

Capacidad quitinolítica de hongos aislados de suelos agrícolas infestados con el nematodo nodulador (*Meloidogyne* spp.) en Puerto Rico¹

Marisol Dávila², Nelia Acosta³, Carlos Betancourt⁴
y José Negrón⁵

J. Agric. Univ. P. R. 83(3-4):189-199 (1999)

RESUMEN

Con el propósito de identificar microorganismos con potencial para el control del nematodo nodulador, *Meloidogyne incognita*, se determinó la capacidad quitinolítica de la micoflora asociada a este nematodo en suelos agrícolas de los pueblos de Adjuntas, Barranquitas, Jayuya y Maricao, Puerto Rico. De un total de 74 hongos aislados, 19 especies mostraron actividad quitinolítica in vitro: *Trichoderma* sp., *T. harzianum*, *Gliocladium roseum*, *Paecilomyces lilacinus*, *P. marquandi* (Tipo I, II y III), *Diheterospora chlamydosporia*, *Acremonium fusidioides*, *Myrothecium verrucaria*, *M. roridum*, *Chaetomium globosum*, *Metarrhizium anisopliae*, *Penicillium melinii*, *P. purpurogenum*, *P. simplicissimum*, *P. thomii*, *Scopulariopsis* sp., y *Aspergillus fumigatus*. El pH, textura y temperatura de los suelos fue similar en todas las localidades. La variación por localidad en el contenido de materia orgánica, humedad relativa y elementos del suelo (contenido de fósforo, potasio, calcio, magnesio y manganeso) aparentemente afectó la distribución de especies de hongos. Estos organismos tienen gran potencial como biocontroladores de nematodos, ya que la mayoría se han encontrado asociados a huevos, larvas y hembras de *Meloidogyne* spp. y *Heterodera* spp.; son endémicos de las áreas; y poseen gran capacidad quitinolítica.

ABSTRACT

Chitinolytic capacity of fungi isolated from agricultural soils infested with the root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) in Puerto Rico

In order to identify microorganisms with potential for the control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*, the chitinolytic capacity of the mycoflora associated with the nematode was determined in agricultural soils in the municipalities of Adjuntas, Barranquitas, Jayuya and Maricao,

¹Manuscrito sometido a la junta editorial el 4 de diciembre de 1992.

²Catedrática Auxiliar, Colegio Regional de la Montaña, Depto. Tecnología Agrícola, Call Box 2500, Utuado, PR 00641-2500.

³Investigadora (retirada), Departamento de Protección de Cultivos.

⁴Catedrático, Departamento de Biología, UPR Recinto de Mayagüez, Apartado 9030, Mayagüez, PR 00681.

⁵Científico Ambiental, Environmental Protection Agency (EPA), Atlanta, Georgia.

Puerto Rico. Out of 74 fungal isolates, 19 showed chitinolytic capacity *in vitro*: *Trichoderma* sp., *T. harzianum*, *Gliocladium roseum*, *Paecilomyces lilacinus*, *P. marquandi* (Types I, II and III), *Diheterospora chlamydosporia*, *Acremonium fusidioides*, *Myrothecium verrucaria*, *M. roridum*, *Chaetomium globosum*, *Metarrhizium anisopliae*, *Penicillium melinii*, *P. purpurogenum*, *P. simplicissimum*, *P. thomii*, *Scopulariopsis* sp. and *Aspergillus fumigatus*. Soil pH, texture and temperature were similar in all localities. The variation among localities in organic matter content, relative soil humidity and soil elements (phosphorus, potassium, calcium, magnesium and manganese) affected the distribution of fungi species in each locality. These organisms have great potential as nematode biocontrol agents since most of them have been found associated with eggs, larvae and females of *Meloidogyne* spp. and *Heterodera* spp. They are endemic to the area and have good chitinolytic capacity.

Key words: Biological control, soil fungi, root-knot nematode, chitin degradation, nematode eggs

INTRODUCCION

Meloidogyne spp. (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 causa pérdidas considerables en la agricultura de Puerto Rico y otros países (Román y Acosta, 1984). En Centro América se informan pérdidas en producción de 5 a 15% en guineo, 10 a 50% en cucurbitáceas y más de 10% en hortalizas (Pinochet, 1987). Dichas pérdidas en producción varían entre 25% y 50% de la producción de pequeños agricultores (Taylor y Sasser, 1983). En Puerto Rico, el nematodo nodulador es la especie de mayor distribución en áreas agrícolas, afectando la mayoría de los cultivos de importancia económica.

Se han usado diversos métodos de combate de este patógeno, siendo los nematicidas muy efectivos. No obstante, son muy costosos, tienen un efecto detrimental en el ambiente, son muy tóxicos y tienen efectos mutágenos y carcinógenos en el hombre.

Como alternativa al control químico se ha evaluado el potencial de agentes biocontroladores en el manejo de los nematodos (Jatala, 1985). Entre éstos hay hongos, bacterias, protozoarios, insectos y nematodos depredadores (Taylor y Sasser, 1983).

Los hongos atrapadores o depredadores parasitan y devoran nematodos de vida libre. Hay además, hongos que son parásitos obligados y oportunistas facultativos que colonizan los quistes y huevos de nematodos fitoparasíticos (Morgan-Jones y Rodríguez-Kábana, 1985). Otros producen metabolitos tóxicos o sustancias estimuladoras que pueden alterar la fisiología del nematodo (Jatala, 1986).

Catastros micológicos de los nematodos nodulador y de quiste, *Globodera* spp., *Heterodera* spp. y *Meloidogyne* spp., demuestran que algunas especies presentes en zonas templadas habitan con más frecuencia en regiones tropicales (Morgan-Jones y Rodríguez-Kábana, 1987). Muchos de esos hongos tienen propiedades quitinolíticas o ca-

pacidad de degradar la quitina, complejo proteínico presente en la capa media de la pared del huevo del nematodo. Estudios de hongos asociados con hembras y quistes jóvenes de *Heterodera glycines* demostraron que *Gliocadium roseum*, *Myrothecium verrucaria* y *Verticillium lecanii* poseen actividad quitinolítica (Ownley-Gintis et al., 1983). *Verticillium leptobactrum*, *V. lamellicola*, *Codinea heteroderae*, *Thielavia terricola*, *Chaetomium indicum*, *Gliocadium roseum* y *Stagonospora heterodeae* también poseen actividad quitinolítica (Godoy et al., 1982).

La capacidad de algunos hongos del suelo para degradar quitina está íntimamente relacionada con su habilidad para parasitar huevos de *M. incognita*. Esto sirvió de base para este estudio, realizado en varios municipios de Puerto Rico, donde se identificó la micoflora asociada al nematodo nodulador en suelos agrícolas y se determinó su capacidad para degradar quitina y su potencial para parasitar huevos de *Meloidogyne* spp.

MATERIALES Y METODOS

Se tomaron muestras al azar en suelos infestados con el nematodo nodulador, *Meloidogyne incognita*, en los municipios de Adjuntas, Barranquitas, Jayuya y Maricao, Puerto Rico, en siembras de café, guineo y repollo. En cada muestra, compuesta de cinco submuestras de 100 g cada una, se tomaron datos de pH, temperatura y humedad relativa del suelo. Para medir el pH y la humedad relativa del suelo se usó un potenciómetro manual (Kelway Soil Tester). La temperatura se tomó en las primeras seis pulgadas de suelo, con un termómetro de suelo. Se determinó la textura, contenido de materia orgánica y elementos del suelo utilizando los métodos convencionales. Los hongos se aislaron del suelo por dilución en serie (Klein y Klein, 1970) usando un amortiguador fosfatado esterilizado como diluyente.

Se tomó 0.1 ml de cada dilución por muestra y se vertió en un plato de Petri con agar de quitina (AQ) (Godoy et al., 1982), rosa de Bengala al 1% y sulfato de estreptomycin al 0.05%. Se incluyeron cinco repeticiones por dilución. Los cultivos se incubaron a 28°C por cinco a siete días. Los organismos que mostraron degradación del medio fueron transferidos a agar de papa y dextrosa (APD) para su purificación e identificación utilizando las siguientes claves taxonómicas: Barnett y Hunter (1987); Bisset (1984); Brown y Smith (1957); Domsch et al. (1980); Rifai (1969); Ramírez (1982); y Thom y Church (1926). La degradación de quitina se caracterizó por la presencia de un área clara o translúcida debajo o alrededor de las colonias de hongos en el AQ.

Los hongos ya identificados se sembraron por separado en cuatro platos de Petri con AQ y APD para obtener datos morfológicos y de cre-

cimiento. Los mismos se mantuvieron a 28°C tomándose medidas de crecimiento a los 2, 4, 8 y 12 días. Se midió el diámetro de las colonias utilizando dos líneas perpendiculares en cada plato. La medida del crecimiento micelial en AQ, el diámetro del área degradada (índice de degradación) y la apariencia del medio (intensidad de degradación) se utilizaron para comparar la habilidad de cada hongo para la degradación de la quitina. Se incluyó el hongo *Paecilomyces lilacinus*, cepa de Perú, que posee capacidad quitinolítica (Jatala, 1986), como punto de referencia. Los hongos se clasificaron en cuatro grupos (Grupo I al IV), de acuerdo al diámetro del área degradada. A cada grupo se le asignó un número basado en un índice de 3 a 1 a saber:

Grupo I - 1.90 a 8.00 cm (índice 3)

Grupo II - 1.40 a 1.80 cm (índice 2)

Grupo III - 1.00 a 1.30 cm (índice 1)

Grupo IV - No presentaron degradación al momento de la lectura

El diámetro del área degradada se midió a los cuatro días, período en el que la mayoría de los hongos tenía buen crecimiento.

RESULTADOS Y DISCUSION

Entre los géneros de hongos aislado se incluyen varias especies por localidad: 18 de Maricao, 19 de Adjuntas, 18 de Jayuya y 22 de Barranquitas. Solamente 19 especies de hongos mostraron habilidad para degradar quitina: *Paecilomyces lilacinus*, *P. marquandi* (Tipo I, II y III), *Trichoderma* sp, *T. harzianum*, *Diheterospora chlamydosporia* (= *Verticillium chlamydosporium*, Goddard), *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium melinii*, *P. thomii*, *P. purpurogenum*, *P. simplicissimum*, *Metarrhizium anisopliae*, *Myrothecium roridum*, *M. verrucaria*, *Chaetomium globosum*, *Acremonium fusidioides*, *Scopulariopsis* sp. y *Gliocladium roseum*. Estos resultados sugieren que en Puerto Rico hay mayor diversidad de especies de hongos con potencial para controlar el nematodo nodulador que géneros diferentes. Resultados similares fueron obtenidos por Godoy et al. (1983) y Morgan-Jones et al. (1981) con hongos asociados a *Heterodera* spp. y *Meloidogyne* spp. La mayoría de estos géneros están asociados a huevos, larvas y hembras de *Meloidogyne* y *Heterodera* (Carris et al., 1989; Culbreath et al., 1984; Morgan-Jones, et al., 1981; Morgan-Jones y Rodríguez-Kabana, 1985, 1986).

Las especies presentes en más de una localidad fueron: *Trichoderma harzianum* en Maricao, Barranquitas y Jayuya; *Paecilomyces marquandi* III en Adjuntas y Barranquitas; *P. marquandi* II en Jayuya,

Adjuntas y Barranquitas; y *Myrothecium roridum* en Maricao y Barranquitas (Cuadro 1). No obstante, no se observó relación entre las especies de hongos encontradas y los cultivos asociados, ni entre los hongos y las localidades o municipios.

La mayoría de los suelos eran de textura arcillosa aunque se encontraron suelos lómicos. Los suelos en general eran ácidos con pH entre 5.3 y 6.6, con una tendencia a mayor acidez en Maricao (5.3). De acuerdo con Alexander (1977) y Garraway (1984) estos rangos de pH son adecuados para el crecimiento de hongos, la eclosión de los huevos y el desarrollo de las larvas de los nematodos. Posiblemente, la diferencia en géneros y especies por localidad estuvo influenciada por la variabilidad en el pH.

CUADRO 1.—Hongos aislados de la rizosfera de plantas afectadas por el nematodo nodulador (*Meloidogyne spp.*) en cuatro localidades (municipios) en Puerto Rico.

Municipio	Especies
Adjuntas	<i>Diheterospora chlamydosporia</i> <i>Paecilomyces lilacinus</i> <i>P. marquandi II</i> <i>P. marquandi III</i> <i>Penicillium melinii</i> <i>P. simplicissimum</i> <i>Trichoderma sp.</i>
Maricao	<i>Gliocladium roseum</i> <i>Myrothecium roridum</i> <i>Paecilomyces marquandi I</i> <i>Penicillium thomii</i> <i>Scopulariopsis sp.</i> <i>Trichoderma harzianum</i>
Barranquitas	<i>Chaetomium globosum</i> <i>Metarrhizium anisopliae</i> <i>Myrothecium roridum</i> <i>P. marquandi II</i> <i>P. marquandi III</i> <i>Penicillium purpurogenum</i> <i>Trichoderma harzianum</i>
Jayuya	<i>Acremonium fusidioides</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Myrothecium verrucaria</i> <i>P. marquandi II</i> <i>Trichoderma harzianum</i>

Aparentemente la temperatura (20 a 25°C) no tuvo un efecto adverso en la población de hongos ya que fue similar en las cuatro localidades. La humedad relativa del suelo en las diferentes localidades varió (41 a 85%), siendo más baja en Jayuya, lo que posiblemente afectó el número de especies aisladas.

Las muestras de Maricao tuvieron el mayor contenido de materia orgánica, mientras que las de Jayuya y Barranquitas tuvieron un contenido menor. Por otro lado, en Adjuntas el contenido de materia orgánica fue sumamente bajo. Es probable que la diversidad de especies de hongos encontradas por localidad se deba a la diferencia en contenido de materia orgánica entre localidades. Esto no aplica al número de géneros de hongos ya que éste fue similar en las cuatro localidades.

Carris et al. (1989) encontraron que la disponibilidad de nutrimentos orgánicos y la humedad relativa del suelo afectan la micoflora presente en los quistes de *H. glycines*, suprimiéndolos y controlando la cantidad de géneros y diversidad de especies. Los resultados del estudio aquí presentado muestran una tendencia hacia una mayor diversidad de especies de hongos asociados al nematodo nodulador, con una mayor humedad relativa y contenido de materia orgánica en el suelo.

El crecimiento de los hongos *Myrothecium roridum* (Figura 1A y B), *Penicillium melinii*, *Penicillium simplicissimum*, *Penicillium purpurogenum*, *Metarrhizium anisopliae* y *Chaetomium globosum* fue más abundante y vigoroso en APD, produciendo estructuras vegetativas y reproductivas, mientras que en AQ predominaron las estructuras reproductivas. Esto fue lo observado por Godoy et al. (1982) en huevos de *H. glycine* y *M. arenaria*.

Se observaron diferencias en el crecimiento radial de las colonias dependiendo del largo del período de incubación. A los dos días (Figura 2A), todos los hongos crecieron en APD, mientras que en AQ sólo crecieron las especies de *Trichoderma*. A los cuatro días (Figura 2B), todas las especies, excepto *A. fusidioides*, crecieron en AQ, observándose un mayor crecimiento en AQ que en APD de *Trichoderma* sp., *T. harzianum*, *P. lilacinus*, *G. roseum*, *P. marquandi* II y *D. chlamydosporia*. A los ocho días (Figura 2C), *P. lilacinus* y *Scopulariopsis* sp. mantuvieron un crecimiento mayor en AQ que en APD. A los doce días (Figura 2D) se comenzó a observar crecimiento de *A. fusidioides* mientras *P. melinii*, *D. chlamydosporia* y *Metarrhizium anisopliae* aceleraron su crecimiento en AQ.

La translucidez del medio AQ se distinguió fácilmente utilizando como referencia el crecimiento de *P. lilacinus* cepa de Perú que degradó el área alrededor de la colonia (área translúcida) (Figura 1D). En este estudio el área translúcida se observó a partir de los dos días de incubación sólo en el cultivo de *Trichoderma harzianum* (Figura 1C). Godoy et al. (1982) hicieron observaciones similares en estudios de parasi-

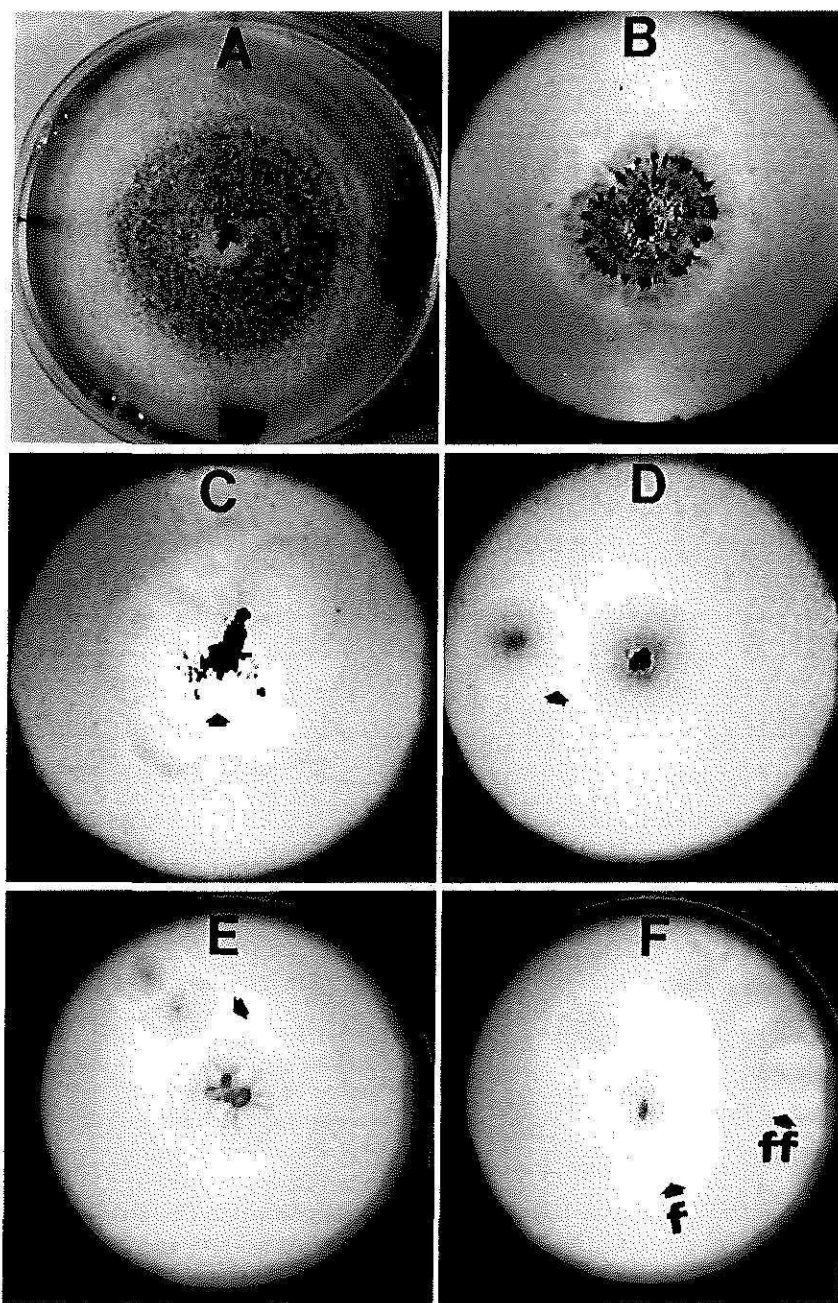


FIGURA 1. Crecimiento de hongos asociados al nematodo nodulador, *Meloidogyne incognita*, en agar de papa y dextrosa (APD) y agar quitina (AQ).

- A) Crecimiento de *Myrothecium roridum* en APD, se observa la producción de micelio blanco y grupos de conidias color verde; B) Crecimiento de *M. roridum* en AQ, se observa menor cantidad de micelio y mayor producción de conidias; C) Crecimiento de *Trichoderma harzianum* en AQ, la flecha indica el área degradada (área clara) por el hongo bajo la colonia; D) Crecimiento de *Paecilomyces lilacinus* (aislado de Perú) en AQ, la flecha indica el área degradada alrededor de la colonia; nótese que en el punto donde se acercan las colonias el área es más intensa; E) Crecimiento de *Paecilomyces marquandi* II en AQ, la flecha indica el área degradada alrededor de la colonia; F) Crecimiento de *P. marquandi* III en AQ, las flechas indican el área degradada alrededor (f) y bajo la colonia (ff).

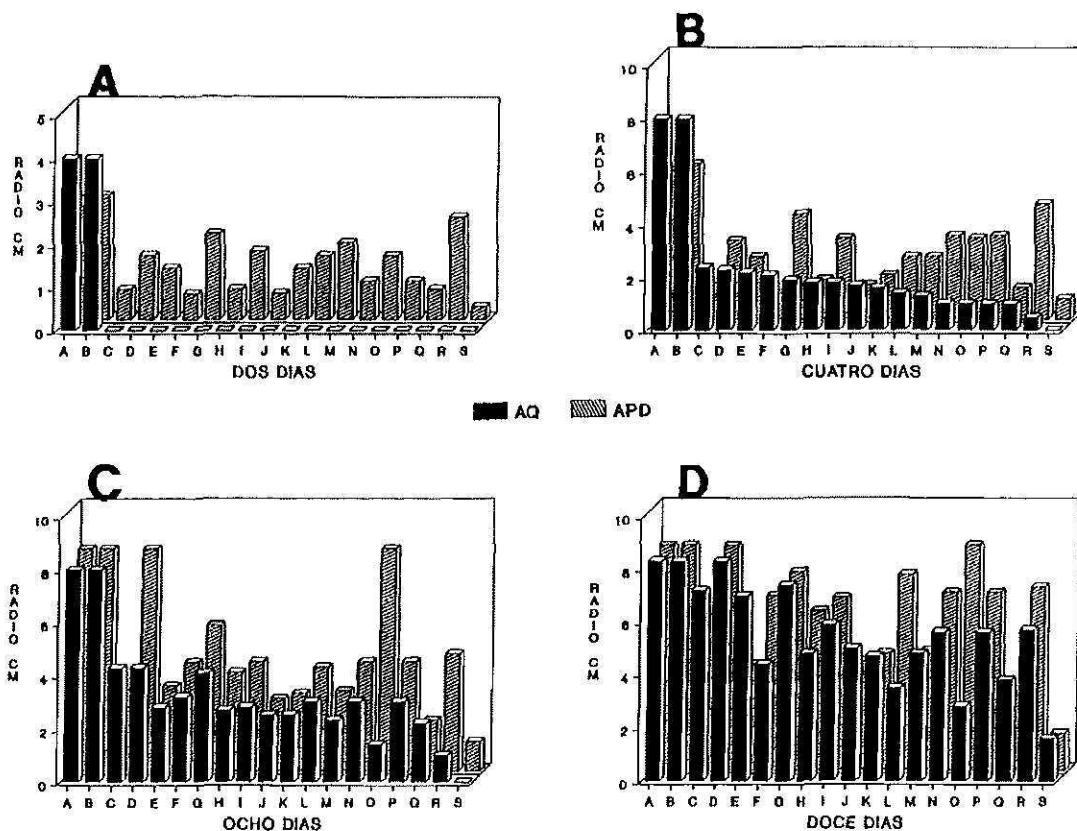


FIGURA 2. Crecimiento de hongos asociados a *Meloidogyne incognita* en agar quitina (AQ) y agar de papa y dextrosa (APD) a los dos (A), cuatro (B), ocho (C) y doce (D) días de observación.

Tratamientos

A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P
Q
R
S

Géneros

Trichoderma harzianum
Trichoderma sp.
Paecilomyces lilacinus
Aspergillus fumigatus
Penicillium melinii
Gliocadium roseum
Penicillium simplicissimum
Paecilomyces marquandi II
Paecilomyces marquandi I
Diheterospora chlamydosporia
Paecilomyces marquandi III
Penicillium purpurogenum
Metarrhizium anisopliae
Myrothecium roridum
Chaetomium globosum
Myrothecium verrucaria
Scopulariopsis sp.
Penicillium thomii
Acremonium fusidioides

tismo de huevo de *H. glycines* y *M. arenaria* por hongos aislados de quistes de *Heterodera glycines*.

Paecilomyces lilacinus, *A. fumigatus*, *P. melinii*, *G. roseum*, *P. marquandi* II, *P. marquandi* I, *D. chlamydosporia*, *P. marquandi* III, *P. purpurogenum*, *M. anisopliae*, *M. roridum*, *M. verrucaria* y *Scopulariopsis* degradaron el medio a partir de los cuatro días, mientras que *Trichoderma* spp. y *C. globosum* lo hicieron a los ocho días de incubación. *Paecilomyces thomii* y *A. fusidioides* degradaron el medio a los 12 días. *Chaetomium* spp. puede tener la habilidad de degradar lentamente la exocutícula de los quistes en el suelo (Godoy et al., 1982; Morgan-Jones et al., 1981).

El área degradada fue diferente entre las especies. Esto es similar a lo que se ha observado en especies de *Chaetomium*, *Codinaea*, *Gliocladium*, *Stagonospora*, *Thielavia* y *Verticillium* (Godoy et al., 1982). Tanto las colonias de *T. harzianum*, mostradas en la Figura 1C, como las colonias de *Trichoderma* sp., *P. melinii*, *G. roseum*, *P. simplicissimum*, *P. purpurogenum*, *M. anisopliae*, *C. globosum*, *A. fusidioides* y *M. roridum*, presentaron un área translúcida bajo el crecimiento de la colonia en platos de Petri con AQ. *Paecilomyces marquandi* II (Figura 1E), *P. marquandi* I, *D. chlamydosporia* y *P. thomii* mostraron translucidez del medio en la periferia de la colonia. Las especies *P. marquandi* III (Figura 1F), *P. lilacinus*, *A. fumigatus*, *Scopulariopsis* sp. y *M. roridum* mostraron translucidez alrededor y bajo la colonia.

La intensidad de degradación de la quitina (mayor translucidez del medio) varió entre las especies. En *T. harzianum*, *P. marquandi* III, *D. chlamydosporia*, *M. anisopliae*, *M. roridum*, *M. verrucaria*, *Scopulariopsis* sp., *C. globosum*, *A. fusidioides* y *P. lilacinus*, el área degradada fue más translúcida que en *Trichoderma* sp., *A. fumigatus*, *P. melinii*, *G. roseum*, *P. simplicissimum*, *P. marquandi* II, *P. marquandi* I, *P. purpurogenum* y *P. thomii*. Estos resultados sugieren que no hay relación entre el índice de degradación y la intensidad de degradación del medio. En los hongos del grupo III con un índice de 1 (área degradada de 1.0 a 1.3 cm) la intensidad de degradación (translucidez) fue mayor que en aquellos con un índice de 3 (área degradada de 1.9 a 8.0 cm) (Cuadro 2).

Los resultados de este estudio y de otros (Godoy et al., 1982), tienden a indicar que las especies de los grupos I y II, que mostraron mayor actividad quitinolítica, poseen gran potencial para parasitar huevos de *Meloidogyne* spp. Particularmente las especies de *Paecilomyces* deben ser incluidas en estudios de control biológico de *Meloidogyne* spp. debido a su gran actividad quitinolítica, alto índice de degradación y por ser endémicas del área. *Paecilomyces lilacinus* ha sido muy efectivo como agente biocontrolador de nematodos noduladores y

CUADRO 2.—Indice de degradación de quitina asignado de acuerdo al área degradada en agar quitina por los diferentes hongos.

Grupo	Género	Indice de degradación (AQ) ^a
I	<i>Trichoderma harzianum</i>	3
	<i>Gliocladium roseum</i>	3
	<i>Penicillium simplicissimum</i>	3
	<i>Penicillium melinii</i>	3
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	3
	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	2
II	<i>Paecilomyces marquandi I</i>	2
	<i>Diheterospora chlamydosporia</i>	2
	<i>Penicillium purpurogenum</i>	2
	<i>P. marquandi II</i>	2
	<i>P. marquandi III</i>	1
III	<i>Myrothecium verrucaria</i>	1
	<i>Metarrhizium anisopliae</i>	1

^aDeterminado a los cuatro días a partir de la inoculación en AQ.

3—zona degradada de 1.9 a 8.0 cm.

2—zona degradada de 1.4 a 1.8 cm.

1—zona degradada de 1.0 a 1.3 cm.

nematodos de quistes en varios lugares (Jatala, 1986). La capacidad de degradación de quitina es probablemente uno de los varios mecanismos involucrados en el proceso de patogenicidad de algunos hongos parásitos de nematodos.

LITERATURA CITADA

- Alexander, M., 1977. Soil Microbiology. John Wiley & Sons., New York, NY. 455 p.
- Barnett, H. L. and B. B. Hunter, 1987. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth edition. Ed. MacMillan Publishing Co., New York, NY. 218 p.
- Bisset, J., 1984. A Revision of the genus *Trichoderma*. I. Section Longibrachiatum sect nov. *Can. J. Bot.* 62:924-31.
- Brown, A. H. S. and G. Smith, 1957. The genus *Paecilomyces* Bainier and its perfect stage *Byssochlamys* Westling. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 40:17-89.
- Carris, L. M., D. A. Glawe, C. A. Smyth and D. I. Edwards, 1989. Fungi associated with populations of *Heterodera glycines* in two Illinois soybean fields. *Mycologia* 81(1):66-75.
- Culbreath, A. K., R. Rodríguez-Kábana and G. Morgan-Jones, 1984. An agar disc method for isolation of fungi colonizing nematodes eggs. *Nematropica* 14(2):15
- Domsch, K. H., W. Gams and Traute-Heidi Anderson, 1980. Compendium of Soil Fungi. Academic Press, London. U.K. 859 p.
- Garraway, E., 1984. Fungal nutrition and physiology. John Wiley & Sons, New York, NY. 259 p.

- Godoy, G., R. Rodríguez-Kábana and G. Morgan-Jones, 1982. Parasitism of eggs of *Heterodera glycines* and *Meloidogyne arenaria* by fungi isolated from cysts of *H. glycines*. *Nematropica* 12(1):111-19.
- Godoy, G., R. Rodríguez-Kábana and G. Morgan-Jones, 1983. Fungal parasites of *Meloidogyne arenaria* eggs in an Alabama soil. A mycological survey and greenhouse studies. *Nematropica* 13(2):201-13.
- Játala, P., 1986. Biological control of plant parasitic nematodes. *Annu. Rev. Phytopath.* 24:453-89.
- Játala, P., 1985. Biological control of nematodes. pp. 303-308. *In: An advance treatise on Meloidogyne*. Vol. I. Biology and Control. Sasser and Carter. North Carolina State Univ. Graphics.
- Klein, R. M. and D. T. Klein, 1970. Research Methods in Plant Science. The Natural History Press. Garden City, New York, NY. pp. 252-53.
- Morgan-Jones, G., B. Ownley-Gintis and R. Rodríguez-Kábana, 1981. Fungal colonization of *Heterodera glycines* cysts in Arkansas, Florida, Mississippi and Missouri soils. 1981. *Nematropica* 11(2):155-63.
- Morgan-Jones, G. and R. Rodríguez-Kábana, 1985. Phytonematode pathology: Fungal modes of action. A perspective. *Nematropica* 15(1):107-14.
- Morgan-Jones, G. and R. Rodríguez-Kábana, 1986. Fungi associated with cysts of potato cyst nematodes in Perú. *Nematropica* 16(1):21-31.
- Morgan-Jones, G. and R. Rodríguez-Kábana, 1987. Fungal biocontrol for the management of nematodes. pp. 94-98. *In Vistas on Nematology*. J. A. Veech and D. W. Dickson (ed.) De León Springs, Florida.
- Ownley-Gintis, B., G. Morgan-Jones and R. Rodríguez-Kábana, 1983. Fungi associated with females and young cysts of *Heterodera glycines* in Alabama soil. *J. Nema.* 15(4):487 (Abstr.).
- Pinochet, J., 1987. Management of plant parasitic nematodes in Central America: The Panama experience. pp. 105-113. *In Vistas on Nematology*. Ed. by J. A. Veech and D. W. Dickson. De León Springs, Florida.
- Ramírez, C., 1982. Manual and Atlas of the Penicillia. Elsevier Biomedical Press, New York, NY. 874 p.
- Rifai, M. A., 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*. 116:1-56.
- Román, J. y N. Acosta, 1984. Nematodos, diagnóstico y combate. Servicio de Extensión Agrícola, Univ. de Puerto Rico. Publ. H-159. 70 p.
- Taylor, A. y J. Sasser., 1983. Biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz. Artes gráficas de la Universidad del Estado de Carolina del Norte. 111 p.
- Thom, C. and M. B. Church, 1926. The Aspergilli. The Williams and Wilkins Co. 272 p.