



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

---

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS  
CAMPUS MONTECILLO  
POSTGRADO EN EDAFOLOGÍA

## BIOTECNOLOGÍA DE HONGOS COMESTIBLES SILVESTRES DE LOS GÉNEROS *Hebeloma* Y *Coprinus*

ANAITZI CARRERA MARTÍNEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2020

---

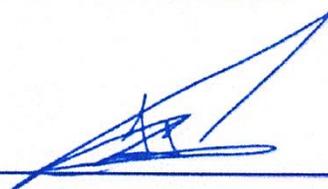
La presente tesis titulada: **Biotecnología de hongos comestibles silvestres de los géneros *Hebeloma* y *Coprinus***, realizada por la alumna: Anaitzi Carrera Martínez bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

EDAFOLOGÍA

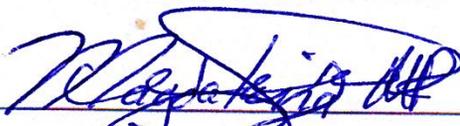
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



**Dr. Jesús Pérez Moreno**

ASESORA



**Dra. Magdalena Martínez Reyes**

ASESOR



**Dr. Enrique Ojeda Trejo**

ASESOR



**Dr. Julián Delgadillo Martínez**

Montecillo, Texcoco, Estado de México, junio de 2020

Esta Tesis formó parte del **Proyecto CONACyT 2014-Proyectos de Desarrollo Científico para tender Problemas Nacionales 246674 “Biotecnologías de los hongos comestibles ectomicorrízicos y su impacto en la mitigación del cambio climático y desarrollo forestal sustentable”**, al cual se agradece su apoyo.



**BIOTECNOLOGÍA DE HONGOS COMESTIBLES SILVESTRES DE LOS  
GÉNEROS *Hebeloma* Y *Coprinus***

**Anaitzi Carrera Martínez, M. en C.**

**Colegio de Postgraduados, 2020**

**RESUMEN**

Los hongos silvestres ectomicorrízicos y saprófitos son un componente de enorme importancia ecológica en los ecosistemas forestales dado que participan en el reciclaje de nutrimentos. Adicionalmente poseen una gran importancia social por su comestibilidad por miembros de grupos étnicos y población rural. En el presente estudio se evaluaron características macro, microscópicas y moleculares de la simbiosis ectomicorrízica entre *Hebeloma alpinum* y *Suillus pseudobrevipes*, asociados con *Pinus ayacahuite*. Las raíces cortas ectomicorrizadas de *H. alpinum* se caracterizaron por poseer micelio laxo de color blanquecino, abundantes hifas emanantes y las de *S. pseudobrevipes* fueron de simples a coraloides con superficie algodonosa blanca cuando jóvenes y posteriormente de color café, con abundantes cristales de oxalato en sus hifas, además de la presencia de rizomorfos. La descripción molecular mostró una homología genética de 99% para *H. alpinum* y 97% para *S. pseudobrevipes*. Por otra parte, se describió macro, morfológica y molecularmente a una nueva especie de hongo perteneciente al género *Coprinus*, denominada *C. pjiiekakjooensis*, un hongo endémico de los bosques de Lomas de Teocalzingo, municipio de Ocuilan, en el estado de México, con importancia gastronómica por habitantes del grupo originario Tlahuica-Pjiiekjakjo. Los caracteres diagnósticos de la especie son la longitud de sus esporomas de hasta 70 cm y el largo y ancho de sus esporas; el análisis filogenético mostró que *C. pjiiekakjooensis* pertenece al género *Coprinus sensu stricto*. Es de gran importancia realizar trabajos que permitan conocer la riqueza de especies de hongos comestibles silvestres saprófitos en nuestra nación, por su potencial de cultivo; y en el caso de las especies ectomicorrízicas, su potencial utilización como bioinoculantes en árboles nativos para la reforestación.

**Palabras clave:** simbiosis micorrízica, conocimiento tradicional, importancia ecológica, técnicas moleculares, hongos saprófitos.

# BIOTECHNOLOGY OF WILD EDIBLE FUNGI OF THE GENERA

## *Hebeloma* and *Coprinus*

Anaitzi Carrera Martínez, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2020

### ABSTRACT

Wild ectomycorrhizal and saprophytic fungi are a component of enormous ecological importance in forest ecosystems because they play a crucial role in nutrient recycling. Furthermore, they have great social importance for its edibility by members of ethnic groups and rural populations. In the present study, the macro, microscopic and molecular characteristics of the ectomycorrhizal symbiosis between *Hebeloma alpinum* and *Suillus pseudobrevipes*, associated with *Pinus ayacahuite*, were evaluated. The short ectomycorrhizal roots of *H. alpinum* were characterized by having lax whitish mycelium, abundant emanating hyphae, and those of *S. pseudobrevipes* ranging from simple to coralloid with a white cottony surface when young and later brown in colour, with abundant oxalate crystals in its hyphae, in addition to the presence of rhizomorphs. The molecular description showed a genetic homology of 99% for *H. alpinum* and 97% for *S. pseudobrevipes*. On the other hand, a new species of fungus belonging to the genus *Coprinus*, named *C. pjiiekakjooensis*, a mushroom endemic to the forests of Lomas de Teocalzingo, municipality of Ocuilan, in the state of Mexico, was described macro, morphologically and molecularly. It has biocultural importance as food by inhabitants of the original group Tlahuica-*Pjiiekjakjo*. The diagnostic characteristics of the species are the length of its basidiomata of up to 70 cm and the length and width of its spores. Phylogenetic analysis found that *C. pjiiekakjooensis* belongs to the genus *Coprinus sensu stricto*. It is of great importance to conduct studies related to the species richness of saprophytic wild edible in Mexico, due to their potential for cultivation; and in the case of ectomycorrhizal species, because of their potential use as bioinoculants in native trees for reforestation.

**Key words:** mycorrhizal symbiosis, traditional knowledge, ecological importance, molecular techniques, saprophytic fungi.

## AGRADECIMIENTOS

A la *Virgen de Juquila*, por tenerme en sus manos, y darme la oportunidad de vivir éste sueño ¡Gracias por todo el amor con el que me rodea!

Al *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)*, por el financiamiento de mis estudios y por ser una institución comprometida con la investigación en México.

A cada uno de los mexicanos, por seguir creyendo en un México mejor y contribuir en mi formación.

Al *Colegio de Postgraduados* por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios en tan honorable Institución de Enseñanza en Ciencias Agrícolas.

Existen personas que nos inspiran, otras que nos enseñan algo nuevo y existen aquellas que tocan nuestra alma, a la *Dra. Magdalena Martínez Reyes*, experta sembradora de nobles conocimientos, agradezco su dedicación, cariño, compromiso, conocimientos transmitidos y apoyo incondicional y al *Dr. Jesús Pérez Moreno* por todo su conocimiento en el ámbito de los hongos, agradezco su amistad y enseñanzas, logró en mí un sentido de creatividad, sin los cuales no podría tener una formación completa.

*Dr. Enrique Ojeda Trejo*, por sus sabios consejos, por todo su apoyo, precisas recomendaciones y apoyo en la dirección de este trabajo.

*Dr. Julián Delgadillo Martínez*, por su excelente orientación y apoyo otorgado en el desarrollo de la presente Tesis.

Las imágenes siguientes son cortesía de Lic. *Eliseete Ramírez Carbajal*, *Dra. Magdalena Martínez Reyes* y *Biol. David Ramos Rendón*, a quienes agradezco su apoyo.

En la Figura 1.1. las fotografías (a, b, c y d), la Figura 2.1. las fotografías (a, b y d), la Figura 2.2. las fotografías (b y d) y la Figura 2.6. la fotografía (a) fueron tomadas por la *Dra. Magdalena Martínez Reyes*.

En la Figura 2.2. la fotografía (c) fue cortesía de la *Lic. Eliseete Ramírez Carbajal*.

Adicionalmente se agradece el apoyo del Biol. David Ramos Rendón por su asesoría en la realización de la Figura 2.4. la ilustración (g).

A *Don Sergio, Doña Cristina* y a *Eliseete* unos extraordinarios seres humanos, pertenecientes del grupo *Tlahuica-Pjiekakjoo*, gracias por darme la maravillosa oportunidad de conocer un poco sobre los hongos comestibles silvestres pertenecientes a sus bosques, de los que han sido guardianes desde épocas prehispánicas.



## DEDICATORIA

A toda mi familia, que fueron una pieza clave y la fuente de mi inspiración. A mi hermosa madre *Leodegaria* y a mi padre *Romeo* por el amor infinito de ambos y apoyo incondicional. A mis bellos ángeles, mis hermanos *Dani*, *Carito* y *Javi*, porque son parte de mi alegría, inspiración y orgullo. A mis abuelos *Columba*, *Raúl*; *Justina* y *Leví †*, gracias por toda una vida llena de memorables momentos.

A mi amado esposo *Uzziel*, gracias por tanto amor, por la alegría que me produce tu presencia, por compartir el amor hacia los hongos y por la oportunidad de aprender más sobre tu cultura Mazateca ¡*Naii' kichile!*- ¡Gracias!

Agradezco su amistad, compañía y dedico este logro a mis amigos: *Ing. Oralia*, *Dra. Irma*, *Dr. Faustino*, *Ing. Armando*, *Biol. María Guadalupe*, *M. C. Rosario*, *M. C. Alfonso*, *M. C. Concepción*, *Biol. Karla Luciano*, *Biol. Samuel*, *M. C. Alexanders*, *Lic. Eliseete*, *M. C. Sigrid*, *Biol. Ivette*, *Biol. Julieta*, *Ing. Sonia*, *Biol. David*, *Ing. Esteban*, *Biol. Juan Carlos*, *M. C. Luis*, *Biol. Karla* y *M. C. Claudia*, gracias por su experiencia, por permitirme aprender de ustedes y con ustedes.

A los pueblos originarios de mi México amado, gracias por sus conocimientos y la comprensión del ambiente, porque en su memoria está escrito el anhelo de la tierra.



## CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	vi
<b>DEDICATORIA</b> .....	viii
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	xii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xiii
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	1
<b>Literatura citada</b> .....	3
<b>Objetivos e hipótesis</b> .....	5
<b>Objetivo general</b> .....	5
<b>Objetivos específicos</b> .....	5
<b>Hipótesis</b> .....	6
<b>CAPÍTULO 1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, ANATÓMICA Y MOLECULAR DE ECTOMICORRÍZAS DE <i>Pinus ayacahuite</i> Ehrenberg CON DOS HONGOS COMESTIBLES</b> .....	7
<b>1.1 RESUMEN</b> .....	7
<b>1.2 ABSTRACT</b> .....	8
<b>1.3 INTRODUCCIÓN</b> .....	9
<b>1.4 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	10
<b>1.4.1 Montaje del experimento, siembra e inoculación</b> .....	10
<b>1.4.2 Caracterización morfológica y anatómica de las raíces ectomicorrizadas</b> .....	11
<b>1.4.3 Análisis molecular de las raíces ectomicorrizadas</b> .....	12
<b>1.5 RESULTADOS</b> .....	13
<b>1.5.1 Descripción de esporomas de <i>Hebeloma alpinum</i></b> .....	13
<b>1.5.2 Ectomicorrizas de <i>Hebeloma alpinum</i> con <i>Pinus ayacahuite</i></b> ....	16
<b>1.5.3 Descripción de esporomas de <i>Suillus pseudobrevipes</i></b> .....	18

1.5.4 Ectomicorrizas de <i>Suillus pseudobrevipes</i> con <i>Pinus ayacahuite</i> .....	18
1.6 DISCUSIÓN.....	22
1.7 CONCLUSIONES.....	25
1.8 LITERATURA CITADA.....	25
<b>CAPÍTULO 2. UNA ESPECIE NUEVA, COMESTIBLE GIGANTE DEL GÉNERO <i>COPRINUS</i> CON IMPORTANCIA BIOCULTURAL EN LA CULTURA MESOAMERICANA TLAHUICA-<i>PJIEKAKJOO</i>.....</b>	<b>29</b>
2.1 RESUMEN.....	29
2.2 ABSTRACT.....	30
2.3 INTRODUCCIÓN.....	31
2.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
2.4.1 Área de recolecta.....	33
2.4.2 Caracterización macro y micromorfológica de los esporomas de <i>C. pjiekakjooensis</i> .....	34
2.4.3 Análisis filogenético molecular.....	35
2.4.4 Determinación de características físicas y químicas del suelo donde se desarrolla <i>C. pjiekakjooensis</i> .....	36
2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
2.5.1 Descripción macro y micromorfológica de esporomas de <i>C. pjiekakjooensis</i> .....	37
2.5.2 Análisis filogenético de los datos moleculares.....	43
2.5.3 Características físicas y químicas del suelo.....	43
2.5.4 Clave de <i>Coprinus sensu stricto</i> .....	48
2.5.5 Características macro y micromorfológicas que distinguen a <i>Coprinus</i> de los tres géneros afines: <i>Coprinellus</i> , <i>Coprinopsis</i> y <i>Parasola</i> .....	48
2.5.6 Potencial medicinal de <i>Coprinus comatus</i> .....	50

2.5.7	Uso como comestible de <i>C. comatus</i> en el mundo.....	50
2.5.8	Cultivo de <i>C. comatus</i> y potencial de cultivo de la nueva especie.....	51
2.5.9	Propuesta como área natural de conservación.....	51
2.6	CONCLUSIONES.....	52
2.7	LITERATURA CITADA.....	53
	CONCLUSIONES GENERALES.....	59

## LISTA DE CUADROS

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.1</b> Características macro y micromorfológicas de <i>Hebeloma alpinum</i> , descritas por diversos autores. ....	<b>15</b>
<b>Cuadro 1.2</b> Características diagnóstico de las estructuras macro y micromorfológicas de las raíces ectomicorrizadas de <i>P. ayacahuite</i> con dos hongos comestibles silvestres, estudiados en el presente trabajo.....	<b>21</b>
<b>Cuadro 1.3</b> Identificación de los micobiontes presentes en las raíces de <i>Pinus ayacahuite</i> , en función con su afinidad filogenética en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank.....	<b>22</b>
<b>Cuadro 2.1</b> Características macro y micro morfológicas de las especies más cercanas a <i>C. pjierekakjoensis</i> .....	<b>45</b>

## LISTA DE FIGURAS

### Página

- Figura 1.1** Vista general de la importancia socioeconómica, cultural y ecológica de los hongos comestibles ectomicorrízicos estudiados: *Hebeloma alpinum* (Ha) y *Suillus pseudobrevipes* (Sp). a) Venta de Ha y otras especies comestibles del género *Hebeloma* en el mercado de Ozumba, el cual data de épocas prehispánicas, en el estado de México; b) Venta de especies de *Suillus*, incluyendo Sp dentro de la canasta, en el mismo mercado de Ozumba, estado de México; c) Macrofotografía mostrando los caracteres diagnósticos de Ha, de ejemplares procedentes de mercado; d) Basidiomas de Sp mostrando la presencia del velo en el estípite, y sus caracteres diagnósticos, en bosque natural de *Pinus ayacahuite* en el estado de México..... **14**
- Figura 1.2** Asociación ectomicorrízica de *Hebeloma alpinum* (Ha) con *Pinus ayacahuite* (Pa). a) Plantas de Pa en microcosmos de seis años de edad; b) Morfotipo con ramificación dicotómica monopodial; c) Presencia de fíbulas (flecha roja) en las hifas del micelio externo ectomicorrízico de Ha; d) Corte transversal de la micorriza de Ha, mostrando la red de Hartig (flecha roja) y el manto de color amarillento en la parte externa de la raíz; e) Abundantes cristales de oxalato de calcio en la superficie del manto de Ha con microscopía electrónica de barrido; f) Microfotografía tomada con el microscopio electrónico de barrido, mostrando el tipo de ramificación tetrapodial, ápices redondeados e hifas emanantes, micelio externo (me) y manto (m)..... **17**
- Figura 1.3** Estructuras macro y micromorfológicas de la asociación ectomicorrízica de *Suillus pseudobrevipes* (Sp) con *Pinus ayacahuite* (Pa). a-c) Macromorfología de la asociación micorrízica de Sp con Pa con ramificación monopodial y dicotómica; d-f) Microfotografías con el microscopio electrónico de barrido, donde se observa: (d) la

<p>presencia de rizomorfos (flecha blanca), estructura diagnóstica de la simbiosis ectomicorrízica del micobionte; (e) morfotipo con ramificación monopodial, rodeado por abundante micelio externo; (f) corte transversal, es posible apreciar la red de Hartig y abundante micelio externo.....</p>	20
<p><b>Figura 2.1</b> Hábitat de crecimiento de <i>C. pjierekakjooensis</i>. a y b) Bosque de <i>Pinus-Quercus</i>; c) Bosque de <i>Abies</i>; d) Bosque mesófilo de montaña.....</p>	34
<p><b>Figura 2.2</b> Basidioma de <i>Coprinus pjierekakjooensis</i> (Cp). a) Basidioma en estadio juvenil de Cp; b) Diversos estadios de Cp mostrando la delicuescencia de las láminas y la longitud del estípite, el cual llega a ser mayor de 60 cm; c) Esporoma maduro en proceso de delicuescencia de sus láminas; d) Presencia de anillo en Cp y presencia de escamas en el píleo, en estadio juvenil.....</p>	38
<p><b>Figura 2.3</b> Esporoma de <i>Coprinus pjierekakjooensis</i> (Cp). a) Corte longitudinal de la parte superior del píleo de Cp mostrando el contexto y el estípite fistuloso; b) Esporas de color café ocre de Cp .....</p>	39
<p><b>Figura 2.4</b> Estructuras del himenio laminar de <i>Coprinus pjierekakjooensis</i> (Cp). a) Vista lateral de esporas, con textura aparentemente lisa; apéndice hilar y poro germinativo prominente; b) Basidio corto clavado (flecha amarilla); c y d) Basidios largos con forma cilíndrico-pedicelado (flecha roja); e) Basidiolos; f) Esferocistos del himenio; g) Estructuras de Cp (a) Esporas; (b) Basidios; y (c) Células del velo de Cp arregladas en un estrato compacto con elementos fusiformes algo subcilíndricos, pálidos hialinos, de pared delgada y lisos. Barra negra 5 <math>\mu</math>m.....</p>	40
<p><b>Figura 2.5</b> Microfotografías de las células de la estipitipelis, células de las escamas del píleo y células del anillo de <i>Coprinus pjierekakjooensis</i> (Cp). a) Arreglo en empalizada y forma cilíndrica de las células de la estipitipelis de Cp; b) Células de la escama del píleo, se observa una célula gutulada de Cp; c) Células cilíndricas del anillo con terminación</p>	

truncada; d) Células cilíndricas del anillo con terminación ovada de Cp..... 41

**Figura 2.6** Estructuras de *Coprinus pjierekajoensis* (Cp). a) Rizomorfos de Cp en la base del estípite señalado con las flechas amarillas; b) Rizomorfos en el sustrato donde se desarrolla Cp; c) Presencia de cordones miceliales en el micelio externo en la base de basidiomas de Cp; d) Acercamiento a (c) donde se observa la trama del micelio externo en la base de basidiomas de Cp; e) Micelio externo septado señalado con la flecha roja en la base de esporomas de Cp..... 42

**Figura 2.7** Árbol filogenético de *Coprinus pjierekajoensis* y especies cercanas; y como grupo externo *Lepiota lilacea*. Para interpretación ver sección 4.4.3 de esta tesis. Las claves para todas las especies corresponden a las registradas en GenBank, excepto las correspondientes a *Coprinus* sp. nov. las cuales corresponden a ejemplares de *C. pjierekajoensis*..... 44

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Los hongos son un grupo de organismos de gran importancia para el mantenimiento de la vida, adquiriendo gran relevancia ecológica en los ecosistemas donde existen, algunos realizan asociaciones simbióticas mutualistas con las raíces de las plantas asociadas (Rentería-Chávez *et al.*, 2017; Villegas-Olivera *et al.*, 2017), e indispensables para el establecimiento de los bosques (Martínez-Reyes *et al.*, 2012), además de ser un importante elemento para la conservación y producción forestal (Pérez-Moreno y Read, 2004); por otra parte, algunas especies de hongos intervienen en la descomposición de materia orgánica, además, reciclan y mineralizan macro y micronutrientes, volviéndolos disponibles para las plantas. Adicional a su relevancia ecológica, los hongos comestibles silvestres (HCS) poseen valor gastronómico y económico, debido a sus propiedades nutricionales (Peng *et al.*, 2020), utilizados en la elaboración de innumerables platillos tradicionales, relevantes para la identidad cultural de las comunidades que practican y transmiten este conocimiento de generación a generación, las cuales datan desde épocas prehispánicas (Hernández *et al.*, 2016). De igual manera, los HCS poseen propiedades medicinales (Jiménez *et al.*, 2013), teniendo efectos benéficos para la salud: utilizados para la cura y prevención de enfermedades. Debido a la asociación que realizan los hongos ectomicorrízicos, se han desarrollado técnicas que permiten la supervivencia de especies forestales, pues dependen de la simbiosis ectomicorrízica establecida entre el hongo y la raíz de las plantas forestales, vital para su crecimiento óptimo. Actualmente la utilización de plantas ectomicorrizadas en el sector forestal enfocado en la producción de árboles de Navidad o con fines de reforestación y restauración de áreas degradadas como es el caso de *Pinus ayacahuite* es de gran interés, además de favorecer la reactivación económica en las áreas en donde se desarrolla (Arteaga-León *et al.*, 2018; Pérez-Moreno *et al.*, 2020), contribuir en la conservación del hábitat (referido a alimentación, abrigo, sitio reproductivo y generación de microclimas específicos) para un gran número de especies asociadas, que a su vez, coadyuvan a mitigar los efectos del cambio global, especialmente en áreas degradadas.

Preocupados por la situación de deterioro en el que se encuentran las áreas microendémicas del desarrollo de la nueva especie aquí descrita y de los bosques de nuestro país, principalmente por los procesos de deforestación y cambio de uso de suelo, se considera

importante conocer los hongos que forman parte de la diversidad que existe en México, dado que estos recursos tienen un potencial importante en la reforestación, restauración y mantenimiento de los bosques. Por otra parte, a pesar de la importancia que poseen los HCS, se conoce que a nivel mundial existen más de 1.5 millones de especies de hongos (Montes *et al.*, 2003) y sólo 7% han sido descritos, 2000 son consideradas comestibles y de ésta cifra, alrededor de 100 se cultivan experimentalmente, cabe señalar que nuestro país es el mayor productor de hongos en Latinoamérica y el décimo sexto productor de hongos a nivel mundial (Martínez-Carrera *et al.*, 2007). Por éste motivo es necesario generar información sobre la diversidad de HCS, que nos permita en un futuro generar los principios para su cultivo, ya que en la actualidad, la producción de hongos comestibles en México ofrece notables ventajas sociales, económicas y ecológicas (Martínez-Carrera *et al.*, 2000).

El presente trabajo tiene como objetivos realizar descripciones macro y micromorfológicas en los micobiontes inoculados en las raíces de *Pinus ayacahuite*, una especie forestal piñonera y nativa de México, así mismo, esta especie puede llegar a ser una alternativa para rehabilitar suelos degradados, además tiene grandes expectativas ornamentales y en México es una de las principales especies para la producción de pinos de Navidad; debido a la importancia que posee *P. ayacahuite*, es necesario generar conocimiento básico para la conservación de la misma y para hacer un uso sustentable de éste recurso a largo plazo. Cabe señalar que son escasos los trabajos publicados que involucran la asociación ectomicorrízica en raíces del pino de Navidad mexicano (Arteaga-León *et al.*, 2018). Por otra parte, se realizó la caracterización macro, micromorfológica y molecular de una nueva especie de hongo gigante perteneciente al género *Coprinus*, denominada *C. pjierekajoensis*, especie con distribución micro endémica y desafortunadamente en peligro de desaparecer. Este hongo es saprófito y por tanto con un enorme potencial de cultivo, y que en un futuro puede ser utilizado para producir alimentos de alta calidad a partir de materia orgánica generada a partir de desechos agrícolas (Dulay *et al.*, 2012), y que el grupo originario que posee las áreas en donde se desarrolla lo cultive, contribuyendo así al conocimiento de *Coprinus pjierekajoensis* como un hongo silvestre con importancia ecológica, biocultural y comestible para el grupo étnico Tlahuica-*Pjierekajoo*, pertenecientes a la comunidad de los Bienes Comunes de San Juan Atzingo, municipio de Ocuilan, estado de México.

## Literatura citada

- Arteaga-León, C., Pérez-Moreno, J., Espinosa-Victoria, D., Almaraz-Suárez, J., Silva-Rojas, H. and Delgado-Alvarado, A. 2018. Ectomycorrhizal inoculation with edible fungi increases plant growth and nutrient contents of *Pinus ayacahuite*. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 89: 1089-1099.
- Dulay, R. M., Parungao, A. G., Kalaw, S. P. and Reyes, R. G. 2012. Aseptic cultivation of *Coprinus comatus* (OF Mull.) Gray on various pulp and paper wastes. *Mycosphere*. 3:392-397.
- Hernández, S. F., Pérez, M. J., Xoconostle, C. B., Almaraz, S. J., Ojeda, T. E., Mata, M. G. and Díaz, A. I. 2016. Traditional knowledge and use of wild mushrooms by Mixtecs or Ñuu savi, the people of the rain, from Southeastern México. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 12:1-22.
- Jiménez, R. M., Pérez-Moreno, J., Almaraz-Suárez, J. and Torres-Aquino, M. 2013. Hongos silvestres con potencial nutricional, medicinal y biotecnológico comercializados en Valles Centrales, Oaxaca. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 4:199-213.
- Martínez-Carrera D., Morales, P., Sobal, M., Bonilla, M. and Martínez, W. 2007. México ante la globalización en el siglo XXI: El sistema de producción consumo de los hongos comestibles. *In: El Cultivo de Setas Pleurotus spp. en México*. Sánchez, J. E., Martínez-Carrera, D., Mata, G., Leal, H. (Eds.). ECOSUR-CONACYT, México. 6:1-20.
- Martínez-Carrera, D., Larqué, A., Aliphath, M., Aguilar, A., Bonilla, M. and Martínez, W. 2000. La biotecnología de hongos comestibles en la seguridad y soberanía alimentaria de México. II Foro Nacional sobre Seguridad y Soberanía Alimentaria. Academia Mexicana de Ciencias CONACYT, México. Pp. 193-207.
- Martínez-Reyes, M., Pérez-Moreno, J., Villarreal-Ruiz, L., Ferrera-Cerrato, R., Xoconostle-Cázares, B., Vargas-Hernández, J. and Honrubia-García, M. 2012. Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con el hongo comestible ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Quél. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*. 18:183-192.
- Montes, B., Restrepo. A. and McEwen. J. G. 2003. Nuevos aspectos sobre la clasificación de los hongos y su posible aplicación médica. *Biomédica*. 23:213-224.
- Peng, Y., Li, T., Jiang, H., Gu, Y., Chen, Q., Yang, C., Qi, W., Liu, S. and Zhang, X. 2020. Postharvest biochemical characteristics and ultrastructure of *Coprinus comatus*. *PeerJ*. 8:e8508. doi.org/10.7717/peerj.8508.
- Pérez-Moreno, J. y Read, J. D. 2004. Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia*. 29:239-247.
- Rentería-Chávez, M. C., Pérez-Moreno, J., Cetina-Alcalá, V. M., Ferrera-Cerrato, R. y Xoconostle-Cázares, B. 2017. Transferencia de nutrientes y crecimiento de *Pinus*

*greggii* Engelm. inoculado con hongos comestibles ectomicorrícicos en dos sustratos. Revista argentina de microbiología. 49:93-104.

Villegas-Olivera, J. A., Pérez-Moreno, J., Mata, G., Almaraz-Suárez, J. J., Ojeda-Trejo, E. and Espinosa-Hernández, V. 2017. Type of light and formation of basidiomata of two species of edible ectomycorrhizal mushrooms associated with neo-tropical pines and the description of basidiomata development. Revista Fitotecnia Mexicana. 40:405-413.

## Objetivos e hipótesis

### Objetivo general

Contribuir al conocimiento biotecnológico de los hongos comestibles silvestres pertenecientes a los géneros *Hebeloma*, *Suillus* y *Coprinus*.

### Objetivos específicos

1. Caracterizar las estructuras diagnósticas de la simbiosis ectomicorrízica de *Pinus ayacahuite* con *Hebeloma alpinum* y *Suillus pseudobrevipes*, especies de hongos silvestres ectomicorrízicos ampliamente consumidos en el centro de México, con potencial biotecnológico para producción de inoculantes forestales.
2. Realizar la caracterización molecular de los micobiontes *Hebeloma alpinum* y *Suillus pseudobrevipes* presentes en las raíces de *P. ayacahuite* a través de la secuenciación de las regiones ITS.
3. Caracterizar las estructuras macro y micromorfológicas de ejemplares de *Coprinus pjierekajoensis*, para su registro e identificación como nueva especie.
4. Efectuar una descripción química, en términos de pH, contenido de materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico, densidad aparente y concentraciones de macro y micronutrientes del suelo forestal en el que crece *Coprinus pjierekajoensis*, un hongo comestible silvestre saprófito, endémico de los bosques de Lomas de Teocalzingo, municipio de Ocuilan en el estado de México, con potencial biotecnológico de cultivo.

## Hipótesis

1. *Pinus ayacahuite* es susceptible de ser colonizado por *Hebeloma alpinum* y *Suillus pseudobrevipes*, especies de basidiomicetes ectomicorrízicos, con interés alimentario, ecológico y biotecnológico.
2. Los estudios moleculares, son un valioso complemento en la confirmación de la identificación de especies de hongos comestibles ectomicorrízicos silvestres de México asociadas con las raíces ectomicorrizadas de *Pinus ayacahuite*, el árbol de Navidad Mexicano.
3. *Coprinus pjierekakjooensis* constituye una nueva especie con base en sus características macro, micromorfológicas y moleculares comparada con otras especies cercanas pertenecientes al género *Coprinus*.
4. Las relaciones filogenéticas entre *Coprinus pjierekakjooensis*, con base en el análisis de secuencias de la región ITS del ADN, permiten confirmar que es una nueva especie, al ser comparada molecularmente con otras especies pertenecientes al género *Coprinus sensu stricto*.

# CAPÍTULO 1- CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, ANATÓMICA Y MOLECULAR DE ECTOMICORRÍZAS DE *Pinus ayacahuite* Ehrenberg CON DOS HONGOS COMESTIBLES

## 1.1 RESUMEN

Cada año México produce aproximadamente 560,000 árboles de Navidad, principalmente la especie nativa *Pinus ayacahuite* Ehrenberg. A pesar de su importancia ecológica y ambiental y de que *P. ayacahuite* requiere de manera obligada del establecimiento en sus raíces de la simbiosis ectomicorrízica, los estudios de los micobiontes ectomicorrízicos asociados con esta especie son escasos. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar las ectomicorrizas de dos hongos comestibles ampliamente consumidos en el centro de México, *Hebeloma alpinum* J. Favre y *Suillus pseudobrevipes* A.H. Sm. y Thiers, asociados con *P. ayacahuite*. Se sintetizaron ectomicorrizas entre *P. ayacahuite* y dos especies de hongos comestibles ectomicorrízicos. Después de 6 años se seleccionaron las plantas que tenían colonizaciones de 100% para caracterizarlas. La caracterización morfoanatómica se realizó mediante cortes histológicos y microscopía óptica de campo claro y electrónica de barrido. La identificación molecular se realizó mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de polimerasa), usando la región ITS (Internal Transcribed Spacer), específicamente ITS4 e ITS5. Las ectomicorrizas de *H. alpinum* se caracterizaron por poseer micelio laxo de color blanquecino y abundantes hifas emanantes y las de *S. pseudobrevipes* por su superficie lisa blanca cuando joven y posteriormente de color café, con abundantes cristales de oxalato en sus hifas, además de la presencia de rizomorfos. Los resultados moleculares mostraron una homología genética de 99% para *H. alpinum* y 97% para *S. pseudobrevipes*. La caracterización morfoanatómica y molecular permite la diferenciación entre micobiontes cercanos a nivel de especie. Sin embargo, a la fecha el uso de dichas herramientas ha recibido escasa atención para las especies Neotropicales. El presente estudio constituye uno de los pocos que caracterizan ectomicorrizas sintetizadas con el pino de Navidad mexicano (*P. ayacahuite*).

**Palabras clave:** *Suillus pseudobrevipes*, *Hebeloma alpinum*, inoculación, hongos comestibles

## 1.2 ABSTRACT

Mexico produces around 560,000 Christmas trees annually, mainly the native species *Pinus ayacahuite* Ehrenberg. Despite its economical, ecological and environmental importance and the fact that *P. ayacahuite* requires the establishment of ectomycorrhizal symbiosis at its roots, identification and characterization of the ectomycorrhizal mycobionts associated with this species have received little attention. The objective of the present work was to characterize the ectomycorrhizae of *P. ayacahuite* with two edible fungi widely consumed in central Mexico: *Hebeloma alpinum* J. Favre and *Suillus pseudobrevipes* A.H.Ye. and Thiers. Ectomycorrhizae were synthesized between *P. ayacahuite* and two edible ectomycorrhizal fungi. After 6 years, plants that had colonizations of 100% were selected to characterize them. Morphoanatomical characterization was performed using histological sections and light field optical and scanning electron microscopies (SEM). Molecular identification was performed using the PCR (polymerase chain reaction) technique, sequencing the ITS (Internal Transcribed Spacer) region, specifically ITS4 and ITS5. The ectomycorrhizae of *H. alpinum* were characterized by having lax mycelium of whitish colour and abundant emanating hyphae, and those of *S. pseudobrevipes* by their smooth white surface when young and brown coloured later, with abundant oxalate crystals in their hyphae, very clear under SEM, and by the presence of rhizomorphs. The molecular results showed a genetic homology of 99% and 97% for *H. alpinum* and *S. pseudobrevipes*, respectively. Morphoanatomical and molecular characterization allows differentiation between closely related mycobionts at the species level. However, to date the use of such tools has received little attention for Neotropical species. The present study constitutes one of the few that characterize synthesized ectomycorrhizae with the Mexican Christmas pine (*P. ayacahuite*).

**Keywords:** *Suillus pseudobrevipes*, *Hebeloma alpinum*, inoculation, edible fungi

### 1.3 INTRODUCCIÓN

Los pinos establecen una simbiosis mutualista con especies de hongos silvestres denominada ectomicorriza la cual produce redes miceliales de enorme relevancia estructural y funcional para el mantenimiento de los ecosistemas forestales (Martínez-Reyes *et al.*, 2012; Villegas-Olivera *et al.*, 2017), permitiendo la absorción de macro y micronutrientes fundamentales para la supervivencia de las plantas (Rentería-Chávez *et al.*, 2017). Por otra parte, algunos de los hongos asociados a las raíces de los pinos producen cuerpos fructíferos o esporomas comestibles, que forman parte de la dieta en la época de lluvia de los pobladores aledaños a las áreas forestales (Pérez-Moreno *et al.*, 2008).

México cuenta con 47 especies de pinos, de los cuales aproximadamente 55% son endémicos. *Pinus ayacahuite* var. *ayacahuite* es un árbol nativo de México. La palabra “ayacahuite” proviene del náhuatl “*ayaucúáhuil*” y significa “pino de niebla” (Viesca y Aranda, 1997), esta especie es ampliamente utilizada en la producción de árboles de Navidad, que requiere de manera obligada del establecimiento de la ectomicorriza en sus raíces, proporcionando resistencia a las enfermedades, al estrés hídrico y a la contaminación. En México, la producción de árboles de Navidad es una actividad que se desarrolla desde hace 40 años, el año anterior se produjeron aproximadamente 560,000 árboles de navidad, principalmente de esta especie (CONAFOR, 2020). A nivel mundial es una industria forestal valuada anualmente en billones de dólares, la cual favorece la reactivación económica en las áreas en donde se desarrolla (Chastagner y Benson, 2000; Arteaga-León *et al.*, 2018). Estas plantaciones contribuyen en la conservación del hábitat (referido a alimentación, abrigo, sitio reproductivo y generación de microclimas específicos) para un gran número de especies asociadas, las cuales a su vez, coadyuvan a mitigar los efectos del cambio global, especialmente en áreas degradadas. Por tal motivo es importante establecer mejoras en los programas de conservación y uso de especies forestales (Álvarez-Moctezuma *et al.*, 2007; Arteaga-León *et al.*, 2018). Debido a que la asociación ectomicorrízica es obligada para los pinos, se han desarrollado técnicas de inoculación con hongos que permiten la supervivencia de especies forestales en campo. Uno de los criterios de selección que ha cobrado actualmente primordial interés a nivel internacional es la utilización de hongos ectomicorrízicos comestibles como bioinoculantes de árboles forestales (Pérez-Moreno *et al.*, 2020).

*Hebeloma alpinum* y *Suillus pseudobrevipes* son dos especies de hongos silvestres comestibles ectomicorrízicos, con gran importancia económica, biotecnológica y ecológica en México (Pérez-Moreno *et al.*, 2010; Blanco *et al.*, 2012); *H. alpinum* es ampliamente consumido en el centro del país (Pérez-Moreno *et al.*, 2010) y *Suillus pseudobrevipes* es una especie con vida de anaquel corta, por lo que es usualmente usada para autoconsumo en México, por lo cual es ideal para la utilización como bioinoculante líquido. Estas dos especies tienen un enorme potencial como bioinoculantes para la utilización en vivero con una tecnología relativamente fácil, de bajo costo y con alta eficiencia de colonizar en los primeros estadios ontogénicos de plantas, puesto que se encuentran catalogadas como especies pioneras (Pérez-Moreno *et al.*, 2020; Garibay-Orijel *et al.*, 2013; Ashkannejhad y Horton, 2005) y prosperan en condiciones de baja fertilidad.

A pesar de su enorme relevancia ecológica los estudios relacionados con la identificación de hongos comestibles silvestres ectomicorrízicos asociados con el árbol de Navidad Mexicano, *P. ayacahuite* han recibido escasa atención (Musálem y Ramírez, 2003; Arteaga-León *et al.*, 2018). Por esta razón, resulta de enorme importancia la exacta identificación y descripción de sus ectomicorrizas. En el presente trabajo por primera ocasión se describen en forma detallada las características de las ectomicorrizas de *H. alpinum* y *S. pseudobrevipes* con *P. ayacahuite* con técnicas de caracterización morfoanatómica y molecular, especialmente usando microscopía electrónica de barrido. Este tipo de estudios permitirán a futuro una adecuada selección e identificación de especies de hongos ectomicorrízicos y su futura utilización en especies de pino para plantaciones, reforestaciones o restauración ecológica de zonas degradadas (Carrasco-Hernández *et al.*, 2011; Garibay-Orijel *et al.*, 2013; Pérez-Moreno *et al.*, 2020), considerando que su implementación puede representar múltiples beneficios a largo plazo en la aplicación de bioinoculantes en invernadero (Martínez-Reyes *et al.*, 2012).

## **1.4 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1.4.1 Montaje del experimento, siembra e inoculación**

El experimento se llevó a cabo en el invernadero del Colegio de Postgraduados, campus Montecillo, Texcoco, estado de México, utilizando semillas de *P. ayacahuite*, provenientes

de un bosque natural de la zona del Cofre de Perote, Veracruz, México. Las semillas se sumergieron en agua durante 24 horas, cambiando el agua cada 7 horas para permitir su oxigenación. Posteriormente se esterilizaron superficialmente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% durante 20 minutos y se enjuagaron con agua destilada (Arteaga-León *et al.*, 2018). La siembra se realizó a 1 cm de profundidad y se colocó 3 semillas por tubete, posteriormente se regaron con agua purificada cada tercer día y se aplicó el fungicida Captan en una solución de 2 g/L para prevenir la aparición de “damping-off” alternado con el riego de agua purificada, hasta que el tallo de la plántula lignificó.

Para la preparación del inóculo ectomicorrízico se utilizaron hongos que procedieron del mercado de Ozumba, estado de México (Figura 1a y 1b). La preparación de los inoculantes consistió en cortar los estípites de los esporomas de *H. alpinum* y el himenio de los hongos de *S. pseudobrevipes*. Los píleos y los himenios frescos fueron molidos con un molino eléctrico de cuchillas (Osterizer clásica, modelo 465-42, Sumbeam, México) con agua destilada estéril, en una proporción 1:1 píleo y agua destilada (100g:100ml) respectivamente, se depositaron en envases de vidrio y se almacenaron a 5°C hasta su utilización, con el fin de preservar su viabilidad.

Previo a realizar el llenado de los envases, para la siembra, los tubetes con capacidad de 130 ml, se lavaron y desinfectaron. El sustrato utilizado consistió en una mezcla de arena-corteza-suelo forestal en proporción 2:2:1, el cual se esterilizó en autoclave durante cuatro horas a 125 °C en el primer día, posteriormente se dejó un día de reposo y al siguiente día se esterilizó nuevamente en autoclave durante tres horas a 125 °C. La inoculación consistió en la aplicación de 20 ml de inóculo líquido a una profundidad de 3 cm por cada tubete.

#### **1.4.2 Caracterización morfológica y anatómica de las raíces ectomicorrizadas**

Seis meses después de la siembra se seleccionaron plantas que presentaban un alto porcentaje de micorrización de los hongos inoculados y se trasplantaron en unidades experimentales denominadas microcosmos (Figura 1.2a). Las plantas fueron mantenidas en esta condición

durante 6 años en invernadero. Después de dicho tiempo se efectuó el análisis de las puntas de raíces ectomicorrizadas bajo un microscopio estereoscópico, de árboles crecidos en esta condición. Que presentaban colonizaciones ectomicorrízicas de 100%, porcentaje que se comprobó al realizar el conteo de todas las raíces cortas de las plantas micorrizadas. Para la caracterización morfológica y anatómica de las raíces ectomicorrízicas se efectuaron cortes transversales detectando la presencia de micelio externo, manto y red de Hartig, que son las estructuras diagnósticas de una raíz ectomicorrizada, además de longitud, diámetro, color, tipo de ramificación, forma de las puntas no ramificadas, textura y anatomía externa del manto (Baeza-Guzman *et al.*, 2017). Las fotografías de estas estructuras fueron tomadas con un microscopio óptico de campo claro Olympus BX51. Para el análisis de las raíces ectomicorrizadas por microscopía electrónica de barrido (SEM) se utilizó un microscopio JEOL JSM-6360LV (Tokio, Japón).

#### **1.4.3 Análisis molecular de las raíces ectomicorrizadas**

Para el análisis molecular de las raíces ectomicorrizadas, de cada especie de hongo inoculado se extrajo el ADN de 1.0 g de raíces ectomicorrizadas jóvenes de *Pinus ayacahuite*. El ADN se extrajo con el kit de aislamiento de ADN Power Soil® (Mo Bio número de catálogo 12888-50), el cual posteriormente fue almacenado a -20 °C. La región de la transcripción interna ribosómica (ITS) se amplificó por PCR, utilizando la combinación de las regiones ITS4 e ITS5. El procedimiento utilizado para la amplificación por PCR fue de: cinco minutos de desnaturalización inicial a 94 °C, seguido por 30 ciclos (30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C y 45 segundos a 72 °C), con una extensión final de 72 °C por cinco minutos. Los productos de PCR se limpiaron con ExoSAP-IT (USB Corporation) y se sometieron a la reacción de secuenciación con BigDye V3.1. Las secuencias de ADN fueron obtenidas por el secuenciador 3130xl Genetic Analyzer, a partir del método de Sanger. Dichas secuencias fueron almacenadas en la base de datos GenBank. Los morfotipos se determinaron por afinidad filogenética de sus secuencias por consenso cuando fueron comparados con dicha base de datos usando el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

## 1.5 RESULTADOS

### 1.5.1 Descripción de esporomas de *Hebeloma alpinum*

Las características distintivas de los esporomas de *H. alpinum* son su píleo con textura viscosa, convexo de color marrón oscuro y más claro hacia el margen, con diámetro de 1.5-5.7 cm, pilipelis de 50-90  $\mu\text{m}$  de grosor. Estípite cilíndrico a claviforme, raramente bulboso, de color crema de 1.2-6.8 x 0.4-1.9 cm, que se vuelve hueco al madurar, superficie seca, pruinosa a flocosa especialmente hacia el ápice. Contexto de color blanquecino (Fig. 1.1c), olor similar a cacao y sabor en fresco ligeramente amargo. Láminas libres de color crema en estado inmaduro a marrón o ámbar al alcanzar la madurez. Esporas de 9.9-13.3 x 5.3-6.0  $\mu\text{m}$ . Basidios tetraesporicos, cilíndricos a clavados, queilocistidios presentes y fíbulas presentes en todo el basidioma. Estas características macromorfológicas son similares a las reportadas por Carrasco-Hernández *et al.* (2015).

A pesar de los altos porcentajes de homología genética comparados con las secuencias existentes en GenBank, existen diferencias macro y micromorfológicas de la especie de *Hebeloma alpinum* que se desarrolla al norte de Europa, en comparación con la que crece en la Faja Volcánica Transmexicana. Vesterholt (2005) mencionó que las esporas generalmente son ornamentadas y carecen de poro germinativo, de color marrón y un tamaño de 10.9-14.4 x 6.0-7.6  $\mu\text{m}$  de largo y ancho, con un índice de  $Q = 1.65$  con forma amigdaloides; Eberhardt *et al.* (2015a) mencionaron que las esporas presentan ornamentación reticulada, con un tamaño de 11.2-13.3 x 6.6-8.0  $\mu\text{m}$  de largo y ancho respectivamente y un índice de  $Q = 1.69$ ; mientras que Carrasco-Hernández *et al.* (2015) reportó que las esporas de *H. alpinum* son elípticas con ornamentación lacunosa de 8.8 y 4.7  $\mu\text{m}$  de largo y ancho, respectivamente (Cuadro 1.1). La identificación de *Hebeloma* a nivel de género es relativamente fácil por su píleo liso, textura viscosa y el borde de las láminas estériles con queilocistidios bien diferenciados; además de la ausencia de colores amarillos fuertes y de crisocistidios (Vesterholt, 2005). Sin embargo, la identificación a nivel de especie es muy compleja, por lo cual es de enorme relevancia la detallada descripción macro y micromorfológica. *H. alpinum* crece en Europa en hábitats alpinos y boreales, y es similar macromorfológicamente a *H. crustuliniforme* y a *H. velutipes* (Vesterholt, 2005).



**Figura 1.1.** Vista general de la importancia socioeconómica, cultural y ecológica de los hongos comestibles ectomicorrízicos estudiados: *Hebeloma alpinum* (Ha) y *Suillus pseudobrevipes* (Sp). **a)** Venta de Ha y otras especies comestibles del género *Hebeloma* en el mercado de Ozumba, el cual data de épocas prehispánicas, en el estado de México; **b)** Venta de especies de *Suillus*, incluyendo Sp dentro de la canasta, en el mismo mercado de Ozumba, estado de México; **c)** Macrofotografía mostrando los caracteres diagnósticos de Ha, de ejemplares procedentes de mercado; **d)** Basidiomas de Sp mostrando la presencia del velo en el estípite, y sus caracteres diagnósticos, en bosque natural de *Pinus ayacahuite* en el estado de México.

**Cuadro 1.1.** Características macro y micromorfológicas de *Hebeloma alpinum*, descritas por diversos autores.

Estructuras	Atributos	Autores			
		Vesterholt (2005)	Eberhardt <i>et al.</i> (2015)	Carrasco-Hernández <i>et al.</i> (2015)	Este trabajo
Píleo	Consistencia	Viscida	Viscida	Viscida	Viscida
	Diámetro	nd	1.2-7.0 cm	1.2-5.2 cm	1.5-5.7 cm
	Forma	Hemisférico o campanulado	Convexo a menudo umbonado	Convexo	Convexo
Pilipelis	Color	Marrón amarillento y más claro hacia el margen	Crema y más pálido hacia el margen	Marrón oscuro y más claro hacia el margen	Blanco a color crema
	Grosor	50-70 $\mu\text{m}$	nd	nd	50-90 $\mu\text{m}$
Láminas	Color	Crema	Crema a ámbar al madurar	Marrón oscuro	Crema
	Adherencia	Libre	Libre	Libre	Libre
Esporas	Color	Marrón	Marrón a veces gutuladas	Café	Café
	Forma	Amigdaloides	Limoniforme	Elíptica	Amigdaloides
	Ornamentación	Presente y carecen de poro germinativo	Reticulada	Lacunosa	Verrucosa
	Largo	10.9-14.4 $\mu\text{m}$	11.2-13.3 $\mu\text{m}$	8.8-8.9 $\mu\text{m}$	9.9-13.3 $\mu\text{m}$
	Ancho	6.0-7.6 $\mu\text{m}$	6.6-8.0 $\mu\text{m}$	4.7-4.8 $\mu\text{m}$	5.3-6.0 $\mu\text{m}$
	Índice de Q	1.65	1.69	nd	1.57
Basidios	Forma	Tetraesporica, clavada	Tetraesporica, clavada	Tetraesporica	Tetraesporica
	Queilocistidios	Presentes	Presentes	nd	Presentes
	Cistidios	Presentes	Presentes	nd	Presentes
	Pleurocistidios	nd	Ausentes	nd	Ausentes
Estípite	Forma	Cilíndrico	Cilíndrico	Cilíndrico	Cilíndrico
	Color	Blanco	Crema	Crema	Blanquecino
	Largo	20-30 mm	nd	1.2-5.7 cm	1.2-6.8 cm
	Ancho	4-8 mm	nd	0.4-1.8 cm	0.4-1.9 cm

Estructuras	Atributos	Autores			
		Vesterholt (2005)	Eberhardt <i>et al.</i> (2015)	Carrasco-Hernández <i>et al.</i> (2015)	Este trabajo
	Superficie	Seca	Seca, pruinosa a flocosa	nd	Fibrosa
Contexto	Color	nd	Blanquecino	nd	Blanquecino
	Olor	nd	Similar al cacao	Rábano	Imperceptible
	Sabor	nd	Amargo	nd	Dulce

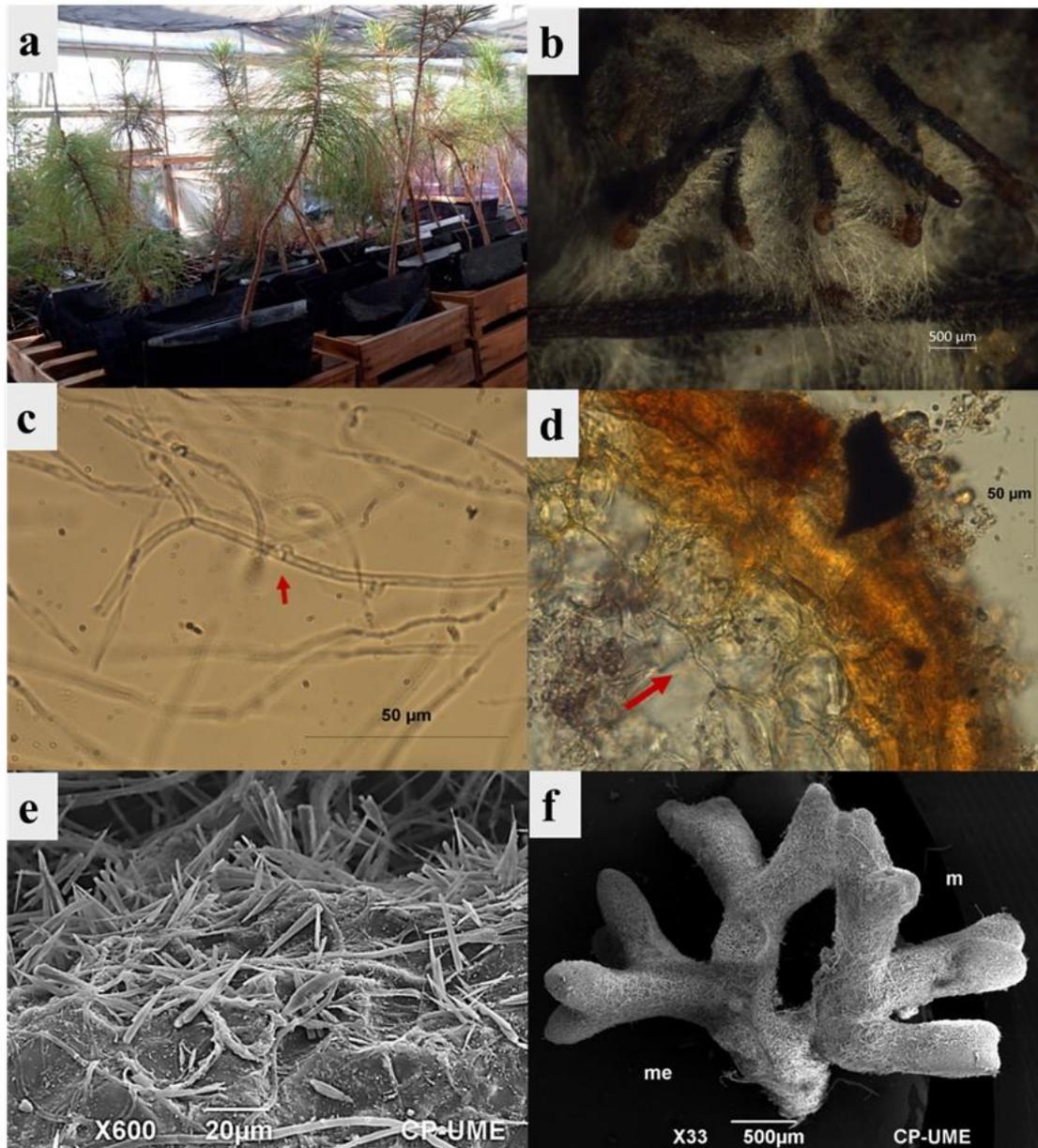
nd: no descrito por los autores.

### 1.5.2 Ectomicorrizas de *Hebeloma alpinum* con *Pinus ayacahuite*

Las raíces micorrizadas de *H. alpinum* con *P. ayacahuite* fueron de color café claro en etapa temprana, siendo más oscura la base del ápice, con el tiempo se torna café obscura, posee un tipo de ramificación monopodial, dicotómica y raramente tetrapodial, la forma de las puntas no ramificadas son rectas con ápices redondeados; con una longitud de 1.32 a 1.98 mm y un diámetro de 0.5 a 0.536 mm, la base del ápice con una longitud de 0.65 a 1.14 mm y el ápice de la micorriza tiene una longitud de 0.35 a 0.42 mm (Fig. 1.2b y f), no posee rizomorfos, pero si hifas emanantes abundantes con presencia de fíbulas de color blanco. La red de Hartig penetró hasta tres capas de células corticales y el manto presenta un arreglo plectenquimatoso y de superficie lisa (Fig. 1.2d).

Estas características morfológicas son similares a las reportadas por López-Gutiérrez *et al.* (2018) para *H. alpinum* con *Pinus pringlei* y Carrasco-Hernández *et al.* (2015) para *H. alpinum* con *P. patula* y *P. pseudostrobus*. En el presente trabajo se presentan por primera ocasión fotografías de ectomicorrizas de *H. alpinum* con *P. ayacahuite* usando microscopía electrónica de barrido. Fue posible observar con esta herramienta claramente la presencia de abundantes cristales de oxalato de calcio (Fig. 1.2e). Esta herramienta brinda un aporte al conocimiento en la clasificación taxonómica de las especies involucradas en un mismo género, puesto que resalta y precisa la diversidad biológica entre estas, como se demostró en las ornamentaciones de las esporas de *H. alpinum*, *H. mesophaeum* y *H. leucosarx* (Carrasco-Hernández *et al.*, 2015). La identificación molecular mostró la presencia de las especies inoculadas en las raíces colonizadas de *P.*

*ayacahuite* con una alta afinidad genética de 99.55 a 99.70 para *Hebeloma alpinum* en comparación con las secuencias existentes en la base de datos de GenBank (Cuadro 1.3).



**Figura 1.2.** Asociación ectomicorrízica de *Hebeloma alpinum* (Ha) con *Pinus ayacahuite* (Pa). **a)** Plantas de Pa en microcosmos de seis años de edad; **b)** Morfotipo con ramificación dicotómica monopodial; **c)** Presencia de fíbulas (flecha roja) en las hifas del micelio externo ectomicorrízico de Ha; **d)** Corte transversal de la micorriza de Ha, mostrando la red de Hartig (flecha roja) y el manto de color amarillento en la parte externa de la raíz; **e)** Abundantes cristales de oxalato de calcio en la superficie del manto de Ha con microscopía electrónica de barrido; **f)** Microfotografía tomada con el microscopio

electrónico de barrido, mostrando el tipo de ramificación tetrapodial, ápices redondeados e hifas emanantes, micelio externo (me) y manto (m).

### **1.5.3 Descripción de esporomas de *Suillus pseudobrevipes***

Esta especie pertenece al orden Boletales y a la familia Suillaceae (Bruns *et al.*, 2010; Blanco *et al.*, 2012) y en 1964 Smith y Thiers la describieron por primera vez dentro de la sección Boletinus por sus esporas elípticas, oblongas o subfusoides, píleo con un suprapellis o epicutis seco fibriloso a escuamuloso; o con presencia de un anillo fibriloso en el estípite sin puntos glandulares o manchas (Smith y Thiers, 1964).

Posee un píleo de 60 a 90 mm de diámetro, convexo, de color café amarillento, víscido en fresco. Contexto sólido esponjoso, muy húmedo, de color amarillo pálido o marrón claro. Himenio de forma tubular, de 5 mm de grosor, poros de color amarillo mostaza. Estípite de 25-50 x 6-15 mm, forma cilíndrica, de color amarillo, de color café claro hasta café oscuro hasta la parte apical con un velo parcial. Esporas subfusiforme a elípticas de 6.5-8.5 x 2.5-3.5  $\mu\text{m}$ , lisas. Estas características concuerdan con las reportadas por Smith y Thiers (1964), Miller *et al.* (2000), Pérez-Moreno *et al.* (2010) y Klofac (2013).

Klofac (2013) mencionó que el velo de esta especie generalmente cubre la mitad inferior del estípite; sin embargo, en nuestro caso no observamos esta característica en todos los esporomas estudiados en este trabajo. Sin embargo, Smith y Thiers (1964) mencionaron que el velo es una estructura muy delicada y su permanencia depende de las condiciones ambientales del sitio de colecta, estadio de los hongos y manejo posterior.

### **1.5.4 Ectomicorrizas de *Suillus pseudobrevipes* con *Pinus ayacahuite***

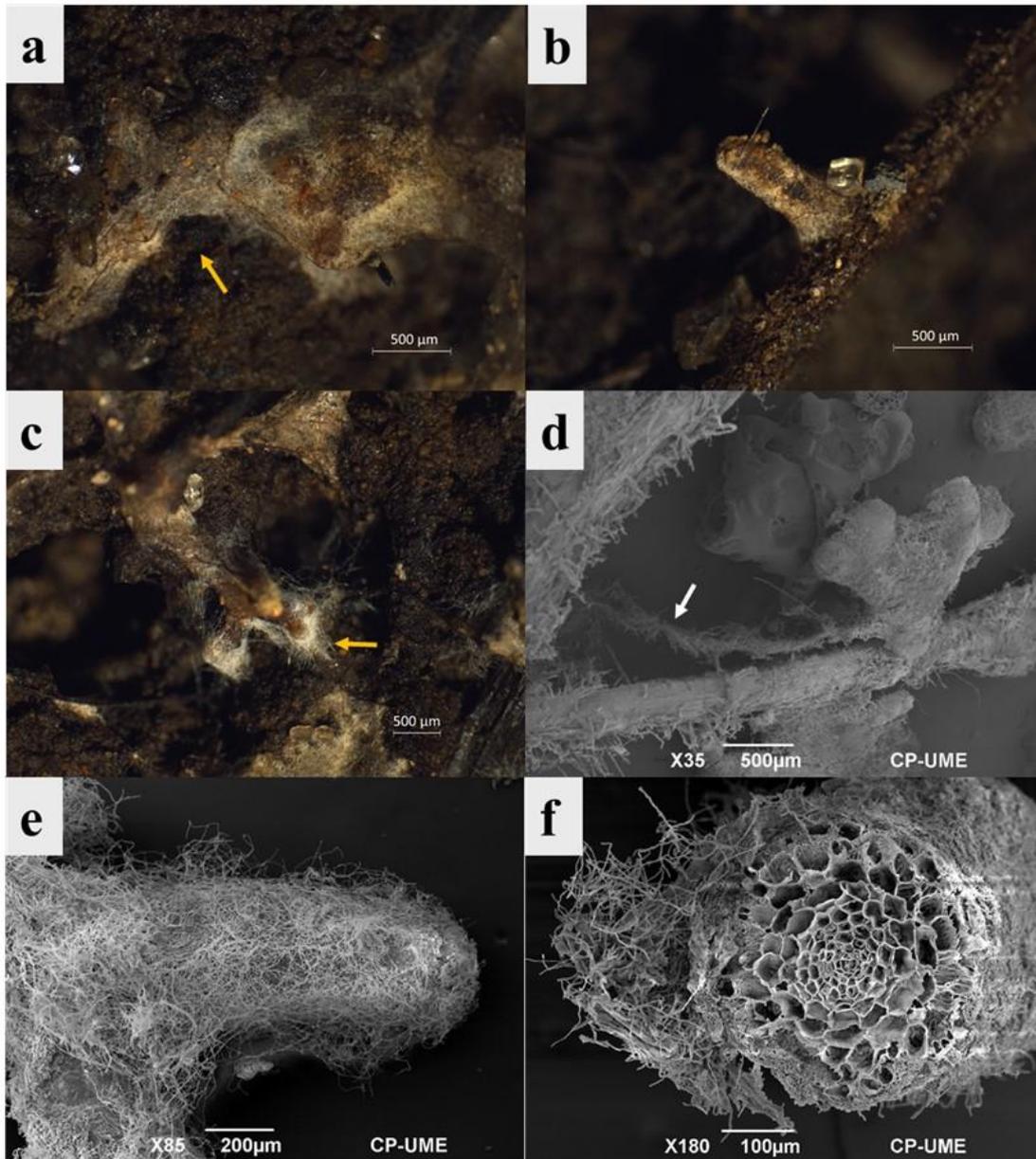
La asociación ectomicorrízica de *S. pseudobrevipes* presentó una longitud de 0.44 mm en etapa joven de desarrollo llegando hasta los 2.9 mm; monopodial a ramificaciones de tipo dicotómico en etapas jóvenes de la raíz corta micorrizada (Fig. 1.3a, b y c) y coraloide en etapa madura. El manto presentó visibilidad media, con superficie algodonosa en gran parte del morfotipo y coloración blanca ligeramente brillante en etapas jóvenes de desarrollo de la raíz ectomicorrizada (Fig. 1.3c) y amarillo pálido, en etapas maduras, con terminaciones, predominantemente rectas a ligeramente torcidas. Las raíces asociadas a *S. pseudobrevipes* presentaron rizomorfos (Fig. 1.3d), las cuales

son estructuras con una alta conductividad hidráulica o transferencia de agua a la planta, por lo que estos son considerados como una extensión del sistema radical de la planta para resistir ambientes con estrés hídrico (Pérez-Moreno y Read, 2004). Se presentan por primera ocasión imágenes de la ectomicorriza de *S. pseudobrevipes* con *P. ayacahuite* utilizando microscopía electrónica de barrido. Esta herramienta permitió la observación detallada de la estructura de rizomorfos (Fig. 1.3d) de las raíces cortas micorrizadas de *S. pseudobrevipes*, caracteres que en taxonomía son relevantes para diferenciar especies, debido al tamaño y complejidad de las estructuras involucradas en los morfotipos (Horton y Bruns, 2001). *S. luteus* y *S. brevipes* son especies muy cercanas a *S. pseudobrevipes*, pero suficientemente distintivas morfológica y molecularmente como para ser consideradas especies distintas (Smith y Thiers, 1964).

La identificación molecular del simbionte *S. pseudobrevipes* en la ectomicorriza de *P. ayacahuite* tuvo una afinidad filogenética de 97.67 a 97.79 en comparación con las secuencias existentes en la base de datos GenBank (Cuadro 1.3). Este tipo de análisis permitió confirmar de manera concluyente que esta especie inoculada fue capaz de colonizar la raíz de *P. ayacahuite* (Fig. 1.3).

La identificación molecular de las especies es fundamental para la correcta identificación de las especies ya que en algunas ocasiones la especie de *S. pseudobrevipes* se puede clasificar en un clado con cuatro subclados o especies que son similares morfológicamente, pero muy difíciles de distinguir debido al velo evanescente a menudo ausente en la madurez o fugaz en determinadas condiciones climáticas como exceso o limitante de humedad.

En el caso específico del género *Suillus* existen especies con grandes similitudes genéticas por lo que no es posible su separación exclusivamente con marcadores moleculares (Nguyen *et al.*, 2016) y se requiere entonces de descripciones taxonómicas morfoanatómicas detalladas para efectuar una identificación precisa.



**Figura 1.3** Estructuras macro y micromorfológicas de la asociación ectomicorrízica de *Suillus pseudobrevipes* (Sp) con *Pinus ayacahuite* (Pa). **a-c)** Macromorfología de la asociación micorrízica de Sp con Pa con ramificación monopodial y dicotómica; **d-f)** Microfotografías con el microscopio electrónico de barrido, donde se observa: **(d)** la presencia de rizomorfos (flecha blanca), estructura diagnóstica de la simbiosis ectomicorrízica del micobionte; **(e)** morfotipo con ramificación monopodial, rodeado por abundante micelio externo; **(f)** corte transversal, es posible apreciar la red de Hartig y abundante micelio externo.

**Cuadro 1.2.** Características diagnóstico de las estructuras macro y micromorfológicas de las raíces ectomicorrizadas de *P. ayacahuite* con dos hongos comestibles silvestres, estudiados en el presente trabajo.

Estructura	Atributos	<i>Hebeloma alpinum</i>	<i>Suillus pseudobrevipes</i>
Morfotipo	Ramificación	Monopodial, dicotómica y raramente tetrapodial	Monopodial y dicotómica
	Largo	1.32-1.98 mm	2.0-2.5 mm
	Ancho	500-536 $\mu$ m	400-370 $\mu$ m
Base del ápice	Largo	648-1143 $\mu$ m	700-750 $\mu$ m
Ápice	Largo	352-418 $\mu$ m	400-500 $\mu$ m
	Forma	Redondeada	Cilíndrica
	Color en etapa temprana	Café claro	Ambar
	Color en etapa madura	Café oscuro	Marrón
Micelio externo	Color en etapa temprana	Blanquecino	Blanquecino
	Color en etapa madura	Blanquecino	Marrón amarillento
	Cantidad	Abundante	Abundante
	Forma de las hifas	Emanantes abundantes	Hialinas, septadas ligeramente incrustadas con granulaciones
	Diámetro	2.5-3 $\mu$ m	2-4 $\mu$ m
	Rizomorfos	Ausentes	Presentes
	Cordones miceliales	Presentes	Ausentes
Manto	Organización	Plectenquimatoso	Plectenquimatoso
	Transparencia	No transparente	No transparente
	Tipo se superficie	Liso	Lanoso
	Coloración	Blanquecino	Café
	Fíbulas	Presentes	Ausentes
	Septos	Presentes	Ausentes
Red de Hartig	Capas de células que penetra	2-3	2-3

**Cuadro 1.3.** Identificación de los micobiontes presentes en las raíces de *Pinus ayacahuite*, en función con su afinidad filogenética en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank.

GenBank <sup>¶¶</sup>	Organismo	e <sup>¶</sup>	% Id <sup>‡</sup>	Coincidencias NCBI GenBank	Número de accesión
		0.0	99.70	<i>Hebeloma alpinum</i>	JN943865.1
MT433884	<i>Hebeloma alpinum</i>	0.0	99.70	<i>Hebeloma alpinum</i>	KM390650.1
		0.0	99.56	<i>Hebeloma alpinum</i>	KY628057.1
		0.0	99.55	<i>Hebeloma alpinum</i>	KY271853.1
		0.0	97.79	<i>Suillus pseudobrevipes</i>	KU721230.1
MT433885	<i>Suillus pseudobrevipes</i>	0.0	97.67	<i>Suillus pseudobrevipes</i>	KX213828.1
		0.0	97.67	<i>Suillus pseudobrevipes</i>	KX213804.1
		0.0	97.67	<i>Suillus pseudobrevipes</i>	KX213803.1

¶¶: Número de accesión en GenBank de las secuencias del presente trabajo;

¶: Probabilidad de error en la identificación; ‡: porcentaje de similitud entre las secuencias.

## 1.6 DISCUSIÓN

El árbol de Navidad Mexicano, *P. ayacahuite*, tiene múltiples usos: como especie maderable, resina, como ocote para encender fogatas, plantaciones de árboles de Navidad, así como para reforestación de zonas urbanas y suburbanas (Bye y Linares 2013; CONAFOR, 2020). Adicionalmente, es una especie que tiene importancia medicinal desde épocas prehispánicas dado que se empleaba para “curar la hiperuricemia o gota, contra la fatiga del que administra la República y desempeña un cargo público, contra el cuerpo maltratado y para curar la herida del rayo”. En la Foja número 50 del facsímil del Códice de la Cruz Badiano se menciona en latín que se usa para la herida del rayo (De la Cruz, 1552), uso medicinal que continua hasta la actualidad, además de emplearse para curar llagas, y contra afecciones respiratorias (Bye y Linares 2013).

Las especies del género *Hebeloma* son consideradas ectomicorrízicas (Vesterholt, 2005). *Hebeloma alpinum* forma asociaciones ectomicorrízicas con *Pinus pringlei* (López-Gutiérrez et al., 2018), *P. patula*, *P. pseudostrobus* (Carrasco-Hernández et al., 2015),

*Salix herbacea*, *S. polaris*, *S. reticulata* y *S. retusa* (Eberhardt *et al.*, 2015a). En contraste, con *Dryas octopetala* que establece simbiosis ectendomicorrízica (Debaud *et al.*, 1981; Eberhardt *et al.*, 2015a). Se ha demostrado que *H. alpinum* tiene una enorme capacidad competitiva de micorrización en pinos, dado que cuando se coinocularon tres especies de *Hebeloma* (*H. alpinum*, *H. leucosarx* y *H. mesophaeum*) *H. alpinum* presentó un 72.3 % de colonización en plantas de *Pinus pseudostrobus*. En contraste, *H. leucosarx* y *H. mesophaeum* registraron porcentajes de micorrización menores, 13.2 y 0.0%, respectivamente. Incluso cuando se inocularon 6 especies (tres de *Hebeloma* y tres de *Laccaria*: *L. laccata*, *L. bicolor* y *L. proxima*) *H. alpinum* fue la especie que dominó la colonización micorrízica con un 34.1% (Carrasco-Hernández *et al.*, 2011).

*Suillus* principalmente se asocia en condiciones naturales con miembros de los Coniferales, principalmente con especies del género *Pinus* (e. g. *Suillus bovinus*, *S. collinitus*, *S. plorans*, *S. sibiricus* y *S. variegatus*), y con *Larix* (e.g. *Suillus flavus*, *S. laricinus* y *S. tridentinus*) (Agerer y Rambold, 2020; Smith y Thiers, 1964). Bajo condiciones *In vitro*, se han registrado especies de *Suillus* que establecen ectomicorrizas con *Arbutus*, *Arctostaphylos*, *Picea* y *Pseudotsuga* (*S. brevipes*); *Araucaria* (*S. granulatus*) y *Quercus* (*S. luteus*) (Palm y Stewart, 1984). Sin embargo, en el caso específico de *S. pseudobrevipes* se tienen muy pocos registros de sus simbiontes asociados. Se conoce que las especies del género *Suillus*, junto con *Rhizopogon* son los principales hongos ectomicorrízicos en el establecimiento de nuevas plantas, en condiciones donde las redes miceliales no están presentes; dado que las especies de estos géneros tienen adaptaciones ecológicas específicas para el establecimiento de pinos en condiciones adversas de sucesión temprana (Ashkannejhad y Horton, 2006).

Dentro de los pocos estudios que existen de *S. pseudobrevipes* en asociación con pinos se encontraron mediante biología molecular raíces micorrizadas de *S. pseudobrevipes* en *Pinus muricata* después de que se inocularon plantas de este pino con suelo nativo de un bosque después de sufrir un incendio. Se encontró que *S. pseudobrevipes* es capaz de colonizar plantas crecidas en cenizas como sustrato, pero no en suelos quemados, sugiriendo que los cambios químicos en el suelo posteriores al fuego es el primer filtro para determinar la abundancia de ectomicorrizas más que la concentración de ceniza (Peay *et al.*, 2009). Esta especie de hongo también formó ectomicorrizas cuando plantas de *P. greggii* fueron inoculadas con himenio seco de *Suillus* aff. *pseudobrevipes* y estas plantas obtuvieron un mayor peso seco total y contenido nutricional en comparación con

plantas no inoculadas (Méndez-Neri *et al.*, 2011). Garibay-Origel *et al.* (2013) describieron también la ectomicorriza de *Suillus pseudobrevipes* asociado con *P. montezumae* en la Faja Volcánica Transmexicana, las características de su descripción concuerdan con casi todas las que se describen en este trabajo, excepto que estos autores mencionaron que tiene abundante micelio externo gris que cubre toda la micorriza pero sin rizomorfos, en nuestro caso sí se formaron rizomorfos en la síntesis efectuada en condiciones de microcosmos.

Se tienen solo tres registros de la inoculación de *P. ayacahuite* con hongos silvestres comestibles ectomicorrízicos inoculados con micelio o con púleos molidos y secados. Dichos registros reportaron la formación de micorrizas entre: i) *P. ayacahuite* con *Lactarius indigo*; ii) *P. ayacahuite* con *L. deliciosus* y iii) *P. ayacahuite* con *Helvella* cf. *lacunosa* y *Hebeloma mesophaeum*. Las ectomicorrizas (ECM) de la síntesis de *P. ayacahuite* con *Lactarius indigo* fueron similares a las descritas en nuestro trabajo (ECM con ramificaciones cortas, dentro de los rangos de longitud y diámetro y dicotómicas); sin embargo las características de color difieren ya que las de *L. indigo* son de color amarillo cuando jóvenes y amarillo oro cuando maduran, con presencia de células laticíferas en sus rizomorfos, presencia de gránulos cristalinos blanquecinos en el exterior de la ECM, manto delgado y sin presencia de fíbulas (Flores *et al.*, 2005). Las ECM de la síntesis de *P. ayacahuite* con *Lactarius deliciosus* fueron simples sin ramificar, muy largas, de color amarillo oro a naranja, con células laticíferas, con presencia de rizomorfos y manto delgado (Díaz *et al.*, 2007).

La inoculación con púleos deshidratados y molidos de *Helvella* cf. *lacunosa* y *Hebeloma mesophaeum* en *P. ayacahuite* después de dos años aumento el peso seco total, y el contenido total de N, P, Mg, y Fe; con un porcentaje de micorrización de plantas inoculadas de 41 % a 59 %, dependiendo de su fuente de inóculo (Arteaga-León *et al.*, 2018).

Las características distintivas principales de la ECM de *H. mesophaeum* fue el color marrón anaranjado a marrón rojo en la base y marrón claro a crema hacia el ápice; y la de *Helvella* cf. *lacunosa* de color marrón oscuro en la base, que se vuelven más claras hacia el ápice con una superficie de color marrón anaranjado a marrón rojo, con ápices blanquecinos a crema cuando jóvenes, lisas, simples o dicotómicas, sin fíbulas, escaso micelio externo y sin rizomorfos (Arteaga-León *et al.*, 2018).

## 1.7 CONCLUSIONES

La inoculación de plantas de *P. ayacahuite* con los bioinoculantes líquidos de *H. alpinum* y *S. pseudobrevipes* fue exitosa, dado que las raíces de *P. ayacahuite* se colonizaron con estas dos especies de hongos silvestres comestibles. Se corroboró con técnicas de caracterización morfoanatómica y molecular que dichas especies de hongos forman ectomicorrizas típicas dado que se observaron las estructuras diagnóstico de las mismas: micelio externo, manto y red de Hartig. En este trabajo se presenta por primera vez imágenes usando microscopía electrónica de barrido de las ectomicorrizas formadas en *P. ayacahuite* con *H. alpinum* y *S. pseudobrevipes*. Los avances en biología molecular en conjunto con las descripciones morfológicas y anatómicas, ha dado resultados prometedores en la clasificación de hongos ectomicorrízicos asociados a diversas especies forestales. En el presente trabajo fueron identificados dos micobiontes, pertenecientes a la familia de los Basidiomycetes, donde las herramientas de microscopía electrónica de barrido y la biología molecular de las ectomicorrizas de *H. alpinum* y *S. pseudobrevipes* con *P. ayacahuite* fueron fundamentales para su identificación precisa. Es fundamental que se realicen más investigaciones de los simbiontes asociados al árbol de Navidad mexicano *P. ayacahuite*, dado que es una de las especies que más se utilizan para este fin, además de ser utilizado en plantaciones forestales con fines comerciales y para la restauración de áreas degradadas en nuestro país.

## 1.8 LITERATURA CITADA

- Agerer and Rambold, 2020. An Information System for Characterization and Determination of Ectomycorrhizae. DEEMY. Consultado en mayo de 2020.
- Álvarez-Moctezuma, J. G., Alia-Tejacal, I., Colinas-Leon, M. T. and Sahagún-Castellanos, J. 2007. Interspecific differences in postharvest quality on Mexican Christmas trees. *Silvae Genetica*. 56:65-73.
- Arteaga-León, C., Pérez-Moreno, J., Espinosa-Victoria, D., Almaraz-Suárez, J., Silva-Rojas, H. and Delgado-Alvarado, A. 2018. Ectomycorrhizal inoculation with edible fungi increases plant growth and nutrient contents of *Pinus ayacahuite*. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 89:1089-1099.
- Blanco, D., Fajardo, J., Verde, A. y Rodríguez, C. 2012. Etnomicología de los hongos del género *Suillus*, una visión global. *Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid*, 36:175-186.

- Ashkannejhad, S. y Horton, T. R. 2005. Ectomycorrhizal ecology under primary succession on coastal sand dunes: interactions involving *Pinus contorta*, suilloid fungi and deer. *New Phytologist*. 169:345-354.
- Bruns, T., Grubisha, L., Trappe, J., Kerekes, J. and Vellinga, E. 2010. *Suillus quiescens*, a new species commonly found in the spore bank in California and Oregon. *Mycologia*. 102:438-446.
- Bye, R. A. y Linares E., 2013. Códice De la Cruz-Badiano I. Medicina prehispánica. *Arqueología Mexicana*. Edición especial. 50:8-91.
- Carrasco-Hernández, V., Pérez-Moreno, J., Espinosa-Hernández, V., Almaraz-Suárez, J., Quintero-Lizaola, R. y Torres-Aquino, M. 2011. Contenido de nutrientes e inoculación con hongos ectomicorrízicos comestibles en dos pinos neotropicales. *Revista Chilena de Historia Natural*. 84:83-96.
- Carrasco-Hernández, V., Pérez-Moreno, J., Quintero-Lizaola, R., Espinosa-Solares, T., Lorenzana-Fernández, A. and Espinosa, H. 2015. Edible species of the fungal genus *Hebeloma* and two neotropical pines. *Pakistan Journal of Botany*. 47:319-326.
- Chastagner, G. A. and Benson, D. M. 2000. The Christmas tree: Traditions, production, and diseases. *Plant health progress*. 1:15.
- CONAFOR (Comisión Nacional Forestal). 2020. Manual para la producción de árboles de Navidad. Comisión Nacional Forestal. Semarnat. México. 48 p.
- De la Cruz, M. 1552. Códice De la Cruz-Badiano, Códice Badiano, Códice Barberini Latin, Herbario azteca. Colegio de la Santa Cruz de Tlatelolco, México. 241p.
- Debaud, J. C., Pepin, R. and Bruchet, G. 1981. Ultrastructure des ectomycorhizes synthétiques á *Hebeloma alpinum* et *Hebeloma marginatulum* de *Dryas octopetala*. *Canadian Journal of Botany*. 59:2160-2166.
- Díaz, G., Flores, R. and Honrubia, M. 2007. *Lactarius indigo* and *L. deliciosus* form mycorrhizae with Eurasian or Neotropical *Pinus* species. *Sydowia*. 59:32-45
- Eberhardt, U., Beker, H. and Vesterholt, J. 2015a. Decrypting the *Hebeloma crustuliniforme* complex: European species of *Hebeloma* section *Denudata* subsection *Denudata* (Agaricales). *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*. 35:101-147.
- Eberhardt, U., Ronikier, A., Schutz, N. and Beker, H. 2015b. The genus *Hebeloma* in the alpine belt of the Carpathians including two new species. *Mycologia*. 107:1285-1303.
- Flores, R., Díaz, G. and Honrubia, M. 2005. Mycorrhizal synthesis of *Lactarius indigo* (Schw.) Fr. with five Neotropical pine species. *Mycorrhiza*. 15:563-570.
- Garibay-Orijel, R., Morales-Marañón, E., Domínguez-Gutiérrez, M. y 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.

- Horton, T. R. and Bruns, T. D. 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular ecology*. 10:1855-1871.
- Klofac, W. 2013. A world-wide key to the genus *Suillus*. *Österreichische Zeitschrift für Pilzkunde*. 22:211-278.
- López-Gutiérrez, A., Pérez-Moreno, J., Hernández-Santiago, F., Uscanga-Mortera, E., García-Esteva, A., Cetina-Alcalá, M., Cardoso-Villanueva, M. and Xoconostle-Cázares, B. 2018. Nutrient mobilization, growth and field survival of *Pinus pringlei* inoculated with three ectomycorrhizal mushrooms. *Botanical Sciences*. 96:286-304.
- Martínez-Reyes, M., Pérez-Moreno, J., Villarreal-Ruiz, L., Ferrera-Cerrato, R., Xoconostle-Cázares, B., Vargas-Hernández, J. y Honrubia-García, M. 2012. Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con el hongo comestible ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Quél. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 18:183-192.
- Méndez-Neri, M., Pérez-Moreno, J., Quintero-Lizaola, R., Hernández-Acosta, E. y Lara-Herrera, A. 2011. Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* inoculado con tres hongos comestibles ectomicorrízicos. *Terra Latinoamericana*. 29: 73-81.
- Miller Jr, O., Lodge, D. and Baroni, T. 2000. New and interesting ectomycorrhizal fungi from Puerto Rico, Mona, and Guana Islands. *Mycologia*. 92:558-570.
- Musálem, M. A. y Ramírez L. 2003. Monografía de *Pinus ayacahuite*. Libro Técnico Núm. 6. División Forestal. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Chapingo, estado de México, México. 364 p.
- Nguyen, N. H., Vellinga, E. C., Bruns, T. D. and Kennedy, P. G. 2016. Phylogenetic assessment of global *Suillus* ITS sequences supports morphologically defined species and reveals synonymous and undescribed taxa. *Mycologia*. 108:1216-1228.
- Palm, M. E. and Stewart, E. L. 1984. In vitro synthesis of mycorrhizae between presumed specific and nonspecific *Pinus*+*Suillus* combinations. *Mycologia*. 76:579-600.
- Peay, K. G., Garbelotto, M. and Bruns, T. D. 2009. Spore heat resistance plays an important role in disturbance mediated assemblage shift of ectomycorrhizal fungi colonizing *Pinus muricata* seedlings. *Journal of Ecology*. 97:537-547.
- Pérez-Moreno, J. and Read, J. D. 2004. Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia*. 29:239-247.
- Pérez-Moreno, J., Lorenzana-Fernández, A., Carrasco-Hernández, V. y Yescas-Pérez, A. 2010. Los hongos silvestres comestibles del parque Nacional Izta-Popo, Zoquiapan y anexos. Primera edición. Colegio de Postgraduados, SEMARNAT, CONACyT. Montecillo, Texcoco, estado de México. 1-167.
- Pérez-Moreno, J., Martínez-Reyes, M., Hernández-Santiago, F. and Ortiz-Lopez, I. 2020. Climate Change, Biotechnology, and Mexican Neotropical Edible Ectomycorrhizal Mushrooms. Springer Nature Switzerland AG. Cham, Suiza, 3,

- 61-93. In. Pérez-Moreno, J., Guerin-Laguette, A., Flores Arzú, R., Yu, F.-Q. (Eds.). *Mushrooms, Humans and Nature in a Changing World*.
- Pérez-Moreno, J., Martínez-Reyes, M., Yescas-Pérez, A., Delgado-Alvarado, A. and Xoconostle-Cázares, B. 2008. Wild mushroom markets in central Mexico and a case study at Ozumba. *Economic Botany*. 62:425-436.
- Rentería-Chávez, M. C., Pérez-Moreno, J., Cetina-Alcalá, V. M., Ferrera-Cerrato, R. y Xoconostle-Cázares, B. 2017. Transferencia de nutrientes y crecimiento de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con hongos comestibles ectomicorrícicos en dos sustratos. *Revista Argentina de Microbiología*. 49:93-104.
- Smith, H. A. and Thiers, D. H. 1964. Contribution toward a monograph of North American species of *Suillus*. Ann Arbor, Michigan. 45p.
- Vesterholt, J. 2005. The genus *Hebeloma*. Fungi of Northern Europe. Danish Mycological Society. Copenhagen. 3:1-150.
- Viesca, T. C. y Aranda, C. A. 1997. Las enfermedades reumáticas entre los nahuas prehispánicos. *Estudios de cultura Náhuatl*. 27:528.
- Villegas-Olivera, J. A., Pérez-Moreno, J., Mata, G., Almaraz-Suárez, J. J., Ojeda-Trejo, E. and Espinosa-Hernández, V. 2017. Type of light and formation of basidiomata of two species of edible ectomycorrhizal mushrooms associated with neo-tropical pines and the description of basidiomata development. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 40:405-413.

## **CAPÍTULO 2. UNA ESPECIE NUEVA, COMESTIBLE GIGANTE DEL GÉNERO *Coprinus* CON IMPORTANCIA BIOCULTURAL EN LA CULTURA MESOAMERICANA TLAHUICA-PJIEKAKJOO**

### **2.1 RESUMEN**

Se describe a una nueva especie del género *Coprinus*, denominada *C. pjierekajoensis*, endémica de los bosques de Lomas de Teocalzingo, municipio de Ocuilan en el estado de México y comestible por personas del grupo étnico Tlahuica-*Pjierekakjoo*. Este taxa conspicuo por el tamaño de sus basidiomas y hasta ahora solo descrito de una localidad puede ser considerado en riesgo debido a que el hábitat donde se desarrolla está en riesgo por la tala clandestina. En el presente trabajo, se describe esta nueva especie la cual posee importancia biocultural por sus propiedades gastronómicas en el grupo étnico Tlahuica-*Pjierekakjoo*, uno de los últimos pueblos altamente micófagos de México, capaces de reconocer y consumir alrededor de 160 especies de hongos comestibles silvestres. Se presenta una caracterización macro y micromorfológicas de la especie. Asimismo, se presenta su análisis molecular y filogenético el cual fue efectuado en el Instituto de Biología de la UNAM, por el Dr. Roberto Garibay Origel. Adicionalmente se incluyen datos de su distribución, ecología; así como una comparación con las otras cuatro especies que integran el género *Coprinus sensu stricto*. Las características morfológicas diagnósticas de la especie son la gran longitud del cuerpo fructífero de hasta 70 cm y el tamaño de sus esporas; además *C. pjierekajoensis* es una especie endémica con un enorme potencial de producción biotecnológica para ser cultivada.

**Palabras clave:** Hongo saprófito, caracterización, conocimiento tradicional, endemismo, herramientas moleculares.

**A NEW, EDIBLE GIANT SPECIES OF THE GENUS *Coprinus* WITH  
BIOCULTURAL IMPORTANCE IN THE MESOAMERICAN CULTURE  
*TLAHUICA-PJIEKAKJOO***

**2.2 ABSTRACT**

A new species of the genus *Coprinus* is described, named *C. pjiekakjooensis*, endemic to the forests of Lomas de Teocalzingo, municipality of Ocuilan in the state of Mexico and edible by people of the Tlahuica-*Pjiekakjoo* ethnic group. This taxon is characterized by the large size of the basidiomata and so far it has only been described from one locality; therefore it can be considered at risk because the habitat where it grows is at risk from clandestine logging. In the present work, this new species is described, and its biocultural importance due to its gastronomic relevance among the Tlahuica-*Pjiekakjoo* ethnic group, one of the last highly mycophagous peoples of Mexico, capable of recognizing and consuming around 160 species of wild edible fungi, is reported. A macro and micromorphological characterization of the species is presented. Additionally, their molecular and phylogenetic analysis is presented, which was carried out at the Institute of Biology of UNAM, by Dr. Roberto Garibay Origel. Finally, data on its distribution, ecology; as well as a comparison with the other four species that currently make up the genus *Coprinus sensu stricto* are presented. The diagnostic morphological characteristics of the species are the conspicuous length of the basidiomata up to 70 cm and the size of its spores. Furthermore, *C. pjiekakjooensis* is an endemic species with enormous potential for biotechnological production to be cultivated.

**Key words:** Saprophytic fungus, characterization, traditional knowledge, endemism, molecular tools.

## 2.3 INTRODUCCIÓN

En México los hongos comestibles silvestres son considerados un recurso con importancia económica, ecológica y cultural, utilizados desde épocas prehispánicas como medicina tradicional y alimento (Boa, 2005; Jiménez *et al.*, 2013; Pérez-Moreno *et al.*, 2008). Se estima que en la nación existen cerca de 200,000 especies de hongos (Guzmán, G. 1995; Aguirre-Acosta *et al.*, 2014); pero hasta el momento sólo se conocen 450 especies de hongos silvestres comestibles (Pérez-Moreno *et al.*, 2020). Dentro de estas especies comestibles, existe una especie del género *Coprinus*, denominada *C. comatus* la cual se caracteriza por poseer esporas oscuras, con poro germinativo apical marcado, paráfisis bien desarrolladas, láminas delicuescentes y desarrollo escalonado de basidios, lo que origina el desarrollo de un área fértil denominada técnicamente inequi-himenoforo (Ko *et al.*, 2001). Las especies del género *Coprinus* son Basidiomicetes que pertenecen a la familia Agaricaceae, con esporomas un poco carnosos con un himenóforo lamelado, de color blanco, tanto estípite, píleo y láminas cuando jóvenes; píleo elíptico, cilíndrico u ovoide, estriado, con escamas, de rápido crecimiento y corto periodo de vida, con una longitud del píleo de 4.0 a 25.4 cm y estípite de 1.2 a 50.5 cm; el píleo se separa muy fácilmente del estípite con un movimiento sencillo, con pérdida natural del velo cuando madura, presencia de un anillo conspicuo, con láminas separadas, paralelas a subparalelas, anexas y adnatas de color negro, con balisporas (Ingold, 2002; Redhead *et al.*, 2001) oscuramente pigmentadas, con poro germinativo pronunciado, los basidios son tetraspóricos, sus esterigmas pigmentados de color negro y sin presencia de pleurocistidios (Redhead *et al.*, 2001). Son hongos con distribución cosmopolita (Campi *et al.*, 2016), se encuentran principalmente en los países europeos de la Península Escandinava y la Península Ibérica (De Román y Boa, 2004), así como también en las costas del Mediterráneo (Arras, 2016); en el norte de Europa (Saar *et al.*, 2015), Rumanía (Ciortan, 2013), Serbia (Stojkovic *et al.*, 2019), Bulgaria (Stoyneva y Uzuno, 2015); asimismo en los países asiáticos como Corea (Berch *et al.*, 2007), China, Japón (Shen *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2014; Ko *et al.*, 2001), Filipinas (Reyes *et al.*, 2009) y Malasia (Li *et al.*, 2008); Nueva Zelanda (Ko *et al.*, 2001) y en algunas regiones del extremo oriental de Australia; en el Continente Americano se encuentra en Estados Unidos (Ko *et al.*, 2001), México (Garibay-Origel, *et al.*, 2010) Colombia (Pulido, 1983), Chile (Valenzuela, 1993), Argentina (Niveiro *et al.*, 2014), Brasil (Bentes, 2012) y Paraguay

(Ko *et al.*, 2001; Campi *et al.*, 2016). Las especies del género *Coprinus* generalmente son solitarias o se encuentran en pequeños grupos sobre un sustrato cubierto con un delgado pero persistente micelio blanco; crecen en bosques, parques, jardines, terrenos perturbados, pastizales o en los bordes de caminos (Pawlik *et al.*, 2015); fructifican abundantemente durante la temporada de lluvia, se desarrollan en terrenos con alta cantidad de materia orgánica en descomposición o en estiércol (Lázaro y Ibiza, 1989) y muy raramente en madera con alto grado de descomposición (Van de Bogart, 1976), crecen en suelos muy húmedos y bien drenados. Por otra parte, se ha estudiado que *C. comatus* tiene potencial para remediar suelos contaminados, llamado micorremediación (Wu *et al.*, 2015).

Durante más de 200 años diversas especies se agrupaban en el género *Coprinus* creando un sistema taxonómico basado únicamente en las características macro, microscópicas y ecológicas (Kemp, 1975; Redhead *et al.*, 2001), en la actualidad muchas especies se han excluido del género *Coprinus* con base en investigaciones moleculares y análisis filogenéticos (Hopple, 1999). Redhead *et al.* (2001) mencionaron que *Coprinus sensu stricto* debe restringirse a un muy pequeño grupo de especies centradas alrededor de la especie tipo *Coprinus comatus*, en la familia Agaricaceae, y poco más de 90 % de las especies de *Coprinus* fueron ubicadas ya sea en la familia Psathyrellaceae o en el género *Lacrymaria*. Por lo cual se agrupó a especies que se creían del género *Coprinus* en los géneros *Coprinellus* P. Karst., *Coprinopsis* P. Karst. y *Parasola* gen. nov. Actualmente el género *Coprinus sensu stricto* agrupa cuatro especies mayormente parecidas con *C. pjiiekakjooensis*: *C. comatus* (O. F. Müll.: Fr.) Pers.; *C. sterquilinus* (Fr.) Fr.; *C. spadiceisporus* Bogart y *C. colosseus* Bogart (Van de Bogart, 1976). Por otra parte, la comunidad Tlahuica-*Pjiiekakjoo*, ubicada en el municipio de Ocuilan, estado de México, es uno de los 68 pueblos originarios presentes en México (INALI, 2008), siendo el grupo étnico más pequeño del estado, asentado solamente en siete pequeños poblados o colonias. Actualmente su idioma solo lo hablan 719 habitantes y en el poblado de Lomas de Teocaltzingo lo hablan de manera fluida 221 personas, cabe mencionar que éstas personas son mayores de 65 años, por lo tanto este idioma está en peligro de desaparecer. La palabra *Pjiiekakjoo* significa "lo que yo soy" o "lo que yo hablo" y pertenece a la familia otopame, del grupo otomange (Álvarez, 2006). Este grupo étnico tiene su propia cosmovisión, costumbres, tradiciones, idioma, variados y precisos conocimientos sobre su entorno, desafortunadamente ha sido escasamente estudiado y se encuentra en grave

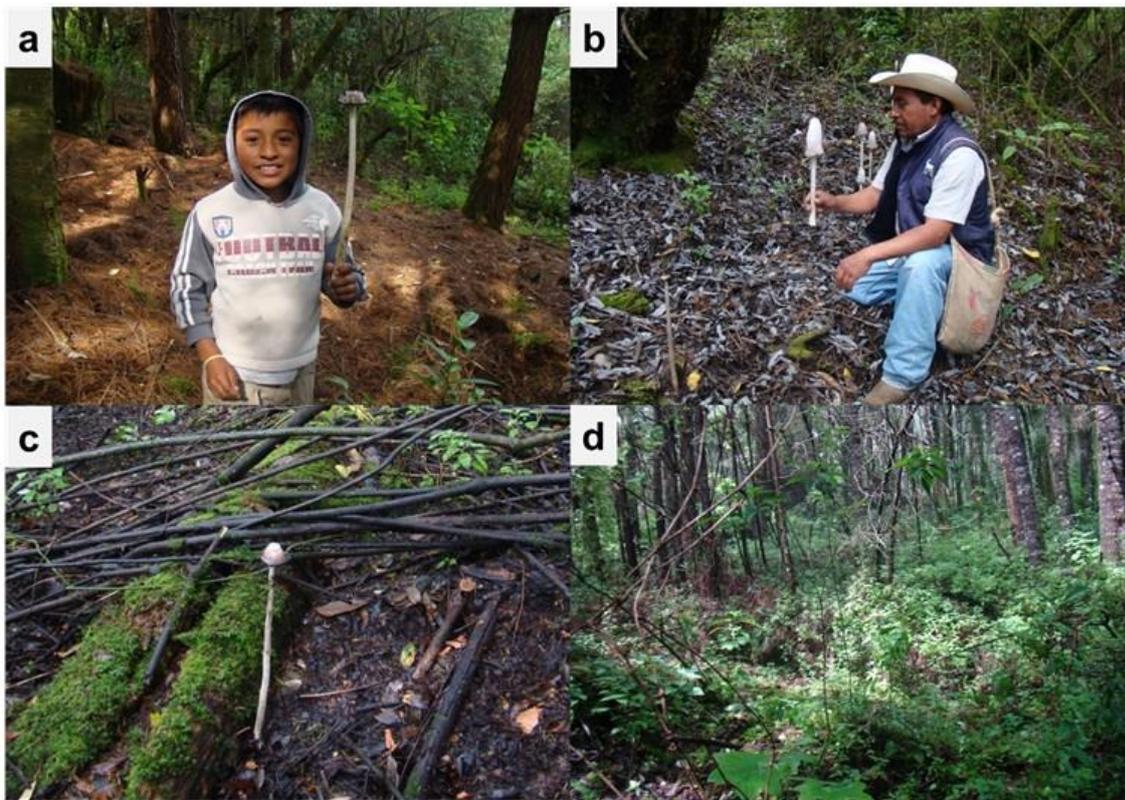
riesgo de desaparición o peligro de extinción y junto con ella su conocimiento biocultural, debido a los procesos de transculturación, erosión cultural y número reducido de hablantes nativos fluidos. Cabe mencionar, que los Tlahuica-*Pjiekakjoo* recolectan y consumen más de 160 especies de hongos comestibles silvestres, los cuales han formado parte de su dieta alimenticia tradicional; este conocimiento se ha mantenido, heredado y acrecentado de generación en generación desde épocas prehispánicas; este acervo etnomicológico se basa en caracteres tales como forma, color, sabor, olor, analogía con animales y plantas locales y su hábitat de crecimiento (Ramírez-Carbajal, 2017). Dentro de las más de 160 especies de hongos silvestres que consume el grupo étnico Tlahuica-*Pjiekakjoo*, se encuentra el descubrimiento de una nueva especie de hongo gigante comestible del género *Coprinus* y que hemos denominado *Coprinus pjiekakjooensis* y que los Tlahuica-*Pjiekakjoo* nombran en su lenguaje *Nchjo pø'é*, donde *Nchjo*=hongo y *pø'é*=excremento de “*pípila*” o guajolote y en castellano lo denominan “*Vela, hongo de pluma u hongo de gallinaza*”; los nombres son por la semejanza con la cera que se escurre de una vela, y el de gallinaza por el color del excremento del ave *Meleagris* sp. conocido coloquialmente como “*guajolote*”, nombre proveniente del náhuatl que significa *huey*, *hueyi* = grande, viejo, y *xólotl* = monstruo, es decir un “*gran monstruo*”, la cual es una especie nativa de México. El presente estudio tuvo como objetivos describir las características micro, macromorfológicas y moleculares de la especie nueva *Coprinus pjiekakjooensis*.

## 2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.4.1 Área de recolecta

Los esporomas de *C. pjiekakjooensis* se recolectaron en tres áreas boscosas dentro de los límites del territorio de la comunidad Tlahuica en Lomas de Teocaltzingo, los ecosistemas fueron bosque de pino-encino (*Pinus* spp.-*Quercus* spp.), donde predominaban las especies de *Pinus pseudostrobus*, *Quercus rugosa*, *Q. candicans* y *Q. laurina* (Fig. 2.1 a y b); en el bosque de *Abies religiosa* u oyamel (Fig. 2.1 c) y bosque mesófilo de montaña (Fig. 2.1 d), donde prosperan las especies arbóreas de *Clethra mexicana*, *Sambucus nigra*, *Alnus jorullensis*, y *Comarostaphylis discolor*. En estas áreas también se desarrollan las especies arbustivas de *Archibaccharis serratifolia*, *Baccharis*

*conferta*, *Buddelia americana*, *B. cordata*, *Fuchsia microphylla*, *Satureja macrostema*, *Oreopanax xalapensis*, *Senecio barba-johannis*, *Symphoricarpos microphyllus* y *Garrya laurifolia*; y especies herbáceas como *Urtica mexicana*, *Salvia iodantha*, *S. genseriflora*, *S. mexicana*, *Rubus pumilus*, *Huperzia* sp., *Pleopeltis mexicana*, *Polypodium colopodes*, *P. madrese*, *Botrychium virginianum* y *Cirsium anartiolepis* entre muchos más. Las altitudes variaron de 3644 a 3698 m, en un clima predominantemente del tipo Cf, templado húmedo con lluvias todo el año (Rzedowski, 1966, 1978).



**Figura 2.1.** Hábitat de crecimiento de *C. pjekekjoensis*. a y b) Bosque de *Pinus-Quercus*; c) Bosque de *Abies*; d) Bosque mesófilo de montaña.

#### 2.4.2 Caracterización macro y micromorfológica de los esporomas de *C. pjekekjoensis*

Para la descripción de la nueva especie se utilizaron caracteres macro y micromorfológicos, siguiendo las técnicas rutinarias de micología (Largent, 1973; Largent *et al.*, 1977) y los trabajos de Woehrel y Light (2017), Campi *et al.* (2016) y Van de Bogart (1976). Además, se prepararon muestras semipermanentes de las estructuras

de la nueva especie con ejemplares frescos de *C. pjiekakjooensis*, utilizando secciones que se montaron en una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 5%, solución de Melzer y solución de rojo Congo Amoniacal al 5%. Se midió el largo y ancho de las esporas, obteniendo la relación del índice de Q=relación longitud/ancho de acuerdo a la cantidad de esporas medidas n=500 acuerdo con la metodología de Lodge *et al.* (2004) y Ramos *et al.* (2017). Las fotografías de estas estructuras fueron tomadas con un microscopio óptico de campo claro Olympus BX51.

### **2.4.3 Análisis filogenético molecular**

El análisis filogenético y molecular y la interpretación de los datos generados fueron efectuados por el Dr. Roberto Garibay Origel del Instituto de Biología, de la UNAM, con quien actualmente se trabaja en conjunto para la preparación del artículo científico correspondiente. Para el análisis molecular, el ADN se extrajo con el kit XNAP (Sigma-Aldrich) ya sea de ejemplares de herbario secos o de tejido de ejemplares frescos preservado en alcohol al 96%. Para esto, se colocó aproximadamente de 1 a 2 mm<sup>2</sup> de tejido en un tubo Eppendorf con 20 µl de solución de extracción, se calentó por 10 min a 65 °C, y 10 min a 95 °C en un termociclador (Bio-Rad T100). Posteriormente se añadió 20 µl de solución de dilución y se incubó a temperatura ambiente por 30 min (Garibay-Orijel *et al.*, 2013).

La región de los Interespaciadores ribosomales (ITS) se amplificó con los primers ITS1F e ITS4 (Gardes y Bruns, 1993) bajo los parámetros descritos en Izzo *et al.* (2005). La calidad de los productos de PCR se revisó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1.0 % en buffer TE (solución amortiguadora). De aquellos productos con buena calidad se eliminaron los primers y nucleótidos sobrantes usando una mezcla de 1.0 µl de ExoSAP-IT (USB-Affimetrix) con 1.0 µl de agua por 3.5 µl de producto de PCR. Para la reacción de secuenciación se usó el kit Big Dye Terminator 3.1 (Applied Biosystems) según las instrucciones del fabricante. Los productos se secuenciaron en ambas direcciones en un secuenciador ABI 3100 (Applied Biosystems) en el Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y la Salud del Instituto de Biología, UNAM. La edición de secuencias y análisis filogenéticos se llevó a cabo en Geneious Pro R7 (Biomatters). Se utilizaron análisis filogenéticos para probar que nuestras muestras corresponden a una nueva especie dentro del género *Coprinus sensu stricto*. En

estos se incluyeron secuencias de GenBank de las tres especies conocidas de *Coprinus*, así como secuencias usadas por estudios filogenéticos previos (Johnson y Vilgalys 1999; Vellinga, 2004). Las secuencias se alinearon en Muscle y se analizaron por medio de Neighbor-Joining, Máxima Verosimilitud y Probabilidades Bayesianas posteriores. Como grupo externo se eligió a *Lepiota lilacea* (FJ998394).

Los árboles se construyeron de Neighbor-Joining con el modelo de distancia genética Tamura-Nei calculando el valor de soporte de las ramas con bootstrap a través de 1000 réplicas. En los análisis de Máxima Verosimilitud usamos PhyML (Guindon *et al.*, 2010) buscando la topología de los árboles con HKY85, JG69 y GTR como modelos de sustitución, buscando la mejor topología con BEST y calculamos el soporte de las ramas con ALRT y bootstrap con mil réplicas.

Los análisis Bayesianos se realizaron con MrBayes (Huelsenbeck y Ronquist 2001) usando el radio de variación Gamma, los modelos de sustitución HKY85, JC69 y GTR con 4 cadenas de Monte carlo sobre 1,100,000 generaciones submuestreando cada 200 generaciones y un valor de temperatura de 0.2. Almacenamos los valores de largo de las ramas y calculamos las probabilidades posteriores.

#### **2.4.4 Determinación de características físicas y químicas del suelo donde se desarrolla *C. pjierekajoensis***

Se tomó 1.0 kg de suelo por debajo de los esporomas de *C. pjierekajoensis* realizándose una muestra compuesta y se transportó en bolsas de plástico en una hielera al laboratorio de Análisis de Suelos del área de Edafología del Colegio de Postgraduados, donde se realizó su análisis. Las muestras compuestas se secaron a temperatura ambiente bajo sombra y se cribaron en un tamiz con una abertura de 2.00 mm. Se determinó el pH utilizando una suspensión suelo:agua 1:2 (CSTPA, 1980), el fósforo disponible según Olsen *et al.* (1980), el potasio y la capacidad de intercambio catiónico siguiendo el método del Centurión con acetato de amonio 1 N pH 7 (Holmgren *et al.*, 1977). Para la determinación del nitrógeno total y materia orgánica, los métodos propuestos por Bremner (1965) y Allison (1965).

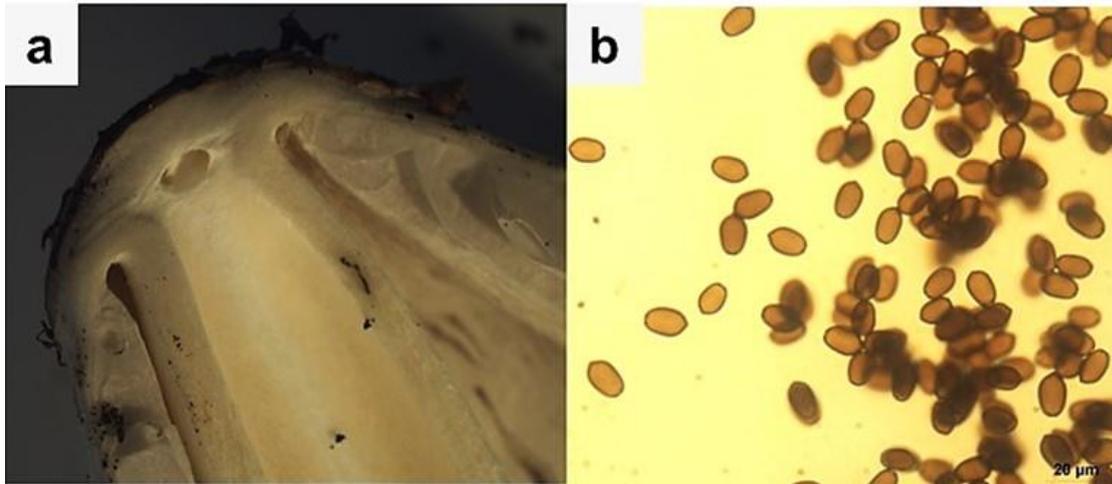
## 2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.5.1 Descripción macro y micromorfológica de esporomas de *C. pjierekakjooensis*

*Coprinus pjierekakjooensis* sp. nov. proviene de la etimología *pjierekakjooensis*, el cual es un nombre derivado del nombre del grupo étnico Thauica-*Pjierekakjoo* que consume este hongo. La palabra *Pjierekakjoo* significa "lo que yo soy" o "lo que yo hablo". *Coprinus pjierekakjooensis* es un basidiomycete saprófito, con basidiomas de hasta 70 cm de longitud, con crecimiento solitario sobre un conjunto de hifas que conforman una red micelial de color blanco con una estructura densa y compacta de hifas entrelazadas, posterior a ella hay una capa de materia orgánica, luego la capa densa de hifas y así sucesivamente hasta formar una estructura tipo multi-laminar (Fig. 2.2 a), con olor fúngico leve y a veces a nuez, sabor ligeramente afrutado. Píleo de 28.5-30.8 x 10.5-16.5 cm de largo y ancho respectivamente, de 8.7 a 10.5 cm de diámetro, ovoide en ejemplares inmaduros (Fig. 2.2 a) y campanulado en ejemplares maduros (Fig. 2.2 c), el píleo se fusiona con el estípite por el margen cuando joven, a medida que madura el esporoma, el margen del píleo se dobla hacia afuera (Fig. 2.2 b) y el ápice es redondeado cubierto por escamas a modo de delgadas fibras de color blanquecino. El centro o disco del píleo de color café claro a café oscuro al madurar. Pilipelis de color blanco, fibrilado, con escamas amplias verticales de color blanquecinas a parduzcas al madurar (Fig. 2.2 d), dejando al descubierto el contexto de color blanco al estar inmaduro y grisáceo al madurar. La forma del corte longitudinal del píleo es incurvada. Posee escamas blanquecinas en ejemplares inmaduros y parduzcos al madurar. El grosor del contexto del píleo es de 40.0 a 50.5  $\mu\text{m}$ . Himenio con forma laminar, láminas con un acomodo muy denso, de 16.0-27.5 x 2.5-3.0 cm, libres, de color blanquecino en ejemplares inmaduros, negro y delicuescente al madurar hasta consumir todo el píleo (Fig. 2.2 c). Estípite fistuloso de 55.5-68.8 x 2.2-3.5 cm de largo y ancho respectivamente, coloración blanquecina (Fig. 2.3 a), no cambia de coloración al ser expuesto, posee consistencia quebradiza y se ancla al suelo en forma estipitada. Anillo ubicado en la zona media del estípite (Figura 2.2 d), textura quebradiza, coloración blanquecina y en ejemplares maduros se mancha de negro por las esporas delicuescentes (Fig. 2.2 b).

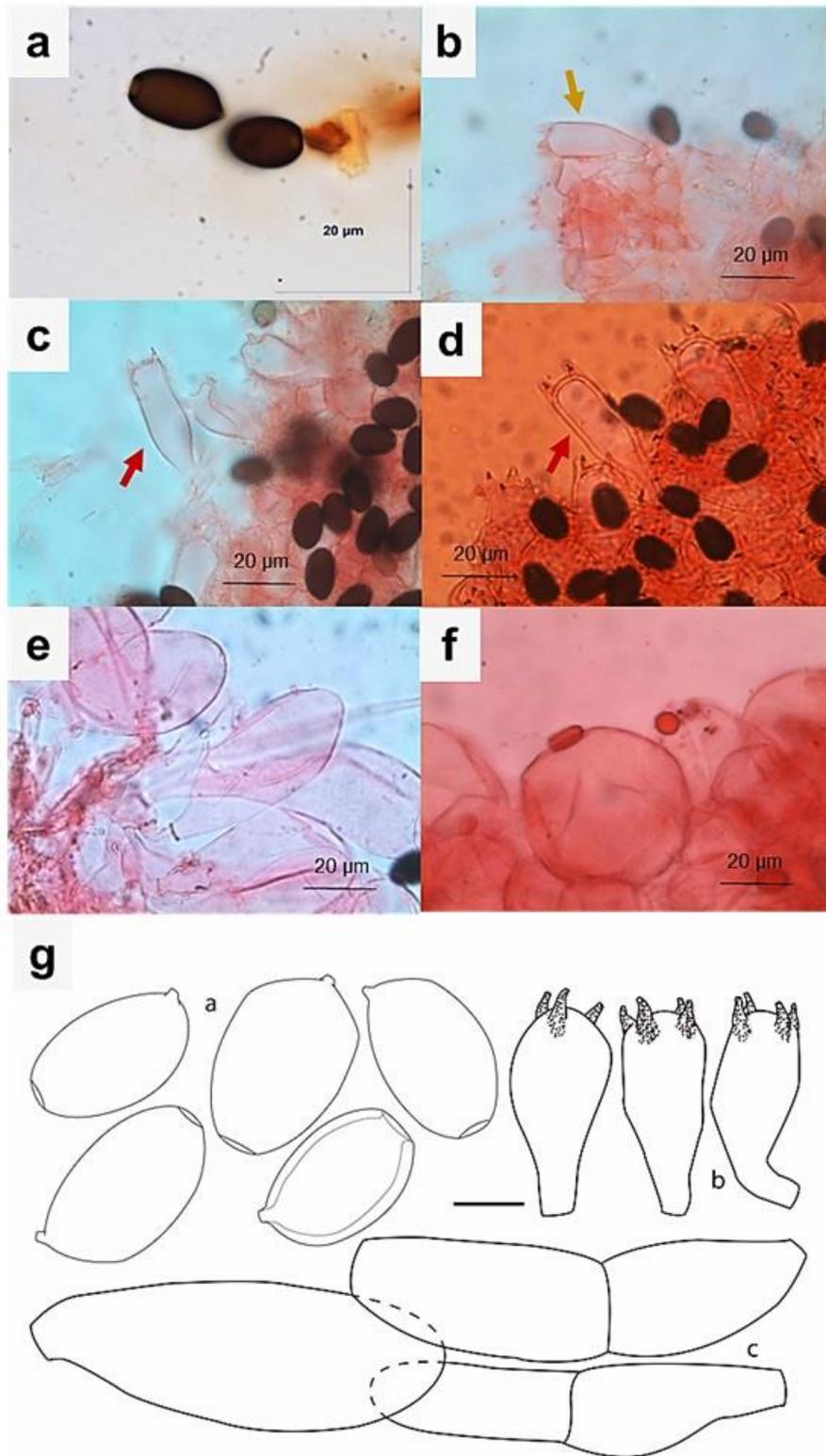


**Figura 2.2.** Basidioma de *Coprinus pjekekjoensis* (Cp). **a)** Basidioma en estadio juvenil de Cp; **b)** Diversos estadios de Cp mostrando la delicuescencia de las láminas y la longitud del estípite, el cual llega a ser mayor de 60 cm; **c)** Esporoma maduro en proceso final de delicuescencia de sus láminas; **d)** Presencia de anillo en Cp y presencia de escamas en el píleo, en estadio juvenil.



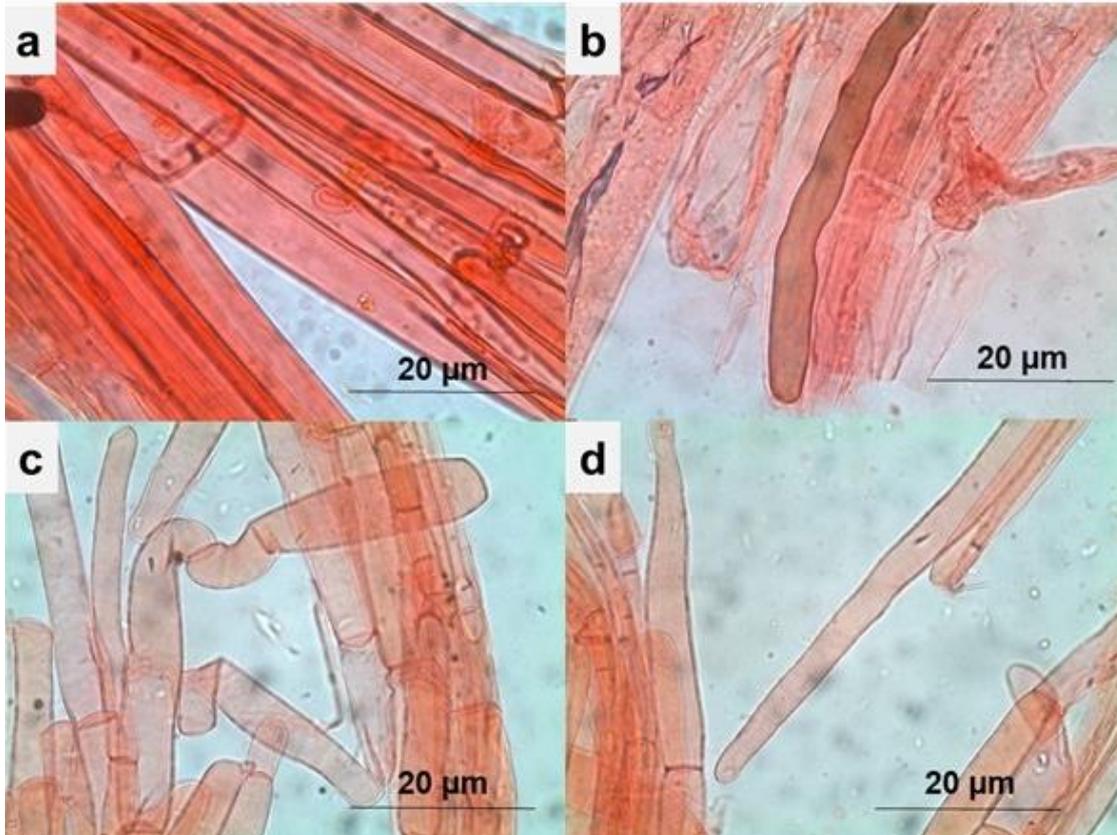
**Figura 2.3.** Esporoma de *Coprinus pjekekjoensis* (Cp). **a)** Corte longitudinal de la parte superior del píleo de Cp mostrando el contexto y el estípote fistuloso; **b)** Esporas de color café ocre de Cp.

Esporada y esporas de color ocre, la forma de las esporas en vista dorsal es heterodiamétrica-elíptica o cilíndrica (Fig. 2.3 b), son lisas en ocasiones gutuladas, de 13.0-15.5 x 7.5-10.0 µm de largo y ancho, índice de Q = 1.7, n = 500; el diámetro del poro germinativo mide de 3.5 a 4.1 µm, la longitud del apéndice hilar de la espora es de 1.9 a 3.4 µm (Fig. 2.4 a y g). Basidios abundantes, tetraesporicos con un tapón pigmentado (Fig. 2.4 b, c, d y g), la separación entre un esterigma y otro es de 5.0 a 6.5 µm, posee dos tipos de basidios: el primero es corto y clavado, de 34.5-36.8 x 13.5-16.0 µm de largo y ancho respectivamente (Fig. 2.4 b); el segundo es largo cilíndrico-pedicelado de 45.5-48.3 x 11.2-14.5 µm de largo y ancho (Fig. 2.4 c). Basidiolos con forma ovado-pedicelado (Fig. 2.4 e). Esferocistos abundantes de 35.3 a 48.2µm (Figura 2.4 f). Las células de la estipitipelis tienen un arreglo en empalizada y forma cilíndrica (Fig. 2.5 a). Pleurocistidios ausentes. Las células de las escamas del píleo algunas se observan gutuladas (Fig. 2.5 b). Las células del anillo son de tres tipos y todas son septadas: i) células cilíndricas de 25.5-30.8 x 3.0-5.8 µm de largo y ancho con terminación hemisférica; ii) células cilíndricas de 31.4-32.9 x 9.5-15.2 µm de largo y ancho con terminación truncada (Fig. 2.5 c) y; iii) células cilíndricas de 48.5-75.5 x 10.8-17.5 µm de largo y ancho con terminación ovada (Fig. 2.5 d).

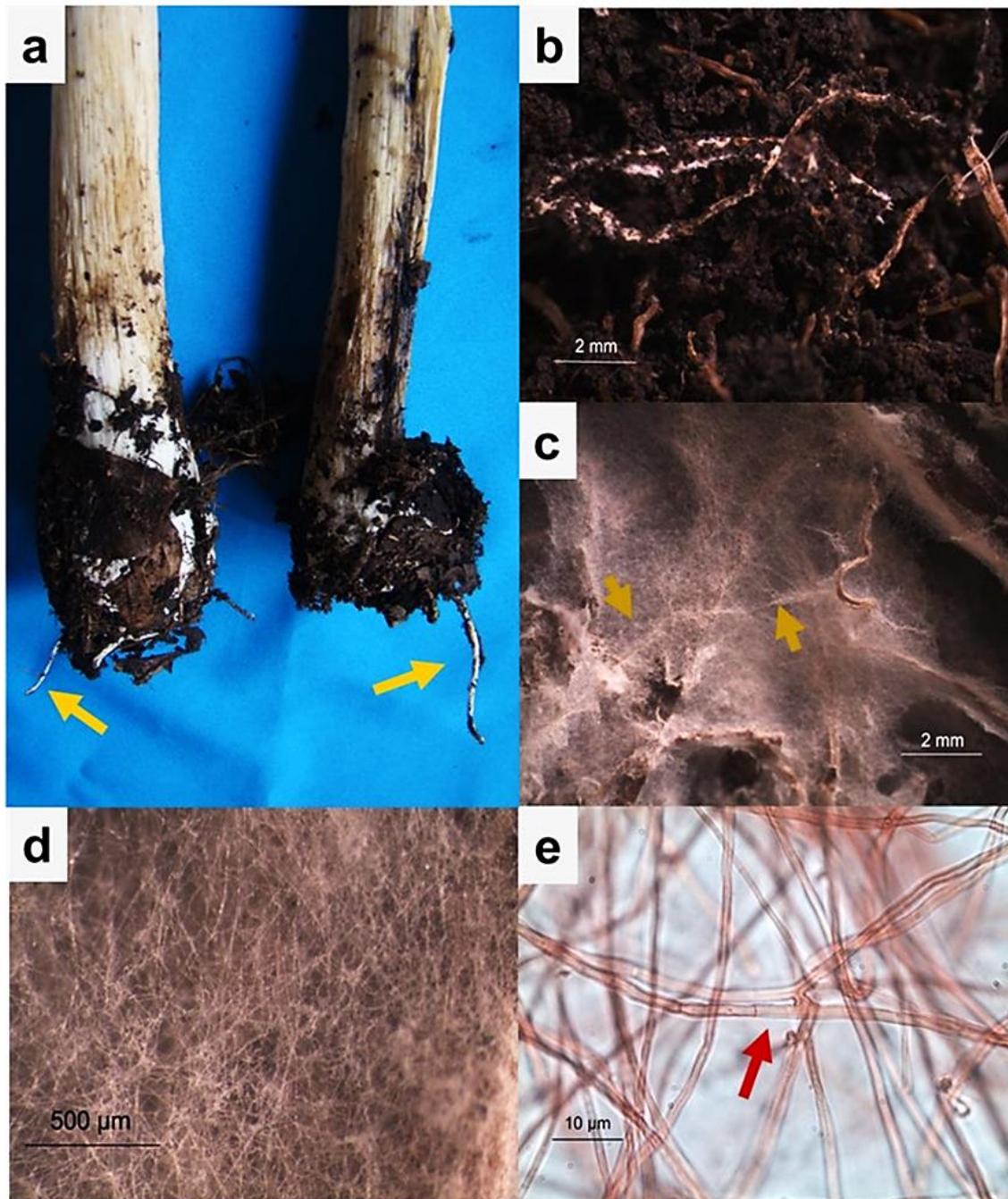


**Figura 2.4.** Estructuras del himenio laminar de *Coprinus pjekekjoensis* (Cp). **a**) Vista lateral de esporas, con textura aparentemente lisa; apéndice hilar y poro germinativo prominente; **b**) Basidio corto clavado (flecha amarilla); **c** y **d**) Basidios largos con forma

cilíndrico-pedicelado (flecha roja); e) Basidiolos; f) Esferocistos del himenio; g) Estructuras de Cp (a) Esporas; (b) Basidios; y (c) células del velo de Cp arregladas en un estrato compacto con elementos fusiformes algo subcilíndricos, pálidos hialinos, de pared delgada y lisos. Barra negra 5  $\mu$ m.



**Figura 2.5.** Microfotografías de las células del estipitipelis, células de las escamas del píleo y células del anillo de *Coprinus pjekekjoensis* (Cp). **a)** Arreglo en empalizada y forma cilíndrica de las células del estipitipelis de Cp; **b)** Células de la escama del píleo, se observa una célula gutulada de Cp; **c)** Células cilíndricas del anillo con terminación truncada; **d)** Células cilíndricas del anillo con terminación ovada de Cp.



**Figura 2.6.** Estructuras de *Coprinus pjekekjoensis* (Cp). **a)** Rizomorfos de Cp en la base del estípite señalados con las flechas amarillas; **b)** Rizomorfos en el sustrato donde se desarrolla Cp; **c)** Presencia de cordones miceliales en el micelio externo en la base de basidiomas de Cp; **d)** Acercamiento a (c) donde se observa la trama del micelio externo en la base de basidiomas de Cp; **e)** Micelio externo septado señalado con la flecha roja en la base de esporomas de Cp.

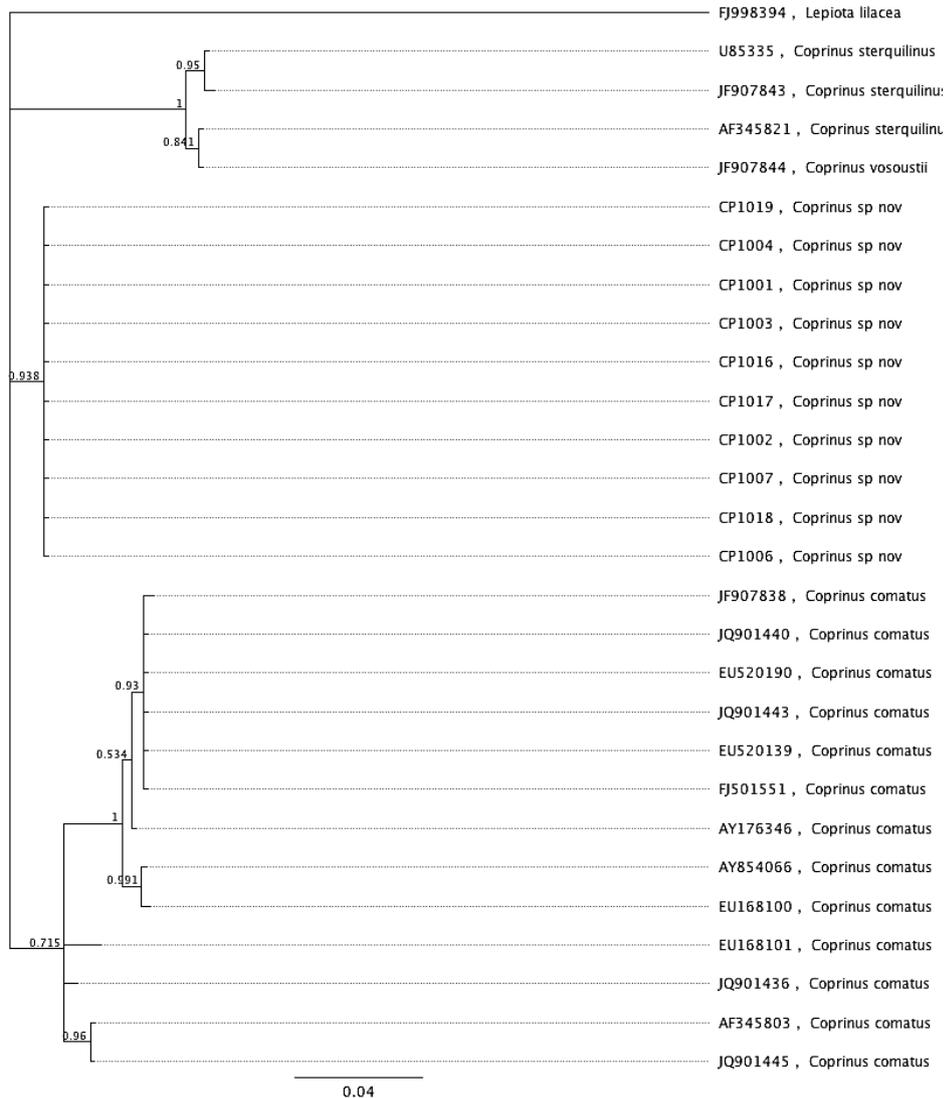
### 2.5.2 Análisis filogenético de los datos moleculares

Se observó una clara separación entre *Coprinus sterquilinus* y *Coprinus vosoustii*, en un clado totalmente distinto de *Coprinus comatus* y *C. pjierekajoensis*. Filogenéticamente, se observó que las secuencias consideradas de *C. comatus*, muestran una amplia diversidad genética. Por el contrario, en el caso de las 10 secuencias obtenidas de ejemplares frescos de *C. pjierekajoensis* existe una baja diversidad genética. Esta homogeneidad genética puede ser intrínseca de la especie o ser indicadora de una recién separación evolutiva de la especie a partir de *C. comatus*. Sin embargo, en cualquiera de los dos casos, el análisis de máxima verosimilitud con soporte de las ramas con valores de 0.938 y de 0.715, para los clados de *C. pjierekajoensis* y *C. comatus*, respectivamente muestran la robustez de la separación de estas dos especies como taxones distintos (Fig. 2.7).

### 2.5.3 Características físicas y químicas del suelo

*C. pjierekajoensis* crece en bosques con condiciones altas de humedad con una precipitación anual de 1000 a 3000 mm, dando como resultado suelos saturados. El nivel de acidez del suelo circundante en la base del micelio externo de *C. pjierekajoensis* fue de 6.5, un pH más alto que los reportados para bosques mesófilos de montaña con pH de 4.0 a 6.0 (Santiago-Pérez *et al.*, 2009; González-Espinosa *et al.*, 2012; Gual-Díaz y Rendón-Correa, 2014), también este valor fue superior a los reportados en bosques de pino, donde la mayoría de los hongos prosperan generalmente a un pH de 5.1 a 6.0 (Pérez-Moreno *et al.*, 2010). El contenido promedio de materia orgánica en los suelos donde se desarrolla *C. pjierekajoensis* fue de 54.9% de MO. Esto indica una alta acumulación de restos vegetales (Aguilera y Martínez, 1986). La conductividad eléctrica fue de  $0.91 \text{ dSm}^{-1}$ , la capacidad de intercambio catiónico (CIC) fue de  $44.7 \text{ cmol/kg}$  muy relacionada con la MO y significa que los coloides del suelo son muy activos tanto física como químicamente (Aguilera y Martínez, 1986). La densidad aparente fue de  $0.301 \text{ gcm}^{-3}$ ; la densidad aparente de los suelos orgánicos en promedio es de  $0.7$  a  $1.0 \text{ gcm}^{-3}$  y este parámetro está relacionado con la cantidad de MO, en el área de estudio la MO fue alta y la densidad aparente es menor, la densidad aparente está relacionada con la porosidad, la humedad y la dificultad o facilidad de penetración de las raíces al suelo y por tanto el acceso a los nutrientes. El contenido de Ca, K, Mg y Na fue de 34.22, 2.18, 7.78 y 0.67

cmol kg<sup>-1</sup>, respectivamente, y para Cu, Fe, Zn, Mn y P fue de 6.76, 6.04, 65.55, 2.31 y 1.21 ppm en ese orden; y por último el N total en el suelo fue de 1.78 %, el cual es alto de acuerdo con Serrato y Landeros (2001) quienes mencionan que contenidos superiores a 0.80% deben ser considerados altos. El contenido de N es un factor muy importante para el desarrollo de los hongos en el suelo y es un nutrimento usualmente limitante de la productividad en la mayoría de los ecosistemas forestales



**Figura 2.7.** Árbol filogenético de *Coprinus pjiakakjooensis* y especies cercanas; y como grupo externo *Lepiota lilacea*. Los métodos empleados se describen en la sección 4.4.3 de esta tesis. Las claves para todas las especies corresponden a las registradas en GenBank, excepto las correspondientes a *Coprinus* sp. nov. las cuales corresponden a ejemplares de *C. pjiakakjooensis*.

**Cuadro 2.1.** Características macro y micro morfológicas de las especies más cercanas a *C. pjierekakjooensis*.

Estructura	Variable	<i>C. comatus</i>	<i>C. sterquilinus</i>	<i>C. spadiceisporus</i> <sup>¶</sup>	<i>C. colosseus</i> <sup>¶</sup>	<i>C. pjierekakjooensis</i>
Píleo	Largo	4.0-12.0 cm	4.0-6.0 cm	3.0-3.8 cm	13.0-25.4 cm	28.5-30.8 cm
	Ancho	2.4-4.5 cm	1.5-3 cm	5.0 a 6.0 cm	8.0-14.0 cm	10.5-16.5 cm
	Forma al madurar	Campanulado	Cónico	Cónico-acampanado	Campanulado	Campanulado
Pilipellis	Color	Blanquecina	Blanquecina	Blanquecina	Blanquecina	Blanquecina
Células de la pilipellis	Largo	12.0-29.0 $\mu\text{m}$	32.0-40.5 $\mu\text{m}$	30.8-60.0 $\mu\text{m}$	35.0-50.0 $\mu\text{m}$	20.5-55.4 $\mu\text{m}$
	Ancho	9.0-18.0 $\mu\text{m}$	8.5-10.5 $\mu\text{m}$	8.5-10.0 $\mu\text{m}$	20.0-25.0 $\mu\text{m}$	11.5-15.3 $\mu\text{m}$
	Forma	Cilíndricas	Cilíndricas	Elipsoidales	Elipsoidal-ovado	Amplias verticales
Himenio	Tipo	Laminar, delicuescente	Laminar, delicuescente	Laminar, delicuescente	Laminar, delicuescente	Laminar, delicuescente
Basidios tetrasporicos	Forma y tamaño	Fusiforme	Clavados	Corto clavado	Corto clavado	Corto clavado
		22-32 x 10-14 $\mu\text{m}$ <sup>‡</sup>	32.0-54.0 x 13.0-16.0 $\mu\text{m}$	12.5-17.5 x 10.0-11.2 $\mu\text{m}$	31.5-35.5 x 16.0-18.0 $\mu\text{m}$	25.5-30.8 x 7.5-9.5 $\mu\text{m}$
		Corto clavado				
		23.8-33.0 x 11.5-15.0 $\mu\text{m}$ <sup>¶</sup>				
		Largo clavado	Subcilíndrico	Largo clavado	Largo clavado	Cilíndrico-pedicelado
		35.0-46.5 x 9.0-16.2 $\mu\text{m}$ <sup>¶</sup>	29.8-43.3 x 10.6-18.21 $\mu\text{m}$	20.0-25.0 x 10.0-11.2 $\mu\text{m}$	42.5-48.5 x 17.0-18.0	34.5-36.8 x 13.5-16.0 $\mu\text{m}$
		Ululiforme		Ululiforme	Clavado-pedicelado	
		45.0-67.5 x 11.3-17.5 $\mu\text{m}$ <sup>¶</sup>		28.7-35.0 x 10.0-11.2 $\mu\text{m}$	54.0-65.0 x 19.0-20.0 $\mu\text{m}$	

Estructura	Variable	<i>C. comatus</i>	<i>C. sterquilinus</i>	<i>C. spadiceisporus</i> <sup>¶</sup>	<i>C. colosseus</i> <sup>¶</sup>	<i>C. pjeekakjooensis</i>
Esterigmas	Característica	Pigmentados de color negro y algunos son hialinos	Pigmentados de color negro	Pigmentados de color negro de superior a medios	Pigmentados de color negro	Pigmentados de color negro
Pleurocistidios	Presentes o ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes
Esporas	Largo	10-11 µm	17-26 µm	8.1-10.0 µm	16.8-20.0 µm	13.0-15.5 µm
	Ancho	7-9 µm	10-15 µm	6.2-6.9 µm	9.8-13.7 µm	7.0-10.0 µm
	Índice de Q <sup>‡</sup>	1.3	1.5	1.6	1.4	1.7
	Forma	Elipsoidales a ovadas	Ovado-elipsoidales	Submitriiformes	Ovalada-elipsoidal	Cilíndrica
Poros germinativos	Coloración en KOH 3%	Castaño oscuras	Marrón oscuro	Marrón claro	Marrón oscuro	Marrón oscuro
	Característica	Apical y marcado	Muy marcado	Ligeramente excéntrico	Marcado	Apical y marcado
Estípites	Largo	5.0 cm	8.0-15.0 cm	10.0-12.0 cm	35.5-50.5 cm	35.5-60.8 cm
	Diámetro	1.5 cm	0.9-1.2 cm	5.0-8.0 mm	1.5-2.5 cm	2.2-3.5 cm
	Interior	Hueco con un cordón de hifas	Hueco con un cordón de hifas	Hueco, con una red de hifas sueltas	Hueco con un cordón de hifas entrelazadas	Fistuloso con un cordón hifal
Células de la estípites	Diámetro	5.0-16.0 µm	4.7-16.8 µm	5.0-22.0 µm	nd	55.0-89.4 µm
	Forma	Delgadas y con septos fibulados	Cilíndrica-tabicado	Cilíndricas	Delgadas y cilíndricas	Cilíndricas con terminación ovada
Anillo	Consistencia	Quebradizo	Delgado y frágil	Membranoso	Suelto	Quebradizo
	Color	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco

Estructura	Variable	<i>C. comatus</i>	<i>C. sterquilinus</i>	<i>C. spadiceisporus</i> <sup>¶</sup>	<i>C. colosseus</i> <sup>¶</sup>	<i>C. pjekekjoensis</i>
	Textura	Lisa	Lisa	Suave	Lisa	Suave
	Tamaño de las células	22-32 x 10-14 µm	25-40 x 10-12 µm	6.0-12.0 µm	45.8-95.5 x 25.5-32.3 µm	25.5-30.8 x 3.0-5.8 µm y 31.4-32.9 x 9.5-15.2 µm
Rizomorfos	Presentes o ausentes	Presentes	Presentes y escasos	Presentes	Presentes	Presentes
Fíbulas	Ubicación	Estípite	Estípite	Velo universal	Estipitipelis	No observadas
Tipo de alimentación		Saprófito	Coprófilo	Coprófilo	Saprófito	Saprófito
Crecimiento		Solitario	Solitario	Muy raro y Solitario	Solitario	Solitario
Distribución	Lugar	Cosmopolita	Europa, Asia y América	Europa, América	nd	Endémica al estado de México
Comestibilidad		Comestible	Tóxico <sup>¶¶</sup>	No comestible	nd	Comestible
Características organolépticas	Aroma	Ligeramente a hongo	Débil y agradable	Inodora	Ninguno	fungoide ligero o a nuez
	Sabor	Sabor suave	Sabor casi imperceptible	Insípida	Ninguno	Ligeramente afrutado
Referencia		Campi <i>et al.</i> (2016)	Woehrel y Light (2017)	Van de Bogart (1976)	Van de Bogart (1976)	Este trabajo

Índice de Q<sup>‡</sup>: Cociente entre la longitud y el ancho de las esporas; nd= carácter no descrito.

#### 2.5.4 Clave de *Coprinus sensu stricto*

Las características morfológicas distintivas de las especies en este grupo son la forma del basidioma, láminas delicuescentes, las escamas pronunciadas del píleo y las esporas oscuras con poro germinativo.

1. Basidiomas maduros de 35 a 60.8 cm de largo..... *C. piekajoensis*
1. Basidiomas maduros menores a 30 cm de largo..... 2
2. Crece sobre estiércol..... 3
2. No crece sobre estiércol; esporas de 10-11 x 7-9 $\mu$ m y esterigmas de basidios hialinos y no oscurecidos..... *C. comatus*
3. Esporas de 17-26 x 10-13 $\mu$ m..... *C. esterquilinus*
3. Esporas de 8.1-10.0 x 6.2-6.9 $\mu$ m..... *C. spadiceisporus*
3. Esporas de 16.8-20.0 x 9.8-13.7 $\mu$ m..... *C. colosseus*

#### 2.5.5 Características macro y micromorfológicas que distinguen a *Coprinus* de los tres géneros afines *Coprinellus*, *Coprinopsis* y *Parasola*

El género *Coprinus* en el año 2001 fue reclasificado con base en análisis moleculares. Esto significó que las especies antiguamente consideradas en dicho género fueron distribuidas en los géneros *Coprinellus*, *Coprinopsis*, *Parasola* y *Coprinus*. El género *Coprinus* se encuentra en la familia Agaricaceae y los géneros *Coprinellus* P. Karst. 1879, *Coprinopsis* P. Karst. y *Parasola* en la familia Psathyrellaceae. Las características distintivas que diferencian a estos últimos tres géneros de *Coprinus* es la presencia del píleo glabro, pubescente de cistidioides (o setoides), puede estar o no cubierto con gránulos sueltos o manchas micáceas, o escamoso, las escamas se desprenden con facilidad, poseen forma de montículos de células inflamadas, efímeras de algodoncillo-flocosas a híbridas de estas; el píleo a menudo se encuentra parcialmente desgastado en forma natural dejando una superficie lisa; si las escamas no se desprenden fácilmente, entonces se encuentran en parches planos adheridos. El píleo es

blanco o conspicuamente pigmentado de color gris, naranja, beige u oxidado, de inmaduro posee forma ovoide a elipsoide, al madurar posee forma campanulada a plano convexo, el himenio se encuentra lacerado y delicuescente. El estípite es fistuloso con un cordón hifal ubicado en el centro; la base puede ser o no bulbosa; posee un velo ausente o fugaz o a veces dejando un anillo un borde basal o escamas; las láminas son delicuescentes en ejemplares maduros, pleurocistidios prominentes (pueden estar ausentes o escasos, en pequeñas o medianas especies delicuescentes); láminas blancas, luego negruzcas, raramente con tinte rosado intermedio, delicuescentes o más raramente no, solo raramente flanqueados, lados estrictamente paralelos y en excepciones sutilmente paralelos; basidios di, tri o tetramórficos (Redhead *et al.*, 2001)

*Coprinus pjierekjooensis* sp. nov. se puede diferenciar de *C. sterquilinus* debido a que *C. sterquilinus* tiene esporas elipsoides más grandes de 17-26 x 10-15  $\mu\text{m}$  y solo crece sobre estiércol, principalmente de caballo; de *C. spadiceisporus* se diferencia porque el píleo de *C. spadiceisporus* es pronunciadamente ranurado hacia el centro, además sus basidiomas son más pequeños y sólo se conoce del Estado de Washington, EE. UU. y en algunas localidades de Europa (Cataluña, España y Tombolo di feniglia, Italia). La especie más cercana filogenéticamente a *C. pjierekjooensis*; es *C. comatus* (Figura 2.7) de la cual se diferencia principalmente por la longitud del estípite que en el caso de *C. pjierekjooensis* puede llegar a alcanzar hasta los 60.8 cm de largo, mientras que *C. comatus* no sobrepasa los 12 cm; lo mismo sucede con *C. colosseus* dado que su estípite puede llegar a alcanzar hasta los 50.5 cm de largo (Uljé y Uljé *et al.*, 1998; Noordeloos, 2000; Tabares y Rocabruna, 2002). Además la nueva especie, *C. pjierekjooensis* se distingue de *C. comatus* por el largo y ancho del píleo de *C. comatus* que es de 4.0-12.0 x 2.4-4.5 cm, respectivamente, dimensiones mucho menores que las de *C. pjierekjooensis*, cuyas dimensiones son de 28.5-30.8 x 10.5-16.5 cm; el largo de las células de la pilipelis también son mayores en *C. pjierekjooensis* las cuales son de 20.5 a 55.4  $\mu\text{m}$ , mientras que las de *C. comatus* son de 12.0 a 29.0  $\mu\text{m}$ ; el tamaño de las esporas de *C. pjierekjooensis* son las más grandes con un largo y ancho de 13.0-15.5 x 7.0-10.0  $\mu\text{m}$ , comparadas con las de *C. comatus* que poseen un largo y ancho de 10.0-11.0 x 7.0-9.0  $\mu\text{m}$ . La longitud del estípite de *C. pjierekjooensis* es una de las características diferenciales más importantes para esta nueva especie, porque presenta una longitud de hasta 60.8 cm, comparado con los 5.0 cm de *C. comatus*; lo mismo sucede con

el diámetro de las células del estipitipelis de *C. pjierekajoensis* con dimensiones que van de 55.0 a 89.4  $\mu\text{m}$ , las cuales son por mucho, más grandes que las de *C. comatus* de 5.0 a 16.0  $\mu\text{m}$  (Cuadro 2.1).

### **2.5.6 Potencial medicinal de *Coprinus comatus***

Desde la década de 1960, se han explorado de manera más intensiva, los constituyentes químicos, farmacológicos y valores medicinales de hongos comestibles silvestres (Huang *et al.*, 2019). *C. comatus* ha sido utilizado por médicos chinos para calmar la mente y tratar el bazo, el estómago y el sistema digestivo, dado que contiene ocho aminoácidos esenciales para los seres humanos (valina, leucina, lisina, isoleucina, treonina, fenilalanina, triptófano y metionina (Reyes *et al.*, 2009). El píleo contiene aspartil proteasas, asparagina y glutamina, mientras que el estípite es una fuente de glutamina, ácido glicérico, treonina, ácido B-aminobutírico, isoleucina y lisina (Chen, 2000). La disolución acuosa (producto de la delicuescencia del píleo de *C. comatus*) posee una sustancia llamada coprinol (Johansson *et al.*, 2001; Cao *et al.*, 2019) utilizada como digestivo, para reforzar el sistema inmune, tratamiento de hemorroides (Sivanandhan *et al.*, 2017) y, enfermedades prostáticas (Dotan *et al.*, 2010). Tiene efectos hipoglucemiantes, antinematicida, actividades antioxidantes, antitumorales, anticanceroso, antibacteriales e hipolipemiantes (Jang *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010; Dotan, 2011; Pawlik *et al.*, 2015) y antifúngicas (Stojković *et al.*, 2013); de igual manera con posible actividad antinociceptiva (Ren *et al.*, 2012). *C. comatus* posee actividad nematocida, dado que se alimenta de microfauna en el sustrato donde se desarrolla, al infectar y matar al nematodo de vida libre *Panagrellus redivivus* y al nematodo parásito de raíz de la planta *Meloidogyne arenaria* (Luo *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2007). Dada la cercanía molecular y filogenética entre *C. comatus* y *C. pjierekajoensis*, sería de enorme interés el estudio de las propiedades nutraceuticas y medicinales potenciales en la especie nueva.

### **2.5.7 Uso como comestible de *C. comatus* en el mundo**

*C. comatus* ha sido utilizada como alimento a nivel mundial por poseer una forma particular, un sabor fino, textura y sabor suaves. Esta especie ha sido reconocida como nutritiva y

saludable tanto por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, como por la Organización Mundial de la Salud (Chen, 2000; Li *et al.*, 2010) quienes mencionan que *C. comatus* es una de las 16 especies raras de hongos que poseen tanto altos valores nutritivos como un amplio rango de propiedades medicinales (Li *et al.*, 2010b), además existen cepas que pueden usarse como aromatizantes para alimentos, dado el peculiar aroma de basidiomas que producen (Tsai *et al.*, 2009).

### **2.5.8 Cultivo de *C. comatus* y potencial de cultivo de la nueva especie**

Los hongos son componentes dietéticos importantes en algunas culturas y consumidos en temporadas de fructificación como alimento desde tiempos ancestrales (Stojkovic *et al.*, 2019). *C. comatus* se ha cultivado en paja de arroz, desperdicios de algodón, mazorcas de maíz, urea, lima, gallinaza o estiércol de pollo y desechos de pulpa y papel (Dulay *et al.*, 2012). Sin embargo, es una especie con un periodo muy corto de vida de anaquel después de la cosecha, máximo 10 días en condiciones controladas, debido a la alta respiración, el cambio de color, la autodisolución y consistencia frágil (Peng *et al.*, 2020). A pesar de ello, en China, ocupa el octavo lugar como una de las especies cultivadas de mayor valor (Ju y He, 2011); en 2006 se produjeron 382 mil toneladas de esta especie en el citado país (Li *et al.*, 2010). Además, está clasificado como un hongo preeminente (Peng *et al.*, 2020), es decir un hongo superior del más alto nivel alimenticio. La comestibilidad de *C. pjiেকakjooensis* por la comunidad Tlahuica-*Pjiেকakjoo* es un conocimiento de gran importancia, transmitido de generación en generación desde tiempos ancestrales. *C. pjiেকakjooensis* tiene la ventaja de ser un hongo saprófito, el cual la propia comunidad lo podría cultivar y comercializar a gran escala y obtener recursos económicos que ayudarían a la conservación de sus recursos naturales y genéticos de su bosque.

### **2.5.9 Propuesta como área natural de conservación**

*Coprinus pjiেকakjooensis* es un hongo silvestre con importancia ecológica, biocultural y comestible para el grupo étnico Tlahuica-*Pjiেকakjoo*, es un hongo saprófito establecido en tres pequeñas áreas de un bosque de pino-encino, bosque de oyamel y bosque mesófilo de

montaña, en el municipio de Ocuilan, al sureste del estado de México. Esta nueva especie se puede considerar microendémica, cuyos ecosistemas donde se desarrolla poseen además, un enorme valor ecológico como aprovisionamiento de agua, suelo, alimentos, combustible, regulación del clima, micoturismo, servicios culturales y madera (Dar y Khuroo, 2020). Desafortunadamente, por la sobreexplotación de sus recursos maderables debido a la tala ilegal, cacería furtiva y el cambio de uso del suelo ponen en grave riesgo de desaparecer esta microrregión en donde se desarrolla *C. pjierekakjooensis*. El área en la cual se desarrolla esta nueva especie pertenece a la comunidad de los Bienes Comunales de San Juan Atzingo, municipio de Ocuilan, estado de México y este predio hasta hace poco tiempo aprovechaba sus recursos de madera legal, teniendo un programa de manejo forestal sustentable, autorizado por la Secretaría de Medio Ambiente (SEMARNAT) y las áreas en donde crece *C. pjierekakjooensis* estaban segregadas del área de aprovechamiento forestal y se delimitaron como áreas de conservación; y hasta donde se conoce es la primera ocasión en donde un área era segregada del aprovechamiento para su conservación por el desarrollo de una especie de hongo; sin embargo, por problemas internos dentro de la comunidad, se suspendió este aprovechamiento legal y se inició la tala clandestina y estas áreas en la actualidad no son respetadas. Debido a estas circunstancias, sería muy importante que la difusión del descubrimiento de esta nueva especie en esa microrregión pueda aplicar un plan de desarrollo local y regional, que considere la conservación del área de desarrollo de *C. pjierekakjooensis*. Dicho hongo, es consumido tradicionalmente por el grupo étnico Tlahuica-*Pjierekakjoo*, es una especie microendémica que solo se desarrolla en tres pequeñas áreas dentro de la comunidad de los Bienes Comunales de San Juan Atzingo, Ocuilan, en el estado de México y en grave riesgo de desaparecer por la tala ilegal de esas áreas.

## 2.6 CONCLUSIONES

Con base en la caracterización macro y micromorfológica y las evidencias moleculares se concluye que *C. pjierekakjooensis* es una especie nueva perteneciente al género *Coprinus sensu stricto*. Dado el gran tamaño de los basidiomas de la especie, lo cual la haría muy obvia, si estuviese ampliamente distribuida en México, es razonable hipotetizar que la especie tenga una distribución restringida o sea endémica del área de estudio. Esto la haría una especie muy

vulnerable a la extinción si no se protegen las áreas en donde prospera, lo cual es un alto riesgo dada la tala inmoderada a la que son objeto diversas áreas en donde se asienta la cultura Tlahuica-*Pjiekakjoo*. Dada su cercanía morfológica y molecular con *C. comatus*, la cual es una especie ampliamente cultivada en Asia Oriental, así como la importancia biocultural que tiene en el citado grupo étnico, *C. pjiekakjooensis* tiene un gran potencial biotecnológico como una especie para ser cultivada, lo cual coadyuvaría a su conservación *ex-situ*.

## 2.7 LITERATURA CITADA

- Aguirre-Acosta, E., Ulloa, M., Aguilar, S., Cifuentes, J. y Valenzuela, R. 2014. Biodiversidad de hongos en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 85: 76-81.
- Arras L. 2016. *Funghi in Sardegna*. Italia. 639 pp.
- Augustynczyk, A. L., Gutsch, M., Basile, M., Suckow, F., Lasch, P., Yousefpour, R. and Hanewinkel, M. 2020. Socially optimal forest management and biodiversity conservation in temperate forests under climate change. *Ecological Economics*. 169:1-14.
- Badalyan, S. M. 2020. Medicinal Coprinoid Mushrooms (Agaricomycetes) Distributed in Armenia (Review). *International Journal of Medicinal Mushroom*. 22: 257-267.
- Baustista-Hernández, S., Raymundo, T., Aguirre-Acosta, E., Contreras-Pacheco, M., Romero-Bautista, L. y Valenzuela, R. 2018. Agaricomycetes gasteroides del bosque mesófilo de montaña de la Huasteca Alta Hidalguense, México. *Acta Botánica Mexicana*. 123:21-36.
- Berch, S. M. Ka, K-H., Park, H. and Winder. R. 2007. Development and potential of the cultivated and wild-harvested mushroom industries in the Republic of Korea and British Columbia. *BC Journal of Ecosystems and Management* 8:53-75.
- Binzer, A., Guill, C., Brose, U. and Rall, B. C. 2012. The dynamics of food chains under climate change and nutrient enrichment. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences*. 367:2935-2944.
- Boa, E. 2005. Los hongos silvestres comestibles: perspectiva global de uso e importancia para la población. *Food & Agriculture Org*. 17:1-170.
- Bremner, J. M. 1965. Total nitrogen. In: Black, C. A. (ed). *Methods of soil analysis*. Part 2. Agronomy 9. American Society of Agronomy. Madison, WI. Pp. 1149-1178.
- Caballero-Cruz, P., Vargas-Noguez, G. y Ortiz-Pulido, R. 2019. Especies de aves en riesgo en el bosque mesófilo de montaña en cinco AICA de la Sierra Madre Oriental, México. *Huitzil, Revista Mexicana de Ornitología*. 21:1-12.

- Campi, M., Miranda, B. y Maubet, Y. 2016. *Coprinus comatus* (O.F. Müll.) Pers. (Agaricaceae-Basidiomycota), hongo de interés medicinal y gastronómico, nueva cita para el Paraguay. *Steviana*. 8:68-74.
- Cao, H., Ma, S., Guo, H., Cui, X., Wang, S., Zhong, X. and Chun-chao, H. 2019. Comparative study on the monosaccharide compositions, antioxidant and hypoglycemic activities in vitro of intracellular and extracellular polysaccharides of liquid fermented *Coprinus comatus*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 15:543-549.
- Chen, F. C., Shimomura, N., Yamaguchi, T. and Aimi, T. 2020. Spore formation and karyological characterization of basidiosporogenesis, meiosis, post-meiotic and nuclear migration mitosis in *Coprinus comatus*. *Mycoscience*. 61:122-127.
- Ciortan L. 2013. The taxonomic diversity of the macromycetes from Căpățâni mountains (Romania). *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*. 17:41-50.
- CSTPA. 1980. Handbook on reference methods for soil testing. Council on soil testing and plant analysis, Athens, Georgia. Council on Soil Testing and Plant Analysis 202 p.
- De Román, M. and Boa, E. 2004. Collection, marketing and cultivation of edible fungi in Spain. *Micología Aplicada Internacional*. 60:284-290.
- Dotan, N., Wasser, S. P. and Mahajna, J. 2010. The Culinary-Medicinal Mushroom *Coprinus comatus* as a Natural Antiandrogenic Modulator. *Integrative Cancer Therapies*. 10:148-159.
- Han, C., Yuan, J., Wang, Y. and Li, L. 2006. Hypoglycemic activity of fermented mushroom of *Coprinus comatus* rich in vanadium. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. Folia Cryptogamica Estonica*. 52:35-40.
- Foster, P. 2001. The potential negative impacts of global climate change on tropical montane cloud forests. *Earth-Science Reviews*. 55:73-106.
- Garibay-Origel, R., Ruán-Soto F. y Estrada-Martínez, E. 2010. El conocimiento micológico tradicional, motor para el desarrollo del aprovechamiento de los hongos comestibles y medicinales. *In: Martínez-Carrera D., Curvetto N., Sobal M. y Morales P., Mora V.M. (Eds.). Hacia un desarrollo sostenible del sistema de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: Avances y perspectivas en el siglo XXI. Puebla. México. 648 p.*
- Gual, M. D. y González-Medrano. 2014. Bosques mesófilos de montaña de México. Diversidad, ecología y manejo. Primera edición. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. 351 p.
- Guzmán, G. 1995. La diversidad de los hongos en México. *Ciencias*. 39:52-57.
- Guzmán, H. G. 1977. Identificación de los hongos comestibles venenosos alucinantes y destructores de la madera. Editorial Limusa. México. 458 p.

- Hayder, F. and Nasri-Ammar, K. 2020. Effects of habitat fragmentation on the sub-social desert terrestrial isopod *Hemilepistus reaumurii*. *Journal of Arid Environments*. 178:1-6.
- Hernández, S. F., Pérez, M. J., Xoconostle, C. B., Almaraz, S. J., Ojeda, T. E., Mata, M. G. and Díaz, A. I. 2016. Traditional knowledge and use of wild mushrooms by Mixtecs or Ñuu savi, the people of the rain, from Southeastern Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 12:1-22.
- Hobbs, R. J. and Yates, C. J. 2003. Impacts of ecosystem fragmentation on plant populations: generalising the idiosyncratic. *Australian Journal of Botany*. 51:471-488.
- Holmgren, G. G. S., Juve, R. L. and Geschwender. 1977. A mechanically controlled variable rate leaching device. *Soil Science Society of America*. 41:1207-1208.
- Hopple, J. S. and Vilgalys, R. 1999. Phylogenetic relationships in the mushroom genus *Coprinus* and dark-spored allies based on sequence data from the nuclear gene coding for the large ribosomal subunit RNA: divergent domains, outgroups, and monophyly. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 13:1-19.
- Huang, L., Sun, N., Ban, L., Wang, Y. y Yang, H. 2019. Ability of different edible fungi to degrade crop straw. *AMB Express*. 9:1-6.
- Jiménez Ruiz, M., Pérez-Moreno, J., Almaraz-Suárez, J. J. y Torres-Aquino, M. 2013. Hongos silvestres con potencial nutricional, medicinal y biotecnológico comercializados en Valles Centrales, Oaxaca. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 4:199-213.
- Johansson, M., Sterner, O., Labischinski, H. and Anke, T. 2001. Coprinol, a new antibiotic cuparane from a *Coprinus* species. *Zeitschrift Für Naturforschung Journal of Biosciences*. 56:31-34.
- Kemp, R. F. 1975. Breeding biology of *Coprinus* species in the section Lanatuli. *Transactions of the British Mycological Society*. 65:375-388.
- Ko, K. S., Lim, Y. W., Kim, Y. H. and Jung, H. S. 2001. Phylogeographic divergences of nuclear ITS sequences in *Coprinus* species *sensu lato*. *Mycological Research*. 105:1519-1526.
- Ko, K. S., Lim, Y. W., Kim, Y. H. and Jung, H. S. 2001. Phylogeographic divergences of nuclear ITS sequences in *Coprinus* species *sensu lato*. *Mycological Research*. 105:1519-1526.
- Kyaw, T. Y., Germain, R. H., Stehman, S. V. and Quackenbush, L. J. 2019. Quantifying forest loss and forest degradation in Myanmar's "Home of Teak." *Canadian Journal of Forest Research*. 50: 89-101.
- Layman, C. A., Quattrochi, J. P., Peyer, C. M. and Allgeier, J. E. 2007. Niche width collapse in a resilient top predator following ecosystem fragmentation. *Ecology Letters*. 10:937-944.

- Lázaro, B. y Ibiza. 1989. Hongos comestibles y venenosos. Décimo primera edición. Manuales Soler. 176 p.
- Liu, Y., Li, Y., Ou, Y., Xiao, S., Lu, C., Zheng, Z. and Shen, Y. 2012. Guanacastane-type diterpenoids with cytotoxic activity from *Coprinus plicatilis*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 22:5059-5062.
- Lodge, D., Ammirati, J., O'Dell, T. and Mueller, G. 2004. Biodiversity of Fungi: Inventory and monitoring methods. Londres, Reino Unido. Academic Press. 127-158 p.
- Maldonado, M. A., 2016. El giro antropocénico sociedad y medio ambiente en la era global. *Política y Sociedad*. 53:795-814.
- Maliva, R. G. 2020. Anthropogenic aquifer recharge. Series Editor. Quinta edición. Springer Hydrogeology. 872 p.
- Meadema, F., Marion, J. L., Arredondo, J. and Wimpey, J. 2020. The influence of layout on Appalachian Trail soil loss, widening, and muddiness: Implications for sustainable trail design and management. *Journal of Environmental Management*. 257:1-10.
- Meerts. 1999. The evolution of spore size in Agarics: do big mushrooms have big spores? *Journal of Evolutionary Biology*. 12:161-165.
- Melguizo-Ruiz, N., Jiménez-Navarro, G., De Mas, E., Pato, J., Scheu, S., Austin, A. T. and Moya-Laraño, J. 2019. Field exclusion of large soil predators impacts lower trophic levels, and decreases leaf-litter decomposition in dry forests. *Journal of Animal Ecology*. 89:334-346.
- Moncalvo, J. M., Lutzoni, F. M., Rehner, S. A., Johnson, J. and Vilgalys, R. 2000. Phylogenetic relationships of agaric fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Systematic Biology*. 49: 278-305.
- Moncalvo, J. M., Vilgalys, R., Redhead, S. R., Johnson, J. E., James, T. Y., Aime, M. C., Hofstetter, V., Verduin, S. J., Larsson E., Baroni, T. J., Thorn, R. G., Jacobsson, S., Cléménçon, H. and Miller O. K. 2002. One hundred and seventeen clades of euagarics. *Molecular phylogenetics and evolution*. 23:357-400.
- Moreno, F. A. 2014. A food resource for natives and mestizo groups of Mexico: the wild mushrooms. *Anales de Antropología*. 48:241-272.
- Morris, W. F., Ehrlén, J., Dahlgren, J. P., Loomis, A. K. and Louthan, A. M. 2019. Biotic and anthropogenic forces rival climatic/abiotic factors in determining global plant population growth and fitness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 117: 1107-1112.
- Nagy, L. G., Vágvölgyi, C. and Papp, T. 2012. Morphological characterization of clades of the *Psathyrellaceae* (Agaricales) inferred from a multigene phylogeny. *Mycological Progress*. 12:505-517.

- Olsen, S. R., Cole, C. V., Wantable, F. S. and Dean, L. A. 1954. Estimation of available phosphorus in soil by extraction with sodium bicarbonate. Circular 939. US Department of Agriculture. Washington, DC.
- Padamsee, M., Matheny, P. B., Dentinger, B. T. and McLaughlin, D. J. 2008. The mushroom family Psathyrellaceae: Evidence for large-scale polyphyly of the genus *Psathyrella*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 46:415-429.
- Peng, Y., Li, T., Jiang, H., Gu, Y., Chen, Q., Yang, C., Qi, W., Liu, S.-Q. and Zhang, X. 2020. Postharvest biochemical characteristics and ultrastructure of *Coprinus comatus*. *Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology*. 10:49-53.
- Pérez-Moreno, J., Martínez-Reyes, M., Hernández-Santiago, F. and Ortiz-Lopez, I. 2020. Climate Change, Biotechnology, and Mexican Neotropical Edible Ectomycorrhizal Mushrooms. Springer Nature Switzerland AG. Cham, Suiza. In: Pérez-Moreno, J., Guerin-Laguette, A., Flores Arzú, R. and Yu, F.-Q. (Eds.). *Mushrooms, Humans and Nature in a Changing World*. 3:61-93 p.
- Pérez-Moreno, J., Martínez-Reyes, M., Yescas-Pérez, A., Delgado-Alvarado, A. and Xoconostle-Cázares, B. 2008. Wild Mushroom Markets in Central Mexico and a Case Study at Ozumba. *Economic Botany*. 62:425-436.
- Pulido, M. M. 1983. Estudios en Agaricales Colombianos los hongos de Colombia IX. Biblioteca José Jerónimo Triana No.7. Bogotá (Colombia): Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia. 143 p.
- Püttker, T., Crouzeilles, R., Almeida-Gomes, M., Schmoeller, M., Maurenza, D., Alves-Pinto, H. and Fonseca, C. R. 2020. Indirect effects of habitat loss via habitat fragmentation: A cross-taxa analysis of forest-dependent species. *Biological Conservation*. 241:1-10.
- Ramírez-Carbajal, E. 2017. Etnomicología en la zona Tlahuica-*Pjiekakjoo* del estado de México. (Tesis de licenciatura). Universidad Intercultural del estado de México, Plantel San Felipe del Progreso, estado de México. 140 pp.
- Ramos, A., Bandala, V. M. and Montoya, L. 2017. A new species and a new record of *Laccaria* (Fungi, Basidiomycota) found in a relict forest of the endangered *Fagus grandifolia* var. *mexicana*. *Mycology*. 27:77-94.
- Redhead, S. A., Vilgalys, R., Moncalvo, J. M., Johnson, J. and Hopple, J. S. 2001. *Coprinus* Pers. and the Disposition of *Coprinus* species *sensu lato*. *Taxon*. 50:203-241.
- Reyes, R. G., Lopez, L. L., Kumakura, K., Kalaw, S. P., Kikukawa, T. and Eguchi, F. 2009. *Coprinus comatus*, a newly domesticated wild nutraceutical mushroom in the Philippines. *Journal of Agricultural Technology*. 5:299-316.
- Rzedowski, J. 1966. Vegetación del estado de San Luis Potosí. *Acta Científica Potosina*. 5:5-291.
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Editorial Limusa. México. 432 p.

- Saar, I., Kalamees, K. and Vimba, E. 2015. Type studies on *Coprinus dunarum* Stoll. *Folia Cryptogamica Estonica*. 52:35-40.
- Saunders, D. A., Hobbs, R. J. and Margules, C. R. 1991. Biological consequences of ecosystem fragmentation: A review. *Conservation Biology*. 5:18-32.
- Shen, Q., Chen, W., Yan, Z. and Zhenfeng, X. 2009. Potential pharmaceutical resources of the Qinling Mountain in central China: medicinal fungi. *Frontiers of biology in China*. 4:89-93.
- Sivanandhan, S., Khusro, A., Paulraj, M. G., Ignacimuthu, S. and AL-Dhabi, N. A. 2017. Biocontrol properties of basidiomycetes: an overview. *Journal of Fungi*. 3:1-14.
- Sotelo-Muñoz, M., Maldonado-Coelho, M., Svensson-Coelho, M., dos Santos, S. S. and Miyaki, C. Y. 2020. Vicariance, dispersal, extinction and hybridization underlie the evolutionary history of Atlantic Forest fire-eye antbirds (Aves: Thamnophilidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 148:1-37.
- Stojkovic, D., Smiljkovic, M., Ciric, A., Glamoclija, J., Van Griensven, L., Ferreira, I. C. F. R. and Sokovic, M. 2019. An insight into antidiabetic properties of six medicinal and edible mushrooms: Inhibition of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase linked to type-2 diabetes. *South African Journal of Botany*. 120: 100-103.
- Valenzuela, E., Ramírez, C. y Moreno, G. 1996. Agaricales más comunes recolectados en el Campus Isla Teja de la Universidad Austral de Chile. *Bosque*. 17:51-63.
- Van de Bogart, F. 1976. The genus *Coprinus* in western North América, part I: Section *Coprinus*. *Mycotaxon*. 4:233-275.
- Vellinga, E. C. 2003. Phylogeny of *Lepiota* (Agaricaceae)-Evidence from nrITS and nrLSU sequences. *Mycological Progress*. 2:305-322.
- Williams-Linera, G. 2002. Tree species richness complementarity, disturbance and fragmentation in a Mexican tropical montane cloud forest. *Biodiversity and Conservation*. 11:1825-1843.
- Williams-Linera, G., Manson, R. H. y Vera, E. I. 2002. La fragmentación del bosque mesófilo de montaña y patrones de uso del suelo en la región oeste de Xalapa, Veracruz, México. *Madera y Bosques*. 8:73-89.
- Yang, J., Huang, Y., Xu, H., Gu, D., Xu, F., Tang, J. and Yang, Y. 2020. Optimization of fungi co-fermentation for improving anthraquinone contents and antioxidant activity using artificial neural networks. *Food Chemistry*. 313:1-8.
- Zhao, S., Rong, C., Kong, C., Liu, Y., Xu, F., Miao, Q., Wang, S., Wang, H. and Zhang, G. 2014. A novel laccase with potent antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from mycelia of mushroom *Coprinus comatus*. *BioMed Research International*. 1:1-8.

## CONCLUSIONES GENERALES

Actualmente el estudio de hongos ectomicorrízicos aplicados como inoculantes en especies forestales y la generación de información novedosa basada en la identificación de hongos saprófitos son líneas de investigación que tienen un enorme potencial biotecnológico y de generación de conocimiento, debido a que se encuentran vinculados con la mitigación de los efectos del cambio climático global a través de reforestaciones exitosas, el deterioro de los recursos naturales, la pérdida de la diversidad biocultural y la seguridad alimentaria, al estar vinculados con la producción de alimento de alta calidad nutricional y contenido de nutraceuticos. Por lo tanto, existe la necesidad de realizar estudios dirigidos a especies de géneros poco estudiados de hongos comestibles silvestres y desarrollar paquetes biotecnológicos aplicables y de esta forma revalorizar el conocimiento ancestral existente en las culturas madre del país. En términos generales, el conocimiento científico de los hongos comestibles silvestres es de gran relevancia, pues constituyen un importante recurso forestal no maderable de gran importancia ecológica, cultural, social y económica para las comunidades aledañas a las áreas boscosas. La caracterización de especies ectomicorrízicas y saprófitas debe efectuarse utilizando enfoques multidisciplinarios que incluyas la caracterización macro y micromorfológica, así como el uso de herramientas moleculares, con la finalidad de la precisión en su identificación. A pesar de los estudios realizados sobre la importancia de los hongos comestibles silvestres e México, es necesario generar más información incorporando nuevas especies en la producción nacional y contribuir al desarrollo de la producción de bioinoculantes forestales en el caso de las especies ectomicorrízicas o del cultivo en el caso de las especies saprobias, como un factor de transformación social en los grupos que habitan áreas rurales, lo cual contribuiría al uso sostenible de este recurso genético y favorecería el equilibrio entre conservación y desarrollo, y simultáneamente a la creación de nuevas alternativas de producción que sean competitivas y sostenibles en un esquema de mercado global, preservando los modos de vida de los grupos étnicos. El presente trabajo contribuye así al conocimiento de la diversidad de HCS de México.