



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

**Evaluación de la toxicidad de
algunos Basidiomycetes del estado
de Jalisco sobre *Artemia franciscana***

Tesis

que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias en Biosistemática y
Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas**

Presenta

Luis Eduardo Ruiz González

DIRECTORA

Dra. Laura Guzmán Dávalos

CO-DIRECTOR

Dr. Fernando Vega Villasante

Zapopan, Jalisco

noviembre de 2014



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Evaluación de la toxicidad de algunos Basidiomycetes del estado de Jalisco sobre *Artemia franciscana*

Por

Luis Eduardo Ruiz González

Maestría en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos
Naturales y Agrícolas

Aprobado por:




Dra. Laura Guzmán Dávalos
Director de Tesis e integrante del jurado

28/oct/2014
Fecha



Dr. Fernando Vega Villasante
Co-Director de Tesis e integrante del jurado

29/oct./2014
Fecha



Dra. Olivia Rodríguez Alcántar
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

28/oct/2014
Fecha



Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba
Integrante del jurado

29/Oct-2014
Fecha



Dr. Ricardo Ramírez Romero
Integrante del jurado

28/OCT/2014
Fecha

DEDICATORIA

A mis padres
quienes han dado todo por mí...
y
a la memoria de Dolores Gallardo...

"El científico no tiene por objeto un resultado inmediato. Él no espera que sus ideas avanzadas sean fácilmente aceptadas. Su deber es sentar las bases para aquellos que están por venir, y señalar el camino"

Nikola Tesla

AGRADECIMIENTOS

A el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a la Maestría en Ciencias BIMARENA y al Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara por su apoyo a esta investigación y mi formación profesional.

A mis héroes de toda la vida, gracias Mamá y Papá, por su gran sabiduría, motivación y apoyo incondicional. A mis hermanos (Alejandro, Daniel y Gaby) por nuestra buena relación, por sus consejos, enseñanzas y ejemplo, siempre acogíendome como el hermano menor. A Madeline, por compartir su creatividad conmigo, por su gran apoyo, su paciencia, creer en mí y estar siempre presente.

A la Dra. Laura Guzmán y el Dr. Fernando Vega por todo su apoyo, dedicación, confianza, paciencia, consejos y enseñanzas durante estos años y sobre todo por su amistad. A la Dra. Olivia Rodríguez, por sus comentarios y consejos tan útiles en cada asesoría. Al Dr. Fernando Santacruz y el Dr. Ricardo Ramírez, por todas las valiosas aportaciones para mejorar este trabajo. Al Dr. Saúl Guerrero por su orientación y consejos en el desarrollo experimental. Al estudiante de Biología Juan Antonio Vázquez Zea por su valiosa ayuda en la fase experimental de este trabajo. Al Biol. Eduardo Fantí por su contribución con las fotografías de los cuerpos fructíferos. A Marcelo Camacho y María "Mary" Herrera por su apoyo, enseñanzas y aportaciones a este trabajo y especialmente por su amistad.

A los miembros del Laboratorio de Micología: Isela Álvarez y Luis Villaseñor. De igual forma a mis compañeros estudiantes, Carlos Corona, Lizeth Félix y Luis Valdivia. También a aquellos que concluyeron sus estudios en el transcurso de mi formación, Alejandra Arceo, Diego Montañez y Virginia Ramírez. Por último pero no menos importante a los miembros del Laboratorio de Acuicultura Experimental: Carolina Rodríguez, Cynthia Montoya, Manuel Alejandro Vargas y Olimpia Chong. A todos ellos, gracias por su amistad.

ÍNDICE

	<i>Pag.</i>
I. RESUMEN_____	i
II. ABSTRACT_____	ii
1. INTRODUCCIÓN_____	1
1.1. Hongos en Jalisco_____	1
1.2. Hongos comestibles_____	1
1.3. Hongos venenosos_____	2
1.4. Problemática_____	5
1.5. Organismo modelo_____	6
2. ANTECEDENTES_____	8
3. OBJETIVOS_____	10
4. MATERIALES Y MÉTODOS_____	11
4.1. Recolecta en campo de material fúngico_____	11
4.2. Determinación de las especies de macromicetes_____	11
4.3. Obtención de extractos_____	11
4.3.1. Extracto acuoso_____	11
4.3.2. Extracto alcohólico_____	12
4.4. Organismos de <i>Artemia franciscana</i> _____	12
4.5. Bioensayos_____	13
4.5.1. Concentraciones evaluadas_____	13
4.5.2. Bioensayo de CL50 en nauplios de <i>Artemia franciscana</i> _____	13
4.5.3. Bioensayo de inhibición de la eclosión de quistes de <i>Artemia franciscana</i> _____	14
4.6. Análisis estadístico_____	14
5. RESULTADOS_____	16
5.1. Especies de Basidiomycetes estudiadas_____	16
5.1.1. Nuevos registros para Jalisco_____	21
5.2. Concentracion letal media de los extractos de hongos sobre nauplios de <i>Artemia franciscana</i> _____	23

5.3. Inhibición de la eclosión de quistes de <i>Artemia franciscana</i> _____	24
6. DISCUSIÓN_____	33
6.1. Contribución al conocimiento de la micobiota de Jalisco_____	33
6.2. Concentración letal media sobre nauplios de <i>Artemia franciscana</i> _____	33
6.3. Inhibición de la eclosión de quistes de <i>Artemia franciscana</i> _____	38
7. CONCLUSIONES_____	41
8. LITERATURA CITADA_____	42

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Especies de Basidiomycetes utilizadas en el bioensayo con <i>Artemia franciscana</i> _____	16
Cuadro 2. Concentración letal media (CL50) de extractos acuosos y alcohólicos, de los Basidiomycetes estudiados sobre nauplios de <i>Artemia franciscana</i> _____	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Especies de Basidiomycetes estudiados_____	19
Figura 2. Especies de Basidiomycetes estudiados_____	20
Figura 3. Concentración letal media (CL50) del extracto acuoso de 28 especies de Basidiomycetes sobre nauplios de <i>Artemia franciscana</i> _____	26
Figura 4. Porcentaje de inhibición de la eclosión y de mortalidad en los quistes de <i>Artemia franciscana</i> provocados por los extractos de Basidiomycetes y el dicromato de potasio, en concentración de 25 µg/mL_____	27
Figura 5. Porcentaje de inhibición de la eclosión y de mortalidad en los quistes de <i>Artemia franciscana</i> provocados por los extractos de Basidiomycetes y el dicromato de potasio, en concentración de 50 µg/mL_____	28
Figura 6. Porcentaje de inhibición de la eclosión y de mortalidad en los quistes de <i>Artemia franciscana</i> provocados por los extractos de Basidiomycetes y el dicromato de potasio, en concentración de 100 µg/mL_____	29

Figura 7. Porcentaje de inhibición de la eclosión y de mortalidad en los quistes de *Artemia franciscana* provocados por los extractos de Basidiomycetes y el dicromato de potasio, en concentración de 250 µg/mL_____ 30

Figura 8. Porcentaje de inhibición de la eclosión y de mortalidad en los quistes de *Artemia franciscana* provocados por los extractos de Basidiomycetes y el dicromato de potasio, en concentración de 500 µg/mL_____ 31

Figura 9. Porcentaje de inhibición de la eclosión y de mortalidad en los quistes de *Artemia franciscana* provocados por los extractos de Basidiomycetes y el dicromato de potasio, en concentración de 1000 µg/mL_____ 32

I. RESUMEN

El consumo de hongos silvestres se ha incrementado en los últimos años; sin embargo, no todos son comestibles y pueden provocar envenenamientos. Por lo tanto, es necesario realizar estudios que permitan obtener información sobre su toxicidad. Para este propósito, se utilizó a *Artemia franciscana*, un crustáceo que se emplea en ensayos de toxicidad y que tiene gran aplicación en la detección de toxinas, incluyendo las micotoxinas. Se recolectaron hongos en varias localidades de Jalisco, México, de estos se seleccionaron y determinaron 28 especies de Basidiomycetes. Se prepararon 28 extractos acuosos y seis alcohólicos de los basidiomas de las 28 especies; se realizaron diluciones para obtener concentraciones de 1000, 500, 250, 100, 50 y 25 µg/mL, las cuales se probaron sobre nauplios (acuoso y alcohólico) y quistes (únicamente acuoso) de *A. franciscana*. Se utilizó dicromato de potasio (DP) como testigo positivo y agua de mar como testigo negativo. Se calculó la concentración letal media (CL50) de los extractos sobre los nauplios y el porcentaje de inhibición de la eclosión y mortalidad sobre los quistes de *A. franciscana*. Los extractos acuosos obtenidos de *Amanita muscaria*, *A. virosa*, *Chlorophyllum molybdites*, *Leucopaxillus amarus* y *Xerocomus* sp. 3, mostraron una CL50 < 70 µg/mL, sin presentar diferencias significativas ($P > 0.05$) con respecto al DP (CL50 = 46 µg/mL). *Cantharellus cibarius* y *Scleroderma texense* provocaron la menor toxicidad sobre este estadio. Por otro lado, 19 de las 22 especies estudiadas en el bioensayo de inhibición de la eclosión, afectaron en más del 80% la eclosión de los quistes de *A. franciscana* en todas las concentraciones probadas, en contraste con el DP que inhibió la eclosión en menos del 50% en todos los casos. El mayor porcentaje de mortalidad en los quistes fue causado por los extractos acuosos de *A. virosa*, *C. molybdites*, *L. amarus* y *Tylopilus* aff. *nicaraguensis*. Por otro lado, *Macrolepiota mastoidea* es la que generó el menor porcentaje de mortalidad en los quistes en todas las concentraciones. El ensayo con *Artemia franciscana* demostró ser eficaz en la evaluación de toxicidad de basidiomas de hongos, con algunas excepciones como fue el caso de *S. texense*, ya que este hongo no resultó tóxico para este crustáceo. En cuanto a lo observado en los quistes de *A. franciscana*, sería interesante realizar investigaciones que permitan aclarar los mecanismos por los cuales los extractos de la mayoría de los Basidiomycetes de este estudio afectaron la eclosión y muchos de ellos la sobrevivencia del embrión.

II. ABSTRACT

The consumption of wild mushrooms has increased in recent years; however, not all are edible and may cause poisoning. Therefore studies to obtain data about their toxicity are needed. For this purpose, we used *Artemia franciscana*, a crustacean employed in toxicity tests and with wide application in the toxin detection, including micotoxins. Mushrooms were collected from Jalisco state, Mexico. Aqueous (28) and alcoholic (6) mushrooms extracts were prepared. Dilutions were performed from each extract's stock solution to final concentrations of 1000, 500, 250, 100, 50, and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Potassium dichromate (PD) was used as positive control and artificial seawater as negative control. The Lethal Dose 50 (LD50) of extracts over nauplii and inhibition-mortality percentage over cysts were calculated. The aqueous extracts obtained from *Amanita muscaria*, *A. virosa*, *Chlorophyllum molybdites*, *Leucopaxillus amarus*, and *Xeroocomus* sp. 3 show a LD50 < 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$, without significant differences ($P > 0.05$) regarding to PD (CL50 = 46 $\mu\text{g}/\text{mL}$). *Cantharellus cibarius* and *Scleroderma texense* caused the lower toxicity to this stage. On other hand, 19 of the 22 species studied in the inhibition of hatching bioassay, affected more than 80% of the cysts hatching of *A. franciscana* in all tested concentrations, contrasting with the PD, which inhibited cysts hatching in less than 50% in all cases. The highest percentage of mortality in the cysts was caused by the aqueous extracts of *A. virosa*, *C. molybdites*, *L. amarus*, and *Tylopilus* aff. *nicaraguensis*; *Macrolepiota mastoidea* produced the minor percentage of mortality in cysts in all concentrations. The brine shrimp bioassay was effective in evaluation of Basidiomycetes toxicity, with some exceptions as in the case of *S. texense* because this fungus was not toxic to the crustacean. In the hatching bioassay, further research is needed to clarify the mechanism by which extracts of the majority of the Basidiomycetes tested in this study affected the hatching and embryo survival.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Hongos en Jalisco

Hawksworth (1991), con base en las relaciones de hongos con plantas vasculares, estimó que existen aproximadamente 1.5 millones de especies en el reino Fungi. Por su parte, Guzmán (1998), considerando la estimación de Hawksworth (1991), calculó 200 000 especies para México, de las cuáles solo se conoce el 3.2% (Aguirre-Acosta *et al.*, 2014). El estado de Jalisco, el cual representa el 4% en superficie del territorio nacional, corresponde al segundo lugar en mayor número de registros de especies de hongos en México (Aguirre-Acosta *et al.*, 2014). Actualmente se conocen 1075 especies: 776 Basidiomycetes, 210 Ascomycetes, 73 Myxomycetes, ocho Zygomycetes, cuatro mitosporicos y cuatro Chromistas para Jalisco, de acuerdo al trabajo de Sánchez-Jácome y Guzmán-Dávalos (2011), quienes realizaron una búsqueda exhaustiva de registros en la literatura de un total de 88 trabajos revisados en los que se citan especies para esta entidad.

1.2. Hongos comestibles

Algunas especies de hongos que producen cuerpos fructíferos macroscópicos (macromicetes) pueden considerarse como un alimento nutritivo y de calidad. Son bajos en grasas y calorías, contienen vitaminas y minerales (Sadler, 2003), por ejemplo vitamina C (ácido ascórbico), B1 (tiamina), B2 (riboflavina), ácido fólico, ácido pantoténico y niacina, así como los minerales, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Na, P y Zn (Çaglarlırmak *et al.*, 2002). En cuanto al contenido proteico, puede llegar a ser entre un 21-50% del hongo dependiendo de la especie, el cual se puede considerar alto en comparación con productos derivados del reino animal como son la carne, el huevo y la leche (Colak *et al.*, 2009). Además, Benjamín (1995) mencionó que los hongos superan en proteína a la mayoría de los vegetales y legumbres con excepción de la soya. Así mismo, poseen todos los aminoácidos esenciales y la mayoría de los no esenciales. Del total de aminoácidos presentes en los hongos, los esenciales representan entre 25 y 40% (Benjamín, 1995; Ribeiro *et al.*, 2008).

El interés por el consumo de hongos silvestres, la mayoría Basidiomycetes, se ha incrementado en los últimos años, debido a su sabor, así como a sus propiedades

antitumorales, antioxidantes, antibióticas y antidiabéticas (Wasser, 2011). Este grupo de hongos tiene un gran potencial como una fuente de metabolitos secundarios así como de enzimas (Brizuela *et al.*, 1998). Ejemplo de esto último se tiene a *Lactarius indigo* (Schwein.) Fr. y *Amanita caesarea* (Scop.) Pers., del primero se ha detectado la presencia de sustancias con capacidad antibiótica, las cuales además mostraron citotoxicidad (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2011). En el segundo, Yamac y Bilgili (2006) observaron que el extracto podría tener propiedades antibióticas sobre *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*. También se han encontrado efectos similares en extractos de especies de *Cortinarius* (Nicholas *et al.* 2001).

1.3. Hongos venenosos

No todos los hongos silvestres son comestibles; algunos pueden causar envenenamientos al consumirlos, principalmente de forma accidental (Ruiz Sánchez *et al.*, 1999). Los distintos envenenamientos por hongos presentan efectos o síndromes que van desde simples alergias hasta severas intoxicaciones (Guzmán, 1980). Estas intoxicaciones, llamadas micetismos, son causadas por la ingestión de macromicetes que contienen sustancias que no son degradadas por los procesos digestivos del humano, por lo que al ser absorbidas, provocan reacciones adversas que generan desde un cuadro diarreico hasta la muerte por daños hepáticos o renales (Ruiz Sánchez *et al.*, 1999).

Lincoff y Mitchel (1977) separaron a los micetismos en cuatro grupos, los cuales se diferencian principalmente por el tiempo de incubación de los síntomas y los efectos físicos que provocan. Posteriormente, Benjamín (1995), bajo el criterio de Lincoff y Mitchel (1977), describió ocho micetismos de la siguiente forma:

Aparición de los síntomas en menos de 4 h

- **Gastrointestinal:** Es el micetismo más común, se caracteriza por los síntomas de dolor abdominal, náuseas, vómito y diarrea. Muy pocas veces es severo.
- **Muscarínico:** Los síntomas se presentan a partir de 30 min, los cuales incluyen vómitos, cólicos abdominales, diarrea, broncoconstricción, miosis, amaurosis e incluso crisis convulsivas, entre otros (Ruiz-Sánchez *et al.*, 1999).

- Alucinógeno: Se presentan alucinaciones visuales y auditivas por la presencia de la psilocibina o uno de los otros alucinógenos como el ácido iboténico (Schultes y Hofmann, 2000). Así mismo, existen registros de que se pueden presentar de forma paralela a los efectos alucinógenos diferentes trastornos como ansiedad, parestesia, midriasis, náusea, taquicardia, inconsciencia, entre otros (Asselborn *et al.*, 2000; Berger y Guss, 2005; Beug *et al.*, 2006). Estos síntomas aparecen aproximadamente 1 h después de la ingestión.
- Panterino: Se produce un estado de embriaguez entre 30 y 120 min después de la ingestión. Este síndrome se caracteriza por mareos y falta de coordinación.

Aparición de los síntomas después de 4 h

- Síndrome por amatoxinas: Síntomas después de 6 h o más de la ingestión, usualmente, similares a los del micetismo gastrointestinal. En un tiempo variable de 48 a 96 h se pueden observar evidencias de daño hepático.
- Síndrome por giromitrina: Se presenta entre 6 y 8 h después de la ingestión. Los síntomas que se presentan son fiebre, dolor de cabeza, calambres musculares y posteriormente hemólisis.
- Síndrome por orellanina: La aparición de los síntomas es muy lenta, a partir de 12 h hasta días o incluso semanas. Comienza con gastroenteritis, seguido de síntomas de falla renal como la poliuria y sed intensa.

Síntomas después de haber ingerido alcohol

- Coprínico: Es el micetismo menos común pero mejor caracterizado debido a que solo se presenta si la ingestión de los hongos que lo producen se combina con alcohol. Aparece pocos minutos después de ingerir alcohol sin importar que los hongos se consumieran desde horas hasta unos pocos días antes. Los síntomas comunes son la sensación de enrojecimiento facial, dolor de cabeza, náuseas y un sabor metálico.

Aproximadamente 5% de todas las intoxicaciones por hongos llegan a un desenlace fatal; sin embargo, la letalidad asociada a los micetismos de larga incubación, provocado por especies como *Amanita virosa* Bertill., que contiene amatoxinas, es aún más elevada, pues puede llegar a presentar una letalidad de hasta 90% de los casos (Ruiz-Sánchez *et al.*,

1999). Es importante señalar que, en algunos casos, las personas intoxicadas pueden recuperarse considerando la edad, el peso corporal y la cantidad consumida del hongo (Pérez-Silva y Herrera, 1992). Por lo general, estos envenenamientos se presentan en el área urbana y suburbana del país, donde las personas recolectan hongos durante la época de verano, en muchas ocasiones, sin conocerlas (Rodríguez-Maldonado *et al.*, 2008).

Guzmán (1987) reportó un caso de envenenamiento producido por *Amanita virosa* en ocho integrantes de una familia de la región de Las Minas, Municipio de Villa Aldama, Veracruz, de los cuáles dos de ellos, de 8 y 10 años de edad, presentaron intoxicación hepática mortal. Los demás integrantes de la familia solo tuvieron una leve intoxicación, de la cual se recuperaron ocho días después. Se sospecha que *A. virosa* se mezcló con otros hongos comestibles conocidos como "tecomate blanco" (*A. rubescens* Pers.) y por lo tanto, es probable que la dosis de hongos venenosos que ingirieron ambos menores fue mayor a la de los otros miembros de la familia. Pérez-Silva y Herrera (1992) mencionaron un caso de micetismo mortal de dos adultos y un menor, en la región de Milpa Alta, D.F., en el cual falleció el menor de 5 años de edad. A pesar de que no se logró determinar la especie involucrada, se atribuyó la intoxicación a *Amanita virosa* y *A. verna*. Rodríguez-Maldonado *et al.* (2008) registraron el caso de seis miembros del sexo femenino que sufrieron intoxicación por el consumo de hongos silvestres, con la muerte de una menor por falla hepática. Aunque no se identificó la especie involucrada, se diagnosticó como micetismo faloidiano (síndrome por amatoxinas) debido a la sintomatología presentada.

Por otra parte, Benjamín (1995) mencionó que los envenenamientos asociados a los hongos no siempre son causados por la acción de micotoxinas, si no que existen otros factores que tienen la capacidad de producir reacciones adversas. Estas reacciones, de acuerdo con este autor pueden ser causadas por: 1) Pánico, principalmente por miedo de haber consumido algún hongo venenoso, o bien, al sentir los efectos del micetismo alucinógeno por primera vez. 2) Obstrucción intestinal al consumir hongos en grandes cantidades, ya que la quitina de la pared celular de los hongos es relativamente difícil de digerir. 3) Reacciones alérgicas e intolerancias, debido a la gran variedad de compuestos que contienen los hongos, los cuales en algunos casos no se pueden metabolizar. 4) Por contaminación de hongos

microscópicos y/o bacterias, por lo general al recolectar hongos deteriorados, los cuales son un sustrato idóneo para el desarrollo de hongos microscópicos, así como un manejo inadecuado en el momento de almacenarlos. 5) Contaminantes químicos como herbicidas e insecticidas, los cuales a menudo se aplican en zonas donde pueden fructificar macromicetes comestibles. A pesar de que muchos de estos compuestos pierden su toxicidad rápidamente posterior a su aplicación, existen otros que tienen la capacidad de perdurar en el ambiente y potencialmente acumularse en los hongos. 6) Metales pesados, en particular isótopos radioactivos, los cuales pueden ser acumulados por diversas especies de hongos, incluidas las comestibles.

1.4. Problemática

Existen diversos mitos en torno al conocimiento de la toxicidad de los hongos, tal es el caso de lo descrito por Ruan-Soto *et al.* (2004) para la planicie del Golfo de México, en donde se dice que todos los hongos que crecen sobre el suelo son tóxicos, en cambio aquéllos que se desarrollan sobre madera o troncos no lo son. Sin embargo, la especie *Trogia venenata* Zhu L. Yang, la cual es lignícola y aparentemente comestible, se ha asociado a aproximadamente 400 casos de muerte en China (Stone, 2012). Guzmán (1980) indicó que deben dejarse de lado ciertas costumbres para conocer si un hongo es comestible o venenoso, tales como hervir el hongo con una moneda de plata o un ajo y determinar su toxicidad en función del color que adquieren estos últimos (si se ennegrecen los hongos son venenosos). De igual forma, existen las creencias erróneas de que los hongos que coagulan la leche son venenosos o que si están mordisqueados por algún mamífero se pueden consumir (Mariaca-Méndez *et al.* 2001).

Con base en lo anterior, se puede inferir que el conocimiento de la toxicidad de los hongos suele ser empírico y variable, así como los métodos utilizados para separar los tóxicos de los comestibles. Además, se desconocen las propiedades de muchos macromicetes, debido a que la mayoría de los estudios al respecto, se han enfocado en las especies más abundantes, o bien, en aquéllas a las que se ha atribuido algún caso de intoxicación. Así mismo, se ha demostrado que algunas especies consideradas comestibles como *Tricholoma flavovirens* (Pers.) S. Lundell y *Boletus edulis* Bull., las cuales tienen un uso gastronómico

muy extendido, provocan rhabdomiólisis en ratones, y el primero de estos hongos incluso efectos cardiotoxicos y hepatotóxicos (Nieminen *et al.*, 2006, 2008). Por lo tanto, es necesario realizar estudios que permitan obtener información básica sobre la toxicidad de las diferentes especies de hongos.

En este tipo de estudios generalmente se utilizan organismos modelo, por ejemplo el ratón de laboratorio *Mus musculus* (Linnaeus 1758), el cual es uno de los más conocidos y utilizados para evaluar la respuesta de un mamífero ante una determinada sustancia (Hernández, 2006). Con respecto a los hongos y por ende a las micotoxinas, se utilizan diferentes organismos modelo con bioensayos específicos, los cuales permiten determinar si un hongo produce metabolitos tóxicos. Estos bioensayos consisten en la exposición de un sistema biológico a un compuesto o sustancia y observar si tiene algún efecto sobre el mismo. Los más comunes involucran el uso de distintas especies de gusanos, larvas del mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), embriones de pollo *Gallus gallus domesticus* (Linnaeus 1758) y *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906) (Wijnands y van Leusden, 2000). Este último ha demostrado ser eficiente en la detección de micotoxinas (González *et al.*, 2003) y metabolitos secundarios (González *et al.*, 2007), y ha presentado una alta correlación de sus resultados con los de otros organismos modelo como los embriones de pollo (Hlywka *et al.*, 1997). Si bien no existe un organismo modelo que se pueda extrapolar en forma perfecta al hombre, si existe una gran diversidad de modelos que proporcionan información que reflejan el posible comportamiento de las sustancias probadas en otros organismos incluyendo al ser humano (Vásquez-López, 2007).

1.5. Organismo modelo

Artemia franciscana es un crustáceo branquiópodo de la familia Artemiidae, que se distribuye a lo largo del continente Americano (Sorgeloos *et al.*, 1986). Esta especie se desarrolla en agua de mar (33-55 UPS) (Soundarapandian y Saravanakumar, 2009), como un filtrador no selectivo, por lo que se alimenta de partículas de materia orgánica disponibles en el medio. Es de reproducción ovovivípara por lo que en condiciones normales las hembras depositan nauplios libres (estado larvario) y en condiciones no

adecuadas para su desarrollo tiene la capacidad de producir en su lugar quistes (fase de latencia) (Sorgeloos *et al.*, 1986).

Se ha sugerido como organismo modelo para pruebas de toxicidad por varios autores, entre ellos Michael *et al.* (1956) y Sorgeloos *et al.* (1978), con una gran aplicación para la detección de micotoxinas (Harwig y Scott, 1971; Wijnands y van Leusden, 2000). Además se ha utilizado en la evaluación de la toxicidad de extractos de plantas (Fernández-Calientes *et al.*, 2009), detección de metabolitos fúngicos (González *et al.*, 2003, 2007; Nieto *et al.*, 2008), citotoxicidad de productos naturales marinos (Carballo *et al.*, 2002) e incluso de compuestos químicos como el dióxido de cloro en agua de mar (Puente *et al.*, 1992). La gran aplicación de *A. franciscana* es debida a su baja variabilidad genética, ciclo de vida corto, adaptabilidad a diferentes condiciones abióticas y fuentes nutricionales, y a la disponibilidad continua de quistes y organismos a bajo costo (Nunes *et al.*, 2006).

2. ANTECEDENTES

Se han realizado diversos estudios sobre la toxicidad y compuestos de los hongos. Rittgen *et al.* (2008) analizaron los oligopéptidos presentes en varias especies mortales del género *Amanita* Pers., a través de electroforesis capilar. Por su parte, Antonyuk *et al.* (2010) purificaron, caracterizaron y observaron los efectos en células de mamíferos de proteínas de *Amanita virosa* Bertill. Horibe *et al.* (2010) llevaron a cabo la caracterización bioquímica y molecular de la isolectina presente en *Boletus venenatus* Nagas., el cual provocó diarrea tras la administración oral en ratones y la muerte tras la administración intraperitoneal. Hu *et al.* (2012) determinaron la presencia de amanotoxinas en los diferentes tejidos del basidioma de *A. exitialis* con el uso de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés). También se aisló y se estudiaron las propiedades enzimáticas y secuencia parcial de aminoácidos de la molibdoilisina, una metaloendopeptidasa tóxica obtenida de *Chlorophyllum molybdites* (G. Mey.) Masee, tras detectar un efecto letal en ratones (Yamada *et al.*, 2012). Además, recientemente Carvalho *et al.* (2014) recomiendan experimentos que se realicen búsquedas no específicas con el uso de un gran número de estándares para la detección y determinación de compuestos presentes en los hongos.

Paralelo a lo anterior, se han realizado pruebas con *Artemia* (Leach, 1819) para determinar la toxicidad de los hongos y para la búsqueda de nuevos metabolitos fúngicos; sin embargo, la mayoría de las mismas se enfoca en micromicetes, principalmente de los géneros *Fusarium* Link, *Aspergillus* P. Micheli y *Penicillium* Link, así como también en micotoxinas purificadas (Harwig y Scott, 1971; Prior, 1979; Abdel-Mallek *et al.*, 1993; Hlywka *et al.*, 1997; Harlt y Humpf, 2000; Pereira y Kimmelmeier, 2000; Siddiqui *et al.*, 2001; González *et al.*, 2003, 2007; Alghalibi y Shater, 2004; Favilla *et al.*, 2006; Moretti *et al.*, 2007; Acosta *et al.*, 2011; Duraković *et al.*, 2011; Qureshi *et al.*, 2011).

En años recientes se aplicó el ensayo de *Artemia franciscana* a la evaluación de la toxicidad de macromicetes. Nieto *et al.* (2008) estudiaron la concentración letal media (CL50) de extractos alcohólicos de los hongos *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., *P. pulmonarius* (Fr.) Quél. y *Paxillus involutus* (Batsch) en *A. franciscana*. Dichos autores encontraron que

Paxillus involutus es altamente tóxico, en contraste con las especies de *Pleurotus*, que resultaron con una CL50 superior a 1000 µg/mL, por lo que se consideraron como inocuas para el consumo humano.

Por su parte, Faridur *et al.* (2010) utilizaron *A. franciscana* para estudiar la toxicidad de diferentes extractos de *Pleurotus ostreatus*, a los cuales se les realizó cromatografía de capa fina, en la que se encontró la presencia de esteroides y terpenoides. Estos mismos autores determinaron como tóxicos a los extractos probados, los cuales presentaron una CL50 menor a 25 µg/mL en todos los casos. Por otro lado, Sasidharan *et al.* (2011) calcularon la CL50 de *Ganoderma boninense* Pat., también a través del bioensayo de *A. franciscana*, quienes encontraron que el extracto alcohólico de este hongo es relativamente poco tóxico para el crustáceo (CL50 = 640 µg/mL), por lo que podría ser utilizado en la medicina natural.

La toxicidad de *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc., *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer, *Hypsizygos tessulatus* (Bull.) Singer, *Pleurotus eryngii* (DC.) Qué. y *P. florida* Singer fue evaluada por Wong *et al.* (2013) en *A. franciscana*. Entre ellas, *A. polytricha* fue la que resultó con la menor toxicidad (CL50 = 115.8 µg/mL), por lo que sugirieron que puede ser consumida por las personas en grandes cantidades; además demostraron que tiene capacidad antibiótica. Así mismo, aunque *F. velutipes*, *H. tessulatus*, *P. eryngii* y *P. florida* presentaron mayor toxicidad, ésta fue significativamente menor que el dicromato de potasio que utilizaron como testigo positivo. Vega Villasante *et al.* (2013) determinaron la CL50 y el porcentaje de inhibición en la eclosión de quistes de *A. franciscana*, de un extracto acuoso de *Psilocybe cubensis* Earle (Singer) recolectado en Bahía de Banderas (Costa Norte del estado de Jalisco). Debido a la CL50 = 135 µg/mL y una inhibición del 100% en la eclosión de los quistes de *A. franciscana*, propusieron que dicha especie es poco recomendable para el consumo humano.

3. OBJETIVOS

General:

- Aportar información básica sobre la toxicidad de Basidiomycetes recolectados en el estado de Jalisco sobre un organismo modelo.

Específicos:

- Determinar la concentración letal media (CL50) de extractos acuosos y alcohólicos de algunos Basidiomycetes tóxicos comunes en Jalisco o de aquéllos de los que se desconoce su toxicidad sobre nauplios de *Artemia franciscana* y compararla con la CL50 de hongos comestibles.
- Determinar el porcentaje de inhibición producido por los diferentes extractos de Basidiomycetes en la eclosión de quistes de *A. franciscana*.
- Determinar el porcentaje de mortalidad producido por los extractos de Basidiomycetes sobre los quistes de *Artemia franciscana*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Recolecta en campo de material fúngico

Se realizaron salidas al campo a bosques templados en el estado de Jalisco, en donde se recolectaron ejemplares de hongos macroscópicos de los grupos correspondientes a comestibles y venenosos de acuerdo con la literatura (Guzmán, 1977), así como ejemplares de los que se desconocían sus propiedades. A los especímenes recolectados se les registraron datos morfológicos en fresco para posteriormente ser deshidratados. Se seleccionaron los que cumplieran con un mínimo de 10 g en peso seco para obtener los extractos, además de una muestra representativa que se incorporó al Herbario IBUG (ver Cuadro 1).

4.2 Determinación de las especies de macromicetes

Se utilizó la metodología de Largent (1986) y Largent *et al.* (1977) para el estudio macro y micromorfológico de los especímenes. Para las observaciones microscópicas se realizaron cortes con navaja, a los que se les agregó una gota de alcohol etílico al 96° y se montaron en hidróxido de potasio (KOH) al 3% para su posterior revisión. En casos necesarios, de acuerdo a la literatura consultada, se utilizó rojo Congo (3%) para teñir las estructuras, solución de Melzer para determinar la reacción amiloide o dextrinoide y azul de cresil para observar la reacción metacromática en las esporas. Se utilizó un microscopio óptico Zeiss K-7 para observar las estructuras, las cuales se midieron y dibujaron; adicionalmente se empleó un microscopio óptico Zeiss Axioskop 40 para la toma de fotografías mediante el software Axio Vision 4. Las estructuras se describieron de acuerdo a los términos propuestos por Vellinga (1998). Para conocer las propiedades comestibles o toxicidad de las especies determinadas, se consultaron a Guzmán (1977, 1978), García (1999) y Ge *et al.* (2010).

4.3 Obtención de extractos

4.3.1. Extracto acuoso

Se realizaron extractos acuosos utilizando la metodología de Vega Villasante *et al.* (2013), ya que esta funcionó de forma adecuada con el macromicete que estudiaron. Ésta consistió

en secar y moler 5 g de los ejemplares de cada especie, mezclar con agua de mar artificial a 40 UPS (10 mL/g), calentar a 80 °C durante 15 min y dejar enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla se centrifugó a 1500 G por 5 min, se recuperó el sobrenadante, y por último se almacenó en frascos color ámbar.

4.3.2. Extracto alcohólico

A partir de los hongos de los que se logró recolectar más de 10 g en peso seco de material (al menos 15 g), se prepararon extractos alcohólicos utilizando la metodología de Nieto *et al.* (2008) con modificaciones, la cual consistió en mezclar 5 g de hongos secos y molidos con 100 mL de etanol al 96° durante 24 h, posteriormente se removió el solvente y se agregó 100 mL más de etanol. Este proceso se repitió cinco veces, para asegurar la extracción de la mayor cantidad de metabolitos. El solvente total se filtró con un papel filtro Whatman No. 4 y se evaporó hasta sequedad a una temperatura de 70 °C.

Nieto *et al.* (2008) utilizó Polisorbato 80 (Tween 80) al 5% para resuspender el extracto alcohólico, así como para el medio en que se colocaron los nauplios de *A. franciscana* durante el bioensayo. En este trabajo, en un experimento piloto, se encontró que la concentración de Tween 80 al 5% ejerce una influencia negativa en la sobrevivencia de los nauplios y, en este sentido, altera la interpretación de los resultados. Por lo que la concentración de Tween 80 se redujo al 0.5%, la cual se demostró que no los afecta. Esta modificación a la metodología contribuye de manera importante a futuras investigaciones, al eliminar el efecto del compuesto como una variable en los experimentos.

4.4. Organismos de *Artemia franciscana*

Se utilizaron quistes comerciales INVE ®, Salt Lake City, Utah de *Artemia franciscana*. Para los ensayos con nauplios se colocaron 0.01 g de quistes en 50 ml de agua destilada durante 10 min para su hidratación; posteriormente se trasladaron a un recipiente con capacidad de 1.5 L en un volumen de 1 L de agua de mar artificial ajustada a 40 UPS. Se proporcionó iluminación las 24 h con un foco fluorescente y aireación constante con una bomba para acuarios, con la finalidad de mantener los quistes en movimiento continuo. La cosecha se realizó al término de 24 h, para obtener de esta forma nauplios del primer

estadio (Soorgelos *et al.*, 1978). Para el bioensayo de inhibición de la eclosión (descrito posteriormente), los quistes se hidrataron durante 10 min antes de iniciarlo.

4.5. Bioensayos

4.5.1. Concentraciones evaluadas

De la solución madre de los extractos de cada especie de macromicete, se realizaron diluciones con el fin de obtener concentraciones de 1000, 500, 250, 100, 50 y 25 µg/mL. Con base en lo señalado por Nieto *et al.* (2008) y Vega Villasante *et al.* (2013), se utilizó dicromato de potasio (DP) como testigo positivo tóxico para todos los bioensayos siguiendo el mismo patrón de concentraciones, es decir, se realizaron bioensayos únicamente con DP con la finalidad de obtener datos comparables de éste con los extractos. Como testigo negativo se utilizó agua de mar artificial en todos los bioensayos.

4.5.2. Bioensayo de CL50 en nauplios de *Artemia franciscana*

Se introdujeron 10 organismos de *A. franciscana* por tubo en ensayo en un volumen de 5 mL (Nieto *et al.*, 2008) de las diferentes concentraciones de extractos de hongos. Se realizó el conteo de organismos muertos al término de 24 h de exposición, los cuales se consideraron muertos si no presentaban movimiento de sus apéndices durante 10 segundos. Originalmente se planteó hacer cinco réplicas; sin embargo, los extractos no se obtuvieron en cantidad suficiente, por lo tanto, con base en la literatura (Moretti *et al.*, 2007; Acosta *et al.*, 2011), el bioensayo se replicó cuatro veces, con un testigo negativo por réplica. Otros autores (Qureshi *et al.*, 2011), han realizado solo tres réplicas. Se realizaron bloques de cuatro extractos por día, ya que era lo máximo que se podía manejar; para mitigar el factor tiempo, cada bloque se llevó a cabo en la misma hora del día. Como testigos se utilizaron tubos de ensayo con 10 organismos en un volumen de 5 mL de agua de mar artificial para el negativo y de DP para el positivo. Para los bioensayos con extractos alcohólicos se agregó Tween 80 al 0.5 % en el agua de mar artificial en todos los casos, incluyendo el testigo.

4.5.3. Bioensayo de inhibición de la eclosión de quistes de *Artemia franciscana*

De acuerdo con los resultados de un experimento piloto se colocaron 40 quistes de *A. franciscana* por tubo de ensayo, ya que se encontró que con este tamaño de muestra el promedio de eclosión se mantuvo constante. Los tubos se llenaron hasta alcanzar un volumen de 5 mL con las soluciones de los diferentes extractos de hongos y de DP a las concentraciones antes mencionadas, así como un tubo correspondiente al testigo negativo con agua de mar artificial. Después de 48 h de exposición con iluminación constante se realizó el conteo de los organismos que eclosionaron; se consideraron aquéllos que alcanzaron el estadio naupliar y los que se encontraban en el estadio de *umbrella* (el embrión salió del quiste pero no se ha separado completamente de él, con aspecto de un paraguas) (Sorgeloos *et al.*, 1986). Posteriormente, se realizó el lavado de los quistes llenando el tubo con agua de mar artificial y tirando ésta, para retirar la mayor cantidad de extracto posible sin remover los quistes, los cuales se alojan en el fondo del tubo. Este proceso se repitió tres veces con el fin de llevar la concentración de los residuos del extracto a niveles mínimos. Se colocaron 5 mL de agua de mar artificial en los tubos por 48 h y se contaron de nuevo los organismos que eclosionaron. El bioensayo se replicó tres veces (debido a que no se contó con extracto para hacer cuatro réplicas) con un par de testigos por réplica, en tubos de ensayo con el mismo número de quistes y volumen, con agua de mar artificial para el testigo negativo y un bioensayo con concentraciones de DP para el positivo. Se realizaron bloques de tres extractos por día, ya que era lo máximo que se podía manejar; para mitigar el factor tiempo, cada bloque se llevó a cabo en la misma hora del día.

Debido a que no todos los quistes eclosionan, el número de organismo que eclosionaron en el control negativo, cuyo promedio se mantuvo constante como se mencionó anteriormente, se tomaron como el 100% de eclosión para cada réplica en todos los bioensayos y con base en esto se hicieron los cálculos correspondientes del porcentaje de inhibición de la eclosión.

4.6. Análisis estadístico

Se realizaron pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y homocedasticidad y como las variables de respuesta cumplieron con éstos presupuestos estadísticos ($P > 0.05$) se

analizaron con un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) y la prueba de Tukey a *posteriori* en cada uno de los casos. Los factores analizados fueron los extractos y sus concentraciones y las variables de respuesta fueron la sobrevivencia de los nauplios y la eclosión de los quistes. En este último se utilizaron los porcentajes de inhibición de la eclosión. El software utilizado fue Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., 2007). El cálculo de la CL50 se realizó con IBM® SSPS® Statics (IBM Corp, 2012).

5. RESULTADOS

5.1. Especies de Basidiomycetes estudiados

Se recolectaron, determinaron y seleccionaron para el estudio un total de 28 taxa de macromicetes, todos Basidiomycetes, agrupados en 18 géneros (Cuadro 1). El género mejor representado fue *Amanita* con cinco especies, le siguen *Lactarius* con cuatro, *Cortinarius* con tres y *Ramaria* con dos; en los 14 restantes solo se estudió una especie de cada uno. No todos los especímenes se adscribieron con seguridad a una especie, cuatro se indican como afines, en dos solo se llegó a género (*Cortinarius* y *Pholiota*) y uno más que se determinó como *Xerocomus* sp. 3, de acuerdo a lo señalado por García (1999).

Cuadro 1. Especies de Basidiomycetes utilizadas en el bioensayo con *Artemia franciscana*.

Especie	Colector	Número de colecta	Propiedades	**Localidad
<i>Amanita aff. advena</i>	L.E. Ruiz-González	6	Desconocida	1
<i>A. polypyramis</i> (Berk. & M.A. Curtis) Sacc. (= <i>A. alexandri</i> Guzmán)	L.E. Ruiz-González	21	Venenosos ¹	1
<i>A. jacksonii</i> Pomerl.	L.E. Ruiz-González	5	Comestible ⁵	2
<i>A. muscaria</i> (L.) Lam.	L.E. Ruiz-González	4	Alucinógeno y venenosos ¹	2
<i>A. virosa</i> Bertill.	L.E. Ruiz-González	18	Venenosos mortal ¹	1
<i>Heimioporus ivoryi</i> (Singer) E. Horak	L.E. Ruiz-González	9	Desconocida	1
<i>Cantharellus cibarius</i> Fr.	M. Herrera	1407	Comestible ¹	3
<i>Chlorophyllum molybdites</i> (G. Mey.) Masee	L.E. Ruiz-González	24	Venenosos ¹	4
<i>Cortinarius</i> sp.	L.E. Ruiz-González	51	Desconocida	3
* <i>Cortinarius caeruleus</i> (Schaeff.) Fr.	L.E. Ruiz-González	53	Desconocida	3
<i>Cortinarius purpureus</i> (Bull.) Bidaud, Moëne-Loec. &	L.E. Ruiz-González	57	Desconocida	2

Reumaux					
<i>Gymnopilus penetrans</i> (Fr.) Murrill	L.E. Ruiz-González	58	No comestible ¹	2	
<i>Hygrophoropsis aurantiaca</i> (Wulfen) Maire	M. Herrera	1397	Comestible ¹	2	
<i>Hygrophorus russula</i> (Schaeff.) Kauffman	L.E. Ruiz-González	26	Comestible ¹	3	
<i>Lactarius aff. pseudoaffinis</i>	L.E. Ruiz-González	52	Desconocida	3	
<i>L. aff. smithii</i>	L. Guzmán-Dávalos	10742	Desconocida	1	
<i>L. indigo</i> (Schwein.) Fr.	L. Guzmán-Dávalos	10738	Comestible ¹	3	
<i>L. piperatus</i> (L.) Pers.	L. Guzmán-Dávalos	10740	Poco comestible ¹	3	
<i>Leucopaxillus amarus</i> (Alb. & Schwein.) Kühner	B.A. Arceo-Orozco	460	No comestible ¹	2	
<i>*Macrolepiota mastoidea</i> (Fr.) Singer	L.E. Ruiz-González	2	Comestible ⁴	2	
<i>Pholiota sp.</i>	L.E. Ruiz-González	55	Desconocida	2	
<i>Psathyrella candolleana</i> (Fr.) Maire	L. Guzmán-Dávalos	10717	No comestible ¹	5	
<i>*Ramaria aurea</i> (Schaeff.) Quél.	L. Guzmán-Dávalos	10851	No comestible ²	3	
<i>*Ramaria holorubella</i> (G.F. Atk.) Corner	L.E. Ruiz-González	56	No comestible ²	3	
<i>Scleroderma texense</i> Berk.	L.E. Ruiz-González	35	Venoso ¹	5	
<i>Suillus tomentosus</i> (Kauffman) Singer	L.E. Ruiz-González	1	Comestible ¹	2	
<i>Tylopilus aff. nicaraguensis</i>	L. Guzmán-Dávalos	10724	Desconocida	1	
<i>Xerocomus sp. 3</i>	B.A. Arceo-Orozco	462	Desconocida ³	2	

*Nuevos registros para Jalisco; ¹Guzmán (1977); ²Guzmán (1978); ³García (1999); ⁴Ge *et al.* (2010); ⁵Rodríguez *et al.* (2013)

**Localidades

1.- Bosque La Primavera, Mpio. de Zapopan, Jalisco, entrada por La Primavera, aprox. 3 km del balneario. Bosque de *Pinus* y *Quercus*.

- 2.- Km 42, carretera Atemajac de Brizuela a Tapalpa, aprox. 3 km antes de Juanacatlán, Mpio. de Tapalpa, Jalisco. Bosque de *Pinus* y *Quercus*.
- 3.- Km 11 camino a la estación de microondas, Volcán de Tequila, Mpio. Tequila, Jalisco México. Bosque de *Pinus* y *Quercus*.
- 4.- La Venta del Astillero, Mpio. Zapopan, Jalisco, México.
- 5.- Km 13 del Camino de San Sebastián del Oeste a La Bufa, Mpio. Cerca del mirador La Bufa San Sebastián del Oeste, Jalisco, México. Camino San Sebastián a la Bufa, cerca del mirador La Bufa.



Figura 1. Especies de Basidiomycetes estudiados: (A) *Amanita* aff. *advena*, (B) *Amanita jacksonii*, (C) *Amanita muscaria*, (D) *Amanita polypyramis*, (E) *Amanita virosa*, (F) *Cantharellus cibarius*, (G) *Chlorophyllum molybdites*, (H) *Cortinarius caerulecens*, (I) *Heimioporus ivoryi*. Fotografías A-D, F-I: E. Fanti; E: L.E. Ruiz González.



Figura 2. Especies de Basidiomycetes estudiadas: (J) *Hygrophorus russula*, (K) *Lactarius* aff. *pseudoaffinis*, (L) *Lactarius* aff. *smithii*, (M) *Lactarius indigo*, (N) *Lactarius piperatus*, (Ñ) *Macrolepiota mastoidea*, (O) *Ramaria aurea*, (P) *Ramaria holorubella*, (Q) *Scleroderma texense*, (R) *Suillus tomentosus*, (S) *Tylopilus* aff. *nicaraguensis*. Fotografías K y P: L.E. Ruiz González; J, L-O, Q-S: E. Fanti.

5.1.1 Nuevos registros para Jalisco

Cortinarius caerulescens (Schaeff.) Fr., *Epicr. syst. mycol. (Upsaliae)*: 265 (1838) [1836–1838]

= *Cortinarius caesiocyaneus* Britzelm., *Zur Hymenomycetenkunde* 1: 10 (1895)

Píleo de 32–50 mm diámetro, convexo, subvíscido, con fibrillas adheridas, azul violáceo, con tonos rojizos o café-rojizos al secarse, restos de velo concoloros al píleo en el centro en los jóvenes, margen entero, incurvado, algunos con restos de la cortina aracnoide. Láminas adheridas, juntas, angostas, azul-violáceas, cambiando a color café oscuro con tonos anaranjados, borde entero. Estípite de 20–25 × 6–11 mm, central, concoloro con el píleo, superficie fibrilosa, fibrillas blanquecinas a violáceas, con velo aracnoide blanquecino, base bulbosa marginada. Contexto blanquecino con tonos azul-violáceo. Olor fúngico y sabor inapreciable.

Basidiosporas de 8–10.8 × 4–4.8 μm, Q = 1.8–2.7, alongadas a cilíndricas, finamente verrugosas, de pared delgada, sin poro germinal, color café amarillento.

Hábito y hábitat: Gregario, terrestre, en bosque de *Pinus* y *Quercus*.

Material estudiado: Localidad 3 (Cuadro1), agosto 31, 2013, L.E. Ruiz-González 53 (IBUG).

Comentarios: Concuerda con las características indicadas por Kauffman (1932) y Breitenbach y Kränzlin (2000), excepto porque los ejemplares estudiados son más pequeños, ya que los autores la registraron de 50-100 mm o de 5-12 cm, respectivamente. Además, Kauffman (1932) mencionó el borde de las láminas de entero a erodado y Breitenbach y Kränzlin (2000), como crenado. Aunque Breitenbach y Kränzlin (2000) dicen que las láminas son anchas, Kauffman (1932) indicó que son muy angostas, lo que coincide con el material estudiado.

Macrolepiota mastoidea (Fr.) Singer, *Lilloa* 22: 417 (1951) [1949]

Píleo de 65–120 mm de diámetro, convexo a plano, umbonado, fibriloso, color crema, disco entero de color café rojizo a café rojizo negruzco o café grisáceo, que se rompe en pequeños parches o escamas planas hacia el margen. Láminas libres, juntas, subangostas, blanquecinas que se manchan irregularmente de rojizo, con borde entero. Estípite de 160–

205 × 20–23 mm, central, cilíndrico, hueco, superficie fibrilosa, color crema, con escamas muy pequeñas, furfuráceas, de color café rojizo claro a café oscuro o café grisáceo, base bulbosa con micelio blanco adherido. Anillo movable, membranoso, sencillo, de color crema, con la parte inferior cubierta con pequeñas escamas similares a las del pie. Contexto blanquecino.

Basidiosporas de 12–15 × 8–9 μm, elipsoides a ligeramente alargadas, lisas, de pared gruesa, con poro germinal, hilalinas, reacción metacromática positiva. Basidios sin fíbulas.

Hábito y hábitat: Solitario a esparcido, terrestre, en bosque de *Pinus* y *Quercus*.

Material estudiado: Localidad 2 (Cuadro1), julio 9, 2012, L.E. Ruiz-González 2 (IBUG).

Comentarios: Esta especie se caracteriza por el píleo umbonado, sus escamas pequeñas en el píleo y estípite, y por la ausencia de fíbulas en la base de los basidios (Ge *et al.*, 2010). De acuerdo con Ge *et al.* (2010), Breitenbach y Kränzlin, (1995) y Candusso y Lanzoni (1990), las láminas no se manchan, contrario al material estudiado.

Ramaria aurea (Schaeff.) Quél., Fl. mycol. France (Paris): 467 (1888)

Basidioma de mediano a grande, ramificado. Ramas crema rosado, amarillo claro hacia los ápices, terminaciones con apariencia de molares con 3 o 4 puntas, guindas. Base blanquecina, pie largo enterrado. Contexto compacto, blanquecino, marmoleado. Olor a arrayán, sabor amargo y picante.

Basidiosporas de 10–13 × 4.5–5.5 μm, Q = 2.1–2.7, cilíndricas, con verrugas que forman estrías ligeramente marcadas, de pared delgada, sin poro germinal, hialinas. Hifas septadas con fíbulas.

Hábito y hábitat: Solitario, terrestre, en bosque de *Pinus* y *Quercus*.

Material estudiado: Localidad 3 (Cuadro1), agosto 31, 2013, L. Guzmán-Dávalos 10851 (IBUG).

Comentarios: Esta especie suele confundirse con *Ramaria flava*, la cual se mancha de rojo al maltratarse y tiene basidiosporas de mayor tamaño, de 10–18 × 3–6 μm (Corner, 1967). Breitenbach y Kränzlin (1986) indicaron la ausencia de fíbulas en *R. aurea*, contrario a Corner (1967), quien mencionó la presencia de fíbulas, lo cual corresponde con el material estudiado.

Ramaria holorubella (G.F. Atk.) Corner, Monograph of *Clavaria* and allied genera (Annals of Botany Memoirs No. 1): 596 (1950)

Basidioma de 85–11 × 10–12 mm, mediano, ramificado. Ramas cortas, poco apretadas, dicotómicas o la mayoría politómicas, superficie lisa a ligeramente rugosa, color carne a anaranjado grisáceo pálido, ápices con forma de molares con hasta cinco puntas, de tonos rosados a morado-rojizos. Estípite corto, pero distinguible, concoloro con las ramas, en partes se mancha de rojizo, base blanquecina. Contexto compacto, carnoso-fibroso, blanco, se mancha de rojizo en algunas partes. Olor fúngico, sabor amargo.

Basidiosporas de 10–12 × 3.5–5 μm, Q = 2.6–3.1, cilíndricas, con ligera depresión suprahilar, ornamentadas con verrugas que forman estrías no continuas, hialinas. Hifas septadas con fíbulas.

Hábito y hábitat: Solitario, terrestre, en bosque de *Pinus* y *Quercus*.

Material estudiado: Localidad 3 (Cuadro1), agosto 31, L.E. Ruiz-González 56 (IBUG).

Comentarios: Esta especie es muy cercana a *Ramaria botrytis* (Pers.) Ricken, se distingue porque esta última tiene los ápices con tonos rosados a púrpura y basidiosporas de mayor tamaño, de 12–20 × 4–6 μm (Corner, 1967).

5.2 Concentración letal media de los extractos de hongos sobre nauplios de *Artemia franciscana*

En la gráfica 1 y el cuadro 2 se muestra la concentración letal media (CL50) de los extractos acuosos de los Basidiomycetes probados sobre nauplios de *A. franciscana*. Se encontraron diferencias altamente significativas entre las especies ($P < 0.001$) y las concentraciones probadas ($P < 0.001$). Los resultados de la prueba de Tukey indican que no existen diferencias significativas entre el dicromato de potasio (CL50 = 46.07 μg/mL) y las especies *Amanita muscaria*, *A. virosa*, *Chlorophyllum molybdites*, *Lactarius piperatus*, *Leucopaxillus amarus* y *Xerocomus* sp. 3, las cuales, presentaron una CL50 menor a 70 μg/mL. *Scleroderma texense* resultó con la toxicidad más baja de las especies estudiadas (CL50 = 2,552.88 μg/mL), seguida de *Cantharellus cibarius* (CL50 = 1,586.63 μg/mL),

Cortinarius caerulescens (CL50 = 1,397.17 µg/mL) y *Ramaria holorubella* (CL50 = 757.37 µg/mL).

Los resultados de la CL50 obtenidos de los extractos alcohólicos se muestran en el Cuadro 2. La toxicidad alta en estos extractos la presentó *Amanita jacksonii* con una CL50 = 395.99 µg/mL. Las especies *Tylopilus* aff. *nicaraguensis* y *Amanita polypyramis* presentaron una mortalidad excesivamente baja, por lo que no fue posible calcular la CL50. Por su parte, *Amanita* aff. *advena* y *Macrolepiota mastoidea* mostraron una CL50 > 1000 µg/mL. En todos los casos probados (seis especies) la CL50 calculada para los extractos alcohólicos fue mayor a la calculada para los extractos acuosos de las mismas especies y significativamente más alta (menos tóxicos) que el control positivo.

5.3. Inhibición de la eclosión de quistes de *Artemia franciscana*

Los resultados de la inhibición de la eclosión y de la mortalidad de los quistes de *A. franciscana* por los extractos acuosos de los hongos se muestran en las Figuras 4–9. Se encontraron diferencias significativas entre los extractos de las especies de macromicetes estudiadas ($P < 0.001$) y entre las concentraciones evaluadas ($P < 0.001$). De las 22 especies estudiadas en este bioensayo, 18 en concentración de 25 µg/mL y 21 en concentración de 50 µg/mL inhibieron en más del 80% la eclosión de quistes de *A. franciscana*. En contraste, el DP inhibió menos del 50% en todas las concentraciones probadas con excepción de la más alta (1000 µg/mL), donde la inhibición de la eclosión fue del 62%. Los extractos de *Pholiota* sp. y *Ramaria aurea*, no presentaron efecto alguno en la eclosión de los quistes.

Posterior al proceso de lavado de los quistes, el porcentaje de mortalidad que se registró para el DP, en 100, 250 y 500 µg/mL es más del 50%, *A. polypyramis*, *Cortinarius* sp., *Cortinarius purpureus*, *Gymnopilus penetrans*, *Lactarius* aff. *smithii*, *Macrolepiota mastoidea* y *Scleroderma texense*, no superó el 50% de mortalidad en todas las concentraciones probadas. El mayor porcentaje de mortalidad, de 100% en la concentración más alta, se registró para los extractos de *Amanita virosa*, *Cantharellus cibarius*,

Chlorophyllum molybdites, *Hygrophorus russula*, *Lactarius indigo*, *L. piperatus*, *Leucopaxillus amarus* y *Tylopilus aff. nicaraguensis*.

Cuadro 2. Concentración letal media (CL50) de extractos acuosos y alcohólicos, de los Basidiomycetes estudiados sobre nauplios de *Artemia franciscana*.

Testigo/Especie	CL50 extracto acuoso µg/mL	CL50 extracto alcohólico µg/mL
Dicromato de potasio	46.07 ^a	46.07
<i>Leucopaxillus amarus</i>	30.31 ^a	NP
<i>Xerocomus sp. 3</i>	33.83 ^a	NP
<i>Amanita muscaria</i>	39.92 ^{ab}	NP
<i>Lactarius piperatus</i>	47.56 ^{ab}	NP
<i>Amanita virosa</i>	50.96 ^{ab}	NP
<i>Chlorophyllum molybdites</i>	69.42 ^{ab}	NP
<i>Psathyrella candolleana</i>	88.79 ^b	NP
<i>Amanita aff. advena</i>	118.32 ^{bc}	3,433.29
<i>Tylopilus aff. nicaraguensis</i>	166.33 ^{bc}	∞
<i>Lactarius indigo</i>	170.74 ^{bc}	663.66
<i>Amanita jacksonii</i>	173.99 ^{bc}	395.99
<i>Amanita polypyramis</i>	176.86 ^{bc}	∞
<i>Hygrophoropsis aurantiaca</i>	179.38 ^c	462.88
<i>Lactarius aff. smithii</i>	188.17 ^c	889.95
<i>Hygrophorus russula</i>	194.89 ^c	NP
<i>Macrolepiota mastoidea</i>	220.63 ^c	1,702.53
<i>Cortinarius purpureus</i>	248.12 ^c	NP
<i>Pholiota sp.</i>	268.44 ^c	NP
<i>Heimioporus ivoryi</i>	269.90 ^c	NP
<i>Gymnopillus penetrans</i>	328.25 ^{cd}	NP
<i>Ramaria aurea</i>	332.21 ^{cd}	NP
<i>Cortinarius sp.</i>	347.39 ^{cd}	NP
<i>Suillus tomentosus</i>	463.13 ^{cd}	NP
<i>Lactarius aff. pseudoaffinis</i>	551.93 ^d	NP
<i>Ramaria holorubella</i>	757.37 ^{de}	NP
<i>Cortinarius caesiocyaneus</i>	1,397.17 ^{de}	NP
<i>Cantharellus cibarius</i>	1,586.63 ^{de}	NP
<i>Scleroderma texense</i>	2,552.88 ^e	NP

∞ = CL50 no calculada por la baja mortalidad registrada; NP = No probado; Superíndices muestran las diferencias significativas resultantes de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

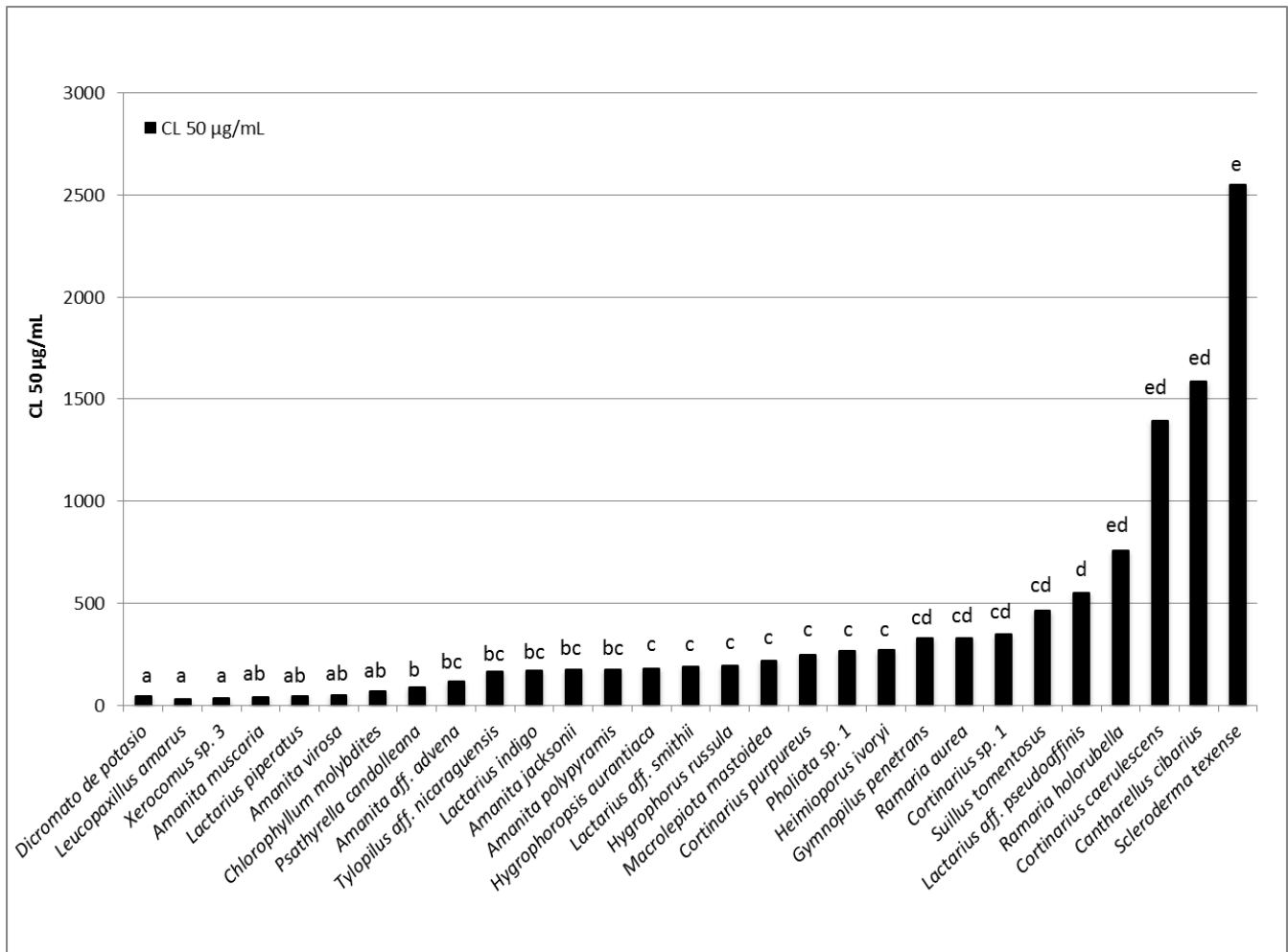


Figura 3. Concentración letal media (CL50) del extracto acuoso de 28 especies de Basidiomycetes sobre nauplios de *Artemia franciscana*. Las barras representan la CL50 por cada macromicete (n = 28) y los superíndices las diferencias significativas (P < 0.001) entre especies, resultantes del análisis de varianza (ANOVA) de dos vías y la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) *a posteriori*.

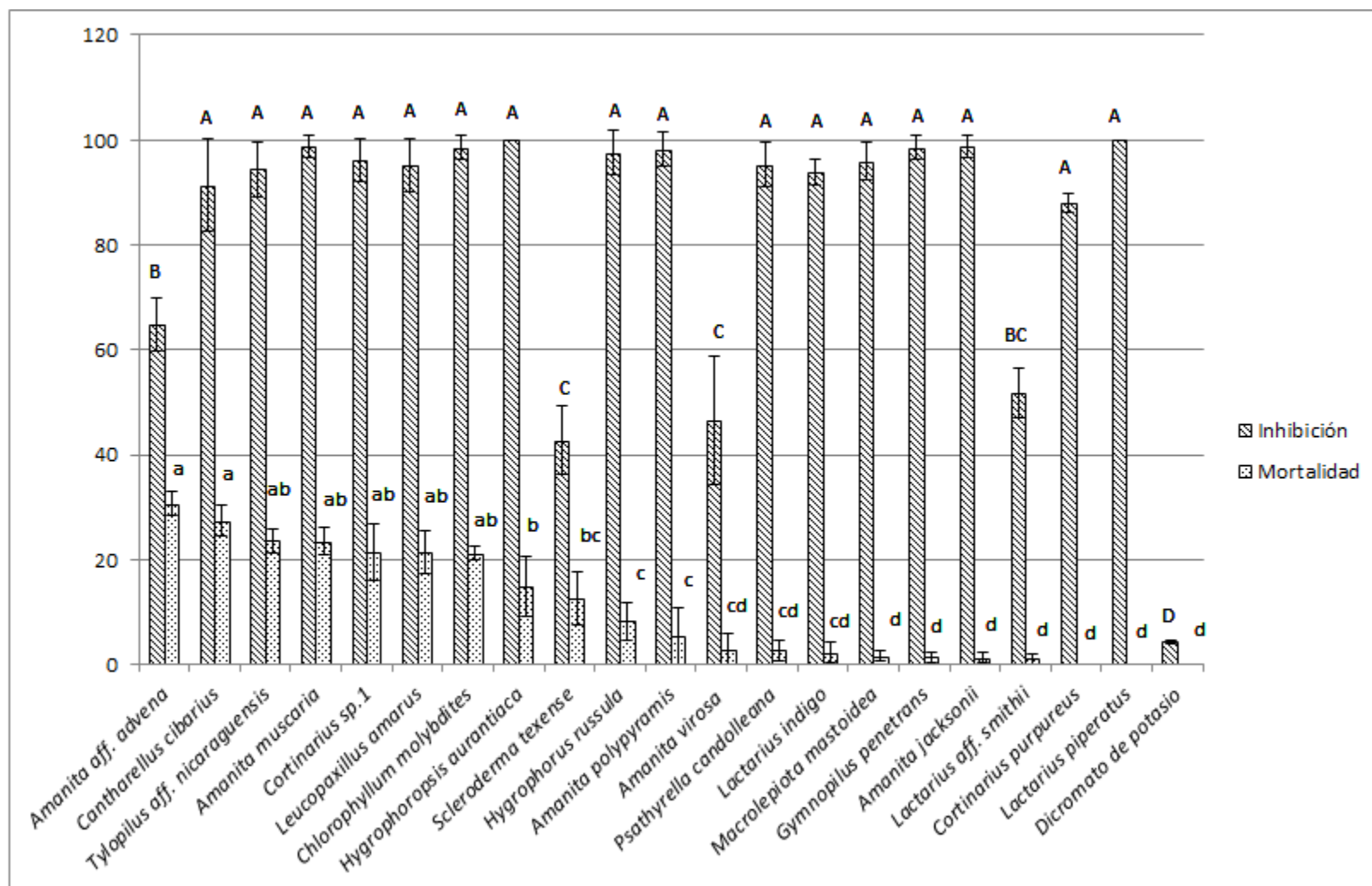


Figura 4. Porcentaje de inhibición de la eclosión y de mortalidad en los quistes de *Artemia franciscana* provocados por los extractos de Basidiomycetes (n = 22) y el dicromato de potasio, en concentración de 25 µg/mL. Las letras, mayúsculas para inhibición y minúsculas para mortalidad, muestran las diferencias significativas resultantes de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

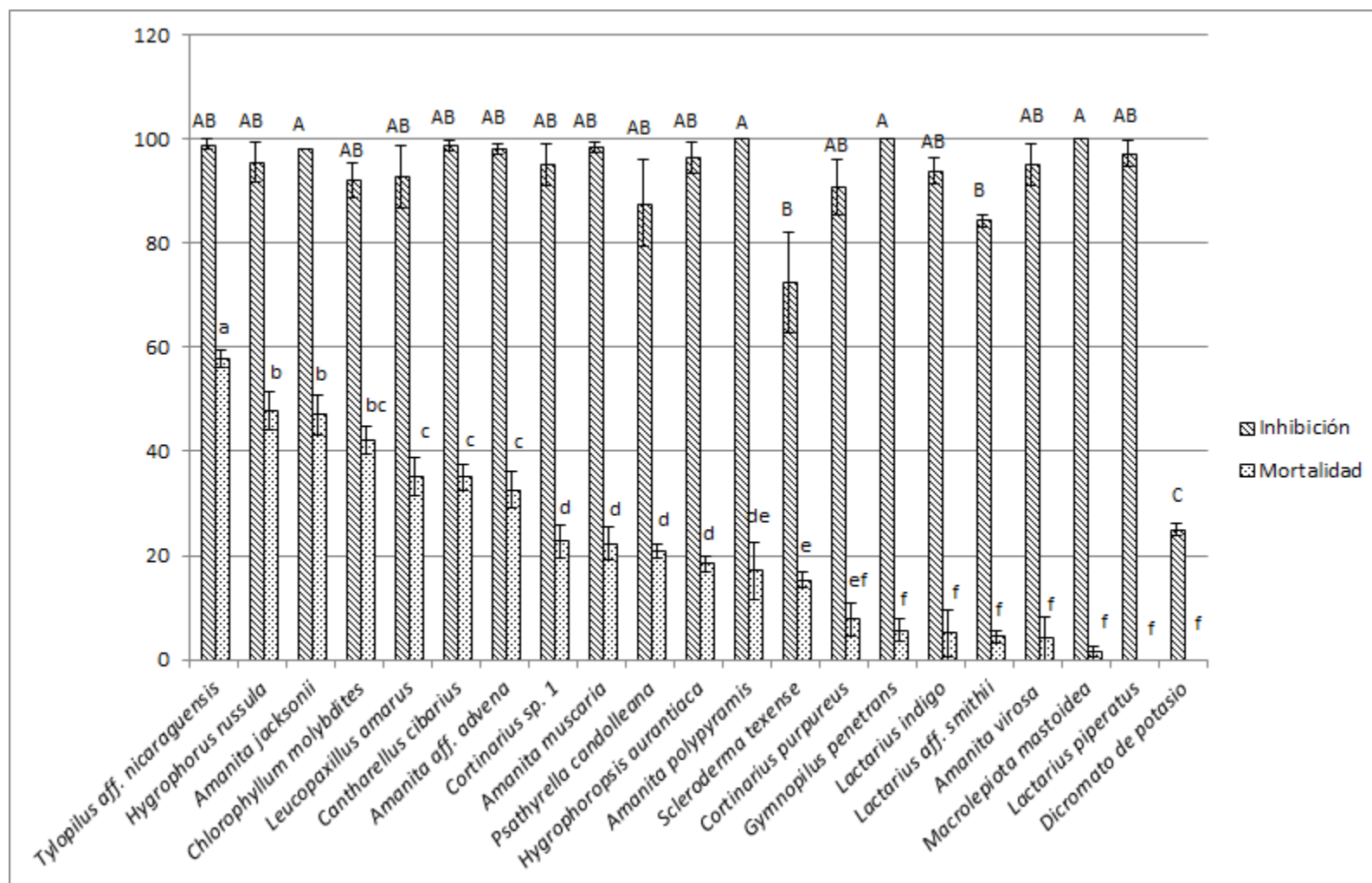


Figura 5. Porcentaje de inhibición de la eclosión y de mortalidad en los quistes de *Artemia franciscana* provocados por los extractos de Basidiomycetes (n = 22) y el dicromato de potasio, en concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$. Las letras, mayúsculas para inhibición y minúsculas para mortalidad, muestran las diferencias significativas resultantes de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

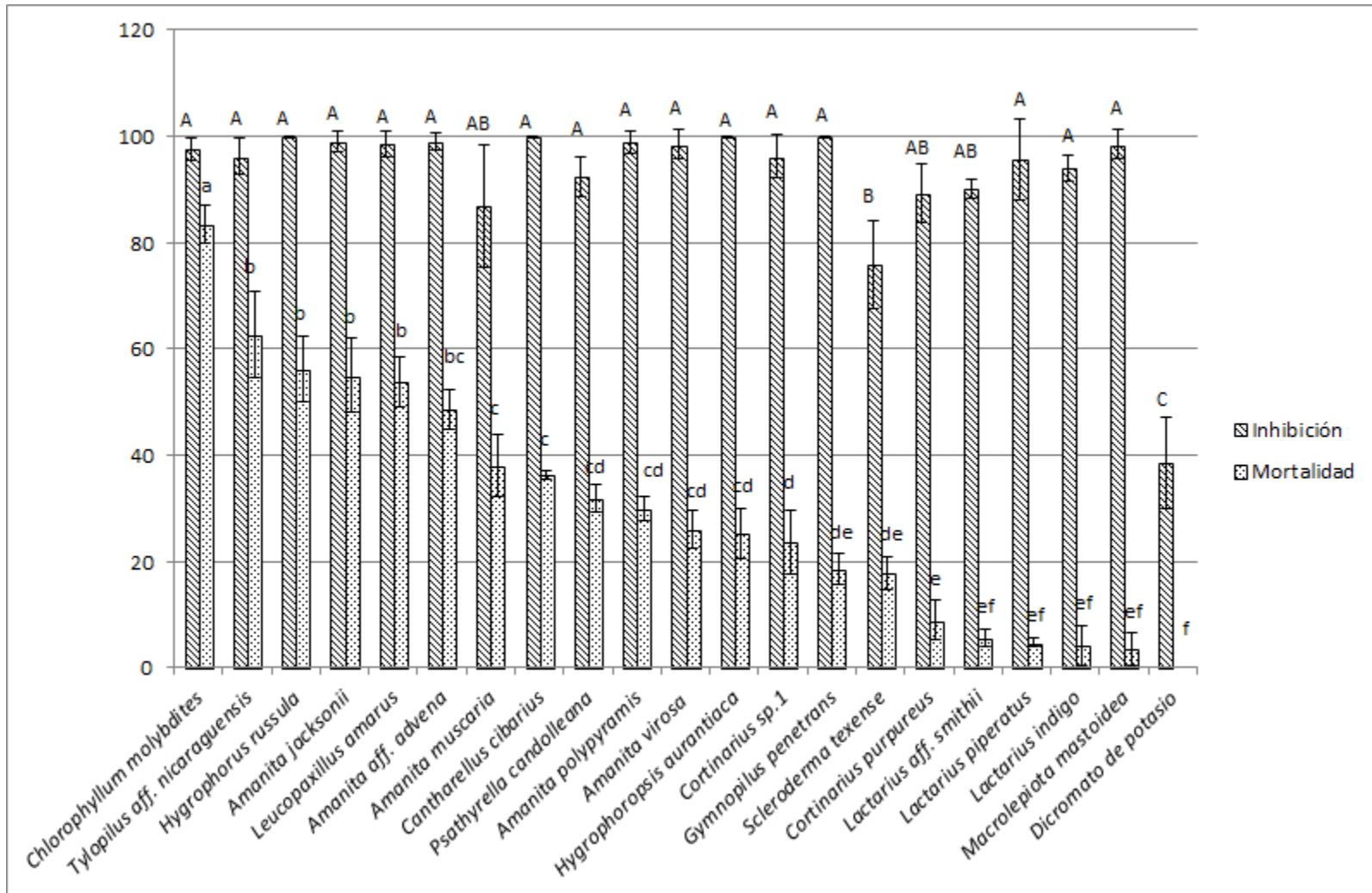


Figura 6. Porcentaje de inhibición de la eclosión y de mortalidad en los quistes de *Artemia franciscana* provocados por los extractos de Basidiomycetes (n = 22) y el dicromato de potasio, en concentración de 100 µg/mL. Las letras, mayúsculas para inhibición y minúsculas para mortalidad, muestran las diferencias significativas resultantes de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

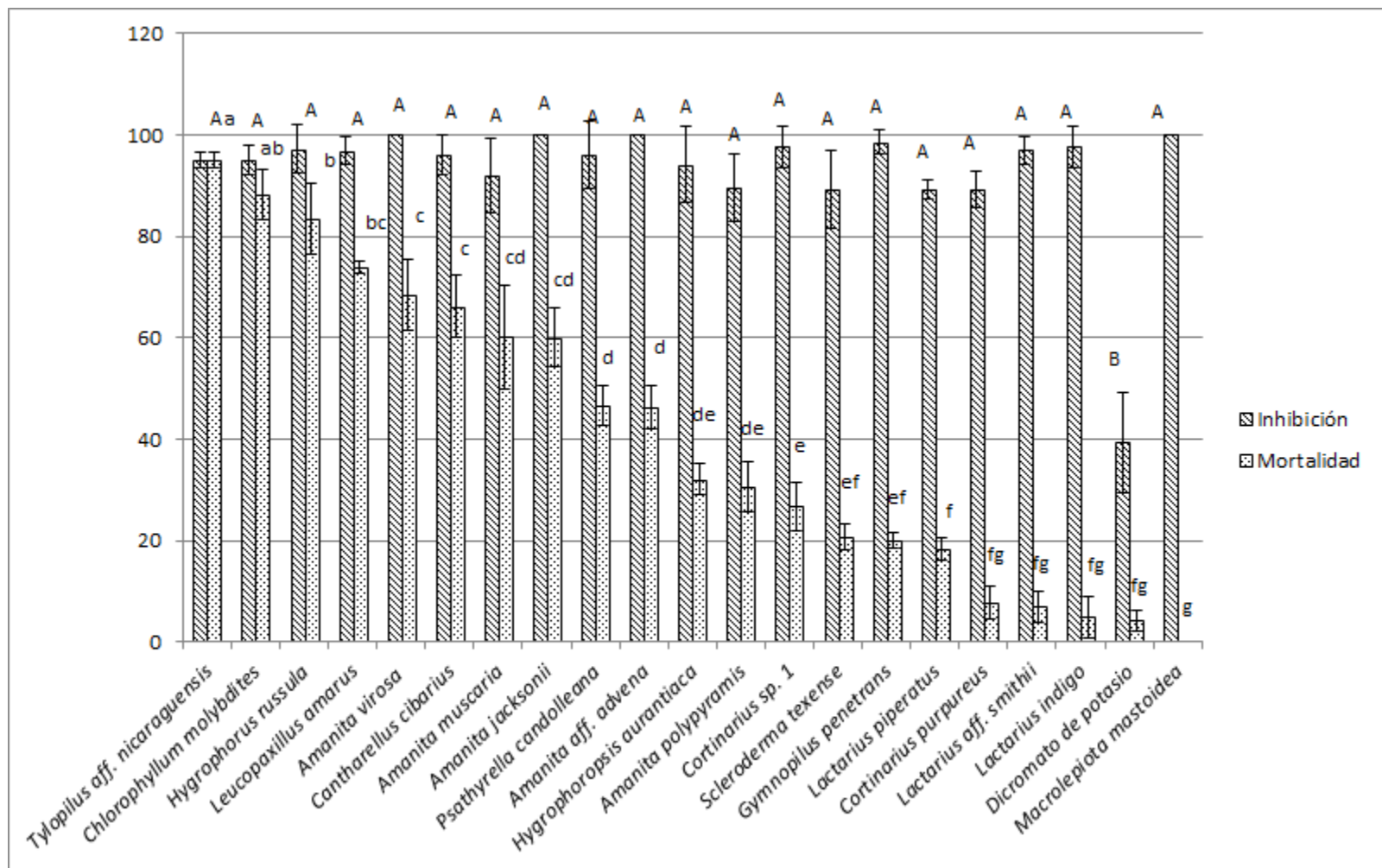


Figura 7. Porcentaje de inhibición de la eclosión y de mortalidad en los quistes de *Artemia franciscana* provocados por los extractos de Basidiomycetes (n = 22) y el dicromato de potasio, en concentración de 250 µg/mL. Las letras, mayúsculas para inhibición y minúsculas para mortalidad, muestran las diferencias significativas resultantes de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

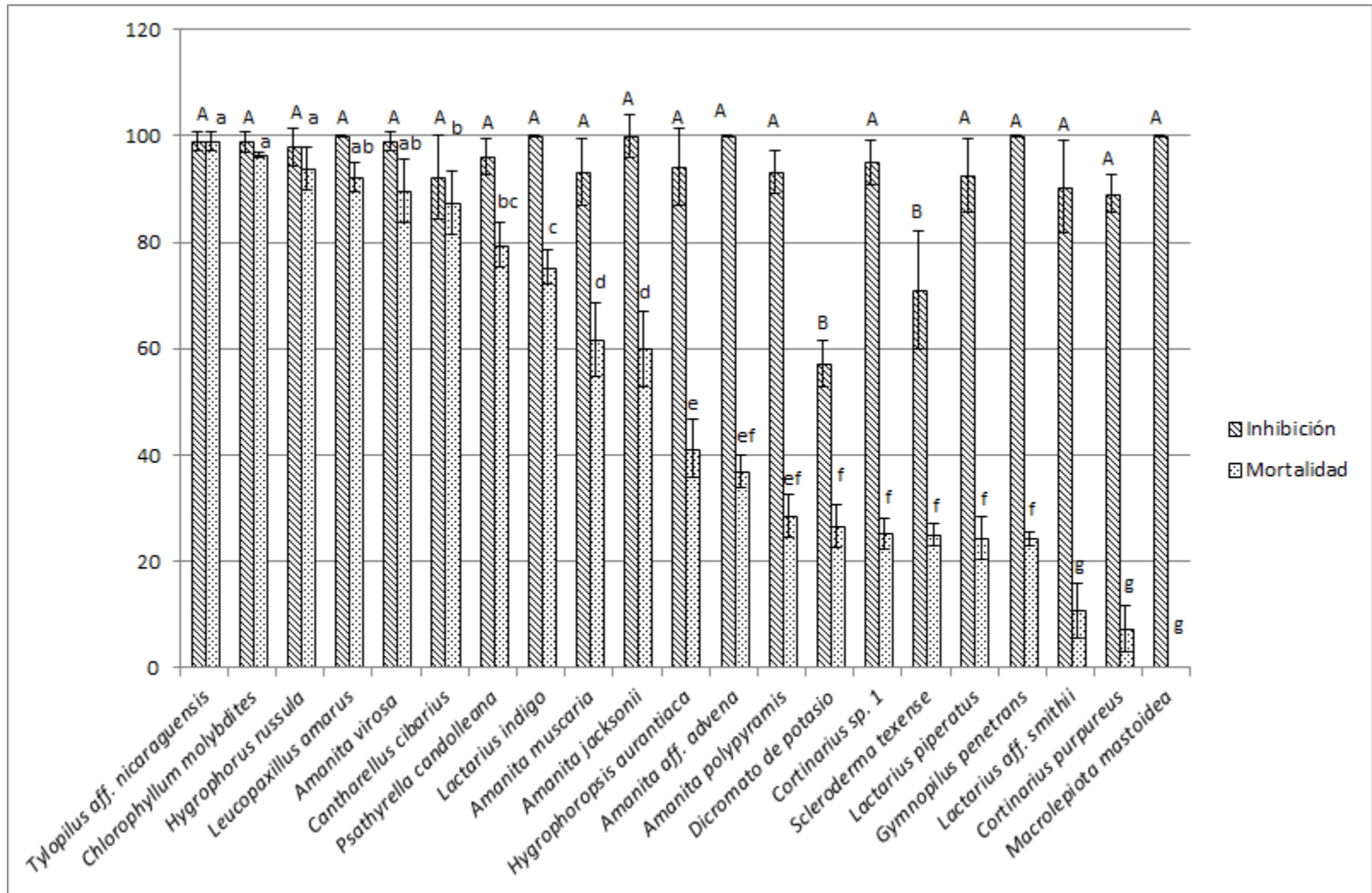


Figura 8. Porcentaje de inhibición de la eclosión y de mortalidad en los quistes de *Artemia franciscana* provocados por los extractos de Basidiomycetes (n = 22) y el dicromato de potasio, en concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las letras, mayúsculas para inhibición y minúsculas para mortalidad, muestran las diferencias significativas resultantes de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

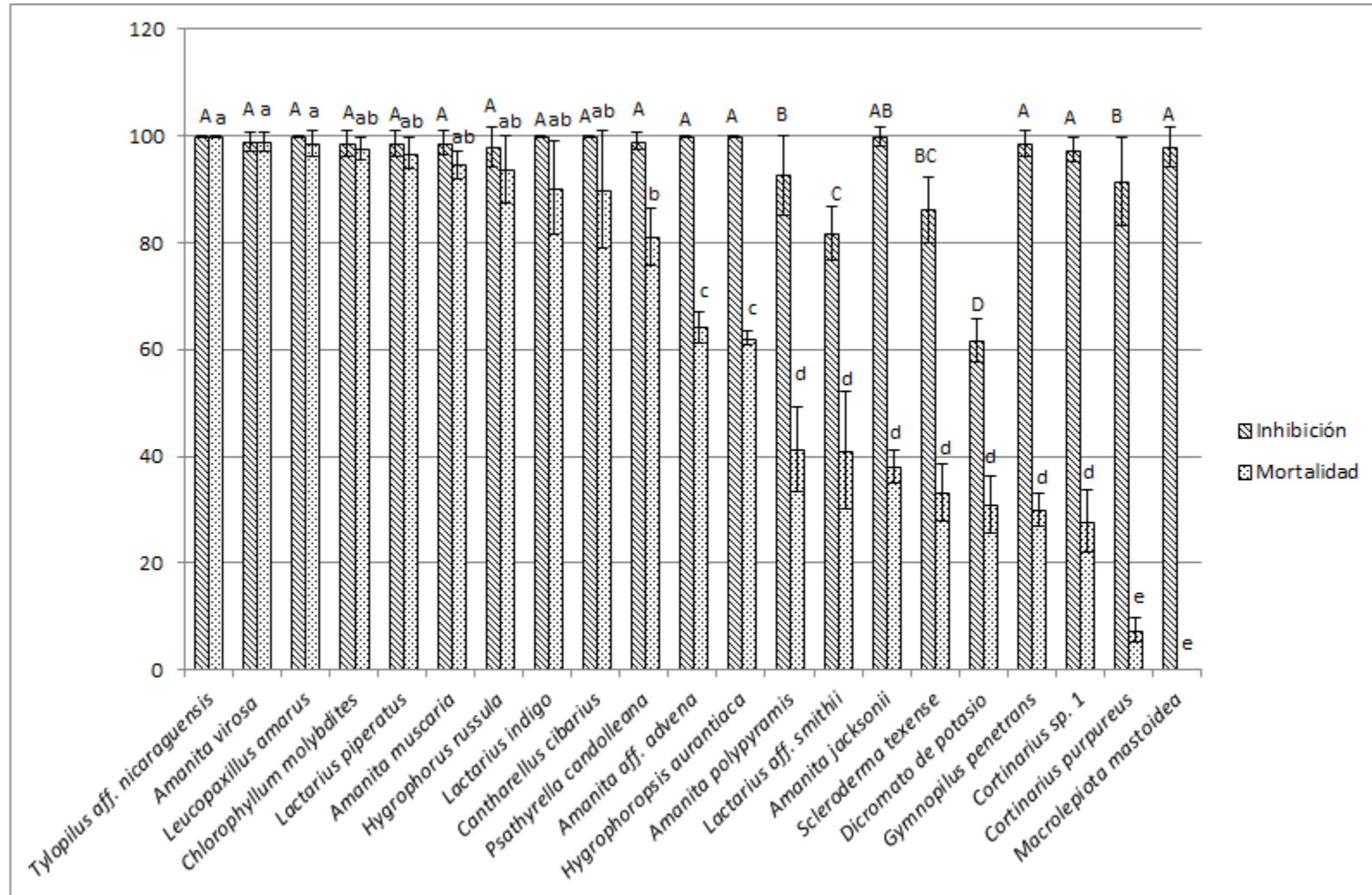


Figura 9. Porcentaje de inhibición de la eclosión y de mortalidad en los quistes de *Artemia franciscana* provocados por los extractos de Basidiomycetes (n = 22) y el dicromato de potasio, en concentración de 1000 µg/mL. Las letras, mayúsculas para inhibición y minúsculas para mortalidad, muestran las diferencias significativas resultantes de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

6. DISCUSIÓN

6.1. Contribución al conocimiento de la micobiota de Jalisco

A pesar de que no es el objetivo principal del estudio y que se estudió una pequeña muestra de apenas 28 especies de Basidiomycetes, cuatro de ellas (*Cortinarius caerulescens*, *Macrolepiota mastoidea*, *Ramaria aurea* y *R. holorubella*) resultaron registros nuevos para Jalisco. Lo anterior, sugiere que son necesarios más estudios con respecto al conocimiento micobiótico para el estado.

6.2. Concentración Letal Media sobre nauplios de *Artemia franciscana*

Mongelli *et al.* (1995) mencionaron que los compuestos que se extraen por medio de solventes orgánicos, como el etanol y metanol, en plantas medicinales son más tóxicos que los extractos acuosos para *A. franciscana*. Sin embargo, en el caso de los hongos estudiados se encontró lo contrario, ya que los extractos acuosos presentaron una mayor toxicidad que los alcohólicos. Esto indica que los principales metabolitos tóxicos de los Basidiomycetes, al menos de los taxa que se probaron con ambos extractos (Tabla 2), son compuestos polares y por tanto hidrosolubles. Debido a lo anterior, es recomendable utilizar tanto extractos acuosos como alcohólicos si se cuenta con el material suficiente para obtenerlos.

Las especies con una CL50 similar a la del DP son en su mayoría consideradas como tóxicas para los humanos. *Amanita virosa* es conocida por provocar un micetismo destructor de células, envenenamiento mortal en el 90% de los casos (Ruiz Sánchez *et al.*, 1999), principalmente por la presencia de α -amanitina, faloidina, falacidina y falisacina (Rittgen *et al.*, 2008). *Chlorophyllum molybdites* es un hongo común en prados y terrenos baldíos (Guzmán, 1978) asociado al micetismo gastrointestinal, al cual se le han atribuido diversos casos de intoxicaciones en México (Pérez-Silva y Herrera, 1986). Recientemente fue estudiado por Yamada *et al.* (2012), quienes lograron aislar una metaloendopeptidasa tóxica, a la que llamaron molybdopilisina, que provocó mortalidad en los ratones al administrarse de forma intraperitoneal en concentración de 0.1 mg disuelto en solución salina. *Amanita muscaria* causa micetismo nervioso por la presencia de ácido iboténico, así como micetismo muscarínico (Michelot y Melendez Howel, 2003). Nuestros resultados

confirman que *A. franciscana* es sensible al menos a una de las sustancias tóxicas presentes en cada una de estas tres especies y reafirma el conocimiento sobre su toxicidad.

Las otras tres especies con una CL50 similar al testigo positivo, a saber *Lactarius piperatus*, *Leucopaxillus amarus* y *Xerocomus* sp. 3 mostraron un comportamiento similar al testigo positivo, lo que comprueba que contienen metabolitos tóxicos para *A. franciscana* y sugiere que podrían ser tóxicas para los humanos. Sin embargo, el conocimiento sobre la toxicidad de las dos últimas es desconocido, con excepción de la referencia de Guzmán (1977), en la que indica a *Leucopaxillus amarus* como “no comestible”, ya que no se consume por su sabor amargo. En el caso de *Lactarius piperatus*, Guzmán (1977) lo clasificó como “poco comestible”, lo que hace referencia probablemente al poco interés por consumirla debido a su sabor picante, así mismo Gerhardt *et al.* (1995) lo mencionó como “comestible, mediocre”. Por lo tanto, son necesarios estudios que permitan corroborar la presencia de compuestos tóxicos en ellos.

A pesar de que los extractos acuosos de las especies anteriores mostraron una toxicidad alta frente a los nauplios de *A. franciscana*, similar a la del DP, es menor en comparación a la de compuestos purificados como algunas micotoxinas. Tal es el caso de la aflatoxina GI, diacetoxiscirpenol, gliotoxina y la esterigmatocistina, que tienen una CL50 entre 0.47–3.5 µg/ml sobre los nauplios de *Artemia* (Harwig y Scott, 1979). En este sentido, los Basidiomycetes estudiados, así como el DP, presentaron una toxicidad menor a las reportadas para biocidas de uso común en salud pública como desinfectantes, como el Oxone, bromuro de dodecil-etil-amonio y Tolcide, de los cuales se obtuvo una CL50 de 11.58, 0.48 y 0.26 µg/mL, respectivamente, sobre nauplios de *A. franciscana* (Bartolomé-Camacho y Sánchez-Fortún Rodríguez, 2007).

Faridur *et al.* (2010) estudiaron la toxicidad de *Pleurotus ostreatus* a partir de extractos acuoso, mezcla de metanol-cloroformo, fracciones con éter de petróleo y los residuos de este último en un ensayo con *Artemia*. Obtuvieron una CL50 de 20.89, 18.62, 6.91 y 15.84 µg/mL, respectivamente. A estos extractos se les realizó una cromatografía de capa fina, en la que se determinó la presencia de esteroides y terpenoides. Sus resultados muestran al

extracto acuoso como altamente tóxico, con la CL50 por debajo de la que encontramos para el DP (CL50 = 46.07 µg/mL) y para el hongo mortal *Amanita virosa* (CL50 = 50.96 µg/mL), además los resultados de su extracto con metanol-cloroformo son contradictorios a lo reportado por Nieto *et al.* (2008) para la misma especie (CL50 > 1000 µg/mL para el extracto alcohólico). Por otro lado, estos datos podrían no ser comparables debido a que el trabajo de Faridur *et al.* (2010), al ser realizado en Bangladesh, probablemente utilizó una especie de *Artemia* distinta de acuerdo con la posición geográfica, la cual podría tener una sensibilidad diferente a la de *A. franciscana*. Ellos citaron a la especie como *A. salina*, la cual se considera actualmente extinta (Sorgeloos *et al.*, 1986). Por otro lado, si el extracto acuoso de *P. ostreatus* tuviera esa CL50, definitivamente no podría ser consumido y este hongo es comestible y uno de los más cultivados en el mundo, alcanzando una producción de hasta 38,708 t en 2001 (Martínez-Carrera, 2002).

El extracto acuoso de *Psathyrella candolleana* (CL50 = 88 µg/mL) aparece como intermedio entre el grupo de los que presentaron toxicidad alta sobre los nauplios de *A. franciscana* (subconjunto a y ab, Figura 3) y aquéllos que presentaron una toxicidad moderada (subconjunto bc, c y cd, Figura 3). Su CL50 es similar a la reportada por Nieto *et al.* (2008) para *Paxillus involutus*, la cual consideraron como poco recomendable para el consumo humano. Sin embargo, Nieto *et al.* (2008) únicamente utilizaron extractos alcohólicos en su estudio. En los subconjuntos bc, c y cd de la Figura 3 se localizan las especies comestibles *Amanita jaksonii*, *Hygrophoropsis aurantiaca*, *Hygrophorus russula*, *Lactarius indigo*, *Macrolepiota mastoidea* y *Suillus tomentosus*; los considerados como no comestibles *Gymnopilus penetrans* y *Ramaria aurea*; *Amanita polypyramis*, venenosa cuya toxicidad se asocia al micetismo gastrointestinal (Guzmán, 1977, como *A. alexandrii*); *Cortinarius purpureus* que se ha registrado con “comestibilidad sospechosa o desconocida” (www.errotari.com/Micologia/especie.php?1410) y *Cortinarius* sp., *Heimioporus ivoryi* y *Pholiota* sp., de las cuales se desconocen sus propiedades. Los resultados sugieren que, de acuerdo con Meyer *et al.* (1982), estos hongos tienen una toxicidad moderada (CL50 < 1000 µg/mL).

En las especies que se probaron que se conocen como comestibles, no se tienen referencias de algún caso de envenenamiento a causa de las mismas. Moshi *et al.* (2007), en su estudio sobre la evaluación de la toxicidad de algunas plantas de Tanzania, mencionó que ya que el ensayo con *A. franciscana* se utiliza también para evaluar capacidad anticancerígena, la mortalidad que observaron pudo deberse al efecto anticancerígeno de algunas de sus muestras. En este sentido, nuestros resultados sugieren que los Basidiomycetes considerados como comestibles pudieron mostrar una toxicidad moderada para *A. franciscana* por la presencia de compuestos bioactivos con potencial anticancerígeno, antioxidante o antibiótico (Brizuela *et al.*, 1998; Wasser, 2011). Por otra parte, Sasidharan *et al.* (2011) estudiaron un extracto alcohólico de *Ganoderma boninense*, especie medicinal que se consideró segura para el uso humano, al mostrar una CL50 = 640 µg/mL, la cual es similar al resultado del extracto alcohólico de *L. indigo*. Así mismo, existen evidencias de que este último contiene sustancias con actividad antibiótica y citotóxica (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2011).

Wong *et al.* (2013) encontraron para *Auricularia polytricha* una CL50 = 115.8 µg/mL, cercana al grupo antes mencionado. Además, los mismos autores indicaron que esta especie presenta actividad antibiótica al mostrar inhibición moderada de *Staphylococcus aureus* (Gram-positivo) y de *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativo). De igual forma, el extracto de acetona de la corteza de *Acacia mearnsii* De Wild. presentó una CL50 = 112.36 µg/mL sobre *Artemia*, y en el mismo trabajo, se demostró una actividad antibiótica del mismo (Olajuyigbe y Afolayan, 2012). Padmaja *et al.* (2002) estudió, mediante el ensayo con *Artemia*, plantas medicinales de la India: *Acorus calamus* L. (CL50 = 217 µg/mL), *Centratherum anthelminticum* Kuntze. (CL50 = 473.4 µg/mL), *Mangifera indica* L. (CL50 = 576.9 µg/mL) y *Commiphora mukul* Hook. (CL50 = 325 µg/mL). Estas especies tienen diferentes usos medicinales como expectorantes, carminativos, antiespasmódicos, sedantes y diuréticos. En particular, *M. indica* se ha registrado como un astringente, en tratamiento de la hemorragia uterina, en la diarrea hemorrágica, reumatismo y para desórdenes nerviosos. Lo anterior refuerza la idea de que la toxicidad observada se puede atribuir a un potencial medicinal de los hongos comestibles antes mencionados, así como de aquéllos de los que se desconocen sus propiedades.

Por otra parte, *Amanita polypyramis*, *Gymnopilus penetrans* y *Ramaria aurea* confirman su toxicidad, con respecto a los reportes en la literatura (Guzmán, 1977, 1978), con una CL50 de 176.86, 328.25 y 332.21 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Estos resultados, que corresponden a una toxicidad moderada como se comentó anteriormente, son similares a lo registrado para *Psilocybe cubensis* por Vega-Villasante *et al.* (2013), quienes consideraron a esta especie como poco recomendable para el consumo humano al presentar una CL50 = 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Este hongo es conocido principalmente por sus efectos psicodislépticos (Schultes y Hofman, 2000) y trastornos múltiples como ansiedad, ataxia, desorientación, hipotensión, hipertensión, parestesia, disforia, espasmos musculares, midriasis, náusea, taquicardia, inconsciencia, entre otros (Asselborn *et al.*, 2000; Berger y Guss, 2005; Beug *et al.*, 2006).

Cortinarius caerulescens, *Lactarius aff. pseudoaffinis* y *Ramaria holorubella* formaron el segundo grupo con la CL50 más alta y por lo tanto, una toxicidad de las más bajas. De estas especies no se encontraron antecedentes sobre sus propiedades, con excepción de lo descrito por Guzmán (1978) para las especies del género *Ramaria* en general, quién comentó que aquéllas con sabor amargo deben considerarse como no comestibles. Las dos especies utilizadas en este estudio, *R. aurea* y *R. holorubella*, se describieron con sabor amargo. Aunque este grupo resultó poco tóxico para *A. franciscana*, de acuerdo con lo observado por Meyer *et al.* (1982) y Olajuyigbe y Afolayan (2012), una CL50 menor a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ puede representar la presencia de compuestos bioactivos en menor concentración.

Por otra parte, *Scleroderma texense*, un hongo venenoso causante de micetismo gastrointestinal (Guzmán, 1977), mostró la CL50 más alta registrada de los Basidiomycetes estudiados, y por lo tanto la mortalidad más baja sobre los nauplios de *A. franciscana* (CL50 = 2552.88 $\mu\text{g}/\text{mL}$), seguido del hongo comestible *Cantharellus cibarius* (CL50 = 1586.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$), sin diferencias significativas entre los mismos. Ambos resultados son similares a los reportados por Nieto *et al.* (2008) para los extractos alcohólicos de las especies comestibles de *Pleurotus ostreatus* y *P. pulmonarius* (CL50 > 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), que se consideran seguras para consumo humano. Harwig y Scott (1979) probaron micotoxinas purificadas sobre nauplios de *A. franciscana* y demostraron que este crustáceo no es

sensible al ácido oxálico, ácido β -nitropropiónico, griseofulvina y luteoskirina, lo que puede sugerir que tampoco es sensible a los compuestos presentes en *S. texense*. De esta manera se podría explicar la baja mortalidad registrada para el extracto de este hongo.

6.3. Inhibición de la eclosión de quistes de *Artemia franciscana*

En este bioensayo no se probaron extractos alcohólicos, debido a que éstos son resuspendidos en el agua de mar con ayuda del Tween 80 al 5%, el cual permite la homogenización de las moléculas no polares en un medio polar. Como se mencionó anteriormente se demostró que el Tween 80 a esta concentración afecta directamente la viabilidad de los quistes de *A. franciscana*.

Existen diferentes condiciones que tienen la capacidad de afectar la eclosión de los quistes de *A. franciscana*, como son la iluminación, oxígeno disuelto en el medio, salinidad y temperatura (Sorgeloos *et al.*, 1986). En este ensayo se utilizó iluminación constante durante el tiempo de exposición de los quistes a los extractos. No se proporcionó aeración constante pero, con base en los resultados de los testigos negativos, esto no representó efecto alguno sobre la eclosión, ya que en los testigos negativos la eclosión fue del 100% en todos los casos. Se ajustó el medio a una salinidad de 40 UPS, la cual de acuerdo con Soundarapandian y Saravanakumar (2009) es óptima para el desarrollo de *A. franciscana*. Además, el bioensayo se realizó a una temperatura ambiente de 24 a 30 °C, que favorece la eclosión de acuerdo con Sorgeloos *et al.* (1986), ya que los quistes eclosionan en un rango de 4 a 32 °C y entre más alta la temperatura los quistes eclosionarán con mayor velocidad. Con base en lo anterior, los resultados obtenidos reflejan únicamente los efectos provocados por sustancias presentes de los hongos estudiados.

Los resultados de todos los extractos acuosos de los Basidiomycetes usados en este estudio (en todas sus concentraciones), mostraron una inhibición de la eclosión de los quistes de más del 80%. Lo anterior es similar a lo reportado para los extractos acuosos de *Psilocybe cubensis*, los cuales inhibieron la eclosión en 100% en todas las concentraciones probadas (Vega-Villasante *et al.*, 2013). Los quistes son estructuras de resistencia de un embrión en etapa de gastrulación en estado ametabólico, liberados por hembras de *A. franciscana*

cuando las condiciones no son adecuadas para el desarrollo de los nauplios. Estas estructuras se encuentran en estado de diapausa, lo cual permite que su resistencia a factores de estrés sea muy alta (MacRae, 2005). En este sentido, se pueden inferir dos cosas: que los extractos solo prolongaron el estado de diapausa o bien que afectaron al embrión. Para comprobarlo, se analizó la viabilidad de los quistes después de retirar el extracto.

Se ha demostrado que los Basidiomycetes tienen la capacidad de bioacumular diversos metales pesados, tales como el Cd, Cu, Hg, Zn, entre otros (Alonso *et al.*, 2004; Falandysz *et al.*, 2012; Fontes-Vieira *et al.*, 2013; Fang *et al.*, 2014). De acuerdo con Brix *et al.* (2006) y Jiménez *et al.* (2006), los metales pesados como el Cu y Ni tienen la capacidad de inhibir la eclosión a partir de concentraciones de 40 µg/mL, debido a que afectan los mecanismos de osmorregulación e ionoregulación en los crustáceos (Lignot *et al.*, 2000), que son esenciales para el desarrollo de los quistes (Soorgelos, 1986). Si se toma en cuenta la posibilidad de bioconcentración de metales pesados y además la presencia de metabolitos tóxicos en algunos de ellos, se podría explicar la alta inhibición registrada. En primera instancia el sistema osmorregulatorio es lo que permite al quiste entrar en fase de ruptura. Una vez que el quiste se encuentra en esta etapa, el embrión queda expuesto al medio y se inicia un sistema de regulación iónica que le posibilita continuar su desarrollo hasta alcanzar el estadio de nauplio. Si el quiste logra alcanzar la fase de ruptura y la regulación iónica falla, el embrión no continuará su desarrollo (Soorgelos, 1986).

Alonso *et al.* (2004) demostró que *Cantharellus cibarius* capta cantidades elevadas de Ni y Cu. Estos metales provocan efectos adversos en la eclosión y viabilidad de los quistes de *A. franciscana* (Brix *et al.*, 2006; Jiménez *et al.*, 2006). Lo anterior sugiere que *Hygrophorus russula* y *Lactarius indigo* probablemente pueden captar a su vez metales pesados que afectan directamente a los quistes de *A. franciscana*. Sin embargo, estas últimas dos especies presentaron toxicidad moderada sobre los nauplios de *A. franciscana*, lo que podría indicar que contienen compuestos activos, en cantidad suficiente para afectar tanto el nauplio como a la viabilidad del quiste, como es el caso de algunos antibióticos (Migliore *et al.*, 1997).

En este trabajo, al igual que en Vega-Villasante *et al.* (2013), se encontró que el DP y los extractos de los Basidiomycetes que quedaron en este grupo (subconjunto d, Figura 9) no son detectados por el sistema de protección del quiste, por lo que bajo las condiciones establecidas en este bioensayo, se rompió la diapausa, se activó el metabolismo y el embrión comenzó su desarrollo.

En el caso de *Macrolepiota mastoidea* es posible que los metabolitos tóxicos estén en baja concentración o que los embriones de *A. franciscana* sean resistentes a ellos, ya que a pesar de haber prolongado el proceso de diapausa en todas sus concentraciones, no se observó efecto alguno en la eclosión, al resultar en más del 98% después del proceso de lavado. Por otra parte, los extractos de *Ramaria aurea* y *Pholiota* sp. no mostraron efecto alguno sobre los quistes a pesar de haber provocado un efecto sobre los nauplios de *A. franciscana*, por lo que probablemente sus compuestos están en concentraciones demasiado bajas como para afectar una estructura de resistencia como lo son los quistes.

Si bien se ha demostrado que la presencia de metales pesados y otras sustancias tienen la capacidad de inhibir la eclosión (Brix *et al.*, 2006; Jiménez *et al.*, 2006; Migliore *et al.*, 1997), no existen trabajos que evalúen el efecto directo sobre la viabilidad de los quistes después de retirarlos de la exposición a las sustancias estudiadas y colocarlos en condiciones óptimas para su desarrollo. En este trabajo, bajo la metodología propuesta, se encontró que existen compuestos capaces de afectar la sobrevivencia del embrión y en contraste, sustancias que a pesar de inhibir la eclosión no afectan la viabilidad de éste, por lo que al encontrar condiciones favorables continúa con su desarrollo.

7. CONCLUSIONES

- i. Con base en la CL50 que resultó similar a la del testigo positivo, se confirma la toxicidad para *Artemia franciscana*, y por ende posiblemente para los humanos, de *Amanita muscaria*, *A. polypyramis*, *A. virosa* y *Chlorophyllum molybdites*.
- ii. Se desconocían las propiedades de *Lactarius piperatus*, *Leucopaxillus amarus* y *Xerocomus* sp. 3, con este trabajo se encontró que son hongos tóxicos.
- iii. Se confirma la nula toxicidad de *Cantharellus cibarius*.
- iv. Algunos hongos comestibles mostraron una toxicidad moderada sobre *A. franciscana*, por lo que es probable que contengan compuestos bioactivos en bajas concentraciones, que pudieran tener un potencial medicinal.
- v. El ensayo con nauplios de *Artemia franciscana* puede ser una herramienta útil en la búsqueda de productos naturales novedosos debido a su alta aplicación en la detección de compuestos de diferente origen en bajas concentraciones. Además el ensayo posee una gran reproducibilidad y se pueden evaluar las sustancias de interés sobre un número elevado de organismos.
- vi. Las causas por las cuales los extractos de las diferentes especies de Basidiomycetes afectaron la eclosión de los quistes y la viabilidad de los embriones de *A. franciscana* son distintas y de naturaleza diferente. Con base en lo anterior, se puede inferir que los resultados obtenidos bajo la metodología propuesta se pueden explicar por varias razones para cada uno o para grupos de los hongos probados y no existe una explicación única para todos. Por lo tanto, es necesario realizar investigaciones que permitan aclarar los mecanismos por los cuales los Basidiomycetes afectaron la eclosión y la sobrevivencia del embrión.
- vii. Son necesarios estudios que permitan corroborar la presencia de compuestos bioactivos en los Basidiomycetes estudiados, caracterización, aislamiento y su potencial medicinal.

8. LITERATURA CITADA

- Alonso J, García MA, Pérez-López M, Melgar MJ. 2004. Acumulación de metales pesados en macromicetos comestibles y factores que influyen en su captación. *Revista de Toxicología* 21: 11–15.
- Abdel-Mallek AY, El-maraghy SSM, Hasan HAH. 1993. Mycotoxin-producing potential of some *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* isolates found on corn grains and sunflower seeds in Egypt. *Journal of Islamic Academy of Sciences* 6(3): 189–192.
- Acosta M, Guevara M, Crescente O. 2011. Actividad biológica de extractos en acetato de etilo de los hongos *Fusarium camptoceras* Wollenw y Reinking y *Aspergillus flocculosus* Frisvad y Samson, aislados de ambientes marinos. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras* 40(1): 25–39.
- Aguirre-Acosta E, Ulloa M, Aguilar S, Cifuentes J, Valenzuela R. 2014. Biodiversidad de hongos en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, Supl. 85: 76–81.
- Alghalibi SMS, Shater ARM. 2004. Mycoflora and mycotoxin contamination of some dried fruits in Yemen Republic. *Assiut University Bulletin for Environmental Researches* 7(2): 19–27.
- Antonyuk VO, Klyuchivska OY, Stoika RS. 2010. Cytotoxic proteins of *Amanita virosa* Secr. mushroom: purification, characteristics and action towards mammalian cells. *Toxicon* 55: 1297–1305.
- Asselborn G, Wennig R, Yegles M. 2000. Tragic flying attempt under the influence of “magic mushrooms”. *Problems of Forensic Sciences* 42: 41–46.
- Bartolomé-Camacho MC, Sánchez-Fortún Rodríguez S. 2007. Valoración de la toxicidad aguda de biocidas utilizados en ambientes de la vida privada y la salud pública sobre *Artemia franciscana*. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales* 3: 90–97.
- Benjamin, D.R., 1995. *Mushrooms: poisons and panaceas. A handbook for naturalists, mycologists, and physicians.* W.H. Freeman and Company, New York.
- Berger KJ, Guss DA. 2005. Mycotoxins revisited: Part I. *The Journal of Emergency Medicine* 28: 53–62.
- Beug MW, Shaw M, Cochran KW. 2006. Thirty-plus years of mushroom poisoning: summary of the approximately 2,000 reports in the NAMA case registry. *McIlvainea* 16: 47–68.
- Breitenbach, J. y F. Kränzlin. 1986. *Fungi of Switzerland. Vol. 2. Mykologia Luzern.* Lucerna, Suiza.
- Breitenbach, J. y F. Kränzlin. 1995. *Fungi of Switzerland. Vol. 4. Mykologia Luzern.* Lucerna, Suiza.
- Breitenbach, J. y F. Kränzlin. 2000. *Fungi of Switzerland. Vol. 5. Mykologia Luzern.* Lucerna, Suiza.
- Brix V, Gerdes R, Adams W, Grosell M. 2006. Effects of copper, cadmium, and zinc on the hatching success of brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Environmental Contamination and Toxicology* 51: 580–583.
- Brizuela MA, García L, Pérez L, Mansur M. 1998. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Revista Iberoamericana de Micología* 15: 69–74.

- Çaglarlırmak N, Ünal K, Ötles S. 2002. Nutritional value of edible wild mushrooms collected from the Black Sea region of Turkey. *Micología Aplicada Internacional* 14(1): 1–5.
- Candusso M, Lanzoni G. 1990. *Fungi Europaei* 4: *Lepiota* s.l. Liberia Ed.. Giovanna Biella, I-21047 Saronno.
- Carballo JL, Hernández-Inda ZL, Pérez P, García-Grávalos MD. 2002. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology* 2: 17–21.
- Carvalho LM, Carvalho F, Bastos ML, Baptista P, Moreira N, Monforte AR, da Silva Ferreira AC, de Pinho PG. 2014. Non-targeted and targeted analysis of wild toxic and edible mushrooms using gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *Talanta* 118: 292–303.
- Colak A, Faiz Ö, Sesli E. 2009. Nutritional composition of some wild edible mushrooms. *Turkish Journal of Biochemistry* 34(1): 25–31.
- Corner E. J. H. 1967. *A Monograph of Clavaria and Allied Genera*. Dawson of Pall Mall, London.
- Duraković L, Blažinkov M, Skelin A, Sikora S, Delaš F, Mrkonjić-Fuka M, Huić-Babić K, Redžepović S. 2011. Temperature-dose relationships with aflatoxin M₁ in milk on the brine shrimp (*Artemia salina*) larvae. *Mljekarstvo* 61(2): 145–153.
- Falandysz J, Widzicka E, Kojta AK, Jarzyska G, Drewnowska M, Dryzalowska A, Danisiewicz-Czuprynska D, Lenz E, Nnorom IC. 2012. Mercury in common chanterelles mushrooms: *Cantharellus* spp. Update. *Food Chemistry* 133: 842–850.
- Fang Y, Sun X, Yang W, Ma N, Xin Z, Fu J, Liu X, Liu M, Mariga AM, Zhu X, Hu Q. 2014. Concentrations and health risks of lead, cadmium, arsenic, and mercury in rice and edible mushrooms in China. *Food Chemistry* 147: 147–151.
- Faridur RM, Rezaul KM, Farhadul IM, Rowshanul HM, Tofazzal HM. 2010. Phytochemical and cytotoxic investigation on oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *International Research Journal of Pharmacy* 1: 342–345.
- Favilla M, Macchia L, Gallo A, Altomare C. 2006. Toxicity assessment of metabolites of fungal biocontrol agents using two different (*Artemia salina* and *Daphnia magna*) invertebrate bioassays. *Food and Chemical Toxicology* 44: 1922–1931.
- Fernández-Calientes A, Mendiola Martínez J, Monzote Fidalgo L, García Parra M, Sariego Ramos I, Acuña Rodríguez D, Scull Lizama R, Gutiérrez Gaitén Y. 2009. Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 61: 254–258.
- Fontes-Vieira PA, Gontijo DC, Vieira BC, Fontes EA, Assunção LS, Leite JP, Oliveira MG. 2013. Antioxidant activities, total phenolics and metal contents in *Pleurotus ostreatus* mushrooms enriched with iron, zinc or lithium. *Food Science and Technology* 54: 421–425.
- García J. 1999. Estudio sobre la taxonomía, ecología y distribución de algunos hongos de la familia Boletaceae (Basidiomycetes, Agaricales) de México. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Ge ZW, Yang ZL, Vellinga EC. 2010. The genus *Macrolepiota* (Agaricaceae, Basidiomycota) in China. *Fungal Diversity* 45: 81–98.

- González AM, Presa MF, Lurá MC. 2003. Ensayo de toxicidad a *Artemia salina*: puesta a punto y aplicación a micotoxinas. FABICIB 7: 117–122.
- González AM, Presa M, Latorre MG, Lurá MC. 2007. Detección de metabolitos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayo sobre *Artemia salina*. Revista Iberoamericana de Micología 24: 59–61.
- Guzmán G. 1977. Identificación de los hongos comestibles, venenosos, alucinantes y destructores de madera. Limusa, México, D.F.
- Guzmán, G. 1978. Hongos. Limusa, México, D.F.
- Guzmán G. 1980. Las intoxicaciones producidas por los hongos. Ciencia y Desarrollo 32: 129–134.
- Guzmán, G., 1987. Un caso especial de envenenamiento mortal producido por hongos de Veracruz. Revista Mexicana de Micología 3: 203–209.
- Guzmán G. 1998. Inventorying the fungi in Mexico. Biodiversity and Conservation 7: 369–384.
- Harlt M, Humpf HU. 2000. Toxicity assessment of fumonisins using the brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay. Food and Chemical Toxicology 38: 1097–1102.
- Harwig J, Scott PM. 1971. Brine shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxins. Applied Microbiology 21: 1011–1016.
- Hawksworth DL. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. Mycological Research 95: 641–655.
- Hernández S. 2006. El modelo animal en las investigaciones Biomédicas. Biomedicina 2(3): 252–256.
- Hlywka JJ, Beck MM, Bullerman LB. 1997. The use of the chicken embryo screening test and brine shrimp (*Artemia salina*) bioassays to assess the toxicity of fumonisin B1 mycotoxin. Food and Chemical Toxicology 35: 991–999.
- Horibe M, Kobayashi Y, Dohra H, Morita T, Murata T, Usui T, Nakamura-Tsuruta S, Kamei M, Hirabayashi J, Matsuura M, Yamada M, Saikawa Y, Hashimoto K, Nakata M, Kawagishi H. 2010. Toxic isolectins from the mushroom *Boletus venenatus*. Phytochemistry 71: 648–657.
- Hu J, Zhang P, Zeng J, Chen Z. 2012. Determination of amatoxins in different tissues and development stages of *Amanita exitialis*. Journal of the Science of Food and Agriculture 92: 2664–2667.
- IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21. Armonk, NY. <http://www-01.ibm.com/software/analytics/spss/>.
- Jiménez J, Gelabert R, Brito R. 2006. Efectos tóxicos del níquel y el zinc en *Artemia franciscana*. Universidad y Ciencia 22: 65–74.
- Kauffman CH. 1932. Cortinarius. En North American Flora 10(5): 282–348.
- Largent DL. 1986. How to identify mushrooms to genus, I: Macroscopic features. Mad River Press, Eureka.
- Largent DL, Johnson D, Watling R. 1977. How to identify mushrooms to genus, III: Microscopic features. Mad River Press, Eureka.
- Lignot JH, Spanings-Pierrot C, Charmantier G. 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. Aquaculture 191: 209–245.
- Lincoff G, Mitchel DC. 1977. Toxic and hallucinogenic mushroom poisoning. A handbook for physicians and mushroom hunters. Van Nostrand Reinhold, New York.

- MacRae TH. 2005. Diapause diverse states of developmental and metabolic arrest. *Journal of Biological Research*. 3: 3–14.
- Mariaca-Méndez, R., L. del C. Silva-Pérez, C.A. Castaños-Montes, 2001. Proceso de recolección y comercialización de hongos comestibles en el valle de Toluca, México. *Ciencia Ergo Sum* 8: 30–40.
- Martínez-Carrera D. 2002. Current development of mushroom biotechnology in Latin America. *Micología Aplicada International* 14(2): 61–74.
- Meyer BN, Ferrigini RN, Jacobsen LB, Nicholas DE, MCLAughlin JL. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* 45: 31–35.
- Michael AS, Thompson CG, Abramovitz M. *Artemia salina* as test organisms for a bioassay. 1956. *Science* 123: 464.
- Michelot D, Melendez Howell LM. 2003. *Amanita muscaria*: chemistry, biology, toxicology and ethnomycology. *Mycological Research* 107: 131–146.
- Migliore L, Civitareale C, Brambilla G, Di Delupis GD. 1997. Toxicity of several important agricultural antibiotics to *Artemia*. *Water Research* 31: 1801–1806.
- Mongelli ER, Coussio JD, Ciccía GN. 1995. Estudio de toxicidad aguda de plantas medicinales argentinas mediante el bioensayo de *Artemia salina* Leach. *Dominguezia* 12: 35–42.
- Moretti A, Mulé G, Ritieni A, Logrieco A. 2007. Further data on the production of beauvericin, enniatins and fusaproliferin and toxicity to *Artemia salina* by *Fusarium* species of *Gibberella fujikuroi* species complex. *International Journal of Food Microbiology* 118: 158–163.
- Moshi MJ, Van den Beukelb CJP, Hamzac OJM, Mbwambo ZH, Nondoa ROS, Masimbaa PJ, Mateed MIN, Kapingua MC, Mikxf F, Verweije PE, Van der Venb AJAM. 2007. Brine shrimp toxicity evaluation of some Tanzanian plants used traditionally for the treatment of fungal infections. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 4: 219–225.
- Nicholas GM, Blunt JW, Munro MHG. 2001. Cortamidine oxide, a novel disulfide metabolite from the New Zealand Basidiomycete (mushroom) *Cortinarius* species. *Journal of Natural Products* 64: 341–344.
- Nieminen P, Kärjä V, Mustonen AM. 2008. Indications of hepatic and cardiac toxicity caused by subchronic *Tricholoma flavovirens* consumption. *Food and Chemical Toxicology* 46: 781–786.
- Nieminen P, Kirsi M, Mustonen AM. 2006. Suspected myotoxicity of edible wild mushrooms. *Experimental Biology and Medicine* 231: 221–228.
- Nieto IJ, Salama AM, Cataño JE, Chegwin C. 2008. Determinación de la toxicidad de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarias* y *Paxillus involutus* sobre *Artemia salina*. *Revista Iberoamericana de Micología* 25: 186–187.
- Nunes BS, Carvalho FD, Guilhermino LM, Stappen GV. 2006. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environmental Pollution*. 144: 453–462.
- Ochoa-Zarzosa A, Vázquez-Garcidueñas SM, Robinson-Fuentes VA, Vázquez- Marrufo G. 2011. Antimicrobial and cytotoxic activity from basidiocarp extracts of the edible mushroom *Lactarius indigo* (Schw.) Fr. (Russulaceae). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 5: 281–288.

- Olajuyigbe OO, Afolayan AJ. 2012. Pharmacological assessment of the medicinal potential of *Acacia mearnsii* De Wild.: Antimicrobial and toxicity activities. *International Journal of Molecular Sciences* 13: 4255–4267.
- Padmaja R, Arun PC, Prashanth D, Deepak M, Amit A, Anjana M. 2002. Brine shrimp lethality bioassay of selected Indian medicinal plants. *Fitoterapia* 73: 508–510.
- Pereira AM, Kimmelmeier C. 2000. Production of mycotoxins by galactose oxidase producing *Fusarium* using different culture media. *Journal of Microbiology* 31: 129–134.
- Pérez-Silva E, Herrera T. 1986. Macromicetos tóxicos: *Chlorophyllum molybdites* causante de micetismo gastrointestinal en México. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* 38: 27–33.
- Pérez-Silva E, Herrera T. 1992. Un caso de aplicación de Medicina Tradicional en intoxicación por hongos de acción mortal del género *Amanita* en México. *Micología Neotropical Aplicada* 5: 83–88.
- Prior MG. 1979. Evaluation of brine shrimp (*Artemia salina*) larvae as a bioassay for mycotoxins in animal feedstuffs. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. 43: 352–355.
- Puente ME, Vega-Villasante F, Holguín G, Bashan Y. 1992. Susceptibility of the brine shrimp *Artemia* and its pathogen *Vibrio parahaemolyticus* to chlorine dioxide in contaminated sea-water. *Journal of Applied Bacteriology* 73: 465–471.
- Qureshi SA, Hira, Sultana V, Ara J, Ehteshamul-Haque S. 2011. Cytotoxic potential of fungi associated with rhizosphere and rhizoplane of wild and cultivated plants. *Pakistan Journal of Botany* 43(6): 3025–3028.
- Ribeiro B, Andrade PB, Silva BM, Baptista P, Seabra RM, Valentão. 2008. Comparative study on free amino acid composition of wild edible mushrooms species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 10973–10979.
- Rittgen J, Pütz M, Pyell U. 2008. Identification of toxic oligopeptides in *Amanita* fungi employing capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry with positive and negative ion detection. *Electrophoresis* 29: 2094–2100.
- Rodríguez O, Herrera-Fonseca MJ, Galván-Corona A. 2013. Nuevos registros de Basidiomycota para Jalisco, México. *Acta Botánica Mexicana* 105: 45–58.
- Rodríguez-Maldonado MG, López-Álvarez F, Andrade Padilla MA. 2008. Intoxicación por hongos: A propósito de un niño con falla hepática. *Revista Mexicana de Pediatría* 75(4): 171–174.
- Ruan-Soto F, Garibay-Origel R, Cifuentes F. 2004. Conocimiento micológico tradicional en la planicie costera del Golfo de México. *Revista Mexicana de Micología* 19: 57–70.
- Ruiz Sánchez D, Tay Zavala J, Sánchez Vega JT, Martínez García H. 1999. Los micetismos y su relevancia en la medicina. *Revista Iberoamericana Micología* 16: 121–125.
- Sadler M. 2003. Nutritional properties of edible fungi. *British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin* 28: 305–308.
- Sánchez-Jácome M R, Guzmán-Dávalos L. 2011. Hongos citados para Jalisco, II. *Ibugana* 16:25–60.

- Sasidharan S, Jinxuan O, Yoga-Latha L, Amutha S. 2011. *In vivo* toxicity study of *Ganoderma boninense*. African Journal of Pharmacy and Pharmacology 5: 1819–1823.
- Schultes RE, Hofmann A. 2000. Plantas de los dioses. Fondo de Cultura Económica, México D.F.
- Siddiqui IA, Amer- Zareen, Shaukat SS. 2001. Cytotoxicity assay of some fungal filtrates using *Artemia salina* Leach (brine shrimp). Pakistan Journal of Biological Sciences 4(3): 356–358.
- Sorgeloos P, Lavens P, Lè P, Tackaert W, Versichele D. 1986. Manual para el cultivo y uso de *Artemia* en acuicultura. <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab474s/ab474s00.htm>
- Sorgeloos P, Van Der Wielen CR, Persoone G. 1978. The use of *Artemia* nauplii for toxicity test, a critical analysis. Ecotoxicology and Environmental Safety 2: 249–255.
- Soundarapandian P, Saravanakumar G. 2009. Effect of different salinities on the survival and growth of *Artemia spp.* Current Research Journal of Biological Sciences 1: 20–22.
- StatSoft, Inc. 2007. Statistica (data analysis software system), version 8.0. www.statsoft.com.
- Stone R. 2012. Heart-Stopping revelation about how Chinese mushrooms kills. Science 335: 1293.
- Vásquez-López JA. 2007. Pautas básicas para el manejo de animales de experimentación en investigación biomédica. <http://www.facultadsalud.unicauca.edu.co>.
- Vega-Villasante F., Ruiz-González LE, Guerrero-Galván S.R., Guzmán-Dávalos L. 2013. Evaluación de la toxicidad de *Psilocybe cubensis* (Agaricales, Basidiomycota) sobre *Artemia franciscana* (Crustacea, Anostraca). Revista Iberoamericana de Micología 30(1): 54–56.
- Vellinga EC. 1998. Glossary. En: Bas C, Kuyper TW, Noordeloos ME, Vellinga EC (eds.). Flora agaricina Neerlandica, 1. A.A. Balkema, Rotterdam.
- Wasser SP. 2011. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. Applied Microbiology and Biotechnology 89: 1323–1332.
- Wijnands LM, van Leusden FM. 2000. An overview of adverse health effects caused by mycotoxins and bioassays for their detection. RIVM report 257852-004. National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven.
- Wong FC, Chai TT, Tan SL, Yong AL. 2013. Evaluation of Bioactivities and Phenolic Content of Selected Edible Mushrooms in Malaysia Tropical Journal of Pharmaceutical Research 12(6): 1011–1016.
- Yamac M, Bilgili F. 2006. Antimicrobial activities of fruit bodies and/or mycelial cultures of some mushroom isolates. Pharmaceutical Biology 44: 660–667.
- Yamada M, Tokumitsu N, Saikawa Y, Nakata M, Asano J, Miyairi K, Okuno T, Konno K, Hashimoto K. 2012. Molybdophyllysin, a toxic metalloendopeptidase from the tropical toadstool, *Chlorophyllum molybdites*. Bioorganic & Medicinal Chemistry 20: 6583–6588.