

**HONGOS NEMATÓFAGOS DEL GÉNERO *Arthrobotrys* spp., EN
EL CONTROL DE *Meloidogyne incognita* BAJO CONDICIONES *in vitro***

DIEGO ALEJANDRO TREVIÑO CUETO

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**



**SALTILLO, COAHUILA
JUNIO DE 2015**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

“HONGOS NEMATÓFAGOS DEL GÉNERO *Arthrobotrys* spp., EN EL
CONTROL DE *Meloidogyne incognita*, BAJO CONDICIONES *in vitro*”

TESIS

DIEGO ALEJANDRO TREVIÑO CUETO

Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y Aprobada
como requisito parcial para optar al grado de:

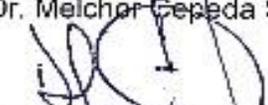
MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

COMITÉ PARTICULAR

Asesor Principal:


Dr. Melchor Cepeda Siller

Asesor:


Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo

Asesor:


Dr. Sergio René Sánchez Peña


Dr. Alberto Sandoval Rangel
Subdirector de Postgrado

Saltillo, Coahuila, México, Junio, 2015

DEDICATORIA

Con mucho afecto para las personas que siempre han estado junto a mí:

A mi esposa Erika por todo su amor y comprensión.

A mis hijas Sofía y María Fernanda por ser el motor de mi vida.

A mis padres: Antonio y Martha quienes siempre me han alentado y apoyado para seguirme preparando para la vida.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por la beca proporcionada durante el posgrado.

Con mucho respeto para los investigadores que me han formado académicamente y profesionalmente:

Dr. Melchor Cepeda Siller

Dr. Sergio René Sánchez Peña

Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo.

Al MSc. Jesús Noel Yáñez Reyes quien ha impulsado mi carrera profesional.

A la Empresa GreenCorp Biorganiks de México S.A de C.V, por permitirme llevar a cabo esta investigación y proporcionarme el apoyo económico para realizarla.

INDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS.....	2
OBJETIVO GENERAL	2
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
HIPÓTESIS	2
REVISIÓN DE LITERATURA	2
NEMATODOS FITOPATÓGENOS	2
NEMATODOS NODULADORES- <i>MELOIDOGYNE SPP.</i>	7
CONTROL.....	7
CONTROL BIOLÓGICO	8
HONGOS NEMATÓFAGOS Y SU APLICACIÓN EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE NEMATODOS FITOPATÓGENOS.....	8
HONGOS QUE ATRAPAN NEMATODOS.....	10
HONGOS ENDOPARÁSITOS.....	12
HONGOS PARÁSITOS DE HEMBRAS Y HUEVOS	13
HONGOS PRODUCTORES DE TOXINAS	15
SELECCIÓN DE CEPAS DE HONGOS NEMATÓFAGOS ALTAMENTE VIRULENTAS PARA SU USO EN EL CONTROL BIOLÓGICO.....	16
PRODUCCIÓN Y FORMULACIÓN DE AGENTES ANTAGÓNICOS DE NEMATODOS	18
CASOS EXITOSOS DE USO DE HONGOS NEMATÓFAGOS EN EL CONTROL DE NEMATODOS FITOPATÓGENOS.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
SELECCIÓN DE MUESTRAS DE SUELO.....	7
MEDIO DE CULTIVO PARA HONGOS NEMATÓFAGOS.....	7
OBTENCIÓN DE NEMATODOS.....	26
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS	26
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LA CEPA HN01	27
ESTUDIOS DE EFECTIVIDAD BIOLÓGICA CONTRA <i>MELOIDOGYNE INCOGNITA</i>	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
CEPAS IDENTIFICADAS	26
RESULTADOS DE BIOENSAYOS DE EFECTIVIDAD BIOLÓGICA A NIVEL LABORATORIO	32
CONCLUSIÓN	31
RESUMEN	31
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

1	Secuencias de bases de los primers utilizados para la identificación de la cepa HN01	28
2	Especies de hongos nematófagos identificados a nivel morfológico	31
3	Análisis de secuencia de ADN de cepa HN01	32
4	Efectividad biológica de la cepa HN01 sobre <i>Meloidogyne incognita</i> .	33
5	Efectividad biológica de la cepa HN02 sobre <i>Meloidogyne incognita</i> .	35
6	Efectividad biológica de la cepa HN03 sobre <i>Meloidogyne incognita</i> .	36
7	Efectividad biológica de la cepa HN04 sobre <i>Meloidogyne incognita</i> .	37
8	Efectividad biológica de la cepa HN05 sobre <i>Meloidogyne incognita</i> .	38
9	Comparación de medias de tratamientos entre cepas de hongos nematófagos sobre <i>Meloidogyne incognita</i>	39

FIGURAS

1	Porcentaje de mortalidad de <i>Meloidogyne incognita</i> causada por la cepa HN01	32
2	Porcentaje de mortalidad de <i>Meloidogyne incognita</i> causada por la cepa HN02	34
3	Porcentaje de mortalidad de <i>Meloidogyne incognita</i> causada por la cepa HN03	35
4	Porcentaje de mortalidad de <i>Meloidogyne incognita</i> causada por la cepa HN04	36
5	Porcentaje de mortalidad de <i>Meloidogyne incognita</i> causada por la cepa HN05	37
6	Porcentaje de mortalidad de cepas de nematófagos sobre <i>Meloidogyne incognita</i>	38

INTRODUCCIÓN

Los nematodos fitopatógenos representan a uno de los mayores estreses bióticos en el mundo alrededor del mundo, causando pérdidas económicas a los cultivos de más de 100 billones de dólares anualmente (Chitwood 2003). La mayoría de pérdidas de cosechas causadas por nematodos fitopatógenos son infligidas por solamente especies pertenecientes a dos grupos de nematodos, los nematodos noduladores *Meloidogyne* spp., y los nematodos quísticos *Heterodera* y *Globodera* spp., (Molinari 2011).

El alto impacto de estos nematodos en específico sobre la agricultura a nivel mundial es el resultado de su amplia distribución y la habilidad de atacar a todo tipo de planta cultivada (Sasser 1980). Se han reportado diversos métodos de control, incluyendo el uso de cultivos de cobertura, abonos, enmiendas del suelo, cultivares resistentes, tratamiento de agua caliente, la rotación de cultivos y el tratamiento de barbecho (Barker y Koenning 1998).

Los nematicidas químicos han sido ampliamente utilizados para controlar los nematodos fitopatógenos, pero estos compuestos están a menudo asociados con efectos ambientales perjudiciales que conducen a sustancialmente a la reducción de su uso en los últimos años. Por ejemplo, bromuro de metilo, uno de los fumigantes químicos más importantes que se utilizan para controlar los nematodos y otras plagas, afecta a una amplia gama de organismos, incluyendo organismos

benéficos, y es una sustancia química que contribuye al agotamiento de la capa de ozono de la Tierra (Carpenter et al. 2001). En las últimas décadas, la preocupación por los riesgos ambientales del uso de nematicidas químicos, han llevado al desarrollo de agentes de control biológico como un componente de protección de los cultivos.

El control biológico está definido como la supresión de la densidad de una población o el impacto de un organismo plaga específica mediante el uso de organismos vivos (Eilenberg et al. 2001). Los agentes de control biológicos pueden regular las poblaciones de nematodos fitopatógenos, se han reportado numerosos organismos que tienen actividad antagónica contra nematodos fitopatógenos dentro los que se incluyen a hongos, bacterias, virus y algunos invertebrados (Tian et al. 2007).

En los últimos años se ha puesto mayor interés en el uso de los hongos nematófagos, estos son los hongos que tienen la capacidad de capturar, parasitar o paralizar nematodos en todo su ciclo de vida. Estos juegan un importante rol como antagonistas de nematodos, por lo tanto existe un gran interés es su uso como agentes de control biológico (Nordbring-Hertz et al. 2006). Se han descrito más de 700 especies de hongos nematófagos (Zhang et al. 2011). Basados en su modo de infección están clasificados en cuatro grupos: (1) hongos atrapadores de nematodos los cuales capturan a nematodos de vida libre mediante estructuras especializadas, (2) los hongos endoparásitos, que infectan a los nematodos utilizando sus esporas adhesivas, (3) hongos productores de toxinas, las cuales secretan para inmovilizar a los nematodos, (4) hongos parásitos de huevos y quistes, infectan estos estadios mediante puntas hifales (Li et al. 2000). Los

hongos nematófagos en la mayoría de las taxas de hongos incluidos los Ascomicetos, Basidiomicetos, Zygomycetos, Chytridiomicetos y Oomycetos (Gams y Zare 2003).

El presente trabajo se enfocó al género de hongo nematófago *Arthrobotrys* spp., el cual se encuentra clasificado como un hongo atrapador de nematodos. Su actividad depredadora de nematodos fue descubierta por Zopf (1888) en *Arthrobotrys oligospora* resultando de interés como agente de control biológico, ya que son capaces de crear redes o trampas que atraen a los nematodos, atrayéndolos e inmovilizándolos seguido a la penetración de hifas la cual involucra a enzimas hidrolíticas con las quitinasas y proteasas y finalmente en la digestión del nematodo.

El objetivo de esta investigación fue aislar, identificar cepas de hongos nematófagos del Género *Arthrobotrys* spp., a partir de suelos agrícolas, así como probar su efectividad biológica contra el nematodo agallador *Meloidogyne incognita* bajo condiciones *in vitro*

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Identificar especies de hongos con actividad nematófaga del género *Arthrobotrys* spp., de diferentes regiones de México

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar al menos una especie del Género *Arthrobotrys* spp., de muestras de suelo de diferentes regiones de México
- Realizar estudios de efectividad biológica bajo condiciones de laboratorio, de las especies identificadas de hongos nematófagos contra *Meloidogyne incognita*

HIPÓTESIS

Se identificará por lo menos una especie del hongo nematófago *Arthrobotrys* spp., que tenga actividad contra *Meloidogyne incognita*

REVISIÓN DE LITERATURA

Nematodos fitopatógenos

Los nematodos fitopatógenos se alimentan obligatoriamente de tejidos vegetales. Causan serios daños a muchos cultivos mundialmente. Sus daños exceden los \$10 billones por año en Estados Unidos (Koenning et al., 1999). Los miembros de este grupo tienen estilete en su aparato bucal y lo usan para penetrar la pared celular de las plantas para absorber su contenido. Además del daño directo de la salud de la planta, los nematodos pueden desempeñar diferentes funciones en los complejos de enfermedades; actúan como vectores (por ejemplo de diversos virus), lesionadores, modificadores del huésped, interruptores de resistencia de la rizosfera (Bardgett et al., 1999; Brussaard et al., 2001; Desaegeer et al., 2004).

Los daños en la planta ocasionados por nematodos fitopatógenos no tienen los mismos efectos. Los nematodos que se alimentan en la corteza de la raíz o epidermis (por ejemplo *Helicotylenchus* y *Pratylenchus*) por lo general tienen un efecto mucho menor en la productividad de la planta que los fitopatógenos vasculares (por ejemplo *Meloidogyne* y *Heterodera*) (Bernhard, 1992). Por otro lado las especies de plantas y su edad afectan en el ciclo de infección. Por ejemplo, las plántulas están particularmente expuestas a los daños causados por nematodos debido a que sus tejidos son más susceptibles al ataque de parásitos y

favorecen el desarrollo de los nematodos (Ruehle, 1973).

Nematodos noduladores- *Meloidogyne spp.*

Los nematodos agalladores tienen distribución cosmopolita, especialmente en áreas con clima cálido o caliente y con periodos de inviernos de mediano a cortos. También se encuentran en los invernaderos donde no usan suelos estériles. Estos atacan a más de 2,000 plantas cultivadas y reducen la producción mundial de alimentos alrededor del 5% (Hussey y Janssen, 2002). Sin embargo en campos individuales el daño puede ser mucho más grande.

Los nematodos nodulares dañan a las plantas al debilitar las puntas de la raíz, causando la formación de hinchazones ó nodulaciones en la raíz. Las cuales no solo privan a la planta de nutrientes, también deforma y disminuye el valor comercial de muchas raíces de cultivos. Cuando las plantas son susceptibles y son infectadas en etapa de plántula, el daño es más fuerte y puede llevar a la destrucción total del cultivo. Las infecciones en plantas adultas pueden reducir y afectar el rendimiento del cultivo

Control

Los nematodos pueden ser controlados efectivamente en invernaderos utilizando esterilización del suelo con vapor o la fumigación del suelo con nematicidas. En campo la mejor manera de control es mediante la fumigación del suelo con nematicidas aprobados. Cada tratamiento generalmente es satisfactorio por cada ciclo. En algunos cultivos, existen variedades de plantas resistentes a los nematodos noduladores. Varias prácticas culturales como la rotación de cultivos,

barbecho, solarización de suelo también son de mucha ayuda a reducir pérdidas por nematodos (Roberts, 1995).

Control biológico

El desarrollo de métodos prácticos para el control biológico de nematodos fitopatógenos ha dependido del uso de agentes microbianos (Stirling, 1991). Los agentes microbianos pueden ser antagonistas que produzcan compuestos bioactivos que maten o afecten el desarrollo de los nematodos, o pueden ser parásitos/patógenos que destruyan a los nematodos tras su colonización, o pueden ser por competencia de recursos (Kerry, 2002).

Hongos nematófagos y su aplicación en el control biológico de nematodos fitopatógenos

Los hongos nematófagos son los hongos que tienen la capacidad de capturar, parasitar o paralizar nematodos en todas sus etapas o estadios de su ciclo de vida. Juegan un rol importante como antagonistas de nematodos fitopatógenos o parásitos de animales, por lo tanto, hay un gran interés en el uso de estos hongos, como modelo adaptativos de evolución y como agentes de control biológicos contra nematodos fitopatógenos (Nordbring-Hertz et al. 2006). Se han descrito más de 700 especies de hongos nematófagos (Zhang et al. 2011). Basado en su mecanismo de infección, son comúnmente subdivididos en cuatro principales grupos: (1) hongos atrapadores de nematodos (380 especies) que capturan nematodos de vida libre utilizando trampas especializadas, (2) hongos endoparásitos (120 especies) que infectan a los nematodos mediante esporas adhesivas, (3) hongos productores de toxinas (270 especies) los cuales secretan

toxinas con la que inmovilizan a los nematodos después de haber penetrado su cutícula utilizando sus hifas y los (4) hongos parásitos de huevos y quistes que infectan estos estadios con sus puntas hifales (Li et al. 2000; Nordbring-Hertz et al. 2006; Zhang et al. 2011).

Los hongos nematófagos se encuentran incluidos en la mayoría de las taxas de hongos incluyendo Ascomycetes (asexual *Orbiliaceae* y *Clavicipitaceae*), Basidiomycetes (*Pleurotaceae*), Zygomycetes (Zoopagales), Chytridiomycetes y Oomycetes (Gams y Zare 2003). Están ampliamente distribuidos en ecosistemas terrestres y acuáticos (Kumar et al. 2011) y pueden reproducirse en todo tipo de suelo debido a su poco requerimiento nutricional y vitamínico (Duddington 1962). Se ha propuesto que el fenotipo de los hongos nematófagos es una respuesta evolutiva celulolítica a la deficiencia de nitrógeno del hábitat donde se encuentran (Barron 1992). Ya que el nitrógeno es esencial para el crecimiento fúngico y no están disponibles en los restos de madera o en suelos donde el carbono es muy abundante, la captura directa de compuestos nitrogenados a partir de otras formas de vida es una ventaja (Barron 2003).

La mayoría de los nematófagos son facultativamente parásitos, aunque algunos son parásitos obligados de nematodos (Hallmann et al. 2009). La facultad para parasitar y poder infectar nematodos es a través de la producción de estructuras las cuales atrapan estadios migratorios de nematodos, produciendo esporas adhesivas especializadas o bien desarrollando un apresorio en una hifa especializada que pueda penetrar la cutícula o caparazón de huevos o quistes (López-Llorca et al. 2008). Los parásitos obligados inician la infección a través de

sus esporas. Las esporas pueden ser ingeridas, germinando en el sistema digestivo de los nematodos y crecer dentro de su pared celular, o bien pueden adherirse a la cutícula del nematodo y penetrarlo directamente (Barron 1977). La habilidad de los hongos nematófagos para capturar nematodos los hace que sean candidatos atractivos como agentes controladores de nematodos parásitos de plantas y animales. Varios nematocidas biológicos han sido desarrollados y aplicados en el control de nematodos.

Hongos que atrapan nematodos

Los hongos que atrapan nematodos se encuentran en todas las regiones del mundo, desde los trópicos hasta la Antártida. Son comúnmente encontrados en suelos y en hojarasca en descomposición (Zhang et al. 2011). Estos hongos crecen vegetativamente en el suelo como saprofitos. Las producciones de trampas o redes se inician espontáneamente o en respuestas al medio ambiente, incluyendo los péptidos y otros compuestos que son secretados por los nematodos (Yang et al. 2011). Diferentes especies de hongos producen uno o varios tipos de estructuras que pueden variar desde una simple hifa cubierta con secreciones pegajosas (*Stylopage* spp.) hasta estructuras mucho más complejas (Moosavi y Zare 2012). Las trampas proveen una importante función en la obtención de nutrientes y puede inferir ventajas competitivas sobre los hongos no predadores (Yang et al. 2007).

Existen tres estructuras básicas de trampas: Botones adhesivos, anillos constrictores y redes adhesivas, y pueden ser subdivididas además en siete tipos

de trampas: hifas ensanchadas adhesivas, botones adhesivos no pedicelados, botones adhesivos pedicelados, anillos no constrictores y constrictores, redes bidimensionales y redes tridimensionales (Rubner 1996). Las ultra estructuras de los hongos nematófagos han sido extensamente estudiadas, aunque existe variación en su morfología, diferentes tipos de trampas adhesivas, comparten algunos aspectos que los distinguen de las hifas vegetativas normales (Dijksterhuis et al. 1994). Un aspecto compartido es la presencia de numerosos organélos cistolíticos (cuerpos densos) dentro de las células de las hifas (Stalhammar-Carlemalm 1978). Otro aspecto es la presencia de una extensa capa de polímeros extracelulares. Estos polímeros son considerados como importantes accesorios en las capas de las trampas (Tunlid et al. 1991).

La mayoría de los hongos que atrapan nematodos se encuentran en su forma asexual, conocidos como Hyphomycetes; también se encuentran en Zygomycota y Ascomycota. Entre los géneros más conocidos se encuentran *Cystopage* Drechsler, *Stylopage* Drechsler, *Zoophagus* Sommerst, *Triposporina*, *Hohnel*, *Tridentaria*, *Nematoctonus* Drechsler, *Hyphoderma* Wallr., *Hohenbuehelia* Schulzer, *Arthrobotrys* Corda, *Drechslerella* Subram, *Orbilina* Fr., *Dactylellina* M. Morelet, *Dactylella* Grove, *Monacrosporium* Oudem (Zhang et al. 2011). El MycoBank reporta 347 especies de hongos nematófagos (Crous et al. 2004). La taxonomía tradicional de los hongos nematofagos se basaba en la morfología de los conidios y del conidióforo sin tomar en cuenta la morfología de las trampas. Esto ha dado a una situación donde especies con diversos tipos de trampas han sido asignados a un solo género (Liu y Zhang, 2003).

Estudios recientes con ITS y secuencias del gen 18S indican que las trampas son más informativas que las otras estructuras en las que se limitan los géneros (Lio y Tzean 1997; Ahrén et al. 1998; Scholler et al. 1999; Li et al. 2005). Ahrén et al. (1998) encontró un linaje de hongos nematófagos el cual se dividía en tres: especies con anillos constrictores, especies con estructuras adhesivas variadas (redes, hifas, botones y anillos no constrictores) y especies sin estructuras de trampas. Basado en resultados de características morfológicas y moleculares

Basado en resultados de características morfológicas y moleculares Scholler et al en 1999 clasificó a los hongos nematófagos dentro de los ascomicetes en cuatro Géneros: *Dactylellina* caracterizada por sus botones adhesivos pedicelados incluyendo especies que se caracterizaban por tener anillos no constrictores y botones adhesivos pedicelados; *Gamsylella* la cual se caracteriza por sus ramas ensanchadas adhesivas y botones no pedicelados; *Arthrobotrys* caracterizada por sus redes adhesivas; y *Drescheslerella* caracterizada por sus anillos constrictores.

Hongos endoparásitos

La mayoría de los hongos endoparásitos son obligados o poco competitivos como saprofitos en el suelo, pero usualmente tienen la capacidad de infectar a un amplio rango de nematodos (Moosavi y Zare 2012). Los parásitos obligados viven todo su ciclo vegetativo dentro del huésped infectado (Lopez-Llorca et al 2008). Los hongos endoparásitos se encuentran dentro de Oomycota, Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Ascomycota y Basidiomycota, en los géneros típicos incluye

Myzocytiium, *Drechmeria*, *Nematoctonus* e *Hirsutella*. Se han reportado alrededor de 122 especies de endoparásitos de nematodos (Zhang et al 2011).

Los hongos endoparásitos de nematodos fitopatógenos, tienen mecanismos de infección mediante sus esporas, las cuales penetran la cutícula de su hospedero. Por ejemplo el caso de *Drechmeria coniospora* que forma un gran número de conidios a comparación de su producción de hifas. *D. coniospora* puede producir hasta 10,000 esporas por nematodo infectado, mientras que otros hongos como *Hirsutella rhossiliensis* solo produce de 100-1000 conidios por nematodo infectado. Ambos hongos desarrollan conidias adhesivas con las cuales infectan a los nematodos (Tedford et al 1993).

El Género *Harposporium* produce esporas con formas especiales, las cuales son ingeridas por los nematodos. Debido a sus formas, las esporas se quedan incrustadas en el esófago de los nematodos y a partir de ahí comienza su infección (Hodge et al. 1997). *Catenaria anguillulae* infecta a los nematodos a través de zoosporas motiles que se enquistan o adhieren a la cutícula del nematodo (Jansson y Thiman 1992). El Género *Haptoglossa* tiene un interesante método de infección en el cual dispara sus esporas hasta que infectan a su hospedero (Robb y Barron 1982).

Hongos parásitos de hembras y huevos

Los hongos parásito de huevos y quistes también son llamados hongos oportunistas, estos utilizan su apresorio o zoosporas para infectar a sus

hospederos (López-Llorca et al. 2008). Este grupo de hongos comprenden los géneros *Pochonia*, *Paecilomyces*, *Lencanicillium* y *Nematophora*. Los parásitos de huevos y estadios sedentarios de nematodos, han atraído la atención debido a su elevado potencial en control biológico de nematodos de importancia económica. Estos hongos pueden sobrevivir como saprófitos en la rizósfera, y son relativamente fáciles de cultivarlos en masa, estos hongos son más infectivos ya que atacan a estadios sésiles de los nematodos (huevos, quistes, hembras).

Dentro de los hongos nematófagos, pocos se han considerados como prometedores como agentes de biocontrol (Siddiqui y Mahmmod, 1996). Dentro de los más comúnmente aislados están *Pochonia chlamydosporia* y *Paecilomyces lilacinus* (Siddiqui y Mahmmod, 1996). Los huevos de los nematodos están compuestos por distintas capas que mayormente consisten en proteína y quitina (Perry, 2002). La penetración de la cubierta del huevo de los nematodos es dada por estructuras especializadas como el apresorio el cual forma una clavija o micelio engrosado para lograr esta fase infectiva (López-Llorca et al, 2008). Las enzimas extracelulares como las proteasas y quitinasas juegan un rol muy importante durante la penetración de la cubierta y en la desintegración de las capas de la cubierta de los huevos (Yang et al. 2007). Los hongos parásitos de huevos y hembras, pueden producir enzimas extracelulares, y por eso se consideran mucho más efectivos en la infección de los huevos de nematodos (Yang et al, 2007).

Los hongos difieren en su habilidad de degradar las capas de los huevos y el proceso de infección (Segers et al. 1999). *Pochonia chlamydosporia* es un

parásito de hembras y huevos de nematodos agalladores y quísticos, este desarrolla micelio engrosado en redes que forman apresorios en la cubierta de los huevos (Vieane et al. 2006). Las proteasas y quitinasas producidas por *P. chlamydosporia* son efectivas en la degradación de la cubierta de los huevos (Vieane et al. 2006). *P. chlamydosporia* secreta la proteasa VCP1 que puede hidrolizar las proteínas de la cubierta de huevos de especies de *Meloidogyne* sin embargo no las de *Globodera* (Segers et al. 1999).

Hongos productores de toxinas

Los hongos que producen toxinas secretan toxinas que inmovilizan a los nematodos después de la penetración con su hifa a la cutícula del nematodo (Loóez-Llorca, et al. 2008). La mayoría de estos hongos pertenecen a los Basidiomycetos (*Pleurotus*, *Coprinus*) aunque otras especies (*Lecanicillium*, *Paecilomyces*, *Pochonia*) también producen compuestos nematocidas. *Paecilomyces lilacinus* secreta ácido acético que paraliza los juveniles de los nematodos (Djian et al. 1991), y algunos compuestos bioactivos se han aislado de cultivos *in vitro* de *Pochonia chlamydosporia* (Kerry y Hominick 2002). Hasta el momento se han reportado más de 270 hongos que inmovilizan nematodos por medio de toxinas y se han identificado 270 compuestos nematocidas secretados por hongo (Zhang et al. 2011). Estos compuestos incluyen alcaloides, péptidos, terpeno, compuestos alifáticos, esteroides, quinonas y compuestos aromáticos (Li et al. 2005). Recientemente se han identificado por medio de rayos X compuestos aislados de *Arthrobotrys oligospora* como el arthrobotrisins A-C 1-3.

También se han reportado nuevos mecanismos nematocidas en *Coprinus comatus* el cual pudo inmovilizar a *Panagrellus redivivus* por medio de dos estrategias (Luo et al. 2007). La primera con estructuras en forma de bolas espinosas, las cuales pueden dañar la cutícula del nematodo mediante fuerzas mecánicas. La segunda este hongo también puede secretar una potente enzima que inmoviliza y da muerte al nematodo en unas cuantas horas.

Selección de cepas de hongos nematófagos altamente virulentas para su uso en el control biológico

Aunque se han encontrado y probado muchos microorganismos antagonistas de nematodos, no se han desarrollado productos que tengan el mismo costo beneficio al igual que los nematocidas químicos (Oka et al. 2000). La estrategia más común para el control de los nematodos fitopatógenos es mediante la producción en masa de hongos que atrapan nematodos seguido de su aplicación en el suelo. Basado en eso han emergido la demanda de crear nuevas estrategias de control de nematodos fitopatógenos, una de ellas es la implementación de cepas nuevas de microorganismo (Casas y Herrera 2007).

Una manera de mejorar la patogenicidad es incrementando el número de copias de los genes virulentos o introducir virulencia exógena. Esta estrategia ha sido usada satisfactoriamente en los hongos entomopatógenos y otros hongos patógenos (Wang et al. 2010). Wang et al (2007) encontraron un alto nivel de expresión en una toxina-neurotóxica del escorpión *Androctonus australis* y su inserción en *M. anisopliae* incrementó su virulencia en un 22% contra el gusano

del cuerno del tabaco (*Manduca sexta*) y 9% contra el adulto del mosquito (*Aedes aegypti*).

La cepa de *M. anisopliae* con modificaciones de ingeniería también fue dramáticamente más virulenta contra la broca del caféto *Hypothenemus hampei*, incrementando su mortalidad de casi 1 a 3. La concentración letal media (CL50) fue reducida 15.7% y el promedio de sobrevivencia fue reducido en un 20% (Pava-Ripoll et al. 2008). Qin et al (2010) modificó genéticamente una cepa de *Beauveria bassiana* con la expresión de una proteína insecticida (Vip3A) de *Bacillus thuringiensis*. Esta cepa mostró una mejora en su virulencia contra larvas de *Spodoptera litura*.

Hay pocos casos exitosos de mejorías de virulencia de hongos nematófagos (Yang et al 2011). Una proteasa degradadora de cutícula fue aislada de *A.oligospora* (Tunlid et al. 1994) y el gen que la codifica fue clonado (Ahman et al. 1996). Subsecuentemente, la transformación

Paecilomyces lilacinus es un hongo oportunista que puede infectar a nematodos e insectos, y ha sido estudiado ampliamente y satisfactoriamente implementado para el control de nematodos fitopatógenos (Kalele et al. 2007). Este hongo puede infectar huevos y quistes a través de enzimas hidrolíticas secretadas (Khan et al. 2003). Una serina proteasa pSP-3 fue identificada de un cultivo filtrado de *P.lilacinus* por medio de cromatografía (Bonants et al. 1995), esta enzima presentó una alta grado de similitud la subtilisina serina proteasa.

El hongo *Leucanicillium psalliotae* es un parasito efectivo de nematodos fitopatógenos (Zare 2000), una proteasa degradadora de cutícula (Ver112) se purificó y clono de este (Yang et al. 2005).

Producción y formulación de agentes antagónicos de nematodos

La fermentación y formulación de microorganismos de biocontrol frecuentemente limitan y son factores decisivos en las medidas de control biológico. (Burges 1998). Este es un caso en particular del uso de hongos nematófagos en el control de nematodos fitopatógenos. La producción y la formulación de hongos bicontroladores son procedimientos claves para la aplicación de agentes antagónicos de nematodos. La fermentación líquida y sólida son los métodos más comunes para la producción en masa de hongos. La fermentación en medio sólido es el método más utilizado, y es especialmente usado para hongos que no pueden producir esporas en líquido. Sin embargo, tiene ciertas desventajas, incluyendo largos periodos de producción, altos residuos y bajo rendimiento. La fermentación en medio líquido se ha considerado frecuentemente como la mejor para uso de control biológico (Papayizas et al. 1984). Por otra parte, la combinación de ambas fermentaciones quizá podrá ser la manera en que se pueda tener una producción en más de estos hongos. La producción de micelio se puede producir usando fermentaciones líquidas y las conidias pueden ser producidas en medios sólidos (Feng et al. 1994). La harina de maíz y los medios de papa con dextrosa han sido utilizados para la producir en masa hongos endoparásitos como *Drechmeria coniospora*, *Verticillium balanoides* y *Harposporium anguillulae* (Lohmann y Sikora 1989). La producción en grandes

cantidades de estos hongos tienen una ventaja como agentes de control biológico, ya que no se basan en una sola fuente de energía, a diferencia de los hongos que parasitan huevos y quistes y hongos atrapadores de nematodos.

Una buena formulación es clave en el éxito de los agentes de control biológico. La formulación de agentes de control biológico incluyen formulas en polvo, polvos humectables, emulsiones, soluciones oleosas, granulares y microencapsulados (Liu et al. 2004). La formulación de los agentes de control biológico puede ser utilizada para estabilizar a los organismos durante su producción, para su distribución y almacenaje, ayudar en el manejo y la aplicación del producto, proteger al agente de las condiciones del medio ambiente y mejorar la actividad del microorganismo (Jones y Burges 1998). Desde un punto de vista técnico, para que una formulación sea efectiva se requiere conocimiento del agente de biocontrol, del patógeno, del medio ambiente y de las interacciones que tiene con los demás microorganismos. Desde el punto de vista del usuario final, hay ciertas cosas que necesita comprender como la manera del manejo de la formula, el equipo necesario y la manera de aplicarlo (Leggett et al. 2011). Es importante empezar con el entendimiento de la biología del agente de control y su organismo objetivo y tener una visión clara de los requerimientos que se le deben de dar. Una vez que se establece el programa de investigación integral necesita ser desarrollado. Los coadyuvantes potenciales deben ser seguros y aceptables para las agencias reguladoras en todas las áreas que se utilizará el producto. Se recomienda recurrir a las experiencias de personas especializadas con el fin de

identificar los ingredientes de la formulación y su desarrollo apropiado (Leggett et al. 2011).

La microencapsulación es un paso prometedor hacia la comercialización de agentes de biocontrol. Patel et al. (2011) investigaron el efecto de las condiciones de fermentación para suprimir la formación de pellets de *Hirsutella rhossiliensis* en matraces de cultivo y desarrollar un nuevo sistema de capsulas con un contenido de nutrientes optimizado. Cuando se incubo un matraz Erlenmeyer con 2% de glucosa y 0.5% de extracto de levadura sin baffles, se observó una formación densa de pellets. Solo el 40% del micelio tenía un tamaño de 500 μ m. Cuando se utilizó un matraz con 3 baffles la porción de micelio que medía < 500 μ m se elevó a 95%. Después se investigó la influencia del nivel de aereación y velocidad de agitación en la producción de micelio en un reactor tipo tanque. La mejor fermentación se obtuvo con 0.4 vvm y 400rpm de velocidad de agitación con 90 % de micelio < 500 μ m y 5 g/L de biomasa. Posteriormente, el micelio fue microencapsulado en perlas huecas de sulfoetilcelulosa. Experimentos mostraron que el nutriente reserva de las capsulas. Recientemente, Jin y Curtis (2011) desarrollaron un método de microencapsulación de conidios de *Trichoderma* con azúcar pulverizada. La microencapsulación con azúcares, como la sucrosa, molasas o glicerol incrementaron significativamente los niveles de viabilidad después del secado. La microencapsulación de las conidias con el 2% de una solución con sucrosa resultó con los mayores porcentajes de viabilidad. La

Casos exitosos de uso de hongos nematófagos en el control de nematodos fitopatógenos

Los hongos nematófagos son potenciales agentes de control biológico para el control de nematodos fitopatógenos, y diversos nematicidas biológicos se han desarrollado en base a estos hongos (Dong y Zhang 2006). Estos nematicidas biológicos han mostrado su capacidad de promover el crecimiento de las plantas y reducir el daño causado por nematodos.

Desde que los hongos atrapadores de nematodos *Arthobotrys irregularis* y *A. robusta* (Cayrol et al 1978) se desarrollaron como agentes comerciales de control biológico, se han usado más hongos para el control biológico de nematodos. *Paecilomyces lilacinus* y *Pochonia chlamydosporia* se han estudiado extensivamente como agentes de control de nematodos fitopatógenos. *Paecilomyces lilacinus* es un hongo biocontrolador con un potencial de actividad de controlar los nematodos fitopatógena de mayor importancia agrícola (Mendoza 2004). Brand et al. (2004) produjeron un nematicida con *P. lilacinus* basado en una fermentación sólida. Este producto fue evaluado para su actividad nematicida en macetas con cultivo de col, inoculadas con *M.incognita*. Las plantas fueron evaluadas dos meses después de su inoculación. Los productos fermentados una reducción en la población de nematodos. Los mejores resultados se obtuvieron con la soja desgrasada, que mostró casi el 100% de reducción en el número de nematodos; con cascarilla de café fue de 80% y con bagazo de yuca fue alrededor del 60% (Brand et al. 2004).

En otro experimento bajo invernadero, se realizó con el fin de controlar *M. incognita* y *M. hapla* en un cultivo de tomate (Kienwich y Sikora 2004). *Paecilomyces lilacinus* formulado como Bioact WG se incorporó a un suelo inoculado con nematodos noduladores antes del trasplante de un cultivar de tomate susceptible. Se incluyeron tratamientos del suelo con plántulas tratadas 24 h antes de ser trasplantadas, tratamientos post-siembra y diferentes niveles de riego. Todos los tratamientos, solos o combinados se le midió el índice de agallas y el número de masas de huevos comparado con un testigo que constaba de una planta de 12 semanas después de ser sembrada. Los resultados mostraron que la combinación de la aplicación en la pre-siembra más las plantas en almácigos y el riego después de la siembra, dieron el mejor control y resultó mayor rendimiento de fruto además de bajar el índice de agallas por planta.

Paecilomyces lilacinus y *Monacrasporium lysipagum* fueron probados para observar su habilidad de reducir poblaciones de los 3 nematodos de mayor importancia económica en un experimento llevado a cabo en macetas (Khan et al. 2006). Los hongos fueron probados tanto individualmente como combinados contra el nematodo nodulador *Meloidogyne incognita*, el nematodo quístico de los cereales *Heterodera avenae* y contra *Radopholus similis* en un cultivo de tomate, cebada y cultivo de tejido de banano respectivamente. En todos los casos, las poblaciones de los nematodos fueron controladas substancialmente con las dos maneras de aplicación de los hongos, solos o combinados. Las aplicaciones combinadas de *Paecilomyces lilacinus* y *Monacrasporium lysipagum* redujeron 62% de las agallas de *Meloidogyne incognita* y el 94% de sus juveniles en el

cultivo de tomate en comparación de su testigo. Para *Heterodera avenae* la población se redujo en un 65 % después de la aplicación de la combinación de los hongos. Para el control de *Radopholus similis*, la aplicación solamente de *Monacrasporium lysipagum* los redujo en 86% y en combinación de *Paecilomyces lilacinus* del 96%. En todos los casos fue mejor la aplicación de ambos hongos.

La eficacia de tres hongos nematófagos, *Paecilomyces lilacinus*, *Plectosphaerella cucumerina* y *Pochonia chlamydosporia*, para el control del nematodo dorado de la papa como parte de un manejo integrado de plagas. Se probó la compatibilidad de los nematófagos con los pesticidas más comunes y además la habilidad de competir contra hongos de suelo como *Rhizoctonia solani*, *Chaetomium globosum*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium bilaii* y *Trichoderma harzianum* fueron probadas *in vitro*. *Paecilomyces lilacinus* mostró además el potencial de controlar el patógeno de suelo *Rhizoctonia solani*, al cual le inhibió su crecimiento además de deformar su crecimiento hifal. *Plectosphaerella cucumerina* tuvo poca competencia con los demás hongos, mientras que *Pochonia chlamydosporia* fue el menos susceptible a la inhibición por otros hongos. El hongo que resultó mejor a la combinación de pesticidas y nematicidas fue *P. lilacinus* pero este trabajo aún no se ha probado en suelo contra el nematodo dorado de la papa (Jacobs et al. 2003)

Recientemente, más hongos nematófagos se ha probado su potencial como agentes de control biológico de nematodos fitopatógenos. Por ejemplo, el hongo

atrapador *Arthrobotrys oligospora* fue probado in vitro contra *Meloidogyne graminicola* y *Rhizoctonia solani* (Singh et al. 2012). Cinco aislados de *Arthrobotrys oligospora* fueron aislados de diferentes localidades de India. La diversidad de estructuras para atrapar nematodos de este hongo depende de las condiciones medioambientales. Se probó in vitro la formación de estructuras y la capacidad de depredar nematodos del género *Meloidogyne graminicola* J2 así como su interacción con *Rhizoctonia solani*. Todos los aislados de *Arthrobotrys oligospora* paralizaron y mataron a *Meloidogyne incognita* y *Rhizoctonia solani*. La aplicación del aislado VNS-1, en suelo infestado con *Meloidogyne incognita* y *Rhizoctonia solani* bajo condiciones de macetas, redujo de un 57-62% la población de nematodos y de un 55-59 % en la incidencia de *Rhizoctonia*

La aplicación de *Arthrobotrys oligospora* al suelo aumentó el crecimiento de las plantas: longitud de brotes por 56.4-68,8%, longitud de la raíz por 44 a 54,55%, peso fresco de los brotes y las raíces por 62,91 a 65,4% y 38,9 a 44,19%, respectivamente, en comparación con las plantas cultivadas en suelos infestados con nematodos del suelo. A partir de los informes anteriores, podemos anticipar que más BCA serían desarrollados en base a hongos nematófagos en el futuro, y estos BCA habrían sido aplicados ampliamente en la agricultura y la producción forestal.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó dentro de las instalaciones del Departamento de parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro y el departamento de Nematología de la empresa GreenCorp Biorganiks de México, S.A de C.V, ubicadas en Saltillo, Coahuila, México.

Selección de muestras de suelo

Las muestras de suelo fueron proporcionadas por el laboratorio de nematología de la empresa GreenCorp Biorganiks de México S.A de C.V, el cual tiene una entrada de muestras para ser analizadas para diagnóstico nematológico. Se seleccionaron 150 muestras de una profundidad de 0-15 cm en base a los siguientes criterios: región geográfica, tipo de suelo y cultivo establecido.

Medio de cultivo para hongos nematófagos

Para el aislamiento primario de los hongos nematófagos se utilizó un medio de cultivo descrito por Ghahfarokhi en el 2004: clorafenicol (0.05%, disuelto en etanol); agar (2%) en un litro de agua destilada (CAA). Todos los componentes serán mezclados en un matraz Erlenmeyer y este se autoclavó por 15 min a 121°C, una vez estéril será vaciado a cajas Petri.

Obtención de nematodos

Se obtuvieron masas de huevecillos del nematodo *Meloidogyne sp* a partir de tubérculos de papas. La extracción fue manual con la ayuda de una aguja de disección y un estereoscopio. Las masas fueron transferidas a frascos de polietileno con 10 mL agua destilada estéril, posteriormente los frascos se cubrieron con papel aluminio y se incubaron a 25°C/48hrs con el fin de que eclosionen los juveniles del segundo estadio (J₂) (Treviño, 2013).

Aislamiento e identificación de hongos

Cada muestra seleccionada se procesó independientemente. Los aislamientos de los hongos nematófagos se llevó acabo de acuerdo a la técnica descrita por Ghahfarokhi, 2004, llamada espolvoreado en placa. Agregando 1 gr de suelo previamente homogenizado directamente en las placas petri con agar agua. Después de tres días de incubación a 25°C se colocaron de 500-1000 J₂ del nematodo *Meloidogyne incognita*, la placas Petri se monitorearon cada 24h con el fin de observar estructuras típicas de los hongos bajo microscopio estereoscópico, los hongos que presentaron estructuras características fueron transferidos a placas Petri con PDA (Agar Papa Dextrosa) mediante la técnica de punta de hifa (Gams, 2003) con el fin de obtener cultivos puros. La identificación de hongos nematófagos se basó en la observación morfológica bajo microscopía utilizando como referencia las claves de identificación taxonómica de (Zhang, 2014) tomando de referencia las estructuras como trampas y anillos, medidas de conidióforo y conidios características del orden *Orbilia*.

Identificación molecular de la cepa HN01

Se llevó a cabo la resiembra de la cepa HN01 en caldo M5 hasta producir una cantidad adecuada de biomasa de la muestra para su posterior extracción de ADN; para la producción de la biomasa se realizó una suspensión de esporas con Tween 80 y/o usando explantes para inocular el medio, se deja en incubación de 28 a 30°C durante 5 días en agitación constante a 100 rpm.

Al término del tiempo de incubación del caldo M5 se filtró la biomasa formada y se lavó con agua destilada estéril de 2 a 3 veces y se colocó en papel aluminio para su congelación a -60 °C. De la biomasa obtenida se llevó a cabo la extracción del ADN con la técnica modificada “Extracción de cepas fúngicas con Acetato de sodio”. Posterior a esto, se checo la integridad y calidad del ADN de las muestras (en gel de agarosa al 1%) seleccionando las mejores para la amplificación, mediante PCR punto final, de la región 18S ribosomal. La reacción se inició con el juego de primers pN3 – pN10 que amplifican ~600bp en la región 18S del rDNA, con una temperatura de hibridación de 60°C condicionada en el termociclador Axygen/Maxigen disponible en el laboratorio de Biología Molecular.

Tabla 1. Secuencias de bases de los PRIMERS utilizados para la identificación de la cepa HN01

Nombre del Primer	Secuencia	Temp. de Alineamiento (°C)
pN3	5' – CCG TTG GTG AAC CAG CGG AGG GAT C– 3'	60

El peso molecular del producto de la PCR se verificó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% y se envió una muestra de dicho producto a la empresa Macrogen Corporation para la secuenciación. Las secuencias obtenidas se corrieron en el programa Chromas 2.0 lite, para corroborar si había señales no definidas. Finalmente usando la base de datos de genomas disponibles en página web del NCBL, con la herramienta BLAST, se compararon las secuencias de las muestras estudiadas con las almacenadas en esta base de datos para su identificación.

Estudios de efectividad biológica contra *Meloidogyne incognita*

Para este estudio, se realizó incremento de las cepas aisladas, utilizando el método de medio de cultivo sólido en placas Petri con PDA, incubándolas a 25°C durante un periodo de 96h, posteriormente se llevó a cabo un barrido de esporas con la ayuda de una varilla de vidrio y una suspensión de agua+tween 20 al .1%, hasta obtener una suspensión conidial. Dicha suspensión se le realizó un conteo de conidios bajo microscopio utilizando una cámara de Neubauer, para así tomar la concentración máxima, media y baja, que fue utilizada en el bioensayo de efectividad biológica. Los bioensayos de actividad nematófaga, de cada especie

identificada del Género *Arthobotrys* spp., contra *Meloidogyne incognita* bajo condiciones *in vitro*. Estos se llevaron a cabo en caja petri de diámetro de 5 cm conteniendo +/- 100 juveniles del segundo estadio de *Meloidogyne incognita*, agregando concentrados celulares 1×10^5 , 1×10^6 y 1×10^7 U.F.C/ml (Unidades Formadoras de Colonias), durante un periodo de tiempo de 168h. Se estableció un diseño completamente al azar, con arreglo factorial con 15 tratamientos con 5 repeticiones más un testigo adicional, los datos obtenidos se analizaron mediante el Software estadístico R versión 3.2. Se evaluó el porcentaje mortalidad realizando un análisis de varianza entre media de tratamientos con un nivel de confianza del 95% y tiempo letal medio (TL_{50}) mediante un análisis de regresión probit.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cepas identificadas

De un total de 150 muestras analizadas se lograron aislar e identificar de acuerdo con las claves taxonómicas de Zhang (2011), cinco cepas de hongos nematófagos, dentro de las cuales destacaron los géneros *Arhrobotrys* spp., y *Drechlerella* spp., las características morfológicas y morfométricas se presentan en la tabla 1.

Mitsui (1985) menciona que la mayoría de los hongos nematófagos se encuentran en la primera capa del suelo de 10-30 cm, lo cual coincide con la profundidad de las muestras utilizadas para el aislamiento de las cepas de hongos. Persmark y Jansson (1997) investigaron la rizósfera de cultivos de cebada, habas y mostaza y encontraron más densidad de hongos en muestras donde estaban los cultivos establecidos. Además encontraron que las especies más comunes de hongos nematófagos fueron *Arhrobotrys oligospora*. Sin embargo *Arhrobotrys musiformis*, *A.robusta* y *Dactylella lobata* también son significativamente más abundantes que otras especies (Jaffee y Strong 2005).

Tabla 2. Especies de hongos nematófagos identificados a nivel morfológico

Clave designada	Género Hongo	Especie	Tipo de trampa	Rango de Medida de conidióforo	Rango de Medida de conidio	Origen	Hospedero
HN01	<i>Arthrobotrys</i>	<i>musiformis</i>	Red	104–640 µm	20–47.5 µm x 7–12.5µm	Chiapas	Banano
HN02	<i>Drechslerella</i>	<i>yunnanensis</i>	Anillo	60–100µm	7.8–12.9 x 3.3–4.2 µm,	Guanajuato	Chile
HN03	<i>Arthrobotrys</i>	<i>oligospora</i>	Red	110–440 µm	17–35 x 8.5–16µm.	Michoacán	Zarzamora
HN04	<i>Arthrobotrys</i>	<i>spp.</i>	Red			Coahuila	Pino
HN05	<i>Arthrobotrys</i>	<i>Musiformis</i>	Red	104–640 µm	20–47.5 µm x 7–12.5µm	Chiapas	Banano

Identificación molecular

Se logró la identificación molecular de la cepa HN01 (*Arthrobotrys musiformis*), la cual su secuencia de ADN fue introducida a la base de datos del BLAST del NCBI, los cuales arrojaron una similitud del 99% con una cobertura del 94%. La secuencia analizada en la base de datos se muestra a continuación:

```

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGCCGCAGGCCTCCTGTAAGCCTGTTTGGC
CGCCTTAACTGCGCGGTCAACTGGTTAACCCCTTTGTGAACCAAAAAACCT
TTCGCTTCGGCAGCTGGGCCCTGACCGGCCTGTCAGCCTGCCGTTAGCAC
CCTTCAAAAACCTTGTGTCAAAACATTGTCTGATAACCAAATTTTGAAT
GAAAATTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCCGCATCGATGAAA
AACGCAGCGAAACGCGATAGTTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATC
GAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCATTGGTATTCCTTTGGGCATGTC
TGTTTGAGCGTCATTACAACCCCTCAGCTAACGCTGGTTTTGAACCCGAA
CGGCCTCGTGCCGCACCGGTTTTAAAGTTGAAGCTCTGCTGGCCGCTCT
GCCCAACCGAAGACATAGTAAGCAACTACTTGTAGGGTGAAGGTGAACG
GTTACGGCCTGAACAAAACCTACTTCTCAAGGTTTGACCTCAAATCAAAC
AAGGATACCCGCTGAACTTAAGCANTANNAANCAAAA

```

El resultado del análisis de esta secuencia proporcionado por la base BLAST se presenta en la tabla 3

Tabla 3. Análisis de secuencia de ADN de cepa HN01

Clave	Identificación molecular	Acceso	Cobertura (%)	Error (%)	Anexo	Maxima identificación (%)
HN01	<i>Arthrobotrys musiformis</i>	Y17070.01	94	0	1	99

Resultados de bioensayos de efectividad biológica a nivel laboratorio

Todas las cepas aisladas de hongos nematófagos tuvieron un efecto nematocida contra los J₂ de *Meloidogyne incognita*. Los tratamientos que mostraron mayor porcentaje de mortalidad fueron los de mayor concentración (1x10⁷ U.F.C/ml), además se observó que la mortalidad máxima se alcanzó en el tiempo máximo de evaluación de 196 h. Coincidiendo con Dávila (2005), quien demostró que los tratamientos de mayor concentración de U.F.C/ml de *Arthrobotrys* spp., ejercieron mayor control sobre *Meloidogyne javanica*.

Se encontró una variabilidad entre el control que ejercieron las cepas entre los diferentes aislados. Esta variabilidad puede ser a las diferentes características de adaptabilidad de cada una como los factores edáficos, la temperatura y la región geográfica de la cual se aislaron las cepas.

En la tabla 4 se presentan el porcentaje de mortalidad y el tiempo letal medio que ocasiona la cepa HN01 (*Arthrobotrys musiformis*) sobre *Meloidogyne incognita*. En donde la concentración de 1x10⁷ U.F.C/ml alcanzó una mortalidad del 94% en un TL50 de 106.07, observando diferencia significativa con el

tratamiento de 1×10^5 U.F.C/ml el cual logro reducir la población solamente en un 58% con un TL 50 de 152.17

Tabla 4. Efectividad biológica de la cepa HN01 sobre *Meloidogyne incognita*.

U.F.C/ml	% Mortalidad	TL50 (h)
1×10^5	58 B	152.17
1×10^6	90 AB	111.63
1×10^7	94 A	106.07
Testigo	3 C	

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

En la figura 1 se presenta la efectividad de los tratamientos de la cepa HN01 sobre la población de *M. incognita* a través del tiempo, en la cual podemos observar que la población se ve afectada hasta después de 48 h ya que existe un proceso en los hongos nematófagos de reconocimiento y recepción. Los porcentajes de mortalidad concuerdan con los reportados por Gutiérrez (2013), en la cual redujo la población del nematodo *Haemonchus contortus* con cepas de *A. musiformis* en un 97%

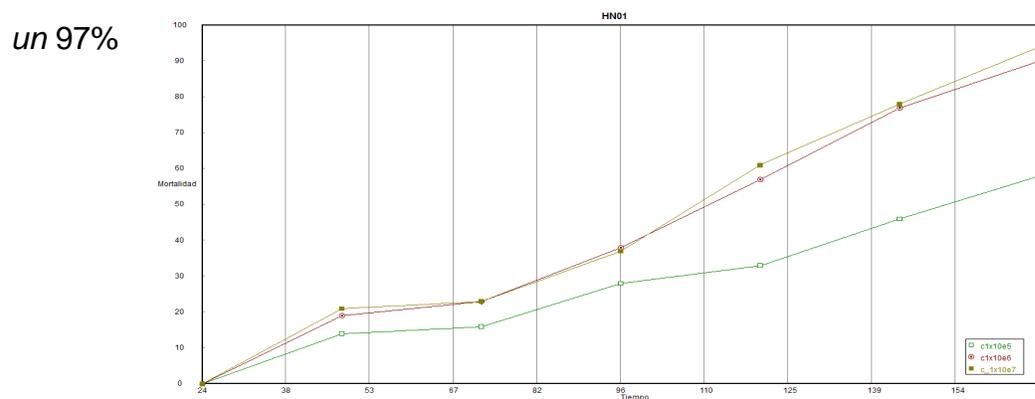


Figura 1. Porcentaje de mortalidad de *Meloidogyne incognita* causada por la cepa HN01

La cepa HN02 identificada como *Drechlerella yunnanensis* fue el hongo que causó menor índice de mortalidad a *M.incognita* como se puede observar en la tabla 4, alcanzando un porcentaje máximo de 59% en su dosis más elevada 1×10^7 U.F.C/ml con TL_{50} de 146.53 h, mientras que la dosis de 1×10^5 U.F.C/ml no pudo reducir el 50% de la población de nematodos.

La efectividad sobre nematodos fitopatógenos de *Drechlerella* ha sido poco estudiada. Castillo et al. (2010), evaluaron dos cepas de este género, *Drechlerella dactyloides* y *Drechlerella brochophaga* contra el nematodo reniforme *Rotylenchulus reniformis*. Describieron que la formación de anillos oscila en un periodo de tiempo de hasta 72 h y lograron observar una mortalidad de un 60% y 70%, coincidiendo con la cepa HN02 que logró obtener un 59% de mortalidad.

Tabla 5. Efectividad biológica de la cepa HN02 sobre *Meloidogyne incognita*.

U.F.C/ml	% Mortalidad	TL50 (h)
1x10 ⁵	43 C	
1x10 ⁶	51 B	164.05
1x10 ⁷	59 A	146.53
Testigo	2 D	

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

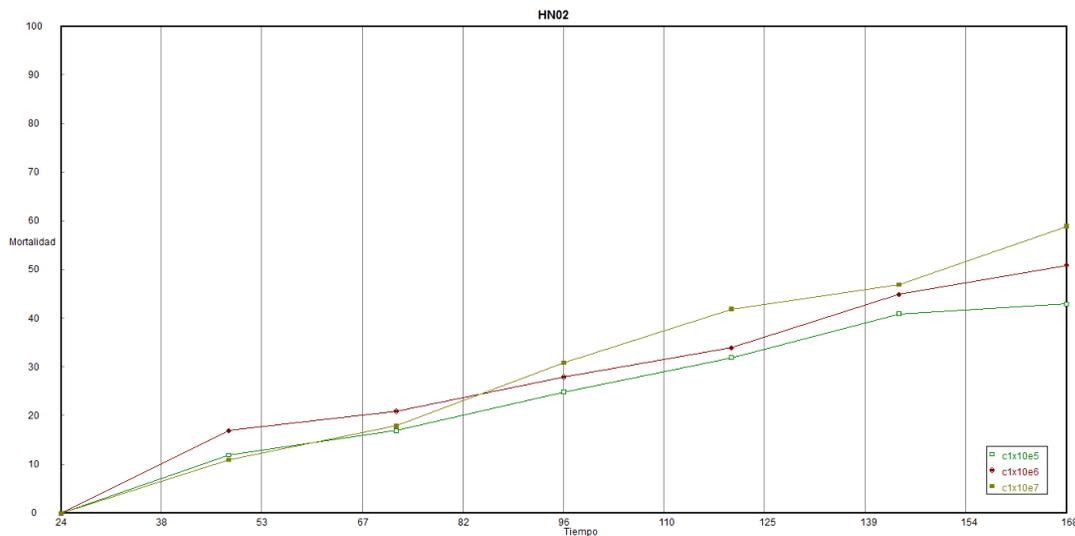


Figura 2. Porcentaje de mortalidad de *Meloidogyne incognita* causada por la cepa HN02

Arthrobotrys oligospora es uno de los hongos nematofagos más estudiado, su actividad nematofaga fue descrita por Zopf (1988) y está considerada como una de las especies del género *Arthrobotrys* más comunes. Dicha actividad se le confiere a genes virulentos los cuales involucran la producción de enzimas hidrolíticas como las proteasas y las quitinasas.

La tabla 5 contiene los porcentajes de mortalidad ocasionados por este hongo, el cual logra reducir la población de *M. incognita* en un 87% en un TL₅₀ de 118 h en el tratamiento de mayor concentración 1×10^7 U.F.C/ml y un 63% en el de menor concentración 1×10^5 .

Zouhar et al. (2010), evaluó la patogenicidad de seis especies de hongos nematofagos en donde destacó la actividad nematocida de una cepa *Arthrobotrys oligospora* la cual logró reducir poblaciones de *Globodera rostochiensis* en un 100%, 82% de *Meloidogyne hapla* y 98% para *Ditylenchus dipsaci*

Singh et al. (2012), reportó que la aplicación de *Arthrobotrys oligospora* reduce en un 57-62% el índice de nodulación de *Meloidogyne graminicola* en plantas de tomate.

Tabla 6. Efectividad biológica de la cepa HN03 sobre *Meloidogyne incognita*.

U.F.C/ml	% Mortalidad	TL50 (h)
1x10 ⁵	63 B	144
1x10 ⁶	85 A	121.51
1x10 ⁷	87 A	118.24
Testigo	4 B	

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

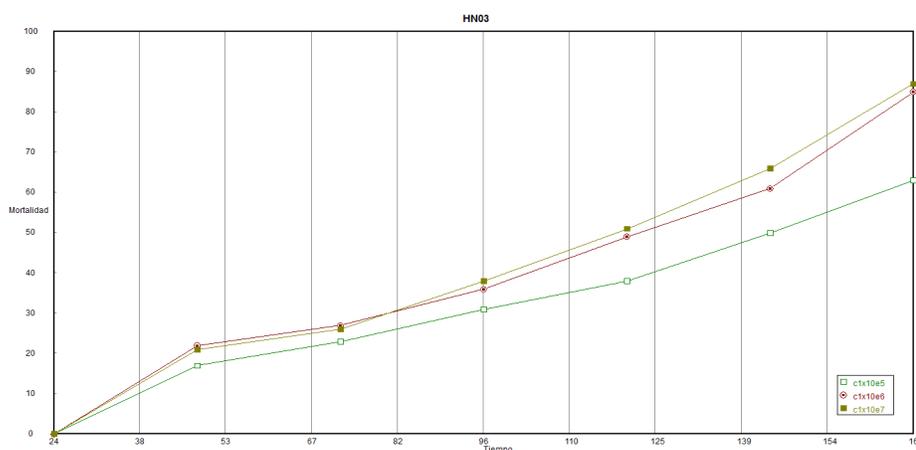


Figura 3. Porcentaje de mortalidad de *Meloidogyne incognita* causada por la cepa HN03

Existen otros factores que no se estudiaron dentro de esta investigación como lo es el rango de temperatura que afecta directamente en la capacidad de depredación de los hongos hacia los nematodos (Castro et al., 2000) motivo por el cual pudieran haberse presentado la baja tasa de mortalidad de algunas cepas aisladas.

La cepa HN04, la cual no se logró identificar morfológicamente, debido a que las características no coincidían con ninguna de las mencionadas en las claves taxonómicas.

Tabla 7. Efectividad biológica *in vitro* de la cepa HN04 sobre *Meloidogyne incognita*.

U.F.C/ml	% Mortalidad	TL50 (h)
1x10 ⁵	55 C	151.67
1x10 ⁶	63 B	140.24
1x10 ⁷	69 A	136.98
Testigo	3 D	

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

En la tabla 7 se muestra la efectividad biológica de la cepa HN04 donde alcanzó un porcentaje máximo de mortalidad de un 69%.

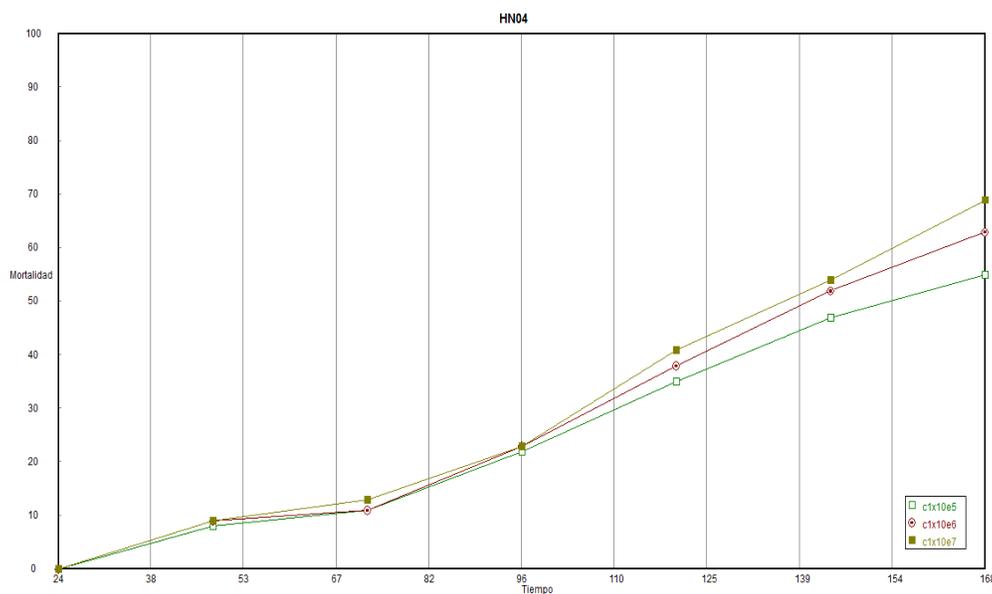


Figura 4. Porcentaje de mortalidad de *Meloidogyne incognita* causada por la cepa HN04

La cepa HN05 *Arthrobotrys musiformes* aislada de suelos forestales, logro reducir la población de *M. incognita* en un 70% y 72% en los tratamientos de 1×10^6 y 1×10^7 U.F.C/ml respectivamente, mostrando resultados muy diferentes a los de la cepa HN01, esta variabilidad puede ser a las diferentes características de adaptabilidad de cada una como los factores edáficos, la temperatura y la región geográfica de la cual se aislaron las cepas.

Tabla 8. Efectividad biológica *in vitro* de la cepa HN05 sobre *Meloidogyne incognita*.

U.F.C/ml	% Mortalidad	TL50 (h)
1x105	68 B	145.51
1x106	70 A	140.94
1x107	72 A	131.88
Testigo	3 C	

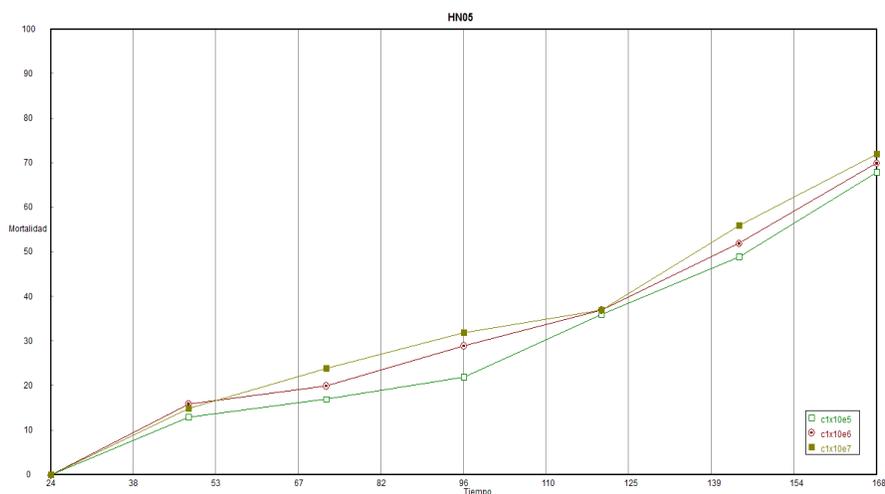


Figura 5. Porcentaje de mortalidad de *Meloidogyne incognita* causada por la cepa HN05

Tabla 9. Comparación de medias de tratamientos entre cepas de hongos nematófagos sobre *Meloidogyne incognita*

HN	% Mortalidad	TL50 (h)
HN01	94 A	106.07
HN02	59 E	146.53
HN03	87 B	118.24
HN04	69 CD	136.98
HN05	72 C	131.88

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Finalmente se presenta la tabla 9, en la que se comparan las medias de porcentaje de mortalidad causado por las cinco cepas de hongos nematófagos, donde claramente se observa que el que tuvo mayor efecto fue la cepa HN01 con un 94% de mortalidad, contrario a la cepa HN02 la cual redujo la población 59%.

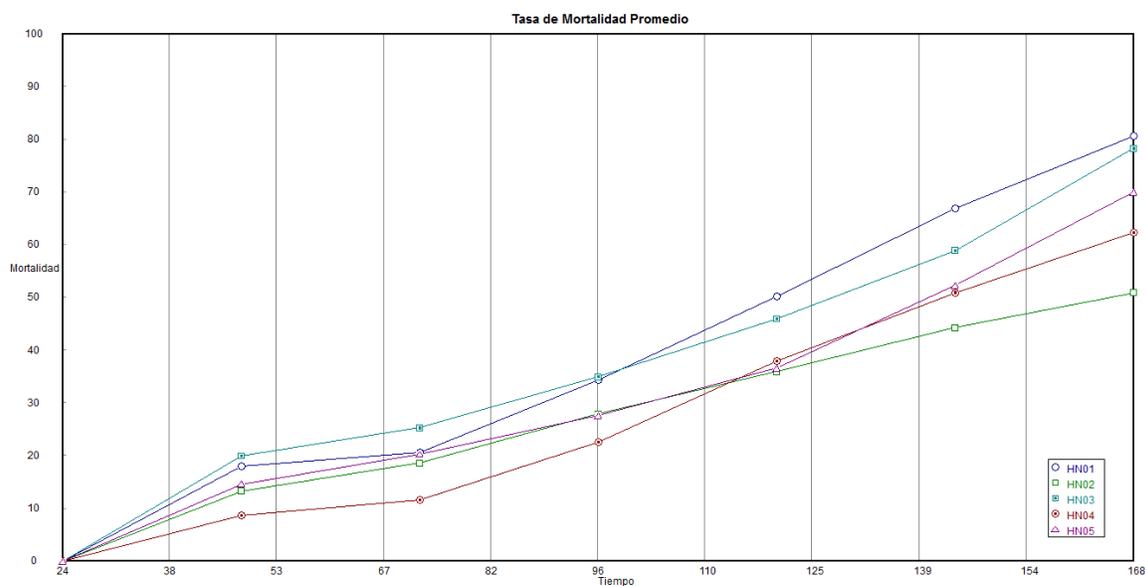


Figura 6. Porcentaje de mortalidad de cepas de nematófagos sobre *Meloidogyne incognita*

CONCLUSIÓN

Se lograron aislar e identificar morfológicamente cinco cepas que mostraron actividad nematocida contra los juveniles J₂ de *Meloidogyne incognita*. En base a los resultados obtenidos del bioensayo realizado, la concentración de U.F.C de las cepas de *Arhrobotrysspp.*, es muy significativo ya que en todos los casos fueron los mejores tratamientos. En general se observó que a mayor tiempo de exposición de los tratamientos contra los nematodos mayores fue el índice de mortandad causado por estos. La cepa HN01 fue la que causó mayor índice de mortalidad sobre *M. incognita*

RESUMEN

El nematodo agallador *Meloidogyne incognita*, esta reportado como el principal nematodo que causa daños severos en la agricultura alrededor del mundo y su control químico ocasiona grandes problemas en el medio ambiente. Los hongos nematófagos del Género *Arthrobotrys* spp, son enemigos naturales de los nematodos, los cuales los pueden inmovilizar y digerir. La infección de los nematodos por los hongos nematófagos, precede a la adherencia, el trampeo y penetración la cual involucra a enzimas hidrolíticas como las quitinasas y proteasas. Con la finalidad de disminuir el uso de nematicidas químicos, se pretende generar nuevas tecnologías, para el control biológico de *Meloidogyne incognita*, a partir del uso de agentes de control, como los hongos nematófagos del Género *Arthrobotrys* spp. El objetivo del presente trabajo fue aislar e identificar especies del hongo del Género *Arthrobotrys*, con actividad nematófaga contra *Meloidogyne incognita*, de diferentes regiones agrícolas de México. La presente investigación, se realizó dentro de las instalaciones del Departamento de Parasitología, de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro y de la empresa GreenCorp Biorganiks, ubicada en Saltillo, Coahuila de Zaragoza. Se procesaron 150 muestras de suelos agrícolas de una profundidad de 0-15 cm en base a metodologías propias para la obtención de hongos y nematodos. Los hongos se identificaron mediante técnicas de

microscopía y claves taxonómicas, encontrando cinco diferentes cepas de hongos nematófagos, *Arthrobotrys musiformis* (HN01), *Drechlerella yunnanensis* (HN02), *Arthrobotrys oligospora* (HN03), *Arthrobotrys spp.* (HN04), *Arthrobotrys spp.* (HN05). Se realizaron bioensayos de actividad nematófaga, de cada especie identificada del Género *Arthrobotrys* contra *Meloidogyne incognita* bajo condiciones *in vitro*. Estos se llevaron a cabo en caja petri de diámetro de 5 cm conteniendo juveniles del segundo estadio de *Meloidogyne incognita*, agregando concentrados celulares 1×10^5 , 1×10^6 y 1×10^7 durante un periodo de tiempo de 168h. Se estableció un diseño completamente al azar, con arreglo factorial con 15 tratamientos con 5 repeticiones más un testigo adicional, los datos obtenidos se analizaron mediante R. Se evaluó el porcentaje mortalidad realizando un análisis de varianza entre media de tratamientos y TL_{50} mediante un análisis probit. La capacidad nematófaga fue HN01 94% TL_{50} 106.07h; HN02 59% TL_{50} 146.53h; HN03 87% TL_{50} 118.24h; HN04 69% TL_{50} 136.98h; HN05 72% TL_{50} 131.88h.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Åhman, J., Ek, B., Rask, L., & Tunlid, A. (1996). Sequence analysis and regulation of a gene encoding a cuticle-degrading serine protease from the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Microbiology (Reading, England)*, 142, 1605-1616.

Ahrén, D., Ursing, B. M., & Tunlid, A. (1998). Phylogeny of nematode-trapping fungi based on 18 S rDNA sequences. *FEMS Microbiology Letters*, 158, 179-184.

Bardgett, R.D., Cook, R., Yeates, G.W., Denton, C.S. (1999): The influence of nematodes on below-ground processes in grassland ecosystems. *Plant Soil* 212: 23-33

Barker, K. R., & Koenning, S. R. (1998). Developing sustainable systems for nematode management. *Annual Review of Phytopathology*, 36, 165-205.

Barron, G. L. (1977). *The nematode-destroying fungi*. Canadian Biological Publications Ltd.

Barron, G. L. (1992). Lignolytic and cellulolytic fungi as predators and parasites. In G. C. Carroll & D. T. Wicklow (Eds.), *The fungal community, its organization and role in the ecosystems*. New York: Marcel Dekker.

Barron, G. L. (2003). Predatory fungi, wood decay, and the carbon cycle. *Biodiversity*, 4, 3-9.

Bonants, P. J. M., Fitters, P. F. L., Thijs, H., den Belder, E., Waalwijk, C., & Henfling, J. W. D. M. (1995). A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus*

with biological activity against *Meloidogyne hapla* eggs. *Microbiology (Reading, England)*, 141, 775-784.

Brand, D., Roussos, S., Pandey, A., Zilioli, P., Pohl, J., & Soccol, C. (2004). Development of a bionematicide with *Paecilomyces lilacinus* to control *Meloidogyne incognita*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 118, 81-88.

Brussaard, L., Kuyper, T.W., Goede, R.G.M. (2001): On the relationships between nematodes, mycorrhizal fungi and plants: functional composition of species and plant performance. *Plant and Soil* 232: 155 - 165.

Burges, H. D. (1998). *Formulation of microbial pesticides*. Dordrecht: Kluwer.

Carpenter, J., Lynch, L., & Trout, T. (2001). Township limits on 1,3-D will impact adjustment to methyl bromide phase-out. *California Agriculture*, 55, 12-18.

Casas-Flores, S., & Herrera-Estrella, A. (2007). Antagonism of plant parasitic nematodes by fungi. In C. P. Kubicek & I. S. Druzhinina (Eds.), *The mycota VI: Environmental and microbial relationships* (2nd ed.). Berlin: Springer

Cayrol, J. C., Frankowski, J. P., Laniece, A., d' Hardemare, G., & Talon, J. P. (1978). Contre les nématodes en champignonniere. Mise an point d' une méthode de lute biologique a l' aide d' un hyphomycete predateur: *Arthrobotrys robustus* souche antipolis' (Royal 300). *Rev Hortie*, 184, 23-30.

Chitwood, D. J. (2003). Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service. *Pest Management Science*, 59, 748-753.

Croll, N. A. (1970). *The behaviour of nematodes: Their activity, senses and responses*. London: Edward Arnold Ltd. Dijksterhuis, J., Veenhuis, M., Harder, W., & Nordbring-Hertz, B. (1994). Nematophagous fungi: Physiological aspects and structure-function relationships. *Advances in Microbial Physiology*, 36, 111–143.

Duddington, C. L. (1962). Predaceous fungi and the control of eelworms. In C. L. Duddington & J. D. Carthy (Eds.), *Viewpoints in biology* (Vol. 1). London: Butterworths.

Crous, P. W., Gams, W., Stalpers, J. A., Robert, V., & Stegehuis, G. (2004). MycoBank: An online initiative to launch mycology into the 21st century. *Studies in Mycology*, 50, 19-22.

Dávila, L. (2005). Evaluación de la actividad biocontroladora de *Arthrobotrys sp.* y *Paecilomyces sp.* sobre *Meloidogyne javanica in vitro* y bajo condiciones de invernadero en crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Anderson). Agronomía colombiana

Desaeger, J.R., RAO, M.R., Bridge. J. (2004): Nematodes and other soilborne pathogens in agroforestry. In: M. van Noordwijk, G. Cadisch and C.K. Ong, (Eds.) Below-Ground Interactions in Tropical Agroecosystems: Concepts and Models with Multiple Plant Components, CABI, Wallingford, pp. 263-283.

Djian, C., Pijarouovski, L., Ponchet, M., & Arpin, N. (1991). Acetic acid, a selective nematicidal metabolite from culture filtrate of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samsan and *Trichoderma longibrachiatum* Rifai. *Nematologica*, 37, 101-102.

Eilenberg, J., Hajek, A., & Lomer, C. (2001). Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*, 46, 387–400.

Feng, M. G., Poprawski, T. J., & Khachatourians, G. G. (1994). Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: Current status. *Biocontrol Science and Technology*, 4, 3-34.

Gams, W., & Zare, R. (2003). A taxonomic review of the clavicipitaceous anamorphs parasitizing nematodes and other microinvertebrates. In J. F. White Jr., C. W. Bacon, N. L.

Ghahfarokhi, M., Razzaghi Abyaneh, M., Ranjbar Bahadori, S., Eslami, A., Zare, R., & Ebrahimi, M. (2004). Screening of soil and sheep faecal samples for predacious fungi: Isolation and characterization of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Iranian Biomedical Journal*, 8, 135-142.

Gutiérrez, A. & Mendoza, P. (2013). Hongos nematófagos (Orbiliales) capturando, destruyendo y alimentándose de larvas hisotrópicas de *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae). *Revista Mexicana de Micología*.

Hallmann, J., Davies, K. G., & Sikora, R. A. (2009). Biological control using microbial pathogens, endophytes and antagonists. In R. N. Perry, M. Moens, & J. L. Starr (Eds.), *Root-knot nematodes*. Wallingford: CABI.

Hodge, K. T., Viaene, N. M., & Gams, W. (1997). Two *Harposporium* species with *Hirsutella* synanamorphs. *Mycological Research*, 101, 1377-1382.

Hugot, J. P., Baujard, P., & Morand, S. (2001). Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study: An overview. *Nematology*, 3, 199–208.

Hywel-Jones & J. W. Spatafora (Eds.), *Clavicipitalean fungi: Evolutionary biology, chemistry, and cultural impacts*. New York: Marcel Dekker.

Jansson, H-B., Norbring-Hertz, B. (1979): Attraction of nematodes to living mycelium of nematophagous fungi. *Journal of General Microbiology* 112: 89-93.

Jaffee, B., & Strong, D. (2005). Strong bottom-up and weak top-down effects in soil: Nematodeparasitized insects and nematode-trapping fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 37, 1011–1021.

Jacobs, H., Gray, S. N., & Crump, D. H. (2003). Interactions between nematophagous fungi and consequences for their potential as biological agents for the control of potato cyst nematodes. *Mycological Research*, 107, 47-56.

Jin, X. X., & Custis, D. (2011). Microencapsulating aerial conidia of *Trichoderma harzianum* through spray drying at elevated temperatures. *Biological Control*, 56, 202-208.

Jones, K. A., & Burges, H. D. (1998). Technology of formulation and application. In H. D. Burges (Ed.), *Formulation of microbial pesticides-beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments* (pp. 7-30). Dordrecht: Kluwer Academic.

Kerry BR (2000) Rhizosphere interactions and exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Annu Rev Phytopathol* 38: 423-441.

Kerry, B. R., & Hominick, W. B. (2002). Biological control. In D. L. Lee (Ed.), *The biology of Nematodes* (pp. 483-510). London: Taylor and Francis.

Koenig, S.R., Overstreet, C., NOLING J.W. (1999): Survey of crop losses in response to phytoparasitic nematodes in the United States for 1994. *Journal of Nematology* 31: 587-618.

Kiewnick, S., & Sikora, R. A. (2003). Efficacy of *Paecilomyces lilacinus* (strain 251) for the control of root-knot nematodes. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, x|68, 123-128.

Kumar, N., Singh, R. K., & Singh, K. P. (2011). Occurrence and colonization of nematophagous fungi in different substrates, agricultural soils and root galls. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 44, 1182-1195.

Leggett, M., Leland, J., Kellar, K., & Epp, B. (2011). Formulation of microbial biocontrol agents– an industrial perspective. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 33, 101-107.

Li, T. F., Zhang, K. Q., & Liu, X. Z. (2000). *Taxonomy of nematophagous fungi (Chinese)*. Beijing:Science Press.

Li, G. H., Shen, Y. M., & Zhang, K. Q. (2005). Nematicidal activity and chemical component of *Poria cocos*. *The Journal of Microbiology*, 43, 17-20.

López-Llorca, L. V., Macia-Vicente, J. G., & Jansson, H. B. (2008). Mode of action and interactions of nematophagous fungi. In A. Ciancio & K. G. Mukerji (Eds.), *Integrated management and biocontrol of vegetable and grain crops nematodes* (pp. 51-76). Dordrecht: Springer.

Luo, H., Liu, Y. J., Fang, L., Li, X., Tang, N., & Zhang, K. Q. (2007). *Coprinus comatus* damages nematode cuticles mechanically with spiny balls and produces potent toxins to immobilize nematodes. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 3916-3923.

Mendoza, A., Sikora, R. A., & Kiewnick, S. (2004). Efficacy of *Paecilomyces lilacinus* (strain 251) for the control of *Radopholus similis* in banana. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 69, 365-372.

Mitsui, Y. (1985). Distribution and ecology of nematode-trapping fungi in Japan. *JARQ*, 18, 182– 193.

Molinari, S. (2011). Natural genetic and induced plant resistance, as a control strategy to plantparasitic nematodes alternative to pesticides. *Plant Cell Reports*, 30, 311–323.

Sasser, J. N. (1980). Root-knot nematodes: A global menace to crop production. *Plant Disease*, 64, 36–41.

Moosavi, M. R., & Zare, R. (2012). Fungi as biological control agents of plant-parasitic nematodes. J. M. Mérillon & K. G. Ramawat (Eds.), *Plant defence: Biological control, progress in biological control*

Nordbring-Hertz, B., Jansson, H. B., & Tunlid, A. (2006). *Nematophagous fungi*. In *Encyclopedia of life sciences*. Chichester: John Wiley & Sons.

Park, J., Gams, W., Scholler, M., Ghisalberti, E., & Sivasithamparam, K. (2002). Orbiliaceous nematode-trapping fungi and related species in Western Australia and their biological activities. *Australasian Mycologist*, 21, 45–52.

Patel, A. V., Jakobs-Schönwandt, D., Rose, T., & Vorlop, K. D. (2011). Fermentation and microencapsulation of the nematophagous fungus *Hirsutella rhossiliensis* in a novel type of hollow beads. *Applied and Environmental Microbiology*, 89, 1751–1760.

Persmark, L., & Jansson, H. B. (1997). Nematophagous fungi in the rhizosphere of agricultural crops. *FEMS Microbiology Ecology*, 22, 303–312.

Roberts, P.A. (1995) Conceptual and practical aspects of variability in root-knot nematodes related to host plant resistance. *Annual Review of Phytopathology* 33, 199–221.

Tian, B. Y., Yang, J. K., & Zhang, K. Q. (2007). Bacteria used in the biological control of plantparasitic nematodes: Populations, mechanisms of action, and future prospects. *FEMS Microbiology Ecology*, 61, 197–213.

Scholler, M., Hagedorn, G., & Rubner, A. (1999). A reevaluation of predatory orbiliaceous fungi. II. A new generic concept. *Sydowia*, 51, 89–113.

Segers, R., Butt, T. M., Carder, J. H., Keen, J. N., Kerry, B. R., & Peberdy, J. F. (1999). The subtilisins of fungal pathogens of insects, nematodes and plants: Distribution and variation. *Mycological Research*, 103, 395–402.

Siddiqui, Z. A., & Mahmood, I. (1996). Biological control of plant parasitic nematodes by fungi: A review. *Bioresource Technology*, 58, 229-239.

Singh, U. B., Sahu, A., Singh, R. K., Singh, D. P., Meena, K. K., Srivastava, J. S., Renu, Manna, M. C. (2012). Evaluation of biocontrol potential of *Arthrobotrys oligospora* against *Meloidogyne graminicola* and *Rhizoctonia solani* in Rice (*Oryza sativa* L.). *Biological Control*, 60, 262–270.

Tedford, E. C., Jaffee, B. A., Muldoon, A. E., Anderson, C. E., & Westerdahl, B. B. (1993). Parasitism of *Heterodera schachtii* and *Meloidogyne javanica* by *Hirsutella*

rhossiliensis in microplots over two growing seasons. *Journal of Nematology*, 25, 427-433.

Tunlid, A., Johansson, T., & Nordbring-Hertz, B. (1991). Surface polymers of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Journal of General Microbiology*, 137, 1231–1240.

Viaene, N., Coyne, D. L., & Kerry, B. R. (2006). Biological and cultural management. In R. N. Perry, M. Moens (Eds.) *Plant nematology*. Wallingford: CABI.

Wang, B., Wu, W. P., & Liu, X. Z. (2007). Purification and characterization of a neutral serine protease with nematocidal activity from *Hirsutella rhossiliensis*. *Mycopathologia*, 163, 169-176.

Wang, J., Wang, J., Liu, F., & Pan, C. (2010). Enhancing the virulence of *Paecilomyces lilacinus* against *Meloidogyne incognita* eggs by overexpression of a serine protease. *Biotechnology Letters*, 32, 1159-1166.

Yang, J. K., Huang, X. W., Tian, B. Y., Wang, M., Nui, Q. H., & Zhang, K. Q. (2005). Isolation and characterization of a serine protease from the nematophagous fungus, *Lecanicillium psalliotae*, displaying nematocidal activity. *Biotechnology Letters*, 27, 1123-1128.

Yang, J. K., Tian, B. Y., Liang, L. M., & Zhang, K. Q. (2007a). Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *75*, 21-31.

Yang, J. K., Gan, Z. W., Lou, Z. Y., Tao, N., Mi, Q. L., Liang, L. M., Sun, Y., Guo, Y., Huang, X. W., Zou, C. G., Rao, Z. H., Meng, Z.H., Zhang, K. Q. (2010). Crystal structure and mutagenesis analysis of chitinase CrChi1 from the nematophagous fungus *Clonostachys rosea* in complex with the inhibitor caffeine. *Microbiology (Reading, England)*, *156*, 3566-3574.

Yang, J. K., Wang, L., Ji, X. L., Feng, Y., Li, X. M., Zou, C. G., Xu JP., Ren, Y., Mi, Q. L., Wu, J. L., Liu, S. Q., Liu, Y., Huang, X. W., Wang, H. Y., Niu, X. M., Li, J., Liang, L. M., Luo, Y. L., Ji, K. F., Zhou, W., Yu, Z. F., Li, G. H., Liu, Y. J., Li, L., Qiao, M., Feng, L., Zhang, K. Q. (2011a). Genomic and proteomic analyses of the fungus *Arthrobotrys oligospora* provide insights into nematode-trap formation. *PLoS Pathogens*, *7*, e1002179.

Zare, R., Gam, W., & Evans, H. C. (2000). A revision of *Verticillium* section Prostrata. V. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora*. *Nova Hedwigia*, *73*, 51-86.

Zhang, Y., Li, G. H., & Zhang, K. Q. (2011). A review on the research of nematophagous fungal species (In Chinese). *Mycosystema*, *30*, 836-845.

Zhang, Y., Yu, Z. F., Xu, J., & Zhang, K. Q. (2011). Divergence and dispersal of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* from China. *Environmental Microbiology Reports*, *3*, 763-773.

Zopf, W. (1888). Zur Kenntnis der Infektionskrankheiten niederer Thiere und Pflanzen. Nova Academy of Caes. *Leop. German. Nat. Cur.*, *52*, 314-376.

