 9%, *Pythium*, 8%, *Aspergillus*, 6%, *Trichoderma*, 5%, *Fusarium moniliforme* 5%, *Corynespora*, 5%, *Geotrichum*, 3%, *Rhizoctonia*, 2%. Some of these genera such as *Fusarium*, *Sclerotinia* and *Phytophthora* are considered crop pathogens without deleterious action on nematodes. With respect to phytopathogenic nematodes management, nematophagous fungi associated to infested soils by *Meloidogyne* spp., three genera based on their microscopic descriptions and morphological aspects, the most common genus isolated and identified was *Dactylella*, 11%, *Arthrobotrys* 5% and *Nematoctonus*, 4%. In the ejido Las Panguitas was where the highest number of fungal isolates was present (57%), followed by "Campo 35" (21%), Jiquilpan (12%) and Estacion Bamoá 10%. In addition to the percentage of nematophagous fungi obtained from The Panguitas and "Campo 35" have been adopted cultural practices such as crop rotation at the end of the harvest, with forage grasses, crotalaria and radish. Meanwhile (Velasco, 2002), found that the addition of organic matter greatly improves soil properties.

By incorporating organic fertilizers it has been registered a positive effect on beneficial populations of bacteria, actinomycetes and fungi; these results coincide with those reported by other authors (Sánchez *et al.*, 1987; Alvarez-Solís *et al.*, 1992). (Hajieghrari *et al.*, 2008) confirmed that pH, temperature and organic matter are key parameters in the growth, sporulation and saprophytic fungi capacity. Other works reported (Capstick *et al.*, 1957; Giurma and Cooke, 1972) that nematodes living in soil will be colonized by parasitic fungi, therefore, can be isolated by extracting nematodes from the soil and transferred them into agar at low concentrations. In previous studies (Hidalgo *et al.*, 2000; Flores *et al.*, 2007; Perez *et al.*, 2007; Flores *et al.*, 2008; Franco *et al.*, 2009) obtained isolates of nematophagous fungi with a high parasitism potential to reduce galls on tomato roots, (Huang *et al.*, 2004; Gan *et al.*, 2007) confirm that chitinase in nematophagus fungi degrade chitinolytic components in root nematodes eggs.

These isolates are similar to the work obtained by (Verdejo *et al.*, 2002), finding *Dactylella* ovi-parasitic, *Pochonia chlamydosporium* and *P. catenulatum* associated with egg



comprobó la presencia de tres especies de *Cladosporium* spp., asociados a quistes de *Globodera rostochiensis* en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) en la región del Cofre de Perote, Veracruz (Yang *et al.*, 2012) reporta a *Dactylella* como un hongo promisorio en el parasitismo de huevos de la familia Heteroderidae. Resultados semejantes deportan a *Dactylella* como viable en el parasitismo de hembras jóvenes lo cual reduciría la ovipostura de huevecillos de *Meloidogyne* spp. (Smith *et al.*, 2011). Otros trabajos realizados por (Timper *et al.*, 1993) demuestran poca virulencia de *Nematoctonus* es por ello que se sugiere pruebas de patogenicidad y comprobar su efectividad bilógica en fitonematodos de la región.

(Persson *et al.*, 1993) afirman que los aislados de hongos nematófagos como *Arthrobotrys dactyloides* y *A. superba*, tienen la capacidad de colonizar las raíces de las plantas de tomate resultando un control biológico eficaz. Estudios anteriores, (Stirling y Mani, 1995; Galper *et al.*, 1995; Jaffee y Muldoon, 1997; Jacobs, 1997; Stirling *et al.*, 1998) reportan la capacidad de *Arthrobotrys* de suprimir a *Meloidogyne* spp. Los resultados obtenidos coinciden con trabajos donde *Meloidogyne* se encuentra asociado a microorganismos benéficos del suelo (Gallegos *et al.*, 2009).

## Conclusiones

La existencia de hongos nematófagos asociados a cultivos afectados por *Meloidogyne* spp., se confirmó en tres de las cuatro regiones estudiadas. Es importante mencionar, que para el aislamiento de hongos nematófagos existen otras metodologías como la técnica de centrifugación diferencial, biología molecular, las cuales pueden favorecer a futuros trabajos para obtener diversidad de hongos particularmente los endoparásitos, obligados o altamente específicos, promisorios en la búsqueda del manejo biológico de las poblaciones de *Meloidogyne* spp., reportadas para Sinaloa.

## Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo incondicional del Dr. Manuel Mundo-Ocampo. Así como, todas las facilidades para obtener material e infraestructura de trabajo en las diversas estancias en la Universidad de California- campus Riverside y tener la oportunidad de interactuar con la Dra. Irma De Ley y Dr. J. Ole Becker.

masses of *Meloidogyne* spp. (Nuñez, 2002) confirmed the presence of three species of *Cladosporium* spp., associated to cysts of *Globodera rostochiensis* in potato crop (*Solanum tuberosum* L.) in the region of Cofre de Perote, Veracruz, (Yang *et al.*, 2012) reports *Dactylella* as a promising fungus in egg parasitism of Heteroderidae family. Similar results report *Dactylella* as viable in the parasitism of young females which would reduce oviposition of *Meloidogyne* spp. (Smith *et al.*, 2011). Other works by (Timper *et al.*, 1993) show low virulence of *Nematoctonus* that is why it is suggested to perform pathogenicity tests and corroborate its biological effectiveness on plant parasitic nematodes in the region.

(Persson *et al.*, 1993) state that isolates of nematophagous fungi like *Arthrobotrys dactyloides* and *A. superba* have the ability to colonize tomato roots resulting in an effective biological control. Previous studies (Stirling and Mani, 1995; Galper *et al.*, 1995; Jaffee and Muldoon, 1997; Jacobs, 1997; Stirling *et al.*, 1998) reported the ability of *Arthrobotrys* to suppress *Meloidogyne* spp. The results obtained agree with jobs where *Meloidogyne* is associated with beneficial soil microorganisms (Gallegos *et al.*, 2009).

## Conclusions

The existence of nematophagous fungi associated to crops affected by *Meloidogyne* spp., was confirmed in three of the four regions studied. It is important to mention that to isolate nematophagous fungi there are other methods like the technique of differential centrifugation, molecular biology, which may favor future work for fungi diversity, particularly endoparasites, obligate or highly specific, promising in the search for biological management of *Meloidogyne* spp. populations reported for Sinaloa.

*End of the English version*



## Literatura citada

- Álvarez, S. J. D.; Ferrera, C. R. y Zebrowski, C. 1992. Análisis de la microflora asociada al manejo ecológico en la recuperación de tepetates. Terra (número especial). 10:419-424.
- Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi, 4th Edition. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA. 218 p.

- Barron, G. L. 1977. The nematode-destroying fungi. [Topics in Mycology No. 1.]. Guelph: Canadian Biological Publications. 140 p.
- Barron, G. L. 1978. Nematophagous fungi: Endoparasites of *Rhabditis terricola*. *Microbial Ecology*, 4:157-163.
- Capstick, C.; Twinn, D. and Waid, J. 1957. Predation of natural populations of free living nematodes by fungi. *Nematologica*, 2:193-201.
- Chen, S. and Dickson, D. W. 2004. Biological control of nematodes by fungal antagonist. Editorial *Nematology. Advances and perspectives*, Volume II. Beijing, China. 979-1039 p.
- Cooke, R. C. and Godfrey, B. E. 1964. A key to the nematode-destroying fungi. *Transactions in British Mycology Society* 47: 61-74.
- Cooke, R. C. 1963. Ecological characteristics of nematode-trapping hyphomycetes I. Preliminary studies. *Annals of Applied Biology*, 52:431-437.
- Connell, S. L. and Padgett, D. E. 1988. An improved technique for making permanent slide cultures of fungi. *Mycopathologia*. 101:165-166.
- Cristie, J. R. and Perry, V. G. 1951. Removing nematodes from soil. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 18:106-108.
- Dong, L. Q. and Zhang, K. Q. 2006. Microbial control of plant-parasitic nematodes: A five-party interaction. *Plant and Soil*. 288:31-45.
- De Leij, F. A. and Kerry, R. B. 1991. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* as a potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria*. *Revue Nematol.* 14: 157-164.
- Drechsler, C. 1937. Some hyphomycetes that prey on free-living terricolous nematodes. *Mycologia*, 29, 447-552.
- Duponnois, R.; Chotte, J. L.; Sall, S. and Cadet, P. 2001. The effects of organic amendments on the interactions between a nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora* and the root-knot nematode *Meloidogyne mayaguensis* parasitizing tomato plants. *Biology and Fertility of Soils*, 34: 1-6.
- Flores, C. R.; Manzanilla L. R. H.; Cid, del P. I. y Martínez, G. A. 2007. Control of *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y Allen, 1944 with *Pochonia chlamydosporia* (*Verticillium chlamydosporium*) (Goddard) Zare and W. Gams. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 25:26-34.
- Flores, C. R.; Atkins, S. D.; Manzanilla, L. R. H.; Cid, Del P. I. and Martínez, G. A. 2008. Caracterización de aislamientos mexicanos de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Goddard) Gams and Zare para el control biológico de *Nacobbus aberrans* (Thorne). *Revista Mexicana de Fitopatología*. 26:93-104.
- Franco, N. F.; Vilchis, M. K. and Miranda, D. J. 2009. New records of *Pochonia chlamydosporia* from Mexico: isolation, root colonization and parasitism of *Nacobbus aberrans*. *Nematropica*. 39:133-142.
- Galper, S.; Edén, L. M.; Stirling, G. R. and Smith, L. J. 1995. Simple screening methods for assessing the predacious activity of nematode-trapping fungi. *Nematologica*. 41:130-140.
- Gallegos, G. M.; Cepeda, M. S.; Hernández, F. D. C.; Zamarripa, A. A. M.; Velásquez, V. R.; González, G. E. and Sánchez, J. M. 2009. Microorganismos benéficos asociados a *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood en Guayabo (*Psidium guajava* L.) de Calvillo, Aguascalientes, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 27(2):106-112.
- Gan, Z.; Yang, J.; Tao, N.; Liang, L.; Mi, Q.; Li, J. and Zhang, K. Q. 2007. Cloning of the gene *Lecanicillium psalliotae* chitinase Lpchl and identification of its potential role in the biocontrol of root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 76:1309-1317.
- Giurma, A. and Cooke, R. 1972. Some endozoic fungi parasitic on soil nematodes. *Transactions of the British Mycological Society*. 59:213-218.
- Gray, A. F. and Soh, H. D. 1989. A nematicide seed treatment to control *Ditylenchus dipsaci* on seedling alfalfa. *Journal of Nematology*. 21:184-188.
- Hidalgo, D. L.; Bourne, J. M.; Kerry, B. R. and Rodríguez, M. G. 2000. Nematophagous *Verticillium* spp. in soil infested with *Meloidogyne* spp. in Cuba: isolation and screening. *International Journal of Pest Management*. 46:277-284.
- Huang, X.; Zhao, N. and Zhang, T. K. Q. 2004. Extracellular enzymes serving as virulence factors in nematophagous fungi involved in infection of the host. *Research in Microbiology*. 155:811-816.
- Jacobs, P. 1997. Untersuchungen über die Wirkung nematophager Pilze auf *Meloidogyne* sp. *in vitro* und auf deren Befall an *Lycopersicon esculentum*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. 104:153-165.
- Jaffee, B. A.; Muldoon, A. A. E. and Didden, W. A. M. 1997. Enchytraeids and nematophagous fungi in soil microcosms. *Biology and Fertility of Soils*. 25:382-388.
- Jansson, H. B. and Lopez, L. L. V. 2001. Biology of Nematophagous fungi. In J. K. Misra y B. W. Horn (Eds.) *Trichomycetes and other fungal groups*. Plymouth: Science Publishers. 145-172 p.
- Jong, S. C. and Atkins, W. B. 1985. Conservation, Collection and distribution of cultures. In: *Fungi Pathogenic for Humans and Animals. Pt B: Pathogenicity and Detection II* (HDH Howard, ed), Marcel Dekker, Inc, New York, NY, USA. 153-194 pp.
- Kendrick, B. 2001. *The fifth kingdom* (3rd ed). Canada: Mycologue Publications. Kerry, B. R. 1987. Biological control. In R. H. Brown & B. R. Kerry (Eds.) *Principles and practice of nematode control in crops* New York: Academic Press. 233-263 pp.
- Kerry B. R. 2000. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review Phytopathology*. 38:423-441.
- Kerry, B. R. 2001. Exploration of the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard for the bio-logical control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) In fungi as Biocontrol Agents: Progress problems and potential. CABI International, Wallingford, UK. 55-168 pp.
- Khan, B. R. and Akram, M. 2000. Effect of certain antagonistic fungi and rhizobacteria on wilt complex caused by *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* on tomato. *Nematologica Mediterranea*. 28:139-144.
- Kohlmeyer, J. and Kohlmeyer, E. 1972. Permanent microscopic mounts. *Mycologia*. 64: 666-669.
- Li, Y.; Hyde, K. D.; Jeewon, R.; Lei, C.; Vijaykrishna, D. and Zhang, K. Q. 2005. Phylogenetics and evolution of nematode-trapping fungi (*Orbiliiales*) estimated from nuclear and protein coding genes. *Mycologia*. 97:1034-1046.
- Liu, X.; Xiang, M. and Che, Y. 2009. The living strategy of nematophagous fungi. *Mycoscience*. 50:20-25.
- Morton, C. O.; Hirsch, P. R. and Kerry, B. R. 2004. Infection of plant-parasitic nematodes by nematophagous fungi. A review of the application of molecular biology to understand infection processes and to improve biological control. *Nematology*. 6:161-170.
- Núñez, E. A. 2002. Aislamiento y evaluación de hongos nematófagos asociados a quistes de *Globodera roschotiensis* (Woll.) en la región del Cofre de Perote Veracruz. Tesis maestría. Universidad de Colima. México. 80-91 pp.

- Olatinwo, R.; Borneman, J. and Becker, J. O. 2006. Induction of beetcyst nematode suppressiveness by the fungi *Dactylella oviparasitica* and *Fusarium oxysporum* in field microplots. *Phytopathology*. 96:855-859.
- Peréz, R. I.; Doroteo, A.; Franco, F. N.; Santiago, V. S. and Montero, A. P. 2007. Isolates of *Pochonia chlamydosporia* Var. *chlamydosporia* from México as potential biological control agent of *Nacobbus aberrans*. *Nematropica*. 37:127-134.
- Persmark, L. and Jansson, H. B. 1997. Nematophagous fungi in the rhizosphere of agricultural crops. *FEMS Microbiology Ecology*. 22:303-312.
- Persson, C. and Jansson, H. 1993. Rhizosphere Colonization and Control of *Meloidogyne* spp. By Nematode-trapping Fungi. *Journal of Nematology*. 31(2):164-171.
- Qadri, A. N. 1989. Fungi associated with sugar beet cyst nematode in Jerash Jordan. MSc Thesis, University Of Jordan. 126 p.
- Qadri, A. N. and Saleh, H. M. 1990. Fungi associated with *Heterodera schachtii* (Nematoda) in Jordan. *Nematologica*. 36:104-113.
- Sánchez, J. M.; Ruíz, J. F. and Cuautle, F. 1987. Comportamiento de dos tipos de Tepetates bajo la adición de abonos orgánicos y abonos verdes en condiciones de invernaderos. En: *Uso y Manejo de Tepetates para el Desarrollo Rural*. Universidad Autónoma de Chapingo, Texcoco: 50-68 pp.
- Sayre, R. M. and Walter, D. E. 1991. Factors affecting the efficacy of natural enemies of nematodes. *Annual Review of Phytopathology*. 29:149-166.
- Scholler, M.; Hagedorn, G. and Rubner, A. 1999. A reevaluation of predatory orbiliaceous fungi. II. A new generic concept. *Sydowia*. 51: 89-113.
- Shepherd, A. M. 1955. Some observations on the distribution and biology of fungi predaceous on nematodes. Ph. D. Thesis, University of London.
- Sikora, R. A. 1992. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for the biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*. 30:245-270.
- Smith, B. J.; Yang, J.; Borneman, J.; Timper, P.; Riggs, R. R. and Becker, J. O. 2011. Investigations into the relatedness of the nematophagous fungi *Dactylella oviparasitica* and ARF-L. *Journal of Nematology*. 43:288.
- Singh, K. P.; Jaiswal, R. K.; Kumar, N. and Kumar, D. 2007. Nematophagous fungi associated with root galls of rice caused by *Meloidogyne graminicola* and its control by *Arthrobotrys dactyloides* and *Dactylaria brochopaga*. *Journal of Phytopathology*. 155:193-197.
- Sorbo, D. G.; Marziano, F. and D'Errico, F. P. 2003. Diffusion and effectiveness of the nematophagous fungus *Hirsutella rhossiliensis* in control of the cyst nematode *Heterodera daverti* under field conditions. *Journal of Plant Pathology*. 85: 219-221.
- Stirling, G. R. and Mani, A. 1995. The activity of nematode-trapping fungi following their encapsulation in alginate. *Nematologica*. 41:240-250.
- Stirling, G. R.; Smith, L. J.; Licastro, K. A. and Edén, L. M. 1998. Control of root-knot nematode with formulations of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys dactyloides*. *Biological Control*. 11:224-230.
- Staniland, L. 1954. A modification of the Baermann funnel technique for the collection of nematodes from plant material. *Journal of Helminthology*, 28: 115-118.
- Timper, P. and Brodie, B. B. 1993. Infection of *Pratylenchus penetrans* by Nematode-pathogenic Fungi. *Journal of Nematology*. 25(2):297-302.
- Velasco, V. J. 2002. Alternativa tecnológica de reciclaje de los desechos orgánicos del Colegio de Postgraduados. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. 91 p.
- Verdejo, S.; Omat, C.; Sorribas, F. J. and Stiehgel, A. 2002. Species of root-knot nematodes and fungal egg parasites recovered from vegetables in Almeria and Barcelona, Spain. *Journal of Nematology*. 34: 405-408.
- Yang, Y. and Lui, X. Z. 2006. A new generic approach to the taxonomy of predatory anamorphic *Orbiliaceae* (Ascomycotina). *Mycotaxon*. 97:153-161.
- Yang, Y.; Yang, E.; An, Z. and Liu, X. 2007. Evolution of nematode-trapping cells of predatory fungi of the Orbiliaceae based on evidence from rRNA-encoding DNA and multiprotein sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104: 83-79.
- Yang, J.; Benecke, S.; Jeske, R. D.; Rocha, F. S.; Becker, J. S. and Timper, P. 2012. Population Dynamics of *Dactylella oviparasitica* and *Heterodera schachtii*: Toward a Decision Model for Sugar Beet Planting. *Journal of Nematology*. 44(3):237-244.
- Zopf, W. 1888. Zur Kenntnis der Infektionskrankheiten niederer Thiere und Pflanzen. *Nova Academy of Caes. Leop. Germán. Naí. Cur.* 52:314-376.