

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

CONTROL BIOLÓGICO DE *Nacobbus aberrans* MEDIANTE HONGOS ANTAGONISTAS

MIGUEL ÁNGEL CORTEZ HERNÁNDEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2019

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Miguel Angel Cortez Hernández, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dra. Emma Zavaleta Mejía, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis CONTROL BIOLÓGICO DE Nacobbus aberrans MEDIANTE HONGOS ANTAGONISTAS

y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 12 de febrero de 2019



Firma del
Alumno (a)



Dra. Emma Zavaleta Mejía

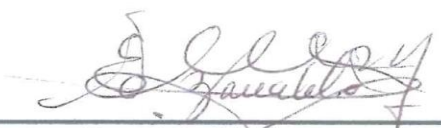
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **CONTROL BIOLÓGICO DE *Nacobbus aberrans* MEDIANTE HONGOS ANTAGONISTAS**, realizada por el alumno: **Miguel Ángel Cortez Hernández**, bajo la dirección del Consejo Particular Indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA


Dra. Emma Zavaleta Mejía

ASESORA


Dra. Reyna I. Rojas Martínez

ASESOR


Dr. Jesús Pérez Moreno

ASERORA


M.C. Victoria Ayala Escobar

Montecillo, Texcoco, Estado de México, febrero de 2019

CONTROL BIOLÓGICO DE *Nacobbus aberrans* MEDIANTE HONGOS

ANTAGONISTAS

Miguel Ángel Cortez Hernández, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2019

RESUMEN

Nacobbus aberrans (Thorne) Thorne y Allen, es considerado como uno de los 10 principales fitonematodos de mayor importancia a nivel mundial. Su control se realiza mediante la aplicación de nematicidas fumigantes y no fumigantes que son costosos y dañan al ambiente; entre las alternativas de manejo amigables con el ambiente está el control biológico. Por tal motivo, en la presente investigación se evaluó el potencial de hongos aislados de huevos de nematodos agalladores como agentes de control biológico de *N. aberrans*. Se probó *in vitro* el parasitismo, sobre huevos y juveniles de segundo estadio (J2) de *N. aberrans*, de 22 hongos aislados de huevos de *Meloidogyne* sp. De estos aislamientos destacaron los identificados como *Fusarium solani* (Fs03 y), *F. oxysporum* (Fo07 y Fo10) y *Penicillium janthinellum* (Pe11) que causaron 86 y 90 %, 84 y 86 %, 89 y 91 %, y 75 y 78 % de parasitismo en huevos y J2 de *N. aberrans*, respectivamente. De estos solamente Fs03 y Pe11 no fueron patogénicos en pimiento cv. Yolo Wonder. Cuando estos aislamientos se inocularon en plantas de pimiento cultivadas en suelo infestado con el nematodo, *P. janthinellum* (Pe11) redujo de manera significativa ($p \leq 0.05$) y consistente el agallamiento radical (de 9 - 49 %) y el número de J2/g de raíz (de 35-56 %) en comparación con las plantas expuestas sólo al nematodo; con *F. solani* (Fs03) únicamente en dos de los tres ensayos realizados existió una reducción significativa ($p \leq 0.05$) de 12-26 % y de 16-41 % en el agallamiento radical y el

número de J2, respectivamente. En general no se observó un efecto consistente de promoción de crecimiento de las plantas (peso seco de la raíz y del follaje) cuando se inocularon sólo con los hongos o con la combinación hongo-nematodo. Los mejores resultados se obtuvieron con *P. janthinellum* (Pe11), cuyo potencial como agente de control biológico, tendrá que demostrarse en ensayos en campos e invernaderos infestados con *N. aberrans*.

Palabras clave: Control biológico, hongos nematófagos, *Nacobbus aberrans*, nematodo falso agallador, *Penicillium janthinellum*.

BIOLOGICAL CONTROL OF *Nacobbus aberrans* BY FUNGAL ANTAGONISTS

Miguel Ángel Cortez Hernández, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2019

ABSTRACT

Nacobbus aberrans (Thorne) Thorne et Allen, is considered one of the 10 most important plant parasitic nematodes around the world. Its control is carried out through the application of fumigant and non-fumigant nematicides which are expensive and noxious to the environment; among the management environmentally friendly alternatives is the biological control. Therefore, in the present study, 22 fungi isolated from *Meloidogyne* sp., eggs were evaluated as biological control agents of *N. aberrans*. Its parasitism on eggs and second stage juveniles (J2) was tested *in vitro* assays. The best results were obtained with the isolates identified as *Fusarium solani* (Fs03 y), *F. oxysporum* (Fo07 y Fo10) and *Penicillium janthinellum* (Pe11) which caused 86 and 90 %, 84 and 86 %, 89 and 91 %, and 75 and 78 % of parasitism on eggs and J2 of *N. aberrans*, respectively. From these only Fs03 and Pe11 were not pathogenic to pepper cv. Yolo Wonder. When these two isolates were inoculated on pepper plants grown in nematode infested soil, *P. janthinellum* (Pe11) caused a significant ($p \leq 0.05$) and consistent reduction in the root gall index (9-49 %) and the number of J2/g of root (35-56 %), as compared to the plants exposed only to the nematode; and *F. solani* (Fs03) only in two out of three assays, produced a significant reduction in the gall index (12-26 %) and the number of J2/g of root (16-41 %). In general, there was not a consistent plant growth promotion effect (dry weight of root and shoot) when plant was inoculated only with the fungi or with the combination

fungi-nematode. The best results were obtained with *P. janthinellum* (Pe11) whose potential as biological control agent, has to be demonstrated in assays carried out in fields and greenhouses infested with *N. aberrans*.

Key words: antagonistic fungi, biological control, false root-knot nematode, nematophagous fungi, *Penicillium janthinellum*.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por el apoyo económico, ya que sin este no hubiese sido posible la realización de mis estudios de posgrado.

Al Colegio de Postgraduados y al Posgrado en Fitosanidad-Fitopatología por darme la oportunidad de pertenecer a esta gran familia.

A mi consejo particular: Dra. Emma Zavaleta Mejía, Dra. Reyna I. Rojas Martínez, Dr. Jesús Pérez Moreno, M.C. Victoria Ayala Escobar, por el apoyo en la dirección, planeación, ejecución y culminación de esta investigación, así como su apoyo personal durante estos años, muchas gracias. Especialmente a la Dra. Emma por su apoyo, paciencia y dedicación que ha tenido conmigo, sin su apoyo esta tesis no hubiera sido posible... no tengo como pagarle su guía, tanto profesional como personal.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 209: Olivia, Lupita, Yoana, Priscila, Jorge, Helena, Yesenia, Vivi y especialmente a Manuel, por su apoyo en cada uno de las etapas del proyecto y por hacer más ameno mi estadía en el Colegio. Así mismo, a cada uno de los compañeros y amigos del Colegio, que me apoyaron con sus conocimientos y consejos.

A mis hermanos de tantos años: Juan Carlos Bárcenas y Víctor Guerrero López (y a sus hermosas familias), por apoyarme durante todo este tiempo y considerarme parte de su familia.

DEDICATORIA

A mi querida madre, por todo el esfuerzo que ha realizado para verme crecer y ser una persona de provecho. Gracias por confiar en mí, no te fallaré.

Y mi compañera de vida, Mayra, por ayudarme a ser una mejor persona día a día.

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	vi
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
INTRODUCCIÓN	1
REVISION DE LITERATURA.....	4
<i>Género Nacobbus</i>	4
Control biológico de nematodos fitopatógenos	6
Hongos parásitos de nematodos	7
MATERIALES Y MÉTODOS	9
Selección de hongos con potencial parasítico sobre huevos de <i>N. aberrans</i>	9
Preparación del inóculo de los hongos parásitos.....	10
Obtención de huevos y juveniles de segundo estadio (J2).	10
Pruebas con filtrados de hongos en J2.....	12
Pruebas de patogenicidad de los hongos seleccionados sobre pimiento cv Yolo Wonder	13
Ensayos de control de <i>N. aberrans</i> en pimiento cv. Yolo Wonder	13
Análisis estadístico	15
Microscopía electrónica de arrido (MEB) de huevos parasitados	15
RESULTADOS	16
DISCUSIÓN	26
LITERATURA CITADA.....	30

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Tratamientos en el ensayo de control de <i>N. aberrans</i> en plantas de pimiento cv. Yolo Wonder.	14
Cuadro 2. Porcentaje de parasitismo de huevos de <i>N. aberrans</i> inoculados con hongos aislados de masas de masas de huevos de nematodos agalladores.	17
Cuadro 3. Efecto de la inoculación con <i>F. solani</i> (Fs03) y <i>Penicillium sp.</i> (Pe11) en Índice de agallamiento (IA), necrosis radical (NR), peso seco del follaje (PSF) y de la raíz (PSR), y número de J2/g de raíz (R) en plantas de pimiento cv. Yolo Wonder cultivadas en suelo infestado con <i>N. aberrans</i>	21

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Porcentaje de parasitismo de siete aislamientos de hongos sobre huevos y J2 de *Nacobbus aberrans*: T: testigo sin hongo; Fo: *F. oxysporum*; Fs: *F. solani*; Pe: *Penicillium* sp.; y GL: *Gliocladium* sp. Cada barra representa el promedio de 20 repeticiones correspondientes a los dos ensayos realizados. Para cada estadio columnas con la misma letra no difieren significativamente (Tukey, $P < 0.05$)... 18
- Figura 2. Expresión de síntomas de enfermedad en plantas de pimiento cv. Yolo Wonder inoculadas con *F. oxysporum* (Fo); *F. solani* (Fs) y *Penicillium* sp. (Pe) en comparación con el testigo (T) no inoculado. 19
- Figura 3. Mortalidad de J2 de *N. aberrans* expuestos a los filtrados de hongos. T: testigo, medio sin hongo; Fo: *Fusarium oxysporum*; Fs: *F. solani*; Pe: *Penicillium* sp.; y GL: *Gliocladium* sp. Cada barra representa el promedio de 20 repeticiones. Barras con la misma letra no difieren significativamente (Tukey, $p < 0.05$). 22
- Figura 4. Microscopia electrónica de barrido de huevos de *N. aberrans* parasitados por *F. solani* (Fs03). (A y B) Testigo. (C) Ensanchamiento de la punta de la hifa (similar a un apresorio, *a*) con secreciones adhesivas (*sa*) sobre la superficie (cáscara) del huevo. (D) Infección avanzada del huevo por *F. solani* (Fs03) donde se observan estructuras similares a laminillas desprendiéndose de la cáscara (*lc*) y micelio del hongo esporulando (*e*). (E y F) Fractura (*f*) de la cáscara y conidios germinados (*cg*). (G y H) Huevos con fracturas (*f*) de donde aparentemente están emergiendo hifas (*h*). 24

Figura 5. Microscopia electrónica de barrido de huevos de *N. aberrans* parasitados por *P. janthinellum* (Pe11). (A) Huevo colonizado por el hongo y cubierto por una fina red de material fibrilar (*rmf*) (B) Huevos colapsados y con abundante crecimiento micelial (*m*) mostrando el desprendimiento de fragmentos laminares (*fl*) de la cáscara. (C) Huevo con fracturas (*f*) de donde aparentemente están emergiendo hifas (*h*). (D) Hifas creciendo sobre el huevo y rodeadas por un material probablemente secretado por ellas (*ms*). 25

INTRODUCCIÓN

Entre los patógenos que afectan la producción de cultivos, se encuentran los nematodos fitoparásitos (Briar *et al.*, 2016). *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne y Allen, es considerado como uno de los 10 principales fitonematodos de mayor importancia a nivel mundial (SIAP, 2017; Jones *et al.*, 2013). Las pérdidas económicas que ocasiona oscilan entre 30 y 80 % de la producción total en 84 cultivos, principalmente jitomate (*Solanum lycopersicum* L.), chile (*Capsicum annum* L.) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), entre otros (Villar-Luna *et al.*, 2016; Cabrera-Hidalgo *et al.*, 2014; Manzanilla-López *et al.*, 2002). El control de este nematodo endoparásito sedentario es difícil debido a que la mayor parte de su ciclo de vida la pasa dentro en las raíces de sus hospedantes, donde se encuentra protegido del efecto tóxico de productos químicos y antagonistas microbianos externos (Olivares-Bernabeu y López-Llorca, 2002). Los juveniles de *N. aberrans* tienen hábitos endoparásitos migratorios, mientras que las hembras adultas presentan endoparasitismo sésil e inducen agallas en el sistema radical.

Como en el caso de otros nematodos agalladores, actualmente el control de *N. aberrans* se basa principalmente en el uso de nematicidas químicos fumigantes y no fumigantes, de alto costo económico y ambiental. Una alternativa que puede mitigar los efectos nocivos causados por los fitonematodos y fitoparásitos en general, es el uso de agentes de control biológico (Huang *et al.*, 2015). Existe una amplia diversidad de microorganismos que en la naturaleza funcionan como antagonistas de nematodos, entre los que destacan los hongos y las bacterias. Los antagonistas de nematodos han desarrollado diversos mecanismos físicos y bioquímicos para afectarlos (Stirling, 2014). El grado de supresión de nematodos en condiciones naturales, puede variar

dependiendo de las especies antagonistas presentes en el suelo y de su densidad, con respecto al patógeno (Hallmann *et al.*, 2009). Los hongos antagonistas tienen gran potencial debido a que son habitantes comunes del suelo, presentan una gran diversidad, son abundantes, son capaces de sobrevivir como saprófitos, son fácilmente cultivados *in vitro* y pueden ser producidos masivamente para el manejo de nematodos en campo (Olivares-Bernabeu y López-Llorca, 2002).

Entre los antagonistas con mayor capacidad para disminuir las poblaciones de nematodos están los hongos nematófagos, dado que comparten el mismo nicho ecológico y son los principales enemigos naturales de los nematodos (Yang *et al.*, 2007). Este tipo de hongos son capaces de atacar, matar y digerir nematodos (Verdejo-Lucas *et al.*, 2002). Algunos de ellos son saprofitos facultativos, pueden atacar a otros hongos, colonizar las raíces de plantas o vivir como endófitos. Con base en el mecanismo de interacción con el nematodo se clasifican en: endoparásitos, parásitos oportunistas parásitos de huevos, y depredadores o formadores de trampas (Stirling, 2014; Sikora *et al.*, 2008). Se reconocen cinco tipos de trampas: redes adhesivas, botones adhesivos, anillos constrictores, anillos no constrictores e hifas con ramificaciones adhesivas (Stirling, 2014).

Los hongos endoparásitos para parasitar y causar daño deben ser ingeridos por el nematodo (Peraza-Padilla *et al.*, 2011; Barrón, 1977); en cambio, los hongos formadores de trampas son capaces de producir estructuras de captura especialmente diseñadas para atrapar nematodos vivos en el suelo, matarlos y utilizarlos como alimento. Los hongos oportunistas parásitos de huevos penetran la cubierta del huevo a través de los pequeños poros en la capa vitelina, inducen cambios en la permeabilidad

de la cubierta y colonizan el interior donde el nematodo se está desarrollando (Olivares-Bernabeu y López-Llorca, 2002; Tunlid *et al.*, 1992).

Los hongos controladores de nematodos pertenecen a diferentes órdenes y familias como Ascomycetes (*Orbiliaceae* y *Claviceae*), Basidiomycetes (*Pleurotaceae*), Chytridiomycetes, Oomycetes y Zygomycetes (*Zoopagales*) (Stirling, 2014); se han descrito más de 700 especies. Las especies *Paecilomyces lilacinus* [actualmente conocido como *Purpureocillium lilacinus* (Luangsa-ard *et al.*, 2011)] (Naranjo, 2008; Lara *et al.*, 1996; Freitas *et al.*, 1995; Dossantos *et al.*, 1992); *Arthrobotrys* spp., (Alfaro-Gutiérrez *et al.*, 2011; Dossantos *et al.*, 1992; Al-Hazmi *et al.*, 1982); *Trichoderma* spp., particularmente *T. longibrachiatum* y *T. harzianum* (Morton *et al.*, 2004); *Dactylella ovoparasitica* y *Pochonia chlamydosporia* (Hallman *et al.*, 2009) son las que con mayor frecuencia se reportan como eficaces agentes de control biológico de huevos de nematodos

Con base en estos antecedentes, el objetivo de la presente investigación fue, evaluar el potencial de hongos aislados de huevos de nematodos agalladores en el control de *N. aberrans*

REVISION DE LITERATURA

Género *Nacobbus*

Este género incluye dos especies: *N. dorsalis* y *N. aberrans*. *N. aberrans* conocido como “falso nematodo agallador”, es endémico en Argentina, Bolivia, Chile, Ecuador, México, Perú y los Estados Unidos (OEPP/EPPO, 2009; Manzanilla-López *et al.*, 2002).

Se distribuye ampliamente en EE.UU., México, Inglaterra, Países Bajos y Sudamérica. Es económicamente importante en latitudes templadas y subtropicales de Norte y Sudamérica. El rango de hospedantes incluye al menos 84 especies de diferentes familias botánicas entre las que destacan plantas de importancia económica como amaranto (*Amaranthus* spp.), chile (*Capsicum annum*), jitomate (*Solanum lycopersicum*), melón (*Cucumis melo*), papa (*Solanum tuberosum*), frijol (*Phaseolus vulgaris*) y remolacha (*Beta vulgaris*) (Villar-Luna *et al.*, 2016; Manzanilla-López *et al.*, 2002; Franco *et al.*, 1999). En América Latina se han reportado pérdidas de rendimiento de hasta 65% en papa, 55% en tomate y 36% frijol para México y entre 10-20% para remolacha azucarera en los Estados Unidos (Tovar-Soto *et al.*, 2012; Manzanilla-López *et al.*, 2002; Santa Cruz y Marbán, 1986). Dentro de una misma región las poblaciones de *N. aberrans* generan diferentes respuestas en los hospedantes, lo cual respalda la idea de la existencia de razas (Cabrera-Hidalgo *et al.*, 2014). Todos los juveniles son endoparásitos migratorios y penetran en los ápices de las raíces de las plantas o en las raíces secundarias. La penetración de los juveniles induce agallamiento en remolacha azucarera y raíces de tomate. Sin embargo, las raíces de papa invadidas por juveniles presentan lesiones de color marrón.

Los hábitos de parasitismo del género *Nacobbus* son complejos debido a que incluyen similitudes tanto con los nematodos lesionadores de raíz como *Pratylenchus* spp., y nematodos formadores de agallas como *Meloidogyne* spp. (Eves-Van Den Akker *et al.*, 2014; Holterman *et al.*, 2009; Doucet y Lax, 2005). En este género, todas las etapas juveniles son infectivas, no obstante, su capacidad infectiva disminuye con cada muda. Las hembras jóvenes y machos son vermiformes. El dimorfismo sexual se hace evidente hasta que las hembras maduras penetran en las raíces, se hinchan, se vuelven sedentarias, inducen la formación de agallas en la raíz y agrandan las células (hipertrofia) para formar un sitio de alimentación que consiste de un “sincitio” multinucleado formado por la unión de varias células cuyas paredes celulares se degradan (Manzanilla-López *et al.*, 2002). El sincitio provee a la hembra de los nutrientes necesarios para la producción de huevos que son depositados en una matriz gelatinosa, dentro o fuera de los tejidos de la raíz en la cual se desarrolla el primer estadio juvenil (J1) dentro del huevo, éste muda y da origen al juvenil J2, que al eclosionar penetra a la raíz. Los siguientes estadios J3 y J4 pueden seguir moviéndose intracelularmente, salir o entrar de la raíz, pero con cada muda se reduce su actividad hasta su madurez. La hembra se aloja cerca del cilindro vascular e induce la formación del sincitio y desarrollo de agallas, mientras que la distribución del macho se restringe a la corteza radical. Los juveniles migratorios, se mueven dentro de los tejidos de la raíz provocando cavidades y lesiones, proceso durante el cual se alimentan de las células del hospedante.

El manejo *N. aberrans* se realiza principalmente con nematicidas fumigantes como Telone II y no fumigantes como Aldicarb, oxamyl, y Fenamifos (Pintor-Malacara, 2010).

Control biológico de nematodos fitopatógenos

El control biológico se define como la disminución de la densidad de inóculo o de la actividad causante de la enfermedad de un patógeno en su estado activo o dormante, por uno o más organismos, que se logra de manera natural o a través de manipulación del ambiente, el hospedante, el antagonista o por la introducción incrementada de uno o más antagonistas (Bautista-Calles *et al.*, 2008).

El control biológico si bien puede ser efectivo utilizado de manera aislada, es mucho más recomendable combinarlo con otros métodos de control para reducir la incidencia y la severidad de la enfermedad (Zavaleta-Mejía, 1999). En la actualidad, es uno de los principales componentes en el manejo integrado de cultivos (Huang *et al.*, 2015). Para que una práctica de control biológico sea efectiva debe utilizar agentes que no sean patógenos para plantas, animales y el humano, tener buena habilidad competitiva para reducir o suprimir eficientemente las poblaciones de nematodos por debajo del nivel crítico, contar con elevada tasa reproductiva, capacidad de adaptación a diferentes tipos de suelo y capacidad de sobrevivir en condiciones adversas (Sun *et al.*, 2006).

Para desarrollar un producto para el control biológico es necesario cumplir con los siguientes pasos: 1) aislamiento e identificación de los organismos con potencial como agentes de control biológico; 2) manipulación ecológica del medio ambiente del suelo para favorecer el crecimiento del antagonista; 3) elucidación de mecanismos de parasitismo e infección; y 4) exploración para el desarrollo de productos comerciales (Hallmann *et al.*, 2009).

Hongos parásitos de nematodos

Entre los antagonistas con mayor capacidad para disminuir las poblaciones de nematodos están los hongos nematófagos, puesto que se encuentran en el mismo nicho ecológico y son los principales enemigos naturales de los nematodos, por lo que pueden controlar la presencia de quistes, huevos y hembras (Yang *et al.*, 2007).

Los hongos nematófagos son microorganismos con la capacidad atacar, matar y digerir nematodos (Verdejo-Lucas *et al.*, 2002). Algunos de ellos son saprofitos facultativos, pueden atacar a otros hongos, colonizar las raíces de plantas o vivir como endófitos. Con base en el mecanismo de interacción con el nematodo se clasifican en: endoparásitos, parásitos oportunistas, y depredadores o formadores de trampas (Stirling, 2014; Sikora *et al.*, 2008). Se reconocen cinco tipos de trampas: redes adhesivas, botones adhesivos, anillos constrictores, anillos no constrictores e hifas con ramificaciones adhesivas (Stirling, 2014).

Los hongos endoparásitos tienen la desventaja de que necesitan ser ingeridos por el nematodo para que ocurra el parasitismo y causen daño (Peraza-Padilla *et al.*, 2011; Barrón, 1977); en cambio, los hongos formadores de trampas son capaces de producir estructuras de captura especialmente diseñadas para atrapar nematodos vivos en el suelo, matarlos y utilizarlos como alimento. Los hongos oportunistas son parásitos de huevos, sus hifas penetran la cubierta del huevo a través de los pequeños poros en la capa vitelina, inducen cambios en la permeabilidad de la cubierta y colonizan el interior; la hifa crece en la capa adyacente de quitina y lípido, y termina por colonizar el interior

del huevo donde el nematodo se está desarrollando (Olivares-Bernabeu y López-Llorca, 2002; Tunlid *et al.*, 1992).

Se han descrito más de 700 especies de hongos controladores de nematodos pertenecientes a diferentes órdenes y familias como Ascomycetes (*Orbiliaceae* y *Claviceae*), Basidiomycetes (*Pleurotaceae*), Chytridiomycetes, Oomycetes y Zygomycetes (*Zoopagales*) (Stirling, 2014). Las especies de hongos que con más frecuencia se reportan como eficaces agentes de control biológico de huevos de nematodos han sido *Paecilomyces lilacinus* [actualmente conocido como *Purpureocillium lilacinus* (Luangsa-ard *et al.*, 2011)] (Naranjo, 2008; Lara *et al.*, 1996; Freitas *et al.*, 1995; Dossantos *et al.*, 1992); *Arthrobotrys* spp. (Alfaro-Gutiérrez *et al.*, 2011; Dossantos *et al.*, 1992; Al-Hazmi *et al.*, 1982); *Trichoderma* spp., particularmente *T. longibrachiatum* y *T. harzianum* (Morton *et al.*, 2004); *Dactylella ovoparasitica* y *Pochonia chlamydosporia* (Hallman *et al.*, 2009).

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento e identificación de hongos parásitos de nematodos agalladores

Se extrajeron masas de huevos de raíces con síntoma de agallamiento de plantas de tomate infectadas con *Meloidogyne* sp. provenientes de invernaderos y campos del Valle del Fuerte, Sinaloa. Las raíces se cortaron en trozos de 0.5 cm aproximadamente, se lavaron con hipoclorito de sodio (NaClO) a 5% durante 2 min y se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril para quitar el exceso de NaClO. Se colectaron huevos y se depositaron en un tubo Eppendorf con 1.5 ml de agua estéril. De esta suspensión se tomaron alícuotas de 250 µl, se distribuyeron en cajas Petri con Agua-Agar e incubaron por 24 h a 26° C. Las hembras y huevos que mostraron crecimiento micelial se transfirieron individualmente a cajas Petri con Papa-Dextrosa-Agar (PDA) con cloranfenicol al 0.1% (p/v). Posteriormente, de estas cajas se tomaron puntas de hifas que se sembraron en PDA sin antibiótico (Giné *et al.*, 2016; Giné *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2006; Olivares-Bernabeu y López-Llorca, 2002). Se realizaron montajes semipermanentes para la observación y medición de estructuras (micelio, conidios y conidióforos), y con ayuda de las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1972) y Leslie y Summerell (2006) se llevó a cabo la identificación.

Identificación molecular de hongos fitopatógenos

La caracterización molecular solo se realizó para los hongos que mostraron mayor capacidad parasítica en los ensayos *in vitro*. La extracción de DNA se realizó siguiendo el método reportado por Nabor-Romero *et al.* (2018). Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se usaron los iniciadores universales ITS1F (5'-

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA -3') e ITS4R (5' TCCTCCGCTTATTGA TATGC-3'). La mezcla de reacción tuvo un volumen final de 25 µl y contenía: 5 µl de buffer, 2.5µl de MgCl₂, 2 µl de cada oligonucleótido, 0.5 µl de dNTP's (Promega®), 1 µl de ADN genómico (100 ng / µl), 0.2 µl de Taq y 11. 8 µl de agua. Las condiciones de amplificación fueron desnaturalización inicial de 94° C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94° C por 30 s, alineamiento de 55° C por 30 s y extensión de 72° C por 30 s y un ciclo de extensión final de 72° C por 10 min. Los productos amplificados se purificaron para ser secuenciados en el Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM en Cuernavaca, Morelos, México. Las secuencias se analizaron con el software BioEdit y mediante la herramienta Blast del National Center Biotechnology Information (NCBI) se determinó su identidad con secuencias reportadas.

Selección de hongos con potencial parasítico sobre huevos de *N. aberrans*

Preparación del inóculo de los hongos parásitos. De la colonia de cada hongo se tomó un fragmento de alrededor de 1 cm², se depositó en un tubo Eppendorf con 1 ml de agua estéril y se agitó en el vórtex durante 60 s para preparar una suspensión de conidios y se preparó una suspensión conteniendo 1x10³ conidios ml⁻¹.

Obtención de huevos y juveniles de segundo estadio (J2). Se obtuvieron de raíces agalladas de plantas de chile y tomate cultivadas en contenedores infestados con *N. aberrans*. Las raíces se lavaron con agua corriente y se cortaron; bajo el microscopio estereoscopio y con una aguja de disección, se extrajeron manualmente las masas de huevos y se depositaron en un tubo con 1 ml de agua con Cloranfenicol al 0.01% (Villar-Luna *et al.*, 2009). Para disgregar los huevos de las masas se agregó 1 ml de NaClO al

0.53% a la suspensión de masas y se agitó durante 5 min. Posteriormente, se centrifugó por 2 min a 8609 RCF, se desechó el sobrenadante y nuevamente se agregó 1 ml de agua estéril. El paso se repitió hasta eliminar las trazas de NaClO.

La suspensión de huevos se centrifugó durante 2 min a 8609 RCF, se eliminó el sobrenadante, y se agregó 1 ml de NaClO 1.3 %, se agitó por inversión durante 5 min para después centrifugar por 2 min más a las mismas RCF, se desechó el sobrenadante, se añadió 1 ml de agua estéril y se agitó hasta disolver la pastilla; estos pasos se repitieron dos veces más hasta eliminar las trazas de NaClO. Se realizó el conteo de huevos en alícuotas de 50 μ l y se ajustó el volumen de la suspensión hasta obtener la cantidad 25 huevos en 30 μ l de la suspensión en agua destilada estéril.

Para obtener los J2, los huevos se incubaron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 h en cajas Petri sobre mallas con papel filtro y agua estéril. Los juveniles obtenidos se concentraron en una suspensión cuyo volumen se ajustó para obtener el número de J2 por ml necesario para realizar los ensayos (Villar-Luna *et al.* 2009).

Pruebas de parasitismo. En la cavidad de un portaobjetos excavado se vaciaron 30 μ l de agua destilada estéril conteniendo 25 huevos y a continuación se adicionaron 25 μ l de una suspensión de 1×10^3 conidios ml^{-1} del hongo a probar. Los portaobjetos se mantuvieron dentro de una cámara húmeda a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 6 días, al cabo de los cuales se registró el porcentaje de huevos parasitados. En cada repetición se registró tanto el número total de huevos como el número de los parasitados; con estos datos se calculó el porcentaje de huevos parasitados.

Se probaron 22 aislamientos de hongos, cada uno con cuatro repeticiones y el ensayo se repitió una vez más. Con los aislamientos de hongos que mostraron un parasitismo mayor a 80 % en la prueba previamente descrita, se establecieron dos ensayos uno para huevos y otro para J2 siguiendo la misma metodología del ensayo anterior, excepto que en estos ensayos se tuvieron 10 repeticiones por tratamiento y cada ensayo se repitió una vez más.

Pruebas con filtrados de hongos en J2

Con la finalidad de conocer si los filtrados de los cultivos de hongos poseían algún efecto tóxico sobre el nematodo, se realizaron las pruebas con aquellos hongos que destacaron por su parasitismo sobre juveniles. Los hongos se cultivaron en matraces con medio líquido Papa – Dextrosa, durante 20 días a temperatura ambiente (26 ± 1 °C) y en agitación constante (Bhat y Wani, 2012). Posteriormente, el contenido del matraz se filtró al vacío primero utilizando filtros de papel Whatman No. 4 y después a través de membranas de 0.45 μm de apertura y 47 mm de diámetro.

Con el filtrado de cada hongo se establecieron 10 repeticiones y los testigos fueron el medio líquido sin hongo y otro con agua estéril. Cada repetición consistió de una cavidad del portaobjetos en la que se colocaron 50 μl de filtrado y 10 μl de una suspensión de nematodos conteniendo 25 J2. Los portaobjetos se mantuvieron a temperatura del laboratorio durante 72 h y se realizaron observaciones a las 12, 24 y 48 h. A las 72 h se registró el número de nematodos inmóviles (Bhat y Wani, 2012). Posteriormente se extrajo el filtrado y se agregaron 30 μl de colorante vital Rojo Neutro al 0.001 % a la muestra, para discriminar entre los J2 vivos y muertos, debido a que los organismos vivos su estructura interna se tiñen de color rojo, particularmente el intestino.

A continuación, se colocaron en cámara húmeda por 72 h a temperatura ambiente. Finalmente, se registró el número de nematodos teñidos (vivos) y no teñidos (considerados como muertos) y se calculó el porcentaje de mortalidad. El experimento se repitió dos veces.

Pruebas de patogenicidad de los hongos seleccionados sobre pimiento cv Yolo Wonder

Las pruebas se realizaron para aquellos aislamientos que presentaron el mayor parasitismo sobre huevos y J2. Las semillas se germinaron en charolas germinadoras con 20 g de vermiculita (AGROLita®) y Peat Moss (marca FLX. PROMIX®) mezclados en proporción 1:1. Las plántulas con dos hojas verdaderas se trasplantaron en macetas conteniendo 100 g suelo estéril (una plántula por maceta) y se mantuvieron en cámara de crecimiento a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, con un fotoperiodo 12 h luz y 12 h oscuridad. El riego se realizó cada tercer día con agua estéril y semanalmente se fertilizó con solución nutritiva (1 g L^{-1} de Nitrofoska®). Se realizaron tres inoculaciones con 3 ml de una suspensión de 1×10^6 conidios ml^{-1} por planta; la primera, una semana antes del trasplante, la segunda un día previo al trasplante y la tercera a los 15 días después del trasplante a las macetas. El tamaño de muestra para cada tratamiento fue de 15 plantas. Durante 30 días se hicieron observaciones para registrar la presencia de algún síntoma y el porcentaje de plantas muertas. El ensayo se repitió una vez más.

Ensayos de control de *N. aberrans* en pimiento cv. Yolo Wonder

Se realizaron tres ensayos, en el primero se utilizó suelo infestado con *N. aberrans* sin mezclar con arena estéril y en los otros dos se mezcló suelo infestado y arena en una

proporción 1:1. Las plantas de pimiento obtenidas como se describió con anterioridad, se trasplantaron en macetas conteniendo 250 g de suelo infestado o una mezcla de 125 g de suelo infestado y 125 g de arena estéril. Se utilizaron los aislamientos de hongos que no mostraron patogenicidad en pimiento y la inoculación se realizó de la manera descrita con anterioridad. En el Cuadro 1 se muestran los tratamientos probados.

Cuadro 1. Tratamientos en el ensayo de control de *N. aberrans* en plantas de pimiento cv. Yolo Wonder.

No	Descripción	Clave
1	Suelo infestado con <i>N. aberrans</i>	N
2	Suelo infestado con nematodo e inoculado con <i>Fusarium solani</i>	N+Fs03
3	Suelo infestado con nematodo e inoculado con <i>Penicillium</i> sp.	N+Pe11
4	Suelo estéril inoculado con <i>Fusarium solani</i>	Fs03
5	Suelo estéril inoculado con <i>Penicillium</i> sp.	Pe11
6	Suelo estéril	T

Para cada tratamiento se establecieron 10 macetas con dos plantas y se mantuvieron bajo las condiciones mencionadas con anterioridad. A las 6 semanas después del trasplante (DDT) se registró: el índice de agallamiento radical de acuerdo a la escala propuesta por Daulton y Nusbaum (1961); el número de J2 por g de raíz (Cristóbal *et al.*, 2006); la necrosis radical con una escala arbitraria de 1 a 4 (donde 1= 0 – 10 % de raíces necrosadas, 2= 11 – 25 % de raíces necrosadas, 3= 26 – 50 % de raíces necrosadas y 4= Más del 50 % de raíces necrosadas); y el peso seco de la parte aérea y de la raíz.

Análisis estadístico

Para cada una de las variables registradas se verificó que los datos cumplieran con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza antes de realizar el análisis de varianza. Cuando éste indicó diferencias significativas entre tratamientos se procedió a realizar la comparación de medias con la prueba Tukey ($\alpha=0.05$). Se utilizó el programa estadístico R versión 3.5.1.

Microscopía electrónica de barrido (MEB) de huevos parasitados

Alrededor de 1000 huevos de *N. aberrans* contenidos en 1 ml de agua estéril se inocularon con 1000 μ l de una suspensión de 1×10^3 conidios ml^{-1} del hongo; 4 días después se fijaron con glutaraldehído, a 2.5 % por 24 h. Al cabo de este tiempo se realizaron dos enjuagues con solución buffer por 10 min. Posteriormente se deshidrataron gradualmente con alcohol etílico (30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % y 100 %) por 30 min en cada concentración. Enseguida los nematodos fueron secados mediante punto crítico de CO_2 (SONDRI -780A simple critical point dryer). Los especímenes se colocaron sobre un portaobjeto y se cubrieron con una película de oro/paladio (80/20) por 90 s (Fine Coat, ion sputter JFC 1100). Finalmente, los nematodos se observaron al microscopio electrónico de barrido marca JEOL, modelo JSM-6390 y se tomaron fotografías digitales con el programa MEB: SEM Control User Interface, versión 8.3.

RESULTADOS

Aislamiento de hongos parásitos de nematodos agalladores.

De las raíces procesadas se obtuvieron 22 aislamientos: 16 correspondieron al género *Fusarium*, de los cuales siete se identificaron como *F. solani* y dos como *F. oxysporum*; tres fueron identificados como *Gliocladium* sp.; dos como *Penicillium* sp.; y uno como *Trichoderma* sp. (Cuadro 2).

Selección de hongos con potencial parasítico sobre huevos de *N. aberrans*.

De los 22 aislamientos de hongos probados destacó *Gliocladium* sp. (GL14) con 100% de parasitismo de huevos (Cuadro 2), seguido de *Penicillium* sp. (Pe11) y *Gliocladium* sp. (GL13 y GL16) con 97 %. Los aislamientos *F. oxysporum* (Fo10) y *Penicillium* sp. (Pe15) parasitaron 93 % de los huevos, *F. solani* (Fs03) 83 % y *F. oxysporum* (Fs07) 81 %.

Cuadro 2. Porcentaje de parasitismo de huevos de *N. aberrans* inoculados con hongos aislados de masas de masas de huevos de nematodos agalladores.

Tratamiento	Aislamiento	Porcentaje de parasitismo
GL14[§]	<i>Gliocladium</i> sp.	100 %
Pe11	<i>Penicillium</i> sp	97 %
GL13	<i>Gliocladium</i> sp.	97 %
GL16	<i>Gliocladium</i> sp.	97 %
Fo10	<i>Fusarium oxysporum</i>	93 %
Pe15	<i>Penicillium</i> sp.	93 %
Fs03	<i>F. solani</i>	83 %
Fo07	<i>F. oxysporum</i>	81 %
F08	<i>Fusarium</i> sp.	63 %
Fs12	<i>F. solani</i>	59 %
Fs06	<i>F. solani</i>	57 %
Fs04	<i>F. solani</i>	48 %
Tr09	<i>Trichoderma</i> sp.	50 %
F20	<i>Fusarium</i> sp.	25 %
F22	<i>Fusarium</i> sp.	24 %
Fs05	<i>F. solani</i>	7 %
F21	<i>Fusarium</i> sp.	4 %
F19	<i>Fusarium</i> sp.	3 %
Fs01	<i>F. solani</i>	3 %
F17	<i>Fusarium</i> sp.	2 %
F18	<i>Fusarium</i> sp.	2 %
Fs02	<i>F. solani</i>	1 %
T(-)	Sin hongo	0 %

[§]El número corresponde a la clave con la que se registró el aislamiento.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos con los hongos seleccionados, el mayor porcentaje de huevos parasitados se obtuvo con los aislamientos Fo10 (89 %) y Fs03 (86 %), Fo07 (84 %) y Pe11 (75 %), en comparación con los tratamientos Pe15 (51 %), GL16 (49 %) y GL13 (46 %). En el parasitismo de J2 destacaron los tratamientos Fo10 (91 %) y Fs03 (90 %), Fo07 (86 %) y Pe11 (78 %) y Pe15 (53 %) (Fig. 1). Con base en los resultados obtenidos, los aislamientos Fo10, Fs03, Fo07 y Pe11 fueron seleccionados para realizar las pruebas de patogenicidad en pimiento.

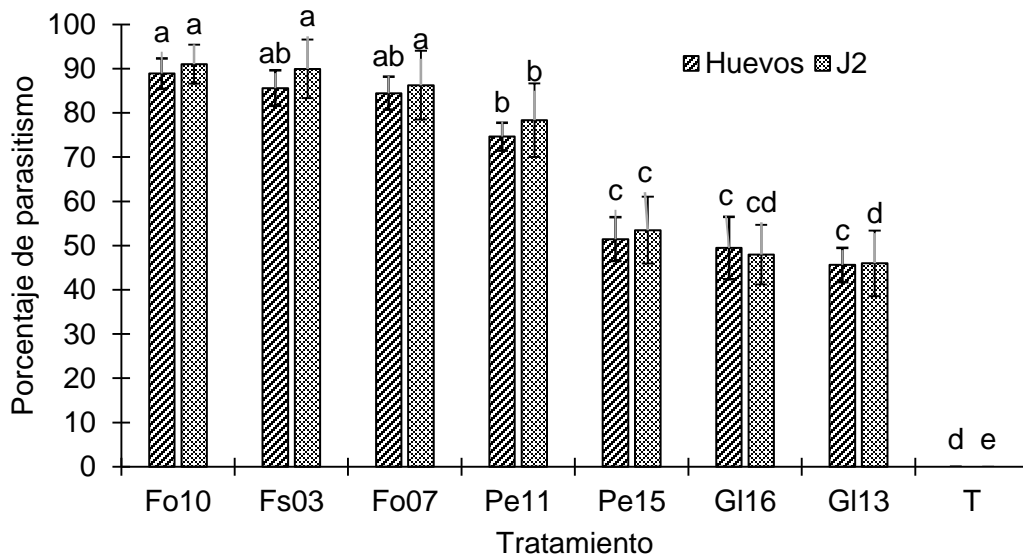


Figura 1. Porcentaje de parasitismo de siete aislamientos de hongos sobre huevos y J2 de *N. aberrans*: T: testigo sin hongo; Fo: *F. oxysporum*; Fs: *F. solani*; Pe: *Penicillium* sp.; y GL: *Gliocladium* sp. Cada barra representa el promedio de 20 repeticiones correspondientes a los dos ensayos realizados. Para cada estadio barras con la misma letra no difieren significativamente (Tukey, $P < 0.05$).

Identificación molecular de los hongos parásitos de nematodos

La comparación de las secuencias obtenidas con la base de datos del NCBI-BLAST permitió confirmar la identidad de *F. oxysporum* (Fo10 y Fs07), *F. solani* (Fs03) y *Penicillium* sp. (Pe11) que correspondió a la especie *P. janthinellum*.

Pruebas de patogenicidad en pimiento cv Yolo Wonder.

De las cuatro cepas inoculadas (Fo10, Fs03, Fo07 y Pe11), los hongos Fo07 y Fo10, ambos identificados como *Fusarium oxysporum*, se comportaron como fitopatógenos provocando la muerte del 100 % de las plantas, mientras que con Fs03 y Pe11 las plantas no mostraron síntomas (Fig. 2). Los aislamientos Fs03 y Pe11 que no indujeron enfermedad fueron seleccionados para los ensayos de control de *N. aberrans* en pimiento.

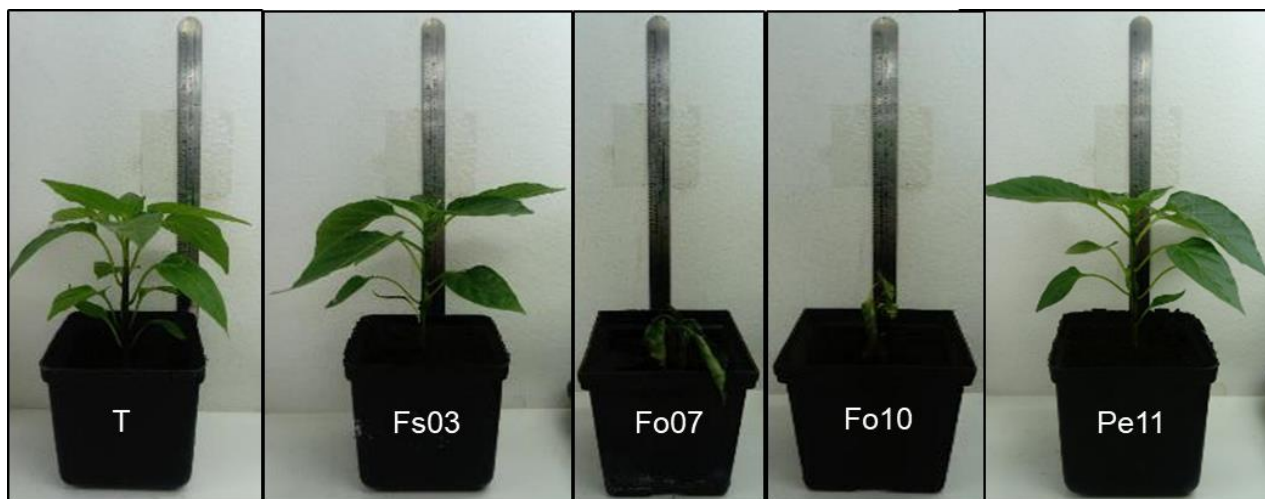


Figura 2. Expresión de síntomas de enfermedad en plantas de pimiento cv. Yolo Wonder inoculadas con *F. oxysporum* (Fo); *F. solani* (Fs) y *Penicillium* sp. (Pe) en comparación con el testigo (T) no inoculado.

Ensayos de control de *N. aberrans* en pimiento cv. Yolo Wonder.

Solamente con *P. janthinellum* (N+Pe11) se redujo de manera significativa ($p \leq 0.05$) y consistente el agallamiento radical (de 9 a 49 %) y el número de J2 (de 35- 56 %) de *N. aberrans* en comparación con las plantas expuestas sólo al nematodo (N). En las plantas inoculadas con *F. solani* (N+F_s03) únicamente en dos de los ensayos hubo una reducción significativa ($p \leq 0.05$) de 12-26 % y de 16-41 % en el agallamiento radical y el número de J2, respectivamente. En cuanto al necrosamiento radical, solo en el primer ensayo se registró una reducción significativa de 34-55 % en los tratamientos N+F_s03 y N+Pe11, respectivamente, en comparación con el tratamiento N. En general no se observó un efecto consistente de promoción de crecimiento de las plantas (peso seco de la raíz y del follaje) cuando se inocularon sólo con los hongos o con la combinación hongo-nematodo (Cuadro 3).

Cuadro 3. . Efecto de la inoculación con *F. solani* (Fs03) y *P. janthinellum* (Pe11) en plantas de pimiento cv. Yolo Wonder cultivadas en suelo infestado con *N. aberrans*.

	IA	NR	PSF (g)	PSR (g)	J2/g R
Primera evaluación					
T	0.00 ±0c	1.00 ±0b	0.76 ±0.19a	0.30 ±0.1a	0.00 ±0d
Fs03	0.00 ±0c	1.00 ±0b	0.70 ±0.05a	0.28 ±0.03a	0.00 ±0d
Pe11	0.00 ±0c	1.00 ±0b	0.75 ±0.08a	0.31 ±0.07a	0.00 ±0d
N	86.25 ±1.62a	2.35±1.0a	0.29 ±0.02b	0.25 ±0.04a	865 ±99a
N+Fs03	85.50 ±0.89a	1.55 ±0.8b	0.28 ±0.07b	0.27 ±0.06a	727 ±88b
N+Pe11	78.50 ±4.67b	1.05 ±0.15b	0.29 ±0.04b	0.23 ±0.04a	376 ±49c
Segunda evaluación					
T	0.00 ±0d	1.00 ±0a	0.50 ±0.11a	0.30 ±0.04a	0.00 ±0d
Fs03	0.00 ±0d	1.00 ±0a	0.43 ±0.06a	0.25 ±0.06abc	0.00 ±0d
Pe11	0.00 ±0d	1.00 ±0a	0.46 ±0.06a	0.26±0.03ab	0.00 ±0d
N	71.18 ±3.99a	1.5 ±0.70a	0.20 ±0.03b	0.19 ±0.05c	1745 ±126a
N+Fs03	62.44 ±6.42b	1.05 ±0.16a	0.23 ±0.04b	0.20 ±0.04bc	1020 ±34b
N+Pe11	36.3 ±7.35c	1.4 ±0.65a	0.26 ±0.05b	0.21 ±0.05bc	802 ±10c
Tercera evaluación					
T	0.00 ±0c	1.00 ±0b	0.27 ±0.04b	0.07 ±0.02a	0.00 ±0c
Fs03	0.00 ±0c	1.00 ±0b	0.40 ±0.04a	0.12 ±0.03a	0.00 ±0c
Pe11	0.00 ±0c	1.00 ±0b	0.36 ±0.06a	0.10±0.03a	0.00 ±0c
N	94 ±7.10a	1.30 ±0.70a	0.11 ±0.02c	0.09 ±0.30a	1604 ±171a
N+Fs03	69.50 ±6.00b	1.20 ±0.16ab	0.11 ±0.02c	0.10 ±0.11a	1491 ±116a
N+Pe11	68.75 ±5.37b	1.15 ±0.65ab	0.13 ±0.03c	0.10 ±0.02a	1043 ±167b

Índice de agallamiento (IA); necrosis radical (NR); peso seco del follaje (PSF); peso seco de la raíz (PSR); número de J2/g de raíz (R); testigo sin nematodo ni hongo (T); suelo infestado con *N. aberrans* (N); inoculación con *F. solani* (Fs); inoculación con *Penicillium janthinellum* (Pe). Medias representan el promedio de 10 repeticiones, cifras en cada columna seguida por la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey, P ≤ 0.05).

Efecto de los filtrados de los hongos sobre J2.

Después de 72 h de exposición a los filtrados de los hongos, se observó que ninguno de ellos tuvo un efecto nocivo sobre los J2 de *N. aberrans* (Fig. 3).

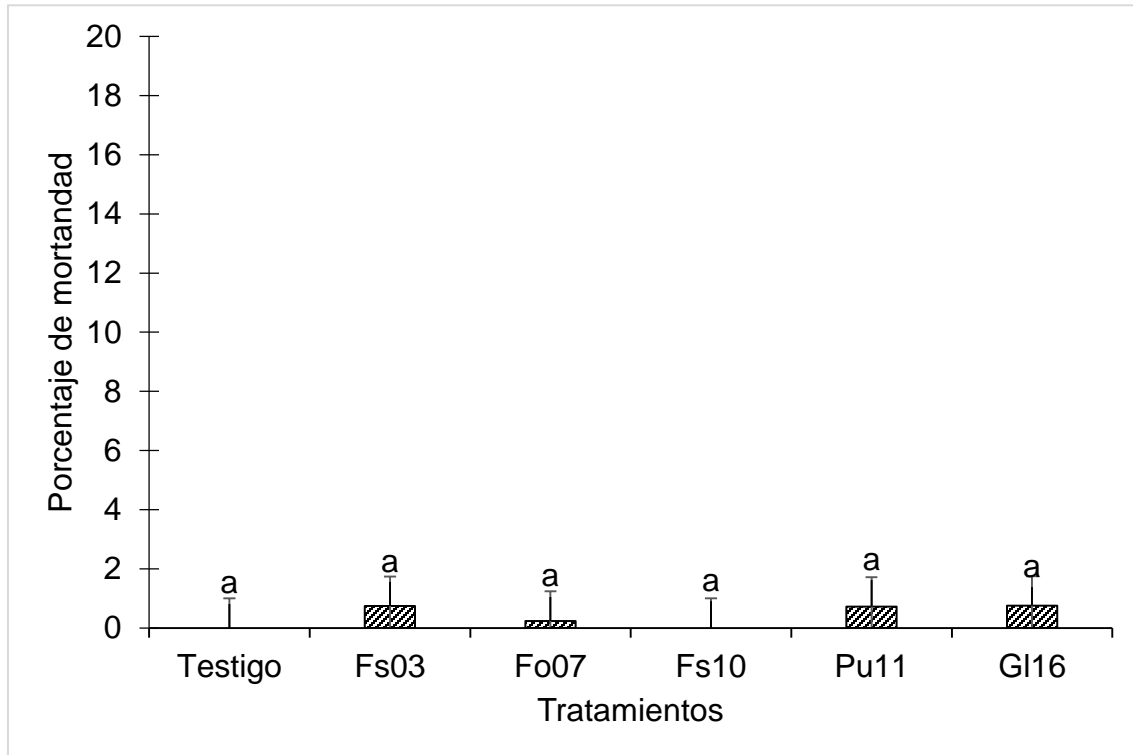


Figura 3. Mortalidad de J2 de *N. aberrans* expuestos a los filtrados de hongos. T: testigo, medio sin hongo; Fo: *F. oxysporum*; Fs: *F. solani*; Pe: *Penicillium* sp.; y GL: *Gliocladium* sp. Cada barra representa el promedio de 20 repeticiones. Barras con la misma letra no difieren significativamente (Tukey, $p < 0.05$).

Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) de huevos parasitados.

Las micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica evidenciaron el parasitismo de los hongos *F. solani* (Fs03) y *P. janthinellum* (Pe11) sobre huevos de *N. aberrans*, observándose la germinación de los conidios, la presencia de secreciones adhesivas a partir de las hifas que colonizaron la superficie del huevo, el recubrimiento total del huevo por el micelio del hongo, así como el rompimiento de la cascara del huevo y la destrucción de éste (Fig. 4 y 5).

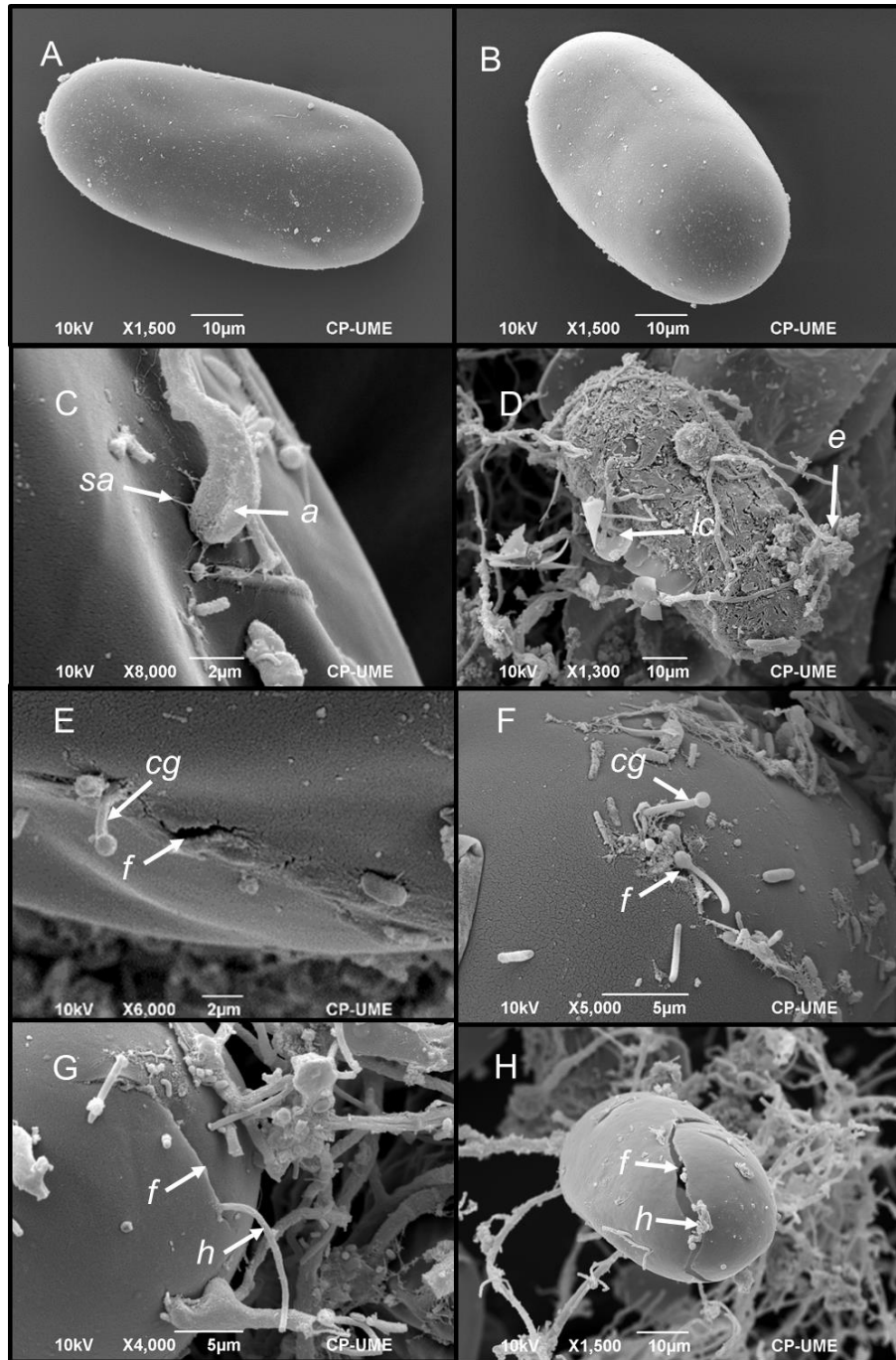


Figura 4. Microscopía electrónica de barrido de huevos de *N. aberrans* parasitados por *F. solani* (Fs03). (A y B) Testigo. (C) Ensanchamiento de la punta de la hifa (similar a un apresorio, a) con secreciones adhesivas (sa) sobre la superficie (cáscara) del huevo. (D) Infección avanzada del huevo por *F. solani* (Fs03) donde se observan estructuras similares a laminillas desprendiéndose de la cáscara (lc) y micelio del hongo esporulando (e). (E y F) Fractura (f) de la cáscara y conidios germinados (cg). (G y H) Huevos con fracturas (f) de donde aparentemente están emergiendo hifas (h).

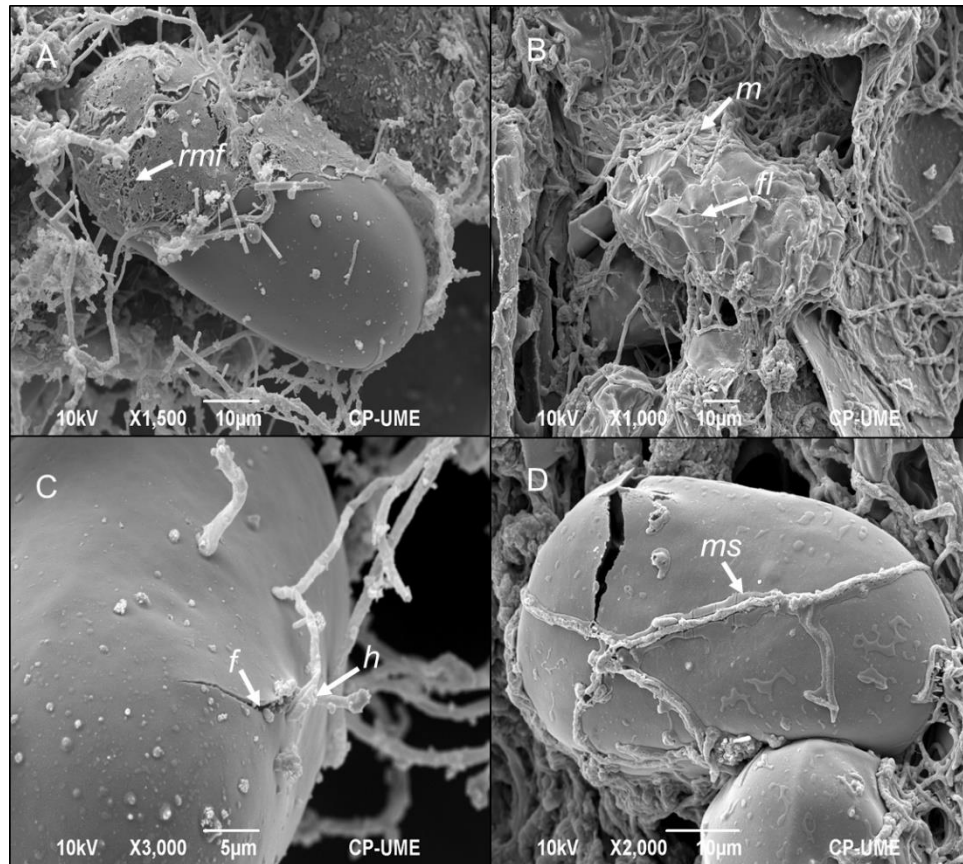


Figura 5. Microscopía electrónica de barrido de huevos de *N. aberrans* parasitados por *P. janthinellum* (Pe11). (A) Huevo colonizado por el hongo y cubierto por una fina red de material fibrilar (*rmf*) (B) Huevos colapsados y con abundante crecimiento micelial (*m*) mostrando el desprendimiento de fragmentos laminares (*fl*) de la cáscara. (C) Huevo con fracturas (*f*) de donde aparentemente están emergiendo hifas (*h*). (D) Hifas creciendo sobre el huevo y rodeadas por un material probablemente secretado por ellas (*ms*).

DISCUSIÓN

Los hongos aislados de raíces agalladas de plantas de tomate infectadas con *Meloidogyne* sp., correspondieron a especies de los géneros *Fusarium*, *Gliocladium*, *Trichoderma* y *Penicillium*. Los primeros tres géneros son los que con mayor frecuencia se han registrado como parásitos de los nematodos agalladores (Aminuzzaman *et al.*, 2018, Sun *et al.*, 2006; Morgan-Jones *et al.*, 1984; Godoy *et al.*, 1983). *Fusarium* ha sido considerado como enemigo natural de nematodos fitopatógeno (Sánchez-Portillo *et al.*, 2016; Peraza-Padilla *et al.*, 2011). Verdejo-Lucas *et al.* (2002) en Almería y Barcelona, España reportaron que aislaron e identificaron diferentes especies de *Fusarium* (*F. solani*, *F. oxysporum* y *Fusarium* sp.) que parasitaron hembras y huevos de *Meloidogyne* spp., lo cual concuerda con los resultados obtenidos en la presente investigación en relación a los aislamientos y ensayos *in vitro* en huevos y J2 de *N. aberrans*. *Gliocladium* mostró menor eficacia, al respecto Godoy *et al.* (1982) mencionan que su parasitismo en huevos de *M. arenaria* fue sólo de 5-12 %. *Trichoderma* también se aisló en la presente investigación, pero se descartó porque en el ensayo de selección solamente parasitó el 50 % de los huevos del nematodo. El género *Trichoderma* se ha considerado como un patógeno importante de huevos de nematodos agalladores; diferentes especies se comercializan por su eficacia como agente de control biológico de diferentes fitopatógenos, debido a que produce metabolitos que inhiben el desarrollo de otros organismos, protege a la rizosfera al establecer una relación simbiótica con la planta, y producen quitinasas y proteasas que degradan las paredes de los huevos, lo que facilita la entrada de las hifas (Del Castillo-Algarate *et al.*, 2014; Morton *et al.*, 2004). Sin embargo, existe una amplia variación en la capacidad antagónica entre los diferentes

aislamientos de *Trichoderma* spp., de modo que no todos son tan eficaces (Hernández-Ochandía *et al.*, 2015; Martínez *et al.*, 2013)

El aislamiento de *Penicillium* aislado de huevos de *Meloidogyne* sp., en el presente estudio, correspondió de acuerdo al análisis molecular a la especie *P. janthinellum*, que es ampliamente conocida por su capacidad de solubilizar el fosfato fijado a las arcillas del suelo y comercializado como biofertilizante (Rojas-Sierra y Moreno-Sarmiento, 2008; Núñez y Acevedo, 2005). También se reconoce como un endófito que produce giberelinas, promueve el crecimiento de jitomate, activa los mecanismos de defensa y protege a las plantas del estrés por factores abióticos (Leitão y Enguita, 2016; Khan *et al.*, 2013). En comparación con los otros géneros de hongos parásitos de nematodos mencionados con anterioridad, es relativamente escasa la información que se encuentra en la literatura acerca del parasitismo de especies del género *Penicillium* en nematodos fitoparásitos. En un trabajo realizado por Utkhede *et al.* (1992), encontraron que la cepa 22 de *P. janthinellum* redujo la reproducción de *Pratylenchus penetrans* en plántulas de manzana cv. McIntosh. En Alabama la supresión de *Meloidogyne* spp. se atribuyó en parte al incremento en las poblaciones de especies de *Penicillium* como *P. janthinellum*, que junto con otros microorganismos del suelo se incrementaron con la siembra de la leguminosa *Mucuna deeringiana* (Vargas-Ayala *et al.*, 2000). Eapen *et al.* (2005) reportaron que *Penicillium digitatum* suprimió hasta en 100% la eclosión de *M. incognita* *in vitro*. El hongo *Penicillium oxalicum* disminuyó la eclosión de juveniles de *Globodera pallida* y *Globodera rostochiensis* en un rango de 30.9% y 98.6% (Martínez-Beringola *et al.*, 2013). En un reporte reciente se mencionó que *P. janthinellum* no parasitó a *Radopholus similis*, *Meloidogyne incognita* ni a *M. exigua* (Varela-Benavides *et al.*, 2017).

La escasa información acerca del parasitismo de *Penicillium* en nematodos, podría deberse a que no se le ha considerado como un potencial agente de control biológico de nematodos o que debido a su similitud morfológica con *Paecilomyces* (= *Purpureocillium*), en algunos reportes de parasitismo sobre nematodos, pudiera haber sido confundido.

De los cuatro aislamientos que tuvieron mayor efectividad parasítica contra huevos y juveniles, dos aislamientos de *F. oxysporum* (Fo07 y Fo10) fueron patogénicos en pimiento cv. Yolo Wonder. La patogenicidad de hongos antagonistas de nematodos en plantas ha sido consignada por algunos investigadores (Ganaie y Khan, 2011; France y Abawi, 1994). Los hongos que no mostraron patogenicidad en las plantas fueron *F. solani* (Fs03) y *P. janthinellum* (Pe11) y ambos destacaron por su parasitismo en los ensayos *in vitro* y protegieron de manera consistente a las plantas de pimiento contra *N. aberrans*.

Los filtrados de los cultivos de *F. oxysporum*, *F. solani*, *P. janthinellum* y *Gliocladium* sp. no tuvieron ningún efecto sobre los huevos y los J2 de *N. aberrans*. La producción de metabolitos tóxicos contra nematodos ha sido consignada para diferentes especies de hongos antagonistas como *Gliocladium fimbriatum* y *G. viren*, que producen gliotoxina y virina, respectivamente (Lian y Zhang, 2014); y *F. oxysporum* cepa 162 que produce metabolitos tóxicos que causan hasta 100 % de mortalidad de los juveniles de *M. incognita* (Hallman y Sikora, 1996). Así mismo, Lian y Zhang (2014) mencionaron que especies del género *Penicillium* producen metabolitos tóxicos a *M. incognita*, *Bursaphelenchus xylophilus* y *Pratylenchus penetrans*. Es importante mencionar que la

producción de metabolitos tóxicos depende del aislamiento, del tipo de medio en el que se crece hongo, el tiempo y las condiciones de incubación (por ejemplo, temperatura y luz), y el pH del medio (Sharma *et al.*, 2014; Peraza-Padilla *et al.*, 2011). Los resultados negativos obtenidos en la presente investigación pudieran deberse a que no se cumplió con alguno de los factores mencionados.

El parasitismo de *F. solani* (Fs03) y *P. janthinellum* (Pe11) sobre los huevos de *N. aberrans* fue evidenciado por las imágenes obtenidas con el microscopio electrónico de barrido (MEB). Las observaciones realizadas sugieren que las hifas de los hongos en contacto con la superficie del huevo desarrollaron apresorios y produjeron secreciones fibrilares adhesivas [Figuras 4 (C y D) y 5 (A)] como ha sido consignado para otros hongos como *Pochonia chlamydosporia* sobre huevos de *Meloidogyne incognita* (Manzanilla-López, 2014) y *Taenia saginata* (Araújo *et al.*, 2009). También se observó el rompimiento de los huevos [Figuras 4 (E-H) y 5 (C y D)] similar al reportado por Leguizamón *et al.* 2001 en huevos de *Meloidogyne* spp. por acción de los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. Los huevos con un alto grado de invasión por el hongo mostraron degradación, deformación y colapso (Figuras 2 (D) y 3 (B)).

CONCLUSION

Los aislamientos Fs03 de *F. solani* y Pe11 de *Penicillium janthinellum* mostraron un alto grado de parasitismo sobre los J2 y huevos de *N. aberrans* en condiciones *in vitro*, no fueron patogénicos en plantas de pimiento y las protegieron contra el agallamiento inducido por del nematodo, así mismo redujeron el número de J2 en las

raíces. Los mejores resultados se obtuvieron con *P. janthinellum* (Pe11), cuyo potencial como agente de control biológico de *N. aberrans*, tendrá que demostrarse en ensayos en campos e invernaderos infestados con el nematodo.

LITERATURA CITADA

Al-Hazmi A. S., D. P. Schmitt, and J. N. Sasser. 1982. The effect of *Arthrobotrys conoides* on *Meloidogyne incognita* population densities in corn as influenced by temperature, fungus inoculum density, and time of fungus introduction in the soil. *Journal of nematology* 14:168–173.

Alfaro-Gutiérrez I. C., P. Mendoza de Gives, E. Liéban, H., M. E. López and V. M. Hernández. 2011. Nematophagous fungi (Orbiliales) capturing, destroying and feeding on the histotrophic larvae of *Haemonchus contortus* (Nematoda: *Trichostrongylidae*). *Revista Mexicana de Micología* 33:29–35.

Aminuzzaman F. M., S. N. Jahan, J. Shammi, A. I. Mitu and X. Z. Liu. 2018. Isolation and screening of fungi associated with eggs and females of root-knot nematodes and their biocontrol potential against *Meloidogyne incognita* in Bangladesh. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 51:1-21.

Araújo J. M., J. V. Araújo, F. R. Braga, R. O. Carvalho, A. R. Silva and A. K. Campos. 2009. Interaction and ovicidal activity of nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Taenia saginata* eggs. *Experimental parasitology* 121:338-341.

- Barnett H. L. and B. B. Hunter. 1972. Illustrated genere of imperfect fungi. 3ra. ed. Edit. Burgess Publishing Company, U.S.A. 217 p.
- Barrón G. L. 1977. The nematode destroying fungi. In Topics in Mycobiology, ed. Inc. Editorial Lancaster Press. Canadian Biological Publications Ltd., Ontario, Canada. 140 p.
- Bautista-Calles J., R. Garcia-Espinosa, J. Pérez-Moreno, E. Zavaleta-Mejía, R. Montes-Belmont and R. Ferrera-Cerrato. 2008. Inducción de supresividad a fitopatógenos del suelo. Un enfoque holístico al control biológico. *Interciencia* 33: 96–102.
- Bhat M. Y., and A. H. Wani. 2012. Bio-activity of fungal culture filtrates against root-knot nematode egg hatch and juvenile motility and their effects on growth of mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) infected with the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 45:1059–1069.
- Booth C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, ed. Kew, Surrey, United Kingdom. 237 p.
- Briar S. S., D. Wichman and G. V. Reddy. 2016. Plant-parasitic nematode problems in organic agriculture. In *Organic Farming for Sustainable Agriculture* Springer, Cham Switzerland. pp. 107-122.
- Cabrera-Hidalgo A. J., G. Valdovinos-Ponce, G. Mora-Aguilera, A. Rebollar-Alviter, y N. Marbán-Mendoza. 2014. Ocurrencia de *Nacobbus aberrans* en cultivos hortícolas del noroeste de Michoacán. *Nematropica* 44:107- 117.
- Del Castillo-Algarate O., C. Collantes-Arana, G. Cox-Trigoso, and J. Wilson-Krugg. 2014.

Efecto de dos especies nativas de *Trichoderma* sobre huevos y juveniles de *Meloidogyne* sp. en condiciones de laboratorio. Revista Científica de Estudiantes de la Universidad Nacional de Trujillo. Recuperado de <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/>.

Cristóbal A.J., P.E. Herrera, O.V. Reyes, S.E. Ruíz, S.J.M. Tun y R.T.R. Celis. 2006. *Glomus intraradices* para el control de *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood en condiciones protegidas. Fitosanidad 14:25-29.

Daulton R.C., and C.J. Nusbaum. 1961. The effect of soil temperature on the survival of the root-knot nematodes *Meloidogyne javanica* and *M. hapla*. Nematologica 6:280–294.

Dossantos M. A., S. Ferraz and J. J. Muchovej. 1992. Evaluation of 20 Species of Fungi from Brazil for Biocontrol of *Meloidogyne incognita* Race-3. Nematropica 22:183–192.

Doucet M., and P. Lax. 2005. El género *Nacobbus* Thorne and Allen, 1944 en Argentina. 6. La especie *N. aberrans* (Thorne, 1935) Thorne and Allen, 1944 (Nematoda: Tylenchida) y su relación con la agricultura. In Anales de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria 59:5-45.

Eapen S. J., B. Beena and K. V. Ramana. 2005. Tropical soil microflora of spice-based cropping systems as potential antagonists of root-knot nematodes. Journal of Invertebrate Pathology 88:218-225.

Eves-van den Akker S., C. J. Lilley, E. G. Danchin, C. Rancurel, P. J. Cock, P. E. Urwin

- and J. T. Jones. 2014. The transcriptome of *Nacobbus aberrans* reveals insights into the evolution of sedentary endoparasitism in plant-parasitic nematodes. *Genome Biology and Evolution* 6:2181-2194.
- France R.A. and G.S. Abawi. 1994. Interaction between *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* f. sp. phaseoli on selected bean genotypes. *Journal of Nematology* 26:467-474.
- Franco J., J. Ramos, R. Oros, G. Maín y N. Ortuño. 1999. Pérdidas económicas causadas por *Nacobbus aberrans* y *Globodera* spp. En el cultivo de la papa en Bolivia. *Revista Latinoamericana de la Papa* 11:40–66.
- Freitas L.G., S. Ferraz, and J.J. Muchovej. 1995. Effectiveness of different isolates of *Paecilomyces lilacinus* and an isolate of *Cylindrocarpon destructans* on the control of *Meloidogyne javanica*. *Nematropica* 25:109–115.
- Ganaie M. A. and T. A. Khan. 2011. Studies on the interactive effect of *Meloidogyne incognita* and *Fusarium solani* on *Lycopersicon esculentum*, Mill. *International Journal of Botany* 7:205-208.
- Giné A., M. Bonmatí, A. Sarro, A. Stchiegel, J. Valero, C. Ornat, C. Fernández and F.J. Sorribas. 2013. Natural occurrence of fungal egg parasites of root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. in organic and integrated vegetable production systems in Spain. *BioControl* 58:407–416.
- Giné A, M. Carrasquilla, M. Martínez-Alonso, N. Gaju and F.J. Sorribas. 2016. Characterization of soil suppressiveness to root-knot nematodes in organic

horticulture in plastic greenhouse. *Frontier in Plant Science* 7:1-15.

Godoy G., R. Rodriguez-Kabana and G. Morgan-Jones. 1982. Parasitism of eggs of *Heterodera glycines* and *Meloidogyne arenaria* by fungi isolated from cysts of *H. glycines*. *Nematropica* 12:111-119.

Hallmann J., K.G. Davies, and R. Sikora. 2009. Biological control using microbial pathogens, endophytes and antagonists. *Root-knot Nematodes*. R. N. Perry, M. Moens and J. L. Starr (eds.). CAB International. Massachusetts, U.S.A. pp. 250-380.

Hallmann J., and R. A. Sikora. 1996. Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil-borne plant pathogenic fungi. *European Journal of Plant Pathology* 102: 155-162.

Hernández-Ochandía D., M. G. Rodríguez, B. Peteira, I. Miranda, Y. Arias y B. Martínez. 2015. Efecto de cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt y Nirenberg sobre el desarrollo del tomate y *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood. *Revista de Protección Vegetal* 30:139-147.

Holterman M., G. Karssen, S. van den Elsen, H. van Megen, J Bakker and J. Helder. 2009. Small subunit rDNA-based phylogeny of the Tylenchida sheds light on relationships among some high-impact plant-parasitic nematodes and the evolution of plant feeding. *Phytopathology* 99:227–235.

- Huang X., K. Zhang, Z. Yu, and G. Li. 2015. Microbial control of phytopathogenic nematodes. In Principles of Plant-Microbe Interactions, ed. In: Lugtenberg B. Springer, Cham, Switzerland. pp. 155–164.
- Jones J. T., A. Haegeman, E. G. Danchin, H. S. Gaur, J. Helder, M. G. Jones, T. Kikuchi, R. Manzanilla-López, J. E. Palomares-Rius, W. M. Wesemael and R. N. Perry. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 14:946–961.
- Khan A. L., M. Waqas, A. R. Khan, J. Hussain, S.M. Kang, S. A. Gilani and B. W. Yun. 2013. Fungal endophyte *Penicillium janthinellum* LK5 improves growth of ABA-deficient tomato under salinity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29: 2133-2144.
- Lara J., N. Acosta, C. Betancourt, N. Vicente y R. Rodríguez. 1996. Control biológico de *Meloidogyne incognita* en tomate en Puerto Rico. *Nematropica* 26:143–152.
- Leguizamón J.E. y B.H. Padilla. 2001. Efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en el control del nematodo del nudo radical del café. *Cenicafé* 52:29-41.
- Leitão A. L., and F. J. Enguita. 2016. Gibberellins in *Penicillium* strains: challenges for endophyte-plant host interactions under salinity stress. *Microbiological research* 183:8-18.
- Leslie J. F. and B. A. Summerell (2006) *The Fusarium Laboratory Manual*. First ed. Blackwell Publishing, Ames, IA, USA. 388 p.

- Lian G. H. and K. Q. Zhang. 2014. Nematode-Toxic Fungi and their Nematicidal Metabolites. (eds) In: Zhang KQ., Hyde K. Nematode-Trapping Fungi. Fungal Diversity Research Series. Springer, Dordrecht. pp. 313-375.
- Luangsa-ard J., J. Houbraeken, T. van Doorn, S. B. Hong, A. M. Borman, N. L. Hywel-Jones and R. A. Samson. 2011. *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. FEMS microbiology letters 321:141-149.
- Manzanilla-López R. H., J. Devonshire and E. Ward. 2014. A combined cryo-scanning electron microscopy/cryoplaning approach to study the infection of *Meloidogyne incognita* eggs by *Pochonia chlamydosporia*. Nematology 16:1059–1067.
- Manzanilla-López R. H., M. A. Costilla, M. Doucet, J. Franco, R. N. Inserra, P. S. Lehman, I. Cid del Prado-Vera, R. M. Souza, and K. Evans. 2002. The genus *Nacobbus* Thorne and Allen, 1944 (Nematoda: *Pratylenchidae*): Systematics, distribution, biology and management. Nematropica 32:149-227.
- Martínez-Beringola M. L., T. Salto, G. Vázquez, I. Larena, P. Melgarejo and A. De Cal. 2013. *Penicillium oxalicum* reduces the number of cysts and juveniles of potato cyst nematodes. Journal of applied microbiology 115:199-206.
- Martinez B., D. Infante y Y. Reyes. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Revista de Protección Vegetal 28:1-11.
- Morgan-Jones G., J. F. White and R. Rodriguez-Kabana. 1984. Fungal parasites of *Meloidogyne incognita* in an Alabama soybean field soil. Nematropica 14:93-96.
- Morton C. O., P. R. Hirsch and B. R. Kerry. 2004. Infection of plant-parasitic nematodes

by nematophagous fungi - a review of the application of molecular biology to understand infection processes and to improve biological control. *Nematology* 6: 161–170.

Nabor-Romero O, M. Silva-Valenzuela, R. I. Rojas-Martínez RI y R. Garza-García. 2018. First report of *Cladosporium cladosporioides*, a fungus that causes rot in zapote mante fruits in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36:356-362.

Naranjo R. P. 2008. Manejo biológico de nematodos fitoparásitos con hongos y bacterias. *Tecnología en Marcha* 21:123-132.

Ñústez C. y J. Acevedo. 2005. Evaluación del uso de *Penicillium janthinellum* Biourge sobre la eficiencia de la fertilización fosfórica en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L. var. Diacol Capiro). *Agronomía Colombiana* 23:290-298.

OEPP/EPPO. 2009. *Nacobbus aberrans* Sensu Lato. EPPO Bulletin 39: 376–381.

Olivares-Bernabeu C. M., and L. V. Lopez-Llorca. 2002. Fungal egg-parasites of plant-parasitic nematodes from Spanish soils. *Revista iberoamericana de micología: organo de la Asociacion Española de Especialistas en Micología* 19:104–110.

Peraza-Padilla W., M. Orozco-Aceves, A. Esquivel-Hernández, G. Rivera-Coto y F. Chaverri-Fonseca. 2011. Aislamiento e identificación de hongos nematófagos nativos de zonas arroceras de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana* 22:233–243.

Rojas-Sierra J., y N. Moreno-Sarmiento. 2008. Producción y formulación de prototipos de un biofertilizante a partir de bacterias nativas asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa*). *Revista Colombiana de Biotecnología* 10:50-62.

- Sánchez-Portillo J. F., G. A. Lugo-García, M. Mundo-Ocampo, A. Reyes-Olivas, I. de Ley-Tandingan y J. Ole-Becker. 2016. Búsqueda y aislamiento de hongos nematófagos vs *Meloidogyne* spp. en el Norte de Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7:1829–1839.
- Santa Cruz U.H. y M.N. Marban. 1986. Respuesta del cultivo de alegría *Amaranthus hypochondriacus* a niveles iniciales de infestación del nematodo *Nacobbus aberrans*. In En: Primer Seminario Nacional Del Amaranto, ed. Chapingo. México. pp. 193–203.
- Sharma A., S. Sharma and M. Dalela. 2014. Nematicidal activity of *Paecilomyces lilacinus* 6029 cultured on Karanja cake medium. *Microbial Pathogenesis* 75:16-20.
- SIAP, Servicio De Información Agroalimentaria y Pesquera. 2017. Atlas Agroalimentario 2017. pp. 231.
- Sikora R.A., L. Pocasangre, A. zum Felde, B. Niere, T. T. Vu and A. A. Dababat. 2008. Mutualistic endophytic fungi and in planta suppressiveness to plant parasitic nematodes. *Biological Control* 46:15–23.
- Stirling G. R. 2014. Nematophagous fungi and oomycetes. In biological control of plant-parasitic nematodes. *Encyclopedia of life sciences* 10:101–156.
- Sun M. H., L. Gao, Y. X. Shi, B. J. Li and X. Z. Liu. 2006. Fungi and actinomycetes associated with *Meloidogyne* spp. eggs and females in China and their biocontrol potential. *Journal of Invertebrate Pathology* 93:22-28.
- Tovar-Soto A., G. Medina-Canales y R. Torres-Coronel. 2012. Distribución, incidencia y

- alteraciones histológicas de una nueva enfermedad en betabel (*Beta vulgaris* L.) causada por el falso agallador *Nacobbus aberrans*, en el Valle de Tepeaca, Puebla, México. *Nematropica* 42:191–197.
- Tunlid A., J. Hans-Börje and B. Nordbring-Hertz. 1992. Fungal Attachment to Nematodes. *Mycology Research* 96:401–412.
- Utkhede R. S., T. C. Vrain and J. M. Yorston. 1992. Effects of nematodes, fungi and bacteria on the growth of young apple trees grown in apple replant disease soil. *Plant and Soil* 139:1-6.
- Vargas-Ayala R., R. Rodríguez-Kábana, G. Morgan-Jones, J. A. McInroy and J. W. Kloepper. 2000. Shifts in soil microflora induced by velvetbean (*Mucuna deeringiana*) in cropping systems to control root-knot nematodes. *Biological Control* 17:11-22.
- Varela-Benavides I., J. Durán-Mora and T. Guzmán-Hernández. 2017. Evaluación in vitro de diez cepas de hongos nematófagos para el control de *Meloidogyne exigua*, *Meloidogyne incognita* y *Radopholus similis*. *Tecnología en Marcha* 30:27-37.
- Verdejo-Lucas S., C. Ornat, F. J. Sorribas and A. Stchiegel. 2002. Species of root-knot nematodes and fungal egg parasites recovered from vegetables in Almería and Barcelona, Spain. *Journal of nematology* 34:405–408.
- Villar-Luna E., O. Gómez-Rodríguez, R. I. Rojas-Martínez, and E. Zavaleta-Mejía. 2016. Presence of *Meloidogyne enterolobii* on Jalapeño Pepper (*Capsicum annuum* L.) in Sinaloa, Mexico. *Helminthologia* 53:155–160.

- Villar-Luna E., B. Reyes-Trejo, R. I. Rojas-Martínez, O. Gómez-Rodríguez, A. M. Hernández-Anguiano and E. Zavaleta-Mejía. 2009. Hypersensitive response in foliage of chili pepper CM-334 resistant to *Phytophthora capsici* infected by *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 39:143–155.
- Yang Y., E. Yang, Z. An and L. Xingzhong. 2007. Evolution of nematode-trapping cells of predatory fungi of the Orbiliaceae based on evidence from rRNA-encoding DNA and multiprotein sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:8379–8384.
- Zavaleta-Mejía E. 1999. Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. *Terra* 17:201–207.