

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



ACTIVIDAD MICROBICIDA DE *Rhus muelleri* Standl et Barkley *in vitro* E *in vivo*

Tesis

Que presenta FRANCISCA ANAKAREN TREJO GONZÁLEZ
como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA DE SISTEMAS DE PRODUCCIÓN

Saltillo, Coahuila

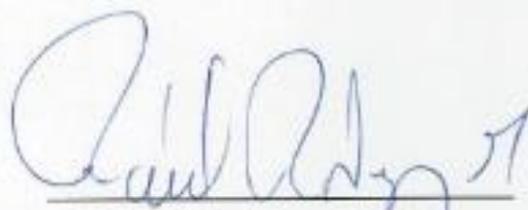
Diciembre 2015

ACTIVIDAD MICROBICIDA DE *Rhus muelleri* Standl et Barkley *in vitro* E *in vivo*
Tesis

Elaborada por FRANCISCA ANAKAREN TREJO GONZÁLEZ como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Ingeniería de Sistemas de Producción con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría



Dra. Diana Jasso Cantú
Asesor Principal



Dr. Raúl Rodríguez García
Asesor

Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo
Asesor



Dr. José Ángel Villarreal Quintanilla
Asesor



Dra. María de Lourdes Virginia Díaz Jiménez
Asesor



Dr. Alberto Sandoval Rangel
Subdirector de Postgrado
UAAAN

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de todo este tiempo hay muchas personas que me han ayudado a realizar este trabajo, también a pensar que si uno quiere conseguir algo debe proponérselo y lograrlo. Agradezco a Dios por permitirme cumplir una meta más en mi vida.

Agradezco a mis Asesores Dra. Diana Jasso Cantú, Dr. Raúl Rodríguez García, Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo, Dr. José Ángel Villarreal Quintanilla y Dra. María de Lourdes Virginia Díaz Jiménez, como una muestra de mi aprecio. Les agradezco la orientación que siempre me otorgaron, sus consejos, asesoría, por compartir sus conocimientos conmigo y con ello lograr el aprendizaje de cómo hacer la investigación y alcanzar éxito en el trabajo. Agradezco también al M.C. Fidel M. Peña Ramos por todo el apoyo brindado por sus consejos, aportaciones y contribución en todo el trayecto de la presente investigación.

De la misma manera agradezco a la Dra. Nuria Elizabeth Rocha Guzmán y la Dra. Martha Rocío Moreno Jiménez, así como a su equipo de trabajo por el apoyo brindado durante el periodo de estancia en la Unidad de Estudios de Posgrado del Instituto Tecnológico de Durango.

Agradezco al equipo de trabajo del Laboratorio de Fitoquímica de la UAAAN a la T.A. María Guadalupe Moreno Esquivel, T.A. Ma. Leticia Rodríguez González, T.A. Olga Leticia Solís Hernández, T.A. Edith E. Charles Colunga y C. Juan José Valenzuela Cabrera, por su apoyo para la realización de esta investigación.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias en Ingeniería de Sistemas de Producción.

DEDICATORIA

Dedico esta Tesis de Maestría primero que nada a mi razón de ser Mi Hija Alejandra, porque es por ella por quien me levanto día a día a dar lo mejor de mí, gracias mi bebé por tanta paciencia, por soportar las ocasiones que hemos estado lejos la una de la otra y por todos los días que me he ausentado por tener que trabajar, gracias porque a pesar de todo siempre me recibiste todo este tiempo con los brazos abiertos y con una sonrisa y te agradezco porque ese es el mejor pago que puedo recibir después de un día difícil.

Dedico también esta Tesis a mi familia, mi mejor amiga mi madre Ana María y a mi hermano Angel, porque siempre han estado conmigo en las buenas y en las malas y han sido mi apoyo para la crianza de mi hija, sobre todo cuando me he ausentado GRACIAS por siempre estar cuando los he necesitado.

Dedico también esta Tesis a la memoria de mi Padre, fuente de inspiración para realizar mis metas, ser mejor profesional y mejor persona. Gracias por tus enseñanzas.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
LISTA DE CUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivo General.....	1
Objetivos Específicos.....	2
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
Las Plantas en México y Los Extractos.....	3
Género <i>Rhus</i> y su Distribución.....	3
Composición y Actividad Biológica de las Especies del Género <i>Rhus</i>	4
<i>Rhus muelleri</i> Standl et Barkley.....	6
El Cultivo del Tomate.....	6
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y Los Extractos Naturales.....	7
Las Bacterias y Los Extractos Naturales.....	10
MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
Colecta de Plantas.....	14
Obtención de Extractos.....	14
Análisis Químico de las Hojas de <i>R. muelleri</i>	14
Cuantificación de Fenoles Totales y Capacidad Antioxidante de las Hojas y del Extracto de Etanol de <i>R. muelleri</i>	15
Contenido de Fenoles Totales.....	15
Capacidad Antioxidante.....	15
DPPH•.....	15
ABTS •+.....	16
Análisis de la Composición Química por GC-MS del Extracto de Etanol de <i>R. muelleri</i>	16
Análisis Infrarrojo.....	17

Bioensayo <i>in vitro</i> de la Actividad Antifúngica del Extracto de Etanol de <i>R. muelleri</i>	17
Análisis Estadístico del Bioensayo <i>in vitro</i> de la Actividad Antifúngica del Extracto de <i>R. muelleri</i>	18
Bioensayo del Extracto de Etanol de <i>R. muelleri</i> en Plantas de Tomate.....	19
Preparación de la Solución Madre del Extracto de <i>R. muelleri</i> para el Bioensayo en Plantas de Tomate.....	19
Determinación del Grado de Fitotoxicidad del Extracto de <i>R. muelleri</i> en Plantas de Tomate.....	19
Diseño Experimental del Grado de Fitotoxicidad del Extracto de <i>R. muelleri</i> en Plantas de Tomate.....	20
Bioensayo del Efecto Antifúngico del extracto de <i>R. muelleri</i> Sobre <i>Fol</i> en Plantas de Tomate en Invernadero.....	21
Preparación de la Solución de Esporas de <i>Fol</i>	21
Establecimiento del Bioensayo en Invernadero.....	21
Diseño Experimental del Efecto Antifúngico del Extracto de <i>R. muelleri</i> sobre <i>Fol</i> en Plantas de Tomate en Invernadero.....	22
Bioensayo Antibacterial <i>in vitro</i> del Extracto de Etanol de <i>R. muelleri</i> Sobre Seis Bacterias.....	22
Preparación de la Solución Madre del Extracto de Etanol para Bioensayo Antibacterial.....	22
Cepas Bacterianas.....	23
Establecimiento de las Concentraciones en Dos Pruebas.....	23
Preparación de los Preinóculos Bacterianos.....	23
Preparación de los Inóculos Bacterianos.....	24
Dilución de los Inóculos Bacterianos.....	24
Bioensayo de la Actividad Antibacteriana con el Extracto de Etanol de <i>R. muelleri</i>	24
Diseño Experimental del Bioensayo de la Actividad Antibacterial del Extracto de Etanol de <i>R. muelleri</i>	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26

Rendimiento del Extracto de Etanol de <i>R. muelleri</i>	26
Características Químicas.....	26
Contenido de Fenoles	26
Actividad Antioxidante.....	28
Composición Química del Extracto de Etanol.....	28
Efecto <i>in vitro</i> de las Concentraciones del Extracto de <i>R. muelleri</i> Sobre <i>Fol</i> ...	32
Grado de Fitotoxicidad del Extracto de <i>R. muelleri</i> en Plantas de Tomate.....	37
Efecto Antifúngico del Extracto de <i>R. muelleri</i> Sobre <i>Fol</i> en Invernadero.....	37
Actividad Antibacterial del Extracto de Etanol de <i>R. muelleri</i>	41
CONCLUSIONES.....	47
REFERENCIAS.....	48

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Escala de Fitotoxicidad Propuesta por Burrill et al. (1976)	20
Cuadro 2. Análisis Químico de las Hojas de <i>R. muelleri</i>	27
Cuadro 3. Contenido de Fenoles Totales y Capacidad Antioxidante	27
Cuadro 4. Compuestos Bioactivos Identificados en el Extracto de Etanol de las Hojas de <i>R. muelleri</i>	30
Cuadro 5. Bandas y asignaciones del espectro de FT-IR (ATR) del extracto de <i>R. muelleri</i>	33
Cuadro 6. Medias del Crecimiento micelial y Porcentaje de Inhibición de <i>Fol</i> Evaluado en Tres Tiempos de Incubación con el Extracto de <i>R. muelleri</i>	34
Cuadro 7. Concentraciones del Extracto de <i>R. muelleri</i> a MIC ₅₀ y MIC ₉₀ para Inhibir el Crecimiento de <i>Fol</i> en Tres Tiempos de Incubación	35
Cuadro 8. Valores Promedio del Grado de Fitotoxicidad del Extracto de <i>R. muelleri</i> , Altura de Planta y Diámetro de Tallo de Tomate para las Diferentes Concentraciones de Estudio	38
Cuadro 9. Valores Promedio de las Variables Severidad e Incidencia Evaluadas en Raíces de Plantas de Tomate, Tratadas con el Extracto de Etanol de <i>R. muelleri</i> para Inhibir el Desarrollo de <i>Fol</i> , a los 78 ddt en Invernadero	38
Cuadro 10. Valores Promedio de las Variables Peso Seco de Raíz, Altura de Planta, Diámetro de Tallo y Rendimiento de Fruto de Plantas de Tomate, Tratadas con el Extracto de <i>R. muelleri</i> para el control de <i>Fol</i> , en Invernadero, a los 78 ddt.....	42
Cuadro 11. Comparación de Medias de la Prueba Uno del Efecto Antibacterial del Extracto de Etanol de <i>R. muelleri</i> Sobre Seis Bacterias	43
Cuadro 12. Comparación de Medias de la Prueba Dos del Efecto Antibacterial del Extracto de Etanol de <i>R. muelleri</i> Sobre Tres Bacterias	44
Cuadro 13. Concentraciones Mínimas Inhibitorias (MIC ₅₀ y MIC ₉₀) del Extracto de Etanol de <i>R. muelleri</i> Sobre Seis Bacterias	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cromatograma GC-MS del Extracto de Etanol de <i>Rhus muelleri</i>	29
Figura 2. Espectro de Masas y la Estructura de Stigmast-5-en-3-ol, oleate	30
Figura 3. Espectro de Masas y la Estructura de Cholest-1-eno [2,1-a] naphthalene, 3', 4'-dihydro	31
Figura 4. Espectro de Masas y la Estructura de 3,5-dihydroxytoluene	31
Figura 5. Espectro de Masas y la Estructura de 9,19-Cyclochoestene-3,7-diol, 4,14-dimetyl-,3.acetate	31
Figura 6. Espectro de Masas y la Estructura de Ethyl iso-allocholate	32
Figura 7. Espectro y la Estructura de 7, 8-Epoxy lanostan-11-ol, 3-acetoxy	32
Figura 8. Efecto del Extracto Etanólico de <i>R. muelleri</i> sobre <i>Fol</i> en las Raíces de Tomate. TA=Testigo absoluto; TI=Testigo inoculado	40

RESUMEN

**ACTIVIDAD MICROBICIDA DE *Rhus muelleri* Standl et Barkley *in vitro* E
*in vivo***

POR

FRANCISCA ANAKAREN TREJO GONZÁLEZ

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA DE SISTEMAS DE PRODUCCIÓN
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

DRA. DIANA JASSO CANTÚ – ASESOR-

Saltillo, Coahuila. Diciembre 2015

Diferentes especies del Género *Rhus* han reportado actividad antifúngica y antibacterial. *Rhus muelleri* Standl et Barkley es una planta endémica del Noreste de México, la cual no ha sido estudiada anteriormente por sus propiedades biológicas. Por lo anterior el objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad microbica de *R. muelleri* *in vitro* e *in vivo*. Concentraciones del extracto de etanol de las hojas de *R. mulleri* entre 100 a 6000 ppm fueron evaluadas contra *F. oxysporum* *in vitro*, y concentraciones del extracto de 100 a 2000 ppm se evaluaron en plantas de tomate infestadas por *F. oxysporum* en invernadero. Para la actividad antibacterial se evaluaron concentraciones de 125 a 2000 ppm contra seis bacterias: *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Proteus vulgaris* (ATCC 49132), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus hauseri* (ATCC 13315), *Proteus mirabilis* (ATCC 7002) y *Staphylococcus epidermidis* (12228). El estudio de composición química se efectuó por GC-MS. Los resultados mostraron que los extractos de *R. muelleri* inhibieron el crecimiento de *F. oxysporum* *in vitro* e *in vivo*. Además, el extracto mostró efecto antibacterial contra las bacterias estudiadas. Se identificaron ocho compuestos bioactivos en el extracto. *R. muelleri* representa una alternativa para ser usado como un producto botánico antimicrobial. La presente investigación es el primer reporte científico sobre la actividad microbica, así como de la composición química de *R. muelleri*.

Palabras clave: *Rhus muelleri*; *Fusarium oxysporum*; actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo*; actividad antibacterial *in vitro*.

ABSTRACT

**MICROBICIDAL ACTIVITY OF *Rhus muelleri* Standl et Barkley *in vitro* AND
*in vivo***

BY

FRANCISCA ANAKAREN TREJO GONZÁLEZ

**MASTER OF SCIENCE IN ENGINEERING OF PRODUCTION SYSTEMS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

PhD. DIANA JASSO CANTÚ – ADVISOR-

Saltillo, Coahuila. December 2015

Various species from the *Rhus* Genus have been reported to have antifungal as well as antibacterial activities. *Rhus muelleri* Standl et Barkley is an endemic plant from Northeast Mexico which has not been studied yet by its biological properties. Therefore, the objective of the present investigation was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* *R. muelleri* microbicidal effect. *R. muelleri* leaves ethanolic extract at a concentration from 100 up to 6000 ppm, were evaluated *in vitro* against *F. oxysporum*. Extract concentration from 100 up to 2000 ppm were assessed in tomato plants infested by *F. oxysporum*, in a greenhouse. In order to study the antibacterial activity, concentrations from 125 up to 2000 ppm against six diverse bacteria were tested: *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Proteus vulgaris*(ATCC 49132), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus hauseri* (ATCC 13315), *Proteus mirabilis* (ATCC 1002) and *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228). The chemical composition evaluation was performed by GC-MS. Results showed that *R. muelleri* inhibited in fact *F. oxysporum* *in vitro* and *in vivo* growth. Furthermore, the extract also had antibacterial activity against all bacteria tested. Eight bioactive compounds were identified. *R.muelleri* represents an alternative botanic antimicrobial. The present research has been the first study to publish data about the chemical composition and antimicrobial effect of *R. muelleri*.

Keywords: *Rhus muelleri*; *Fusarium oxysporum*; antifungal activity *in vitro* and *in vivo*; antibacterial activity *in vitro*.

INTRODUCCIÓN

Las plantas, no solo nos proveen de alimento, vestido y materiales para construcción, sino también son la base de una gran variedad de productos necesarios para el bienestar, la salud y la comodidad de las poblaciones urbanas y rurales. En virtud a lo anterior resulta claro e indispensable que el hombre utilice las plantas para su subsistencia y provecho. Los extractos de las plantas pueden ser una alternativa para contrarrestar ciertas enfermedades ocasionadas por patógenos y/o microorganismos que ataquen a cultivos de interés y/o a la salud humana, además de ser productos inofensivos al medio ambiente y fácilmente biodegradables. Por ello, la OMS promueve la búsqueda de antibióticos que contrarresten microorganismos ya existentes y los reemergentes (OMS, 2001; Vega-Menchaca et al., 2013).

Dada la relevancia del uso terapéutico de la flora vegetal de México así como la persistente búsqueda de nuevas alternativas naturales para el desarrollo de nuevos productos, basados en el aislamiento de compuestos a partir de extractos vegetales, que protejan a cultivos de interés comercial del ataque de hongos fitopatógenos, además de proteger la salud humana. Por lo anterior se vuelve necesaria la realización de estudios biológicos, fitoquímicos, toxicológicos y clínicos que permitan una mayor caracterización de los extractos vegetales (Céspedes et al., 2006).

En este trabajo se presentan los estudios que se han realizado con el apoyo del grupo de trabajo del laboratorio de Fitoquímica de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, enfocados en conocer tanto las actividades biológicas así como la fitoquímica de la planta de *Rhus muelleri*.

Objetivo General

Evaluar la actividad microbicida de *Rhus muelleri* Standl et Barkley *in vitro* e *in vivo*.

Objetivos Específicos

- Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* del extracto de etanol de *R. muelleri* sobre *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.
- Determinar el efecto antifúngico del extracto de *R. muelleri* en plantas de tomate contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* en invernadero.
- Evaluar el efecto antibacterial del extracto de *R. muelleri* contra seis bacterias: *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Proteus vulgaris* (ATCC 49132), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus hauseri* (ATCC 13315), *Proteus mirabilis* (ATCC 7002) y *Staphylococcus epidermidis* (12228).
- Identificar los compuestos bioactivos del extracto de *R. muelleri*.

REVISIÓN DE LITERATURA

Las Plantas en México y Los Extractos

Dada la enorme extensión de México, que abarca desde el Océano Atlántico al Océano Pacífico, el país posee una variada topografía e importantes diferencias climáticas, lo que propicia una flora multivariada, reportando en este sentido a México como el cuarto país más rico en ese aspecto, donde unas 25,000 especies de plantas están registradas, y se cree que aproximadamente 30,000 no están registradas (Jasso de Rodríguez et al., 2011). De igual manera se ha reportado que en las regiones áridas y semiáridas de México se han identificado 6,000 plantas vasculares, de las cuales el 60% aproximadamente son endémicas (Hernández-Magaña et al., 2012).

En México existen un gran número de especies vegetales ampliamente distribuidas, que pueden ser evaluadas desde el punto de vista fitoquímico para determinar su actividad biológica. Debido a que las plantas cuentan con una capacidad ilimitada de producir compuestos químicos la mayoría fenoles y derivados de fenoles, pudiendo llegar a producir más de 100,000 metabolitos secundarios (Domingo y López-Brea, 2003). En virtud a lo anterior, investigadores de todo el mundo han puesto un gran interés en la búsqueda de nuevas alternativa para el aprovechamiento de los compuestos bioactivos presentes en las plantas. Por ello, se ha considerado a los extractos naturales como una fuente atractiva así como nuevos medicamentos (Vega-Menchaca et al., 2013), para la elaboración de biofunguicidas y bioinsecticidas para los cultivos (González-Acosta et al., 2013).

Género *Rhus* y su Distribución

Rhus, su nombre común es Sumac (Kossah et al., 2010; Rayne and Mazza, 2007; Raodah et al., 2014). El género *Rhus* incluye alrededor de 35 especies, de las cuales alrededor de 25 estas se encuentran distribuidas en el Sureste de Estados Unidos y México (Andrés-Hernández et al., 2006; Andrés-Hernández y Terrazas, 2006). Aunque otros hacen mención que existen más de 250

especies individuales de plantas que se encuentran en regiones templadas y tropicales de todo el mundo (Rayne and Mazza, 2007; Reichling et al., 2009; Olchowik et al., 2012; Kossah et al., 2010).

El género *Rhus* pertenece a la familia de las *Anacardiaceae*, caracterizadas por ser especies madereras compuestas principalmente de árboles y arbustos (Tropicos, 2014; Pell et al., 2011).

Las especies del género *Rhus* se clasifican en dos subgéneros: el *Rhus* y el *Lobadium* (Andrés-Hernández et al., 2006). Los dos subgéneros de *Rhus* fueron reconocidos por primera vez por Barkley (1937), y luego por Young (1978). El Subgénero *Rhus* incluye cerca de 10 especies, con cuatro en el este de Asia, cuatro en América del Norte, uno en Europa y otro en Hawai. El subgénero *Lobadium* consta de aproximadamente 25 especies agrupadas en tres secciones: *Lobadium* (5), *Styphonia* (13) y *Terebinthifolia* (7) (Andrés-Hernández y Terrazas, 2006; Yi et al., 2004). El subgénero *Lobadium* está distribuido principalmente en el Suroeste de los Estados Unidos y México (Andrés-Hernández et al., 2006; Andrés-Hernández y Terrazas, 2006). Yi et al. (2004), menciona que también se distribuyen en el Norte de América Central. El género *Rhus* se originó en América del Norte o en América del Norte y Asia, el subgénero *Rhus* se dispersó a Eurasia durante el Eoceno tardío y el subgénero *Lobadium* se diversificó en América del Norte siendo México el centro de su distribución actual (Andrés-Hernández et al., 2006).

Composición y Actividad Biológica de las Especies del Género *Rhus*

Los extractos acuosos y alcohólicos de las especies del género *Rhus* son bien conocidos por su amplia gama de actividad biológica (Rayne and Mazza, 2007). El género *Rhus* está caracterizado por compuestos fenólicos y triterpenos (Reichling et al., 2009), además de flavonoides y otros fitoquímicos (Itidel et al., 2013).

Dentro del subgénero *Rhus* la especie más utilizada es *Rhus coriaria* L. (principalmente los frutos), la cual es originaria del Mediterráneo, Turquía y del

Medio Oriente (Raodah et al., 2014; Rayne and Mazza, 2007; Kosar et al., 2007; Nasar-Abbas and Kadir-Halkman, 2004). *R. coriaria* es usada como antibacterial, antidiarréico, antiséptico, antiespasmódico, antiviral, astringente, analgésico, antiinflamatorio, antióxidante, reduce la hiperinsulinemia y la intolerancia a la glucosa, además es conocida por sus propiedades para reducir la fiebre, como antifúngico, anti-isquémico, hipouricémico, hipoglucemiante y hepatoprotector (Anwer et al., 2013; Kossah et al., 2010; Nasar-Abbas and Kadir-Halkman, 2004; Raodah et al., 2014). Las hojas de *R. coriaria* se han utilizado como un agente bronceador debido a su alto contenido de taninos, flavonas, antocianinas y ácidos orgánicos (Kosar et al., 2007; Malvlyanov et al., 1997). Se ha reportado que esta planta contiene taninos hidrolizables (Mavlyanov et al., 1997), galotaninos, aceite volátil, flavonoides, antocianinas, ácido gálico, flavonas tales como: miricetina, quercetina y kaempferol, contenidos de nitrato y nitrito, así como ácidos palmítico, málico, oléico, linoléico que se encuentran como los principales componentes del aceite de *R. coriaria*. Los minerales presentes en la planta son: K, P, Si, Br, Al, Cu, S, Cl, Pb, Ti, Ca, Mn, Fe, Zn, Sr, Mg, Ba, Cr, Li, N y V (Shabbir, 2012; Raodah et al., 2014).

Abu-Reidah et al. (2015), identificaron 211 compuestos fenólicos y otros fitoconstituyentes y más de 180 fitoquímicos (taninos, (iso) flavonoides, terpenoides, etc.) en la especie *R. coriaria*.

La especie *Rhus aromática*, del subgénero *Lobadium*, es un arbusto nativo de las regiones rocosas del Este de los Estados Unidos, el extracto acuoso de la corteza de la raíz de este especie, presenta propiedades para el tratamiento de la incontinencia urinaria, vejiga hiperactiva, problemas funcionales de la vejiga y ciertos tipos de hemorragias uterinas (Borchert et al., 2004; Reichling et al., 2009). El extracto acuoso de la corteza de la raíz/tallo de *R. aromática* presenta propiedades antivirales contra el virus herpes simple tipo 1 y tipo 2 en un cultivo celular usando un ensayo de reducción de placa. *R. aromática* contenía 8% de taninos, ácido gálico, flavonoides como la quercetina y quercitrina, glucósidos,

triterpenos como oleanol de aldehído, así como de 0.01- 0.07% de aceite esencial con el mayor componente general acetona (Reichling et al., 2009).

***Rhus muelleri* Standl et Barkley**

Rhus muelleri Standl et Barkley es una planta endémica del Noreste de México (Tropicos, 2014). Perteneciente al género *Lobadium*, se distribuye en la Sierra Madre Oriental y el Altiplano Mexicano, en zonas templadas con tipo de vegetación de bosque de pino-encino entre los 2,000-2,500 m de altitud (Andrés-Hernández et al., 2006). Los estudios morfológicos y anatómicos para las especies del género *Rhus* son escasos (Andrés-Hernández y Terrazas, 2006). A la fecha solo existe una publicación sobre la actividad biológica de la planta, donde Jasso de Rodríguez et al. (2015) reportaron la actividad antifúngica *in vitro* del extracto de etanol de *R. muelleri* contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), evaluaron concentraciones de 100 a 6,000 ppm. El extracto inhibió a *Fol* a una concentración mínima inhibitoria del 50% (MIC₅₀) con 3,363 ppm y a MIC₉₀ con 11,793 ppm, representando una alternativa para ser utilizado como fungicida botánico. En el extracto de etanol se identificaron 8 compuestos bioactivos a los cuales se les atribuye la actividad del extracto, como responsables de la actividad antifúngica.

El Cultivo del Tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es la hortaliza que mundialmente ocupa el segundo lugar posterior a la papa (McGovern, 2015), con una producción de 163,963,770 ton (FAOSTAT, 2015). En México, en el ciclo primavera-verano 2014 la producción total de tomate con riego fue de 1,249,782.58 ton (SIAP, 2015).

La mayoría de los cultivos son susceptibles a numerosas enfermedades causadas por diferentes patógenos, lo que conlleva a una pérdida considerable en la producción de cultivos de interés económico en todo el mundo (Burketová et al., 2015). Un factor que limita la producción del cultivo de tomate es la enfermedad ocasionada por *Fol* (McGovern, 2015; González-Acosta et al.,

2013; Mahlo et al., 2010), la cual causa marchitez en la planta (McGovern, 2015; Celis et al., 2008; Rodríguez y Montilla , 2002).

Los fungicidas sintéticos utilizados para el control de *Fol* no son fácilmente biodegradables y el patógeno ha desarrollado resistencia a los mismos, lo que hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas para el control de este patógeno (Burketová et al., 2015; Jasso de Rodríguez et al., 2007; Gamboa-Alvarado et al., 2003). Las plantas son fuentes potenciales de compuestos microbicidas (Ben-Jabeur et al., 2015), por ello su utilización en forma de extractos para el control de patógenos ha ido aumentando considerablemente.

***Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y Los Extractos Naturales**

Una alta proporción de los hongos han interactuado con las plantas y a pesar de los escasos registros fósiles se tienen evidencias de la presencia de hongos parásitos de plantas desde hace alrededor de 400 millones de años (Montes-Belmont, 2000). Un ejemplo es, *Fusarium oxysporum*, el cual es un hongo que se presenta principalmente como saprófito en el suelo o también como patógeno especializado, denominado forma especial (f. sp.), según la planta hospedante que afecta (De Granada et al., 2001). *Fol* es un hongo fitopatógeno del suelo que se distribuye en todo el mundo, posee estructuras de resistencia que le permiten perdurar en el suelo por espacio de seis años (González-Morales et al., 2011), es responsable de mermas en los rendimientos de las cosechas de tomate, reportando en algunos trabajos pérdidas de 50-60% (Sathiyabama and Charles, 2015; Hernández-Martínez et al., 2014; Marzano et al., 2013; Ascencio-Álvarez et al., 2008; Borrero et al., 2004). Los *Fusarium* causantes de la marchitez siguen un patrón similar de infección, penetran por la raíz y colonizan el sistema vascular del tallo ocasionando obstrucción en el paso del agua, lo que conlleva a una sintomatología de marchitez (Garcés de Granada et al., 2001). La utilización de fungicidas sintéticos para el control de *Fol* no son fácilmente biodegradables y el patógeno ha desarrollado resistencia a los mismos, lo que hace necesario la búsqueda de nuevas alternativas para

su control (Burketová et al., 2015; Jasso de Rodríguez et al., 2007; Gamboa-Alvarado et al., 2003).

La mayoría de las investigaciones efectuadas con extractos naturales para el control de fitopatógenos, se basan en pruebas *in vitro* como el de Cáceres-Rueda de León et al. (2014), quienes evaluaron la actividad antifúngica *in vitro* de extractos acuosos de especias de clavo (*Eugenia caryophyllata*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y orégano mexicano (*Lippia berlandieri*), obtenidos mediante la técnica de hidrodestilación, contra seis de los principales hongos patógenos que atacan a los alimentos (*Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma* spp., *Penicillium digitatum* y *Aspergillus niger*). Los resultados mostraron que el extracto acuoso de orégano presentó la mejor capacidad de inhibición de crecimiento radial del micelio con una concentración de 40 mg/L. Además los principales constituyentes identificados en los extractos acuosos de las especies estudiadas fueron ácidos fenólicos, flavonoides y compuestos volátiles (Eugenol, Timol y Carvacrol).

Vásquez-Covarrubias et al. (2013), evaluaron distintas concentraciones de aceites esenciales y extractos acuosos de cinco especies de la familia *Chenopodiaceae* sobre el crecimiento micelial y esporulación de *Fol* y *F. solani*. Se encontró que existe una respuesta diferencial entre las razas 2 y 3 de *Fol* e incluso entre aislamientos de una misma raza. Los aceites esenciales de *Chenopodium album* (0.3%) y *C. ambrosioides* (2%) inhibieron totalmente el crecimiento y esporulación en ambas especies de *Fusarium*. De los extractos acuosos probados, el de *Beta vulgaris* ejerció la mayor reducción del crecimiento micelial (38%) y esporulación (61%). Los extractos acuosos al 5%, de las cinco especies evaluadas, mostraron una estimulación del 27% al 183% en el crecimiento micelial en las cuatro cepas empleadas. Al 10%, *Beta vulgaris*, *C. album*, *C. berlandieri* subsp. *nuttalliae* y *C. graveolens* redujeron entre 11% y 38% el crecimiento de *F. solani* y *Fol* raza 2 (aislamiento Yautepec) con respecto al testigo.

Rodríguez-Pedroso et al. (2012), evaluaron el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Fol* de dos extractos de la especie vegetal *Acaíca farnesiana*: Uno hidroalcohólico (Extracto A) y otro acuoso (Extracto B). Los extractos mostraron más de un 90% de inhibición del crecimiento micelial a la primera evaluación realizada a las 72 horas después de la inoculación. Además, se comprobó efecto fungicida de los mismos sobre el hongo. También, se observó la presencia de metabolitos con actividad antimicrobiana reconocida como: flavonoides, taninos, fenoles, alcaloides y saponinas.

González-Morales et al. (2011), obtuvieron 17 aislados de *Fusarium* spp. de raíces de tomate con síntomas de marchitez. Nueve aislados fueron identificados como *Fol*. Se determinó la patogenicidad de los aislados, uno de ellos nombrado como *Fol* 10, ocasionó los síntomas más severos. Dicho aislado se seleccionó para evaluar *in vitro* la dosis mínima inhibitoria del extracto etanólico de *Heliopsis longipes*. Se determinó la concentración de afinina como componente principal del extracto. La dosis letal media estimada fue de 164.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de afinina, y la dosis letal 90 fue de 348.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de afinina.

López-Benítez et al. (2005), evaluaron *in vitro* extracto de ajo (*Allium sativum*), jarilla (*Larrea tridentata*), tarbuh (*Flourensia cernua*), clavo (*Syzygium aromaticum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y mango (*Mangifera indica*), para inhibir el crecimiento micelial de *Fol*, *Rhizoctonia solani* y *Verticilium deahliae*. El fungicida tiabendazola a 600 ppm de concentración inhibió completamente el crecimiento de *Fol* y *R. solani*, mientras que en *V. deahliae* la inhibición varió de 80.7% a 90% después del período de 72 y 144 horas de incubación, respectivamente. Las concentraciones de 5% y 10% de los extractos de clavo de olor y ajo inhibieron 100% el crecimiento del micelio de las tres especies de hongos después de 72 horas de período de incubación.

Gamboa-Alvarado et al. (2003), evaluaron extractos metanólicos de *Flourensia cernua*, *Origanum majorana* y *Bouvardia ternifolia* en el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora infestans in vitro*. Los resultados expresados en porcentaje de inhibición fueron aceptables para los tres extractos sobre *R.*

solani, mostrando un efecto fungistático hasta la dosis de 20,000 ppm. Para el caso de *P. infestans* se obtuvieron valores altamente significativos con el extracto de *O. majorana* el cual presentó un efecto fungicida desde la dosis de 8,000 ppm, mientras que los extractos de *F. cernua* y *B. ternifolia* mostraron un ligero efecto fungistático a dosis alta.

Los realizados en campo son pocos como el de Rodríguez y Montilla (2002) quienes reportaron el efecto del extracto de semillas de *Citrus paradisi* (Citrex) sobre la marchitez causada por *Fol* en plantas de tomate, donde indican que la aplicación semanal al suelo logró reducir la marchitez en un 85%, seguido de una aplicación combinada al suelo y al follaje (64%), aunque no determinaron la naturaleza del extracto citan que la planta de *C. paradisi* contiene flavonoides.

Araujo et al. (2008) evaluaron el efecto de extractos etanólicos al 5% (50,000 ppm) de *Phyllanthus niruri*, *Heliotropium indicum*, *Ricinus communis* sobre el inoculo de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) en el suelo y sobre el control de la enfermedad del Mal de Panamá *in vivo*. Los extractos probados fueron de *Phyllanthus niruri*, *Heliotropium indicum* y *Ricinus communis*. Los resultados de los extractos etanólicos sobre el inóculo en el suelo resultaron en una mayor producción de conidios de *Foc*. Los resultados del ensayo realizado *in vivo* no se observaron síntomas de marchitez.

Las Bacterias y Los Extractos Naturales

Las enfermedades infecciosas ocasionadas por bacterias se han convertido en un problema grave de salud ya que son causa importante de muertes en el mundo (Vega-Menchaca et al., 2013). La Organización Mundial de la Salud, declara que la resistencia bacteriana es un problema de salud pública (OMS, 2001; Ramírez-Rueda y Mojica-Ávila, 2014). Por ello, la OMS promueve la búsqueda de antibióticos que contrarresten microorganismos ya existentes y los emergentes (OMS, 2001; Vega-Menchaca et al., 2013). Lo que ha llevado a investigadores a desarrollar nuevas fuentes de antibióticos o sustancias que

sirvan como estrategia para combatir las bacterias y su resistencia a los antimicrobianos (Ramírez-Rueda y Mojica-Ávila, 2014).

Nasar-Abbas and Kadir-Halkman (2004), evaluaron el efecto antimicrobiano en crecimiento de doce cepas bacterianas (seis cepas Gram positivas y Gram negativas) de los extractos acuosos de *R. coriaria* en concentraciones de 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.5% y 5.0% (w/v), no neutralizada y neutralizada a pH 7.2 ± 0.1 . Entre los organismos Gram positivos, después de 24 horas de incubación, las especies de *Bacillus* fueron más sensibles con una MIC₁₀₀ de 0.25% a 0.32%, seguido de *Staphylococcus aureus* (0.49%), mientras que *Listeria monocytogenes* se encontró que era la menos sensible con una MIC₁₀₀ de 0.67%. De los organismos Gram negativos, se encontró que *Salmonella enteritidis* era la más resistente con una MIC₁₀₀ de 0.67%, seguido por *Escherichia coli* Tipo I, *E. coli* O157:H7, *Proteus vulgaris* y *Hafnia alvei* con MIC₁₀₀ de 0.63%, 0.60%, 0.55% y 0.45%, respectivamente; mientras que *Citrobacter freundii* resultó ser el menos resistente, que sobrevive hasta el 0.42%.

Kossah et al. (2011), reportaron la actividad antimicrobiana del extracto de las frutas de *R. typhina* probado contra doce cepas, incluyendo bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como levaduras. El extracto mostró una fuerte actividad antimicrobiana para todas las especies de bacterias ensayadas. *Bacillus cereus* y *Helicobacter pylori* fueron las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas más sensibles respectivamente, con una MIC₁₀₀ de 0.10%. Sin embargo, las levaduras mostraron sensibilidad mucho menor, con MIC₁₀₀ de 0.60-0.75%.

Fazeli et al. (2007), evaluaron extractos hidroalcohólicos al 80% (v/v) de *R. coriaria* y *Zataria multiflora* Boiss, contra varias bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, incluyendo *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Proteus vulgaris* y *Shigella flexneri*. Las concentraciones utilizadas fueron 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.4%, 0.8% y 1.6% (w/v). *R. coriaria* mostró mejor actividad inhibitoria contra las bacterias ensayadas en

comparación con *Z. multiflora*. Las MIC₁₀₀ de *Z. multiflora* contra las bacterias ensayadas variaron de 0.4% a 0.8%. *Salmonella typhi* se encontró que era la más resistente a una MIC₁₀₀ de 0.2% y 0.8% con *R. coriaria* y *Z. multiflora*, respectivamente.

Adwan et al. (2010), reportaron la sinergia entre extractos etanólicos de plantas de *R. coriaria* (semilla), *Sacropoterium espinoso* (semilla) y *Rosa damascena* (flor) y ciertos medicamentos antimicrobianos conocidos tales como oxitetraciclina HCl, penicilina G, cefalexina, sulfadimetoxina como sodio, frente a las cepas de *P. aeruginosa*. El resultado más interesante se muestra por la combinación entre *R. coriaria* y estos antibióticos, que mostraron una alta disminución de MIC₁₀₀, y una fuerte actividad bactericida contra estas cepas.

Ertürk (2010), reportó actividades antibacterianas y antifúngicas de los extractos etanólicos crudos de 41 especies de plantas medicinales contra cuatro bacterias y dos hongos: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger*. Dentro de las 41 especies de plantas 39 mostraron actividad antibacteriana entre ellas *R. coriaria*. Las plantas más potentes reportan MIC₁₀₀ <0.25 a 0.5 mg/ml resultando ser *C. cyminum*, *J. officinale*, *T. capitatus*, *V. álbum*, *T. sorbifolium*, *P. anisum*, *G. officinalis* L. *orientalis*, *R. coriaria*, *A. glutinosa*, *P. officinalis* y *C. sinensi*.

Rhus glabra L., originaria de Norte América, es utilizada tradicionalmente por los pueblos nativos en los tratamientos de las enfermedades bacterianas, como la sífilis, la gonorrea, la disenteria y la gangrena (Nasar-Abbas and Kadir-Halkman, 2004).

McCutcheon et al.(1994), reportó que extractos metanólicos de las ramas de *R. glabra* inhibieron 9 cepas de hongos probados: *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *Candida albicans*, *Fusarium tricinctum*, *Microsporium cookerii*, *M. gypseum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma viridae* y *Trichophyton mentagrophytes* en un estudio de 100 plantas. Para comprender mejor los compuestos

responsables de la actividad antimicrobiana observada en *R. glabra*, se extrajeron los compuestos de las ramas secas con metanol y se fraccionó con hexano, cloroformo, cloroformo/metanol (03:02 v/v) y agua (Saxena et al., 1994). La cromatografía subsiguiente permitió el aislamiento y la purificación de tres compuestos: galato de metilo, ácido dihidroxibenzóico y ácido gálico (Rayne and Mazza, 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de Plantas

Se tomaron muestras al azar de los tallos con hojas de diversos arbustos de *R. muelleri* (siete) de los sitios silvestres ubicados en los límites de Coahuila y Nuevo León, México, en 25°22.022' N y 100°24.716' W a 2,104.08 m de altitud. Las muestras se depositaron en bolsas de plástico y transportadas al laboratorio de Fitoquímica de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). Inmediatamente se separaron las hojas de los tallos y se secaron en una estufa Mapsa durante 24 horas. Las hojas se molieron en un molino Thomas Wiley con un tamiz de 2 mm. Las hojas molidas se mezclaron y se almacenaron en la oscuridad hasta su uso en los bioensayos.

Obtención de Extractos

Con el fin de obtener el extracto de la planta, 14 g de muestras de hojas secas fueron colocados en extractor Soxhlet que contiene 200 mL de etanol absoluto, la extracción se realizó durante 72 horas. El disolvente de todos los extractos se eliminó bajo vacío usando un evaporador rotatorio (Büchi Laboratoriums-Technik, Schweiz), el disolvente restante fue eliminado colocando el matraz en una estufa de secado durante 24 horas y se determinó el rendimiento. La resina obtenida se conservó en un lugar seco para su uso en los bioensayos.

Análisis Químico de las Hojas de *R. muelleri*

Las muestras de hojas de *R. muelleri* se analizaron para humedad, proteína cruda, grasa y contenido de fibra, usando métodos reportados por la Association of Official Analytical Chemists (1990), los resultados se expresaron en base de peso seco.

Cuantificación de Fenoles Totales y Capacidad Antioxidante de las Hojas y del Extracto de Etanol de *R. muelleri*

Antes de los análisis, 20 mg de hojas secas de *R. muelleri* se hidrolizaron con ácido sulfúrico 67% (v/v) durante tres horas a temperatura ambiente.

Al final de la reacción, la solución se aforó con agua destilada hasta un volumen final de 50 mL y se almacenó en refrigeración para su posterior análisis. Para los estudios del extracto de etanol, la resina de *R. muelleri* obtenida en la extracción fue analizado en concentraciones de 10 mg/mL (w/v), diluida en etanol absoluto.

Contenido de Fenoles Totales

El contenido de fenoles de las hojas y del extracto de etanol de *R. muelleri* se evaluó con el reactivo de Folin-Ciocalteu, siguiendo el método de la CFI (Reglamento de la Comisión, CEE No. 2676/90). Brevemente, 20 μ L de la solución control de la curva de calibración se mezclaron con 120 μ L de Na_2CO_3 (15% w/v), 30 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu y 400 μ L de agua. La reacción se realizó a 50°C durante cinco min y la absorbancia se leyó a 700 nm. Como estándar se usó ácido gálico.

Capacidad Antioxidante

La actividad antioxidante total de los extractos se determinó por dos diferentes pruebas de inhibición de radicales libres: [1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH \cdot) y 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS $^{+\cdot}$).

DPPH \cdot

El ensayo de capacidad de barrido DPPH \cdot se llevó a cabo de acuerdo con la metodología descrita por Rodríguez-Jasso et al. (2014). Brevemente, se preparó una solución de DPPH \cdot reactivo 60 μ M y 2,950 μ L, de esta solución se añadió a 50 μ L de muestra. La mezcla se agitó vigorosamente y se mantuvo durante 30 min en la oscuridad y a temperatura ambiente. La reducción del

radical DPPH[•] se midió mediante el continuo monitoreo de la disminución de la absorción a 517 nm. La solución control contenía 100 µL de agua destilada. El porcentaje de inhibición DPPH[•] se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición}(\%) = \left\{ \frac{1 - \text{Abs } 517\text{nm}_{\text{sample}}}{1 - \text{Abs } 517\text{nm}_{\text{control}}} \right\} \times 100$$

ABTS^{•+}

El ensayo de capacidad de barrido ABTS^{•+} se llevó a cabo de acuerdo con la metodología descrita por Rodríguez-Jasso et al. (2014). Para la formación de radicales (ABTS^{•+}), 12.5 mL de persulfato de potasio 2.45 mM, se mezclaron con 25 mL de solución de ABTS^{•+} 7 mM; y la mezcla se mantuvo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 12 a 16 horas antes de su uso. A continuación, la absorbancia se midió a 734 nm, y la solución ABTS^{•+} se diluyó con etanol hasta obtener un valor de absorbancia de 0.7 ± 0.01 . Para los ensayos, se añadieron 950 µL de solución de ABTS^{•+} a 50 µL de muestra, y se midió la absorbancia después de un minuto de la reacción. La solución de control contenía 50 µL de agua destilada en lugar de la muestra. El porcentaje de inhibición ABTS^{•+} se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición}(\%) = \left\{ \frac{1 - \text{Abs } 734\text{nm}_{\text{sample}}}{1 - \text{Abs } 734\text{nm}_{\text{control}}} \right\} \times 100$$

Análisis de la Composición Química por GC-MS del Extracto de Etanol de *R. muelleri*

La composición de la fracción volátil de los extractos se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en un equipo Agilent Technologies del Cinvestav Unidad Saltillo. Las condiciones de operación fueron: Columna HP-5MS (30 m x 0.25 mm 1D x 0.25 µ). Para la detección, se utilizó un sistema de ionización de energía de 70 eV. Como gas portador, se usaron un flujo constante a 1.1 mL/min y un volumen de inyección

de 1 μL , la temperatura de inyección fue de 250°C. El programa de calentamiento del horno fue isotérmico durante 5 min a 60°C seguido de un calentamiento de 5°C/min hasta 100°C/min (2 min) y 10°C/min hasta 250°C/min (cinco min). La identificación de compuestos se realizó por comparación con espectros de compuestos puros de la biblioteca NIST (National Institute of Standard and Technology).

Análisis Infrarrojo

El extracto de etanol de *R. muelleri* no requirió ningún tratamiento especial para el análisis, la muestra se analizó directamente en un espectrofotómetro Perkin Elmer FTIR, utilizando un dispositivo de ATR con el modelo de punta de diamante GX00, a temperatura ambiente, en un rango de 600 a 4000 cm^{-1} y 32 barridos por espectro.

Bioensayo *in vitro* de la Actividad Antifúngica del Extracto de Etanol de *R. muelleri*

El hongo *F. oxysporum* se obtuvo de la colección de hongos del laboratorio de Fitopatología de la UAAAN, en Saltillo, Coahuila, México. Una solución madre se preparó con la resina del extracto de etanol de *R. muelleri* a una concentración de 10,000 ppm. La solución se filtró con papel Whatman N° 1 y se esterilizó por exposición a los rayos UV durante 15 min.

El efecto inhibitor del extracto de etanol de *R. muelleri* sobre el crecimiento de los hongos se llevó a cabo por el método de dilución en agar. A partir de la solución madre, se prepararon diferentes concentraciones: 0 (control), 100, 300, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000 ppm, añadiendo el volumen necesario para cada medio de cultivo agar-papa-dextrosa (PDA), previamente esterilizado, que se vertió en cajas Petri (9.0 cm de diámetro) y se dejó durante cuatro horas en una campana de flujo laminar para su solidificación. Después, las cajas Petri se inocularon asépticamente mediante la colocación al centro de un disco de micelio de 7 mm de diámetro de un cultivo de *Fol* de 7 días de edad. Esto se hizo para cada concentración.

Todas las concentraciones se llevaron a cabo por cuadruplicado. Las cajas Petri se incubaron a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 7 días. El diámetro del crecimiento del micelio se midió (mm), teniendo dos lecturas en cruz por cada caja Petri con un vernier digital a las 72, 120, y 168 horas. El porcentaje de inhibición para el crecimiento del micelio se determinó utilizando como referencia el crecimiento de la concentración control (la caja Petri con solamente medio PDA), y se calculó según la fórmula:

$$\text{Inhibición}(\%) = \left\{ \frac{DC - DT}{DC} \right\} \times 100$$

Dónde:

DC= es el diámetro de la colonia de la concentración control.

DT= es el diámetro de la colonia de las diferentes concentraciones tratadas.

Análisis Estadístico del Bioensayo *in vitro* de la Actividad Antifúngica del Extracto de *R. muelleri*

El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con 15 concentraciones y cuatro repeticiones por cada una. Se aplicó el análisis Probit (Finney, 1971) para calcular la concentración de extracto de la planta que resulta en una inhibición de crecimiento visible del patógeno al 50% y 90% cuando se compara con el control (MIC₅₀ y MIC₉₀). El programa de análisis Probit SAS (Versión 9.1), se utilizó para la evaluación estadística. Los valores de MIC's se calcularon y se asocian con valores de Chi-cuadrado estadísticamente significativas a nivel $p < 0.05$. La prueba de ANOVA y la media también se realizó por el método de Tukey ($p = 0.05$) utilizando el software SAS versión PC-System® 9.1.3 para Windows.

Bioensayo del Extracto de Etanol de *R. muelleri* en Plantas de Tomate

Preparación de la Solución Madre del Extracto de *R. muelleri* para el Bioensayo en Plantas de Tomate

A partir del extracto de etanol de *R. muelleri* se obtuvo una solución madre de 50,000 ppm, de la cual se prepararon las diferentes concentraciones para los bioensayos de:

- Determinación del grado de fitotoxicidad del extracto en plantas de tomate.
- Evaluación del efecto antifúngico del extracto sobre *Fol* en plantas de tomate.

Determinación del Grado de Fitotóxicidad del Extracto de *R. muelleri* en Plantas de Tomate.

El bioensayo fitotóxico se llevó a cabo con la finalidad de descartar las concentraciones del extracto de *R. muelleri* que causaran daño a las plantas de tomate. Las concentraciones que no causaron daño fitotóxico en las plantas, fueron seleccionadas para el bioensayo de actividad antifúngica en invernadero. Para la prueba de fitotoxicidad se tomó como base el trabajo reportado por Jasso de Rodríguez et al. (2015), en donde el extracto de etanol inhibió a *Fol* con la MIC₅₀ de 3,363 ppm y se seleccionaron para la evaluación de fitotoxicidad las siguientes concentraciones: 100, 300, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 y 4000 ppm.

El experimento se estableció en un invernadero ubicado en la UAAAN, Buenavista Saltillo, Coahuila, México. Se utilizaron plantas de tomate tipo Saladette variedad "Río Grande" con una edad de cinco semanas y de cinco a seis hojas verdaderas que fueron trasplantadas a macetas de un litro con mezcla esterilizada perlita-peat moss (1:1).

El riego y la nutrición se realizaron diariamente hasta que la planta estuviera a capacidad de campo, la nutrición se basó en los índices propuestos por Steiner (1966). A los 10 días después del trasplante (*ddt*) se aplicaron 300 mL de cada

una de las concentraciones preparadas del extracto, directamente al sustrato junto al tallo de la planta, con la finalidad de que fuera absorbida por las raíces. Posteriormente, se efectuaron tres aplicaciones más del extracto: a los 20 *ddt* (300 mL de extracto), a los 30 *ddt* (100 mL) y a los 40 *ddt* (100 mL). Las variables evaluadas fueron:

- Fitotoxicidad, medida con la escala propuesta por Burrill et al. (1976) (Cuadro 1).
- Altura de la planta, medida con una cinta métrica en cm.
- Diámetro de tallo, medido con un vernier digital (marca Stainless Hardened) en mm.

Diseño Experimental del Grado de Fitotoxicidad del Extracto de *R. muelleri* en Plantas de Tomate

El experimento se estableció con un diseño completamente al azar, con 10 concentraciones, un testigo absoluto (TA) y cuatro repeticiones. El análisis de datos se realizó con un análisis de varianza (ANOVA) y para la comparación de medias se utilizó el método de Diferencia Mínima Significativa (DMS), usando el programa SAS-PC System ® Versión 9.1.3 para Windows.

Cuadro 1. Escala de Fitotoxicidad Propuesta por Burrill et al. (1976)

Grado	Efecto sobre el Cultivo	% de Fitotoxicidad al Cultivo
1	Sin Efecto	0.0 - 1.0
2	Síntomas muy Ligeros	1.0 - 3.5
3	Síntomas Ligeros	3.5 - 7.0
4	Síntomas que no se Reflejan en el Rendimiento	7.0 - 12.5
5	Daño Medio	12.5 - 20.0
6	Daños Elevados	20.0 - 30.0
7	Daños muy Elevados	30.0 - 50.0
8	Daños Severos	50.0 - 99.0
9	Muerte Completa	99.0 - 100.0

Bioensayo del Efecto Antifúngico del extracto de *R. muelleri* Sobre *Fol* en Plantas de Tomate en Invernadero

Preparación de la Solución de Esporas de *Fol*

Se preparó una solución de esporas de *Fol* a partir de cultivos fúngicos de siete días de edad, los cuales se obtuvieron del laboratorio de Fitopatología de la UAAAN. Con una pipeta se agregaron 10 mL de agua destilada previamente esterilizada al medio de cultivo para obtener el sobrenadante que se depositó en un matraz, y se obtuvo una solución a concentración de 1×10^6 UFC/mL, la cual se colocó en refrigeración (4 a 5 °C), hasta su utilización.

Establecimiento del Bioensayo en Invernadero

El experimento se llevó a cabo en un invernadero ubicado en la UAAAN, en el ciclo Primavera-Verano del 2014. Se utilizaron plantas de tomate tipo Saladette variedad "Río Grande" con una edad de cinco semanas, con cinco a seis hojas verdaderas. Las raíces de las plantas de tomate fueron despuntadas para ser infestadas con la solución de esporas (sumergidas cinco min), anteriormente preparada. Se evaluaron seis concentraciones del extracto de etanol de *R. muelleri*, en base a los resultados del ensayo de índice de fitotoxicidad (Cuadro 7), las cuales fueron: 100, 300, 500, 1000, 1500 y 2000 ppm, así como dos testigos: testigo absoluto (TA) y testigo inoculado (TI) y 8 repeticiones (una planta por repetición), por cada concentración y testigo. El trasplante se realizó en macetas de 5 galones en una mezcla esterilizada de suelo-perlita-peat moos (1:1:1). Una vez efectuado el trasplante se aplicaron 100 mL del extracto de *R. muelleri* directamente al sustrato junto al tallo de la planta para asegurar que penetrara a la raíz. Posteriormente, se efectuaron tres aplicaciones más: a los 20 *ddt* (100 mL de extracto); a los 30 *ddt* (300 mL) y a los 40 *ddt* (300 ml).

A los 78 *ddt* se efectuó la cosecha y se evaluaron las siguientes variables: incidencia, severidad y peso seco de la raíz, altura de planta, diámetro de tallo y rendimiento de fruto. La evaluación de la severidad del ataque del patógeno en la raíz de la planta, se llevó a cabo según la modificación de la escala de

severidad propuesta por Wang y Jeffers (2000), donde: 0= Ningún efecto sobre la coloración de la corona ni de la raíz; 1= Ligera decoloración en el córtex de la corona del tallo y ningún efecto sobre la raíz; 2= Ligera decoloración en el córtex de la corona del tallo y ligera decoloración en la raíz; 3= Decoloración extensiva en el córtex en la corona del tallo y ligera decoloración en la raíz; 4= Decoloración extensiva en el córtex de la corona del tallo y decoloración extensiva de la raíz; 5= Decoloración extensiva en el córtex de la corona del tallo y necrosamiento de la raíz; 6= Necrosamiento completo de la corona y de la raíz; 7= Necrosamiento completo de la corona, de la raíz y muerte de la planta.

Diseño Experimental del Efecto Antifúngico del Extracto de *R. muelleri* sobre *Fol* en Plantas de Tomate en Invernadero

El experimento se estableció con un diseño de bloques completamente al azar, para las variables de incidencia y severidad se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$) y para las variables peso seco de raíz, altura de planta, diámetro de tallo y rendimiento se efectuó el ANOVA y la comparación de medias por el método de DMS ($p = 0.05$), usando el programa SAS-PC System © Versión 9.1.3 para Windows.

Bioensayo Antibacterial *in vitro* del Extracto de Etanol de *R. muelleri* Sobre Seis Bacterias

Preparación de la Solución Madre del Extracto de Etanol para Bioensayo Antibacterial

A partir del extracto de etanol de *R. muelleri* se obtuvo una solución madre de 10,000 ppm, la cual se preparó de la siguiente manera: Se pesaron 112.5 mg de la resina del extracto de etanol en una balanza analítica marca Adventure OHAUS, la resina pesada se disolvió en 1.12 mL de Dimetilsulfóxido al 0.04% (DMSO) para facilitar que se disolviera se utilizó un equipo Vortex marca

SCIOLOGEX MX-S, posteriormente se hizo pasar por filtros de membrana de Nylon de 0.45 μM para esterilizar.

Cepas Bacterianas

Las cepas bacterianas se obtuvieron de la colección de bacterias del laboratorio de Alimentos Funcionales y Nutracéuticos del Instituto Tecnológico de Durango. Las cepas fueron: *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Proteus vulgaris* (ATCC 49132), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus hauseri* (ATCC 13315), *Proteus mirabilis* (ATCC 7002) y *Staphylococcus epidermidis* (12228).

Establecimiento de las Concentraciones en Dos Pruebas

Para determinar las mejores concentraciones antibacteriales del extracto de *R. muelleri* fue necesario realizar dos pruebas las cuales se describen a continuación:

Prueba Uno. Se evaluaron seis bacterias: *E. aerogenes*, *P. vulgaris*, *E. coli*, *P. hauseri*, *P. mirabilis* y *S. epidermidis*. Por cada bacteria se estableció un testigo absoluto y cuatro concentraciones: 125, 250, 500 y 1000 ppm; además un testigo con DMSO por cada concentración. La evaluación se realizó por triplicado.

Prueba Dos. Se evaluaron tres bacterias: *S. epidermidis*, *P. vulgaris* y *E. coli*. Por cada bacteria se estableció un testigo absoluto y dos concentraciones: 1500 y 2000 ppm. La evaluación se realizó por triplicado.

Preparación de los Preinóculos Bacterianos

Para la obtención de los preinóculos bacterianos, se utilizaron réplicas frescas de cepas madre de las diferentes bacterias, cada una con 24 horas de incubación a 34 °C, las cuales fueron sembradas con asas bacteriológicas en 50 mL de caldo nutritivo en distintos matraces Erlenmeyer con capacidad de 250 mL cada uno y previamente esterilizados. Posteriormente, cada matraz fue identificado con el nombre de la bacteria correspondiente y colocado en una

incubadora marca Shaking Labnet International Benchtop Shaking Incubator 222DD a 130 rpm por 24 horas. Transcurrido el tiempo se realizó un conteo del número de bacterias con la cámara de Neubauer. La concentración se determinó con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{número de células} \times 10,000}{\text{número de cuadrados} \times \text{dilución}}$$

Los resultados obtenidos se ajustaron para cada bacteria a una concentración de 1×10^6 Unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

Preparación de los Inóculos Bacterianos

Para la preparación de los inóculos bacterianos se utilizaron tubos de ensayo de 13 x 100 mm previamente esterilizados, a los cuales se les adicionó 10 mL de caldo nutritivo, posteriormente se les adicionó la cantidad correspondiente a las partes por millón de la solución madre del extracto de etanol preparado anteriormente, que correspondían para cada prueba, además se agregó la cantidad ajustada de la solución que se obtuvo en los preinóculos bacterianos. Una vez preparados los tubos de ensayo con el caldo nutritivo, el extracto de etanol de *R. muelleri* y la solución de bacterias ajustadas a una concentración de 1×10^6 UFC/mL, los tubos de ensayo se taparon con aluminio y se pusieron en la incubadora por 16 horas a 130 rpm.

Dilución de los Inóculos Bacterianos

Transcurrido el tiempo de la preparación de los inóculos bacterianos se les realizó una dilución a cada inóculo, en tubos eppendorf colocando 10 μ L de los inóculos bacterianos y 990 μ L de agua destilada estéril.

Bioensayo de la Actividad Antibacteriana con el Extracto de Etanol de *R. muelleri*

Se prepararon cajas Petri con medio de cultivo agar-papa-dextrosa (PDA) ya solidificado, a las cuales se les adicionó 100 μ L de la dilución anteriormente preparada de los inóculos bacterianos, la cual se dispersó con una varilla de vidrio en toda la caja Petri. Posteriormente se pusieron en incubación a 37 ± 2 °C

por 24 horas. Transcurrido el tiempo se contó el número de colonias con un equipo marca CRAFT. Los resultados se expresaron en UFC/mL y en porcentaje de inhibición, el cual se determinó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{\text{Testigo Absoluto} - \text{UFC/mL}}{\text{Testigo Absoluto}} \times 100$$

Diseño Experimental del Bioensayo de la Actividad Antibacterial del Extracto de Etanol de *R. muelleri*

El experimento fue establecido bajo un diseño completamente al azar con diferentes concentraciones y testigos según la prueba y tres repeticiones por cada concentración y testigos. Se aplicó el análisis Probit (Finney, 1971) para calcular la concentración del extracto de la planta que resulta en una inhibición de crecimiento visible de cada bacteria al 50 % y 90 % cuando se compara con el control (MIC₅₀ y MIC₉₀). El programa de análisis Probit SAS (Versión 9.1) se utilizó para la evaluación estadística. Los valores de MIC se calcularon y se asocian con valores de Chi-cuadrado significativas a $p < 0.05$. La prueba de ANOVA y la media también se realizó por el método de DMS utilizando el software SAS versión PC-System® 9.1.3 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimiento del Extracto de Etanol de *R. muelleri*

El rendimiento del extracto etanólico de las hojas de *R. muelleri* en base seca fué 37.43% de resina recuperada, este valor es alto en comparación con lo reportado para *Flourensia cernua* con un rendimiento de 8.2 % usando el mismo disolvente (Guerrero-Rodríguez et al., 2007). El rendimiento de *R. muelleri* muestra el alto valor de esta especie para aplicaciones futuras como microbicida, como se ha informado de otras especies del género *Rhus* (Abu-Reidah et al., 2015). A la fecha, solo existe el presente reporte científico sobre el rendimiento de etanol de las hojas de *R. muelleri*.

Características Químicas

Los resultados obtenidos por el análisis químico de las hojas *R. muelleri* se presentan en el Cuadro 2. Los valores de cenizas y contenido de proteína de 6.19 % y 5.73 %, respectivamente, fueron más altos que los valores reportados por Raodah et al. (2014), y Özcan and Haciseferogullari (2004), para los frutos de *R. coriaria*. Raodah et al. (2014) reportaron que los frutos de *R. coriaria* eran ricos en proteínas; por lo tanto se puede afirmar que las hojas de *R. muelleri* también son ricas en proteínas, ya que superaron el contenido en frutos de *R. coriaria*. El contenido de proteína en *R. muelleri* sólo fue superada por la proteína de las semillas de *R. lancea* (7.79 %) (Aganga and Mosase, 2001). En esta investigación, el contenido de fibra cruda de *R. muelleri* es importante y es similar a los de *R. coriaria* (Özcan and Haciseferogullari, 2004). Esta información es relevante para las futuras aplicaciones de esta especie endémica de México.

Contenido Total de Fenoles

La cantidad de fenoles totales obtenido en el extracto de etanol fue de 33.94 mg/100 mg, lo que corresponde a 84.9 % de los contenidos fenólicos totales en las hojas (Cuadro 3).

Al-Boushi et al. (2014), reportan que en las hojas y tallos de *R. coriaria* se encuentran concentraciones de fenoles de 19.31 mg/100 mL y 11.11 mg/100 mL, respectivamente. Raodah et al. (2014) y Kosar et al. (2007), estudiaron el fruto de *R. coriaria* y reportaron contenido de fenoles con valores de 15.17 mg/100 mg y 17.16 mg/100 mg, respectivamente, inferiores a los valores obtenidos en esta investigación. Itidel et al. (2013) reportaron el contenido de fenoles en hojas, corteza de tallos y fruto de *R. tripartita* con valores de 7.11, 14.17 y 7.68 mg/100 mg, respectivamente, y para las hojas, corteza de tallos y el fruto de *R. pentaphylla* los valores fueron de 6.41, 10.88 y 7.51 mg/100 mg, respectivamente.

Cuadro 2. Análisis Químico de las Hojas de *R. muelleri*

Componentes	Hojas
	% peso seco
Humedad	7.65
Proteína Cruda	5.73
Extracto Etéreo	3.29
Ceniza	6.19
Fibra Cruda	13.88

Los datos son media de tres determinaciones

Cuadro 3. Contenido de Fenoles Totales y Capacidad Antioxidante de *Rhus muelleri*, Utilizando DPPH[•] y ABTS^{•+}

<i>R. muelleri</i>	Fenoles totales mg/100 mg	Capacidad Antioxidante	
		DPPH [•] %	ABTS ^{•+} %
Hojas	37.94 ± 4.18	73.42	83.24
Extracto etanol	33.94 ± 2.86	96.90	95.97

Los datos son media de tres determinaciones

El extracto de metanol de las hojas de *R. coriaria* fueron estudiados por su alta actividad inhibidora frente a diferentes cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas y propiedades de resistencia contra los hongos y se utiliza contra la descomposición de la madera, la máxima cantidad de metabolitos de gran importancia nutricional y medicinal como ácidos fenólicos, taninos,

antocianinas, ácidos orgánicos, fibras y minerales (Sen et al, 2009; Shabbir, 2012).

Por lo tanto, *R. muelleri* es una fuente natural de compuestos fenólicos con efectos inhibitorios viables contra bacterias y agentes patógenos que afectan a las plantas y la salud humana.

Actividad Antioxidante

Las hojas y el extracto de etanol de *R. muelleri* mostraron una alta actividad antioxidante (73.42 % y 96.9 %, respectivamente) en el ensayo de DPPH[·], y también la alta actividad antioxidante se detectó en las hojas y el extracto de etanol (83.24 % y 95.97 %, respectivamente) en el ensayo de ABTS^{•+} (Cuadro 3). Estos resultados están de acuerdo con los valores reportados por Gabr et al. (2014), que mostraron la actividad antioxidante del extracto de *R. coriaria* de 72.7 % a 87.9 %. Kosar et al. (2007), reportaron que las antocianinas y taninos hidrolizables derivados de *R. coriaria* fueron responsables de la inhibición de la actividad captadora de peroxidación lipídica de DPPH[·]. La alta actividad antioxidante mostrada por *R. muelleri* demuestra el potencial de esta planta como una alternativa antifúngica, teniendo en cuenta además, que otras especies del mismo género se han utilizado con éxito como agentes antibacterianos y antivirales.

Composición Química del Extracto de Etanol

Los resultados del análisis GC-MS mostraron la identificación de los diferentes compuestos obtenidos en la extracción de etanol de las hojas de *R. muelleri* (Fig. 1). Tiempo de retención (Rt), nombre compuesto, fórmula molecular, peso molecular (MW) y la concentración (% de área) se presentan en el Cuadro 4. Los resultados muestran la presencia de principalmente ocho compuestos; de los cuales Stigmast-5-en-3-ol, oleate, de naturaleza esteroles, fue el más abundante, con 33.74 %; seguido por el cholest-1-eno [2,1-a] naphthalene, 3', 4'-dihydro, también esteroles, con 10.77 %. Estos dos compuestos se han reportado para su actividad anticolesterolémica (Myant, 1981). Además, se

identificó el 3,5-dihydroxytoluene, con un contenido del 9.5 %, que es un compuesto fenólico con un potencial contra el anti-HIV-1 (Wang et al., 2008); seguido por lup-20 (29)-en-3-one (compuesto de la familia de los lupenos) y 9,19-Cyclocholestene-3,7-diol,4,14-dimethyl-, 3.acetate (esterol) con un contenido de 8.29 % y 8.17 %, respectivamente. Los últimos compuestos fueron: ethyl iso-allocholate (esteroide); 7,8-epoxylanostan-11-ol, 3-acetoxy (compuesto alcohólico); y 3-trifluoro acetoxy pentadecane (compuesto de flour), con contenidos de 6.21 %, 4.87 % y 1.12 %, respectivamente. Estos tres compuestos se han reportado con actividad antimicrobianas, antioxidantes, antiinflamatorios y con potencial anticancerígeno (Sarada et al., 2011, Muthulakshmi et al., 2012 y Sheela and Uthayakumari, 2013).

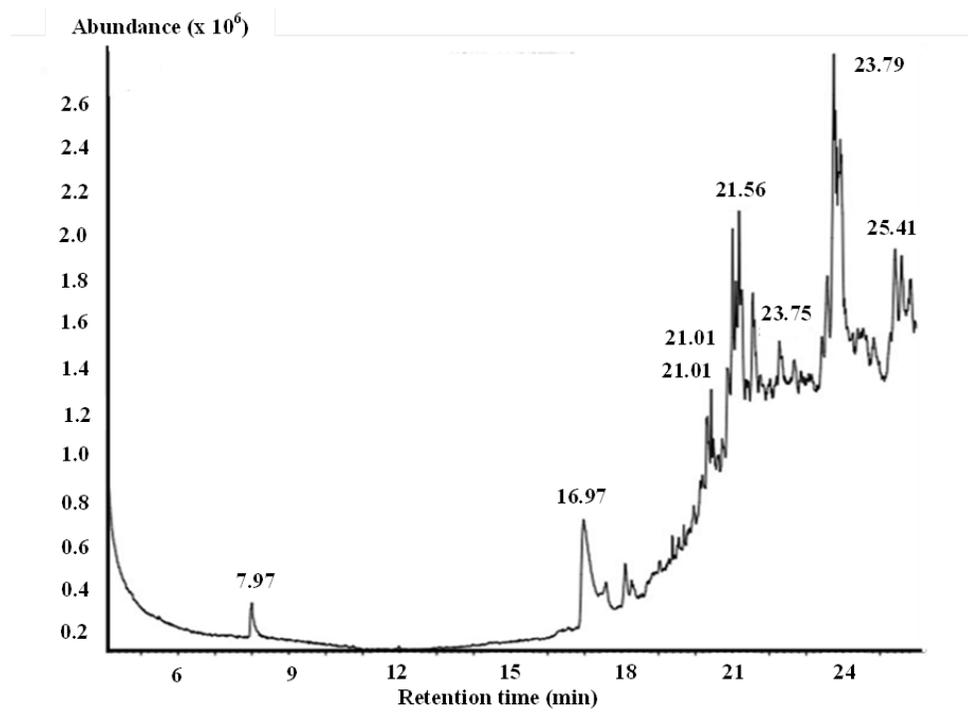


Figura 1. Cromatograma GC-MS del Extracto de Etanol de *Rhus muelleri*

Las Fig. 2-7 muestran los espectros de masas y las estructuras de los compuestos identificados en el extracto de etanol. Además, las señales de longitud de onda de los grupos funcionales que se presentan en los compuestos identificados se presentan en el Cuadro 5. Las señales con longitud de onda de 1,607, 1,316, y 1,202 cm^{-1} , puede ser debido a las vibraciones del anillo

aromático del compuesto fenólico 3,5-dihydroxytoluene, y también para el anillo aromático de cholest-1-eno [2,1-a] naphthalene, 3',4'-dihydro. La señal en 2925 cm^{-1} se asocia con cualquier enlace sencillo C-H de los compuestos extraídos. Abu-Reidah et al. (2015) identificaron 211 compuestos fenólicos en los frutos del *R. coriaria* (taninos, (iso) flavonoides, terpenos, etc.). El presente estudio es el primer reporte científico sobre los compuestos identificados en el extracto de etanol de *R. muelleri*.

Cuadro 4. Compuestos Bioactivos Identificados en el Extracto de Etanol de las Hojas de *R. muelleri*

No	Rt (min)	Nombre del Compuesto	Fórmula Molecular	MW	Área %
1	7.97	3-trifluoro acetoxy pentadecane	$\text{C}_{17}\text{H}_3\text{F}_3\text{O}_2$	324	1.12
2	16.97	3,5-dihydroxytoluene	$\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$	124	9.59
3	21.01	Lup-20(29)-en-3-one	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}$	424	8.29
4	21.10	7,8-epoxy lanostan-11-ol, 3-acetoxy	$\text{C}_{32}\text{H}_{54}\text{O}_4$	502	4.87
5	21.56	Cholest-1-eno[2,1-a]naphthalene, 3',4'-dihydro	$\text{C}_{33}\text{H}_{54}\text{O}_3$	498	10.77
6	23.57	Ethyl iso-allocholate	$\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{O}_5$	436	6.21
7	23.79	Stigmast-5-en-3-ol, oleate	$\text{C}_{47}\text{H}_{82}\text{O}_2$	687	33.74
8	25.41	9,19-cyclocholestene-3,7-diol, 4, 14-dimethyl-, 3-acetate	$\text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{O}_3$	472	8.17

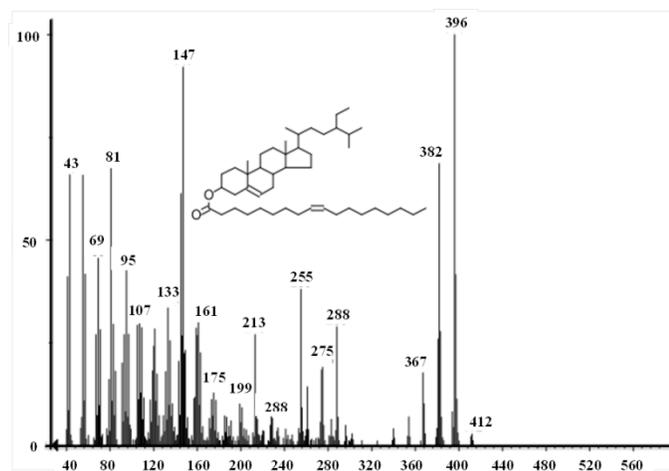


Figura 2. Espectro de Masas y la Estructura de Stigmast-5-en-3-ol, oleate

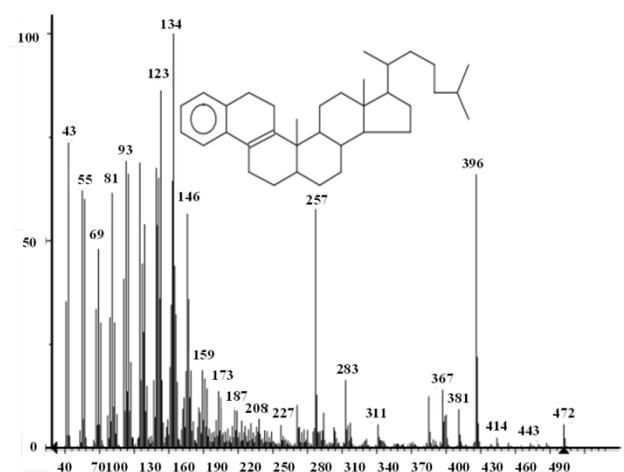


Figura 3. Espectro de Masas y la Estructura de Cholest-1-eno [2,1-a] naphthalene, 3', 4'-dihydro

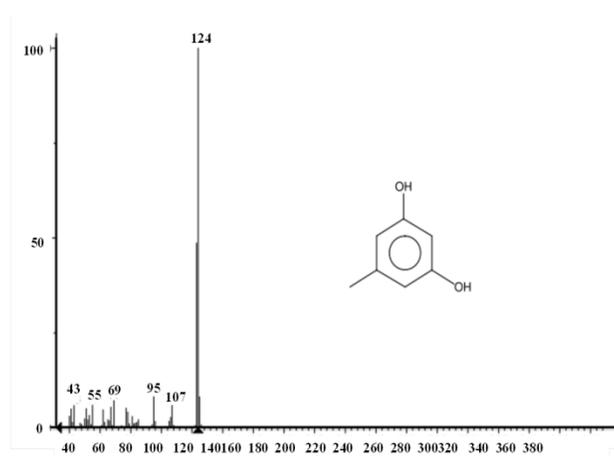


Figura 4. Espectro de Masas y la Estructura de 3,5-dihydroxytoluene

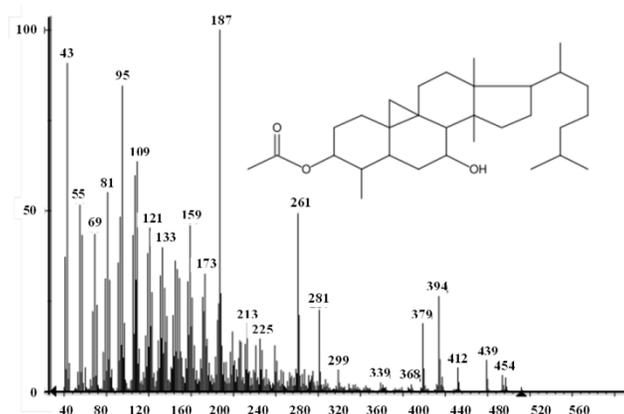


Figura 5. Espectro de Masas y la Estructura de 9,19-Cyclocholestene-3,7-diol, 4,14-dimethyl-,3.acetate

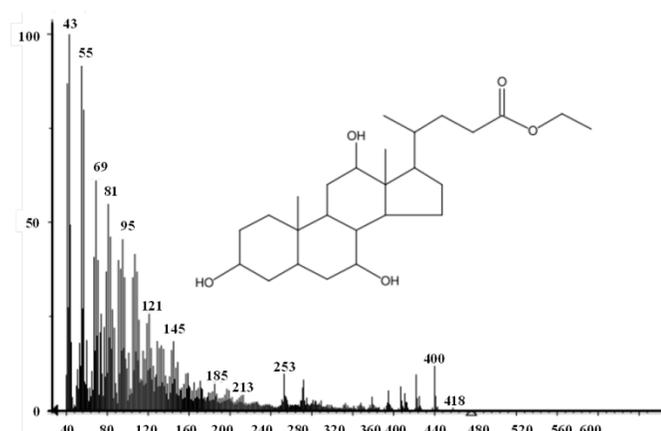


Figura 6. Espectro de Masas y la Estructura de Ethyl iso-allocholate

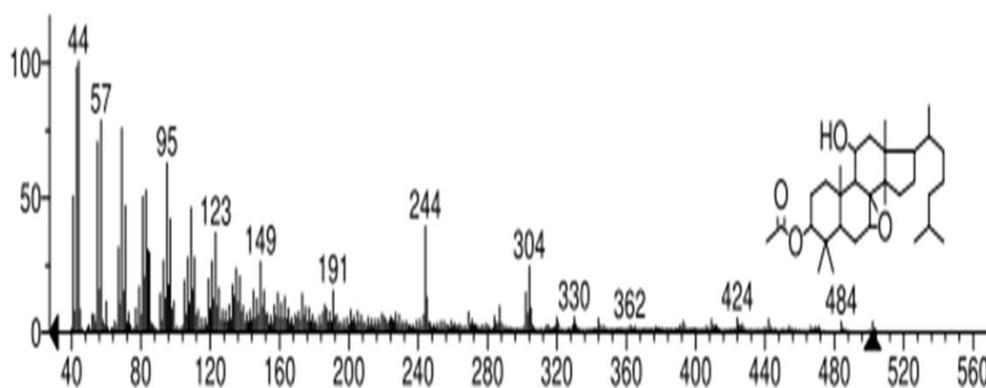


Figura 7. Espectro y la Estructura de 7, 8-Epoxy lanostan-11-ol, 3-acetoxy

Efecto *in vitro* de las Concentraciones del Extracto de *R. muelleri* Sobre *Fol*

El efecto de la actividad biológica de las concentraciones de extracto de *R. muelleri* sobre *Fol in vitro*, fueron altamente significativas ($p < 0.01$). Al aumentar la concentración del extracto, el crecimiento micelial de *Fol* se reduce significativamente en los tres tiempos de incubación (Cuadro 6). El efecto más alto se encontró a las 168 horas con concentraciones de 4,500-6,000 ppm con un rango de inhibición micelial de 66.8 % a 71.4 %.

Cuadro 5. Bandas y asignaciones del espectro de FT-IR (ATR) del extracto de *R. muelleri*

Wavenumber (cm ⁻¹)	Assignations
3290	O-H, NH ₂
2925	C-H
1693	C=N-OH stretching of oxime
1607	C=C overtone of aromatic ring
1530	C-N stretching
1447	C-O-H in plane bending; N=N stretching of Azo compound
1316	C-O stretching of phenol
1201	O-H phenol; C-H in plane bending
1010	C-O stretching
965	N-O stretching of oxime

Los valores de MIC₅₀ y MIC₉₀ (Cuadro 7) mostraron una mejor eficacia del extracto para inhibir el patógeno a medida que el tiempo de incubación aumentó, debido al hecho de que la dosis de extracto requerido para alcanzar estos umbrales de inhibición del patógeno disminuyó con el tiempo. La MIC₅₀ al final del ensayo fue de 3,363 ppm (con límites de confianza de 3,045 a 3,734) y la MIC₉₀ fue de 11,793 ppm (con límites de confianza de 9,544-15,706).

Estas concentraciones contrastan con las utilizadas por López-Benítez et al. (2005) que mediante el uso de extractos acuosos de *Larrea tridentata* y *Cinnamomum zeylanicum* requirieron de una concentración de 5 % (50,000 ppm) para inhibir *Fol* al 100 % y 96.2 %, respectivamente.

Cuadro 6. Medias del Crecimiento micelial y Porcentaje de Inhibición de *FoI* Evaluado en Tres Tiempos de Incubación con el Extracto de *R. muelleri*

Concentración (ppm)	Tiempo (h)					
	72		120		168	
	mm	%	mm	%	mm	%
0	25.8 a	0.0	47.3 a	0.0	73.5 a	0.0
100	25.5 a	0.9	47.3 b a	0.0	72.7 a	1.0
300	25.6 a	0.8	46.5 b a	1.7	71.4 a	2.8
500	25.3 a	1.8	46.4 b a	1.9	70.3 a	4.4
1000	23.4 b	9.2	43.6 b c	7.8	66.6 b a	9.4
1500	21.6 c	16.2	40.5 c	14.3	60.5 b c	17.7
2000	20.4 d	20.8	34.2 d	27.7	52.7 d c	28.2
2500	19.9 d	22.6	30.7 d	27.8	50.3 d e	31.6
3000	17.1 e	33.4	34.1 d	35.1	43.4 e	41.0
3500	14.3 f	44.4	24.3 e	48.7	32.7 f	55.5
4000	13.3 f	48.2	21.8 f e	53.8	28.6 g f	61.1
4500	11.1 g	56.8	18.7 f g	60.5	24.4 g	66.8
5000	10.7 g	58.3	17.8 g	62.3	22.2 g	69.8
5500	9.5 h	63.1	16.6 g	64.9	21.0 g	71.4
6000	9.5 h	63.0	16.2 g	65.7	21.5 g	70.7
Media	18.2068		32.410		47.4572	
Tukey	1.1317		3.6567		8.0033	

Valores con la misma letra dentro de cada columna son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha = 0,05\%$)

El extracto también mostró mayor actividad antifúngica en comparación con los resultados obtenidos por Ramaiah and Garampalli (2015), que mediante el uso de extractos acuosos de *Solanum indicum*, *Azadirachta indica* y *Oxalis latifolia* los cuales requirieron una concentración de 60 % (600,000 ppm) para inhibir este mismo patógeno en un 78.3 %, 75 % y 70.3 %, respectivamente.

Castillo et al. (2010) reportaron que el uso de etanol como solvente extractor permitió mayor extracción de compuestos polifenólicos que el uso de agua, lo que puede explicar por qué en la investigación de *R. muelleri* se requirió menor concentración de extracto para inhibir el patógeno. Esta información coincide con lo reportado por Shabbir (2012), quien encontró que el etanol y los extractos de metanol de los frutos de *R. coriaria* inhibían cepas de bacterias

clínicas, pero no se detectó inhibición con los extractos acuosos evaluados en las mismas cepas.

Cuadro 7. Concentraciones del Extracto de *R. muelleri* a MIC₅₀ y MIC₉₀ para Inhibir el Crecimiento de *Fol* en Tres Tiempos de Incubación

Time (h)	MIC ₅₀ (ppm)	95 % Fiducial Limits		MIC ₉₀ (ppm)	95 % Fiducial Limits		Chi ^a
		Lower	Upper		Lower	Upper	
72	4273	3868	4792	17513	13668	244534	4.6591
120	3875	3309	4684	15456	10806	27789	13.6157
168	3363	3045	3734	11793	9544	15706	6.5669

^a Chi-cuadrado, significancia $p < 0.05$

Hernández-Castillo et al. (2010) utilizaron concentraciones de taninos extraídos con etanol a partir de *Lippia graveolens* y *Carya illinoensis* (cáscara de la nuez) para el control de *Rhizoctonia solani*. Los valores de MIC₅₀ y MIC₉₀ fueron 1,930 ppm y 22,500 ppm, respectivamente para *Lippia*, y 434 ppm y 1,450 ppm, respectivamente para *Carya*. La concentración de MIC₉₀ de *Lippia* es superior a la de esta investigación, pero en comparación con *Carya*, es más alta. La capacidad inhibitoria de extractos de plantas es debido a las diferencias existentes de componentes y concentraciones de los compuestos activos contenidos en la especie (Jasso de Rodríguez et al., 2006). De hecho, la actividad antifúngica observada en *R. muelleri* sobre *Fol* podría atribuirse a la presencia de los compuestos identificados en esta investigación, tales como: acetato de Ethyl iso-allocholate (esteroide); 7,8-epoxylanostan-11-ol, 3-acetoxi (compuesto alcohólico); y 3-trifluoro acetoxi pentadecane (compuesto de Flour). Estos compuestos han sido reportados por su actividad antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatoria y con potencial anticancerígeno (Sarada et al., 2011, Muthulakshmi et al., 2012 y Sheela and Uthayakumari, 2013). Además, el extracto tiene otros compuestos que han sido reportados por su actividad terapéutica como: Stigmast-5-en-3-ol, oleate de naturaleza esterol; Cholest-1-

eno [2,1-a], naphthalene, 3', 4'-dihydro, también esteroles, estos dos compuestos han sido reportados por su actividad anticolesterolémica (Myant, 1981); el 3,5-dihydroxytoluene, es un compuesto fenólico que se ha reportado por su capacidad potencial anti-VIH-1 (Wang et al., 2008); otros compuestos son Lup-20 (29)-en-3-one (compuesto lupene) y 9,19-cyclocholestene-3,7-diol, 4, 14-dimethyl-, 3-acetate (esteroles). El mecanismo de acción de los compuestos identificados en el extracto, que causan inhibición antifúngica no se conoce, sin embargo el mecanismo de fenoles contra estos patógenos, se atribuye a que los fenoles producen una inhibición enzimática a través de la oxidación de compuestos y los taninos inhiben la síntesis de proteínas en la célula (Rodríguez-Pedroso et al., 2012).

Es importante notar que los taninos de *R. coriaria* aumentan la rigidez de la región hidrofílica de la membrana de los eritrocitos, en el intervalo de concentración, los taninos presentan actividad antihemolítica. También es importante señalar que la presencia de los compuestos identificados en el extracto, así como la alta concentración de polifenoles, produce una interacción sinérgica entre estos compuestos que le proporcionan al extracto capacidad inhibitoria contra *Fol.* Adwan et al. (2010) encontraron una interacción sinérgica entre el extracto de las semillas de *R. coriaria* y agentes antimicrobianos. Los autores observaron que esta combinación puede ser útil en la lucha contra los patógenos resistentes a los fármacos.

Los resultados obtenidos en esta investigación se atribuyen a la eficacia de los componentes bioactivos del extracto de *R. muelleri*, el cual tiene potencial como fungicida botánico. Esta planta tiene la ventaja de que el extracto etanólico de las hojas tienen un alto rendimiento de compuestos bioactivos (37.43 %, w/v), en comparación con otras especies, con un contenido de polifenoles y una alta actividad antioxidante.

Grado de Fitotoxicidad del Extracto de *R. muelleri* en Plantas de Tomate.

El ANOVA del grado de fitotoxicidad mostró diferencias significativa entre concentraciones ($p < 0.05$), y la prueba de medias mostró que las concentraciones a partir de 2,000 ppm presentaron toxicidad en las plantas, en un rango de índice de 5 a 9 (12.5- 99 % de fitotoxicidad al cultivo, respectivamente), que representa daño medio a daño severo en el cultivo (Cuadro 1). El daño se reflejó en un decremento significativo ($p < 0.05$), de la variable altura de planta, en cuanto a diámetro de tallo no se presentó diferencia ($p > 0.05$), aunque numéricamente se observó un decremento a partir de 2,000 ppm (Cuadro 8). García-Mateos et al. (2013) mencionaron que la diferencia entre especies a los diferentes tratamientos no se debe solo a la actividad biológica de extractos o compuestos sino también a la sensibilidad de la planta receptora y al proceso metabólico implicado. En base a los resultados obtenidos las concentraciones de 2,500 a 4,000 ppm fueron descartadas para el bioensayo de plantas infestadas por *Fol* en invernadero.

Efecto Antifúngico del Extracto de *R. muelleri* Sobre *Fol* en Invernadero

Los resultados del ANOVA mostraron diferencia significativa ($p < 0.05$) entre concentraciones para la variable severidad en raíz, el extracto de etanol de *R. muelleri* a la concentración de 1,000 ppm presentó el menor grado de severidad (2.38), lo cual indica que el extracto protegió a la planta del ataque del patógeno (Cuadro 9).

La mayor severidad se presentó en el testigo inoculado y a la concentración de 2,000 ppm, con un valor de 5.57, (Cuadro 9). Al respecto López et al. (2010) citan que la severidad de la enfermedad está directamente relacionada con la formación de estructuras de infección y que ésta habilidad es estimulada por el hospedante.

El efecto del control del extracto sobre *Fol* se reflejó en la sintomatología presentada en las raíces de las plantas de tomate, donde se observó que a la concentración de 1,000 ppm, las raíces no presentaron daño, ni necrosamiento

en el tallo, ni en la corona del tallo, con coloración clara, además de un mayor desarrollo radicular y raíces voluminosas similares a las del testigo absoluto y completamente diferentes a las del testigo inoculado (Fig. 8).

Cuadro 8. Valores Promedio del Grado de Fitotoxicidad del Extracto de *R. muelleri*, Altura de Planta y Diámetro de Tallo de Tomate para las Diferentes Concentraciones de Estudio

Concentración (ppm)	Fitotoxicidad (grado)	Altura de planta (cm)	Diámetro de tallo (mm)
TA	0.00 a	59.75 ab	4.71 a
100	1.00 ab	58.75 ab	4.64 a
300	1.00 ab	56.25 ab	4.83 a
500	1.25 abc	56.00 ab	4.37 a
1000	1.50 abc	65.75 a	4.92 a
1500	3.25 bcd	62.75 ab	4.24 a
2000	3.50 cd	56.75 ab	4.40 a
2500	5.50 de	38.75 ab	3.15 a
3000	7.00 ef	45.75 ab	3.13 a
3500	7.00 ef	39.50 b	4.16 a
4000	8.00 f	46.50 ab	3.29 a
Prueba	*	*	

*, DMS= Diferencia mínima significativa, ($\alpha=0.05$); TA=Testigo absoluto; TI=Testigo inoculado

Cuadro 9. Valores Promedio de las Variables Severidad e Incidencia Evaluadas en Raíces de Plantas de Tomate, Tratadas con el Extracto de Etanol de *R. muelleri* para Inhibir el Desarrollo de *Fol*, a los 78 ddt en Invernadero

Concentración (ppm)	Severidad (grado)	Incidencia (%)
TA	0.00 a	0.0 c
TI	5.57 d	100.0 a
100	4.13 bc	100.0 a
300	3.88 bc	100.0 a
500	3.13 bc	87.5 b
1000	2.38 ab	87.5 b
1500	4.63 cd	100.0 a
2000	5.57 d	100.0 a
Pruebas	Kruskal-Wallis ($p < 0.05$)	DMS ($p < 0.05$)

ddt= días después del trasplante; TA=Testigo absoluto; TI=Testigo inoculado; DMS=Diferencia mínima significativa.

El mayor efecto de *Fol* se observó en el testigo inoculado, donde se presentó un menor desarrollo radicular que en el testigo absoluto, además la raíz presentó adelgazamiento, y coloración de amarillo a café oscuro, y en algunos casos

necrosamiento completo, se presentó necrosis interna en el tallo y en la corona (Fig. 8).

La sintomatología en plantas de tomate ya ha sido evaluada en otras investigaciones como la de Salazar et al. (2011), quienes con aislamientos de *Trichoderma* spp. en el control de la fusariosis del tomate *in vivo*, describieron los síntomas producidos en las plantas de tomate como un leve amarillamiento, necrosis interna, y en algunos casos la muerte. Otros autores también describen sintomatología en otras clases de *Fusarium* como García-Rodríguez et al. (2012), quienes mencionan que la podredumbre de las raíces y del cuello del tomate causada por *Fori* causa podredumbre intensa de la raíz principal, con una necrosis de color marrón lo que ocasiona que la planta se marchite y muera.

Los resultados del presente estudio comprobaron la protección que el extracto de etanol de *R. muelleri* proporcionó a las raíces de las plantas a la concentración de 1,000 ppm. Este efecto de protección se puede atribuir a los compuestos bioactivos presentes en el extracto, el cual se encuentra constituido mayoritariamente por compuestos de naturaleza esteroide, fenólicos, de naturaleza lupene, esteroide, alcohólicos y de flour, los cuales son: stigmast-5-en-3-ol,oleate; cholest-1-eno[2,1-a]naphthalene, 3´4´dihydro; 3,5-dihydroxytoluene; lup-20(29)-en-3-one; 9, 19-cyclocholestene-3,-7, diol, 4, 14-dimetilhyl-,3,acetate; ethyl iso-allocholeate; 7, 8 epoxylanostan-11-ol, 3-acetoxy; 3-trifluoro acetoxy pentadecane.

El mecanismo de acción de los compuestos identificados en el extracto etanólico de *R. muelleri* responsables de la actividad antifúngica, no es conocido, sin embargo el mecanismo de los fenoles contra los patógenos se ha discutido, ya que produce una inhibición enzimática a partir de la oxidación de compuestos y los taninos inhiben la síntesis de proteínas en las células (Rodríguez-Pedroso et al., 2012).

Lambert et al. (2001) mostraron que los mecanismos de inhibición de los compuestos con estructuras fenólicas (altamente activos), es debido al daño que causan a la integridad de la membrana del patógeno, también afecta el pH, la homeostasis y el equilibrio de iones inorgánicos.

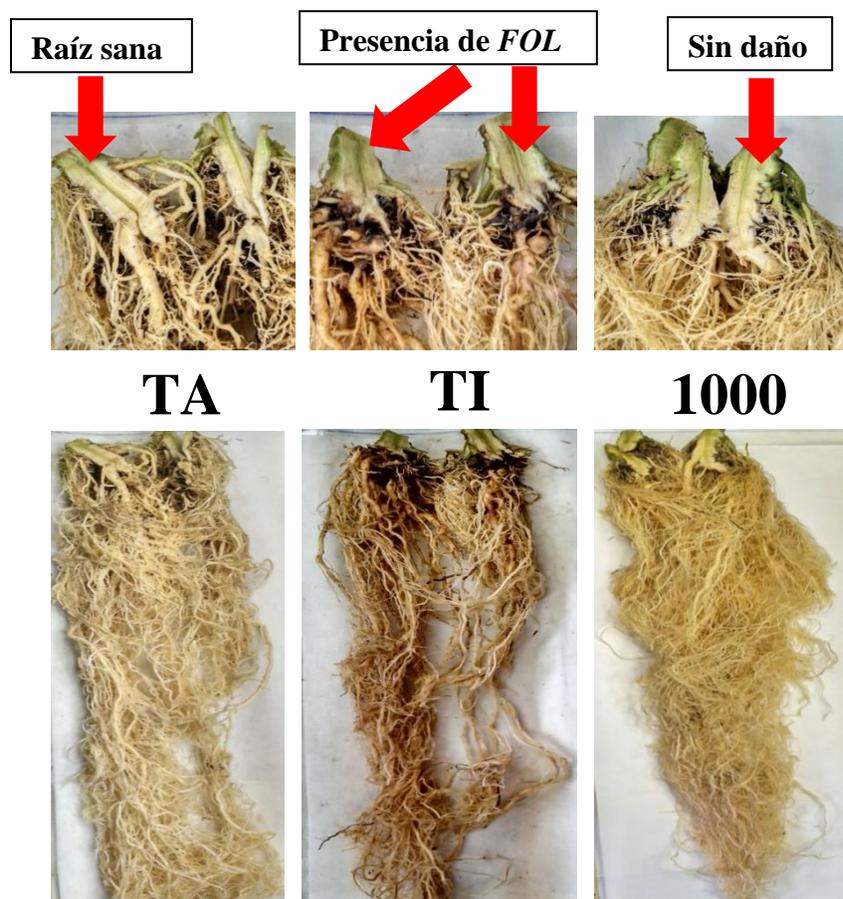


Figura 8. Efecto del Extracto Etanólico de *R. muelleri* sobre *Fol* en las Raíces de Tomate. TA=Testigo absoluto; TI=Testigo inoculado

En relación a la incidencia del patógeno en las raíces de las plantas, los resultados estadísticos mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre concentraciones; la menor incidencia se presentó en las concentraciones de 500 y 1,000 ppm con 87.5% y la mayor incidencia (100 %) en las concentraciones 100, 300, 1500, 2000 ppm y en el TI (Cuadro 9).

Lo anterior confirma que los componentes químicos del extracto etanólico de *R. muelleri* a la concentración de 1,000 ppm, presentaron la mejor sinergia para protección de la planta contra *Fol* en relación al resto de las concentraciones evaluadas. En este sentido Jiménez y Mosquera (2015), citan que las plantas sintetizan metabolitos secundarios que pueden tener actividades biológicas sobre insectos, plagas, o microorganismos fitopatógenos e inclusive pueden producir fortalecimiento estructural en la planta, incrementando su resistencia a la penetración de micelios de los hongos y a los ataques de insectos.

Los resultados del ANOVA para las variables peso seco de raíz, altura de planta, diámetro de tallo y rendimiento de fruto en cosecha (78 ddt), mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las concentraciones del extracto. Indicando que la concentración de 1,000 ppm fue la que tuvo el mayor control sobre el patógeno, que el resto de las concentraciones evaluadas (Cuadro 10).

Estos resultados confirman que a menor severidad e incidencia (Cuadro 9), se obtiene mayor desarrollo de las variables agronómicas de la planta. Lo anterior se puede atribuir a la elevada concentración de fenoles, así como a la alta actividad antioxidante del extracto de etanol de *R. muelleri* lo cual potencializa el efecto de la bioactividad que ejercen en conjunto los componentes químicos del extracto sobre *Fol* (Jasso de Rodríguez et al., 2015).

Chitwood (2002) mencionó que una gran variedad de plantas tienen un amplio espectro de compuestos orgánicos bioactivos tales como isocianatos, glucocynolatos, glucósidos, lípidos y fenoles con propiedades fungistáticas. Castillo et al. (2010) mencionan que las propiedades antifúngicas de las plantas están dadas por compuestos químicos producidos como metabolitos secundarios, tales como polifenoles, que son parte de los mecanismos de defensa de las plantas contra artrópodos y microorganismos.

Actividad Antibacterial del Extracto de Etanol de *R. muelleri*

El efecto inhibitor de diferentes concentraciones del extracto de etanol de *R. muelleri* en el crecimiento de diversas cepas bacterianas en dos pruebas

realizadas, se observa en los Cuadros 11 y 12. El análisis estadístico mostró una reducción altamente significativa ($p < 0,01$) en las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ mL), para todas las concentraciones del extracto de *R. muelleri* sobre todas las cepas de bacterias probadas en los dos ensayos.

Cuadro 10. Valores Promedio de las Variables Peso Seco de Raíz, Altura de Planta, Diámetro de Tallo y Rendimiento de Fruto de Plantas de Tomate, Tratadas con el Extracto de *R. muelleri* para el control de *Fol*, en Invernadero, a los 78 ddt

Concentración (ppm)	P.S.R. (g)	A. P. (cm)	D. T. (mm)	Rendimiento (g)
TA	8.25 a	156.5 a	9.36 ab	339.72 bc
TI	6.05 c	150.9 a	9.44 ab	324.96 d
100	6.38 bc	141.4 ab	8.79 ab	345.07 b
300	6.91 abc	139.1 ab	9.49 ab	336.33 c
500	7.41 abc	140.6 ab	9.12 ab	324.27 d
1000	7.13 abc	156.4 a	9.98 a	359.20 a
1500	7.19 abc	145.5 ab	9.69 ab	295.45 f
2000	8.16 ab	124.2 b	8.42 b	308.44 e
Prueba	**	**	**	**

ddt= días después del trasplante; P.S.R.=Peso seco de raíz. A.P.= Altura de la planta. D.T.= Diámetro del tallo; TA= Testigo absoluto; TI= Testigo inoculado; **, DMS= Diferencia mínima significativa.

En la Prueba Uno, la mayor cantidad de UFC/mL se presentó en el testigo absoluto y sobre las concentraciones de DMSO (Cuadro 11). La mayor inhibición se presentó para la bacteria de *P. mirabilis*, en la cual se observó, un control del 100 % a partir de 500 ppm, seguida de *P. hauseri* la cual presentó a la concentración de 250 ppm una inhibición del 98 %, de igual manera para la bacteria *E. aerogenes* se observó una inhibición del 95.83 % a la concentración de 1,000 ppm del extracto de etanol (Cuadro 11). De acuerdo con el análisis estadístico para el porcentaje de inhibición de cada bacteria, el testigo absoluto y las diferentes concentraciones de DMSO son estadísticamente iguales en todas las bacterias (Cuadro 11), con esto se confirma que el disolvente DMSO no afectó en el control antibacterial, atribuyendo el control de cada bacteria a los componentes bioactivos presentes en el extracto de etanol de *R. muelleri*. Vega-Menchaca et al. (2013), mencionaron que al usar el solvente DMSO como control negativo para disolver el extracto metanólico de *Leucophyllum*

frutescens, para el control de *Staphylococcus aureus*, este no mostró inhibición del crecimiento bacteriano con el extracto probado. De igual manera reportaron inhibición con el extracto de *L. frutescens* a concentraciones de 250, 500 y 1000 µg/ mL, estos resultados concuerdan con lo reportado en este trabajo, donde el uso del extracto de etanol de *R. muelleri* presentó inhibición a concentraciones a partir de 125 ppm.

Para las bacterias *S. epidermidis*, *P. vulgaris* y *E. coli* se observó una baja inhibición por lo que se consideró que para estas bacterias se les aumenta la concentración del extracto, para obtener una mayor inhibición.

En la Prueba Dos, los resultados del análisis estadístico mostraron diferencias altamente significativas ($p < 0.01$), ya que al aumentar la concentración a 1,500 y 2,000 ppm en las bacterias *S. epidermidis*, *P. vulgaris* y *E. coli* el número de UFC/ mL fue nulo (cero), por consiguiente el resultado del porcentaje de inhibición fue del 100 % (Cuadro 12). El extracto de *R. muelleri* demostró una mayor capacidad inhibitoria contra todas las cepas bacterianas, que lo reportado por Nasar-Abbas and Kadir-Halkman (2004), los cuales reportaron que el efecto inhibitor de diferentes extractos acuosos de *R. coriaria* sobre el crecimiento de 12 bacterias, se incrementó con el aumento de la concentración del extracto, de 0.5 a 5% (w/v), concentraciones equivalentes a 5,000 y 50,000 ppm, respectivamente. Concentraciones que son muy superiores a las utilizadas con el extracto de *R. muelleri*.

Cuadro 11. Comparación de Medias de la Prueba Uno del Efecto Antibacterial del Extracto de Etanol de *R. muelleri* Sobre Seis Bacterias

Concentración (ppm)	<i>E. aerogenes</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>P. vulgaris</i>		<i>P. mirabilis</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. hauseri</i>	
	UFC/mL ***	% Inhibición	UFC/mL ***	% Inhibición	UFC/mL ***	% Inhibición	UFC/mL ***	% Inhibición	UFC/mL ***	% Inhibición	UFC/mL ***	% Inhibición
TA	160,000 d	0 c	570,000 ab	0 c	425,000 bc	0 c	645,000 d	0 c	680,000 b	0 d	2,875,500 c	0 c
DMSO 125	460,000 a	0 c	730,000 a	0 c	490,000 a	0 c	790,000 b	0 c	510,000 c	0 d	3,500,000 a	0 c
DMSO 250	410,000 b	0 c	660,000 ab	0 c	465,000 ab	0 c	670,000 cd	0 c	690,000 b	0 d	2,930,000 c	0 c
DMSO 500	160,000 d	0 c	620,000 ab	0 c	425,000 bc	0 c	890,000 a	0 c	890,000 a	0 d	3,120,000 b	0 c
DMSO 1000	170,000 d	0 c	580,000 ab	0 c	435,000 abc	0 c	740,000 bc	0 c	780,000 ab	-36.84 e	3,450,000 a	0 c
<i>R. muelleri</i> 125	256,700 c	-60.42 d	156,700 c	72.51 ab	390,000 c	8.237 c	116,700 e	81.91 b	300,000 d	55.88 b	190,000 e	93 a
<i>R. muelleri</i> 250	100,000 e	37.5 b	100,000 c	82.46 a	296,700 d	30.19 b	10,000 f	98.45 a	470,000 c	30.88 c	65,000 e	98 a
<i>R. muelleri</i> 500	160,000 d	0 c	516,700 b	9.357 c	270,000 d	36.47 b	0 f	100 a	410,000 cd	39.71 bc	585,000 d	80 b
<i>R. muelleri</i> 1000	6,667 f	95.83 a	300,000 c	47.37 b	150,000 e	64.71 a	0 f	100 a	106,700 e	84.31 a	80,000 e	97 a
CV	11.16	183.04	26.36	84.42	10.00	55.23	11.82	16.61	14.58	70.70	4.49	6.42

Cuadro 12. Comparación de Medias de la Prueba Dos del Efecto Antibacterial del Extracto de Etanol de *R. muelleri* Sobre Tres Bacterias

Concentración (ppm)	<i>S. epidermidis</i>		<i>P. vulgaris</i>		<i>E. coli</i>	
	UFC/mL	% Inhibición	UFC/mL	% Inhibición	UFC/mL	% Inhibición
TA	165000 a	0 b	55000 a	0 b	490000 a	0 b
<i>R. muelleri</i> 1500	0 b	100 a	5000 b	90.91 a	0 b	100 a
<i>R. muelleri</i> 2000	0 b	100 a	0 b	100 a	0 b	100 a
CV	120.72	0.00	20.41	8.25	31.81	0.00

El efecto de la actividad antibacterial de las diferentes concentraciones del extracto de *R. muelleri* sobre las bacterias se puede observar también en el Cuadro 13, donde por medio del análisis Probit se observó que las MIC₅₀ y MIC₉₀ variaron según la bacteria. El mejor efecto antibacteriano se presentó para *P. hauseri* con MIC₅₀ de 3.67 ppm y MIC₉₀ de 63.15 ppm; seguido de *P. mirabilis* (MIC₅₀ de 86.64 ppm y MIC₉₀ de 152.55 ppm), *S. epidermidis* (MIC₅₀ de 276.85 ppm y MIC₉₀ de 102.49 ppm), *E. coli* (MIC₅₀ de 258.01 ppm y MIC₉₀ de 1463 ppm), *P. vulgaris* (MIC₅₀ de 512.63 ppm y MIC₉₀ de 1707 ppm) y *E. aerogenes* (MIC₅₀ de 554.76 ppm y MIC₉₀ de 1642 ppm).

Cuadro 13. Concentraciones Mínimas Inhibitorias (MIC₅₀ y MIC₉₀) del Extracto de Etanol de *R. muelleri* Sobre Seis Bacterias

Bacteria	95 % Fiducial Limits			95 % Fiducial Limits			CHI ²
	MIC ₅₀ (ppm)	Lower	Upper	MIC ₉₀ (ppm)	Lower	Upper	
<i>E. aerogenes</i>	554.76			1,642.00			2.36
<i>E. coli</i>	258.01	118.71	405.41	1,463.00	841.77	5,394.00	2.12
<i>P. hauseri</i>	3.67	0.04	15.50	63.15	14.38	107.08	1.96
<i>P. mirabilis</i>	86.64	68.88	99.13	152.55	140.41	168.04	1.96
<i>P. vulgaris</i>	512.63	413.22	627.33	1,707.00	1,295.00	2,556.00	2.12
<i>S. epidermidis</i>	276.85	99.12	11,331.00	102.49	0.00	185.31	2.36

La actividad antibacterial reportada en este estudio por el extracto de etanol de *R. muelleri* contra bacterias no fue demostrado anteriormente, sin embargo es comparable con lo realizado para otras especies del mismo género que se encuentran reportadas en la literatura. Kossah, et al. (2013) reportaron la evaluación antimicrobial del extracto de etanol de los frutos de *R. coriaria*, contra 10 microorganismos (bacterias Gram negativas, Gram positivas y tres levaduras), el extracto mostró mejor actividad contra las bacterias ensayadas en

comparación con las levaduras. Las MIC₁₀₀ del extracto frente a bacterias Gram-positivas variaron de 500 a 1500 ppm, mientras que el MIC₁₀₀ con bacterias Gram-negativas fue mayor (1,000-3,500 ppm).

Ali-Shtayeh et al. (2013), reportaron la actividad antimicrobiana de 56 plantas medicinales palestinas contra agentes etiológicos de acné vulgaris, principalmente *Propionibacterium acnes* y *Staphylococcus aureus*. Entre las plantas más activas destacaron *R. coriaria* y *Ricinus communis* ya que presentaron un fuerte efecto inhibitor sobre *P. acnes* y la mayoría de otras bacterias de prueba. El extracto de *R. coriaria*, tuvo el mayor efecto antimicrobiano contra *P. acnes* (MIC 6000 ppm, concentración mínima bactericida (MBC) a 6000 ppm), *S. aureus* (MIC 4000 ppm, MBC 6000 ppm), *E. coli* (MIC 6000 ppm, MBC 8000 ppm) y *P. aeruginosa* (4000 y 6000ppm), valores superiores a los utilizados en este trabajo, en el cual con el extracto de etanol de *R. muelleri*, se requirió una concentración máxima de 2000 ppm para inhibir al 100% de las bacterias.

Ertürk (2010), reportó actividades antibacterianas y antifúngicas de los extractos etanólicos crudos de 41 especies de plantas medicinales contra cuatro bacterias y dos hongos: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger*. Dentro de las 41 especies de plantas, 39 mostraron actividad antibacteriana entre ellas *R. coriaria*. La plantas con mayor actividad antibacteriana fueron: *C. cyminum*, *J. officinale*, *T. capitatus*, *V. album*, *T. sorbifolium*, *P. anisum*, *G. officinalis* *L. orientalis*, *R. coriaria*, *A. glutinosa*, *P. officinalis* y *C. sinensi*.

Motaharinia et al. (2012) reportaron la actividad antibacteriana de los extractos de *Zataria multiflora* Boiss., *R. coriaria* (zumaque), *Mentha piperita* L. y *Ocimum basilicum* L. contra las cepas de *Brucella*, aisladas de pacientes con brucelosis. El extracto de *Z. multiflora*, y de *M. piperita* tuvieron efectos altamente antibacterianos en las cepas de *Brucella*. La media MIC y MBC del extracto de *Z. multiflora* fue 1,237 g/ mL y 5,902 g/ mL. Por otra parte, para el extracto de

zumaque, la media MIC y MBC fue 3255,2 g/ mL y 9,027 g/ mL y de *M. piperita* fue 5,642 g/ mL.

CONCLUSIONES

El extracto de *R. muelleri*, debido a la eficacia de compuestos de naturaleza esterólica, fenólica y de flavonoides, inhibió el crecimiento micelial de *F. oxysporum in vitro* y en plantas de tomate, así como el crecimiento bacterial de *E. aerogenes*, *S. epidermidis*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. hauseri* y *E. coli*.

Por su seguridad ambiental y de origen natural este extracto es una alternativa para ser usada como un microbicida botánico. La tendencia del uso de microbicidas basados en metabolitos secundarios de las plantas, se ha incrementado en relación directa con el desarrollo de tendencias ambientales y de manejo integrado, ganando cada vez más terreno en el control de hongos y bacterias dañinas.

REFERENCIAS

- Abu-Reidah, I.M., Ali-Shtayeh, M.S., Jamous, R.M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., 2015. HPLC–DAD–ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. *Food Chem.* 166, 179-191.
- Adwan, G., Abu-Shanab, B., Adwan, K., 2010. Antibacterial activities of some plant extracts alone and in combination with different antimicrobials against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 3, 266-269.
- Aganga, A.A., Mosase, K.W., 2001. Tannin content, nutritive value and dry matter digestibility of *Lonchocarpus capassa*, *Zizyphus mucronata*, *Sclerocarya birrea*, *Kirkia acuminata* and *Rhus lancea* seeds. *Anim. Feed Sci. Tech.* 91, 107–113.
- Al-Boushi, M.A., Housam Haj Hamdo, H.H., Herballi, J., 2014. Extraction and study of the phenolic compounds in the leaves and sticks of the Syrian sumac plant (*Rhus coriaria* L.). *Int. J. Chem. Tech. Res.* 6, 2414–2420.
- Ali-Shtayeh, M.S., Al-Assali, A.A., Jamous, R.M., 2013. Antimicrobial activity of Palestinian medicinal plants against acne-inducing bacteria. *African J. Microbiol. Res.* 7, 2560-2573.
- Andrés-Hernández, A.R., Morrone, J.J., Terrazas, T., López-Mata, L., 2006. Análisis de trazos de las especies mexicanas de *Rhus* subgénero *lobadium* (Angiospermae: Anacardiaceae). *Interciencia/Caracas* 31, 900-904.
- Andrés-Hernández, A.R., Terrazas, T., 2006. Anatomía foliar y del pecíolo de especies del género *Rhus* s. str. (Anacardiaceae). *Bol. Soc. Bot. Méx.* 78, 95-106.
- Anwer, T., Sharma, M., Khan, G., Iqbal, M., Ali, M.S., Alam, M.S., Safhi, M.M. and Gupta, N., 2013. *Rhus coriaria* ameliorates insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus (niddm) rats. *Acta Pol. Pharm.* 70, 861-867.
- Araujo, D., Rodríguez, D., Sanabria, M.E., 2008. Respuesta del hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, causante del Mal de Panamá, a algunos extractos vegetales y fungicidas. *Fitopatol. Venez.* 21, 2-8.
- Ascencio-Álvarez A., López-Benítez A., Borrego-Escalante F., Rodríguez-Herrera S.A., Flores-Olivas A., Jiménez-Díaz F., Gámez-Vázquez, A.J., 2008. Marchitez del tomate. I: Presencia de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 26, 114-120.

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1990. Official Methods of Analysis, 15th.ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, pp. 245
- Barkley, F., 1937. A monographic study of *Rhus* and its immediate allies in North and Central America, including the West Indies. Ann. Mo. Bot. gard. 24, 265-498.
- Ben-Jabeur, M., Ghabri, E., Myriam, M., Hamada, W., 2015. Thyme essential oil as a defense inducer of Tomato against gray mold and Fusarium wilt. Plant Physiol. Biochem. 94, 35-40.
- Borchert, V.E., Czyborra, P., Fetscher, C., Goepel, M., Michel, M.C., 2004. Extracts from *Rhois aromatica* and *Solidaginis virgaurea* inhibit rat and human bladder contraction. N-S Arch. Pharmacol. 369, 281-286.
- Borrero, C., Trillas, M.I., Ordovás, J., Tello, J.C., Aviles, M., 2004. Predictive factors for the suppression of *Fusarium* wilt of tomato in plant growth media. Phytopathol. 94, 1094-1101.
- Burketová, L., Trdá, L., Ott, P. G., Valentová, O., 2015. Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens. Biotechnol. Adv. 33, 994-1004.
- Burrill, L. C., Cárdenas, J., Locatelli, E., 1976. Field manual for weed control research. Field manual for weed control research, 1-57.
- Cáceres-Rueda de León, I., Colorado-Vargas, R., Salas-Muñoz, E., Muñoz-Castellanos, L.N., Hernández-Ochoa, L., 2014. Actividad antifúngica in vitro de extractos acuosos de especias. Rev. Mex. Fitopatol. 31, 105-112.
- Castillo, F., Hernández, D., Gallegos, G., Mendez, M., Rodríguez, R., Reyes, A., Aguilar, C.N., 2010. In vitro antifungal activity of plant extracts obtained with alternative organic solvents against *Rhizoctonia solani* Kühn. Ind. Crops Prod. 32, 324–328.
- Chitwood, D.J., 2002. Phytochemical based strategies for nematode control. Annu. Rev. Phytopathol. 40, 221-249.
- Celis, A., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, J., Delgado, W., Cuca, L.E., 2008. Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia *Piperaceae*. Una revisión. Agron. Colomb. 26, 97-106.
- Céspedes, C.L., Avila, J.G., Martínez, A., Serrato, B., Calderón-Mugica, J.C., Salgado-Garciglia, R., 2006. Antifungal and antibacterial activities of Mexican tarragon (*Tagetes lucida*). J. Agr. Food Chem. 54, 3521-3527.
- De Granada, E.G., De Amézquita, M.O., Bautista, G.R., Valencia, H., 2001. *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. Acta Bioló. Colomb. 6, 7.

- Domingo, D., López-Brea, M., 2003. Plantas con acción antimicrobiana. Rev. Esp. Quimioterap. 16, 385-393.
- Ertürk, O., 2010. Antibacterial and antifungal effects of alcoholic extracts of 41 medicinal plants growing in Turkey. Czech J. Food Sci. 28, 53-60.
- FAOSTAT. Consulta de bases de datos de producción mundial y comercio internacional de Tomate. De: http://faostat3.fao.org/browse/rankings/commodities_by_regions/S Consultado en Agosto 2015.
- Fazeli, M.R., Amin, G., Attari, M.M.A., Ashtiani, H., Jamalifar, H., Samadi, N., 2007. Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-e shirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria. Food control 18, 646-649.
- Finney, D.J., 1971. Probit analysis. Cambridge University Press, London
- Gabr, S.A., El-Metwally, M.M., Al-Ghadir, A.H., 2014. Antioxidant and antibacterial active constituents of *Rhus coriaria*. Biotechnology 13, 37-45.
- Gamboa-Alvarado, R., Hernández-Castillo, F.D., Guerrero-Rodríguez, E., Sánchez-Arizpe, A., Lira-Saldivar, R.H., 2003. Inhibición del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora infestans* Mont. (De Bary) con extractos vegetales metanólicos de hojaseén (*Flourensia cernua* D.C.), mejorana (*Origanum majorana* L.) y trompetilla [*Bouvardia ternifolia* (Ca.) Schlecht]. Rev. Mex. Fitopatol. 21, 13-18.
- Garcés de Granada, E., Orozco de Amézquita, M., Rocío-Bautista, G., Valencia, H., 2001. *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. Acta Biol. Colomb. 6, 7-25.
- García-Mateos, R., Ibarra-Estrada, E., Nieto-Ange, R., 2013. Antioxidant compounds in hawthorn fruits (*Crataegus* spp.) of Mexico. Rev. Mex. Biodiv. 84, 1298-1304.
- García-Rodríguez, C., Ruiz-Olmos, C., Palmero-Llamas, D., Garcia, C., Díaz-Pérez, M., Camacho-Ferre, F., Tello-Marquina, J., 2012. Comportamiento de patrones de tomate frente a la patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Acta Hort. 60, 318-320.
- Guerrero-Rodríguez, E., Solís-Gaona, S., Hernández-Castillo, F.D., Flores-Olivas, A., Sandoval-López, V., Jasso-Cantú, D., 2007. Actividad biológica *in vitro* de extractos de *Flourensia cernua* D. C. en patógenos de postcosecha: *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. y *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc. (In Spanish). Rev. Mex. Fitopatol. 25, 48-53

- González-Acosta, A., Mateos-Rocha, R.A., López, M., De la luz-Hernández, M., González-Castro, A., 2013. Alternativas para el manejo de *Damping off* en plántulas de tomate *Lycopersicon esculentum* Mill (L., 1753) (Solanales: Solanaceae). Rev. Biol. Agropecuaria Tuxpan 1, 1-10.
- González-Morales, S., Flores-López, M.L., Benavidez-Mendoza, A., Flores-Olivas, A., 2011. Actividad Inhibitoria del extracto de *Heliopsis longipes* sobre *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Rev. Mex. Fitopatol. 29, 146-153.
- Hernández-Castillo, F.D., Castillo-Reyes, F., Gallegos-Morales, G., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar-González, C.N., 2010. *Lippia graveolens* and *Carya illinoensis* organic extracts and there *in vitro* effect against *Rhizoctonia solani* Kuhn. Am. J. Agric. Biol. Sci 5, 380–384.
- Hernández-Magaña, R., Hernández-Oria, J. G., Chávez, R., 2012. Datos para la conservación florística en función de la amplitud geográfica de las especies en el semidesierto Queretano, México. Acta Bot. Mex. 99, 105-140.
- Hernández-Martínez, R., López-Benítez, A., Borrego-Escalante, F., Espinoza-Velázquez, J., Sánchez-Aspeytia, D., Maldonado-Mendoza, I. E., López-Ochoa, L. A., 2014. Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en predios tomateros en San Luis Potosí. Rev. Mex. Cienc. Agríc., 5, 1169-1178.
- Itidel, C., Chokri, M., Mohamed, B., Yosr, Z., 2013. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content variation among Tunisian natural populations of *Rhus tripartite* (Ucria) Grande and *Rhus pentaphylla* Desf. Ind. Crops Prod. 51, 171-177.
- Jasso de Rodríguez, D., Angulo-Sánchez, J.L., Hernández-Castillo, F.D., 2006. An overview of the activity of Mexican plants against pests and diseases. In: Rai, M., Carpinella, M. (Eds.), Naturally Occurring Bioactive Compunds: A New and Safer Alternative for Control of Pests and Diseases. Elsevier, 382.
- Jasso de Rodríguez, D., Hernández-Castillo, D., Angulo-Sánchez, J.L., Rodríguez-García, R., Quintanilla, J. V., Lira-Saldivar, R.H., 2007. Antifungal activity in vitro of *Flourensia spp.* extracts on *Alternaria sp.*, *Rhizoctonia solani*, and *Fusarium oxysporum*. Ind. Crops Prod. 25, 111-116.
- Jasso de Rodríguez, D., Rodríguez-García, R., Hernández-Castillo, F.D., Aguilar-González, C.N., Sáenz-Galindo, A., Villarreal-Quintanilla, J.A., Moreno-Zuccolotto, L.E., 2011. *In vitro* antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahuan Desert plants against postharvest fruit fungi. Ind. Crops Prod. 34, 960-966.

- Jasso de Rodríguez, D., Trejo-González, F. A., Rodríguez-García, R., Díaz-Jimenez, M. L. V., Sáenz-Galindo, A., Hernández-Castillo, F. D., Peña-Ramos, F. M., 2015. Antifungal activity *in vitro* of *Rhus muelleri* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Ind. Crops Prod.* 75, 150-158.
- Jiménez, E.V., Mosquera, O.M., 2015. Actividad antifúngica *in vitro* de tres extractos de plantas frente a *Botrytis cinerea* (Moho gris). *Salud Soc. Uptc.* 1, 16-21.
- Kosar, M., Bozan, B., Temelli, F., Baser, K. H. C., 2007. Antioxidant activity and phenolic composition of sumac (*Rhus coriaria* L.) extracts. *Food Chem.* 103, 952-959.
- Kossah, R., Nsabimana, C., Zhang, H., Chen, W. 2010. Optimization of Extraction of Polyphenols from Syrian Sumac (*Rhus coriaria* L.) and Chinese Sumac (*Rhus typhina* L.) Fruits. *Res. J. Phytochemistry* 4, 146–153.
- Kossah, R., Zhang, H., Chen, W., 2011. Antimicrobial and antioxidant activities of Chinese sumac (*Rhus typhina* L.) fruit extract. *Food Control* 22, 128-132.
- Kossah, R., Nsabimana, C., Zhang, H., Chen, W., 2013. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of Syrian Sumac fruit extract. *J. Nat. Prod.* 6, 96-102.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., Nychas, G. J., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91, 453-462.
- López, Y., Pineda, J., Hernández, A., Ulacio, D., 2010. Efecto diferencial de seis aislamientos de *Trichoderma* sobre la severidad de *Rhizoctonia solani*, desarrollo radical y crecimiento de plantas de maíz. *Bioagro* 22, 37-42.
- López-Benítez, A., López-Betancourt, S.R., Vázquez-Badillo, M.E., Rodríguez-Herrera, S.A., Mendoza-Elos, M., Padrón-Corral, E., 2005. Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* Schlechtend.f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder and Hansen *Rhizoctonia solani* Kühn, and *Verticillium dahlia* Kleb., mediante extractos vegetales acuosos (In Spanish). *Rev. Mex. Fitopatol.* 23, 183–190.
- Mahlo, S. M., McGaw, L. J., Eloff, J. N., 2010. Antifungal activity of leaf extracts from South African trees against plant pathogens. *Crop Prot.* 29, 1529-1533.
- Marzano, M., Gallo, A., Altomare, C., 2013. Improvement of biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum* vs. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* through UV-induced tolerance to fusaric acid. *Biol. Control* 67, 397-408.

- Mavlyanov, S.M., Islambekov, Sh.Yu., Karimdzhanov, A.K., Ismailov, A.I., 1997. Anthocyanins and organic acids of the fruits of some species of sumac. *Chem. Nat. Compd.* 33, 209.
- McCutcheon, A.R., Ellis, S.M., Hancock, R.E.W., Towers, G.H.N., 1994. Antifungal screening of medicinal plants of British Columbian native peoples. *J. Ethnopharmacol.* 44, 157-169.
- McGovern, R. J., 2015. Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. *Crop Prot.* 73, 78-92.
- Montes-Belmont, R., Cruz-Cruz, V., Martínez-Martínez, G., Sandoval-García, G., García-Licona, R., Zilch-Domínguez, S., Carvajal-Moreno, M., 2000. Propiedades antifúngicas en plantas superiores. Análisis retrospectivo de investigaciones. *Revista Mexicana de Fitopatología, Sonora*, 18(2), 125-131.
- Motaharinia, Y., Rezaee, M. A., Hazhir, M.S., Zandi, F., Shapouri, R., Hakhamaneshi, M. S., Rashidi, A., Rahmani, M.R., 2012. Evaluation of the antibacterial activity of *Zataria multiflora* Boiss., *Rhus coriaria* L.(sumac), *Mentha piperita* L., and *Ocimum basilicum* L. extracts on *Brucella* strains isolated from brucellosis patients. *Turkish J. Medical Sci.* 42, 816-822.
- Muthulakshmi, A., Margret, R.J., Mohan, V., 2012. GC–MS Analysis of bioactive components of *Feronia elephantum* Correa (Rutacea). *J. App. Pharm. Sci.* 2, 69–74.
- Myant, N.B., 1981. Sterols in biological membranes. In: *The Biology of Cholesterol and Related Steroids*, First Ed. Williams Heinemann Medical Books (Publisher), Chichester, London, pp. 338–351 (Chapter 7).
- Nasar-Abbas, S.M., Kadir-Halkman, A., 2004. Antimicrobial effect of water extract of sumac (*Rhus coriaria* L.) on the growth of some food borne bacteria including pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 97, 63-69.
- Olchowik, E., Sciepek, A., Mavlyanov, S., Abdullajanova, N., Zamaraeva, M., 2012. Antioxidant capacities of polyphenols from Sumac (*Rhus typhina* L.) leaves in protection of erythrocytes against oxidative damage. *B.M.C. Prev. Nut.* 2, 99-105.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), 2001. Strategy to contain resistance to antimicrobial drugs. *Rev. Panam. Salud Pública* 10, 284-294.
- Özcan, M., Haciseferogullari, H., 2004. A condiment [sumac (*Rhus coriaria* L.) fruits]: Some physicochemical properties. *Bulg. J. Plant Physiol.* 30,74–84.
- Pell, S.K., Mitchell, J.D., Miller, A.J., Lobova, T.A., 2011. Anacardiaceae. In: K. Kubitzki (Ed.). *The Families and Genera of Vascular Plants*. Springer Heidelberg Dordrecht, London-New York 10, 7-50.

- Ramaiah, A.K., Garampalli, R.K.H., 2015. In vitro antifungal activity of some plant extracts against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. Asian J. Plant Sci. Res., 22–27.
- Ramírez-Rueda, R.Y., Mojica-Ávila, D.N., 2014. Actividad antibacteriana de extractos de *Gnaphalium polycephalum* Michx contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Rev. Investig. Salud Univ. Boyacá 1, 63-71.
- Rayne, S., Mazza, G., 2007. Biological activities of extracts from sumac (*Rhus* spp.): a review. Plant Foods Hum. Nutr. 62, 165-75.
- Reichling, J., Neuner, A., Sharaf, M., Harkenthal, M., Schnitzler, P., 2009. Antiviral activity of *Rhus aromatica* (fragrant sumac) extract against two types of herpes simplex viruses in cell culture. Die Pharmazie - An Int. J. Pharm. Sci. 64, 538-541.
- Raodah, M., Alia, Z.H., Faleeha, H.H., 2014. The antioxidant and antimicrobial of Syrian sumac (*Rhus coriaria*) fruit extracts. J. Nat. Sci. Res. 4, 36–40.
- Rodríguez, D. A., Montilla, J. O., 2002. Disminución de la marchitez causada por *Fusarium* en tomate con extracto de *Citrus paradisi*. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 63, 46-50.
- Rodríguez-Pedroso, A.T., Ramírez-Arrebato, M.A., Bautista-Banos, ~ S., Cruz-Triana, A., Rivero, D., 2012. Actividad antifúngica de extractos de Acacia farnesiana sobre el crecimiento in vitro de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (In Spanish). Revista Científica UDO Agrícola 12, 91–96.
- Rodríguez-Jasso, R.M., Mussato, S.I., Pastrana, L., Aguilar, N.C., Teixeira, J., 2014. Chemical composition and antioxidant activity of sulphated polysaccharides extracted from *Fucus vesiculosus* using different hydrothermal processes. Chem. Papers 68, 203–209.
- Salazar, L., Sanabria, N., Aponte, G., Alcano, M., Herrera, R., Colmenares, D., Magaña, S., Alemán, L., Magaña, S., 2011. Efectividad de aislamientos de *Trichoderma* spp. en el control de la fusariosis del tomate en condiciones *in vitro* e *in vivo*. Bioagro 23, 185-190.
- Sarada, K., Margret, R.J., Mohan, V.R., 2011. GC–MS determination of bioactive components of *Naringi crenulata* (Roxb) Nicolson. Int. J. Chem. Tech. 3, 1548–1555.
- Sathiyabama, M., Charles, R. E., 2015. Fungal cell wall polymer based nanoparticles in protection of tomato plants from wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Carbohyd. Polym. 133, 400-407.
- Saxena, G., McCutcheon, A.R., Farmer, S., Towers, G.H.N., Hancock, R.E.W., 1994. Antimicrobial constituents of *Rhus glabra*. J. Ethnopharmacol. 42, 95-99.

- Sen, S., Cihat, T., Tırak, K., 2009. Fixation, leachability, and decay resistance of wood treated with some commercial extracts and wood preservative salts. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 63, 135–141
- Shabbir, A., 2012. *Rhus coriaria* L. inn, a plant of medicinal, nutritional and industrial importance: A review. *JAPS, J. Anim.Plant.Sci.* 22, 505-512.
- Sheela, D., Uthayakumari, F., 2013. GC–MS analysis of bioactive constituents from coastal sand dune taxon *Sesuvium portulacastrum* L. *Biosci. Discovery* 4, 47–53.
- SIAP. Producción agrícola, primavera- verano 2014, tomate rojo. De: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/> Consultado en Agosto 2015.
- Steiner, A.A., 1966. The influence of chemical composition of a nutrient solution on the production of tomato plants. *Plant Soil* 24, 454-465.
- Tropicos, 2014. Tropicos recovered on October 27, 2014. *Ann. Missouri Bot. Garden* <http://www.tropicos.org/Name/1300180>.
- Vega-Menchaca, M. del C., Verde-Star, J., Oranday-Cárdenas, A., Morales-Rubio, M.E., Núñez-González, M.A., Rivera-Guillén, M.A., Serrano-Gallardo, L.B., Rivas-Morales, C., 2013. Actividad antibacteriana y citotóxica de *Leucophyllum frutescens* (Berl) IM Johnst del Norte de México contra *Staphylococcus aureus* de aislados clínicos. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 44, 24-30.
- Vásquez-Covarrubias, D. A., Montes-Belmont, R., Jiménez-Pérez, A., Flores-Moctezuma, H. E., 2013. Aceites esenciales y extractos acuosos para el Manejo *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *F. solani*. *Rev. Mex. Fitopatol.* 31, 170-179.
- Wang, B., Jeffers, S. N., 2000. *Fusarium* root and crown rot: a disease of container-grown hostas. *Plant Dis.* 84, 980-988.
- Wang, R.R., Gu, Q., Wang, Y.H., Zhang, X.M., Yang, L.M., Zhou, J., Chen, J.J., Zheng, Y.T., 2008. Anti-HIV-1 activities of compounds isolated from the medicinal plant *Rhus chinenses*. *J. Ethnopharmacol.* 117, 249–256.
- Yi, T., Miller, A. J., Wen, J., 2004. Phylogenetic and biogeographic diversification of *Rhus* (Anacardiaceae) in the Northern Hemisphere. *Mol. Phylogenet. Evol.* 33, 861-879.
- Young, D., 1978. Re-evaluation of the section of *Rhus* L. sub genus *Lobadium* (Raf) T. and G. (Anacardiaceae). *Brittonia* 30, 411-415.