

Aislamiento y Potencial Parasítico de un Aislamiento Nativo de *Pochonia chlamydosporia* en Contra de *Nacobbus aberrans* en Frijol

Isolation and Parasitic Potential of *Pochonia chlamydosporia* Against *Nacobbus aberrans* on Bean

Francisco Franco Navarro, Ignacio Cid del Prado Vera y María de la Luz Romero Tejeda, Programa de Fitopatología, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, km 36.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230, México. Correspondencia: ffranco@colpos.mx

(Recibido: Octubre 24, 2011 Aceptado: Abril 10, 2012)

Franco Navarro, F., Cid del Prado Vera, I. y Romero Tejeda, M. de la L. 2013. Aislamiento y Potencial Parasítico de un Aislamiento Nativo de *Pochonia chlamydosporia* en Contra de *Nacobbus aberrans* en Frijol. Revista Mexicana de Fitopatología 30:101-114

Resumen. Se tomaron muestras en suelos naturalmente infestados con *Nacobbus aberrans* dentro del municipio Pozo de Gamboa, estado de Zacatecas, México, y se obtuvo un aislamiento nativo del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*. Se realizaron pruebas para determinar su potencial como agente de control biológico del nematodo: primero su capacidad de colonización de raíces, tanto de plantas empleadas en esquemas de rotación como de diferentes variedades de frijol, y posteriormente su capacidad para parasitar huevos de *N. aberrans in vitro*. También se probó su efectividad como biocontrolador del nematodo bajo condiciones de invernadero. El aislamiento nativo colonizó el 100 % de raíces de las plantas probadas y de las variedades de frijol utilizadas; el parasitismo de huevos fue del 82 %. En invernadero, las plantas de frijol inoculadas con dos dosis diferentes del aislamiento nativo (7,500 y 15,000 clamidosporas g⁻¹ de suelo) desarrollaron mayor follaje y peso de raíces que las plantas testigo y las tratadas con carbofuran 48 % (4 L ha⁻¹). El agallamiento de raíces y el número de nematodos dentro de las mismas fueron menores al aplicarse el hongo. Este es el primer reporte de *P. chlamydosporia* en el estado de Zacatecas y de su uso como potencial agente de control biológico del nematodo falso nodulador en frijol.

Palabras clave adicionales: control biológico de nematodos, hongos nematófagos, nematodo falso nodulador, *Phaseolus vulgaris*.

El hongo *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare y Gams (= *Verticillium chlamydosporium*) es un parásito facultativo de huevos de nematodos ampliamente

Abstract. Naturally infested with *Nacobbus aberrans* soil samples were taken at Pozo de Gamboa municipality, Zacatecas state, Mexico, and native isolates of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* were obtained. Tests to evaluate their potential as a biological control agent against this nematode were done: first, their root colonization capacity was evaluated both from plants used in rotation schemes as well as of different bean varieties, and also their ability to parasitize *N. aberrans* eggs *in vitro* was tested. Additionally, tests were done to prove their effectiveness as a nematode biocontroller under greenhouse conditions. The native isolate colonized 100 % of the roots of the plants and the bean varieties tested; egg parasitism was 82 %. Greenhouse bean plants inoculated with two different doses of the native isolate (7,500 and 15,000 chlamydosporas g⁻¹ of soil) showed more foliage and root weight than the control plants and those treated with 48 % carbofuran (4 L ha⁻¹). Root galling and nematode numbers inside them were lower after fungus application. This is the first report of *P. chlamydosporia* in Zacatecas state and its use as a potential biological control agent for false root - knot nematode in beans.

Additional keywords: biological control of nematodes, nematophagous fungi, false root-knot nematode, *Phaseolus vulgaris*.

The fungus *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare and Gams (= *Verticillium chlamydosporium*) is a facultative parasite of nematode eggs widely distributed. It is found in soil where it can survive feeding from organic matter, but it can also grow and develop in the egg masses deposited by the female root-knot nematodes. Furthermore, this fungus has the ability to colonize the rhizoplane and rhizosphere (Bourne *et al.* 1994; De Leij and Kerry, 1991, Hirsch *et al.*, 2001), it can be root endophyte (Bordallo *et al.*, 2002, Lopez *et al.*, 2002) and even reduce colonization and damage by fungal pathogens (Monfort *et al.*, 2005) in several

distribuido. Se encuentra en suelo donde puede sobrevivir alimentándose de materia orgánica, pero también puede crecer y desarrollarse en las masas de huevos depositadas por la hembra de los nematodos agalladores. Además, este hongo tiene la capacidad de colonizar el rizoplasma y la rizósfera (Bourne *et al.*, 1994; De Leij y Kerry, 1991; Hirsch *et al.*, 2001), ser endófito de raíz (Bordallo *et al.*, 2002; López *et al.*, 2002) e incluso reducir la colonización y daño por parte de hongos fitopatógenos (Monfort *et al.*, 2005) en varios cultivos de importancia económica, ello sin causar lesiones o afectar su crecimiento. El hecho de que pueda colonizar raíces y aplicarse al suelo en forma de suspensión de clamidosporas o bien, en sustrato sólido previamente colonizado, le permite al hongo multiplicarse cerca de las hembras en desarrollo, invadir la masa de huevos e infectar estos últimos reduciendo eventualmente las poblaciones de los nematodos (Bourne *et al.*, 1996; De Leij y Kerry, 1991; Vianene y Abawi, 2000) y en consecuencia el impacto negativo de éstos en sus plantas hospedantes. Por tal motivo, *P. chlamydosporia* ha sido reconocido a nivel mundial como un potencial agente de control biológico de nematodos formadores de quistes (Kerry *et al.*, 1984), nematodos agalladores (Atkins *et al.*, 2003b; De Leij *et al.*, 1993; Ebadia *et al.*, 2009; Hidalgo *et al.*, 2000; Kerry e Hidalgo, 2004; Sorribas *et al.*, 2003), e incluso de *Rotylenchulus reniformis* (Wang *et al.*, 2005). Este hongo ha sido aislado en México, principalmente en zonas donde se cultiva jitomate y algunas áreas naturales del trópico mexicano (Flores *et al.*, 2008; Franco *et al.*, 2009), y ha probado ser un potencial agente de control biológico del nematodo falso nodulador *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne y Allen, en jitomate y chile (Flores *et al.*, 2008; Franco *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2007, 2011).

Nacobbus aberrans sensu Sher es una de las especies de nematodos fitopatógenos de mayor importancia en México, debido al daño y las pérdidas que ocasiona en varias plantas cultivadas como chile (*Capsicum annum* L.), jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) (Cristóbal *et al.*, 2001a). En el caso del frijol, alimento fundamental en la dieta de la población mexicana, se ha estimado que las pérdidas debidas al nematodo pueden alcanzar un 36 % del valor de la producción, principalmente en variedades como Negro Puebla y Canario (Manzanilla *et al.*, 2002). Las estrategias de control del nematodo, incluida la aplicación de nematicidas, no han sido satisfactorias; además, el uso de nematicidas tiene un costo elevado, no sólo desde el punto de vista económico sino también por sus efectos nocivos tanto al ambiente como a la salud humana (Pérez *et al.*, 2007).

Considerando la importancia que el nematodo falso nodulador tiene en varias zonas productoras de frijol del estado de Zacatecas, la actual tendencia en la búsqueda de alternativas sustentables para el control de nematodos fitoparásitos, y que el control biológico con organismos antagonistas no se ha probado en el patosistema *N. aberrans*-frijol, se plantearon los siguientes objetivos: 1) obtener aislamientos nativos de *P. chlamydosporia* en varias localidades del estado de Zacatecas donde *N. aberrans* está presente en frijol, y 2) probar el potencial como agente de

económicamente importantes, sin causar daño o afectar su crecimiento. El hecho de que puede colonizar raíces y aplicarse al suelo en forma de suspensión de clamidosporas, o en un sustrato previamente colonizado, permite al hongo multiplicarse cerca de las hembras en desarrollo, invadir la masa de huevos e infectar estos últimos reduciendo eventualmente las poblaciones de los nematodos (Bourne *et al.*, 1996; De Leij y Kerry, 1991; Vianene y Abawi, 2000) and, therefore, their negative impact on host plants. *P. chlamydosporia* has been recognized worldwide as a potential biological control agent against cyst-forming nematodes (Kerry *et al.*, 1984), root-knot nematodes (Atkins *et al.*, 2003b; De Leij *et al.*, 1993; Ebadia *et al.*, 2009; Hidalgo *et al.*, 2000; Kerry and Hidalgo, 2004; Sorribas *et al.*, 2003), and even against *Rotylenchulus reniformis* (Wang *et al.*, 2005). This fungus has been isolated in Mexico, mainly in tomato growing areas and in some natural areas of the Mexican tropics (Flores *et al.*, 2008; Franco *et al.*, 2009), and it has proven to be a potential biological control agent of the false root-knot nematode *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne and Allen, present in tomato and chili plants (Flores *et al.*, 2008; Franco *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2007, 2011).

One of the pathogenic nematode species of major importance in Mexico is *Nacobbus aberrans sensu* Sher because of the damage and the losses it causes in several crop plants such as chili (*Capsicum annum* L.), tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L.) (Cristóbal *et al.*, 2001a). In the case of beans, main food in the diet of Mexican population, it has been estimated that losses due to this nematode can reach up to 36 % of the production value, mainly in Negro Puebla and Canario bean varieties (Manzanilla *et al.* 2002). The nematode control strategies, including the use of nematicides, have not been satisfactory; in addition, the use of nematicides is costly, not only from the economic point of view but also for its harmful effects to both the environment and human health (Pérez *et al.*, 2007).

Considering the importance that this false-knot nematode has in several bean growing areas of Zacatecas state, the current trend in the search of sustainable alternatives for the control of plant parasitic nematodes, and that the biological control with antagonistic organisms has not been tested in the *N. aberrans*-beans pathosystem, the aims of this study were: 1) to obtain native *P. chlamydosporia* isolates from several Zacatecas state locations where *N. aberrans* is present in beans, and 2) to test the isolate obtained as a potential biological control agent on the false root-knot nematode and then contribute in finding alternatives for effective and sustainable control of this nematode.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection. Sampling sites in Zacatecas were selected based on a history of the presence and impact of *N. aberrans* in the area and on the aerial and underground observation of symptoms caused by the nematode in bean plants. The sample collection was conducted in the summer of 2009 on three land crops of the Municipality of Panuco, Zacatecas; one was located in Pozo de Gamboa (22.95 ° Lat

control biológico del aislamiento obtenido sobre el nematodo falso nodulador y así contribuir en la búsqueda de alternativas para el control eficaz y sustentable de este nematodo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de muestras. En Zacatecas, los sitios de muestreo se seleccionaron con base en los antecedentes de la presencia e impacto de *N. aberrans* en la zona y en la observación de síntomas tanto aéreos como subterráneos ocasionados por el nematodo en plantas de frijol. La colecta de muestras se llevó a cabo en el verano de 2009 en tres predios del Municipio de Pánuco, Zacatecas; uno ubicado en Pozo de Gamboa (22.95 ° Lat N, 102.57 ° Long O; 2250 msnm) y los otros dos aproximadamente a 9 km de éste, ambos (India 1 e India 2) localizados en La India (22.99 ° Lat N, 102.55 ° Long O; 2180 msnm).

En cada predio se tomaron 30 muestras de suelo y de raíces. El suelo se colectó en la periferia de las raíces, tomando muestras de 200 g de suelo entre los 15 y 25 cm de profundidad. En cuanto a las raíces, se tomaron aproximadamente 60 g en cada punto donde se colectó suelo y se revisó que éstas estuvieran agalladas (más del 80 % del sistema de raíces). Cada muestra se colocó por separado en bolsas de plástico etiquetadas y se conservaron frescas hasta su traslado al laboratorio para su procesamiento.

Aislamiento del hongo. Con el fin de obtener uno o más aislamientos nativos de los predios muestreados, se procesaron por separado suelo, raíces agalladas y también masas de huevos del nematodo siguiendo los protocolos descritos por Kerry (1997) y utilizando medio selectivo a base de Papa-Agar con antibióticos (PAA) (Hidalgo *et al.*, 2000). Para la detección a partir de suelo y de raíces agalladas de cada localidad, se procesaron 10 muestras de 1 g, de las cuales se hicieron dos diluciones (10^{-1} y 10^{-2}) y 200 µL de cada una se colocaron en medio selectivo; en el caso de las raíces, cada gramo de raíz se maceró previamente antes de preparar la dilución. Una vez sembradas las cajas, éstas se incubaron a 27 °C durante tres semanas (Franco *et al.*, 2009; Hidalgo *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 2007). La detección del hongo a partir de masas de huevos se llevó a cabo tomando masas extraídas de raíces agalladas y desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio 2.0 % por 30 s; posteriormente, las masas se enjuagaron con tres lavados de agua destilada esterilizada durante 1 min cada uno y se colocaron 20 masas por cada placa Petri con PAA. Las placas se incubaron durante 4 d a 27 °C para luego revisar el crecimiento o no del hongo a partir de los huevos.

Una vez que se detectaron colonias que por su crecimiento en medio selectivo se identificaron como *Pochonia*, y con base en experiencias previas, éstas se transfirieron sobre PAA y se incubaron durante 10 d a 27 °C para observar el crecimiento característico de la colonia (Hidalgo *et al.*, 2000). Las cajas se revisaron directamente en un microscopio compuesto a 400 aumentos para corroborar la producción de conidios y dictioclamidosporas que caracterizan al género y a la especie. El hongo se identificó morfológicamente de acuerdo a las descripciones de Gams y Zare (2001), Kerry (1997) y Zare *et al.* (2001).

N, 102.57 ° Long W, 2250 masl) and the other two lands were about 9 km away from the first one, both (India 1 and India 2) were located at La India (22.99 ° Lat N, 102.55 ° Long W; 2180 masl).

From each land, 30 soil and roots samples were collected. The soil was collected from around the roots by sampling 200 g of soil at 15 to 25 cm of depth. As for the roots, approximately 60 g were taken at each point where soil was collected and it was observed that they were galled (over 80 % of the root system). Each sample was placed separately in labeled plastic bags and kept cool until transportation to the laboratory for processing.

Fungus isolation. In order to obtain one or more native isolates from each land crop sampled, the soil, galled roots and nematode egg masses were separately processed following the protocols described by Kerry (1997) and using selective medium based on Potato-Agar with antibiotics (PAA) (Hidalgo *et al.*, 2000). For detection from soil and galled roots of each locality, 10 samples of 1 g each were processed; two dilutions (10^{-1} and 10^{-2}) were done for each sample and 200 µL were placed on selective medium; in the case of roots, each root gram was previously macerated before preparing the dilution. Once the Petri dishes were ready, they were incubated at 27 °C during three weeks (Franco *et al.*, 2009, Hidalgo *et al.*, 2000 Perez *et al.*, 2007). Fungus detection in egg masses was achieved using masses extracted from galled roots and disinfected with a 2.0 % sodium hypochlorite solution during 30 s; then masses were rinsed with three washes of sterile distilled water during 1 min each and 20 masses per each Petri dish with PAA were placed. The plates were incubated during 4 d at 27 °C in order to study the fungus growth from eggs.

Once colonies were detected and that by their growth on selective medium were identified as *Pochonia*, they were transferred to PAA and incubated during 10 d at 27 °C (based on previous experiences) to observe the characteristic growth of the colony (Hidalgo *et al.*, 2000). The plates were observed directly with a compound microscope at 400x to corroborate conidia and dictioclamyospore production that characterize the genus and species. The fungus was identified morphologically according to descriptions of Gams and Zare (2001), Kerry (1997) and Zare *et al.* (2001). Later on, it was transferred to PAA plates in order to have enough material for the following tests. Some 21 d old plates with previously identified isolate were kept in test tubes with PAA and mineral oil, and at deep freezing at -80 °C in 25 % sterile glycerol as storage medium.

Parasitic potential evaluation. In order to evaluate the potential as biocontrol agent of the *P. chlamydosporia* isolate obtained from soil, three tests were conducted for this purpose: root colonization, parasitism of nematode eggs *in vitro* conditions and its effectiveness as a biological control agent under greenhouse conditions (De Leij and Kerry, 1991; Hidalgo *et al.*, 2000) that have also been applied in previous studies with other Mexican isolates (Flores *et al.*, 2008; Franco *et al.*, 2009; Perez *et al.*, 2007).

Root colonization tests. The cultures tested, used in some cases as part of the rotation cycles in the Zacatecas state, were grouped based on their susceptibility degree to *N.*

Posteriormente, se transfirió a placas de PAA con el fin de contar con suficiente material para las siguientes pruebas. Algunas placas de 21 d de edad del aislamiento identificado previamente, se utilizaron para preservarlo en tubos con medio PAA y aceite mineral, así como en ultracongelación a -80 °C en glicerol 25 % esterilizado como medio de almacenaje.

Evaluación del potencial parasítico. Para evaluar el potencial del aislamiento de *P. chlamydosporia* obtenido a partir de suelo, como agente de control biológico, se realizaron tres pruebas para tal fin: la colonización de raíces, el parasitismo de huevos del nematodo en condiciones *in vitro*, y su efectividad como agente de control biológico en condiciones de invernadero (De Leij y Kerry, 1991; Hidalgo *et al.*, 2000); estas pruebas han sido aplicadas en estudios previos con aislamientos mexicanos (Flores *et al.*, 2008; Franco *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2007).

Pruebas de colonización de raíces. Los cultivos probados, empleados en algunos casos como parte de los ciclos de rotación en el estado de Zacatecas, se agruparon con base en su grado de susceptibilidad a *N. aberrans* en hospedantes (jitomate y chile), hospedantes pobres (calabaza y tomate de cáscara), y no hospedantes (maíz, col y brócoli) (datos no publicados). También se probaron variedades de frijol mejoradas con diferente grado de susceptibilidad al nematodo: Bayo INIFAP y Flor de Mayo criollo (susceptibles), Flor de Mayo M-38 (tolerante) y Bayo Mecentral (resistente) (Hernández, 2001).

Con el fin de evaluar la capacidad del aislamiento obtenido para colonizar las raíces de las plantas antes mencionadas, se siguió la metodología de Franco *et al.* (2009). Las semillas de dichas plantas se sumergieron en agua destilada estéril durante 10 min y luego 1 min en una solución de hipoclorito de sodio 8 % en agitación constante; finalmente, las semillas se enjuagaron con agua destilada estéril durante 1 min y hasta eliminar el exceso de hipoclorito de sodio. Las semillas se distribuyeron sobre papel absorbente contenido en una caja de Petri esterilizada, se humedecieron con agua destilada estéril y se incubaron a 27 °C durante ocho días para el caso de semillas grandes (maíz, frijol y calabaza) y doce días para semillas pequeñas (jitomate, chile, tomate de cáscara, col y brócoli). A la par de la germinación de las semillas, se llenaron tubos de ensaye (20 x 3 cm), con 70 g de vermiculita humedecida y estéril. Los tubos se dejaron enfriar y en cada uno de ellos, por debajo de la superficie, se colocaron tres círculos de medio PAA de 1 cm de diámetro con el aislamiento de *P. chlamydosporia* (IZ1) de aproximadamente 20 d de edad; los círculos se tomaron de la zona más externa de la colonia (zona de crecimiento). Otro lote igual de tubos se sembró con el aislamiento mexicano de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* SC1, el cual sirvió como referencia para esta prueba. Dicho aislamiento está depositado en la colección de *Pochonia chlamydosporia* del Programa de Fitopatología, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo (Estado de México, México) y cuya capacidad colonizadora de raíces, parasitismo de huevos de *N. aberrans* y efectividad biológica han sido probados en ensayos tanto en invernadero como en campo (Flores *et al.*,

aberrans in hosts (tomato and chili), poor hosts (squash and tomatillo) and non-host (corn, cabbage and broccoli) (unpublished data). Also improved bean varieties with different degrees of susceptibility to the nematode were tested: Bayo INIFAP and Flor de Mayo creole (susceptible), Flor de Mayo M-38 (tolerant) and Bayo Mecentral (resistant) (Hernández, 2001).

In order to evaluate the ability of the obtained isolate to colonize the roots of the plants specified above, the methodology by Franco *et al.* (2009) was followed. Seeds from these plants were immersed in sterile distilled water during 10 min and then 1 min in 8 % sodium hypochlorite solution under constant stirring; lastly, the seeds were rinsed with sterile distilled water during 1 min until excess sodium hypochlorite was removed. The seeds were spread on paper towels in a sterile Petri dish, they were moistened with sterile distilled water and incubated at 27 °C during eight days for large seeds (corn, beans and squash) and twelve days for small seeds (tomato, pepper, tomatillo, cabbage and broccoli). Along with the germination of the seeds stage, test tubes (20 x 3 cm) were filled with 70 g of moistened and sterilized vermiculite. The tubes were allowed to cool and on each of them three circles of 1 cm diameter of PAA media with the *P. chlamydosporia* isolate (IZ1) approximately 20 d old were placed; the circles were taken from the outermost zone of the colony (growth zone). A similar tubes batch was plated with Mexican isolate of *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* SC1, which served as a reference for this test. This isolate is deposited in the *Pochonia chlamydosporia* collection of the Phytopathology Program, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo (State of Mexico, Mexico) and whose root colonizing ability, *N. aberrans* egg parasitism and biological effectiveness have been already tested under both greenhouse and field conditions (Flores *et al.*, 2007; Perez *et al.*, 2007; Perez *et al.*, 2011).

Two germinated seeds of corn, beans and squash were placed on each tube, or three for small seeds (tomato, pepper, tomatillo, cabbage and broccoli). For each crop and fungal isolate, three replicates were done. All tubes were incubated at 25 °C during one week (corn, beans and squash) and up to two weeks for the rest of the plants, depending on the germination and growing time. After incubation under sterile conditions, plants were removed from each tube and excess vermiculite was removed, roots were cut into 1 cm segments (corn, beans and squash) or 0.5 cm (tomato, pepper, tomatillo, cabbage and broccoli), mixed (considering equally proximal and distal parts of the roots) and plated in Petri dishes with PAA; roots segments were incubated during seven days at 27 °C. For each tube or repetition, three Petri dishes with 10 root segments were plated. After seven incubation days, the boxes were observed directly under a compound microscope at 400x to corroborate the colonization of the isolates tested. Furthermore, the number of colonized segments was quantified and the percentage of colonization was then calculated (Franco *et al.*, 2009, Hidalgo *et al.*, 2000).

Parasitism of *N. aberrans* eggs. In order to carry out this test, the previously mentioned isolates *P.*

2007; Pérez *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2011).

En cada tubo se colocaron dos semillas germinadas de maíz, frijol y calabaza, o tres para semillas pequeñas (jitomate, chile, tomate de cáscara, col y brócoli). Para cada cultivo, y aislado fúngico, se tuvieron tres réplicas. Todos los tubos se incubaron a 25 °C durante una semana (maíz, frijol y calabaza) y hasta dos semanas para el resto de las plantas, ello en función del tiempo que tardaron en germinar y desarrollarse. Luego del período de incubación en condiciones estériles, se sacaron las plantas de cada tubo, se les removió el exceso de vermiculita, se cortaron las raíces en segmentos de 1 cm (maíz, frijol y calabaza) o 0.5 cm (jitomate, chile, tomate de cáscara, col y brócoli), se mezclaron (para considerar por igual partes proximales y distales de la raíces), y se sembraron en cajas de Petri con PAA para luego incubarlas durante siete días a 27 °C. Por cada tubo o repetición, se sembraron tres cajas de Petri con 10 segmentos de raíz. Transcurridos los siete días de incubación, las cajas se revisaron directamente en un microscopio compuesto a 400 aumentos para corroborar la colonización por parte de los aislamientos probados. Además, se cuantificó el número de segmentos colonizados y se calculó así el porcentaje de colonización (Franco *et al.*, 2009; Hidalgo *et al.*, 2000).

Parasitismo de huevos de *N. aberrans*. Para llevar a cabo esta prueba, se emplearon nuevamente los dos aislamientos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* antes referidos (IZ1 y SC1) y se siguió la metodología propuesta por Hidalgo *et al.* (2000). Ambos aislamientos se mantuvieron durante 21 d en medio PAA, tiempo después del cual se les colocaron 5 mL de agua destilada estéril, se raspó la superficie con una varilla de vidrio y se obtuvo una suspensión de material fúngico (conidios y fragmentos miceliales). En cada caso, se tomaron alícuotas de 0.2 mL de la suspensión y se dispersaron uniformemente sobre placas de Petri con Agua-Agar y antibióticos (AAA) para luego incubarlas a 25 °C durante dos días. Los huevos para la prueba se obtuvieron a partir de masas extraídas de plantas de frijol infectadas por una de las poblaciones de *N. aberrans* proveniente de Zacatecas (La "India 2"), las cuales se mantuvieron en el invernadero del Área de Nematología Agrícola del Programa de Fitopatología del Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo (temp máxima promedio = 29.6 °C; temp mínima promedio = 6.1 °C; humedad relativa promedio = 20.5 %). Las masas de huevos colectadas se disgregaron utilizando jeringas de insulina para liberar los huevos de la masa gelatinosa. Una alícuota de 1 mL (aproximadamente 300 huevos) se colocó en cada una de las cajas previamente sembradas con los respectivos aislamientos y se incubaron a 25 °C por cuatro días. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se estimó el porcentaje de parasitismo de huevos mediante el conteo al azar de 100 huevos en un microscopio compuesto a 400 aumentos. La prueba consistió de cinco réplicas por cada aislamiento más huevos. Además, se incluyó un control negativo que consistió de cinco cajas con huevos pero sin hongo.

Prueba de efectividad sobre *N. aberrans* en condiciones de invernadero. Los seis tratamientos que se

chlamydosporia var. *chlamydosporia* (IZ1 and SC1) were used, as well as the methodology proposed by Hidalgo *et al.* (2000). Both isolates were maintained during 21 d in PAA medium, then 5 mL of sterile distilled water were added and the surface was scraped with a glass rod to obtain a suspension of fungal material (conidia and mycelial fragments). For each case, 0.2 mL aliquots of the suspension were uniformly dispersed on Petri plates with Water-Agar and antibiotics (WAA) and then incubated at 25 °C during two days. Eggs for tests were obtained from egg masses extracted from bean plants infected with one of the *N. aberrans* populations from Zacatecas ("India 2"), which were maintained in the greenhouse of the Department of Agricultural Nematology of the Phytopathology Program at Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo (maximum average temp= 29.6 °C; minimum average temp= 6.1°C; average relative humidity = 20.5 %). Collected egg masses were disrupted using insulin syringes to release the eggs from the gelatinous mass. A 1 mL aliquot (about 300 eggs) was placed in each of the boxes previously plated with each isolate respectively and incubated at 25 °C during four days. After incubation time, the egg parasitism percentage was estimated by randomly counting 100 eggs with a compound microscope at 400x. The test consisted of five replicates per each isolate plus eggs. Furthermore, a negative control consisting of five plates with eggs without fungus was included.

***N. aberrans* effectiveness test under greenhouse conditions.** The six treatments applied in this stage are shown in Table 1. The experimental design was completely randomized with four replications. In order to set the test conditions up as similar as those in the field, the test was carried out in 5 kg containers filled with soil from one of the previously sampled lands naturally infected with *N. aberrans sensu* Sher, located in Pozo de Gamboa town, Zacatecas; it is important to mention that in this locality *P. chlamydosporia* was not detected and the level of nematode inoculum was high (62 vermiform individuals, 21 mature females and 14 galls g⁻¹ root in average). The soil was homogenized, 4.5 kg were placed on each container and four bean seeds var. Flor de Mayo creole previously disinfected were seeded; this bean variety is susceptible to the nematode and it was used in order to increase its level of inoculum in soil prior to starting the greenhouse test. The plants were kept 40 d after sowing (maximum average temp = 30.8 °C; minimum average temp = 7.1 °C, mean relative humidity = 21.6 %) and from each container two plants were extracted in order to confirm the presence of the nematode and to indirectly know the inoculum level on each of them (by counting the number of galls). Once the galls of all sampled roots were counted (5-8 galls g⁻¹ root) they were again incorporated to their respective soil. As part of the test itself, again four bean seeds var. Flor de Mayo creole were planted.

The nematicide (48 % carbofuran at 4 L ha⁻¹ doses) was applied twice at the same dose, but in order make more efficient both applications and to register precisely the date of the first application, some destructive samplings were made on bean plants grown simultaneously to those of the experiment; such samplings were done every third day after

Cuadro 1. Tratamientos probados en invernadero para el control de *Nacobbus aberrans* en plantas de frijol var. Flor de Mayo Criollo crecidas en suelo naturalmente infestado.

Table 1. Treatments tested for *Nacobbus aberrans* control in bean plants var. Flor de Mayo creole grown in naturally infested soil under greenhouse conditions.

| Clave | Descripción |
|-----------|---|
| TA | <i>N. aberrans</i> (Testigo Absoluto) |
| TA + V | <i>N. aberrans</i> + Vermicomposta |
| N | <i>N. aberrans</i> + carbofuran 48 % a dosis de 4 L ha ⁻¹ (Nematicida) |
| SCI | <i>N. aberrans</i> + Vermicomposta + <i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> (clave SCI) a dosis de 15,000 clamidosporas g ⁻¹ de suelo |
| IZI-7500 | <i>N. aberrans</i> + Vermicomposta + <i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> (clave IZI) a dosis de 7,500 clamidosporas g ⁻¹ de suelo |
| IZI-15000 | <i>N. aberrans</i> + Vermicomposta + <i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> (clave IZI) a dosis de 15,000 clamidosporas g ⁻¹ de suelo |

aplicaron en esta fase se presentan en el Cuadro 1. El diseño experimental fue completamente al azar, con cuatro repeticiones. Con el fin de establecer el ensayo en condiciones lo más parecidas a lo que sucedería en campo, éste se llevó cabo en macetas de 5 kg de capacidad que contenían suelo proveniente de uno de los predios previamente muestreados y naturalmente infestados con *N. aberrans sensu* Sher, ubicado en la localidad de Pozo de Gamboa, Zacatecas; cabe mencionar que en dicha localidad no se detectó a *P. chlamydosporia* y el nivel de inóculo del nematodo era elevado (62 individuos vermiformes, 21 hembras maduras y 14 agallas g⁻¹ de raíz en promedio). El suelo se homogeneizó y en cada maceta se vaciaron 4.5 kg para luego sembrar cuatro semillas de frijol var. Flor de Mayo criollo previamente desinfectadas; esta variedad es susceptible al nematodo y se utilizó con el fin de incrementar su nivel de inóculo en suelo antes de iniciar el ensayo en invernadero. Las plantas se mantuvieron 40 d posteriores a la siembra (temp máxima promedio = 30.8 °C; temp mínima promedio = 7.1 °C; humedad relativa promedio = 21.6 %) y de cada maceta se extrajeron dos plantas con el fin de corroborar la presencia del nematodo y conocer indirectamente el nivel de inóculo en cada una de ellas (a través del conteo de agallas). Una vez contadas las agallas de todas las raíces muestreadas (5-8 agallas g⁻¹ de raíz), éstas se incorporaron nuevamente a su respectivo suelo. Como parte propiamente del ensayo, en cada una de los macetas se sembraron nuevamente cuatro semillas de frijol var. Flor de Mayo criollo.

El nematicida (carbofuran 48 % a dosis de 4 L ha⁻¹) se aplicó en dos ocasiones a la misma dosis, pero para hacer más eficientes ambas aplicaciones y saber la fecha de la primera aplicación, se hicieron muestreos destructivos de plantas de frijol mantenidas a la par de las del experimento; dichos muestreos se realizaron cada tercer día luego de la aparición de las primeras hojas verdaderas. Este monitoreo del nematodo se realizó debido al conocimiento que ya se tiene de la capacidad de sobrevivencia de los estadios biológicos del nematodo (Cristóbal *et al.*, 2001b) y con el fin de saber el momento idóneo para la aplicación del nematicida. Una vez detectados los nematodos por métodos convencionales (en suelo), se estableció la fecha de la

the appearance of the first true leaves. This nematode monitoring was achieved based on those previous studies about survivability of biological stages of the nematode (Cristóbal *et al.*, 2001b) and it was done with the aim to detect the right time for the nematicide application. Once the nematodes were detected by conventional methods (in soil), the date of first application of the nematicide was established (10 d after the emergence of the first true leaves), and the second two weeks later (Pérez *et al.*, 2011).

Both isolates were massively spread on cracked corn (Perez *et al.*, 2007) and applied to the corresponding treatments in two doses (Table 1). Before application of the isolates, quality tests were done to the cracked corn used as substrate for fungus propagation. The tests were: number of chlamydo spores and Colony Forming Units (CFU) g⁻¹ colonized corn, as well as chlamydo spores germination percentage; for these tests the protocols described by Noble *et al.* (2000) and Kerry (1997) were followed. Chlamydo spores number g⁻¹ colonized corn for SC1 isolate was 5.0 x 10⁶, while for the IZ1 isolate it was 5.4 x 10⁶. Total UFC g⁻¹ colonized corn for SC1 isolate was 6.76 x 10⁶ and for IZ1 isolate it was 6.05 x 10⁶. Lastly, the chlamydo spores germination percentage for the SC1 isolate was 80% and 76 % for IZ1 isolate.

Once the amount of chlamydo spores g⁻¹ of colonized corn for each isolate was known, the amount of colonized substrate needed in the different treatments was estimated. For SC1 isolate, 10 g of cracked corn colonized per repetition were applied, while for IZ1 isolate 10.8 g of cracked corn colonized per repetition for the low dose and 21.6 g per replicate for the high dose were applied, these were equivalent to 7500 and 15000 chlamydo spores g⁻¹ soil, respectively (Table 1) (Perez *et al.*, 2007 and 2011). In order to apply the colonized substrate, vermicompost produced from goat manure as a vehicle application was used; the reference dose was 15 t ha⁻¹ (52 g pot⁻¹). In one of the treatments only vermicompost was applied (Table 1) in order to follow the effect of the fertilizer on the bean plants without the fungus presence. All treatments, except for the nematicide application, were applied one week after sowing, since the bean plants were already germinated and there were roots ready for fungus colonization. The

primera aplicación del nematicida (10 d posteriores a la aparición de las primeras hojas verdaderas), y la segunda dos semanas después (Pérez *et al.*, 2011).

Ambos aislamientos utilizados se propagaron masivamente sobre maíz quebrado (Pérez *et al.*, 2007) y se aplicaron en los tratamientos correspondientes en dos dosis (Cuadro 1). Antes de la aplicación de los aislamientos, se realizaron pruebas de calidad al maíz quebrado colonizado que se utilizó como sustrato de propagación del hongo. Las pruebas fueron: número de clamidosporas y unidades formadoras de colonias (UFC) g^{-1} de maíz colonizado, así como el porcentaje de germinación de clamidosporas; para éstas se siguieron los protocolos descritos por Hidalgo *et al.* (2000) y Kerry (1997). El número de clamidosporas g^{-1} de maíz colonizado para el aislamiento SC1 fue de 5.0×10^6 , en tanto que para el aislamiento IZ1 fue de 5.4×10^6 . El total de UFC g^{-1} de maíz colonizado del aislamiento SC1 fue de 6.76×10^6 y el del aislamiento IZ1 fue de 6.05×10^6 . Finalmente, el porcentaje de germinación de clamidosporas correspondientes al aislamiento SC1 fue del 80 %, mientras que para el aislamiento IZ1 fue del 76 %.

Una vez conocida la cantidad de clamidosporas g^{-1} de maíz colonizado por cada aislamiento, se estimó la cantidad de sustrato colonizado a utilizar en los diferentes tratamientos. Del aislamiento SC1 se aplicaron 10 g de maíz quebrado colonizado por repetición, mientras que del aislamiento IZ1 se aplicaron 10.8 g de maíz quebrado colonizado por repetición para la dosis baja y 21.6 g por repetición para la dosis alta, equivalentes a 7500 y 15000 clamidosporas g^{-1} de suelo, respectivamente (Cuadro 1) (Pérez *et al.*, 2007 y 2011). Para aplicar el sustrato colonizado, se utilizó vermicomposta elaborada a base de estiércol de cabra como vehículo de aplicación; la dosis referencia fue de $15 t ha^{-1}$ ($52 g maceta^{-1}$). En uno de los tratamientos sólo se aplicó vermicomposta (Cuadro 1) con el fin de establecer el efecto único del abono en las plantas de frijol sin la presencia del hongo. Todos los tratamientos, a excepción de la aplicación del nematicida, se aplicaron una semana después de la siembra, toda vez que las plantas de frijol ya habían germinado y había raíces para colonizar por parte del hongo. El sustrato colonizado y la vermicomposta se incorporaron al suelo, mientras que el nematicida se aplicó al cuello de cada planta.

Se vigiló que el suelo se mantuviera húmedo durante el transcurso del experimento y se aplicó fertilización foliar a las plantas cada 20 d durante el período vegetativo (Bayfolan® Forte a dosis de $1.5 mL L^{-1}$ de agua). A los 60 d posteriores a la siembra del frijol (temp máxima promedio = $34.3 ^\circ C$; temp mínima promedio = $8.2 ^\circ C$; humedad relativa promedio: 25.8 %), en las plantas se cuantificó el peso seco del follaje mediante el secado de la parte aérea de cada planta dentro de bolsas de papel en una estufa a $40 ^\circ C$ por 72 h. También se cuantificó el peso fresco de las raíces y se calculó el índice de agallamiento, que se obtuvo mediante el cociente del número de agallas entre el peso fresco de raíces y se utilizó para tener una medida más precisa del daño del nematodo en las raíces (Pérez *et al.*, 2011). Además, se contó el número de individuos de los juveniles de tercer (J_3) y cuarto estadio (J_4), y el de hembras maduras g^{-1} de raíz; para

colonized substrate and vermicompost were incorporated into the soil, while the nematicide was applied by ground.

Soil was wet during all the experiment and foliar fertilization was applied to the plants every 20 d during the growing season (Bayfolan® Forte, $1.5 mL L^{-1}$ of water). After 60 d of bean sowing (maximum temp average = $34.3 ^\circ C$; minimum temp average = $8.2 ^\circ C$, average relative humidity: 25.8 %), the foliage dry weight was quantified by drying the aerial part of each plant inside paper bags in an oven at $40 ^\circ C$ during 72 h. Also the root fresh weight was quantified and the galling index was calculated; this was obtained by the ratio of the galls number and the fresh roots weight, and it was used to have a more accurate measure of nematode damage in roots (Pérez *et al.*, 2011). In addition, the number of individuals of third (J_3) and fourth stage (J_4) were counted, as well as the number of mature females g^{-1} of root; for this purpose, three root samples were liquefied (1 g each) (Ayoub, 1977) and another three samples (1g each) previously stained with acid fuchsin were screened (Byrd *et al.*, 1983). Fungal CFU were quantified both in root and soil at the end of the experiment in order to confirm its presence and then associate the observed effects (Kerry, 1997 Pérez *et al.*, 2007, 2011).

Statistical Analysis. The data obtained from the measured variables were subjected to a variance analysis and when significant differences between treatments were detected, the media comparison using the Tukey test ($P < 0.05$) was done. For this purpose, Statistical Analysis System® software for Windows V8 was used.

RESULTS

Search of native isolates. From the soil and root samples collected in Zacatecas, as well as from the *N. aberrans* egg masses, only one isolate from soil was obtained, which corresponded to the La India 2 land ($23 ^\circ 00' 9''$ Lat N, $102 ^\circ 30' 7''$ Long W). This isolate was labeled as IZ1 to indicate the location and home state, and number one as it was the first isolate obtained in the area. This isolate is part of the *Pochonia chlamydosporia* collection of the Phytopathology Program, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo.

On the PAA plates, the obtained isolate showed growth with cottony appearance, rounded edges and white color that eventually became creamy due to the chlamydospore production. The IZ1 isolate was morphologically identified as *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* according to Gams and Zare (2001) and Zare *et al.* (2001). The isolate usually showed prostrated conidiophores and poorly differentiated from the mycelium; seclusive phialides, or 2 to 3 per nodule in a whorl around each conidiophore. Conidiophores have hyaline or bright color unicellular conidia, and subglobose to ellipsoidal shape; they were attached and clustered in heads coated with an adhesive substance. Also, dictiochlamydospores or resistance structures were observed in the aerial mycelium.

Evaluation of the parasitic potential. Root colonization tests. SC1 and IZ1 isolates colonized 100% of the segments grown in PAA of all the plants tested. When Petri dishes were observed under the microscope, after

ello, se licuaron tres muestras de raíces (1 g cada una) (Ayoub, 1977) y se revisaron otras tres muestras de 1 g teñidas previamente con fucsina ácida (Byrd *et al.*, 1983), respectivamente. Del hongo se cuantificaron las UFC tanto en raíces como en suelo al final del experimento con el fin de corroborar su presencia y así asociar los efectos observados (Kerry, 1997; Perez *et al.*, 2007, 2011).

Análisis estadístico. Los datos obtenidos de las variables medidas se sometieron a un análisis de varianza y cuando en éste se detectaron diferencias significativas entre tratamientos, se realizó la comparación de medias con la prueba de Tukey ($P < 0.05$). Para tal fin se utilizó el programa Statistical Analysis System® para Windows V8.

RESULTADOS

Búsqueda de aislamientos nativos. De las muestras de suelo y raíces colectadas en Zacatecas, así como de las masas de huevos de *N. aberrans* se obtuvo sólo un aislamiento a partir de suelo, mismo que correspondió a la localidad La India 2 (23 °00 '9 " lat N, 102 °30 '7 " long O), etiquetado como IZ1 para indicar la localidad y el estado de procedencia, así como el hecho de haber sido el primer aislamiento obtenido en la zona. Este aislamiento forma parte de la colección de *Pochonia chlamydosporia* del Programa de Fitopatología, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo.

En placas de PAA, el aislado presentó una colonia con apariencia algodonosa y bordes redondeados, de color blanco que con el tiempo se tornó color crema debido a la producción de clamidosporas. IZ1 se identificó morfológicamente como *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* de acuerdo a las claves de Gams y Zare (2001), y Zare *et al.* (2001). El aislado presentó conidióforos por lo general postrados y poco diferenciados del micelio, fíalides solitarias, o de 2 a 3 por nódulo en verticilo. Los conidióforos portan conidios unicelulares hialinos o de color brillante, de forma subglobosa a elipsoidal; éstos mostraron estar adheridos y agrupados en cabezuelas recubiertas de una sustancia adhesiva. Además, se observaron dictioclamidosporas o estructuras de resistencia en el micelio aéreo.

Evaluación del potencial parasítico. Pruebas de colonización de raíces. El aislamiento SC1 e IZ1 colonizaron el 100 % de los segmentos sembrados en PAA de todas las plantas probadas. Al revisar las cajas Petri bajo el microscopio, y luego de siete días de haberse hecho la siembra de los fragmentos de raíz, se observó la presencia de clamidosporas sólo en aquellas que contenían fragmentos de raíces de calabaza; en el resto de los cultivos las clamidosporas se presentaron entre el noveno y el décimo día. Respecto a la colonización de raíces de variedades de frijol, tanto el aislamiento IZ1 como SC1 colonizaron también el 100 % de los segmentos sembrados; en este caso, la presencia de clamidosporas en los segmentos de raíces de todas las variedades de frijol probadas se dio al doceavo día de incubación.

Parasitismo de huevos de *N. aberrans*. Los dos aislamientos de *Pochonia chlamydosporia* parasitaron huevos de *N. aberrans*. En el caso del aislamiento SC1 el

seven days that the root fragments were placed, the presence of chlamydo spores was observed only on those containing fragments of squash roots; in other crops, chlamydo spores occurred between the ninth and tenth day. Regarding root colonization of different bean varieties, both IZ1 and SC1 isolates colonized also 100 % of segments placed on PPA plates; in this case, chlamydo spores presence in root segments of all bean varieties tested was observed at the twelfth day of incubation.

Parasitism of *N. aberrans* eggs. Both *Pochonia chlamydosporia* isolates parasitized *N. aberrans* eggs. In the case of SC1 isolate, parasitism percentage was 84 % while the IZ1 isolate parasitized 82 % of the nematode eggs.

Effectiveness test on *N. aberrans* under greenhouse conditions. Although there were no significant differences in the foliage dry weight of plants between different treatments, the IZ1 isolate at the highest chlamydo spores concentration in soil (IZ1-15000) showed the highest foliage dry weight compared to the rest of the plants (Table 2). Additionally, there were no significant differences in the fresh weight of roots; however, plants inoculated with SC1 isolate and those with high doses of IZ1, shown heavier weight on average (Table 2). In the galling index, highly significant differences between treatments ($P = 0.001$) were detected; such index decreased in the roots of plants where IZ1 was applied at low (7500) and high (15000) chlamydo spores concentration into the soil. The reduction was 81.2 and 76.8 % compared with the absolute control plants and those that only received vermicompost, respectively (Table 2). The galling index reduction when SC1 isolate was applied was slightly lower (38 %) than when IZ1 isolate was applied (Table 2).

There were highly significant differences between treatments ($P = 0.001$) in the number of J_3 and J_4 inside the roots; the most remarkable differences occurred in the roots where SC1 isolate was applied, since in these, J_3 and J_4 numbers was in average lower than in the other treatments. The number of J_3 - J_4 juveniles inside on the roots of the plants where IZ1 was applied at low and high chlamydo spores concentration, was in average 30.5 and 43.8 % lower than the quantified on the plant roots where nematicide was applied; similarly, when comparing the number of juveniles of the treatments where isolate from Zacatecas was applied in the roots of the control plants, the reduction was 48 % (IZ1-15000) and 36 % (IZ1-7500). It is important to mention that applying only vermicompost to soil with *N. aberrans*, the number of individuals of both J_3 and J_4 was lower compared to the control, although not to the extent observed when *P. chlamydosporia* was added to the vermicompost (SC1 and IZ1 isolates in high doses).

Although there were no significant differences between treatments regarding the number of mature female g^{-1} root, the lowest number of females g^{-1} root was observed in the roots of plants treated with SC1 and IZ1. In these treatments, the reduction in the number of females ranged between 68.4 and 70 % compared to absolute control plants, and between 74 and 75.4 % compared to plants with nematicide applications (Table 2).

In plants with SC1 applications, it was possible to

porcentaje de parasitismo fue del 84 %, mientras que el aislamiento IZ1 parasitó un 82 % de los huevos del nematodo.

Prueba de efectividad sobre *N. aberrans* en condiciones de invernadero. Aunque no hubo diferencias significativas en el peso seco de follaje de las plantas entre los diferentes tratamientos, el aislamiento IZ1 a la concentración más alta de clamidosporas en suelo (IZ1-15000) presentó el mayor peso seco del follaje comparado con el resto de las plantas (Cuadro 2). Tampoco se detectaron diferencias significativas en el peso fresco de raíces; sin embargo, las plantas inoculadas con el aislamiento SC1 y a las que se aplicó IZ1 a dosis alta presentaron mayor peso en promedio (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto de los tratamientos aplicados en invernadero en plantas de frijol var. Flor de Mayo Criollo crecidas en suelo naturalmente infestado con *Nacobbus aberrans*.

Table 2. Effect of treatments applied in bean plants var. Flor de Mayo creole grown in soil naturally infested with *Nacobbus aberrans* under greenhouse conditions.

| Tratamiento | PSF ^s (g) | PFR ^t (g) | IA ^u | J3 ^v | J4 ^w | HM ^x | UFCR ^y | UFCS ^z |
|-------------|-------------------------|-------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|-------------------|
| TA | 2.2 a ^f | 3.1 a | 6.9 a*** | 15 a*** | 10 a*** | 15 a | 0 c*** | 0 c*** |
| TA + V | 2.1 a | 3.3 a | 5.6 ab | 10 bc | 8 ab | 14 a | 0 c | 0 c |
| N | 1.8 a | 3.5 a | 5.5 abc | 13 ab | 10 a | 18 a | 0 c | 0 c |
| SCI | 2.4 a | 3.9 a | 2.1 bc | 7 c | 5 b | 5 a | 17 b | 12 a |
| IZI-7500 | 2.3 a | 3.4 a | 1.3 c | 8 c | 8 ab | 4 a | 16 b | 5 b |
| IZI-15000 | 2.5 a | 3.8 a | 1.3 c | 7 c | 6 b | 6 a | 26 a | 15 a |
| C.V. | 18.18 | 14.86 | 49.34 | 19.83 | 23.09 | 64.86 | 37.01 | 32.68 |

*** Significativo por $P < 0.001$

^f Promedio de cuatro repeticiones. Números con la misma letra, dentro de la misma columna, son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey por $P < 0.05$

^s Peso seco de follaje

^t Peso fresco de raíces

^u Índice de agallamiento (i.e., cociente del número de agallas entre el peso fresco de raíces)

^v Juveniles del tercer estadio

^w Juveniles del cuarto estadio

^x Hembras maduras

^y Unidades formadoras de colonias en raíces

^z Unidades formadoras de colonias en suelo

C.V. Coeficiente de variación

En el Índice de agallamiento se detectaron diferencias altamente significativas entre tratamientos ($P < 0.001$); dicho índice se redujo en las raíces de plantas donde se aplicó IZ1 a baja (7500) y alta concentración (15000) de clamidosporas en el suelo. La reducción fue del 81.2 y 76.8 % comparado con las plantas del testigo absoluto y las que recibieron sólo vermicomposta, respectivamente (Cuadro 2). La reducción del índice de agallamiento al aplicar el aislamiento SC1 fue ligeramente menor (38 %) que al aplicar el aislamiento IZ1 (Cuadro 2).

Hubo diferencias altamente significativas entre tratamientos ($P < 0.001$) en el número de J3 y J4 dentro de las raíces; las diferencias más notorias se presentaron en las raíces donde se aplicó el aislamiento SC1, ya que en éstas el número de J3 y J4 en raíces fue en promedio menor que en el

detect the presence of the fungus, a similar situation to that observed in plants where IZ1 was applied at both concentrations. *Pochonia chlamydosporia* grew up only in the plates where processed roots of inoculated plants were present. The highest UFC number in roots corresponded to the IZ1-15000 treatment (Table 2). As for the UFC number in soil, the fungus was only detected in the treatments where this was inoculated. The highest UFC number in soil corresponded to the SC1 and IZ1 treatments at high concentration (15,000 chlamydospores g^{-1} soil) (Table 2).

DISCUSSION

Isolation of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* obtained from soil samplings, galled roots

and associated egg masses represent the first record of the presence of such nematophagous fungus in soils of Zacatecas state, adding to those reported in other regions of the country (Flores *et al.*, 2008, Franco *et al.*, 2009).

Pochonia chlamydosporia as a potential agent for biological control of pathogenic nematodes of agricultural importance, must meet a number of requirements that allow to select and discriminate among ineffective isolates to those that potentially can be exploited on a large scale and commercially. According to Kerry (1997), *P. chlamydosporia* isolates with potential for use as biological control agents should record rates of 80 % or more in both laboratory tests (eggs parasitism and roots colonization) so that they can be then evaluated under greenhouse and field conditions.

resto de los tratamientos. El número de juveniles J3-J4 en las raíces de las plantas donde se aplicó IZ1 a baja y alta concentración de clamidosporas fue en promedio 30.5 y 43.8 % menor que el cuantificado en las raíces de las plantas donde se aplicó el nematicida; de igual manera, al comparar el número de juveniles de los tratamientos en los cuales se aplicó el aislamiento zacatecano con el observado en las raíces de las plantas del testigo absoluto, la reducción en promedio fue del 48 % (IZ1-15000) y del 36 % (IZ1-7500). Cabe mencionar que al aplicar sólo vermicomposta al suelo con *N. aberrans*, el número de individuos tanto de J3 como de J4 fue menor en comparación con el testigo, aunque no en la magnitud que se observó cuando a la vermicomposta se le adicionó *P. chlamydosporia* (aislamientos SC1 e IZ1 en dosis alta).

Aunque no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos con relación al número de hembras maduras g^{-1} de raíz, en las raíces de las plantas tratadas con SC1 e IZ1 se presentó el menor número de hembras g^{-1} de raíz. En estos tratamientos, la reducción en el número de hembras osciló entre 68.4 y 70 % respecto a las plantas del testigo absoluto, y entre el 74 y 75.4 % comparado con las plantas a las que se les aplicó nematicida (Cuadro 2).

En las plantas a las que se les aplicó SC1, fue posible detectar la presencia del hongo, situación similar a la observada en las plantas donde se aplicó IZ1 a ambas concentraciones. *Pochonia chlamydosporia* se observó creciendo sólo en las cajas donde se procesaron raíces de plantas inoculadas. El mayor número de UFC en raíces correspondió al tratamiento IZ1-15000 (Cuadro 2). En cuanto al número de UFC en suelo, el hongo sólo se detectó en los tratamientos donde éste se inoculó. El mayor número de UFC en suelo correspondió a los tratamientos con SC1 e IZ1 a alta concentración (15,000 clamidosporas g^{-1} de suelo) (Cuadro 2).

DISCUSIÓN

El aislamiento de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* obtenido a partir de los muestreos de suelo, raíces agalladas y masas de huevos asociadas representa el primer registro de la presencia de dicho hongo nematófago en suelos del estado de Zacatecas, sumándose así a los reportados en otras regiones del país (Flores *et al.*, 2008; Franco *et al.*, 2009).

Pochonia chlamydosporia, como un agente potencial de control biológico de nematodos fitopatógenos de importancia agrícola, debe cumplir con una serie de requisitos los cuales permiten seleccionar y discriminar entre aislamientos poco efectivos y aquellos que potencialmente pueden explotarse a gran escala y de manera comercial. De acuerdo con Kerry (1997), los aislamientos de *P. chlamydosporia* con potencial para utilizarse como agentes de control biológico deben registrar porcentajes de 80 % o más en ambas pruebas de laboratorio (parasitismo de huevos y colonización de raíces), para posteriormente proceder a su evaluación en invernadero y campo.

Como se ha establecido con anterioridad, *P. chlamydosporia*, una vez presente en suelo, no sólo se alimenta de huevos de nematodos sino que es capaz de

As stated previously, once *P. chlamydosporia* is present in soil it does not only feeds on nematode eggs but also it is able to feed on organic matter and colonize the rhizosphere of several cultivated plants; in fact, this colonization phenomenon has been studied in detail and evidence that the fungus is able to colonize the roots even endophytically has been found (Bordallo *et al.*, 2002; Macia *et al.*, 2009b).

This fungus does parasite the active stages of nematodes, mainly eggs and sometimes sessile females (Hidalgo *et al.*, 2000, Kerry, 1997); for this reason, root colonization is a key event to enhance contact with eggs contained in the gelatinous masses found on the roots surface (Kerry & Bourne, 1996). This is the main reason why root colonization is essential in the selection and evaluation of isolates of this fungus for the control of *Meloidogyne* (De Leij and Kerry, 1991, Hidalgo *et al.*, 2000; Sorrentino *et al.*, 2003) and false root-knot nematode (Flores *et al.*, 2008, Franco *et al.*, 2009, Perez *et al.*, 2007). Moreover, roots colonization is even more important because of the evidences that this interaction can be endophytic (Bordallo *et al.*, 2002). Such interaction, according to Maciá *et al.* (2009a and b), may be beneficial for colonized plants, as they not only promote their growth, but also protect them from attack by fungal pathogens.

To know the colonization capacity in plants with different susceptibility degree to the nematode, also allows to use to *P. chlamydosporia* in combination with rotation schemes to induce their development and maintain their presence in soil after application, without numerous and consistent applications; this practice has been successful in the management of root-knot nematodes under specific management (Atkins *et al.*, 2003b; Kerry and Hidalgo, 2004).

In the present study, the results of the colonization tests allowed to advance in the knowledge about the potential of this new isolate from Zacatecas state, besides that it is the first time that tests are done in plants that can be used in rotation schemes and even in host varieties of interest (bean in this case) with different susceptibility degree to the nematode. This makes a difference with respect to previous studies in which tests were directed only towards plants highly susceptible to *N. aberrans* (Flores *et al.*, 2008, Perez *et al.*, 2007). The knowledge gained will allow knowing which of the tested plants (that can be used as part of rotation cycles in Zacatecas state) can stimulate the presence and maintenance of the fungus in the rhizosphere and in the soil itself, under a nematode biomanagement scheme in which crop rotation or planting resistant varieties are incorporated. In this scheme it is also important the role of the organic matter that is incorporated as a vehicle of the fungus application. In the present study, vermicompost was the source of organic matter, whose properties have been documented as a source of slow release nutrients, promoter in the production of phenolic compounds (increasing resistance to herbivory), enhancer of soil microbial diversity and as a biopesticide (Dominguez *et al.*, 2010). Although in this study there was no apparent effect of one single vermicompost application as documented by Villa *et al.*

alimentarse de materia orgánica y colonizar la rizosfera de varias plantas cultivadas; de hecho, este fenómeno de colonización se ha estudiado con detalle y se ha encontrado evidencia respecto a que el hongo es capaz de colonizar las raíces incluso endofíticamente (Bordallo *et al.*, 2002; Maciá *et al.*, 2009 a y b).

Este hongo parasita las etapas activas de los nematodos, principalmente huevos y en contadas ocasiones hembras sésiles (Hidalgo *et al.*, 2000; Kerry, 1997); por tal motivo, la colonización de raíces es un evento fundamental para potenciar el contacto con los huevos contenidos en las masas gelatinosas que se encuentran sobre la superficie de las raíces (Kerry y Bourne, 1996). Esta es la principal razón del por qué la colonización de raíces es básica en el proceso de selección y evaluación de aislamientos de este hongo para el control de *Meloidogyne* (De Leij y Kerry, 1991; Hidalgo *et al.*, 2000; Sorribas *et al.*, 2003) y del nematodo falso nodulador (Flores *et al.*, 2008; Franco *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2007). Además, la colonización de las raíces cobra aún mayor importancia al encontrarse evidencias de que dicha interacción puede ser endofítica (Bordallo *et al.*, 2002). Esta interacción, de acuerdo con Maciá *et al.* (2009a y b), puede ser benéfica para las plantas colonizadas, ya que no sólo promueve su crecimiento, sino que además las protege contra el ataque de hongos fitopatógenos.

Conocer la capacidad de colonización en plantas con diferente grado de susceptibilidad al nematodo, también permite utilizar a *P. chlamydosporia* en conjunto con esquemas de rotación para así inducir su desarrollo y mantener su presencia en suelo una vez aplicado, ello sin necesidad de recurrir a numerosas y constantes aplicaciones del mismo, experiencia que ha resultado exitosa en el manejo de nematodos agalladores bajo condiciones específicas de manejo (Atkins *et al.*, 2003b; Kerry y Hidalgo, 2004).

En el presente estudio, los resultados de las pruebas de colonización permitieron avanzar en el conocimiento sobre el potencial del nuevo aislamiento proveniente del estado de Zacatecas, además de que por primera vez se probaron plantas que pueden ser utilizadas en esquemas de rotación e incluso variedades del hospedante de interés (en este caso frijol) con diferente grado de susceptibilidad al nematodo. Esto marca una diferencia con relación a estudios previos en los cuales las pruebas se dirigieron sólo hacia plantas altamente susceptibles a *N. aberrans* (Flores *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2007). El conocimiento obtenido permitirá saber con cuáles de las plantas probadas, y que pueden ser empleadas como parte de ciclos de rotación en el estado de Zacatecas, se puede estimular la presencia y mantenimiento del hongo en la rizosfera y en el suelo mismo, bajo un esquema de biomanejo del nematodo en el cual se incorpore la rotación de cultivos o la siembra de variedades resistentes. En este esquema también es importante el papel que juega la misma materia orgánica que se incorpora como vehículo de aplicación del hongo. En el presente estudio la fuente de materia orgánica fue la vermicomposta, de la cual se han documentado sus propiedades como: fuente de nutrientes de liberación lenta, promotora en la producción de compuestos fenólicos

(2008) against the same *N. aberrans* and by Castro *et al.* (2011) against *M. incognita*, the results observed in the number of nematodes in the roots (J3, J4 and mature females) were smaller in percentage compared to the nematicide application and absolute control; the reductions were clear and sometimes significant when vermicompost was used as a vehicle for the fungus application.

While it is true that the root colonization ability is a good reference to assess the potential of a *P. chlamydosporia* isolate, when the analysis of the ability to infect nematode eggs is added, it is possible to discriminate and select the most effective isolates. In previous studies (Flores *et al.*, 2007, Flores *et al.*, 2008, Franco *et al.*, 2009, Hidalgo *et al.*, 2000, Perez *et al.*, 2007) it was observed that isolates with the highest parasitism percentages, regardless of colonizing capacity, showed the best results in reducing galling on tomato roots by *N. aberrans* under greenhouse conditions. In this study, the parasitism test with SC1 and IZ1 gave a percentage above 80% for both, therefore, they are considered potential agents for biological control of false root-knot nematode; these percentages were higher than those shown by other isolates of *P. chlamydosporia* with *Meloidogyne* (De Leij and Kerry, 1991, Hidalgo *et al.*, 2000) and very similar to parasitism exerted on *N. aberrans* eggs (Flores *et al.*, 2008, Perez *et al.* 2007, Perez *et al.*, 2011). In the case of SC1 isolate, parasitism observed is relevant because this isolate has already been tested with nematode populations from Puebla (Perez *et al.*, 2007) and Mexico State (Perez *et al.*, 2011), but not with a population from Zacatecas associated to beans. Therefore, such isolate could also be tested at some point in the pathosystem *N. aberrans*-beans.

Also, although not significant, bean plants showed higher biomass with SC1 and IZ1 treatments. More experiments are required in the future to re-evaluate this effect. Zacatecas isolate remained present throughout the experiment, and it could be re-isolated from soil and roots of all treatments where applied; this coincides with the results obtained in previous studies under greenhouse conditions with both *Meloidogyne* (De Leij and Kerry, 1991; Verdejo *et al.*, 2003) and *N. aberrans* (Perez *et al.*, 2007, Perez *et al.*, 2011).

In previous studies carried out for *N. aberrans* control in tomato (Perez *et al.*, 2007) and chili (Perez *et al.*, 2011), also promising results were obtained for *P. chlamydosporia* used as a reference (SC1) as a biological control agent. In both studies, the application of high doses (15,000 chlamydospores g⁻¹ soil) of *P. c.* var. *chlamydosporia* in chili and tomato plants grown in the greenhouse, significantly reduced both the number of juveniles and mature females, as well as its harmful effect on plants. Although with different pathosystem, De Leij *et al.* (1993) reported 50 % reduction of infective juveniles of *Meloidogyne incognita* in tomato roots by applying *P. chlamydosporia*; and on the other hand, Mousa *et al.* (1995) reduced up to 80 % the number of females of *Meloidogyne javanica* and 50 % the number of galls on tomato by applying this fungus two weeks before transplanting. Vianene and Abawi (2000) have also documented adverse *P.*

(incremento de la resistencia a la herbivoría), potenciadora de la diversidad microbiana del suelo y bioplaguicida (Domínguez *et al.*, 2010). Aunque en el presente trabajo no se observó un efecto evidente de la sola aplicación de vermicomposta como ha sido documentado por Villa *et al.* (2008) contra el mismo *N. aberrans* y por Castro *et al.* (2011) contra *M. incognita*, los resultados observados en cuanto al número de nematodos dentro de las raíces (J3, J4 y hembras maduras) fueron porcentualmente menores en comparación con la aplicación del nematicida y el testigo absoluto; las reducciones fueron claras y en algunos casos significativas, cuando la vermicomposta se utilizó como el vehículo de aplicación del hongo.

Si bien es cierto que la capacidad de colonización de raíces es un buen referente para valorar el potencial de un aislamiento de *P. chlamydosporia*, cuando a ésta se le suma el análisis de la capacidad para parasitar huevos de nematodos, es posible discriminar y seleccionar los aislamientos más eficaces. En estudios previos (Flores *et al.*, 2007; Flores *et al.*, 2008; Franco *et al.*, 2009; Hidalgo *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 2007) se observó que aquellos aislamientos con los más altos porcentajes de parasitismo, independientemente de su capacidad colonizadora, mostraron los mejores resultados en invernadero al reducir el agallamiento en raíces de jitomate por *N. aberrans*. En el presente estudio la prueba de parasitismo con SC1 e IZ1 arrojó un porcentaje arriba del 80 % para ambos, con lo cual se consideran agentes potenciales para el control biológico del nematodo falso nodulador; tales porcentajes fueron mayores a los mostrados por otros aislamientos de *P. chlamydosporia* con *Meloidogyne* (De Leij y Kerry, 1991; Hidalgo *et al.*, 2000) y muy similares al parasitismo ejercido sobre huevos de *N. aberrans* (Flores *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2011). En el caso del aislamiento SC1, el parasitismo observado es relevante por el hecho de que este aislamiento ya ha sido probado con poblaciones del nematodo provenientes de Puebla (Pérez *et al.*, 2007) y del Estado de México (Pérez *et al.*, 2011), pero no con una población de Zacatecas asociada a frijol. De esto se desprende que dicho aislamiento también pudiera ser probado en algún momento en el patosistema *N. aberrans*-frijol.

También, aunque no significativo, en los tratamientos con IZ1 y SC1 las plantas de frijol presentaron mayor biomasa. Se requiere repetir estos experimentos en el futuro para reevaluar este efecto. El aislamiento de Zacatecas se mantuvo presente a lo largo del experimento, y pudo ser re-aislado del suelo y raíces de todos los tratamientos donde se aplicó; esto coincide con lo obtenido en estudios previos bajo condiciones de invernadero tanto con *Meloidogyne* (De Leij y Kerry, 1991; Verdejo *et al.*, 2003) como con *N. aberrans* (Pérez *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2011).

En trabajos realizados para el control de *N. aberrans* en jitomate (Pérez *et al.*, 2007) y chile (Pérez *et al.*, 2011), también se obtuvieron resultados promisorios en cuanto al uso, como agente de control biológico, del aislamiento de *P. chlamydosporia* utilizado como referencia (SC1). En ambos estudios, la aplicación de *P. c.* var. *chlamydosporia* a dosis alta (15,000 clamidosporas g⁻¹ de suelo) en plantas de

chlamydosporia effects on eggs and even second-stage juveniles of *M. hapla* in lettuce. Recently Ebadi *et al.* (2009) found *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* isolate is able to infect 40 % of the eggs and reduce up to 56 % the *M. incognita* population in pistachio.

Despite the results obtained in this study and the potential shown by the *P. chlamydosporia* isolate from Zacatecas state, it is necessary to continue the study by implementing and standardize its production on a larger scale with the aim to test its parasitic potential under field conditions, and determine their effectiveness in a wider range of conditions before its extensive use as a biocontrol agent in the pathosystem *N. aberrans*-beans.

CONCLUSIONS

This study contributes to widen the knowledge about *P. chlamydosporia* in Mexico, first because this is the first report of an isolate obtained in Zacatecas and secondly, because it confirms the importance of this fungus as an alternative in the false root-knot nematode control in several crops, beans among them.

Acknowledgements. The present work, with the consequent graduation of one of the authors, was conducted thanks to CONACYT funding through its Programa de Becas de Posgrado Nacionales. Special thanks to Dr. Jorge A. Acosta Gallegos, researcher at INIFAP-Campus Experimental Valle de México, for providing bean varieties used in root colonization tests.

LITERATURA CITADA

- Atkins SD, Hidalgo DL, Kalisz H, Mauchline TH, Hirsch PR and Kerry BR. 2003a. Approaches for monitoring the release of *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*, a biocontrol agent of root-knot nematodes. *Mycological Research* 107:206-212.
- Atkins SD, Hidalgo DL, Kalisz H, Mauchline TH, Hirsch PR and Kerry BR. 2003b. Development for a new management strategy for the control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in organic vegetable production. *Pest Management Science* 59:183-189.
- Ayoub SM. 1977. *Plant Nematology*. An Agricultural Training Aid. Department of food and agriculture. Division of plant industry. Laboratory Services-Nematology. USA. 157p.
- Bordallo JJ, Lopez-Llorca LV, Jansson HB, Salinas J, Persmark L and Asensio L. 2002. Colonization of plant roots by egg-parasitic and nematode-trapping fungi. *New Phytologist* 154:491-499.
- Bourne JM, Kerry BR and De Leij FAAM. 1994. Methods for the study of *Verticillium chlamydosporium* in the rhizosphere. Supplement of *Journal of Nematology* 26:587-591.
- Bourne JM, Kerry BR and De Leij FAAM. 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.
- Byrd DW Jr, Kirkpatrick T and Barker KR. 1983. An

chile y jitomate en invernadero, redujo sensiblemente tanto el número de juveniles y hembras maduras, como su efecto dañino sobre las plantas. Aunque con otro patosistema, De Leij *et al.* (1993) registraron la reducción del 50 % de juveniles infectivos de *Meloidogyne incognita* en raíces de jitomate al aplicar *P. chlamydosporia*; por su parte Mousa *et al.* (1995) lograron reducir hasta un 80 % el número de hembras de *Meloidogyne javanica* y 50 % el número de agallas en jitomate al aplicar este hongo dos semanas antes del trasplante. Vianene y Abawi (2000) también han documentado efectos negativos de *P. chlamydosporia* sobre huevos e incluso juveniles del segundo estadio de *M. hapla* en lechuga. Recientemente Ebadi *et al.* (2009), encontraron un aislamiento de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* capaz de parasitar el 40 % de los huevos y reducir hasta en un 56 % la población de *M. incognita* en pistache.

A pesar de los resultados obtenidos en este estudio y del potencial mostrado por el aislamiento de *P. chlamydosporia* proveniente del estado de Zacatecas, es necesario dar continuidad al trabajo e implementar y estandarizar su producción a mayor escala con el fin de probar su potencial parasítico en condiciones de campo, y así determinar su efectividad en un rango más amplio de condiciones antes de utilizarlo de manera más extensiva como agente de control biológico en el patosistema *N. aberrans*-frijol.

CONCLUSIONES

El presente estudio contribuye al conocimiento sobre *P. chlamydosporia* en México, primeramente por el hecho de ser el primer reporte de un aislamiento obtenido en Zacatecas y segundo, al confirmar la importancia de este hongo como una alternativa más en el control del nematodo falso nodulador en varios cultivos, entre ellos el frijol.

Agradecimientos. El presente trabajo, con la consecuente titulación de uno de los autores, se llevó a cabo gracias al financiamiento del CONACYT a través de su Programa de Becas de Posgrado Nacionales. Un especial agradecimiento al Dr. Jorge A. Acosta Gallegos, Investigador del INIFAP-Campus Experimental Valle de México, por haber proporcionado las variedades de frijol utilizadas en las pruebas de colonización de raíces.

improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology* 15:142-143.

- Castro L, Flores L y Uribe L. 2011. Efecto del vermicompost y quitina sobre el control de *Meloidogyne incognita* en tomate a nivel de invernadero. *Agronomía Costarricense* 35:21-32.
- Cristóbal AJ, Cid Del Prado VI, Sánchez GP, Marbán MN, Manzanilla LRH y Mora AG. 2001a. Alteraciones nutrimentales en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) por efecto de *Nacobbus aberrans*. *Nematopica* 31:221-228.
- Cristóbal AJ, Cid del Prado VI, Marbán MN, Sánchez GP, Mora AG y Manzanilla LRH. 2001b. Sobrevivencia de estadios biológicos de *Nacobbus aberrans* en

condiciones de campo. *Nematopica* 31:229-235.

- De Leij FAAM and Kerry BR. 1991. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard, as a potencial biological control agent for *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood. *Revue of Nematologie* 14:157-164.
- De Leij FAAM, Kerry BR and Dennehy JA. 1992. The effect of fungal application rate and nematode density on the effectiveness of *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita*. *Nematologica* 38:112-122.
- De Leij FAAM, Kerry BR and Dennehy JA. 1993. *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* in pot and micro-plot test. *Nematologica* 39:115-126.
- Domínguez J, Gómez BM y Lazcano C. 2010. Propiedades bioplaguicidas del vermicompost. *Acta Zoologica Mexicana* (n. s.) Número Especial 2: 373-383.
- Ebadi M, Fatemy S and Riahi H. 2009. Evaluation of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* as a control agent of *Meloidogyne javanica* on pistachio. *Biocontrol Science and Technology* 19: 689-700.
- Flores CR, Manzanilla LRH, Cid del Prado VI y Martínez GA. 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 CR, Atkins SD, Manzanilla LRH, Cid Del Prado VI y Martínez GA. 2008. Caracterización de aislamientos mexicanos de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Goddard) Gams & Zare para el control biológico de *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne y Allen. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26:93-104.
- Franco NF, Vilchis MK and Miranda DJ. 2009. New records of *Pochonia chlamydosporia* from Mexico: isolation, root colonization and parasitism of *Nacobbus aberrans*. *Nematopica* 39:133-142.
- Gams W and Zare R. 2001. A revision of *Verticillium* sect. Prostrata. III. Generic classification. *Nova Hedwigia* 72:329-337.
- Hernández AJ. 2001. Respuesta de Genotipos de Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Nacobbus aberrans*. Tesis Maestra en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Instituto de Fitosanidad, Montecillo, Edo. de México. p 75.
- Hidalgo DL, Bourne JM, Kerry BR and Rodriguez MG. 2000. Nematophagous *Verticillium* spp. in soil infested with *Meloidogyne* spp. in Cuba: isolation and screening. *International Journal of Pest Management* 46:277-284.
- Hirsch PR, Atkins SD, Mauchline TH, Morton CO, Davies KG and Kerry BR. 2001. Methods for studying the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* in the root environment. *Plant and Soil* 232:21-30.
- Kerry BR, Simon A and Rovira AD. 1984. Observations on the introduction of *Verticillium chlamydosporium* and other parasitic fungi into soil for control of the cereal cyst-nematode *H. avenae*. *Annals of Applied Biology* 105:509-516.
- Kerry BR and Bourne JM. 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 BR. 1997. A Workshop Manual for Research on *Verticillium chlamydosporium* As a Biological Control Agent for Root-knot Nematodes. Integrated Approach to Crop Research. Rothamsted Long Ashton Broom's Barn, UK. 90 p.
- Kerry BR and Hidalgo DL. 2004. Application of *Pochonia chlamydosporia* in the integrated control of root-knot nematodes on organically grown vegetable crops in Cuba. Multitrophic Interactions in Soil and Integrated Control. IOBC-WPRS Bulletin 27:123-126.
- Lopez LLV, Bordallo JJ, Salinas J, Monfort E, López SML. 2002. Use of light and scanning electron microscopy to examine colonisation of barley rhizosphere by the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium*. Micron 33:61-67.
- Maciá VJG, Jansson HB, Talbot NJ and Lopez LLV. 2009a. Real-time PCR quantification and live-cell imaging of endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*. New Phytologist 182:213-228.
- Maciá VJG, Rosso LC, Ciancio A., Jansson HB and Lopez LLV. 2009b. Colonisation of barley roots by endophytic *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia* effects on plant growth and disease. Annals of Applied Biology 155:391-401.
- Manzanilla LRH, Costilla MA, Doucet M, Franco J, Inserra RN, Lehman PS, Cid Del Prado VI, Souza RM and Evans K. 2002. The genus *Nacobbus* Thorne & Allen 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): systematics, distribution, biology and management. Nematropica 32:149-227.
- Monfort E, Lopez LLV, Jansson HB, Salinas J, Park JO and Sivasithamparam K. 2005. Colonisation of seminal roots of wheat and barley by egg-parasitic nematophagous fungi and their effects on *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and development of root-rot. Soil Biology & Biochemistry 37:1229-1235.
- Mousa ME, Basiony MA and Mahdy EM. 1995. Control of *Meloidogyne javanica* by *Verticillium chlamydosporium* on tomatoes. Afro-Asian Journal of Nematology 5:113-115.
- Pérez RI, Doroteo MA, Franco NF, Santiago SV and Montero PA. 2007. Isolates of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* from Mexico as potencial biological control agents of *Nacobbus aberrans*. Nematropica 37:127-134.
- Pérez RI, Franco NF, Cid Del Prado VI y Zavaleta ME. 2011. Control de *Nacobbus aberrans* en chile ancho (*Capsicum annum* L.) mediante el uso combinado de enmiendas orgánicas, hongos nematófagos y nematicidas. Nematropica 41:122-129.
- Sorribas FJ, Ornat C, Galeano M and Verdejo LS. 2003. Evaluation of a native and introduced isolate of *Pochonia chlamydosporia* against *Meloidogyne javanica*. Biocontrol Science and Technology 13:707-714.
- Verdejo LS, Sorribas FJ, 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.
- Vianene NM and Abawi GS. 2000. *Hirsutella rhossiliensis* and *Verticillium chlamydosporium* as biocontrol agents of the root-knot nematode *Meloidogyne hapla* on lettuce. Journal of Nematology 32:85-100.
- Villa BA, Zavaleta ME, Vargas HM, Gómez RO y Ramírez AS. 2008. Incorporación de vermicomposta para el manejo de *Nacobbus aberrans* en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Revista Chapingo Serie Horticultura 14:249-255.
- Wang K, Riggs RD and Crippen D. 2005. Isolation, selection, and efficacy of *Pochonia chlamydosporia* for control of *Rotylenchulus reniformis* on cotton. Phytopathology 95:890-893.
- Zare R, Gams W and Evans HC. 2001. A revision of *Verticillium* section *Prostata*. V. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora*. Nova Hedwigia 73:51-86.