

Biological control of *Fusarium oxysporum* causal agent of gladiolus corm rot by streptomycetes

Control biológico de *Fusarium oxysporum*, agente causal de la pudrición del cormo en gladiolo, mediante estreptomicetos

Tania Ameyally Rios-Hernández, Alberto Uc-Varguez*, Zahaed Evangelista-Martínez, Centro de investigación y asistencia en tecnología y diseño del estado de Jalisco, A.C. Subsede sureste. Tablaje catastral 31264 km 5.5. carretera Sierra Papacal-Chuburná Puerto. Parque Científico y Tecnológico de Yucatán. C.P. 97302. Mérida, Yucatán, México. *Autor de correspondencia: auc@ciatej.mx

Recibido: 31 de Mayo, 2021.

Aceptado: 03 de Agosto, 2021.

Rios-Hernández TA, Uc-Varguez A and Evangelista-Martínez Z. 2021. Biological control of *Fusarium oxysporum* causal agent of gladiolus corm rot by streptomycetes. Mexican Journal of Phytopathology 39(3).

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2105-3>

Primera publicación DOI: 19 de Agosto, 2021.

First DOI publication: August 19, 2021.

Resumen. *Fusarium oxysporum* causa la pudrición del cormo en gladiolo provocando pérdidas de hasta el 100%. Se seleccionaron aislados de *Fusarium* a partir de cormos infectados, se identificó morfológica y molecularmente y se seleccionó un aislado a partir de prueba de patogenicidad. Se seleccionó entre 22 aislados de estreptomicetos una cepa que presentó una actividad antagonista del 40% contra *Fusarium*. Se obtuvo el Extracto Bioactivo (EB) mediante Fermentación en Fase Sólida

Abstract. *Fusarium oxysporum* causes gladiolus corm rot and production damage could reach up to 100%. *Fusarium* isolates were selected from infected corms, one of them was morphologically and molecularly identified, and was selected from pathogenicity testing. One strain from 22 streptomycetes isolates that showed a 40% antagonist activity against *Fusarium* was selected. Bioactive extract (BE) was obtained by Solid Phase Fermentation and the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum lethal concentration (MLC) were determined by the microdilution method. A MIC of 0.19 mg mL⁻¹ and an MLC of 0.38 mg mL⁻¹ were obtained, which was confirmed with a conidia germination test at 8 h, which showed inhibition percentage of 17 and 98% for ¼ and ½ of the MIC. The effect of BE was evaluated at 1 and 2 MIC's concentration against corm rot in infected gladiolus corm, obtaining a protective effect of gladiolus corms and maintaining their hardness after 15 days, in comparison with

y se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima letal (MLC) por el método de microdilución. Se obtuvo una MIC para el EB de 0.19 mg mL⁻¹ y una MLC de 0.38 mg mL⁻¹, que se confirmó con un ensayo de germinación de microconidios a 8 h, mostrando un porcentaje de inhibición del 17 y 98% para ¼ y ½ de la MIC. Se evaluó el efecto del EB a 1 y 2 MIC's de concentración contra la pudrición en cormos de gladiolo infectados, obteniendo un efecto protector en los cormos al mantener su dureza después de 15 días, en comparación con el fungicida Carbendazim. Los resultados indican a *Streptomyces* sp., como un potencial agente de control biológico contra *F. oxysporum*.

Palabras clave: *Gladiolus grandiflorus*, Actinobacterias, actividad antifúngica, cormos, efecto protector.

En México, el cultivo de gladiolo (*Gladiolus grandiflorus*) es considerado el tercer cultivo ornamental por su importancia económica, con un valor de producción de 1,136 360.17 miles de pesos durante el 2020 (SIAP, 2020). Sin embargo, diversos factores pueden disminuir el volumen y calidad de la producción del gladiolo, entre los que sobresalen problemas fitosanitarios ocasionados por hongos, bacterias y virus (Elmer y Kamo, 2018).

La pudrición del cormo, inducida por *Fusarium oxysporum* f sp. *gladioli*, es una de las enfermedades más importantes del gladiolo, al provocar la marchitez y amarillamiento de hojas y una pudrición seca en la base del cormo que afecta la calidad de la vara floral (Khan *et al.*, 2017). La pudrición del cormo se observa como un cambio en la coloración que va, de marrón claro a marrón oscuro a negro y finaliza con la momificación del cormo. Cuando la infección ocurre en los cormos almacenados en

the fungicide Carbendazim. These results indicate *Streptomyces* sp., as a potential biological control agent against *F. oxysporum*.

Key words: *Gladiolus grandiflorus*, Actinobacterias, fungal activity, corms, protective effect.

In Mexico, the gladiolus crop (*Gladiolus grandiflorus*) is considered the third most economically important ornamental crop, with a production value of over 1.1 billion pesos in 2020 (SIAP, 2020). However, several factors may reduce the volume and quality of the gladiolus production, including phytosanitary problems caused by fungi, bacteria and viruses (Elmer and Kamo, 2018).

Corm rot, induced by *Fusarium oxysporum* f sp. *gladioli*, is one of the most important disease in the gladiolus, since it causes the wilting and yellowing of leaves and a dry rot in the base of the corm that affects the quality of the floral rod (Khan *et al.*, 2017). The appearance of the corm rot is a change in coloring which goes from light maroon to dark maroon to black and ends with the mummification of the corm. When the infection takes place in refrigerated corms, it causes a severe infection which may lead to the death of the plant and/or economic losses of 60 to 100% of the production (Khan *et al.*, 2017; Elmer y Kamo, 2018).

Fusarium oxysporum is a cosmopolitan fungus that can survive for years in the soil without the presence of the host. On the other hand, the use of fungicides based on benzimidazoles and azoles is the commonly used control method. Considering that the persistence of the pathogen increases the use of agrochemicals for the phytosanitary control of the crops, another series of problems arises, such as the selection of strains of the pathogen that resist these products, the increase in production costs, and

refrigeración, ocasiona una infección severa que puede llevar a la muerte de la planta y/o pérdidas económicas del 60 al 100% de la producción (Khan *et al.*, 2017; Elmer y Kamo, 2018).

Fusarium oxysporum es un hongo cosmopolita que puede sobrevivir por años en el suelo sin la presencia del hospedante. Por otra parte, el uso de fungicidas a base de bencimidazoles y azoles es el método de control utilizado generalmente. Considerando que la persistencia del patógeno incrementa la aplicación de agroquímicos para el control fitosanitario de los cultivos, se genera otra serie de problemas como: la selección de cepas del patógeno resistente a estos productos, el incremento de costos de producción, además los riesgos de daño al ambiente y la salud humana, los cuales son cada vez mayores (Al-Hatmi *et al.*, 2019; Marx-Stoelting *et al.*, 2020).

Considerando lo anterior, es necesario llevar a cabo la búsqueda de alternativas económicas y ecológicamente viables para el manejo de este patógeno (Alizadeh *et al.*, 2020). Entre las alternativas económica y ambientalmente sustentables, se encuentra el uso de microorganismos para el control de diversos hongos y bacterias fitopatógenas (Goredema *et al.*, 2020). Al respecto, se han reportado bacterias del género *Streptomyces* como antagonistas a diversos hongos patógenos. El antagonismo de los estreptomicetos se debe a la producción de metabolitos secundarios con actividad fungicida en combinación con enzimas extracelulares del tipo quitinasas y pectinasas (Pedroza *et al.*, 2019; Danial *et al.*, 2020; Tlemsani *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020). La cepa CACIS-1.16CA (*Streptomyces* sp.) es una especie que produce una mezcla de metabolitos de color amarillo solubles en agua, que

the risk of damages to the environment and human health, which are increasingly larger (Al-Hatmi *et al.*, 2019; Marx-Stoelting *et al.*, 2020).

Considering this, it is crucial to search for cheap and ecologically viable alternatives for the control of this pathogen (Alizadeh *et al.*, 2020). One of the cheap and environmentally sustainable alternatives is the use of microorganisms to control diverse fungi and phytopathogenic bacteria (Goredema *et al.*, 2020). In this regard, bacteria of the genus *Streptomyces* have been reported as antagonists to several pathogenic fungi. The antagonism of the streptomycetes is due to the production of secondary metabolites with fungicidal activity in combination with extracellular enzymes of the type of chitinases and pectinases (Pedroza *et al.*, 2019; Danial *et al.*, 2020; Tlemsani *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020). The strain CACIS-1.16CA (*Streptomyces* sp.) is a species that produces a mixture of yellow metabolites, which are soluble in water and have an inhibiting effect on the growth of phytopathogenic fungi in the genera *Curvularia*, *Aspergillus*, *Helminthosporium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Phytophthora*, *Colletotrichum* and *Rhizoctonia* (Evangelista-Martínez, 2014). In the biopesticide market there are two commercial products that are based on *Streptomyces* species, such as *S. lydicus* WYEC108 and *S. griseoviridis* K61, both of which control species of *Fusarium* spp. in different crops (Evangelista-Martínez *et al.*, 2020; Shrestha *et al.*, 2020). The aim of this investigation was to select antagonistic streptomycetes against *F. oxysporum* and to evaluate, *in vitro* and *in vivo*, the inhibiting activity of the bioactive extract of *Streptomyces* sp. isolations to control the rotting of corms in gladiolus.

ejercen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos de los géneros *Curvularia*, *Aspergillus*, *Helminthosporium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Phytophthora*, *Colletotrichum* y *Rhizoctonia* (Evangelista-Martínez, 2014). En el mercado de los biopesticidas, existen dos productos comerciales que se basan en especies de *Streptomyces*, tal como *S. lydicus* WYEC108 y *S. griseoviridis* K61, ambas controlan especies de *Fusarium* spp., en diferentes cultivos (Evangelista-Martínez *et al.*, 2020; Shrestha *et al.*, 2020). El objetivo de este trabajo fue seleccionar estreptomicetos antagonistas contra *F. oxysporum* y evaluar *in vitro* e *in vivo* la actividad inhibitoria del extracto bioactivo de aislados de *Streptomyces* sp., para controlar el desarrollo de pudrición en cormos de gladiolo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento y caracterización del hongo patógeno. A partir de un lote de 60 cormos de gladiolo de la variedad borrega blanca, provenientes del Estado de México y con síntomas de pudrición del cormo (Figura 1), se seleccionaron seis cormos a partir de los cuales se aisló y purificó a tres aislados del hongo *Fusarium* sp. (GL1, GL2 y GL3). Se obtuvieron cultivos monospóricos siguiendo el protocolo reportado por González-Pérez *et al.* (2009) y se mantuvieron en cajas de Petri con medio de cultivo agar, dextrosa y papa (PDA), incubados en oscuridad a una temperatura de 27 °C.

La caracterización morfológica de los hongos aislados se realizó de acuerdo con caracteres descritos por Leslie *et al.* (2006). La identificación a nivel de género se realizó comparando las características morfológicas de la colonia (forma y color de la colonia, tipo de hifas, presencia de clamidosporas, macro y microconidios) y se registraron la forma, longitud y ancho de 50 macroconidios y 50 microconidios seleccionados al azar.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and characterization of the pathogenic fungus. From a plot of 60 gladiolus corms of the borrega blanca variety from the State of Mexico and with symptoms of corm rot (Figure 1), six corms were chosen, out of which three isolations of the fungus *Fusarium* sp. were isolated and purified (GL1, GL2 y GL3). Monosporic cultures were obtained, following the protocol reported by González-Pérez *et al.* (2009). They were then stored in Petri dishes with a potato, dextrose and agar (PDA) culture medium, and incubated in the dark at a temperature of 27 °C.

The morphological characterization of the fungi was carried out according to the characteristics described by Leslie *et al.* (2006). The identification at a genus level was carried out by comparing the morphological characteristics of the culture (shape and color of the culture, type of hyphae, presence of chlamidospores, macro and microconidia) and the shape, length and width of 50 macroconidia and 50 microconidia, chosen at random, were registered.

Molecular identification. Out of one of the three *Fusarium* spp. isolations, one monosporic culture of the isolation GL1 was chosen for its pathogenicity and growth rate *in vitro*. The molecular identification of the fungus was carried out with DNA extraction, following the extraction protocol with DNazol (Life Technologies), with some modifications. The amplification by PCR of the fragments of the gene that codifies for β -Tubulin was carried out with oligonucleotides T1 (5'-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3') and T2 (5'-TAGTGACCCTTGCCCCAGTTG-3') (O'Donell and Cigelnik, 1997), Histone 3 with oligonucleotides H3-1b (5'-CGCGGCGAGACTGGATGTCCTT-3'), H3-1a (5'-ACTAAGCA GACCGCCCGCAGG-3') (He *et al.*, 2017), elongation factor 1 α with oligonucleotides EF-1

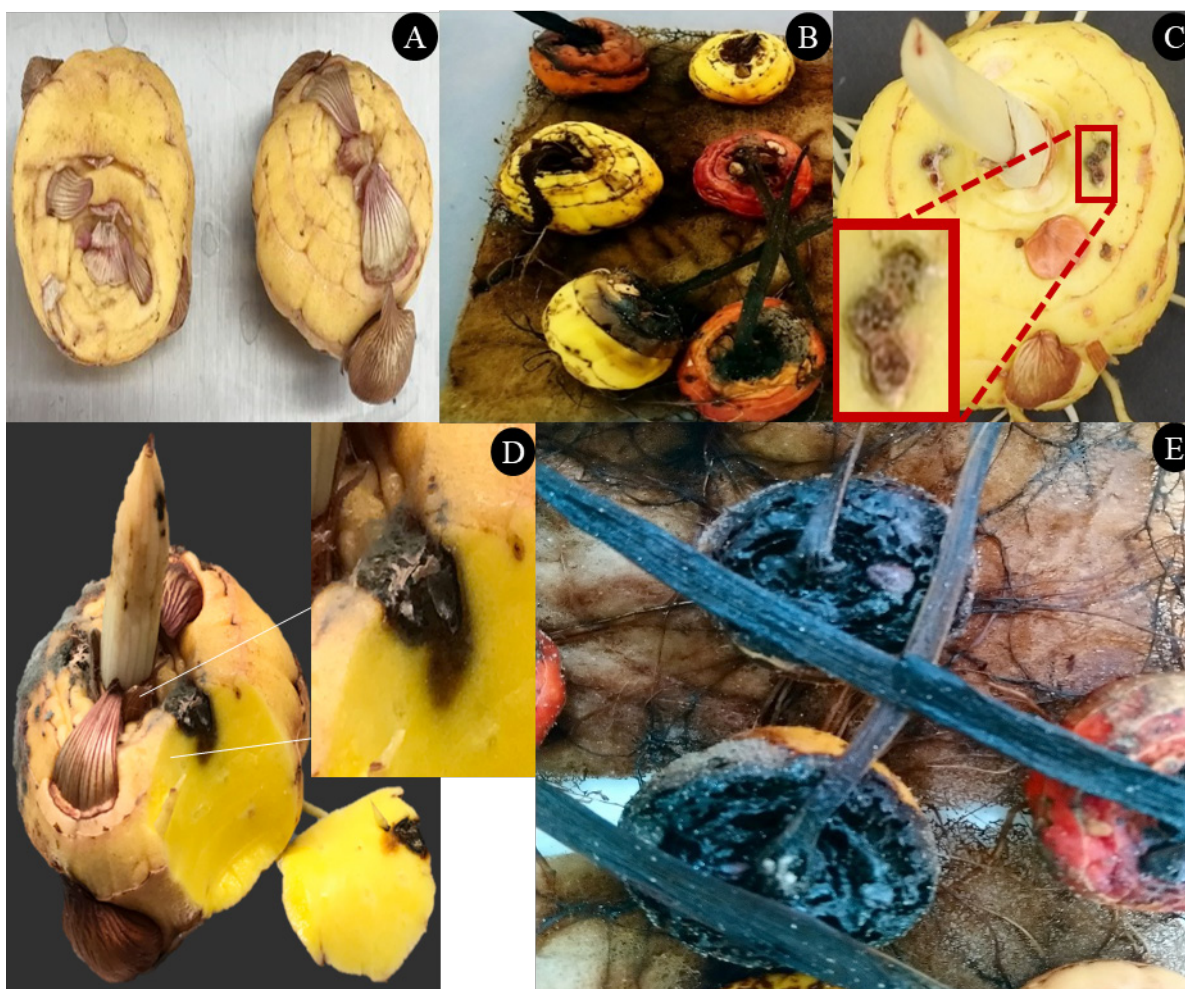


Figura 1. Cormos de gladiolo asintomáticos de la variedad borrega blanca (A). Cormos con síntomas de pudrición donde se aisló a *F. oxysporum* (B), los cuales fueron reproducidos mediante dos heridas realizadas con tres punciones y deposición de una solución de 5 µL de conidios a una concentración de 2.4×10^6 conidios mL⁻¹ de *F. oxysporum* GL1 (C). El corte perpendicular en el sitio de las heridas, muestra que a los 20 días después de la inoculación, la pudrición avanza en el interior del cormo (D) y después de tres a cuatro meses el cormo presenta una pudrición seca y oscura (E).

Figure 1. Corms from asymptomatic gladiolus of the variety borrega blanca (A). Corms with symptoms of rotting where *F. oxysporum* was isolated (B), which were reproduced with two cuts made with three punctures and the addition of 5 µL of a conidia solution at a concentration of 2.4×10^6 conidia mL⁻¹ of *F. oxysporum* GL1 (C). The perpendicular cut in the place of the wounds shows that 20 days after inoculation, rotting progresses inside the corm (D) and after three to four months, the corm displays a dry and dark rot (E).

Identificación molecular. A partir de uno de los tres aislados de *Fusarium* spp., se seleccionó por su patogenicidad y velocidad de crecimiento *in vitro*, una colonia monoesporica del aislado GL1. La identificación molecular del hongo se realizó mediante

(5'-ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC-3'), EF-2 (5'-GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT-3') (Herkert *et al.*, 2019), and finally, region ITS, using the universal oligonucleotides ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') and ITS5

la extracción de ADN, siguiendo el protocolo de extracción con DNazol (Life Technologies), con algunas modificaciones. La amplificación por PCR de los fragmentos del gen que codifica para la β -Tubulina se realizó con los oligonucleótidos T1 (5'-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3') y T2 (5'-TAGTGACCCTTGGCCCAGTTG-3') (O'Donnell & Cigelnik, 1997), Histona 3 con los oligonucleótidos H3-1b (5'-CGCGGCGAGACTGGATGTCCTT-3'), H3-1a (5'-ACTAAGCAGACCGCCCGCAGG-3') (He *et al.*, 2017), factor de elongación-1 α con los oligonucleótidos EF-1 (5'-ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC-3'), EF-2 (5'-GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT-3') (Herkert *et al.*, 2019) y finalmente la región ITS utilizando oligonucleótidos universales ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') siguiendo el protocolo y condiciones de amplificación reportados previamente (Betancourt-Resendes *et al.*, 2012; Uc-Varguez *et al.*, 2018). Los fragmentos amplificados fueron purificados y enviados para su secuenciación a MACROGEN en Korea. La secuencia resultante, fue editada con el programa edit sequence (DNASTAR) y posteriormente se compararon con secuencias reportadas en la base de datos del NCBI, con ayuda del algoritmo de BLAST disponible en Internet.

Preparación del inóculo. La suspensión de conidios empleada para obtener la MIC, MLC y para los experimentos de infección de los cormos, se preparó a partir de un cultivo del hongo crecido por 11 días en cajas Petri con medio PDA. A una caja Petri con el hongo, se le agregó 5 mL de agua destilada estéril para remover la masa de conidios. La suspensión se filtró a través de varias capas de gasa y algodón para descartar residuos de micelio. La suspensión se centrifugó a 6000 rpm/10 min a 25 °C. El precipitado de conidios se lavó dos veces

(5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'), following the protocol and amplification conditions reported earlier (Betancourt-Resendes *et al.*, 2012; Uc-Varguez *et al.*, 2018). The amplified fragments were purified and sent for sequencing to MACROGEN in Korea. The resulting sequence was edited using a sequence editing program (DNASTAR) and later compared with sequences reported in the NCBI data base, using the BLAST algorithm available on the Internet.

Preparation of the inoculant. The conidial suspension used to obtain the MIC, MLC and for the corm infection experiments was prepared from a culture of the fungus grown for 11 days in Petri dishes with PDA medium. One Petri dish with the fungus was added 5 mL of sterile distilled water to remove the mass of conidia. The suspension was filtered through several layers of gauze and cotton to discard mycelial residues. The suspension was centrifuged at 6000 rpm/10 min at 25 °C. The conidial precipitate was washed twice with sterile distilled water, then resuspended and, using a Neubauer chamber, the concentration was adjusted to 1×10^5 conidia mL⁻¹ or 2.4×10^6 , according to the activity to be carried out *in vitro* or *in vivo*, respectively.

Pathogenicity test of the *Fusarium* sp. isolation. The pathogenicity of the fungus isolations was verified by inoculating 30 gladiolus corms. All corms were disinfected by submersion into a 0.3% NaOCl solution for 2 min, rinsed with sterile distilled water for 1 min, followed by submersion in 70% ethanol for 2 min and rinsed with sterile distilled water for 1 min. Finally, the excess moisture was eliminated using sterile paper towels (González-Pérez *et al.*, 2009).

The disinfected corms were inoculated experimentally, with two cuts made in the upper

con agua destilada estéril, luego se resuspendió y con ayuda de la cámara de Neubauer se ajustó la concentración a 1×10^5 conidios mL^{-1} o 2.4×10^6 según la actividad a realizar *in vitro* o *in vivo* respectivamente.

Prueba de patogenicidad del aislado de *Fusarium* sp. La patogenicidad de los aislados del hongo se verificó mediante inoculación de 30 cormos de gladiolo. Todos los cormos fueron desinfectados por inmersión en una solución de NaOCl al 0.3%/2 min, enjuagados con agua destilada estéril/1 min, seguido por una inmersión en etanol al 70%/2 min, y enjuagados con agua destilada estéril/1 min. Al final, el exceso de humedad se eliminó con papel absorbente estéril (González-Pérez *et al.*, 2009).

Los cormos desinfectados fueron inoculados experimentalmente, mediante dos heridas hechas en la parte superior del cormo con tres punciones (por herida) realizadas con un palillo estéril. Posteriormente, en cada herida se depositó 5 μL de una solución de 2.4×10^6 conidios mL^{-1} de *F. oxysporum*, obtenidos de una colonia con 11 días de crecimiento en medio PDA. Todos los cormos incluyendo controles inoculados con agua destilada estéril, fueron incubados en condiciones de oscuridad en una cámara bioclimática a 25 °C y 70% de humedad. El registro sintomatológico se realizó a intervalos de cinco días durante 30 días. Finalmente, los cormos se mantuvieron por cuatro meses bajo las mismas condiciones y solo se registró el síntoma final (González-Pérez *et al.*, 2009).

Crecimiento de *Streptomyces* spp. Cultivos de 22 cepas de *Streptomyces* se obtuvieron del banco de germoplasma de Actinomicetos conservado en la Subsección Sureste del CIATEJ, provenientes de suelos de Aguascalientes, Campeche, Hidalgo y Yucatán. Adicionalmente, en los ensayos se utilizó como cepa control a *Streptomyces lydicus* WYEC

part of the corm with three punctures (per cut) with a sterile toothpick. Later, in each cut, we placed 5 μL of a solution of 2.4×10^6 conidia mL^{-1} of *F. oxysporum*, obtained from a culture with 11 days of growth in a PDA medium. All corms, including the controls inoculated with sterile distilled water, were incubated in the dark in a bioclimatic chamber at 25 °C and 70% humidity. Symptoms were recorded in intervals of five days for 30 days. Finally, the corms were kept for four months under the same conditions and only the final symptom was recorded (González-Pérez *et al.*, 2009).

Growth of *Streptomyces* spp. Cultures of 22 strains of *Streptomyces* were obtained from the Actinomycetes germplasm bank in the CIATEJ of the southeast, taken from soils from the states Aguascalientes, Campeche, Hidalgo and Yucatan. Additionally, in the trials, *Streptomyces lydicus* WYEC 108 was used as a control strain. All strains were grown in an International Streptomyces Project 2 (ISP 2) agar medium, at a temperature of 29 °C for 14 days. For the antagonism experiments, a general inoculant (GI) was prepared, consisting of spores from each strain at a concentration of 10^8 UFC mL^{-1} (Evangelista-Martínez, 2014).

Antagonistic evaluation of streptomycetes against *F. oxysporum*. The antagonistic activity of the 22 *Streptomyces* strains was carried out by dual confrontation tests in an ISP2 medium (Evangelista-Martínez *et al.*, 2020). We inoculated 3 mL of the GI on the edge of the Petri dish with the ISP 2 medium, and in the middle of the dish, we placed an agar disk with active mycelia from a *F. oxysporum* culture with an 11-day growth in PDA. The cultures were kept at 29 °C for 11 days and the growth of the fungus was measured, in the direction of a streptomycete, using a digital caliper (Caldi-6MP Truper). The percentage of

108. Todas las cepas se crecieron en medio agar International Streptomyces Project 2 (ISP 2) a una temperatura de 29 °C durante 14 días. Para los experimentos de antagonismo se preparó un inóculo general (IG) que consistió de esporas de cada cepa a una concentración de 10^8 UFC mL⁻¹ (Evangelista-Martínez, 2014).

Evaluación antagonica de estreptomicetos contra *F. oxysporum*. La actividad antagonica de las 22 cepas de *Streptomyces* se realizó mediante ensayos de confrontación dual en medio ISP2 (Evangelista-Martínez *et al.*, 2020). Se inocularon 3 mL del IG en el borde de la caja Petri con el medio ISP 2 y al centro de la caja se depositó un disco de agar con micelio activo de un cultivo de *F. oxysporum* de 11 días de crecimiento en PDA. Los cultivos se mantuvieron a 29 °C durante 11 días y se midió el crecimiento del hongo en dirección del estreptomiceto mediante un vernier digital (Caldi-6MP Truper). El porcentaje de inhibición (PI) se calculó a partir de la fórmula: $PI (\%) = \frac{(FR - AR)}{FR * 100}$ en donde “FR” representa el radio de crecimiento (mm) del hongo en la caja control y “AR” es el radio de crecimiento del hongo en dirección al crecimiento de *Streptomyces* (Dikhoba *et al.*, 2019).

Obtención del extracto bioactivo (EB) de *Streptomyces* sp. El extracto bioactivo de los dos aislados con mayor actividad antagonica (*Streptomyces* sp. GCAL-9 y CACIS 1.6 CA), se obtuvo mediante una fermentación en fase sólida (FES) empleando espuma de poliuretano (Evangelista-Martínez *et al.*, 2020). El soporte tenía una dimensión de 12 x 10 x 2.5 cm, al cual se le agregó 70 mL de caldo ISP2 inoculado con una suspensión de esporas de cada uno de los estreptomicetos, ajustando la turbidez a una DO₄₅₀ de aproximadamente 1.0. La FES se realizó en recipientes de plástico estéril

inhibition (PI) was calculated using the formula $PI (\%) = \frac{(FR - AR)}{FR * 100}$, where “FR” represents the growth radius (mm) of the fungus in the control dish and “AR” is the radius of the fungal growth in the direction of the growth of *Streptomyces* (Dikhoba *et al.*, 2019).

Obtaining the Bioactive extract (BE) of *Streptomyces* sp. The bioactive extract of the two isolations with the greatest antagonistic activity (*Streptomyces* sp. GCAL-9 and CACIS 1.6 CA) was obtained by fermentation in a solid phase (FES), using polyurethane foam (Evangelista-Martínez *et al.*, 2020). The support measured 12 x 10 x 2.5 cm, and 70 mL of ISP2 broth, inoculated with a suspension of spores from each one of the streptomycetes was added, adjusting the turbidity to a DO₄₅₀ of approximately 1.0. The FES was carried out in sterile plastic containers for the *in vitro* cultivation of plants. The ISP2 broth was inoculated. The dishes were then closed and incubated in the dark at 29 °C for 21 days. The BE produced was separated from the cells by a series of filtrations, starting with Whatman No 3. Filter paper, followed by Whatman No. 1, 0.65 µm micropore filter, and ending in a 0.22 µm Micropore filter. The extract was stored at 4 °C until use (Evangelista-Martínez *et al.*, 2020).

MIC and MLC with the method of microdilution. The minimum inhibiting concentration of the bioactive extract was carried out using 96 well plates in the potato dextrose broth medium (PDB) as per the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017). The MIC tests were carried out in sterile microplates with 96 wells containing 100 µL of PDB broth. Later, the samples to be evaluated were added in each well of the first column, ending with a volume of 200 µL. The wells

para cultivo *in vitro* de plantas. El caldo ISP2 se inoculó. Posteriormente, las cajas se cerraron e incubaron en condiciones de oscuridad a 29 °C por 21 días. El EB producido se separó de las células mediante filtraciones en serie, iniciando con papel filtro Whatman No 3., seguido de papel Whatman No. 1, filtro micropore de 0.65 µm hasta terminar con un filtro Micropore de 0.22 µm. El extracto se almacenó a 4 °C hasta su uso (Evangelista-Martínez *et al.*, 2020).

MIC y MLC por el método de microdilución.

La concentración mínima inhibitoria del extracto bioactivo se realizó empleando placas de 96 pozos en el medio caldo papa dextrosa (PDB) de acuerdo a la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017). Las pruebas MICs se realizaron en microplacas estériles de 96 pozos conteniendo 100 µL de caldo PDB. Posteriormente, a cada pozo ubicado en la primera columna se le adicionaron las muestras a evaluar, finalizando con un volumen de 200 µL. Los pozos de la primera columna con las diferentes muestras, se homogenizaron y tomaron 100 µL de cada pozo y colocaron en los pozos de la segunda columna y así sucesivamente, de manera que la concentración en el primer pozo quedó a la mitad respecto a la concentración en la solución (two-fold dilutions). Una vez terminadas las diluciones, a cada pozo se le agregó 100 µL de conidios ajustados a 1×10^5 conidios mL⁻¹, se mezclaron y mantuvieron en incubación a 29 °C. La inhibición del crecimiento del hongo se determinó a las 24, 48 y 72 h mediante adición de resazurina (Barua *et al.*, 2017). La resazurina se empleó como indicador de crecimiento del hongo, cuando la solución fue de color azul se consideró inhibición del crecimiento, mientras que la coloración rosa indicó crecimiento o ausencia de inhibición. La MIC se definió como la menor concentración del EB que inhibió el crecimiento de *F. oxysporum*.

of the first column with the different samples were homogenized and 100 µL were taken from each well and placed in the wells of the second column, and so on, so the concentration in the first well is half of that of the concentration of the solution (two-fold dilutions). After finishing the dilutions, 100 µL of conidia were added, adjusted to 1×10^5 conidia mL⁻¹; they were mixed and incubated at 29 °C. The inhibition of the fungal growth was determined after 24, 48 and 72 h by adding resazurin (Barua *et al.*, 2017). The resazurin was used as a fungal growth indicator, and when the solution turned blue, it indicated growth inhibition, whereas when it was pink, it indicated growth or the absence of inhibition. The MIC was defined as the lowest concentration of the BE that inhibited the growth of *F. oxysporum*.

The value of the minimum lethal concentration (MLC) was determined when subcultivating directly from the plate used to calculate the MIC, 5 µL for the cell mass of the fungus of each well in the microplate with PDB broth. The cultures were kept at 29 °C for three days until mycelial growth was observed. The fungal growth after this period indicated fungistatic control, whereas the absence of growth indicated fungicidal activity of the BE. The MLC was defined as the lowest concentration in which there was no growth of the fungus. The BE of *Streptomyces* sp., GCAL-9 and CACIS 1.6 CA was analyzed in duplicate in two independent experiments. As the growth control, the product carbendazim (Syngenta) was used, prepared at a concentration of 72.8 mg mL⁻¹.

Effect of the BE on the germination of microconidia. The inhibiting activity of the BE was evaluated with a test of the inhibition of the germination of the conidia. The test was carried out on a slide with a well with a final volume of 40 µL containing 20 µL of PDB broth mixed with

El valor de la concentración mínima letal (MLC) se determinó al subcultivar directamente de la placa usada para el cálculo de la MIC, 5 mL de la masa celular del hongo de cada pozo en microplaca con caldo PDB. Los cultivos se mantuvieron a 29 °C por tres días hasta observar crecimiento micelial. El crecimiento del hongo después de este periodo fue indicativo de control fungistático, mientras que la ausencia de crecimiento indicó actividad fungicida del EB. La MLC se definió como la menor concentración en la que no existió crecimiento del hongo. El EB de *Streptomyces* sp., GCAL-9 y CACIS 1.6 CA, se analizó por duplicado en dos experimentos independientes. Como control de crecimiento se empleó el producto carbendazim (Syngenta) preparado a una concentración de 72.8 mg mL⁻¹.

Efecto del EB sobre la germinación de microconidios. La actividad inhibitoria del EB se evaluó mediante un ensayo de inhibición de la germinación de los conidios. El ensayo se realizó en portaobjetos con cavidad en 40 µL de volumen final que contenía 20 µL de caldo PDB mezclado con 10 µL de la suspensión de conidios de *F. oxysporum* (10⁵ conidios mL⁻¹) más 10 µL de la solución del EB a diferentes concentraciones. Las concentraciones evaluadas fueron a ¼, ½, 1, 4, 6 y 8 MIC's (0.0475, 0.095, 0.19, 0.38, 1.14, 1.52 mg mL⁻¹). Enseguida se colocó un cubreobjetos y se mantuvieron en una cámara húmeda a 29 °C en oscuridad. Como control se usó agua destilada estéril. El efecto sobre la germinación se determinó cada hora durante 8 horas de crecimiento, empleando un microscopio invertido (modelo Olympus), contabilizando 100 conidios al azar, separando los conidios germinados de los que aún no lo estaban (Evangelista-Martínez *et al.*, 2020). El experimento se llevó a cabo por triplicado y la evaluación se basó en la presencia del tubo de germinación. Un conidio se consideró germinado, si el tubo de germinación alcanzó el doble

10 µL of the suspension of *F. oxysporum* conidia (10⁵ conidia mL⁻¹) plus 10 µL of the BE solution at different concentrations. The concentrations evaluated were ¼, ½, 1, 4, 6 and 8 MIC's (0.0475, 0.095, 0.19, 0.38, 1.14, 1.52 mg mL⁻¹). A slide was then placed and kept in a humid chamber at 29 °C in the dark. Sterile distilled water was used as a control. The effect on germination was determined every hour for 8 hours of growth, using an inverted microscope (Olympus), counting 100 conidia at random, separating the germinated conidia from the yet ungerminated ones (Evangelista-Martínez *et al.*, 2020). The experiment was carried out in triplicate and the evaluation was based on the presence of the germination tube. A conidium was considered germinated if the germination tube reached a diameter twice that of the diameter of the conidium. Results were expressed as the percentage of germinated conidia (PG) in comparison with the control, based on the following formula (Zhang *et al.*, 2020):

$$\text{Percentage of germinated} = \left(\frac{\text{Number of germinated conidia}}{\text{Number of total conidia}} \right) \times 100$$

Fungicidal activity of the BE. The fungicidal potential of the BE on *F. oxysporum* was evaluated by carrying out spore germination tests at different concentrations and following up on different times of contact with the conidia. The experiments were carried out using the microdilution method described earlier. The concentrations of the BE were 1, 2 and 3 MIC's. Carbendazim at 72.8 mg mL⁻¹ was used as a positive control. After mixing the PDB broth and the BE, 100 µL of the conidia suspension were added and homogenized. Every hour for 4 h, 5 µL of the suspension were taken from each mixture and placed in Petri dishes with

del diámetro del conidio. Los resultados se expresaron como el porcentaje de conidios germinados (PG) comparado al control, con base a la siguiente fórmula (Zhang *et al.*, 2020):

$$\text{Porcentaje de germinación} = \left(\frac{\text{Número de conidios germinados}}{\text{Número total de conidios}} \right) \times 100$$

Actividad fungicida del EB. El potencial fungicida del EB sobre *F. oxysporum* se evaluó realizando ensayos de germinación de esporas a diferentes concentraciones y dando seguimiento a diferentes tiempos de contacto con los conidios. Los experimentos se realizaron por el método de microdilución previamente descrito. Las concentraciones del EB fueron 1, 2 y 3 MIC's. Como control positivo se empleó Carbendazim a 72.8 mg mL⁻¹. Después de realizar las mezclas del caldo PDB y el EB, se agregó 100 µL de la suspensión de conidios y homogenizó. Durante cada hora y hasta completar 4 h, de cada mezcla se tomaron 5 µL de la suspensión y depositó en cajas Petri con medio PDA y se incubó a 29 °C durante tres días. Se determinó el tiempo de contacto óptimo para ejercer el efecto fungicida, en aquellas muestras donde no se presentó crecimiento.

Efecto protector del EB en cormos de gladiolo.

La evaluación del efecto del EB para el control de la pudrición en cormos de gladiolo, se realizó empleando 50 cormos de gladiolo de la variedad Red Beauty por cada tratamiento. El proceso de desinfección de los cormos y de la inoculación con la suspensión de conidios de *F. oxysporum*, se realizó como se describió previamente.

Los tratamientos evaluados fueron: a) cormos inoculados con *F. oxysporum* y tratados con agua; b) cormos inoculados con *F. oxysporum* y tratados

a PDA medium and incubated at 29 °C for three days. The optimal time of contact for the fungicidal effect was determined in the samples where no growth was observed.

Protective effect of the BE on gladiolus corms.

The evaluation of the effect of the BE for the control of rot in gladiolus corms was carried out using 50 gladiolus corms of the Red Beauty variety for each treatment. The disinfection process of the corms and of the inoculation with the *F. oxysporum* conidia suspension was carried out as described earlier.

The treatments evaluated were a) corms inoculated with *F. oxysporum* and treated with water; b) corms inoculated with *F. oxysporum* and treated with Carbendazim (72.8 mg mL⁻¹); c) corms inoculated with *F. oxysporum* and treated with BE MIC (0.19 mg mL⁻¹) and d) corms inoculated with *F. oxysporum* and treated with BE and double the MIC (0.38 mg mL⁻¹). Later, the corms in all treatments were stored in the dark in a bioclimatic chamber at 25 °C and 70% humidity.

The symptoms were registered every 5 days from time zero until 20 days after inoculation, in five corms per treatment. The variable hardness or firmness of the corms was the parameter used to determine the protective effect of the BE on the inoculated corms, using a Shimadzu® EZ-SX digital texturometer with a needle, 5 mm in diameter, on a standard base table. The compression test was carried out at a speed of 3mm/s at a depth of 0.5mm. The firmness of the corms was registered in Newtons (Morales-Pérez *et al.*, 2014).

Data analysis. The data registered for the PG were analyzed statistically using a multifactorial ANOVA and a test of separation of means using LSD. The data registered for corm firmness were analyzed statistically using a simple ANOVA and

con Carbendazim (72.8 mg mL^{-1}); c) cormos inoculados con *F. oxysporum* y tratados con EB MIC (0.19 mg mL^{-1}) y d) cormos inoculados con *F. oxysporum* y tratados con EB al doble de la MIC (0.38 mg mL^{-1}). Posteriormente, los cormos de todos los tratamientos fueron almacenados en condiciones de oscuridad en una cámara bioclimática a 25°C y 70% de humedad.

Los síntomas fueron registrados, cada cinco días a partir del tiempo cero hasta veinte días después de la inoculación, en cinco cormos por cada tratamiento. La variable dureza o firmeza de los cormos, fue el parámetro empleado para determinar el efecto protector del EB en los cormos inoculados, utilizando un Texturómetro digital Shimadzu® EZ-SX con una aguja de 5mm de diámetro en una mesa base estándar. La prueba de compresión se realizó a una velocidad de 3mm/s y una profundidad de 0.5mm. La dureza de los cormos se registró en Newtons (Morales-Pérez *et al.*, 2014).

Análisis de datos. Los datos registrados para el PG fueron analizados estadísticamente mediante un ANOVA multifactorial y mediante una prueba de separación de medias por LSD. Los datos registrados para la dureza del corno fueron analizados estadísticamente mediante una ANOVA simple y una prueba de separación de medias por Tukey, con ayuda del programa Statgraphics centurió XVIII.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento y caracterización del patógeno. A partir de cormos de gladiolo con síntomas de pudrición asociado a la presencia de *Fusarium* spp., se obtuvieron tres aislados (GL1, GL2 y GL3) con características morfológicas del género. A partir de los tres aislados de *Fusarium*, se generaron cepas monospóricas que se caracterizaron por desarrollar un micelio aéreo con tonalidades blanquecinas a

a Tukey test of separation of means, using the program Statgraphics centurió XVIII.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation and characterization of the pathogen.

Three isolations (GL1, GL2 and GL3) with morphological characteristics of the genus were taken from gladiolus corms with symptoms of rotting related to the presence of *Fusarium* spp. From the three *Fusarium* isolations, monosporic strains were produced, characterized by the development of an aerial mycelium with whitish to orange colors, without curled hyphae. Fusiform and slightly curved macroconidia were also found, with a conical apical cell and an oval-shaped base cell, with one to three septa; the microconidia presented an oval morphology and without septa (Table 1). These characteristics coincide with those reported for *F. oxysporum* (González-Pérez *et al.*, 2009; Hafizi *et al.*, 2013; Leslie *et al.*, 2006).

Molecular identification of the fungus isolated from corms with rot.

The analysis of the sequence of the ITS fragments (584 pb) of the *Fusarium oxysporum* GL1 isolation showed, when comparing with sequences registered in the GenBank, a similarity of 96% with ITS sequences of the genus *F. oxysporum*. The same result was obtained when analyzing the sequences of the genes that codify β -Tubulin (549 pb, 95% similarity), histone 3 (458 pb, 94% similarity) and elongation factor of 1 α (300 pb, 98% similarity). Considering the morphological characteristics and the close molecular similarity with species of the *Fusarium* genus, isolation GL1, isolated from corms with rot, belongs to *F. oxysporum*.

Pathogenicity test of the isolation of *F. oxysporum*. Isolation GL1 induced the appearance

naranjas, sin la presencia de hifas enrolladas. También se detectó la presencia de macroconidios fusiformes y ligeramente curvos con la célula apical cónica y la basal ovalada, entre uno y tres septos; los microconidios presentaron morfología ovalada y sin septos (Cuadro 1). Estas características coinciden con las reportadas para *F. oxysporum* (González-Pérez *et al.*, 2009; Hafizi *et al.*, 2013; Leslie *et al.*, 2006).

Identificación molecular del hongo aislado de cormos con pudrición. El análisis de la secuencia de los fragmentos de ITS (584 pb) del aislado *Fusarium oxysporum* GL1 mostró, al comparar con secuencias registradas en el genbank, una similitud del 96% con secuencias ITS del género *F. oxysporum*. El mismo resultado se obtuvo al analizar las secuencias de los genes que codifican a la β -Tubulina (549 pb, 95% de similitud), histona 3 (458 pb, 94% de similitud) y factor de elongación-1 α (300 pb, 98% de similitud). Considerando las

of symptoms, therefore molecular identification, as well as the *in vitro* and *in vivo* trials described were carried out using this strain. The inoculated corms presented an initial symptom after 15 days (Figure 1), which was characterized by a brown color inside the corm, as well as a loss of turgidity; superficially, the symptom was imperceptible (Figure 1C), but when the corm was cut perpendicularly, the color changed from the place of inoculation (Figure 1D). The corms dried three to four months after inoculation, becoming dark brown (Figure 1E). This corresponds with the symptoms described for the rot of gladiolus corms caused by *Fusarium* (González-Pérez *et al.*, 2009; Michel-Aceves *et al.*, 2014; Pedroza *et al.*, 2019).

Antagonistic activity *in vitro*. The antagonistic activity of the 22 strains of streptomycetes against the isolation of *F. oxysporum* GL1 is shown in Table 2, where we can also see, for the streptomycetes in the soil of the states of Hidalgo and Aguascalientes,

Cuadro 1. Características macroscópicas y microscópicas registrados de la colonia monospórica de *F. oxysporum* GL1 aislada a partir de cormos de gladiolo con síntomas de pudrición.

Table 1. Registered macroscopic and microscopic characteristics of the monosporic culture of *F. oxysporum* GL1 isolated from gladiolus corms with symptoms of rot.

Características morfológicas	² Descripción
Color de la colonia	Tonalidades naranjas y blancas, micelio aéreo
Morfología del macroconidio	Fusiforme, ligeramente curvo
Morfología de la célula apical	Cónica y curva
Morfología de la célula de la base	Ovalada
Largo de macroconidios (μ m)	52.9
Ancho de macroconidios (μ m)	7.4
Número de septos	3
Morfología del microconidio	Ovalada
Largo de microconidio (μ m)	20.4
Ancho de microconidios (μ m)	7.3

²Las mediciones y registros al microscopio se realizaron mediante la observación directa y medición de 50 macroconidios y 50 microconidios de la colonia monospórica del hongo a 40x.
/ ²The measurements and records under the microscope were carried out by direct observation and measurements of 50 macroconidia and 50 microconidia of the monosporic culture of the fungus at 40x.

características morfológicas y la estrecha similitud molecular con especies del género *Fusarium*, se sugiere que el aislado GL1 aislado de cormos con pudrición pertenece a *F. oxysporum*.

Prueba de patogenicidad del aislado de *F. oxysporum*. El aislado GL1 indujo la aparición de síntomas, por lo que la identificación molecular, así como los ensayos *in vitro* e *in vivo* descritos se realizaron utilizando esta cepa. Los cormos inoculados presentaron un síntoma inicial a los 15 días (Figura 1), que se caracterizó por una coloración café en el interior del cormo, así como una pérdida de turgencia; superficialmente el síntoma fue imperceptible (Figura 1C), pero cuando se realizó un corte perpendicular del cormo se observó el cambio de color a partir del sitio de inoculación (Figura 1D). Los cormos tres a cuatro meses después de la inoculación, se secaron adquiriendo una coloración café oscura (Figura 1E). Lo anterior concuerda con la sintomatología descrita para la pudrición de cormos de gladiolo debidas a *Fusarium* (González-Pérez *et al.*, 2009; Michel-Aceves *et al.*, 2014; Pedroza *et al.*, 2019).

Actividad antagónica *in vitro*. La actividad antagónica de las 22 cepas de estreptomicetos contra el aislado de *F. oxysporum* GL1 se presentó en el Cuadro 2. En ella se observa, para los estreptomicetos de suelo del Estado de Hidalgo y del Estado de Aguascalientes un PI menor al 20%, mientras que para los estreptomicetos que provienen de suelos de los Petenes, en dos se observa un PI ligeramente superior al 30% y solo para *Streptomyces* sp. CACIS-1.16CA un PI mayor al 40%. Para el caso de *Streptomyces* sp., GCAL-9, se observó un PI de 40.4. Resultados similares se observaron con la cepa control *S. lydicus* WYEC 108 (PI= 41.1%). En general no se observaron diferencias en el PI de *S. lydicus* y los estreptomicetos CACIS-1.16CA y GCAL-9. Con base a estos resultados se seleccionaron estos

a PI lower than 20%, whereas for the streptomycetes from the soils of the Petenes, in two, the PI is slightly higher than 30%, and only for *Streptomyces* sp. CACIS-1.16CA is the PI higher than 40%. In the case of *Streptomyces* sp., GCAL-9, a PI of 40.4 was observed. Similar results were observed with control strain *S. lydicus* WYEC 108 (PI= 41.1%). In general, no differences were observed in the PI of *S. lydicus* and the streptomycetes CACIS-1.16CA and GCAL-9. Based on these results, these isolations were chosen to evaluate the corresponding BE. The PIs obtained with *Streptomyces* sp. CACIS-1.16CA and *Streptomyces* sp. GCAL-9 are near to the results reported for other actinomycetes on *F. oxysporum* (PI de 58.1%), which confirms the capacity of some species of the genus *Streptomyces* to inhibit *F. oxysporum* (Goredema *et al.*, 2020; Nguyen *et al.*, 2020; Tlemsani *et al.*, 2020). Earlier results with *Streptomyces* sp. CACIS 1.16CA showed antagonistic activity against other species of *Fusarium*, leading the fungal growth inhibition to fluctuate between 40 and 70% (Evangalista-Martinez, 2014).

Determination of the MIC and MLC of the BE against *F. oxysporum*. The bioactive extract (BE) of *Streptomyces* sp. GCAL-9, produced with a solid fermentation, as described in materials and methods, was used to obtain a minimum inhibiting concentration (MIC) and minimum lethal concentration (MLC) on *F. oxysporum*. The MIC obtained was 0.19 mg mL⁻¹, while the MLC was 0.38 mg mL⁻¹. The MIC obtained in the investigation is similar to that reported for other strains of *Streptomyces*, considered to have an outstanding microbial effect on different species of bacteria and fungi, including *F. oxysporum* (Hima-Bindu *et al.*, 2017; Pérez-Rojas *et al.*, 2015).

Effect of the BE on the germination of *F. oxysporum* conidia. The bioactive extract of

Cuadro 2. Actividad antagonista de 22 *Streptomicetos* sobre *Fusarium oxysporum*, determinada mediante el porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo en dirección del actinomiceto en ensayos de antagonismo dual.**Table 2. Antagonistic activity of 22 streptomycetes on *Fusarium oxysporum*, determined with the percentage of inhibition of the fungal growth rate in the direction of the actinomycete in dual antagonism trials.**

Cepa	PI (%)	Cepa	PI (%)
Suelos del Parque Nacional El Chico, Hidalgo			
CACIA 1.3 HGO	17.1	CACIA 1.5	10.1
CACIA 1.33 HGO	14.1	CACIA 1.7	14.1
Suelos de la Reserva de la Biósfera Los Petenes, Campeche			
CACIS 1.16 CA	43.4	CACIS 2.30 CA	19.1
CACIS 2.16 CA	30.3	CACIS 2.3 CA	24.2
CACIS 2.17 CA	32.3	CACIS 2.5 CA	19.1
CACIS 2.26 CA	20.2		
Suelos de campo de cultivo de chile serrano, Aguascalientes			
AGS 4	28.2	AGS 13	32.3
AGS 6	24.2	AGS 32	15.1
AGS 9	25.2	AGS 44	26.2
AGS 10	35.10	AGS 50	29.2
AGS12	23.2	AGS 58	31.7
Suelos de Yucatán			
GCAL 9	40	<i>Streptomyces lydicus</i> wyec 108 ^z	41.1

^zCepa comercial utilizada como referencia. / ^zCommercial strain used as a reference.

aislados para evaluar el EB correspondiente. Los PI obtenidos con *Streptomyces* sp. CACIS-1.16 CA y *Streptomyces* sp. GCAL-9 son cercanos a los resultados reportados para otros actinomicetos sobre *F. oxysporum* (PI de 58.1%), lo que confirma la capacidad de algunas especies del género *Streptomyces* para inhibir a *F. oxysporum* (Goredema *et al.*, 2020; Nguyen *et al.*, 2020; Tlemsani *et al.*, 2020). Resultados previos con *Streptomyces* sp. CACIS 1.16CA mostraron actividad antagonista contra otras especies de *Fusarium*, fluctuando entre 40 al 70% la inhibición en el crecimiento del hongo (Evangelista-Martínez, 2014).

Determinación de la MIC y MLC del EB contra *F. oxysporum*. El extracto bioactivo (EB) de

the isolation CACIS 1.16 CA did not inhibit the germination of the *Fusarium* sp. GL1 conidia, suggesting that the antagonism it presented in the dual antagonism trials (Table 2) may be due to direct competition, and not to the production of extracellular compounds with antagonistic activity (Alizadeh *et al.*, 2020). Considering this, subsequent trials were performed only with the BE of the strain of *Streptomyces* sp. GCAL-9.

The results of the evaluation of the effects of five concentrations of the BE of the *Streptomyces* sp. GCAL-9 strain on the germination of *F. oxysporum* conidia display significant differences ($p \leq 0.05$) in the percentage from applying $\frac{1}{2}$ MIC, with a value of around 90% in comparison with the control. Higher BE concentrations completely inhibited

Streptomyces sp. GCAL-9, producido mediante una fermentación sólida, tal como se describió en materiales y métodos, se utilizó para obtener la concentración mínima inhibitoria (MIC) y mínima letal (MLC) sobre *F. oxysporum*. Se obtuvo una MIC de 0.19 mg mL⁻¹, mientras que la MLC fue del 0.38 mg mL⁻¹. La MIC obtenida en el trabajo es similar a los reportados para otras cepas de *Streptomyces*, consideradas con efecto antimicrobiano sobresaliente sobre diferentes especies de bacterias y hongos, incluyendo *F. oxysporum* (Hima-Bindu *et al.*, 2017; Pérez-Rojas *et al.*, 2015).

Efecto del EB sobre la germinación de conidios de *F. oxysporum*. El extracto bioactivo del aislado CACIS 1.16 CA, no inhibió la germinación de los conidios de *Fusarium* sp. GL1, sugiriendo que el antagonismo que presentó en los ensayos de antagonismo dual (Cuadro 2), se debe posiblemente a competencia directa y no necesariamente debido a la producción de compuestos extracelulares con actividad antagonica (Alizadeh *et al.*, 2020). Considerando lo anterior, los ensayos subsecuentes se realizaron únicamente con el EB de la cepa de *Streptomyces* sp. GCAL-9.

Los resultados de la evaluación del efecto de cinco concentraciones del EB de la cepa *Streptomyces* sp. GCAL-9 sobre la germinación de conidios de *F. oxysporum*, muestran diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en el porcentaje de inhibición de la germinación a partir de la aplicación de ½ MIC, con un valor de alrededor del 90 % respecto al control. Concentraciones mayores del EB inhibieron completamente la germinación (Figura 2A). A nivel morfológico, se observaron cambios estructurales en los conidios con el EB a ½, 1 y 2 MIC's en comparación con los conidios en fase de germinación (Figura 2B). Se observa una evidente interrupción de la fase de transición hacia la formación del tubo de germinación y a medida que se incrementa

germinación (Figure 2A). At a morphological level, structural changes were found in the conidia with the BE at ½, 1 and 2 MIC's in comparison with the conidia in the germination phase (Figure 2B). There is a clear disruption of the transition phase towards the formation of the germination tube, and as the concentration of the BE increases, the size of the conidia decreases, the elongated shape of the macroconidia changes to round and swollen, an excess of vacuoles forms in the cytoplasm, the septa are no longer visible, and an excess of vacuoles forms. These characteristics have been observed in other investigations (Cordova-Albores *et al.*, 2016), particularly in the evaluation of the *Jatropha curcas* oil and other derived oils on the germination of *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* conidia; the authors report some morphological effects on the conidia, such as irregular or swollen edges, few to no organelles and, in the germinated conidia, there was scarce growth of hyphae and the appearance of a high number of vacuoles in the cytoplasm.

Other authors reported that extracellular compounds from *Streptomyces blastmyceticus* affect the germination of *Colletotrichum acutatum* and *F. oxysporum* conidia, highlighting effects on the conidial membrane permeability, as well as changes in their morphology with a reduction in their size and the presence of a wrinkly surface in conidia and hyphae, in comparison with the smooth surface of not conidia not exposed to the compounds (Kim *et al.*, 2019).

The optimum time for the fungicidal effect of the BE is determined by evaluating, for three days, the ability of germination of the conidia and the growth of the *F. oxysporum* mycelia after being exposed to different concentrations (1, 2 and 3 MIC's) and times (0, 1, 2, 3 and 4 h) of exposure to the BE (Figure 3). The results show that the concentration of 1 MIC (0.19 mg mL⁻¹), 2 MIC (0.38 mg mL⁻¹) and 3 MIC (0.57 mg mL⁻¹) inhibited the germination and

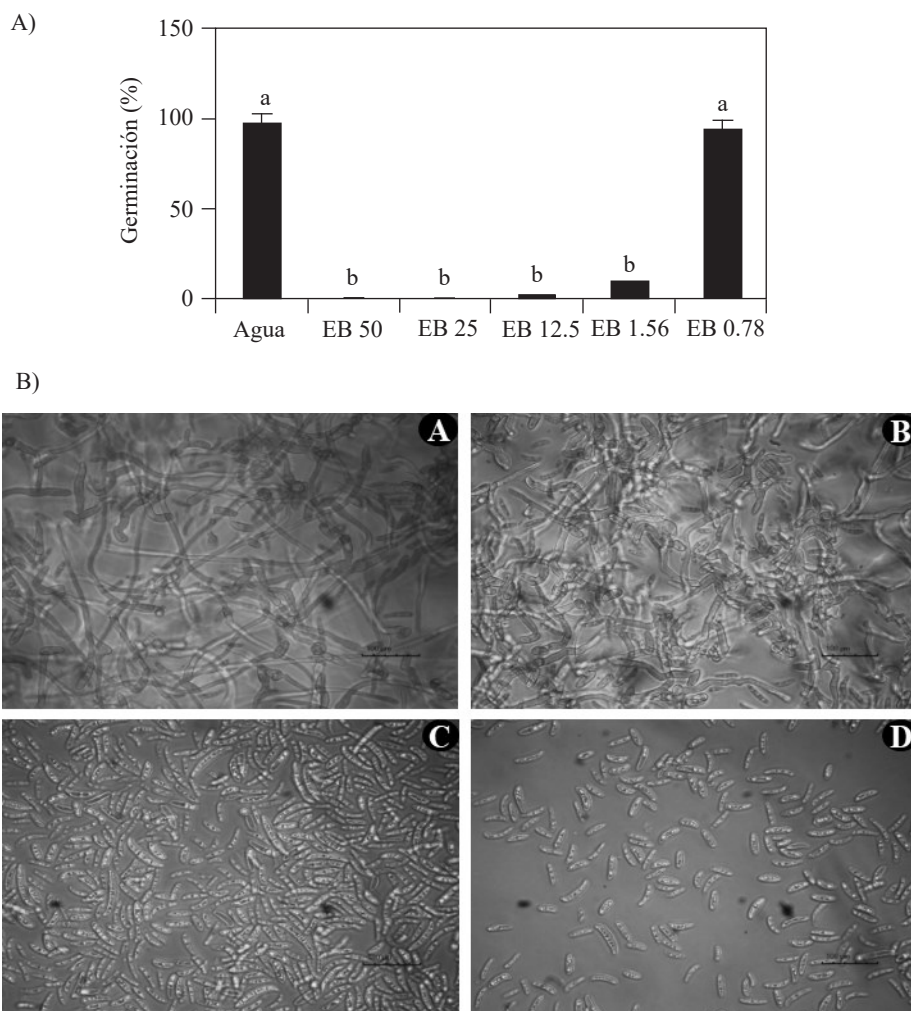


Figura 2. Efecto del extracto bioactivo (EB) sobre la germinación de conidios de *F. oxysporum*. 2A) Porcentaje de germinación de conidios después de 8 h de tratamiento con cinco concentraciones de EB de *Streptomyces* sp., GCAL-9. Columnas con la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de LSD ($p \leq 0.05$); 2B) La germinación de los conidios de *F. oxysporum* en agua como control A), fue similar a la que ocurrió al 0.78% B) del EB, mientras que concentraciones como 25% C) y 12.5% D) inhibieron el 100% la germinación de los conidios del hongo.

Figure 2. Effect of the bioactive extract (BE) on the germination of *F. oxysporum* conidia. 2A) Percentage of germination of conidia after 8 h of treatment with five concentrations of BE of *Streptomyces* sp., GCAL-9. Columns with the same letter are not statistically different, according to the LSD test ($p \leq 0.05$); 2B) Germination of the *F. oxysporum* conidia in water as a control A), was similar to the one that took place in 0.78% B) of the EB, while concentrations such as 25% C) and 12.5% D) inhibited the germination of the fungal conidia by 100%.

la concentración del EB, se presenta una reducción en el tamaño de los conidios, un cambio de la forma alargada de los macroconidios a redondeada e hinchada, formación excesiva de vacuolas en el

growth of the mycelia of the fungus after on hour of being in contact with the BE of GCAL-9, and this effect was observed for the three days in which the subcultures were kept at 29 °C. Meanwhile,

citoplasma, dejan de ser evidentes los septos, y formación excesiva de vacuolas. Estas características se han observado en otros trabajos (Cordova-Albore *et al.*, 2016), en particular en la evaluación del aceite de *Jatropha curcas* y algunos aceites derivados sobre la germinación en conidios de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*; los autores reportaron algunos efectos morfológicos en los conidios como bordes irregulares, hinchados, poca o nula presencia de organelos, y en los conidios germinados se presentó poco crecimiento de hifas y aparición de un número elevado de vacuolas en el citoplasma.

Otros autores reportaron que, compuestos extracelulares de *Streptomyces blastomyceticus* afectan la germinación de conidios de *Colletotrichum acutatum* y *F. oxysporum*, destacando efectos sobre la permeabilidad de la membrana de los conidios, además de cambios en su morfología con una reducción de su tamaño y presencia de una superficie arrugada en los conidios e hifas, en comparación a la superficie lisa de los conidios no expuestos a los compuestos (Kim *et al.*, 2019).

El tiempo óptimo del efecto fungicida del EB se determinó evaluando durante tres días la capacidad de germinación de los conidios y crecimiento del micelio de *F. oxysporum* después de estar expuesto a diferentes concentraciones (1, 2 y 3 MIC's) y tiempos (0, 1, 2, 3 y 4 h) de exposición al EB (Figura 3). Los resultados muestran que la concentración de 1 MIC (0.19 mg mL⁻¹), 2 MIC (0.38 mg mL⁻¹) y 3 MIC (0.57 mg mL⁻¹) inhibieron la germinación y crecimiento de micelio del hongo con una hora de contacto con el EB de GCAL-9, este efecto se observó durante los tres días en los que se mantuvieron los subcultivos en condiciones de 29 °C. Mientras que el Carbendazim a la dosis evaluada (72.8 mg mL⁻¹), permitió la reactivación del conidio y, por tanto, el crecimiento del micelio al ser transferidos a medio PDA (Figura 3). Estos resultados confirman el potencial antimicrobiano de los

the Carbendazim in the evaluated doses (72.8 mg mL⁻¹) helped reactivate the conidia and, therefore, the growth of the mycelia when transferred to the PDA medium (Figure 3). These results confirm the antimicrobial potential of the extracellular compounds released by the strain of *Streptomyces* sp. GCAL-9. On the other hand, they differ from the report by Albuquerque and Gusqui (2018), who mention that Carbendazim was 100% effective to inhibit the development of *F. oxysporum* 72 h after the treatment under *in vitro* conditions.

Control of rot in corms with the BE. The corms inoculated with *F. oxysporum* and protected with different concentrations of bioactive extracts did not show any differences in external symptoms in relation with the corms protected with Carbendazim the first 20 days after inoculation. On the other hand, the inoculated and unprotected corms displayed slight external symptoms, such as small dark brown spots in the inoculated areas, with creamy-white mycelia: These symptoms are similar to those reported for corm rot by *Fusarium* sp. (Pedroza *et al.*, 2019; González-Pérez *et al.*, 2009). Cuts of the inoculated rots displayed that the dark brown spot moved and expanded inside the corm (Figure 1). This suggests that there are differences between treatments after 15 days, but its estimation requires alternative methods to the symptom record used (González-Pérez *et al.*, 2009).

Measurements of firmness taken with the Shimadzu digital texturometer showed that the corms inoculated with *F. oxysporum* and protected with the *Streptomyces* sp. G-CAL9 bioactive extract at 0.19 and 0.38 mg mL⁻¹ were initially similar to the firmness of the control corms in the first 10 days after the treatment. However, the firmness of the corms treated with EB 15 (2MIC) and 20 days (1 MIC) after the treatment was greater in comparison with the controls treated with water and commercial

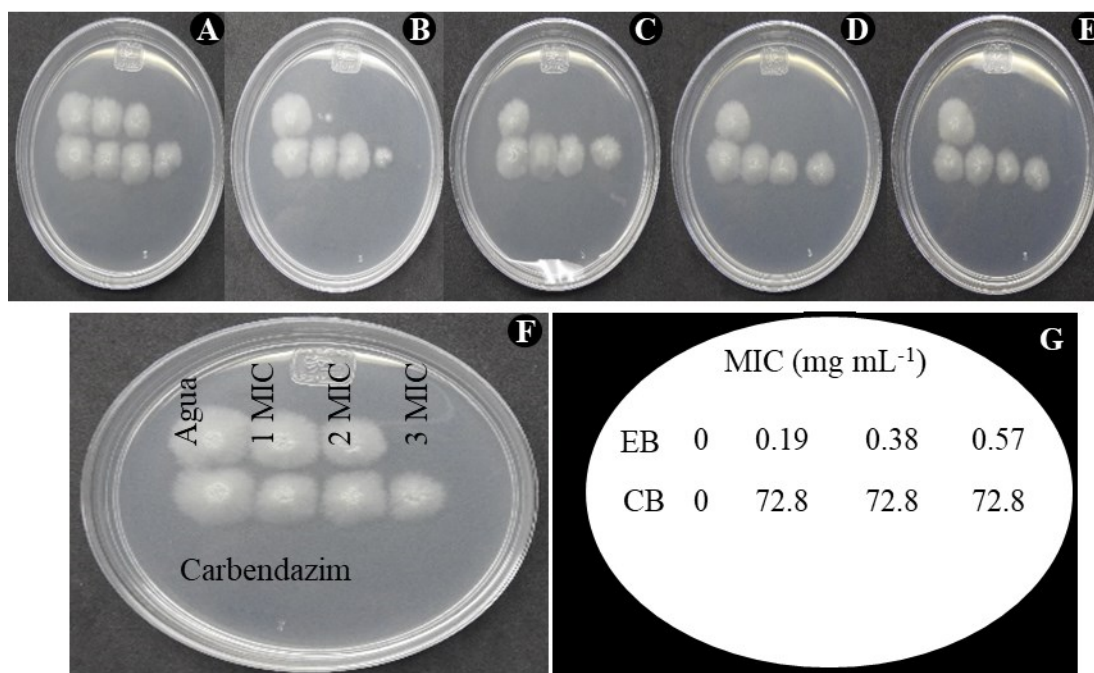


Figura 3. Tiempo óptimo del efecto fungicida del EB de *Streptomyces* sp., GCAL-9. Crecimiento micelial en caja Petri con medio PDA después de tres días de subcultivo de la solución de conidios de *F. oxysporum* proveniente de la microdilución en placa con el EB a 1, 2 y 3 MICs F y G), después de 0 A), 1 B), 2 C), 3 D) y 4 E) horas de tratamiento con el EB.

Figure 3. Optimum time for the effect fungicidal of the BE of *Streptomyces* sp., GCAL-9. Mycelial growth in a Petri dish with a PDA medium after three days of subculture of the solution of *F. oxysporum* conidia from the microdilution on a plate with BE at 1, 2 and 3 MICs F and G), after 0 A), 1 B), 2 C), 3 D) and 4 E) hours in treatment with the BE.

compuestos extracelulares liberados por la cepa de *Streptomyces* sp. GCAL-9. Por otra parte, difieren del reporte de Alburquerque y Gusqui (2018), quienes mencionan que Carbendazim fue 100% efectivo para inhibir el desarrollo de *F. oxysporum* a las 72 h después del tratamiento bajo condiciones *in vitro*.

Control de la pudrición en cormos con el EB.

Los cormos inoculados con *F. oxysporum* y protegidos con diferentes concentraciones de extracto bioactivo, no mostraron diferencias en síntomas externos con relación a cormos protegidos con Carbendazim, los primeros 20 días después de la inoculación. Por otro lado, cormos inoculados y sin ninguna protección, presentaron ligeros síntomas

fungicide ($p \leq 0.05$) (Figure 4), suggesting that the BE protected the corms from deterioration of the corms caused by the development of the pathogen inoculated (González-Pérez *et al.*, 2009). The differences observed regarding the effectiveness in time of both concentrations of the BE may be due to factors such as differences in absorption, permanence and translocation of the BE, also influenced by differences in the surfaces of the corms used, as described by Mirabent (2012) as the main factors that exert an influence on the efficiency of the fungicides. Taking this into account, future evaluations will have to consider the use of coadjuvants that improve absorption, adherence, mobility, and therefore the efficiency of the BE.

externos, tales como pequeñas manchas café oscuras en los sitios inoculados, con presencia de micelio blanco cremoso, estos síntomas son similares a los reportados para la pudrición del cormo por *Fusarium* sp. (Pedroza *et al.*, 2019; González-Pérez *et al.*, 2009). Cortes de los cormos inoculados mostraron que la mancha café oscuro avanzó y extendió en el interior del cormo (Figura 1). Lo anterior sugiere que existen diferencias entre tratamientos después de 15 días, pero su estimación requiere de métodos alternativos al registro sintomatológico utilizado (González-Pérez *et al.*, 2009).

La dureza medida con el texturómetro digital Shimadzu, mostró que los cormos inoculados con *F. oxysporum* y protegidos con el extracto bioactivo de *Streptomyces* sp. G-CAL9 a 0.19 y 0.38 mg mL⁻¹, fueron inicialmente similares con la dureza de los cormos control en los primeros 10 días después del tratamiento. Sin embargo, la firmeza de los cormos tratados con EB 15 (2MIC) y 20 días (1 MIC) después del tratamiento fue mayor con relación a los controles tratados con agua y fungicida comercial ($p \leq 0.05$) (Figura 4), sugiriendo que el EB protegió el deterioro de los cormos debidos al desarrollo del patógeno inoculado (González-Pérez *et al.*, 2009). Las diferencias observadas respecto a la efectividad en el tiempo de las dos concentraciones del EB probablemente se deban a factores tales como diferencias en la absorción, permanencia y translocación del EB, influenciada además por diferencias superficiales en los cormos utilizados, según lo describe Mirabent (2012) como los principales factores que influyen en la eficacia de los fungicidas. Tomando en cuenta lo anterior, evaluaciones futuras deberán considerar el uso de coadyuvantes que mejoren la absorción, adherencia, movilidad y por ende la eficacia del EB.

Por otro lado, los cormos tratados con el fungicida comercial a base de Carbendazim presentaron una dureza similar a la que presentaron los cormos

On the other hand, the corms treated with the commercial Carbendazim-based fungicide displayed a similar firmness to that presented by the corms in the control treatment, suggesting that the commercial fungicide in the dose applied in the present study did not hinder the development of the fungus in the inoculated corms, since Carbendazim has an effect on the germination of the fungal conidia by inhibiting the assembly of the Beta-tubulin in mitosis and inhibiting the formation of the appressorium, the development of the mycelia of fungi (FRAC, 2019) as verified in the inhibition trials in microplates.

CONCLUSIONS

The study proved the antifungal potential of the bioactive extract obtained by fermentation in a solid phase of the strain of *Streptomyces* sp. GCAL-9, by inhibiting the total germination of conidia and the mycelial growth of *F. oxysporum* at a dose of 0.19 and 0.38 mg mL⁻¹, and due to its protective effect, since it maintained the firmness of gladiolus corms inoculated with conidia of the fungus for 15 and 20 days, under controlled *in vivo* conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the project “Desarrollo de un producto con metabolitos bioactivos producidos por bacterias *Streptomyces* para el control biológico de hongos patógenos que afectan frutos tropicales en la etapa de postcosecha” (Development of a product with bioactive metabolites produced by *Streptomyces* bacteria for the biological control of pathogenic fungi that affect tropical fruits in the postharvest stage). To the CONACYT FOINS-Problemas Nacionales NO. 2016-2900 fund for financing the article.

To the CONACYT through the scholarship for postgraduate studies granted to Tania Ameyally Rios Hernández for the

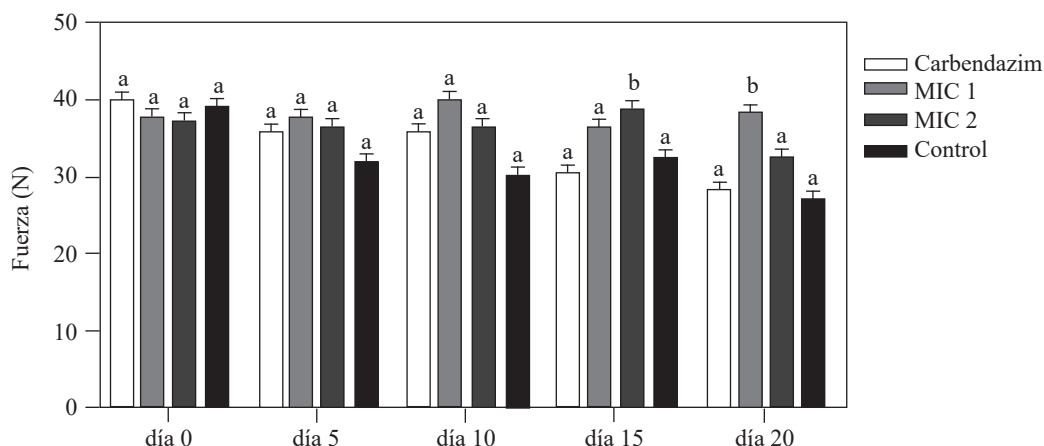


Figura 4. Firmeza de cormos de gladiolo inoculados experimentalmente con una solución de 5 μL de conidios de *F. oxysporum* a 2×10^6 conidios mL^{-1} y protegidos con EB de *Streptomyces* sp., GCAL-9 con uno (0.19 mg mL^{-1}) y dos (0.38 mg mL^{-1}) veces la concentración MIC; registrados a los 0, 5, 10, 15 y 20 días después de la inoculación con un texturómetro digital Shimadzu. Los controles del ensayo fueron, cormos inoculados con el hongo y protegidos con carbendazim a 72.8 mg mL^{-1} y agua. Columnas con la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Figure 4. Firmness of gladiolus corms experimentally inoculated with a solution of 5 μL of *F. oxysporum* conidia at 2×10^6 conidia mL^{-1} and protected with *Streptomyces* sp., GCAL-9 BE with one (0.19 mg mL^{-1}) and two (0.38 mg mL^{-1}) times the MIC concentration; registered 0, 5, 10, 15 and 20 days after inoculation with a Shimadzu digital texturometer. The test controls were corms inoculated with the fungus and protected with carbendazim at 72.8 mg mL^{-1} and water. Columns with the same letter are not significantly different, according to Tukey's test ($p \leq 0.05$).

del tratamiento control, sugiriendo que el fungicida comercial a la dosis aplicada en este trabajo, no impidió el desarrollo del hongo en los cormos inoculados, ya que el Carbendazim tiene un efecto sobre la germinación de conidios de los hongos al inhibir el ensamblaje de la Beta-tubulina en la mitosis e inhibir la formación del apresorio, el crecimiento y desarrollo del micelio de los hongos (FRAC, 2019) tal como se corroboró en los ensayos de inhibición en microplaca.

CONCLUSIONES

El estudio demostró el potencial antifúngico del extracto bioactivo obtenido por fermentación en fase sólida de la cepa de *Streptomyces* sp. GCAL-9, al inhibir la germinación total de conidios y el

study of her Master's Degree in Floriculture Science in the CIATEJ of the Southeast.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

crecimiento micelial de *F. oxysporum* a una dosis de  $0.19$  y  $0.38 \text{ mg mL}^{-1}$ , y por su efecto protector, al mantener durante 15 y 20 días la firmeza de cormos de gladiolo inoculados con conidios del hongo, bajo condiciones controladas *in vivo*.

## AGRADECIMIENTOS

Al proyecto "Desarrollo de un producto con metabolitos bioactivos producidos por bacterias *Streptomyces* para el control biológico de hongos patógenos que afectan frutos tropicales en la etapa de postcosecha". Fondo CONACYT FOINS-Problemas Nacionales NO. 2016-2900. Por financiar el artículo.

Al CONACYT través de la Beca de posgrado otorgado a Tania Ameyally Ríos Hernández para sus estudios de Maestría en Ciencias de la Floricultura en el CIATEJ subsele Sureste.

## LITERATURA CITADA

- Alizadeh M, Vasebi Y and Safaie N. 2020. Microbial antagonists against plant pathogens in Iran: A review. *Open Agriculture* 5(1): 404-440. <https://doi.org/10.1515/opag-2020-0031>
- Al-Hatmi AMS, de Hoog GS and Meis JF. 2019. Multiresistant *Fusarium* pathogens on plants and humans: solutions in (from) the antifungal pipeline? *Infection and drug resistance* 12: 3727-3737. <https://doi.org/10.2147/IDR.S180912>
- Alburquerque D y Gusqui R. 2018. Eficacia de fungicidas químicos para el control *in vitro* de diferentes fitopatógenos en condiciones controladas. *Arnaldoa* 25(2): 489-498. <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.252.25209>
- Barua P, You MP, Bayliss K, Lanoiselet V and Barbetti MJ. 2017. A rapid and miniaturized system using Alamar blue to assess fungal spore viability: implications for biosecurity. *European journal of plant pathology* 148:139-150. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1077-5>
- Betancourt-Resendes I, Velázquez-Monreal JJ, Montero-Castro JC, Fernández-Pavía SP, Lozoya-Saldaña H y Rodríguez-Alvarado G. 2012. *Fusarium mexicanum* Agente causal de la malformación del mango en Jalisco, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:115-127. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61230188002>
- Cordova-Albores LC, Zapotitla ES, Ríos MY, Barrera-Necha LL, Hernández-Lopez M y Bautista-Baños S. 2016. Microscopic study of the morphology and metabolic activity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* treated with *Jatropha curcas* oil and derivatives. *Journal of Microscopy and ultrastructure* 4: 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.jmau.2015.10.004>
- CLSI. 2017. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 27th ed. CLSI supplement M100. Clinical and laboratory standards institute; Wayne, Pennsylvania USA. 282p. <http://file.qums.ac.ir/repository/mmrc/clsi%202017.pdf>
- Danial AM, Medina A, Sulyok M and Magan N. 2020. Efficacy of metabolites of a *Streptomyces* strain (AS1) to control growth and mycotoxin production by *Penicillium verrucosum*, *Fusarium verticillioides* and *Aspergillus fumigatus* in culture. *Mycotoxin Research* 36: 225-234. <https://doi.org/10.1007/s12550-020-00388-7>
- Dikhoba P, Mongalo N, Elgorashi and Makhafola T. 2019. Antifungal and anti-mycotoxigenic activity of select South African medicinal plant species. *Heliyon* 5(10): <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02668>
- Elmer WH and Kamo KK. 2018. Diseases of *Gladiolus*. Pp. 1289-1311 *In*: McGovern R., Elmer W. (eds) *Handbook of Florists' Crops Diseases*. *Handbook of Plant Disease Management*. Springer, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-39670-5-47>
- Evangelista-Martínez Z. 2014. Isolation and characterization of soil *Streptomyces* species as potential biological control agents against fungal plant pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30(5):1639-1647. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1568-x>
- Evangelista-Martínez Z, Contreras-Leal EA, Corona-Pedraza LF and Gastelum-Martínez E. 2020. Biocontrol potential of *Streptomyces* sp. CACIS-1.5CA against phytopathogenic fungi causing postharvest fruit diseases. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 30: 117. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00319-9>
- FRAC. 2019. FRAC Clasificación de fungicidas y bactericidas según el modo de acción. Primera edición, España. <https://www.syngenta.es/sites/g/files/zhg516/f/2019/04/clasificacion-fungicidas-bactericidas-segun-modo-accion.pdf>
- González-Pérez E, Yáñez-Morales MJ, Ortega-Escobar HM and Velázquez-Mendoza J. 2009. Comparative analysis among pathogenic fungal species that cause gladiolus (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) corm rot in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 27(1): 45-52. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61211414006>
- Goredema N, Ndowora T, Shoko T and Ngadze E. 2020. *In vitro* suppression of pathogenic fungi by *Streptomyces* spp. *African crop science Journal* 28(2): 141-149. <https://doi.org/10.4314/acsj.v28i2.1>
- Hafizi R, Salleh B and Lattifah Z. 2013. Morphological and molecular characterization of *Fusarium solani* and *F. oxysporum* associated with crown disease of oil palm. *Brazilian Journal of Microbiology* 44(3): 959-968. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822013000300047>
- He M-H, Li D-L, Zhu W, Wu E-J, Yang L-N, Wang YP, Waheed A and Zhan J. 2017. Slow and temperature-mediated pathogen adaptation to a nonspecific fungicide in agricultural ecosystem. *Wiley Evolutionary Applications*. <https://doi.org/10.1111/eva.12526>
- Herkert P, Al-Hatmi A, Salvador G, Muro M, Pinheiro R, Nucchi M, Queiros-Telles F, Hoog G. and Meis J. 2019. Molecular characterization and antifungal susceptibility of clinical *Fusarium oxysporum* species from Brazil. *Frontiers in Microbiology* 10: 737. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00737>
- Hima-Bindu BSSN, Muvva V, Munaganti RK, Naragani K, Konda S and Dorigondla KR. 2017. Production of antimicrobial metabolites by *Streptomyces lavendulicolor* VHB-9 Isolated from Granite Mines. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 60: <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2017160385>
- Khan MR, Shahid S, Mohidin FA and Mustafa U. 2017. Interaction of *Fusarium oxysporum* and *Meloidogyne incognita* on gladiolus cultivars and its management through corm treatment with biopesticides and pesticides. *Biological Control* 115: 95-104. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.09.010>
- Leslie JF, Summerell BA and Bullock S. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. First edition. Ed. Blackwell Publishing Iowa, USA. 388p. <https://doi.org/10.1002/9780470278376>
- Marx-Stoelting P, Knebel C and Braeuning A. 2020. The connection of Azole fungicides with xeno-sensing nuclear receptors, drug metabolism and hepatotoxicity. *Cells* 9(5): 1192. <https://doi.org/10.3390/cells9051192>

- Michel-Aceves AC, Ariza-Flores R, Otero-Sánchez MO, Barrios-Ayala A y Quiroz-Millán AM. 2014. Efectividad *in vitro* e *in situ* de fungicidas químicos y biológicos en el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* y *Uromyces transversalis* en gladiola. AP Agroproductividad 7: 3-11. <https://core.ac.uk/download/pdf/249320317.pdf>
- Mirabent R. 2012. Adyuvantes para Fungicidas. Phytoma España: La Revista profesional de Sanidad Vegetal 240: 64-65. [https://www.phytoma.com/images/240empresasfungicidas\\_croda.pdf](https://www.phytoma.com/images/240empresasfungicidas_croda.pdf)
- Morales-Pérez AA, Franco-Mora O, Castañeda-Vildozola A and Morales-Rosales EJ. 2014. The anti-senescence effect of resveratrol reduces postharvest softening rate in chirimoya fruit. Scientia Agropecuaria 5: 35-44. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2014.01.04>
- Nguyen PA, Strub C, Lagrée M, Bertrand-Michel J, Schorr-Galindo S and Fontana A. 2020. Study of *in vitro* interaction between *Fusarium verticillioides* and *Streptomyces* sp. using metabolomics. Folia Microbiológica 65: 303-314. <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00725-z>
- O'Donell K and Cigelnik E. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS<sub>2</sub> types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. Molecular phylogenetics and Evolution 7(1): 103-16. <https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0376>
- Pedroza RR, Ribeiro WS, Silva SM, Finger FL, Zanuncio JC, Correa EB, Fugate KK, Bezerra da Costa F and Araujo RH. 2019. Healing of *Gladiolus grandiflora* corms under refrigeration and *Fusarium oxysporum* infection. Plant Signaling & Behavior 14(10). <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1652520>
- Pérez-Rojas F, León-Quipe J y Galindo-Cabello N. 2015. Actinomicetos aislados del compost y su actividad antagonista a fitopatógenos de la papa (*Solanum tuberosum* spp. andigena Hawkes). Revista Mexicana de Fitopatología 33(2): 116-139. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61242145001>
- SIAP (Servicio de Información agrícola y pesquera), 2020. Anuario estadístico de la producción agrícola 2020. <https://www.gob.mx/siap>. Julio 2021
- Tlemsani M, Fortas Z, Dib S and 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)
- Uc-Varguez A, López-Puc G, Góngora-Canul C, Martínez-Sebastián M and Aguilera-Cauich EA. 2018. Spatio-temporal spread of foot rot (*Lasiodiplodia theobromae*) in *Jatropha curcas* L. plantations in Yucatán, México. European Journal plant pathology 150: 991-1000. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1338-y>
- Kim YJ, Kim JH and Rho JY. 2019. Antifungal activities of *Streptomyces blastmyceticus* strain 12-6 against plant pathogenic fungi. Mycobiology 47(3): 329-334. <https://doi.org/10.1080/12298093.2019.1635425>
- Shrestha U, Dee ME, Piya S, Ownley BH, and Butler DM. 2020. Soil inoculation with *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum* or *Streptomyces griseoviridis* prior to anaerobic soil disinfestation (ASD) does not increase ASD efficacy against *Sclerotium rolfsii* germination. Applied soil ecology 147: 103383. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103383>
- Zhang X, Wang H, Zhu W, Li W and Wang F. 2020. Transcriptome analysis reveals the effects of chinese chive (*Allium tuberosum* R.) extract on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* spore germination. Current Microbiology 77: 855-864. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01875-x>