

# Inhibition of fungal endo-1,3- $\beta$ -glucanase by phenols isolated from *Turnera diffusa*: an alternative for conventional antifungals

## Inhibición de endo-1,3- $\beta$ -glucanasa fúngica por compuestos fenólicos aislados de *Turnera diffusa*: una alternativa para antifúngicos convencionales

**Paulina Tapia-Quirós, Miguel Ángel Martínez-Téllez**, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas No. 46. Colonia La Victoria, Hermosillo, Sonora, 83304, México; **Graciela Dolores Ávila-Quezada**, Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Ciudad Universitaria s/n. Chihuahua, Chihuahua, 31313, México; **Irasema Vargas-Arispuro\***, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas No. 46. Colonia La Victoria, Hermosillo, Sonora, 83304, México. \*Corresponding author: iris@ciad.mx

**Recibido:** 14 de Noviembre, 2019.

**Aceptado:** 19 de Diciembre, 2019.

Tapia-Quirós P, Martínez-Téllez MA, Ávila-Quezada GD and Vargas-Arispuro I. 2020. Inhibition of fungal endo-1,3-  $\beta$ -glucanase by phenols isolated from *Turnera diffusa*: an alternative for conventional antifungals. Mexican Journal of Phytopathology 38(1): 160-169.

**DOI:** 10.18781/R.MEX.FIT.1911-3

Primera publicación DOI: 26 de Diciembre, 2019.

First DOI publication: December 26, 2019.

**Abstract.** The fungal enzyme endo-1,3- $\beta$ -glucanase plays a physiological role in morphogenetic processes during development and differentiation in some fungi. Additionally, this enzyme has been implicated in fungal attack during fungus-plant interactions. Therefore, fungal endo-1,3- $\beta$ -glucanase has been used as a target site for the directed search of antifungal compounds. Using

**Resumen.** La enzima endo-(1,3)- $\beta$ -glucanasa tiene una función fisiológica en los procesos morfo-genéticos durante el desarrollo y diferenciación en algunos hongos. Adicionalmente, esta enzima ha sido implicada durante el ataque de hongo en la interacción hongo fitopatógeno-planta. Por lo que la endo-(1,3)- $\beta$ -glucanasa fúngica, se ha utilizado como sitio-objetivo para la búsqueda dirigida de antifúngicos. Utilizando un aislamiento bio-dirigido de compuestos bioactivos, se aislaron dos ácidos fenólicos de tallos de *Turnera diffusa*, los cuales inhiben la actividad de endo-(1,3)- $\beta$ -glucanasa fúngica. Los compuestos identificados como apigenina y luteolina inhiben la actividad del enzima en 90 y 60%, respectivamente. Consistente con el efecto de la inhibición de la enzima fúngica, la apigenina a concentración milimolar, fue capaz de inhibir completamente la germinación de esporas de *Botrytis cinerea*. Con estos resultados se infiere que

the biodirected isolation of bioactive compounds, two phenolic compounds were isolated from *Turnera diffusa* stems that inhibited the activity of fungal endo-1,3- $\beta$ -glucanase. The identified compounds apigenin and luteolin inhibited the activity of the enzyme by 90 and 60%, respectively. Consistent with the inhibitory effect of the fungal enzyme, apigenin at millimolar concentrations was able to completely inhibit the spore germination of *Botrytis cinerea*. It is inferred that the antifungal action of apigenin is due to its ability to inhibit the fungal endo-1,3- $\beta$ -glucanase enzyme.

**Key words:** antifungal, apigenin, luteolin, phenol acids.

Plant pathogenic fungi have developed resistance mechanisms to synthetic fungicides (Dooley *et al.*, 2016), which has promoted the search for new fungicide agents; moreover, fungicide agents isolated from natural sources are especially valued (Mishra *et al.*, 2010). Compounds that exert fungicidal action on a target site are of particular interest because they affect the essential processes involved in fungal growth, specifically those ones required to maintain pathogenic cell viability (Arroyo *et al.*, 2016).

The fungal cell wall is one of the most important target sites because it is a fundamental structure for the viability and pathogenicity of fungi (Arroyo *et al.*, 2016). Antagonistic microorganisms produce enzymes that degrade the components of the cell wall of other microorganisms (Mouyna *et al.*, 2013). Consequently, agents that inhibit the synthesis of fungal cell wall components must be very selective (Balasubramanian *et al.*, 2012). The cell wall of ascomycetes, basidiomycetes, deuteromycetes and some oomycetes is composed of 1,3- $\beta$ -glucans, 1,6- $\beta$ -glucans, chitin and proteins (Kagimura *et al.*,

la acción antifúngica de la apigenina es una consecuencia de su capacidad para inhibir la enzima endo-(1,3)- $\beta$ -glucanasa.

**Palabras clave:** antifúngico, apigenina, luteolina, ácidos fenólicos.

Los hongos fitopatógenos han creado mecanismos de resistencia a los fungicidas sintéticos (Dooley *et al.*, 2016) y esto ha generado la búsqueda de nuevos agentes fungicidas. Además, los agentes fungicidas que se aíslan de fuentes naturales son especialmente valiosos (Mishra *et al.*, 2010). Los compuestos que ejercen acción fungicida en un sitio-objetivo son de interés porque afectan los procesos esenciales involucrados en el crecimiento de los hongos, específicamente aquellos que son necesarios para mantener la viabilidad celular del patógeno (Arroyo *et al.*, 2016).

La pared celular del patógeno es uno de los sitios-objetivo porque se trata de una estructura fundamental de la viabilidad y la patogenicidad de los hongos (Arroyo *et al.*, 2016). Los microorganismos antagonistas producen enzimas que degradan los componentes de la pared celular de otros microorganismos (Mouyna *et al.*, 2013). En consecuencia, los agentes que inhiben la síntesis de la pared celular fúngica deben ser muy selectivos (Balasubramanian *et al.*, 2012). La pared celular de los ascomycetos, basidiomicetos, deuteromicetos y algunos oomicetos está compuesta de 1,3- $\beta$ -glucanos, 1,6- $\beta$ -glucanasa, quitina y proteínas (Kagimura *et al.*, 2015) ordenados en una estructura multicapa. Los 1,3- $\beta$ -glucanos son los polisacáridos más abundantes en la pared celular fúngica (Gastebois *et al.*, 2010; Paspaspyridi *et al.*, 2018). La reorganización estructural dinámica de la pared fúngica durante los cambios morfológicos, como el crecimiento celular (ramificación), la división celular y la germinación

2015) in a multilayered structure. 1,3- $\beta$ -glucans are the most abundant polysaccharide of the fungal cell wall (Gastebois *et al.*, 2010; Papaspyridi *et al.*, 2018). The dynamic structural reorganization of the fungal cell wall during morphological changes, such as cell growth (branching), cell division and germination in filamentous fungi or budding of yeast, are morphogenetic events in which endo- $\beta$ -1,3-glucanases play an essential role in the synthesis of the cell wall (Gastebois *et al.*, 2010; Hartl *et al.*, 2011). Because all of these important morphogenetic events involve the  $\beta$ -1,3-glucans of the fungal wall, a strategy to discover antifungal agents of natural origin is to identify substances that inhibit endo- $\beta$ -1,3-glucanases at specific target sites of fungi whose cell walls contain  $\beta$ -glucans, specifically at the  $\beta$ -1,3-glucan linkage (Balasubramanian *et al.*, 2012; Mouyna *et al.*, 2016). During the search for antifungal substances in plant extracts that selectively inhibit the synthesis of the fungal cell wall, it has been previously reported that the crude extracts of *Turnera diffusa*, effectively inhibited the activity of endo-1,3- $\beta$ -glucanase (Vargas-Arispuro *et al.*, 2017). Therefore, this work was focused on the identification of the components from crude extract of *T. diffusa* that have the inhibitory effect on the fungal endo-1,3- $\beta$ -glucanase activity.

To reach this objective, leaves and small stems of *T. diffusa* (Passifloraceae), were collected from natural populations located near to Tonichi Sonora (28° 35' 56" N, 109° 33' 56" W).

Plant samples were identified the Botanical Herbarium of the Sonora University (Mexico), and a voucher specimen was deposited at the herbarium. The leaves and small stems were separated and air-dried at room temperature for two weeks. Dried material (500 g of leaves or 300 g of small stems) was macerated in methanol (1 L), at room temperature (25 °C) for 7 days in darkness. The filtrates of each extract were evaporated to dryness

en hongos filamentosos o en la gemación en la levadura, son eventos morfogénéticos en los que las endo- $\beta$ -1,3-glucanasas desempeñan un papel esencial en la síntesis de la pared celular (Gastebois *et al.*, 2010; Hartl *et al.*, 2011). Por todos estos importantes eventos morfogénéticos en los cuales los  $\beta$ -1,3-glucanos de la pared fúngica están implicados, una estrategia para descubrir agentes antifúngicos de origen natural, es la búsqueda de sustancias inhibitoras de endo- $\beta$ -1,3-glucanasas como un sitio-objetivo específico de los hongos cuyas paredes celulares contienen  $\beta$ -glucanos, específicamente en el enlace  $\beta$ -1,3-glucano (Balasubramanian *et al.*, 2012; Mouyna *et al.*, 2016). Durante la búsqueda de sustancias antifúngicas en extractos vegetales que inhiben de manera selectiva la síntesis de la pared celular fúngica, con anterioridad se han reportado que los extractos crudos de *Turnera diffusa* inhiben de manera eficaz la actividad de la endo-1,3- $\beta$ -glucanasa (Vargas-Arispuro *et al.*, 2017). Por tanto, el presente trabajo se concentró en la identificación de los componentes del extracto crudo de *T. diffusa*, que tiene un efecto inhibitor de la actividad de la endo-1,3- $\beta$ -glucanasa. Para lograr este objetivo, se recolectaron hojas y tallos pequeños de *T. diffusa* (Passifloraceae) de poblaciones naturales en un sitio cercano a Tonichi, Sonora (28° 35' 56" N, 109° 33' 56" O).

Las muestras fueron identificadas en el Herbario Botánico de la Universidad de Sonora (México) y se depositó una de las muestras en el herbario. Las hojas y los tallos fueron separados y secados al aire a temperatura ambiente por dos semanas. Una vez seco (500 g de hojas o 300 g de tallos), fueron macerados en metanol (1 L), a temperatura ambiente (25 °C) por 7 días, en obscuridad. Los filtrados de cada extracto fueron evaporados a 40 °C bajo presión reducida (450 mmHg) hasta que se eliminó todo el solvente. El residuo viscoso que se obtuvo se denominó extracto crudo de hojas o extracto

at 40 °C under reduced pressure (450 mmHg). The viscous residue resulted, were called the crude extract of leaves or crude extract of stems of *T. diffusa*. The effect of the crude extract on endo-1,3-β-glucanase (*Trichoderma* sp, SIGMA) activity was determined using laminarin (*Laminaria digitata*, SIGMA) by coupled procedure previously described by Vargas-Arispuro *et al.* (2017). The procedure was carried out in 250 μL of a reaction mixture containing 100 mM potassium acetate buffer (pH 5.0), 0.5% (w/v) laminarin, 10 μL of endo-β-1,3-glucanase (0.05 U) and 50 μL of plant crude extract (3 mg mL<sup>-1</sup>) or pure compounds (10 and 25 mM). The reaction was run for 40 min at 37 °C and then stopped by boiling for 5 min. The amount of reducing sugars released was measured with a spectrophotometer (BioSpec-1601) at 540 nm. Enzyme and substrate blanks were also included. A calibration curve with glucose was used. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that catalyzed the release 1 μmol of glucose equivalent per minute under the reaction conditions used. The following equation was used to calculate the enzyme activity. Units mL<sup>-1</sup> of enzyme = (μM of glucose released) (0.410) / (40)(0.01)(0.01), where 0.410 is the total volume of the sample in mL; 40 is the reaction time in min; 0.01 is the volume of the enzyme used in mL and 0.01 is the adjustment volume of the colorimeter in mL. Protein concentrations were determined by the Bradford method, with bovine serum albumin as the standard.

The active compounds in the plant extract were purified by chromatographic techniques. For this procedure, plant crude extract (100 mg) was dissolved in 5 mL of methanol for analysis by preparative thin-layer chromatography (TLC). Preparative TLC plates coated with a GF-254 fluorescent silica gel 60 (5 x 20 cm, 250 μm, EM, Science, Germany) and spotted with plant

crudo de tallos de *T. diffusa*. El efecto del extracto crudo sobre la actividad de la endo-1,3-β-glucanasa (*Trichoderma* sp, SIGMA) se determinó utilizando laminarina (*Laminaria digitata*, SIGMA) mediante el procedimiento acoplado anteriormente descrito por Vargas-Arispuro *et al.* (2017). El procedimiento se realizó en 250 μL de una mezcla de reacción preparada con 100 mM de solución amortiguadora de potasio (pH 5.0), 0.5% (w/v) laminarina, 10 μL de endo-β-1,3-glucanasa (0.05 U) y 50 μL de extracto vegetal crudo (3 mg mL<sup>-1</sup>) o de compuestos puros (10 y 25 mM). La reacción se corrió durante 40 min a 37 °C y luego se detuvo por ebullición por 5 min. La cantidad de azúcares reductores obtenida se midió con un espectrofotómetro (BioSpec-1601) a 540 nm. También se incluyeron los controles de la enzima y el sustrato. Se utilizó una curva de calibración con glucosa. Una unidad de la actividad enzimática se definió como la cantidad de la enzima que catalizó la liberación de 1 μmol de glucosa equivalente por minuto en las condiciones bajo las cuales se produjo la reacción. Para calcular la actividad de la enzima se utilizó la siguiente ecuación: unidades mL<sup>-1</sup> de enzima = (μM de glucosa liberada) (0.410) / (40)(0.01)(0.01), donde 0.410 es el volumen total de la muestra en mL; 40 es el tiempo de reacción en min; 0.01 es el volumen utilizado de la enzima en mL y 0.01 es el volumen ajustado del colorímetro en mL. Las concentraciones de proteína se determinaron utilizando el método Bradford, con albúmina bovina como estándar.

Los compuestos activos en el extracto vegetal fueron purificados mediante técnicas cromatográficas. Para este procedimiento, cada uno de los extractos crudo (100 mg) se disolvió por separado en 5 mL de metanol para su análisis mediante cromatografía de capa fina preparativa (TLC), recubiertas con gel silica fluorescente 60 GF-254 (5 x 20 cm, 250 μm, EM, Science, Alemania) en las que se colocaron muestras de extracto vegetal

crude extract in methanol were developed in dichloromethane. The TLC plate was marked under ultraviolet (UV) light at 254 nm, and each band was carefully scraped off the plate. The scrapings were dissolved in methanol, filtered through filter paper (Whatman N° 1) and centrifuged at 5,000 rpm for 10 min. The methanol filtrates of each band were evaporated to dryness at 40 °C under reduced pressure. A portion of each residue from the separated TLC bands was dissolved (1:1 w/v) in methanol and subjected to an enzyme assay. The fraction that retained the compounds with inhibitory activity was subjected to high pressure liquid chromatography (HPLC) purification process (1260 AgilentTechnology, USA) on an instrument coupled to a photodiode array detector (HP-1260, Germany), with a Nucleosil 120 C18 (250 x 4 mm, 5 µ, Cronus) reverse-phase column. HPLC separation was performed using a gradient program with the mobile phase of 1% formic acid (solvent A) and 100% acetonitrile (Solvent B) and beginning with 80% A in 40 min, 50% A in 60 min, 10% A in 80 min and 0% A in 85 min. The flow rate was 0.3 mL min<sup>-1</sup>, detection was performed at 254, 280 and 320 nm, and spectral data were collected from 240 to 550 nm. Subfractions were collected under 254 nm and subjected to the enzyme assay. The compounds were identified by comparing the data with the UV spectrum of pure compounds from a database of phenolic compounds.

The antifungal evaluation of both plant extracts and the isolated compounds was carried out on spores from *Botrytis cinerea* (a fungus isolated from grape, GenBank accession number AY568636) grown at 25 °C on potato dextrose agar (PDA, Difco, Sparks, MD, USA) in 9-cm diameter petri dishes until sporulation. The spore suspension was prepared by adding 5 mL of sterile water with 0.01% Tween 20 to each plate, and the surface was scraped gently with a glass rod to release spores.

crudo en metanol, fueron procesadas en diclorometano. La placa TLC se reveló con luz ultravioleta (UV) a 254 nm, y cada banda fue cuidadosamente separada de la placa. Los raspados se disolvieron en metanol, se filtró con papel filtro (Whatman N° 1) y se centrifugaron a 5,000 rpm por 10 min. Los filtrados recuperados fueron evaporados at 40 °C a presión reducida hasta que se eliminó todo el solvente. Una porción de cada fracción fue disuelta (1:1 p/v) en metanol para la evaluación enzimática. La fracción que retuvo los compuestos inhibidores, fue sometida proceso de purificación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (1260 AgilentTechnology, EE. UU), acoplado a un detector de arreglo de diodos (HP-1260, Germany), con una columna Nucleosil 120 C18 (250 x 4 mm, 5 µ, Cronus). La separación por HPLC se realizó utilizando un programa de gradientes con la fase móvil de ácido fórmico al 1% (solvente A) y acetonitrilo al 100% (solvente B) y comenzando con 80% de A en 40 min, 50% de A en 60 min, 10% de A en 80 min y 0% de A en 85 min. La tasa de flujo fue de 0.3 mL min<sup>-1</sup>, la detección se llevó a cabo a 254, 280 y 320 nm, y se obtuvieron datos espectrales de 240 a 550 nm. Las subfracciones se recolectaron a 254 nm y se sometieron a un ensayo enzimático. Los compuestos activos se identificaron por comparación de espectro UV de compuestos puros de una base de datos de compuestos fenólicos.

La evaluación antifúngica de ambos extractos vegetales y los compuestos aislados se realizó en esporas de *Botrytis cinerea* (un hongo aislado de uva, número de accesión AY568636 del GenBank) cultivadas a 25 °C en un medio de papa-dextrosa-agar (PDA, Difco, Sparks, MD, EE. UU.) en cajas Petri de 9 cm de diámetro hasta la esporulación. La suspensión de esporas se preparó agregando 5 mL de agua estéril con 0.01% de Tween 20 a cada caja, y la superficie se raspó ligeramente con una varilla de vidrio para liberar las esporas. La suspen-

The water-spore suspension was filtered through glass wool to remove the mycelium. The collected filtrate was centrifuged at 5000 x g for 15 min and adjusted to a density of  $1 \times 10^4$  spores mL<sup>-1</sup> using a hemacytometer. The spore germination assay was performed on microwell strips (Nalge, Nunc, Naperville, IL, USA). Sabouraud dextrose broth (SDB) (Difco, Sparks, MD, USA) (900 µL) containing HPLC fractions (50 and 100 mM) or water (control) was pipetted into each well of a strip of 8 wells per treatment. A spore suspension (100 µL) containing  $\sim 100 \pm 15$  spores of *B. cinerea* was added, the well contents were gently mixed, and the strips were incubated at 25 °C. The germinated spores in each well were counted by microscopic examination until the control spores reached 100% germination. These bioassays were conducted four times. The data were analyzed by analysis of variance of one way using NCSS software (version 2007). The means were compared by Tukey's test ( $p \leq 0.01$ ).

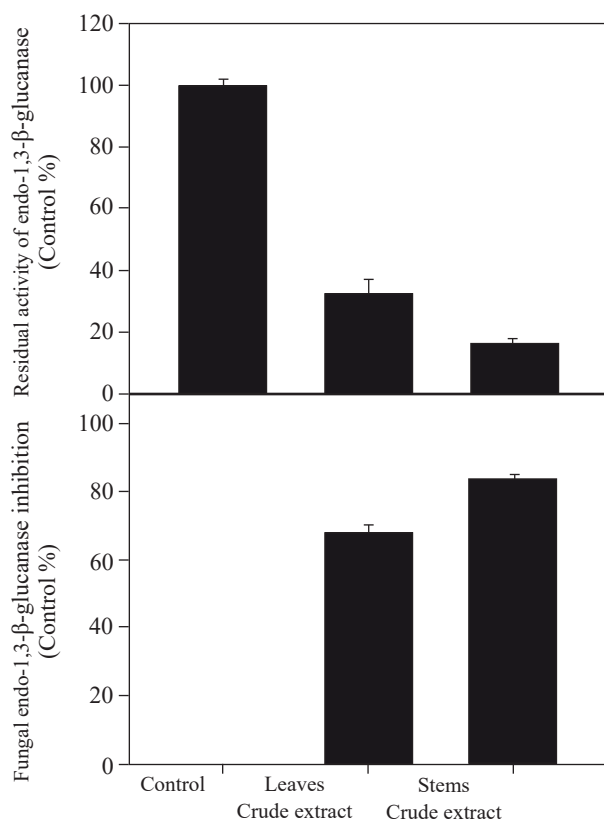
The effect of the plant crude extracts on fungal endo-1,3-β-glucanase is shown in Figure 1. The stem extract showed greater inhibition of enzymatic activity than the leaf extract. Thus, by preparative thin layer chromatography, the crude extract from stems was separated, and four fractions were obtained (Table 1). After evaluating the effect of the fractions on the enzyme, it was determined that the inhibitory compounds of the enzyme were retained in fraction 2 (Table 1). The inhibitory effect of this fraction against fungal endo-1,3-β-glucanase displayed the same inhibition percentage to that of the crude extract of stems (Figure 1).

Based on these results, were separated the compounds from fraction 2 using HPLC. Fifteen identified compounds were classified as phenolic compounds. The evaluation of the effect of each isolated compound on the activity of the fungal endo-1,3-β-glucanase revealed that only 2

sión agua-esporas fue filtrada sobre fibra de vidrio y el filtrado fue centrifugado a 5000 g por 15 min y ajustado a una densidad de  $1 \times 10^4$  esporas mL<sup>-1</sup>, usando un hematocitómetro. El ensayo de germinación de esporas se realizó en tiras de micropocillos (Nalge, Nunc, Naperville, IL, EE. UU.). Con una pipeta, se agregó caldo Sabouraud dextrosa (SDB) (Difco, Sparks, MD, EE. UU.) (900 µL) que contenía fracciones de HPLC (50 y 100 mM) o agua (control) a cada pocillo de una tira de 8 pocillos por tratamiento. Se agregó la suspensión de esporas (100 µL) que contenía  $\sim 100 \pm 15$  esporas de *B. cinerea*, el contenido de los pocillos se mezcló suavemente, y se incubaron a 25 °C. Las esporas germinadas en cada pocillo se cuantificaron mediante un examen microscópico hasta que las esporas control alcanzaron el 100% de germinación. Los bioensayos se realizaron cuatro veces. Los datos se sometieron a un análisis de varianza de una vía con el software NCSS versión 2007. Las medias se compararon con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.01$ ).

El efecto de los extractos vegetales crudos sobre la endo-1,3-β-glucanasa fúngica se muestra en la Figura 1. El extracto de tallos mostró mayor inhibición de la actividad enzimática que el extracto de hojas. Por tanto, se separó el extracto crudo de los tallos, mediante cromatografía de capa fina preparativa, y se obtuvieron cuatro fracciones (Cuadro 1). Después de evaluar el efecto de las fracciones sobre la enzima, se determinó que los compuestos inhibidores de la enzima fueron retenidos en la fracción 2 (Cuadro 1). El efecto inhibitorio de esta fracción contra la endo-1,3-β-glucanasa fúngica mostró el mismo porcentaje de inhibición que el del extracto crudo de los tallos (Figura 1).

Con base en estos resultados, se separaron los compuestos de la fracción 2 mediante HPLC. Quince de los compuestos identificados fueron clasificados como compuestos fenólicos. La evaluación del efecto de cada compuesto aislado sobre la



**Figure 1.** Effect of the leaf and stem crude extracts of *Turnera diffusa* on the activity of fungal endo-1,3-β-glucanase evaluated at 3 mg mL<sup>-1</sup> expressed as a percentage of inhibition related to control (means ± SD, n=6).

**Figura 1.** Efecto de los extractos crudos de hojas y tallos de *Turnera diffusa* en la actividad fúngica de la endo-1,3-β-glucanasa evaluado a 3 mg mL<sup>-1</sup>, expresado como porcentaje de inhibición con respecto al control (media ± SD, n=6).

actividad de la endo-1,3-β-glucanasa fúngica reveló que solo dos compuestos, identificados como luteolina y apigenina, evaluados a 25 mM, inhibieron la enzima fúngica en 60 y 89%, respectivamente. Los otros 13 compuestos no tuvieron efecto sobre la actividad de la enzima fúngica (Cuadro 2). La apigenina y la luteolina mostraron efectos inhibitorios sinérgicos sobre la actividad de la enzima, y cuando se evaluaron juntas a la misma concentración mostraron 100% de efecto inhibitorio de la enzima con respecto al control (Cuadro 2). En estudios anteriores se ha reportado que la actividad antifúngica de algunos extractos de plantas se debe al contenido de compuestos inhibidores endógenos de tipo fenólicos (Kaushik *et al.*, 2015); algunos de estos compuestos inhiben la actividad de las células. La endo-1,3-β-glucanasa es miembro de este grupo de enzimas (Takeda *et al.*, 2015; Menget *et al.*, 2016).

El potencial fungicida de las flavonas se calculó con base en el efecto que produjeron sobre la germinación de esporas de *B. cinerea*. Los resultados muestran que la apigenina inhibió completamente la germinación de esporas a una concentración de 100 mM, en tanto que la luteolina inhibió 90% de la germinación de esporas a la misma concentración (Figura 2). Estos resultados se correlacionan con el efecto de las flavonas sobre la inhibición de

**Table 1.** Residual activity and inhibition of fungal endo-1,3-β-glucanase by fractions of *Turnera diffusa* stems extract obtained from preparative thin layer chromatography evaluated at 3 mg mL<sup>-1</sup> expressed as a percentage of germination related to control.

**Cuadro 1.** Actividad residual e inhibición de la enzima endo-1,3-β-glucanasa fúngica por fracciones de extracto de tallos de *Turnera diffusa* obtenidas mediante cromatografía de capa fina preparativa evaluadas a 3 mg mL<sup>-1</sup>, expresada como porcentaje de germinación con respecto al control.

TLC Fraction	Retention factor (Rf)	Residual activity of fungal endo-1,3-β-glucanase (%)	Inhibition of fungal endo-1,3-β-glucanase (%)
1	0.7	100	0
2	0.5	15	85
3	0.3	97	3
4	0.2	100	0

compounds, identified as luteolin and apigenin, evaluated at 25 mM, were able to inhibit the fungal enzyme by 60 and 89 %, respectively. The remaining 13 compounds had no effect on the activity of the fungal enzyme (Table 2). Apigenin and luteolin showed synergistic inhibitory effects on the enzyme activity, when were evaluated together at the same concentration, they showed an inhibitory effect of the enzyme of 100 % compared to the control (Table 2). Previous works have reported that the antifungal activity of extracts of some plants is due to the content of endogenous inhibitory phenolic compounds (Kaushik *et al.*, 2015); some of these compounds inhibit the activity of cellulases. Endo-1,3- $\beta$ -glucanase is a member of this group of enzymes (Takeda *et al.*, 2015; Menget *et al.*, 2016).

la actividad de la endo-1,3- $\beta$ -glucanasa fúngica ( $r=0.98$ ) (Cuadro 2) y, por tanto, es posible inferir que la apigenina tiene un mayor efecto fungicida que la luteolina. Szewczyk y Zidorn (2014) y Sarris *et al.* (2013) reportaron el aislamiento de apigenina de un extracto de *T. diffusa* en el que identificaron la apigenina como un compuesto activo que protege contra la ansiedad. Asimismo, Willer *et al.* (2019) reportaron que encontraron luteolina y apigenina en 24 compuestos fenólicos aislados de *T. diffusa* y que la apigenina tenía actividad estrogénica. La apigenina es reconocida en la medicina tradicional y alternativa porque tiene diversas actividades farmacológicas (Si *et al.*, 2009), como la inhibición de la enzima 17- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Choi y Kim, 2009; Hasegawa *et al.*, 2013). No existen reportes publicados sobre el efecto

**Table 2. Phenolic compounds identified in the stem extract of *Turnera diffusa* and their effects on fungal endo-1,3- $\beta$ -glucanase activity evaluated at 25 mM expressed as a percentage of germination related to control.**

**Cuadro 2. Compuestos fenólicos identificados en el extracto de tallos de *Turnera diffusa* y sus efectos en la actividad de la endo-1,3- $\beta$ -glucanasa fúngica evaluada a 25 mM, expresada como porcentaje de germinación con respecto al control.**

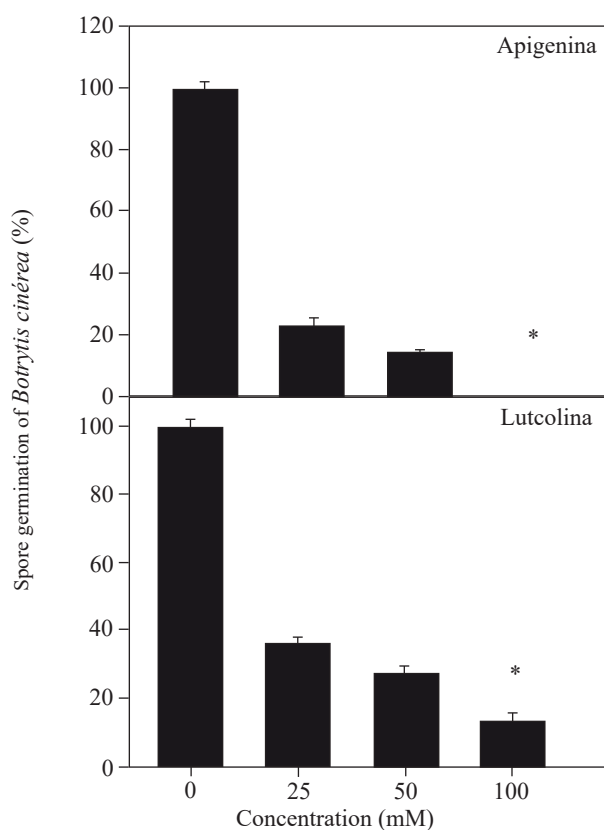
Compound	Name	Inhibition of fungal endo-1,3- $\beta$ -glucanase (%)
1	Hydrated catechin	0
2	Epicatechin	0
3	Luteolin	60
4	Kaempferol	0
5	Cinnamic acid	0
6	Quercetin	0
7	Trans-4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid	0
8	P-coumaric acid	0
9	3,4-Dihydroxycinnamic acid	0
10	Chlorogenic acid	0
11	Ferulic acid	0
12	Sodium 4-hydroxybenzoate	0
13	Trans-cinnamic anhydrous acid	0
14	Apigenin	89
15	Gallic acid	0
3+14	Luteolin + apigenin	100



The fungicidal potential of the flavones was calculated based on their effect on the germination of *B. cinerea* spores. The results show that apigenin completely inhibited spore germination at a concentration of 100 mM, while luteolin inhibited 90 % of spore germination at the same concentration (Figure 2). These results correlated with the effect of flavones on the inhibition of the activity of fungal endo-1,3- $\beta$ -glucanase ( $r= 0.98$ ), presented in Table 2; thus, it is possible to infer

inhibidor de la apigenina en enzimas endo-1,3- $\beta$ -glucanasa fúngicas; por tanto, el presente trabajo constituye el primer reporte sobre esta actividad. Con base en los resultados de esta investigación, se concluye que el compuesto fenólico de apigenina aislado de extractos de tallos de *T. diffusa* inhibe la enzima endo-1,3- $\beta$ -glucanasa fúngica y, en consecuencia, disminuye la germinación de esporas de *B. cinerea*.

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



**Figure 2.** Effect of apigenin and luteolin isolated from *Turnera diffusa* on spore germination of *Botrytis cinerea*, expressed as a percentage of germination related to control (means  $\pm$  SD, n=12). Asterisks indicate significant differences (Tukey test  $p \leq 0.1$ ).

**Figura 2.** Efecto de la apigenina y luteolina aisladas de *Turnera diffusa* sobre la germinación de esporas de *Botrytis cinerea*, expresado como porcentaje de germinación con respecto al control (media  $\pm$  SD, n=12). Los asteriscos indican diferencias significativas (prueba de Tukey  $p \leq 0.1$ ).

that apigenin has a greater fungicidal effect than luteolin. Szewczyk and Zidorn (2014) and Sarris *et al.* (2013) reported the isolation of apigenin from an extract of *T. diffusa*, identifying apigenin as an active compound that protects against anxiety. Additionally, Willer *et al.* (2019) reported that among the 24 phenolic compounds isolated from *T. diffusa*, luteolin and apigenin were found, and the latter exerted estrogenic activity. Apigenin is recognized in traditional and alternative medicine to have diverse pharmacological activities (Si *et al.*, 2009), including the inhibition of the 17- $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase enzyme (Choi and Kim, 2009; Hasegawa *et al.*, 2013). There have been no published reports on the inhibitory effect of apigenin on fungal endo-1,3- $\beta$ -glucanase enzymes; hence, this work is the first report of this activity. Based on these research findings, it is concluded that the phenolic compound apigenin isolated from stem extracts of *T. diffusa* inhibits the fungal enzyme endo-1,3- $\beta$ -glucanase and consequently decreases the germination of *B. cinerea* spores.

## LITERATURE CITED

- Arroyo J, Farkas V, Sanz A and Cabib E. 2016. Strengthening the fungal cell wall through chitin–glucan cross-links: effects on morphogenesis and cell integrity. *Cellular Microbiology*. 18: 1239-1250. DOI: 10.1111/cmi.12615
- Balasubramanian V, Vashisht D, Cletus J and Sakthivel N. 2012. Plant  $\beta$ -1, 3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. *Biotechnology Letters*. 34: 1983-1990. DOI: 10.1007/s10529-012-1012-6
- Choi EJ and Kim GH. 2009. Apigenin induces apoptosis through a mitochondria/caspase-pathway in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *Journal of Clinical Biochemistry. and Nutrition*. 44: 260–265. DOI: 10.3164/jcbn.08-230
- Dooley H, Shaw MW, Spink J and Kildea S. 2016. The effect of succinate dehydrogenase inhibitor/azole mixtures on selection of *Zyoseptoria tritici* isolates with reduced sensitivity. *Pest Management Science*. 72: 1150-1159. DOI: 10.1002/ps.4093
- Gastebois A, Mouyna I, Simenel C, Clavaud C, Coddeville B, Delepierre M, Latgé JP and Fontaine T. 2010. Characterization of a new  $\beta$ -(1–3)-glucan branching activity of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Biological Chemistry*. 285:2386–2396. DOI: 10.1074/jbc.M109.077545
- Hartl L, Gastebois A, Aimanianda V and Latgé JP. 2011. Characterization of the GPI-anchored Endo-(1-3)-Glucanase Eng2 of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetic and Biology*. 48:185-191. DOI: 10.1016/j.fgb.2010.06.011
- Hasegawa E, Nakagawa S, Sato M, Tachikawa E and Yamato S. 2013. Effect of polyphenols on production of steroid hormones from human adrenocortical NCI-H295R cells *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 36:228-237. DOI: 10.1248/bpb.b12-00627
- Kagimura FY, da Cunha MA, Barbosa AM, Dekker RF and Malfatti CRM. 2015. Biological activities of derivatized D-glucans: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 72:588-598. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2014.09.008
- Kaushik P, Andujar I, Vilanova S, Plazas M, Gramazio P, Herraiz FJ, Brar N and Prohens J. 2015. Breeding vegetables with increased content in bioactive phenolic acids. *Molecules*. 20: 18464–18481. DOI: 10.3390/molecules201018464
- Menget DD, Wang B, Ma X Q, Ji S.Q, Lu M and. Li FL.2016. Characterization of a thermostable endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanase from *Caldicellulosiruptor* sp. strain F32 and its application for yeast lysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100: 4923-4934. DOI: 10.1007/s00253-016-7334-x
- Mishra SN, Rao Ch V, Ojha SK, Vijayakumar M and Verma A. 2010. An analytical review of plants for antidiabetic activity with their phytoconstituent and mechanism of action. *International Journal of Pharmaceutical Science Research*. 1:29-46. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.1(1).29-46
- Mouyna I, Aimaniand V, Hartl L, Prevost MC, Sismeiro O, Dillies M A, Jagla B, Legendre R, Coppee J.Y and Latgé JP. 2016. GH16 and GH81 family  $\beta$ -(1,3)-glucanases in *Aspergillus fumigatus* are essential for conidial cell wall morphogenesis. *Cellular Microbiology*. 18: 1285-1293. DOI: 10.1111/cmi.12630
- Mouyna I, Hartl L and Latgé JP. 2013.  $\beta$ -1, 3-glucan modifying enzymes in *Aspergillus fumigatus*. *Frontiers in Microbiology*. 4:81. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00081
- Papaspyridi L M, Zerva A and Topakas E. 2018. Biocatalytic synthesis of fungal  $\beta$ -glucans. *Catalysts* 8:274. DOI: 10.3390/catal8070274
- Sarris J, McIntyre E and Camfield DA. 2013. Plant-based medicines for anxiety disorders, part 1. *CNS Drugs* 27: 207-219. DOI: 10.1007/s40263-013-0044-3
- Si D, Wang Y, Zhou YH, Guo Y, Wang J, Zhou H, Li S and Fawcett JP. 2009. Mechanism of CYP2C9 inhibition by flavones and flavonols. *Drugs Metabolism and Disposition*. 37: 629-634. DOI: 10.1124/dmd.108.023416
- Szewczyk K and Zidorn C. 2014. Ethnobotany, phytochemistry, and bioactivity of the genus *Turnera* (Passifloraceae) with a focus on damiana *Turnera diffusa*. *Journal of Ethnopharmacology*. 152: 424-443. DOI: 10.1016/j.jep.2014.01.019
- Takeda T, Nakano Y, Takahashi M, Konno N, Sakamoto Y, Arashida R, Marukawa Y, Yoshida E, Ishikawa T and Suzuki K. 2015. Identification and enzymatic characterization of an endo-1,3- $\beta$ -glucanase from *Euglena gracilis*. *Phytochemistry*. 116:21-27. DOI: 10.1016/j.phytochem.2015.05.010
- Vargas-Arispuro I, Fraijo-Martínez M, Vallejo-Cohen S, Corrales-Maldonado C and Martínez-Téllez M A. 2017. Looking for natural antifungal agent: Sensitive assay to detect fungal endo-1,3- $\beta$ -glucanase inhibitors from crude plant extracts. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 35: 130-138. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1606-5
- Willer J, Jöhrer K, Greil R, Zidorn C and Sezai Çiçek S. 2019. Cytotoxic properties of Damiana (*Turnera diffusa*) extracts and constituents and A validated quantitative UHPLC-DAD assay. *Molecules*. 24(5):2855. DOI: 10.3390/molecules24050855.