

Selección de actinobacterias para el biocontrol de la roya asiática de la soya, *Phakopsora pachyrhizi*

Selection of actinobacteria for biocontrol of the Asian soybean rust, *Phakopsora pachyrhizi*

Raúl Rodríguez-Guerra^{1*}, Moisés Felipe-Victoriano², Kenzy Ivveth Peña-Carrillo¹, J. Isabel López-Arroyo¹, Isidro Humberto Almeyda-León¹, Zeferino Vicente-Hernández³, Ángel Ismael Narváez-Rodríguez³, Roberto Carlos González-Gutiérrez⁴

¹INIFAP, Campo Experimental General Terán, Km. 31 Carretera Montemorelos-China, C.P. 67400, General Terán, Nuevo León, México. ²INIFAP, Campo Experimental Huastecas, kilómetro 55 Carretera Tampico-Ciudad Mante C.P. 89610, Estación Cuauhtémoc, Tamaulipas. ³Profesionista independiente. ⁴Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. Av. Pedro de Alba y Manuel L. Barragán S/N, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. C.P. 66450.

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

RESUMEN

La roya asiática de la soya causada por el hongo *Phakopsora pachyrhizi* ocurre en importantes estados productores de este cultivo en México. Las principales estrategias para su control incluyen el uso de genotipos resistentes y de fungicidas. Algunas bacterias y hongos han mostrado potencial de control biológico de la roya asiática de la soya; sin embargo, es necesario ampliar la búsqueda de nuevos microorganismos con mayor capacidad de biocontrol que los ya encontrados. En nuestro estudio exploramos el potencial que pueden tener las actinobacterias contra este fitopatógeno. Los objetivos de esta investigación consistieron en seleccionar morfotipos de actinobacterias que inhiben *in vitro* la germinación de urediosporas de *P. pachyrhizi*, evaluar los morfotipos seleccionados por su capacidad de biocontrol de la roya utilizando la técnica de hoja desprendida e identificar actinobacterias promisorias mediante el análisis de la secuencia del gen 16S. En el estudio *in vitro*, de 45 morfotipos de actinobacterias 41 produjeron menor porcentaje de germinación de urediosporas con respecto a los testigos. De siete morfotipos utilizados para evaluar su capacidad de biocontrol, los morfotipos de actinobacterias MT-8, MT-23 y MT-42 sobresalieron por causar menor porcentaje de área dañada, así como el nivel de esporulación, número total de uredios, número de uredios abiertos y el porcentaje de área foliar cubierta con uredios. El morfotipo MT-42 fue el más sobresaliente, considerando los mayores porcentajes de inhibición de seis variables que mostraron diferencias estadísticas entre tratamientos ($p < 0.05$). Mediante el análisis del gen 16S que codifica para el ARN ribosomal 16S, MT-42 se relacionó con cuatro especies del género *Streptomyces*: *S. hirsutus*, *S. violaceorectus*, *S. bikiniensis* y *S. termitum*; de las cuales se desconoce su actividad contra *P. pachyrhizi*. Los resultados demuestran el

ABSTRACT

The Asian soybean rust caused by the fungus *Phakopsora pachyrhizi* occurs in important producing states of this crop in Mexico. The main strategies for its control include the use of resistant genotypes and fungicides. Some bacteria and fungi have shown biocontrol potential of the Asian soybean rust; however, it is necessary to extend the search for new microorganisms with higher biocontrol capacity than the already found. In our study, we explored the potential that actinobacteria may have against this phytopathogen. The objectives of this research were to select morphotypes of actinobacteria that inhibit *in vitro* the germination of *P. pachyrhizi* urediospores, demonstrate that selected morphotypes have a biocontrol effect on rust using the detached leaf technique, and to identify the actinobacteria with the greatest potential for rust biocontrol by sequence analysis of the 16S gene. In the *in vitro* study, from 45 morphotypes of actinobacteria, 41 produced a lower percentage of urediospore germination with respect to the controls. From 45 morphotypes of actinobacteria, 41 produced a lower percentage of urediospore germination compared to two established controls. Among seven morphotypes used to evaluate their biocontrol capacity, morphotypes MT-8, MT-23 and MT-42 stood out for causing lower percentage of damaged area, level of sporulation, total number of uredinia, number of open uredinia and percentage of leaf area covered with uredinia. MT-42 morphotype was the most outstanding considering the highest percentage of inhibition of six variables that showed statistically differences among treatments ($p < 0.05$). Through analysis of the 16S gene that codes for 16S ribosomal RNA, MT-42 was related to four species of the *Streptomyces* genus: *S. hirsutus*, *S. violaceorectus*, *S. bikiniensis*, and *S. termitum*; their activity against *P. pachyrhizi* is unknown. Results demonstrate the

potencial de biocontrol de actino-bacterias contra la roya asiática de la soya causada por *P. pachyrhizi*.

Palabras clave: Actinomycetos, urediosporas, porcentaje de germinación, biocontrol.

INTRODUCCIÓN

La roya asiática de la soya es una enfermedad causada por el hongo *Phakopsora pachyrhizi* y se encuentra ampliamente distribuida en el mundo, causando pérdidas en rendimiento de hasta 90% (Sharma and Gupta, 2006). Esta roya es originaria de Asia; en México, se detectó en 2005 en los estados de San Luis Potosí y Tamaulipas (Cárcamo-Rodríguez *et al.*, 2006; Terán *et al.*, 2007). Las pérdidas que se han reportado en el país a causa de la enfermedad han variado desde un 50 al 100% (Terán *et al.*, 2007). García-Rodríguez *et al.* (2018) mencionan que las principales estrategias para el control de la enfermedad son el uso de variedades resistentes y de fungicidas. La búsqueda de antagonistas con potencial para el biocontrol de la roya asiática de la soya ha sido limitada, identificándose algunas bacterias y hongos con esta capacidad (Twizeyimana y Hartman, 2019; Dorighello *et al.*, 2015; Ward *et al.*, 2012); sin embargo, se desconoce el potencial de las actinobacterias como agentes de biocontrol de la enfermedad. De hecho, son escasas las investigaciones dirigidas a evaluar el impacto de actinobacterias contra royas (Yi *et al.*, 2004; Wagacha *et al.*, 2003). En México, se desconocen estudios de investigación dirigidos a la búsqueda de estos microorganismos con capacidad antagonista y potencial para el biocontrol de la roya asiática de la soya. Las actinobacterias son reconocidas por producir numerosos compuestos utilizados en medicina, veterinaria y agricultura, entre otros (Jakubiec-Krzesniak *et al.*, 2018; Hasani *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2014), y han mostrado un gran potencial antagonista y de biocontrol contra diversos fitopatógenos (Ebrahimi-Zarandi *et al.*, 2022; O'Brien, 2017), por lo que se exploró su potencial como agentes de biocontrol contra la roya asiática de la soya. En esta investigación determinamos: 1. La actividad de una colección de morfotipos de actinobacterias aisladas del suelo de El Mante, Tamaulipas, México, sobre la germinación de urediosporas de *P. pachyrhizi*. 2. La capacidad de biocontrol de esta roya por morfotipos de actinobacterias sobre folíolos de soya mediante la técnica de hoja desprendida. 3. La identidad a nivel de género de las actinobacterias más destacadas por su capacidad de biocontrol.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fuente de *Phakopsora pachyrhizi*

Se utilizó una población de roya asiática colectada en noviembre de 2021 de un cultivo de soya variedad Huasteca 400, en el Ejido Francisco I. Madero, Municipio de González, Tamaulipas, México. Se colectaron folíolos con signos y síntomas de roya asiática y se transportaron al Laboratorio de Toxicología del Campo Experimental Las Huastecas

biocontrol potential of actinobacteria against the Asian soybean rust caused by *P. pachyrhizi*.

Key words *Actinomycetes, urediospores, germination percentage, biocontrol.*

INTRODUCTION

The Asian soybean rust is a disease caused by the fungus *Phakopsora pachyrhizi* and is widely distributed throughout the world, causing yield losses of up to 90% (Sharma and Gupta, 2006). This rust is native to Asia; in Mexico, it was detected in 2005 in San Luis Potosí, and Tamaulipas states (Cárcamo-Rodríguez *et al.*, 2006; Terán *et al.*, 2007). The losses that have been reported in the country due to the disease have varied from 50 to 100% (Terán *et al.*, 2007). García-Rodríguez *et al.* (2018) mentioned that the main strategies to control the disease are the use of resistant varieties and fungicides. The search for antagonists with potential for the biocontrol of the Asian soybean rust has been limited, identifying some bacteria and fungi with this capacity (Twizeyimana and Hartman, 2019; Dorighello *et al.*, 2015; Ward *et al.*, 2012); however, potential of actinobacteria as biocontrol agents of the disease is unknown. In fact, research aimed at evaluating the impact of actinobacteria against rusts has been scarce (Yi *et al.*, 2004; Wagacha *et al.*, 2003). In Mexico, research studies directed to the search for these microorganisms with antagonistic capacity and potential for the biocontrol of the Asian soybean rust are unknown. Actinobacteria are recognized for producing numerous compounds used in medicine, veterinary and agriculture, among others (Jakubiec-Krzesniak *et al.*, 2018; Hasani *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2014), and have shown high antagonistic potential and biocontrol against diverse phytopathogens (Ebrahimi-Zarandi *et al.*, 2022; O'Brien, 2017) hence, their potential as biocontrol agents against the Asian soybean rust was explored. In this research, we determined: 1. The activity of a collection of actinobacteria morphotypes isolated from the soil of El Mante, Tamaulipas, Mexico, on the germination of urediospores of *P. pachyrhizi*. 2. The biocontrol capacity of this rust by actinobacteria morphotypes on soybean leaflets using detached leaf technique. 3. The identity at genus level of the most outstanding actinobacteria for its biocontrol capacity.

MATERIALS AND METHODS

Source of *Phakopsora pachyrhizi*

We used an Asian rust population collected from a crop of Huasteca 400 soybean variety, in the Ejido Francisco I. Madero, González Municipality, Tamaulipas, Mexico, during November 2021. Collected soybean leaflets with signs and symptoms of Asian rust were transported to the Toxicology Laboratory of the Las Huastecas Experimental Station (CEHUAS), of the National Institute of Forest, Agricultural and Livestock Research (INIFAP). Therein, we multiplied urediospores according to the methodology developed by the Japan International Research Center for Agricultural Sciences

(CEHUAS), del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), para la multiplicación de urediosporas de acuerdo a la metodología desarrollada por el Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS) (Yamanaka *et al.*, 2021). En cada foliolo desprendido se eliminaron 5-10 mm de su parte basal y grupos de tres folíolos se colocaron con el envés hacia arriba dentro de recipientes de plástico de 12 × 12 cm. En seguida, el área del corte realizado se cubrió a lo largo de la parte inferior y superior con una banda de papel estéril KIMTECH SCIENSE de aprox. 1 cm de ancho; el papel se humedeció con agua destilada para mantener la turgencia de los folíolos. Se inoculó el envés de los folíolos con una suspensión de 5×10^4 urediosporas mL⁻¹ utilizando un pincel fino para dispersarla sobre la superficie del tejido. Posteriormente, se mantuvieron en cámara bioclimática a 21 ± 1 °C y fotoperiodo L:O de 12:12 horas. La humedad del papel KIMTECH SCIENSE se monitoreó diariamente y se humedeció según se requiera con agua destilada para mantener una humedad relativa >80% y favorecer el desarrollo de pústulas de roya asiática. Cuando se observó abundante producción de urediosporas, éstas se colectaron sobre papel parafinado (Yamanaka *et al.*, 2021), se transfirieron a tubos cónicos de 2 mL y se transportaron en frío al Campo Experimental General Terán del INIFAP.

Cultivo de actinobacterias

De una colección de 45 morfotipos de actinobacterias aisladas de suelo del municipio de El Mante, Tamaulipas, México, en 2021, cada uno se transfirió a cajas Petri de 90 x 15 mm que contenían el medio de cultivo agar nutritivo (AN), se dispersaron en el centro de ellas y se incubaron a 26 °C por 14 días.

Evaluación de actinobacterias

Se realizó un escrutinio sin repeticiones con el propósito de establecer la capacidad de cada morfotipo de actinobacterias de afectar la germinación de urediosporas. Urediosporas de *P. pachyrhizi* se retiraron del almacenamiento por el que se mantuvieron a -20°C por una semana y se colocaron por 4 min en baño María a 39°C; luego se elaboró una suspensión de 42.000 urediosporas por mL en una solución de Tween 20 al 0.04% con agua destilada estéril. Se colocó una alícuota de 10 µL de la suspensión de urediosporas a una distancia aproximada de 1.5 cm del borde de la colonia de las actinobacterias. Como testigos se depositó una alícuota de urediosporas en placas con AN y agar agua al 2%. Se permitió secar las alícuotas depositadas en las placas para evitar escurrimientos fuera del sitio donde se depositaron, y las cajas se mantuvieron en oscuridad por 12 h a 21 °C. Las confrontaciones y testigos se revisaron bajo un microscopio compuesto a las 24 h de establecidas. Se registró el número de urediosporas germinadas de las primeras 50 observadas. Se consideró que las urediosporas germinaron cuando desarrollaron un tubo germinativo al menos tan largo como su diámetro. Con los datos obtenidos se obtuvo el porcentaje de inhibición de la germinación de urediosporas causado por los morfotipos de actinobacterias respecto al pro-

(JIRCAS) (Yamanaka *et al.*, 2021). In each detached leaflet, 5-10 mm of its basal part were removed, and groups of three leaflets were placed with the underside up inside 12 × 12 cm plastic containers. Next, the area of the cut made was covered along the bottom and top with a KIMTECH SCIENSE sterile paper band of approx. 1cm wide; the paper was moistened with distilled water to maintain leaflets turgidity. Leaflets underside was inoculated with a suspension of 5×10^4 urediospores mL⁻¹ using a fine brush to disperse it on the surface of the tissue. Subsequently, they were kept in a bioclimatic chamber at 21 ± 1 °C and photoperiod 12:12 L:D hours. Humidity of the KIMTECH SCIENSE paper was monitored daily and moistened as required with distilled water to maintain relative humidity >80% and favor development of Asian rust pustules. When abundant production of urediospores were observed, they were collected on paraffin paper (Yamanaka *et al.*, 2021), transferred to 2 mL conical tubes and transported in cold to INIFAP's General Terán Experimental Station.

Culture of actinobacteria

From a collection of 45 morphotypes of actinobacteria isolated from soil in the municipality of El Mante, Tamaulipas, Méx., in 2021, each one of them was transferred and dispersed in the center of 90 x 15 Petri dishes containing NA culture medium, and incubated at 26 °C for 14 days.

Evaluation of actinobacteria

A screening without replications was carried out in order to establish the capacity of actinobacterial morphotypes to affect urediospore germination. Urediospores of *P. pachyrhizi* were removed from the storage for one week at -20°C and placed for 4 min in water bath at 39°C; then a suspension of 42,000 urediospores spores per mL was elaborated in a solution of Tween 20 at 0.04% with sterile distilled water. Aliquot of 10 µL of the urediospore suspension was placed at a distance of approximately 1.5 cm from the edge of the actinobacterial colony. As controls, an aliquot of urediospores was deposited on plates with NA and 2% water-agar. In order to avoid runoff of the suspension, deposited aliquots were allowed to dry and the dishes were kept in the dark for 12 h at 21 °C. Confrontations and controls were observed under a compound microscope 24 h after establishment. Number of germinated urediospores of the first 50 observed was recorded. Urediospores were considered germinated when they developed a germ tube at least as long as its diameter. With the obtained data, the percentage of inhibition of urediospore germination caused by the morphotypes of actinobacteria was obtained with respect to the average observed for the established controls.

Biocontrol

Biocontrol effect of actinobacteria was evaluated using the detached leaf technique (Twizeyimana *et al.*, 2007). This test was performed with a group of seven actinobacteria morphotypes selected from the screening described above. They were chosen by their produced range of urediospore germination inhibition; we included morphotypes with low

medio obtenido de los testigos establecidos.

Biocontrol

El efecto biocontrolador de actinobacterias se evaluó utilizando la técnica de hoja desprendid (Yamanaka *et al.*, 2021). La prueba se realizó con un grupo de siete morfotipos de actinobacterias seleccionados del escrutinio descrito previamente. Éstos fueron elegidos por su elevada inhibición de la germinación de urediosporas; se incluyó morfotipos con bajo y alto porcentaje de inhibición. A partir de colonias de actinobacterias cultivadas en AN durante 7 días, se obtuvo un fragmento de 0.5 mm² y se inoculó en matraces de 250 mL que contenían un volumen de 100 mL de caldo nutritivo; se incubaron a 26°C en un agitador orbital (90 rpm). A los diez días, cada colonia fue transferida a un recipiente y mezclada con ayuda de un batidor de mano (T-fal®) por 10 seg, y posteriormente se transfirió a un atomizador para su aplicación sin determinar la concentración de unidades formadoras de colonia. La multiplicación de urediosporas se realizó como se mencionó anteriormente. El inóculo del fitopatógeno se elaboró en una suspensión de agua destilada con Tween 20® al 0.04% a una concentración de 10⁵ urediosporas mL⁻¹. Foliolos de soya aparentemente sanos de la variedad Huasteca 700 fueron colectados de plantas crecidas en microtúnel, y fueron colocados en pares con el envés hacia arriba dentro de recipientes de plástico de 12 x 12 cm. La inoculación de urediosporas se realizó como se describió anteriormente y en seguida cada caja con dos foliolos se asperjó con siete atomizaciones de cada actinobacteria o caldo nutritivo desde una distancia aproximada de 20 cm. Los foliolos fueron mantenidos en oscuridad por 12 h y posteriormente en un fotoperiodo de 12:12 h en luz y oscuridad. Con una muestra de las urediosporas utilizadas, se determinó el porcentaje de germinación en agar agua al 0.5% sobre un portaobjetos, después de 12 h. Se establecieron nueve tratamientos (un testigo absoluto sólo con urediosporas, un testigo con caldo nutritivo, y las siete actinobacterias). Cada tratamiento consistió de seis repeticiones (foliolo) y se establecieron bajo un diseño completamente al azar en el CEHUAS. A los 15 días de establecido el experimento se revisó el envés de los foliolos y se registró el porcentaje de área dañada mediante el programa IMAGEJ y también se evaluó de manera visual. Con los protocolos descritos por el JIRCAS (Yamanaka *et al.*, 2021) se evaluó el nivel de esporulación al estereoscopio, así como visualmente.

Además, se registró el número de uredios totales (número de uredios en 30 lesiones) y uredios abiertos (número de uredios abiertos en 30 lesiones), también se evaluó visualmente el porcentaje de área foliar cubierto con uredios. Los datos de las variables fueron sometidos a la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar si cumplían con una distribución normal; dependiendo del resultado se utilizaron pruebas paramétricas o no paramétricas. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza completamente al azar de una vía (ANOVA) para valores paramétricos y la prueba de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos en el Programa INFOSTAT (Versión: 30/04/2020).

And high inhibition percentages. From colonies of actinobacteria grown in NA for 7 days, a 0.5 mm² fragment was obtained and inoculated into 250 mL flasks containing a volume of 100 mL of nutritive broth; they were incubated at 26°C in an orbital shaker (90 rpm). After 10 days, each colony was transferred to a container and mixed with the help of a hand mixer (T-fal®) during 10 seconds; subsequently, they were transferred to an atomizer for application without determining concentration of colony-forming units. Urediospores multiplication was performed as mentioned above. Phytopathogen inoculum was prepared in a suspension of distilled water with 0.04% Tween 20® at 10⁵ urediospores mL⁻¹ concentration. Apparent healthy soybean leaflets of the variety Huasteca 700 were collected from plants grown in microtunnels, and placed in pairs with the underside up inside 12 x 12 cm plastic containers. Inoculation of urediospores was performed as described above and then each container with two leaflets was sprayed with seven sprays of each actinobacteria or nutritive broth from a distance of approximately 20 cm. The leaflets were kept in the dark for 12 h and later in a 12:12 L:D h photoperiod. In order to have a proof of the urediospore's germination, we took a sample of the used suspension, placed it in 0.5% water agar on a slide, and determined germination percentage after 12 hours. Nine treatments were established (an absolute control only with urediospores, a control that received nutritive broth, and seven actinobacteria). Each treatment consisted of six replications (leaflet); they were arranged under a completely randomized design in the laboratory at CEHUAS. 15 days after the experiment was settled down, the underside of the leaflets was checked and the percentage of damaged area was recorded using the IMAGEJ program; it was also visually estimated. With the protocols described by JIRCAS (Yamanaka *et al.*, 2021), the level of sporulation was evaluated under the stereoscope as well as visually. In addition, the total number of uredinia in 30 lesions and the number of open uredinia in 30 lesions were recorded, the percentage of leaf area covered with uredinia was also visually evaluated. Data were subjected to the Kolmogorov-Smirnov test to determine normality; depending on the results, we used parametric or non-parametric tests. Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) for parametric values, or the Kruskal-Wallis test for non-parametric data in the INFOSTAT Program (Version: 04/30/2020).

Actinobacteria identification

DNA was extracted from actinobacteria that stood out for its ability to biocontrol the Asian soybean rust as previously described (Almeyda-León *et al.*, 2021). The gene encoding 16S ribosomal RNA was amplified with oligonucleotides F1 (5'-AGAGTTTGATCITGGCTCAG-3') and R5 (5'-ACGGITACCTTGTTACGACTT-3') previously used by Cook and Meyers (2003). The PCR product was sequenced in both directions, and a consensus sequence was obtained, which was searched in GenBank using the BLAST tool to establish its relationship with previously recorded actinobacterial sequences. The genetic distances between the

Identificación de actinobacteria

Se extrajo el ADN de la actinobacteria que sobresalió por su capacidad de biocontrol de la roy asiática de la soya como se describió previamente (Almeyda-León *et al.*, 2021). El gen que codifica para el ARN ribosomal 16S se amplificó con los oligonucleótidos F1 (5'-AGAGTTTGATCITGGCTCAG-3') y R5 (5'-ACGGITACCTTGTTACGACTT-3') utilizados previamente por Cook y Meyers (2003). El producto de PCR se secuenció en ambos sentidos, y se obtuvo una secuencia consenso con la que se realizó una búsqueda en el GenBank utilizando la herramienta BLAST para establecer su relación con secuencias de actinobacterias previamente registradas. Se calcularon las distancias genéticas entre las secuencias por el método de p-distance en el programa Mega X. Este método compara dos secuencias y calcula la proporción (p) de los sitios nucleotídicos que varían entre ellas; la distancia se obtiene dividiendo el número de diferencias de nucleótidos por el número total de nucleótidos comparados.

RESULTADOS

Veinticuatro horas después de haberse establecido la confrontación entre las actinobacterias y la roya asiática de la soya, las observaciones microscópicas diferenciaron claramente entre urediosporas germinadas y no germinadas (Figura 1). En las urediosporas germinadas fue posible observar la formación de un tubo germinativo largo, mientras que en las no germinadas esto no ocurrió o se formó sólo una pequeña hinchazón sobresaliendo de las urediosporas (Figura 1).

sequences were calculated by the p-distance method in the Mega X program. This method compares two sequences and calculates the proportion (p) of the nucleotide sites that vary between them; the distance is obtained by dividing the number of nucleotide differences by the total number of nucleotides compared.

RESULTS

24 hours after the confrontation between actinobacteria and the Asian soybean rust had been established, microscopic observations allowed to clearly differentiate between germinated and non-germinated urediospores. (Figure 1). In the germinated urediospores it was possible to observe the formation of a long germ tube; meanwhile, in the ungerminated ones this did not occur or only a small swelling was formed protruding from the urediospores (Figure 1).

In the NA control, germination was 94%; while in water-agar, it was 82%, with an average of 88% for both. Percentage of germination inhibition varied from 6.8 to 72.7% among morphotypes (Table 1). Two actinobacterial morphotypes (MT-38, MT-39) caused a stimulatory effect on germination; nine showed an inhibition percentage of 25% or less, in 17 inhibition percentage ranged from 29.5 to 50.0% and in another 17 from 52.3 to 72.7%. Morphotypes MT-8, MT-19, MT-23, MT-32, MT-38, MT-39 and MT-42 were selected to evaluate their ability for biocontrol of the Asian soybean rust using the detached leaf technique, based on the inhibition percentages of urediospore germination throughout the range observed in the screening test.

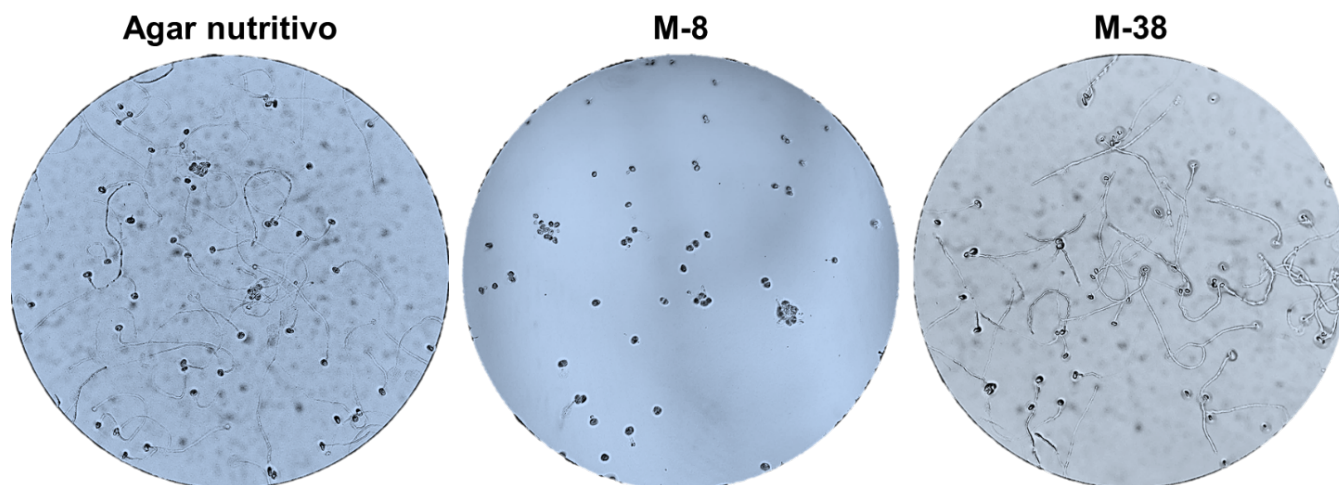


Figura 1. Germinación de urediosporas de *Phakopsora pachyrhizi* en agar nutritivo (testigo) y dos morfotipos de actinobacterias (M-8 y M-38).

Figure 1. *Phakopsora pachyrhizi* urediospore germination in nutritive agar (control) and two actinobacteria morphotypes (M-8 and M-38).

En el testigo de AN la germinación fue del 94% mientras que en agar-agua fue de 82%, con un promedio del 88% entre ambos. El porcentaje de inhibición de la germinación varió de 6.8 hasta 72.7 entre los morfotipos (Cuadro 1). Dos morfotipos (MT-38, MT-39) causaron un efecto estimulador sobre la germinación, nueve produjeron un por-

Germination of the urediospores used to infect leaflets in the biocontrol experiment was 92%. For percentage of damaged area determined with the IMAGEJ program, there were no statistical differences among treatments (Tukey test; $p > 0.05$). In the case of total number of uredinia and number of open uredinia differences among treatments were highly

centaje de inhibición del 25% o menos, 17 inhibieron de 29.5 a 50.0% y otras 17 de 52.3 a 72.7%. Los morfotipos MT-8, MT-19, MT-23, MT-32, MT-38, MT-39 y MT-42 se seleccionaron para evaluar su capacidad de biocontrol de la roya asiática de la soya mediante la técnica de hoja desprendida, por causar porcentajes de inhibición de la germinación de urediosporas en todo el rango observado en la prueba de escrutinio.

significant (Tukey test; $p < 0.01$) (Table 2).

For the variable's percentage of damaged area, sporulation level (evaluated visually and under the stereoscope), and percentage of area with uredinia, there were highly significant differences among treatments (Kruskal-Wallis test, $p < 0.01$) (Table 3), with H values of 29.64, 39.85, 42.77, and 39.0, respectively.

Cuadro 1. Porcentaje de inhibición de la germinación de urediosporas de roya asiática de la soya en confrontación con morfotipos de actinobacterias, respecto al promedio de los dos testigos establecidos.

Table 1. Percentage of germination inhibition of urediospores of the Asian soybean rust in confrontation with morphotypes of actinobacteria, with respect to the average of two established controls.

Morfotipo	% de inhibición	Morfotipo	% de inhibición	Morfotipo	% de inhibición
Morphotype	% inhibition	Morphotype	% inhibition	Morphotype	% inhibition
MT-1	56.8	MT-17	63.6	MT-32	52.3
MT-2	38.6	MT-18	72.7	MT-33	22.7
MT-3	29.5	MT-19	2.3	MT-35	52.3
MT-4	18.2	MT-20	40.9	MT-36	25.0
MT-5	36.4	MT-21	34.1	MT-37	43.2
MT-6	40.9	MT-22	45.5	MT-38	-6.8
MT-7	47.7	MT-23	4.5	MT-39	-6.8
MT-8	72.7	MT-24	52.3	MT-40	52.3
MT-9	68.2	MT-25	47.7	MT-41	29.5
MT-10	65.9	MT-26	40.9	MT-42	50.0
MT-12	45.5	MT-27	56.8	MT-43	18.2
MT-13	68.2	MT-28	52.3	MT-45	25.0
MT-14	65.9	MT-29	13.6	MT-46	34.1
MT-15	59.1	MT-30	9.1	MT-47	40.9
MT-16	54.5	MT-31	52.3	MT-48	34.1

La germinación de urediosporas utilizadas en el experimento de biocontrol fue del 92%. No se encontró diferencias estadísticas entre tratamientos (Tukey; $p > 0.05$) para el porcentaje de área dañada determinada con el programa IMAGEJ. Para el número total de uredios y número de uredios abiertos se encontró diferencias altamente significativas entre tratamientos (Tukey; $p < 0.01$) (Cuadro 2).

Se encontraron diferencias altamente significativas (prueba de Kruskal-Wallis, $p < 0.01$) entre tratamientos para las variables porcentaje de área dañada, nivel de esporulación (evaluadas bajo el microscopio y visualmente) y porcentaje de área con uredios, con valores de H de 29.64, 42.77, 39.85 y 39.0, respectivamente.

Los morfotipos de actinobacterias MT-8 y MT-42 presentaron de manera consistente los valores más bajos para

Morphotypes of actinobacteria MT-8 and MT-42 consistently presented the lowest values for all the variables that showed differences among treatments. Figure 2 shows an image of the reaction to rust in leaflets of the absolute control and of the three outstanding morphotypes.

MT-39 morphotype, which showed high percentage of urediospore germination during the screening, also showed outstanding results in rust biocontrol, except for showing high percentage of visually evaluated damaged area. Other morphotypes showed high values for most of the analyzed variables, confirming their inability to inhibit germination of *P. pachyrhizi* urediospores.

The MT-42 morphotype stood out with the lowest number of total uredinia (0.01) and number of open uredinia (0.01) (Table 2), as well as the lowest percentage of damaged area determined visually (5.0), level of sporulation evaluated

todas las variables que mostraron diferencias estadísticas. En la Figura 2 se muestra una imagen con la reacción del testigo absoluto inoculado sólo con urediosporas y de los tres morfotipos sobresalientes.

under the stereoscope (0.0), level of sporulation evaluated visually (0.0) and percentage of area with uredinia

Cuadro 2. Efecto de actinobacterias sobre folíolos inoculados con urediosporas de roya asiática de la soya para tres variables.

Table 2. Effect of actinobacteria on leaflets inoculated with urediospores of the Asian soybean rust for three variables.

Tratamiento Treatment	% de área dañada ¹ % damaged area ¹	Uredios totales Total number of uredinia	Uredios abiertos Number of open uredinia
Testigo absoluto Absolute control	37.1 a ²	3.5 b (0.873)	3.5 b (0.877)
Testigo agar nutritivo Nutrient agar control	32.1 a	4.0 b (0.785) (-14.3) ³	4.0 b (0.721) (-14.3)
MT-8	46.1 a	0.3 a (0.233) (91.4)	0.3 a (0.203) (91.4)
MT-19	35.3 a	3.6 b (0.521) (-2.9)	3.6 b (0.520) (-2.9)
MT-23	19.3 a	3.4 b (0.357) (2.9)	3.3 b (0.457) (5.6)
MT-32	27.2 a	1.5 a (0.772) (57.1)	1.1 a (0.547) (68.6)
MT-38	27.4 a	3.4 b (1.529) (2.9)	3.0 b (1.670) (14.3)
MT-39	33.7 a	0.4 a (0.663) (88.6)	0.3 a (0.556) (91.4)
MT-42	32.7 a	0.1 a (0.249) (97.1)	0.1 a (0.263) (97.1)

¹ Determinado con el programa IMAGEJ. ² Promedios dentro de columna seguidos con la misma letra no difieren estadísticamente (Tukey; p < 0.05). ³ Valores entre paréntesis representan la desviación estándar y el porcentaje de inhibición de la variable para cada tratamiento respecto al testigo absoluto.

¹ Determined with the IMAGEJ program. ² Means within a column followed by the same letter do not differ statistically (Tukey; p < 0.05). ³ Values in parentheses represent the standard deviation and the percentage of inhibition of the variable for each treatment with respect to the absolute control.

Cuadro 3. Comparación de medianas entre tratamientos sobre el efecto de urediosporas de la roya asiática de la soya en folíolos inoculados para cuatro variables analizadas (prueba de Kruskal-Wallis).

Table 3. Comparison of medians among treatments on the effect of urediospores of the Asian soybean rust in inoculated leaflets for four variables analyzed (Kruskal-Wallis test).

Tratamiento Treatment	% de área dañada ¹ % damaged area ¹		Nivel de esporulación ² Sporulation level ²		Nivel de esporulación ³ Sporulation level ³		% de área con uredios % area with uredinia	
	Media Mean	Mediana Median	Media Mean	Mediana Median	Media Mean	Mediana Median	Media Mean	Mediana Median
Testigo absoluto Absolute control	25.0	25.0 c ⁴	2.8	2.82 c	3.0	3.0 b	16.2	15.0 b
Testigo de caldo nutritivo Nutritive broth control	15.0	10.0 bc	2.9	2.94 c	3.0	3.0 b	9.3	9.0 b
MT-8	5.0	5.0 a	0.1	0.10 a	0.0	0.0 a	1.0	1.0 a
MT-19	6.7	5.0 ab	2.6	2.74 bc	2.8	3.0 b	1.7	1.5 a
MT-23	9.2	10.0 abc	2.6	2.67 bc	2.8	3.0 b	3.0	3.0 ab
MT-32	10.0	7.5 ab	0.7	0.77 ab	0.7	0.5 a	2.0	2.0 a
MT-38	26.7	22.5 c	2.3	3.00 c	2.8	3.0 b	16.7	15.0 b
MT-39	10.0	10.0 bc	0.1	0.05 a	0.0	0.0 a	1.2	1.0 a
MT-42	5.0	5.0 a	0.1	0.00 a	0.0	0.0 a	1.0	1.0 a

¹ Evaluada visualmente. ² Evaluado al estereoscopio. ³ Evaluado visualmente. ⁴ Medianas dentro de columna seguidas con la misma letra no difieren estadísticamente (Tukey; p < 0.05).

¹ Visually evaluated. ² Evaluated under the stereoscope. ³ Visually evaluated. ⁴ Medians within columns followed by the same letter do not differ statistically (Tukey; p < 0.05).

El morfotipo MT-39 que mostró elevado porcentaje de germinación de urediosporas en el escrutinio, también mostró resultados sobresalientes en el biocontrol de la roya, excepto por mostrar un elevado porcentaje de área dañada evaluada visualmente. Los demás morfotipos mostraron valores elevados para la mayoría de las variables analizadas, confirmando su falta de capacidad para inhibir la germinación de urediosporas de *P. pachyrhizi*. El morfotipo MT-42 sobresalió con el menor número de uredios totales (0.01) y uredios abiertos (0.01) (Cuadro 2), así como por el menor porcentaje de área dañada determinado visualmente (5.0), nivel de esporulación evaluado al estereoscopio (0.0), nivel de esporulación evaluado de manera visual (0.0) y porcentaje de área con uredios determinado visualmente (1.0) (Cuadro 3).

determined visually (1.0) (Table 3).

The sequence size of morphotype MT-42 was 1360 bases. According to BLAST analysis, the sequence resembles 99.85% for species of the *Streptomyces* genus: *S. hirsutus*, *S. violaceorectus*, *S. bikiniensis* and *S. termitum*. For the first three species, the genetic distance of MT-42 was 0.0, while for *S. termitum* it was 0.001, with 100% coverage. These genetic distances make it impossible to accurately determine the species-level identity of MT-42 within the genus *Streptomyces*.

DISCUSSION

Search for microorganisms displaying biological activity against rusts has been strongly directed to the evalua-

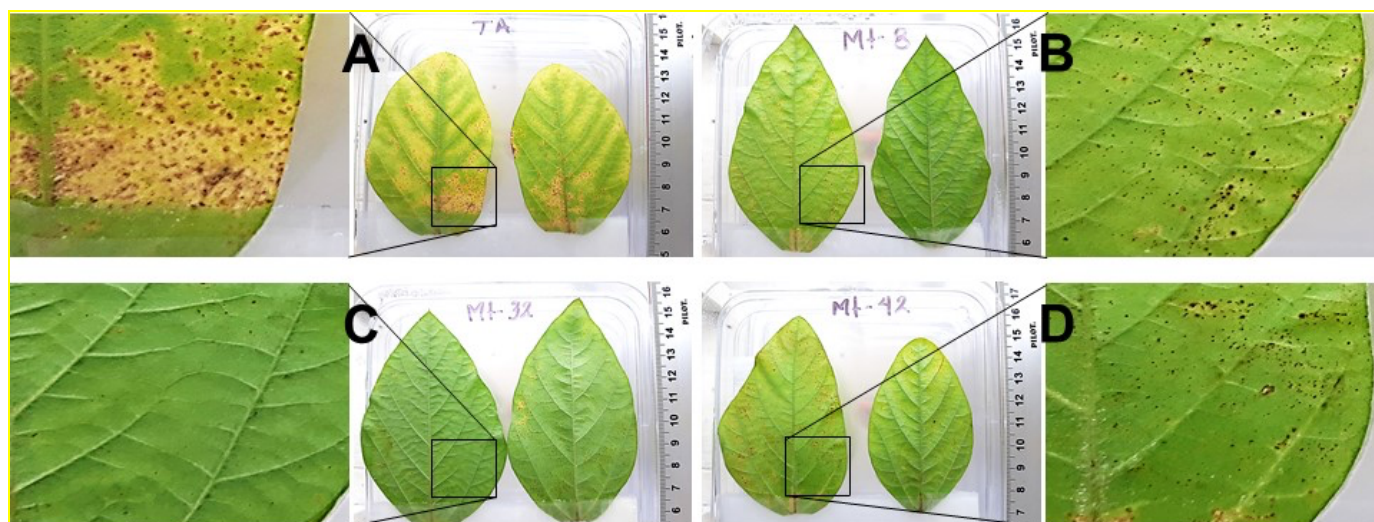


Figura 2. Reacción de folíolos de soja de la variedad Huasteca 700 inoculados con urediosporas de *P. pachyrhizi*. A. Testigo inoculado sólo con roya. En B, C y D los folíolos recibieron los morfotipos MT-8, MT-32 y MT-42, respectivamente. Los recuadros muestran un acercamiento de los folíolos expuestos a los tratamientos señalados; en (A) se muestran lesiones con uredios esporulados, mientras que en (B), (C) y (D) se muestran lesiones sin uredios.

Figure 2. Reaction of soybean leaflets of the Huasteca 700 variety inoculated with urediospores of *P. pachyrhizi*. A. Control inoculated only with rust. In B, C and D, the leaflets received the morphotypes MT-8, MT-32 and MT-42, respectively. The boxes show a close-up of the leaflets exposed to the indicated treatments; in (A) lesions have sporulated uredinia, in (B), (C) and (D) in the lesions the uredinia are absent.

Los porcentajes de inhibición causados por los tratamientos con base al testigo absoluto, para cada variable que mostró diferencias estadísticas, se muestra en la Figura 3. En general, todos los tratamientos causaron un efecto inhibitorio sobre las variables analizadas. La aplicación de caldo nutritivo incrementó el área dañada (evaluada visualmente), número de uredios totales y número de uredios abiertos. Para estas dos últimas variables el morfotipo MT-19 mostró una respuesta similar al testigo; mientras que el morfotipo MT-38 incrementó el área dañada (evaluada visualmente) y área con uredios.

El tamaño de la secuencia de MT-42 fue de 1360 bases. De acuerdo con el análisis BLAST, la secuencia se asemeja en un 99.85% a las especies del género *Streptomyces*: *S. hirsutus*, *S. violaceorectus*, *S. bikiniensis* y *S. termitum*.

tion of bacteria and mycoparasitic fungi (Twizeyimana and Hartman, 2019; Dorighello *et al.*, 2015; Ward *et al.*, 2012); however, evaluation of actinobacteria with the ability to inhibit urediospore germination has been neglected in recent research. Actinobacteria are an important source of bioactives in various application areas (Jakubiec-Krzysiak *et al.*, 2018; Hasani *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2014) and in this research their potential as inhibitors of urediospore germination was demonstrated; more importantly, as biocontrol agents of the Asian soybean rust. Due to the current impossibility of producing rust urediospores in laboratory, mainly by the fact that it is a biotrophic phytopathogen, a strategy that has been commonly used to overcome the above, consists in the selection of microorganisms capable of inhibiting the germination of rust spores *in vitro*, without utilizing host tissue. This consists in placing in contact in solid culture me-

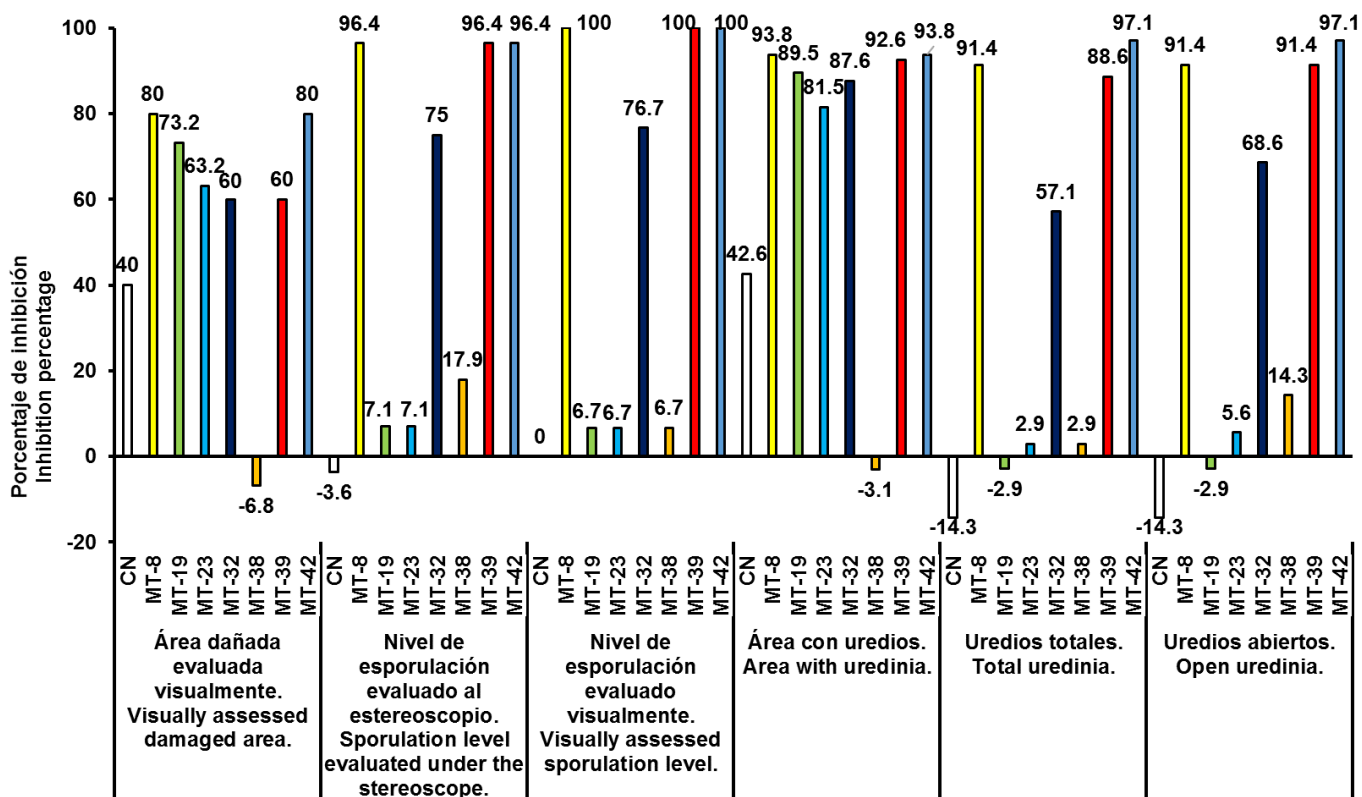


Figura 3. Porcentaje de inhibición de la roya asiática de la soja de siete morfotipos de actinobacterias y caldo nutritivo (CN) con respecto al testigo absoluto (inoculado con urediosporas solamente), en seis variables que mostraron diferencias estadísticas.

Figure 3. Percentage of inhibition of the Asian soybean rust by seven morphotypes of actinobacteria and nutrient broth (CN) with respect to the absolute control (inoculated only with urediospores) for six variables that showed statistical differences.

Para las primeras tres especies la distancia genética de MT-42 fue de 0.0, mientras que para *S. termitum* fue de 0.001, con el 100% de cobertura. Estas distancias genéticas imposibilitan determinar con precisión la identidad al nivel de especie de MT-42 dentro del género *Streptomyces*.

DISCUSIÓN

La búsqueda de microorganismos con actividad biológica contra royas ha sido fuertemente dirigida a la evaluación de bacterias y hongos micoparásitos (Twizeyimana y Hartman, 2019; Dorighello *et al.*, 2015; Ward *et al.*, 2012); sin embargo, la evaluación de actinobacterias con capacidad de inhibir la germinación de urediosporas ha carecido de importancia relevante en investigaciones recientes. Las actinobacterias son una fuente importante de bioactivos en diversas áreas de aplicación (Jakubiec-Krzesniak *et al.*, 2018; Hasani *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2014) y en esta investigación se demostró su potencial como inhibidoras de la germinación de urediosporas y el biocontrol de la roya asiática de la soja. Debido a la imposibilidad actual de producir urediosporas de roya en laboratorio debido a que es un fitopatógeno biótrofo, una estrategia que se ha utilizado comúnmente para sobreponerse a lo anterior consiste en la selección de microorganismos capaces de inhibir la germinación de esporas de royas *in vitro* sin utilización de tejido del hospedante. Esto consiste en colocar en contacto en

dium (Kiani *et al.*, 2021) or in liquid suspensions (Dorighello *et al.*, 2015; Shiomi *et al.*, 2006) both target microorganisms (antagonist-urediospores of the rust under study), and in this way establishing possible antagonistic effects against the phytopathogen. In this investigation screening consisted of placing urediospores in solid medium without direct contact with the actinobacteria. From 45 morphotypes of actinobacteria evaluated, 17 showed more than 50% inhibition on urediospore germination, and two stood out for causing the highest percentages of germination inhibition (72.7%). This indicated a high potential of these microorganisms for selection as outstanding candidates for the biocontrol of *P. pachyrhizi*. It is possible that the inhibition levels of urediospore germination observed in this research are due to the production of diffusible antibiotics in the culture medium, volatile compounds or other types of compounds, which are capable of being produced by actinobacteria (Borah *et al.*, 2022; Choudoir *et al.*, 2019). Although the mycoparasitic capacity of *Trichoderma* spp. against various phytopathogenic fungi is known, there is only a record of *T. asperellum* and *T. harzianum* producing secondary metabolites that reduce the germination of urediospores and the severity caused by *P. pachyrhizi* (El-Hasan *et al.*, 2022). Given the lack of contact of the urediospores with the colonies of actinobacteria in the culture medium, the findings supports the possibility of chemical

medio de cultivo sólido (Kiani *et al.*, 2021) o en suspensiones líquidas (Dorighello *et al.*, 2015; Shiomi *et al.*, 2006) ambos microorganismos objetivo (antagonista-urediosporas de la roya bajo estudio), y así establecer posibles efectos antagónicos contra el fitopatógeno. En esta investigación el escrutinio consistió en colocar urediosporas en medio sólido sin contacto directo con las actinobacterias. De 45 morfotipos de actinobacterias evaluados, 17 mostraron más del 50% de inhibición sobre la germinación de urediosporas, y dos sobresalieron por causar los mayores porcentajes de inhibición de la germinación (72.7%). Lo anterior indica un elevado potencial de estos microorganismos para seleccionar candidatos sobresalientes para el biocontrol de *P. pachyrhizi*. Es posible que los niveles de inhibición de la germinación de urediosporas observados en esta investigación se deban a la producción de antibióticos difusibles en el medio de cultivo, compuestos volátiles u otros tipos de compuestos, los cuales son capaces de ser producidos por actinobacterias (Borah *et al.*, 2022; Choudoir *et al.*, 2019). Aunque es conocida la capacidad micoparasítica de *Trichoderma* spp. contra diversos hongos fitopatógenos, sólo se cuenta con registro de *T. asperellum* y *T. harzianum* como productores de metabolitos secundarios que reducen la germinación de urediosporas y la severidad causada por *P. pachyrhizi* (El-Hasan *et al.*, 2022). Debido a la falta de contacto de las urediosporas con las colonias de actinobacterias en medio de cultivo, esta investigación soporta la posibilidad de factores químicos involucrados en la inhibición de la germinación de urediosporas de la roya. El efecto estimulador sobre la germinación de urediosporas por los morfotipos MT-38 y MT39 fue inesperado; sin embargo, este tipo de respuesta ha sido observado previamente con esporas de *Fusarium oxysporum* combinadas con *Escherichia coli* y *Klebsiella ozaenae* (Sivanantham *et al.*, 2013); la inducción de germinación de esporas del hongo micorrízico *Gigaspora margarita* (Carpenter-Boggs *et al.*, 1995) también ha sido documentada. Esta respuesta de inducción de la germinación puede deberse a compuestos volátiles, factores que debilitan la pared de las esporas o afectan compuestos inhibitorios de la germinación (de Boer *et al.*, 2005)

La técnica de hoja desprendida de soya ha sido utilizada para establecer la capacidad de biocontrol de diversos microorganismos contra *P. pachyrhizi*. Tres cepas de *Bacillus subtilis* y una de *B. pumilus* han sido reportadas por su capacidad de reducir la severidad de la roya asiática de la soya en un 61.2 a 98.6% en ensayos con hoja desprendida (Dorighello *et al.*, 2015). También, se ha reportado que *B. subtilis* y *T. harzianum* fueron capaces de causar elevados porcentajes de reducción de *P. pachyrhizi* (95.7% y 82.5%, respectivamente) (Twizeyimana y Hartman, 2019); y se ha reportado la capacidad micoparasítica tanto de *Trichothecium roseum* (Pankaj *et al.*, 2014) como *Simplicillium lanosoniveum* (Gauthier *et al.*, 2014) sobre urediosporas de *P. pachyrhizi*. Sin embargo, se considera que esta es la primera ocasión en que se evalúa la capacidad de biocontrol de una actinobacteria contra la roya asiática de la soya. En esta investigación, se encontró 60% (MT-32 y MT-39) y 80% (MT-8 y MT-42) de inhibición de área dañada evaluada

factors involved in the inhibition of the germination of urediospores of the rust. The stimulus effect on urediospore germination by morphotypes MT-38 and MT39 was unexpected; however, this type of response has been previously observed with *Fusarium oxysporum* spores combined with *Escherichia coli* and *Klebsiella ozaenae* (Sivanantham *et al.*, 2013); the induction of spore germination of the mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* (Carpenter-Boggs *et al.*, 1995) has also been documented. This germination induction response may be due to volatile compounds, factors that weaken the spore wall, or affect germination inhibitory compounds (de Boer *et al.*, 2005). The soybean detached leaf technique has been used to establish the biocontrol capacity of various microorganisms against *P. pachyrhizi*. Three strains of *Bacillus subtilis* and one of *B. pumilus* have been reported for their ability to reduce the severity of the Asian soybean rust by 61.2 to 98.6% in detached leaf assays (Dorighello *et al.*, 2015). Also, it has been reported that *B. subtilis* and *T. harzianum* were able to cause high percentages of reduction of *P. pachyrhizi* (95.7% and 82.5%, respectively) (Twizeyimana and Hartman, 2019); in addition, it has been reported the mycoparasitic capacity of both *Trichothecium roseum* (Pankaj *et al.*, 2014) and *Simplicillium lanosoniveum* (Gauthier *et al.*, 2014) on *P. pachyrhizi* urediospores. However, this is the first time that the biocontrol capacity of an actinobacteria against the Asian soybean rust has been evaluated.

In this investigation, 60% (MT-32 and MT39) and 80% (MT-8 and MT-42) inhibition of the damaged area visually evaluated was found with respect to the absolute control, and due to the morphotype MT-42 caused the greatest reduction of uredinia (97.1%) on the detached leaves, this was considered the most outstanding in the biocontrol of rust. Although, it is possible that the production of metabolites is involved in the inhibition of urediospore germination, it is also possible to consider a parasitic activity considering the high level of biocontrol observed by MT-42 against *P. pachyrhizi*. The MT-39 morphotype produced an unexpected response because it stimulated the germination of urediospores in the screening and caused a positive effect on rust biocontrol. We do not know the causes of this response; however, the interaction with the host may be directly or indirectly involved with this observed biocontrol effect.

Due to the low genetic variability of MT-42 with *S. hirsutus*, *S. violaceorectus*, *S. bikiniensis* and *S. termitum*, it was impossible with our methodology to determine the identity of the MT-42 morphotype. Of these species, there are only records of biological activity of *S. violaceorectus* against the phytopathogenic fungi *Macrophomina phaseoli* and *Helminthosporium turcicum* (El-Gammal, 1987) and *S. bikiniensis* against *Fusarium oxysporum* (Zhao *et al.*, 2012). In such regard, this allows establishing that the MT-42 morphotype of *Streptomyces* sp. is the first actinobacteria reported with biocontrol capacity against the Asian soybean rust.

visualmente respecto al testigo absoluto, y debido a que el morfotipo MT-42 causó la mayor reducción de uredios (97.1%) sobre las hojas desprendidas, este se consideró el más sobresaliente en el biocontrol de la roya. Aunque es posible que en la inhibición de la germinación de urediosporas se encuentre involucrada la producción de metabolitos, también es posible considerar una actividad parasítica considerando el nivel elevado de biocontrol observado por MT-42 contra *P. pachyrhizi*. El morfotipo MT-39 produjo una respuesta inesperada debido a que estimuló la germinación de urediosporas en el escrutinio y causó un efecto positivo en el biocontrol de la roya. Desconocemos las causas de esta respuesta; sin embargo, la interacción con el hospedero es posible que esté involucrada directa o indirectamente con este efecto de biocontrol observado.

Debido a la escasa variabilidad genética de MT-42 con *S. hirsutus*, *S. violaceorectus*, *S. bikiniensis* y *S. termitum*, fue imposible con nuestra metodología determinar la identidad de la cepa MT-42. De estas especies sólo se cuenta con registros de actividad biológica de *S. violaceorectus* contra los hongos fitopatógenos *Macrophomina phaseoli* y *Helminthosporium turcicum* (El-Gammal, 1987) y de *S. bikiniensis* contra *Fusarium oxysporum* (Zhao *et al.*, 2012). Lo anterior permite establecer que el morfotipo MT-42 de *Streptomyces* sp. es la primera actinobacteria que se reporta con capacidad de biocontrol contra la roya asiática de la soya.

CONCLUSIONES

Este es el primer reporte dirigido a la búsqueda de actinomicetos con capacidad de inhibir la germinación de urediosporas de *P. pachyrhizi*, el agente causal de la roya asiática de la soya. Se demostró su potencial de biocontrol de actinobacterias contra este fitopatógeno. Se identificaron actinobacterias sobresalientes por su efecto antagónico contra la germinación de urediosporas de *P. pachyrhizi*. La actinobacteria MT-42 sobresalió en su capacidad de biocontrol al reducir los efectos de la roya en folíolos de la soya, y su identidad se encontró relacionada a especies del género *Streptomyces*.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícola y Pecuarias (INIFAP), para la realización de esta investigación bajo el proyecto 13403834745 "Aprovechamiento de la biodiversidad microbiana contra problemas fitosanitarios de cultivos del área de influencia del CIR-Noreste"

REFERENCIAS

Almeyda-León, I. H., Peña-Carrillo, K. I., López-Arroyo, J. I., Narvaéz-Rodríguez, Á. I., Armijo-Martínez, L. F., y Rodríguez-Guerra, R. 2021. Coinoculación y cultivos esterilizados por calor de actinobacterias inhiben la germinación y formación de colonias de esclerocios de *Sclerotium rolfsii*. *Biología y Sustentabilidad*, 6(2),

CONCLUSIONS

This is the first report directed to the search for actinomycetes with the capacity to inhibit the germination of urediospores of *P. pachyrhizi*, the causal agent of the Asian soybean rust. The study demonstrates the biocontrol potential of actinobacteria against this phytopathogen. Outstanding actinobacteria were identified for their antagonistic effect against the germination of urediospores of *P. pachyrhizi*. The actinobacteria MT-42 stood out in its biocontrol capacity by reducing the effects of rust on soybean leaflets; its identity was found to be related to species of the *Streptomyces* genus.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the National Institute of Forestry, Agricultural and Livestock Research (INIFAP) for the support of this study under the project 13403834745 "Use of microbial biodiversity against phytosanitary problems of crops in the area of influence of the CIR-Northeast".

1-15. <https://doi.org/10.57737/biotecnologiaysust.v6i2.1231>
Borah, A., Hazarika, S. N., and Thakur, D. 2022. Potentiality of actinobacteria to combat against biotic and abiotic stresses in tea [*Camellia sinensis* (L) O. Kuntze]. *Journal of Applied Microbiology*.
<https://doi.org/10.1111/jam.15734> Cárcamo-Rodríguez,

- A., Rios, J. A., and Hernández, J. R. 2006. First report of Asian soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* from Mexico. *Plant Disease*, 90(9), 1260-1260. <https://doi.org/10.1094/PD-90-1260B>
- Carpenter-Boggs, L., Loynachan, T. E., and Stahl, P. D. 1995. Spore germination of *Gigaspora margarita* stimulated by volatiles of soil-isolated actinomycetes. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(11), 1445-1451. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(95\)00075-P](https://doi.org/10.1016/0038-0717(95)00075-P)
- Choudoir, M., Rossabi, S., Gebert, M., Helmig, D., and Fierer, N. 2019. A phylogenetic and functional perspective on volatile organic compound production by actinobacteria. *MSystems*, 4(2), e00295-18. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00295-18>
- 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>
- de Boer, W. D., Folman, L. B., Summerbell, R. C., and Boddy, L. 2005. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS microbiology reviews*, 29(4), 795-811. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.11.005>
- Dorighello, D. V., Bettiol, W., Maia, N. B., and de Campos, R. M. V. B. 2015. Controlling Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) with *Bacillus* spp. and coffee oil. *Crop Protection*, 67, 59-65. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.09.017>
- Ebrahimi-Zarandi, M., Saberi Rish, R., and Tarkka, M. T. 2022. Actinobacteria as effective biocontrol agents against plant pathogens, an overview on their role in eliciting plant defense. *Microorganisms*, 10(9), 1739. <https://www.mdpi.com/2076-2607/10/9/1739>
- El-Gammal, A. A. 1987. Characterization of an antimicrobial substance, produced by *Streptomyces violaceorectus*. *Zentralblatt für Mikrobiologie*, 142(2), 175-178. [https://doi.org/10.1016/S0232-4393\(87\)80035-5](https://doi.org/10.1016/S0232-4393(87)80035-5)
- El-Hasan, A., Walker, F., Klaiber, I., Schöne, J., Pfannstiel, J., and Voegelé, R. T. 2022. New approaches to manage Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) using *Trichoderma* spp. or their antifungal secondary metabolites. *Metabolites*, 12(6), 507. <https://doi.org/10.3390/metabo12060507>
- García-Rodríguez, J. C., Ascencio-Luciano, G., Terán-Vargas, A. P., Maldonado-Moreno, N., y de-la-Rosa-Flores, J. E. 2018. Avances en el estudio de la roya asiática de la soya (*Phakopsora pachyrhizi*) en México. *Revista Biológica Agropecuaria Tuxpan*, 6(1), 6-14. <https://doi.org/10.47808/revistabioagro.v6i1.127>
- Gauthier, N. W., Maruthachalam, K., Subbarao, K. V., Brown, M., Xiao, Y., Robertson, C. L., and Schneider, R. W. 2014. Mycoparasitism of *Phakopsora pachyrhizi*, the soybean rust pathogen, by *Simplicillium lanosoniveum*. *Biological Control*, 76, 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.05.008>
- Hasani A., Kariminik, A., and Issazadeh K. 2014. Streptomycetes: Characteristics and their antimicrobial activities. *Int. J. Adv. Biol. Biom. Res.* 2:63-75. http://www.ijabbr.com/article_7033_7733c8235876d7ba635f6c831a916648.pdf
- Jakubiec-Krzesniak, K., Rajniesz-Mateusiak, A., Guspil, A., Ziemska, J., and Solecka, J. 2018. Secondary metabolites of actinomycetes and their antibacterial, antifungal and antiviral properties. *Polish Journal of Microbiology*, 67(3), 259-272.
- Kiani, T., Mehboob, F., Hyder, M. Z., Zainy, Z., Xu, L., Huang, L., and Farrakh, S. 2021. Control of stripe rust of wheat using indigenous endophytic bacteria at seedling and adult plant stage. *Scientific Reports*, 11(1), 1-14. <https://www.nature.com/articles/s41598-021-93939-6>
- O'Brien, P. A. 2017. Biological control of plant diseases. *Australasian Plant Pathology*, 46(4), 293-304. <https://researchrepository.murdoch.edu.au/id/eprint/37568/1/biological-control-of-plant-diseases.pdf>
- Pankaj, B., Tiamerenao, N., Upadhyay, D. N., and Satish, C. 2014. Evaluation of different fungi as mycoparasite for eco-friendly management of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*). *Journal of Eco-Friendly Agriculture*, 9(1), 101-103. <http://ecoagrijournal.com/wp-content/uploads/2019/10/Full-Paper-91.pdf>
- Sharma, M., Dangi, P., and Choudhary, M. 2014. Actinomycetes: source, identification, and their applications. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(2), 801-832. <https://www.ijcmas.com/vol-3-2/Mukesh%20Sharma.pdf>
- Sharma, S. K., and Gupta, G. K. 2006. Current status of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*)-A review. *Agricultural Reviews*, 27(2), 91-102. <https://arccjournals.com/journal/agricultural-reviews/ARCC4172>
- Shiomi, H. F., Silva, H. S. A., Melo, I. S. D., Nunes, F. V., and Bettiol, W. 2006. Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. *Scientia Agricola*, 63, 32-39. <https://www.scielo.br/j/sa/a/CmT46HgKBcXfXpHcCrYvHwh/?format=pdf&lang=en>
- Sivanantham, T., Rasaiyah, V., Satkunanathan, N., and Thavaranjit, A. C. (2013). In vitro screening of antagonistic effect of soil borne bacteria on some selected phytopathogenic fungi. *Arch Appl Sci Res*, 5(1), 1-4. <https://www.scholarsresearchlibrary.com/articles/in-vitro-screening-of-antagonistic-effect-of-soil-borne-bacteria-on-some-selected-phytopathogenic-fungi.pdf>
- Terán, V. A. P., Ascencio, L. G., Maldonado, M. M., y Avila, V. J. 2007. La roya asiática de la soya en México. *Folleto Técnico Núm. 22*. CIRNE- INIFAP, Altamira, Tamaulipas, México. <https://www.inifapcirne.gob.mx/Biblioteca/Publicaciones/247.pdf>
- Twizeyimana, M., and Hartman, G. L. 2019. Effect of selected biopesticides in reducing soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) development. *Plant*

- Disease*, 103(9), 2460-2466.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-02-19-0384-RE>
- Wagacha, J. M., Mutitu, E. W., Muthomi, J. W., and Mwaura, F. B. 2003. Translocation and persistence of antibiotics produced by *Bacillus* and *Streptomyces* spp. in the bean plant. *African Crop Science Conference Proceedings*, 6, 81-84.
<http://erepository.uonbi.ac.ke/bitstream/handle/11295/29840/28.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ward, N. A., Robertson, C. L., Chanda, A. K., and Schneider, R. W. 2012. Effects of *Simplicillium lanosoniveum* on *Phakopsora pachyrhizi*, the soybean rust pathogen, and its use as a biological control agent. *Phytopathology*, 102(8), 749-760. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-11-0031>
- Yamanaka, N., M. Kato, H. Akamatsu and Y. Yamaoka. 2021. Laboratory Manual for Studies on Soybean Rust Resistance (version 26). Japan International Research Center of Agricultural Sciences (JIRCAS). 51 p. https://www.jircas.go.jp/sites/default/files/publication/manual_guideline/manual_guideline--73.pdf
- Yi, Y. S., Kim, S. H., Kim, M. W., Choi, G. J., Cho, K. Y., Song, J. K., and Lim, Y. H. 2004. Antifungal activity of *Streptomyces* sp. against *Puccinia recondita* causing wheat leaf rust. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(2), 422-425.
<https://koreascience.kr/article/JAKO200411922331006.pdf>
- Zhao, S., Du, C. M., and Tian, C. Y. 2012. Suppression of *Fusarium oxysporum* and induced resistance of plants involved in the biocontrol of Cucumber Fusarium Wilt by *Streptomyces bikiniensis* HD-087. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(9), 2919-2927.
<https://doi.org/10.1007/s11274-1102-6>