

---

## OBTENCIÓN DE ESCLEROCIOS DE MORILLA (*Morchella esculenta*)

---

### EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

---

Gerardo Alvarado-Castillo, Gerardo Mata, Martha Elena Nava Tablada, Daniel Martínez-Carrera y Diego Esteban Platas Rosado

#### RESUMEN

*Morchella esculenta* es un hongo comestible de alto valor comercial y la obtención de esclerocios es considerada como la clave para su cultivo. En este trabajo se evaluó el desarrollo de la cepa IE-750 en ocho medios de cultivo sólido y seis en forma líquida, utilizando como parámetros el crecimiento micelial, la producción de biomasa, la habilidad para producir esclerocios y su biomasa. El mejor crecimiento micelial se obtuvo en el tratamiento con composta (T7: 53,87cm<sup>2</sup>), y en cuanto a la biomasa, el medio de cultivo con levadura fue mejor (T3: 80,3mg). Los

tratamientos con gallinaza y composta, presentaron 40 y 80% de esclerocios, respectivamente, tanto en medio sólido como líquido. La mayor cantidad de biomasa de estas estructuras se presentó en el tratamiento con composta en medio sólido (T7: 27,04mg). Los esclerocios se obtuvieron en lapsos de 9-12 días (medio sólido) y de 7-9 días (medio líquido), lo cual es un tiempo relativamente corto y abre una posibilidad de cumplir con una de las condiciones necesarias para su domesticación.

#### OBTAINING SCLEROTIA OF MOREL MUSHROOM (*Morchella esculenta*) IN DIFFERENT CULTURE MEDIA

Gerardo Alvarado-Castillo, Gerardo Mata, Martha Elena Nava Tablada, Daniel Martínez-Carrera and Diego Esteban Platas Rosado

#### SUMMARY

*Morchella esculenta* is an edible mushroom of high commercial value and obtaining sclerotia is considered important for its cultivation. In this work, the growth of the IE-750 strain was studied in eight solid and six liquid culture media. Parameters assessed were mycelial growth, production of biomass, and ability to produce sclerotia and their biomass. The best mycelial growth was obtained in the treatment containing compost extract

(T7: 53.87cm<sup>2</sup>), while the highest production of biomass was recorded in the treatment containing yeast (T3: 80.3mg). Treatments with poultry manure and compost showed 40 and 80% of sclerotia in solid and liquid media, respectively, and the highest sclerotia biomass was recorded in the compost treatment (solid medium). Sclerotia were obtained in periods of 9-12 days (solid medium) and 7-9 days (liquid medium).

#### Introducción

Las colmenillas o morillas (*Morchella* spp.) son hongos comestibles cotizados a nivel mundial (Alexopoulos *et al.*, 1996; Molina *et al.*, 1993), aunque su cultivo tuvo inicio hace más de dos décadas con los trabajos de Ower *et al.* (1998), no se ha logrado establecer una producción satisfactoria. Al contrario, las patentes derivadas de esas investigaciones (Ower *et al.*, 1986, 1988) han recibido numerosos cuestionamientos sobre la eficiencia de sus resultados (Molina *et al.*, 1993;

Barnes y Wilson, 1998; Stott y Mohammed, 2004). Sin embargo, los trabajos realizados a la fecha coinciden en que es necesaria la obtención de esclerocios como una condición básica para la consecución del ascocarpo o cuerpo fructífero (Ower, 1982; Ower *et al.*, 1986, 1988; Volk y Leonard, 1990; Stott y Mohammed, 2004).

Los esclerocios se diferenciarán para fructificar, al encontrar las condiciones ambientales óptimas (Güler y Arkan, 2000) o cuando sean inducidos por estrés causado por condiciones extremas ta-

les como inviernos largos, inundaciones o incendios. Estos últimos son asociados fuertemente con la producción de morillas en condiciones naturales (Volk y Leonard, 1989; Stamets, 1993), por lo cual se han provocado intencionalmente para la fructificación de este hongo, ocasionando la pérdida y la fragmentación del hábitat donde son recolectados (Dagleish y Jacobson, 2005).

Existen dos pasos para la domesticación de morillas propuestos por Stott y Mohammed (2004). El primero se centra en los requisitos

ambientales y nutricionales para producir esclerocios de forma confiable y abundante, mientras que el segundo es la investigación de los activadores y las condiciones requeridas para la iniciación y maduración de ascocarpos. El primero de los pasos mencionados conforma el objeto de estudio del presente trabajo, pues la producción masiva de esclerocios maduros, permitirá implementar ensayos futuros bajo dos enfoques principales que serían la producción artificial de morilla y la introducción a su hábitat natural. Esta última es

---

#### PALABRAS CLAVE / Composta / Esclerocios / Medios de Cultivo / *Morchella esculenta* /

Recibido: 02/07/2007. Aceptado: 16/06/2008.

**Gerardo Alvarado-Castillo.** Maestro en Ciencias en Agroecosistemas Tropicales, Colegio de Postgraduados (COLPOS), Veracruz, México. Dirección: Km 88.5 Carr. Xalapa-Veracruz, México. e-mail: galvarado@colpos.mx

**Gerardo Mata.** Doctor en Ciencias de Agrorecursos, Institut Nacional Polytechnique de Toulouse, Francia. Investigador, Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz, México.

**Martha Elena Nava Tablada.** Doctora, Benemérita Univer-

sidad Autónoma de Puebla, México. Profesora Investigadora, El Colegio de Veracruz, Xalapa, Veracruz, México.

**Daniel Martínez-Carrera.** Ph.D., King's College, Londres, RU. Profesor Investigador, COLPOS, Puebla, México.

**Diego Esteban Platas Rosado.** Ph.D. en Economía Aplicada, University of Minnesota, EEUU. Profesor Investigador, COLPOS, Veracruz, México.

# OBTENCIÓN DE ESCLERÓCIOS DE MORILLA (*Morchella esculenta*) EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO

Gerardo Alvarado-Castillo, Gerardo Mata, Martha Elena Nava Tablada, Daniel Martínez-Carrera e Diego Esteban Platas Rosado

## RESUMO

*Morchella esculenta* é um cogumelo comestível de alto valor comercial e a obtenção de esclerócios é considerada como a chave para seu cultivo. Neste trabalho foi avaliado o desenvolvimento da cepa IE-750 em oito meios de cultivo sólido e seis em forma líquida, utilizando como parâmetros o crescimento micelial, a produção de biomassa, a habilidade para produzir esclerócios e sua biomassa. O melhor crescimento micelial foi obtido no tratamento por compostagem (T7: 53,87cm<sup>2</sup>), e em relação à biomassa, o meio de cultivo com levedura foi melhor

(T3: 80,3mg). Os tratamentos de cama-de-frango e composta-gem apresentaram 40 e 80% de esclerócios, respectivamente, tanto no meio sólido como líquido. A maior quantidade de biomassa de estas estruturas se apresentou no tratamento com compostagem no meio sólido (T7: 27,04 mg). Os esclerócios foram obtidos em períodos de 9-12 dias (meio sólido) e de 7-9 dias (meio líquido), o qual é tempo relativamente curto e abre uma possibilidade de cumprir com uma das condições necessárias para sua domesticação.

parte de una estrategia para su conservación, ya que este hongo se encuentra catalogado en México como una especie amenazada (INE, 1994) y su recolección está regulada por las normas oficiales NOM-059-ECOL-1994 y NOM-010-RECNAT-1996. Con base en lo anterior se realizó la evaluación del crecimiento micelial, producción de biomasa y de esclerocios de *M. esculenta* IE-750 en ocho medios de cultivo sólidos y seis líquidos.

## Materiales y Métodos

### Obtención de la cepa

La cepa utilizada [*Morchella esculenta* (L.) Pers.] proviene de EEUU, habiendo sido importada por la casa comercial Fungi Perfecti y se encuentra depositada en el cepario de hongos del Instituto de Ecología, A.C., Xalapa, Veracruz, México, como IE-750. La cepa se conserva en medio de cultivo EMA (extracto de malta y agar) en condiciones de refrigeración.

### Medios de cultivo

La composición de los tratamientos se indica en la Tabla I. En el caso del tratamiento T5 los nutrientes fueron, en porcentajes del fertilizante soluble marca Solucat: nitrógeno nítrico 6,5; nitrógeno amoniacal 2,0; nitrógeno ureico 1,5; fósforo total 10; potasio total 40; hierro 0,020; mangane-

so 0,010; zinc 0,002; boro 0,010; y cobre 0,002%. En T7, el extracto se obtuvo de composta para champiñón de la planta productora RIOXAL (Las Vigas, Veracruz, México), colocando 1,2kg en 4l de agua destilada e hirviendo la mezcla a fuego lento durante 15min con agitación constante. Posteriormente, se filtró con ayuda de una gasa para obtener el extracto. En T8, se hirvieron 20g de suelo (franco arenoso) en un l de agua destilada hasta que se evaporó la mitad, filtrando el resto para ser usado en la preparación del medio. De todos los medios de cultivo sólidos se depositaron 30ml en cajas de Petri de 10cm de diámetro.

Los medios de cultivo líquido fueron los mismos que los antes descritos, con la diferencia que se excluyó el agar como agente solidificante y se eliminaron los tratamientos T4 y T1, porque fueron los de más bajo crecimiento en medio sólido. Se tuvo un total de seis tratamientos y un testigo

(T) que fueron colocados en frascos de vidrio, en cantidad de 7ml cada uno.

Todos los medios se esterilizaron durante 15min a 120°C y a 15lb de presión.

### Evaluación del crecimiento micelial y biomasa

Para determinar el crecimiento micelial, se utilizaron los medios de cultivo sólidos, donde se inoculó la cepa (obtenida previamente de una resiembra en medio EMA) colocando un implante circular en el centro de la caja de Petri. Las cajas inoculadas se incubaron a 27°C en oscuridad, durante un periodo de 12 días, trazando el área de crecimiento durante las revisiones que se realizaron cada tercer día. Terminadas las mediciones, las áreas se dibujaron en hojas transparentes para ser escaneadas y descargadas al programa Arc View GIS 3.12 y determinar su superficie en cm<sup>2</sup> para cada tratamiento y durante cada periodo.

Para la determinación de biomasa se utilizaron los medios de cultivo líquidos. Se colocaron 7ml de cada tratamiento en frascos de 80ml, se tomó un implante de la cepa estudiada y se depositó en el centro del frasco, cuidando que no quedara cubierto totalmente por el medio. Los tratamientos se incubaron durante un periodo de 9 días bajo las condiciones mencionadas. La masa micelial obtenida se colocó en cuadros de papel filtro Waltham® N° 1 previamente pesados en una balanza analítica, y se llevaron a peso seco en una estufa de secado a 100°C durante 24h. La biomasa se obtuvo de la diferencia de peso.

### Diseño experimental y análisis estadístico

Los tratamientos se distribuyeron en un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones para la evaluación del crecimiento micelial y biomasa. Los datos obtenidos se procesaron con el programa STATISTICA®. Se realizó un análisis de varianza y posteriormente una prueba de comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0,05$ ) para determinar los mejores tratamientos.

La capacidad de producción de esclerocios se estimó cualitativamente, determinando su porcentaje de aparición en relación al número de repeticiones de cada tratamiento, así como la biomasa producida.

TABLA I  
CONTENIDO DE LOS TRATAMIENTOS EN MEDIO DE CULTIVO SÓLIDO

Tratamiento	Contenido aforado a 1l agua destilada
T	20g de malta, 20g de agar
T1	T+ 2g de peptona (Bioxon®)
T2	T+ 2g de gallinaza (estiércol de gallina)
T3	T+ 2g de levadura (Bioxon®)
T4	T+ 2g de indulina (Bioxon®)
T5	T+ 2g de micronutrientes
T6	T+ 2g de alimento de pollo
T7	T+ 800ml de extracto de composta
T8	T+ 800ml de extracto de suelo

TABLA II  
CRECIMIENTO MICELIAL DE *Morchella esculenta*  
EN MEDIO DE CULTIVO SÓLIDO

Tratamiento	pH	Área promedio final (cm <sup>2</sup> )	Biomasa promedio de esclerocios (mg)
T4	5,9	8,59 a	
T	7,0	16,56 a	
T1	5,8	23,96 ab	
T8	6,8	43,36 bc	
T7	6,3	53,87 bcd	82,825
T6	6,3	49,59 cd	
T5	6,2	52,92 cd	
T3	6,8	53,30 cd	
T2	6,5	52,28 d	13,166

Letras indican grupos diferentes según la prueba de Tukey.

### Resultados y Discusión

El micelio desarrolló diferentes colores, dependiendo del medio de cultivo, desde el amarillo-café hasta el marrón oscuro y texturas que van de hialinas (T3, T6 y T8) normales o intermedias (T, T4, T7) hasta algodonosas (T1, T2, T5).

El crecimiento micelial mostró diferencias significativas (Tabla II), siendo T7, T3, T5, T2 y T6 los mejores tratamientos.

En cuanto a la producción de biomasa (Tabla III), existieron diferencias significativas entre tratamientos, siendo el mejor tratamiento el T3, seguido por los tratamientos T7, T2 y T5. Se realizó una prueba de correlación entre crecimiento y biomasa, la cual fue positiva (64%).

Respecto a la capacidad para producir esclerocios, hubo resultados positivos en los tratamientos T2 (40% de las muestras) y T7 (80%

de las muestras), presentándose en un periodo de 9-12 días en medio de cultivo sólido (Figura 1). En medio líquido, la producción de esclerocios tuvo lugar en menor tiempo (7-9 días; Figura 2). En ambos casos no se requirió de condiciones adversas, ni de competencia para que se desarrollaran estas estructuras. Los demás tratamientos no presentaron esclerocios durante el tiempo de la evaluación (120 días de conservación en incubación).

Las combinaciones de EMA con los diferentes suplementos (composta, gallinaza, micronutrientes, alimento de pollo y suelo) presentaron respuestas al crecimiento que fueron similares o mayores que aquellas en los medios de cultivo usados tradicionalmente en el laboratorio (indulina, peptona, levadura y EMA). Aunque estadísticamente la producción de biomasa fue mayor

en levadura, no dista mucho de la generada por otros elementos (micronutrientes, gallinaza y composta), por lo que el uso de este tipo de medios de cultivo alternativos es recomendable.

En términos generales, el medio de cultivo que tiene mayor potencial para la producción de esclerocios es el tratamiento con composta (T7), lo cual difiere de estudios anteriores. Faris *et al.* (1996) utilizó composta combinándola únicamente con agar y de manera seca, obteniendo escasa producción de esclerocios, a pesar de que usó el método de medio pobre-rico propuesto por Amir *et al.* (1993). Así mismo, Ramos (1999) no obtuvo esclerocios al utilizar composta como medio nutritivo pobre en ninguna de las cepas utilizadas en su experimento. Ante estos resultados, se puede pensar que el método para obtener el extracto de composta en el presente trabajo, logra conservar los nutrientes y sustancias necesarias que promueven la diferenciación del micelio en esclerocios.

Distintos estudios (Volk y Leonard, 1989; Buscot, 1993; Stott *et al.*, 2002) señalaron que el micelio de *M. esculenta* crece relativamente rápido en medios de cultivo; sin embargo, requiere de una barrera física, una zona no nutricional (medio pobre-rico) o agentes competidores, para detener su crecimiento y diferenciarse en estructuras compactas que irán madurando hasta obtener esclerocios. En el presente experimento no se requirió de estas condiciones para obtener estas

estructuras, lo cual parece indicar que el extracto de composta y la gallinaza tienen precursores que estimulan la diferenciación de los esclerocios.

Uno de los resultados de interés es el corto tiempo en el que se obtuvieron los esclerocios en los tratamientos con composta y gallinaza (tanto en medio sólido como líquido), pues los reportes del periodo de formación de estas estructuras en medios de cultivo o sustratos han registrado lapsos mayores.



Figura 1. Formación de esclerocios de *Morchella esculenta* en tratamiento con extracto de composta en medio de cultivo sólido (T7).

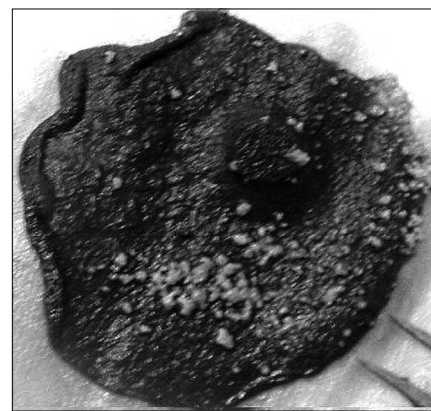


Figura 2. Producción de esclerocios de *Morchella esculenta* en tratamiento con extracto de composta en medio líquido (T7).

Singh *et al.* (1999) logró el máximo de esclerocios en sustrato de arena y un medio rico en nutrientes en 70-75 días. Ramos (1999) obtuvo microesclerocios (masa compactada de hifas tubulares y globosas unidas entre sí sin ningún tipo de diferenciación) en un lapso

TABLA III  
PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *Morchella esculenta*  
EN MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO

Tratamiento	pH	Biomasa promedio (mg)	Biomasa promedio de esclerocios (mg)
T	6,8	8,1 a	
T8	7,0	10,6 a	
T6	6,6	11,1 a	
T5	6,4	63,4 b	
T2	6,4	65,6 b	9,08
T7	6,4	66,2 b	27,04
T3	6,8	80,3 c	

Letras indican grupos diferentes según la prueba de Tukey.

de 20-25 días en medio de cultivo EMA. Durán (1999), imitando las condiciones descritas en el método del frasco de Ower *et al.* (1986), observó estas estructuras en 120 días. Por su parte, Volk y Leonard (1989) obtuvieron esclerocios en un lapso de 3-4 semanas con la modificación del método anterior. Así mismo, existen reportes donde se han utilizado medios de cultivo que no han producido esclerocios; tal es el caso de los trabajos de Kosaric y Miyata (1981) que obtuvieron masas miceliales en suero de leche, o de Güler y Arkan (2000) que utilizaron medios de agar adicionados con NaNO<sub>3</sub>.

La importancia de los esclerocios ha sido ha sido demostrada por Ower (1982), Ower *et al.* (1986), y Volk y Leonard (1989), quienes encontraron que los esclerocios pueden ser cultivados bajo condiciones controladas para formar ascocarpos. La formación y el desarrollo de los esclerocios fueron descritos más a fondo por Volk y Leonard (1990) en la descripción del ciclo de vida de *M. esculenta*, y por Amir *et al.* (1993). Estos últimos autores observaron que la producción de esclerocios puede ser del tipo terminal o lateral, obtenida a través de una zona no nutricional o un medio pobre-rico. De la misma manera, Buscot (1993) observó la formación de dos tipos de esclerocios (EES y LIS) producidos cuando el crecimiento micelial fue interrumpido físicamente por el borde de la caja petri, o como una posible respuesta asociada a la edad del medio de cultivo. Lo anterior sugiere que las paredes de vidrio de los frascos y cajas petri o el agotamiento de nutrientes pueden crear las condiciones adversas necesarias para la diferenciación (Stott *et al.*, 2002). Sin embargo, dicha explicación no es aplicable al presente trabajo, dado que el periodo de obtención de

esclerocios fue corto, 9-12 días en medio sólido y 7-9 días en medio líquido, y no se requirieron de condiciones adversas para lograr la diferenciación. Así mismo, en los demás tratamientos utilizados no se observaron esclerocios en los 120 días durante los cuales se mantuvo el experimento, aunque el micelio había invadido todo el medio de cultivo y, consecuentemente, se restringió el crecimiento apical de las hifas y la disponibilidad de nutrientes.

La obtención de esclerocios maduros en lapsos de tiempo breves, tanto en medio de cultivo sólido como líquido, especialmente en el tratamiento con extracto de composta, abre una posibilidad de producción masiva, dado que se cumple la primera condición para su domesticación. Esto servirá de base para estudios posteriores que tengan como objetivo la producción artificial de *M. esculenta* o su introducción en hábitats donde crece naturalmente. No obstante, aún se desconoce el mecanismo que dio origen a la diferenciación y formación de esclerocios, por lo que es necesaria la realización de estudios sobre los mecanismos que inducen dicho proceso.

### Conclusiones

Los resultados obtenidos indican que los medios de cultivo no tradicionales pueden ser una opción para la obtención de micelios de *M. esculenta*. Así mismo, el medio con extracto de composta (T7), tanto en medio sólido como en líquido representa el mayor potencial, pues tuvo el mayor porcentaje de producción y biomasa total de esclerocios. El aspecto más sobresaliente es el corto tiempo en que se obtuvieron estas estructuras respecto a otros estudios, con lo cual se abre la posibilidad de dar cumplimiento a la primera condición para su domesticación.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Colegio de Postgraduados, a la Unidad de Micología del INECOL y al CONACYT, México, por la orientación, implementación y financiamiento de esta investigación.

### REFERENCIAS

- Alexopoulos CJ, Mims CW, Blacwell M (1996) *Introductory Mycology*. 4th ed. Wiley. Nueva York, EEUU. 632 pp.
- Amir R, Levanon D, Hadar Y, Chet I (1993) Morphology and physiology of *Morchella esculenta* during sclerotium formation. *Mycol. Res.* 97: 683-689.
- Barnes S, Wilson A (1998) *Cropping of the french black morel. A preliminary investigation*. (Project N° UT-12A). Rural Industries Research and Development Corporation. Australia. 14 pp.
- Buscot F (1993) Mycelial differentiation of *Morchella esculenta* in pure culture. *Mycol. Res.* 97: 136-149.
- Dalgleish HJ, Jacobson KM (2005) A first assessment of genetic variation among *Morchella esculenta* (Morel) populations. *J. Hered.* 96: 396-403.
- Durán HE (1999) Germinación de ascosporas, obtención de esclerocios e intento de producción de ascocarpos de *Morchella spp.* Tesis. Universidad Autónoma Chapingo, México.
- Faris HA, Broderick A, Nair NG (1996) Occurrence and initial observations of *Morchella* in Australia. En Royse DJ (Ed). *Proc. 2nd Int. Conf. - World Society of Mushroom Biology and Mushroom Products*. Pennsylvania State University, EEUU. pp. 393-399.
- Güler P, Arkan O (2000) Cultural characteristics of *Morchella esculenta* mycelium on some nutrients. *Turk. J. Biol.* 24: 783-794.
- INE (1994) Legislación y listas rojas ¿hongos en peligro de extinción? Anexo normativo. Lista de especies en riesgo. Instituto Nacional de Estadística. México. ([www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/gacetas/227/especies.html](http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/gacetas/227/especies.html))
- Kosaric N, Miyata N (1981) Growth of morel mushroom mycelium in cheese whey. *J. Dairy Res.* 48: 149-162.
- Molina R, O'Dell T, Luoma DA, Michael C, Michael RK (1993) *Biology, ecology, and social aspects of wild edible mushrooms in the forests of the Pacific Northwest: a preface to managing commercial harvest*. Forest Service Gen. Tech. Rep. PNW-GTR-309. Pacific Northwest Research Station. Department of Agriculture. Portland, OR, EEUU. 42 pp.
- Ower RD (1982) Notes on the development of the morel ascocarp: *Morchella esculenta*. *Mycologia* 74: 142-144.
- Ower RD, Mills GL, Malachowsky JA (1986) Cultivation of *Morchella*. U.S. Patent N° 4,594,809.
- Ower RD, Mills GL, Malachowsky JA (1988) Cultivation of *Morchella*. U.S. Patent N° 4,757,640.
- Ramos RH (1999) *Cultivo de cepas mexicanas de Morchella esculenta en el laboratorio*. Tesis. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. 59 pp.
- Singh SK, Dhar BL, Verma RN (1999) Mass production of carpogenic sclerotium spawn in *Morchella esculenta*- An attempt at its domestication. En 3<sup>rd</sup> Int. Conf. - *World Society of Mushroom Biology and Mushroom Products*. Pennsylvania State University. EEUU. pp. 1-11.
- Stamets P (1993) *Growing Gourmet and Medicinal Mushroom*. 3<sup>a</sup> ed. Ten Speed Press. Berkeley, CA, EEUU. pp 401-418.
- Stott KG, Gill W, Mohammed C, Brown M (2002) Specialty gourmet medicinal fungi research in Tasmania. En 4<sup>th</sup> Int. Conf. - *World Society of Mushroom Biology and Mushroom Products*. Pennsylvania State University. EEUU. pp. 1-11.
- Stott K, Mohammed C (2004) *Specialty mushroom production systems: maitake and morels*. Project N° UT-30AII. Rural Industries Research and Development Corporation. Australia. 86 pp.
- Volk TJ, Leonard TJ (1989) Physiological and environmental studies of sclerotium formation and maturation in isolates of *Morchella crassipes*. *Appl. Env. Microbiol.* 55: 3095-3100.
- Volk TJ, Leonard TJ (1990) Cytology of the life-cycle of *Morchella*. *Mycol. Res.* 94: 399-406.