

# Etiology of a black spot symptom in *Agave angustifolia*: An *in vitro* approach towards its biological control

## Etiología de la mancha necrótica del *Agave angustifolia*: Una aproximación *in vitro* hacia su control biológico

**Horacio Duque-Bautista, Guilbaldo Gabriel Zurita-Vásquez**, Universidad de la Sierra Sur, Guillermo Rojas Mijangos S/N, Ciudad Universitaria CP 70800, Miahuatlán de Porfirio Díaz, Oaxaca, México; **Yesenia Pacheco-Hernández**, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada-IPN, Ex-Hacienda San Juan Molino Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, CP 90700, Tlaxcala, México; **Nemesio Villa-Ruano\***, Universidad de la Sierra Sur, Guillermo Rojas Mijangos S/N, Ciudad Universitaria CP 70800, Miahuatlán de Porfirio Díaz, Oaxaca, México. \*Autor para correspondencia: [necho82@yahoo.com.mx](mailto:necho82@yahoo.com.mx).

**Recibido:** 12 de Enero, 2017.

**Aceptado:** 15 de Febrero, 2017.

Duque-Bautista H, Zurita-Vásquez GG, Pacheco-Hernández Y, Nemesio Villa-Ruano N. 2017. Etiology of a black spot symptom in *Agave angustifolia*: An *in vitro* approach towards its biological control. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35: 326-337.

**DOI:** 10.18781/R.MEX.FIT.1701-2

Primera publicación DOI: 22 de Marzo, 2017.

First DOI publication: March 22, 2017.

**Resumen.** Presentamos la identificación molecular de una especie de *Cladosporium* aislada de las manchas necróticas de los tallos enfermos de *Agave angustifolia*, los cuales se colectaron en San Luis Amatlán Oaxaca, México. Los análisis de los espaciadores transcritos internos (ITS) del gen de RNA ribosomal 18S y de la secuencia parcial codificante (cDNA) de una proteína alergénica conservada de choque térmico 70 (HSP70), revelaron su similitud

**Abstract.** We present the molecular identification of a *Cladosporium* species isolated from necrotic spots of diseased stalks of *Agave angustifolia*, which were collected in San Luis Amatlán, Oaxaca, Mexico. Analyses of the internal transcribed spacer (ITS) from the 18S ribosomal RNA gene and the partial coding region (cDNA) from an allergenic conserved heat shock protein 70 (HSP70), revealed its similarity with *Cladosporium herbarum* (Pers.: Fr.) Link. The *in vitro* assessment of the ethanolic extracts from *Zaluzania montagnifolia* roots and its main *ent*-kaurenoids resulted in the growth inhibition of the fungus. Minimum inhibitory concentration (MIC) values were obtained by the agar dilution and broth microdilution methods. The ethanolic extract, *ent*-kaurenoic acid (*ent*-16-kauren-19-oic acid) and grandiflorenic acid (*ent*-kaur-9(11),16-dien-19-oic acid) showed MIC values of 150.4±3.5, 100.3±2.1, and 80.7±1.4 µg mL<sup>-1</sup>, respectively

con *Cladosporium herbarum* (Pers.: Fr.) Link. La evaluación *in vitro* de los extractos etanólicos de las raíces *Zaluzania montagnifolia* y de sus principales *ent*-kaurenoides resultó en la inhibición del crecimiento normal del hongo. La concentración mínima inhibitoria (MIC) se obtuvo por el método de dilución en agar y microdilución en caldo. El extracto etanólico, el ácido *ent*-kaurenoico (*ent*-16-kauren-19-oic acid) y el ácido grandiflorenico (*ent*-kaur-9(11),16-dien-19-oic acid) mostraron valores MIC de  $150.4 \pm 3.5$ ,  $100.3 \pm 2.1$  y  $80.7 \pm 1.4$   $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente.

**Palabras clave:** *Cladosporium herbarum*, ITS, maguey mezcalero, derivados del *ent*-kaureno, inhibición del crecimiento.

El género *Cladosporium* está constituido por alrededor de 500 miembros con 40 especies oficialmente nombradas y 180 cepas sin nombre que han sido reportadas alrededor del mundo (Alonso, 2012). Estas especies polifiléticas son caracterizadas por su morfofisiología heterogénea y por su extraordinaria capacidad para colonizar hospederos inertes y vivos incluyendo humanos y muchas especies de plantas (Bensch *et al.*, 2012). A pesar de que muchos de estos hongos son conocidos por ser endófitos comunes, algunas especies pueden actuar como organismos oportunistas asociados a manchas foliares y otras lesiones similares en frutos de plantas con importancia agronómica (Schubert, 2005). *Cladosporium herbarum* (Pers.: Fr.) Link, es uno de los tres mayores complejos de especies del género *Cladosporium* que usualmente colonizan hojas muertas o en senescencia o incluso plantas herbáceas o leñosas como invasor secundario de manchas necróticas foliares (Bensch *et al.*, 2015). *C. herbarum* produce la enfermedad de pudrición en cierto número de frutos agronómicos tales como la pera, la uva, la cereza y el maracuyá (Barbosa

**Key words:** *Cladosporium herbarum*, ITS, maguey mezcalero, *ent*-kaurene derivatives, growth inhibition.

The *Cladosporium* genus is comprised by around 500 members with 40 officially named species and 180 unnamed strains reported worldwide (Alonso, 2012). These polyphyletic species are characterized by its morphophysiological heterogeneity and by its extraordinary capacity to colonize non-living and living hosts including humans and many plant species (Bensch *et al.*, 2012). Despite many of these fungi are known to be common endophytes, some species can act as opportunistic microorganisms associated to leaf spots and other lesions in fruits from plants with agronomic importance (Schubert, 2005). *Cladosporium herbarum* (Pers.: Fr.) Link, is one of the three major species complexes of the genus *Cladosporium* which usually colonizes falling or dead leaves or even herbaceous and woody plants as secondary invader on necrotic leaf spots (Bensch *et al.*, 2015). *C. herbarum* produces rot diseases in a number of agronomic fruit crops such as pear, grape, cherry and passion fruit (Barbosa *et al.*, 2001). Its teleomorph, *Mycosphaerella tassiana* (De Not.) Johans is associated to the brown leaf spot disease of date palm (Barbosa *et al.*, 2001). *C. herbarum* has been documented as an opportunistic phytopathogen isolated from *Agave americana* cultivated in Italy (Bensch *et al.*, 2012). However, the incidence of cladosporiosis in *Agave* plants cultivated in Latin America has been poorly described. Some regions of Mexico such as Jalisco and Oaxaca economically depend on *Agave* crops to commercialize traditional distillates. Thus, the identification of its main phytopathogens and the formulation of alternatives for their biological control should be very valuable. Considering that some *Cladosporium* species could aggravate the necrosis of many vegetables including *Agave*

*et al.*, 2001). Su teleomorfo, *Mycosphaerella tassiana* (De Not.) Johans está ligado a la enfermedad de la mancha marrón foliar de la palmera datilera (Barbosa *et al.*, 2001). *C. herbarum* ha sido documentado como un patógeno oportunista aislado del *Agave americana* cultivado en Italia (Bensch *et al.*, 2012). Sin embargo, la incidencia de cladosporiosis en plantas de *Agave* cultivadas en Latinoamérica ha sido poco descrita. Algunas regiones de México tales como Jalisco y Oaxaca dependen económicamente de los cultivos de *Agave* para comercializar destilados tradicionales. De este modo, la identificación de sus principales fitopatógenos, así como la formulación de alternativas para su biocontrol serían muy valiosas. Considerando que algunas especies de *Cladosporium* podrían agravar la necrosis de muchos vegetales incluyendo a las plantas de *Agave* y tomando en cuenta que estos hongos también contienen proteínas alergénicas para los humanos (Achatz *et al.*, 1995), su biocontrol alternativo debe ser investigado.

Las plantaciones de *Agave* en el distrito de Miahuatlán de Porfirio Díaz Oaxaca están usualmente circundadas por matorral xerófilo. En estos ecosistemas existen muchas plantas silvestres que no han sido probadas en cuanto a su capacidad antimicrobiana (Meave *et al.*, 2012). Así bien, la evaluación de sus extractos crudos y compuestos mayoritarios sobre especies fitopatógenas selectas, podría originar alternativas menos costosas para lograr su biocontrol. En este contexto, algunas enfermedades de plantas podrían razonablemente ser tratadas con recursos de plantas nativas. Una de las plantas más abundantes asociadas a este sitio geográfico es *Zaluzania montagnifolia*, una Asteraceae nativa comúnmente conocida como “yegachin” o “vara ceniza” (Villa-Ruano *et al.*, 2013). La planta es considerada como una fuente de diterpenos kaurénicos con actividad antimicrobiana sobre una vasta cantidad de especies patógenas para animales

plants and also contain some allergens for humans (Achatz *et al.*, 1995), its alternative biological control should be investigated.

The *Agave* crops from the district of Miahuatlán de Porfirio Díaz Oaxaca are usually surrounded by xeric scrublands. In this ecosystem, there are several wild plants that have not been tested for its capacity as antimicrobials (Meave *et al.*, 2012). Thus, the evaluation of crude extracts and its majoritarian compounds on selected phytopathogenic species, could originate less expensive alternatives to achieve its biological control. In this context, some plant diseases could reasonably be treated with native plant sources. One of the most abundant plants associated to this geographical location is *Zaluzania montagnifolia*, a native Asteraceae commonly known as “yegachin” or “vara ceniza” (Villa-Ruano *et al.*, 2013). The plant is considered as a source of kaurane type diterpenes with antimicrobial activity on several animal- and plant pathogenic species (Villa-Ruano *et al.*, 2016). Considering the availability of *Z. montagnifolia* in this region and the known antimicrobial activity of its main chemical components, the objectives of this work were to determine the identity of the main phytopathogen involved in the generation of necrotic spots in diseased *Agave* plants, as well as to evaluate the ethanolic extracts and pure entkaurenoids of *Z. montagnifolia* on the *in vitro* growth of that phytopathogen.

#### **Isolation of *Cladosporium* sp. from diseased *A. angustifolia***

Ten stalks from *Agave angustifolia* showing necrotic spots were collected in open-field crops from San Luis Amatlán Oaxaca, México (16° 39' 02" N, 96° 49' 95" W, 1,500 masl) in July 2016. The stalks were carefully washed three times with a solution of 2 % sodium hypochlorite. After this step,

y plantas (Villa-Ruano *et al.*, 2016). Considerando la disponibilidad de *Z. montagnifolia* en esta región y la conocida actividad antimicrobiana de sus compuestos mayoritarios, los objetivos primordiales de este trabajo fueron determinar la identidad del patógeno involucrado en la generación de manchas necróticas en plantas de *Agave* sintomáticas, así como también evaluar los extractos etanólicos y *ent*-kaurenoides puros de *Z. montagnifolia* sobre el crecimiento *in vitro* de tal fitopatógeno.

### **Aislamiento de *Cladosporium* sp. de plantas de *A. angustifolia* sintomáticas**

Diez tallos de *A. angustifolia* con signos de manchas necróticas fueron colectadas en cultivos abiertos de San Luis Amatlán Oaxaca, México (16° 39' 02" N, 96° 49' 95" O, 1,500 msnm) en julio del 2016. Los tallos fueron cuidadosamente lavados en tres ocasiones con una solución de hipoclorito de sodio al 2 %. Después de este paso, las manchas necróticas fueron extraídas con un bisturí estéril y entonces sumergidas en una solución de etanol absoluto (J.T. Baker, USA) por 1 minuto. El tejido fue desecado bajo flujo de N<sub>2</sub> y fue cortado en piezas pequeñas en campana de flujo laminar para posteriormente ser incubadas en medio PDA (Difco®, USA) a 30 °C en oscuridad por 5 días. Los microorganismos fueron purificados por estría cruzada y entonces mantenidos en placas Petri frescas conteniendo el mismo medio de cultivo. El microorganismo más dominante (*Cladosporium* sp.) fue sometido a identificación molecular y posteriormente evaluado en su posible papel en la generación de manchas necróticas.

### **Identificación molecular de *Cladosporium* sp. aislado del *A. angustifolia* sintomático**

100 mg de una mezcla de hifas y conidióforos fueron tomados del medio PDA conteniendo el

the necrotic spots were scratched out with a sterile surgical blade and then immersed in a solution of absolute ethanol (J.T. Baker, USA) for 1 min. The tissue was dried under N<sub>2</sub> stream and cut into small pieces in a sterile cabinet for posteriorly being incubated in PDA medium (Difco®, USA) at 30 °C in darkness for 5 days. The microorganisms were purified by cross streaking method and maintained in fresh petri dishes containing the same culture media. The most dominant microorganism (*Cladosporium* sp.) was subjected to molecular identification and it was subsequently tested for its possible involvement in the generation of necrotic spots.

### **Molecular determination of *Cladosporium* sp. isolated from diseased *A. angustifolia***

100 mg of a mixture of hyphal cells and conidiophores were taken from PDA containing the filamentous fungus. The cells were disrupted with acid-washed glass beads (G-9268, 425-600 µm 0.5 mm diameter, Sigma-Aldrich Co., USA.) in the presence of 300 µL of DNAzol reagent (ThermoFisher™, USA). The following steps were carried out in accordance with the manufacturer's recommendations. The isolated DNA was washed twice with a mix of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1, v/v: Sigma-Aldrich Co., USA). PCR reactions were carried out using 1 µg of DNA dissolved in a final volume of 50 µL. The identity of the microorganism was determined by the amplification of internal transcribed spacers (ITS) using the primers ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) and ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) and performing the PCR conditions described by White *et al.* (1990). The amplicon was cloned into TOPO TA cloning vector (ThermoFisher™, USA) and sequenced in triplicate in an ABI PRISM 3700 instrument sequencer (ABI, Foster City, CA). The

hongo filamentoso. Las células fueron lisadas con perlas de vidrio-acidificadas (G-9268, 425-600 µm 0.5 mm de diámetro, Sigma-Aldrich Co., USA) en presencia de 300 µL del reactivo DNAzol (Thermo-fisher™, USA). Los pasos siguientes fueron llevados a cabo de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El ADN aislado fue lavado dos veces con una mezcla de fenol:cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1, v/v, Sigma-Aldrich Co., USA). Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo usando 1 µg de ADN disuelto en un volumen final de 50 µL. La identidad del microorganismo fue determinada por la amplificación del espaciador transcrito interno (ITS) usando los iniciadores ITS1 (TCCGTAGG-TGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATT-GATATGC) y siguiendo las condiciones de PCR descritas por White *et al.* (1990). El amplicón fue clonado en el vector TOPO TA (Thermo-fisher™, USA) y fue secuenciado por triplicado en un aparato ABI PRISM 3700 (ABI, Foster City, CA). La proteína alergénica de *C. herbarum* (proteína de choque térmico 70, acceso S83210) fue amplificada por transcripción inversa a partir del ARN total del hongo, usando el reactivo TRIZOL (Thermo-fisher™, USA) y la enzima SuperScript II (Thermo-fisher™, USA). Los ensayos de PCR fueron realizados con la enzima Platinum® ADN polimerasa de alta fidelidad (Thermo-fisher™, USA) y los iniciadores GAGATCCTTCTTCTCGACGTCG y CCTTCTAATCGTTAACGCCATG. El protocolo de PCR para amplificar este ADNc constó de 94 °C por 5 min de desnaturalización inicial, seguida de 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 57 °C por 30 s, 72 °C por 1 min y una extensión final de 72 °C por 4 min. El amplicón fue separado por electroforesis y visualizado en un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio. Las secuencias fueron comparadas con las depositadas en la base de datos del NCBI (usando BLAST nucleotide) y la base MycoBank.

allergenic protein of *C. herbarum* (heat shock protein 70, accession S83210) was amplified by reverse transcription from total RNA, using TRIZOL (Thermo-fisher™, USA) and SuperScript II enzyme (Thermo-fisher™, USA). PCR assays were carried out with Platinum® DNA polymerase high fidelity (Thermo-fisher™, USA) and the primers GAGATCCTTCTTCTCGACGTCG and CCTTCTAATCGTTAACGCCATG. The PCR protocol to amplify this cDNA was 94 °C for 5 min of initial denaturation, followed by 35 cycles at 94 °C for 30 s, 57 °C for 30 s, 72 °C for 1 min and a final extension of 72 °C for 4 min. The amplicon was visualized in an agarose 1 % gel electrophoresis after staining with ethidium bromide and it was simultaneously cloned and sequenced as previously described. The sequences were compared with those deposited in the nucleotide data base of the NCBI (by nucleotide BLAST) and MycoBank.

#### **Pathogenicity tests of *Cladosporium* sp. on *A. angustifolia* stalks**

Healthy young stalks of *A. angustifolia* were excised from the plant and were immersed in water to avoid dehydration along the experimental tests and finally maintained at 25 °C in normal photoperiod (12 hours light). Conidiophores from the fungus were directly harvested with a sterile needle and were immediately inoculated in the stalks by mechanic penetration in order to examine Koch's postulates. The process was carried in a sterile cabinet. The appearance of the spots was observed during 47 days.

#### **Isolation of *ent*-kaurenoids and its *in vitro* evaluation on *Cladosporium* sp.**

500 g of dried roots from *Zaluzania montagnifolia* were extracted for 10 days at room

### Pruebas de patogenicidad de *Cladosporium* sp. en tallos de *A. angustifolia*

Tallos jóvenes asintomáticos de *Agave angustifolia* fueron cortados y sumergidos en agua para evitar deshidratación durante el proceso experimental y se mantuvieron finalmente a 25 °C en fotoperiodo normal (12 horas de luz). Conidióforos del hongo se colectaron directamente con una aguja estéril y fueron inmediatamente inoculados en los tallos por penetración mecánica, con el objetivo de examinar los postulados de Koch. El proceso se realizó en una campana de flujo laminar. La apariencia de las manchas se observó durante 47 días.

### Aislamiento de los *ent*-kaurenoides y su evaluación *in vitro* sobre *Cladosporium* sp.

500 g de raíces secas de *Z. montagnifolia* fueron extraídas con 2 L de etanol absoluto (J.T. Baker, USA) por 10 días a temperatura ambiente. El extracto etanólico crudo fue filtrado con papel Whatman grado 1 y subsecuentemente reducido a sequedad en un rotaevaporador (Buchi R200). La goma resultante fue recobrada y resuspendida en el mismo solvente para obtener soluciones madre de 100 mg mL<sup>-1</sup>. Estas soluciones fueron directamente usadas para los métodos de dilución en agar y microdilución en caldo o se fraccionaron por HPLC para la obtención del ácido kaurenico (ácido *ent*-16-kauren-19-oico) y el ácido grandiflorenico (ácido *ent*-kaur-9(11),16-dien-19-oico). La purificación semi-preparativa se llevó a cabo en un aparato Hewlett Packard 1050 acoplado a un detector de arreglo de diodos HP G1306A equipado con una columna Varian C<sub>18</sub> (250×4.5 mm D.I.; 5 µm tamaño de la partícula). Los metabolitos fueron colectados durante corridas continuas (100 µL de volumen de inyección) usando una fase móvil isocrática consistente de acetonitrilo (J.T.

temperature with 2 L of absolute ethanol (J.T. Baker, USA). The crude ethanolic extract was filtered with Whatman filter paper grade 1 and subsequently reduced until dryness in a rotary evaporator (Buchi R200). The resulting gum was recovered and then resuspended in the same solvent in order to obtain stock solutions of 100 mg mL<sup>-1</sup>. These solutions were directly used for broth microdilution and agar dilution methods or were fractioned by HPLC for the obtainment of kaurenico acid (*ent*-16-kauren-19-oic acid) and grandiflorenic acid (*ent*-kaur-9(11),16-dien-19-oic acid). Semipreparative purification was carried out in a Hewlett Packard 1050 system coupled to a HP G1306A diode array detector equipped with a Varian C<sub>18</sub> column (250×4.5 mm I.D.; 5 µm particle size). The metabolites were collected during continuous runs (100 µL injection volume) using an isocratic mobile phase consisting of 70 % acetonitrile (J.T. Baker, USA) with 0.05 % acetic acid (v/v) at 1 mL min<sup>-1</sup> flow rate as previously described by Villa-Ruano *et al.* (2009). The retention time was compared with that of authentic standards available in our laboratory. The diterpenoids were resuspended in methanol (J.T. Baker, USA) for further antifungal assessment. Agar diffusion method was carried out by dissolving distinct concentrations (dose-response curves of 10-300 µg mL<sup>-1</sup>) of ethanolic extracts and/or pure diterpenoids in 10 mL of PDA medium (Valgas *et al.*, 2007). The phytopathogenic fungus was inoculated in the medium by massive streaking and these experiments were performed in quintuplicate. The plates were visualized in a white light transilluminator. The obtainment of MIC values was achieved by the broth microdilution method for filamentous fungi proposed by Pfaller *et al.* (2000) using resazurin (Sigma-Aldrich Co., USA) as an indicator of cell viability. The dose-response curves (10-300 µg mL<sup>-1</sup>) to obtain MIC values were performed in quintuplicate.

Baker, USA) al 70 % con 0.05 % de ácido acético (v/v) a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup> como lo describe previamente Villa-Ruano *et al.* (2009). El tiempo de retención fue comparado con el de estándares puros disponibles en nuestro laboratorio. Los diterpenoides se resuspendieron en metanol (J.T. Baker, USA) para su posterior evaluación antifúngica. El método de difusión en agar se efectuó por disolución de distintas concentraciones (curvas dosis-respuesta de 10-300 µg mL<sup>-1</sup>) del extracto etanólico y/o diterpenoides puros en 10 mL de medio PDA (Valgas *et al.*, 2007). El hongo fitopatógeno fue inoculado por estriado masivo y estos experimentos fueron efectuados por quintuplicado. Las placas fueron visualizadas en un transiluminador de luz blanca. La obtención de los valores de la MIC se logró por el método de microdilución en caldo para hongos filamentosos propuesto por Pfaller *et al.* (2000) usando resazurina (Sigma-Aldrich Co., USA) como indicador de viabilidad celular. Las curvas de dosis respuesta (10-300 µg mL<sup>-1</sup>) para obtener los valores de la MIC fueron efectuadas en quintuplicado. Las reacciones colorimétricas se midieron a 545 nm. Los valores de la MIC fueron adicionalmente validados por ANOVA-Tukey Test (p<0.01) usando el programa GraphPad 6.05.

Como resultado de la incubación del tejido necrótico en medio PDA, fue aislado un hongo filamentosos verde-marrón (entre otros aislados) con pequeños conidios terminales (Figura 1 A-B). Este hongo fue observado como el más dominante en todas las incubaciones efectuadas. La macroscopia y microscopia óptica del microorganismo sugirió su similitud con *Cladosporium* sp. (Bensch *et al.*, 2012). Las reacciones de PCR con el ADN genómico y los ADNc's obtenidos a partir de transcripción inversa produjeron fragmentos de ~500 and ~800 pb (Figura 1 C). Los análisis de la secuencia del ITS en las bases de datos del NCBI y del MycoBank demostraron su homología (94 %) con el gen

Colorimetric reactions were measured at 545 nm. The MIC values were additionally validated by ANOVA-Tukey Test (p<0.01) using the software GraphPad 6.05.

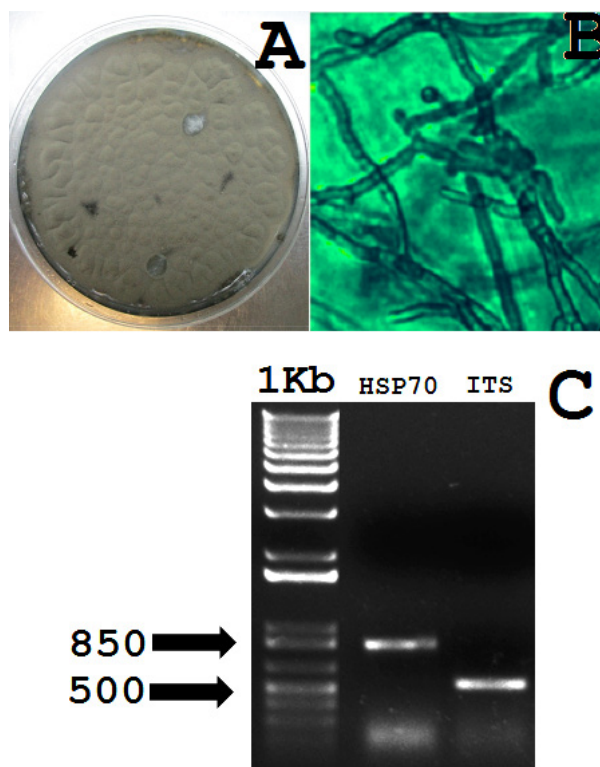
As a result of the incubation of the necrotic tissue in PDA medium, it was isolated a brown-green filamentous fungi (between others isolates) with small terminal conidia (Figure 1 A-B). This fungus was observed as the most dominant species in all the incubations. Macroscopy and microscopy of the microorganism suggested its similarity with *Cladosporium* species (Bensch *et al.*, 2012). PCR reactions with genomic DNA and cDNAs from reverse transcription produced fragments of ~500 and ~800 bp (Figure 1 C). The analyses of the ITS sequence with NCBI and MycoBank data bases demonstrated its homology (94 %) with the 18S ribosomal RNA gene from the isolate "olrim85" (ID: AY354234.1) of *C. herbarum* (Figure 2A). Whereas, the coding sequence of the allergenic protein had 99 % homology with the sequence ID:X81860.1 from *C. herbarum* deposited in the NCBI (Figure 2B). These molecular data strongly suggested the identity of the fungus as *C. herbarum*.

The inoculation of the fungus in asymptomatic *Agave* stalks exhibited necrotic symptoms since day 4 (Figure 3B). Despite the penetration with the sterile needle produced a damage in the stalks (Figure 3A), the inoculation of the fungus caused an evident systemic response and a darkening of the vasculature (Figure 3B). The systemic response was also perceived by emerging yellow spots around the necrotic cells which were visible since day 15 (Figure 3B). Interestingly, the lesions generated by the sole mechanical damage were almost imperceptible at day 47 (Figure 3A). Contrarily, those infected with the fungus were clearly aggravated at the same period of time (Figure 3B). These data strongly suggested the susceptibility of those *Agave* stalks to the *C. herbarum* infection.

de ARN ribosomal 18S del aislado “olrim85” (ID: AY354234.1) de *C. herbarum* (Figura 2A). Mientras tanto, la secuencia codificante de la proteína alergénica tuvo un 99% de homología con la secuencia ID:X81860.1 de *C. herbarum* depositada en el NCBI (Figura 2B). Estos datos moleculares sugirieron fuertemente la identidad del hongo como *C. herbarum*.

La inoculación del hongo en tallos asintomáticos de *Agave* exhibieron síntomas de necrosis desde el día 4 (Figura 3B). A pesar de que la penetración con la aguja estéril produjo un daño en los tallos (Figura 3A), la inoculación del hongo causó una evidente respuesta sistémica y un oscurecimiento de la vasculatura (Figura 3B). Dicha respuesta sistémica fue también percibida por manchas amarillas que circundaron las células necrosadas, las cuales fueron visibles desde el día 15 (Figura 3B). Interesantemente, las lesiones generadas únicamente por el daño mecánico fueron casi imperceptibles al día 47 (Figura 3A). Contrariamente, aquellas lesiones infectadas con el hongo se encontraron agravadas en el mismo periodo de tiempo (Figura 3B). Estos resultados sugieren fuertemente la susceptibilidad de estos tallos de *Agave* a la infección por *C. herbarum*. A pesar de que esta evidencia apoya el hecho de que *C. herbarum* está asociado a la generación de manchas necróticas, la participación de otros microorganismos oportunistas en la infección de cultivos de campos abiertos, no puede ser descartada.

La actividad antifúngica *in vitro* de los extractos etanólicos de las raíces de *Z. montagnifolia* contra *C. herbarum* mostraron un claro efecto inhibitorio (Figura 4). El método de dilución en agar usando los ácidos *ent*-kaurenoico y grandiflorenico puros (usualmente los principales constituyentes de los extractos etanólicos de las raíces de la planta) permitió exhibir su participación en el efecto antifúngico observado (Figura 4). Como se muestra



**Figura 1.** Macroscopia y microscopia óptica de *C. herbarum* aislado de tallos sintomáticos de *Agave*. A, *C. herbarum* crecido en medio PDA. B, organización de las hifas y conidióforos de *C. herbarum*, la imagen fue grabada a 40X. C, identificación molecular de *C. herbarum* por la amplificación de un ADNc parcial proveniente de una HSP70 alergénica (~800 bp) y el ITS del gen RNA ribosomal 18S (~500bp). Los pesos moleculares aproximados son mostrados.

**Figure 1.** Macroscopy and optical microscopy of *C. herbarum* isolated from diseased *Agave* stalks. A, *C. herbarum* grown in PDA medium. B, hyphal organization and conidiophores of *C. herbarum*, the image was recorded at 40X. C, Molecular identification of *C. herbarum* by the amplification of a partial cDNA from the allergenic HSP70 (~800 bp) and the ITS from 18S ribosomal RNA gene (~500bp). The approximated molecular weights are shown.

Despite this evidence supports the fact that *C. herbarum* is associated to the generation of necrotic spots, the involvement of another opportunistic microorganisms in the infection of open-air crops, cannot be discarded.



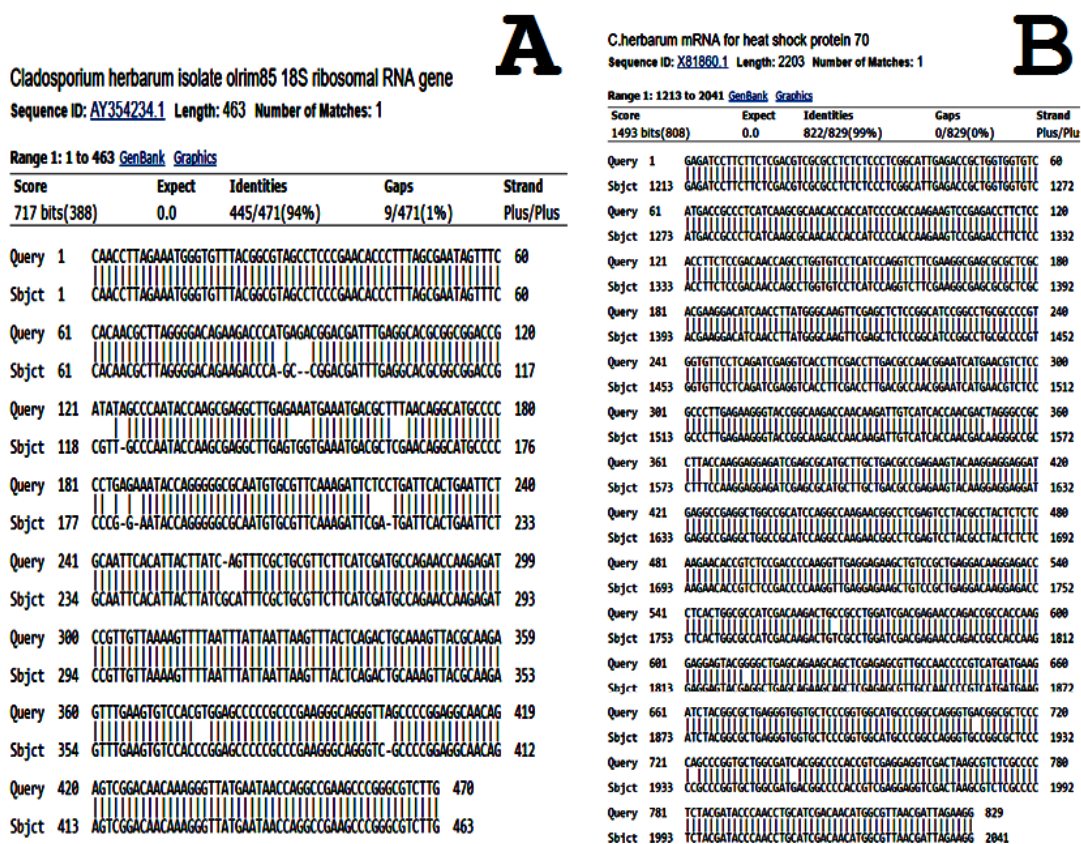


Figura 2. Resultados de los alineamientos por BLAST entre la secuencia original (query) de *C. herbarum* y su homología con aquellas depositadas en la base de nucleótidos del NCBI (subject). A, secuencia ITS; B, secuencia HSP70.

Figure 2. Results of the BLAST alignment for the original DNA sequences (query) from *C. herbarum* and its homology with those deposited in the nucleotide data base from the NCBI (subject).

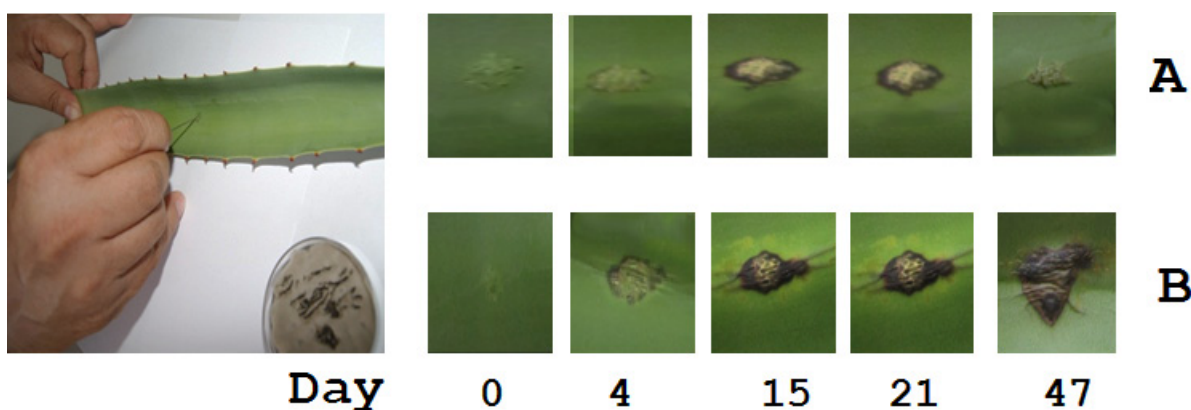


Figura 3. Efecto del daño mecánico (A) y daño mecánico con la inoculación *C. herbarum* (B) en tallos jóvenes asintomáticos de *Agave angustifolia*.

Figure 3. Effect of mechanical damage (A) and mechanical damage with inoculation by *C. herbarum* (B) in healthy young stalks from *A. angustifolia*.

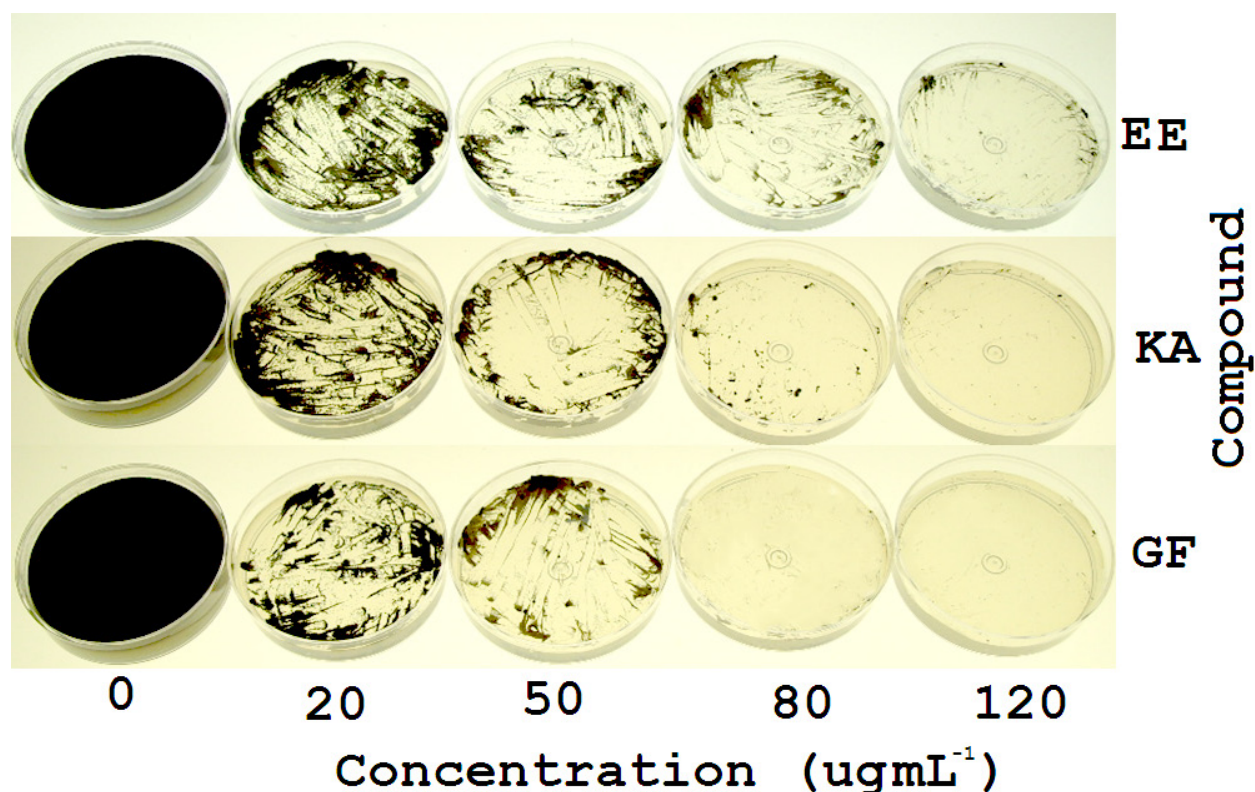


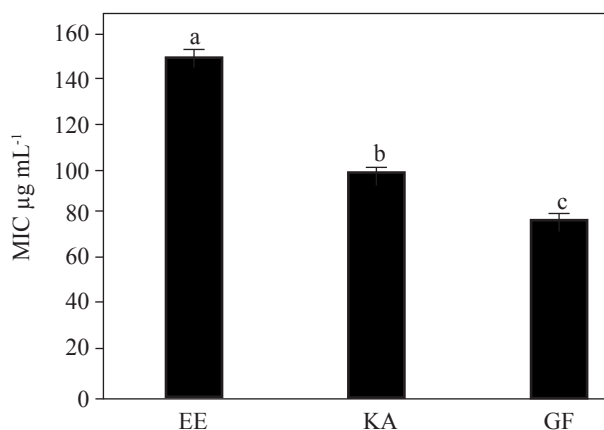
Figura 4. Efecto de diferentes concentraciones del extracto etanólico (EE) de *Z. montagnifolia*, el ácido *ent*-kaurenoico (KA) y el ácido grandiflorénico (GF) en el crecimiento *in vitro* de *C. herbarum*.

Figure 4. Effect of different concentrations of the ethanolic extract (EE) of *Z. montagnifolia*, *ent*-kaurenoic acid (KA) and grandifloreonic acid (GF) in the *in vitro* growth of *C. herbarum*.

en la Figure 4, el hongo creció perfectamente en medio PDA puro ( $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), mientras que una evidente inhibición del crecimiento fue observada en relación al aumento de la concentración de cada componente evaluado ( $20\text{-}120 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Estos experimentos semi-cuantitativos mostraron que el extracto etanólico conteniendo ambos diterpenos fue capaz de inhibir el crecimiento normal del hongo a menos de  $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ . Los ensayos ejecutados mediante el método de dilución en caldo condujeron a la obtención de los valores de la MIC. Estos valores reflejaron la concentración del agente antimicrobiano en la cual no hay signos de crecimiento. Los valores obtenidos fueron de  $150.4 \pm 3.5$ ,

The *in vitro* antifungal activity of the ethanolic extracts from the roots of *Z. montagnifolia* against *C. herbarum* showed a clear inhibitory effect (Figure 4). Agar dilution method using pure *ent*-kaurenoic and grandifloreonic acids (usually the main constituents of the root extracts of the plant) exhibited their involvement in the observed antifungal effect (Figure 4). As shown in Figure 4, the fungus perfectly grew in sole PDA medium ( $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), whereas an evident growth inhibition was observed as the concentration of each component assessed was increased ( $20\text{-}120 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). These semi-quantitative experiments showed that the ethanolic extract containing both diterpenes

100.3±2.1 y 80.7±1.4 µg mL<sup>-1</sup>, para el extracto etanólico, el ácido *ent*-kaurenoico y el ácido grandiflorénico, respectivamente (Figura 5). Diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) fueron observadas entre los tratamientos (Figura 5). De éste modo, el uso de los extractos etanólicos debería ser considerado como una alternativa económica para futuros ensayos *in vivo*, con el objetivo de determinar su posible aplicación en el control biológico de *C. herbarum*. La actividad antimicrobiana de los diterpenos evaluados ya ha sido propuesta y confirmada en diversas especies bacterianas y fúngicas (Villa-Ruano *et al.*, 2016). Este trabajo contribuye a la investigación de nuevas actividades antimicrobianas de extractos de plantas conteniendo *ent*-kaurenoides. Conside-



**Figure 5.** Comparación de los valores de la MIC de los extractos etanólicos de *Z. montagnifolia* (EE), el ácido *ent*-kaurenoico (KA) y el ácido grandiflorénico (GF) sobre el crecimiento *in vitro* de *Cladosporium herbarum*. Las barras indican la desviación estándar de 5 repeticiones (n=5) y letras diversas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos por ANOVA-Tukey test.

**Figure 5.** Comparison of MIC values of the ethanolic extract from *Z. montagnifolia* (EE), *ent*-kaurenoic acid (KA) and grandiflorenic acid (GF) in the *in vitro* growth of *Cladosporium herbarum*. Bars indicate the standard deviation of five repetitions (n=5) and diverse letters indicate significant differences between treatments by ANOVA-Tukey test ( $p < 0.01$ ).

was able to inhibit the normal grow of the fungus at less than 0.5 mg mL<sup>-1</sup>. The assays performed with the broth microdilution method allowed to the obtainment of MIC values. These values reflected the concentration of the antimicrobial agent in which there are no signs of growth. The values were 150.4±3.5, 100.3±2.1, and 80.7±1.4 µg mL<sup>-1</sup>, for ethanolic extract, kaurenoic acid and grandiflorenic acid, respectively (Figure 5). Significant differences ( $p < 0.01$ ) were observed among those treatments (Figure 5). Thus, the use of the ethanolic extract should be considered as a less expensive alternative for further *in vivo* trials in order to determine its possible use in the biological control of *C. herbarum*. The antimicrobial activity of these assayed diterpenes has been already proposed and confirmed in diverse bacterial and fungal species (Villa-Ruano *et al.*, 2016). This work contributes to the investigation of novel antimicrobial activities from plant extracts containing *ent*-kaurenoids. Considering that *Z. montagnifolia* can be found in the vegetation of those regions, its viability as a source for further antifungal *in vivo* test should be contemplated.

## CONCLUSIONS

A phytopathogenic fungus was isolated from the necrotic spots of diseased *A. angustifolia* plants collected in San Luis Amatlán Oaxaca, Mexico. Based upon molecular analyses and molecular characters the fungus was identified as *C. herbarum*. The ethanolic extracts and pure kaurenoids from *Z. montagnifolia* showed *in vitro* antifungal effect at <0.5 mg mL<sup>-1</sup> on this fungus.

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

rando que *Z. montagnifolia* puede ser localizada en la vegetación circundante de aquellas regiones, su viabilidad como un recurso para subsiguientes pruebas antifúngicas *in vivo*, debe ser contemplada.

## CONCLUSIONES

Un hongo fitopatógeno se aisló de las manchas necróticas provenientes de plantas sintomáticas *A. angustifolia* colectadas en San Luis Amatlán Oaxaca, Mexico. Basado en los análisis moleculares y caracteres morfológicos el hongo fue identificado como *C. herbarum*. Los extractos etanólicos y kauronoides puros de *Z. montagnifolia* mostraron un efecto antifúngico *in vitro* a  $<0.5 \text{ mg mL}^{-1}$  sobre este hongo.

## LITERATURA CITADA

- Achatz G., Oberkofler H., Lechenauer E., Simon B., Unger A., Kandler D., Ebner C., Prillinger H., Kraft D. and Breitenbach M. 1995. Molecular cloning of major and minor allergens of *Alternaria alternata* and *Cladosporium herbarum*. *Molecular Immunology* 32:213-227. [http://dx.doi.org/10.1016/0161-5890\(94\)00108-D](http://dx.doi.org/10.1016/0161-5890(94)00108-D)
- Alonso S. F. B. 2012. *Cladosporium*: género fúngico que deteriora soportes documentales y afecta a la salud del hombre. *Boletín del Archivo Nacional* 20:104-118. <http://www.arnac.cu/wp-content/uploads/2013/03/Cladosporium.pdf>
- Barbosa M.A.G., Rehn K.G., Menezes M. and Mariano R.L.R. 2001. Antagonism of *Trichoderma* species on *Cladosporium herbarum* and their enzymatic characterization. *Brazilian Journal of Microbiology* 32:98-104. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822001000200005>
- Bensch K., Braun U., Groenewald J.Z. and Crous P.W. 2012. The genus *Cladosporium*. *Studies in Mycology* 72:1-401. <http://dx.doi.org/10.3114/sim0003>
- Bensch K., Groenewald J.Z., Braun U., Dijksterhuis J., Yáñez-Morales M.J. and Crous P.W. 2015. Common but different: the expanding realm of *Cladosporium*. *Studies in Mycology* 82:23-74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2015.10.001>
- Meave J.A., Romero-Romero M.A., Salas-Morales SH, Pérez-García EA, Gallardo-Cruz JA. 2012. Diversidad, amenazas y oportunidades para la conservación del bosque tropical caducifolio en el estado de Oaxaca, México. *Ecosistemas* 21:85-100. <http://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/viewFile/29/25>
- Pfaller M.A., Messer S.A., Mills K. and Bolmström A. 2000. *In vitro* susceptibility testing of filamentous fungi: comparison of etest and reference microdilution methods for determining itraconazole MICs. *Journal of Clinical Microbiology* 38:3359-3361. <http://jcm.asm.org/content/38/9/3359.full.pdf+html>
- Schubert K. 2005. Taxonomic revision of the genus *Cladosporium* s. lat. 3. A revision of *Cladosporium* species described by J.J. Davis and H.C. Greene (WIS). *Mycotaxon* 92:55-76. <http://www.mycotaxon.com/vol/abstracts/92/92-55.html>
- Valgas C., de Sousa S.M., Smania E.F.A., Smania A. (2007) Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology* 38:369-380. <http://www.scielo.br/pdf/bjm/v38n2/v38n2a34.pdf>
- Villa-Ruano N., Betancourt-Jiménez M.G. and Lozoya-Gloria E. 2009. Biosynthesis of uterotonic diterpenes from *Montanoa tomentosa* (zoapatle). *Journal of Plant Physiology* 166:1961-1967. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2009.06.004>
- Villa-Ruano N., Lozoya-Gloria E. and Pacheco Hernández Y. 2016. Kaurenoic acid: a diterpene with a wide range of biological activities. *In: Studies in Natural Products Chemistry Vol.51*, Atta-ur-Rahman (ed.) Elsevier. 151-174p. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63932-5.00003-6>
- White T.J., Bruns T., Lee S., and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: PCR protocols: a guide to methods and applications*. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, and White TJ (eds). Academic Press, Inc., San Diego, Calif. 315-322 p. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>