



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



**Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral
Regional, Unidad Durango**

Análisis micoquímico y molecular del complejo *Amanita
caesarea* encontrado en la región de El Salto, Pueblo Nuevo,
Durango

TESIS

Para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Gestión
Ambiental

PRESENTA

Laura Anabel Páez Oliván

DIRECTORES DE TESIS

Néstor Naranjo Jiménez

Eli Amanda Delgado Alvarado

Durango, Dgo. Octubre de 2014



SIP-14-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**ACTA DE REVISIÓN DE TESIS**

En la Ciudad de Durango, Dgo. siendo las 12:00 horas del día 31 del mes de Octubre del 2014 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del: CIIDIR-IPN Unidad Durango para examinar la tesis titulada:

Análisis micoquímico y molecular del complejo *Amanita caesarea* encontrado en la región de El Salto, Pueblo Nuevo, Durango

Presentada por el alumno:

PÁEZ**OLIVAN****LAURA ANABEL**

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre(s)

Con registro:

B	1	2	0	6	2	6
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Gestión Ambiental

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

M. en Néstor Naranjo Jiménez
M. en C. Eli Amanda Delgado Alvarado
Dra. Norma Almaraz Abarca
Dr. Jesús Herrera Corral
Dr. Raúl Díaz Moreno
M. en Natividad Uribe Soto**PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES**
Dr. José Antonio Avila Reyes
CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.D.I.R.
UNIDAD DURANGO
I.P.N.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-13-BIS

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS
Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 19 de Noviembre del 2014

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR Durango en su sesión ordinaria No. 9 celebrada el día 4 del mes de Noviembre conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

PÁEZOLIVANLAURA ANABEL

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre (s)

Con registro:

B	1	2	0	6	2	6
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: _____

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

Análisis micoquímico y molecular del complejo *Amanita caesarea* encontrado en la región de El Salto, Pueblo Nuevo, Durango

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:

M. C. Néstor Naranjo Jiménez y M. C. Eli Amanda Delgado Alvarado3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:
CIIDIR-IPN Unidad Durango

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

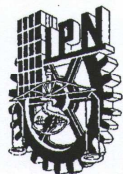
M. C. Néstor Naranjo Jiménez

Aspirante

M. C. Eli Amanda Delgado Alvarado

Presidente del Colegio

Ing. Laura Anabel Páez Olivan
CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
CIIDIR
UNIDAD DURANGO
I.P.N.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Durango, Dgo., el día **05** del mes de **Noviembre** del año **2014**, la que suscribe **Laura Anabel Páez Olivan** alumna del Programa de **Maestría en Ciencias en Gestión Ambiental**, con número de registro **B120626**, adscrita al **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango. CIIDIR-IPN Unidad Durango**, manifiesta que es la autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **M. en C. Néstor Naranjo Jiménez** y de la **M. en C. Eli Amanda Delgado Alvarado** y cede los derechos del trabajo titulado **“Análisis micoquímico y molecular del complejo *Amanita caesarea* encontrado en la región de El Salto, Pueblo Nuevo, Durango”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso de la autora y/o de los directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones anapaezoli@hotmail.com, nneestor2@yahoo.com y delgadoamanda78@yahoo.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

LAURA ANABEL PÁEZ OLIVAN

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado una beca para cursar mis estudios de Maestría y por el apoyo de beca mixta para realizar una estancia de investigación en Argentina.

Y al Instituto Politécnico Nacional por otorgarme la beca de estímulo institucional de formación de investigadores.

Al CIIDIR-IPN Unidad, Durango por haberme brindado la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

Gracias al instituto de Investigaciones Biotecnológicas "Dr. Rodolfo A. Ugalde." Y al instituto tecnológico de Chascomús, Buenos Aires, Argentina por permitirme realizar una estancia de investigación en su plantel.

Agradezco al Instituto Nacional de Ecología, Veracruz (INECOL), especialmente al Dr. Gastón Guzmán y a la Dra. Florencia Ramírez Guillen por haber identificado las especies involucradas en el presente estudio.

A la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina y al Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías (CNMN) del Instituto Politécnico Nacional, por brindarme el apoyo para realizar la identificación de compuestos micoquímicos del presente estudio.

En especial al M.C. Néstor Naranjo Jiménez, por su amistad, confianza, apoyo, enseñanzas profesionales y personales por sus consejos y por transmitirme ese amor a los hongos, por el asesoramiento durante estos dos años para poder concluir esta investigación.

A la Dra. Norma Almaraz por su invaluable atención y gentileza, a M.C. Amanda Delgado, Dr. Rene Torres, I.B.Q. Ana Chaidez y M.C. Roberto Medrano, por su tolerancia y asesoramiento, amistad, dedicación y apoyo así como también al comité revisor.

A mis compañeros David, Ali, Silvia, Rafa, Fabián, Omar, Miguel y Daniela por su valiosa amistad y por todos los momentos compartidos y el apoyo durante toda la maestría.

A mis padres y hermanos que siempre me han alentado a seguir superándome que han creído en mí y siempre me han apoyado en todo lo que me he propuesto alcanzar. A Jaime por su apoyo incondicional y gentileza.

Y a todas aquellas personas que contribuyeron indirecta o directamente a la realización del presente trabajo.

ÍNDICE

GLOSARIO.....	i
ABREVIATURAS Y ACRONIMOS.....	ii
RELACIÓN DE FIGURAS.....	iii
RELACIÓN DE TABLAS.....	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
INTRODUCCIÓN.....	1
I ANTECEDENTES.....	2
1.1 Generalidades.....	2
1.2 Importancia de los hongos silvestres.....	2
1.3 Diversidad de hongos.....	4
1.3.1 Diversidad de hongos en México.....	4
1.3.1.2 Consumo de hongos en México.....	5
1.3.2 Diversidad de hongos en Durango.....	6
1.3.2.1 Consumo de hongos en Durango.....	6
1.4 Complejo <i>Amanita caesarea</i>	7
1.4.1 Morfotaxonomía de la sección <i>Caesareae</i>	9
1.4.2 Descripción macroscópica general.....	11
1.4.3 Distribución geográfica.....	12
1.4.4 Hábitat.....	13
1.4.5 Época de recolecta.....	13
1.5 Taxonomía en hongos.....	13
1.5.1 Clasificación taxonómica.....	14

1.5.1.2 Nombre común.....	15
1.5.2 Problemática taxonómica.....	15
1.6 Variabilidad genética.....	17
1.6.1 Marcadores moleculares.....	17
1.6.2 Marcadores ISTR.....	18
1.7 Conservación de los recursos genéticos de hongos.....	18
1.8 Variabilidad química.....	21
1.8.1 Metabolitos secundarios.....	22
1.8.1.2 Metabolitos secundarios en basidiomicetos.....	24
II JUSTIFICACIÓN.....	26
III OBJETIVO.....	27
3.1 Objetivos específicos.....	27
IV HIPÓTESIS.....	27
V MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
5.1 Descripción de la zona de colecta.....	28
5.1.2 Colecta de hongos del Complejo <i>Amanita caesarea</i>	30
5.2 Conservación y preparación de la muestra.....	31
5.3 Caracterización Micoquímica.....	32
5.3.1 Extracción de polifenoles.....	32
5.3.2 Extracción de terpenos y ácidos grasos.....	32
5.3.3 Análisis HPLC-DAD-ESI/MS.....	33
5.3.4 Análisis de CG-MS.....	34
5.3.5 Análisis de datos.....	35
5.4 Caracterización molecular.....	35
5.4.1 Extracción de DNA en hongos.....	35

5.4.2 Amplificación de marcadores ISTR.....	36
5.4.3 Análisis de datos.....	37
5.5 Identificación taxonómica del Complejo <i>Amanita caesarea</i>	38
VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
6.1 Identificación taxonómica.....	39
6.2 Perfiles ISTR.....	42
6.2.1 Variación Genética Intrapoblacional.....	44
6.2.2 Variación Genética Interpoblacional.....	46
6.3 Identificación cualitativa de compuestos terpénicos.....	49
6.4 Determinación estructural de los metabolitos secundarios.....	50
6.4.1 Compuestos triterpenoidales.....	55
6.4.2 Ácidos grasos no esterólicos.....	56
6.4.3 Compuestos polifenólicos.....	57
VII CONCLUSIONES.....	61
IX RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS.....	63
VIII BIBLIOGRAFÍA.....	65
IX ANEXOS.....	75

GLOSARIO

Basidiomicetos	Son una división del reino Fungi que incluye los hongos que producen basidios con basidiosporas. Contiene a las clásicas setas y hongos con sombrero.
Complejo críptico	Son un grupo de especies que satisfacen la definición biológica de especie, pero no son distinguibles morfológicamente entre sí.
Electroforesis	Técnica de separación en la cual las moléculas como proteínas, ADN o ARN se separan entre sí por su carga eléctrica y peso molecular.
Fíbula	Es una estructura que se encuentra en muchas especies de basidiomicetos y que se produce entre dos células binucleadas adyacentes de una misma hifa.
Hemiangiocárpico	Tipo de desarrollo del basidiocarpio en los basidiomicetos.
Micófago	Individuo o pueblo que usa los hongos como alimento.
Sub-especie	Cada uno de los grupos en que se dividen las especies y que se componen de individuos que además de los caracteres propios de las misma, tienen en común otros caracteres morfológicos por los cuales se asemejan entre si y los distinguen de los otros grupos.

ABREVIATURAS Y ACRONIMOS

A260	Absorbancia a 260 nm
A280	Absorbancia a 280 nm
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ESI	Ionización por electrospray
GTS	Coeficiente de diferenciación genética
H	Diversidad de Nei
I	Diversidad de Shannon
IIB-INTECH	Instituto de Investigaciones Biotecnológicas de la Universidad de San Martín, Chascomús, Argentina.
INECOL	Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz
ISTR	Inverse sequence tagged repeat, por sus siglas en ingles
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
MS	Espectrometría de masas
Na	Número medio de alelos por locus
Ne	Número medio efectivo de alelos por locus
Nm	Flujo génico
P	Polimorfismo
PCR	Polimerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
TLC	Cromatografía de capa fina
UV	Luz ultravioleta
µL	Microlitro
µm	Micra

RELACIÓN DE FIGURAS

- Figura 1. Desarrollo del cuerpo fructífero de *Amanita caesarea*
- Figura 2. Caracteres morfológicos de *Amanita caesarea*
- Figura 3. Distribución geográfica del hongo silvestre *Amanita caesarea*
- Figura 4. Mapa de la zona de colecta
- Figura 5. *Amanita basii* Guzmán & Ramírez-Guillén
- Figura 6. *Amanita caesarea* (Scop.: Fr.) Persoon
- Figura 7. *Amanita laurae* Guzmán & Ramírez-Guillén
- Figura 8. *Amanita tulosii* Guzmán & Ramírez-Guillén
- Figura 9. *Amanita tulosii* irregular Guzmán & Ramírez-Guillén
- Figura 10. Patrones de amplificación utilizando el primer ISTR F1/B8
- Figura 11. Dendrograma del análisis de similitud intrapoblacional
- Figura 12. Dendrograma del análisis de similitud intrapoblacional
- Figura 13. Cromatografía de capa fina de terpenos obtenidos de cuerpos fructíferos de especies del complejo *A. caesarea*. A = observado en onda larga (UV); B = observado en onda corta (UV); C = observado en onda larga, luego de aplicar revelador específico para terpenos.
- Figura 14. Ruta biosintética del ácido gálico
- Figura 15. Dendrograma del análisis micoquímico del complejo *A. caesarea*

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la especie *Amanita caesarea*

Tabla 2. Coordenadas geográficas de las localidades de colecta.

Tabla 3. Secuencias de los iniciadores ISTR

Tabla 4. Clasificación taxonómica de los individuos colectados

Tabla 5. Porcentaje de polimorfismo (P), e índice de genotipificación (GI) para iniciadores ISTR en el complejo *Amanita caesarea*.

Tabla 6. Diversidad genética de las especies pertenecientes al complejo *Amanita caesarea* encontradas en la Región de El Salto P.N. Dgo.

Tabla 7. Identidad genética de Nei (arriba de la diagonal) y distancia genética (debajo de la diagonal).

Tabla 8. Compuestos triterpenoidales

Tabla 9. Ácidos grasos no esterólicos

Tabla 10. Compuestos polifenólicos

Tabla 11. Matriz binaria de los compuestos identificados en el complejo *A. caesarea*

RESUMEN

Actualmente existe una controversia taxonómica sobre la delimitación de las especies mexicanas que integran el complejo *Amanita caesarea*. Con el fin de generar herramientas taxonómicas diferentes a las morfológicas que puedan contribuir a solucionar esas controversias, en el presente trabajo se realizó un análisis molecular, basado en perfiles ISTR, de 82 individuos de *A. caesarea*, *A. basii*, *A. laurae* y *A. tullosii*. Todas pertenecientes al complejo, encontradas en la región de El Salto, Pueblo Nuevo, Durango, México. Las combinaciones de iniciadores ISTR empleadas fueron F1/B1 y F1/B8, las que produjeron un total de 79 loci, cuyos tamaños se estimaron entre de 70 (locus amplificado con el par F1/B1) a 2570 bp (locus amplificado con el par F1/B8). Los valores del índice de genotipificación variaron entre 0.93 y 0.90. En el estudio de variación genética interpoblacional se obtuvo un coeficiente de diferenciación genética de 0.0739 y un flujo génico de 6.2699, que indican una fuerte migración genética entre las especies. Las distancias genéticas entre las especies del complejo permiten distinguir dos grupos, el primero formado por *A. caesarea* y *A. basii*, entre las cuales existe un elevado flujo génico ($N_m > 1$), que sugiere un estado de conespecificidad; y el otro, integrado por *A. laurae* y *A. tullosii*, entre las cuales existe un bajo flujo génico ($N_m > 0.15$), que sugiere que se trata de especies distintas. Para la caracterización micoquímica se identificaron 23 compuestos, mediante HPLC-DAD-ESI/MS y CG-MS, de los cuales 11 corresponden a triterpenoides, nueve se identificaron como ácidos grasos no estéricos y tres como polifenoles. Para el análisis fenético de cluster se elaboró una matriz binaria de cada uno de los compuestos contra cada una de las especies del complejo, resultando dos grupos, el primero formado por *A. caesarea*, *A. basii* y *A. laurae* donde se observa que químicamente son especies muy similares y por otro lado *A. tullosii* aparece como una especie que se separa del resto.

Palabras clave: Complejo *Amanita caesarea*, marcadores ISTR, variabilidad genética, delimitación específica, micoquímico

ABSTRACT

There is currently a controversy about the taxonomic delimitation of the Mexican species that make up the complex *Amanita caesarea*. In order to generate different morphological taxonomic tools that can help resolve those disputes, in this study a molecular analysis based on profiles ISTR, 82 individuals of *A. caesarea*, *A. basii*, *A. laurae* was performed and *A. tullosii*. All belonging to the complex, found in the region of El Salto, Pueblo Nuevo, Durango, Mexico. ISTR primer combinations used were F1 / B1 and F1 / B8, which produced a total of 79 loci, whose sizes were estimated between 70 (amplified with the pair F1 / B1 locus) to 2570 bp (amplified with the pair locus F1 / B8). The index values ranged from 0.93 genotyping and 0.90. In the study of genetic variation between populations genetic differentiation coefficient of 0.0739 and a gene flow of 6.2699, indicating a strong genetic migration between species was obtained. Genetic distances between species complex to distinguish two groups, the first consisting of *A. caesarea* and *A. basii*, between which there is a high gene flow ($N_m > 1$), suggesting a state of conspecificity; and the other, composed of *A. tullosii* and *A. laurae*, among which there is low gene flow ($N_m > 0.15$), suggesting that they are different species. For characterization microquímica 23 compounds were identified by HPLC-DAD-ESI / MS and GC-MS, of which 11 correspond to triterpenoids, nine were identified as steric fatty acids and three as polyphenols. For cluster analysis phenetic a binary matrix of each of the compounds against each of the species of the complex was prepared, resulting in two groups, the first formed by *A. caesarea*, *A. basii* and *A. laurae* observed where chemically are very similar across species and *A. tullosii* appears as a kind that separates from the other.

Keywords: Complex *Amanita caesarea*, ISTR markers, genetic variability, specific delimitation, mycochemical.

INTRODUCCIÓN

Amanita caesarea es la especie silvestre comestible de mayor consumo nacional y local, es de gran importancia para los habitantes de El Salto, Pueblo Nuevo, Durango quienes de la recolección obtienen beneficios económicos y nutrimentales.

Existe una controversia taxonómica relativa a la delimitación específica del complejo *Amanita Caesarea*, debido a las diferencias morfológicas entre las especies que lo integran. Se han presentado avances respecto a la identificación basada en caracteres morfológicos para poder ubicar a las especies de este complejo. En 1984 Montiel-Arcos presentó un documento bajo el nombre de Complejo *Amanita caesarea*, donde consideraba miembros de este complejo a *A. basii*, *A. tecomante*, *A. tullossii* y *A. yema*, más tarde Guzmán y Ramírez-Guillen (2001) reportaron que las especies mexicanas del complejo *Amanita caesarea* eran seis: *A. basii*, *A. caesarea*, *A. laurae*, *A. tecomante*, *A. tullossii* y *A. yema*.

Los rasgos taxonómicos que fueron tomados en cuenta por Guzmán y Ramírez-Guillen (2001) para distinguir las especies del complejo fueron el tamaño de las esporas y la forma (considerado aquí como la variación normal de la longitud dividida por la anchura, sin los extremos), si el píleo era escaldado y su color, la longitud y la descamación del estípite. El resto de las características microscópicas, como cheilocystidia, elementos de la volva y anillo, pileipellis, entre los más importantes.

Su clasificación taxonómica ha sido complicada al tratarse de un complejo críptico de especies, diferentes marcadores además de los morfológicos, han sido utilizados para abordar este tipo de problemática taxonómica, entre ellos se encuentran los caracteres químicos y moleculares, herramientas usadas para estimar la variabilidad ya que aportan información muy valiosa para este tipo de estudios (Almaraz-Abarca, 2011). En el presente trabajo se utilizaron marcadores micoquímicos y moleculares basados en perfiles polifenólicos, terpénicos, ácidos grasos e ISTR respectivamente, con el fin de generar información que ayude a discernir sobre las especies que conforman el complejo *Amanita caesarea*.

I. ANTECEDENTES

1.1 Generalidades

Los hongos son organismos ampliamente distribuidos en todo el globo terraqueo, constituyendo un grupo independiente reconocido internacionalmente como reino Fungi. Viven en cualquier sitio que presente materia orgánica y agua. Estos organismos pueden vivir en climas ecuatoriales, tropicales, subtropicales, templados y aún fríos, desde el nivel del mar hasta altitudes de más de 4,000 metros, y desde lugares muy húmedos hasta regiones semidesérticas en épocas en que puede haber una ligera humedad (Pedraza *et al.*, 1994, citado por Montoya, 2001)

Lo que se conoce por setas u hongos son solamente estructuras reproductoras (carpóforo) que se originan en condiciones favorables, a partir de una maraña de filamentos microscópicos, no fácilmente reconocibles bajo el suelo, en la hojarasca o dentro de troncos podridos. Esa maraña de filamentos, denominada micelio, es la estructura vegetativa de los organismos llamados hongos; por tanto, haciendo una homología con las plantas superiores, la seta sería el "fruto" de un tipo de hongo, los denominados Macromicetos u Hongos Superiores (González, 2000).

1.2 Importancia de los hongos silvestres

Resulta indiscutible la importancia ecológica de los hongos silvestres en los ecosistemas forestales, debido a su papel como agentes degradadores de la materia orgánica, así como por ser simbioses mutualistas o antagonistas de las plantas y animales del bosque, la distribución de los hongos se efectúa a través de esporas o pequeños propágulos, por el agua o por el aire, u otro medio, lo que favorece más su amplia distribución. Por otra parte, constituyen un componente económico en las actividades productivas dentro de las comunidades campesinas que habitan las regiones boscosas de México, actividad que han venido desarrollando desde épocas prehispánicas. Sin embargo, el potencial de aprovechamiento de los hongos silvestres como recurso genético tiene amplias perspectivas para la obtención de

bienes y servicios para el hombre. Por tal motivo es necesario detectar las especies útiles presentes en los bosques y estudiar su potencial productivo (Guzmán, 1997).

Entre los principales beneficios ambientales que aportan los hongos micorrícicos silvestres mediante su interacción biológica con los árboles se encuentran (Villarreal, 1995):

- **Absorción de agua y nutrientes:** Es evidente que el hongo con su larga red de filamentos (hifas) es capaz de explorar mayor volumen de terreno y de absorber mayor cantidad de agua y de sales minerales, especialmente de fósforo que suele presentarse en forma de sales insolubles difícilmente aprovechables por los pelos absorbentes de las raíces de las plantas ectomicorrícicas, con lo que estas presentan un mayor grado de tolerancia a los suelos con baja fertilidad y a las condiciones de extrema sequedad.
- **Producción de reguladores de crecimiento:** Los hongos ectomicorrícicos producen diversas hormonas como auxinas, citoquininas, y otros compuestos que afectan positivamente al desarrollo de la planta micorrizada, (movilización de nutrientes, iniciación de la suberización y del crecimiento de las raíces después de la parada invernal, etc.)
- **Protección contra enfermedades:** Existen diferentes mecanismos por los que pueden llegar a actuar las micorrizas contra los diversos agentes patógenos; en primer lugar se podría considerar que antes que nada actúan como una barrera física, impidiendo que en el lugar ocupado por ellas se instale cualquier otro agente perjudicial. Otro mecanismo es la producción de compuestos fungiestáticos y antibióticos que pueden eliminar al patógeno en caso de que consiguiera instalarse. Aunque tal vez, el efecto más importante sea el aumento de la tolerancia de la planta contra los patógenos como consecuencia de los cambios fisiológicos causados por la simbiosis micorrícica en la planta.

1.3 Diversidad de hongos

Los hongos son el grupo de organismos más numerosos en la tierra después de los insectos. En efecto, se calcula que hay más de 1,500,000 especies de hongos, por lo que su impacto en el medio es enorme. La diversidad de estos organismos, favorece que se desarrollen en un sinfín de hábitats, por lo que se dice que los hongos están en todas partes (Guzmán, 1997).

1.3.1 Diversidad de hongos en México

México es considerado el cuarto país en diversidad biológica a nivel mundial. En el país son consumidas más de 205 especies de hongos silvestres, que han constituido parte de una estrategia tradicional de subsistencia. De dichas especies un alto porcentaje (46%) son hongos ectomicorrízicos y dependen por lo tanto de la existencia de sus hospederos para sobrevivir. De estos taxones un 81% se distribuyen en bosques de coníferas, un 52% en los bosques de *Quercus spp* y un 5% en bosques subtropicales. En contraste con su gran diversidad e importancia los estudios micocenológicos de las especies comestibles de ectomicorrizas son muy recientes en el país (Pérez y Ferrera, 1993).

Se considera que existen en el país aproximadamente 200,000 especies de hongos, de las cuales se conocen aproximadamente 7,000, esto nos indica que existe un fuerte desconocimiento de este grupo biológico, si consideramos que las estimaciones de biodiversidad fungica del planeta son de entre 1.5 y 2.5 millones de especies (García-Jiménez *et al.*, 2001)

1.3.1.2 Consumo de hongos en México

El primer registro científico de un hongo comestible de México fue realizado por Patouillard y Arito en 1896, quienes registraron *Agaricus campestris* de la Península de Baja California, sin mencionar datos de su comestibilidad. A partir de entonces y hasta la década de los 80's ya se tenían 204 especies registradas de hongos y Mixomicetos comestibles empleadas como alimento y de las cuales el 55% son

objeto de venta en los mercados populares del centro del país (Villarreal y Pérez-Moreno, 1989).

Los hongos comestibles silvestres forman parte de la diversidad biológica, ecológica y cultural de México, ya que han constituido parte importante de una estrategia tradicional de subsistencia, la cual data de épocas prehispánicas y que se basa en el uso múltiple de los recursos naturales. Muchas de estas tradiciones se mantienen hasta nuestros días mediante prácticas familiares de recolección en épocas debidamente caracterizadas (Villarreal y Pérez-Moreno, 1989).

En México, los estudios ecológicos de los hongos son escasos, desconociéndose la potencialidad de las poblaciones silvestres y sus posibilidades de uso sustentable, por ejemplo la diversidad alimentaria de sus etnias, como consecuencia de su diversidad biológica, ecológica y cultural (Villarreal, 1995).

Desde el punto de vista alimentario, en México existe gran tradición por el consumo de los hongos silvestres. En la actualidad, siguen siendo parte importante tanto del consumo como de la economía de muchas personas que viven cerca de las zonas boscosas e incluso de la gente que vive en las grandes ciudades. La gente, sobre todo aquellos que viven cerca de los bosques tienen un amplio conocimiento sobre el lugar y la época de crecimiento de los hongos, utilizan muchos nombres comunes y diversos criterios para distinguir a las especies comestibles de aquellas que son consideradas venenosas (Montoya, 2001).

1.3.2 Diversidad de hongos en Durango

En Durango, el aprovechamiento forestal está enfocado a la extracción de madera exclusivamente, en particular hacia especies de pino y en un menor grado especies de hoja ancha. En los bosques también existen recursos no maderables que pueden ser aprovechados, como es la colecta de hongos silvestres comestibles para su comercialización en el mercado internacional (Naranjo y Herrera, 2000).

En el estado de Durango se sabe que los pobladores de la región de Pueblo Nuevo consumen hongos cada verano, algunos los recolectan y otros son cultivados (Naranjo y Herrera, 2000).

Dentro de las especies encontradas como comestibles, aunque no todas apreciadas de igual forma se encuentran: *Helvella lacunosa*, *H. crispa*, *Morchella esculenta*, *Hypomyces lactiflorum*, *Hericius erinaceus*, *Hydnum repandum*, *Ramaria botrytis*, *R. flava*, *Polyporus tenuiculus*, *Gomphus floccosus*, *Cantharellus cibarius*, *Pleurotus roseopileatus*, *Schizophyllum commune*, *Hygrophorus russula*, *Armillariella mellea*, *A. polymyces*, *Clitocybe gibba*, *Collybia dryophila*, *Laccaria laccata*, *L. amethystina*, *Lentinula boryana*, *Lyophyllum decastes*, *Pleurotus djamur*, *Tricholoma flavovirens*, *T. magnivelare*, *Amanita caesarea*, *A. rubescens*, *A. vaginata*, *A. flava*, *Albatrellus confluens*, *A. ellisi*, *Lactarius indigo*, *L. deliciosus*, *Agaricus campestris*, *A. silvaticus*, *A. silvicola*, *Boletus edulis*, *B. pinicola*, *B. aestivalis*, *B. regius*, *Suillus luteus*, *S. granulatus*, *Leccinum aurantiacum* y *Boletellus ruselli* (Naranjo y Herrera, 2000).

1.3.2.1 Consumo de hongos en Durango

Las especies de mayor consumo en el estado de Durango son *Ramaria flava*, *Amanita caesarea*, *Boletus sp.*, e *Hypomyces lactifluorum*, existen otras de menor consumo local como son *Agaricus campestris*, *Hericius erinaceus* y actualmente *Tricholoma magnivelare*, este ultimo de manera insipiente. Muchas de esas especies solo se extraen del bosque por relacionarse simbióticamente con árboles, no es posible cultivarlas (Díaz et al., 2009).

Algunas especies de hongos son altamente cotizadas como el matzutake *Tricholoma magnivelare*, que es exportado al Japón con un precio de mercado de 45 a 60 dólares el kilogramo. Por otro lado *Morchella spp* y *Boletus spp*, son altamente cotizados así como *Amanita caesarea*, el cual tiene un potencial elevado de comercialización en el mercado internacional, tanto en Francia como en Italia se cotiza en 100 euros el kilogramo, en México tiene uno de los valores más elevados para especies silvestres alrededor de \$80.00/kilogramo, debido a que es el hongo silvestre con mayor demanda en el mercado nacional, de ahí la posibilidad de

aprovechar algunas especies de los hongos de los bosques de Durango (Díaz *et al.*, 2009).

1.4 Complejo *Amanita caesarea*

La especie *Amanita caesarea* era una de las especies más apreciadas entre las civilizaciones griega y romana, estas civilizaciones lo nombraron de éste modo porque se consideraba un manjar propio de los césares. Era tal la afición que tenía el emperador Claudio a esta seta, que Agripina pudo envenenarlo sustituyéndola por la oronja verde (*Amanita phalloides*) para que su hijo Nerón accediera al trono (Castilla, 2008).

El término *Amanita* (A.) pudo haber derivado del nombre del monte Amanon situado en Cilicia, o bien, de la palabra griega amanía que significa locura, ya que varias especies del género *Amanita* son alucinógenas y ocasionalmente venenosas (Pérez y Herrera, 1991).

El nombre *Amanita*, derivado del griego amanítai, usado en la antigüedad clásica por Tournefort y Dilenio, desde finales del siglo XVII y principios del XVIII, fue asignado por Persoon, en 1797, a las especies con velo universal o volva, segregadas por él del género *Agaricus*, en el que habían sido clasificadas por Linneo (Pérez y Herrera, 1991).

Más tarde Fríes aceptó el género *Amanita* en el sentido de Persoon, pero en 1821, lo relegó al rango de tribu del género *Agaricus* y separó a las especies con volva y esporas rosadas en la tribu *Volvaria*, las cuales, en la actualidad, quedan incluidas en el género *Amanita* con la delimitación que ahora tiene. Varios autores han tratado de cambiar esta delimitación e hicieron descripciones de otros géneros como *Vaginata* S.F. Gray, *Amanitopsis* roze, *Pseudofarinaceus* O. Kuntze, y *Amanitella* Earle, que incluyen especies carentes de anillo, estructura que, como resto del velo parcial o interno, generalmente, permanece en la parte superior del estípite en las especies

del género *Amanita*; no obstante, las especies sin anillo, también se siguen incluyendo actualmente en éste último género (Pérez y Herrera, 1991).

Earle, en 1909, sustituyó el nombre *Amanita* por el de *Venenarius* y propuso el género *Leucomyces* para las especies tradicionalmente incluidas en el primer género, que presentan anillo y volva en forma de saco; pero los géneros *Venenarius* Earle y *Leucomyces* Earle no tuvieron una aceptación general entre los micólogos y en la actualidad no se usan (Pérez y Herrera, 1991).

Amanita caesarea fue descrita por primera vez por Giovanni Antonio Scopoli en 1772, quien le dio el nombre de *Agaricus caesareus* Scop. A partir de su primera descripción se le colocó en varios géneros. Lamark la ubicó por primera vez en el género *Amanita* en 1783, con el nombre de *aurantia*. No obtuvo su nombre científico actual hasta que el botánico C. H. Persoon, en 1801, la nombró como actualmente se le conoce: *Amanita caesarea*. Sin embargo otros botánicos y micólogos como C. E. O. Kuntze en 1898, W. A. Murril en 1913, y E. Horak en 1968, la ubicaron en los géneros *Fungus*, *Venenarius* y *Volvamanita*, respectivamente (Sánchez-Ramírez 2011).

Amanita caesarea (Scop.) Persoon es la especie tipo de la sección *Caesareae* y es considerada como un valioso recurso gastronómico en Europa. Otras especies de la sección, con parecido morfológico, se han descrito principalmente en Norte América, Asia, y África, y se han comparado con especies Europeas (Bas, 1977; Guzmán y Ramírez-Guillén, 2001). Adicionalmente, estas especies tienen un valor etnomicológico (Härkönen, 2002; Garibay-Orijel *et al.*, 2007; Christensen *et al.*, 2008) y económico como hongos silvestres comestibles (Yun y Hall, 2004 y Boa, 2004). No obstante su cultivo o producción no ha sido posible hasta ahora debido a múltiples impedimentos relacionados con la biología misma de los hongos ectomicorizógenos (Savoie y Largeteau, 2011).

1.4.1 Morfotaxonomía de la sección *Caesareae*

Desarrollo del cuerpo fructífero. Es hemiangiocárpico (Figura 1) debido a que el himenio es endógeno y se exhibe justo antes de la esporulación. Esto se debe, en primera instancia, a que la volva está bien desarrollada. Esta característica es de considerable importancia debido a que en diferentes secciones, el desarrollo del primordio es variable. La diferencia radica en el desarrollo del bulbo inicial que gradualmente se desarrolla en distintos tejidos del cuerpo fructífero.

La elongación del estípite también es variable dentro de las secciones y está relacionada con la formación de la volva y la presencia del bulbo (Sánchez-Ramírez, 2011).

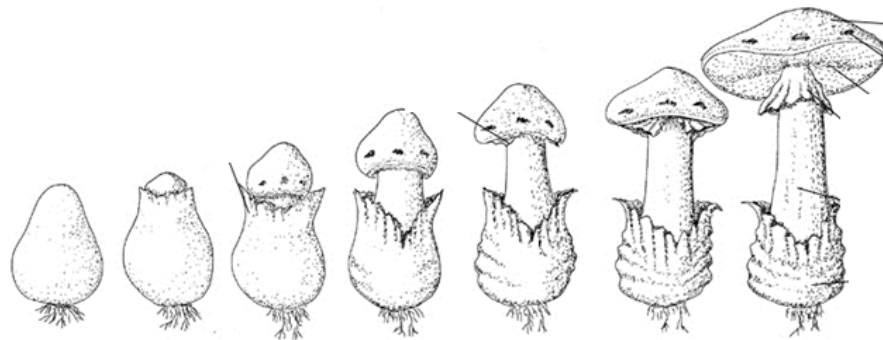


Figura 1. Desarrollo del cuerpo fructífero de *Amanita caesarea*

Elementos del margen del píleo. Bas (1969) consideró que había una fuerte correlación entre la reacción de basidiosporas con la solución de Melzer y la sulcación del margen del píleo. El valor biológico del margen de las estrías tiene que ver con la facilitación de una extensión y crecimiento rápido del píleo, lo cual confiere al cuerpo fructífero una ventaja para la liberación exitosa de basidiosporas antes de exponerse a las condiciones ambientales. La sulcación del margen es una característica importante del subgénero *Amanita*.

La volva. Dentro de los *Agaricales* la volva puede tener orígenes distintos; puede formarse a partir de: 1) el micelio circundante del primordio; 2) de hifas que crecen de

partes del cuerpo fructífero juvenil; y 3) de la diferenciación temprana de la capa externa del velo universal del primordio (Bas, 1969; Singer, 1986; Alexopoulos *et al.*, 1996). A esta última pertenece la volva de *Amanita*. La volva puede ser friable o fugaz, discreta, sacciforme, limbada o adnata. El tipo de volva friable es el más variable dentro del género y tiene que ver con los restos que quedan sobre el píleo. Los tipos de volva están directamente relacionados con la estructuración de las células del velo universal y el desarrollo del primordio. Dentro de la sección *Caesareae* la volva es sacciforme y se diferencia poco entre las especies. Adicionalmente, una característica de la volva la cual Tulloss (2009b) considera que puede ser de importancia para la sección *Caesareae sensu* (Tulloss, 2009a) es el borde interno de la volva, y la extensión de la parte felpada del estípite. El análisis que hizo Bas (1969) sobre el borde interno es excelente y revelador. Él observó un patrón de localización y de origen del borde interno, relacionado con el desarrollo del basidioma.

El velo parcial o anillo. El tejido primordial que se localiza entre las láminas primordiales y el estípite, generalmente se diferencia en un velo que cubre los bordes de las láminas jóvenes. Cuando el basidioma se desarrolla totalmente, el velo queda colgado sobre el estípite en forma de un anillo (Sánchez-Ramírez, 2011).

Fíbulas. Son estructuras celulares que están relacionadas con el crecimiento y diferenciación de las hifas. En particular, están implicadas en la migración de uno de los núcleos a la célula que acaba de desarrollarse en un micelio dicariótico (Alexopolous *et al.*, 1996). De ahí su nombre en inglés "clamp connections". Las fíbulas pueden encontrarse en cualquier estructura celular, pero es más frecuente que se encuentren en la base de los basidios. Las fíbulas de los basidios son comunes dentro del subgénero *Amanita* en la sección *Caesareae* y es un carácter necesario para distinguir entre miembros (Sánchez-Ramírez, 2011).

Basidiosporas. Son de suma importancia taxonómica dentro del género. Bas (1969,1977) llegó a la conclusión de que el tamaño de las basidiosporas es un caracter importante para la identificación de especies y estirpes.

Pigmentación y coloración. En *Amanita* la pigmentación celular por lo general proviene de la vacuola, la coloración del píleo es sumamente variable dentro de especies como en algunas de la estirpe *Caesarea*, por lo cual en algunos casos puede ser un caracter polimórfico (Sánchez-Ramírez, 2011).

1.4.2 Descripción macroscópica general

Amanita caesarea es un hongo común, caracterizado por ser un basidiomiceto, con un atractivo píleo de 50-180 mm de diámetro, hemisférico cuando joven, extendido o al madurar; anaranjado en el centro a amarillento hacia el margen; superficie viscosa, con restos de la volva en forma de placas lisas en su fase juvenil y ausentes en la fase adulta; margen estriado. Láminas libres, amarillas, bordes ligeramente flocosos. Estípite de 80-200 X 20-40 mm, cilíndrico, inicialmente macizo, después hueco, liso; color amarillo. Anillo amarillo, grueso, membranoso, flocoso en el exterior y estriado en su interior; volva blanca, en forma de saco, carnosa, con el borde libre (Figura 2) (Guzmán y Ramírez-Guillén, 2001).



Figura 2. Caracteres morfológicos de *Amanita caesarea*

1.4.3 Distribución geográfica

Tuxtla Gutiérrez (mercados), y Comitán, Chiapas; Nabogame, Chihuahua; Pueblo Nuevo, Durango; Acambay, Chalco, Ocuilan, Tejupilco de Hidalgo, Tenango del Aire, Estado de México; Taxco, Guerrero; Metzquititlán y Zacualtipán, Hidalgo; Morelia y Zitácuaro, Michoacán; Huitzilac, Morelos; Santiago, Nuevo León; San Juan Mixtepec, Oaxaca; Amealco y Pinal de Amoles, Querétaro; Calculalpan, Huamantla, Ixtenco, Nanacamilpa de Mariano Arista, San Pablo del Monte, Teolocholco, Tlaxco, y Yauhquemecan, Tlaxcala, Xico, Veracruz y Monte Escobedo, Zacatecas (Figura 1) (SEMARNAT, 2007).



Figura. 3 Distribucion geográfica del hongo silvestre *Amanita caesarea*

Fuente: Herbario Nacional Forestal (INIF) “Biol. Luciano Vela” del INIFAP

1.4.4 Hábitat

Es muy común en los bosques de *Pinus* (*P. hartwegii*, *P. montezumae*, *P. patula*, y *P. pseudostrobus*), bosques de oyamel (*Abies religiosa*) y bosques de *Pinus-Quercus*. Prospera en lugares donde hay abundante hojarasca. El intervalo altitudinal es de 2000-3157 msnm (Zamora-Martínez et al., 2001).

1.4.5 Época de recolecta

Julio a septiembre (Zamora-Martínez *et al.*, 2001).

1.5 Taxonomía en hongos

Desde que se comenzaron a estudiar los hongos se han presentado muchos tipos de clasificación para este grupo. Mediante observación al microscopio se han logrado reunir las características de tamaño de espora, consistencia y topografía en el anverso, así como las estructuras de las hifas. Si todo el conjunto de detalles expuesto anteriormente es interpretado de forma adecuada, se hará la identificación correcta de un hongo. (Franco y Santaella, 2000).

La taxonomía en hongos mantiene categorías, niveles o jerarquías, las cuales agrupan a los especímenes desde grupos que comparten características desde muy generales a nivel reino, hasta aquellas que comparten características muy específicas, las cuales suben hasta el nivel de género, especie, variedad, etc. Dentro de las claves taxonómicas para hongos basidiomicetos se toman en cuenta la morfología del sombrero (superficie, margen y color), las láminas (libres, apretadas, color), Basidios, células marginales, esporas, esporada, volva, anillo y hábitat (Franco y Santaella, 2000).

1.5.1 Clasificación taxonómica

Existen dos filo (divisiones): Zigomycota y Dicarimycota, ésta última, a su vez, comprende dos subfilo: Ascomycota y Basidiomycota. De ahí en adelante quedan agrupados en clases, órdenes, familias, géneros, especies y variedades como se muestra en la Tabla 1 (Franco y Santaella, 2000).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la especie *Amanita caesarea* (Guzmán, 2001).

Clasificación taxonómica	
Reino:	Fungi
Filo:	Basidiomycota
Clase:	Agaricomycetes
Orden:	Agaricales
Familia:	Amanitaceae
Género:	<i>Amanita</i>
Especie:	<i>A. caesarea</i>

El género de *Amanita caesarea* fue reportado por primera vez en México por Gándara durante el periodo de 1929 a 1931, seguido por Sharp reportándolo en 1948, Singer en 1957, Herrera y Guzmán 1972, Gastón Guzmán en los años de 1973,1977,1978,1984 y 1997 por último Montiel-Arcos en 1984. Guzmán (1997) reportó más de 60 nombres comunes para estos hongos, más de 30 en lenguas indígenas.

1.5.1.2 Nombre común

Los nombres importantes de este complejo en México son; “ahuevado”, “hongo amarillo”, “hongo de huevo”, “hongo real”, “hongo rojo”, “hongo del tiempo de aguas”, “yema” y “oronja” (Guzmán y Ramírez-Guillén ,2001).

En 1984 Montiel-Arcos presento un documento bajo el nombre de complejo *Amanita caesarea*, donde consideraba miembros de este complejo a; *A. basii*, *A. tecomante*, *A. tullossii* y *A. yema*.

1.5.2 Problemática taxonómica

En 1984 Montiel-Arcos presentó un documento bajo el nombre de complejo *Amanita caesarea*, donde consideraba miembros de este complejo a *A. basii*, *A. tecomante*, *A. tullossii* y *A. yema* (Guzmán y Ramírez-Guillén, 2001).

Hace algún tiempo se presentó una importante controversia por los nombres de los miembros de este complejo, Guzmán y Tapia, en 1997, llegaron a la conclusión que probablemente los especímenes de América del Norte eran los mismos que los encontrados en México solo con diferentes nombres, por lo que optaron por no incluir esos nombres en materiales mexicanos (Guzmán y Ramírez -Guillén, 2001).

Guzmán y Ramírez-Guillén (2001) reportaron que las especies mexicanas del complejo *Amanita caesarea* son seis: *A. basii*, *A. caesarea*, *A. laurae*, *A. tecomante*, *A. tullossii* y *A. yema*. Estos hongos que forman el complejo *Amanita caesarea* desde el Este de E.U.A y Canadá hasta México y Guatemala tienen una historia confusa ya que hay varios nombres utilizados para este complejo.

Debido a las discrepancias anteriores se realizó un estudio comparativo de diferentes colecciones del Oriente de Canadá y EE.UU., México, Europa, Asia y África, a partir del cual se consideró que 13 especies integran el complejo *Amanita caesarea* (Guzmán y Ramírez -Guillén, 2001). Las especies de este complejo están divididas en dos familias: Familia *Caesareae*, con *A. basii* sp. nov., *A. caesarea*, *A. mafingensis*, *A. tecomante* sp. nov., *A. tullossii* sp. Nov., *A. yema* sp. nov., y las familias *Hemibaphae* con *A. hemibapha* (con cuatro variedades), *A. Arkansana*, *A. caesareoides*, *A. jacksonii*, *A. laurae*, *A. masasiensis*, *A. tanzanica*. Esta división en dos familias se basa en el espesor del sub-himenio de más de 3 células de grosor y

de espesor no más de 3 células, respectivamente. Sin embargo, varios materiales de *A. jacksonii* tenía un espesor sub-himenio con (3), 4-5 células, lo que lo separa de *A. tullossii*.

Debido a esto fue necesario realizar un estudio cuidadoso del sub-himenio para este complejo en varias etapas de desarrollo del basidioma para evaluar el valor taxonómico del espesor del sub-himenio con relación al problema presentado con *A. jacksonii* vs. *A. tullossii* (Guzmán y Ramírez -Guillén, 2001).

Los rasgos taxonómicos para distinguir la especie son el tamaño de las esporas y la forma (considerado aquí como la variación normal de la longitud dividida por la anchura, sin los extremos), si el píleo es escaldado y su color, la longitud y la descamación del estípite. El resto de las características microscópicas, como cheilocystidia, elementos de la volva y anillo, pileipellis, entre los más importantes (Guzmán y Ramírez-Guillén, 2001).

La nueva especie, *A. basii* fue descrita en base en aquellos "*A. caesarea*" de México y Europa que presentaron esporas más pequeñas. *Amanita laurae* fue separada de *A. arkansana* por la descamación visible sobre el estípite cambiándolo de amarillo a blanco, el rasgo no ha sido observado en *A. arkansana* y confusamente fue observado en *A. masasiensis*. *Amanita yema* es una especie mexicana con una pizca de rojo, convexo, no umbonado, píleo moderadamente escaldado y estípite mucho más largo, que lo separan de *A. caesarea*. *Amanita tecomante* se diferencia sólo de *A. yema* por tener esporas más pequeñas. Es probable que ambos crezcan en los EE.UU. y Guatemala. En México, *A. jacksonii*, es la especie más común, seguida por *A. yema*, *A. tecomante*, *A. tullossii*, *A. caesarea* y *A. basii*. La especie más rara es *A. laurae* (Guzmán y Ramírez-Guillén, 2001).

Guzmán y Ramírez-Guillén en el 2001 propusieron que las especies que conformaban el complejo *Amanita caesarea* sólo eran seis, se pudo haber llegado a éste resultado debido a que ellos realizaron un análisis taxonómico más detallado

tomando en cuenta rasgos morfológicos que Pérez y Herrera no tomaron en cuenta en el análisis realizado en 1991.

1.6 Variabilidad genética

La caracterización genética de las poblaciones contribuye a la conservación de los recursos naturales proporcionando herramientas que describen la diversidad genética inter e intrapoblacional y proporcionando todos los antecedentes para entender los cambios evolutivos (Sosa, 2001).

La determinación de la variabilidad de las poblaciones de una especie y los parámetros poblacionales que pueden ser estimados a partir de ella, como la distancia génica, la identidad genética y el flujo génico son elementos que ayudan en la determinación de límites específicos, siendo así esta determinación un elemento esencial para las estimaciones de la diversidad porque la especie es la unidad básica de esta, y los límites específicos son un factor clave que mejoran la validez de las estimaciones de la diversidad (Bañares, 1994, citado por Almaraz-Abarca, 2011).

1.6.1 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son herramientas que permiten identificar variaciones directamente en el material genético de los organismos, provienen de diferentes clases de mutaciones en el genoma, son prácticamente ilimitados en número y una de sus grandes ventajas es que no están influenciados por factores ambientales, por la edad o el estado fenológico del individuo. Estas variaciones genéticas pueden ser visualizadas mediante técnicas electroforéticas, según el método de detección usado se pueden clasificar en: los detectados por hibridación, por PCR y por secuenciación (Almaraz-Abarca, 2011).

1.6.2 Marcadores ISTR

Uno de los marcadores moleculares usado para estudios de Hongos son los ISTR (inverse sequence tagged repeat), ya que se basan en la detección del polimorfismo asociado a la inserción de retrotransposones, lo que ha explicado algunas variaciones morfológicas en estos individuos, los marcadores ISTR son detectadas por medio de la amplificación por PCR, de la variabilidad producida por la acumulación en el tiempo de inserciones de retrotransposones llamados copi-like. Tienen la capacidad de detectar amplios niveles de polimorfismos sin digestión de ADN, el uso de iniciadores universales, amplifican gran número de loci, son altamente reproducibles, no requieren gran cantidad ni calidad de ADN y son aplicables a una amplia gama de organismos (Almaraz-Abarca, 2011).

Ya que estos marcadores presentan diferentes grados de heterogeneidad en sus secuencias y de polimorfismo dado por su inserción aleatoria, lo que les confiere una gran capacidad de detección de variabilidad tanto inter como intraespecífica y por lo tanto, son capaces de diferenciar entre individuos y entre poblaciones (Almaraz-Abarca, 2011).

Prácticamente no se ha encontrado información sobre la variabilidad genética del complejo *Amanita caesarea*, mexicano, basada en marcadores moleculares ISTR a pesar de que es la especie silvestre de mayor consumo en México y del riesgo que esta especie enfrenta debido al proceso de colecta al que ha estado sometido.

1.7 Conservación de los recursos genéticos de hongos

Los recursos genéticos de hongos no sólo son de gran interés en áreas tales como agronomía, agricultura, alimentos y piensos, sino también para el descubrimiento y la producción de moléculas o componentes de alto valor añadido en las industrias química y farmacéutica. La FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) ha tenido éxito en la estimulación de una serie de actividades para el desarrollo de cultivo de hongos y de este modo promover oportunidades de cooperación entre los profesores, científicos, tecnólogos, políticos,

que participan en un gran campo de actividades tales como: micología, industrias de taxonomía, genética, biología molecular, producción de semilla, cultivo, conservación, alimentos, químicos y farmacéuticos (Sánchez-Vázquez y Huerta, 2000).

El programa de la FAO sobre recursos genéticos de hongos puso en marcha un boletín informativo sobre los recursos micogenéticos en el año 1957. En 1963, la FAO asignó a un grupo de expertos sobre exploración fúngica para establecer directrices internacionales para la recopilación, conservación e intercambio de germoplasma (Sánchez-Vázquez y Huerta, 2000).

La FAO promovió y creó oportunidades para la cooperación y el intercambio científico entre los países interesados por la investigación y el desarrollo de la producción de setas, el resultado ha sido el establecimiento de la Red de setas en 1988, como un grupo de trabajo especial que cubre los países de Europa, promovido por la Oficina Regional. Esta red se amplió en 1991 para formar la Red Global de Setas de Investigación y Desarrollo, establecida bajo los auspicios de la FAO. La Red Global también contribuirá al Sistema de Alerta sobre los Recursos Fitogenéticos de la FAO de Información Global y de la Agricultura y la Alimentación (Quimio *et al.*, 1990).

El programa de la FAO para la conservación de germoplasma de hongos y la explotación, se centrará en la organización de una gran red de cooperación multidisciplinaria complementaria y coordinada (Sánchez-Vázquez y Huerta, 2000).

Tomando en cuenta:

- La colecta de los recursos fúngicos.
- Colecciones coordinadas de germoplasma de hongos y la constitución de bancos de germoplasma y bases de datos internacionales.
- Caracterización taxonómica de los enfoques morfológicos y moleculares, la determinación de la variabilidad genética de las poblaciones de hongos silvestres para su posterior reproducción.

- Conservación del Germoplasma: metodologías para la conservación de acuerdo con el nivel técnico de los países que participan en el programa.
- La caracterización de las potencialidades de las cepas de acuerdo a los sustratos sin valor disponible, las costumbres alimentarias, la micorrización, productos metabólicos, potencialidades para la protección del medio ambiente, y para el control biológico, etc.
- La identificación de los desechos sin valor para el cultivo de hongos comestibles.
- La implantación de las redes de familiares, la producción de semilla semi-industrial e industrial.
- Implantación de redes para determinar las técnicas de cultivo
- Estudio de las posibilidades de patentar la explotación comercial y/o industrial del germoplasma, especialmente para las cepas que producen componentes de alto valor añadido.
- Los cursos técnicos en la ciencia y el cultivo de setas.

A pesar de la abundancia de los recursos genéticos de hongos en México y la extensa tradición de consumo de setas en este país. Se puede observar que los vínculos entre la investigación y la industria, los investigadores y los productores y consumidores de setas silvestres son insuficientes, lo que implica un desconocimiento parcial o total en relación con la problemática que se está enfrentando. Donde los esfuerzos de la investigación básica, se han resumido a la parte taxonómica. Actualmente hay varios estudios en curso que se centran principalmente en la taxonomía de las especies no comestibles. Se puede prever que esta línea de investigación se extenderá a los aspectos genéticos y en el futuro abarcará las especies comestibles de importancia comercial (Rambelli, 1985).

La FAO establece que, para planificar una estrategia de conservación, es necesario definir, registrar y evaluar los recursos genéticos que se hallen en peligro. Es esencial, por lo tanto, una descripción o caracterización completa de los mismos, proponiéndose cuatro niveles de actuación (Quimio *et al.*, 1990).

- 1.- Elaboración de un inventario nacional de los recursos genéticos fúngicos;
- 2.- Control del estado del conjunto de los recursos genéticos fúngicos;
- 3.- Mayor conocimiento genético y económico de las cualidades únicas de las especies con objeto de desarrollar estrategias que hagan un mejor uso de estas características a corto y largo plazo;
- 4.- Descripción molecular comparativa mediante marcadores moleculares para establecer qué especies poseen una diversidad genética significativa para dirigir mejor las acciones de conservación.

La posibilidad de diferenciación específica con base genética ha tomado gran interés en la gestión de especies locales. Para el estudio de esta diferenciación específica es necesario estudiar la diversidad existente entre las especies. La FAO define la biodiversidad como la variabilidad genética de los diferentes tipos de recursos genéticos a nivel de especies, familias y genes, de los que se deben conservar tantos alelos o variantes como sea posible (Crossa, 1993), (Smith, 1984). El objetivo es mantener los recursos genéticos destacando que la variación genética en caracteres, tanto conocidos como desconocidos, puede ser útil para mantener las características productivas a pesar de los cambios del entorno. Esto implica que los esfuerzos de conservación se enfocarán hacia la diversidad genética de una especie en conjunto, sin preferencias de ciertos caracteres sobre otros.

Aunque el hecho del estudio de las setas no se considera prioridad entre las políticas de la nación, así como la insuficiencia de recursos humanos y financieros, nos lleva a predecir que los avances de la investigación seguirán fuera de proporción con la diversidad fúngica de México (Smith, 1984).

1.8 Variabilidad química

La caracterización química es una herramienta importante con la cual se puede lograr la tipificación de especies con relativa facilidad y rapidez, haciendo uso de los metabolitos secundarios como marcadores químicos, ya que desempeñan funciones

muy diversas y fundamentales en los organismos que las producen (Almaraz-Abarca, 2011).

1.8.1 Metabolitos secundarios

Los hongos, al igual que las bacterias, las plantas, las algas e inclusive algunos animales, sintetizan compuestos que han sido denominados como metabolitos secundarios. Dichos compuestos son especialmente abundantes en organismos que no cuentan con un sistema inmunológico, también han sido considerados como productos de desintoxicación, sobre expresiones del metabolismo primario, productos de degradación y almacenamiento, sin que haya evidencias concretas de que desempeñen esas funciones (Hadacek, 2002).

La gran diversidad estructural del metabolismo secundario fue reconocida a finales del siglo XIX, Almaraz-Abarca (2011) menciona que el químico Bu'Luck en 1961 describió la dimensión de la diversidad y a lo que se enfrentaban los investigadores del metabolismo secundario de la siguiente manera: "Mientras el jardín de los enzímólogos es un sueño de uniformidad, un prado verde donde los ciclos de Calvin y Krebs funcionan alrededor de un orden disciplinado, el químico orgánico camina en una jungla desordenada de extractos poco refinados, de arcoíris de pigmentos, donde en cada arbustos se encuentran la acecho las formas desfiguradas de algunos alcaloides, el perfume exótico de algún nuevo terpeno o algunos espantoso y explosivos poliacetilenos".

De forma muy general, los metabolitos secundarios se clasifican en función de su origen biosintético en tres grupos principales: los fenoles, los terpenos y los compuestos secundarios nitrogenados (Taiz y Zeiger, 1991).

Uno de los compuestos clave importante en la elaboración de los metabolitos secundarios, es el ácido fosfoenolpirúvico. A partir de este y por diversos procesos se genera por un lado el ácido shiquímico, cuyas posteriores transformaciones producirán: los aceites esenciales del tipo arilpropanoide, los bisarilpropanoides, los alcaloides derivados de aminoácidos aromáticos, y una parte carbonada de la estructura de los flavonoides. Por otra ruta, el ácido fosfoenolpirúvico se convierte en

ácido pirúvico, cuya descarboxilación enzimática produce el acetil coenzima A, sustancia que será punto de partida para la biosíntesis de estos metabolitos: los aceites esenciales del tipo terpenoide, los ácidos grasos, las cadenas policetidas y algunos compuestos de tipo fenólico, los alcaloides originados en el ciclo del ácido cítrico y una parte de la estructura de la gran diversidad de los flavonoides (Geissman, 1969).

Dicha diversidad se da principalmente por diferencias en el nivel de oxidación del anillo heterocíclico, lo que permite clasificar al grupo de los flavonoides en sus diferentes tipos, esta diversidad también se da por los diferentes patrones de hidroxilación, glicosilación, metilación, metoxilación y acilación en los anillos A y B. Dentro de las principales clases de flavonoides se encuentran las flavonas, los flavonoles, los flavonoides, las antocianinas y los isoflavonoides, los compuestos no flavonoides se dividen en ácidos fenólicos (benzoicos y cinámicos) y en estilbenos (resveratrol) (Valls *et al.*, 2000).

Los aceites esenciales pueden tener dos orígenes distintos; las que son del tipo arilpropanoide, es decir C6-C3, se producen, obviamente, mediante la ruta del ácido shiquímico, y los que provienen del isoeugenol. Los aceites esenciales que son del tipo terpenoide (mono y sesquiterpenos), se biosintetizan por la ruta del ácido acético, en su forma activa Acetil Coenzima A (Geissman, 1969).

A nivel fisiológico participan ya sea formando parte de la estructura química de sustancias del metabolismo primario o actuando como precursores de sustancias del mismo, a nivel ecológico su participación contribuye a garantizar la sobrevivencia de los organismos productores de metabolitos secundarios como individuos y especie y representa la base de un lenguaje químico en el que se basa una parte importante del equilibrio de los ecosistemas (Almaraz-Abarca, 2011).

Los metabolitos secundarios en su mayoría desempeñan funciones de protección, por ejemplo contra la radiación ultravioleta, contra posibles daños causados por

factores ambientales, oxidativos y ataque contra microorganismos (Singsaas y Sharkey, 2000).

Recientemente se ha demostrado que existe todo un lenguaje químico, basado en los compuestos secundarios, que implica tres de los niveles tróficos, en el que se sustenta el equilibrio ecológico de los ecosistemas (Almaraz-Abarca, 2011).

En el caso de los hongos y algunas plantas las relaciones simbióticas están basadas en los compuestos secundarios, por ejemplo la interacción aleloquímica puede establecerse entre individuos de una misma especie o entre individuos de diferente especie, considerando en ambas que los metabolitos secundarios son compuestos que puedan tener influencia sobre el crecimiento ectomicorrízico (Almaraz-Abarca, 2011).

Sabiendo las diferentes funciones y la importancia que tienen los metabolitos secundarios para los organismos que las producen y el valor que representan como compuestos útiles desde el punto de vista antropocéntrico, es importante mencionar que la composición y distribución de ciertas clases de compuestos secundarios han sido investigadas en grupos particulares de plantas con el fin de encontrar relaciones biológicas (fenéticas, evolutivas o filogenéticas) que contribuyan a la delimitación y a la ubicación de diferentes taxa en un sistema de clasificación con resultados que permitan considerar a los perfiles de metabolitos secundarios como caracteres químicos valiosos en taxonomía (Almaraz-Abarca, 2011).

1.8.2 Metabolitos secundarios en basidiomicetos

Dentro de los hongos reportados como productores de metabolitos biológicamente activos (metabolitos secundarios), los basidiomicetos constituyen una clase de hongos representada por más de 30,000 especies, las cuales producen una amplia gama de productos naturales que abarca desde componentes estructurales con actividad antitumoral inmunológicamente activos, hasta agentes antimicrobianos,

antifúngicos, antivirales, citostáticos, enzimas reguladoras de crecimiento y aromas (Brizuela *et al.*, 1998).

Es conocido que ciertos componentes macromoleculares aislados de hongos superiores, tales como polisacáridos, glicoproteínas, ácidos nucleicos, etc., poseen actividad antitumoral, relacionada esta con la activación que provocan dichas sustancias de la respuesta inmunológica del hospedero (Manitto, 1981)

Dentro de los fungimetabolitos se encuentran desde compuestos apreciados por su valor nutricional (proteínas, aminoácidos esenciales, etc.) hasta aquellos con excelentes acciones biológicas (triterpenoides, esteroides, ácidos triterpenoidales, etc.) (Huie, 2004).

Los polisacáridos antitumorales producidos por basidiomicetos han ido recibiendo en los últimos años una creciente atención, sobre la obtención de β -glucanos solubles en agua y en álcali, polisacáridos antitumorales aislados a partir de hongos comestibles o medicinales tales como *Lentinula edodes*, *Grifola frondosa*, *Amanita caesarea* y *Trametes versicolor* (Brizuela *et al.*, 1998).

II.- JUSTIFICACIÓN

Amanita caesarea es la especie silvestre comestible de mayor consumo nacional y local, es de gran importancia para los habitantes del lugar, quienes de la recolección obtienen beneficios económicos y nutrimentales.

En la actualidad no existe un plan de manejo para la extracción de esta especie, y su explotación desmedida la ha colocado en la NOM-059-ECOL-1994, norma que incluye a todos los miembros del complejo como una sola especie, situación que estaría dejando desprotegidas a las demás, sin mencionar cuál de ellas está sufriendo una mayor presión, de continuar con estas colectas exhaustivas sin conocer que especies se están colectando, llevaría a la pérdida de la diversidad de este recurso, por ello es necesario desarrollar planes de manejo para su aprovechamiento sustentable, pero es preciso estimar la variabilidad de dicha especie.

Existe una controversia taxonómica relativa a la delimitación específica del complejo *Amanita caesarea*, debido a las diferencias morfológicas entre las especies que lo integran. Se han presentado avances respecto a la identificación basada en caracteres morfológicos para poder ubicar a las especies de éste complejo, pero al tratarse de un complejo críptico de especies se debería hacer uso de herramientas más específicas para estimar la variabilidad, basadas en marcadores moleculares y químicos, marcadores que han aportado información muy valiosa para estudios taxonómicos y de variabilidad, por lo que su posible aplicación podría ayudar a discernir sobre las especies que conforman el complejo *Amanita caesarea*.

III.- OBJETIVO

Determinar la variabilidad genética de las especies pertenecientes al complejo *Amanita caesarea* encontradas en la región de El Salto, Pueblo Nuevo, Durango, mediante marcadores micoquímicos (perfiles polifenólicos, terpénicos y ácidos grasos por HPLC–DAD–ESI/MS y CG-MS) y marcadores moleculares (ISTR determinados por PCR), para aportar nuevos caracteres de interés taxonómico que ayuden a la delimitación del complejo *Amanita caesarea*.

3.1 Objetivos específicos

- Colectar los ejemplares pertenecientes al complejo *Amanita caesarea* en el periodo julio- septiembre de 2013, presentes en la región de El Salto, Pueblo Nuevo, Durango.
- Realizar la identificación taxonómica de las especies colectadas.
- Determinar los compuestos micoquímicos (perfiles polifenólicos, terpénicos y ácidos grasos por HPLC–DAD–ESI/MS y CG-MS) de las especies colectadas.
- Realizar un análisis molecular (usando marcadores ISTR) de las especies colectadas.

IV.- HIPÓTESIS

Los metabolitos secundarios y marcadores moleculares pueden ser características que proporcionen información para encontrar relaciones biológicas (fenéticas, evolutivas o filogenéticas) que contribuyan a la delimitación y la ubicación taxonómica de las especies del complejo *Amanita caesarea*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Descripción de la zona de colecta

Localización.- Parte sureste del estado de Durango, colinda: al norte con el municipio de Tayoltita y el municipio de Durango; al suroeste con el Estado de Sinaloa y Nayarit; y al este con el municipio del Mezquital. Su ubicación geográfica corresponde a los 23° 44' de latitud norte y 105° 22' de longitud oeste, con una altitud de 2,560 metro sobre el nivel del mar (INEGI, 1997).

Geología.- La Sierra Madre Occidental, en donde está asegurada la región de El salto pertenece a la era cenozoica, del período terciario y con roca o suelo constituido por material ígneo extrusivo (INEGI, 1997).

Fisiografía.- La Sierra Madre Occidental es una de las cuatro provincias fisiográficas más importantes del país, con una subprovincia la cual es la Gran Meseta y cañones duranguenses, mesetas y cañones del sur que es donde se encuentra el sitio de recolección (INEGI, 1997).

Clima.- Es de tipo o subtipo semifrío, subhúmedo con lluvias en verano. Con una temperatura media anual de 11.5°C. La precipitación promedio anual es de 936.2 milímetros. Los días con heladas se presentan de manera decreciente; donde los meses de enero, febrero, marzo, abril, noviembre y diciembre son los meses que presenta más días con heladas; después siguen mayo y octubre; en tercer lugar Junio y septiembre; En cuarto lugar agosto y en último lugar julio que no presenta días con heladas (INEGI, 1997).

Vegetación.- La región de El Salto presenta un tipo de vegetación boscosa, con masas arboladas de *Pinus spp* (pino) y *Quercus spp* (encino), la mayor parte de ellas están dominadas por pinos y por comunidades mixtas de pinos y encinos (INEGI, 1997).

Suelo.- Es el denominado litosol, el cual puede sustentar cualquier tipo de vegetación según el clima, predominando la vegetación forestal. El litosol es un suelo muy delgado, su espesor es menor de 10 cm, descansa sobre un estrato duro y continuo, tal como roca, tepetate o caliche (INEGI, 1997).

En la figura 4 se muestra la ubicación geográfica de las localidades pertenecientes a la región de El Salto, Pueblo Nuevo, Durango, dónde se realizaron las colectas y en la tabla 2 se presentan sus coordenadas geográficas.

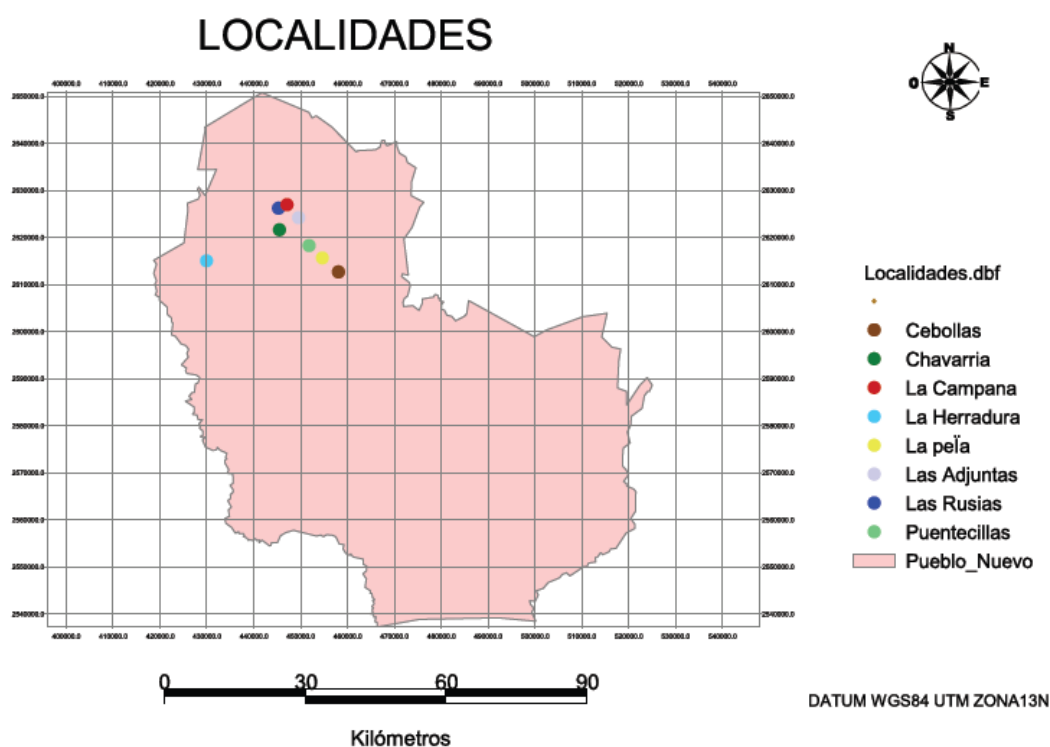


Figura 4. Mapa de la zona de colecta

Tabla 2.- Coordenadas geográficas de las localidades de colecta.

Localidad	Coordenadas	
	N	W
La Herradura	23°75'28"	105°34'75"
Las Rusias	23°44'47"	105°32'14"
La Campana	23°45'11"	105°31'09"
Las Adjuntas	23°39' 17"	105° 44' 16"
Chavarria	23° 42' 5"	105°43' 45"
Puentecillas	23°39'88"	105°27'82"
La Peña	23°39' 88"	105° 27' 82"
Cebollas	23°37'28"	105°24'41"

5.1.2 Colecta de hongos del Complejo *Amanita caesarea*

La colecta del complejo *A. caesarea* se realizó en el periodo de máxima producción de fructificaciones (julio a septiembre del año 2013) en la region de El Salto, Pueblo Nuevo, Durango, el tipo de muestreo fue guiado, y las recomendaciones que se tomaron en cuenta fueron las siguientes; (Zamora-Martínez, 2001):

1. Se localizaron las fructificaciones mediante recorridos por el bosque, buscando montículos de hojarasca en el piso forestal.
2. La búsqueda se realizó siguiendo una dirección circular alrededor de los árboles hospederos.
3. Una vez ubicado el hongo, se procedió a remover la hojarasca con movimientos suaves de la mano con la finalidad de maltratar lo menos posible el sombrero. Solo se recolectaron los individuos mayores a 7 cm de longitud, no muy maduros, ni con el sombrero muy abierto, o los incompletos (rotos, mordidos, larvas, etc.)

- 4.- La extracción del esporoma se realizó con una pala pequeña tratando de extraer todo el cuerpo fructífero sin dañar la volva.
5. Una vez que se extraía el cuerpo fructífero se cubría con hojarasca el hueco dejado al extraer el hongo.
6. Las fructificaciones recolectadas fueron previamente etiquetadas y fotografiadas para su identificación y se transportaron en una canasta ancha y de 20-30 cm de profundidad, colocándolas con el sombrero invertido.

5.2 Conservación y preparación de la muestra

Las muestras colectadas, se limpiaron quitando hojarasca, tierra e insectos. Enseguida se registro el peso en fresco de cada uno de los hongos. Posteriormente a todas las muestras se les extrajo aproximadamente un gramo de basidio fresco para el análisis molecular dicha porción se puso en congelación a -20° C para el análisis molecular. Una vez tomada dicha muestra el cuerpo fructífero restante de cada individuo se puso a secar a 55 °C durante 48 horas, transcurrido ese tiempo las muestras se guardaron en cajas de cartón para enviarlas a su posterior identificación taxonómica al Instituto de Ecología (INECOL), en Xalapa, Veracruz. Una vez que todos los ejemplares fueron identificados se prosiguió a triturarlos en un mortero hasta obtener un polvo fino, el cual fue colocado en bolsas de papel previamente etiquetadas con el correspondiente número de muestra, para una fácil identificación, de ahí se tomó la cantidad requerida para los diferentes análisis micoquímicos.

5.3 Caracterización Micoquímica

5.3.1 Extracción de polifenoles

Se pesaron de forma individual tres gramos de muestra perteneciente al carpóforo seco y molido, los cuales se pusieron a macerar durante 6 horas en 40 mL de una mezcla de acetona/agua 80:20 a una temperatura de -4° C. Transcurrido dicho tiempo las muestras fueron colocadas en un baño ultrasónico durante 15 minutos,

después las muestras fueron centrifugadas a 4000 g durante 10 minutos, posteriormente se recuperó el sobrenadante y el residuo se extrajo con tres lavados de 40 mL adicionales de la mezcla de acetona/agua. Una vez que se obtuvieron todos los lavados se combinaron y se evaporaron a 30° C para eliminar la acetona. A continuación la fase acuosa se lavó con 40 mL de n-hexano, enseguida las muestras fueron sometidas a una extracción líquido-líquido con tres lavados de 40 mL de éter dietílico, a continuación las fases orgánicas se evaporaron a 30 ° C hasta sequedad y después las muestras fueron resuspendidas en 2mL de una mezcla de metanol/agua 80:20 y posteriormente fueron filtradas con un disco de filtro de 0.22 micras desechable para análisis HPLC (Markham y Campos, 1996).

5.3.2 Extracción de terpenos y ácidos grasos

Se pesaron 2 g de hongo seco molido y se le agregaron 50 mL de diclorometano, enseguida se puso en agitación en el Shaker por una hora a temperatura ambiente, se dejó reposar un día. Posteriormente se filtró la solución con papel Whatman # 1 y el filtrado se puso a secar en oscuridad obteniendo F1. La parte sólida del filtrado se puso a macerar con 50 mL acetato de etilo en agitación en el Shaker por una hora a temperatura ambiente después se dejó reposar un día. Enseguida se filtró nuevamente la solución con papel Whatman # 1 y el filtrado se puso a secar en oscuridad obteniendo F2.

Para obtener las fracciones restantes se pesaron 6 gramos de hongo seco y molido luego se le adicionaron 250 mL de NaOH 0.1 M y posteriormente se puso en agitación constante en el Shaker por 2 horas a temperatura ambiente. Enseguida se filtró la solución con papel Whatman 1, la fase líquida llamada F3 se guardó y a la fase sólida se le adicionaron 250 mL de NaOH 0.5 M y se colocó en agitación constante en el Shaker por 2hrs a temperatura ambiente. A continuación se filtró la solución con papel Whatman 1 obteniendo la fase líquida F4 y a la fase sólida se le adicionaron 250 mL de cloroformo para después colocarla en el Shaker por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se filtró la solución con papel Whatman # 1

obteniendo la fase líquida F5 y a la fase sólida se le adicionó una solución de cloroformo/metanol 2:1 colocándolo después en agitación constante en el Shaker por 30 min a temperatura ambiente. Después se filtró la solución y se guardó para análisis posteriores la fase sólida junto con la fase líquida llamada F6. Por último todas las fracciones F1, F2, F5 y F6 se dejaron secar en oscuridad para usarse en el análisis de cromatografía en capa fina, donde se utilizó como fase estacionaria sílica y como fase móvil tolueno/etilmetilcetona (9:1). Luego se revelaron las placas aplicando una mezcla de $MnCl_2$ / MeOH/ H_2SO_4 (revelador de terpenos) y después la placa fue calentada a 60 °C en la estufa. A continuación se observaron bajo luz UV (254/365 nm onda corta y larga y respectivamente) antes y después de ser reveladas.

5.3.3 - Análisis HPLC-DAD-ESI/MS

El análisis HPLC–DAD–ESI/MS se realizó en el Laboratorio de Micología del Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB-INTECH), de la Universidad de San Martín, Chascomús, Argentina.

Los extractos polifenólicos se analizaron en un cromatógrafo de líquidos Hewlett-Packard 1100 series (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). La separación se llevó a cabo en una columna de fase inversa Spherisorb C18 (3x 150 mm, x4.6 μ m) a 25°C.

Los disolventes utilizados fueron: 2.5 % de ácido acético en agua (A), ácido acético 2.5 % / acetonitrilo (90:10) (B), y acetonitrilo grado HPLC 100 % (C). El gradiente empleado fue: isocrático 100 % de A durante 10 min , 50 % de A y 50 % de B durante 10 min , isocrático 100 % de B durante 15 min , 90 % de B y 10 % C durante 10 min , 70 % de B y 30 % C durante 10 min , 50 % de B y 50 % C durante 5 min , 20 % de B y 80 % C durante 5 min , 100 % de A durante 5 min , a una velocidad de flujo de 0.5 mL / min . La detección se llevó a cabo en un detector de matriz de diodos (DAD), usando 280 nm como longitud de onda preferida, y en un espectrómetro de masas (MS) acoplado al sistema de HPLC.

El análisis LC-MS se realizó utilizando un detector FinniganTM LCQ MS (Thermoquest, San José, CA, EE.UU.) equipado con una fuente de API, utilizando una interface ESI (ionización por electrospray) . Tanto el gas envolvente y el gas auxiliar eran de nitrógeno a velocidades de flujo de 1.2 y 6 L / minuto, respectivamente. La tensión capilar y fuente de voltaje eran 10 V y 3,5 kV, respectivamente, y la temperatura del capilar fue de 175 ° C. Los espectros se registraron en el modo de iones negativos entre 80 y 620 m/z .

El cromatógrafo de MS fue programado para llevar a cabo una serie de tres exploraciones consecutivas: una masa total de 150-1500 amu, una exploración de zoom del ion más abundante en un rango de ± 5 amu , y una exploración de MS-MS del ion más abundante en la masa completa usando una energía normalizada de colisión de 45 % .

5.3.4 Análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas CG-EM

Los análisis por CG-EM se realizaron en un cromatógrafo marca Hewlett Packard 6890 con las siguientes características: columna capilar HP-5 de 30m, 0.33 mm de diámetro interno y 25 μ m de espesor; gas de arrastre Helio 4.5 a 1ml/min; modo split 1:10, temperatura del inyector 300° C, programa de temperatura desde 70° C hasta 300° C a 7.4°C/min para el análisis de los ácidos grasos. Este cromatógrafo, está acoplado a un espectrómetro de masas 5973 con una fuente de ionización de 70eV. Los espectros fueron adquiridos en modo SCAN.

Para el análisis de los compuestos polifenólicos se emplearon las condiciones descritas por Juárez, *et al.* (2008): temperatura del inyector 250° C, y el programa de temperatura: 90° C por 1 min, se incrementó a 220° C a 6° C/min, y hasta 290° C a 10° C/min durante 1,23 min y finalmente se elevó hasta 310° C a 40°C/min y se mantuvo dicha temperatura durante 7.5 min.

5.3.5 Análisis de datos

Los datos de la masa exacta de los iones moleculares se analizaron mediante el software Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania), el cual provee una lista de posibles fórmulas y estructuras químicas de los compuestos mediante un editor de fórmulas inteligentes (Smart Formula Editor).

Una vez que se obtuvieron todos los compuestos micoquímicos con el software antes mencionado se consideró cada uno de ellos como un carácter químico individual. Después se construyó una matriz de presencia ausencia formada por las muestras individuales contra todos los compuestos resueltos. La matriz de presencia ausencia se sometió a un análisis de cluster en el programa PAST3.

5.4 Caracterización molecular

5.4.1 Extracción de DNA en hongos.

El DNA genómico se aisló con el kit comercial DNAzol® en el laboratorio de Biotecnología del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Durango (CIIDIR IPN Durango), siguiendo el protocolo del fabricante:

Se pesaron 0.5g de la muestra de basidioma congelado y se colocaron en un tubo eppendorf, enseguida se le añadieron 400 µl del reactivo DNAzol®, después se prosiguió a triturar la muestra con un pistilo estéril, enseguida se mezcló la solución en vortex y posteriormente se dejó reposar durante 5 min a temperatura ambiente. Transcurrido dicho tiempo se centrifugo la muestra a 12,000 g durante 10 min y se transfiere el sobrenadante o fase acuosa, en un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml.

Después se precipitó el ADN adicionando a la fase acuosa 500 µl de alcohol etílico absoluto y mezclando las muestras por inversión de los tubos 8 veces, enseguida las muestras se dejaron reposar 5 min a temperatura ambiente durante 5 min y por último se centrifugaron a 5,000 g por 4 min. A continuación se preparó una solución de lavado con DNAzol®-etanol mezclando 1mL de DNAzol® con 750 µl de etanol absoluto. Después

se decantaron las muestras y enseguida se les agregaron 600 µl de la solución anterior con el ADN precipitado, dejándolas reposar durante 5 min seguida de otra centrifugación a 5,000 g por 4 min. Después se removió la solución de lavado y se lavó la pastilla de DNA mezclando vigorosamente con 500 µl de etanol al 80% seguido por una centrifugación de 5,000 g durante 4 min. Por último se removió el etanol por decantación y se colocaron los tubos invertidos en posición vertical por 1-2 min para secar la pastilla de ADN. Enseguida se disolvió la pastilla de ADN en 25 µl de buffer TE (pH 8.0) y se almaceno a -20°C hasta su utilización.

La cuantificación y la pureza del ADN obtenido de cada una de las muestras, se realizó mediante métodos espectrométricos estándares (Sambrook *et al.*, 1989), a una absorbancia de 260-280 nm de las soluciones de ADN. La integridad y el tamaño molecular del ADN obtenido se apreciaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% de acuerdo a protocolos estándar propuestos por Sambrook y Russell en el 2001. Las soluciones de ADN se prepararon a una concentración de 100 ng/µL y de 25 ng/µL para su posterior utilización en la amplificación de marcadores ISTR por medio de la técnica de PCR.

5.4.2 Amplificación de marcadores ISTR

Se realizó la amplificación por PCR de dos combinaciones de marcadores ISTR, siguiendo el protocolo reportado por Osorio *et al.*, (2006) para los marcadores ISTR, en un volumen final de mezcla de reacción de 20 µl, utilizando regulador PCR 1X, MgCl₂ 3mM, 0.3 µM de cada iniciador, dNTPs 0.25 mM, y 0.25Mm de ADN de cada muestra.

Las secuencias de los iniciadores ISTR empleados se indican en la Tabla 3.

Tabla 3. Secuencias de los iniciadores ISTR

INICIADOR	SECUENCIA 5´ - 3´
F1	GCA CTC CAC CAA GAA TAC C
B1	ATC AGG AAG GTC TGT AAA GC
B8	ATA CCT TTC AGG GGG ATG

Las condiciones para la amplificación fueron: el primer ciclo de desnaturalización de 95°C durante 3 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 seg; el proceso de alineación se realizó a 45°C por 1 min y la fase final de extensión a 72°C durante 10 min la temperatura de almacenamiento fue de 4°C.

La separación de los diferentes fragmentos de DNA amplificados se efectuó por la técnica de electroforesis propuesta por Sambrook *et al.*, (1989) en geles de agarosa al 1%, la visualización, se realizó con SyberGreen (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del protocolo del fabricante.

5.4.3 Análisis de datos

El perfil de amplificación por PCR de cada muestra se construyó con todos los fragmentos resueltos en los respectivos electroferogramas. Cada fragmento se consideró un carácter molecular individual. Se construyó una matriz binaria de presencia/ausencia de bandas (1: presencia, 0: ausencia) formada por todas las muestras individuales (fragmentos vs individuos), que se sometió a un análisis fenético usando el programa de cómputo Popgene 1.32.

Se realizó un análisis de similitud basado en los marcadores ISTR entre las especies pertenecientes al complejo *Amanita caesarea*, donde cada loci amplificado se consideró como un carácter molecular individual. Después se construyó una matriz binaria de presencia/ausencia de bandas formada por cada una de las muestras contra el fragmento amplificado, enseguida haciendo uso de paquetes de cómputo, software y programas como Popgene 1.32 y Past 3, se calcularon directamente los diversos índices y parámetros necesarios para realizar la caracterización y estimación de la variabilidad genética de las especies a partir de los resultados obtenidos del análisis molecular (Hammer *et al.*, 2001).

Los parámetros que se calcularon para el análisis de similitud basado en los marcadores ISTR fueron. Porcentaje de bandas polimórficas (P), número observado de alelos por locus (n_a), número efectivo de alelos por locus (n_e), diversidad genética

(He), índice de diversidad de Shannon (I), diversidad génica de Nei (h), identidad génica de Nei (GI), distancia genética (GD), flujo génico (Nm), y coeficiente de diferenciación génica (GsT). Estos parámetros y el análisis de *cluster* basado en la matriz de distancias génicas y el dendrograma correspondiente se realizaron con el programa Popgene 1.32. La similitud genética entre poblaciones (coeficiente de Jaccard), basada en los datos de los marcadores ISTR, se calcularon usando el programa Past 1.43 (Almaraz-Abarca, 2011) y los datos obtenidos se presentaron en un dendrograma.

Con los datos de distancias génicas se elaboró una matriz para realizar el análisis de *cluster* con el que se obtuvo el dendrograma que reveló el grado de diferencias génicas entre especies (Almaraz-Abarca, 2011).

5.5 Identificación taxonómica del Complejo *Amanita caesarea*

Los ejemplares colectados fueron identificados por Gastón Guzmán, Florencia Ramírez Guillén y Alonso Cortés Pérez en el Laboratorio de micología del Instituto de Ecología (INECOL), en Xalapa, Veracruz siguiendo las claves del complejo *Amanita caesarea* elaboradas por Gastón Guzmán en The *Amanita caesarea*-complex.

VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Identificación taxonómica

Dentro de las especies colectadas pertenecientes al complejo *Amanita caesarea* encontradas en la región de El Salto, Pueblo Nuevo, Durango, se identificó a *Amanita basii* Guzmán y Ramírez-Guillén (Figura 5), especie previamente registrada en 1982 en una colecta en La Reserva de la Biósfera. La Michilía, Durango. En cuanto a los registros de *A. caesarea* (Scop.: Fr.) Pers. (Figura 6) fueron realizados previamente en la Región de El Salto, Pueblo Nuevo, Durango, en 1995 y en 1982 se registró esta especie en una colecta de La Reserva de la Biósfera La Michilía. *Amanita laurae* Guzmán y Ramírez-Guillén (Figura 7) solamente era conocida en Chiapas y Jalisco por lo que se reporta el primer registro para Durango al igual que *A. tulosii* Guzmán y Ramírez-Guillén (Figura 8), aunque 4 de estos individuos presentan una volva irregular, muy corta, quizá por mala formación o normalmente es así en la Figura 9 se muestra dicha volva encerrada por un círculo rojo. De ser éste último el caso, sería una especie nueva, pero se necesita coleccionar más ejemplares, para corroborarlo. Se considera por ahora tentativamente *A. tulosii*, ya que los demás caracteres macro y microscópicos concuerdan con dicha especie.



Figura 5. *Amanita basii* Guzmán y Ramírez-Guillén



Figura 6. *Amanita caesarea* (Scop.: Fr.) Persoon



Figura 7. *Amanita laurae* Guzmán y Ramírez-Guillén



Figura 8. *Amanita tulosii* Guzmán y Ramírez-Guillén



Figura 9. *Amanita tulosii* irregular Guzmán y Ramírez-Guillén, los círculos rojos muestran la volva irregular.

En la Tabla 4 se presenta la clasificación taxonómica que se le asignó a cada uno de los 82 individuos colectados pertenecientes al complejo *Amanita caesarea*.

Tabla 4. Clasificación taxonómica de los individuos colectados

Sub- especie	No. de individuos
<i>Amanita caesarea</i>	11
<i>Amanita basii</i>	13
<i>Amanita laurae</i>	25
<i>Amanita tullosii</i>	33

6.2 Perfiles ISTR

Las combinaciones de iniciadores ISTR empleados en la caracterización molecular de 82 individuos pertenecientes al complejo *Amanita caesarea* (Tabla 4) produjeron un total de 79 secuencias amplificadas (*loci*), que se consideran suficientes para la estimación adecuada de distancias génicas, de acuerdo con Keim *et al.*, (1992) quienes establecieron que un número entre 65 y 90 marcadores es adecuado para estimaciones precisas. De los 79 loci amplificados, 41 pertenecen a la combinación F1/B8, y 39 provienen del par F1/B1, con un promedio de 39.5 *loci* por *primer*. El tamaño estimado de las secciones amplificadas varió de 70 (locus amplificado con el par F1/B1) a 2570 bp (locus amplificado con el par F1/B8). En la Figura 10 se muestra un ejemplo de algunos patrones de amplificación de loci usando el iniciador F1/B8.

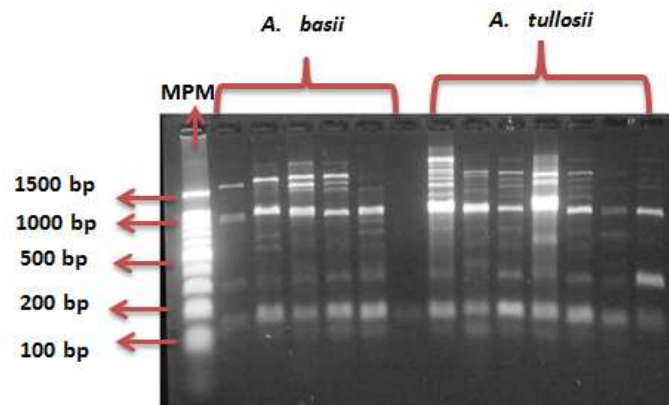


Figura 10. Patrones de amplificación utilizando el primer ISTR F1/B8

Los valores calculados de GI de cada par de iniciadores se muestran en la tabla 5. Los altos valores de índice de genotipificación (0.93-0.90) revelan que ambas combinaciones de primers pueden ser útiles para estudios de variabilidad genética de poblaciones de especies pertenecientes al complejo *Amanita caesarea* cabe resaltar que es la primera vez que se usan este tipo de marcadores en hongos basidiomicetos, aun así los valores de GI son mayores a los reportados para *Ustilago maydis* (Zambino, 1997 y Valverde *et al.*, 2000). Cada una de las especies de *Amanita caesarea* analizadas mostró un perfil ISTR típico: *caesarea* 39 loci, *basii* 39, *laurae* 47, mientras que el perfil de *tullosii* se conformó por 70 loci. Los primers ISTR usados en este estudio detectaron altos niveles de polimorfismo (100%, tabla 5). Según Almaraz-Abarca en el 2011 y Montalvo en el 2010 mencionan que algunos autores han reportado niveles similares de polimorfismo quienes sugieren que estos marcadores tienen una alta capacidad para cuantificar diversidad genética y una alta capacidad discriminatoria a nivel específico.

Tabla 5. Porcentaje de polimorfismo (P), e índice de genotipificación (GI) para iniciadores ISTR en el complejo *Amanita caesarea*.

	Combinación de iniciadores	
	F1/B8	F1/B1
Número total de bandas	41	39
Bandas polimórficas	41	39
P	100	100
Perfiles ISTR diferentes	76	63
Perfiles ISTR únicos	71	57
GI	0.93	0.90

6.2.1 Variación Genética Intrapoblacional

Se detectaron altos niveles de variabilidad genética en las especies de *Amanita caesarea*. Los parámetros manejados para la evaluación de la variación dentro de poblaciones (Tabla 6) indican que la diversidad fue más alta en la población de *Amanita tullosii*.

Una de las explicaciones de los altos niveles de variabilidad genética del complejo *Amanita caesarea*, podría ser la alta presión ambiental a la que han estado sometidas aunada a la recolección exhaustiva, que ha favorecido de alguna forma la ocurrencia de procesos de retrotransposición y por ende la acumulación progresiva de mutaciones y variaciones genéticas, incrementando la variabilidad de estas especies, variaciones que han sido reportadas como consecuencia de este tipo de elementos móviles retrotransposones (Bennetzen, 2000), pudiendo ser esta la causa probable de las variaciones morfológicas que presenta dicho complejo.

Estos altos niveles de variabilidad concuerdan con los trabajos de (Valverde *et al.*, 2000) y (Zambino, 1997) en hongos basidiomicetos como el *Ustilago maydis*. Los resultados en el presente trabajo son más altos en cuanto a diversidad genética y

polimorfismo comparado con el trabajo de (Shale *et al.*, 2006) esto también podría sugerir que los marcadores ISTR son más informativos para este tipo de análisis en hongos basidiomicetos que los ITS usados en dicho estudio.

Tabla 6. Diversidad genética de las especies pertenecientes al complejo *Amanita caesarea* encontradas en la Región de El Salto P.N. Dgo.

Población	P	Na	Ne	I	H
<i>Amanita caesarea</i>	0.4937	1.4937	1.2128	0.2139	0.1347
		0.5032	0.3056	0.2448	0.1667
<i>Amanita basii</i>	0.4937	1.4937	1.2128	0.2139	0.1347
		0.5032	0.3056	0.2448	0.1667
<i>Amanita tulosii</i>	0.8861	1.8861	1.2435	0.2957	0.1739
		0.3197	0.2207	0.1811	0.1273
<i>Amanita laurae</i>	0.5949	1.5949	1.2146	0.2337	0.1429
		0.4940	0.2756	0.2273	0.1539

P= polimorfismo; Na= número medio de alelos por *locus*; Ne= número medio efectivo de alelos por *locus*; I= diversidad de Shannon; h= diversidad de Nei. Los valores representan la media y la desviación estándar.

El siguiente dendrograma (Figura 11) resultante de un análisis de similitud entre los 82 individuos pertenecientes a las cuatro especies analizadas, se basó en dos combinaciones de marcadores ISTR, donde se aprecian dos grupos separados a un valor cercano al 6% de similitud. El primer grupo formado por los individuos de la especie *A. caesarea* y *A. basii*, y el segundo formado por los individuos pertenecientes al grupo de *A. laurae* y *A. tulosii*, respectivamente.

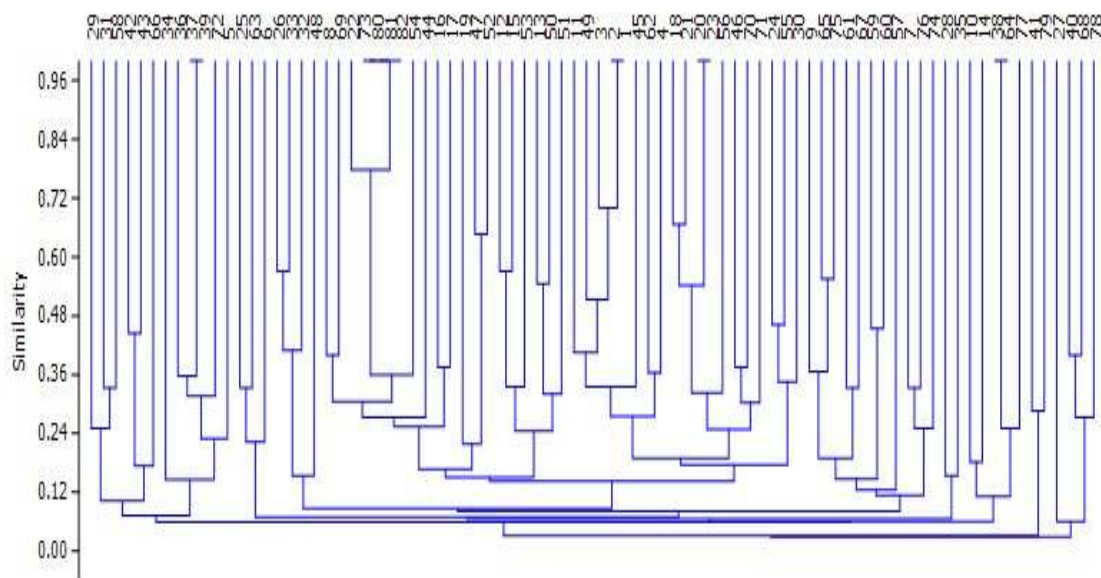


Figura 11. Dendrograma del análisis de similitud intrapoblacional.

6.2.2 Variación Genética Interpoblacional

Se obtuvo un coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}) de 0.0739 y un flujo génico (N_m) de 6.2699, que indica una fuerte migración genética entre las especies analizadas.

Los valores de identidad genética y distancia genética entre las especies analizadas se muestran en la tabla 7. La mayor distancia genética se encontró entre *Amanita caesarea* y *Amanita tulosii* y la más baja entre *Amanita caesarea* y *Amanita basii*.

Tabla 7. Identidad genética de Nei (arriba de la diagonal) y distancia genética (debajo de la diagonal).

Especie	<i>caesarea</i>	<i>Basii</i>	<i>tullosii</i>	<i>laurae</i>
<i>caesarea</i>	-----	1.0000	0.9797	0.9727
<i>Basii</i>	0.0000	----	0.9797	0.9797
<i>Tullosii</i>	0.0205	0.0205	----	0.9863
<i>Laurae</i>	0.0277	0.0277	0.0138	----

El dendrograma que se obtuvo del análisis de *cluster* basado en una matriz de distancias genéticas se muestra en la figura 12. Las distancias genéticas entre las especies de *Amanita caesarea* permiten distinguir dos grupos, uno formado por *A. caesarea* y *A. basii* donde se obtuvo un valor de $Nm > 1$, que indica un flujo génico continuo el cual es un factor muy importante ya que promueve similitudes genéticas entre grupos y por lo tanto ellos deberían considerarse como una sola especie (Sites y Marshall, 2004), ya que el flujo génico es una característica que define a las especies (Petit y Excoffier, 2009) y ocurre constantemente como un importante proceso entre esas dos sub-especies híbridas. El otro grupo integrado por *A. laurae* y *A. tullosii* obtuvieron un valor de $N > 0.15$, donde Highton (1990) menciona que grupos con esos valores deberían considerarse como especies distintas. Estas propuestas se ven apoyadas por los valores calculados en la tabla 7, de identidad genética de Nei, debido a que estos valores representan el grado de similitud genética entre poblaciones (Nei, 1987); debajo de 0.85 corresponde a especies bien definidas.



Figura 12. Dendrograma del análisis de similitud intrapoblacional

Tulloss (2005) consideró a *A. basii* y *A. caesarea* como la misma especie durante mucho tiempo. Pero en el 2001 Guzmán y Ramírez-Guillén mostraron que la única diferencia morfológica entre *A. caesarea* y *A. basii*, era el tamaño de esporas, indicando que la segunda presenta basidiosporas más pequeñas en un rango de 1-2 micrones. Los resultados generados por los perfiles ISTR muestran una congruencia con la delimitación propuesta por Tulloss.

En cuanto a *Amanita laurae* Sánchez-Ramírez (2011) sugirió que debían hacerse análisis más profundos a dicha especie para comprobar que efectivamente se trataba de una especie real, ya que Guzmán y Ramírez-Guillén no aportaban evidencia molecular que respaldara tal delimitación ya que estas muestras según su investigación resultaron ya sea en los clados de *A. basii* o de *A. jacksonii*, por lo tanto con los resultados demostrados en el presente análisis se aporta evidencia respaldando la teoría de Guzmán y Ramírez-Guillén donde *Amanita laurae* se delimita como una especie totalmente distinta a *Amanita basii*.

6.3 Identificación cualitativa de compuestos terpénicos

Respecto al análisis químico cualitativo para identificar terpenoides, preliminarmente se realizó una cromatografía de capa fina (TLC), que al ser revelada se evidenciaron manchas de color morado y verdes (Figura 13), típicas de estructuras triterpénicas, pero que bajo el efecto de la luz UV en onda larga se evidencian colores rojizo marrón que se atribuyen a lactonas sesquiterpénicas que formarían parte de la coloración rojiza de la seta, la coloración de fluorescencia verde corresponde a estructuras triterpénicas junto con la coloración morada que presume también posible causa de las coloraciones cobrizas en la seta (mono-, di-, tri- y sesquiterpenos) (Bruneton, 2001).

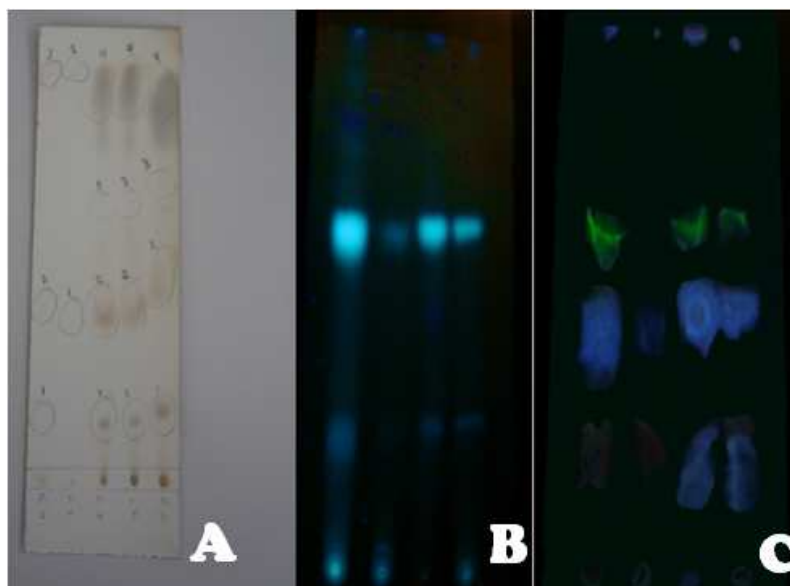


Figura 13. Cromatografía de capa fina de terpenos obtenidos de cuerpos fructíferos de especies del complejo *A. caesarea*. A = observado en onda larga (UV); B = observado en onda corta (UV); C = observado en onda larga, luego de aplicar revelador específico para terpenos.

6.4 Determinación estructural de los metabolitos secundarios presentes en cuerpos fructíferos de las especies pertenecientes al complejo *Amanita caesarea*.

Los metabolitos secundarios de las especies pertenecientes al complejo en cuestión, no han sido investigados, a continuación se muestran los resultados de cuatro de las especies pertenecientes al complejo basados en la composición química del cuerpo fructífero, que podrían ser útiles para sugerir la variabilidad que puede ser encontrada en dichas especies. Se identificaron un total de 23 metabolitos secundarios, en la tabla 8, 9 y 10 se muestra la relación de los compuestos indicando el nombre del posible compuesto, la fórmula molecular, tiempo de retención en minutos (Tr), pico del ion molecular (M+), índice de deficiencia de hidrogeno (IDH), los fragmentos característicos (intensidad relativa en porcentaje), la masa calculada (m/z) y la estructura química respectivamente. De los 23 compuestos identificados 11 corresponden a triterpenoides, 9 se identificaron como ácidos grasos no estéricos y tres como polifenoles.

Tabla 8.- Compuestos triterpenoidales

No. de compuesto	Posible Compuesto	Fórmula molecular	Tr.(min)	M+	IDH	Fragmentos (IR%)
1	Ergosta-7,22-dien- β -ona	C ₂₈ H ₄₄ O	35.132	395	7	396(7,9); 381(2,5); 353(4,5); 325(1,2); 298(15,7); 271(25); 269(100); 246(10,8); 229(14,1); 175(7,9); 161(15,2); 147(22,3)
2	Lanosta-2,5,7,24-tetraeno	C ₃₀ H ₄₆	36.602	406	8	406(100); 391(82,8); 363(24); 335(7,6); 309(62,9); 295(26,7); 281(25,4); 267(66,8); 253(3,2); 225(10,4); 185(19,7); 157(27,1); 129(18,3)
3	4,16-dimetilergosta-3,5,7,22-tetraeno	C ₃₀ H ₄₆	32.782	406	8	406(64,9); 391(100); 301(21); 281(11,4); 266(3,6); 239(4,9); 223(8,9); 189(3,7); 178(9,8); 149(10,3); 125(6,4); 105(58)
4	Lanosta-5,7,24-trien- β -ol	C ₃₀ H ₄₈ O	36.770	424	7	424(22,2); 409(16,5); 355(7,3); 341(9,1); 313(26); 271(6,3); 253(5,3); 245(29,5); 205(100); 191(35,2); 188(73,8); 175(33); 121(72,2); 95(90,3)
5	4,4-dimetil-colesta-5,7,14,22-tetraen-3 β -ol	C ₂₉ H ₄₄ O	36.109	408	8	408(72,5); 393(86,7); 390(27,9); 375(21,9); 365(16,7); 325(20,7); 311(52,7); 297(12,2); 281(100); 271(14,4); 253(46,3); 239(10,4); 191(32,8); 185(21,6); 159(27,6)
6	Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 β -ol	C ₂₈ H ₄₂ O	34.080	394	8	394(13); 376(12,2); 361(6,5); 269(9,5); 251(100); 209(31,2); 179(13,6); 157(13,3); 141(9,1); 135(10,9); 69(43,1).
7	Ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol	C ₂₈ H ₄₄ O	34.602	396	7	396(58,2); 378(5,4); 363(100); 337(42,5); 271(12,2); 253(51,7); 229(7); 211(42,2); 171(28,8); 143(67,3); 119(30,7); 69(80,1).

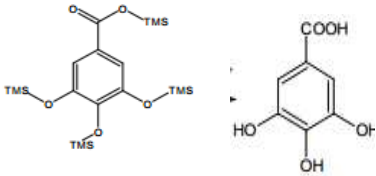
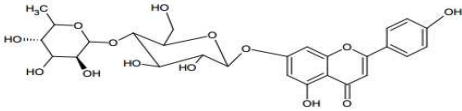
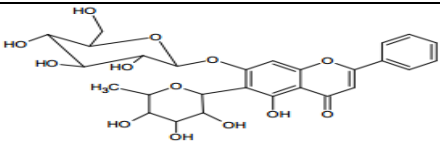
8	4-metil-ergosta-5, 7,24-trien-3 β -ol.	C29H46O	38.112	410	7	410(18,4); 395(11,5); 392(7,5); 377(41,5); 327(8,1); 285(21,9); 267(40,2); 253(34,2); 225(24,6); 191(36); 158(13,7); 135(30,4); 109(35,6); 91(41,8); 69(100).
9	Ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaeno	C28H38	32.312	376	9	376(40,7); 361(3,7); 251(100); 236(19,2); 209(8,6); 197(36,1); 157(11,2); 141(18); 129(9,8); 105(22,1); 69(19,5).
10	Ergosta-4, 6,15(16),22-tetraen-3-ona	C28H40O	36.892	392	9	392(10,7); 341(5,4); 327(6,4); 281(25,2); 268(100); 267(64,2); 253(30,2); 251(5,6); 240(6,8); 225(7,4); 173(17,5); 155(10,1); 129(8,9); 109(13,6); 69(26,5).

Tabla 9.- Ácidos grasos no esterólicos

No. de compuesto	Posible Compuesto	Tr. (min)	IDH	M+	FRAGMENTOS (IR%)
11	9-octadecenoico (ac. oléico)	23.742	2	282	282(2,3); 264(10,3); 221(2,6); 207(2,8); 193(1,7); 179(3,4); 165(4,7); 151(6,4); 137(8,6); 123(12,4); 111(23,2); 97(46,7); 83(56,1); 69(74); 60(12,1); 55(100); 41(68,9).
12	Acido9-Octadecenoico	23.738	2	282	282(2,3); 264(10,3); 221(2,6); 207(2,8); 193(1,7); 179(3,4); 165(4,7); 151(6,4); 137(8,6); 123(12,4); 111(23,2); 97(46,7); 83(56,1); 69(74); 60(12,1); 55(100); 41(68,9).
13	Eicosano	21.908	0	282	282(2); 241(0,9); 211(1); 197(0,9); 183(1,5); 169(1,8); 155(2,4); 141(3,5); 127(5,6); 113(7,9); 99(13,1); 85(47,5); 71(64,8); 57(100); 43(66,8).
14	Hexadecano	16.287	0	226	226(2,6); 197(0,4); 183(0,8); 169(1,1); 155(1,6); 141(2,3); 127(2,6); 113(5,3); 99(11); 85(46,4);

					71(66,7); 57(100).
15	Octadecano	19.538	0	254	254(2,5); 210(0,4); 197(1,2); 183(1,4); 169(2);155(2,7); 141(2,6); 127(3,8); 113(9,1); 99(11,8); 85(47,8); 71(68,1); 57(100).
16	9,12-octadecadienoato de Metilo	23.408	3	294	294(35,7); 263(30,9); 220(9,1); 178(10,1); 164(17); 150(24,9); 136(21,3); 123(24,4); 109(43,9); 95(81,2); 88(10); 81(100); 74(11,8); 67(92,6).
17	ácido 9,12 octadecadienóico (ácido linoléico)	21.938	3	280	280(33,5); 264(28,8); 222(10,1); 172(9,1); 134(19,2); 121(22,4); 107(41,9); 92(78,2); 86(9); 74(11,8); 64(91,4).
18	9-hexadecenoato de metilo	20.685	3	268	268(4,6); 226(2,6); 210(0,4); 197(1,2); 183(1,4); 151(6,4); 137(8,6); 123(12,4); 71(66,7); 54(98).
19	heptadecanoato de metilo	22.223	2	284	284(36,5); 262(26,6); 229(7); 209(8,6); 197(36,1); 157(11,2); 141(18);129(9,8);
20	Octadecanoato de metilo	23.486	4	298	298(28,9); 281(25,4); 266(64,7); 252(3,2); 228(8,4); 185(19,7); 152(25,1);121(16,3)

Tabla 10.- Compuestos Polifenólicos

No. de compuesto	Posible Compuesto	Familia	Tr. (min)	m/z Calculada	Estructura
21	Ac. Gálico (C ₁₉ H ₃₈ O ₅ Si ₄)- tetrametilsilil	Ácido fenólico	20.553	458	
22	Apigenin-7-O- rutinosido (C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄)	Flavona glicosilada	19.016	579	 apigenin-7-O-rutinosido
23	7-O-β-D- glucopiranosil-6- fucopiranosilcrisina	Flavona glicosilada	19.566	563	 7-O-β-D-glucopiranosil-6-fucopiranosilcrisina

6.4.1 Compuestos triterpenoidales

La tabla 8 recopila los metabolitos triterpenoidales propuestos en la fracción en diclorometano del extracto metanólico crudo obtenido del cuerpo fructífero de los basidiomicetos antes mencionados. Dado que es el primer estudio sobre la composición micoquímica de éste complejo, todos los metabolitos son reportados por primera vez para dichas especies.

El compuesto Ergosta-7,22-dien- β -ona, metabolito también fue identificado en los basidiomicetos *G. applanatum*, *Lentinula edodes* (Gan et al., 1998) y *Fomes fomentarius* (Cole, et al., 2003). En cuanto al 4,16-dimetil-ergosta-3, 5, 7, 22-tetraeno, fue reportado previamente en el basidiomiceto *Lycoperdon sp.* (Hernandez, 2007). El compuesto Ergosta-5,7, 9(11),22-tetraen-3 β -ol, coincide totalmente con el reportado previamente en los Basidiomicetos *Pleurotus ostreatus* y *Ganoderma lucidum* (Chegwin, 2007; Jaramillo, 2009).

El triterpenoide Ergosta-5, 7,22-trien-3 β -ol (Ergosterol), es el esteroide más abundante en hongos superiores. 4-metil-ergosta-5, 7,24-trien-3 β -ol, metabolito también identificado en los hongos basidiomicetos *Ganoderma applanatum* (Valencia, 2002), *Lentinula edodes* (Benavides, 2004), *Lycoperdon sp.* (Hernandez, 2007), *Suillus luteus* (Avila, 2007), *Auricularia auricula-judae* (Serrano, 2009) y *Ganoderma lucidum* (Jaramillo, 2009). El metabolito Ergosta-4, 6,15(16),22-tetraen-3-ona, fue también aislado en *Pleurotus sajor-cajú* (Chegwin, 2005) y *P. ostreatus* (Chegwin, 2007).

Por último el Ergosta-2, 5, 7,9(11), 22-pentaeno, fue reportado previamente para *Ganoderma lucidum* (Jaramillo, 2006), *Pleurotus ostreatus* (Chegwin, 2007), *Lycoperdon sp.* (Hernandez, 2007) y *Auricularia auricula-judae* (Serrano, 2009). Los compuestos que aparecen en la tabla 8 y que no fueron mencionados no se encontró ningún reporte de su existencia en el material consultado hasta el momento.

Como se puede ver, las estructuras dadas a los compuestos triterpenoidales presentes en las fructificaciones silvestres del complejo estudiado corresponden al núcleo Lanosta y Ergosta, en contraste con lo encontrado para especies

cultivables como *Ganoderma lucidum* y *Lentinula edodes*, en las cuales los componentes mayoritarios corresponden a núcleos Ergosta y Colesta (Jaramillo, 2009).

6.4.2 Ácidos grasos no esterólicos

De acuerdo con los resultados obtenidos Tabla 9, los componentes grasos no esterólicos mayoritarios del extracto metanólico de los hongos pertenecientes al complejo *Amanita caesarea* son esteres metílicos de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y diinsaturados, lo cual es concordante con los estudios realizados sobre basidiomicetos silvestres o cultivados, los mismos que reportan a estos compuestos como los componentes mayoritarios y más comunes presentes en basidiomicetos (Cucaita, 2007, Chegwin, 2007, Jaramillo, 2009, Serrano, 2009).

La presencia de ácidos grasos insaturados como el ácido oléico y linoléico se constituyen en una característica nutricional favorable, puesto que este tipo de compuestos son esenciales en una dieta sana (Miles, 1999), ya que brindan protección frente a enfermedades cardiovasculares y arterioesclerosis producida por el colesterol (Xiao *et al.*, 2009). Lo que permitiría recomendar su consumo, como un alimento nutraceutico.

Dentro del análisis micoquímico del complejo *Amanita caesarea* se identificaron algunos hidrocarburos, aunque no han sido reportados éste tipo de fungimetabolitos para dichas especies, Xiao *et al.*, 2009 encontraron ésta clase de hidrocarburos en la fracción volátil de tres especies pertenecientes al género *Cordyceps*, por otro lado Wu *et al.*, 2005 y de D'armas *et al.*, en el mismo año, reportaron dichos compuestos provenientes del cuerpo fructífero del hongo macromiceto silvestre *Polyporus sulphureus* (hongo comestible) y en micromiceto marino *Aspergillus ochraceus* aislado de raíces de *Rhizophora mangle*, respectivamente. Así mismo, el hexadecano fue identificado en la fracción volátil del hongo micromiceto endófito *Gliocladium roseum* (Strobel *et al.*, 2008).

Entonces tales compuestos al tener una aparición tan restringida en los basidiomicetos se podrían convertir en quimiomarcadores, como sucede con algunas cianobacterias del suelo, específicamente *Microcoleus vaginatus* (Brocks *et al.*, 2003). Ladygina *et al.*, 2006, reportaron que este tipo de compuestos se encuentran en las paredes de las esporas fungales y tienen funciones protectoras.

6.4.3 Compuestos polifenólicos

El ácido gálico es un ácido fenólico simple, ampliamente distribuido en los productos naturales vegetales, como es el caso de las angiospermas y que se ha encontrado también en algunas algas verdes (Chanwitheesuk *et al.*, 2007). En cuanto a su presencia en hongos sólo se encuentra reportado en el Zigomiceto *Phycomyces blakesleeanus* (Barrero *et al.*, 1996) y en el hongo basidiomiceto medicinal *Inonotus obliquus* el cual se ha empleado ampliamente en la medicina tradicional de Rusia y del este de Europa (Zheng *et al.*, 2009). La presencia de este metabolito dentro de los compuestos extraídos del carpóforo del hongo puede deberse a su biosíntesis por parte del mismo, lo cual está en total concordancia con las rutas biosintéticas (Figura 14) de los hongos basidiomicetos en general, las cuales permiten producir metabolitos provenientes del ácido Shiquímico (Rivera, 1998), como sería el caso del ácido gálico.

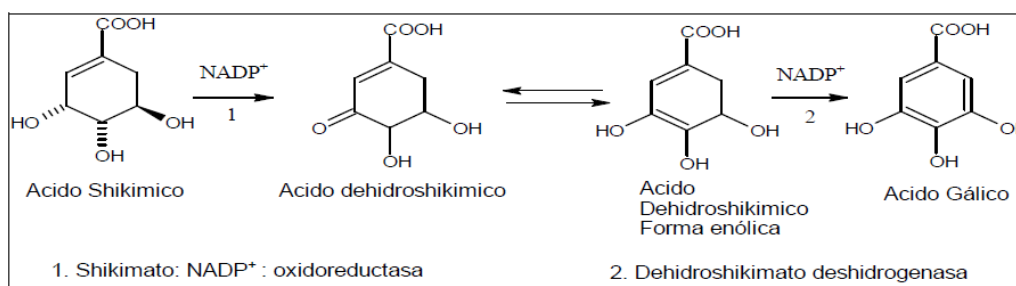


Figura 14.- Ruta biosintetica del ácido gálico

Dentro de las pocas investigaciones sobre el tema en macrohongos solamente se ha reportado un flavonoide glicosilado, siendo la presencia de un posible glicósido,

un hallazgo novedoso para el reino fungi. En los hongos sólo han sido identificados dos flavonoides en la seta *Fistulina hepática* (lengua de buey) (Ribeiro *et al.*, 2007): el hiperosido y la quercetina, los cuales son un glicósido y un flavonoide respectivamente. Sin embargo teniendo en cuenta que dicho hongo pertenece al orden de los *Agaricales* al igual que el complejo en estudio, es de esperarse que produzcan metabolitos similarmente estructurales.

Respecto al compuesto 7-O- β -D-glucopiranosil-6-fucopiranosilcrisina al parecer es un metabolito muy poco común, incluso en el reino plantae, pues sólo se encontraron dos reportes en literatura donde se aisló este compuesto en *Cyclanthera pedata* (Caigua), una fruta peruana, perteneciente a la familia de las Cucurbitaceae (Carbone *et al.*, 2004) y otro para el hongo *Lentinula edodes* que se encuentra dentro del orden de los *Agaricales* al igual que el complejo *Amanita caesarea* (Jaramillo, 2009).

Para el análisis fenético de cluster se elaboró una matriz binaria de datos (Tabla 11) considerando la presencia/ausencia de cada uno de los 23 compuestos identificados contra cada una de las especies del complejo *Amanita caesarea*.

Tabla 11.- Matriz binaria de los compuestos identificados en el complejo A.

caesarea

No.	Nombre del compuesto	A. <i>caesarea</i>	A. <i>basii</i>	A. <i>laurae</i>	A. <i>tullosii</i>
1	Ergosta-7,22-dien-3-ona	1	1	1	1
2	Lanosta-2,5,7,24-tetraeno	1	1	0	0
3	4,16-dimetilergosta-3,5,7,22-tetraeno	0	0	0	1
4	Lanosta-5,7,24-trien- β -ol	0	0	0	1
5	4,4-dimetil-colesta-5,7,14,22-tetraen-3 β -ol	1	1	1	1
6	Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 β -ol	0	0	1	1
7	Ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol	0	0	1	0
8	4-metil-ergosta-5, 7,24-trien-3 β -ol.	1	0	1	0
9	Ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaeno	0	0	0	1
10	Ergosta-4, 6,15(16) ,22-tetraen-3-ona	0	0	1	1
11	9-octadecenoico (ac. oléico)	1	1	1	1
12	Acido 9-Octadecenoico	0	0	0	1
13	Eicosano	1	1	0	0
14	Hexadecano	0	0	1	0
15	Octadecano	0	0	0	1
16	9,12-octadecadienoato de metilo ácido 9,12-octadecadienóico (ácido	1	1	0	0
17	linoléico)	1	1	1	1
18	9-hexadecenoato de metilo	0	0	1	1
19	heptadecanoato de metilo	0	0	1	0
20	Octadecanoato de metilo	0	0	0	1
21	Ac. Gálico	1	1	1	1
22	Apigenin-7-O-rutinosido	0	0	1	1
23	7-O- β -D-glucopiranosil-6-fucopiranosilcrisina	0	0	0	1

En el dendrograma obtenido a partir de la tabla anterior se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.99 (figura 15). En él se observan dos grupos, uno formado con por *A. caesarea*, *A. basii* y *A. laurae* dónde se observa que químicamente son especies muy similares y en el otro grupo se encuentra *A. tullosii* dónde se aprecia que es una especie que se separa del resto. Estos resultados no corresponden a la clasificación propuesta por Guzmán y Ramírez (2001) en *The Amanita caesarea* complex, dónde identifica al primer grupo como especies distintas, los resultados en el presente trabajo concuerdan con los resultados de

Tulloss, 2005, en el que se establece que *A. caesarea* y *A. basii* son la misma especie.

Los perfiles de los compuestos triterpenoidales y ácidos grasos no esterólicos pueden llegar a diferenciar taxa a nivel específico con un alto nivel de correlación ($r=0.98$), en cambio los perfiles polifenólicos pueden usarse también aunque tomando en cuenta que estos arrojan un nivel de correlación menor ($r=0.93$).

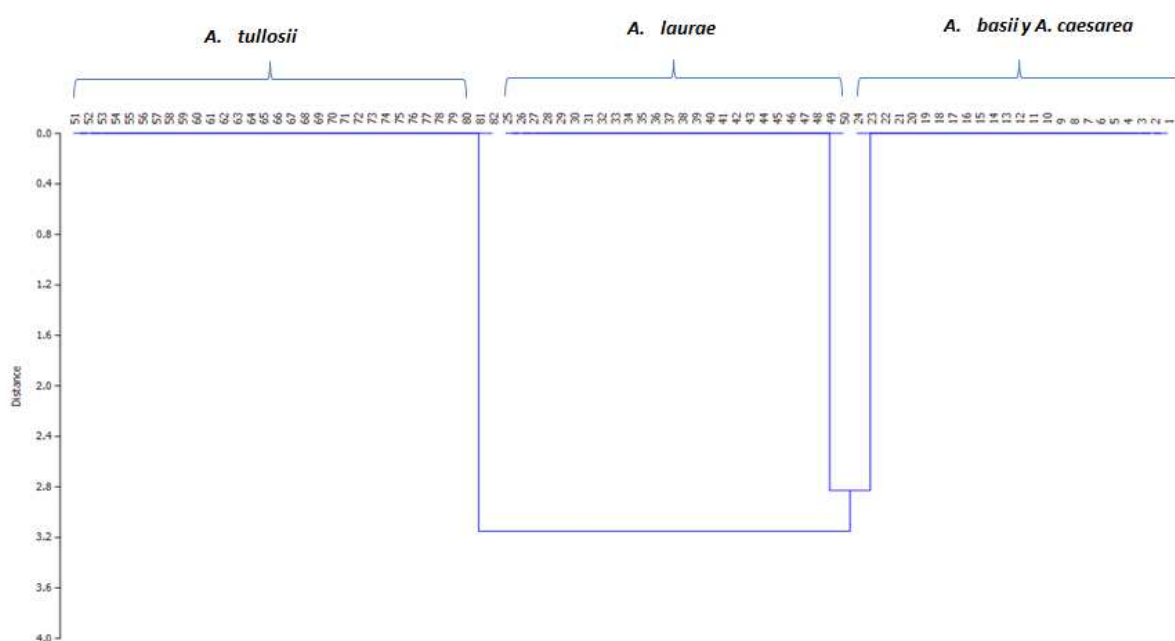


Figura 15.-Dendrograma correspondiente al análisis micoquímico del complejo *A. caesarea*

VII CONCLUSIONES

Se obtuvo el primer registro para Durango de las especies *A. laurae* y *A. tullosii*.

Los marcadores ISTR representan una buena opción para el análisis de la variabilidad genética de Basidiomicetos son fáciles de usar y son accesibles en términos económicos.

El número de secuencias amplificadas (79) con los marcadores ISTR fueron todas polimórficas.

Los perfiles de amplificación ISTR para el estudio en cuestión permitieron discriminar a nivel tanto intra como interespecífico.

Tomando en cuenta los datos de colecta que muestran que la especie más abundante es *Amanita tullosii* y comparando esto con los altos valores de variabilidad genética y química que se observaron, se podría decir que esto es un reflejo de un proceso actual de evolución dentro de la misma, la cual al ser la especie más abundante se encuentra bajo una fuerte presión ambiental debido a las actividades antrópicas de sobreexplotación.

Los cuerpos fructíferos de los hongos analizados cuentan con una gran variabilidad de compuestos micoquímicos, entre los que tuvieron en común todos ellos se encuentran el Ergosta-7,22-dien-3-ona, 4,4-dimetil-colesta-5, 7,14, 22-tetraen-3 β -ol, ácido 9-Octadecenoico (ácido oléico), ácido 9,12-octadecadienóico (ácido linoléico) y el ácido gálico.

Entre otra de las particularidades micoquímicas del complejo se encontró que las especies *A. laurae* y *A. tullosii* cuentan con hidrocarburos, compuestos que ya han sido reportados como marcadores químicos.

A. tullosii presentó la mayor variabilidad química albergando a 16 de los 23 compuestos identificados, seguido por *A. laurae* con 13 metabolitos, 9 para *A. caesarea* y por último 8 para *A. basii*.

Los perfiles de compuestos triterpenoides y ácidos grasos no estéricos por tener una mayor variabilidad química pueden utilizarse como marcadores micoquimiotaxonómicos para especies de este género.

Se comprobó con un análisis micoquímico que *Amanita caesarea*, *Amanita basii* y *Amanita laurae* molecular son especies muy cercanas.

El análisis molecular basado en perfiles ISTR mostro que *Amanita caesarea* y *Amanita basii* son especies muy similares.

Con la información creada en el presente trabajo se generaron nuevas herramientas taxonómicas para el discernimiento de la situación actual del complejo *Amanita caesarea* mexicano.

Es el primer trabajo donde se usan marcadores ISTR para estimar la variabilidad genética en hongos basidiomicetos.

Primer reporte del uso de metabolitos secundarios en hongos basidiomicetos como quimiomarcadores.

IX RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS

Con la presente investigación se han generado herramientas que puedan ayudar a problemáticas taxonómicas de otras especies de basidiomicetos que se encuentren en situaciones similares, esperando que esta información sea útil para proponer un plan de manejo en el futuro.

Los hidrocarburos encontrados en las fructificaciones del complejo *Amanita caesarea* posiblemente son biosintetizados por el hongo y se podría estar frente a nuevos quimiomarcadores para este género en particular, se sugeriría aislar el micelio de cada una de las especies y con este realizar nuevamente un análisis micoquímico para asegurarse que dichos compuestos sean sintetizados por el hongo y no absorbidos del medio.

Los hongos cuentan con una gran cantidad de metabolitos secundarios con actividad biológica importante, que aún no han sido estudiados por lo que se recomendaría hacer estudios más profundos sobre éstos.

El uso de otro tipo de marcadores moleculares también sería importante para estandarizar un mayor número de técnicas, probar con otras especies ya que algunas cuentan con cutículas muy cerosas que causan problemas en la extracción del material genético.

Realizar estudios de variabilidad genética en las poblaciones donde las colectas son más exhaustivas y compararlas con sitios donde las colectas son ocasionales y de este modo ver cómo afectan las colectas a la pérdida de variabilidad genética.

VIII BIBLIOGRAFÍA

Alexopolous, C.J.; Mims, C.W., Blackwell, M. (1996). *"Introductory mycology"* 4ta ed. Wiley. EUA. 868p.

Almaraz-Abarca N. (2011). *"Agave duranguensis"*, en: *Variabilidad genética*. Instituto Politécnico Nacional. México, 231 p.

Ávila, M. (2007). Determinación de los compuestos triterpenoidales del extracto en metil etil cetona de *Suillus luteus*. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogotá.

Barrero, A.; Oltra, J.; Poyatos, J. (1996). Acidic metabolites from *Phycomyces blakesleeanus*, *Phytochemistry.*, 42, 1427p.

Bas, C. (1969). "Morphology and subdivision of *Amanita* and a monograph of ITS section *Lepidella*." pp 285-579.

Bas, C. (1977). "Species concepts in *Amanita* section *Vaginatae*" *Journal of Mycol.* 61 J. Cramer, Vaduz. p 79-91.

Benavides, O. (2004). Estudio químico de la fracción insaponificable del hongo macromiceto *Lentinula edodes* (shiitake). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogota.

Bennetzen, J.L (2000). "Transposable element contribution to plant gene and genome evolution", *Plant Molecular Biology* 42, pp. 251-269.

Boa, E. (2004). *Wild edible fungi, a global overview of their use and importance to people*. Non-Wood Forest Products 17, Food Agriculture Organization of the United Nations.141p. Roma, Italia.

Brizuela, M.A.; García, L.; Pérez, L. y Mansur Mariana (1998). *Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios*. Revista Iberoamericana de Micología. Vol. 15: 69-74.

Brocks, J.J.; Buick, R.; Summons, R.E.; Logan, G.A. (2003). Reconstruction of Archean biological diversity based on molecular fossils from the 2.78 to 2.45 billion-year-old Mount Bruce Supergroup, Hamersley Basin, Western Australia. *Geochim. Cosmochim. Acta*. 67. 4321–4335.

Bruneton, J. (2001). “Fotoquímica y plantas medicinales”. Editorial Acribia 2ª edición. Zaragoza, pp. 547-549

Carbone, V.; Mоторo, P.; Tommasi, N.; Pizza, C. (2004). Analysis of flavonoids from *Cyclanthera pedata* fruits by liquid chromatography/electrospray mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34, 295

Castilla, F. (2008). “Hongos del Arboreto y del Monte Abantos”, Cuadernos del Arboreto Luis Ceballos, Vol.3, Consejería del Medio Ambiente, Vivienda y ordenación del Territorio, pp. 5,15.

Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A., Kilburn, J.D., Rakariyatham, N. (2007). Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. *Food Chemistry* 100, 1044–1048p.

Chegwin, C. (2005). Estudio químico preliminar de los metabolitos secundarios mayoritarios de tipo esteróico presentes en el extracto de acetato de etilo del hongo macromiceto *Pleurotus sajor-cajú* e inicio en la búsqueda de estatinas en el mismo. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogotá.

Chegwin, C. (2007). Estudio de la influencia del sustrato en la cantidad y clase de triterpenoides de *Pleurotus ostreatus* así como en el contenido de estatinas si

dicho hongo las presenta. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogotá.

Christensen, M., Bhattarai, S., Devkota, S., Larsen, H.O. (2008). Collection and use of wild edible fungi in Nepal. *Econ. Bot.* 62(1): 12-23p.

Cole, R.J.; Schweikert, M.A. (2003). Handbook of secondary fungal metabolites. Academic press. USA. Vol. II.

Crossa, J.; Hernandez, C.M.; Bretting, P.; Eberhart, S.A. and Taba, S. (1993). "Statistical genetic considerations for maintaining germ plasm collections" en: *Theoretical and Applied*

Cucaita, E. (2007). Estudio químico comparativo de metabolitos secundarios de los hongos comestibles *Laccaria laccata* y *Lentinula edodes* y determinación de su variación respecto al estadio del hongo. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogotá.

D'armas, H.; Castillo-Machalskis, I.; Noguera, T.; Quintero, M. (2009). Evaluación química del hongo *Aspergillus ochraceus* 3MCMC3 aislado de raíces de *Rhizophora mangle*. *Bol. Centro Invest. Biol.* 43(2). 225–243 p.

Díaz-Moreno R; Valenzuela, R. y Díaz, D. (2009). "Algunos hongos comestibles del Estado de Durango". Revista reforestamos México. Vol. 2 No. 93.

Franco C.; Santaella G. (2000). *Manual de Fundamentos de Micología*. Facultad de Ciencias, México.

Gan, K.H.; Kuo, S.H.; Lin, C.N. (1998). Steroidal Constituents of *Ganoderma applanatum* and *Ganoderma neo-japonicum*. *J. Nat. Prod.* 61. 1421–1422 p.

García-Jiménez J.; Garza O. J.; Fortunato, O. (2001). *Conocimiento de los hongos de la familia Boletaceae de México*. Revista Ciencia UANL. Vol. 4, No. 3.

Garibay-Orijel, R., Caballero, J., Estrada, A., Cifuentes, J. (2007). Understanding cultural significance, the edible mushrooms case. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 3:4.

Geissman, T.A. (1969). "Organic Chemistry of Secondary plant metabolism". Freeman, Cooper and Company, San Francisco, California. *Genetics*, pp 86, 673-678.

González S. F. J (2000). *Morfología de Macromicetos*. Revista Medio ambiente islas canarias. Vol. 3. No 2.

Guzmán G. (1997). *Los Hongos y el Hombre Biodiversidad e Impacto Ecológicos, Social y Económico*. Instituto de Ecología de Xalapa, México.

Guzmán G.; Ramírez-Guillen F. (2001). *The Amanita caesarea-complex*. Berlin. Stuttgart Band 187, (1-9)p.

Hammer, O.; Harper, P. y Ryan, P. (2001). "PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis", *Paleontologia Electronica* 4:9.

Hadacek, F. (2002). "Secondary metabolites as plant traits: current assessment and future perspectives", *Critical Reviews in Plant Science* 21, 273-322 p

Härkönen, M. (2002). Mushroom collection in Tanzania and Hunan (Southern China): Inherited wisdom and folklore of two different cultures. *In: R. Watling, J.C. Frankl, A.M. Ainsworth, S. Isaac, G.H. Robinson (Eds.) Tropical Mycology Vol. I, Macromycetes.* CABI International. Londres, Reino Unido. 149-166 p.

Hernández, Y. (2007). Estudio químico de los metabolitos secundarios de tipo triterpenoidal mayoritarios presentes en el extracto etanólico del hongo *Lycoperdon sp.* Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogotá.

Highton, R. (1990). "Taxonomic treatment of genetically differentiated populations", *Herpetologica* 46, 114-121 p.

Hoelzel, A.R. y Brancoft D.R. (1994). "Statistical analysis of variation", in: *Molecular Genetic Analysis of Populations. A Practical Approach* (Ed. Hoelzel, A.R.), IRL Press, Oxford, 297-305 p.

Hrazdina, G. (1992). "Biosynthesis of Flavonoids", in: *"Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance"* (Eds: Hemingway, R. W., O.E. Lakes), New York, Plenum Press, 61-72 p.

Huie, C. (2004). Chromatographic and electrophoretic methods for *Lingzhi* pharmacologically active components. *J. Chromatogr. B.* 812. 241–257p.

Jaramillo, M. (2006). Estudio químico preliminar del extracto metanólico del micelio del hongo basidiomiceto colombiano *Ganoderma lucidum* cultivado sobre

suero de leche. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogotá.

Jaramillo, M. (2009). Determinación estructural y de actividad antimicrobiana de los intra y exo metabolitos secundarios triterpenoidales en *Ganoderma lucidum* obtenido en cultivo sumergido. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogotá.

Juárez, M.; Zafra, A.; Luzón, B.; Ballesteros, O.; Navalon, A.; González, J. y Vilchez, J. (2008). Gas chromatographic–mass spectrometric study of the degradation of phenolic compounds in wastewater olive oil by *Azotobacter Chroococcum*. *Bioresource Technology*, 99, 2392p

Keim, P.; Beavis W.; Schupp J. y Freestone R. (1992). “Evaluation of soybean RFLP marker diversity in adapted germoplasm”, *Theoretical and Applied Genetics* 85, 205-212 p.

Ladygina, N.; Dedyukhina, E.G.; Vainshtein, M.B. A (2006). Review on microbial synthesis of hydrocarbons. *Process Biochemistry*. 41, 1001–1014.

Markham, K. R. y Campos, M. (1996). *Techniques of flavonoid identification*, Academic Press, London.

Manitto, P. (1981). “Biosynthesis of Natural products”. Halsted Press (John Wiley and Sons), New York.

Miles, P.; Chang, S.T. (1999). Biología de las setas. Fundamentos básicos y acontecimientos actuales. Primera edición. World Scientific, Bogotá

Montoya E.A. (2001). *Hongos comestibles de México*. Revista Asociación Etnobiológica Mexicana (AEM). IV Congreso Mexicano de Etnobiología.

Naranjo J. N. y Herrera C. J. (2000). *El cultivo de Hongos comestibles para el desarrollo comunitario*. Interciencia, antología de Hongos. CIIDIR-IPN-DGO. México.

Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*, Columbia University Press, New York, 512 pp.

NOM-059-SEMARNAT-1994. Consultada el 19/10/2012 (<http://www.semarnat.gob.mx>) en el siguiente vínculo: NOM-059-SEMARNAT-1994.

Osorio, Z., M.A., D. Infante y S. Molina. (2006). "Variación genética asexual en *Agave cocui* Trelease". Bol'NAKARI, Edición digital pp. 17:1-7.

Pérez M. J.; Ferrera C.R. (1993). *Ecología y perspectivas de cultivo de los hongos comestibles ectomicorrizos en México*. Memoria 1er. Simposium sobre Hongos Comestibles en México.

Pérez S. y Herrera S.; (1991). Iconografía de Macromicetos de México: I Amanita, México, UNAM.

Petit, R.J. y Excoffier L. (2009). "Gene flow and species delimitation" Trends in Ecology and Evolution 24, 386-393 p.

Quimio T.H.; Chang S.T.; Royse D.J. and Menini U.G. (1990). "Technical guidelines for mushroom growing in the tropics F.A.O Plant Production and Protection Paper". Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma. 106p.

Rambelli A. (1985). "Manual on mushroom cultivation". Published by F.A.O. Roma

Ribeiro, B. Valentao, P. Baptista, P. Seabra, R. Andrade,P. (2007). Phenolic compounds, organic acids profiles and antioxidative proprieties of beefsteak fungus (*Fistulina hepatica*). *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1805p

Rivera. A. (1998). Producción de vitamina D2 a partir de hongos macromicetos: aspectos científicos, técnicos y económicos, Colciencias. Bogotá.

Saleh F.M.; Defrawy. R.F.; Abdou., y Mohammed A.F. (2006). "Genetic Variability at The b-Mating Type Locus In *Ustilago maydis* In Egypt and ITS Molecular Identification". *Assiut Journal of Agricultural Science.Egipto*, 37: 153-170 p

Sambrook, J.; Fritsch E.F y Maniatis T. (1989). " Molecular Cloning a Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

Sánchez-Ramírez S. (2011). "Sistemática molecular de las especies de *Amanita* sección *caesaerae*" Universidad nacional Autónoma de México. México, D.F. 80p.

Sánchez-Vázquez E. y Huerta-Palacios G. (2000). "Genetic resources of edible mushrooms in México, and their utilization" en: *Characterization, conservation, evaluation y utilization of mushroom genetic resources for food y agriculture*. Bordeaux France El colegio de la frontera sur, Tapachula, Chiapas, México.

Savoie, J-M., Largeteau, M. L. (2011). Production of edible mushrooms in the forest: trends in development of amycosilviculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89: 971-979.

SEMARNAT, (2007). Manual que establece los criterios técnicos para el aprovechamiento sustentable de los recursos forestales no maderables de clima templado/frio. México.

Serrano, E. (2009). Estudio químico de los metabolitos secundarios presentes en el hongo *Auricularia auricula-judae*. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Química.

Singer, R. (1986). "*The Agaricales in modern taxonomy*" 4ta ed. Koeltz Science, Koenigstein. 912p.

Singsaas, E.L. y Sharkey, T.D. (2000). "The effect of high temperature on isoprene synthesis in oak leaves", *Plant Cell and Environment* 23, pp. 751-757.

Sites, J. W. Jr. y Marshall J.C. (2004). "Operational criteria for delimiting species", *Annual Review of Ecology and Systematics* 35, pp.199-227.

Smith, C. (1984). "Genetic aspects of conservation in farm livestock". 11, 37-48 p.

Sosa, P. A. (2001). “*Genes, poblaciones y especies*”, en: *Naturaleza de las Islas Canarias. Ecología y Conservación*, Ediciones Turquesa, España, 151-155, p.

Strobel, G.; Knighton, B.; Kluck, K.; Ren, R.; Livinghouse, T.; Griffin, M.; Spakowicz, D.; Sears, J. (2008). The production of myco-diesel hydrocarbons and their derivatives by the endophytic fungus *Gliocladium roseum* (NRRL 50072). *Microbiology*. 154. 3319– 3328p.

Taiz, L. y Zeiger, E. (1991). *Plant Physiology*, Benjamin Cumings, California.

Tulloss, R.E. (2005). “*Amanita*—distribution in the Americas with comparison to Eastern and southern Asia notes on spore character variation with latitude and ecology” . *Mycotaxon* 93: pp 189-231.

Tulloss, R.E. (2009a). “Studies in the *Amanitaceae*” Ed. R.E. Tulloss. <http://www.amanitaceae.org/?Home> Consulta: 30 de Octubre del 2013.

Tulloss, R.E. (2009b). “Notes on *Amanita* section *Caesareae*, In: Studies in the *Amanitaceae*” <http://www.amanitaceae.org/content/uploaded/pdf/hemibkey.pdf> Consulta: 4 de enero 2014.

Valencia, M. (2002). Estudio químico de metabolitos secundarios del hongo micromiceto *Ganoderma australe*. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogotá.

Valls J; Lampreave M.; Nadal M.; Arola (2000). *Importancia de los compuestos fenólicos*. Revista Alimentación Equipos y Tecnología. Vol.19, No. 2, 119-124p.

Valverde, M.E.; Vandemark G.J. y Paredes-Lopez O. (2000). "Genetic diversity of *Ustilago maydis* strains". World Journal of Microbiology & Biotechnology. 16: 49-55 p.

Villareal L.; Pérez-Moreno J. (1989). *Los hongos comestibles silvestres de México, un enfoque integral*. Bol. Inf. Soc. Mex. Mic. 2, 16-24.

Villarreal, L. (1995). "Los hongos comestibles, una alternativa para el manejo integral de los bosques" en: Alternativas al manejo de laderas en Veracruz. SEMARNAP, México, D.F.

Wu, S.; Zorn, H.; Krings, U.; Berger, R.F. (2005). Characteristic Volatiles from Young and Aged Fruiting Bodies of Wild *Polyporus sulfureus* (Bull.:Fr.) Fr. *J. Agric. Food Chem.* 53. 4524–4528 p.

Xiao, J.H.; Xiao, D.M.; Sun, Z.H.; Xiong, Q.; Liang, Z.Q.; Zhong, J.J. (2009). Chemical compositions and antimicrobial property of three edible and medicinal *Cordyceps* species. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 7, 91–100p.

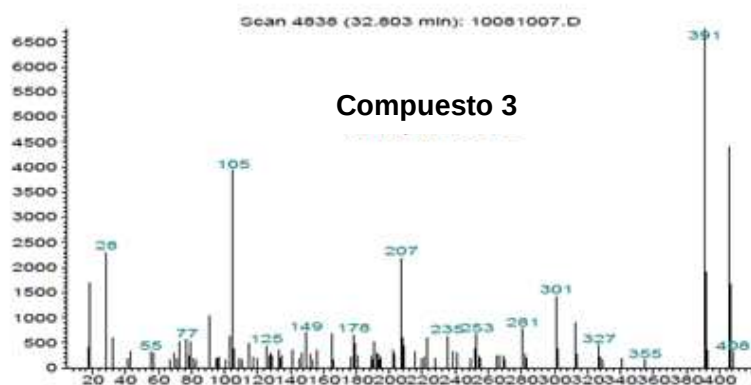
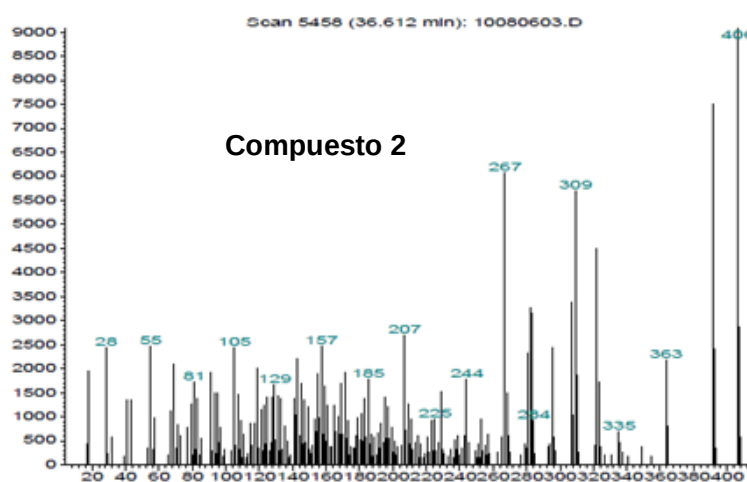
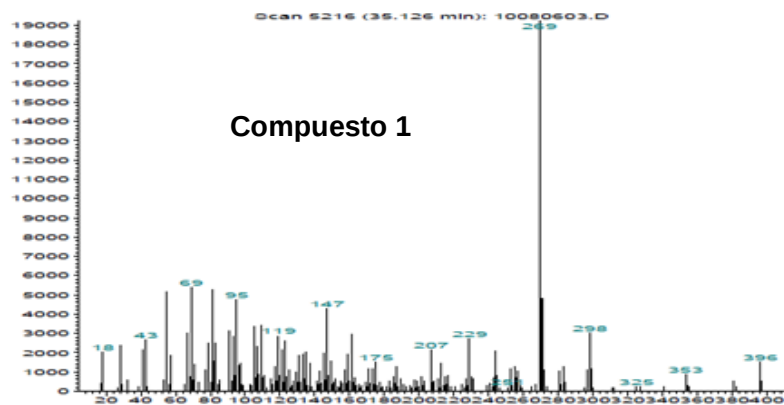
Yun, W., Hall, I.R. (2004). Edible ectomycorrhizal mushrooms: challenges and achievements. *Can. J. Bot.* 82: 1063-73 p.

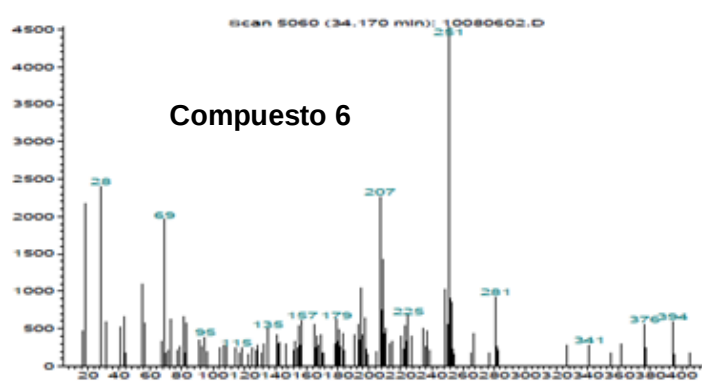
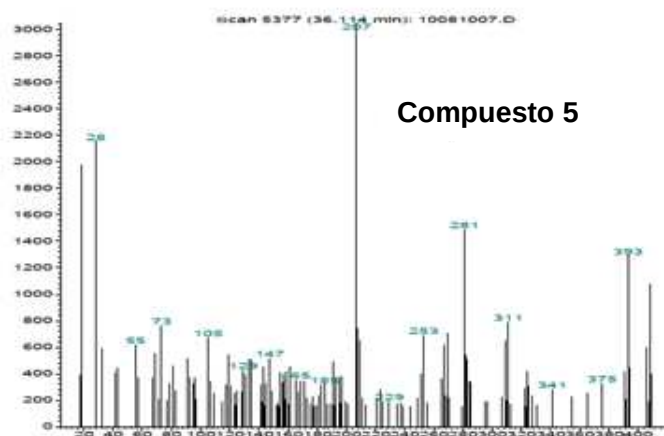
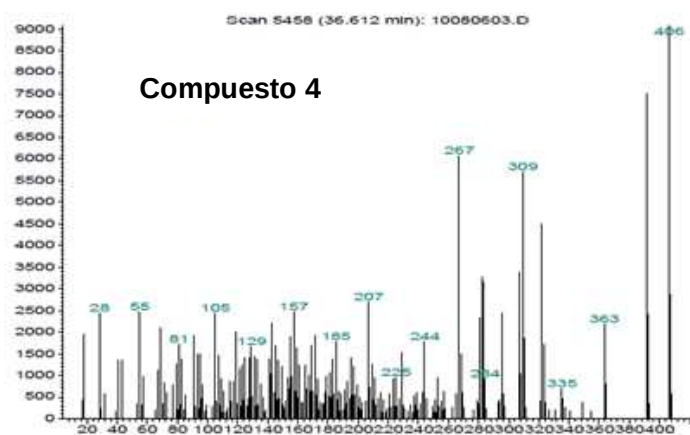
Zambino E. (1997). "Variation at the b Mating Type Locus of *Ustilago maydis*". Ecology and Population Biology, Egipto, 87: 1233-1239 p.

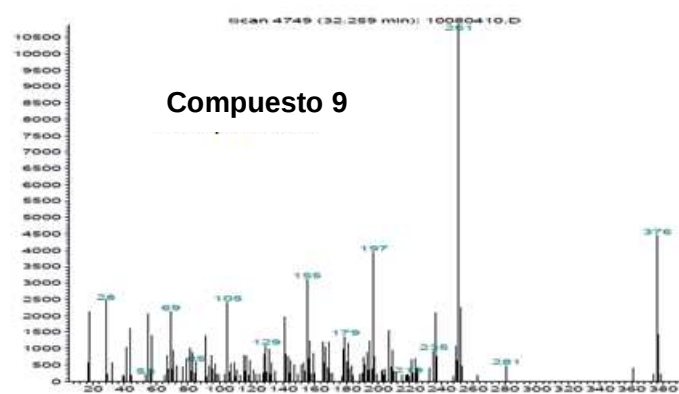
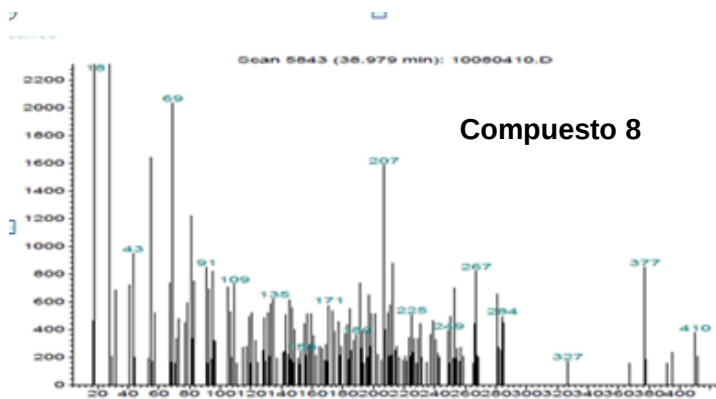
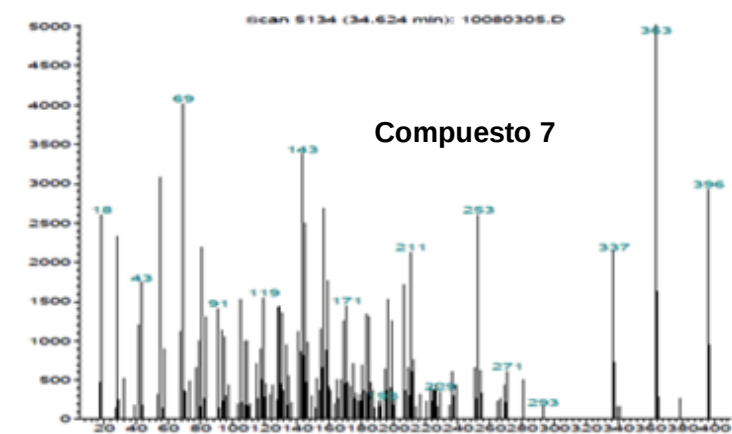
Zamora-Martínez, M.C.; Torres R. y L.I. Zamora Martínez (2001). "Análisis de la información sobre productos forestales no maderables en México". FA.O. Chile. 120p.

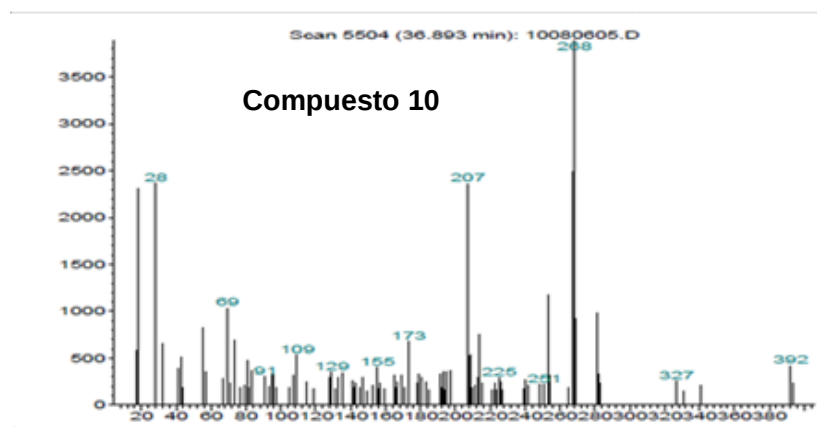
IX ANEXOS

a) Cromatogramas de los compuestos ácidos grasos no esterólicos

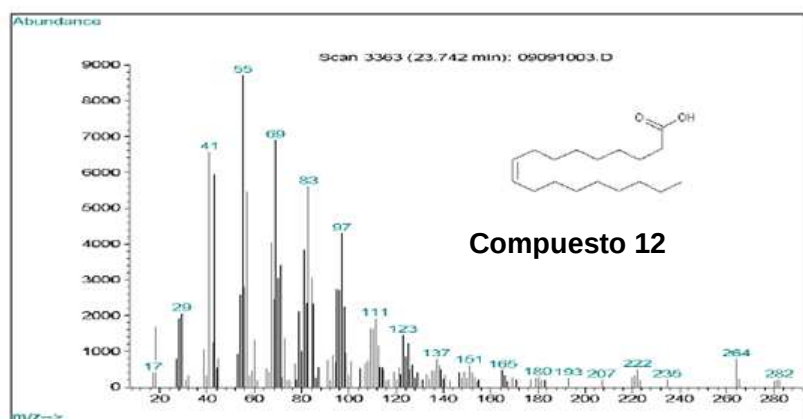
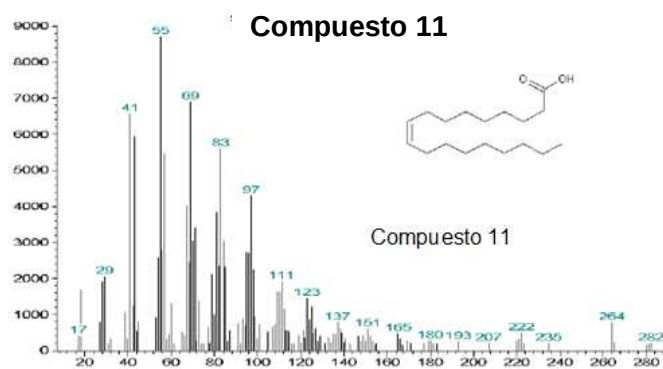


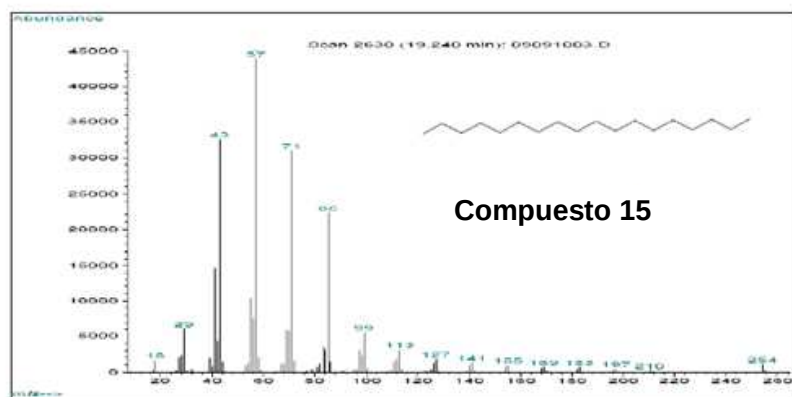
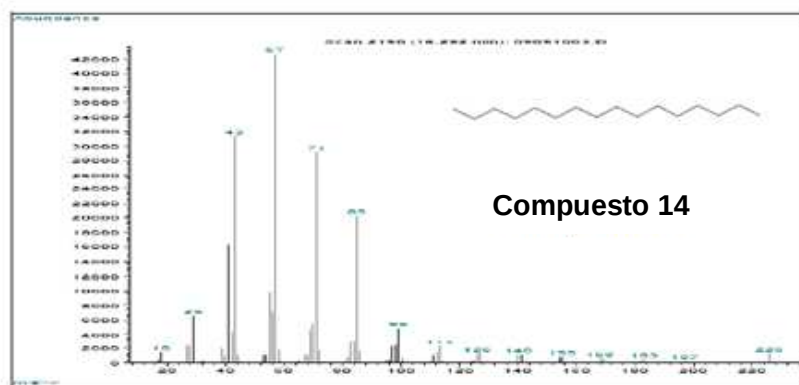
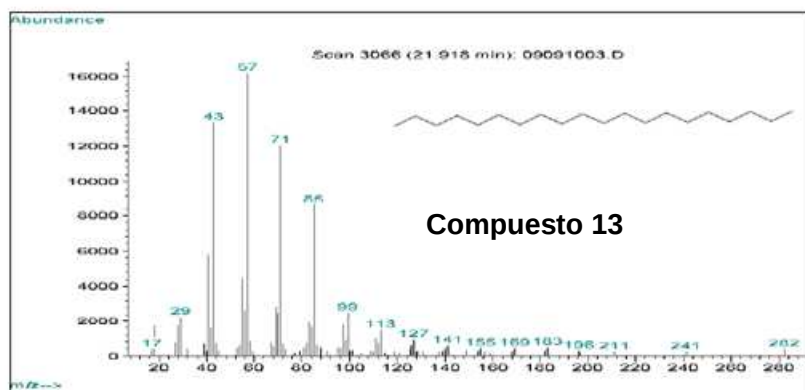


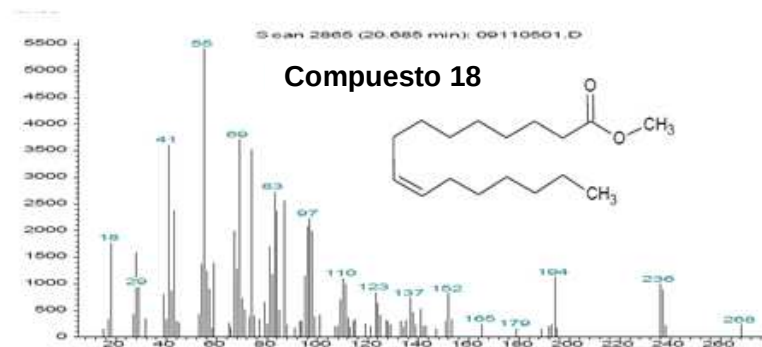
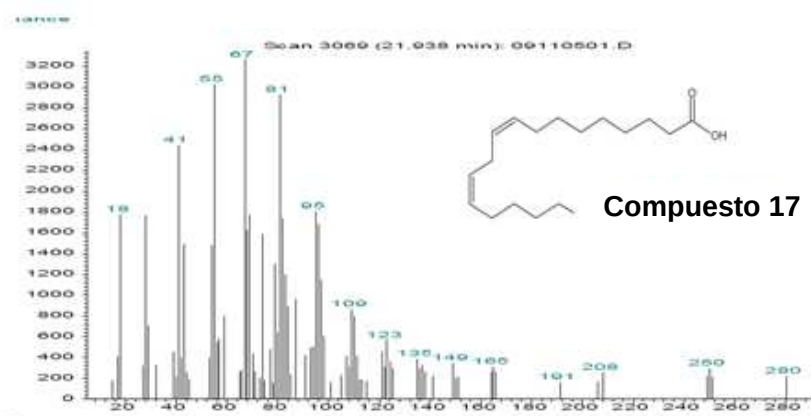
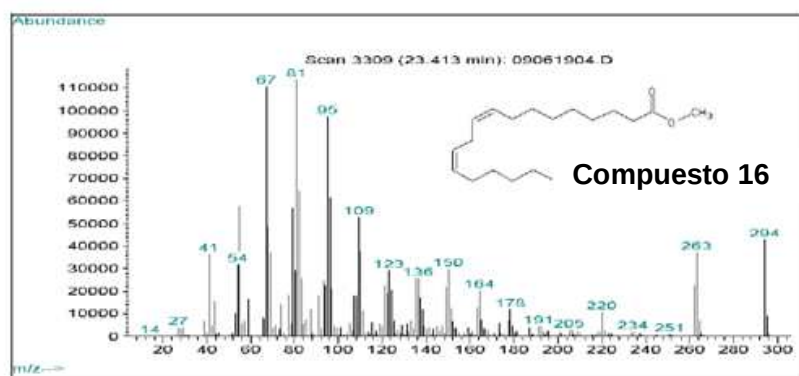


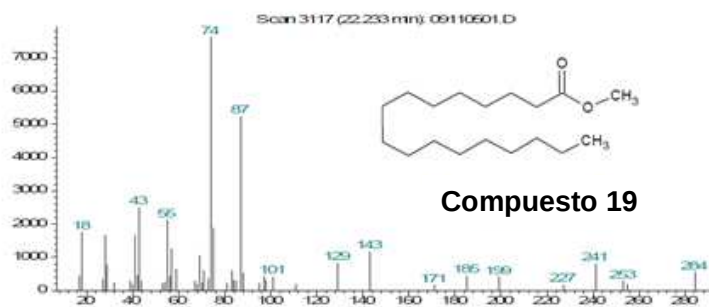


b) Cromatogramas de los compuestos terpénicos









c) Cromatogramas de los compuestos polifenolicos

