

OSSERVAZIONI SULL'EFFICACIA E PERSISTENZA DI TRATTAMENTI A BASE DELL'IFOMICETE *POCHONIA CHLAMYDOSPORIA* CONTRO NEMATODI GALLIGENI

A. CIANCIO ⁽¹⁾, L. ROSSO ⁽¹⁾, A. LOFFREDO ⁽²⁾, M. FINETTI-SIALER ⁽³⁾

⁽¹⁾ Istituto per la Protezione delle Piante, CNR, Via G. Amendola 165/A, 70126 Bari
a.ciancio@ba.ipp.cnr.it

⁽²⁾ Dipartimento di Entomologia e Zoologia Agraria, Università degli Studi di Napoli

⁽³⁾ Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata, Università di Bari

RIASSUNTO

Sono state realizzate due prove contro i nematodi galligeni (*Meloidogyne* spp.) utilizzando un isolato dell'ifomicete *Pochonia chlamydosporia*. La prima prova è stata condotta in vaso in condizioni controllate. La seconda ha considerato principalmente la persistenza del fungo nel terreno e nella rizosfera delle piante trattate. Nella prova di lotta i trattamenti hanno previsto la ripetizione ad intervalli di 15 giorni a partire dal trapianto con aggiunta di 5×10^6 clamidospore per litro di terreno. Nella seconda prova per l'analisi della persistenza sono stati applicati protocolli di quantificazione del fungo basati su real-time PCR e sonde molecolari specifiche. I dati sono stati utilizzati per modelli non lineari della dinamica di popolazione degli ospiti e dell'antagonista. Nella prova in vaso il trattamento col fungo ha mostrato la minor densità di uova sulle radici. Il monitoraggio in tempo reale con la PCR ha permesso l'identificazione del fungo fino a quantità pari a 100 ng di biomassa per g di terreno.

Parole chiave: lotta biologica, nematodi, funghi, modellistica, sonde molecolari

SUMMARY

OBSERVATIONS ON THE EFFICACY AND PERSISTENCE OF TREATMENTS BASED ON THE HYPHOMYCETE *POCHONIA CHLAMYDOSPORIA* AGAINST ROOT-KNOT NEMATODES

Two root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) control trials were carried out using an isolate of the hyphomycete *Pochonia chlamydosporia*. The first trial was carried out in pots in controlled conditions. The second considered mainly the persistence of the fungus in soil and in the rhizosphere of the treated plants. In the control trial the treatments were repeated at intervals of 15 days from transplant, adding 5×10^6 chlamydospores per liter of soil. In the second trial, fungus quantitation protocols were applied for persistence analysis, based on real-time PCR and specific molecular probes. Data were used in non linear models of the host and antagonist population dynamics. In the pot trial the treatment with the fungus showed the lowest density of eggs on roots. Real time PCR monitoring showed the identification of the fungus until 100 ng of biomass per g of soil.

Keywords: biological control, nematodes, fungi, modeling, molecular probes

INTRODUZIONE

La lotta biologica contro i nematodi dipende da numerosi fattori fra cui l'efficacia e la persistenza dei microrganismi utilizzati. L'uso di antagonisti naturali si basa su approcci di tipo "inondativo", con l'introduzione di quantità eccedenti quelle in cui essi sono rinvenuti in natura, ovvero su "inoculi", per colonizzare terreno e rizosfera. In entrambi i casi sono necessari strumenti d'identificazione e monitoraggio semplici ed efficaci come metodi molecolari o modelli epidemiologici. Con queste metodologie è possibile valutare l'effetto e

l'attività di molti antagonisti (Arora *et al.*, 1996; Hirsh *et al.*, 2000; Hirsh *et al.*, 2001; Mauchline *et al.*, 2002; Ciancio *et al.*, 2005).

Fra i funghi parassiti di nematodi, *P. chlamydosporia* è stato studiato nel terreno e nella rizosfera (Kerry *et al.*, 1993; De Leij *et al.*, 1993; Hirsh *et al.*, 2000; Viaene e Abawi, 2000). Alcune tecniche sono state elaborate per studiarne le interazioni con i nematodi galligeni (*Meloidogyne* spp.), in diverse condizioni climatiche ed agronomiche (Kerry *et al.*, 1993; Arora *et al.*, 1996; Hirsh *et al.*, 2001). Sono inoltre disponibili metodi molecolari per quantificarne la densità e la prevalenza (Mauchline *et al.*, 2002; Ciancio *et al.*, 2005). L'applicazione di questi strumenti è in grado di far luce sulle condizioni necessarie per la persistenza dell'agente biologico nella rizosfera. E' quindi conveniente approfondirne la conoscenza, per valutare le procedure di lotta biologica e misurare l'efficacia dell'antagonista, ai fini della conservazione dei livelli di fertilità a seguito della colonizzazione del terreno.

In questa nota vengono presentate alcune risultanze sperimentali su un isolato di *P. chlamydosporia* valutato contro nematodi galligeni (*Meloidogyne* spp.) in condizioni controllate. E' stato altresì saggiato, in serra non riscaldata, l'uso della reazione a catena della polimerasi (PCR) per la quantificazione del fungo nel terreno e di modelli non lineari per la valutazione della sua persistenza.

MATERIALI E METODI

La sperimentazione contro nematodi galligeni è stata condotta in serra riscaldata a 26 ± 3 °C, in vasi da 4 litri con terreno sabbioso sterilizzato a vapore. I trattamenti, sei tesi in cinque replicazioni, sono iniziati al trapianto il 10/05/05 su pomodoro cv UC82, suscettibile ai nematodi galligeni. Nella prima tesi si è utilizzato un preparato a base di spore e micelio di *P. chlamydosporia* var *chlamydosporia*, alla dose di 2 ml di preparato, pari a 5×10^6 clamidospore per pianta, arricchito con propaguli del fungo *Arthrobotrys oligospora*. Nella seconda tesi si è somministrato 0,9 ml p.c per pianta di olii vegetali, i cui p.a. appartengono a gruppi quali limonoidi, acidi grassi, flavonoidi ed altri terpenoidi e steroli. La terza tesi ha previsto 0,018 ml p.c. per pianta di estratti di *Azadirachta indica* (Meliaceae). I principi attivi del prodotto includono limonoidi, fra cui triterpenoidi (Azadiractina A). La quarta tesi ha previsto gli estratti di *Quillaja saponaria* (Rosaceae) alla dose di 0,07 ml p.c. $\cdot$ l⁻¹, per cui è riportata un'azione nematocida (Insunza *et al.*, 2001) di saponine, polifenoli e tannini. Per la quinta tesi si è utilizzato oxamyl, con 0,3 ml per vaso di p.c. Per il testimone, inoculato con solo nematodi, si è usato acqua. I trattamenti sono stati effettuati al trapianto, immergendo le radici per 20 min nei diversi prodotti in 500 ml d'acqua, poi somministrata al terreno. Il giorno successivo al trapianto si sono inoculate 10^4 uova di *M. incognita* per vaso. Gli ulteriori due trattamenti sono stati eseguiti al quindicesimo e al trentesimo giorno. Dopo tre mesi si è rilevato il peso fresco di pianta e radici, le densità di uova e larve (J2) nel terreno e delle uova sulle radici e l'indice medio d'infestazione delle radici (IMI, da 0 a 5) (Coolen, 1979; Hussey e Barker, 1973). I risultati sono stati analizzati con il test di Duncan.

Per la persistenza di *P. chlamydosporia*, è stata effettuata una prova a Leverano (Lecce), in una serra non riscaldata coltivata a pomodoro cv Shiren. Il terreno (sabbia 81,6%, limo 14,9%, argilla 3,5%) è risultato naturalmente infestato da *M. incognita* presente in pre-trapianto alla densità di 3274 J2 $\cdot$ 100 cc⁻¹ di terreno. Sono state utilizzate quattro tesi in cinque ripetizioni. Nella prima si è utilizzato il preparato a base di *P. chlamydosporia*, introdotto ogni settimana alla dose di 100 ml (pari a 250×10^6 clamidospore) distribuiti su parcelle di 60 m² con l'impianto d'irrigazione a goccia con ala autocompensante, per 10 settimane, da agosto a dicembre 2005. Per la seconda e terza tesi si è utilizzata la stessa dose, dopo fumigazione con 1,3 dicloropropene alla dose di 200 l $\cdot$ ha⁻¹ e con CH₃Br (50 g $\cdot$ m⁻²). Per il testimone si è

utilizzato terreno non trattato. Sono state misurate le densità delle J2 di *M. incognita* in pretrattamento e ad ottobre e dicembre.

Per la quantificazione del fungo nel terreno si è utilizzata la reazione a catena della polimerasi in tempo reale (RT-PCR), amplificando un frammento del gene VCP1 di *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (GenBank AJ427460), a partire dal DNA totale estratto dal terreno. Il gene, presente in singola copia, codifica una serinproteasi alcalina che varia, a livello d'isolato e secondo l'ospite di provenienza, per via di una specializzazione parassitaria che è specifica per l'ospite (Norton *et al.*, 2003).

Per la misura della densità del fungo nel terreno dei diversi trattamenti, da ogni campione sono stati prelevati 50 g di terreno, filtrati e concentrati fino ad 1/10 del peso originario, utilizzando 0.5 g di concentrato per la quantificazione con PCR. Per l'amplificazione, circa 30 mg di micelio, spore e clamidospore sono stati sospesi in 500 µl di acqua sterile, prelevando, in tre ripetizioni, aliquote da 2×10^6 , 1×10^6 , 5×10^5 , 1×10^5 , 1×10^3 e 1×10^2 ng di biomassa fungina, aggiunte a 0,5 g di terreno. Si è anche estratto il DNA dalla coltura pura. Il DNA totale è stato estratto dal micelio puro e dal terreno con microsfele di vetro (456 µm in diametro) su vortex per 5 min in presenza di buffer d'estrazione (Na_2HPO_4 0.12 M, NaCl 1.5 M, CTAB 2%), centrifugazione a 4 °C per 20 min a 12×10^3 rpm, estrazione cloroformica 1:1 (v/v) del DNA contenuto nel surnatante e precipitazione in presenza di 1:10 (v:v) di Na acetato in 1,5 v di isopropanolo. Il pellet è stato lavato in etanolo al 70%, essiccato a 65°C per 3-5 min e risospeso in acqua nuclesi-free. Il DNA è stato purificato attraverso una mini-colonna di sepharose (Sigma) e usato nell'amplificazione.

Per la PCR sono stati usati i primers For1 (5'GCGCCACATGGTTGAAGAGC 3') e Rev1 (5' TGTACCGCCGTTAATCCAAG 3') posizionati ai nucleotidi 1474 e 1954, e For0 (5'CTCGAGGCTGCCCCACA 3') e Rev0 (5'TGCATGCACTAGGCTCGG 3'), posizionati ai nucleotidi 1681 e 1840. Essi producono due amplificati di 480 e di 159 pb, rispettivamente. Come sonda si è utilizzato un molecular beacon, con all'estremità 5' il gruppo 6-carboxyfluorescein (6-FAM) e al 3' il quencher dabcy1, disegnato per riconoscere il complementare della regione tra i nucleotidi 1748 e 1763 della sequenza AJ427460. I primers sono specie-specifici, mentre la sonda riconosce gli isolati associati a nematodi galligeni caratterizzati da un cambio puntiforme in posizione 1754. I molecular beacons sono sensibili ad un singolo cambio nucleotidico, e l'ibridazione avviene solo se il 100% delle basi corrisponde al DNA bersaglio (Tyagi e Kramer, 1996; Thelwell *et al.*, 2000). Queste caratteristiche diagnostiche hanno potenzialità anche per l'identificazione al livello d'isolato (Ciancio *et al.*, 2005; Finetti-Sialer e Ciancio, 2005).

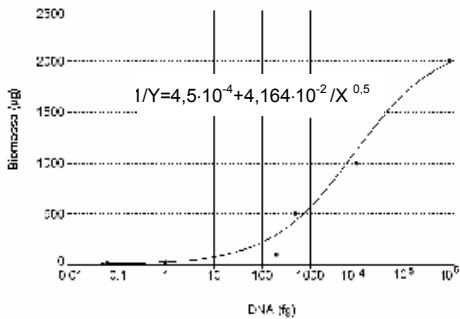
La nested PCR è stata realizzata sul DNA di tutti i campioni, inclusi quelli provenienti dalla coltura pura usati per la costruzione della curva standard, che lega il ciclo soglia (C_t , ciclo di PCR del primo segnale fluorescente positivo) al DNA presente. La prima reazione è stata condotta con 30 cicli d'amplificazione in 25 µl contenenti i seguenti reagenti: dNTPs 200 µM, PCR buffer 1X, primers (*For1/Rev1*) 0,5 µM, MgCl_2 2,5 mM, 1 unità di Taq polimerase (Roche) e 4 µl di DNA (eccetto gli standard a quantità nota). La seconda reazione, col rilevamento della fluorescenza alla fine dell'annealing, è stata condotta utilizzando un thermal cycler con lettura della fluorescenza (Mx3000, Stratagene, USA). La mix di reazione con 200 µM di dNTPs, PCR buffer 1X, primers (*For0/Rev0*) 0,5 µM, MgCl_2 4 mM, 1 unità di Taq polimerasi (Roche), 0,3 µM di sonda ed 1 µl del primo amplificato, è stata tenuta a 95°C per 4 min con 40 cicli successivi a 94 °C per 30 sec, 54 °C per 30 sec e 72 °C per 20 sec.

La funzione standard che lega i C_t ed il DNA è stata costruita con diluizioni di quantità note di DNA (100, 10, 1 e 0,1 ng) estratto dalla coltura pura e misurato con uno spettrofotometro (DU 800, Beckman). Il DNA del fungo nel terreno è stato misurato interpolando la funzione ai

valori di Ct ottenuti durante l'amplificazione dai campioni ignoti e dai controlli interni (terreno + DNA). Per la quantificazione del fungo si è quindi utilizzata la relazione determinata, in precedenza, fra DNA e biomassa (figura 1).

Applicando il modello G di Anderson e May (1981) alla dinamica di popolazione di *P. chlamydosporia*, si è infine valutata la persistenza del fungo nel terreno alla termine della prova.

Figura 1 - Relazione fra quantità di biomassa di *P. chlamydosporia* e DNA corrispondente



RISULTATI

Nella prova in vaso il trattamento con *P. chlamydosporia* e *A. oligospora* ha mostrato la minor densità di uova di *M. incognita* sulle radici, inferiore anche ad oxamyl e testimone. Le uova sulle radici, nei trattamenti con estratti di *A. indica* e *Q. saponaria*, non differivano dal testimone, mentre gli olii hanno mostrato valori prossimi ad oxamyl (tabella 1).

Tabella 1 - Effetto dei diversi trattamenti nei confronti di *M. incognita* ⁽¹⁾

Trattamento	Uova · g di radice ⁻¹ (× 10 ³)	Uova e J2 · 100 ml terreno ⁻¹ (× 10 ³)	Pf/Pi ⁽²⁾	IMI	Peso fresco pianta (g)	Peso bacche (g)	Peso radici (g)
<i>P.chlamydosporia</i> + <i>A. oligospora</i>	13,8 a	35,2 b	1495 ab	4,6 b	151,8 ab	68,5 ab	161 b
Olii vegetali	24,1 ab	45,2 b	1855 abc	4,4 b	158,4 ab	64,6 ab	121 ab
<i>A. indica</i>	36,8 b	24,2 ab	2829 c	3,6 b	156,8 ab	89,2 ab	145 b
<i>Quillaja</i>	34,2 b	43,6 b	2519 bc	4,2 b	107,4 a	21,6 a	118 ab
Oxamyl	20,3 a	4,0 a	921 a	1,4 a	216,4 b	106,2 b	81 a
Testimone	35,1 b	26,4 ab	2494 bc	4,0 b	179,6 b	74,8 ab	126 ab

⁽¹⁾ I dati in colonna con la stessa lettera non differiscono secondo il test di Duncan (P≤0,05).

⁽²⁾ Valore calcolato sulla base del rapporto della popolazione totale rispetto all'inoculo iniziale.

Quest'ultima tesi ha mostrato i valori minimi di carica nel terreno. Ciò è anche confermato dall'IMI e dal minor incremento di popolazione (Pf/Pi). *P. chlamydosporia* ha mostrato densità nel terreno simili al testimone e alle altre tesi, con l'esclusione di oxamyl e di estratti

di *A. indica*. L'incremento di popolazione (Pf/Pi) osservato per il trattamento con *P. chlamydosporia* è risultato inferiore rispetto alle altre tesi, con l'esclusione dell'oxamyl. Gli altri trattamenti non hanno mostrato un Pf/Pi differente dal testimone. Il trattamento con oxamyl ha mostrato i più alti valori di peso fresco e delle bacche, con l'eccezione del peso dell'apparato radicale, che è risultato significativamente inferiore al testimone e a quanto osservato per gli altri trattamenti. Il peso maggiore dell'apparato radicale è stato osservato nel trattamento con *P. chlamydosporia* (tabella 1).

Tabella 2 - Quantità di DNA e presenza di *P. chlamydosporia* nel terreno della prova in serra non riscaldata, misurate mediante nested RT-PCR, nel mese di dicembre

Trattamento	C _t (dR) ^a	DNA _i (ng) ^b	DNA ^c (pg x g terreno ⁻¹)	Biomassa ^d (µg x g terreno ⁻¹)
Testimone	10,6	6,20 x 10 ⁻³	129,1	1461 ± 384
CH ₃ Br + <i>P. chlamydosporia</i>	10,2	8,74 x 10 ⁻³	44,9	1366 ± 306
1,3 dicloropropene+ <i>P. chlamydosporia</i>	9,2	2,04 x 10 ⁻²	105,2	1566 ± 241
<i>P. chlamydosporia</i>	11,0	4,41 x 10 ⁻³	21,5	1177 ± 380

^a Ciclo soglia corrispondente al primo segnale positivo d'amplificazione.

^b Quantità iniziale di DNA (media di tre replicazioni), calcolata come $y = -2,76 \cdot \log(x) + 4.55$

^c Quantità di DNA di *P. chlamydosporia* presente all'origine nel campione.

^d Quantità di *P. chlamydosporia* presente nel terreno proveniente dal campionamento.

Il monitoraggio in tempo reale con i primers *For0/Rev0* e il molecular beacon ha permesso l'identificazione del fungo fino a quantità pari a 100 ng di biomassa del fungo nel terreno. Dall'analisi della relazione fra quantità di DNA iniziale e biomassa, è risultata una relazione di tipo sigmoide ($r^2 = 0,98$; figura 1) che ha permesso, nota la relazione tra concentrazione del DNA negli amplificati ed il Ct, di risalire alla quantità di fungo presente nel campione (figure 2-3).

La nested RT-PCR si è dimostrata molto sensibile per il riconoscimento del fungo dal terreno. La curva standard ($r^2 = 0,99$, figura 2), indica che è possibile rilevare, in modo riproducibile, fino a 1,38 fg di DNA · g di terreno⁻¹ (tabella 2). *P. chlamydosporia* è risultata presente in tutti i campioni, incluso il testimone che è risultato naturalmente infestato e pertanto mostra un contenuto di DNA maggiore. Il fungo è stato rinvenuto in quantità dell'ordine di 10³ µg · g⁻¹ di terreno (tabella 2).

Nelle parcelle trattate solo col formulato si è osservato un indice di moltiplicazione delle J2 (Pf/Pi) inferiore rispetto a quanto riscontrato nelle parcelle trattate con 1,3 dicloropropene (6,7 contro 23,3) e superiore a quanto riscontrato per le parcelle trattate con CH₃Br (0). Viceversa, gli apparati radicali hanno mostrato un IMI di 3,2 leggermente superiore rispetto alle parcelle fumigate (IMI=0,6), mentre nessun danno è stato osservato per le piante allevate in terreno trattato con CH₃Br.

La simulazione di questa relazione col modello G di Anderson e May è stata effettuata sulla base dei tempi intercorsi fra i trattamenti e il campionamento finale. La simulazione ha prodotto, dopo un intervallo di tempo pari a quanto effettivamente trascorso fra il primo e l'ultimo campionamento, valori delle densità di *M. incognita* (746 larve x 100 cc di terreno⁻¹) e di *P. chlamydosporia* (1687 µg x g di terreno⁻¹) compatibili con quelli rilevati (figura 4).

Figura 2 - A) Curva standard fra il DNA ottenuto da quantità note di micelio (quadrati pieni) e il ciclo soglia (C_t) d'amplificazione della PCR. I simboli in chiaro sulla funzione indicano sulle ascisse le quantità di DNA (ottenute dal C_t per regressione) dei campioni terreno cui sono state aggiunte quantità di micelio pari a 1×10^6 ng (a), 5×10^5 ng (b), 1×10^5 ng (c), 1×10^3 ng (d) e 1×10^2 ng (e). B) Curva standard con gli stessi standard (simboli pieni) ed i campioni della prova di Leverano (a = controllo; b = CH_3Br ; c = 1,3 dicloropropene; d = solo *P. chlamydosporia*)

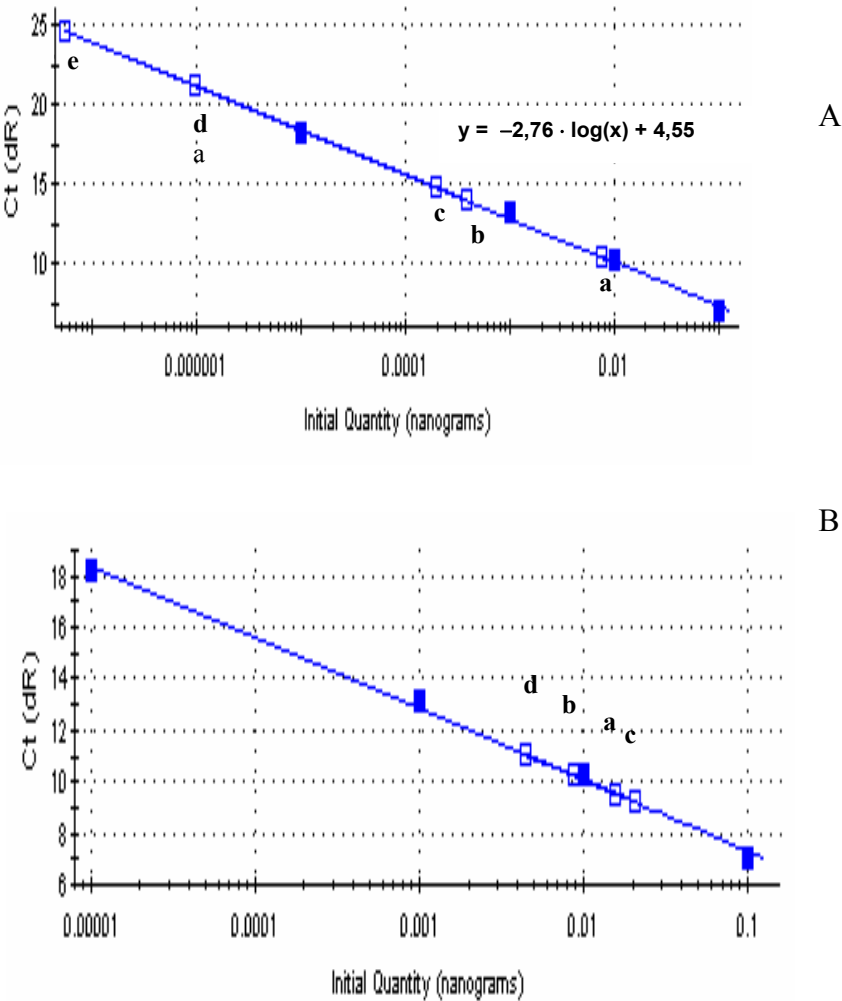


Figura 3 - A) Fluorescenza registrata durante l'amplificazione con PCR del gene VCP1 di *P. chlamydosporia*, da diverse quantità di DNA nello standard (std, ng) e di DNA estratto da terreno con quantità note di micelio (FT). NTC: testimone negativo con acqua. B) Secondo round d'amplificazione con PCR per gli standard ed i campioni provenienti dalla prova condotta in agro di Leverano. Le linee orizzontali indicano il valore minimo del segnale positivo

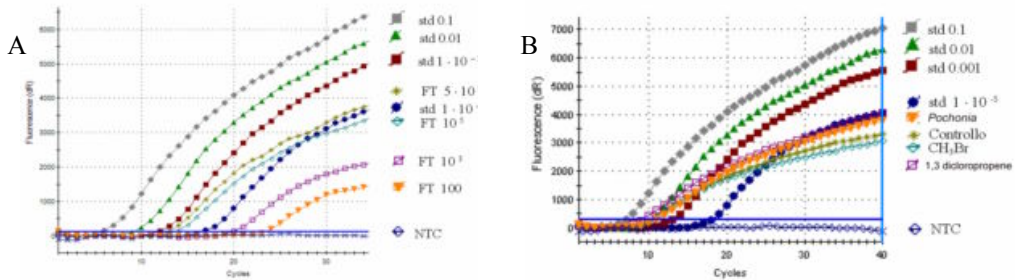
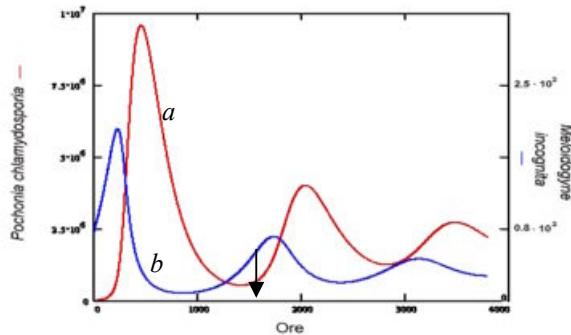


Figura 4 - Simulazione dell'interazione fra *P. chlamydosporia* (a , ng x g di terreno⁻¹) e *M. incognita* (b , J2 x 100 cc di terreno⁻¹). Densità iniziale pari a 3274 uova x 100 cc di terreno⁻¹, di cui 328 parassitate da *P. chlamydosporia*, (J2 = 25% delle uova). Al fungo è stata assegnata la densità iniziale di 8×10^3 ng di biomassa x g di terreno⁻¹. I valori delle costanti sono: $a = 0,325$; $b = 0,32$; $\alpha = 0,02$; $v = 0,055 \cdot 10^{-6}$; $\gamma = 0$; $\lambda = 24$; $\mu = 0,0055$. La freccia indica $t = 1752$ ore



CONCLUSIONI

L'efficacia di formulati a base di *P. chlamydosporia* appare legata alla dose e all'interazione con gli apparati radicali delle piante trattate, osservandosi nelle piante trattate in vaso col fungo una minor densità di uova di *M. incognita* sulle radici (inferiore di un terzo rispetto ad oxamyl) e un apparato radicale più sviluppato (maggiore del 27% rispetto al testimone e del 98% rispetto ad oxamyl). Poche differenze rispetto al testimone sono riscontrabili per gli estratti vegetali, segnalandosi una maggior dimensione degli apparati radicali per *A. indica* ed una minor produzione di bacche per *Q. saponaria*. Un effetto sulle densità delle uova sulle radici è stato inoltre riscontrato per gli olii vegetali. Il monitoraggio con la RT-PCR ha confermato la persistenza del fungo nel terreno, identificato fino a quantità non rilevabili con tecniche tradizionali (Mauchline *et al.*, 2002). Il riconoscimento molecolare, sebbene efficace, risente però degli effetti dovuti alle frazioni organiche sulla purezza dell'estratto o sull'amplificazione (Niemi *et al.*, 2001). La densità di *P. chlamydosporia* ha mostrato valori prossimi, per tutti i trattamenti, indicando facilità di dispersione nel terreno. Per incrementarne

i livelli di prevalenza appare necessario incrementarne le dosi o ricorrere a più trattamenti, su tempi più lunghi. I bassi tassi di moltiplicazione di *M. incognita* riscontrati nel controllo non trattato, inoltre, indicano presenza di altri fattori di controllo della popolazione (tolleranza della pianta ospite e/o altri antagonisti indigeni). La corrispondenza fra i dati osservati e quelli del modello indicano un rapporto densità dipendente fra i due organismi, con fluttuazioni cicliche delle densità.

Si ringrazia il dr M. Binetti per la collaborazione prestata e l'azienda Zecca (Leverano, Lecce) per l'ospitalità.

LAVORI CITATI

- Anderson R.M., May R.M. 1981. The population dynamics of microparasites and their invertebrate hosts. *Philos. Trans. R. Soc. London*, 291, 451-524.
- Arora D.K., Hirsh P.R., Kerry B.R. 1996. PCR-based discrimination of *Verticillium chlamydosporium*. *Mycological Research*, 100, 801-809.
- Ciancio A., Loffredo A., Paradies F., Turturo C., Finetti-Sialer M. 2005. Detection of *Meloidogyne incognita* and *Pochonia chlamydosporia* by fluorogenic molecular probes. *OEPP/ EPPO Bulletin*, 35, 157-164.
- Coolen W. A. 1979. Methods for the extraction of *Meloidogyne* spp. and others nematode from roots and soil. In: Root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). Systematics, biology and control. (Lamberti F. e Taylor C. E. coord), Academic Press, London, 317-329.
- De Leij F.A.A.M., Kerry B.R., Dennehy J.A. 1993. *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* in pot and micro-plot tests. *Nematologica* 39, 115-126.
- Finetti-Sialer M. M., Ciancio A. 2005. Isolate-specific detection of *Grapevine fanleaf virus* from *Xiphinema index* through DNA-based molecular probes. *Phytopathology*, 95, 262-268.
- Hirsh P.R., Mauchline T.H., Mendum T. H., Kerry B.R. 2000. Detection of the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* in nematode-infested plant roots using PCR. *Mycological Research*, 104, 435-439.
- Hirsh P.R., Atkins S.D., Mauchline T.H., Morton O.C., Davies K.G., Kerry B.R. 2001. Methods for studying the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* in the root environment. *Plant and Soil*, 232, 21-30.
- Hussey R. S., Barker K. R. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant disease Reporter*, 57, 1025-1028.
- Insunza V., Aballay E., Macaya J. 2001. *In vitro* nematicidal activity of aqueous plant extracts on Chilean populations of *Xiphinema americanum* sensu lato. *Nematropica*, 31, 47-54.
- Kerry B.R., Kirkwood I.A., De Leij F.A.A.M., Barba J., Leijens M.N., Brookes P.C. 1993. Growth and survival of *Verticillium chlamydosporium* Goddard, a parasite of nematodes in soil. *Biocontrol Science and Technology*, 3, 355-365.
- Mauchline T.H., Kerry B.R., Hirsch P.R. 2002. Quantification in soil and the rhizosphere of the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* by competitive PCR and comparison with selective plating. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1846-1853.
- Niemi R. M., Heiskanen I., Wallenius K., Lindstrom K. 2001. Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *Journal of Microbiological Methods*, 45, 155-165.
- Norton C. O., Mauchline T. H., Kerry B. R., Hirsch P. R. 2003. PCR - base DNA fingerprinting indicates host-relates genetic variation in the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. *Mycological Research*, 107, 198-205.
- Thelwell N., Millington S., Solinas A., Booth J., Brown T. 2000. Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acid Research*, 28, 3752-3761.
- Tyagi S., Kramer F. R. 1996. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology*, 14, 303-308.
- Viaene, N.M.M., Abawi G. S. 2000. *Hirsutella rhossiliensis* and *Verticillium chlamydosporium* as biocontrol agents of the root-knot nematode *Meloidogyne hapla* on lettuce. *Journal of Nematology*, 32, 85-100.