

Caracterización de Aislamientos Mexicanos de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Goddard) Gams y Zare para el Control Biológico de *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne y Allen

Rosalinda Flores-Camacho, Dirección General de Inspección Fitosanitaria, Municipio Libre 377 Piso 7-B, Col. Santa Cruz Atoyac, Deleg. Benito Juárez, México, D.F. 03310; **Simon D. Atkins**, Plant Pathology and Microbiology Department, Rothamsted Research, Harpenden, Herts, AL5 2JQ, UK.; **Rosa Helena Manzanilla-López**, Nematode Interactions Unit, Rothamsted Research, Harpenden, Herts, AL5 2JQ, UK; **Ignacio Cid del Prado-Vera**, Colegio de Postgraduados (CP), Programa de Fitosanidad, km 36.5 Carr. México- Texcoco, Montecillo, Edo. de México 56230; y **Ángel Martínez-Garza**, CP. Correspondencia: rosa.manzanilla-lopez@bbsrc.ac.uk

(Recibido: Octubre 30, 2006 Aceptado: Agosto 11, 2008)

Flores-Camacho, R., Atkins, S.D., Manzanilla-López, R.H., Cid del Prado-Vera, I. y Martínez-Garza, Á. 2008. Caracterización de aislamientos mexicanos de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Goddard) Gams y Zare para el control biológico de *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne y Allen. Revista Mexicana de Fitopatología 26:93-104.

Resumen. Cinco aislamientos nativos del hongo *Pochonia chlamydosporia*, agente de control biológico de nematodos agalladores y formadores de quistes, se obtuvieron de muestras colectadas en parcelas infestadas con *Nacobbus aberrans sensu stricto*, en localidades de los estados de México, Morelos, Puebla y Tlaxcala (México). Se describen las metodologías para la obtención y el cultivo de los aislamientos SMB3A, SC1, SMB3, SM4 y MHCH, y las pruebas de efectividad del hongo en el control biológico del nematodo (*i.e.* porcentaje de huevos parasitados y colonización de la rizósfera), así como la caracterización molecular con β -tubulina-PCR, ERIC-PCR (amplificación de secuencias intergénicas de consenso repetitivas de enterobacterias), ITS-PCR (espaciadores internos transcritos), RFLP-PCR (polimorfismo de tamaño de los fragmentos de restricción) y RAPD-PCR (ADN polimórfico amplificado al azar). Los aislamientos mexicanos produjeron un parasitismo superior al 60% en los huevos del nematodo y una colonización del 100% de la rizósfera. Todos los aislamientos se identificaron molecularmente como pertenecientes a *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* usando cebadores específicos (β -tubulina-PCR) para esta especie.

Palabras clave adicionales: Nematodo falso-agallador, hongos nematófagos, RFLP, ERIC, ITS, β -tubulina.

Abstract. Five native isolates of the fungus *Pochonia chlamydosporia*, a biological control agent of root-knot and cyst-forming nematodes, were collected from *Nacobbus aberrans sensu stricto* infested plots in different localities in the states of Mexico, Morelos, Puebla and Tlaxcala (Mexico). Isolation and culturing methods are described for isolates SMB3A, SC1, SMB3, SM4, MHCH, and evaluation of the parasitism of nematode eggs and rhizosphere colonization by the fungus. Molecular characterization of the isolates was made using β -tubulin-PCR, ERIC-PCR (enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence), ITS-PCR (internally transcribed spacer regions), RFLP-PCR (restriction fragment length polymorphism), RAPD-PCR (random amplified polymorphic DNA) and sequencing of DNA fragments. More than 60% of nematode eggs were parasitized by the Mexican isolates. All isolates colonised the complete extent of the rhizosphere. All isolates were identified using species-specific primers (β -tubulin-PCR) as belonging to *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*.

Additional keywords: False root-knot nematode, nematophagous fungi, RFLP, ERIC, ITS, β -tubulin.

Abbreviated article.

Pochonia chlamydosporia (Goddard) Gams and Zare (2001) is a facultative fungal parasite that has been isolated from cyst (*Globodera* spp., *Heterodera* spp.) and root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) (Kerry and Jaffee, 1997; Kerry, 2001; Morgan-Jones and Rodríguez-Kabana, 1988). The fungus colonizes the rhizoplane as a saprotroph until it infects the nematode eggs, forming hyphal nets and specialized organs that penetrate the vitelline egg layer through enzymatic

Pochonia chlamydosporia (Goddard) Gams y Zare (2001) es un parásito facultativo que se ha aislado de nematodos formadores de quistes (*Globodera* spp., *Heterodera* spp.) y agalladores (*Meloidogyne* spp.) (Kerry y Jaffee, 1997; Kerry, 2001; Morgan-Jones y Rodríguez-Kabana, 1988). El hongo coloniza el rizoplasma como saprófito hasta que infecta los huevos del nematodo y forma redes de hifas con órganos especializados que penetran la capa vitelina mediante lisis enzimática (Kerry, 1997). La posibilidad de cultivarlo en medio artificial líquido o sólido (Kerry y Jaffee, 1997), su abundancia en raíces infestadas con nematodos, su fácil dispersión y colonización en la rizósfera así como su especificidad hospedadora y virulencia (De Leij y Kerry, 1991; Gams, 1988; Mauchline *et al.*, 2004; Morton *et al.*, 2003), lo han hecho un agente de uso potencial en el control biológico de *Meloidogyne* spp. (Kerry y Bourne, 1996, 2002). La selección de aislamientos depende de pruebas de laboratorio e invernadero en las que se evalúa: 1) la capacidad para colonizar la rizósfera, 2) la producción y viabilidad de las clamidosporas y 3) la mortalidad que causan a los huevos. La planta hospedante y las condiciones ambientales tienen un efecto significativo en el crecimiento del hongo (Bourne *et al.*, 1996), por lo que es preferible identificar aislamientos con potencial colonizador de la rizósfera de los cultivos locales (Hidalgo-Díaz *et al.*, 2000). Otra característica importante del hongo es que puede sobrevivir en ausencia del nematodo. Antes del uso de técnicas moleculares, la caracterización de las especies del género *Pochonia* se basaba en criterios morfológicos, el análisis de compatibilidad vegetativa, características bioquímicas y diferencias en virulencia (Butterfield y De Vary, 1977; Gams, 1988; Joaquim y Rowe, 1990). Hirsch *et al.* (2000) han reportado distintos métodos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y el uso de cebadores (secuencias iniciadoras) específicos, diseñados con base en el gen de la β -tubulina para discriminar entre especies estrechamente relacionadas. Este ha sido un avance importante pues la universalidad de la β -tubulina permite emplearla tanto en el análisis filogenético (Edlind *et al.*, 1996) como en el diseño de cebadores. La especificidad de los cebadores de la β -tubulina (Tub1f y Tub1r) para *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* ha sido confirmada en Rothamsted Research usando aislamientos provenientes de distintos nematodos (*e.g.* *Globodera* spp., *Heterodera* spp., *Meloidogyne* spp.), de países latinoamericanos (Hidalgo-Díaz *et al.*, 2000), de la Comunidad Europea (Morton *et al.*, 2003), Australia y Nueva Zelanda (Arora *et al.*, 1996) entre otros. Los resultados han demostrado la importancia de contar con una herramienta de diagnóstico rápida para la identificación precisa del hongo en muestras de suelo, raíces y huevos (Atkins *et al.*, 2003; Hirsch *et al.*, 2000, 2001). *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne y Allen incluye a la mayor parte de poblaciones del nematodo falso-agallador (*N. aberrans sensu lato*) estudiadas en Norte y Sudamérica, aunque las poblaciones mexicanas se ubican en *N. aberrans sensu stricto* (s.s.) (Reid *et al.*, 2003). Al igual que *Meloidogyne* spp.,

lysis (Kerry, 1997). The possibility of culturing the fungus in artificial liquid or solid media (Kerry and Jaffee, 1997), its abundance on roots infested with nematodes, its easy dispersion and colonization in the rhizosphere as well as its host specificity and virulence (De Leij and Kerry, 1991; Gams, 1988; Mauchline *et al.*, 2004; Morton *et al.*, 2003) have made this fungus a potential biological control agent to be used in management of *Meloidogyne* spp. (Kerry and Bourne, 1996, 2002). Selection of fungal isolates depends on laboratory and glasshouse tests that evaluate: 1) capacity to colonize the rhizosphere, 2) production and viability of chlamydospores, and 3) egg mortality produced by isolates. Host plant and environmental conditions have a significant effect on the fungus (Bourne *et al.*, 1996) being preferable to identify isolates with potential of colonizing the rhizosphere of local crops (Hidalgo-Díaz *et al.*, 2000) instead of introducing new isolates for biological control. Another important characteristic of the fungus is its survival in the absence of the nematode. Before the use of molecular techniques, characterization of the species of the genus *Pochonia* was based on morphological criteria, analysis of vegetative compatibility, biochemical characteristics, and virulence differences (Butterfield and De Vary, 1977; Gams, 1988; Joaquim and Rowe, 1990). Hirsch *et al.* (2000) have reported different PCR methods (polymerase chain reaction) and the use of specific primers, based on the β -tubulin gene to discriminate between closely related species. This has been an important advance due to the universality of the β -tubulin gene that allows phylogenetic analysis (Edlind *et al.*, 1996) and the design of primers. The specificity of the β -tubulin primers (Tub1f and Tub1r) for *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* has been confirmed in Rothamsted Research using isolates obtained from different nematodes (*e.g.* *Globodera* spp., *Heterodera* spp., *Meloidogyne* spp.) and also in Latin American countries (Hidalgo-Díaz *et al.*, 2000), the European Union (Morton *et al.*, 2003), Australia and New Zealand (Arora *et al.*, 1996), among others. Results have shown the importance of having a fast diagnostic tool for accurate identification of the fungus in soil, root, and egg samples (Atkins *et al.*, 2003; Hirsch *et al.*, 2000, 2001). *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne and Allen includes most of the populations of the false root-knot nematode (*N. aberrans sensu lato*) studied in North and South America, although Mexican populations are placed in *N. aberrans sensu stricto* (s.s.) (Reid *et al.*, 2003). As with *Meloidogyne* spp., *Nacobbus* spp. induce galls in the host roots. Both genera produce endoparasitic sedentary females that lay eggs in a gelatinous matrix that is generally expelled from the gall, thereby being exposed to the rhizosphere along with the eggs that it contains. These eggs can be parasitized and destroyed by the fungus. Studies on nematophagous fungi for the biological control of *Nacobbus aberrans sensu lato* (s.l.) are scarce (Manzanilla-López *et al.*, 2002), but it is possible that some fungal species shown to be effective in the biological control of *Meloidogyne* spp. can also act as biocontrol agents

Nacobbus spp. induce agallas en las raíces del hospedante. Ambos géneros producen hembras endoparásitas sedentarias que depositan huevos en una matriz gelatinosa, la cual es generalmente expulsada de la agalla quedando expuesta en la rizósfera junto con los huevos. Estos huevos pueden ser parasitados y destruidos por el hongo. Los estudios sobre hongos nematófagos en el control de *Nacobbus aberrans sensu lato* (s.l.) son escasos (Manzanilla-López *et al.*, 2002), pero es posible que algunas especies de hongos que han sido efectivas en el control biológico de *Meloidogyne* spp. sean bio-controladores de *N. aberrans* también. Considerando que la especie *P. chlamydosporia* es un parásito facultativo que habita naturalmente en suelos supresivos (Kerry, 1995) y que es un agente promisorio para el control biológico de los nematodos agalladores (Kerry y Bourne, 2002), se realizó el presente trabajo con el objetivo de aislar y caracterizar molecularmente aislamientos nativos mexicanos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* del suelo y las raíces de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), chile (*Capsicum annuum* L.) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) infectados por *N. aberrans* y que pudiesen ser usados como agentes potenciales en el control biológico del nematodo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo. Se colectaron muestras de raíces y suelos en zonas productoras de jitomate, frijol y chile infestados en forma natural con *N. aberrans*, ubicadas en los estados de México, Morelos, Tlaxcala y Puebla (Cuadro 1). El muestreo se realizó en la temporada de lluvias de verano (1999-2000). Los muestreos se realizaron con un patrón aleatorio (Barker y Campbell, 1981). El suelo se recogió en la periferia de la raíz, eliminando los primeros 5 cm de suelo, antes de colectar muestras de 100 g entre los 15 y 25 cm de profundidad, además

of *N. aberrans*. Considering that the species *P. chlamydosporia* is a facultative parasite that naturally inhabits suppressive soils (Kerry, 1995) and that the fungus is a promising agent for the biological control of root-knot nematodes (Kerry and Bourne, 2002), the present study was done with the objective of isolating and molecularly characterizing Mexican native isolates of *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* from soil and roots of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), chilli pepper (*Capsicum annuum* L.), and beans (*Phaseolus vulgaris* L.) infected by *N. aberrans* that could have potential in the biological control of the nematode.

MATERIALS AND METHODS

Sampling. Soil and root samples were collected from tomato, beans, and chilli pepper in fields from growing zones known to be naturally infested with *N. aberrans* located in the states of Mexico, Morelos, Tlaxcala, and Puebla (Table 1). Sampling was done during the summer rainy season (1999-2000). Samplings were taken in a randomized pattern (Barker and Campbell, 1981). Soil was collected around the roots of the crop, the first 5 cm of soil being discarded before collecting at a depth of 15 to 25 cm. A 100 g soil sample, plus a 50 g sample of galled roots was taken per sampling point. Samples were placed in polythene plastic bags, labelled and kept in an ice box until processed in the nematology laboratory of Instituto de Fitosanidad del Colegio de Posgraduados (CP).

Isolation of *Pochonia* sp. from soil samples. One g of soil from each sample was placed into a glass tube containing 9 mL of 0.05% water-agar (WA), vortexed for 10 to 15 sec and then 1 mL was taken to make 10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3} dilutions. Subsequently, 0.2 mL from the 10^{-2} and 10^{-3} dilutions was placed into Petri dishes containing semi-selective agar medium

Cuadro 1. Ubicación geográfica de las localidades muestreadas, para la búsqueda de aislamientos de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* en cultivos de jitomate (*Lycopersicon esculentum*), chile (*Capsicum annuum*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*) infectados por *Nacobbus aberrans sensu stricto*.

Table 1. Geographic location of sites sampled for isolates of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* in tomato (*Lycopersicon esculentum*), chilli pepper (*Capsicum annuum*), and bean (*Phaseolus vulgaris*) crops infected with *Nacobbus aberrans sensu stricto*.

Localidad	Latitud	Longitud	msnm
Chapingo, Edo. de México	19° 28' 60 N	98° 54' 00 O	2245
Montecillo, Edo. Méx.	19° 26' 60 N	98° 54' 00 O	2254
Yacapixtla, Morelos	18° 52' 60 N	98° 52' 00 O	1586
Buena Vista, Tlaxcala	19° 10' 00 N	98° 10' 00 O	2384
Calpan, Puebla	19° 06' 00 N	98° 27' 00 O	2359
Cuapixtla, Pue.	18° 55' 00 N	97° 49' 00 O	2055
La Virgen, Tlax.	19° 27' 60 N	98° 19' 00 O	1562
Tecamachalco, Pue.	8° 52' 60 N	97° 43' 00 O	2028
Tehuacan, Pue.	18° 26' 60 N	97° 22' 60 O	1554
Totoltepec, Pue.	18° 40' 00 N	98° 20' 60 O	1399

N = norte, O = oeste, msnm = metros sobre el nivel del mar.

de 50 g de raíces agalladas por punto de muestreo. Las muestras se depositaron en bolsas de polietileno, se etiquetaron y se mantuvieron en una hielera hasta su procesamiento en el laboratorio de nematología del Instituto de Fitosanidad del Colegio de Posgraduados (CP).

Aislamiento de *Pochonia* sp. a partir de muestras de suelo.

Un gramo de suelo de cada muestra se depositó en un tubo conteniendo 9 mL de agua-agar (AA) al 0.05%. La muestra se agitó en un vortex de 10 a 15 seg y luego se tomó 1 mL para hacer diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} . Posteriormente, 0.2 mL de las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} se depositaron en placas de Petri con medio de cultivo semi-selectivo (harina de maíz + rosa de Bengala + antibióticos) (Kerry y Bourne, 2002). Las placas se incubaron 10 días a 25°C, al término de los cuales se identificaron y cuantificaron las colonias correspondientes. Para la producción de clamidosporas, las colonias se cultivaron en harina de maíz-agar (HMA) o papa-dextrosa-agar (PDA).

Aislamiento de *Pochonia* sp. a partir de raíces. Las raíces infectadas con *N. aberrans* fueron cortadas en segmentos de 1 cm. Se separó al azar un 1 g de raíces y se maceró con 9 mL de AA al 0.05% en un mortero estéril. Enseguida se tomó 1 mL de esta mezcla (10^{-1}) para diluirlo en otro tubo con 9 mL de AA al 0.05%. Este procedimiento se repitió dos veces más para obtener diluciones 10^{-2} y 10^{-3} . Después se tomaron 0.2 mL de cada dilución y se sembraron en placas de Petri con medio semi-selectivo, esparciéndolos uniformemente con una asa de vidrio. Las colonias se identificaron 10 días después de mantener en incubación las placas Petri a 25°C.

Aislamiento de *Pochonia* sp. a partir de masas de huevos de *N. aberrans*. Se siguieron dos métodos: En el primero, con ayuda del microscopio estereoscópico, se separaron 600 masas de huevos (mh) a partir de las raíces agalladas de cada cultivo muestreado. Aquéllas que presentaron micelio, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril antes de agitarlas para dispersar los huevos. Después de 3 h en reposo, se tomaron alícuotas de 0.2 mL de la suspensión que se depositaron en placas de Petri con AA (8 g de agar en 1 L de agua sin antibióticos) e incubaron a 25°C por dos a tres días. En el segundo método, los huevos de 400 mh se separaron de la matriz gelatinosa y se sembraron en placas de Petri con HMA. Posteriormente, bajo el microscopio compuesto se identificaron los huevos parasitados por el hongo y se sembraron en HMA.

Incremento y selección de aislamientos de *Pochonia* sp.

Todos los aislamientos se incrementaron masivamente en dos sustratos: A) Trigo molido-arena de cuarzo. Discos de HMA con el hongo fueron depositados en matraces de 250 mL conteniendo trigo molido y arena de cuarzo previamente esterilizada. Después de una semana en reposo a temperatura ambiente, cada matraz se agitó vigorosamente y se dejó dos semanas más en reposo hasta obtener sustratos cubiertos por una masa algodonosa. La presencia de clamidosporas se verificó antes de proceder a su extracción. El sustrato de cada matraz se lavó en una serie de tamices de 150 μ m, 53 μ m

(corn meal + Bengal rose + antibiotics) (Kerry and Bourne, 2002). Petri dishes were incubated for 10 days at 25°C, the colonies of the fungus then being identified and counted. To produce chlamydospores, colonies were grown in corn meal agar (CMA) or potato-dextrose-agar (PDA).

Isolation of *Pochonia* sp. from roots. *Nacobbus aberrans* infected roots were cut into 1 cm segments and mixed. One g of roots was taken at random and macerated in a sterile mortar containing 9 mL of 0.05% WA. One mL (10^{-1} dilution) was taken to be diluted in another glass tube containing 9 mL of 0.05% WA. This procedure was repeated twice to produce 10^{-2} and 10^{-3} dilutions. Afterwards, 0.2 mL was taken from each dilution and plated, the sample being spread evenly with a glass rod, into Petri dishes containing semi-selective agar medium and then incubated at 25°C. Fungal colonies were identified 10 days later.

Isolation of *Pochonia* sp. from *N. aberrans* egg masses. Two methods were used: In the first one, 600 egg masses (em) were collected from the galled roots of each crop under a stereomicroscope. Egg masses that had mycelium were selected and rinsed three times with sterile distilled water before dispersing the eggs by shaking the egg masses. After three hours of leaving the samples to rest, 0.2 mL aliquots of the egg suspension were plated into Petri dishes containing WA (8 g agar in 1 L of water without antibiotics) and incubated at 25°C for two to three days. In the second method, eggs from 400 em were separated from the gelatinous matrix and plated into a Petri dish containing CMA. Afterwards, eggs parasitized by the fungus were identified using a compound microscope, and then plated in CMA.

Increment and selection of *Pochonia* sp. isolates. All isolates were mass produced in two substrates: A) Milled wheat-quartz sand. CMA plugs with the fungus were placed into 250 mL flasks containing milled wheat and quartz sand that had been previously sterilized. After a week at room temperature, each flask was vigorously shaken and left two more weeks to rest until the substrate looked like cotton wool. The presence of chlamydospores was verified before their extraction. The substrate contained in each flask was washed in a series of sieves of 150 μ m, 53 μ m, and 10 μ m mesh aperture. The residue left in the last sieve was mixed with fine quartz sand in a ratio 10:1 (10 of sand: 1 of chlamydospores w:w) (De Leij and Kerry, 1991). B) Rice. This process involved two fermentation phases: one liquid and one solid. For liquid fermentation, 50 g of rice were washed and cooked for 45 min in 1 L of boiling water; 50 mL of this mixture were filtered and placed into a 250 mL flask before being sterilized. Five CMA plugs with the fungus were added to the flask and shaken at 150 rpm for three days at 28°C. For the solid fermentation phase, 50 g of pre-soaked, sterilized rice was placed into a 250 mL flask with 25 mL of the liquid containing conidia and chlamydospores and left to incubate at 28°C for 21 days. The substrate was washed through 150 μ m and 53 μ m mesh aperture sieves and the chlamydospores collected in a sieve of 10 μ m mesh aperture and mixed with fine quartz sand in a ratio 10:1.

y 10 µm de apertura de malla. El residuo del tamizado final se mezcló con arena de cuarzo fina en proporción de 10:1 (10 de arena: 1 de clamidosporas p:p) (De Leij y Kerry, 1991). B) Arroz. Este proceso involucró dos fases de fermentación: a) una líquida y otra sólida. Para la fermentación líquida, se lavaron 50 g de arroz que se pusieron a cocer en 1 L de agua hasta llevarla a punto de ebullición durante 45 min; de esta mezcla se tomaron y filtraron 50 mL que se vertieron en un matraz de 250 mL antes de ser esterilizados. Luego se agregaron cinco discos de HMA con el hongo. El matraz con su contenido se mantuvo a 28°C en agitación constante a 150 rpm durante tres días. Después se realizó la fermentación sólida. En un matraz de 250 mL, se añadieron 50 g de arroz remojado estéril y se agregaron 25 mL del líquido con conidios y clamidosporas dejándolos en incubación a 28°C por 21 días. El sustrato se lavó enseguida en los tamices de 150 µm, 53 µm de apertura; las clamidosporas se colectaron en un tamiz de 10 µm de apertura y se mezclaron con arena fina de cuarzo en una proporción de 10:1.

Producción y viabilidad de clamidosporas. El sustrato con las clamidosporas se mezcló antes de tomar una muestra de 1 g y depositarla en un tubo con 9 mL de AA al 0.05%, agitando para formar una suspensión. Las clamidosporas se cuantificaron en un hemacitómetro (dos repeticiones por alícuota). Para evaluar la viabilidad de las clamidosporas, se pesó 1 g de la mezcla del sustrato de arena fina de cuarzo y se agregó a tubos con AA al 0.05%, para hacer diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} . Se sembraron 0.2 mL de cada dilución en placas de Petri con sorbosa (2 g L⁻¹), agar (12 g L⁻¹), con antibióticos (50 mg L⁻¹ de sulfato de estreptomycin, cloramfenicol e hidrocloreuro de clortetraciclina). Las placas se incubaron dos días a 25°C. El porcentaje de germinación se estimó cuantificando aleatoriamente un total de 100 clamidosporas germinadas y no germinadas (Kerry y Bourne, 2002). Los aislamientos mexicanos se compararon con un aislamiento estándar procedente de Brasil (VC10), para evaluar su efectividad en la colonización de la rizósfera y huevos del nematodo. El aislamiento VC10 fue provisto por Rothamsted Research.

Colonización de la rizósfera en condiciones estériles. La superficie de semillas de trigo (*Triticum aestivum* L.) se esterilizó en hipoclorito de sodio al 7% con unas gotas de detergente líquido, manteniendo las semillas y la solución esterilizadora en agitación durante 2 h. Después se enjuagaron 4 ó 5 veces con agua estéril y se transfirieron a placas de Petri (12 g de agar, 10 g de glucosa, 0.1 g peptona, 0.1 g levadura) y se incubaron para su germinación de 2 a 3 días a 25°C. Varios tubos de ensayo se llenaron con vermiculita hasta $\frac{3}{4}$ partes de su volumen, enseguida se les agregó agua hasta el nivel de la vermiculita y se taparon con algodón antes de esterilizarlos. Cuatro discos de HMA con los aislamientos del hongo y las semillas de trigo previamente esterilizadas, lavadas y germinadas, se colocaron dentro de los tubos de ensayo. Los tubos se sellaron y cubrieron con papel aluminio antes de incubarlos por tres semanas a 25°C. Posteriormente,

Production and viability of chlamydospores. The substrate with the chlamydospores was mixed before taking 1 g sample that was placed into a glass tube containing 9 mL of 0.05% WA and shaken until a suspension was formed. Chlamydospores were counted in a haematocytometer (two replicates per aliquot). To evaluate chlamydospore viability, 1 g of the mixture made up of fine quartz sand and chlamydospores was weighted and added to glass tubes containing 0.05% WA to make 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , and 10^{-5} dilutions. From each dilution 0.2 mL were plated into Petri dishes containing media made of sorbose (2 g L⁻¹), agar (12 g L⁻¹), and antibiotics (50 mg L⁻¹ of streptomycin sulfate, chloramphenicol, and chlortetracycline hydrochloride). Plates were incubated for two days at 25°C. Germination percentage was estimated by counting at random a total of 100 germinated and non-germinated chlamydospores (Kerry and Bourne, 2002). Mexican isolates were compared with a standard isolate, which was originally obtained from Brazil (VC10), so as to evaluate their effectiveness in colonizing the rhizosphere and nematode eggs. The isolate VC10 was provided by Rothamsted Research.

Rhizosphere colonization under sterile conditions. Wheat seed (*Triticum aestivum* L.) was surface sterilized with 7% sodium hypochlorite with a few drops of liquid detergent. Seeds and the sterilizing solution were shaken for 2 h, seeds were rinsed 4 to 5 times with sterile distilled water and transferred into Petri dishes containing nutritive agar (12 g agar, 10 g glucose, 0.1 g peptone, 0.1 g yeast) and incubated for 2 to 3 days at 25°C for germination. Several glass tubes were three-quarters filled with vermiculite, water was added up to the vermiculite level and then sealed with cotton plugs before being sterilized. Four CMA plugs with fungal isolates and surface sterilized germinated wheat seeds were placed together inside each glass tube, sealed and wrapped with aluminum before being incubated for three weeks at 25°C. Afterwards, under aseptic conditions, wheat roots were cut into 1 cm fragments that were transferred into WA plates. Three days later root fragments were examined for root colonization using a stereomicroscope. Root fragments showing fungal mycelium were counted as positive and the percentage of colonization by the fungus was estimated.

Fungal parasitism in *N. aberrans* s.s. eggs. 0.2 mL of the suspension of *N. aberrans* s.s. eggs from the nematode populations Montecillo, Tecamachalco, and Zacatecas (Flores-Camacho *et al.*, 2007) were plated into CMA Petri dishes containing the fungal isolates. Plates were incubated at 25°C for three days and 100 eggs were examined at random under the microscope to determine the percentage of parasitized eggs (*i.e.* infected with hyphae) in each of the three populations of *N. aberrans* s.s. The control consisted of nematode eggs obtained from egg masses produced on tomato plants previously inoculated with the nematode, but not the fungus.

Statistical analysis. Data, except for egg parasitism percentage, were transformed and used to perform an Analysis

en condiciones asépticas, se cortaron fragmentos de raíz del trigo de 1 cm de largo que se sembraron en AA. Tres días después se observaron al microscopio para verificar la colonización de la raíz con el micelio del hongo. Los fragmentos positivos se cuantificaron y se estimaron los porcentajes de colonización.

Parasitismo del hongo en los huevos de *N. aberrans* s.s. Se agregaron 0.2 mL de suspensión de huevos de *N. aberrans* s.s. de las poblaciones Montecillo, Tecamachalco y Zacatecas (Flores-Camacho *et al.*, 2007) en placas de Petri con los aislamientos ya desarrollados del hongo en HMA. Después de tres días a 25°C, se examinaron aleatoriamente 100 huevos bajo el microscopio para determinar el porcentaje de huevos parasitados (*i.e.* infectados con hifas) en tres poblaciones de *N. aberrans* s.s. El testigo consistió de huevos del nematodo colectados a partir de masas de huevos producidas en plantas de jitomate inoculadas con los nematodos y sin el hongo.

Análisis estadístico. Los resultados obtenidos de todas las variables excepto el porcentaje de parasitismo de huevos, se transformaron a rangos para hacer una aproximación del análisis estadístico por ser variables no paramétricas. Con los valores transformados se hizo un análisis de varianza (ANAVA) y una comparación de medias (Tukey) con un nivel de significancia de 0.05 utilizando el paquete estadístico Statistical Analysis System (SAS) de acuerdo a la metodología citada por Martínez-Garza (1980).

Identificación de los aislamientos del hongo. Los aislamientos purificados se identificaron con claves taxonómicas (Barnett y Hunter, 1987; Domsch y Gams, 1980). Una parte de cada aislamiento se liofilizó y otra parte se cultivó en HMA antes de almacenarlos a 4°C para su identificación molecular en Rothamsted Research (Reino Unido).

Extracción del ADN genómico. Previo a la extracción del ADN genómico los aislamientos se cultivaron por 7 días en HMA en placas de Petri. Una porción de micelio de cada aislamiento se transfirió a microtubos (vol = 1.5 mL) conteniendo 40 µL de sosa cáustica (NaOH al 0.25 M). Posteriormente, los microtubos se colocaron en baño maría a punto de ebullición durante 30 seg. Las muestras se neutralizaron con la adición de 40 µL de HCl al 0.25 M y 20 µL de tampón Tris-HCl al 0.5 M con pH de 8.0, 0.25% (p/v) de Nonidet® P-40 (Sigma), y se colocaron en un baño maría a punto de ebullición 2 min, al término de los cuales los microtubos se colocaron en hielo inmediatamente (Klimyuk *et al.*, 1993). Los testigos negativos para las PCR fueron *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson y *Acremonium* sp., los cuales junto con el aislamiento VC10 de *P. c.* var. *chlamydosporia* (testigo positivo), fueron proporcionados por Rothamsted Research.

Amplificación del ADN. Las PCR se realizaron en un volumen de 20 µL. Cada solución constó de: 2 µL de 10x tampón de PCR (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, MgCl₂ 1.5 mM), 2 µL (0.02 pM) de cada cebador, 0.4 µL de dNTPs (deoxinucleótido trifosfatos), 0.08 µL de Taq polimerasa (5 U µL⁻¹) (Taq polimerasa Roche®), 1 µL de DNA y 12.88 µL de agua de alta pureza. La amplificación se hizo en un

of Variance (ANOVA), and the mean comparison was done using Tukey's test (P = 0.05) using the Statistical Analysis System (SAS) following Martínez-Garza (1980).

Identification of the fungal isolates. The purified isolates were identified using taxonomic keys (Barnett and Hunter, 1987; Domsch and Gams, 1980). Part of the isolate samples were lyophilized and another part was grown in CMA before being stored at 4°C for molecular identification in Rothamsted Research (UK).

Extraction of genomic DNA. Prior to genomic DNA extraction, isolates were grown for 7 days in CMA. From each isolate a portion of mycelium was transferred to microtubes (vol = 1.5 mL) containing 40 µL of caustic soda (NaOH 0.25 M). Microtubes were placed in a boiling water bath for 30 sec. Samples were neutralized by adding 40 µL HCl 0.25 M, 20 µL of buffer Tris-HCl 0.5 M, pH 8.0, 0.25% (w/v) de Nonidet® P-40 (Sigma), and returned to the boiling water bath for 2 min before being placed immediately into ice (Klimyuk *et al.*, 1993). PCR negative controls included *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson and *Acremonium* sp. which, together with the isolate VC10 de *P. c.* var. *chlamydosporia* (positive control), were provided by Rothamsted Research.

DNA amplification. PCR reactions were performed in 20 µL volume. Every reaction consisted of: 2 µL 10x PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, MgCl₂ 1.5 mM), 2 µL (0.02 pM) of each primer, 0.4 µL dNTPs (deoxinucleotide triphosphates), 0.08 µL Taq polymerase (5 U µL⁻¹) (Taq polymerase Roche®), 1 µL DNA and 12.88 µL PCR grade water. Amplification was done in a thermocycler (TRIO-Thermoblock TBI, Biometra®). PCR conditions were as follows: β-tubulin-PCR (Hirsch *et al.*, 2000). β-tub primers 1: 5'- ATG CAA GAA AGC CTT GCG AC-3'; β-tub 2: 5'-TTT GCA GTA TCT CAG TGT TC-3'. PCR conditions: 95°C pause, 35 cycles [94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min]; 72°C 5 min. ERIC-PCR (White *et al.*, 1990). ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence): R1 CIRE: 5'- CAC TTA GGG GTC CTC GAA TGTA -3'; ERIC2: 5'- AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G -3'. Each primer concentration was 10 pM and 2.5 mM for MgCl₂. Amplification conditions were: 95°C pause, 35 cycles [1 min at 94°C, 42°C 1 min, 72°C 1 min]; 72°C 5 min (Atkins and Clark, 2005). ITS-PCR (White *et al.*, 1990). ITS primers (internally transcribed spacer regions): ITS 4: 5'- GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'; ITS 5: 5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'. PCR conditions: 95°C pause, 94°C 3 min, 35 cycles [94°C 1 min, 42°C 1.5 min, 72°C 1.5 min]; 72°C 5 min. RFLP-PCR (Carder *et al.*, 1993). RFLP-PCR (restriction fragment length polymorphism) restriction enzymes included *Hae* III (10 U µL⁻¹), *Hin* F1 (10 U µL⁻¹), *Cfo* I (10 U µL⁻¹), *Xba* I (10 U µL⁻¹), *Nar* I (10 U µL⁻¹), and *Sau* 3A (4 U µL⁻¹) (BRL Ltd). The digestion of ITS-PCR products was made in 20 µL vol, including the 2.3 µL of 10x buffer and restriction enzyme (1 µL). Each reaction was incubated for 1 h in a water bath preset at the temperature specified by the manufacturer. Products from enzymatic digestion were run in a 1.5% agarose gel (Helena Biosciences, Sunderland). RAPD-PCR (Folkertsma

termociclador (TRIO-Thermoblock TBI, Biometra®). Las condiciones de PCR se describen a continuación: β -tubulina-PCR (Hirsch *et al.*, 2000). Cebadores β -tub 1: 5'-ATG CAA GAA AGC CTT GCG AC-3'; β -tub 2: 5'-TTT GCA GTA TCT CAG TGT TC-3'. Condiciones de PCR: 95°C pausa, 35 ciclos [94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min]; 72°C 5 min. ERIC-PCR (White *et al.*, 1990). Cebadores ERIC (amplificación de secuencias intergénicas de consenso repetitivas de enterobacterias): R1CIRE: 5'-CACTTAGGG GTC CTC GAA TGTA-3'; ERIC2: 5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3'. La concentración de cada cebador fue de 10 pM y la concentración de $MgCl_2$ de 2.5 mM. Las condiciones de amplificación fueron: 95°C pausa, 35 ciclos [1 min a 94°C, 42°C 1 min, 72°C por 1 min]; 72°C 5 min (Atkins y Clark, 2005). ITS-PCR (White *et al.*, 1990). Cebadores ITS (espaciadores internos transcritos): ITS 4: 5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'; ITS 5: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'. Condiciones de PCR: 95°C pausa, 94°C 3 min, 35 ciclos [94°C 1 min, 42°C 1.5 min, 72°C 1.5 min]; 72°C 5 min. RFLP-PCR (Carder *et al.*, 1993). Las enzimas de restricción para los RFLP-PCR (polimorfismo de tamaño de los fragmentos de restricción) fueron *Hae* III (10 U μL^{-1}), *Hin* F1 (10 U μL^{-1}), *Cfo*I (10 U μL^{-1}), *Xba*I (10 U μL^{-1}), *Nar*I (10 U μL^{-1}) y *Sau* 3A (4 U μL^{-1}) (BRL Ltd). La digestión de los productos de ITS-PCR se hizo en un volumen de 20 μL . Se adicionaron 2.3 μL del tampón 10x, la enzima(s) de restricción (1 μL) y se incubó 1 h en un baño maría a la temperatura adecuada, de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Los productos de la digestión enzimática se corrieron en un gel de agarosa (Helena Biosciences, Sunderland) al 1.5%. RAPD-PCR (Folkertsma *et al.*, 1994). Cebador para RAPD-PCR (ADN polimórfico amplificado al azar) V17 (Operon Technologies, Alameda, CA): 5'-ACC GGC TTG T-3'. Las condiciones para PCR fueron: 92°C pausa, 92°C 2 min, 35°C 1 min, 72°C 1 min, 39 ciclos [92°C 1 min, 35°C 1 min, 72°C 1 min ciclo], 92°C 1 min, 35°C 1 min, 72°C 5 min.

Electroforesis. El ADN se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa (Ultrapure ADN Grade Agarose-Bio-Rad®) al 1.5 % en tampón TBE (0.089 M Tris-HCl, pH 8.6, 0.089 M de ácido bórico y 0.002 M de EDTA). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 mg mL^{-1}) y se tomaron fotografías a 302 nm en un transiluminador con UVP imagestore con software 7500 (WP®, UK). El tamaño de los fragmentos de ADN se cuantificó en geles de agarosa. El tamaño del marcador fue de múltiplos de 123 pares de bases (pb) (Life Technologies Ltd®, UK). Los productos de PCR y los marcadores se tiñeron con bromuro de etidio y se determinaron aquéllos aislamientos diferentes o similares entre sí.

Clonado y secuenciado. Muestras de los aislamientos almacenados en HMA a 4°C en las placas de Petri fueron cultivadas nuevamente en HMA e incubadas a 28°C. El DNA se extrajo de los aislamientos (Klimyuk *et al.*, 1993) y las condiciones para ITS-PCR fueron las ya descritas. Los fragmentos de ITS-PCR se cortaron del gel de agarosa usando

et al., 1994). RAPD-PCR (random amplified polymorphic DNA) primers: V17 (Operon Technologies, Alameda, CA): 5'-ACC GGC TTG T-3' PCR conditions: 92°C pause, 92°C 2 min, 35°C 1 min, 72°C 1 min, 39 cycles [92°C 1 min, 35°C 1 min, 72°C 1 min cycle], 92°C 1 min, 35°C 1 min, 72°C 5 min.

Electrophoresis. PCR samples and markers were loaded in 1.5% agarose gels (Ultrapure DNA Grade Agarose-Bio-Rad®) prepared with TBE (0.089 M Tris-HCl, pH 8.6, 0.089 M boric acid and 0.002 M EDTA), and run in an electrophoresis tank (Bio-Rad®). Gels were stained with ethidium bromide (0.5 mg mL^{-1}) prior to DNA visualisation. Pictures were taken at 302 nm in a transilluminator with UVP imagestore software 7500 (WP®, UK). Size marker was expressed in multiples of 123 base pairs (bp) (Life Technologies Ltd®, UK). PCR products and markers were stained with ethidium bromide, and PCR band patterns used to identify similar or different fungal isolates.

Cloning and sequencing. Fungal samples were taken from the isolates kept in CMA at 4°C to be cultured again in CMA and incubated at 28°C. DNA from isolates was extracted (Klimyuk *et al.*, 1993) for ITS-PCR as previously described. ITS-PCR fragments were cut from the agarose gel using an elution kit (lab Qiagen®) and cloned using the vector TA® (In Vitro Gel®) according to manufacturer's guidelines and sequenced using the universal primers M13 (forward and reverse).

RESULTS

Fungal isolates. Four isolates of *P. chlamydosporia* were obtained from soil samples and labelled as: SC1, SMB3A, SMB3, and SM4. Isolate MHCH was obtained from egg masses of the nematode. Isolates were deposited in Rothamsted Research with the following numbers (Mexican identification labels in parenthesis): 242 (SMB3), 472 (SMB3A), 240 (SC1), 241 (SM4), 476 (MHCH).

Culturing substrate. Isolate SMB3A produced the largest number ($\log_{10}$) of chlamydospores (8.36 g^{-1}) in milled wheat-quartz sand substrate in comparison with rice (Table 2).

Viability and chlamydospores production. The best isolate was SMB3A with 93.3% chlamydospore germination, followed by SMB3 with 92.3%, and VC10 with 92.3%. The isolate that showed the lowest chlamydospore viability (80%) was MHCH. The highest chlamydospore production per g of substrate was achieved with the quartz sand substrate (Table 2). Both substrates (quartz sand and rice) have reportedly been used for mass production of the fungus in field trials (Atkins *et al.*, 2003; Hidalgo-Díaz *et al.*, 2000; Verdejo-Lucas *et al.*, 2003).

Rhizosphere colonization. All isolates attained 100% root colonization.

Eggs parasitism percentage. Isolate VC10 (standard isolate), showed the highest parasitism percentage (89%) in the Zacatecas population of the nematode, followed by isolates MHCH (86%), and SMB3 (59%). For the Tecamachalco nematode population, the highest parasitism was obtained

un “kit” de elución (lab Qiagen®, “elution kit”) y se clonaron en el vector TA® (In Vitro Gel®), siguiendo en ambos casos recomendaciones del proveedor y se secuenciaron usando los cebadores universales M13 (en sentido directo y reverso).

RESULTADOS

Aislamientos del hongo. A partir de las muestras de suelo se obtuvieron cuatro aislamientos de *P. chlamydosporia* a los cuales se asignaron las claves: SC1, SMB3A, SMB3 y SM4. El aislamiento MHCH se obtuvo a partir de masas de huevos del nematodo. Los aislamientos se encuentran depositados en Rothamsted Research con los siguientes números que corresponden a las claves mexicanas entre paréntesis: 242 (SMB3), 472 (SMB3A), 240 (SC1), 241 (SM4), 476 (MHCH).

Sustrato de cultivo. En el sustrato de cultivo trigo molido-arena de cuarzo, SMB3A produjo el mayor número ($\log_{10}$) de clamidosporas (8.36 g^{-1}) en comparación con el arroz (Cuadro

Cuadro 2. Evaluación del número ($\log_{10}$) de clamidosporas producidas por gramo de sustrato para cinco aislamientos mexicanos de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*.

Table 2. Evaluation on the number ($\log_{10}$) of chlamydospores produced per gram of substrate by five Mexican isolates of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*.

Aislamiento	Clamidosporas Arena de cuarzo ^y	Clamidosporas Arroz precocido ^y
SMB3A	8.36 a ^z	6.74 a
SMB3	8.25 b	6.78 a
MHCH	8.23 b	6.44 a
SM4	8.04 c	6.94 a
SC1	7.89 c	6.88 a

^yValores de dos repeticiones.

^zvalores con letra distinta indican diferencia significativa (Tukey, $p < 0.05$).

with isolate MHCH (88%); whilst SMB3A (72%) was the isolate that produced the lowest percentage of parasitized eggs (Table 3). For the Montecillo population, fungal isolates that showed the highest and the lowest parasitism percentages were SM4 (82%), and SC1 (67%), respectively.

PCR identification of isolates of *P. chlamydosporia*. β -tubulin-PCR of the five mexican isolates and the positive control (VC10) gave a single PCR product of 270 base pairs, thereby confirming that isolates belonged to *P. c.* var. *chlamydosporia* (Fig. 1). Using ERIC-PCR (Fig. 2), the band profiles showed two distinct groups of isolates: one formed by MHCH and SMB3, and another formed by SMB3A and SM4. Isolate SC1 was different to the other two groups. However, primers ITS4 and ITS5 showed that all isolates were similar. RFLP-PCR did not show differences (data not shown). Profiles obtained with primer V17 suggested that RAPD-PCR can identify three groups of isolates: SC1 and SMB3A; SMB3 and MHCH; and SM4 (Fig. 3). The sequences of two of the isolates were deposited in the GenBank database. Accession numbers are: AY903605 (isolate 476), AY912487 (isolate 472). Sequence analysis of the ITS-PCR product showed homologies with other *P. c.* var. *chlamydosporia* sequences deposited in GenEmbl.

DISCUSSION

There are few biological control studies on *N. aberrans* using nematophagous fungi (Manzanilla-López *et al.*, 2002). Because of this, and to make the search of nematophagous isolates in mexican locations faster and more efficient, it was decided to search for *P. chlamydosporia* isolates. The parasitic effect of the five mexican isolates of the fungus on nematode eggs was above 60%, thus placing the isolates as candidates to be used in the biological control of *N. aberrans*. All mexican isolates produced a single product of 270 base pairs using β -tubulin-PCR thus confirming that they belonged to *P. c.* var.

Cuadro 3. Porcentaje de parasitismo ejercido por aislamientos nativos y la cepa estándar VC10 de *Pochonia chlamydosporia* en huevos de tres poblaciones mexicanas de *Nacobbus aberrans*.

Table 3. Parasitism (%) by native isolates and the standard strain VC10 of *Pochonia chlamydosporia* on eggs of three Mexican populations of *Nacobbus aberrans*.

Montecillo ^x		Zacatecas		Tecamachalco	
SM4 ^y	82 a ^z	VC10	89 a	MHCH	88 a
SMB3A	81 a	MHCH	86 b	SC1	87 a
SMB3	76 a	SMB3A	81 c	SM4	84 b
VC10	73 a	SC1	71 c	VC10	82 b
MHCH	72 a	SM4	69 d	SMB3	76 b
SC1	67 a	SMB3	59 d	SMB3A	72 b
Testigo	0 a	Testigo	0 d	Testigo	0 b

^xHuevos obtenidos a partir de cultivos del nematodo establecidos en jitomate en el invernadero del Colegio de Postgraduados.

^yVC10 = aislamiento brasileño; SM4, SMB3A, SMB3, MHCH y SC1 = aislamientos mexicanos.

^zValores con distinta letra indican diferencia significativa (Tukey, $p < 0.05$).

2).

Viabilidad y producción de clamidosporas. El mejor aislamiento fue SMB3A con un 93.3% de germinación, seguido del SMB3 con un 92.3 y VC10 con 92.3%. El que mostró menor viabilidad de las clamidosporas (80%) fue MHCH. La mayor producción de clamidosporas por g de sustrato se obtuvo con la arena de cuarzo (Cuadro 2). Ambos sustratos han sido reportados en la reproducción masiva del hongo para ser usado en pruebas de campo (Atkins *et al.*, 2003; Hidalgo-Díaz *et al.*, 2000; Verdejo-Lucas *et al.*, 2003).

Colonización de la rizósfera. Todos los aislamientos produjeron un 100% de colonización.

Porcentaje de parasitismo en los huevos. El aislamiento VC10 o aislamiento estándar ejerció el mayor porcentaje de parasitismo (89%) en la población Zacatecas del nematodo, seguido del MHCH (86%) y SMB3 (59%). Para la población Tecamachalco, el mayor porcentaje de parasitismo se obtuvo con el MHCH (88%); y SMB3A (72%), el de menor porcentaje de huevos parasitados (Cuadro 3). Para la población Montecillo, el aislamiento que produjo el mayor porcentaje de parasitismo fue SM4 (82%) y el menor SC1 (67%).

Identificación de aislamientos de *P. chlamydosporia* con PCR. En el β -tubulina-PCR los cinco aislamientos mexicanos y el testigo positivo (VC10) generaron un solo producto de PCR de 270 pares de bases, confirmándose que corresponden a la especie *P. c. var. chlamydosporia* (Fig. 1). Usando el ERIC-PCR (Fig. 2), el perfil de bandas mostró distintos grupos: uno formado por MHCH y SMB3 y otro por SMB3A y SM4. El aislamiento SC1 parece ser diferente a estos dos grupos. Los cebadores ITS4 y ITS5 indicaron que todos los aislamientos son similares. Los RFLP no mostraron diferencias (datos no presentados). Los perfiles generados con el cebador V17 sugieren que con RAPD-PCR pueden identificarse tres grupos: SC1 y SMB3A; SMB3 y MHCH; y SM4 (Fig. 3). Las secuencias de dos de los aislamientos se depositaron en la base de datos GenBank. Los números de acceso son: AY903605 (clave para 476), AY912487 (clave para 472). El análisis de la secuencia del producto de ITS-PCR mostró homologías con otras secuencias de *P. c. var. chlamydosporia* depositadas en GenEmbl.

DISCUSIÓN

Los estudios de control biológico de *N. aberrans* con hongos nematófagos son escasos (Manzanilla-López *et al.*, 2002). Por ello, para hacer más rápida y eficiente la búsqueda de aislamientos en localidades mexicanas, se decidió obtener aislamientos de *P. chlamydosporia*, tomando en consideración su efecto bio-controlador en *Meloidogyne* spp. La acción parasítica de los cinco aislamientos mexicanos del hongo sobre los huevos del nematodo fue superior al 60%, lo cual los coloca como candidatos para ser usados en el control biológico de *N. aberrans*. Todos los aislamientos mexicanos generaron un solo producto de 270 pares de bases para β -tubulina-PCR. Las otras especies de hongos utilizados como testigos negativos (*P. lilacinus* y *Acremonium* sp.)

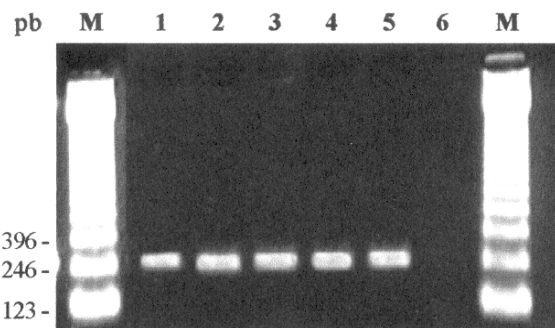


Fig. 1. PCR- β -Tubulina. M = marcador. Carril 1 = MHCH, 2 = SM4, 3 = SMB3A, 4 = SC1, 5 = SMB3, 6 = testigo negativo, pb = pares de bases.

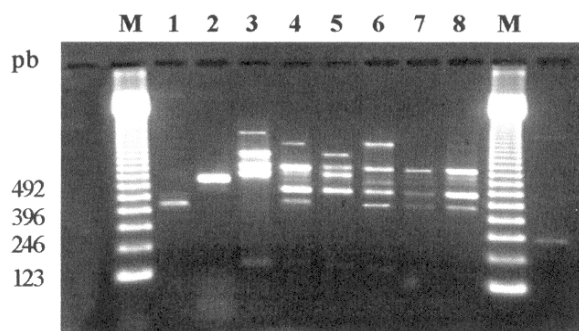


Fig. 2. PCR-ERIC. M = marcador. Carril 1 = *Paecilomyces* sp., 2 = *Acremonium* sp., 3 = VC10, 4 = SMB3, 5 = SC1, 6 = SMB3A, 7 = SM4, 8 = MHCH, pb = pares de bases.

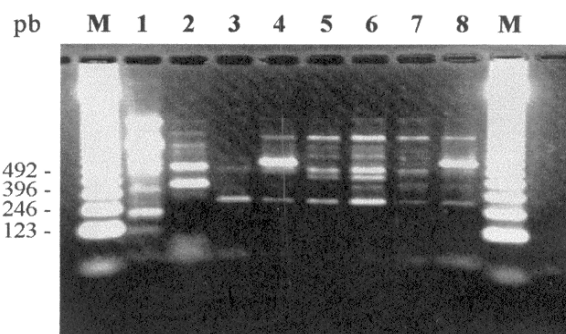


Fig. 3. PCR-RAPD. M = marcador. Carril 1 = *Paecilomyces lilacinus*, 2 = *Acremonium* sp., 3 = *Pochonia chlamydosporia* (VC10), 4 = SMB3, 5 = SC1, 6 = SMB3A, 7 = SM4, 8 = MHCH, pb = pares de bases.

chlamydosporia. The other two species of fungi that were used as negative controls (*P. lilacinus* and *Acremonium* sp.) confirmed the specificity of *P. c. var. chlamydosporia* primers. The ITS region has been used in other assays to differentiate between isolates of *P. chlamydosporia* (Arora *et al.*, 1996;

confirmaron la especificidad de los cebadores para *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*. La región ITS ha sido utilizada en otros ensayos para diferenciar entre aislamientos de *P. chlamydosporia* (Arora *et al.*, 1996; Atkins *et al.*, 2003). Aún cuando el producto amplificado del ITS-RFLP no permitió separar entre sí a los aislamientos mexicanos, éstos mostraron diferencias en la presencia de una secuencia repetitiva extragénica como ERIC (Fig. 2). La variación entre los aislamientos de *P. chlamydosporia* ha sido mostrada en otros estudios usando cebadores para ERIC-PCR (Arora *et al.*, 1996; Mauchline *et al.*, 2004; Morton *et al.*, 2003). Este método molecular se ha utilizado para examinar rápidamente la variación genética entre poblaciones del hongo dando resultados más reproducibles que el uso de los cebadores estándares para RAPD-PCR (Arora *et al.*, 1996). Debido a que el clonado y secuenciado de algunos fragmentos del DNA de los aislamientos mexicanos se realizó con un número pequeño de éstos, no se procedió a elaborar un árbol para establecer similitudes taxonómicas. Sin embargo, la información generada podría facilitar el diseño de cebadores específicos para estos aislamientos mexicanos, abriendo la posibilidad para identificar diversidad genética y monitorear los aislamientos del hongo en estudios aplicados (e.g. ecología, invernadero, laboratorio) de control biológico (Mauchline *et al.*, 2002), y diseñar estrategias de manejo del nematodo y del cultivo más compatibles con el medio ambiente.

CONCLUSIONES

Los cinco aislamientos mexicanos fueron positivos a los cebadores β -tubulina específicos para la especie *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* y cumplen con los requisitos básicos para ser considerados como agentes potenciales en el control biológico de *N. aberrans*. La producción de clamidosporas en el sustrato de trigo molido-arena de cuarzo fue mayor que en el de arroz precocido. Todos los aislamientos produjeron clamidosporas con germinación superior al 80%. Los métodos ERIC-PCR y RAPD-PCR detectaron diferencias entre aislamientos. El uso de cebadores específicos reduce el tiempo en las fases de detección y aislamiento del hongo en muestras de suelo y del nematodo (Atkins *et al.*, 2005). Es necesario continuar la búsqueda de aislamientos de *Pochonia* spp. en distintas localidades y cultivos donde ocurre *N. aberrans* en la República Mexicana para evaluar su diversidad y eficiencia en el control biológico con base en criterios como los descritos en el presente trabajo.

Agradecimientos. El primer autor agradece al CONACYT (México) el apoyo brindado en sus estudios de maestría y al Consejo Británico (Educational Links) para realizar parte del presente estudio en el Reino Unido. Al Dr. Ken Evans por su ayuda en la revisión del trabajo y a la Dra. Joana Bourne por su ayuda en la primera fase del trabajo. Al Dr. Ángel Martínez Garza (*in memoriam*). Rothamsted Research recibe fondos de apoyo del Consejo de Investigación de Biotecnología y

Atkins *et al.*, 2003). Although ITS-RFLP amplified product did not allow separation of the mexican isolates, they showed differences with repetitive extragenic sequences such as ERIC (Fig. 2). Variation between *P. chlamydosporia* isolates has been shown in previous studies using ERIC-PCR primers (Arora *et al.*, 1996; Mauchline *et al.*, 2004; Morton *et al.*, 2003). This molecular method has been used to examine the genetic variation between populations more rapidly and to provide more reproducible results than the use of standard primers for RAPD-PCR (Arora *et al.*, 1996). Due to the fact that cloning and sequencing of DNA fragments was made with a reduced number of mexican isolates, a phylogenetic study was not done to establish taxonomic similarity. However, the genetic information generated through the different molecular protocols could facilitate the design of specific primers for the isolates, thus opening the possibility to identify further genetic diversity and monitor the fungal isolates in other applied biological control studies (e.g. ecology, glasshouse, laboratory) (Mauchline *et al.*, 2002), and to design crop management strategies and so as to make nematode control more environmentally compatible.

End of the abbreviated article.

Ciencias Biológicas del Reino Unido (BBSRC).

LITERATURACITADA

- Arora, D.K., Hirsch, P.R., and Kerry, B.R. 1996. PCR-based molecular discrimination of *Verticillium chlamydosporium* isolates. *Mycological Research* 100:801-809.
- Atkins, S.D., and Clark, I.M. 2005. *Molecular Microbial Ecology Manual*. Rothamsted Research (Internal Document), Harpenden, U.K. 22 p.
- Atkins, S.D., Clark, I.M., Pande, S., Hirsch, P.R., and Kerry, B.R. 2005. The use of real-time PCR and species-specific primers for the identification and monitoring of *Paecilomyces lilacinus*. *Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Ecology* 51:257-264.
- Atkins, S.D., Hidalgo-Díaz, L., Clark, I.M., Morton, O., Montes de Oca, N., Gray, P., and Kerry, B.R. 2003. Approaches for monitoring the release of *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*, a biological control agent of root-knot nematodes. *Mycological Research* 107:206-212.
- Barker, K.R., and Campbell, C.L. 1981. Sampling nematode populations. pp. 451-474. In: B.M. Zuckermann, and R.A. Rhode (eds.). *Plant Parasitic Nematodes Vol. III*. Academic Press. New York, USA. 508 p.
- Barnett, H.L., and Hunter, B.B. 1987. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Burgess Publishing Company. Minneapolis, MN, USA. 241 p.
- Bourne, J.M., Kerry, B.R., and De Leij, F.A.A.M. 1996. The importance of the host plant on the interaction between root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and the

- nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard. Biocontrol Science and Technology 6:539-548.
- Butterfield, E.J., and De Vary, J.E. 1977. Reassessment of soil assays for *Verticillium dahliae*. Phytopathology 67:1073-1078.
- Carder, J.H., Segers, R., Butt, T.M., Barrara, D.J., Mende, N.V., and Coosemans, J. 1993. Taxonomy of the nematophagous fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlasporium* based on secreted enzyme activities and RFLP analysis. Journal of Invertebrate Pathology 62:178-184.
- De Leij, F.A.A.M., and Kerry, B.R. 1991. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard, as a potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood. Revue de Nématologie 14:157-164.
- Domsch, K.H., and Gams, W. 1980. Compendium of Soil Fungi. Vol. I. Academic Press. London, UK. 859 p.
- Edlind, T.D., Li, J., Visvesvara, G.S., Vodkin, H.H., McLaughlin, G.L., and Katiyar, S.K. 1996. Phylogenetic analysis of β -tubulin sequences from a mitochondrial protozoa. Mycological Phylogenetics and Evolution 5:359-367.
- Flores-Camacho, R., Manzanilla-López, R.H., Cid del Prado-Vera, I. y Martínez-Garza, 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.
- Folkertsma, R.T., Rouppe Van Der Voort, J.N.A.M., Van Gent-Pelzer, M.P.E., De Groot, K.E., Van Den Bos, W.J., Schots, A., Bakker, J., and Gommers, F.J. 1994. Inter and intra specific variation between populations of *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* revealed by random amplified polymorphic DNA. Phytopathology 84:807-811.
- Gams, W. 1988. A contribution to the knowledge of nematophagous species of *Verticillium*. Netherlands Journal of Plant Pathology 94:123-148.
- Gams, W., and Zare, R. 2001. A revision of *Verticillium* sect. Prostrata. III. Generic classification. Nova Hedwigia 72:329-337.
- Hidalgo-Díaz, L., Bourne, J.M., Kerry, B.R., and Rodríguez, M.G. 2000. Nematophagous *Verticillium* spp. in soils infested with *Meloidogyne* spp. in Cuba: isolation and screening. International Journal of Pest Management 46:277-284.
- Hirsch, P.R., Mauchline, T.H., Mendum, T.A., and Kerry, B.R. 2000. Detection of the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* in nematode-infested plant roots using PCR. Mycology Research 104:435-439.
- Hirsch, P.R., Atkins, S.D., Mauchline, T.H., Morton, C.O., and Kerry, B.R. 2001. Methods for studying the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* in the root environment. Plant and Soil 232:21-30.
- Joaquim, T.R., and Rowe, R.C. 1990. Re-assessment of vegetative compatibility relationships among strains of *Verticillium dahliae* using nitrate non-utilizing mutants. Phytopathology 80:1160-1166.
- Kerry, B.R. 1995. Ecological considerations for the use of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium*, to control plant parasitic nematodes. Canadian Journal of Botany 73:565-570.
- Kerry, B.R. 2001. Exploitation of the nematophagous fungal *Verticillium chlamydosporium* Goddard for the biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). pp. 155-167. In: T.M. Butt, C. Jackson, and N. Magan (eds.). Fungi as Biocontrol Agents. Progress, Problems and Potential. CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom. 309 p.
- Kerry, B.R., and Bourne, J.M. 1996. The importance of rhizosphere interactions in the biological control of plant parasitic nematodes a case study using *Verticillium chlamydosporium*. Pest Science 47:69-75.
- Kerry, B.R., and Bourne, J.M. 2002. A Manual for Research on *Verticillium chlamydosporium*, a Potential Biological Control Agent for Root-Knot Nematodes. IOBC/SORP. Darmstadt, Germany. 84 p.
- Kerry, B.R., and Jaffee, B.A. 1997. Fungi as biological control agents for plant parasitic nematodes. The Mycota 4:203-218.
- Klimyuk, V.I., Carroll, B.J., Thomas, C.M., and Jones, J.D.G. 1993. Alkali treatment for rapid preparation of plant material for reliable PCR analysis. Plant Journal 3:493-494.
- Martínez-Garza, A. 1980. Introducción al SAS (Statistical Analysis System). Sistema para análisis estadístico. Centro de Estadística y Cálculo. Colegio de Postgraduados. Chapingo, Edo. de México. 176 p.
- Mauchline, T.H., Kerry, B.R., and Hirsch, P. 2004. The biocontrol fungus *Pochonia chlamydosporia* shows nematode host preference at the infraspecific level. Mycological Research 108:161-169.
- Mauchline, T.H., Kerry, B.R., and Hirsch, P. 2002. Quantification in soil and the rhizosphere of the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* by competitive PCR and comparison with selective plating. Applied and Environmental Microbiology 68:1846-1853.
- Manzanilla-López, R.H., Costilla, M.A., Doucet, M., Franco, J., Inserra, R.N., Lehman, P.S., Cid del Prado-Vera, I., Souza, R.I., and Evans, K. 2002. The genus *Nacobbus* Thorne and Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): Systematics, distribution, biology and management. Nematropica 32:149-227.
- Morgan-Jones, G., and Rodríguez-Kabana, R. 1988. Fungi colonizing cysts and egg. pp. 39-58. In: G.O. Poinar, and H.B. Jansson (eds.). Diseases of Nematodes. Vol II. Press Inc. Boca Raton, Florida, USA. 150 p.
- Morton, C.O., Mauchline, T.H., Kerry, B.R., and Hirsch, P. 2003. PCR-based DNA fingerprinting indicates host-related genetic variation in the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. Mycological Research 107:198-205.
- Reid, A., Manzanilla-López, R.H., and Hunt, D.J. 2003. *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne and Allen, 1944

- (Nematoda: Pratylenchidae); a nascent species complex revealed by RFLP analysis and sequencing of the ITS-rDNA region. *Nematology* 5:441-551.
- Verdejo-Lucas, S., Sorribas, F.J., Ornat, C., and Galeano, M. 2003. Evaluating *Pochonia chlamydosporia* in a double-cropping system of lettuce and tomato in plastic houses infested with *Meloidogyne javanica*. *Plant Pathology* 52:521-528.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. In: M.A. Innes, D.H. Gelfand, J.S. Sninsky, and T.J. White. (eds). *PCR Protocols*. Academic Press. London, UK. 482 p.