

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA

**Evaluación antifúngica de actinobacterias asociadas a hormigas cortadoras de hojas
(*Acromyrmex spp.*) de la reserva natural Otongachi**

Disertación previa a la obtención del título de Microbiólogo

ANDRÉS FERNANDO GUERRERO ARÉVALO

Quito, 2023

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Microbiología del candidato Andrés Fernando Guerrero Arévalo ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Mtr. Jeniffer Yánez Altuna

Directora de la Disertación

Quito, Febrero 2023

DEDICATORIA

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi mamá Tania Arévalo por su apoyo incondicional en cada etapa de mi vida, por siempre motivarme a salir adelante y por ayudarme alcanzar mis metas y sueños. A mi hermano Joaquín por siempre estar a mi lado y sacarme una sonrisa cuando más lo necesitaba. A mi familia por siempre acompañarme y apoyarme en cada momento.

Agradezco a mi directora de tesis la Mtr. Jeniffer Yánez por sus orientaciones y enseñanzas durante toda la carrera universitaria, por su apoyo para realizar esta investigación y por su invaluable contribución a mi crecimiento académico y personal. Al Dr. Martín Marcial por compartir su conocimiento y consejos en el desarrollo de este estudio. Al Dr. David Donoso apasionado investigador de hormigas quien ha facilitado para que esta investigación pueda realizarse. A mis profesores, por ser una guía durante todo este tiempo y por inculcarme la atención al detalle, la perseverancia en la investigación y el amor a la microbiología y a la ciencia.

Agradezco a mis compañeros de microbiología y biología por su apoyo y amistad. Finalmente agradezco a Camila Rodríguez por su apoyo incondicional y aliento a lo largo de mi formación universitaria, especialmente en este estudio, de no ser por ella no me hubiera interesado tanto en las hormigas y este tema de investigación no habría salido a la luz.

TABLA DE CONTENIDOS

| | |
|--|----|
| Resumen | 1 |
| Introducción | 1 |
| Materiales y métodos | 2 |
| Recolección de muestras de hormigas y hongos fitopatógenos | 2 |
| Aislamiento y cultivo de actinobacterias..... | 2 |
| Ensayos de selección por tamizaje | 3 |
| Evaluación antifúngica | 3 |
| Caracterización morfológica..... | 3 |
| Identificación molecular y análisis filogenético de aislados | 3 |
| Análisis estadísticos..... | 4 |
| Resultados | 4 |
| Aislamiento y tamizaje preliminar de aislados actinobacterianos..... | 4 |
| Evaluación antifúngica | 5 |
| Caracterización morfológica..... | 6 |
| Identificación molecular y análisis filogenético | 6 |
| Discusión..... | 8 |
| Conclusión..... | 12 |
| Referencias | 12 |
| Declaraciones | 15 |
| Contribuciones de los autores..... | 15 |
| Financiación..... | 15 |
| Intereses contrapuestos | 15 |
| Aprobación ética..... | 15 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** **a** *Acromyrmex* spp. in situ. **b** *Acromyrmex* spp. observada en estereoscopio (Aumento total: 20x). **c** Actinobacterias aisladas en medios de cultivo selectivos. **d** Número de actinobacterias aisladas de cabeza, tórax y gáster de *Acromyrmex* spp.....4
- Figura 2.** **a** Controles del ensayo de selección por tamizaje. **b** Aislados actinobacterianos **1:** Ax6.1.1; **2:** Ax8.2.8; **3:** Ax8.2.4 y **4:** Ax9.2.2.1 frente a los hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea* OT05-03, *Phoma exigua* NJC2 y *Fusarium oxysporum* YC3.....5
- Figura 3.** Porcentajes de inhibición de actinobacterias frente a tres hongos fitopatógenos **a** *Fusarium oxysporum* YC3. **b** *Phoma exigua* NCJ2. **c** *Botrytis cinerea* OT05-03. Cada barra representa la media y error estándar de tres réplicas independientes.....6
- Figura 4.** **a** Características fenotípicas en medios ISP2 y ISP3 (anverso y reverso) de aislados Ax7.2.6 y Ax8.2.12. **b** Microcultivo de aislados Ax8.2.1 y Ax9.2.2.1, se observan hifas ramificadas organizadas en forma de cadenas largas rectas y onduladas (Aumento total: 1000x).....7
- Figura 5.** Resultados de la amplificación del gen ARNr 16S con los cebadores 27F' y 1492R' en un gel de agarosa al 0.8%. **Ld:** 1k *DNA Ladder* (Promega), **P:** Control positivo, **N:** Control negativo, **A1:** Producto amplificado por PCR del aislado Ax7.2.6, **A2:** Producto amplificado por PCR del aislado Ax8.2.1, **A3:** Producto amplificado por PCR del aislado Ax8.2.12, **A4:** Producto amplificado por PCR del aislado Ax9.2.2, **A5:** Producto amplificado por PCR del aislado Ax9.2.2.1.....8
- Figura 6.** Árbol filogenético basado en el análisis de *Neighbor-Joining* de la secuencia del gen ARNr 16S del aislado Ax7.2.6 y secuencias del gen ARNr 16S de actinobacterias de

bases de datos (GenBank y EzBioCloud). Los números en los nodos de las ramas indican los porcentajes *bootstrap* de 1000 réplicas. Las distancias evolutivas fueron calculadas mediante el método de Kimura de dos parámetros. Este análisis incluyó 13 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones ambiguas de cada par de secuencias. En el conjunto de datos final hubo un total de 371 posiciones.....9

Figura 7. Árbol filogenético basado en el análisis de *Neighbor-Joining* de la secuencia del gen ARNr 16S del aislado Ax8.2.1 y secuencias del gen ARNr 16S de actinobacterias de bases de datos (GenBank y EzBioCloud). Las ramas que corresponden a las particiones reproducidas en menos del 50% de las réplicas *bootstrap* están colapsadas. Los números en los nodos de las ramas indican los porcentajes *bootstrap* de 1000 réplicas. Las distancias evolutivas fueron calculadas mediante el método de Kimura de dos parámetros. Este análisis incluyó 13 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones ambiguas de cada par de secuencias. En el conjunto de datos final hubo un total de 840 posiciones.....10

Figura 8. Árbol filogenético basado en el análisis de *Neighbor-Joining* de la secuencia del gen ARNr 16S del aislado Ax8.2.12 y secuencias del gen ARNr 16S de actinobacterias de bases de datos (GenBank y EzBioCloud). Las ramas que corresponden a las particiones reproducidas en menos del 50% de las réplicas *bootstrap* están colapsadas. Los números en los nodos de las ramas indican los porcentajes *bootstrap* de 1000 réplicas. Las distancias evolutivas fueron calculadas mediante el método de Kimura de dos parámetros. Este análisis incluyó 13 secuencias de nucleótidos. En el conjunto de datos final hubo un total de 1333 posiciones.10

Figura 9. Árbol filogenético basado en el análisis de *Neighbor-Joining* de la secuencia del gen ARNr 16S del aislado Ax9.2.2 y secuencias del gen ARNr 16S de actinobacterias de

bases de datos (GenBank y EzBioCloud). Las ramas que corresponden a las particiones reproducidas en menos del 50% de las réplicas *bootstrap* están colapsadas. Los números en los nodos de las ramas indican los porcentajes *bootstrap* de 1000 réplicas. Las distancias evolutivas fueron calculadas mediante el método de Kimura de dos parámetros. Este análisis incluyó 13 secuencias de nucleótidos. En el conjunto de datos final hubo un total de 674 posiciones.....11

Figura 10. Árbol filogenético basado en el análisis de *Neighbor-Joining* de la secuencia del gen ARNr 16S del aislado Ax9.2.2.1 y secuencias del gen ARNr 16S de actinobacterias de bases de datos (GenBank y EzBioCloud). Las ramas que corresponden a las particiones reproducidas en menos del 50% de las réplicas *bootstrap* están colapsadas. Los números en los nodos de las ramas indican los porcentajes *bootstrap* de 1000 réplicas. Las distancias evolutivas fueron calculadas mediante el método de Kimura de dos parámetros. Este análisis incluyó 13 secuencias de nucleótidos. En el conjunto de datos final hubo un total de 755 posiciones.....11

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|---|
| Tabla 1. Características morfológicas de aislados actinobacterianos tras 21 días de incubación a 28°C en dos medios señalados por el <i>International Streptomyces Project</i> (ISP)..... | 7 |
|--|---|

MANUSCRITO PARA LA PUBLICACIÓN

Revista

Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology

Título

Evaluación antifúngica de actinobacterias asociadas a hormigas cortadoras de hojas (*Acromyrmex* spp.) de la reserva natural Otongachi

Autores

Andrés Fernando Guerrero Arévalo*, Jeniffer Marcela Yánez Altuna**, Martín Sebastián Marcial Coba***

Correo electrónico

*afguerrero@puce.edu.ec, **jyanez989@puce.edu.ec, ***msmarcial@puce.edu.ec

Dirección

Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico, Carrera de Microbiología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

El siguiente trabajo de investigación se presenta en el formato de la revista *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology* a partir de la siguiente página.

Directrices de presentación: <https://www.springer.com/journal/10482/submission-guidelines>

Evaluación antifúngica de actinobacterias asociadas a hormigas cortadoras de hojas (*Acromyrmex spp.*) de la reserva natural Otongachi

Andrés F. Guerrero^{1*}, Jeniffer Yáñez Altuna^{1†}, Martín Marcial Coba^{2†}

¹Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Escuela de Ciencias Biológicas, Quito, Ecuador

²Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Escuela de Ciencias Biológicas, Quito, Ecuador

*Autor corresponsal. E-mail: afguerrero@puce.edu.ec

Autores participantes: jyanez989@puce.edu.ec, msmarcial@puce.edu.ec

; †Estos autores contribuyeron de igual manera en este trabajo

Resumen

Las actinobacterias son una fuente de metabolitos bioactivos antifúngicos y su localización en la cutícula varía entre las especies de hormigas cortadoras de hojas. Los especímenes del género *Acromyrmex spp.* recolectados en el bosque de Otongachi permitieron el aislamiento de cinco cepas actinobacterianas con actividad antifúngica. A través de la caracterización morfológica y molecular se confirmó que dichos aislados pertenecen al género *Streptomyces*. Pese a la similitud entre las secuencias de los aislados con secuencias de especies existentes del género *Streptomyces* en bases de datos, no se logró discriminar a las cinco cepas actinobacterianas a nivel de especie. Por esta razón, se plantea necesario la implementación de estudios moleculares complementarios como las técnicas de tipificación basadas en el polimorfismo de genes de: mantenimiento y no codificantes con el fin de discriminar especies estrechamente relacionadas del género *Streptomyces*. Por otro lado, los porcentajes de inhibición obtenidos en la evaluación antifúngica, frente a *Fusarium oxysporum* y *Phoma exigua* variaron entre 52 y 70%, indicando la efectividad de los aislados actinobacterianos en enfrentamientos *in vitro*. Sin embargo, para *Botrytis cinerea* los efectos inhibitorios de los cinco aislados fueron poco eficientes en el antagonismo *in vitro*.

Palabras clave Actinobacteria · Hongos fitopatógenos · Hormigas cortadoras de hojas · Actividad antifúngica · Metabolitos bioactivos · Análisis filogenético

Agradecimientos Damos las gracias a David Donoso (Escuela Politécnica Nacional) por su ayuda en el muestreo de las hormigas cortadoras de hojas. Agradecemos a Giovanni Onore (Reserva Otongachi) por facilitar la reserva natural Otongachi como área de muestreo.

Introducción

La incidencia y la severidad de las enfermedades fúngicas en plantas han aumentado significativamente en las últimas décadas, en especial debido a las malas prácticas agrícolas y fluctuaciones climáticas. Los hongos patógenos de plantas destruyen alrededor del 30% de los productos agrícolas, lo que supone una cantidad de alimentos suficiente para alimentar a 600 millones de personas al año (Avery et al. 2019). Patógenos fúngicos como *Fusarium oxysporum*, *Phoma exigua* y *Botrytis cinerea* tienen un impacto económico desastroso en varios cultivos de importancia económica como la uva, fresa, tomate, papa, plátano, café, caña de azúcar, entre otros (Agrios 2012; Hua et al. 2018; Deb et al. 2020). El control eficaz de los hongos que debilitan la seguridad del suministro de alimentos es un objetivo socioeconómico importante (Avery et al. 2019). Pese a que, el uso de fungicidas es el método más popular y eficaz de protección frente a enfermedades fúngicas, la preocupación social por la seguridad de los alimentos alienta la búsqueda de métodos alternativos para el control de hongos fitopatógenos (Grzegorzczuk et al. 2015). En los últimos años, las actinobacterias filamentosas surgen como una alternativa prometedora para el tratamiento de las enfermedades en plantas (Sharma y Salwman 2018). Su gran diversidad e interacciones ecológicas con otros organismos las hace muy aplicables en el control biológico, debido a sus fuertes propiedades antimicrobianas (Solecka et al. 2012; Ebrahimi-Zarandi et al. 2022). De hecho, aproximadamente el 60% de insecticidas y herbicidas de origen natural reportados en

los últimos años tienen su origen en actinobacterias del género *Streptomyces* (Sharma y Salwman 2018). Las actinobacterias son una extensa gama de bacterias Gram positivas. Los miembros de este filo son ampliamente reconocidos por ser fuentes de metabolitos antimicrobianos, aislados generalmente de hábitats marinos y terrestres (Holmes et al. 2016; Mendes et al. 2013; Wang et al. 2020).

Con el objetivo de desarrollar nuevos agentes antimicrobianos, muchas empresas dirigen su búsqueda a nuevos entornos como los bosques tropicales, ambientes marinos y endosimbiontes microbianos asociados a plantas o animales (Jakubiec-Krzesniak et al. 2018; Mendes et al. 2013). Así, en la búsqueda de nuevos metabolitos antimicrobianos, la asociación entre actinobacterias y hormigas cortadoras de hojas sale a la luz como una fuente potencial de compuestos antifúngicos. Matarrita-Carranza et al. (2017) mencionan que, la asociación de Hymenoptera con endosimbiontes como las actinobacterias permiten mantener mecanismos de defensa contra patógenos, una razón de su éxito evolutivo. Las hormigas cortadoras de hojas se encuentran únicamente en el continente americano, especialmente en el neotrópico (Salazar et al. 2015). Los géneros más representativos de la tribu Attini de hormigas son *Acromyrmex* y *Atta*.

El aislamiento, la caracterización fenotípica y molecular de actinobacterias a partir de distintas especies de hormigas cortadoras de hojas ha permitido evaluar su actividad antifúngica frente a varios géneros de hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Curvularia lunata*, *Alternaria solani*, *Phytophthora infestans*, entre otros (Cao et al. 2017; Dalitz et al. 2017; Liu et al. 2019; Wang et al. 2020). Wang et al. (2020) señalan que, en sus estudios, del total de actinobacterias aisladas y evaluadas por su actividad antifúngica, alrededor del 52-53% presentaron actividad antagonista contra al menos uno de los hongos fitopatógenos evaluados. Además, existe evidencia de que las actinobacterias asociadas a insectos muestran actividad antifúngica significativamente mayor en comparación con las actinobacterias del suelo (Liu et al. 2019).

En Ecuador, los géneros de hormigas arriba mencionados están presentes en las provincias de Guayas, Loja, Napo, Orellana, Pichincha, Santo Domingo y Sucumbíos (Salazar et al. 2015). Particularmente, el bosque premontano del norte de los Andes es considerado como una de las regiones más biodiversas del planeta. La reserva natural Otongachi (00°08 49'S; 078°57 15'W, 850-m) alberga un bosque secundario húmedo premontano (Cañadas 1983), se encuentra en un rango altitudinal estacional entre 800 y 1800 m, con una temperatura media anual de 18 a 24°C y entre 1000 y 2000 mm de precipitación anual (Donoso y Ramón 2009). Este bosque es un refugio importante para la flora y fauna de la zona. En este contexto, el presente estudio se centró en el aislamiento de actinobacterias circulantes asociadas a *Acromyrmex* en la búsqueda de potenciales controladores biológicos de hongos fitopatógenos.

Materiales y métodos

Recolección de muestras de hormigas y hongos fitopatógenos

Las hormigas fueron recolectadas vivas utilizando guantes de nitrilo y pinzas entomológicas estériles en la reserva natural Otongachi, Pichincha, Ecuador. Los especímenes se almacenaron individualmente en microtubos de 1.5 ml estériles bajo refrigeración a 4°C durante cinco días. Las hormigas cortadoras de hojas fueron identificadas morfológicamente como *Acromyrmex* spp. de acuerdo con la “Guía De Identificación De Los Géneros De Hormigas Del Mundo” (Bolton 1994).

Tres patógenos fúngicos de plantas, *Fusarium oxysporum* YC3, *Phoma exigua* NJC2, y *Botrytis cinerea* OT05-03 fueron proporcionados por el Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, localizado en Quito–Ecuador.

Aislamiento y cultivo de actinobacterias

Según las pautas establecidas por Wang et al. (2020), cada una de las 10 hormigas recolectadas fueron enjuagadas dos veces para remover el suelo de la superficie y epífitos adherentes. Luego, en cada microtubo se introdujo una hormiga y se añadió 1.2 ml de agua estéril y se agitó en un vortex durante 30 segundos. Las suspensiones se transfirieron a microtubos estériles para su desinfección con etanol al 70% por un minuto. Se removió el etanol y las hormigas se enjuagaron tres veces con agua estéril. Después, se dividió el cuerpo de cada hormiga en cabeza, tórax y gáster. Cada segmento se separó en un microtubo con 1.2 ml de agua estéril y se suspendió en agitación a 180 rpm durante 30 minutos a 28°C.

Posteriormente, se inocularon 200 µl de cada una de las suspensiones obtenidas en medios de cultivo selectivos: Agar HV (Hayakawa y Nonomura, 1987) y Agar sintético de Gauze No. 1 (Atlas 2010). Para evitar el crecimiento de bacterias Gram negativas y hongos, se añadió gentamicina y nistatina a todos los medios. Las placas Petri se incubaron durante tres semanas a 28°C. Las colonias con morfología

característica de actinobacterias fueron luego transferidas a Agar Extracto de Malta-Levadura (ISP 2) y Agar Avena (ISP 3) e incubadas durante tres semanas a 28°C (Shirling y Gottlieb 1966).

Ensayos de selección por tamizaje

Las colonias actinobacterianas aisladas se enfrentaron a tres hongos fitopatógenos: *Fusarium oxysporum* YC3, *Phoma exigua* NJC2, y *Botrytis cinerea* OT05-03 mediante el método del disco de agar (Qi et al. 2019). En el centro de las cajas Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) se colocó un disco de 5 mm de diámetro de agar con micelio del hongo fitopatógeno objetivo. Asimismo, se colocaron cuatro discos de agar de cada aislado actinobacteriano en cuatro puntos simétricos a 26 mm del centro de la placa (Qi et al. 2019). Las cajas Petri fueron incubadas durante siete días a 20°C. En consecuencia, la ejecución de este ensayo permitió determinar los aislados que presentaron actividad antifúngica mediante la observación directa de las colonias actinobacterianas que redujeron el tamaño de la colonia del patógeno enfrentado.

Evaluación antifúngica

La actividad antagonica de los aislados actinobacterianos asociados a *Acromyrmex* spp. que presentaron actividad antifúngica se evaluó mediante bioensayos en placas de cultivo dual. Estos ensayos se realizaron por triplicado. Las actinobacterias se inocularon mediante punción en el margen de las cajas Petri y se incubaron durante tres días a 28°C. Luego, se transfirió un disco de 5 mm de agar PDA con micelio del hongo fitopatógeno al margen opuesto de la caja Petri y se incubaron a 20°C por siete días (Liu et al. 2019; Wang et al. 2020). Los controles fueron realizados colocando un disco de 5 mm de agar PDA con micelio del hongo fitopatógeno en el margen de la caja Petri.

Las tasas de inhibición se calcularon de acuerdo a la fórmula descrita por Liu et al. (2019):

$$\text{Tasa de inhibición (\%)} = W_i/W \times 100\%$$

donde W_i es el ancho de inhibición y W es el ancho entre el hongo fitopatógeno y la actinobacteria.

Caracterización morfológica

Los aislados se cultivaron en los medios ISP2 e ISP3 a 28°C por dos semanas (Wang et al. 2020). Preliminarmente, la identificación de estos fue orientada con base en las características fenotípicas de las colonias como color del micelio aéreo y del sustrato, y a la producción de pigmento difusible (Shirling y Gottlieb 1966). Por otro lado, las características microscópicas de las colonias bacterianas se evaluaron mediante la presencia/ausencia de cadenas de esporas, comparándolas con los criterios válidos indicados por Shirling y Gottlieb (1966). Para esto, se preparó un microcultivo en placas Petri con medio ISP3 y se colocaron cubreobjetos en un ángulo de 45°. A lo largo de la interfaz agar/cubreobjeto se dispensaron 5 μ l de dilución 1:100 de cultivo líquido y se incubó a 28°C durante siete días (ActinoBase 2020). Transcurrido un lapso de una semana, cuidadosamente se retiraron los cubreobjetos, se montaron en portaobjetos con solución de glicerol al 40% y se visualizaron en el microscopio compuesto a 1000x de aumento total.

Identificación molecular y análisis filogenético de aislados

El ADN genómico de las bacterias fue extraído utilizando el kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, Wisconsin, E.E.U.U.), con ligeras modificaciones, en este caso, la adición de nitrógeno líquido para incrementar la fragmentación del tejido durante la maceración previa a la utilización de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). El ADN extraído se cuantificó utilizando el espectrofotómetro de microvolumen de barrido nano Jenway 7415 (Cole-Parmer, USA). La amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) del gen ARNr 16S, fue realizada con los cebadores universales 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TCAGGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane 1991). Las condiciones de reacción fueron de 95°C durante cinco minutos, seguidos de 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 45 segundos y 72°C durante un minuto, con una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR se observaron en un gel de agarosa al 0.8% y se visualizaron en el transiluminador Safe Imager™ 2.0. Los productos obtenidos de la amplificación fueron secuenciados mediante el método de Sanger (Macrogen Inc., Seúl, Corea del Sur). Las secuencias obtenidas se editaron mediante el programa MEGA 11 (Tamura et al. 2021) y se compararon a través de la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) con las secuencias de la base de datos GenBank (NCBI) y la base de datos curada de secuencias del gen ARNr 16s EzBioCloud, para determinar el género y especie de los aislados bacterianos. Por otro lado, la relación genética entre los aislados se determinó mediante la creación de un árbol filogenético diseñado

en MEGA 11 de acuerdo con el método *Neighbor-Joining*, utilizando el modelo de sustitución Kimura de dos parámetros (Kimura 1980) con un valor de *bootstrap* de 1000 réplicas.

Análisis estadísticos

Las pruebas de antagonismo se organizaron en un diseño completamente al azar y, además, los datos fueron analizados mediante estadística descriptiva. El análisis de varianza (ANOVA) determinó la significancia de cada tratamiento con respecto a la inhibición del crecimiento micelial de cada fitopatógeno. Asimismo, la prueba de Tukey al 95% de confianza identificó diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tratamientos. Se utilizó el software estadístico IBM SPSS Statistics 26 para el análisis de los datos.

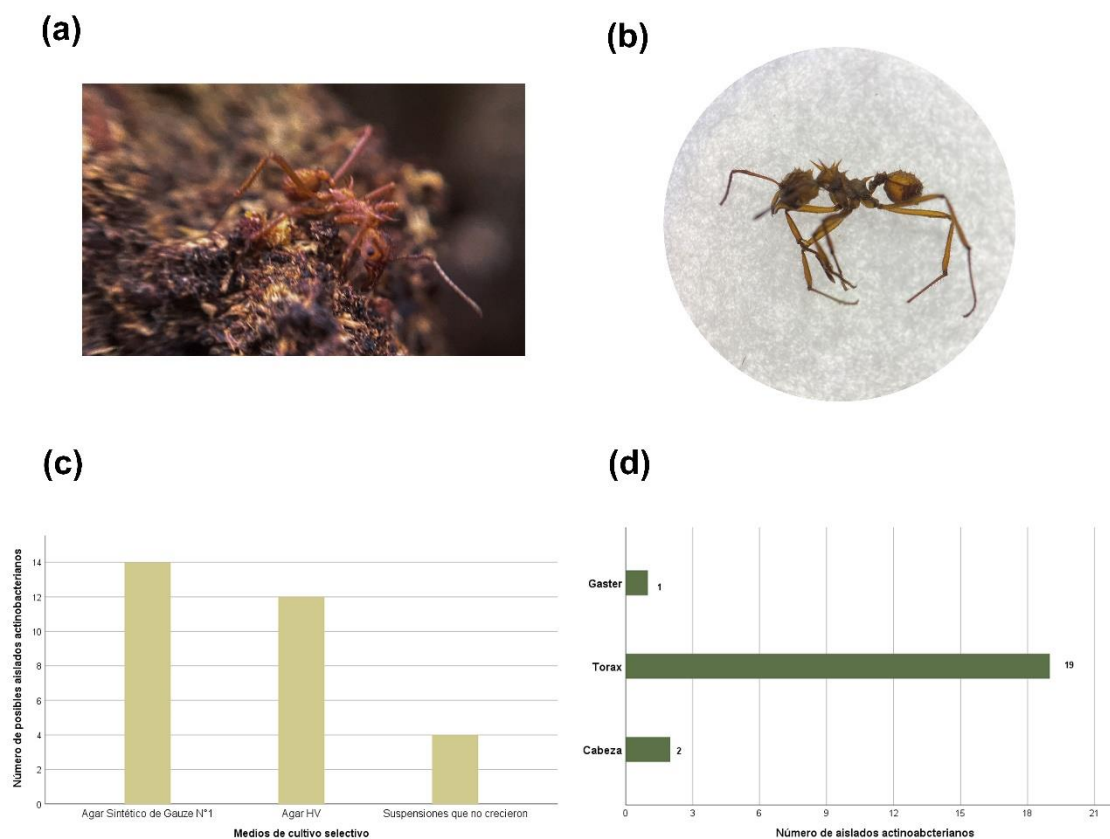


Fig. 1 a *Acromyrmex* spp. *in situ*. b *Acromyrmex* spp. observada en estereoscopio (Aumento total: 20x). c Actinobacterias aisladas en medios de cultivo selectivos. d Número de actinobacterias aisladas de cabeza, tórax y gáster de *Acromyrmex* spp.

Resultados

Aislamiento y tamizaje preliminar de aislados actinobacterianos

El medio selectivo Agar sintético de Gauze N°1 permitió el mayor número de aislamientos a partir de las 30 suspensiones iniciales en comparación con el medio selectivo Agar HV (*Humic Acid Vitamin Agar*) (Fig. 1c). La mayoría de aislados actinobacterianos se obtuvieron a partir de las muestras de tórax (19 aislados), seguido de los obtenidos de la cabeza (2 aislados) y del gáster (1 aislado) (Fig. 1d). En total se obtuvieron 22 aislados actinobacterianos asociados a *Acromyrmex* spp. (Fig. 1a y 1b).

Estos microorganismos fueron sometidos a un ensayo de tamizaje frente *Fusarium oxysporum* YC3, *Phoma exigua* NJC2, y *Botrytis cinerea* OT05-03 mediante el método del disco de agar (Fig. 2), obteniendo cinco aislados (23%) con actividad antifúngica, Ax7.2.6, Ax8.2.1, Ax8.2.12, Ax9.2.2 y Ax9.2.2.1.

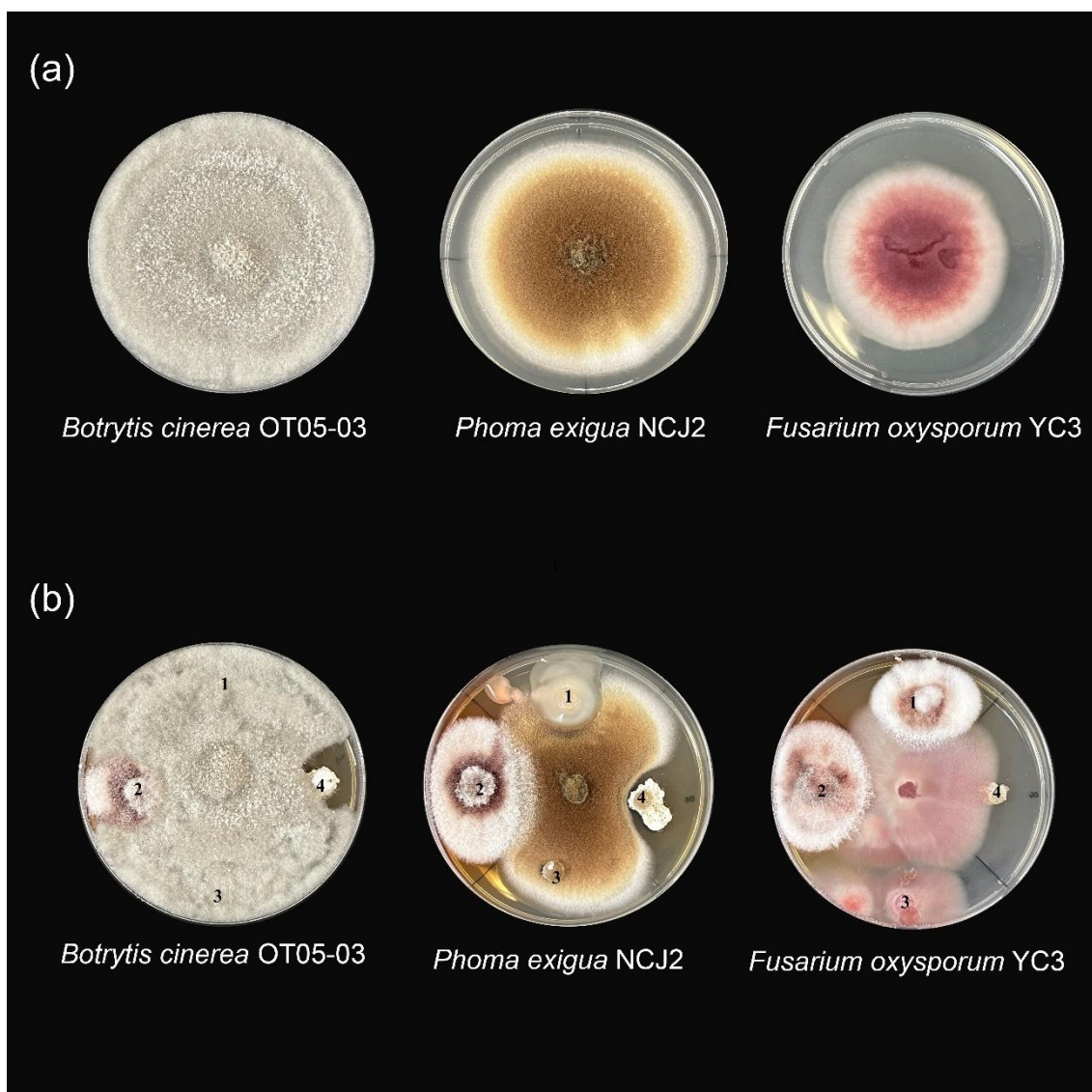


Fig. 2 a Controles del ensayo de selección por tamizaje. b Aislados actinobacterianos 1: Ax6.1.1; 2: Ax8.2.8; 3: Ax8.2.4 y 4: Ax9.2.2.1 frente a los hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea* OT05-03, *Phoma exigua* NCJ2 y *Fusarium oxysporum* YC3

Evaluación antifúngica

Del total de actinobacterias evaluadas por su actividad antifúngica frente a *Fusarium oxysporum*, el aislado Ax7.2.6 presentó el mayor porcentaje de inhibición 96,4%. Por otro lado, Ax8.2.1, Ax8.2.12, Ax9.2.2 y Ax9.2.2.1 presentaron 70,77%, 56,41%, 63,61% y 58,46% respectivamente. Los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas se verificaron y al analizar la varianza se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). La prueba de Tukey al 95% de confianza presentó tres grupos, grupo 1: Ax8.2.12, Ax9.2.2 y Ax9.2.2.1; grupo 2: Ax8.2.1 y Ax9.2.2 y grupo 3: Ax7.2.6.

Al analizar la varianza se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$) evaluados frente a *Phoma exigua*. Sin embargo, el aislado Ax8.2.1 presentó el mayor porcentaje de inhibición 64,10%, en comparación con el resto de aislados Ax7.2.6, Ax8.2.12, Ax9.2.2 y Ax9.2.2.1 que mostraron 62,56%, 52,31%, 53,85% y 62,56% respectivamente. La prueba de Tukey al 95% de confianza presentó tres grupos, grupo 1: Ax8.2.12, Ax9.2.2; grupo 2: Ax9.2.2, Ax7.2.6 y Ax9.2.2.1 y grupo 3: Ax7.2.6, Ax9.2.2.1 y Ax8.2.1. Para finalizar, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p = 0,238$) evaluados frente a *Botrytis cinerea*. No obstante, los porcentajes de inhibición obtenidos en estos tratamientos fueron los más bajos, siendo 11,79%, 19,49%, 29,74% y 33,33% respectivamente Ax8.2.1, Ax9.2.2.1, Ax9.2.2 y Ax7.2.6. El aislado Ax8.2.12 no presentó inhibición contra *Botrytis cinerea*.

El comportamiento de las medias y el error estándar de los porcentajes de inhibición de las actinobacterias frente a *Fusarium oxysporum* YC3, *Phoma exigua* NJC2 y *Botrytis cinerea* OT05-03 se observa en las figuras 3a,3b y 3c.

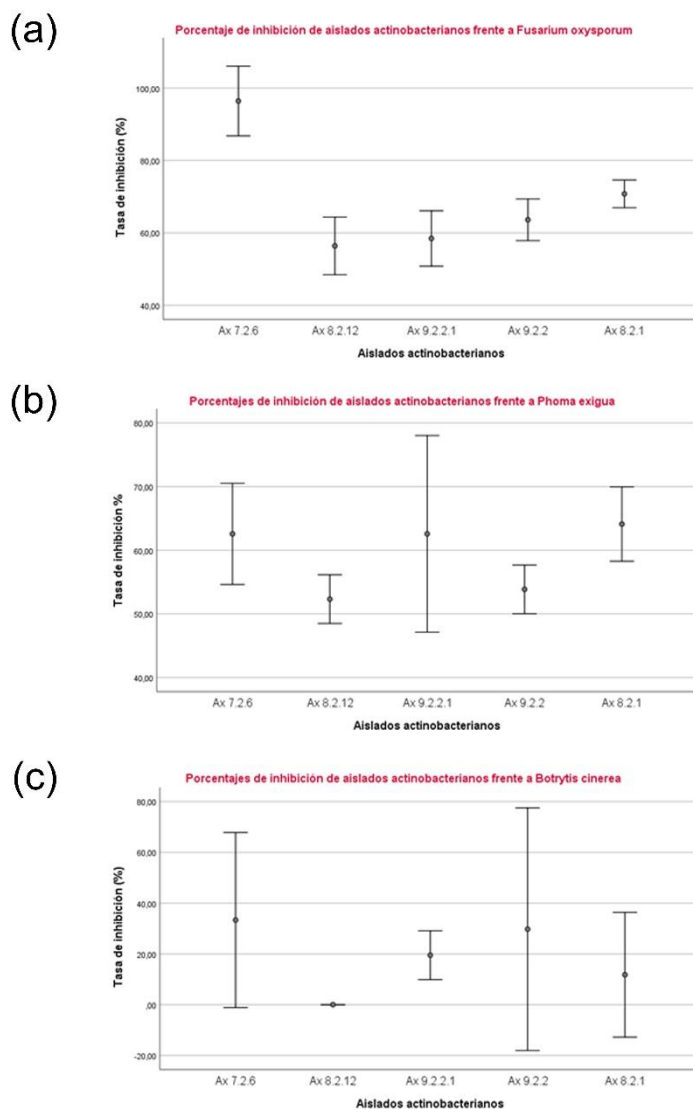


Fig. 3 Porcentajes de inhibición de actinobacterias frente a tres hongos fitopatógenos **a** *Fusarium oxysporum* YC3. **b** *Phoma exigua* NJC2. **c** *Botrytis cinerea* OT05-03. Cada barra representa la media y error estándar de tres repeticiones independientes

Caracterización morfológica

El tamaño de las colonias fue variable, presentando diámetros entre 2 mm y 5 mm. Los aislados presentaron colonias con micelio aéreo blanco grisáceo, blanco y crema verdoso (Tabla 1). Asimismo, presentaron micelio del sustrato de color café claro y crema. Por otro lado, gran parte de los aislados mostraron pigmentos difusibles de color amarillo anaranjado claro, anaranjado claro y amarillo claro (Fig. 4a). Las observaciones microscópicas mediante la técnica de microcultivo permitió observar hifas ramificadas organizadas en forma de cadenas largas rectas y onduladas (Fig. 4b). Las pruebas de caracterización fenotípica indican que todos los aislados pertenecen al género *Streptomyces*.

Identificación molecular y análisis filogenético

La amplificación del gen ARNr 16S mediante PCR evidenció la formación de bandas en gel de agarosa que luego de la electroforesis se ubicaron en una posición correspondientes a una longitud de ~1500 bp (Fig. 5). La edición y comparación de secuencias de los aislados Ax7.2.6, Ax8.2.1, Ax8.2.12, Ax9.2.2 y Ax9.2.2.1 a través de BLAST y EzBioCloud permitió identificarlos como miembros del género *Streptomyces*. La secuencia de nucleótidos del aislado Ax7.2.6 mostró un 98% de similitud con *Streptomyces daghestanicus* (número de acceso GenBank [DQ442497](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/DQ442497)). Por otra parte, el aislado Ax8.2.1 mostró un 99,05% de similitud con *Streptomyces lividans* (número de acceso GenBank [MK629802](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/MK629802)). En

cuanto al aislado Ax8.2.12, éste mostró un 99,56% de similitud con *Streptomyces californicus* (número de acceso GenBank [MT533919](#)). Asimismo, el aislado Ax9.2.2 mostró un 99,55% de similitud con *Streptomyces cyaneofuscatus* (número de acceso GenBank [KX507059](#)). Por último, el aislado Ax9.2.2.1 mostró un 99,07% de similitud con *Streptomyces flavogriseus* (número de acceso GenBank [MT355868](#)). El parentesco filogenético de los aislados con especies estrechamente relacionadas obtenidas por el método *neighbor joining* se muestra en la figura 6, figura 7, figura 8, figura 9 y figura 10.

Tabla 1 Características morfológicas de aislados actinobacterianos tras 21 días de incubación a 28°C en dos medios señalados por el *International Streptomyces Project* (ISP)

| Aislado | Medio | Pigmento difusible | Características de la colonia | Micelio aéreo | Micelio del sustrato |
|-----------|-------|---------------------------|-------------------------------|-----------------|----------------------|
| Ax7.2.6 | ISP2 | Amarillo-anaranjado claro | Áspera | Blanco grisáceo | Café claro |
| Ax8.2.1 | ISP2 | Anaranjado claro | Polvorienta | Blanco | Crema |
| Ax8.2.12 | ISP2 | Anaranjado claro | Polvorienta | Crema | Crema |
| Ax9.2.2 | ISP2 | Ninguno | Surcos radiales | Blanco | Crema |
| Ax9.2.2.1 | ISP2 | Amarillo-anaranjado claro | Polvorienta | Blanco | Crema |
| Ax7.2.6 | ISP3 | Amarillo claro | Áspera | Blanco | Crema |
| Ax8.2.1 | ISP3 | Anaranjado claro | Polvorienta | Blanco | Crema |
| Ax8.2.12 | ISP3 | Anaranjado claro | Polvorienta | Crema | Crema |
| Ax9.2.2 | ISP3 | Amarillo claro | Surcos radiales | Blanco | Crema |
| Ax9.2.2.1 | ISP3 | Ninguno | Polvorienta | Crema verdoso | Crema |

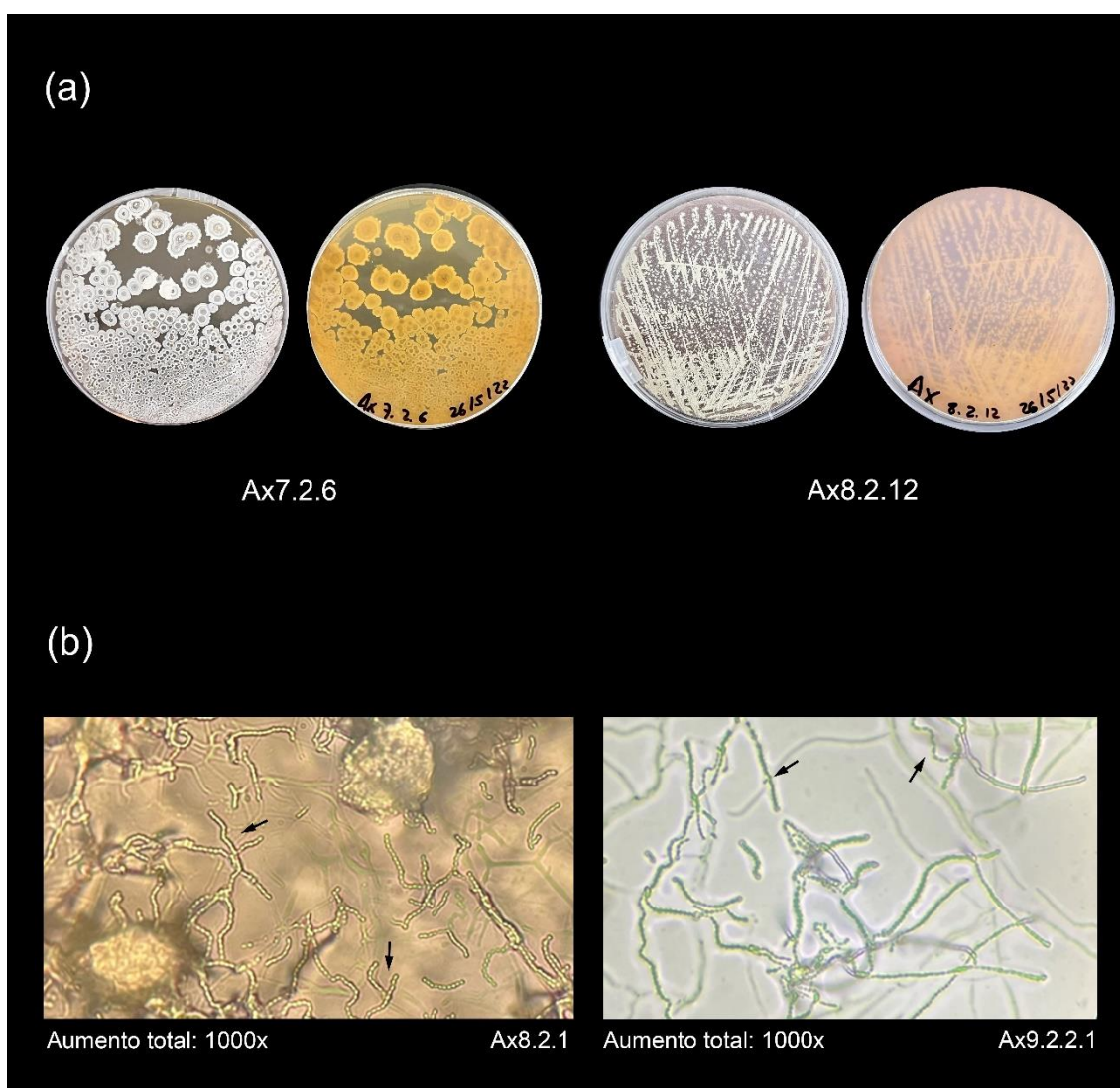


Fig. 4 a Características fenotípicas en medios ISP2 y ISP3 (anverso y reverso) de aislados Ax7.2.6 y Ax8.2.12. **b** Microcultivo de aislados Ax8.2.1 y Ax9.2.2.1, se observan hifas ramificadas organizadas en forma de cadenas largas rectas y onduladas (Aumento total: 1000x)

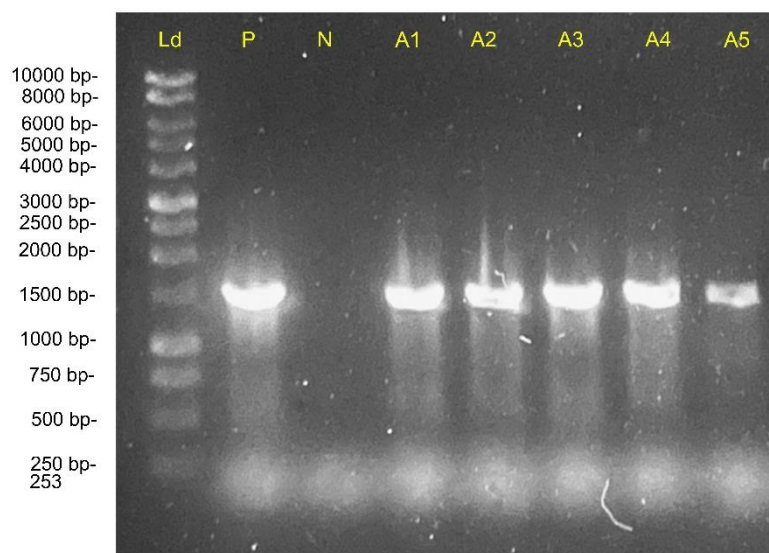


Fig. 5 Resultados de la amplificación del gen ARNr 16S con los cebadores 27F' y 1492R' en un gel de agarosa al 0.8%. **Ld:** 1k *DNA Ladder* (Promega), **P:** Control positivo, **N:** Control negativo, **A1:** Producto amplificado por PCR del aislado Ax7.2.6, **A2:** Producto amplificado por PCR del aislado Ax8.2.1, **A3:** Producto amplificado por PCR del aislado Ax8.2.12, **A4:** Producto amplificado por PCR del aislado Ax9.2.2, **A5:** Producto amplificado por PCR del aislado Ax9.2.2.1

Discusión

El segmento del tórax de las hormigas del género *Acromyrmex* fue el que permitió el mayor número de aislados en este estudio. Estos resultados se deben, a que la localización de las bacterias en la cutícula varía entre las especies de hormigas de la tribu Attini, ya que las actinobacterias viven en estructuras especializadas como las criptas cuticulares con glándulas exocrinas asociadas (Currie et al. 2006). Así pues, el papel de las secreciones antimicrobianas de las glándulas metapleurales, compleja estructura glandular exclusiva de las hormigas localizada en el metatórax sugiere un papel crítico en su éxito ecológico (Currie et al. 2006; Yek y Mueller 2010; Mattoso et al. 2012).

En este trabajo, se utilizaron cinco aislados actinobacterianos provenientes de hormigas cortadoras de hojas del género *Acromyrmex*, los cuales fueron probados como tratamientos frente a las cepas fúngicas descritas anteriormente. Los porcentajes de inhibición obtenidos con Ax7.2.6 (96,4%), Ax8.2.1 (70,77%), Ax8.2.12 (56,41%), Ax9.2.2 (63,61%) y Ax9.2.2.1(58,41%) frente a *Fusarium oxysporum* se relacionan con otros resultados reportados, en donde aislados pertenecientes al género *Streptomyces* mostraron actividad antagonista contra otras especies de *Fusarium*, la inhibición del crecimiento fúngico varió entre el 40% y 70% (Evangelista-Martínez 2014; Evangelista-Martínez et al. 2020; Rios-Hernández et al. 2021). En cuanto a los resultados obtenidos en los tratamientos frente a *Phoma exigua*, estos variaron entre 52% y 64%. Naik et al. (2009) obtuvieron resultados similares al enfrentar un aislado perteneciente al género *Streptomyces* frente a *Phoma sorghina*, consiguiendo un porcentaje de inhibición del 52.22%. Asimismo, resultados reportados de enfrentamientos entre cepas de *Streptomyces* indican la presencia de antagonismo fuerte, moderado y débil frente a distintas especies de *Phoma* (De Boer et al. 1998; Degtyareva et al. 2009; Rodríguez et al. 2018).

Por último, los resultados obtenidos en los tratamientos frente a *Botrytis cinerea* fueron los más bajos en comparación con los resultados conseguidos con *F. oxysporum* y *P. exigua*, presentando así porcentajes de inhibición menores al 34%. En contraste con resultados obtenidos por otros investigadores como Lahmyed et al. (2021) en donde cinco aislados actinobacterianos presentaron una actividad antagonista muy significativa oscilando entre 50% y 72%. Asimismo, tres cepas de *Streptomyces* spp. inhibieron el crecimiento micelial de 41 cepas de *B. cinerea* en un rango del 73% al 100% de inhibición (Boukaew et al. 2017). Por otra parte, en el estudio realizado por Jiang et al. (2021) la cepa *Streptomyces botrytidirepellens* sp. nov. mostró un fuerte efecto antagonista contra *B. cinerea* (82,6±2,5%), así como varios grados de inhibición sobre otros nueve hongos fitopatógenos.

La actividad antagonista de *Streptomyces* con hongos fitopatógenos ha sido descrita principalmente mediante tres mecanismos: antibiosis, parasitismo y la competencia por espacio y nutrientes. Este género es reconocido por la producción de una gran cantidad de metabolitos secundarios bioactivos, así como compuestos orgánicos volátiles y enzimas líticas, que actúan en la comunicación entre células y en la degradación de la pared celular (Gebily et al. 2021, Nah et al. 2021, Pacios-Michelena et al. 2021, Jepsen et al. 2022). Varios estudios indican que este género potencialmente podría producir más de 100.000 compuestos bioactivos adicionales a los producidos por el mismo género descrito hasta la actualidad (Watve et al. 2001). Por este motivo es imprescindible que se realicen estudios de caracterización e identificación de estos compuestos. Aunque la identificación de los metabolitos responsables del antagonismo *in vitro* no fue contemplada en esta investigación, estos hallazgos generan una nueva perspectiva para futuros estudios.

Todos los aislados participantes en los análisis de antagonismo *in vitro* fueron clasificados como pertenecientes al género *Streptomyces* al comparar las secuencias con las bases de datos de GenBank y EzBioCloud. Esto es coherente con la asignación según características morfológicas y culturales (Shirling y Gottlieb 1966). Pese a la similitud obtenida de los aislados Ax7.2.6 (98%) con *S. daghestanicus*, Ax8.2.1 (99,05%) con *S. lividans*, Ax8.2.12 (99,56%) con *S. californicus*, Ax9.2.2 (99,55%) con *S. cyaneofuscatus* y Ax9.2.2.1 (99,07%) con *S. flavogriseus*. Los valores de *bootstrap* generados por el algoritmo *neighbor joining* indican que los aislados no se distinguen de las especies estrechamente relacionadas utilizando el gen ARNr 16S. El análisis de la secuencia del gen ARNr 16S carece de suficiencia en la distinción entre especies estrechamente relacionadas dentro de los clados de *Streptomyces*, limitándose a la distinción de estreptomicetos ligeramente relacionados (Martens et al. 2008; Guo et al. 2008; Rong y Huang, 2010). Asimismo, Kämpfer (2006) y Rong y Xuang (2010) mencionan que las secuencias de ARNr no pueden utilizarse por sí solas, debido a la variación intraespecífica y a la heterogeneidad intragenómica, ocasionando dificultades para identificar diferencias fenotípicas significativas.

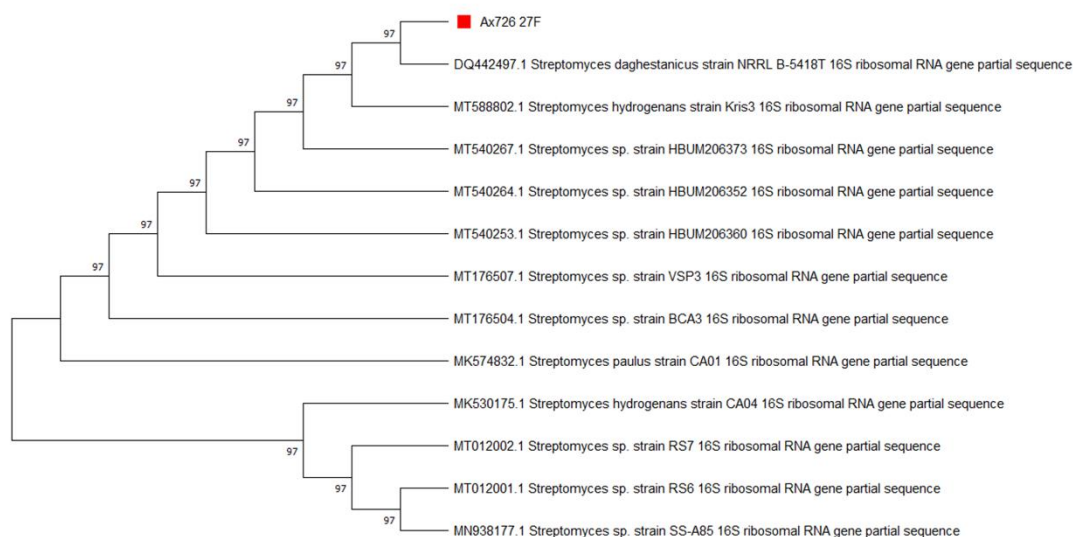


Fig. 6 Árbol filogenético basado en el análisis de *Neighbor-Joining* de la secuencia del gen ARNr 16S del aislado Ax7.2.6 y secuencias del gen ARNr 16S de actinobacterias de bases de datos (GenBank y EzBioCloud). Los números en los nodos de las ramas indican los porcentajes *bootstrap* de 1000 réplicas. Las distancias evolutivas fueron calculadas mediante el método de Kimura de dos parámetros. Este análisis incluyó 13 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones ambiguas de cada par de secuencias. En el conjunto de datos final hubo un total de 371 posiciones.

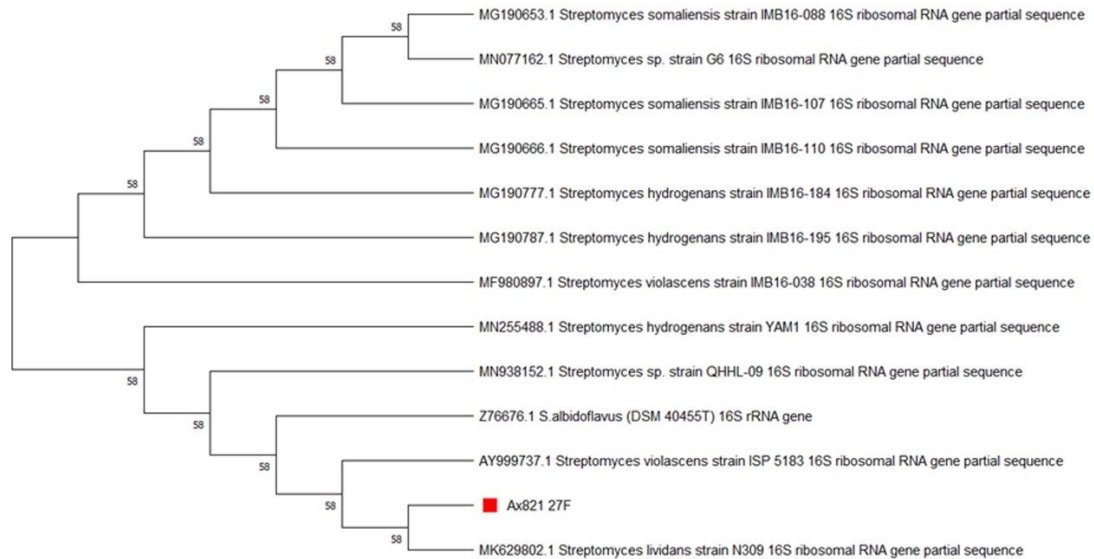


Fig. 7 Árbol filogenético basado en el análisis de *Neighbor-Joining* de la secuencia del gen ARNr 16S del aislado Ax8.2.1 y secuencias del gen ARNr 16S de actinobacterias de bases de datos (GenBank y EzBioCloud). Las ramas que corresponden a las particiones reproducidas en menos del 50% de las réplicas *bootstrap* están colapsadas. Los números en los nodos de las ramas indican los porcentajes *bootstrap* de 1000 réplicas. Las distancias evolutivas fueron calculadas mediante el método de Kimura de dos parámetros. Este análisis incluyó 13 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones ambiguas de cada par de secuencias. En el conjunto de datos final hubo un total de 840 posiciones.

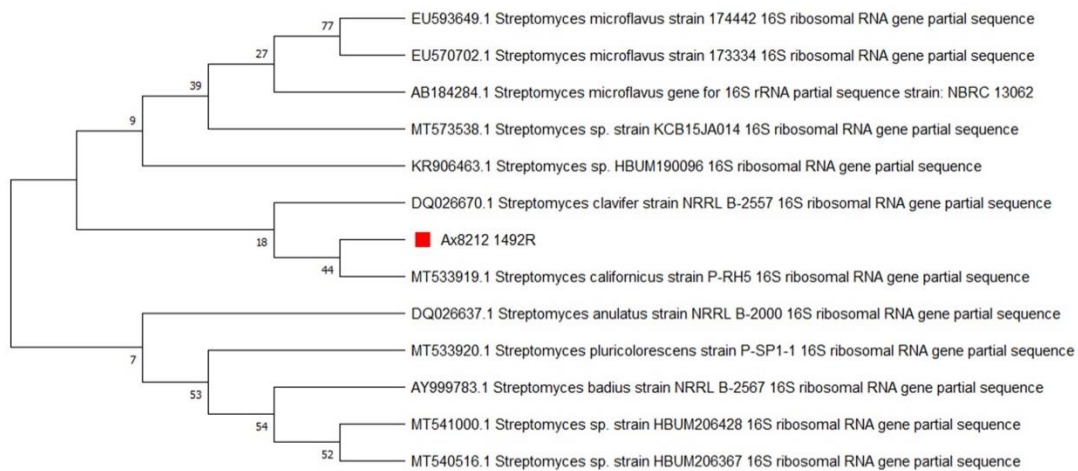


Fig. 8 Árbol filogenético basado en el análisis de *Neighbor-Joining* de la secuencia del gen ARNr 16S del aislado Ax8.2.12 y secuencias del gen ARNr 16S de actinobacterias de bases de datos (GenBank y EzBioCloud). Las ramas que corresponden a las particiones reproducidas en menos del 50% de las réplicas *bootstrap* están colapsadas. Los números en los nodos de las ramas indican los porcentajes *bootstrap* de 1000 réplicas. Las distancias evolutivas fueron calculadas mediante el método de Kimura de dos parámetros. Este análisis incluyó 13 secuencias de nucleótidos. En el conjunto de datos final hubo un total de 1333 posiciones.

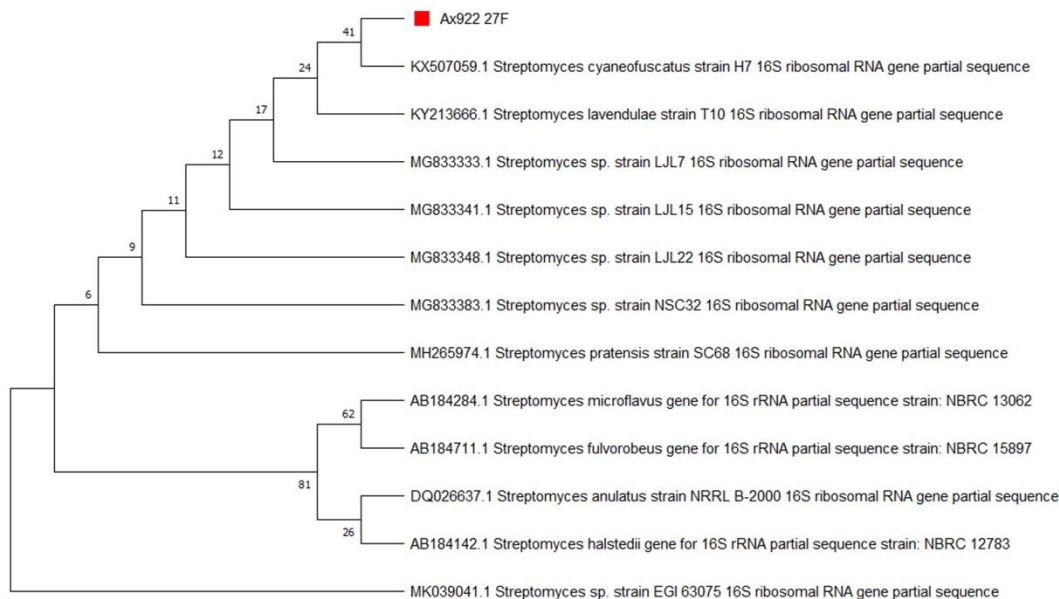


Fig. 9 Árbol filogenético basado en el análisis de *Neighbor-Joining* de la secuencia del gen ARNr 16S del aislado Ax9.2.2 y secuencias del gen ARNr 16S de actinobacterias de bases de datos (GenBank y EzBioCloud). Las ramas que corresponden a las particiones reproducidas en menos del 50% de las réplicas *bootstrap* están colapsadas. Los números en los nodos de las ramas indican los porcentajes *bootstrap* de 1000 réplicas. Las distancias evolutivas fueron calculadas mediante el método de Kimura de dos parámetros. Este análisis incluyó 13 secuencias de nucleótidos. En el conjunto de datos final hubo un total de 674 posiciones.

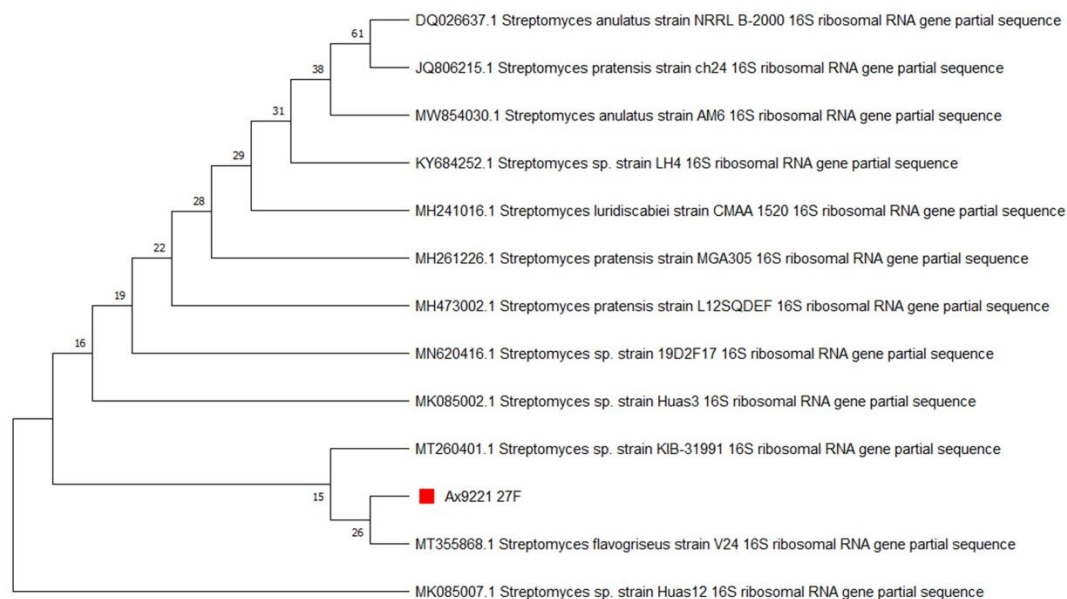


Fig. 10 Árbol filogenético basado en el análisis de *Neighbor-Joining* de la secuencia del gen ARNr 16S del aislado Ax9.2.2.1 y secuencias del gen ARNr 16S de actinobacterias de bases de datos (GenBank y EzBioCloud). Las ramas que corresponden a las particiones reproducidas en menos del 50% de las réplicas *bootstrap* están colapsadas. Los números en los nodos de las ramas indican los porcentajes *bootstrap* de 1000 réplicas. Las distancias evolutivas fueron calculadas mediante el método de Kimura de dos parámetros. Este análisis incluyó 13 secuencias de nucleótidos. En el conjunto de datos final hubo un total de 755 posiciones.

Por este motivo, se plantea la implementación de estudios moleculares complementarios como el análisis de secuencias multilocus (MLSA, por sus siglas en inglés), análisis filogenético de múltiples fragmentos internos de genes que son ubicuos al taxón estudiado (Macheras et al. 2011). Este análisis caracteriza directamente las variaciones de las secuencias de varios genes que codifican proteínas con funciones conservadas (*housekeeping genes*) evaluando las relaciones entre las cepas basados en sus secuencias y perfiles alélicos únicos (Rong y Huang 2014). El árbol filogenético construido por el método *neighbor joining* en base al análisis de secuencias multilocus realizadas por Qi et al. (2021) utilizando las

secuencias de los genes *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* y *trpB*, permitió demostrar que la cepa SCA2-4 formó un clado distinto con *S. mobaraensis*, con un valor de *bootstrap* del 100%. Por esta razón, se considera a MLSA como un método alternativo, por su reproducibilidad y la eficiencia de resolución inter e intraespecies.

Conclusión

La asociación de actinobacterias con las hormigas cortadoras de hojas que cultivan hongos, se fundamenta en la producción de metabolitos bioactivos que han demostrado funciones clave en el moldeamiento de su ecosistema. Los resultados obtenidos evidencian un mayor número de aislados actinobacterianos en la sección metapleurale de las hormigas del bosque de Otongachi. Aunque los aislados pertenecientes al género *Streptomyces* presentaron un notable antagonismo *in vitro* frente a *Fusarium oxysporum* y *Phoma exigua*, se evidenció una menor actividad antifúngica frente a *Botrytis cinerea*. En consecuencia, esta investigación sugiere que *Acromyrmex* spp. es una fuente prometedora de numerosos aislados actinobacterianos con la capacidad de producir compuestos bioactivos contra ascomicetos fitopatógenos. Al mismo tiempo, representa un estudio preliminar en las investigaciones de controladores biológicos provenientes de la asociación endosimbiótica entre hormigas cortadoras de hojas y actinomicetos en Ecuador. Además, sienta las bases a futuras investigaciones enfocadas en caracterizar e identificar bioquímicamente los metabolitos bioactivos producidos por las actinobacterias responsables del antagonismo contra fitopatógenos. No obstante, nuestra investigación indica que deben considerarse estudios más amplios en cuanto al número de muestras y castas morfológicas recolectadas dentro de una misma población de hormigas, con el fin de observar la variedad taxonómica de actinobacterias dentro de una misma especie y así obtener un mayor número de candidatos con potencial antagonista. Igualmente, es necesaria la implementación de técnicas de tipificación basadas en el polimorfismo de genes de mantenimiento y no codificantes. Esto debido a que especies estrechamente relacionadas de actinobacterias son difíciles de discriminar utilizando únicamente genes con secuencias altamente conservadas como el gen ARNr 16S.

Referencias

- ActinoBase (2020). Cultivating Actinobacteria for Microscopic Analysis. http://actinobase.org/index.php/Cultivating_Actinobacteria_for_Microscopic_Analysis. Accessed 7 September 2022
- Agrios G (2012). Fitopatología. Academic Press, New York
- Atlas R (2010). Handbook of Microbiological Media. Taylor & Francis Group, Boca Raton
- Avery SV, Singleton I, Magan N, Goldman GH (2019) The fungal threat to global food security. *Fungal Biol* 123:555-557. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.03.006>
- Bolton B (1994). Identification Guide to the Ant Genera of the World. Harvard University Press: Cambridge, Massachusetts, pp 103-110
- Boukaew S, Prasertsan P, Troulet C et al (2017). Biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea* by using *Streptomyces* spp. *BioControl* 62: 793-803. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9825-9>
- Cañadas L (1983) El Mapa Bioclimático y Ecológico del Ecuador. Banco Central del Ecuador, Quito
- Cao T, Mu S, Lu C et al (2017). *Streptomyces amphotericinicus* sp. nov., an amphotericin-producing actinomycete isolated from the head of an ant (*Camponotus japonicus* Mayr). *Int J Syst Evol Microbiol* 67:4967-4973. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002382>
- Currie CR, Poulsen M, Mendenhall J et al (2006) Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. *Science* 311:81-83. <https://doi.org/10.1126/science.1119744>
- Dalitz C, Porsani M, Figel I et al (2017) Potential for biocontrol of melanized fungi by actinobacteria isolated from intertidal region of Ilha Do Mel, Paraná, Brazil. *Braz J Microbiol* 48:32-36. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.09.010>
- De Boer W, Gunnewiek PJK, Lafeber P et al (1998). Anti-fungal properties of chitinolytic dune soil bacteria. *Soil Biol Biochem* 30:193-203. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00100-4](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00100-4)

- Deb D, Khan A, Dey N (2020) Phoma diseases: Epidemiology and control. *Plant Pathol* 69:1203-1217. <https://doi.org/10.1111/ppa.13221>
- Degtyareva EA, Vinogradova KA, Aleksandrova AV et al (2009) Soil actinomycetes as potential biofungicides. *Moscow Univ Soil Sci Bull* 64:73-77. <https://doi.org/10.3103/S0147687409020045>
- Donoso, DA, Ramoin G (2009) Composition of a high diversity leaf litter ant community (Hymenoptera: Formicidae) from an Ecuadorian pre-montane rainforest. *Ann Soc Entomol Fr* 45:487–499. <https://doi.org/10.1080/00379271.2009.10697631>
- Ebrahimi-Zarandi M, Saberi Riseh R, Tarkka MT (2022) Actinobacteria as Effective Biocontrol Agents against Plant Pathogens, an Overview on Their Role in Eliciting Plant Defense. *Microorganisms* 10:1739. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091739>
- Evangelista-Martínez Z (2014) Isolation and characterization of soil *Streptomyces* species as potential biological control agents against fungal plant pathogens. *World J Microbiol Biotechnol* 30:1639-1647. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1568-x>
- Evangelista-Martínez Z, Contreras-Leal EA, Corona-Pedraza LF et al (2020) Biocontrol potential of *Streptomyces* sp. CACIS-1.5 CA against phytopathogenic fungi causing postharvest fruit diseases. *Egypt J Biol Pest Control* 30:1-10. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00319-9>
- Gebily DAS, Ghanem GAM, Ragab MM et al (2021) Characterization and potential antifungal activities of three *Streptomyces* spp. as biocontrol agents against *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary infecting green bean. *Egypt J Biol Pest Control* 31:33. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00373-x>
- Grzegorzczak M, Szalewicz A, Zarowska B et al (2015) Microorganisms in biological control of phytopathogenic fungi. *Acta Sci Pol Biotechnol* 14:19-42.
- Guo Y, Zheng W, Rong X et al (2008) A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:149–159. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65224-0>
- Hayakawa M, y Nonomura H (1987) Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J Ferment Technol* 65:501–509. [https://doi.org/10.1016/0385-6380\(87\)90108-7](https://doi.org/10.1016/0385-6380(87)90108-7)
- Holmes N, Innocent T, Heine D et al (2016) Genome analysis of two *Pseudonocardia* phylotypes associated with *Acromyrmex* leafcutter ants reveals their biosynthetic potential. *Front Microbiol* 7:1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02073>
- Hua L, Yong C, Zhanquan Z et al (2018) Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis cinerea* causing post-harvest decay in fruits and vegetables. *Food Qual Saf* 2:111-119. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy016>
- Jakubiec-Krzesniak K, Rajnisz-Mateusiak A, Guspiel A (2018) Secondary metabolites of actinomycetes and their antibacterial, antifungal and antiviral properties. *Pol J Microbiol* 67:259–272. <https://doi.org/10.21307/pjm-2018-048>
- Jepsen T, Jensen B, Jørgensen NOG (2022) Volatiles produced by *Streptomyces* spp. delay rot in apples caused by *Colletotrichum acutatum*. *Curr Res Microb Sci* 3:100121. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100121>
- Kämpfer P (2006) The Family Streptomycetaceae, Part I: Taxonomy. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (ed) *The Prokaryotes*, 3rd edn. Springer, New York, pp 538–604.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111-120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>

- Lahmyed H, Bouharroud R, Qessaoui R et al (2021) Actinomycete as biocontrol agents against tomato gray mold disease caused by *Botrytis cinerea*. Kuwait J Sci 48:1-8. <https://doi.org/10.48129/kjs.v48i3.9200>
- Lane D (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E. and Goodfellow M (ed) Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic. John Wiley and Sons, New York, pp 115-175.
- Liu C, Zhuang X, Yu Z et al (2019) Community structures and antifungal activity of root-associated endophytic actinobacteria of healthy and diseased soybean. Microorganisms 7:1–15. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7080243>
- Macheras E, Roux AL, Bastian S et al (2011) Multilocus sequence analysis and rpoB sequencing of *Mycobacterium abscessus* (sensu lato) strains. J Clin Microbiol 49:491–499. <https://doi.org/10.1128/JCM.01274-10>
- Martens M, Dawyndt P, Coopman R et al (2008) Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). Int J Syst Evol Microbiol 58:200–214. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65392-0>
- Matarrita-Carranza B, Moreira-Soto RD, Murillo-Cruz C et al (2017) Evidence for widespread associations between neotropical hymenopteran insects and Actinobacteria. Front Microbiol 8:1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02016>
- Mattoso TC, Moreira DD, Samuels RI (2012) Symbiotic bacteria on the cuticle of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* protect workers from attack by entomopathogenic fungi. Biol Lett 8:461–464. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2011.0963>
- Mendes T, Borges W, Rodrigues A et al (2013) Anti-Candida properties of urauchimycins from actinobacteria associated with *Trachymyrmex* ants. Biomed Res Int 1-8. <https://doi.org/10.1155/2013/835081>
- Nah HJ, Park J, Choi S, Kim ES (2021) WblA, a global regulator of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. J Ind Microbiol Biotechnol 48:3-4. <https://doi.org/10.1093/jimb/kuab007>
- Naik BS, Shashikala J, Krishnamurthy YL (2009) Study on the diversity of endophytic communities from rice (*Oryza sativa* L.) and their antagonistic activities in vitro. Microbiol Res 164:290-296. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.12.003>
- Qi D, Zou L, Zhou D et al (2021) Identification and antifungal mechanism of a novel actinobacterium *Streptomyces huiliensis* sp. nov. against *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4 of banana. Front Microbiol 12:722661. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.722661>
- Qi D, Zou L, Zhou D et al (2019) Taxonomy and broad-spectrum antifungal activity of *Streptomyces* sp. SCA3-4 isolated from rhizosphere soil of *Opuntia stricta*. Front Microbiol 10:1390. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01390>
- Rios-Hernández TA, Uc-Varguez A, Evangelista-Martínez Z (2021) Biological control of *Fusarium oxysporum* causal agent of gladiolus corm rot by streptomycetes. Rev Mex Fitopatol 39:391-413. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2105-3>
- Rodríguez C, Álvarez F, Pérez L et al (2018) Production of antifungal compounds by actinomycetes isolated from Andean and Antarctic soils. Ital J Food Sci 151-163.
- Rong X, Huang Y (2010) Taxonomic evaluation of the *Streptomyces griseus* clade using multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, with proposal to combine 29 species and three subspecies as 11 genomic species. Int J Syst Evol Microbiol 60:696–703. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.012419-0>
- Rong X, Huang Y (2014) Multi-locus sequence analysis: taking prokaryotic systematics to the next level. In: Goodfellow M, Sutcliffe I and Chun J (ed) Methods in microbiology. Academic Press, New York, pp 221-251.
- Salazar F, Reyes-Bueno F, Sanmartin D et al (2015) Mapping continental Ecuadorian ant species. Sociobiology 62:132–162. <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v62i2.132-162>

- Sharma V, Salwan R (2018) Biocontrol Potential and Applications of Actinobacteria in Agriculture. In: Singh BP, Gupta VK, Passari AK (ed) New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. Elsevier, Amsterdam, pp 93–108. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63994-3.00006-0>
- Shirling E, Gottlieb D (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int J Systematic Bacteriol 16:313–340. <https://doi.org/10.1099/00207713-16-3-313>
- Soleck J, Zajko J, Postek M et al (2012) Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. Open Life Sci 7:373-390. <https://doi.org/10.2478/s11535-012-0036-1>
- Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. Mol Biol Evol 38:3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Wang Z, Yu Z, Zhao J et al (2020) Community composition, antifungal activity and chemical analyses of ant-derived actinobacteria. Front Microbiol 11:1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00201>
- Watve MG, Tickoo R, Jog MM et al (2001) How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*?. Arch Microbiol 176:386-390. <https://doi.org/10.1007/s002030100345>
- Yek SH, Mueller UG (2010) The metapleural gland of ants. Biol Rev 86:774–791. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2010.00170.x>
- Zhao S, Du CM, Tian CY (2012) Suppression of *Fusarium oxysporum* and induced resistance of plants involved in the biocontrol of Cucumber *Fusarium* Wilt by *Streptomyces bikiniensis* HD-087. World J Microbiol Biotechnol 28:2919-2927. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1102-6>

Declaraciones

Contribuciones de los autores AFG realizó los experimentos, el análisis de datos y la redacción del borrador del manuscrito, JYA y MSM corrigieron y revisaron el borrador. Todos los autores revisaron y contribuyeron a la redacción del manuscrito.

Financiación Esta investigación fue financiada de por la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Intereses contrapuestos Los autores declaran no tener intereses contrapuestos.

Aprobación ética Esta investigación no incluyó ningún estudio con humanos o animales realizados por ninguno de los autores.