

Cuernavaca, Morelos a 23 de mayo de 2022

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: **JESÚS ALEJANDRO OLVERA BAÑUELOS**, con el título del trabajo: **Cultivo y Caracterización Micoquímica de *Tylopilus plumbeoviolaceus***. En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por Tesis Profesional por Etapas como lo marca el artículo 33° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: M. C. ELIZUR MONTIEL ARCOS

SECRETARIO: DR. ISAAC TELLO SALGADO

VOCAL: DR. ISMAEL LEÓN RIVERA

SUPLENTE: M. F. JONATHAN CORTÉS ÁLVAREZ

SUPLENTE: DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO
TAKETA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ISMAEL LEON RIVERA | Fecha:2022-05-23 14:35:32 | Firmante

e8dALiUu03ABmRQV5UQH07ay6zKKIPhG3Zy9WYwZXjE5OxGTq3j9OJb1nnKDqBUmhwQ8gtj4PPjyiqYuuAaCZ25T3f420HoozZjndlsGBUcoWqAnKEa+fzQwCsTSoT0r/AnQqs
e0eSCpbluKA5Pfs/mHyr55T+4xS4flghaJ/SsFX0YCmydzN9BJA74X+dLUjT6lpdn7qWIKGYtie1qB6ulZNRyJKPtIEOgAF531iMcaYL72emBjgwEWcVqkvO/Q57uCPu05ZAUt+Z
PrxR5+Kq9y74nqJe9APY7OPyFdacxDOwJvGtM7Ti1GqWNLcbv1sCKT00Q3RYZvZALBaw==

ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA | Fecha:2022-05-23 15:50:46 | Firmante

hGE0sbYzAmW3BqA3DmxyNq7JTtDqAaBhTql13wMXWUNspfxdlitxeSMGNWGWxhRil94aC3zFubdAxIPdlvX2dbt/pSWJGKDLcfrl3T0Rb99iStHudX+pZORXdH+njryXrB/i1FBTD
aMRybTxDLJwnrQaXoUjCTPflhQtxSgDYbce8gl0YzswywhvuvVp03VIXKLUNCq8lVcbgl9m7AyxH62MA1YUUCOrPw/DoDYxjSEcnfeTnfn8NQtQ0VqCis6AYHiuCHStO8FYnhQx
yflfL56ODsY5o7tCiohsQVOYgQ7Q3muMAPz8Ze4WxGkhvLf7d4UWHA5ufHDWeeAowLalPEA==

ELIZUR MONTIEL ARCOS | Fecha:2022-05-25 12:28:51 | Firmante

a/XHqIortdC4w+inx288MauN034wlAX/05whTMXwOwOAOqvrZG/u4ApXtJ8aRQWTWQkgjgDyA5srdbsDlyFJnuqO4mf1VSdKr1J8fwBMqOdAyYI+BKtn9KzVIC+I46T0VO6XcoA9
NmVG9RcSv7dr4xsbbKg+bDceL1MHyzmO2f7A4ygOo9DjhJ9JfYlYcdxvput/N7IFPtOuXMIiWHKN7JhJwG5u046ZA7Grz6YynfQ52qwjll8jsin/Auk3htYGwZBtHLD1du6ci3hV1Quu4
6mlsM5J98vLu3Jg/HmWuLGPSP3JAWWQUJlFjMirNBjhXffashrhRHKS1uFGB3fYQ==

ISAAC TELLO SALGADO | Fecha:2022-05-25 12:46:33 | Firmante

Z+qtNUH9cRc3tFXdBZ38xbtJJHejFw7Ou0suZ2Je7HO29mdadLDe8lf4980AZICztObtaYp+8d9Kj0d/DgrDLnacvpY8/d5CXixuXzWBW3x4v7IZV/5Bn+cD6OM1oAqKeSPKpnoco
rehCLN+SudEsVoY0Njv9Rcf/9yDbtJ27QB+JyJTzpeQuedyjCC7dYnRrUro+oLWJMMrbr1nWldEzw9TuSmISi/8px9cytFBbYvb9KUBhJlFTlITe9ILV61VuR18MdV4JE7VKyuhmqo
X0ZYADh6+PcsfU3sBri7gQl4d6R.JpTVVMDoM+Y1ERA6wQlkOaBRnPlLiqH6Vg==

JONATHAN CORTÉS ÁLVAREZ | Fecha:2022-05-26 07:52:41 | Firmante

TBKan91LjGqA6Emi7h8BPhCNkyoQc/qG4n/M75QtAR5EMhwxqra9bPaBphV9xbST2BfOLhoUn4PoKpC+I09VVe6l8y57Z+VrazTQKQUZ1VM/B9wTmW2VhftcfEQP3z6eCVoSfb
8y6CmcOZS/JaL0m70v4OPRTapXnUv7dUC+fDRYGEKejsWPZwUd5OVfGo7ByicoNt0tN2r+5lc3ONfh6cmUwfm2eLP4XyEVI3zlOgi+81qLJbLrKU1ItJG79gv3KuFhRBe5QErUfs
Ke408PK+NXHMjQxNSkTdxCbiwDSQY7LsNYiyd1jmn6adNXF+0lyk0PHeIUHYgkIERRECig==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



LxK5VOmtv

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/txQomNVc36EhzWj5msrc9ksmT7RuZhT>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Cultivo y Caracterización Micoquímica de
*Tylopilus plumbeoviolaceus***

TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

JESÚS ALEJANDRO OLVERA BAÑUELOS

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ISMAEL LEÓN RIVERA

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO, 2022

JURADO SEMINARIO

M. C. Elizur Montiel Arcos

Presidente

Dr. Isaac Tello Salgado

Secretario

Dr. Ismael León Rivera

Vocal 1

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Vocal 2

M. F. Jonathan Cortés Álvarez

Vocal 3

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco sinceramente a mi director de Tesis el Dr. Ismael León Rivera, por la dirección de este proyecto y por su apoyo incondicional en todo momento.

De la misma forma agradezco a los sinodales, M. en C. Elizur Montiel Arcos, Dr. Isaac Tello Salgado, M. en F. Jonathan Cortés Álvarez y al Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa, los comentarios y sugerencias hechas al trabajo.

Agradezco a mis padres Sra. Ma. Elena y el Sr. Enrique por brindarme su ejemplo, apoyo y comprensión, con los cuales he logrado una gran meta en la vida y que por siempre les estaré agradecido. A mi hermano Guillermo por brindarme siempre su apoyo incondicional. A mis tíos José Guadalupe, Hilda, Nazario, Margarita, Ma. De Lourdes, Enriqueta y Víctor por todo el cariño, apoyo y paciencia.

A todas aquellas personas que de alguna manera colaboraron con este trabajo.

Agradezco a la familia Montiel, la familia Varela y a nuestro guía de campo el Sr. Arnulfo, pertenecientes al Municipio de Puente de Ixtla, por todas las facilidades brindadas para recolectar y conocer las especies silvestres de hongos.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 HONGOS COMESTIBLES	3
2.2 HONGOS MICORRÍCICOS	4
2.2.1 CLASIFICACIÓN DE LAS MICORRIZAS MUTUALISTAS	5
2.2.1.1 ECTOMICORRIZAS	5
2.3 FAMILIA BOLETACEAE.....	6
2.3.1 GÉNERO <i>BOLETUS</i>	6
2.3.2 GÉNERO <i>TYLOPILUS</i>	7
3. ANTECEDENTES.....	13
3.1. PROPIEDADES BIOLÓGICAS DEL GÉNERO <i>BOLETUS</i>	13
3.2 PROPIEDADES BIOLÓGICAS DEL GÉNERO <i>TYLOPILUS</i>	18
3.3 PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE OTROS MIEMBROS DE LA FAMILIA BOLETACEAE	20
3.4 CULTIVO DE MICELIO DE ALGUNOS MIEMBROS DE LA FAMILIA BOLETACEAE	23
4. JUSTIFICACIÓN	28
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	30
6. HIPÓTESIS.....	30
7. OBJETIVOS	30
7.1 OBJETIVO GENERAL	30
7.2 OBJETIVOS PARTICULARES	30
8. DISEÑO EXPERIMENTAL	31
9. MATERIALES Y MÉTODOS	33
9.1 TRABAJO DE CAMPO	33
9.2. IDENTIFICACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO RECOLECTADO	33
9.2.1 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA	33
9.2.2 CARACTERES MACROSCÓPICOS	33
9.2.3 CARACTERES MICROSCÓPICOS	34
9.3 AISLAMIENTO DE CEPAS	35
9.3.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO MICELIAL EN MEDIO SOLIDO	35

9.3.2 TASA ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO EN MEDIO SOLIDO.....	35
9.4 ANÁLISIS MICOQUÍMICOS.....	36
9.4.1 EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS.....	36
9.4.2 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO.....	36
9.5. CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS Y/O FRACCIONES CROMATOGRÁFICAS POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	37
10. RESULTADOS.....	38
10.1 RECOLECTA DE ESPECIMENES FÚNGICOS.....	38
10.2 AISLAMIENTO DE LOS HONGOS RECOLECTADOS.....	41
10.3 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE <i>Tylopilus plumbeoviolaceus</i>	43
10.4 CULTIVO SUMERGIDO DE <i>Tylopilus plumbeoviolaceus</i> EN MATRAZ ...	47
10.4.1 EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO.....	47
10.4.2 EFECTO DEL pH.....	48
10.5 ANÁLISIS MICOQUÍMICO.....	54
10.5.1 EXTRACCIÓN POR MACERACIÓN EN DICLOROMETANO.....	54
10.5.2 ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS SOLUBLES EN CH ₂ Cl ₂ DE <i>Tylopilus felleus</i> , <i>Tylopilus plumbeoviolaceus</i> y <i>Boletus edulis</i>	56
10.5.2 EXTRACCIÓN POR MACERACIÓN EN METANOL.....	71
11. DISCUSION.....	73
12. CONCLUSIONES.....	76
11. LITERATURA CITADA.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. <i>Boletus edulis</i> BULL. 1782	9
Figura 2. <i>Tylopilus felleus</i> (BULL.: FR.) P. KARST. 1881	9
Figura 3. <i>Tylopilus plumbeoviolaceus</i> SNELL Y DICK, 1970	9
Figura 4. Cuerpo fructífero de <i>Boletus badius</i>	14
Figura 5. Esquema de las vías biosintéticas para producir los pigmentos boletus atromentina, grevilina A y derivados del ácido pulvínico (Nelsen, 2010)	15
Figura 6. Esquema de las rutas biosintéticas para producir los pigmentos boleto atromentina, grevilina A y derivados del ácido pulvínico (Nelsen, 2010).	16
Figura 7. Reacción de blanqueo de <i>Boletus luridus</i> , que contiene ácido variegático y ácido xerocómico. (Parque Estatal de Newport, Door Co., WI) (Nelsen, 2010)	16
Figura 8. Cuerpo fructífero de <i>Tylopilus felleus</i>	19
Figura 9. Pigmentos relacionados con grevillin A y atromentin (Nelsen, 2010).....	21
Figura 10. Algunos derivados de difenol de ciclopentenona de Paxillus y Gyroporus (Nelsen, 2010)	21
Figura 11. <i>Gyroporus cyanescens</i> conteniendo gyrocyanin (Rowan Creek, Columbia Co., WI) (Nelsen, 2010).....	22
Figura 12. Cuerpo fructífero de <i>Boletus edulis</i>	25
Figura 13. Cuerpo fructífero de <i>Lyophyllum shimeji</i>	26
Figura 14. Columna cromatográfica para fraccionar el extracto de <i>T. felleus</i>	36
Figura 15. Vista panorámica desde la cima de Cerro frío.	38
Figura 16. Especímenes recolectados de <i>Tylopilus felleus</i> y de <i>Tylopilus plumbeoviolaceus</i>	39
Figura 17. Ejemplares de los hongos recolectados del grupo de <i>Tylopilus felleus</i>	39
Figura 18. Ejemplares de los hongos recolectados del grupo de <i>Tylopilus plumbeoviolaceus</i>	40
Figura 19. Ejemplares de los hongos recolectados del grupo <i>Boletus edulis</i>	41
Figura 20. <i>Boletus edulis</i> de origen italiano en caja comprado de la empresa Hanseatik	41
Figura 21. Aislamiento de <i>Boletus edulis</i> y <i>Tylopilus</i> en medio de cultivo modificado (cereal, malta y agar)..	42
Figura 22. Crecimiento de la cepa <i>Tylopilus plumbeoviolaceus</i> en medio de maíz.....	42
Figura 23. Cepa de <i>T. plumbeoviolaceus</i> aislada del cuerpo fructífero creciendo en medio PDA	43

Figura 24. Crecimiento del hongo <i>T. plumbeoviolaceus</i> en medio PDA a temperatura 30-35 °C y en oscuridad.....	45
Figura 25. Hifas del hongo <i>Tylophilus plumbeoviolaceus</i> bajo el microscopio	46
Figura 26. Crecimiento de <i>Tylophilus plumbeoviolaceus</i> en medio sumergido con papa al 3% y malta al 2%..	47
Figura 27. Medio preparado con papa al 3% y sacarosa al 2% aforados a 3 litros de agua destilada..	47
Figura 28. Crecimiento de <i>Tylophilus plumbeoviolaceus</i> en medio sumergido con diferentes fuentes de carbono..	47
Figura 29. Medio preparado con papa al 3% y glucosa al 2% aforados a 3 litros de agua destilada..	48
Figura 30. Crecimiento de <i>Tylophilus plumbeoviolaceus</i> en medio sumergido con papa al 3% y malta al 2%con un pH de 6..	49
Figura 31. Crecimiento de <i>Tylophilus plumbeoviolaceus</i> en medio sumergido con papa al 3% y malta al 2%con un pH de 7..	49
Figura 32. Crecimiento de <i>Tylophilus plumbeoviolaceus</i> a los 13 días.....	50
Figura 33. Crecimiento de <i>Tylophilus plumbeoviolaceus</i> a los 22 días.....	50
Figura 34. Crecimiento de <i>Tylophilus plumbeoviolaceus</i> a los 30 días.....	50
Figura 35. Crecimiento de <i>Tylophilus plumbeoviolaceus</i> a los 37 días.....	51
Figura 36. Crecimiento de <i>Tylophilus plumbeoviolaceus</i> a los 37 días.....	51
Figura 37. Gráfica del crecimiento de <i>Tylophilus plumbeoviolaceus</i> en medio PDA a un pH ajustado a 5, 6, 8	53
Figura 38. Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, D ₂ O) del residuo soluble en agua del medio agotado en cultivo sumergido de <i>Tylophilus plumbeoviolaceus</i>	54
Figura 39. Cromatopla de los extractos de CH ₂ Cl ₂ bajo luz ultravioleta	56
Figura 40. Cromatopla de los extractos de CH ₂ Cl ₂ revelados con ácido sulfúrico.....	56
Figura 41. Cromatograma del extracto soluble en diclorometano de <i>Tylophilus felleus</i>	57
Figura 42. Cromatograma del extracto soluble en diclorometano de <i>Tylophilus plumbeoviolaceus</i>	58
Figura 43. Cromatograma de iones totales del extracto soluble en diclorometano de <i>Boletus edulis</i> mexicano.	58
Figura 44. Cromatograma del extracto diclorometano de <i>Boletus edulis</i> italiano.....	59
Figura 45. Espectro de masas del pico cromatográfico con tiempo de retención 32.52 min y su comparación espectral con la Biblioteca NIST.....	60

Figura 46. Espectro de masas del pico cromatográfico con tiempo de retención 35.71 min y su comparación espectral con la Biblioteca NIST.....	61
Figura 47. Espectro de masas del pico cromatográfico con tiempo de retención 35.82 min y su comparación espectral con la Biblioteca NIST.....	62
Figura 48. Espectro de masas del pico cromatográfico con tiempo de retención 42.06 min y su comparación espectral con la Biblioteca NIST.....	63
Figura 49. Espectro de RMN del extracto de diclorometano de <i>T. felleus</i> (200 MHz, CDCl ₃).	64
Figura 50. Espectro de RMN del extracto de diclorometano de <i>T. plumbeoviolaceus</i> (200 MHz, CDCl ₃).	64
Figura 51. Espectro de RMN del extracto de diclorometano de <i>Boletus edulis</i> recolectado en Cerro Frío (200 MHz, CDCl ₃).	65
Figura 52. Espectro de RMN del extracto de diclorometano de <i>Boletus edulis</i> comprado (200 MHz, CDCl ₃).	65
Figura 53. Espectro de RMN ¹ H de la fracción 6 del extracto diclorometano de <i>Boletus edulis</i> mexicano.	66
Figura 54. Espectro de RMN ¹ H de la fracción 10 del extracto diclorometano de <i>Tylopilus felleus</i>	66
Figura 55. Espectro de RMN ¹³ C de la fracción 10 del extracto diclorometano de <i>Tylopilus felleus</i>	67
Figura 56. Espectro de RMN HSQC de la fracción 10 del extracto diclorometano de <i>Tylopilus felleus</i>	67
Figura 57. Espectro de RMN COSY de la fracción 10 del extracto diclorometano de <i>Tylopilus felleus</i>	68
Figura 58. Espectro de RMN HMBC de la fracción 10 del extracto diclorometano de <i>Tylopilus felleus</i>	68
Figura 59. Ergosterol.....	70
Figura 60. Cromatoplaque de los extractos solubles en metanol bajo luz ultravioleta.....	71
Figura 61. Cromatoplaque de los extractos de metanol revelados con ácido y calor.....	72
Figura 62. Cromatoplaque de las fracciones 1, 2, 3 y 10 y extracto de <i>Tylopilus felleus</i>	72

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Comparación taxonómica y macroscópica de <i>Boletus edulis</i> , <i>Tylopilus felleus</i> y <i>Tylopilus plumbeoviolaceus</i> :	9
Tabla 2. Mediciones del crecimiento del hongo <i>Tylopilus plumbeoviolaceus</i> en las 4 cajas Petri.	43
Tabla 3. Crecimiento de <i>Tylopilus plumbeoviolaceus</i> en PDA (Control pH 5.9) durante 44 días.....	51
Tabla 4. Crecimiento de <i>Tylopilus plumbeoviolaceus</i> en PDA ajustado a pH 5 durante 44 días.....	52
Tabla 5. Crecimiento de <i>Tylopilus plumbeoviolaceus</i> en PDA ajustado a pH 6 durante 44 días.....	52
Tabla 6. Crecimiento de <i>Tylopilus plumbeoviolaceus</i> en PDA ajustado a pH 8 durante 44 días.....	53
Tabla 7. Peso de los hongos secos	55
Tabla 8. Peso de los extractos de diclorometano de los hongos.....	55
Tabla 9. Comparación de desplazamientos químicos del metabolito obtenido de la RMN con los datos de RMN del ergosterol (Islas-Santillán, <i>et al.</i> 2018).....	69
Tabla 10. Peso de los extractos metanólicos de los hongos:	71

RESUMEN

Los hongos comestibles silvestres son un recurso forestal no maderable que ha sido utilizado en su gran mayoría desde tiempos milenarios. Una de las familias de hongos comestible, es la Boletaceae.

La familia Boletaceae tiene una gran diversidad de géneros y especies en México, siendo *Tylopilus* uno de los géneros menos estudiados, debido en parte a que es un hongo no comestible. Ante la falta de información sobre el cultivo y la composición micoquímica de *Tylopilus plumbeoviolaceus*, es que se plantea la investigación del trabajo de investigación.

El objetivo general del presente trabajo experimental, es determinar la composición adecuada para el crecimiento micelial de *Tylopilus plumbeoviolaceus*.

Los cuerpos fructíferos de *Tylopilus felleus* y *Boletus edulis* fueron recolectados en los bosques del sur de Morelos. Las muestras de material fúngico fueron identificadas por investigadores del Laboratorio de Micología, del Centro de Investigaciones Biológicas, UAEM. El material micológico fue aislado en cajas Petri con medio de cultivo sólido de PDA, para posteriormente efectuar el escalamiento a cultivo sumergido en matraz. A partir de cuerpos fructíferos por maceración con disolventes orgánicos y agua se obtienen los extractos de los hongos *Tylopilus plumbeoviolaceus*, *Tylopilus felleus* y *Boletus edulis* (mexicano e italiano). Los extractos obtenidos son fraccionados por cromatografía en columna. Las fracciones cromatográficas fueron caracterizadas por Resonancia Magnética Nuclear y Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas.

Los resultados obtenidos muestran que es posible establecer un cultivo en caja Petri y en medio sumergido de *Tylopilus plumbeoviolaceus* con fuente de carbono no convencional. El micelio de *Tylopilus plumbeoviolaceus* excreta al medio sacáridos como los metabolitos más abundantes. El análisis micoquímico de los extractos de cuerpo fructífero mostró que los metabolitos aislados en los cuatro ejemplares son del mismo tipo ácidos grasos y ergosterol.

En conclusión, se pudo desarrollar el cultivo sumergido de *Tylopilus plumbeoviolaceus* utilizando una fuente de carbono no convencional. El cultivo sumergido de *T.*

plumbeoviolaceus produce sacáridos como los metabolitos más abundantes secretados al medio.

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos constituyen un grupo de organismos muy variado con gran importancia en el entorno ecológico, económico, alimenticio y social. Se encuentran ampliamente distribuidos por todo el mundo y desempeñan un papel importante de forma natural en el mantenimiento de los ecosistemas como reintegradores de la materia orgánica al suelo. Además, de ser utilizados como organismos indicadores y remediadores de ecosistemas alterados (Herrera y Ulloa, 1998).

La diversidad fúngica en México es muy grande, debido a la posición biogeográfica que nuestro país tiene, además, su intrincada orografía favorece una gran variedad de climas, lo que provoca el complejo mosaico vegetal que cubre el territorio nacional siendo las vegetaciones tropical y subtropical, las más ricas en especies fúngicas (Guzmán, 1998).

Los hongos superiores, *Basidiomicetos*, ofrecen la posibilidad de obtener nuevos compuestos químicos con alto potencial para aplicaciones medicinales y agrícolas. Los pioneros en el campo de los estudios químicos de Basidiomicetos (M. Anchel, A. Hervey, F. Kavanagh y W. H. Wilkin) investigaron alrededor de 2 000 especies de hongos a través de extractos de cuerpos fructíferos y micelios producidos artificialmente. Varios hongos superiores son fuentes abundantes de metabolitos secundarios como: polisacáridos, triterpenos, proteínas, polipéptidos, nucleótidos, alcaloides, entre otros. Estos metabolitos se pueden encontrar en el basidioma y/o micelio.

La investigación de Basidiomicetos, se implementaron los procesos de fermentación y el desarrollo de nuevas metodologías analíticas para aislar y elucidar la estructura de compuestos químicos, con lo cual se pudieron aplicar estos metabolitos en modelos biológicos in vivo e in vitro (Aqueveque, Becerra, y Silva, 2010).

Los hongos comestibles son un recurso poco abordado en la investigación para la obtención de compuestos con diversas funciones y actividades biológicas, considerándose como suplementos nutricionales (nutricéuticos) (2010 de Bruijn, *et al.*).

Una de las especies comestibles más consumidas a nivel mundial es *Boletus edulis*. Es común que este hongo sea consumido junto con otras especies del mismo género *Boletus*,

en ocasiones se les conoce como el complejo de *Boletus edulis* y que comprende a las especies: *Boletus aereus*, *Boletus edulis*, *Boletus pinophilus* y *Boletus reticulatus* (Hall et al. 1998).

En el orden *Boletales*, se encuentran los hongos micorrícicos no comestibles, del género *Tylopilus*. Debido a que estos hongos no son comestibles y a que tampoco se les atribuyen propiedades medicinales, hay poca información sobre el cultivo de *Tylopilus plumbeoviolaceus* y la caracterización micoquímica de la familia Boletaceae: *Boletus edulis*, *Tylopilus felleus* y *Tylopilus plumbeoviolaceus*. Debido a la escasa información científica reportada para las especies *Tylopilus plumbeoviolaceus*, *Tylopilus felleus* y *Boletus edulis*, recolectados en el Estado de Morelos, así como la dificultad para cultivar hongos micorrícicos, es que se decidió realizar esta investigación.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 HONGOS COMESTIBLES

La recolección de hongos constituye una actividad social y comercial, que permite el establecimiento de comunidades en torno a la zona de recolecta de estas especies. La recolección y comercio de hongos es realizada principalmente por personas de áreas rurales, brindando a sus habitantes la oportunidad de aumentar sus ingresos (Wang y Hall 2004).

Debido a que mucha de la recolecta de hongos comestibles son consumidas por la comunidad, es difícil establecer una estadística de la recolecta y comercialización de hongos comestibles silvestres. Sin embargo, se estima que el consumo mundial total anual del complejo *Boletus edulis* es entre 20,000 y 100,000 toneladas (Hall *et al.* 1998). Los mercados importantes para este hongo incluyen América del Norte, Francia, Italia y Alemania (Hall *et al.* 1998).

Se han hecho investigaciones en algunos hongos sobre su valor nutricional o la composición química de éstos, por ejemplo Reis (*et al.* 2011), hicieron un trabajo sobre la composición química y el valor nutricional de las especies más consumidas de hongos frescos cultivados como lo son: *Agaricus bisporus* (champiñones), *Pleurotus ostreatus* (hongo ostra), *Lentinula edodes* (shiitake) y *Flammulina velutipes* (seta aguja dorada). Sus resultados muestran que el shiitake dio los niveles más altos de macronutrientes a comparación de los demás, como también los niveles más altos de azúcares, tocoferoles (tienen actividad antioxidante) y ácidos grasos poliinsaturados (los cuales tienen un efecto beneficioso en general, disminuyendo el colesterol total), y el contenido más bajo de ácidos grasos saturados. Mientras que las setas blancas y marrones mostraron una composición de macronutrientes similar, al igual que valores similares de azúcares totales, ácidos grasos monoinsaturados (que pueden ayudar a reducir el nivel de colesterol malo (LDL), ácidos grasos poliinsaturados y tocoferoles totales. El hongo oreja de Cazahuate (*Pleurotus ostreatus*) presenta el contenido más alto de ácidos grasos monoinsaturados con contenidos similares en ácidos grasos poliinsaturados, ácidos grasos monoinsaturados y ácidos grasos saturados comparado con otros hongos comestibles.

2.2 HONGOS MICORRÍDICOS

Las raíces de las plantas vasculares están en contacto con un tipo de sustrato, además de diversos factores abióticos y bióticos que influyen en su desarrollo y función (Peterson, 1992). Algunos microorganismos ocupan uno o varios nichos en ese sustrato lo cual afecta a las raíces y el rendimiento de la planta de varias maneras. Dentro de este grupo de organismos se encuentran algunos hongos o bacterias patógenas que son perjudiciales para el crecimiento y la reproducción de las plantas. Lo que ocasiona que se requieran recursos o más gastos para controlar la densidad de la población y/o la patogenicidad de este grupo de organismos. Por otro lado, existe un grupo de organismos que son todo lo contrario, pueden ser beneficiosos para las plantas e incluso se pueden manipular para aumentar o mejorar su efecto sobre el rendimiento de las plantas (Peterson, Massicotte, y Melville, 2004).

Los organismos benéficos más prevalentes asociados con las plantas son los hongos que habitan el suelo, formando asociaciones mutualistas de raíces y hongos llamados micorrizas (Smith y Read 1997). La palabra micorriza tiene su origen en las palabras griegas hongo (*mukés*) y raíz (*Rhiza*). A partir de la raíz el hongo se alimenta de los nutrientes de la planta (agua, minerales, productos fotosintéticos y vitaminas). Los hongos micorrícicos pueden establecer una relación simbiótica con más de una especie de planta.

Existen siete tipos de micorrizas que se dividen en varios grupos según su morfología, dependiendo de si hay penetración o no de los hongos en la corteza de la raíz: ectomicorrizas, endomicorrizas, micorrizas arbutoides, micorrizas monotropoides, micorrizas ericoides y micorrizas de orquídeas, etc. Alrededor del 95% de los árboles en áreas templadas (*Pinaceae*, *Fagaceae*, *Dipterocarpaceae* y las familias *Caesalpinoidaceae*) forman ectomicorrizas con un número de especies del orden Ascomycota y Basidiomycota, incluidos los hongos comestibles con un alto valor comercial como *Tuber sp.*, *Boletus sp.* y *Lactarius sp.*

Se tiene la impresión de que la producción de hongos ectomicorrícicos silvestres comestibles ha disminuido con el transcurso de los años. Esta apreciación es debida a que en algunas zonas de recolección de este tipo de hongos ya no crecen los cuerpos fructíferos. El cambio climático, la degradación del hábitat y la sobreexplotación parecen ser los factores de esta reducción en la producción.

El desarrollo de técnicas de inoculación controlada para el establecimiento de hongos micorrícicos, las plantaciones de productores podrían ser formas sostenibles de mantener la producción de este tipo de especies, sin afectar la conservación de las poblaciones de hongos nativos.

2.2.1 CLASIFICACIÓN DE LAS MICORRIZAS MUTUALISTAS

Los hongos micorrícicos (HM) asociados que, por su tamaño pueden clasificarse en micromicetos o macromicetos, pueden pertenecer a los fila Glomeromycota (*i.e. Glomus, Gigaspora, Acaulospora*), Ascomycota (*i.e. Peziza, Tuber*) y Basidiomycota (*i.e. Amanita, Cantharellus, Boletus y Tylopilus*). En el caso de las plantas hospederas, la asociación puede presentarse en las gimnospermas (plantas que no forman flores como los pinos), angiospermas (plantas que forman flores), briofitas (musgos), equisetos y los helechos (tanto en el gametofito como en el esporofito). Así, dependiendo del tipo de hongo involucrado en esta asociación y de la integración morfológica existente entre los hongos y las raíces de las plantas hospederas, la asociación se ha clasificado como: a) Micorrizas con manto fúngico y b) Micorrizas sin manto fúngico. Las micorrizas con manto fúngico, a su vez, se han clasificado en: a) Ectomicorrizas, b) Micorriza arbutoide y c) Micorriza monotrofoide. Por su parte, las micorrizas sin manto fúngico se han clasificado en: (a) Micorriza arbuscular, (b) Micorriza ericoide, y (c) Micorriza orquideoide. En la naturaleza, cada tipo de micorriza se presenta en un ecosistema y ambiente edáfico particulares y, en ocasiones, con familias de plantas específicas (Camargo-Ricalde *et al.*, 2012).

2.2.1.1 ECTOMICORRIZAS

Existe una variación considerable en las características morfológicas y estructurales de las ectomicorrizas, aunque pueden ser fácilmente reconocidas por la característica cubierta fúngica o manto que envuelve a las raíces activas, a menudo el micelio fúngico en forma de fibra, puede ser visto emergido directamente del manto y colonizando el suelo el sustrato de enraizamiento, la segunda característica principal de la ectomicorriza es la formación de la red de Hartig. En el interior de esta extensiva zona de contacto entre el hongo y el hospedante, el hongo trae y libera los nutrientes y el agua hacia su hospedante, recibiendo a cambio azúcares y otros productos de la fotosíntesis generados por la planta (Olivares Reyes, 2008) dentro de este grupo se encuentra la familia Boletaceae.

Además, algunas ectomicorrizas desarrollan agregaciones lineales de hifas (rizomorfos o hebras), en el micelio extraradical que se especializan en el transporte rápido de nutrientes y agua. Unos pocos hongos ectomicorrícicos desarrollan esclerocios que consisten en hifas de almacenamiento compactas rodeadas por una corteza. Los cuerpos reproductivos hipogeos o epigeos también pueden formarse periódicamente a partir de micelio extraradical (Peterson, Massicotte, y Melville, 2004).

ESPECIES DE PLANTAS INVOLUCRADAS

Las ectomicorrizas generalmente se encuentran en especies arbóreas, aunque algunas especies arbustivas y herbáceas también pueden desarrollar esta asociación. Muchas de las especies arbóreas involucradas son importantes comercialmente para la madera y los productos de papel en todo el mundo. Dentro de los géneros de coníferas que se saben que tienen ectomicorrizas están *Picea*, *Pinus* y *Larix*, los cuales forman vastas extensiones del bosque boreal en el hemisferio norte. Mientras que en el hemisferio sur, algunos miembros del género *Dipterocarpaceae* y del género *Eucalyptus* son las especies dominantes de árboles ectomicorrízicos (Peterson, Massicotte, y Melville, 2004).

ESPECIES FÚNGICAS INVOLUCRADAS

La mayoría de las especies de hongos involucradas en la simbiosis de ectomicorrizas pertenecen a familias en Basidiomycota (basidiomicetes), junto con algunas especies pertenecientes a Ascomycotina (ascomicetes). Hay aproximadamente 5.500 especies conocidas de hongos que pueden formar micorrizas, de los cuales el 80% (aproximadamente) son epigenéticos, cuyas estructuras reproductivas se encuentran en el suelo. En contraste, hay menos especies hipogeas, las cuales producen sus estructuras reproductivas bajo tierra (Peterson, Massicotte, y Melville, 2004).

2.3 FAMILIA BOLETACEAE

2.3.1 GÉNERO *BOLETUS*

En el caso del género *Boletus*, se pueden considerar dos características para distinguir las especies tóxicas de las comestibles, por un lado, los hongos comestibles más apreciados presentan poros blancos o amarillentos y conservan el color blanco o rosado que es característico de la parte inferior del píleo (sombrero) y del estípite (tallo). En tanto que, los hongos tóxicos presentan poros rojos o adquieren tintes azules y verdosos al ser cortados,

heridos o frotados, incluso pueden presentar una combinación de estas dos características; aunque también las pueden presentar algunas especies comestibles (Herrera y Ulloa, 1998).

El género *Boletus* Bull. comprende numerosas especies con esporas generalmente alargadas y lisas, esporada en masa de color moreno olivácea y fructificaciones carnosas que pueden ser relativamente grandes. El himenio se encuentra forrado al interior por tubos, los cuales generalmente pueden ser separados con facilidad de la parte inferior del píleo, que desemboca en poros de forma, tamaño y color característicos según las especies. Comprende varios géneros cuyas especies son frecuentemente micorrízicas (Herrera y Ulloa, 1998). Algunos ejemplos dentro de este grupo son *Boletus edulis* (figura 1) y *Boletus pinicola* los cuales son muy parecidos y apreciados entre los recolectores por ser comestibles, mientras que *Boletus satanas* es una especie altamente tóxica y mortal (Herrera y Ulloa, 1998).

2.3.2 GÉNERO TYLOPILUS (Snell & E.A. Dick) Snell & E.A. Dick 1941

De acuerdo con Chakraborty *et al.* (2018) el género *Tylopilus* P. Karst., es uno de los taxones ectomicorrízicos menos atractivos por no ser comestible, asociado principalmente con árboles Fagales y Pinaceae en la familia Boletaceae. Se caracteriza por su aspecto seco, superficie de poro blanco a grisácea, pulpa de color rosa a morado-marrón en la madurez, de inmutable a ligeramente parduzco o se vuelve azul-verde en el contexto de carne compacta, estípites sólidos con pruina o reticulación en la superficie, ausencia de anillo o velo, pulpa de esmalte ocre pulido a pulido mate. Basidiosporas de color rosa, presencia de pleurocystidia y ausencia de conexiones de pinza (Wu *et al.* 2014). Sombrero de 7 a 17 cm de diámetro, de forma convexa texturizada aterciopelada y afelpada, que con el tiempo desaparece para tener la superficie lisa en el centro de su superficie con un margen irregular, arqueado y redondeado. Los especímenes jóvenes presentan un color violáceo con color y de tonalidades grisáceas cuando adultos sus tonos cambian a gris tenue y violeta claro, sus poros del himenio tienen una profundidad de 0.4 a 1.9 mm, poros de 2 a 3 mm. Su carne es de color blanquecina y de sabor amargo. Esporas fusiformes, lisas hialinas, amarillentas en KOH de 7.5-10.5 X 3.5-4.0 μm , cistidios del himenio de 30 a 45 X 7.5 a 11.5 μm langeniformes de cuellos muy estrechos, células del pileo con conclusiones globulares doradas, células terminales fusiformes cistidiosas a cilíndricas, ápices agudos alargados. Estípites de 10 a 25 cm de largo por 3 a 7 de ancho. Reacciones químicas negativo

en KOH la carne se torna amarillenta y con sales de hierro al aplicar una gota el contexto de la carne vira a un color azul-violáceo.

El género *Tylopilus* fue dividido en dos subgéneros: *T.* subg. *Tylopilus* y *T.* subg. *Porphyrellus* (Smith y Thiers 1971). El primer subgénero se caracteriza por esporas con paredes de color amarillo canela pálido a amarillo pálido en KOH y KI; el contexto generalmente no cambia o se oxida en la herida; el contexto no se torna de color marrón rojizo en KOH; el contexto generalmente se vuelve azul-verde en la lesión, luego se vuelve rojo marrón y, en algunos taxones, el contexto se vuelve rojo marrón en KOH " (Wolfe 1979).

De todo el mundo se reportan alrededor de 75 especies (Kirk *et al.* 2008; Magnago *et al.* 2017). Según Wu *et al.* (2014), todos los 11 clados que consisten en los miembros de *Tylopilus* se clasifican en cinco subfamilias (Austroboletoidae, Leccinoideae, Boletoidae, Pulveroboletus group y Zangioideae) en Boletaceae y *Tylopilus* ss, tipificadas por *Tylopilus felleus* (Bull.) (García Jiménez y Garza Ocañas (2001) situados dentro de la subfamilia Boletoidae.

Tabla 1. Comparación taxonómica y macroscópica de *Boletus edulis*, *Tylopilus felleus* y *Tylopilus plumbeoviolaceus*:

Comparación de: <i>Boletus edulis</i>, <i>Tylopilus felleus</i> y <i>Tylopilus plumbeoviolaceus</i>		
		
<p>Figura 1. <i>Boletus edulis</i> BULL. 1782</p>	<p>Figura 2. <i>Tylopilus felleus</i> (BULL.: FR.) P. KARST. 1881</p>	<p>Figura 3. <i>Tylopilus plumbeoviolaceus</i> SNELL Y DICK, 1970</p>
<p>TAXONOMÍA:</p>		
<ul style="list-style-type: none">• Filum: Basidiomycota• Subfilum: Basidiomycotina<ul style="list-style-type: none">• Clase: Homobasidiomycetes<ul style="list-style-type: none">• Subclase: Agaricomycetidae<ul style="list-style-type: none">• Orden: Boletales<ul style="list-style-type: none">• Familia: Boletaceae		

Recuperado de: <https://www.fungipedia.org/hongos/boletus-edulis.html>

<https://www.fungipedia.org/hongos/tylopilus-felleus.html>

(Snell y Dick, 1970)

DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA

SOMBRERO (PÍLEO) (Kobold, 2000)	SOMBREO (PÍLEO) (Rodríguez Ramírez, 2009)	SOMBRERO (PÍLEO) (Snell y Dick, 1970)
10-20 (25) cm, caroso, redondo o convexo, finalmente almohadillado, castaño-marrón oscuro, siempre más claro en el borde, que remata con una delgada línea blanca; cutícula lisa, brillante, untuosa, viscosa con la humedad, desbordante. Es graso, untuoso, resbaladizo como el jabón con la humedad.	32-100 mm de largo, de color café violáceo, sin cambio de coloración, glabro a casi subtomentoso, convexo a plano-convexo, con margen plano a decurvado, de textura lisa. Sus poros son de 0.5-1 mm de diámetro, de unión junta entre ellos, de forma redonda a irregular, con color a los tubos.	Duro y firme cuando es joven, 5-16 cm de ancho. Superficie seca, viscosa solo después de una lluvia prolongada, con un aspecto aterciopelado fino cuando es joven pero apenas subtomentoso, pronto se vuelve glabro, bastante violáceo cuando es joven, se vuelve opaco violáceo-gris violáceo, pálido u opaco lavanda a grisáceo-heliotropo, plomo-violáceo a monótono y luego marrón violáceo.
TÚBULOS (Kobold, 2000)	TÚBULOS (Rodríguez Ramírez, 2009)	TÚBULOS (Snell y Dick, 1970)
Primero cortos, luego más largos, de amarillo verdoso; pequeños poros redondeados blancos o amarillentos y	2-12 mm de largo, de unión libres con relación al estípote, de forma boletoide, de color crema blanco, a rosa, cambiando de	Los himenóforos se adhieren a una ligera decoloración, son blancas al principio y permanecen así durante

después oliváceos.	coloración a café claro.	mucho tiempo, madurando las esporas y volviéndose rosadas muy lentamente, sin cambios; poros casi redondos, diminutos, 2-3 a mm.
<p align="center">ESTÍPITE (Kobold, 2000)</p> <p>10-20(25) x 4-10 cm, grueso o cilíndrico, de un blanco yeso pasa a un tinte castaño. Está cubierto en la parte superior de una película blanca.</p>	<p align="center">ESTÍPITE (Rodríguez Ramírez, 2009)</p> <p>35.5 mm de largo por 17.3 mm de ancho, de forma clavado a subcilíndrico, en el ápice en algunos ejemplares presentan formas bulbosas en la parte basal, de color amarillo opaco, en la parte basal de color blanco, sin cambio de coloración, ampliamente reticulado.</p>	<p align="center">ESTÍPITE (Snell y Dick, 1970)</p> <p>Se estrecha hacia arriba u obclavado, ligeramente reticulado en hasta el ápice, a veces de 2-3 mm, con una eclosión cuando es joven</p>
<p align="center">CONTEXTO (Kobold, 2000)</p> <p>Sosa, blanca, no varía el color, con un tinte color vino bajo la cutícula del sombrero. Agradable olor a hongo; buen sabor, como a avellana.</p>	<p align="center">CONTEXTO (Rodríguez Ramírez, 2009)</p> <p>Consistencia carnosa, de 12 mm de grosor, de color blanco, sin cambio de coloración, amargo, olor dulce.</p>	<p align="center">CONTEXTO (Snell y Dick, 1970)</p> <p>Carne dura y firme, tanto cuando es joven, blanca, a menudo púrpura debajo de la superficie externa, sin cambios; olor insignificante a levemente butiraceo; sabe amargo.</p>

Boletus edulis es el más importante de una serie de especies agrupadas bajo el nombre de Boletos, inconfundible por su carne blanca que no cambia de color. Córdova-Chávez *et al.* (2014) señala que un estudio realizado por Pérez-Moreno *et al.* (2010) menciona que la presencia de algunas especies como *Boletus edulis*, ha disminuido debido a la destrucción de sus hábitats naturales. Algunos de los factores que han intervenido en esta disminución de especies fueron mencionados por Bandala *et al.* (1997), como son efectos de la recolecta, factores económicos, tenencia de la tierra, por mencionar algunos. Esto corrobora con lo que mencionan Contreras Cortés *et al.* (2018) quienes señalan que *Boletus edulis* aparece en la NOM-059-ECOL-2010, dentro de la categoría de ESPECIE AMENAZADA.

Por otro lado, en estadios inmaduros *Tylopilus felleus* es confundida con *Boletus edulis*, sin embargo *Tylopilus felleus* posee poros violáceos a rosados, no es tóxico pero su sabor es desagradable.

3. ANTECEDENTES

3.1. PROPIEDADES BIOLÓGICAS DEL GÉNERO *BOLETUS*

Uno de los primeros estudios relacionados con las propiedades anticancerígenas de esta clase de hongos fue realizado por Lucas *et al.* en 1957, quienes aplicaron con éxito un extracto obtenido de cuerpos fructíferos de *Boletus edulis* en el tratamiento del sarcoma 180 en ratones (Kinga Lemieszek *et al.*, 2013).

Kinga Lemieszek *et al.* (2013) determinaron las propiedades anticancerígenas de *Boletus edulis*. Sus estudios indican que este hongo posee un potencial agente anticancerígeno y puede proporcionar una nueva opción terapéutica / preventiva en la quimioprevención del cáncer de colon debido principalmente a los biopolímeros que contienen, donde se incluyen principalmente polisacáridos, glicoproteínas y proteínas.

Vamanu y Nita (2013) investigaron la actividad antioxidante de extractos etanólicos y metanólicos liofilizados (obtenidos en agua fría y caliente) de cuerpos fructíferos secos de *B. edulis*. La capacidad antioxidante de *B. edulis* fue mayor en extractos alcohólicos en comparación con extractos acuosos. El ácido rosmarínico fue el principal compuesto fenólico, que se identificó en una concentración entre $7 \pm 0,23$ y $56 \pm 0,15$ mg / 100 g de extracto. Se determinó una correlación positiva entre el contenido de fenoles totales, flavonoides, antocianinas y tocoferoles, y la capacidad antioxidante de los extractos.

Otro ejemplo dentro del género *Boletus* se presenta en *Boletus badius* Pers. (bolette de bahía) (figura 4) este hongo es una especie comestible popular debido a su fragancia que es similar a *B. edulis* (King bolette). Se demostró que los cuerpos fructíferos de *B. badius* pueden ser una fuente valiosa de zinc para el organismo humano (Rojowski *et al.*, 2017).



Figura 4. Cuerpo fructífero de *Boletus badius*

Recuperado de: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/2e/Boletus_badius_JPG1.jpg/280px-Boletus_badius_JPG1.jpg

Nelsen (2010) menciona que los *Boletus*, al igual que muchos otros hongos y líquenes, contienen compuestos derivados de la dimerización controlada por enzimas del ácido p-hidroxifenilpirúvico, que se deriva de la oxidación del aminoácido tirosina, seguida de la formación de enlaces CO para producir grevillinas, como la grevilina A o formación de enlaces CC para producir derivados de terfenilquinona hidroxilados como la atromentina, así como productos de reacciones adicionales, incluida la escisión del enlace oxidativo y la reorganización de la atromentina con deshidratación al ácido dihidroxipulvínico (figura 5), o reacciones de oxidación adicionales.

Bertrand (1901; 1902) sugirió que los compuestos de *Boletus* que se tornan azules al magullarse o cortarse son quinonas y, más específicamente, un ácido hidroxilato antraquinona hidroxilado (Kögl, 1935). Años más tarde, Edwards *et al.* (1968) demostraron que el azulado de muchos miembros de *Boletus* y *Suillus*, se debía a la oxidación enzimática de un derivado del ácido pulvínico más altamente hidroxilado que el compuesto dihidroxilado del ácido variegático (*B. erythropus*, *B. appendiculatus*, *S. varietatus* y *S. bovinus*, posteriormente *B. pulverulentus*, una de las sustancias más azuladas, este compuesto se ha encontrado en más de 100 especies de los Boletales).

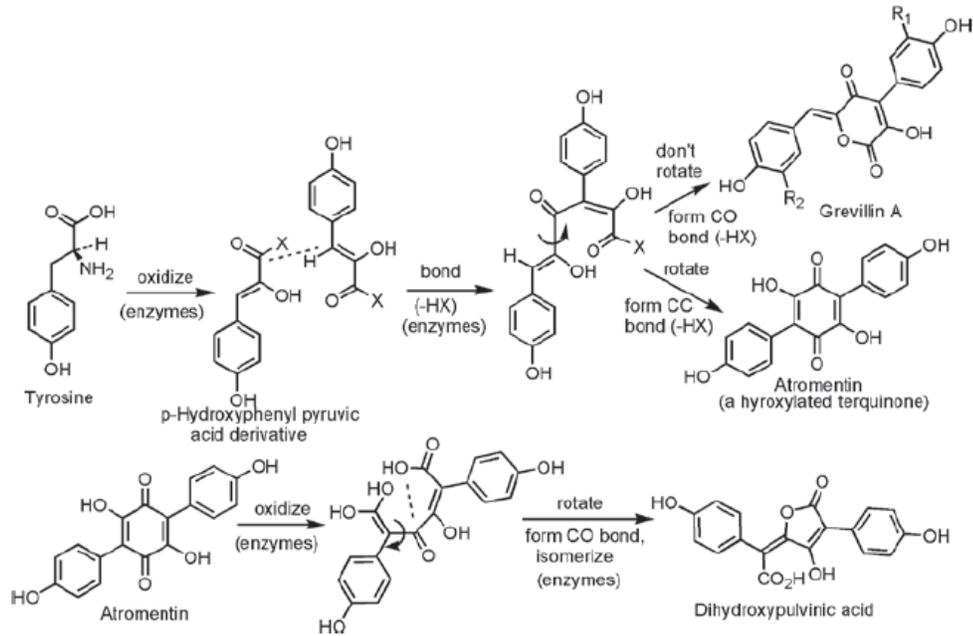


Figura 5. Esquema de las vías biosintéticas para producir los pigmentos boletus atromentina, grevilina A y derivados del ácido pulvínico (Nelsen, 2010)

La estructura del ácido xerocómico fue reportada por Steglich *et al.* (1968), también contribuye a las reacciones de coloración, y se aisló por primera vez de *Boletus (Xerocomus) chrysenteron* y también se ha encontrado en más de 95 especies en los Boletales, en su mayoría iguales a las que contienen ácido variegático. Ambos se oxidan a derivados de metida de quinona por las enzimas oxidadas presentes en sus cuerpos fructíferos (figura 6).

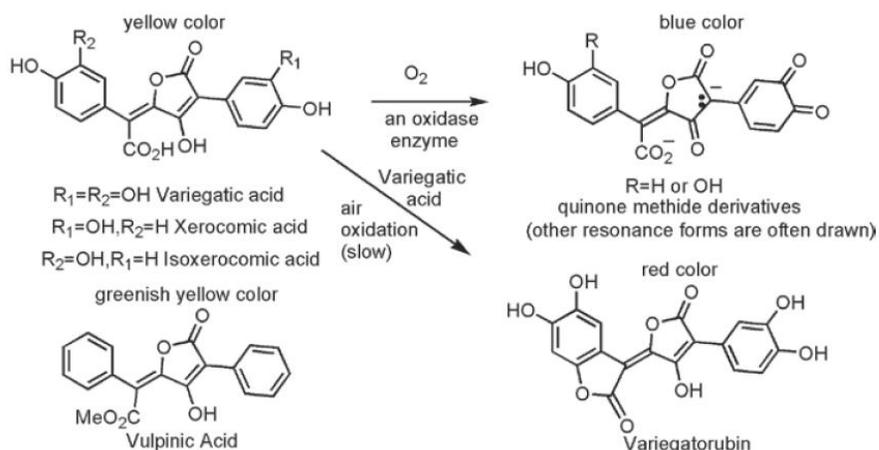


Figura 6. Esquema de las rutas biosintéticas para producir los pigmentos boletina atromentina, grevilina A y derivados del ácido pulvínico (Nelsen, 2010).

Sin embargo, muchas de las especies que contienen ácidos variegáticos y xerocómicos no se vuelven azules en absoluto, presumiblemente porque carecen de las enzimas oxidasas que son necesarias para producir los meturos de quinona azul. Se afirma que los ácidos variegáticos y xerocómicos solo están presentes en el orden Boletales (figura 7), por lo que su aislamiento de las especies *Gomphidius*, *Omphalotus*, *Hygrophoropsis*, *Coniophora*, *Leucogyrophana*, *Rhizopogon* y *Serpula* es una prueba sólida de su inclusión en los Boletales.



Figura 7. Reacción de blanqueo de *Boletus luridus*, que contiene ácido variegático y ácido xerocómico (figura 5). (Parque Estatal de Newport, Door Co., WI) (Nelsen, 2010)

Nelsen (2010) considera que la oxidación por aire del ácido variegático, especialmente si hay trazas de ácido presentes, produce variegatorubina, que es el pigmento rojo común presente en los boletes. Está presente en todas las especies reportadas que contienen ácido variegático, incluso aquellas que no son rojas, y posiblemente se forme durante el procesamiento de las muestras. Se reportan concentraciones especialmente altas en *B. erythropus*, *B. (Chalciporus) piperatus*, *B. frostii*, *B. rhodoxanthus*, *B. splendens*, *B. chryserveron* y *B. rubellus*. Muchos pigmentos relacionados están menos extendidos. Por ejemplo, el color amarillo verdoso de *Pulveroboletus ravenelii* y de *B. subglobosus* es causado por el ácido vulpínico, y *P. auriflammeus* contiene cinco pigmentos relacionados, más altamente oxigenados y, a menudo, clorados.

Nelsen (2010) también menciona considera que:

- la reacción de azulado de *Boletus luridus* se debe a que contiene ácidos variegáticos y xerocómicos,
- el azulado de *Boletus pulverulentus* porque contiene solo ácido variegático.
- la coloración roja en *Boletus frostii* porque presumiblemente contiene grandes cantidades de variegatorubin,
- *Pulveroboletus ravenelii* que contiene ácido vulpínico
- *Pulveroboletus* (*Boletus* en la nomenclatura de Smith) *auriflammeus*, contiene cinco derivados más oxidados o clorados del ácido vulpínico.

Mirończuk-Chodakowska, *et al.* (2017) investigaron el contenido de 1,3-1,6- β -D-glucano en hongos silvestres cultivados, entre esos hongos esta *Boletus pinophilus*, concluyendo con un valor porcentual del 35 % del contenido de 1,3-1,6- β -D-glucano en relación con el contenido total de β -glucano.

Rodríguez Morcuende (2011) menciona que algunas especies del genero *Boletus*, pueden provocar gastroenteritis aguda, por ejemplo *Boletus satanas*. En dichas especies se han aislado sustancias que son capaces de irritar el tubo digestivo y por eso se produce la gastroenteritis. Los síntomas son muy variados desde náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea, astenia o sensación de cansancio, hasta mialgias, que son dolores musculares que pueden afectar a varios músculos produciendo una sensación de debilidad que conlleva en muchos casos calambres.

Liu (2018) estudió la melanina (BgM) obtenida de *Boletus griseus*. La composición química y la estructura de BgM se caracterizaron por técnicas espectroscópicas y cromatográficas. El espectro UV-vis de BgM mostró un pico de absorción máximo a 214 nm. Los picos de absorción característicos se observaron a 3426, 1600 y 1105 cm^{-1} , y BgM contenía grupos hidroxilo fenólico, amidógeno, carbonilo, metileno y metilo. Además, BgM es una eumelanina, y su esqueleto principal tiene un anillo de benceno y un indol, y la cadena ramificada consiste principalmente en alcanos, alcoholes y ácidos grasos. BgM se hidrolizó con H_2O_2 y cuatro compuestos se analizaron provisionalmente a partir del perfil UPLC-MS / MS. La estructura química de BgM se caracterizó como 5,6-dihidroxiindol eumelanina, y la fórmula molecular condensada es $[\text{C}_{28} (\text{OR}1)_4 (\text{OR}2)_3 \text{H}_{11} \text{O}_6 \text{N}_4]_n$.

3.2 PROPIEDADES BIOLÓGICAS DEL GÉNERO *TYLOPILUS*

Defaye *et al.* (1988) señalan que el D-glucano de *Tylophilus felleus* (figura 8) inhibe el crecimiento de células cancerígenas de sarcoma 180 Ehrlich en 100%. Por otro lado, Sang-Jun Lee *et al.* (1999) señalan que *Tylophilus neofelleus*, una especie similar en Korea, presenta compuestos llamados “peptaibols” (Tylopeptido A y B), los cuales fueron aislados e identificados del cuerpo fructífero del hongo, y que tienen actividad antimicrobial contra bacterias Gram-positivas, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* R-209, *Staphylococcus aureus* IFO-12732, y *Corybacterium lilium*.

Muñoz Domínguez en 2007 evaluó los efectos tóxicos y genotóxicos, de extractos metanólicos de macromycetes, con base en estudios biotecnológicos relacionados con su toxicidad en Hidalgo, México. Ese estudio permitió demostrar un efecto no tóxico en pruebas en ratas, pero en *Drosophila* existió un efecto tóxico para *Boletus satanoides* y *Tylophilus felleus* y en cuanto a su genotoxicidad obtuvo un resultado positivo para *B. satanoides* con un efecto directo e indirecto, mientras que para *Tylophilus felleus* resultó positivo solamente como agente mutagénico indirecto.

Por otro lado, el fucogalactomanano (FGM) es un polisacárido no sulfatado aislado del hongo *Tylophilus ballouii*. Se investigó las características químicas de este FGM mediante HPLC, métodos químicos y estudios de RMN (espectros de ^1H , ^{13}C , $^1\text{H} / ^{13}\text{C}$ -HSQC y DEPT-135). Este polisacárido consistió principalmente en manosa y galactosa con cantidades variables de fucosa y trazas de xilosa, y con un PM de 140 kDa. Sus resultados sugirieron

una estructura e indicaron posibles actividades antiinflamatorias y antioxidantes de estos polisacáridos (Lima, *et al.* 2016).

En ese mismo año, Friedman (2016) menciona que un fucogalactomanano del hongo *Tylopilus ballouii* inhibió los radicales superóxido e hidroxilo con valores de IC₅₀ de 1,25 y 1.6 mg/ml, respectivamente, y redujo el edema hasta en un 56% en un ensayo antiinflamatorio.



Figura 8. Cuerpo fructífero de *Tylopilus felleus*

Recuperado de: <https://forest6871.files.wordpress.com/2016/05/tylopilus-felleus.jpg?w=416>

Fukuda, *et al.* (2012) investigaron los racematos de los metabolitos difenólicos (\pm) -tylopilusin A (1) y (\pm) -tylopilusin B (2) los cuales fueron aislados de los cuerpos fructíferos de *Tylopilus eximius*. Sus estructuras se elucidaron sobre la base de análisis espectroscópicos de RMN 1D y 2D y cristalografía de rayos X.

Wu *et al.* en 2000 aislaron dos nuevos secoergosteroles, 3 β -hidroxi-8 α , 9 α -oxido-8,9-secoergosta-7,9 (11), 22-trieno (tylopiol A) (1) y 3 β -hidroxi-8 α , 9 α -oxido-8, 9-secoergosta-7,22-dien-12-ona (tylopiol B) (2), de los cuerpos de fruta fresca de *Tylopilus plumbeoviolaceus*, junto con tres compuestos conocidos, ergosta-7,22-dien-3 β -ol, uridina, y allitol. Sus estructuras se determinaron mediante técnicas de RMN 1D y 2D. La estructura y la estereoquímica del compuesto 1 se demostró mediante cristalografía de rayos X.

Wu *et al.* en 2009 estudiaron los constituyentes químicos de *Tylopilus plumbeoviolaceus*. Los compuestos se aislaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice y sus estructuras se explicaron mediante métodos espectrales. Se aislaron cinco compuestos y se identificaron como ergosterol (I), ergosterol 5a, 8a-peróxido (II),

ergotioneína (III), adenosina (IV), uracilo (V). Todos estos compuestos se obtienen de este hongo por primera vez.

3.3 PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE OTROS MIEMBROS DE LA FAMILIA BOLETACEAE

Nelsen (2010) menciona que muchas especies de *Suillus* contienen grevillins, que son pigmentos de color naranja a rojo oscuro que contienen anillos de pirrandiona que también se derivan de las rutas biosintéticas.

Grevillin A se ha aislado de *S. grevillei*, *S. bresadolae*, *S. americanus*, *S. luteus*, *S. placidus* y *S. punctatipes*, B y C de la misma especie que A más *S. granulatus*, *S. tridentinus*, *S. pictus*, *S. lakei*, *S. aeruginascens*, *S. collinitus* y *S. sibiricus*, D de muchas de las mismas especies y *S. albidipes*, *S. leptopus*, *S. pseudobrevipes*, *S. riparius* y *S. umbonatus*. Grevillin B también se ha aislado de *Gasteroboletus laricinus*. La anhidrogrevilina se ha encontrado en la mayoría de las especies que producen grevilina D, incluidas *S. americanus* y *S. granulatus*, y puede ser un artefacto de los métodos de aislamiento (Nelsen, 2010).

El hongo venenoso *Paxillus atrotomentosus* contiene varios compuestos similares a atromentina, incluyendo flavomentina B y espiromentina B. A medida que se han desarrollado mejores métodos de separación y análisis, se ha encontrado que el componente principal de su carne incolora es el compuesto reducido con tri-R (figura 9), junto con cantidades más pequeñas del compuesto tetra-R sustituido.

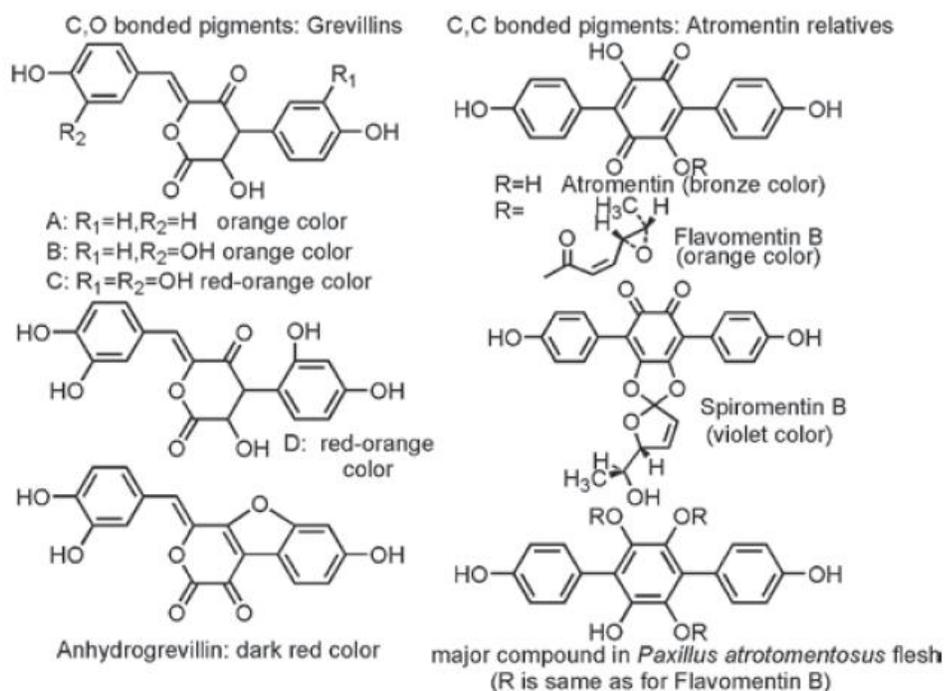


Figura 9. Pigmentos relacionados con grevillin A y atromentin (Nelsen, 2010)

Otros Boletes han desarrollado una alternativa de atromentina, que puede lograrse sin enzimas oxidándola con ferricianuro de potasio ($K_3Fe(CN)_6$) en presencia de calcio, produciendo finalmente ciclopentenonas bisfenoladas (figura 10). La chamonixina es encontrado como el enantiómero (+) en *Chamonixia caespitosa* y como el enantiómero (-) en *Paxillus involutus*, que también contiene la involutina más altamente hidroxilada, lo que causa la decoloración marrón observada al magullar su carne.

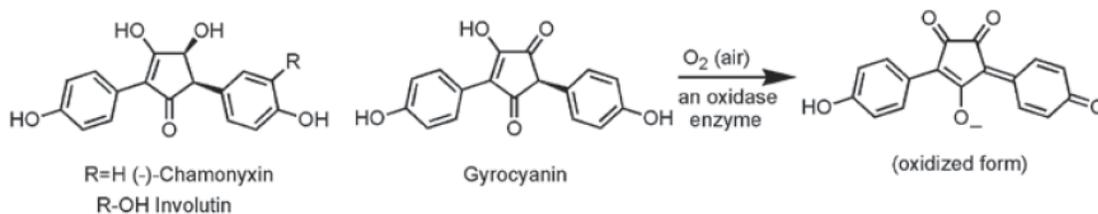


Figura 10. Algunos derivados de difenol de ciclopentenona de Paxillus y Gyroporus (Nelsen, 2010)

La reacción azulada de *Gyroporus cyanescens* no es causada por la oxidación del ácido variegático, sino por oxidación de gyrocyanin, una ciclopentenona bis-fenol sustituida más altamente oxidada (figura 11). El color azul de *Lactarius indigo* no tiene nada que ver químicamente con los colores azules producidos en boletes. Una docena de otros pigmentos relacionados producen los colores de las otras especies de *Lactarius* que tienen látex coloreada (Daniewski y Vidari, 1999).

Nelsen (2010) menciona que *Suillus grevillei* contiene grevilinas A, B y C; el hongo azulado *Gyroporus cyanescens* contiene girocianina; y *Paxillus involutus* contiene involutina.



Figura 11. *Gyroporus cyanescens* conteniendo gyrocyanin (Rowan Creek, Columbia Co., WI) (Nelsen, 2010)

Robles-García *et al.* (2016) registraron por primera vez el uso de *Fistulinella wolfeana* como especie comestible en las comunidades otomíes de Tesquedó, Xajay y Tenasdá, en Amealco de Bonfil, Querétaro, México, la cual forma parte de los recursos naturales utilizados durante la estación de lluvias. Además, describen el valor nutricional de las muestras en fresco, así como en seco. Muestran que tiene una alta actividad antioxidante, alcanzando casi 90% de inhibición en diluciones 1:10 de extracto metanólico, comparable con valores para otros miembros de la familia Boletaceae. Además, menciona que *Fistulinella wolfeana* podría confundirse con algunas especies de *Tylopilus*, ya que ambos géneros tienen tubos de rosa y poros rosados, sin embargo éstos cambian de color a naranja o rojizo ocráceo cuando se tocan a diferencia de los *Tylopilus*.

Pedneault, *et. al* (2006) encontraron más de 25 ácidos grasos (AG) diferentes en los lípidos de hongos micorrizicos. Los AG insaturados, principalmente los ácidos linoleico y

oleico, representaron alrededor del 83% del total de AG, mientras que el ácido palmítico fue el principal AG saturado. Algunos AG se identifican por primera vez en Boletaceae y en basidiomicetos superiores (ácido cis-11,12-metilenoctadecanoico, 7-cis, 10-cis hexadecadienoico) o en hongos (ácido cis-11,12-metilenoctadecanoico). Hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) en el contenido de AG específicos entre especies de hongos.

3.4 CULTIVO DE MICELIO DE ALGUNOS MIEMBROS DE LA FAMILIA BOLETACEAE

Los macromicetos han sido parte de la cultura humana desde hace miles de años y aparecen descritos como alimento humano en las más importantes civilizaciones de la historia. Se han descrito muchísimas propiedades nutricéuticas de los macromicetos como sus propiedades anticancerígenas, antitumorales, hipocolesterolémicas, antivirales, antibacterianas, o inmunomoduladoras, entre otras.

Dado que la producción de hongos por cultivo tradicional y la extracción de los metabolitos bioactivos requieren de mucho tiempo (meses), la biotecnología se ha convertido en la herramienta alternativa para el desarrollo de técnicas rentables y productivas para la obtención de estos metabolitos. Es el desarrollo de esta tecnología y la facilidad que proporciona en cuanto al manejo de sus variables, lo que ha permitido realizar el cultivo en medio líquido del micelio de macrohongos con significativa reducción de tiempo y aumento en la producción de sus metabolitos lo que ha impulsado aún más su obtención y el estudio de compuestos con potencial como medicamentos, nutricéuticos y cuasifarmacéuticos tanto del medio agotado como del micelio (Suárez Arango y Jeannette Nieto, 2013).

En un trabajo de revisión del 2012 de Elisashvili se habla sobre “los hongos medicinales que pertenecen a los Basidiomicetos superiores son un recurso inmensamente rico, pero en gran parte sin explotar, de compuestos naturales útiles y de fácil acceso con diversas actividades biológicas que pueden promover el bienestar humano”. Las propiedades medicinales se encuentran en varios componentes celulares y metabolitos secundarios (polisacáridos, proteínas y sus complejos, compuestos fenólicos, policétidos, triterpenoides, esteroides, alcaloides, nucleótidos, etc.) que se han aislado e identificado a partir de los cuerpos fructíferos, micelio de cultivo y caldo de cultivo de setas.

Algunos de los compuestos anteriores tienen actividades reductoras del colesterol, antidiabéticas, antioxidantes, antitumorales, inmunomoduladoras, antimicrobianas y antivirales listas para ensayos industriales y mayor comercialización, mientras que otros se

encuentran en diversas etapas de desarrollo. Recientemente, el cultivo sumergido de hongos medicinales ha recibido mucha atención como una alternativa prometedora y reproducible para la producción eficiente de micelio y metabolitos de hongos.

El cultivo sumergido de hongos tiene un potencial industrial significativo, pero su éxito a escala comercial depende del aumento de los rendimientos de los productos y del desarrollo de nuevos sistemas de producción que aborden los problemas asociados con esta técnica de cultivo de hongos. La gran mayoría de los estudios de cultivo sumergido de hongos se han centrado en la producción de polisacáridos y triterpenos.

Dentro de los trabajos que se han hecho con hongos micorrizicos se encuentran: Řeháček *et al.* (1962) usaron un cultivo recién aislado a partir del carpóforo del basidiomiceto *Boletus edulis* (Bull. ex Fr.) var. *reticulatus* (figura 11) mediante inoculación en agar de malta (8 blg, pH 6.0) y cultivo a 28 °C. La cepa se cultivó en un medio sumergido usando un fermentador de acero inoxidable de laboratorio de 20 litros, con 10 l de medio, se aireó a una velocidad de 7 L/min y se agitó a una velocidad de 430 r.p.m. La fermentación sumergida se llevó a cabo a 27°C en el siguiente medio: 3% de glucosa, 3% de licor de maíz, 0.6% de aceite de soya (agregado después de la esterilización). La esterilización se llevó a cabo durante 1 hora a 120 °C. El pH del medio se ajustó a 5.5 después de la esterilización. Se inoculó el fermentador con un inóculo sumergido al 5%. El inóculo se preparó transfiriendo una suspensión acuosa de cultivo de 12 días de agar de malta a un matraz de 2 L que contenía 500 ml del medio de fermentación sin aceite de soya y mediante un cultivo de 7 días en una máquina de agitación a 28 °C.

Por otro lado, Ohta (1997) cultivó los hongos basidiomicetos ectomicorrizas *Boletus fraternus* Peck y *Boletus reticulatus* Schaaffer. También se usaron tres especies saprófitas como referencia, siendo elegidas entre hongos que se pudren en la madera que comúnmente se cultivan comercialmente en Japón. Las cepas fúngicas se mantuvieron a 5 °C en tubos de ensayo que contenían medio de cultivo de reserva hasta su uso. La composición del medio de cultivo de reserva fue: glucosa 4 g, extracto de levadura 0.4 g, agar 15 g y agua destilada 1000 ml a pH 5.1.

Yamanaka, Namba y Tajiri (2000) mencionan que el hongo ectomicorrícico *Boletus reticulatus* formó cuerpos fructíferos jóvenes en cultivo puro en medios líquidos y sólidos. Se

requirió suficiente nutriente en el medio para que el hongo formara cuerpos fructíferos maduros en cultivo puro. Se utilizaron tres tipos de medio, líquido, agar y sólido, para formar los cuerpos frutales de *B. reticulatus* in vitro en 1996 y 1997. Se usó medio para hongos ectomicorrizales (Ohta, 1990) como medio basal líquido.



Figura 12. Cuerpo fructífero de *Boletus edulis*

Recuperado de: <http://www.ruraliberica.com/archivo/fotos/Boletus%20edulis.JPG>

Yamanaka, Namba y Tajiri (1996, 1997 y 2000) utilizaron medio basal líquido en matraces para la formación del cuerpo fructífero. El medio basal líquido suplementado con agar al 1.5% en tubos de ensayo de 16.5 mm de diámetro se utilizó como medio de agar. Se usó sustrato sólido compuesto por 34 g (peso seco, d.w.) de granos de cebada, 7 g de aserrín de haya japonesa (*Fagus crenata*, Blume) y 72 ml del medio basal líquido en botellas de plástico de 230 ml. Cada medio se autoclavó a 120°C durante 10 min para medio líquido y agar, y durante 30 min para medio sólido. Los medios en matraces, tubos de ensayo y botellas de plástico se inocularon con discos miceliales de 5 mm de inóculo precultivados en medio de agar con dextrosa de patata (APD) a 20°C durante 20 días. Después de la incubación a 20°C en la oscuridad durante 20 días, todos los cultivos se incubaron a 20°C bajo iluminación con lámparas fluorescentes a aproximadamente 250 lux durante 2 horas / día para inducir primordios.

Ohta y Fujiwara (2003) mencionan que según lo enumerado por Godbout y Fortin (1990), es poco común que los hongos ectomicorrícicos produzcan sus cuerpos fructíferos en cualquier condición artificial. Antes de la década de 1980, se sabía que solo dos especies en *Boletus* producían cuerpos fructíferos en un cultivo axénico sin una planta huésped. Se reportó que *Lyophyllum shimeji* (Kawamura) (FIGURA 13) Hongo (Ohta 1994) y dos especies de *Hebeloma* (Ohta 1998a) producen cuerpos fructíferos cuando se cultivan en una

mezcla de serrín y granos de cebada suplementados con nutrientes inorgánicos. Más tarde, se cultivó *L. shimeji* utilizando equipos diseñados para la producción comercial de hongos saprófitos como *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler y *Pleurotus ostreatus* (Jacq. : Fr.) Kummer (Ohta 1998b). Tanto *L. shimeji* como *Hebeloma spp* utiliza fácilmente almidón y compuestos relacionados (Ohta 1997), lo que permite el crecimiento de una gran cantidad de micelios, lo que facilita la producción posterior de cuerpos fructíferos sin una planta huésped. En el estudio de Ohta y Fujiwara (2003) informan sobre la producción en el cuerpo fructífero de un hongo ectomicorrízico *Boletus sp* en cultivo puro usando métodos similares. La cepa se mantuvo a 5°C en un medio de cultivo (glucosa, 4 g; extracto de levadura, 0,4 g; agar, 15 g; agua destilada, 1000 ml; ajustada a pH 5,1 con HCl 0.1 M).



pixtastock.com - 20517961

Figura 13. Cuerpo fructífero de *Lyophyllum shimeji*

Recuperado de: <https://en.pimg.jp/020/517/961/1/20517961.jpg>

Kikuchi, Matsushita y Suzuki (2009) reportaron la formación del cuerpo fructífero de *Tylopilus castaneiceps* en cultivo puro. Se intentaron aislar los cuerpos fructíferos recolectados en medio Hamada de 1/5 de concentración [0.4% de glucosa, 0.04% de extracto de levadura y 1.5% de agar (p/v)]. Las cepas se mantuvieron en el mismo medio que se usó para el aislamiento a 4°C en la oscuridad. Los márgenes de micelios en cultivo madre de las cepas Tyc1 y Tyc2 se cortaron a aproximadamente 1 cm de tamaño y se colocaron en 250 ml de medio Ohta (Ohta 1990) en matraces Erlenmeyer cubierto con un tapón de cultivo Silicosen (C-40; Shin-Etsu Polymar, Tokio, Japón). La concentración de agar en el medio varió de 0% a 1.5% (p / v). Los matraces se incubaron en una cámara de crecimiento MIR-253 (Sanyo, Osaka, Japón) a 23°C en la oscuridad.

Díaz *et al.* (2009) emplearon los medios de cultivo Moser-B (Moser, 1960), Melin y Norkrans modificado-MNM (Marx, 1969), Pachlewski (Pachlewski y Pachlewski, 1974) y Gamborg (Gamborg *et al.*, 1968) para 7 cepas de Boletales procedentes de Guatemala (2 de *Boletus edulis*, 1 de *B. pinophilus*, 1 de *B. luteoloincrustatus*, 1 de *Boletellus russelii*, 1 de *Suillus tomentosus*, 1 de *S. bovinus*) y 3 cepas procedentes de España (2 de *Boletus edulis*, 1 de *B. pinophilus*). Las cepas se sembraron en todos los medios de cultivo utilizados en cajas de Petri, las cajas se inocularon con un fragmento de cultivo a pH 5 y 6. En general, los mayores crecimientos de micelios se obtuvieron con los medios MNM y Moser. Se obtuvo la formación de primordios diferenciados en píleos y estípites rudimentarios en la cepa *B. edulis* SO 18 en frasco con turba-vermiculita y medio MNM, pero no en tubos con PDA a diferentes valores de pH.

4. JUSTIFICACIÓN

Los hongos son una fuente de productos naturales con un alto potencial de uso funcional de sus metabolitos en la medicina. Muchos de estos compuestos han sido extraídos a partir del cuerpo fructífero.

En general, se puede afirmar que los metabolitos más abundantes en los hongos basidiomicetos han sido aislados a partir de cuerpos fructíferos. Estos metabolitos han sido identificados como glucanos y sus derivados, los cuales han demostrado inducir efectos farmacológicos. Otro conjunto de metabolitos también abundantes son los ácidos grasos, los cuales son característicos también en plantas.

La recolecta de cuerpos fructíferos de hongos presenta dos grandes inconvenientes, el primero, el largo tiempo de espera para que madure el cuerpo fructífero, por lo general es una vez al año en caso de hongos silvestres; el segundo inconveniente, es la variabilidad de las condiciones climáticas y ecológicas (plagas), por lo que en los hongos silvestres la producción aleatoria de metabolitos en contenido y cantidad puede variar.

El cultivo en sustrato sólido, que implica en conocer y controlar las variables ambientales en un laboratorio, disminuye el riesgo de variaciones en el contenido de los metabolitos, pero mantiene los largos tiempos de espera para la maduración de los cuerpos fructíferos.

En el presente siglo se han incrementado el número de reportes sobre el crecimiento de basidiomicetos en la forma de biomasa micelial por cultivo sumergido. Estos reportes se han enfocado en hongos con reputación en sus propiedades medicinales, como: *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes*, *Hericiium erinaceus*, etc. En estos cultivos se ha buscado incrementar la producción de algunos metabolitos bioactivos aislados de los cuerpos fructíferos (polisacáridos, proteínas, proteoglucanos, triterpenos, etc.).

Hasta hace poco se consideraba como muy difícil el cultivo de hongos micorrícicos, debido a la dificultad para emular a la raíz de un árbol en el laboratorio. Sin embargo, ya hay algunos reportes en los cuales se ha logrado el cultivo de micelio en caja Petri y en el cultivo en medio sumergido.

En México no se han realizado estudios sobre cultivo de hongos micorrícicos, y tampoco hay estudios micoquímicos sobre el contenido metabólico de los hongos de la familia Boletaceae, y menos aún sobre el género *Tylopilus felleus*. Si a lo anterior le agregamos que el hongo *Tylopilus plumbeoviolaceus* es un hongo no comestible, debido a su sabor amargo, había resultado ser un hongo poco atractivo para realizar investigación.

Como una contribución al conocimiento de los hongos de la familia Boletaceae se decidió realizar la presente investigación a fin de determinar las condiciones experimentales para el cultivo del hongo *Tylopilus plumbeoviolaceus*.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Es posible cultivar en medio sumergido el micelio de *Tylopilus plumbeoviolaceus*?

6. HIPÓTESIS

El micelio del hongo *Tylopilus plumbeoviolaceus* crece en medio sumergido bajo condiciones de fuente de carbono no convencional.

7. OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar y optimizar las condiciones de cultivo sumergido del micelio de *Tylopilus plumbeoviolaceus*.

7.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar especies del género *Boletus* y *Tylopilus* que crecen en los Municipios de Puente de Ixtla y Cuernavaca, Morelos.
- Evaluar la eficiencia de fuentes de carbono no convencionales en el cultivo sumergido de *Tylopilus plumbeoviolaceus*.
- Evaluar el efecto del pH en el cultivo sumergido de *Tylopilus plumbeoviolaceus*.
- Caracterizar los metabolitos más abundantes en cuerpos fructíferos de los hongos *Boletus edulis*, *Tylopilus felleus*, *Tylopilus plumbeoviolaceus*.

8. DISEÑO EXPERIMENTAL

Las recolectas se realizaron en los municipios de Puente de Ixtla y Cuernavaca, tomando nota del lugar donde se recolectaron.

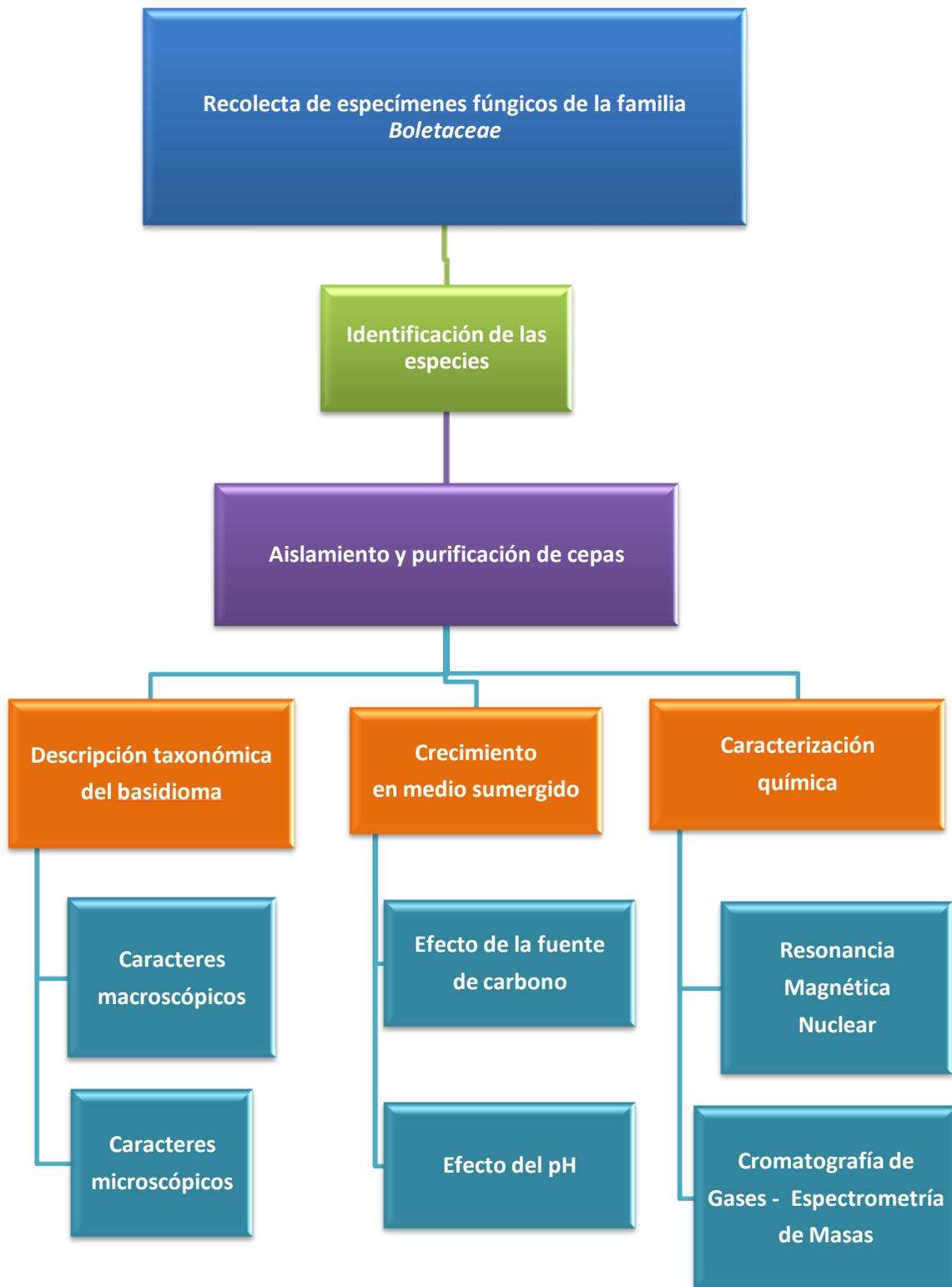
Posteriormente se llevaron los especímenes al laboratorio y se tomaron las medidas de los caracteres morfo descriptivos macroscópicos y microscópicos de las especies recolectadas.

El material micológico se seca y se resguarda en el Herbario de Micología del CIB, UAEM.

Los cuerpos fructíferos secos y molidos son extraídos por maceración con disolventes orgánicos. Los extractos orgánicos son fraccionados por métodos cromatográficos. Las fracciones más abundantes son analizadas por métodos espectroscópicos.

Realizar el aislamiento de las cepas de *Boletus edulis*, *Tylopilus felleus* y *Tylopilus plumbeoviolaceus* en cajas Petri a partir del cuerpo fructífero de estos hongos.

Realizar el cultivo sumergido del micelio de *Boletus edulis*, *Tylopilus felleus* y *Tylopilus plumbeoviolaceus* en cultivo sumergido en matraz.



9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 TRABAJO DE CAMPO

El crecimiento de los hongos está sujeto principalmente al clima y su desarrollo está dado principalmente en tiempo de lluvias, por lo cual las recolecciones de los especímenes se desarrollaron en los meses de junio a octubre que son los meses más lluviosos del año. Se realizaron recorridos en distintas zonas de los Municipios de Puente de Ixtla y Cuernavaca con el propósito de recolectar especies pertenecientes a los géneros *Boletus* y *Tylopilus*, recorriendo principalmente veredas, que son los sitios donde suelen desarrollarse estos especímenes.

El material que se requiere para las recolectas son: canasta o caja de cartón para transportar los hongos; papel encerado para envolver, evitar contaminación y en su caso recuperar las esporas. Se toman fotografías del material fúngico recolectado y una regla para la medición de algunos caracteres *in situ* del basidioma.

9.2. IDENTIFICACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO RECOLECTADO

9.2.1 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

La identificación taxonómica de los especímenes en estudio se lleva a cabo en el Laboratorio de Micología, del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM).

La medición de las estructuras morfológicas (color, textura, olor y sabor) se efectúan con el material fresco. Una vez recolectado el material fúngico se obtuvieron las esporadas de algunos ejemplares, ya que la impresión de las esporas (color, forma, presencia de queilocistidio y pleurocistidios, tamaño) es fundamental para la identificación de los hongos. La identificación de los especímenes se complementa con información etnomicológica (comestibles, venenosos, alucinantes, destructores de la madera) y bibliográfica (Guzmán, 1977).

9.2.2 CARACTERES MACROSCÓPICOS

El material fúngico es colocado en un deshidratador y guardado dentro de bolsas selladas, colocadas en un lugar libre de humedad para evitar el deterioro del organismo. Se describen los caracteres macroscópicos de los hongos recolectados:

1.-Pileo:

- Forma
- Tamaño
- Diámetro
- Color
- Superficie
- Consistencia (viscosa o seca)

2.- Túbulos:

- Posición
- Color
- Borde

3.- Estípites:

- Tamaño
- Superficie
- Presencia de rizomorfos
- Presencia de pseudorriza
- Presencia de anillo

4.- Contexto:

- Color
- Consistencia
- Olor
- Sabor

9.2.3 CARACTERES MICROSCÓPICOS

Para estudiar los componentes microscópicos de los especímenes que se pretende identificar, se realizaron cortes del basidioma y se colocaron en portaobjetos y cubreobjetos de vidrio. Los cortes deben ser lo más delgados posibles para poder apreciar las estructuras en microscopio con el objetivo de 100X. Las estructuras microscópicas a observar son hifas y fíbulas, las preparaciones se realizan con ejemplares frescos.

9.3 AISLAMIENTO DE CEPAS

El medio de cultivo se prepara de la siguiente manera: para preparar 500 ml de medio, se agrega a un matraz 19.5 g de medio de cultivo PDA y se afora a 500 ml de agua destilada. La solución se esteriliza en autoclave por 20 minutos a 121°C. En seguida, se vacía en cajas de Petri de 5 cm de diámetro, con 10 ml por caja y se incuban a temperatura ambiente por 24 horas antes de su uso.

Para la obtención de las cepas, el método implementado es: el aislamiento fúngico o vegetativo, el cual consiste en tomar pequeños fragmentos ya sea del contexto o carne del hongo con la ayuda de una aguja de disección previamente esterilizada, y colocar esos fragmentos en cajas Petri con medio de cultivo (PDA). Posteriormente, las cajas se incuban a temperatura ambiente y se revisan cada 3 días para descartar posibles contaminantes.

Una vez llena la caja, se resembró de manera consecutiva para obtener un cultivo puro y se visualiza al microscopio para la identificación de hifas, carácter de gran importancia para saber si el micelio es monocariótico o dicariótico además de corroborar que efectivamente se trata de un basidiomiceto y evitar observar posibles contaminantes.

9.3.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO MICELIAL EN MEDIO SOLIDO

La cinética se realiza en cajas Petri de 5 cm de diámetro con 10 ml de medio sólido. Se coloca un fragmento de micelio en el centro de la caja y se incuban a 24°C, hasta que el micelio cubra por completo el medio de cultivo, se registra la medida del diámetro ocupado por el micelio cada 24hrs.

9.3.2 TASA ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO EN MEDIO SOLIDO

La tasa radial del crecimiento (K_r) se utiliza frecuentemente como una forma indirecta de estimar la tasa específica de crecimiento (μ) y sus variaciones, calculándose de la siguiente forma:

$$K_r = \mu w$$

En donde K_r es el tiempo expresado en días y w es la zona periférica de crecimiento expresado en milímetros (mm) y μ es la tasa específica de crecimiento expresado en mm/día, como se muestra en la siguiente fórmula (Sánchez Vázquez y Royse, 2001):

$$\mu = \frac{w}{K_r}$$

9.4 ANÁLISIS MICOQUÍMICOS

9.4.1 EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS

Los cuerpos fructíferos colectados se secan a la sombra, se muelen y se someten a extracción por maceración con los disolventes: diclorometano, metanol y agua cada 72 hrs. Los extractos se concentran a presión reducida en un rotaevaporador Büchi.

9.4.2 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

Los extractos obtenidos con diclorometano y metanol se analizan por cromatografía en capa fina, fase normal con diferentes sistemas de solventes. Las cromatoplasas son reveladas con luz UV y con ácido sulfúrico.

Con la información obtenida por TLC, se hará una Cromatografía en columna, para fraccionar los extractos. La columna es empacada con SiO_2 y utilizando una mezcla de disolventes de diferentes polaridades ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{CH}_3\text{OH}$). En una pipeta se adicionó gel de sílice y después se le agregó CH_2Cl_2 . Se pesó 1 gr del extracto de CH_2Cl_2 de *Tylophilus felleus* (color amarillo) y se disolvió con CH_2Cl_2 . A continuación el extracto se colocó en la parte superior de la columna (figura 14).

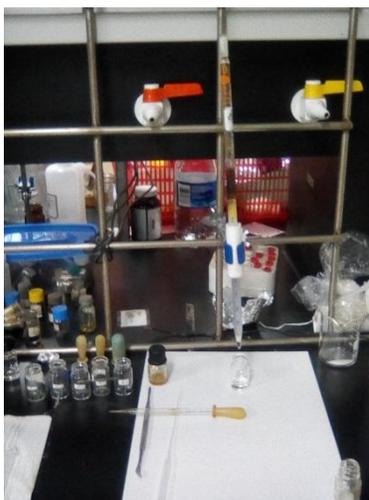


Figura 14. Columna cromatográfica para fraccionar el extracto de *T. felleus*

La separación se realizó iniciando con CH_2Cl_2 (primeras seis fracciones), a partir de la fracción 7 se le agregó 5 ml de una mezcla 3% metanol en CH_2Cl_2 . En la fracción 8 se cambió a 5 ml de una mezcla 5% metanol en CH_2Cl_2 . La fracción 10 tenía un color amarillo. En la fracción 11 se incrementó la concentración de metanol hasta 10%. En la fracción 12 subió la concentración a 15 % metanol en 5 ml de CH_2Cl_2 . Y termino la columna al obtener la fracción 13.

9.5. CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS Y/O FRACCIONES CROMATOGRÁFICAS POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Las fracciones más abundantes y puras son preparadas para análisis espectroscópico, 15 mg de la muestra son disueltos en 0.5 mL de CDCl_3 y analizadas en un espectrómetro de RMN de ^1H de 200 MHz marca Varian.

De forma separada 5 mg de la fracción es disuelta en 1 mL de disolvente y enviada al sistema acoplado Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas (impacto electrónico).

10. RESULTADOS

10.1 RECOLECTA DE ESPECIMENES FÚNGICOS

La salida a recolectar fue el 08 de septiembre del 2019 al sur del Estado de Morelos en el municipio de Puente de Ixtla se encuentra Cerro Frío (figura 15), que alcanza una altura de 2,260 m esta zona presenta un clima cálido-subhúmedo. En cuanto a la vegetación en este tipo de clima se presenta el bosque pino-encino (Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México).



Figura 15. Vista panorámica desde la cima de Cerro frío.

Se recorrió el cerro con el objetivo de llegar a la cima y encontrar especímenes en el camino (figura 16), se recolectaron en total 10 especímenes en buen estado, entre ellos se encuentran los hongos *Tylopilus felleus* y *Tylopilus plumbeoviolaceus*, los cuales fueron llevados al Laboratorio de Micología del Centro de Investigaciones Biológicas de la UAEM.

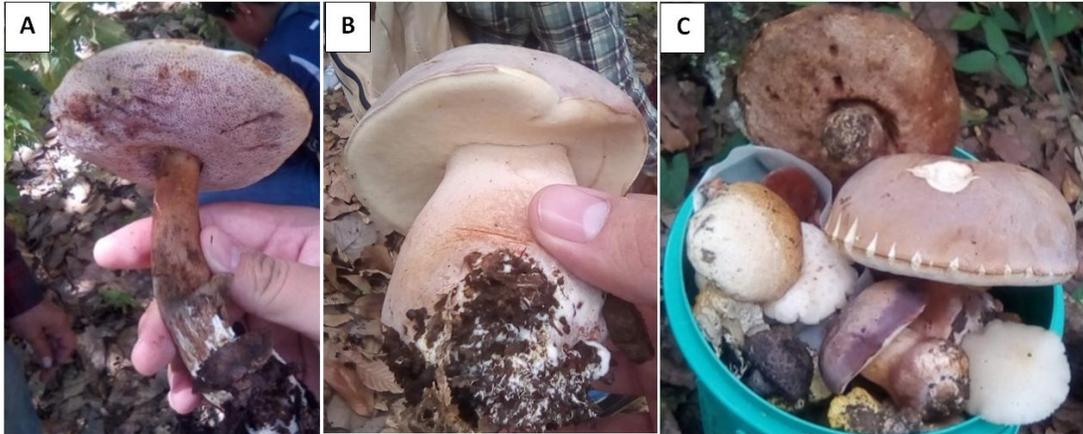


Figura 16. Especímenes recolectados de *Tylopilus felleus* y de *Tylopilus plumbeoviolaceus*. En **A** se muestra un espécimen de *Tylopilus felleus* recolectado en Cerro Frío, en el municipio de Puente de Ixtla. En **B** se muestra un espécimen recolectado de *Tylopilus plumbeoviolaceus*. En **C** se muestran los especímenes recolectados de *Tylopilus felleus* y de *Tylopilus plumbeoviolaceus*.

Los especímenes fueron identificados por el M. C. Elizur Montiel Arcos, posteriormente fueron separados según la especie, se les pesó (figuras 17 y 18) y se separó de cada especie un espécimen para efectuar el aislamiento vegetativo.

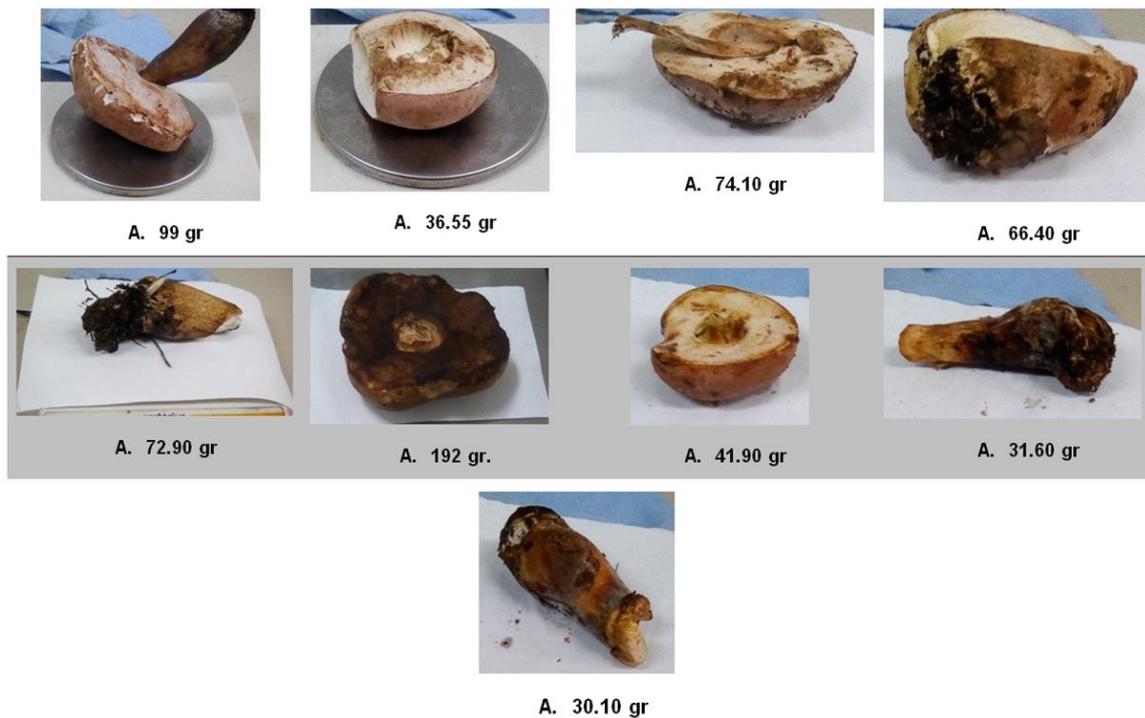


Figura 17. Ejemplares de los hongos recolectados del grupo de *Tylopilus felleus*



Figura 18. Ejemplares de los hongos recolectados del grupo de *Tylopilus plumbeoviolaceus*.

El hongo *Boletus edulis* fue recolectado en la Colonia del Bosque, Cuernavaca, Morelos. Posteriormente, los ejemplares fueron deshidratados, además se compró una caja con 50 g del hongo *Boletus edulis* Italiano en una tienda naturalista de la empresa Hanseatik, S.A. de C.V., con el nombre comercial de “Hongo Porcini deshidratado *Boletus edulis*”. (Figuras 19 y 20)





Figura 19. Ejemplares de los hongos recolectados del grupo *Boletus edulis*.



Figura 20. *Boletus edulis* de origen italiano en caja comprado de la empresa Hanseatik

Se hizo una segunda recolecta de especímenes en la siguiente temporada de lluvias y se tomaron las medidas del cuerpo fructífero, además se les pesó en fresco y en seco. Estos especímenes solo se usaron para poder aislar las cepas de los hongos y conservarlas.

10.2 AISLAMIENTO DE LOS HONGOS RECOLECTADOS

Para conservar el micelio de los hongos recolectados, se efectuó el aislamiento en cajas Petri. Se usaron los medios de cultivo disponibles en el Laboratorio de Micología (PDA; medio modificado: malta, cereal comercial y agar). Se seleccionó un espécimen de una especie y se le cortó un pequeño pedazo del sombrero del hongo, después con una aguja de disección se tomaron cinco pedazos de la carne interior del sombrero y se colocaron en una de las cajas Petri, este proceso se repitió con las otras dos cajas (figura 21).

El primer aislamiento fue realizado con un medio de cultivo compuesto de: agar, cereal y malta en 3 cajas Petri para cada hongo. Después de un par de semanas se observó que el crecimiento de *Tylopilus plumbeoviolaceus* era lento, pero después de 3 semanas se

manifestó la contaminación en la caja Petri. En cambio, para *Boletus edulis*, *Tylopilus felleus* y *Boletus edulis* (italiano, comprado en supermercado) el crecimiento fue nulo y algunas cajas se contaminaron.

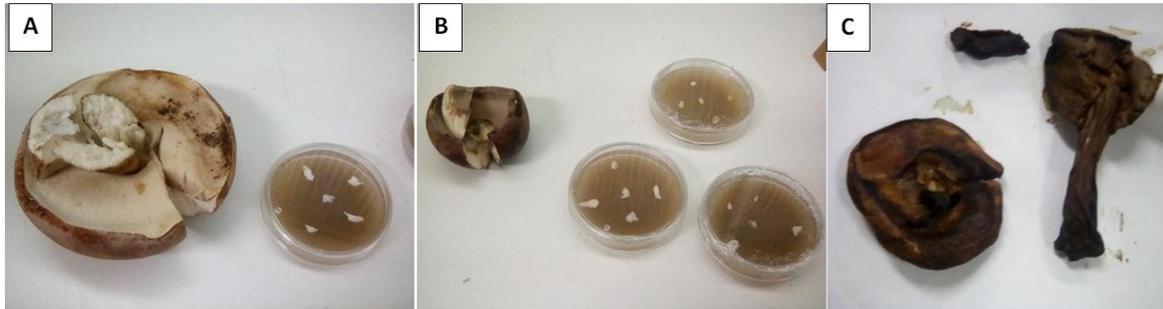


Figura 21. Aislamiento de *Boletus edulis* y *Tylopilus* en medio de cultivo modificado (cereal, malta y agar). **A)** representa el aislamiento del hongo *Tylopilus felleus*; **B)** representa el aislamiento del hongo *Tylopilus plumbeoviolaceus*; **C)** representa a los especímenes de *Boletus edulis* recolectados y comprados utilizados para el aislamiento de la cepa.

En un segundo experimento se intentó cultivar *Tylopilus plumbeoviolaceus* usando como medio de cultivo: Maseca en polvo y agar en 5 cajas Petri. Se les hicieron observaciones diarias, pero al pasar los días no se veía crecimiento del hongo (figura 22)

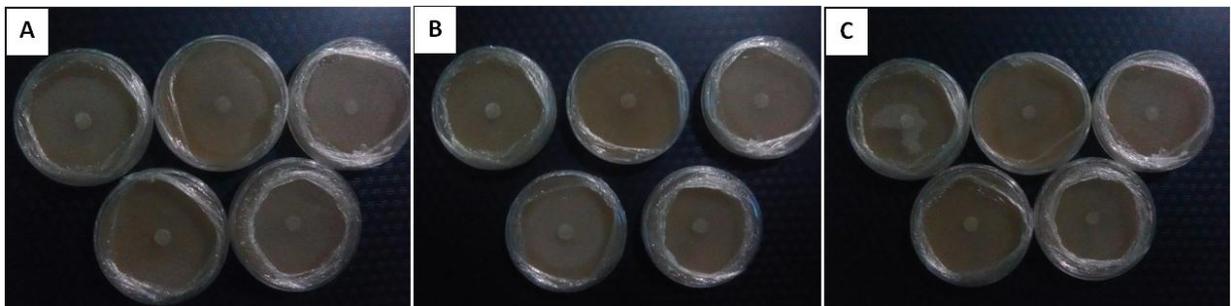


Figura 22. Crecimiento de la cepa *Tylopilus plumbeoviolaceus* en medio de maíz. **A)** primer día de registro del crecimiento de la cepa; **B)** registro del día 10, sin ver crecimiento de la cepa; **C)** registro del día 20, no hay crecimiento de la cepa.

En un tercer experimento (por duplicado) se utilizó el medio PDA, y a cada caja Petri se le agregó un pedazo del hongo *T. plumbeoviolaceus*. Al cabo de unas semanas se observó que en las cajas de PDA con el hongo, el micelio estaba creciendo. Después de

dos meses el micelio creció aproximadamente 5 cm de diámetro (figura 23). En este tiempo el micelio fue resembrado en 4 cajas nuevas. Con los demás hongos no se logró el crecimiento del hongo y las cajas se contaminaron.



Figura 23. Cepa de *T. plumbeoviolaceus* aislada del cuerpo fructífero creciendo en medio PDA

10.3 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Tylophilus plumbeoviolaceus*

Se preparó medio PDA para 4 cajas Petri de 5 cm de diámetro, Se sembró el hongo usando la técnica de caja a caja, el procedimiento fue el mismo de cuando se aislaron los hongos la primera vez, se tomó la caja Petri donde creció el hongo *T. plumbeoviolaceus* y se le cortó un pedazo de 1 cm³ aproximadamente usando una aguja de disección, y se colocó en medio de cada caja Petri con PDA, se sellaron y se etiquetaron con la fecha 29 de noviembre del 2018. Siendo hasta el 24 de diciembre de ese año cuando el micelio cubrió el pequeño pedazo de PDA de la caja original que venía junto con el hongo al momento de resembrar y que comenzó a expandirse por toda la caja Petri se comenzó a medir el diámetro de hongo cada cuatro días usando una regla (TABLA 2).

Tabla 2. Mediciones del crecimiento del hongo *Tylophilus plumbeoviolaceus* en las 4 cajas Petri.

Fecha	Número de caja	Diámetro del micelio (cm)
	1	1.8
	2	1.6

24 de diciembre del 2018	3	1.8
	4	1.5
02 de enero del 2019	1	2.3
	2	2.1
	3	2.4
	4	2.0
06 de enero del 2019	1	2.5
	2	2.3
	3	2.6
	4	2.2
10 de enero del 2019	1	2.8
	2	2.7
	3	2.9
	4	2.4
14 de enero del 2019	1	3.2
	2	3.1
	3	3.2
	4	2.9

19 de enero del 2019	1	3.7
	2	3.6
	3	3.7
	4	3.4
22 de enero del 2019	1	4.0
	2	3.9
	3	4.0
	4	3.6

SEGUNDA MEDICIÓN

Se prepararon cinco cajas Petri de 5 cm de diámetro con medio de PDA como se hicieron en la primera medición, y se resembró el hongo *T. plumbeoviolaceus* a partir de una de las cajas que se les tomaron las medidas de crecimiento. En la figura 24 se muestran las medidas de crecimiento de una de las cajas medida cada diez días durante un mes con su respectiva fotografía.

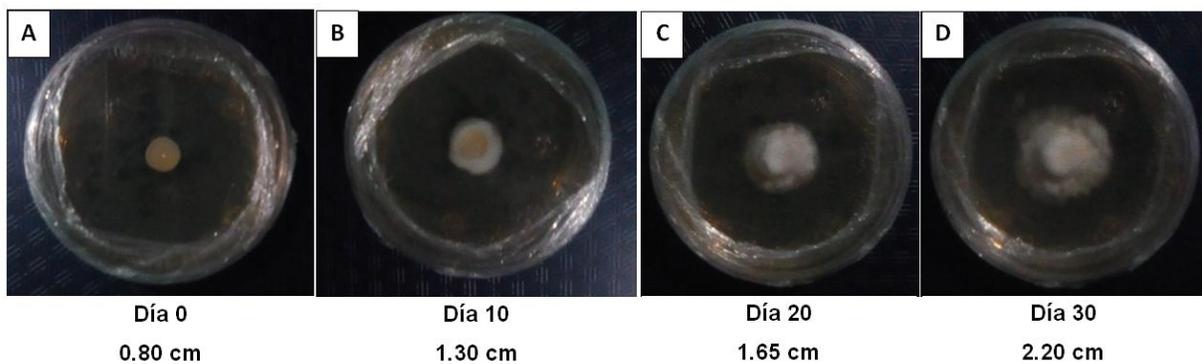


Figura 24. Crecimiento del hongo *T. plumbeoviolaceus* en medio PDA a temperatura 30-35 °C y en oscuridad.

Una vez que el hongo ha crecido casi hasta llenar la caja, se puede hacer una preparación para observar al microscopio las hifas y fíbulas (figura 25).

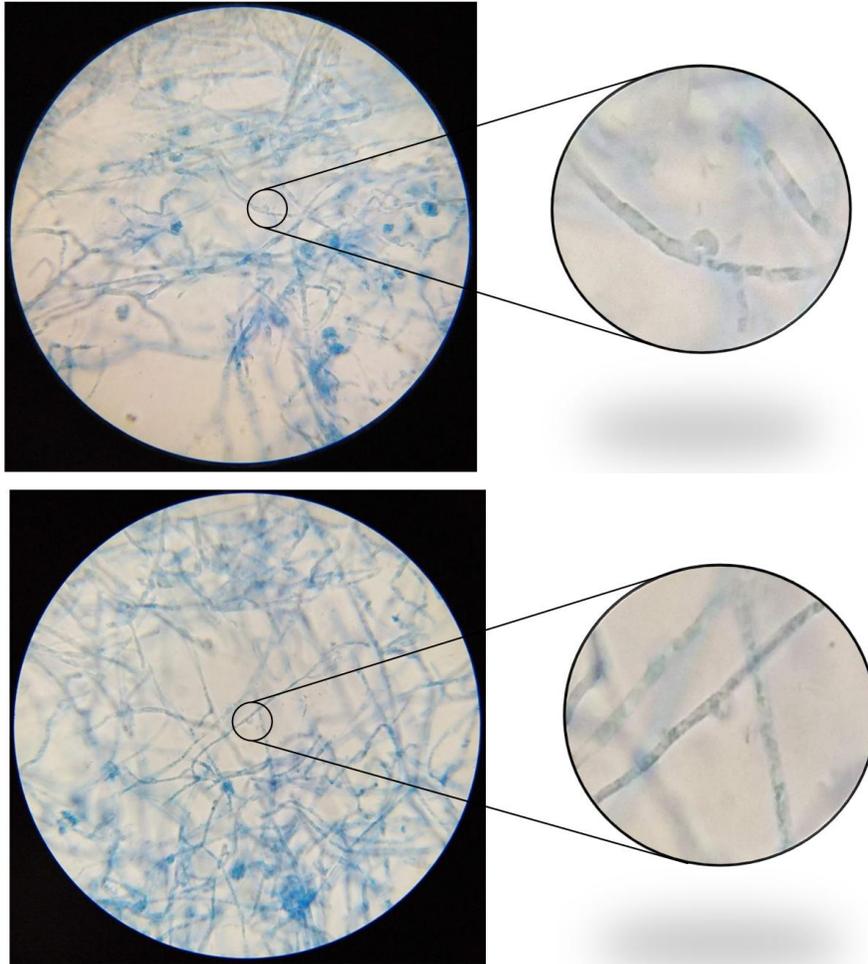


Figura 25. Hifas del hongo *Tylopilus plumbeoviolaceus* bajo el microscopio, en las imágenes están señaladas las fíbulas que presentan las hifas del hongo.

10.4 CULTIVO SUMERGIDO DE *Tylophilus plumbeoviolaceus* EN MATRAZ

10.4.1 EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO



Figura 26. Crecimiento de *Tylophilus plumbeoviolaceus* en medio sumergido con papa al 3% y malta al 2%. **A)** Matraz recién inoculado con la cepa; **B)** Cepa a los diez días de agitación continua; **C)** Crecimiento de la cepa a los 20 días; **D)** Es la cepa creciendo a los 30.

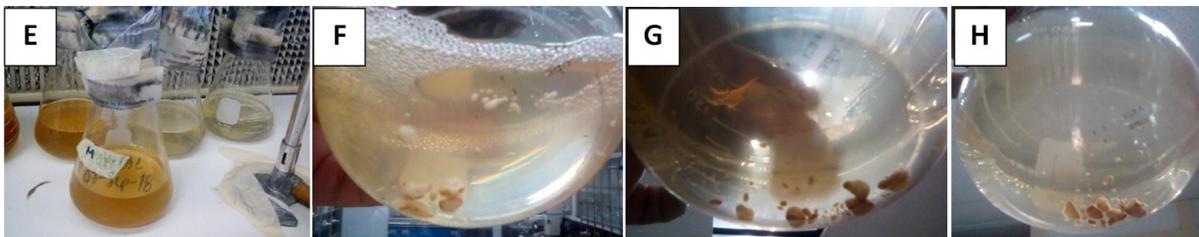


Figura 27. En las figuras (E, F, G, H) se usó un medio preparado con papa al 3% y sacarosa al 2% aforados a 3 litros de agua destilada. La **figura E** es el matraz recién inoculado con la cepa del *Tylophilus plumbeoviolaceus*. La **figura F** es el crecimiento de la cepa después de diez días de agitación continua. La **figura G** es el crecimiento a los 20 días. Y la **figura H** es la cepa creciendo a los 30 días en medio sumergido.

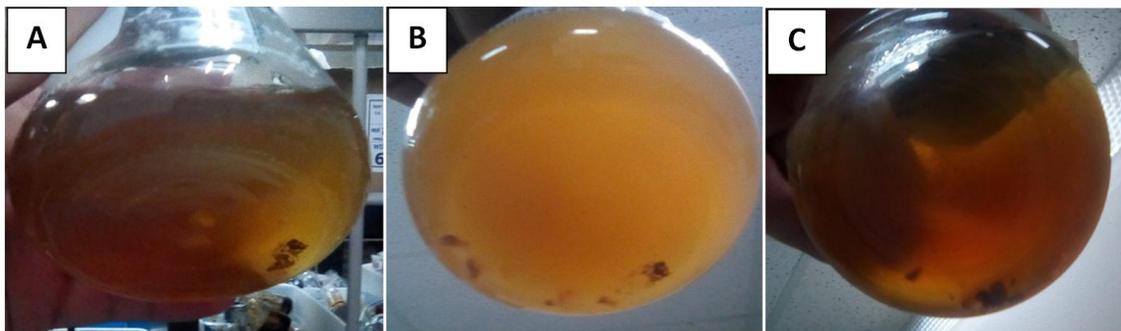


Figura 28. Crecimiento de *Tylophilus plumbeoviolaceus* en medio sumergido con diferentes fuentes de carbono. En las figuras A, B, C se usó un medio preparado con papa al 3%,

malta al 2% y glucosa al 2% aforados a 3 litro de agua destilada. La **figura A** es el matraz recién inoculado con la cepa del *Tylophilus plumbeoviolaceus*. La **figura B** es el crecimiento de la cepa después de 30 días de agitación continua. La **figura C** es el crecimiento de la cepa a los 60 días en medio sumergido.

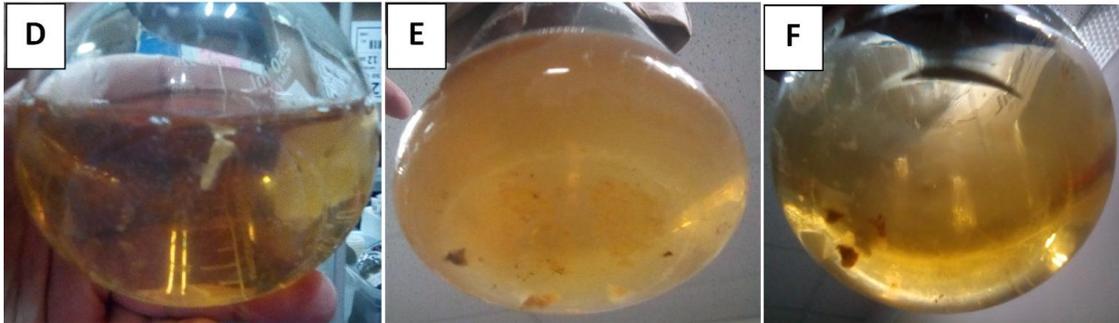


Figura 29. En las figuras E, F, G se usó un medio preparado con papa al 3% y glucosa al 2% aforados a 3 litros de agua destilada. La **figura D** es el matraz recién inoculado con la cepa del *Tylophilus plumbeoviolaceus*. La **figura E** es el crecimiento de la cepa después de 30 días de agitación continua. La **figura F** es el crecimiento a los 60 días en medio sumergido.

Estos resultados indican que si es posible crecer el hongo *Tylophilus plumbeoviolaceus* de manera *ex situ* en medio sumergido, determinándose que la mejor opción para continuar con los experimentos del crecimiento de la cepa es usando como fuente de carbono es el medio de papa al 3% y malta al 2% aforados a 3 litros de agua destilada.

10.4.2 EFECTO DEL pH

Se hicieron pruebas usando el medio de papa al 3% y malta al 2%, aforado a 3 litros de agua destilada usando diferente pH (4, 6 y 7) por triplicado, agitándose a 144 rpm a temperatura ambiente durante 30 días. Los resultados se muestran en las figuras 30 y 31. La cepa solo creció en pH 6 y 7 en los demás matraces no se produjeron pellets. En el medio de pH 7 el crecimiento tardó un poco más a comparación con el de pH 6 ya que a partir de los primeros diez días empezó a producir pellets mientras que el medio de pH 7 empezó a producir pellets durante la última semana del experimento. Se midió el pH al terminar los 30 días, dando como resultado que el medio que empezó con un pH de 6 cambió a 3, mientras que el medio que empezó con un pH de 7 cambió a 4.

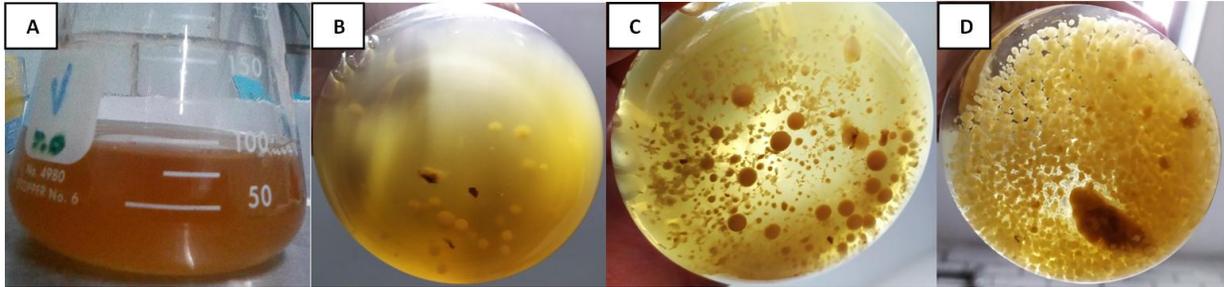


Figura 30. Crecimiento de *Tylopilus plumbeoviolaceus* en medio sumergido con papa al 3% y malta al 2% con un pH de 6. **A)** matraz recién inoculado con la cepa; **B)** cepa a los diez días de agitación continua; **C)** crecimiento de la cepa a los 20 días; **D)** es la cepa creciendo a los 30.

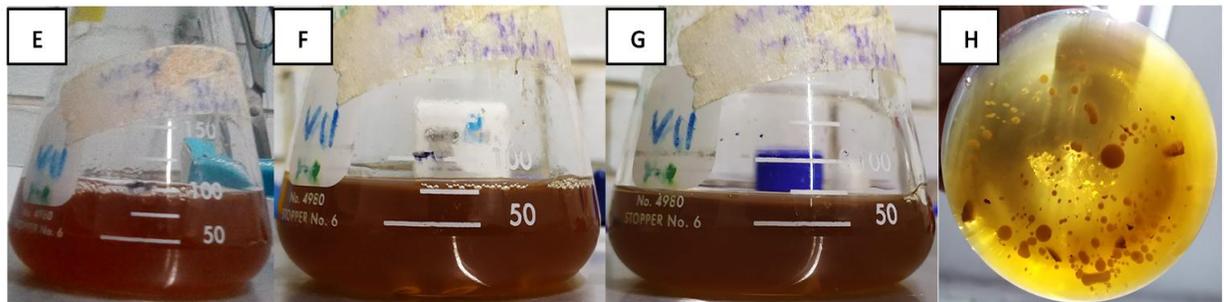


Figura 31. Crecimiento de *Tylopilus plumbeoviolaceus* en medio sumergido con papa al 3% y malta al 2% con un pH de 7. **E)** matraz recién inoculado con la cepa; **F)** cepa a los diez días de agitación continua; **G)** crecimiento de la cepa a los 20 días; **H)** es la cepa creciendo a los 30.

Se hizo un experimento con medio PDA en cajas Petri usando diferentes pH (5, 6, 8) y comparando el crecimiento de la cepa con el medio PDA sin cambiar el pH (control) hasta llenar la caja Petri (figuras 32, 33, 34, 35 y 36); se hizo por duplicado en cada pH diferente. Los datos de las mediciones del hongo en diferentes pH se encuentran en las Tablas 3, 4, 5, 6. Además de una gráfica que marca la diferencia de crecimientos en diferentes pH en relación con el paso del tiempo (figura 37).

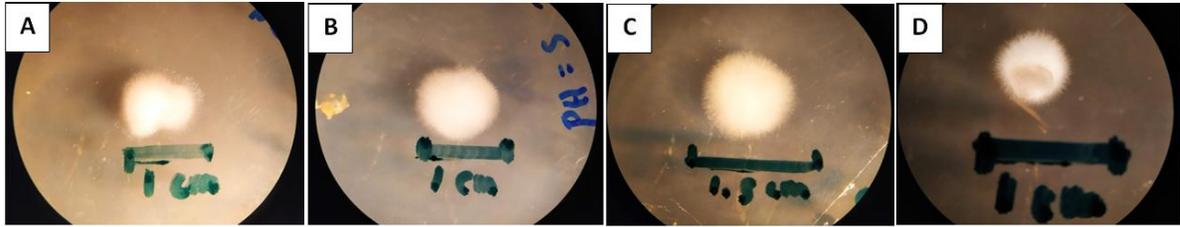


Figura 32. Crecimiento de *Tylopilus plumbeoviolaceus* a los 13 días. En la **A** muestra el crecimiento a un pH de 5.9 (Control). En la **B** el medio fue ajustado a un pH de 5. En **C** el medio fue ajustado a un pH de 6. En la **D** el medio fue ajustado a un pH de 8

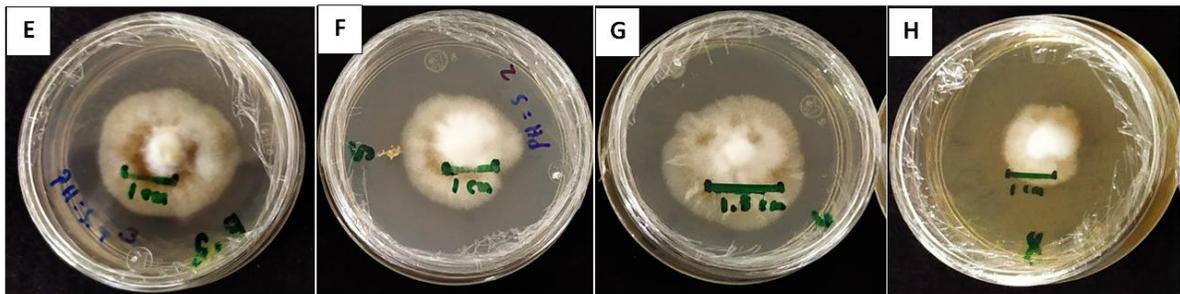


Figura 33. Crecimiento de *Tylopilus plumbeoviolaceus* a los 22 días. En la **E** muestra el crecimiento a un pH de 5.9 (Control). En la **F** el medio fue ajustado a un pH de 5. En **G** el medio fue ajustado a un pH de 6. En la **H** el medio fue ajustado a un pH de 8

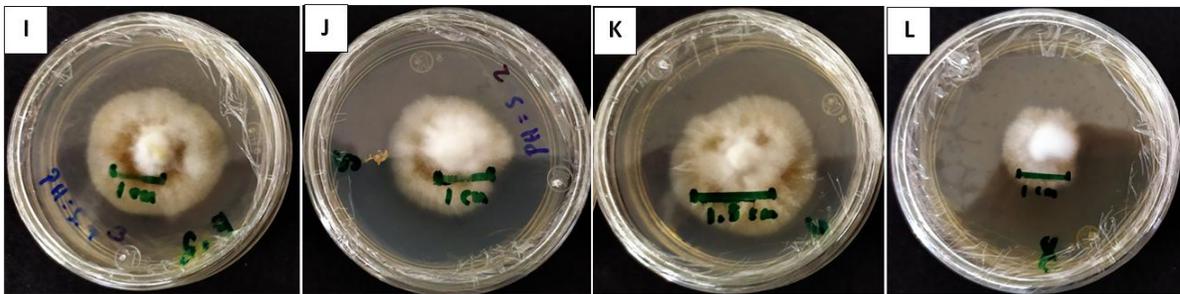


Figura 34. Crecimiento de *Tylopilus plumbeoviolaceus* a los 30 días. En la **I** muestra el crecimiento a un pH de 5.9 (Control). En la **J** el medio fue ajustado a un pH de 5. En **K** el medio fue ajustado a un pH de 6. En la **L** el medio fue ajustado a un pH de 8

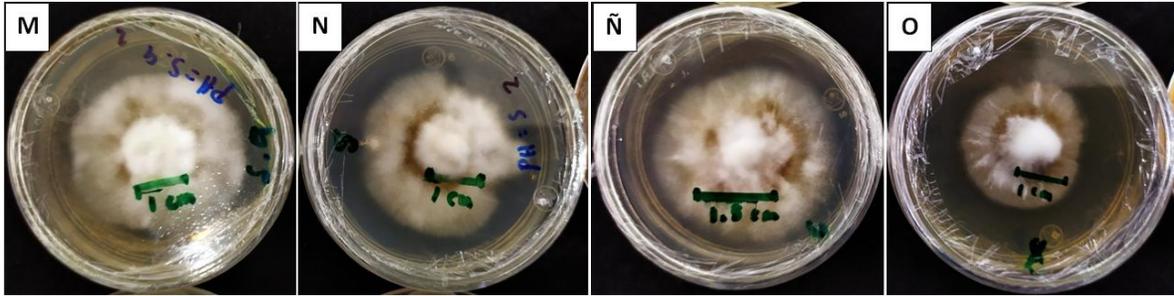


Figura 35. Crecimiento de *Tylopilus plumbeoviolaceus* a los 37 días. En la **M** muestra el crecimiento a un pH de 5.9 (Control). En la **N** el medio fue ajustado a un pH de 5. En **Ñ** el medio fue ajustado a un pH de 6. En la **O** el medio fue ajustado a un pH de 8

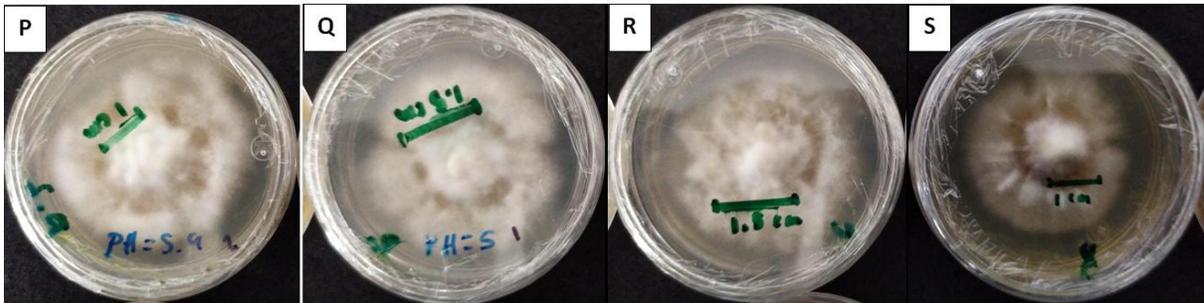


Figura 36. Crecimiento de *Tylopilus plumbeoviolaceus* a los 37 días. En la **P** muestra el crecimiento a un pH de 5.9 (Control). En la **Q** el medio fue ajustado a un pH de 5. En **R** el medio fue ajustado a un pH de 6. En la **S** el medio fue ajustado a un pH de 8

Tabla 3. Crecimiento de *Tylopilus plumbeoviolaceus* en PDA (Control pH 5.9) durante 44 días

	REPETICIONES	TIEMPO (DÍA)	CRECIMIENTO (mm)	PROMEDIO	m	Promedio
INOCULO	R1	0	0.5			
INOCULO	R2	0	0.5	0.5		
CONTROL	R1	13	10.5		0.80	0.88
CONTROL	R2	13	12.5	11.5	0.96	
CONTROL	R1	22	28		1.27	1.37
CONTROL	R2	22	32.5	30.25	1.47	
CONTROL	R1	30	55		1.83	1.97
CONTROL	R2	30	63.5	59.25	2.11	
CONTROL	R1	37	91		2.45	2.61
CONTROL	R2	37	102.5	96.75	2.77	
CONTROL	R1	44	135		3.06	3.19

CONTROL	R2	44	146.5	140.75		
---------	----	----	-------	--------	--	--

Tabla 4. Crecimiento de *Tylophilus plumbeoviolaceus* en PDA ajustado a pH 5 durante 44 días

	REPETICIONES	TIEMPO (DÍA)	CRECIMIENTO (mm)	PROMEDIO	m	PROMEDIO
INOCULO	R1	0	0.5			
INOCULO	R2	0	0.5	0.5		
PH5	R1	13	14.5		1.11	0.96
PH5	R2	13	10.5	12.5	0.80	
PH5	R1	22	36.5		1.66	1.47
PH5	R2	22	28.5	32.5	1.29	
PH5	R1	30	70		2.33	2.10
PH5	R2	30	56.5	63.25	1.88	
PH5	R1	37	112.5		3.04	2.74
PH5	R2	37	90.5	101.5	2.44	
PH5	R1	44	159.5		3.62	3.29
PH5	R2	44	130	144.75	2.95	

Tabla 5. Crecimiento de *Tylophilus plumbeoviolaceus* en PDA ajustado a pH 6 durante 44 días

	REPETICIONES	TIEMPO (DÍA)	CRECIMIENTO (mm)	PROMEDIO	m	PROMEDIO
INOCULO	R1	0	0.5			
INOCULO	R2	0	0.5	0.5		
PH6	R1	13	11.5		0.88461538	0.92
PH6	R2	13	12.5	12	0.96153846	
PH6	R1	22	32		1.45454545	1.46
PH6	R2	22	32.5	32.25	1.47727273	
PH6	R1	30	63.5		2.11666667	2.1
PH6	R2	30	62.5	63	2.08333333	
PH6	R1	37	102.5		2.77027027	2.73
PH6	R2	37	99.5	101	2.68918919	
PH6	R1	44	146.5		3.32954545	3.27
PH6	R2	44	142	144.25	3.22727273	

Tabla 6. Crecimiento de *Tylophilus plumbeoviolaceus* en PDA ajustado a pH 8 durante 44 días

	REPETICIONES	TIEMPO (DÍA)	CRECIMIENTO (mm)	PROMEDIO	m	PROMEDIO
INOCULO	R1	0	0.5			
INOCULO	R2	0	0.5	0.5		
PH8	R1	13	6.5		0.5	0.53
PH8	R2	13	7.5	7	0.57	
PH8	R1	22	16		0.72	0.78
PH8	R2	22	18.5	17.25	0.84	
PH8	R1	30	33		1.1	1.16
PH8	R2	30	37	35	1.23	
PH8	R1	37	62		1.67	1.73
PH8	R2	37	66	64	1.78	
PH8	R1	44	95		2.16	2.24
PH8	R2	44	102.5	98.75	2.33	

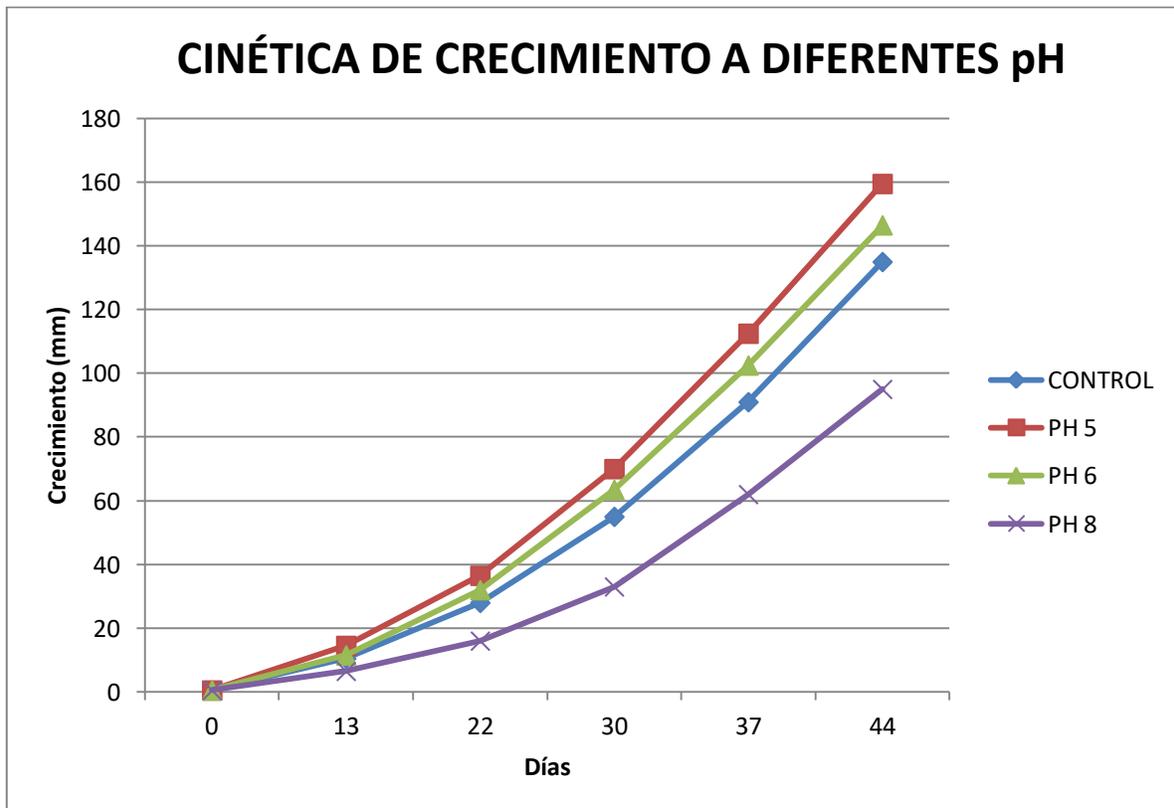


Figura 37. Gráfica del crecimiento de *Tylophilus plumbeoviolaceus* en medio PDA a un pH ajustado a 5, 6, 8 y comparándolos con el medio PDA sin ajustar el pH (5.9 control)

durante 44 días. Siendo el pH 5 en el que se ve un crecimiento ligeramente mayor a comparación del control, seguido por el pH 6.

ANÁLISIS DE POLISACÁRIDOS

Al término del período de crecimiento de la biomasa de *Tylophilus plumbeoviolaceus* se filtró la biomasa del medio de cultivo sobre un papel filtro. La biomasa se secó en una estufa hasta alcanzar un peso constante. La fase líquida del cultivo sumergido se dejó secar a temperatura ambiente y al residuo se le disolvió en agua, y volvió a filtrar. El filtrado se dejó secar y al residuo (15 mg) se le disolvió en D₂O para obtener su espectro de RMN (figura 38).

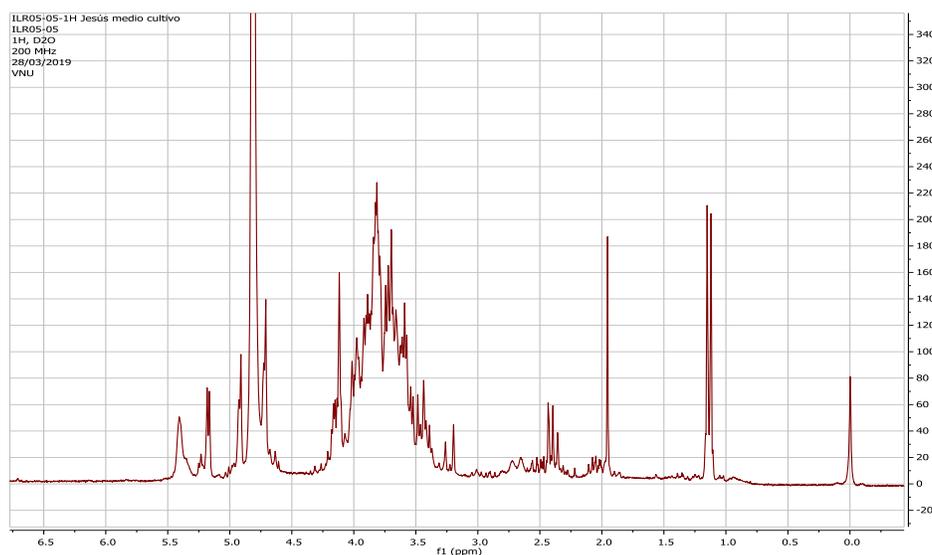


Figura 38. Espectro de RMN ¹H (200 MHz, D₂O) del residuo soluble en agua del medio agotado en cultivo sumergido de *Tylophilus plumbeoviolaceus*.

10.5 ANÁLISIS MICOQUÍMICO

10.5.1 EXTRACCIÓN POR MACERACIÓN EN DICLOROMETANO

Los cuerpos fructíferos de todos los hongos recolectados y comprados fueron secados y pesados (tabla 7). Los hongos molidos se pusieron en matraces diferentes, uno para cada uno. El cuerpo fructífero de *Tylophilus felleus* se colocó en un matraz de 1 litro, el cuerpo fructífero de *Tylophilus plumbeoviolaceus* se puso en un matraz de 250 ml y de

igual manera se colocó *Boletus edulis* (italiano, caja) en un matraz de la misma capacidad y finalmente el hongo *Boletus edulis* mexicano se colocó en un matraz de 500 ml.

Tabla 7. Peso de los hongos secos

HONGO	PESO (gr)
<i>Tylopilus felleus</i>	113 gr
<i>Tylopilus plumbeoviolaceus</i>	43 gr
<i>Boletus edulis</i> mexicano	109 gr
<i>Boletus edulis</i> italiano (caja)	41 gr

A cada uno de los matraces se les agrego diclorometano hasta que el volumen estuviera 2 cm arriba de la superficie del hongo, se les dejó en reposo 6 días. Se comenzó a filtrar el hongo *Boletus edulis* italiano (caja) usando papel filtro. La solución resultante fue evaporada en un rotavapor. Obteniéndose de esta manera el extracto soluble en diclorometano, el cual después fue pesado (tabla 8). Este mismo proceso se usó para los otros 3 matraces, usando un papel filtro y un matraz bola diferente para cada hongo. Este procedimiento se realizó dos veces.

Tabla 8. Peso de los extractos de diclorometano de los hongos

HONGO	PESO (gr)
<i>Tylopilus plumbeoviolaceus</i>	0.3734
<i>Boletus edulis</i> italiano (caja)	0.6435
<i>Boletus edulis</i> mexicano	1.5869
<i>Tylopilus felleus</i>	0.5765

Una fracción de los extractos obtenidos fueron pesados (4 mg) y disueltos en diclorometano para ser analizados con el sistema analítico cromatografía de gases – espectrometría de masas.

ILR06_01= *T. felleus*

ILR06_02= *T. plumbeoviolaceus*

ILR06_03= *B. edulis* mexicano

ILR06_04= *B. edulis* italiano (caja)

10.5.2 ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS SOLUBLES EN CH₂Cl₂ DE *Tylopilus felleus*, *Tylopilus plumbeoviolaceus* y *Boletus edulis*

CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

A los extractos obtenidos se les analizó por cromatografía en capa fina de SiO₂ sobre aluminio, utilizando un sistema de elución CH₂Cl₂ / CH₃OH (90:10). Las placas se revelaron con luz UV y H₂SO₄.



Figura 39. Cromatoplaqa de los extractos de CH₂Cl₂ bajo luz ultravioleta

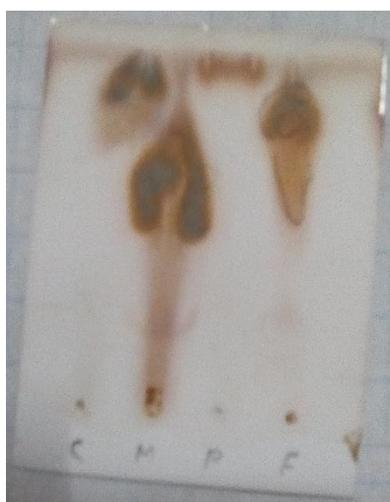


Figura 40. Cromatoplaqa de los extractos de CH₂Cl₂ revelados con ácido sulfúrico.

C- *Boletus edulis* italiano (Caja); **M-** *Boletus edulis* mexicano; **P-** *Tylopilus plumbeoviolaceus*; **F-** *Tylopilus felleus*

ANÁLISIS CROMATOGRAFÍA DE GASES - ESPECTROMETRÍA DE MASAS

En las figuras 41, 42, 43 y 44 se presentan los cromatogramas obtenidos por detección de iones totales de los cuatro extractos solubles en diclorometano de los hongos: *Tylopilus felleus*, *Tylopilus plumbeoviolaceus*, *Boletus edulis* (México) y *Boletus edulis* (Italia). Los cromatogramas de los cuatro extractos muestran similitudes, se puede observar que hay un componente mayoritario (tr = 54.9 – 55.1 min) y cuatro menos abundantes. El cromatograma de *Boletus edulis* italiano presenta otros componentes con tiempos de retención superiores a 55.5 min.

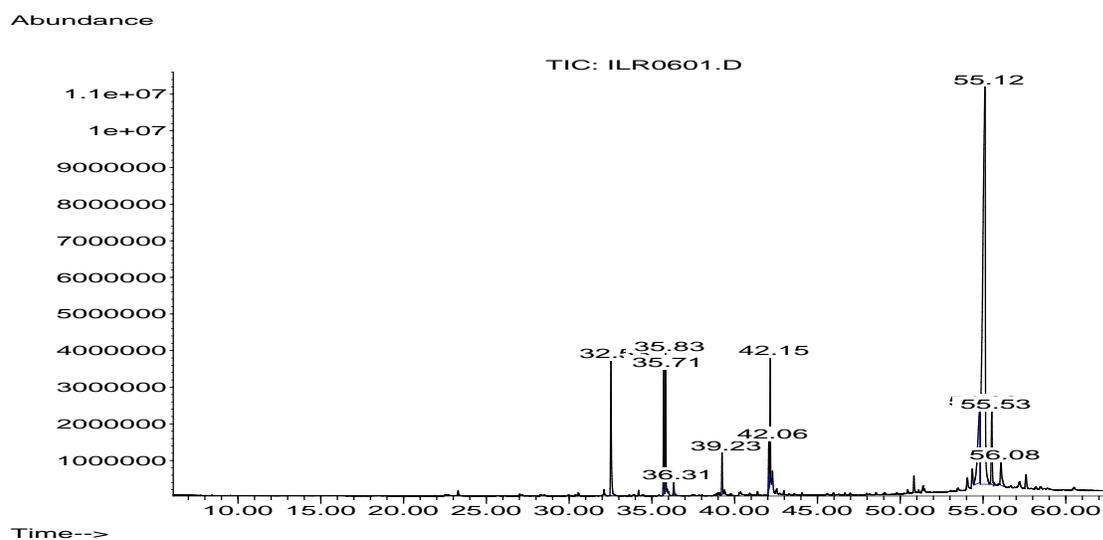


Figura 41. Cromatograma del extracto soluble en diclorometano de *Tylopilus felleus*.

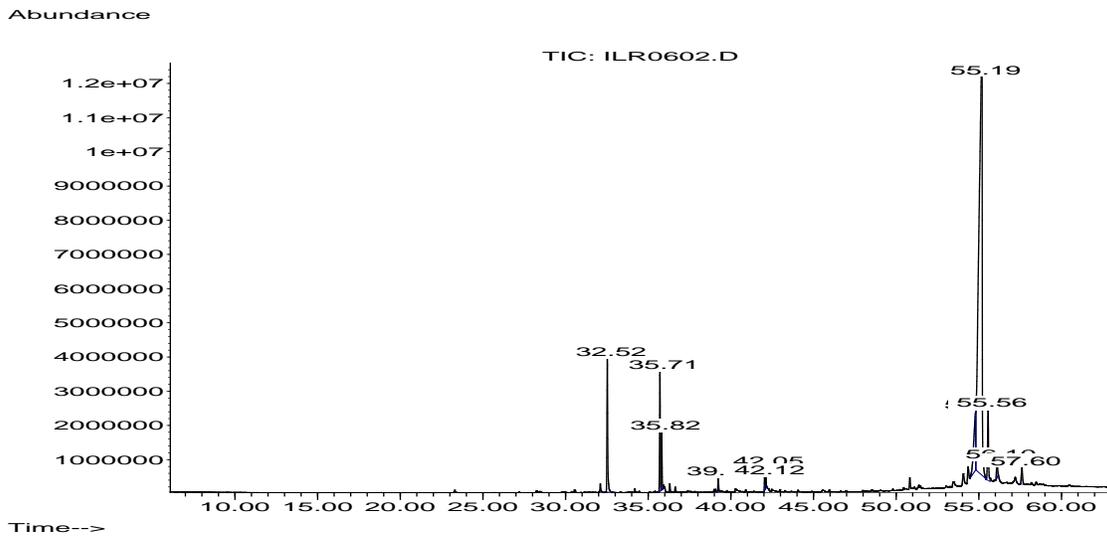


Figura 42. Cromatograma del extracto soluble en diclorometano de *Tylopilus plumbeoviolaceus*

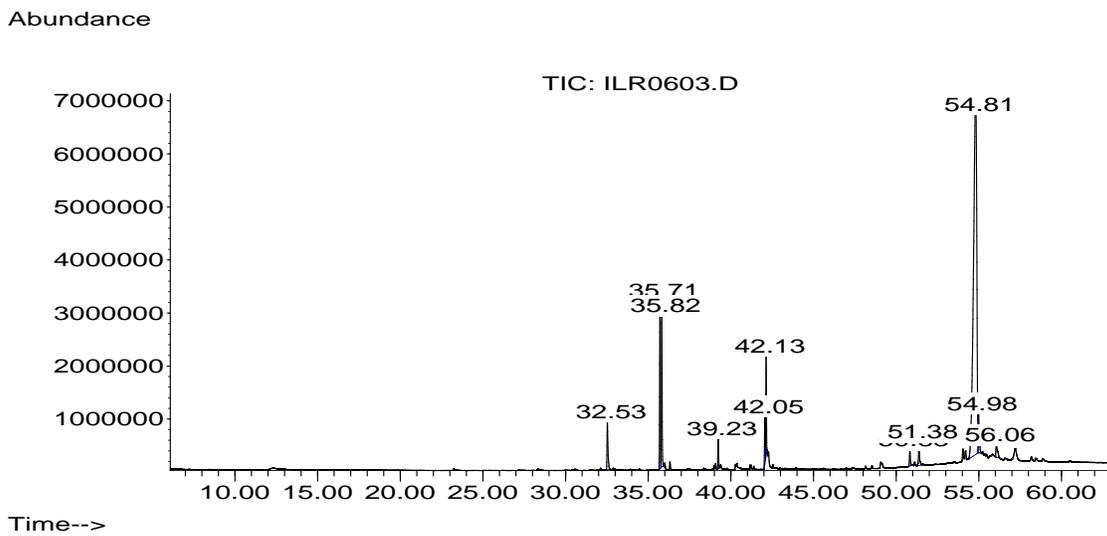


Figura 43. Cromatograma de iones totales del extracto soluble en diclorometano de *Boletus edulis mexicano*.

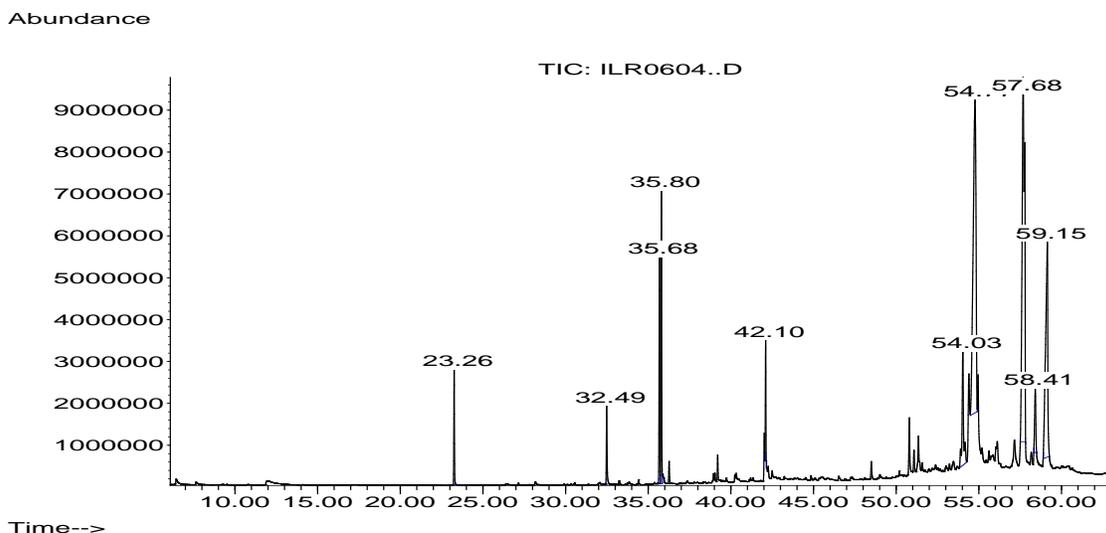


Figura 44. Cromatograma del extracto diclorometano de *Boletus edulis* italiano.

Los espectros de masas de los picos sugieren que el componente con $t_r = 55$ min corresponden a una estructura de tipo esteroidal, teniendo como estructura probable la de ergosterol. Los espectros de masas de los picos con $t_r = 32, 35$ y 42 min corresponden a ácidos grasos o monoacilglicéridos. Lo que permite resumir que los componentes principales de los extractos solubles en diclorometano de los cuatro hongos son ácidos grasos y terpenos de tipo esteroidal (figuras 45, 46, 47 y 48).

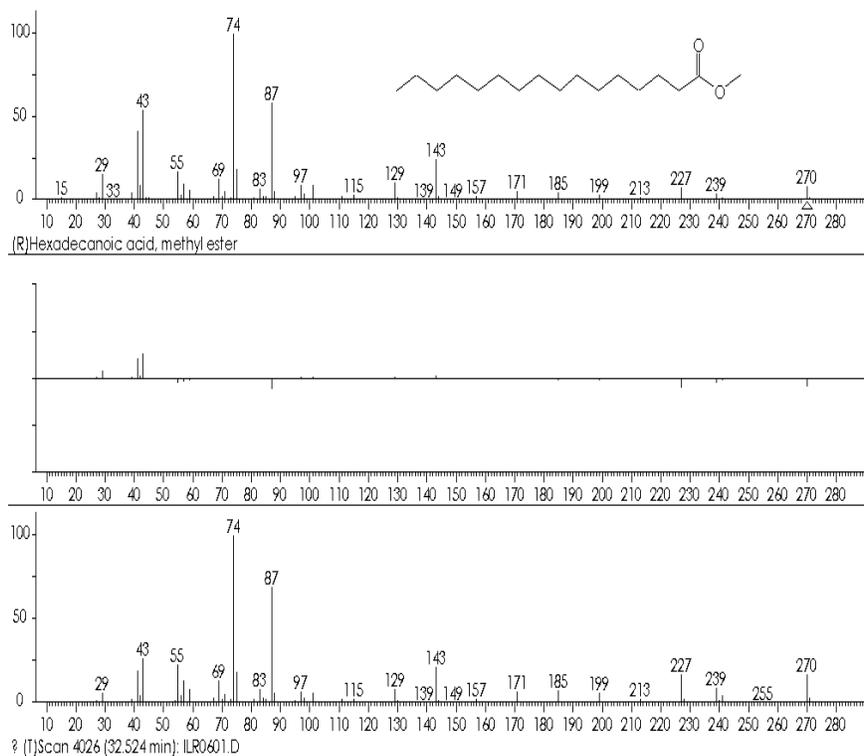


Figura 45. Espectro de masas del pico cromatográfico con tiempo de retención 32.52 min y su comparación espectral con la Biblioteca NIST.

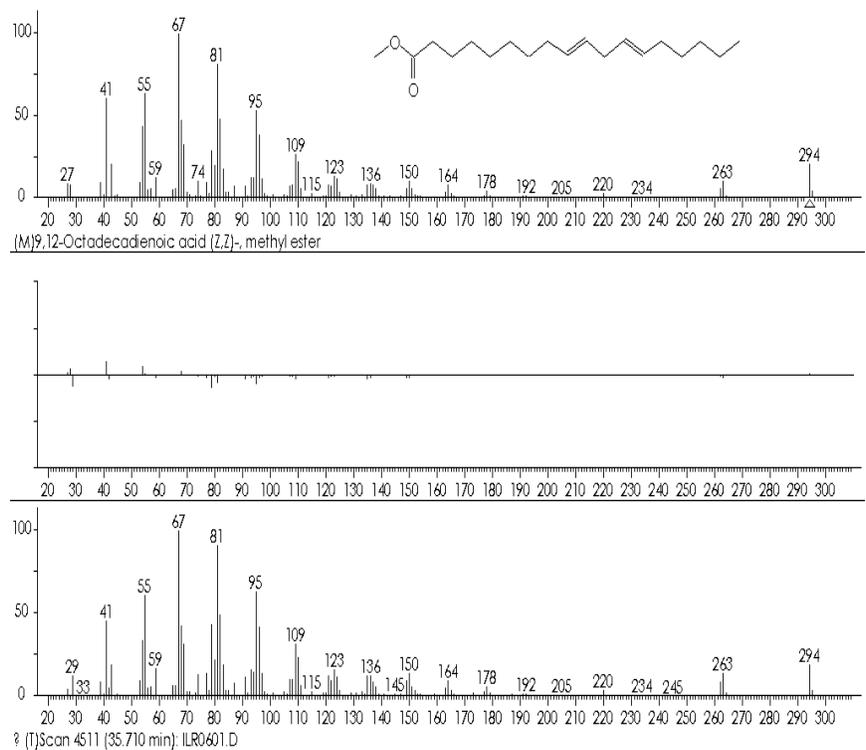


Figura 46. Espectro de masas del pico cromatográfico con tiempo de retención 35.71 min y su comparación espectral con la Biblioteca NIST.

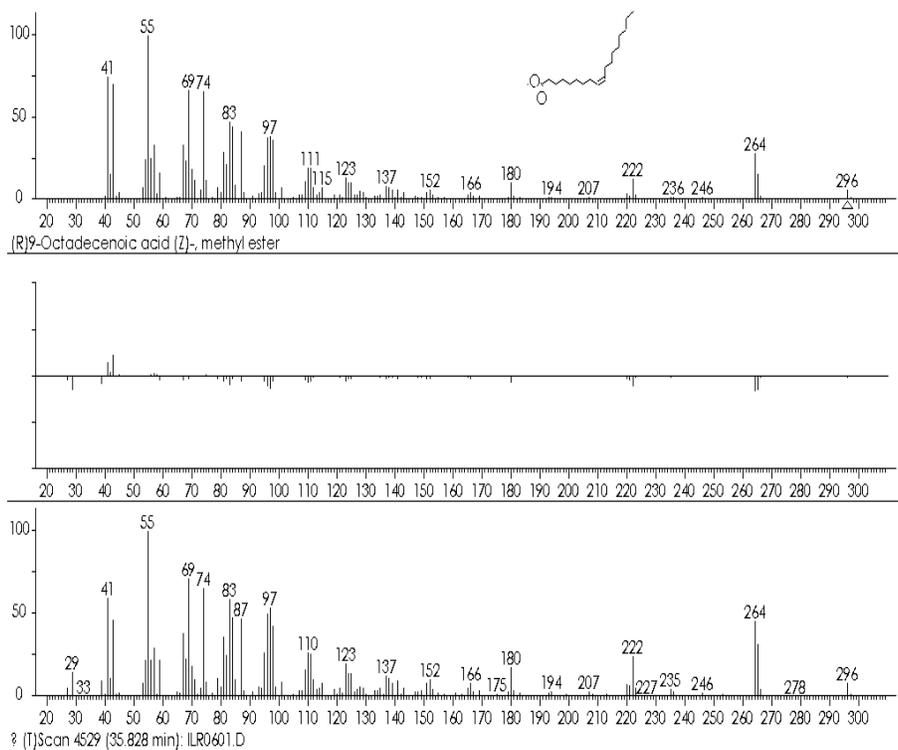


Figura 47. Espectro de masas del pico cromatográfico con tiempo de retención 35.82 min y su comparación espectral con la Biblioteca NIST.

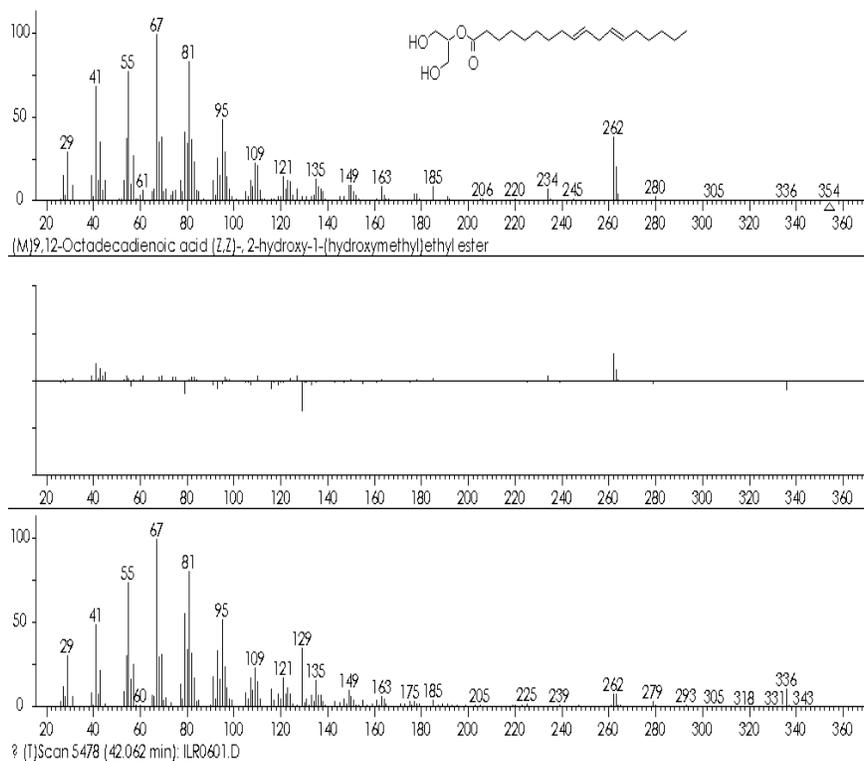


Figura 48. Espectro de masas del pico cromatográfico con tiempo de retención 42.06 min y su comparación espectral con la Biblioteca NIST.

ANÁLISIS POR RMN

Los espectros de RMN de los extractos de diclorometano de los cuatro hongos, indican que los ácidos grasos son los componentes principales. En el espectro de *T. plumbeoviolaceus* (figura 49) también se observan señales de un triterpeno en baja abundancia.

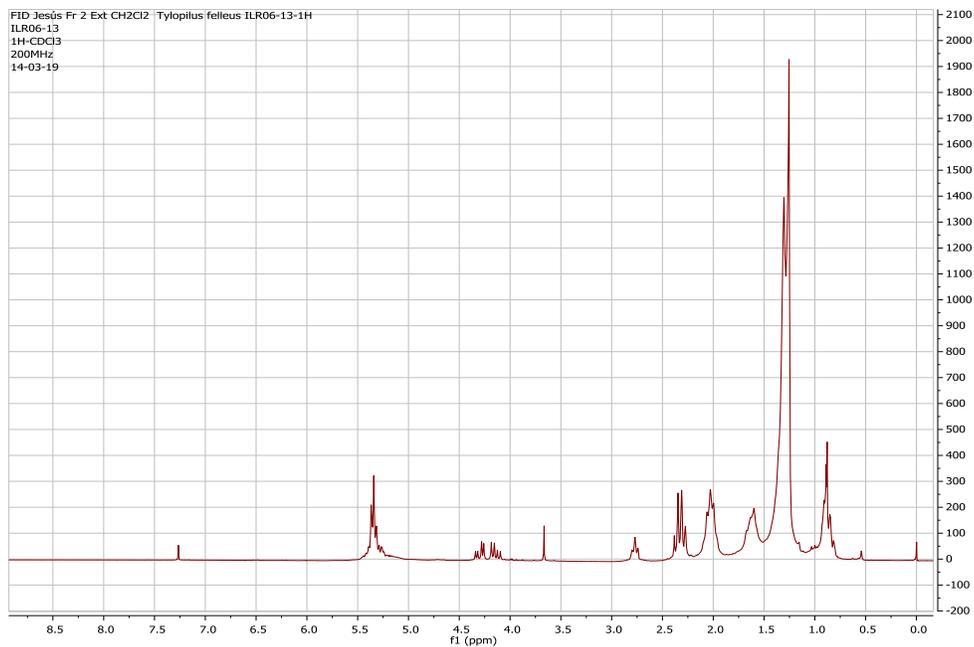


Figura 49. Espectro de RMN del extracto de diclorometano de *T. felleus* (200 MHz, CDCl_3).

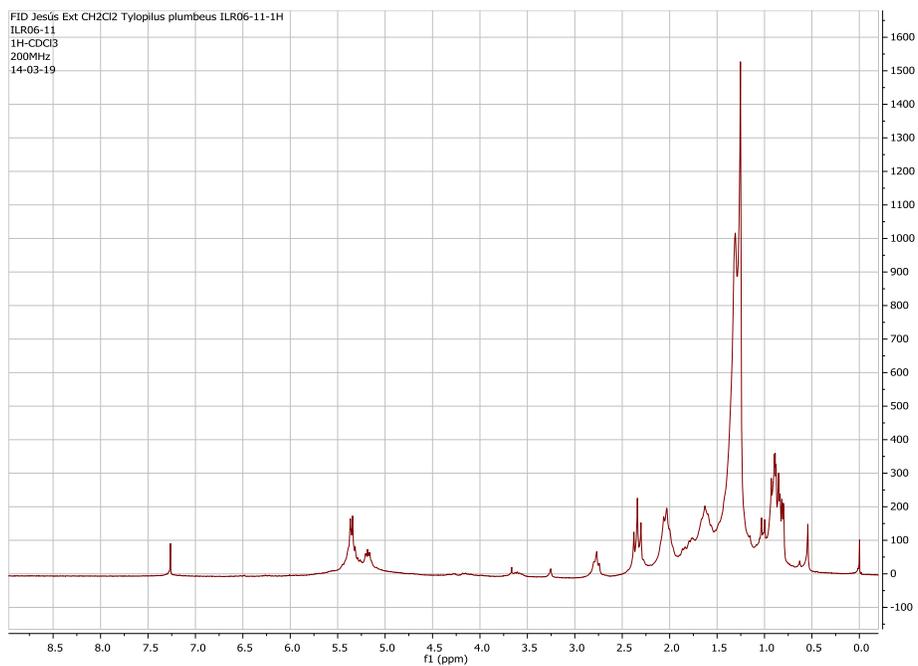


Figura 50. Espectro de RMN del extracto de diclorometano de *T. plumbeoviolaceus* (200 MHz, CDCl_3).

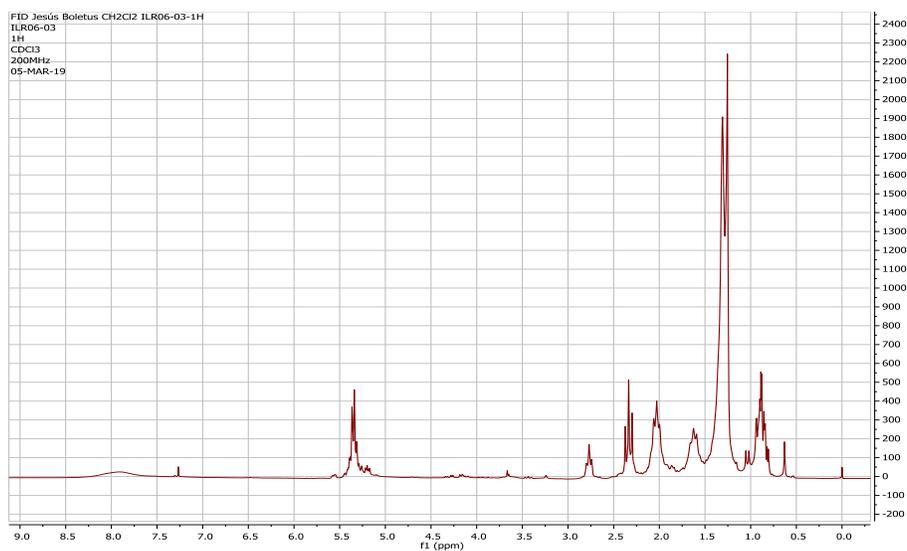


Figura 51. Espectro de RMN del extracto de diclorometano de *Boletus edulis* recolectado en Cerro Frío (200 MHz, CDCl₃).

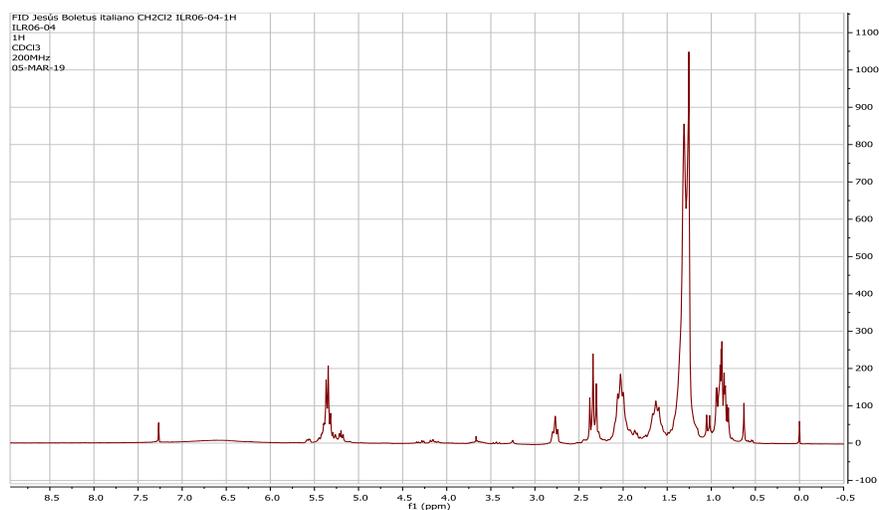


Figura 52. Espectro de RMN del extracto de diclorometano de *Boletus edulis* comprado (200 MHz, CDCl₃).

El fraccionamiento del extracto de diclorometano de *Tylopilus felleus* por cromatografía en columna permitió aislar una fracción, cuyos espectros de RMN Uni- y Bidimensionales sugieren que se trata de una mezcla de ácido graso y un triterpeno o un compuesto esteroidal (figuras 54 y 55).

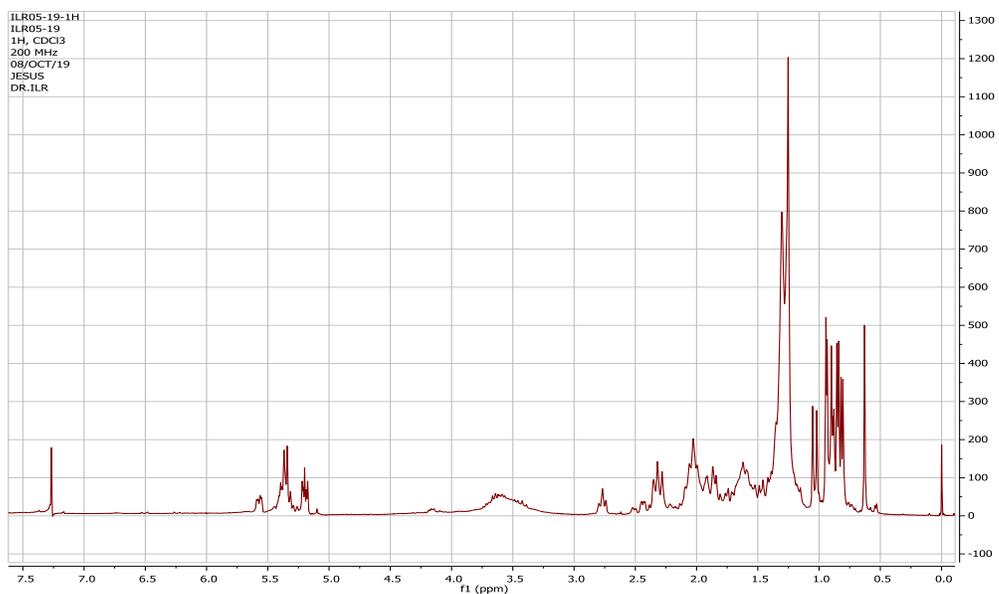


Figura 53. Espectro de RMN ^1H de la fracción 6 del extracto diclorometano de *Boletus edulis mexicanus*.

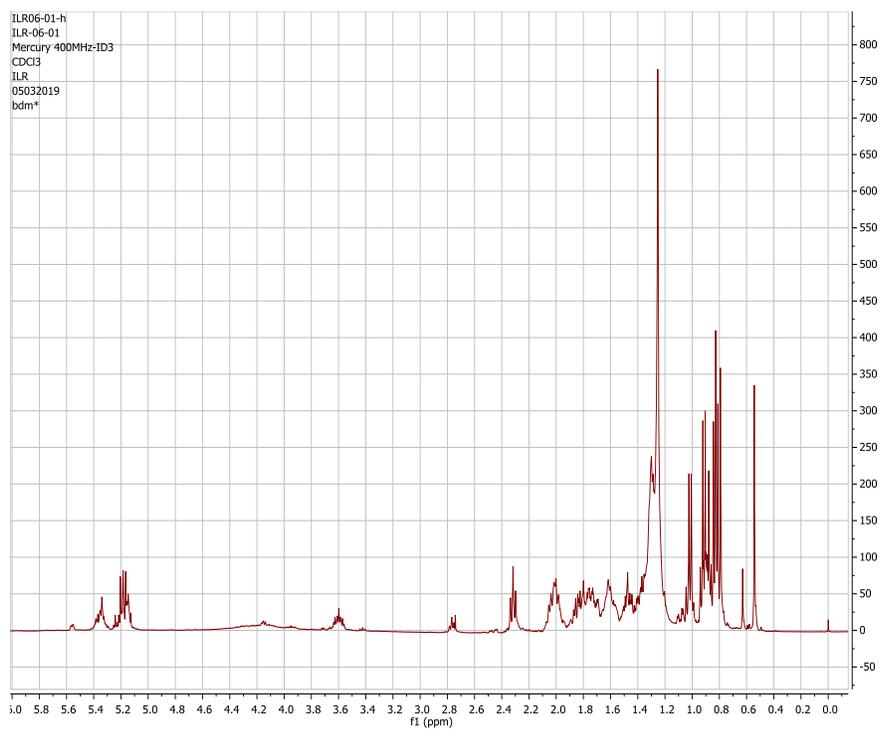


Figura 54. Espectro de RMN ^1H de la fracción 10 del extracto diclorometano de *Tylopilus felleus*.

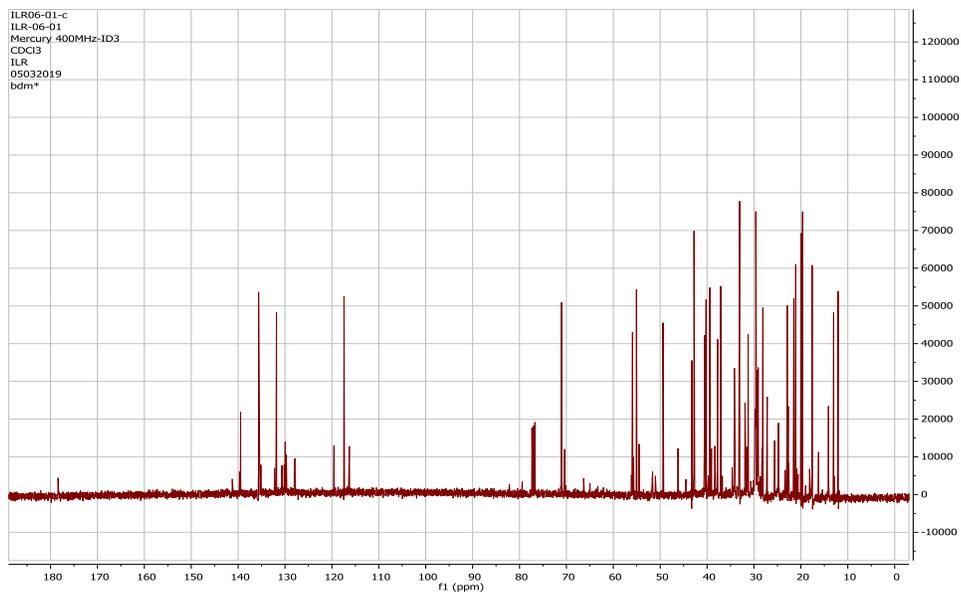


Figura 55. Espectro de RMN ^{13}C de la fracción 10 del extracto diclorometano de *Tylopilus felleus*.

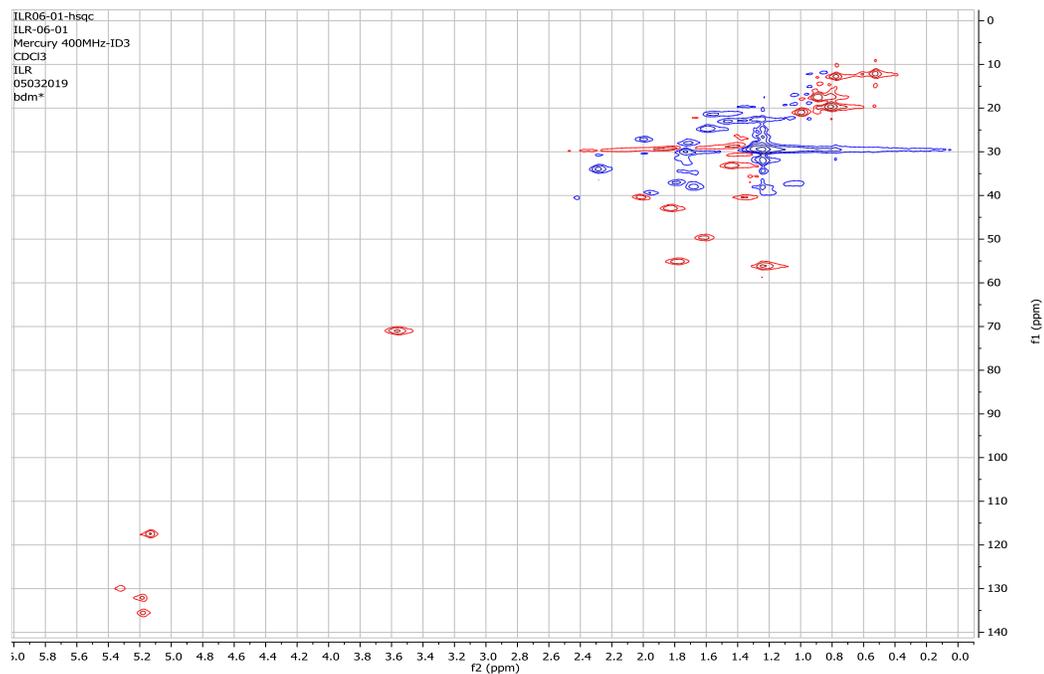


Figura 56. Espectro de RMN HSQC de la fracción 10 del extracto diclorometano de *Tylopilus felleus*.

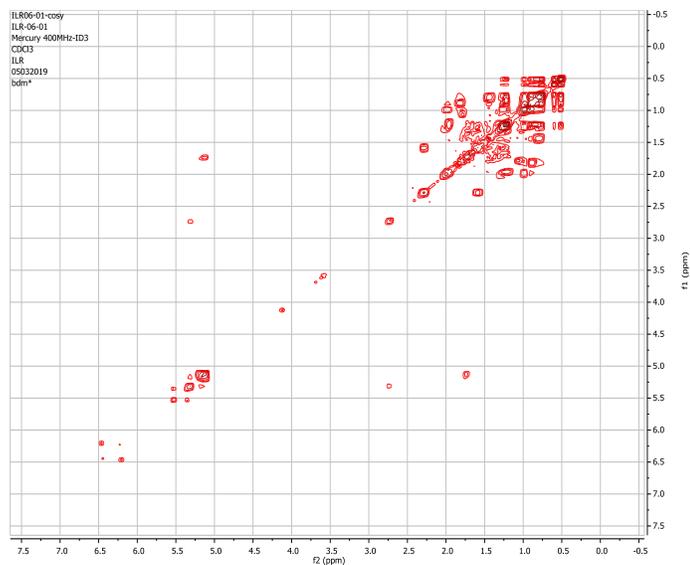


Figura 57. Espectro de RMN COSY de la fracción 10 del extracto diclorometano de *Tylopilus felleus*.

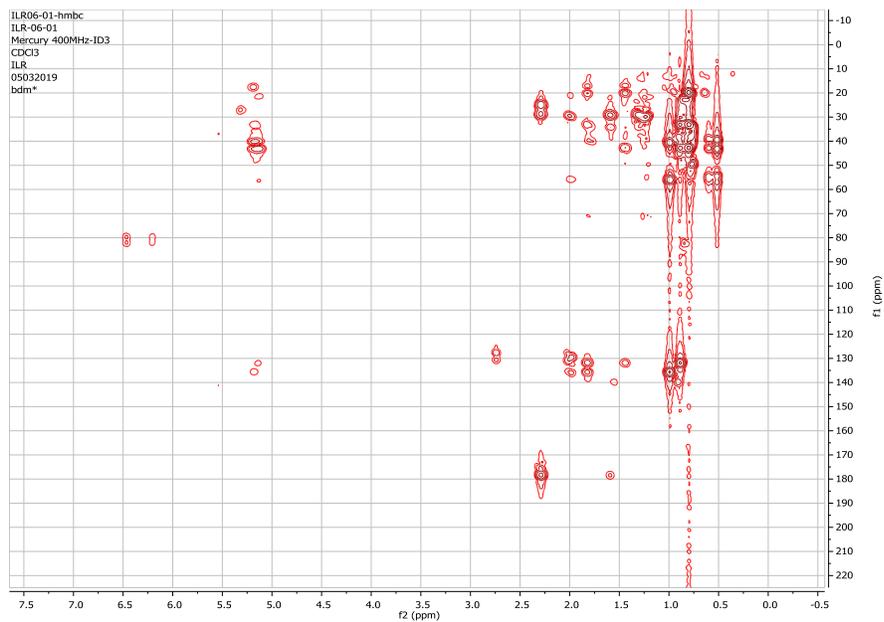


Figura 58. Espectro de RMN HMBC de la fracción 10 del extracto diclorometano de *Tylopilus felleus*.

Tabla 9. Comparación de desplazamientos químicos del metabolito obtenido de la RMN con los datos de RMN del ergosterol (Islas-Santillán, *et al.* 2018).

	$\delta^1\text{H}$		$\delta^{13}\text{C}$	
	Ergosterol	metabolito	Ergosterol	metabolito
1	0.95, 1.73	1.02, 1.79	38.77	37
2	1.59, 1.63	1.70, 1.68	27.35	28
3	3.2	3.3	79.01	78
4	1.38, 1.53		38.92	39
5			139	139
6	5.2	5.22	118	119
7	5.1	5.22	119	119
8			139	139
9	1.33	1.31	54.48	55
10			37.12	
11	1.28, 1.54	1.2, 1.5	21.43	22
12	1.10, 1.69	1.1, 1.7	26.17	26
13	1.68	1.7	39.17	40
14	1.25	1.3	42.02	
15	5.1	5.1	26.64	
16	5.1	5.2	138.31	139
17	2.0		138.53	139
18	1.97		48.67	
19	2.11		39.40	
20	5.1	5.22	119	119
21			139	139
22	1.37, 1.41		39.88	
23	0.97, 0.85		28.02	
24	0.76	0.5	15.39	15
25	0.85	0.9	16.78	17
26	1.02	1.0	15.87	16
27	0.94	0.9	14.76	15
28	0.86	0.8	19.49	20

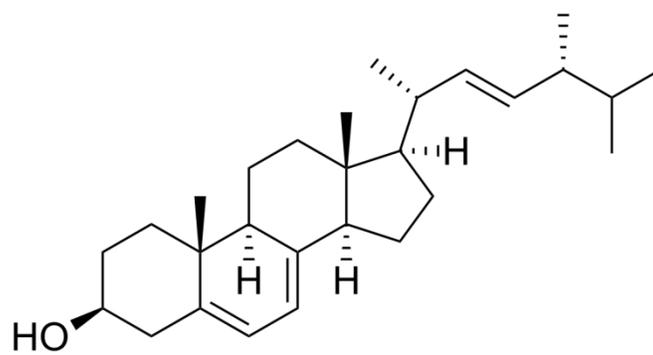


Figura 59. Ergosterol

10.5.2 EXTRACCIÓN POR MACERACIÓN EN METANOL

Al material fúngico residual de la maceración con diclorometano se le agrego metanol. Se dejó reposar durante 6 días, al cabo de este tiempo se filtró el macerado y el disolvente se eliminó con el rotavapor. Este procedimiento se repitió tres veces (tabla 10).

Tabla 10. Peso de los extractos metanólicos de los hongos:

HONGO	PESO (gr)
<i>Tylopilus felleus</i>	4.3287
<i>Tylopilus plumbeoviolaceus</i>	2.4953
<i>Boletus edulis</i> mexicano	11.1452
<i>Boletus edulis</i> italiano (caja)	5.5344

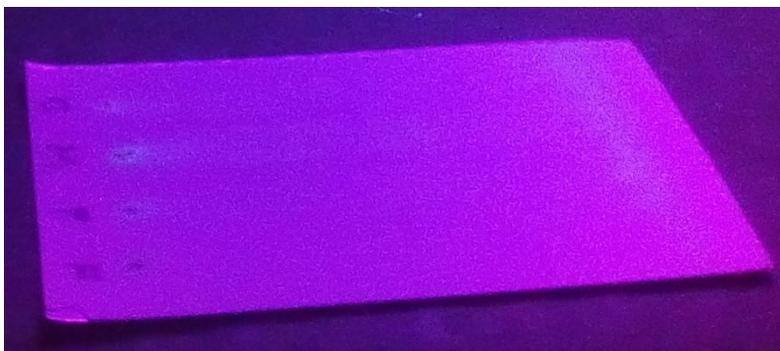


Figura 60. Cromatoplate de los extractos solubles en metanol bajo luz ultravioleta



Figura 61. Cromatoplaça de los extractos de metanol revelados con ácido y calor. C- *Boletus edulis* italiano (Caja); M- *Boletus edulis* mexicano; P- *Tylopilus plumbeoviolaceus*; F- *Tylopilus felleus*

Se hizo una cromatografía en placa fina con las fracciones eluidas, revelando con H_2SO_4 y se le aplicó calor (figura 62).



Figura 62. Cromatoplaça de las fracciones 1, 2, 3 y 10 y extracto de *Tylopilus felleus*

11. DISCUSION

Las características taxonómicas de los hongos recolectados *Tylopilus plumbeoviolaceus*, *Tylopilus felleus* y *Boletus edulis* concuerdan con lo reportado por Snell y Dick (1970), Rodríguez Ramírez (2009) y Kobold (2000) respectivamente.

Tylopilus felleus y *Tylopilus plumbeoviolaceus* fueron registrados por (López-Eustaquio, *et al.* 1984). Sin ningún estudio químico, sólo taxonómico, del Corredor Biológico Chichinautzin. El cultivo de hongos en fase sólida no permite obtener los componentes bioactivos en breves periodos de tiempo (días) y con procesos de purificación sencillos, a comparación de los métodos biotecnológicos. El objetivo actual del cultivo en medio líquido del micelio de macrohongos consiste en aumentar la producción de los metabolitos bioactivos.

Considerando que los polisacáridos son los metabolitos más abundantes y con gran variedad de actividades biológicas, resulta importante efectuar investigación con aquellos hongos que no son tan conocidos, pero que podrían tener buenos rendimientos en cultivo sumergido, como es el caso de *Tylopilus plumbeoviolaceus*.

Godbout y Fortin (1990), consideraban que sería poco probable que los hongos ectomicorrícicos produzcan sus cuerpos fructíferos en un medio de cultivo artificial. Sin embargo, gracias a los avances en investigaciones en años posteriores, ya se ha logrado el aislamiento de algunos hongos ectomicorrizógenos así como la obtención del cuerpo fructífero (Galindo Flores y Santiago Martínez 2003) pero las condiciones en las que el hongo crece juegan un papel importante, ya que no todos los hongos crecen en las mismas condiciones.

El hongo *Boletus luridellus*, tiene un crecimiento relativamente rápido al ser cultivado en medio de Melin Norkrans modificado, observándose un crecimiento de 3.9 cm por mes y 2.8 cm en promedio por mes respectivamente a un pH de 6.5 (Garza Ocañas, *et al.* 2018). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la rapidez de crecimiento de *Tylopilus plumbeoviolaceus* es de 2.2 cm/mes, aunque siendo menor a *B. luridellus* se logró se aislamiento.

La capacidad que tienen los hongos en tolerar diferentes valores de pH puede influir en la colonización y establecimiento de las micorrizas (Galindo Flores y Santiago Martínez, 2003). Esto es debido a que incide sobre el carácter iónico del medio e influye directamente sobre las proteínas de la membrana y sobre la actividad de las enzimas ligadas a la pared celular; es decir, afecta directamente su metabolismo (Sánchez Vázquez y Royse, 2001). El cultivo sumergido de *Tylophilus plumbeoviolaceus* presentó un cambio en el pH tendiendo a la acidificación, esto se vio en los experimentos usando el medio de papa, dando como resultado que el medio que empezó con un pH de 6 cambió a 3, mientras que el medio que empezó con un pH de 7 cambió a 4. Pereira, *et al.* (2014) reportan que el hongo ectomicorrícico *Lactarius aff. Deliciosus* también presenta esa característica, además menciona que el grado de acidificación aumenta a medida que el valor de pH inicial del medio fue mayor, independiente de las condiciones de cultivo (estática o agitación).

Por otra parte, un factor relevante en el crecimiento de los hongos ectomicorrizógenos es la fuente de carbono (Galindo Flores y Santiago Martínez, 2003). El carbono puede ser utilizado por el hongo a partir de diferentes fuentes como carbohidratos, lípidos, etc. (Sánchez Vázquez y Royse, 2001). Tanto *Lyophyllum shimeji* como *Hebeloma spp* utilizan almidón y compuestos relacionados (Ohta 1997), que les permiten el crecimiento de una gran cantidad de micelio, lo que facilita la producción posterior de cuerpos fructíferos sin una planta huésped; al igual que en algunos casos de hongos del género *Suillus* que crecen mejor en medio de PDA (Murrieta-Hernández, *et al.* 2014). La preferencia que tiene *Tylophilus plumbeoviolaceus* con el medio de papa y malta sobre el medio que cambia la malta por la glucosa y la sacarosa en cultivo sumergido es notable al haber crecimiento el hongo en ese medio mientras que en los que tenían glucosa y sacarosa el crecimiento fue nulo.

Dentro de los pocos trabajos que se tienen sobre el cultivo de *Tylophilus* esta Kikuchi, K., Matsushita, N., y Suzuki, K. (2009) donde mencionan que *Tylophilus castaneiceps* fue cultivado a diferentes concentraciones de agar, donde se vieron mejores resultados fueron al 0.25 y 0.50 % concentración de agar, concluye que la concentración de agar

afecta la difusión de solutos. Siendo los resultados que aquí se presentan los segundos en reportados sobre el cultivo sumergido de *Tylopilus*.

Con relación a la obtención de metabolitos del medio agotado de un cultivo de *Tylopilus*, éste es el primer reporte, en el cual se logró aislar una fracción de polisacáridos solubles en agua. Con este resultado se puede considerar a *Tylopilus plumbeoviolaceus* como un hongo productor de polisacáridos con potencial actividad biológica.

Por otro lado, los resultados obtenidos en la parte química de los hongos *Tylopilus* y *Boletus* indican la presencia de ácidos grasos y terpenos de tipo esteroidal siendo el ergosterol uno de ellos. Este resultado es coherente con lo mencionado con el trabajo de Wu et al. en 2000 quienes aislaron dos secoergosteroles, 3 β -hidroxi-8 α , 9 α -oxido-8,9-secoergosta-7,9 (11), 22-trieno (tylopiol A) (1) y 3 β -hidroxi-8 α , 9 α -oxido-8, 9-secoergosta-7,22-dien-12-ona (tylopiol B) (2), de los cuerpos de fructíferos de *Tylopilus plumbeoviolaceus*, junto con tres compuestos conocidos, ergosta-7,22-dien-3 β -ol, uridina, y allitol. Años más tarde Wu et al. en 2009, estudiaron los constituyentes químicos de *Tylopilus plumbeoviolaceus* y mencionan que se aislaron cinco compuestos y se identificaron como ergosterol (I), ergosterol 5a, 8a-peróxido (II), ergotioneína (III), adenosina (IV), uracilo (V). Todos estos compuestos fueron obtenidos de este hongo superior por primera vez.

El análisis por cromatografía de gases acoplado con detector de masas, muestra la presencia de ácidos grasos saturados e insaturados como los metabolitos más abundantes en los extractos solubles en diclorometano de los cuerpos fructíferos en los tres hongos estudiados. El análisis de los espectros de masas y la comparación espectral en la biblioteca de espectros NIST, indican que los ácidos oleico y linoleico son los ácidos más abundantes en los cuerpos fructíferos de los tres hongos estudiados. Otro ácido presente es el ácido palmítico (como ester metílico). Los espectros de RMN unidimensionales confirman la presencia de dobles enlaces C = C, correspondientes a los ácidos oleico y linoleico.

La presencia de ácidos carboxílicos (grasos) en hongos, aunque no es novedosa, sí es importante porque el contenido de ácidos grasos omega se está demostrando en la actualidad que tienen funciones importantes en la bioquímica y farmacología de los seres vivos animales, incluyendo al ser humano.

12. CONCLUSIONES

Se logró aislar en caja Petri por medio vegetativo *Tylophilus plumbeoviolaceus*, utilizando medio de cultivo de PDA, aunque el crecimiento es lento.

Se logró establecer un medio el cultivo sumergido de *Tylophilus plumbeoviolaceus* en un medio malta y papa a un pH inicial de 6 y 7.

El cambio de pH de 5.6 a 6 incrementó la cinética de crecimiento en medio sumergido pasando de 2 a 1 mes, con un consecuente aumento de la biomasa producida. Por otro lado, en medio sólido se ve un crecimiento ligeramente mayor en pH 5 y 6 comparándolo con el pH de 5.6, mientras que el crecimiento en pH 8 se ve más reducido.

El estudio micoquímico mostró similitud en la composición metabólica de *Boletus edulis* mexicano e italiano, así como de *Tylophilus felleus* y *Tylophilus plumbeoviolaceus*, siendo los ácidos grasos y ergosterol los metabolitos más abundantes.

11. LITERATURA CITADA

- Aqueveque, P., Becerra, J., y Silva, M. (2010). Secondary metabolites isolated from Chilean Basidiomycetes. *Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI* (págs. 19-30). Puebla: Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAPEP-IMINAP.
- Camargo-Ricalde, S., Montaña, N. M., De la rosa-Mera, C. J., y Montaña Arias, S. A. (2012). Micorrizas: Una Gran Unión Debajo del Suelo. *Revista Digital Universitaria UNAM*, 1-19.
- Chakraborty, D., Vizzini, A., y Das, K. (2018). Two new species and one new record of the genus *Tylophilus* (Boletaceae) from Indian Himalaya with morphological details and phylogenetic estimations. *MycKeys*, 103-124.
- Contreras Cortés, L. E., Vázquez García, A., y Ruan-Soto, F. (2018). Etnomicología y venta de hongos en un mercado del Noroeste del estado de Puebla, México. *Scientia Fungorum*, 47-55.
- Córdova-Chávez, O., Medel, R., Mata, G., Castillo, R., y Vázquez-Ramírez, J. (2014). Evaluación de hongos ectomicorrícicos del grupo de los basidiomicetos en la zona del Cofre de Perote, Veracruz. *Madera y Bosques*, 97-106.
- de Bruijn, J., Loyola, C., Aqueveque, P., Cañumir, J., Cortéz, M., y France, A. (2010). Extraction of secondary metabolites from edible Chilean mushrooms. *Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI* (págs. 3-17). Puebla: Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP.
- Díaz, G., Flores, R., y Honrubia, M. (2009). Descripción de cultivos miceliarios de Boletales neotropicales y europeos (*Boletus* grupo *edulis*, *Boletellus* y *Suillus*) y formación de primordios de *B. edulis* en cultivo puro. *Revista Mexicana de Micología*, 1-7.
- Elisashvili, V. (2012). Submerged Cultivation of Medicinal Mushrooms: Bioprocesses and Products (Review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 211-239.
- Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México*. (s.f.). Recuperado el 10 de Mayo de 2019, de Morelos: <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM17morelos/mediofisico.html>

- Friedman, M. (2016). Mushroom Polysaccharides: Chemistry and Antiobesity, Antidiabetes, Anticancer, and Antibiotic Properties in Cells, Rodents, and Humans. *Foods*, 1-40.
- Fukuda, T., Nagai, K., y Tomoda, H. (2012). (±)-Tylophilusins, Diphenolic Metabolites from the Fruiting Bodies of *Tylophilus eximius*. *Journal of Natural Products*, 2228-2231.
- Galindo Flores, G. L., y Santiago Martínez, G. (2003). El manejo de los hongos ectomicorizógenos en el laboratorio. En A. Estrada-Torres, y M. G. Santiago-Martínez, *Avances en el estudio de la ectomicorriza en el estado de Tlaxcala, México* (págs. 42-55). Tlaxcala: Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- García Jiménez, J., y Garza Ocañas, F. (2001). Conocimiento de los hongos de la familia Boletaceae en México. *Ciencia UANL*, 336-344.
- Garza Ocañas, F., García Jiménez, J., Quiñonez Martínez, M., Guevara Guerrero, G., Valenzuela Garza, R., Carrillo Parra, A., y otros. (2018). *Boletus luridellus* (Murr.) Murrill y *Quercus fusiformis* Small: cultivo, síntesis de micorrizas y producción de esporomas en invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 361-378.
- Herrera, T., y Ulloa, M. (1998). *El reino de los Hongos: Micología Básica y Aplicada*. México: FCE, IB, UNAM.
- Islas-Santillán, M. Á., Romero-Bautista, L., Valenzuela, R., y Torres-Valencia, M. (2018). Esteroles principales de *Ganoderma curtisii* y *Ganoderma applanatum* del estado de Hidalgo, México. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 43-54.
- Jiménez Ruiz, M., Pérez-Moreno, J., Almaraz-Suárez, J. J., y Torres-Aquino, M. (2013). Hongos silvestres con potencial nutricional, medicinal y biotecnológico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 199-213.
- Kikuchi, K., Matsushita, N., y Suzuki, K. (2009). Fruit body formation of *Tylophilus castaneiceps* in pure culture. *Mycoscience*, 313-316.
- Kinga Lemieszek, M., Cardoso, C., Ferreira Milheiro, F. H., Ramos Novo Amorim de Barros, A. I., Marques, G., Pożarowski, P., y Rzeski, W. (2013). *Boletus edulis* biologically active biopolymers induce cell cycle arrest in human colon adenocarcinoma cells. *Food y Function*, 575-585.
- Kobold, M. (2000). *Setas de prados y bosques: Cómo identificarlas, respetarlas, recogerlas y cocinarlas*. Madrid: Susaeta.
- Lee, S.-J., Yun, B.-S., Cho, D.-H., y Yoo, I.-D. (1999). Tylopeptins A and B, NewAntibiotic Peptides from *Tylophilus neofelleus*. *THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS*, 998-1006.

- Lima, A. T., Santos, M. N., de Souza, L. A., Pinheiro, T. S., Paiva, A. A., Dore, C. M., . . . Leite, E. L. (2016). Chemical characteristics of a heteropolysaccharide from *Tylophilus ballouii* mushroom and its antioxidant and anti-inflammatory activities. *Carbohydrate Polymers*, 400-409.
- Liu, Q., Xiao, J., Liu, B., Zhuang, Y., y Sun, L. (2018). Study on the Preparation and Chemical Structure Characterization of Melanin from *Boletus griseus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 1-11.
- Mirończuk-Chodakowska, I., Witkowska, A., Elżbieta Zujko, M., y Terlikowska, K. M. (2017). Quantitative evaluation of 1,3-1,6- β -d-glucan contents in wild-growing species of edible polish mushrooms. *Rocz Panstw Zakl Hig*, 281-290.
- Mleczek, M., Magdziak, Z., Gąsecka, M., Niedzielski, P., Kalač, P., Siwulski, M., . . . Sobieralski, K. (2016). Content of selected elements and low-molecular-weight organic acids in fruiting bodies of edible mushroom *Boletus badius* (Fr.) Fr. from unpolluted and polluted areas. *Environ Sci Pollut Res*, 20609-20618.
- Muñoz Domínguez, M. (2007). *Evaluación de los Efectos tóxicos y Genotóxicos de Extractos Metanólicos de Macromycetes, con Base en Estudios Etnomicológicos del Estado de Hidalgo*. Tesis de Licenciatura en Biología, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Murrieta-Hernández, D. M., Noa-Carrazana, J. C., Mata-Rosas, M., Pineda-López, M., Zulueta-Rodríguez, R., y Flores-Estévez, N. (2014). EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO EN EL DESARROLLO DE *Suillus granulatus* (L.) Roussel y *S. brevipes* (Pk.) Kuntze. Revista Chapingo. *Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 20 (1), 101-107.
- Nelsen, S. (2010). Bluing Components and Other Pigments of Boletes. *FUNGI*, 11-14.
- Ohta, A. (1997). Ability of ectomycorrhizal fungi to utilize starch and related substrates. *Mycoscience*, 403-408.
- Ohta, A., y Fujiwara, N. (2003). Fruit-body production of an ectomycorrhizal fungus in genus *Boletus* in pure culture. *Mycoscience*, 295-300.
- Olivares Reyes, A. R. (2008). *Estudio de algunos Hongos Ectomicorrizógenos Comestibles*. Tesis de ingeniería en alimentos, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Pedneault, K., Angers, P., Gosselin, A., y Tweddell, R. J. (2006). Fatty acid composition of lipids from mushrooms belonging to the family Boletaceae. *Micological Research*, 1179-1183.

- Pereira, G., Campos, J. L., Chávez, D., Anabalón, L., y Arriagada, C. (2014). Caracterización del crecimiento micelial del hongo ectomicorrícico *Lactarius aff. deliciosus* y su simbiosis con plántulas de *Pinus radiata*. *Quebracho*, 22 (1,2), 30-39.
- Peterson, R. L., Massicotte, H. B., y Melville, L. H. (2004). *Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology*. Ottawa: *NRC Research Press*.
- Řeháček, Z., Färber, G., Ševčík, V., Musílek, V., y Pilát, A. (1962). Submerged Cultivation of the Basidiomycete *Boletus edulis* var. *reticulatus*. *FOLIA MICROBIOLOGICA*, 75-79.
- Reis, F. S., Barros, L., Martins, A., y Ferreira, I. C. (2012). Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: An inter-species comparative study. *Food and Chemical Toxicology*, 191-197.
- Robles-García, D., Yahia, E., García-Jiménez, J., Esquivel-Naranjo, E. U., y Landeros, F. (2016). First ethnomycological record of *Fistulinella wolfeana* as an edible species and some of its nutritional values. *Revista Mexicana de Micología*, 31-39.
- Rodríguez Morcuende, J. F. (2011). Principales tipos de intoxicaciones por consumo de setas. *CT 3*, 157- 172.
- Rodríguez Ramírez, E. C. (2009). *Diversidad de la familia Boletaceae en dos bosques de Fagus grandifolia var. mexicana en el estado de Hidalgo, México*. Tesis de maestría en ciencias en biodiversidad y conservación, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Rojowski, J., Zajac, M., Muszyńska, B., y Opoka, W. (2017). Influence of extraction procedure from edible mushroom species *Boletus badius* on zinc quantity released into simulated gastric fluid. *ACTA POLONIAE PHARMACEUTICA – DRUG RESEARCH*, 597-602.
- Sánchez Vázquez, J. E., y Royse, D. J. (2001). *La biología y el cultivo de Pleurotus spp.* (Primera edición ed.). Chiapas, México: *Noriega Editores*.
- Snell, W. H., y Dick, E. A. (1970). *The Boleti of Northeastern North America*. New York, USA: *Verlag Von J. Cramer Publisher*.
- Suárez Arango, C., y Jeannette Nieto, I. (2013). Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutraceuticos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 1-8.

- Vamanu, E., y Nita, S. (2013). Antioxidant Capacity and the Correlation with Major Phenolic Compounds, Anthocyanin, and Tocopherol Content in Various Extracts from the Wild Edible *Boletus edulis* Mushroom. *BioMed Research International*, 1-11.
- Wang, X.-M., Zhang, J., Li, T., Wang, Y.-Z., y Liu, H.-G. (2015). Content and Bioaccumulation of Nine Mineral Elements in Ten Mushroom Species of the Genus *Boletus*. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 1-7.
- Wu, S. H., Chen, Y. W., Yang, L. Y., Li, Z. y., y Li, S. L. (2009). Studies on chemical constituents of *Tylopilus plumbeoviolaceus*. *Journal of Chinese medicinal materials*, 226-228.
- Wu, S. H., Luo, X. D., Ma, Y. B., Liu, J. K., Wu, D. G., Zhao, B., y otros. (2000). Two novel secoergosterols from the fungus *Tylopilus plumbeoviolaceus*. *Journal of Natural Products*, 534-536.
- Yamanaka, K., Namba, K., y Tajiri, A. (2000). Fruit body formation of *Boletus reticulatus* in pure culture. *Mycoscience*, 189-191.