

# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

---

FACULTAD DE CIENCIAS



**ASPECTOS TAXONOMICOS, QUIMICOS Y  
FARMACOLOGICOS DE *Amanita verna*  
(Agaricales)**

**T E S I S**

que para optar por el título de

**B I O L O G O**

p r e s e n t a :

**EDUARDO FCO. CHINCHILLA SANDOVAL**

México, D. F.

1981



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## CONTENIDO

|     |                           |    |
|-----|---------------------------|----|
| I   | INTRODUCCION.....         | 1  |
| II  | MATERIALES Y METODOS..... | 6  |
| III | UBICACION TAXONOMICA..... | 15 |
| IV  | RESULTADOS.....           | 21 |
| V   | DISCUSION.....            | 38 |
| VI  | CONCLUSIONES.....         | 43 |
| VII | LITERATURA CITADA.....    | 44 |

## RESUMEN

Los ejemplares de la especie Amanita verna, que en este trabajo se estudiaron mediante los ensayos taxonómico, químico y biológico, fueron tóxicos debido a la presencia en ellos de amanotoxinas, en particular  $\alpha$ -amanotoxina, substancias que se registraron mediante la utilización de los ensayos químico y biológico.

La presencia de estos compuestos en los ejemplares de A. verna, utilizada como marcador taxonómico, fue otro aspecto que se tomó en cuenta junto con los caracteres macroscópicos y microscópicos para determinar la identidad de los ejemplares estudiados. Siendo así este trabajo uno de los primeros registros acerca de las investigaciones sobre los macromicetos tóxicos de México.

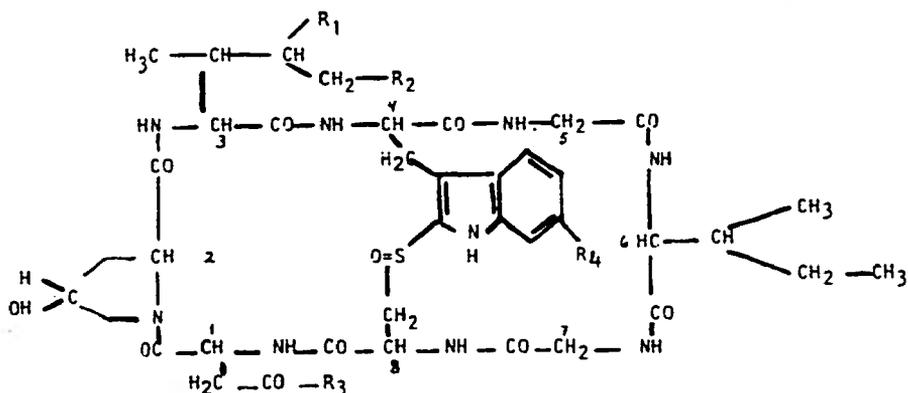
## 1. INTRODUCCION

Amanita verna (Bull. ex Fr.) Roques es un basidiomicete completamente blanco que taxonómicamente se ubica dentro de la sección Phalloidae del género Amanita, junto con otras especies afines a ella, como son A. phalloides (Fr.) Secr., A. bisporigera Atk. y A. virosa Secr. Estas especies son muy parecidas entre sí macroscópicamente. Además forman parte de un grupo de hongos conocidos comúnmente como amanitas mortales, las cuales son responsables de aproximadamente el 90% de las muertes ocasionadas en el hombre por envenenamientos con hongos, como lo señalan los trabajos de Block et al. (1955) y Bussi et al. (1977).

Desde un punto de vista químico pueden presentar diversas sustancias ciclopeptídicas que, agrupadas en dos familias, son conocidas con los nombres genéricos de amanotoxinas y falotoxinas, cuya estructura química ha sido investigada por Wieland et al. (1968, 1972, 1973 y 1978):

Las amanotoxinas son octapéptidos bicíclicos, entre las cuales se distinguen, por la potencia de su toxicidad, las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (Fig. 1), habiendo sido probadas tanto en condiciones in vivo (Tyler et al., 1963 y Brady et al., 1975) como in vitro (Preston et al., 1975 y Johnson y Kimbrough, 1976). De esta manera el estudio efectuado sobre la inhibición de la ARN polimerasa B por  $\alpha$ -amanotoxina ha conducido a la obtención de un bioensayo controlado, in vitro, que apoya los estudios de las propiedades tóxicas y de confirmación quimiotaxonómica de las especies investigadas.

Las falotoxinas son heptapéptidos bicíclicos, de las cuales la que más se ha estudiado por sus propiedades tóxicas es la faloidina (Fig. 2), habiendo sido objeto de estudios que principalmente se han realizado en condiciones in vivo, en donde actúa específicamente sobre las membranas de los hepatocitos y de algunos de sus organelos como lisosomas y retículo endoplásmico (Litten, 1975).

ESTRUCTURA QUIMICA DE  $\alpha$ ,  $\beta$  Y  $\gamma$ --AMANOTOXINAS

|                         | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub>  | R <sub>4</sub> |
|-------------------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|
| $\alpha$ --Amanotoxina* | OH             | OH             | NH <sub>2</sub> | OH             |
| $\beta$ --Amanotoxina   | OH             | OH             | OH              | OH             |
| $\gamma$ --Amanotoxina  | H              | OH             | NH <sub>2</sub> | OH             |

Fig. 1. \* Los aminoácidos que forman esta amanotoxina son en el orden que están enumerados: asparagina, hidroxiprolina, dihidroxisoleucina, triptofano, glicina, isoleucina, glicina y cisteína. (Wieland, 1978).

\*\* La línea punteada está señalando el radical involucrado con la toxicidad que causan las amanotoxinas. (Wieland, 1978).

Aunque ambas familias de compuestos tóxicos de hecho pueden presentarse en los hongos involucrados en los envenenamientos ocasionados por el grupo faloides, es importante señalar que la toxicidad producida por la faloidina es insignificante comparada con la causada por la  $\alpha$ -amanotoxina, la cual de acuerdo con Lampe (1979), en la especie humana, por vía digestiva, puede provocar tres fases sintomatológicas. La primera se caracteriza por provocar trastornos gastrointestinales que se manifiestan entre las 10 y 14 horas; la segunda se caracteriza por una aparente calma pasajera que puede durar hasta tres días; en la tercera fase los daños inducidos por la toxina se localizan en el hígado y en los riñones, pudiendo ocurrir la muerte entre 48 y 96 horas después de haber ingerido el hongo.

Son varios los investigadores que han registrado algunos daños acerca de los efectos tóxicos causados por  $\alpha$ -amanotoxina en el ratón, por vía intraperitoneal. Tyler et al. (1963) y Brady et al. (1975) señalan que algunos de los síntomas farmacológicos disintintivos presentados en los animales inoculados con esta toxina fueron: erección pilomotoras, temblores musculares, pérdida de peso y, en caso de muerte, ésta ocurrió entre las 48 y 72 horas siguientes a la inoculación. Las necropsias en los casos de muerte experimental mostraron el hígado moteado y decolorado, congestión en los riñones, pulmones y bazo; el estómago y la vejiga urinaria distendidos. Los estudios histopatológicos realizados por Panner (1969), mostraron en el hígado, la destrucción masiva de sus células, así como también, daños en el núcleo y en el citoplasma.

Asimismo es importante señalar que la presencia de estas sustancias (amanotoxinas y falotoxinas) en las especies citadas anteriormente, puede variar dependiendo de la interacción existente entre las características genéticas y los diversos factores ambientales que caracterizan las regiones particulares en donde se localizan y crecen estos hongos, como sucede en particular con A. verna, especie con la que han trabajado varios investigadores. Block et al. (1955), se

## ESTRUCTURA QUIMICA DE LA FALOIDINA

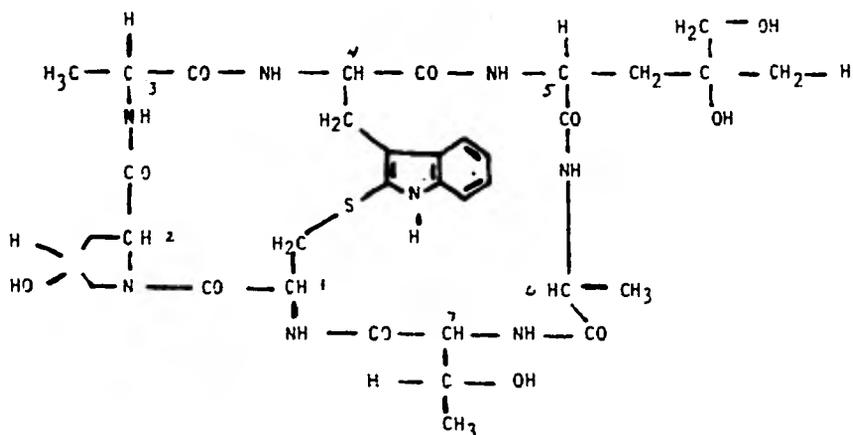


Fig. 2. Los aminoácidos que forman la faloidina son en el orden que están enumerados: cisteína, hidroxiprolina, alanina, triptofano, dihidroxileucina, alanina y treonina. (Wieland, 1978).

ñalaron la falta de  $\alpha$  y  $\beta$ -amanotoxinas en varios ejemplares de esta especie; Tyler et al. (1966), encontraron que de diez ejemplares trabajados, en dos de ellos había ausencia total tanto de  $\alpha$  como de  $\beta$ -amanotoxina; Benedict et al. (1970), registraron  $\alpha$  y  $\beta$ -amanotoxinas en una recolección de dos que revisaron cromatográficamente; Preston et al. (1975), trabajaron con cuatro ejemplares de A. verna y en sólo dos de ellos encontraron  $\alpha$  y  $\beta$ -amanotoxinas; Yocum et al. (1977), comunicaron la existencia de tan solo trazas de  $\beta$ -amanotoxina en un solo ejemplar de A. verna, de los cuatro que revisaron.

La variabilidad de los resultados señalados anteriormente ha planteado la necesidad de utilizar diversos parámetros que apoyen de forma más precisa la ubicación taxonómica de esta especie; la cual en México, se tiene bien localizada como lo señalan los trabajos taxonómicos de Pérez-Silva (1969), Pascoe (1970), Manzi (1976) y Guzmán (1977); dando a conocer por un lado, la distribución parcial de la especie y por otro el dato de que la ingestión de ejemplares de A. verna causó la muerte de tres menores (Pérez-Silva et al., 1970).

De acuerdo con lo citado anteriormente el objetivo del presente trabajo es: Utilizando como marcador quimiotaxonómico la presencia de amanotoxinas, confirmar la posición taxonómica de diversas recolecciones mexicanas de A. verna y establecer su toxicidad.

Con el propósito de alcanzar el objetivo propuesto, se pretenden desarrollar los siguientes puntos:

1. Taxonomía de los ejemplares de A. verna recolectados en algunas localidades de México.
2. Registro y confirmación de la existencia de amanotoxinas en los ejemplares mexicanos de A. verna mediante el análisis cromatográfico y la utilización de un ensayo biológico.

## II. MATERIALES Y METODOS

Este trabajo se realizó con material seco y fresco proveniente de algunas localidades de la República Mexicana, que son citadas en el texto. El material se encuentra depositado en el Herbario Nacional del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (MEXU). A manera de comparación se estudiaron los ejemplares de A. verna depositados en el Herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (ENCB) y en el Herbario de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (FCME).

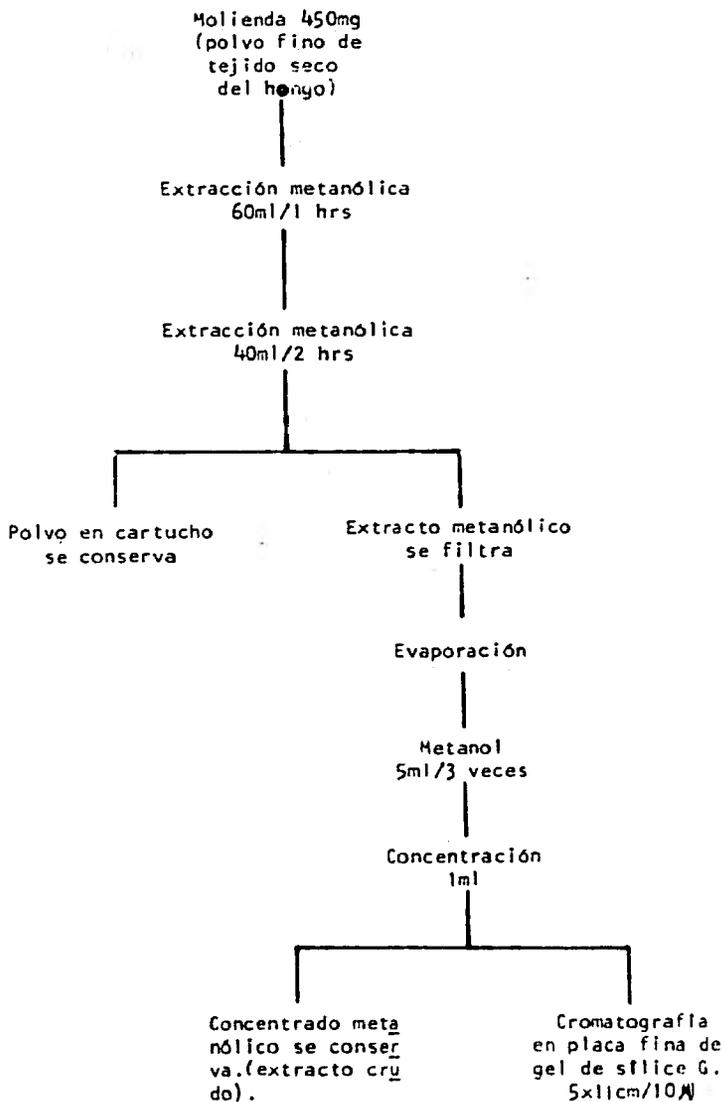
Se analizaron las características tanto macroscópicas como microscópicas de los carpóforos. Se observaron las reacciones químicas en fresco con KOH al 5% y  $H_2SO_4$  en material herborizado. Microscópicamente se observaron las características morfológicas y dimensiones que presentaron basidios y esporas, para lo cual se hicieron cortes a navaja de las láminas y colocados en una gota de KOH al 5%, solución de Melzer o azul láctico.

Para el registro de las sustancias ciclopeptídicas se realizó la siguiente metodología:

Extracción. (Fig. 3). Según Sullivan (1965), modificado por Aroche (1981). Se pulverizaron en un mortero de porcelana 450 mg de tejido seco del pileo de cada uno de los ejemplares estudiados, sometiéndose a extracción en un aparato Soxhlet (Fig. 4). El tiempo total de extracción fue de tres horas y media, extrayendo inicialmente con 60 ml del disolvente (metanol Backer) durante una hora y media; pasado este tiempo, se agregaron 40 ml del mismo disolvente, dejándose hasta completar el tiempo requerido.

Concentración. (Fig. 3). Según Issacs y Tyler (1963). Al concluir la extracción, el disolvente y los solutos contenidos en el matraz de fondo redondo se filtraron en papel Whatman N° 1 y se evaporaron en baño maría hasta observar

Fig. 3. EXTRACCION Y CONCENTRACION



sequedad, momento en el cual se agregaron tres veces seguidas 5 ml de metanol para cada intervalo de sequedad, agregándose finalmente un ml de metanol para la obtención del extracto crudo.

Cromatografía. (Fig. 5). Según Wieland y Schimidt (1952); Sullivan (1965), modificado por Aroche (1981). En placa fina de gel de sílice G (Merck 5724) de 5x11 cm, se colocaron alcuotas de 10  $\mu$ l del extracto crudo de cada uno de los ejemplares (tres alcuotas por cada placa). Se desarrolló en el solvente metil etil cetona—metanol (Backer), en proporción 1:1 y se dejó secar al aire. Se reveló rociando con cinamaldehído al 1% en metanol, secando y exponiendo la placa a vapores de ácido clorhídrico concentrado. Este mismo procedimiento se hizo paralelamente para cromatografiar los estándares de  $\alpha$  y  $\beta$ -amanotoxinas proporcionadas por el Dr. Wieland y de productos Sigma. Los extractos crudos que mediante este método cromatográfico presentaron amanotoxinas, se procesaron experimentalmente con los otros dos métodos utilizados por Sullivan (1965), con el fin de confirmar que tipo de amanotoxinas están presentes.

Reextracción de las amanotoxinas. Se cromatografiaron en placas de gel de sílice G 450 ml del extracto crudo con amanotoxinas. Se raspó la porción que coincidía con la región ocupada por estas sustancias en la placa, eluyéndose el compuesto por extracción Soxhlet, concentrando y recromatografiando junto con los estándares de  $\alpha$  y  $\beta$ -amanotoxinas.

Verificación de amanotoxinas con el Reactivo de Pauly. Se siguió la técnica cromatográfica ya mencionada y en lugar de revelar con cinamaldehído al 1% en metanol y vapores de ácido clorhídrico concentrado, se reveló con el Reactivo de Pauly (ácido sulfanílico diazotizado).

Con el objeto de confirmar en los extractos crudos y en los ejemplares secos de A. verna la presencia de amanotoxinas, se llevó a cabo la prueba de Meixner de acuerdo con Beutler (1980).

Para extractos metanólicos crudos. En una tira de papel con alto conte-

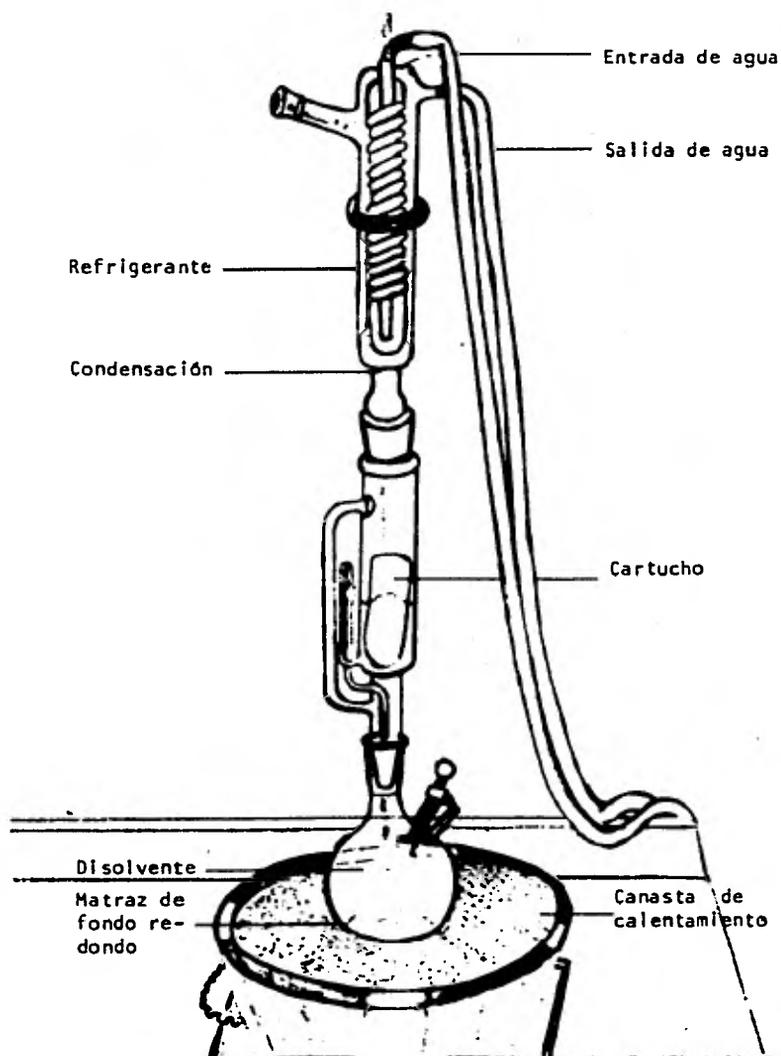
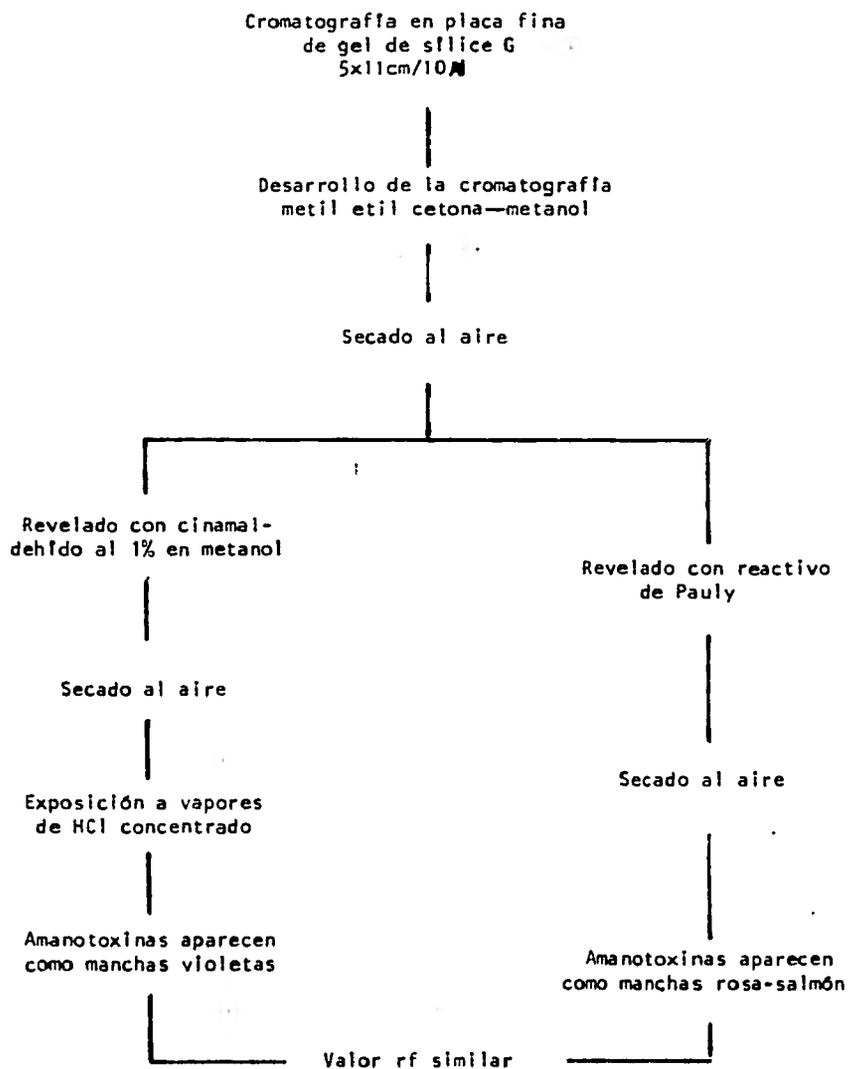


Fig. 4. Aparato de extracción Soxhlet. El goteo que produce la condensación de los vapores del disolvente moja completamente el cartucho que contiene el polvo fino del tejido del hongo; los solutos disueltos se van concentrando en el matraz de fondo redondo que contiene el disolvente, el cual es reciclado a través del sistema.

Fig. 5. CROMATOGRAFIA DE LOS EXTRACTOS  
CRUDOS DE A. verna.



nido de lignina se marcaron a lo largo de ella círculos de 1 cm de diámetro y el número del extracto correspondiente. Sobre cada círculo se colocaron 3  $\mu$ l de cada uno de los extractos crudos; se secó al aire y se adicionó una gota de ácido clorhídrico concentrado a cada una de las manchas. Paralelamente, como manchas testigos se utilizaron el estándar de  $\alpha$ -amanotoxina y el ácido clorhídrico concentrado.

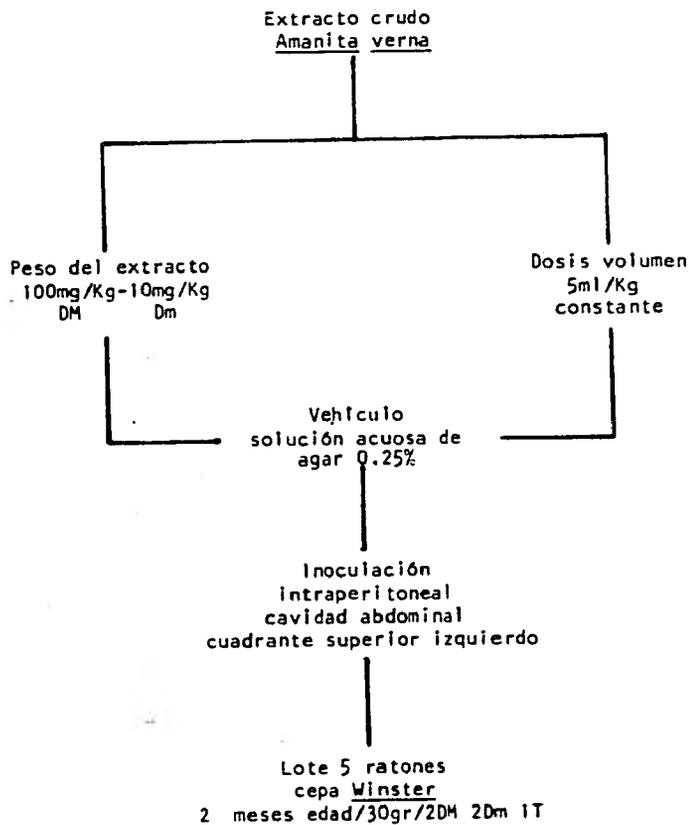
Para ejemplares secos. Pequeñas porciones (50 a 70 mg) de diferentes partes de cada uno de los ejemplares herborizados (pflero y estípites), fueron colocadas sobre un vidrio de reloj, humedecidas con 200-250 ml de metanol y presionadas con una varilla de vidrio; el líquido junto con las manchas testigos fueron entonces aplicados en una tira de papel con alto contenido de lignina (Gaceta UNAM), secado al aire y finalmente se adicionó una gota de ácido clorhídrico concentrado.

Con base en la información reportada sobre los daños ocasionados por la  $\alpha$ -amanotoxina en condiciones in vivo (Tyler et al., 1963 y Brady et al., 1975) y con el fin de caracterizar de forma más precisa su presencia y/o ausencia en los extractos evaluados químicamente, se realizó mediante el ensayo biológico una evaluación farmacológica y un estudio histopatológico. Se utilizaron ratones de la cepa Wistar de dos y medio meses de edad y 30 gr de peso, proporcionados por el bioterio del Centro de Investigaciones en Fisiología Celular (CIFIC) de la Universidad Nacional Autónoma de México, y nueve extractos crudos de A. verna respectivamente. Se formaron nueve lotes de cinco ratones cada uno para probar en cada lote, dos dosis máximas (DM), dos dosis mínimas (Dm) y un testigo. Los ratones que se inocularon con dosis máxima y dosis mínima fueron marcados con ácido pícrico al 0.5% en etanol al 70%. Los ratones testigo no se marcaron y fueron inoculados con una solución acuosa de agar (Difco 0140-01) al 0.25%, la cual se utilizó como vehículo. Una constante de 5 ml/Kg fue utilizada como volumen de las dosis, las cuales se calcularon tomando como base para dosis máxima 100 mg/Kg, y para dosis mínima 10 mg/Kg. Los ratones se inocularon intraperitonealmente en el cuadrante superior

izquierdo (Fig. 6). Las observaciones se realizaron a los 5, 10, 15, 30 y 60 minutos; 2, 12 y 24 horas; y 2, 4 y 7 días después de la inoculación, registrándolas en hojas de trabajo, como se ejemplifica en la Fig. 7 con uno de los ratones trabajados (Malone y Robichaud, 1962).

Después del séptimo día de observación se procedió con el estudio histopatológico, sacrificando a los animales por decerebración, extirpándose los siguientes órganos; hígado, riñones, estómago, intestino, bazo y pulmones, de los cuales se obtuvieron pequeñas porciones y se fijaron en formol al 10% durante 48 horas. Posteriormente el material se deshidrató en concentraciones crecientes de alcohol 50, 60, 70, 80, 90, absoluto y xilol. Después, cada una de estas porciones se incluyeron en parafina (Ham, 1964). Los cortes así incluidos se montaron en un microtomo y se hicieron cortes de 4 a 8  $\mu$ m. Una vez montados en portaobjetos rehidratados y teñidos con hematoxilina-eosina, deshidratados nuevamente, montados en bálsamo de Canadá, fueron analizados e interpretados histopatológicamente por el Dr. Pablo Fuentes en el Laboratorio de Patología de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales (ENEP) Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Fig. 6. EVALUACION FARMACOLOGICA



DM. Dosis máxima  
Dm. Dosis mínima  
T. Testigo

Fig. 7. HOJA DE TRABAJO DE LA EVALUACION FARMACOLOGICA CON EXTRACTOS CRU DOS DE Amanita verna.

Fecha: 12 feb. 1981  
Animal tratado: ratón  
edad: 2 meses  
peso: 26.3gr.  
cepa: Winster.  
marca: C.A.

Extracto: N°1 (MEXU 7487)  
Marcado con ácido pícrico\*  
Vía de inoculación: intra  
peritoneal(cuadrante su  
perior izquierdo).  
Vehículo: solución acuosa  
de agar al 0.25%.

Dosis: 100mg/Kg(DM)  
Alimento y agua sus  
pendidos: 9:40 A.M.  
Inoculación: 9:45A.M.  
Alimento y agua re  
establecidos: 11:30  
A.M.

| SINTOMAS   | C   | Respuesta después de la inoculación. |      |      |                |      |     |      |            |     |     |     |
|--|---|--------------------------------------|------|------|----------------|------|-----|------|------------|-----|-----|-----|
|  |   | +5'                                  | +10' | +15' | +30'           | +60' | +2h | +12h | +24h       | +2d | +4d | +7d |
| Temblores finos del cuerpo.....                                      | 0   | 0                                    | 0    | 0    | 0              | 0    | 0   | 0    | 0          | 0   | 0   | 0   |
| Temblores bruscos del cuerpo.....                                    | 0   | 0                                    | 0    | 0    | 0              | 0    | 0   | 0    | 0          | 0   | 0   | 0   |
| Baja de la actividad motora.....                                     | 0   | 0                                    | 0    | 0    | 0              | +    | ++  | +++  | +++        | +++ | +++ | ++  |
| Erección pilomotor   | 0   | 0                                    | 0    | 0    | 0              | 0    | 0   | 0    | 0          | +   | +   | +   |
| Tonicidad muscular   | 0   | 0                                    | 0    | 0    | 0              | 0    | 0   | 0    | 0          | 0   | 0   | 0   |
| Alteración de la circulación.....                                    | 0   | 0                                    | 0    | 0    | 0              | 0    | 0   | 0    | 0          | 0   | 0   | 0   |
| Evacuaciones bucales.....  | 0   | 0                                    | 0    | 0    | 0              | 0    | 0   | 0    | 0          | 0   | 0   | 0   |
| Ojos proyectados hacia afuera.....                                   | 0   | 0                                    | 0    | 0    | 0              | 0    | 0   | 0    | 0          | 0   | 0   | 0   |
| Ojos hundidos.....   | 0   | 0                                    | 0    | 0    | 0              | 0    | 0   | 0    | 0          | 0   | 0   | 0   |
| Lacrimación.....   | 0   | 0                                    | 0    | 0    | 0              | 0    | 0   | 0    | 0          | 0   | 0   | 0   |
| Sudoración.....  | 0   | 0                                    | 0    | 0    | 0              | 0    | 0   | 0    | 0          | 0   | 0   | 0   |
| Acumulaciones de sangre.....   | 0   | 0                                    | 0    | 0    | 0              | 0    | 0   | 0    | 0          | 0   | 0   | 0   |
| Diarrea.....   | 0   | 0                                    | 0    | 0    | 0              | 0    | 0   | 0    | 0          | 0   | 0   | 0   |
| Peso.....  | 26.3g   | -                                    | -    | -    | -              | -    | -   | -    | 27g        | 27g | 25g | 22g |
| Necropsia.....   | Hígado colapsado y poco isquémico, riñón completamente isquémico, estómago y bazo colapsados. |                                      |      |      |                |      |     |      |            |     |     |     |
| * Preparado con 0.5% de ácido pícrico en solución con etanol al 70%. |   |                                      |      |      |                |      |     |      |            |     |     |     |
| ' Minutos  |   |                                      |      |      |                |      |     |      |            |     |     |     |
| h Horas  | + muy poco  |                                      |      |      | +++ común      |      |     |      | 0 ausencia |     |     |     |
| d Días   | ++ poco   |                                      |      |      | ++++ abundante |      |     |      |            |     |     |     |

## III. UBICACION TAXONOMICA

Amanita verna (Bull. ex Fr.) Roques, fue descrita por Bulliard en 1782 como Agaricus bulbosus vernus y por Fries en 1821 como A. vernus (Smith, 1949); además de él ha sido estudiada por diversos autores, como lo señalan las descripciones existentes acerca de esta especie. Fries (1821), Secretan (1833) y Gillet (1874) - (in Kauffman, 1971), Gilbert (Bresadola, 1940), Smith (1949), Romagnesi (1956), Maubianc (1959), Parrott (1960), Braddy (1970), Kauffman (1971), Marchand (1973), Trimbach (1973) y Singer (1975). Para México la especie ha sido descrita por Pérez-Silva (1969) y Pascoe (1970), y citada como especie venenosa por Pérez-Silva et al. (1970), Manzi (1976) y Guzmán (1977).

Para la ubicación taxonómica de A. verna en el presente estudio se siguieron los criterios de Singer (1975) y de Ulioa y Hanlin (1978).

REINO: Fungi

DIVISION: Eumycota

SUBDIVISION: Basidiomycotina

CLASE: Holobasidiomycetes

SUBCLASE: Hymenomycetidae

ORDEN: Agaricales

FAMILIA: Amanitaceae

GENERO: Amanita

SUBGENERO: Lepidella

SECCION: Phalloidae

ESPECIE: A. verna

Descripción de la especie.

Amanita verna (Bull. ex Fr.) Roques

Agaricus bulbosus vernus Bulliard (1782)

Amanita bulbosa var. alba Persoon (1801)

Agaricus vernus Fries (1821)

Amanita virosa Secretan (1833)

Amanita verna Gillet (1874)

Figs. 8 y 9.

Pileo de 6 a 12 cm de diámetro, generalmente blanco pero en ocasiones con una coloración blanca cremosa hacia el centro; borde generalmente liso, ocasionalmente estriado; cuando el ejemplar está fresco la superficie del pileo es algo viscosa. Láminas ligeramente unidas al estípote, blancas, finamente aserradas y en ocasiones flocosas. Estípote completamente blanco, compacto, liso, de 5 a 15 cm de longitud y de 1 a 2.3 cm de diámetro, ornamentado en posición apical con el anillo, el cual es de color blanco, generalmente suelto pero a veces adherido al estípote, amplio, membranoso, de superficie externa lisa y superficie interna estriada; en la parte inferior con volva de color blanco, en forma de saco, con parte del borde adherido por un lado al estípote y suelto por el otro; en algunos ejemplares la volva es carnosa en la base y bastante grande, de 2.5 a 3 cm de ancho por 3 a 5 cm de longitud.

Basidios tetrasporados, claviformes, de 26.5-39.5 x 7.5-10.5  $\mu\text{m}$ , con glóbulos de grasa. Esterigmas hasta de 5.8  $\mu\text{m}$  de longitud (Fig. 9-B). Esporas de (8-)9-10.5(-12)(-13)(-14) x 6-7.5(-9)  $\mu\text{m}$ , hialinas, amiloides, cortamente elípticas y apiculadas (Fig. 9-C).

Reacción del KOH al 5%, sobre la superficie del pileo negativa en ejemplares frescos y, en ocasiones débilmente positiva (vira a un color amarillo tenue). Con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado sobre la superficie de las láminas los ejemplares secos reaccionaron negativamente (no vira a un color púrpureo); en ejemplares frescos la reacción no fue realizada.

Comúnmente a esta especie se le conoce con el nombre vulgar de "angel destructor", "amanita de primavera" u "hongo loco" en Estados Unidos de Norteamérica, Europa y México respectivamente. Martín del Campo (1968), interpretó que los az-



Fig. 8. Carpóforos de Amanita verna. MEXU 16798(D) y MEXU16799(A y B), procedentes de Hidalgo. MEXU 16800(C), procedente de Puebla.

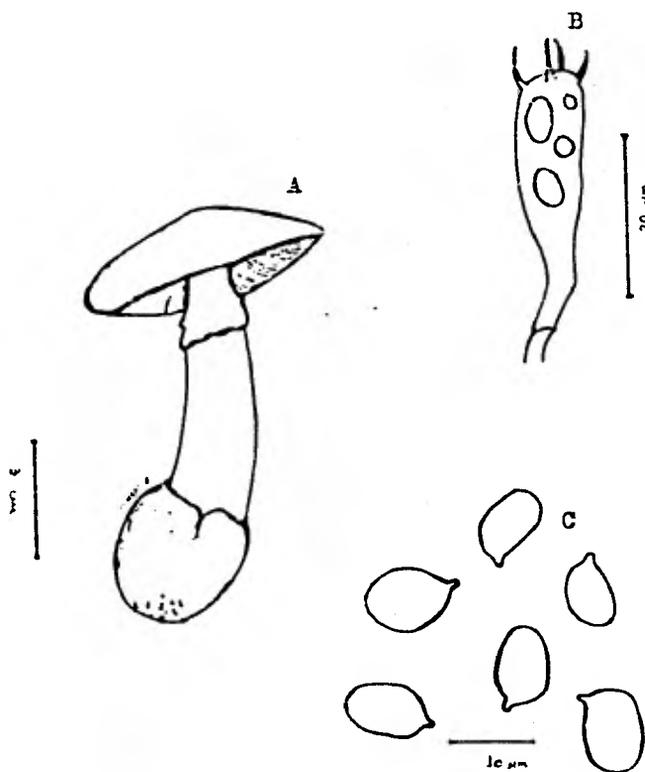


Fig. 9. A. Carpóforo maduro de *Amanita verna*. B. Basidio con esterigmas de *A. verna*. C. Esporas de *A. verna*.

tecas posiblemente conocieron A. verna por el nombre náhuatl mlcoanl nanácatl que significa hongo ponzoñoso.

Hábitat y distribución. A. verna es una especie que crece generalmente en bosque de Quercus spp. sobre suelo calcáreo, pero también se encuentra en bosques mixtos de Pinus spp. y Quercus spp. Se desarrolla a partir de finales de mayo hasta septiembre, creciendo en forma solitaria y en ocasiones gregariamente en grupos de 3 ó 4 ejemplares; la frecuencia con la que se encuentra en México es escasa y no común como se menciona en la literatura (Pascoe, 1970 y Manzi, 1976). Esta especie se conocía de las siguientes entidades federativas: DISTRITO FEDERAL, ESTADO DE MEXICO, GUANAJUATO, GUERRERO, HIDALGO, MICHOACAN, MORELOS, VERACRUZ y ZACATECAS. En el presente trabajo se exploraron además otras localidades, ampliándose su distribución a DURANGO y PUEBLA.

Material estudiado. DISTRITO FEDERAL: Cerca de Cuajimalpa, Km 20 carr. al Desierto de los Leones. Ortega, 30 nov. 1970 (MEXU 7487). DURANGO: Km 69 carr. Durango-Mazatlán. Pérez et al., 14 ago. 1981 (MEXU 16812); Km 57 carr. Durango-Mazatlán, Fracc. Navíos. Pérez et al., 15 ago. 1981 (MEXU 16813). ESTADO DE MEXICO: 2 Kms al sur de Cahuacán. Guzmán 3963, jun. 1968 (ENCB). GUANAJUATO: Ojo de agua, entre Guanajuato y Dolores Hgo. Pérez et al., 25 ago. 1968 (MEXU 5792). GUERRERO: Rincón Viejo, Campo Santo. Kruse, 7 jul. 1963 (MEXU 1550); 8 Kms al SE de Chichinalco. Pascoe 18, jul. 1966 (ENCB). HIDALGO: Agua Blanca, N de Tullancingo. Gimate 50, s/f (ENCB); Hacienda San Miguel Regla. Pérez et al., 14 ago. 1978 (MEXU 12282); Km 4 a Huasca, frente al balneario. Pérez et al., 31 may. 1980 (MEXU 16798); Km 3 a Huasca, Sierra Verde. Chinchilla, 16 ago. 1980 (MEXU 16799). MICHOACAN: Campo Experimental del INIF, Mpio de Uruapan. Ventura 2436, sep. 1970 (ENCB). MORELOS: 5 Kms al NW de Tepoztlán, Autopista México-Cuernavaca. Herrera, 16 ago. 1970 (MEXU 7505); Camino de Tres Marías a Cuernavaca, antes de Tepoztlán. Guzmán 2036, jul. 1959 (ENCB). PUEBLA: Km 3 carr. Jilotepec-Zacapoaxtla. Pérez et al., 15 sep. 1980 (MEXU 16800). VERACRUZ: Rafael Lucio, antes de San Miguel El Soldado, Uxpanapan. Ventura 4264, 14 sep. 1971 (EN-

CB); San Pedro Soteapa, carr. Minatitlán-Acayuca, desviación Chinameca, Uxpanapan. Ortiz 189, 15 ago. 1976 (ENCB); Encinal, Mpio de Totutla, Uxpanapan. Ventura 8400, s/f (ENCB). ZACATECAS: Cerro del Pinal, NE de Uncidero. Guzmán 2231, sep. 1959 (ENCB); Cerca de El Plateado. Guzmán 2219, sep. 1959 (ENCB).

Clave para identificar A. verna y otras especies afines, todas ellas con - carpóforos blancos.

A. Estípote liso, compacto; pfileo blanco, algo cremoso hacia el centro.

B. Reacción del KOH al 5% sobre la superficie del pfileo positiva (vira a un color amarillo oro); basidios generalmente bispóricos; esporas globosas, de  $7-10.5(-12)\mu\text{m}$ .....A. bisporigera

B. Reacción del KOH al 5% sobre la superficie del pfileo negativa generalmente; basidios tetraspóricos; esporas cortamente elípticas, de  $(8-)9-10.5(-12)(-13)(-14) \times 6-7.5(-9)\mu\text{m}$ .....A. verna

A. Estípote escamoso; pfileo blanco, algo cremoso al centro.

C. Reacción del KOH al 5% sobre la superficie del pfileo negativa, en ocasiones se mancha de un color amarillo pálido; esporas largamente elípticas, de  $9-10.5(-12) \times 4.5-6\mu\text{m}$  ..... A. magnivelaris

C. Reacción del KOH al 5% sobre la superficie del pfileo positiva (vira a un color amarillo oro instantáneamente); esporas globosas, de  $(6-)7.5-10.5\mu\text{m}$  ...  
..... A. virosa

## IV. RESULTADOS

El análisis taxonómico realizado tanto en el aspecto macroscópico como microscópico de los ejemplares estudiados en este trabajo, permitió determinar la identidad de éstos como Amanita verna (Tabla I).

Con el análisis cromatográfico preliminar (Fig. 10) se observó que el extracto de A. verna (MEXU 7487) presentó una banda con una coloración similar al del estándar que contenía  $\alpha$  y  $\beta$ -amanotoxinas (Tabla II), y que en los ocho extractos restantes de A. verna (MEXU 5792, 1550, 12282, 16798, 16799, 16800 y 7505) no se presentó. Utilizando los procedimientos de Sullivan (1965), se confirmó que la banda aislada obtenida de este extracto coincidió con el estándar de  $\alpha$ -amanotoxina, lo cual se muestra en la figura 11 y en la tabla III.

La prueba de Meixner llevada a cabo (Tabla IV) tanto con los extractos crudos de los ejemplares de A. verna como con algunas de las partes de los ejemplares secos, confirmó la presencia de  $\alpha$ -amanotoxina en el ejemplar MEXU 7487, al coincidir el color presentado en las manchas del extracto y de las partes de dicho ejemplar, con el color obtenido en la mancha del estándar de  $\alpha$ -amanotoxina.

Los ratones tratados in vivo (Tabla V) con los extractos crudos de los nueve ejemplares de A. verna presentaron a los pocos minutos de haber sido inoculados una notable baja de su actividad motora, la cual permaneció constante durante los siete días que duró el tratamiento; en algunos casos se mostró pérdida de peso y diarrea, y solamente en un caso se observó erección pilomotoras; mientras que los ratones testigo solo mostraron baja de la actividad motora. Todos los ratones sobrevivieron al tratamiento.

La necropsia (Tabla VI) realizada en todos los ratones reveló que los que fueron inoculados con dos de los nueve extractos de A. verna (MEXU 7487 y 5792), mostraron los riñones decolorados y el estómago colapsado (Fig. 12), el hígado

TABLA I  
 ASPECTOS TAXONOMICOS IMPORTANTES DE LOS EJEMPLARES DE Amanita verna ESTUDIADOS

| Ejemplar   | KOH al 5% sobre el pileo     | Dimensión de las esporas     | Hábitat y localidad                     |
|------------|------------------------------|------------------------------|---|
| MEXU 5792  | Negativo (seco)              | 9-12(-13)x6-7(-9) $\mu$ m    | Bosque <u>Quercus</u> Guanajuato        |
| MEXU 7487  | Negativo (seco)              | 9-12(-14)x6-7(-9) $\mu$ m    | B. <u>Pinus-Quercus</u> Cuajimalpa D.F. |
| MEXU 7505  | Negativo (seco)              | 10-13(-14)x6-7.5(-9) $\mu$ m | B. <u>Quercus</u> Morelos               |
| MEXU 16798 | Débilmente positivo (fresco) | 9-10.5(-12)x6-7.5 $\mu$ m    | B. <u>Quercus-Pinus</u> Hidalgo         |
| MEXU 12282 | Débilmente positivo (seco)   | 9-10.5(-12)x6-7.5 $\mu$ m    | B. <u>Quercus</u> Hidalgo               |
| MEXU 16800 | Negativo (seco y fresco)     | 8-9(-10)x6-7.5 $\mu$ m       | B. <u>Pinus-Quercus</u> Puebla          |
| MEXU 16799 | Débilmente positivo (fresco) | 9-10.5(-12)x6-7.5 $\mu$ m    | B. <u>Quercus-Pinus</u> Hidalgo         |
| MEXU 1550  | Negativo (seco)              | 9-10.5(-12)x6-7.5 $\mu$ m    | B. <u>Pinus</u> Guerrero                |

Macroscópicamente todos los ejemplares presentaron características similares, las cuales se han citado ya en el texto.

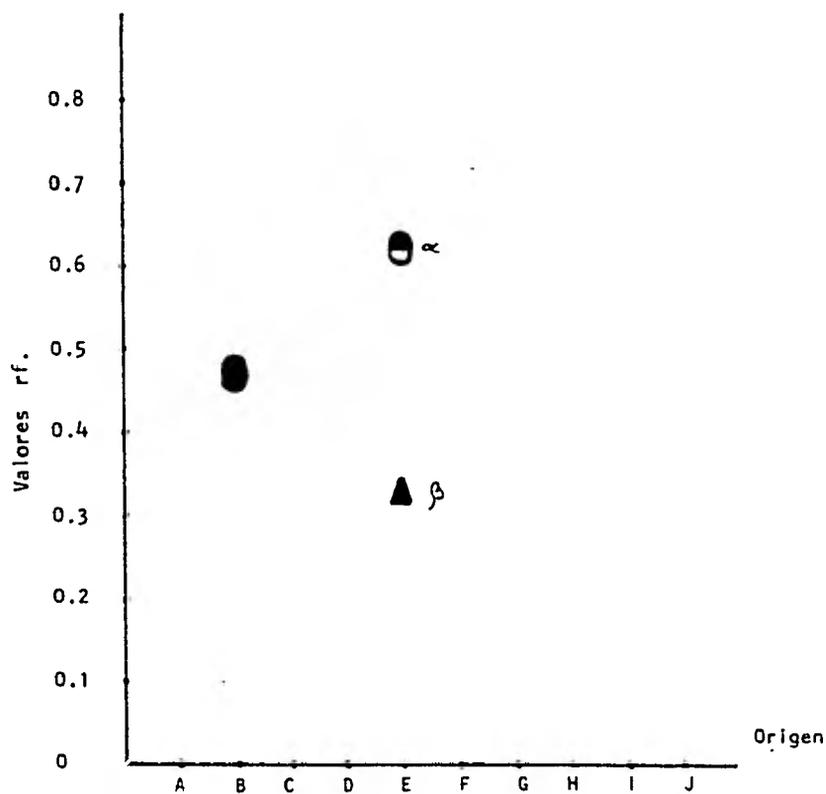


Fig. 10. Cromatograma de los extractos crudos de *Amanita verna*. (A) MEXU-5782; (B) MEXU 7487; (C) MEXU 7505; (D) MEXU 16798; (E) Estándar-con  $\alpha, \beta$ -amanotoxinas; (F) MEXU 12282; (G) MEXU 16800; (H) MEXU-16799; (I) MEXU 1550.

TABLA II  
VALDRES RF DE LAS BANDAS AISLADAS PDR CRDMATOGRFIA DE  
LDS EXTRACTOS DE Amanita verna.

|                             |                | B A N D A |         |
|-----------------------------|----------------|-----------|---------|
| C*                          |                | violeta   | violeta |
| MEXU<br>5792                | (rf) $\bar{X}$ | --        | --      |
| MEXU<br>7487                | " "            | 0.47      | --      |
| MEXU<br>7505                | " "            | --        | --      |
| Estándar**                  |                | 0.62      | 0.32    |
| MEXU<br>16798               | (rf) $\bar{X}$ | --        | --      |
| MEXU<br>12282               | " "            | --        | --      |
| MEXU<br>16800               | " "            | --        | --      |
| Estándar**                  |                | 0.62      | 0.32    |
| MEXU<br>16799               | (rf) $\bar{X}$ | --        | --      |
| MEXU<br>1550                | " "            | --        | --      |
| Estándar**                  |                | 0.62      | 0.32    |
| MEXU***<br>7487             | " "            | 0.60      | ---     |
| MEXU 7487****<br>+ estandar | (rf) $\bar{X}$ | 0.62      | 0.47    |
| MEXU 7487****<br>+ estandar | " "            | 0.59      | --      |

$\bar{X}$  Promedio obtenido de tres valores rf para cada extracto de A. verna

\* Color de la banda al ser revelada con cinamaldehído 1% en metanol.

\*\* Estándar con  $\alpha$ -amanotoxina(0.62) y  $\beta$ -amanotoxina(0.32).

\*\*\* Extracto de A. verna después de haber sido tratado como lo señala - Sullivan(1965).

\*\*\*\* Estándar con  $\alpha$ -amanotoxina únicamente.

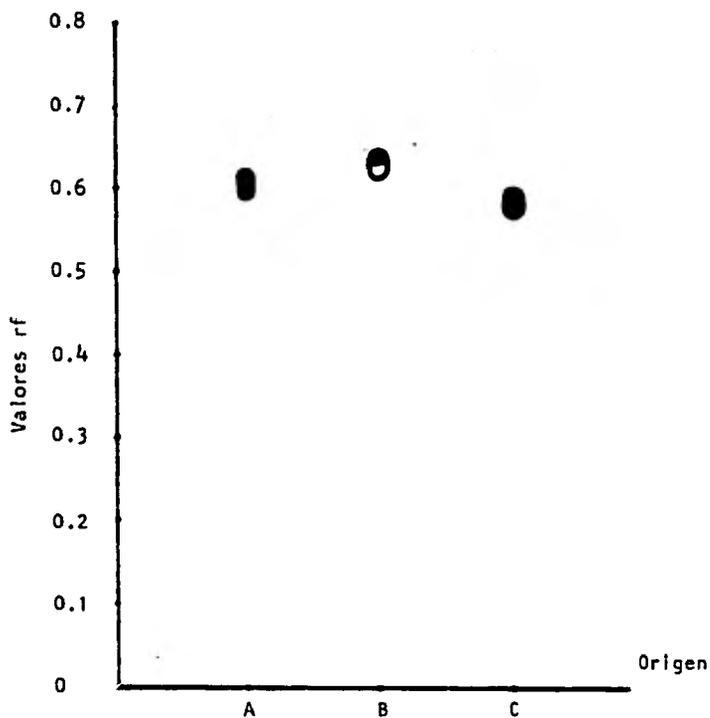


Fig. 11. Banda aislada del extracto de *Amanita verna* (MEXU 7487), después de ser cromatografiada, reextraída y recromatografiada, y del estándar de  $\alpha$ -amanotoxina, ajustados a una concentración de 0.08mg/5 $\mu$ l. (A) Banda aislada del extracto MEXU 7487; (B) es estándar  $\alpha$ -amanotoxina; (C) banda aislada del extracto MEXU 7487 con el estándar de  $\alpha$ -amanotoxina.

TABLA III

VALORES RF DE LAS BANDAS AISLADAS POR CROMATOGRAFIA  
Y REVELADAS CON EL REACTIVO DE PAULY DEL EXTRACTO -  
DE Amanita verna (MEXU 7487) Y DEL ESTANDAR

|  |      | B A N D A   |      |
|--|------|-------------|------|
| C <sup>**</sup>                        |      | rosa-salmón |      |
| MEXU<br>7487                           | (rf) | 0.60        | ---  |
| Estándar <sup>***</sup>                | "    | 0.62        | 0.32 |
| MEXU 7487<br>+ Estándar <sup>***</sup> | "    | 0.59        | 0.32 |
| MEXU 7487<br>+ Estándar <sup>***</sup> | "    | 0.59        | ---  |

- \* Color de la banda al ser revelada con el reactivo de Pauly.  
\*\* Estándar con  $\alpha$ -amanotoxina (0.62) y  $\beta$ -amanotoxina (0.32).  
\*\*\* Estándar con  $\alpha$ -amanotoxina (0.62) únicamente

TABLA IV

PRUEBA DE MEIXNER EN EJEMPLARES SECOS DE Amanita  
verna Y SUS EXTRACTOS

| Ejemplar  | COLOR DE LAS MANCHAS          |                               |                   |                 |
|---|-------------------------------|-------------------------------|-------------------|-----------------|
|   | azul-<br>verde                | amarillo-café<br>(fondo azul) | amarillo-<br>café | verde-<br>olivo |
| MEXU 5792   | Pfleo<br>Estfpite<br>Extracto | -<br>-<br>-                   | +<br>+<br>+       | -<br>-<br>-     |
| MEXU 7487   | Pfleo<br>Estfpite<br>Extracto | +<br>+<br>+                   | -<br>-<br>-       | -<br>-<br>-     |
| MEXU 7505   | Pfleo<br>Estfpite<br>Extracto | -<br>-<br>-                   | +<br>+<br>+       | -<br>-<br>-     |
| MEXU 16798  | Pfleo<br>Estfpite<br>Extracto | -<br>-<br>-                   | +<br>+<br>+       | -<br>-<br>-     |
| MEXU 12282  | Pfleo<br>Estfpite<br>Extracto | -<br>-<br>-                   | +<br>-<br>-       | -<br>-<br>-     |
| MEXU 16800  | Pfleo<br>Estfpite<br>Extracto | -<br>-<br>-                   | +<br>+<br>+       | -<br>-<br>-     |
| MEXU 16799  | Pfleo<br>Estfpite<br>Extracto | -<br>-<br>-                   | +<br>+<br>+       | -<br>-<br>-     |
| MEXU 1550   | Pfleo<br>Estfpite<br>Extracto | -<br>-<br>-                   | +<br>+<br>+       | -<br>-<br>-     |
| Estándar $\alpha$ -ama-<br>notoxina                   |                               | +                             | -                 | -               |
| MEXU 7487 + Es-<br>tándar $\alpha$ -amano-<br>toxina. |                               | +                             | -                 | -               |
| HCL concentrado                                       |                               | -                             | -                 | +               |

TABLA V

ALTERACIONES OBSERVADAS EN RATONES DURANTE LOS SIETE DIAS SIGUIENTES A LA INOCULACION CON EXTRACTOS CRUDOS DE Amanita verna.

| Ejemplar y extracto | Baja de la actividad motora. | Erección pilomotoras. | Diarrea. | Pérdida de peso |
|---------------------|------------------------------|-----------------------|----------|-----------------|
| MEXU 5792           | +                            | -                     | -        | -               |
| MEXU 7487           | +                            | +                     | +        | +               |
| MEXU 7505           | +                            | -                     | -        | -               |
| MEXU 16798          | +                            | -                     | -        | +               |
| MEXU 12282          | +                            | -                     | -        | -               |
| MEXU 16800          | +                            | -                     | +        | -               |
| MEXU 16799          | +                            | -                     | -        | -               |
| MEXU 1550           | +                            | -                     | -        | -               |

TABLA VI

ALTERACIONES OBSERVADAS EN LA NECROPSIA DE RATONES SOBREVIVIENTES  
A LA INOCULACION CON EXTRACTOS CRUDOS DE Amanita verna

| Ejemplar y extracto | Hígado isquémico | Riñón isquémico | Bazo colapsado | Estómago colapsado | Pulmón congestionado |
|---------------------|------------------|-----------------|----------------|--------------------|----------------------|
| MEXU 5792           | +                | +               | +              | +                  | +                    |
| MEXU 7487           | +                | +               | +              | +                  | +                    |
| MEXU 7505           | -                | -               | -              | -                  | +                    |
| MEXU 16798          | -                | -               | -              | -                  | +                    |
| MEXU 12282          | -                | -               | -              | -                  | -                    |
| MEXU 16800          | -                | -               | -              | -                  | +                    |
| MEXU 16799          | -                | -               | -              | -                  | +                    |
| MEXU 1550           | -                | -               | -              | -                  | +                    |



Fig. 12. Alteraciones causadas en órganos de ratones tratados con extractos crudos de Amanita verna. (A y B) Órganos del animal testigo, -estómago y riñón respectivamente; (C) estómago colapsado del animal tratado con el extracto crudo MEXU 7487; (D) riñón isquémico del animal tratado con el extracto crudo MEXU 7487.

también decolorado (isquémico) y un poco moteado, el bazo colapsado y los pulmones congestionados, daño que también fue causado en los ratones por el resto de los extractos (MEXU 7505, 16798, 16800, 16799 y 1550), con excepción del extracto de A. verna (MEXU 12282). La necropsia de los ratones testigo no mostró síntomas parecidos a los anteriores.

El estudio histopatológico realizado en varios órganos de cada ratón tratado, mostró que para todos los ratones que fueron inoculados con los extractos de los nueve ejemplares de A. verna, el estómago, el intestino y el bazo no presentaron alteraciones histológicas de importancia. El hígado (Tabla VII) fue dañado en todos los casos, presentando necrosis zonales de células hepáticas, hiperplasia de células de Kupffer y gotas finas de grasa en zonas periportales (Fig. 13); daños que no fueron ocasionados por el extracto del ejemplar de A. verna (MEXU 12282). El daño en los riñones (Tabla VIII) de los ratones tratados fue solamente causado por cuatro de los nueve extractos de A. verna (MEXU 7487, 5792, 16799 y 1550), observándose tumefacción turbia en el epitelio de los túbulos con torneados proximales, material proteico en los túbulos colectores distales y áreas de necrosis tubular aguda (Fig. 14). En los pulmones (Tabla IX) los daños fueron menos severos observándose para todos los casos congestión venosa, con excepción de los ratones inoculados con el extracto de A. verna (MEXU 12282). El hígado (Fig. 15), los riñones y los pulmones de los ratones testigos no mostraron ningún daño.

TABLA VII

DAÑOS OCASIONADOS POR EXTRACTOS CRUDOS DE Amanita verna EN HIGADO DE RATONES

| Ejemplar y extracto | Necrosis zonal en células hepáticas | Incremento de células retículo-endoteliales cerca de áreas porta-les en sinusoides. | Gotas finas de grasa en zonas periportales. | Hiperplasia de células de Kupffer. |
|---------------------|-------------------------------------|---|---|------------------------------------|
| MEXU 5792           | +                                   | +   | +   | +                                  |
| MEXU 7487           | +                                   | +   | +   | +                                  |
| MEXU 7505           | +                                   | +   | +   | +                                  |
| MEXU 16798          | +                                   | +   | +   | +                                  |
| MEXU 12282          | -                                   | +   | -   | -                                  |
| MEXU 16800          | +                                   | +   | +   | +                                  |
| MEXU 16799          | +                                   | +   | +   | +                                  |
| MEXU 1550           | +                                   | +   | +   | +                                  |

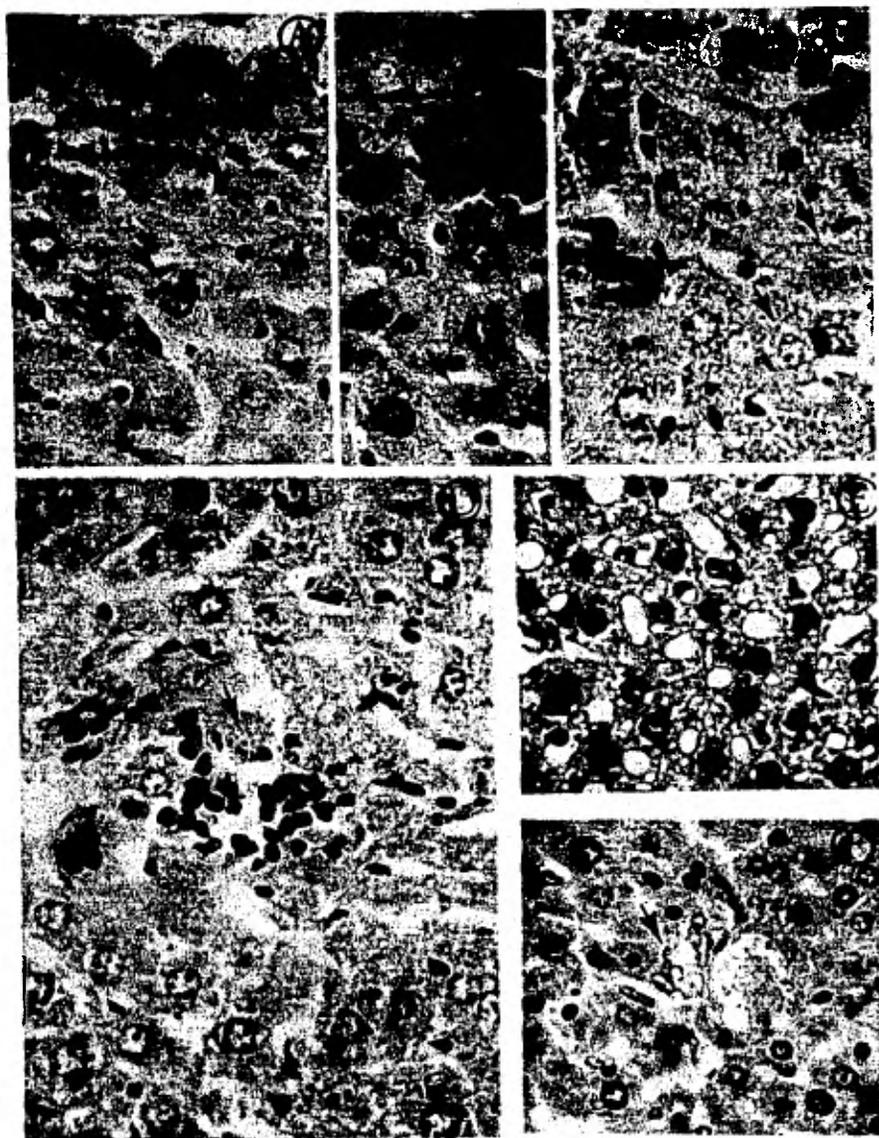


Fig. 13. Daños ocasionados por extractos de *Amanita verna* a nivel histológico en hígado de ratones. MEXU 7487 ocasionó (A y C) zonas de células hepáticas en necrosis; (D) incremento de células reticulo-endoteliales y de Kupffer. MEXU 16798 ocasionó (B) zonas de células hepáticas en necrosis; (E) gotas finas de grasa y (F) incremento de células reticulo-endoteliales y de Kupffer.

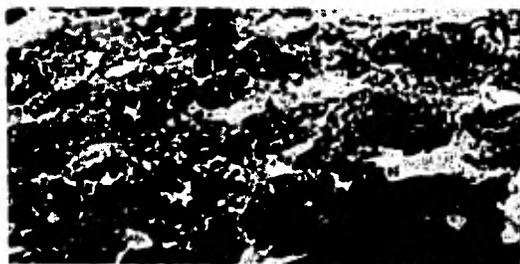
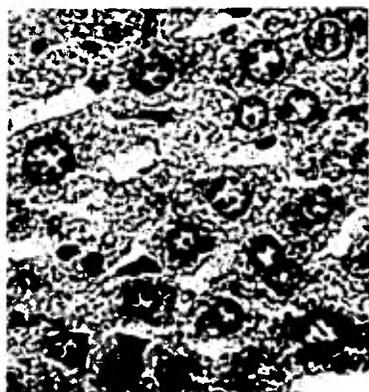
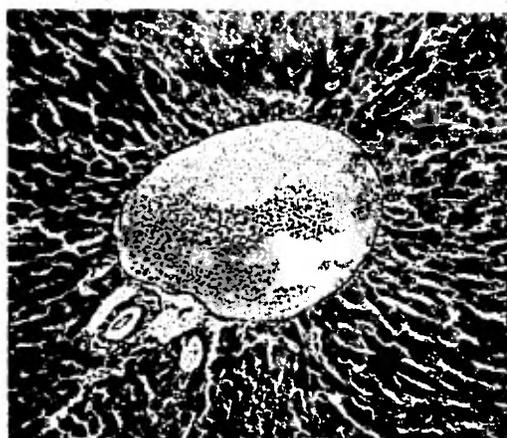


Fig. 15. Tejido hepático normal de ratones testigos. A. Zona portal. B y C. Areas con células hepáticas normales.

TABLA VIII

DAÑOS OCASIONADOS POR EXTRACTOS CRUDOS DE Amanita verna EN RIÑÓN DE RATONES

| Ejemplar y extracto | Tumefacción turbia del túbulo contorneado proximal | Material proteínico en túbulo contorneado distal | Áreas de necrosis tubular aguda |
|---------------------|--|--|---------------------------------|
| MEXU 5792           | +  | -  | -                               |
| MEXU 7487           | +  | +  | +                               |
| MEXU 7505           | -  | -  | -                               |
| MEXU 16798          | -  | -  | -                               |
| MEXU 12282          | -  | -  | -                               |
| MEXU 16800          | -  | -  | -                               |
| MEXU 16799          | +  | -  | +                               |
| MEXU 1550           | +  | -  | +                               |

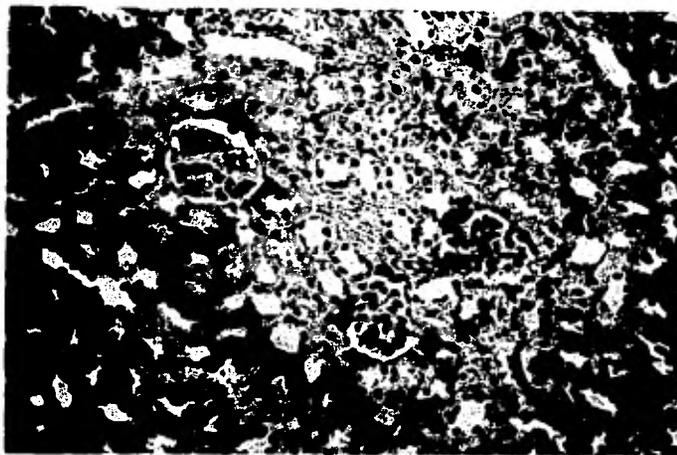


Fig . 14. Alteraciones causadas por el extracto de Amanita verna (MEXU-7487) a nivel histológico en riñón de ratones. A. Riñón tratado con el extracto crudo MEXU 7487; (a) tumefacción turbia del epitelio del túbulo contorneado proximal, (b) material proteínico en túbulos contorneados distales, (c) necrosis tubular. B. Tejido renal normal de uno de los ratones testigo.

TABLA IX

DAÑOS OCASIONADOS POR EXTRACTOS CRUOSOS DE Amanita verna EN PULMON  
DE RATONES

| Ejemplar y extracto | Congestión pulmonar | Hemorragia pleural | Enfisema pulmonar |
|---------------------|---------------------|--------------------|-------------------|
| MEXU 5792           | +                   | -                  | -                 |
| MEXU 7487           | +                   | -                  | -                 |
| MEXU 7505           | +                   | +                  | -                 |
| MEXU 16798          | +                   | -                  | -                 |
| MEXU 12282          | -                   | -                  | -                 |
| MEXU 16800          | +                   | -                  | -                 |
| MEXU 16799          | +                   | -                  | +                 |
| MEXU 1550           | +                   | -                  | +                 |

## V. DISCUSION

Amanita verna en México es una especie muy similar, por sus características macroscópicas a A. virosa, A. bisporigera y A. magnivelaris, todas ellas afines pero que, no obstante, pueden ser distinguidas fácilmente (ver clave para especies afines a A. verna). A. virosa reacciona positivamente al contacto de una gota de KOH al 5% sobre la superficie del piele, la cual vira a un color amarillo-oro instantáneamente (Pérez-Silva et al., 1976); A. bisporigera, A. magnivelaris y A. verna reaccionan por lo general negativamente al KOH al 5% sobre la superficie del piele (no hay cambio de color), sin embargo ocasionalmente la reacción con la potasa en estas especies es débilmente positiva, lo cual ya había sido observado por Marchand (1973) y Trimbach (1973) en A. verna. A. virosa presenta basidios tetraspóricos con esporas globosas, ocasionalmente piriformes de (6-)7.5-10.5  $\mu\text{m}$  (Pérez-Silva et al., 1976); A. bisporigera tiene basidios bisporicos con esporas globosas-esféricas de 7-10.5(-12)  $\mu\text{m}$  (Pascoe, 1970); A. magnivelaris posee basidios tetraspóricos con esporas largamente elípticas de 9-10.5(-12) x 4.5-6  $\mu\text{m}$  y A. verna presenta basidios tetraspóricos con esporas cortamente elípticas de (8-)9-10.5(-12)(-13)(-14) x 6-7.5(-9)  $\mu\text{m}$ . El problema de la variabilidad observada en las dimensiones de las esporas de A. verna no es algo nuevo; en la tabla X se muestran las dimensiones de las esporas de A. verna citadas por varios autores. Tanghe (1974) considera que la variabilidad en las dimensiones de las esporas está relacionada con la madurez del carpóforo.

Por otra parte, con el análisis cromatográfico realizado con los ejemplares de A. verna en este trabajo, se demostró la presencia de  $\alpha$ -amanotoxina en uno solo de los ejemplares de esta especie (MEXU 7487), estando aparentemente ausente en el resto de los ejemplares (MEXU 5792, 7505, 16798, 12262, 16800, 16799 y 1550), lo cual posiblemente tenga que ver con la variabilidad intrínseca en que se encuen

TABLA X

DIMENSIONES DE LAS ESPORAS DE Amanita verna  
(Pelissier et al. 1978) MODIFICADA PARA ESTE-  
TRABAJO EN LA INCLUSION DE LAS DIMENSIONES-  
CITADAS CON UN ASTERISCO.

| Autores   | Dimensiones ( $\mu$ m)              |
|---|-------------------------------------|
| Astier  | 7.5-9(-10)x7-8.5(-9)                |
| Bresadola   | 7-10                                |
| Cetto   | 9-12x8-9                            |
| Chinchilla*   | (8-)9-10.5(-12)(-13)(-14)x6-7.5(-9) |
| Kauffman  | 10-14x7-9                           |
| Kühner y<br>Romagnesi   | 8-11x7-9                            |
| Malençon y<br>Bertault  | 9-10x7-9                            |
| Marchand  | 8.75-10.5x8-9.4                     |
| Maublanc  | 8-10x7-9                            |
| Pérez-<br>Silva   | 9-12x6-7.5                          |
| Trimbach  | 12.5-14x6.75-7.5(-8.75)             |
| <u>A. verna</u><br>var. <u>decipiens</u><br>var. <u>tarda</u> | 7.8-9.5x5.6-7.5<br>7-9.5x6-7        |

tra la toxina en A. verna y que aparentemente en esta especie está más acentuada que en otras, como se ha observado en los estudios realizados por Blook et al. (1965), Tyler et al. (1966), Benedict et al. (1970), Preston et al. (1975) y Yocum et al. (1977). También es importante considerar en este punto la distribución de la toxina en los ejemplares, es decir que además de encontrarse en el pf ileo pudiera estar presente en otra estructura del hongo, e inclusive que en el mismo pf ileo, la distribución de la toxina no fuera uniforme. Este fue uno de los motivos que nos llevó a realizar la prueba de Meixner en diferentes partes de los ejemplares estudiados, además de confirmar el registro de  $\alpha$ -amanotoxina en el ejemplar MEXU 7487 y en el extracto obtenido de él; de esta manera con excepción de este ejemplar y de A. verna (MEXU 12282) que fue negativo en este ensayo, los resultados obtenidos con las partes del pf ileo y del estípite del resto de los ejemplares (MEXU 5792, 7505, 16798, 16800, 16799 y 1550) no fueron claros, debido a que los colores de las manchas de las diferentes partes no dieron la coloración característica de las amanotoxinas, ni el color característico de la mancha control de ácido clorhídrico concentrado. Sin embargo, el color de las manchas que presentaron se acercó más al color azul-verde del estándar de  $\alpha$ -amanotoxina, que al color verde olivo mostrado por la mancha control de ácido clorhídrico concentrado.

Es de pensarse también que otros factores intervengan en la presencia o ausencia de metabolitos secundarios en los hongos, como podrían ser la madurez de los carpóforos, su relación con el medio ambiente (tipo de vegetación, tipo y componentes del suelo, temperatura ambiental, humedad relativa, etc.), o que tal vez estén involucrados factores genéticos, por lo cual se tendrían que estudiar estas variables por separado.

Ante lo ya discutido, el ensayo biológico realizado nos reveló en su primera fase (tratamiento in vivo y necropsia) que algunos ejemplares de A. verna (ver resultados), además del ejemplar MEXU 7482 causaron alteraciones como las señala-

das por Tyler et al. (1963) y Brady et al. (1975), al inocular ratones con extractos crudos con amanotoxinas, por lo cual se podría inferir parcialmente que los ejemplares estudiados en este trabajo, que causaron dichas alteraciones, podrían tener amanotoxinas en muy pequeñas cantidades, ya que químicamente no fueron detectadas. Esto nos condujo a realizar el estudio histopatológico, el cual nos reveló daños en el hígado, en los riñones y en los pulmones (ver resultados); los daños en el hígado fueron similares a los ocasionados por un caso de envenenamiento con A. verna en Estados Unidos de Norteamérica al cual sobrevivieron dos personas (Paner, 1969). Este mismo autor registra algunas zonas con áreas necróticas en el tejido hepático, incremento de células reticuloendoteliales en sinusoides cerca de áreas portales, polimorfonucleares cerca de sinusoides, hiperplasia de células de Kupffer y gotas finas de grasa en zonas periportales. Estos daños son característicos de envenenamientos con amanotoxinas y son las mismas alteraciones que con mayor o menor frecuencia mostraron los hígados de los ratones tratados con los diferentes extractos de los ejemplares de A. verna. Para el riñón está registrado que el daño que causan las amanotoxinas es en el túbulo contorneado proximal (Simons, 1971; Hatfield, 1975; Lincoff, 1977; Lampe, 1979), daño que en el presente estudio fue causado por los ejemplares de A. verna (MEXU 7487, 5792, 16799 y 1550). El pulmón fue dañado por todos los extractos de A. verna, con excepción del ejemplar MEXU 12282, causando una congestión venosa, daño que coincidió con lo observado por Aroche (1981) y que podría ser consecuencia secundaria en los envenenamientos con amanotoxinas.

Lo ya expuesto nos sugiere que aunque químicamente la toxina no se haya registrado en los ejemplares de A. verna (MEXU 5792, 7505, 16798, 12282, 16800 y 1550), ésta posiblemente se encuentra presente en muy poca cantidad, con excepción del ejemplar MEXU 12282 que mostró por lo general resultados negativos en todas las pruebas. Además se sugiere que los ejemplares MEXU 5792 y 1550 presenten en muy poca cantidad  $\alpha$ -amanotoxina, ya que los resultados del ensayo biológico son

muy semejantes a los obtenidos con el ejemplar (MEXU 7487), positivo al registro químico de  $\alpha$ -amanotoxina.

## VI. CONCLUSIONES

1. Todos los ejemplares estudiados pertenecen taxonómicamente a la especie A. verna, la cual es de escasa frecuencia en los bosques mexicanos de encino o mixtos de encino-pino, ampliándose su distribución en los estados de Durango y Puebla en donde se registró por primera vez.

2. Se registró y confirmó mediante los ensayos químico y biológico la presencia de  $\alpha$ -amanotoxina en el ejemplar MEXU 7487.

3. Con excepción del ejemplar MEXU 12282, los demás ejemplares (MEXU 5792, 7487, 7505, 16798, 16799, 16800 y 1550) son tóxicos, debido a que se demostró por bioensayo la presencia en ellos de amanotoxinas. Considerándose en México este trabajo entre los pioneros en la investigación de macromicetos tóxicos.

4. Finalmente, en apoyo al análisis taxonómico que nos permitió identificar en algunos casos y rectificar en otros la identidad de A. verna, los ensayos químico y biológico mostraron la presencia de amanotoxinas en el material estudiado, la cual tomada como marcador taxonómico es un aspecto que se debe considerar junto con los caracteres macroscópicos y microscópicos para determinar la identidad de A. verna.

## VII. LITERATURA CITADA

- Aroche, A. R. 1981. (Comunicación personal).
- Benedict, R. G., L. R. Brady, D. E. Stuntz and J. Spurr. 1970. Occurrence of the deadly Amanita verna in the Pacific North West. Mycologia 62: 597-599.
- Beutler, A. J. and P. P. Verger. 1980. Amanotoxins in American mushrooms: Evaluación of the Meixner Test. Mycologia 72: 1142-1149.
- Block, S. S., R. L. Stephens and W. A. Murrill. 1955. The Amanita toxins in Mushrooms. J. Agr. Food Chem. 3 (7): 584-587.
- Brady, R. A. 1970. The Genus Amanita in North Carolina. Tesis North Carolina University State.
- Brady, L. R., R. G. Benedict, V. E. Tyler, D. E. Stuntz and M. H. Malone. 1975. Identification of Conocybe filaris as a toxic basidiomycete. Lloydia 38 (2): 172-173.
- Bresadola, J. 1940. Iconographia Mycologica. 27. 427 p.
- Bussi, C. and L. Fiume. 1977. Identificazione di piccoli pezzi di Amanita phalloides e Amanita verna mediante la misura del loro contenuto di amanitine. Minerva Medicoleg. 97 (2): 93-94.
- Fries, E. 1821. Systema Mycologicum I: 13. Lund.
- Guzmán, G. 1977. Identificación de los hongos comestibles, venenosos y alucinantes. Limusa. México, D. F. 235 p. 218 L. 582 f.
- Ham, A. W. 1969. Tratado de Histología. Ed. Interamericana. México, D. F. 1025 p.
- Hatfield, G. M. and L. R. Brady. 1975. Toxins of higher fungi. Lloydia 38 (1): 36-55.
- Issacs, B. F. and V. F. Tyler. 1963.  $\beta$ -amanitin in an Amanita from Oregon. Mycologia 55: 124-127.
- Johnson, B. E., J. F. Preston and J. W. Kimbrough. 1976. Quantitation of amanitins in Galerina autumnalis. Mycologia 68: 1248-1253.

- Kauffman, C. H. 1971. The Gilled Mushrooms (Agaricaceae) of Michigan and the Great Lakes Region. Dover Publications Inc. New York. 877 p.
- Lampe, K. F. 1979. Toxic fungi. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 19: 85-104.
- Lincoff, G. 1977. Toxic and Hallucinogenic Mushrooms Poisoning. Va. Nostrand Reinhold Company. New York. 267 p.
- Litten, W. 1975. The most poisonous mushrooms. Sci. Am. 232 (3): 91-101.
- Malone, M. H. and R. C. Robichaud. 1962. A hippocratic screen for pure or crude drug materials. Lloydia 25: 320-332.
- Manzi, J. 1976. Hongos Comestibles y Venenosos. Ed. Combonianas. Guadalajara, Méx. 119 p. 64 f.
- Marchand, A. 1973. Amanita verna (Bull. ex Fr.) Roques. Rev. de Mycologie 37 (1-2): 9-13.
- Martín del Campo, R. 1968. Contribución al conocimiento de la nomenclatura micológica náhuatl. Bol. Soc. Mex. Mic. 2: 25-36.
- Maubianc, A. 1959. Les Champignons de France. Ed. Paul Lechevalier. Paris. 283 p.
- Panner, B. J. and R. J. Hanss. 1969. Hepatic injury in mushrooms poisoning. Arch. Path. 87: 35-45.
- Parrot, A. G. 1960. Amanites du Sudouest de la France. Centre d'estudes et de Recherches Scientifiques. Biarritz, France. 168 p.
- Pascoe, A. M. 1970. Contribución al Conocimiento de las Especies de Amanita en México. (Fungi-Basidiomycetes). Tesis ENCB, IPN. Méx. D. F.
- Pelissier, F., J. Astier, A. Gerault, H. Ferrari, J. L. Deveze, J.M. David, J. Roux, J. Arditti et J. Jouglard. 1978. Intoxication par Amanita verna Bulliard. Reflexions sur la forme des spores. Collection de Médecine Legale et de Toxicologie Medicale 106: 107-113.
- Pérez-Silva, E. 1969. Hongos de Guanajuato. An. Inst. Biol. Univ. Nat. Autón. Méx. 40, Serie Botánica (1): 93-104.
- Pérez-Silva, E. y G. Guzmán. 1976. Primer registro en México del hongo venenoso

- Amanita virosa. Bol. Soc. Mex. Mic. 10: 23-26.
- Pérez-Silva, E., T. Herrera y G. Guzmán. 1970. Introducción al estudio de los macromicetos tóxicos de México. Bol. Soc. Mex. Mic. 4: 49-53.
- Preston, J. F., H. J. Stark and J. W. Kimbrough. 1975. Quantitation of amanitines in Amanita verna with calf thymus RNA polymerase B. Lloydia 38 (2): 153-161.
- Romagnesi, H. 1956. Nouvel Atlas des Champignons. Tomo 1. Bordos. Paris, Francia. 95 p. 79 L.
- Simons, O. 1971. The mushrooms toxins. Delaware Medical Journal 43 (7): 177-187.
- Singer, R. 1975. The Agaricales in Modern Taxonomy. J. Cramer. Chicago, Ill. 412 p. 84 L.
- Smith, A. H. 1949. Mushrooms in their Natural Habitats. Sawyer's Inc. Portland, Ore. 626 p.
- Sullivan, G., L. R. Brady and V. E. Tyler. 1965. Identification of amanitin by thin-layer chromatography. Journal of Pharmacological Science 51 (6): 921-922.
- Tanghe, L. J. and E. Hillhouse. 1974. Dependence of spore shape on maturity of carpophore in the Phalloide section of Amanita. Mcilvainea 1 (2): 1-8.
- Trimbach, J. 1973. Note sur Amanita verna (Bull. ex Fr.) ss. str. et sus varietes. Annales du Muséum d'Histoire Naturelle National de Nice 1: 83-86.
- Tyler, V. F., L. R. Brady, R. G. Benedict, J. M. Khanna and M. H. Malone. 1963. Chromatographic and pharmacologie evaluation of some toxic Galerina species. Lloydia 23 (3): 154-157.
- Tyler, V. F., R. G. Benedict, L. R. Brady and J. E. Robbers. 1966. Occurrence of Amanita toxins in american collections of deadly Amanitas. J. Pharm. Sci. 55 (6): 590-593.
- Ulloa, M. y R. Hanlin. 1978. Atlas de Micología Básica. Ed. Concepto. México, D.F. 158 p. 18 L. y 233 fig.
- Wieland, T. and G. Schmindt. 1952. Über die Giftstoffe des Knollenblätterpilzes VIII. Ann. Chem. 577: 215+233.

- Wieland, T. 1968. Poisonous principles of mushrooms of the genus Amanita. Science 159 (3818): 946-952.
- Wieland, T. and O. Wieland. 1972. The toxic peptides of Amanita species. Microbial Toxins 8: 244-279.
- Wieland, T. 1973. Über die giftstoffe du gattum Amanita. Zeitschr 39: 103-112.
- Wieland, T. and H. Faulstich. 1978. Amanotoxins, phallotoxins, phallolysin and antamanide. The biologically components of poisonous Amanita mushrooms. Crit. Rev. Biochem. 5 (3): 185-260.
- Yocum, R. R. and D. Simons. 1977. Amanotoxins and phallotoxins in Amanita species of the north easter United States. Lloydia 40 (2): 179-190.