

22  
2ej.



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS  
(BIOLOGIA)

**AISLAMIENTO, CARACTERIZACION Y  
CONFIRMACION DE MICELIOS EN CUATRO  
ESPECIES DE AMANITA (AGARICALES) DE MEXICO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**B I O L O G O**

**P R E S E N T A:**

**HECTOR AVILA ZELAYA**



## **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 está 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.

## INDICE

	Página
INTRODUCCION -----	1
CONSIDERACIONES GENERALES	
El género <u>Amanita</u>	
a). Ubicación y caracteres taxonómicos -----	8
b). El concepto de especie en <u>Amanita</u> -----	16
La caracterización de micelios -----	21
Confirmación del origen del micelio	
a). La fíbula -----	23
b). El septo doliporo -----	25
Los micelios en cultivo, la micorriza y los metabolitos secundarios -----	31
ANTECEDENTES	
La caracterización de micelios en basidiomicetes -	38
La caracterización de micelios en Agaricales -----	41
La caracterización de micelios en <u>Amanita</u> -----	44
OBJETIVOS -----	48
MATERIALES Y METODO	
a). Condiciones de esterilidad -----	50
b). Medios de cultivo -----	54
c). Aislamiento -----	56
d). Purificación -----	58
e). Propagación -----	59
f). Preservación -----	60
g). Recolección y manejo de ejemplares -----	61
h). Caracterización de micelios -----	62
i). Confirmación de las cepas -----	64

RESULTADOS

<u>Amanita</u> <u>abrupta</u> Peck -----	67
<u>Amanita</u> <u>gemmata</u> f. <u>gracilis</u> Konrad y Maublanc(1925)	79
<u>Amanita</u> <u>muscaria</u> (L.;Fr.)Pers. ex Hooker -----	86
<u>Amanita</u> <u>rubescens</u> (Pers. Fr.) S.F. Gray -----	102

DISCUSION

Caracteres macroscópicos

A) Tasa de crecimiento -----	116
B) Textura -----	121
C) Color -----	122
D) Oxidasa extracelular -----	122

Caracteres microscópicos

A) Fíbulas -----	124
B) Seudofíbulas -----	124
C) Células filamentosas -----	128
D) Células vesiculares -----	129
E) Células infladas -----	133
La clave de Nobles (1965) -----	135

Hacia un método estandarizado para la

descripción de micelios de Amanita ----- 136

<u>Amanita</u> <u>muscaria</u> -----	145
<u>Amanita</u> <u>rubescens</u> -----	150
<u>Amanita</u> <u>abrupta</u> -----	152
<u>Amanita</u> <u>gemmata</u> f. <u>gracilis</u> -----	152

CONCLUSIONES -----	153
--------------------	-----

APENDICE I

El sistema de Nobles (1965) para la caracteri-  
zación de micelios en hongos degradadores de  
madera ----- 155

APENDICE II

Caracterizaciones miceliales de de A. muscaria y  
A. rubescens realizados por otros autores ----- 165

BIBLIOGRAFIA CITADA ----- 170

## I N T R O D U C C I O N

Dentro del conocimiento que actualmente se tiene sobre las amanitas y hongos superiores en general existen muchos vacíos que en disciplinas como la genética, la bioquímica, la biología del desarrollo, etc., se encuentran más o menos cubiertos en otros grupos de organismos. Un ejemplo que ilustra la situación del conocimiento biológico de los hongos, es el de la Taxonomía: se estima que en el mundo existen de 250 a 300,000 especies de hongos, de las que únicamente 100,000 han sido descritas (Müller y Loeffler, 1976). En México existen alrededor de 40,000 especies, de las que se han reportado 5,000 aproximadamente (Guzmán, 1987). Lo que ha motivado comentarios como el de Ainsworth (1975):

"La principal dirección del trabajo micológico ha sido en el más amplio sentido, la taxonómica. Y la Taxonomía, si menos popular de lo que fuera antaño, continúa siendo el aspecto micológico de actividad más intensa; su literatura comprende la cuarta parte del total actualmente. Lo más seguro es que esta tendencia continúa, debido a que el censo primario o inventario de los hongos está muy lejos de estar completo".

Sin embargo, aunque lo anterior es cierto, también lo es el hecho de que las especies de agaricales que se han descrito, excepto de motivar discusiones a nivel taxonómico y de aumentar el número de ejemplares herborizados contenidos en los herbarios, pocas veces son incluidos en otro tipo de estudios referentes a la biología y ecología de los mismos. Las generalizaciones sobre ciclos de vida, genética, nutrición, están basadas en observaciones realizadas en pocos géneros, por lo general saprobios.

Asimismo, pocas veces en la Taxonomía misma, se hace uso

de otros criterios, aparte del morfológico, para definir a las especies. Aun cuando esta rama es la que presenta mayor desarrollo dentro de la Micología, en comparación con la de otros grupos de organismos, resulta anacrónica, dando la impresión de haberse "congelado" en la era de los naturalistas del siglo pasado. Boidín (1986) expone algunas de las razones por las que la sistemática de hongos ha progresado de una manera relativamente lenta:

1. El talo somático de muchos hongos se desarrolla en el suelo, madera en descomposición, estiércol u otras fuentes nutritivas y únicamente puede ser observado de manera adecuada en cultivo puro.
2. Los cuerpos fructíferos de muchas especies de hongos son efímeros y aparecen a intervalos irregulares, por lo que las estructuras reproductivas de algunas especies han sido colectadas sólo una o dos veces, aun cuando esto sucede, por lo común, en localidades geográficamente separadas.
3. El núcleo de los hongos es comparativamente pequeño y difícil de estudiar, por lo que los números cromosómicos sólo han sido reportados para algunas especies.
4. Las diferencias morfológicas entre varios taxa fúngicos son pequeñas y difíciles de discernir.
5. El número de taxónomos es considerablemente menor que el de, por ejemplo, plantas vasculares.

En Amanita los puntos 1 y 4 resultan especialmente críticos dado su carácter micorrízico y la existencia de complejos de especies como el caesarea y el vaginata, en donde la extrema intergradación morfológica impide una delimitación adecuada de los distintos taxa.

Termodinámicamente se ha considerado a los seres vivos como sistemas abiertos dinámicos en continuo recambio, cuya estabilidad depende paradójicamente de mantener procesos energé

ticos inestables en funcionamiento (Hladik, 1982), siendo los organismos... "concentraciones pasajeras de disposiciones extremadamente complicadas de moléculas, las cuales, mientras están vivas, no tienen constituyentes fijos y permanentes". (Gordon, 1979). Dentro de este contexto, en el intento de una comprensión integral de Amanita como organismo cambiante, en movimiento perpetuo, se hace necesario, debido a las dificultades que generalmente se presentan al realizar su estudio en el campo y a los pocos datos que en este sentido aporta el espécimen herborizado, sacar al hongo de la tierra y llevarlo al laboratorio, donde el mantenerlo vivo en condiciones ambientales manipulables y precisas, nos permite la reproducibilidad experimental y el desarrollo de una Micología Teórica a todos los niveles, principalmente en el campo de la Sistemática, la Ecología, la Fisiología y la Genética, constituyendo esto la principal importancia del aislamiento de micelios como herramienta en la investigación.

Dentro de Agaricales, desde los primeros trabajos con micelios de basidiomicetes a principio de siglo, a la fecha, ha habido una gran proliferación de publicaciones referentes a diversos aspectos. Principalmente sobre genética, fisiología, hongos comestibles y la biología de la micorriza.

Los estudios fisiológicos generalmente incluyen una colección de basidiomicetes pertenecientes a los distintos grupos a los que se someten a distintas variables, como proteínas (Kalisz y Moore, 1986), vitaminas y trazas de elementos (Robbins, 1950), distintas fuentes de nitrógeno (Hacskeylo y Bar

nett, 1954) o aportan datos cuantitativos sobre su metabolismo (Gray y Bushnel, 1955).

Los que se refieren exclusivamente a agaricáceos enfocando se a géneros o especies particulares, especialmente aquéllas que fructifican en medios artificiales como Collybia velutipes (Airth y Foerster, 1965) Coprinus (Watling y Miller, 1973), Panus fragilis (Miller, 1967); siendo algunos de mayor interés por ser micorrícicos como Laccaria laccata (Davis y Jong, 1976), Boletus rubinellus (McLaughlin, 1970) y Boletus amarellus (Pantidou y Watling, 1973).

Los trabajos sobre genética constituyen en su mayoría, estudios sobre sistemas de interfertilidad evidenciados mediante cruza de micelios de géneros de fácil cultivo como Pleurotus (Bresinsky et al, 1977) y Collybia (Vilgalys y Miller, 1982).

Amanita aparece esporádicamente en algunos estudios fisiológicos generales que abarcan varios géneros o en aquéllos referentes a diversos aspectos sobre ectomicorrizas.

Amanita es importante para el hombre debido a tres aspectos:

- Es un género micorrícico, influyendo en el mantenimiento del equilibrio y productividad de los bosques en que habita.
- Algunas especies son tóxicas, en muchos casos provocando la muerte de quienes las ingieren.
- Una de las especies comestibles de hongos más preciadas corresponde al género: A. caesarea. No obstante existe la imposibilidad de hacerla fructificar en medios artificiales.

Para la investigación referida a estos tres aspectos los micelios en cultivo puro se hacen imprescindibles, ya sea para la producción de metabolitos secundarios como para síntesis "in vitro" del proceso de micorrización y el posible desarrollo de un método para la producción artificial de carpóforos.

Dichas perspectivas en la producción de recursos que el estudio de los micelios promete, actualmente es un foco de interés, dadas las repercusiones económicas que conllevan dentro de la Biotecnología y la Silvicultura, así como la importancia ecológica de esta última.

Por otra parte, el significado taxonómico de la caracterización morfológica del micelio como complemento a la del carpóforo y de la posibilidad de llegar a verificar el aislamiento reproductivo mediante cruces, como apoyo en la definición de especies resulta relevante, ya que en muchos casos la morfoanatomía del cuerpo fructífero en Amanita ha sido insuficiente para lograr ésto de una manera natural.

En Agaricales, la utilización de micelios en estudios morfológicos de apoyo a la taxonomía, sólo ha sido extensamente aplicada a algunos grupos degradadores de madera (Nobles, 1965; Stalpers, 1978).

En Amanita únicamente encontramos un trabajo importante (Campbell y Petersen, 1975), el cual no ha sido continuado.

Al aislar el micelio de un hongo, los datos inmediatos que puede aportar son aquéllos que se refieren a su propia estructura morfológica. Al obtener los micelios en cultivo de cualquier hongo, lo primero que podemos hacer es observarlo y des-

cribirlo. Sin embargo, resulta extraño que las caracterizaciones miceliales sean menos frecuentes en la literatura que lo referente a otros aspectos investigados en cultivos. Seguramente, quienes publican resultados fisiológicos o fermentativos han caracterizado sus micelios, pero no han dado a conocer sus caracterizaciones, lo cual frena en cierta medida el avance en el conocimiento que la morfología del micelio puede aportar. Lo primero que se ocurre al observar ésto es que la caracterización no se considera importante, no obstante que el micelio constituye el cuerpo principal del hongo, el que entabla la asociación micorrícica y que en su crecimiento subterráneo, como un "iceberg", únicamente presenta a la vista una parte mínima, aunque no menos importante, el carpóforo.

El aislamiento confirmado y la caracterización micelial apoyan la obtención de un concepto integral de la especie, además de brindar información experimental sobre el componente mayoritario del hongo.

La palabra confirmado significa que se han aportado pruebas sobre el origen o procedencia del micelio. Esta confirmación resulta básica dentro de un método de prueba en condiciones experimentales, ya que sin ella la validez de los resultados es ambigua e incierta. Al respecto, en Amanita, únicamente Johnson y Preston (1979) demuestran el origen basidiomicete mediante la observación del septo doliporo, método empleado en el presente trabajo.

Así, se aprecia que los estudios realizados sobre dicho género además de escasos, en la mayoría de las veces no se apo-

yan los datos mediante la confirmación del aislamiento.

La posibilidad de aprovechamiento de los micelios en cultivo como herramientas de investigación y fuente de recursos; la escasez de investigaciones que se han hecho al respecto; y el papel del cepario como medio para proteger las especies de la extinción que la deforestación representa, constituyen las motivaciones más importantes que impulsaron la realización del presente trabajo, cuya aportación consiste del aislamiento, confirmación y caracterización del micelio de cuatro especies de Amanita, una cepa de cada especie.

## CONSIDERACIONES GENERALES

## EL GENERO AMANITA

a). Ubicación y caracteres taxonómicos. Con Whittaker, en 1969, se establece el sistema de cinco reinos para la clasificación de los seres vivos que pueblan el planeta.

Los hongos que en un sistema anterior de clasificación eran incluidos dentro del Reino Protocista, junto con los protozoarios y las algas rojas, constituyen a partir de aquí, un reino aparte, coordinado con el de las plantas y animales superiores. En este sistema, la línea entre estos tres reinos y los Protista se encuentra colocada en la transición que va de la condición unicelular a la multicelular y multinucleada, al mismo tiempo que los delimita según su modo de nutrición, es decir, la fotosíntesis en las plantas, la ingestión en los animales y la lisotrofia en los hongos.

Dentro del Reino Fungi, Amanita se encuentra ubicado en la División Eumycota, dentro de la subdivisión Basidiomycotina, la cual junto con la subdivisión Ascomycotina conforman a los hongos superiores.

División Eumycota

Subdivisión Basidiomycotina

Clase Holobasidiomycetes

Subclase Hymenomycetidae

Orden Agaricales

Familia Amanitaceae

Género Amanita

(Ulloa y Hanlin, 1978)

Las características de los Basidiomycotina y que los define como grupo son: el basidio, el septo doliporo y la larga duración de la fase dicariótica.

El establecimiento de los distintos grupos de basidiomicetes se ha basado, principalmente, en el mecanismo de dispersión de esporas, relacionado con la estructura del basidiocarpo, y en el modo de nutrición: simbiosis biotrófica, parásitos necrótrofos, saprobios primarios y saprobios secundarios (Shaffer, 1975).

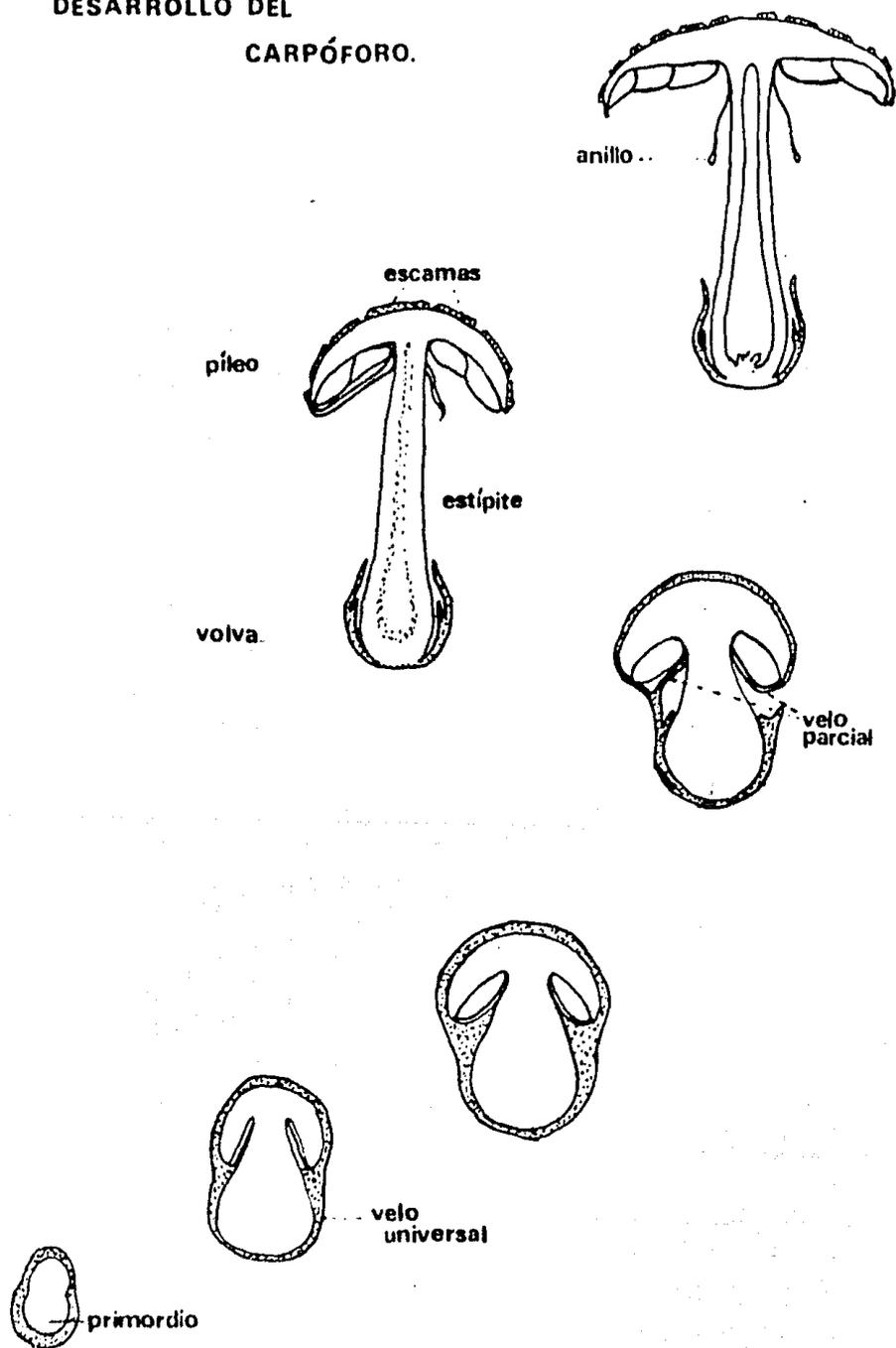
El basidio en los Holobasidiomycetes es unicelular y de forma clavada, pudiendo ser producido en un himenio expuesto (Hymenomycetidae) o cerrado (Gasteromycetidae) dentro del cuerpo fructífero.

Los Agaricales son himenomicetes carnosos, cuyo basidiocarpo es generalmente capitado, con un estípite, y los basidios se forman sobre láminas, en tubos y poros, o raramente sobre una superficie lisa. El himenio puede ser expuesto desde el principio de la maduración, o éste, en un inicio endógeno, puede descubrirse inmediatamente antes del inicio de la esporulación, una vez que el basidiocarpo ha llegado a estar maduro (desarrollo hemiangiocárpico), como sucede en Amanita.

En Amanita el carpóforo comienza como un nudo pequeño de células hifales que luego van a desarrollar un cuerpo pequeño, globoso u ovoide: el primordio. (fig. 1)

Según Bas (1969), el primer tejido en diferenciarse a partir del tejido primordial es el velo universal que envolverá al futuro basidiocarpo. Muy tempranamente también, la parte

FIG. 1  
DESARROLLO DEL  
CARPÓFORO.



de tejido que delimita al píleo del estípite y que constituirá el velo parcial, inicia su desarrollo.

En el carpóforo propiamente dicho, el píleo es el primero en diferenciarse siguiéndole el estípite y finalmente, las láminas; siendo la ontogenia de estas últimas característica del género. En la mayoría de los Agaricales se desarrolla una capa pre-himénial de células en empalizada en el envés del píleo primordial, a partir de esta se originan las láminas en forma de surcos o dobleces que se proyectan hacia abajo dentro de una cavidad pre-existente entre el píleo y el estípite, por lo que el borde de las láminas siempre permanece libre. En Amanita no existe tal cavidad. Las láminas se diferencian a partir del tejido primordial en forma de "placas" estrechamente empacadas, formadas de hifas paralelas. Por un lado, la trama de las láminas primordiales se encuentra conectada con la trama del píleo y por el otro, con el tejido que rodea al estípite, el cual posteriormente dará origen al velo parcial. De este modo, los bordes de las láminas no se encuentran libres sino hasta que el píleo desgarrar el velo parcial al expanderse en su crecimiento, quedando el velo adherido al estípite en forma de un anillo colgante, algunas veces dejando restos en el borde del píleo.

Cuando el basidiocarpo crece, el velo universal se rompe de tal manera que deja una estructura en forma de copa, la volva, alrededor de la base del estípite, y una serie de escamas o parches sobre el píleo.

El desarrollo característico de las láminas (desarrollo esquizohiménial) y su color blanco, la presencia de la volva, el anillo súpero y los restos del velo sobre el píleo constituyen caracteres diagnósticos de Amanita, los cuales junto con otros más nos dan la siguiente descripción general.

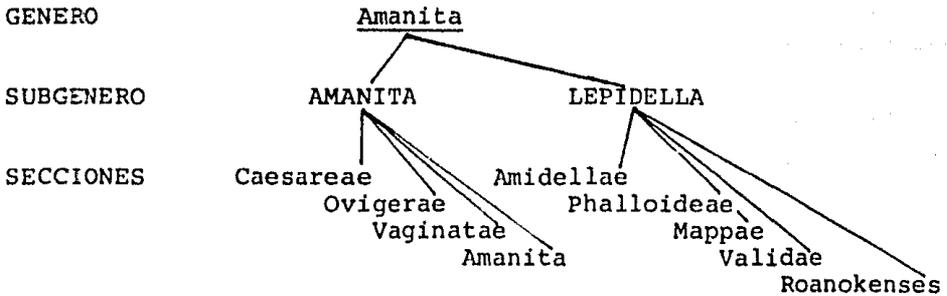
AMANITA Pers. ex Hooker

Margen del píleo estriado (y en este caso con esporas no-amiloides) o liso (y entonces las esporas amiloides); fragmentos de por lo menos una volva rudimentaria (pero en muchas especies, volva membranosa a carnosa bien desarrollada) ya sea en la superficie del píleo y/o en la base del estípite; anillo súpero presente, raramente ausente; láminas alternándose con lamélulas, las cuales pueden ser truncas o atenuadas; láminas libres o casi libres; esporada blanco puro, color crema; esporas típicamente de más de 7.5  $\mu\text{m}$  de largo, lisas, acianofílicas, de medianas a grandes, con pared delgada, binucleadas, de globosas a cilíndricas; basidios voluminosos con granulosidad carminofílica, tetraspóricos, raramente bispóricos de manera constante; cistidios ausentes, pero algunas veces con pseudocistidios; trama himenoforal bilateral con elementos bastante anchos; estípite central con o sin bulbo en su base; contexto carnoso, desarrollando o no coloración al dañarlo, constituido de tejido de organización característica, no amiloide; hifas pocas veces fibuladas. Crecimiento en el suelo, raramente en otros sustratos, generalmente en bosques. A excepción de algunas especies de la sección Lepidella todas son ectomi-

corrílicas. (Singer, 1986)

"Amanita" aparentemente hace referencia al Monte Amanon, en Sicilia, Italia (Jenkins, 1977) siendo uno de los nombres más antiguos dentro de la Micología que aún permanece en uso. Una historia detallada sobre el género la podemos encontrar en Bas (1969), siendo pertinente mencionar únicamente que desde 1797, en que Persoon separando de Agaricus aquellas especies que poseían una volva las incluye en un nuevo género (aplicándole a éste el término Amanita acuñado por Dillenius en 1719), a la fecha, el Género ha mostrado una cierta estabilidad en cuanto a la concepción del mismo, debido a que caracteres como la volva no se encuentran en otros agaricales, aunque en un inicio géneros como Volvariella y Lepiota estuvieron involucrados en algunas confusiones debido a la semejanza que éstos guardan (restos del velo sobre el píleo, en el segundo, y la copa en la base del estípite en el primero) con respecto a las amanitas. Así también amanitas que pierden su volva tempranamente en su desarrollo y no era observada al momento de colectarlas, eran incluidas en otros grupos.

Jenkins (1977) establece que fuera de estas confusiones la validez de Amanita como género ha sido poco cuestionada, siendo más bien el foco de discusión la agrupación de especies y la denominación de las distintas gradaciones infragenéricas, lo cual ha conducido al establecimiento del siguiente esquema general:



(Singer, 1986).

Los dos subgéneros surgen de las dos distintas respuestas de las esporas frente al yodo (reactivo de Melzer), pudiendo ser amiloides (Lepidella) o no-amiloides (Amanita). En las Secciones, caracteres como forma y dimensiones de las esporas, características macro y microscópicas de la volva, tipos de estriación del margen del píleo y otros caracteres como tipo de escamas, forma del bulbo, etc., han sido importantes para su definición.

Los criterios que han sido determinantes en el establecimiento del esquema anterior, han sido desarrollados durante el presente siglo:

- Lange en 1915 es el primero en dar prioridad a la forma de las esporas sobre la estructura de la volva.
- Gilbert y Kühner en 1928 con la reacción de las esporas frente al yodo provocan el primer cambio fundamental en la clasificación infragenérica de Amanita desde tiempos de Fries.
- Bas en 1969 caracteriza microscópicamente la volva y sistematiza el conocimiento de la organización estruc-

tural de los tejidos de *Amanita* y su aplicación a la Sección *Lepidella*. (Bas, 1969)

Paralelamente a este perfeccionamiento de la Taxonomía Clásica del Género han ido surgiendo criterios de apoyo quimiota-xonómicos (Tyler, 1977; Andary et al, 1979; Beutler y Der Marderosian, 1981; Courtillot y Staron, 1970; Wieland, 1978) y otras herramientas, como pruebas macroquímicas (Meixner, 1979 y Beutler y Vergeer, 1980), la inmunología de esporas (Galli et al, 1980), la caracterización de micelios (Campbell, 1975), etc., los cuales al aportar cada vez más datos permitirán que la concepción infragenérica de *Amanita* refleje más objetivamente los límites entre las especies así como su relación filogenética al resolver problemas en donde la morfología y la morfometría de la Taxonomía Clásica se han visto impotentes.

En México algunos de los criterios quimiota-xonómicos han sido aplicados para ubicar diversas especies, como *A. citrina* (Pérez-Silva y Aroche, 1983), *A. porphyria* (Aroche y Pérez-Silva, 1982) y *A. phalloides* (Villegas et al, 1982); en la determinación del potencial tóxico de especies de la Sección Phalloidae (Aroche y Fuentes, 1982) y la confirmación de la ubicación de *A. porphyria* y *A. brunescens* en las estirpes Citrina y Rubescens respectivamente, dentro de la Sección Mappae, para México. (Aroche et al, 1982).

Por otro lado, la presencia en nuestro país de varios complejos de especies (*gemmata*, *caesarea*, *vaginata*, etc.) que no han podido ser ubicadas de una manera adecuada, por medio de los criterios taxonómicos clásicos, reclama la intensificación

en el empleo y búsqueda de otras heramientas taxonómicas de apoyo como las antes mencionadas. Los micelios en cultivo resultan, en este sentido, muy importantes ya que en el futuro, permitirán la confirmación del aislamiento reproductivo, al mismo tiempo que los datos aportados por su caracterización, complementarios a la morfología distintiva observada en los carposoros, conducirá a la aplicación de un concepto biológico de la especie.

b). El concepto de especie en Amanita

"Las formas que poseen en grado considerable el carácter de especies, pero que se parecen mucho a otras formas o están tan estrechamente vinculadas con ellas por gradaciones intermedias que los naturalistas no gustan de clasificarlas como especies distintas, son en varios sentidos las más importantes para nosotros. Tenemos todas las razones para creer que muchas de las formas dudosas y estrechamente relacionadas han conservado siempre sus caracteres durante largo tiempo, tanto tiempo por lo que sabemos, como las buenas y verdaderas especies".

Darwin, 1859.

Darwin, en su "Origen de las especies", hace referencia a un problema que ha acompañado siempre a los intentos de la taxonomía por diferenciar a cada especie particular y que, actualmente, en numerosos casos no ha sido superado. Las diferencias ocurren en la naturaleza a veces de manera obvia, produciendo morfologías distinguibles a simple vista, o en muchos casos discernibles mediante la microscopía óptica, otras por ningún método de observación directo. En el último caso, el fenotipo macro y microscópico presenta ligeras diferencias en estructuras de valor diagnóstico menor y que pueden no tener un origen genético, lo cual impide considerar a cada variación como una especie, al mismo tiempo que al incluirlas

dentro de un solo taxa resulta incierto. Asimismo existen especies cuyos fenotipos son exactamente iguales y a las que se les ha denominado especies gemelas. El establecimiento de éstas, así como el de las variedades, en el caso de las plantas superiores y animales, se efectúa mediante pruebas de entrecruzamiento que debido a la morfología de sus estructuras reproductoras resulta, en muchos casos, sencillo. Por el contrario, en los hongos, existen las dificultades que se enumeran en la introducción.

En Agaricales, y por tanto en Amanita, las especies han sido establecidas basándose en la morfología del carpofo, principalmente, cuando éste ya ha sido herborizado, de modo que el concepto de especie que predomina es un concepto taxonómico, definido esencialmente por un principio ordenador, descriptivo y de inventario, en el que la biología del hongo (fisiología, ciclo de vida, ecología, etc.) ha sido relegado o excluido (Petersen, 1977) y que, recientemente, se ha planteado como una de las preocupaciones más trascendentes dentro de la Micología, dado el atraso relativo, comparado con otras disciplinas, que representa la no-aplicación de los criterios básicos de la Biología moderna como es precisamente, el concepto biológico de especie. Dicha preocupación se ha manifestado principalmente en la forma de simposia internacionales. En 1971 se efectuó el primero en torno a la "Evolución en Basidiomycetes Superiores", en el que aparte de la Micología convencional, los criterios quimiotaxonómicos, el comportamiento de núcleos, sistemas de interfertilidad y caracteres en cultivo, presentan sus esquemas más actualizados de una manera sintética, perfilando

se el curso de una serie de lineamientos que en 1976, en el "Herbertt Symposium of Species Concept in Hymenomyces" contribuyen de una manera definitiva en la modificación del concepto decimonónico de Especie que había privado dentro de la Micología. La conclusión de dicho symposium constituye la formulación del concepto de especie actualmente aceptado:

"Las poblaciones pertenecen a la misma especie cuando son capaces de entrecruzarse y producir descendencia fértil, estipulando que en la ausencia de interfertilidad, ésta sea causada únicamente por aquellos parámetros que operan en el ciclo sexual completo. Para los taxa, en los cuales se carece de la información, o de la aplicación de los criterios antes mencionados, la siguiente definición práctica debe ser aplicada: Una especie es una población que posee caracteres constantes y reproducibles, para los cuales existe una discontinuidad entre ésta y otras poblaciones".

En este mismo symposium Bas (1977) expone con un enfoque morfológico varios ejemplos con complejos de especies de la Sección *Vaginatae* en los que sus caracteres muestran una gran intergradación, existiendo diversas tonalidades de grises y salmones en el píleo, siendo muy sutiles las diferencias: sus esporas generalmente muestran una "preferencia" por una sola medida (9-13  $\mu$ m) y en las láminas los basidios van de mono a tetraspóricos en un mismo ejemplar. En esta misma situación se encuentran otros complejos como el caesarea con especies de Europa, América y Asia. El autor aclara que falta el estudio de más recolecciones y que mediante el análisis distribucional, geográfico-ecológico, además de la morfoanatomía, principalmente de la volva, quizás sea posible taxonomizar a las especies de un modo natural.

Por otro lado Petersen (1977) con base en el estudio realizado en 1975 (Campbell y Petersen) con ejemplares de A. citri-

na y sus micelios en cultivo ilustra cómo en este sentido puede ser útil la caracterización de los micelios. Mientras que los ejemplares variaban ligeramente en su coloración (una tonalidad lavanda en los restos del velo universal y el margen del anillo en unos, mientras que en otros ausente) en los cultivos se expresaban divergencias más marcadas, lo que motivó una revisión más minuciosa de los ejemplares, terminando por diferenciar por un lado a A. citrina (Schaeff.) Gilb., y por otro a una de sus variedades, A. citrina var. lavendula Vesely diferenciación que fue complementaria con un estudio cromatográfico en el que las divergencias se acentuaron, pues la variedad presentaba todas las toxinas de A. phalloides en grandes cantidades, mientras la especie típica sólo dos amanotoxinas en pequeñas dosis. De este modo los especímenes se diferenciaron, primero ligeramente en sus cuerpos fructíferos; segundo, claramente a nivel de la micromorfología de sus cultivos y en su composición química. Petersen pregunta: ¿Son dos especies?. Al querer contestar, se hace evidente la necesidad de verificar la presencia del aislamiento reproductivo. Sin embargo, sin los criterios combinados que emplea, no hubiera podido llegar a plantearse esta necesidad.

De esta manera, con la adopción de un concepto de especie acorde con la tónica evolucionista actual, y los distintos criterios de que se dispone, la manera de abordar a la especie ha sido modificada de manera importante, indicándonos cómo habrán de estudiarse los organismos para su comprensión integral:

En México existen casos como los señalados por Bas (1977).

con respecto al complejo de A. gemmata (Bonavides y Aroche, 1986); así como de las Secciones Phalloidee, Vaginatae y Caesareae (Aroche et al, 1986 y Aroche, 1986) en los cuales de manera predecible, lo único que podrá trazar un límite entre los taxa, o constatar por el contrario, otro tipo de gradación infraespecífica, será la verificación del aislamiento reproductivo correlacionado integrativamente con la morfología del carpoforo, distribución geográfico-ecológica, pruebas quimiota-xonómicas y la caracterización de sus micelios en cultivo. El que este tipo de problemática, en Amanita, esté empezando a ser afrontada por micólogos mexicanos (los antes citados) marcarán las prioridades en cuanto al aislamiento de micelios con especies dudosas, en posteriores estudios.

La caracterización de micelios juega un papel importante como apoyo a la caracterización del carpoforo, al mismo tiempo que constituye un marcador o evidenciador de diferencias que muestra dónde las pruebas de interfertilidad son factibles de producir resultados significativos, en la manera expuesta por Petersen (1977). El presente trabajo representa en este sentido, un primer acercamiento a la morfología del micelio en cultivo de Amanita en México, aplicado a cuatro especies. Acercamiento tendiente a la aplicación de un concepto biológico de especie y que por el momento se limita a la aplicación e evaluación de la metodología empleada por otros (Campbell y Petersen, 1975; Nobles, 1965) así como a su modificación, la cual se expresa en las caracterizaciones presentadas.

## LA CARACTERIZACION DE MICELIOS

Como es sabido, el ácido desoxirribonucléico (ADN), contiene las informaciones específicas para el desarrollo, diferenciación y funcionamiento del organismo.

Todas las células somáticas, diploides, o en el caso de los hongos aquellas que forman el micelio dicariótico y la fase diploide, contienen genomas idénticos, siendo algunos genes "activados" y otros "desactivados" en distintas etapas del desarrollo, durante el cual, conjuntos de células de las diferentes partes del organismo, en un inicio totipotenciales, se modifican para desempeñar determinadas funciones, denominándosele a este fenómeno de especialización estructural y funcional "diferenciación celular".

Para cultivar el micelio de Amanita se emplean inóculos obtenidos a partir de tejido indiferenciado y en crecimiento. Dicho tejido es dicariótico, dado que proviene del micelio terciario, y sus células contienen la misma información genética que todas aquéllas que forman al cuerpo fructífero y que determina el fenotipo característico de la especie. Es lógico entonces suponer que las células en cultivo expresarán rasgos característicos que concuerden con el fenotipo de la especie de la cual provienen, es decir, si los genomas y su expresión fenotípica en cada especie son distintos, esos mismos genomas en células en cultivo habrán de expresarse también de manera distintiva y constante. Además de la importancia taxonómica que esto reviste y que ya se explicó en el apartado anterior, la caracterización morfológica del micelio se hace imprescindible siempre que se aísla cualquier hongo. Estudiar el com-

portamiento de un hongo en condiciones artificiales implica conocer su morfología y caracteres esenciales, así como los cambios que pueda experimentar en el transcurso del tiempo o al someterlo a distintas variables, ya que fenómenos degenerativos, de especialización y haploidización pueden tener lugar sin que lo advirtamos si no lo hacemos a través de la observación al microscopio. La caracterización representa el registro de una situación inicial, sin el cual se hace imposible la evaluación de los fenómenos anteriores. Al mismo tiempo este registro, realizado de una manera periódica, puede aportar datos morfogenéticos importantes en cuanto al proceso de diferenciación de algunos tipos celulares que puedan aparecer en el carpoforo.

Por otro lado, dada la escasez de estudios al respecto en Amanita no sabemos si en la morfología del micelio existe algún carácter específico para el género y cuya presencia apoye la confirmación del origen del micelio o que lo confirme de manera definitiva permitiendo obviar otros procedimientos como el de la observación del septo doliporo que, en el caso de la presente tesis, se eligió como método de confirmación.

## CONFIRMACION DEL ORIGEN DEL MICELIO

La identidad de un micelio en cultivo ha de ser lo más inequívoca y evidente posible, tanto para evitar confusiones posteriores como para darle validez a la caracterización y al mismo cultivo. En Amanita esto resulta crucial ya que no es posible obtener cuerpos fructíferos en cultivo, lo cual sería una confirmación automática y directa del origen del micelio, por lo que se ha de recurrir a un método de confirmación indirecto.

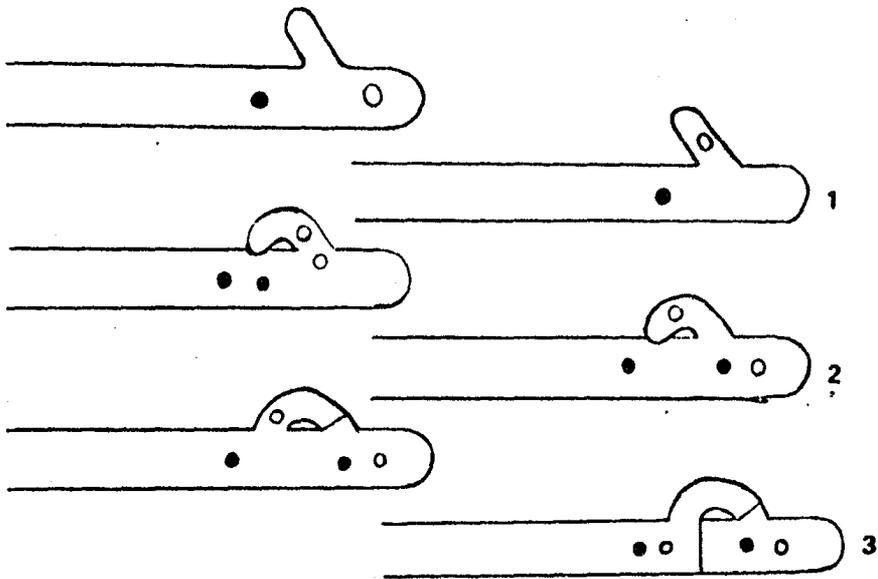
Una manera de llevar a cabo la confirmación es mediante la observación del septo doliporo con la ayuda del microscopio electrónico de transmisión y/o de fíbulas, en el caso de que se produzcan, en el microscopio óptico. Dichas estructuras son caracteres únicos de basidiomicetes, por lo que la confirmación no asegura con un 100% el que los micelios provengan de una Amanita. Sin embargo, las probabilidades de que un micelio con doliporo aislado a partir de tejido interno poco diferenciado de una Amanita, es decir, el micelio de un basidiomicete, no provenga de ella, son mínimas.

a). La fíbula. Salvo algunas excepciones la fíbula se presenta únicamente en el micelio dicariótico (Singer, 1986). La seguridad en afirmar esto proviene precisamente de la función que las fíbulas cumplen durante el proceso de dicarionización del micelio. (Fig. 2)

En los casos en que esta estructura no se presenta, la dicarionización se lleva a cabo a través del poro del septo entre las células.

El micelio dicariótico se encuentra constituyendo la totalidad del carpoforo y la fase vegetativa previa a su for-

mación. Por lo tanto, los micelios que aquí se describen dado que se obtuvieron a partir de carposoros, son dicarióticos.



Alexopoulos, 1980.

1. La fíbula se origina como una ramificación corta que surge a partir de uno de los extremos de una célula en crecimiento.
2. La ramificación se curva hasta que su extremo libre toca la pared de la hifa. Simultáneamente los núcleos se dividen y uno de los núcleos, producto de la división migra hacia el extremo de la fíbula.
3. Las paredes entre la fíbula y la célula madre se disuelven y se forman dos septos produciendo dos células dicarióticas conteniendo dos núcleos distintos.

FIG.2 Dikariotización por fibulación.

Existen especies que no presentan fíbulas en el micelio secundario ni en el terciario. Sin embargo, en todos los casos en que se logra observar se trata del micelio dicariótico de un basidiomicete, lo cual constituye un apoyo en la verificación del origen del micelio, así como de su condición nuclear.

En Amanita, la presencia o ausencia de fíbulas ha sido un carácter taxonómico de importancia menor (Bas, 1969), mientras que en la caracterización de cultivos constituye un carácter diagnóstico importante (Nobles, 1965 Ver apéndice I) siendo su aparición dependiente del medio de cultivo empleado (Watling, 1981).

Las fíbulas pueden mostrar variaciones en su forma, pudiendo ser muy prominentes y con una perforación central ("medallion clamps", Largent, 1977), otras pueden ser redondeadas y aun otras adquirir formas más o menos rectangulares (Watling, 1981).

b). El septo dolíporo. El primero en llamar la atención sobre esta estructura fue Buller en 1933, siendo sus observaciones a nivel de microscopio óptico, por lo que no pudo estar seguro de si lo que observó en hifas de Rhizoctonia solani, Coprinus sterquelinus y C. lagopus era en realidad un artefacto, por lo que se limitó a plantear la posibilidad de que el septo de basidiomicetes podría tener una estructura más compleja que en otros grupos.

Posteriormente, mediante el empleo del microscopio electrónico, Girbardt en 1958, ilustra por primera vez la estructura fina del dolíporo, siendo Moore y McAlear, en 1962,

TABLA I Basidiomycetes en que se ha observado el doliporo

GENERO O ESPECIE	REFERENCIA
<u>Agaricales</u>	
<u>Agaricus bisporus</u>	Manocha, 1965; Thielke, 1972.
<u>Agrocybe praecox</u>	Gull, 1976.
<u>Amanita hygroskopica</u>	Johnson y Preston, 1979.
<u>A. muscaria</u>	Flegler, et al, 1976.
<u>A. solitaria</u>	Johnson y Preston, 1979.
<u>Armillaria mellea</u>	Berlinery Duff, 1965.
<u>Coprinus lagopus</u>	Giesy y Day, 1965.
<u>C. radiatus</u>	Desole, 1982.
<u>C. stercorearius</u>	Ellis, et al, 1972.
<u>C. truncorum</u>	Stepanova, 1986.
<u>Favolus alveolaris</u>	Flegler, et al, 1976.
<u>Lenzites saepiaria</u>	Hyde, 1966.
<u>Merulius tremellosus</u>	Moore y McAlear, 1962.
<u>Panaeolus campanulatus</u>	Berta y Vecco, 1976 a.
<u>P. Foeniseii</u>	Berta y Vecco, 1976 b.
<u>P. sphinctrinus</u>	" " 1976 a.
<u>Polyporus betulinus</u>	Moore y McAlear, 1962.
<u>P. rugulosus</u>	Wilsenach y Kessel, 1965.
<u>P. tomentosus</u>	Setliff, et al, 1972.
<u>Poria latermarginata</u>	" "
<u>Nematoloma puiggarii</u>	Khan y Kimbrough, 1979.
<u>Pholiota terrestris</u>	Wells. 1978.
<u>Psilocybe mexicana</u>	Flegler, et al, 1976.
<u>Stropharia rugosa</u>	Thielke, 1972.
<u>Volvariella bombycina</u>	Flegler, et al, 1976.
<u>Schizophyllum commune</u>	Wells, 1965; Jersild, et al, 1967.
<u>Aphylophorales</u>	
<u>Hericium coralloides</u>	Flegler, et al, 1976.
<u>Inonotus</u>	Moore 1980.
<u>Onnia</u>	"
<u>Phellinus</u>	"
<u>Lycoperdales</u>	
<u>Calvatia gigantea</u>	Beneke, 1963.
<u>Lycoperdon perlatum</u>	Marchant, 1969.
<u>Tremellales</u>	
<u>Auricularia auricula</u>	Tu y Kimbrough, 1978.
<u>A. auricularis</u>	Moore y McAlear, 1962.
<u>A. fuscisuccinae</u>	Khan y Kimbrough, 1980.
<u>A. mesenterica</u>	Patton y Marchant, 1978..

A. poytricha  
Calocera viscosa  
Dacromyces stillatus  
Exidia glandulosa  
Tremella foliacea  
T.rhytidhysterii  
Tremellodon gelatinosum  
Tetragoniomyces uliginosus

Patton y Marchant, 1978  
 " " "  
 Flegler, et al, 1976.  
 Moore, 1971.  
 Patrignani, 1983.  
 Bezerra y Kimbrough, 1978.  
 Patrignani, 1983.  
 Oberwinkler y Bandoni, 1981.

Phallales

Clathrus cancellatus

Eymé y Parriaud, 1970

Ustilaginales

Entorrhiza casparyana  
Entyloma nymphae  
Tilletia caries

Deml y Oberwinkler, 1981.  
 Deml, 1977.  
 " "

quienes lo caracterizan y bautizan con ese nombre proporcionando la primera reconstrucción.

Desde entonces a la fecha se ha constatado que esta estructura es un carácter único de basidiomicetes.

El hecho de que se encuentre en todas aquellas formas en las que la dicarionización del micelio se lleva a cabo por migración nuclear, y no en ninguna otra manera, parece indicar que el doliporo juega un papel crítico en este proceso (Raper y Flexer, 1971).

La regulación de la corriente protoplasmática, el paso de organelos y la posible correlación entre estos procesos y la fructificación del hongo, como funciones del septo doliporo, se apoya en varios estudios (Bracker y Butler, 1963; Flegler et al, 1976; Giesy y Day, 1965; Moore y Marchant, 1972).

Como se observa en la tabla I, la distribución del septo doliporo es muy amplia dentro de los basidiomicetes. Se encuentra presente en todos los holobasidiomicetes (aun en los marinos como Nia vibrissa y Digitatispora marina, Brooks, 1975), así como en los fragmobasidiomicetes (Uredinales, Septobasidiales y Exobasidiales) y hemibasidiomicetes (Ustilaginales), según el nuevo esquema propuesto por Khan y Kimbrough (1982) para reagrupar a los basidiomicetes, tomando en cuenta la diversidad estructural de los septos en este grupo de hongos, que al ser congruente con un gradiente de complejidad ha permitido establecer correlaciones con otro indicador filogenético: el basidio.

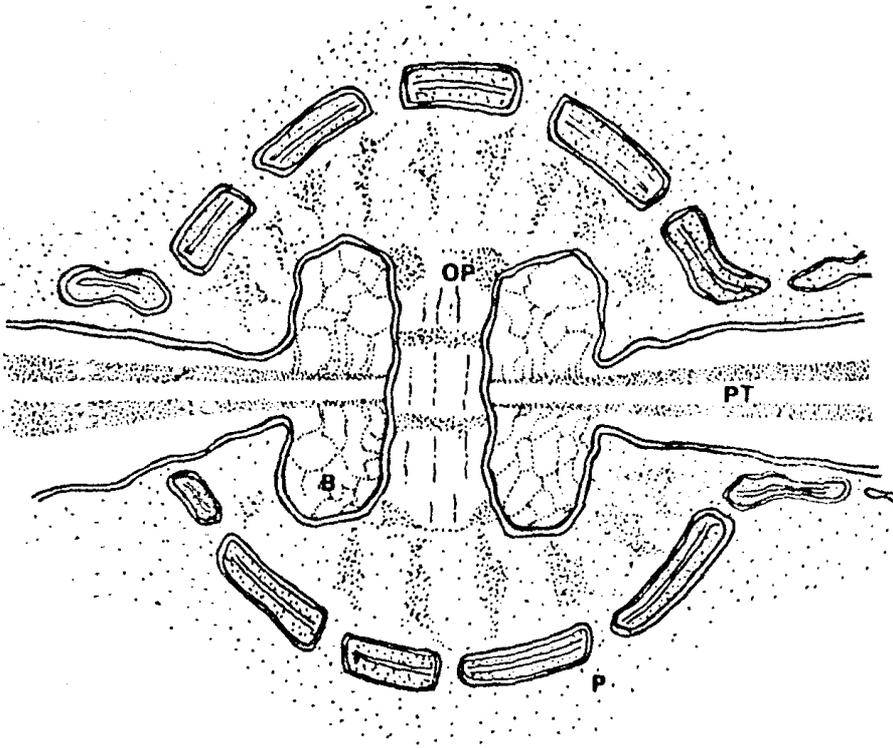
El septo doliporo estructuralmente más complejo es el que se ha observado en holobasidiomicetes (Fig. 3). En este grupo, la pared alrededor del poro muestra una proyección acentuada y los parentosomas consisten en cisternas multi-perforadas en forma de domo, que contienen estructuras tri-laminares similares a la unidad de membrana. Otros parentosomas se han reportado como presentando un recubrimiento adicional de material fibroso o granular en la parte exterior, en Agaricales. Esta descripción ha de corresponder con los septos observados en el presente trabajo.

El doliporo puede estar presente tanto en el micelio primario (Giesy y Day, 1965), como en el micelio dicariótico del cuerpo fructífero y de la fase vegetativa (Bracker, 1967).

La presencia de esta estructura en nuestros cultivos ha sido utilizada como evidencia en la confirmación del origen de los mismos, como provenientes de un basidiomicete, con probabilidades mínimas de que no sea una Amanita. Este procedimiento fue empleado ya por otros autores (Johnson y Preston, 1979) ante la imposibilidad de producir cuerpos fructíferos en cultivo dada la condición ectomicorrícica del género, para utilizar eso mismo como confirmación.

FIG. 3

## SEPTO DOLIPORO DE HOLOBASIDIOMYCETES



- B.... Botón o hinchazón de la pared transversal.  
 OP... Oclusión del poro.  
 P.... Parentosoma.  
 PT... Pared transversal.

## LOS MICELIOS EN CULTIVO, LA MICORRIZA Y LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

Aislar y cultivar micelios de especies de Amanita, automáticamente implica la obtención de un cepario. La importancia inherente de la constitución de este cepario en lo que se refiere a su función como banco de germoplasma, a su aprovechamiento y a la investigación, confluye junto con la serie de alternativas y posibilidades de resolución de problemas que al enfrentarnos con el estudio de los hongos, el género Amanita nos plantea. El producto de esta interacción dinámica, potencialmente, nos brinda respuestas que necesariamente se revierten en beneficio tanto del conocimiento de la Micología, como de otras ramas (Genética, Bioquímica, etc.), para las cuales, el cepario constituye una herramienta importante en la aplicación de sus conocimientos y desarrollo de sus procesos experimentales. Al mismo tiempo, este conocimiento representa la posesión y el dominio del Hombre, sobre un recurso natural con ciertas características biológicas muy especiales, cuya explotación, hasta el momento limitada, promueve el aprovechamiento y la conservación no sólo de las amanitas, sino también de otro recurso ecológica y económicamente muy importante: el bosque, siendo el puente entre los dos, la micorriza.

La micorriza constituye una relación simbiótica entre las hifas de cierto hongo y la raíz de una planta (Cooke, 1977).

Se ha considerado que la mayoría de las especies del Género Amanita son ectomicorrícicas obligadas (Bass, 1969) y que junto con los géneros Boletus y Tricholoma, conforman a la mayoría de los hongos ectomicorrícicos (Harley, 1969). Los av-

boles involucrados en este tipo de asociación son predominantes de zonas boscosas (Quercus, Pinus, Eucalyptus, etc.) siendo incapaces de sobrevivir en comunidades competitivas en hábitats naturales en ausencia del hongo.

Algunos de los beneficios más importantes que la planta recibe de su simbionte, son el aumento en la solubilidad de minerales en la tierra, incremento en la absorción de nutrientes (K,N,P), protección de las raíces en contra de organismos patógenos, producción de hormonas vegetales de crecimiento por parte del hongo, etc. El hongo a su vez recibe carbohidratos simples y nutrientes producto de la fotosíntesis de la planta.

Las implicaciones que la micorriza tiene en cuanto a la estructuración, productividad y equilibrio de los bosques, la sitúa como un punto clave y que por lo mismo, ha sido objeto de un marcado interés dentro de la investigación, hecho que se ve reforzado por la importancia económica que los bosques representan. En dichas investigaciones el cultivo de micelios ha jugado un papel importante desde la reproducción "in vitro" del proceso de infección del hongo a la planta, hasta maniobras de reforestación y la introducción de plantas exóticas en distintas regiones.

La prueba definitiva de si un hongo es o no micorrícico, consiste de una demostración experimental de su habilidad para formar micorrizas con raíces del hospedero en cultivo puro. Las condiciones asépticas son siempre anormales para el crecimiento de ambos organismos, especialmente con respecto a la humedad, aereación, intensidad luminosa y condiciones de la raíz. Así, resultados negativos no demuestran que un hongo es inca-

paz de formar micorrizas. Los resultados positivos, por el contrario, deben ser aceptados como evidencia de la condición micorrícica del hongo (Harley, 1969).

No obstante que este método data de 1921 (HacsKaylo y Palmer, 1955), hasta 1971 menos del 10% de los hongos que se suponen micorrícicos habían sido confirmados como tales (Haskaylo, 1971). En el caso de *Amanita* las especies confirmadas son:

ESPECIE	REFERENCIA
<u>A. caesarea</u>	HacsKaylo y Palmer, 1955.
<u>A. citrina</u>	Vozzo y HacsKaylo, 1962.
<u>A. frostiana</u>	HacsKaylo y Palmer, 1955.
<u>A. flavorubescens</u>	Vozzo y HacsKaylo, 1962.
<u>A. muscaria</u>	Bryan y Zac, 1961.
<u>A. pantherina</u>	Modess, 1941.
<u>A. rubescens</u>	HacsKaylo y Palmer, 1955.
<u>A. strobiliformis</u>	Vozzo y HacsKaylo, 1962.
<u>A. verna</u>	HacsKaylo, 1951.

Por otro lado, el hecho de que géneros dentro de la Sección Roanokenses, particularmente en su subsección Vittadiniae, son reportadas como creciendo en llanos, praderas y pastizales; y la presencia de una especie no micorrícica (A. nauseosa) (Singer, 1986), hace evidente la posibilidad de que la generalización que se ha establecido por mera suposición en cuanto a la condición ectotrófica obligada de las amanitas, tenga algunas restricciones importantes.

La escasez de estudios al respecto realizados en el país, la importancia de Amanita como micorrícico y la posibilidad de que

en algún momento cultivos de especies de este género puedan ser empleadas en la reforestación de bosques mexicanos con especies de hongos mexicanos y que para esto es imprescindible contar con las cepas apropiadas, han constituido un estímulo importante en la realización de este trabajo, cuya aportación al respecto, por el momento, son los cultivos de cuatro especies, confirmados y caracterizados.

Otro carácter importante en Amanita y que convierte el estudio de sus micelios en una fuente potencial para la producción de recursos es su capacidad para sintetizar varios tipos de metabolitos secundarios. De ellos los que han captado el mayor interés por parte de los investigadores son las toxinas, ya sea por su carácter alucinógeno (ácido iboténico, muscimol, bufotenina) o por su comportamiento como venenos mortales (amanotoxinas).

Todas estas sustancias actualmente constituyen herramientas de investigación. Las primeras en estudios referentes a neurotransmisores en sistema nervioso central y los segundos en estudios sobre la síntesis de ARN, así como a su funcionamiento relacionado con la ARN polimerasa II de eucariontes, ya que las amanotoxinas son inhibidoras de la acción de esta última. El cultivo sumergido sirve para la producción de metabolitos secundarios siendo importante al aumentar su disponibilidad para quienes trabajan dentro de estas áreas.

Las amanitas productoras de ciclopéptidos tóxicos que se han logrado aislar: A. hygroskopica (Johnson y Preston, 1979), A. verna, A. tenuifolia y A. suballiacea (Stark, et al, 1973) han sido incapaces de producir las toxinas en cultivo. Por

otro lado, cultivos sumergidos de Galerina (Benedict et al, 1966; Benedict y Brady, 1967) otro género productor de estas sustancias, han sido exitosos en cuanto a la producción de las mismas.

En cuanto a las toxinas neurotransmisoras, la bufotenina de A. citrina ya ha sido producida en medio líquido (Fiussello y Romano, 1982).

Dentro de los metabolitos secundarios cabe mencionar a los antibióticos. No obstante que de los 2550 antibióticos producidos por hongos que se hayan descritos, sólo siete han mostrado ser útiles, por lo que se producen a gran escala (penicilina, ácido fusídico, griseofulvina, vanotina, cefalosporina C, fumagilina y sircanina) (Lowe y Elander, 1983), la búsqueda de nuevos antibióticos prosigue, intensificándose cada vez más en hongos superiores. La presencia de este tipo de metabolitos secundarios parece ser bastante extendida en Agaricales. Garrido (1982) con 36 miembros de este Orden (ectomicorrícicos y saprobios) encontró que 30 de ellos mostraron actividad antibiótica contra uno o más de los siguientes patógenos humanos: Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis y Escherichia coli. Amanita ha sido probada en algunos casos de manera positiva (Wilkins, 1954).

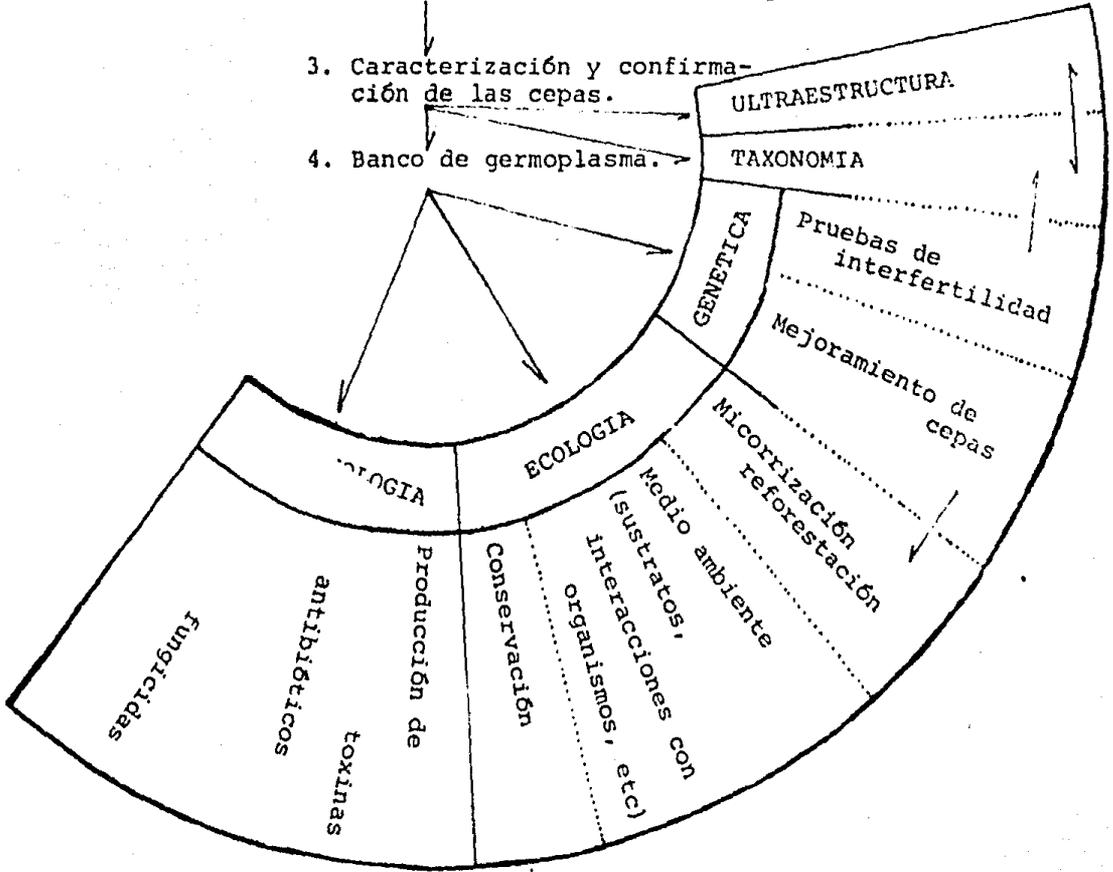
El término antibiosis no sólo se refiere a la inhibición del crecimiento de patógenos humanos, existen también fitopatógenos, hongos en su mayoría, siendo las sustancias fungicidas o fungistáticas otro tipo de metabolitos importantes que pueden ser producidos por micelios en cultivo. Chaumont y Simeray (1983) reportan actividad antifúngica de Amanita fulva

(contra Cytospora), A. Phalloides y A. porphyria (contra Fusarium oxysporum, Graphium ulmi, Rhizoctonia solani y Stereum purpureum) utilizando extractos de tejido de carpoforo.

Hasta ahora el micelio de Amanita no ha sido empleado en la producción a gran escala de metabolitos secundarios, pero sin duda al aparecer un procedimiento rentable en el futuro, este aspecto de las amanitas será un foco de interés importante en la Biotecnología.

De lo que hasta aquí se ha expuesto; podemos delinear el siguiente esquema de aprovechamiento de los micelios en cultivo de Amanita:

- 1 Aislamiento del micelio.
- 2 Establecimiento de cultivos puros.
3. Caracterización y confirmación de las cepas.
4. Banco de germoplasma.



## ANTECEDENTES

## LA CARACTERIZACION DE MICELIOS EN BASIDIOMICETES

Debido a la importancia económica de los hongos lignocelulolíticos como destructores de cualquier tipo de construcción de madera, así como de madera almacenada y como parásitos de árboles maderables importantes, este grupo de hongos son los primeros en ser sujetos al cultivo y caracterización de sus micelios, a finales del siglo pasado, siendo Brefeld quien dentro de los himenomicetes, aplica el cultivo puro publicando las primeras descripciones detalladas del micelio de algunas especies, como Heterobasidion annosum, en 1876 (Citado por Stalpers, 1978).

En países ricos forestalmente como Canadá y Estados Unidos, para principios de este siglo ya se contaba con grandes colecciones de cepas de hongos degradadores de madera, siendo Davidson, Campbell y Blaisdell, en 1938, los primeros en sistematizar la caracterización de los micelios en cultivo dentro de los basidiomicetes, utilizando para ello como caracteres, la tasa de crecimiento y la reacción para la detección de oxidasa extracelular, en agar con ácido gálico y ácido tánico, en el estudio de 210 especies, encontrando que desde el punto de vista taxonómico la caracterización de los cultivos, en este grupo de hongos, era potencialmente útil.

En 1942 Davidson, Campbell y Vaughn, establecen el primer sistema de clasificación e identificación de cultivos, incorporando caracteres macroscópicos del micelio dentro de la caracterización, además de los criterios empleados por los anteriores.

Posteriormente, Nobles (1948) expande el sistema de Davidson et al (1942) al incluir un número mayor de especies en una clave de identificación de cultivos, estableciendo al mismo tiempo un método estandarizado para el estudio de los hongos degradadores de la madera. El sistema de identificación consistía en asignarle a cada especie un código formado por 11 dígitos, cada uno de los cuales se refería a un carácter diagnóstico significativo. Al disponer los códigos numéricos en orden ascendente, se obtenía una clave de identificación que dentro de ciertos límites podía ser ampliada y perfeccionada.

El gran número de aislamientos que este autor maneja, la diversidad de caracteres morfológicos (distintos tipos de fibulación, formación de oídos y clamidosporas, especializaciones hifales) y otros de tipo fisiológico (tipo de pudrición, reacción con guayacol, etc.) y genético observados en sus cultivos, le permite establecer correlaciones entre los carpoforos y los cultivos, encontrando que muchos de los grupos de éstos segregados mediante el uso de la clave correspondían con la agrupación taxonómica que con base en los caracteres del carpoforo se había establecido, hecho que implicó el cuestionamiento de la ubicación taxonómica de aquéllos grupos o géneros en los que dicha correspondencia no era observada. Nobles (1948, 1958) contribuye de esta manera a la mejor caracterización de micelios como una herramienta taxonómica importante, demostrando que algunos caracteres poseían valor filogenético elevado.

Posteriormente, la misma autora (Nobles, 1965) pensando que su clave resultaba un tanto artificial y que no relaciona-

ba suficientemente a los hongos de una manera filogenética, la reelabora, incorporando un mayor número de caracteres y estructurada de modo que los distintos aislamientos utilizados en la identificación fueran siendo segregados en grupos de especies cercanas. Reincidiendo con más fuerza en la filogenia de los pliporáceos en 1971.

La elocuencia de las evidencias aportadas por Nobles en cuanto al significado de la caracterización de cultivos como marcador taxonómico y evolutivo ha motivado la adopción del esquema de dicho autor por la mayoría de los investigadores que se dedican al estudio de los micelios tanto de Aphylophorales como de Agaricales.

## LA CARACTERIZACION DE MICELIOS EN AGARICALES

"Hasta la fecha, en Agaricales, el micelio no ha sido empleado en gran escala con fines taxonómicos. No obstante que las diferencias en coloración, zonación, consistencia y manera de crecer en cultivos estandarizados, como han sido empleadas por Nobles (1958, 1971), deberían poseer valor diagnóstico" (Singer, 1986).

Desde Davidson et al (1938) aparecen descripciones de cultivos de algunos agaricales (Armillaria, Clitocybe, Collybia, Hypoholoma, Lentinus, Pleurotus) que junto con los poliporáceos dentro de la categoría de "Hongos degradadores de la madera" ocupaban un lugar muy secundario. Algunos de estos géneros lignícolas vuelven a aparecer en los trabajos de Nobles, siendo así los primeros cuyos cultivos se describen de una manera sistemática aunque con pocas implicaciones taxonómicas.

Para 1971, año en que Nobles presenta su esquema filogenético más acabado, ya existen varios estudios en grupos específicos de agaricales principalmente en Boletaceae (Pantidou 1961 a, 1961 b, 1962, 1964; Pantidou y Groves, 1966, Pantidou y Watling, 1970), Tricholomataceae (Miller, 1971), siendo estas familias las que más extensamente se han caracterizado a nivel de su micelio en cultivo. Otros estudios se refieren a las caracterizaciones de grupos heterogéneos que incluyen a varias familias (Semerdzieva, 1965) o géneros particulares como Coprinus (Johnson y Jones, 1941), Panaeolus (Ola'h, 1969) constituyendo los primeros intentos por adoptar la caracterización de los micelios como herramienta taxonómica.

En los años siguientes, si bien de una manera lenta, se produce la acumulación de datos descriptivos que poco a poco, incluyendo a más géneros, han ido explorando la capacidad de

diferenciación de los micelios, en este sentido son importantes los trabajos de Pandidou y Watling (1973) con Boletus amarellus; Campbel y Petersen (1975) con varias especies de Amanita; Thielke (1978) con A. caesarea; Scurti (1982) con Panaeolus; Bianco y Romondotto (1982) con varios géneros; Pantidou et al (1983) y Miller et al (1983) que junto con varios agaricales describen los cultivos de algunas especies de Amanita, y Mueller (1984) con varias especies de Laccaria.

Desde Nobles (1965), la mayoría de los autores adopta su método estandarizado en lo referente a terminología y tiempos de incubación, variando los medios de cultivo. Otros, en su búsqueda por condiciones que permitan una mayor diferenciación se apartan un poco más del esquema de dicho autor. Por ejemplo, Miller (1971), al observar poco o ningún crecimiento en sus aislamientos al emplear una temperatura estandarizada de 25°C, recurre a la variación de este parámetro, encontrando que al emplear un rango de temperaturas más bajo (1.7-23°C) se podía estimular el crecimiento y la inducción de tipos celulares, incluso la fructificación. Entre los caracteres morfológicos que menciona se encuentran: clamidosporas, conidios, oídios, cistidios, cuerpos refractivos y fructificaciones anormales.

Pantidou, et al (1983) por su parte, exploran distintos medios de cultivo (papa dextrosa-agar, el de Hagem modificado por Modess y el de malta modificado por Kauffman) observando que el papa-dextrosa-agar era el más favorable en la mayoría de las especies estudiadas, ya que estimula la diferenciación y el crecimiento, hecho que se refleja en la diversidad morfo-

lógica que presentan los micelios de las distintas familias que tratan, siendo las más relevantes: artroconidios, distintos tipos de fibulación, clamidosporas, hifas helicoidales, la ticíferos y cuerpos refractivos. Estos autores, además de variar los medios de cultivo, emplean tiempos de incubación menores (20 a 30 días) a diferencia de Nobles (1965) que emplea 42 (6 semanas).

Actualmente no existe, aparte de Nobles (1965), un método estandarizado adoptado universalmente para aquéllos que, dentro de Agaricales, se dediquen a este tipo de estudios, lo cual aunado a la heterogeneidad de los géneros investigados hasta hoy hace imposible el establecer comparaciones y llegar a conclusiones taxonómicas firmes, que al demostrar la utilidad de la caracterización de micelios estimule a otros a emprender estudios similares. Sin embargo, estos trabajos aportan datos, cuya acumulación habrá de conducir en un futuro a establecer dicho método. Aparentemente la dificultad más importante en este sentido lo ha constituido la poca diferenciación de las hifas, principalmente en hongos micorrícicos (Laccaria, Mueller 1984; Amanita, Campbell y Petersen, 1975; Boletaceae, Panti-dou op. cit.) lo que en primera instancia impide un uso adecuado de la clave de Nobles (1965) y por otro, la escasez de trabajos extensivos que se refieren a un sólo género, lo que ayudaría a encontrar caracteres diagnósticos de géneros, familias etc.

CARACTERIZACION DE MICELIOS EN AMANITA

El estudio más extenso sobre Amanita, y el único que exclusivamente se dedica al género, es el de Campbell y Petersen (1975). En éste se incluyen las caracterizaciones de: A. citrina, A. citrina var. lavendula, A. flavoconia, A. affin flavoconia, A. muscaria, A. polypiramis, A. rubescens, A. affin strobiliformis y A. velatipes. Para ello emplean tres medios de cultivo: Extracto de Malta-Agar (MA), Papa-dextrosa-Agar (PDA), y MA enriquecido con tiamina, e intentan la aplicación de Nobles (1965).

Los tipos celulares que resaltan en las descripciones de sus cultivos son: fíbulas, basidios, células vesiculares, hifas refringentes, hifas heliocoidales, blastosporas, células lobosas y células profusamente ramificadas (Fig. 4). Ya que es en PDA donde observan el mayor crecimiento y diferenciación, estos autores lo proponen como el medio de cultivo indicado para llevar a cabo estudios similares, concluyendo que la taxonomía de cultivos es válida como apoyo a la taxonomía clásica en Amanita ya que en varios casos, mientras que la morfología y anatomía de los cuerpos fructíferos variaba muy ligeramente, los caracteres de sus cultivos eran claramente distintivos, como en el caso de A. citrina y su variedad lavendula. Sin embargo, señalan, estas diferencias no se hayan codificadas en Nobles (1965) y su codificación en otro sistema no fue posible, ya que la caracterización de varios aislamientos de una misma especie no eran consistentes, tanto en la tasa de crecimiento como en los tipos celulares.

Descripciones de otras especies se han reportado de manera aislada: A. rubescens (Miller, et al, 1983), A. Muscaria (Jenkins y Petersen, 1976), A. caesarea (Thielke, 1978), A. Ovoidea y A. pantherina (pantidou, et al, 1983), correspondiendo la mayoría de estas descripciones a micelios poco diferenciados. Se menciona la presencia de vesículas en cadena para A. rubescens fíbulas en A. caesarea y A. pantherina, y la producción de pigmentos amarillos y agregaciones hifales parecidas a primordios en A. caesarea. Por otro lado, de los micelios aislados de Amanita que se han reportado, son pocos los que han sido confirmados en cuanto al origen del micelio. Salvo en los casos de A. caesarea (Thielke, 1978), A. velatipes y A. sp affin strobiliformis (Campbell y Petersen, 1975) y A. pantherina (Pantidou, et al, 1983) donde se verifica el origen mediante la observación de fíbulas, todas las demás cepas carecen de él.

Unicamente Johnson y Preston (1979) con A. hygroskopica y A. solitaria, lo hacen mediante microscopía electrónica del septo doliporo y su trabajo no se refiere a la caracterización de micelios.

Es indudable que una cepa micorrícica cuyo origen no ha sido confirmado, de alguna manera, le resta validez tanto al aislamiento como a los estudios en los que se le emplee.

Estudios sobre el micelio de dos especies de las incluidas en el presente trabajo, A. muscaria y A. rubescens, han sido realizados por otros autores. En el apéndice II se reproducen las caracterizaciones que dichos autores han publicado con el fin de facilitar la discusión y comparación posteriores.

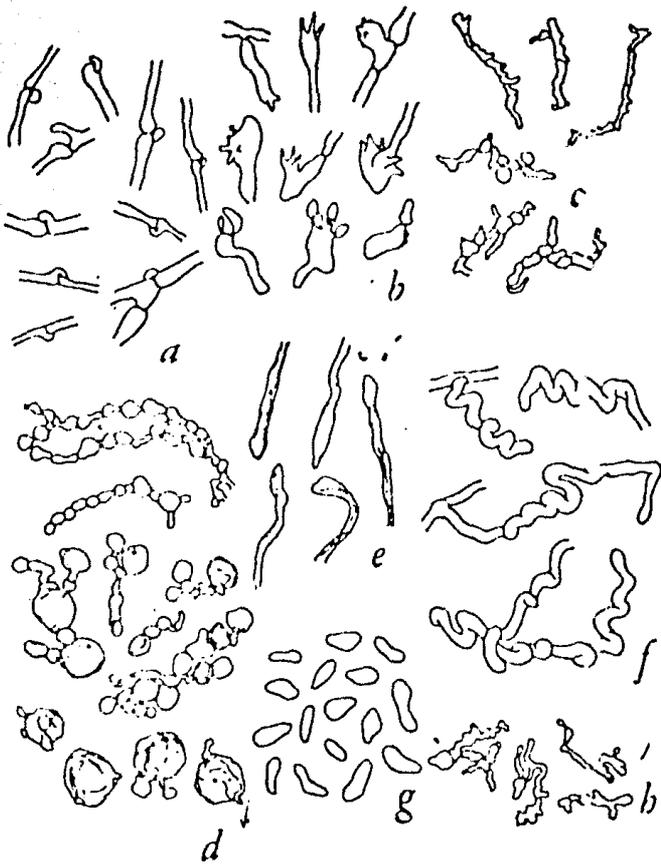


Fig. 1. Hyphae of *Ananita* cultures. a. Clamp connections. b. Basidia. c. gnarled, profusely branched hyphae. d. Menkiform hyphae. e. Refringent hyphae. f. Helicoid hyphae. g. Elastospores. h. Lobose cells. a. *Ananita* affinis *strobiliformis*. b, e, g. *A. citrina* var. *lavendula*. c. *A. citrina*. d, h. *A. muscaria*. f. *A. rotellipes*.

Fig. 4

Tipos celulares observados por Campbell y Petersen, 1975.

Siendo Campbell y Petersen (1975), la referencia más cercana en cuanto a que su estudio se refiere a diversas especies de Amanita, y dado que Nobles (1965) constituye la única referencia en cuanto a un método estandarizado de cultivo, consideramos que ambos trabajos son el punto de partida del presente trabajo.

No obstante que los primeros señalan en sus conclusiones que el método de Nobles no es adecuado para la caracterización de los micelios del género que nos interesa, los resultados que mediante la aplicación de este método obtuvieron estos autores, nos permitió, al reproducir el mismo con especies mexicanas, tener una referencia con que comparar nuestros propios resultados, a la vez que, mediante la experiencia, nos permite contemplar el problema "desde adentro", lo que en un momento dado es importante para plantear lineamientos que, en un futuro, conduzcan a una solución. Por el momento sólo se analizarán de manera preliminar, las estructuras obtenidas en la diferenciación de los cultivos estudiados, haciendo hincapié en que, más que la caracterización, dada su incipiencia como herramienta taxonómica, son las pruebas de interfertilidad, el criterio más próximo que los cultivos ofrecen en la definición de especies y que la conjunción de ambos con la taxonomía clásica promete hallazgos importantes en un futuro, que esperamos, no sea muy lejano.

## OBJETIVOS

El aislamiento y caracterización de micelios constituye una primera fase, básica para desarrollar el planteamiento propuesto sobre el aprovechamiento de los micelios de Amanita (pág. 37). El presente trabajo pretende contribuir con esta primera fase en lo que respecta al estudio de cuatro cepas correspondientes a cuatro especies: Amanita abrupta Peck, A. gemmata f. gracilis Konrad y Maublanc (1925), A. Muscaria (L.; Fr.) Pers. ex Hooker y A. rubescens (Pers.; Fr.) S.F. Gray.

De los datos aportados por las caracterizaciones, intentaremos un análisis preliminar acerca del significado taxonómico de algunas estructuras, comparando nuestros resultados con los obtenidos por otros autores.

El finalizar el presente trabajo significa, además de iniciar el estudio del micelio de amanitas mexicanas, la conservación del germoplasma de cuatro especies micorrícicas que en el futuro podrán ser aprovechadas.

Por orden de importancia, los objetivos de esta tesis son:

- 1). Aislar cuatro especies del género Amanita y cultivar su micelio para iniciar un banco de germoplasma de amanitas mexicanas.
- 2). Caracterizar los micelios en cultivo.
- 3). Confirmar el origen de las cepas como provenientes de un basidiomicete, observando el septo doliporo mediante la transmisión de electrones.
- 4). Con los datos obtenidos por la caracterización de las cepas mexicanas y los reportados por otros autores, discutir

la posibilidad de emplear la caracterización como herramienta taxonómica dentro del género y definir el curso que habrán de seguir investigaciones posteriores en el mismo sentido.

- 5). Proveer de una herramienta experimental a futuras investigaciones que las requieran.

## MATERIALES Y METODO

## MATERIALES Y METODO

a). Condiciones de esterilidad. Dado el carácter de este trabajo, se requirió de una vigilancia permanente de las condiciones asépticas en todas las fases de esta investigación. Desde la preparación de las cajas de Petri, hasta el momento de llevar a cabo la caracterización de los cultivos, fue necesario el mantenimiento de las condiciones asépticas lo más posible cerca de la esterilidad.

En este cuidado constante son cinco las fuentes de contaminación que se hubieron de tomar siempre en cuenta. A saber:

1. El medio externo inmediato.
2. El medio de cultivo.
3. El equipo de laboratorio empleado.
4. La persona que realiza el aislamiento y resiembras.
5. El inóculo mismo.

Al mismo tiempo, debido a que parte del trabajo de laboratorio se verificó en dos lugares distintos, la manera en que estas fuentes de contaminación fueron reducidas a un mínimo, varió en ciertos aspectos, aunque no de una manera esencial, dependiendo de si nos encontrábamos en el campo, donde se realizaba la obtención del inóculo; o en el laboratorio en que se practicaban las resiembras, mantenimiento y purificación de los cultivos.

Obtención del inóculo. En lo que se refiere a la primera de las fuentes de contaminación consideradas, lo ideal hu-

biera sido el haber podido trabajar en un sitio destinado exclusivamente para la realización de este tipo de investigaciones, es decir, una habitación cerrada en la que privaran condiciones de esterilidad, o un laboratorio de cultivo de tejidos equipado con filtros de aire, termostatos y una campana de flujo laminar, todo totalmente desinfectado tal y como se describe en los manuales.

Desde un inicio se desechó la idea de contar con un laboratorio como el antes descrito, pues no obstante que en la Facultad de Ciencias se pudiera disponer de algún espacio con tales características, la lejanía del lugar de recolección, la duración de las salidas de campo (tres o cuatro días) y el hecho de que la obtención del inóculo habría de realizarse el mismo día en que el ejemplar era colectado, esta opción resultaba inadecuada.

Así, se decidió trabajar en el sitio más cercano que permitiera tener el control más adecuado posible de las condiciones ambientales externas que posibilitara, si no la esterilidad completa, ni mucho menos, sí disminuir el riesgo de contaminación y por otro lado, obtener el inóculo el mismo día en que se llevaba a cabo la recolección de especímenes. Este sitio lo constituyó el cuarto de un hotel en el poblado más cercano al sitio de recolección.

Aunque un cuarto de hotel con camas, baño y quien sabe que tan limpio, dista mucho de la idea que se pueda tener un laboratorio estéril, por lo menos permite evitar las corrientes de aire y desinfectar las superficies inmediatas a la mesa de trabajo.

No se podía considerar a toda la habitación como "el laboratorio", pues hubiera sido necesario desinfectar totalmente todas las superficies y evacuar el mobiliario. La idea de "laboratorio" tenía que restringirse (aún más de lo que ya estaba al estar en un hotel) a un área dentro de la habitación que procurara las condiciones más apropiadas. En este sentido se siguieron los pasos que a continuación se enumeran:

1. Cerrar todas las puertas y ventanas con el fin de evitar corrientes de aire.
2. Elegir el rincón más alejado de superficies porosas, tales como entrepaños, cortinas, etc., que pudieran acumular polvo y, por ende, esporas de otros hongos.
3. Desinfectar la mesa de trabajo y silla con una solución de hipoclorito de sodio comercial y agua (1:2).
4. Los utensilios empleados en el aislamiento (dos agujas de disección y un mechero) eran flameados con alcohol, después de haberlos limpiado con hipoclorito de sodio, y colocados en el centro de la mesa, la cual era cubierta con un paño empapado en la solución desinfectante.
5. En la mayoría de los casos se dispuso de un aerosol desodorante ambiental, de cualquier marca, con el que era rociada la atmósfera del cuarto para precipitar las esporas que pudieran encontrarse flotando.
6. Esperar de 15 a 20 minutos para permitir dicha precipitación.

7. Una vez dispuesto todo y empleando tapabocas, se procedía a el aislamiento. Para esto, sobre la mesa de trabajo, se colocaban únicamente los utensilios necesarios para la siembra del tejido en un ejemplar: dos cajas de Petri por cada medio de cultivo, el mechero encendido, dos agujas de disección y un pequeño recipiente con alcohol, en el que se enfriaban las agujas después de ponerlas al rojo vivo.

El ejemplar se colocaba, en caso necesario, sobre la mesa, pero fuera del área cubierta con el paño, en la cual, en su centro, se realizaban todas las manipulaciones. Después de cada aislamiento el ejemplar era retirado, junto con las cajas de Petri ya etiquetadas y selladas.

Con estas medidas, el índice de contaminación permaneció más o menos constante en un 35%, es decir, de cada diez cajas, tres o cuatro resultaban contaminadas. Siendo la mayoría de las veces el inóculo mismo, la fuente de contaminación, especialmente en aquellos casos en los que se intentó aislar ejemplares sin velo parcial cerrado.

En condiciones óptimas de trabajo el índice de contaminación aceptable, en aislamientos obtenidos a partir de ejemplares silvestres, es del 25% (Stamets y Chilton, 1983).

Resiembras y mantenimiento de cultivos. En lo que se refiere a las condiciones de higiene en el laboratorio en la ciudad hubo un con

trol más riguroso que en el campo, ya que se contó con un sitio cerrado del que se tenía un control absoluto.

Al iniciar este estudio se adecuó una habitación para su uso como laboratorio, lo cual brindó las siguientes ventajas:

- 1). Tener un sitio exclusivo destinado al cultivo de micelios de Amanita.
- 2). Un laboratorio siempre limpio y cerrado. Únicamente las personas relacionadas con este trabajo tenían acceso a él y las condiciones de higiene dependían única-mente de ellas.

El laboratorio consistió únicamente de lo siguiente: una mesa, una silla y una repisa.

El procedimiento para resembrar fue esencialmente el mismo que para la obtención del inóculo.

Las cajas de Petri se limpiaban periódicamente con la solución desinfectante. Aquellas que habiendo concluido el tiempo de incubación, eran trasladadas a la Facultad de Ciencias para su caracterización microscópica, eran asimismo, desinfectadas antes de reintegrarlas al laboratorio.

- b). Medios de Cultivo. En este estudio se emplearon: Extracto de Malta Agar (MA) y Papa Dextrosa Agar (PDA), cuya composición es la siguiente:

<u>Extracto de Malta Agar</u>	<u>Papa dextrosa Agar</u>
Extracto de malta -- 12.5 g.	Papa macerada -- 200 g.
Agar ----- 20.0 g.	Dextrosa ----- 20 g.
	Agua destilada - 1 l.
Agua destilada 1 l.	Agar ----- 20 g.

(Nobles, 1965)

(Watling, 1981)

Ambos medios fueron enriquecidos con tiamina (25 p.p.m.) según indica Thielke (1978) para Amanita caesarea.

Modo de preparación. En un matraz de 1 litro se vertían las dos terceras partes del agua junto con la papa o el extracto de malta, siendo calentados en baño maría hasta obtener ebullición moderada. Posteriormente, el agar disuelto en la otra tercera parte de agua, era agregado continuando con el calentamiento hasta lograr una textura homogénea, una vez que se hubieran integrado todos los ingredientes.

La dextrosa es añadida justamente antes de vertir el medio en botellas de 500 ml., de boca chica y tapón de rosca, para su posterior esterilización.

La tiamina se incorporaba al salir las botellas del autoclave.

Los medios de cultivo así embotellados, eran almacenados hasta el momento de ser utilizados.

Esterilización. Se llevó a cabo en autoclave a 15 lb/pul<sup>2</sup> durante 20 minutos.

Vaciado. Al salir las botellas con el medio de cultivo del autoclave, se dejaba un lapso suficiente para que la temperatura disminuyera a 45°, aproximadamente, con el objeto de evitar la excesiva acumulación de agua, producto de la condensación de vapor, sobre la superficie del medio de cultivo una vez que éste se haya solidificado. Al suceder esto último, las cajas se sellaban con cinta adhesiva (masking tape) quedando listas para su utilización en

el campo.

El vaciado se realizaba ante el mechero y empleando el paño con solución desinfectante, tres días antes de la recolección. Dicho lapso con el fin de constatar que, efectivamente, el medio de cultivo se encontraba estéril al momento de abrir por primera vez las cajas, al no producirse el crecimiento de ningún tipo de organismo durante ese tiempo.

En un inicio se pensó que el sellar las cajas sólo sería necesario para el transporte de las cajas del laboratorio al campo, y viceversa, pero el hecho de que, aún con todas las medidas de seguridad tomadas para evitar la intrusión de esporas y otros organismos dentro del laboratorio, la presencia de contaminantes en los cultivos se hacía evidente al pasar el tiempo, hizo obligatorio el trabajar siempre con las cajas selladas. Se pensó que el crecimiento se vería afectado al disminuir la circulación de aire, pero que esto era preferible a perder los aislamientos por contaminación. Sin embargo, no se observaron cambios en la tasa de crecimiento. Es posible que el abrir las cajas para su examen y para realizar las resiembras, procuró a los cultivos el oxígeno suficiente, además de que la cinta adhesiva no procuraba un aislamiento gaseoso total.

- c). Aislamiento. Todos los cultivos fueron aislados a partir de tejidos de carpóforos frescos siguiendo la técnica descrita por Watling (1981), empleando como inóculos fragmen-

tos de tejido productor de esporas (lámina) y del que se halla en la unión del estípote con el contexto del pileo.

Para la obtención de los fragmentos de lámina primero se retiraba el velo parcial cuidadosamente, tratando de no tocar las láminas, ni con la aguja de disección con que manipulamos el velo, ni con el velo mismo ya que en su superficie externa, que se encuentra en contacto con el ambiente, pudiera haber esporas, hongos o bacterias contaminantes.

Una vez retirado el velo, con otra aguja estéril se cortaron fragmentos de lámina procurando que fueran de la parte central de la misma. Si era posible, se retiraban varios fragmentos al mismo tiempo para evitar abrir la caja de Petri varias veces. Inmediatamente después de haber fijado el tejido a la aguja, ésta era acercada a la flama del mechero, mientras que con la otra mano se tomaba la caja de Petri acercándola a la flama para introducir el inóculo. La caja era abierta sólo lo suficiente como para que la aguja con el tejido pudieran penetrar al interior.

Una vez hecho esto, se volvía a sellar la caja etiquetándola y retirándola de la mesa de trabajo.

Posteriormente se procedía a abrir el carpoforo. Esto se realizaba únicamente con las manos. Con el pulgar e índice de ambas manos se fijaba el pileo y se procedía a partirlo simplemente abriendo el espacio entre las mismas. No se usó ni navaja ni bisturí para cortarlo, ya que se trató de evitar que el exterior del hongo entrara en contacto con el interior probablemente estéril.

Una vez expuesto el interior del píleo se obtenía el inóculo siguiendo el procedimiento descrito para las láminas, sólo que esta vez empleando el tejido del contexto que se halla en la unión con el estípite. Si el contexto resultaba escaso o muy delgado, el inóculo se obtenía de la parte interior del estípite situada en el ápice del mismo.

Siempre en una caja de Petri se colocaban varios fragmentos del mismo tejido con el fin de aprovechar toda la superficie de la misma. Cuando el inóculo se sembraba en tubo de ensaye se colocaban uno o dos fragmentos de tejido.

Como ya dijimos, los ejemplares elegidos para ser aislados fueron los más jóvenes y que poseían el velo parcial cerrado, hecho que nos brinda un tejido en crecimiento factible de seguir desarrollándose en cultivo y que, lo más probable, se encuentra estéril en su interior.

El aislamiento se verificó siempre el mismo día en que se colectaba el ejemplar, aproximadamente a las ocho horas.

d). Purificación. A partir del momento en que se sembraba el inóculo, las cajas de Petri eran sujetas a una vigilancia permanente con el objeto de detectar cualquier cambio. En este sentido podían suceder cuatro cosas:

1. Que la porción de tejido germinara permaneciendo libre de organismos extraños. En este caso se esperaba el tiempo suficiente para que las nuevas hifas se incrustaran en el agar y fuera posible la obtención de inóculos para la resiembra.

2. Que la porción de tejido germinara pero que al mismo tiempo proliferaran otros hongos, levaduras o ácaros. Cuando esto sucedía, se procedía a transferir el tejido con o sin crecimiento a otra caja limpia, desechando la anterior.

En el caso de encontrar ácaros, la caja era mantenida fuera del laboratorio para no correr el riesgo de infectar a los demás aislamientos.

3. Que el inóculo fuera invadido por levaduras, larvas de dípteros, hongos parásitos, etc., presentes en el tejido desde el momento de obtener el inóculo. En este caso se aislaban las especies de hongos parásitas para su posterior identificación.

4. Que el inóculo permaneciera estéril pero sin manifestar crecimiento. En este caso el tejido se guardaba por tiempo indefinido.

e). Propagación. Una vez purificados los cultivos se procedía a resemar en los dos medios de cultivo mencionados.

Primera resiembra. Se llevaba a cabo en dos cajas de Petri por cada medio de cultivo para cada aislamiento.

Al cabo de cuatro semanas se elegía una caja por cada medio, aquella que mostrara crecimiento más vigoroso, para realizar la segunda resiembra.

Simultáneamente se observaba al microscopio con el fin de registrar los tipos celulares presentes, ya sea para constatar que éstos se mantenían dentro de

"lo esperado" o para detectar el desarrollo de alguna estructura característica de otro grupo de hongos. Cabe decir que los micelios, aún cuando mostraran todas las posibilidades de ser de Amanita, hasta que no fueran confirmados por microscopía electrónica o por la presencia de fíbulas, seguirían siendo "micelios sospechosos".

Segunda resiembra. Del margen de una colonia de cuatro semanas se obtenía un cubo de agar de aproximadamente 3 mm<sup>2</sup>, el cual era utilizado como inóculo para la segunda resiembra. Como en la resiembra anterior el inóculo era colocado en el centro de la caja de Petri, empleándose cuatro cajas por cada medio de cultivo para cada una de las cajas elegidas de la primera resiembra.

Transcurridas nueve semanas se procedía a la caracterización y a la aplicación de la técnica de microscopía electrónica para la observación del septo doliporo.

- f). Preservación. Al momento de hacer la segunda resiembra se inoculaban tubos de ensaye con medio de cultivo con el fin de crear un pequeño cepario o almacén de micelios. La operación se hacía por triplicado por cada especie y en ambos medios de cultivo, pensando en depositar tres juegos en tres lugares distintos como medida de seguridad que impida la desaparición accidental del aislamiento.

Estos tubos almacenadores se mantienen en refrigeración

aproximadamente 4°C requiriendo sembrarse el micelio cada tres o cuatro meses.

Además de las resiembras practicadas para la realización de las observaciones, se han hecho varias con el objeto de dejar que lentamente se deshidraten a temperatura ambiente, pensando que si permanecen viables ésta puede ser una manera de conservar el micelio. Asimismo, otros tres juegos de tubos almacenadores permanecen sin refrigeración.

g). Recolección y manejo de ejemplares. Con el objeto de recolectar especímenes de Amanita que nos pudieran servir como fuente para la obtención de inóculos, se realizaron varias salidas al campo que comprendieron localidades previamente exploradas, ricas en especies del género.

1. Teziutlán, Puebla. Bosque mesófilo de montaña; bajo Quercus crassifolia, Q. candicans, Alnus jorullensis y Clethra mexicana (Aroche, et al, 1984)

Se recolectaron especímenes durante las fechas que van del 21 al 23 de junio, del 25 al 28 de julio y del 15 al 18 de septiembre de 1986.

2. Molango y Tlanchinol, Hidalgo. Bosques mixtos de Pinus-Quercus y mesófilo de alta montaña, respectivamente. Del 8 al 11 de agosto de 1986.

3. Altotonga, Veracruz. Bosque de Pinus sp. Del 19 al 20 de septiembre de 1986.

La descripción del material fresco se hizo siguiendo la terminología propuesta por (Scates, 1982).

El color de los basidiocarpos se determinó según el ma

nual de Methuen (Kornerup y Wanscher, 1978).

A cada ejemplar le era asignada una etiqueta con un número congruente con la numeración de las papeletas en las que eran transcritas las descripciones en limpio.

Al tiempo en que se describían los especímenes, se verificaba la selección de los ejemplares que habrían de ser aislados, a lo cual se procedía una vez completada la descripción.

En el momento de la selección los números que correspondían a cada ejemplar, eran anotados en una libreta y, posteriormente, en la etiqueta de la caja de Petri.

Una vez descrito y aislado, el ejemplar era deshidratado al calor de una parrilla eléctrica en una secadora especialmente diseñada para tal efecto. Una vez seco, cada ejemplar fue colocado en una bolsa de plástico junto con la papeleta que contenía su descripción, la cual sería completada posteriormente al verificarse la caracterización microscópica en el laboratorio.

-La descripción microscópica se realizó con base en las técnicas de Bas (1969) y Largent et al, (1977).

-La identificación de los ejemplares seleccionados se realizó siguiendo los criterios de Bas (1969), y Jenkins (1986).

- h). Caracterización de micelios. La caracterización de los cultivos fue macro y microscópica, siguiendo los procedimientos empleados por varios autores (Campbell y Petersen, 1975; Nobles, 1965; Pantidou et al, 1983, principalmente).

Caracteres macroscópicos. Se tomaron en cuenta los siguientes: color, textura y tasa de crecimiento de la colonia. Esta última medida con base en el diámetro alcanzado en un lapso determinado (9 y 16 semanas).

Se empleó guayacol para la detección de oxidasa extracelular (Singer, 1986).

Caracteres microscópicos. Considerando la forma, el tamaño y el grosor de la pared celular, se registraron distintos tipos celulares.

Para su descripción al microscopio óptico se obtenían muestras de tres regiones de la colonia: zona de avance o margen, zona media y zona central. Con una aguja de disección se obtenían pequeñas porciones de micelio provenientes de varios puntos de las zonas antes citadas, procurando que estuvieran distribuidos uniformemente de modo que los datos fueran representativos. Dependiendo del grado de diferenciación del micelio variaba el número de puntos.

Dada la homogeneidad observada en el crecimiento de cada aislamiento, y a la ausencia en la mayoría de los casos de algún tipo de zonación en cuanto a caracteres "atípicos", que proliferaran en regiones o puntos anárquicamente dispuestos, la caracterización se efectuó de una manera fluida y sin muchas dificultades, concordando la aparición de tipos celulares con la edad del micelio, de modo que el iniciar nuestras observaciones con el margen y finalizar con el centro de la colonia, nos permitió apreciar la evolución de la diferenciación de algunos tipos celulares específicos.

Las preparaciones se efectuaban mediante un ligero "squash", después de teñida la muestra. En el caso del micelio sumergido, después de eliminar el micelio aéreo, uno o dos fragmentos que abarcaran al micelio incrustado eran extraídos de otro fragmento más grande (4mm) que había sido cortado de la colonia.

El micelio aéreo se observaba después de esparcir los filamentos con la ayuda de agujas y pinzas, de modo que el empalmamiento de células no dificultara su observación.

Las preparaciones, temporales, se hacían con agua, KOH, rojo congo, Melzer y azul algodón.

Una vez realizada la descripción de cada caja de Petri (4 por cada medio de cultivo por cada especie) se procedió a la caracterización general del aislamiento y a la elaboración del código de especie con el empleo de la clave de Nobles (1965).

i). Confirmación de las cepas.

La observación del septo doliporo con la ayuda del microscopio electrónico de transmisión electrónica, en el presente caso, se logró mediante la utilización de una técnica muy difundida, empleada de manera rutinaria en la mayoría de los laboratorios de microscopía electrónica y que se encuentra descrita en libros de texto básicos como Hayat (1978) y Sjöstrand (1967). Dicha técnica permite la tinción general de los componentes celulares. En resumen consiste de lo siguiente:

1. Empleando cultivos de PDA de 9 semanas se obtuvieron pequeños bloques de agar y micelio de 1 mm<sup>2</sup>, aproximadamente, en su base menor, cuadriculando toda la mata con una navaja.
2. Los bloques de tejido fueron fijados en glutaraldehído al 2.5% amortiguado a pH 7.3 con buffer de fosfatos 0.16 M durante 1 hora a temperatura ambiente.
3. Después de lavar con tres cambios de amortiguador se post-fijó el tejido con tetraóxido de Osmio al 1% con el mismo amortiguador, por 1 hora, a temperatura ambiente.
4. Posterior a otro lavado con la solución "buffer" se deshidrató con etanol en soluciones graduales hasta etanol absoluto.
5. Se incluyó el material en Epon 812 polimerizado a 60°C durante 24 horas.
6. En un microtomo manual "Sorvall" se realizaron cortes de 60 nm aproximadamente, los cuales fueron colocados sobre rejillas de cobre cubiertas con una membrana de Formvar.
7. Los cortes se contrastaron con acetato de uranilo al 5% y citrato de plomo 0.3 M, lavando con agua destilada antes y después de la tinción.
8. Las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico modelo "EM 9" de la casa "Carl Zeiss".

El contrastado se hizo colocando la rejilla de cobre con el corte sobre una gota de colorante dentro de una caja de

Petri con el fondo cubierto con papel filtro.

Hasta el momento las cepas confirmadas son las que se reportan en el presente trabajo. Se han aislado micelios que microscópicamente corresponden a la morfología de Amanita (células vesiculares, helicoidales, etc.) pero que habrán de considerarse como "micelios sospechosos" en tanto no se confirme su origen.

## RESULTADOS

Amanita abrupta Peck

Aislamiento Aa 1: Ejemplar recolectado el 25 de julio de 1986 en Teziutlán, Puebla. En bosque de Quercus. Aislado a partir de lámina.

Código de especie: 2.6.10.22.26.32.36.38.47.56.  
(con base en Nobles, 1965. Ver apéndice I).

## CARACTERIZACION DE LOS CULTIVOS

Colonia en MA a las 9 semanas

a). Descripción macroscópica.- Los fragmentos de lámina germinaron exhibiendo finos filamentos hifales en toda su superficie. Sin embargo, previamente al crecimiento filamentososo, las láminas mostraron una turgencia o hinchamiento que terminó por conferirle a las mismas una textura verrucosa, posteriormente proyectando las hifas que habrían de invadir el agar a las dos semanas de la siembra.

En las resiembras sucesivas el mismo fenómeno se presenta, ya que el inóculo aumenta de tamaño creciendo sobre sí mismo en forma rugosa, y no es sino hasta que transcurre un mes aproximadamente, que inicia la producción de micelio aéreo, el cual, a las nueve semanas presenta las siguientes características:

Diámetro de la colonia de 15 a 45 mm. Micelio blanco, algodonoso, principalmente aéreo. Crecimiento homogéneo y vigoroso, las hifas se extienden hasta 3 mm., aproximadamente, sobre el agar. Margen uniforme. Sin olor. La prueba para oxidasa extracelular fué positiva; al aplicar guayacol al micelio éste adquirió una coloración vinácea en un lapso de tres

minutos.

b). Descripción microscópica.- Hifas generativas sin fíbulas presentando la siguiente morfología:

Zona de avance y zona media

- i) Hifas filamentosas, simples, delgadas (1-2 $\mu$ m), pared fina, contenido homogéneo, en arreglos más o menos paralelos o entrelazadas unas con otras. En micelio aéreo.
- ii) Hifas helicoidales de diámetro uniforme (2-3 $\mu$ m), pudiendo observarlas individualmente formando "bulbilos", entre varias formando "nudos" o trenzadas en forma de "zarcillos" (Fig. 5). En micelio aéreo.
- iii) Filamentosas de 2-3 $\mu$ m de diámetro, con pared delgada, ensanchándose en el ápice (3.5-5 $\mu$ m) formando vesículas ovals; con gemaciones muy frecuentes con la misma forma. En micelio aéreo. (Fig. 6).
- iv) Filamentosas de diámetro variable, hifas de 1 $\mu$ m que repentinamente dan lugar a hinchamientos de hasta 3 y 4 $\mu$ m. Dispuestas laxamente de manera intrincada. En micelio sumergido. (Figs. 7 y 8).
- v) Hifas simples, más gruesas (3-4 $\mu$ m) con ápices ligeramente ensanchados. En micelio sumergido. (Fig. 11a).

Zona centro.- Además de las anteriores se observan:

- vi) Células vesiculares de 5-7 $\mu$ m de diámetro, con forma variable tendiendo a ser redondeadas, con paredes finas, contenido granular más o menos homogéneo, formando cadenas de 5 a 7 células en segmentos terminales. (Fig. 10). En micelio aéreo.

- vii) Células moniliformes de 5-7 X 6-9  $\mu\text{m}$  con paredes refringentes engrosadas ligeramente de manera irregular principalmente en los puntos de unión con otras células. Desprendidas individualmente o unidas en cadenas cortas de 2 a 3 células, poco frecuentes. (Figs. 9 y 11 b). En micelio sumergido.
- viii) Hifas de diámetro irregular de 2-5 $\mu\text{m}$ . No existe uniformidad en las formas aunque tienden a ser filamentosas; con ramificaciones azarosas e hinchamientos desiguales. En micelio sumergido son el tipo más común. (Fig. 11c)

#### Colonia en MA a las 16 semanas

- a). Descripción macroscópica. Colonia de 20-55mm de diámetro, igual que en 9 semanas.
- b). Descripción microscópica. No se observan cambios en la morfología de las células, a excepción de que en la zona central las células filamentosas se encuentran vacías, observándose también un incremento en la frecuencia de células vesiculares, como las anteriormente descritas, en las zonas media y central.



Fig.5

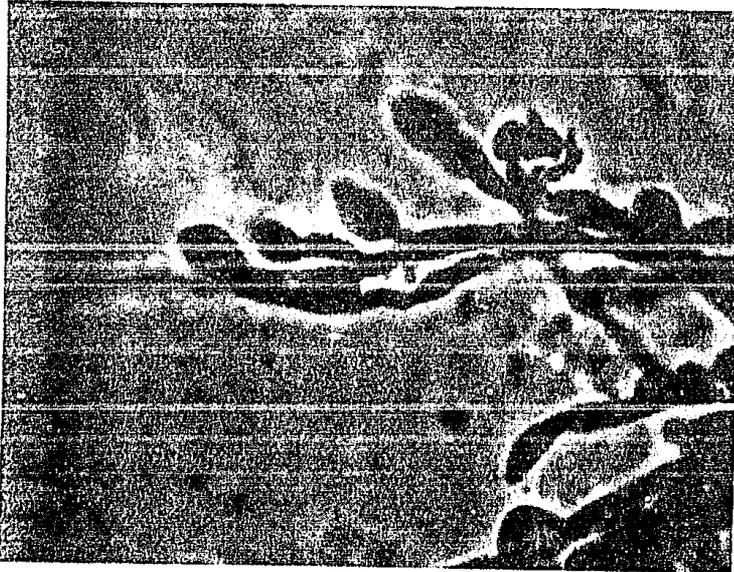


Fig.6

Amanita abrupta. Cultivos en MA.

Fig.5. Hifas helicoidales en nudos o bulbilos. 1500 x.

Fig.6. Filamentos con ápices ensanchados en forma de vesículas ovales. 1500 x.

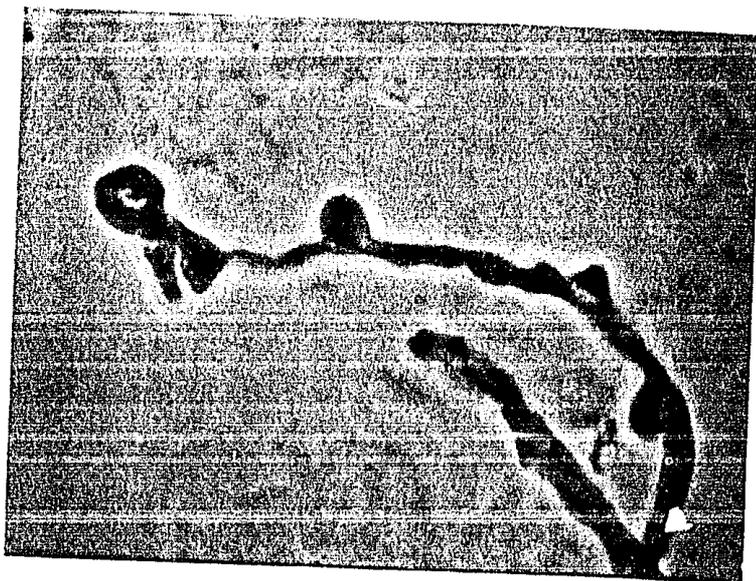


Fig. 7

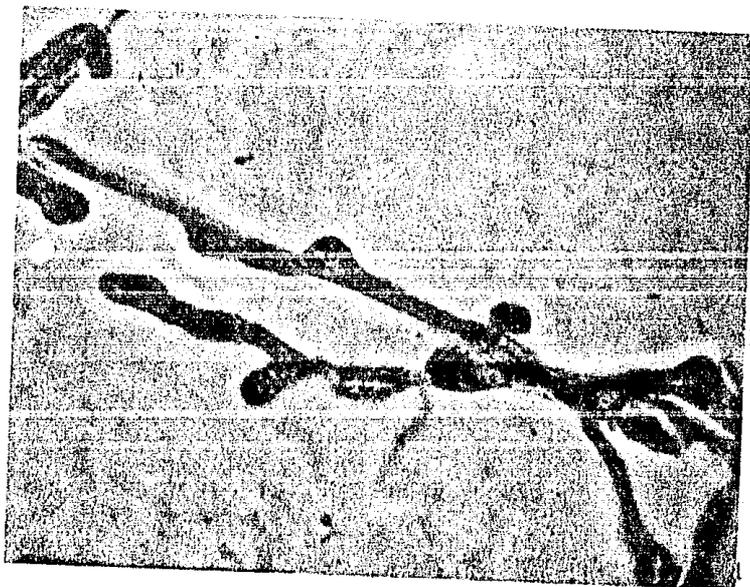


Fig. 8

Amanita abrupta. Cultivos en MA.

Figs. 7 y 8. Filamentos de diámetro variable con hinchamientos y gemaciones. 1500 x.



Fig. 9



Fig. 10

Amanita abrupta. Cultivos en MA.

Fig. 9. Células moniliformes en cadenas cortas ( $\blacktriangleright$ ).  
1500 x.

Fig. 10. Células vesiculares e hifas helicoidales en "zarcillos". 1500 x.

FIG.11  
Amanita abrupta (MA)

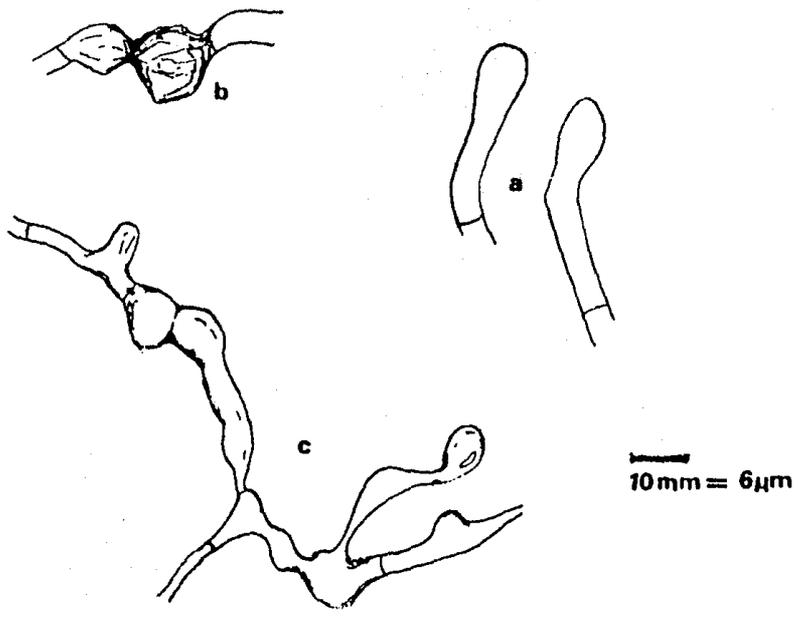


Fig.11, Amanita abrupta. Cultivos en MA. a: hifas simples con ápices ligeramente ensanchados, b: células moniliformes con paredes engrosadas, c: hifas de diámetro y forma irregulares.

Colonia en PDA a las 9 semanas

a). Descripción macroscópica. Diámetro de la Colonia de 10 a 55mm. Micelio algodonoso blanco, aéreo, alcanzando gran altura sobre la superficie del agar hasta llegar a tocar la tapa de la caja de Petri (9mm). Crecimiento homogéneo, margen uniforme, sin olor.

Como en MA hay una fase inicial de crecimiento rugoso.

b). Descripción microscópica.

Zona de avance y zona media. Además de los tipos celulares observados en las mismas zonas en MA, se presentan las células moniliformes como las descritas en ese medio para la zona centro, así como otro tipo celular nuevo:

1) Hifas anchas (4.5-6 $\mu$ m) con hinchamientos seriados, redondeados y simétricos, dándole una apariencia ondulada al contorno del filamento (Fig. 12a). En micelio aéreo.

Zona centro. La mayoría de las células son vesiculares formando grandes masas y conglomerados junto con hifas de forma tortuosa o azarosa y diámetros variables, dando la apariencia de un pseudot Tejido. Dentro de las células vesiculares encontramos los tipos antes descritos así como otras que representan un estado más avanzado de las hifas seriadamente hinchadas que se observan en la zona media, ya que se puede ver la gradación que va desde hifas con ligeros ensanchamientos en serie hasta la formación de células vesiculares, y su desprendimiento como células moniliformes al incrementarse el tamaño de las mismas. Estas células moniliformes son dís

tintas a las observadas anteriormente, ya que su forma es subglobosa, sus paredes delgadas y su tamaño mucho mayor (12-17 $\mu$ m) (Fig. 12b).

#### Colonia en PDA a las 16 semanas

- a). Descripción macroscópica. Ningún cambio a excepción del diámetro que va de 30 a 90mm.
- b). Descripción microscópica. Aparte de los tipos antes mencionados, que en este caso aumentan su frecuencia en la zona media y central, encontramos lo siguiente:

Zona centro. La textura del pseudotejido es más firme y las formas de las células más caprichosas, mientras que en el micelio algodonoso aparece un tipo celular nuevo: células infladas de tres tipos.

- ii) Pedunculadas, con la base ensanchada, presentando gútulas refringentes en el interior que tiende a estar vaccío. Tomando su longitud y su parte más ancha, miden de 12-23 X 23-34  $\mu$ m, de acuerdo al Q que resulta de estas medidas su forma varía de elipsoides a cilíndricas, aunque son más angostas en uno de sus extremos. Pueden ser apicales o intercalares (Fig. 12c).
- iii) De 13.8 - 26 X 17-34  $\mu$ m (cortamente elípticas) y de 20-21 X 30-34 $\mu$ m (elipsoides). Algunas con gútulas refringentes, la mayoría vacías, con paredes arrugadas, raras veces unidas a filamentos (Fig. 12d).
- iv) Células infladas gigantes (7-30 X 46-76  $\mu$ m) de basiliformes a cilíndricas según el Q; vacías, paredes arruga

das. Desprendidas. Escasas (Fig. 12e).

### OTRAS OBSERVACIONES

Después de las 16 semanas, de manera variable, el micelio cesa su crecimiento, languideciendo el micelio aéreo. Sin embargo, en ocasiones la mata continúa expandiéndose hasta cubrir la totalidad de la superficie disponible.

En las resiembras sucesivas se nota una disminución en la tasa de crecimiento en la mayoría de los casos. En ocasiones el micelio crece rápidamente sin pasar por la fase de crecimiento rugoso. Asimismo, de manera inconstante se observa una zona de difusión alrededor del inóculo de color café a gris oscuro, en PDA.

Varios cultivos se guardaron con el objeto de constatar la posibilidad de que después de deshidratarse el micelio, éste volviera a germinar. Se ha podido observar, en cultivos de un año, la germinación y crecimiento, permaneciendo los caracteres constantes.

La prueba con guayacol para oxidasa extracelular fué positiva, el micelio adquirió una coloración vinácea a los cinco minutos de la aplicación del reactivo.

El septo doliporo observado en el micelio corresponde con la descripción del septo de holobasidiomicetes que se hizo en la pág. 29. Todas las estructuras que se mencionan en la misma pueden ser identificadas en las fotomicrograffias que muestra la fig. 13. La presencia del septo doliporo y de las células infladas confirman que la cepa que aquí se ha descrito, corresponde a Amanita abrupta Peck.

FIG.12  
*Amanita abrupta* (PDA).

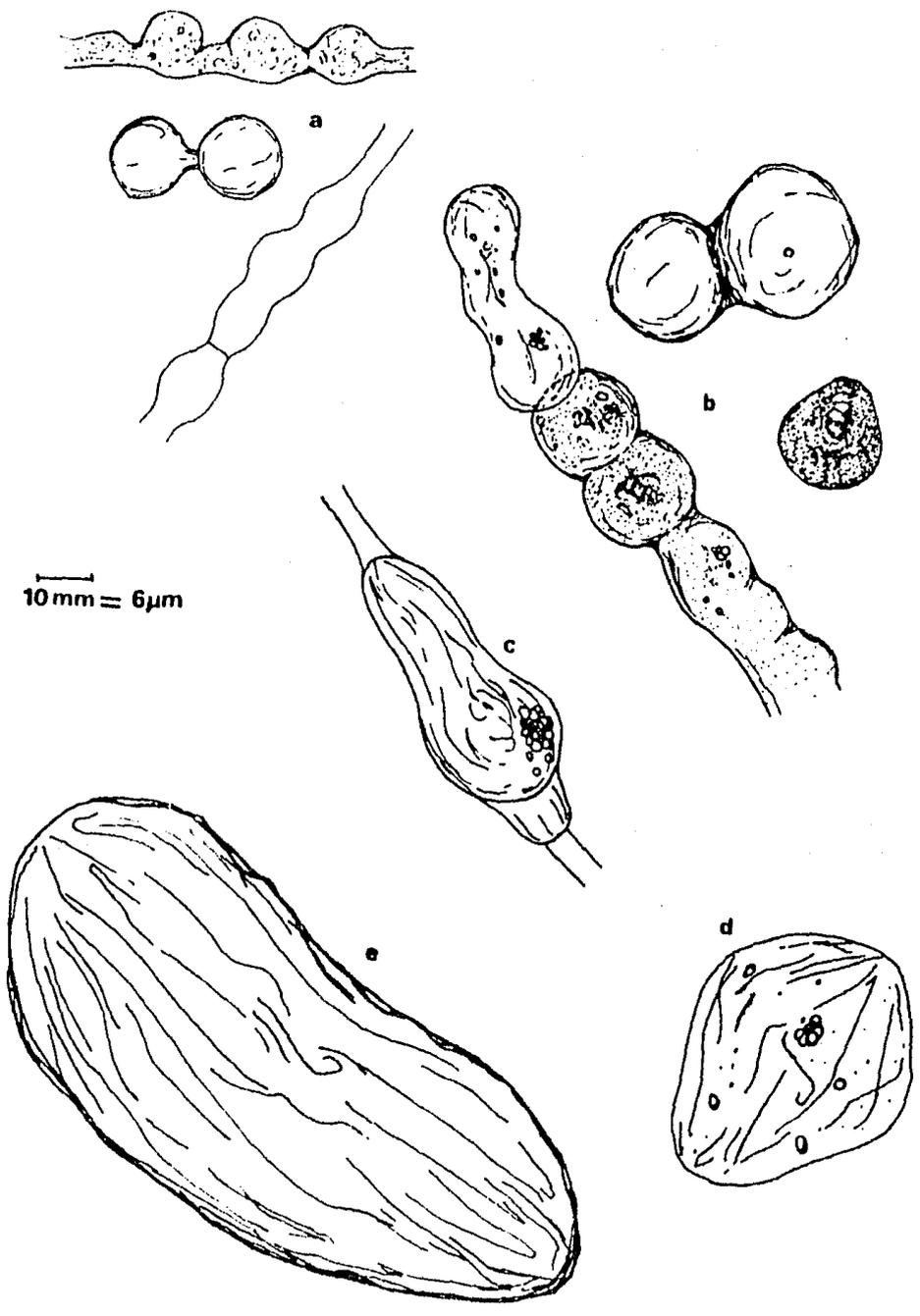




Fig. 13. Septo doliporo en Amanita abrupta. 22,000 x.



Fig. 13. Septo doliporo en Amanita abrupta. 22,000 x.

Amanita gemmata f. gracilis Konrad y Maublanc (1925)

Aislamiento Ag 1: Ejemplar recolectado el 25 de julio de 1986 en Teziutlán, Puebla, En Bosque de Quercus. Aislamiento obtenido a partir de lámina, en PDA.

Código de especie: 2.6.26.32.36.38.47.56.  
(con base en Nobles, 1965. Ver apéndice I).

#### CARACTERIZACION DE LOS CULTIVOS

A los diez días de realizado el aislamiento se observó germinación de la porción de tejido. Sin embargo, durante dos meses éste no logró invadir el agar, creciendo únicamente sobre el inóculo en forma de finos filamentos, postrados, blancos y de poca densidad. Pasado este lapso el crecimiento se aceleró, el micelio invadió el agar como un finísimo terciopelo blanco, formando un anillo de crecimiento denso alrededor del inóculo, en el que posteriormente desarrolló la misma textura. Once semanas después del aislamiento, cuando el micelio creció 5mm alrededor del centro, se practicaron las resiembras.

#### Colonia en MA a las 9 semanas

- a). Descripción macroscópica. Diámetro de la colonia de 5-10mm. Micelio principalmente sumergido, blanquecino, laxo, translúcido. El micelio aéreo sobresalió apenas del agar en forma de una tenue peluza blancuzca. Margen irregular, crecimiento lento.
- b). Descripción microscópica. Micelio indiferenciado consistente de hifas filamentosas delgadas, simples, de 1 a 3µm de diámetro con gemaciones digitiformes finas y pseudofibras o brotes contiguos a septos, algunas veces múltiples. Puentes

plasmogámicos frecuentes.(Figs. 14 y 16e).

Colonia en MA a las 16 semanas

- a). Descripción macroscópica. Colonia de 22 a 30mm de diámetro. Con las mismas características que para 9 semanas, a excepción de que en la zona central del micelio ya no es translúcido, siendo blanco, más denso.
- b). Descripción microscópica. Micelio casi totalmente indiferenciado a excepción hecha de la presencia de hifas helicoidales en forma de "zarcillos" o individualmente poco espiraladas. En ocasiones se observa material refringente sobre la superficie externa de la pared de algunas hifas, asimismo, el contenido de algunas células se muestra totalmente refringente.

Colonia en PDA a las 9 semanas

- a). Descripción macroscópica. Colonia de 4 a 12mm de diámetro. Micelio principalmente aéreo, como gamuza tersa, filamentos muy cortos, crecimiento uniforme, margen regular.
- b). Descripción microscópica. Filamentos simples de 1 a 3 $\mu$ m de diámetro, frecuentemente formando zarcillos (Fig. 15). Brotes como los descritos para MA.

Colonia en PDA a las 16 semanas

- a). Descripción macroscópica. Micelio igual que para 9 semanas. Diámetro de la colonia de 25 a 60mm.
- b). Descripción microscópica. Además de lo ya descrito para MA y PDA de 9 semanas, en la zona central se observa lo siguiente:

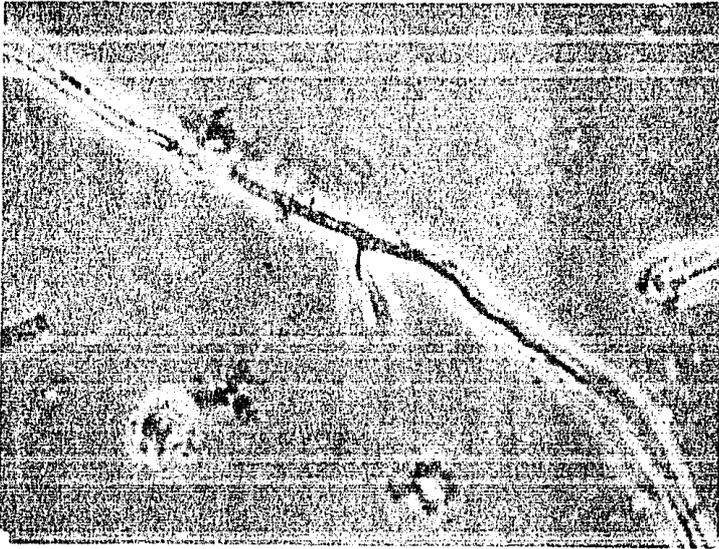


Fig. 14

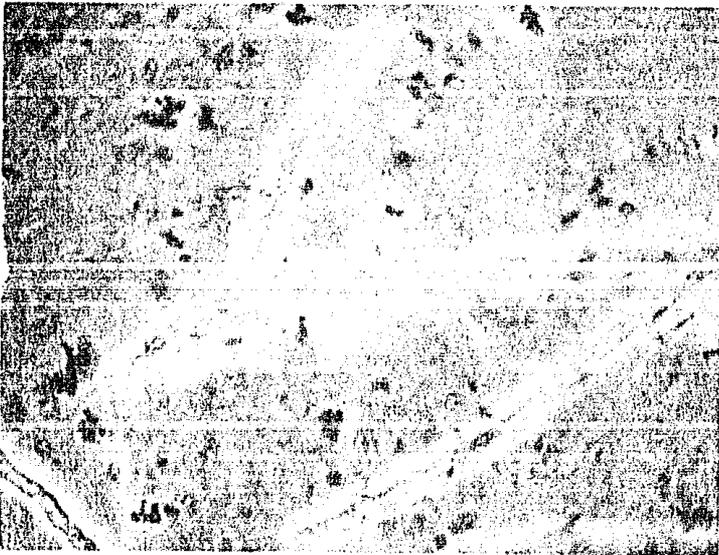


Fig. 15

Amanita gemmata i. gracilis. Cultivos en MA.

Fig. 14. Hifa delgada con gemación digitiforme. 1500 x.

Fig. 15. Hifas helicoidales refringentes en forma de zarcillos. 1500 x.

- i) Células con vesículas pequeñas (3-4 $\mu$ m) formando cadenas, cada célula por lo general presenta dos vesículas al estrecharse en el centro. Paredes delgadas, contenido más o menos homogéneo (Fig. 16a).
- ii) Filamentos anchos (6-8 $\mu$ m) formados por células en forma de huzo, de pared delgada, con gúttulas refringentes (Fig. 16b).
- iii) Células de 20 a 25 $\mu$ m de longitud, con contenido refringente de color amarillo (en agua y KOH), con hinchamientos seriados de diámetro variable (3-8 $\mu$ m). Terminales y unidas a filamentos mucho más delgados (1.5 $\mu$ m) (Fig. 16c).
- iv) Células de forma irregular y diámetro variable, con hinchamientos en células largas (27-40  $\mu$ m), pared delgada, contenido poco vacualizado (Fig. 16d).

#### OTRAS OBSERVACIONES

Después de las 16 semanas existe un lapso (30 días aproximadamente) en el que el crecimiento continúa uniformemente; luego, éste puede suspenderse permanentemente o continuar de manera intermitente formándose anillos de micelio de mayor o menor densidad alrededor de la mata.

En las resiembras se nota un aumento en la tasa de crecimiento.

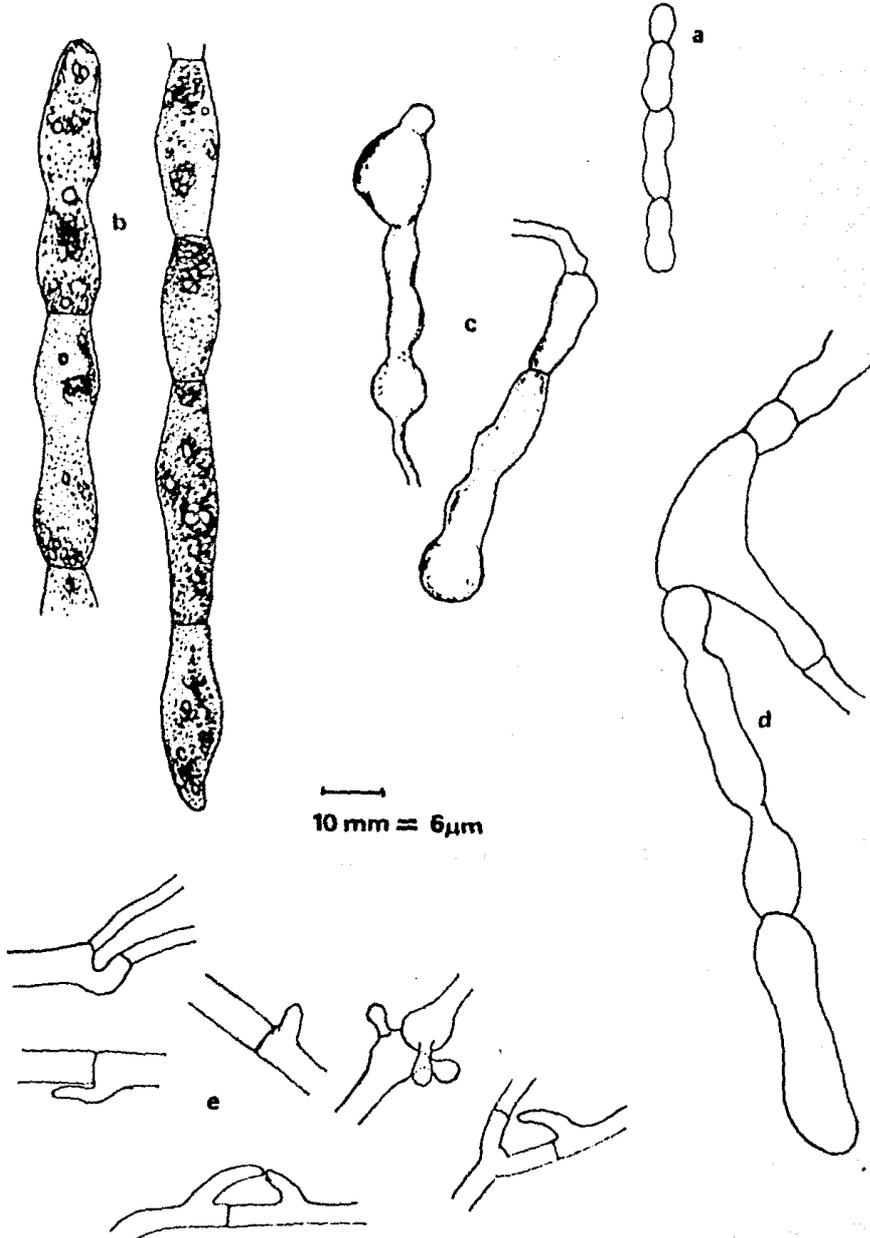
El micelio permanece viable al año de edad sin cambios aparentes en su morfología.

La prueba con guayacol para la detección de oxidasa extracelular fue positiva.

## CONFIRMACION DEL AISLAMIENTO

La estructura del septo doliporo observado (Fig. 17) corresponde a la de holobasidiomicetes, lo cual confirma que la cepa antes descrita corresponde a Amanita gemmata f. gracilis. Konrad y Maublanc (1925).

FIG.16  
*Amanita gemmata* f. *gracilis*



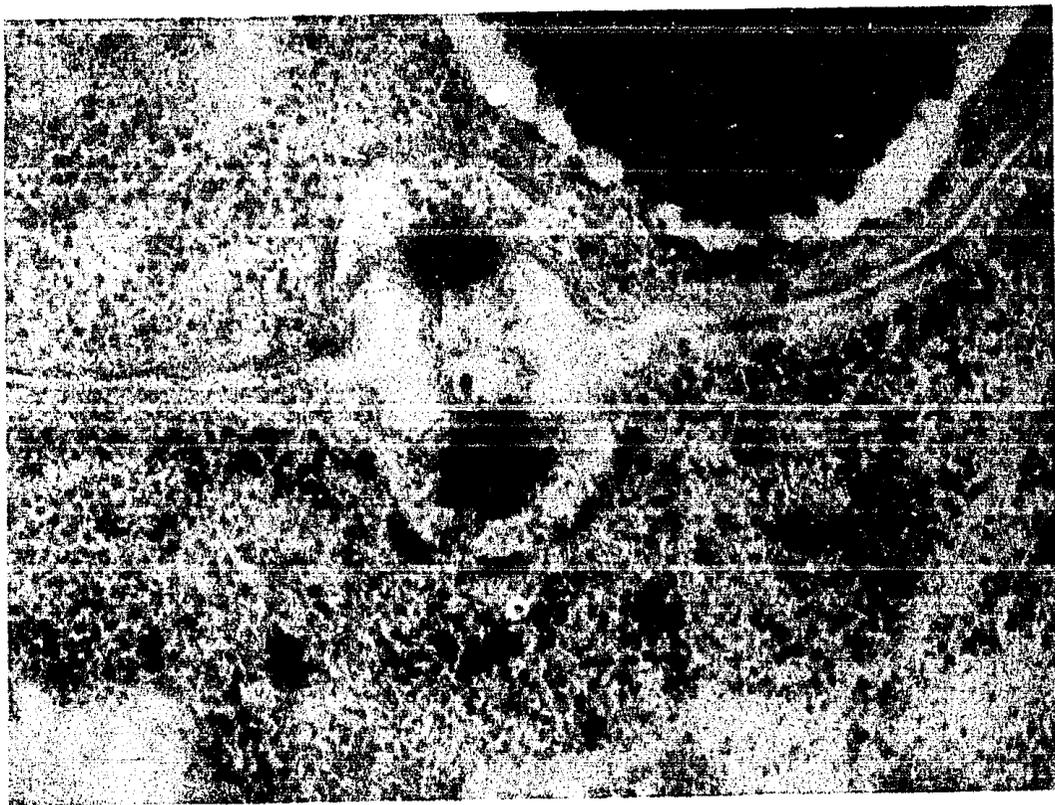


Fig. 17. Septo doliporo en Amanita gemmata f. gracilis. 99,000 x.

Amanita muscaria (L.; Fr.) Pers. ex Hooker.

Aislamiento Am 1: Ejemplar recolectado en Altotonga, Veracruz. En bosque de Pinus sp. El 19 de septiembre de 1986. Aislamiento obtenido a partir de lámina, en PDA.

Código de especie: 1.3.10.26.32.36.39.47.56 (con base en Nobles, 1965. Ver apéndice I).

Colonia en MA a las 9 semanas

a). Descripción macroscópica. Diámetro de la colonia muy variable, de 12 a 60mm. Micelio principalmente sumergido, laxo, con crecimiento más o menos uniforme. Se presenta micelio aéreo en la parte central, blanco como fieltro, laxo, elevándose escasamente sobre el agar. El micelio sumergido es blanquecino y translúcido.

b). Descripción microscópica.

Zona de avance. Hifas generativas delgadas (1-2 $\mu$ m); paredes finas la mayoría hialinas con algunos gránulos oscuros o refringentes; algunas con contenido totalmente refringente en preparaciones con agua y KOH (Fig. 18); poco fibuladas, fíbulas en medallón ("Medallion clamps"; Largent, 1981).

Zona media y zona central. Hifas generativas, frecuentemente fibuladas. De cuatro tipos morfológicos:

- i) Simples de 1 a 2 $\mu$ m de diámetro. Algunas veces presentan células vesiculares intercalares de 4-5 $\mu$ m (Fig. 19) casi esféricas, individuales.
- ii) Filamentosas simples de 3-4 $\mu$ m, con paredes delgadas.
- iii) Células moniliformes de 9 a 16 $\mu$ m de diámetro, redondeadas, algunas con gránulos refringentes, otras apa-

rentemente sin contenido. Muy escasas, se encuentran desarticuladas. (Fig. 20).

iv) Hifas helicoidales delgadas (1-2 $\mu$ m), con paredes finas, generalmente en forma de zarcillos; se pueden observar también de manera individual con espiralización laxa. (Fig. 21).

v) Hifas de diámetro variable formadas por células que presentan un segmento recto de 3-4 $\mu$ m, y otro en el que se ensanchan bruscamente (7.6-9 $\mu$ m) o de manera sinuada (4.6-6 $\mu$ m). En micelio sumergido.

#### Colonia en MA a las 16 semanas

a). Descripción macroscópica. Diámetro de la colonia de 55-90mm. Igual a la descripción hecha para nueve semanas a excepción de que la zona central de micelio aéreo se ha expandido de 5mm (9 semanas) hasta llegar a medir de 15 a 35mm en su diámetro, además de que se ha desarrollado una coloración ligeramente ocrácea al revés de la caja de Petri en el centro de la mata.

b). Descripción microscópica.

Zona de avance. Hifas de tres tipos morfológicos:

vi) Filamentos de diámetro uniforme (3.06 $\mu$ m), formados por células con uno de sus extremos ligeramente ensanchado y redondeado, sin fíbulas, pero presentan pseudofíbulas de una manera constante. Contenido granular poco denso, células apicales ensanchadas. (Fig. 22b).

La unión entre las células son del tipo 1 y 3, (Fig. 22n).

- vii) Filamentos de células que muestran hinchamientos bruscos (7.6-9.2 $\mu$ m) o sinuados (3.8-6 $\mu$ m), siendo el diámetro normal de la hifa de 3 a 3.8 $\mu$ m aproximadamente. (Fig. 22a). La unión entre las células de los tipos 2 y 3 (Fig. 22n).
- viii) Células vesiculares con uno o dos hinchamientos continuos, uno más grande (7.6 a 9.2 $\mu$ m) y otro más pequeño (4.6 a 5.4 $\mu$ m) tendiendo a formar cadenas de dos a cuatro células; de paredes delgadas y contenido homogéneo, granular (Fig. 22g).

Los tres tipos celulares se presentan en micelio sumergido. El micelio aéreo es muy escaso o ausente, estando compuesto de hifas filamentosas simples y delgadas (1.5 $\mu$ m), poco fibuladas.

Zona media. En el micelio aéreo hifas filamentosas de tres tipos:

- ix) Delgadas (1-1.5 $\mu$ m), sin contenido celular, formando conglomerados al entrelazarse unas con otras.
- x) Helicoidales, delgadas (1.5 $\mu$ m), individuales poco espiraladas, en zarcillos o creciendo alrededor de tipos celulares más grandes.
- xi) Gruesas (3-5.4 $\mu$ m), poco ramificadas, uniformemente cilíndricas, en arreglo paralelo y denso. Contenido homogéneo, refringente, frecuentemente fibuladas y con pseudofibulas dando origen a ramificaciones (Fig. 22c).

En micelio sumergido se observaron:

- xii) Filamentosas de 3 a 5.4 $\mu$ m de diámetro con tipo de unión 3 y 4; en azul algodón el contenido finamente granular con un cuerpo plano de forma estrellada adherido al in

- terior de la pared que se tiñe más densamente (Fig. 22k).
- xiii) Células alargadas de diámetro uniforme  $3\mu\text{m}$ ) con ambos extremos ensanchados ligeramente dando la apariencia de "huesos" o "falanges", en cadenas, contenido homogéneo ligeramente refringente (Fig. 22d).
- xiv) Células vesiculares grandes de  $7.6-12.2 \times 12.2-26\mu\text{m}$  de forma variable, pudiendo ser de más o menos elípticas a clavadas, en cadenas o solas intercaladamente. Frecuentemente fibuladas (Fig. 22e).
- xv) Vesiculares de  $15.3-18.4 \times 18.4-21.4\mu\text{m}$  con contenido granular y vacuolizado. En cadenas cortas o intercalares de manera individual (Fig. 22f).
- xvi) Células infladas apicales, vacías con la pared arrugada, de  $15-20 \times 23-28\mu\text{m}$ . Poco frecuentes. En micelio aéreo. (Fig. 22h).
- xvii) Células alargadas con diámetro ligeramente irregular caracterizadas por poseer en uno de sus extremos una lobulación que les confiere forma de "calceta". En su extremo más ancho midiendo de  $10.7-14\mu\text{m}$  mientras que en el más estrecho de 5 a  $6\mu\text{m}$ . El extremo lobulado se une a la célula siguiente según el tipo 4 (Fig. 22n) mientras que el otro mediante el tipo 2. Se localizan aisladas intercaladamente. Su contenido es granular y moderadamente vacuolizado (Fig. 22l).
- xviii) Células vesiculares de reniformes a faseoliformes, midiendo de extremo a extremo de 20 a  $30\mu\text{m}$  (el segmento de recta que une las puntas del arco) y de 9.18 a  $12.24\mu\text{m}$  en su diámetro mayor. Puede encontrárseles in

dividualmente conectando dos células, de manera aislada, o en zonas en que se hacen muy frecuentes, apicales e intercalares, formando conglomerados densos junto con otros tipos celulares (Fig. 22m).

xix) Células vesiculares cortas ( $6.12 \times 7\mu\text{m}$ ) en forma de "barril" frecuentemente pseudofibuladas, intercalares, solitarias (Figs. 22i y 22l).

xx) Células de forma azarosa formando uniones entre distintos tipos celulares.

Zona central. Todos los tipos celulares mencionados para la zona media los encontramos en la central, siendo en esta última más frecuentes las células interconectoras de formas caprichosas, así como mayor la densidad del micelio. Además de los anteriores, se presentan los siguientes tipos:

xxi) Células infladas de subglobosas a fusiformes, grandes, de  $15.3$  a  $24.5\mu\text{m}$  las primeras y de  $12.24-20 \times 21.4-32\mu\text{m}$  las segundas. Unidas en pares o individualmente desarticuladas, raras veces unidas a filamentos, cuando esto sucede, las células adyacentes son mucho más estrechas y se encuentran muy vacuolizadas o totalmente vacías.

En micelio aéreo (Fig. 22j).

En micelio aéreo es frecuente la presencia de filamentos que han perdido su contenido al mismo tiempo que se observan hifas jóvenes con gemaciones, así como los tipos antes mencionados.

En el micelio sumergido se presenta la estructura de un pseudo-tejido formado por células tanto maduras y senescentes (vacías), como indiferenciadas. Los tipos celulares se interconectan unos con otros directamente o mediante células amorfas, siendo estas últimas muy frecuentes.

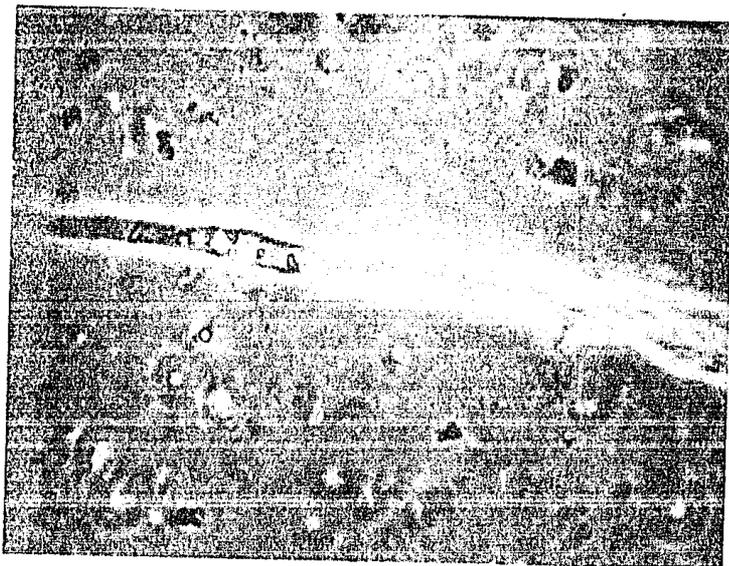


Fig. 18



Fig. 19

Amanita muscaria. Cultivos en MA.

Fig. 18. Célula refringente intercalar. 1500 x.

Fig. 19. Célula vesicular intercalar con gránulos refringentes. 1500 x.



Fig. 20

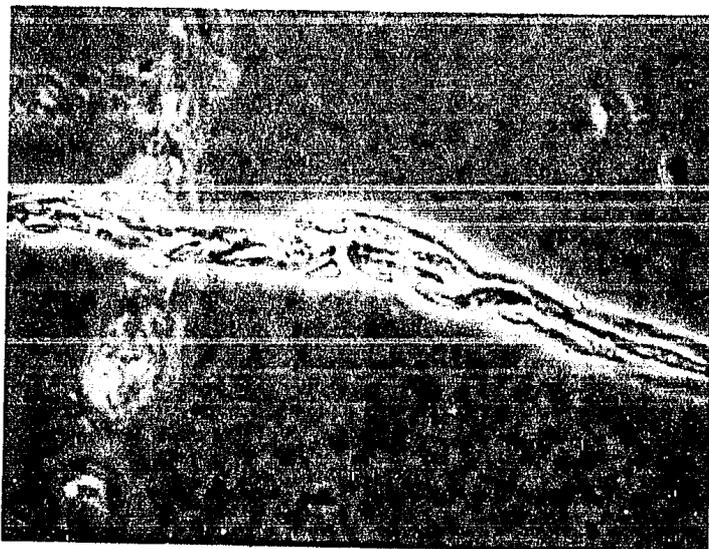


Fig. 21

Amanita muscaria. Cultivos en MA.

Fig. 20. Célula moniliforme, desprendida. 1500 x.

Fig. 21. Hifas helicoidales en zarcillos. 1500 x.

FIG.22

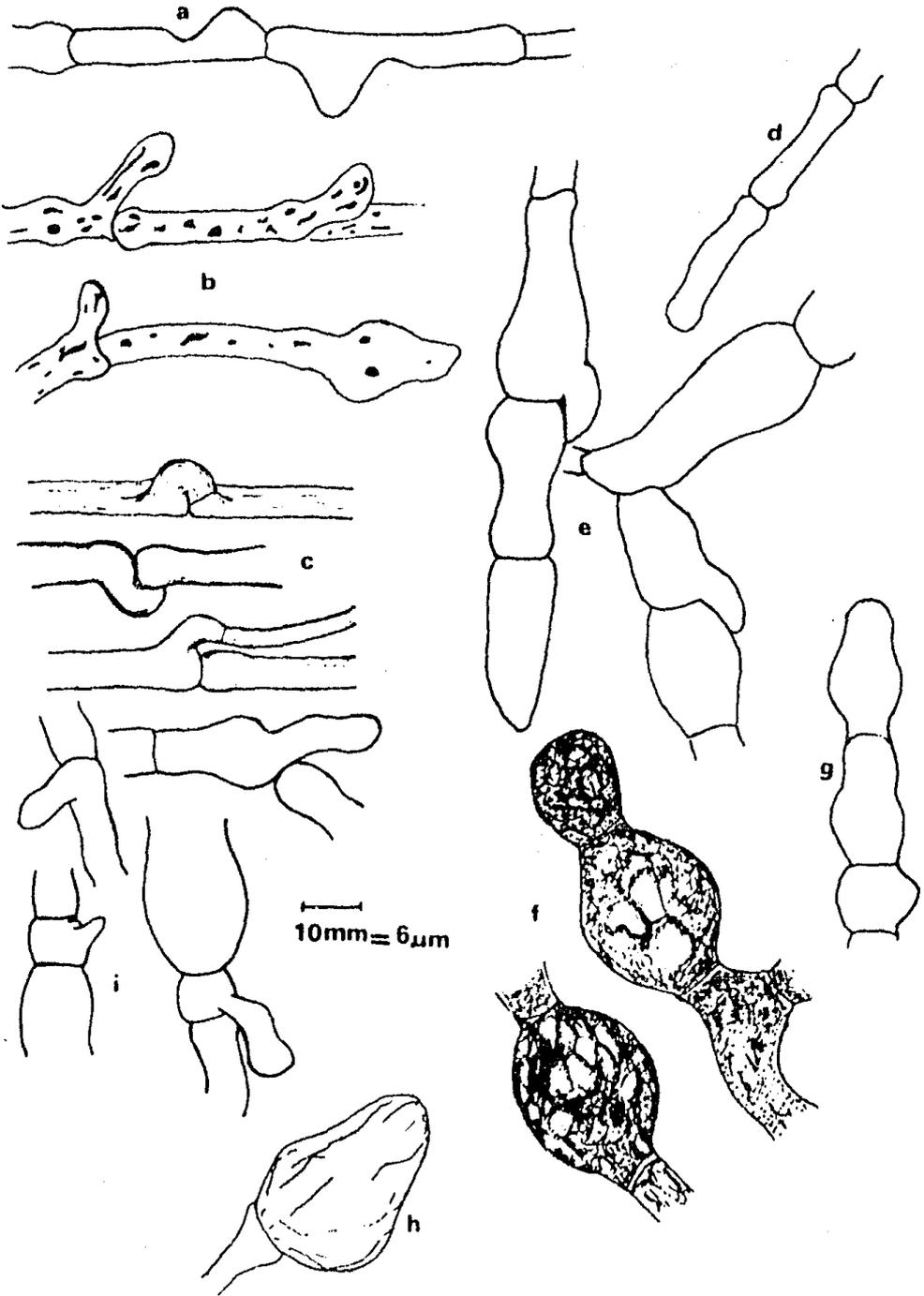
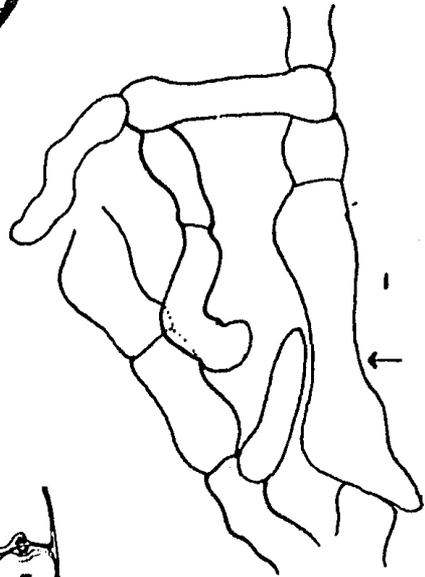
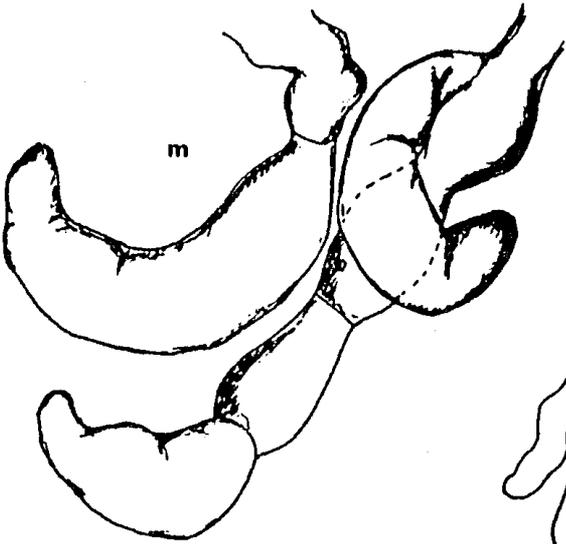
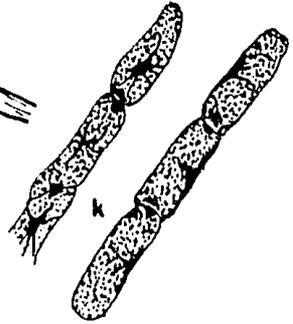
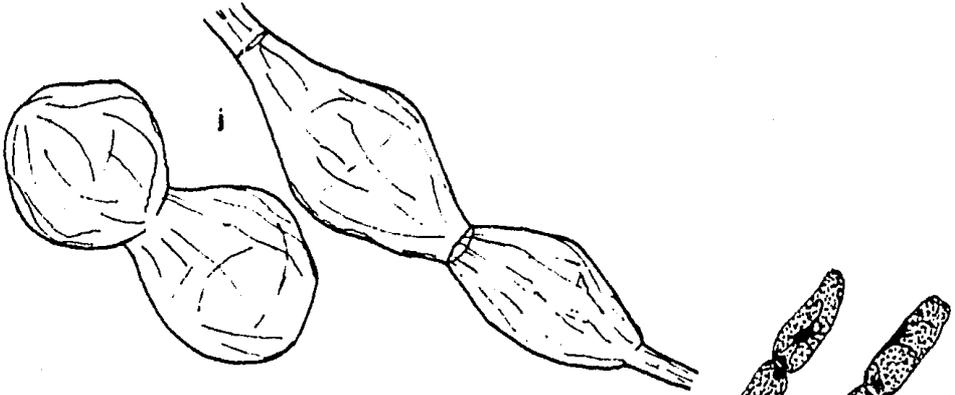
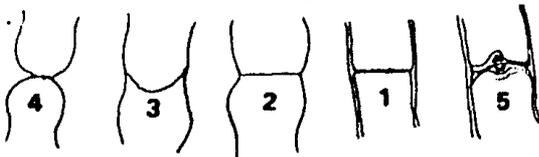
*Amanita muscaria* (MA)

FIG.22 (cont.)



n  
Tipos de union entre celulas



Colonia en PDA a las 9 semanas

- a). Descripción macroscópica. Diámetro de la colonia de 25 a 40 mm. Micelio blanco, compacto, de afelpado a algodonoso, principalmente aéreo. Crecimiento y margen uniformes. Al reverso de la caja de Petri se observa en el centro una colocación oscura café grisásea de 15 a 20 mm de diámetro.
- b). Descripción microscópica. En la zona de avance hifas generativas filamentosas, de 1 a 3µm de diámetro, consistentemente fibuladas, paredes finas, frecuentemente con contenido refringente.

Zona media. Hifas de cuatro tipos morfológicos:

- i) Hifas delgadas (1-3µm), frecuentemente fibuladas, con células intercalares vesiculares de 3-4µm de diámetro y contenido refringente. En micelio aéreo.
- ii) Filamentosas más anchas, de 3-4µm de diámetro. Fibuladas (Fig. 23b).
- iii) Helicoidales en zarcillos, delgadas (1-4µm). En micelio aéreo.
- iv) Células moniliformes grandes de 16 a 20µm de diámetro, más o menos globosas, escasas y desprendidas. Sin contenido o con gránulos refringentes y la pared ligeramente engrosada.

Zona central

- v) Hifas filamentosas de una micra de espesor, sin contenido celular, o con una luz muy delgada, paredes refringentes y ligeramente engrosadas de manera irregular.
- vi) Filamentosas de 2 a 4µm de diámetro con brotes y gema-

ciones frecuentemente fibuladas.

- vii) Hifas lobuladas en forma de "calceta" como las descritas anteriormente en la colonia en MA. Poco frecuentes.
- viii) Hifas contorsionadas, sin contenido, con la pared refringente ligeramente engrosada, ramificadas dendríticamente (Fig. 23f).

#### Colonia en PDA a las 16 semanas

- a). Descripción macroscópica. El diámetro de la colonia de 40 a 90mm, igual que en 9 semanas. La zona oscura al revés de la caja de 25 a 35mm.
- b). Descripción microscópica.

Zona de avance. En micelio aéreo, las hifas son filamentosas, muy poco ramificadas, con diámetro completamente uniforme tanto en la hifa individual como entre varias hifas (3 $\mu$ m), las células miden 150 $\mu$ m o más de largo; son consistentemente fibuladas, de contenido homogéneo y paredes delgadas (Fig. 23b).

En micelio sumergido encontramos los siguientes tipos morfológicos:

- ix) Hifas filamentosas como las anteriores, pero se unen unas con otras según el tipo 3 (Fig. 22n), ya que los extremos de las células se encuentran ligeramente ensanchados de tal manera que uno de ellos es simétricamente redondeado mientras que el otro se ensancha sólo hacia un lado. Este es el tipo celular más común (Fig. 23a).
- x) Hifas en forma de falange o "hueso" similares a las descritas para MA.

xi) Hifas con un extremo lobulado en forma de "calceta" como las observadas en MA. Poco frecuentes.

Zona media. Los tipos celulares mencionados para la zona de avance se presentan aquí también, siendo característicos en este caso, los siguientes:

- xii) Filamentosas delgadas sin contenido, formando redes intrincadas y densas.
- xiii) Filamentosas gruesas de 6 a 7 $\mu$ m, cilíndricas, con pared delgada y contenido heterogéneo y vacuolizado.
- xiv) Células vesiculares apicales, elipsoides, de 7.6-9 X 12 $\mu$ m. Contenido homogéneamente cianófilo, refringente en KOH en un inicio, después heterogéneo en distintos grados de vacuolización y de pérdida de material, habiendo algunas totalmente vacías, las más grandes. La célula a la que se encuentran unidas por lo general vacía y de 4.5 $\mu$ m de ancho. (Fig. 23c).
- xv) Células fusiformes en filamentos, con paredes ligeramente engrosadas. Diámetro de 27-33 X 7-9 $\mu$ m.
- xvi) Células hinchadas más o menos rectangulares, formando filamentos de 6-9 $\mu$ m. Contenido de finamente granular en azul algodón a vacuolizado o ausente. La pared muestra arrugas al irse perdiendo el contenido. En un mismo filamento pueden encontrarse estas gradaciones hasta encontrar segmentos totalmente vacíos. La pared engrosada de manera regular (Fig. 23d).
- xvii) Células infladas de 15-17 X 20-25 $\mu$ m, con paredes arrugadas, sin contenido, apicales, intercalares o desprendidas. De subglobosas a cilíndricas y amorfas (Fig. 23e).

xviii) Células de formas azarosas, tamaños variables y ramificaciones caprichosas (Fig. 23f).

Zona centro. El micelio aéreo casi totalmente formado por células sin contenido, generalmente filamentosas e infladas. Los tipos que permanecen con contenido son filamentos en crecimiento, con fíbulas y pseudofíbulas, siendo menos frecuentes.

En micelio sumergido, igual número de células vacías y llenas entremezcladas, de formas caprichosas extremas, así como contrastes entre dimensiones e hinchazones, cuyas uniones casi de manera constante presentan lo que parecería un doli-poro.

Los tipos celulares mencionados para las zonas anteriores se presentan en menor frecuencia, a excepción hecha de las células infladas que en esta zona son más frecuentes aunque con formas irregulares e indefinibles. La estructura del micelio es pseudoparenquimatosa (Ver apéndice I, No. 10) aun cuando no se observa coloración en las paredes como en A. rubescens.

#### OTRAS OBSERVACIONES

En las resiembras sucesivas se observó incremento de la tasa de crecimiento. En varios casos el micelio produjo una zona de difusión (en PDA) de color rosado, la cual se expande en todo el agar.

Después de un año el micelio continúa siendo viable, germinando en todos los casos.

No se detectó la presencia de oxidasa extracelular.

## CONFIRMACION DEL AISLAMIENTO

La descripción anterior aporta como evidencias para la confirmación de la cepa la presencia de fíbulas y de las células infladas.

Esto aunado a la observación del septo doliporo estructuralmente más complejo dentro de basidiomicetes (Fig. 24), deja pocas dudas sobre la identidad del micelio. Podemos decir que los cultivos aquí descritos pertenecen a Amanita muscaria (L.; Fr.) Pers. ex Hooker.

FIG.23

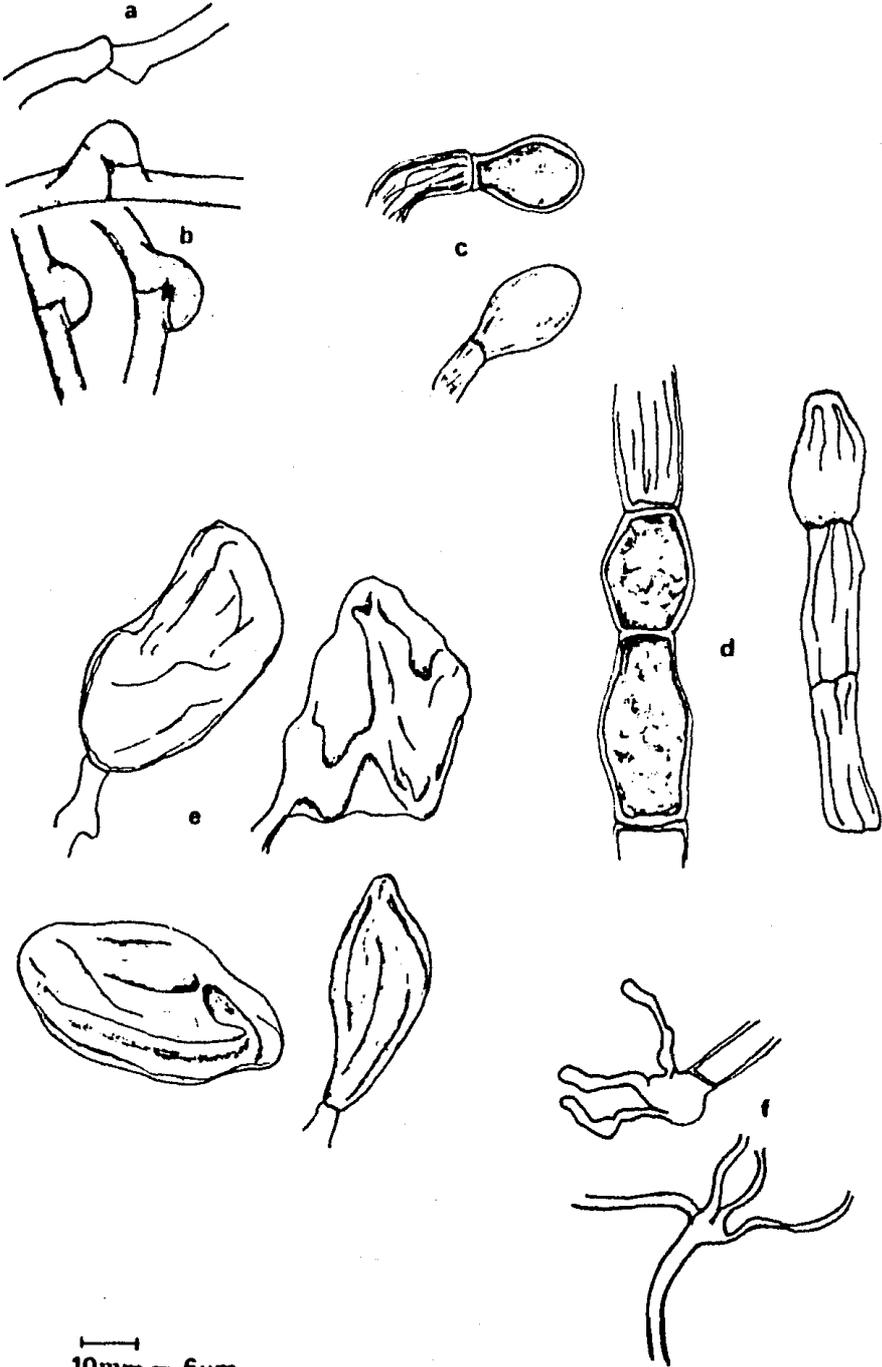
*Amanita muscaria* (PDA)



Fig. 24. Septo doliporo en Amanita muscaria. 78,000 x.

Amanita rubescens (Pers. Fr.) S.F. Gray.

Aislamiento Ar 1: Ejemplar recolectado el 25 de julio de 1986 en Teziutlán, Puebla. En bosque de Quercus sp. Obtenido a partir de tejido de contexto. En PDA.

Código de especie: 2.6.10.22.26.32.37.39.47.56.

Colonia en MA a las 9 semanas

- a). Descripción macroscópica. Diámetro de la colonia de 5 a 8mm. Micelio principalmente sumergido en un inicio blanquecino y posteriormente de color carne a café rojizo oscuro. El micelio aéreo muy tenue y laxo como una pelusilla blanquecina a color crema. Crecimiento lento e irregular, formándose zonas más densas en cuanto a micelio y coloración, correspondiendo éstas al centro. Hacia la periferia, el micelio se hace más difuso siendo translúcido y blanquecino, totalmente sumergido. Margen irregular y difuso.
- b). Descripción microscópica.

Zona de avance. Hifas principalmente filamentosas, células vesiculares poco frecuentes. Se presentan los siguientes tipos:

- i) Hifas germinativas delgadas (1-2 $\mu$ m), simples terminando en punta (Fig. 25a).
- ii) Hifas gruesas (3-4 $\mu$ m) con pared delgada y dos tipos de septo uno fino y otro ancho y refringente de aproximadamente 1 $\mu$ m. Algunas células apicales con contenido homogéneo y refringente (Fig. 25b).
- iii) Hifas helicoidales delgadas (1-2 $\mu$ m) en zarcillos, espi

ralas individualmente o formando nudos (Figs. 26, 27 y 28).

Zona central.

- iv) Filamentosas gruesas de 3-4 $\mu$ m, simples, frecuentemente con células esféricas intercalares, unas de 4-5 $\mu$ m con pared delgada y otras más grandes (6-7 $\mu$ m) con paredes ligeramente engrosadas y refringentes (Fig. 29).
- v) Células vesiculares formando cadenas cortas de dos o tres células con paredes refringentes separadas unas de otras por un septo grueso (1 $\mu$ m) y refringente. Poco frecuentes (Fig. 25c).
- vi) Células moniliformes de 7-15 $\mu$ m desprendidas, con pared delgada, contenido desde granular hasta ausente. Escasas (Figs. 30 y 31).

Colonia en MA a las 16 semanas

- a). Descripción macroscópica. Diámetro de la colonia de 10 a 25mm. Las zonas en que el micelio es más denso se elevan sobre el agar, como parches planos o "mesetas" de 2 a 4mm de diámetro siendo redondeados y compuestos de tejido compacto de color café rojizo oscuro. El aumento en el diámetro de la colonia compuesto de micelio sumergido, blanquecino, laxo, translúcido, dando la apariencia de vaho. Únicamente el centro presenta micelio aéreo en forma de filamentos dispersos como peluza, blanquecina o cremosa. Margen irregular.
- b). Descripción microscópica.

Zona de avance.

- vii) Filamentosas de 4.5-6 $\mu$ m de diámetro, con pseudofibras

anchas (4.5 $\mu$ m) (Fig. 25e).

- viii) Células intercalares homogéneamente refringentes de color amarillo con diámetro de 3 a 9 $\mu$ m, generalmente cilíndricas, otras vesiculares de forma irregular (Fig. 25f).
- ix) Células apicales en forma de "raqueta". Miden 9.2 X 10.7 $\mu$ m de manera constante. Contenido homogéneamente refringente, pared ligeramente engrosada. En su unión con el filamento presentan un segmento recto de 6.1 $\mu$ m de largo (Fig. 25g).

#### Zona media.

- x) Filamentos contorsionados formados por células de 7-10 $\mu$ m de diámetro, no ramificadas, con gúttulas refringentes o con un cuerpo refringente homogéneo en el centro de la célula (Fig. 25m).
- xi) Células con lobulaciones, intercalares de 4-5 $\mu$ m de grosor (Fig. 25i).
- xii) Vesiculares fusiformes, intercalares, solitarias o en cadenas de tres a seis células, miden de 6-8 X 12-17 $\mu$ m (Fig. 25j)

#### Zona centro.

- xiii) Células en forma de raqueta más grandes (13-15 X 17-18 $\mu$ m) con paredes arrugadas y contenido refringente en gúttulas. Frecuentemente con brotes o gemaciones. Otras sin contenido. (Fig. 25h).
- xiv) Hifas vesiculares de 9-15 X 10-20 $\mu$ m con contenido refringente en gúttulas. Desarticuladas o unidas por

segmentos rectos entre sí, en pares.

- xv) Vesiculares en tríadas, formando un conjunto de forma arriñonada, que se observó siempre desarticulado (Fig. 25k).
- xvi) Células infladas, hialinas de 12-15(21) X 12-17(23)µm, desarticuladas, individuales o en pares. Generalmente sin contenido, algunas con gotas refringentes (Fig. 25l).

En las zonas de tejido más denso y más viejas, existen además de los tipos mencionados en la zona centro, otras, de formas azarosas, siendo mayoritarias, principalmente vesiculares con contenidos variables, siendo frecuentes las que poseen refringencia homogénea y en forma de agregaciones de gúttulas, entremezcladas con células cuyo contenido ha desaparecido y de paredes engrosadas de manera irregular, las cuales muestran una coloración de amarillo a café oscuro (en agua y KOH). En este pseudoparénquima (Nobles 1965, el No.10) los filamentos se tornan extremadamente contorsionados, así como sus diámetros muy diversos. El tejido es duro e imposible de disgregar con pinzas y aguja, ya que sólo se logra romperlo en fragmentos más pequeños. Cortando una rebanada fina y tomando una pequeña porción, ejerciendo la presión posible sin que se rompa el cubreobjetos, las células no logran separarse completamente, observándose siempre empalmadas.

El pseudotejido no muestra ninguna disposición especial reconocible, sólo podemos decir que los tipos celulares de la zona centro se hacen menos frecuentes hacia las partes internas,

limitando su presencia a las capas superficiales; que el seudo parénquima se haya cohesionado por las células cuyas paredes se han engrosado y carecen de contenido, tanto vesiculares como fibras, las cuales forman una especie de matriz en que las células de forma azarosa, las vesiculares y los filamentos con torsionados y gruesos crecen entre los anteriores, de modo que existe un componente "muerto" de soporte, y otro "vivo" que no deja de crecer, pues aun en las partes más viejas se llegan a observar filamentos delgados con gemaciones y brotes digitiformes.

FIG. 25  
*Amanita rubescens* (MA)

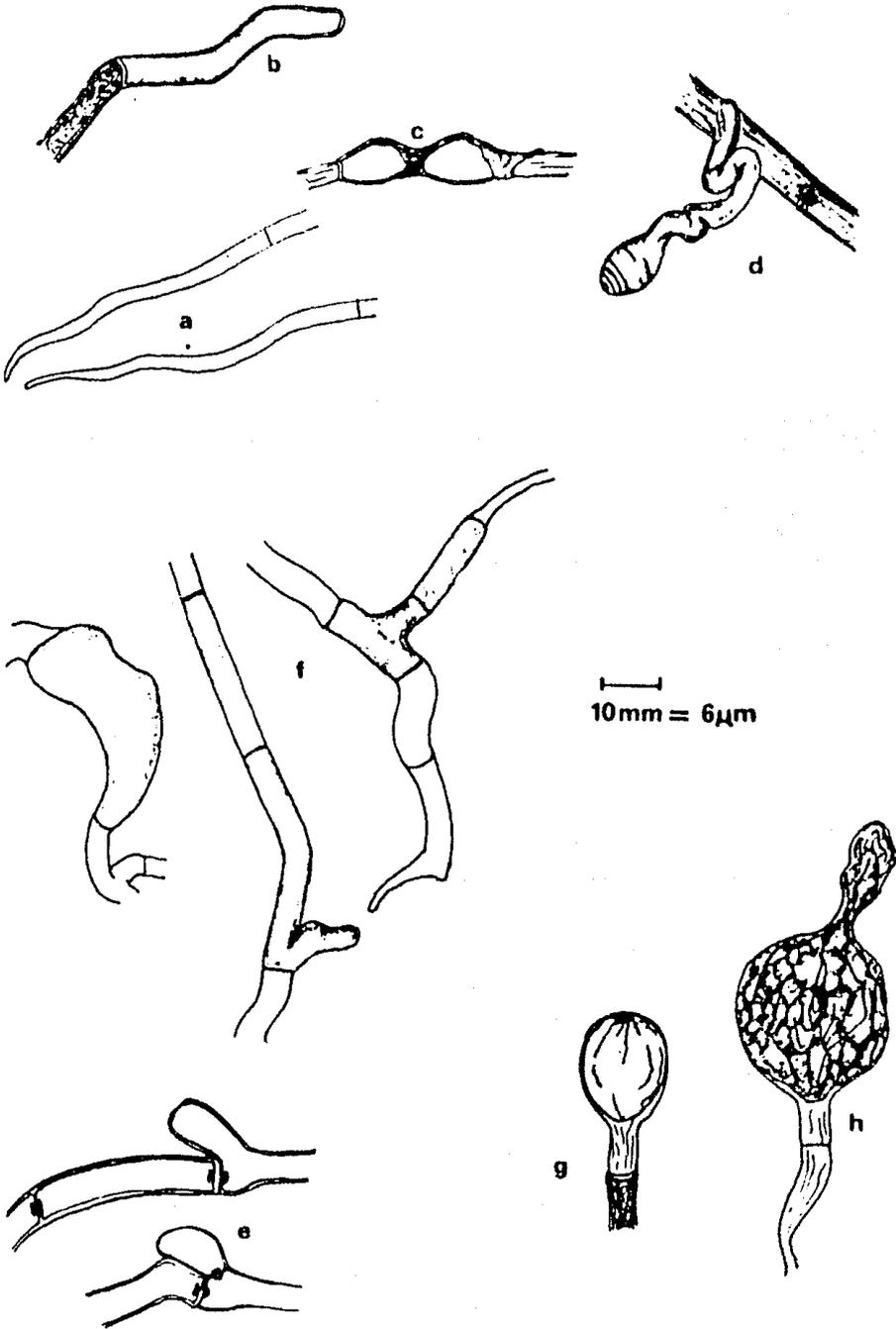
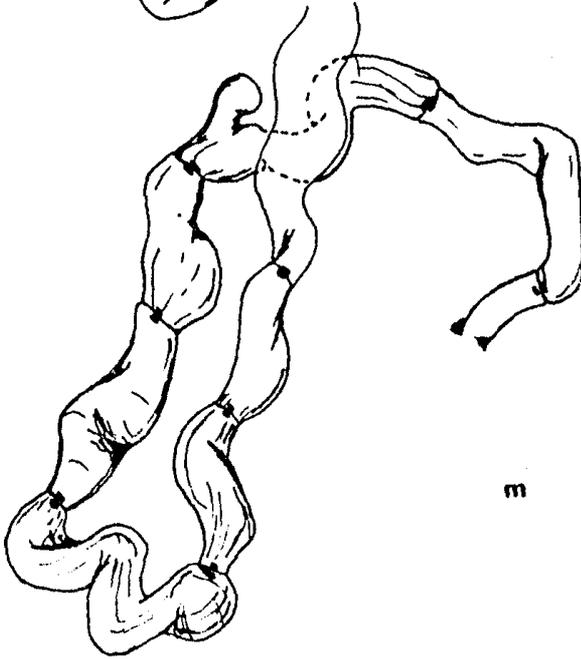
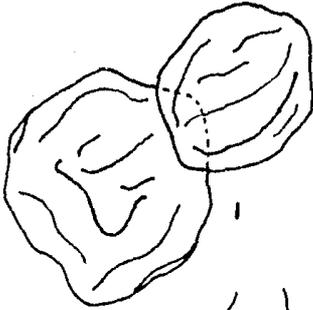
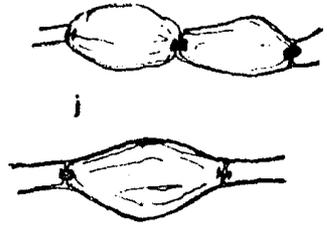
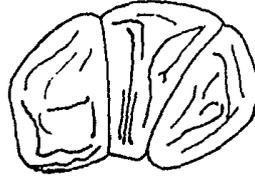
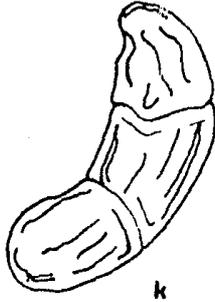
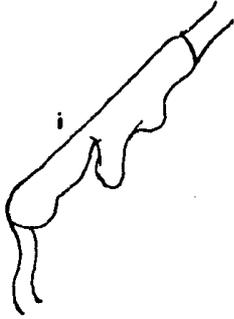


FIG. 25 (cont.)



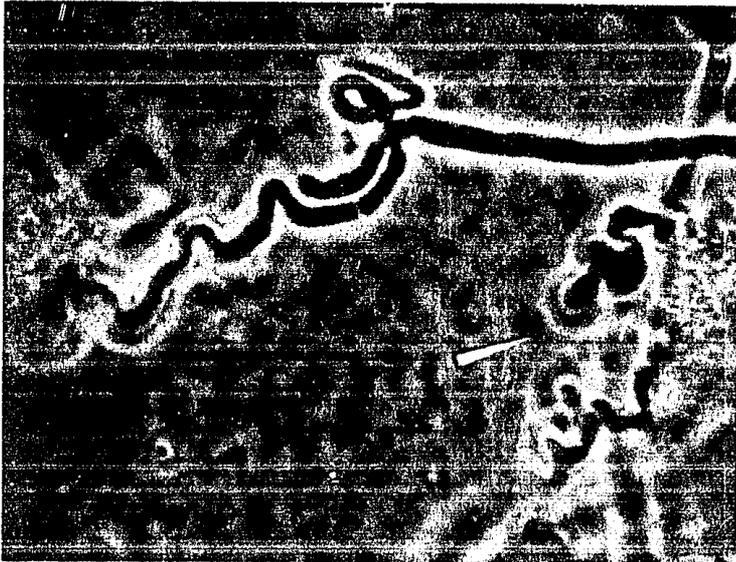


Fig.28



Fig.29

Amanita rubescens. Cultivos en MA.

Fig. 28. Hifas helicoidales espiraladas individualmente de manera laxa.

Fig. 29. Hifas filamentosas con células vesiculares intercalares.



Fig. 26



Fig. 27

Amanita rubescens. Cultivos en MA.

Fig. 26. Hifas helicoidales en zarcillos. 1500 x.

Fig. 27. Hifas helicoidales formando un bulbilo. 1500 x.



Fig. 30

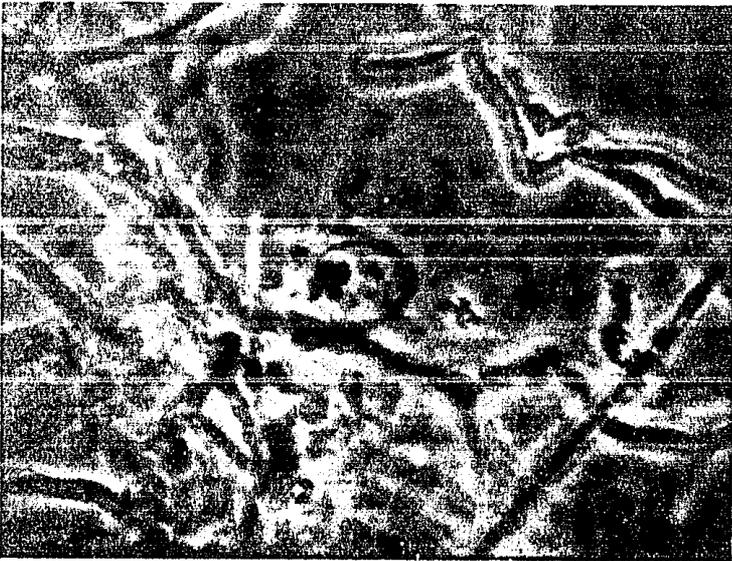


Fig. 31

Amanita rubescens. Cultivos en MA.

Figs. 30 y 31. Células moniliformes desprendidas con contenido escaso.

Colonia en PDA a las 9 semanas

- a). Descripción macroscópica. Diámetro de la colonia de 3-4mm. Micelio principalmente aéreo, fino, laxo, como pelusa. En un inicio blanco, tornándose de color crema rosado. Una zona de difusión café grisásea se observa alrededor de un radio de 4mm aproximadamente. Crecimiento lento, margen regular.
- b). Descripción microscópica. La mayoría de las células son filamentosas simples de 1-2 $\mu$ m y de 3-4 $\mu$ m, con brotes helicoidales más delgados (menos de 1.5 $\mu$ m), ramificados, poco espiralados. En el centro se observan de manera escasa, células vesiculares poco desarrolladas de 4-5 $\mu$ m de diámetro, algunas refringentes (Fig. 32a).

Colonia en PDA a las 16 semanas

- a). Descripción macroscópica. Diámetro de la colonia de 5-20mm. Micelio aéreo color crema a café rojizo. La zona de difusión gris oscuro desvaneciéndose hacia la periferia.
- b). Descripción microscópica. Menos diferenciación que en MA.
- Zona de avance. Filamentosas de 3-4 $\mu$ m, con pseudofibras comunes y otras enroscadas como caracol, con brotes perpendiculares. Se observan puentes plasmogámicos de los que surgen brotes helicoidales ramificados poco espiralados (Fig. 32b).
- Zona media. Helicoidales en zarcillos, como en MA.
- Zona centro. Filamentosas de 3-4.5 $\mu$ m, más o menos cilíndricas y poco contorsionadas, con contenido homogéneo y re

fringente.

Células apicales en forma de raqueta como en MA.

Células cilíndricas terminales como contenido refringente y homogéneo como en MA 9 semanas.

De manera muy constante en ambos medios de cultivo, en las uniones de las células se observa lo que parecería un doliporo.

#### OTRAS OBSERVACIONES

El micelio que en PDA crecía de manera escasa siendo principalmente aéreo, en las resiembras aumenta su tasa de crecimiento así como su densidad.

Las hifas no reaccionan al Melzer ni al KOH.

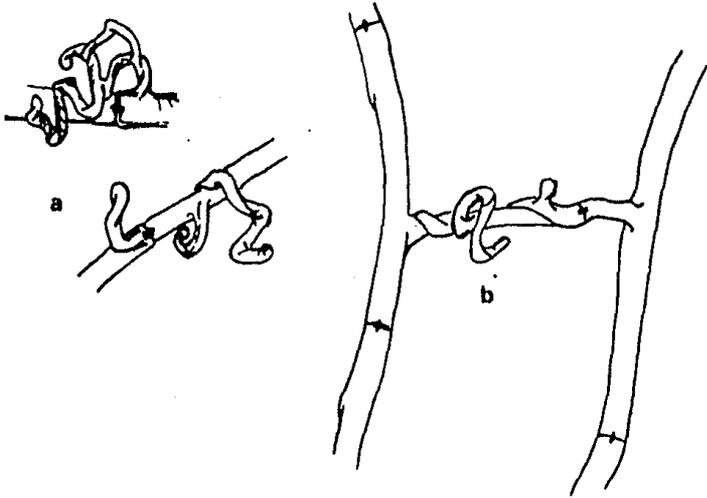
El micelio permanece viable después de un año.

Se detectó la presencia de oxidasa extracelular.

#### CONFIRMACION DEL AISLAMIENTO

Las características estructurales del septo doliporo observado (Fig. 33) y la presencia de células infladas en los cultivos confirman la identidad del aislamiento. El micelio que aquí se describió corresponde a Amanita rubescens (Pers.; Fr.) S.F. Gray.

FIG. 32  
*Amanita rubescens* (PDA)



—  
 10 mm = 6 $\mu$ m

Fig. 32. *Amanita rubescens*. Cultivos en PDA.  
 a: brotes helicoidales ramificados poco espiralados, b: puente plasmogámico con brotes helicoidales.

## D I S C U S S I O N

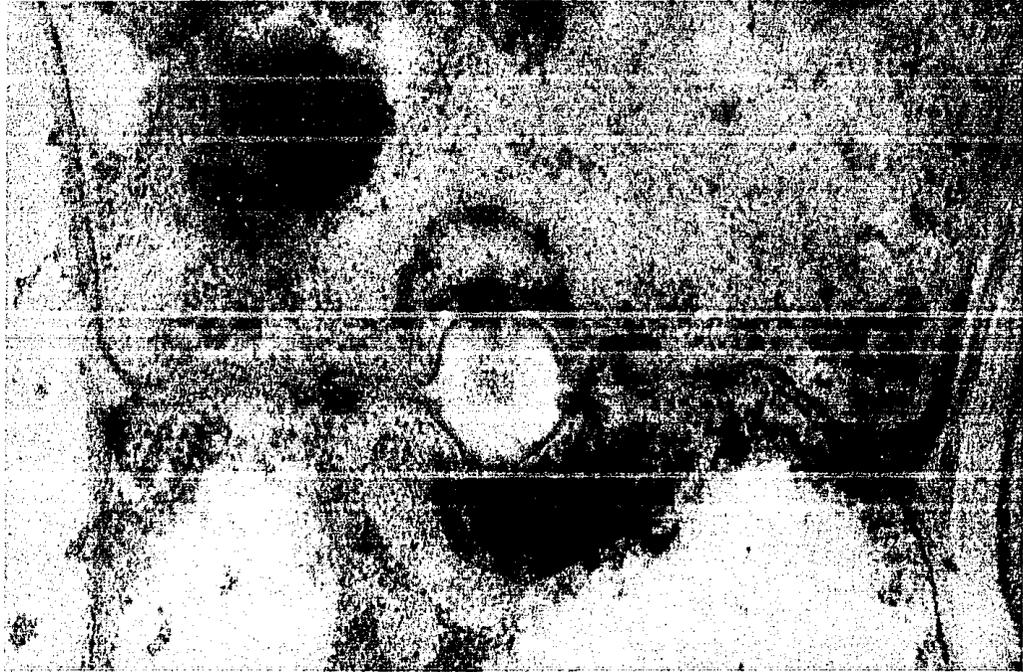


Fig. 33. Septo diploporo en Amanita rubescens. 20,000 x.

## CARACTERES MACROSCOPICOS

A). Tasa de crecimiento. Como se observa en la tabla II, la tasa de crecimiento que se obtuvo para cada aislamiento no es constante. Aun cuando el medio de cultivo y las condiciones ambientales para las resiembras de un aislamiento fueron las mismas, las medidas de este parámetro fueron distintas. Campbell y Petersen (1975), por el contrario, no observan esta variación dando un solo dato para la tasa de crecimiento de cada aislamiento. Sin embargo, hacen notar que entre aislamientos de la misma especie (A. flavoconia y A. muscaria) existe variabilidad.

El tomar el incremento en el diámetro de la colonia en un lapso dado, ha sido considerado como un buen parámetro para la estimación de la tasa de crecimiento (Brancato y Golding, 1953) en los hongos en cultivo. Esta estimación está basada en el crecimiento de micromicetes (Penicillium, Aspergillus, etc.) y es el empleado por Nobles (1965) para basidiomicetes degradadores de la madera, así como por Campbell y Petersen (1975), Pantiduo et al (1983), Bianco y Rimondoto (1982) y Miller et al (1983), para agaricales en cultivo.

Brancato y Golding (1953) indican que el diámetro de la colonia en sí mismo, constituye una medida satisfactoria de la tasa de crecimiento, debido a que no existe aceleración del crecimiento con el tiempo; que después de un lapso corto posterior a la germinación, muchos mohos, adquieren su tasa de crecimiento radial característica en un óp-

timo de temperatura y que esta tasa es mantenida por un período de tiempo que varía con los organismos y el medio de cultivo. Asimismo explica que este crecimiento radial constante se debe al hecho de que únicamente las células apicales se multiplican. De este modo, la tasa de crecimiento posee tres componentes: 1) La tasa de división de las células apicales; 2) La tasa de ramificación (incremento en el número de células apicales) y 3) La tasa de agrandamiento de las células.

Estos tres probablemente tienen una base genética.

ESPECIE	MA		PDA	
	A	B	A	B
<u>A. abrupta</u>	15-45	20-55	10-55	15-70
<u>A. gomata</u> <u>f. gracilis</u>	5-10	22-30	4-12	25-60
<u>A. muscaria</u>	12-60	55-90	25-40	40-90
<u>A. rubescens</u>	5-8	10-25	3-4	5-20

TABLA II. Diámetro de la colonia (mm) de los distintos aislamientos.

A. 9 semanas; B 16 semanas.

De manera general el crecimiento observado en micelios de Amanita puede ser descrito como sigue:

1. Después de resemenbrar, existe un lapso en el que el inóculo no presenta crecimiento, dicho lapso por lo regular varía de 6 a 10 días.
2. El micelio aparece como un fino vello cubriendo el inóculo.
3. Al cabo de dos a tres días, el micelio invade el agar, iniciando el crecimiento radial, el cual durante la primera semana se verifica de una manera relativamente lenta.
4. La tasa de crecimiento se incrementa y permanece constante hasta la semana 18 o 19.
5. El crecimiento radial disminuye, en algunos caso (A. rubescens) permaneciendo estable hasta cubrir el área total del agar, llegando a suspenderse en otros de manera intermitente (A. gemmata) o de manera definitiva (A. abrupta).

Así, el incremento en el diámetro de la colonia no sucede a una velocidad constante. Además, el crecimiento aéreo y, más aún, el sumergido muestran ser en muchos casos, componentes importantes que no necesariamente se reflejan en un aumento del diámetro. Lo mismo puede decirse con respecto al agrandamiento de las células (vesiculares, moniliformes, infladas, etc.), el cual se acentúa en las partes más viejas coincidiendo con la formación de pseudoteji-

dos que se incrustan en el agar, a veces en todo su espesor y elevándose sobre su superficie.

Estos hechos nos hacen cuestionar la validez de la medida del diámetro como índice de la tasa de crecimiento y si no habrá de pensarse en otro modo de evaluarla, como el incremento en peso seco, en el caso de Amanita.

De cualquier manera, independientemente de lo anterior, era de esperar que las resiembras de un mismo aislamiento bajo las mismas circunstancias crecieran a la misma velocidad, lo cual, no sucedió.

Desconocemos las causas de esta variabilidad, se podría suponer la posible existencia de poblaciones celulares en el margen de la colonia, de donde era obtenido el inóculo, las cuales varían en su capacidad de crecimiento, aun cuando se supone que en dicha área todas las células son indiferenciadas. De alguna manera, no todas las células del inóculo mantienen la misma tasa de división cuando son desarticuladas del micelio del que forman parte, respondiendo de manera distinta en el nuevo medio. Esto y la manera en que crece A. abrupta en un inicio, nos sugiere algún grado de organización dentro de la colonia. Por alguna razón, las hifas del margen, células totipotenciales en constante división, dependen de las hifas más viejas que han disminuido o suspendido su crecimiento.

Lo anterior podría explicar la "dificultad" con que Amanita inicia su crecimiento como se ha expresado en los puntos 1 y 2. De las cuatro especies estudiadas A. abrupta

ma especie, por lo que le resta valor diagnóstico, siendo distintiva a nivel de cepas más no a nivel de especies.

El medio de cultivo parece influir sobre la textura del micelio. En PDA tiende a ser aéreo, mientras que en MA a excepción de A. abrupta, son casi totalmente sumergidos. Esto posiblemente se debe a que la papa macerada le confiere más densidad al medio de cultivo, dificultando la penetración de las hifas en un inicio.

- C). Color. Este carácter resulta relevante cuando es parecido al del observado en el carpoforo, como sucede con A. rubescens; o cuando aparece en determinadas zonas como en muscaria, ya que en los demás casos es blanco. En el primer caso concordando con Miller, et al (1933) y en el segundo con Jenkins y Petersen (1976). Ver apéndice II.
- D). Oxidasa extracelular. La prueba de detección de presencia de oxidasa extracelular fue positiva en los casos de A. abrupta, A. gemmata for. gracilis y A. rubescens. Después de la aplicación del guayacol (10-15 min.) apareció una coloración vinácea oscura.

Campbell y Petersen (1975) y Jenkins y Petersen (1976) no observan reacción positiva en sus aislamientos. Miller et al (1983), por el contrario, reporta para A. rubescens la presencia de la enzima.

El que los resultados de esta prueba sean distintos en especies pertenecientes a la misma Sección (A. gemmata y

constituye el ejemplo más claro; no es sino hasta después de seis semanas aproximadamente que se inicia el crecimiento aéreo, como ya se mencionó, y no obstante que las resiembas se efectúen con inóculos en que la mayor parte del micelio es aéreo, forzosamente habrá de transcurrir un lapso durante el cual no existe más que crecimiento rugoso en el mismo inóculo. Durante esta fase sucede la acumulación de algún factor que permite el crecimiento aéreo, acumulación que probablemente va en función del aumento en el número de células, incremento que sucede de manera lenta y gradual hasta el momento en que es disparado algún mecanismo, mediante el cual el fenotipo del micelio cambia, dando la apariencia que se ha descrito.

Lo mismo sucede con los otros aislamientos, aunque de manera menos drástica ya que el crecimiento sólo se retarda, pero no cambia de textura, siendo A. abrupta la única en la que su forma de crecer resulta diagnóstica de una manera más evidente.

B). Textura. En nuestro caso, las texturas de todas las cepas son distintas, aunque su evaluación y denominación resultan, a veces, difíciles, ya que dos micelios algodonosos y blancos pueden ser distintos como en A. muscaria (PDA) y A. abrupta, siendo en esta última más extendido en el aire, mientras que en la primera generalmente más apresado al agar, aunque también adquiere gran altura en ocasiones.

Por su parte, Campbell y Petersen (1975) señalan que la apariencia de la colonia varía entre aislamientos de la mis

A. muscaria) y dentro de la misma especie (A. rubescens) puede significar que dicho carácter se presenta o no, dependiendo de la cepa y no de la especie (si es así, el punto de dicotomía que Nobles establece en su clave (Nos. 1 y 2) en Amanita carecería de validez); o por el contrario, puede ser indicador de una divergencia en un proceso de especiación. La escasez de datos al respecto, por el momento, impide precisar el valor diagnóstico de esta prueba dentro del género que nos interesa.

### CARACTERES MICROSCOPICOS

- A). Fíbulas. Esta estructura únicamente en A. muscaria fue observada contribuyendo a la confirmación del origen del aislamiento y siendo acorde con la morfología del cuerpo fructífero en el que también existe el desarrollo de fíbulas. Asimismo, dentro de las caracterizaciones de los aislamientos estudiados esta estructura distingue a A. muscaria de los demás. (Tabla III). Aun cuando el grado de diferenciación del micelio no hubiera requerido de las fíbulas para reconocerlo entre los otros, este caracter puede ser importante en el mismo sentido en que lo interpreta Nobles (1965), es decir, un punto de dicotomía entre aquéllos que la presentan y los que no, lo cual tiene algunas implicaciones filogenéticas si como dice Bas (1969) "el género se encuentra en el proceso de perder sus fíbulas...". El mismo autor señala que fuera de la Sección Roanokenses, las fíbulas son relativamente raras en Amanita, pudiéndolas observar únicamente en A. caesarea, A. hemibapha y A. princeps de la Sección Vaginatae y en A. muscaria de la Sección Amanita.
- B). Seudofíbulas. Al igual que las anteriores, la seudofíbula es indicadora de tetrapolaridad (Matling, 1981) y la frecuencia de su presencia puede resultar diagnóstica en la caracterización, así como su forma. Por otro lado, podrían representar un estadio intermedio en el proceso de pérdida de las fíbulas en Amanita.
- Este carácter no se encuentra codificado en Nobles (1965).

ESPECIE	FIBULAS	SEUDOFIBULAS	HELICOIDALES		REFRINGENTES
			Zarcillos	Solitarias	
<u>A.abrupta</u>			oo	oo	o
<u>A.gemata</u> <u>f.gracilis</u>		oo	o	o	oo
<u>A.muscaria</u>	ooo	ooo	oo	o	oo
<u>A.rubescens</u>		ooo	oo	ooo	ooo

TABLA III Diferenciaciones en hifas filamentosas.

o, escasas; oo, frecuentes; ooo, abundantes.

FORMA Y DIMENSIONES	ESPECIE
Ovales (3.5-5 $\mu$ m) Fig. 5 Redondeadas (5-7 $\mu$ m), en cadenas. Fig. 10 Moriliformes (5.7 X 6-9 $\mu$ m), des- Fig. 9 prendidas.	<u>A. abrupta</u>
En cadenas largas, dos hinchazo- Fig. 16a nes por célula (3-4.6 $\mu$ m). Subglobosas (4.5 $\mu$ m, intercala- Fig. 19 res.	<u>A. gemmata</u> f. <u>gracilis</u>
En cadenas, dos hinchamientos Fig. 22g por célula (4.6-9 $\mu$ m)	<u>A. muscaria</u>
Con forma de barril (6-7 $\mu$ m), in Fig. 22i tercalares, con pseudofibras.	
Intercalares, subglobosas, de Fig. 29 4-7 $\mu$ m de diámetro.	<u>A. rubescens</u>

TABLA IV Células vesiculares pequeñas (hasta 9 $\mu$ m).

C). Células filamentosas. Este tipo morfológico dado que es la base o materia prima para la diferenciación se encuentra en cambio permanente, por lo que nos brinda poca información específica.

Su diámetro es muy variable, siendo constante en su fase más indiferenciada, constancia (1-3 $\mu$ m) que es común a todas las cepas. Sin embargo, existen hifas filamentosas que se disponen en espirales o portan ramificaciones helicoidales más pequeñas, que en el caso de A. rubescens en forma ramificada resultan distintivas.

Otro rasgo de diferenciación temprana en filamentos es la refringencia homogénea en células apicales o intercalares (Figs. 18 y 25f), así como hinchamientos sinuados en las células que componen al filamento, cuyas formas, como las de tipo "Falange" de A. muscaria, resultan diagnósticas al igual que el ahusamiento en filamentos gruesos (A. gemmata) o en aquellos casos en los que cierto tipo de hinchamientos prefiguran las células vesiculares en las que se habrán de convertir.

En su proceso de diferenciación, el filamento, en un inicio delgado (1-3 $\mu$ m) se ensancha gradualmente adquiriendo dimensiones de hasta 7.5 $\mu$ m, posteriormente ondulándose de manera característica según sea el tipo vesicular que se produzca. En esta diferenciación las paredes pueden engrosarse al mismo tiempo que el contenido se vacuoliza o produce zonas con densidades distintas, pudiendo permanecer en una condición más o menos filamentosa, a veces

contorsionadas, hincharse intercaladamente o simplemente perder su contenido sin presentar ninguna diferenciación morfológica.

- D). Células vesiculares. Campbell y Petersen (1975) ya habían hecho notar que en los micelios de Amanita las diferencias entre especies se expresaban, principalmente, en la forma y tamaño de sus células vesiculares y que no existe una terminología para denominar a cada tipo de hinchazón. En nuestras caracterizaciones, asimismo, aparece una variedad de células vesiculares que salvo en algunos casos en que adquieren alguna forma regular como las de tipo "raqueta" o las reniformes, no encontramos otro medio más que esquematizarlas y medirlas, para referirnos a ellas. Sin embargo, a excepción de las moniliformes pequeñas que pueden no ser claramente distintivas, esta manera "ilustrativa" convencional ha sido suficiente, por el momento, para expresar las diferencias que junto con los otros elementos de la caracterización integran un diagnóstico útil del comportamiento del micelio (Tablas IV y V).

Las células vesiculares se hacen más frecuentes conforme envejece el micelio y las formas distintivas no se desarrollan sino hasta que transcurren más de 9 semanas en la mayoría de los casos. Siendo crítico en el caso de A. gemmata en que inicialmente no se desarrollaban diferencias de valor.

De los esquemas de los principales tipos morfológicos

(Fig. 4) que Campbell y Petersen (1975) proporcionan, pocos denotan formas especiales, siendo más bien generales dentro de Amanita, y las que mencionan sin esquematizar no describen de manera poco ambigua a algún tipo morfológico que sin dudar pudiéramos reconocer en nuestros cultivos, a excepción de algunas moniliformes y helicoidales. Suponemos que el lapso de 6 semanas que emplearon les impidió hacer un registro más detallado al no observar la evolución completa en la diferenciación de las células.

Además de su forma y su tamaño, el contenido celular resulta significativo cuando aparece estructurado de manera reconocible, pudiendo ser homogéneamente refringente o su refringencia agrupada en aglomeraciones de gúttulas; o como en el caso de las células en que se tiñen cuerpos definidos, como los que adquieren forma estrellada (Fig. 22k). En los demás casos es el contenido heterogéneo u homogéneamente granular, sin ser diagnóstica su presencia.

En las ocasiones que tuvimos la oportunidad de observar las gradaciones en la diferenciación de un tipo morfológico, el contenido variaba, con el tiempo, de finamente granular homogéneo a refringente homogéneo, posteriormente distribuyéndose en gúttulas, las cuales al final desaparecían dejando la célula vacía, un ejemplo de este caso es el tipo "raqueta"; o de finamente granular en filamentosas se vacuolizaba simultáneamente al engrosamiento de las paredes, desapareciendo posteriormente como en el caso anterior (Fig. 23d).

FORMA Y DIMENSIONES		ESPECIE
Subglobosas (12-17 $\mu$ m)	Fig. 12b	<u>A. abrupta</u>
Moniliformes (9-16 $\mu$ m), desarticuladas.	Fig. 20	<u>A. muscaria</u>
Clavadas (7.6-12.2 X 12.2-26 $\mu$ m), fibuladas.	Fig. 22e	
Cortante elípticas (15.3-18.4 X 13.4-21.4 $\mu$ m)	Fig. 22f	
En forma de "calceta".	Fig. 22i	
Reniformes a faseoliformes.	Fig. 22m	
Elipsoides, apicales, simétricas de 7.6-9 X 12 $\mu$ m.	Fig. 23c	
Moniliformes (7-15 $\mu$ m), desprendidas.	Fig. 30 y 31	<u>A. rubescens</u>
Apicales, en forma de raqueta de 9.2 X 10.7 $\mu$ m.	Fig. 25g	
Tríadas reniformes.	Fig. 25k	

TABLA V Células vesiculares grandes  
(más de 9 $\mu$ m de diámetro).

FORMA Y DIMENSIONES		ESPECIE
Pedunculadas, de elipsoides a cilíndricas (12-23 X 23-34 $\mu$ m).	Fig. 12c	<u>A. abrupta</u>
De cor-amente elípticas (13.8-26 X 17-34 $\mu$ m) a elipsoides (20-21 X 30-34 $\mu$ m).	Fig. 12d	
Gigantos de basiliformes a cilíndricas (7-30 X 46-76 $\mu$ m).	Fig. 12e	
Apicales, elipsoides (15.3-13.4 X 18.4-21).	Fig. 22h	<u>A. muscaria</u>
Subglobosas (15.3-24.5 $\mu$ m).	Fig. 22j	
Fusiformes (12.24-20 X 21.4 X 32 $\mu$ m)		
De subglobosas a cilíndricas y amorfas (15-17 X 20-25 $\mu$ m)	Fig. 23e	
De 12-15 (21) $\mu$ m X 12-17 (23) $\mu$ m, subglobosas.	Fig. 25l	<u>A. rubescens</u>

TABLA VI Células infladas.

De este modo, el contenido celular, en algunos casos, puede indicar en qué fase de la diferenciación estamos haciendo nuestras observaciones, pudiendo determinar qué células habremos de medir y tomar en cuenta en la caracterización. Por ejemplo, las células apicales con forma de "raqueta" muestran dimensiones uniformes cuando su contenido es homogéneamente refringente, posteriormente al agrandarse y perder su contenido sus paredes se arrugan y las dimensiones muestran mayor variabilidad entre cada célula. Así como en el carpofoero las esporas que se utilizan en la medición, son aquéllas que se han desprendido del esterigma y muestran el apículo, algún parámetro habremos de seguir para las mediciones de las células vesiculares de modo que resulten significativas. Hay un punto en el que la célula muestra su mayor turgencia o clímax en su desarrollo, tras el cual, sus paredes se arrugan, pierden contenido y/o se agrandan azorosamente. Este punto es importante de tomar en cuenta en el momento que se proponga un método estandarizado para caracterizar micelios de Amanita, así como el tiempo de incubación que permita el desarrollo de células vesiculares.

- E). Células infladas. Otro tipo celular desarrollado y que constituye la fase terminal en la vida de una célula vesicular es la célula inflada.

Su parecido con las células que aparecen en el velo de carpofoero, además de apoyar la confirmación del origen de

la cepa, nos brinda al mismo tiempo un carácter más que de finirá a las especies estudiadas. En la tabla VI se suman sus tamaños y disposición de estas células, sobresaliendo A. abrupta por presentar células infladas pedunculadas y gigantes. El tiempo de incubación fue decisivo para lograr observar este tipo morfológico que no por ser un es tadio terminal o "degenerado" deja de tener un lugar impor tante en el diagnóstico.

LA CLAVE DE NOBLES (1965)

Como ya se dijo, Nobles (1965) constituye el único método estandarizado para el cultivo y descripción de micelios de basidiomicetes (Stalpers, 1978, puede considerarse como un perfeccionamiento del anterior, pero menos práctico) y como dice Campbell y Petersen (1975), resulta inadecuado para Amanita, ya que las células vesiculares que muestran ser diagnósticas, todas, quedan incluidas en el número 26 dentro de "hinchazones conspicuas" (ver apéndice I) sin establecer ninguna distinción. Esto resulta lógico, ya que el diseño de esta clave está basado en hongos degradadores de madera. Sin embargo, representa un "modelo" y mientras no se proponga uno mejor que cubra con los requerimientos de Amanita no dejará de ser la referencia más próxima para quienes se dedican al estudio de micelios.

Nobles (1965) es importante porque funciona como parámetro o marco de referencia, pudiendo servir de guía en la implementación de un método estandarizado para el género que nos interesa. Su carácter "inadecuado" enfatiza lo que debemos modificar y perfeccionar. Por ejemplo Campbell y Petersen (1975) y Pantidou et al (1983) encontraron que el PDA permite mayor crecimiento y diferenciación, proponiendo este medio como el estándar, a reserva de que se prueben otros. En nuestro caso atendiendo a esta sugerencia confirmamos que, efectivamente, el PDA resulta por el momento el más efectivo, aunque en ocasiones el MA posibilita mayor diferenciación (A. rubescens), por lo que ha de seguirse empleando.

De la misma manera, al verificar que el tiempo de incuba-

ción de 6 semanas no es suficiente para Amanita, con un crecimiento lento, logre diferenciarse plenamente, se hace necesaria la ampliación de dicho lapso.

Al mismo tiempo, el número 10 (seudoparénquima); el No. 3 (fíbulas); el No. 6 (hifas indiferenciadas); y los Nos. del 38 al 40 (Color en el reverso) habrán de contemplarse en el método que se proponga en el futuro.

El que las caracterizaciones de Amanita se hayan realizado anteriormente en lapsos de seis semanas, no logrando toda la diferenciación posible, impide aseverar categóricamente que Nobles (1965) es inadecuado, ya que estructuras que puedan formarse y estén incluidas en esta clave no se han tomado en cuenta, aunque es cierto que las células vesiculares requieren de una ampliación en el lugar que ocupan dentro de la misma. Por otro lado, faltaría asimismo, considerar las relaciones micorrícicas tanto con hospederos naturales como resultados de pruebas de micorrización, lo que además reforzaría la confirmación del origen del aislamiento.

#### HACIA LA OBTENCION DE UN METODO ESTANDARIZADO PARA LA DESCRIPCION DE MICELIOS DE AMANITA.

El método que en un momento dado se adopte, ha de cubrir con una serie de requerimientos:

1. Ha de ser lo más accesible posible a cualquier micólogo dedicado al Género, es decir, que no requiera de una infraestructura material sofisticada que impida su empleo generalizado.

2. Ha de permitir la diferenciación celular del micelio.
3. Los caracteres sistematizados y jerarquizados de modo que ofrezcan datos de afinidad o parentesco, ordenados en una clave de identificación.
4. Las cepas deberán confirmarse en cuanto a su origen siempre.

La experiencia que esta tesis representa así como los datos que aporta en conjunción con los publicados por otros autores nos permite, por lo pronto, abordar tentativamente los puntos 1, 2 y 4, haciendo algunas sugerencias que se han venido insinuando, quizás demasiado reiterativamente, en los párrafos anteriores.

a) Un método accesible. La técnica empleada para el aislamiento y cultivo de micelios de Amanita en esta tesis como se pudo apreciar es sencilla y relativamente barata. Dicha técnica no constituye ninguna novedad, en el presente caso se aplicaron los criterios conjugados de Stamets y Chilton (1983) y Watling (1981) adecuándolos a nuestras circunstancias. Esta técnica además de poseer un rendimiento bastante aceptable, permite la verificación del aislamiento el mismo día de recolección en cualquier lugar en el que se pueda disponer de un espacio cerrado. No obstante que el trabajo de mantenimiento de los cultivos es bastante laborioso y requiere de un lugar especial, lo mismo sería aún contando con recursos más sofisticados. Sin embargo, el que los micelios puedan crecer en cajas de Petri selladas cumpla las posibilidades, en cuanto a que, en los casos de carencia de espacio, los micelios pueden ser alma-

cenados en algún mueble acondicionado para tal efecto y únicamente en el momento de reseñar recurrir a otro sitio, algún laboratorio o simplemente un cuarto, en el que siguiendo la técnica se evite la contaminación.

Este método sencillo de aislamiento y cultivo, posibilita el hecho de que cada vez que se colecte un ejemplar que reúna las características (velo parcial cerrado) pueda ser aislado y que al momento de su descripción, se incorpore la caracterización del micelio, siendo ésta nuestra intención para futuras recolecciones y una recomendación para aquellos que se dedican al estudio de macromicetos.

b) Medios de cultivo simples y tiempo de incubación. Se ha enfatizado mucho sobre el hecho de que los hongos ectomicorrícicos poseen requerimientos nutricionales complejos que impiden o dificultan en gran medida la obtención de sus micelios en cultivo. Esta aseveración es común escucharla entre los micólogos, de boca de profesores que imparten clases en licenciatura, en artículos de divulgación y en casi todos los libros de texto, uno de los primeros comentarios que se hacen en la introducción al estudio de estos hongos consiste en citar la serie de casos en que ha sido imposible el cultivo de alguna especie.

Es cierto que la condición ectomicorrícica en muchos casos va acompañada de cierto radicalismo en cuanto a que el hongo muestra ser incapaz de crecer en otras condiciones que no sean aquéllas que le propicia su asociación y que no han logrado ser comprendidas plenamente. Sin embargo, es poco frecuente que se mencionen los casos en que hongos ectomicorrícicos han

logrado crecer y hasta fructificar en sustratos con polisacáridos complejos y medios de cultivo estandarizados de composición simple, como los que aparecen en la Tabla VII.

La lista no pretende ser exhaustiva, únicamente lo es con respecto a Amanita incluyendo a Campbell y Petersen (1975) con nueve especies más creciendo en MA y PDA.

Como dijimos, poco se hace mención de estos casos, lo que propicia la difusión de un prejuicio que desanima a llevar a la práctica el aislamiento de micelios con estos hongos.

Por otro lado, para fines de caracterización, faltaría la exploración de otros medios de cultivo tomando en consideración para hacer esto el que sean accesibles y permita un amplio uso, al mismo tiempo que diferenciación. En este sentido, hemos observado que por ejemplo, el medio de Melin-Norkrans que nos ha sido recomendado insistentemente por varias personas, además de que requiere una lista de sales y vitaminas, no ha propiciado la diferenciación morfológica de las hifas cuando ha sido empleado en caracterización de micelios de otros hongos ectomicorrícicos como lo indicó Mueller (1984) con especies de Laccaria, no obstante que dicho medio es especial para el cultivo de hongos ectomicorrícicos. Lo mismo sucede con el medio de Hagem modificado por Modess (Pantidou et al, 1933) el cual es superado en cuanto a crecimiento y diferenciación por el PDA. Por nuestro lado, la diferenciación presentada por los micelios en este medio de cultivo ha sido satisfactoria.

El que las distintas especializaciones se hayan obtenido en un lapso mayor de seis semanas en el presente trabajo, nos ha-

ESPECIE O GENERO	MEDIO DE CULTIVO	REFERENCIA
<u>Amanita rubescens</u>	Extracto de levadura-agar	Gray y Bushnell, 1955.
<u>A. caesarea</u>	MA, CMA, trigo, arroz, maíz, avena, estiércol, paja, papel periódico con extracto de levadura, tomate.	Thielke, 1973.
<u>A. verna</u> <u>A. tenuifolia</u> <u>A. suballiacea</u>	Czapek-Dox	Stark <u>et al</u> , 1973
<u>A. hygroskopica</u> <u>A. solitaria</u>	PDY	Johnson y Preston, 1979.
<u>A. ovoidea</u> <u>A. pantherina</u>	PDA	Pantidou <u>et al</u> , 1983.
<u>A. muscaria</u>	PDA	Jenkins y Petersen, 1976.
<u>A. citrina</u>	Czapek y MA	Fiussello, 1982.
<u>Cortinarius</u> sp. <u>Boletus</u> sp. <u>Tricholoma</u> sp. <u>Laccaria laceata</u>	Extracto de levadura	Gray y Bushnell, 1955.
	PDA (primordios) MA	Davis y Jong, 1976.
<u>Tricholoma</u> sp.	MA	Miller, 1971.

TABLA VII Medios de cultivo en que se han podido aislar hongos micorrícicos.

bla de un proceso de maduración, el cual impone un tiempo para que la caracterización del micelio se lleve a cabo, hecho que no ha sido tomado en cuenta anteriormente al cultivar micelios de Amanita. Así como la descripción del carpoforo maduro es indispensable para el taxónomo, así el micelio en cultivo debe caracterizarse hasta el momento en que todos sus caracteres posibles de expresarse en condiciones de laboratorio, en un medio de cultivo particular, se evidencian y alcanzan su mayor desarrollo. Este es el aspecto más importante a tomar en cuenta al querer establecer un método estandarizado que posibilite la caracterización distintiva de las especies en cultivo.

Se ha querido estandarizar las condiciones sin tomar en cuenta la manera diferente en que los grupos de hongos crecen en cultivo. Se ha querido forzar este crecimiento mediante cambios en la temperatura, con la mentalidad de un mando ficticio hacia el organismo, cuando éste es el que determina, lo queramos o no, el trato que habremos de proporcionarle con el fin de que su desarrollo sea lo más completo posible, siendo lo más sencillo y natural el dejarlo simplemente crecer.

Jenkins y Petersen (1976) no observan diferenciaciones en A. muscaria, Miller et al (1983) con A. rubescens encuentra muy pocas, lo mismo que Pantidou et al (1983) con A. ovoidea y A. pantherina, e incluso estos últimos reducen el tiempo de incubación a 30 días (4 semanas).

Existe el prejuicio de que la mayoría de los hongos ectomicorrícicos no crecen en cultivo cuando la mayoría no ha sido probada. Amanita ha crecido en medios de cultivo diversos (hasta en papel periódico), ha mostrado señales de especialización

en cultivo, pero no se le ha dado tiempo para crecer, recibiendo el mismo trato que los hongos saprobios, capaces de germinar, crecer y desarrollar cuerpos fructíferos en lapsos breves. Desde que uno intenta el aislamiento de este género se hace evidente su crecimiento lento. Sin embargo, se ha tomado como referencia la tasa de crecimiento de los hongos saprobios adjudicándole al crecimiento lento de los ectomicorrícicos su requerimiento de sustancias nutritivas especiales. Se ha probado que el hongo recibe fotosintetatos de su hospedero, pero esto no implica que el crecimiento sea más rápido o igual al de los saprobios en condiciones naturales. Es posible que el crecimiento lento sea un caracter intrínseco al genoma de Amanita y no el producto de una limitante, como se ha interpretado. Si es así, resulta absurdo el fijar un tiempo insuficiente para describir sus micelios.

El tiempo de 16 semanas es tentativo, se determinó tomando en cuenta no únicamente al hongo, sino al medio de cultivo. Posterior a este lapso la desecación del MA se traduce en un adelgazamiento del medio de cultivo excesivo y su consistencia demasiado sólida. El PDA con papa macerada permanece más tiempo hidratado permitiendo el empleo de lapsos más largos, otro punto a su favor para su empleo como medio de cultivo estándar.

Por el momento los tiempos de 9 y 16 semanas han permitido el observar células infladas, vesiculares y organización incipiente del micelio en un pseudoparénquima siendo la manifestación de estos caracteres distintiva en cada una de las especies consideradas.

c) Confirmación del origen de la cepa. Muchas veces, después de que una porción de tejido ha sido colocada en un medio de cultivo, se observa crecimiento micelial a partir del inóculo, como si el micelio realmente surgiera de éste, haciéndonos pensar en un aislamiento exitoso. Sin embargo, aun cuando el micelio que así se observa es el único que crece es decir, un cultivo puro, es frecuente que se trate de alguna especie parásita o contaminante, la cual puede ser identificada debido a la presencia de estructuras características (conidios, cleistotecios, etc.) generalmente de deuteromicetes y ascomicetes; o puede no serlo al no observar ningún tipo de diferenciación, impidiéndose el conocimiento de la identidad del hongo que cultivamos, el cual puede ser una amanita o el micelio de un contaminante, un "mycelia sterilia" por ejemplo.

Amanita no produce cuerpos fructíferos en cultivo, por lo que no podemos estar seguros de la identidad del micelio que cultivamos, a menos que se confirme el origen, de alguna manera.

Al revisar la bibliografía existente, referente a los aislamientos reportados, salta a la vista la escasez de cepas de Amanita que se caracterizan y están confirmadas. La confirmación del origen de la cepa es fundamental, pues no tenemos ninguna otra manera de garantizar que el micelio que describimos, efectivamente corresponda a la especie que se supone ha sido aislada. Salvo en los casos de A. caesarea (Thielke, 1978), A. velatipes y Amanita sp affín strobiliformis (Campbell y Petersen, 1975) donde se verifica el origen mediante la observación de fibulas, únicamente Johnson y Preston (1979) con A. hygroskopica

y A. Solitaria, lo hacen mediante microscopía electrónica del septo doliporo.

Si la caracterización de micelios en cultivo se propone como herramienta taxonómica, es obvia la importancia que la confirmación del origen del micelio representa para evitar confusiones posteriores en cuanto a la identidad del micelio.

Por otro lado, no sabemos si el septo doliporo pueda proporcionar alguna información diagnóstica del género o de las especies en particular, Berta y Vecco (1976) lo han intentado con Panaeolus, encontrando que la diferencia en las dimensiones de los componentes del septo no son significativas. Sin embargo se requiere de más información y una comparación exhaustiva entre doliporos observados en aislamiento de una especie, entre especies y entre géneros, hecho muy lejano dada la infraestructura material requerida.

Straatsma (1985) en Cantharellus cibarius emplea la hibridación molecular de ADN proveniente del carpoforo fresco y de su micelio en cultivo. Este método de confirmación garantiza no solamente que el micelio proviene de una especie correspondiente al género estudiado, sino que además indica de qué ejemplar fue aislado, siendo así un método directo de confirmación eficiente en un 100% superando a la microscopía electrónica del doliporo.

AMANITA muscaria

Campbell y Petersen (1975) presentan la caracterización de tres aislamientos de esta especie, provenientes de ejemplares colectados en tres localidades distintas, es decir, tres cepas, de Canadá. Los tres aislamientos muestran distintas tasas de crecimiento. Se observan también variaciones en la coloración yendo del blanco hasta el café madera pasando por tonalidades rosáceas o avellanadas, en los distintos medios empleados (ver apéndice II).

En nuestro caso la tasa de crecimiento varía dentro del mismo aislamiento, siendo nuestros cultivos blancos en todo el micelio aéreo.

En cuanto a los caracteres microscópicos resalta el hecho de que ni Campbell y Petersen (op cit) ni Jenkins y Petersen (1976) hayan observado fíbulas en sus micelios, aun cuando en el carpóforo están presentes, siendo uno de los caracteres más conspicuos en el aislamiento creciendo en PDA.

El aislamiento de Jenkins y Petersen (1976) es casi totalmente indiferenciado notando únicamente ligeras hinchazones e hifas refringentes escasas, no observando ninguno de los tipos celulares indicados por Campbell y Petersen (1975).

De los caracteres que mencionan estos autores, sólo ilustran las células vesiculares de 20 $\mu$  en MA y las de formas caprichosas. En su descripción reconocemos varios de los tipos encontrados por nosotros, aunque en ciertos casos no se puede estar seguro dada la falta de esquemas. Por ejemplo, lo que ellos llaman "células alargadas con los ápices ensanchados", puede corresponder a las células en forma de "falange", sin embargo ignoramos si

entre los ápices existe un segmento cilíndrico como el observado en este trabajo.

El tipo celular más grande (20µm) y que acompañan de un esquema (ver fig.4), señala a una célula moniliforme con paredes engrosadas de manera irregular, mientras que en nuestro caso las moniliformes poseen paredes ligeramente engrosadas de manera uniforme, siendo su forma más definida.

Las células helicoidales son consistentes con nuestros resultados, así como las células bulbosas y las de formas azarosas pueden ser identificadas dentro de nuestras caracterizaciones, en las cuales, los demás tipos celulares son distintos o no aparecen en las de los autores antes citados quizás debido al tiempo de incubación insuficiente que emplean.

Campbell y Petersen (1975) indican que de los tres aislamientos, uno mostró ser distinto en su caracterización, lo que los llevó a tomar en cuenta la posibilidad de que sea una "variedad" de A. muscaria con diferencias poco evidentes en el carpóforo, o que quizás tales caracteres del cultivo representan un carácter real de separación de taxa. Dicha posibilidad podría ser aplicada a los tres casos considerados, siempre y cuando la variabilidad no sea únicamente a nivel de cepas.

Jenkins y Petersen (1976) obtienen sus cultivos del neotipo de A. muscaria colectado en Suecia, en bosques mixtos de Sorbus, Picea y Betula; Campbell y Petersen los obtienen en Canadá (no especifican hábitat) y nuestro ejemplar fue colectado en Altotonga, Veracruz, bajo Pinus, perteneciendo a una variedad de A. muscaria típica empleada por Jenkins y Petersen (1976) y probablemente distinta a la de Campbell y Petersen (op cit). Las di

ferencias que se observan al comparar las caracterizaciones de las tres regiones geográficas pueden ser indicativos del proceso de especiación que se está verificando en los distintos puntos. Sería interesante poder realizar cruza con micelios provenientes de las tres regiones, quizás el aislamiento reproductivo se ha completado, existiendo especies y no variedades. La presencia de fíbulas en los cultivos permite el que las cruza se verifiquen de la manera convencional, no así como en el caso de A. rubescens en la que se tiene que buscar otro indicador.

Ninguno de los autores citados ha confirmado el origen de sus cepas.

De los caracteres microscópicos, las células reniformes (Fig. 22m) las de forma de falange (Fig. 22d), las vesiculares refringentes apicales (Fig. 23c) y las de forma de "calceta" (Fig. 22l), así como las infladas, son las más factibles de constituir caracteres específicos. Hecho que tendrá que ser verificado mediante la observación repetida de los mismos en varias cepas de la especie.

El septo doliporo característico de holobasidiomicetes observado en este estudio (Fig. 24), las similitudes de las caracterizaciones con Campbell y Petersen (1975), la presencia de células infladas, las fíbulas y las pseudofíbulas se complementan en la confirmación del origen del aislamiento estudiado, la cual será total al sintetizar ectomicorrizas con su hospedero en el laboratorio o mediante cromatografía detectar la producción de Acido iboténico, muscimol, muscarina, etc.

De las especies de Amanita, el micelio de A. muscaria es el que se ha incluido en un mayor número de trabajos. Muchos desde el punto de vista del estudio de los hongos micorrícicos incluyen aislamientos de esta especie junto con otros hongos en publicaciones que se refieren a varios aspectos, como la capacidad de las cepas para la producción de diversas sustancias, tales como enzimas lignocelulolíticas (Trojanowski, 1984), aminoácidos libres (Rozycki y Strzelczyk, 1985), hormonas vegetales (IAA) (Jungquist y Stenstrom, 1983); al crecimiento en cultivo bajo distintas condiciones ambientales, como variaciones en el pH (Hung y Trappe, 1983) y distintas fuentes de carbono (Rudawska, 1982); a la síntesis de micorrizas en el laboratorio como Shaw, et al, 1982, con Picea sitchensis y P. grauca; o al aislamiento de micelio a partir de las raíces del hospedero (Chu-Chou y Grace, 1981).

Fries (1978) verifica la germinación de esporas de esta especie. En presencia de Rhodotorula glutinis y carbón activado, aumentó su tasa de germinación de 0.0001 a 0.01%, siendo la única de las especies estudiadas (Laccaria laccata, Lactarius helvus, Paxillus involutus y Leccinum scabrum) capaz de germinar en el medio basal sin ninguno de los aditamentos antes mencionados.

Otros se refieren a la tolerancia en su crecimiento ante metales pesados como el zinc (Brown y Wilkins, 1985), A. muscaria muestra ser altamente tolerante, hecho importante debido a que esta tolerancia faculta a sus hospederos a crecer en suelos con alto contenido de este metal, pudiéndose emplear en la refores-

tación de regiones contaminadas o con alto contenido de metales pesados.

De los trabajos que tratan exclusivamente con el micelio de esta especie resaltan: Pacieici (1960), que somete cultivos sumergidos de una cepa a varias condiciones de temperatura (22, 25, 28, 31 °C), fuentes de nitrógeno (Neopeptona,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) y concentraciones de carbohidratos (dextrosa 2 y 1%), encontrando como temperatura óptima la de 25°C; y el de Miller et al (1986) que se refiere a la síntesis de micorriza con la variedad persicina de A. muscaria, asociada a Pinus taeda y P. virginiana Mill. empleando un método sencillo. Este autor menciona que dicha variedad crece mejor en MA y el medio de Hagem y que las resiembras muestran mayor crecimiento que los cultivos originales.

Por otro lado, resulta interesante el hecho de que A. muscaria posee propiedades antifúngicas. Chaumont y Simeray (1983) encontraron que extractos acuosos, obtenidos de carpóforos, inhibieron el crecimiento de Cytospora, Fusarium, Graphium ulmi, Rhizoctonia solani y Stereum purpureum, todos hongos patógenos de vegetales. Esto añadido a los metabolitos secundarios tóxicos a nivel de sistema nervioso central y el hecho de que es la especie más investigada, en cuanto a su micelio, la hace atractiva para futuras investigaciones.

AMANITA rubescens

Los micelios descritos por Campbell y Petersen (1975) y Miller et al (1983) varían en su grado de diferenciación, siendo consistentes en cuanto a la tasa de crecimiento. Macroscópicamente nuestro aislamiento es más parecido al de Miller con respecto al micelio sumergido y a la coloración rosácea. Por el contrario, microscópicamente, el único tipo morfológico que describe no parece corresponder a ninguno de los observados por nosotros y por Campbell y Petersen (op.cit.).

En las caracterizaciones de estos últimos podemos reconocer en el presente trabajo a las hifas helicoidales, las células fusiformes en cadenas y ciertos tipos vesiculares apicales e intercalares que aunque no se esquematizan, observan estos autores y que pueden corresponder con las células en "raqueta", no teniendo seguridad en afirmar esto pues no se indican diámetros de las células.

Los caracteres que diferencian al aislamiento descrito en el presente estudio del de los otros autores son las pseudofibrillas, las células de refringencia homogénea, las infladas y lo que parece un doliporo en casi todas las uniones de las células. Dichas diferencias pueden ser efecto de un proceso de especiación o a los distintos tiempos de incubación.

La cepa de Campbell y Petersen (op cit) proviene de Canadá, la de Miller (op cit) al parecer de algún cepario de E.U.A pues no indica más que el número de cepa (VT990), asimismo no informa de qué parte del cuerpo fructífero se obtuvo el aislamiento y si su cepa ha permanecido almacenada por mucho tiempo; posiblemente la poca diferenciación que obtiene se deba a eso mismo.

y al hecho de emplear una temperatura de 25°C constante durante la incubación.

Los antes citados tampoco informan sobre el hábitat del ejemplar colectado y no confirman el origen de sus micelios.

Existen algunos estudios con micelios de esta especie. La síntesis de micorrizas se ha efectuado con Pinus virginiana Mill (HacsKaylo y Palmer, 1955); la temperatura óptima para su crecimiento parece ser de 24-29°C (HacsKaylo, et al, 1965). Asimismo esta especie contiene una toxina, rubescenslisina, que se ha demostrado causa daño a células en cultivo de tejidos de distintos órganos (Odenthal 1932).

Los caracteres que se presentan únicamente en los cultivos de esta especie y que podrían ser diagnósticos son: las células apicales en forma de raqueta (Fig. 25g), las tríadas en forma de riñón (Fig. 25k), y las helicoidales ramificadas (Fig. 32a), principalmente. Asimismo, la coloración del micelio parecida a la del carpoforo (el color vino o rosado que aparece en el estípite al ser dañado) distingue a esta especie de las demás.

AMANITA abrupta

Aroche y Aguilar (1986) hacen el primer registro para México de esta especie indicando que extractos obtenidos de carpóforos e inyectados por vía intraperitoneal provocaron la muerte en todos los animales experimentales.

Los caracteres con posible valor diagnóstico a nivel de especie son las células infladas pedunculadas y las gigantes, así como la fase de crecimiento rugoso.

No existen datos en la bibliografía sobre la morfología del micelio de esta especie.

AMANITA gemmata f. gracilis

Los cultivos de esta especie fueron, de los estudiados, los que presentaron menor diferenciación. Únicamente las células vesiculares pequeñas (Fig. 16a), las refringentes apicales (Fig. 16c) y las pseudofibras múltiples (Fig. 16e), la diferencian de las demás, no existiendo un tipo celular con forma definida que la distinga claramente o que pudiera ser considerado como carácter de la especie como los que se observan en los otros aislamientos.

Bonavides y Aroche (1986) observan que A. gemmata y sus formas (amici y gracilis) presentan diferencias en la morfología del carpóforo, así como en ciertos efectos tóxicos evidenciados por bioensayo (Bonavides et al, 1987) que sugieren una separación de taxa. Los micelios serán útiles como apoyo taxonómico en el momento en que se aisle y confirmen cepas de la especie y sus formas.

## CONCLUSIONES

Debido a la poca información de que se dispone en cuanto a las características del micelio de Amanita en cultivo y al poco número de aislamientos incluidos en esta tesis, las conclusiones a las que podemos llegar son un poco limitadas. Sin embargo, el análisis de los datos presentados en conjunción con los de otros autores, nos ofrece un panorama que empieza a delinear sus contornos con base en una serie de hechos sencillos:

1. Para aislar los micelios de Amanita no se requiere de una infraestructura material sofisticada y cara.
2. Amanita es capaz de crecer en medios de cultivo de composición simple.
3. El crecimiento y diferenciación del micelio ocurren más lentamente que en otros tipos de hongos, por lo que el tiempo indicado por Nobles (1965) para llevar a cabo la caracterización, resulta insuficiente en el caso de Amanita. Asimismo el sistema de Nobles (1965) ha resultado inadecuado hasta hoy para la caracterización morfológica del micelio.
4. Las especializaciones hifales producidas en medios de cultivo sencillos son suficientes para diferenciar a las especies a nivel de su micelio.
5. La confirmación del origen de la cepa por medio de la microscopía electrónica es apoyada por la presencia de ciertos tipos celulares como las fíbulas y las células infladas.
6. Un banco de germoplasma de Amanita, con base en cepas

confirmadas es imprescindible para el avance en el estudio del Género así como para la conservación de los organismos y como aportación al conocimiento y manejo de nuestros bosques.

## APENDICE I

El sistema de Nobles (1965) para la caracterización de  
micelios en hongos degradadores de la madera

A continuación se enumeran los caracteres empleados por Nobles (1965) para caracterizar los cultivos de hongos degradadores de madera. El número asignado a cada uno de éstos es empleado en la elaboración del código de especie como más adelante se explicará.

#### PRODUCCION DE OXIDASA EXTRACELULAR

1. Resultados negativos en las pruebas de oxidasa extracelular.
2. Resultados positivos en las pruebas de oxidasa extracelular.

En el caso en que no sea constante el resultado de la prueba, es decir, que en un mismo aislamiento se observen resultados positivos y negativos, los números 1 y 2 se incluyen en el código de especie.

#### SEPTACION DE LAS HIFAS

3. Hifas con pared delgada constantemente nodoso-septadas.
4. Hifas con pared delgada y septos simples en la zona de avance, estas hifas, usualmente anchas, emitiendo ramificaciones que son más estrechas y nodoso-septadas. La parte más vieja de la mata estando compuesta de tales hifas nodoso-septadas.
5. Hifas con paredes delgadas, principalmente con septo simple pero con fíbulas múltiples o solitarias ocasionales, presentándose éstas más frecuentemente en las hifas de la zona de avance.

6. Hifas con pared delgada y septos simples.

El examen de las hifas de la zona de avance es esencial en la diagnosis, ya que es en esta zona que los septos simples de las hifas en especies con el No. 4 y las fibuladas múltiples o individuales de las hifas de las especies con el No. 5 pueden ser observados.

PRESENCIA DE ESTRUCTURAS ESPECIALES FORMADAS POR DIFERENCIACION DE LAS HIFAS.

7. Hifas con pared delgada permaneciendo indiferenciadas.
8. Hifas que se diferencian para formar fibras, es decir, hifas con paredes gruesas, refractantes, hialinas o de color café y luz estrecha o aparentemente ausente. Estas hifas surgen, por lo general, como la elongación de la célula terminal de una hifa, por lo tanto son aceptadas. Pueden presentar fíbulas. En muchas especies las fibras son numerosas, largas y flexionadas y entretejidas, formando una mata densa, cohesionada y correosa.
9. Hifas diferenciadas para formar hifas nodoso-septadas con paredes engrosadas irregularmente o con áreas gruesas y refractantes dispersas en las paredes. En las hifas de este tipo, las paredes se engruesan desigualmente, son refractantes y, en algunas especies al menos, se modifican a gelatinosas, mientras que el lumen se reduce a una línea estrecha con expansiones ocasionales que corre de un extremo a otro de la hifa. En algunas especies la primera indicación de este tipo de diferenciación, es la formación de hifas con numerosas ramas

cortas o protuberancias, cuyas paredes son gruesas y refractantes. Las fíbulas pueden agrandarse, engrosarse en las paredes y semejar la estructura de una articulación ósea tipo "ball and socket".

10. Hifas diferenciadas para formar células cuticulares, empaquetadas muy estrechamente dando origen a un pseudoparenquima.

Las hifas de este tipo surgen como hinchazones terminales o intermedias sobre las hifas, al principio hialinas con el interior tiñéndose con floxina y finalmente con paredes ligeramente engrosadas y permaneciendo hialinas o tornándose de tonos cafés, formando áreas parenquimatosas que se observan como piel o crustosas sobre la superficie de la mata.

11. Hifas diferenciadas a través de la formación de numerosas ramas cortas, recurvadas o en forma de gancho o nódulos con paredes gruesas entrelazados para formar un plecténquima.

Las preparaciones para el estudio microscópico de las áreas correosas de las matas miceliales de numerosas especies muestran un plecténquima que parece un rompecabezas o mosaico. Las hifas componentes, firmemente entrelazadas, denotadas por el No. 11, incluyen dos tipos, aquellas con ramificaciones cortas en forma de gancho o curvadas y aquellas con ramificaciones, nódulos o protuberancias irregulares y con paredes gruesas.

12. Hifas diferenciadas para formar extremos hifales contor-

- sionados y con recubrimientos ("incrusted").
13. Cistidios presentes en el micelio vegetativo. El término cistidio se aplica generalmente a órganos estériles que se presentan en el himenio de diversas especies, pero estructuras similares se pueden encontrar en ciertos micelios aéreos.
  14. Cistidios presentes exclusivamente en el himenio o áreas con fructificaciones.
  15. Gleocistidios presentes en el micelio vegetativo o en el himenio de áreas fructificantes.
  16. Las hifas se agregan para formar rizomorfas o hebras conspicuas.
  17. Setas en micelio aéreo o en áreas con fructificaciones.
  18. Hifas en forma de setas.
  19. Sin uso.
  20. Hifas con proyecciones minúsculas sobre las paredes.
  21. Hifas con masas resinosas adheridas a las paredes.
  22. Bulbilos o nudos de hifas.
  23. Esclerocios.
  24. Hifas con paredes ligeramente engrosadas y lumen vacío, o al menos que permanece sin teñir, y con ramificaciones rígidas más o menos en ángulo recto.
  25. Hifas con paredes engrosadas permaneciendo el lumen sin teñir.
  26. Hinchazones conspicuas en las hifas.  
 "Hinchazones" constituye un término amplísimo que abarca desde hinchamientos poco notorios en hifas con pared delga

da, a las prominentes con disposición moniliforme, células lactíferas, aloclistos, expansiones en fibras e hinchazones que pueden interpretarse como clamidosporas o simplemente como hinchamientos.

Como se ha visto, el número 7 y los números del 8 al 26 son opuestos separando aquellas especies en las que las hifas permanecen indiferenciadas de aquellas en las que se presentan diferenciaciones en estructuras especializadas. Por lo tanto, el No. 7 y los Nos. del 8 al 26 son mutuamente excluyentes. No obstante, en algunas especies una estructura puede ser "rara o aparentemente ausente", una condición que se expresa en el código de especie incluyendo el No. 7, denotando ninguna estructura especial, y también el número que denota la presencia de dicha estructura.

27 a 31. Permanecen sin uso.

#### PRESENCIA DE CONIDIOS, CLAMIDOSPORAS U OÍDIOS

32. Conidios, clamidosporas y oídios ausentes.

33. Conidios presentes.

34. Clamidosporas presentes.

35. Oídios presentes.

El No. 32 es opuesto a los 33, 34 y 35, separando aquellas especies en las que no existen esporas accesorias de aquellas que sí las presentan. Sin embargo, en algunas especies se presentan muy escasamente. Tales especies tendrán el número 32 y el 33, 34 o 35 en su código de especie.

Como se utiliza aquí, los conidios son aquellas esporas secundarias que crecen terminalmente sobre estructuras especializadas, los conidióforos.

Las clamidosporas pueden ser raras o abundantes, terminales o intercalares, con paredes gruesas a delgadas, hialinas o con color café.

Los oídios se forman por la fragmentación de hifas nodoso-septadas donde la fíbula puede permanecer unida al oídio, o por la fragmentación de ramificaciones con septos simples.

#### COLOR DE LAS HIFAS Y DE LAS MATAS MICELIALES

36. Hifas hialinas y matas blancas o de color pálido.
37. Hifas amarillas o de color café cuando se montan en KOH y matas amarillas o de color café al menos parcialmente.

#### CAMBIOS EN LA COLORACION DEL AGAR INDUCIDOS POR EL CRECIMIENTO DEL MICELIO (REVERSO DE LA CAJA DE PETRI)

33. Reverso sin cambio de color.
39. Reverso café, al menos en parte.
40. Reverso decolorado, al menos parcialmente.

#### TASA DE CRECIMIENTO

41. Caja de Petri cubierta en una semana.
42. Caja de Petri cubierta en dos semanas.
43. Caja de Petri cubierta en tres semanas.
44. Caja de Petri cubierta en cuatro semanas.
45. Caja de Petri cubierta en cinco semanas.
46. Caja de Petri cubierta en seis semanas.
47. Caja de Petri que no se cubre en seis semanas.

Las tasas de crecimiento son expresadas como el número de semanas requeridas por el cultivo para cubrir una caja de Petri de 9cm. de diámetro a partir de un inóculo, colocado a lado de

la pared de la caja, cuando crecen en la obscuridad a temperatura ambiente fluctuante.

#### PRODUCCION DE CUERPOS FRUCTIFEROS

48. Cuerpos fructíferos regularmante producidos antes del fin de las seis semanas.
49. Sin emplear en la presente clave.

#### OLOR DE LOS CULTIVOS

50. Olor fragante, incluyendo los olores dulces o de frutas y el olor "wintergreen".
51. Olor a tierra o a rancio.
52. Olor que sugiere un antiséptico, como el olor a yodoformo.
53. Olor digno de hacerse notar pero no incluido en los anteriores.

#### RELACION CON EL HOSPEDERO

54. Asociado con la degradación de árboles de hojas anchas.
55. Asociado con la degradación de coníferas.
56. En otros hábitats.

#### FENOMENOS DE INTERFERTILIDAD

57. Especies homotálicas, completando su ciclo de vida a partir de una sola espora.
58. Heterotálica, con tipo de interfertilidad desconocido.
59. Heterotálica, mostrando el tipo bipolar de interfertilidad.
60. Heterotálica, mostrando ser del tipo tetrapolar de interfertilidad.

EL CODIGO NUMERICO DE LA ESPECIE

La lista de símbolos (el número asignado a cada carácter) que codifican los caracteres del cultivo de una especie dada constituye el código de la especie, el cual provee de una descripción bastante completa del micelio de una especie. Así, para Trametes suaveolens el código de especie 2.3.3.43.36.40.42.43.50.54.60. describe a la especie como productora de oxida sa extracelular en cultivo, de hifas con paredes delgadas nodosamente septadas, con fibras, clamidosporas, una mata de micelio blanco, agar decolorado, que se presenta en árboles de hojas anchas, y con heterotalismo tetrapolar. Tal especie, sin variaciones en los caracteres, aparecerá sólo una vez en la clave de Nobles (1966).

Nobles ordena los distintos códigos de especie en una clave de identificación de cultivos que separa a las especies primero, mediante los números 1 y 2 para la presencia o ausencia de oxida sa extracelular. Las dos secciones producto de esta separación, a su vez se divide cada una en cuatro, de acuerdo a la septación de las hifas (Nos. 3 a 6), siendo cada subgrupo dividido nuevamente de acuerdo a si presentan o no diferenciaciones especiales. A excepción de estos puntos de dicotomía, los demás caracteres que no son mutuamente excluyentes simplemente se van agregando hasta completar la caracterización del micelio.

Consideramos innecesario transcribir la clave de identificación de cultivos hecha por Nobles, ya que en ella se emplean los códigos de las especies que el autor incluyó en su estudio, siendo todas de hongos degradadoras de la madera. Simplemente

queríamos exponer el modo en que los caracteres de cultivo fueron sistematizados para diferenciar las especies en cultivo que sería lo que en el estudio de los mismos caracteres en el género Amanita, llega a ser significativo dentro de los objetivos del presente trabajo.

En seguida mencionaremos los términos que este autor emplea para describir la textura de la mata de micelio a la que Nobles no asigna ningún número, limitándose a mencionarlo después de cada código de especie.

#### TERMINOS EMPLEADOS PARA LA DESCRIPCION DE LA TEXTURA DEL MICELIO

Como gamuza (Chamoislike). Suave, con la textura de la gamuza fina.

Algodonosa (Cottony). Micelio erecto, largo (3-5mm) extendiéndose en todas direcciones.

Costrosa (Crustose). Formando una costra, generalmente de color obscuro.

Como pelusa o pequeños vellos o como plumas finísimas (Downy). Hifas finas cortas, frecuentemente erectas, dispuestas en la superficie del agar de forma dispersa, produciendo una mata vellosa generalmente lo suficientemente fina como para ser translúcida.

Farinácea, como harina (Farinaceous). Superficie harinosa, polvosa.

Afelpada (Felty). Mata compuesta de micelio algodonoso o lanoso, el cual se ha entrelazado, formando un tapete compacto y áspero constituyendo una superficie parecida al fieltro.

Flocosa (Flocose). Consistente de pequeñas borlas sobre el agar

o de micelio lanoso o algodonoso agregado para formar pequeños brotes erectos.

Lagunoso (Lacunose). Cubierto de depresiones o pequeños orificios.

Plumosa (Plumose). Presenta brotes de micelio con un eje central, a partir del cual, radian, en forma de abanico, hifas cortas o largas o grupos de hifas, dando la apariencia de plumas.

Felpuda (Plushlike, como peluche). Similar al aterciopelado pero con los filamentos más largos.

Subaterciopelada (Subfelty). Con micelio apretado al agar, formando una mata delgada apenas visible en ocasiones.

Aterciopelada (Felty). Con una capa de micelio consistente de hifas erectas, rectas y separadas, dispuestas de manera densa para formar una composición como la del terciopelo.

Lanosa (Wooly). Micelio compuesto de hifas o grupos de hifas muy largas, algo entrelazadas y postradas, formando una superficie parecida a la tela de lana suavemente texturizada.

## APENDICE II

Caracterizaciones miceliales de A. muscaria  
y A. rubescens realizadas por otros autores

Descripción de micelios de A. muscaria en Campbell y Petersen,  
1975.

248

Isolate: Caspareau Woods, approx 3 mi SE Wolfville,  
Kings Co., Nova Scotia, Can., 28.viii.73,  
Tenn. no. 37908.

Key Code: MA, MA+, PDA: 1. 6. 10. 26. 32. 36. 38. 47. 56.

Isolate: Scot's Bay, Cape Split, Kings Co., Nova  
Scotia, Can., 29.viii.73, Tenn. no.  
37928.

Key Code: MA, MA+: 1. 6. 26. 32. 36. 38. 47. 56.  
PDA: 1. 6. 26. 32. 36. 38. 47. 51. 56.

Isolate: Kejinkujik National Park, Victoria Lake,  
Annapolis Co., Nova Scotia, Can.,  
11.ix.73, Tenn. no. 38250.

Key Code: MA, MA+, PDA: 1. 6. 26. 32. 36. 38. 47. 56.

Colony on MA:

37908. Colony approx 5 cm diam after 6 weeks,  
aerial mycelium white, submerged mycelium "drab gray", mat  
felty to velvety, highly convoluted; margin even.

37928. Colony approx 23 cm diam in 6 weeks, "light  
pinkish cinamon" surrounding inoculum, sharply demarcated  
from "pale pinkish buff" mycelium toward margin, homo-  
geneously wooly with occasional hyphal tufts, not  
submerging; margin even.

38250. Colony approx 6 cm diam in 6 weeks,  
"avellaneous"; mat mostly aerial, texture chamoislike,  
extremely convoluted; margin uneven.

Advancing zone: hyphae generative, without clamp  
connections, contents heterogeneous, of 4 morphological  
types: a) very common vesicular to coniform or  
articulated, with bizarre lobose or spherical cells (Fig.  
1, b), interconnected in one isolate only (37908),  
frequently branched, often with large rough-walled  
vesicles approx 20  $\mu$  diam, empty and collapsed or with  
refringent contents, sometimes detached (Fig. 1, d); b)  
approx 2  $\mu$  diam, filamentous; c) approx 3  $\mu$  diam, thin-  
walled, composed of elongated cells with swollen apices;  
d) 4  $\mu$  diam or greater, long, occasionally refringent,  
cells with swollen apices. Mat: hyphae generative,

similar to advancing zone with more extreme cell shapes and increased refringence. Extracellular oxidase reactions negative with gum guaiacum, no growth but a faint brown diffusion zone on tannic acid agar (37908 and 38250), no diffusion zone (37928).

Colony on MA+:

37908. Colony approx 5 mm diam in 6 weeks, mat similar to MA.

37928. Colony approx 30 mm diam in 6 weeks, mat similar to MA except becoming submerged toward margin.

38250. Colony approx 6 mm in 6 weeks, "wood brown", mat felty and farinaceous due to intermingling of white hyphae, compact, tightly convoluted, growing upward on itself rather than into agar; margin uneven.

Advancing zone: hyphae generative, approx 3  $\mu$  diam, thin-walled, without clamp connections, of 3 morphological types: a) predominantly moniliform or vesicular with large lobose, randomly constricted and inflated cells, vesicles sometimes actively budding new vesicles or branches, empty and collapsed or contents refringent or homogeneous; b) approx 3  $\mu$  diam, filamentous, moderately branched, contents granular; c) (37928 only) approx 2  $\mu$  diam, short, tendrill-like hellicoid hyphae, tightly coiled in older mat. Mat: hyphae generative, similar to advancing zone.

Colony on PDA:

37908. Colony approx 2 mm diam in 6 weeks, mostly restricted to inoculum block, aerial mycelium white, submerged mycelium "drab gray", mat downy, convoluted, compact, advancing zone irregularly spreading; margin uneven.

37928. Colony approx 19 mm diam in 6 weeks, "cartridge buff", mat woolly, with massed aerial hyphae of variable density; margin uneven with areas of diffuse, silky, submerged hyphal tips. Odor of urine, faintly earthy.

38250 Colony approx 8 mm after 6 weeks, "buckthorn brown", mat chamoislike with white felty concentric zones, undulating topography of mat corresponding to crenations in advancing margin; margin uneven.

Advancing zone: hyphae generative, thin-walled, without clamp connections, contents moderately vacuolate, cells often with swollen apices, hyphae of 4 morphological types: a) vesicular and moniliform, with large (12-22  $\mu$  diam) terminal vesicles and intercalary utriform cells, both turgid and collapsed, sometimes refringent, interconnected in one isolate only (37908); b) approx 2  $\mu$  diam, filamentous, often copiously branched, cells with swollen apices; c) 3-5  $\mu$  diam, composed of bulbous cells; d) (37928 only) hellicoid hyphae, approx 3  $\mu$  diam and loosely coiled or 1-2  $\mu$  diam and tendrill-like. Mat: hyphae generative, including types in advancing zone but predominantly moniliform, and refringent with large terminal vesicles.

Caracterización micelial del neotipo de A. muscaria (Jenkins y Petersen, 1976).

Cultural characters.—Key Code (Nobles, 1965): 1. 6. 7. 32. 36. 39. 47. (50).56.

Colony on potato-dextrose agar up to 20 mm in diam in six wk; surface rugulose-mealy to minutely felty and then appearing granular, off-white to paler than "pale smoke gray;" agar depressed at colony margin; margin (2 mm) white, appressed to depressed agar, minutely imbricate, obscurely zonate; reverse "drab-gray," irregularly convoluted, with off-white margin (2 mm); odor faintly fragrant, as of cooking fruit. Hyphae 2.7-5.2  $\mu$ m in diam, thin-walled, hyaline, without clamp connections, often slightly inflated, tightly packed, interwoven into a very loose, irregular prosenchyma; contents of two types: a) mostly granular to vacuolate, and b) rarely gloeoplerous, refringent under phase contrast, not delimited by septa, usually somewhat inflated. Vesicular hyphae and helicoid hyphae not observed.

Campbell and Petersen (1975) reported hyphal differentiation in cultures of North American *A. muscaria*, but no distinct differentiation was observed in the cultures from the neotype specimen. Cultures originating from lamellae and stipe flesh were found to be essentially identical.

Caracterización de micelios de A. rubescens en Campbell y Petersen, 1975.

*Amnita rubescens* (Pers. per Fr.) S. F. Gray, Nat. Arr. Brit. Plants, 1: 600, 1821.

Isolate: Kings Co., Nova Scotia, Can., 10.ix.73., Tenn. no. 3249.

Key Code: MA, MA+, PDA: 1. 6. 26. 32. 36. 38. 47. 56.

Colony on MA approx 50 mm diam in 6 weeks, "tulleul buff", mat wooly, submerged toward advancing zone; margin even. Advancing zone: hyphae generative, 3-4  $\mu$  diam, thin-walled, without clamp connections, undifferentiated except for some short, irregularly thickened, swollen cells, large vacuoles, and refringent guttules. Mat: hyphae generative, 3-4  $\mu$  diam, thin-walled, without clamp connections; bulbous cells and terminal vesicles occasional, often with granular contents; helicoïd hyphae with variable coiling, loosely folded or accordianed to tightly spiraled. Extracellular oxidase reactions negative with ~~the~~ guaiacum, no growth but a faint brown diffusion zone on tannic acid agar.

Colony on MA+ approx 44 mm diam after 6 weeks, "pale olive buff", aerial and wooly near inoculum, submerged in advancing zone; margin even. Advancing zone: hyphae generative, 3-4  $\mu$  diam, thin-walled, without clamp connections, filamentous, unbranched and undifferentiated tips or occasionally shorter with irregularly thickened walls and dense contents; helicoïd hyphae present. Mat: hyphae generative, similar to advancing zone but with thickened, fusiform cells, singly and in chains.

Colony on PDA approx 40 mm diam after 6 weeks, off-white, wooly overall, ranging from loose tangles to dense tufts; margin even. Advancing zone: hyphae generative, of 4 morphological types; a) approx 4  $\mu$  diam, thin-walled, without clamp connections, cell apices often swollen preliminary to branching; b) moniliform, with thickened cells and large, terminal, densely staining vesicles; contents becoming heterogeneous with age and size; c) helicoïd, varying from tightly coiled to slightly serpentine or folded; d) approx 2  $\mu$  diam, with refringent guttules. Mat: hyphae generative, as in advancing zone with increasing heterogeneity in form and contents.

Caracterización de micelios de A. rubescens en Miller et al, 1983.

1. *Amanita rubescens* (Pers.:Fr.) S. F. Gray Fig. 1  
VT 990

**MICROSCOPIC CHARACTERISTICS:** Mycelial mat white to light cream or slightly rosey, under U. V. Light light purple submerged hyphae form a yellow-green ring; reverse cream to orange-beige; mat primarily submerged, aerial mycelium sparse, surface velvety, margin even, grows submerged in agar; maximum growth rate 4.2-4.5 cm in one month at 25°C; smell slightly unpleasant, plasticlike.

**MICROSCOPIC CHARACTERISTICS:** Hyphae mostly 3-5  $\mu$ m wide, thin-walled, smooth, vesicular hyphae 3-12  $\mu$ m wide, subglobose to irregular, forms long, catenulate chains (Fig. 1); septae single, common, contents extremely granular; branching simple, frequent; clamp connections absent.

**MICROCHEMICAL REACTIONS:**<sup>2</sup> Oleiferous granules in cylindrical and moniliform hyphae black in Sudan Black-B but negative in Sudan IV.

**EXTRACELLULAR OXIDASE PRODUCTION:**<sup>3</sup> Gum guaiac, syringaldazine and phenol were positive.

## BIBLIOGRAFIA CITADA

- Ainsworth, G.C. 1975. Introduction to the History of Mycology. Cambridge University Press. 359 págs.
- Airth, R.L. y G.E. Foerster. 1965, Light emission from the luminous fungus Collybia velutipes under different nutritional conditions. Amer. J. Bot. 52 (5):495-505.
- Alexopoulos, C.J. 1980. Division Amastigomycota III; The basidiomycotina. En: Harold, C.B. et al, Morphology of plants and fungi. Cuarta edición. Harper and Row Publishers. N.Y. pp 686-712.
- Andary, C., G. Privat, F. Enjalbert y B. Mandrou. 1979. Teneur comparative en Amanitines de diferentes Agaricales toxiques D'Europe. Documents mycologiques 10 (37-38): 61-70.
- Aroche, R.M. 1986. Estudios de apoyo taxonómico en el Género Amanita I. Caracterización de diversas especies. Resumen, II Congreso Nacional de Micología, Oaxtepec, Morelos.
- Aroche, R.M. y E. Pérez-Silva. 1982. Amanita porphyria en la micoflora mexicana. Resumen, III Congreso Latinoamericano de Botánica, Lima, Perú.
- Aroche, R.M. y P. Fuentes. 1982. Presencia de ciclopéptidos tóxicos en algunas especies de la Sección Phalloïdae del género Amanita en México. Bol. Soc. Mex. Mic. 17: 187-193.
- Aroche, R.M. y O. Aguilar. 1986. Primer registro de Amanita abrupta Peck para México. Resumen, II Congreso Nacional de Micología, Oaxtepec, Morelos.
- Aroche, R.M., O. Aguilar, J. Bonavides y V. Valenzuela. 1986. El complejo Phalloïdes en Tlanchinol y Molango, Hidalgo. Resumen, II Congreso Nacional de Micología, Oaxtepec, Morelos.
- Aroche, R.M., E. Pérez-Silva Y P. Fuentes. 1982. Estudio de Amanita porphyria y A. brunescens de la sección Mappae en México. Bol. Soc. Mex. Mic. 17: 158-165.
- Aroche, R.M., M. Villegas, J. Cifuentes, F. Lorea y J. Bonavides. 1984. Nuevos datos sobre la distribución y taxonomía de Amanita Phalloïdes en México. Bol. Soc. Mex. Mic. 19: 275-281.
- Bas, C. 1969. Morphology and subdivision of Amanita and a monograph on its Section Lepidella. Persoonia 5:285-579.
- Bas, C. 1977. Species concept in Amanita Section Vaginatae. En: Clémenton, H. Species concept in Hymenomycetes, pp. 79-104.

- Bracker, Ch.E. y E.E. Butler. 1963. The ultrastructure and development of septa in hyphae of Rhizoctonia solani. Mycologia 55: 35-57.
- Brancato, F.P. y N.S. Golding. 1953. The diameter of the mold colony as a reliable measure of growth. Mycologia 45: 848-864.
- Bresinsky, A., A.O. Hilber y H.P. Molitoris. 1977. The genus Pleurotus as an aid for understanding the concept of species in Basidiomycetes. En: Clémencion, H. The species concept in Hymenomycetes: pp. 216-229.
- Brooks, R.D. 1975. The presence of dolipore septa in Nia vibri-ssa and Digitatispora marina. Mycologia 67: 172-174.
- Brown, M.T. y D.A. Wilkins. 1985. Zinc tolerance of Amanita and Paxillus. Trans. Brit. Mycol. Soc. 84(2): 367-369.
- Bryan, W.C. y B. Zak. 1961. Synthetic culture of mycorrhizae of southern pines. Forest Sci. 7: 123-129.
- Buller, A.H.R. 1933. The translocation of protoplasm through the septate mycelium of certain pyrenomycetes, discomycetes, and hymenomycetes. Res. on Fungi 5: 75-167.
- Campbell, M.P. y R.H. Petersen. 1975. Cultural characters of certain Amanita taxa. Mycotaxon 1 (3): 239-258.
- Clémencion, H. 1977. The species concept in hymenomycetes. Proceedings of a Herbette Symposium held at the University of Lausanne, Switzerland. August 16-20, 1976. J. Cramer.
- Cooke, R. 1977. The biology of simbiotic fungi. John Willey and Sons.
- Courtillot, M., y T. Staron. 1970. Amanita virosa Fr. Précisions sur L'espece mise en évidence de Sa toxine principale (viroisine). Ann. Phytopathol. 2(3): 261-584.
- Chaumont, J.P. y J.S. Simeray. 1983. Antifungal properties of 225 basidiomycetes and ascomycetes against 7 phytopathogens cultivated in vitro. Cryptogam. mycol. 3(3): 249-260.
- Chu Chou, M. y L.J. Grace. 1981. Mycorrhizal fungi of Pseudotsugamenziesii in the North Island of New Zeland. Soil. Biol. Biochem. 13(3): 247-250.
- Darwin, Ch. 1859. El origen de las especies. Editorial Porrúa (1982), página 32. En "Especies dudosas".
- Davidson, R.W., W.A. Campbell y D.J. Blaisdell. 1938. Differentiation of wood decaying fungi by their reactions on gallic or tannic acid medium. J. Agr. Res. 57: 683-695.

- Davidson, R.W., W.A. Campbell y D.B. Vaughn. 1942. Fungi causing decay of living oaks in the eastern United States and their cultural identification. U.S.D.A. Tech. Bull. 785:65.
- Davis, E.E. y S.C. Jong. 1976. Basidiocarp formation by Laccaria laccata in agar culture. Mycologia 68: 211-214.
- Deml, G. 1977. Feinstrukturelle Merkmalsanalysen an Utilaginales-Arten. Z. Pilzkunde 43:291-303.
- Deml, G. y F. Oberwinkler. 1981. Studies in heterobasidiomycetes Part 4. Investigations on Entorrhiza casparyana by light and electron microscopy. Mycologia 73: 392-398.
- Desole, S. 1982. Bibliotheca mycologica 88. Development of the dolipore of Coprinus radiatus.
- Ellis, T.T., M.A. Rogers, C.W. Mims. 1972. The fine structure of septal pore cap in Coprinus stercorearius. Mycologia 64: 681-688.
- Eymé J. y H. Parriaud. 1970. Au sujet de l'infrastructure des hyphes de Clathrus cancellatus Tournefort, champignon gasteromycete. C.R. Hebd. Séances Acad. Sci. Ser. D. Sci. Nat. (Paris) 270:1890-1892.
- Fiussello, N. y M.L. Romano. 1982. Ocurrence of bufotenine in the mycelium and cultural medium of Amanita citrina. Allionia 25: 77-80.
- Flegler, S.L., G.R. Hooper y W.G. Fields. 1976. Ultrastructural and cytochemical changes in the basidiomycete dolypore septum associated with fruiting. Can. J. Bot. 54: 2243-2253.
- Fries, N. 1978. Basidiospore germination in some mycorrhiza-forming hymenomycetes. Trans. Brit. Mycol. Soc. 70 (3): 319-324.
- Galli, R., G. Tedesco y G.A. Amirante. 1980. Importanza tassonomica dell'analisi immunocitochimica delle spore. Mic. Ital. I:7-11.
- Garrido, N. 1982. Antibiotic properties of ectomycorrhizae and saprophytic fungi growing on Pinus radiata. Mycopathologia 77(2): 93-98.
- Giesy, R.M. y P.R. Day. 1965. The septal pore of Coprinus lagopus in relation to nuclear migration. Am. J. Bot. 52: 287-293.
- Girbardt, M. 1958. Uber die substruktur von Polystictus versicolor L. Arch. Mikrobiol. 28: 255-269.
- Gordon, M.S. 1979. Fisiología animal. Cía. Editorial Continental, Méx., D.F.

- Gray, W.D. and Bushnell, W.R. 1955. Biosynthetic potentialities of higher fungi. Mycologia 47: 646-663.
- Gull, K. 1976. Differentiation of septal ultrastructure according to cell type in the basidiomycete Agrocybe prae-cox. J. Ultrastruct. Res. 54: 89-94.
- Guzmán, G. 1987. Conferencia en la reunión anual de la Sociedad Mexicana de Micología del 30 de enero.
- Hacskaylo, E. 1951. A study of the roots of Pinus virginiana in relation to certain hymenomycetes suspected of being mycorrhizal. Wash. Acad. Sci. Jour. 41: 399-400.
- Hacskaylo, E. 1971. The role of mycorrhizal associations in the evolution of the higher basidiomycetes. En Petersen, R.H. Evolution in the higher basidiomycetes. Págs. 217-231.
- Hacskaylo, E. y L. Barnett. 1954. Growth of fungi on three sources of nitrogen. Mycologia 46: 691-700.
- Hacskaylo, E. y J.G. Palmer. 1955. Hymenomycetous species forming mycorrhizae with Pinus virginiana. Mycologia 47: 145-147.
- Hacskaylo, E., J.G. Palmer y J.A. Vozzo. 1965. Effect of temperature on rowth and respiration of ectotrophic Mycorrhizal fungi. Mycologia 57: 748-756.
- Harley, J.L. 1969. The biology of mycorrhiza. Second Edition. Leonard Hill, London.
- Hayat, M.A. 1978. Principles and techniques of electron microscopy. Van Nostrand Reinhold, N.Y.
- Hladik, J. 1982. La Biofísica. Breviarios del Fondo de Cultura Económica. México, D.F. Segunda edición, 166 págs.
- Hung, L.L. y J.M. Trappe. 1983. Growth variation between and within species of ectomycorrhizal fungi in response to pH in-vitro. Mycologia 75(2):234-241.
- Hyde, J.M. 1966. Ultrastructure of basidiospores and mycelium of Lenzites saepiaria. J. Bacteriol. 92: 1218-1227.
- Jenkins, D.T. 1977. A taxonomic and nomenclatural study of the genus Amanita Section Amanita for North America. J. Cramer, Germany.
- Jenkins, D.T. 1986. Amanita of North America. Mad River Press, Eureka.
- Jenkins, D.T. y R.H. Petersen. 1976. A neotype specimen for Amanita muscaria. Mycologia 68:463-469.

- Jersild, R., S. Mishkin, y D.J. Nieder Pruem. 1967. Origin and ultrastructure of complex septa in Schizophyllum commune development. Arch. Mikrobiol. 57: 20-32.
- Johnson, G.T. y A.C. Jones. 1941. Data on the culture characteristics of species of Coprinus. Mycologia 33: 424-433.
- Johnson, B.C. and J.F. Preston. 1979. Unique amanitin resistance of ARN synthesis in isolated nuclei from Amanita species accumulating amanitins. Arch. Microbiol. 122 161-167.
- Jungquist, P.O. y E. Stenstrom. 1983. IAA production by mycorrhizal fungi determined by gas chromatography and mass spectrometry. New phytol. 94 (3): 401-408.
- Kalisz, H.M. y R.T. Moore. 1986. Protein utilization by basidiomycete fungi. Trans. Brit. Mycol. Soc. 86 (4): 519-526.
- Khan, S.R. y J.W. Kimbrough. 1979. Ultrastructure of septal pore apparatus on the lamellae of Nematoloma puiggarii. Can. J. Bot. 57: 2064-2070.
- Khan, S.R. y J.W. Kimbrough. 1980. Septal structure in some genera of Tremellaceae. Can. J. Bot. 58: 55-60.
- Khan, S.R. y J.W. Kimbrough. 1982. A reevaluation of the basidiomycetes based upon septal and basidial structures. Mycotaxon 15(0): 103-120.
- Kornerup, A. y H.J. Wanscher. 1978. Methuen handbook of color. Ed. Eyre Methuen, Londres.
- Largent, D., D. Johnson y R. Watling. 1977. How to identify mushrooms to genus III: Microscopic features. Mad River Press, Eureka.
- Lowe, D.H. y R.P. Elander. 1983. Contribution of mycology to the antibiotic industry. Mycologia 75(2): 361-373.
- Manocha, M.S. 1965. Fine structure of Agaricus carpophore. Can. J. Bot. 43: 1329-1333.
- Marchant, R. 1969. The fine structure and development of fructification of Lycoperdon perlatum. Trans. Brit. Micol. Soc. 53: 63-68.
- McLaughlin, D.J. 1970. Environmental control of fruitbody development in Boletus rubinellus in axenic culture. Mycologia 62: 307-331.
- Meixner, A. 1979. Amatoxin-Nachweis in Pilzen. Z. Mykol. 45: 137-139.
- Miller, O.K. 1967. The role of light in the fruiting of Panus fragilis. Can. J. Bot. 45: 1939-1943.

- Miller, O.K. 1971. The relationship of cultural characters to the taxonomy of the agarics. En Petersen, R.H. Evolution in higher basidiomycetes. The Univ. of Tenn. Press., Knoxville. pp. 197-215.
- Miller, O.K., S.L. Miller y J.G. Palmer. 1983. Description and identification of selected mycorrhizal fungi in pure culture. Mycotaxon 18(2): 457-481.
- Miller, O.K., Jenkins, D.T. y P. Dery. 1986. Mycorrhizal synthesis of Amanita muscaria var. persicina with hard pines. Mycotaxon 26: 165-172.
- Modess, O. 1941. Zur Kenntnis der Mykorrhizabildner von Kiefer und Fichte Symbolae Bot. Upsaliensis 5(1): 1-146.
- Moore, R.T. 1971. (Discusión y fotografía) En: Raper, J.R. y A. S. Flexer Mating systems and evolution of basidiomycetes. En: Evolution in the higher basidiomycetes. Editado por R.H. Petersen. Univ. of Tenn. Press. Knoxville.
- Moore, R.T. 1980. Taxonomic significance of septal ultrastructure in the genus Onnia (Polyporineae, Hymenochaetales). Bot. Notiser. 133: 169-175.
- Moore, R.T. y J.H. McAlear. 1962. Fine structure of Mycota. 7. Observations on septa of ascomycetes and basidiomycetes. Amer. J. Bot. 49: 86-94.
- Moore, R.T. y R. Marchant. 1972. Ultrastructural characterization of the basidiomycete septum of Polyporus biennis. Can. J. Bot. 50: 2463-2469.
- Mueller, G.M. 1984. New North American species of Laccaria (Agaricales). Mycotaxon 20: 101-106.
- Müller E. y W. Loeffler. 1976. Micología. Manual para naturalistas y médicos. Ed. Omega, S.A., Barcelona, Esp.
- Nobles, M.K. 1948. Studies in forest pathology. VI. Identification of cultures of wood-rotting fungi. Can. J. Res. C 26: 281-431.
- Nobles, M.K. 1958. Cultural characters as a guide to the taxonomy and phylogeny of the polyporaceae. Can. J. Bot. 36: 883-926.
- Nobles, M.K. 1965. Identification of cultures of wood-inhabiting hymenomycetes. Can J. Bot. 43: 1097-1139.
- Nobles, M.K. 1971. Cultural characters as a guide to the taxonomy of the polyporaceae. En: Petersen, H.R. Evolution in higher basidiomycetes. pp. 169-195.

- Oberwinkler, F. y R.J. Bandoni. 1981. Tetragoniomyces gen. nov. and tetragoniomycetaceae fam. nov. (Tremellales). Can. J. Bot. 59: 1034-1040.
- Odenthal, K.P. 1982. Damage in vitro to various organs and tissues by rubescenslysin from the edible mushroom A. rubescens. Toxican 20(4): 765-782.
- Ola'h, G.M. 1969. Le genre Panaeolus. Essai taxonomique et physiologique. Rev. Mycol. 10: 1-173.
- Pecieici, L.R. 1960. Preliminary growth and nutrition studies of Amanita muscaria in submerged culture. Lloydia 23 (2): 43-49.
- Pantidou, M.E. 1961 a. Cultural studies of Boletaceae. Gyrodon merulioides and four species of Boletinus. Can J. Bot. 39: 1149-1162.
- Pantidou, M.E. 1961 b. Carpophores of Phlebopus sulphureus in culture. Can J. Bot. 39: 1163-1167.
- Pantidou, M.E. 1962. Cultural studies of Boletaceae. Carpophores of Phlebopus lignicola in culture. Can.J. Bot. 40: 1314-1319.
- Pantidou, M.E. 1964. Cultural studies of Boletaceae. Carpophores of Xerocomus badius and Xerocomus illudens in culture. Can.J. Bot. 42: 1147-1149.
- Pantidou, M.E. y Groves, J.W. 1966. Cultural studies of Boletaceae. Some species of Suillus and Fuscoboletinus. Can. J. Bot. 44:1371-1392.
- Pantidou, M.E. y R. Watling. 1970. A contribution to the study of the Boletaceae-Suilloideae. Notes Roy. Bot. Gdn., Edinb. 30: 207-237.
- Pantidou, M.E. y R. Watling. 1973. Fruit bodies of Boletus amarellus in pure culture. Notes Roy. Bot. Gdn., Edinb. 32: 439-444.
- Pantidou, M., R. Watling y G. Zacharoula. 1983. Mycelial characters, anamorphs and teleomorphs in genera and species of various families of Agaricales in culture. Mycotaxon. 17: 409-432.
- Patrignani, G. 1983. Septal pore apparatus ultrastructure in Tremella foliacea and Tremellodon gelatinosum. Caryologia 36(I): 19-26.
- Patton, A.M. y R. Marchant. 1978. A mathematical analysis of dolipore parenthosome structure in Basidiomycetes. J. Gen. Microbiol. 109: 335-349.

- Pérez-Silva, E. y R.M. Aroche. 1983. Chromatographic and taxonomic evaluation of Amanita citrina (Agaricales). Mycologia 75: 1030-1035.
- Petersen, R.H. 1971. Evolution in the higher basidiomycetes. An International Symposium. The University of Tennessee Press, Knoxville.
- Petersen, R.H. 1977. Species concept in higher Basidiomycetes: Taxonomy, Biology, and Nomenclature. En: H. Cléménçon. The species concept in higher basidiomycetes, pp.363-379.
- Raper, J.R. y A.S. Flexer. 1971, Mating systems and evolution of the basidiomycetes. En: R.H. Petersen. Evolution in the higher basidiomycetes. The Univ. of Tenn.Press, Knoxville, pp. 149-167.
- Robbins, W.J. 1950. A survey of the growth requirements of some basidiomycetes. Mycologia 42: 470-476.
- Rozycki, H. y E. Strzelczyk. 1985. Free aminoacid production by ectomycorrhizal fungi of pine (Pinus sylvestris) Acta Microbiol. Pol. 34(1):59-66.
- Rudawska, M. 1982. Effect of various organic sources of nitrogen on the growth of mycelium and content of auxin and cytokinin in cultures of some mycorrhizal fungi. Acta Physiol. Plant. 4(1/2): 11-20.
- Scates, K. 1982. Easy guide to mushrooms descriptions.
- Scurti, J.C. 1982. Microscopic and antibiotic characteristics of Panaeolus fimicola. Allionia 24(0): 55-60.
- Semerdzieva, M. 1965. Cultivation and morphological studies of certain fungi of the agaricaceae family in vitro. Ceska Mykologie 19: 230-239.
- Setliff, M.D. y A.M. Patton. 1972. Fine structure of the septal pore apparatus in Polyporus tomentosus, Poria latermarginata, and Rhizoctonia solani. Can. J. Bot. 50: 2559-2563.
- Shaffer, R.L. 1975. The mayor groups of basidiomycetes. Mycologia 67: 1-18.
- Shaw, Ch.G.III, R. Molina y J. Walden. 1982. Development of the ectomycorrhizae following inoculation of containerized Sitka spruce (Picea sitchensis) and white spruce (Picea glauca) seedlings. Can. J. For. Res. 12: 191-195.
- Singer, R. 1986. The Agaricales in Modern Taxonomy. Fourth edition. Koeltz Scientific Books.
- Sjöstrand. F.S. 1967. Electron microscopy of cells and tissues. Academic Press, NY. Y.

- Stalpers, J.A. 1978. Identification of wood-inhabiting fungi in pure culture. Studies in Mycology, 16: 1-248.
- Stamets, P. y J.S. Chilton. 1983. The mushroom cultivator. A practical guide to growing mushrooms at home. Agarikon Press. Olympia, Wash.
- Stark, H.J., J.W. Kimbrough y J.F. Preston. 1973. Toxicological and cultural studies in the genus Amanita. A.S.B. Bulletin 20(2):84.
- Stepanova, A.A. 1986. Ultrastructure of the septal pore apparatus of Coprinus truncorum lamellae. Mikol. Fitopatol. 20(1):18-23.
- Straatsma, G. 1985. A strain collection of the mycorrhizal mushroom Cantharellus cibarius obtained by germination of spores and culture of fruit body tissue. Trans. Brit. Mycol. Soc. 85(4):689-697.
- Thielke, C. 1972. New investigations on the fine structure of mushrooms. Mushroom Science VIII: 285-293.
- Thielke, C. 1978. Mycelial growth in Amanita caesarea. Mushroom Science X(I):551-554.
- Trojanowski, J. 1984. Decomposition of Carbon-14 labeled lignin, holocellulose and ligno-cellulose by mycorrhizal fungi. Arch. Microbiol. 139 (2/3): 202-206.
- Tu, C.C. y J.W. Kimbrough. 1978. Systematics and phylogeny of fungi in the Rhizoctonia complex. Bot. Gaz. (Chicago) 139:454-466.
- Tyler, V.E. 1977. Chemotaxonomy in the basidiomycetes. En: Petersen, H. Evolution in Higher basidiomycetes, pp. 29-62.
- Ulloa M. y R.T. Hanlin. 1978. Atlas de micología básica. Ed. Concepto. Méx., D.F.
- Vilgalys, R. y O.K. Miller. 1982. Observations on sexuality in Collybia botryraceae using a simplified crossing technique. Mycotaxon 14(1): 305-308.
- Villegas, M., J. Cifuentes, R.M. Aroche y P. Fuentes. 1982. Primer registro de Amanita phalloides en México. Bol. Soc. Mex. Mic. 17: 140-146.
- Vozzo, J.A. y E. Hacskaylo. 1962. Mycorrhizal fungi on Pinus virginiana. Mycologia 53:538-539.
- Watling, R. 1981. How to identify mushrooms to genus. V: Cultural and development features. Mad River Press, Eureka, Cal.

- Watling, R. y O.K. Miller. 1973. A. *Coprinus* from white rot of sugar maple. Notes Roy. Bot. Gdn., Edinb. 32: 444-447.
- Wells, M. 1965. Ultrastructural features of developing and mature basidia and basidiospores of *Schizophyllum commune*. Mycologia 57: 236-261.
- Wells, K. 1978. Fine structure of septal pore apparatus in the lamellae of *Pholiota terrestris*. Can. J. Bot. 56: 2915-2924.
- Whittaker, R.H. 1969. New concepts of kingdoms of organisms. Science 163: 150-160.
- Wieland, T. 1978. Amatoxins, phallotoxins, phallolysin, and antamanide: The biologically active components of poisonous *Amanita* mushrooms. Critical Reviews in Biochemistry. pp. 185-260.
- Wilkins, W.H. 1954. Investigation into the production of bacteriostatic substances by fungi. Preliminary examination of the thirteenth 100 species, all basidiomycetes. Brit. J. Exp. Pathol. 35:28-31.
- Wilsenach, R. y Kessel, M. 1965. On the function and structure of septal pore of *Polyporus rugulosus*. J. Gen. Microbiol. 40: 397-400.