

## Coinoculación y cultivos esterilizados por calor de actinobacterias inhiben la germinación y formación de colonias de esclerocios de *Sclerotium rolfsii*

### Co-inoculation and heat sterilized cultures of actinobacteria inhibit sclerotia germination and colony formation of *Sclerotium rolfsii* sclerotia

Isidro Humberto Almeyda-León<sup>1</sup>, Kenzy Ivveth Peña-Carrillo<sup>1</sup>, J. Isabel López-Arroyo<sup>1</sup>, Ángel Ismael Narváez-Rodríguez<sup>2</sup>, Luis Fernando Armijo-Martínez<sup>2</sup>, Raúl Rodríguez-Guerra<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Campo Experimental General Terán, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Km. 31 Carretera Montemorelos-China, C.P. 67400, General Terán, Nuevo León, México.

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. Av. Pedro de Alba y Manuel L. Barragán S/N, Ciudad Universitaria, C.P. 66450, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

\*Autor para correspondencia: rodriguez.raul@inifap.gob.mx

**Resumen.** En esta investigación se evaluó el efecto de la coinoculación de las actinobacterias M-14 y M-18 y de concentraciones de colonias de éstas esterilizadas por calor, sobre la germinación y desarrollo de colonias a partir de esclerocios del hongo *Sclerotium rolfsii*. Para la coinoculación, cuatro alícuotas de las actinobacterias se depositaron en cajas Petri con agar nutritivo y sobre ellas se colocaron esclerocios. Al tercer y quinto día se determinó el porcentaje de esclerocios que germinaron produciendo hifas y que desarrollaron colonias, respectivamente. Cuatro concentraciones (100, 75, 50 y 25%) de colonias esterilizadas por calor fueron vaciadas a cajas Petri e inoculadas con cuatro esclerocios. A las 48 h se determinó el porcentaje de esclerocios germinados que desarrollaron colonia y éstos se subcultivaron en nuevas cajas Petri conteniendo sólo agar nutritivo; a las 72 h se determinó el porcentaje de esclerocios germinados. En la coinoculación el 100, 100 y 91.7% de esclerocios formaron hifas en el testigo, M-14 y M-18 al tercer día; y el promedio de colonias formadas fue de 100, 0 y 0 para los mismos tratamientos al quinto día. Los esclerocios inoculados en las cuatro concentraciones fueron incapaces de germinar, y al subcultivarse los esclerocios previamente expuestos a la concentración de 25% de M-14 y M-18, sólo germinaron en un 81.25% y 56.25%. Debido a que la cepa M-18 causó el menor porcentaje de germinación, se secuenció el gen

**Abstract.** We evaluated the effects of co-inoculation of the actinobacteria strains M-14 and M-18, as well as heat sterilized colonies of these at different concentrations on the germination and development of colonies from sclerotia of the fungus *Sclerotium rolfsii*. For co-inoculation, four aliquots of the actionobacteria strains were transferred into petri dishes containing nutrient agar. On the third and fifth day, the percentage of sclerotia that germinated producing hyphae and that developed colonies, respectively, was determined. Four concentrations (100, 75, 50 and 25%) of heat sterilized colonies were poured into petri dishes and inoculated with four sclerotia. At 48 h the percentage of germinated sclerotia that developed colony was determined and these were subcultured in new Petri dishes containing only nutrient agar; at 72 h the percentage of germinated sclerotia was determined. In co-inoculation, 100, 100 and 91.7% of sclerotia formed hyphae in the control, M-14 and M-18 on the third day; and the average number of colonies formed was 100, 0 and 0 for the same treatments on the fifth day. The sclerotia inoculated in the fourth concentrations did not grow and when subcultured, the sclerotia previously exposed to 25% of M-14 and M18 germinated only at 81.25 and 56.25%. Because the lowest percentage of germination was obtained with the strain M-18, we sequenced its ribosomal 16S gen. The BLAST analysis allowed us to determine its relationship with three species of the

16S ribosomal, y el análisis BLAST permitió determinar su relación con tres especies de *Streptomyces*. Los resultados demostraron que esclerocios en contacto con las actinobacterias y durante la exposición a colonias esterilizadas por calor inhiben su germinación, que la exposición por 48 h a concentraciones esterilizadas mayores al 25% tiene un efecto fungicida y que la cepa de *Streptomyces* M-18 está relacionada a *S. maritimus*, *S. rochei*, *S. enissocaesilis* y *S. fungicidicus*.

**Palabras clave:** *Streptomyces*, germinación de esclerocios, fungicida, fungistasis, termoestabilidad.

### Introducción

El hongo *Sclerotium rolfsii* es un fitopatógeno habitante del suelo y en México ataca a más de 18 especies de cultivos como sorgo, soya, chile y frijol (Hernández-Jiménez et al., 2004; Hernández-Morales et al., 2018). Este fitopatógeno es capaz de producir gran cantidad de esclerocios capaces de sobrevivir por largos periodos, tiene gran número de plantas hospederas y es de rápido crecimiento (Billah et al., 2017; Kator et al., 2015; Farr et al., 1989; Punja, 1985), lo que hace difícil su control. En las últimas décadas se ha acentuado la búsqueda de microorganismos antagónicos con elevado potencial para ser utilizados en el control biológico de *S. rolfsii*, y diversas especies como *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* (Paramasivan et al., 2019; Maheswari et al., 2002), *Trichoderma* spp. (Bosah et al., 2010; Khattabi et al., 2004) y *Streptomyces* spp. (Singh y Gaur, 2016; Errakhi et al., 2009) se han identificado. De las especies anteriores, *Pseudomonas fluorescens* y *Streptomyces* han mostrado un 100% de inhibición de la germinación de esclerocios de *S. rolfsii*.

Recientemente se han identificado dos cepas (M-14 y M-18) de actinobacterias con elevada actividad antagónica contra *S. rolfsii*, causando hasta el 100% de inhibición del crecimiento de fragmentos de colonias con micelio en coinoculación por sobreposición en las actinobacterias, y de esclerocios durante confrontaciones; además se demostró que tiempos prolongados de exposición del

*Streptomyces* genus. Our results demonstrated that sclerotia in contact with actinobacteria, and during the exposition to heat sterilized colonies inhibit their germination. Also, that a period of 48 h of exposition to sterilized concentrations above 25% have a fungicide effect, and that the *Streptomyces* strain M-18 is phylogenetically related to the species *S. maritimus*, *S. rochei*, *S. enissocaesilis* and *S. fungicidicus*.

**Keywords:** *Streptomyces*, sclerotia germination, fungicide, fungistasis, thermostability.

### Introduction

The fungus *Sclerotium rolfsii* is a soil phytopathogen and in Mexico it attacks more than 18 species of crops such as, sorghum, soybean, chili pepper and beans (Hernández-Jiménez et al., 2004; Hernández-Morales et al., 2018). Sclerotia produced by this phytopathogen are capable to survive over large periods of time, the fungus is fast growing and has a wide range of host plants (Billah et al., 2017; Kator et al., 2015; Farr et al., 1989; Punja, 1985), these characteristics made its control difficult. The search for microorganisms with high potential as biological control agents against *S. rolfsii* increased in the last decades, and several species such as, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* (Paramasivan et al., 2019; Maheswari et al., 2002), *Trichoderma* spp. (Bosah et al., 2010; Khattabi et al., 2004) and *Streptomyces* spp. (Singh y Gaur, 2016; Errakhi et al., 2009) have been identified. From these last species, *Pseudomonas fluorescens* y *Streptomyces* have shown to inhibit 100% of sclerotia germination of *S. rolfsii*.

Recently, two strains (M-14 and M-18) of actinobacteria have been identified with high antagonistic activity against *S. rolfsii*, causing up to 100% inhibition of the growth of fragments of colonies with mycelium in co-inoculation due to simultaneous overlaying in actinobacteria, and of sclerotia during confrontations; moreover, it was demonstrated that the prolonged exposition of this phytopathogen to the two actinobacteria strains caused a fungicide effect (Rodríguez-Guerra et al.,

fitopatígeno a ambas actinobacterias, causan un efecto fungicida (Rodríguez-Guerra *et al.*, 2020). Debido a que de las actinobacterias presentes en suelo el género *Streptomyces* es el más abundante, Rodríguez-Guerra *et al.* (2020) consideran que las cepas M-14 y M-18 pudieran corresponder a este género. En esta investigación se evaluó el efecto de la coinoculación por sobreposición de las actinobacterias M-14 y M-18 y de concentraciones de colonias de éstas esterilizadas por calor, sobre la germinación y desarrollo de colonias a partir de esclerocios del hongo *Sclerotium rolfsii*. Además, se determinó la identidad a nivel de género de la cepa M-18 mediante el análisis del gen 16S. Esto permitirá determinar la capacidad fungicida/fungistática y de termoestabilidad de la actividad antagónica observada de ambas actinobacterias contra esclerocios del fitopatígeno, y la relación genética de la actinobacteria M-18 con especies del género.

### Materiales y métodos

**Cepas utilizadas.** Las cepas de actinobacterias utilizadas fueron la M-14 y M18, y la cepa de *S. rolfsii* fue aislada de frijol, todas utilizadas previamente por Rodríguez-Guerra *et al.* (2020). Durante la investigación, las cepas fueron mantenidas por transferencias en el medio de cultivo agar nutritivo, y los experimentos llevados a cabo se realizaron en este mismo medio.

**Germinación de esclerocios sobre actinobacterias.** Se obtuvo una suspensión de esporas de las cepas M-14 y M-18 a partir de colonias de siete días de edad. Cuatro alícuotas de 20 µL se depositaron en puntos cardinales de cajas Petri; después de permitir su secado se colocó un esclerocio sobre cada una. Seis repeticiones fueron establecidas junto con un testigo sin actinobacterias. A los tres y cinco días se determinó el porcentaje de esclerocios que germinaron formando hifas y que formaron colonias, respectivamente. El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar. Porcentajes abajo de 25, de 26 a 50 y mayores de 51 de esclerocios germinados y que formaron colonia, se consideró que las actinobacterias tienen una actividad antagónica alta, una actividad antagónica moderada y una actividad antagónica baja contra *S. rolfsii*, respectivamente.

Capacidad antagónica de cultivos esterilizados.

2020). Due to the fact that of the actinobacteria present in soil the genus *Streptomyces* is the most abundant, Rodríguez-Guerra *et al.* (2020) proposed that the strains M-14 and M-18 may correspond to this genus. In this research, the effect of the co-inoculation by simultaneous overlaying of actinobacteria M-14 and M-18 and of concentrations of colonies of these sterilized by heat, on the germination and development of colonies from sclerotia of the fungus *Sclerotium rolfsii*, was evaluated. In addition, the identity at the genus level of the M-18 strain was determined by analyzing the 16S gene. This will allow to determine the fungicide/fungistatic capacity and thermostability of the antagonistic activity observed of both actinobacteria against sclerotia of the phytopathogen, and the genetic relationship of actinobacteria M-18 with genus species.

### Materials and Methods

**Strains.** The actinobacteria strains used were M-14 and M18, and the *S. rolfsii* strain was isolated from beans, all previously used by Rodríguez-Guerra *et al.* (2020). During the investigation, the strains were maintained by transfers in the nutrient agar culture medium, and the experiments carried out were carried out in this same medium.

**Sclerotia germination over actinobacteria.** A spore suspension of the strains M-14 and M-18 was obtained from colonies grown for seven days. Then, four aliquots of 20 µL were deposited in the cardinal points of Petri dishes containing nutrient agar; after the colonies were dried, one sclerotium was laid over each point. Six repetitions and a control group without actinobacterias were set. After three and five days, the percentage of sclerotia that germinated producing hyphae and the percentage of sclerotia producing colonies were determined. The experiment was conducted in a completely randomized design. For percentages of sclerotia germination and colony growth below 25, from 26 to 50 and above 51, it was considered that actinobacteria had a high, moderate, or low antagonistic activity against *S. rolfsii*, respectively.

**Antagonistic capacity of sterilized cultures.** To determine the antagonistic capacity of the sterilized cultures, colonies of the actinobacteria strains M-14 and M-18 were inoculated by dispersion on Petri dishes with nutrient medium.

Para determinar la capacidad antagónica de los cultivos esterilizados, colonias de las cepas M-14 y M-18 de actinobacterias fueron inoculadas por dispersión en cajas Petri con medio de cultivo, y a los diez días se retiró el medio de las cajas y se fundió en un microondas hasta quedar líquido. Con éste se elaboraron 100 mL de las concentraciones de 100, 75, 50 y 25%; a cada concentración se agregó 1.5 gr de agar nutritivo y cero, 25, 50 y 75 mL de agua, respectivamente. Las concentraciones se esterilizaron en autoclave y se vaciaron a cajas Petri, en seguida se inocularon con cuatro esclerocios del fitopatógeno. A las 48 h se determinó la actividad antagónica al registrar el porcentaje de esclerocios germinados que desarrollaron colonia. El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con dos factores (cepas y concentraciones), cuatro repeticiones (caja Petri con cuatro esclerocios) y un tratamiento extra que, consistió en el testigo en agar nutritivo inoculado con esclerocios.

Porcentajes abajo de 25, de 26 a 50 y mayores de 51 de esclerocios germinados y que formaron colonia, se consideró que las concentraciones de actinobacterias esterilizadas por calor tienen una actividad antagónica y termoestabilidad alta, una actividad antagónica y termoestabilidad moderada y una actividad antagónica y termoestabilidad baja contra *S. rolfsii*, respectivamente, mientras están en contacto con los cultivos esterilizado por calor.

Actividad fungicida/fungistasis de cultivos esterilizados. Una vez registrado el porcentaje de inhibición de esclerocios en el experimento anterior, y para determinar el efecto fungicida/fungistático de su exposición por 48 h a los cultivos con actinobacterias esterilizados por calor, los esclerocios presentes en las cuatro concentraciones fueron removidos y se subcultivaron en nuevas cajas Petri conteniendo sólo medio de cultivo. A las 72 h se determinó el porcentaje de esclerocios germinados. Porcentajes menores a 25, de 26 a 50, de 51 a 75 y mayores de 75, se consideró que la exposición por 48 h de los esclerocios a los medios de cultivo con actinobacterias esterilizados, tienen un fuerte efecto fungicida, una actividad fungicida moderada, una actividad fungistática moderada y una fuerte actividad fungistática contra *S. rolfsii*, respectivamente. El experimento se estableció

Then, after 10 days the medium was taken from the Petri dishes and melted in a microwave. The melted medium was used to prepare 100 mL dilutions at 100, 75, 52 and 25% concentrations, 1.5 gr of nutrient agar was added to each concentration and 0, 25, 50 and 75 mL of water, respectively. Concentrations were sterilized by autoclaving and poured into Petri dishes, after this they were inoculated with four sclerotia of the phytopathogen. At 48 hours the antagonistic activity was determined by registering the percentage of sclerotia germinated that developed a colony. The experiment was conducted in a completely randomized design with two factors (strains and concentrations), four repetitions (Petri dishes with four sclerotia) and one extra treatment that consisted in the control with nutrient agar inoculated with sclerotia. For percentages of germinated sclerotia under 25, from 26 to 50 and higher 51, the antagonistic activity and thermostability of heat sterilized actinobacteria were considered as, antagonistic activity with high thermostability, antagonistic activity with moderate thermostability and antagonistic activity with low thermostability against *S. rolfsii*, respectively.

Fungicide/fungistatic activity of sterilized cultures. After registering the percentage of sclerotia inhibition in the former experiment, and to determine the fungicide/fungistatic effect of its exposition during 48 h to the cultures with heat sterilized actinobacteria. Sclerotia from the fourth concentrations were removed and subcultured in new Petri dishes containing only the nutrient medium. After 72 h the percentage of sclerotia germinated was determined. For percentages lower than 25, from 26 to 50, from 51 to 75 and higher than 75, it was considered that the exposition during 48 of the sclerotia to the medium with sterilized actinobacteria had a strong fungicide effect, a moderate fungicide activity, a moderate fungistatic activity and a strong fungistatic activity against *S. rolfsii*, respectively. The experiment was conducted in a completely randomized design with two factors (strain and concentrations) and four repetitions.

Identity of the actinobacterial strain M-18. Actinobacteria DNA was extracted with the

bajo un diseño completamente al azar con dos factores (cepa y concentraciones) y cuatro repeticiones.

Identidad de la actinobacteria M-18. El ADN de la actinobacteria se extrajo con el kit DNeasy Blood and tissue (QIAGEN) de acuerdo a las especificaciones para extracción de ADN de bacterias gram positivas. Pero, en lugar de utilizar el buffer de lisis enzimático sugerido por el protocolo, seguimos una disrupción mecánica con perlas durante 10 segundos en un tubo que contenía 200  $\mu$ l de PBS y 25  $\mu$ l de proteinasa K. Posteriormente, se amplificó el gen 16S del ADN ribosomal con los oligonucleótidos F1 (5'-AGAGTTTGATCITGGCTCAG-3') y R5 (5'-ACGGITACCTTGTACGACTT-3') utilizados previamente por Cook y Meyers (2003). Las condiciones de reacción para la PCR fueron las siguientes: buffer 1x, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 0.6 mM DNTPs, 500 nm de cada oligonucleótido y 2 unidades de Taq platinum (Invitrogen), con 94°C -2 min, 30 ciclos de 94°C x 45 seg., 56°C x 30 seg., 72°C x 2 min y una extensión final de 72°C x 5 min. Los productos de PCR se enviaron a secuenciar en forma sentido y antisentido, con las que se obtuvo una secuencia consenso. Con esta secuencia se realizó una búsqueda en la base de datos del GenBank con la herramienta BLAST para establecer su relación genética con algún género de actinobacteria y especies previamente reportadas.

## Resultados

En el experimento de coinoculación por sobreposición de esclerocios en alícuotas de actinobacterias, los porcentajes de esclerocios que germinaron y mostraron hifas al tercer día fueron de 100, 100 y 91.7 para el testigo, M-14 y M-18 respectivamente, y hubo ausencia de diferencias entre estos tratamientos ( $p > 0.05$ ) (Figura 1). Sin embargo, a los cinco días el 100% de los esclerocios formaron colonias en el testigo, mientras que los esclerocios sobrepuestos en las actinobacterias fueron incapaces de crecer y formar colonias, por lo que el porcentaje de colonias fue de cero (Figura 1 y 2). Considerando los resultados al quinto día de establecida la coinoculación, se demostró que las actinobacterias tienen una actividad antagónica elevada inhibiendo la capacidad de germinación

DNeasy Blood and tissue kit (QIAGEN) according to the DNA extraction protocol for gram positive bacteria. But, instead of using the enzymatic lysis buffer suggested by the protocol, we followed a mechanical disruption with beads for 10 seconds in a tube containing 200  $\mu$ l of PBS and 25  $\mu$ l of proteinase K. Later, the ribosomal 16S gen was amplified with the primers F1 (5'-AGAGTTTGATCITGGCTCAG-3') and R5 (5'-ACGGITACCTTGTACGACTT-3') according to the protocol of Cook and Meyers (2003). PCR conditions were as follows: buffer 1x, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 0.6 mM DNTPs, 500 nm of each primer and 2U of Taq platinum polymerase (Invitrogen) and 94°C -2 min, 30 cycles of 94°C x 45 seg., 56°C x 30 seg., 72°C x 2 min and a final extension of 72°C x 5 min. PCR products were sent to sequence in both directions (forward and reverse) and were used to obtain a consensus sequence. With this sequence, a search was carried out in the GenBank database with the BLAST tool to establish its genetic relationship with some genus of actinobacteria and previously reported species.

## Results

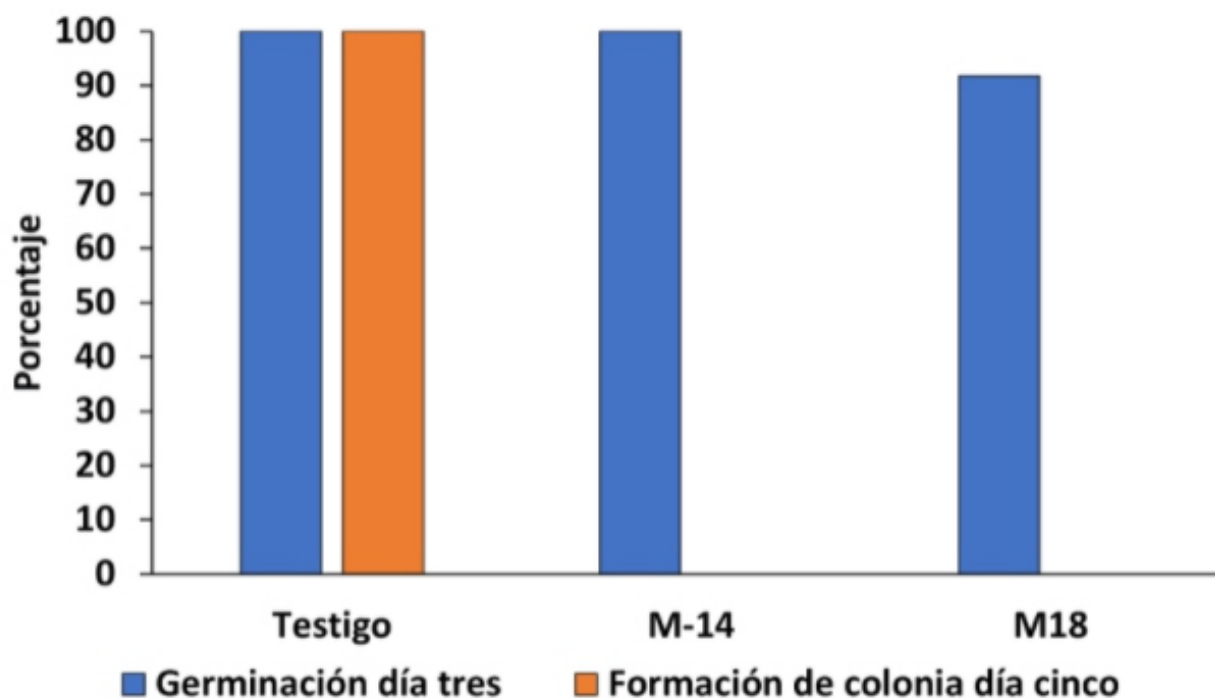
In the experiment of co-inoculation by the overlaying of sclerotia on aliquots of actinobacteria, the percentages of germinated sclerotia that showed hyphae at the third day were 100, 100 and 91.7 for the controls, M-14 and M18 respectively. Also, there were not statistically significant differences between these treatments ( $p > 0.05$ ). Nevertheless, at the fifth day 100% of sclerotia developed colonies in the control, while the sclerotia overlayed in the actinobacteria were not capable to grow and develop any colony, so the percentage of colonies was zero (Figure 1 and 2). Considering the results at the fifth day of the co-inoculation, it was demonstrated that actinobacteria possess a high antagonistic activity inhibiting the capacity of sclerotia germination at 100%.

During the confrontation of sclerotia with the concentrations of 100, 75, 50 and 25% of the heat sterilized actinobacteria cultures, anyone was capable to germinate and develop a colony at the 48 h (Figure 3). Due to this result, the germination percentage of the control was 100%, reason why we did not perform any statistical analysis. These results showed that the heat sterilized

del 100% de esclerocios.

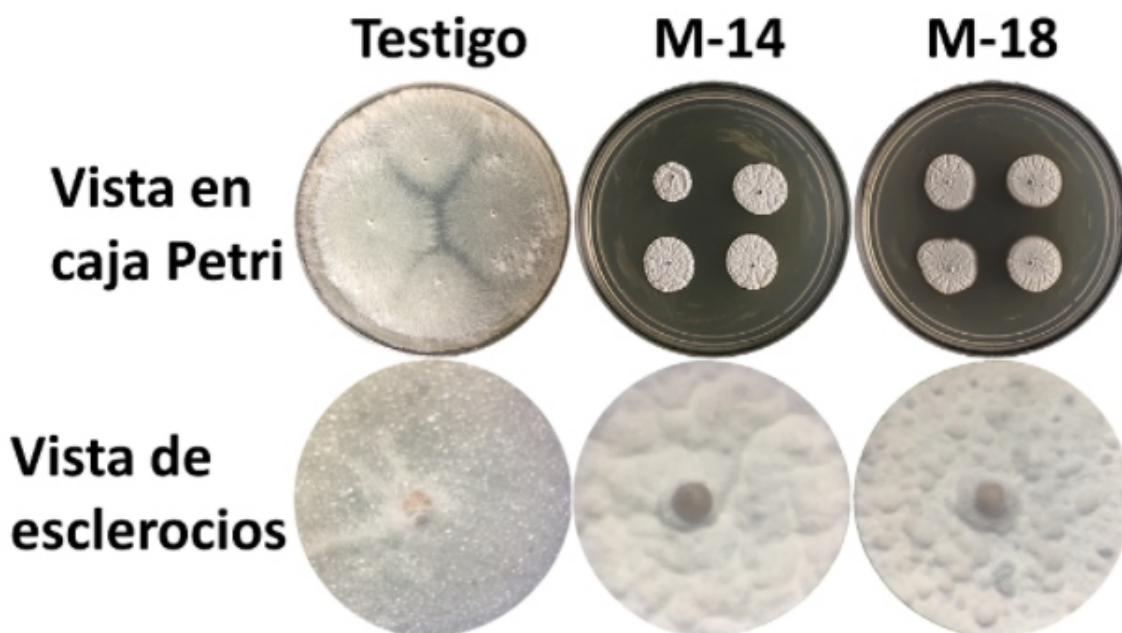
Durante la confrontación de esclerocios con las concentraciones de 100, 75, 50 y 25% de los cultivos con actinobacterias esterilizados por calor, ninguno fue capaz de germinar y desarrollar colonia a las 48 h (Figura 3), por lo que el porcentaje de germinación fue de cero en todas las concentraciones. Sin embargo, el porcentaje de germinación en el testigo fue del 100%, por lo que se omitió algún análisis estadístico. Estos resultados mostraron que los cultivos de las actinobacterias esterilizados por calor tienen un antagonismo y termoestabilidad alta sobre los esclerocios, mientras éstos se encuentran confrontados a las concentraciones utilizadas. La observación a las 48 h mostró cambios en la coloración de esclerocios expuestos a las cuatro concentraciones evaluadas, respecto a los esclerocios en el testigo (Figura 4), los esclerocios en el testigo fueron de color café claro, en la actinobacteria M-14 de café oscuro y en M-18 de color oscuro.

actinobacterial cultures are thermostable and have antagonistic capacities over the sclerotia while they are confronted in the tested concentrations. Observation at 48 h showed changes in the coloration of sclerotia exposed to the four concentrations evaluated respect to sclerotia in the control (Figure 4), the sclerotia in the control were light brown color, in the actinobacteria M-14 dark brown and in the strain M-18 dark color.



**Figura 1.** Porcentaje de esclerocios que germinaron al tercer día y que formaron colonias al quinto día de la sobreposición de éstos sobre las actinobacterias M-14 y M-18.

**Figure 1.** Percentage of sclerotia germinated at the third day and that developed a colony at the fifth day of the overlaying on the actinobacteria strains M-14 and M18.



**Figura 2.** Vista de la confrontación por sobreposición de esclerocios de *Sclerotium rolfsii* sobre alícuotas de actinobacterias a los cinco días de establecidas (arriba) y apariencia de esclerocios en una vista de acercamiento (abajo).

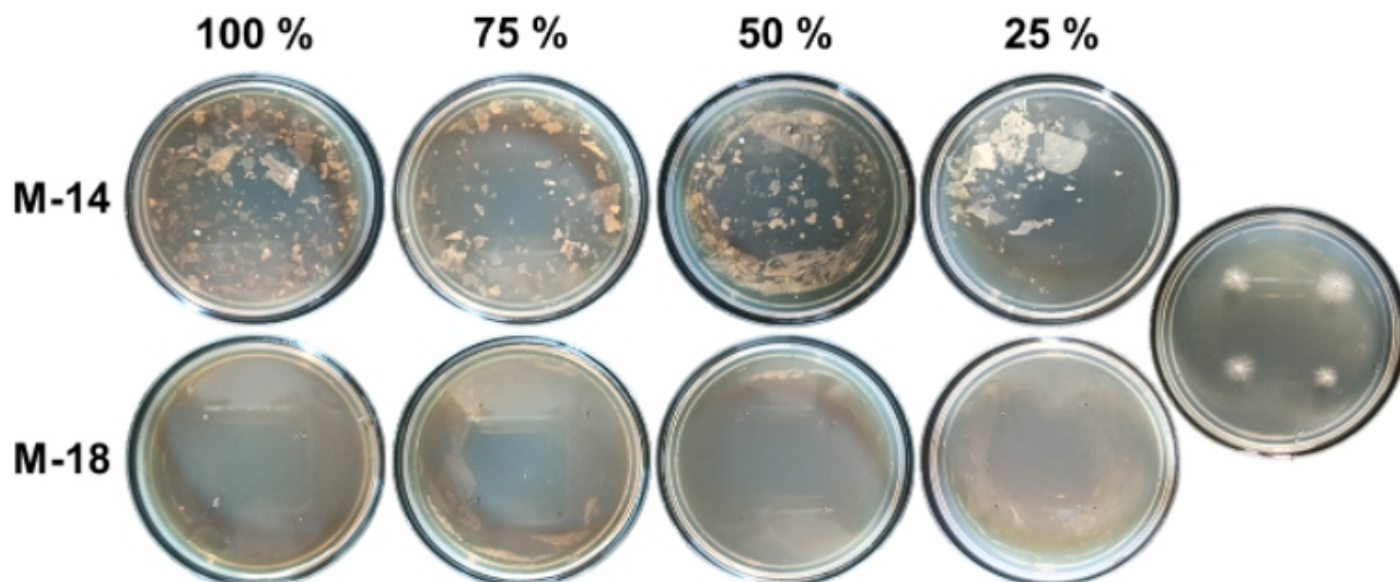
**Figure 2.** Confrontation by overlaying of *Sclerotium rolfsii* sclerotia on aliquots of actinobacteria at the fifth day of their establishment (above), and appearance of sclerotia in a close-up view (bottom).

En el experimento de fungistásis/fungicida, el análisis de varianza sólo mostró diferencias ( $p < 0.05$ ) en el porcentaje de esclerocios germinados entre concentraciones a las 72 h de aquellos expuestos por 48 h a los cultivos esterilizados por calor, con un 68.75% de germinación a la concentración de 25%, y 0.0% de germinación en las concentraciones de 50% a 100%. Aunque no se encontró diferencias en la interacción de factores y entre cepas, ocurrió un 81.25% y 56.25% de germinación de los esclerocios expuestos a los cultivos esterilizados por calor a la concentración de 25% de las actinobacterias M-14 y M-18, respectivamente (Figura 5), sobresaliendo ésta última con el menor porcentaje de germinación. Estos resultados demostraron que las concentraciones de 50%, 75% y 100% de ambas actinobacterias tienen un fuerte efecto fungicida aun después de ser

In the experiment of fungistasis/fungicide, the analysis of variance showed statistical differences ( $p < 0.05$ ) in the percentage of sclerotia germinated between concentrations at 72 h from those exposed for at 48 h to the heat sterilized cultures, with a 68.75% of germination at the concentration of 25% and 0% of germination for the concentration of 50% to 100%. Despite we did not find differences in the interaction of factors and between strains, there was a 81.25% and 56.25% of germination of the sclerotia exposed to the heat sterilized cultures at the concentration of 25% of the actinobacteria strains M-14 and M-18, respectively (Figure 5). The strain M-18 was notable because of it had the lowest percentage of germination. These results demonstrated that concentrations of 50%, 75% and 100% from both actinobacteria have a strong fungicide effect even after being heat sterilized. While at the 25% of concentration, the strain M-14

esterilizadas por calor; mientras que a la concentración de 25% la cepa M-14 tiene una fuerte actividad fungistática y la de M-18 una actividad fungistática moderada contra los esclerocios de *S. rolfsii*.

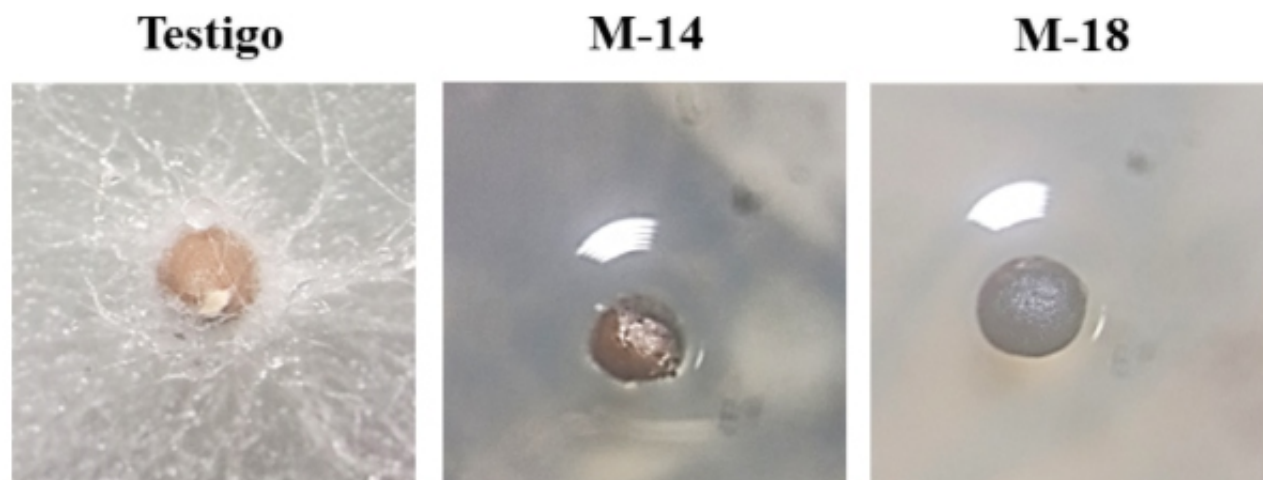
has a strong fungistatic activity against *S. rolfsii* sclerotia and the strain M-18 a moderated one.



**Figura 3.** Respuesta de esclerocios de *Sclerotium rolfsii* a las 48 h de exposición a cuatro concentraciones del cultivo de dos actinobacterias esterilizados por calor. La caja Petri en el extremo derecho representa al testigo con esclerocios inoculados sólo en medio de cultivo.

**Figure 3.** Response of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* at the 48 h of exposition to four concentrations of the heat sterilized cultures of actinobacteria. The Petri dish at the right extreme represents the control with sclerotia inoculated only in culture medium.



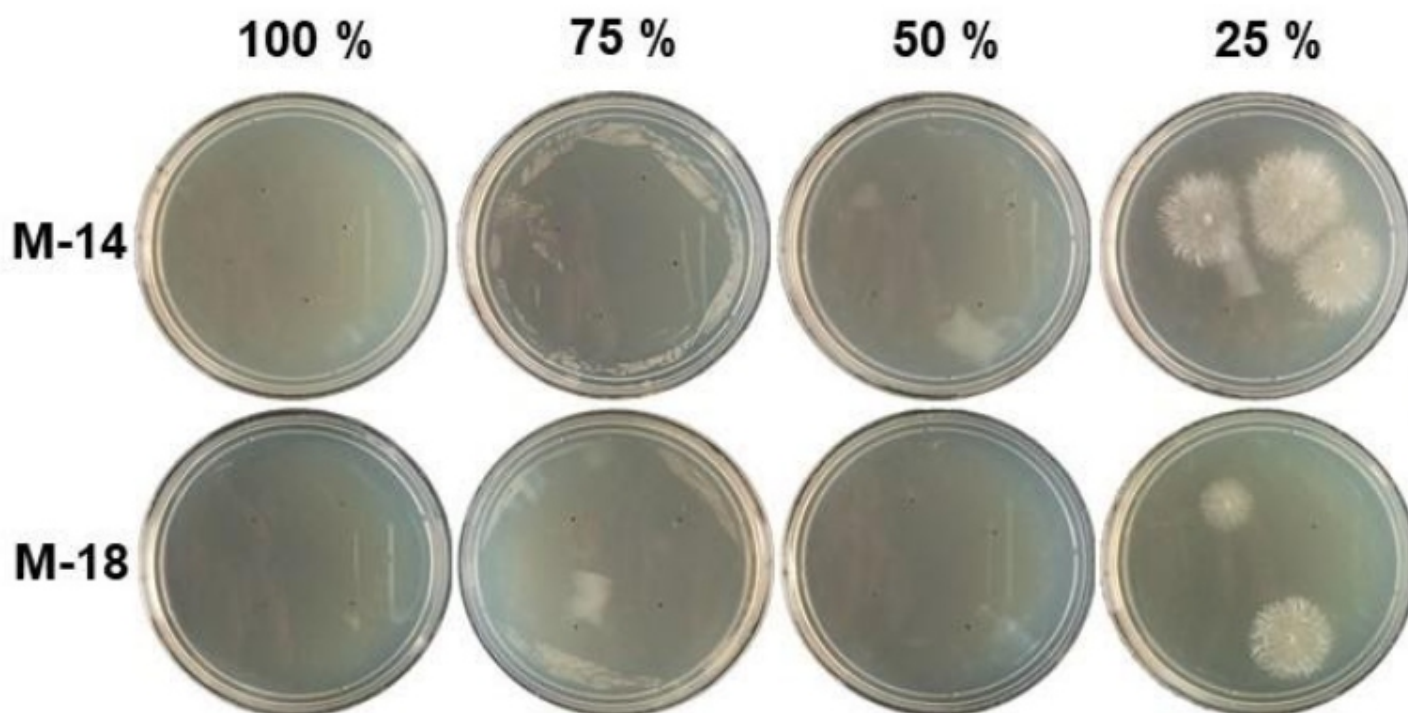


**Figura 4.** Cambios observados en el color de esclerocios expuestos a la concentración de 25% de los cultivos con actinobacterias esterilizados por calor.

**Figure 4.** Observed changes in the color of sclerotia exposed to the concentration of 25% of the heat sterilized cultures of actinobacteria.

La secuencia consenso obtenida del gen 16S de la actinobacteria M-18 constó de 1355 pares de bases. La secuencia será sometida al GenBank como *Streptomyces* sp. cepa M-18. El análisis BLAST mostró un 99.93% de identidad con especies del género *Streptomyces* (*S. maritimus*, *S. rochei*, *S. enissocaesilis*, *S. fungicidicus*). Estas especies han sido reportadas con actividad biológica contra diversos microorganismos.

The consensus sequence obtained with the gen 16S of the actinobacteria strain M-18 was 1355 bp in length. The sequence will be submitted to GenBank as *Streptomyces* sp. strain M-18. In the analysis BLAST the sequence showed 99.93% of similarity with species of the genus *Streptomyces* (*S. maritimus*, *S. rochei*, *S. enissocaesilis*, *S. fungicidicus*), which have been reported to have activity against diverse microorganisms.



**Figura 5.** Respuesta a las 72 h de esclerocios de *Sclerotium rolfii* subcultivados en medio de cultivo después de su exposición por 48 h en cuatro concentraciones del cultivo de dos actinobacterias esterilizados por calor.

**Figure 5.** Response at the 72 h of *Sclerotium rolfii* sclerotia subcultured in culture medium after their 48 h exposition to four different concentrations of the heat sterilized actinobacteria cultures.

### Discusión

La coinoculación por sobreposición de esclerocios sobre alícuotas de actinobacterias permitió observar hifas emergiendo de ellos al tercer día, lo que indicó que estos germinaron, pero fueron incapaces de colonizar el medio de cultivo y crecer más allá del borde de las colonias de actinobacterias hasta el quinto día. Lo anterior demuestra que las actinobacterias no evitan la germinación de los esclerocios y sugiere que las hifas que emergieron de los esclerocios son inhibidas evitando su crecimiento hasta formar colonias. Esto último es apoyado por los resultados de Rodríguez-Guerra *et al.* (2020), quienes demostraron que las cepas de actinobacterias M-14 y M-18 inhibieron totalmente

### Discussion

The co-inoculation by overlaying of sclerotia on aliquots of actinobacteria allowed us to observe hyphae germinating from them at the third day, which indicated that despite they germinated, they were not capable to colonize the culture medium and to grow further than the edge of the actinobacteria colonies up to the fifth day. The former demonstrates that the actinobacteria do not prevent the germination of sclerotia and suggests that the hyphae emerged from the sclerotia are inhibited and their growth was also prevented. This was supported by the results of Rodríguez-Guerra *et al.* (2020), who demonstrated that the actinobacteria strains M-14 and M-18 completely inhibited the mycelia growth of fragments of colonies overlayed on these actinobacterial

el crecimiento micelial de fragmentos de colonias sobrepuestas sobre estas actinobacterias. Esta respuesta, posiblemente se debe a la producción de metabolitos producidos por las actinobacterias y liberados al medio de cultivo que inhiben el crecimiento micelial como ha sido demostrado por Singh y Gaur (2016) y Errakhi *et al.* (2009); sin embargo, también es posible que las actinobacterias puedan tener un mecanismo de parasitismo como el reportado en *Streptomyces* contra *Sclerotinia sclerotiorum* (Gebily *et al.*, 2021).

También, los resultados obtenidos por Rodríguez-Guerra *et al.* (2020) mostraron que las cepas de actinobacterias M-14 y M-18 inhibieron totalmente la germinación de esclerocios de *S. rolfsii* mientras se mantenían sin contacto en confrontación dual con esas actinobacterias; y aún después de subcultivarse la germinación de los esclerocios fue menor al 10%.

Las concentraciones de las colonias de actinobacterias esterilización por calor inhibieron la germinación de esclerocios del fitopatógeno aún a la concentración más baja (25%); sin embargo, al subcultivar los esclerocios en agar nutritivo, solamente hubo germinación en los esclerocios que estuvieron en contacto con los medios con actinobacterias esterilizados por calor a esa concentración. Aunque estos resultados son alentadores por su actividad contra esclerocios de *S. rolfsii*, es importante determinar cuál es el tiempo mínimo de exposición de los esclerocios en las diversas concentraciones evaluadas para tener un efecto fungicida.

Se ha registrado que las actinobacterias son capaces de producir diversos compuestos a los que se ha asociado actividad antagónica contra hongos fitopatógenos, como son sideróforos (Gao *et al.*, 2020), quitinasas (Abo-Zaid *et al.*, 2021; Shrivastava *et al.*, 2017) y proteasas (Palaniyandi *et al.*, 2013). Gao *et al.* (2020), al someter un filtrado de cultivo de la cepa OsiLf-2 de *Streptomyces albidoflavus* a 100 °C por una hora, encontraron que la actividad inhibitoria del crecimiento micelial de *Magnaporthe oryzae* fue del 78.37% respecto al testigo sin esterilizar, mostrando una ligera pérdida de la inhibición del fitopatógeno. Además, encontraron que el filtrado sin esterilizar inhibe el crecimiento micelial de *S. rolfsii* (30.37%). También, Prapagdee *et al.* (2008)

strains. This response might be due to the presence of metabolites produced by the actinobacteria and their release in the nutrient culture, preventing the mycelial growth as it has been previously demonstrated by Singh y Gaur (2016) y Errakhi *et al.* (2009). Nevertheless, it might also be that the actinobacteria have a mechanism of parasitism as the one reported in *Streptomyces* against *Sclerotinia sclerotiorum* (Gebily *et al.*, 2021).

The results obtained by Rodríguez-Guerra *et al.* (2020) demonstrated that the actinobacterial strains M.14 and M-18 completely inhibited the germination of sclerotia of *S. rolfsii* while they were kept without contact in dual confrontations with these actinobacteria and even after their sub-cultivation the sclerotia germination was lower than 10%.

The concentrations of heat sterilized actinobacteria inhibited the germination of the phytopathogen's sclerotia even at the lowest concentration (25%); however, when sclerotia were sub-cultivated in nutrient agar there was germination only in the sclerotia that were in contact with the medium of heat sterilized actinobacteria at that concentration. Thought results are promising because of their activity against sclerotia of *S. rolfsii*, it is important to determine which is the minimum time of sclerotia exposition in the different concentrations evaluated to have a fungicide effect. We have registered that the actinobacteria are capable to produce diverse components associated to antagonistic activity against phytopathogen fungi such as, siderophores (Gao *et al.*, 2020), chitinases (Abo-Zaid *et al.*, 2021; Shrivastava *et al.*, 2017) and proteases (Palaniyandi *et al.*, 2013). When Gao *et al.* (2020) subjected a culture filtered of the strain OsiLf-2 of *Streptomyces albidoflavus* heated at 100°C for one hour, they found that the inhibiting activity of mycelial growth of *Magnaporthe oryzae* was 78.37% with respect to the control. Also, they found that the non-sterilized filtered inhibited the mycelial growth of *S. rolfsii* (30.37%). Additionally, Prapagdee *et al.* (2008) determined that the liquid culture filtered of the stationary phase of the strain SRA14 of *S. hygroscopicus* inhibit the growth of *S. rolfsii* at 20% of concentration (v/v), but the inhibition is not complete. Also, they found that the filtered maintains its activity after being boiled

determinaron que el filtrado de cultivo líquido de la fase estacionaria de la cepa SRA14 de *S. hygroscopicus* inhibe el crecimiento de *S. rolfssii* a una concentración de 20% (v/v), pero la inhibición no es completa; además, que ese filtrado mantiene su actividad después de ser hervido por 60 min. Y aunque la cepa PACCH 277 de *S. hygroscopicus* también ha mostrado una excelente inhibición in vitro y elevado biocontrol de *S. rolfssii* (Pattanapitpaisal y Kamlandharn, 2012), sólo Li *et al.* (2017) han reportado un 100% de inhibición de germinación de esclerocios con una concentración de 20% de filtrados libres de células de *S. flavotricine* mientras los esclerocios se encuentran en medio PDA a esa concentración. Aunque filtrados libres de células de especies de *Streptomyces* pueden tener actividad inhibitoria contra *S. rolfssii*, ningún reporte ha registrado elevada capacidad fungicida contra este fitopatógeno como la que causan las cepas de actinobacterias M-14 y M-18. La búsqueda de actividad antagonica termoestable en actinobacterias puede apoyar fuertemente las alternativas de biocontrol de *S. rolfssii*.

La actinobacteria M-18 fue identificada como parte del género *Streptomyces* como se propuso previamente (Rodríguez-Guerra *et al.*, 2020), además se encontró relacionada con *S. maritimus*, *S. rochei*, *S. enissocaesilis*, *S. fungicidicus*, con una similitud del 99.93%. De estas especies. *S. rochei* es la única que ha sido reportada con actividad biológica contra *S. rolfssii* (Li *et al.*, 2020); sin embargo, *S. enissocaesilis* (Kumaran *et al.*, 2020; Masand *et al.*, 2018), *S. maritimus* (Al-Bari *et al.*, 2007) y *S. fungicidicus* (Matsuoka y Umezawa, 1960) han mostrado actividad biológica contra otras especies de microorganismos. Debido a que el género *Streptomyces* cuenta con más de 500 especies (Kämpfer, 2012) y su identificación genética se basa sobre la secuencia del gen 16S, resulta complicado definir con certidumbre la especie de la actinobacteria M-18, y otros análisis serán necesarios para establecer la identidad de la especie de *Streptomyces* a la que pertenece. Esta situación es similar a la reportada por Taechowisan *et al.* (2016), quienes identificaron una cepa de *Streptomyces* con una similitud de 97.48% con *S. maritimus*, cuyo porcentaje es inferior al de 99.93 encontrado entre la actinobacteria M-18 y las especies mencionadas.

during 60 min. Although the strain PACCH 277 of *S. hygroscopicus* has also shown an excellent in vitro inhibition and a high biocontrol level of *S. rolfssii* (Pattanapitpaisal and Kamlandharn, 2012). Only Li *et al.* (2017) have reported 100% of inhibition of sclerotia germination at 20% of concentration of filtered free of cells of *S. flavotricine*, while sclerotia were kept PDA medium at such concentration. Although filtered free of cells of *Streptomyces* species can have an inhibitory activity against *S. rolfssii*, up to now any study has reported a high fungicide capacity against this pathogen as the one cause by the actinobacterial strains M-14 y M-18. The search for thermostable antagonistic activity may strongly help the biocontrol alternatives for *S. rolfssii*.

The actinobacteria M-18 was identified as part of the genus *Streptomyces* as it was previously proposed (Rodríguez-Guerra *et al.*, 2020), also it was found to be related to *S. maritimus*, *S. rochei*, *S. enissocaesilis*, *S. fungicidicus*, with a similarity of 99.93%. From the former species, *S. rochei* is the only one that has been reported to have biological activity against *S. rolfssii* (Li *et al.*, 2020). Notwithstanding, *S. enissocaesilis* (Kumaran *et al.*, 2020; Masand *et al.*, 2018), *S. maritimus* (Al-Bari *et al.*, 2007) and *S. fungicidicus* (Matsuoka y Umezawa, 1960) have shown to have biological activity against other species of microorganisms. Because the genus *Streptomyces* includes more than 500 hundred species (Kämpfer, 2012) for which their genetic classification is based on the gen 16S, it is complicated to certainty define to which species the actinobacteria strain M-18 belongs, also, more analyses should be required to establish to which species of *Streptomyces* genus it belongs. A similar situation was reported by Taechowisan *et al.*, (2016), who identified a strain of *Streptomyces* with a similarity of 97.48% with the species *S. maritimus*, whose percentage is lower than the 99.93% found between the strain M-18 and the species aforementioned.

## Conclusions

It was shown that *S. rolfssii* sclerotia are unable to form colonies when in contact with actinobacteria M-14 and M-18, and that both maintain the ability to inhibit sclerotia germination while in contact with heat-sterilized colonies. Furthermore, with this study it was also demonstrated that the 48 h

## Conclusiones

La formación de colonias a partir de esclerocios de *S. rolfsii* es completamente inhibida por el contacto de estos con las actinobacterias M-14 y M-18, y la esterilización por calor de colonias de ambas actinobacterias mantiene la capacidad de inhibir la germinación de esclerocios. Las exposiciones por 48 h a concentraciones mayores al 25% cuentan con actividad fungicida contra el fitopatógeno. Lo anterior demuestra que la actividad antagonica y capacidad fungicida/fungistática de los compuestos producidos por el crecimiento de las actinobacterias es termostable. La identidad de la actinobacteria M-18 está relacionada a cuatro especies del género *Streptomyces*; sin embargo, pruebas adicionales son necesaria para determinar la especie.

## Agradecimientos

Se agradece al INIFAP el apoyo financiero para la realización de esta investigación como parte del Proyecto “Aprovechamiento de la biodiversidad microbiana contra problemas fitosanitarios de cultivos del área de influencia del CIR Noreste”.

## Literatura citada

- Abo-Zaid, G., Abdelkhalek, A., Matar, S., Darwish, M., and Abdel-Gayed, M. 2021. Application of bio-friendly formulations of chitinase-producing *Streptomyces cellulosa* actino 48 for controlling peanut soil-borne diseases caused by *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Fungi*, 7, 167. <https://doi.org/10.3390/jof7030167>
- Al-Bari, M.A.A., Sayeed, M.A., Khan, A., Islam, M.R., Khondokar, M.P., Rahman, M.M.S., and Islam, M.U. 2007. In vitro antimicrobial activities and cytotoxicity of ethyl acetate extract from *Streptomyces maritimus*. *Proma Khondokar. Biotechnology*, 6, 82-86. <https://doi.org/10.3923/biotech.2007.81.85>
- Billah, K.M.M., Hossain, Md.B., Prince, M.H., and Sumon, Md.M.P. 2017. Pathogenicity of *Sclerotium rolfsii* on different host, and its over wintering survival; A mini review. *International Journal of Advances in Agriculture Sciences*, 2, 1-6. [https://www.researchgate.net/profile/Mahamud-Prince/publication/321994800\\_Pathogenicity\\_of\\_Sclerotium\\_Rolfsii\\_on\\_Different\\_Host\\_and\\_Its\\_over\\_Wintering\\_Survival\\_A\\_Mini\\_Review/links/5a3c7ceba6fdcc21d878075b/Pathogenicity-of-Sclerotium-Rolfsii-on-Different-Host-and-Its-over-Wintering-Survival-A-Mini-Review.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Mahamud-Prince/publication/321994800_Pathogenicity_of_Sclerotium_Rolfsii_on_Different_Host_and_Its_over_Wintering_Survival_A_Mini_Review/links/5a3c7ceba6fdcc21d878075b/Pathogenicity-of-Sclerotium-Rolfsii-on-Different-Host-and-Its-over-Wintering-Survival-A-Mini-Review.pdf)
- Bosah, O., Igeleke, C. A., and Omorusi, V.I. 2010. In vitro microbial control of pathogenic *Sclerotium rolfsii*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 12, 474-476. [https://www.researchgate.net/profile/Clara-Igeleke/publication/268063022\\_In\\_Vitro\\_Microbial\\_Control\\_of\\_Pathogenic\\_Sclerotium\\_rolfsii/links/5675b70808ae125516e725ea/In-Vitro-Microbial-Control-of-Pathogenic-Sclerotium-rolfsii.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Clara-Igeleke/publication/268063022_In_Vitro_Microbial_Control_of_Pathogenic_Sclerotium_rolfsii/links/5675b70808ae125516e725ea/In-Vitro-Microbial-Control-of-Pathogenic-Sclerotium-rolfsii.pdf)
- Cook, A. E., and Meyers, P. R. 2003. Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S rRNA gene restriction fragment patterns. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1907-1915. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02680-0>
- Errakhi, R., Lebrihi, A., and Barakate, M. 2009. In vitro and in vivo antagonism of actinomycetes isolated

exposure to concentrations higher than 25% have fungicide capacity against the phytopathogen. The above demonstrates that the antagonic activity and the fungicide/fungistatic capacity of the compounds produced by the growth of the actinobacteria is termostable. The identity of the actinobacteria M-18 is linked to four species of the genus *Streptomyces*, however, additional tests are necessary to determine the species.

## Acknowledgments

We thank the INIFAP for the financial support for the performing o this study as part of the project “Use of microbial biodiversity against phytosanitary problems of crops in the area of influence of the Northeast CIR”.

- from Moroccan rhizospheric soils against *Sclerotium rolfsii*: a causal agent of root rot on sugar beet *Beta vulgaris* (L.). *Journal of Applied Microbiology*, 107, 672-681. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04232.x>
- Farr, D.F., Bills, G.F., Chamuris, G.P., Rossman, A.Y. 1989. *Fungi on Plants and Plant Products in the United States*. American Phytopathological Society, St Paul, MN, 1252. <https://www.cabi.org/isc/abstract/19901142686>
- Gao, Y., Zeng, X.D., Ren, B., Zeng, J.R., Xu, T., Yang, Y.Z., Hu, X.C., Zhu, Z.Y., Shi, L.M., Zhou, G.Y., Zhou, Q., Liu, X.M. and Zhu, Y.H. 2020. Antagonistic activity against rice blast disease and elicitation of host-defence response capability of an endophytic *Streptomyces albidoflavus* OsilF-2. *Plant Pathology*, 69, 259-271. <https://doi.org/10.1111/ppa.13118>
- Gebily, D. A., Ghanem, G. A., Ragab, M. M., Ali, A. M., Soliman, N. E. D. K., and Abd El-Moity, T. H. 2021. Characterization and potential antifungal activities of three *Streptomyces spp.* as biocontrol agents against *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary infecting green bean. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31, 1-15. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00373-x>
- Hernández-Jiménez, J., Montes-Belmont, R., Flores-Moctezuma, H.E., Nava-Juárez, R.A., y Chanona Pérez, J. 2004. Caracterización de aislamientos de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en diferentes medios de cultivo. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22, 345-350. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61222305.pdf>
- Hernández-Morales, J., Ochoa-Martínez, D. L., and Ayala-Escobar, V. 2018. First report of southern blight caused by *Sclerotium rolfsii* on sesame in Mexico. *Journal of Plant Pathology*, 100, 323-323. <https://doi.org/10.1007/s42161-018-0052-8>
- Kämpfer P. 2012. Genus I. *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339 emend. Witt and Stackebrandt 1990, 370 emend. Wellington, Stackebrandt, Sanders, Wolstrup and Jorgensen 1992, 159. In: Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J et al (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Part B, vol 5, 2nd edn. Springer, New York, pp:1455-1767. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68233-4>
- Kator, L., Hosea, Z. Y., and Oche, O. D. 2015. *Sclerotium rolfsii*: causative organism of southern blight, stem rot, white mold and sclerotia rot disease. *Annals Biol. Res.* 6, 78-89. [https://www.researchgate.net/profile/Kator-Liamngee/publication/343268195\\_Sclerotium\\_rolfsii\\_Causative\\_organism\\_of\\_southern\\_blight\\_stem\\_rot\\_white\\_mold\\_and\\_sclerotia\\_rot\\_disease/links/5f208f3645851515ef527626/Sclerotium-rolfsii-Causative-organism-of-southern-blight-stem-rot-white-mold-and-sclerotia-rot-disease.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Kator-Liamngee/publication/343268195_Sclerotium_rolfsii_Causative_organism_of_southern_blight_stem_rot_white_mold_and_sclerotia_rot_disease/links/5f208f3645851515ef527626/Sclerotium-rolfsii-Causative-organism-of-southern-blight-stem-rot-white-mold-and-sclerotia-rot-disease.pdf)
- Khattabi, N., Ezzahiri, B., Louali, L. and Oihabi, A. 2004. Antagonistic activity of Trichoderma isolates against *Sclerotium rolfsii*: screening of efficient isolates from Morocco soils for biological control. *Phytopathologia Mediterranea*, 43, 332-340. <https://core.ac.uk/download/pdf/228523898.pdf>
- Kumaran, S., Utra, V., Thirunavukkarasu, R., Nainangu, P., Krishnan, V. G., Renuga, P.S., Wilson, A. and Balaraman, D. 2020. Bioactive metabolites produced from *Streptomyces enissocaesilis* SSASC10 against fish pathogens. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29, 101802. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101802>
- Li, Y., Guo, Q., He, F., Li, Y., Xue, Q., and Lai, H. 2020. Biocontrol of root diseases and growth promotion of the tuberous plant *Aconitum carmichaelii* induced by actinomycetes are related to shifts in the rhizosphere microbiota. *Microbial Ecology*, 79, 134-147. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01388-6>
- Li, Y., He, F., Lai, H. and Xue, Q. 2017. Mechanism of in vitro antagonism of phytopathogenic *Scelrotium rolfsii* by actinomycetes. *European Journal of Plant Pathology*, 149, 299-311. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1177-x>
- Maheswari, M.U., Muthusamy, M. and Alice, D. 2002. Evaluation of antagonists against jasmine wilt caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Journal of Biological Control*, 16, 135-140. <https://doi.org/10.18311/jbc/2002/4122>
- Masand, M., Sivakala, K. K., Menghani, E., Thinesh, T., Anandham, R., Sharma, G., Sivakumar, N., Jebakumar, S.R.D. and Jose, P.A. 2018. Biosynthetic potential of bioactive Streptomyces isolated

- from arid region of the Thar desert, Rajasthan India. *Frontiers in Microbiology*, 9, 687. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00687>
- Matsuoka, M., and Umezawa, H. 1960. Unamycin, an antifungal substance produced by *Streptomyces fungicidicus*. *The Journal of Antibiotics, Series A*, 13, 114-120. [https://doi.org/10.11554/antibioticsa.13.2\\_114](https://doi.org/10.11554/antibioticsa.13.2_114)
- Palaniyandi, S.A., Seung, H.Y., Karthiyaini, B. and Joo-Won, S. 2013. Genetic and functional characterization of culturable plant-beneficial actinobacteria associated with yam rhizosphere. *Journal of Basic Microbiology*, 53, 985-995. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200531>
- Paramasivan, M., Thaveedu, S., Jhonson, I., and Karthikeyan, M. 2019. Screening of rhizosphere and phyllo plane bacterial antagonist against *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) in tropical sugar beet ecosystems. *Journal of Emerging Technologies and Innovative Research*, 6, 947-952. [https://www.researchgate.net/profile/Paramasivan-Mookkan/publication/337670797\\_Screening\\_of\\_rhizosphere\\_and\\_phyllo\\_plane\\_bacterial\\_antagonist\\_against\\_Sclerotium\\_rolfsii\\_Sacc\\_in\\_Tropical\\_sugar\\_beet\\_ecosystems/links/5de46ef992851c83645a089b/Screening-of-rhizosphere-and-phyllo-plane-bacterial-antagonist-against-Sclerotium-rolfsii-Sacc-in-Tropical-sugar-beet-ecosystems.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Paramasivan-Mookkan/publication/337670797_Screening_of_rhizosphere_and_phyllo_plane_bacterial_antagonist_against_Sclerotium_rolfsii_Sacc_in_Tropical_sugar_beet_ecosystems/links/5de46ef992851c83645a089b/Screening-of-rhizosphere-and-phyllo-plane-bacterial-antagonist-against-Sclerotium-rolfsii-Sacc-in-Tropical-sugar-beet-ecosystems.pdf)
- Pattanapitpaisal, P. and Kamlandharn, R. 2012. Screening of chitinolytic actinomycetes for biological control of *Sclerotium rolfsii* stem rot disease of chilli. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 34, 387-393. <https://core.ac.uk/download/pdf/26804621.pdf>
- Prapagdee, B., Kuekulvong, C. and Mongkolsuk, S. 2008. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygrosopicus* against phytopathogenic fungi. *International Journal of Biological Sciences*, 4, 330-337. <https://dx.doi.org/10.7150%2Fijbs.4.330>
- Punja, Z.K. 1985. The biology, ecology, and control of *Sclerotium rolfsii*. *Annual Review of Phytopathology*, 23, 97-127. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.23.090185.000525>
- Rodríguez-Guerra, R., Castillo-Reyes, F., Ledesma-Bravo, B., Calderón-Ruiz, A., Armijo-Martínez, L. F. y Ruiz-Amaro, C.J. 2020. Diversidad en suelo y antagonismo de actinobacterias contra *Sclerotium rolfsii*. *Biología y Sustentabilidad*, 5, 19-36. <https://revistas.uaz.edu.mx/index.php/biotecnologiaysust/article/view/925>
- Singh, S.P., and Gaur, R. 2016. Evaluation of antagonistic and plant growth promoting activities of chitinolytic endophytic actinomycetes associated with medicinal plants against *Sclerotium rolfsii* in chickpea. *Journal of Applied Microbiology*, 121, 506-518. <https://doi.org/10.1111/jam.13176>
- Shrivastava, P., Kumar, R., and Yandigeri, M.S. 2017. In vitro biocontrol activity of halotolerant *Streptomyces aureofaciens* K20: A potent antagonist against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24, 192-199. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.12.004>
- Taechowisan, T., Singtotong, S., and Phutdhawong, W.S. 2016. Antibacterial and antioxidant activities of acetogenins from *Streptomyces sp.* VE2; an endophyte in *Vernonia cinerea* (L.) Less. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6, 067-072. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.60810>