

## Actividad inhibitoria de extractos alcohólicos de hongos comestibles contra *Rhizoctonia solani*

Mónica de Jesús Narváez-Montaño<sup>1</sup>

Ma. Remedios Mendoza-López<sup>2</sup>

Gabriela Sánchez-Viveros<sup>1</sup>

Juan José Almaraz-Suarez<sup>3</sup>

Rosalba Argumedo-Delira<sup>1,2§</sup>

<sup>1</sup>Posgrado en Ciencias Agropecuarias-Facultad de Ciencias Agrícolas-Universidad Veracruzana. Circuito Gonzalo Aguirre Beltrán s/n, Xalapa, Veracruz, México. CP. 91000. (mjnmescorp@gmail.com; gabrielauv@gmail.com). <sup>2</sup>Instituto de Química Aplicada-Universidad Veracruzana. Luis Castelazo Ayala s/n, Colonia Industrial Animas, Xalapa, Veracruz, México. CP. 91190. (remendoza@uv.mx). <sup>3</sup>Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Estado de México, México. CP. 56230. (jalmaraz@hotmail.com).

Autor para correspondencia: rargumedo@uv.mx.

### Resumen

Las enfermedades fúngicas representan una de las causas de pérdidas en cultivos anualmente. *Rhizoctonia solani* es un hongo patógeno de distribución mundial asociado a enfermedades de raíces y tubérculos de diferentes cultivos; ocasiona pérdidas económicas importantes en plantas perennes y anuales, incluyendo casi todos los cultivos hortícolas. Para mitigar las pérdidas por hongo se ha usado fungicidas de origen sintético; sin embargo, muchas de estas sustancias están asociadas a carcinogenicidad y son tóxicas para el ambiente. Los hongos macromicetos comestibles son una fuente de compuestos antifúngicos para controlar enfermedades en cultivos agrícolas. Este trabajo evaluó la actividad antifúngica de extractos de hongos comestibles (*Lactarius deliciosus*, *Ustilago maydis*, *Amanita jacksonii* y *Amanita rubescens*) contra el fitopatógeno *R. solani* por medio de tres técnicas: difusión de pozos, discos y dilución en placa. Los resultados muestran que con la difusión de pozos no se observó ningún efecto sobre el crecimiento de *R. solani* con los extractos alcohólicos y sus diluciones. Mientras con la difusión de discos se observó un crecimiento más lento de manera cualitativa en comparación con los controles de *R. solani* con el extracto etanólico de *A. jacksonii* y en su dilución 1:1 de metanol-agua. En la dilución en placa se encontró que la dilución etanol-agua 1:1 de *L. deliciosus* tuvo 88% de inhibición sobre el crecimiento de *R. solani*, seguido del extracto de etanol de *L. deliciosus* (65%), extracto de metanol de *U. maydis* (63%) y extracto de metanol de *L. deliciosus* (57%). Por lo cual, los extractos y la dilución se deben estudiar a mayor profundidad, al ser probados en un sistema *in vivo* e identificar los metabolitos secundarios presentes.

**Palabras clave:** *Lactarius*, *Ustilago*, fitopatógeno.

Recibido: mayo de 2023

Aceptado: junio de 2023

## Introducción

Las enfermedades fúngicas representan una de las principales causas de pérdidas en cultivos anualmente, causando 60% de ellas durante la producción y post-cosecha (Sommer *et al.*, 2002). *Rhizoctonia solani* es un agente causal patógeno de distribución mundial asociado a enfermedades de raíces y tubérculos de diferentes cultivos que ocasiona pérdidas económicas importantes. A continuación, se menciona las familias y cultivos en donde se ha encontrado este fitopatógeno. Poaceae o Gramínea: arroz, trigo, cebada, avena; Fabaceae: soja, maní, frijol seco, alfalfa, garbanzos, lentejas, guisantes; Solanaceae: tabaco y papa; Amaranthaceae: remolacha azucarera; Brassicaceae: canola; Rubiaceae: café; Malvaceae: algodón y Asteraceae: lechuga (Ajayi y Bradley, 2018).

Este patógeno necrotrófico (requiere primero matar las células de su hospedante y después tomar los nutrientes) es uno de los más destructivos que se encuentran en el suelo (Khaledi *et al.*, 2015), dentro de las enfermedades que comúnmente ocasionan se encuentra el llamado ahogamiento de las plántulas y la pudrición de las raíces (Arcos y Zúñiga, 2015). Los síntomas ocasionados por el complejo patológico de *R. solani* son observados en las partes subterráneas y aéreas de las plantas en dos fases: 1) cáncer del tallo que es la infección de las plantas en crecimiento; y 2) costra negra o infección de tubérculos con la formación de esclerosios. La ‘costra negra’ es el signo más evidente de enfermedad causada por *R. solani* y se caracteriza por esclerosios negros de tamaños irregulares en el tubérculo que en un estado de severidad puede llegar a deformarlo y agrietarlo (Hide *et al.*, 1973; Frank y Leach, 1980; Tsror, 2010).

Para contrarrestar los efectos de este fitopatógeno se ha hecho uso de fungicidas pertenecientes a diferentes grupos químicos con diversos principios activos. Se han reportado cuatro grupos principalmente: 1) inhibidores externos de quinona (QoI) y principios activos como azoxistrobina, piraclostrobina y trifloxistrobina; 2) inhibidores del succinato deshidrogenasa (SDHI) y principios activos como carboxina, penflufen y sedaxano; 3) inhibidores de la desmetilación (DMI) y principios activos como penconazol y proticonazol; y 4) inhibidores de los fenilpirroles (PP) con el principio activo fludioxonil (Ajayi y Bradley, 2018).

Sin embargo, el comité de acción de resistencia a fungicidas (FRAC) por sus siglas en inglés declaró que el riesgo de desarrollo de resistencia a los fungicidas es alto ya que estos actúan en un solo sitio dentro de una ruta metabólica del fitopatógeno, por lo que la dependencia de estos fungicidas químicos para su control aumenta el riesgo de que estos organismos sean resistentes a estas sustancias (FRAC, 2017). Si bien el uso de fungicidas de amplio espectro ayuda en el control de las enfermedades generadas por *R. solani*, estas sustancias son altamente tóxicas y han ocasionado graves problemas ambientales y de salud (asociadas a carcinogenicidad) (Patiño *et al.*, 2020).

Las estrategias para el control de este fitopatógeno son limitadas debido a las altas tasas de supervivencia por la formación de esclerosios, se han buscado otras alternativas naturales y menos tóxicas. Tal es el caso de extractos de plantas con actividad antifúngica, un ejemplo es el trabajo de Al-Askar y Rashad (2010) quienes prueban extractos hidroalcohólicos de cuatro plantas medicinales: canela (*Cinnamomum verum* Presl.), anís (*Pimpinella anisum* L.), semilla negra (*Nigella sativa* L.) y clavo (*Syzygium aromaticum* L. Merr. y Perry) contra *R. Solani* en guisantes (*Pisum sativum* L.).

Encontrando que el extracto de clavo al 1% inhibió por completo el crecimiento radial del hongo; mientras que para los otros extractos hidroalcohólicos (4%) de plantas se observó una inhibición del 90.5 al 100%. Los autores mencionan que el efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de clavo se puede atribuir al eugenol, principal compuesto activo del aceite esencial de esta planta, el cual puede formar enlaces en los sitios activos de las enzimas desactivándolas. En otra investigación Rafiq *et al.* (2021), evaluaron el potencial antifúngico de extractos metanólicos de hojas de cártamo (*Carthamus oxyacantha*) contra *R. solani*, encontrando de 27 al 37% de inhibición en el crecimiento del hongo fitopatógeno. Los efectos observados se les atribuyeron a 95 compuestos encontrados en los extractos metanólicos, entre los que destacan un derivado de la D-ribofuranosa, ftalato y en menor proporción algunos ácidos grasos.

Mientras que en el caso de hongos macromicetos se ha reportado que estos organismos poseen una fuente potencial de compuestos antifúngicos que podrían usarse para controlar patógenos en plantas y humanos (Patiño *et al.*, 2020). Tal es el caso de los metabolitos provenientes de extractos etanólicos de *Amanita rubescens* que presentaron actividad antibacteriana y actividad antioxidante contra *Candida albicans*, *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus* (Martínez *et al.*, 2021). Otro ejemplo, son los glucolípidos (biosurfactantes) obtenidos de *Ustilago maydis* que han presentado actividad antimicrobiana contra *Salmonella enterica* y *S. aureus* (Cortes *et al.*, 2011).

En el caso de los extractos metanólicos de *Lactarius* sp. Se ha reportado su actividad antitumoral y antimicrobiana en contra de *S. aureus*, atribuida a metabolitos como sesquiterpenos, esteroides, compuestos nitrogenados y otros metabolitos secundarios (Feussi *et al.*, 2017). Doğan y Akbaş (2013) reportan la actividad antimicrobiana de extractos de cloroformo, acetona y metanol de *Amanita caesarea* contra cuatro bacterias grampositivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Streptococcus pyogenes*), cinco gramnegativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* y *Salmonella enteritidis*) y una levadura (*Candida albicans*) mediante el método de microdilución, encontrando un efecto inhibitorio alto para *C. albicans* a una concentración de 4.8 µg ml<sup>-1</sup> del extracto de acetona, siguiendo la escala de Craig (1998).

Además, Doğan y Akbaş (2013) reportan que el extracto metanólico presentó el máximo efecto antimicrobiano contra *Staphylococcus pyogenes* y *E. coli* (valores MIC, 78 y 156 mg ml<sup>-1</sup>, según escala de Craig) atribuyéndole este efecto a diterpenos, triterpenos y polisacáridos. Los solventes más utilizados para realizar la extracción de metabolitos en hongos son el agua, etanol, metanol, acetona y acetato de etilo (Elbatrawy *et al.*, 2015) lo cual fue un punto a considerar al realizar los extractos; de igual manera se buscó que los solventes elegidos fueran de fácil acceso y manejo para los productores del sector agrícola, con la finalidad de buscar su aplicabilidad en el futuro.

Cabe mencionar que los reportes sobre el uso de extractos de hongos macromicetos para el control de fitopatógenos son escasos, Patiño *et al.*, 2020; Volcão *et al.*, 2021). Reinoro *et al.* (2013) probaron que los extractos de hongos macromicetos nativos de Chile por medio de la técnica de difusión en disco poseen actividad biológica activa contra hongos fitopatógenos.

El extracto de *Mycena hialinotricha* presentó mayor actividad antifúngica en el crecimiento de *Penicillium notatum*, *Ceratostylis pilifera* y *Rhizoctonia solani* al formar halos de inhibición. Los autores concluyeron que los extractos de hongos comestibles son buenas fuentes de compuestos activos antifúngicos y sugieren la necesidad de seguir investigando el potencial de estos

metabolitos en la industria agroforestal como control de agentes fitopatógenos. Otro estudio que explora el efecto de los metabolitos activos de hongos comestibles contra fitopatógenos es lo reportado por Priya *et al.* (2019), quienes estudiaron ocho especies de hongos de los cuales *Lentinus edodes* u hongo shitake, *Schizophyllum commune*, *Coprinus comatus* y *Volvariella volvacea* son comestibles, contra el crecimiento del hongo fitopatógeno *Colletotrichum capsici*.

Encontraron que *L.edodes* mostró la máxima actividad antifúngica al inhibir el crecimiento micelial de *C.capsici* en 45.55% con una zona de inhibición máxima de 4.86 mm. La identificación y el estudio de los compuestos bioactivos secretados por los macromicetos comestibles, son necesaria para poder desarrollar fungicidas de amplio espectro contra patógenos de plantas. Por lo cual la presente investigación tuvo como objetivo probar el efecto antifúngico de extractos alcohólicos (metanol y etanol) de cuatro hongos comestibles (*Lactarius deliciosus*, *Ustilago maydis*, *Amanita jacksonii* y *Amanita rubescens*) contra el fitopatógeno *R. solani* mediante tres metodologías.

## Materiales y métodos

### Obtención de los hongos comestibles

Los hongos comestibles se consiguieron en los mercados locales de la ciudad de Xalapa, Veracruz en el periodo de julio-agosto de 2021. Posteriormente los ejemplares se llevaron al laboratorio de Biotecnología Microbiana del Instituto de Química Aplicada para ser limpiados y cortados.

### Obtención de los extractos hidroalcohólicos

Se pesaron 330 g del material fúngico de cada respectivo hongo, luego se cortaron en fragmentos de aproximadamente de 4 cm x 4 cm, después los fragmentos se colocaron en un frasco de vidrio hermético de 3 L de capacidad. Se establecieron seis recipientes con material fúngico de los cuales a tres de estos se les adicionaron 350 ml de metanol y a los otros tres recipientes se les agregaron 350 ml de etanol. Los recipientes con material fúngico y disolventes se dejaron macerar por cinco días a temperatura ambiente y transcurrido este tiempo se filtraron a gravedad con papel filtro de filtración media poro de 8  $\mu\text{m}$ , posteriormente el sobrenadante obtenido de cada respectivo hongo y disolvente se colocó en un matraz Erlenmeyer de 500 ml.

El líquido obtenido en cada tratamiento se llevó a evaporación en un rotavapor para conseguir el extracto concentrado que regularmente presenta consistencia pastosa-oleosa. Los tres extractos metanólicos y los tres extractos etanólicos se establecieron como soluciones madre y a partir de estos se prepararon los extractos hidroalcohólicos (tratamientos) con las siguientes proporciones: etanol-agua 1:1, metanol-agua 1:1, etanol-agua 3:7 y metanol-agua 3:7 (todo por triplicado).

### Actividad antifúngica de los extractos alcohólicos

### Difusión en discos

Se prepararon cajas de Petri con medio papa dextrosa agar (PDA), luego se cortaron discos de papel filtro (filtración media 8  $\mu\text{m}$  de poro) con 0.5 mm de diámetro y se esterilizaron en autoclave a 120 lb de presión por 20 min. Posteriormente en condiciones asepticas los discos de papel filtro (cuatro

discos para cada extracto alcohólico) se impregnaron con 150  $\mu\text{l}$  de cada extracto alcohólico y se dejaron reposar hasta que el disco absorbió por completo el extracto. Después las cajas de Petri con PDA se inocularon con un disco del hongo *R. solani*, el cual se colocó en el centro de la caja con medio de cultivo.

Se colocaron cuatro discos impregnados de cada extracto de forma equidistante al disco con micelio de *R. solani*. *R. solani* fue aislado de la rizósfera de chile poblano (*Capsicum annuum L.*) y forma parte del cepario del departamento de Fitopatología del Colegio de Posgraduados *Campus Montecillo*, Edo de México. Dentro de los tratamientos se incluyeron un control de agua destilada estéril, un control de metanol y un control de etanol. Las cajas se incubaron a 28 °C por tres días, transcurrido el tiempo de incubación se observó si había inhibición sobre el crecimiento de *R. solani* y se midió con una regla el diámetro de inhibición en milímetros alrededor del disco impregnado con el extracto, todos los tratamientos se realizaron por triplicado.

### Difusión en pozos

Se prepararon cajas de Petri con medio PDA y se realizaron tres perforaciones en el agar con ayuda de un sacabocados de 0.5 mm de diámetro. A cada pozo se le colocó 100  $\mu\text{l}$  de cada extracto alcohólico (etanol-agua 1:1, metanol-agua 1:1, etanol-agua 3:7 y metanol-agua 3:7), luego en el centro de cada caja se colocó un disco de *R. solani* con micelio fresco (Cruz *et al.*, 2010). Dentro de los tratamientos se incluyeron un control de agua destilada estéril, un control de metanol y un control de etanol (todo por triplicado). Posteriormente las cajas se incubaron a 28 °C durante tres días, transcurrido el tiempo de incubación se observó si había inhibición sobre el crecimiento de *R. solani* cercana al pozo, para medir el halo de inhibición se midió en milímetros.

### Dilución en placa

#### Determinación de la concentración de una solución de fragmentos de micelio de *R. solani*

Se prepararon 100 ml de caldo papa dextrosa, luego el medio de cultivo se inoculó con un disco de 7 mm de diámetro de micelio fresco de *R. solani*. Se incubó durante cuatro días a 28 °C, transcurrido este tiempo se filtró la solución fúngica a través de un sistema filtrante estéril (columna de plástico empacada con algodón), para permitir el paso de los fragmentos más pequeños de micelio. La concentración de los fragmentos de micelio del líquido filtrado se estimó utilizando una cámara de Neubauer.

Una vez conocida la concentración de la solución de fragmentos de micelio fúngico ( $2 \times 10^7$  fragmentos de micelio  $\text{ml}^{-1}$ ,  $1 \times 10^4$  UFC) se determinó la actividad antifúngica por el método de microdilución en placa utilizando el método descrito por Casaril *et al.* (2011); Ren *et al.* (2014) con modificaciones. En cada pozo de una placa de 96 pozos se colocó, 100  $\mu\text{l}$  de caldo papa dextrosa, 50  $\mu\text{l}$  del respectivo extracto alcohólico de los hongos comestibles (etanol-agua 1:1, metanol-agua 1:1, etanol-agua 3:7 y metanol-agua 3:7) y 50  $\mu\text{l}$  de la solución de fragmentos de micelio de *R. solani*. Dentro de los tratamientos se incluyeron un control de agua destilada estéril, un control de metanol, un control de etanol, un control de caldo de papa dextrosa y un control de papa dextrosa todos con solución de fragmentos de micelio de *R. solani* (todo por triplicado).

Posteriormente las cajas se incubaron a temperatura ambiente en un agitador horizontal a 400 rpm por cuatro días, transcurrido este tiempo se leyó la absorbancia a 595 nm con un lector de microplacas. La actividad antifúngica se midió comparando las densidades ópticas de los pozos que contienen los mismos extractos y controles. El porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico se calculó usando la siguiente ecuación: % inhibición=  $[A_F - (A_{FE} - A_E)]/A_F \times 100$ . Donde:  $A_F$  es la absorbancia del control fúngico sin la adición del extracto;  $A_{FE}$  es la absorbancia de la mezcla (extracto alcohólico y suspensión de fragmentos de micelio) y  $A_E$  es la absorbancia del extracto.

### Análisis estadístico

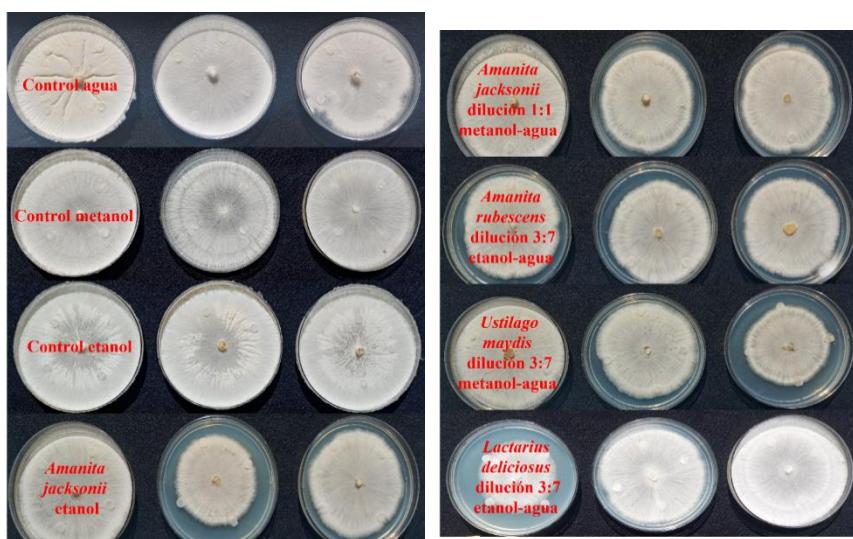
Para la técnica de dilución en placa el bioensayo se estableció bajo un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones. A los datos obtenidos se les realizó un análisis de varianza Anova y la prueba de comparación de medias (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ) con el programa estadístico SAS Institute (2020).

## Resultados y discusión

### Actividad antifúngica de los extractos hidroalcohólicos por las técnicas de difusión en pozos, difusión en discos y dilución en placa

#### Difusión en disco

En los resultados obtenidos con el método de difusión en disco se observó que el hongo en algunos tratamientos como el extracto etanólico de *A. jacksonii* en su dilución 1:1 de metanol-agua, aunque también el extracto de *A. rubescens* en la dilución 3:7 de etanol-agua y 1:1 metanol-agua; extracto de *U. maydis* dilución 3:7 metanol-agua y *L. deliciosus* dilución 3:7 etanol-agua; creció de manera más lenta y menos abundante en comparación con los controles (Figura 1).



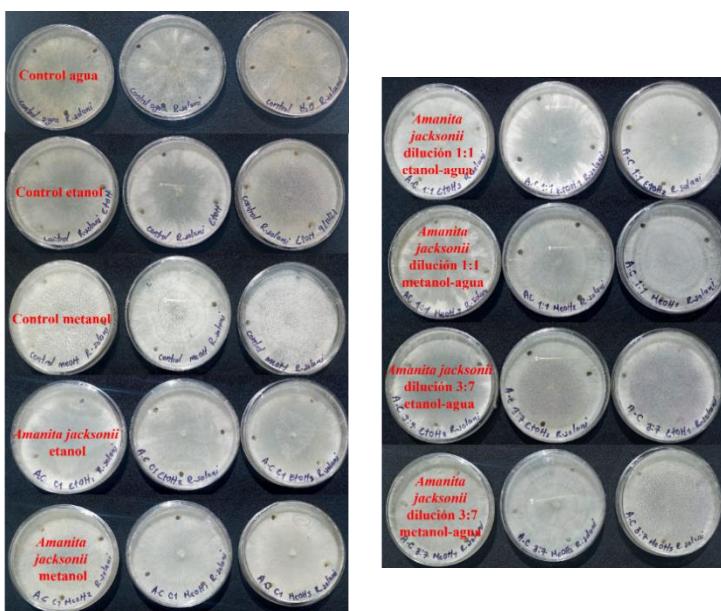
**Figura 1. Extractos alcohólicos y diluciones de *Amanita jacksonii* contra *Rhizoctonia solani* a 28 °C por tres días de incubación.**

Se observó de manera cualitativa que *R. solani* creció de manera más lenta en el extracto de *A. rubescens* en la dilución 3:7 de etanol-agua, donde el hongo no creció de manera homogénea y en la totalidad de la superficie del PDA como en el caso de los controles. Si bien el perfil metabólico de cada hongo es único (Shen *et al.*, 2017), la observación de la afectación en el crecimiento y desarrollo de *R. solani* podría deberse a los metabolitos reportados en extractos alcohólicos de hongos comestibles, como los compuestos fenólicos de bajo peso molecular que tienen actividad antimicrobiana (Alves *et al.*, 2013).

Otra posibilidad es que un mínimo porcentaje de los metabolitos polares de naturaleza fenólica quedaron libres en los extractos alcohólicos de algunos macromicetos y pudieron difundirse sobre el agar mostrando un crecimiento más lento en *R. solani* con respecto a los controles (Naczk y Shahidi, 2006). Además, la difusión en disco depende directamente de la capacidad de difusión de las sustancias activas presentes en los extractos, lo que puede provocar poca movilidad de los metabolitos en el agar si estos presentan baja solubilidad o alta masa molecular.

### Difusión en pozo

No se observó ningún efecto sobre el crecimiento de *R. solani* con los extractos alcohólicos y sus diluciones (Figura 2), ya que *R. solani* creció dentro y fuera de los pozos con extractos. Estos resultados podrían relacionarse con el peso molecular de los compuestos presentes en el extracto, ya que si es muy alto el peso molecular de los compuestos o si presentan baja solubilidad se dificultará su movilidad por el agar (no difusibles), está podría ser una razón por la cual no se observó ningún efecto inhibitorio por parte de los extractos alcohólicos y sus diluciones (Ren *et al.*, 2014; Martínez *et al.*, 2021).



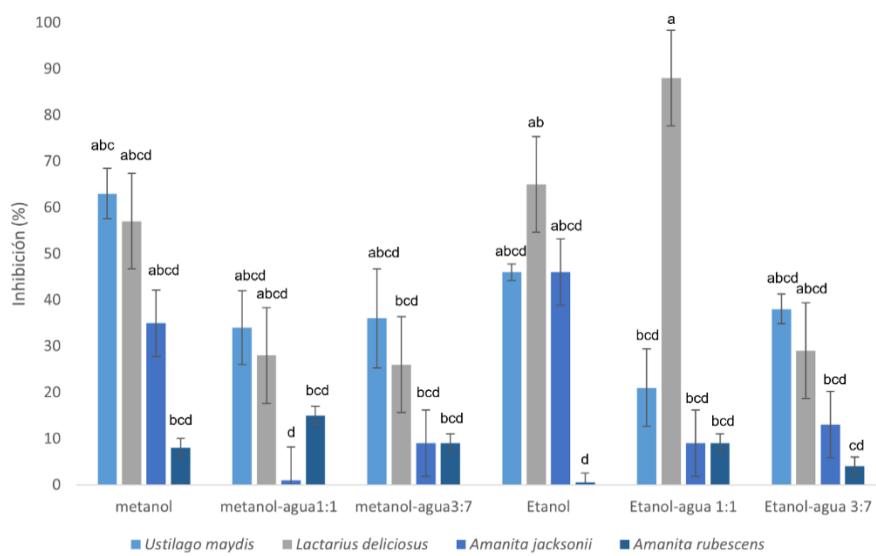
**Figura 2. Diluciones de extractos alcohólicos de *Lactarius deliciosus*, *Ustilago maydis*, *Amanita jacksonii* y *Amanita rubescens* contra *Rhizoctonia solani* a 28 °C por tres días de incubación.**

Si bien no se conoce que tipo de metabolitos están presentes en los extractos de los hongos comestibles probados, se debe destacar que el material fúngico fue utilizado en fresco y por el tipo de disolventes utilizados (metanol, etanol y agua) se buscaba arrastrar en los extractos, metabolitos polares como polifenoles, azúcares, alcaloides, saponinas, glucósidos y algunas proteínas provenientes de hongos macromicetos (Naczk y Shahidi, 2006; Akpi *et al.*, 2017). La presencia o ausencia de estos metabolitos en los extractos dependerá del entorno en donde se desarrolla el hongo y las diferentes fuentes de nutrientes disponibles durante su crecimiento (Shen *et al.*, 2017).

También puede existir la posibilidad que los compuestos polares presentes en los extractos alcohólicos de los hongos comestibles no tuvieran actividad inhibitoria contra *R. solani* en la técnica de difusión de pozo. Por otro lado, se ha reportado que para el género *Amanita* los péptidos son los principales constituyentes de los extractos polares, dichos metabolitos presentan mayor actividad antimicrobiana en medio líquido o caldo que en medios sólidos como el agar, debido a que tienen baja solubilidad (Li y Oberlies, 2005).

### Dilución en placa

Los resultados indican que la mayor actividad inhibitoria la presentó la dilución etanol-agua 1:1 de *L. deliciosus* (88%), mientras que la menor actividad inhibitoria la tuvo el extracto etanólico de *A. rubescens* (0.5%) (Figura 3). Estos resultados difieren con los encontrados en las técnicas de difusión de pozos y discos. Este comportamiento, se puede explicar con lo que se reporta en la literatura (Ren *et al.*, 2014; Balouiri *et al.*, 2016), pues nos mencionan que, en la técnica de dilución en placa, los metabolitos presentes en los extractos tienden a difundirse mejor en medios líquidos que en sólidos, tal es el caso del caldo de papa dextrosa que se utilizó en esta técnica.



**Figura 3. Extractos alcohólicos y diluciones de hongos comestibles con actividad inhibitoria sobre el crecimiento de *Rhizoctonia solani*.** Media ± error estándar, n= 3.

Una de las ventajas de utilizar esta técnica es su capacidad para identificar la actividad antimicrobiana y cuantificarla de manera precisa, ya que los resultados no se ven afectados por la tasa de crecimiento de los diferentes microorganismos (Morales *et al.*, 2013). La cual es una posible

razón de que se presentan inhibiciones más fuertes con mayor efectividad. La actividad inhibitoria presentada por el extracto etanólico y la dilución etanol-agua 1:1 de *L. deliciosus* en el crecimiento de *R. solani*, se puede atribuir a la presencia de compuestos fenólicos contenidos en el extracto etanólico de este hongo comestible (Zavastin *et al.*, 2015).

*L. deliciosus* posee actividad antifúngica probada como lo reporta Volcão *et al.* (2021) que evaluaron la actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico obtenido de *L. deliciosus* contra el fiopatógeno *Monilinia fructicola* (Wint.), reportan que el extracto inhibió el crecimiento fúngico y redujo el desarrollo micelial del fitopatógeno a una concentración de  $1.25 \text{ mg L}^{-1}$ . Por otra parte, también se debe considerar el procesamiento del material fúngico (fresco o secó), el tiempo de extracción y el tipo de solvente, lo cual influirá en la actividad antimicrobiana de los extractos (Adhikari *et al.*, 2018).

Dentro de los solventes más utilizados para realizar la extracción de metabolitos en hongos se encuentra el agua, etanol, metanol, acetona y acetato de etilo (Elbatrawy *et al.*, 2015). En los resultados encontrados en este estudio fue una dilución etanol-agua 1:1 de *L. deliciosus* quien presentó mayor actividad antifúngica, aun mayor que aquellos extractos que no tenían ninguna dilución y solo era el solvente, una posible explicación de este comportamiento es lo reportado por Yim *et al.* (2012) quienes señalan que el mejor solvente para la extracción de compuestos fenólicos de hongos es el agua ya que esta no rompe los enlaces glucosídicos, lo que indica la presencia de fenoles libres. En la dilución 1:1 la presencia del agua favoreció la extracción de los fenoles libres y por ello se pudo cuantificar la mayor actividad antifúngica de este extracto.

## Conclusiones

En cuanto a la difusión en disco se observó en algunos tratamientos que el hongo no crecía de manera homogénea como en los controles, lo que sugiere de manera cualitativa crecimiento lento de *R. solani*; sin embargo, hacen falta más evidencias y estudios para afirmar que con esta metodología hay algún efecto inhibitorio cuantificable. Mientras que en el método de difusión por discos no se encontró inhibición del crecimiento de *R. solani*. No obstante, los resultados obtenidos por la técnica de dilución en placa se consideran confiables, ya que los extractos alcohólicos (y diluciones) tuvieron un contacto directo en medio líquido con *R. solani* en los pozos de la microplaca.

Por lo cual, la dilución etanol-agua 1:1 de *L. deliciosus*, extracto de etanol de *L. deliciosus*, extracto de metanol de *U. maydis* y extracto de metanol de *L. deliciosus* deben de ser estudiados con mayor profundidad, al probarlos en un sistema *in vivo* e identificar los metabolitos presentes.

## Bibliografía

- Adhikari, P.; Pandey, A.; Agnihotri, V. and Pande, V. 2018. Selection of solvent and extraction method for determination of antimicrobial potential of *Taxus wallichiana* Zucc. Res Pharmacy. 8(1):1-9. Doi: 10.25081/rip.2018.v8.3487.
- Ajai-Oyetunde, O. O.; and Bradley, C. A. 2018. *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population biology and management of *Rhizoctonia* seedling disease of soybean. Plant Pathol. 67(1):3-17. <https://doi.org/10.1111/ppa.12733>.

- Akpi, U. K.; Odoh, C. K.; Ideh, E. E. and Adobu, U. S. 2017. Antimicrobial activity of *Lycoperdon perlatum* whole fruit body on common pathogenic bacteria and fungi. Afr. J. Clinical Exp. Microbiol. 18(2):79-85. Doi: 10.4314/ajcem.v18i2.4.
- Al-Askar, A. A.; and Rashad, Y. M. 2010. Efficacy of some plant extracts against *Rhizoctonia solani* on pea. J. Plant Protec. Res. 50(3):239-243. Doi: 10.2478/v10045-010-0042-0.
- Alves, M. J.; Ferreira, I. C.; Froufe, H. J.; Abreu, R. M. V.; Martins, A. and Pintado, M. 2013. Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. J. Appl. Microbiol. 115(2):346-357. <https://doi.org/10.1111/jam.12196>.
- Arcos, J. y Zúñiga, D. 2015. Efecto de rizobacterias en el control de *Rhizoctonia solani* en el cultivo de papa. Ecología Aplicada. 14(2):95-101.
- Balouiri, M.; Sadiki, M. and Ibsouda, S. K. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. J. Pharmaceutical Analysis. 6(2):71-79.
- Casaril, K. B. P. B.; Kasuya, M. C. M. and Vanetti, M. C. D. 2011. Antimicrobial activity and mineral composition of shiitake mushrooms cultivated on agricultural waste. Braz. Archiv. Biol. Technol. 54(5):991-1002.
- Cortes, S. A.; Hernández S. H. and Jaramillo, F. M. 2011. Production of glycolipids with antimicrobial activity by *Ustilago maydis* FBD12 in submerged culture. Afr. J. Microbiol. Res. 5(17):2512-2523. Doi: 10.5897/AJMR10.814.
- Craig, W. A. 1998. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. Clinical Infec. Dis. 26(1):1-10.
- Cruz, C. A.; Rodríguez, N. N. and Rodríguez, C. E. 2010. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*. Rev. UDCA Actualidad & Divulgación Científica. 13(2):117-124.
- Doğan, H. H. and Akbaş, G. 2013. Biological activity and fatty acid composition of Caesar's mushroom. Pharmaceutical Biol. 51(7):863-871. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.768272>.
- Elbatrawy, E. N.; Ghonimy, E. A.; Alassar, M. M. and Wu, F. S. 2015. Medicinal mushroom extracts possess differential antioxidant activity and cytotoxicity to cancer cells. Inter. J. Med. Mushrooms. 17(5):471-479.
- Feussi, T. M.; Qin, J.; Ndongo, J. T. and Laatsch, H. 2017. New azulene-type sesquiterpenoids from the fruiting bodies of *Lactarius deliciosus*. Natural products and bioprospecting. 7(3):269-273. <https://doi.org/10.1007/s13659-017-0130-1>.
- FRAC. 2017. Fungicide Resistance Action Committee. Fungicides sorted by mode of action including FRAC code numbering. <http://www.frac.info/docs/default-source/publications/fraccode-list/frac-code-list-2017-final.pdf?sfvrsn=2>.
- Frank, J. A. and Leach S. S. 1980. Comparison of tuber-borne and soilborne inoculum in the *Rhizoctonia* disease of potato. Phytopathology. 70(1):51-53.
- Hide, G. A.; Hirst, J. M. and Stedman, O. J. 1973. Effects of black scurf (*Rhizoctonia solani*) on potatoes. Annal. Appl. Biol. 74(2):139-148. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1973.tb07733.x>.
- Khaledi, N.; Taheri, P. and Tarighi, S. 2015. Antifungal activity of various essential oils against *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina* as major bean pathogens. J. Appl. Microbiol. 118(3):704-717. <https://doi.org/10.1111/jam.12730>.
- Li, C.; and Oberlies, N. H. 2005. The most widely recognized mushroom: chemistry of the genus *Amanita*. Life Sci. 78(5):532-538. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.09.003>.

- Martínez, E. N. A.; Vázquez, G. F. J.; Valero, G. J.; Álvarez, P. E.; Garza, O. F.; Najera, M. J. A. and Quiñónez, M. M. 2021. Antimicrobial activity, phenolic compounds content, and antioxidant capacity of four edible macromycete fungi from Chihuahua, México. TIP. Rev. Especial. Cienc. Quím. Biológ. 24:1-11 <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2021.318>.
- Naczk, M.; and Shahidi, F. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. J. Pharmaceutical Bio. Analys. 41(5):1523-1542. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.04.002>.
- Patiño, M.; Nieto, R. I. J.; Chegwin, A. C. and Torres, R. E. 2020. Actividad biocontroladora *in vitro* de macrohongos contra diferentes hongos fitopatógenos. Acta Biol. Colomb. 25(2):265-279. <https://doi.org/10.15446/abc.v25n2.75303>
- Priya, K.; Thiribhuvanamala, G.; Kamalakannan, A. and Krishnamoorthy, A. S. 2019. Antimicrobial activity of biomolecules from mushroom fungi against *Colletotrichum capsici* (Syd) Butler and bisby, the fruit rot pathogen of Chilli. Inter. J. Current Microbiol. Appl. Sci. 8(6):1172-1186.
- Rafiq, M.; Javaid, A. y Shoaib, A. 2021. Antifungal activity of methanolic leaf extract of *Carthamus oxyacantha* against *Rhizoctonia solani*. Pak. J. Bot. 53(3):1133-1139. [http://dx.doi.org/10.30848/PJB2021-3\(17\)](http://dx.doi.org/10.30848/PJB2021-3(17)).
- Reinoso, R.; Cajas, M. D.; Martinez, M.; Martin, A.; Perez, C.; Fajardo, V. and Becerra, J. 2013. Biological activity of macromycetes isolated from Chilean subantarctic ecosystems. J. Chilean Chem. Soc. 58(4):2016-2019.
- Ren, L.; Hemar, Y.; Perera, C. O.; Lewis, G.; Krissansen, G. W. and Buchanan, P. K. 2014. Antibacterial and antioxidant activities of aqueous extracts of eight edible mushrooms. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre. 3(2):41-51. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2014.01.003>.
- SAS. 2020. Institute Inc. The System for Windows, version 9.4; SAS Institute Inc.: Cary, NC, USA.
- Shen, H. S.; Shao, S.; Chen, J. C. and Zhou, T. 2017. Antimicrobials from mushrooms for assuring food safety. Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety. 16(2):316-329. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12255>.
- Sommer, N. F.; Fortalage, J. R; Edwards, D. C. 2002. Postharvest Diseases of selected commodities. In: Kader, A. A. Ed. Postharvest technology of horticultural crops. University of California. 223-227 pp.
- Tsror, L. 2010. Biology, epidemiology and management of *Rhizoctonia solani* on potato. J. Phytopathol. 158(10):649-658. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01671.x>.
- Volcão, L. M.; Halicki, P. C. B.; Christ, R. A.; Ramos, D. F.; Badiale, F. E.; Andreazza, R. and Silva J. F. 2021. Mushroom extract of *Lactarius deliciosus* (L.) Sf. Gray as biopesticide: antifungal activity and toxicological analysis. J. Toxicol. Environ Health. 85(2):43-55.
- Yim, H. S.; Chye, F. Y.; Koo, S. M.; Matanjun, P.; How, S. E. and Ho, C. W. 2012. Optimization of extraction time and temperature for antioxidant activity of edible wild mushroom, *Pleurotus porrigens*. Food and Bioproducts Processing. 90(2): 235-242.
- Zavastin, D. E.; Miron, A.; Gherman, S. P.; Boerescu, C. M.; Breaban, I. G. and Gavrilescu, C. M. 2015. Antioxidant activity, total phenolic and metals contents of *Lactarius salmonicolor*. Farmacia. 63(5):755-759.