



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

---

---

*DEPARTAMENTO DE SUELOS*

**MAESTRÍA EN AGROFORESTERÍA PARA EL  
DESARROLLO SOSTENIBLE**

**CONTRIBUCIÓN A LA CONSERVACIÓN DE  
"TOTOLCOZCATL" [*Entoloma abortivum* (BERK. & CURTIS)  
DONK, FUNGI, BASIDIOMYCOTINA] EN REMANENTES DE  
BOSQUE DE NIEBLA**

**TESIS**

**Que como requisito parcial para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias**

**Presenta:**

**MATEO GUZMÁN NATALIA**



TERMINACIÓN GENERAL ACADÉMICA  
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES  
TIEMPO DE EXAMENES PROFESIONALES

**Bajo la supervisión de: Dra. María Edna Álvarez Sánchez**



Chapingo, Estado de México, marzo 2018

CONTRIBUCIÓN A LA CONSERVACIÓN DE "TOTOLCOZCATL" [*Entoloma abortivum* (BERK. & CURTIS) DONK. FUNGI, BASIDIOMYCOTINA] EN REMANENTES DE BOSQUE DE NIEBLA

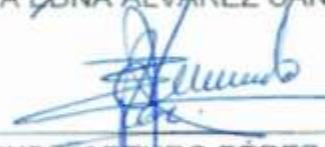
Tesis realizada por **NATALIA MATEO GUZMÁN** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN AGROFORESTERÍA PARA EL DESARROLLO SOSTENIBLE**

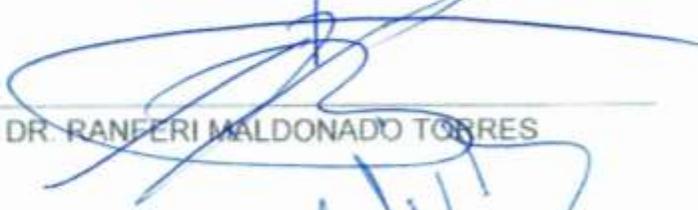
DIRECTOR:

  
DRA. MARÍA EDNA ALVAREZ SANCHEZ

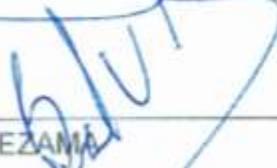
ASESOR:

  
M.C. EDMUNDO ARTURO PÉREZ GODÍNEZ

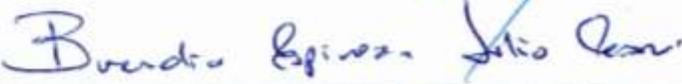
ASESOR:

  
DR. RANFERI MALDONADO TORRES

ASESOR:

  
DR. SAÚL UGALDE LEZAMA

ASESOR:

  
DR. JULIO CÉSAR BUENDÍA ESPINOZA

ASESOR:

  
DR. VÍCTOR MANUEL BANDALA MUÑOZ

## Contenido

1. INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1
1.1. OBJETIVOS.....	2
1.1.1. General .....	2
1.1.2. Específicos.....	2
2. REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
2.1. Características de la Familia Entolomataceae y género <i>Entoloma</i> .....	4
2.1.1. Género <i>Entoloma</i> .....	6
2.1.2. Ecología, hábitat y distribución.....	8
2.2. Clasificación taxonómica de <i>E. abortivum</i> (Berk. & Curtis) Donk.....	10
2.3. Descripción morfológica.....	10
2.3.1. Cuerpo fructífero o carpóforo .....	11
2.3.2. Sombrero y cutícula .....	12
2.3.3. Estípite .....	13
2.3.4. Esporada.....	14
2.4. Reintroducción de <i>Entoloma abortivum</i> en el bosque de niebla .....	15
2.4.1. Conservación en el manejo forestal .....	16
2.5. Conclusiones de la revisión de literatura .....	17
2.6. Literatura citada .....	19
3. CARACTERIZACIÓN DEL MICROHÁBITAT DEL HONGO “TOTOLCOZCATL” [ <i>Entoloma abortivum</i> (BERK. & CURTIS) DONK, BASIDIOMYCOTINA] EN XALTEPUXTLA, PUEBLA .....	21
3.1. Resumen .....	21
3.2. Abstract.....	22
3.3. Introducción .....	23
3.4. Materiales y métodos.....	24
3.4.1. Localización del área de estudio .....	24
3.4.2. Intervención participativa.....	26

3.4.3.	Localización de las áreas de distribución natural de <i>E. abortivum</i> y aplicación de entrevistas .....	27
3.4.4.	Condiciones microclimáticas de los sitios .....	28
3.4.5.	Colecta de material de sustrato y análisis químico.....	31
3.4.6.	Caracterización taxonómica del hongo Totolcozcatl .....	31
3.5.	Resultados y discusión .....	35
3.5.1.	Descripción de los sitios de emergencia de <i>Entoloma</i> .....	35
3.5.2.	Periodo de emergencia de <i>Entoloma abortivum</i> y requerimientos climáticos.....	40
3.5.3.	Caracterización taxonómica y molecular del hongo Totolcozcatl ..	43
3.6.	Conclusiones .....	43
3.7.	Literatura citada .....	45
3.8.	Anexos.....	47
4.	AISLAMIENTO Y REINTRODUCCIÓN DEL HONGO "TOTOLCOZCATL" [ <i>Entoloma abortivum</i> (BERK. & CURTIS) DONK, BASIDIOMYCOTINA].....	50
4.1.	Resumen .....	50
4.2.	Abstract .....	51
4.3.	Introducción .....	52
3.9.	Materiales y métodos.....	55
3.9.1.	Colecta y desinfección del material.....	55
3.9.2.	Obtención de micelio.....	56
3.9.3.	Reintroducción del hongo en bosque de niebla .....	61
3.9.4.	Diseño de tratamientos para la reintroducción del micelio .....	65
3.9.5.	Siembra de micelio en campo .....	66
3.10.	Resultados y discusión.....	67
3.10.1.	Prueba de velocidad de crecimiento micelial .....	67
3.10.2.	ANOVA de medias repetidas (ANOVA-MR) para medios de cultivo	

3.11.	Conclusiones .....	73
3.12.	Literatura citada.....	75
3.13.	Anexos .....	77

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Coordenadas de los sitios localizados. ....	27
Cuadro 2. Propiedades químicas del sustrato de emergencia del sitio dos de <i>Entoloma abortivum</i> . ....	39
Cuadro 3. Propiedades químicas del sustrato de emergencia del sitio tres de <i>Entoloma abortivum</i> . ....	39
Cuadro 4. Promedio de crecimiento (mm) de <i>Entoloma</i> en tres medios de cultivo. ....	68
Cuadro 5. Estadística descriptiva de los datos tomados en cada medio de cultivo. ....	69
Cuadro 6. Pruebas multivariadas del crecimiento del micelio en los medios de cultivo. ....	69
Cuadro 7. Resultados de la prueba de esfericidad de Mauchly. ....	70
Cuadro 8. Prueba de efectos intra-sujetos. ....	71
Cuadro 9. Contraste de efectos entre medios de cultivo. ....	71
Cuadro 10. Resultados de la prueba de medias marginales. ....	72
Cuadro 11. Comparación de medias entre los medios de cultivo. ....	73

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de elaboración de los programas de manejo forestal, integrando el componente de conservación de la biodiversidad.....	17
Figura 2. Localización de predio Ocotitla en Xaltepuxtla, Puebla. (Tomado de Ruiz, 2016).....	25
Figura 3. Localización de los cuatro sitios de monitoreo.....	28
Figura 4. Datalogger colocado en los sitios de monitoreo. ....	29
Figura 5. Descarga de los registros tomados por los dataloggers. ....	29
Figura 6. Registro de temperatura y pH del sustrato. ....	30
Figura 7. Zonas de monitoreo.....	35
Figura 8. Sitio de monitoreo uno.....	36
Figura 9. Localización de los sitios dos y tres.....	36
Figura 10. Localización del sitio cuatro.....	37
Figura 11. Periodo de emergencia y temperatura en el sustrato de <i>Entoloma</i> en el sitio dos.....	41
Figura 12. Periodo de emergencia y temperaturas en el sustrato de <i>Entoloma</i> en el sitio tres.....	42
Figura 13. Ejemplares colectados del hongo "Totolcozcatl.....	55
Figura 14. Hongos desinfectados, listos para aislamientos. a) <i>Entoloma</i> forma abortada; b) <i>Entoloma</i> forma agaricoide típico con un estípite. ....	56
Figura 15. Proceso de aislamiento por contexto de los hongos colectados.....	57
Figura 16. Proceso de preparación del grano de sorgo.....	60
Figura 17. Bolsas con grano de sorgo inoculado dentro de la incubadora. ....	61

## ABREVIATURAS USADAS

Bosque Mesófilo de Montaña	BMM
Hongos Silvestres Comestibles	HSC
Hongos Comestibles Silvestres	HCS
Comisión Nacional Forestal	CONAFOR
Productos Forestales No Maderables	PFNM
Sistema de Posicionamiento Global	GPS
Cloruro de Calcio	CaCl <sub>2</sub>
Potasio	K
Calcio	Ca
Magnesio	Mg
Hierro	Fe
Manganeso	Mn
Cobre	Cu
Zinc	Zn
Boro	B
Norma Oficial Mexicana	NOM
Relación Carbono/Nitrógeno	C/N
Investigación Acción Participativa	IAP

## DEDICATORIAS

A los seres que me dieron vida, mis padres: *Lauro Mateo Hernández* y *Amapola Guzmán Castañeda*, por su amor, confianza, apoyo y consejos; por inculcarme los valores que me han hecho una persona de bien.

A mis hermanos: Lety, Mikis, Lauro e Isa, por el apoyo y fortaleza con la que me animan a seguir adelante en lo que me propongo.

A Sergio, por el apoyo incondicional que siempre me brinda en toda decisión que tomo y por impulsarme a ser mejor cada día.

A mis amigos, sin mencionar nombres por no cometer el error de omisión, pero con los que he compartido momentos agradables e inolvidables, y en los que sé, siempre podré contar.

A todos los profesores de la Maestría en Agroforestería, que me han compartido conocimientos y experiencias muy valiosas para mi formación.

A la Dra. Edna, por el apoyo en todo momento, la valiosa amistad brindada y por la confianza que depositó en mí.

A mis compañeros de maestría, especialmente a Yoli que además de ser una excelente compañera, me brindó su amistad y apoyo en todo momento.

Y a todas aquellas personas que en cierto momento se cruzaron en mi camino para hacer de la vida interesante y me han dado palabras de aliento, me brindaron un instante de su tiempo, me dieron lecciones de vida y han confiado en mí.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por guardar siempre de mí camino y por las bendiciones que me ha dado.

A la Universidad Autónoma Chapingo, mi querida casa de estudios que me ha forjado, tanto personal como profesionalmente, y a la que me enorgullece pertenecer.

A la Maestría en Ciencias en Agroforestería para el Desarrollo Sostenible, por la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y lograr uno de los objetivos más en mi vida.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por las becas que me otorgó, que sin las cuales no podría haber realizado esta etapa de mi formación.

A la Dra. Ma. Edna Álvarez Sánchez, por el apoyo, amistad, confianza y el entusiasmo con la que tomó la dirección y el acompañamiento, para la realización de esta investigación, y el sustento durante la maestría.

A mis asesores, que en los momentos requeridos me brindaron su apoyo y compartieron sus conocimientos en la realización de las secciones de este trabajo.

A las laboratoristas Erika y Ara, por la disposición de apoyo en todo momento en los trabajos de laboratorio que realicé.

A Lolis, asistente del posgrado de Agroforestería por su buena disposición en todo momento, excelente trabajo y amistad.

A Xaltepuxtla Pue., principalmente a Ange y Juan, sus hijos Luis y José, Toñita, Juanita y Hermelindo, a Don José Luis por la autorización para trabajar en su propiedad, a todos ellos, por su apoyo en las actividades realizadas en campo.

A la Dra. Lety, a David y Juan Carlos, que hicieron agradable mi estancia en el Laboratorio de Sistemática en INECOL.

A todas aquellas personas que aunque no se nombran, y de alguna u otra forma colaboraron en la elaboración de este trabajo.

## DATOS BIOGRÁFICOS



### Datos personales

Nombre	Natalia Mateo Guzmán
Fecha de nacimiento	30 de enero 1991
Lugar de nacimiento	Ricardo Flores Magón, Tuzamapan de Galeana, Puebla
CURP	MAGN910130MPLTZT05
Profesión	Ingeniero en Restauración Forestal
Cedula profesional	9982641

### Desarrollo académico

Bachillerato	Bachillerato General EMSAD “Nuevo Milenio”, San Antonio Rayón, Jonotla, Puebla
Licenciatura	Ingeniero en Restauración Forestal, División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo

## RESUMEN GENERAL

### CONTRIBUCIÓN A LA CONSERVACIÓN DE “TOTOLCOZCATL” [*Entoloma abortivum* (BERK. & CURTIS) DONK, BASIDIOMYCOTINA] EN REMANENTES DE BOSQUE DE NIEBLA<sup>1</sup>

Los hongos silvestres comestibles son considerados un recurso forestal no maderable, de importancia alimenticia, ecológica, cultural y económica para las comunidades rurales, aprovechamiento que ha derivado en saqueo y sobreexplotación de la especie *Entoloma abortivum* conocido como “totalcozcatl” en el bosque mesófilo de montaña en Xaltepuxtla, Puebla. El presente trabajo hace una contribución al estudio de esta especie con fines de restauración y aprovechamiento sostenible por los productores de la zona. Mediante acciones participativas, se identificaron y caracterizaron sitios de emergencia del hongo. La caracterización del hábitat consistió en la identificación de especies vegetales y el porcentaje de sombra asociado, la medición de las condiciones ambientales, microclimáticas y composición química del sustrato en que se desarrolla el totalcozcatl. Para el seguimiento de las condiciones microclimáticas se colocaron sensores de temperatura y humedad relativa, antes y durante todo el período de desarrollo del hongo. Una vez que emergió el totalcozcatl, se colectaron esporomas para la caracterización taxonómica de la especie y para el aislamiento y cultivo del hongo por el método de contexto. Se evaluaron diferentes medios de cultivo en el desarrollo de las cepas aisladas. A partir del crecimiento del micelio en el mejor medio de cultivo, se produjo inóculo primario en semilla de sorgo, mismo que se llevó a campo para su reintroducción en los sitios que cumplían con los requerimientos para el desarrollo del hongo.

**Palabras clave:** hongos silvestres comestibles, *Entoloma abortivum*, totalcozcatl, caracterización taxonómica.

---

<sup>1</sup> Tesis de Maestría en Ciencias en Agroforestería para el Desarrollo Sostenible, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Natalia Mateo Guzmán

Director de tesis: Dra. María Edna Álvarez Sánchez

## GENERAL ABSTRACT

### CONTRIBUTION TO THE CONSERVATION OF "TOTOLCOZCATL" [*Entoloma abortivum* (BERK. & CURTIS) DONK, BASIDIOMYCOTINA] IN REMNANTS OF MIST FOREST<sup>2</sup>

Edible wild mushrooms are considered a non-timber forest resource of nutritional, ecological, cultural and economic importance for the rural communities, which has led to looting and exploitation of the species *Entoloma abortivum* known as "totolcozcatl" in the cloud forest in Xaltepuxtla, Puebla. The present work makes a contribution to the study of this species for the purpose of restoration and sustainable use by the producers of the area. Through participatory actions, emergence sites of the fungus were identified and characterized. The characterization of the habitat consisted of the identification of plant species and the associated percentage of shade, and the measurement of the environmental, microclimatic and chemical composition conditions of the substrate in which the totolcozcatl develops. For monitoring the microclimatic conditions, temperature and relative humidity sensors were placed before and during the entire period of development of the fungus. Once the totolcozcatl emerged, sporomes were collected for the taxonomic characterization of the species and for the isolation and cultivation of the fungus by the context method. Different culture media were evaluated in the development of the isolated strains. From the growth of the mycelium in the best culture medium, primary inoculum was produced in sorghum seed, which was taken to the field for reintroduction in the sites that met the requirements for the development of the fungus.

**Keywords:** edible wild mushrooms, *Entoloma abortivum*, totolcozcatl, taxonomic characterization.

---

<sup>2</sup> Thesis Master's Degree in Agroforestry for Sustainable Development, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Natalia Mateo Guzmán

Thesis advisor: Dra. María Edna Álvarez Sánchez

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Xaltepuxtla municipio de Tlaola, se ubica en la Sierra Norte de Puebla, lugar donde alguna vez dominó el Bosque de Niebla. Un gran sector de la población se dedica a la producción de plantas de ornato y plantas de temporada, combinadas con algunos cultivos alimenticios de ciclo corto. En estos sistemas de producción existen fragmentos de Bosque de Niebla en el que ingresan diversos “usuarios”, que extraen productos del bosque para cubrir necesidades de leña, explotar especies vegetales, hacer uso de los manantiales, y de paso, destruir (López, 2013). Derivado de todas estas acciones que se han realizado por más de treinta años, actualmente sólo se encuentran remanentes de bosque con una gran pérdida en la diversidad de especies.

Es posible aseverar que en los remanentes aún se conservan diversos estratos que favorecen la presencia o desarrollo de componentes importantes, tal es el caso de la diversidad de hongos presentes en el estrato bajo, los cuales cumplen un papel indispensable dentro del grupo de los descomponedores de la materia orgánica para el enriquecimiento del suelo, formando el último eslabón trófico. Además de los beneficios ecológicos también son fuente de alimento y de ingresos económicos; estos bienes son aprovechados en mayor medida por las poblaciones que viven cerca de los bosques y se dedican a la recolección y venta de hongos. Sin embargo, el saqueo y la sobreexplotación de hongos silvestres comestibles son factores precisos en la disminución de sus poblaciones naturales, hasta el punto de la desaparición de algunas especies. Es el caso de la especie saprobia *Entoloma abortivum* (Berk. & Curtis) Donk, que desde hace poco más de cinco años su emergencia se ha reducido a unos cuantos sitios bien definidos donde logran emerger algunos ejemplares.

El hongo es conocido por la población como *Totolcozcatl* “collar o moco de guajolote” en náhuatl. El nombre científico se le atribuye debido a que la especie parasita a otro hongo conocido por la población como *comales*, a los que aborta para poder emerger, tal aborto provoca que el hongo *Totolcozcatl* aunque es un tipo de seta, no se desarrolla como tal y el cuerpo fructífero del mismo presenta

deformaciones parecidas al collar que se forma en los guajolotes. Esta especie de hongo es muy apreciado en la región por su valor cultural, su sabor exquisito, además, por ser difícil de encontrar y de recolectar, alcanzando así precios elevados en el mercado.

En la investigación realizada por López (2013) se menciona que actualmente se hace complicada la colecta de esta especie de hongo, pues sus poblaciones han disminuido, y a veces es necesario recorrer muchos kilómetros en su búsqueda para obtener algunos ejemplares, con ello se refuerza la necesidad urgente de llevar a cabo algún tipo de intervención. Dado el valor cultural y los conocimientos de aprovechamiento del hongo por las recolectoras indígenas, la Etnomicología como disciplina, es esencial para la implementación de buenas prácticas de recolección a fin de evitar la extinción de las especies fúngicas como el *Totolcozcatl*.

Para contribuir a la propagación y restauración del hongo nativo, se precisa determinar las condiciones microclimáticas para su desarrollo y estudiar el comportamiento reproductivo fuera de su hábitat natural, con fines de restaurar poblaciones y al mismo tiempo, proporcionar a los recolectores una fuente de alimento e ingreso económico.

## 1.1. OBJETIVOS

### 1.1.1. General

Contribuir a la propagación y conservación del hongo Totolcozcatl (*E. abortivum*) con fines de restauración y suministro de una fuente de alimento e ingreso económico para recolectores, en un ecosistema de Bosque de Niebla en Xaltepuxtla, Puebla.

### 1.1.2. Específicos

1. Identificar la taxonomía del hongo silvestre comestible *E. abortivum*, mediante la descripción de los carpóforos macro y microscópicamente.

2. Caracterizar en su área de distribución natural, las condiciones microclimáticas, de dosel, así como las propiedades químicas de los sustratos en que se desarrolla, para identificar zonas potenciales propicias para su propagación dentro de los remanentes de Bosque de Niebla.
3. Contribuir a la propagación del hongo por el método de contexto e inoculación de sustrato, para su restauración en las zonas potenciales de propagación.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Características de la Familia Entolomataceae y género *Entoloma*

Los miembros de la familia Entolomataceae se distinguen por su carne color rosado, basidiosporas de colores vinoso o rojizo canela que se encuentran en forma angular en al menos una visión de un extremo visión (polar), y en vista de perfil o son claramente angulares o adornada con pústulas o crestas longitudinales, el cianófilo tiene paredes que son uniformemente (Largent, Henkel, Aime, & Baroni, 2008). El color de la esporada y la forma característica de las basidiosporas, el carácter morfológico que define a la familia Entolomataceae, es la capa interna que posee la pared de la basidiospora, llamada epicorium. Esta peculiaridad es única en los Agaricales, bien desarrollada y definida, sin embargo sólo es visible en el Microscopio. En algunas secciones de la pared, el engrosamiento gradual del epicorium produce una apariencia angular (Co-David, Langeveld, & Noordeloos, 2009). De acuerdo al estudio que realizó Montañez (2013) en la última versión del diccionario de los hongos, se mencionaron cuatro géneros como miembros de Entolomataceae. Sin embargo, esto fue un error que señalaron algunos autores, ya que en esa fecha se incluían seis géneros con base en el hábito del basidioma y la forma de las basidiosporas. Así, se distinguían los géneros *Entoloma*, *Clitopilus* (Fr. ex Rabenh.) P. Kumm., *Rhodocybe* Maire, *Rhodocybella* T.J. Baroni & R. H. Petersen, *Richoniella* Costantin & L.M. Dufour y *Rhodogaster* E. Horak. Los tres primeros agrupan especies de hábito agaricoide. Por su parte, *Rhodocybella* cuenta con especies de hábito cifeoide, *Richoniella* presenta el hábito secotioide, por último, *Rhodogaster* desarrolla un hábito gasteroide. Montecchio, Roca, Courty, y Garbaye, (2006) refieren que los estilos de vida son igualmente variados. La mayoría de las especies son saprótrofos en suelo, en la madera o el musgo, pero algunos son parásitos de otros hongos, parásitos de plantas o ectomicorrízica.

Los miembros de Entolomataceae se han clasificado juntos porque todos comparten la característica de esporas que son de color rosa a marrón o rosa

grisáceo en combinación con esporas que son desiguales, o angulares en una terminación o en todas las vistas. Las ornamentaciones de la pared de esporas son únicas, estando formadas por engrosamientos locales en la pared de la espora, la epicorium (Cléménçon, Emmett, & Emmett, 2004). Co-David et al. (2009) mencionan que la presencia de esporas de color rosa, angulares se ha considerado tan único que Entolomataceae, a diferencia de muchas otras familias Agaricales, ha sido ampliamente considerado un grupo natural. Esta Entolomataceae comprende los géneros *Entoloma*, *Rhodocybe*, *Clitopilus*, *Richoniella* y *Rhodogaster*, y probablemente *Rhodocybella* también. Este estudio confirma que la presencia de esporas de color rosa, angulares o desiguales con un epicorium bien desarrollado en la pared de la espora, que forma las facetas, crestas o protuberancias y que se utilizan tradicionalmente para definir la familia Entolomataceae, ha evolucionado una sola vez entre los agaricoides. Las ornamentaciones que se encuentran entre los familiares, los miembros del clado Tricholomatoide, son diferentes y no homólogas con las de Entolomataceae, como ya se ha señalado antes por (Cléménçon et al., 2004).

Noordeloos y Gates (2012) sugieren que la familia Entolomataceae es muy variable en función de la morfología del esporocarpo (ya sea pequeño a grande) puede ser *Pleurotoide*, *Omphalioide*, *Collybioide*, *Mycenoide*, y *Tricholomatoide*, y la micromorfología (forma de esporas, las estructuras, tipos de pigmentación, la presencia y la forma de cistidia, etc). La familia tradicionalmente se divide en tres principales géneros agaricoides: *Rhodocybe*, *Clitopilus* y *Entoloma*. El último género a veces se divide en más géneros (por ejemplo, 13 géneros, incluyendo *Entoloma*, *Nolanea*, *Leptonia*, *Inocephalus*, *Trichopilus*, *Claudopus*, etc.). No es de extrañar que Entolomataceae, sea una familia tan grande y muy variable, se ha planteado que el análisis de caracteres morfológicos por sí solo no puede responder, ya sea debido a la escasez de características y/o dificultad para interpretar la significación de estos. Co-David et al. (2009) aplicaron métodos filogenéticos moleculares en un intento de aclarar las relaciones entre los genéricos dentro de la Entolomataceae, así como la evolución de la morfología característica de las esporas dentro de la familia.

Huffman, Tiffany, Knaphus, y Healy (2008) mencionan que las tapas de esta familia son cónicas o de punta redondeada a ampliamente redondeada o plana, incluso en la madurez, que van desde el blanco al gris y marrones apagados o rosa a naranja-salmón. La cubierta de la carne es suave y blanca pálida de color blanquecino. Las cubiertas superficies van de un rango de seco a húmedo pegajoso cuando se maduran, a menudo cuando se secan son suaves como la seda, con márgenes de frecuencia inscritos y división ondulado en la madurez. Las branquias están unidos y, o bien con muescas o ligeramente decurrentes. Los tallos son delgadas a moderadamente gruesa, casi igual a algo ampliada en la base, a menudo estriado, frágil, y algo torcido en apariencia. Las esporas son de color rosa de color rosa amarronado y, o bien tener rebordes largos o son angulares, estas características morfológicas de las esporas se utilizan generalmente para delimitar los géneros y especies, por lo que el grupo no se interpreta fácilmente sin un microscopio. No se recomienda este grupo para comer debido a las dificultades de identificación y debido a las toxinas en las especies venenosas son aparentemente variadas, con diversos efectos.

#### 2.1.1. Género *Entoloma*

Montañez (2013) menciona que el género *Entoloma* (Fr.) P. Kumm., pertenece a la familia Entolomataceae Kotl. & Pouzar, y al orden Agaricales Underw. La familia se distingue por tener esporada de color rosa, café rosáceo o rosa grisáceo y basidiosporas angulares, por lo menos en alguna de sus vistas. Dicho conjunto de características se consideró único dentro de los Agaricales y confirió a la familia el estado de grupo natural. Moncalvo et al. (2002) demostraron, con datos moleculares, que se trata de un grupo monofilético, hermano de la familia Lyophyllaceae Jülich.

La primera clasificación de *Entoloma* fue hecha en 1821, dando importancia principalmente al color de la esporada. En el género *Agaricus* serie *Hyporhadius*, se agrupó a todos los Agaricales con esporada color rosa. *Agaricus clypeatus* L. [actualmente *Entoloma clypeatum* (L.) P. Kumm.], fue la primera especie descrita de *Entoloma*, en 1753. Posteriormente, se dividió *Hyporhadius* en las tribus

*Volvaria*, *Pluteus*, *Entoloma* y *Clitopilus*. *Volvaria* incluía especies con basidiosporas lisas y velo universal permanente. De forma similar, en *Pluteus* se ubicaban especies con basidiosporas lisas, pero que carecían de velo universal permanente. *Entoloma* y *Clitopilus* agrupaban especies con basidiosporas que forman ángulos, pero en el primero se desarrollaba un hábito tricolomatoide y en *Clitopilus* el píleo era depresso con láminas decurrentes. Más adelante, en 1874 se creó la tribu *Claudopus* para especies con láminas color rosa y hábito pleurotoide (Montañez, 2013).

El género *Entoloma* tiene esporas con un esqueleto interno de las costillas conectadas. Cuando se observa bajo el microscopio de luz que tienen una apariencia angular. Además, las esporas son de color rosa a marrón rosáceo de masas que, por lo general, es fácilmente observado por el color rosáceo en las laminillas (Noordeloos & Gates, 2012). Montañez (2013) indica que el género *Entoloma* es uno de los géneros más diversos de los Agaricales. Además, es un género heterogéneo, al contener especies con caracteres macro y micromorfológicos muy diferentes entre sí. Están presentes en diversos hábitats alrededor del mundo y tienen una amplia distribución en los cinco continentes. Estados Unidos de Norteamérica, Oceanía y Europa son las regiones más estudiadas. En México, se registraron 42 especies, listadas en inventarios micobióticos de algunos estados o de reservas naturales, tres de ellas en Jalisco. No existe ningún estudio taxonómico del género para el país. En este trabajo se determinaron las especies de *Entoloma* de Jalisco, con base en sus caracteres morfológicos. Se revisaron 142 especímenes recolectados en Jalisco, depositados en las colecciones de hongos de los herbarios ENCB, IBUG, MEXU y XAL. Se determinaron 106 ejemplares, que se relacionaron con 46 especies, de las cuales 39 se registran por primera vez en México y seis en Jalisco. Otros 36 ejemplares podrían ser 15 especies nuevas, *Entoloma rhodopolium* y *Entoloma* sp., seis son las más abundantes en el estado. El color en detalle del píleo y el estípite en estado adulto, la opacidad del píleo, el color de las láminas en estado juvenil, el olor, la forma de las basidiosporas, el tipo de pigmento en el

pileipellis, la presencia y forma de los queilocistidios y la presencia y ubicación de las fíbulas, son características básicas para la distinción de especies similares.

### 2.1.2. Ecología, hábitat y distribución

Lindner, Volk, y Burdsall, (2001) indican que *Entoloma abortivum* (Berk. y Curt.) Donk habita en bosques y ha sido descrito como algo que ocurre en dos formas. La primera forma es un cuerpo fructífero agaricoide típico con un estípote gris, un píleo gris y rosa, a corto decurrente de branquias adnatos, mientras que la segunda forma es un carpóforo blanco ("abortado") que le falta formar bien las branquias. Esta segunda forma se produce a menudo en estrecha asociación con basidiomas de *Armillaria*. Para una descripción completa de estos hongos.

Montañez (2013) en su investigación del género *Entoloma*, indica que se encuentra formado por especies con hábitos muy diferentes. Generalmente, son hongos saprótrofos, por lo que obtienen sus nutrientes de la descomposición de materia orgánica muerta. También existen varias especies que establecen asociaciones micorrizógenas con los géneros *Pinus*, *Quercus*, *Salix*, *Ulmus* y varios miembros de la familia Rosaceae. Con respecto al sustrato donde crecen, la mayoría de las especies son terrícolas o humícolas. También hay algunas que crecen sobre madera en descomposición, como *E. subtenuipes* Murrill y *E. violaceonigrum*. Además, existen especies fungícolas, como *E. parasiticum* (Qué.) Kriese, que crece sobre el basidioma de *Cantharellus cibarius* Fr., *Coltricia perennis* (L.) Murrill y *Trametes versicolor* (L.) Lloyd. Casi todas las especies presentan un crecimiento solitario a esparcido, a veces gregario. Se considera el crecimiento cespitoso muy raro y por lo tanto, útil en la determinación de *E. viridiflavipes* (Largent) y *E. laceratum* Largent, entre otras.

En *Entoloma*, existen algunas especies comestibles en Norteamérica como *E. abortivum*, *E. subvile* (Peck) Hesler y *E. carneogriseum* (Berk. & Broome) Noordel. También se reportó que *E. sepium* es valorada en Europa. En México, se registró la venta de *E. abortivum* en algunos mercados de Puebla, con el nombre de "totolcózcatl" o "totolcóztl de encino". Algunos autores mencionaron

el consumo y venta en mercados de *E. clypeatum*, en Tlaxcala y el Estado de México, respectivamente (Montañez, 2013).

*Entoloma abortivum* (Berkeley y Curtis) Donk, un hongo probablemente mejor conocido por el nombre de edad *Clitopilus ubortivus*, se observa con frecuencia en la discusión micológica por su capacidad para producir dos formas de los cuerpos fructíferos. La forma normal en el que se produce el cuerpo fructífero es agaricoide, con píleo completamente desarrollado, laminillas y estípites y una segunda forma, llamado carpóforo, que a menudo acompaña, domina o a veces sustituye a los agaricoides. Esta última produce esporas en forma de masas visibles de tejido y cuando están totalmente desarrollados son típicamente subglobosos. Tales carpóforos a veces se han referido como la aberración de gasteroides de un hongo de otra forma gimnocárpica. *E. abortivum* se encuentra en América del Norte y se registra desde Florida, Luisiana, Maryland, Massachusetts, Michigan, Minnesota, Nueva York, Carolina del Norte, Rhode es, Tennessee, Vermont, Virginia y Nueva Escocia, Ontario, Quebec. A menudo en forma cespitosa en grupos gregarios. En el suelo, humus o troncos en descomposición en los bosques de hoja caduca (Watling, 1974).

Frecuentemente dispersos en madera o bosques mixtos, con frecuencia agrupados en la base de árboles en hábitats húmedos, alrededor de tocones y podrido la madera; a finales del verano, el otoño. Las setas parasitadas son típicamente muy modificadas, incluso el aspecto de grumos irregulares de tejido empapado, de color blanquecino. No hay evidencia de que las branquias o el pedúnculo puedan estar presente. Los hongos implicados en el parasitismo son *Armillaria* spp., y *Entoloma abortivum*. Aunque esta última especie es comestible y valorado por algunos que lo reconoce, que instan a la precaución, ya que es relativamente fácil confundir las formas no parasitadas con especies venenosas de *Entoloma* y la formas parasitadas con otras entes que afectan a especies parasitadas no identificables. Este hongo ha sido conocido bajo varios nombres y puede ser llamado *Clitopilus abortivus* o *Rhodophyllus abortivus* (Huffman et al., 2008).

## 2.2. Clasificación taxonómica de *E. abortivum* (Berk. & Curtis) Donk

Subdivisión Basidiomycota

Holobasidiomycetidae

Orden: Agaricales

Familia: Entolomataceae

*Entoloma abortivum* (Berk. & Curtis) Donk

Los hongos no producen clorofila, por lo tanto no pueden realizar la fotosíntesis como las plantas superiores. Incapaces de elaborar su propio alimento a partir de la luz solar, se ven obligados a depender de otros organismos vivos o muertos, vegetales o animales para la elaboración del alimento, para llevar a cabo esta función ellos actúan como saprotrofos, parásitos y como micorrizas. Los saprotrofos viven de la materia orgánica muerta, como son: madera, tejido inerte de árboles vivos, estiércol y pequeñas hojas. Los hongos constituyen un reino independiente llamado Fungi o Myceteae, anteriormente se les consideraba como un grupo integrante de las plantas, sin embargo por sus características nutricionales, la ausencia de clorofila, los hace diferentes del resto de los seres vivos. Los hongos se agrupan en dos grandes grupos que son los Ascomycetes y los Basidiomycetes. Estas dos grandes subdivisiones se subdividen a su vez en Clases, cada Clase en Órdenes y cada Orden en Familias (Díaz, 2002).

## 2.3. Descripción morfológica

Los cuerpos fructíferos del micelio de los hongos superiores macroscópicos, es la parte que típicamente aparece sobre la tierra, entre la hojarasca, sobre madera, estiércol o insectos y que todo mundo conoce como hongos, este es en realidad el cuerpo fructífero o mejor dicho es el fruto del hongo, que contiene la unidad reproductiva que son las esporas. Por debajo de la tierra se encuentra la parte vegetativa del hongo que es el micelio, que se puede observar en forma de una capa filamentosa de color blanco y es la que se encarga de extraer los

nutrientes de los diferentes sustratos. Crece entre la hojarasca o sobre madera en descomposición, solitario o gregario, en bosque de encino (*Quercus* spp.), fructifica en septiembre. Generalmente se encuentra acompañado de formas globosas que pertenecen a la misma especie, pero que son abortadas, de ahí el epíteto específico *abortivum*. Se reporta como una especie comestible de buena calidad, pero hay que consumirlo con precaución, ya que puede confundirse con especies tóxicas de *Entoloma* (Díaz, 2002).

### 2.3.1. Cuerpo fructífero o carpóforo

Lindner et al. (2001) describen el carpóforo atribuido a *Entoloma abortivum* ("entoloma abortada") que representan malformaciones en los cuerpos fructíferos, *Armillaria* es invadida por las hifas de *E. abortivum*. Esto contradice la hipótesis generalmente aceptada de que los cuerpos fructíferos de *E. abortivum* son colonizados por *Armillaria*. Los carpóforos poseen muchas de las características estructurales de los cuerpos fructíferos de *Armillaria*, incluyendo el crecimiento y el desarrollo de rizomorfos y la producción de esporas como en basidios de *Armillaria*. Experimentos de inoculación demuestran la capacidad de *E. abortivum* para abortar el desarrollo de estructuras de fructificación *A. tabescens in vitro*. En raras ocasiones la introducción de *E. abortivum* interrumpe estructuras fructíferas de *A. tabescens* al punto en el que macroscópicamente se asemejan los carpóforos inmaduros como se observa en la naturaleza. Si *E. abortivum* es un parásito de las especies de *Armillaria* en condiciones naturales, *E. abortivum* puede contribuir a la regulación de las poblaciones de *Armillaria* y podría ser investigado como un candidato para el control biológico de las especies de *Armillaria* destructivas.

Antes de 1974, se creía que los carpóforos eran cuerpos fructíferos de *E. abortivum* que nunca se desarrollaron correctamente. Posteriormente se cambió esta interpretación informando que la forma del carpóforo de *E. abortivum* no está compuesto únicamente de las hifas de *E. abortivum*. A través de sus estudios de cultivos preparados a partir de formas agaricoides y carpoforoides de *E. abortivum*. Se llegó a la conclusión de que había un segundo hongo presente en

los carpóforos que estaba ausente en los cuerpos fructíferos agaricoides. Este segundo hongo normalmente sectorizado en la cultura y produce un micelio más oscuro con rizomorfos negros. A través de un análisis de estos rizomorfos, la luminosidad de sus culturas, y los resultados de los experimentos de fusión de hifas, identificaron el segundo hongo *Armillaria mellea*, un trabajo considerable en los últimos 15 años se ha puesto de manifiesto que se trata de un complejo de especies, y *A. mellea* se ha dividido en 5 especies en Europa, 10 especies de América del Norte, y aproximadamente 35 especies en todo el mundo (Lindner et al., 2001).

Watling (1974) refiere al receptáculo de 10-75 mm, piriforme, elipsoide, ovoides o sub-globoso, carnoso de color blanco, ancho por encima de la mitad del cuerpo, arrugada a surcada hacia la base. Estípite ausente, reducido a un pequeño montículo de tejido o en cuerpos fructíferos ovoides que desembocan en el píleo sin distinción. Carne blanca a lo largo de la piel, acuosa moteada de zonas de color rojo-marrón más fuertes sobre todo hacia la base, bolsillos descoloridos a menudo se desarrolla con la edad. Laminillas ausente o reducida a pequeños hoyos que se alinean con una serie de células similares a un himenio.

Tapas de 5 - 10 cm de ancho, redondeadas a casi plano en la madurez, algo nudosa en el centro; gris marrón; oscuramente dividido en zonas con pelos fibrosos a escalas, llegando a ser suave en la madurez; margen inscrito. Carne suave; blanca, cuerpos fructíferos parasitados o abortados: masas blanquecinas, con baches, blandos e irregulares que ocurren solos o cerca de setas normales. Branquias que van desde simplemente unido a un poco decurrentes, algo concurrido; gris, el envejecimiento de rosa palo o rosa salmón. Tallos de 4 - 10 cm de altura, 0,8 - 2 cm de espesor, blanco a gris con superficie peluda desaliñado y el micelio blanco en la base (Huffman et al., 2008).

### 2.3.2. Sombrero y cutícula

Sombrero de 4 cm de diámetro, convexo, con el margen enrollado, ligeramente protuberante en el centro, liso, seco, de color blanco cremoso, blanco grisáceo a

café gris; laminas decurrentes al pie, angostas a moderadamente amplias, distantes entre sí, blanco cremosas, gris pálidas a rosadas (Díaz, 2002).

Píleo de 45-50 mm de diámetro, al principio cónico-convexo, después ondulado o aplanado, con margen ondulado, superficie de color pardo oscuro, casi negro en estado húmedo, radial y uniformemente fibrilosa-escamosa. Láminas espaciadas, adnatas o subdecurrentes, ventrudas, desiguales, al principio de color rosa pálido, después pardo-rosa, con arista con color, entero o algo irregular; lamélulas escasas (Blanco, 2012).

Watling (1974) describe el píleo (12) -40- 100- (170) mm de ancho, convexo luego se expande, monótona luz pálida o gris ratón o piel de ante de oliva pálido, grisáceo, a continuación, uniforme a densamente y por lo general radialmente pubescente o sedosa a veces, llegando a ser suave, más o menos por zonas; los márgenes se hacen curvados posteriormente.

### 2.3.3. Estípite

Pie de 4.5 cm de largo por 0.5 a 1.5 cm de diámetro, excéntrico, sólido, más angosto en la base, blanco a grisáceo, con restos de micelio en su base. Carne blanca, olor suave semejante al pepino y sabor similar (Díaz, 2002).

Blanco (2012) refiere al estípite de 60-65 x 4-10 mm, connato, central, subcilíndrico o engrosado en la base, curvado, macizo, en la mitad superior de color verde-negruzco, que pasa gradualmente a violáceo en dirección a la base, siendo más pálido este color cuanto más nos acercamos a ella, superficie fibriloso-escamosa, longitudinalmente estriada, con las escamas más densas en la mitad superior y con la base tomentosa, blanca. Trama de color grisáceo, delgada, blanda. Olor y sabor no destacables.

Watling (1974) detalla al estípite 20-70- / 16-12- (18) mm (120) mm, con píleo de color grisáceo pálido, fibrilosa o casposa especialmente en el vértice ligeramente hinchado, a veces estriada por debajo del recubrimiento del micelio, igual o subglobosa, blanco, sólido, con tomento blanco del micelio en la base. Laminillas

corta, decurrente, pálido grisáceo, piel canela rosado, estrecho a medio, ancho, estrechado hacia el margen rugoso. La carne es blanca el píleo gris claro y el estípote blanco; olor y sabor harinoso puede provocar náuseas especialmente después de la masticación.

#### 2.3.4. Esporada

Esporada rosa.

Esporas 9,5-12,5 (13,5) x (6,5) 7-8 (8,5)  $\mu\text{m}$ ,  $Q=1,2-1,8$ ,  $Q_m=1,4$  ( $n=30$ ), heterodiamétricas (algunas nodulosas), con 6-9 (11) ángulos obtusos; se han observado numerosas esporas con distintos grados de cianofilia. Basidios 25.5-44,5 x 9,5-15,5  $\mu\text{m}$ , tetraspóricos, con esterigmas de 2-3,5  $\mu\text{m}$  de largo, claviformes, fibulíferos. Basidiólos abundantes. Láminas con arista heterogénea. Queilocistidios de 18-40,5 x 6,5-19  $\mu\text{m}$ , aislados o fasciculados, bifurcados, claviformes, anchamente claviformes, claviformes con ápices diverticulados o nodulosos, fusiformes, lobulados, rostrados, esferopedunculados, subcapitados, utriformes o con formas irregulares, frecuentemente septados, raramente en cadenas ramificadas, frecuentemente con pared gruesa. Pileipielis del tipo cutis, con transiciones a un tricoderma, formada por hifas de 1,5-21  $\mu\text{m}$  de diámetro, de cilíndricas a subfusiformes, constrictas al nivel del septo o entre tabiques, con elementos terminales claviformes de 19,5-45,5 x 8-14  $\mu\text{m}$ , normalmente con pigmento intracelular de color que varía entre el crema y el pardo y presencia de pigmento incrustante en numerosas hifas. Estipitipielis del tipo cutis, de hifas cilíndricas de 1,5-17,5  $\mu\text{m}$  de diámetro, paralelas, subparalelas o enredadas, constrictas en el septo o entre tabiques. Caulobasidios de 11-21,5 x 4-5,5  $\mu\text{m}$ , tetraspóricos, con esterigmas de 1-2  $\mu\text{m}$  de largo, claviformes, localizados en el ápice y en la base del estipe, escasos. Caulocistidios de 13,5-22,5 x 4-6  $\mu\text{m}$ , localizados en la base del estipe, capitados, escasos. Fíbulas presentes, no abundantes, presentes en todos los tejidos (Blanco, 2012). Esporas color canela dando la impresión de un color beige madera (Watling, 1974).

Las esporas de 8 - 10 \* 4 - 6 micras, angular elíptica; esporas de impresión tostado canela a rosa salmón (Huffman et al., 2008). Esporas de 8-10 \* 4,7-6 µm, elípticas, angulares de 6 lados. Esporada rosada (Díaz, 2002).

#### 2.4. Reintroducción de *Entoloma abortivum* en el bosque de niebla

La diversidad vascular del bosque de niebla del suelo es fundamental, cuyos grupos son los más longevos del planeta como los briófitos y hongos, estos últimos además de degradar la materia orgánica facilitan el acceso de las plántulas de los árboles, a nutrientes como el nitrógeno y el fósforo a cambio de azúcares producto de la fotosíntesis. La deforestación del Bosque Mesófilo, comúnmente para darle al suelo otro uso, como el agropecuario, afecta negativamente la composición y abundancia de estos hongos (Gual & Rendón, 2014). La mayor parte de las especies de hongos tiende a desarrollarse en los suelos de los bosques de coníferas. En segundo término destacan los bosques de latifoliadas, particularmente del género *Quercus* spp., los Bosques Mesófilos de Montaña y los bosques tropicales. Es importante destacar que los hongos suelen desarrollarse en asociaciones arbóreas dado su papel ecológico en dichos ecosistemas. Los bosques de niebla presentan gran diversidad y son vitales para la supervivencia y el bienestar de la humanidad, albergan al 66% de las especies animales, vegetales y fúngicas del planeta, y es frecuente que las personas que viven en regiones aledañas a los bosques utilicen los recursos naturales disponibles para subsistencia y como una alternativa de obtención de alimentos e ingresos (Rapoport & Ladio, 1999; López, Chanfón, & Segura, 2005; Padilla, Savedra, Petit, & Iglesias, 2005).

En México, los Hongos Comestibles Silvestres (HCS) son considerados como un recurso forestal no maderable de importancia alimenticia, ecológica, cultural y económica para las comunidades rurales, ya que a partir de su recolección y comercialización éstas obtienen ingresos adicionales durante la temporada de lluvias (Burrola, Montiel, Garibay, & Zizumbo, 2012). Los HSC forman parte de esta riqueza biocultural y se encuentran amenazados por el desconocimiento de pautas de aprovechamiento sostenible y la creciente demanda por sus

propiedades gastronómicas y nutracéuticas. Esto aumenta la probabilidad de sobreexplotación o extinción de distintas especies, especialmente de aquellas tradicionales y más conocidas. Por ello, es necesario entender el papel de los hongos silvestres comestibles dentro de los agroecosistemas, así como desarrollar tecnologías que permitan su domesticación y producción (Alvarado, Mata, & Benítez, 2015). En las comunidades rurales de diversas áreas de México poseen un profundo conocimiento biológico, ecológico y cultural en aspectos como sus estructuras morfológicas, lugar y época de crecimiento, sustratos en donde se desarrollan, tipos de vegetación propicios para su desarrollo, formas de uso, así como la importancia cultural que tienen para ellos (Mariaca, Silva, & Castaños, 2001; Moreno, Aguirre, & Pérez, 2004). La explotación de ciertas especies de hongos podría generar erosión genética, pérdida de biodiversidad y degradación ambiental (Alvarado & Benítez, 2009). Es debido a esta razón por la que no sólo es importante el papel de los hongos en la conservación de estos ecosistemas, si no que forman parte integral de una serie de productos, beneficios y servicios que las comunidades rurales han utilizado a lo largo del tiempo (Villarreal, 1996). Por lo anterior podemos concluir que los hongos gobiernan la estabilidad y productividad de los ecosistemas forestales al degradar moléculas orgánicas complejas en moléculas disponibles más simples en estado mineralizado (Mariaca et al., 2001).

#### 2.4.1. Conservación en el manejo forestal

Después de lo anterior expuesto, es preciso buscar la manera en que las especies nativas de los bosques continúen desarrollando las funciones que desempeñan dentro del rol del proceso de la cadena trófica, con especial atención en aquellas especies que han sido degradadas en su hábitat natural y se encuentran en riesgo. Es en este sentido que se consideraron los criterios para la conservación de la biodiversidad en los programas de manejo forestal, propuesta por la Comisión Nacional Forestal (CONAFOR, 2015) para llevar a cabo el plan de reintroducción del hongo Totolcozcatl. Como referencia se abordaron los puntos del apartado de planificación para la conservación en el

manejo forestal, en el que se plantea el procedimiento indicado en la Figura 1. Es necesario especificar, que el proceso se adecuó a las necesidades y consideraciones del trabajo de reintroducción en el área de estudio, algunos aspectos similares se abordan en las actividades ya realizadas, aunque de manera distinta, siempre se persiguen objetivos que nos lleven a la conservación de las especies.

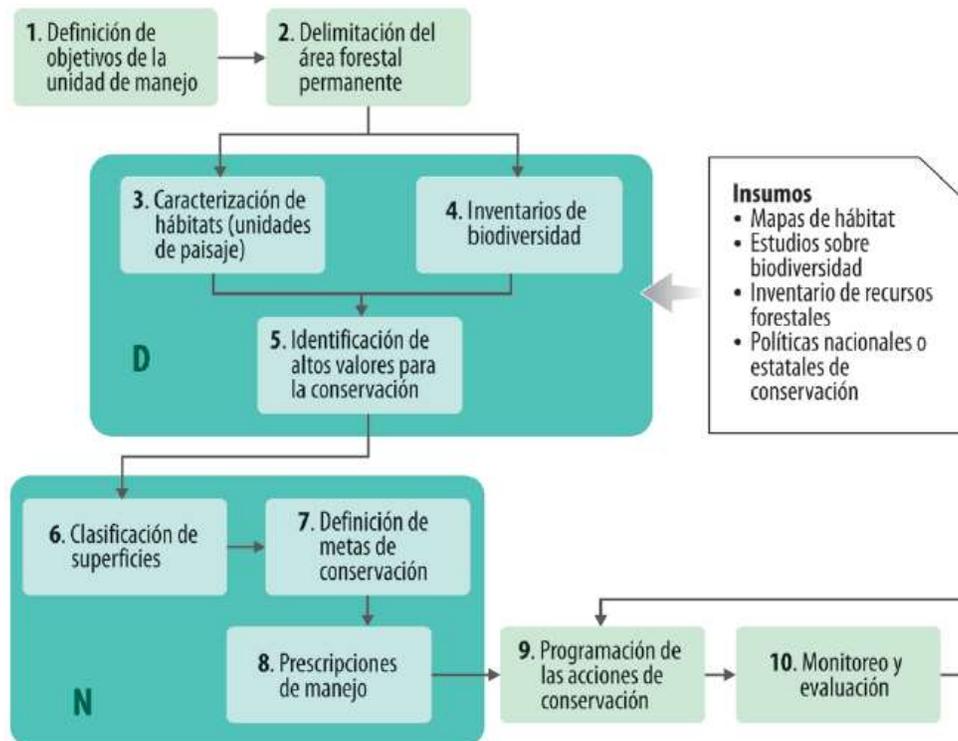


Figura 1. Proceso de elaboración de los programas de manejo forestal, integrando el componente de conservación de la biodiversidad.

## 2.5. Conclusiones de la revisión de literatura

De acuerdo a la revisión de la literatura disponible en lo referente al estado del conocimiento de la especie, se puede concluir que no existe información de las poblaciones ni de la distribución de totolcozcatl que crece en nuestro país. A través de los informantes solamente se han detectado un par de lugares en mercados locales donde se comercializa.

Las descripción taxonómica que se cita, son de especies de otros países donde se distribuye el hongo *Entoloma*, en cambio, para México no se puede asegurar si se trata de la misma especie, sólo se conjetura. En esta investigación así se manejó por la semejanza que presentan los cuerpos fructíferos observados, tanto en su forma agaricoide típico con un estípote y deformada, con la descripción que mencionan algunos autores.

No se encontró información de las condiciones ambientales que requiere la especie, ni los periodos de emergencia, excepto que se menciona que es una especie de invierno; más no hay especificidad en cuanto a los periodos en que se pueden coleccionar los cuerpos fructíferos. Por lo anterior, se tienen que abordar estos aspectos que sirven como eje para el conocimiento y descripción de la especie en el país, específicamente en la Sierra Norte del Estado de Puebla.

## 2.6. Literatura citada

- Alvarado, C. G., & Benítez, B. G. (2009). El enfoque de agroecosistemas como una forma de intervención científica en la recolección de hongos silvestres comestibles. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 3(10), 531-539.
- Alvarado, C. G., Mata, G., & Benítez, B. G. (2015). Importancia de la domesticación en la conservación de los hongos silvestres comestibles en México. *Bosque*, 36(2), 151-161.
- Blanco-Dios, J. B. (2012). Notas sobre el género *Entoloma* en el Noroeste de la Península Ibérica (IV): *Entoloma legionense*, una nueva especie del subgénero *Leptonia*. *Revista Catalana de Micología*, 34, 13-18.
- Burrola, A. C., Montiel, O., Garibay, O. R., & Zizumbo, V. L. (2012). Conocimiento tradicional y aprovechamiento de los hongos comestibles silvestres en la región de Amanalco, Estado de México. *Revista Mexicana de Micología*, 35, 1-16.
- Cléménçon, H., Emmett, V., & Emmett, E.E. (2004). Cytology and plectology of the Hymenomycetes. J. Cramer (Ed.). *Bibliotheca Mycologica Series*, 199.
- Co-David, D., Langeveld, D., & Noordeloos, M. E. (2009). Molecular phylogeny and spore evolution of Entolomataceae. *Persoonia*, 23, 147-176.
- Comisión Nacional Forestal (CONAFOR). (2015). Criterios para la conservación de la biodiversidad en los programas de manejo forestal. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), Fondo para el Medio Ambiente Mundial (Gef), Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD), Jalisco, México.
- Díaz, B. H. (2002). Hongos macromicetos comestibles, venenosos, medicinales y destructores de la madera, de la Reserva de la Biósfera de la mariposa monarca, Sierra Chincua, Michoacán, México. Fundación Produce, Michoacán, A. C. Comisión Forestal del Estado de Michoacán (COFOM). Morelia, Mich. México.
- Gual, D. M., & Rendón, C. A. (comps.). (2014). Bosques Mesófilos de Montaña de México: diversidad, ecología y manejo. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- Huffman, D. M., Tiffany, L. H., Knaphus, G., & Healy, R. A. (2008). *Mushrooms and Other Fungi of the Midcontinental United States*. Second Edition. University of Iowa Press, Iowa City.
- Largent, D. L., Henkel, T. W., Aime, M. C., & Baroni, T. J. (2008). The Entolomataceae of the Pakaraima Mountains of Guyana I: four new species of *Entoloma* s. str. *Mycologia*. The Mycological Society of America, 100, 132-140.
- Lindner, C. D.L., Volk, T. J., & Burdsall, H. H. Jr. (2001). Field observations and inoculation experiments to determine the nature of the carpophoroids

- associated with *Entoloma abortivum* and *Armillaria*. Mycologia. The Mycological Society of America, 93, 841-851.
- López, C., Chanfón, S., & Segura, G. (2005). La riqueza de los bosques mexicanos: más allá de la madera. Experiencias de comunidades rurales. SEMARNAT/CONAFOR/CIFOR/INE. México, D.F.
- López, A. R.L. (2013). Implementación de un modelo integral de intervención agroforestal en Xaltepuxtle, Puebla. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Edo. de México, México.
- Mariaca, M. R., Silva, P. L.C., & Castaños, M. C.A. (2001). Proceso de recolección y comercialización de hongos comestibles silvestres en el Valle de Toluca, México. Ciencia Ergo Sum, 8(1), 30-40.
- Moncalvo, J. M., Vilgalys, R., Redhead, S. A., Johnson, J. E., James, T. Y., Aime, M. C.,... Miller, O. K. Jr. (2002). One hundred and seventeen clades of euagarics. Molecular Phylogenetics and Evolution, 23, 357-400.
- Montañez, D. A.D. (2013). Estudio taxonómico del género *Entoloma* s.l. (Fungi, Agaricales) en Jalisco. Tesis de Maestría, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara, México.
- Montecchio, L., Roca, S., Courty, P. E., & Garbaye, J. (2006). *Entoloma nitidum* Qué. + *Carpinus betulus* L. Descriptions. Ectomycorrhizae, 9, 33-38.
- Moreno, F. A., Aguirre, A. E., & Pérez, R. L., (2004). Conocimiento tradicional y científico de los hongos en el estado de Chihuahua, México. Etnobiología, 4, 89-117.
- Noordeloos, M. E., & Gates, G. M. (2012). The Entolomataceae of Tasmania. Series Fungal Diversity Research, 22.
- Padilla, A., Savedra, S., Petit, J., & Iglesias, A. (2005). Habitantes de los bosques y desarrollo sostenido. Revista Forestal Latinoamericana, 37, 45-58.
- Rapoport, R., & Ladio, A. (1999). Los Bosques andino patagónicos como fuentes de alimento. Bosque, 20, 55-64.
- Villareal, R. L. (Ed). (1996). Los hongos silvestres: componentes de la biodiversidad y alternativa para la sustentabilidad de los bosques templados. Informe final del proyecto CONABIO C066. Instituto de Recursos Genéticos y productividad. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas Montecillo Estado de México, México.
- Watling, R. (1974). Dimorphism in *Entoloma abortivum*. Travaux Mycologiques. Numéro spécial du Bolletín de la Société Linnéenne de Lyon 43, 450-470.

### 3. CARACTERIZACIÓN DEL MICROHÁBITAT DEL HONGO “TOTOLCOZCATL” [*Entoloma abortivum* (BERK. & CURTIS) DONK, BASIDIOMYCOTINA] EN XALTEPUXTLA, PUEBLA<sup>3</sup>

#### 3.1. Resumen

Los hongos silvestres comestibles son considerados un recurso forestal no maderable de importancia alimenticia, ecológica, cultural y económica para las comunidades rurales, aprovechamiento que ha derivado en saqueo y sobreexplotación de la especie *Entoloma abortivum* “totalcozcatl” en el bosque mesófilo de montaña en Xaltepuxtle, Puebla. En este trabajo se presenta la caracterización del hábitat que requiere el hongo para su desarrollo, como punto de partida para su conservación y propuesta de restauración en el ecosistema. Mediante recorridos de campo con recolectoras del hongo “totalcozcatl” se identificaron y delimitaron cuatro sitios de emergencia de la especie. En cada sitio, a la profundidad de emergencia de los carpóforos, se colocaron sensores de temperatura y humedad relativa del microclima, antes y durante todo el período de desarrollo del hongo; también se registró el pH y la temperatura del sustrato en el mismo lapso. Se hizo la descripción de la composición vegetal y se midió la densidad de sombra sitio específico. La composición química del sustrato también se incluyó en la caracterización. La emergencia se registró en dos de los sitios seleccionados, cuando la temperatura ambiente descendió de 19°C a 16.5°C y en el sustrato entre 11 a 13 °C; con humedad relativa ambiental del 65.5%; además, en el sustrato el pH se mantuvo ente 5-5.5. Se observaron carpóforos blancos (“abortado”). La densidad de sombra promedio en los sitios fue del 93.63%. Para las condiciones climáticas registradas, el periodo de emergencia de “totalcozcatl” comprendió del 19 de diciembre 2016 al 12 de febrero 2017, cuando ocurren descensos de temperatura y la HR ambiental mayor a 65%, así como condiciones de acidez en el sustrato. La base del tallo de bambú así como su hojarasca; los macollos de pastos en descomposición y trozos podridos de jonote, son otra condición para su restauración.

**Palabras clave:** *Entoloma abortivum*, “totalcozcatl”, caracterización de hábitat, sensores, emergencia.

---

<sup>3</sup> Tesis de Maestría en Ciencias en Agroforestería para el Desarrollo Sostenible, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Natalia Mateo Guzmán

Director de tesis: Dra. María Edna Álvarez Sánchez

CHARACTERIZATION OF THE MICROHABITAT OF THE FUNGUS  
"TOTOLCOZCATL" [*Entoloma abortivum* (BERK. & CURTIS) DONK,  
BASIDIOMYCOTINA] IN XALTEPUXTLA, PUEBLA<sup>4</sup>

3.2. Abstract

Edible wild mushrooms are considered a non-timber forest resource of nutritional, ecological, cultural and economic importance for rural communities. These uses have resulted in looting and overexploitation of the species *Entoloma abortivum* "totalcozcatl" in the cloud forest in Xaltepuxtlá, Puebla. This work presents the characterization of the habitat that the fungus requires for its development, as a starting point for its conservation and the development of a restoration proposal in the ecosystem. Through field trips with gatherers of the "totalcozcatl" fungus, four emergence sites of the species were identified and delimited. In each site, at the depth of emergence of the carpophores, microclimate temperature and relative humidity sensors were placed before and during the entire period of development of the fungus; the pH and the temperature of the substrate were also recorded in the same period. The description of the plant composition was made and the specific site shade density was measured. The chemical composition of the substrate was also included in the characterization. Emergence was recorded in two of the selected sites, when the environmental temperature dropped from 19°C to 16.5°C and in the substrate between 11 to 13°C, with environmental relative humidity of 65.5%; in addition, in the substrate the pH remained between 5-5.5. White carpophores ("aborted") were observed. The average shade density at the sites was 93.63%. For the recorded climatic conditions, the emergence period of "totalcozcatl" was from December 19, 2016 to February 12, 2017, when temperature drops occur and environmental RH is greater than 65%, as well as acidity conditions in the substrate. The base of the bamboo stem as well as its leaf litter, decomposing pasture tillers and rotten jonote pieces are other conditions for restoration.

**Keywords:** *Entoloma abortivum*, "totalcozcatl", characterization of habitat, sensors, emergence.

---

<sup>4</sup> Thesis Master's Degree in Agroforestry for Sustainable Development, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Natalia Mateo Guzmán

Thesis advisor: Dra. María Edna Álvarez Sánchez

### 3.3. Introducción

El interés en los Productos Forestales No Maderables (PFNM) ha aumentado y con ello la creciente problemática de la deforestación de los bosques y la necesidad de diversificar e incrementar el valor de los recursos forestales. Los hongos silvestres comestibles forman parte del grupo de los (PFNM), y muchas familias dependen de su recolección, para contribución en la alimentación, fuente de ingresos y empleos complementarios.

En referencia a lo anterior, la recolección de estos recursos depende de la cantidad de lluvia, la temperatura y la humedad presente en el sitio, además, las condiciones edáficas donde surgen; éstas se conforman de madera y hojarasca de plantas superiores, factores que deben considerarse al momento de realizar la caracterización de un hábitat tan específico como el de los hongos. En los marcos de las observaciones anteriores, Velasco, Zamora-Martínez, Nieto de Pascual, Martínez-Valdez, y Montoya, (2010) sugieren que la producción de los hongos silvestres en condiciones naturales está determinada por la biología de cada taxón, la conformación de las dimensiones del arbolado presente en los rodales donde se desarrollan, así como por los elementos edáficos y climatológicos propios de sus hábitats. Conocer con precisión las particularidades ecológicas y dasométricas de los sitios de colecta de hongos permite asociar su productividad tanto con dichos componentes, como con la fisiografía de los bosques. La producción total fúngica se puede predecir a partir del número de árboles presentes, su altura, diámetro normal y cobertura, así como de información precisa de temperatura y de precipitación media anual correspondiente al periodo considerado en el muestreo. Lorenzana (2008) supone importante evaluar las características de microhábitats edáficos, como pH, clase textural, contenidos de materia orgánica, nitrógeno, fósforo, potasio y capacidad de intercambio catiónico de hongos ectomicorrízicos comestibles. Para Arteaga y Moreno (2006) las características ecológicas que se relacionan con la producción de hongos, son la temperatura media mensual, diámetro promedio del arbolado, precipitación mensual y edad promedio del arbolado.

Es evidente que la menor densidad de árboles, baja humedad relativa, compactación del suelo por la actividad humana, presencia de contaminantes, y disminución de la capa de humus, tienen un considerable impacto cuando menos en el desarrollo de esporomas macroscópicos (Villanueva-Jiménez, Villegas-Ríos, Cifuentes-Blanco, & León-Avendaño, 2006). Así como en la propagación de especies de hongos pueden intervenir diversos vectores, como el aire, lluvia, roedores que abundan en la zona y plantas introducidas (Herrera, Pérez-Silva, & Valenzuela, 2006).

Por lo anterior, la presente investigación tuvo por objetivo caracterizar las condiciones ecológicas del microhábitat donde desarrolla el hongo totolcozcatl "*Entoloma abortivum*"

### 3.4. Materiales y métodos

#### 3.4.1. Localización del área de estudio

La investigación se llevó a cabo en la comunidad de Xaltepuxtla, Puebla, en la finca Ocotitla que tiene una extensión de 40 ha (Figura 2). En el predio existe remanentes de bosque de niebla y es predominantemente dedicado a la producción de ornamentales: chima, arrayán, azálea y cedrela. Dicha zona se localiza entre las coordenadas extremas 97°58'5.303" longitud oeste y 20°11'23.06" latitud norte; 97°57'30.836" longitud oeste y 20°10'57.124" latitud norte, a una altitud de 1280 msnm (Ruiz-Moreno, Álvarez-Sánchez, Gómez-Díaz, y Cuevas-Sánchez, 2016). Se encuentra entre los municipios de Xicotepec de Juárez, Zihuateutla, Juan Galindo, Huauchinango, Jopala, Tlaola, Chiconcuautla (López, 2013).

El clima (A)Cb(fm)(e)gw" semi-cálido húmedo con lluvias todo el año, precipitación del mes más seco mayor de 40 mm y menos de 18% de lluvia invernal con respecto a la lluvia total; Temperatura media anual oscila entre los

18° y 24°C, extremoso, el mes más caliente antes de junio (marcha de la temperatura tipo Ganges) y sequía intraestival (López, 2013).



Figura 2. Localización de predio Ocotitla en Xaltepuxtla, Puebla. (Tomado de Ruiz, 2016).

El tipo de vegetación que se encuentra en la finca son remanentes de especies de bosque de niebla, existe abundancia de *Liquidambar* sp., *Platanus* sp., *Pinus patula*, helechos arborescentes del género *Cyathea*, *Heliconia* sp., llamada localmente hoja de papatla o apatla y la cual es endémica de la zona; debido a la actividad antropocéntrica, se tiene en el terreno abundancia de *Pteridium aquilinum* (ocopetate), el cual es utilizado para efectos de sombra en el plantío; así como, de *Rhododendron simsii*, (azalea) y chima, *Chamaecyparis lawsoniana*. El estrato herbáceo (medio). Arbustos de uso múltiple, medicinales, ornamentales: cedrela (*Chamaecyparis thyoides ericoides*) Chimansimpar (*Chamaecyparis lawsoniana ellwoodii*), Bambusae, Gardenia entre otras, *Rhododendron*, Cyatheaceae. Estrato bajo: principalmente con hortalizas, ornamentales, cultivos de ciclo corto como chile, tomate, rábanos, cilantro, pápalo de tamaño pequeño. Hojarasca de “pinos”, “encinos”, “helechos”, “ocopetate” (López, 2013).

### 3.4.2. Intervención participativa

Una manera de hacer partícipes a los miembros de la comunidad, tanto medieros como propietarios, y que colaboren en actividades que son para su beneficio es que ellos conozcan de qué se trata la investigación a desarrollar y el proceso que se seguirá. Es aquí donde toma importancia la Investigación Acción Participativa (IAP), como se refiere posteriormente.

En la IAP se propone una aplicación rigurosa del método científico por parte de un equipo científico técnico, que, a partir de un diagnóstico de la realidad comunitaria diseña la investigación, sus objetivos y el método de la misma, incluyendo la participación parcial de la comunidad, ya sea para la recolección y/o contrastación de los datos de investigación, o para la implementación de las estrategias a seguir. Los resultados del proceso investigativo son ordenados, sistematizados e interpretados por el equipo de investigación, pudiendo ser devueltos a la población estudiada (Durstun & Miranda, 2002).

Con base en lo anterior, se realizó una presentación comunitaria ante los propietarios de la zona, los cuales mostraron interés por la importancia alimenticia que significa para ellos el hongo “Totolcozcatl” y estuvieron dispuestos a brindar las facilidades para trabajar en sus propiedades. Una vez obtenida la aprobación, se procedió a presentar el proyecto con los medieros que trabajan en la propiedad, algunos de los cuales son recolectores; con estos últimos se trabajó de manera directa. Dado que los medieros son una comunidad indígena de habla náhuatl, con dificultad para entender y hablar el español, la presentación del proyecto se hizo en su lengua nativa. Con esto se logró un mayor acercamiento con ellos y mejor participación en las opiniones que emitieron acerca del interés de trabajar con la especie, debido a los ingresos alimenticios y económicos que les representa.

### 3.4.3. Localización de las áreas de distribución natural de *E. abortivum* y aplicación de entrevistas

Se realizaron recorridos dentro del área de estudio con el apoyo y el conocimiento tradicional local de tres recolectoras de hongos, un recolector y dos niños, los cuales identifican la especie “Totolcozcatl” en campo y conocen las áreas donde se desarrolla de manera natural. Los recorridos de reconocimiento en campo se hicieron en el mes de junio de 2016, previo al periodo en que el hongo comienza a emerger, que de acuerdo con las recolectoras se presenta de finales del mes de noviembre o principios de diciembre, extendiéndose ocasionalmente hasta febrero.

En el momento en que se realizaron los recorridos de campo con las recolectoras, también se les aplicó una entrevista dirigida, pues el conocimiento de la especie, lo adquirieron desde pequeñas cuando acompañaban a sus mamás o abuelas a hacer la recolección en tiempos de lluvias. La estructura de la entrevista se anexa en el documento.

Se eligieron cuatro de los sitios identificados por las recolectoras con mayor emergencia de hongos; dichos sitios se georreferenciaron con un GPS. Se indica las coordenadas respectivas y localización de los sitios (Figura 3, Cuadro 1).

Cuadro 1. Coordenadas de los sitios localizados.

<b>Sitios</b>	<b>Uno</b>	<b>Dos</b>	<b>Tres</b>	<b>Cuatro</b>
<b>Coordenadas</b>				
N	20°11'12.1”	20°11'15.8”	20°11'15.4”	20°11'04.8”
W	097°57'42.5”	097°57'51.5”	097°57'51.4”	097°57'47.8”
<b>Altitud</b>	1215 m	1252 m	1251 m	1229 m

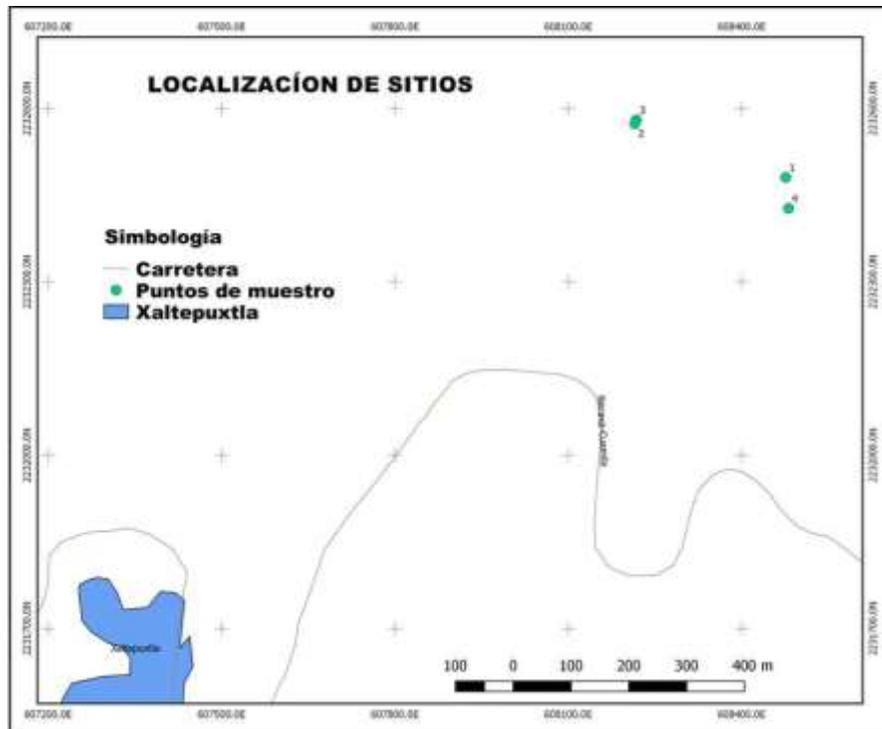


Figura 3. Localización de los cuatro sitios de monitoreo.

#### 3.4.4. Condiciones microclimáticas de los sitios

Con la finalidad de monitorear las condiciones microclimáticas de los sitios donde se desarrolla las poblaciones de “Totolcozcatl”. Una vez localizados los sitios se procedió a marcarlos, se colocaron cinco estacas formando un cuadro (una estaca por esquina y una en el centro). Se instaló en cada sitio un sensor HOBO Pro v2, el cual registró la temperatura, humedad relativa y punto de rocío del microclima del sitio, dicho equipo se sujetó a la estaca del centro y a ras de suelo (Figura 4). Previo a la colocación, se configuró el equipo para que el registro de las variables tuviera una frecuencia de registro de cada 15 minutos, tomando datos de la temperatura y humedad máxima, mínima y promedio. La finalidad de colocar los sensores antes de la emergencia fue de obtener mayor información en cuanto al comportamiento y requerimientos microclimáticos del hábitat natural.



Figura 4. Datalogger colocado en los sitios de monitoreo.

Los datos registrados por los Dataloggers se descargaron cada 15 días después de colocados los equipos, por medio de una estación base óptica que se embona a un coupler USB (Figura 5), y el programa para computadora HOBOWare. La descarga se realizó siguiendo las indicaciones que marca el programa, una vez descargado el registro se volvió a configurar el equipo para continuar registrando los datos.



Figura 5. Descarga de los registros tomados por los dataloggers.

Cuando se colocaron los equipos también se registró con un instrumento de estudio de suelos modelo SK-300B, la intensidad de la luz solar ambiental, el valor de pH del suelo, la temperatura y la humedad del sustrato en los cinco puntos donde se colocaron las estacas (Figura 6). También se registró la temperatura y humedad relativa ambiente, tanto el máximo, mínimo y promedio en los sitios con un Higrotermógrafo. Estos datos se tomaron cada 15 días en puntos distintos dentro del sitio.



Figura 6. Registro de temperatura y pH del sustrato.

La densidad de cobertura de dosel de los sitios se obtuvo con un densiómetro cóncavo, compuesto por una pequeña caja de madera con nivel esférico de burbuja, un espejo en forma cóncavo y dicho espejo está subdividido por una cuadrícula que consta de 24 cuadrados. La medición se hizo de la siguiente manera:

Se colocó el densiómetro esférico sobre una tabla de campo con superficie plana y fija, a la altura del codo y una distancia de 30 cm de los ojos, para evitar el reflejo de la cabeza en el área de la cuadrícula. Este método es subjetivo, porque se asume cuatro subcuadrados en cada cuadrado de la cuadrícula, y sistemáticamente se asigna un punto por cada cuadrado que no refleje cobertura de dosel del bosque. Se tomó el registro en cuatro puntos dentro del sitio, en cada punto se niveló la burbuja del nivel que tiene el densiómetro, las cuatro lecturas son en dirección al Norte, Sur, Este y Oeste. Estos valores se registraron en un formato de campo y se promediaron para obtener un solo valor. El promedio obtenido se multiplicó por el factor de corrección (1,04), propia del instrumento, de esta forma se obtuvo el porcentaje de cielo visible o apertura de dosel. La diferencia del valor obtenido y el 100% de cobertura, representa la densidad de dosel del sitio o cobertura de dosel.

#### 3.4.5. Colecta de material de sustrato y análisis químico

Transcurridos veinte días después de terminado el periodo de emergencia, se realizó la toma de muestras de sustrato en los dos sitios donde se colectaron los hongos. Se tomaron cinco repeticiones por sitios, quedando un total de 10 muestras de sustrato. Para la extracción se hicieron cortes de bloques de 15 x 25 cm aproximadamente, a una profundidad de 2,5 cm, con el apoyo de una espátula y cuchillo. Estos bloques se metieron en bolsas de plástico para posteriormente colocarlos en una hielera y conservar la humedad. Se transportaron las muestras al laboratorio y se colocaron en el refrigerador para su posterior análisis.

En el laboratorio se cortaron cuatro pedazos de cada muestra, quedando cuatro repeticiones por muestra y veinte repeticiones por sitio. A una fracción de cada muestra se le determinó el porcentaje de humedad previo peso en húmedo y después de secado en estufa a 70 °C. El resto de los bloques de cada muestra también se secaron en la estufa a la misma temperatura para su molienda. Las determinaciones incluyeron materia orgánica (Walkley y Black), nitrógeno inorgánico, P disponible (técnica de Olsen), K, Ca y Mg intercambiable (acetato de amonio a pH neutro), Fe, Mn Cu, Zn (extraídos con DTPA) B (extraído con CaCl<sub>2</sub>) y S (por turbidimetría) de acuerdo con las metodologías indicadas en la NOM- norma oficial mexicana.

#### 3.4.6. Caracterización taxonómica del hongo Totolcozcatl

Cabe mencionar que, como únicamente se obtuvieron esporomas en su forma abortada, no se puede concluir con la taxonomía de la especie, pues para hacer la identificación, sería necesario contar con la especie en su forma típica antes de ser parasitada.

Se colectaron especímenes de hongo en fase reproductiva, los cuales fueron colectados del tronco de un árbol, fueron retirados desde su base y depositados en papel aluminio y en una hielera al laboratorio de Sistemática del Instituto de

Ecología, lugar donde se llevó a cabo el proceso de caracterización taxonómica de la especie. Para una buena colecta se tomaron los datos de la localidad donde se colectó, la fecha, nombres comunes de los arboles más cercanos, fotografías donde se ilustre la forma de hábitat de la especie, color, tamaño y forma.

Se procedió a realizar la descripción morfológica (caracterización fenotípica) mediante claves con imágenes, debido a que no se encontraron cuerpos fructíferos agaricoide típico con un estípite, se limitó a describir los carpóforos blancos (abortados).

Para la aplicación de técnicas moleculares se inició con la extracción de ADN y la obtención de datos confiables y reproducibles, esto depende en gran medida, de la extracción de ADN íntegro y puro. La extracción consiste en el aislamiento y purificación de los ácidos nucleicos y se basa en las características fisicoquímicas de la molécula. En extracción de ADN, calidad y cantidad de muestra, una vez colectada la muestra en fase reproductiva previamente desinfectada y lavada, se procedió a extraer una muestra de aproximadamente 100 mg y se depositó en un tubo eppendorf de 1,5 ml, se adicionó 450  $\mu$ l de buffer de extracción el cual contiene: SDS que funciona como detergente, TRIS 7.5 el cual permite mantener el pH de la solución estable, EDTA molécula quelante que sirve desestabilizar la membrana celular e inhibir a las ADNasas), NaCl recubre al ADN protegiéndolo y ayudando a evitar su degradación; se maceró el material repetitivamente en un mortero de porcelana hasta obtener la muestra homogénea, (este paso es clave en el proceso de extracción ya que se debe romper completamente la pared celular de la muestra), se adicionó 450  $\mu$ l de cloroformo para separar las dos fases de la muestra, dejando el ADN expuesto) y se mezcló todo el contenido del tubo por inversión, después se centrifugó las muestras a 14 mil rpm durante 5 minutos y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de 1,5 ml que contenía 250 $\mu$ l de isopropanol que se encarga de remover la concentración residual de sales y promover la precipitación del ácido nucleico), luego se mezcló por inversión varias veces y se mantuvo en refrigeración a -20°C durante 20 min, al retirar las muestras del refrigerador se

centrifugó por segunda vez durante 5 minutos. Se removió el sobrenadante, ya que el ADN se encuentra en la base del tubo eppendorf y se adiciona 1 ml de etanol frío al 70% para ayudar a precipitar el ADN, luego se volvió a centrifugar por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante de etanol y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente sobre un papel absorbente dejando boca abajo el tubo eppendorf, una vez evaporado el etanol se re-suspendió el pellet en 50µl de buffer TE (se utiliza para eludir y conservar el ADN) y se almacenó a -20°C.

Como segundo paso en el análisis molecular se realizó la electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida, es una de las metodologías más utilizadas en lo relacionado con el trabajo con ácidos nucleicos. Mediante la electroforesis podemos separar fragmentos de ADN y ARN en función de su tamaño, esta consiste en la migración de las moléculas a través de un gel, en el cual, por acción de un campo eléctrico, se separan de acuerdo a su tamaño o peso molecular, se visualizan mediante una sencilla tinción, y de esta forma determinar el contenido de ácidos nucleicos de una muestra, teniendo una estimación de su concentración y grado de entereza. Se puede extraer del gel los fragmentos de ADN que sean de interés, para posteriormente utilizarlos en diferentes aplicaciones. Para ello se preparó un gel de agarosa al 0.8% para visualizar cantidad y calidad de ADN, para lo cual se pesó 0.48 g de agarosa, diluida en 60 ml de TAE 1X (buffer de corrida, el cual tendrá el pH requerido y los iones necesarios para que fluya la corriente y pueda migrar el ADN), luego para homogenizar la solución se calentó hasta obtener un producto totalmente líquido, se dejó enfriar 10 minutos y luego se procedió a servir el gel en la cámara de electroforesis, este se dejó polimerizar aproximadamente por media hora y se procedió a servir las muestras mezclando 2 µl de gel red con 4 µl de ADN total, y se depositaron las muestras en los carriles; una vez se dejaron todas las muestras en los carriles correspondientes se conectó y por último se programó para que la cámara de electroforesis a 45V durante 30 minutos y por último se reveló el gel en la cámara de luz UV.

Por último se realizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual pretende aumentar el número de copias de fragmentos de ADN de una muestra de manera *in vitro*, según las condiciones establecidas y el propósito de su uso. Se añadieron los ingredientes teniendo en cuenta el orden específico: 1) Buffer 1x1µL el cual mantiene las condiciones para que la enzima trabaje adecuadamente a cierto pH, 2) MgCl<sub>2</sub> 1µL como un cofactor catalítico de la reacción, 3) oligonucleótidos (llamados también primers, iniciadores o cebadores, en este caso los primers utilizados fueron ITS4 0,5µL e ITS5 0,5µL necesarios para que se inicie la transcripción, 4) dinucleótidos (dNTPs) 1µL para complementar los fragmentos amplificados, 5) taq polimerasa 0,5µL, 6) muestra de ADN 0,5µL y por último se agregaron 6,5 µL de agua mili-Q para llevar a un volumen total de 12,5 µL. El siguiente paso fue colocar los tubos en el termociclador, que básicamente sirve para calentarlos o enfriarlos a temperaturas muy precisas que se repiten una y otra vez, el primer ciclo fue 95°C donde se desnaturaliza la doble cadena del ADN, quedando en forma de cadenas sencillas; luego se ajusta la temperatura a 55°C, donde empieza la fase de alineamiento donde la taq polimerasa se une a los pedazos de ADN de doble cadena y comienza a copiar en sentido 5' a 3'. Después la temperatura sube a 72°C, que es la temperatura en la cual la polimerasa alcanza su máxima actividad y continúa la síntesis de los fragmentos de ADN a partir de los oligonucleótidos que ya se habían alineado. En el primer ciclo, con estas tres temperaturas, se sintetizaron los primeros fragmentos a partir del ADN genómico y este número de copias va aumentando exponencialmente de esta manera: en el ciclo 1 se producen  $2^1=2$  nuevos fragmentos, en el ciclo 2 serán  $2^2$ , esto es, 4 fragmentos recién sintetizados.

Para la caracterización sistemática se atribuyó valores taxonómicos a aspectos asociados a la morfología, tanto macroscópica como microscópica, es decir, si hay presencia o ausencia de septos en las hifas, formación de esporas y mecanismos de liberación de las mismas.

### 3.5. Resultados y discusión

#### 3.5.1. Descripción de los sitios de emergencia de *Entoloma*

En la Figura 7, se presentan los cuatro sitios en los que se colocaron los equipos de monitoreo, cabe mencionar que los sitios dos y tres se generalizan en la descripción por presentar composición y estructura similar, debido a la cercanía que presentan. Así también, es necesario especificar que solamente en estos dos sitios se registró emergencia de los cuerpos fructíferos de la especie de interés.

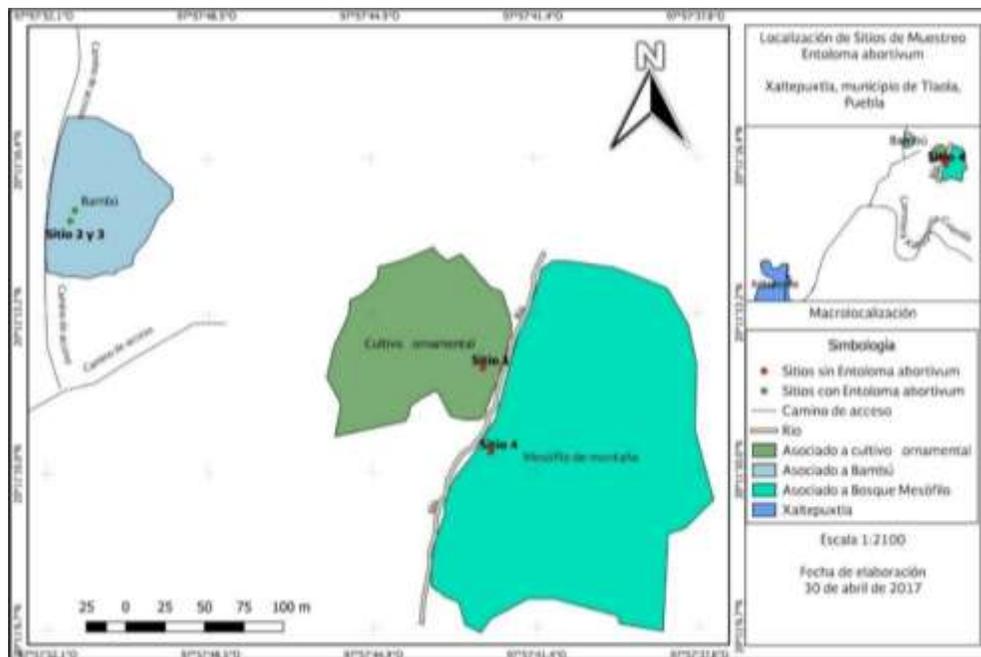


Figura 7. Zonas de monitoreo.

Sitio uno (asociado con cultivo ornamental). En este sitio no se observó la presencia de hongos. El estrato superior de la vegetación presente es de liquidámbar (*Liquidambar styraciflua*); el estrato medio se conforma de ejemplares de helechos arborescentes (*Helecho* sp.); para el estrato bajo se encuentran plantas de ornato de chima (*Chamaecyparis lawsoniana*), y helecho arbustivo (*Nephrolepis exaltata*) (Figura 8). El sustrato es una mezcla de hojarasca de las especies vegetales presentes con trozos de madera, ambas en descomposición.



Figura 8. Sitio de monitoreo uno.

Los sitios dos y tres (vegetación de bambú). Se encuentran muy cercanos y sólo separados por un caño donde corre agua derivado de un manantial. En ambos sitios, el estrato alto y medio es vegetación de bambú (*Guadua* sp.) mejor conocido por la población como otate, en el sitio dos, además, existe un ejemplar de liquidámbar. El estrato bajo lo compone una especie de pasto en macollo. El sustrato donde se desarrolla el hongo es predominantemente hoja de bambú, aunque cabe mencionar que existe hojarasca de liquidámbar en los dos sitios por la cercanía de los mismos. En los sitios se identificaron trozos de madera en descomposición y un tronco de jonote (*Heliocarpus appendiculatus*) en la que se registró emergencia del hongo y en macollos podridos de pasto (Figura 9).



Figura 9. Localización de los sitios dos y tres.

Sitio cuatro (remanente de bosque). En este sitio tampoco se registró presencia de hongos. La vegetación presente es diversa en este sitio, debido a que se trata

de un remanente del bosque que existió en el lugar, con vegetación que alguna vez predominó en el predio. El estrato superior presenta ejemplares de liquidámbar y álamo (*Platanus* sp.) el estrato medio se conforma de helechos arborescentes, cítricos, especies de enredaderas. El estrato herbáceo hay presencia de helecho (*Nephrolepis* sp.), selaginelas, cícadadas, algunas palmas y pastos (Figura 10). El sustrato es de hojarasca en descomposición en combinación con gran cantidad de material vegetal muerto.



Figura 10. Localización del sitio cuatro.

La identificación de las especies vegetales que conforman el microclima del hongo es importante debido a que la hojarasca es la que genera un sustrato propicio para la reproducción del hongo, por tanto es esencial conocer la composición vegetal que se encuentra presente. Así como lo indican Velasco et al. (2010) la producción de los hongos silvestres en condiciones naturales está determinada por la conformación de las dimensiones del arbolado presente en los rodales donde se desarrollan, así como por los elementos edáficos y climatológicos propios de sus hábitats. Igualmente, lo observado coincide con

Villanueva et al. (2006) al indicar que la menor densidad de árboles y disminución de la capa de humus, impacta en el desarrollo de esporomas macroscópicos. Para Arteaga y Moreno (2006) las características ecológicas que se relacionan con la producción de hongos, es el diámetro promedio y la edad promedio del arbolado.

Además de las características que proporcionan las especies vegetales para el desarrollo del hongo nativo, en el sitio dos, la densidad de sombra promedio fue de 94.54% y para el sitio tres de 92.72%. Con estos resultados podemos afirmar que esta especie requiere de considerable cobertura arbórea para su producción, esto coincide con lo identificado por Velasco et al. (2010) referente a que la producción total fúngica, se puede predecir a partir del número de árboles presentes y la cobertura que estos brindan al sitio.

#### 3.5.1.1. *Sustrato de emergencia*

El sustrato donde emergió el hongo se componía básicamente de hojas de bambú y madera en descomposición; base de tallos de bambú, macollos de pastos en descomposición y sobre un trozo podrido de jonote. Díaz (2002) también describe a la especie creciendo en la base de los árboles, entre la hojarasca o sobre madera en descomposición. Noordeloos (1992<sup>a</sup>), citado por Montañez (2013), hace referencia al género *Entoloma* como saprótrofos, por lo que obtienen sus nutrientes de la descomposición de materia orgánica muerta. De acuerdo con la investigación realizada por Montañez (2013) relativo al estudio taxonómico del género *Entoloma*, el sustrato donde crece la mayoría de las especies de este género son terrícolas o húmicas y algunas crecen sobre madera en descomposición. Lo mismo observaron Watling (1974) y Huffman et al. (2008) los hongos presentes en el suelo, humus o troncos en descomposición o madera podrida en los bosques de hoja caduca.

Los resultados de las determinaciones del análisis químico realizado a los sustratos de emergencia del hongo se presentan en los Cuadros 2 y 3. Dados estos resultados y a la literatura consultada, no se encontraron reportes de

requerimientos de sustrato para *Entoloma* y muy escasos para la producción de especies de *Pleurotus*.

Cuadro 2. Propiedades químicas del sustrato de emergencia del sitio dos de *Entoloma abortivum*.

	MO	Ca	Mg	K	Zn	Cu	Mn	Fe	B	S	P-Olsen
	%	me/100g			ppm						
1	9.52	5.28	0.88	1.28	1.65	0.09	4.29	28.98	1.97	30.00	0.00
2	15.45	7.78	1.81	1.27	11.34	0.72	54.98	110.88	2.22	39.71	0.84
3	13.98	26.95	2.42	1.47	12.40	0.48	70.21	79.34	2.06	8.33	0.56
4	15.00	4.12	1.89	1.49	17.33	1.79	101.45	26.91		14.10	20.79
5	9.42	3.51	1.90	0.83	6.41	0.80	17.34	104.83	3.14	9.74	7.02
$\bar{X}$	12.67	9.53	1.78	1.27	9.83	0.78	49.65	70.19	2.35	20.38	5.84
$\sigma^2$	2.66	8.83	0.50	0.25	5.38	0.57	35.32	36.09	1.14	12.36	7.91

$^2N=10$

Cuadro 3. Propiedades químicas del sustrato de emergencia del sitio tres de *Entoloma abortivum*.

	MO	Ca	Mg	K	Zn	Cu	Mn	Fe	B	S	P-Olsen
	%	me/100g			ppm						
6	9.18	2.53	1.59	1.77	3.01	0.44	5.69	106.46	2.32	10.00	5.34
7	7.89	1.57	1.51	1.24	2.27	0.24	3.98	105.70	3.21	26.86	0.56
8	11.26	2.40	1.13	0.55	2.28	0.31	4.65	109.30	1.90	6.73	5.62
9	7.18	24.15	1.95	1.50	1.95	0.30	9.26	149.03	1.46	10.00	1.69
10	9.56	2.95	1.22	1.29	1.78	0.47	7.98	124.94	1.65	9.04	3.09
$\bar{X}$	9.01	6.72	1.48	1.27	2.26	0.35	6.31	119.09	2.11	12.53	3.26
$\sigma$	1.41	8.73	0.29	0.41	0.42	0.09	2.00	16.57	0.63	7.27	2.27

$^2N=10$

La mayoría de los estudios que evalúan diferentes fórmulas de sustratos para la producción de especies de *Pleurotus* sp., se basan escasamente en las variables pH, contenido de humedad, proteína, nitrógeno total, relación C/N (Sözbir, Bektas, & Zülkadir, 2015); otros estudios incluyen además P y K para el mismo género (Varnero, Quiroz, & Álvarez, 2010; Olfati & Peyvast, 2008). En estudios más detallados sobre la evaluación de sustratos en la producción de *Pleurotus ostreatus* y *P. cystidiosus*, indican que el período de colonización total,

características de los cuerpos de fructificación, rendimiento, eficiencia biológica, composición nutricional y contenido mineral, están determinados por las características químicas del sustrato (Ha, Chun-Li, & Chong-Ho, 2015; Yehia, 2012).

Dado que el cultivo de hongos es un proceso multifactorial Krupodorova y Barshteyn (2015) la utilidad de los datos presentados sobre las características químicas del medio natural donde desarrolla *Entoloma*, deben considerarse en la preparación de sustratos una vez que sea posible su reproducción, ya que estos factores son únicos para cada especie de hongo.

### 3.5.2. Periodo de emergencia de *Entoloma abortivum* y requerimientos climáticos

Los promedios de los datos registrados de temperatura y humedad relativa ambiental durante los períodos de monitoreo de emergencia del hongo, indican que sus requerimientos son de 15.8°C a 17.5°C y humedad relativa de 64 a 67%. En el caso del sustrato, para emerger, el hongo necesita de condiciones de temperatura de 08 a 13°C y un pH ácido de 5 a 5.5. En las Figuras 11 y 12, se presentan los gráficos de temperatura registrados con el Datalogger y el periodo de emergencia de hongos en los sitios de emergencia donde se realizó la colecta, durante los dos periodos de monitoreo. En los gráficos se puede apreciar los requerimientos de descenso de temperaturas que la especie demanda para poder emerger.

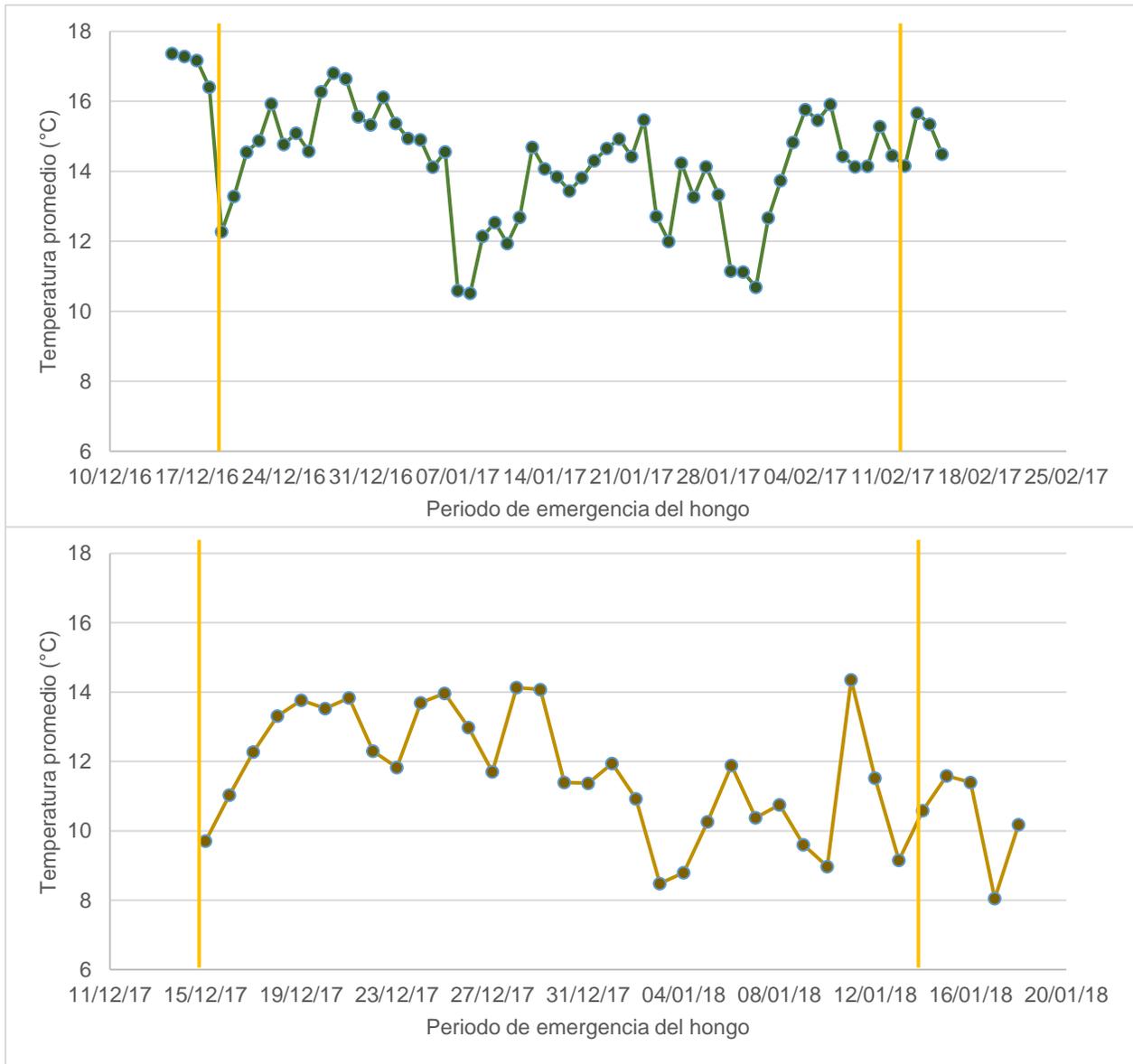


Figura 11. Periodo de emergencia y temperatura en el sustrato de *Entoloma* en el sitio dos.



Figura 12. Periodo de emergencia y temperaturas en el sustrato de *Entoloma* en el sitio tres.

La forma de crecimiento observado de la especie es cespitosa, los cuerpos fructíferos se desarrollan juntos pero no fusionados; y forma gregaria, los hongos se encontraban próximos entre sí y poco esparcidos en un área pequeña. Lo anterior coincide con lo indicado por los autores Huffman et al. (2008) y Watling (1974) que la especie crece con frecuencia agrupados en la base de árboles en hábitats húmedos, a menudo en forma cespitosa en grupos gregarios.

Como indican Lindner, Volk, y Burdsall, (2001) se observaron en los sitios dos formas de ocurrencia del hongo, la mayoría de los cuerpos fructíferos en forma de un carpóforo blanco ("abortado") que le falta formar bien las branquias y la forma de un cuerpo fructífero agaricoide típico con un estípote.

### 3.5.3. Caracterización taxonómica y molecular del hongo *Totolcozcatl*

Es necesario recalcar que aún no se puede dar algún resultado concreta en cuanto a la especie, pues no se logró obtener las dos formas de ocurrencia de la especie. Para la continuación de esta primera parte de la caracterización molecular se concluirá cuando se puedan analizar las dos formas de *Entoloma* y si es posible de la especie de *Armillariella* con la que comparten el proceso de parasitismo. En cuanto se tenga las secuencias resultantes se compararan en el GenBank, mediante una búsqueda BLAST. Las muestras se caracterizaran de acuerdo con la máxima identidad presentada por los registros del GenBank. Además cada secuencia se comparará con las tres secuencias más afines para reconstruir, mediante métodos bayesianos, el árbol filogenético de los hongos del género *Entoloma*.

### 3.6. Conclusiones

Dadas las condiciones climáticas registradas, el periodo de emergencia de "totolcozcatl" comprendió del 19 de diciembre 2016 al 12 de febrero 2017 para el primer registro y del 15 de diciembre 2017 al 14 de enero 2018, para el segundo periodo, cuando ocurrieron descensos de temperatura ambiental inferiores de entre 15.8 a 17.5 °C y en el sustrato de 8 a 13 °C y la humedad relativa ambiental

alta de un promedio entre 64 a 67%, así como en condiciones de acidez en el sustrato.

La especie requiere sitios con porcentaje de sombra de casi el 100%, y por tanto hábitats con alta humedad (60-70%) son propicios para el desarrollo de esta especie de hongo.

Materiales derivados de la base del tallo de bambú así como su hojarasca, además de los macollos de pastos en descomposición y trozos podridos de jonote, son biomasa capaz de promover el posible desarrollo del hongo para su restauración.

Es necesario contar con las dos formas de ocurrencia del hongo *Totalcozcatl* para su identificación taxonómica y sistemática, para fines de esta investigación la especie estudiada se considera como *Entoloma abortivum* por la coincidencia en las características que otros autores en la revisión de literatura, que han descrito a la especie.

### 3.7. Literatura citada

- Arteaga, M. B., & Moreno, Z. C. (2006). Los hongos comestibles silvestres de Santa Catarina del Monte, Estado de México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 12(2), 125-131.
- Díaz, B. H. (2002). Hongos macromicetos comestibles, venenosos, medicinales y destructores de la madera, de la Reserva de la Biósfera de la mariposa monarca, Sierra Chincua, Michoacán, México. Fundación Produce, Michoacán, A. C. Comisión Forestal del Estado de Michoacán (COFOM). Morelia, Mich. México.
- Durston, J., & Miranda, F. (compiladores). (2002). Experiencias y metodología de la investigación participativa. CEPAL-SERIE Políticas sociales. Santiago de Chile.
- Ha, T. H., Chun-Li, W., & Chong-Ho, W. (2015). The Effects of Different Substrates on the Growth, Yield, and Nutritional Composition of Two Oyster Mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*). *Mycobiology*, 43(4), 423-434.
- Herrera, T., Pérez-Silva, E., & Valenzuela, V. H. (2006). Nueva contribución al conocimiento de los macromicetos de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, D.F., México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 77, 51-57.
- Huffman, D. M., Tiffany, L. H., Knaphus, G., & Healy, R. A. (2008). *Mushrooms and Other Fungi of the Midcontinental United States*. Second Edition. University of Iowa Press, Iowa City.
- Krupodorova, T.A., & Barshteyn, V.Y. (2015). Alternative substrates for higher mushrooms mycelia cultivation. *J. BioSci. Biotechnol*, 4(3), 339-347.
- Lindner, C. D.L., Volk, T. J., & Burdsall, H. H. Jr. (2001). Field observations and inoculation experiments to determine the nature of the carpophoroids associated with *Entoloma abortivum* and *Armillaria*. *Mycologia*. The Mycological Society of America, 93, 841-851.
- López, A. R.L. (2013). Implementación de un modelo integral de intervención agroforestal en Xaltepuxtla, Puebla. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Edo. de México, México.
- Lorenzana, F. A. (2008). Caracterización de microhábitats de hongos comestibles ectomicorrízicos en bosques de pino, oyamel y encino en los Parques Nacionales Ixta-Popo y Zoquiapan. Tesis de Maestría, Colegio de Postgraduados, Texcoco, Edo. de México, México.
- Montañez, D. A.D. (2013). Estudio taxonómico del género *Entoloma* s.l. (Fungi, Agaricales) en Jalisco. Tesis de Maestría, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara, México.

- Olfati, J. A., & Peyvast, Gh. (2008). Lawn Clippings for Cultivation of Oyster Mushroom. *International Journal of Vegetable Science*, 14(2), 98-2013.
- Ruiz, M. S. (2016). Calidad del suelo en sistemas de producción tradicionales y con tecnologías agroforestales en Xaltepuxtla, Puebla. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Edo. de México, México.
- Ruiz-Moreno, S., Álvarez-Sánchez, M.E., Gómez-Díaz, J.D., & Cuevas- Sánchez, J. S. (2016). Sistemas productivos de ornamentales típicos de Xaltepuxtla, Puebla. In J. J. Magdaleno-Villar, J. Martínez-Solís, N. Magaña-Lira, & M. López-Rojo (Eds.), *Memoria del IV Congreso Internacional y XVIII Congreso Nacional de Ciencias Agronómicas*. Universidad Autónoma Chapingo, Edo. de México, México.
- Sözbir, G. D., Bektas, İ., & Zülkadir, A. (2015). Lignocellulosic Wastes Used for the Cultivation of *Pleurotus ostreatus* Mushrooms: Effects on Productivity. "Mushroom cultivation media," *BioResources*, 10(3), 4686-4693.
- Varnero, T. M., Quiroz, S. M., & Álvarez, H. C. (2010). Utilización de Residuos Forestales Lignocelulósicos para Producción del Hongo Ostra (*Pleurotus ostreatus*). *Información Tecnológica*, 21(2), 13-20.
- Velasco, B. E., Zamora-Martínez, M. C., Nieto de Pascual, P. C., Martínez-Valdez, J. I., & Montoya, A. (2010). Modelos predictivos de la producción de hongos silvestres comestibles en bosques de coníferas, Tlaxcala, México. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 1(1), 95-104.
- Villanueva-Jiménez, E., Villegas-Ríos, M., Cifuentes-Blanco, J., & León-Avenidaño, H. (2006). Diversidad del género *Amanita* en dos áreas con diferente condición silvícola en Ixtlán de Juárez, Oaxaca, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 77, 17-22.
- Yehia, R. S. (2012). Nutritional value and biomass yield of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* cultivated on different wastes in Egypt. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 11, 9-14.
- Watling, R. (1974). Dimorphism in *Entoloma abortivum*. *Travaux Mycologiques*. Numéro spécial du Bolletín de la Société Linnéenne de Lyon 43, 450-470.

### 3.8. Anexos

#### ENCUESTA ETNOMICOLÓGICA DE RECOLECTA DEL HONGO SILVESTRE COMESTIBLE TOTOL

##### **Identificación**

¿Cómo reconoce al hongo “totolcozcatl”?

¿Cómo aprendió a coleccionar y a distinguir el hongo?

¿Cuál es la forma que tiene el hongo (estructura morfológica)?

##### **Parámetros ecológicos**

###### **Abundancia**

¿Encuentra muchos hongos en los sitios de colecta?

¿Cuántos ejemplares colecciona por sitio?

###### **Distribución**

¿Se encuentra lejos un sitio de colecta de otro?

¿Cuántos sitios de colecta ha identificado?

###### **Fenología**

¿Cuándo salen los hongos?

¿En qué meses o temporadas? En qué periodo emerge y cuándo ya se puede coleccionar

###### **Ecología**

¿Dónde ha visto que salen los hongos? De la tierra, sobre los árboles, hojarasca, madera descompuesta

¿Salen de los árboles cuando están vivos o cuando están tirados, cuando se queman?

¿Por qué salen los hongos? ¿Se pueden sembrar?

¿Salen cerca de las milpas, de los potreros, o dentro del bosque?

¿Qué plantas se relacionan con el hongo (tipo de vegetación asociada)?

### ***Factores de perturbación***

¿Algún animal se come el hongo?

### ***Aspectos de aprovechamiento***

#### **Uso de los hongos**

¿Los consume la familia o es para venta?

¿Además de comerlos utiliza los hongos para alguna otra cosa?

#### **Preservación**

¿Corta toda la pieza o deja la raíz o semilla?

¿Vuelven a salir hongos de donde colectó el año anterior?

¿Realiza alguna actividad de mantenimiento en los sitios de colecta?

#### **Proceso de recolección**

¿Cómo hace la colecta?

¿Con qué corta el hongo?

¿Qué parte del hongo aprovecha?

¿Cuándo el hongo ya se puede aprovechar? Cambio de coloración, tamaño

#### **Proceso de venta**

¿Dónde lo vende?

¿Cómo realiza el transporte de los hongos?

¿Existe alguna manera de acomodarlo para que no se maltrate?

La forma de cocinar el hongo, consumida por la familia,

#### **Observaciones**

¿Estaría dispuesta hacer alguna práctica que fomente su crecimiento?

La forma correcta de cortar, ¿estaría dispuesto(a) realizar actividades para mantener su emergencia?

¿Estaría dispuesto(a) colaborar para la preservación de la especie, o en reproducirlo para que puede seguir siendo una fuente de aprovechamiento para ustedes?

¿Quiénes son los principales compradores del hongo?

## 4. AISLAMIENTO Y REINTRODUCCIÓN DEL HONGO "TOTOLCOZCATL" [*Entoloma abortivum* (BERK. & CURTIS) DONK, BASIDIOMYCOTINA]<sup>5</sup>

### 4.1. Resumen

En México, la degradación de sus boques ha perturbado el medio ecológico y sociocultural inmerso a ellos. Los hongos silvestres comestibles constituyen una gran riqueza biocultural de los ecosistemas forestales, pero su creciente demanda de extracción, los coloca en la escala de especies amenazadas. Dado que representan un recurso alimenticio y económico para los productores de escasos recursos, resulta oportuno desarrollar tecnologías que permitan el aprovechamiento adecuado y la conservación de la diversidad de estas especies. Con la finalidad de estudiar la metodología más adecuada para el cultivo y conservación del hongo silvestre comestible *Entoloma abortivum* (Berk & curtis), conocido como "Totolcozcatl" en relictos de bosque mesófilo de montaña en Xaltepuxtla, Puebla, en la presente investigación se evaluó el aislamiento y cultivo del hongo por el método de contexto, debido a la deformación que caracteriza a la especie; también se evaluó la velocidad de crecimiento micelial, a partir de la cepa obtenida en el aislamiento derivado de esporomas colectados en su hábitat natural. Las cepas se evaluaron en tres medios de cultivo (MYPA: Extracto de malta-Extracto de levadura-Polipeptona-Agar; CYM: Peptona de carne-Dextrosa-Extracto de levadura-Agar bacteriológico; EMS: Extracto de malta- Salvado). La especie desarrolló en los tres medios a temperatura ambiente en condiciones de laboratorio, sin embargo, el mejor desarrollo micelial se consiguió en el medio de cultivo EMS. A partir de éste, se produjo inóculo primario en semilla de sorgo, en la que se observó buena adaptación por la densidad de micelio y grano cubierto. Este inóculo se llevó a campo para su reintroducción en los sitios más adecuados para su desarrollo, seleccionados en conjunto con las recolectoras de hongos.

**Palabras clave:** hongos silvestres comestibles, conservación, totalcozcatl, aislamiento por contexto, medios de cultivo.

---

<sup>5</sup> Tesis de Maestría en Ciencias en Agroforestería para el Desarrollo Sostenible, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Natalia Mateo Guzmán

Director de tesis: Dra. María Edna Álvarez Sánchez

## ISOLATION AND REINTRODUCTION OF THE FUNGUS "TOTOLCOZCATL"

[*Entoloma abortivum* (BERK. & CURTIS) DONK, BASIDIOMYCOTINA]<sup>6</sup>

### 4.2. Abstract

In Mexico, the degradation of its forests has disrupted the ecological and sociocultural environment immersed in them. Edible wild mushrooms are a great biocultural wealth of forest ecosystems, but their growing demand for extraction places them on the scale of threatened species. Since they represent a nutritional and economic resource for producers of scarce resources, it is opportune to develop technologies that allow the adequate use and conservation of the diversity of these species. In order to study the most appropriate methodology for the cultivation and conservation of the edible wild mushroom *Entoloma abortivum* (Berk & curtis), known as "Totolcozcatl" in mountain mesophyll forest relics in Xaltepuxtla, Puebla, the present investigation evaluated the isolation and cultivation of the fungus by the context method, due to the deformation that characterizes the species; the speed of mycelial growth was also evaluated, from the strain obtained in the isolation derived from sporomes collected in their natural habitat. The strains were evaluated in three culture media (MYPA: Malt Extract-Yeast Extract-Polypeptone-Agar, CYM: Meat Peptone-Dextrose-Yeast Extract-Bacteriological Agar, EMS: Malt Extract-Bran). The species developed in the three media at room temperature under laboratory conditions; however, the best mycelial development was achieved in the EMS culture medium. From this, primary inoculum was produced in sorghum seed, in which good adaptation was observed due to the density of mycelium and covered grain. This inoculum was taken to the field for its reintroduction in the most suitable sites for its development, selected in conjunction with the mushroom collectors.

**Keywords:** wild edible fungi, conservation, totalcozcatl, isolation by context, culture media.

---

<sup>6</sup> Thesis Master's Degree in Agroforestry for Sustainable Development, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Natalia Mateo Guzmán

Thesis advisor: Dra. María Edna Álvarez Sánchez

### 4.3. Introducción

Los hongos silvestres son componentes funcionales esenciales de los ecosistemas forestales y proporcionan directamente a los seres humanos productos valiosos. Sin embargo, la sobreexplotación de este recurso ha provocado consecuencias en la distribución y abundancia en los ecosistemas naturales (Pilz, Molina, Amaranthus, Castellano, & Weber, 1996). Alvarado-Castillo, Mata, y Benítez-Badillo, (2015) indican que la creciente demanda de los hongos, ya sea por sus propiedades gastronómicas y nutraceuticas aumenta la probabilidad de sobreexplotación o extinción de distintas especies, en especial aquellas tradicionales y más conocidas. También se provocan alteraciones en la biodiversidad, por la perturbación excesiva de las áreas de recolección. Por ello Alvarado (2011) menciona que solo se pueden plantear dos posibles opciones para el aprovechamiento racional de este recurso y su conservación: 1) El manejo y gestión de las poblaciones naturales y 2) El desarrollo de técnicas para su domesticación y producción comercial.

Actualmente, la producción de hongos en México ofrece notables ventajas sociales, económicas y ecológicas. Se estima que la producción comercial en fresco es de aproximadamente 28, 895 toneladas anuales. Nuestro país es el mayor productor de Latinoamérica ya que contribuye con alrededor del 57% de la producción total y se ubica como el 18° productor a nivel mundial, actividad que genera alrededor de 15 mil empleos directos e indirectos (Martínez-Carrera & López-Martínez de Alva, 2010). El cultivo de hongos silvestres comestibles ha venido tomando impulso a nivel global desde mediados del siglo pasado y es predecible que siga con esta tendencia por varias razones, dentro de las cuales se pueden citar: el incremento de la población, el incremento en la demanda, el incremento en el ingreso promedio de las personas, la diversificación de los hongos producidos, las nuevas aplicaciones de los hongos en el campo de la alimentación y la medicina, el atractivo como actividad económica, etc., (Sánchez & Mata, 2012).

Para el cultivo comercial de hongos silvestres comestibles es necesario identificar las especies prevaletentes en la región y determinar los factores que influyen en su desarrollo y crecimiento (Ríos & Ruiz, 1993). La técnica a emplear dependerá de la especie, sin embargo, en todos los casos las fases son: obtención del micelio, elaboración de inóculo, preparación del sustrato, inoculación del sustrato, incubación y fructificación. La *obtención del micelio* es la etapa más delicada del proceso, en este caso es necesario contar con un laboratorio equipado, que sea posible desinfectar y de acceso restringido para evitar contaminantes. También es necesario tener un ejemplar del hongo objetivo en excelentes condiciones de crecimiento y sanidad, para obtener un micelio de calidad. El proceso de obtención de micelio se basa en que los hongos pueden multiplicarse de manera asexual a partir de un trozo del carpóforo y con ello volver a recrear el ciclo completo del hongo, asegurando las características fenotípicas y productivas del espécimen del cual provino. En esta etapa, el micelio del hongo se obtiene depositando un fragmento del carpóforo dentro de tubos de ensayo que contiene un medio de cultivo apropiado, PDA (Papa, dextrosa y agar) por ejemplo. El cultivo puro de la cepa se obtendrá luego de repetidas transferencias del micelio a cajas Petri con medio de cultivo fresco (Ardón, 2007).

La obtención del micelio puede hacerse con base en el cultivo de basidiosporas (esporada) y de tejido (contexto) (Ríos & Ruiz, 1993). Para aislar esporas se limpia al hongo recolectado, luego se coloca en una placa Petri dispuesto el himenio hacia la placa. De ocho a diez horas se nota en el fondo de la placa una esporada en forma de polvillo blanco. Las esporas, diluidas en hipoclorito de sodio y esporas diluidas únicamente en agua, se inoculan con una gota de dilución en el medio de cultivo. En el cultivo de tejidos, se procede a lavar el hongo cuidadosamente en agua corriente, enseguida se corta en pequeños fragmentos del cuerpo fructificante y éstos se sumergen en una solución de hipoclorito de sodio y luego se siembran en caja Petri conteniendo medio de cultivo. Posteriormente se hace la purificación de las cepas (micelio), esto se consigue transfiriendo, semanalmente, discos miceliales del borde de la colonia hacia otros medios de cultivo. Ardón (2007) indica que las cepas de todos los

hongos generalmente se comportan de diferente manera en cada medio de cultivo. De un medio a otro puede variar su morfología, su color, su tasa de crecimiento, etc. Por lo mismo, cuando se recibe una cepa nueva, se deben hacer ciertos estudios básicos de caracterización micelial y de conservación para saber cómo se comporta en cada medio y cuál es el método de conservación que mejor se adapta a ella. Los medios de cultivo corresponden a un conjunto de sustancias que garantizan a un microorganismo los nutrientes necesarios para su conservación, crecimiento y desarrollo. Contienen una base mineral (Ca, Mg, etc), fuente de carbono, nitrógeno y los requerimientos físico-químicos adecuados dependiendo del tipo de microorganismo a desarrollar (Silva, Fritz, Cubillos, & Díaz, 2010)

La *elaboración del inóculo*, esta etapa también debe llevarse a cabo en condiciones de asepsia. Es necesaria para simplificar la siembra del micelio o inoculación del substrato definitivo en donde crecerá y fructificará el hongo. El inóculo o "semilla" lo constituye un substrato intermedio que contiene micelio secundario del hongo, con características ideales para su multiplicación, provocar infección y colonización del substrato definitivo. Como substratos intermedios se pueden utilizar: sorgo, trigo o aserrín hidratado de árboles latifoliados, dependiendo del tipo de hongo. La semilla madre se obtiene depositando fracciones del cultivo puro de la cepa obtenido en la fase anterior, sobre el substrato intermedio. De este modo se tendrá suficiente cantidad de substrato intermedio impregnado con el micelio para infectar cantidades proporcionalmente mayores del mismo (Ardón, 2007).

Los hongos saprófitos o saprobios viven sobre materia orgánica en descomposición, es decir, restos orgánicos de la descomposición de plantas y animales que contiene el suelo, partes muertas de la madera de un árbol, excrementos de animales. Este grupo es muy importante en los ciclos de la mayoría de los macroelementos y sustancias indispensables para la vida. Sólo este tipo de hongos y algunas micorrizas pueden ser cultivados bajo ambiente controlado, ya que al ser independientes de otros seres vivos sólo basta

desarrollar un sustrato lignocelulósico determinado y entregar las condiciones de temperatura, ventilación, humedad y luz adecuadas para lograr que estos hongos crezcan y fructifiquen (Silva et al., 2010).

El estado de Puebla es rico en biodiversidad fúngica (Pérez-López, Mata, Aragón, Jiménez, & Romero-Arenas, 2015). En dicha entidad, el hongo “Totolcozcatl” se distribuye en la Sierra Norte, se considera de importancia económica y alimenticia y se le describe como especie saprófita, es por ello que puede tener mayor facilidad para su aislamiento y reproducción en laboratorio. Con el fin de probar este planteamiento, el objetivo de esta investigación fue aislar vegetativamente, en diferentes medios de cultivo, cepas de *Entoloma abortivum*; e identificar el medio más adecuado para el cultivo *in vitro* y producción de inóculo primario para su posterior reintroducción a campo, planteado como un eje fundamental para la conservación de este recurso.

### 3.9. Materiales y métodos

#### 3.9.1. Colecta y desinfección del material

La colecta del hongo se realizó durante el periodo de emergencia de los mismos, ya descrito en el capítulo anterior. Al momento de coleccionar el hongo se realizó de manera que se sustrajera el cuerpo completo. Los ejemplares se colocaron envueltos en papel aluminio dentro de una hielera, para transportarlos lo inmediato posible al laboratorio y realizar los aislamientos con material fresco. (Figura 13).



Figura 13. Ejemplares colectados del hongo “Totolcozcatl.

### 3.9.1.1. Selección y desinfección de los hongos

En el laboratorio se seleccionaron los hongos que se encontraban en buen estado, es decir, completos y sanos, sin aberturas ni cortes para procurar la menor contaminación posible. Una vez seleccionados los ejemplares con los que se trabajó, se procedió a desinfectarlos, frotando la superficie del hongo con algodón remojado en 10 ml de agua destilada con 5 g de detergente disuelto, la segunda limpieza fue con una solución de cloro al 10 % y por último se limpiaron con una solución al 0.2 % de antibiótico gentamicina de uso veterinario (Figura 14). También se desinfectó la cámara de flujo laminar, lugar donde se realizaron los aislamientos.



Figura 14. Hongos desinfectados, listos para aislamientos. a) *Entoloma* forma abortada; b) *Entoloma* forma agaricoide típico con un estípite.

### 3.9.2. Obtención de micelio

Se trabajó con los medios de cultivo MYPA, CYM y EMS, los ingredientes para cada medio se proporcionan en el apartado de anexos de este capítulo, estas formulaciones son la que se utilizan en el Laboratorio de Hongos Silvestres Comestibles. En el proceso de obtención de la semilla hasta la inoculación se siguió el proceso que sugieren (Ardón, 2007; Silva et al., 2010).

### 3.9.2.1. *Aislamiento por contexto*

Los aislamientos solo se realizaron siguiendo el método por contexto, se pretendía utilizar también el método por esporada, pero por la forma cerrada de los cuerpos fructíferos no se pudo obtener espora. Es por ello que solamente se trabajó bajo el método que se describe a continuación.

Para el aislamiento se emplearon dos mecheros de alcohol; cajas plásticas de Petri estériles de 9 cm de diámetro conteniendo medio de cultivo, previamente preparados; bisturí, espátulas, pinzas, alcohol etílico al 96% y toallas sanitas. Se trabajó entre los mecheros encendidos. En una caja Petri vacía se colocó un hongo y se le aplicó alcohol con atomizador para asegurar que estuviera libre de agentes contaminantes, con el apoyo del bisturí se procedió a cortar trozos de 5 mm aproximadamente de la parte interna del hongo, donde no estuvo expuesto a contaminación (Figura 15). Es necesario mencionar que se flameó el bisturí y la espátula en cada movimiento de corte que se hizo, esto es importante para evitar contaminaciones. Se colocaron de 4 a 6 trozos distribuidos en la caja Petri. Cada caja Petri una vez inoculada, se rotuló y selló con parafilm para evitar contaminaciones. Posteriormente se colocaron en la incubadora a 25°C, para promover su crecimiento y efectuar su purificación. Previamente se desinfectó la incubadora con cloro y alcohol.

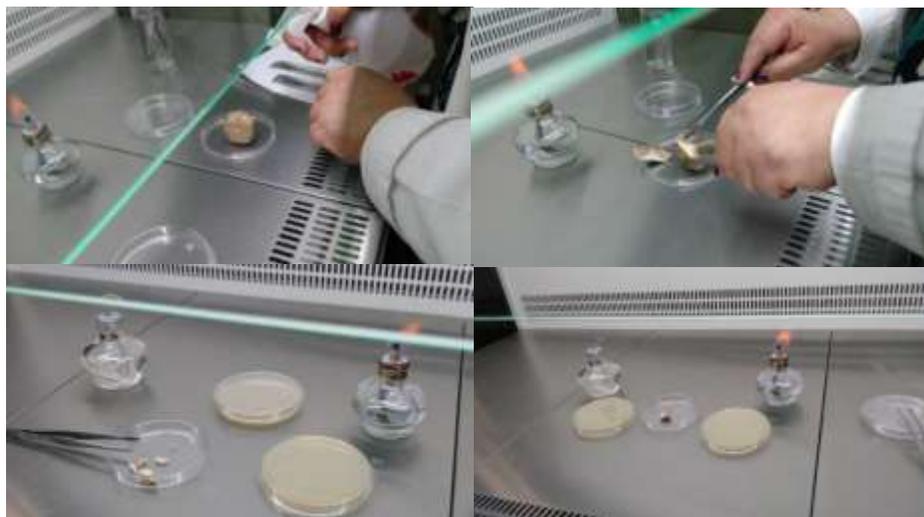


Figura 15. Proceso de aislamiento por contexto de los hongos colectados.

### *3.9.2.2. Proceso de purificación*

Para el proceso de purificación se realizó con los mismos medios de cultivo empleados durante el aislamiento, bajo las mismas condiciones de asepsia que se tuvo al momento de aislar. Esta purificación se logró a través de una secuencia de trasposos de micelio puro a otra caja Petri, para ello se cortaron segmentos de 1 cm x 1 cm del medio de cultivo con micelio desarrollado y se colocaron de 3 a 4 segmentos en otra caja Petri con medio. Entre cada traspaso se promovió el crecimiento micelial en la incubadora, hasta la obtención de una cepa pura. Refiriendo como cepa pura la invasión del micelio a toda la caja Petri sin presentar algún tipo de contaminación, bien sea de otro hongo o algunas bacterias. Una vez obtenidas las cepas puras, se sometieron a refrigeración para conservarlas hasta ser utilizadas en el proceso de siembra.

### *3.9.2.3. Pruebas de crecimiento de micelio en medios de cultivo*

De las cepas que se obtuvieron del aislamiento por contexto (vegetativo) en medio (CYM), se sembraron en tres medios de cultivo, con el fin de comparar el crecimiento en cada uno y definir el medio al que mejor se adapta y crece el micelio de "Totolcozcatl". Se aplicó un diseño completamente al azar (3 x 5) con 3 tratamientos (medios de cultivo T1: MYPA, T2: CYM y T3: EMS) y 5 réplicas por cada tratamiento. Los datos registrados se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA-MR) de medias repetidas y comparación de medias.

En las pruebas de crecimiento se utilizaron cajas Petri de 9 cm de diámetro contenidas con los medios de cultivo indicados. Cabe mencionar que se inocularon más de cinco cajas por medio, esto por la incertidumbre de alguna contaminación, al final solamente se escogieron los cinco con mejor apariencia y ausencia de contaminante, para una mejor evaluación. El método que se siguió para la inoculación de los medios es el siguiente:

Se tomó una fracción de cepa de forma circular de aproximadamente 0.5 cm y se colocó en el centro de la caja Petri, se procedió a sellar la caja con parafilm y etiquetar con el nombre del medio y la fecha de inoculación. Esto se hizo con cada una de las cajas, hasta concluir. Finalmente se colocaron a temperatura ambiente y se midió el diámetro de crecimiento micelial con ayuda de un vernier cada dos días. La velocidad de crecimiento se calculó mediante la siguiente fórmula planteada por Huerta, Martínez-Carrera, Sánchez, y Leal-Lara (2009):

$$VC = (Df - Di) / (Tf - Ti)$$

Donde:

VC: velocidad de crecimiento

Df: Diámetro final de crecimiento

Di: Diámetro inicial de crecimiento

Tf - Ti = Días de crecimiento micelial

#### *3.9.2.4. Inoculación en grano de sorgo*

Con las sepas puras se procedió a trabajar para pasar el micelio a semilla de sorgo. A continuación se describe el procedimiento para la preparación de 6 kilogramos de grano: lavarlo con agua de la llave, dándole tres enjuagadas o hasta que deje de flotar el sobrenadante, se debe mover hasta lo más profundo del contenedor en el que se lave para que flote toda la semilla vana y la basura que contenga. Posteriormente se escurrió un poco para después dejarlo remojando por 24 horas con agua a 60°C en el momento de adicionarla. También se le agregó 20 gramos de bicarbonato de sodio por litro de agua. Al siguiente día se escurrió la semilla y se secó con una franela desinfectada para retirar el exceso de agua contenido en el grano. Al grano todavía húmedo, por cada kilo de grano se le agregó: 10 gramos de salvado de trigo, 20 gramos de yeso, 5 gramos de cal, 1.5 gramos de sulfato de cobre, 10 gramos de vermiculita (en peso seco). Se mezcló bien la semilla para que se incorporara todo lo agregado,

después se vació en bolsas de plástico, cada embolsado fue de 250 gramos, obteniendo un total de 24 bolsas, con los embolsados se procedió a esterilizarlos en autoclave a 120°C por hora y media (Figura 16).



Figura 16. Proceso de preparación del grano de sorgo.

Se dejaron enfriar las bolsas dentro del autoclave y al siguiente día se hizo la siembra de micelio (inoculación de la semilla), en la cámara de flujo laminar previamente desinfectada. Se trabajó entre los mecheros encendidos, con el bisturí y espátulas desinfectadas, flameando los instrumentos de trabajo en cada movimiento de corte y traspaso de caja a bolsa. Para la siembra se cortó en trozos el micelio contenido en la caja Petri, los trozos fueron de 1cm x 1cm aproximadamente y se colocaron de 4 a 6 trozos por bolsa de semilla con la ayuda de la espátula. Cada bolsa se selló con ligas de hule y una vez serrados se aplicó con un atomizador, propóleo de abeja en una concentración de 3 mL por 100 mL de agua destilada; la aplicación se hizo en al área de amarre de la bolsa, con la finalidad de evitar agentes contaminantes. Terminado el trabajo se

procedió a colocar las bolsas inoculadas en la incubadora, previamente desinfectada con cloro y alcohol (Figura 17).



Figura 17. Bolsas con grano de sorgo inoculado dentro de la incubadora.

Las bolsas completamente invadidas de micelio son las que se utilizaron en la reintroducción en campo. Las bolsas que se contaminaron se desecharon y algunas lograron rescatarse inyectándoles alcohol al 96% en las secciones infectadas.

### 3.9.3. Reintroducción del hongo en bosque de niebla

Las bolsas con micelio que se obtuvieron en el procedimiento descrito anteriormente son las que se llevaron a campo para su reintroducción, siguiendo la metodología propuesta en *Criterios para la conservación de la biodiversidad en los programas de manejo forestal* por Comisión Nacional Forestal (CONAFOR, 2015).

#### 3.9.3.1. Acciones participativas

Se realizó una reunión con los propietarios del predio Ocotitla y los medieros que trabajan en los terrenos de las áreas de distribución de la especie de interés, además de las recolectoras que apoyaron desde el inicio de la investigación. Esta reunión fue con fines de establecer los objetivos de los intereses tanto de los dueños, productores, como del proyecto de investigación realizado, dichos objetivos concordaron en la conservación y restauración del hongo “Totolcozcatl”,

y con ello también, contribuir con los fines alimenticios y económicos de los productores de la finca.

### 3.9.3.2. *Delimitación de las unidades de manejo*

Las áreas donde se establecieron las parcelas para la reintroducción de la semilla del hongo fueron propuestas por los productores y las recolectoras, las cuales conocen las condiciones en las que habita el hongo. Entre estos sitios se consideraron aquellos que se monitorearon con los equipos en el capítulo de caracterización de microhábitat, tanto en los que se presentó emergencia como aquellos en los que no se registró. El único sitio sin considerar fue el cuatro del capítulo anterior, por las complicaciones para el cuidado debido a que se encuentra del otro lado del río que atraviesa el predio. Cinco fueron los sitios que se seleccionaron de acuerdo a las condiciones de vegetación y microclima del área de distribución natural de la especie. Las áreas que se agregaron son dos que se encuentran cercanos al área del silvopastoril.

El sitio uno se asignó en un área donde en años pasados se presentaba emergencia de la especie, de acuerdo con experiencias contadas de las recolectoras; es conocido por los productores como el predio de Hermelindo. Esta área de siembra es de vegetación natural asociado con cultivo ornamental de chima, desde el inicio del trabajo de monitoreo se seleccionó este sitio, pero no hubo emergencia. Los sitios dos y tres de siembra se delimitaron en el área conocida como semillero, este se encuentra contiguo al área de bambú, único sitio donde se registró la emergencia del hongo en los dos periodos de monitoreo, dichos sitios ya se describieron en el capítulo de caracterización de microhábitat. Los sitios cuatro y cinco se establecieron a orilla del sistema silvopastoril que se instauró en el predio. Estos sitios se seleccionaron por las condiciones de humedad que mantiene en todo el año, de acuerdo a las observaciones de los productores. Además de la presencia de vegetación de liquidámbar, helecho arborescente y arbustivo, así como álamo (*Platanus* sp.) y una especie de pino, dichas especies proporcionan el microclima adecuado para el hongo. El sustrato

se compone de material vegetal muerto en descomposición, además de la presencia de un cuerpo de agua, que brinda humedad al sitio.

#### 3.9.3.3. *Caracterización de hábitats*

La caracterización de los sitios de siembra ya se tenía elaborado en el capítulo anterior, en la que se describen las áreas de monitoreo. Para el área cercana al sistema silvopastoril que se incluyó, se hizo una descripción general en el punto anterior. El inventario de biodiversidad no se consideró necesario realizarlo, solo se mencionan las especies presentes en los sitios.

En conjunto con los recolectores se identificaron aquellas especies a las que se debía poner atención especial y cuidado, por estar asociadas al crecimiento del hongo, de acuerdo a lo observado en campo y lo comentado por las recolectoras en la entrevista. Derivado de esto, las especies valoradas por su presencia en el hábitat natural del hongo son: *otate*, *helecho arborescente*, *liquidámbar* y *álamo*. Además del cuidado de estas especies, los participantes se comprometieron al cuidado y conservación de las áreas tanto de distribución natural, como de aquellas asignadas para la reintroducción del hongo. También se tomó el acuerdo de cuidar la limpieza de los cuerpos de agua presentes dentro del predio.

#### 3.9.3.4. *Definición de metas de conservación*

En reunión con los propietarios y medieros recolectores, se establecieron metas para la reintroducción de la especie, encaminadas a la conservación, son las que se mencionan a continuación:

- Propagación en bosque para restaurar el ecosistema
- Propagación comercial
- Convertirse en productores comerciales de hongos
- Diversificar actividades y producción para beneficios económicos
- Recibir y ser centro de capacitación y demostrativo en términos de conservación

- Realizar videos de promoción desde el comienzo del trabajo de conservación de la especie

### 3.9.3.5. *Especificación de las prácticas y prescripciones de manejo que serán aplicadas en función de las metas*

Dentro de las actividades de restauración participativa, se establecieron compromisos para el logro de los objetivos y metas de la investigación, éstas incluyeron: realizar el cercado de las áreas de siembra, como del área de distribución natural del hongo; colocación de los sensores HOBO Pro v2 para el monitoreo de las condiciones microclimáticas; colocación de letreros en español y náhuatl que indican las áreas que se destinaron a la conservación de la especie, con el fin de lograr que más personas se interesen en el tema (Figura 18); se asignaron responsables de las áreas de siembra, cuya función sería cuidar y mantener en observación los sitios para que no se extrajera el material vegetal vivo y muerto, así como de la semilla que se introdujo, y evitar que ocasionaran mayor perturbación de estos sitios; y por último hacer la siembra de la semilla de la especie.



Figura 18. Letreros en las áreas de conservación (en español y náhuatl).

#### 3.9.3.6. Programación de las acciones de conservación

Las acciones que se listaron en el punto anterior se programaron de la siguiente manera: el cercado del área lo realizaron los dueños y medieros en el mes de agosto de 2017; los letreros de las indicaciones de conservación de la especie y los sensores HOBO Pro v2 se colocaron en octubre del mismo año; la siembra de la semilla de sorgo inoculada se realizó en tres periodos dentro de los meses de octubre a noviembre; el cuidado de las áreas que se asignaron a cada responsable se mantuvo hasta la finalización del monitoreo e incluso en un periodo más a futuro por interés de los participantes.

#### 3.9.4. Diseño de tratamientos para la reintroducción del micelio

Para la introducción del micelio en campo se utilizó un diseño en parcelas divididas, en donde la parcela grande consistió en tres fechas de siembra: (13-oct-2017; 28-oct-2017; 21-nov-2017); la parcela mediana el sustrato de sorgo con micelio en dos condiciones: a) con hidrogel y sin hidrogel; y la parcela chica dos cantidades del embolsado de grano (150 y 250 gramos). Los tratamientos se distribuyeron en bloques al azar. Se estableció una parcela testigo, este fue el sitio uno, donde no se delimitó el área, solamente se distribuyeron al azar bloques de 0,5 x 0,5 m en la que se sembró sin hidrogel, sin ningún peso específico de semilla y sin riego.

Cada sitio (con superficie aproximada de 30 m<sup>2</sup>) se dividió en dos secciones: en una sección, la semilla se esparció en combinación con hidrogel y esta sección se delimitó con hilo rafia color rojo; en la otra parte del sitio, la semilla se colocó sin hidrogel. Cada sitio quedó delimitado e identificado. Dentro de cada sección se establecieron cinco bloques al azar de 0,5 m x 0,5 m y en cada bloque se asignó al azar la cantidad de semilla correspondiente cinco bolsas de 150 gramos y cinco bolsas de 200 gramos para todo el sitio, quedando en total 10 bloques por sitio de siembra (Figura 19).



Figura 19. Diagrama del diseño de siembra para cada sitio.

### 3.9.5. Siembra de micelio en campo

El procedimiento de siembra de micelio en campo se empezó desde la preparación del hidrogel, con 24 horas de anticipación al momento de la siembra, para esto se pesó 2 gramos de hidrogel y se hidrató con 600 mililitros de agua destilada, se esperó dos horas para que hidratara bien y se retiró el excedente de agua con un colador, posteriormente se vació el hidrogel en bolsas de plástico para transportarlos a campo.

En campo con ayuda de una pala, se retiró la hojarasca que cubría cada bloque de 0,5 m x 0,5 m delimitado dentro del sitio, después se distribuyó la semilla a manera que abarcara todo el bloque. La semilla que se mezcló con el hidrogel se hizo dentro de la bolsa, una vez bien mezclada se distribuyó usando guantes, esto para trabajar con la mayor asepsia posible. Posterior a la distribución de la semilla se procedió a cubrirla con la materia orgánica que se removió, y se hizo un riego para mantener la humedad lo más posible. Al término de la siembra se colocaron letreros en los bloques para marcar la cantidad de semilla que se asignó a cada bloque, como se observa en la Figura 20.



Figura 20. Proceso de siembra del hongo en campo.

Para continuar con la evaluación de los requerimientos microclimáticos del hongo, previo a la primera siembra se colocaron los sensores de temperatura y humedad en el sustrato en los sitios cinco sitios. Además, en cada sitio se registró la condición de pH, temperatura ambiental y humedad relativa durante el periodo del 13 de octubre 2017 a 14 de enero 2018, periodo tipificado como de emergencia del hongo.

### 3.10. Resultados y discusión

El mejor aislamiento se obtuvo de tejidos de basidiocarpos debidamente desinfectados, y con los cuerpos fructíferos en buen estado, sin daños por depredadores o por pudrición.

#### 3.10.1. Prueba de velocidad de crecimiento micelial

Se obtuvo la velocidad de crecimiento micelial, de acuerdo a la fórmula:  $V_c = (D_f - D_i) / (T_f - T_i)$ .

Se calculó la  $V_c$  para las cinco repeticiones que se hicieron de cada medio de cultivo. Posteriormente se obtuvo el promedio de los cinco resultados, obteniendo

así un promedio de la velocidad de crecimiento por medio. Dando como resultado que los medios de cultivo EMS (Extracto de malta-Salvado), y MYPA (Extracto de malta-Extracto de levadura-Polipeptona-Agar) fueron los más favorables para el desarrollo de la especie, respecto al medio CYM (Peptona de carne-Dextrosa-Extracto de levadura-Agar bacteriológico), sin embargo, fue el medio EMS en el que mejor se apreció crecimiento micelial, como se observa en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Promedio de crecimiento (mm) de *Entoloma* en tres medios de cultivo.

Medios	Días de medición							
	2	4	6	8	10	12	14	16
MYPA	8.50	20.80	35.00	50.40	64.80	77.00	85.25	89.00
CYM	7.40	15.30	27.40	38.90	51.90	59.90	71.10	78.80
EMS	9.30	23.00	36.20	50.60	66.00	88.30	90.00	90.00

Sin embargo, en este periodo de observación, el hongo alcanzó diámetro máximo de 9 cm en 14 días en el medio EMS. Lo anterior se relaciona con la teoría de que, bajo condiciones nutricionales favorables, los hongos incrementan la ramificación de sus hifas y, por consiguiente, la cantidad de biomasa, aumentando la eficiencia de suministro de nutrientes al incrementarse el área superficial del micelio (Harris, 2008). Contrariamente a esta aseveración, en condiciones limitantes de nutrientes, el micelio tiende a ser menos ramificado para maximizar la disponibilidad de éstos (Prosser & Tough, 1991). Los otros medios pueden considerarse como alternativos.

### 3.10.2. ANOVA de medias repetidas (ANOVA-MR) para medios de cultivo

Al factor MR se le llamó “Medio de Cultivo”, con 3 niveles (1-MYPA, 2-CYM y 3-EMS); y quedó definida como variable dependiente “Avance del micelio en mm” (Caja Petri 1. Efecto del MYPA, Caja Petri 2. Efecto del CYM y Caja Petri 3. Efecto del EMS). Con N=8, que son las 8 veces que se tomaron los datos. Se estudió el posible efecto del Medio del Cultivo sobre el Avance del Hongo. En el Cuadro 5 se presentan los datos de estadística descriptiva de los datos y en el Cuadro 6, las pruebas multivariadas del análisis realizado.

Cuadro 5. Estadística descriptiva de los datos tomados en cada medio de cultivo.

	Mean	Std. Deviation	N
MYPA	53,8438	30,22170	8
CYM	43,8375	25,98153	8
EMS	56,6750	31,94356	8

Cuadro 6. Pruebas multivariadas del crecimiento del micelio en los medios de cultivo.

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.	Partial Eta Squared
Trat	Pillai's Trace	,827	14,364	2,000	6,000	,005	,827
	Wilks' Lambda	,173	14,364	2,000	6,000	,005	,827
	Hotelling's Trace	4,788	14,364	2,000	6,000	,005	,827
	Roy's Largest Root	4,788	14,364	2,000	6,000	,005	,827

**Prueba de hipótesis:**

Ho: El efecto del factor Medio de Cultivo es igual en el avance del hongo.

H1: al menos uno de ellos es diferente.

Dado que el nivel crítico (significancia=sig) asociado a cada una de las pruebas es menor que 0.05, se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias y se concluye que el desarrollo del hongo no es igual en los diferencias medios de cultivo.

**Prueba de esfericidad de Mauchly:**

En los modelos de medidas repetidas es necesario suponer que las varianzas de las diferencias entre cada dos niveles del factor son iguales. Este supuesto equivale a afirmar que la matriz de varianzas y covarianzas es circular o esférica (Cuadro 7).

Cuadro 7. Resultados de la prueba de esfericidad de Mauchly.

Measure: milime

Within		Approx.			Epsilon		
Subjects	Mauchly's W	Chi-Square	df	Sig.	Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Lower-bound
trat	,239	8,586	2	,014	,568	,604	,500

Dado que el nivel crítico asociado al estadístico (Sig: 0.014) no es mayor que 0.05, se rechaza  $H_0$ , que es la hipótesis de esfericidad que significa que la matriz de covarianzas de error de las variables dependientes no es proporcional a una matriz identidad.

Debido a que el estadístico W llevó al rechazo de la hipótesis de esfericidad es posible optar por dos soluciones alternativas. Bien se puede basar la decisión en los estadísticos multivariados de la tabla 6 (pues no les afecta el incumplimiento del supuesto de esfericidad), o bien se puede utilizar el estadístico F univariado que ofrece la tabla siguiente aplicando un índice corrector llamado  $\epsilon$ . Este índice corrector (ver Cuadro 7) expresa el grado en que la matriz de varianzas-covarianzas se aleja de la esfericidad: en condiciones de esfericidad perfecta,  $\epsilon$  vale 1. La tabla ofrece dos estimaciones de  $\epsilon$ : Greenhouse-Geisser y Huynh-Feldt, siendo la primera de ellas algo más conservadora. Un tercer valor, Límite inferior, expresa el valor que adoptaría  $\epsilon$  en el caso de incumplimiento extremo del supuesto de esfericidad. Se puede utilizar el estadístico F univariado (Cuadro 8), en condiciones de no-esfericidad es necesario corregir los grados de libertad de F (tanto los del numerador como los del denominador) multiplicándolos por el valor estimado de  $\epsilon$ .

Cuadro 8. Prueba de efectos intra-sujetos.

Measure: milime

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
trat	Sphericity Assumed	727,846	2	363,923	21,056	,000	,750
	Greenhouse- Geisser	727,846	1,136	640,847	21,056	,002	,750
	Huynh-Feldt	727,846	1,208	602,348	21,056	,001	,750
	Lower-bound	727,846	1,000	727,846	21,056	,003	,750
Error (trat)	Sphericity Assumed	241,972	14	17,284			
	Greenhouse- Geisser	241,972	7,950	30,436			
	Huynh-Feldt	241,972	8,458	28,607			
	Lower-bound	241,972	7,000	34,567			

Después de lo anterior, se puede observar en el cuadro que los cuatro estadísticos F conducen a la misma conclusión, es decir que se rechaza la hipótesis de igualdad de medias y se concluye que el avance del hongo no es el mismo en los diferentes medios de cultivo.

*Prueba de efecto inter-sujetos*

Cuadro 9. Contraste de efectos entre medios de cultivo.

Measure: milime  
Transformed Variable: Average

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Intercept	63535,605	1	63535,605	24,682	,002	,779
Error	18019,499	7	2574,214			

En el Cuadro 9 se muestra el contraste de los efectos inter-sujetos (entre-medios de cultivo). En un diseño de un solo factor intra-sujetos el único efecto inter-sujetos es el que se refiere a la media global. El estadístico F de la tabla permite contrastar la hipótesis de que el promedio poblacional global vale 0. Puesto que el nivel crítico (Sig. = 0.002) es menor que 0.05, se puede rechazar esa hipótesis

y concluir que la media total es significativamente distinta de cero. Generalmente, este contraste carece de sentido.

### *Medias Marginales*

Se calcularon las medias marginales y se presentan en el Cuadro 10. El primer cuadro muestra la media global de los tres niveles del factor y la segunda muestra para cada uno de ellos: la media estimada, el error típico y el intervalo de confianza.

Cuadro 10. Resultados de la prueba de medias marginales.

<b>Grand Mean</b>				
Measure: milime				
Mean	Std. Error	95% Confidence Interval		
		Lower Bound	Upper Bound	
51,452	10,357	26,963	75,942	

<b>Estimates</b>				
Measure: milime				
Trat	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
1	53,844	10,685	28,578	79,110
2	43,838	9,186	22,116	65,559
3	56,675	11,294	29,970	83,380

### *Comparación de medias*

El siguiente Cuadro 11 muestra las comparaciones dos a dos entre los niveles del factor. Los niveles críticos de la tabla están ajustados mediante la corrección de Bonferroni (para controlar la tasa de error o probabilidad de cometer errores de tipo I). Observando los niveles críticos asociados a cada comparación se puede ver que únicamente existen diferencias significativas entre el tratamiento 2 con respecto 1 y 3. En tanto que 1 y 3 no tienen diferencias significativas.

Cuadro 11. Comparación de medias entre los medios de cultivo.

Measure: milime

(I) trat	(J) trat	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. <sup>b</sup>	95% Confidence Interval for Difference <sup>b</sup>	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	10,006*	1,810	,003	4,344	15,669
	3	-2,831	1,306	,201	-6,916	1,254
2	1	-10,006*	1,810	,003	-15,669	-4,344
	3	-12,838*	2,825	,008	-21,672	-4,003
3	1	2,831	1,306	,201	-1,254	6,916
	2	12,838*	2,825	,008	4,003	21,672

b. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.

La producción de inóculo se hizo a partir del micelio contenido en EMS, por presentar mayor adaptación para el desarrollo micelial en este medio.

### 3.11. Conclusiones

De acuerdo con los resultados de velocidad de crecimiento y producción de inóculo primario, tanto el medio como el grano de sorgo pueden considerarse como alternativas importantes y viables para el proceso de cultivo de la especie.

Las diferencias encontradas entre el desarrollo en medios empleados pueden estar asociadas a la composición química de los mismos. De acuerdo a lo observado, podemos asegurar que el medio EMS posee características nutritivas que favorecen el desarrollo de la especie, ya que proporciona los nutrientes como maltosa, glucosa y principalmente el salvado de trigo, el cual contiene celulosa, polisacáridos y hemicelulosa, que en el hábitat natural del hongo la celulosa está presente en la materia en descomposición.

Bajo las condiciones de evaluación, no se observó emergencia del hongo en los sitios de siembra, esto se puede deber a que el inoculo aún no encuentra las condiciones adecuadas para su desarrollo; sin embargo, se plantea la situación de poder obtener resultados tangibles en el próximo periodo de emergencia.

Los resultados obtenidos también sugieren que además de evaluar la producción de esporomas en diferentes sustratos, es necesario realizar investigaciones enfocadas al aislamiento de cepas de las dos especies que participan en el proceso para el crecimiento del hongo Totolcozcatl; para poder hacer comparaciones e inoculaciones entre ellas. Aunque el grano de sorgo presentó buena adaptación e invasión del micelio, se recomienda probar diferentes granos para producción de inóculo, también se puede modificar o controlar las variables de pH y humedad, así como agregar los elementos a los medios y a la semilla, los elementos que se encontraron en la determinación química del sustrato de crecimiento natural de la especie.

### 3.12. Literatura citada

- Alvarado-Castillo, G., Mata, G., & Benítez-Badillo, G. (2015). Importancia de la domesticación en la conservación de los hongos silvestres comestibles en México. *Bosque Hongos silvestres comestibles*, 36(2), 151-161.
- Alvarado, C. G. (2011). Aislamiento, cultivo y producción de esclerocios de *Morchella esculenta* Y *Morchella cónica*, como principio para su domesticación y producción bajo condiciones controladas. Tesis doctoral, Colegio de Postgraduados, Veracruz, México.
- Ardón, L. C. E. (2007). La producción de los hongos comestibles. Tesis Maestría, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Comisión Nacional Forestal (CONAFOR). (2015). Criterios para la conservación de la biodiversidad en los programas de manejo forestal. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), Fondo para el Medio Ambiente Mundial (Gef), Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD), Jalisco, México.
- Harris, S. D. (2008). Branching of fungal hyphae: Regulation, mechanisms and comparison with other branching systems. *Mycologia*, 100(6), 823-832.
- Huerta, G., Martínez-Carrera, D., Sánchez, J. E., & Leal-Lara, H. (2009). Grupos de intersterilidad y productividad de cepas de *Pleurotus* de regiones tropicales y subtropicales de México. *Revista Mexicana de Micología*, 30, 31-42.
- Martínez-Carrera, D., & López-Martínez de Alva, L. (2010). Historia del cultivo comercial de hongos comestibles en México II: éxitos y fracasos durante el período 1991-2009. In D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales, V. M. Mora (Eds.), *Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI*. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales, Puebla.
- Pérez-López, R., Mata, G., Aragón, G. A., Jiménez, G. D., Romero-Arenas, O. (2015). Diversidad de hongos silvestres comestibles del Cerro el Pinal, municipio de Acajete, Puebla, México. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 2(6), 277-289.
- Pilz, D., Molina, R., Amaranthus, M., Castellano, M., & Weber, N. S. (1996). Forest fungi and ecosystem management. In "Managing forest ecosystems to conserve fungus diversity and sustain wild mushroom harvests" (pp. 86-94). USDA, Forest Service. Pacific Northwest Research Station. PNW-GTR-371.
- Prosser, J. I., & Tough, A. J., (1991). Growth mechanisms and growth kinetics of filamentous microorganisms. *Critical Reviews in Biotechnology*, 10(4), 253-274.

- Ríos, R. R. A., & Ruiz, R. L. (1993). Aislamiento y cultivo del hongo comestible *pleurotus* afin *ostreatus* (jacq. ex fr) kumm en Tingo María. *Folia Amazónica*, 5, 5-14.
- Sánchez, J. E., & Mata, G. (2012). Cultivo y aprovechamiento de macromicetos. Una tendencia global en crecimiento. In J. E. Sánchez, & G. Mata (Eds.), *Hongos Comestibles y Medicinales en Iberoamérica: investigación y desarrollo en un entorno multicultural* (pp. 365-376). Tapachula, Chiapas, México.
- Silva, S. R., Fritz, F. C., Cubillos, A. J., & Díaz C. M. (2010). Manual para la producción de hongos comestibles (Shiitake). Proyecto CONAMA-FPA RM-027-2010, "Utilización de desechos de podas del arbolado urbano como sustrato para la producción de hongos comestibles (Shiitake) en la comuna de La Pintana". Santiago, Chile.

### 3.13. Anexos

#### Materiales para preparar un litro de medio

---

Medio de cultivo MYPA	
Elemento	Cantidades
Extracto de malta	20 g
Extracto de levadura	2 g
Polipeptona	1 g
Agar	20 g
*FeCl <sub>3</sub> 1%	1 ml
*CaCl <sub>2</sub> 1%	1 ml
*MnSO <sub>4</sub> 2%	1 ml
*ZnSO <sub>4</sub> 2%	1 ml

---

\*Elementos menores

#### Materiales para preparar un litro de medio

---

Medio de cultivo CYM	
Elemento	Cantidades
Peptona de Carne	2 g
Dextrosa	20 g
Extracto de levadura	2 g
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,5 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,46 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 ml
Agar bacteriológico	20 ml

---

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Fosfato de potasio monobásico

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Difosfato de potasio

