

Diversidad en suelo y antagonismo de actinobacterias contra *Sclerotium rolfsii*

Soil diversity and antagonism of actinobacteria against *Sclerotium rolfsii*

Raúl Rodríguez-Guerra¹, Francisco Castillo-Reyes², Bernardo Ledesma-Bravo³, Alberto Calderón-Ruiz³, Luis Fernando Armijo-Martínez⁴, Carlos Jesús Ruiz-Amaro⁴

¹Campo Experimental General Terán, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Km 31 Carretera Montemorelos-China, CP 67400, General Terán, Nuevo León, México. ²Campo Experimental Saltillo-INIFAP. Carretera Saltillo-Zacatecas, km 342+119, Núm. 9515, CP 25315. Buenavista, Saltillo, Coahuila. ³Universidad Tecnológica del Suroeste de Guanajuato, Km 1.2 carretera Valle-Hanímaro, CP 38400, Valle de Santiago, Guanajuato, México. ⁴Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. Av. Pedro de Alba y Manuel L. Barragán S/N, Ciudad Universitaria, C.P. 66450, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

Resumen

Actinobacterias aisladas de suelo cultivado con melón y de suelo cercano no cultivado fueron caracterizadas por morfotipo y evaluadas por su actividad antagonica mediante un escrutinio sin repeticiones contra *Colletotrichum musae*, *Moniliophthora roreri*, *Phytophthora capsici* y *Sclerotium rolfsii*. Adicionalmente, se evaluó con mayor profundidad el antagonismo de dos actinobacterias sobresalientes contra *S. rolfsii*. Cincuenta morfotipos diferentes fueron identificados entre ambos suelos, 20 exclusivos de suelo cultivado, 24 de suelo nativo cercano no cultivado y seis fueron comunes en ambos. El índice de diversidad para el suelo cultivado fue de 3.76, mientras que para el no cultivado fue de 3.46 lo que demuestra que la diversidad es muy similar entre ambos suelos, pero con escasos morfotipos similares. Los morfotipos obtenidos fueron comparados en el escrutinio contra los fitopatógenos e inhibieron en promedio el crecimiento de los fitopatógenos más del 95 %. Dos morfotipos (M-14 y M-18) fueron seleccionados para determinar su capacidad antagonica contra *S. rolfsii* mediante pruebas de confrontación dual, actividad fungicida/ fungistática y producción de compuestos volátiles. Ambos morfotipos mostraron 100% de inhibición del crecimiento micelial del fitopatógeno, y exposiciones de 4 y

Abstract

Actinobacteria isolated from melon-grown soil and from nearby uncultivated soil were characterized by morphotype and evaluated for their antagonistic activity by means of a scrutiny without repeats against *Colletotrichum musae*, *Moniliophthora roreri*, *Phytophthora capsici* and *Sclerotium rolfsii*. Additionally, the antagonism of two outstanding actinobacteria against *S. rolfsii* was further evaluated. Fifty different morphotypes were identified between both soils, 20 exclusively from cultivated soil, 24 from nearby non-cultivated native soil, and six were common in both. The diversity index for the cultivated soil was 3.76, while for the non-cultivated one it was 3.46, which show that the diversity is very similar between both soils but with few similar morphotypes. The morphotypes obtained were compared in the screening against phytopathogens and inhibited their growth on average by more than 95%. Two morphotypes (M-14 and M-18) were selected to determine their antagonistic capacity against *S. rolfsii* by means of dual confrontation tests, activity fungicidal/fungistatic and production of volatile compounds. Both morphotypes showed 100% inhibition of mycelial growth of the phytopathogen, and exposures of 4 and 8 h in confrontation with actinobacteria showed fungistatic and fungicidal effect, respectively.

8 h en confrontación con las actinobacterias mostraron un efecto fungistático y fungicida respectivamente. Los resultados demostraron que los morfotipos tienen una elevada capacidad antagonista, por lo que pueden ser considerados potenciales agentes de biocontrol contra *S. rolfsii*.

Palabras clave: Diversidad morfológica, inhibición de crecimiento micelial, actividad fungicida, actividad fungistática.

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

Introducción

El hongo *Sclerotium rolfsii* Sacc., cuyo teleomorfo es *Athelia rolfsii* (Curzi) C.C. Tu & Kimbr., es un habitante del suelo que causa diversas enfermedades (Billah *et al.*, 2017) en más de 500 plantas hospederas que pertenecen a más de 250 géneros en Estados Unidos (Farr *et al.*, 1989; Kator *et al.*, 2015). En México, *S. rolfsii* se ha registrado en al menos 18 especies de plantas, la mayoría cultivadas, entre las que se encuentran frijol, soya, chile, sorgo, garbanzo (Hernández-Jiménez *et al.*, 2004; Hernández-Morales *et al.*, 2018), y el rango de plantas hospedantes de diversos aislamientos del hongo ha sido evaluado, demostrando que *S. rolfsii* tiene la capacidad de infectar a más especies de plantas en México (Flores-Moctezuma *et al.*, 2006), aunque se desconoce su impacto en la producción de la mayoría de los cultivos.

Diversas estrategias son utilizadas para el control de *S. rolfsii* (Kumar *et al.*, 2013; Dwivedi y Prasad, 2016); sin embargo, a pesar de la gran importancia que tiene este fitopatógeno por las pérdidas que causa en la producción de especies cultivadas de plantas, su control es difícil debido a su amplio rango de hospederos, rápido crecimiento y formación de esclerocios que sobreviven por largos periodos Kator *et al.*, 2015; Billah *et al.*, 2017). Aunque

The results showed that the morphotypes have a high antagonistic capacity, so they can be considered potential biocontrol agents against *S. rolfsii*.

Key words: Morphotypic diversity, inhibition of mycelial growth, fungicity activity, fungistatic activity.

Introduction

The fungus *Sclerotium rolfsii* Sacc., whose teleomorph is *Athelia rolfsii* (Curzi) C.C. Tu & Kimbr., is a soil inhabitant that causes various diseases (Billah *et al.*, 2017) in more than 500 host plants belonging to more than 250 genera in the United States (Farr *et al.*, 1989; Kator *et al.*, 2015). In Mexico, *S. rolfsii* has been recorded in at least 18 species of plants, the majority cultivated, among which are beans, soybeans, chili, sorghum, chickpea (Hernández-Jiménez *et al.*, 2004; Hernández-Morales *et al.*, 2018), and the range of host plants of various isolates of the fungus has been evaluated, showing that *S. rolfsii* has the capacity to infect more plant species in Mexico (Flores-Moctezuma *et al.*, 2006), although its impact on the production of most crops is unknown.

Various control strategies are used to control *S. rolfsii* (Kumar *et al.*, 2013; Dwivedi y Prasad, 2016); however, despite the great importance of this phytopathogen due to the losses it causes in the production of cultivated species of plants, its control is difficult due to its wide range of hosts, rapid growth and formation of sclerotia that survive for long periods (Kator *et al.*, 2015; Billah *et al.*, 2017). Although the use of pesticides is the main strategy to control phytopathogens, they cause negative effects on health, the environment and biodiversity, among others (Bale *et al.*, 2007; Aktar *et al.*, 2009).

In recent years, the search for antagonistic microorganisms has been accentuated as a potential alternative to be used

el uso de plaguicidas es la principal estrategia para controlar a los fitopatógenos, estos causan efectos negativos en la salud, el ambiente y biodiversidad, entre otros (Bale *et al.*, 2007; Aktar *et al.*, 2009).

En los últimos años se ha acentuado la búsqueda de microorganismos antagónicos como una alternativa potencial para ser utilizados en el control biológico y reducir las poblaciones de fitopatógenos y los daños que causan, así como disminuir los riesgos por el uso de plaguicidas. Se han identificado numerosas especies de microorganismos que muestran desde bajos a elevados porcentajes de inhibición contra *Sclerotium rolfisii*, entre los que se encuentran *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* y *Trichoderma* spp. (Maheswari *et al.*, 2002; Khattabi *et al.*, 2004).

Otro grupo importante de microorganismos con actividad antagónica contra *S. rolfisii* son las actinobacterias (Singh y Gaur, 2016; Errakhi *et al.*, 2009). En éstas se encuentra el género *Streptomyces*, el cual tiene más de 500 especies (Kämpfer, 2012) y del que se han reportado más de 7,000 compuestos químicos activos importantes en diferentes áreas de aplicación (Hasani *et al.*, 2014; Kumar y Kumar, 2014; Sharma, 2014). Además, tan sólo del 2016 a la fecha se han identificado al menos 12 nuevas especies de actinobacterias.

Diversas especies de *Streptomyces* son comercialmente disponibles para el biocontrol de fitopatógenos. En México son escasas las cepas de microorganismos que han mostrado importante actividad antagónica contra este fitopatógeno (Rodríguez-Villarreal *et al.*, 2014; Paredes-Escalante *et al.*, 2009), las cuales han sido aisladas de suelo no cultivados o cultivado. Comúnmente la selección de potenciales agentes de biocontrol se realizó mediante pruebas de confrontación dual (Singh y Gaur, 2016); sin embargo, el uso de escrutinios sin repeticiones puede ser útil cuando existen numerosos microorganismos a evaluar contra un fitopatógeno (Rodríguez-Villarreal *et al.*, 2014). El objetivo de esta investigación es determinar la diversidad de

in biological control and to reduce the populations of phytopathogens and the damage they cause, as well as to reduce the risks due to the use of pesticides. Numerous species of shows low to high percentages of inhibition against *Sclerotium rolfisii*, among which are *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* y *Trichoderma* spp. (Maheswari *et al.*, 2002; Khattabi *et al.*, 2004). Another important group of microorganisms with antagonistic activity against *S. rolfisii* are actinobacteria (Singh y Gaur, 2016; Errakhi *et al.*, 2009). In these is the genus *Streptomyces*, which has more than 500 species (Kämpfer, 2012) and of which more than 7,000 important active chemical compounds have been reported in different application areas (Hasani *et al.*, 2014; Kumar y Kumar, 2014; Sharma, 2014); furthermore, only from 2016 to date at least 12 new species of actinobacteria have been identified.

Various species of *Streptomyces* are commercially available for the biocontrol of phytopathogens. In Mexico, there are few strains of microorganisms that have shown important antagonistic activity against this phytopathogen (Rodríguez-Villarreal *et al.*, 2014; Paredes-Escalante *et al.*, 2009), which have been isolated from uncultivated or cultivated soil. Commonly, the selection of potential biocontrol agents is done through dual confrontation tests (Singh and Gaur, 2016); however, the use of screenings without repetitions can be useful when there are numerous microorganisms to evaluate against a phytopathogen (Rodríguez-Villarreal *et al.*, 2014). The objective of this research is to determine the diversity of cultivable actinobacteria from melon-grown soil and from nearby non-cultivated native soil, and to identify strains with antagonistic activity against *S. rolfisii*, through preliminary screening against four plant pathogens.

Materials and methods

Actinobacteria isolation

Cultivated melon soil (25°39'28.253"N;

actinobacterias cultivables de suelo cultivado con melón y de un suelo nativo cercano no cultivado, e identificar cepas con actividad antagonica contra *S. rolfii* mediante un escrutinio preliminar contra cuatro fitopatógenos.

Materiales y métodos

Aislamiento de actinobacterias

Se colectó suelo cultivado de melón (25°39' 28.253" N; 101° 53' 51.745" O, 101°54'38.75"O) y suelo nativo cercano no cultivado (25°38' 22.614" N; 101° 54' 38.746" O) en el municipio de Paila Coahuila durante agosto de 2019. El aislamiento de actinobacterias se realizó mediante la técnica de dilución en placa en el medio de cultivo agar nutritivo. Se colocaron y distribuyeron 50 µL de las diluciones 10⁻² y 10⁻³ en cajas con medio de cultivo, y entre las 24 y 72 hr de la siembra, con ayuda de un microscopio compuesto, se transfirieron microcolonias de actinobacterias de cada tipo de suelo a nuevas cajas con el mismo medio. A los 12 días posteriores a la transferencia las colonias fueron visualmente caracterizadas con base en el color, crecimiento y apariencia, así como al color y apariencia por la parte inferior de la colonia y producción de color en el medio de cultivo. Cada conjunto de características únicas en las colonias se definió como morfotipo. Colonias con características similares fueron consideradas del mismo morfotipo. Los morfotipos del suelo cultivado fueron comparados con los aislados del suelo no cultivado. Se registró el número de morfotipos en cada fuente de suelo y se obtuvo el índice de diversidad de Shannon-Wiener (Shannon, 1948) utilizando la fórmula:

$$H = -1 \sum_{i=1}^S p_i * \ln(p_i)$$

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 una muestra de suelo y " S " = número total de morfotipos.

101°53'51.745"W) and nearby non-cultivated native soil (25°38'22.614' N; 101°54' 38.746"W) were collected in the municipality of Paila Coahuila during August 2019. Actinobacteria were isolated using the plate dilution technique in the nutrient agar culture medium. 50 µL of the 10⁻² and 10⁻³ dilutions were placed and distributed in Petri dishes with culture medium, and between 24 and 72 hr after sowing, with the help of a compound microscope, actinobacteria microcolonies of each type of soil were transferred to new dishes with the same medium. At 12 days after the transfer, the colonies were visually characterized based on color, growth and appearance, as well as the color and appearance of the lower part of the colony and color production in the culture medium. Each set of unique characteristics in the colonies was defined as a morphotype. Colonies with similar characteristics were considered the same morphotype. Morphotypes of cultivated soil were compared with morphotypes isolated from non-cultivated soil. The number of morphotypes determined in each soil source was recorded and the Shannon-Wiener diversity index (Shannon, 1948) was obtained using the formula:

$$H = -1 \sum_{i=1}^S p_i * \ln(p_i)$$

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 a soil sample and " S " = total number of morphotypes.

Screening with phytopathogenic fungi

Morphotypes of actinobacteria were evaluated for their ability to inhibit the growth of *Colletotrichum musae* (isolated from plantain and provided by M.C. Raúl Asael Rodríguez Garrido Ramírez, National Institute of Forestry, Agricultural and Livestock Research), *Phytophthora capsici* (isolated from Chile and provided by Dr. Sylvia Patricia Fernández,

Escrutinio con hongos fitopatógenos

Morfotipos de actinobacterias fueron evaluados por su capacidad de inhibir el crecimiento de *Colletotrichum musae* (aislado de plátano y facilitado por el M.C. Raúl Asael Rodríguez Villarreal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL), *Moniliophthora roreri* (aislado de cacao y facilitado por el Dr. Eduardo Raymundo Garrido Ramírez del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias), *Phytophthora capsici* (aislado de chile y facilitado por la Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo) y *Sclerotium rolfsii* (aislado de frijol y facilitado por la M.C. Bertha María Sánchez García del Instituto Tecnológico de Roque). En el centro de cajas Petri, conteniendo agar nutritivo, se inoculó cada colonia de los morfotipos y se incubó a 26 °C por 9 días y en seguida en cada extremo cardinal se inóculo un fragmento de colonia cada fitopatógeno. A los 3 días de establecida la confrontación se determinó el crecimiento radial de cada fitopatógeno en dirección a la colonia de cada actinobacteria, así como el porcentaje de inhibición respecto al testigo, el cual consistió en la inoculación de los fitopatógenos en los cuatro extremos de una caja Petri sin presencia de actinobacteria.

Confrontación dual

Con base a los resultados del escrutinio se seleccionaron dos cepas de actinobacterias (M-14, M-18) consideradas sobresalientes por la elevada inhibición causada contra *S. rolfsii*, y se evaluaron en confrontación dual contra este fitopatógeno con seis repeticiones. En el extremo de cajas Petri se inoculó cada morfotipo, se incubaron a 26 °C por 8 días y posteriormente se inoculó un fragmento de colonia de *S. Rolfsii* en el extremo opuesto de cada actinobacteria. El testigo consistió en inocular al fitopatógeno en un extremo de las cajas Petri libre de actinobacterias. A las 24

Villarreal, Faculty of Biological Sciences of the UANL), *Moniliophthora roreri* (isolated from cocoa and provided by Dr. Eduardo Raymundo Pavía, Institute of Agri-livestock and Forestry Research of the Michoacan University of San Nicolás de Hidalgo), and *Sclerotium rolfsii* (Bertha María Sánchez García, Technological Institute of Roque) by screening without repeats. In the center of Petri dishes, containing nutrient agar, each colony of the morphotypes was inoculated and incubated at 26 °C for 9 days and then a fragment of each phytopathogen colony was inoculated at each cardinal end. Three days after the confrontation was established, the radial growth of each phytopathogen towards the colony of each actinobacteria was determined, as well as the percentage of inhibition with respect to the control, which consisted in the inoculation of phytopathogens at the four ends of a Petri dish without actinobacteria

Dual confrontation

Based on the results of the scrutiny, two strains of actinobacteria (M-14, M-18) considered outstanding due to the high inhibition caused against *S. rolfsii*, were selected and evaluated in dual confrontation against this phytopathogen with six repetitions.

Each morphotype was inoculated at the end of the Petri dishes, incubated at 26 °C for 8 days, and subsequently a *S. rolfsii* colony fragment was inoculated at the control consisted in inoculating the phytopathogen in one end of the Petri dishes free of actinobacteria. At 24 and 72 hr, radial mycelial growth was determined in the direction of the actinobacteria colony. With the data, a completely random analysis of variance and a comparison of means were performed (Tukey, $p \leq 0.05$). In addition, the percentage of inhibition of the radial growth of the phytopathogen with respect to the control was obtained.

y 72 hr se determinó el crecimiento micelial radial en dirección a la colonia de la actinobacteria. Con los datos se realizó un análisis de varianza completamente al azar y una comparación de medias (Tukey, $p \leq 0.05$). Además, se obtuvo el porcentaje de inhibición del crecimiento radial del fitopatógeno respecto al testigo.

Confrontación por sobreposición simultánea

Se determinó la capacidad de las actinobacterias M-14 y M-18 para inhibir el crecimiento de *S. rolfsii* cuando fragmentos de colonia de éste se colocan sobre inóculo de las actinobacterias. Cajas Petri con agar nutritivo se inocularon con un fragmento de cada actinobacteria y se dispersó ligeramente en el centro, inmediatamente después se colocó un fragmento de colonia del fitopatógeno sobre el inóculo de las actinobacterias. A las 48 y 96 hr se registró el crecimiento radial de *S. rolfsii*. El testigo consistió en la inoculación del fitopatógeno solamente. Se realizó análisis de varianza completamente al azar y comparación de medias (Tukey, $p \leq 0.05$). También se obtuvo el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del fitopatógeno en los tratamientos con actinobacterias respecto al testigo.

Actividad fungicida/fungistática sobre micelio

Considerando los resultados de inhibición micelial en la confrontación dual y en confrontación por sobreposición simultánea, se evaluó el efecto fungicida y fungistático de las dos actinobacterias sobre fragmentos de colonia de *S. rolfsii*. Cada actinobacteria se inoculó en el centro de cajas Petri con medio agar nutritivo, se incubaron a 26 °C por 7 días y posteriormente se inoculó cada caja con ocho fragmentos de colonia de *S. rolfsii* alrededor y sin contacto con las actinobacteria. El testigo consistió en fragmentos de colonia del fitopatógeno inoculados en cajas Petri sin actinobacteria.

El experimento se realizó con cuatro

Confrontation by simultaneous overlap

The ability of actinobacteria M-14 and M-18 to inhibit the growth of *S. rolfsii* was determined when fragments of its colony are placed on inoculum of actinobacteria. Petri dishes containing nutrient agar were inoculated with a small fragment of each actinobacteria and it was slightly dispersed in the center, immediately afterwards a fragment of a colony of the phytopathogen was placed on actinobacteria inoculum. *S. rolfsii* radial growth was recorded at 48 and 96 hr. Control consisted of the inoculation of the phytopathogen only. A variance analysis completely random and means comparison were performed (Tukey, $p \leq 0.05$). Inhibition percentage of mycelial growth of the phytopathogen was also obtained in the treatments with actinobacteria respect to the control.

Fungicidal/fungistatic activity on mycelium

Considering the results of mycelial inhibition in the dual confrontation and in confrontation by simultaneous superposition, the fungicidal/fungistatic effect of the two actinobacteria on fragments of *S. rolfsii* colony was evaluated. Each actinobacteria was inoculated in the center of Petri dishes with nutrient agar medium, they were incubated at 26 °C for 7 days and then each dish was inoculated with eight fragments of *S. rolfsii* colony around and without contact with the actinobacteria. The control consisted of colony fragments of the phytopathogen inoculated in Petri dishes without actinobacteria. The experiment was carried out with four repetitions. At 4 and 8 hr after the start of the confrontation, four fragments of each repetition were extracted and transferred to another Petri dish containing only nutrient agar. At 120 hr after the fragments were extracted, the percentage of these that developed colonies of *S. rolfsii* was evaluated. With percentages less than 10, from 10 to 50, from 51 to 90 and greater than 90, it was considered that the actinobacteria has a strong fungicidal effect,

repeticiones. A las 4 y 8 hr de iniciada la confrontación, se extrajeron cuatro fragmentos de cada repetición y se transfirieron a otra caja conteniendo sólo agar nutritivo. A las 120 hr de extraídos los fragmentos se evaluó el porcentaje de éstos que desarrollaron colonias de *S. rolfsii*. Con porcentajes menores a 10, de 10 a 50, de 51 a 90 y mayores de 90, se consideró que la actinobacteria tiene un fuerte efecto fungicida, una actividad fungicida moderada, una actividad fungistática moderada y una fuerte actividad fungistática contra *S. rolfsii*, respectivamente. Los datos fueron transformados al arcoseno de la raíz cuadrada, se sometieron a análisis de varianza completamente al azar y se realizó comparación de medias (Tukey, $p \leq 0.05$).

Actividad fungicida/fungistasis sobre esclerocios

Cada actinobacteria se inoculó en el centro de cajas Petri con medio agar nutritivo, se incubaron a 26 °C por 14 días y posteriormente se inocularon con cuatro esclerocios de *S. rolfsii* alrededor de las colonias de actinobacterias, sin que hubiera contacto con las actinobacterias. El testigo consistió en esclerocios inoculados en cajas Petri sin actinobacteria.

El experimento se realizó con cinco repeticiones. A las 48 hr de iniciada la confrontación, se evaluó el porcentaje de esclerocios que desarrollaron colonia y esos mismos esclerocios se extrajeron de cada repetición y se transfirieron a otra caja conteniendo sólo agar nutritivo. El porcentaje de esclerocios extraídos que desarrollaron colonias fue evaluado a las 120 hr. El criterio de respuesta fue el mismo al establecido en el experimento anterior. Los datos fueron transformados al arcoseno de la raíz cuadrada para realizar un análisis de varianza completamente al azar.

Prueba de compuestos volátiles

Se utilizó la prueba de cultivos enfrentados (Dennis y Webster, 1971) para

moderate fungicidal activity, a moderate fungistatic activity and a strong fungistatic activity against *S. rolfsii*, respectively. Data were transformed to the arcsine of the square root, they were subjected to a completely random analysis of variance and a comparison of means was made (Tukey, $p \leq 0.05$).

Fungicidal/fungistatic activity on sclerotia

Each actinobacteria was inoculated in center of Petri dishes (repetitions) with nutrient agar medium, incubated at 26 °C for 14 days and subsequently inoculated with four *S. rolfsii* sclerotia around of actinobacteria colonies. The control consisted of sclerotia inoculated in Petri dishes without actinobacteria. The experiment was carried out with five replicates. To 48 hr after of confrontation started, the percentage of sclerotia that developed colony was evaluated and those same sclerotia were extracted from each repetition and transferred to another Petri dish containing only nutrient agar. The percentage of sclerotia extracted that developed colonies was evaluated at 120 hr. The response criterion was the same as that established in the previous experiment. The data were transformed to the arcsine of the square root to perform a completely random analysis of variance.

Volatile compound test

Faced cultures test (Dennis and Webster, 1971) was used to determine the possible production of volatile compounds to inhibit the mycelial growth of *S. rolfsii*. The lid of Petri dishes with nutrient agar inoculated with the 9-day-old M-14 and M-18 morphotypes was removed and replaced with the bottom of another Petri dish containing the same culture medium inoculated with a colony fragment of *S. rolfsii*, and both bottoms were sealed facing each other. The control consisted of the union of two bases of Petri dishes, one containing the phytopathogen and the other only with culture medium, they were kept at 26 °C and each treatment consisted of seven repetitions. At 48

determinar la posible producción de compuestos volátiles para inhibir el crecimiento micelial de *S. rolfsii*. Se retiró la tapa de cajas Petri con agar nutritivo inoculadas con los morfotipos M-14 y M-18 de 9 días de edad y se reemplazó con la base de otra caja Petri conteniendo el mismo medio de cultivo inoculado con un fragmento de colonia de *S. rolfsii*, y ambas bases se sellaron una frente a la otra. El testigo consistió en la unión de dos bases de cajas Petri, una conteniendo al fitopatógeno y la otra sólo con medio de cultivo, se mantuvieron a 26 °C y cada tratamiento consistió de siete repeticiones. A las 48 hr se registró el crecimiento radial en el testigo y se comparó con el crecimiento en las bases enfrentadas del fitopatógeno con los morfotipos. Se realizó un análisis de varianza completamente al azar, una comparación de medias (Tukey, $p \leq 0.05$) y se obtuvo el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial con respecto al testigo.

Análisis de datos

La transformación de datos al arcoseno de la raíz cuadrada y la desviación estándar de las medias se realizaron en el programa Microsoft® Office Excel 2016 (Microsoft® Corp., USA), mientras que los análisis de varianza y la comparación de medias se realizaron con el Programa de Diseños Experimentales ver. 1.6, de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Olivares, 2015).

Resultados

En el suelo cultivado con melón se obtuvieron 49 colonias de actinobacterias y 52 en el suelo no cultivado, de las cuales se identificaron 50 morfotipos distintos, y seis de ellos fueron comunes en ambos tipos de suelo (Figura 1). El índice de diversidad obtenido para la muestra de suelo cultivado y suelo nativo cercano no cultivado fue de 3.76 y 3.46 respectivamente.

Del total de morfotipos, 46 (27 de suelo no cultivado y 19 de suelo cultivado) se

hr the radial growth was recorded in the control and it was compared with the growth in the opposite bases of the phytopathogen with the morphotypes. A completely random analysis of variance was performed, a comparison of means (Tukey, $p \leq 0.05$) and the percentage of inhibition of mycelial growth with respect to the control was obtained.

Data analysis

The transformation of data to the arcsine of the square root and the standard deviation of the means were performed in the Microsoft® Office Excel 2016 program (Microsoft® Corp., USA), while the analysis of variance and the comparison of means were performed with the Experimental Design Program ver. 1.6, from the Faculty of Agronomy of the Autonomous University of Nuevo León (Olivares, 2015).

Results

In the soil cultivated with melon, 49 actinobacteria colonies were obtained and 52 in the non-cultivated soil, of which 50 different morphotypes were identified, six were common in both types of soil (Figure 1). The diversity index for the sample of cultivated soil and non-cultivated near native soil was 3.76 and 3.46 respectively.

Of the total morphotypes, 46 (27 from uncultivated soil and 19 from cultivated soil) were scrutinized for their antagonistic capacity against *C. musae*, *M. roreri*, *P. capsici* and *S. rolfsii*. The ranges of percent inhibition 95-97.9, 98-99.1 and greater than 99.2 were established, and the number of morphotypes that showed the highest range of percent inhibition against *S. rolfsii*, *M. roreri*, *P. capsici* and *C. musae* was 43, 41, 28 and 17, respectively (Figure 2). Of the 46 morphotypes, only three showed less than 99.2% inhibition against *S. rolfsii*. Morphotypes called M-14 (from non-cultivated soil) and M-18 (from soil cultivated with melon) were two of those that completely inhibited *S. rolfsii* growth during the scrutiny, and were selected as the most contrasting for their morphotypic characteristics to determine with

sometieron a un escrutinio con *C. musae*, *M. roreri*, *P. capsici* y *S. rolf sii*. Los rangos de porcentaje de inhibición 95-97.9, 98-99.1 y mayor de 99.2 fueron establecidos, y el número de morfotipos que mostraron el mayor rango de porcentaje de inhibición contra *S. rolf sii*, *M. roreri*, *P. capsici* y *C. musae* fue de 43, 41, 28 y 17, respectivamente (Figura 2). De los 46 morfotipos sólo tres presentaron menos del 99.2% de inhibición contra *S. rolf sii*.

greater precision the radial growth and inhibition percentage of the phytopathogen in dual confrontation. The results showed that both morphotypes are capable of completely inhibiting (100%) the radial growth of *S. rolf sii* even at 72 hr after the start of the confrontation (Table 1), in a similar way as was observed during the screening test. In addition, inoculation by superimposition of *S. rolf sii* in inoculum of morphotypes M-14 and M18

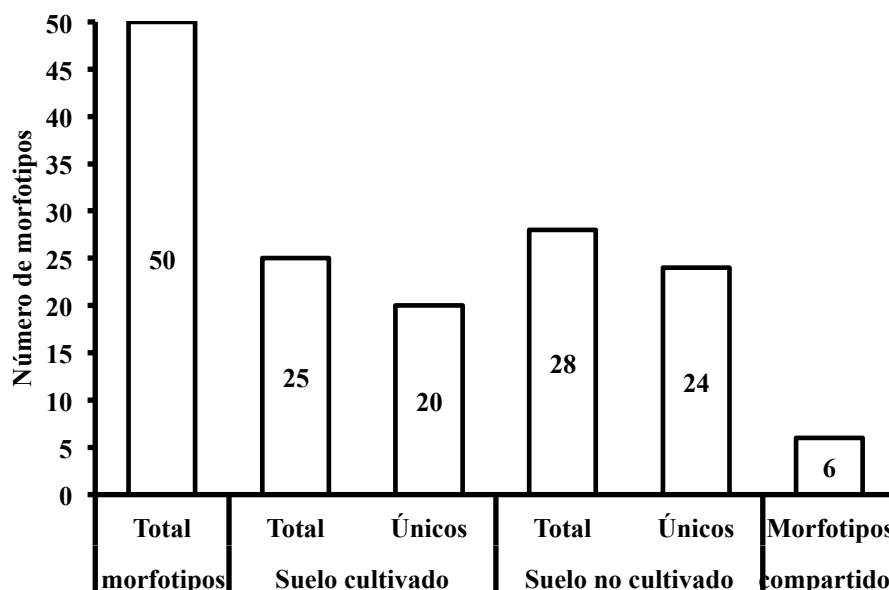


Figura 1. Morfotipos de actinobacterias en suelo cultivado con melón y suelo no cultivado.

Figure 1. Morphotypes of actinobacteria in soil grown with melon and non-cultivated soil.

Los morfotipos denominados M-14 (de suelo no cultivado) y M-18 (de suelo cultivado con melón) fueron dos de los que inhibieron completamente el crecimiento de *S. rolf sii* durante el escrutinio, y fueron seleccionados por ser los más contrastantes con base a sus características morfológicas para determinar con mayor precisión el crecimiento radial y el porcentaje de inhibición del fitopatógeno en confrontación dual. Los resultados mostraron que ambos morfotipos son capaces

prevented the growth of the phytopathogen, causing 100% inhibition at 48 and 96 hr (Table 2). In the fungicity/fungistasis experiment on *S. rolf sii* colony fragments confronted with the M-14 and M-18 morphotypes and before being removed at 4 hr after the confrontation, they showed a percentage of inhibition of 100% of the fragments; while 87.5 and 50.0% formed colonies at 120 hr after being removed from the confrontation respectively. While the fragments exposed for 8 hr to both morphotypes showed

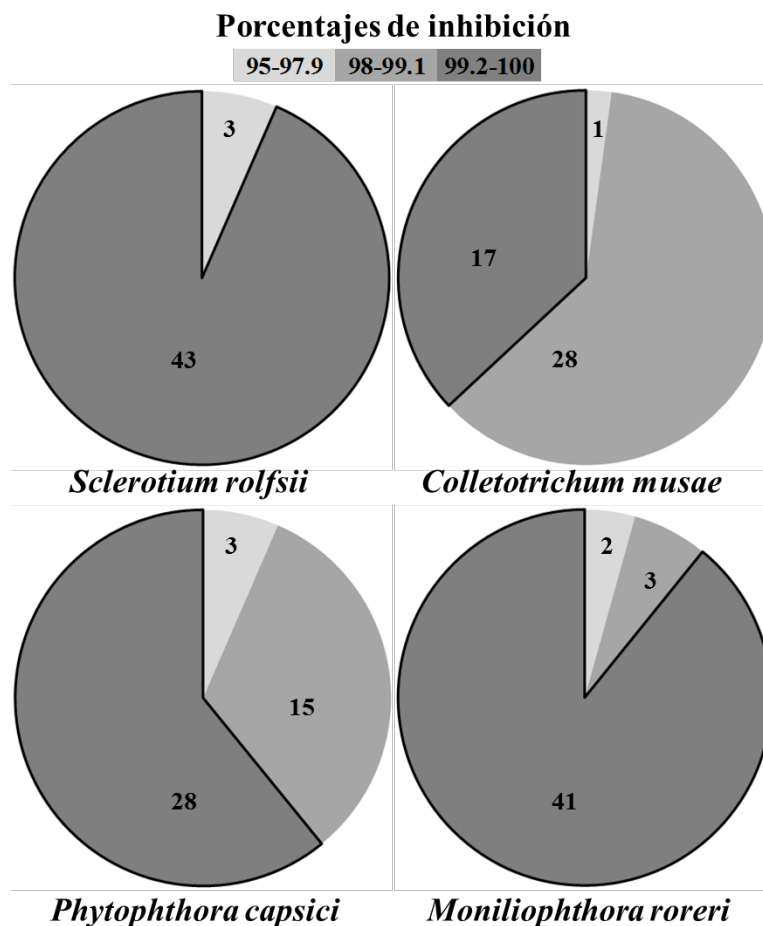


Figura 2. Número de morfotipos de actinobacterias que causaron alguno de los rangos de porcentaje de inhibición del crecimiento radial contra cuatro fitopatógenos.

Figure 2. Number of actinobacterial morphotypes that caused some of the percentage ranges of radial growth inhibition against four phytopathogens.

de inhibir completamente (100 %) el crecimiento radial de *S. rolfsii* aún a las 72 hr después del inicio de la confrontación (Cuadro 1), de manera similar como se observó durante el ensayo de escrutinio. Además, la inoculación por sobreposición de *S. rolfsii* en inóculo de los morfotipos M-14 y M18 evitó el crecimiento del fitopatógeno causando una inhibición del 100 % a las 48 y 96 hr (Cuadro 2).

En el experimento de actividad fungicida/fungistasis sobre fragmentos de

0.0% of colonies developed at 120 hr (Figure 3).

The 100% of the sclerotia of the phytopathogen exposed for 48 hr with colonies of actinobacteria were unable to develop a colony. At 120 hr after extracting the sclerotia from the confrontation with M-14 actinobacterium, and transferred to dishes without actinobacteria, only an average of 10% developed colonies, while no sclerotia exposed to M-18 developed colony. In the control, 100% of the sclerotia developed a colony (data

Cuadro 1. Crecimiento radial (cm) de *Sclerotium rolfsii* en confrontación dual con dos morfotipos de actinobacterias en dos tiempos de evaluación.

Table 1. Radial growth (cm) of *Sclerotium rolfsii* in dual confrontation with two actinobacteria morphotypes at two evaluation times.

Tratamiento	24 hr		72 hr	
	Crecimiento Radial (C.V.= 7.13)*	Porcentaje de inhibición	Crecimiento Radial (C.V.= 9.51)	Porcentaje de inhibición
Testigo	0.18 (+/- 0.075**) a***	-	1.87 (+/- 0.103) a	-
M-14	0.00 (+/- 0.000) b	100	0.00 (+/- 0.000) b	100
M-18	0.00 (+/- 0.000) b	100	0.00 (+/- 0.000) b	100

Coefficiente de variación. ** Desviación estándar. ***Promedios en cada tratamiento con misma letra no difieren estadísticamente (Tukey, p≤ 0.05).

* Coefficient of variation. ** Standard deviation. *** Averages in each treatment with the same letter do not differ statistically (Tukey, p≤ 0.05).

Cuadro 2. Crecimiento radial (cm) de *Sclerotium rolfsii* al sobreponerlo a inóculo de dos morfotipos de actinobacterias en confrontación simultánea, en dos tiempos de evaluación.

Table 2. Radial growth (cm) of *Sclerotium rolfsii* when superimposed on inoculum of two actinobacteria morphotypes in simultaneous confrontation.

Tratamiento	48 hr		96 hr	
	Crecimiento radial (C.V.= 21.15)*	Porcentaje de inhibición	Crecimiento radial (C.V.= 20.32)	Porcentaje de inhibición
Testigo	0.68 (+/- 0.084**) a***	-	2.14 (+/- 0.251) a	-
M-14	0.00 (+/- 0.000) b	100	0.00 (+/- 0.000) b	100
M-18	0.00 (+/- 0.000) b	100	0.00 (+/- 0.000) b	100

* Coeficiente de variación. ** Desviación estándar. ***Promedios en cada tratamiento con misma letra no difieren estadísticamente (Tukey, p≤ 0.05).

* Coefficient of variation. ** Standard deviation. *** Averages in each treatment with the same letter do not differ statistically (Tukey, p≤ 0.05).

colonia de *S. rolfsii* confrontados con los morfotipos M-14 y M-18 y antes de ser retirados a las 4 hr de la confrontación, mostraron un porcentaje de inhibición del 100% de los fragmentos (datos no mostrados). Después de retirados los fragmentos de la confrontación con M-14 y M-18 por 4 hr, el 87.5 y 50.0 % formaron colonias a las 120 h posteriores a ser retirados de la confrontación, respectivamente, mientras que los fragmentos expuestos por 8 hr a ambos morfotipos mostraron 0.0 % de colonias desarrolladas a las 120 hr (Figura 3). El 100 % de los esclerocios del fitopatógeno expuestos por 48 hr con colonias de la actinobacterias fueron incapaces de desarrollar colonia. A las 120 hr

not shown).

In the experiment to determine whether actinobacterial morphotypes have the ability to produce volatile compounds that inhibit the growth of *S. rolfsii*, it was observed that radial growth was inhibited by 42.8 and 45.9% by the M-14 and M-18 strains, respectively. (Table 3).

Discussion

The diversity of actinobacteria determined through the morphotypic characterization carried out, showed that the populations are very diverse in both types of soil analyzed, as shown by the observed diversity indices of 3.76 and 3.46 for cultivated

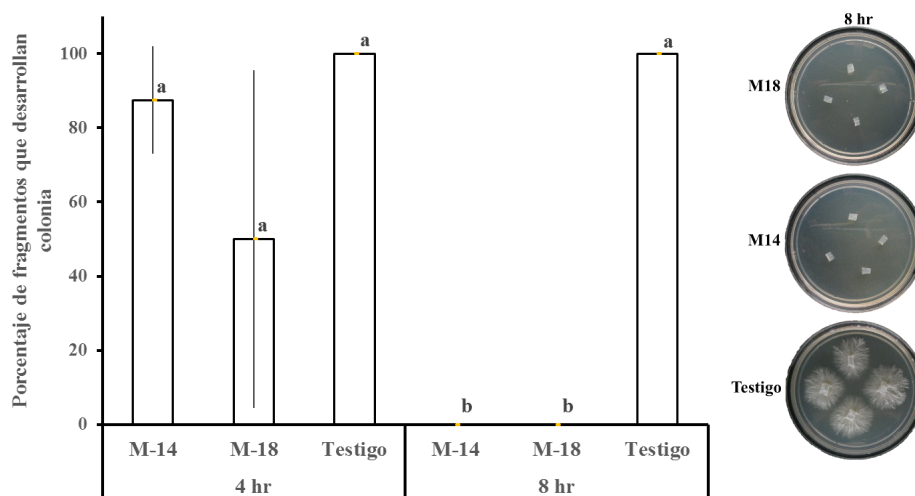


Figura 3. Porcentaje de fragmentos de colonias de *S. rolfsii* que desarrollan colonia a las 120 hr después de retirarse a los tiempos de exposición por 4 y 8 hr de la confrontación con dos morfotipos de actinobacterias. La comparación de medias se realizó entre tratamientos para cada tiempo de exposición. Imágenes a la derecha representan la respuesta del fitopatógeno después de retirarlo a las 8 hr de cada tratamiento. La línea en las barras representa la desviación estándar de las medias.

Figure 3. Percentage of *S. rolfsii* colony fragments that develop colony at 120 hr after its withdrawal at the exposure times for 4 and 8 hr after confrontation with two actinobacterial morphotypes. The comparison of means was made between treatments for each exposure time. Images on the right represent the response of the phytopathogen after removing it at 8 hr after each treatment. The line in the bars represents the standard deviation of the means.

de extraídos los esclerocios de la confrontación con la actinobacteria M-14, y transferidos a cajas sin actinobacterias, sólo un promedio del 10 % desarrolló colonias, mientras que ningún esclerocio expuesto a M-18 desarrollo colonia. En el testigo el 100 % de los esclerocios desarrollaron colonia (datos no mostrados).

En el experimento para determinar si los morfotipos de actinobacterias tienen la capacidad de producir compuestos volátiles inhibitorios del crecimiento de *S. rolfsii*, se observó que el crecimiento radial fue inhibido un 42.8 y 45.9 % por la cepa M-14 y M-18, respectivamente (Cuadro 3).

and non-cultivated soil; considering that index values close to zero represent little diversity. The high diversity in each soil and with only six common morphotypes in both, suggests that native populations of actinobacteria have been displaced from the cultivated soil or that particular populations of actinobacteria have been favored by the established cultivation and soil factors due to the agronomic management of the production system. We do not know of a similar study, but actinobacteria diversity indices in natural soils can vary from low values such as 1.4 to 1.9 and 1.8 to 2.0 (Binayke *et al.*, 2018) to high values

Cuadro 3. Inhibición del crecimiento radial (cm) de *Sclerotium rolfsii* por efecto de compuestos volátiles producidos por morfotipos de actinobacterias en dos tiempos de evaluación.

Table 3. Inhibition of radial growth (cm) of *Sclerotium rolfsii* due to the effect of volatile compounds produced by actinobacterial morphotypes in two evaluation times.

Tratamiento	48 hr		96 hr	
	Crecimiento Radial (C.V.= 23.76)*	Porcentaje de inhibición	Crecimiento Radial (C.V.= 17.38)*	Porcentaje de inhibición
Testigo	0.84 (+/- 0.055*) a**	-	2.66 (+/- 0.114) a	-
M-14	0.46 (+/- 0.181) b	45.2	1.52 (+/- 0.432) b	42.8
M-18	0.38 (+/- 0.130) b	54.7	1.44 (+/- 0.343) b	45.9

* Coeficiente de variación. ** Desviación estándar. ***Promedios en cada tratamiento con misma letra no difieren estadísticamente (Tukey, p≤ 0.05).

* Coefficient of variation. ** Standard deviation. *** Averages in each treatment with the same letter do not differ statistically (Tukey, p≤ 0.05).

Discusión

La diversidad de actinobacterias determinada a través de la caracterización morfológica realizada, mostró que las poblaciones son muy diversas en ambos tipos de suelo analizados, como lo demuestran los índices de diversidad observados de 3.76 y 3.46 para el suelo cultivado y no cultivado; considerando que índices con valores cercanos a cero representan escasa diversidad. La elevada diversidad en cada suelo y con sólo seis morfotipos comunes en ambos, sugiere que poblaciones nativas de actinobacterias han sido desplazadas del suelo cultivado o que poblaciones particulares de actinobacterias han sido favorecidas por el cultivo establecido y factores del suelo debido al manejo agronómico del sistema de producción. Desconocemos de un estudio similar, pero índices de diversidad de actinobacterias en suelos naturales pueden variar desde valores bajos como 1.4 a 1.9 y de 1.8 a 2.0 (Binayke *et al.*, 2018) a valores elevados como 4.0 a 5.1 (Bull *et al.*, 2018), según los sitios analizados. Sin embargo, mayor diversidad de actinobacterias puede ser determinada en suelos mediante análisis genómicos de nueva generación (Mohammadipanah y Wink 2016; Zhao *et al.*, 2012).

El escrutinio realizado permitió

such as 4.0 to 5.1 (Bull *et al.*, 2018), according to the sites analyzed. However, greater diversity of actinobacteria can be determined in soils by next-generation genomic analysis (Mohammadipanah y Wink 2016; Zhao *et al.*, 2012).

The screening carried out allowed the identification of numerous morphotypes with the capacity to inhibit the radial growth of *S. rolfsii*, *M. roreri*, *P. capsici* and *C. musae* by more than 99.2%, which shows a high functional capacity of actinobacteria against these phytopathogens. Of the morphotypes evaluated in the scrutiny, 93% showed the highest range of inhibition against *S. rolfsii*, and two of the outstanding ones (M-14 and M-18) were selected to determine in more detail their effect on this phytopathogen in additional experiments. The results obtained showed great richness of the soils analyzed as a source of actinobacteria with potential activity against *S. rolfsii* in relation to previous investigations. Pattanapitpaisal and Kamlandharn (2012) selected 68 strains with chitinolytic activity from 283 strains of actinobacteria isolated from soil, of which 13 (4.6%) significantly inhibited the mycelial growth of *S. rolfsii*, and of which only five were extremely outstanding. Similarly, Thampi and Bhai(2017) selected only three strains (6%) of 50 isolated from soil with high

identificar numerosos morfotipos con capacidad de inhibir el crecimiento radial de *S. rolfsii*, *M. roreri*, *P. capsici* y *C. musae* en más del 99.2%, lo que demuestra una elevada capacidad funcional de las actinobacterias contra estos fitopatógenos. De los morfotipos evaluados en el escrutinio el 93% mostró el mayor rango de inhibición contra *S. rolfsii*, y dos de los sobresalientes (M-14 y M-18) fueron seleccionados para determinar más detalladamente su efecto sobre este fitopatógeno en experimentos adicionales. Los resultados obtenidos demostraron gran riqueza de los suelos analizados, como fuente de actinobacterias con potencial actividad contra *S. rolfsii* en relación con previas investigaciones. Pattanapitpaisal y Kamlandharn (2012) seleccionaron 68 cepas con actividad quitinolítica a partir de 283 cepas de actinobacterias aisladas de suelo, de las cuales 13 (4.6%) inhibieron de manera importante el crecimiento micelial de *S. rolfsii*, y de las cuales sólo cinco fueron en extremo sobresalientes. De igual manera, Thampi y Bhai (2017) seleccionaron sólo tres cepas (6%) de 50 aisladas de suelo con elevada actividad antagonica contra *S. rolfsii*; mientras que Khamna *et al.* (2009) reportan 2 cepas (0.4%), a partir de 445 actinobacterias aisladas de suelo, con los mayores niveles de inhibición.

En los experimentos de confrontación dual y de actividad fungicida/fungistasis, en los que *S. rolfsii* no estuvo en contacto con las actinobacterias durante las confrontaciones, el porcentaje de inhibición del crecimiento radial fue del 100%. También, en los experimentos de actividad fungicida/fungistasis se demostró que en exposiciones de fragmentos de colonia del fitopatógeno por 4 y 8 hr, ocurre un efecto fungistático y un efecto fungicida respectivamente, además de un fuerte efecto fungicida sobre esclerocios expuestos por 48 h en confrontación con las actinobacterias.

Elevados porcentajes de inhibición del crecimiento micelial a partir de fragmentos de colonias de *S. rolfsii* han sido reportados previamente (Singh y Gaur, 2016; Errakhi *et*

antagonistic activity against *S. rolfsii*; while Khamna *et al.* (2009) report 2 strains (0.4%), from 445 actinobacteria isolated from soil, with the highest levels of inhibition.

In the dual confrontation and fungicity/fungistasis experiments, in which *S. rolfsii* was not in contact with actinobacteria during the confrontations, the percentage of inhibition of radial growth was 100%. Also, in fungicity/fungistasis experiments it was demonstrated that in exposures of colony fragments of the phytopathogen for 4 and 8 hr, a fungistatic effect and a fungicidal effect occur respectively; in addition to a strong fungicidal effect on sclerotia exposed for 48 h in confrontation with actinobacteria. High percentages of inhibition of mycelial growth from fragments of *S. rolfsii* colonies have been previously reported (Singh y Gaur, 2016; Errakhi *et al.*, 2009; Khamna *et al.*, 2009), even regarding the inhibitory effect on germination (Li *et al.*, 2017; Errakhi *et al.*, 2009) and fungicidal action (Jacob *et al.*, 2016) against sclerotia.

In this investigation, the two outstanding strains demonstrated a high inhibitory effect on mycelial growth from *S. rolfsii* colony fragments in the volatile compound experiment. The action of these compounds on the phytopathogen is unknown, however, numerous strains of actinobacteria have been reported as volatile producers (Schöller *et al.*, 2002). An extremely surprising result was the inhibition of the growth of *S. rolfsii* in the experiment of superposition of a colony fragment on the actinobacteria, which could have been due to a rapid production of antibiotic compounds by the actinobacteria; however, an action by other compounds such as siderophores and extracellular enzymes produced by actinobacteria (Thampi and Bhai, 2017; Pattanapitpaisal and Kamlandharn, 2012), and their interaction with volatile compounds, is not ruled out.

Considering that actinobacteria contribute more than 30% of the microbial populations present in soils (Yadav *et al.*,

al., 2009; Khamna *et al.*, 2009), incluso respecto al efecto inhibitorio sobre la germinación (Li *et al.*, 2017; Errakhi *et al.*, 2009) y acción fungicida (Jacob *et al.*, 2016) contra esclerocios.

En esta investigación, las dos cepas sobresalientes demostraron un elevado efecto inhibitorio del crecimiento micelial de *S. rolfsii* en el experimento de compuestos volátiles. Se desconoce la acción de estos compuestos sobre el fitopatógeno, sin embargo, numerosas cepas de actinobacterias han sido reportadas como productoras de volátiles (Schöller *et al.*, 2002). Un resultado en extremo sorprendente fue la inhibición del crecimiento de *S. rolfsii* en el experimento de sobreposición de un fragmento de colonia sobre las actinobacterias, lo cual pudo deberse a una rápida producción de compuestos antibióticos por las actinobacterias; sin embargo, no se descarta una acción por otros compuestos como sideróforos y enzimas extracelulares producidas por las actinobacterias (Thampi y Bhai, 2017; Pattanapitpaisal y Kamlandharn, 2012), y su interacción con compuestos volátiles.

Considerando que las actinobacterias aportan más del 30% de las poblaciones microbianas presentes en suelos (Yadav *et al.*, 2018), fue posible identificar nuevas cepas de actinobacterias en suelos cultivados y no cultivados, con capacidad antagonista sobresaliente con potencial como agentes de biocontrol contra *S. rolfsii*. El elevado porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *M. roreri*, *P. capsici* y *C. musae* por actinobacterias en el escrutinio sin repeticiones, permitirá continuar con más estudios sobre antagonismo contra estos fitopatógenos. El género *Streptomyces* es el más abundante de las actinobacterias en suelos (Yadav *et al.*, 2018), por lo que no descartamos que los morfotipos aquí designados como M-14 y M-18 puedan corresponder a éste; lo cual será posteriormente determinado.

Conclusiones

La diversidad de actinobacterias es

(2018), it was possible to identify new strains of actinobacteria in cultivated and non-cultivated soils, with outstanding antagonistic capacity with potential as biocontrol agents against *S. rolfsii*. The high percentage of inhibition of mycelial growth of *M. roreri*, *P. capsici* and *C. musae* by actinobacteria in the screening without repetitions, will allow to continue with more studies on antagonism against these phytopathogens. The genus *Streptomyces* is the most abundant of the actinobacteria in soils (Yadav *et al.*, 2018), so we do not rule out that the morphotypes here designated as M-14 and M-18 may correspond to it; which will be determined later.

Conclusions

Actinobacteria diversity is high and different between melon-grown soil and nearby non-cultivated native soil. A large percentage of isolated actinobacteria showed strong antagonistic capacity against the phytopathogenic fungus *S. rolfsii*. Strains M-14 and M-18 stood out for inhibiting mycelial growth and the germination of sclerotia by compounds produced in the substrate and by volatile compounds, which is why they are considered potential biocontrol agents of the phytopathogen.

Acknowledgments

INIFAP is thanked for financial support to carry out this research as part of the Project "Taking advantage of microbial

References

elevada y diferente entre el suelo cultivado con melón y el suelo nativo cercano no cultivado. Un gran porcentaje de actinobacterias aisladas mostraron fuerte capacidad antagónica contra el hongo fitopatógeno *S. rolfsii*. Las cepas M-14 y M-18 sobresalieron por inhibir el crecimiento micelial y la germinación de esclerocios mediante compuestos producidos en el sustrato y por compuestos volátiles, por lo que se consideran como potenciales agentes de biocontrol del fitopatógeno.

Agradecimientos

Se agradece al INIFAP el apoyo financiero para la realización de esta investigación como parte del Proyecto “Aprovechamiento de la biodiversidad microbiana contra problemas fitosanitarios de cultivos del área de influencia del CIR-Noreste”; así como a Yesenia Yazmín Salazar Mata por su apoyo técnico durante los experimentos.

Referencias

- Aktar, M.W., Sengupta, D. and Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: Their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology* 2: 1-12.
- Bale, J.S., Van Lenteren, J.C. and Bigler F. (2008). Biological control and sustainable food production. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363: 761-776.
- Billah, K.M.M., Hossain, Md.B., Prince, M.H., and Sumon, Md.M.P. 2017. Pathogenicity of *Sclerotium rolfsii* on different host, and its over wintering survival; A mini review. *International Journal of Advances in Agriculture Sciences* 2: 1-6.
- Binayke, A., Ghorbel, S., Hmidet, N., Raut, A., Gunjal, A., Uzgare, A., Patil, N., Waghmode, M. and Nawani, N. (2018). Analysis of diversity of actinomycetes from arid and saline soils at Rajasthan, India. *Environmental Sustainability* 1: 61-70.
- Bull, A.T., Idris, H., Sanderson, R., Asenjo, J., Andrews, B. and Goodfellow, M. 2018. High altitude, hyper-arid soils of the Central-Andes harbor mega-diverse communities of actinobacteria. *Extremophiles* 22: 47-57.
- Dennis, C. and Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* II. Production of volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 57: 41-48.
- Dwivedi, S.K. and Prasad, G. 2016. Integrated management of *Sclerotium rolfsii*: an overview. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 3(11): 137-146.
- Errakhi, R., Lebrihi, A., and Barakate, M. 2009. In vitro and in vivo antagonism of actinomycetes isolated from Moroccan rhizospheric soils against *Sclerotium rolfsii*: a causal agent of root rot on sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Applied Microbiology* 107: 672-681.
- Farr, D.F., Bills, G.F., Chamuris, G.P., Rossman, A.Y., 1989. *Fungi on Plants and Plant Products in the United States*. American Phytopathological Society, St Paul, MN, pp. 1252.
- Flores-Moctezuma, H. E., Montes-Belmont, R., Jimenez-Perez, A., and Nava-Juarez, R. 2006. Pathogenic diversity of *Sclerotium rolfsii* isolates from Mexico, and potential control of southern blight through solarization and organic amendments. *Crop Protection* 25(3): 195-201.
- Hasani A., A. Kariminik and K. Issazadeh. 2014. Streptomycetes: Characteristics and their antimicrobial activities. *Int. J. Adv. Biol. Biom. Res.* 2:63-75.
- Hernández-Jiménez, J., Montes-Belmont, R., Flores-Moctezuma, H.E., Nava-Juárez, R.A., y Chanona Pérez, J. 2004. Caracterización de aislamientos de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en diferentes medios de cultivo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:345-350.
- Hernández-Morales, J., Ochoa-Martínez, D. L., and Ayala-Escobar, V. 2018. First report of southern blight caused by *Sclerotium rolfsii* on sesame in Mexico. *Journal of Plant Pathology* 100(2): 323-323.
- Jacob, S., Sajjalaguddam, R.R., Kumar, K.V.K., Varshney, R. and Sudini, H.K. 2016. Assessing the prospects of *Streptomyces* sp. RP1A-12 in managing groundnut stem rot disease caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Journal of General Plant Pathology* 82: 96-104.
- Kämpfer P. 2012. Genus I. *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339 emend. Witt and Stackebrandt 1990, 370 emend. Wellington, Stackebrandt, Sanders, Wolstrup and Jorgensen

- 1992, 159. In: Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J *et al* (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology, Part B, vol 5, 2nd edn. Springer, New York, pp:1455-1767.
- Kator, L., Hosea, Z. Y., and Oche, O. D. 2015. *Sclerotium rolfii*: causative organism of southern blight, stem rot, white mold and sclerotia rot disease. *Annals Biol. Res.* 6(11): 78-89.
- Khamna S., Yokota, A. and Lumyong, S. 2009. Actinobacteria isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World J Microbiol Biotechnol.* 25: 649-655.
- Khattabi, N., Ezzahiri, B., Louali, L. and Oihabi, A. 2004. Antagonistic activity of *Trichoderma* isolates against *Sclerotium rolfii*: screening of efficient isolates from Morocco soils for biological control. *Phytopathologia Mediterranea*, 43: 332-340.
- Kumar, N., Dagla, M. C., Ajay, B. C., Jadon, K. S., and Thirumalaisamy, P. P. 2013. *Sclerotium* stem rot: A threat to groundnut production. *Popular Kheti* 1: 26-30.
- Kumar R. and S. Kumar. 2014. Bioprospecting of actinomycetes and its diversity in various environments: a review. *Current Discovery* 3:16-32.
- Li, Y., He, F., Lai, H. and Xue, Q. 2017. Mechanism of in vitro antagonism of phytopathogenic *Sclerotium rolfii* by actinomycetes. *European Journal of Plant Pathology* 149: 299-311.
- Maheswari, M.U., Muthusamy, M. and Alice, D. 2002. Evaluation of antagonists against jasmine wilt caused by *Sclerotium rolfii* Sacc. *Journal of Biological Control* 16: 135-140.
- Mohammadipanah, F. and Wink, J. 2016. Actinobacteria from arid and desert habitats: diversity and biological activity. *Frontiers in Microbiology* 6, 1541.
- Olivares, S.E. 2015. Programa de diseños experimentales FAUANL, versión 1.6. Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Versión transportable. emolivares@gmail.com
- Paredes-Escalante, J.E., Carrillo-Fasio, J.A., García-Estrada, R.S., Allende-Molar, R., Sañudo-Barajas, J.A. y Valdez-Torres, J.B. 2009. Microorganismos antagonistas para el control del complejo de hongos causantes de la rabia del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el Estado de Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 27:27-35.
- Pattanapitpaisal, P. and Kamlandharn, R. 2012. Screening of chitinolytic actinomycetes for biological control of *Sclerotium rolfii* stem rot disease of chilli. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, 34: 387-393.
- Rodríguez-Villarreal, R.A., Peña-Carrillo, K.I., Fernández-Cruz, E., Almeyda-León, I.H., Hernández-Torres, I., Acosta-Díaz, E. y Rodríguez-Guerra, R. 2014. Antagonismo e identificación genética de un actinomiceto con potencial para el biocontrol de *Phytophthora capsici* Leonian (Peronosporales: Pythiaceae). *Vedalia* 15: 5-15.
- Schöller, C.E., Gürtler, H., Pedersen, R., Molin, S. and Wilkins, K. 2002. Volatile metabolites from actinomycetes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 2615-2621.
- Sharma M. 2014. Actinomycetes: Source, identification, and their applications. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 3:801-832.
- Shannon, C.E. 1948. A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal*, 27, 379-423.
- Singh, S.P. and Gaur, R. 2016. Evaluation of antagonistic and plant growth promoting activities of chitinolytic endophytic actinomycetes associated with medicinal plants against *Sclerotium rolfii* in chickpea. *Journal of Applied Microbiology* 121: 506-518.
- Thampi, A. and Bhai, R.S. 2017. Rhizosphere actinobacteria for combating *Phytophthora capsici* and *Sclerotium rolfii*, the major soil borne pathogens of black pepper (*Piper nigrum* L.). *Biological Control* 109: 1-13.
- Yadav, A.N., Verma, P., Kumar, S., Kumar, V., Kumar, M., Sugitha, T.C.K., Sing, B.P., Saxen A.K. and Dhaliwal, H.S. 2018. Actinobacteria from rhizosphere: molecular diversity, distributions, and potential biotechnological applications. In: Singh, B. P., Gupta, V. K., & Passari, A. K. (Eds.). *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. Actinobacteria: Diversity and Biotechnological Applications.* (pp. 13-41). Elsevier. Cambridge, USA.
- Zhao, K., Penttinen, P., Chen, Q., Guan, T., Lindström, K., Ao, X., Zhang, L. and Zhang, X. 2012. The rhizospheres of traditional medicinal plants in Panxi, China, host a diverse selection of

actinobacteria with antimicrobial
properties. Applied Microbiology and
Biotechnology 94: 1321-1335.