

# Phytochemical profile and *in vitro* activity of *Agave angustifolia* and *A. cupreata* extracts against phytopathogenic fungi

## Perfil fitoquímico y actividad antifúngica *in vitro* de extractos de *Agave angustifolia* y *A. cupreata* contra hongos fitopatógenos

Anayareth Almazán-Morales, Ma. Elena Moreno-Godínez, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, <sup>1</sup>Universidad Autónoma de Guerrero. Avenida Lázaro Cárdenas S/N, Ciudad Universitaria, Chilpancingo, Guerrero, C.P. 39087, México; Elías Hernández-Castro, Mirna Vázquez-Villamar, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales. Universidad Autónoma de Guerrero. Carretera Iguala-Teloloapan S/N, Iguala de la Independencia, Guerrero, C.P. 40040, México; José Antonio Mora-Aguilera, Eugenia Cabrera-Huerta Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillos, Texcoco, C.P. 56230, México; <sup>1</sup>Patricia Alvarez-Fitz\*, Cátedras CONACyT.

\*Corresponding author: palvarezfi@conacyt.mx.

Received: February 25, 2022.

Accepted: April 08, 2022.

Almazán-Morales A, Moreno-Godínez ME, Hernández-Castro E, Vázquez-Villamar M, Mora-Aguilera JA, Cabrera-Huerta E and Alvarez-Fitz P. 2022. Phytochemical profile and *in vitro* activity of *Agave angustifolia* and *A. cupreata* extracts against phytopathogenic fungi. Mexican Journal of Phytopathology 40(2): 169-187.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2202-6>

Primera publicación DOI: 20 de Abril, 2022.

First DOI publication: April 20, 2022.

**Abstract.** Phytopathogenic fungi can cause economic losses. The application of natural products from species of the genus *Agave* is an alternative for controlling these organisms. The present study aimed to determine the phytochemical profile of *Agave angustifolia* and *A. cupreata* extracts and to evaluate their antifungal

**Resumen.** Los hongos fitopatógenos pueden causar pérdidas económicas. La aplicación de productos naturales de especies del género *Agave* constituye una alternativa para el control de estos organismos. El objetivo del presente trabajo fue determinar el perfil fitoquímico de extractos de *Agave angustifolia* y *A. cupreata*, así como evaluar su actividad antifúngica contra varias especies de hongos fitopatógenos. Se obtuvo el extracto acuoso de las hojas de *A. angustifolia* y acetónico de *A. cupreata*. El perfil fitoquímico se determinó por cromatografía en capa fina y se evaluó la inhibición del crecimiento micelial y producción de esporas. El tamizaje reveló la presencia de alcaloides, flavonoides, saponinas y triterpenos. El extracto acetónico de *A. cupreata* inhibió el 76, 60 y 59% del crecimiento micelial de *Lasiodiplodia viticola*, *Colletotrichum* sp., y *Epicoccum sorghinum* respectivamente a 8 y 16 mg mL<sup>-1</sup> (p≤0.05), mientras que el porcentaje de producción de esporas disminuyó

activity against several species of phytopathogenic fungi. The aqueous extract from *A. angustifolia* and the acetonic extract from *A. cupreata* were studied. The phytochemical profile was determined by thin-layer chromatography. Mycelial growth inhibition and spore production were evaluated. Phytochemical screening revealed the presence of alkaloids, flavonoids, saponins, and triterpenes. The acetonic extract of *A. cupreata* inhibited 76, 60, and 59% of the mycelial growth of *Lasiodiplodia viticola*, *Colletotrichum* sp., and *Epicoccum sorghinum*, respectively, at 8 and 16 mg mL<sup>-1</sup> (p≤0.05), while spore production decreased by 92 and 86 % (p≤0.001) for *Fusarium subglutinans* and *Colletotrichum* sp., respectively. The aqueous extract of *A. angustifolia* inhibited 40% of the mycelial growth of *E. sorghinum* at 16 mg mL<sup>-1</sup> (p≤0.05) and reduced the spore production of *L. viticola* by 35% (p≤0.001). The results indicate that the extracts under study can be an alternative source of antifungal compounds.

**Key words:** *Agave*, phytopathogenic fungi, *in vitro* inhibition.

According to some estimates, the world population will reach 9.7 billion by 2050. Agricultural production will have to increase to meet the increased demand for food (United Nations, 2019). A worldwide problem working against increased agricultural production is the damaging effect of diseases caused by pathogens that reduce harvest yields and in extreme cases cause the death of crops (Jain *et al.*, 2019). These pathogens include nematodes, phytoplasmas, viruses, bacteria, and fungi (Ortiz-Martínez *et al.*, 2022). Phytopathogenic fungi are one of the main infectious agents of crops during pre-harvest, harvest and post-harvest stages (transport, storage

92 y 86 % (p≤0.001) para *Fusarium subglutinans* y *Colletotrichum* sp., respectivamente. El extracto acuoso de *A. angustifolia* inhibió 40% del crecimiento micelial de *E. sorghinum* a 16 mg mL<sup>-1</sup> (p≤0.05) y disminuyó en 35% (p≤0.001) la producción de esporas de *L. viticola*. Los resultados indicaron que los extractos representan una alternativa para obtención de compuestos antifúngicos.

**Palabras clave:** *Agave*, hongos fitopatógenos, inhibición *in vitro*.

Se estima que la población mundial para el año 2050 aumente hasta alcanzar los 9,700 millones; por lo que la demanda de alimentos crecerá y será necesario aumentar la producción agrícola para garantizar y satisfacer la alimentación de la población (United Nations, 2019). Sin embargo, una problemática que enfrenta la agricultura en el mundo son las enfermedades provocadas por patógenos que reducen las cosechas y en casos extremos provocan la muerte de los cultivos (Jain *et al.*, 2019). Entre los patógenos que causan enfermedades se encuentran los nematodos, fitoplasmas, virus, bacterias y hongos (Ortiz-Martínez *et al.*, 2022). Los hongos fitopatógenos son de los principales agentes infecciosos en los cultivos durante la pre cosecha, cosecha y post cosecha (transporte, almacenamiento y comercialización) siendo estos responsables de cuantiosas pérdidas económicas (Juárez *et al.*, 2010). Dentro las especies de hongos fitopatógenos que son consideradas de importancia agrícola por infectar una gran variedad de cultivos y provocar problemas de calidad, valor nutricional o de características sensoriales se encuentran *Alternaria* spp., *Botrytis* spp., *Epicoccum sorghinum*, *Fusarium* spp., *Lasiodiplodia* spp., *Monilinia* spp., *Mucor* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Colletotrichum* spp., *Aspergillus* spp., *Phomopsis* spp. y *Phytophthora*

and marketing), causing very significant economic losses (Juárez *et al.*, 2010). Among the species of phytopathogenic fungi that are considered of agricultural importance because they infect a wide variety of crops and affect the quality, nutritional value and sensory characteristics of agricultural products are *Alternaria* spp., *Botrytis* spp., *Epicoccum sorghinum*, *Fusarium* spp., *Lasiodiplodia* spp., *Monilinia* spp., *Mucor* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Colletotrichum* spp., *Aspergillus* spp., *Phomopsis* spp., and *Phytophthora* spp. (De Oliveira *et al.*, 2021). Many agricultural products are susceptible to these pathogens, which cause necrotic lesions on the leaves (leaf spots), gummosis, vascular wilt, rot, decay, and extensive necrosis (Nachilima *et al.*, 2020; Palma-Guerrero *et al.*, 2021). Chemical fungicides are the most widely used method for controlling these phytopathogenic fungi due to their quickness and effectiveness. However, frequent application of these compounds has led to the development of resistance in various fungal strains and has negative effects on human health and the environment (Zubrod *et al.*, 2019). In Mexico, there are an estimated 10,000-13,000 endemic plants that have various biological properties (antioxidant, antibacterial, anticancer, and antifungal activity, among others). The extracts or compounds (alone or in combination) obtained from them are important for the pharmaceutical, food and agricultural industries. The latter is constantly looking for new fungicides of natural origin that can be used in the field and that can bring added value to endemic plants. Scientific interest in the use of plant products such as essential oils, organic extracts and purified compounds has increased in recent years. These products are recommended as safe alternatives to synthetic fungicides and as an important element of sustainable agricultural practices (Tapia-Quirós *et al.*, 2020; Mui Yun Wong *et al.*, 2020). The antifungal potential of various plant extracts

spp. (De Oliveira *et al.*, 2021). Muchos productos agrícolas son susceptibles a estos patógenos que provocan lesiones necróticas en las hojas (manchas foliares), gomosis, marchitez vascular, podredumbre, pudrición y necrosis extensivas (Nachilima *et al.*, 2020; Palma-Guerrero *et al.*, 2021). Los fungicidas químicos constituyen el método de control más empleado para su control, debido a su rapidez y efectividad. Sin embargo, su aplicación frecuente ha provocado que las cepas desarrollen resistencia, además de afectar negativamente la salud humana e impacto ambiental (Zubrod *et al.*, 2019). En México, se estiman de 10,000-13,000 plantas endémicas que presentan diversas propiedades biológicas (antioxidante, antibacteriana, anticancerígena, antifúngica, entre otras), y los extractos o compuestos (solos o en combinación) obtenidos de ellas son importantes para las industrias farmacéutica, alimentaria y agrícola. Particularmente en esta última, se buscan nuevas alternativas de fungicidas naturales que puedan ser utilizados en campo, además de conferir un valor agregado a las plantas endémicas. Por lo anterior, el uso de productos derivados de plantas como aceites esenciales, extractos orgánicos y compuestos purificados han adquirido un interés científico relevante, ya que son recomendados como alternativas seguras en comparación con los fungicidas sintéticos, además de impulsar la agricultura sostenible (Tapia-Quirós *et al.*, 2020; Mui Yun Wong *et al.*, 2020). En este sentido, se ha evaluado el potencial antifúngico de los extractos de varias plantas (*Larrea tridentata*, *Tagetes lucida*, *Flourensia cernua*, *Acaciella angustissima*, *Jatropha cuneata*, *Yucca filifera*) contra *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum* spp., *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata*, *Sclerotium* spp., entre otros y se ha determinado que inducen inhibición de 30-100% del crecimiento micelial (Asael *et al.*, 2018).

Los agaves son plantas que tienen importancia social, ecológica y económica alta por ofrecer más

(*Larrea tridentata*, *Tagetes lucida*, *Flourensia cernua*, *Acaciella angustissima*, *Jatropha cuneata*, *Yucca filifera*) was evaluated against *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum* spp., *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata*, *Sclerotium* spp., among others, and it was reported that they induced 30-100% inhibition of mycelial growth (Asael *et al.*, 2018).

Agaves are plants with high social, ecological, and economic importance. They are used in more than 100 different ways, such as food, drink, medicine, decoration, fiber, fuel, fertilizer, and construction material, among others. Their ecological importance lies in their ability to limit rainwater runoff, reduce soil erosion, capture carbon, and offer shelter and food to a wide range of animal species, from insects to mammals. Their most important use is as raw material for the production of distilled beverages such as mezcal, tequila, sotol, charanda, and bacanora (García-Mendoza, 2007; Barrientos-Rivera *et al.*, 2019). These plants are characterized by synthesizing secondary metabolites such as fatty acids, terpenes, coumarins, triterpenes, steroids, tannins, flavonoids, glycosides, fructans, saponins, and alkaloids, which are responsible for their various biological activities (El-Hawary *et al.*, 2020; Soto-Castro *et al.*, 2021). The antifungal activity of the genus *Agave* has been evaluated against fungi of agricultural importance such as *Postia placenta*, *Aspergillus niger*, *B. cinerea*, *Mucor* spp., *Fusarium* spp., and *Penicillium* spp. (El-Hawary *et al.*, 2020; Soto-Castro *et al.*, 2021).

In Guerrero, Mexico, the “piña” of *A. angustifolia* and *A. cupreata* is traditionally used for the production of mezcal. However, the leaves, which represent 46% of the total weight of the plant, are not used in any other process and become a waste product (Iñiguez-Covarrubias *et al.*, 2001). Recent studies have shown that the leaves

de 100 formas de uso, ya sea como alimento, bebida, medicina, ornato, fibra, combustible, fertilizante y vivienda, entre otras. Su importancia ecológica radica en limitar el escurrimiento pluvial del agua de lluvia, reducir la erosión del suelo, son captadores de carbono, ofrecen refugio y alimento a una amplia gama de especies animales, desde insectos hasta mamíferos. Sin embargo, el mayor aprovechamiento es por usarse como materia prima para la producción de bebidas destiladas como el mezcal, tequila, sotol, charanda y bacanora (García-Mendoza, 2007; Barrientos-Rivera *et al.*, 2019). Estas plantas se han caracterizado por sintetizar metabolitos secundarios como ácidos grasos, terpenos, cumarinas, triterpenos, esteroides, taninos, flavonoides, glucósidos, fructanos, saponinas y alcaloides responsables de sus diversas actividades biológicas (El-Hawary *et al.*, 2020; Soto-Castro *et al.*, 2021). Entre estas, se ha evaluado la actividad antifúngica del género *Agave* contra hongos de importancia agrícola como: *Postia placenta*, *Aspergillus niger*, *B. cinerea*, *Mucor* spp., *Fusarium* spp. y *Penicillium* spp. (El-Hawary *et al.*, 2020; Soto-Castro *et al.*, 2021).

En Guerrero, México, tradicionalmente se usa la piña de *A. angustifolia* y *A. cupreata*, para la producción de mezcal. Sin embargo, las hojas, que representan el 46 % del total del peso de la planta, no se utilizan en ningún otro proceso convirtiéndose en un producto de desecho (Iñiguez-Covarrubias *et al.*, 2001). Estudios recientes han demostrado que las hojas de *A. cupreata*, contienen antranas, antraquinonas, cumarinas, alcaloides, aceites esenciales, compuestos pungentes y saponinas, y también se ha evaluado su actividad antibacteriana y antiinflamatoria (Salazar-Pineda *et al.*, 2017); mientras de las hojas de *A. angustifolia* se han aislado triterpenos ( $\beta$ -sitosterol), saponinas esteroidales (agliconas o glicosiladas) y fructanos y se ha evaluado la actividad antibacteriana, antiinflamatoria, antiulcero-

of *A. cupreata* contain anthrones, anthraquinones, coumarins, alkaloids, essential oils, pungent compounds, and saponins, which have antibacterial and anti-inflammatory activity (Salazar-Pineda *et al.*, 2017). Triterpenes ( $\beta$ -sitosterol), steroidal saponins (aglycones or glycosylated), and fructans have been isolated from the leaves of *A. angustifolia* and their antibacterial, anti-inflammatory, antiulcerogenic, and molluscicidal activity has been evaluated (López-Salazar *et al.*, 2019; Camacho-Campos *et al.*, 2020). There are no previous reports on the antifungal activity of *A. cupreata* and *A. angustifolia*. Thus, the present study aimed: 1) to determine the phytochemical profile of *A. angustifolia* and *A. cupreata*, and 2) to evaluate the antifungal effect of the extracts of these two botanical species on the mycelial growth and spore production of five phytopathogenic fungi of agricultural importance.

## MATERIALS AND METHODS

**Plant material.** Leaves of *A. angustifolia* and *A. cupreata* were collected in the state of Guerrero, Mex., in the towns of Coacán, municipality of Atenango del Río (Latitude: 18.139444, Longitude: -49.187778) and in Totomochapa municipality of Tlapa de Comonfort, Guerrero (Latitude: 17.541111, Longitude: -98.459167) respectively. The identification of *A. cupreata* and *A. angustifolia* was carried out by Dr. Abisai J. García Mendoza of the National Herbarium of Mexico (MEXU). The assigned accession numbers were: MEXU-2050 for *Agave cupreata* and ARC for *Agave angustifolia*.

**Obtaining extracts from *Agave* spp.** The collected leaves were cleaned with water. With the help of a knife, they were then cut into fractions of an approximate size of 3 cm. The aqueous extract

génica y molusquicida (López-Salazar *et al.*, 2019; Camacho-Campos *et al.*, 2020). Para las especies de *A. cupreata* y *A. angustifolia* no existen reportes previos sobre su actividad antifúngica, por lo que los objetivos de este trabajo fueron: 1) conocer el perfil fitoquímico de *A. angustifolia* y *A. cupreata*, y 2) evaluar el efecto antifúngico en el crecimiento micelial y producción de esporas de los extractos de estas dos especies botánicas, contra cinco hongos fitopatogénicos de importancia agrícola.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal.** Las hojas de *A. angustifolia* y *A. cupreata* se recolectaron en Guerrero, México, en las localidades de Coacán, municipio de Atenango del Río (Latitud: 18.139444, Longitud: -49.187778) y en Totomochapa municipio de Tlapa de Comonfort, Guerrero (Latitud: 17.541111, Longitud: -98.459167) respectivamente. La identificación de *A. cupreata* y *A. angustifolia* la realizó el Dr. Abisai J. García Mendoza del Herbario Nacional de México (MEXU). Los números de acceso asignados fueron: MEXU-2050 para *Agave cupreata* y ARC para *Agave angustifolia*.

**Obtención de extractos de *Agave* spp.** Las hojas se sometieron a un proceso de limpieza con agua, posteriormente se cortaron en fracciones con ayuda de un cuchillo a un tamaño aproximado de 3 cm. La obtención del extracto acuoso de *A. angustifolia* (EAAa) se realizó mediante la incorporación del material vegetal (300 g) con agua a 60 °C y se dejó reposar durante 3 h, transcurrido este tiempo se filtró y el extracto acuoso obtenido se congeló a -40 °C hasta realizar el proceso de liofilización en un equipo Free Zone 4.5 L (Labconco, Kansas, EE. UU.) a vacío de 0.045 mBar y temperatura de -52 °C. El polvo obtenido se almacenó a -20 °C hasta su

of *A. angustifolia* (EAAa) was obtained by mixing the plant material (300 g) with water at 60 °C and leaving it to stand for 3 h. The mixture was then filtered and the obtained aqueous extract was frozen at -40 °C until lyophilization, which was carried out in a Free Zone 4.5 L system (Labconco, Kansas, USA) at a vacuum of 0.045 mBar and a temperature of -52 °C. The obtained powder was stored at -20 °C for later use in the antifungal activity test. The acetone extract of *A. cupreata* (EAAc) was obtained by direct maceration of the leaves (3500 g) with acetone (Golden Bell, Mexico) for 48 h. It was then filtered and the organic phase was evaporated in a rotary evaporator (digital rotary 410, Puebla, Mexico) at 80 rpm and 60 °C. Once the extract was obtained, it was stored at room temperature in amber bottles protected from light. The yield percentage of the extracts was calculated using the following formula:

$$\text{Yield percentage} = \frac{\text{Extract obtained (g)} \times 100}{\text{Macerated plant material (g)}}$$

**Qualitative phytochemical Profile.** The phytochemical profile was determined using thin-layer chromatography, as proposed by Salazar-Pineda *et al.* (2017). The extracts (5 mg) were diluted in 1 mL of extraction solvent and placed, using a capillary tube, on chromatoplates with silica gel TLC-F<sub>254</sub> (5 cm high x 5 cm wide; Merck) that were eluted with hexane-acetone (7:3). The chromatoplates were observed under UV light (254 nm) and sprayed with the following chemical developers: Dragendorff (alkaloids), Polyethylene glycol (flavonoids), Liebermann-Burchard (triterpenes and saponins), and vanillin-phosphoric acid (terpenes, lignans, and curcubitacins) for the qualitative identification of secondary metabolites.

**Phytopathogenic fungi and preparation of colonies.** The fungi used were obtained from the

uso en la prueba de actividad antifúngica. El extracto acetónico de *A. cupreata* (EAAc) se obtuvo por maceración directa de las hojas (3500 g) con acetona (Golden Bell, México) durante 48 h, posteriormente se filtró y la fase orgánica se evaporó en un rota-evaporador (digital rotary 410, Puebla, México) a 80 rpm y 60 °C, una vez obtenido el extracto, se almacenó a temperatura ambiente en frascos ámbar protegidos de la luz. El porcentaje de rendimiento de los extractos se calculó con la siguiente formula:

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{Extracto obtenido (g)} \times 100}{\text{Material vegetal macerado (g)}}$$

**Perfil fitoquímico cualitativo.** Para determinar el perfil fitoquímico se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina, propuesta por Salazar-Pineda *et al.* (2017). Los extractos (5 mg) se diluyeron en 1 mL de disolvente de extracción y se colocaron con un capilar sobre cromatoplasmas de silica gel TLC-F<sub>254</sub> (5 cm de altura x 5 cm de ancho; Merck) que se eluyeron con el sistema 7:3 hexano-acetona. Finalmente, las cromatoplasmas se observaron en luz UV (254 nm) y se trataron con los siguientes reveladores químicos: Dragendorff (alcaloides), Polietilenglicol (flavonoides), Liebermann-Burchard (triterpenos y saponinas) y vainillina-ácido fosfórico (terpenos, lignanos y curcubitacinas) para la identificación cualitativa de metabolitos secundarios.

**Hongos fitopatógenos y preparación de colonias.**

Los hongos utilizados fueron proporcionados de la colección del Laboratorio de Enfermedades de Frutales del Programa de Fitopatología del Colegio de Postgraduados, con sede en Motecillo, Texcoco, México. Las especies utilizadas en los ensayos fueron: *E. sorghinum*, *Fusarium subglutinans*, *Lasiodiplodia viticola*, *L. iraniensis* y *Colletotrichum* sp., todas fueron patógenas en sus hospedantes primarios. Colonias de cada especie fungosa,

collection of the Laboratory of Fruit Diseases of the Phytopathology Program of the Colegio de Postgraduados, based in Motecillo, Texcoco, Mexico. The species used in the assays were: *E. sorghinum*, *Fusarium subglutinans*, *Lasiodiplodia viticola*, *L. iraniensis*, and *Colletotrichum* sp., all of which were pathogenic for their primary hosts. Colonies of each fungal species were used for *in vitro* tests. The colonies were obtained from monosporic isolates and incubated for 72 h in Petri dishes with PDA medium (Potato Dextrose Agar 5%, Bioxon, Mexico).

#### **Effect of *Agave* spp. extracts on mycelial growth.**

The agar dilution technique was used (González-Alvarez *et al.*, 2015), with some modifications. The EAAc and EAAa extracts were dissolved in sterile water to concentrations of 2-16 mg mL<sup>-1</sup> and placed in sterile Petri dishes (60 x 15 mm) containing 3 mL of unsolidified PDA agar. Once the agar gelled, a PDA disk with mycelial growth (5 mm in diameter) was placed in the center of the Petri dishes for each experimental fungal species. The dishes were incubated at 25 °C and the diameter of mycelial growth was monitored at 24, 48 and 72 h until the negative control colony (PDA medium plus fungi without extracts) covered the surface of the Petri dish completely. The antifungal Mancozeb (Manzate®) was used as a positive control at a concentration of 16 mg mL<sup>-1</sup>. All tests were performed in triplicate. The percentage of mycelial growth inhibition was determined at 72 h and was estimated using the following formula:

$$\% \text{ of inhibition} = (1 - (D2 / D1)) * 100$$

Where D1 is the average value of the diameter of the negative control colony and D2 is the average value of the diameter of the colony inhibited by the extracts.

obtenidas a partir de aislamientos monospóricos e incubadas durante 72 h en cajas Petri con medio PDA (Papa Dextrosa Agar 5%, Bioxon, México) se utilizaron para las pruebas *in vitro*.

**Efecto de extractos de *Agave* spp., sobre el crecimiento micelial.** Se utilizó técnica de dilución en agar (González-Alvarez *et al.*, 2015) con algunas modificaciones. Los extractos EAAc y EAAa se disolvieron en agua estéril y se adicionaron a concentraciones de 2-16 mg mL<sup>-1</sup> en cajas de Petri (60 x 15 mm) estériles que contenían 3 mL de agar PDA sin solidificar. Una vez que el agar se gelificó en el centro de las cajas Petri se colocó un disco de PDA con crecimiento micelial (5 mm de diámetro) por especie fungosa experimental. Las cajas se incubaron a 25 °C y se monitoreó el diámetro del crecimiento micelial a las 24, 48 y 72 h hasta que la colonia del control negativo (medio PDA más hongos sin extractos) cubrió completamente la superficie de la caja de Petri. Se utilizó como control positivo el antifúngico Mancozeb (Manzate®) a 16 mg mL<sup>-1</sup>. Todas las pruebas se realizaron por triplicado. El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial se determinó a las 72 h y se estimó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = (1 - (D2 / D1)) * 100$$

Donde D1 valor promedio del diámetro de la colonia del control negativo y D2 valor promedio del diámetro de la colonia inhibida por los extractos.

**Efecto de los extractos de *Agave* spp., sobre la producción de esporas.** Para determinar el efecto de los extractos EAAc y EAAa sobre la esporulación a las 72 h de crecimiento, se usaron las mismas cajas donde se determinó la actividad antifúngica a la concentración de 16 mg mL<sup>-1</sup>. El micelio de las cajas se asperjó con agua destilada estéril (5 mL)

### **Effect of *Agave* spp. extracts on spore production.**

The effect of the EAAc and EAAa extracts on sporulation at 72 h of growth was determined in the same Petri dishes that were used to determine antifungal activity at a concentration of 16 mg mL<sup>-1</sup>. The mycelium in the dishes was sprinkled with sterile distilled water (5 mL) and scraped with a bacteriological loop. The obtained suspension was filtered through a Pasteur pipette containing cotton as a filter (sterile) to remove fragments of culture medium and mycelium. Subsequently, 20 µL of the filtered suspension were placed in a Neubauer chamber. The spores were counted with the help of an optical microscope (10x; Olympus). The spore concentration was expressed in spores mL<sup>-1</sup>. All experiments were performed in triplicate.

**Statistical analysis.** The results were expressed as the mean of three repetitions ± standard deviation. Mycelial growth inhibition was assessed using an analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey's test. The inhibition of spore production was assessed using Dunnett's test with the negative control used for comparison. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant. The statistical package Sigma Plot version 11.0 was used for all analyses.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

**Phytochemical profile.** The amount of extract obtained for EAAc was 20 g (0.57%) and 2.8 g (0.93%) for EAAa. Different phytochemical compounds were identified in the EAAc and EAAa extracts (Table 1). The variability is mainly due to the polarity of the solvent used in the extraction since the extractability of the compounds depends on their nature and solubility (Bui *et al.*, 2021). The flavonoids present in the EAAa are generally

and were scraped with a bacteriological loop, the suspension obtained was filtered in a Pasteur pipette that contained cotton as a filter (sterile) to eliminate fragments of culture medium and mycelium. Subsequently, from the filtered suspension 20 µL were placed in a Neubauer chamber and with the help of an optical microscope (10x; Olympus) the spores were counted and the concentration expressed in spores mL<sup>-1</sup>. All experiments were performed in triplicate.

**Análisis estadístico.** Los resultados se expresaron como el promedio de tres repeticiones ± desviación estándar. Para la actividad de inhibición del crecimiento micelial se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Tukey y para la actividad de inhibición en la producción de esporas se realizó una prueba de Dunnett con respecto al control negativo. Se utilizó el paquete estadístico Sigma Plot version 11.0. Se consideró diferencia estadística significativa con un valor de  $p < 0.05$ .

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Perfil fitoquímico.** La cantidad de extracto obtenido para el EAAc fue de 20 g (0.57 %) y 2.8 g (0.93%) para el EAAa. Se determinó que los extractos EAAc y EAAa presentaron diferentes compuestos fitoquímicos (Cuadro 1). La variabilidad se debe principalmente a la polaridad del disolvente utilizado en la extracción, ya que la extractabilidad de estos depende de su naturaleza y solubilidad (Bui *et al.*, 2021). En este sentido, los flavonoides que se presentaron en el EAAa generalmente son extraídos con disolventes altamente polares como el agua, mientras que los alcaloides detectados en el EAAc son insolubles o poco solubles en agua, por lo que se extraen con otros disolventes orgánicos como etanol, metanol, acetona y cloroformo. Aunque



**Table 1. Qualitative phytochemical profile of the aqueous and acetone extracts of *Agave angustifolia* and *Agave cupreata*.****Cuadro 1. Perfil fitoquímico cualitativo de los extractos acuoso y acetónico de *Agave angustifolia* y *Agave cupreata*.**

Revelador	Metabolito identificado	Disolvente	
		EAAa <sup>y</sup>	EAAc <sup>z</sup>
Dragendorff	Alcaloides	-	+
Polietilenglicol	Flavonoides	+	-
Liebermann-Burchard	Triterpenos, Saponinas	+	+
Vainillina ácido fosfórico	Terpenos, Lignanos, Curcubitacinas	-	-

<sup>y</sup>EAAa: extracto acuoso de *Agave angustifolia*, <sup>z</sup>EAAc: extracto de acetona de *Agave cupreata*; +: Presencia, - Ausencia. / <sup>y</sup>EAAa: extracto acuoso de *Agave angustifolia*, <sup>z</sup>EAAc: extracto de acetona de *Agave cupreata*; +: Presencia, - Ausencia.

extracted using highly polar solvents such as water, while the alkaloids detected in the EAAc are insoluble or slightly soluble in water, so they are extracted with other organic solvents such as ethanol, methanol, acetone, and chloroform. The presence or absence of certain compounds is also due to the biotic or abiotic factors to which the plants have been subjected (Pavarini *et al.*, 2012). The saponins detected in *A. cupreata* have already been reported by Salazar-Pineda *et al.* (2017) and Urbina *et al.* (2018). Steroidal saponins have also been identified in methanolic extracts of the leaves of *A. angustifolia* (Pereira *et al.*, 2017). Some authors have pointed out that these compounds are very common in the genus and yucagenin, hecogenin, tigogenin, diosgenin, ruizgenin and chlorogenin have been identified in species such as: *A. lechuguilla*, *A. americana*, *A. inaequidens*, *A. hookeri*, *A. fourcroydes*, *A. brittoniana*, and *A. macroacantha* (López-Salazar *et al.*, 2019; González-Madariaga *et al.*, 2020). With respect to triterpenes, Ahumada-Santos *et al.* (2013) reported the presence of p-cymene, limonene,  $\beta$ -trans ocimene, linalool,  $\alpha$ -terpineol, nerol, geraniol and trans-nerolidol in extracts of *A. angustifolia*. Salazar-Pineda *et al.* (2017) reported the qualitative presence of triterpenes in extracts of the leaves of *A.*

también la presencia o ausencia de compuestos se debe a los factores bióticos o abióticos a los que se han sometido las plantas (Pavarini *et al.*, 2012). Aunado a lo anterior, las saponinas detectadas en *A. cupreata* ya han sido reportadas por Salazar-Pineda *et al.* (2017) y Urbina *et al.* (2018); mientras que, para *A. angustifolia* se han identificado saponinas esteroidales en extractos metanólicos de hojas (Pereira *et al.*, 2017). Algunos autores señalaron que estos compuestos son muy comunes en el género y se han identificado yucagenina, hecogenina, tigogenina, diosgenina, ruizgenina y clorogenina en *Agaves* como: *A. lechuguilla*, *A. americana*, *A. inaequidens*, *A. hookeri*, *A. fourcroydes*, *A. brittoniana* y *A. macroacantha* (López-Salazar *et al.*, 2019; González-Madariaga *et al.*, 2020). En cuanto a los triterpenos, Ahumada-Santos *et al.* (2013) reportaron la presencia de p-cymeno, limoneno,  $\beta$ -trans ocimeno, linalool,  $\alpha$ -terpineol, nerol, geraniol y trans-nerolidol en extractos de *A. angustifolia*, mientras, Salazar-Pineda *et al.* (2017) señalan la presencia cualitativa de triterpenos en los extractos de las hojas de *A. cupreata*. También se ha detectado la presencia de  $\alpha$ -linalol,  $\alpha$ -terpineno, limoneno, geraniol, nerol,  $\alpha$ -cubebeno, cadineno y trans-nerolidol entre otros, en extractos de *Agave salmiana*, *Agave tequilana* y *Agave potatorum* (Soto-Castro *et al.*,

*cupreata*. The presence of  $\alpha$ -linalool,  $\alpha$ -terpinene, limonene, geraniol, nerol,  $\alpha$ -cubebene, cadinene and trans-nerolidol, among others, has also been detected in extracts of *Agave salmiana*, *Agave tequilana*, and *Agave potatorum* (Soto-Castro *et al.*, 2021). Regarding flavonoids, Ahumada-Santos *et al.* (2013) mentioned that the concentration of flavonoids in *A. angustifolia* was low. Kaempferol, myricetin rhamnoside, and quercetin arabinoside have been identified in the methanolic extracts of the leaves of *Agave attenuata* and qualitatively in *A. potatorum* (Soto-Castro *et al.*, 2021).

#### **Effect of *Agave* spp. extracts on mycelial growth.**

The obtained extracts showed different effects on the mycelial growth of the fungi under study (Figure 1). In general, the application of these extracts was associated with a decrease in colony growth (Figure 1 A2-E2), presence of aerial mycelium (Figure 1 B2 and 3; D2 and 3), cottony (Figure 1 A5, C5, D5, E5) and deformed (Figure 1 A2, A5, C5, E5), as well as pigment production (Figure 1 A2, A3, A4, C5 and D3). The colonies in the negative control grew with normal shape, size and texture (Figure 1 A1-E1).

Even though no previous studies exist on the negative effect of *A. angustifolia* and *A. cupreata* on the morphology of the fungi under study, Siddhapura *et al.* (2011) mentioned that the methanolic extracts of *Agave ferox*, *A. marginata*, *A. americana*, *A. montana* and *A. scabra* affected the development of *Postia placenta*. The observed effects on the morphology, texture, vertical expansion of the mycelium, dehydration and pigment production have already been reported (De la Cruz-Ricardez *et al.*, 2020). However, it is important to indicate that the mechanism by which they are produced is related to the action of metabolites associated with the cell wall. For example, the essential oils of *Lavandula angustifolia* and *Eucalyptus globulus* induced the formation of rough folds, torsion,

2021). Para los flavonoides, Ahumada-Santos *et al.* (2013) mencionaron que la cantidad de flavonoides en *A. angustifolia* fue baja. El kaempferol, ramnosido de myrcetina y arabinosido de quercetina se han identificado en los extractos metanólicos de las hojas de *Agave attenuata* y de manera cualitativa en *A. potatorum* (Soto-Castro *et al.*, 2021).

#### **Efecto de extractos de *Agave* spp., sobre el crecimiento micelial.**

Los extractos presentaron efectos diferentes sobre el crecimiento micelial de los hongos (Figura 1). En general, se observó disminución del crecimiento de la colonia (Figura 1 A2-E2), presencia de micelio aéreo (Figura 1 B 2 y 3; D 2 y 3), algodonoso (Figura 1 A5, C5, D5, E5) y deforme (Figura 1 A2, A5, C5, E5) y la producción de pigmentos (Figura 1 A2, A3, A4, C5 y D3). Así mismo, se determinó que las colonias correspondientes al control negativo se desarrollaron con forma, tamaño y textura normales (Figura 1 A1-E1).

Aunque no se han realizado estudios relacionados con el efecto de negativo de *A. angustifolia* y *A. cupreata* sobre la morfología de los hongos que se evaluaron, Siddhapura *et al.* (2011) mencionaron que los extractos metanólicos de *Agave ferox*, *A. marginata*, *A. americana*, *A. montana* y *A. scabra* tuvieron un efecto sobre el desarrollo de *Postia placenta*. Los efectos observados en el cambio de morfología, textura, expansión vertical del micelio, deshidratación y producción de pigmentos ya han sido reportados (De la Cruz- Ricardez *et al.*, 2020). Sin embargo, es importante indicar que el mecanismo por el cual se producen está relacionado con la acción de los metabolitos con la pared celular. Por ejemplo, los aceites esenciales de *Lavandula angustifolia* y *Eucalyptus globulus* indujeron la formación de pliegues rugosos, torsión, descamación, fracturas y deshidratación de las hifas de *Monilinia fructicola* y *Rhizopus stolonifer* (da Silva *et al.*, 2020; De la Cruz- Ricardez *et al.*, 2020).

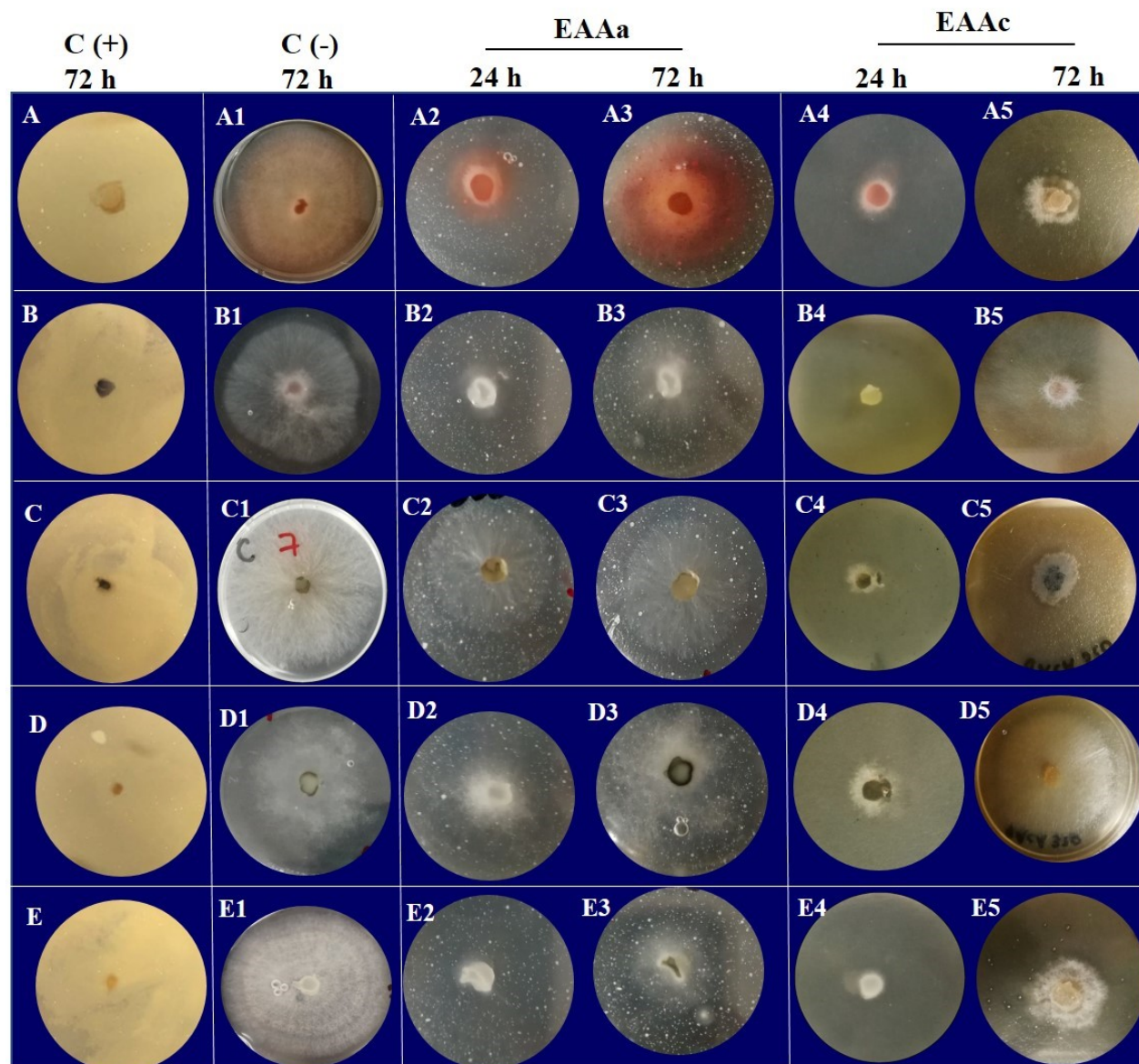


Figure 1. Effect of the aqueous extract from the leaves of *A. angustifolia* (EAAa) and the acetone extract of *A. cupreata* (EAAc) on the growth of five phytopathogenic fungi incubated in 5% PDA for 24 and 72 hours of exposure. A) *E. sorghinum*; B) *F. subglutinans*; C) *L. viticola*; D) *L. iraniensis*; E) *Colletotrichum* sp. C (+): antifungal Manzateb (Manzate®) at 16 mg mL<sup>-1</sup>; C(-): 5% PDA agar.

Figura 1. Efecto del extracto acuoso de hoja de *A. angustifolia* (EAAa) y del extracto de acetona de *A. cupreata* (EAAc) sobre el crecimiento de cinco hongos fitopatogénos incubados en PDA 5% durante 24 y 72 h de exposición. A) *E. sorghinum*; B) *F. subglutinans*; C) *L. viticola*; D) *L. iraniensis*; E) *Colletotrichum* sp. C (+): antifúngico Manzateb (Manzate®) a 16 mg mL<sup>-1</sup>; C(-): agar PDA 5%.

peeling, fractures, and dehydration of the hyphae of *Monilinia fructicola* and *Rhizopus stolonifer* (da Silva *et al.*, 2020; De la Cruz- Ricardez *et al.*, 2020).

El efecto antifúngico de los EAAa y EAAc a diferentes concentraciones contra los hongos fitopatogénos se muestra en el Cuadro 2. La inhibición del crecimiento micelial del EAAc (39-

Table 2 shows the antifungal effect of different concentrations of EAAa and EAAC against phytopathogenic fungi. The inhibition of mycelial growth of EAAC (39-76%) was significantly different ( $p \leq 0.05$ ) compared to that of EAAa (20-40%). The table shows that the species *L. viticola*, *E. sorghinum* and *Colletotrichum* sp. were sensitive to EAAC, with mycelial growth inhibition percentages between 38 and 76% at concentrations of 16 and 8 mg mL<sup>-1</sup> ( $p \leq 0.001$ ).

In the case of EAAa, the percentages of mycelial growth inhibition in *E. sorghinum* and *Colletotrichum* sp. did not show statistically significant differences ( $p \geq 0.064$ ) at concentrations of 4-16 mg mL<sup>-1</sup>. However, this extract was the only one that showed inhibitory activity against *F. subglutinans*, at 16 mg mL<sup>-1</sup>. Exposure to EAAa had no effect on *L. viticola* and *L. iraniensis*.

The results obtained demonstrate for the first time the antifungal activity of the polar extracts

76%) presentó diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) en comparación con el EAAa (20-40%). Del cuadro se desprende que las especies *L. viticola*, *E. sorghinum* y *Colletotrichum* sp. fueron sensibles al EAAC, determinándose porcentajes de inhibición del crecimiento micelial entre 38-76% a concentraciones de 16 y 8 mg mL<sup>-1</sup> ( $p \leq 0.001$ ).

Para el EAAa los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial en las concentraciones de 4-16 mg mL<sup>-1</sup> sobre *E. sorghinum* y *Colletotrichum* sp., no presentaron diferencias estadísticas significativas ( $p \geq 0.064$ ) para estas especies. Mientras que este extracto fue el único que presentó actividad contra *F. subglutinans* a 16 mg mL<sup>-1</sup>. Adicionalmente, la exposición a EAAa no tuvo efecto en *L. viticola* y *L. iraniensis*.

Los resultados obtenidos documentan por primera vez la actividad antifúngica de los extractos polares EAAa y EAAC sobre hongos fitopatógenos de interés económico. Sin embargo, otros autores

**Table 2. Inhibition percentage of mycelial growth of five phytopathogenic fungi exposed to aqueous and acetic extracts from the leaves of *A. angustifolia* and *A. cupreata*.**  
**Cuadro 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de cinco hongos fitopatógenos expuestos a los extractos acuoso y acético de hojas de *A. angustifolia* y *A. cupreata*.**

Extracto	Concentración (mg mL <sup>-1</sup> )	% de inhibición del crecimiento micelial				
		<i>Epicoccum sorghinum</i>	<i>Fusarium subglutinans</i>	<i>Lasiodiplodia viticola</i>	<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	<i>Colletotrichum</i> sp.
EAAa <sup>y</sup>	2	---	---	---	---	---
	4	39.4b	---	---	---	---
	8	39.4b	---	---	---	---
	16	40.0b	20.0a	---	---	41.6b
EAAC <sup>z</sup>	2	---	---	17.3b	---	---
	4	13.3c	---	16.6b	---	32.0c
	8	39.4b	---	74.0a	12.0b	38.0b
	16	59.6a	---	76.6a	17.8a	60.8a
Control (+) Manzate	16	100	100	100	100	100

<sup>y</sup>EAAa: extracto acuoso de *Agave angustifolia* acuoso, <sup>z</sup>EAAC: extracto de acetona de *Agave cupreata*; ---: No Presentó inhibición del crecimiento micelial. Medias con letras distintas en una misma columna son significativamente diferentes (Tukey;  $p \leq 0.05$ ). / <sup>y</sup>EAAa: extracto acuoso de *Agave angustifolia* acuoso, <sup>z</sup>EAAC: extracto de acetona de *Agave cupreata*; ---: No Presentó inhibición del crecimiento micelial. Medias con letras distintas en una misma columna son significativamente diferentes (Tukey;  $p \leq 0.05$ ).

EAAa and EAAC on phytopathogenic fungi of economic interest. However, other authors have indicated the antifungal potential of polar extracts obtained from different species of *Agave* (*A. montana*, *A. americana*, *A. marginetta*, *A. lechuguilla*, *A. scabra* and *A. ferox*) against *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. udum*, and *Colletotrichum gloeosporioides*, reporting mycelial growth inhibition percentages ranging from 15 to 100% (De Rodríguez *et al.*, 2011; Maharshi and Thaker, 2014; González-Alvarez *et al.*, 2015).

The results of the present study show variability in the phytochemical profile (Table 1) and mycelial growth inhibition activity (Table 2) of the *Agave* extracts under study when used on phytopathogenic fungi. The biological effect of each compound on different microorganisms has been reported before. Lagrouh *et al.* (2017) mentioned the antifungal effect of alkaloids and attributed to them the ability to intercalate with DNA, stop protein synthesis, induce apoptosis, and inhibit carbohydrate metabolism enzymes. Zhao *et al.* (2021) indicated that the alkaloid lycorine damages the integrity of cell membranes, reduces cell viability and affects the expression of GTPase BcMPS1, Bccdc, BcRac and BcRas1 in *B. cinerea*. Furthermore, flavonoids have been reported to have antifungal activity against *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* through their effect on protein precipitation and the formation of complexes with the nucleophilic amino acids of proteins, which inactivates them and causes developmental arrest. In contrast, the effect of flavonoids on *B. cinerea* is attributed to the inhibition of fungal endo-1,3- $\beta$ -glucanase (Jin, 2019; Tapia-Quirós *et al.*, 2020). In *R. solani*, terpene compounds affect the permeability of the pathogen's membrane, causing metabolic disorders and inhibiting mycelial growth. They also disrupt the potential of the mitochondrial membrane (causing loss of structure and function),

sustentan el potencial antifúngico de extractos polares obtenidos de diferentes especies de *Agaves* (*A. montana*, *A. americana*, *A. marginetta*, *A. lechuguilla*, *A. scabra* y *A. ferox*) contra *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. udum* y *Colletotrichum gloeosporioides* determinando porcentajes de inhibición del crecimiento micelial en rangos de 15-100% (De Rodríguez *et al.*, 2011; Maharshi y Thaker, 2014; González-Alvarez *et al.*, 2015).

Los resultados de este estudio demuestran que los extractos de *Agave* presentan una variabilidad tanto en su perfil fitoquímico (Cuadro 1) como en su actividad de inhibición del crecimiento micelial sobre hongos fitopatógenos (Cuadro 2). El efecto biológico que ejerce cada compuesto sobre distintos microorganismos ha sido reportado. Lagrouh *et al.* (2017) mencionaron el efecto antifúngico de los alcaloides y les atribuyeron la capacidad de intercalarse con el ADN, detener la síntesis de proteínas, inducir la apoptosis e inhibir las enzimas del metabolismo de carbohidratos. Mientras que Zhao *et al.* (2021), mencionaron que el alcaloide licorina daña la integridad de la membrana celular, disminuye la viabilidad y tiene un efecto sobre la expresión de GTPasa BcMPS1, Bccdc, BcRac y BcRas1 en *B. cinerea*. Asimismo, los mecanismos de acción antifúngicos para los flavonoides se han reportado en *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans* y se han relacionado con la precipitación de proteínas y la formación de complejos con los aminoácidos nucleofílicos de las proteínas inactivándolas y provocando la detención del desarrollo. En contraste, en *B. cinerea* su efecto se atribuye a la inhibición de la endo-1,3- $\beta$ -glucanasa fúngica (Jin, 2019; Tapia-Quirós *et al.*, 2020). Por su parte, en *R. solani*, los compuestos terpénicos afectan la permeabilidad de la membrana del patógeno, provocando trastornos metabólicos e inhibiendo el crecimiento micelial, también disrumpen el potencial de la membrana mitocondrial (provocando pérdida de estructura y

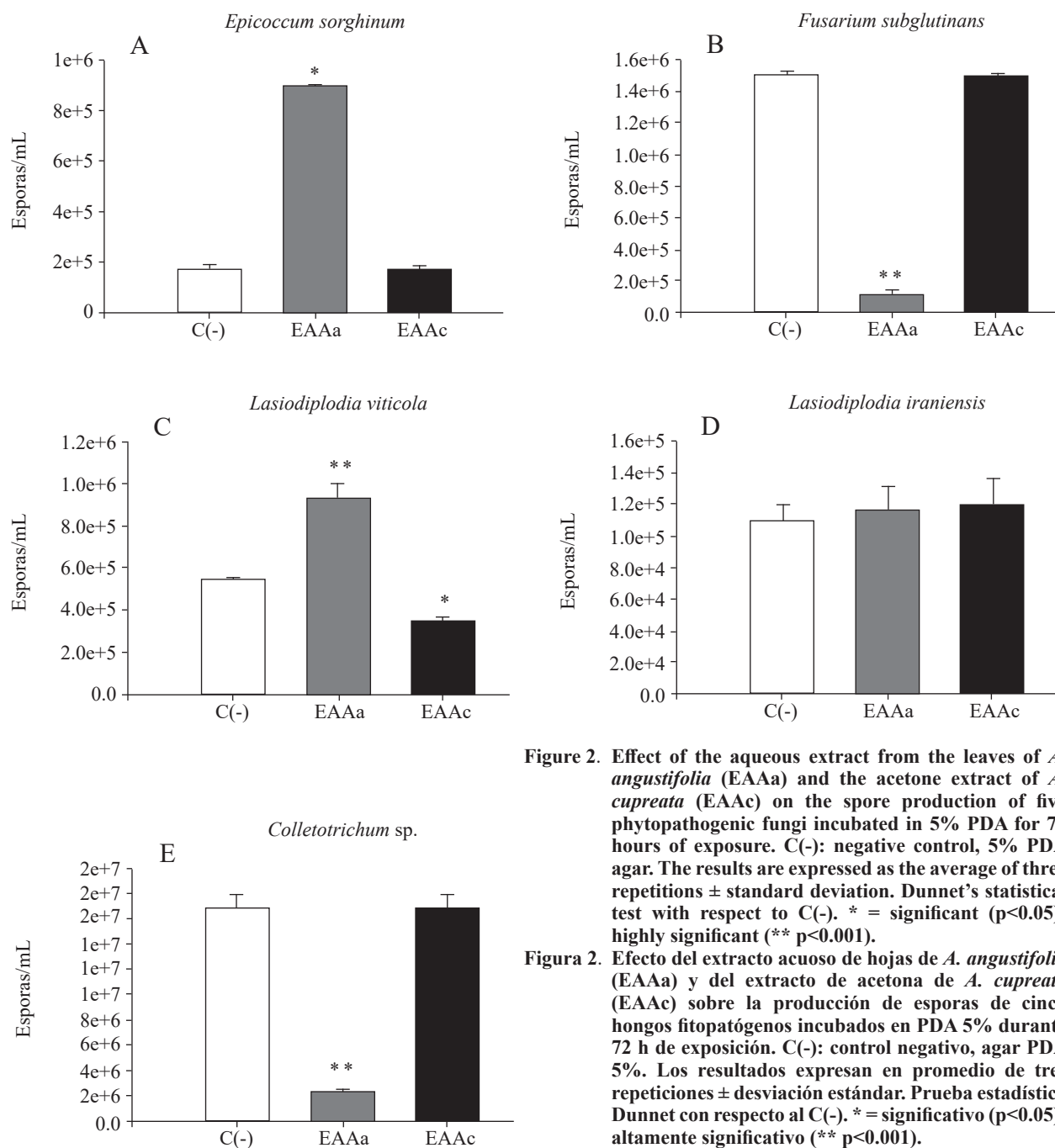
inhibit the cycle of tricarboxylic acids, reduce ATP content and inhibit ATPase (Yan *et al.*, 2020). Regarding saponins, it has been determined that these compounds form complexes with sterols in the cell membranes, causing them to disintegrate through the formation of pores and the triggering of cell lysis (Zaynab *et al.*, 2021). Ito *et al.* (2007) mentioned that  $\alpha$  tomatine induces apoptosis mediated by the accumulation of reactive oxygen species in *F. oxysporum*.

**Effect of *Agave* spp. extracts on spore production.** Figure 2 shows the effect of the extracts under study on the production of spores of each of the fungal strains tested. The most surprising results were obtained with the EAAa extract, which showed 40% inhibition of mycelial growth against *F. subglutinans* and *Colletotrichum* sp. However, spore production decreased by 92 and 86.6% compared to the negative control, respectively (Figure 2 B and E). This result is relevant for the control of these phytopathogens because it would prevent their reproduction and dissemination. On the contrary, EAAa stimulated the production of the spores of *E. sorghinum* and *L. viticola* (Figure 2 A and C), causing an increase of 407.5 and 73.2%, respectively, compared to the negative control ( $p \leq 0.001$ ). No effect was observed on the production of spores *L. iraniensis* (Figure 2D). Regarding the EAAC extract, which showed a greater inhibiting effect on the mycelial growth of *L. viticola*, *E. sorghinum* and *Colletotrichum* sp. (Table 2), caused a decrease of only 35.6% in the production of spores of *L. viticola* (Figure 2C), compared to the negative control ( $p \leq 0.001$ ), while no effects were observed on the spore production of *E. sorghinum*, *F. subglutinans*, *L. iraniensis* and *Colletotrichum* sp. (Figure 2 A, B, D and E), compared to the negative control ( $p \geq 0.05$ ).

Although the inhibitory effect of extracts from different agaves on the mycelial growth of various

función), inhiben el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, reducen el contenido de ATP e inhiben las ATPas (Yan *et al.*, 2020). En cuanto a las saponinas, se ha determinado que estos compuestos forman complejos con los esteroides en las membranas causando su desintegración debido a la formación de poros y finalmente lisis celular (Zaynab *et al.*, 2021). Por otro lado, Ito *et al.* (2007) mencionaron que la  $\alpha$  tomatina induce apoptosis mediada por acumulación de especies reactivas de oxígeno en *F. oxysporum*.

**Efecto de los extractos de *Agave* spp., sobre la producción de esporas.** El efecto de los extractos sobre la producción de esporas en cada una de las cepas de hongos ensayados se muestra en la Figura 2. Los resultados más sorprendentes se obtuvieron con el extracto de EAAa que presentó 40% inhibición del crecimiento micelial para *F. subglutinans* y *Colletotrichum* sp., sin embargo, se observaron porcentajes de disminución en la producción de esporas de 92 y 86.6% respectivamente con respecto al control negativo (Figura 2 B y E). Este resultado es relevante para el control de estos fitopatógenos porque impediría su reproducción y disseminación. Por el contrario, el EAAa estimuló la producción de esporas de *E. sorghinum* y *L. viticola* (Figura 2 A y C), determinándose un aumento del 407.5 y 73.2% respectivamente en comparación con el control negativo ( $p \leq 0.001$ ). Mientras que para *L. iraniensis* no se observó efecto sobre la disminución de las esporas (Figura 2D). Para el extracto EAAC, que presentó mayor inhibición del crecimiento micelial sobre *L. viticola*, *E. sorghinum* y *Colletotrichum* sp. (Cuadro 2), sólo se observó una disminución del 35.6 % en la producción de esporas de *L. viticola* (Figura 2C), respecto al control negativo ( $p \leq 0.001$ ) y para *E. sorghinum*, *F. subglutinans*, *L. iraniensis* y *Colletotrichum* sp. (Figura 2 A, B, D y E) no se encontraron diferencias en la producción de esporas con respecto al control negativo ( $p \geq 0.05$ ).



**Figure 2.** Effect of the aqueous extract from the leaves of *A. angustifolia* (EAAa) and the acetone extract of *A. cupreata* (EAAc) on the spore production of five phytopathogenic fungi incubated in 5% PDA for 72 hours of exposure. C(-): negative control, 5% PDA agar. The results are expressed as the average of three repetitions  $\pm$  standard deviation. Dunnet's statistical test with respect to C(-). \* = significant ( $p < 0.05$ ); highly significant (\*\*  $p < 0.001$ ).

**Figura 2.** Efecto del extracto acuoso de hojas de *A. angustifolia* (EAAa) y del extracto de acetona de *A. cupreata* (EAAc) sobre la producción de esporas de cinco hongos fitopatógenos incubados en PDA 5% durante 72 h de exposición. C(-): control negativo, agar PDA 5%. Los resultados expresan en promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. Prueba estadística Dunnet con respecto al C(-). \* = significativo ( $p < 0.05$ ); altamente significativo (\*\*  $p < 0.001$ ).

species of fungi has been evaluated before, studies on the inhibition of sporulation are still scarce. Lozano-Muñiz *et al.* (2011) found that the aqueous and methanolic extracts from the leaves and flowers

Aunque se ha evaluado el efecto de extractos de diferentes agaves sobre la inhibición del crecimiento micelial en diversas especies de hongos, los estudios sobre la inhibición de la esporulación son escasos.

of *A. americana*, *A. asperima*, *A. lechuguilla*, *A. tequilana* negatively affected the conidiogenesis of *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. They reported that the methanolic extracts of *A. asperima* and *A. americana* caused notable changes in conidiophore morphology, which may affect conidiogenesis. Other authors pointed out that the inhibition or stimulation of spore production are possible responses of fungi when exposed to different extracts. For example, Achimon *et al.* (2020) reported that the essential oils of *Pimenta dioica* and *Curcuma longa* (1000 mg L<sup>-1</sup>) inhibited the mycelial growth of *Fusarium verticillioides* M3125 by 87.2 and 55.5%, respectively, but the percentages of conidia production were 3046.4 and 341% respectively. The authors also reported that oils from *Rosmarinus officinalis* showed little growth inhibitory activity (24%), but inhibited conidia production by 27% compared to the control, which is similar to what was observed in the present study.

## CONCLUSIONS

The phytochemical profile of the extracts of *A. angustifolia* and *A. cupreata* confirmed the presence of alkaloids, flavonoids, saponins and triterpenes. The aqueous extract of *A. cupreata* showed an antifungal effect against *L. viticola*, *Colletotrichum* sp. and *E. sorghinum* inhibiting 76, 60 and 59 % of mycelial growth, respectively, at concentrations of 8 and 16 mg mL<sup>-1</sup> (p≤0.05), while spore production decreased by 86% in *Colletotrichum* sp. Therefore, this extract has the potential to be used as an alternative source of new natural antifungal compounds.

The acetone extract of *A. angustifolia* inhibited 40% of the mycelial growth of *E. sorghinum* at 16 mg mL<sup>-1</sup> (p≤0.05) without reducing its sporulation (p≥0.05).

En este sentido, Lozano-Muñiz *et al.* (2011), encontraron que los extractos acuosos y metanólicos obtenidos de las hojas y flores de *A. americana*, *A. asperima*, *A. lechuguilla*, *A. tequilana* afectaron negativamente la conidiogénesis de *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus flavus* reportando que los extractos metanólicos de *A. asperima* y *A. americana* causaron cambios notables en la morfología de los conidióforos que pueden afectar la conidiogénesis. Otros autores señalaron que la inhibición o estimulación en la producción de esporas son respuestas posibles de los hongos al ser expuestos a diferentes extractos. Por ejemplo, Achimón *et al.* (2020), reportaron que los aceites esenciales de *Pimenta dioica* y *Curcuma longa* (1000 mg L<sup>-1</sup>) inhibieron el crecimiento micelial de *Fusarium verticillioides* M3125 en 87.2 y 55.5% respectivamente, pero al mismo tiempo, los porcentajes de producción de conidios fueron de 3046.4 y 341% respectivamente; también determinaron que los aceites de *Rosmarinus officinalis* presentaron poca actividad de inhibición del crecimiento (24%), pero inhibieron en 27% la producción de conidios con respecto al control, lo anterior es similar a lo observado en este estudio.

## CONCLUSIONES

El perfil fitoquímico de los extractos de *A. angustifolia* y *A. cupreata* confirmó la presencia de alcaloides, flavonoides, saponinas y triterpenos.

El extracto acuoso de *A. cupreata* presentó efecto antifúngico contra *L. viticola*, *Colletotrichum* sp. y *E. sorghinum* inhibiendo el 76, 60 y 59 % del crecimiento micelial respectivamente en concentraciones de 8 y 16 mg mL<sup>-1</sup> (p≤0.05), mientras que, disminuyó la producción de esporas en un 86% en *Colletotrichum* sp. Por lo que puede ser utilizado como una alternativa para la búsqueda de nuevos antifúngicos naturales.



## ACKNOWLEDGMENTS

To sector project number 263188 SEMARNAT-CONACYT “Caracterización física, química y biológica del maguey sacatiro (*Agave angustifolia* Haw) para su aprovechamiento sustentable en la región comprendida entre los municipios de Chilapa y Huitzucu, Gro. Cuenca del Balsas”.

## LITERATURE CITED

- Achimón F, Brito VD, Pizzolitto RP, Ramirez-Sanchez A, Gomez EA and Zygodlo JA. 2020. Chemical composition and antifungal properties of commercial essential oils against the maize phytopathogenic fungus *Fusarium verticillioides*. Revista Argentina de Microbiología. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2020.12.001>
- Ahumada-Santos YP, Montes-Ávila J, Uribe-Beltrán M. de J, Díaz-Camacho SP, López-Angulo G, Vega-Aviña R and Delgado-Vargas F. 2013. Chemical characterization, antioxidant, and antibacterial activities of six *Agave* species from Sinaloa, Mexico. Industrial Crops and Products 49:143-149. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.050>
- Asael RGH, Guevara-Gonzalez RG, de Jesus RGS and Angelica FPA. 2018. Antifungal activity of mexican endemic plants on agricultural phytopathogens: a review. XIV International Engineering Congress (CONIIN), Engineering Congress (CONIIN), 2018 XIV International.1-11. <https://doi.org/10.1109/CONIIN.2018.8489793>
- Barrientos Rivera G, Esparza Ibarra EL, Segura Pacheco HR, Talavera Mendoza O, Sampedro Rosas ML and Hernández Castro E. 2019. Caracterización morfológica de *Agave angustifolia* y su conservación en Guerrero, México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 10(3): 655-668. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i3.1554>
- Bui NT, Pham TLT, Nguyen KT, Le PH and Kim KH. 2021. Effect of extraction solvent on total phenol, flavonoid content, and antioxidant activity of *Avicennia officinalis*. Biointerface Research in Applied Chemistry 12(2): 2678-2690. <https://doi.org/10.33263/BRIAC122.26782690>
- Camacho-Campos C, Pérez-Hernández Y, Valdivia-Ávila A, Rubio-Fontanills and Fuentes-Alfonso L. 2020. Evaluación fitoquímica, antibacteriana y molusquicida de extractos de hojas de *Agave* spp. Revista Cubana de Química 32(3): 390-405. [https://www.researchgate.net/publication/352712851\\_Evaluacion\\_fitoquimica\\_antibacteriana\\_y\\_molusquicida\\_de\\_extractos\\_de\\_hojas\\_de\\_Agave\\_spp/link/619ba7423068c54fa5114323/download](https://www.researchgate.net/publication/352712851_Evaluacion_fitoquimica_antibacteriana_y_molusquicida_de_extractos_de_hojas_de_Agave_spp/link/619ba7423068c54fa5114323/download)
- da Silva, PPM, de Oliveira J, Biazotto A dos M, Parisi MM, da Glória EM and Spoto MHF. 2020. Essential oils from *Eucalyptus staigeriana* F. Muell. Ex Bailey and *Eucalyptus urograndis* W. Hill ex Maiden associated to carboxymethyl cellulose coating for the control of *Botrytis*

El extracto acetónico de *A. angustifolia* inhibió el 40% del crecimiento micelial de *E. sorghinum* a 16 mg mL<sup>-1</sup> (p≤0.05) sin limitar su esporulación (p≥0.05).

## AGRADECIMIENTOS

Proyecto sectorial clave 263188 SEMARNAT- CONACYT “Caracterización física, química y biológica del maguey sacatiro (*Agave angustifolia* Haw) para su aprovechamiento sustentable en la región comprendida entre los municipios de Chilapa y Huitzucu, Gro. Cuenca del Balsas”.

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

- cinerea* Pers, Fr. and *Rhizopus stolonifer* (Ehrend, Fr) Vuill in strawberries. Industrial Crops and Products 156. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112884>
- De la Cruz-Ricardez D, Ortiz-García CF, Lagunes-Espinoza L del C and Torres de la Cruz, M. 2020. Efecto antifúngico de extractos metanólicos de *Capsicum* spp. en *Moniliophthora roreri*. Agro-Ciencia 54(6): 813-824. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v54i6.2186>
- De Oliveira FJG, Silva G da C, Cipriano L, Gomes M and Egea MB. 2021. Control of postharvest fungal diseases in fruits using external application of RNAi. Journal of Food Sciences 86 (8): 3341-3348. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15816>
- De Rodríguez DJ, García RR, Castillo FDH, González CNA, Galindo AS, Quintanilla JAV and Zuccolotto LEM. 2011. *In vitro* antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahuan Desert plants against postharvest fruit fungi. Industrial Crops and Products 34(1): 960-966. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.03.001>
- El-Hawary SS, El-Kammar HA, Farag MA, Saleh DO and El Dine RS. 2020. Metabolomic profiling of five *Agave* leaf taxa via UHPLC/PDA/ESI-MS in relation to their anti-inflammatory, immunomodulatory and ulceroprotective activities. Steroids 160: 108648. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2020.108648>
- García-Mendoza AJ. 2007. Los Agaves de México. Ciencias, Universidad Autónoma de México 87: 14-23. <https://www.redalyc.org/pdf/644/64408704.pdf>
- González-Álvarez M, Moreno-Limón S, Salcedo-Martínez S and Pérez-Rodríguez E. 2015. *In vitro* evaluation of antifungal activity of Agave (*Agave scabra* Salm Dyck) extracts against post-harvest mushrooms. Phytón Revista Internacional de Botánica Experimental 84(1):427-434. <http://www.scielo.org.ar/pdf/phyton/v84n2/v84n2a23.pdf>

- González-Madariaga Y, Mena-Linares Y, Martín-Montegudo D, Valido-Díaz A, Guerra-de-León JO and Nieto-Reyes L. 2020. *In vivo* anti-inflammatory effect of saponin-enriched fraction from *Agave brittoniana* Trel subspecies brachypus. *Ars Pharmaceutica* (Internet) 61(4): 231-237. <https://scielo.isciii.es/pdf/ars/v61n4/2340-9894-ars-61-04-231.pdf>
- Iñiguez-Covarrubias G, Díaz-Teres R, Sanjuan-Dueñas R, Anzaldo-Hernández J and Rowell R. 2001. Utilization of by-products from the tequila industry, part 2: potential value of *Agave tequilana* Weber azul leaves. *Bioresource Technology* 77(2): 101-108. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00167-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00167-X)
- Ito S, Ihara T, Tamura H, Tanaka S, Ikeda T, Kajihara H, Dissanayake C, Abdel-Motaal FF and El-Sayed MA. 2007.  $\alpha$ -tomatina, the major saponin in tomato, induces programmed cell death mediated by reactive oxygen species in the fungal pathogen *Fusarium oxysporum*. *FEBS Letters* 58(17), 3217-3222. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.06.010>
- Jain A, Sarsaiya S, Wu Q, Lu Y and Shi J. 2019. A review of plants leaf fungal diseases and its environmental speciation. *Bioengineered* 10(1): 409-424. <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1649520>
- Jin YS. 2019. Recent advances in natural antifungal flavonoids and their derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 29(19): 126589. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.07.048>
- Juárez B, Sosa M and López M. 2010. Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos 4*: 14-23. [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No4-Vol-2/TSIA-4\(2\)-Juarez-Becerra-et-al-2010.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No4-Vol-2/TSIA-4(2)-Juarez-Becerra-et-al-2010.pdf)
- Lagrouh F, Dakka N and Bakri Y. 2017. The antifungal activity of Moroccan plants and the mechanism of action of secondary metabolites from plants. *Journal of Mycologie Médicale* 27(3): 303-311. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.04.008>
- López-Salazar H, Camacho-Díaz BH, Ávila-Reyes SV, Pérez-García MD, González-Cortázar M, Arenas Ocampo ML and Jiménez-Aparicio AR. 2019. Identification and quantification of  $\beta$ -sitosterol  $\beta$ -D-glucoside of an ethanolic extract obtained by microwave-assisted extraction from *Agave angustifolia* Haw. *Molecules* (Basel, Switzerland) 24(21): 3926. <https://doi.org/10.3390/molecules24213926>
- Lozano-Muñiz S, García S, Heredia N and Castro-Franco R. 2011. Species of *Agave* induces morphological changes in *Aspergillus parasiticus* Speare and *Aspergillus flavus* Link ex Fries. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 9(2): 767-770. <https://www.researchgate.net/publication/215484700>
- Maharshi A and Thaker V. 2014. Antifungal activity of *Agave* species from Gujarat, India. 423-430 Pp. *In*: In: Kharwar R, Upadhyay R, Dubey N, Raghuvanshi R (eds). *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security*. Springer, New Delhi. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-1801-2\\_37](https://doi.org/10.1007/978-81-322-1801-2_37)
- Mui Yun Wong, Hamid S, Iskandar Shah NA and Ab Razak NH. 2020. Botanical extracts as biofungicides against fungal pathogens of rice. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science* 43(4): 457-466. <https://doi.org/10.47836/pjtas.43.4.03>
- Nachilima C, Chigeza G, Chibanda M, Mushoriwa H, Diers BD, Murithi HM and Hartman GL. 2020. Evaluation of foliar diseases for soybean entries in the Pan-African trials in Malawi and Zambia. *Plant Diseases* 104(8): 2068-2073. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-19-2617-SR>
- Ortiz-Martínez EL, Robles-Yerena L, Leyva-Mir GS, Camacho-Tapia M and Juárez-Rodríguez L. 2022. *Fusarium* sp., causal agent of vascular wilt in citrus and its sensitivity to fungicides, *Mexican Journal of Phytopathology* 4(1):1-17. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2106-3>
- Palma-Guerrero J, Chancellor T, Spong J, Canning G, Hammond J, McMillan VE and Hammond-Kosack KE. 2021. Take-all diseases: New insights into an important wheat root pathogen. *Trends in Plant Science* 26 (8): 836-848. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.02.009>
- Pavarini DP, Pavarini SP, Niehues M and Lopes N. 2012. Exogenous influences on plant secondary metabolites levels. *Animal Feed Science and Technology* 176 (1-4): 5-16. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.07.002>
- Pereira GM, Ribeiro MG, da Silva BP and Parente JP. 2017. Structural characterization of a new steroidal saponin from *Agave angustifolia* var. Marginata and preliminary investigation of its *in vivo* antiulcerogenic activity and *in vitro* membrane permeability property. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 27 (18): 4345-4349. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.08.026>
- Salazar-Pineda DT, Castro-Alarcón N, Moreno-Godínez ME, Nicasio-Torres MP, Pérez-Hernández J and Álvarez-Fitz P. 2017. Antibacterial and anti-inflammatory activity of extracts and fractions from *Agave cupreata*. *International Journal of Pharmacology* 13: 1063-1070. <https://doi.org/10.3923/ijp.2017.1063.1070>
- Siddhapura S, Maharshi A and Thaker V. 2011. Varietal difference in antifungal activity of some species of *Agave*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 44(2): 135-141. <https://doi.org/10.1080/03235400902952087>
- Soto-Castro D, Santiago-García PA, Vásquez-López A, Sánchez-Heraz F, Vargas-Mendoza Y and Gaitán-Hernández R. 2021. Effect of ethanolic extracts from *Agave potatorum* Zucc leaves in the mycelial growth of *Pleurotus* spp. *Emirates Journal of Food and Agriculture (EJFA)* 33(3):228-236. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2021.v33.i3.2664>
- Tapia-Quirós P, Martínez-Téllez MA, Ávila-Quezada GD and Vargas-Arispuro I. 2020. Inhibición de endo-1,3- $\beta$ -glucanasa fúngica por compuestos fenólicos aislados de *Turnera diffusa*: una alternativa para antifúngicos convencionales. *Revista Mexicana de Fitopatología* 38(1):160-169. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1911-3>
- United Nations. 2019. How certain are the United Nations global population projections?. *Population Facts*. <https://population.un.org/wpp/Publications/>
- Urbina CJF, Casas A, Martínez-Díaz Y, Santos-Zea L and Gutiérrez-Urbe JA. 2018. Domestication and saponin contents in a gradient of management intensity of *Agaves*: *Agave cupreata*, *A. inaequalis* and *A. hookeri* in central

- Mexico. Genetic Resources and Crop Evolution; An International Journal 65(4):1133. <https://doi.org/10.1007/s10722-017-0601-6>
- Yan YF, Yang CJ, Shang XF, Zhao ZM, Liu YQ, Zhou R, Liu H, Wu TL, Zhao WB, Wang YL, Hu GF, Qin F, He YH, Li HX and Du SS. 2020. Bioassay guided isolation of two antifungal compounds from *Magnolia officinalis* and the mechanism of action of honokiol. Pesticide Biochemistry and Physiology 170. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104705>
- Zaynab M, Sharif Y, Abbas S, Afzal MZ, Qasim M, Khalofah A, Ansari MJ, Khan KA, Tao L and Li S. 2021. Saponin toxicity as key player in plant defense against pathogens. Toxicon 193: 21-27. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.01.009>
- Zhao S, Guo Y, Wang Q and An B. 2021. Antifungal effects of lycorina on *Botrytis cinerea* and possible mechanisms. Biotechnology Letters 43(7): 1503-1512. <https://doi.org/10.1007/s10529-021-03128-8>
- Zubrod JP, Bundschuh M, Arts G, Knäbel A, Payraudeaus S, Rasmussen JJ, Rohr J, Scharmüller A, Smalling K, Sehle S, Schulz R and Schäfer RB. 2019. Fungicides: An overlooked pesticide class?. Environmental Science and Technology 53(7):3347-3365. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b04392>