

Actinobacterias antagonicas contra hongos fitopatogenos de raíz Antagonistic actinobacteria against plant root pathogenic fungi

Raúl Rodríguez-Guerra^{1*}, Roberto Carlos González-Gutiérrez², Raúl Asael Rodríguez-Villarreal², Efrén Ricardo Robledo-Leal², Kenzy Iveth Peña-Carrillo¹, J. Isabel López-Arroyo¹, Isidro Humberto Almeyda-León¹, Moisés Felipe-Victoriano³, Ángel Ismael Narváez-Rodríguez⁴

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental General Terán, 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, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. C.P. 66450

³INIFAP, Campo Experimental Huastecas, kilómetro 55 Carretera Tampico-Ciudad Mante C.P. 89610, Estación Cuauhtémoc, Tamaulipas.

⁴Profesionista independiente.

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

RESUMEN

En esta investigación se determinó la diversidad de morfotipos de actinobacterias, así como su capacidad antagonica contra *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Rhizoctonia solani* y *Macrophomina phaseolina*. También se determinó la capacidad fungistática o fungicida de morfotipos con actividad sobresaliente contra *F. oxysporum* y *M. phaseolina*, y su posible identidad. Se obtuvieron 125 aislados de actinobacterias del suelo de una parcela de soya; de esta colección, se identificaron 49 morfotipos que se diferenciaron en cuanto a características de crecimiento en medio de cultivo. Una cepa de cada morfotipo se utilizó para identificar aquellas con mayor actividad antagonica contra los fitopatogenos en una prueba de confrontación. Tres morfotipos sobresalieron por sus niveles de antagonismo contra *M. phaseolina* (M3, M17) y *F. oxysporum* (M35). En experimento subsecuente M17 inhibió totalmente el crecimiento micelial de *M. phaseolina*, mientras que M35 inhibió completamente la germinación de conidios y crecimiento micelial de *F. oxysporum*. En la prueba de capacidad fungistática y fungicida del morfotipo M17, los fragmentos de colonia de *M. phaseolina* permanecieron libres de crecimiento durante la confrontación contra el morfotipo por 4 días; mientras que en el testigo todos los fragmentos desarrollaron colonia. Después de extraerse el fitopatogeno de la prueba de confrontación, el 100 % de los fragmentos reanudaron su crecimiento, demostrando que la actinobacteria tiene actividad fungistática elevada contra el fitopatogeno. Durante la misma prueba de M35 contra *F. oxysporum*, hubo el mismo patrón de respuesta que en M17 durante la confrontación. Cuando se extrajeron los conidios a las 24, 48 y 72 h de iniciada la prueba de confrontación, los porcentajes de germinación fueron de 2.32, 0.14 y 0.18 %, respectivamente, demostrando que M35 tiene una alta actividad fungicida sobre los conidios. De acuerdo con la

ABSTRACT

In this research, we studied diversity of actinobacteria morphotypes as well as their antagonistic capacity against *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina*. In addition, we determined the fungistatic or fungicidal capacity and possible identification of morphotypes with outstanding activity against *F. oxysporum* and *M. phaseolina*. One hundred twenty-five isolates of actinobacteria were obtained from the soil of a soybean plot; from such collection, 49 morphotypes were identified by their differences in terms of growth characteristics in culture medium. One strain of each morphotype was used to identify those with the highest antagonistic activity against the phytopathogens in a confrontation test. Three morphotypes stood out for their levels of antagonism against *M. phaseolina* (M3, M17) and *F. oxysporum* (M35). In a subsequent experiment, M17 totally inhibited *M. phaseolina* mycelial growth; while, M35 completely inhibited *F. oxysporum* conidial germination and mycelial growth. In a fungistatic and fungicidal capacity test of M17 morphotype, colony fragments of *M. phaseolina* remained free of growth during the confrontation against the morphotype for 4 days; in the control, all the fragments developed colonies. After extracting the phytopathogen from the confrontation test, 100% of the *M. phaseolina* fragments resumed growth, demonstrating that the actinobacteria have high fungistatic activity against the phytopathogen. In a similar test of M35 morphotype against *F. oxysporum*, there was the same pattern of response as in M17 during the confrontation. When conidia were extracted at 24, 48 and 72 h after the beginning of the confrontation test, germination percentages were 2.32, 0.14 and 0.18 %, respectively, demonstrating that M35 has a high fungicidal activity on *F. oxysporum* conidia. According to the analyzed sequence of M17 and M35 morphotypes, both actinobacteria correspond

secuencia analizada de los morfotipos M17 y M35, ambas actinobacterias corresponden al género *Streptomyces*.

Palabras clave: *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum*, crecimiento micelial, germinación de conidios.

INTRODUCCIÓN

Un importante grupo de hongos fitopatógenos que atacan a las plantas cultivadas son aquellos que causan pudriciones de raíz y tallo, entre los cuales se encuentran *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Rhizoctonia solani* y *Macrophomina phaseolina*. Diversos cultivos de gran importancia como Chile (Mmbaga *et al.*, 2018; Vásquez *et al.*, 2009), frijol (Granados-Montero *et al.*, 2021; Montiel-González *et al.*, 2005), melón (González *et al.*, 2020; Michereff *et al.*, 2008) y sorgo (Marquez *et al.*, 2021; Al-Jedabi, 2009), entre otros, son afectados por estos fitopatógenos que causan pérdidas severas en cantidad y calidad de la cosecha. La búsqueda de microorganismos con actividad antagonista notable y alto potencial de biocontrol contra fitopatógenos, ha tomado suma importancia en los últimos años. Lo anterior ha ocurrido debido a diversos factores como el uso excesivo de plaguicidas sintéticos, con el inherente riesgo al ambiente y la salud, y generación de resistencia en poblaciones de los fitopatógenos (Raymaekers *et al.*, 2020). Entre los microorganismos que han tomado importancia relevante en los años recientes destacan las actinobacterias. Éstas producen una gran cantidad de antibióticos con aplicación en medicina, veterinaria y agricultura, entre otras áreas (Jakubiec-Krzysiak *et al.*, 2018; Hasani *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2014). En las investigaciones dirigidas a la búsqueda de microorganismos antagonistas contra fitopatógenos ha sido necesario contar con numerosos aislados para lograr identificar potenciales cepas sobresalientes, y posteriormente continuar estudios más detallados sobre el antagonismo observado (Bojórquez-Armenta *et al.*, 2021; Mmbaga *et al.*, 2018; Jalaluldeen *et al.*, 2014; Gopalakrishnan *et al.*, 2011; Suárez-Estrella *et al.*, 2007). En México, algunas actinobacterias se han reportado con elevados porcentajes de inhibición contra *M. phaseolina* (Armijo-Martínez *et al.*, 2019; Rodríguez-Villarreal *et al.*, 2014) y *F. oxysporum* (Peña-Carrillo *et al.*, 2021; Espinoza-Ahumada *et al.*, 2019). Sin embargo, es necesaria la búsqueda de nuevas cepas y especies con elevados niveles de antagonismo y con potencial para su uso como agentes de biocontrol. Los objetivos de esta investigación consistieron en caracterizar un banco de actinobacterias aisladas de suelo cultivado con soya, en cuanto a su diversidad morfológica y actividad antagonista contra *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Rhizoctonia solani* y *Macrophomina phaseolina*, determinar la capacidad fungistática o fungicida de morfotipos más sobresalientes contra *F. oxysporum* y *M. phaseolina* y establecer la posible identidad de morfotipos sobresalientes.

to the genus *Streptomyces*.

Keywords: *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum*, mycelial growth, conidial germination.

INTRODUCTION

Fusarium oxysporum, *F. solani*, *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani* are an important group of phytopathogenic fungi that attack cultivated plants causing root and stem rots. Various crops of great importance such as chili-peppers (Mmbaga *et al.*, 2018; Vásquez *et al.*, 2009), beans (Granados-Montero *et al.*, 2021; Montiel-González *et al.*, 2005), melon (González *et al.*, 2020; Michereff *et al.*, 2008) and sorghum (Marquez *et al.*, 2021; Al-Jedabi, 2009), among others, are affected by these phytopathogens causing severe losses in yield quantity and quality. Search for microorganisms with remarkable antagonistic activity and high potential of biocontrol effects against phytopathogens has become very important in recent years. This has occurred due to various factors such as excessive use of synthetic pesticides and their inherent risk to the environment and health, and development of resistant phytopathogen populations (Raymaekers *et al.*, 2020). Among the beneficial microorganisms that have gained relevant importance in recent years, actinobacteria stand out. They produce a large number of antibiotics with applications in medicine, veterinary and agriculture, among other areas (Jakubiec-Krzysiak *et al.*, 2018; Hasani *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2014). In the investigations aimed at the search for antagonistic microorganisms against phytopathogens, it is required to have availability of numerous isolates that could allow to identify potential outstanding strains, and subsequently continue performing more detailed studies on the detected antagonism (Bojórquez-Armenta *et al.*, 2021; Mmbaga *et al.*, 2018; Jalaluldeen *et al.*, 2014; Gopalakrishnan *et al.*, 2011; Suárez-Estrella *et al.*, 2007). In Mexico, some actinobacteria have been reported with high percentages of inhibition against *M. phaseolina* (Armijo-Martínez *et al.*, 2019; Rodríguez-Villarreal *et al.*, 2014) and *F. oxysporum* (Peña-Carrillo *et al.*, 2021; Espinoza-Ahumada *et al.*, 2019). However, it is necessary to search for new strains and species with high levels of antagonism and potential for use as biocontrol agents. The objectives of this research were to characterize a bank of actinobacteria isolated from soil cultivated with soybean, in terms of their morphological diversity and antagonistic activity against *F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani* and *M. phaseolina*, to determine the fungistatic or fungicidal capacity of outstanding morphotypes against *F. oxysporum* and *M. phaseolina*, and establishing their possible identity.

MATERIALS AND METHODS

Soil sample and isolation of actinobacteria.

Actinobacteria were isolated from soil samples that were obtained in a similar manner as previously reported by Peña-Carrillo *et al.* (2021). In an area of 5 m² of a plot

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra de suelo y aislamiento de actinobacterias.

Las actinobacterias se aislaron de muestras de suelo que se obtuvieron de manera similar a lo reportado previamente por Peña-Carrillo *et al.* (2021). En un área de 5 m² de una parcela cultivada con soya en 2021 (22°34'13.9''N, 98°10'13.9''E) en el estado de Tamaulipas, del Campo Experimental Las Huastecas, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), se obtuvieron 50 gr de suelo de cinco puntos a una profundidad de 15 a 20 cm. El suelo colectado se mezcló y transportó al Campo Experimental General Terán del INIFAP en Nuevo León, México.

Se elaboraron diluciones seriadas de suelo y se dispersaron 50 µL de cada dilución en cajas Petri conteniendo agar nutritivo (AN). A las 24-48 h, bajo el microscopio y utilizando las diluciones 10⁻² y 10⁻³, se transfirieron microcolonias de actinobacterias al mismo medio de cultivo; estas fueron reconocidas por formar filamentos sumamente delgados. A los catorce días se caracterizaron las colonias desarrolladas con base a características de color, crecimiento y apariencia, así como al color por la parte inferior de la colonia y producción de color en el sustrato. Colonias con características comunes se consideraron el mismo morfotipo. Se registró el número de morfotipos obtenidos y se obtuvo el índice de diversidad de Shannon-Wiener (Shannon, 1948) utilizando la fórmula: $H = -\sum_{i=1}^S p_i * \ln(p_i)$; donde H = índice de diversidad de la muestra; " p_i "= proporción de la abundancia relativa del morfotipo " i " en relación con la abundancia de todos los morfotipos en la muestra de suelo y " S "= número total de morfotipos.

Preselección de actinobacterias antagonicas. Se evaluó la capacidad antagonica de cada morfotipo en un escrutinio sin repeticiones contra *F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani* y *M. phaseolina*. Un fragmento de colonia de cada morfotipo se dispersó en el centro de cajas Petri conteniendo AN, y se incubó a 25°C. A los siete días se inoculó un fragmento de colonia (1 cm²) de *M. phaseolina*, *R. solani*, *F. oxysporum* y *F. solani*, en los puntos cardinales de las cajas Petri a una distancia aproximada de 1.5 cm de cada colonia de actinobacteria. El testigo consistió en la inoculación de los fitopatógenos en medio de cultivo libre de actinobacterias. Al tercer día se registró el crecimiento radial de los hongos en las confrontaciones con las actinobacterias y en el testigo, y el porcentaje de inhibición causado por cada morfotipo respecto al testigo se obtuvo de la siguiente manera: [(crecimiento radial en el testigo – crecimiento radial en la confrontación) / crecimiento radial en el testigo] * 100. Las actinobacterias se agruparon en tres categorías de acuerdo a la inhibición causada a cada fitopatógeno: 1= inhibición de 33.3 % o menos, 2= inhibición de 33.4 a 66.6 % y 3= superior a 66.6 %. Los morfotipos que sobresalieron con una completa inhibición de los fitopatógenos fueron seleccionados para confirmar su nivel de antagonismo en experimentos posteriores.

plot cultivated with soybean, 50 gr of soil were obtained from five points at a depth of 15 to 20 cm. The site was located at INIFAP, Las Huastecas Experimental Station (22°34'13.9"N, 98°10'13.9"E) in the state of Tamaulipas, México. Samples were taken during 2021; the obtained soil was mixed and transported to INIFAP, General Terán Experimental Station in Nuevo León, México.

Serial dilutions of soil were prepared and 50 µL of each dilution were dispersed in Petri dishes containing nutrient agar (NA). At 24-48 h, under the microscope and using the 10⁻² and 10⁻³ dilutions, microcolonies of actinobacteria were transferred to the same culture medium; they were recognized for forming extremely thin filaments. After 14 days, the developed colonies were characterized based on color, growth and appearance characteristics, as well as the color of the bottom of the colony and color production in the substrate. Colonies with constant, common characteristics were considered the same morphotype. The number of morphotypes obtained was recorded and the Shannon-Wiener diversity index (Shannon, 1948) was calculated using the formula: $H = -\sum_{i=1}^S p_i * \ln(p_i)$; where H = diversity index of the sample; " p_i "= proportion of the relative abundance of morphotype " i " in relation to the abundance of all morphotypes in the soil sample and " S "= total number of morphotypes.

Preselection of antagonistic actinobacteria. Antagonistic capacity of each morphotype was evaluated in a non-replicated screen against *F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani* and *M. phaseolina*. A colony fragment of each morphotype was dispersed in the center of Petri dishes containing NA, and incubated at 25°C. After seven days, colony fragments (1 cm²) of *M. phaseolina*, *R. solani*, *F. oxysporum* and *F. solani* were inoculated at the cardinal points of the Petri dishes at an approximate distance of 1.5 cm from each actinobacteria colony. The control consisted of the phytopathogens inoculated in a culture medium free of actinobacteria. On the third day, the radial growth of the fungi in the confrontations with the actinobacteria and in the control was recorded, and the percentage of inhibition caused by each morphotype with respect to the control was obtained as follows: [(radial growth in the control – radial growth in the confrontation) / radial growth in the control] * 100. Actinobacteria were grouped into three categories according to the inhibition caused to each phytopathogen: 1= inhibition of 33.3 % or less, 2= inhibition from 33.4 to 66.6 %, and 3= greater than 66.6 %. The morphotypes that stood out with a complete inhibition of the phytopathogens were selected to confirm their level of antagonism in subsequent experiments.

Antagonism of outstanding morphotypes

From the previous scrutiny, the most outstanding morphotypes were selected based on 100 % inhibition of mycelial growth against *M. phaseolina* as well as 100 % inhibition of *F. oxysporum* conidial germination. These were evaluated in a completely randomized experiment

Antagonismo de morfotipos sobresalientes

Del escrutinio anterior, se seleccionaron los morfotipos más sobresalientes por causar el 100 % de inhibición del crecimiento micelial contra *M. phaseolina* y por inhibir el 100 % de la germinación de conidios de *F. oxysporum*. Estos se evaluaron en un experimento completamente al azar con cuatro repeticiones (caja Petri) para confirmar su actividad. Los morfotipos sobresalientes contra *M. phaseolina* se inocularon en AN como se mencionó anteriormente; al séptimo día se inocularon fragmentos (0.64 cm², aprox.) de colonia de seis días de edad del fitopatógeno, a una distancia aproximada de 1.5 cm de los morfotipos en los puntos cardinales de las cajas Petri. El testigo consistió de fragmentos del fitopatógeno en un medio libre de actinobacterias. A las 48 h se determinó el crecimiento radial (mm) del fitopatógeno en dirección al centro de las cajas Petri. Se obtuvo el promedio de crecimiento en cada repetición y con los datos se realizó un análisis de varianza de una vía. Se realizó una comparación de medias mediante la prueba de Tuckey en el programa INFOSTAT (Versión: 30/04/2020) (Di Rienzo *et al.*, 2020). Un morfotipo sobresaliente contra *F. oxysporum* se inoculó como se mencionó anteriormente. Cuando las colonias tenían siete días de edad, se colocaron 20 µL de una suspensión de conidios en los puntos cardinales de las cajas Petri. La suspensión de conidios se elaboró a partir de un fragmento de colonia (1 cm²) de *F. oxysporum* de siete días de edad. El testigo consistió solamente en la inoculación de las alícuotas en AN. Cuatro repeticiones fueron establecidas. A las 24 h se evaluó el porcentaje de conidios germinados a partir de los primeros cien observados. A las 48 h se registró el crecimiento radial (mm) fuera de las alícuotas depositadas con conidios en dirección al centro de las cajas Petri. Se tomó una imagen de la confrontación con la actinobacteria y del testigo al cuarto día de establecido el experimento. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza de una vía.

Capacidad fungistática y fungicida

Los morfotipos que mantuvieron la capacidad de inhibir el 100 % el crecimiento micelial contra *M. phaseolina* y el 100 % de la germinación de conidios de *F. oxysporum* en el experimento anterior, se caracterizaron por su capacidad de causar un efecto fungistático o fungicida. Colonias de 7 días de edad del morfotipo que se mantuvo sobresaliente contra *M. phaseolina*, se inocularon con cuatro fragmentos de colonia de siete días de edad del fitopatógeno, cada uno en puntos cardinales de las cajas Petri con la actinobacteria, como se describió previamente. Un testigo libre de actinobacterias fue incluido. Se establecieron cuatro repeticiones en ambos tratamientos bajo un diseño completamente al azar. Los fragmentos de *M. phaseolina* fueron retirados al cuarto día de inoculados y se transfirieron a nuevas cajas conteniendo sólo AN; dos días posteriores a su transferencia se determinó el porcentaje de fragmentos que desarrollaron colonia. Los datos se transformaron al arcoseno de la raíz cuadrada y se realizó

with four replicates (Petri dish) to confirm their activity. Outstanding morphotypes against *M. phaseolina* were inoculated in NA as described above; on the seventh day, fragments (0.64 cm², approx.) of a six-day-old colony of the phytopathogen were inoculated at an approximate distance of 1.5 cm from the morphotypes, in the cardinal points of the Petri dishes. The control consisted of fragments of the phytopathogen in a medium free of actinobacteria. At 48 h, radial growth (mm) of the phytopathogen was determined towards the center of the Petri dishes. Average growth in each replication was obtained; data were submitted to one-way analysis of variance. Comparison of means was carried out using Tuckey test in the INFOSTAT program (Version: 04/30/2020) (Di Rienzo *et al.*, 2020).

One outstanding morphotype against *F. oxysporum* was inoculated as previously described. When colonies were seven days-old, there were placed 20 µL of a conidia suspension at the cardinal points of the Petri dishes. Conidial suspension was prepared from a *F. oxysporum* seven days old colony fragment (1 cm²). The control consisted only of the inoculation of the aliquots in NA. Four replicates were established. At 24 h, percentage of germinated conidia from the first hundred observed was evaluated. At 48 h, we recorded the radial growth (mm) from outside of the deposited aliquots with conidia towards the center of the Petri dish. Images of the confrontation with the actinobacteria as well as the control were taken on the fourth day after the experiment was established. Obtained data were subjected to one-way analysis of variance.

Fungistatic and fungicidal capacity

Morphotypes that displayed ability to inhibit 100% mycelial growth against *M. phaseolina* and 100% of *F. oxysporum* conidial germination in the previous experiment, they were characterized by their ability to cause fungistatic or fungicidal effects. 7-day-old colonies of the morphotype that remained outstanding against *M. phaseolina* were inoculated with four 7 days old colony fragments of the phytopathogen, each one at cardinal points of the Petri dishes with the actinobacteria, as previously described. A control free of actinobacteria was included. Four replicates were established in both treatments under a completely randomized experimental design. *M. phaseolina* fragments were removed on the fourth day after inoculation and transferred to new Petri dishes containing only NA; two days after their transfer, the percentage of fragments that developed a colony was determined. Data were transformed to the arcsine of the square root and a one-way analysis of variance was performed. A fungistatic effect was considered when 75% or more of *M. phaseolina* fragments developed colonies; in contrast, a fungicidal effect was considered when only 25% or less developed colonies.

Three sets of colonies, with seven replicates each one, of the morphotype that constantly remained outstanding

un análisis de varianza de una vía. Se consideró un efecto fungistático cuando el 75 % o más de los fragmentos de *M. phaseolina* desarrollaron colonias; en contraste, se consideró un efecto fungicida cuando solo un 25 % o menos desarrollaron colonias.

Se desarrollaron tres series de colonias, con siete repeticiones cada una, del morfotipo que se mantuvo sobresaliente contra *F. oxysporum*. A los siete días se inocularon con alícuotas de 20 μ L de una suspensión de conidios del fitopatógeno elaborada como se describió previamente, en los puntos cardinales de las cajas Petri. Alícuotas con conidios de *F. oxysporum* se depositaron en cajas con AN libres de actinobacteria como testigos. Cada 24 h se transfirieron los conidios de cada serie a nuevas cajas sin actinobacteria. A las 72 h se determinó el porcentaje de conidios germinados a partir de los primeros cien observados y se obtuvo el promedio de germinación por cada repetición. Se consideró que la inhibición fue debida a una capacidad fungistática cuando el porcentaje de germinación fue mayor al 90 %, mientras que valores de germinación menores al 5 % se consideraron que la inhibición fue del tipo fungicida. Los datos de porcentaje obtenidos de los experimentos se transformaron al arcoseno de la raíz cuadrada y se sometieron a un análisis de varianza de una vía.

Identificación de actinobacterias

Se extrajo el ADN de los morfotipos sobresalientes como se describió previamente (Peña-Carrillo *et al.*, 2021), y se amplificó el gen que codifica para el ARN ribosomal 16S con los oligonucleótidos F1 (5'-AGAGTTTGATCITGGCTCAG-3') y R5 (5'-ACGGITACCTTGTTACGACTT-3') utilizados previamente por Cook y Meyers (2003). Los productos de PCR se secuenciaron en ambos sentidos, se obtuvo una secuencia consenso para cada morfotipo y se realizó una búsqueda en el GenBank utilizando la herramienta BLAST para establecer su relación con secuencias de actinobacterias previamente registradas. Finalmente, las secuencias que resultaron con una similitud mayor a 99% se descargaron del GenBank y se utilizaron para calcular su distancia genética por el método de p-distance, con respecto a las secuencias de las cepas sobresalientes; el cálculo de distancias genéticas se realizó en el programa Mega X (Kumar *et al.*, 2018). Las secuencias obtenidas en este estudio se utilizaron para inferir un árbol filogenético mediante un análisis de Máxima verosimilitud realizado en el servidor en línea IQ-tree versión 1.6.12 (Trifinopoulos *et al.* 2016). El análisis se realizó con el fin de demostrar las relaciones filogenéticas de las cepas de estudio con respecto a otras especies de *Streptomyces*. Para el análisis filogenético se descargó secuencias de las especies con un porcentaje de identidad mayor a 98% con respecto a las secuencias sobresalientes. La selección del modelo de sustitución se realizó de manera automática y el soporte de cada nodo se obtuvo con la prueba de una sola rama y una aproximación ultrafast bootstrap (Hoang *et al.* 2018) de

against *F. oxysporum* were developed. At 7 days-old, they were inoculated with 20 μ L aliquots of a conidia suspension of the phytopathogen prepared as previously described, at the cardinal points of the Petri dishes. Controls received aliquots with *F. oxysporum* conidia, which were deposited in the NA medium free of actinobacteria. Every 24 h, conidia of each set were transferred to new actinobacteria free Petri dishes. At 72 h, the percentage of germinated conidia was determined from the first hundred observed, and average conidial germination was obtained for each replication. It was considered that inhibition was produced by fungistatic effects when percentage of conidial germination was greater than 90%; while, fungicidal effects were considered when such values were less than 5 %. Obtained percentages from the experiments were transformed to the arcsine of the square root and subjected to a one-way analysis of variance.

Identification of actinobacteria. DNA was extracted from outstanding actinobacteria morphotypes as previously described (Peña-Carrillo *et al.*, 2021), and the gene encoding the 16S ribosomal RNA was amplified with F1 oligonucleotides (5'-AGAGTTTGATCITGGCTCAG-3') and R5 (5'-ACGGITACCTTGTTACGACTT-3') previously used by Cook and Meyers (2003). PCR products were sequenced in both directions, a consensus sequence was obtained for each morphotype, and a search was performed in the GenBank using the BLAST tool to establish their relationship with previously recorded actinobacterial sequences. Finally, sequences that were more than 99% similar were downloaded from GenBank and used to calculate their genetic distance by the p-distance method, with respect to the sequences of the outstanding strains; the calculation of genetic distances was carried out in the Mega X program (Kumar *et al.*, 2018). The sequences from this study were used to infer a phylogenetic tree with the Maximum Likelihood method in the IQtree version 1.6.12 online server (Trifinopoulos *et al.* 2016). This analysis was performed with the aim of demonstrating the phylogenetic relations of our strains versus other *Streptomyces* species. For the phylogenetic analysis only sequences with 98 or more percent identity were included, and the substitution model used to infer the tree was selected with the function Auto; branch support was assessed with the single branch test and the ultrafast bootstrap approximation (Hoang *et al.* 2018) with 10000 replicates.

RESULTS

125 strains of actinobacteria were obtained; they were grouped into 49 morphotypes. Twenty-four morphotypes were represented by a single strain, six by two strains, eight by three strains, four by four strains, three by five strains, one by six strains, one by seven strains, one by eight strains, and one by 13 strains. The Shannon-Wiener diversity index was 3.58 for the actinobacteria morphotypes present in the analyzed soil sample. An example of the diversity of morphotypes obtained is shown in Figure 1.

10000 réplicas.

RESULTADOS

Se obtuvieron 125 cepas de actinobacterias, las cuales fueron agrupadas en 49 morfotipos. Veinticuatro morfotipos estuvieron representados por una sola cepa, seis por dos cepas, ocho por tres cepas, cuatro por cuatro cepas, tres por cinco cepas, uno por seis cepas, uno por siete cepas, uno por ocho cepas y uno por 13 cepas. El índice de diversidad de Shannon-Wiener fue de 3.58 para los morfotipos de actinobacterias presentes en la muestra de suelo analizada. Una muestra de la diversidad de morfotipos obtenidos se muestra en la Figura 1.

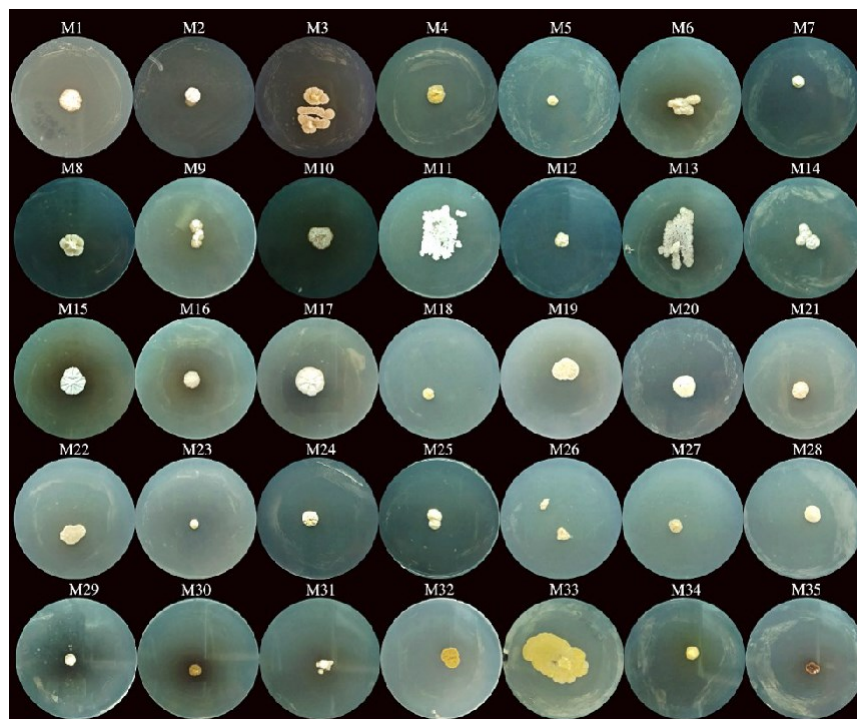


Figura 1. Muestra de morfotipos de actinobacterias aisladas de suelo a partir de una parcela cultivada con soya en 2021, del estado de Tamaulipas, México.

Figure 1. Sample of actinobacteria morphotypes isolated from soil from a plot cultivated with soybean in 2021, from Tamaulipas state, Mexico.

El fitopatógeno que mostró el porcentaje de inhibición promedio más elevado contra los morfotipos de actinobacterias fue *M. phaseolina* (62.0 %), seguido de *R. solani* (47.9 %), *F. solani* (41.7 %) y *F. oxysporum* (32.1 %). Sólo cinco morfotipos (M3, M8, M17, M26, M35) causaron en promedio un porcentaje de inhibición del 68.9 a 80.9 contra los cuatro fitopatógenos. El número de morfotipos varió en cuanto al porcentaje de inhibición que causaron a cada uno de los fitopatógenos (Figura 2). En la Figura 3 se muestra la respuesta de los cuatro fitopatógenos a tres morfotipos durante la preselección.

M. phaseolina showed the highest average inhibition percentage (62.0 %) by actinobacterial morphotypes, followed by *R. solani* (47.9 %), *F. solani* (41.7 %) and *F. oxysporum* (32.1 %). Only five morphotypes (M3, M8, M17, M26, M35) caused an average inhibition percentage of 68.9 to 80.9 in the four phytopathogens. Number of morphotypes varied in terms of inhibition percentage that they caused to each of the phytopathogens (Figure 2). Figure 3 shows the response of the four phytopathogens to three morphotypes during preselection.

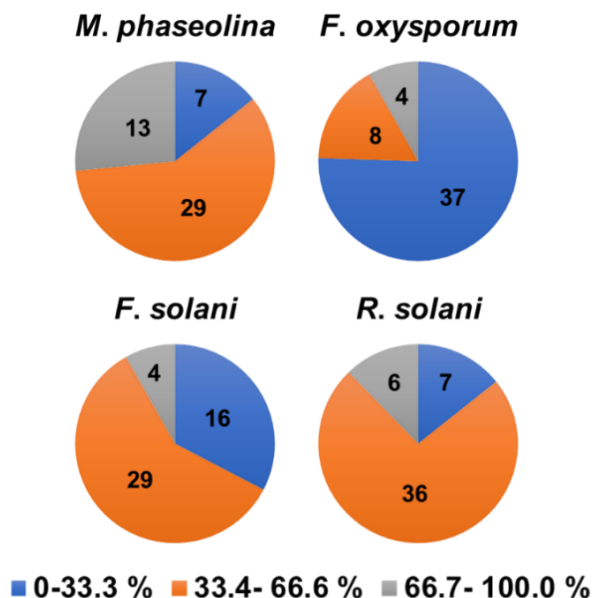


Figura 2. Cantidad de morfotipos que causaron algún porcentaje de inhibición sobre cuatro especies de hongos fitopatógenos.
 Figure 2. Number of morphotypes that caused some percentage of inhibition on four species of phytopathogenic fungi.

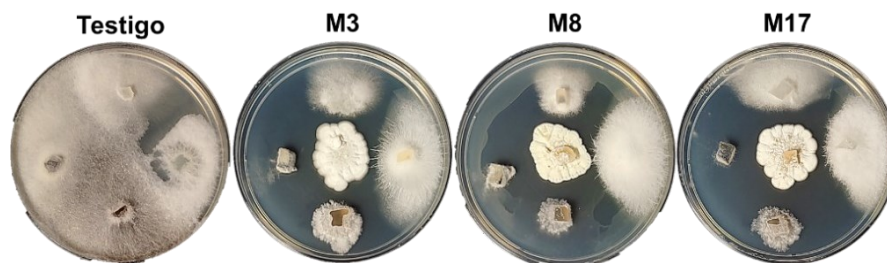


Figura 3. Aspecto del crecimiento de cuatro hongos fitopatógenos en el ensayo de preselección en el testigo y tres morfotipos de actinobacterias, cuatro días después de su inoculación. En cada caja Petri se encuentra en la parte superior *F. oxysporum*, y en el sentido de las manecillas del reloj *F. solani*, *R. solani* y *M. phaseolina*.

Figure 3. Aspect of the growth of four phytopathogenic fungi in the preselection test in the control and three morphotypes of actinobacteria, four days after inoculation. In each Petri dish, *F. oxysporum* is found at the top, and clockwise *F. solani*, *R. solani*, and *M. phaseolina*.

Debido a que en el escrutinio sólo se encontró porcentajes de inhibición del 100% contra *M. phaseolina* y *F. oxysporum*, se evaluaron estas respuestas en experimentos subsecuentes. Dos morfotipos (M3, M17) fueron seleccionados durante la preselección por su sobresaliente actividad antagonista contra *M. phaseolina*. Se encontraron diferencias estadísticas ($p < 0.01$) entre tratamientos en el crecimiento radial desarrollado a partir de los fragmentos inoculados. El testigo mostró un crecimiento radial promedio de 6.4 mm, mientras que en el morfotipo M3 fue de 4.0 mm (37.5 % de inhibición) y en M17 fue de 0.0 mm (100 % de inhibición). Durante la preselección, el morfotipo M35 fue seleccionado por causar el 100 % de inhibición de *F. oxysporum*. Cuando se realizó la confrontación de esta actinobacteria en el experimento posterior, se observó la ausencia de germinación de conidios del hongo a las 24 h de establecida la confrontación; mientras que en el testigo fue imposible

Since only 100% inhibition percentages were found against *M. phaseolina* and *F. oxysporum* in the preselection test, such response was evaluated in subsequent experiments. Two morphotypes (M3, M17) were selected during the preselection phase due to their outstanding antagonistic activity against *M. phaseolina*. For radial growth of this fungus developed from the inoculated fragments, there were statistical differences among treatments ($p < 0.01$). Average radial growth in the control was 6.4 mm; while, in the M3 morphotype it was 4.0 mm (37.5 % growth inhibition) and in M17 it was 0.0 mm (100 % growth inhibition). During preselection, the M35 morphotype was selected for causing 100% inhibition of *F. oxysporum*. When the confrontation of this actinobacteria was carried out in the subsequent experiment, absence of conidia germination of this fungus was observed 24 hours after the confrontation was settled down; meanwhile, in the control, it was impossible to quantify

realizar una cuantificación de la germinación debido al abundante crecimiento micelial, por lo que se consideró una germinación del 100 %. A las 48 h el promedio de crecimiento micelial en el testigo en dirección al centro de la caja Petri fue de 1.6 mm y en la confrontación con la actinobacteria fue de 0.0 mm. En ambos resultados se encontraron diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre el testigo y la confrontación con la actinobacteria. confrontación con la actinobacteria fue de 0.0 mm. En ambos resultados se encontraron diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre el testigo y la confrontación con la actinobacteria.

En el experimento para determinar el efecto fungicida o fungistático, *M. phaseolina* and *F. oxysporum* fueron incapaces de desarrollar un crecimiento micelial más allá de donde fueron depositados mientras se encontraron en confrontación con las actinobacterias. El 100 % de los fragmentos de colonia de *M. phaseolina* retirados al final de la confrontación con la cepa M17, así como los del testigo, desarrollaron colonia a las 48 h, por lo que no se encontró diferencias estadísticas entre ambos. Este resultado indica que la actividad inhibitoria de M17 contra el fitopatógeno es del tipo fungistática (Figura 4).

quantify germination due to the abundant mycelial growth; therefore, a 100 % germination was considered for such treatment. At 48 h, the average mycelial growth in the control towards the center of the Petri dish was 1.6 mm; in the case of the confrontation with the actinobacteria it was 0.0 mm. In both results, there were statistical differences among treatments ($p < 0.05$).

In the experiment to determine fungicidal or fungistatic effects from actinobacteria, *M. phaseolina* and *F. oxysporum* were unable to develop mycelial growth beyond the site where they were deposited; this was observed during the confrontational periods with actinobacteria. 100 % of the *M. phaseolina* colony fragments removed at the end of the confrontation with the M17 morphotype, as well as those of the control, resumed growth and developed colonies at 48 h, with no statistical differences between the two treatments. This result indicates that the inhibitory activity of M17 against the phytopathogen is a fungistatic type (Figure 4).

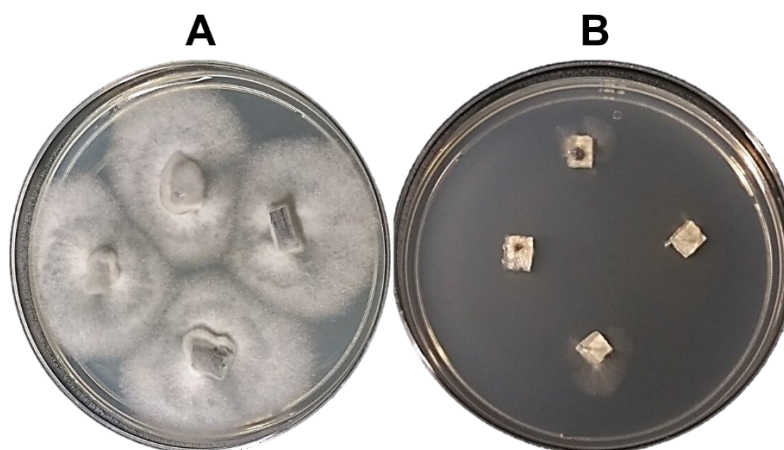


Figura 4. Crecimiento de *Macrophomina phaseolina* en fragmentos de colonia, removidos a los dos días de establecido el experimento en el testigo sin actinobacteria (A) y de la confrontación con la actinobacteria M35 (B).

Figure 4. Growth of *Macrophomina phaseolina* in colony fragments, removed two days after the experiment was established in the control without actinobacteria (A) and from the confrontation with the actinobacteria M35 (B).

Se encontraron diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre los porcentajes de germinación de conidios de *F. oxysporum* extraídos de los testigos y de las confrontaciones con la cepa M35 en cada serie. El porcentaje de conidios germinados fue de 2.32, 0.14 y 0.18 en aquellos extraídos de la confrontación con M35 a las 24, 48 y 72 h, respectivamente; mientras que en los testigos fue imposible determinar la cantidad de conidios germinados debido al abundante crecimiento micelial, por lo que se consideró una germinación del 100 % (Figura 5). Estos resultados muestran que la inhibición causada por M35 sobre la germinación de *F. oxysporum* es del tipo fungicida. Aunque se encontraron algunos conidios germinados después de la

Statistical differences were found between germination percentages of *F. oxysporum* conidia extracted from the controls and from the confrontations with the M35 morphotype in each series ($p < 0.05$). Percentage of germinated conidia was 2.32, 0.14 and 0.18 in those extracted from the confrontation with M35 at 24, 48 and 72 h, respectively; whereas, in the control, it was impossible to determine the amount of germinated conidia due to the abundant mycelial growth; thus, 100 % germination was considered for this treatment (Figure 5). These results show that the inhibition caused by M35 on the germination of *F. oxysporum* is fungicidal type. Although, some germinated conidia were found after the removal of the confrontation

remoción de la confrontación con la actinobacteria, fue imposible observar la formación de alguna colonia de *F. oxysporum*.

with the actinobacteria, it was impossible to observe the formation of any *F. oxysporum* colony.

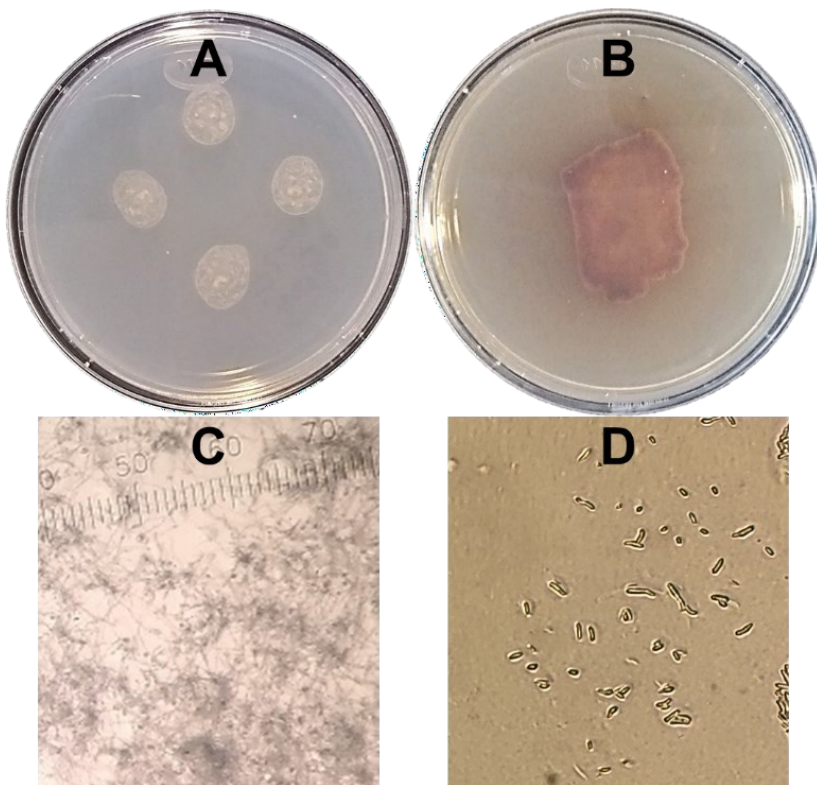


Figura 5. Apariencia de cajas Petri del testigo (A) y de la confrontación con la cepa M35 (B) a las 24 h de establecido el experimento, y vista al microscopio de conidios en el testigo (C) y en la confrontación (D) a las 24 h posteriores de ser removidos del testigo y de la confrontación a nuevo medio de cultivo.

Figure 5. Appearance of the Petri dishes of the control (A) and the confrontation with the M35 strain (B) 24 h after the experiment was established, and microscopic view of conidia in the control (C) and in the confrontation (D) 24 h after being removed from the control and confronted with M35, to a new culture medium.

Respecto a la identidad genética de los morfotipos sobresalientes, el tamaño de la secuencia del morfotipo M17 fue de 1374 bases. De acuerdo con el análisis BLAST, la secuencia se asemeja en un 99.85% a la especie *Streptomyces catenulae* (distancia 0.0007) y en un 99.64% a la especie *S. ramulosus* (distancia genética 0.002) con el 100% de cobertura. Por otra parte, la secuencia del gen 16S del morfotipo M35 constó de 1374 bases, y se asemejó en un 99.20% a la especie *S. catenulae* (distancia 0.008) con el 100% de cobertura; la distancia genética entre los morfotipos M17 y M35 fue de 0.008. Las realaciones filogenéticas se observan de forma gráfica en el árbol filogenético (Figura 6), en donde las secuencias de las cepas M17 y M35 se agruparon con secuencias de *S. catenulae* y *S. ramulosus*. Hasta el momento, la estrecha relación genética entre ambos morfotipos sólo permite establecer la identidad de ambos morfotipos como miembros del género *Streptomyces*.

Regarding the genetic identity of the outstanding morphotypes, size of the sequence of M17 morphotype was 1374 bases. According to the BLAST analysis, the sequence is 99.85% similar to the species *Streptomyces catenulae* (distance 0.0007) and 99.64% to the species *S. ramulosus* (genetic distance 0.002) with 100% coverage. On the other hand, the sequence of the 16S gene of the M35 morphotype consisted of 1374 bases, and was 99.20% similar to the species *S. catenulae* (distance 0.008) with 100% coverage; the genetic distance between the M17 and M35 morphotypes was 0.008. The phylogenetic relationships are graphically observed in the phylogenetic tree (Figure 6), where the sequences from strains M17 and M35 were grouped with sequences from *S. catenulae* and *S. ramulosus*. The close genetic relationship between both morphotypes only allows to establish the identity of both morphotypes as members of the genus *Streptomyces*.

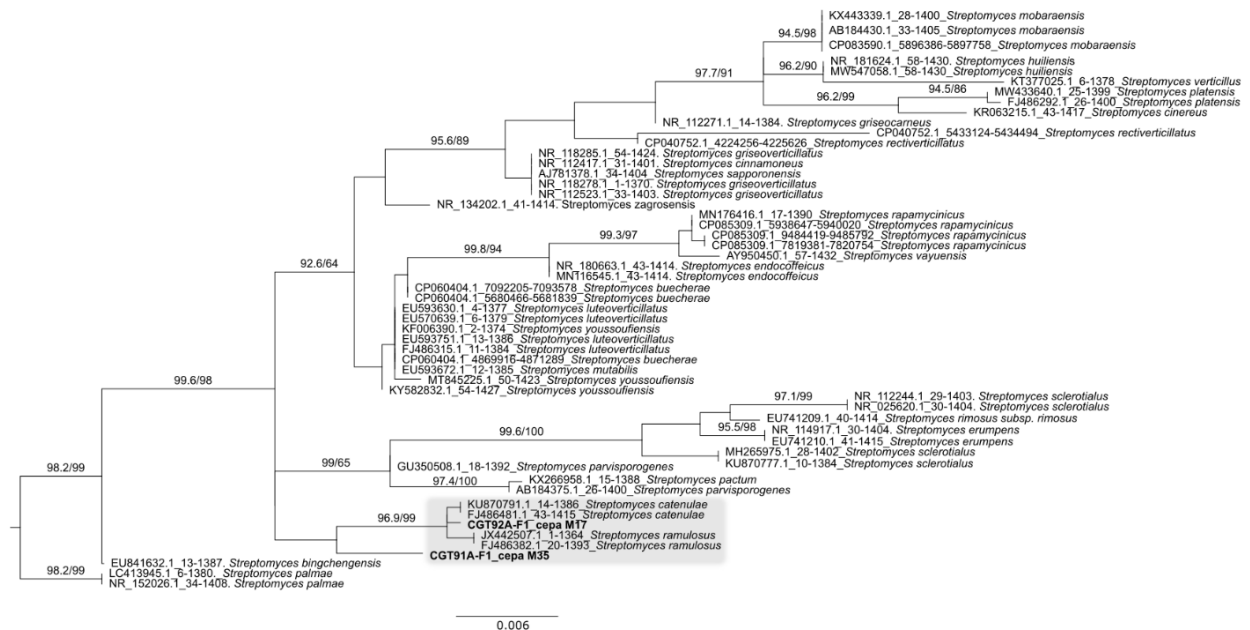


Figura 6. Relaciones filogenéticas de cepas M17 y M35. El árbol demuestra agrupación de las cepas 17 y 35 con respecto a las especies *Streptomyces catenulae* y *S. ramulosus*. Sobre cada rama se representan los porcentajes de los soportes SH-aLRT (%) / ultrafast bootstrap (%) mayores a 90.

Figure 6. Phylogenetic relationships of strains 17 and 35. The tree demonstrates grouping of strains 17 and 35 with respect to the species *Streptomyces catenulae* and *S. ramulosus*. On each branch, the percentages of SH-aLRT (%) / ultrafast bootstrap (%) supports greater than 90 are represented.

DISCUSIÓN

El 39.2 % de las cepas de actinobacterias aisladas correspondió a morfotipos distintos que mostraron características diferentes. El índice de diversidad de 3.58 de morfotipos presentes en la muestra de suelo analizada se considera elevado, tomando en cuenta que índices de 3.46 - 3.76 y de 4.05 han sido reportados de suelo en los estados de Coahuila (Rodríguez-Guerra *et al.*, 2020) y Tamaulipas (Peña-Carrillo *et al.*, 2021), México.

Durante la búsqueda de microorganismos antagonísticos contra *F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani* y *M. phaseolina*, se han encontrado algunas bacterias, hongos y actinobacterias con sobresaliente actividad antagonística (Díaz-Díaz *et al.*, 2022; Bojórquez-Armenta *et al.*, 2021; Mmbaga *et al.*, 2018; Jalaluldeen *et al.*, 2014; Gopalakrishnan *et al.*, 2011; Suárez-Estrella *et al.*, 2007); sin embargo, comúnmente un número reducido de cepas son seleccionadas para continuar estudios más detallados sobre el antagonismo observado. En el ensayo de preselección realizado, sólo fue posible identificar los morfotipos M3 y M17 con inhibición completa del crecimiento de *M. phaseolina*, mientras que sólo M35 inhibió totalmente el crecimiento de *F. oxysporum*. De estos morfotipos sometidos a un experimento adicional para confirmar el nivel de antagonismo previamente observado, sólo M3 fue incapaz de mantener su inhibición contra *M. phaseolina*. La preselección y evaluación de antagonistas sobresalientes permitió identificar morfotipos con los niveles mayores de antagonismo contra los fitopatógenos

DISCUSSION

39.2 % of the isolated actinobacteria strains corresponded to different morphotypes that showed different characteristics. The diversity index of 3.58 of morphotypes found in the analyzed soil sample is considered high, taking into account that indices of 3.46 - 3.76 and 4.05 have been reported for soil in the states of Coahuila (Rodríguez-Guerra *et al.*, 2020) and Tamaulipas, Mexico (Peña-Carrillo *et al.*, 2021).

During the search for antagonistic microorganisms against *F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani* and *M. phaseolina*, some bacteria, fungi and actinobacteria with outstanding antagonistic activity have been found (Díaz-Díaz *et al.*, 2022; Bojórquez-Armenta *et al.*, 2021; Mmbaga *et al.*, 2018; Jalaluldeen *et al.*, 2014; Gopalakrishnan *et al.*, 2011; Suárez-Estrella *et al.*, 2007); however, commonly a reduced number of strains are selected to continue more detailed studies on the observed antagonism. In the preselection test carried out, it was possible to identify just the M3 and M17 morphotypes with complete inhibition of the growth of *M. phaseolina*; while only M35 totally inhibited the growth of *F. oxysporum*. Of these morphotypes subjected to a further experiment to confirm the previously observed level of antagonism, only M3 was unable to maintain its inhibition against *M. phaseolina*. The preselection and evaluation of outstanding antagonists allowed us to identify morphotypes with the highest levels of antagonism against the phytopathogens under study; also, we obtained insights about the possible factors

bajo estudio, y poder establecer las posibles actividades involucradas en la elevada inhibición observada.

Los niveles de inhibición registrados contra *M. phaseolina* en otras investigaciones han sido del 70.4 % (Díaz-Díaz *et al.*, 2022), 60 % (Gopalakrishnan *et al.*, 2011), 64.52 % (Shrivastava *et al.*, 2017) y 50 % (Yadav *et al.*, 2014). En esta investigación el morfotipo M17 causó 100 % de inhibición contra *M. phaseolina*, y se considera que este es el primer registro con inhibición total del crecimiento micelial de este fitopatógeno por un antagonista. También se realizó un experimento para determinar un posible efecto fungistático o fungicida del morfotipo M17. El resultado obtenido mostró una reanudación del crecimiento de *M. phaseolina* después de haberse retirado de su exposición con la actinobacteria. El procedimiento demostró que la potente actividad del microorganismo es del tipo fungistático al inhibir el crecimiento micelial del fitopatógeno sólo mientras están confrontados.

Resultados sobresalientes se han registrado respecto a la inhibición del crecimiento micelial de *F. oxysporum*, los cuales han sido del orden del 79.9 % (Zou *et al.*, 2021), 41.88 % (Tlemsani *et al.*, 2020) y 71 % (Jalaluldeen *et al.*, 2014), entre otros. En esta investigación los conidios confrontados con la actinobacteria M35 fueron incapaces de desarrollar colonias demostrando un 100 % de inhibición del crecimiento micelial. Zou *et al.* (2021) y Getha y Vikineswary (2002) también han reportado una completa inhibición de la germinación de esporas de *F. oxysporum* mediante el uso de extractos de actinomicetos obtenidos con solventes, lo que indica que compuestos químicos son producidos por las actinobacterias evaluadas. Los porcentajes bajos de germinación (0.18 al 2.42 %) observados después de la confrontación con la cepa M35, en esta investigación, y la incapacidad de estos para desarrollar alguna colonia, demuestra una elevada actividad fungicida sobre los conidios de la cepa de *F. oxysporum*. La falta de contacto entre las actinobacteria M17 y M35 con fragmentos de colonia de *M. phaseolina* y conidios de *F. oxysporum*, sugiere que la producción de compuestos difusibles en el sustrato, o volátiles, podrían estar involucrados en la actividad fungistática y fungicida observada, respectivamente.

De acuerdo con la secuencia analizada, los morfotipos M17 y M35 corresponden al género *Streptomyces*, y se relacionan genéticamente a las especies *S. ramulosus* y *S. catenulae*. De ambas especies de *Streptomyces*, sólo *S. ramulosus* es la única que se ha reportado como productora de compuestos con actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos de eucalipto. Además, se reporta como promotora del crecimiento de sus raíces (Himaman *et al.*, 2016). Al momento, los resultados obtenidos para la identificación de las actinobacterias hacen imposible determinar si ambos morfotipos corresponden a una especie o especies diferentes. Aunque la relación genética entre ambos morfotipos es fuerte, la actividad biológica que demostraron durante la preselección es contrastante, sugiriendo que ambos morfotipos de actinobacterias pueden

involved in the high inhibition observed.

Inhibition levels registered against *M. phaseolina* in other studies have been 70.4% (Díaz-Díaz *et al.*, 2022), 60 % (Gopalakrishnan *et al.*, 2011), 64.52 % (Shrivastava *et al.*, 2017) and 50% (Yadav *et al.*, 2014). In this research, M17 morphotype caused 100% inhibition against *M. phaseolina*; such finding is the first record concerning total inhibition of the mycelial growth of this phytopathogen by an antagonist. An experiment was also carried out to determine a possible fungistatic or fungicidal effect by the M17 morphotype. The results showed resumed growth of *M. phaseolina* after withdrawn from exposure to the actinobacteria. The procedure demonstrated that the potent activity of the microorganism is a fungistatic effect, which inhibits mycelial growth of the phytopathogen only during the time that they are confronted.

Outstanding results have been recorded regarding the inhibition of the mycelial growth of *F. oxysporum*, which have been in the range of 41.88% (Tlemsani *et al.*, 2020), 71% (Jalaluldeen *et al.*, 2014) and 79.9% (Zou *et al.*, 2021), and among others. In this investigation, the conidia confronted with the M35 actinobacteria were unable to develop colonies, demonstrating 100% inhibition of mycelial growth. Zou *et al.* (2021) and Getha and Vikineswary (2002) have also reported complete inhibition of spore germination of *F. oxysporum* by using solvent-based extracts of actinomycetes, indicating that chemical compounds are produced by the tested actinobacteria. The low conidia germination percentages (0.18 to 2.42 %) observed in our study after confrontation with the M35 strain, and the inability of the scarce germinated conidia to develop any colonies after ending the confrontation, demonstrate high fungicidal activity of the actinobacteria on the conidia of *F. oxysporum*. Lack of contact between actinobacteria M17 and M35 with colony fragments of *M. phaseolina* and conidia of *F. oxysporum*, suggests that the production of diffusible or volatile compounds could be involved in the observed fungistatic and fungicidal activity, respectively.

According to the analyzed sequence, M17 and M35 morphotypes correspond to the genus *Streptomyces*, genetically related to the species *S. ramulosus* and *S. catenulae*. Regarding such species of *Streptomyces*, only *S. ramulosus* has been reported as a producer of compounds with antifungal activity against eucalyptus phytopathogenic fungi. In addition, it is reported as a promoter of the growth of its roots. (Himaman *et al.*, 2016). At this moment, results obtained for the identification of the actinobacteria make impossible to determine if both morphotypes correspond to the same species or each one to different species. Although the genetic relationship between both morphotypes is strong, biological activity found during preselection is remarkably contrasting, suggesting that both actinobacteria morphotypes could be different species. Consequently, it is necessary to perform additional studies aimed to sequence their complete genome, determine chemical properties, among other characteristics, that could allow to conclude

ser especies diferentes. En consecuencia, es necesario realizar estudios adicionales que contemplen la secuenciación de su genoma completo, propiedades químicas, entre otras características, con el fin de determinar su identidad con mayor certidumbre.

CONCLUSIONES

La diversidad morfológica entre los 125 aislados de actinobacterias obtenidas de suelo fue elevada. Dos morfotipos sobresalieron por su actividad antagónica, uno inhibiendo completamente el crecimiento radial de *M. phaseolina* y otro inhibiendo la germinación de conidios y el crecimiento micelial de *F. oxysporum*. Las actinobacterias M17 y M35 pertenecen al género *Streptomyces* y poseen actividad fungistática y fungicida potente contra *M. phaseolina* y *F. oxysporum*, respectivamente.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, 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".

other characteristics, that could allow to conclude their identity with greater certainty.

CONCLUSIONS

The morphotypic diversity among the 125 isolates of actinobacteria obtained from soil was high. Two morphotypes stood out for their antagonistic activity, one completely inhibiting radial growth of *M. phaseolina* and the other totally inhibiting conidia germination and the mycelial growth of *F. oxysporum*. Actinobacteria M17 and M35 belong to the genus *Streptomyces* and have potent fungistatic and fungicidal activity against *M. phaseolina* and *F. oxysporum*, respectively.

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".

Literatura citada

References

- Al-Jedabi, A. A. 2009. Biological control of *Fusarium* root-rot of sorghum. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 5(4), 465-473. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-11-18-0052-R>
- Armijo-Martínez, L. F., Rodríguez-Guerra, R., Almeyda-León, I. H., López-Arroyo, J. I., Rodríguez-Villarreal, R. A., Robledo-Leal, E., y Ruiz-Amaro, C. J. 2019. Selección de actinobacterias y hongos de suelo antagonistas al hongo fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*. *VI Encuentro Internacional sobre Biotecnología en la UATX*. pp: 102. <https://www.researchgate.net/profile/Carlos-Ruiz-Amaro/publication/360181621>
- Bojórquez-Armenta, Y. D. J., Mora-Romero, G. A., López-Meyer, M., Maldonado-Mendoza, I. E., Castro-Martínez, C., Romero-Urías, C. de los A., Cordero-Ramírez, J.D. and Martínez-Álvarez, J. C. 2021. Evaluation of *Bacillus* spp. isolates as potential biocontrol agents against charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* on common bean. *Journal of General Plant Pathology*, 87(6), 377-386. <https://doi.org/10.1007/s10327-021-01019-4>
- 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>
- Díaz-Díaz, M., Bernal-Cabrera, A., Trapero, A., Medina-Marrero, R., Sifontes-Rodríguez, S., Cupull-Santana, R. D., García-Bernal, M., and Agustí-Brisach, C. 2022. Characterization of actinobacterial strains as potential biocontrol agents against *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani*, the main soil-borne pathogens of *Phaseolus vulgaris* in Cuba. *Plants*, 11(5), 645. <https://doi.org/10.3390/plants11050645>
- Di Rienzo, J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., González L., Tablada M., y Robledo C.W. InfoStat versión 2020. Centro de transferencia InfoStat, F. C. A. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina. <https://www.infostat.com.ar>
- Espinoza-Ahumada, C. A., Gallegos-Morales, G., Hernández-Castillo, F. D., Ochoa-Fuentes, Y. M., Cepeda-Siller, M., y Castillo-Reyes, F. 2019. Antagonistas microbianos a *Fusarium* spp., como agente causal de pudrición de raíces y tallo en melón. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 6(16), 45-55. <https://www.scielo.org.mx/pdf/era/v6n16/2007-901X-era-6-16-45.pdf>
- Getha, K., and Vikineswary, S. 2002. Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4: indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(6), 303-310. <https://doi.org/10.1038/sj/jim/7000247>
- González, V., Armijos, E., and Garcés-Claver, A. 2020. Fungal endophytes as biocontrol agents against the main soil-borne diseases of melon and watermelon in Spain. *Agronomy*, 10(6), 820. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060820>
- Gopalakrishnan, S., Kiran, B. K., Humayun, P., Vidya, M. S., Deepthi, K., Jacob, S., Vadlamudi, S., Alekhya, G. and Rupela, O. 2011. Biocontrol of charcoal-rot of sorghum by actinomycetes isolated from herbal vermicompost. *African Journal of Biotechnology*, 10(79), 18142-18152. <https://doi.org/10.5897/AJB11.2710>
- Granados-Montero, M. D. M., Chaves-Barrantes, N., Chaverri, P., Hernández-Fonseca, J. C., y Escudero-Leyva, E. 2021. Hongos asociados a la marchitez del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) en Costa Rica. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 39(2), 289-301. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2011-1>
- Hasani A., A. Kariminik, and K. Issazadeh. 2014. Streptomycetes: Characteristics and their antimicrobial activities. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2:63-75. <https://www.semanticscholar.org/paper/Streptomycetes-%3A-Characteristics-and-Their-Amin-Ashraf/a4c711310eb4d826a473db5480ee568201cbaed2>
- Himaman, W., Thamchaipenet, A., Pathom-Aree, W., and Duangmal, K. 2016. Actinomycetes from *Eucalyptus* and their biological activities for controlling *Eucalyptus* leaf and shoot blight. *Microbiological Research*, 188, 42-52. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.04.011>
- Hoang, D. T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B. Q., and Vinh, L. S. 2018 UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Mol. Biol. Evol.*, 35:518–522. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx281>
- Jakubiec-Krzyszniak, K., Rajnisz-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. <https://doi.org/10.21307/pjm-2018-048>
- Jalaluldeen, A. M., Sijam, K., Othman, R., and Ahmad, Z. A. M. 2014. Isolation and characterization of actinomycetes with in-vitro antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* from rhizosphere of chilli. *Methodology*, 3, 45-51. <https://www.erpublications.com/our-journals-dtl-pdf.php?pid=1&id=110>

- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. 2018. Mega X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6):1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Marquez, N., Giachero, M. L., Declerck, S., and Ducasse, D. A. 2021. *Macrophomina phaseolina*: General characteristics of pathogenicity and methods of control. *Frontiers in Plant Science*, 12, 634397. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.634397>
- Michereff, S. J., Andrade, D. E., and Sales, J. R. 2008. Reaction of melon genotypes to *Rhizoctonia solani*. *Horticultura Brasileira*, 26, 401-403. <https://www.scielo.br/j/hb/a/PMX5jcxbyKdPVwQhC6jCYMr/?lang=en&format=pdf>
- Mmbaga, M. T., Gurung, S., and Maheshwari, A. 2018. Screening of plant endophytes as biological control agents against root rot pathogens of pepper (*Capsicum annum* L.). *J. Plant Pathol. Microbiol*, 9(3), 1000435. <https://doi:10.4172/2157-7471.1000435>
- Montiel-González, L., González-Flores, F., Sánchez-García, B. M., Guzmán-Rivera, S., Gámez-Vázquez, F. P., Acosta-Gallegos, J. A., Rodríguez-Guerra, R., Simpson-Williamson, J., Cabral-Enciso, M., y Mendoza-Elos, M. 2005. Especies de *Fusarium* presentes en raíces de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con daños de pudrición, en cinco estados del centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(1), 1-7. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61223101.pdf>
- Peña-Carrillo, K. I., Almeyda-León, I. H., López-Arroyo, J. I., Narvaéz-Rodríguez, Á. I., Torres-Acosta, R. I., Ochoa-Ascencio, S., Estrada-Virgen, O., and Rodríguez-Guerra, R. 2021. Diversidad de actinobacterias aisladas de suelo y su antagonismo contra la germinación de esporas de hongos fitopatógenos. *Biotecnología y Sustentabilidad*, 6(2), 70-84. <https://doi.org/10.57737/biotecnologiaysust.v6i2.1233>
- Raymaekers, K., Ponet, L., Holtappels, D., Berckmans, B., and Cammue, B. P. 2020. Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management—a review. *Biological Control*, 144, 104240.
- Rodríguez-Guerra, R., Reyes-Castillo, F., Ledesma-Bravo, B., Calderón-Ruiz, A., Armijo-Martínez, L. F., and Ruiz-Amaro, C. J. 2020. Diversidad en suelo y antagonismo de actinobacterias contra *Sclerotium rolfsii*. *Biotecnología y Sustentabilidad*, 5(1), 19-36. <https://doi.org/10.57737/biotecnologiaysust.v5i1.925>
- Rodríguez-Villarreal, R. A., Peña-Carrillo, K. I., Fernández-Cruz, E., Almeyda-León, I. H., Hernández-Torres, I., Acosta-Díaz, E., and 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. <https://www.researchgate.net/profile/Raul-Rodriguez-Guerra/publication/270395860>
- Shannon, C. E. 1948. A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal* 27:379-423. <https://people.math.harvard.edu/~ctm/home/text/others/shannon/entropy/entropy.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>
- Shrivastava, P., Kumar, R., & Yandigeri, M. S. 2017. In vitro biocontrol activity of halotolerant *Streptomyces aureofaciens* K20: a potent antagonist against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(1), 192-199. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.12.004>
- Suárez-Estrella, F., Vargas-García, C., Lopez, M. J., Capel, C., and Moreno, J. 2007. Antagonistic activity of bacteria and fungi from horticultural compost against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Crop Protection*, 26(1), 46-53. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.04.003>
- Tlemsani, M., Fortas, Z., Dib, S., & Bellahcen, M. 2020. In vitro antagonism between actinomycete isolates and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*: The causative agent of chickpea vascular wilt. *South Asian Journal of Experimental Biology*, 10(4), 255-267. [https://doi.org/10.38150/sajeb.10\(4\).p255-267](https://doi.org/10.38150/sajeb.10(4).p255-267)
- Trifinopoulos, J., Nguyen, L.-T., von Haeseler, A., and Minh B. Q. 2016 W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res.*, 44:W232-W235. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw256>
- Vásquez, L. A., Tlapal, B. B., Yáñez, M. M., Pérez, P. R., y Quintos, E. M. 2009. Etiología de la marchitez del 'chile de agua' (*Capsicum annum* L.) en Oaxaca, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32(2), 127-134. <https://doi.org/10.35196/rfm.2009.2.127>

Yadav, A. K., Yandigeri, M. S., Vardhan, S., Sivakumar, G., Rangeshwaran, R., and Tripathi, C. P. M. 2014. *Streptomyces* sp. S160: a potential antagonist against chickpea charcoal root rot caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Annals of Microbiology*, 64(3), 1113-1122.

<https://annalsmicrobiology.biomedcentral.com/articles/10.1007/s13213-013-0750-6>

Zou, N., Zhou, D., Chen, Y., Lin, P., Chen, Y., Wang, W., Xie, J. and Wang, M. 2021. A Novel antifungal actinomycete *Streptomyces* sp. strain H3-2 effectively controls banana *Fusarium* wilt. *Frontiers in Microbiology*, 12, 706647.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.706647>