

***In vitro* evaluation of biological fungicides against *Curvularia eragrostidis*, a phytopathogenic fungus of pineapple crop**

Evaluación *in vitro* de fungicidas biológicos contra *Curvularia eragrostidis*, hongo fitopatógeno del cultivo de piña

Eduardo Hernández-Navarro, Gustavo Ángel Agustín-Maravilla, Juan Carlos Sánchez-Rangel, Pedro Valadez-Ramírez, Wilberth Chan-Cupul*, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima, Km 40 autopista Colima-Manzanillo, C.P. 28934, Tecomán, Colima, México.

*Corresponding author: wchan@uacol.mx

Received: June 10, 2022.

Accepted: December 14, 2022.

Hernández-Navarro E, Agustín-Maravilla GA, Sánchez-Rangel JC, Valadez-Ramírez P and Chan-Cupul W. 2023. *In vitro* evaluation of biological fungicides against *Curvularia eragrostidis*, a phytopathogenic fungus of pineapple crop. Mexican Journal of Phytopathology 41(1): 93-111.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2206-4>

First DOI publication: December 27, 2022.

Primera publicación DOI: 27 de Diciembre, 2022.

Abstract. *In vitro* effectiveness of two plant extract-based products, System Max® (*Mimosa tenuiflora* + *Quercus robur*) and Sedric 4X® (*Yucca schidigera*); and three biological control agents-based products, BliteFree® (*Streptomyces* spp.), BioFungus Clean® (*Bacillus subtilis* + *B. thuringiensis* + *Trichoderma harzianum* + *T. viride*), and Tonka® (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma harzianum* + *Streptomyces lydicus*)

Resumen. Se evaluó la eficacia *in vitro* contra *Curvularia eragrostidis* de dos productos a base de extractos de plantas, System Max® (*Mimosa tenuiflora* + *Quercus robur*) y Sedric 4X® (*Yucca schidigera*), y tres productos a base de agentes de control biológico, BliteFree® (*Streptomyces* spp.), BioFungus Clean® (*Bacillus subtilis* + *B. thuringiensis* + *Trichoderma harzianum* + *T. viride*) y Tonka® (*Bacillus subtilis* + *T. harzianum* + *Streptomyces lydicus*). El fitopatógeno fue aislado de manchas foliares en plantas de piña (*Ananas comosus*). La cepa fue identificada por reconstrucción filogenética usando las secuencias rDNA ITS1-5.8S-ITS2 como *Curvularia eragrostidis*. En bioensayos dosis respuesta se evaluaron cinco concentraciones: 0 (control), 0.125, 0.25, 0.5 y 1.0% de cada producto comercial. Se midió el crecimiento diario del micelio (CDM), la inhibición del crecimiento del micelio (% ICM) y la concentración letal media (CL₅₀). Sedric 4X® mostró el % ICM más alto (75%) a la concentración más alta, mientras que Tonka® mostró

were evaluated against *Curvularia eragrostidis*, an associated fungus to leaf spot disease in pineapple (*Ananas comosus*) plants. The strain was identified by phylogenetic reconstruction using the rDNA ITS1-5.8S-ITS2 sequences as *Curvularia eragrostidis*. Through a doses response-bioassays five concentrations: 0 (control), 0.125, 0.25, 0.5 and 1.0% of each commercial product were tested. Daily mycelial growth (DMG), mycelial growth inhibition (% MGI) and the lethal mean concentration (LC_{50}) were calculated. Sedric 4X® showed the highest% MGI (75%) at highest concentration, while Tonka® showed the highest% MGI (65%) at lower concentration, being constant (65.3-66.9%) at all the concentrations tested. The lowest values of EC_{50} were achieved by Tonka® (0.008%), BliteFree® (0.015%) and BioFungus Clean® (0.017%). In contrast, the highest CE_{50} were reached by Sedric 4X® (0.260%) and System Max® (3.5%). SystemMax® and Sedric 4X®, showed a positive relation between concentration and% MGI, despite its highest CE_{50} values. The biofungicides seem to be more effective against *C. eragrostidis* than plant extracts fungicides.

Key words: *Bacillus*, CL_{50} , phytopathogen, *Trichoderma*, *Streptomyces*.

Pineapple (*Ananas comosus*) is the third most important tropical crop worldwide (Sanewski *et al.*, 2018). *Curvularia clavata* is the causal agent of leaf spot in pineapple plants with incidences from 35 to 58% in China (Zhong *et al.*, 2016) and *C. eragrostidis* causes a post-harvest loss in pineapple fruit in Brazil (Ferreira *et al.*, 2014), and *Curvularia* sp. causes leaf spot in pineapple crop fields in Nicaragua (García-Osorio and Orozco-Gomez, 2016). Mexico is the 7th producer of pineapple (INEGI, 2019) around the world.

el% ICM más alto (65%) a la concentración más baja, siendo constante (65.3-66.9%) en todas las concentraciones probadas. Los valores más bajos de CL_{50} los alcanzaron Tonka® (0.008%), BliteFree (0.015%) y BioFungus Clean® (0.017%). En cambio, los CL_{50} más altos los alcanzaron Sedric 4X® (0.260%) y System Max® (3.5%). SystemMax® y Sedric 4X® mostraron una relación positiva entre concentración y% ICM, a pesar de sus valores altos de CL_{50} . Los biofungicidas fueron más efectivos que los fungicidas a base de extractos de plantas.

Palabras clave: *Bacillus*, CL_{50} , fitopatógeno, *Trichoderma*, *Streptomyces*.

La piña (*Ananas comosus*) es el tercer cultivo tropical más importante en todo el mundo (Sanewski *et al.*, 2018). *Curvularia clavata* es el agente causal de la mancha foliar en plantas de piña, con una incidencia de entre 35 y 58% en China (Zhong *et al.*, 2016). *Curvularia eragrostidis* causa pérdidas poscosecha en frutos de piña en Brasil (Ferreira *et al.*, 2014). *Curvularia* sp. causa mancha foliar en campos de cultivo de piña en Nicaragua (García-Osorio y Orozco-Gomez, 2016). México es el 7° productor de piña (INEGI, 2019) a nivel mundial. Recientemente, Maldonado-Michel *et al.* (2021) reportaron a *C. eragrostidis* como el agente causal de la mancha foliar de la piña en el estado de Colima (Pacífico Centro de México). Sin embargo, ese estudio carece de datos moleculares para una identificación precisa de las especies. También probaron la actividad antifúngica de los extractos de semillas de *Swietenia humilis*. No obstante, el manejo local regular de enfermedades fúngicas incluye fungicidas químicos, a pesar de que los principales efectos secundarios de estos productos están relacionados con daños a la salud humana, impacto ambiental severo y desarrollo de cepas resistentes (Heydari

Recently, Maldonado-Michel *et al.* (2021) reported *C. eragrostidis* as the causal agent of pineapple leaf-spot in Colima state (Pacific Center of Mexico). However, this study lacks molecular data for accurate species identification. They also tested seed extracts of *Swietenia humilis* for antifungal activity. However, the regular local management of fungal diseases includes chemical fungicides, despite the fact that the main side-effects of these products are related to damage to human health, severe environmental impact, and development of resistant strains (Heydari and Pessarakli, 2010). Therefore, there is a need to evaluate alternative methods such as biological control agents (BCA) and plant extracts (PE), which have shown to be safer and efficient (Cerqueira-Sales *et al.*, 2016) against *C. eragrostidis*. In Colima, Mexico some BCA and PE bio fungicides are available but have not been locally and properly tested; the main goal of this research were to identify the causal agent of the leaf-spot disease in pineapple and to evaluate the *in vitro* effectiveness of five commercial biological products against *C. eragrostidis*.

Plants with leaf spot symptoms were sampled randomly in a pineapple (cv. MD2) plantation in Tecoman, Colima, Mexico (18°47'41.3" N; 103°51'26.9" W). Ten samples were collected in 2 ha. Fungal isolation was carried out according to Orozco-Santos *et al.* (2004); infected leaves were cut, washed with 1% NaClO for 3 min, rinsed with autoclaved distilled water, and dried on sterile filter paper. Disinfected plant tissue was ground in liquid nitrogen and then lyophilized. This served as an inoculum in 400 mL of Czapek broth shaken at 2 Hz at room temperature for 3 d. After that, 50, 100, and 150 µL of culture were inoculated in Petri dishes with PDA and incubated at 31 °C for 3 d. Individual colonies were transferred and incubated for 5 d and used as inoculum for microcultures in slides with PDA (Zhong *et al.*, 2016).

y Pessarakli, 2010). Por lo tanto, existe la necesidad de evaluar métodos alternativos como el uso de agentes de control biológico (ACB) y extractos de plantas (EP), que han demostrado ser más seguros y eficientes (Cerqueira-Sales *et al.*, 2016) contra *C. eragrostidis*. En Colima, México, están disponibles algunos biofungicidas ACB y EP, pero no se han probado localmente y de manera adecuada. El objetivo principal de esta investigación fue identificar el agente causal de la enfermedad de la mancha foliar en piña y evaluar la efectividad *in vitro* de cinco productos biológicos comerciales contra *C. eragrostidis*.

Se tomaron muestras al azar de plantas con síntomas de mancha foliar en una plantación de piña (cv. MD2) en Tecomán, Colima, México (18° 47' 41.3" N; 103° 51' 26.9" O). Se recolectaron diez muestras en 2 hectáreas. El aislamiento fúngico se realizó de acuerdo con Orozco-Santos *et al.* (2004). Las hojas infectadas se cortaron, se lavaron con NaClO al 1% durante 3 min, se enjuagaron con agua destilada en autoclave y se secaron en papel de filtro estéril. El tejido vegetal desinfectado se molió en nitrógeno líquido y luego se liofilizó. Esto sirvió como inóculo en 400 mL de caldo Czapek agitado a 2 Hz a temperatura ambiente por 3 días. Posteriormente, se inocularon 50, 100 y 150 µL de cultivo en cajas de Petri con PDA y se incubaron a 31 °C durante 3 días. Las colonias individuales se transfirieron e incubaron durante 5 días y se usaron como inóculo para microcultivos en portaobjetos con PDA (Zhong *et al.*, 2016).

La identificación morfológica se realizó siguiendo a Ferreira *et al.* (2014), Manamgoda *et al.* (2012) y Rocha-Santos *et al.* (2018). Se utilizaron muestras de cultivos monoconidiales para la identificación molecular mediante la secuenciación de la región parcial ITS utilizando los cebadores ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990). Las secuencias se inspeccionaron mediante cromatogramas utilizando

Morphological identification was carried out following Ferreira *et al.* (2014), Manamgoda *et al.* (2012) and Rocha-Santos *et al.* (2018). Samples of monoconidial cultures were used for molecular identification through sequencing of the ITS partial region with the ITS1 and ITS4 primers (White *et al.*, 1990). The sequences were inspected by chromatograms on the SequencherSoftware™ v. 5.2.3 and curated sequence was used for BLASTN query at NCBI's GenBank. Then, a MegaBlast was performed, and 48 highly similar *Curvularia* sequences (ex-types, Figure 1) and two outgroup sequences were downloaded from GenBank, aligned using the CLUSTALW algorithm with default parameters (Thompson *et al.*, 2003), and manually edited using MEGA X software suite (Tamura *et al.*, 2013). The molecular phylogenetic analysis consisted of a Maximum likelihood (ML) phylogenetic analysis, with the Kimura-2-parameter+G+I model (Kimura, 1980) with gaps treated as partial deletions with a 95% of coverage, using an NNI heuristic method for topology improvement with 1000 bootstrap replicates. The trees were rooted using *Bipolaris maydis* (= *Cochliobolus heterostrophus*) as sister clade and *Alternaria alternata* as outgroup (Manamgoda *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2018).

Commercial biofungicides are detailed in Table 1. Based on their concentrations, four doses were evaluated: 1.0, 0.5, 0.25 and 0.125% (v/v or w/v) in 20 mL of PDA + biofungicide. Solid products were expressed in mg L⁻¹ and liquid products were expressed in mL L⁻¹. Amended PDA Petri dishes were obtained in two ways: 1) PE-based, and 2) BCA-based. PE products (System Max® / Sedric 4X®) were added to PDA before solidification and then served in Petri dishes. BCA products were mixed in the PDA and 20 mL were verted in Petri dishes. In each Petri dish, a disk of 9 mm in diameter of fungal pathogen that was 7 d old was inoculated and incubated at 29 °C for 10 d.

el programa Sequencher™ v. 5.2.3. La secuencia curada se usó para consulta BLASTN en el GenBank de NCBI. Después se realizó un MegaBlast y se descargaron de GenBank 48 secuencias de *Curvularia* muy similares (Figura 1) y dos secuencias de grupos externos. Estas secuencias se alinearon usando el algoritmo CLUSTALW con parámetros predeterminados (Thompson *et al.*, 2003) y se editaron manualmente utilizando el paquete de software MEGA X (Tamura *et al.*, 2013). El análisis filogenético molecular consistió en un análisis filogenético de Máxima Verosimilitud (ML) con el modelo Kimura de 2 parámetros G+I (Kimura, 1980). Los huecos fueron tratados como deleciones parciales con un 95% de cobertura, utilizando un método heurístico NNI (intercambio del vecino más cercano, por sus siglas en inglés) para refinar la topología del árbol con 1000 réplicas de arranque. Los árboles se enraizaron utilizando *Bipolaris maydis* (= *Cochliobolus heterostrophus*) como clado hermano y *Alternaria alternata* como grupo externo (Manamgoda *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2018).

El Cuadro 1 muestra los detalles de los biofungicidas comerciales. Se evaluaron cuatro dosis con distintas concentraciones: 1.0, 0.5, 0.25 y 0.125% (v/v o p/v) en 20 mL de PDA + biofungicida. Los productos sólidos se expresaron en mg L⁻¹ y los líquidos en mL L⁻¹. Las cajas de Petri con PDA suplementadas se prepararon de dos formas: 1) a base de EP y 2) a base de ACB. Los productos de EP (System Max®/Sedric 4X®) se agregaron al PDA antes de la solidificación y después se sembraron en cajas de Petri. Los productos ACB se mezclaron en el PDA y se vertieron 20 mL en cajas de Petri. En cada placa de Petri se inoculó un disco de 9 mm de diámetro del hongo patógeno de 7 días de edad y se incubó a 29 °C durante 10 días.

La tasa de crecimiento diario (TCD) se calculó midiendo el diámetro de la colonia del patógeno cada 24 horas durante 5 días usando la fórmula $TCD = [(R1-R0)/(T1-T0)]$, donde R1 y R0 es el

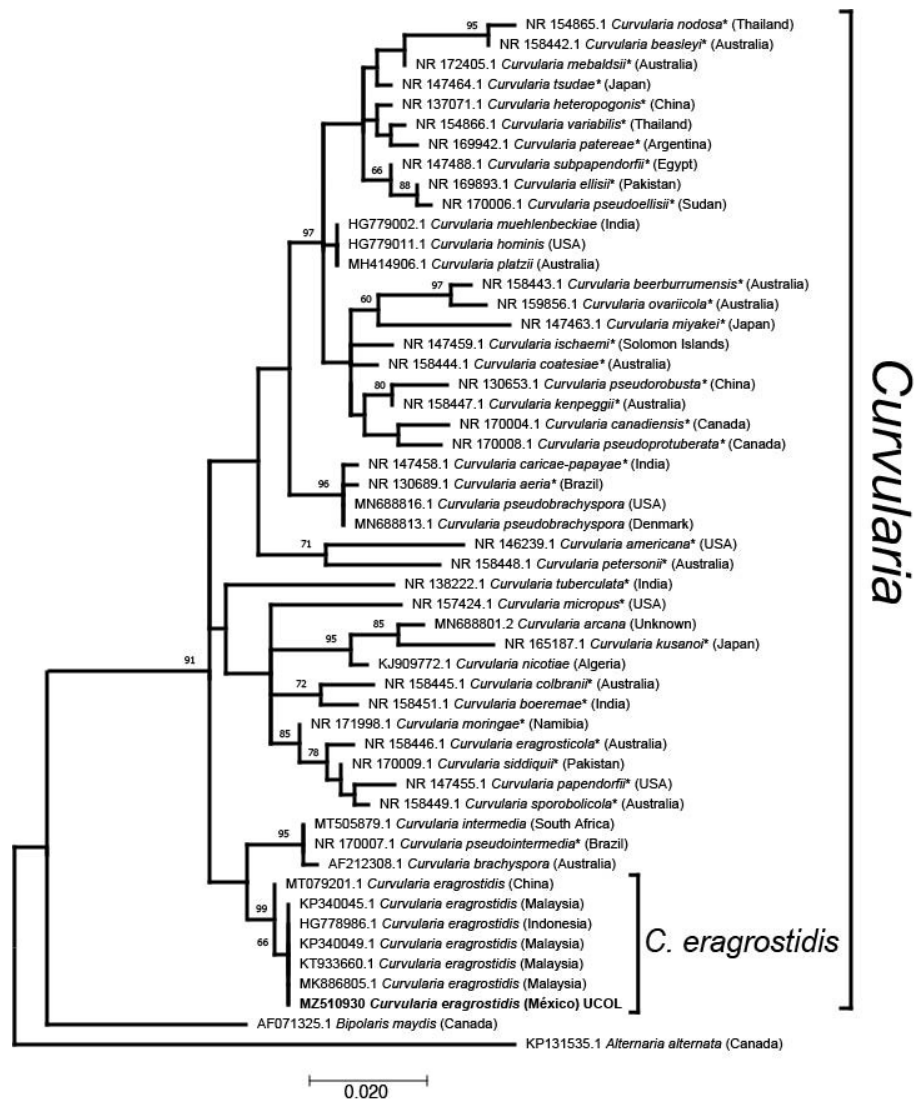


Figure 1. Molecular phylogenetic analysis of *Curvularia* species based on the Maximum likelihood method using the Kimura 2-parameter (G+I) model. The tree with the highest log likelihood (-1962.89) is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches, based on 1000 bootstrap replicates. Accession number is indicated in each taxon. Taxa names marked with * are ex-type material. Country of origin of isolates are in parenthesis.

Figura 1. Análisis filogenético molecular de especies de *Curvularia* basado en el método de Máxima verosimilitud y utilizando el modelo Kimura de 2 parámetros (G+I). Se muestra el árbol con el logaritmo de probabilidad más alto (-1962.89). El porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agruparon se muestra junto a las ramas, según 1000 réplicas de arranque. El número de accesión se indica en cada taxón. Los nombres de taxones marcados con * son material ex-tipo. El país de origen de los aislamientos está entre paréntesis.

Daily growth rate (DGR) was calculated by measuring pathogen colony diameter each 24 h for 5 d using the formula $DGR = [(R1 - R0) / (T1 - T0)]$,

crecimiento del diámetro de la colonia (mm) y T1 y T0 es el tiempo (días) (Bahekar *et al.*, 2017). La inhibición del crecimiento micelial del patógeno

Table 1. Characteristics of the biological products evaluated in the doses response bioassay.
Cuadro 1. Características de los productos biológicos evaluados en el bioensayo dosis respuesta.

Commercial name	Active ingredient	Recommended doses	Concentration
System Max® (Plantoria)	<i>Mimosa tenuiflora</i> extract + <i>Quercus robur</i> extract	4.5 mL L ⁻¹	60 and 30 %
Sedric 4X® (BioCampo)	<i>Yucca schidigera</i> extract	3 L ha ⁻¹	2.16 %
BliteFree® (Altus Biopharm)	<i>Streptomyces</i> spp.	1.5 L ha ⁻¹	60 %
BioFungus Clean® (Syme Agroinsumo)	<i>Bacillus subtilis</i> + <i>B. thuringiensis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i> + <i>T. viride</i>	2 L ha ⁻¹	1.0, 1.0, 1.0 and 1.0 %
Tonka® (Novigo Natura)	<i>B. subtilis</i> + <i>T. harzianum</i> + <i>Streptomyces lydicus</i>	1.5 kg ha ⁻¹	1x10 ⁸ UFC g ⁻¹ 1x10 ⁷ UFC g ⁻¹ and 1x10 ⁶ UFC g ⁻¹

where R1 and R0 is the colony diameter growth (mm) and T1 and T0 is the time (days) (Bahekar *et al.*, 2017). Mycelial Growth Inhibition of the pathogen (% MGI) was calculated $\% \text{ MGI} = [(C - T)/C] \times 100\%$ where C = Control growth diameter (mm) and T = Treatment growth diameter (mm) (Bahekar *et al.*, 2017). Fifty and ninety effective concentrations (EC₅₀ and EC₉₀) were calculated using a Probit analysis in SAS 9.0 (Manzo-Sánchez *et al.*, 2018). The experimental design consisted of a completely randomized design with the combinatorial factorial arrangement, being A the biological products brand and B the different doses of each product. Five biological products, four doses each, and a control (no product); each treatment had six repetitions, with a total of 126 experimental units. Data analysis of DGR was carried out with an ANOVA and mean comparison using the minimum significant difference (MSD) with $p=0.05$. Percentage of MGI data were transformed using the arcsen equation $(\% \text{ MGI})^{1/2}$ to obtain an approximately normal distribution and posterior analysis. The CL₅₀ was calculated with a Probit analysis. Finally, a linear regression analysis ($Y=mX+b$) between the concentration of the product (X) and percentage of MGI (Y) were performed.

(% ICM) se calculó como $\% \text{ ICM} = [(C - T)/C] \times 100\%$, donde C = diámetro de crecimiento del control (mm) y T = diámetro de crecimiento del tratamiento (mm) (Bahekar *et al.*, 2017). Se calcularon las concentraciones efectivas media y noventa (CE₅₀ y CE₉₀) mediante un análisis Probit en SAS 9.0 (Manzo-Sánchez *et al.*, 2018). El diseño experimental consistió en un diseño completamente al azar con arreglo factorial combinatorio, siendo A la marca del producto biológico y B las diferentes dosis de cada producto. Cinco productos biológicos, cuatro dosis cada uno, y un control (sin producto). Cada tratamiento tuvo seis repeticiones, con un total de 126 unidades experimentales. El análisis de datos de TCD se llevó a cabo con ANOVA y comparación de medias utilizando la diferencia mínima significativa (DMS), con $P=0.05$. El porcentaje de datos de ICM se transformó utilizando la ecuación de arcsen $(\% \text{ ICM})^{1/2}$ para obtener una distribución aproximadamente normal y someter a análisis más tarde. La CE₅₀ se calculó con un análisis Probit. Finalmente, se realizó un análisis de regresión lineal ($Y=mX+b$) entre la concentración del producto (X) y el porcentaje de ICM (Y).

El aislado mostró características morfológicas macro y microscópicas coincidentes con *Curvularia eragrostidis*, como una colonia gris algodonosa

The isolate showed macro and microscopic morphological characteristics matching with *Curvularia eragrostidis*, such as a cottony grayish colony (7.7 cm, 5 d of incubation) turning into velvety-black with regular edges. Ellipsoidal distoseptate conidia, 21.6–24.9 × 11.6–13.3 µm. Grouped and septate brown conidiophores. Mycelium is composed of dark septate hyphae. Molecular phylogenetic analysis of *Curvularia* species based on the maximum likelihood method, grouped the sequence with the aforementioned with high support, confirming the identity of the studied isolate as *C. eragrostidis*. As expected, Chinese material is slightly different from the isolates from Malaysia, Indonesia and Mexico. *C. eragrostidis* closest subclade, includes *C. intermedia*, *C. pseudointermedia* and *C. brachyspora* (Figure 1). All sequences were grouped within the monophyletic genus *Curvularia* with high support, separated from *Bipolaris maydis*, a sister anamorphic clade, which matches with Manamgoda *et al.* (2012) and Tan *et al.* (2018).

C. eragrostidis daily growth was affected by biological products with highly significant differences ($P \leq 0.0001$, Table 2). The DGR of the

(7.7 cm, 5 días de incubación) que se tornó negra aterciopelada con bordes regulares. Conidios elipsoidales, distoseptados, de 21.6–24.9 × 11.6–13.3 µm. Conidióforos marrones, agrupados y septados. El micelio se compone de hifas septadas oscuras. El análisis filogenético molecular de especies de *Curvularia*, basado en el método de máxima verosimilitud, agrupó la secuencia con la anterior con alto apoyo estadístico, confirmando la identidad del aislado estudiado como *C. eragrostidis*. Como era de esperar, el material chino es ligeramente diferente de los aislamientos de Malasia, Indonesia y México. El subclado más cercano de *C. eragrostidis* incluye *C. intermedia*, *C. pseudointermedia* y *C. brachyspora* (Figura 1). Todas las secuencias fueron agrupadas dentro del género monofilético *Curvularia* con alto apoyo estadístico, separadas de *Bipolaris maydis*, un clado anamórfico hermano, un resultado que coincide con Manamgoda *et al.* (2012) y Tan *et al.* (2018).

El crecimiento diario de *C. eragrostidis* fue afectado por los productos biológicos, con diferencias altamente significativas ($P \leq 0.0001$, Cuadro 2). La TCD del grupo control fue de 1.6 cm día⁻¹, mientras que Tonka® mostró la tasa de crecimiento más

Table 2. *In vitro* daily growth rate (cm day⁻¹) of *Curvularia eragrostidis* under different doses of biological products.

Cuadro 2. Tasa de crecimiento diario *in vitro* (cm día⁻¹) de *Curvularia eragrostidis* bajo diferentes dosis de productos biológicos.

Commercial products	Doses (%)			
	0.125	0.25	0.5	1.0
Control	1.635±0.018 b	1.635±0.018 e	1.635±0.018 c	1.635±0.018 c
System Max®	1.698±0.007 b	1.476±0.015 d	1.298±0.031 b	1.186±0.057 b
Sedric 4X®	1.571±0.056 b	0.27±0.016 c	0.173±0.008 a	0.048±0.007 a
Tonka®	0.01±0.006 a	0.028±0.006 a	0.013±0.008 a	0.018±0.013 a
BioFungus Clean®	0.026±0.009 a	0.12±0.054 b	0.086±0.030 a	0.04±0.010 a
Blite Free®	0.036±0.004 a	0.026±0.009 a	0.181±0.169 a	0.021±0.010 a
P-value	0.00001	0.00001	0.00001	0.00001
F=	1135.94	523.85	46.12	353.54

Means (± SE) with different letters in the same column indicates significant differences (LSD, $P \leq 0.05$). / Medias (± ES) con diferente literal en la misma columna indica diferencias significativas (DMS, $P \leq 0.05$).

control group was 1.6 cm day⁻¹, while Tonka® showed the lowest growth rate in all four evaluated concentrations with a DGR mean of 0.015 cm day⁻¹, which is 106.6 times lower than the control group. The BioFungus Clean® activity had a similar effect in the first three concentrations (1.0, 0.5, and 0.25%) with a mean of 0.082 cm day⁻¹. SystemMax® and Sedric 4X®, only reduced the DGR of *C. eragrostidis* from 0.25% and beyond with 1.47 and 0.27 cm day⁻¹; however, at 1.0% (0.048 cm day⁻¹) was statistically equal between Tonka®, Biofungus Clean® and BliteFree® with 0.02, 0.04 and 0.021 cm day⁻¹, respectively. The % MGI achieved significant differences ($P \leq 0.0001$) at 5 d after inoculation. Sedric 4X® showed the highest inhibition percentage at 1% concentration (86.8%), 2.5 times higher than System Max® and 1.3 times higher than BliteFree® (63.7%) at the same concentration. This value was significantly higher ($P \leq 0.0001$) than the other concentrations of the same product (Table 3). On the other hand, Tonka® was effective in every concentration with no statistical differences ($P \leq 0.2657$) between all four doses, with a mean of 68.97% of inhibition. Similarly, Biofungus Clean® had the same

baja con las cuatro concentraciones evaluadas, con una TCD media de 0.015 cm día⁻¹, que es 106.6 veces menor que la del grupo control. La actividad de BioFungus Clean® tuvo un efecto similar en las tres primeras concentraciones (1.0, 0.5 y 0.25%) con una media de 0.082 cm día⁻¹. SystemMax® y Sedric 4X® solo redujeron la TCD de *C. eragrostidis* a partir de una concentración de 0.25% con 1.47 y 0.27 cm día⁻¹; sin embargo, al 1.0% (0.048 cm día⁻¹), la reducción fue estadísticamente igual entre Tonka®, Biofungus Clean® y BliteFree®, con 0.02, 0.04 y 0.021 cm día⁻¹, respectivamente. El %ICM logró diferencias significativas ($P \leq 0.0001$) a los 5 días después de la inoculación. Sedric 4X® mostró el mayor porcentaje de inhibición al 1% de concentración (86.8%), 2.5 veces mayor que System Max® y 1.3 veces mayor que BliteFree® (63.7%) a la misma concentración. Este valor fue significativamente mayor ($P \leq 0.0001$) que las demás concentraciones del mismo producto (Cuadro 3). Por otro lado, Tonka® fue efectivo en todas las concentraciones, sin diferencias estadísticas ($P \leq 0.2657$) entre las cuatro dosis, con un promedio de 68.97% de inhibición. De manera similar, Biofungus Clean® tuvo el mismo efecto de inhibición ($P \leq 0.0871$) en

Table 3. Mycelial growth inhibition (%) of *Curvularia eragrostidis* under different doses of biological products.

Cuadro 3. Inhibición del crecimiento micelial (%) de *Curvularia eragrostidis* bajo diferentes dosis de productos biológicos.

Commercial products	Doses (%)			
	0.125	0.25	0.5	1.0
System Max®	4.51 ± 0.77 d	5.77 ± 0.75 d	13.16 ± 1.78 c	24.16 ± 1.29 e
Sedric 4X®	7.13 ± 1.22 c	57.48 ± 0.55 b	68.87 ± 0.39 a	74.96 ± 0.14 a
Tonka®	65.31 ± 0.25 a	65.77 ± 0.62 a	66.91 ± 0.96 a	66.72 ± 0.61 b
BioFungus Clean®	53.47 ± 1.15 b	47.64 ± 3.62 c	51.57 ± 2.08 b	56.22 ± 1.27d
Blite Free®	53.90 ± 0.93 b	56.30 ± 0.64 b	52.95 ± 2.13 b	61.45 ± 1.02 c
P-value	0.00001	0.00001	0.00001	0.00001
F=	677.44	178.68	137.32	353.54

Means (± SE) with different letters in the same column indicates significant differences (LSD, $P \leq 0.05$). / Medias (± ES) con diferente literal en la misma columna indica diferencias significativas (DMS, $P \leq 0.05$).

inhibition effect ($P \leq 0.0871$) in all concentrations with 1.2 times lower inhibition than Tonka®. BliteFree® registered the highest inhibition rate ($P \leq 0.0002$) with 63.7% at the highest concentration, while lower ones between 55.8 and 58.6%. On the contrary, System Max® had a poor effect against *C. eragrostidis*, 5.1 times lower than Tonka® (0.125%). Control group had a radial mycelial growth of 7.7 cm. The results of the inhibition assays with the five products at four doses in 5 d are showed in Figure 2.

Tonka® achieves a CL₅₀ of 0.008%, which was the lowest value in comparison with the rest of the treatments, 32.2 times lower than Sedric 4X® (0.260%) and 449.8 times lower than System Max® (3.59%) (Table 4). However, BliteFree®, BioFungus Clean® also showed good values with 0.015% and 0.017%, respectively. In EC₉₀, the best result was again for Tonka® with 0.040%, which was 9.7 times lower than BioFungus Clean® and 4.9 times lower than BliteFree®. The linear regression analysis between inhibition percentages and product doses (Figure 3) indicated a high correlation between System Max® concentrations ($r=0.86$, $P \leq 0.0001$) and Sedric 4X®, ($r=0.69$, $P \leq 0.0001$) and their inhibition percentages with highly significant differences. On the contrary, BliteFree® showed a low correlation between concentration and inhibition ($r=0.40$, $P \leq 0.0008$). On the other hand, Tonka® and BioFungus Clean® did not indicate a statistical difference ($P \leq 0.1191$ and $P \leq 0.0939$, Table 4).

Leaf spot disease caused by *C. eragrostidis* is an emerging disease of pineapple production in Colima, Mexico (Maldonado-Michel *et al.*, 2021), the present study corroborates the identity of the causative agent morphologically and molecularly. In South America, it has been reported at *C. eragrostidis* as a plant pathogen in pineapple plants in similar features by Ferreira *et al.* (2014). In other

todas las concentraciones, con una inhibición 1.2 veces menor que Tonka®. BliteFree® registró la tasa de inhibición más alta ($P \leq 0.0002$), con 63.7% a la concentración más alta, mientras que las concentraciones más bajas produjeron reducciones de 55.8 y 58.6%. En contraste, System Max® tuvo un pobre efecto contra *C. eragrostidis*, 5.1 veces menor que Tonka® (0.125%). El grupo control tuvo un crecimiento micelial radial de 7.7 cm. La Figura 2 muestra los resultados de los ensayos de inhibición con cuatro dosis de los cinco productos después de 5 días.

Tonka® logra un CL₅₀ de 0.008%, que fue el valor más bajo en comparación con el resto de los tratamientos, 32.2 veces menor que Sedric 4X® (0.260%) y 449.8 veces menor que System Max® (3.59%) (Cuadro 4). Sin embargo, BliteFree® y BioFungus Clean® también mostraron buenos valores con 0.015 y 0.017%, respectivamente. En la CE₉₀, el mejor resultado fue nuevamente para Tonka® con 0.040%, 9.7 veces menor que BioFungus Clean® y 4.9 veces menor que BliteFree®. El análisis de regresión lineal entre los porcentajes de inhibición y las dosis del producto (Figura 3) indicó una alta correlación entre las concentraciones de System Max® ($r=0.86$, $P \leq 0.0001$) y Sedric 4X®, ($r=0.69$, $P \leq 0.0001$), y sus porcentajes de inhibición, con diferencias muy significativas. Por el contrario, BliteFree® mostró una baja correlación entre la concentración y la inhibición ($r=0.40$, $P \leq 0.0008$). Por otro lado, Tonka® y BioFungus Clean® no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.1191$ y $P \leq 0.0939$, Cuadro 4).

La enfermedad de la mancha foliar causada por *C. eragrostidis* es una enfermedad emergente de la producción de piña en Colima, México (Maldonado-Michel *et al.*, 2021). El presente estudio corrobora morfológica y molecularmente la identidad del agente causal. En América del Sur, *C. eragrostidis* ha sido reportado como patógeno vegetal en plantas

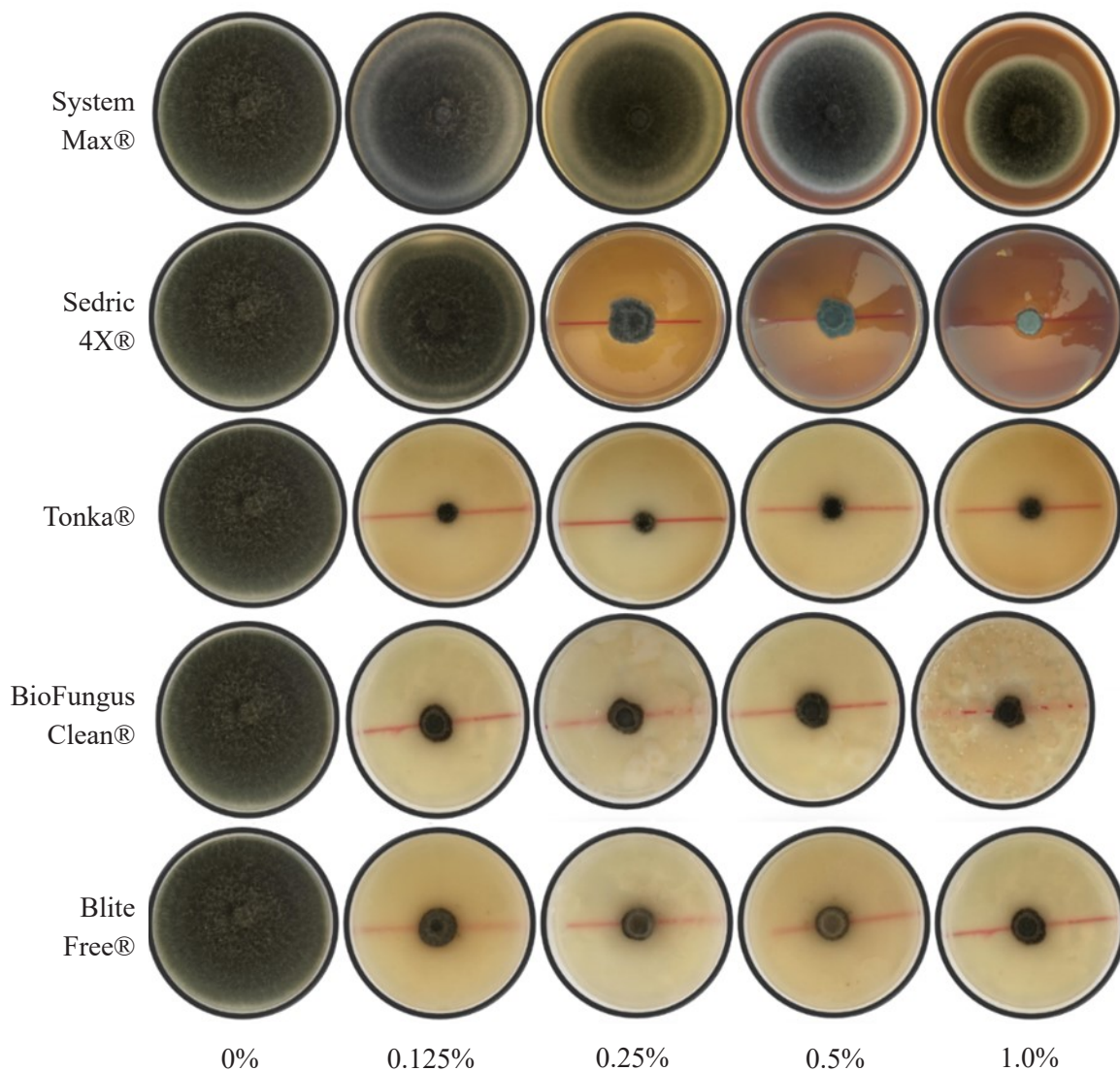


Figure 2. Mycelial growth of *Curvularia eragrostidis* in PDA amended with five doses of biological products.
Figura 2. Crecimiento micelial de *Curvularia eragrostidis* en PDA suplementado con cinco dosis de productos biológicos.

hand, plant extracts have been used to control plant pathogens in biological and organic agriculture. La-Torre *et al.* (2014) evaluated the *in vitro* efficiency of a Mimoten®, a PB extract of *Mimosa tenuiflora* (80.0%) against *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea* with a maximum inhibition of 19.2% and 14.1%, respectively, at maximum doses (1.0%). There are no reports of the use of *M. tenuiflora*

de piña por Ferreira *et al.* (2014), con características similares a las identificadas en el presente estudio. Se han utilizado extractos de plantas para controlar patógenos vegetales en agricultura biológica y orgánica. La-Torre *et al.* (2014) evaluaron la eficiencia *in vitro* de Mimoten®, un extracto de *Mimosa tenuiflora* (80.0%), contra *Alternaria alternata* y *Botrytis cinerea*. La inhibición máxima

Table 4. Mean effective concentration (EC₅₀) and ninety (EC₉₀) of biological products on *Curvularia eragrostidis*. Cuadro 4. Concentración efectiva media (CE₅₀) y noventa (CE₉₀) de productos biológicos sobre *Curvularia eragrostidis*.

Commercial products	EC ₅₀ (%)	FL (%)	Slope	Probit equation	Chi-X ²	P>Chi-X ²
System Max®	3.599	2.32-7.01	0.8070	y=0.8070(x)-0.4485	85.51	≤0.0001
Sedric 4X®	0.260	0.24-0.27	2.2153	y=2.2153(x)+1.2974	536.62	≤0.0001
Tonka®	0.008	NC	0.0650	y=0.0650(x)+0.5264	121.15	≤0.0001
BioFungus Clean®	0.017	NC	0.0921	y=0.0921 (x)+0.1631	12.70	≤0.0004
BliteFree®	0.015	NC	0.1579	y=0.1579 (x)+0.2876	38.79	≤0.0001
Commercial products	EC ₉₀ (%)	FL (%)	Slope	Probit equation	Chi-X ²	P>Chi-X ²
System Max®	139.405	47.22-758.51	0.8070	y=0.8070(x)+(-0.4485)	85.51	≤0.0001
Sedric 4X®	0.984	0.885-1.110	2.2153	y=2.2153(x)+1.2974	536.62	≤0.0001
Tonka®	0.040	NC	0.0650	y=0.0650(x)+0.5264	121.15	≤0.0001
BioFungus Clean®	0.388	NC	0.0921	y=0.0921 (x)+0.1631	12.70	≤0.0004
BliteFree®	0.197	NC	0.1579	y=0.1579 (x)+0.2876	38.79	≤0.0001

FL=fiducial limits, NC=no estimated by the model, X=biological product concentration, Y=inhibition percentage.
/ LF=limites fiduciales, NC=no estimado por el modelo, X=concentración del producto biológico, Y=porcentaje de inhibición. .

against *C. eragrostidis*; in this case, System Max® contains *M. tenuiflora*, but it is supplemented with *Quercus* sp. extract and gallic acid, which increased the inhibition up to 34.6%. *Quercus* extracts have been tested as antibacterial and antifungal activity, in this sense, Söhretoglu *et al.* (2007) tested methanolic extracts from four *Quercus* species, against gram (+) and (-) bacteria and three *Candida* spp. Extracts were more effective against fungi than bacteria. In filamentous fungi, Yeo *et al.* 2008 tested *Q. mongolica* in aqueous, methanolic and ethanolic extracts against *Botrytis cinerea*, being the aqueous extract more effective. Gallic acid and other phenolic compounds have been tested as an antifungal for human and plant pathogens.

In *Trichophyton rubrum*, gallic acid (50.0 µg mL⁻¹) reduced the activity of sterol 14α-demethylase P450 (CYP51) and squalene epoxidase altering the fungal membrane (Li *et al.*, 2017). In the present study, Sedric 4X®, PB extract of *Y. schidigera* showed 86% of inhibition at the highest concentration. Wulff *et al.* (2012) evaluated

obtenida fue de 19.2% y 14.1%, respectivamente, a dosis máximas (1.0%). No hay reportes del uso de *M. tenuiflora* contra *C. eragrostidis*. System Max®, usado en el presente estudio, contiene *M. tenuiflora*, pero complementado con extracto de *Quercus* sp. y ácido gálico, lo que aumentó la inhibición hasta 34.6%. La actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos de *Quercus* han sido probados antes. Söhretoglu *et al.* (2007) probaron extractos metanólicos de cuatro especies de *Quercus* contra bacterias gram (+) y (-) y tres bacterias *Candida* spp. Los extractos fueron más efectivos contra los hongos que contra las bacterias. En hongos filamentosos, Yeo *et al.* (2008) probaron *Q. mongolica* en extractos acuosos, metanólicos y etanólicos contra *Botrytis cinerea*, siendo el extracto acuoso más efectivo. El ácido gálico y otros compuestos fenólicos se han probado como antifúngicos contra patógenos humanos y vegetales.

En *Trichophyton rubrum*, el ácido gálico (50.0 µg mL⁻¹) redujo la actividad de la enzima estero 14α-desmetilasa P450 (CYP51) y de la enzima

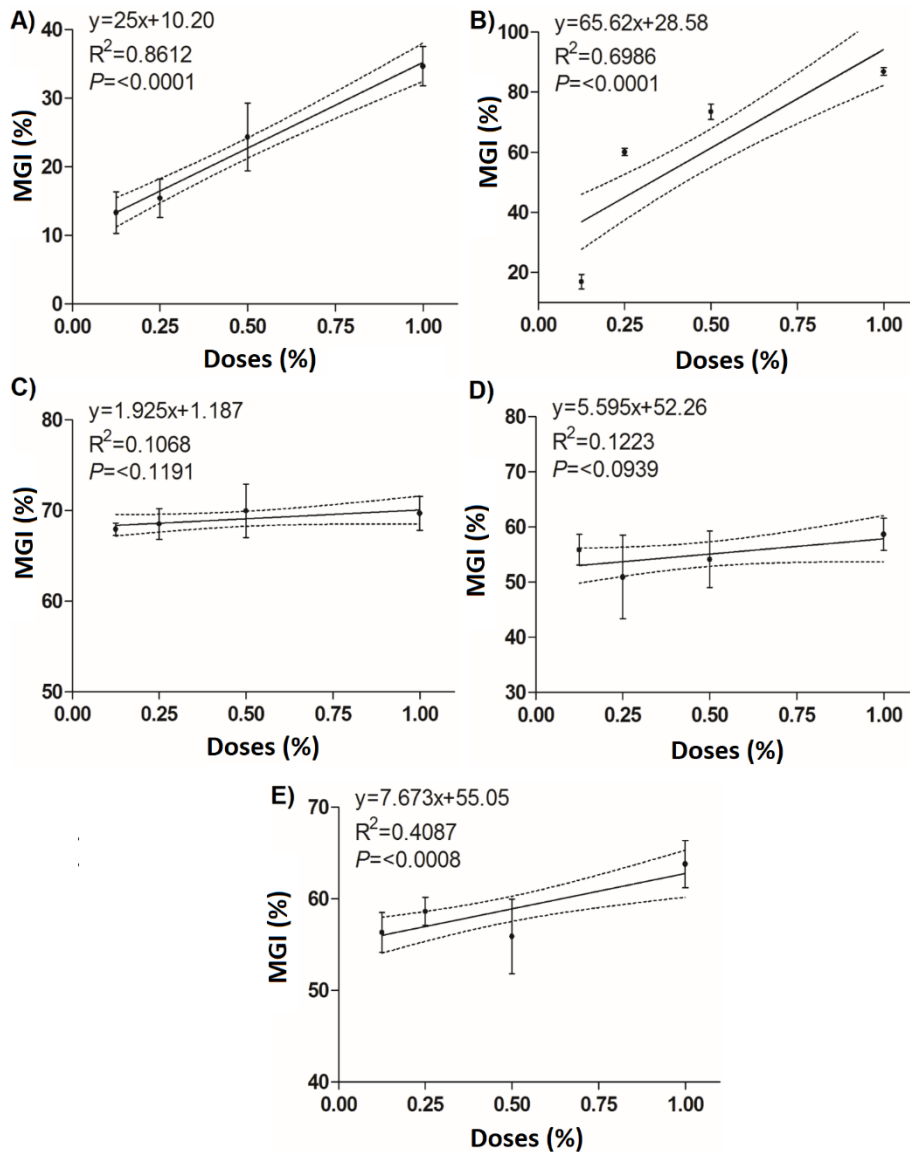


Figure 3. Linear regression between the mycelial growth inhibition (%) of *Curvularia eragrostidis* and the doses of the biological products. A) System Max®; B) Sedric 4X®; C) Tonka®; D) BioFungus Clean® and E) BliteFree®.

Figura 3. Regresión lineal entre la inhibición del crecimiento micelial (%) de *Curvularia eragrostidis* y las dosis de los productos biológicos. A) Sistema Max®; B) Sedric 4X®; C) Tonka®; D) BioFungus Clean® y E) BliteFree®.

the effect of *Y. schidigera* extract against *C. lunata* from sorghum, no incidence (0%) was achieved when was used 10.0% (v/v) of *Y. schidigera* extract. These plants are rich in saponins, which can alter the cell membranes having a toxic effect on fungi. Maldonado-Michel *et al.* (2021) tested hexane,

escualeno epoxidasa, alterando la membrana fúngica (Li *et al.*, 2017). En el presente estudio, Sedric 4X®, extracto de *Y. schidigera* mostró 86% de inhibición en la concentración más alta. Wulff *et al.* (2012) evaluaron el efecto del extracto de *Y. schidigera* contra *C. lunata* de sorgo, no se

ethyl acetate dichloromethane and methanol PE of *Swietenia humilis* against this isolate of *C. eragrostidis*, being the ethyl-acetate at 500 mg L⁻¹ the most effective with 68.0% of MGI. The main secondary metabolites of *S. humilis* are limonoids, a kind of triterpenoids that are found in the seeds (Ovalle-Magallanes *et al.*, 2015).

A complete inhibition (100.0%) of spore germination of *C. lunata* using *Cinnamomum zeylanicum* organic extracts at lowest concentration (50 µg mL⁻¹) and a complete fungicidal activity at highest concentration (500 µg mL⁻¹), but aqueous extracts were not efficient (Mishra *et al.*, 2009). Otherwise, Akinbode (2010) evaluated *in vitro* the efficacy of leaf aqueous extracts of *Gliricidia sepium*, *Tithonia diversifolia*, *Phyllanthus amarus* and *Morinda lucida* to control *C. lunata*. All the extracts at 100% concentration, suppressed the growth of the pathogen.

In the other hand, BliteFree® achieved 55.6-67.7% inhibition against *C. eragrostidis*. These results are similar to those reported by Evangelista-Martínez (2014), who evaluated *Streptomyces* spp. against *Curvularia* sp. with a 55.0% of plant-pathogen growth inhibition. Wonglom *et al.* (2019) confronted *C. lunata* isolated from *Brassica rapa* with *S. angustmyceticus* (NR8-2) with inhibition of 69.0%. Some of the antagonism mechanisms of *Trichoderma* spp. against plant pathogens include antibiosis, mycoparasitism, induced resistance of the host cell, nutrient and niche competition (Ghazanfar *et al.*, 2018). Tekade *et al.* (2017) evaluated *T. viride* and *T. harzianum* against *C. lunata*, presenting 60.8 and 50.7% of inhibition, respectively, in 7 d at 27 °C. These results are similar to BioFungus Clean® which caused 54.8% inhibition in 5 d against *C. eragrostidis*. *Bacillus* spp. is one of the most studied genera as BCA since they present a diverse biochemical activity against plant pathogens (Layton *et al.*, 2011). It

logró inhibición (0%) cuando se utilizó una concentración de 10.0% (v/v) del extracto de *Y. schindigera*. Estas plantas son ricas en saponinas, que pueden alterar las membranas celulares y tienen un efecto tóxico sobre los hongos. Maldonado-Michel *et al.* (2021) probaron hexano, acetato de etilo, diclorometano y metanol para extractos de *Swietenia humilis* contra este aislado de *C. eragrostidis*, siendo el acetato de etilo, a 500 mg L⁻¹, el más efectivo con 68.0% de ICM. Los principales metabolitos secundarios de *S. humilis* son los limonoides, un tipo de triterpenoides que se encuentran en las semillas (Ovalle-Magallanes *et al.*, 2015).

Se ha reportado la inhibición completa (100.0%) de la germinación de esporas de *C. lunata* usando extractos orgánicos de *Cinnamomum zeylanicum* a la concentración más baja (50 µg mL⁻¹) y actividad fungicida completa a la concentración más alta (500 µg mL⁻¹), pero los extractos acuosos no fueron eficientes (Mishra *et al.*, 2009). Por otro lado, Akinbode (2010) evaluó *in vitro* la eficacia de extractos acuosos de hojas de *Gliricidia sepium*, *Tithonia diversifolia*, *Phyllanthus amarus* y *Morinda lucida* para controlar *C. lunata*. Al 100% de concentración, todos los extractos suprimieron el crecimiento del patógeno.

Por otro lado, BliteFree® logró una inhibición de 55.6-67.7% contra *C. eragrostidis*. Estos resultados son similares a los reportados por Evangelista-Martínez (2014), quien evaluó *Streptomyces* spp. contra *Curvularia* sp., logrando un 55.0% de inhibición del crecimiento del patógeno vegetal. Wonglom *et al.* (2019) confrontaron *C. lunata* aislada de *Brassica rapa* con *S. angustmyceticus* (NR8-2), logrando una inhibición del 69.0%. Los mecanismos de antagonismo de *Trichoderma* spp. contra patógenos vegetales incluyen antibiosis, micoparasitismo, resistencia inducida de la célula huésped, competencia por nutrientes y nicho (Ghazanfar *et al.*, 2018). Tekade *et al.* (2017) evaluaron

has been reported that *Bacillus* spp. induces cell membrane defects and cell death in fungal hyphae, when the cell membrane is destroyed the nucleus and protoplast are exuded. Among the secondary metabolites secreted by *Bacillus* spp. has been reported antimicrobial proteins with active components such as paeonol, ethyl palmitate and oxalic acid, which are able to inhibit the sporulation and mycelial growth in fungal plant pathogens (Ku *et al.*, 2021).

Basha and Ulaganathan (2002) evaluated BC121, a chitinase producer *Bacillus* strain against *C. lunata*, with inhibition up to 60.0%. Scanning electron microscope images showed a clear hyphae lysis and degradation of fungal wall. Orberá-Ratón *et al.* (2012) tested five rhizosphere isolates of *B. subtilis* against *C. lunata* with inhibition up to 61.0% (SR/A-1) and *Curvularia gudauskasii* with inhibition up to 71.0% (SR/B-16), and observed vacuolization, bulb formation, hyphal swelling, growing and conidia formation inhibition. However, other strains show different results. For example, Fleitas-Centurion and Grabowsky-Ocampos (2015) evaluated a *Bacillus* sp. (500 uL) against *Curvularia* sp. with 31.0% of inhibition. These previously reported values are heterogeneous, as occurred with BioFungus Clean® and Tonka®.

Sunpapao *et al.* (2018) confronted *C. oryzae* against *S. hygroscopicus*, *T. harzianum* and an endophytic *Trichoderma* species (V76-12), the latter was the most effective treatment tested in reducing leaf spot disease of oil palm seedlings with 85.71% of MGI. The formulation of Tonka® consists of three species consortia: a fungus (*T. harzianum*), a *Bacillus* species (*B. subtilis*), and an actinobacteria (*S. lydicus*). These results are interesting, because BioFungus Clean® has four species, two bacteria (*B. subtilis* and *B. thuringiensis*) and two fungi (*T. harzianum* and *T. viride*), this situation suggest that is more efficient a higher phylogenetic, biochemical and ecological

T. viride y *T. harzianum* contra *C. lunata*, logrando 60.8 y 50.7% de inhibición, respectivamente, en 7 días a 27 °C. Estos resultados son similares a los obtenidos con BioFungus Clean®, que provocó una inhibición del 54.8% contra *C. eragrostidis* después de 5 días. *Bacillus* spp. es uno de los géneros más estudiados como ACB ya que las presencias que comprende presentan una actividad bioquímica diversa contra patógenos de plantas (Layton *et al.*, 2011). Se ha informado que *Bacillus* spp. induce defectos en la membrana celular y muerte celular en las hifas fúngicas, cuando la membrana celular se destruye, el núcleo y el protoplasto se exudan. Entre los metabolitos secundarios secretados por *Bacillus* spp., se han reportado proteínas antimicrobianas con componentes activos como paeonol, palmitato de etilo y ácido oxálico, que son capaces de inhibir la esporulación y el crecimiento micelial en hongos patógenos de plantas (Ku *et al.*, 2021).

Basha y Ulaganathan (2002) evaluaron la cepa BC121 de *Bacillus*, productora de quitinasa, contra *C. lunata*, registrando una inhibición de hasta 60.0%. Las imágenes del microscopio electrónico de barrido mostraron una clara lisis de hifas y degradación de la pared fúngica. Orberá-Ratón *et al.* (2012) probaron cinco aislados de rizosfera de *B. subtilis* contra *C. lunata*, registrando una inhibición de hasta 61.0% (SR/A-1), y contra *Curvularia gudauskasii*, logrando una inhibición de hasta 71.0% (SR/B-16). Los autores observaron vacuolización, formación de bulbos, hinchazón de hifas, crecimiento e inhibición de la formación de conidios. Sin embargo, otras cepas han mostrado resultados diferentes. Por ejemplo, Fleitas-Centurion y Grabowsky-Ocampos (2015) evaluaron *Bacillus* sp. (500 uL) contra *Curvularia* sp., registrando 31.0% de inhibición. Los valores reportados anteriormente son heterogéneos, como ocurrió en el presente estudio con BioFungus Clean® y Tonka®.

Sunpapao *et al.* (2018) enfrentaron a *C. oryzae* contra *S. hygroscopicus*, *T. harzianum* y una espe-

diverse composition than a high number of close-related microorganisms. This is coherent with the concept of suppressive soils, on which plant diseases do not develop even with the presence of a plant pathogen in a susceptible host and favorable conditions. Pathogens may or not establish, persist, cause no or low harm, or the disease may manifest but disappear over time, which is widely attributed to soil microbiomes. General suppression depends on a high diversity and abundance of microorganisms, competing for space and resources; while specific suppression on the effect of individuals or groups of microorganisms directly over the life cycle of a pathogen (Raaijmakers and Mazola, 2016).

Research of microorganisms with BCA potential is challenging because the *in vitro* behavior might be promising, but the application in agricultural lands results in fluctuations of effectiveness. Production of metabolites is a common phenomenon in antagonistic relationships; however, their synthesis carries an energetic cost, which must be compensated with the benefits and can be influenced by toxic substances and the proportion of strains. For example, bacterial antagonism rises with carbon source metabolism similarities (Russel *et al.*, 2017). We can differentiate microorganisms into productive and sensitive strains, which interact according to microbial diversity and their environment (Kelsic *et al.*, 2015). Production of metabolites and their related processes decreases the growth rate. Despite this, productive strains rise compared to sensitive ones, even with low growth rates. The carbon source is not a problem when strains are grown *in vitro*; however, in agricultural lands, organic matter fluctuates according to soil type and management. Also, the use of fungicides and bactericides affected native microorganisms and added BCA and their performance. In addition to studying the diversity of soil microorganisms to develop biological products; another alternative is

cie endofítica de *Trichoderma* (V76-12). Este fue el tratamiento más efectivo para reducir la mancha foliar de plántulas de palma aceitera, con 85.71% de ICM. La formulación de Tonka® consta de tres consorcios de especies: un hongo (*T. harzianum*), una especie de *Bacillus* (*B. subtilis*) y una actinobacteria (*S. lydicus*). Estos resultados son interesantes, ya que BioFungus Clean® tiene cuatro especies, dos bacterias (*B. subtilis* y *B. thuringiensis*) y dos hongos (*T. harzianum* y *T. viride*). Esta situación sugiere que es más eficiente una composición más diversa en términos filogenéticos, bioquímicos y ecológicos que un alto número de microorganismos estrechamente relacionados. Esto es coherente con el concepto de suelos supresores, en los que las enfermedades de las plantas no se desarrollan incluso con la presencia de un patógeno vegetal en un huésped susceptible y en condiciones favorables. Los patógenos pueden o no establecerse, persistir, causar poco o ningún daño, o la enfermedad puede manifestarse, pero desaparecer con el tiempo, lo que se atribuye ampliamente a los microbiomas del suelo. La supresión general depende de una gran diversidad y abundancia de microorganismos compitiendo por espacio y recursos, mientras que la supresión específica depende del efecto directo de individuos o grupos de microorganismos sobre el ciclo de vida de un patógeno (Raaijmakers y Mazola, 2016).

La investigación de microorganismos con potencial como ACB es un desafío porque el comportamiento *in vitro* puede ser prometedor, pero la aplicación en tierras agrícolas da como resultado fluctuaciones en la efectividad. La producción de metabolitos es un fenómeno común en las relaciones antagónicas. Sin embargo, su síntesis conlleva un costo energético que debe ser compensado con los beneficios y que puede ser influenciado por sustancias tóxicas y la proporción de cepas. Por ejemplo, el antagonismo bacteriano aumenta con

the design of synthetic microorganism communities or “syncoms”. This highly diverse consortium results closer to a natural community, with higher complexity and resilience (Rábago-Aguilar *et al.*, 2020). By other hand, this study provides the LC_{50} values for five biofungicides against *C. eragrostidis*, LC_{50} indicates the amount of biofungicide required to inhibit the 50% of fungal growth. There are no abundant reports of biological or biorational products with respect to the LC_{50} against *Curvularia* species. Therefore, the present study provides these values, which are useful to define doses to be evaluated under *in situ* conditions. In a previous study, Kumar *et al.* (2020) evaluated the antifungal activity of *Cedrus deodara* essential oil against *C. lunata*, *Alternaria alternata* and *Bipolaris spicifera*, reporting LC_{50} values of 2.22, 3.71 and 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ for each fungus, respectively. By other hand, García-Ordaz *et al.* (2021) reported LC_{50} values of chemical fungicides against *C. eragrostidis*, the lowest values were achieved by System Cu®, Mancozeb® 80 WP and Tecto® 60 with 0.024, 0.066 and 0.076%, respectively. Future studies should be carried out to test the LC_{50} under field conditions in pineapple production.

In conclusion, the associated fungus to the leaf spot disease in pineapple plants corresponded at *Curvularia eragrostidis* according to the morphological and molecular analyses. Tonka® was the better biofungicide against *C. eragrostidis*, according to the EC_{50} . While, Sedric 4X® achieved the highest% of MGI at the highest studied doses (1.0%).

LITERATURE CITED

Akinbode OA. 2010. Evaluation of antifungal efficacy of some plant extracts on *Curvularia lunata*, the causal organism of maize leaf spot. African Journal of Environmental Science and Technology 4(11):797-800. <https://doi.org/10.4314/ajest.v4i11.71351>

las similitudes del metabolismo de la fuente de carbono (Russel *et al.*, 2017). Podemos diferenciar los microorganismos en cepas productivas y sensibles que interactúan según la diversidad microbiana y su entorno (Kelsic *et al.*, 2015). La producción de metabolitos y sus procesos relacionados disminuyen la tasa de crecimiento. A pesar de ello, las cepas productivas aumentan frente a las sensibles, incluso con bajas tasas de crecimiento. La fuente de carbono no es un problema cuando las cepas se cultivan *in vitro*. Sin embargo, en las tierras agrícolas la materia orgánica fluctúa según el tipo de suelo y de su manejo. Asimismo, el uso de fungicidas y bactericidas afecta a los microorganismos nativos. Además de estudiar la diversidad de microorganismos del suelo para desarrollar productos biológicos, otra alternativa es el diseño de comunidades sintéticas de microorganismos “syncoms”. Estos consorcios altamente diversos resultan más cercanos a las comunidades naturales, con mayor complejidad y resiliencia (Rábago-Aguilar *et al.*, 2020).

El presente estudio proporciona los valores de CE_{50} de cinco biofungicidas contra *C. eragrostidis*. Los valores de CE_{50} indican la cantidad de biofungicida requerida para inhibir el 50% del crecimiento fúngico. No existen muchos reportes de la CE_{50} de productos biológicos o biorracionales contra especies de *Curvularia*. El presente estudio proporciona estos valores, que son útiles para definir las dosis a evaluar en condiciones *in situ*. En un estudio previo, Kumar *et al.* (2020) evaluaron la actividad antifúngica del aceite esencial de *Cedrus deodara* contra *C. lunata*, *Alternaria alternata* y *Bipolaris spicifera*, reportando valores de EC_{50} de 2.22, 3.71 y 4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para cada hongo, respectivamente. Por su parte, García-Ordaz *et al.* (2021) reportaron los valores de CE_{50} de fungicidas químicos contra *C. eragrostidis*. Los valores más bajos se registraron con System Cu®, Mancozeb® 80 WP y

- Bahekar AM, Ingle RW and Kendre VP. 2017. Efficacy of fungicides and bioagent against fungal pathogens of *Aloe vera*. International Journal of Chemistry Studies 5(4):1540-1543. <https://www.chemjournal.com/archives/?year=2017&vol=5&issue=4&ArticleId=845>
- Basha S and Ulaganathan K. 2002. Antagonism of *Bacillus* species (strain BC121) towards *Curvularia lunata*. Current Science 82(12):1457-1463. <https://www.jstor.org/stable/24106181>
- Cerqueira-Sales MD, Barcellos-Costa H, Fernandes PMB, Aires-Ventura J and Dummer-Meira D. 2016. Antifungal activity of plant extracts with potential to control plant pathogens in pineapple. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 6 (1):26-31. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.09.026>
- 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>
- Ferreira APS, Pinho DB, Machado AR and Pereira OL. 2014. First report of *Curvularia eragrostidis* causing postharvest rot on pineapple in Brazil. Plant Disease 98(9):1277-1277. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-14-0288-PDN>
- Fleitas-Centurión A y Grabowski-Ocampos CJ. 2015. Control biológico del complejo de hongos causantes de la mancha foliar en maíz dulce (*Zea mays* var. *saccharata*) con bacterias benéficas. Investigación Agraria 16(2): 83-92. http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2305-06832014000200002&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- García-Osorio MS y Orozco-Gómez BA. 2016. Etiología de enfermedades en el cultivo de piña (*Ananas comosus* L. cv. Monte lirio) y pruebas de antagonismo “*in vitro*” con *Trichoderma*. Master Thesis, Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua. 51 pp.
- Ghazanfar MU, Raza M, Raza W and Qamar MI. 2018. *Trichoderma* as potential biocontrol agent, its exploitation in agriculture. Plant Protection 2(3):109-135. <https://esciencepress.net/journals/index.php/PP/article/view/3142/1571>
- Heydari A and Pesarakli M. 2010. A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. Journal of Biological Science 10(4): 273-290. <https://doi.org/10.3923/jbs.2010.273.290>
- INEGI (2019). Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2019. <https://www.inegi.org.mx>. Accessed: May 5, 2021.
- Kelsic ED, Zhao J, Vetsigian K and Kishony R. 2015. Counteraction of antibiotic production and degradation stabilizes microbial communities. Nature 521(7553): 516-519. <https://doi.org/10.1038/nature14485>
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution 16(2):111-120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Tecto® 60 con 0.024, 0.066 y 0.076%, respectivamente. Se deben realizar más estudios para probar la CE₅₀ en condiciones de campo en la producción de piña.
- En conclusión, el hongo asociado a la enfermedad de la mancha foliar en plantas de piña correspondió a *Curvularia eragrostidis* según los análisis morfológicos y moleculares. Tonka® fue el mejor biofungicida contra *C. eragrostidis*, según la CE₅₀. Mientras que Sedric 4X® logró el mayor% de ICM en la dosis más alta estudiada (1.0%).

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

- Kumar A, Suravajhala R and Bhagat M. 2020. Bioactive potential of *Cedrus deodara* (Roxb.) Loud essential oil (bark) against *Curvularia lunata* and molecular docking studies. SN Applied Sciences 2:1045. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-2837-6>
- Ku Y, Yang N, Pu P, Mei X, Cao L, Yang X and Cao C. 2021. Biocontrol mechanism of *Bacillus subtilis* C3 against bulb rot disease in *Fritillaria taipaiensis* P.Y.Li. Frontiers in Microbiology 12:756329. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.756329>
- La-Torre A, Caradonia F, Gianferro M, Molinu MG and Battaglia V. 2014. Activity of natural products against some phytopathogenic fungi. Communication in Agricultural and Applied Biological Sciences 79(3):439-449. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26080478/>
- Layton C, Maldonado E, Monroy L, Corrales LC, Sánchez LC. 2011. *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. NOVA 9(15):177-187. <https://doi.org/10.22490/24629448.501>
- Li ZJ, Liu M, Dawuti G, Dou Q, Ma Y, Liu HG and Aibai S. 2017. Antifungal activity of gallic acid *in vitro* and *in vivo*. Phytotherapy Research 31(7):1039-1045. <https://doi.org/10.1002/ptr.5823>
- Maldonado-Michel MA, Muñiz-Valencia R, Peraza-Campos AL, Ramos RCP, Valadez-Ramírez P, Parra-Delgado H and Chan-Cupul W. 2021. Antifungal activity of *Swietenia humilis* (Meliaceae: Sapindales) seed extracts against *Curvularia eragrostidis* (Ascomycota: Dothideomycetes). Journal of Plant Disease and Protection 128:471-479. <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00410-1>
- Manamgoda DS, Cai L, McKenzie EH, Crous PW, Madrid H, Chukeatirote E, Shivas RG, Tan YP and Hyde KD.



2012. A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris-Cochliobolus-Curvularia* complex. *Fungal Diversity* 56(1):131-144. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0189-2>
- Manzo-Sánchez G, Ocón-Pérez R, Chan-Cupul W, Silva-Jiménez E, Sánchez-Rangel JC y Ayala-Zermeño MA. 2018. Actividad antifúngica de extractos etanólicos de propóleo contra *Mycosphaerella fijiensis*: un estudio *in vitro*. *Scientia Fungorum* 47:13-24. <https://doi.org/10.33885/sf.2018.47.1189>
- Mishra AK, Mishra A, Kehri HK, Sharma B and Pandey AK. 2009. Inhibitory activity of Indian spice plant *Cinnamomum zeylanicum* extracts against *Alternaria solani* and *Curvularia lunata*, the pathogenic dematiaceous moulds. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 8(1):1-7. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-8-9>
- García-Ordaz HA, Chan-Cupul W, Buenrostro-Nava MT and Valadez-Ramírez P. 2021. Efectividad *in vitro* de fungicidas químicos contra *Curvularia eragrostidis* (Henn.) J. A. Mey, agente causal de la mancha foliar en piña. *Scientia Agropecuaria* 12(3):429-434. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.047>
- Orberá-Ratón T, González-Giro Z, Serrat-Díaz M and Rodríguez-Pérez S. 2012. *In vitro* growth inhibition of *Curvularia gudauskasii* by *Bacillus subtilis*. *Annals of Microbiology* 62(2):545-551. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0290-x>
- Orberá-Ratón T, Serrat-Díaz M y González-Giro Z. 2009. Potencialidades de bacterias aerobias formadoras de endosporas para el biocontrol en plantas ornamentales. *Fitosanidad* 13:95-100. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0290-x>
- Orozco-Santos M, Manzo-Sánchez G, Guzmán-González S, Fariás-Larios J y Timmer LW. 2004. Crecimiento y cambios morfológicos de *Colletotrichum acutatum* Simmonds, agente causal de la antracnosis del Limón Mexicano (*Citrus aurantifolia* Christm. Swingle) incubado en diferentes medios. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22(3):423-428. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61222316.pdf>
- Ovalle-Magallanes B, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J and Mata R. 2015. Hypoglycemic and antihyperglycemic effects of phytopreparations and limonoids from *Swietenia humilis*. *Phytochemistry* 110:111-119. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.11.004>
- Raaijmakers JM and Mazzola M. 2016. Soil immune responses. *Science* 352(6292):1392-1393. <https://doi.org/10.1126/science.aaf3252>
- Rábago-Aguilar J, Hernández-Navarro E y Sepúlveda-Sánchez HE. 2020. Suelos supresores: ecología microbiana para el control de enfermedades en plantas. In: Orozco-Mosqueda MC y Santoyo-Pizano G (eds.) *Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: Aspectos básicos y aplicaciones para una agricultura sustentable*. 1st ed. Fontamara, México. 131-148 pp.
- Rocha-Santos PR, Urzêdo-Leão E, Souza-Aguiar RW, Pereira-Melo M and Rodrigues-Santos G. 2018. Morphological and molecular characterization of *Curvularia lunata* pathogenic to andropogon grass. *Bragantia* 77(2):326-332. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.2017258>
- Russel J, Roder HL, Madsen JS, Burmolle M, Sorensen SJ. 2017. Antagonism correlates with metabolic similarity in diverse bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114(40):10684-10688. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706016114>
- Sanewski GM, Bartholomew DP and Paull RE. 2018. The pineapple: botany, production and uses. CABI. <https://doi.org/10.1079/9780851995038.0000>
- Söhretoglu D, Ekizoglu M, Kiliç E and Sakar MK. 2007. Antibacterial and antifungal activities of some *Quercus* species growing in Turkey. *FABAD Journal of Pharmacy Science* 32(3):127-130. <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/2253125>
- Sunpapao A, Chairin T and Ito SI. 2018. The biocontrol by *Streptomyces* and *Trichoderma* of leaf spot disease caused by *Curvularia oryzae* in oil palm seedlings. *Biological Control* 123:36-42. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.04.017>
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725-2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst19>
- Tan YP, Crous PW and Shivas RG. 2018. Cryptic species of *Curvularia* in the culture collection of the Queensland Plant Pathology Herbarium. *MycKeys* 35(11):1-25. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.35.25665>
- Tekade A, Koche MD, Kothikar RB and Surpam AN. 2017. Efficacy of fungicides and bioagents against *Curvularia lunata* causing blight of coleus under laboratory conditions. *Journal of Medicinal Plants Studies* 5(2):189-191. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.17611.13600>
- Thompson JD, Gibson TJ and Higgins DG. 2003. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current Protocols in Bioinformatics* 2.3.1-2.3.22. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0203s>
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA gene for phylogenetics. In: MA Innis, DH Gelfand, J Sninsky, TJ White (Eds.). *PCR protocols, a guide to methods and applications* San Diego, California, E.U.A., Academic Press. pp. 315-322. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>
- Wonglom P, Suwannarach N, Lumyong S, Ito SI, Matsui K and Sunpapao A. 2019. *Streptomyces angustmyceticus* NR8-2 as a potential microorganism for the biological control of leaf spots of *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* caused by *Colletotrichum* sp. and *Curvularia lunata*. *Biological Control* 138:104046. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104046>



- Wulff EG, Zida E, Torp J and Lund OS. 2012. *Yucca schidigera* extract: a potential biofungicide against seedborne pathogens of sorghum. *Plant Pathology* 61(2):331-338. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02517.x>
- Yeo HD, Lee HC, Lim BK, Kim HK, Choi MS and Yang JK. 2008. Antifungal activity of the *Quercus mongolica* extracts against *Botrytis cinerea*. *Journal of the Korean Wood Science and Technology* 36(1):88-101. <https://doi.org/10.5658/WOOD.2008.36.1.088>.
- Zhong LC, Ai YJ, Chun RH and Yi YD. 2016. Identification of *Curvularia clavata* causing leaf spot on pineapple (*Ananas comosus*) in China. *Canadian Journal of Plant Pathology* 38(2):250-253. <https://doi.org/10.1080/07060661.2016.1158743>.