



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

---

---

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA  
ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA  
DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN

**Aproximación morfológica, citotóxica y  
genética del complejo *Amanita rubescens* Pers.,  
en México**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**DOCTOR EN CIENCIAS EN BIODIVERSIDAD Y**  
**CONSERVACIÓN**

**P R E S E N T A:**  
M. EN C. GRISELDA NALLELY HERNÁNDEZ RICO

**DIRECTOR DE TESIS:**  
DR. PABLO OCTAVIO AGUILAR

**MINERAL DE LA REFORMA, HGO., JUNIO DE 2020**



PERLPILZ · *Amanita rubescens* (PERS. ex FR.) S. F. GRAY

Publicado en Alemania, 1963 por Claus Caspari.



Mineral de la Reforma, Hgo., a 18 de mayo de 2020

**Número de control:** ICBI-D/441/2020  
**Asunto:** Autorización de impresión de tesis.

**M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO**  
**DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH**

Por este conducto le comunico que el comité revisor asignado a la C. Griselda Nallely Hernández Rico, alumna del Doctorado en Ciencias en Biodiversidad y Conservación con número de cuenta 143356, autoriza la impresión del proyecto de tesis titulado “Aproximación morfológica, citotóxica y genética del complejo *Amanita rubescens* Pers., en México”, en virtud de que se han efectuado las revisiones y correcciones pertinentes.

A continuación se registran las firmas de conformidad de los integrantes del comité revisor.

**PRESIDENTE** Dr. Juan Carlos Gaytán Oyarzún

**SECRETARIO** Dr. Roberto Garibay Orijel

**VOCAL** Dr. Pablo Octavio Aguilar

**SUPLENTE** Dra. Leticia Romero Bautista

Sin otro particular reitero a Usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente  
 “Amor, Orden y Progreso”

Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval  
 Director del ICBI



OAAS/CIAF



Ciudad del Conocimiento  
 Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5 Colonia Carboneras,  
 Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. C.P. 42184  
 Teléfono: +52 (771) 71 720 00 ext. 2231 Fax 2109  
 direccion\_icbi@uaeh.edu.mx

## DEDICATORIA

*“Aprendí que el coraje no era la ausencia de miedo, sino el triunfo sobre él. El valiente no es quien no siente miedo, sino aquel que conquista ese miedo” ... Nelson Mandela*



### *A mi familia:*

Dedicado a las personas que siempre han estado a mi lado, con su apoyo incondicional en otra etapa y su amor, para ustedes padres: Virginia Rico Ponce y Marcelo Hernández Pedraza a los cuales les debo todo y que siempre les estaré agradecida, también a mis hermanos: Jhair, Omar y Adán con quienes he compartido muchas cosas, los quiero mucho... ¡¡¡¡MUCHAS GRACIAS!!!!



## AGRADECIMIENTOS



Un agradecimiento especial al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca otorgada con número de CVU **284900**.

A la **Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH)** por el espacio brindado durante mi formación académica.

A el **Proyecto 252807 de CONACYT-INFR-2015-01** por el apoyo en la infraestructura prestada dentro de la UAEH.

Agradecer al **Dr. Pablo Octavio Aguilar**, el apoyo brindado para la realización de este trabajo, la paciencia y los consejos, no tengo más que decirle una vez más **GRACIAS POR TODO SU APOYO**.

A los sinodales conformados por: **Dra. Leticia Romero Bautista, Dr. Roberto Garibay-Orijel y Dr. Juan Carlos Gaytán Oyarzún** por su ayuda en las observaciones, apoyo en laboratorio y los comentarios para la mejora de este trabajo, gracias por su tiempo, **MUCHAS GRACIAS**.

A todos mis compañeros de **Laboratorio de Genética-UAEH**, quienes me han brindado su amistad y apoyo.

Al **M. en C. Cuauhtémoc Alain Rubio Tobón** por todo su gran apoyo, amistad, comprensión y compañía en esta carrera profesional... mil gracias.

A la **Dra. Noemi Matías** por su ayuda, paciencia en laboratorio y su hospitalidad, mil gracias.

A los chicos de **Sistemática y Ecología de Micorrizas-UNAM**, por su amistad y apoyo en laboratorio: Julieta Álvarez, Andrés Argüelles y Rodolfo Ángeles.

A la **M. en C. Ma. Berenit Mendoza Garfias** por su apoyo en la preparación de muestras y obtención de fotografías de esporas con el Microscopio Electrónico de Barrido-UNAM.

# ÍNDICE GENERAL

Permiso de Impresión.....	¡Error! Marcador no definido.
Dedicatoria .....	iv
Agradecimientos .....	v
Índice General.....	vii
Abreviaturas.....	ix
Índice de Figuras .....	x
Índice de Cuadros y Tablas .....	xii
Resumen General.....	1
<b>CAPÍTULO 1: Introducción General.....</b>	<b>2</b>
1.1 Resumen.....	2
1.2 Introducción .....	3
1.3 Antecedentes.....	4
<b>1.3.1 Consumo Tradicional de Hongos en México .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3.2 Complejo Amanita rubescens .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3.3 Toxinas en los Hongos.....</b>	<b>10</b>
<b>1.3.4 Marcadores Moleculares para Toxinas.....</b>	<b>16</b>
1.4 Hipótesis .....	18
1.5 Justificación .....	18
1.6 Objetivo General.....	19
1.7 Objetivos Particulares .....	20
1.8 Materiales y Métodos.....	20
<b>1.8.1 Extracción de DNA, Protocolos de PCR y Secuenciación .....</b>	<b>21</b>
1.9 Literatura citada .....	24
<b>CAPÍTULO 2: Genotoxic Profile and Morphological Variation of the <i>Amanita rubescens</i> Complex: Traditional Knowledge for Safe Consumption in Mexico .....</b>	<b>45</b>
2.1 Abstract.....	45
2.2 Introduction.....	45
2.3 Materials and Methods.....	46
<b>2.3.1 Sampling.....</b>	<b>46</b>
<b>2.3.2 DNA Extraction .....</b>	<b>47</b>
<b>2.3.3 Amplification .....</b>	<b>48</b>
<b>2.3.4 Morphological Analysis .....</b>	<b>48</b>
<b>2.3.5 Analysis .....</b>	<b>49</b>
2.4 Results.....	49
2.5 Discussion .....	52
2.6 Conclusion .....	53
2.7 Acknowledgments.....	54
2.8 References Cited .....	54
<b>CAPÍTULO 3: Phylogenetic Analysis of the <i>Amanita rubescens</i> Complex: <i>Amanita rubosporeaspera</i> a New Species From Mexico.....</b>	<b>58</b>
3.1 ABSTRACT.....	58
3.2 INTRODUCTION .....	59
3.3 MATERIALS AND METHODS.....	60

<b>3.3.1 Molecular Analysis</b> .....	<b>61</b>
3.4 RESULTS .....	63
3.5 DISCUSSION .....	66
3.7 REFERENCES .....	67
<b>CAPÍTULO 4: Aproximación Toxicológica del Complejo <i>Amanita rubescens</i> en Hidalgo, México</b> .....	<b>73</b>
4.1 Resumen.....	73
4.2 Abstract.....	74
4.3 Introducción .....	74
4.4 Material y Método.....	78
<b>4.4.1 Germinación</b> .....	<b>78</b>
<b>4.4.2 Obtención de Macerados Fúngicos</b> .....	<b>79</b>
<b>4.4.3 Tratamientos</b> .....	<b>79</b>
<b>4.4.4 Análisis Citológico</b> .....	<b>80</b>
4.5 Resultados .....	81
4.5 Discusión.....	83
4.6 Literatura Citada .....	85
<b>CAPÍTULO 5: Discusión General sobre el Análisis de la Variación del Complejo <i>Amanita rubescens</i> en Hidalgo, México</b> .....	<b>92</b>
5.1 Conclusiones .....	101
5.2 Literatura Citada .....	102
<b>ANEXOS</b> .....	<b>110</b>
Anexo 1. Valores de la Cuantificación. ....	110
Anexo 2. Imagen de la Región ITS en Hongos. ....	112
Anexo 3. Protocolo de Amplificación .....	113



## ABREVIATURAS

AMA1	Amatoxina ( <i>gen</i> ).
CL50	Concentración letal al 50%.
cm	Centímetros.
cm <sup>3</sup>	Centímetro cúbico.
CONACYT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.
CTAB	<i>Cetyl-Trimethyl-Ammonium-Bromide</i> (Bromuro de hexadecil-trimetil-amonio).
dH <sub>2</sub> O	Agua bidestilada estéril.
DNA	<i>Desoxiribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico).
dNTP	Deoxinucleósido trifosfato.
EE. UU.	Estados Unidos de América.
g/Kg	Gramos por kilo.
HCL	Ácido Clorhídrico.
HCS	Hongos Comestibles Silvestres.
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta calidad).
ITS	<i>Intergenic Sequences</i> (Secuencias Intergénicas).
KCl	Cloruro de Potasio.
Kg/ha/año	Kilogramo por hectárea por año.
KOH	Hidróxido de Potasio.
Ma	Millones de años.
MCMC	<i>Markovian Chain of a Monte Carlo Model</i> (Cadenas Markovianas de Monte Carlo).
MEXU-UNAM	Colección de Hongos del Herbario Nacional de México.
mg/mL	Miligramo sobre mililitro.
Mg/Kg	Miligramo por kilo.
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de Magnesio.
min	Minutos.
ml	Mililitro.
mM	Milimolar.
mm	Milímetro.
mm <sup>2</sup>	Milímetros cuadrados.
msnm	Metros sobre el nivel del mar.
N	Normalidad /Normal.
Ng/g	Nanogramos sobre gramo.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
PFNM	Productos Forestales No Maderables.
pH	Potencial de iones Hidrógeno.
PHA1	Falotoxina ( <i>gen</i> ).
POP	Prolil-oligopeptidasas ( <i>gen</i> ).
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido Ribonucleico).
rpm	Revoluciones por Minuto.
s.s.	<i>Sensu stricto</i>
seg	Segundo.
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
TBE	Buffer de Tris Borato EDTA.
U	Unidades enzimáticas.
UAEH	Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
UH/min	Unidades por minuto.
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México.
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i> .
V	Volts.
v/v	Volumen sobre volumen.
µg/ml	Microgramo sobre mililitro.
µl	Microlitro.
µm	Micrómetro.

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>CAPÍTULO 1: Introducción General</b> .....	2
<b>Figura 1.1.</b> Diagrama de la organización del género <i>Amanita</i> y algunos ejemplos de especie de cada sección (Modificado de Pérez-Silva y Herrera-Suárez, 1991; Méndez-Navarro <i>et al.</i> , 2011).....	7
<b>Figura 1.2.</b> a) <i>Amanita</i> aff <i>rubescens</i> , b) <i>A. aff rubescens</i> , c) <i>A. aff rubescens</i> , bosque de pino ( <i>Pinus patula</i> ) en las lajas, Puebla y d) <i>A. aff rubescens</i> , bosque de encino ( <i>Quercus</i> ) San Jerónimo, El Arenal, Hidalgo (Fotos: Hernández-Rico, 2011; Hernández-Rico, 2008).....	10
<b>Figura 1.3.</b> a) Estructura química de falotoxinas; b) Estructura química de amatoxinas (Fuente: Anderl <i>et al.</i> , 2012) y c) Estructura química de virotoxinas (Fuente: Wong y Ng, 2006).....	14
<b>Figura 1.4.</b> Mapa donde se muestran los sitios de colecta de ejemplares del complejo de <i>A. rubescens</i> . 1) Hidalgo, 2) Tlaxcala, 3) Ciudad de México, 4) Edo de México, 5) Michoacán y 6) Jalisco (ArcGIS 10.3, elaboración: Hernández-Rico). .....	21
<b>CAPÍTULO 2: Genotoxic Profile and Morphological Variation of the <i>Amanita rubescens</i> Complex: Traditional Knowledge for Safe Consumption in Mexico</b> .....	45
<b>Figure 2.1.</b> Geographic locations of the sampling sites of <i>A. rubescens</i> complex mushrooms.....	47
<b>Figure 2.2.</b> A) Molecular grouping using the UPGMA method, B) simple linkage grouping with Gower's distance of morphological discontinuous data, C) ward grouping with Euclidian distances of continuous morphological variables. Red samples (‡) showed all molecular amplifies including genotoxic and positive controls of <i>A. rubescens</i> complex in Hidalgo, orange samples (†) showed one to three genotoxic markers, black samples (¥) only showed positive control amplifies.....	50
<b>Figure 2.3.</b> Samples of <i>A. rubescens</i> complex with reddish color detail. A GNHR-1 (AMA, PHA positive), B GNHR-4 (AMA, PHA positive), C GNHR-9 (complete genotoxic profile), D GNHR-16 (only POP1 negative), E GNHR-18 (only PHA negative) and F GNHR-29 (no toxic profile). The reddish color of the sample with the complete profile is highlighted (c), the brown color of the samples with a partial genotoxic profile (a, b, d, e) and the light color of the negative sample (f).....	51
<b>CAPÍTULO 3: Phylogenetic Analysis of the <i>Amanita rubescens</i> Complex: <i>Amanita rubosporeaspera</i> a New Species From Mexico</b> .....	58
<b>Figure 3.2</b> a-b) Mature basidiome of <i>Amanita rubosporeaspera</i> ; c) mature (left-down) and juveniles (right-up) basidiospores in its basidies; d) basidiospores in the basidies with KOH 5%; e) mature basidiospore showing the roughness, f-g) basidiospores with KOH 5% showing the roughness (scale bars: a-b = 1 cm; c-d = 10 µm; e-g = 4 µm). .....	66
<b>CAPÍTULO 4: Aproximación Toxicológica del Complejo <i>Amanita rubescens</i> en Hidalgo, México</b> .....	73

**Figura 4.2.** Células en división: a) Profase, b) Metafase, c) Anafase y d) Telofase..... 81

**Figura 4.3.** Tratamiento de las raíces de *V. faba*. Extractos Cocidos: a) micronúcleo (*A. virosa*); Extractos Crudos: b) profase (*A. virosa*) y c) negativo donde se observan metafases y telofases..... 82

**Figura 4.3.** a) Comparación entre los tratamientos cocidos y crudos, no se observan diferencias, b) Análisis de Funciones Discriminantes Generalizado (AFDG). EV: eigenvalor, CV: porcentaje de varianza acumulada. Los valores de correlación muestran que a la derecha hay menor cantidad de divisiones y hacia arriba una mayor cantidad de micronúcleos. .... 83

**CAPÍTULO 5: Discusión General sobre el Análisis de la Variación del Complejo *Amanita rubescens* en Hidalgo, México..... 92**

**ANEXOS..... 110**

**Figura A2.1.** Se muestra la región ITS utilizada para definir las especies. Tomado de: <http://sites.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm> ..... 112

**Figura A3.1** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR de ITS1F e ITS4; 47 min., a 90V. Pozo 1-10 son diluciones 1:100; Pozo 11-20 son diluciones 1:1000; los controles positivos: Pozo 21 (1:10); pozo 22 (1:100); pozo 23 (1:1000) no amplificó; pozo 24 (1:1) y pozo 25 es el negativo. Las muestras de los pozos 1-10 se mandaron a secuenciar, excepto la muestra 3, por la presencia de doble-banda, como se puede observar las bandas con dilución 1:1000 no tiene buena calidad, por lo que no se usaron..... 114

**Figura A.3.2.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR de ITS1F e ITS4; 50 min., a 90V. Pozos 1-24, 26-29 son diluciones 1:100 muestras Hidalgo; pozo 25 positivo; pozos 30-49 son diluciones 1:100 de muestras de Colección de Tlaxcala; pozo 50 es negativo. Las muestras mostraron buena calidad de bandas, excepto la muestra 26, todas las demás se mandaron secuenciar..... 115

# ÍNDICE DE CUADROS Y TABLAS

<b>CAPÍTULO 1: Introducción General</b> .....	2
Cuadro 1.1. Estudios toxicológicos y taxonómicos realizados en el complejo <i>Amanita rubescens</i> .....	9
Cuadro 1.2. Compuestos tóxicos identificados en las diferentes secciones del género <i>Amanita</i> (tomado de <a href="http://enhancedwiki.altervista.org/en.php?title=Amanita_rubescens">http://enhancedwiki.altervista.org/en.php?title=Amanita_rubescens</a> ). .....	15
<b>CAPÍTULO 2: Genotoxic Profile and Morphological Variation of the <i>Amanita rubescens</i> Complex: Traditional Knowledge for Safe Consumption in Mexico</b> .....	45
Table 2.1. Sample sites description and its traditional use of the <i>A. rubescens</i> complex. 47	
Table 2.2. Categorical traits of the groups formed by the simple linkage agglomerative method of Mexican <i>A. rubescens</i> complex. All genotoxic profiles are included in the group 2. ....	48
Table 3.3. Description of the groups formed with Euclidean distances obtained from continuous traits of the <i>A. rubescens</i> complex.....	51
<b>CAPÍTULO 3: Phylogenetic Analysis of the <i>Amanita rubescens</i> Complex: <i>Amanita rubosporeaspera</i> a New Species From Mexico</b> .....	58
Table 3.1 List of collections used, with origin and GenBank accession numbers.....	61
<b>CAPÍTULO 4: Aproximación Toxicológica del Complejo <i>Amanita rubescens</i> en Hidalgo, México</b> .....	73
Tabla 4.1. Zona de muestreo y tipo de vegetación donde se colectaron los ejemplares. ..	78
Tabla 4.2. Comparación de las fases mitóticas de <i>Vicia faba</i> entre los tratamientos con extractos cocidos y crudos. Controles positivos: <i>Amanita</i> aff <i>virosa</i> y <i>A. aff verna</i> . N: número de muestras analizadas (considerando las réplicas cocidas y crudas), se resaltan en color las anomalías en las frecuencias identificadas. ....	82
<b>CAPÍTULO 5: Discusión General sobre el Análisis de la Variación del Complejo <i>Amanita rubescens</i> en Hidalgo, México</b> .....	92
<b>ANEXOS</b> .....	110
Tabla A1.1. Evaluación de pureza y concentración de la extracción de DNA para el complejo <i>Amanita rubescens</i> .....	110
Tabla A3.1. Volumen y composición de la mezcla de reacción para el PCR usado. Programa de amplificación para el PCR.....	113

## RESUMEN GENERAL

El consumo de hongos silvestres en México requiere de una adecuada identificación para evitar intoxicaciones. Desafortunadamente, la mayoría de los micetismos se presentan por la inexperiencia de los colectores y creencias equivocadas sobre la manera "tradicional" de elección de los hongos comestibles. Además, el uso de claves taxonómicas basadas en descripciones de hongos europeos, la posible contaminación cruzada y la ausencia de ensayos toxicológicos incrementan el riesgo de micetismo por parte de los consumidores. Por lo anterior, en este trabajo se realizó una caracterización genética, morfológica y citotóxica de hongos identificados previamente como *Amanita rubescens*, especie considerada comestible en Europa y que presenta un consumo tradicional en la región central del estado de Hidalgo.

Los resultados mostraron que la especie consumida en la región central de México y comercializada en los mercados tradicionales no corresponde con *Amanita rubescens sensu stricto*, por lo que se describe como una nueva especie denominada *Amanita rubosporeaspera*. El nuevo taxa presenta genes asociados con la producción de amatoxinas y falotoxinas propias de la sección *Vallidae* a la que pertenece, los extractos de estos hongos destinados al consumo humano son capaces de inhibir la división celular en radículas de haba, aquellos hongos con un perfil genotóxico completo presentan una coloración más rojiza pudiéndose identificar esta nueva especie porque sus esporas presentan rugosidades, carácter ausente en *A. rubescens*. Por todo lo anterior, no se recomienda el consumo de esta especie pues algunos genotipos resultan tóxicos y corresponde a un taxa previamente no caracterizado.

# CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL

## 1.1 Resumen

Los Hongos Comestibles Silvestres constituyen un producto forestal no maderable de importancia alimenticia, ecológica, cultural y económica para las comunidades rurales. México tiene una alta diversidad de estos hongos, aunque existen problemas de micetismo (intoxicación por consumo) debido a confusión, desconocimiento y variación natural dentro de las especies. Además, son pocos los estudios tanto bioquímicos, genéticos y taxonómicos que ayudan a definir que especies son potencialmente comestibles.

El complejo *Amanita rubescens* es considerado comestible en Europa, Estados Unidos, México y algunas regiones de África y Asia, aunque se ha identificado la presencia de Rubescenslisina, una toxina termolábil. En México, hay regiones donde se consume y otras en donde lo consideran tóxico. Por lo anterior, es necesario determinar si la especie mexicana es la misma que se consume en Europa, Estados Unidos y dentro del Estado de Hidalgo. En caso contrario, es necesario determinar las causas del consumo diferencial entre regiones, ya sean morfológicas (confusión con otras especies), citotóxicas y genéticas (variación intraespecífica). El presente trabajo contribuirá al conocimiento de las limitaciones al consumo de lo que se asocia como el complejo *Amanita rubescens* en México; considerando la variación morfológica, genética y toxicológica de localidades bajo aprovechamiento.

## 1.2 Introducción

Los Productos Forestales No Maderables (PFNM) se definen como los bienes de origen biológico distintos a la madera, la leña y el carbón vegetal; así como los servicios brindados por los ecosistemas. Los Hongos Comestibles Silvestres (HCS) representan un PFNM por su importancia alimenticia, ecológica, cultural y económica para las comunidades rurales, ya que a partir de su recolección y comercialización se obtienen ingresos y alimentos cuando son destinados para el autoconsumo (Bandala *et al.*, 1997; Montoya *et al.*, 2003; 2004; Garibay-Orijel *et al.*, 2006; Ruan-Soto *et al.*, 2006; SEMARNAT, 2008).

La diversidad de hongos en México es alta; se estima que en el país hay entre 90,000 y 110,000 especies de macromicetos (Aguirre-Acosta *et al.*, 2014), aunque sólo 350 son considerados comestibles (Garibay-Orijel y Ruan-Soto, 2014). No obstante, el consumo es elevado, particularmente entre grupos étnicos con un amplio conocimiento de las características morfológicas que distinguen a las especies, lo que evita intoxicaciones u otros efectos nocivos para la salud (Vásquez-Zárate, 2007; Rodríguez-Muñoz *et al.*, 2012). Cuando se ingieren hongos tóxicos se generan efectos nocivos en el organismo que reciben el nombre de micetismo, las toxinas no son degradadas durante la digestión, y al ser absorbidas provocan reacciones adversas (Ruiz-Sánchez *et al.*, 1999; Herrera-Suárez, 2003). Algunos micetismos se pueden presentar porque los hongos son capaces de captar y acumular metales pesados tales como cadmio, plomo y mercurio; por lo que son un problema toxicológico y/o genotóxico para el consumo (Alonso *et al.*, 2010).

Por otro lado, Chapela y Garbelotto (2004) reportaron variantes alélicas que manifiestan diferencias en la toxicidad de las poblaciones del hongo Matsutake (*Tricholoma matsutake*). La expresión diferencial de los alelos depende de requerimientos

ambientales como la necesidad de una asociación micorrízica específica (selección natural), procesos de colonización aleatoria con individuos portadores de alelos con expresión más o menos tóxicos (efecto fundador), endogamia, flujo génico, aspectos históricos etc. No obstante, algunos rasgos, como la presencia de amatoxinas y falotoxinas, constituyen un rasgo sinapomórfico, lo que sugiere un origen único en el grupo (Cai *et al.*, 2014), invariable ante el ambiente.

En resumen, se puede inferir que los micetismos dependen de: a) las especies de hongos que se consumen pueden ser confundidos con otras especies comestibles, b) procesos evolutivos asociados a la distribución diferencial de alelos tóxicos y no tóxicos entre las poblaciones y c) variación debida al ambiente. Por lo tanto, es importante establecer la relación genética, morfológica y toxicológica para comprender mejor el perfil metabólico de estos organismos (Rühling y Tyler, 1990; Deja *et al.*, 2014), y los procesos implicados en el micetismo.

### **1.3 Antecedentes**

#### **1.3.1 Consumo Tradicional de Hongos en México**

Los HCS forman parte de la diversidad biocultural de México, ya que representan una fuente de ingresos alternativa o única para los habitantes de las comunidades rurales y su venta se realiza entre los vecinos de la misma localidad o regiones aledañas por lo que es una de las pocas actividades que permiten generar un ingreso adicional en comunidades marginales, ya que no demanda de inversiones ni herramientas. Esta actividad se ha llevado a cabo desde épocas prehispánicas asociando importantes elementos culturales determinados por el género, origen, ocupación y grupo étnico; así como una extensa



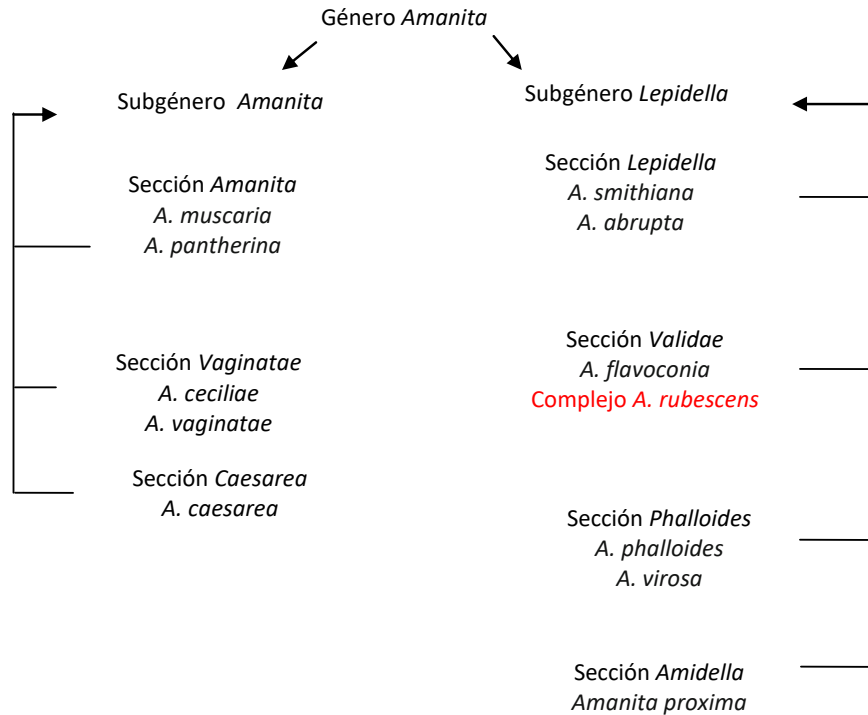
comprensión sobre su ingestión, propiedades medicinales y uso ritual (Villarreal y Pérez-Moreno, 1989; Guzmán, 1994, Alvarado-Castillo y Benítez, 2009; Garibay-Orijel *et al.*, 2012; Ruan-Soto *et al.*, 2013). Varias etnias de nuestro país, por ejemplo los Purépechas en Michoacán, Náhuatl y Totonacas en Veracruz, Zapotecos en Oaxaca, Tzeltales en Chiapas, Náhuatl y Otomí en Hidalgo, Mestiza en Tlaxcala, tienen bastante arraigo en el consumo tradicional de hongos (Ruan-Soto *et al.*, 2004; Moreno-Fuentes y Bautista-Nava, 2006; Guzmán, 2007; Bautista-Nava y Moreno-Fuentes, 2009; Hernández-Rico y Moreno-Fuentes, 2010; Ruan-Soto *et al.*, 2013; Alonso-Aguilar *et al.*, 2014; Hunn *et al.*, 2015; Ruan-Soto y Ordaz-Velázquez, 2015). El consumo de los hongos en el país depende principalmente del conocimiento con respecto a una especie, conocimiento que puede variar de una región a otra, debido a que su sustento es de carácter empírico y no científico. Por ejemplo, los diversos pueblos mayas cuentan con criterios para reconocer y evitar las especies tóxicas, entre los criterios más comunes para identificarlos se mencionan las características morfológicas y el sustrato sobre el que crecen (Morales *et al.*, 2002; Lampman, 2007; Robles *et al.*, 2007; Ruan-Soto *et al.*, 2009; Alvarado-Rodríguez, 2010).

Para los pueblos indígenas, la toxicidad de los hongos se basa en aspectos morfológicos y por su coloración (Hernández-Rico y Moreno-Fuentes, 2010). Los pocos trabajos que se generan con relación a las toxinas en México se enfocan solo a las especies reconocidas como peligrosas para los consumidores, abarcando: *Amanita virosa*, *A. verna*, *A. phalloides*, *A. bisporigera* y *A. muscaria*; esta última como la más conocida y mencionada en la mayor parte de los reportes por Ruan-Soto y García-Santiago (2013). Sin embargo, a pesar de su relevancia, los estudios ecológicos, toxicológicos, genéticos y biotecnológicos de este importante recurso, se encuentran en etapas tempranas de

desarrollo, son puntuales y la información se encuentra dispersa (Alvarado-Castillo *et al.*, 2015).

### 1.3.2 Complejo *Amanita rubescens*

El género *Amanita* Pers.: Fr., actualmente es uno de los más conocidos y característicos dentro del Orden Agaricales Clem. Comprende hongos tanto comestibles como venenosos distribuidos en todo el mundo (Villanueva-Jiménez *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2008). En México, se comercializan en diferentes regiones, principalmente en Hidalgo, Tlaxcala, Puebla y en el Estado de México (Morales-Torres, 1997; Mariaca-Méndez *et al.*, 2001; Montoya-Esquivel *et al.*, 2008; Estrada-Martínez *et al.*, 2009; Hernández-Rico y Moreno-Fuentes, 2010). Se encuentra dentro del Phylum Basidiomycota, Clase Agaricomycetes, Orden Agaricales y Familia *Amanitaceae* (Kirk *et al.*, 2008); se caracterizan por presentar un desarrollo hemiangiocárpico (la estructura sexual parte de una estructura primaria llamada velo), porque el primordio de dicho esporoma presenta tanto un velo universal como velo interno (Largent y Baroni, 1988; Pérez-Silva y Herrera-Suárez, 1991). Este género se ha estudiado extensamente a nivel morfológico y molecular, no obstante, existen problemas de agrupación taxonómica aún sin resolver (Villanueva-Jiménez *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2008). Este género comprende dos subgéneros: *Amanita* y *Lepidella* Corner y Bas, teniendo el primero las secciones: *Amanita* (Fr.), *Vaginatae* (Fr.) Quél y *Caesareae* Singer, el segundo comprende las secciones: *Amidellae* (Gilbert) Konr *et al.*, Maubl., *Lepidella* (Gilbert) Vesely, *Phalloideae* (Fr.) Quél., y *Validae* (Fr.) Quél. En la sección *Validae* del subgénero *Lepidella* se encuentra la especie *A. rubescens* Pers., (Pérez-Silva y Herrera-Suárez, 1991; Tulloss, 2016).



**Figura 1.1.** Diagrama de la organización del género *Amanita* y algunos ejemplos de especie de cada sección (Modificado de Pérez-Silva y Herrera-Suárez, 1991; Méndez-Navarro *et al.*, 2011).

Esta especie presenta la misma problemática taxonómica del complejo *Caesareae*, en la cual hay una confusión de especies con características morfológicas similares aun cuando se encuentran en localidades alejadas (Figura 1.1). Desde hace más de 25 años, el complejo *Caesareae* ha sido estudiado por varios micólogos como Pérez-Silva y Herrera-Suárez (1991), Tulloss (1994), Morales-Torres (1997), Guzmán y Ramírez-Guillén (2001) y Sánchez-Ramírez *et al.*, (2014). En cuanto al complejo *A. rubescens*, se cuenta con pocos estudios genéticos para caracterizar a las especies (eg. Vargas *et al.*, 2017; Mehmood *et al.*, 2018). Tulloss (2016) menciona que las especies de América Central y Sudamérica deben ser estudiadas con más cuidado ya que es posible que se registren hongos similares a los que se encuentran en Europa, EE.UU. y en Asia; sin ser necesariamente las mismas especies. Aunque se sabe que los hongos tienen una gran capacidad de dispersión puesto

que el transporte de esporas e hifas depende de los hospederos con los que están asociados (Wolfe *et al.*, 2010; Sánchez-Ramírez *et al.*, 2015).

Por otro lado, se ha reportado que la toxicidad de *Amanita rubescens* depende de la cocción; además se puede confundir con especies tóxicas como *A. pantherina* (Cuadro 1.1), ya que en estado crudo presenta toxinas que pueden ocasionar malestares intestinales (Tulloss y Rodríguez-Caycedo, 2011; Piqueras-Carrasco, 2014) (Figura 1.2). Por otro lado, se ha detectado la presencia de Rubescenslisina, particularmente en el complejo *A. rubescens* (Cuadro 1.1), una proteína tóxica termolábil con un peso molecular de 35.000 daltons, que interviene como un detergente, debido a que tiene interacción con los fosfolípidos de la membrana celular generando hemólisis intravascular, cardiotoxicidad y efectos del sistema nervioso central (Odenthal *et al.*, 1982; Seeger, 1980a; 1980b; Seeger y Bunsen, 1980; Seeger *et al.*, 1981; Seeger y Wachter, 1981; Chu, 2006) no hay reportes con respecto a la estructura molecular para poder identificar este compuesto en el complejo *A. rubescens* o en otros hongos. Además, no existen reportes donde se haya identificado una región del genoma de las amanitas asociada a la expresión de la toxina Rubescenslisina, por lo que no se cuenta con marcadores moleculares apropiados.

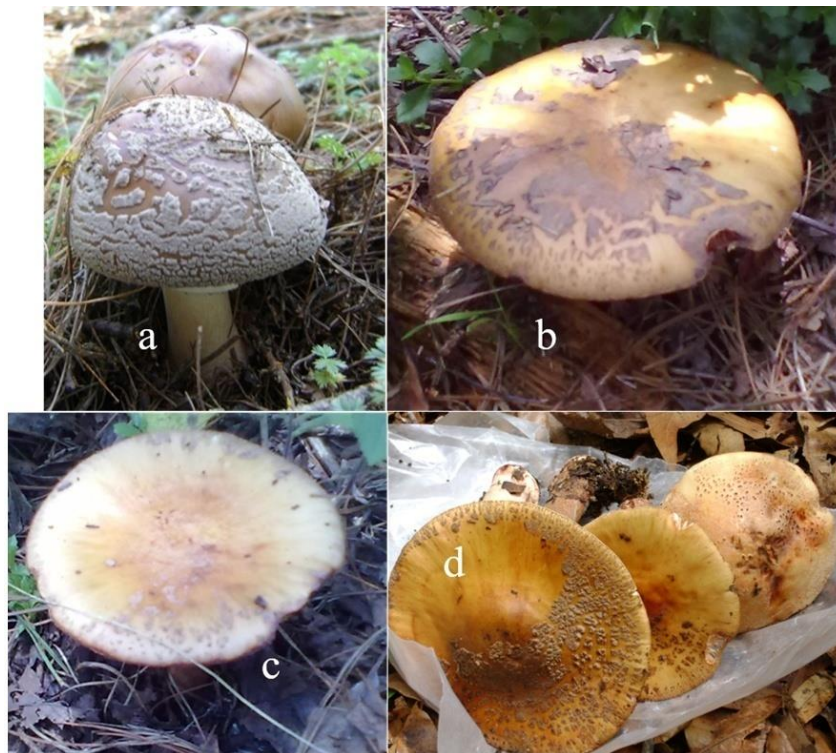
No obstante, mediante inmunodetección se ha identificado la presencia de bajas cantidades de amatoxinas en *A. rubescens*, encontrando entre 6.5 a 7.5ng/g de tejido fresco; cantidades consideradas no letales para el consumo (Faulstich y Cochet-Meilhac, 1976), aunque no se determinó si la expresión de estas toxinas es dependiente del ambiente o si existen alelos con diferente capacidad tóxica en su expresión. Por otro lado, Mullersman y Preston (1982) y Vargas *et al.*, (2011), encontraron una presencia mínima de amatoxinas y falotoxinas en la misma especie usando HPLC (los ejemplares utilizados fueron de Gainesville, Florida y Provincias de Colombia, respectivamente). Sin embargo, Clarke y

colaboradores (2012), no encontraron amatoxinas en muestras de *A. rubescens* procedentes de cinco regiones de Reino Unido. En principio se utilizó una técnica distinta (Espectrometría de Masa de Tiempo de Real-ToF-MS), capaz de identificar tanto amatoxinas como falotoxinas en *A. phalloides*, considerada como control positivo. La variación encontrada entre los estudios mencionados sugiere que la expresión de las toxinas se encuentra bajo regulación genética o pueden ser diferentes especies o poblaciones, además que la concentración absoluta podría ser variable en respuesta a las condiciones ambientales.

**Cuadro 1.1.** Estudios toxicológicos y taxonómicos realizados en el complejo *Amanita rubescens*.

Autor (es)	Considerada comestible	Considerada tóxica	Estudio taxonómico	Toxina presente	Concentración
Alonso-Aguilar <i>et al.</i> , 2014 (México).	X				
Arrillaga-Anabitarte y Laskibar-Urkiola, 2006 (España).	X Aconseja bien cocida				
Arteaga-Martínez y Moreno-Zárate, 2006 (México).	X				
Bhatt <i>et al.</i> , 2003 (India).			X		
Chu, 2006 (China).		X		Rubescenslisina	0.15-0.31 mg/Kg en ratones
Córdova-Chávez <i>et al.</i> , 2014 (México).	X				
Estrada-Martínez <i>et al.</i> , 2009 (México).	X				
Feregrino-Feregrino <i>et al.</i> , 2013 (México).	X				
Garibay-Orijel <i>et al.</i> , 2010 (México).	X				
Gry y Andersson, 2014 (Países Nórdicos).	X Aconseja bien cocida				
Hallen <i>et al.</i> , 2002 (África).	X			No encontraron toxinas	
Hernández-Rico, 2008 (México).			X		
Hernández-Rico, 2011 (México).		X			
Hernández-Velázquez, 2007 (México).		X			
Herrera-Fonseca <i>et al.</i> , 2002 (México).			X		
Jarvis <i>et al.</i> , 2004 (México).	X				
Kim <i>et al.</i> , 2013 (Corea).			X		
Lara-Vázquez <i>et al.</i> , 2013 (México).	X				
Mariaca-Méndez <i>et al.</i> , 2001 (México).	X				
Montoya <i>et al.</i> , 2004 (México).	X				
Montoya <i>et al.</i> , 2012 (México).	X				
Montoya <i>et al.</i> , 2014 (México).	X				
Odenthal <i>et al.</i> , 1982 (Europa).		X		Rubescenslisina	0.25-1 UH/min (corazón); 0.2-3.3 UH/ml (musculo)
Pardavé-Díaz <i>et al.</i> , 2007 (México).			X		
Pérez Silva <i>et al.</i> , 2006 (México).			X		
Pérez Silva <i>et al.</i> , 2011 (México).			X		

Ribeiro <i>et al.</i> , 2006 (Portugal).		X		Ácidos Orgánicos	91 g/Kg
Rodríguez <i>et al.</i> , 2010 (México).	X				
Sánchez-Rodríguez <i>et al.</i> , 1991 (España).			X		
Seeger, 1980a (Alemania).		X		Rubescenslisina	1.4 mg/Kg en ratas
Seeger, 1980b (Alemania).		X		Rubescenslisina	0.8-5.2 UH/ml en diferentes especies
Seeger <i>et al.</i> , 1981 (Alemania).		X		Rubescenslisina	0.15 UH/Kg (rata) y 0.31 UH/Kg (ratón)
Seeger y Bunsen, 1980 (Alemania).		X		Rubescenslisina	1 UH (hombre) 1.25 UH (ratas)
Seeger y Wachter, 1981 (Alemania).		X		Rubescenslisina	0.5-1 UH/ml
Tulloss y Smullen, 2006 (U.S.A).		X en crudo causa síndrome gastrointestinal			
Winterstein, 2000 (Alemania).		X		Rubescenslisina	



**Figura 1.2.** a) *Amanita aff rubescens*, b) *A. aff rubescens*, c) *A. aff rubescens*, bosque de pino (*Pinus patula*) en las Lajas, Puebla y d) *A. aff rubescens*, bosque de encino (*Quercus*) San Jerónimo, El Arenal, Hidalgo (Fotos: Hernández-Rico, 2011; Hernández-Rico, 2008).

### 1.3.3 Toxinas en los Hongos

Existen diversos mitos en torno a la toxicidad de los hongos, tal es el caso de lo descrito por Ruan-Soto *et al.*, (2004) para la planicie del Golfo de México, en donde se dice que todos

los hongos tóxicos que crecen sobre el suelo están contaminados, en cambio aquéllos que se desarrollan sobre madera o troncos son comestibles. Si bien estas observaciones podrían considerarse mitos, se han realizado trabajos que soportan la posible toxicidad de los hongos del suelo. Por ejemplo, Melgar *et al.*, (2009) analizaron la cantidad de selenio que se acumula en los esporomas de especies comestibles como *Boletus pinicola*, *Boletus edulis*, *Hydnum repandum* y *Lactarius deliciosus*; en todos los casos la cantidad del metal dependía directamente del sustrato donde se encontraban los hongos. Además, existe la posibilidad que la capacidad de captación de algunos metales dependa de la especie, sobre todo en función de la presencia de proteínas y otras moléculas. Por ejemplo, *Agaricus urinascens*, acumula cadmio debido a la presencia de una fosfogluco-proteína llamada cadmio-micofosfatina (Meisch y Schmitt, 1986), incluso cuando crece en terrenos con muy bajos niveles de este metal (Alonso *et al.*, 2010).

Las estrategias evolutivas de los organismos, incluidos los hongos, los llevan a desarrollar diferentes habilidades adaptativas como respuesta a cambios climáticos de la región donde se desarrollan, depredación, asociaciones, etc. Algunas de estas estrategias implican el modo de dispersión, ya sea por el viento o por medio de algún portador, permitiéndoles colonizar diferentes regiones, específicas o generalizadas. Esto es común en hongos ya que las esporas se adhieren a las semillas de los hospederos asociados, llevándolas consigo en eventos de colonización (Geml *et al.*, 2008; Justo *et al.*, 2010; Hughes *et al.*, 2013, Cai *et al.*, 2014). No obstante, el área a la que llegan para desarrollarse podría condicionar su capacidad de colonización-radiación por particulares como los contaminantes. Esto modifica los patrones adaptativos constituyendo una presión de selección sobre la variabilidad genética, dejando solo aquellos alelos aptos, lo que depura la diversidad. De esta forma, algunas especies comestibles, al colonizar ambientes

contaminados con metales pesados, adquieren cierta toxicidad que modificaría el patrón de aprovechamiento a nivel regional. Sin embargo, cabe aclarar que esta toxicidad no dependerá de la expresión genética asociada con amatoxinas o falotoxinas, sino con genes que faciliten la absorción y metabolismo de los metales pesados, constituyendo un buen indicador sobre el origen de la toxicidad (genético vs ambiental) (Pringle *et al.*, 2009).

Por otro lado, se tiene una idea de que existen especies cosmopolitas con poca variación morfológica y con distribuciones disyuntas incluso a nivel continental. La idea de esta unidad taxonómica poco relacionada con la conectividad geográfica se basa en la capacidad de dispersión mencionada en el párrafo anterior. Sin embargo, estudios filogenéticos con datos moleculares muestran que los endemismos en realidad son comunes debido a una estructuración geográfica y a la adaptación local (Vilgalys y Sun, 1994; Wu *et al.*, 2000; Coetzee *et al.*, 2000; James *et al.*, 2001; Chapela y Garbelotto, 2004; Geml *et al.*, 2008, 2010; Hughes *et al.*, 2007). Anteriormente, se utilizaban nombres de especies de *Amanita* descritas en Europa para nombrar hongos en otros continentes basados en la similitud morfológica y a la idea de unidad taxonómica, aunado al hecho de que estas colecciones no son revisadas por micólogos especializados (Tulloss, 2005; Guzmán, 2008). Sin embargo, los estudios moleculares demuestran que esta aproximación es errada.

En particular, Hallen y colaboradores (2002) encontraron que diferentes especies de *Amanita* lograron la colonización de distintos ambientes gracias a la asociación micorrízica con árboles hospederos introducidos en África desde zonas más septentrionales. Sin embargo, esta asociación no favorece de forma particular a especies tóxicas (*Amanita reidii*, *A. phalloides* var. *phalloides*, *A. phalloides* f. *alba* Britzelm y *A. phalloides* f. *umbrina*) que poseen  $\alpha$ - y  $\beta$ -amanitina, faloidina y falacidina; ni tampoco a especies comestibles, incluida *A. rubescens*, por lo que la toxicidad no es un rasgo adaptativo que se



perda ante la colonización o que se adquiriera de manera local, sino más bien constituye un arrastre filogenético fijo ancestralmente en las especies tóxicas que permite diferenciar claramente entre especies similares morfológicamente pero con una base genética distinta (Fraiture *et al.*, 2019).

Se desconocen las propiedades de muchos macromicetos, debido a que la mayoría de los estudios al respecto se han enfocado en las especies más abundantes, o bien, en aquellas a las que se ha atribuido algún caso de micetismo (Ruiz-González, 2014). Como los que se han presentado por consumir accidentalmente especies tóxicas pertenecientes a *Amanita* (Heuhs *et al.*, 1994; Lima *et al.*, 2012; Parmen *et al.*, 2016). Se han dividido en ocho grupos para su identificación (Kendrick, 2000).

**A) Grupo I Ciclopéptidos:** se encuentran en las especies más peligrosas ya que constituyen toxinas termoestables.

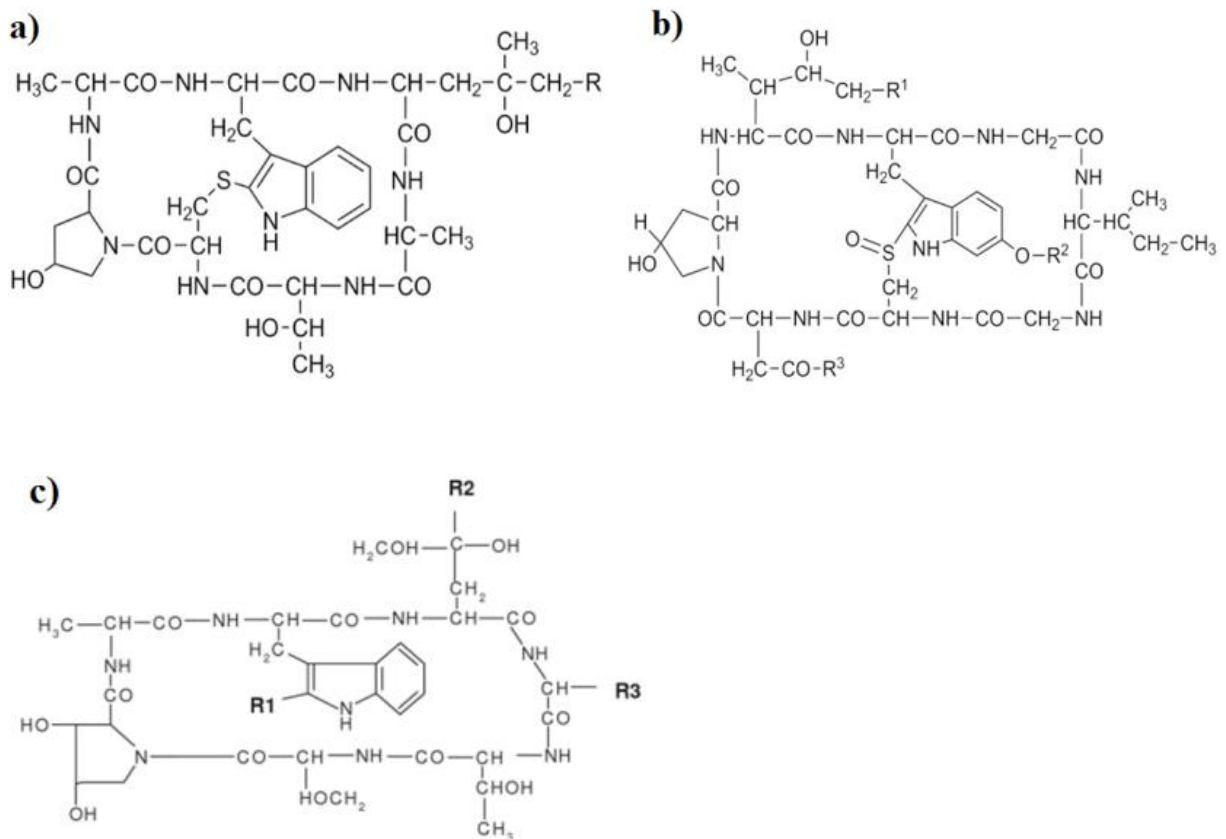
**i) Amatoxinas (Figura 1.3a) con ocho compuestos:**  $\alpha$ -amanitina y la  $\beta$ -amanitina son las más abundantes y las principales causantes de la toxicidad,  $\gamma$ -amanitina,  $\epsilon$ -amanitina, proamanulina, amanulina, ácido amanulico y amanina. Bloquean la transcripción de las RNA polimerasa I y II, es decir, bloquea la síntesis proteica en las células.

**ii) Falotoxinas (Figura 1.3b) con siete compuestos:** faloidina, faloina, profaloina, falisina, falacina, falacidina y falisaroidina. Causan vómito, dolor abdominal epigástrico, diarrea fétida y en ocasiones sanguinolentas. Puede haber calambres musculares, sed intensa y signos de deshidratación (Ruiz-Sánchez *et al.*, 1999).

**iii) Virotoxinas (Figura 1.3c) con cuatro compuestos:** Viridina, desoxiviroidina,  $\alpha$ -viroidina y viroisina. Las dos últimas son hepatotóxicas y causan destrucción celular en el hígado y riñón. Especies responsables: *Amanita bisporigera*, *A. ocreata*, *A. verna* y

*A. phalloides* (Kostansek *et al.*, 1977; Kendrick, 2000; Pérez-Silva *et al.*, 2008; Piqueras-Carrasco, 2014).

**B) Grupo V variantes del ácido iboténico:** muscimol, muscarina, muscazona, ácido tricolómico, ácidos estizolóbico y estizolobínico, las especies responsables son *Amanita muscaria*, *A. cokeri*, *A. gemmata* y *A. pantherina*. Afectan directamente al sistema nervioso central ocasionando efectos de alucinaciones, delirio, éxtasis y sueño progresivo, en ocasiones es mortal (Kendrick, 2000; Pérez-Silva *et al.*, 2008; Piqueras-Carrasco, 2014).



**Figura 1.3.** a) Estructura química de falotoxinas; b) Estructura química de amatoxinas (Fuente: Anderl *et al.*, 2012) y c) Estructura química de virotoxinas (Fuente: Wong y Ng, 2006).

Las toxinas responsables del daño muestran diferentes modos de acción. Las amatoxinas son inhibidores específicos de la RNA polimerasa que reducen la síntesis de

proteínas; mientras que el complejo de falotoxinas actúan sobre la actina, produciendo daño en las células hepáticas y musculares que requieren la actividad de estas fibras (Hallen *et al.*, 2007; Kaya *et al.*, 2012). En este trabajo solo nos enfocaremos a los grupos de toxinas encontradas en el género *Amanita* (Cuadro 1.2).

**Cuadro 1.2.** Compuestos tóxicos identificados en las diferentes secciones del género *Amanita* (tomado de [http://enhancedwiki.altervista.org/en.php?title=Amanita\\_rubescens](http://enhancedwiki.altervista.org/en.php?title=Amanita_rubescens)).

Sección	Especie	Compuestos	Otros compuestos
Amanita	<i>A. albocreata</i> <i>A. crenulata</i> <i>A. farinosa</i> <i>A. frostiana</i> <i>A. gemmata</i> <i>A. multiquamosa</i> <i>A. muscaria</i> <i>A. pantherina</i> <i>A. porphyria</i> <i>A. regalis</i> <i>A. strobiliformis</i> <i>A. xanthocephala</i>	Ácido iboténico Muscimol	Muscarina Muscazona Amavadina
Phalloidea	<i>A. bisporigera</i> <i>A. exitialis</i> <i>A. magnivelaris</i> <i>A. ocreata</i> <i>A. verna</i> <i>A. virosa</i> <i>A. virosiformis</i> <i>A. arocheae</i> <i>A. phalloides</i> <i>A. subjunquilea</i>	Amanitina -alfa, beta, gamma, épsilon Amanulina, Ácido amanulinica, Amaninamida, Amanina y Proamanulina, Falacidina, Falacina, Falisacina, Falisina, Faloidina, Faloina y Profaloina, Alaviroidina, Viroisina, Deoxoviroisina, Viroidina y Deoxoviroidina	Antamanida Falolisina Toxopalina
Lepidella	<i>A. nauseosa</i> <i>A. proxima</i> <i>A. smithiana</i> <i>A. sphaerobulbosa</i> <i>A. thiersii</i>	Norleucinaalenica y propargilglicina	
Validae	<i>A. rubescens</i> ( <i>A. amerirubescens</i> nom. Prov.)	Rubescenslisina	

### 1.3.4 Marcadores Moleculares para Toxinas

La diversidad y la historia evolutiva de los hongos letales o tóxicos es poco conocida debido a limitaciones en los marcadores moleculares disponibles para los análisis filogenéticos. Cai *et al.*, (2014) utilizaron cinco loci de genes conservados filogenéticamente (nrLSU, ITS, rpb2, ef1- $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina) para el estudio de las Amanitas letales, tomando muestras en el Este y Sur de Asia, Europa, América del Norte y Central, África del Sur y Australia. También realizaron análisis bioquímicos con la intención de detectar amatoxinas y faloidinas. Sus resultados sugieren que las especies de *Amanita* que se consideran letales, probablemente se originaron en la zona paleotropical en África hace unos 64.92 Ma, en el Paleoceno temprano, constituyendo un grupo monofilético, corroborando la afirmación de que la toxicidad por amatoxinas y falotoxinas constituye una sinapomorfía que permite separar claramente a las especies tóxicas de las no tóxicas. En las regiones holárticas disjuntas del Este de Asia, Este de América del Norte y Eurasia (Sánchez-Ramírez *et al.*, 2014), las poblaciones probablemente se establecieron durante el Oligoceno medio al Mioceno. Los autores reconocen la necesidad de más estudios filogenéticos moleculares en los trópicos y en el hemisferio sur, brindando información relevante sobre el uso y eficacia de los marcadores moleculares utilizados para detectar variación intra e interespecífica.

Se han realizado algunos estudios en los cuales han encontrado que la mayoría de estas toxinas se encuentran codificadas por genes específicos, AMA1 codifica a una proteína de 35 aminoácidos, cuya región activa en la toxicidad se restringe a un dominio conservado de ocho aminoácidos (IWGIGCNP) con secuencia 5'-ATCTGGGGTATCGGTTGCAACCCG-3'; este gen es identificado gracias al juego de

iniciadores AMA1F: 5'-CCATCTGGGGTATCGGTTGC-3' y AMA1R: 5'-TTGGGATTGTGAGGTTTAGAGGTC-3'. Por otro lado, el gen PHA1 codifica para una pro-proteína de 34 aminoácidos con un dominio tóxico conservado de siete aminoácidos (AWLATCP) con secuencia 5'-GCTTGGCTTGTAGATTGCCCA-3', identificado con el juego de iniciadores PHA1F: 5'-CGTCAACCGTCTCCTC-3' y PHA1R: 5'-ACGCATGGGCAGTCTAC-3'. Estas dos proteínas constituyen las toxinas más frecuentes en el grupo, propios de las especies europeas tóxicas (*Amanita* sección *Phalloideae*), pero están ausentes en especies no tóxicas de otras secciones (Walton *et al.*, 2004; Hallen *et al.*, 2007). Las síntesis de las toxinas han sido relacionadas con la expresión de proteínas Prolil-oligopeptidasas (POP), necesarias para convertir la pro-proteína en su forma activa, por lo que la sola presencia de AMA1 y PHA1 no hacen a una especie tóxica. Los genes POP se han encontrado en especies tóxicas y no tóxicas fuera del grupo, tales como *Galerina marginata*, *Conocybe apala* y *Pleurotus cystidiosus*; conformando una "familia" de genes AbPOPA, AbPOPB en *Amanita* y *GmPOPA* en *Galerina* (Luo *et al.*, 2010, 2012). Llama la atención que las toxinas son compartimentalizadas en grupos de células especializadas que caracterizan a las especies, por lo que no todas las estructuras resultan tóxicas y debe existir expresión diferencial de los genes asociados a tejidos específicos. Los marcadores utilizados para la identificación de los genes de la familia POP son POP1F: 5'-GAAACGAGAGGCGAAGTCAAGGTG-3' y POP1R: 5'-AAGTGGATGACGATTATGCGG CAG-3'; además de POP2F: 5'-TCAAATGAAGTAGACGAATGGAC-3' y POP2R: 5'-CACACGGATGAGCAATGGATGAG-3' (Luo *et al.*, 2010). Para facilitar la identificación de genes asociados a toxicidad, Hallen y colaboradores (2007), desarrollaron iniciadores degenerados capaces de identificar los genes para las amatoxinas del género:

AMAF: 5'-ATGTCNGAYATYAAAYGCNACNCG-3' y AMAR: 5'-AAGGSYCTCGCCACGAGTGAGGAGWSKRKTGAC-3', mismos que se probaron con un marcador de expresión positivo ( $\beta$ -tubulina). Actualmente, se cuenta con herramientas para diagnóstico molecular que utilizan secuencias ITS y de tubulina, las que permiten identificar relaciones entre especies (Parnmen *et al.*, 2016).

#### **1.4 Hipótesis**

No obstante, la amplia capacidad de dispersión de los hongos, dada por la facilidad con que sus esporas e hifas se asocian a las raíces de los hospederos; la distancia geográfica entre las poblaciones europeas, asiáticas y norteamericanas del hongo comestible *Amanita rubescens* condicionan el intercambio genético, por lo que las taxas mexicanas identificadas como *Amanita rubescens* podrían no ser la misma especie descrita en otras latitudes. En caso de que esta divergencia fuese cierta, la falta de información sobre la toxicidad de la especie mexicana, dada principalmente por amatoxinas y falatoxinas propias de la sección *Validae*; podría condicionar su consumo en diferentes localidades.

#### **1.5 Justificación**

Este trabajo permitirá determinar si la especie que se conoce en México realmente corresponde al complejo *Amanita rubescens* o se trata de diferentes especies parecidas morfológicamente a la europea. Debido a que en este género hay problemáticas de agrupación, así como el surgimiento de especies nuevas y la progresiva búsqueda de resolver los grupos filogenéticos (Tang *et al.*, 2015; Tulloss *et al.*, 2015; Tulloss *et al.*, 2016). A pesar de su ubicuidad, su riqueza taxonómica y su diversidad ecológica, los estudios biogeográficos y evolutivos globales siguen siendo escasos (Geml *et al.*, 2010;

Sánchez-Ramírez *et al.*, 2015). Además, se ha estudiado la introducción de hongos ectomicorrízicos asociados a las raíces de plantas exógenas, como algunas especies de este género; pero aún falta por conocer bien los rangos de distribución que pueden alcanzar, así como la influencia que el ambiente pueda tener sobre la expresión genética de los hongos, la interacción con los árboles hospederos, así como la dispersión a grandes distancias que puedan tener debido a la intervención antropogénica, la cual ha facilitado la propagación de hongos patógenos y simbióticos con la importación de productos forestales y el establecimiento de plantaciones forestales exóticas (Tedersoo *et al.*, 2007; Wolfe *et al.*, 2010). Lo anterior es relevante, ya que se ha reportado que cuando una especie nueva de hongo se establece, tiene efectos sobre la biogeoquímica de los bosques, lo que ocasiona cambios considerables en las cantidades de carbono fijados (Högberg y Högberg, 2002; Wolfe *et al.*, 2010). Además, las diferencias en la expresión de las toxinas, como por ejemplo las Amatoxinas; depende de variantes alélicas ( $\beta$  y  $\alpha$ -amanitina) distribuidas de manera diferencial en los ambientes, generando variación dependiente de la procedencia, aspectos no evaluados en México ni en el complejo *rubescens*. Además, este tipo de investigaciones ayudan a delimitar zonas de consumo aceptables y descartar posibles intoxicaciones ya sea por confusión o por variación bioquímica. Finalmente, este trabajo permitirá establecer las causas, si es que existen, de toxicidad en la especie. Adicionalmente, puede ser usada como referencia para otras especies que presenten la misma problemática.

## **1.6 Objetivo General**

Determinar la variación morfológica, citotóxica y genética del complejo *Amanita rubescens* en la zona centro de México; mediante herramientas moleculares, comparaciones

morfológicas y bioensayos de citotoxicidad; para contribuir al conocimiento en las relaciones intraespecíficas del complejo, así como identificar la presencia de toxinas, o efectos nocivos de los ejemplares mexicanos.

### **1.7 Objetivos Particulares**

- Determinar la variación morfológica intraespecífica del complejo *A. rubescens* en México.
- Determinar si la especie identificada dentro del complejo *Amanita rubescens* que se encuentra en México es la misma que la reconocida como *A. rubescens sensu stricto* en otras regiones del mundo.
- Identificar la presencia de los genes *AMA1*, *PHA1* y *POP* en los hongos.
- Evaluar la capacidad citotóxica de extractos de *A. rubescens s.l.* para asociarla con las características genéticas y morfológicas que permitan una separación efectiva de las accesiones tóxicas y no tóxicas.

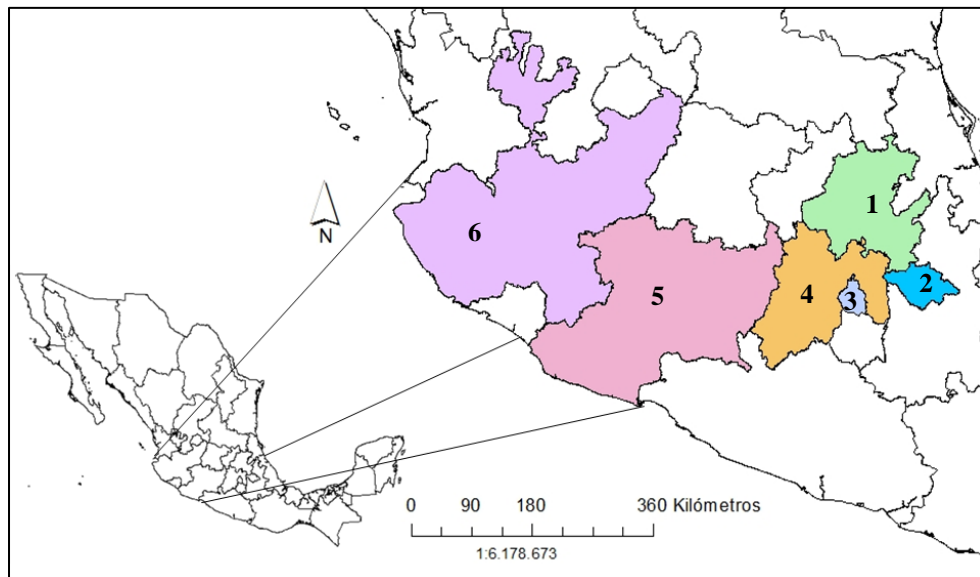
### **1.8 Materiales y Métodos**

Se colectaron muestras de esporomas del complejo *Amanita rubescens* provenientes de distintas regiones de México. Se contó con 16 muestras del mercado de Pachuca, 14 muestras provenientes de los bosques de Hidalgo (seis de Omitlán, cuatro de Acaxochitlán, dos de Mineral del Chico y dos de Huasca) y 63 muestras de la Colección de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UAT) de las cuales ocho muestras son de Chihuahua, ocho de Chiapas y el resto de Tlaxcala. Se describieron morfológicamente las muestras de Hidalgo para hacer las comparaciones taxonómicas y se tomaron datos adicionales como localidad, coordenadas, tipo de vegetación asociada, entre otros. Los materiales recolectados fueron



depositados en la Colección de Hongos del Herbario Nacional de México (MEXU-UNAM), después de ser analizados.

Se realizaron secuencias ribosomales de las muestras procedentes de Hidalgo (Omitlán, Acaxochitlán, Mineral del Chico, Huasca y de mercados en San Miguel el Cerezo); Ciudad de México: Tlalpan (Volcán pelado, ex-estación de ferrocarril y Volcán Ajusco Ladera Norte); Edo. De México: Amanalco (San Juan y Corral de piedra); Coatepec Harinas (Agua Blanca); Temascaltepec (El Varal); Zinacantepec (Raices, Buenavista y Agua Blanca); Atlautla (Popocatépetl); Jalisco: Tuxpan (Nevado de Colima) y Michoacán: Morelia (Cerro el Remolino), las muestras se encuentran depositadas en la Colección de Hongos del Herbario Nacional de México (MEXU-UNAM) (Figura 1.4).



**Figura 1.4.** Mapa donde se muestran los sitios de colecta de ejemplares del complejo de *A. rubescens*. 1) Hidalgo, 2) Tlaxcala, 3) Ciudad de México, 4) Edo de México, 5) Michoacán y 6) Jalisco (ArcGIS 10.3, elaboración: Hernández-Rico).

### 1.8.1 Extracción de DNA, Protocolos de PCR y Secuenciación

Para la extracción de DNA de las muestras procedentes del mercado de Pachuca, de los bosques y ejemplares de la Colección de Tlaxcala se llevó a cabo el siguiente protocolo:

Protocolo de extracción orgánico (fenol-cloroformo): Cuando las muestras de tejido se prepararon en campo, se tomó una pequeña porción del píceo (contexto y láminas) y se colocó en un tubo de 1.5 µl con alcohol al 96° (Se conserva máximo 4 semanas después de la colecta). Cuando el tejido se obtuvo de hongos deshidratados, las muestras se procesaron dentro de una campana de flujo para evitar la contaminación de esporas del ambiente y de las otras muestras, de igual manera se colocaron en tubos de 1.5 µl y se rotularon. Los tubos se sumergieron en nitrógeno líquido para que se congelaran las muestras. El macerado se hizo con asas de siembra microbiológica dentro del tubo y se resuspendieron en 800 µl de 2x CTAB para colocarlos posteriormente en baño maría a 65°C, invirtiendo los tubos cada 20 min, por 1 hora.

Posteriormente, se añadieron 600 µl de cloroformo: isoamílico (24:1) mezclando en vortex por ~30 seg., se centrifugó por 10 min, a 13,000 rpm. Después se tomó el sobrenadante (~550-800 µl) y se colocó en un tubo nuevo. Se añadió 0.6 X de volumen frío de isopropanol (800 µl de sobrenadante y 480 µl de isopropanol) y se mezcló suavemente durante 1 min; después se centrifugaron por 10 min, a 13,000 rpm. Se eliminó todo el líquido posible con cuidado para no perder la pastilla. Se añadieron 500 µl de etanol al 70% y se centrifugó a 6,000 rpm por 5 min, se retiró el sobrenadante con cuidado tirando la mayor cantidad de líquido posible, los tubos se llevaron a una centrifuga de vacío para secar la pastilla. Por último, el DNA se resuspendió en 60 µl dH<sub>2</sub>O y se guardaron a -50°C. (Modificado de Gardes y Bruns, 1993; Bruns, 2014).

Una vez realizada la extracción, se midió la concentración de DNA de cada muestra, con un espectrofotómetro BioSpectrometer Basic®. El cual calcula los niveles de proteínas, sales y la pureza del DNA para evaluar la eficiencia de la extracción (Anexo 1).

El par de primers (iniciadores) que se utilizó para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue: ITS1 e ITS4 (Gardes y Bruns, 1993) para la región ITS1-5.8S-ITS2 (Anexo 2).

Para obtener bandas definidas y realizar la secuenciación, se realizó un PCR y una electroforesis para observar las bandas (Anexo 3). Las reacciones se realizaron con un volumen total de 25  $\mu$ l: 17.32  $\mu$ l de dH<sub>2</sub>O (agua estéril), 2.5  $\mu$ l de Buffer 10x PCR (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, KCl 500 mM y MgCl<sub>2</sub> 50 mM), 2.5  $\mu$ l de dNTPs (2mM), 1  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0.25  $\mu$ l de cada primer (50mM), 0.18  $\mu$ l de Taq polimerasa (Invitrogen™) y 1  $\mu$ l del DNA muestra (diluido 1:100). El protocolo para las condiciones del termociclador PTC-100™ Programmable Thermal Controller, consistió en un ciclo a 94°C por 1 min; 38 ciclos a 94°C por 1 min; 51°C por 1 min; 72°C por 1 min; un ciclo a 72°C por 8 min, y 4°C por 5 min.

Una vez obtenidos los productos de PCR, se llevó a cabo la electroforesis en un gel de agarosa al 1% con 1  $\mu$ l de RedGel, para observar la calidad de los fragmentos amplificados. Se colocó 5  $\mu$ l de LB buffer y 5  $\mu$ l de DNA (PCR) en el gel que se corrió a 90 V, por 50 min. Las muestras que se utilizaron corresponden a las de Hidalgo y la colección de Tlaxcala (Anexo 4). Todos los productos de PCR fueron "limpiados" o purificados a través de un método enzimático que digiere DNA de cadena sencilla (iniciadores) y dímeros. El método se conoce como Exo-Sap y consiste en el uso de dos enzimas una exonucleasa y una fosfatasa. Después se colocaron en el termociclador 2720 Thermal Cycler Applied Biosystems a 37°C por 45 min y 80°C por 15 min (Dentinger *et al.*, 2010).

## 1.9 Literatura citada

- Aguirre-Acosta, E., Ulloa, M., Aguilar, S., Cifuentes, J. y R. Valenzuela. 2014. Biodiversidad de hongos en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, Supl. 85: S76-S81.
- Alonso, J., García, M. A., Melgar, M. J., Abuín, M. C. y M. Corral. 2010. Elementos traza en hongos comestibles. Repercusiones alimentarias y valoración nutricional. *Biological Mycology FAMCAL* 5: 101-126.
- Alonso-Aguilar, L. E., Montoya, A., Kong, A., Estrada-Torres, A. y R. Garibay-Orijel. 2014. The cultural significance of wild mushrooms in San Mateo Huexoyucan, Tlaxcala, Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 10:27-40.
- Alvarado-Castillo, G. y G. Benítez. 2009. El enfoque de agroecosistemas como una forma de intervención científica en la recolección de hongos silvestres comestibles. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 10: 531-539.
- Alvarado-Castillo, G., Mata, G. y G. Benítez-Badillo. 2015. Importancia de la domesticación en la conservación de los hongos silvestres comestibles en México. *Bosque* 36 (2): 151-161.
- Alvarado-Rodríguez, R. 2010. Conocimiento micológico local y micetismo: una aproximación a la etnomicología tseltal de Kotolte', Tenejapa, Chiapas, México. Tesis de maestría, San Cristóbal de Las Casas, El Colegio de la Frontera Sur.
- Anderl, J., Echner, H. y H. Faulstich. 2012. Chemical modification allows phallotoxins and amatoxins to be used as tools in cell biology. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 8: 2072–2084.

- Arrillaga-Anabitarte, P. y X. Laskibar-Urkiola. 2006. Setas tóxicas e Intoxicaciones. Munibe. Suplemento 22. España. Gehigarria. Pp. 151.
- Bandala, V., Montoya, L. y I. Chapela. 1997. Wild edible mushrooms in Mexico: a challenge and opportunity for sustainable development. Pág. 76-90. *En*: Palm, M. E. y H. I. Chapela (Eds.). *Mycology in sustainable development: expanding concepts vanishing borders*. Parkway Publishers Inc. Boone.
- Bautista-Nava, E. y A. Moreno-Fuentes. 2009. Primer registro de *Calostoma cinnabarina* (Sclerodermatales) como especie comestible. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 80: 561-564.
- Bhatt, R. P., Tulloss, R. E., Semwal, K. C., Bhatt, V. K., Moncalvo, J.-M. y S. L. Stephenson. 2003. Amanitaceae reported from India. A critically annotated check list. *Mycotaxon* 88: 249-270.
- Bruns, T. D. 2014. *Molecular Protocols for Ectomycorrhizal Fungi* (version 7).
- Cai, Q., Tulloss, R. E., Tang, L. P., Tolgor, B., Zhang, P., Chen, Z. H. y Z. L. Yang. 2014. Multi-locus phylogeny of lethal amanitas: Implications for species diversity and historical biogeography. *BMC Evolutionary Biology* 14: 143-158.
- Chapela, I. H. y M. Garbelotto. 2004. Phylogeography and evolution in matsutake allies inferred by analyses of ITS sequences and AFLPs. *Mycologia* 96 (4): 730-741.
- Chu, F. S. 2006. Mycotoxins and alimentary mycotoxicoses. Pág. 583-661. *En*: Riemann, H. P. y D. O. Cliver. *Food borne Infections and Intoxications*. 3era. Edition. Food Science and Technology, International Series. Elsevier Academic Press.
- Clarke, D. B, Lloyd, A. S. y P. Robb. 2012. Application of liquid chromatography coupled to time-to-flight mass spectrometry separation for rapid assessment of toxins in *Amanita* mushrooms. *Analytical Methods* 4: 1298-1309.

- Coetzee, M. P., Wingfield, B. D., Harrington, T. C., Dalevi, D., Coutinho, T. A. y M. J. Wingfield. 2000. Geographical diversity of *Armillaria melleas*. s. Based on phylogenetic analysis. *Mycologia* 92: 105-113.
- Córdova-Chávez, O., Medel, R., Mata, G., Castillo R. y J. Vázquez-Ramírez. 2014. Evaluación de hongos ectomicorrícicos del grupo de los basidiomicetos en la zona del Cofre de Perote, Veracruz. *Madera y Bosques* 20 (1): 97-106.
- Deja, S., Wieczorek, P. P., Halama, M., Jasicka-Misiak, I., Kafarski, P., Poliwoda, A. y P. Młynarz. 2014. Do Differences in chemical composition of stem and cap of *Amanita muscaria* fruiting bodies correlate with topsoil type? *PLOS ONE* 9 (12):1-19.
- Dentinger, B. T. M., Margaritescu, S. y J.-M. Moncalvo. 2010. Rapid and reliable high-through put methods of DNA extraction for use in barcoding and molecular systematics of mushrooms. *Molecular Ecology Resources* 10 (4):628-633.
- Estrada-Martínez, E., Guzmán, G., Cibrián, T. D. y P. R. Ortega. 2009. Contribución al conocimiento etnomicológico de los hongos silvestres comestibles en los mercados regionales y comunidades de la sierra nevada (México). *Interciencia* 34 (1): 25–33.
- Faulstich, H. y M. Cochet-Meilhac. 1976. Amatoxins in edible mushrooms. *FEBS Letters* 64 (1): 73–75.
- Feregrino-Feregrino, C. A., Morales-Garza, M. R., Martínez-García, M., Monsalvo-Reyes, A. y J. E. Campos-Contreras. 2013. Descripción molecular de hongos macromicetos del género *Amanita* de Villa del Carbón, México, empleando la región LSU rDNA. *Facultad de Ciencias y Tecnología* 86-94.

- Fraiture, A., Amalfi, M., Raspé, O., Kaya, E., Akata I. y J. Degreef. 2019. Two new species of *Amanita* sect. Phalloideae from Africa, one of which is devoid of Amatoxins and phallotoxins. *MycKeys* 53: 93-125.
- Gardes, M. y T. D. Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.
- Garibay-Orijel, R., Cifuentes, J., Estrada-Torres, A. y J. Caballero. 2006. People using macro-fungal diversity in Oaxaca, Mexico. *Fungal Diversity* 21: 41-67.
- Garibay-Orijel, R., Ruan-Soto, F. y E. Estrada-Martínez. 2010. El conocimiento micológico tradicional, motor para el desarrollo del aprovechamiento de los hongos comestibles y medicinales. Pág. 243-270. *En: Martínez-Carrera, D. (Ed.), Hacia un desarrollo sostenible del sistema de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: avances y perspectivas en el siglo XXI, Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales, México, D.F.*
- Garibay-Orijel R., Ramírez-Terrazo, A. y M. Ordaz-Velázquez. 2012. Women care about local knowledge, experiences from ethnomycology. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 8 (25): 1-12.
- Garibay-Orijel, R. y F. Ruan-Soto. 2014. Listado de los hongos silvestres consumidos como alimento tradicional en México. Pág. 99-120. *En: Moreno-Fuentes, A. y R. Garibay-Orijel (Eds.). La etnomicología en México: estado del arte, México, Red de Etnoecología y Patrimonio Biocultural/Conacyt/Universidad Autónoma de Hidalgo/UNAM/Asociación Etnobiológica Mexicana.*

- Gardes, M. y T. D. Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.
- Geml, J., Tulloss, R. E., Laursen, G. A., Sazanova, N. A. y D. L. Taylor. 2008. Evidence for strong inter and intracontinental phylogeographic structure in *Amanita muscaria*, a wind-dispersed ectomycorrhizal basidiomycete. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48: 694–701.
- Geml, J., Tulloss, R. E., Laursen, G. A., Sazanova, N. A. y D. L. Taylor. 2010. Phylogeographic analyses of a boreal-temperate ectomycorrhizal basidiomycete, *Amanita muscaria*, suggest forest refugia in Alaska during the last glacial maximum. Pág. 173-186. *En*: Habel, J. C. y R. Assman, eds. *Relict species. Phylogeography and Conservation Biology*.
- Gry, J. y C. Andersson. 2014. Mushrooms traded as food. Vol. II sec. 2. Nordic questionnaire and guidance list for edible mushrooms suitable for commercial marketing. Pp. 471.
- Guzmán, G. 1994. Los hongos en la medicina tradicional de Mesoamérica y de México. *Revista Iberoamericana de Micología* 11: 81-85.
- Guzmán, G. 2007. Variabilidad, producción e importancia de los hongos en la naturaleza. Pág. 19-29. *En*: R. Zulueta-Rodríguez, Trejo-Aguilar, D. y A. R. Trigos-Landa (eds.). *El Maravilloso Mundo de los Hongos*. Dirección General Editorial. Universidad Veracruzana.
- Guzmán, G. 2008. Diversity and use of traditional Mexican medicinal fungi. A review. *International Journal Medicinal Mushrooms* 10: 209-217.



- Guzmán, G. y F. Ramírez-Guillén. 2001. The *Amanita caesarea*-complex. J. Cramer. Berlín, Alemania. Pp. 65.
- Hallen, H. E., Adams, G. C. y A. Eicker. 2002. Amatoxins and phallotoxins in indigenous and introduced South African *Amanita* species. South African Journal of Botany 68: 322–326.
- Hallen, H. E., Luo, H., Scott-Craig, J. S. y J. D. Walton. 2007. Gene family encoding the major toxins of lethal *Amanita* mushrooms. Proceedings of the National Academy of Sciences 104(48): 19097-19101.
- Hernández-Rico, G. N. 2008. Inventario de las familias Agaricaceae, Pluteaceae, Tricholomataceae y Russulaceae de un encinar en Omitlán, Hidalgo. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Mineral de la Reforma. Pp. 78.
- Hernández-Rico, G. N. 2011. Taxonomía y Etnomicología del género *Amanita* Pers., en el municipio de Acaxochitlán, Hidalgo. Tesis de Maestría en Ciencias en Conservación y Biodiversidad. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Mineral de la Reforma. Pp. 151.
- Hernández-Rico, G. N. y A. Moreno-Fuentes. 2010. Hongos comestibles del género *Amanita* en el mercado de Acaxochitlán, Hidalgo, México. Etnobiología 8: 31-38.
- Hernández-Velázquez, H. 2007. Macromicetos de una región de Mineral del Chico, Hidalgo: Una aproximación a la Etnomicología. Tesis de Licenciatura en Biología, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca. Pp. 129.
- Herrera-Fonseca, Ma. De J., Guzmán-Dávalos, L. y O. Rodríguez. 2002. Contribución al conocimiento de la micobiota de la región de San Sebastián del Oeste, Jalisco, México. Acta Botánica Mexicana 58: 19-50.

- Herrera-Suárez, T. 2003. Impresiones de un breve recorrido de la memoria a través de más de medio siglo en la UNAM. Pág. 1-32. *En*: García-Rubio G., A. A (Ed.). Forjadores de la ciencia en la UNAM, participan en el ciclo de conferencias «Mi vida en la ciencia». Cuadernillos de las conferencias. Universidad Nacional Autónoma de México. Coordinación de la Investigación Científica, México.
- Heuhs, L., Fogel, E. y G. Scaiola. 1994. Intoxicación por hongos *Amanita phalloides*. *Revista Médica del Uruguay* 10: 138-141.
- Högberg, M. N. y P. Högberg. 2002. Extramatrical ectomycorrhizal mycelium contributes one-third of microbial biomass and produces, together with associated roots, half the dissolved organic carbon in a forest soil. *New Phytologist* 154: 791-795.
- Hughes, K.W., Petersen, R. H., Mata, J. L., Psurtseva, N. V., Kovalenko, A. E., Morozoba, O. V., Lickey, E. B., Cifuentes-Blanco, J., Lewis, D. P., Nagasawa, E., Halling, R. E., Takehashi, S., Aime, M. C., Bau, T. y T. Henkel. 2007. *Megacollybia* (Agaricales). *Reports of the Tottori Mycological Institute* 45: 1-57.
- Hughes, K. W., Petersen, R. H., Logde, D. J., Gergemann, S. E., Baumgarther, K., Tulloss, R. E., Lickey, E. y J. Cifuentes. 2013. Evolutionary consequences of putative intra and inter specific hybridization in agaric fungi. *Mycologia* 105 (6): 1577–1594.
- Hunn, E. S., Venegas-Ramírez, Y. y M. A. Vásquez-Dávila. 2015. Where Do Fungi Fit? The Fungal Domain In Mixtepec Zapotec. *Journal of Ethnobiology* 35(2): 286–313.
- James, T.Y., Moncalvo, J.-M., Li, S. y R. Vilgalys. 2001. Polymorphism at the ribosomal DNA spacers and ITS relation to breeding structure of the widespread mushroom *Schizophyllum commune*. *Genetics* 157: 149-161.
- Javis, M. C., Miller, A. M., Sheahan, J., Ploetz, K., Ploetz, J., Watson, R. R., Palma-Ruiz, M., Pascario-Villapan, C. A., García-Alvarado, J., López-Ramírez, A. y B. Orr.

2004. Edible Wild mushrooms of the Cofre de Perote region, Veracruz, México: An ethnomycological study of common names and uses. *Economic Botany* 58: S111-S115.
- Justo, A., Morgenstern, I., Hallen-Adams, H. E. y D. S. Hibbett. 2010. Convergent evolution of sequestrate forms in *Amanita* under Mediterranean climate conditions. *Mycologia* 102(3): 675-688.
- Kaya, E., Karahan, S., Bayram, R., Yaykasli, K. O., Colakoglu, S. y A. Saritas. 2012. Amatoxin and phallotoxin concentration in *Amanita phalloides* spores and tissues. *Toxicology and Industrial Health* 31(12):1-6.
- Kendrick, B. 2000. *The fifth kingdom*. Focus Publishing. Newburyport. Pp. 373.
- Kim, C. S, Jo, J. W., Kwag, Y-N., Kim, J-H., Shrestha, B., Sung, G-H. y S-K. Han. 2013. Taxonomic study of *Amanita* subgenus *Lepidella* and three unrecorded *Amanita* species in Korea. *Mycobiology* 41(4): 183-190.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W. y J. A. Stalpers. 2008. *Dictionary of the Fungi*. 10th. Edition. CABI Publishing. Wallingford. Pp. 784.
- Kostansek, E. C., Lipscomb, W. N., Yocum, R. R. y W. E. Thiessen. 1977. The crystal structure of the mushroom toxin beta-amanitin. *Journal of the American Chemical Society* 99: 1273-1274.
- Lampman, A. M. 2007. General principles of ethnomycological classification among the tzeltalmaya of Chiapas, México. *Journal of Ethnobiology* 27(1): 11-27.
- Lara-Vázquez, F., Romero-Contreras, A. T. y C. Burrola-Aguilar. 2013. Conocimiento tradicional sobre los hongos silvestres en la comunidad otomí de San Pedro Arriba; Temoaya, Estado de México. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo* 10(3): 305-326.

- Largent, D. L. y T. J. Baroni. 1988. How to identify mushrooms to genus VI: Modern Genera. Mad River Press. Inc. Pp. 280.
- Lima, A. D. L., Costa Fortes, R., Garbi-Novaes, M. R. C. y S. Percário. 2012. Poisonous mushrooms; a review of the most common intoxications. *Nutrición Hospitalaria* 27(2): 402-408.
- Luo, H., Hallen-Adams, H. E., Scott-Craig, J. S. y J. D. Walton. 2010. Colocalization of Amanitin and Candidate Toxin-Processing Prolyl Oligopeptidase in *Amanita* Basidiocarps. *Eukaryotic Cell* 9(12): 1891-1900.
- Luo, H., Hallen-Adams, H. E., Scott-Craig, J. S. y J. D. Walton. 2012. Ribosomal Biosynthesis of  $\alpha$ -amanitin in *Galerina marginata*. *Fungal Genetics and Biology* 49: 123-129.
- Mariaca-Méndez, R., Silva-Pérez, L. Del C. y C. A. Castaños-Montes. 2001. Proceso de recolección y comercialización de hongos comestibles silvestres en el Valle de Toluca, México. Universidad Autónoma del Estado de México. *Ciencia Ergo Sum*8(1): 30-40.
- Mehmood, T., Bhatt, R. P., Uniyal, P., Singh, U. y A. K. Chowdhary. 2018. Morphological and phylogenetic characterization of genus *Amanita* from Uttarakhand, India: I. *Current Research in Environmental & Applied Mycology* 8(1): 118-134
- Meisch, H. U. y J. A. Schmitt. 1986. Characterization studies on cadmium-mycophosphatin from the mushroom *Agaricus macrosporus*. *Environmental Health Perspectives*65: 29-32.
- Melgar, M. J., Alonso, J. y M. A. García. 2009. Acumulación de selenio en setas silvestres comestibles: captación y toxicidad. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*7(3): 217-223.

- Méndez-Navarro, J., Ortiz-Olivera, N. X. y M. Villegas-Ríos. 2011. Hepatotoxicity from ingestion of wild mushrooms of the genus *Amanita* section Phalloideae collected Mexico City: two case reports. *Annals of Hepatology* 10(4):568–574.
- Montoya, A., Hernández-Totomoch, O., Estrada-Torres, A., Kong, A. y J. Caballero. 2003. Traditional knowledge about mushrooms in a Nahuatl community in the state of Tlaxcala, Mexico. *Mycologia* 95: 793-806.
- Montoya, A., Kong, A., Estrada-Torres, A., Cifuentes, J. y J. Caballero. 2004. Useful wild fungi of La Malinche National Park, Mexico. *Fungal Diversity* 17: 115-143.
- Montoya-Esquível, A., Hernández, N., Mapes, C., Kong, A. y A. Estrada-Torres. 2008. The Collection and Sale of Wild Mushrooms in a Community of Tlaxcala, México. *Economic Botany* 62(3): 413-424.
- Montoya, A., Torres-García, E. A., Kong, A., Estrada-Torres, A. y J. Caballero. 2012. Gender Differences and regionalization of the cultural significance of wild mushrooms around La Malinche volcano, Tlaxcala, México. *Mycologia* 104(4): 826-834.
- Montoya, A., Kong, A., Garibay-Orijel, R., Méndez-Espinoza, C., Tulloss R. E. y A. Estrada-Torres. 2014. Availability of wild edible fungi in La Malinche National Park, México. *Journal of Mycology*. Hindawi Publishing Corporation 1-14.
- Morales-Torres, E. 1997. Contribución al conocimiento del género *Amanita* Subgénero y Sección *Lepidella* en México. Tesis, Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F. Pp. 146.
- Morales, O., Flores, R., Samayoa, B. y M. C. Bran. 2002. Estudio etnomicológico de la cabecera municipal de Tecpán Guatemala, Chimaltenango. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia* 15(1): 10-20.

- Moreno-Fuentes, A. y E. Bautista-Nava. 2006. El “hongo blanco patón”, *Pleurotus albidus*, en Hidalgo. Su primer registró en México. *Revista Mexicana de Micología* 22: 41-47.
- Moreno, G., Platas, G., Peláez, F., Bernedo, M., Vargas, A., Daza, A., Santamaría, C., Camacho, M., Romero de la Osa, L. M. y J. L. Manjón. 2008. Molecular phylogenetic analysis shows that *Amanita ponderosa* and *A. curtipes* are distincts pecies. *Mycological Progress* 7: 41-47.
- Mullersman, J. E. y J. F. Preston. 1982. A micro assay for phallotoxins: Quantification of phallotoxins in *Amanita* species. *Analytical Biochemistry* 119: 266–273.
- Odenthal, K. P., Seeger, R., Braatz, R., Petzinger, E., Moshaf, H. y C. Schmitz-Dräger. 1982. Damage *In vitro* to various organs and tissues by rubescenslysin from the edible mushroom *Amanita rubescens*. *Toxicon* 20: 765-781.
- Pardavé-Díaz, L. M., Flores-Pardavé, L., Ruíz-Esparza, V. F. y M. Robledo-Cortés. 2007. Contribución al conocimiento de los hongos (macromicetos) de la Sierra Fría, Aguascalientes. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes* 37: 4-12.
- Parnmen, S., Sikaphan, S., Leudang, S., Boonpratuang, T., Rangsiruji, A. y K. Naksuwankul. 2016. Molecular identification of poisonous mushrooms using nuclear ITS region and peptide toxins: a retrospective study on fatal cases in Thailand. *The Journal of Toxicological Sciences* 41(1): 65-76.
- Pérez-Silva, E. y T. Herrera-Suárez. 1991. Iconografía de macromicetos de México: I *Amanita*. Instituto de Biología. UNAM. Pp. 104.
- Pérez-Silva, E., Esqueda, M., Herrera, T. y M. Coronado. 2006. Nuevos registros de agaricales de Sonora, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 77: 23-33.

- Pérez-Silva, E., Esqueda, M. y T. Herrera. 2008. Macromicetos tóxicos de Sonora, México. *Revista Mexicana de Micología* 28: 81-88.
- Pérez-Silva, E., Herrera, T. y A. Ocampo-López. 2011. Nuevos registros de macromicetos para el municipio de Temascaltepec, Estado de México. *Revista Mexicana de Micología* 34: 23-30.
- Piqueras-Carrasco, J. 2014. Intoxicaciones por setas, una actualización. *Revista Española de Medicina Legal* 40(1): 19-29.
- Pringle, A., Adams, R. I. Cross, H. B. y T. D. Bruns. 2009. The ectomycorrhizal Fungus *Amanita phalloides* was introduced and is expanding its range on the west coast of North America. *Molecular Ecology* 18: 817-833.
- Ribeiro, B., Rangel, J., Valentão, P., Baptista, P., Seabra, R. M. y P. B. Andrade. 2006. Contents of carboxylic acids and two phenolics and antioxidant activity of dried portuguese wild edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 8530-8537.
- Robles, L., Huerta, G., Andrade, R. H. y H. M. Ángeles. 2007. Conocimiento tradicional sobre los macromicetos en dos comunidades Tseltales de Oxchuc, Chiapas, México. *Etnobiología* 5: 21-35.
- Rodríguez, O., Herrera-Fonseca, M., Sánchez-Jácome, Ma. del R., Álvarez, I., Valenzuela, R., García, J. y L. Guzmán-Dávalos. 2010. Catálogo de la micobiota del bosque La Primavera, Jalisco. *Revista Mexicana de Micología* 32: 29-40.
- Rodríguez-Muñoz, G., Zapata-Martelo, E., Rodríguez, M., Vázquez-García, V., Martínez-Corona, B. y I. Vizcarra-Bordi. 2012. Saberes tradicionales, acceso, uso y transformación de hongos silvestres comestibles en Santa Catarina del Monte, Estado de México. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo* 9(2): 191-207.

- Ruan-Soto, F., Garibay-Origel, R. y J. Cifuentes. 2004. Conocimiento micológico tradicional en la planicie costera del Golfo de México. *Revista Mexicana de Micología* 19: 57–70.
- Ruan-Soto, F., Garibay-Orijel, R. y J. Cifuentes. 2006. Process and dynamics of traditional selling wild edible mushrooms in tropical Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 2: 3-15.
- Ruan-Soto, F., Cifuentes, J., Mariaca, R., Limón, F., Pérez-Ramírez, L. y S. Sierra. 2009. Uso y manejo de hongos silvestres en dos comunidades de la Selva Lacandona, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Micología* 29: 61-72.
- Ruan-Soto, F. y W. García-Santiago. 2013. Uso de los hongos macroscópicos: estado actual y perspectivas. *En: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, La biodiversidad en Chiapas: Estudio de estado, México, CONABIO/Gobierno del Estado de Chiapas. pp. 243-258.*
- Ruan-Soto, F., Caballero, J., Martorell, C., Cifuentes, J., González-Esquinca, A. R. y R Garibay-Orijel. 2013. Evaluation of the degree of mycophilia-mycophobia among highland and low land inhabitants from Chiapas, Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 9(36): 1-13.
- Ruan-Soto, F. y M. Ordaz-Velázquez. 2015. Aproximaciones a la etnomicología maya. *Revista Pueblos y Fronteras digital* 10(20): 44-69.
- Ruiz-González, L. E. 2014. Evaluación de la toxicidad de algunos Basidiomycetes del estado de Jalisco sobre *Artemia franciscana*. Maestría en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas. Universidad de Guadalajara. Jalisco. Pp. 47.



- Ruiz Sánchez D., Tay-Zavala, J., Sánchez-Vega, J. T. y H. Martínez-García. 1999. Los micetismos y su relevancia en la medicina. *Revista Iberoamericana Micología* 16: 121–125.
- Rühling, A. y G. Tyler. 1990. Soil factors influencing the distribution of macrofungi in oak forests of southern Sweden. *Holarctic Ecology* 13: 11–18.
- Sánchez-Ramírez, S., Tulloss, R. E., Amalfi, M. y J. M. Moncalvo. 2014. Palaeotropical origins, boreotropical distribution and increase rates of diversification in a clade of edible ectomycorrhizal mushrooms (*Amanita* section *Caesareae*). *Journal of Biogeography* 1-13.
- Sánchez-Ramírez, S., Etienne, R. S y J.-M. Moncalvo. 2015. High speciation rate at temperate latitudes explains unusual diversity gradients in a clade of ectomycorrhizal fungi. *Evolution* 69(8): 2196-2209.
- Sánchez-Rodríguez, J. A., Andrés-Rodríguez, J., García-Prieto, O., Terrón-Alfonso, A., Llamas-Frade, B., Arrojo-Martín, E. y T. Pérez-Jarauta. 1991. El Género *Amanita* Pers. Ex. Hooker en la Provincia de León. *Acta Botánica Malacitana* 16(1): 123-132.
- Seeger, R. 1980a. Cytolytic toxins of basidiomycetes. *En: Naturao Toxins*: 165-172.
- Seeger, R. 1980b. Studies on rubescenslysin haemolysis. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 311: 95-103.
- Seeger, R. y E. Bunsen. 1980. Degranulation of rat mast cells *in vitro* by the fungal cytolysis Phallolysin, Rubescenslysin and Fascicularelysin. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 315: 163-166.
- Seeger, R. y B. Wachter. 1981. Rubescenslysin and phallolysin release marker molecules from phospholipid cholesterol liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 645(1): 59-62.

- Seeger, R., Odenthal, K. P. y U. Mengs. 1981. Toxic effects in mouse and rat of rubescenslysin from *Amanita rubescens*. *Toxicon* 19(3): 409-417.
- SEMARNAT. 2008. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Manual que establece los Criterios Técnicos para el Aprovechamiento Sustentable de Recursos Forestales No Maderables de Clima Templado-Frío. Pp. 120.
- Tang, L. P., Cai, Q., Lee, S. S., Buyck, B., Zhang, P. y Z. L. Yang. 2015. Taxonomy and phylogenetic position of species of *Amanita* sect. *Vaginatae* s.l. from tropical Africa. *Mycological Progress* 14(39): 1-15.
- Tedersoo, L., Suvi, T., Beaver, K. y U. Kõljalg. 2007. Ectomycorrhizal fungi of the Seychelles: diversity patterns and host shift from the native *Vateriopsis seychellarum* (Dipterocarpaceae) and *Intsia bijuga* (Caesalpiniaceae) to the introduced *Eucalyptus robusta* (Myrtaceae), but not *Pinus caribea* (Pinaceae). *New Phytologist* 175: 321-333.
- Tulloss, R. E. 1994. Type studies in *Amanita* section *Vaginatae* I: Some taxa described in this Century (studies 1-23) with notes on description of spores and refractive hyphae in *Amanita*. *Mycotaxon* 52(1): 305-396.
- 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: 189-231.
- Tulloss, R. E. y D. Smullen. 2006. Mushroom toxins y Poisonings in New Jersey y Nearby eastern North America. Pp. 31.
- Tulloss, R. E. y C. Rodríguez-Caycedo. 2011. *Amanita* Workshop. 6<sup>th</sup>. Ed. Cook College Rutgers University. Pp 34.

- Tulloss, R. E., Rodríguez-Caycedo, C., Hughes, K. W., Geml, J., Kudzma, L. V., Wolfe, B. E. y D. Arora. 2015. Nomenclatural changes in *Amanita*. II. Amanitaceae 1(2): 1-6.
- Tulloss, R. E. 2016. *Amanita rubescens*. En: Tulloss, R. E. y Z. L. Yang (Eds.). *Amanitaceae* estudios. <http://www.amanitaceae.org?Amanita+rubescens>. Consultado marzo 2016.
- Tulloss, R. E., Kuyper, T. W., Vellinga, E. C., Yang, Z. L., Halling, R. E., Geml, J., Sánchez-Ramírez, S., Conçalves, S. C., Hess, J. y A. Pringle. 2016. The genus *Amanita* should not be split. *Amanitaceae* 1(3): 1-16.
- Vargas, N., Bernal, A., Sarria, V., Franco-Molano, A. y S. Restrepo. 2011. Amatoxin and phallotoxin composition in species of the genus *Amanita* in Colombia: A taxonomic perspective. *Toxicon* 58: 583–590.
- Vargas, N., Pardo-de La Hoz, C. J., Danies, G., Franco-Molano, E., Jiménez, P., Restrepo, S. y A. Grajales. 2017. Defining the phylogenetic position of *Amanita* species from andean Colombia. *Mycologia* 109(2): 261-276. DOI: 10.1080/00275514.2017.1309631
- Vásquez-Zárate, S. 2007. La utilización ritual de los hongos en las sociedades prehispánicas de México. Pág. 13-18. En: Zulueta-Rodríguez, R., Trejo-Aguilar, D. y A. R. Trigos-Landa (Eds.). *El Maravilloso Mundo de los Hongos*. Dirección General Editorial. Universidad Veracruzana.
- Vilgalys, R. y B. L. Sun. 1994. Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91: 4599-4603.

- Villanueva-Jiménez, E., Villegas-Ríos, M., Cifuentes-Blanco, J. y H. León-Avendaño. 2006. Diversidad del género *Amanita* en dos áreas con diferente condición silvícola en Ixtlán de Juárez, Oaxaca, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 77: 17-22.
- Villarreal, L. y J. Pérez-Moreno. 1989. Los hongos comestibles silvestres de México un enfoque integral. *Micología Neotropical Aplicada* (2): 78-86.
- Walton, J. D., Panaccione, D. G. y H. E. Hallen. 2004. Peptide Synthesis without Ribosomes. Pág. 127-162. *En: Tkacz J.S., Lange L. (eds) Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine. Springer, Boston, MA*
- Winterstein, D. 2000. Hämolytine in Pilzen. *Der Tintling* 22(4): 10-26.
- Wolfe, B. E., Richard, F., Cross, H. B. y A. Pringle. 2010. Distribution and abundance of the introduced ectomycorrhizal fungus *Amanita phalloides* in North America. *New Phytologist* 185: 803-816.
- Wong, J. H., y T.B. Ng. 2006. Toxins from basidiomycete fungi (Mushroom): Amatoxins, Phallotoxins and Virotoxins. Pág. 1596. *En: A. J. Kastin (Ed.). Handbook of Biologically Active Peptides. Elsevier. Press Publications.*
- Wu, Q.-X., Mueller, G. M., Lutzoni, F. M., Huang, Y-Q. y S-Y. Guo. 2000. Phylogenetic and biogeographic relationships of Eastern Asian and Eastern North American disjunct *Suillus* species (Fungi) as inferred from nuclear ribosomal RNA ITS sequences. *Molecular Phylogenetics Evolution* 17(1): 37-47.

## CAPÍTULO 2: GENOTOXIC PROFILE AND MORPHOLOGICAL VARIATION OF THE *AMANITA RUBESCENS* COMPLEX: TRADITIONAL KNOWLEDGE FOR SAFE CONSUMPTION IN MEXICO

Griselda Nallely Hernández-Rico<sup>1</sup>, Pablo Octavio-Aguilar<sup>1\*</sup>, Roberto Garibay-Orijel<sup>2</sup>, and Leticia Romero-Bautista<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. <sup>2</sup>Laboratorio de sistemática y ecología de micorrizas, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, México.

\*pablo\_aguilar9900@uaeh.edu.mx

Received February 7, 2018 | Accepted May 23, 2019 | Published 04/09/2019  
*Ethnobiology Letters* 2019 10(1): 76–85 | DOI 10.14237/ebl.10.1.2019.1259

---

**2.1 Abstract** Wild mushrooms are important to the nutritional health and economic subsistence of rural populations in Mexico, but inaccurate identification of mushrooms has led to reported cases of poisoning. The aim of this study is to establish genotoxic profiles of mushrooms of the putative *Amanita rubescens* complex and to link those profiles with morphological attributes that suggest a correct identification of mushrooms, in order to prevent poisoning. Several combinations of amplification products (AMA, PHA, POP1, and POP2 genes) were identified in *A. rubescens* fungi sold in traditional markets; these genes are related to the presence of toxic polypeptides and its enzymatic regulators. The sequences correspond to a previously reported toxic gene family (MSDIM). All samples with the complete toxic gene profile presented reddish to dark-brown sporomes; this is the only attribute that visually distinguishes samples with toxic potential. Our results suggest that the mushrooms sold in traditional Mexican markets do not correspond to the *A. rubescens* complex. We conclude that morphological variability allows for identification of edible and inedible mushrooms.

Keywords Ethnomycology, Genotoxic profile, Edible mushrooms,  $\alpha$ -Amanitin, Phalloidin

---

## 2.2 Introduction

Mushrooms are outstanding for their diversity and traditional uses that provide economic, cultural, and nutritional benefits. As a result, there is abundant traditional knowledge concerning mushrooms' nomenclature, ecology, management, use, conservation, and identification (Bandala et al. 2014; Gry and Anderson 2014; Mariaca-Méndez et al. 2001). Mushroom consumption in Mexico is regionally variable with preferences for some local species that are found in traditional markets: *Amanita* aff. *caesarea*, *A. rubescens*, *Boletus edulis*, *Cantharellus cibarius*, *Lactarius indigo*, *Morchella esculenta*, *Ramaria* sp., *Russula brevipes*, and *Ustilago maydis*, among others

(Bandala et al. 1997; Estrada-Martínez et al. 2009; Herrera and Guzmán 1961; Mariaca-Méndez et al. 2001; Montoya et al. 2003, 2014).

Traditional collectors' criteria for identification of edible mushrooms are based on form, color, consistency, habitat, developmental stage, and season (Guzmán 1999; Hernández-Rico 2011; Hung et al. 2015; Jiménez-González et al. 2013; Montoya et al. 2003; Romero-Bautista 2007). However, there have been reported cases of poisoning associated with misidentification by inexperienced consumers, who possess inaccurate or insufficient knowledge (Hernández-Rico 2011). In general, identification criteria to distinguish edible from poisonous species seem to rest not on detailed recognition of the second set but precise knowledge of the first (Ruan-Soto 2018).

Some authors suggest that edible mushrooms in the *Amanita rubescens* complex in North America constitute different taxa than the European species or cryptic (morphologically similar but genetically distinct) species (Tulloss and Lindgren 1994), which probably have different toxic profiles. Most of the toxins in *Amanita* have been studied and described, with  $\alpha$ -amanitin (blocks protein synthesis) and phalloidin (hepato- and nephrotoxic), which are both in the MSDIM toxic gene family (Anderl et al. 2012), as identified by their effects and general location at the genus level. However, it is unknown whether the edible amanitas, such as those belonging to the *A. rubescens* complex, have genes associated with the expression of  $\alpha$ -amanitin and phalloidin but less toxic allelic variants that make them safe to consume after cooking. In addition, the activation of toxic genes requires the presence of enzymatic regulators (POP1 and POP2) that transform the protoxin into its active form (Luo et al. 2010).

Genetic variation, including toxic genes, usually causes phenotypic changes that can be appreciated at a glance; identifying morphological features that allow the discrimination of toxic and non-toxic genotypes should help to prevent poisoning (Anderl et al. 2012; Cai et al. 2014; Feregrino et al. 2013; Hallen et al. 2007; Kendrick 2000; Lima et al. 2012; Luo et al. 2010). The aim of this research was to identify the presence of genes associated with toxicity in mushrooms of the *A. rubescens* complex sold for human consumption and to associate genotoxic profiles with morphological variation to establish a putative diagnostic attribute that can be used for safe consumption.

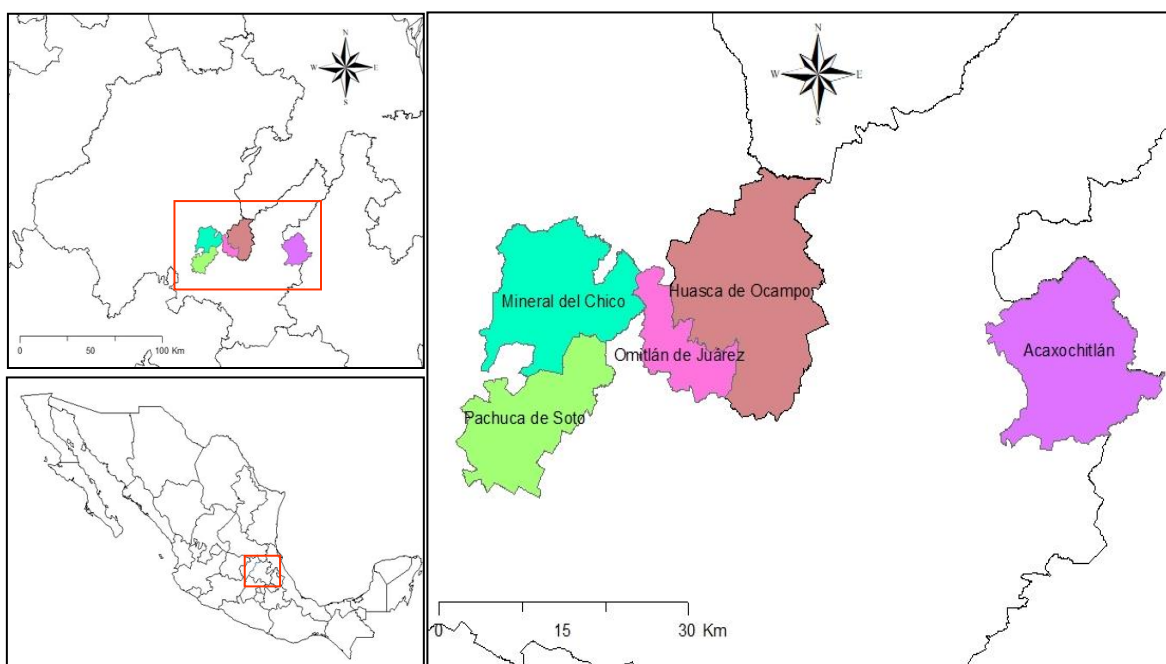
## 2.3 Materials and Methods

### 2.3.1 Sampling

Thirty sporocarps (i.e., the fruiting body of the fungi) of *A. rubescens* specimens were collected from five regions of Hidalgo, Mexico (Acaxochitlan, Huasca, Mineral del Chico, Pachuca, and Omitlan), which include places with and without traditional consumption of these mushrooms (Table 1; Figure 1). The samples were described, and locality, associated vegetation type, and other data were recorded. The biological material was kept in the mushroom collection of the Autonomous National University of Mexico (UNAM).

**Table 2.1.** Sample sites description and its traditional use of the *A. rubescens* complex.

Municipality	Locality	Vegetation	Edible	Common name
Acaxochitlan	La Montaña Viviente and Las Terrazas	Pine-oak	No	Crazy fungus
Huasca	Cerro del Zembo	Oak	Sometimes	Unnamed
Mineral del Chico	Mineral del Chico	Cedar	No	Unnamed
Pachuca	San Miguel Cerezo market	Pine-oak	Yes	Chiquita brisket or small cake
Omitlan	Omitlan	Oak	Yes	Chiquita brisket



**Figure 2.1.** Geographic locations of the sampling sites of *A. rubescens* complex mushrooms.

### 2.3.2 DNA Extraction

The standardized system of phenol-chloroform extraction, based on a modification of Gardes and Bruns' (1993) method, was used. Dry samples were processed in a laminar flow hood. A 3 mm<sup>2</sup> tissue fragment was put in a 1.5 µl microcentrifuge tube, submerged in liquid nitrogen, and macerated with a microbiological handgrip inside the tube. The macerate was suspended in 800 µl of CTAB 2x and incubated in a water bath at 65°C for one hour, moving the tubes every 20 minutes. Six hundred µl of chloroform-isoamyl alcohol (24:1) was added, mixed, and centrifuged at 13,000 rpm for ten minutes. Cold isopropanol (0.6x) was added to the supernatant, mixed gently for a minute, and centrifuged as above. The pellet was cleaned with 500 µl 70% ethanol, dried, resuspended in 60 µl of dH<sub>2</sub>O, and stored at -20°C. The quality and concentration of DNA was assayed by spectrophotometry (Bio Spectrometer Basic®).

### 2.3.3 Amplification

Markers specific to  $\alpha$ -amanitin (Walton et al. 2004), phalloidin (Hallen et al. 2007), and two regulatory genes named POP (Luo et al. 2010) were used. As positive controls of the amplification, ITS1F, ITS4, and  $\beta$ -tubulin markers were used (White et al. 1990). Total reaction volume was 15  $\mu$ l, consisting of 8.84  $\mu$ l of dH<sub>2</sub>O, 2.5  $\mu$ l of 10x buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, KCl 500 mM), 0.16  $\mu$ l of dNTPs (2 mM), 0.3  $\mu$ l of MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1  $\mu$ l of each primer (50 mM), 0.75 U of Taq polymerase (Promega®), and 1  $\mu$ l of DNA sample. The amplification conditions were 94°C for 8 minutes of initial denaturation, 35 cycles at 94°C for 30 seconds, 57°C for 30 seconds, 72°C for 1 minute, and 72°C for final amplification. The product evaluation was made by electrophoresis on acrylamide gels at 15%, over 50 minutes at 90 V. PCR products were used for two subsequent rounds of nested PCR with the primers proposed by Hallen et al. (2007; Supplementary File 1). Final PCR products of the six samples with a complete genotoxic profile and two probed toxic fungi (*Amanita* aff. *verna* and *A.* aff. *virosa*) were sequenced (Macrogen®), aligned (MEGA 7.0.26; Kumar et al. 2015), and compared with the GenBank database (BLAST-NCBI).

### 2.3.4 Morphological Analysis

Macro- and micromorphological attributes were described, with continuous (data that can take any value) and discontinuous (variation that can fall into a number of categories or classes) morphological data separated (Table 2). The macromorphological data were 1) pileus (cap): form, color, ornamentation, color of ornamentation, texture (discontinuous data), thickness of the context, diameter, and number of grooves (continuous data); 2) stipe (stem): form, color, ornamentation, color of ornamentation, texture (discontinuous data), thickness of the context, and length and width of the stipe (continuous data); 3) lamella (gills): color, frequency, and edge type (discontinuous data); and 4) ring: form, color, and position (discontinuous data). The micromorphological data were: 1) Melzer's reaction (amyloid or inamyloid); 2) spore size (length and width); and 3) basidia size (length and width), which are attributes for taxonomic description of mushrooms according to Largent and Baroni (1988).

**Table 2.2.** Categorical traits of the groups formed by the simple linkage agglomerative method of Mexican *A. rubescens* complex. All genotoxic profiles are included in the group 2.

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
Pileus color	Brown	Reddish-brown	Brown	Brown
Pileus form	Convex	Convex	Convex	Depressed
Pileus ornamentation	Fibrillas	Verruca	Verruca	Without ornamentation
Color of the pileus ornamentation	Reddish-brown	Reddish-brown	Dark brown	Without ornamentation
Color of the pileus context	Pink	Beige	Beige	Pink
Texture of the pileus context	Spongy	Fleshy	Fleshy	Spongy



Stipe color	Pink	Cream	Cream	Pink
Stipe form	Claviform	Cylindrical	Claviform	Cylindrical
Stipe ornamentation	Fibrillas	Fibrillas	Fibrillas	Fibrillas
Color of the stipe ornamentation	Pink	Reddish*	Pink	Pink
Color of the stipe context	Without color	Pink	Pink	Pink
Texture of the stipe context	Fibrous	Spongy	Spongy	Fibrous
Lamella color	Beige	Cream	Cream	Cream
Frequency of the sheets	Close together	Close together	Close together	Close together
Edge of the lamella	Sawing	Sawing	Fimbriated	Fimbriated
Ring form	Fragile	Membranous	Membranous	Membranous
Ring color	Beige	Cream	Cream	Beige
Ring position	Subapical	Apical	Subapical	Apical
Spores form	Ellipsoids	Ellipsoids	Ellipsoids	Ellipsoids
Spores staining (Melzer's reaction)	Amyloid	Amyloid	Inamyloid	Amyloid

\*Exclusive characteristic of Group 2.

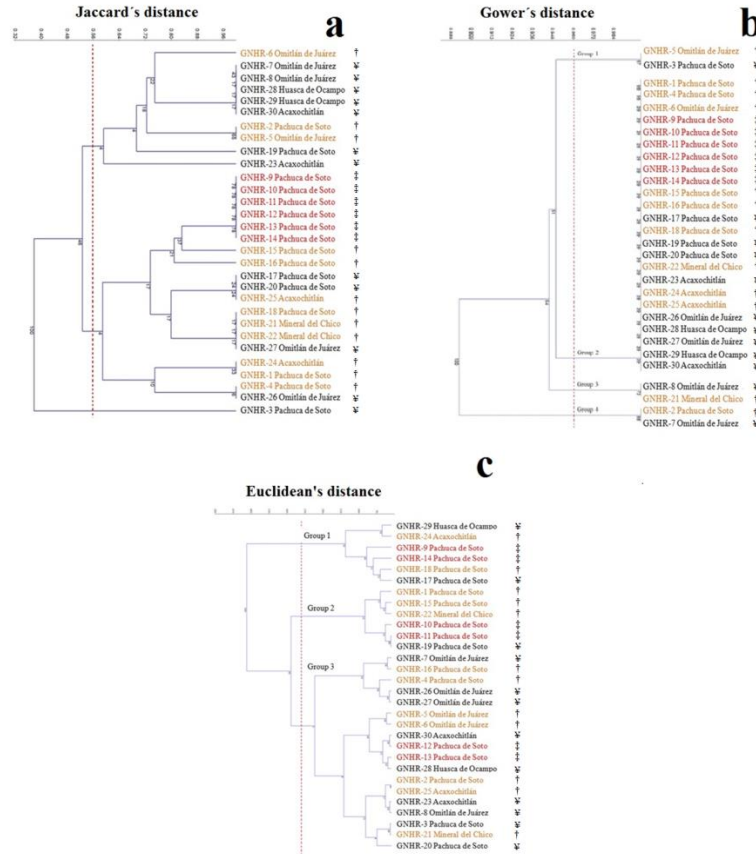
### 2.3.5 Analysis

Continuous morphological attributes were used to group the samples based on Ward's method of amalgamation with Euclidean distances. Discontinuous morphological attributes were grouped by simple linkage with Gower's distances, specific to the diverse nature of attributes. The genetic matrix with a specific amplification of genes related to toxicological profile was grouped by UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) clustering based on Jaccard's distances (amplified presence-absence data set; Lloyd 2016). For all generated trees, the standard number of groups was obtained by the bootstrap method at 10,000 steps. Paired distance matrix (genetic with Jaccard's distances, morphological by Euclidean distance for continuous data and Gower's distances for discontinuous data) were correlated with a Mantel test to establish a correspondence between the genetic profile and morphological traits, following transformation of the data with the formula  $z = (x - \mu)/\sigma$ , where  $x$  is the original distance between individual,  $\mu$  is the average distance, and  $\sigma$  is the deviation of the distance. This transformation was used to orthogonalize the magnitude of the distances.

## 2.4 Results

Molecular analysis grouped the mushrooms in two clades and one isolated individual from Pachuca de Soto with ITS1F as the unique amplified gene (Figure 2a). Individuals in the first group mostly amplified only to the control genes (seven individuals in black ¥), while some

individuals presented one or two toxic profile genes (three individuals in orange †). The second group consisted of six individuals from the Pachuca market that amplified to all toxic profile genes and controls (AMA, PHA, POP1, POP2, ITS 1F, and  $\beta$ -tubulin) (red ‡), as well as some individuals with black (¥ four individuals) and orange († nine individuals) profiles as described above.



**Figure 2.2.** A) Molecular grouping using the UPGMA method, B) simple linkage grouping with Gower's distance of morphological discontinuous data, C) ward grouping with Euclidian distances of continuous morphological variables. Red samples (‡) showed all molecular amplifies including genotoxic and positive controls of *A. rubescens* complex in Hidalgo, orange samples (†) showed one to three genotoxic markers, black samples (¥) only showed positive control amplifies.

A partial fragment of DNA flanked by the nested primers was obtained for  $\alpha$ -amanitin ( $268.9 \pm 17.25$ , rank 236–287 bp) and phalloidin ( $96.75 \pm 2.94$ , rank 96–98 bp, Supplementary File 2) in the six samples with the complete genotoxic profile from Pachuca de Soto (red group) and positive controls (*A. aff. verna* and *A. aff. virosa*). The first amplified sequence in the red group of *A. rubescens* corresponds to *A. pallidorosea*  $\alpha$ -amanitin gene cds (84%, KC778580.1), *A. exitialis*  $\alpha$ -amanitin gene cds (71%, KF813063.1), and *A. fulginea*  $\alpha$ -amanitin gene cds (71%, KC778575.1). Positive controls (*A. aff. verna* and *A. aff. virosa* respectively) amplified correspond to the  $\alpha$ -amanitin gene from *A. pallidorosea* (84% and 82% identity, KC778580.1), *A. phaloides* (both 79%, KC778577.1), *A. fulginea* (78% and 79%, KF552088.1), and *A. exitabilis* (68% and 79%, KF813063.1).

The second amplified sequence of the red group corresponds to phallacidin (PHA1) partial genes from *A. biosporigera* (identity 86%, EU196141.1), *A. virosa* (84% FN555144.1), and *A. exitalis* (84% KC778564.1). Controls (*A. aff. verna* and *A. aff. virosa* respectively) correspond to partial phallacidin genes from *A. biosporigera* (82% and 81%, EU196143.1), *A. virosa* (80% and 79%, FN555144.1), and *A. exitalis* (78% and 76%, KF813064.1), all of them poisonous.

The grouping by simple linkage with Gower's distances showed four groups (Figure 2b). All individuals with the complete genotoxic profile are included in the second group. The distinctive feature of the group was the reddish color of the stipe ornamentation. In general, all individuals with complete or partial genotoxic profile had a darker reddish coloration (Table 2; Figure 3).



**Figure 2.3.** Samples of *A. rubescens* complex with reddish color detail. A GNHR-1 (AMA, PHA positive), B GNHR-4 (AMA, PHA positive), C GNHR-9 (complete genotoxic profile), D GNHR-16 (only POP1 negative), E GNHR-18 (only PHA negative) and F GNHR-29 (no toxic profile). The reddish color of the sample with the complete profile is highlighted (c), the brown color of the samples with a partial genotoxic profile (a, b, d, e) and the light color of the negative sample (f).

The Ward's grouping showed three morphological groups associated with sporome size (Figure 2c). The smaller mushrooms are grouped in the third group, although they have wide stretch marks on the pileus; the largest mushrooms are grouped in the second group, and do not have stretch marks on the pileus. The first group is made up by medium size mushrooms (Table 3). However, none of these morphological groups are related to the genotoxic profile. Finally, the Mantel test showed no correlation between genetic and morphological distances.

**Table 3.3.** Description of the groups formed with Euclidean distances obtained from continuous traits of the *A. rubescens* complex.

		Group 1	Group 2	Group 3
Macromorphology	Minimum diameter of the pileus (mm)	48.2 ± 16.22	78 ± 24.97	6.94 ± 20.2
	Maximum diameter of the	81.8 ± 27.2	102.5 ± 19.89	80.67 ± 23.1

	pileus (mm)			
	Stretch length (mm)	$0.8 \pm 2.04$	0	$1.06 \pm 1.9$
	Context of the pileus (mm)	$6 \pm 1.79$	$5.67 \pm 0.52$	$6.11 \pm 3.4$
	Minimum longitude of the stipe (mm)	$91.5 \pm 39.24$	0	0
	Maximum longitude of the stipe (mm)	$114.2 \pm 32.3$	$92.5 \pm 18.06$	$70.5 \pm 42.1$
	Minimum width of the stipe (mm)	$13.2 \pm 3.71$	0	$0.72 \pm 3.1$
	Maximum width of the stipe (mm)	$13.8 \pm 10.09$	$14 \pm 2.1$	$13.22 \pm 5$
	Context of the stipe (mm)	$16 \pm 4.69$	$14 \pm 2.1$	$13.22 \pm 5$
Micromorphology	Minimum longitude of the spore ( $\mu$ )	$7.4 \pm 0.92$	$7.33 \pm 0.5$	$7.4 \pm 0.5$
	Maximum longitude of the spore ( $\mu$ )	$10.4 \pm 1.07$	$9.73 \pm 0.25$	$10.43 \pm 1$
	Minimum width of the spore ( $\mu$ )	$5.9 \pm 0.46$	$5.72 \pm 0.44$	$5.64 \pm 0.5$
	Maximum width of the spore ( $\mu$ )	$8 \pm 0.84$	$7.92 \pm 0.48$	$7.81 \pm 0.8$
	Minimum longitude of the basidia ( $\mu$ )	$25.7 \pm 2.31$	$22.57 \pm 1.76$	$21.22 \pm 6$
	Maximum longitude of the basidia ( $\mu$ )	$35.3 \pm 2.55$	$32.87 \pm 2.37$	$31.16 \pm 8.7$
	Minimum width of the basidia ( $\mu$ )	$9 \pm 0.49$	$7.58 \pm 1.45$	$7.27 \pm 2$
	Maximum width of the basidia ( $\mu$ )	$11.7 \pm 0.84$	$10.28 \pm 1.32$	$10.07 \pm 2.7$

## 2.5 Discussion

Our results show that edible fungi from Hidalgo markets are different from the European *A. rubescens* complex because they show high variability in the presence or absence of genes associated with toxicity, which are totally absent in *A. rubescens sensu stricto* as defined based on the European taxa. One group from Pachuca was positive for all analyzed genes (AMA, PHA, POP1, POP2, and the positive controls ITS 1F and  $\beta$ -tubulin) that correspond to the sequenced toxic genes in other *Amanita* species of the section Phalloidiae. Several samples have different

combinations of analyzed genes, but these genotypes showed no clear relationship with morphological variation. However, qualitative morphological analysis showed that the reddish to dark-brown color of sporomes is a possible attribute associated with a partial or complete genotoxic profile.

The presence of genes responsible for the expression of toxins in the *A. rubescens* complex suggests that they are potentially dangerous; the complex is accordingly assigned to section Phalloidae, where most species are toxic (Cai et al. 2014). The variability of combinations in genotoxic profiles could relate to deletions and/or duplications in the copy number of the sequences AMA and PHA, which give rise to hypervariable regions that code for different peptides of between seven to ten amino acids (Hallen et al. 2007). However, we cannot assume that the fungi really are toxic, as it is unknown which genes are expressed and to what extent. To elucidate toxicity, assays by liquid chromatography mass-spectrometry (Parnmen et al. 2016) for the detection of expression products are necessary.

The fact that the AMA and PHA genes are absent in non-toxic fungi in section Phalloidae (Hallen et al. 2007) suggests that the mushrooms consumed in Hidalgo are mistakenly identified as species within the *A. rubescens* complex, or that some edible non-toxic mushrooms in section Phalloideae conserve the potential to express toxicity. In addition, fungi can have other compounds that result in poisoning in combination with alcoholic beverages or some foods. For example, *Coprinus atramentarius* has coprine, which in combination with alcohol causes pain and sickness (Graeme 2014; Gry and Anderson 2014; Jo et al. 2014). In particular, *A. rubescens* presents a thermolabile toxin called rubescenslysin, which interacts with phospholipids in cell membranes, generating intracellular hemolysis, cardiotoxicity, and adverse effects in the central nervous system. The sequence of genes associated with this toxin is not yet known, so no appropriate molecular markers are available (Odenthal et al. 1982; Seeger and Wachter 1980).

With respect to the categorical traits associated with the presence of AMA, PHA, POP1, and POP2 genes; the distinctive attribute for recognizing a potentially toxic mushroom is the dark reddish stipe ornamentation (Table 2; Figure 2b). The other five recorded traits are shared between groups that present partial genotoxic profiles. However, in general, it could be said that more intense reddish-brown-colored mushrooms tend to have more genes associated with toxicity.

On the other hand, morphological variation of the continuous characteristics did not show any structure that would allow for the identification of toxicity. Traditional sellers group mushroom according to size for pricing; attributes such as size, width, and weight that are traditional criteria of the vendors do not appear to be related to toxicity (Burrola-Aguilar et al. 2012; Hernández-Rico 2011; Rodríguez-Muñoz et al. 2012).

## 2.6 Conclusion

Women are the main fungal collectors in the central mountainous region of Hidalgo. In general, the criteria for choosing edible fungi vary across regions, so some cases of mycetism in Acaxochitlan and Real del Monte have removed *A. rubescens* from local diet. Our results suggest modifying the traditional criteria for the selection of edible fungi, those like *A. rubescens*, by considering the color intensity. In addition, the possibility of horizontal transfer of MSDIM genes

and/or the preservation of toxic potential in the genome of *A. rubescens* (from Hidalgo, at least), brings into question the viability of continuing consume this fungus.

In conclusion, these results show that a macromorphological characteristic, color, is associated with a complete or partial genotoxic profile among edible fungi identified as *A. rubescens*. This is not yet a solid guideline for the collection of guaranteed edible mushrooms. In order to develop more conclusive recommendations for traditional mushroom collectors and vendors, these results must be replicated using a larger sample size, and the evaluation of toxicity must consider traditional collectors' criteria used to form morphological groups. However, these results are a significant contribution to developing restrictive criteria (intense reddish-brown-colored mushrooms) for the avoidance of potentially toxic fungi.

## 2.7 Acknowledgments

We thank the women of the high region of Hidalgo, who allowed us to live together and learn from their traditional knowledge. We also thank CONACYT for the grant to the first author and INFR-252807 for financial support.

Declarations

*Permissions:* None declared.

*Sources of funding:* CONACYT grant to GNHR and INFR-252807 project.

*Conflicts of Interest:* None declared.

## 2.8 References Cited

- Anderl, J., H. Echner, and H. Faulstich. 2012. Chemical Modification allows phallotoxins and amatoxins to be used as tools in cell biology. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 8: 20172-2084. DOI: 10.3762/bjoc.8.233.
- Bandala, V. M., L. Montoya, and I. Chapela. 1997. Wild edible mushrooms in Mexico: a challenge and opportunity for sustainable development. In *Mycology in sustainable development: expanding concepts, vanishing borders*, edited by M. Palm, and I. Chapela, pp. 76-90. Parkway Publishers, North Carolina, USA.
- Bandala, V. M., L. Montoya, R. Villegas, T. G. Cabrera, M. J. Gutiérrez, and T. Acero. 2014. "Nangañaña" (*Tremelloscypha gelatinosa*, sebacinaceae), hongo silvestre comestible del bosque tropical deciduo en la depresión central de Chiapas, México. *Acta Botánica Mexicana* 106: 149-159. DOI: 10.21829/abm106.2014.216.
- Burrola-Aguilar, C., O. Montiel, R. Garibay-Orijel, and L. Zizumbo-Villareal. 2012. Conocimiento tradicional y aprovechamiento de los hongos comestibles silvestres en la región de Amanalco, Estado de México. *Revista Mexicana de Micología* 35: 1-16.
- Cai, Q., R. E. Tulloss, L. P. Tang, B. Tolgor, P. Zhang, Z. H. Chen, and Z. L. Yang. 2014. Multi-locus phylogeny of lethal *Amanitas*: Implications for species diversity and historical biogeography. *BMC Evolutionary Biology* 14: 143-158. DOI: 10.1186/1471-2148-14-143.

- Estrada-Martínez, E., G. Guzmán, T. D. Cibrián, and P. R. Ortega. 2009. Contribución al conocimiento etnomicológico de los hongos silvestres comestibles en los mercados regionales y comunidades de la sierra nevada (México). *Interciencia* 34 (1): 25–33. Available at: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442009000100006](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442009000100006). Accessed on December 5, 2017.
- Feregrino-Feregrino, C. A., M. R. Morales-Garza, M. Martínez-García, A. Monsalvo-Reyes, and J. E. Campos-Contreras. 2013. Descripción molecular de hongos macromicetos del género *Amanita* de Villa del Carbón, México, empleando la región LSU rDNA. *Facultad de Ciencias y Tecnología* 86-94. Available at: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4745385>. Accessed on December 5, 2017.
- Gardes, M., and T. D. Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118. DOI: 10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x.
- Grame, K. A. 2014. Mycetism: A review of the Recent Literature. *Journal of Medical Toxicology* 10: 173-189. DOI: 10.1007/s13181-013-0355-2.
- Gry, J., and C. Andersson. 2014. *Mushrooms traded as food*. Tema Nord Press, Copenhagen: Nordisk Ministerråd. Denmark.
- Guzmán, G. 1999. Los hongos comestibles, medicinales y sagrados en México. In *La etnobiología en México: Reflexiones y experiencias*, edited by M. A. Vásquez-Dávila, pp. 145-151. Secretaría de Educación Pública/Asociación Etnobiológica de México. Oaxaca, Oaxaca, MEX.
- Hallen, H. E., H. Luo, J. S. Scott-Craig, and J. D. Walton. 2007. Gene family encoding the major toxins of lethal *Amanita* mushrooms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (48): 19097-19101. DOI: 10.1073/pnas.0707340104.
- Hernández-Rico, G. N. 2011. Taxonomía y Etnomicológica del género *Amanita* Pers., en el municipio de Acaxochitlán, Hidalgo. Master Dissertation, Postgraduate in Conservation and Biodiversity, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Mineral de la Reforma, Hidalgo, MEX.
- Herrera, T., and G. Guzmán. 1961. Taxonomía y ecología de los principales hongos comestibles de diversos lugares de México. *Anales del Instituto de Biología, Serie Botánica* 22: 33-135. UNAM, México D. F., MEX.
- Hunn, E. S., Y. Venegas-Ramírez, and M. A. Vásquez-Dávila. 2015. Where do fungi fit? The fungal domain in Mixtepeczapotec. *Journal of Ethnobiology* 35(2): 286-313. DOI: 10.2993/etbi-35-02-286-313.1.
- Jiménez-González, M., L. Romero-Bautista, M. A. Villavicencio-Nieto, and B. E. Pérez-Escandón. 2013. Los hongos comestibles de la región de Molango de Escamilla, Hidalgo, México. In *Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas, Vol II*, edited by Pulido-Flores, G., and S. Monks, pp 69-82. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo Press, Mineral de la Reforma, Hidalgo, MEX.
- Jo, W., A. Md. Hossain, and S. Park. 2014. Toxicological Profiles of Poisonous edible and medicinal mushrooms. *Mycobiology* 42 (3): 215-220. DOI: 10.5941/MYCO.2014.42.3.215.

- Kendrick, B. 2000. *The fifth kingdom*. Focus Publishing. Newburyport., Massachusetts, USA.
- Kumar, S., G. Stecher, and K. Tamura 2015. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetic Analysis. version 7.0.26. Available at: <http://www.kumarlab.net/publications>
- Largent, D. L., and T. J. Baroni. 1988. *How to identify mushrooms to genus VI: Modern Genera*. Mad River Press, California, USA.
- Lima, A. D. L., R. Costa Flores, M. R. C. Garbi-Novaes, and S. Percário. 2012. Poisonous mushrooms; a review of the most common intoxications. *Nutrición Hospitalaria* 27 (2): 402-408. DOI: 10.1590/S0212-16112012000200009.
- Lloyd, G. T. 2016. Estimating morphological diversity and tempo with discrete character-taxon matrices: implementation, challenges, progress, and future directions. *Biological Journal of the Linnean Society* 118(1): 131-151. DOI: 10.1111/bij.12746.
- Luo, H., H. E. Hallen-Adams, J. S. Scott-Craig, and J. D. Walton. 2010. Colocalization of amanitin and candidate toxin-processing prolyl oligo peptidase in *Amanita* Basidiocarps. *Eukaryotic Cell* 9 (12): 1891-1900. DOI: 10.1128/EC.00161-10.
- Mariaca-Méndez R., L. Del C. Silva-Pérez, and C. A. Castaños-Montes. 2001. Proceso de recolección y comercialización de hongos comestibles silvestres en el Valle de Toluca, México. *Ciencia Ergo Sum* 8(1): 30-40. Available at: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10402004>. Accessed on December 7, 2017.
- Montoya, A., O. Hernández-Totomoch, A. Estrada-Torres, A. Kong, and J. Caballero. 2003. Traditional knowledge about mushrooms in a Nahua community in the state of Tlaxcala, Mexico. *Mycologia* 95: 793-806. DOI: 10.1080/15572536.2004.11833038.
- Montoya, A., A. Kong, R. Garibay-Orijel, C. Méndez-Espinoza, R. E. Tulloss, and A. Estrada-Torres. 2014. Availability of wild edible fungi in La Malinche National Park, México. *Journal of Mycology* ID 241806. DOI: 10.1155/2014/241806.
- Odenthal, K. P., R. Seeger, R. Braatz, E. Petzinger, H. Moshaf, and C. Schmitz-Drager. 1982. Damage in vitro to various organs and tissues by rubescensylsins from the edible mushroom *Amanita rubescens*. *Toxicon* 20(4): 765-781. DOI: 10.1016/0041-0101(82)90124-6.
- Parnmen, S., S. Sikaphan, S. Leudang, T. Boonpratuang, A. Rangsiruji, and K. Naksuwankul. 2016. Molecular identification of poisonous mushrooms using nuclear ITS regions and peptide toxins: a retrospective study on fatal cases in Thailand. *Journal of Toxicology Science* 41(1): 65-76. DOI: 10.2131/jts.41.65.
- Rodríguez-Muñoz, G., E. Zapata-Martelo, M. N. Rodríguez, V. Vázquez-García, B. Martínez-Corona, and I. Vizcarra-Bordi. 2012. Saberes tradicionales, acceso, uso y transformación de hongos silvestres comestibles en Santa Catarina del Monte, Estado de México. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo* 9(2): 191-207. Romero-Bautista, L. 2007. La sistemática: Base del conocimiento de la biodiversidad. In *Avances en la Taxonomía y sistemática de los hongos: Una revisión general*, edited by Contreras Ramos, A., C. Cuevas Cardona, I. Goyenechea, and U. Iturbe, pp. 67-74. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo Press, Mineral de la Reforma, Hidalgo, MEX.



- Ruan-Soto, F. 2018. Sociodemographic differences in the cultural significance of edible and toxic mushrooms among Tsotsil towns in the highlands of Chiapas, Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 14: 32. DOI: 10.1186/s13002-018-0232-9
- Segeer, R., and B. Wachter. 1980. Rubescenslysin and phallolysin release marker molecules from phospholipids cholesterol liposomes. *Acta Biochemistry and Biophysics* 645(1): 59-62.
- Tullos, R. R., and J. E. Lindgreen. 1994. *Amanita novinupta*-  $\alpha$  rubescent, with the specie from the western United-States and Southwestern Canada. *Mycotaxon* 51: 179-190.
- Walton, J. D., D. G. Panaccione, and H. E. Hallen. 2004. Peptide Synthesis without Ribosomes. In *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture and Medicine*, edited by Tkacz, J., and L. Lange, pp. 127-162. Kluwer Academic, New York, USA.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, edited by Innis, M.A., D.H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J White, pp. 315-322. Academic Press, New York, USA.
-

# **CAPÍTULO 3: PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE *AMANITA RUBESCENS* COMPLEX: *AMANITA RUBOSPOREASPERA* A NEW SPECIES FROM MEXICO**

Hernández-Rico, G. Nallely<sup>1</sup>, Garibay-Orijel, Roberto<sup>2</sup>, Romero-Bautista, Leticia<sup>3</sup>, Gaytán-Oyarzún, Juan Carlos<sup>1</sup>, and Pablo Octavio Aguilar<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Genética, Centro de Investigaciones Biológicas, UAEH.

<sup>2</sup> Laboratorio de Sistemática y Ecología de Micorrizas, Instituto de Biología, UNAM.

<sup>3</sup> Laboratorio de Micología, Centro de Investigaciones Biológicas, UAEH.

\*Correspondence Author: pablo\_aguilar9900@uaeh.edu.mx

## **3.1 ABSTRACT**

Anatomical and morphological descriptions of Eurasian fungi have been used to identify American taxa. However, in most ectomycorrhizal species, molecular tools show a paraphyletic origin of cosmopolitan species. The aim of this work was to contrast the phylogenetic origin of *Amanita rubescens* complex in central Mexico respect accessions from Europe, America and Asia. 56 sequences of the ITS regions, from America, Asia and Europe, were used in a phylogenetic Bayesian analysis. Our results suggest a monophyletic intercontinental origin but with a strong biogeographic component with higher divergences between American taxa respect European and Asiatic accessions identified as *Amanita rubescens*. Two independent Mexican subgroups, close to *A. brunneolocularis* from Colombia were identified. Both are strongly influenced by habitat disjunctions and geographic isolation in central Mexico. However, exist some reports in the same region, that identified similarities of singular reports with Northamerican accessions. The American fungi, particularly the Central Mexican taxa, could be considered as an Independent and cryptic entity within the complex. Based on its morphological and anatomical variation we propose a new species named *Amanita rubosporeaspera* considering the reddish-brown color of the pileus and its rough spores.

**Keywords:** *Amanita*, edible fungi, monophyletic intercontinental origin, cryptic species, *Amanita rubosporeaspera*.

### 3.2 INTRODUCTION

The speciation of several fungi has been associated with high levels of genetic diversity and posterior differentiation, but with a unique ancestral origin for many geographically isolated species (Vilgalys and Lin-Sun, 1994). However, wrong assignation is common, because some taxonomic studies are based on macro and micromorphological data, with partial descriptions of incomplete individuals (Morales et al., 1999; Davison, 2011). Currently, the combined use of molecular tools and morphological approaches distinguish several confused or hidden species in synonyms or incorrect assignments, even in the description of new taxa (Nguyen et al., 2013).

The genus *Amanita* is a monophyletic group with a wide distribution. Traditional taxonomy divides the genus into two subgenera: 1) *Amanita* Pers., with inamyloid basidiospores and 2) *Lepidella* Corner and Bas., with amyloid basidiospores (Kim et al., 2013). *Amanita* includes edible and poisonous mushrooms with mycorrhizal habit. Although there are many morphological and molecular studies, the taxonomy of species complexes remains unresolved (Villanueva et al., 2006; Moreno et al., 2008).

In particular, the *Amanita rubescens* complex (Tullos, 2016) presents inconsistent species assignment of geographically isolated species in the same taxa. Another reason of similarity could be the dispersion strategies of fungi by association with external hosts, that facilitate the colonization events on distant sites provided that there are optimal environmental conditions or similar to those of their origin, which allow them to prosper (Geml et al., 2008; Hughes et al., 2013).

*A. rubescens* was originally described on Europe and count with reports from Asia, Africa and North America, from both coasts, and some reports from North of Mexico, and some distant accessions from southern Mexico on Chiapas and Oaxaca. Given this distribution, it is possible to find morphological similitude but with different genetic basis (Pérez and Herrera, 1991; Sánchez et al., 1991; Montoya et al., 2004; Zamora et al., 2013; Tulloss, 2015).

Several phylogenetic studies within the genus in the world, have been conducted with the ITS region of the ribosomal RNA gene (Sánchez, 2011), but in Mexico most of the jobs have been focused on morphological characteristics (Varela and Cifuentes, 1979; Herrera et al, 2002; Rodríguez et al., 2010; Pérez et al., 2011; Cordova et al., 2014) or ethnomycological approaches (Mariaca et al., 2001; Jarvis et al., 2004; Moreno et al., 2004; Villanueva et al., 2006; Estrada et al., 2009; Lara et al., 2013).

Feregrino et al found considerable genetic variation in the *Amanita caesarea* complex in the center of Mexico. However, they identified all the samples as *A. rubescens* (Feregrino et al., 2013). Tullos (2015) reported integrated results of molecular, taxonomical and biogeographic studies and proposed a subspecies in Valideae section. All this variation on nomenclature, focus on necessity of stronger and robust systematic studies with more molecular markers that include the major possible variation in the more extensive geographical distribution (Tullos and Rodríguez, 2011). The aim of this work was to elucidate the genetic diversity of the *Amanita rubescens* complex in Mexico and make preliminary phylogenetic inferences.

### **3.3 MATERIALS AND METHODS**

22 sporomes from Hidalgo and Mexico State were analyzed, all of them morphologically identified as *A. rubescens*. We included in the analysis 20 *A. rubescens* accessions from Europe, Asia and North America. We considered 14 *Amanita* external species: *A. brunnescens*, *A. brunneocularis*, *A. flavipes*, *A. flavoconia*, *A. flavorubescens*, *A. franchetii*, *A. frutillaria*, *A. morrisii*, *A. novinupta*, *A. orsonii*, *A. porphyria* and *A. spissa*; all of them previously considered in the *A. rubescens* complex (Table 3.1)

**Table 3.1** List of collections used, with origin and GenBank accession numbers.

Species		GenBank accession no.
Specimen voucher	Country	ITS
<i>A. rubescens</i>	Canada	KJ638284
	Canada	JN020972
	USA	EU819464
	USA	JF313654
	Brazil	KF248918
	Italia	JF907760
	Netherlands	KU973872
	Poland	KM409441
	Denmark	AJ889922
	Denmark	AM087243
	Germany	EU346872
	Russia	JF313653
	Russia	JF313651
	Japan	AB015682
	Korea	KU139514
	Korea	KP004965
	Korea	AF085484
	Korea	KU139515
	Korea	KT779089
	Korea	KF245919
<i>A. brunnescens</i>	Canada	KJ638286
<i>A. brunneolocularis</i>	Colombia	FJ890032
	Colombia	FJ890033
<i>A. flavipes</i>	Korea	KT894854
	Japan	AB015696
	China	AY436455
<i>A. flavoconia</i>	Canada	KJ638283
	USA	EU819463
<i>A. flavorubescens</i>	USA	JF313650
	USA	GQ166902
<i>A. franchetii</i>	USA	DQ822790
<i>A. frutillaria</i>	China	AY436457
<i>A. morrisii</i>	USA	KR919762
<i>A. novinupta</i>	USA	DQ974690
<i>A. orsonii</i>	India	KX270327
	Pakistan	KU248132
	Pakistan	KU248133
<i>A. porphyria</i>	Canada	EU597069
<i>A. spissa</i>	Korea	KF245910
	Sweden	EF493271

### 3.3.1 Molecular Analysis

DNA extraction was performed from dry fruit bodies with XNAP kit (Sigma Aldrich). Approximate 2 mm<sup>2</sup> of hymenium was put on a microtube with 20 µl of extraction solution and heated to 65°C by 10 min and after to 95°C by 10 min on a thermocycler (Bio-Rad

T100). 20 µl of dilution solution were added and incubated at room temperature (Garibay-Orijel et al., 2013). For samples from Hidalgo an organic extraction was carried out. A small portion of the pileus (context and gills) was taken and placed in 1.5 µl tubes that were submerged in liquid nitrogen until to frozen, then were macerated with microbiological seeding handles inside the tube and were suspended in 800 µl of 2x CTAB to place them later in a water bath at 65 °C, inverting the tubes every 20 minutes for one hour. Subsequently, 600 µl of chloroform: isoamyl alcohol (24:1) were added by mixing in vortex for 30 sec and centrifuged for 10 min at 13,000 rpm. The supernatant was then taken (500 to 800 µl) and placed in a new tube. 0.6 X cold volume of isopropanol (800 µl of supernatant and 480 µl of isopropanol) was added and mixed gently for 1 min; after they were centrifuged for 10 min at 13,000 rpm. Dry pellet was cleaned with 500 µl of 70% ethanol and was centrifuged at 6,000 rpm by 5 min, the tubes were taken to a vacuum centrifuge to dry pellet. Finally, the DNA was resuspended in 60 µl dH<sub>2</sub>O and stored at -50 °C (Gardes and Bruns, 1993; Bruns, 2014).

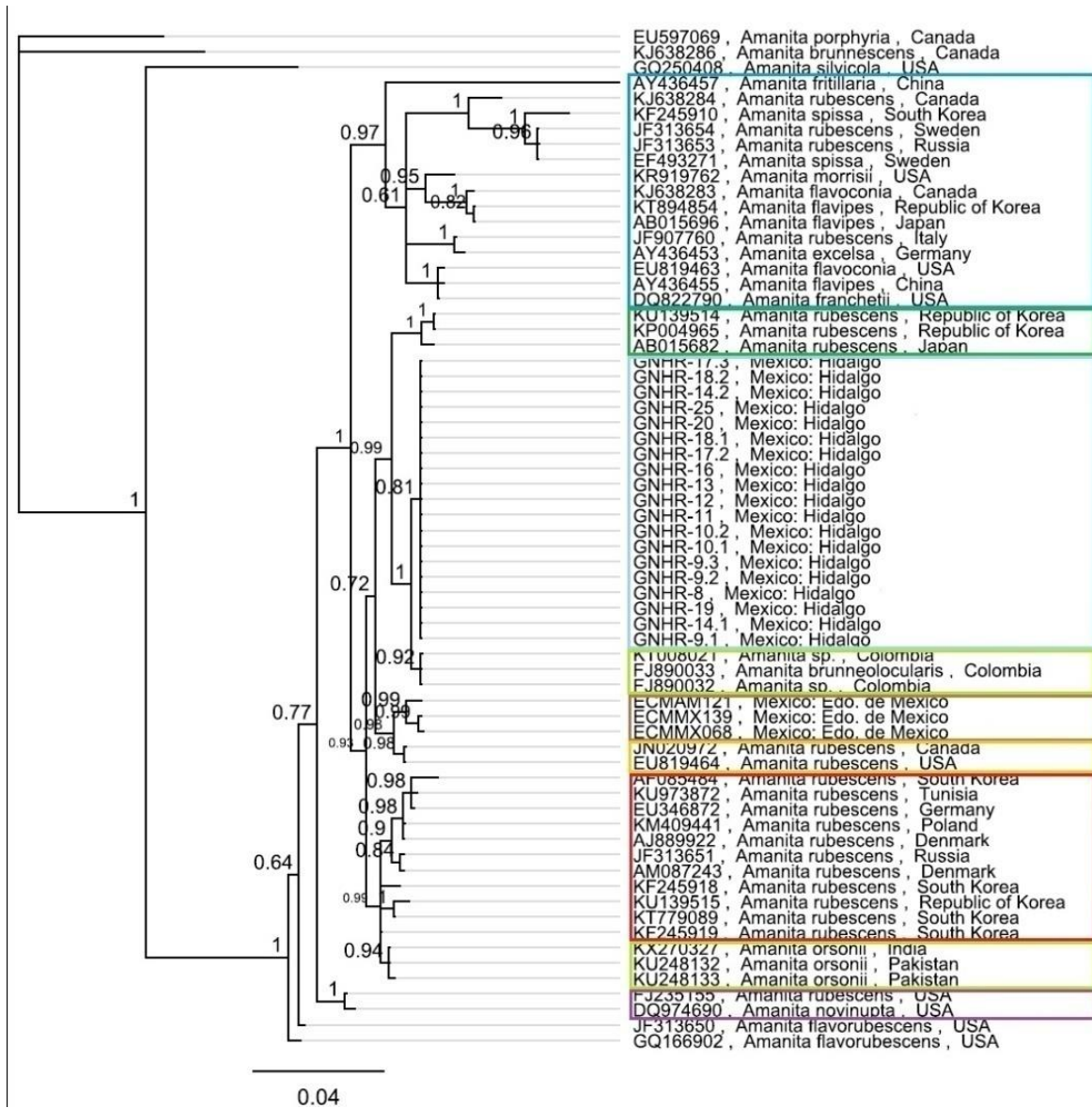
The ITS region was amplified with ITS1F and ITS4 primers (Gardes and Bruns, 1993). Thermocycler program was 94 °C by 4 min, 34 cycles at 94 °C by 1 min, 51 °C by 1 min, 72 °C by 1 min, with a final extension at 72 °C by 8 min. PCR products were checked by agarose electrophoresis at 1% on TBE. Good PCR products were cleaned by ExoSAP-IT (USB-Affimetrix) with 1 µl of sterile water, 1 µl of ExoSAP-IT and 3.5 µl of PCR product. Sequencing was made with Big Dye Terminator 3.1 chemistry (Applied Biosystems) in an ABI 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems) in both directions with PCR primers in the Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud, Instituto de Biología-UNAM.

GeneBank sequences identified as *Amanita rubescens* were obtained and aligned with MEGA7 software (Kumar et al., 2016). We made a phylogenetic bayesian analysis, based on Gamma variation with a substitution model T92 in four simultaneous Monte Carlo's chains (MCMC), considering a Metropolis resampling by 50,000,000 generations, with a depuration of the first 100,000 and an oversampled each 400,000. These analyses were made in MrBayes 3.0 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) only using over 95% of posterior probability.

### 3.4 RESULTS

Nine monophyletic clusters were formed with *A. porphyria*, *A. brunnescens*, and *A. silvicola* as external groups, all of them from North America. *A. rubescens* was a congruent group formed by accessions from Asia and Europe, but some accessions from Asia, Europe and North America were assigned to other clusters, suggesting a polyphyletic species complex with cryptic species and miss assignments. The complex includes *A. flavipes*, *A. flavoconia*, *A. franchetii*, *A. fritillaria*, *A. excelsa*, *A. morrissi*, *A. novinupta*, and *A. spissa*. *Amanita orsonii* was a sister group of *A. rubescens* from Europe, while *A. novinupta* and *A. flavorubescens* formed an external related group in the same clade.

In Latin America, three clades were formed, one from Hidalgo, sister to *A. brunneocularis* from Colombia, and one from Mexico State, related with North America and Eurasian accessions identified as *A. rubescens* (Figure 3.1). Hidalgo accessions came from three sites: Omitlán, Acaxochitlán and Pachuca market, separated by more than 50 km, but some accessions were collected from unknown sites been sold in the market. Morphological description of these samples showed a reddish-brown color of the pileus and a unique-specific trait of its basidiospores, a rough surface. Based on these attributes we propose a new species and a complete morphological description is made below.



**Figure 3.1** Phylogeny of *Amanita rubescens* complex based on ITS sequences with a bayesian model.

*Amanita rubosporeaspera* Hernández-Rico, Garibay-Orijel, Romero-Bautista, Gaytán-Oyarzun & Octavio-Aguilar.

**Holotype:** MEXICO, HIDALGO: Acaxochitlán, La Montaña Viviente (GNHR-446).  
Habitat: Pinus-Quecus forest, elevation 2237 m asl.

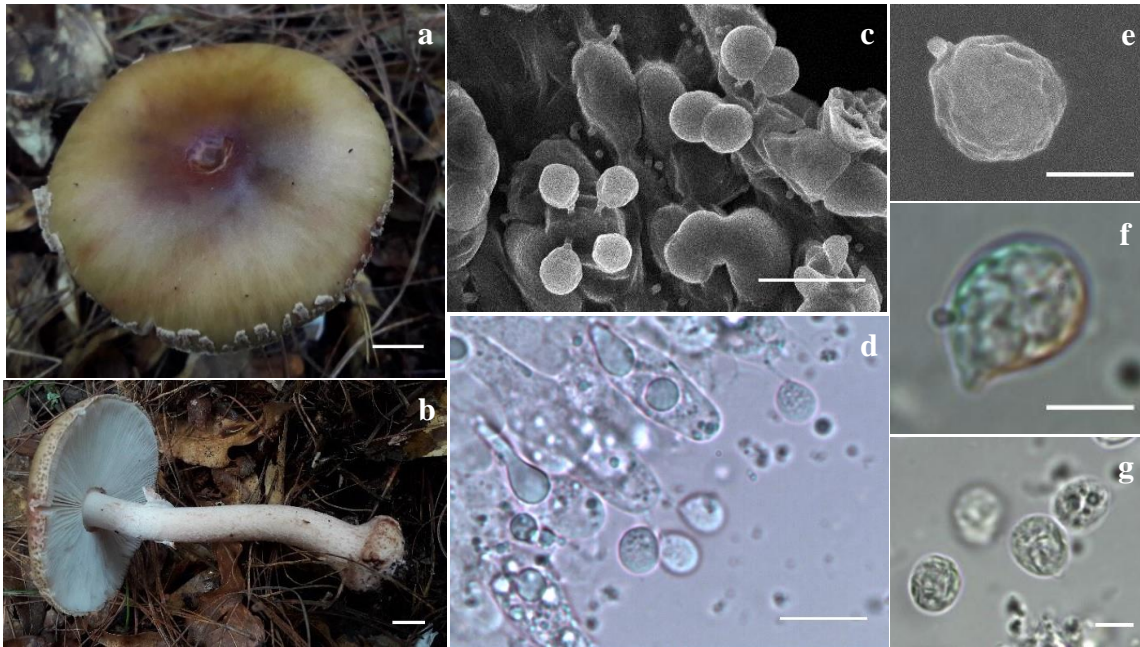


**Examined material:** May 1 market in Pachuca de Soto, June 28<sup>th</sup>, 2016, sample GNHR-429 collected in Omitlán. Miguel Hidalgo market in Pachuca de Soto, June 24<sup>th</sup>, 2016, samples GNHR-430, GNHR-431, GNHR-432, GNHR-433, GNHR-434, GNHR-435, GNHR -437, GNHR-438, GNHR-439, GNHR-441, collected in San Miguel Cerezo, Pachuca de Soto, Hidalgo (Figure 3. 2a). Assignment numbers are ID of the collection.

**Basidiome:** medium size. **Pileus:** 64 mm of diameter in adult stage, flat-convex, slightly depressed at the centre, viscose to moist surface, dark brown at the center to reddish-brown around, incurved margin; with velum rest reddish-brown patches, not striated, context of 5 mm, fleshy, cream to pink. **Gills:** free, cream colored, serrated edge, joints; uniform lamelulle at middle of the pileus. **Stipe:** 104 x 11 mm, cream to pink on contact, cylindrical to claviform; surface with reddish fibrils, reddish color to the mistreatment; **context** cream to reddish at cut; with subglobose bulb and margin. **Partial veil:** apical, membranous, pint and striated. **Odor:** not distinctive (Figure 3. 2a-b).

**Pileipellis:** Long, lax, and filamentous hyphae of 15-19  $\mu\text{m}$ ; matrix with gelatinized hyphae, arrangement type skin. **Pileus context:** interlaced and elongated hyphae with thin-walled and inflated at the end, of 5-10  $\mu\text{m}$ , between elongated and inflated in a range of 117.5-142.5 x 22.5-27.5  $\mu\text{m}$ . **Lamella trama:** bilateral, wide, interlaced, and partially gelatinized hyphae with thin wall. **Subhymenium:** Branched cell intertwined, basidia arise from inflated cells, without fibulas, with a distance from the centre of 27-38  $\mu\text{m}$  and with a distance from the stratum close to the basidia of 12-15  $\mu\text{m}$ . **Lamella edge tissue:** inflated subglobose or spherocytes cells of (12) 55 x (20) 62  $\mu\text{m}$ . **Stipe trama:** filamentous hyphae with thin and thick walls, terminated in acrofulisids ranging 82.5-250 x 15-45  $\mu\text{m}$ . **Stipe context:** hyphae arranged longitudinally; filamentous and undifferentiated of 5-10  $\mu\text{m}$  to wide, thin to slightly thickened walls, acropisalides 142.5-250 x 25-42.5  $\mu\text{m}$ . **Pilei veil:** Formed by subglobose to globose hyphae of 30-70 x 32.5-72.5  $\mu\text{m}$ , with brown walls as a whole, thin, grouped on the skin. **Partial veil:** filamentous hyphae 5-7.5  $\mu\text{m}$  to wide, gelatinized, branched, hyaline, terminal cells inflated 22.5-75 x 15-55  $\mu\text{m}$ , thin walls, light brown. **Basidia:** 24.7 - 38.7 x 7.9 - 11.1  $\mu\text{m}$ , thin wall, sterigmata 1.9 - 3.6  $\mu\text{m}$  long, nailed, 4-sterigmas. **Basidiospores:** (6.6-) 6.9 - 9.0 (-9.4) x (5.8-) 6.2 - 7.4 (-7.6)  $\mu\text{m}$ , (L = 7.8 -8.7  $\mu\text{m}$ , L'= 8.2  $\mu\text{m}$ , W = 6.2 - 7.4  $\mu\text{m}$ ; W'= 6.8  $\mu\text{m}$ , Q = 8.1 - 6.7, Q' = 7.4), hyaline, ellipsoid, amyloid, monogutulate, thin wall, smooth and large during growth when mature the surface

becomes rough with small bumps and the size is decreased; the roughness is a stable condition independent of the preparation method (Figure 3. 2 c-g).



**Figure 3.2** a-b) Mature basidiome of *Amanita rubrosporeaspera*; c) mature (left-down) and juveniles (right-up) basidiospores in its basidies; d) basidiospores in the basidies with KOH 5%; e) mature basidiospore showing the roughness, f-g) basidiospores with KOH 5% showing the roughness (scale bars: a-b = 1 cm; c-d = 10  $\mu$ m; e-g = 4  $\mu$ m).

### 3.5 DISCUSSION

The presence of *Amanita rubescens* in Mexico was considered by several years, based only in morphological descriptions (Coetzee *et al.*, 2000; Guzmán and Ramírez 2001; Chapela *et al.*, 2004; Sánchez 2011; Sánchez *et al.*, 2014; Tulloss 2015, 2016). In contrast, some *Amanita* species of sections *Caesarea*, *Vaginatae*, *Validae*, *Phalloideae* and *Amidella*; recognized by its disjunction distribution; do not showed monophyletic conditions in molecular analysis even when they were similar in anatomic and morphological comparisons, so the global distribution of these species were not recognized (Weiss *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2004). Our results support the Mexican divergence, consistent with a biogeographic isolation in central Mexico, like the propose of Feregrino *et al.* (2013). In our study we identified a clear relationship with the Colombian *A. brunneolocularis*, that suggest a tropical divergence, possible associated with natural selection processes.

However, a robust assignment of mixed accessions from Europe, Asia and North America collections in a single clade identified as *A. rubescens*, suggest a global distribution or a polytomial grouping without real relationship. For example, *Laccaria amethystina* (Vincenot *et al.*, 2012), *A. phalloides* (Pringle *et al.*, 2009) and *A. muscaria* (Geml *et al.*, 2005, 2008); have a disjunctive and global distribution but mixed with related species in the same distribution. Such amplitude responds to the broad radiation capacity due to its spore dispersion by wind and mycorrhizal associations of cosmopolitan hosts (Kennedy *et al.*, 2011). However, the mixture of some *A. rubescens* accessions, suggesting a misidentification and possible cryptic species related with *A. flavipes*, *A. flavoconia*, *A. franchetii*, *A. fritillaria*, *A. excelsa*, *A. morrissi*, *A. novinupta*, and *A. spissa*. More strict systematic analysis based on several nuclear and mitochondrial sequences is required to clarify the taxonomic complex and the possible description of new cryptic species.

According to a parsimony analysis proposed by Drehmely *et al.* (1999), *A. rubescens* is a sister group of *A. flavoconia* and *A. flavorubescens* and formed an unresolved clade with *A. franchetii*. Our results show relation with *A. flavorubescens* and *A. novinupta* as external clades of the new *A. rubosporeaspera*; *A. brunneolocularis*, *A. orsonii*, *A. rubescens*, and *Amanita* sp from Mexico State, increasing the number of subclades unresolved in the phylogeny, but generating an integrate complex of American species.

### **3.6 ACKNOWLEDGEMENTS**

To CONACYT by grant to H-R GN. To the Laboratory of Sistematic and Ecologic of Mycorrhize, from the Instituto de Biología-UNAM. To Dr. Tulloss RE by several suggestion about methods and results interpretation.

### **3.7 REFERENCES**

Bruns TD. 2014. Molecular Protocols for Ectomycorrhizal Fungi (version 7).

Chapela IH, Garbelotto M. 2004. Phylogeography and evolution in matsutake allies inferred by analyses of ITS sequences and AFLPs. *Mycologia*. 96: 730-741. DOI: 10.2307/3762107.

- Coetzee MP, Wingfield BD, Harrington TC, Dalevi D, Coutinho TA, Wingfield MJ. 2000. Geographical diversity of *Armillaria melleas* s. based on phylogenetic analysis. *Mycologia*. 92: 105-113. DOI: 10.2307/3761454
- Córdova CO, Medel R, Mata G, Castillo R, Vázquez RJ. 2014. Evaluación de hongos ectomicorrícicos del grupo de los basidiomicetos en la zona del Cofre de Perote, Veracruz. *INECOL. Maderas y Bosques*. 20:97-106. ISSN 1405-0471.
- Davison EM. 2011. *Amanita ochroterrea* and *Amanita brunneiphylla* (Basidiomycota), one species or two? *Nuytsia*. 21:177-184. ISSN 2200-2790.
- Drehmel D, Molcalvo JM, Vilgalys R. 1999. Molecular phylogeny of *Amanita* based on Large-Subunit Ribosomal DNA sequences: Implications for taxonomy and character evolution. *Mycologia* 91(4): 610-618. DOI: 10.2307/3761246
- Estrada ME, Guzmán G, Tovar DC, Ortega PR. 2009. Contribución al conocimiento etnomicológico de los hongos comestibles silvestres de mercados regionales y comunales de la sierra nevada (México). *Interciencia*. 34:25-33. ISSN 0378-1844.
- Feregrino FCA, Morales GMR, Martínez GM, Monsalvo RA, Campos CJE. 2013. Descripción molecular de hongos macromicetos del género *Amanita* de Villa del Carbón, México, empleando la región LSU rDNA. *Facultad de Ciencia y Tecnología*. 12:86-94. ISSN-e 1665-692X.
- Gardes M, Bruns TD. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*. 2: 113-118. DOI: 10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x.
- Garibay-Orijel R, Morales-Marañón E, Domínguez-Gutiérrez M. Flores-García A. 2013. Caracterización morfológica y genética de las ectomicorrizas formadas entre *Pinus montezumae* y los hongos presentes en los bancos de esporas en la Faja Volcánica Transmexicana. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84: 153-169. DOI: 10.7550/rmb.29839
- Geml J, Laursen GA, O'Neill K, Nusbaum HC, Taylor DL. 2005. Beringian origins and cryptic speciation events in the fly agaric (*Amanita muscaria*). *Molecular Ecology* 15(1): 225-239. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2005.02799.x
- Geml J, Tulloss RE, Laursen GA, Sazanova NA, Taylor DL. 2008. Evidence for strong inter- and intracontinental phylogeographic structure in *Amanita muscaria*, a wind-

- dispersed ectomycorrhizal basidiomycete. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 48:694–701. DOI: 10.1016/j.ympev.2008.04.029.
- Guzmán G, Ramírez GF. 2001. The *Amanita caesarea*-complex. J. Cramer. Berlín, Alemania. p. 66. ISBN 978-3-443-59089-5.
- Herrera FMJ, Guzmán DL, Rodríguez O. 2002. Contribución al conocimiento de la micobiota de la región de San Sebastián del Oeste, Jalisco, México. *Acta Botánica Mexicana*. 58:19-50. ISSN 0187-7151.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*. 17: 754–755. DOI: 10.1093/ Bioinformatics/17.8.754.
- Hughes KW, Petersen RH, Logde DJ, Gergemann SE, Baumgarther K, Tulloss RE, Lickey E, Cifuentes J. 2013. Evolutionary consequences of putative intra and interspecific hybridization in agaric fungi. *Mycologia*. 105: 1577–1594. DOI: 10.3852/13-041.
- Jarvis MC, Miller AM, Sheahan J, Ploetz K, Ploetz J, Watson RR, Palma RM, Pascario VCA, García AJ, López RA, Orr B. 2004. Edible wild mushrooms of the Cofre de Perote region, Veracruz, México: an ethnomycological study of common names and uses. *Economic Botany*. 58: S111–S115. ISSN 1874-9364.
- Mycologia*.102: 675-688. DOI: 10.3852/09-191.
- Kennedy PG, Garibay-Orijel R, Higgins LM, Angeles-Arguiz R. 2011. Ectomycorrhizal fungi in Mexican *Alnus* forest support the host co-migration hypothesis and continental-scale patterns in phylogeographic. *Mycorrhiza* 21(6): 559-568. DOI: 10.1007/s00572-011-0366-2
- Kim CS, Won JJ, Kwag YN, Kim JH, Shrestha B, Sung GH, Han SK. 2013. Taxonomic study of *Amanita* subgenus *Lepidella* and three unrecorded *Amanita* species in Korea. *Mycobiology* 41: 183-190. DOI: 10.5941/MYCO.2013.41.4.183.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33(7): 1870-1874. DOI:10.1093/molbev/msw054
- Lara VF, Romero CAT, Burrola AC. 2013. Conocimiento tradicional sobre los hongos silvestres en la comunidad otomí de San Pedro Arriba; Temoaya, Estado de México. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*. 10: 305-333. ISSN 1870-5472.

- Mariaca MR, Silva PLC, Castaños MCA. 2001. Proceso de recolección y comercialización de hongos comestibles silvestres en el Valle de Toluca, México. Universidad Autónoma del Estado de México. Ciencia Ergo Sum. 8:30-40. ISSN 1405-0269
- Montoya A, Kong A, Estrada TA, Cifuentes J, Caballero J. 2004. Useful wild fungi of La Malinche National Park, Mexico. Fungal Diversity. 17: 115-143. ISSN 1560-2745
- Morales TE, Villegas M, Cifuentes J, Tulloss RE. 1999. Revisión of *Amanita alexandri* and ITS similarity to *Amanita polypyramis*. Mycotaxon. 73:477-491.
- Moreno FA, Aguirre AE, Pérez RL. 2004. Conocimiento tradicional y científico de los hongos en el estado de Chihuahua, México. Etnobiología. 4: 89-105. ISSN 1665-2703.
- Moreno G, Platas G, Peláez F, Bernedo M, Vargas A, Daza A, Santamaría C, Camacho M, Romero OLM, Manjón JL. 2008. Molecular phylogenetic analysis shows that *Amanita ponderosa* and *A. curtipes* are distinct species. Mycological Progress. 7:41-47. DOI: 10.1007/s11557-007-0551-z
- Nguyen NH, Landeros F, Garibay-Origel R, Hansen K, Vellinga EC. 2013. The *Helvella lacunosa* species complex in western North America: cryptic species, misapplied names and parasites. Mycologia. 105(5): 1275-1286. DOI: 10.3852/12-391
- Pérez SE, Herrera ST. 1991. Iconografía de macromicetos de México: I Amanita. Instituto de Biología. UNAM. p.104. ISBN 968-36-1634-8
- Pérez SE, Herrera T, Ocampo LA. 2011. Nuevos registros de macromicetos para el municipio de Temascaltepec, Estado de México. Revista Mexicana de Micología. 34: 23-30. ISSN 0187-3180
- Pringle A, Adams RI, Cross HB, Brunds TD. 2009. The ectomycorrhizal fungus *Amanita phalloides* was introduced and is expanding its range on the west coast of North America. Molecular Ecology. 18 (5): 817-833. DOI: 0.1111/j.1365-294X.2008.04030.x
- Rodríguez O, Herrera FM, Sánchez JMR, Álvarez I, Valenzuela R, García J, Guzmán DL. 2010. Catálogo de la micobiota del bosque La Primavera, Jalisco. Revista Mexicana de Micología. 32: 29-40. ISSN 0187-3180
- Sánchez RJA, Rodríguez JA, García PO, Terrón AA, Llamas FB, Arrojo ME, Pérez JT. 1991. El Género *Amanita* Pers., ex Hooker en la Provincia de León. Acta Botánica Malacitana. 16:123-132. ISSN 0210-9506

- Sánchez RS. 2011. Sistemática molecular de las especies de *Amanita* sección *Caesareae*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas (sistemática). Posgrado en Ciencias Biológicas. Instituto de Ecología. UNAM. pp. 80.
- Sánchez RS, Tulloss RE, Amalfi M, Moncalvo JM. 2014. Palaeotropical origins, boreotropical distribution and increased rates of diversification in a clade of edible ectomycorrhizal mushrooms (*Amanita* section *Caesareae*). *Journal of Biogeography*. 1-13. DOI: 10.1111/jbi.12402
- Tulloss RE, Rodríguez CC. 2011. *Amanita* Workshop. 6<sup>th</sup>. Ed. Cook College Rutgers University. NJ 08555-0057
- Tulloss RE. 2015. *Studies in the Amanitaceae*. In: Tulloss RE, Yang ZL, editors. *Amanitaceae* studies. [<http://www.amanitaceae.org?home>]. Accessed February 2, 2015.
- Tulloss RE. 2016. *Amanita rubescens*. In: Tulloss RE, Yang ZL, editors. *Amanitaceae* estudios. [<http://www.amanitaceae.org?Amanita+rubescens>]. Accessed March 2016.
- Varela L, Cifuentes J. 1979. Distribución de algunos macromicetos en el norte del estado de Hidalgo. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 13: 75-88. ISSN 0085-6223
- Vilgalys R, Lin-Sun B. 1994. Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. *Proceedings of National Academic of Science USA*. 91: 4599-4603. PMID: PMC43833
- Villanueva JE, Villegas RM, Cifuentes BJ, León AH. 2006. Diversidad del género *Amanita* en dos áreas con diferente condición silvícola en Ixtlán de Juárez, Oaxaca, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 77: 17-22. ISSN 1870-3453
- Vincenot L, Nara K, Sthultz C, Labbe J, Dubois MP, Tedersoo L, Martin F, Selosse MA. 2012. Extensive gene flow over Europe and possible speciation over Eurasia in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina* complex. *Molecular Ecology*. 21(2): 281-299. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2011.05392.x
- Weiss M, Zhu-Liang Y, Oberwinkler F. 1998. Molecular phylogenetic studies in the genus *Amanita*. *Canadian Journal of Botany*. 76(7): 1170-1179. DOI: 10.1139/b98-129
- Zamora MMC, González HA, Islas GF, Corté BEN, López VLI. 2013. Distribución geográfica y ecológica de 13 especies de hongos silvestres en Oaxaca. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*. 5: 76-93. ISSN 2007-1132

Zhang LF, Yang JB, Yang ZL. 2004. Molecular phylogeny of eastern Asian species of *Amanita* (Agaricales, Basidiomycota): taxonomic and biogeographic implications. *Fungal Diversity*. 17: 219-238. ISSN: 1560-2745



## CAPÍTULO 4: APROXIMACIÓN TOXICOLÓGICA DEL COMPLEJO *AMANITA RUBESCENS* EN HIDALGO, MÉXICO

Hernández-Rico, G. Nallely<sup>1</sup>, Gaytán-Oyarzún, Juan Carlos<sup>1</sup>, Garibay-Orijel, Roberto<sup>2</sup> and Romero-Bautista, Leticia<sup>3</sup>, Pablo Octavio Aguilar<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Genética, Centro de Investigaciones Biológicas, UAEH.

<sup>2</sup> Laboratorio de Sistemática y Ecología de Micorrizas, Instituto de Biología, UNAM.

<sup>3</sup> Laboratorio de Micología, Centro de Investigaciones Biológicas, UAEH.

\*Correspondence Author: [pablo\\_aguilar9900@uaeh.edu.mx](mailto:pablo_aguilar9900@uaeh.edu.mx)

### 4.1 Resumen

Los hongos silvestres del género *Amanita* son ampliamente comercializados en varias regiones del mundo. Sin embargo, debido a que hay pocas diferencias macroscópicas entre especies comestibles y tóxicas, se han generado confusiones con graves consecuencias. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar si extractos del complejo *A. rubescens* procedente de Pachuca, Hidalgo, ocasionan un efecto citotóxico en células radiculares de *Vicia faba* (haba). Los resultados, con extractos crudos y cocidos de *A. rubescens* que presentaban un perfil genotóxico completo y/o parcial (presencia de genes para amatoxinas, falotoxinas y enzimas POP, precursoras de las toxinas), mostraron un efecto positivo para la inhibición de la división celular con relación al control positivo *A. aff virosa* y *A. aff verna*, con un índice mitótico de  $4.69 \pm 7.23$  % células en división. Independientemente de la forma en que se prepararon las extracciones (cruda o cocida), la reducción de la división celular fue conspicua (índice mitótico extracto crudo:  $5.08 \pm 4.82$  %; índice mitótico cocido:  $5.3 \pm 6.12$  %). En conclusión, los hongos evaluados son citotóxicos y

genotóxicos, pues disminuyeron considerablemente la actividad celular y generaron daños al genoma (micronúcleos).

**Palabras clave:** Hongos comestibles, *Vicia faba*, toxinas, Amatoxinas, *Amanita virosa*.

#### 4.2 Abstract

The wild mushrooms of *Amanita*'s genus, are widely commercialized in several regions of the world. However, as toxic and edible mushrooms have several similarities; confusions are common causing important health consequences. Therefore, the aim of this work was to evaluate whether extracts of *A. rubescens* complex from Pachuca, Hidalgo, caused toxicological damage to the root's cells of *Vicia faba* (bean). The results showed damage caused by the crude and cooked extracts of *A. rubescens s.l.* that presented a complete or partial genotoxic profile (presence of genes for amatoxins, phallotoxin and POP enzymes, precursor of the toxins) inhibiting cell division, which support by the positive controls *A. aff virosa* and *A. aff verna* (mitotic index  $4.69 \pm 7.23$  cell by slice). No matter the way in which the extractions are prepared (crude or cooked), the reduction of the cell division is conspicuous (mitotic index of crude extracts:  $5.08 \pm 4.82$ , mitotic index of cooked extracts:  $5.3 \pm 6.12$ ). In conclusion, fungi are if they are geno and citotoxic, because decreased considerably the cellular activity and generates damage to the genome (micronuclei).

**Keywords:** Edible mushrooms, *Vicia faba*, toxins, amanotoxins, *Amanita virosa*.

#### 4.3 Introducción

Los hongos silvestres son recursos no maderables de uso libre, ya que pueden utilizarse con fines alimenticios, económicos, ceremoniales, medicinales, como insecticidas, combustible entre otros. Sin embargo, en cuanto a su uso alimenticio, existen reportes de casos de

intoxicación debido a la confusión entre hongos tóxicos y comestibles, ya que muchas de sus características macroscópicas son similares (Ruiz *et al.*, 1999; Pérez-Silva y Herrera, 1991; Ruan-Soto y García-Santiago, 2013; Sailatha *et al.*, 2014). Por ello, los métodos para la discriminación entre hongos basados en la experiencia (conocimiento empírico), no son efectivos a menos que sean aplicados por conocedores versados y entrenados, preferentemente procedentes de comunidades indígenas con conocimientos ancestrales en la materia. Desafortunadamente, la mayoría del conocimiento documentado de intoxicaciones se refiere a casos en especies abundantes de alto consumo, por ejemplo, *Boletus* sp., pero que no de aquellos hongos que solo constituyen una fuente de alimento local (Muñoz Domínguez, 2007; López-Sánchez *et al.*, 2016; Ruiz-González *et al.*, 2017).

El consumo e intoxicación ocasional han generado diversos mitos y/o falsas premisas. Por ejemplo, se dice que el oscurecimiento de una moneda de plata o un ajo al ser hervido con cierto tipo de hongos es indicador de toxicidad, lo cual es falso en casos como *Cantharellus cibarius* que ennegrece monedas, pero es comestible; o por el contrario *Amanita phalloides* que no lo hace y es mortal. Otro mito es que los hongos que coagulan la leche son venenosos o si están mordisqueados por algún mamífero son comestibles (Arrillaga-Anabitarte y Laskibar-Urkiola, 2006; Ruiz-González *et al.*, 2017).

En México, los trabajos toxicológicos del género *Amanita* se han enfocado a especies peligrosas para los consumidores como *A. virosa*, *A. verna*, *A. phalloides*, *A. bisporigera* y *A. muscaria*; esta última es la que cuenta con más reportes de micetismos, diagnosticados por los síntomas después de la ingesta (entre 30 minutos a cuatro horas). Suelen ser intoxicaciones leves, aunque, cuando superan las 12 o 15 horas, se consideran graves (Ruan-Soto y García-Santiago, 2013; Piqueras-Carrasco, 2014). Los estudios

toxicológicos en el género son importantes, pues entre sus metabolitos se encuentran las amatoxinas y falotoxinas (Wieland, 1986; Bresinsky y Besl, 1990), dos de las sustancias más tóxicas reportadas en hongos. No obstante, algunas especies del género son consideradas comestibles; por ejemplo, *Amanita rubescens*, comercializada en México y Europa a pesar de que se han reportado intoxicaciones hemolíticas ocasionales cuando es consumida cruda o poco cocinada (Arrillaga-Anabitarte y Laskibar-Urkiola, 2006; Tulloss y Rodríguez-Caycedo, 2011; Piqueras-Carrasco, 2014, Montoya *et al.*, 2014). En el Estado de Hidalgo, del 2007 a 2017 se han registrado un total de 64 reportes de intoxicaciones, por lo que se sugiere a los pobladores comprar solo con quien tiene conocimiento tradicional de la recolecta de hongos. Los municipios donde se comercializan son Acaxochitlán, Huehuetla, Cuauhtepc de Hinojosa, Tulancingo, Apan, Mineral del Monte, Mineral de la Reforma y Pachuca (Criterio Hidalgo, 2017). Por otra parte, es importante mencionar que este hongo es considerado comestible, aun cuando previamente algunos individuos fueron caracterizados molecularmente con perfiles genotóxicos positivos (Hernández-Rico *et al.*, 2019). Estas observaciones justifican la necesidad de evaluar la toxicidad de los hongos destinados al consumo humano mediante el uso de bioensayos.

Un bioensayo se realiza sobre un tejido vivo, un organismo o un grupo de organismos, expuestos a un agente para determinar el efecto de sustancias fisiológicamente activas (Villamarín-Jiménez *et al.*, 2013). Su uso permite determinar la gravedad de los síntomas y la dosis activa de alguna toxina y/o contaminante bajo condiciones experimentales específicas y controladas, así como cuantificar su efecto en la variación del biomarcador a evaluar (fisiológico y/o morfológico) (Ronco *et al.*, 2004; Ramírez-Romero y Mendoza-Cantú, 2008; Sobrero, 2010). En particular, la toxicidad de extractos fúngicos

procedentes de especies comestibles ya ha sido probada con bioensayos por Nieto y colaboradores (2008), quienes estudiaron toxinas en especies comestibles como *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., y *P. pulmonarius* (Fr.) Quél., ambos inocuos sobre *Artemia salina* en concentraciones de  $< 1.000 \mu\text{g/ml}$ , aunque *Paxillus involutus* (Batsch) Fr., (considerada comestible), presentó un  $\text{CL}_{50} = 94,4 \mu\text{g/ml}$ , lo que indica toxicidad en el mismo animal.

Otros ejemplos son los estudios realizados por Vega-Villasante y colaboradores (2013) quienes probaron extractos de *Psilocybe cubensis*, que resultaron tóxicos para nauplios de *Artemia franciscana* en concentraciones de  $\text{CL}_{50}=135 \mu\text{g/ml}$ , mientras que en adultos de la misma especie, la  $\text{CL}_{50}$  fue de  $172 \mu\text{g/ml}$ . Ruiz-González y colaboradores (2017), observaron que *Amanita virosa* (venenosa), *Leucopaxillus amarus* (no comestible) y *Tylopilus violatinctus* (desconocido) produjeron el 100% de mortalidad de quistes de *Artemia franciscana*; mientras que el hongo comestible *Macrolepiota mastoidea*, produjo la inhibición en la eclosión de huevos de *A. franciscana*, aunque no provocó mortalidad en adultos.

En cuanto a otros bioensayos, las células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba* (haba) son ampliamente usadas para evaluar daños toxicológicos por ser versátiles, eficientes, de fácil manejo, mantenimiento económico y posee 12 cromosomas con buen tamaño para distinguirse a 100X. Otra ventaja es que se conoce perfectamente el tiempo que dura cada etapa de su ciclo celular, que varía entre 30 minutos a 19 horas. Además, en los meristemas apicales de su radícula hay una gran cantidad de células en división indiferenciadas, lo que facilita estudios toxicológicos, por lo que ayuda a obtener una respuesta adecuada a los macerados de los ejemplares del complejo *A. rubescens* y observar

si es que causan daños a las células (Prieto-García *et al.*, 2006, Sánchez-Zepeda *et al.*, 2019). Por todo lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la toxicidad de extractos crudos y cocidos de *Amanita rubescens s.l.* sobre células radiculares de *Vicia faba*.

#### 4.4 Material y Método

Se utilizaron seis muestras de esporomas identificados como *Amanita rubescens s.l.*, en el estado de Hidalgo, por ser ejemplares que presentaron un perfil genético asociado a la producción de toxinas (perfil genotóxico completo) en un estudio previo (Capítulo 2). Todas las muestras se adquirieron en el Mercado de Pachuca (Miguel Hidalgo), pero proceden de la localidad San Miguel Cerezo (Tabla 4.1).

**Tabla 4.1.** Zona de muestreo y tipo de vegetación donde se colectaron los ejemplares.

Municipio	Localidad	Vegetación	Comestible	Nombre común
Pachuca (mercado)	San Miguel Cerezo	Pino-Encino	Si	Pechuguita o pastelito

##### 4.4.1 Germinación

Las semillas fueron lavadas durante 1 hora en agua corriente, posteriormente fueron sumergidas en agua durante 24 horas en oscuridad. Posteriormente, las semillas remojadas se lavaron nuevamente durante 10 minutos. Se colocaron entre dos capas de algodón humedecido y se mantuvieron en oscuridad hasta que aparecieron las radículas de 2 a 3 cm de longitud (Gaytán-Oyarzún, 2006) (Figura 4.1).



**Figura 4.1** Proceso de germinación de *Vicia faba*, distribuidas sobre cama de algodón.

#### *4.4.2 Obtención de Macerados Fúngicos*

Para la preparación de los macerados se pesaron los seis ejemplares con el perfil genotóxico completo, se tomó el de menor peso (0.56 gr) y se obtuvieron las equivalencias para las demás muestras. Para los macerados cocidos el material se calentó a punto de ebullición. Para los extractos crudos, el macerado se sumergió en 0.72 ml de agua a temperatura ambiente. Ambos extractos se colocaron en microtubos de 1.5 ml de capacidad, donde se sumergieron los meristemos de haba previamente germinada.

#### *4.4.3 Tratamientos*

Los meristemos fueron expuestos durante 12 horas en condiciones de oscuridad a los macerados con seis réplicas por tratamiento (tres crudos, tres cocidos). Se utilizó como control positivo extractos de *A. aff virosa* y *A. aff verna* (seis réplicas por especie, tres cocidos y tres crudos) por poseer amatoxinas y falotoxinas (Walton, 2018). Como controles

negativos se utilizó agua salina para el tratamiento de meristemas (seis réplicas para cinco individuos, tres cocidas y tres crudas) y el extracto de un individuo (tres réplicas crudas y tres cocidas) de *A. rubescens* que resultó con una amplificación parcial de los genes relacionados con genotoxicidad.

#### 4.4.4 Análisis Citológico

A todas las raíces tratadas se les cortaron 2 mm del meristemo apical; se fijaron en etanol-ácido acético (3:1 v/v) por 15 minutos. Posteriormente se colocaron en etanol al 70% durante 15 minutos y se maceraron con ayuda de una navaja. A continuación, el tejido se hidrolizó con ácido clorhídrico 5N durante 25 minutos en movimiento continuo. Se decantó el excedente del ácido y el material se lavó tres veces con solución salina al 5%. Finalmente, se agregaron unas gotas de acetorceína dejando 15 minutos en oscuridad, se añadió ácido acético al 45%, se colocó un cubreobjetos y se disgregó el tejido por compresión (squash) para obtener una monocapa (Modificado de Gaytán-Oyarzún, 2006) (Figura 4.2).

Las preparaciones citológicas se observaron a 40X en microscopio óptico, donde se realizó el recuento de 500 células por réplica y tratamiento, cuantificando el número de células totales, células en división y etapa de la división en la que se encontraban. El índice mitótico se determinó dividiendo el número de células en división entre el número de células totales por cien, lo que se identifica como:  $IM = CM/CT * 100$ . Por otra parte, también se registraron las células interfásicas y la presencia de micronúcleos, los cuales se deben a un daño genotóxico, asociado al rompimiento de cromosomas y/o a la inactivación de centrómeros que generan una no migración a los polos celulares durante la separación



anafásica. El índice de daño inducido se determinó por la división del número de micronúcleos observados entre el número de células analizadas.



**Figura 4.2.** Células en división: a) Profase, b) Metafase, c) Anafase y d) Telofase.

Los tratamientos fueron descritos y comparados mediante un Análisis de Funciones Discriminantes Generalizado (AFDG), considerando una distribución Gamma (previa comprobación del ajuste mediante una prueba de Kolmogorov-Smirnov,  $p > 0.05$ ), y mediante una prueba de Mann-Whitney para los elementos pareados.

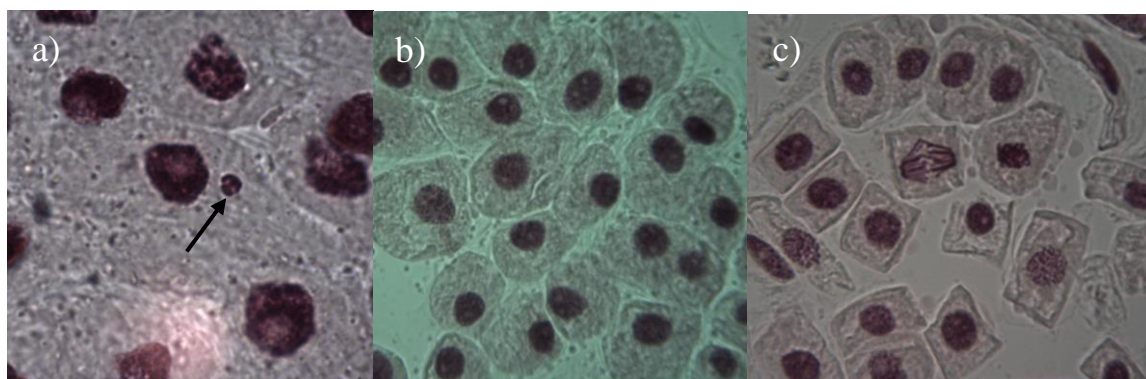
#### **4.5 Resultados**

Los extractos cocidos y crudos de *Amanita rubescens* con el perfil genotóxico completo produjeron cambios importantes en la frecuencia de división y sus fases, así como el mayor daño genotóxico (índice de micronúcleos =  $1.5 \pm 3.36$ ) con relación al resto de los tratamientos. Sin embargo, la muestra de *A. rubescens* con un perfil parcial de genes de toxicidad, así como el control positivo (*A. aff verna* y *A. aff virosa*) también inhibieron la división celular, aunque en menor medida. No se observó efecto del control negativo sobre la división celular (Tabla 4.2, Figura 4.2).

**Tabla 4.2.** Comparación de las fases mitóticas de *Vicia faba* entre los tratamientos con extractos cocidos y crudos. Controles positivos: *Amanita* aff *virosa* y *A.* aff *verna*. N: número de muestras analizadas (considerando las réplicas cocidas y crudas), se resaltan en color las anomalías en las frecuencias identificadas.

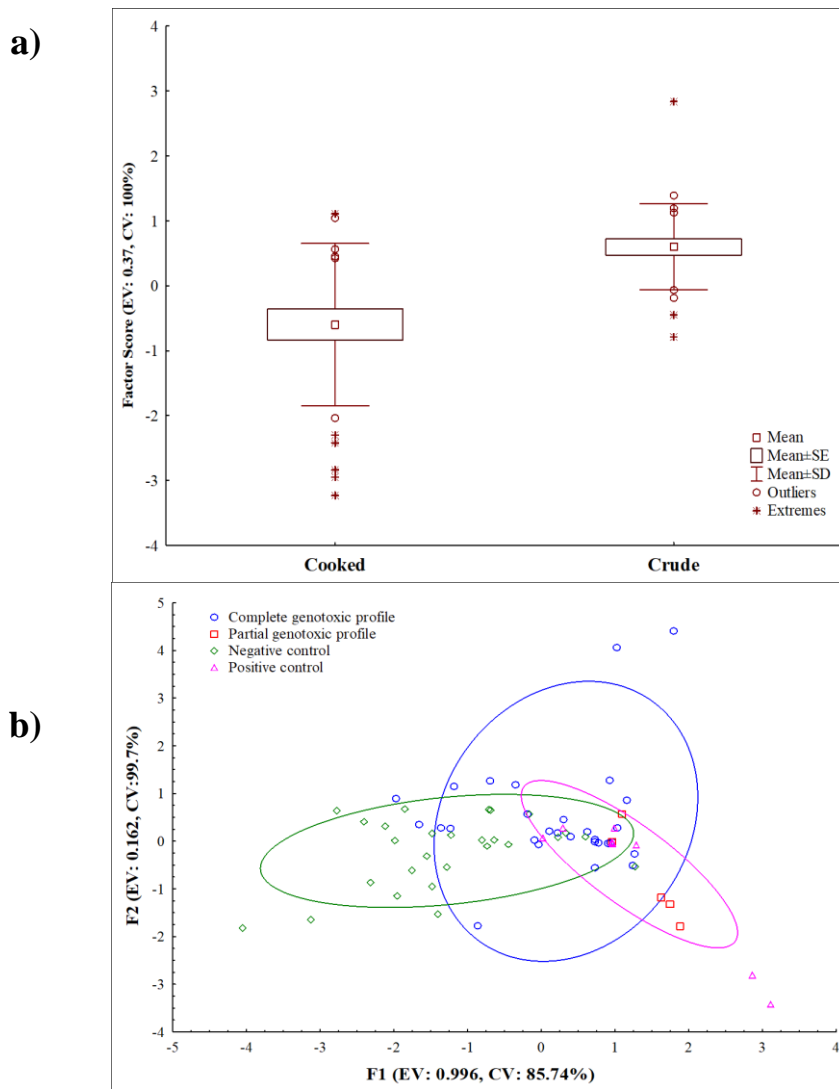
	N	Profase	Anafase	Metafase	Telofase	Micronúcleos	% D
<i>Amanita rubescens</i> perfil genotóxico completo	30	4 ± 5.18 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.33 ± 0.82 <sup>b</sup>	5.3 ± 6.12 <sup>a</sup>
<i>A. aff verna</i>	6	4.75 ± 3.67 <sup>a</sup>	0.09 ± 0.32 <sup>a</sup>	0.5 ± 1.24 <sup>a</sup>	0.25 ± 0.88 <sup>a</sup>	0.17 ± 0.38 <sup>b</sup>	4.71 ± 6.93 <sup>a</sup>
<i>A. aff virosa</i>	6	5.26 ± 2.87 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.5 ± 1.08 <sup>a</sup>	0.26 ± 0.79 <sup>a</sup>	0.18 ± 0.37 <sup>b</sup>	4.57 ± 8.17 <sup>a</sup>
<i>A. rubescens</i> perfil genotóxico parcial	6	13.94 ± 13.98 <sup>b</sup>	1.028 ± 2.03 <sup>b</sup>	2.22 ± 3.83 <sup>b</sup>	2.61 ± 4.71 <sup>b</sup>	1.5 ± 3.36 <sup>a</sup>	5.08 ± 4.82 <sup>a</sup>
Control negativo	30	28.07 ± 15.18 <sup>c</sup>	5.11 ± 4.54 <sup>c</sup>	6.05 ± 4.21 <sup>c</sup>	8 ± 4.40 <sup>c</sup>	0.07 ± 0.26 <sup>b</sup>	10.11 ± 4.80 <sup>b</sup>

%D= Índice mitótico, <sup>a</sup> y <sup>b</sup>: Prueba de Mann-Whitney p < 0.05.



**Figura 4.3.** Tratamiento de las raíces de *V. faba*. Extractos Cocidos: a) micronúcleo (*A. virosa*); Extractos Crudos: b) profase (*A. virosa*) y c) negativo donde se observan metafases y telofases.

El AFDG no mostró diferencias entre el efecto de los extractos crudos y cocidos (Figura 4.3), por lo que esta variable fue eliminada del modelo de asignación, conjuntando los tratamientos tal como se muestra en la Tabla 4.2. Sin embargo, se identificaron diferencias entre tratamientos, por lo que la variación se explica por dos factores, el primero relacionado con la ausencia de divisiones en los controles positivos y en los extractos de *A. rubescens* sin genes de toxicidad (Profase: r = -0.86, Anafase: r = -0.96, Metafase: -0.79, Telofase: -0.64, en todos los casos p < 0.05). El segundo está relacionado con el índice de micronúcleos (r = 0.48, p = 0.043; Figura 4.4).



**Figura 4.3.** a) Comparación entre los tratamientos cocidos y crudos, no se observan diferencias, b) Análisis de Funciones Discriminantes Generalizado (AFDG). EV: eigenvalor, CV: porcentaje de varianza acumulada. Los valores de correlación muestran que a la derecha hay menor cantidad de divisiones y hacia arriba una mayor cantidad de micronúcleos.

#### 4.5 Discusión

Los hongos siempre han formado parte de la dieta humana debido a su sabor, contenido de proteínas, sus efectos medicinales y hasta ceremoniales (Felice, 1992; Cheung, 2010; Grotto *et al.*, 2015). Sin embargo, resulta alarmante la frecuencia con que se presentan

micetismos por su consumo (Ruiz *et al.*, 1999, Balendres *et al.*, 2019) lo que pone de manifiesto la necesidad de más estudios con respecto a las especies comestibles que se encuentran en secciones donde hay especies tóxicas. Los resultados obtenidos revelaron que los hongos del complejo *A. rubescens*, a pesar de considerarse comestibles (Moreno-Fuentes, 2014; Montoya *et al.*, 2014; Quiñónez-Martínez *et al.*, 2014; Domínguez-Romero *et al.*, 2015) causan una disminución significativa en la división celular y un incremento en la cantidad de micronúcleos en células meristemáticas de haba, independientemente de si se cocinan o se prueban crudos. Lo más preocupante es que tanto los hongos previamente identificados como portadores de genes potencialmente tóxicos (Hernández-Rico *et al.*, 2019), como los que presentaban perfil genotóxico parcial causaron efectos negativos, un tanto menos intensos que los hongos considerados venenosos (Tabla 4.2).

Algunos autores han documentado que las toxinas en este complejo (rubescenslisina) son termolábiles, por lo que se desnaturalizan al momento de la cocción (Tulloss y Rodríguez-Caycedo, 2011; Piqueras-Carrasco, 2014). Sin embargo, la presencia de genes para amatoxinas y falotoxinas en este complejo (Hernández-Rico *et al.*, 2019), las cuales son resistentes al calor y los métodos de procesamiento de alimentos como asar, hervir, freír y cocinar al vapor (Seeger, 1980; Unluoglu y Tayfur 2003; Parmen *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2016; Brandenburg, 2017); explican por qué no se pierde toxicidad en nuestros bioensayos, por lo que se considera a estas últimas las sustancias bioactivas responsables del efecto.

Las especies tóxicas más conocidas del subgénero *Lepidella*, al que pertenece *Amanita rubescens* son: *A. phalloides*, *A. virosa*, *A. verna*, *A. smithiana*, *A. ocreata*, *A. nauseosa* y *A. bisporigera* (Tavassoli *et al.*, 2019). Sin embargo, la cantidad de toxinas que

expresan depende en gran medida de la región donde crece el hongo (Pringle *et al.*, 2009), lo que sugiere al ambiente como un factor definitorio de la toxicidad.

Cabe señalar que recientemente se han identificado y descrito toxinas como la viroidina, un péptido monocíclico propio de *A. virosa* (Tang, *et al.*, 2016), por lo que no se descarta la existencia de otras sustancias no caracterizadas que resulten responsables de la actividad detectada en nuestro bioensayo. Otra posible causa de la toxicidad es la conjugación citoplasmática de las hifas de hongos relacionados o mediada por intermediarios bacterianos (Thoma *et al.*, 2015), en cuyo caso la coexistencia de especies venenosas del subgénero *Lepidella* en las regiones de colecta de *A. rubescens* para comercio, resultaría en una posible contaminación cruzada por transferencia horizontal de las toxinas o sus genes. Finalmente, se ha mostrado que la especie comercializada en México es distinta a la *A. rubescens* procedente en Europa y Asia, por lo que este primer acercamiento permite caracterizar al hongo en cuestión en cuanto a su potencial de consumo. En conclusión, los hongos comercializados en México no corresponden a la asignación *Amanita rubescens*, tienen genes relacionados con toxicidad y producen alteraciones del ciclo celular además de daño al genoma, por lo que no se recomienda su consumo.

#### **4.6 Literatura Citada**

Arrillaga-Anabitarte, P. y X. Laskibar-Urkiola. 2006. Setas tóxicas e Intoxicaciones.

Munibe. Suplemento 22. España. Gehigarria. Pp. 151.

- Balendres, M. A. O., Karlovsky, P. y C. J. R. Cumagun. 2019. Mycotoxigenetic fungus and mycotoxins in agricultural crop commodities in the Philippines: A review. *Foods* 8: 249.
- Brandenburg, W. 2017. Mushroom poisoning. *Wilderness Environmental Medicine* 28: 368–369.
- Bresinsky, A. y H. Besl. 1990. *A Colour Atlas of Poisonous fungi*. Wolfe Publishing Ltd. 165 pp.
- Cheung, P.C.K. 2010. The nutritional and health benefits of mushrooms. *Nutritional Bulletin* 35: 292–299.
- Criterio Hidalgo. 2017. <https://criteriohidalgo.com/regiones/tulancingo/por-ingesta-de-hongos-5-personas-intoxicadas>.
- Domínguez-Romero, D., Arzaluz-Reyes, J. I., Valdés-Valdés, C. y N. P. Romero-Popoca. 2015. Uso y manejo de hongos silvestres en cinco comunidades del municipio de Ocoyoacac, Estado de México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 18: 133-143.
- Felice, S. 1992. Chemical constituents of some mushrooms. *Journal of Science Food Agriculture* 58: 499–503.
- Gaytán-Oyarzún, J. C. 2006. Evaluación ecotoxicológica del estradiol y sus metabolitos primarios liberados al ambiente, a través de la actividad ganadera. Tesis de Doctorado en Química. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

- Grotto, D., Gerenutti, M., Souza, V. y F. Barbosa. 2015. Deficiency of macro-and micronutrients induced by *Lentinula edodes*. Toxicology Report 2: 401–404.
- Hernández-Rico, G. N., Octavio-Aguilar, P., Garibay-Orijel, R. y L. Romero Bautista. 2019. Genotoxic profile and morphological variation of the *Amanita rubescens* complex: traditional knowledge for safe consumption in Mexico. Ethnobiology Letters 10(1): 76-85. DOI: 10.14237/ebl.10.1.2019.1259.
- López-Sánchez, H., Ayala-Sánchez, N., Rodríguez-Alcantar, O., Portillo-López, A., Ñíguez, M. A. y I. S. Mercado. 2016. Actividad citotóxica de extractos de hongos silvestres de Ensenada, Baja California, México. Revista Mexicana de Micología 43: 37-42.
- Montoya, A., Kong, A., Garibay-Orijel, R., Méndez-Espinoza, C., Tulloss R. E. y A. Estrada-Torres. 2014. Availability of wild edible fungi in La Malinche National Park, México. Journal of Mycology. Hindawi Publishing Corporation 1-14.
- Moreno-Fuentes, A. 2014. Un recuento alimentario de los grupos originarios y mestizos de México: Los hongos silvestres. Annals of Antropology 48(1): 241-272.
- Muñoz Domínguez, M. 2007. Evaluación de los efectos tóxicos y genotóxicos de extractos metanólicos de macromycetes, con base en estudios etnomicológicos del Estado de Hidalgo. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Nieto, R. I. J., Salama, A. M., Cataño, P. J. E. y C. A. Chegwin. 2008. Determination of *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* and *Paxillus involutus* toxicity over *Artemia salina*. Revista Iberoamericana de Micología 25(3):186-187.

- Parnmen, S., Sikaphan, S., Leudang, S., Boonpratuang, T., Rangsiruji, A. y K. Naksuwankul. 2016. Molecular identification of poisonous mushrooms using nuclear ITS region and peptide toxins: a retrospective study on fatal cases in Thailand. *The Journal of Toxicological Sciences* 41 (1): 65-76.
- Pérez-Silva, E y T. Herrera. 1991. Iconografía de Macromicetos de México. I *Amanita*. Instituto de Biología 6. UNAM. México, D. F. 133 p.
- Prieto-García, F., Lechuga-Vargas, M. De Los Á., Méndez-Marzo, M. A., Barrado-Esteban, E. y J. C. Gaytán-Oyarzún. 2006. Daños tóxicos en tejidos vegetales, producidos por aguas contaminadas con arsénico en Zimapán, Hidalgo, México. *Ciencia de Tecnología de Alimentos, Campinas*, 26: 94-97.
- Pringle, A., Adams R. I., Cross H. B. y T. D. Brunds. 2009. The ectomycorrhizal fungus *Amanita phalloides* was introduced and is expanding its range on the west coast of North America. *Molecular Ecology*. 18 (5): 817-833. DOI: 0.1111/j.1365-294X.2008.04030.x
- Piqueras-Carrasco, J. 2014. Intoxicaciones por setas, una actualización. *Revista Española de Medicina Legal* 40: 19-29.
- Quiñónez-Martínez, M., Ruan-Soto, F., Aguilar-Moreno, I. E., Garza-Ocañas, F., Lebgue-Keleng, T., Lavín-Murcio, P. A. y I. D. Enríquez-Anchondo. 2014. Knowledge and use of edible mushrooms in two municipalities of the Sierra Tarahumara, Chihuahua, Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 10: 67.
- Ramírez-Romero, P. y A. Mendoza-Cantú. 2008. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo: La experiencia en México. Secretaría de



- Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat), Instituto Nacional de Ecología. México. pp. 5-13.
- Ronco, A, Díaz-Báez, M. C. y. Pica Granados. 2004. Conceptos Generales. pp. 17-22. En: G. Castillo Morales. (ed.). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. México.
- Ruan-Soto, F. y W. García-Santiago. 2013. Uso de los hongos macroscópicos: estado actual y perspectivas. pp. 243-258. En: A. Cruz-Angón, F. Camacho Rico, E. D. Melgarejo y K. C. Nájera Cordero (Eds.). La Biodiversidad en Chiapas: Estudio de Estado. Vol. 1. CONABIO. DOI 10.13140/2.1.4439.3608.
- Ruiz, D., Tay, J., Sánchez, J. y H. Martínez. 1999. Los micetismos y su relevancia en medicina. Revista Iberoamericana de Micología 16: 121-125.
- Ruiz-González, L. E., Vázquez-Zea, J. A., Vega-Villasante, F., Guzmán-Dávalos, L. y S. R. Guerrero-Galván. 2017. Evaluación del efecto tóxico de hongos Basidiomycota en la eclosión de quistes de *Artemia franciscana*. Revista Iberoamericana de Micología 34: 220-224. DOI: 10.1016/j.riam.2017.03.007.
- Sailatha, S., Naveen, S., Naika M. y K. Anilakumar. 2014. Toxicological evaluation of *Inocybe virosa*. Proceedings of the 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP8). 467- 472.
- Sánchez-Zepeda, M. Y., López-Herrera, M., Gordillo-Martínez, A. J., Gaytán-Oyarzún, J. C., Prieto-García, F. y P. Octavio-Aguilar. 2019. Micronuclei, mitotic index and chromosomal aberrations as biomarkers of genotoxicity in haba (*Vicia faba* L.) by effect of cadmium. Avances en Ciencias e Ingeniería 10(1): 27-40.

- Seeger, R. 1980. Studies on rubescenslysin haemolysis. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 311: 95-103.
- Sobrero, M. C. 2010. Estudio de la fitotoxicidad de metales pesados y del herbicida glifosato en ambientes acuáticos. Bioensayos con plantas vasculares como organismos diagnósticos. Tesis de Doctor en Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.
- Tang, S., Zhou, Q., He, Z., Luo, T., Zhang, P., Cai, Q., Yang, Z., Chen, J. y Z. Chen. 2016. Cyclopeptide toxins of lethal amanitas: compositions, distribution and phylogenetic implication. *Toxicon* 120: 78–88.
- Tavassoli, M., Afshari, A., Letiția A. A., Mégarbane, B., Dumanov, J., Bastos P. M. M., Tsatsakis, A., Carvalho, F., Hashemzaei, M., Karimi, G. y R. Rezaee. 2019. Toxicological profile of *Amanita virosa*– A narrative review. *Toxicology Reports* 6: 143–150.
- Thoma, L., Vollmer, B. y G. Muth. 2015. Fluorescence microscopy of *Streptomyces* conjugation suggests DNA transfer at the lateral walls and reveals the spreading of the plasmid in the recipient mycelium. *Environmental Microbiology* 18(2): 598-608. DOI: 10.1111/1462-2920.13027
- Tulloss, R. E. y C. Rodríguez-Caycedo. 2011. *Amanita* Workshop. 6th. Ed. Cook College Rutgers University. pp 34.
- Unluoglu, I. y M. Tayfur. 2003. Mushroom poisoning: an analysis of the data between 1996 and 2000. *European Journal of Emergence Medicine* 10:23–26.

- Vega-Villasante, F., Ruiz-González, L. E., Guerrero-Galván, S. R. y L. Guzmán-Dávalos. 2013. Evaluación de la toxicidad de *Psilocybe cubensis* (Agaricales, Basidiomycota) sobre *Artemia franciscana* (Crustacea, Anostraca). Revista Iberoamericana de Micología 30: 54-56.
- Villamarín-Jiménez, S., Chacón-Castro, M. F. y R. Álvarez-León. 2013. Pruebas de toxicidad aguda CL (I) 50 en peces estuarinos (*Gambusia affinis*) utilizando efluentes industriales a la Bahía de Cartagena, Colombia. Biosalud 12:24-39.
- Walton, J. 2018. The Cyclic Peptide Toxins of *Amanita* and Other Poisonous Mushrooms. Springer. 253 p.
- Wieland, T. 1986. Peptides of poisonous *Amanita* mushrooms. Springer-Verlag. 1-31.

## **CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN GENERAL SOBRE EL ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN DEL COMPLEJO *AMANITA RUBESCENS* EN HIDALGO, MÉXICO**

Para coleccionar hongos comestibles se requiere conocimiento sobre la riqueza fúngica y su variación regional, de allí que cualquier criterio de reconocimiento y diferenciación entre especies comestibles y tóxicas se debe basar en la experiencia de uso, la observación cuidadosa de su aspecto físico, la época del año, así como la perfecta delimitación de la zona susceptible de colecta (Ruan-Soto *et al.*, 2009; Alvarado-Rodríguez, 2010; Hernández-Rico y Moreno-Fuentes, 2010). Sin embargo, aún con todo este acervo cultural, existen varios mitos que generan confusiones peligrosas en personas menos experimentadas; por ejemplo, el ennegrecimiento de los ajos o de algún objeto de plata al cocerlos con hongos venenosos, los cambios de color de alguna parte del esporoma al ser maltratado o cortado, señas de mordidas por algunos roedores como ardillas o conejos, etc. (Montoya *et al.*, 2007; Alvarado-Rodríguez, 2010) y muchos otros más que podrían no estar documentados. A diferencia de las personas crédulas de los mitos, las verdaderas hongueras, quienes en Hidalgo se autodenominan "Nanacateras"; se guían por los colores y formas externas para comparar los hongos comestibles contra los que conocen como tóxicos, por lo que sólo aprecian las características del hongo fresco, directamente en la región de donde proceden (Guzmán, 1999; Hernández-Rico, 2011; Jiménez-González *et al.*, 2013; Hunn *et al.*, 2015). Esto evita cualquier micetismo y permite un consumo seguro, en la mayoría de los casos.

Desafortunadamente, existen elementos ambientales que podrían modificar la sanidad en el consumo aún con todas las precauciones mencionadas. Sobre todo, porque la elección depende de experiencias previas (incluyendo el ocasional fallo fatal),

documentación general basada en especies abundantes que excluyen experiencias locales; confusiones taxonómicas y miedos arraigados sobre posibles intoxicaciones por parte de los consumidores (Ruiz-González *et al.*, 2017).

Esta situación pone de manifiesto la importancia de la identificación morfológica, basada en conocimiento tradicional, uso reiterado y regionalización, para separar aquellas especies de *Amanita* no comestibles y tóxicas. El gran problema radica en que existen muchas similitudes morfológicas en especies aisladas geográficamente, tanto que incluso se encuentran en continentes distintos, aunado a que los datos moleculares señalan que son hongos completamente distintos, de allí que la identificación de caracteres no basta como factor de separación entre lo que se puede comer o aquello que resulta peligroso.

Desde el punto de vista morfológico, se puede considerar que la clasificación del género *Amanita* inició en el siglo XVII y principios del XVIII. Persoon fue quien en 1797 nombró así a las especies con velo universal o volva, pero fue Hooker en 1821 el primero en describir al género *Amanita* (Pérez-Silva y Herrera-Suárez, 1991). Después de ellos, otros micólogos contribuyeron en la sistemática y taxonomía del grupo dividiéndolo en pequeños géneros, basándose principalmente en caracteres macroscópicos como la presencia o ausencia de un bulbo o anillo, forma de la volva, forma de las láminas y estriación en el píleo (Weiß *et al.*, 1998). Las secciones *Amanita* y *Lepidella* han tenido un tratamiento monográfico en los últimos 35 años. Lamentablemente, el centro de México y Sudamérica deben ser estudiadas detenidamente ya que es posible que se registren hongos similares a los que se encuentran en Europa, EE.UU. y en Asia; sin ser necesariamente las mismas especies, ya que no se ha explorado tan a fondo como las otras regiones; las

colecciones de estas zonas no han sido revisadas por expertos y los taxones probablemente están subestimados (Tulloss, 2005; Tulloss, 2016, Tulloss *et al.*, 2016).

En los últimos años, estudios morfológicos y moleculares (Wolfe *et al.*, 2012; Hughes *et al.*, 2013), han indicado que varios taxones originalmente descritos en el rango de forma o variedad deben ser reconocidos como especies. Sánchez-Ramírez y colaboradores (2014), refieren que la distribución geográfica de la mayoría de las especies de hongos aún es poco conocida; en consecuencia, sus orígenes y distribuciones históricas siguen estando poco estudiadas, además, los altos niveles de diversidad críptica, escasos registros fósiles y regiones submuestreadas, pueden explicar algunas de estas deficiencias. Por ejemplo, los hongos ectomicorrizógenos comestibles, *Amanita caesarea* y sus especies afines (Sección *Caesareae*), tienen un origen en el Paleoceno y el Eoceno a escala global, con una amplia dispersión en el Mioceno tardío y Plioceno, hacia áreas templadas en Europa Mediterránea, Este de Australia y América del Norte y Central. Esta dispersión obedeció a los efectos del cambio climático del Plioceno, lo que generó una gran diversidad genética de reciente divergencia y por lo tanto con poca afinidad a la segregación biogeográfica (Sánchez-Ramírez *et al.*, 2015).

No obstante, la situación actual de la taxonomía y sistemática de los hongos ha ido progresando con el tiempo, pero aún requiere cambios en la nomenclatura de las especies. Históricamente, su clasificación se basa en características morfológicas macroscópicas y microscópicas, aunque en general la gran mayoría han surgido polifiléticamente (Katoch y Kapoor, 2014). Para poder conjuntar y complementar el conocimiento, se requieren nuevos recursos para explotar al máximo los datos que fluyen de los estudios de ecología molecular de hongos, utilizando tecnologías de secuenciación, contrastes entre atributos de diferente

naturaleza y eliminación de información obsoleta o falsable. Además, es necesario clasificar un gran número de taxones no descritos y vincularlos con características fenotípicas, ecológicas y funcionales (Hibbett *et al.*, 2016), tal como se realizó en este trabajo.

Paradójicamente, el uso de las nuevas herramientas para determinar a las especies mediante la identificación automática de secuencias puede reemplazar la experiencia taxonómica introduciendo nuevas fuentes de error. Por ejemplo, las bases de datos públicas como GenBank pueden contener errores de denominación y secuencias atribuidas incorrectamente. Por este motivo, se mantienen bases de datos de secuencias evaluadas y de calidad comprobada para algunos grupos de hongos donde la identificación confiable es crítica para una comunidad científica (Watkinson, 2016).

Con tal nivel de complejidad y huecos en la información, no es de extrañar que, a nivel mundial, más del 90% de micetismos fatales se deba al consumo de hongos del género *Amanita*. Esta toxicidad se debe en principio a un par de sustancias ya identificadas denominadas amatoxinas (*AMA*) y falotoxinas (*PHA*), consideradas como una "familia" monofilética de proteínas codificadas por genes *MSDIN* (Cai *et al.*, 2014). Sin embargo, las proteínas generadas son inactivas, por lo que requieren modificaciones posteriores mediadas por eximas polifiléticas con actividad prolil-oligopeptidasas (*POP*), para iniciar la acción tóxica que consiste en la inhibición de la ARN polimerasa (Zhang *et al.*, 2005; Walton *et al.*, 2010); por lo tanto, la sola presencia de los genes *AMA* y *PHA* no hacen a una especie tóxica. Los genes *POP* se han encontrado en especies tóxicas y no tóxicas fuera del grupo, tales como *Galerina marginata*, *Conocybe apala* y *Pleurotus cystidiosus* (Luo *et al.*, 2010, 2012). A la fecha, las evidencias indicaban que la conjunción de los tres genes

(AMA, PHA y POP) no se presentaba en especies comestibles (Luo *et al.*, 2014). No obstante, los resultados mostrados en esta tesis manifiestan francas contradicciones, pues mientras algunos autores indican que no existe la presencia de las toxinas en el hongo *Amanita rubescens sensu stricto* procedente Europa y Asia (Hallen *et al.*, 2007), otras investigaciones reportaron la presencia de bajas cantidades de amatoxinas y falotoxinas en el complejo americano (Faulstich y Cochet-Meilhac 1976; Mullersman y Preston 1982; Vargas *et al.*, 2011). Lo que podría ser un indicador de que se trata de especies distintas y, sobre todo, que en América es factible encontrar hongos conformando un complejo *A. rubescens* tóxicos. Al respecto, los resultados del capítulo dos corroboran la presencia de los genes con potencial tóxico en varios individuos, mientras que el capítulo tres muestra sin lugar a duda que los hongos mexicanos son una especie distinta. Además, el capítulo cuatro muestra efectos tóxicos del clado mexicano sobre un bioensayo particular, aunque no se determinó si las sustancias responsables son falatoxinas, amatoxinas, rubescenslisinas, una combinación o alguna otra toxina propia de esta región. Otro resultado interesante es la diversidad de perfiles genotóxicos en el grupo, lo que podría ser resultado de cierta plasticidad del genoma o la transferencia horizontal de los genes NSDIM desde otras especies del subgrupo *Lepidella*, como *Amanita muscaria*; una de las especies más estudiadas en cuanto al micetismo y que coexiste en la misma región donde se realizó el estudio. Por lo tanto, se puede afirmar que los hongos consumidos en México no corresponden a la especie *A. rubescens sensu stricto*, además que tienen perfiles genotóxicos, parciales y completos, con actividad citotóxica.

Al respecto, las toxinas en el clado europeo, el aislamiento geográfico respecto a las americanas y la imposibilidad de flujo génico; son causas evolutivas que sustentan la



afirmación de que el complejo americano no pertenece al mismo grupo comestible, por lo que su toxicidad es variable y desconocida. Además, el hecho de que en algunas regiones se consumen y en otros lados la consideran toxica (Mariaca-Méndez *et al.*, 2001; Estrada-Martínez *et al.*, 2009; Hernández-Rico y Moreno-Fuentes, 2010; Montoya *et al.*, 2014) sugiere variación en la expresión o presencia de los genes mencionados, o en su defecto creencias de uso basadas en el temor a sufrir una intoxicación, lo cual tampoco suena descabellado considerando el conocimiento tradicional basado en la experiencia de las hoongueras que coincidiría con nuestros resultados. Ante esta aparente contradicción, es necesario generar información confiable sobre su ingesta y contribuir al conocimiento de los hongos silvestres comestibles para un consumo seguro (Feregrino-Feregrino *et al.*, 2013; Sánchez-Ramírez *et al.*, 2014).

Los estudios en México sobre toxinas, no se han explorado lo suficiente porque solo se enfocan a las especies consideradas peligrosas como: *A. virosa*, *A. verna*, *A. phalloides*, *A. bisporigera* y *A. muscaria*; en este ámbito, el realizar estudios en aquellas que se encuentran en secciones donde se conoce que hay especies tanto toxicas mortales como comestibles, es de suma importancia porque forman parte de una cosmovisión importante para los diferentes grupos que hacen uso de este recurso, que si bien solo lo encuentran en temporada de lluvias forma parte de su dieta y su manutención en algunos casos (Arrillaga-Anabitarte y Laskibar-Urkiola, 2006; Ruan-Soto y García-Santiago, 2013; Ruiz-González *et al.*, 2017). Por lo anterior, se deben realizar bioensayos que permitan determinar los efectos por alguna toxina y/o contaminante sobre un organismo bajo condiciones experimentales específicas, controladas y cuantificar los efectos tales como muerte, crecimiento, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos (Ronco *et*

al., 2004; Ramírez-Romero y Mendoza-Cantú, 2008; Sobrero, 2010), sin la necesidad de los registros históricos de micetismos o el riesgo que conlleva el consumo no regulado.

Además, se debe considerar que la presencia de los genes no garantiza su expresión, por lo que los resultados del capítulo 2 son complementados por el capítulo 4. Por ejemplo, Walton y colaboradores (2010), encontraron que *Conocybe apala*, presenta células especializadas considerados sitios de biosíntesis y/o de almacenamiento en donde se producen falotoxinas. En el caso de *Russula bella* y *Strobilurus ohshimae*, Nakamori y Suzuki (2007), sugieren que los cistidios contienen metabolitos tóxicos para proteger a las basidioesporas de los colémbolos, ya que evitan depredación, siendo un factor ambiental (depredación) el desencadenante de la toxicidad. Además, Luo y colaboradores (2010), realizaron un estudio para observar los sitios de mayor concentración de toxinas, por lo que analizaron las partes de contexto del basidioma (píleo y estípite), láminas, trama y velo universal. Ellos mostraron que había bajas concentraciones en todas las estructuras analizadas, por lo que aparentemente no existe un efecto intrínseco, siendo más importante el ambiente y la procedencia como factores que influyen en la expresión de los genes tóxicos.

Otros ejemplos son los estudios realizados por Vega-Villasante y colaboradores (2013) usando cuerpos fructíferos de *Psilocybe cubensis*, los cuales mostraron toxicidad para nauplios de *Artemia franciscana* en concentraciones de CL50=135 µg/ml, mientras que en adultos de CL50=172 µg/ml. Ruiz-González y colaboradores (2017), observaron que *Amanita virosa* (venenosa), *Leucopaxillus amarus* (no comestible) y *Tylopilus violatinctus* (desconocido) produjeron el 100% de mortalidad de quistes de *Artemia franciscana*; el hongo comestible *Macrolepiota mastoidea*, produjo la inhibición en la

eclosión de huevos de *A. franciscana* pero no provocó mortalidad. Por todo lo anterior, la utilización de pruebas toxicológicas ayuda a evaluar si existen variaciones intraespecíficas en la toxicidad de las especies, dado que muestran variación en cuanto a la concentración y procedencia que resultan tóxicas para el organismo de prueba, resaltando además la importancia de los bioensayos para la evaluación independiente del perfil toxicológico respecto a la variación morfológica y/o genética.

Por otro lado, la presencia de otros hongos tóxicos del mismo género que fructifican en el mismo periodo podrían ser fuentes horizontales de transmisión de la toxicidad (Gluck-Thaler y Slot, 2015), lo que explicaría variación estacional en los casos de micetismo, aunque esto último deberá ser comprobado con secuenciación tanto de la especie "comestible" como de las especies tóxicas simpátricas. Al respecto, Reynolds y colaboradores (2018), realizaron un estudio en donde sugieren que la selección ambiental puede favorecer la transferencia horizontal de genes utilizando tres especies que producen Psilocybina (*Psilocybe cyanescens*, *Gymnopilus dilepis* y *Panaeolus cyanescens*), que son de diferentes linajes. Lo anterior, sugiere que la síntesis de psilocibina puede proporcionar una ventaja al crecer en el estiércol y en los nichos fúngicos de pudrición de madera, que pueden servir como reservorios de metabolitos que alteran el comportamiento de invertebrados micófagos y maderófagos.

En lo que respecta a aspectos ecológicos, compete a las interacciones simbióticas mutualistas mediante la formación de ectomicorrizas en las raíces de plantas vasculares dentro de ecosistemas de bosques templados y boreales, la causa de variación en la toxicidad (Dahlberg, 2001; Taylor y Alexander, 2005; Smith y Read, 2008). Se sabe que *Amanita phalloides* cambia la expresión de su toxicidad respecto a la zona donde se

establece su hospedero (*Pinus strobus*), por lo que en algunas regiones puede ser letal, situación que se puede considerar plástica no adaptativa (Pringle *et al.*, 2009).

Con todo lo mostrado se puede afirmar que los hongos poseen una biología contrastante respecto a aquella que muestran plantas y animales; contrastes que se manifiestan en aspectos ecológicos, fisiológicos y moleculares (Moreno-Fuentes, 2014). Es por ello, que los estudios integradores como el presente, proporcionan información completa y complementaria, lo que constituye un estándar en la identificación, descripción y evaluación de hongos comestibles. De esta forma, es posible encontrar relaciones entre especies, incrementar el entendimiento de la historia evolutiva del grupo, ayudar a identificar su distribución, procesos de colonización y extinción, así como mejorar la visión del uso y manejo de los hongos comestibles. Por lo tanto, es importante reconocer que la taxonomía basada en caracteres morfológicos, la reconstrucción filogenética basada en secuencias de ácidos nucleicos, la identificación de asociaciones ecológicas bióticas y abióticas, así como la caracterización bioquímica y toxicológica; pueden beneficiarse de manera recíproca (Steele y Pires, 2011).

Ya sea que existan modificaciones metabólicas en la expresión de los hongos mediados por el hospedero, que exista transferencia horizontal de toxicidad desde hongos emparentados, que el ambiente pueda activar o inactivar la expresión de toxinas o que simplemente se trate de especies aún no identificadas y confundidas por su similitud morfológica; la búsqueda de otros factores que influyan en la composición química de los hongos se debe considerar dentro de los estudios futuros.

Finalmente, se desconoce si las amanitas comestibles presentan los genes asociados a la expresión de la toxicidad, variantes alélicas poco tóxicas o la existencia de rasgos

morfológicos que permitan la discriminación de genotipos tóxicos y no tóxicos (Lou *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2012; Feregrino-Feregrino *et al.*, 2013; Cai *et al.*, 2014). Por lo tanto, contar con características asociadas con toxicidad es un avance en la prevención de intoxicaciones. El identificar y proponer esas diferencias implica la creación de una clave para las especies mexicanas, por lo que el resultado del agrupamiento mostrado en el capítulo dos, abre una puerta al consumo cuidadoso de la especie recién descrita como *Amanita rubosporeaspera*. No obstante, varios hongos con ausencia del perfil genotóxico, que podrían considerarse inocuos por su color; resultaron tóxicos en los bioensayos; así que no es tan simple como decir que los hongos más claros y cremosos se pueden comer.

## 5.1 Conclusiones

- La evaluación morfológica, genética y toxicológica del complejo *Amanita rubescens*, mostró que la especie consumida en México es distinta a la descrita en Europa y Asia, además de ser potencialmente tóxica.
- La evaluación morfológica del complejo *Amanita rubescens* en México, permitió identificar un atributo (coloración rojiza del cuerpo fructífero) relacionado con el potencial tóxico del hongo.
- El análisis de las secuencias en la región intergénica simple (ITS), indican que la especie consumida en México se trata de un taxón independiente de *Amanita rubescens sensu stricto*, con esporas ligeramente rugosas lo que constituye un carácter diagnóstico. Por lo anterior, el clado mexicano se describe como una nueva especie denominada *Amanita rubosporeaspera*, en referencia al color rojizo del cuerpo fructífero (*rubo*), ya mencionado como elemento asociado con el perfil

genotóxico completo; así como a la rugosidad característica de la espora (*spore-aspera*).

- El análisis de las secuencias específicas para los genes *AMA*, *PHA* y *POP*, mostraron diferentes combinaciones en los hongos destinados al consumo, por lo que el perfil genotóxico es variable, parcial y complementario, confirmando el potencial tóxico de la especie descrita. La variación mencionada es indicador de algún proceso de transición, ya sea filogenético o mediado por transferencia horizontal de genes que aún no ha sido descrito en su totalidad. Por ello, la presencia de otras especies consideradas tóxicas en los sitios de colecta, debe ser un elemento ambiental de exclusión para el consumo.
- Todas las accesiones destinadas a consumo, independientemente del perfil genotóxico (completo o parcial), tienen un efecto inhibitorio sobre el ciclo celular de radículas de haba, por lo que no es posible separar de manera efectiva las accesiones tóxicas y no tóxicas. Cabe aclarar que la ausencia los genes *AMA*, *PHA* y *POP* sugieren que la actividad citotóxica podría estar mediada por otras toxinas no descritas aún.

## 5.2 Literatura Citada

- Alvarado-Rodríguez, R. 2010. Conocimiento micológico local y micetismo: una aproximación a la etnomicología tseltal de Kotolte', Tenejapa, Chiapas, México. Tesis de Maestría, San Cristóbal de Las Casas, El Colegio de la Frontera Sur.
- Arrillaga-Anabitarte, P. y X. Laskibar-Urkiola. 2006. Setas tóxicas e Intoxicaciones. Munibe. Suplemento 22. España. Gehigarria. Pp. 151.

- Cai, Q., Tulloss, R. E., Tang, L. P., Tolgor, B., Zhang, P., Chen, Z. H. y Z. L. Yang. 2014. Multi-locus phylogeny of lethal amanitas: Implications for species diversity and historical biogeography. *BMC Evolutionary Biology* 14: 143-158.
- Dahlberg, A. 2001. Community ecology of ectomycorrhizal fungi: an advancing interdisciplinary field. *New Phytologist* 150: 555-562.
- Estrada-Martínez, E., Guzmán, G., Cibrián, T. D. y P. R. Ortega. 2009. Contribución al conocimiento etnomicológico de los hongos silvestres comestibles en los mercados regionales y comunidades de la sierra nevada (México). *Interciencia* 34: 25–33.
- Faulstich, H. y M. Cochet-Meilhac. 1976. Amatoxins in edible mushrooms. *FEBS Letters* 64: 73–75.
- Feregrino-Feregrino, C. A., Morales-Garza, M. R., Martínez-García, M., Monsalvo-Reyes, A. y J. E. Campos-Contreras. 2013. Descripción molecular de hongos macromicetos del género *Amanita* de Villa del Carbón, México, empleando la región LSU rDNA. *Facultad de Ciencias y Tecnología*. 86-94.
- Guzmán, G. 1999. Los hongos comestibles, medicinales y sagrados en México. pp. 145-151. En: Vásquez-Dávila, M.A. (Ed). *La Etnobiología en México: Reflexiones y experiencias*. Secretaría de Educación Pública/Asociación Etnobiológica de México. Oaxaca, Oaxaca.
- Gluck-Thaler, E. y J. C. Slot. 2015. Dimensions of Horizontal Gene Transfer in Eukaryotic Microbial Pathogens. *PLoS Pathog* 11: e1005156.

- Hallen, H. E., Luo, H. Scott-Craig, J. S. y J. D. Walton. 2007. Gene family encoding the major toxins of lethal *Amanita* mushrooms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (48): 19097-19101.
- Hernández-Rico, G. N. y A. Moreno-Fuentes. 2010. Hongos comestibles del género *Amanita* en el mercado de Acaxochitlán, Hidalgo, México. *Etnobiología* 8: 31-38.
- Hernández-Rico, G. N. 2011. Taxonomía y Etnomicología del género *Amanita* Pers., en el municipio de Acaxochitlán, Hidalgo. Tesis de Maestría en Ciencias de la Conservación y Biodiversidad. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Mineral de la Reforma.
- Hibbett, D., Abarenkov, K., Kõljalg, U., Öpik, M., Chai, B., Cole, J., Wang, Q., Crous, P., Robert, V., Helgason, T., Herr, J. R., Kirk, P., Lueschow, S., O'Donnell, K., Nilsson, R. H., Oono, R., Schoch, C., Smyth, C., Walker, D. M., Porras-Alfaro, A., Taylor, J. W. y D. M. Geiser. 2016. Sequence-based classification and identification of Fungi. *Mycologia* 108: 1049-1068.
- Hughes, K. W., Petersen, R. H., Lodge, D. J., Bergemann, S. E., Baumgartner, K., Tulloss, R. E., Lickey, E. y J. Cifuentes. 2013. Evolutionary consequences of putative intra- and interspecific hybridization in agaric fungi. *Mycologia* 105: 1577-1594.
- Hunn, E. S., Venegas-Ramírez, Y. y M. A. Vásquez-Dávila. 2015. Where Do Fungi Fit? The Fungal Domain In Mixtepec Zapotec. *Journal of Ethnobiology* 35: 286–313.
- Jiménez-González, M., Romero-Bautista, L., Villavicencio-Nieto, M. A. y B. E. Pérez-Escandón. 2013. Los hongos comestibles de la región de Molango de Escamilla, Hidalgo. Pág.69-82. En: Pulido-Flores, Griselda and Monks, Scot (Ed.), *Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas*, Vol. II. México.



- Katoch, A. y P. Kapoor. 2014. Recent concepts in Fungal Taxonomy: A Review. *Journal of Agriculture and Allied Sciences* 3: 23-35.
- Lima, A. D. L., Costa Flores, R., Garbi Novaes, M. R. C. y S. Percário. 2012. Poisonous mushrooms; a review of the most common intoxications. *Nutrición Hospitalaria* 27: 402-408.
- Luo, H., Hallen-Adams, H. E., Scott-Craig, J. S. y J. D. Walton. 2010. Colocalization of Amanitin and Candidate Toxin-Processing Prolyl Oligopeptidase in *Amanita* Basidiocarps. *Eukaryotic Cell* 9: 1891-1900.
- Luo, H., Hallen-Adams, H. E., Scott-Craig, J. S. y J. D. Walton. 2012. Ribosomal Biosynthesis of  $\alpha$ -amanitin in *Galerina marginata*. *Fungal Genetics and Biology* 49: 123-129.
- Luo, H., Hong, S. Y., Sgambelluri, R. M., Angelos, E., Li, X. y J. D. Walton. 2014. Peptide macrocyclization catalyzed by a prolyl oligopeptidase involved in  $\alpha$ -amanitin biosynthesis. *Chemistry & Biology* 21: 1610–1617.
- Mariaca-Méndez, R., Silva-Pérez, L. Del C. y C. A. Castaños-Montes. 2001. Proceso de recolección y comercialización de hongos comestibles silvestres en el Valle de Toluca, México. Universidad Autónoma del Estado de México. *Ciencia Ergo Sum* 8: 30-40.
- Montoya, A., Méndez-Espinoza, C. Flores-Rivera, R. Kong, A. y A. Estrada-Torres. 2007. Hongos tóxicos de Tlaxcala. Instituto de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. México.

- Montoya, A., Kong, A., Garibay-Orijel, R., Méndez-Espinoza, C., Tulloss R. E. y A. Estrada-Torres. 2014. Availability of wild edible fungi in La Malinche National Park, México. *Journal of Mycology*. Hindawi Publishing Corporation 1-14.
- Moreno-Fuentes, A. 2014. Un recuento alimentario de los grupos originarios y mestizos de México: Los hongos silvestres. *Anales de Antropología* 48(1): 241-272.
- Mullersman, J. E. y J. F. Preston. 1982. A micro assay for phallotoxins: Quantification of phallotoxins in *Amanita* species. *Analytical Biochemistry* 119: 266–273.
- Nakamori, T. y A. Suzuki. 2007. Defensive role of cystidia against Collembola in the basidiomycetes *Russula bella* and *Strobilurus ohshimae*. *Mycological research* 111: 1345-1351.
- Pérez-Silva, E. y T. Herrera-Suárez. 1991. Iconografía de macromicetos de México: I *Amanita*. Instituto de Biología. UNAM. Pp. 104.
- Pringle, A., Adams, R. I., Cross, H. B. y T. D. Bruns. 2009. The ectomycorrhizal fungus *Amanita phalloides* was introduced and is expanding its range on the west coast of North America. *Molecular Ecology* 18: 817-833.
- Ramírez-Romero, P. y A. Mendoza-Cantú. 2008. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo: La experiencia en México. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat), Instituto Nacional de Ecología. México. pp. 5-13.
- Reynolds, H. T., Vijayakumar, V., Gluck-Thaler, E., Brynn-Korotkin, H., Brandon Matheny, P. y J. C. Slot. 2018. Horizontal gene cluster transfer increased hallucinogenic mushroom diversity. *Evolution Letters* 2: 88-101.

- Ronco, A, Díaz-Báez, M. C. y. Pica-Granados. 2004. Conceptos Generales. pp. 17-22. En: G. Castillo Morales. (ed.). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. México.
- Ruan-Soto, F., Cifuentes, J., Mariaca, R., Limón, F., Pérez-Ramírez, L. y S. Sierra. 2009. Uso y manejo de hongos silvestres en dos comunidades de la Selva Lacandona, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Micología* 29: 61-72.
- Ruan-Soto, F. y W. García-Santiago. 2013. Uso de los hongos macroscópicos: estado actual y perspectivas. pp. 243-258. En: A. Cruz-Angón, F. Camacho Rico, E. D. Melgarejo y K. C. Nájera Cordero (Eds.). *La Biodiversidad en Chiapas: Estudio de Estado*. Vol. 1. CONABIO. DOI: 10.13140/2.1.4439.3608.
- Ruiz-González, L. E., Vázquez-Zea, J. A., Vega-Villasante, F., Guzmán-Dávalos, L. y S. R. Guerrero-Galván. 2017. Evaluación del efecto tóxico de hongos Basidiomycota en la eclosión de quistes de *Artemia franciscana*. *Revista Iberoamericana de Micología* 34: 220-224.
- Sánchez-Ramírez, S., Tulloss, R. E., Amalfi, M. y J. M. Moncalvo. 2014. Palaeotropical origins, boreo-tropical distribution and increase rates of diversification in a clade of edible ectomycorrhizal mushrooms (*Amanita* section *Caesareae*). *Journal of Biogeography* 1-13.
- Sánchez-Ramírez, S., Etienne, R. S. y J. M. Moncalvo. 2015. High speciation rate at temperate latitudes explains unusual diversity gradients in a clade of ectomycorrhizal fungi. *Evolution* 69: 2196-2209.

- Sobrero, M. C. 2010. Estudio de la fitotoxicidad de metales pesados y del herbicida glifosato en ambientes acuáticos. Bioensayos con plantas vasculares como organismos diagnósticos. Tesis de Doctor en Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.
- Smith, S. E. y D. J. Read. 2008. Mycorrhizas in ecological interactions. Pág. 573-610. En: Smith, S. E. y D. J. Read (Eds.). Mycorrhizal Symbiosis. Third Edition.
- Steele, P. R. y J. C. Pires. 2011. Biodiversity assessment: State-of-the-art techniques in phylogenomics and species identification. American Journal of Botany 98: 415–425.
- Taylor, A.F.S. y I. Alexander. 2005. The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. Mycologist 19: 102-112.
- 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: 189-231.
- Tulloss R. E. 2016. *Amanita rubescens*. En: Tulloss, R. E. y Z. L. Yang (Eds.). Amanitaceae estudios. <http://www.amanitaceae.org?Amanita+rubescens>. Consultado marzo 2016.
- Tulloss, R. E., Kuyper, T. W., Vellinga, E. C., Yang, Z. L., Halling, R. E., Geml, J., Sánchez-Ramírez, S., Gonçalves, S. C., Hess, J. y A. Pringle. 2016. The genus *Amanita* should not be Split. AMANITACEAE 1(3): 1-16.
- Vargas, N., Bernal, A., Sarria, V., Franco-Molano, A. y S. Restrepo. 2011. Amatoxin and phallotoxin composition in species of the genus *Amanita* in Colombia: A taxonomic perspective. Toxicon 58: 583–590.

- Vega-Villasante, F., Ruiz-González, L. E., Guerrero-Galván, S. R. y L. Guzmán-Dávalos. 2013. Evaluación de la toxicidad de *Psilocybe cubensis* (Agaricales, Basidiomycota) sobre *Artemia franciscana* (Crustacea, Anostraca). *Revista Iberoamericana de Micología* 30: 54-56.
- Walton, J. D., Hallen-Adams, H. E. y L. Hong. 2010. Ribosomal Biosynthesis of the Cyclic Peptide Toxins of *Amanita* Mushrooms. *Biopolymers* 94: 659–664.
- Watkinson, S. C. 2016. Chapter 6. Molecular Ecology. Pág. 189-203. En: S. C. Watkinson, N. P. Money and L. Boddy (Eds.). *The Fungi*. Elsevier.
- Weiβ, M., Yang, Z. L. y F. Oberwinkler. 1998. Molecular phylogenetic studies in the genus *Amanita*. *Canadian Journal of Botany* 76: 1170-1179.
- Wolfe, B. E., Tulloss, R. E. y A. Pringle. 2012. The irreversible loss of a decomposition pathway marks the single origin of an ectomycorrhizal symbiosis. *PLoS ONE* 7: e39597.
- Zhang, P., Chen, Z. H., Hu, J. S., Wei, B. Y., Zhang, Z. G. and W. Q. Hu. 2005. Production and characterization of Amanitin toxins from a pure culture of *Amanita exitialis*. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* 252: 223-228.

# ANEXOS

## Anexo 1. Valores de la Cuantificación.

**Tabla A1.1.** Evaluación de pureza y concentración de la extracción de DNA para el complejo *Amanita rubescens*.

No. de Muestra	Ng/ $\mu$ l	A260/A280	A260/A230
1 Ar	25	2.44	3.68
2 Ar	71	2.22	1.70
3 Ar	12	2.12	0.31
4 Ar	49	2.00	1.08
5 Ar	75	2.26	1.76
6 Ar	44	2.33	2.23
7 Ar	21	2.33	2.11
8 Ar	18	2.38	2.10
9.1 Ar	62	2.35	1.49
9.2 Ar	19	2.38	2.09
9.3 Ar	30	2.24	1.98
10.1 Ar	85	2.49	1.44
10.2 Ar	16	2.39	2.20
11 Ar	20	2.35	2.08
12 Ar	74	1.89	1.23
13 Ar	15	2.15	1.65
14.1 Ar	21	2.23	1.79
14.2 Ar	15	2.39	1.39
15.1 Ar	24	2.33	2.08
15.2 Ar	29	2.21	1.38
16 Ar	20	2.34	1.88
17.1 Ar	16	2.36	1.67
17.2 Ar	45	2.34	2.26
17.3 Ar	59	2.60	1.53
18.1 Ar	90	2.53	1.84
18.2 Ar	84	2.56	2.22
19 Ar	75	2.23	2.15
20 Ar	37	2.26	2.23
21 Ar	34	2.18	1.99
22 Ar	36	2.28	2.00
23 Ar	51	2.20	2.15
24 Ar	15	2.12	1.41
25 Ar	28	2.31	2.02
26 Ar	30	3.04	2.21
27 Ar	49	2.17	1.81
28 Ar	26	2.29	2.31
29 Ar	69	2.57	2.28
30 Ar	25	2.14	1.68
31 TAr	34	1.98	2.15
32 TAr	26	2.13	2.22
33 TAr	22	2.26	2.20
<b>34TAr</b>	121.9	1.9	2.13
<b>35TAr</b>	698.9	2.4	2.23
<b>36TAr</b>	525.3	2.2	2.15
<b>37TAr</b>	49.9	1.9	1.92
<b>38 TAr</b>	639.1	2.1	2.15
<b>39TAr</b>	57.9	1.1	1.39
<b>40 TAr</b>	61.0	1.1	1.79
<b>41 TAr</b>	76.9	1.9	1.99
<b>42 TAr</b>	63.4	2.2	2.14
<b>43 TAr</b>	120.8	1.7	2.10
<b>44 TAr</b>	1002.8	2.2	2.16
<b>45 TAr</b>	567.5	2.4	2.24
<b>46 TAr</b>	255.6	1.9	2.16
<b>47 TAr</b>	328.4	2.2	2.17
<b>48 TAr</b>	150.4	1.9	2.19
<b>49 TAr</b>	42.8	2.2	2.28
<b>50 TAr</b>	62.6	1.9	2.31
<b>51 TAr</b>	64.0	1.9	1.85
<b>52 TAr</b>	564.0	2.2	2.23
<b>53 TAr</b>	197.2	1.9	1.89
<b>54 TAr</b>	413.9	2.1	2.19
<b>55 TAr</b>	30.4	1.1	2.09
<b>56 TAr</b>	121.0	1.9	1.81
<b>57 TAr</b>	364.0	2.1	2.05
<b>58 TAr</b>	184.9	2.4	2.22
<b>59 TAr</b>	189.3	2.0	2.04
<b>60 TAr</b>	113.1	2.4	2.32
<b>61 TAr</b>	42.9	2.2	2.02
<b>62 TAr</b>	751.2	2.4	2.26
<b>63 TAr</b>	64.3	2.0	1.72
<b>64 TAr</b>	168.3	2.1	1.97
<b>65 TAr</b>	163.7	2.0	2.13
<b>66 TAr</b>	308.5	2.1	2.08
<b>67 TAr</b>	95.3	2.2	2.14
<b>68 TAr</b>	891.0	2.1	2.05
<b>69 TAr</b>	627.9	2.2	2.19
<b>70 TAr</b>	139.5	2.1	2.10
<b>71 TAr</b>	405.2	2.2	2.08
<b>72 TAr</b>	1201.5	2.2	2.16
<b>73 TAr</b>	397.4	2.2	2.17
<b>74 TAr</b>	47.7	1.7	1.79

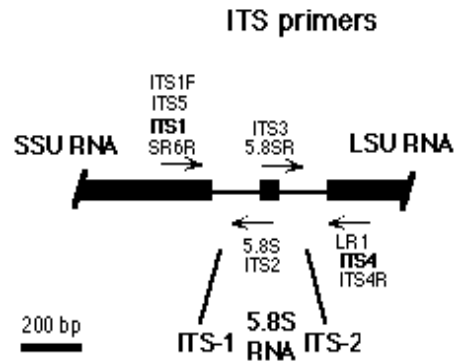
A260/A280=cantidad de proteínas presentes; A260/A230= cantidad de sales u otros residuos; TAr = Colección de Tlaxcala

### Anexo 1. Continuación.

No. de Muestra	Ng/ $\mu$ l	A260/A2 80	A260/A2 30
75 TAr	239.4	1.85	1.89
76 TAr	1285.4	2.39	2.19
77 TAr	202.5	2.09	2.21
78 TArch	168.7	2.21	1.92
79 TArch	89.1	1.95	2.23
80 TArch	57.9	1.61	1.86
81 TArch	321.8	2.23	2.06
82 TArch	83.7	1.51	2.01
83 TArch	663.8	2.55	2.27
84 TArch	583.6	2.09	2.27
85 TArch	669.7	2.27	2.19
86 TAr cp	118.4	2.25	2.28
87 TAr cp	156.1	2.52	2.26
88 TAr cp	709.5	2.38	2.21
89 TAr cp	896.3	2.25	2.16
90 TAr cp	548.4	2.44	2.24
91 TAr cp	397.9	2.44	2.24
92 TAr cp	257.0	2.35	2.20
93 TAr cp	487.0	2.51	2.27

TArch = Colección de Tlaxcala procedente de Chihuahua; TAr cp = Colección de Tlaxcala procedente de Chiapas.

## Anexo 2. Imagen de la Región ITS en Hongos.



**Figura A2.1.** Se muestra la región ITS utilizada para definir las especies. Tomado de: <http://sites.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>

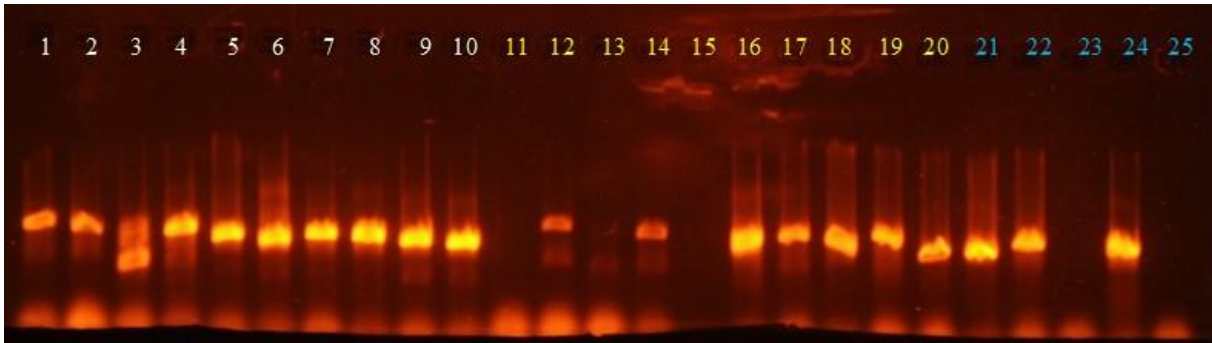


### Anexo 3. Protocolo de Amplificación

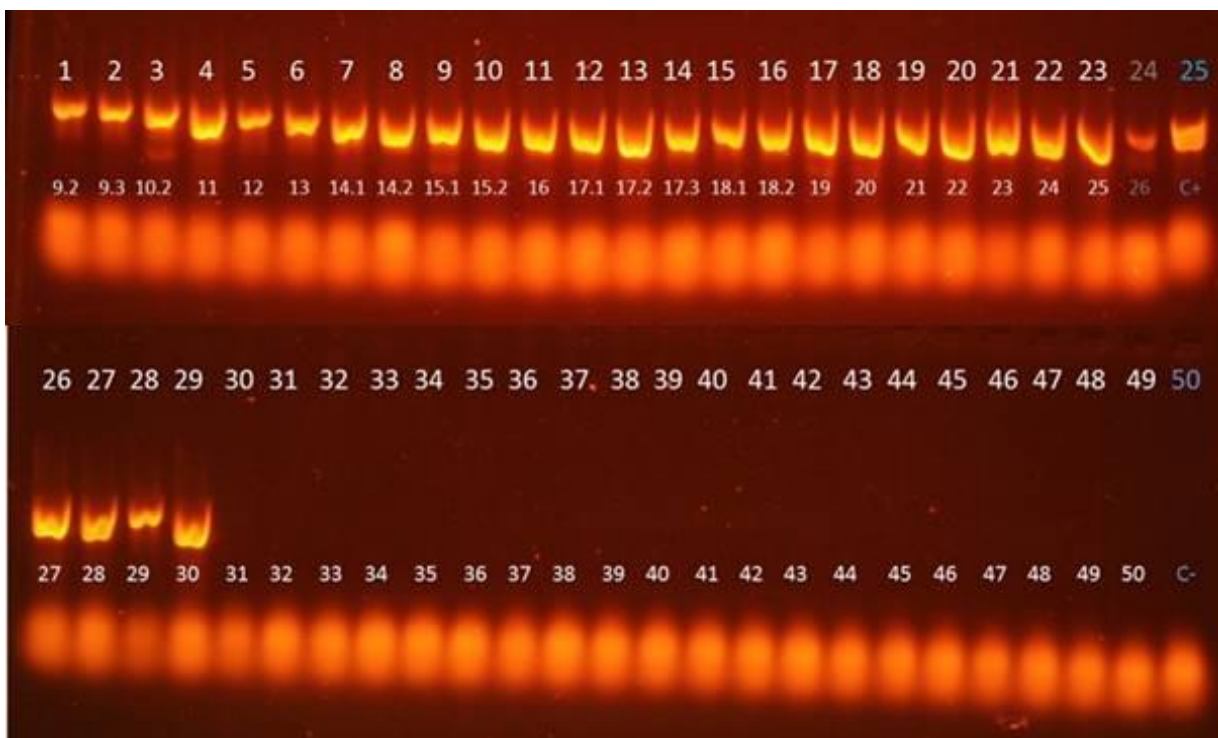
**Tabla A3.1.** Volumen y composición de la mezcla de reacción para el PCR usado. Programa de amplificación para el PCR.

<b>Volumen para preparar X muestras: 27</b>		
<b>25 µl total</b>		
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen 1x (µl)</b>	<b>volumen total</b>
dH <sub>2</sub> O	17.25	465.75
10x Buffer	2.5	67.5
dNTPs [2mM]	2.5	67.5
MgCl <sub>2</sub> [50mM]	1.0	27
ITS1F[50mM]	0.25	6.75
ITS4[50mM]	0.25	6.75
Taq	0.25	6.75
DNA (1 µl)		
	<b>Total</b>	<b>648/27= 24</b>

<b>PCR</b>
1. 94 ° por 1 min
2. 94 ° por 1 min
3. 51 ° por 1 min
4. 72 ° por 1 min
5. 35 ciclos
6. 72 ° por 8 min
7. 4 ° por 5 min



**Figura A3.1** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR de ITS1F e ITS4; 47 min., a 90V. Pozo 1-10 son diluciones 1:100; Pozo 11-20 son diluciones 1:1000; los controles positivos: Pozo 21 (1:10); pozo 22 (1:100); pozo 23 (1:1000) no amplificó; pozo 24 (1:1) y pozo 25 es el negativo. Las muestras de los pozos 1-10 se mandaron a secuenciar, excepto la muestra 3, por la presencia de doble-banda, como se puede observar las bandas con dilución 1:1000 no tiene buena calidad, por lo que no se usaron.



**Figura A.3.2.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR de ITS1F e ITS4; 50 min., a 90V. Pozos 1-24, 26-29 son diluciones 1:100 muestras Hidalgo; pozo 25 positivo; pozos 30-49 son diluciones 1:100 de muestras de Colección de Tlaxcala; pozo 50 es negativo. Las muestras mostraron buena calidad de bandas, excepto la muestra 26, todas las demás se mandaron secuenciar.