

Evaluación de actinomicetos contra hongos fitopatógenos y análisis de sus relaciones filogenéticas

Evaluation of actinomycetes against phytopathogenic fungi and analysis of their phylogenetic relationships

Raúl Rodríguez-Guerra¹, Anahí González-Acevedo², Kenzy Ivveth Peña-Carrillo¹, Isidro Humberto Almeyda-León¹, Carlos Eduardo Hernández-Luna², Sergio Manuel Salcedo-Martínez².

¹Campo Experimental General Terán, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Km. 31 Carr. Montemorelos-China, CP 67400, General Terán, Nuevo León, México.

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

Resumen

Cepas de actinomicetos aisladas de suelos no cultivados del estado de Nuevo León han mostrado fuerte actividad antagonica contra fitopatógenos de la raíz, especies de *Colletotrichum* y hongos asociados a la fumagina de cítricos. En esta investigación se evaluó el antagonismo de 15 cepas por su capacidad para inhibir el desarrollo de colonias de *Penicillium* sp., *Moniliophthora roreri* y *Fusarium oxysporum* a partir de suspensiones de conidios, y la relación filogenética entre 12 de estas cepas. Los actinomicetos se inocularon en papa dextrosa agar (PDA) con 13 días de anticipación a la inoculación de la suspensión con conidios de los fitopatógenos en cuatro puntos de cada caja. Los testigos consistieron en inocular los fitopatógenos en PDA. La relación genética entre los actinomicetos se realizó mediante el análisis de la secuencia del gen 16S. Seis actinomicetos inhibieron completamente la germinación de conidios de los tres fitopatógenos, mientras que tres cepas fueron incapaces de hacerlo. Las otras cepas mostraron inhibición limitada a algunos fitopatógenos. Las secuencias del gen 16S mostraron que todas las cepas corresponden al género *Streptomyces* y que son diferentes entre sí, excepto las cepas con clave Rayones-4 y Rayones-21 que fueron idénticas entre ellas.

Palabras clave: Antagonismo, *Penicillium* sp., *Moniliophthora roreri*; *Fusarium oxysporum*.

Abstract

Actinomycete strains isolated from uncultivated soils in the state of Nuevo Leon have shown strong antagonistic activity against root phytopathogens, *Colletotrichum* species, and fungi associated with citrus fumagina. In our research, the antagonism of 15 strains was evaluated for their ability to inhibit the development of colonies of *Penicillium* sp., *Moniliophthora roreri* and *Fusarium oxysporum* from conidia suspensions, as well as the phylogenetic relationship between 12 of these strains. The actinomycetes were inoculated in potato dextrose agar (PDA) with 13 days before the inoculation of the suspension with conidia of the phytopathogens in four points of each box. The controls consisted of inoculating the phytopathogens in PDA. The genetic relationship between actinomycetes was carried out by analyzing the sequence of the 16S gene. Six actinomycetes inhibited the germination of conidia of the three phytopathogens completely, while three strains were unable to do so. The remaining strains showed limited inhibition of some phytopathogens. The 16S gene sequences showed that all strains correspond to the genus *Streptomyces* and that they are different from each other, except for Rayones-4 and Rayones-21 strains that were identical between them. The identity of the strains at the species level will be determined later.

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

Introducción

Los actinomicetos son un grupo de bacterias Gram positivas, entre las que se encuentra el género *Streptomyces* que cuenta con más de 500 especies (Kämpfer, 2012), de las cuales se ha reportado que producen más de 7,000 compuestos químicos con actividad antibiótica en diferentes áreas de aplicación (Hasani *et al.*, 2014; Kumar y Kumar, 2014; Sharma, 2014). Lo anterior demuestra el potencial de este grupo de bacterias como una fuente importante de especies con actividad biológica contra fitopatógenos. Previamente se evaluó la capacidad antagonista de catorce cepas de actinomicetos aisladas de cinco municipios del estado de Nuevo León (González-Acevedo *et al.*, 2014), de las cuales, cinco mostraron actividad sobresaliente contra patógenos de raíz, especies de *Colletotrichum* y hongos asociados a la fumagina en cítricos, y otras nueve cepas también mostraron actividad antagonista importante contra algunos de estos organismos (González-Acevedo *et al.*, 2014). Adicionalmente, se ha reportado la acción fungicida de la cepa CP-5 de *Streptomyces*, aislada del municipio de Galeana, Nuevo León, contra *Phytophthora capsici* (Rodríguez-Villarreal *et al.*, 2014). La relación genética entre estas cepas y entre especies de actinomicetos es desconocida. Las más de 650 especies de la familia *Streptomycetaceae* se agrupan en más de 130 clados con base en el análisis del gen 16S (Labeda *et al.*, 2012). Nosotros inferimos que las 14 cepas antagonistas difieren entre sí y con la cepa CP-5 de *Streptomyces*, debido a que previamente fueron consideradas morfológicamente distintas, lo que abre la posibilidad de contar con una potencial diversidad de especies como acervo para el control de un amplio espectro de fitopatógenos. El propósito de esta investigación fue establecer si las catorce cepas sobresalientes, y la cepa CP-5, son capaces de inhibir la germinación de

Keywords: Antagonism, *Penicillium* sp., *Moniliophthora roreri*; *Fusarium oxysporum*.

Corresponding author:
rodriguez.raul@inifap.gob.mx;

Introduction

As a member of the phylum Actinomycetes, a heterogeneous group of gram-positive bacteria, the *Streptomyces* genus includes more than 500 species (Kämpfer, 2012) with reported production of more than 7,000 chemical compounds with antibiotic activity for application in different areas (Hasani *et al.*, 2014; Kumar and Kumar, 2014; Sharma, 2014). The above shows the potential of this group of bacteria as a source of species with biological activity against phytopathogens. In previous publications, we evaluated the antagonistic capacity of fourteen strains of actinomycetes isolated from five municipalities of the state of Nuevo León (González-Acevedo *et al.*, 2014), with five strains showing outstanding antibiotic activity against root pathogens, *Colletotrichum* species, and citrus fumagina-associated fungi; in addition to another nine displaying significant antagonistic activity against some members of the same groups of organisms (González-Acevedo *et al.*, 2014). Additionally, we reported the fungicidal activity of *Streptomyces* strain CP-5, isolated from the municipality of Galeana, Nuevo León, against *Phytophthora capsici* (Rodríguez-Villarreal *et al.*, 2014). The genetic relationship between these strains and between species of actinomycetes is unknown. With more than 650 species, members of the *Streptomycetaceae* family are grouped into more than 130 clades according to 16S gene analysis (Labeda *et al.*, 2012). We conclude that the 14 antagonistic strains differ from each other and from the *Streptomyces* strain CP-5 giving that they were wrongly considered morphologically distinct, creating the opportunity to obtain a diverse species collection for the control of a broad spectrum of phytopathogens. The purpose of this research is to establish if the fourteen outstanding strains

conidios de *Penicillium sp.*, *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) Evans, Stalpers, Samson & Benny (Agaricales: Marasmiaceae) y *Fusarium oxysporum* Schlechtendal (Hipocreales: Nectriaceae), causantes de pudrición de frutos en cítricos, la moniliasis de cacao, y pudrición de raíz de numerosas plantas, respectivamente. Adicionalmente se evaluó la relación filogenética entre 12 de estas cepas, y su identidad al nivel de género.

Materiales y Métodos

Cepas de actinomicetos. Las cepas utilizadas en esta investigación fueron aisladas de suelo no cultivado de los municipios de Rayones, Galeana, Aramberri, Doctor Arroyo y Bustamante del estado de Nuevo León (González -Acevedo *et al.*, 2014; Rodríguez -Villarreal *et al.*, 2014).

Antagonismo contra fitopatógenos. Quince cepas de actinomicetos se inocularon previamente en el medio PDA por 25 días y a partir de estas colonias se inocularon por extensión nuevas cajas con el mismo medio. En estas últimas se inoculó a los 13 días una suspensión de 106 conidios de los fitopatógenos en cuatro puntos de las cajas. Los testigos consistieron en la inoculación de los fitopatógenos en cajas Petri con PDA libre de actinomicetos. A los tres (*Penicillium sp.* y *F. oxysporum*) o siete (*M. roreri*) días se determinó el desarrollo de colonias de los fitopatógenos considerando tres tipos de reacción (+), inhibición de la germinación de conidios; (+/-), existe germinación de conidios y el crecimiento micelial se inhibe en dirección del actinomiceto; (-), germinación y crecimiento micelial.

Análisis filogenético. Doce de las 15 cepas fueron crecidas durante 15 o 25 días en medio PDA. Se colectaron esporas de la superficie de las colonias y la extracción de ADN se realizó con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, se precipitó con isopropanol y se resuspendió en buffer TE 1X. Se amplificó parcialmente el gen 16S usando los iniciadores F1/R5 diseñados por Cook y Meyers (2003) de

and strain CP-5 are capable to inhibit the germination of conidia of *Penicillium sp.*, *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) Evans, Stalpers, Samson & Benny (Agaricales: Marasmiaceae) and *Fusarium oxysporum* Schlechtendal (Hipocreales: Nectriaceae), responsible for fruit rot in citrus, cocoa moniliasis, and root rot of numerous plants, respectively. Additionally, the phylogenetic relationship between 12 of these strains, and their identity at the genus level was evaluated.

Materials and methods

Actinomycete strains. The strains used in this research were isolated from uncultivated soil from municipalities of Rayones, Galeana, Aramberri, Doctor Arroyo and Bustamante in the state of Nuevo León (González -Acevedo *et al.*, 2014; Rodríguez-Villarreal *et al.*, 2014).

Antagonism against phytopathogens. After an initial inoculation of the fifteen strains of actinomycetes in the PDA medium for 25 days, obtained colonies were used to inoculate Petri dishes by extension with the same medium. After 13 days, a suspension containing 106 of the phytopathogens conidia were inoculated in four points of the solid cultures. Controls consisted of cultures inoculated with phytopathogens in PDA media free of actinomycetes. After three days for *Penicillium sp.* and *F. oxysporum* and seven days for *M. roreri*, growth of phytopathogen colonies were classified into three different categories according to their interactions: inhibition of conidial germination (+), conidia germination and mycelial growth inhibited in the direction of actinomycete (+/-), germination and mycelial growth (-).

Phylogenetic Analysis. Twelve of the fifteen strains were grown for 15 or 25 days in PDA medium. Surface spores from colonies were collected and used for DNA extraction with phenol-chloroform-isoamyl alcohol followed by isopropanol precipitation and resuspension in 1X TE buffer. The 16S gene was partially amplified using the F1/R5 primers designed by Cook and Meyers (2003) according to the

acuerdo a las condiciones propuestas por los autores. Los productos de PCR se purificaron con el kit QIAquick (Qiagen, Valencia, CA, E. U.A.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y se secuenciaron en ambos sentidos en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT). El análisis de secuencias se realizó con el programa MEGA 7.0 (Kumar et al. 2016). Con las secuencias consenso se realizó un análisis BLAST en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) con la finalidad de establecer su relación con géneros de actinomicetos. El análisis filogenético se realizó con el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo de Tamura-Nei. Se utilizó la secuencia de *Kitasatospora kazuensis* como grupo externo.

Resultados y discusión

Antagonismo contra fitopatógenos. Tres tipos de reacción fueron observados entre las confrontaciones (Figura 1). Las quince cepas de actinomicetos causaron diversas reacciones de antagonismo contra *Penicillium* sp., *M. roleri* y *F. oxysporum*, y seis grupos de respuesta fueron observados (Tabla 1).

Los grupos fueron definidos por la reacción de cada actinomiceto contra los fitopatógenos. El grupo de respuesta uno consistió de seis cepas que inhibieron la germinación de conidios de los tres patógenos. El grupo dos consistió de cuatro cepas que inhibieron la germinación en *Penicillium* sp. y *M. roleri*, e inhibieron el crecimiento micelial de *F. oxysporum* en dirección de los actinomicetos. El grupo tres consistió de la cepa CP-5 que inhibió la germinación en *Penicillium* sp. y *F. oxysporum*. El cuarto grupo está constituido por una cepa que inhibió la germinación de conidios de *M. roleri*. Los grupos cinco (dos cepas) y seis (una cepa) fueron incapaces de inhibir la germinación de conidios de los tres fitopatógenos.

conditions proposed by the authors. The PCR products were purified with the QIAquick kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions, and sequenced both ways in the National Laboratory of Agricultural, Medical and Environmental Biotechnology (LANBAMA) of the Potosino Institute of Scientific and Technological Research (IPICYT). Sequence analysis was performed with the MEGA 7.0 program (Kumar et al. 2016). A consensus sequence was used for BLAST analysis against the database of the National Center for Biotechnological Information (NCBI) in order to establish its relationship with actinomycete genera. The phylogenetic analysis was performed using the Maximum Likelihood method based on the Tamura-Nei model. The sequence of *Kitasatospora kazuensis* was used as an external group.

Results and discussion

Antagonism against phytopathogens. Three categories were observed in the conditions tested (Figure 1). The fifteen strains of actinomycetes caused various antagonism reactions against *Penicillium* sp., *M. roleri* and *F. oxysporum*, and six response groups were observed (Table 1).

Groups were defined by kind of interaction between each actinomycete against the phytopathogens. Response group one consisted of six strains that inhibited the germination of conidia from the three phytopathogens. Group two consisted of four strains that inhibited the germination of conidia of *Penicillium* sp. and *M. roleri* and inhibited the mycelial growth of *F. oxysporum* in the direction of actinomycetes. Group three consisted of strain CP-5 that inhibited the germination of conidia of *Penicillium* sp. and *F. oxysporum*. The fourth group consists of a strain that inhibited the germination of conidia of *M. roleri*. Groups five (two strains) and six (one strain) were unable to inhibit the germination of conidia of the three phytopathogens

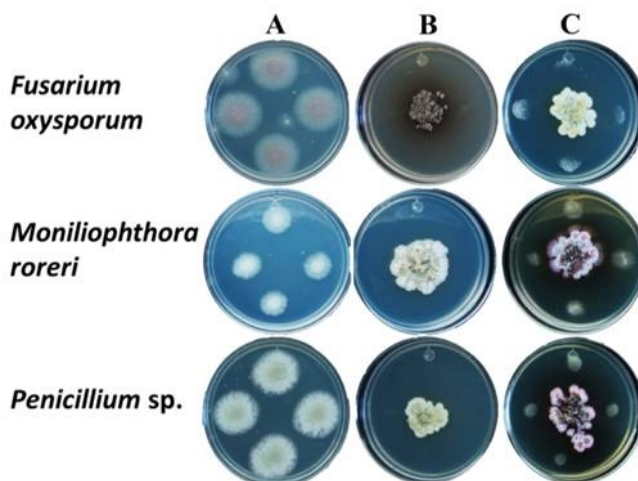


Figura 1. Tipos de reacción al confrontar tres fitopatógenos contra cepas de actinomicetos. Las cajas de la columna A corresponde a los testigos (fitopatógenos sin actinomiceto). La columna B corresponde a la reacción "+", sin germinación de conidios ni crecimiento micelial de los fitopatógenos. La columna C corresponde a la reacción "+/-" de germinación de conidios y crecimiento micelial inhibido de los fitopatógenos en dirección del actinomiceto (caja superior) y a la reacción "-" de germinación y crecimiento micelial (caja media e inferior). Imágenes al tercer día para *F. oxysporum* y *Penicillium* sp., y a los siete días para *M. roreri*.

Figure 1. Interaction categories after confronting three phytopathogens against actinomycete strains. Petri dishes in column A correspond to the controls (phytopathogens without actinomycete). Column B corresponds to the "+" reaction, without conidial germination or mycelial growth of phytopathogens. Column C corresponds to the "+/-" reaction of conidia germination and inhibited mycelial growth of the phytopathogens in the direction of the actinomycete (upper box) and the "-" reaction of germination and mycelial growth (middle box and lower). Images on the third day for *F. oxysporum* and *Penicillium* sp., and at seven days for *M. roreri*.

Tabla 1. Grupos de respuesta de cepas de actinomicetos por su reacción antagonista contra tres fitopatógenos.
Table 1. Response groups of actinomycete strains due to their antagonistic reaction against three phytopathogens.

Grupos de respuesta	Cepa	Fitopatógeno		
		<i>Penicillium</i> sp.	<i>Moniliophthora roreri</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
1	Bustamante-5	+	+	+
1	Bustamante-7	+	+	+
1	Dr. Arroyo -1	+	+	+
1	Rayones-8	+	+	+
1	Rayones-15	+	+	+
1	Rayones-28	+	+	+
2	Rayones-4	+	+	+/-
2	Bustamante-14	+	+	+/-
2	Bustamante-17	+	+	+/-
2	Rayones-21	+	+	+/-
3	CP-5	+	NE	+
4	Bustamante-1	+/-	+	-
5	Rayones-11	+/-	-	-
5	Rayones-14	+/-	-	-
6	Arramberri-5	-*	-	-

* Tipos de reacción: +, inhibición de la germinación con ausencia de crecimiento; +/-, existe germinación de conidios y el crecimiento micelial se inhibe; -, germinación de conidios y crecimiento micelial; ND, no evaluado.

* Types of reaction: +, germination inhibition with no growth; +/-, there is conidial germination and mycelial growth is inhibited; -, germination and mycelial growth; NE, no evaluated.

Análisis genético. La secuencia de las cepas varió de 1356 a 1364 nucleótidos. El análisis filogenético mostró que las 12 cepas analizadas son diferentes entre sí, con excepción de las secuencias de las cepas Rayones-4 y Rayones-21 (Figura 2). La cepa Bustamante-1 es la más contrastante entre las analizadas. El análisis BLAST mostró que todas las cepas están relacionadas con especies del género *Streptomyces*.

Genetic analysis. The sequence of the strains varied from 1356 to 1364 nucleotides. Phylogenetic analysis showed that the 12 strains analyzed are different from each other, with the exception of the Rayones-4 and Rayones-21 sequences (Figure 2). The Bustamante-1 strain is the most contrast among the strains analyzed. The BLAST analysis showed that all strains are related to species of the genus *Streptomyces*.

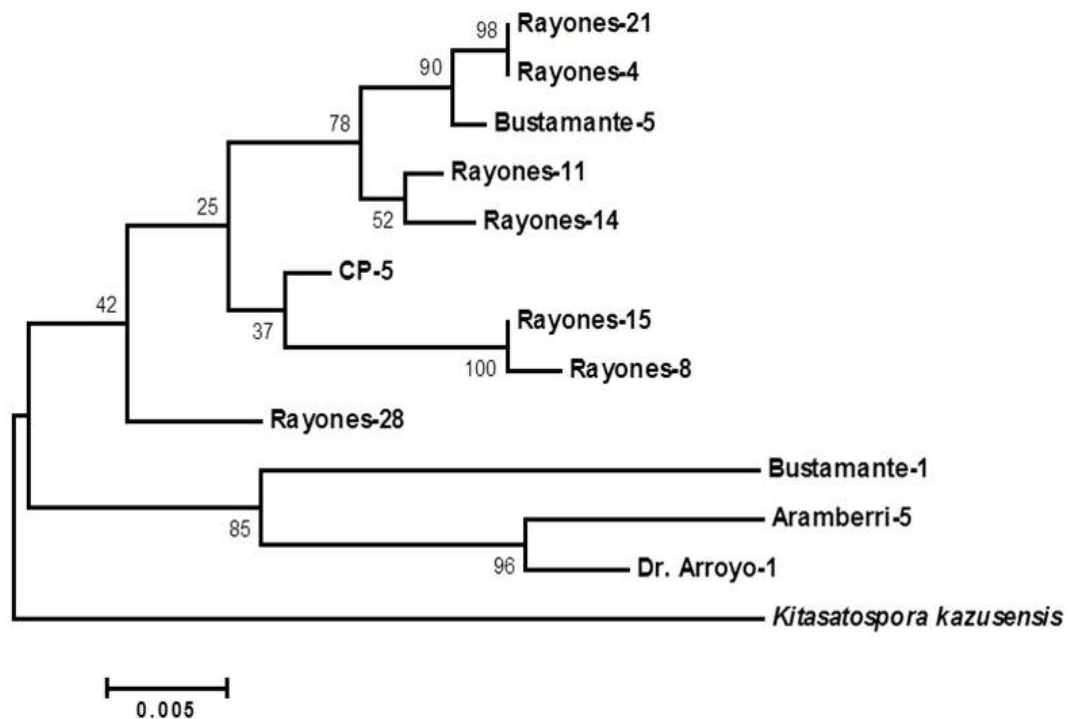


Figura 2. Árbol filogenético generado con el método Máxima Verosimilitud basado en el modelo de Tamura-Nei, con secuencias del gen 16S de doce cepas de actinomicetos. Los porcentajes del análisis de Bootstrap que respaldan la ramificación del árbol se muestran en sus respectivos nodos. La escala representa la cantidad de sustituciones por cada 100 nucleótidos.

Figure 2. Phylogenetic tree generated with the Maximum Likelihood method based on the Tamura-Nei model, with sequences from the 16S gene of twelve strains of actinomycetes. The percentages of the Bootstrap analysis that support the branching of the tree are shown in their respective nodes. The scale represents the number of substitutions per 100 nucleotides.

En esta investigación fue posible identificar seis cepas que inhibieron la germinación de conidios de *Penicillium sp.*, *M. roreri* y *F. oxysporum*. De estas cepas, Rayones-4, Rayones-8, Rayones-15, Rayones-28 y Bustamante-7 tienen acción fungicida contra 2 a 4 especies de *Colletotrichum* (González-Acevedo *et al.*, 2014). Se ha reportado que la

This research identified six strains capable to inhibit conidia germination of *Penicillium sp.*, *M. roreri* and *F. oxysporum*. Of these strains, Rayones -4, Rayones -8, Rayones -15, Rayones -28 and Bustamante -7, showing at the same time fungicidal action against 2 to 4 species of *Colletotrichum* (González-Acevedo *et al.*, 2014). Furthermore,

cepa CP-5 tiene acción fungicida contra *Phytophthora capsici* Leonian (Peronosporales: Pythiaceae) y fungistática contra *Rhizoctonia solani* Kühn (Cantharellales: Ceratobasidiaceae) y *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanichen (Botryosphaeriales: Botryosphaeriaceae) (Rodríguez-Villarreal *et al.*, 2014), y en este trabajo se demostró que inhibe completamente la germinación de conidios de *Penicillium sp.* y *F. oxysporum*. En esta investigación fue posible determinar un mayor espectro de acción de actinomicetos contra fitopatógenos. Además, cepas de actinomicetos que previamente no han sido consideradas sobresalientes (González-Acevedo *et al.*, 2014) pueden ser valiosas como antagonistas contra los tres fitopatógenos evaluados en este estudio, como Bustamante-5 y Dr. Arroyo-1. Es necesario determinar la acción fungicida o fungistática de las cepas que inhibieron la germinación de conidios de *Penicillium sp.*, *F. oxysporum* y *M. royeri*.

Conclusiones

Se identificaron seis cepas que inhiben la germinación de conidios de *Penicillium sp.*, *M. royeri* y *F. oxysporum*. La cepa CP-5 inhibe la germinación de conidios de *Penicillium sp.* y *F. oxysporum*. Las cepas Bustamante -5 y Dr. Arroyo -1 pueden ser valiosas como antagonistas contra los tres fitopatógenos aquí evaluados, y es necesario analizar la acción fungicida o fungistática de las cepas que inhibieron la germinación de conidios de *Penicillium sp.*, *F. oxysporum* y *M. royeri*.

Las doce cepas analizadas filogenéticamente demostraron ser distintas entre ellas, con excepción de Rayones-4 y Rayones-21. Estas dos cepas se consideraron morfológicamente distintas (González-Acevedo *et al.*, 2014), lo que indica que entre cepas con secuencia 16S similar es posible que ocurran morfoespecies diferentes. Con base al árbol filogenético, es sugestivo que las cepas de *Streptomyces* puedan pertenecer a once especies de este género. Previamente se registró

this project shown that CP-5 strain inhibits the germination of conidia of *Penicillium sp.* and *F. oxysporum* completely, in addition to the previously reported fungicidal action against *Phytophthora capsici* Leonian (Peronosporales : Pythiaceae) and fungistatic against *Rhizoctonia solani* Kühn (Cantharellales : Ceratobasidiaceae) and *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanichen (Botryosphaeriales : Botryosphaeriaceae) (Rodríguez -Villarreal *et al.*, 2014), Moreover , our group determined a greater spectrum of action of actinomycetes against phytopathogens . In addition, strains of actinomycetes that have not previously been considered outstanding (González -Acevedo *et al.*, 2014) may be valuable as antagonists against the three phytopathogens evaluated in this study, such as Bustamante -5 and Dr. Arroyo -1. It is necessary to determine the fungicidal or fungistatic action of the strains that inhibited the germination of conidia of *Penicillium sp.*, *F. oxysporum* and *M. royeri*.

Conclusions

Six strains that inhibit the germination of conidia of *Penicillium sp.*, *M. royeri* and *F. oxysporum* were identified. The CP-5 strain inhibits the germination of conidia of *Penicillium sp.* and *F. oxysporum*. The Bustamante-5 and Dr. Arroyo-1 strains can be valuable as antagonists against the three phytopathogens evaluated in this study, and it is necessary to analyze the fungicidal or fungistatic action of the strains that inhibited the germination of conidia of *Penicillium sp.*, *F. oxysporum* and *M. royeri*.

The twelve strains analyzed phylogenetically proved to be different from each other, with the exception of Rayones-4 and Rayones-21. These two strains were considered morphologically distinct (González-Acevedo *et al.*, 2014), which indicates that different morphospecies may occur between strains with a similar 16S sequence. Based on the phylogenetic tree, it is suggestive that *Streptomyces* strains can belong to eleven species of this genus. Previously, the partial

en el NCBI la secuencia parcial del gen 16S de la cepa CP-5 (Rodríguez-Villarreal et al., 2014), y en esta investigación se obtuvo nuevamente una secuencia del mismo gen de esta cepa que mostró 100 % de cobertura e identidad con la secuencia depositada. Lo anterior nos da certidumbre de la pureza de la cepa después de haber sido manipulada durante dos años en diferentes experimentos. La identidad de CP-5 como de las otras 11 cepas de actinomicetos será establecida posteriormente.

En esta investigación se determinó que cepas previamente reportadas con acción fungicida o fungistática contra algunos fitopatógenos corresponden al género *Streptomyces*, poseen un mayor espectro de acción contra otras especies de fitopatógeno, y se reportan nuevas cepas capaces de inhibir la germinación de conidios de *Penicillium* sp., *F. oxysporum* y *M. roleri*.

Agradecimientos

Se agradece el financiamiento otorgado por el INIFAP (Proyecto: 10551533905) y la Fundación Produce Nuevo León (Ejercicio 2013-2014), para la realización de esta investigación.

Referencias

- Cook, A.E., 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.
- González-Acevedo, A., R. Rodríguez-Guerra, I.H. Almeyda-León, K.I. Peña-Carrillo, I. Hernández-Torres, J.F. Pinales-Quiroz, C.E. Hernández-Luna, S.M. Salcedo-Martínez. 2014. Selección de actinomicetos con potencial de biocontrol contra Fitopatógenos. XXXVII Congreso Nacional de Control Biológico, Mérida, Yucatán, México. pp: 259-264.

sequence of the 16S gene of strain CP-5 (Rodríguez-Villarreal et al., 2014) was recorded in the NCBI, and in the present research a sequence of the same gene from this strain was obtained again that showed 100% coverage and identity with the deposited sequence. This gives us the certainty of the purity of the strain after having been manipulated for two years in different experiments. The identity of CP-5 as of the other 11 strains of actinomycetes will be established later.

In this investigation it was determined that previously reported strains with fungicidal or fungistatic action against some phytopathogens correspond to the genus *Streptomyces*, have a greater spectrum of action against other species of phytopathogen, and new strains capable of inhibiting the germination of conidia of *Penicillium* sp., *F. oxysporum* and *M. roleri* are reported.

Acknowledgments

The financing granted by INIFAP (Project: 10551533905) and the Foundation Produce Nuevo León (2013-2014 exercise) for the realization of this research are appreciated.

References

- Hasani A., A. Kariminik, K. Issazadeh. 2014. *Streptomyces*: Characteristics and their antimicrobial activities. *Int. J. Adv. Biol. Biom. Res.* 2:63-75.
- 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.

Kumar R. and S. Kumar. 2014. Bioprospecting of actinomycetes and its diversity in various environments: a review. *Current Discovery* 3:16-32.

Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *MolBiolEvol* 33:1870-1874.

Labeda, D. P., Goodfellow, M., Brown, R., Ward, A. C., Lanoot, B., Vannanneyt, M., Swings, J., Kim, S. B., Liu, Z., Chun, J., Tamura, T., Oguchi, A., Kikuchi, T., Kikuchi, H., Nishii, T., Tsuji, K., Yamaguchi, Y., Tase, A., Takahashi, M., Sakane, T., Suzuki, K.I., Hatano, K. 2012. Phylogenetic study of the species within the family Streptomycetaceae. *Antonie van Leeuwenhoek* 101, 73-104.

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.

Sharma M. 2014. Actinomycetes: Source, identification, and their applications. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 3:801-832.