

Diversidad de actinobacterias aisladas de suelo y su antagonismo contra la germinación de esporas de hongos fitopatógenos

Antagonismo of soil isolated actinobacteria against phytopathogenic fungi spore germination

Kenzy Iveth Peña-Carrillo¹, Isidro Humberto Almeyda-León¹, J. Isabel López-Arroyo¹, Ángel Ismael Narváez-Rodríguez², Reyna Ivonne Torres-Acosta³, Salvador Ochoa-Ascencio⁴, Orlando Estrada-Virgen⁵, Raúl Rodríguez-Guerra^{1*}

¹Campo Experimental General Terán, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Km. 31 Carretera Montemorelos-China, C.P. 67400, General Terán, Nuevo León, México. ²Facultad 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. ³Universidad Autónoma de Tamaulipas, Unidad Académica Multidisciplinaria Mante, Blvd. Enrique Cárdenas González 1201 Pte., C.P. 89840, Ciudad Mante, Tamaulipas, México. ⁴Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Agrobiología, Paseo Lázaro Cárdenas 2290, Col. Emiliano Zapata, CP 60170, Uruapan, Michoacán, México. ⁵Universidad Autónoma de Nayarit, Unidad Académica de Agricultura, Carretera Tepic-Compostela Km. 9, C.P. 63780, Xalisco, Nayarit, México.

*Autor de correspondencia: rodriguez.raul@inifap.gob.mx

Resumen.

En esta investigación se determinó la diversidad morfológica de actinobacterias aisladas de un suelo desmontado de El Mante, Tamaulipas, México. En un escrutinio sin repeticiones se evaluó la capacidad de morfotipos contra la germinación de esporas de *Raffaelea* sp., *Colletotrichum musae*, *Fusarium oxysporum* y *F. solani* en dos tiempos de evaluación. Con morfotipos sobresalientes que inhibieron la germinación de esporas de *Raffaelea* sp., se evaluó su efecto en el desarrollo de colonias en confrontaciones duales, y su capacidad fungicida/fungistática, sobre esporas de *Raffaelea* spp.; además, se determinó la identidad de esas actinobacterias a nivel de género mediante el análisis de la secuencia del gen 16S. De 92 cepas de actinobacterias aisladas, se definieron 64 morfotipos y el índice de diversidad de Shannon-Wiener fue de 4.05 para los morfotipos de actinobacterias presentes en el suelo. Se determinó que 44, 13, 1 y 1 morfotipos inhibieron la germinación de esporas de *Raffaelea* sp., *Colletotrichum musae*, *Fusarium oxysporum* and *F. solani* a las 24 h, respectivamente; y a las 96 h la cantidad fue de 14, 5, 1 y 1. En la confrontación dual con seis morfotipos de actinobacterias sobresalientes se encontró diferencias ($p < 0.01$) entre actinobacterias, especies de *Raffaelea* y en la interacción de ambos factores. Las esporas de *Raffaelea* sp., *R. fusca* y *R. subalba* fueron incapaces de germinar y desarrollar colonias en la confrontación con las actinobacterias, por lo que su crecimiento radial fue

Abstract.

In this research, the morphotypic diversity of actinobacteria isolated from a disassembled soil of El Mante, Tamaulipas, Mexico was determined. In a screening without repetitions was evaluated the ability of morphotypes against spore germination of *Raffaelea* sp., *Colletotrichum musae*, *Fusarium oxysporum* and *F. solani*, in two evaluation times. With outstanding morphotypes that inhibited spore germination of *Raffaelea* sp., their effect on the development of colonies in dual confrontations, and on their fungicidal / fungistatic capacity on spore of *Raffaelea* spp. were evaluate; furthermore, the identity of these actinobacteria was determined at the genus level by analyzing the 16S gene sequence. From 92 isolated actinobacteria strains, 64 morphotypes were defined and the Shannon-Wiener diversity index was 4.05 for actinobacterial morphotypes present in the soil. It was determined that 44, 13, 1 and 1 morphotypes inhibited spore germination of *Raffaelea* sp., *Colletotrichum musae*, *Fusarium oxysporum* and *F. solani* at 24 h, respectively; and at 96 h the amount was 14, 5, 1 and 1. In dual confrontation with six outstanding actinobacterial morphotypes, differences ($p < 0.01$) were found between actinobacteria, *Raffaelea* species and in the interaction of both factors. Spores of *Raffaelea* sp., *R. fusca* and *R. subalba* were unable to germinate and develop colonies in the confrontation with actinobacteria, so their radial growth was 0.0 mm. However, the three *Raffaelea* species were able to grow in the controls free of actinobacteria, and on average

de 0.0 mm. Sin embargo, las tres especies de *Raffaelea* fueron capaces de crecer en los testigos libres de actinobacterias, y en promedio alcanzaron un crecimiento de 4.3 mm. La evaluación de la actividad fungistática/fungicida de las actinobacterias sobre esporas de *R. fusca* y *R. subalba* mostró que cuatro morfotipos (M-18, M-21, M-31, M-74) causaron un efecto fungicida sobre el 100 % de alícuotas (cuatro) de suspensiones de esporas de la primera especie, y que el morfotipo M-46 fue el único en causar esta actividad contra *R. subalba*. Los morfotipos de actinobacterias se identificaron como miembros del género *Streptomyces*, y cada uno estuvo relacionado con diversas especies de este género. Actinobacterias del género *Streptomyces* aisladas de El Mante, Tamaulipas, tienen importante actividad contra la germinación de esporas de hongos fitopatógenos, en particular contra *Raffaelea* spp. en condiciones *in vitro*.

Palabras clave: Morfotipos, escrutinio, confrontación dual, inhibición de la germinación de esporas, *Raffaelea* spp.

Introducción

Las actinobacterias son un grupo de microorganismos con elevado potencial biotecnológico en diversas áreas de interés como en la industria, medicina y agrícola, entre otras (Hasani *et al.*, 2014; Sharma, 2014). A partir de diversas fuentes y ambientes (Kumar y Kumar, 2014) se han aislado actinobacterias, y en el suelo éstas representan una gran proporción del microbioma presente (Anandan *et al.*, 2016; Yadav *et al.*, 2018), por lo que el suelo puede considerarse la fuente de mayor riqueza de actinobacterias. El género *Streptomyces* es el más frecuentemente aislado de suelo y cuenta con al menos 500 especies reconocidas (Anandan *et al.*, 2016; Kämpfer, 2012), de las cuales se han obtenido más de 7,000 compuestos biológicamente activos (Sharma, 2014). En este género se han identificado cepas con gran potencial biotecnológico que son utilizadas comercialmente para el control de hongos y oomicetos fitopatógenos; sin embargo, se ha reconocido que nuevas especies con esta capacidad pueden ser identificadas (Rodríguez-Villarreal *et al.*, 2014). A pesar de la gran riqueza de actinobacterias en el suelo, el aislamiento de cepas con elevada actividad antagónica contra microorganismos fitopatógenos es baja, el número de cepas antagónicas sobresalientes puede variar dependiendo de los hongos fitopatógenos contra los cuales son evaluadas, como se ha reportado contra *Aphanomyces euteiches* (Oubaha *et al.*, 2019), *Phytophthora capsici* y *Sclerotium rolfsii* (Thampi y

they reached a growth of 4.3 mm. The evaluation of the fungistatic / fungicidal activity of actinobacteria on spores of *R. fusca* and *R. subalba* showed that four morphotypes (M-18, M-21, M-31, M-74) caused a fungicidal effect on 100% of aliquots (four) of spore suspensions of the first species, and that the M-46 morphotype was the only one to cause this activity against *R. subalba*. Actinobacteria morphotypes were identified as members of the genus *Streptomyces*, and each was related to various species of this genus. Actinobacteria of the genus *Streptomyces* isolated from El Mante, Tamaulipas, have important activity against spore germination of phytopathogenic fungi, in particular against *Raffaelea* spp. under *in vitro* conditions.

Keywords: Morphotypes, screening, dual confrontation, spore germination inhibition, *Raffaelea* spp.

Introduction

Actinobacteria are a group of microorganisms with high biotechnological potential in various areas of interest such as industry, medicine and agriculture, among others (Hasani *et al.*, 2014; Sharma, 2014). Actinobacteria have been isolated from various sources and environments (Kumar and Kumar, 2014), and represent a large proportion of the microbiome present in soil (Anandan *et al.*, 2016; Yadav *et al.*, 2018), so the soil can be considered the richest source of actinobacteria. The genus *Streptomyces* is the most frequently isolated from soil and has at least 500 recognized species (Anandan *et al.*, 2016; Kämpfer, 2012), from which more than 7,000 biologically active compounds have been obtained (Sharma, 2014). In this genus, strains with great biotechnological potential have been identified that are used commercially for the control of phytopathogenic fungi and oomytes, however it has been recognized that new species with this capacity can be identified (Rodríguez-Villarreal *et al.*, 2014). Despite the great richness of actinobacteria in soil, strain isolation with high antagonistic activity against phytopathogens is low, the number of outstanding antagonistic strains may vary depending on the phytopathogenic fungi against which they are evaluated, as reported against *Aphanomyces euteiches* (Oubaha *et al.*, 2019), *Phytophthora capsici* and *Sclerotium rolfsii* (Thampi and Bhai *et al.*, 2017), *Verticillium dahliae*, *Fusarium culmorum*, *Drechslera teres*, *Microdochium nivale*, *Bipolaris sorokiniana*, *Botrytis fabae* and *Fusarium oxysporum* (Aouar *et al.*,

Bhai *et al.*, 2017), *Verticillium dahliae*, *Fusarium culmorum*, *Drechslera teres*, *Microdochium nivale*, *Bipolaris sorokiniana*, *Botrytis fabae* y *Fusarium oxysporum* (Aouar *et al.*, 2012) y *Colletotrichum kahawae*, *Fusarium spp.* y *F. oxysporum* (Nonoh *et al.*, 2010).

Existe una gran diversidad de hongos fitopatógenos que producen estructuras con un importante papel para el desarrollo de las enfermedades que causan, entre las que se encuentran los esclerocios y algún tipo de esporas. Estas estructuras tienen como función la sobrevivencia por largos periodos y la diseminación de los microorganismos fitopatógenos. Frecuente durante la búsqueda de actinobacterias antagonicas éstas son evaluadas por su actividad contra el crecimiento micelial de los hongos u oomicetos de interés, lo cual también es importante pues el micelio está involucrado en la colonización de las plantas hospederas y en la producción de esclerocios y esporas. Varias especies y cepas de actinobacterias han sido identificadas con elevada capacidad para inhibir la germinación de esporas de hongos fitopatógenos (Rodríguez-Guerra *et al.*, 2019; Sittivate y Nalumpang, 2015; Macagnan *et al.*, 2009), por lo que es importante evaluar el antagonismo contra estas estructuras que juegan un importante papel en el desarrollo de las enfermedades que causan. Entre los hongos fitopatógenos que producen abundantes esporas se encuentran especies de *Colletotrichum* y *Fusarium* que causan numerosas e importantes enfermedades a una amplia gama de especies de plantas (Cannon *et al.*, 2012; Leslie y Summerell, 2013). También existen especies de hongos fitopatógenos asociados a artrópodos vectores que transportan y diseminan sus esporas, como es el caso de *Raffaelea spp.* (Simmons *et al.*, 2016). En esta investigación se determinó la diversidad morfológica y la capacidad antagonica de actinobacterias de un suelo desmontado contra la germinación de esporas de cuatro especies de hongos fitopatógenos, la actividad antagonica y fungicida de seis actinobacterias contra la germinación de esporas de *Raffaelea spp.* y la identidad a nivel de género de éstas actinobacterias.

Materiales y métodos

Aislamiento y caracterización morfológica de actinobacterias. Se obtuvo una colección de actinobacterias aisladas de un área de 5 x 5 m de un suelo desmontado del municipio de El Mante, Tamaulipas (22°43'04.5''N; 98°57'45''W). Cinco muestras de 100 g aproximadamente de suelo fueron tomadas a una profundidad de 15 a 20 cm, se combinaron en una sola

2012) and *Colletotrichum kahawae*, *Fusarium spp.* and *F. oxysporum* (Nonoh *et al.*, 2010).

There is a great diversity of phytopathogenic fungi that produce structures with an important role for the development of the diseases they cause, among which are sclerotia and some type of spores. These structures have the function of survival for long periods and the dissemination of phytopathogenic microorganisms. Frequently during the search for antagonistic actinobacteria, these are evaluated for their activity against the mycelial growth of fungi or oomycetes of interest, which is also important because the mycelium is involved in the colonization of host plants and in the production of sclerotia and spores. Several species and strains of actinobacteria have been identified with high capacity to inhibit the germination of spores of phytopathogenic fungi (Rodríguez-Guerra *et al.*, 2019; Sittivate and Nalumpang, 2015; Macagnan *et al.*, 2009), so it is important to assess the antagonism against these structures that play an important role in the development of the diseases they cause. Among the phytopathogenic fungi that produce abundant spores are *Colletotrichum* and *Fusarium* species that cause numerous major diseases to a wide range of plant species (Cannon *et al.*, 2012; Leslie and Summerell, 2013). There are also species of phytopathogenic fungi associated with arthropod vectors that transport and spread their spores, such as *Raffaelea spp.* (Simmons *et al.*, 2016). The objectives of this research were to determine the morphotypic diversity and the antagonistic capacity of actinobacteria of a disassembled soil against the germination of spores of four species of phytopathogenic fungi, the antagonistic and fungicidal activity of six actinobacteria against spore germination of *Raffaelea* species and the identity of these actinobacteria to genera level.

Materials and methods

Isolation and morphotype characterization of actinobacteria. A collection of actinobacteria isolated from an area of 5 x 5 m of a disassembled soil in the municipality of El Mante, Tamaulipas (22°43'04.5''N; 98°57'45''W) was obtained. Five samples of approximately 100 g of soil were taken at a depth of 15 to 20 cm, they were combined in a single bag, and transported to the General Terán Experimental Station of National Research Institute for Forestry, Agriculture and Livestock. With one gram of soil, dilutions 10⁻¹ to 10⁻⁴ were obtained, and aliquots of 50 µL were added, and dispersed in Petri dishes containing nutritive agar as culture medium. At 24 - 48 h, under a compound

bolsa y se transportaron al Campo Experimental General Terán del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Con un gramo de suelo se obtuvieron las diluciones 10^{-1} a 10^{-4} y alícuotas de 50 μL fueron agregadas y dispersadas en cajas Petri conteniendo agar nutritivo como medio de cultivo. A las 24 - 48 h, bajo un microscopio compuesto, se extrajeron microcolonias de actinobacterias y se transfirieron a nuevo medio de cultivo. A los 10 días se caracterizaron las cepas y se definieron morfotipos con base a características de sus colonias como se describió previamente (Rodríguez-Guerra *et al.*, 2020a; Silva *et al.*, 2013) y un índice de diversidad de éstos fue obtenido (Shannon, 1948) con la fórmula:

$$H = -\sum_i p_i \ln(p_i)$$

donde H= índice de diversidad de la muestra; "pi"= proporción de la abundancia relativa del morfotipo "i" en relación con la abundancia de todos los morfotipos en una muestra de suelo y "S"= número total de morfotipos.

Prueba preliminar de antagonismo. Una cepa de cada morfotipo de actinobacteria se utilizó para determinar su capacidad de inhibir la germinación de esporas de *Colletotrichum musae*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum* y *Raffaelea* sp. mediante un escrutinio sin repeticiones. Las actinobacterias se inocularon y dispersó en el centro de cajas Petri con agar nutritivo, se mantuvieron a 26 °C por siete días y entonces se colocó una alícuota de 20 μL de las suspensiones de esporas de cada fitopatógeno a 1.5 a 2.0 cm del borde de las colonias de las actinobacterias. Un testigo sin actinobacterias fue establecido. A las 24 y 96 h se revisó y registró la capacidad de cada actinobacteria de inhibir la germinación de esporas.

Confrontación dual. Seis morfotipos de actinobacterias con sobresaliente actividad por inhibir la germinación de esporas de *Raffaelea* sp. en el escrutinio, se seleccionaron para llevar una confrontación dual contra ésta misma cepa y las especies *R. fusca* y *R. subalba*, con sus respectivos testigos. Las actinobacterias fueron inoculadas y dispersadas en un extremo de cajas Petri con agar nutritivo; a los 7 días se inoculó en el extremo opuesto 20 μL de una suspensión de esporas de cada especie de *Raffaelea*. Los testigos consistieron sólo en la inoculación de las esporas en un extremo de las cajas Petri conteniendo el medio de cultivo agar nutritivo libre de actinobacterias. Al séptimo día de iniciadas las confrontaciones se evaluó el crecimiento radial en dirección a las colonias de actinobacterias a partir de las

microscope, microcolonies of actinobacteria were extracted and transferred to a new culture medium. At 10 days the strains were characterized and morphotypes were defined based on characteristics of their colonies as previously described (Rodríguez-Guerra *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2013) and a diversity index of these was obtained (Shannon, 1948) with the formula:

$$H = -\sum_i p_i \ln(p_i)$$

where H= sample diversity index; "pi"= proportion of the relative abundance of morphotype "i" relative to the abundance of all morphotypes in a soil sample and "S"= total number of morphotypes.

Preliminary test of antagonism. One strain of each actinobacteria morphotype was used to determine its ability to inhibit the germination of spores of *Colletotrichum musae*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum* and *Raffaelea* sp. by screening without repetitions. The actinobacteria were inoculated and dispersed in the center of Petri dishes with nutrient agar, kept at 26 °C for seven days and then a 20 μL aliquot of the spore suspensions of each phytopathogen was placed 1.5 to 2.0 cm from the edge of the actinobacteria colonies. A control without actinobacteria was established. At 24 and 96 h, the capacity of each actinobacteria to inhibit spore germination was reviewed and recorded.

Dual confrontation. Six morphotypes of actinobacteria with outstanding activity for inhibiting spore germination of *Raffaelea* sp. in the screening, were selected to carry out a dual confrontation against this same strain and the species *R. fusca* and *R. subalba*, with their respective controls. The actinobacteria were inoculated and dispersed at one end of Petri dishes with nutrient agar, and at 7 days 20 μL of a spore suspension of each *Raffaelea* species was inoculated at the opposite end. The controls consisted only of the inoculation of the spores at one end of the Petri dishes containing the nutrient agar culture medium free from actinobacteria. On the seventh day of the beginning of the confrontations, the radial growth was evaluated from the aliquots deposited. At seven days, the radial growth of *Raffaelea* spp. was evaluated in the direction of actinobacteria colonies.

Fungistatic/fungicide activity. A experiment was conducted to observe the germination behavior of *R. fusca* and *R. subalba* spores after exposure, without contact, with six actinobacteria morphotypes. Spores of both *Raffaelea* species were confronted with each actinobacteria. Actinobacteria were inoculated in the center of Petri dishes with nutrient agar and after seven

alícuotas depositadas.

Actividad fungistática/fungicida. Se realizó un experimento para observar el comportamiento de la germinación de esporas de *R. fusca* y *R. subalba* después de su exposición, sin contacto, con seis morfotipos de actinobacterias. Esporas de ambas especies de *Raffaelea* se confrontó con cada actinobacteria. Las actinobacterias se inocularon en el centro de cajas Petri con agar nutritivo y a los siete días se inocularon cuatro alícuotas (repeticiones) de 20 µL de una suspensión de esporas de cada especie en los puntos cardinales con cada actinobacteria. Los testigos consistieron en suspensiones de esporas inoculadas en cajas Petri libres de actinobacterias. A las 48 h se removió los fragmentos de medio de cultivo donde fueron depositadas las esporas, incluyendo aquellos de los testigos, se invirtieron en nuevas cajas Petri para permitir que las esporas quedaran depositadas en ellas, y los fragmentos fueron retirados. A las 96 h se observó bajo el microscopio compuesto el área donde quedaron depositadas las esporas y se determinó para cada área la ocurrencia de alguna de las siguientes respuestas: 1. sin germinación y sin formación de colonia aparente; 2. con germinación y formación de colonia aparente. Sólo las actinobacterias que mostraron inhibición de la germinación en el 100 % de las áreas, se consideró que tienen actividad fungicida, mientras que actinobacterias que causaron ambos tipos de respuesta se consideró que tienen actividad fungistática.

Análisis del gen 16S. Las Seis cepas de actinobacterias sobresalientes fueron crecidas en 15 mL de caldo nutritivo por 4 días, se centrifugaron a 8000 rpm y se eliminó el sobrenadante. El ADN se extrajo con el kit DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN) de acuerdo con las especificaciones para extracción de ADN de bacterias Gram positivas, en lugar de usar el buffer de lisis enzimático sugerido por el protocolo, la pastilla con actinobacterias se sometió a una disrupción mecánica con perlas durante 10 segundos en un tubo que contuvo 200 µL de PBS y 25 µL de proteinasa K.

Se amplificó el gen 16S del ADN ribosomal con los oligonucleótidos F1 (5' - AGAGTTTGATCITGGCTCAG-3') y R5 (5' - ACGGITACCTTGTTACGACTT-3') utilizados previamente por Cook y Meyers (2003). Las condiciones de reacción para la PCR fueron las siguientes: buffer 1x, MgCl² 2 mM, 0.6 mM DNTPs, 500 nM de cada oligonucleótido y 2 U de Taq platinum (Invitrogen), con 94°C por 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 al

days four 20 µL aliquots (replications) a spore suspension of each species were inoculated at the cardinal points with each actinobacteria. Controls consisted of spore suspensions inoculated into actinobacteria-free Petri dishes. At 48 h, the fragments of culture medium where the spores were deposited were removed, including those of the controls, they were inverted in new Petri dishes to allow the spores to remain deposited in them, and the fragments were removed. At 96 h, the area where the spores were deposited was observed under the compound microscope and the occurrence of any of the following responses was determined for each area: 1. without germination and without apparent colony formation; 2. with germination and apparent colony formation. Only actinobacteria that showed inhibition of germination in 100% of the areas were considered to have fungicide activity, while actinobacteria that caused both types of response were considered to have fungistatic activity.

Analysis of the 16S gene. The six outstanding actinobacteria strains were grown in 15 mL of nutrient broth for 4 days, they were centrifuged at 8000 rpm and the supernatant was removed. The DNA was extracted with the DNeasy Blood and Tissue kit (QIAGEN) according to the specifications for DNA extraction from Gram positive bacteria, instead of using the enzymatic lysis buffer suggested by the protocol, the actinobacteria pellet was subjected to a mechanical disruption with bead by 10 sec in a tube containing 200 µL of PBS and 25 µL of proteinase K.

The 16S gene of ribosomal DNA was amplified with the oligonucleotides F1 (5' - AGAGTTTGATCITGGCTCAG-3') and R5 (5' - ACGGITACCTTGTTACGACTT-3') previously used by Cook and Meyers (2003). The reaction conditions for PCR were as follows: buffer 1x, MgCl₂ 2 mM, 0.6 mM DNTPs, 500 nM of each oligonucleotide and 2 U of Taq platinum (Invitrogen), with 94°C for 2 min, 30 cycles of 94°C x 45 sec, 56°C x 30 sec, 72°C for 2 min and a final extension of 72°C for 5 min. The PCR products were sent to the National Laboratory of Agricultural, Medical and Environmental Biotechnology of the Potosino Institute of Scientific and Technological Research for sequencing in both senses. With the sequences, a consensus sequence was obtained for each actinobacteria and with these a search was carried out in the GenBank database with the BLAST tool to establish its relationship with some genus of actinobacteria and previously registered species.

Statistical analysis. In the dual confrontation experiment, five repetitions were established under a

Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica para su secuenciación en ambos sentidos. Con las secuencias se obtuvo una secuencia consenso para cada actinobacteria y con éstas se realizó una búsqueda en la base de datos del GenBank con la herramienta BLAST para establecer su relación con algún género de actinobacteria y especies previamente registradas.

Análisis estadísticos. El experimento de confrontación dual cinco repeticiones fueron establecidas bajo un diseño completamente al azar con dos factores (actinobacterias y especie de *Raffaelea*) y los datos de crecimiento radial fueron analizados en el programa InfoStat versión 30/04/2020. En el experimento para determinar la actividad fungistática/fungicida de las actinobacterias sobre la germinación de esporas se registró la frecuencia de cada tipo de respuesta, considerando el 100 % las cuatro áreas depositadas en cada caja Petri.

Resultados

Noventa y dos cepas de actinobacterias fueron aisladas del suelo desmontado de El Mante, Tamaulipas, y 64 morfotipos fueron definidos con base a características de sus colonias. El índice de diversidad de Shannon-Wiener fue de 4.05 con base a los morfotipos de actinobacterias que se definieron, el cual se considera alto. Una muestra de la diversidad de morfotipos se presenta en la Figura 1.

De los morfotipos que presentaron dos o más cepas idénticas una fue seleccionada arbitrariamente, y los 64 morfotipos se evaluaron en un ensayo sin repeticiones contra suspensiones de esporas de cuatro hongos fitopatógenos. A las 24 h se observó que 44, 13, 1 y 1 morfotipos de actinobacterias inhibieron la germinación de esporas de *Raffaelea* sp., *Colletotrichum musae*, *Fusarium oxysporum* y *F. solani*, respectivamente. Sin embargo, en una segunda evaluación a la 96 h, se registró que 14, 5, 1 y 1 actinobacterias mantuvieron la acción inhibitoria de la germinación de esporas de los mismos fitopatógenos. Una muestra del escrutinio entre actinobacterias y esporas de los cuatro fitopatógenos se presenta en la Figura 2.

Debido a que un mayor número de morfotipos de actinobacterias mostraron inhibición de la germinación de esporas de *Raffaelea* sp. y a que especies de este género son simbiosis y se transmiten por coleópteros ambrosiales, que representan un riesgo para especies vegetales en el país, seis de esos morfotipos (M-18, M-21, M-31, M-46, M-47, M-74) fueron seleccionados

completamente randomized design with two factors (actinobacteria and *Raffaelea* species) and the radial growth data were analyzed in the InfoStat program version 04/30/2020. In the experiment to determine the fungistatic / fungicidal activity of actinobacteria on spore germination, the frequency of each type of response was recorded, considering 100% the four areas deposited in each Petri dish.

Results

Ninety-two strains of actinobacteria were isolated from the disassembled soil of El Mante, Tamaulipas, and 64 morphotypes were defined based on characteristics of their colonies. The Shannon-Wiener diversity index was 4.05 based on the actinobacterial morphotypes that were defined, which is considered high. A sample of the diversity of morphotypes is presented in Figure 1.

Of the morphotypes that presented two or more identical strains, one was arbitrarily selected, and the 64 morphotypes were evaluated in a without repetition trial against spore suspensions of four phytopathogenic fungi. At 24 h it was observed that 44, 13, 1 and 1 morphotypes of actinobacteria inhibited the germination of spores of *Raffaelea* sp., *Colletotrichum musae*, *Fusarium oxysporum* and *F. solani*, respectively. However, in a second evaluation at 96 h, it was recorded that 14, 5, 1 and 1 actinobacteria maintained the inhibitory action of spore germination of the same phytopathogens. A sample of the screening between actinobacteria and spores of the four phytopathogens is presented in Figure 2.

Due to greater number of actinobacteria morphotypes showed inhibition of spore germination of *Raffaelea* sp. and that species of this genus are both symbionts and transmitted by ambrosial beetles, that represent a risk to plant species in the country, six of these morphotypes (M-18, M-21, M-31, M-46, M-47, M-74) were arbitrarily selected to be evaluated in dual confrontation against spores of *Raffaelea* sp., *R. fusca* and *R. subalba*.

arbitrariamente para ser evaluados en confrontación dual contra esporas de *Raffaelea* sp., *R. fusca* y *R. subalba*.

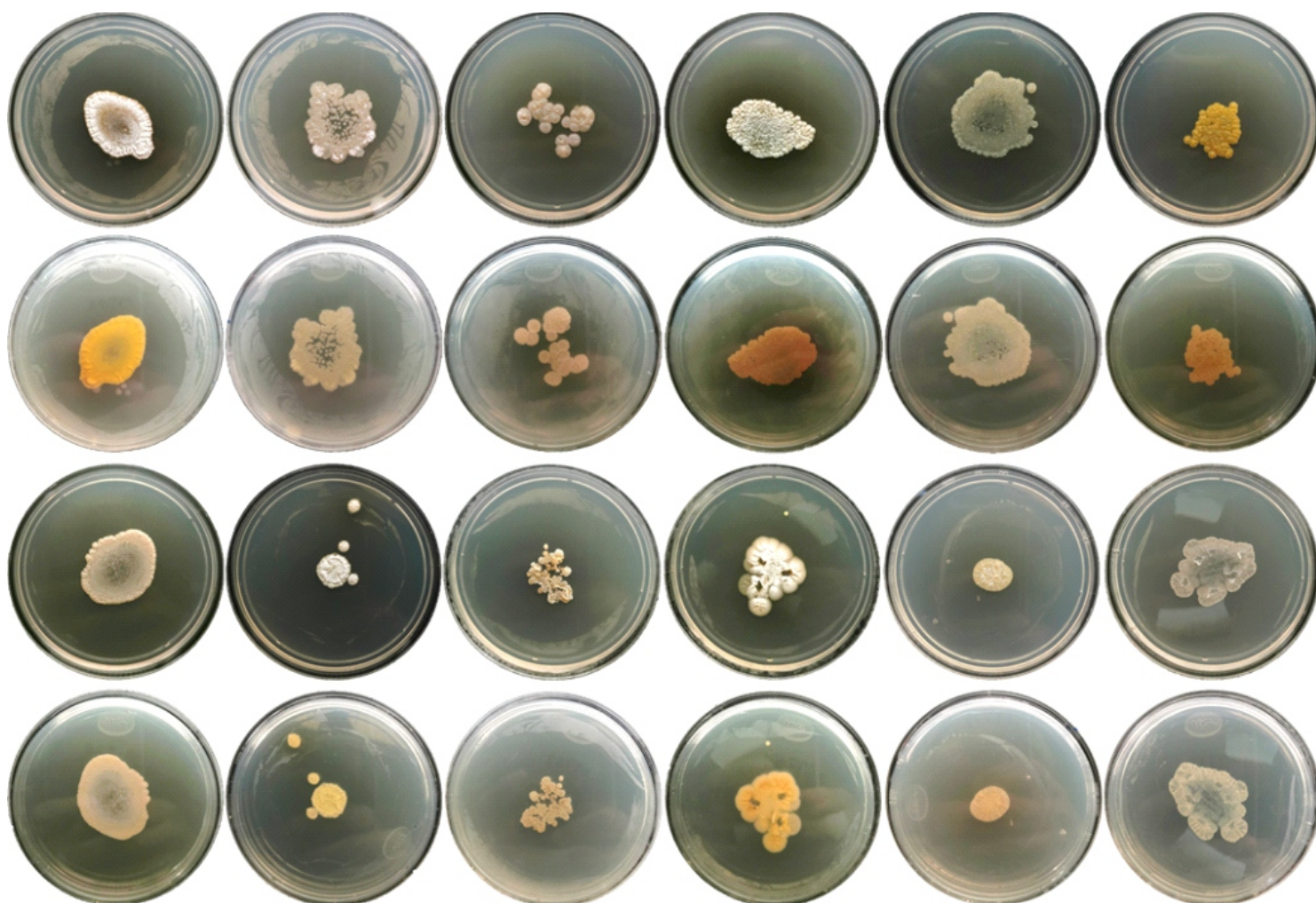


Figura 1. Aspecto de colonias de doce morfotipos de actinobacterias aisladas de suelo de El Mante, Tamaulipas, definidas con base a las características de sus colonias. Vista frontal (filas 1 y 3) y por el inverso (filas 2 y 4).

Figure 1. Appearance of colonies of twelve morphotypes of actinobacteria isolated from the soil of El Mante, Tamaulipas, defined based on the characteristics of their colonies. Front view (rows 1 and 3) and reverse view (rows 2 and 4).

En la confrontación dual se encontró diferencias ($p < 0.01$) entre actinobacterias, especies de *Raffaelea* y en la interacción de ambos factores. Las esporas de *Raffaelea* sp., *R. fusca* y *R. subalba* fueron incapaces de germinar y desarrollar colonias en la confrontación con las seis actinobacterias, por lo que su crecimiento radial fue de 0.0 mm. Sin embargo, el promedio de crecimiento radial

In dual confrontation differences were found ($p < 0.01$) between actinobacteria, *Raffaelea* species and in the interaction of both factors. The spores of *Raffaelea* sp., *R. fusca* and *R. subalba* were unable to germinate and develop colonies in the confrontation with the six actinobacteria, so their radial growth was 0.0 mm. However, average radial growth in the controls was 8.6,

en los testigos fue de 8.6, 2.0 y 3.6 mm para *Raffaelea* sp., *R. fusca* y *R. subalba* respectivamente. En la Figura 3 se muestra la confrontación dual de los seis morfotipos de actinobacterias con *R. fusca*.

2.0 and 3.6 mm for *Raffaelea* sp., *R. fusca* and *R. subalba* respectively. Figure 3 shows the dual confrontation of the six actinobacteria morphotypes with *R. fusca*.

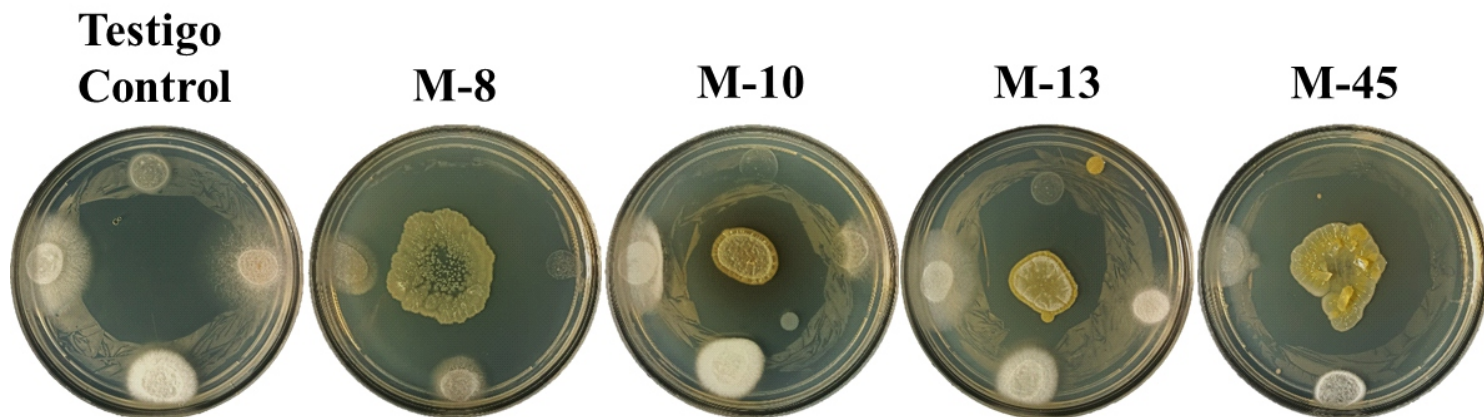


Figura 2. Respuesta de esporas de cuatro especies de hongos fitopatogénos en el escrutinio con cuatro actinobacterias y en el testigo libre de actinobacterias. En el testigo y demás cajas Petri se localiza arriba y en el sentido de las manecillas del reloj *Raffaelea* sp., *Colletotrichum musae*, *Fusarium solani* y *F. oxysporum*.

Figure 2. Spore response of four species of phytopathogenic fungi in the screening with four actinobacteria and in the control free of actinobacteria. In the control and other Petri dishes, *Raffaelea* sp., *Colletotrichum musae*, *Fusarium solani* and *F. oxysporum* are located at the top and clockwise.

En la prueba de fungistasis/fungicida las esporas de *R. fusca* y *R. subalba* fueron incapaces de germinar mientras permanecieron por 48 h en las cajas Petri con las actinobacterias sin contacto con ellas. Sin embargo, en los testigos las esporas iniciaron la germinación. A las 96 h de transferidas las esporas a nuevas cajas Petri libres de actinobacterias, sólo cuatro actinobacterias (M-18, M-21, M-31 y M-74) inhibieron la germinación de esporas de *R. fusca* en el 100 % de las áreas donde las esporas fueron depositadas, por lo que se consideró que poseen actividad fungicida. Mientras que sólo la actinobacteria M-46 se consideró que tiene actividad fungicida contra *R. subalba* (Figura 4).

El análisis de la secuencia del gen 16S mostró que los seis morfotipos pertenecen al género *Streptomyces*. Los morfotipos M-18 y M-74 tuvieron elevado porcentaje de identidad (99.63 a 100) con dos especies en común (*Streptomyces levis*, *Streptomyces pseudogriseolus*), mientras que los morfotipos M-21, M-46 y M-47

In the fungistatic/fungicide test, spores of *R. fusca* and *R. subalba* were unable to germinate while they remained for 48 h in the Petri dishes with the actinobacteria without contact with them. However, in the controls the spores started germination. At 96 h after the spores were transferred to new actinobacteria-free Petri dishes, only four actinobacteria (M-18, M-21, M-31, and M-74) inhibited the germination of *R. fusca* spores in 100% of the areas where the spores were deposited, for which they were considered to have fungicide activity. While only actinobacteria M-46 was considered to have fungicide activity against *R. subalba* (Figure 4).

Sequence analysis of the 16S gene showed that the morphotypes M-18, M-21, M-31, M-46, M-47, M-74 belong to the genus *Streptomyces*. Morphotypes M-18 and M-74 had a high percentage of identity (99.63 to 100) with two species in common (*Streptomyces levis*, *Streptomyces pseudogriseolus*), while morphotypes M-

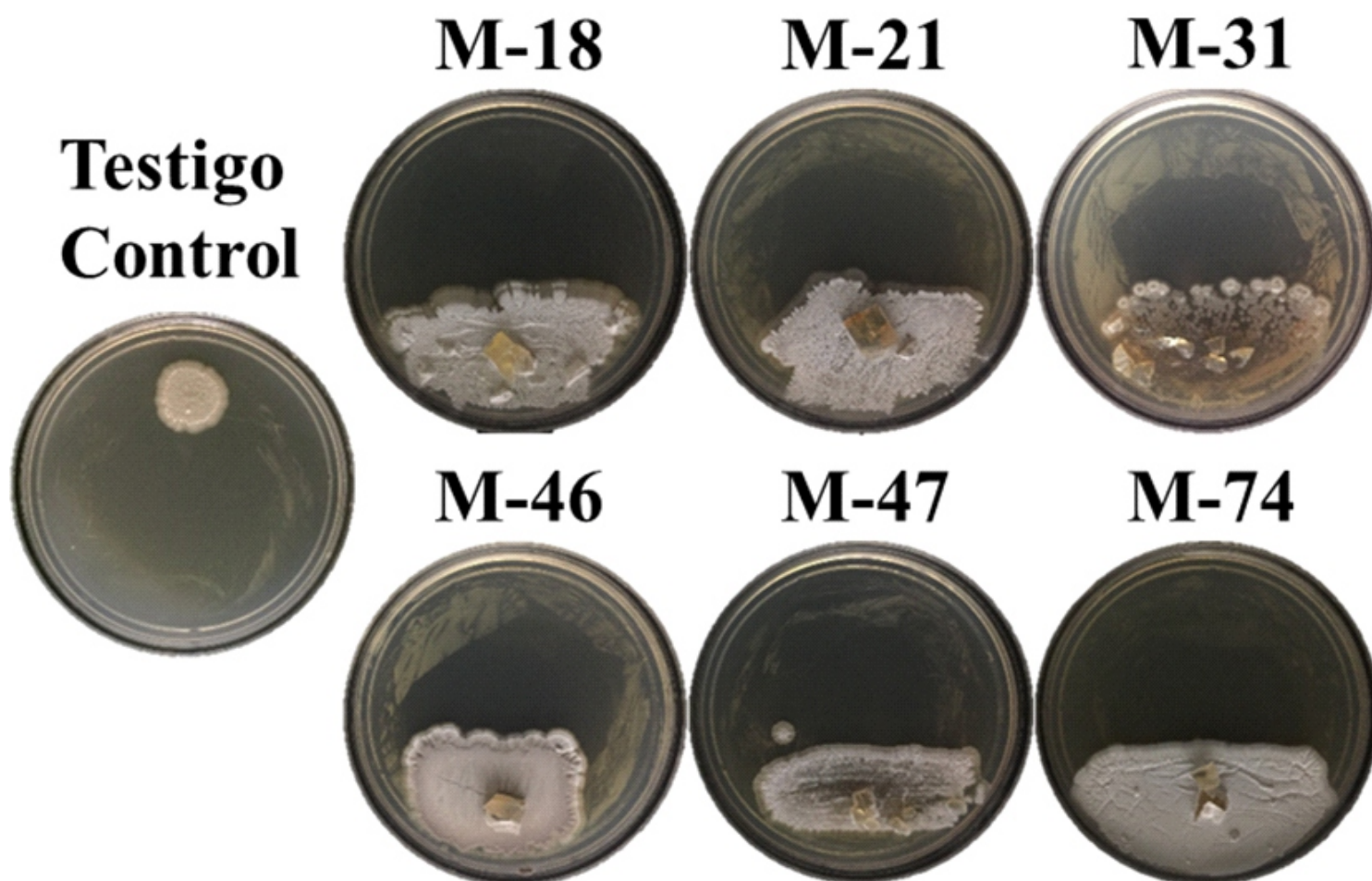


Figura 3. Confrontación dual de seis morfotipos de actinobacterias con esporas de *Raffaelea fusca* y el testigo. Observe la ausencia de colonias del hongo fitopatológico en la confrontación, respecto al testigo.

Figure 3. Dual confrontation of six actinobacteria morphotypes with *Raffaelea fusca* spores and the control. Observe the absence of colonies of the phytopathogenic fungus in the confrontation, with respect to the control.

mostraron los mayores porcentajes de identidad con *Streptomyces diastatochromogenes* (98.75), *Streptomyces thermotolerans* (99.78) y *Streptomyces coeruleorubidus* (99.78). El morfotipo M-31 mostró el mismo porcentaje de identidad (99.78) con cuatro especies (Cuadro 1). Las secuencias de cada cepa serán sometidas al GenBank como *Streptomyces* sp. y se pondrá como referencia este artículo.

21, M-46 and M-47 showed the highest percentages of identity with *Streptomyces diastatochromogenes* (98.75), *Streptomyces thermotolerans* (99.78) y *Streptomyces coeruleorubidus* (99.78). M-31 morphotype showed the same percentage of identity (99.78) with four species (Cuadro 1). Sequences of each strain will be submitted to GenBank as *Streptomyces* sp. and this article will be put as a reference.

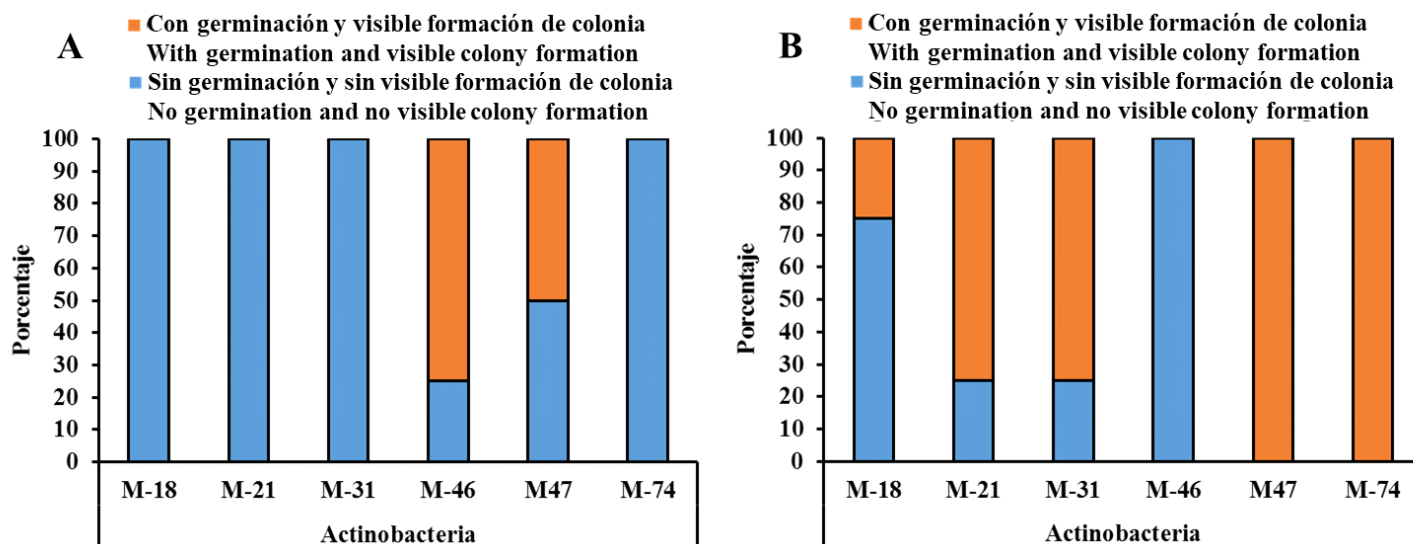


Figura 4. Porcentaje de repeticiones en que ocurrió germinación de esporas con formación de colonias y ausencia de germinación de esporas sin formación de colonias de *Raffaelea fusca* (A) y *R. subalba* (B) a las 96 h de transferidas de su confrontación con actinobacterias por 48 h.

Figure 4. Percentage of replicates in which spore germination occurred with colony formation and absence of spore germination without colony formation of *Raffaelea fusca* (A) and *R. subalba* (B) at 96 h after being transferred from their confrontation with actinobacteria for 48 h.

Cuadro 1. Porcentajes de identidad de secuencias del gen 16S de morfotipos de actinobacterias con especies del género *Streptomyces*.

Cuadro 1. Sequence identity percentages of the 16S gene of actinobacterial morphotypes with species of the genus *Streptomyces*.

| Morfotipo | Related species (identity percentage) |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| M-18 | <i>Streptomyces levis</i> (100); <i>Streptomyces pseudogriseolus</i> (99.78) |
| M-21 | <i>Streptomyces diastatochromogenes</i> (98.75); <i>Streptomyces europaeiscabiei</i> (98.16); <i>Streptomyces stelliscabiei</i> (98.08); <i>Streptomyces bottropensis</i> (98.01) |
| M-31 | <i>Streptomyces scabiei</i> (99.78); <i>Streptomyces europaeiscabiei</i> (99.78); <i>Streptomyces deccanensis</i> (99.78); <i>Streptomyces bottropensis</i> (99.78) |
| M-46 | <i>Streptomyces thermotolerans</i> (99.78); <i>Streptomyces purpurascens</i> (99.70); <i>Streptomyces hawaiiensis</i> (99.70); <i>Streptomyces indiaensis</i> (99.63) |
| M-47 | <i>Streptomyces coeruleorubidus</i> (99.78); <i>Streptomyces bellus</i> (99.70); <i>Streptomyces coeruleofuscus</i> (99.56); <i>Streptomyces massasporeus</i> (99.56) |
| M-74 | <i>Streptomyces levis</i> (99.85); <i>Streptomyces pseudogriseolus</i> (99.63) |

Discusión

Las actinobacterias son un grupo de organismos abundantes y comunes presentes en suelos y entre las cuales es posible identificar especies y cepas antagonicas con potencial para el biocontrol de hongos fitopatógenos (Rodríguez-Guerra *et al.*, 2019; Yadav *et al.*, 2018). Una estrategia para seleccionar cepas de actinobacterias con actividad contra hongos fitopatógenos, y posteriormente utilizar las más sobresalientes en estudios detallados de antagonismo, consiste en definir morfotipos con base a las características de las colonias y de cambios en el medio de cultivo donde crecen, y utilizar una cepa de cada morfotipo (Rodríguez-Guerra *et al.*, 2020a, b). Se considera que la cantidad de morfotipos de actinobacterias presentes en el suelo de El Mante, Tamaulipas, es elevado tomando en cuenta que se identificaron 64 a partir de 92 aislados obtenidos. El índice de diversidad de morfotipos de 4.05 observado, se considera alto respecto a la ocurrencia de índices observados en suelos cultivados y no cultivados del norte y noreste de México (Rodríguez-Guerra *et al.*, 2020a, b).

Durante la evaluación preliminar de la actividad antagonica de los 64 morfotipos, se encontró un número variable de éstos con actividad para cada fitopatógeno. Esto es comúnmente observarlo en diversos estudios que realizan escrutinios para preseleccionar actinobacterias con antagonismo sobresaliente contra fitopatógenos para estudios más detallados (Hong *et al.*, 2018; Semwal *et al.*, 2018; Palaniyandi *et al.*, 2013). Durante el escrutinio sin repeticiones, a partir de los 64 morfotipos evaluados, la inhibición de la germinación de esporas de *F. oxysporum* y *F. solani* se mantuvo hasta las 96 h por un morfotipo para cada fitopatógeno. Sin embargo, la reducción del número de morfotipos que inhibieron la germinación de esporas de *Raffaelea* sp. y *C. musae*, de las 24 a las 96 h durante el escrutinio, sugiere que algún factor químico producido por las actinobacterias retrasa la germinación de esporas y formación de colonias de ambos hongos; sin embargo, es necesario confirmar esta hipótesis bajo un diseño experimental. Desconocemos que un comportamiento así tan marcado como éste haya sido reportado en alguna investigación previa; sin embargo, los porcentajes de inhibición del crecimiento de colonias de *R. quercus-mongolicae* pueden ser menores en colonias de actinobacterias de mayor edad en confrontaciones duales (Hong *et al.*, 2018). También fue posible observar marcada inhibición del crecimiento en dirección a las actinobacterias de *C. musae* y *F.*

Discussion.

Actinobacteria are a group of abundant and common organisms present in soils and among which it is possible to identify both species and strains antagonistic with potential for the biocontrol of phytopathogenic fungi (Rodríguez-Guerra *et al.*, 2019; Yadav *et al.*, 2018). A strategy to select strains of actinobacteria with activity against phytopathogenic fungi, and then use the most outstanding in detailed studies of antagonism, is to define morphotypes based on the characteristics of the colonies and changes in the culture medium where they grow and use a strain of each morphotype (Rodríguez-Guerra *et al.*, 2020a, b). However, the possibility that there are interactions during screening that may underestimate or overestimate the number of morphotypes with outstanding antagonistic characteristics is not ruled out. It is considered that the amount of morphotypes of actinobacteria present in the soil of El Mante, Tamaulipas, is high taking into account that 64 were identified in 92 isolates obtained. The observed index of morphotype diversity of 4.05 is considered high with respect to the indexes observed in cultivated and uncultivated soils of the north and northeast of Mexico (Rodríguez-Guerra *et al.*, 2020a, b).

During the preliminary evaluation of the antagonistic activity of the 64 morphotypes, a variable number of these with activity was found for each phytopathogen. This is commonly observed in various studies that conduct scrutiny to pre-select actinobacteria with outstanding antagonism against phytopathogens for more detailed studies (Hong *et al.*, 2018; Semwal *et al.*, 2018; Palaniyandi *et al.*, 2013). During the scrutiny without repetitions, from the 64 morphotypes evaluated, the inhibition of spore germination of *F. oxysporum* and *F. solani* was maintained until 96 h by a morphotype for each phytopathogen. However, the reduction in the number of morphotypes that inhibited spore germination of *Raffaelea* sp. and *C. musae*, from 24 to 96 h during the scrutiny, suggests that some chemical factor produced by actinobacteria delays spore germination and colony formation of both fungi; however, it is necessary to confirm this hypothesis under an experimental design. We unknown that such a marked behavior as this has been reported in any previous investigation; however, growth inhibition percentages of *R. quercus-mongolicae* colonies may be lower in older actinobacteria colonies in dual confrontations (Hong *et al.*, 2018). It was also possible to observe marked growth inhibition in the direction of the actinobacteria of *C. musae* and *F. oxysporum* (e.g., M-

oxysporum (ej. M-10 en Figura 2).

En la confrontación dual de seis morfotipos de actinobacterias contra *Raffaelea* sp., *R. fusca* y *R. subalba*, ninguna de las tres especies fue capaz de desarrollar colonias a partir de suspensiones de esporas, debido a que estas fueron incapaces de germinar. Son escasas las investigaciones dirigidas a evaluar la actividad antagónica de actinobacterias contra especies de *Raffaelea*; sólo se cuenta con información de la actividad antagónica de la cepa TPML13089 de *Streptomyces blastmyceticus*, que produce la mayor área de inhibición (43 %) de *Raffaelea quercus-mongolicae*, respecto a otras cepas de la misma especie, y otras dos especies de *Streptomyces* (Hong *et al.*, 2018). El efecto observado en la confrontación dual sobre la inhibición de la germinación de las esporas de las tres especies de *Raffaelea*, sugirió que podría existir un efecto fungicida sobre ellas por metabolitos producidos por las actinobacterias. La confrontación de las seis actinobacterias con esporas de *R. fusca* y *R. subalba* mantuvo la inhibición de la germinación durante las 48 en que permanecieron confrontadas, como se observó en el experimento de confrontación dual. Sin embargo, al remover las esporas de la confrontación y transferirse a cajas con medio de cultivo libre de actinobacterias, se observó que la inhibición de la germinación de esporas de *R. fusca* se mantuvo por cuatro morfotipos de actinobacterias y de *R. subalba* por un morfotipo. Lo anterior muestra que la respuesta de inhibición de la germinación de esporas por actinobacterias es específica de la especie de *Raffaelea*, y que es posible identificar cepas con capacidad fungicida contra esporas de especies de *Raffaelea*. Sobre la germinación de esporas de *Raffaelea quercus-mongolicae* ha sido reportado efectos inhibitorios del 100% utilizando filtrados de colonia de la cepa TPML13089 de *Streptomyces blastmyceticus* (Hong *et al.*, 2018), pero no se establece si la inhibición observada es debida a un efecto fungicida o fungistático como se demuestra aquí. Aunque la selección arbitraria de seis de los 14 morfotipos que inhibieron a *Raffaelea* sp. en el escrutinio mostraron elevada actividad en la confrontación dual y una inhibición de la germinación de esporas dependiente de la especie *R. fusca* y *R. subalba* con los seis morfotipos sobresalientes en la prueba de fungistas/fungicidad, no se descarta la posibilidad de que la interacción durante el escrutinio puede subestimar o sobreestimar el número de morfotipos con características antagónicas sobresalientes contra especies de *Raffaelea*.

La similitud de las secuencias del gen 16S de los

10 in Figure 2).

In the dual confrontation of six actinobacterial morphotypes against *Raffaelea* sp., *R. fusca* and *R. subalba*, none of the three species was able to develop colonies from spore suspensions, because they were unable to germinate. There is little research aimed at evaluating the antagonistic activity of actinobacteria against *Raffaelea* species; only information is provided on the antagonistic activity of the TPML13089 strain of *Streptomyces blastmyceticus*, which produces the largest inhibition area (43%) of *Raffaelea quercus-mongolicae*, compared to other strains of the same species, and two other species of *Streptomyces* (Hong *et al.*, 2018).

The effect observed in the dual confrontation on the inhibition of the germination of the spores of the three species of *Raffaelea*, suggested that there could be a fungicide effect on them by metabolites produced by actinobacteria. The confrontation of the six actinobacteria with spores of *R. fusca* and *R. subalba* maintained the inhibition of germination during the 48 in which they remained confronted, as observed in the dual confrontation experiment. However, when the spores were removed from the confrontation, and transferred to dishes with culture medium free of actinobacteria, it was observed that the inhibition of spore germination of *R. fusca* was maintained by four morphotypes of actinobacteria and of *R. subalba* by a morphotype. This shows that the response of inhibition of spore germination by actinobacteria is specific to the *Raffaelea* species, and that it is possible to identify strains with fungicidal capacity against spores of *Raffaelea* species. On the germination of *Raffaelea quercus-mongolicae* spores, 100% inhibitory effects have been reported using colony filtrates of the *Streptomyces blastmyceticus* strain TPML13089 (Hong *et al.*, 2018), but it is not established whether the observed inhibition is due to a fungicide or fungistatic effect as demonstrated here.

The similarity of the 16S gene sequences of the M-18 and M-74 morphotypes with the *Streptomyces* species to which they are related based on BLAST analysis, shows that the morphological differences are not enough to establish that different morphotypes could belong to different species, as has been shown by Visser *et al.* (2012). However, the identity percentage of the M-21, M-31, M-46 and M-47 morphotypes with different species of *Streptomyces*, also shows that the 16S gene is insufficient to be able to have certainty in determining the identity of strains of actinobacteria, considering that about 650 species are grouped in the

morfotipos M-18 y M-74 con las especies de *Streptomyces* con que están relacionadas en base al análisis BLAST, muestra que las diferencias morfológicas no son suficientes para establecer que morfotipos distintos pudieran pertenecer a especies diferentes, como ha sido demostrado por Visser *et al.* (2012). Sin embargo, el porcentaje de identidad de los morfotipos M-21, M-31, M-46 y M-47 con diferentes especies de *Streptomyces*, también muestra que el gen 16S es insuficiente para poder tener certidumbre en determinar la identidad de cepas de actinobacterias, considerando que cerca de 650 especies se agrupan en los streptomycetaceos con base a la secuencia de este gen (Labeda *et al.*, 2012). Ninguna de las especies relacionadas con los seis morfotipos bajo estudio ha sido reportada con actividad biológica contra *Raffaelea*, por lo que pueden ser consideradas con potencial para ser utilizadas en el biocontrol de especies de este género.

Conclusiones

La diversidad de morfotipos de actinobacterias en el suelo de El Mante, Tamaulipas, es bajo; sin embargo, se identificaron cepas con importante actividad para inhibir la germinación de esporas de hongos fitopatógenos. Esporas de *Raffaelea* sp., *R. fusca* y *R. subalba* fueron completamente inhibidas por seis morfotipos de actinobacterias mientras permanecen en confrontación. Al menos una cepa de actinobacteria inhibió la germinación de esporas de *R. fusca* y *R. subalba* después de la exposición por 48 h, sugiriendo una fuerte actividad fungicida dependiente de la especie de *Raffaelea*. Los seis morfotipos analizados contra *Raffaelea* spp. están relacionados a especies del género *Streptomyces* y pueden considerarse con potencial para el control de especies de *Raffaelea*.

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".

streptomycetaceans based on the sequence of this gene (Labeda *et al.*, 2012). None of the species related to the six morphotypes under study has been reported with biological activity against *Raffaelea* spp., so they can be considered with potential to be used in the biocontrol of species of this genus.

Conclusions

Diversity of actinobacterial morphotypes in the disassembled soil of El Mante, Tamaulipas, is low; however, strains with significant activity to inhibit spore germination of phytopathogenic fungi were identified. *Raffaelea* sp., *R. fusca* and *R. subalba* spores were completely inhibited by six actinobacterial morphotypes while in confrontation. At least one strain of actinobacteria inhibited spore germination of *R. fusca* and *R. subalba* after exposure for 48 h, suggesting strong fungicide activity dependent on the *Raffaelea* species. The six morphotypes analyzed against *Raffaelea* spp. they are related to species of the genus *Streptomyces* and can be considered with potential for the biocontrol of *Raffaelea* species.

Acknowledgments

We thank the INIFAP for the financial support for the performing of 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".

Literatura citada

- Anandan, R., Dharumadurai, D., and Manogaran, G.P. 2016. An introduction to actinobacteria. In: Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications. London: Intechopen, 3-37.
- Hasani A., A. Kariminik, K. Issazadeh. 2014. Streptomycetes: Characteristics and their antimicrobial activities. *Int. J. Adv. Biol. Biom. Res.* 2, 63-75.
- Aouar, L., Lerat, S., Ouffroukh, A., Boulahrouf, A., and Beaulieu, C. 2012. Taxonomic identification of rhizospheric actinobacteria isolated from Algerian semi-arid soil exhibiting antagonistic activities against plant fungal pathogens. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 34, 165-176.
- Cannon, P.F., Damm, U., Johnston, P.R., and Weir, B.S. 2012. *Colletotrichum*—current status and future directions. *Studies in Mycology*, 73, 181-213.
- Hong, A.R., Yun, J.H., Yi, S.H., Lee, J.H., Seo, S.T., and Lee, J.K. 2018. Screening of antifungal microorganisms with strong biological activity against oak wilt fungus, *Raffaelea quercus-mongolicae*. *Journal of Forest and Environmental Science*, 34, 395-404.
- 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, 1455-1767.
- Kumar R. and S. Kumar. 2014. Bioprospecting of actinomycetes and its diversity in various environments: a review. *Current Discovery*, 3, 16-32.
- Labeda, D. P., Goodfellow, M., Brown, R., Ward, A. C., Lanoot, B., Vannanneyt, M., Swings, J., Kim, S. B., Liu, Z., Chun, J., Tamura, T., Oguchi, A., Kikuchi, T., Kikuchi, H., Nishii, T., Tsuji, K., Yamaguchi, Y., Tase, A., Takahashi, M., Sakane, T., Suzuki, K.I., Hatano, K. 2012. Phylogenetic study of the species within the family Streptomicetaceae. *Antonie van Leeuwenhoek*, 101, 73-104.
- Leslie, J.F., and Summerell, B.A. 2013. An overview of *Fusarium*. In: *Fusarium - Genomics, Molecular and Cellular Biology*. Ed. by Brown, D.W. and Proctor, R.H. Norfolk, UK: Caister Academic Pres, 1-11.
- Macagnan, D., Romeiro, R.D.S., and Pomella, A.W.V. 2009. Inhibition of *Crinipellis pernicioso* basidiospore germination by volatile compounds produced by five actinomycetes phylophanerisidents of cocoa. *Summa Phytopathologica*, 35, 140-142. <https://doi.org/10.1590/S0100-54052009000200011>
- Nonoh, J.O., Lw, W., Masiga, D., Herrmann, R., Presnail, J.K., Schepers, E., Okech, M.A., Bagine, R., Mungai, P., Nyende, A.B. and Boga, H.I. 2010. Isolation and characterization of *Streptomyces* species with antifungal activity from selected national parks in Kenya. *African Journal of Microbiology Research*, 4, 856-864.
- Oubaha, B., Nafis, A., Baz, M., Mauch, F., and Barakate, M. 2019. The potential of antagonistic moroccan *Streptomyces* isolates for the biological control of damping-off disease of pea (*Pisum sativum* L.) caused by *Aphanomyces euteiches*. *Journal of Phytopathology*, 167, 82-90.
- Palaniyandi, S.A., Yang, S.H., Damodharan, K. and Suh, J.W. 2013. Genetic and functional characterization of culturable plant-beneficial actinobacteria associated with yam rhizosphere. *Journal of Basic Microbiology*, 53, 985-995.
- Rodríguez-Guerra, R., Reyes-Castillo, F., Ledesma-Bravo, B., Calderón-Ruiz, A., Armijo-Martínez, L. F., and Ruiz-Amaro, C. J. 2020a. Diversidad en suelo y antagonismo de actinobacterias contra *Sclerotium rolfsii*. *Biotechnología y Sustentabilidad*, 5, 19-36.
- Rodríguez-Guerra, R., Armijo-Martínez, L.F., Rodríguez-Villarreal, R.A. y Robledo-Leal, E.R. 2020b. Diversidad y antagonismo a *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid de actinobacterias aisladas de suelo. *Ciencia e Innovación* 3, 721-729.
- Rodríguez-Guerra, R., González-Acevedo, A., Peña-Carrillo, K.I., Almeyda-León, I.H., Hernández-Luna, C.E. y Salcedo-Martínez, S.M. 2019. Evaluación de actinomicetos contra hongos fitopatógenos y análisis de sus relaciones filogenéticas. *Biotechnología y Sustentabilidad*, 4, 5-13.
- Rodríguez-Villarreal, R. A., Peña-Carrillo, K. I., Fernández-Cruz, E., Almeyda-León, I. H., Hernández-Torres, I., Acosta-Díaz, E. y Rodríguez-Guerra, R. 2014. Antagonismo e identificación genética de un actinomiceto con potencial para el biocontrol de *Phytophthora capsici* Leonian (Peronosporales: Pythiaceae). *Vedalia*, 15, 5-15.
- Semwal, P., Rawat, V., Sharma, P. and Baunthiyal, M. 2018. Actinobacteria from cow feces: Isolation, identification

- and screening for industrially important secondary metabolites. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 46, 68-76.
- Sharma, M., Dangi, P., and Choudhary M. 2014. Actinomycetes: Source, identification, and their applications. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 3, 801-832.
- Silva, M.S., Sales A.N., Magalhães-Guedes K.T., Dias, D.R. and Schwan, R.F. 2013. Brazilian Cerrado soil actinobacteria ecology. *BioMed Res Int.* 2013, 503805.
- Simmons, D.R., De Beer, Z.W., Huang, Y.T., Bateman, C., Campbell, A.S., Dreaden, T.J., Li, Y., Ploetz, R.C., Black, A., Li, H.-F., Chen, C.-Y., Wingfield, M.J. and Hulcr, J. 2016. New *Raffaelea* species (Ophiostomatales) from the USA and Taiwan associated with ambrosia beetles and plant hosts. *IMA Fungus*, 7(2), 265-273.
- Sittivate, W., and Nalumpang, S. 2015. Evaluation of actinomycetes culture media for control of bakanae Disease of rice seeds. *Journal of Agricultural Technology*, 11, 731-746.
- Thampi, A., and Bhai, R.S. 2017. Rhizosphere actinobacteria for combating *Phytophthora capsici* and *Sclerotium rolfsii*, the major soil borne pathogens of black pepper (*Piper nigrum* L.). *Biological Control*, 109, 1-13.
- Visser, A.A., Nobre, T., Currie, C.R., Aanen, D.K., and Poulsen, M. 2012. Exploring the potential for actinobacteria as defensive symbionts in fungus-growing termites. *Microbial Ecology*, 63, 975-985.
- Yadav, A.N., Verma, P., Kumar, S., Kumar, V., Kumar, M., Sugitha, T.C.K., Singh, B.P., Saxena, A.K. and Dhaliwal, H.S. 2018. Actinobacteria from rhizosphere: molecular diversity, distributions, and potential biotechnological applications. In: New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering. Actinobacteria: Diversity and Biotechnological Applications. Ed. by Singh, B.P., Gupta, V.K., Passari, Ajit Kumar. Amsterdam: Elsevier, 13-41.