



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRICOLAS

CAMPUS VERACRUZ

PROGRAMA DE POSGRADO EN AGROECOSISTEMAS TROPICALES

**Cultivo de *Morchella esculenta* (L.) Pers. y obtención de
esclerocios *In Vitro***

GERARDO ALVARADO CASTILLO

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS

TEPETATES, MANLIO FABIO ALTAMIRANO, VERACRUZ

2008

La presente tesis, titulada: **Cultivo de *Morchella Esculenta* (L.) Pers. y obtención de esclerocios *In Vitro***, realizada por el alumno: **Gerardo Alvarado Castillo**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
EN AGROECOSISTEMAS TROPICALES

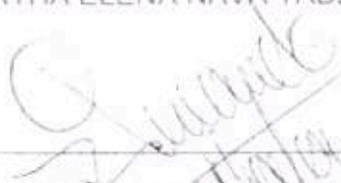
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA



DRA. MARTHA ELENA NAVA TABLADA

DIRECTOR



DR. GERARDO MATA MONTES DE OCA

ASESOR EXTERNO



DR. DANIEL MARTINEZ CARRERA

ASESOR



DR. DIEGO ESTEBAN PLATAS ROSADO

Tepetates, Manlio Fabio Altamirano Veracruz, 30 de Noviembre de 2007

AGRADECIMIENTOS

A mis profesores consejeros que me dieron libertad, consejo y guía para realizar mi investigación.

Dra Martha Elena Nava Tablada, por su apoyo incondicional y tolerancia, pero sobre todo por su amistad.

Dr. Gerardo Mata Montes de Oca, por su comprensión y apoyo pero sobre todo por su amistad y compañerismo.

Dr. Daniel Carrera Martínez, que siempre me ofreció su mano amiga para lograr esta meta en mi vida.

Dr. Diego Esteban Platas Rosado, por su amistad y por ser una excelente persona dentro y fuera del salón de clases.

Al CONACYT, que con el esfuerzo de todos los mexicanos sostuvo mis estudios de Maestría.

Al Colegio de Postgraduados Campus Veracruz, que me adoptó como un miembro de su comunidad y que me ha abierto las puertas a nuevos horizontes.

Al Instituto de Ecología A.C. (INECOL), por recibirme y permitirme ser parte de su familia.

A mis amigas: Tere, Wendy, y en especial a Gris que con su bondad y gentileza me ha mostrado que todavía puedo tener confianza en la gente y en el futuro.

DEDICATORIA

A DIOS por haberme permitido llegar a este momento y poderlo compartir con mis seres amados.

A mi padre Juan Gerardo Alvarado Morales, que aunque materialmente ya no esta con nosotros, sus consejos y enseñanzas prevalecen junto con su recuerdo, gracias, nos veremos del otro lado.

A mi madre Sara Castillo Ramírez, que siempre nos ha apoyado en todos los aspectos y nos ha dado lo que tiene mayor valor en este mundo: El Ejemplo. Toma esto como un pequeño reconocimiento a tu labor de toda la vida.

A mis hijos, Gerardo y Ángel, como una muestra de que donde hay voluntad hay un camino.

A mi esposa: Bárbara, suegros: Don Felipe y Doña Socorro y a todas las personas que forman parte de mi y que han contribuido a colocarme en donde ahora estoy. Mil gracias.

A todos los demás que me han apoyado y que no tengo un orden para mencionarlos, solo quiero decirles que nada es suficiente para expresarles mi gratitud.

CONTENIDO

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
CAPITULO I. OBTENCION DE ESCLEROCIOS DE MORILLA (<i>Morchella esculenta</i>) EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO	6
1.1 RESUMEN.....	6
1.2 ABSTRACT.....	7
1.3 INTRODUCCIÓN.....	8
1.4 MATERIALES Y METODOS.....	9
1.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
1.6 CONCLUSIONES.....	18
CAPITULO II. EFECTO DE LA PRESENCIA DE FENOLES EN LA PRODUCCIÓN DE ESCLEROCIOS EN MEDIO DE CULTIVO Y PRODUCCIÓN DE ALGUNAS ENZIMAS DE <i>Morchella esculenta</i>	20
2.1 RESUMEN.....	20
2.2 ABSTRACT.....	21
2.3 INTRODUCCIÓN.....	22
2.4 MATERIALES Y METODOS.....	23
2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
2.6 CONCLUSIONES.....	31
CONCLUSIONES GENERALES	33
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	35

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1. Contenido de los tratamientos en medio de cultivo sólido	10
Tabla 1.2. Crecimiento micelial de <i>Morchella esculenta</i> en medio de cultivo sólido.....	13
Tabla 1.3. Producción de biomasa de <i>Morchella esculenta</i> en medio de cultivo líquido.....	13
Tabla 2.1. Producción de biomasa de esclerocios en medios de cultivo con diferentes concentraciones de compost.....	28
Tabla 2.2. Actividad enzimática y biomasa producida por <i>M. esculenta</i>	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Formación de esclerocios de <i>Morchella esculenta</i> en tratamiento con extracto de composta en medio de cultivo sólido.....	14
Figura 1.2. Producción de esclerocios de <i>Morchella esculenta</i> en tratamiento con extracto de composta en medio líquido.....	15
Figura 2.1. Media, Error y Desviación Estándar de la biomasa de esclerocios obtenidos en los tratamientos con medio sólido.....	28

INTRODUCCIÓN GENERAL

En el ámbito mundial se han domesticado aproximadamente 22 especies de hongos, la mayoría de regiones tropicales y subtropicales. No obstante, sólo en diez se ha logrado una producción a escala comercial, (Martínez-Carrera, 1998). En México, sólo tres especies de hongos se cultivan comercialmente: *Agaricus bisporus* (champiñón), *Pleurotus ostreatus* (setas) y *Lentinula edodes* (shiitake) (Zamora-Martínez, 1999).

Entre los hongos que crecen en México y que tienen alto valor comercial, se encuentran las morillas (*Morchella spp*), las cuales son altamente apreciadas en el ámbito culinario, por lo que son productos con gran potencial de mercado a nivel nacional e internacional, comparable al que tienen las trufas europeas (*Tuber spp*), (Alexopoulos *et al.*, 1996). *Morchella esculenta* es una de las morillas con mayor valor comercial, esta especie presenta una interfase en su esporulación y en el desarrollo del micelio que dificulta su producción, por lo que su aprovechamiento se limita a la recolección. Esta relativa escasez producida por su estacionalidad y los altos precios que alcanza, hacen que la presión extractiva sobre sus poblaciones naturales sea muy alta, generando un problema de sobreexplotación, por lo cual en México siete especies del género, se encuentran catalogadas bajo normas de protección (NOM-010-RECNAT-1996 y NOM-059-ECOL-1994).

Los intentos para producir *Morchella esculenta* han sido muy variados, estos han abarcado desde la inoculación de esporas en campo, semicultivos, hasta la

provocación intencional de incendios forestales, ya que se ha asociado erróneamente a la morilla con este fenómeno (Volk and Thomas, 1989a; Staments, 1993).

El intento más exitoso en cuanto a diseñar una técnica de producción de *M. esculenta* lo reporta Ower (1982), el cual dio origen a tres patentes, que sin embargo, no han resultado muy eficientes, pues han mostrado una serie de anomalías que no han podido superarse, tales como la malformación de ascocarpos (cuerpos fructíferos), aborto de primordios, y baja productividad, motivo por lo cual estas patentes han sido sujeto de múltiples críticas, como la ocultación de información, manipulación de datos y otras (Barnes and Wilson, 1998; Stott and Mohammed, 2004; Molina *et al.*, 1993). Por ello, en la actualidad la información generada para el cultivo de *Morchella esculenta*, es escasa y poco concluyente.

En el contexto nacional, los estudios relacionados con este hongo son pocos y se limitan a la descripción de sus condiciones ecológicas o a la reproducción de las patentes descritas anteriormente. Por ello, es importante desarrollar más investigación científica sobre *Morchella esculenta* (Pankaj *et al.*, 2002), que contribuya a aumentar el conocimiento sobre la domesticación de este hongo y generar tecnología apropiada a las condiciones y necesidades específicas de México.

En este contexto, la presente investigación tuvo como objetivos identificar el medio de cultivo más adecuado para la producción de esclerocios de *Morchella esculenta*

en laboratorio y evaluar a través de un estudio enzimático, la ruta metabólica, por medio de la cual este hongo obtiene sus nutrientes.

Para el primer experimento se manejó la hipótesis de que el mejor medio de cultivo sería aquel que produjera mayor cantidad de biomasa en el menor tiempo posible y que tuviera la capacidad de diferenciar el micelio en esclerocios, ya que varios autores (Ower, 1982; Ower *et al.*, 1986; Volk and Leonard, 1989b) consideran a estas estructuras como la clave para la producción artificial de *Morchella esculenta*.

La hipótesis que orientó el segundo estudio se basa en lo expuesto por (Yasue *et al.*, 2005), que indica que los mecanismos fisiológicos, cultivo y crecimiento de los hongos pueden ser explicados a través del comportamiento de las enzimas involucradas en la degradación de los componentes del sustrato donde crecen, sin embargo, en el transcurso de este experimento, se observó que en uno de los tratamientos (utilizando un medio de cultivo a base de compost para la producción de champiñón), existía una relación entre la cantidad de fenoles, y la producción de esclerocios, lo cual toma un lugar más relevante en el capítulo correspondiente, pues es una aportación valiosa en el estudio de este hongo, ya que como se discute en las secciones correspondientes, los esclerocios son estructuras de resistencia que forma el hongo para acumular reservas y sobrevivir a condiciones adversas, para posteriormente diferenciarse y fructificar cuando exista el entorno adecuado, pues la obtención de ascocarpos en condiciones naturales, se basa en la diferenciación de los esclerocios (Zamora-Martínez, 1999; Shu-Ting and Miles, 2004).

En el primer capítulo se expone el experimento que se desarrolló para identificar el medio de cultivo más adecuado para la producción de esclerocios de *Morchella esculenta*, dado que como indican Stott and Mohammed (2004), hay dos pasos para lograr la domesticación de esta especie, el primero se refiere a los requisitos ambientales y alimenticios para producir esclerocios de manera confiable y abundante. Mientras, el segundo consiste en investigar los disparadores y las condiciones requeridas para la iniciación y la maduración del ascocarpo.

En el segundo capítulo se expone el estudio realizado para determinar la actividad de tres enzimas lignocelulolíticas (celulasas, xilanasas y lacasas) y observar su capacidad de degradación de sustratos lignocelulósicos, con el objetivo de determinar su ruta metabólica y así poder inferir algún tipo de sustratos adecuados para el crecimiento y desarrollo de *Morchella esculenta* bajo condiciones controladas. Durante esta evaluación se identificó una relación directa entre la concentración del medio con compost, cantidad de fenoles presentes y la diferenciación del micelio en esclerocios, lo que dio lugar a un experimento que mostró resultados preeliminares que indican que los fenoles contenidos en el compost son los precursores de la diferenciación del micelio en esclerocios.

Los experimentos descritos, aportaron conocimientos sobre la producción de esclerocios en laboratorio, especialmente si se toma en cuenta el corto lapso de tiempo en que se obtuvieron dichas estructuras. Es decir, los resultados proporcionan información útil para producir esclerocios en laboratorio, cubriendo con ello el primer principio establecido para su domesticación, lo cual permitirá

implementar ensayos posteriores bajo dos enfoques principales: la producción artificial de morilla a escala comercial y la introducción a su hábitat natural como parte de una estrategia de conservación que contrarreste la extracción excesiva producida por la recolección.

Así, esta investigación se orientó al conocimiento de los principios básicos de técnicas de producción de *Morchella esculenta*, por medio de pasos individuales, hacia eventos complejos. Pero, obviamente el presente estudio sólo representa un pequeño porcentaje de una temática más amplia y debe complementarse con investigaciones sobre el papel ecológico de esta especie, la evaluación de sus poblaciones naturales, su potencial como producto forestal no maderable, su producción bajo condiciones controladas y comercialización, así como problemáticas relacionadas con el impacto acumulativo de los disturbios causados por la cosecha de morilla, reportadas por investigaciones previas (Pilz *et al.*, 2004), entre otras más.

CAPITULO I. OBTENCION DE ESCLEROCIOS DE MORILLA (*Morchella esculenta* (L). Pers) EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

Gerardo Alvarado-Castillo, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2007

1.1. 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 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: 53.87 cm²), y en cuanto a la biomasa, el medio de cultivo con levadura fue mejor (T3: 80.3 mg). 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: 27.04 mg). Los esclerocios se obtuvieron en lapsos de 9-12 días (medio sólido) y de 7-9 días (medio líquido), lo cual es tiempo relativamente corto, lo que abre una posibilidad de cumplir con una de las condiciones necesarias para su domesticación.

Palabras clave: Esclerocios, Composta, Medios de cultivo, *Morchella esculenta*.

OBTAINING SCLEROTIA OF MORILLA (*Morchella esculenta* (L). Pers.) IN

DIFFERENT CULTURE MEDIA

Gerardo Alvarado-Castillo, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2007

1.2. ABSTRACT

Morchella esculenta is an edible mushroom of high market demand, and obtaining sclerotia is considered an important issue for its commercial production. In this work, the strain IE-750 was carried out on eight solid culture media and six liquid culture media. Parameters assessed were mycelial growth, biomass production, and ability to produce sclerotia and its biomass. The best mycelial growth was obtained in the treatment containing compost extract (T7: 53.87 cm²). The highest production of biomass was recorded with the treatment containing yeast (T3: 80.3 mg). Scenarios with poultry manure and compost showed 40% and 80% of sclerotia in solid and liquid culture media, respectively, and the highest sclerotia biomass was recorded with compost treatment (solid medium). Sclerotia were obtained in periods of 9-12 days (solid medium) and 7-9 days (liquid medium), which is good time for its domestication.

Key words: Sclerotia, Compost, Culture media, *Morchella esculenta*.

1.3. INTRODUCCIÓN

Las morillas (*Morchella* spp.) son hongos comestibles cotizados a nivel mundial (Alexopoulos *et al.*, 1996; Molina *et al.*, 1993), y aunque su cultivo inició hace más de dos décadas con los trabajos de Ower (1982), no se ha logrado establecer una producción totalmente satisfactoria. Al contrario, las patentes derivadas de estas investigaciones (Ower *et al.*, 1986; 1988) han recibido numerosos cuestionamientos sobre la eficiencia de sus resultados (Barnes and Wilson, 1998; Stott and Mohammed, 2004; Molina *et al.*, 1993). 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; Stott and Mohammed, 2004; Volk and Leonard, 1990).

Los esclerocios se diferenciarán para fructificar, al encontrar las condiciones ambientales óptimas (Güler and Arkan, 2000), o cuando sean inducidos por estrés causado por condiciones extremas como inviernos largos, inundaciones o incendios. Estos últimos, son asociados fuertemente con la producción de morillas en condiciones naturales (Stamets, 1993; Volk and Leonard, 1989b), por lo cual se han provocado intencionalmente para la fructificación de este hongo, ocasionando la pérdida y la fragmentación del hábitat donde son recolectados (Dalglish and Jacobson, 2005).

Existen dos pasos para la domesticación de morillas propuestos por Stott and Mohammed (2004), el primero se centra en los requisitos ambientales y nutricionales para producir esclerocios de forma confiable y abundante, el segundo es la

investigación de los disparadores y las condiciones requeridas para la iniciación y maduración de ascocarpos. El primer punto mencionado conforma el objeto de estudio de la presente investigación, 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 como 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.

1.4. MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la cepa

La cepa utilizada [*Morchella esculenta* (L.) Pers.] proviene de Estados Unidos, se importó de la casa comercial Fungi Perfecti y se encuentra depositada en el cepario de hongos del Instituto de Ecología, A.C., como IE-750. La cepa se conserva en medio de cultivo Extracto de Malta y Agar (EMA) en condiciones de refrigeración.

Medios de cultivo

La composición de los tratamientos se indica en la Tabla 1.1.

Específicamente, en T5 los nutrientes fueron: nitrógeno nítrico 6.5%, nitrógeno amoniacal 2.0%, nitrógeno ureico 1.5%, fósforo total 10%, potasio total 40%, hierro, 0.020%, manganeso 0.010%, zinc 0.002%, boro 0.010%, y cobre 0.002% del

fertilizante soluble marca Solucat. En T7, el extracto se obtuvo de composta para champiñón de la planta productora RIOXAL (Las Vigas, Veracruz), colocando 1.2 kg en cuatro litros de agua destilada, se hirvió la mezcla a fuego lento durante 15 minutos agitándola constantemente. Posteriormente, se filtró con ayuda de una gasa para obtener el extracto. En T8, se hirvieron 20 g de suelo (franco arenoso) en un litro de agua destilada hasta que se evaporó la mitad, filtrando el resto para ser usado en la preparación del medio de cultivo. Todos los medios de cultivo sólidos se depositaron en cajas petri de 10 cm. de diámetro, en una proporción de 30 mL por caja.

Tabla 1.1. Contenido de los tratamientos en medio de cultivo sólido.

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

Los medios de cultivo líquido fueron los mismos que los descritos anteriormente, 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 una cantidad de 7 mL cada uno.

Todos los tratamientos se esterilizaron durante 15 minutos a 120 °C, y a 15 lb de presión, tanto para medios sólidos como líquidos.

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 EMA) colocando un implante circular en el centro de la caja petri. Estas se incubaron a 27 °C en condiciones de 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 cm² para cada tratamiento y durante cada periodo.

Para la determinación de biomasa se utilizaron los medios de cultivo líquidos. Se colocaron 7 mL de cada tratamiento en frascos de 80 mL, 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 anteriormente mencionadas. La masa micelial obtenida se colocó en cuadros de papel filtro Waltham^R del No 1, que previamente se pesaron en una balanza analítica, y se llevaron a peso seco en una estufa de secado con temperatura constante a 100 °C durante 24 horas. 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^R. 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.

1.5. 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 1.2), el mejor de ellos se observó en los tratamientos T7 (53.87 cm²), T6 (49.59 cm²), T5 (52.92 cm²), T3 (53.30 cm²) y T2 (52.28 cm²).

Tabla 1.2. Crecimiento micelial de *Morchella esculenta* en medio de cultivo sólido.

Tratamiento	pH	Área promedio final (cm ²)		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 negritas significan grupos diferentes según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

En cuanto a la producción de biomasa (Tabla 1.3.), existieron diferencias significativas entre tratamientos, siendo el mejor tratamiento el T3 (80.3 mg), seguido por los tratamientos T7 (66.2 mg), T2 (65.6 mg) y T5 (63.4 mg). Se realizó una prueba de correlación entre crecimiento y biomasa, la cual fue positiva (64%).

Tabla 1.3. 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 negritas significan grupos diferentes según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

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 1.1.).



Figura 1.1. Formación de esclerocios de *Morchella esculenta* en tratamiento con extracto de composta en medio de cultivo sólido (T7).

Sin embargo, en medio líquido, la producción de esclerocios fue igual, pero más precoz (7-9 días) (Figura 1.2.). En ambos casos no se requirieron 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 que se conservaron en incubación).



Figura 1.2. Producción de esclerocios de *Morchella esculenta* en tratamiento con extracto de composta en medio líquido (T7).

La combinación de EMA con los diferentes suplementos (composta, gallinaza, micronutrientes, alimento de pollo y suelo) presentaron una respuesta al crecimiento, similar o mayor que los medios de cultivo usados tradicionalmente en 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 ello 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 dichos 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 and Leonard, 1989b; Stott *et al.*, 2002; Buscot, 1993) 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.

Uno de los resultados más sobresalientes es el corto de 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. 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 de 20-25 días en medio de cultivo EMA. Duran (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 and Leonard (1989b) 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 and Miyata (1981) que obtuvieron masas miceliares en suero de leche, o de Güler and Arkan (2000) que utilizaron medios de agar adicionados con NaNO₃.

La importancia de los esclerocios ha sido ha sido demostrada por Ower (1982) y Volk and Leonard (1989b), 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 and 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 (Sttot *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 en que se mantuvo el experimento, aunque el micelio había invadido todo 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.

1.6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indicaron que los medios de cultivo no tradicionales pueden ser una opción para la obtención de micelio 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 el que se obtuvieron estas estructuras respecto a otras investigaciones, con lo cual se abre la posibilidad de dar cumplimiento a la primera condición para su domesticación.

CAPITULO II. EFECTO DE LA PRESENCIA DE FENOLES EN LA PRODUCCIÓN DE ESCLEROCIOS EN MEDIO DE CULTIVO Y PRODUCCIÓN DE ALGUNAS ENZIMAS DE *Morchella esculenta* (L) Pers.

Gerardo Alvarado-Castillo, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2007

2.1. 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 estudio se evaluó la cantidad de biomasa de esclerocios producida por la cepa IE-750 en cuatro diferentes concentraciones de compost en medio de cultivo líquido y sólido. Se encontró una relación directamente proporcional entre la concentración de compost y la cantidad de fenoles presentes en los medios de cultivo. En cuanto a la producción de esclerocios, se observó que ésta crece conforme aumenta la concentración de fenoles, llegando a un punto máximo en el M3 (20g de malta+1.2 k compost. 4l⁻¹) para después declinar en el M4 (20g de malta+1.5 k compost. 4l⁻¹), describiendo así una curva de crecimiento típica. Estadísticamente el mejor medio de cultivo es el M3 (27.04 mg) en forma líquida, ya que los medios de cultivo sólido no presentaron diferencias significativas. Los esclerocios se obtuvieron en lapsos de 7-9 días en medio sólido y de 6-8 días en medio líquido. Lo anterior sugiere que los fenoles juegan un papel importante en la diferenciación del micelio en esclerocios. Se observó una ligera degradación de fenoles, lo que dio lugar a la determinación enzimática de celulasas, xilanasas y lacasas, sin embargo, no fue posible determinar alguna posible vía metabólica utilizada por esta especie.

Palabras clave: Enzimas, Esclerocios, Compost, Fenoles, *Morchella esculenta*.

EFFECT OF THE PRESENCE OF PHENOLS IN THE PRODUCTION OF
SCLEROTIA IN DIFFERENTS CULTURE MEDIA AND PRODUCTION OF SOME
ENZYMES OF *Morchella esculenta* (L.) Pers.

Gerardo Alvarado-Castillo, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2007

2.2. ABSTRACT

Morchella esculenta is an edible mushroom, with high market demand and obtaining of sclerotia is considered as a key for its commercial production. In this study was evaluated the biomass of sclerotia produced by strain IE-750 in four different concentrations of compost, in liquid and solid state. A direct relation exists between the concentrations of compost and the amount of phenols in the culture media. It was observed that the production of sclerotia increases, up to a maximum point in the M3 (20g from malt+1.2 k compost. 4l-1) after it declines in the M4 (20g of malt+1.5 k compost. 4l-1), describing therefore a typical curve of growth. Statistically ($\alpha=0.05$) the best culture media are the M3 (27.04 mg) in liquid state, the solid culture media didn't display significant differences. The sclerotia were obtained in 7-9 days in solid culture media and 6-8 days in liquid culture media. This result suggests that the phenols might play an important role in the differentiation of mycelia to sclerotia. A degradation of phenols was observed, but it was not possible to determine about a metabolic route used by this specie.

Key words: Enzymes, Sclerotia, Compost, Phenols, *Morchella esculenta*.

2.3. INTRODUCCIÓN

Morchella esculenta es un hongo con alto valor comercial a nivel nacional e internacional, por lo cual se han realizado múltiples intentos para producirlo, sin embargo, la información generada para su cultivo es escasa (Barnes and Wilson, 1998; Stott and Mohammed, 2004; Molina *et al.*, 1993), no obstante, el punto donde convergen todas las investigaciones, es en que los esclerocios son una condición necesaria para la fructificación de este hongo (Ower, 1982; Ower *et al* 1986, 1988; Stott and Mohammed, 2004; Volk and Leonard, 1990), tanto en condiciones naturales, como controladas.

Los esclerocios son estructuras que forma este hongo para sobrevivir a situaciones adversas (Staments, 1993; Smith, 1995; Stott and Mohammed, 2004) y que pueden diferenciarse en un cuerpo fructífero al encontrar las condiciones adecuadas. Considerando lo anterior, en esta investigación se probó la influencia de la concentración de fenoles sobre la diferenciación del micelio en esclerocios, ya que estos pueden fungir como compuestos tóxicos presentes en los materiales lignocelulósicos (Salmones and Mata, 2002), además se buscó la relación entre la concentración del extracto de compost, la concentración de fenoles y la producción de esclerocios, partiendo de los antecedentes reportados por Alvarado-Castillo *et al* (2007), en donde se reporta la obtención de esclerocios *in vitro* utilizando medios de cultivo adicionados con extracto de compost, el cual es el sustrato utilizado comúnmente para el cultivo de champiñón (*Agaricus bisporus*).

En cuanto a la actividad enzimática, Rengasayee *et al.* (2005) indica que las enzimas constituyen el mecanismo a través del cual los hongos obtienen los elementos necesarios para sus funciones vitales, así mismo, Yasue *et al.* (2005). mencionan que la explicación de los mecanismos fisiológicos, cultivo y crecimiento de los hongos es posible, a través del examen de las características y comportamiento de las enzimas involucradas en la degradación de los componentes del sustrato donde crecen, por lo que en la presente investigación se buscó conocer más acerca del metabolismo de *M. esculenta*, a través de la exploración de tres enzimas lignocelulolíticas.

2.4. MATERIALES Y METODOS

Origen de la cepa

La cepa utilizada de *Morchella esculenta* (L.) Pers. proviene de Estados Unidos y se encuentra depositada en el cepario de hongos del Instituto de Ecología A.C. registrada como IE-750. Se conserva en medio de cultivo Extracto de Malta y Agar (EMA) en condiciones de refrigeración.

Preparación de medios de cultivo

Para la medición de biomasa de esclerocios, se realizaron medios de cultivo líquidos y sólidos (adicionando 20g.l⁻¹de agar) en cuatro diferentes concentraciones, todos ellos contienen 20g de malta+800mL de extracto de compost, pero la concentración de este dio lugar a los diferentes medios, teniendo que M1: contiene 0.3 k compost. 4l⁻¹, M2: 0.6 k compost. 4l⁻¹, M3: 1.2 k compost. 4l⁻¹ y M4: 1.5 k compost. 4l⁻¹.

El extracto de compost se obtuvo colocando la cantidad correspondiente a cada medio de cultivo en cuatro litros de agua destilada, se hirvió la mezcla a fuego lento durante 15 minutos agitándola constantemente. Posteriormente, se filtró con ayuda de una gasa para obtener el extracto. Todos los medios se esterilizaron durante 15 minutos a 120 °C y 15 lb. de presión. Los medios de cultivo se inocularon bajo condiciones estériles, colocando un implante circular de *M. esculenta* (5mm de diámetro) en el centro de la caja petrí o frasco según fuera el caso (medio sólido o líquido) y se incubaron a 27 °C en condiciones de oscuridad, durante un periodo de 7-9 días en medio sólido y de 6-8 días en medio líquido, que es el periodo en el cual se obtuvieron los esclerocios.

Los esclerocios obtenidos fueron separados uno por uno de la masa micelial, colocados en papel filtro marca Waltham^R No. 1 y pesados en una balanza analítica; posteriormente se secaron en una estufa durante 24 hrs. a 80°C para llevarlos a peso seco. La biomasa neta de los esclerocios se obtuvo a través de la diferencia de peso.

Diseño experimental y análisis estadístico

Para la evaluación de la biomasa de los esclerocios, se realizaron cuatro medios de cultivo en un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones, tanto en medio de cultivo líquido como sólido, siendo la unidad de estudio: cajas petrí (para medio sólido) y frascos de vidrio con capacidad de 80 mL (para medio líquido). Los datos obtenidos se procesaron con el programa STATISTICA^R (versión 6.0) y con los resultados se realizó un ANAVA ($\alpha=0.05$) para determinar diferencias significativas y una prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha=0.05$).

Determinación de la degradación de fenoles

Paralelamente a la obtención de esclerocios, se determinó la concentración de fenoles en medio líquido para cada medio de cultivo (que sirvieron como testigo), antes de la inoculación y seis días después de inoculado. Se utilizó el método de Box (1983), el cual se basa en el uso del agente Folin Ciocalteu's.

Se elaboraron 5 muestras de cada medio de cultivo, cada una contenía 2.4 mL de agua destilada, 0.375 mL de carbonato de sodio al 10%, 0.125 mL del reactivo Folin Ciocalteu's y 0.1 mL de cada medio de cultivo líquido; se incubó 1 hora a temperatura ambiente y se obtuvo la lectura del espectrofotómetro a 750 nm. Los resultados son expresados en μmol de fenol por litro de solución.

Determinación de la actividad enzimática

La determinación de las enzimas celulasa, xilanasa y lacasa se realizó de manera complementaria para establecer un mayor entendimiento sobre la ruta metabólica de *M. esculenta*. El estudio se realizó durante las etapas iniciales de colonización del micelio, pues la secreción de enzimas por hongos filamentosos es un proceso muy relacionado con el crecimiento (Iriarte, 2003).

Para esta determinación se utilizaron medios de cultivo líquidos preparados bajo las condiciones anteriormente descritas, usando como testigo el medio de cultivo EMA (20 g.l^{-1} de malta), comparado con el medio de cultivo que produjo mayor cantidad de esclerocios (M3). Se midió la actividad enzimática en dos periodos: antes de inocular el medio (el cual sirvió como referencia) y a los seis días (tiempo en que el micelio

del M3 invadió totalmente la superficie del frasco en que fue inoculado). Se realizaron las mediciones correspondientes con un espectrofotómetro (Espectronic Génesis 5), además se midió el peso seco de la biomasa total producida en cada medio.

Para la determinación de celulasas y xilanasas se utilizó la metodología propuesta por Mata and Savoie (1998), a través del uso del ácido dinitro-salicílico (DNS) que mide la reacción de azúcares reductores de un sustrato a un pH y temperatura conocidos. Como sustrato enzimático se utilizó carboximetil celulosa 2% (CMC) y Xilano, respectivamente. Se usó una solución Buffer (Tampon) de acetato de sodio 0.1M con un pH de 5.0, la cual se calentó a 40°C para disolver el sustrato enzimático correspondiente, y así preparar las muestras. Estas se incubaron 30 minutos a 30°C, se les agregó 3 mL de DNS mezclado previamente con bisulfito de sodio al 0.05%, se calentó a baño maría a 100°C durante 10 minutos, después de lo cual se adicionó 1 mL de tartrato de potasio al 40% y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La reacción se midió en el espectrofotómetro calibrado a 550 nanómetros y los resultados se expresan en unidades que fueron definidas como mg de glucosa o xilosa liberados/mL de medio de cultivo/minuto

En el caso de lacasa se utilizó el método de Leonowicz and Grzywnowicz (1981), el cual se basa en la oxidación de syringaldazina. Se preparó una solución Buffer (2 mL de tampon fosfato-citrato), a la cual se le adicionaron 50 µl de syringaldazina y 1 mL del medio de cultivo líquido, realizando la preparación de muestras por quintuplicado. Se leyó la cinética a 526 nanómetros en el espectrofotómetro durante dos minutos.

Los resultados se expresan como mmol de syringaldazina oxidados por 1 mL de medio de cultivo por minuto (mmol/mL/min).

2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron esclerocios en los cuatro medios de cultivo estudiados, tanto en forma líquida como sólida, lo cual coincide con lo expuesto por Alvarado-Castillo *et al* (2007) que indica que el extracto de compost es apropiado para conseguir estas estructuras, las cuales se presentaron en lapsos de 7-9 días en medio sólido y de 6-8 días en medio líquido.

No existen diferencias significativas en los medios de cultivo sólido, pues aunque se observa una producción promedio de biomasa de esclerocios alta en el M3 (82.82 mg), esta no es estadísticamente significativa, ya que los valores analizados se encuentran muy dispersos (Figura 2.1).

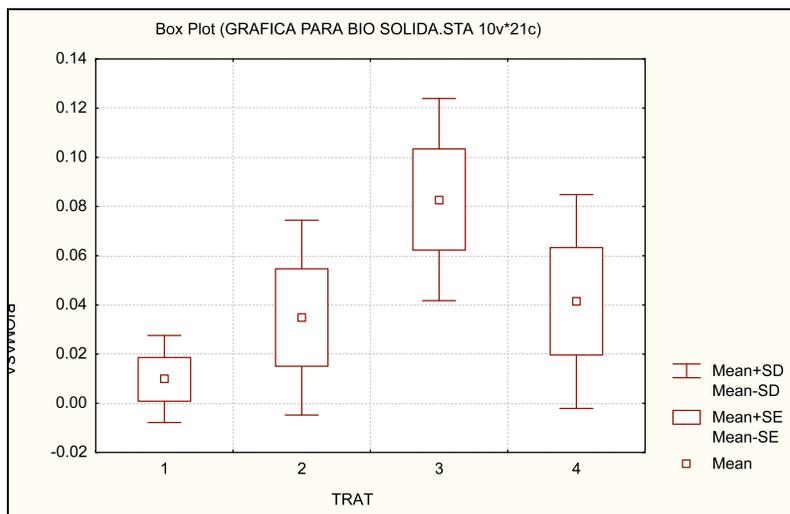


Figura 2.1. Media, Error y Desviación Estándar de la biomasa de esclerocios obtenidos en los tratamientos con medio sólido.

En cambio, en los medios de cultivo líquido se detectaron diferencias estadísticas, por lo que se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha=0.05$) donde se muestran tres grupos de respuesta, el mejor de ellos contiene al M3 (Tabla 2.1.).

Tabla 2.1. Producción de biomasa de esclerocios en medios de cultivo con diferentes concentraciones de compost

Medio de cultivo	Concentración de fenoles		Degradación (Conc. inicial- final)	Biomasa (mg)	
	inicial (μmol)	final (μmol)		medio líquido	medio sólido
M1	1.57778	1.42218	0.15560	9.08 a	13.16 *
M2	2.63324	2.47468	0.15856	20.40 b	34.82 *
M3	4.08364	3.77594	0.30770	27.04 c	82.82 *
M4	4.53806	3.49940	1.03866	22.00 b	55.16 *

Letras negritas significan grupos diferentes según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

* No existen diferencias estadísticamente significativas.

Respecto a la concentración de fenoles se observa una relación directamente proporcional entre la cantidad de éstos y la concentración del extracto de compost (Tabla 2.1.). Así mismo, conforme aumenta la concentración de fenoles aumenta la producción de esclerocios en ambos tipos de medio de cultivo, alcanzando el óptimo en la concentración del M3 para después declinar (M4). Además, se observa cierta degradación de fenoles, la cual es proporcional a la concentración. Lo anterior podría indicar que existe una relación entre la concentración de fenoles y la producción de esclerocios (coeficiente de correlación de 0.96812004), y que la presencia de fenoles posiblemente sea el factor tóxico que influya en esta diferenciación, pues como se señala en estudios anteriores (Volk and Leonard, 1989b; Stott et al., 2002; Buscot,

1993) el micelio de *M. esculenta* requiere de condiciones adversas, tales como 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.

Actividad enzimática

La actividad enzimática se muestra en la Tabla 2.2. y es el resultado de la diferencia entre la concentración detectada en el testigo (sin inocular) y la concentración al final de la producción de biomasa (día seis).

Tabla 2.2. Actividad enzimática y biomasa producida por *M. esculenta*

Medio de cultivo	Actividad enzimática					
	Celulasas (mg/mL/min).	Biomasa (mg)	Xilanasas (mg/mL/min).	Biomasa (mg)	Lacasas (mmol/mL/min)	Biomasa (mg)
EMA	28.6884005	5.65	ND	7.67	ND	4.57
M3	5.55983065	63.70	ND	62.30	ND	64.10

EMA=20 g.l⁻¹ de malta

M3=T+1.2 k compost. 4l⁻¹

ND= No detectado

La mayor actividad enzimática se presentó en celulasas, en el testigo, (28.6884005 mg/g/min). La actividad de xilanasas no fue detectada y puesto que estas enzimas se asocian a la degradación de hemicelulosa, se infiere que este compuesto no se encuentra presente en los medios estudiados, así mismo la actividad de lacasas no fue detectada durante el experimento.

En muchos hongos la producción de lacasas se relaciona con actividad lignolítica, lo cual sugiere que dichas enzimas tienen un papel importante en la biodegradación de lignina a través de la oxidación de compuestos fenolicos (Bonnen *et al.*, 1994). Sin

embargo, en la cepa de *M. esculenta* la actividad detectada de lacasas es nula, pero existe cierta degradación de fenoles (Tabla 2.2.) y a su vez una relación de éstos con la producción de esclerocios. Este resultado no coincide con el papel detoxificador de la lacasa mencionado por Salmones y Mata (2002), por lo que se desconoce la vía que posibilita la degradación de fenoles, o simplemente en el medio de cultivo no se producen enzimas como las relacionadas con la fructificación de los hongos sobre un sustrato determinado.

No obstante lo anterior, se observan diferencias en la producción de biomasa de ambos medios, teniendo en el testigo (EMA) una producción de biomasa, significativamente menor que en M3, debido posiblemente, a que el contenido nutritivo del testigo es bajo o no disponible, por lo que el micelio del hongo tiene que desplegar mayor actividad enzimática gastando energía en esta función. En contraste, esto no sucede en M3, donde posiblemente la mayor riqueza y disponibilidad de nutrientes influye en menor gasto energético, que se traduce en mayor producción de biomasa. Este resultado coincide con lo mencionado por (Hatakka, 1994), quien indica que la maquinaria enzimática es diferente para cada organismo y existe más de una trayectoria de degradación para obtener nutrientes.

La ruta metabólica a través de la cual *M. esculenta* obtiene sus nutrientes no se encuentra totalmente especificada aún, pues no se ha definido si *M. esculenta* es un organismo saprofito o micorrízico (Buscot and Roux, 1987; Buscot, 1992; Smith, 1995; Dahlstrom *et al.*, 2000). Así mismo se han identificado una gran variedad de hábitats en donde este hongo se desarrolla de forma natural (áreas quemadas,

dunas costeras, huertas, prados y bosques), (Staments, 1993; Smith, 1995; Stott and Mohammed, 2004), razón por la que se reporta una amplia gama de estrategias tróficas y plasticidad ecológica de esta especie.

2.6. CONCLUSIONES

Es posible obtener esclerocios *In Vitro* a través de la utilización de medios de cultivo adicionados con compost, ya que todos los medios de cultivo con el extracto de éste, produjeron dichas estructuras, así mismo, el mejor medio para la producción de esclerocios es el M3 (1.2 k compost. 4l⁻¹).

Existe una relación directa entre la concentración de compost y la concentración de fenoles y estos influyen en la producción de esclerocios, presentando un comportamiento que describe una curva típica, que alcanza su máximo en la concentración del M3. Esto sugiere que los fenoles son precursores de la diferenciación del micelio en esclerocios; resultado que puede ser útil para inducir esta en otros medios de cultivo o sustratos.

No se detectó actividad significativa de las enzimas estudiadas, sin embargo, existe una ligera degradación de fenoles que no es realizada por las lacasas; lo cual deja abierta la posibilidad de realizar estudios más específicos y profundos que ayuden a la mejor comprensión de la trayectoria de degradación y la maquinaria enzimática de esta especie.

CONCLUSIONES GENERALES

A diferencia de otros hongos, *M. esculenta*, presenta en su ciclo de vida la formación de estructuras llamadas esclerocios, que son elementos clave en la producción de este hongo bajo condiciones controladas, por ello los resultados conseguidos indican que la obtención de estas estructuras se puede inducir de forma sistemática en tiempos relativamente cortos a través de medios de cultivo (líquidos o sólidos) elaborados a partir del extracto de compost, con lo cual se abre la posibilidad de dar cumplimiento a la primera condición para su domesticación.

La relación entre la concentración de compost es directamente proporcional a la concentración de fenoles y éstos a su vez están ligados a la producción de esclerocios. Es decir, los fenoles son, al menos, uno de los elementos que influye en la diferenciación del micelio de *Morchella esculenta* en esclerocios, lo cual sugiere que estos compuestos pueden ser utilizados en otros medios de cultivo o sustratos, como promotor de dichas estructuras.

La determinación de la actividad de celulasas, xilanasas y lacasas, mostró que no existe acción de dichas enzimas en la cepa IE-750 de *Morchella esculenta*, lo cual confirma que los mecanismos fisiológicos de esta especie, son diferentes a los de otros hongos de interés comercial, como los géneros *Pleurotus*, *Volvariella* o *Lentinula*. La ruta metabólica, a través de la cual *M. esculenta* realiza sus funciones vitales, no pudo ser determinada en este estudio, sin embargo, esto abre mayores posibilidades de investigación en este aspecto, pues sería interesante realizar

experimentos que analicen los perfiles enzimáticos en diferentes etapas fenológicas y en diferentes cepas de *Morchella esculenta*, para así profundizar el conocimiento sobre qué tipos de sustratos o elementos nutritivos son los más adecuados para esta especie.

Finalmente, es necesario subrayar que la falta de investigación básica de *Morchella esculenta*, ha limitado su producción comercial, restringiendo su aprovechamiento a la recolección, lo cual conlleva una serie de problemas que impactan negativamente sobre su hábitat natural y los recursos forestales íntimamente ligados a ellos. Por ello, en México es necesario desarrollar líneas de investigación en torno a la producción de hongos, que aporten el conocimiento requerido respecto a los mecanismos de conservación, protección y manejo sustentable de estos recursos forestales no maderables, que son parte importante de la biodiversidad de los ecosistemas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Alexopoulos CJ, Mims CW, Blacwell M (1996). Introductory mycology. 4th ed. Wiley and Sons. New York.

Alvarado-Castillo G, Mata G, Martínez-Carrera DC, Nava ME, Platas DE (2007) Obtención de esclerocios de morilla (*Morchella esculenta*) en diferentes medios de cultivo. En prensa.

Amir R, Levanon D, Hadar Y, Chet I (1993) Morphology and physiology of *Morchella esculenta* during sclerotial formation Mycological Research 97: 683-689.

Barnes S, Wilson A (1998). Cropping of the french black morel a preliminary investigation (Project No UT-12A). Rural Industries Research and Development Corporation. Australia.

Bonnen MA, Antón HL, Orth BA (1994) Lignin-degrading enzymes of the comercial button mushroom, *Agaricus bisporus*. Applied and environmental Microbiology. 60(3):960-965.

Box JD (1983) Investigation of Folin Ciocalteu's reagent for determination of polyphenolic substances in natural waters. Water Research.17: 501-525.

Buscot F, Roux J (1987) Association between living roots and ascocarps or "Morchella rotunda". Transactions of the British Mycological Society. 89:249-252.

- Buscot F (1992) Mycorrhizal succession and morel biology. *In: Mycorrhizas in Ecosystems*, D.J. Read, D.H. Lewis, A.H. Fitter and I.J. Alexander (eds). CAB International Wallingford Oxon UK. pp 220-224.
- Buscot F (1993) Mycelial differentiation of *Morchella esculenta* in pure culture *Mycological Research* 97: 136-149.
- Dahlstrom JL, Smith J, Weber NS (2000) Mycorrhiza-like interaction by “Morchella” with species of the pineaceae in pure culture synthesis. *Mycorrhiza*. 9:279-285.
- Dalgleish HJ, Jacobson KM (2005) A first assessment of genetic variation among *Morchella esculenta* (Morel) populations. *Journal of Heredity* 96:396-403.
- Duran HE (1999). Germinación de ascosporas, obtención de esclerocios e intento de producción de ascocarpos de *Morchella* spp. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma Chapingo, Estado de México.
- Faris HA, Broderick A, Nair NG (1996) Occurrence and initial observations of *Morchella* in Australia. *In: D.J. Royse (ed). Proceed. 2nd International Conference - World Society of Mushroom Biology and Mushroom Products*. Penn. State University, USA. 393-399.
- Güler P, Arkan O (2000) Cultural characteristics of *Morchella esculenta* mycelium on some nutrients. *Turkey Journal Biology* 24:783–794.

- Hatakka A (1994) Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: Production and role in lignin degradation FEMS. Microbiol Rev. 13:125-135.
- INE (1994) Legislación y listas rojas ¿hongos en peligro de extinción? Anexo normativo. Lista de especies en riesgo. <http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/gacetas/227/especies.html>
- Iriarte HC (2003) Estudio de la producción y secreción de enzimas celulolíticas en micelios "rápidos" y "lentos" de *P. ostreatus*. Universidad Pública de Navarra.
- Kosaric N, Miyata N (1981) Growth of morel mushroom mycelium in cheese whey. Journal Dairy Research 48: 149-162.
- Leonowicz A, Grzywnowicz K (1981) Quantitative estimation of laccase from in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate. Enzyme Microbiology and Technology. 3:55-58.
- Mata G, Savoie JM (1998) Extracellular enzyme activities in six *Lentinula edodes* strains during cultivation in wheat straw. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 14:513-519.
- Martínez-Carrera CD (1998) La producción de Pleorotus en México. *In*: Memorias del Primer Simposio Nacional de Hongos Comestibles. Pachuca, Hgo. SEP. INIFAP/UAEH. pp.33-38.
- 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. Gen. Tech. Rep. PNW-GTR-309. Portland, OR: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station. 42 p.

Ower RD (1982) Notes on the development of the morel ascocarp: *Morchella esculenta*. Mycologia 74: 142-144.

Ower RD, Mills GL, Malachowski JA (1986) Cultivation of *Morchella* U.S. Patent No: 4,594,809.

Ower RD, Mills GL, Malachowski JA (1988) Cultivation of *Morchella* U.S. Patent No: 4,757,640.

Pankaj PKC, Kandari LS, Maikhuri RK, Aditya P, Bhatt RP and Rao KS (2002) *Morchella esculenta* (Guchhi): Need for scientific intervention for its cultivation in Central Himalaya. Current Science.82 (9):1098-10100.

Pilz D, Smith NW, Carter MC, Prarks GC, Molina R (2004) Productivity and diversity of morel mushroom in healthy, burned, and insect-damaged forest of northeastern Oregon. Forest Ecology and Management 198: 367-386

Ramos RH (1999) Cultivo de cepas mexicanas de *Morchella esculenta* en el laboratorio Tesis de maestría Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. 59 pp.

Rengasayee V, Thomas NJ, Siddharth B (2005) Optimisation of xylanase enzyme production in *Aspergillus spp.* Sri Venkateswara College of Engineering, Pennalur, Anna University: Chennai.

- Salmones D, Mata G (2002) Detection of Extracellular Enzymes Produced by *Pleurotus* spp. Grown on Coffee Proceed IV International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products. Cuernavaca, México pp 213-219.
- Shu-Ting C, Miles PG (2004) Mushroom cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. Second edition CRC Press. Washington D.C. USA.
- Singh SK, Dhar BL, Verma RN (1999) Mass production of carpogenic sclerotial spawn in *Morchella esculenta*- An attempt at its domestication In:3rd International Conference - World Society of Mushroom Biology and Mushroom Products. Penn. State University, USA. 1-11.
- Smith WN (1995). A morel hunter's companion: A guide to true and false morels. Thunder Bay Press. Michigan.
- Stamets P (1993) Growing Gourmet and Medicinal Mushroom Third edition pp 401-418.
- Stott KG, Gill W, Mohammed C, Brown M (2002) Specialty gourmet an medicinal fungi research in Tasmania *In: 4nd International Conference - World Society of Mushroom Biology and Mushroom Products*. Penn. State University, USA. 1-11.
- Stott K, Mohammed C (2004) Specialty mushroom production systems: maitake and morels. (Project No UT-30All) Rural Industries Research and Development Corporation. Australia. 86 pp.

- Volk TJ, Leonard TJ (1989a) Experimental studies on the morel I. Heterokaryon formation between monoascosporous strains of *Morchella*. *Mycologia* 81(4): 523-531.
- Volk TJ, Leonard TJ (1989b) Physiological and environmental studies of sclerotium formation and maturation in isolates of *Morchella crassipes*. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 3095-3100.
- Volk TJ, Leonard TJ (1990) Cytology of the life-cycle of *Morchella*. *Mycological Research* 94:399-406.
- Yasue A, Shirasaka N, Yoshikawa K, Kitamoto Y, Suzuki A, Sakamoto R, Sata H, Terashita T (2005) The stimulation of extracellular carbohydrases of edible mushroom by the hot water-soluble fraction from corn fiber. *Mycoscience*. 46:235-240.
- Zamora-Martínez, MC (1999) Hongos comestibles de México. *In* Memorias del Ciclo de Conferencias "La investigación y la educación forestal en México. SEMARNAP pp: 87-104.