

Looking for natural antifungal agent: sensitive ensayo to detect fungal endo-1,3- β -glucanase inhibitors from crude plant extracts

Buscando agentes antifúngicos naturales: ensayo sensible para detectar inhibidores de endo-1,3- β -glucanasa en extractos crudos de plantas

Vargas-Arispuro, Irasema*, Fraijo-Martínez, Marisol, Vallejo-Cohen, Socorro, Corrales-Maldonado, Consuelo and Martínez-Téllez, Miguel Ángel. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carr. A la Victoria Km 0.6, 83304 Hermosillo, Sonora, México. * Autor para correspondencia: iris@ciad.mx

Recibido: 20 de junio 2016.

Aceptado: 03 de octubre 2016.

Vargas-Arispuro I, Fraijo-Martínez M, Vallejo-Cohen S, Corrales-Maldonado C and Martínez-Téllez MA. 2016. Looking for natural antifungal agent: sensitive assay to detect fungal endo-1,3- β -glucanase inhibitors from crude plant extracts. 35 (1). DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1606-5

RESUMEN

La enzima 1,3- β -glucanasa está implicada en la construcción de la pared celular de hongos, en la formación del septum de división y en el ensamblado de la pared de ascoporas. Razón por la cual la 1,3- β -glucanasa es un sitio blanco para el desarrollo de nuevas generaciones de agentes antifúngicos naturales. Con el objetivo de buscar compuestos antifúngicos en extractos de plantas, nosotros implementamos un simple y sensible ensayo para detectar inhibidores de endo-1,3- β -glucanasa fúngica en extractos crudos de plantas. El ensayo es especialmente útil para evaluar un gran número de extractos crudos de plantas, está basado en la difusión

ABSTRACT

1,3- β -glucanase is an enzyme involved in fungal cell wall construction, division septum deposition and ascospore wall assembly. Hence, the 1,3- β -glucanase is a target site to develop into new generations of natural antifungal agents. With the aim of seeking antifungal compounds in plant extracts, we implemented a simple and sensitive assay to detect inhibitors of endo-1,3- β -glucanase from crude plant extracts. The assay, especially useful for screen large number of crude plant extracts, is based on the diffusion of glucanase enzyme from wells through agarosa gel containing the enzyme substrate (laminarin). As the substrate is depolymerized, glucanase diffuses outward in a radial manner leaving a circular zone around the well, unstained by dye calcofluor. A linear relationship between the diameter of hydrolyzed zone and pure enzyme concentration, provide the basis for the method. Results of the assay using plant extracts obtained in methanol or dichloromethane are discussing.

radial de la enzima glucanasa incluida en pozos realizados en un gel de agarosa, el cual contiene el sustrato de la enzima (laminarina). Conforme el sustrato es depolimerizado en el gel por acción de la enzima, la cual difunde de forma radial, dejando unas zonas circulares alrededor de los pozos, las cuales no son teñidas por el colorante calcoflúor. La relación lineal entre el diámetro de la zona hidrolizada y las concentraciones de enzima pura, es la base del método. Se discuten resultados de la utilización del ensayo con extractos de plantas obtenidos con metanol o diclorometano.

Palabras clave: Fungicida natural, sitio blanco fúngico, extractos de plantas, hidrolasa.

La mayoría de los agroquímicos antifúngicos están perdiendo su efectividad debido al desarrollo de resistencia de los hongos patógenos (Dooley *et al.*, 2016). Una forma potencial y de amplia aceptación para descubrir nuevos agentes de control de enfermedades vegetales es buscar compuestos derivados de plantas, que se ha demostrado que mejoran las actividades antifúngicas y reducen la toxicidad (Mishra *et al.*, 2010).

Un aspecto importante de la actual investigación de fungicidas es el uso del adecuado y novedoso sitio-objetivo, en los que los compuestos ejercen su efecto fungicida, afectando un proceso que debería ser esencial para el crecimiento de los hongos, y de preferencia uno que sea requerido para mantener la viabilidad celular. Entre los sitios-objetivo, la pared celular fúngica ha surgido como uno de los más importantes, ya que los hongos están encerrados en una pared que contiene hidratos de carbono. En consecuencia, los agentes que inhiben la síntesis de la pared celular fúngica serán más selectivos (Liu y Balasubramanian, 2001). La pared celular fúngica de ascomicetos, basidiomicetos y

Keywords: Natural fungicide, fungal target site, plant extracts, hydrolase.

Most of the available antifungal agrochemicals are losing their effectiveness because of the development of fungi pathogens resistance (Dooley *et al.*, 2016). A potential and widely accepted way to discovery new plant disease control agents is to look for plant-derivatives compounds, which have been showed to improve antifungal activities and reduces toxicity (Mishra *et al.*, 2010).

An important aspect of current fungicide research is the used of suitable and novel target site, in which compounds exerts its fungicide effect, affecting a process that should be essential to the fungal growth and preferably one that is required to maintain cell viability. Amount these, the fungal cell wall has emerged as a major target, since fungal are encased in a carbohydrate-containing wall. In consequence, agents that inhibits the synthesis of the fungal cell wall will be more selective (Liu and Balasubramanian, 2001). Fungal cell wall of ascomycetes, deuteromycetes, basidiomycetes and some oomycetes, are composed of β -glucans (Douglas, 2001), that are β -1,3-linked glucose homopolymers, with variable amounts of 1,6- β and 1,4- β -linked glucose side chains and chitin that are responsible for cell rigidity (Gastebois *et al.*, 2010). The dynamic structural reorganization of fungal cell wall requires undergo partial lysis to obtain plasticity during morphological changes as cell growth (branching), cell division and germination in filamentous fungi or the cell separation in yeast, where endo- β -1,3-glucanases play an essential role during such morphogenetic events (Baladrón *et al.*, 2002; Martin-Cuadrado, *et al.*, 2003; Hartl *et al.*, 2011). Therefore a strategy for discovering plant disease control agents would be to looking in plant derivatives endo- β -1,3-glucanase inhibitors

deuteromicetos, y algunos oomicetos, están compuestos de β -glucanos (Douglas, 2001), que son homopolímeros de β -1,3-unidos a glucosas, con cantidades variables de cadenas de β -1,6 y β -1,4-unidos a glucosa y quitina que son responsables de mantener la rigidez celular (Gastebois *et al.*, 2010). La reorganización estructural dinámica de la pared celular fúngica debe alcanzar una lisis parcial para hacerse de plasticidad durante los cambios morfológicos como el crecimiento celular (ramificación), división celular y germinación en hongos filamentosos o la separación celular en la levadura, donde las endo- β -1,3-glucanasas juegan un papel esencial durante tales eventos morfogénicos (Baladrón *et al.*, 2002; Martín-Cuadrado, *et al.*, 2003; Hartl *et al.*, 2011). Por lo tanto, una estrategia para descubrir agentes de control de enfermedades vegetales sería buscar en los compuestos de las plantas sustancias inhibitoras de endo- β -1,3-glucanasas como un sitio-objetivo específico de aquellos hongos cuyas paredes celulares contienen β -glucanos, específicamente en el enlace β -1,3-glucano. Hay limitados metodologías para evaluar de forma masiva a derivados de plantas y otras fuentes poco comunes para ciertos tipos de actividad biológica, tal como la actividad de enzimas fúngicas (Muller, 2002). Por el contrario, se han obtenido grandes avances en las industrias farmacéuticas y miles de compuestos con actividad biológica en potencia pueden ser evaluados de forma rápida en busca de cierto tipo de actividad biológica (Kurtz y Rex, 2001).

Nuestro laboratorio ha evaluado extractos crudos de plantas del desierto de Sonora en busca de compuestos antifúngicos derivados de material vegetal, evaluando cientos de extractos crudos usando un ensayo antifúngico tradicional (Rivera-Castañeda *et al.*, 2001; Vargas-Arispuro *et al.*, 2005). Considerando que algunos extractos crudos han presentado propiedades antifúngicas contra un panel de hongos fitopatogénicos, nos concentramos

as a specific target site of those fungi that their cell wall contained β -glucans, specifically in 1,3-glucan link. There are limited screening methodologies to evaluate in a massive way, plant derivatives and other unusual sources for certain type of biological activity such as fungal enzymes activity (Muller, 2002). On the contrary, in the pharmaceutical industries great advances have been made and thousands of compounds with potential biological activity can be screened in rapid fashion, looking for certain type of biological activity (Kurtz and Rex, 2001).

Our laboratory has been evaluated crude extracts of Sonora Desert plants looking for antifungal plant-derived compound, screening hundreds of crude extract using a traditional antifungal assay (Rivera-Castañeda *et al.*, 2001; Vargas-Arispuro *et al.*, 2005). Considering that some crude extracts have showed antifungal properties against a panel of phytopathogenic fungi, we focused on looking for those plant extract that would selectively inhibit the synthesis of the fungal cell wall, thorough of inhibit endo- β -1,3-glucanase in those fungi that contained it, such as *Aspergillus*, *Penicillium*, *Tilletia*, *Botryotinia*, *Alternaria*, *Phytophthora*, among others (Vargas-Arispuro *et al.*, 2009). In this work, we implemented a simple high-throughput and target-oriented assay for screening of 40 medicinal plant crude extracts for detecting inhibitors to fungal endo-1,3- β -glucanase. This assay would facilitate the biological evaluation of plant crude extracts during the Hit-to-lead transition of a novel class of plant disease control agent discovery.

Forty medicinal/aromatic plants species listed in Table1, were collected from native populations of the Sonora Desert and sun-dried for several weeks. A voucher specimen was deposited at the Herbarium of Universidad de Sonora (Mexico).

To plant extracts, five hundred grams of leaves

en la búsqueda de aquellos extractos de plantas que inhibiría de forma selectiva la síntesis de la pared celular fúngica, mediante la inhibición de la endo- β -1,3-glucanasa, en aquellos hongos que lo contienen, tales como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Tilletia*, *Botryotinia*, *Alternaria*, *Phytophthora*, entre otros (Vargas-Arispuro *et al.*, 2009). En el presente trabajo implementamos un ensayo simple pero orientado a un sitio-objetivo para la evaluación de 40 extractos crudos de plantas medicinales para la detección de inhibidores de la endo-1,3- β -glucanasa fúngica. Este ensayo facilitaría la evaluación biológica de extractos crudos de plantas durante el descubrimiento de moléculas guías para desarrollar una nueva clase de agente de control de enfermedades ocasionadas por hongos.

Cuarenta plantas medicinales/aromáticas, enlistadas en el Cuadro 1, fueron recolectadas de poblaciones nativas del desierto de Sonora y secadas al sol por varias semanas. Un espécimen voucher fue depositado en el Herbario de la Universidad de Sonora (México).

Para obtener los extractos de las plantas, se extrajeron secuencialmente 500 gramos de hojas y pequeños tallos de cada planta seca con diclorometano (1 L) y metanol (1 L), la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente por 7 días en la oscuridad. Los filtrados de cada solvente fueron evaporados por completo bajo presión reducida para obtener un residuo viscoso, llamado el extracto crudo de la planta. Los extractos crudos fueron resuspendidos en dimetilsulfóxido para llevar a cabo el ensayo de difusión en gel.

Para preparar el gel de agarosa, se disolvieron 1.6 g de agarosa en 100 mL de buffer de incubación (0.1 M ácido cítrico, 0.2 M fosfato de sodio, pH 5.0) en un horno de microondas. Se dejó enfriar la mezcla a 50 °C y fue agregado de forma gradual laminarin de *Laminaria digitata* (0.5 g en 100 mL de 0.1 M ácido cítrico /0.2 M buffer de fosfato

and small stems of dried plants were sequentially extracted with dichloromethane (1 L) and methanol (1 L), the slurry was held at room temperature for 7 days in darkness. The filtrates of each solvent were evaporated to dryness under reduced pressure to obtain a viscous residue, called plant crude extract. The crude extracts were re-suspended in dimethylsulfoxide to perform the gel diffusion assay.

To agarose gel preparation, one point six grams of agarose were dissolved in 100 mL of incubation buffer (0.1 M citric acid, 0.2 M sodium phosphate, pH 5.0) in a microwave oven. The mix was cooled at 50 °C and laminarin from *Laminaria digitata* (0.5 g in 100 mL of 0.1 M citric acid/0.2 M sodium phosphate buffer, pH 5.0) was gradually added, and the solution was vigorously shaken. Twenty mL of warm agarose-laminarin mix were pipetted into glass Petri dishes (14 cm x 2 cm) and let them cooled at room temperature until agarose solidified. After that, a cork borer was used to cut 2-mm diameter wells in the gel, evenly spaced as radii in the Petri dishes. Excised gel pieces were removed by vacuum.

To Diffusion assay, endo1,3- β -glucanase standard from *Trichoderma* species (5 unit) was dissolved in 1 mL of 0.1 M citric acid/0.2 M sodium phosphate buffer (pH 5.0) to prepare a standard stock solution. Crude plant extracts (17.5 mL) and pure glucanase (2.5 mL) were pipetted into individual wells in the gel plates. One well with pure glucanase (2.5mL) and incubation buffer (17.5 mL) were added to each Petri dish as a positive control and one well with 20 mL of incubation buffer were added as negative control. The Petri dishes were incubated at 28 °C for 16 h. After incubation, gel were stained with 20 mL of freshly prepared calcofluor [0.1 g in 100 mL of 500 mM Tris-HCl (pH 8.9)] for 10 min. The gels were gently washed three times with distilled water during two hours, using a shaker.

Cuadro 1. Evaluación de extractos de plantas obtenidos en metanol (MeOH) or diclorometano (DCM) para detectar inhibidores de endo- β -1,3-glucanasa usando el ensayo de difusión de gel.

Table 1. Evaluation of plant extract obtained in methanol (MeOH) or dichloromethane (DCM) to detect fungal endo- β -1,3-glucanase inhibitors using the gel diffusion assay.

Plant	MeOH Extract	DCM extract
<i>Ambrosia ambrosioides</i>	---	+++
<i>Ambrosia confertiflora</i>	---	---
<i>Anemopsis californica</i>	---	---
<i>Argemone mexicana</i>	---	---
<i>Artemisia ludoviciana</i>	---	---
<i>Atriplex elegans</i>	---	---
<i>Avicennia germinans</i>	---	---
<i>Baccharis glutinosa</i>	---	---
<i>Bursera laxiflora</i>	---	---
<i>Bursera mycophylla</i>	---	---
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	---	+++
<i>Damiana officinalis</i>	---	---
<i>Datura stramonium</i> (leaves)	---	---
<i>Datura stramonium</i> (flowers)	---	---
<i>Encelia farinosa</i>	---	+++
<i>Euphorbia aerea</i>	---	---
<i>Euphorbia postrata</i>	---	---
<i>Euphorbia hyssopifolia</i>	---	---
<i>Forchaheria watsoii</i>	---	---
<i>Guasuma ulmifolia</i>	---	---
<i>Haemaxilon brazziletto</i>	---	---
<i>Hibiscus cannabinus</i>	---	---
<i>Jatropha cinerea</i>	---	---
<i>Jacquinia macrocarpa</i>	---	---
<i>Larrea tridentate</i> (leaves)	+++	---
<i>Mascagnia macroptera</i>	---	---
<i>Maximowiczia sonora</i>	---	---
<i>Mellia azedarach</i>	---	---
<i>Neirum oleander</i>	---	---
<i>Nicotina glauca</i>	---	---
<i>Proboscidea parviflora</i>	+++	---
<i>Pachycormus discolor</i>	---	---
<i>Ricinus communis</i>	---	---
<i>Rizophora mangle</i>	---	+++
<i>Sarcostemma cynanchoides</i>	---	---
<i>Strathantias palmen</i>	---	---
<i>Turnera diffusa</i> (leaves)	---	---
<i>Turnera diffusa</i> (stems)	+++	---
<i>Valeriana officinalis</i>	---	---
<i>Vallessia glabre</i>	---	---

de sodio, pH 5.0) y la solución se agitó vigorosamente. Se vertieron 20 mL de la mezcla tibia de

Hydrolyzed laminarin zones in the gel were visualized by UV transillumination as

agarosa-laminarin en cajas Petri de vidrio (14 cm x 2 cm) y se dejaron enfriar a temperatura ambiente hasta que la agarosa se solidificara. Posteriormente, se usó un sacabocados para cortar pozos de 2 mm de diámetro en el gel, separados equitativamente, como radios en las cajas Petri. Los pedazos de gel fueron removidos con aspiradora.

Para el ensayo de difusión en gel, el estándar de endo-1,3- β -glucanase de *Trichoderma* sp. (5 unidades) se disolvió en 1 mL de 0.1 M ácido cítrico /0.2 M buffer de fosfato de sodio (pH 5.0) para preparar una solución stock del estándar. Los extractos crudos de plantas (17.5 mL) y glucanasa pura (2.5 mL) fueron pipetados individualmente en pozos del gel. Un pozo con glucanasa pura (2.5 mL) y buffer de incubación (17.5 mL) fueron agregados a cada caja Petri como control positivo y un pozo con 20 mL de buffer de incubación fue agregado como control negativo. Las cajas Petri fueron incubadas a 28 °C por 16 h. Después de la incubación, los geles fueron teñidos con 20 mL de calcoflúor recientemente preparado [0.1 g en 100 mL de 500 mM Tris-HCl (pH 8.9)] por 10 min. Los geles fueron lavados tres veces con agua destilada por dos horas.

Usando un transiluminador de UV se visualizaron las zonas hidrolizadas de laminarin como círculos oscuros no fluorescentes en un fondo fluorescente (laminarin no digerida teñida por calcoflúor). Los diámetros de las zonas hidrolizadas fueron medidos (mm) en el gel de agarosa. El ensayo fue llevado a cabo al menos cinco veces usando ocho réplicas para cada extracto.

Durante la estandarización del ensayo de difusión de gel, el laminarin incorporada en gel de agarosa fue fácilmente hidrolizada por la acción de la enzima endo-1,3- β -glucanasa, produciendo círculos transparentes alrededor de los pozos, que fueron medibles. La Figura 1 muestra una relación lineal entre los diámetros de las zonas hidrolizadas en el gel con las unidades de enzimas añadidas al

nonfluorescent dark circles in a fluorescent background (undigested laminarin stained by calcofluor). The diameter of hydrolyzed zone were measured (mm) on agarose gel. The assay were conducted at least five times using eight replicates for each extract.

During standardization of gel diffusion assay, laminarin incorporated in agarose gel was easily hydrolyzed by action of endo-1,3- β -glucanase enzyme, produced a clear circles around the wells, which were measurable. Figure 1 shows a linear relationship between the diameters of the hydrolyzed zones in the gel with the units of enzyme added to the well. The coefficient of determination for the regression line was 0.9879. Similar results were obtained in five other experiments. This result suggests that assay can be used for qualitative and quantitative analysis when been necessary.

After the assay conditions were established, we evaluated 80 crude plant extracts (40 from dichloromethane and 40 from methanol) in order to detect endo- β -(1-3)-glucanase inhibitors. Figure 2 shows images of gel diffusion agar assay in which dark circles around the wells represent plant extracts that did not contain inhibitors of endoglucanase activity (E_3 - E_{11}). On the contrary, wells in which no dark circles appeared were considered as plant extracts that contained compounds that inhibit the enzyme activity (E_1 , E_2 and E_{12}).

Results of the radial gel diffusion assay to detect inhibitors of fungal endo- β -(1-3)-glucanase activity in crude plant extracts are shown in Table 1. Of the 80 plant extracts evaluated just 3 obtained with methanol (MeOH) and 4 obtained in dichloromethane (DCM), showed endo-1,3- β -glucanase inhibition (Table 1). These results suggest that 7.5 % of MeOH extracts and 10 % of DCM extract, contain compounds that inhibit fungal enzyme. Although other assays to detect glucanase inhibitors may be more sensitive and accurate, they may also be time

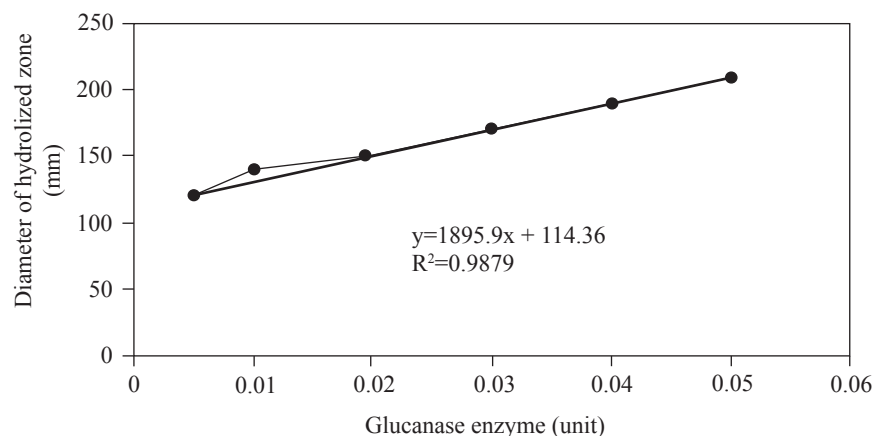


Figure 1. Línea de regresión que correlaciona el diámetro de las zonas hidrolizadas en el gel de agarosa con unidades de glucanasa pura. Cada punto representa las medias de 8 muestras de réplica. En otros cinco experimentos se obtuvieron ecuaciones de regresión similares.

Figura 1. Regression line correlating the diameter of hydrolyzed zones in the plate with unit of pure glucanase. Each point represents the means of 8 replicate samples. Similar regression equations were obtained in five other experiments

pozo. El coeficiente de determinación de la línea de regresión fue de 0.9879. Otros cinco experimentos obtuvieron los mismos resultados. Este resultado indica que el ensayo puede ser usado para análisis cualitativos o cuantitativos cuando sea necesario.

Después de establecer las condiciones, evaluamos 80 extractos crudos de plantas (40 de diclorometano y 40 de metanol) para poder detectar inhibidores de endo- β -(1-3)-glucanasa. La Figura 2 muestra imágenes del ensayo de difusión en gel, donde los círculos oscuros alrededor de los pozos representan extractos de plantas que no contenían inhibidores de actividad de endoglucanasa (E_3 - E_{11}). Por el contrario, los pozos en los que no aparecían círculos oscuros fueron considerados extractos de plantas que contenían compuestos que inhiben la actividad enzimática (E_1 , E_2 and E_{12}).

Los resultados del ensayo de difusión de gel radial para detectar inhibidores de la actividad fúngica de endo- β -(1-3)-glucanasa en extractos crudos de plantas, se muestran en el Cuadro 1. De los 80 extractos de plantas evaluados, sólo 3 obtenidas

consuming, and require specialized equipment (Nelson, 1944; Somogyi, 1952) or several steps (Pan *et al.*, 1991).

Natural products screening remains one of the most useful avenues for finding new, unique molecules to serve as leads for the development of novel crop protection agents (Thompson *et al.*, 2000). Developing more rapid throughput screens for natural products should greatly accelerate progress in the discovery of these molecules. Because of limited screening methodologies, often hundreds of natural compounds are discarded. The gel diffusion assay is a valuable tool for screening crude plant extract in a massive, rapid and inexpensive way, compared with Somogyi and Nelson coupled procedure.

Several experiments indicating a high reproducibility of the assay, for this reason, we can concluded that the gel diffusion assay was successfully used to detection of inhibitors of fungal endo- β -(1-3)-glucanase present in crude plant extracts.

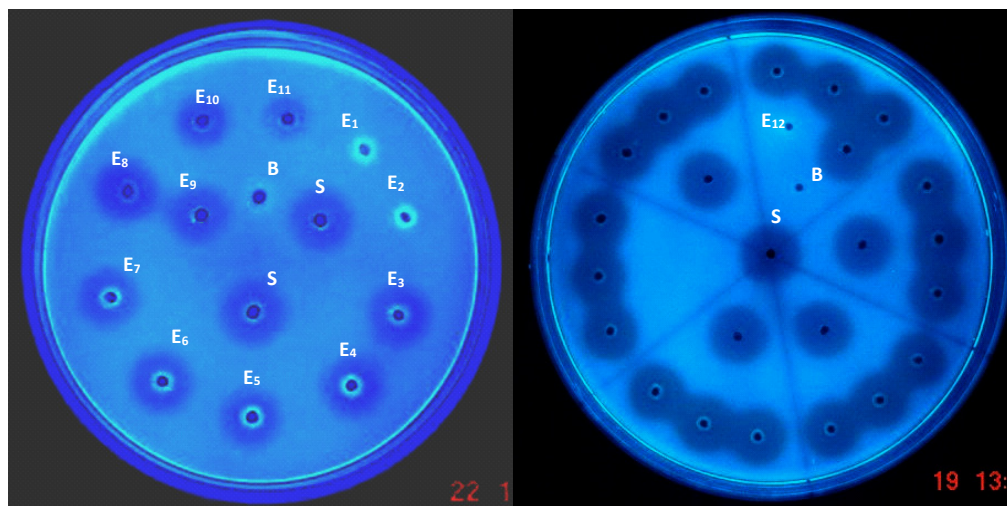


Figura 2. Imágenes del ensayo de gel de difusión para detectar inhibidores de β -(1-3)-glucanasa en extractos crudos de plantas. Cada pozo etiquetado con **E** contenía 17.5 μ L de extracto crudo de planta y 2.5 μ L de glucanasa. El pozo **S** contenía 2.5 μ L (0.125 unidad) de glucanasa pura de la especie *Trichoderma* y 17.5 μ L de buffer de incubación. El pozo **B** contenía 20 μ L de buffer de incubación como control.

Figure 2. Images of gel diffusion agar assay to detect inhibitors of β -(1-3)-glucanase in crude plant extracts. Each well label as **E** contained 17.5 μ L of crude plant extract and 2.5 μ L of glucanase. Well **S** contained 2.5 μ L (0.125 unit) of pure glucanase from *Trichoderma* species and 17.5 μ L of incubation buffer. Well **B** contained 20 μ L of incubation buffer

con metanol (MeOH) y 4 obtenidas en diclorometano (DCM), mostraron inhibición de endo-1,3- β -glucanasa (Cuadro 1). Estos resultados sugieren que 7.5 % de los extractos de MeOH y 10 % de los extractos de DCM contienen compuestos que inhiben la enzima fúngica. Si bien otros ensayos para detectar inhibidores de glucanasa pueden ser más sensibles y precisos, también pueden ser tardados y requerir de equipo especializado (Nelson, 1944; Somogyi, 1952) o muchos pasos en el proceso de evaluación (Pan *et al.*, 1991).

La evaluación de productos naturales sigue siendo una de las vías más útiles para encontrar moléculas nuevas y únicas que sirvan como pistas para el desarrollo de nuevos agentes para la protección de los cultivos (Thompson *et al.*, 2000). Desarrollar metodologías de evaluación más rápidas para los productos naturales, podría acelerar mucho el proceso de descubrimiento de estas moléculas.

Debido a la falta de metodologías de evaluación masiva, muchas veces se descartan cientos de compuestos naturales con potencial antifúngico. El ensayo de difusión de gel es una herramienta valiosa para evaluar extractos crudos de planta de forma masiva, rápida y económica, en comparación con el procedimiento acoplado de Somogyi y Nelson.

Varios experimentos indican una alta reproducibilidad del ensayo, por lo que podemos concluir que el ensayo de gel de difusión fue usado de manera exitosa para detectar inhibidores de endo- β -(1-3)-glucanasa fúngica presente en extractos crudos de plantas.

LITERATURE CITED

Baladrón V, Ufano S, Dueñas E, Martín-Cuadrado B, Del Rey F and Vazquez de Aldana C. 2002. Eng1p, an endo-1,3- β -1,3-glucanase localized at the daughter side of cell separation in *Sacharomyces cerevisiae*. Eukaryot Cell 1:774-

786. doi: 10.1128/EC.1.5.774-786.2002
- Dooley H, Shaw MW, Spink J and Kildea S. 2016. The effect of succinate dehydrogenase inhibitor/azole mixtures on selection of *Zymoseptoria tritici* isolates with reduced sensitivity. *Pest Management Science* 72:1150-1159. doi:10.1002/ps.4093
- Douglas, A.M. 2001. Fungal $\beta(1,3)$ -D-glucan synthesis. *Medical Mycology* 39 Suppl. 1:55-66. Available online: www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/mmy.39.1.55.66.
- Gastebois A, Mouyna I, Simenel C, Clavaud C, Coddeville B, Delepierre M, Latgé JP and Fontaine T. 2010. Characterization of a new $\beta(1-3)$ -Glucan branching activity of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Biological Chemistry* 285:2386-2396. doi:10.1074/jbc.M109.077545
- Hartl L, Gastebois A, Aimaniananda V and Latgé J P. 2011. Characterization of the GPI-anchored Endo- $\beta(1-3)$ -Glucanase Eng2 of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biological* 48:185-191. doi:10.1016/j.fgb.2010.06.011
- Kurtz, MB and Rex JH. 2001. Glucan synthase inhibitors as antifungal agents. *Advances in Protein Chemistry* 56:423-475. doi:10.1016/S0065-3233(01)56011-8
- Liu J and Balasubramanian M. 2001. 1,3- β -glucan synthase: A useful target for antifungal drugs. *Current Drug Targets-Infectious Disorders* 1:159-169. doi:http://dx.doi.org/10.2174/1568005014606107
- Martín-Cuadrado AB, Dueñas E, Sipiczki M, Vazquez de Aldana C R and Del Rey F. 2003. The endo- $\beta(1,3)$ -glucanase eng1p is required for dissolution of the primary septum during cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Cell Science* 116:1689-1698. doi:10.1242/jcs.00377
- Mishra SN, Rao Ch V, Ojha SK, Vijayakumar M and Verma A. 2010. An analytical review of plants for anti diabetic activity with their phytoconstituent and mechanism of action. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 1:29-46. doi: [http://dx.doi.org/10.13040/IJP-SR.0975-8232.1\(1\).29-46](http://dx.doi.org/10.13040/IJP-SR.0975-8232.1(1).29-46)
- Muller, U. 2002. Chemical crop protection research. Methods and challenges. *Pure and Applied Chemistry* 74:2241-2246. doi: 10.1351/pac200274122241
- Nelson, N. A. 1944. Photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*, 153:375-380. Available online: <http://www.jbc.org/content/153/2/375.citation.full.html#ref-list-1>
- Pan SQ, Ye XS and Kuc J. 1991. A technique for detection of chitinase, $\beta(1,3)$ -glucanase, and protein patterns after a single separation using polyacrylamide gel electrophoresis or isoelectrofocusing. *Phytopathology* 81:970-974. Available online: http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1991Articles/Phyto81n09_970.pdf
- Rivera-Castañeda G, Martínez-Téllez MA, Vallejo-Cohen S, Vargas-Arispuro I, Moya-Sanz P and Primo-Yúfera E. 2001. In vitro Inhibition of Mycelial Growth of *Tilletia indica* by Extracts of Native Plants from Sonora, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:2014-217. Available online: www.socmexfito.org/images/stories/revista_smf/2001/002/61219213.pdf.
- Somogyi, M. 1952. Notes in sugar determination. *Journal of Biological Chemistry* 195: 19-23. Available online: <http://www.jbc.org/content/195/1/19.full.pdf>
- Thompson G, Dutton R and Sparks T. 2000. Spinosad-a case study: an example from a natural products discovery programme. *Pest Management Science* 56:696-702. doi:10.1002/1526-4998(200008)56:8<696::AID-PS182>3.0.CO;2-5
- Vargas-Arispuro I, Contreras-Valenzuela A and Martínez-Téllez MA. 2009. Lignans from *Larrea tridentata* (Creosote Bush) as fungal $\beta(1,3)$ -glucanase inhibitors. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 94:60-63. doi:10.1016/j.pestbp.2009.04.002
- Vargas-Arispuro I, Reyes-Baez R, Rivera-Castañeda G, Martínez-Téllez MA, Rivero-Espejel I. 2005. Antifungal lignans from Creosote Bush (*Larrea tridentata*). *Industrial Crops and Products* 22:101-107. doi:10.1016/j.indcrop.2004.06.003.