



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS VERACRUZ

POSTGRADO EN AGROECOSISTEMAS TROPICALES

**AISLAMIENTO, CULTIVO Y PRODUCCIÓN DE ESCLEROCIOS DE
Morchella esculenta Y *Morchella conica*,
COMO PRINCIPIO PARA SU DOMESTICACIÓN Y PRODUCCIÓN
BAJO CONDICIONES CONTROLADAS**

GERARDO ALVARADO CASTILLO

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

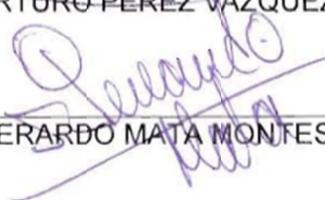
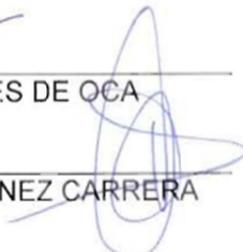
TEPETATES, MANLIO FABIO ALTAMIRANO, VERACRUZ

2011

La presente tesis, titulada: **Aislamiento, cultivo y producción de esclerocios de *Morchella esculenta* y *Morchella conica*, como principio para su domesticación y producción bajo condiciones controladas**, realizada por el alumno: **Gerardo Alvarado Castillo**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
AGROECOSISTEMAS TROPICALES

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:	 _____ DR. ARTURO PÉREZ VÁZQUEZ
DIRECTOR:	 _____ DR. GERARDO MATA MONTES DE OCA
ASESOR:	 _____ DR. DANIEL CLAUDIO MARTÍNEZ CARRERA
ASESOR:	 _____ DRA. MARTHA ELENA NAVA TABLADA
ASESOR:	 _____ DR. FELIPE GALLARDO LÓPEZ
ASESOR:	 _____ DR. FRANCISCO OSORIO ACOSTA

Tepetates, Manlio Fabio Altamirano Veracruz, México, 28 de Noviembre de 2011

AISLAMIENTO, CULTIVO Y PRODUCCIÓN DE ESCLEROCIOS DE *Morchella*
esculenta Y *Morchella conica*, COMO PRINCIPIO PARA SU DOMESTICACIÓN Y
PRODUCCIÓN BAJO CONDICIONES CONTROLADAS

Gerardo Alvarado Castillo, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2011

La domesticación de hongos silvestres comestibles, particularmente de *Morchella* es actualmente una necesidad, generada por su demanda en los mercados nacionales e internacionales. Sin embargo, no se tiene establecido un procedimiento para su producción comercial y el 100% de la producción comercializada proviene de recolecta del bosque, ocasionando la degradación del recurso. Por tanto, para contribuir a la solución de esta situación se realizó la presente investigación, la cual integra dos etapas, una de reflexión teórica y la otra de estudios experimentales. En la primera, se efectuó un trabajo de análisis, identificando el papel del enfoque de Agroecosistemas y una propuesta conceptual de la domesticación para el caso de los hongos silvestres comestibles. En la segunda etapa se procedió a realizar experimentos tendientes a la domesticación de *Morchella*, mediante la aplicación de dos principios básicos: la producción en masa de esclerocios y la determinación de las condiciones para la fructificación de los mismos. Los resultados obtenidos en la investigación indican que es posible dar cumplimiento a la primera condición para la domesticación de *Morchella* y que a pesar de que no se lograron producir fructificaciones, el conocimiento generado puede contribuir a la domesticación de este hongo, a través de estrategias de producción *in Vitro* e *in situ*, aprovechando el vasto conocimiento etnomicológico y las modernas herramientas de la biotecnología.

Palabras clave: domesticación, inducción, recolección, suplementación

ISOLATION, CULTURE AND PRODUCTION OF SCLEROTIA OF *Morchella esculenta* AND *Morchella conica*, AS PRINCIPLE FOR ITS DOMESTICATION AND PRODUCTION UNDER CONTROLLED CONDITIONS

Gerardo Alvarado Castillo, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2011

The domestication of wild edible mushroom, particularly of *Morchella* is at the moment a necessity, generated by its demand in the national and international markets. Nevertheless, it is not been established a protocol or procedure for his commercial production and all of the commercialized production comes from collects of the forest, causing the degradation of this resource. Therefore, to contribute to the solution of this problem the present investigation began, which includes two important stages, one of theoretical reflection and another one of experimental studies. In the first, a work of introspection took place, identifying the paper of the Agroecosystems. This work presents a theoretical background and concepts related to the domestication process. In the second stage, it was carried out several experiments to the domestication of *Morchella*, by means of the application of two basic principles: the production in mass of sclerotia and the determination of the conditions for the fruition of the same. The investigation as a whole, one concludes that fulfillment to the first condition for the domestication of *Morchella* occurs and that although they were not managed to produce fruitions, the obtained results can contribute to the domestication of this fungus, through strategies of production *in vitro* and *in situ*, taking advantage of the vast etnomicological knowledge and the modern tools the biotechnology.

Key words: Domestication, induction, harvesting, supplementation

“Investigación es lo que hago cuando no sé lo que estoy haciendo”

Wernher Von Braun (1912-1977)

DEDICATORIA

A DIOS por haberme bendecido con un logro más en mi vida.

A mi padre, Juan Gerardo Alvarado Morales...Ahora que soy padre comprendo muchas cosas y espero no sea tarde.

A mi madre, Sara Castillo Ramírez, sin ti no sería lo que soy, que Dios te colme de bendiciones y continúes cosechando frutos. Siempre estás en mi pensamiento.

A mis hijos, Gerardo, Ángel, Alejandro y Antonio, que me elevaron a la dignidad de ser padre por partida cuádruple.

A mi esposa Bárbara, que apegada a lo indicado en la Epístola de Melchor Ocampo se graduó en la suprema magistratura de hacerme padre.

A mis amigas de toda la vida: Tere, Wendy, Martha, pero con especial cariño a Gris, cuyo apoyo y consejos siempre marcaron la diferencia...Por su amistad y apoyo incondicional, mi eterno agradecimiento.

A todos los demás que me han apoyado, a los que no, y sobre todo a los que me pusieron piedras en el camino, pues a pesar de todo forman parte de la dialéctica de la vida.

AGRADECIMIENTO

Al CONACYT, que con el esfuerzo de todos los mexicanos sostuvo mis estudios de Doctorado a través la beca CONACyT No.175325.

Al Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz, por ofrecerme una formación sólida y coherente con la realidad.

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

A mis Profesores Consejeros con los cuales encontré apoyo, tolerancia y consejo.

Al Dr. Arturo Pérez Vázquez, que fungió más que como un Consejero, como compañero y amigo.

Dr. Gerardo Mata Montes de Oca, por su apoyo, comprensión y atinados consejos, pero sobre todo por su gran disposición y criterio, lo que nunca permitió que cayera el ánimo.

Dr. Daniel Carrera Martínez, por su apoyo incondicional, sencillez y calidad humana, cuya participación fue fundamental para lograr esta meta en mi vida.

Dra. Martha Elena Nava Tablada, por su comprensión, apoyo en momentos difíciles, tolerancia, pero sobre todo por su amistad.

Dr. Felipe López Gallardo, por sus acertadas observaciones, asistencia precisa y apoyo sin condición.

Dr. Francisco Osorio Acosta, por su mano amiga, paciencia y buen criterio, virtudes sin las cuales no hubiera sido posible lograr esta meta.

CONTENIDO

	Página
INTRODUCCIÓN GENERAL -----	1
1. Marco teórico conceptual -----	5
2. Situación problemática y problema de investigación-----	22
3. Hipótesis y objetivos -----	24
4. Esquema general metodológico-----	26
5. Literatura citada -----	29
CAPÍTULO I. EL ENFOQUE DE AGROECOSISTEMAS COMO UNA FORMA DE INTERVENCIÓN CIENTÍFICA EN LA RECOLECCIÓN DE HONGOS SILVESTRES COMESTIBLES -----	37
Resumen-----	37
Abstract-----	38
1.1. Introducción-----	39
1.2. Impactos de la recolección no regulada de hongos silvestres -----	43
1.3. El enfoque de agroecosistemas en relación con los hongos silvestres comestibles -----	45
1.4. Escala económica en la recolección de hongos silvestres-----	47
1.5. Aspectos sociales de la recolección de hongos silvestres comestibles -----	48
1.6. Implicaciones ecológicas en la recolección de hongos silvestres comestibles --	52
1.7. La recolección de hongos en el contexto político-administrativo -----	53
1.8. El papel de la intervención científica -----	54
1.9. Conclusiones -----	56
1.10. Literatura citada -----	57

CAPÍTULO II. EL CONCEPTO DE DOMESTICACIÓN: EL CASO DE LOS HONGOS SILVESTRES COMESTIBLES-----64

Resumen----- 64

Abstract----- 65

2.1. Introducción-----66

2.2. La domesticación tradicional: el caso de los hongos comestibles -----68

2.3. Conocimiento micológico y el proceso de domesticación -----72

2.4. Los hongos silvestres y su integración a los agroecosistemas -----74

2.5. El concepto de domesticación en el caso de los hongos silvestres comestibles75

2.6. Avances en la domesticación de morilla-----76

2.7. Conclusiones -----77

2.8. Literatura citada-----78

CAPÍTULO III OBTENCIÓN DE ESCLEROCIOS DE *Morchella* MEDIANTE LA SUPLEMENTACIÓN DE GRANO-----84

Resumen----- 84

Abstract----- 85

3.1. Introducción-----86

3.2. Materiales y métodos-----88

3.3. Resultados -----92

3.4. Discusión -----99

3.5. Conclusiones -----105

3.6. Literatura citada-----106

CAPÍTULO IV FORMACIÓN DE ESCLEROCIOS DE *Morchella esculenta* Y *Morchella conica in vitro*-----109

Resumen----- 109

Abstract-----110

4.1. Introducción-----	111
4.2. Materiales y métodos-----	114
4.3. Resultados -----	115
4.4. Discusión -----	118
4.5. Conclusiones -----	122
4.6. Literatura citada-----	123
CAPÍTULO V. INDUCCIÓN DE LA FRUCTIFICACIÓN DE <i>Morchella esculenta</i> Y <i>Morchella conica</i> MEDIANTE LA APLICACIÓN DE ESTRÉS -----	126
Resumen-----	126
Abstract-----	127
5.1. Introducción-----	128
5.2. Materiales y métodos-----	130
5.3. Resultados -----	134
5.4. Discusión -----	138
5.5. Conclusiones -----	142
5.6. Literatura citada-----	143
CONSTRATACIÓN DE HIPÓTESIS -----	145
CONCLUSIONES GENERALES -----	146
RECOMENDACIONES GENERALES -----	149
ANEXOS-----	150

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 3.1. Tratamientos evaluados en la producción esclerocios.....	90
Cuadro 3.2. Eficiencia productiva de los esclerocios de <i>Morchella</i>	98
Cuadro 4.1. Etapas en la formación de esclerocios.....	116

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Zonas potenciales de recolección de hongos.....	15
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Morchella</i>	19
Figura 3. Esquema general metodológico de la investigación.....	28
Figura 1.2. El enfoque de agroecosistemas en la recolección de hongos....	45
Figura 2.1. Especies de hongos conocidos, domesticados y producidos a escala comercial.....	70
Figura 2.2. Xochipilli, Príncipe de las flores.....	73
Figura 3.1. Crecimiento micelial en diferentes tipos de grano en las cinco cepas estudiadas.....	93
Figura 3.2. Producción de esclerocios a través de modificaciones al método del frasco de Ower <i>et al.</i>	94
Figura 3.3. Producción de esclerocios en diferentes tratamientos con y sin barrera física.....	95
Figura 3.4. Producción de esclerocios en diferentes cepas con y sin barrera física.....	96
Figura 3.5. Producción de esclerocios en diferentes tratamientos con diferentes cepas.....	97
Figura 3.6. Esclerocios obtenidos a los 28 días después de la inoculación.....	99
Figura 4.1a. Crecimiento de hifas principales.....	117
Figura 4.1b. Hifas secundarias ramificadas.....	117

Figura 4.1c.	Cruzamiento que forma hifas multinucleadas.....	117
Figura 4.1d.	Inicio de la formación de masas hifales.....	117
Figura 4.1e.	Crecimiento de la masa hifal.....	117
Figura 4.1f.	Inicio de la formación de esclerocios.....	117
Figura 4.2a.	Integración de células de la periferia hacia el centro para la formación de esclerocios.....	118
Figura 4.2b.	Anastomosis de las hifas de <i>Morchella</i>	118
Figura 4.2c.	Clamidosporas en los esclerocios de <i>Morchella</i>	118
Figura 5.1.	Modificaciones al Método del frasco de Ower <i>et al.</i>	132
Figura 5.2.	Esclerocios maduros y pigmentados obtenidos a cuatro semanas de incubación.....	133
Figura 5.3.	Agregados miceliales descritos por Masaphy.....	134
Figura 5.4.	Interacciones entre cepas y frío.....	135
Figura 5.5.	Interacción entre cepas y horas de inundación del sustrato.....	136
Figura 5.6.	Interacción entre frío y horas de inundación.....	137
Figura 5.7.	Interacciones entre cepas, condiciones de frío e inundación del sustrato.....	138
Figura 5.8.	Condiciones para la diferenciación entre la fase vegetativa y la de fructificación.....	141

INTRODUCCIÓN GENERAL

La recolección de hongos silvestres comestibles forma parte de lo que se ha denominado Productos Forestales No Maderables (PFNM). Estos son un elemento relevante en la alimentación e ingresos de varios millones de hogares en todo el mundo (Ceballos, 2005). Actualmente, gobiernos e instituciones han comenzado a valorar su importancia dentro de las comunidades rurales (Zamora-Martínez y Nieto de Pascual-Pola, 1995; Peña *et al.*, 2000), por su aporte a la autosuficiencia alimentaria y obtención de ingresos (Bandala *et al.*, 1997; Pastor, 2002).

Sin embargo, la sobreexplotación de este recurso ha provocado consecuencias negativas en su distribución y abundancia natural (Pilz *etal.*, 1996), así como alteraciones sobre la biodiversidad, debido a la perturbación excesiva del hábitat donde son recolectados (COINBIO, 2002). En respuesta a esta actividad informal de explotación masiva y pérdida de los hongos, se han establecido en México una serie de regulaciones y leyes (NOM-010-SEMARNAT-1996 y NOM-059-SEMARNAT-2010), en las cuales desafortunadamente predomina un enfoque proteccionista y no de fomento de un aprovechamiento sustentable del recurso. Por tanto, las opciones posibles hoy en día, para el aprovechamiento racional de este recurso y su conservación a largo plazo son: 1) El manejo y gestión de las poblaciones naturales y 2) El desarrollo de técnicas para su domesticación y producción comercial.

El manejo de estas opciones puede conducir a un nuevo enfoque de conservación y desarrollo sustentable de este recurso natural, constituyendo una respuesta ante el

estado de vulnerabilidad de muchas especies de hongos comestibles en su medio natural (Ruiz *et al.*, 2004). En este sentido, los esfuerzos para la producción comercial de *Morchella* han sido limitados, pues a pesar de que se han generado patentes para su producción a gran escala (Ower *et al.*, 1986; 1988), no han resultado del todo satisfactorias cuando se llevan a la práctica. De tal manera que han sido objeto de múltiples críticas, tales como la posible ocultación de información y manipulación de datos (Barnes y Wilson, 1998; Stott y Mohammed, 2004; Molina *et al.*, 1993).

No obstante, todas las investigaciones convergen en un aspecto importante que tiene relación directa con el ciclo biológico de *Morchella* (Volk y Leonard, 1990) y que es la obtención de esclerocios. Estas son las estructuras de resistencia que permiten al hongo sobrevivir en condiciones adversas, constituyendo además una condición básica y necesaria para la obtención del cuerpo fructífero (Ower, 1982; Ower *et al.*, 1986; 1988; Stott y Mohammed, 2004; Volk y Leonard, 1990). Por ello, se considera que el conocimiento que se pueda generar en la producción de esclerocios de *Morchella* y las condiciones para su diferenciación en cuerpos fructíferos, sentará las bases para la creación de tecnologías que permitan una producción confiable y abundante y en consecuencia un aprovechamiento sustentable del recurso.

En México el consumo de éste y otros hongos forma parte del acervo cultural de la población rural, donde su conocimiento y uso, constituyen, aún en nuestros días, parte de una estrategia de subsistencia basada en el uso múltiple de los recursos naturales (SEMARNAT, 2004). En ese sentido, se analizó el papel de los

agroecosistemas en la recolección de los hongos silvestres comestibles, lo cual forma parte del Capítulo I del presente manuscrito. Este análisis fue elaborado con el fin de generar un instrumento de propuesta para los tomadores de decisión, pues a pesar de su importancia social, económica, ecológica y cultural (Marshall *et al.*, 2006; Martínez-Carrera, *et al.*, 2007; Alvarado y Benítez, 2009), la producción y recolección de hongos, representa todavía una de las actividades poco reconocidas del sector primario nacional (Villareal-Ruiz, 1996; Arteaga y Moreno, 2006); sobre todo en relación a sus estructuras, procesos, variables socioeconómicas, patrones de desarrollo, e interrelaciones con otros sectores (Martínez-Carrera, *et al.*, 2007; Mariaca *et al.*, 2001).

En el mismo sentido, en el Capítulo II se analizó la domesticación del hongo *Morchella*, el cual tiene una alta demanda en el mercado nacional e internacional, comparable a la que tienen las trufas europeas (*Tuber spp*), (Alexopoulos *et al.*, 1996). Este capítulo plantea que la domesticación es un elemento básico para emprender acciones de desarrollo que busquen fortalecer el valor de dicho recurso, en dos sentidos principales: 1) Disminución de la extracción (práctica considerada como el mayor componente para la pérdida de la biodiversidad de los recursos naturales) y 2) impulsar un modelo agroecológico de aprovechamiento del recurso que favorezca la conservación del medio ambiente natural. Por lo cual, impulsar un proceso de domesticación -a diferentes escalas- puede conducir a un nuevo enfoque de conservación y desarrollo sustentable de los recursos naturales, ya que es una respuesta viable ante el estado de vulnerabilidad de estas especies en su ambiente natural.

En el Capítulo III se describe el proceso técnico de domesticación de *Morchella*, con el objetivo de cumplir el primero de los principios para su domesticación (Stott y Mohammed, 2004), que es la producción de esclerocios a gran escala. Para ello se realizaron dos experimentos, el primero para determinar el mejor grano para el crecimiento micelial de *Morchella* y un segundo para evaluar el efecto de la suplementación de grano para la producción de esclerocios, usando modificaciones al método del frasco de Ower (Pat: 4,594,809, Junio 1986).

Dada la importancia de los esclerocios como estructuras de reproducción, se investigó su formación, generación y morfogénesis, a través de su cultivo *in vitro*, etapas que fueron descritas en el Capítulo IV. Finalmente, en el Capítulo V se investigó la mejor forma de inducir la fructificación de los esclerocios bajo condiciones controladas.

La presente investigación aporta información que puede contribuir a la domesticación de *Morchella*, a través de estrategias de producción *in vitro* e *in situ*, aprovechando el vasto conocimiento etnomicológico y las modernas herramientas de la biotecnología. No obstante, este trabajo puede complementarse con investigaciones sobre el papel ecológico de la especie abordada, la evaluación de sus poblaciones naturales, su potencial económico 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 Pilz *et al.* (2007), entre otras.

1. Marco teórico conceptual

En esta sección se definen los conceptos claves que dan sustento a la investigación y que son básicos para la comprensión del tema, es decir la base conceptual y teórica respecto al tema de investigación con su visión y características particulares. El presente trabajo parte del enfoque de sistemas, que tiene su origen en la Teoría General de Sistemas planteada por Bertalanffy (1986), donde se concibe el fenómeno estudiado como un conjunto organizado de elementos que interactúan entre sí o que son interdependientes, formando un todo complejo, identificable y distinto, que se entiende no sólo por sus componentes físicos sino también por las funciones que estos realizan. Así, al abordar científicamente la comprensión de los sistemas concretos que forman la realidad, generalmente complejos y únicos, resultantes de una historia particular, dio pauta al enfoque de Agroecosistemas como disciplina (Ruiz, 2006; Gliessman, 2007).

Dicho enfoque es un modelo de un ecosistema modificado, especializado y complejo diseñado para la producción de alimentos, fibras y otros productos agrícolas (Conway y McCracken, 1990), o también es conocido como la unidad de estudio, bajo el enfoque agroecológico y sistémico, en sentido amplio de la agricultura, donde interactúan aspectos ecológicos, socioeconómicos y tecnológicos (Ruiz, 1995).

El Agroecosistema además ha sido definido como la entidad en cuya estructura se encuentra un componente socioeconómico (el productor y su familia) y productivo (la finca), sustentado sobre bases ecológicas (ecosistemas naturales), para la obtención de satisfactores, y que cuenta por lo menos con una población de utilidad agrícola

(Hart, 1985), además presenta límites internos y externos en el cual funciona el sistema (Sarabia, 1985). Igualmente es un concepto acuñado por el hombre en un sistema económico, por lo cual representa la integración de procesos económicos y ecológicos (Emmanuel y Weersink, 1997).

Por tanto, existen varias conceptualizaciones y acepciones de lo que es el agroecosistema. Sin embargo, para efectos de este trabajo, se le considera como la unidad de estudio que integra condiciones biofísicas y socioeconómicas, que tienen influencia sobre cada una de las propiedades emergentes de ésta, como son: Productividad, Sustentabilidad, Estabilidad y Equidad (Krishna *et al.*, 2008). Por tanto, entender el concepto de agroecosistema es básico ya que permite un mejor entendimiento de cómo acercarse a la realidad, estudiarla y comprender sus transformaciones y funciones.

El enfoque de Agroecosistemas admite la conjunción de varias corrientes filosóficas, lo que ha permitido orientar los trabajos en aspectos particulares (reduccionista), con fines productivos (pragmatismo) pero siempre con una visión global de los efectos potenciales que pueda tener en el entorno y en la sociedad (holismo). Estas corrientes filosóficas no son necesariamente excluyentes, sino por el contrario son complementarias, de tal manera se considera que el enfoque sistémico (integrativo) y reduccionista (disciplinario) son imprescindibles, en la solución y explicación de los fenómenos. Así por ejemplo, el empleo de procedimientos cuantitativos y cualitativos en una investigación probablemente podría ayudar a corregir los sesgos propios de cada método (López, 2001), coadyuvando a la evolución del método científico y el avance de la ciencia.

El presente trabajo adopta la aplicación del enfoque agroecosistémico, ya que el estudio de la agricultura en general y el de la recolección y producción de hongos comestibles en particular, se han realizado con un enfoque tecnocrático, en el que se estima que la incorporación de tecnología es más que suficiente para lograr el mejoramiento productivo de las explotaciones y de las condiciones de vida de la población (Ortega-Ponce, 2004). Sin embargo, este es un problema complejo que debe comprenderse en toda su magnitud para poder establecer soluciones integrales y viables desde un enfoque sistémico (Alvarado y Benítez, 2009), pues reviste una gran complejidad antropológica, socioeconómica, política y cultural (Ortega-Ponce, 2004).

En el caso del *Morchella* y de muchos otros hongos comestibles, la tendencia reduccionista ha producido estudios muy particulares y específicos, que reportan enormes éxitos en términos de conocimiento científico. Como ejemplo de ello están los trabajos taxonómicos de Gessner *et al.* (1987), Wipf *et al.* (1996) y Buscot *et al.* (2000), genéticos de Pilz *et al.* (2007) y Masaphy *et al.* (2009) y fisiológicos de Dalgles y Jacobson (2005), Harald *et al.* (2007), donde se privilegia el análisis intelectual para la generación del conocimiento, y usa el método lógico-matemático para explicar los fenómenos y confirmarlos con cierto nivel de probabilidad (Caponi, 2008), pero generalmente abordando una parte del problema complejo.

Por el contrario, la presente investigación se basó en un enfoque integrativo, examinando su aplicación directa en los procesos productivos y en la generación de tecnología para la producción, así como el desarrollo de conceptos y la difusión de las actividades relacionadas con la recolección de hongos. Es decir, se buscó la

integración de disciplinas como la economía y la ecología, con aspectos sociales y culturales, estas dos últimos, relacionados estrechamente con el rescate del conocimiento local e indígena (Toledo, 1992), todas ellas relacionadas con el manejo sustentable de los ecosistemas (Molina, *et al.*, 1993; Pilz *et al.*, 1996) y agroecosistemas (Alvarado y Benítez, 2009).

Esta investigación se realizó con el fin tener una herramienta de difusión al alcance de los tomadores de decisiones, pues la falta de generación de conocimiento, sobre la producción y recolección de hongos, lo ha relegado de los temas prioritarios del desarrollo rural (Larson, 2007; Martínez-Carrera *et al.*, 2007), quedando fuera de las estrategias, programas de apoyo y toma de decisiones del sector público (Martínez-Carrera *op cit.*).

Con base en lo anterior, se buscó la aplicación de técnicas, instrumentos y estrategias para llevar a cabo la investigación, cumplir con los objetivos y tener acceso al conocimiento como mecanismo de producción científica (Camacho y Marcano, 2003), pues se considera que el conocimiento es dinámico y está lejos de ser encajonado en tal o cual teoría, enfoque o metodología, por lo que este razonamiento es sólo una convención que sirve como un simple cuadro de referencia, ya que no pretende ser una posición rígida e inmutable. Al respecto y como lo indica Giraldo (2004), lo que se trata es de reconocer que sin una opción inter-transdisciplinaria del conocimiento estamos perdidos.

A continuación se exponen las teorías existentes sobre el objeto de estudio, a través de una revisión documental que permitió contextualizar el trabajo. De manera introductoria se señalan las características generales de los hongos, la descripción del género *Morchella*, su clasificación taxonómica, nombres comunes y propiedades alimenticias. Posteriormente, se expone su distribución ecológica en México y las condiciones para su desarrollo en ecosistemas naturales. Finalmente se aborda la producción de los hongos comestibles, la comercialización de *Morchella*, su *status* como especie protegida en México, ciclo de vida y avances en el proceso de su domesticación.

Definición de los hongos y sus características generales

La palabra hongo proviene del latín *fungus*. Un hongo es un organismo eucariota que pertenece al reino Fungi. Los hongos forman un grupo polifilético (no existe un antepasado común a todos los miembros), son heterótrofos y presentan diversas interacciones biológicas siendo parásitos, micorrízicos o facultativos (Chang y Miles, 2004).

El reino de los hongos está formado por organismos que presentan gran variedad de colores, desde el blanco más puro hasta tonalidades negras, pasando por una inmensa gama de tonos intermedios. Su textura va desde suave y aterciopelada (tomentoso) hasta viscosa-gelatinosa (vícido). El tamaño fluctúa desde ejemplares visibles únicamente con microscópico hasta aquellos de 20 a 30 cm de altura. La forma de sus cuerpos fructíferos también es variable y pueden encontrarse hongos de forma esférica hasta la forma típica de las setas. En este último caso, generalmente presentan las siguientes estructuras básicas: pie (estípite), en algunos

casos tienen otras estructuras como anillo y volva, y sombrero (píleo), cuya parte inferior puede estar constituida por láminas, poros ó dientes, de diferentes tamaños (también conocido como himenóforo) (Chang y Miles, 2004).

Los hongos constituyen un importante y valioso recurso biológico, que existe de forma diversa y abundante en la naturaleza, pues alcanzan los más altos índices de biodiversidad después de los insectos, estimándose la existencia de 1.5 a 2.5 millones de especies a nivel mundial (Guzmán, 1997; García y Guevara, 2005).

Las cifras para México indican la existencia de alrededor de 200 mil especies, de las cuales se han registrado taxonómicamente sólo el 3.5% (Guzmán, 1997) y se cultivan comercialmente sólo tres géneros, siendo: *Agaricus* (champiñón), *Pleurotus* (setas) y *Lentinula* (shiitake) (Martínez-Carrera *et al.*, 2010; Zamora-Martínez, 1999a; SEMARNAT, 2004).

Los hongos como recurso biológico y alimenticio

Los hongos tienen un papel fundamental en la descomposición de la materia orgánica, reciclamiento de nutrientes en el suelo y la integración de estos en los ciclos biogeoquímicos, principalmente del carbono. Los procesos bioquímicos donde los hongos actúan como catalizadores son diversos, tales como la mineralización, inmovilización, óxido-reducción, volatilización, fijación, precipitación y solubilización de nutrientes (Villareal-Ruiz, 1996). De la misma manera desempeñan un importante papel en la regulación de los ecosistemas terrestres, ya que interaccionan directa o indirectamente con la comunidad vegetal, influyendo en su productividad, diversidad y estructura (Martínez y Pugnaire, 2009). Particularmente destacan por su

importancia los hongos formadores de micorrizas arbusculares, los cuales son un grupo abundante que mejoran el establecimiento de algunas plantas y las ayudan a superar condiciones de estrés, aumentando la captación de nutrientes y agua, así mismo están relacionados con la agregación y conservación del suelo (Lovera y Cuenca, 2007), y pueden servir como bioindicadores de prácticas sustentables del manejo del bosque (Amaranthus, 1998).

Su importancia no sólo se limita a que son una fuente de alimentación y en algunos casos como medicamento (Amaranthus, 1998), sino que su recolección es una fuente primaria de ingreso para muchas personas del medio rural (McFarlane *et al.*, 2005; Mc Lain y Jones, 2005). Adicionalmente, los hongos tienen usos rituales y culturales (Guzmán, 1994; Velandia *et al.*, 2008). Así pues, los hongos ofrecen simultáneamente productos y servicios ambientales a la sociedad (Pilz y Molina, 2002; Tacón y Palma, 2006).

El Género *Morchella*

A los hongos del género *Morchella* se le conocen normalmente como morillas. Estas presentan una forma muy original e inconfundible, parecida a una colmena. Se describen como conos alveolados, a manera de esponja, hueca en su interior (Alexopoulos *et al.*, 1996; Molina *et al.*, 1993). Sus tipos se clasifican según la coloración de su cuerpo fructífero, el cual puede ser amarillo, ocre, pardo o gris. Sus propiedades organolépticas las hacen muy apetecidas para consumo humano (Guzmán, 1997).

Las morillas se han descrito como hongos con carpóforo de 80-150 mm, píleo globoso, a veces algo cónico; color amarillo ocre, gris moreno, con alvéolos amplios, irregularmente redondeados, algo venosos, separados por costillas estériles, de color más claro. Estípite de 40-80 mm x 20-50 mm, receptáculo robusto, hueco, pálido, algo furfuráceo, engrosado y surcado en la base. Esporas de 20-25 µm x 12-16 µm, blancas, lisas y elípticas. La esporada es de color ocre-naranja y la carne gruesa, tierna, blanquecina y olor fúngico fuerte y sabor dulce (Molina *et al.*, 1993; Pilz *etal.*, 2007).

Clasificación taxonómica, nombres comunes y *status* de *Morchella*

Reino:Fungi

División:Ascomycota

Clase:Pezizomycetes

Orden:Pezizales

Familia:Morchellaceae

Genero: *Morchella*

Especies: *M. angusticeps*, *M. conica*, *M. costata*, *M. crassipes*, *M. elata*, *M. esculenta*, *M. gigas*, *M. semilibera*, *M. spongiola*, *M. spongiolavar. Dunensis*, *M. vulgaris*, *M. MA4SSI73* y *M. UC 1475091* (Pilz *etal.*, 2007).

Estos hongos son conocidos en México con los nombres de “morilla”, “mazorquita”, “elotillo”, “panalillo”, “colmenilla”, “elote” y “morita”, y a su vez se clasifica según su color en amarillas, negras, blancas y grises (Manzola, 1995; Guzmán, 1997).

Existen en México siete especies de este género, las cuales se encuentran bajo alguna categoría de protección, siendo: *M conica*, *M. costata*, *M. elata*, *M. esculenta*, *M. umbrina*, *M. rufobrunneay* *M. angusticeps* las especies protegidas, debido al aprovechamiento intensivo y selectivo, originado por la alta demanda y el elevado

valor comercial (INE, 1994). Además, la pérdida y la fragmentación del hábitat donde son recolectados estos hongos, ha provocado serias consecuencias sobre la diversidad de la especie, así como una erosión intragenética (Dalglish y Jacobson, 2005).

Propiedades alimenticias de *Morchella*

Los hongos comestibles silvestres han desempeñado un papel importante en la alimentación del pueblo mexicano, pues esta tradición etnomicológica se ha practicado desde tiempos prehispánicos y en la actualidad la población indígena y mestiza que habita cerca o en los bosques de zonas templadas y frías tienen amplio conocimiento de las especies de hongos comestibles (Villareal y Pérez-Moreno, 1989). Son fuente de vitaminas y minerales, algunos aportan cantidades considerables de calcio, fósforo, hierro, sodio, potasio y carbohidratos, además tienen un valor nutritivo igual al de algunos alimentos ricos en proteínas y fibras (Stamets, 1993).

La morilla es una de las setas comestibles más estimada, debido a su sabor delicado, y su textura sustanciosa, también se le otorgan propiedades medicinales, pero esto no ha sido totalmente comprobado (Thomas y Volk, 1992).

El hongo *Morchella* contiene aminoácidos tales como: metionina, valina y leucina (Instituto Nacional de la Biodiversidad, 2010; Kosaric y Miyata, 1981) y el micelio contiene en base a su peso seco 45% de proteína, 5% de grasa 8.5% de ceniza y el resto es agua. Así mismo el cuerpo fructífero tiene 30.8% de proteína, 1.8% de lípidos, 13.1% de cenizas y el resto es agua (Karaboz y Oner, 1988). Sin embargo,

no existen estudios que determinen las características nutritivas de cada especie en particular.

Distribución ecológica de *Morchella* en México y condiciones para su desarrollo

Los hongos del género *Morchella* crecen normalmente en zonas templadas de México como el Distrito Federal, Estado de México, Veracruz (zona centro alta), Puebla, Morelos, e Hidalgo (Figura 1). Sin embargo, aún no existe un monitoreo que defina las zonas específicas donde se localizan. Se desarrollan preferentemente en bosque de oyamel en altitudes que van de los 2800 a 3300 msnm, bajo sombra completa; aunque, también llegan a encontrarse en zonas perturbadas, con total exposición al sol. Fructifican desde fines de agosto hasta octubre y en años lluviosos incluso hasta diciembre (SEMARNAT, 2004).

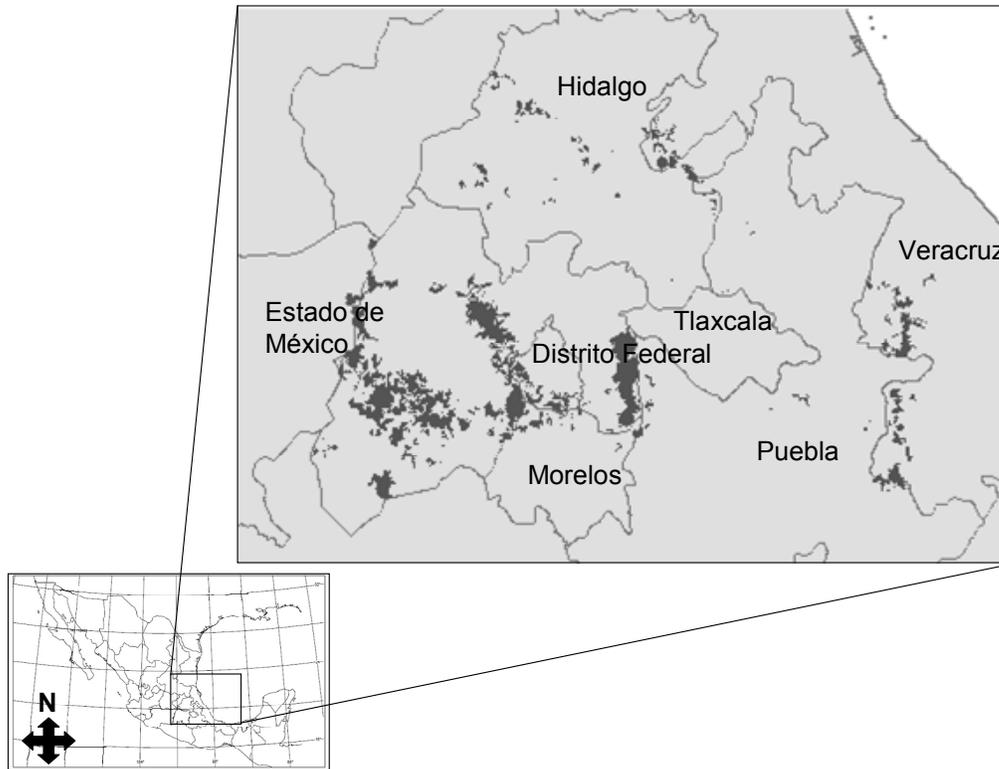


Figura 1. Zonas potenciales de recolección de hongos. Fuente: Zamora-Martínez (1999b).

Los recolectores expertos buscan ejemplares de *Morchella* en los parajes más húmedos y sombreados; pero sobre todo en áreas donde anteriormente ocurrieron incendios. Por ello, particularmente en Estados Unidos y Chile, existe la costumbre de prender fuego a la hojarasca del bosque antes y al inicio de las lluvias, para favorecer la fructificación de este hongo (Molina *et al.*, 1993; Pilz *et al.*, 2007). En México no se ha documentado dicha práctica, pero este tipo de acciones deben evitarse o ser inducidas bajo un control supervisado, puesto que representan un riesgo para la integridad del bosque y los núcleos humanos que lo habitan (SEMARNAT, 2004).

Las morillas se asocian a una gran variedad de especies vegetales y mantienen una relación simbiótica durante gran parte de su ciclo de vida, especialmente con coníferas (Vogel, 1988; Stamets, 1993). Esta estrecha y estable relación hace que el hongo se reproduzca sexualmente sólo bajo ciertas condiciones, lo que se traduce en una escasa producción de cuerpos fructíferos. Sin embargo, cuando la contraparte vegetal desaparece por tala o incendios, el hongo presenta una fuerte fructificación como estrategia para dispersarse y sobrevivir. Por esta razón, *Morchella* ha sido erróneamente asociada a la perturbación por fuego, que se ha provocado intencionalmente para fomentar su producción. No obstante, la fructificación puede ser igualmente estimulada por otras condiciones adversas, tales como lluvias intensas o inviernos prolongados (Ower, 1982).

Producción y comercialización de *Morchella*

A nivel mundial se han domesticado aproximadamente 22 especies fúngicas, la mayoría provenientes de regiones tropicales y subtropicales. De éstas sólo 10 se producen a escala industrial, con un volumen del orden de los dos millones de toneladas anuales (Martínez-Carrera *et al.*, 2010).

En México, las estadísticas de recolecta de hongos silvestres y producidos comercialmente: *Agaricus bisporus* (champiñón), *Pleurotus ostreatus* (setas) y *Lentinula edodes* (shiitake) son inconsistentes, se encuentran dispersas o sencillamente no existen (Zamora-Martínez, 1999a).

Las especies del género *Morchella* son normalmente bien cotizadas a nivel nacional e internacional (Villareal y Pérez-Moreno, 1989), debido a que la oferta en el mercado es irregular (SEMARNAT, 2004). La producción mundial total de morillas se

estima aproximadamente en 150 t (peso seco), equivalente a 1.5 millones de t de morillas en peso fresco. La India y Pakistán son los principales países productores, cada uno con cerca de 50 t.año⁻¹ (Ciesla, 2002), el resto se produce en países como Nueva Zelanda, Chile y Argentina. Por otro lado, los principales países consumidores de *Morchella* son Alemania, Suiza, Francia, España, Estados Unidos y Canadá (FAO, 2007). En México la comercialización se realiza normalmente por encargo del consumidor (UNEP-WCMC, 2003) o por compra directa en el mercado. Los precios al consumidor oscilan desde 50 hasta 120 pesos por kilogramo en fresco (SEMARNAT, 2004).

La venta de hongos silvestres normalmente la realizan los mismos recolectores. Por ejemplo, durante la temporada de lluvias se establecen centros de acopio donde llega el producto proveniente de los bosques aledaños. Los centros más importantes por la cantidad y diversidad de especies que ofertan son los siguientes:

- En el Distrito Federal los mercados de la Central de Abastos, Jamaica, la Merced y Xochimilco,
- En el Estado de México los mercados de Toluca, Santiago Tlaxiaco, Capulhuac, Chalma, Ocuilan, Santa Martha y Texcoco.
- En Morelos los mercados regionales de Cuernavaca y Cuautla
- En Tlaxcala los mercados de la ciudad de Tlaxcala y Huamantla
- En Puebla el mercado de Cuetzalan (UNEP-WCMC, 2003).

Ciclo de vida de *Morchella*

El ciclo de vida de *Morchella* implica una serie de eventos que involucran las principales etapas de desarrollo del hongo, para que la siguiente generación de individuos se produzca. El ciclo inicia con la producción de esporas, las cuales para llegar a germinar y producir micelio necesitan condiciones específicas. La espora se desarrolla a través de tubos germinativos que se engrosan y elongan hasta formar una hifa (que mide alrededor de 10 a 70 μm de diámetro). La hifa crece repetidamente y se dispersa hasta formar una masa interconectada entre sí que se conoce comúnmente como micelio primario, el cual puede producir conidios o puede fusionarse con otros micelios a través de un fenómeno conocido como plasmogamia (unión de contenido citoplasmático), dando lugar a la formación de micelio secundario (Volk y Leonard, 1990; Pilz *et al.*, 2007).

El micelio primario y secundario tiene la capacidad de formar esclerocios y estos a su vez pueden diferenciarse al existir las condiciones óptimas, para dar lugar a los carpóforos o cuerpos fructíferos, los cuales producirán esporas que inician un nuevo ciclo. El esclerocio producido por micelio secundario puede diferenciarse en cuerpos fructíferos al encontrar las condiciones ambientales adecuadas o volver a producir micelio (Figura 2). Sin embargo, no se sabe con certeza si el esclerocio producido por micelio primario tiene la capacidad de diferenciarse en cuerpos fructíferos (Volk y Leonard, 1990; Pilz *et al.*, 2007).

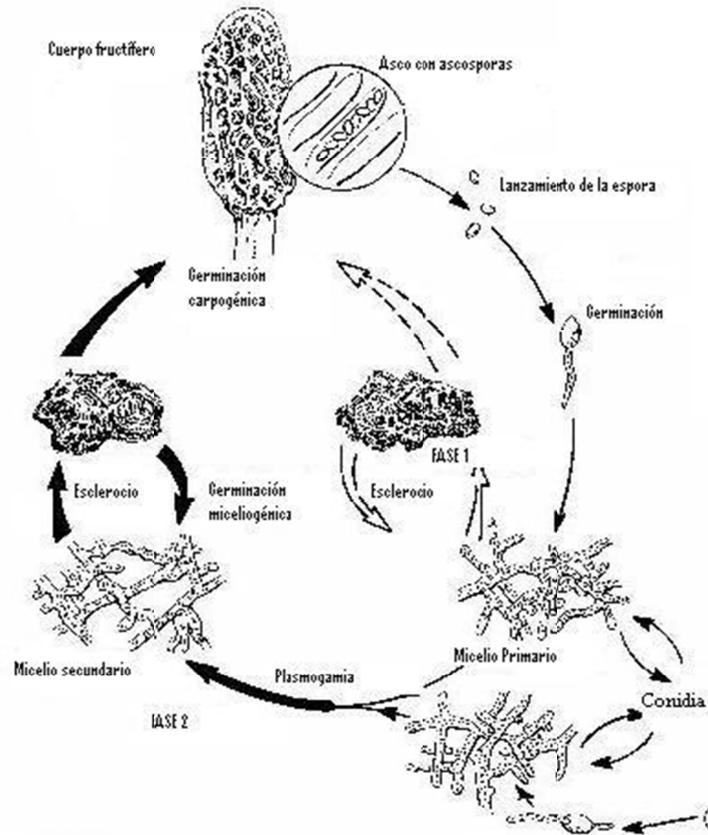


Figura 2. Ciclo de vida de *Morchella* propuesto por Volk y Leonard (1990).

A diferencia de otros hongos cultivados, los hongos del género *Morchella*, presentan en su ciclo de vida la formación de estructuras llamadas esclerocios (Volk y Thomas, 1989), las cuales son relativamente grandes (1-5 mm de diámetro), con paredes gruesas que permiten que sobreviva a las condiciones naturales adversas y que representan su fase asexual. Este fenómeno ha sido aprovechado para lograr producir cuerpos fructíferos bajo condiciones controladas de cultivo (Ower, 1982).

Avances en la domesticación de *Morchella*

En la época prehispánica, los antiguos habitantes de México únicamente se dedicaron a la colecta de hongos, sin embargo, actualmente existen trabajos que intentan la domesticación de algunas especies con importancia socioeconómica como *Laetiporus sulphureus*, *Calvatia sp*, *Lycoperdon sp*, *Sparassis crispa* (SEMARNAT, 2004), pero el conocimiento generado no permite aún su cultivo bajo condiciones controladas, por lo que su aprovechamiento se restringe a la recolección de sus poblaciones naturales. El intento más exitoso en cuanto a desarrollar una técnica de producción de *Morchella*, (específicamente en *M. esculenta*) es el de Ower (1982), cuyos estudios dieron origen a dos patentes (Pat. 4.594.809 y Pat. 4.757.640). Sin embargo, la aplicación de éstas patentes no ha resultado eficiente, pues en la práctica muestran una serie de limitantes que no han podido superarse, tales como la malformación de cuerpos fructíferos, aborto de primordios y baja productividad.

Los avances en la domesticación del género *Morchella* coinciden en que los esclerocios son una condición necesaria para su fructificación (Ower, 1982; Ower *et al.*, 1986, 1988; Stott y Mohammed, 2004; Volk y Leonard, 1990). Por ello, la obtención abundante de esclerocios es uno de los pasos necesarios para su domesticación (Stott y Mohammed, 2004). En el contexto nacional, los estudios relacionados con este hongo son contados y se limitan a la descripción de las condiciones ecológicas donde normalmente crecen o a la reproducción de las condiciones indicadas en las patentes mencionadas. Debido a las inconsistencias en

los avances logrados y el vacío de conocimiento sobre las condiciones idóneas para la producción de este hongo, se planteo desarrollar esta investigación científica sobre el género *Morchella*, con el objetivo de contribuir a generar conocimiento sobre su domesticación y generar tecnología apropiada a las condiciones y necesidades específicas de México.

2. Situación problemática y problema de investigación

Debido al alto valor comercial de los hongos silvestres, particularmente del género *Morchella*, en los mercados nacionales e internacionales, se ha provocado una alta presión extractiva (Dalglish y Jacobson, 2005), cuyo nivel no se encuentra documentado en México. Esto ha ocasionado la perturbación excesiva de su hábitat y la interrupción de su ciclo biológico. Estos efectos se producen debido a que la recolección se hace de forma repetitiva en un mismo sitio, provocando compactación del suelo y en general por las modificaciones al entorno donde se desarrollan los hongos. Así mismo, la recolecta se realiza sin una selección de individuos, por lo que se cosechan especímenes jóvenes que no alcanzan su madurez y por lo tanto no diseminan sus esporas al medio, interrumpiendo así su ciclo de reproducción. Es común, que al recolectarlos sin el cuidado necesario se dañen las estructuras subterráneas del hongo. Consecuentemente, en México se ha percibido una disminución de la disponibilidad del recurso durante la última década, aunque no existen datos que soporten dicha afirmación (Marshall *et al.*, 2006).

A pesar de que existe un marco legal que regula el aprovechamiento de los hongos comestibles, específicamente establecido en las Normas Oficiales Mexicanas (NOM-059-SEMARNAT-2010 y NOM-010-SEMARNAT-1996), éstas no han demostrado su efectividad, predominando en estos ordenamientos un enfoque proteccionista y no de aprovechamiento sustentable. Así mismo, mucha de la investigación en los hongos se ha realizado desde una perspectiva limitada y disciplinaria, produciendo estudios localizados y en temas puntuales, (especialmente en la zona centro del

país y en temas taxonómicos), que adolecen de un enfoque integral. Esta falta de generación de conocimiento, impide integrara los hongos comestibles en los temas prioritarios del desarrollo rural (Larson, 2007; Martínez-Carrera *et al.*, 2007) y por tanto los deja fuera de las estrategias, programas de apoyo y toma de decisiones del sector público (Martínez-Carrera *et al.*, 2007).

Por lo anterior, es necesario desarrollar un entendimiento del papel de los hongos comestibles dentro de los agroecosistemas, así como desarrollartecnologías que permitan la domesticación y producción de los mismos (particularmente del género *Morchella*) a escala comercial, para contribuir a disminuir los efectos nocivos que provoca la recolección extractiva, ya que la domesticación es una de las herramientas más promisorias para evitar la sobreexplotación de esta especie. La domesticación en el caso de *Morchella* se basa en dos aspectos fundamentales, la producción en masa de esclerocios y la identificación de las condiciones ambientales necesarias para la estimulación de la fructificación de éstos (Stott y Mohammed, 2004), Ambos temas se abordan en esta tesis, partiendo de la pregunta de investigación que a continuación se indica.

Pregunta de investigación

¿Cuáles son los factores ambientales y nutricionales que inciden en la formación, producción y fructificación de esclerocios de *Morchella*, bajo condiciones controladas?

3. Hipótesis y objetivos

Con base a la pregunta de investigación planteada anteriormente se exponen los objetivos e hipótesis.

Hipótesis general

La formación y producción de esclerocios y cuerpos fructíferos de *Morchella* bajo condiciones controladas, está en función de las condiciones adversas y nutricionales del sustrato donde se desarrolla.

Hipótesis particulares

1. La producción y formación de esclerocios depende de las condiciones nutricionales del sustrato donde se desarrolla.
2. La formación de cuerpos fructíferos se logra por el estímulo de condiciones adversas de temperatura y humedad en los esclerocios.

Objetivo general

Determinar las condiciones adversas y nutricionales necesarias para la formación y producción de esclerocios y cuerpos fructíferos de *Morchella*, bajo condiciones controladas.

Objetivos particulares

1. Evaluar la suplementación de grano con diferentes elementos nutritivos para la producción de esclerocios.
2. Evaluar condiciones de estrés, tanto de bajas temperaturas como de saturación hídrica del sustrato, para inducir la fructificación de esclerocios de *Morchella*, bajo condiciones controladas.

4. Esquema general metodológico

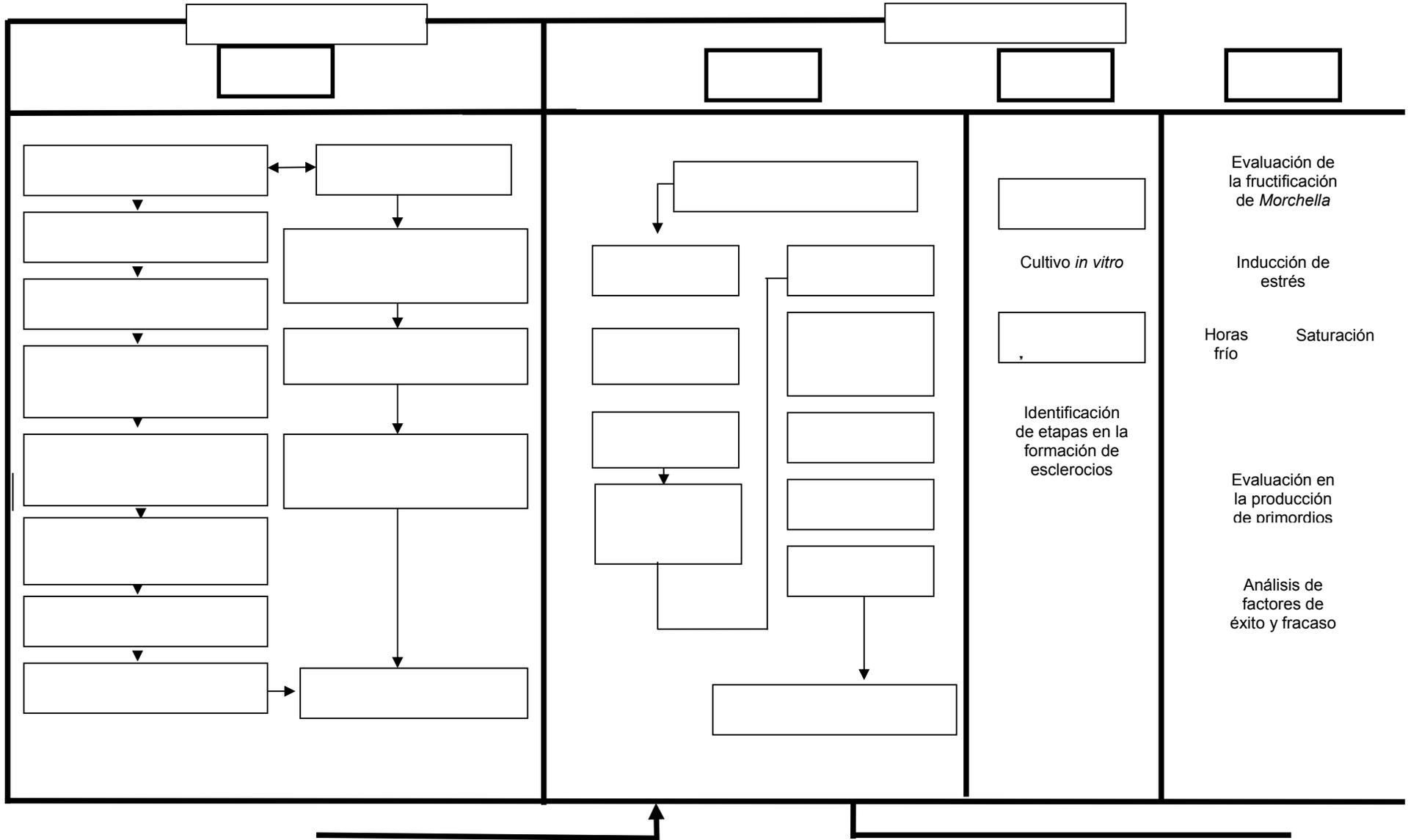
Este apartado tiene como propósito describir el proceso metodológico general para realizar la presente investigación. Este incluyó cuatro fases (Figura 3). La primera etapa consistió en hacer una reflexión teórica, para determinar cómo se inserta la presente investigación dentro del marco metodológico de los agroecosistemas y el enfoque agroecológico, de tal forma que incluyera aspectos ecológicos, socioeconómicos y tecnológicos, para contribuir desde una visión integral a la comprensión de los principios para la domesticación de *Morchella*, y con ellos apoyar a su conservación. Esto implicó establecer y proponer un concepto *ad hoc* de domesticación, bajo el cual se pudieran regir las acciones presentadas en las siguientes fases. Este análisis generó una propuesta teórica de la domesticación para el caso de los hongos silvestres comestibles.

La segunda etapa, fue de carácter experimental, y para ello se contó con el apoyo del Área de Micología del Instituto de Ecología A.C. (INECOL). Un primer trabajo se realizó con el fin de evaluar la suplementación de sustratos para la producción de esclerocios, para lo cual se establecieron dos experimentos, el primero para evaluar el material biológico importado de la casa *Fungi Perfecti*^R de Estados Unidos, así como materiales (cepas) obtenidos en campo (Los datos de los ejemplares recolectados para esta investigación se describen en el Anexo A). El segundo experimento fue con el objetivo de evaluar la producción de esclerocios, a través de la suplementación con diversos materiales orgánicos, y tratar de cumplir la primera de las condiciones para la domesticación de este hongo.

Un trabajo experimental más consistió en obtener esclerocios y profundizar en la biogénesis de los mismos, para ello se identificaron las etapas y procesos de formación de esclerocios *in vitro*, con el fin de tener mayor claridad sobre el papel de estas estructuras en el ciclo de vida de *Morchella*.

Finalmente la última actividad experimental consistió en evaluar el potencial de fructificación de los esclerocios para dar cumplimiento al segundo principio para su domesticación. Para ello se valoró el estímulo producido por dos condiciones adversas de estrés como son bajas temperaturas y saturación del sustrato por humedad. Todas estas actividades conformaron la presente investigación.

Figura 3. Esquema general metodológico de la investigación



5. Literatura citada

- Alexopoulos CJ, Mims CW, Blacwell M (1996) *Introductory mycology*. 4th ed. Wiley and Sons. New York. 868 p.
- Alvarado G, Benítez G (2009) El enfoque de agroecosistemas como una forma de intervención científica en la recolección de hongos silvestres comestibles. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 10(3):531-539.
- Amaranthus MP (1998) The Importance and Conservation of Ectomycorrhizal Fungal Diversity in Forest Ecosystems: Lessons From Europe and the Pacific Northwest. General Technical Report PNW-QTR-431, Pacific Northwest Research Station Forest Service United States Department of Agriculture 20 pp.
- Arteaga MB, Moreno ZC (2006) Hongos comestibles silvestres de Santa Catarina del Monte, Estado de México. *Revista Chapingo: Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 12(2):125-131.
- Bandala MV, Montoya L, Chapela HI (1997) Wild edible mushrooms in Mexico: a challenge and opportunity for sustainable development. *In: Mycology in sustainable development. Expanding concepts, vanishing borders*. ME Palm and IH Chapela (eds). Parkway publishers. USA. pp: 77-89.
- Barnes S, Wilson A (1998) Cropping of the french black morel a preliminary investigation (Project No UT-1B2A). Rural Industries Research and Development Corporation. Australia. 14 p.
- Bertalanffy LV (1986) *Teoria General de Sistemas*. Fondo de Cultura, México. 254 pp.
- Buscot F, Munch JC, Charcosset JY, Gardes M, Nehls U, Hampp R (2000) Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbios in ecosystems. *Microbiology Reviews* 24: 601-614.
- Camacho H, Marcano N (2003) El enfoque de investigación introspectiva vivencial y sus secuencias operativas. *Algunos casos de estudio*. *Omnia* 9(1):1-23.
- Caponi G (2008) Física del organismo vs hermenéutica del viviente: el alcance del programa reduccionista en la biología contemporánea. *Hist. cienc. saude-Manguinhos* 14(2): 443-468.
- Ceballos D (2005) Productos Forestales No Maderables, una oportunidad de desarrollo para las comunidades forestales rurales. El caso de Pueblos

Mancomunados de Oaxaca. México Forestal No 21, Revista electrónica de la Comisión Nacional Forestal.

<http://www.mexicoforestal.gob.mx/nota.php?id=159> (Consultado: 3 de febrero 2010).

Chang ST, Miles PG (2004) Mushroom cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. Second edition, CRC Press Washington D.C. 451p.

Ciesla WM (2002) Non wood forest products from temperate broadleaved trees. FAO Non-Wood Forest Products. 137 pp.
<http://www.fao.org/docrep/005/y4351e/y4351e0d.htm> (Consultado 15 de Septiembre de 2010).

COINBIO (2002) Proyecto de conservación de la biodiversidad en comunidades indígenas de Oaxaca, Michoacán y Guerrero. Subproyectos comunitarios tipo C (a) para proyectos de productos forestales no maderables y maderables no tradicionales PFMN.
http://oaxaca.gob.mx/ecologia/info2007/convoc_coinbio/TDR_PFMN.pdf.
(Consultado: 8 de marzo 2010).

Conway GR, McCracken A (1990) Rapid rural appraisal and agroecosystem analysis. En Altieri MA, Hecht SB (eds). Agroecology and small farm development. CRC. Press. USA. pp 221-234.

Dalgleish HJ, Jacobson KM (2005) A first assessment of genetic variation among *Morchella esculenta* (Morel) populations. Journal of Heredity 96: 396-403.

Emmanuel KY, Weersink A (1997) A review and evaluation of agroecosystem health analysis: the role of economics. Agricultural Systems 55(4):601-626.

FAO (2007) Los productos forestales no madereros. Departamento Forestal. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
<http://www.fao.org/forestry/foris/pdf/infonotes/infofaospanish-losproductosforestalesmadereros.pdf> (Consultado: 13 febrero 2010).

García J, Guevara G (2005) Macromicetos (hongos) superiores de Tamaulipas. In: Barrientos L., Correa S.A., Horta J. V., García J. (eds.). Biodiversidad Tamaulipeca Vol. I. ITCV, Cd. Victoria. Pp 67-79.

Gessner RV, Romano M, Schultz A, (1987) Variation and Segregation in *Morchella deliciosa* and *M. esculenta*. Mycologia 79(5): 683-687.

Giraldo G (2004) Hacia una Epistemología evolucionista. Cinta de Moebio 20:1-27.

Gleissman (2007) Agroecology: Ecological Processes in Sustainable Agriculture. Second edition. By S. R.. Boca Raton, FL, USA: Lewis Publishers (CRC Press) pp. 408.

- Guzmán G (1994) Los hongos en la medicina tradicional de Mesoamérica y de México. *Revista Iberoamericana de Micología* 11: 81-85.
- Guzmán G (1997) La diversidad fúngica en México. *In: VI Congreso Nacional de Micología (memorias). IX Jornadas Científicas. UNACH-Sociedad Mexicana de Micología Tapachula, Chiapas. 20 p.*
- Harald K, Luis P, Buscot F (2007) Diversity of laccase-like multicopperoxidase genes in Morchellaceae: identification of genes potentially involved in extracellular activities related to plant litter decay. *FEMS Microbiol Ecol* 61: 153–163.
- Hart, R.D (1985) Conceptos básicos sobre agroecosistemas. Series materiales de enseñanza No. 1. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 159 pp.
- 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/gacetitas/227/especies.html>
- Instituto Nacional de la Biodiversidad (2010) Hongos. <http://www.inbio.ac.cr/ES/papers/hongos/comestibles.htm> (Consultado 15 de septiembre 2010).
- Karaboz I, Oner M (1988) The chemical composition and use as single-cell protein of *Morchella conica* var *costata* Vent, mycelium growth in submerged culture. *Doga Turk biyoloji Dergisi* 12(3):190-196.
- Kosaric N, Miyata N (1981) Growth of morel mushroom mycelium in cheese whey. *Journal Dairy Research* 48: 149-162.
- Krishna PV, Cardina J, Hitzhusen F, Ibayoh I, Moore R, Parker J, Stinner B, Stinner D, Casey H (2008) Case study of an integrated framework for quantifying agroecosystem health. *Ecosystems* 11(2):283-306.
- Larson GJ (2007) Historias para cenar y la diversidad en la mesa del jardín. *Biodiversitas*: 71: 1-15.
- López PHJ (2001) Un enfoque histórico-hermeneutico y crítico-social en psicología y educación ambiental. Universidad Pontificia Bolivariana, 220pp.
- Lovera M, Cuenca G (2007) Diversidad de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y potencial micorrízico del suelo de una sabana perturbada de la gran sabana, Venezuela. *Interciencia* 32(2):108-114.
- Manzola CJM (1995) El aprovechamiento de los hongos silvestres *In: Memorias de la reunión Nacional de Productores y Recolectores de Hongos. México, D. F. SEDESOL.*

- Mariaca MR, Silva PLC, Castaños MCA (2001) Proceso de recolección y comercialización de hongos comestibles silvestres en el valle de Toluca, México. *Ciencia Ergo Sum* 8(1):30-40.
- Marshall E, Schrekenberg K, Newton AC (Eds) (2006) Comercialización de productos forestales no maderables: factores que influyen en el éxito. Conclusiones del estudio México y Bolivia e implicancias políticas para los tomadores de decisión Centro Mundial de Vigilancia de la Conservación del PNUMA-WCWC, Biodiversity Series No 23. Cambridge, Reino Unido. 152 p.
- Martínez LB, Pugnaire FI (2009) Interacciones entre las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares y de plantas. Algunos ejemplos en los ecosistemas semiáridos. *Ecosistemas* 18 (2): 44-54.
- Martínez-Carrera D, Morales P, Sobal M, Bonilla M, Martínez W (2007) México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción consumo de los hongos comestibles. Capítulo 6.1, 20 pp. *In: El Cultivo de Setas Pleurotus spp. In México*. J. E. Sánchez, D. Martínez-Carrera, G. Mata & H. Leal (Eds.). ECOSUR-CONACYT, México, D.F. ISBN 978-970-9712-40-7.
- Martínez-Carrera, D, Curvetto N, Sobal M, Morales P, Mora VM (2010) Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales. COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP, Puebla. 648 pp.
- Masaphy S, Zabari L, Goldberg D (2009) New long season ecotype of *Morchella rufobrunnea* from Northern Israel. *Mycol Apl.* 21:45–55.
- McFarlane EM, Pilz D, Weber SN (2005) High-elevation gray morels and other *Morchella* species harvested as non-timber forest products in Idaho and Montana. *Mycologist* 19:62-68.
- McLain RJ, Jones ET (2005) Nontimber Forest Products Management on National Forests in the United States. USDA. General Technical Report PNW-GTR-655. USA. 85pp
- Molina R, O'Dell T, Luoma D, Amaranthus M, Castellano, M Russell K (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. 52 p.
- Ortega-Ponce, L (2004) Las comunidades indígenas forestales de la Sierra de Juárez, Oaxaca, México. Estudio de caso sobre innovación participativa. 44p. <http://www.prgaprogram.org/downloads/PRGA/Innovacion%20Participativa/DocumentoFinalOaxaca.doc> (Consultado: 15 de octubre 2010).

- Ower RD (1982) Notes on the development of the morel ascocarp: *Morchella esculenta*. Mycologia 74: 142-144.B
- 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.
- Pastor BJB (2002) Los productos forestales no maderables, una fuente de materia prima para el desarrollo de la industria eléctrica en Cuba. Revista Chapingo: serie Ciencias Forestales y del Ambiente 8(2):147-152.
- Peña LA, Zamora-Martínez MC, Montoya AE (2000) Comercialización de hongos silvestres comestibles en el estado de Tlaxcala. *In*: Memorias del VII Congreso Nacional de Micología (1-4 de octubre). 26 p.
- Pilz D, McLain R, Alexander S, Villarreal-Ruiz L, Berch S, Wurtz T, Parks C, McFarlane E, Baker B, Molina R, Smith JE (2007) Ecology and management of morels harvested from the forests of western North America. Gen. Tech. Rep. PNW-GTR-710. Portland, OR: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station. 161 p.
- Pilz D, Molina R (2002) Commercial harvests of edible mushrooms from the forests of the Pacific Northwest United States: issues, management, and monitoring for sustainability. *Forest Ecology and Management* 155(1-3):3-16.
- Pilz D, Molina R, Amaranthus M, Castellano M, Weber SN (1996) Forest fungi and ecosystem management *In*: Managing forest ecosystem to conserve fungus diversity and sustain wild mushroom harvests. USDA Forest Service Pacific Northwest research Station, PNW-GTR-371. 104. pp. 86-94.
- Ruiz PM, Belcher B, Achdiawan R, Alexaidés M, Aubertin C, Caballero J, Campbell B, Clement C, Cunningham T, Fantini A, de Foresta H, García Fernández C, Gautam KH, Hersch Martínez P, de Jong W, Kusters K, Kutty MG, López C, Fu M, Martínez Alfaro MA, Fair TR, Ndoye O, Ocampo R, Rai N, Ricker M, Schreckenberk K, Shackleton S, Shanley P, Sunderland T, Youn Y (2004) Markets drive the specialization strategies of forest peoples. *Ecology and Society* 9(2): 1.-29.
- Ruiz RO (1995). Agroecosistema: el término, concepto y su definición bajo el enfoque agroecológico y sistémico. En Ponencia presentada en el II Seminario Internacional de Agroecología. 29-31 de marzo. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. 1-9 pp.
- Ruiz RO (2006) Agroecología: una disciplina que tiende a la transdisciplina. *Interciencia* 31(2):140-145.

- Sarabia, A (1985). Un enfoque de sistemas para el desarrollo agrícola. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Editorial IICA. San José, Costa Rica.
- SEMARNAT (2004) Especies con usos no maderables en bosques de encino, pino y pino-encino en los estados de Chihuahua, Durango, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca. <http://semarnat/conafor/procimaf/html> (consultado 7 marzo 2006).
- Stamets P (1993) Growing Gourmet and Medicinal Mushroom Third edition pp 401-418.
- Stott K, Mohammed C (2004) Specialty mushroom production systems: maitake and morels. (Project No UT-30All) Rural Industries Research and Development Corporation. Australia. 86 p.
- Tacón A, Palma J (2006) Productos forestales no madereros. La comercialización de los productos forestales no madereros: una oportunidad para el manejo comunitario y la valoración del bosque nativo. *Revista Bosque Nativo*39(2): 253-266.
- Thomas LJ, Volk, TJ (1992) Production of new edible mushrooms in North America: shiitake and morels. In *Frontiers in Industrial Mycology*. Gary F. Leatham editor. pp. 1-23
- Toledo VM (1992) What is ethnoecology? origins, scope and implications of a rising discipline. *Ethnoecológica*1(1): 5-21.
- UNEP-WCMC (2003) Proyecto de comercialización de Productos Forestales No Maderables. Factores de éxito y fracaso, El mercado de los hongos silvestres. http://quin.unep-wcmc.org/forest/ntfp/cd/7_Market_reports/g_Hongos_silvestres.pdf (Consultado: 10 septiembre 2008).
- Velandia C, Galindo L, Matheus K (2008) Micolatría en la iconografía prehispánica de América del sur. *Int.J. S. Am. Archaeol.* 3: 6-13.
- Villareal-Ruiz L (Ed) (1996) Los hongos silvestres: componentes de la biodiversidad y alternativa para la sustentabilidad de los bosques templados Informe final del proyecto CONABIO C066 Instituto de Recursos Genéticos y productividad, Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas Montecillo Estado de México, México. 88 p.
- Villarreal L, Pérez-Moreno J (1989) Los hongos comestibles silvestres de México, un enfoque integral. *Micología Neotropical Aplicada* 2:77-114.
- Vogel, S (1988) Taming the Wild Morel. *Discover* 9: 58-60.

- Volk TJ, Leonard TJ (1990) Cytology of the life-cycle of *Morchella*. Mycological Research 94: 399-406.
- Volk TJ, Thomas LJ (1989) Physiological and environmental studies of sclerotium formation and maturation in *Morchella*. Microbiology 55: 3095-3100.
- Wipf D, Munch JC, Botton B, Buscot F (1996) DNA Polymorphism in Morels: Complete Sequences of the Internal Transcribed Spacer of Genes Coding for rRNA in *Morchella esculenta*(Yellow Morel) and *Morchella conica* (Black Morel) . Appl. Environ. Microbiol62(9): 3541-3543.
- Zamora-Martínez MC (1999a) Hongos comestibles de México. *In* Memorias del Ciclo de Conferencias "La investigación y la educación forestal en México". SEMARNAP. Pp. 87-104
- Zamora-Martínez MC (1999b) Distribución conocida y potencial de 48 especies de hongos silvestres comestibles en la región central del país. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Bases de datos SNIB-CONABIO proyecto No. J064. México, D.F.
- Zamora-Martínez MC, Nieto de Pascual-Pola C (1995) Natural production of wild edible mushrooms in the southwestern rural territory of Mexico City, Mexico. Forest Ecology and Management 72(1):13-20

CAPÍTULO I. EL ENFOQUE DE AGROECOSISTEMAS COMO UNA FORMA DE INTERVENCIÓN CIENTÍFICA EN LA RECOLECCIÓN DE HONGOS SILVESTRES COMESTIBLES¹

Gerardo Alvarado Castillo, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2011

El presente ensayo tiene el propósito de proveer un marco de referencia y revisión del estado del arte que guardan las múltiples facetas e interacciones existentes en el proceso de recolección de hongos silvestres comestibles como un elemento natural de los ecosistemas. Es decir, su relación e interacciones en el contexto biológico, económico y social. Los hongos silvestres son un recurso que ha sido escasamente estudiado y apenas empieza a ser reconocido, por lo que éste trabajo pretende mostrar su valor como producto no tradicional y parte importante del ecosistema, que representa una alternativa viable para el desarrollo de las comunidades, lo que a su vez puede incentivar a los dueños y poseedores del bosque para el fomento y protección de sus recursos. Al igual que cualquier otro producto, los hongos silvestres obedecen a las fuerzas de mercado, y actualmente su demanda es dinámica y poco predecible a nivel nacional e internacional. Tal situación presenta oportunidades y retos que deben ser atendidos, por lo que se propone la intervención científica y la aplicación de nuevos enfoques para lograr un equilibrio entre las necesidades del ser humano y la protección y conservación de los recursos naturales.

Palabras clave: agroecosistemas, PFSM; recolección de hongos; servicios ambientales; sustentabilidad

¹ Publicado en Tropical and Subtropical Agroecosystems 10 (2009): 531-539 (Anexo B).

AGROECOSYSTEMS APPROACH AS A MECHANISM OF SCIENTIFIC INTERVENTION IN THE HARVEST OF EDIBLE WILD MUSHROOMS

Gerardo Alvarado-Castillo, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2011

This essay aims to provide a framework and review on the status of the multiple facets and interactions in the process of harvesting wild edible mushrooms as a natural element of ecosystems. This means, its relationship and interactions in the biological, economic and social context. Wild edible fungi are a resource that has been poorly studied. This essay attempts to show its value as a nontraditional product and important part of the ecosystems, representing a viable alternative for community development, which can also influence owners and users of the forest to promote and protect its resources. Like any other product, wild mushrooms are subject to market forces, and their demand is fairly predictable and dynamic at the national and international levels. Such situation presents a challenge that must be attended with scientific intervention and application of new approaches such as the harvest of non-timber forest products, to achieve a balance between the needs of human beings and the protection and conservation of natural resources.

Key words: agroecosystems; environmental services; harvesting; NTFP; sustainability; wild mushrooms

1.1. Introducción

Los hongos silvestres comestibles forman parte de lo que se ha denominado Productos Forestales No Maderables (PFNM). Varios millones de hogares en todo el mundo dependen de su recolección, como un aporte en su alimentación y fuente de ingresos. La FAO (2007) calcula que el 80% de la población en países en desarrollo utiliza los PFNM, entre ellos los hongos para satisfacer sus necesidades nutricionales y de salud.

Los gobiernos e instituciones han comenzado recientemente a valorar la importancia que tienen estos productos en la alimentación y mejora de ingresos de comunidades rurales (Zamora-Martínez y Nieto de Pascual-Pola, 1995; Peña *et al.*, 2000; Ceballos, 2005). Además, su aprovechamiento y comercialización están ligados normalmente a un uso sustentable de los recursos naturales (Bandala *et al.*, 1997; Pastor, 2002), debido a la oferta de servicios ambientales, conservación de ecosistemas, biodiversidad y factores socioculturales en los que se encuentran inmersos.

Los hongos son probablemente el PFNM más conocido en México no sólo por sus propiedades comestibles, sino también por sus propiedades medicinales (Galván *et al.*, 1998) y usos rituales (Guzmán, 1994, 1995).

Estos organismos han sido usados desde la época prehispánica y actualmente constituyen un mercado potencial, el cual ya se ha desarrollado en otros países. Por ejemplo, en los Estados Unidos de América, Chile (Molina *et al.*, 1993), Italia, Suiza

y Alemania (Corporación Colombiana Internacional, 2004), representan una industria multimillonaria cuyo mercado tiene efectos en México. Esto se aprecia particularmente a través de la gran demanda de especies, como el hongo blanco o matsutake (*Tricholoma magnivelare* [Peck] Redhead) que a finales de los ochentas inició su explotación en los bosques de pino en la región del Cofre de Perote, Veracruz, por parte de compañías japonesas y posteriormente se extendió a otras regiones de los estados de Michoacán, Hidalgo, Puebla y el Estado de México (Villareal-Ruiz, 1994). Lo mismo sucede para el caso de morillas (*Morchella esculenta* Pers. ex St. Amans, *M. cónica* Pers, *M. costata* [Vent.] Pers y *M. elata* Fr), panza (*Boletus edulis* [Bull] Fr), masayel (*Boletus pinicola* [Vitt.] Venturi), cema (*Boletus aestivalis* [Paul] Fr), duraznillo (*Cantharellus cibarius* Fr) y tecomate (*Amanita caesarea* [Scop.:Fr] Pers ex Schwein) (Ramos *et al.*, 2005; CEPFOR UNEP-WCMC, 2006), los cuales tienen como destino principal la exportación.

En México existen al menos 205 especies de hongos silvestres comestibles con un alto valor comercial (Villareal-Ruiz, 1996). Por ejemplo, los de mayor demanda son: *Amanita caesarea* [Scop.:Fr] Pers ex Schwein (yema, tecomate, amarillo), *Amanita rubescens* (Pers.: Fr.) Gray (mantecado), *Lactarius deliciosus* (Fr.) Gray, (enchilado), *Lactarius indigo* (Schwein.) Fr (azul), *Morchella spp* (elotito, mazorquita, colmena, chipotle), *Boletus aff edulis* (pambazo, panadero, cema), *Boletus erithropus* Fr. y *Boletus luridus* Schaeff Fr. (galambo, hongorado), *Suillus spp.* (panzas de encino, pancita), *Cantharellus cibarius* Fr. (duraznillo), *Gomphus floccosus* (Schwein.) Singer (corneta, corneta de oyamel), *Lyophyllum descastes* (Fr.) Singer (clavitos, xolete), *Ramaria flava* (Schaeff.: Fr) Quél y *Ramaria spp.* (patitas de pájaro, escobetas), entre otros (Zamora y Torres, 2002). Sin embargo, hasta ahora la única

forma de aprovecharlos es mediante recolección. Esta se lleva a cabo principalmente en los bosques templados y templado-fríos del país y solamente en una época del año. Además se estima que alrededor del 46% de las especies son micorrizógenas; es decir, son organismos que se encuentran asociados con las raíces de ciertas especies de árboles (Villareal-Ruiz, *op cit.*).

En México, de manera general, no existen datos estadísticos suficientes, para determinar si este recurso está siendo aprovechado de forma adecuada o no y si se están poniendo en riesgo sus poblaciones naturales (Marshall *et al.*, 2006). Además, se desconocen los efectos que pudiera tener la frecuente cosecha de estos productos sobre el hábitat forestal.

Si bien en México se ha percibido una disminución de la disponibilidad del recurso durante la última década, no existen datos que soporten dicha declinación (Marshall *et al.*, 2006). No obstante, en respuesta a este fenómeno, el gobierno mexicano ha emitido una serie de regulaciones y leyes (por ejemplo la NOM-010-SEMARNAT-1996, y NOM-059-SEMARNAT-2010) a través de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), institución responsable del cuidado del medio ambiente a nivel nacional. Hasta ahora, el efecto de disuasión y eficiencia de recuperación del recurso, como resultado de estos ordenamientos, no ha sido comprobado. Además, en esta normatividad predomina un enfoque proteccionista - posiblemente por la falta de un mayor sustento científico- y no necesariamente un enfoque de aprovechamiento sustentable del recurso.

Es por ello que el decremento de las poblaciones naturales asociado con la demanda de estos productos en México, debe ser atendido no sólo con acciones que contemplen el fortalecimiento del área técnica, sino también que abarquen un mayor esfuerzo en los aspectos sociales, culturales, políticos y económicos, ofreciendo una opción de aprovechamiento sustentable (Altieri, 2001). Ello se resume en la necesidad de intervención científica con un enfoque integral, tal como se concibe en la fundamentación filosófica del enfoque de los agroecosistemas.

Tal enfoque dirigido hacia la producción de hongos silvestres, debe aportar elementos que generen oportunidades para los productores rurales, a través del desarrollo de un mercado potencial y del fortalecimiento de sus capacidades organizativas, como ha ocurrido en algunas regiones del país, como la Sierra de Juárez, Oaxaca (Chapela-Mendoza, 2006; Ortega-Ponce, 2004). Así puede conservarse el recurso a través de un aprovechamiento racional, a la vez que se valora el conocimiento local y se propicia el bienestar social.

Por otro lado, si no se toman las decisiones y se implementan acciones para revertir el fenómeno de la declinación de las poblaciones naturales de hongos silvestres comestibles, se corre el riesgo de agotar este recurso por la sobreexplotación (Ruiz, *et al.*, 2004), comprometiendo su permanencia y causando a la larga efectos económicos, sociales y ambientales no deseables.

1.2. Impactos de la recolección no regulada de hongos silvestres

Los ecosistemas forestales como bosques y selvas albergan la mayor riqueza biológica del planeta y millones de personas dependen de éstos como su principal medio de vida; irónicamente más del 90% de dichas poblaciones humanas sufren de elevados niveles de pobreza (Marshall *et al.*, 2006). Además, existe un desconocimiento sobre la importancia de los hongos comestibles, lo que no ha permitido aquilatar su valor económico, social y biológico.

La falta de orientación técnica y científica en la utilización de los recursos naturales aumenta la probabilidad de sobreexplotación o extinción de las especies tradicionales más conocidas, así como la afectación del hábitat natural donde se encuentran, por la conversión a actividades agrícolas y ganaderas que, no siempre redundan en un mayor beneficio social o económico (Arteaga y Moreno, 2006).

El alto valor de los hongos silvestres en los mercados nacionales e internacionales, provoca una alta presión extractiva, lo que ha transformado su aprovechamiento y comercialización de un nivel de autoconsumo y venta local, a la comercialización a gran escala. Ello ha generado una perturbación excesiva del hábitat, lo que conlleva la degradación del suelo, eliminación de plantas y animales que interactúan con los hongos, interrupción de su ciclo biológico y por ende, disminución y fluctuación de la abundancia y distribución de las principales especies de hongos comestibles (Pilz *etal.*, 1996). Asimismo, la sobreexplotación de los hongos puede interferir en el importante papel que juegan en el reciclamiento de nutrientes y en la incorporación de materia orgánica al suelo (Baldy *et al.*, 1995).

La sobreexplotación de ciertas especies de hongos, especialmente las de alto valor comercial, podría generar erosión genética, pérdida de biodiversidad y degradación ambiental (COINBIO, 2002). Por otro lado, el alto valor comercial a nivel internacional (UNEP-WCMC, 2003) y los vacíos legales existentes pueden desplazar a los recolectores tradicionales, quienes usan normalmente este recurso como estrategia de subsistencia, por personas contratadas para recolectar grandes volúmenes de hongos silvestres, provocando impactos y problemas difíciles de predecir (Tacón y Palma, 2006).

A lo anterior se añade la falta de tecnologías para el escalamiento de la producción rural de hongos, la comercialización centralizada, la falta de estadísticas oficiales y estudios de mercado (nacional e internacional), escaso interés público y privado para incentivar la producción y el mercado, problemas técnicos de almacenamiento, conservación y transporte (Colegio de Postgraduados y Fundación Produce Tlaxcala A.C., 2003). La falta de entendimiento de los componentes de esta actividad, sus interacciones y procesos, puede originar una disminución de los productos y servicios que estos recursos ofrecen a la sociedad (Pilz *et al.*, 1996).

La problemática alrededor de la recolección de hongos no puede ser vista y mucho menos solucionada desde una sola perspectiva, ya que se encuentra inmersa en varios contextos: económico, social, político, biológico y hasta cultural. Es claro entonces, que el problema es complejo y debe comprenderse desde un enfoque integral o sistémico para proponer soluciones viables.

1.3. El enfoque de agroecosistemas en relación con los hongos silvestres comestibles

El enfoque de sistemas aplicado a la producción agrícola implica elementos, interrelación entre ellos, límites, entradas y salidas, procesos de retroalimentación, transformación, comunicación, control y niveles jerárquicos, en donde cada sistema es componente de un suprasistema y este incluye a una serie de subsistemas (Checkland, 1981). Por tanto, el enfoque de sistemas implica considerar a los hongos como un componente más de los ecosistemas y agroecosistemas, y a estos dos como parte del paisaje (Figura 1.2).

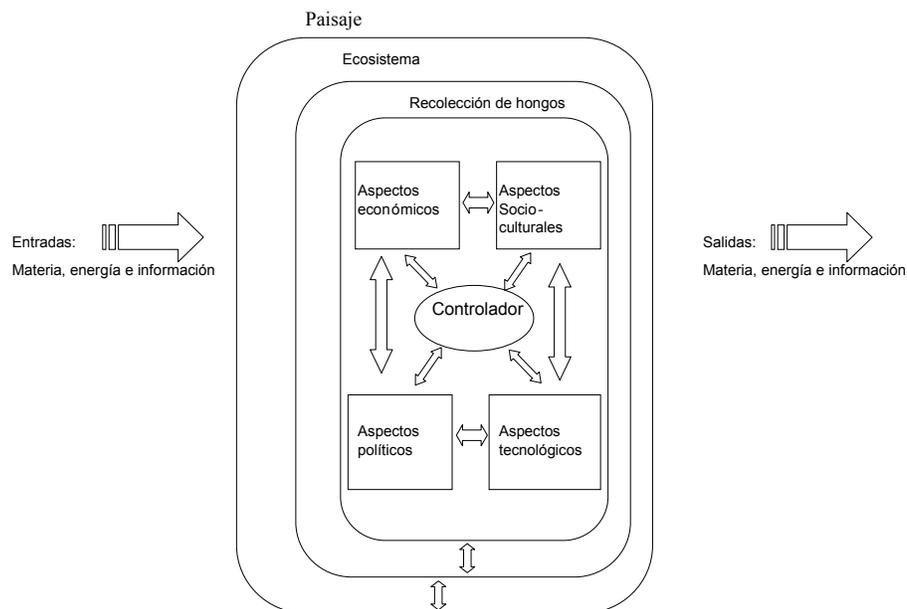


Figura1.2. El enfoque de agroecosistemas en la recolección de hongos

La conservación y aprovechamiento sustentable guarda estrecha relación con el manejo responsable y racional que puedan llevar a cabo los dueños y poseedores

de la tierra, que les permita lograr una producción continua de los bienes y servicios que proporciona el bosque. Es decir, la planificación y valorización de sus PFNM debe contextualizarse en las dimensiones económica, social y ambiental (Villarreal-Ruiz y Pérez-Moreno, 1989).

Lo anterior significa conciliar dos aspectos, por un lado, lo que tiene que ver con la exigencia de conservación de los PFNM y por otro, lo relativo a la necesidad de su aprovechamiento. Ambos criterios deben guardar armonía entre sí y un equilibrio dinámico permanente (Ramos *et al.*, 2005).

La recolección de hongos es una actividad profundamente arraigada en la cultura de muchas comunidades indígenas y campesinas, las cuales han conservado, reelaborado y transmitido su conocimiento de una generación a otra, dando origen a sistemas de producción estables que han demostrado ser compatibles con la conservación de los recursos naturales a largo plazo (Toledo, 1992).

El enfoque de agroecosistemas, puede servir como una metodología de análisis de la problemática en torno a la recolección de hongos comestibles, pero también, ofrecer estrategias alternativas para el aprovechamiento sustentable del recurso. Adoptar este enfoque en la investigación y en la solución de problemas, puede ser una forma útil de corregir deficiencias como la sobreexplotación, ausencia de orientación técnica y científica, y falta de organización para el uso racional y mercadeo del producto, pues este enfoque considera todos los elementos ambientales y humanos, con especial atención sobre la forma, dinámica y función de sus interrelaciones en una escala espacial y temporal (Altieri, 2001). Esto permitiría

un entendimiento de los procesos, interacciones y contextualización en los distintos niveles jerárquicos (comunidad, región, etc.) en el que se inserta el aprovechamiento de los hongos silvestres.

1.4. Escala económica en la recolección de hongos silvestres

Los hongos silvestres representan una alternativa productiva y de ingresos para las comunidades que habitan regiones boscosas del país, por su uso tradicional como alimento, medicina y en ceremonias rituales (Guzmán, 1994).

Normalmente la recolección de hongos presenta una marcada estacionalidad (junio-agosto), que coincide con periodos de baja actividad agrícola (Marshall *et al.*, 2006). Así, esta actividad permite asegurar un flujo monetario temporal, complementario, que junto con la recolección de otros PFNM, constituye elementos de la estrategia de supervivencia, seguridad alimentaria e ingresos de muchos hogares rurales (Ruiz *et al.*, 2004).

La recolección de hongos es una de las pocas actividades que permiten generar un ingreso adicional en comunidades marginales, que no demanda de inversiones ni herramientas e incluye la participación de todos los miembros de la familia (Marshall *et al.*, 2006).

La venta de hongos en México ha evolucionado y se ha adaptado a las necesidades actuales, pasando de mercados locales y regionales a la comercialización en las grandes ciudades. Por ejemplo, en la ciudad de México se comercializan en los

mercados de la Merced, Sonora, Central de Abasto, Jamaica y tiendas especializadas. El fenómeno descrito obedece a los hábitos de consumo, resultado de una larga historia de vínculos comerciales desde la época de la Colonia (González y Leal, 1994), y a la “nostalgia” de la población que migró del campo hacia los grandes centros urbanos (CEPFOR UNEP-WCMC, 2006).

Por su parte, el mercado internacional se enfoca en especies particulares; por ejemplo la demanda del mercado europeo se dirige principalmente hacia las morillas (*Morchella* spp) y el mercado japonés hacia el hongo blanco (*Tricholoma magnivelare* [Peck] Redhead), (CEPFOR UNEP-WCMC, 2006). Ello ha favorecido la aparición de una nueva clase de acopiadores que buscan obtener ganancias en el corto plazo, aprovechándose de la necesidad económica de las comunidades rurales, el acceso a los recursos en tierras de tipo comunal o pública y la falta de observación en la legislación pertinente.

1.5. Aspectos sociales de la recolección de hongos silvestres comestibles

La recolección de hongos forma parte de una rica tradición transgeneracional (Tacón *et al.*, 1999), que se mantiene activa de manera vertical, de padres a hijos, y horizontal, entre gente de la misma generación y comunidad (Mariaca *et al.*, 2001). Así se da el intercambio de experiencias y cotidianidades sobre el proceso de colecta, preparación y consumo de hongos, no sólo en el momento de la recolección, sino también al realizar su venta en mercados locales.

La extracción de los hongos no sólo provee ganancias hogareñas sino que puede generar en las comunidades un incentivo para proteger sus recursos forestales contra la conversión de los bosques hacia otros usos del suelo, como la ganadería (Wilsey, 2006). Ejemplo de ello es el manejo que se realiza en la región de Washington, Oregón y California, en Estados Unidos, en donde se elabora un inventario año con año de las poblaciones naturales de hongos silvestres, se aplica la legislación al determinar cuotas de recolección y se proporciona capacitación para coleccionar correctamente el recurso (por ejemplo seleccionar individuos maduros y sacudir el ejemplar recolectado para diseminar sus esporas e inducir su propagación natural); además, existe investigación de los efectos de la perturbación del hábitat, productividad y aspectos socioeconómicos (Molina *et al.*, 1993), lográndose una verdadera valoración del bosque.

En México, la recolección de hongos silvestres, forma parte de la cultura de las comunidades y se encuentra muy arraigada entre sus habitantes; este conocimiento tradicional no sólo comprende usos comestibles, sino también medicinales y rituales (Guzmán, 1994). No obstante, existen pocos casos en que se haya realizado un aprovechamiento y comercialización organizada, tal como se reporta en la Sierra norte de Oaxaca (CEPFOR UNEP-WCMC, 2006), donde el aprovechamiento de los hongos tiene un verdadero impacto social positivo.

Los factores de éxito, en experiencias como la mencionada, pueden ser clasificados en los siguientes puntos:

1.- La integración y respeto a la autonomía de los pueblos, pues la forma política y social de manejar los asuntos comunitarios está presente en la administración de sus bienes, la gestión de nuevos proyectos de desarrollo productivo y el destino de las utilidades generadas en las empresas comunitarias (Ortega-Ponce,2004).

2.- El mantenimiento y/o reproducción de la estructura comunal, sustentada en la equidad entre todos los miembros de la comunidad y el consenso a través figuras tradicionales como la asamblea comunitaria (Toledo, 1999).

3.- Defensa de los valores culturales tradicionales (Toledo, 1999), por medio del reconocimiento del capital social (anteriormente latente), basado en la cultura y la filosofía indígenas, expresadas en el colectivismo, las articulaciones como comunidad y de su estrecha relación con la naturaleza (Ortega-Ponce, 2004).

4.- Alta eficiencia tecnológica y administrativa (Toledo, 1999), que se refleja en la elaboración de proyectos (de innovación y/o productivos) a partir del involucramiento de la propia comunidad en los procesos de análisis e identificación de los problemas, lo cual genera respuestas concretas y pautas que obligan a la articulación con otras entidades y/o actores (Ortega-Ponce, 2004).

5.- Control colectivo de los procesos económicos (Toledo, 1999), a través de la diversificación de las actividades madereras, (Ortega-Ponce, 2004), consolidando por medio del uso integral y/o diversificado de los ecosistemas forestales lo que a su vez ha generado empleo y mayores ingresos.

6.- Equilibrio productivo y uso conservacionista de los recursos naturales (Toledo, 1999), a través de la cosmovisión de los pueblos indígenas al concebir a la naturaleza, no sólo como una fuente productiva, sino como parte de su propia vida. Esta cultura e identidad étnica, permite tener otra percepción, en la que todas las cosas vivientes y no vivientes y los mundos naturales y sociales están intrínsecamente ligados (algo semejante al enfoque de agroecosistemas). Por ello, la defensa de la naturaleza es también la defensa de su cultura (Toledo, 1999). Esto puede ser el mejor instrumento para salvaguardar y reforzar el conocimiento ancestral comunitario y los usos y costumbres, que han permitido la permanencia de los bosques a través de los años.

7.- La comunicación e interacción de las comunidades entre sí, lo que genera una fuerte dinámica de aprendizaje y confianza para emprender nuevas acciones económicas y sociales, que a su vez constituye el entorno necesario para la innovación (Ortega-Ponce, 2004), es decir el manejo de los recursos naturales basado en el conocimiento.

Todas estas acciones, paradójicamente, contradicen el paradigma social dominante, pues en este caso, se privilegia la solidaridad social y conciencia comunitaria frente al individualismo; el uso diversificado de los recursos frente a uso especializado y la acumulación colectiva de capital, no la individual. Ello significa no más, que la adecuación, la estructura, la racionalidad y la filosofía comunitarias en el no poco hostil universo mercantil y globalizado que gobierna el mundo moderno (Toledo, 1999).

1.6. Implicaciones ecológicas en la recolección de hongos silvestres comestibles

La recolección de hongos usualmente ha sido vista como un aporte al desarrollo sustentable, ya que este tipo de aprovechamiento es menos perjudicial que otros métodos extractivos y contribuye a la subsistencia e ingreso de los hogares rurales (Ruiz *et al.*, 2004; Marshall *et al.*, 2006).

Esta actividad está íntimamente relacionada con la conservación del hábitat y la preservación de servicios ambientales como el agua, biodiversidad, captura de carbono, retención de suelo, incremento de la fertilidad del mismo, etc. Aspectos imposibles de desligar de los ecosistemas forestales, ya que los hongos junto con otros PFNM forman parte integral de una serie de productos, beneficios y servicios (alimento, medicina, materiales de construcción, leña, etc.) que las comunidades rurales han utilizado a lo largo del tiempo, llegando a crear una tradición fuertemente arraigada entre sus habitantes (Villarreal-Ruiz, 1996; Molina *et al.*, 1997).

Algunos hongos de alto valor comercial como matsutake (*Tricholoma magnivelare* [Peck] Redhead), morillas (*Morchella* spp.) y tecomate (*Amanita caesarea* [Scop.:Fr] Pers ex Schwein), tienen estrecha relación con árboles a través de un mutualismo, que incide en la salud y productividad de éstos (Molina *et al.*, 1997). Además tienen otras funciones ecológicas como degradadores de la materia orgánica, para su posterior incorporación a los ciclos biológicos (Odum, 1972). Esta y otras interrelaciones, forman parte de la compleja dinámica del sistema ecológico, en la que la afectación de un elemento tiene repercusiones sobre el resto de los componentes (Grupo Autónomo para la Investigación Ambiental, 2004). Por ello, el

enfoque de agroecosistemas enfatiza el manejo diversificado del territorio, pues ofrece mayores garantías de sostenibilidad y es la opción que se adapta mejor a este tipo de aprovechamientos (Ferrera y Alarcón, 2001).

1.7. La recolección de hongos en el contexto político-administrativo

Este aspecto tiene una fuerte influencia sobre la conservación y manejo sustentable del recurso, pues es indiscutible el papel que juegan las políticas y las instituciones en la regulación de los recursos naturales. No obstante, dicho tema está prácticamente relegado de las universidades, institutos o instituciones públicas, ya que son escasos los trabajos dedicados a documentar, investigar y desarrollar el manejo y el conocimiento tradicional que enmarca la recolección de hongos silvestres (Tacón y Palma, 2006).

La legislación sobre los PFNM en México es escasa y tiene un enfoque conservacionista, sin bases científicas respaldadas por inventarios y monitoreos del recurso (Villareal-Ruiz, 1996). Esto da como resultado una legislación prácticamente imposible de cumplir, confusa o prohibitiva. Además, los requisitos son tan complejos que la mayoría de los productores continúan la recolecta de hongos sin los permisos especificados por la ley, lo que a la larga los obliga a abandonar la actividad o ejercerla clandestinamente (Marshall *et al.*, 2006). Es decir, en tanto siga existiendo una evidente falta de coherencia y complementariedad entre los ordenamientos legales en materia ambiental y productiva aplicables a los PFNM, la posibilidad de promover un manejo sustentable del bosque se verá obstaculizada permanentemente (Aguilar *et al.*, 2008).

Lo anterior puede explicarse si se considera que en la generación de regulaciones y políticas ambientales no se toma en cuenta la experiencia e iniciativas campesinas y no se reconocen las normas y acuerdos comunitarios. Con ello se niega la capacidad de control que las comunidades tienen sobre sus propios recursos, lo cual hace que la normatividad vigente sea inaplicable y ajena a los intereses propios de las comunidades (Aguilar *et al.*, 2008). Es evidente que la sustentabilidad del recurso sólo será posible a través de estrategias encaminadas a fortalecer la capacidad técnica y organizativa de los poseedores del mismo (Von Hagen *et al.*, 1999).

1.8. El papel de la intervención científica

Aunque en países como Chile y Estados Unidos se reconoce la contribución de la recolección de hongos silvestres a la economía y desarrollo social local (Arteaga y Moreno, 2006) y se han abordado los temas críticos en el manejo del recurso (potencial social, ambiental, regulación y manejo considerando estrategias de mercado), en México estos temas aún se encuentran con bajo grado de desarrollo (Chamberlain *et al.*, 1998).

Investigaciones realizadas en dichos países, sugieren que el valor económico total de estos productos podría llegar a superar el valor de los productos maderables del bosque y que su aprovechamiento podría crecer sustancialmente sin efectos ambientales negativos (Pastor, 2002). Por ello, es necesario expandir el conocimiento del papel biológico, económico y social de la recolección de los

hongos, en el mediano y largo plazo, los servicios que aporta a la biodiversidad y su relación con los ecosistemas forestales (Pilz *et al.*, 1996).

Es a través de la intervención científica que se podrá lograr un equilibrio entre las necesidades del ser humano y la protección y conservación de los recursos naturales, específicamente si se abordan temas relativos a la biodiversidad de los hongos silvestres (Garibay-Orijel *et al.*, 2006), tales como sus etapas de desarrollo, estructuras, habilidad y resistencia de las especies, ambiente físico, interacción con otros recursos bióticos y las cadenas/redes tróficas (Amaranthus, 1997).

Finalmente, el enfoque de agroecosistemas permite fortalecer la comprensión y el entendimiento de la problemática en torno a la recolección de hongos silvestres y plantea una visión holística que puede ayudar a establecer una estrategia para conservar el recurso, haciendo un aprovechamiento sustentable de éste, abordando su problemática de manera participativa con la aplicación de acciones preventivas y de gestión y no sólo correctivas. Esto, basado en un enfoque agroecológico, requiere de una nueva generación de científicos con nuevos enfoques y actitudes que considere las necesidades y prioridades de la sociedad aunadas a la conservación del recurso natural, pero de igual manera de una redefinición del concepto de agroecosistema, incluyente de las corrientes de pensamiento emergentes y de los servicios ambientales.

1.9. Conclusiones

La problemática de la recolección de hongos silvestres involucra aspectos culturales, sociales y económicos, que deben ser abordados de manera integral (Villareal-Ruiz y Pérez-Moreno, 1989; Ruíz, 2006). Esto permitiría que su aprovechamiento se convierta en una estrategia de diversificación económica basada en el uso sustentable del recurso (Bandala *et al.*, 1997).

Aunque no hay datos que sustenten la disminución de las poblaciones de hongos silvestres en México, es probable que la sobreexplotación y deterioro de bosques y selvas esté afectando la resiliencia de éstos, así como su productividad y biodiversidad, perturbando sobre todo a las especies de alto valor comercial.

El manejo de los recursos con un enfoque de agroecosistemas, puede permitir la obtención de beneficios que favorezcan el balance ambiental, fortalezcan la sostenibilidad de los ecosistemas, preserven el conocimiento empírico y ayuden a desarrollar una legislación pertinente para la gestión del recurso. Así, la sustentabilidad no sólo dependerá de las características biológicas de una especie en particular, sino del contexto socioeconómico, legal y cultural que lo enmarca.

Ciertamente, el mercado es la principal fuerza que promueve el progreso y origina los cambios en los sistemas de producción, y el pequeño productor-recolector no se encuentra ajeno a ello. En este sentido, la intervención científica puede permitir mejorar la capacidad de negociación y técnicas de manejo en sistemas

agroforestales, que permitan la conservación y restauración del ecosistema con una mayor rentabilidad económica y equidad social.

Así mismo, el enfoque de agroecosistemas en relación con el aprovechamiento de los hongos silvestres comestibles, puede orientar la investigación hacia los aspectos de mayor relevancia y pertinencia, promoviendo su aprovechamiento a través del manejo basado en el conocimiento local y científico.

1.10. Literatura citada

Aguilar J, Illsley C, Gómez T, Tlacotempa A, Flores A (2008). Normatividad y manejo sustentable de productos forestales no maderables: el caso de la palma soyate en el estado de Guerrero (de cómo los aprovechamientos campesinos de los recursos naturales pueden ser sustentables, aunque no sean legales) http://www.raises.org/documentacion/documentos/manejocampesino/ArtSanz_e.pdf. (Consultado: 28 abril 2008).

Altieri MA (2001) Agroecología: principios y estrategias para diseñar sistemas agrarios sustentables <http://agroeco.org/brasil/material/cap2-Altieri.pdf>. (Consultado: 28 abril 2008).

Amaranthus M (1997) Forest sustainability: An approach to definition and assessment at the landscape level. Gen Tech Rep PNW-GTR-416 Portland OR: U.S. Department of Agriculture, Forest service, Pacific Northwest Research Station. 14 p.

Arteaga MB, Moreno ZC (2006) Hongos comestibles silvestres de Santa Catarina del Monte, Estado de México. Revista Chapingo: Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 12(2):125-131.

Baldy V, Gessner MO, Chauvet E (1995) Bacteria, fungi and the breakdown of leaf litter in a large river. *Oikos* 74:93-102.

Bandala MV, Montoya L, Chapela HI (1997) Wild edible mushrooms in Mexico: a challenge and opportunity for sustainable development. *In: Mycology in sustainable development. Expanding concepts, vanishing borders.* M.E. Palm and I.H. Chapela (eds). Parkway publishers. USA. pp: 77-89.

- Ceballos D (2005) Productos Forestales No Maderables, una oportunidad de desarrollo para las comunidades forestales rurales. El caso de Pueblos Mancomunados de Oaxaca. México Forestal No 21, Revista electrónica de la Comisión Nacional Forestal. <http://www.mexicoforestal.gob.mx/nota.php?id=159> (Consultado: 3 de febrero 2008).
- CEPFOR UNEP-WCMC (Proyecto) (2006) El aprovechamiento y comercialización de hongos silvestres en la sierra norte de Oaxaca, México Marcos habilitantes para la reducción de la pobreza a través del desarrollo de PyMEs forestales. <http://cecoeco.catie.ac.cr/descargas/Edouard.pdf>. (Consultado: 11 abril 2008).
- Chamberlain J, Bush R, Hammett AL (1998) Non-timber Forest products, The other forest products. *Forest Products Journal* 48(10):10-19.
- Chapela-Mendoza F (2006) Planeación comunitaria del territorio en La Unión Zapoteca – Chinanteca. *Estudios Rurales y Asesoría. A,C*, 44pp. http://www.coinbio.com/docs/CE/CasosOTC/CasoUZACHI_Final.pdf (Consultado: 8 de octubre 2008).
- Checkland PB (1981) *Systems Thinking, Systems Practice*. J. Wiley. Chichester Sussex. 330 p.
- COINBIO (2002) Proyecto de conservación de la biodiversidad en comunidades indígenas de Oaxaca, Michoacán y Guerrero. Subproyectos comunitarios tipo C (a) para proyectos de productos forestales no maderables y maderables no tradicionales PFMN. http://oaxaca.gob.mx/ecologia/info2007/convoc_coinbio/TDR_PFMN.pdf. (Consultado: 8 de marzo 2008).
- Colegio de Postgraduados en ciencias agrícolas y Fundación Produce Tlaxcala A.C. (2003) Programa estratégico para el desarrollo de la producción, transformación y comercialización de hongos comestibles en el estado de Tlaxcala. <http://www.snitt.org.mx/pdfs/demanda/hongos.pdf>. (Consultado: 23 marzo 2008).
- Corporación Colombiana Internacional (2004) Setas y hongos, Perfil del producto No 21. Bogotá, Colombia. http://www.agronet.gov.co/www/docs_agronet/200511314480_perfil_producto_setas.pdf. (Consultado: 23 abril 2008).
- FAO (2007) Los productos forestales no madereros. Departamento Forestal. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación <http://www.fao.org/forestry/foris/pdf/infonotes/infofaospanish-losproductosforestalesmadereros.pdf> (Consultado: 13 febrero 2009).

- Ferrera CR, Alarcón A (2001) La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. *Ciencia Ergo Sum*. 8(2):175-183.
- Galván E, Pérez-Ramírez L, Cifuentes J (1998) El uso de los hongos macroscópicos en la medicina tradicional en México. *Memorias del 3er. Congreso Mexicano de Etnobiología*. México. p. 41.
- Garibay-Orijel R, Cifuentes J, Estrada-Torres A, Caballero J (2006) People using macro-fungal diversity in Oaxaca, Mexico. *Fungal Diversity* 21: 41-67.
- González J, Leal R (1994) Demanda comercial y manejo de recursos en una comunidad indígena campesina. *Alteridades* 4 (8): 83-91.
- Grupo Autónomo para la Investigación Ambiental A.C. (2004) Métodos para la valoración de productos forestales no maderables con fines de manejo sostenible. Taller de capacitación: 20-220 de mayo del 2004. Santa María Huatulco Oaxaca, México. <http://www.coinbio.org/Capacitacion/CursoPFNM.pdf> (Consultado: 26 mayo 2008).
- Guzmán G (1994) Los hongos en la medicina tradicional de Mesoamérica y de México. *Revista Iberoamericana de Micología* 11: 81-85.
- Guzmán G (1995) La diversidad de Hongos en México. *Revista Ciencias* 39: 52-57.
- Mariaca MR, Silva PLC, Castaños MCA (2001) Proceso de recolección y comercialización de hongos comestibles silvestres en el valle de Toluca, México. *Ciencia Ergo Sum* 8(1):30-40.
- Marshall E, Schrekenberg K, Newton AC (Eds) (2006) Comercialización de productos forestales no maderables: factores que influyen en el éxito. Conclusiones del estudio México y Bolivia e implicancias políticas para los tomadores de decisión Centro Mundial de Vigilancia de la Conservación del PNUMA-WCWC, Biodiversity Series No 23. Cambridge, Reino Unido. 152 p.
- Molina R, O'Dell T, Luoma D, Amaranthus M, Castellano M, Russell K (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. 52 p.
- Molina R, Vance N, Weigand J, Pilz D, Amaranthus M (1997) Special forest products: Integrating social, economic, and biological consideration into ecosystem management pp. 315-336 http://www.fs.fed.us/pnw/pubs/journals/pnw_1997_molina001.pdf (Consultado: 23 abril 2008).

- Odum EP (1972) Ecología. 3ª Ed. México, Interamericana. 639 p.
- Ortega-Ponce L (2004) Las comunidades indígenas forestales de la Sierra de Juárez, Oaxaca, México. Estudio de caso sobre innovación participativa. 44p. <http://www.prgaprogram.org/downloads/PRGA/Innovacion%20Participativa/DocumentoFinalOaxaca.doc> (Consultado: 15 de octubre 2008).
- Pastor BJF (2002) Los productos forestales no maderables, una fuente de materia prima para el desarrollo de la industria eléctrica en Cuba. Revista Chapingo: serie Ciencias Forestales y del Ambiente 8(2):147-152.
- Peña LA, Zamora-Martínez MC, Montoya AE (2000) Comercialización de hongos silvestres comestibles en el estado de Tlaxcala. *In*: Memorias del VII Congreso Nacional de Micología (1-4 de octubre). pp. 26.
- Pilz D, Molina R, Amaranthus M, Castellano M, Weber SN (1996) Forest fungi and ecosystem management *In*: Managing forest ecosystem to conserve fungus diversity and sustain wild mushroom harvests. USDA Forest Service Pacific Northwest research Station, PNW-GTR-371. 104. pp. 86-94.
- Ramos SE, Hernández GAB, Cinta FI (2005) Los hongos comestibles silvestres: una alternativa para el desarrollo regional Instituto Nacional de Ecología SEMARNAT, México. <http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/gacetas/154/hongos.html>. (Consultado: 23 marzo 2008).
- Ruiz RO (2006) Agroecología: una disciplina que tiende a la transdisciplina. *Interciencia* 31(2):140-145.
- Ruiz PM, Belcher B, Achdiawan R, Alexaidés M, Aubertin C, Caballero J, Campbell B, Clement C, Cunningham T, Fantini A, de Foresta H, García Fernández C, Gautam KH, Hersch Martínez P, de Jong W, Kusters K, Kutty MG, López C, Fu M, Martínez Alfaro MA, Fair TR, Ndoye O, Ocampo R, Rai N, Ricker M, Schreckenberk K, Shackleton S, Shanley P, Sunderland T, Youn Y (2004) Markets drive the specialization strategies of forest peoples. *Ecology and Society* 9(2): 1-29.
- SEDESOL (1994) Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-1994, que determina las especies y subespecies de flora y fauna silvestres terrestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras y las sujetas a protección especial, y que establece especificaciones para su protección. *Diario Oficial de la Federación*, 488 (10): 2-60.
- SEMARNAT (1996) Norma oficial mexicana NOM-010-RECNAT-1996, que establece los procedimientos, criterios y especificaciones para realizar el aprovechamiento, transporte y almacenamiento de hongos. *Diario Oficial de la Federación*. 23 de octubre de 1995. México.

- SEMARNAT (2002) Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001, Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. Segunda Sección. 6 de marzo de 2002. México.
- Tacón A, Fernández U, Ortega F (1999) El mercado de los PFM y su papel en la conservación de la ecoregión de los Bosques Valdivianos. Red de Productos Forestales No Maderables PFM de Chile. WWF. 142 p.
- Tacón A, Palma J (2006) Productos forestales no madereros. La comercialización de los productos forestales no madereros: una oportunidad para el manejo comunitario y la valoración del bosque nativo. *Revista Bosque Nativo* 39(2): 253-266.
- Toledo VM (1992) What is ethnoecology? origins, scope and implications of a rising discipline. *Etnoecológica* 1(1): 5-21.
- Toledo VM (1999) El otro zapatismo. Luchas indígenas de inspiración ecológica en México. *La Paz y la Tierra: ecología, zapatismo y modernidad alternativa*. http://biblioteca.hegoa.ehu.es/system/ebooks/8962/original/El_otro_Zapatismo.pdf (Consultado: 15 de Febrero 2011).
- Villareal-Ruiz L, Pérez-Moreno J (1989) Los hongos comestibles silvestres de México, un enfoque integral. *Micología Neotropical Aplicada* 2:77-114.
- Villarreal-Ruiz L (1994) Análisis ecológico-silvícola de la productividad natural de hongos comestibles silvestres en- los bosques del Cofre de Perote, Veracruz. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de postgraduados. Montecillos. Edo. de Méx. 158 pp.
- Villareal-Ruiz L (Ed) (1996) Los hongos silvestres: componentes de la biodiversidad y alternativa para la sustentabilidad de los bosques templados Informe final del proyecto CONABIO C066 Instituto de Recursos Genéticos y productividad, Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas Montecillo Estado de México, México. 88 p.
- Von Hagen B, Fighth RD (1999) Opportunities for conservation-based development of no timber products in the Pacific Northwest Gen, Tech. Rep. PNW-GTR-473. Portland, OR. USA, Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station. 18 p.
- UNEP-WCMC (2003) Proyecto de comercialización de Productos Forestales No Maderables. Factores de éxito y fracaso, El mercado de los hongos silvestres. http://quin.unep-wcmc.org/forest/ntfp/cd/7_Market_reports/g_Hongos_silvestres.pdf (Consultado: 10 septiembre 2008).

Wilsey D (2006) Can NTFP certification help to ensure the viability of natural production in community-managed extractive reserves? University of Florida, Gainesville, FL, USA. Ecological Society of America ESA International Conference Merida, Mexico.
<http://abstracts.co.allenpress.com/pweb/esai2006/document/59051>.
(Consultado: 23 abril 2008).

Zamora-Martínez MC, Nieto de Pascual-Pola C (1995) Natural production of wild edible mushrooms in the southwestern rural territory of Mexico City, Mexico. *Forest Ecology and Management* 72(1):13-20

Zamora MC, Torres JM (2002) Estado actual de la información sobre productos forestales no madereros. Estado de la Información Forestal de México. Monografías de Países Vol. 11. Comisión Europea y FAO. 179-279. <http://www.fao.org/docrep/006/ad398s/AD398s13.htm> (Consultado: 14 febrero 2008).

CAPÍTULO II. EL CONCEPTO DE DOMESTICACIÓN: EL CASO DE LOS HONGOS SILVESTRES COMESTIBLES

Gerardo Alvarado-Castillo, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2011

Este ensayo presenta antecedentes teóricos y conceptuales relacionados con el proceso de domesticación, profundiza en supuestos básicos del mismo y se discuten sus limitaciones, señalando la necesidad de adaptar el concepto para el caso de los hongos silvestres comestibles. Se aborda el conocimiento micológico y su potencial en relación con los agroecosistemas. Se considera que la domesticación en los hongos silvestres comestibles, a diferencia del concepto tradicional, es un proceso sujeto a cambios, que se define a partir de su uso e interacción con el entorno, por lo que integra términos sociales, culturales y biológicos, de tal manera que juega un papel activo en los usos y prácticas tradicionales (no previstas por el mercado) y que debido a la presencia de grupos étnicos y tecnología tradicional ha logrado mantener los procesos empíricos de selección y domesticación de éstos, como una importante forma de conservación *in situ*. En este caso, la domesticación es un proceso en el que la naturaleza ha sido integrada al sistema sociocultural de los pueblos, a través del establecimiento de los principios básicos para la obtención de sus fructificaciones a partir de un profundo conocimiento etnomicológico y del manejo empírico de las condiciones naturales de propagación.

Palabras clave: concepto, sistemas tradicionales, sustentabilidad, productividad

THE CONCEPT OF DOMESTICATION: THE CASE OF THE WILD EDIBLE MUSHROOMS

Gerardo Alvarado-Castillo, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2011

This essay presents a theoretical background and concepts related to the domestication process. It is deepened in basic conceptual assumptions and its limitations are discussed, indicating the necessity to extend the concept for the case of wild edible mushrooms. The mycological knowledge and its potential, in relationship to the agroecosystems are considered. In this case domestication is a subject process of changes, which is defined from their use and interaction with the surrounding environment. Therefore, it includes social, cultural and biological aspects. In such way the uses and traditional practices not anticipated by the market and due to the presence of ethnic groups and traditional technology it plays an active role to maintain the empirical processes of selection and domestication of the fungi, as an important form of *in situ* conservation. In the case of the fungi, domestication is a process in which the nature has been integrated to the sociocultural system of rural communities, through establishment of the basic principles for obtaining its fruitbodies from the handling of its natural conditions of propagation.

Key words: concept, productivity, sustainability traditional systems

2.1. Introducción

El concepto es una síntesis en la cual se expresan los conocimientos adquiridos acerca de procesos reales, grupos de procesos y su relación entre ellos, y en lo general de fenómenos de la naturaleza (Eli de Gortari, 1969). Su utilidad radica en la precisión y claridad que otorga para la comprensión y en su caso la intervención y modificación de un fenómeno.

El concepto de domesticación, tradicionalmente se refiere a un proceso por medio del cual plantas, animales y microorganismos son extraídos de su medio natural para adaptarlos a hábitats creados por el hombre con fines de reproducción y consumo directo o indirecto (IUNC, 2008). Este proceso resulta de una interacción prolongada y de una selección deliberada por parte del ser humano, el cual elige las características morfológicas valiosas para uso antropogénico. La domesticación es normalmente un proceso largo que implica la selección y cruzamiento de una especie, así como el manejo de su entorno natural, para la obtención de características deseables, de tal manera que estas modificaciones genéticas son acumuladas y heredadas a través del tiempo (Harlan, 1992; Solbrig, 2004).

Con el desarrollo de la ciencia, estas técnicas pasaron del método empírico, de ensayos de prueba y error, a experiencias basadas en el conocimiento científico, el cual proveyó una comprensión más precisa acerca de los organismos y sus condiciones de reproducción, dando lugar a ciencias como la biología, agronomía y más recientemente a la biotecnología (Solbrig, 2004).

En la actualidad la domesticación se realiza con fines productivos y se emplean nuevas herramientas biotecnológicas para acelerar el proceso, que de otra manera sería impreciso y lento. Con técnicas como el cultivo de células y tejidos, es posible identificar, retener y producir (por ejemplo a través de mutaciones) características útiles para fines antropocéntricos como, resistencia a sequía, mayor rendimiento, precocidad, etc. (Solbrig, 2004).

No obstante, esta selección y manejo en la producción de genotipos implica eliminar o retener ciertas características de desarrollo y uso, tales como su adaptación al hábitat, facilidad de cosecha, tamaño y sabor, entre otras, conduciendo así a una alta uniformidad morfogénica, lo que supone un riesgo ante epidemias y enfermedades (Hernández, 1993).

En el caso de los hongos silvestres comestibles, el concepto de domesticación no debe ser enmarcado en el concepto tradicional, puesto que es imprescindible observar las relaciones entre las actividades humanas, los procesos físicos de medio y los intercambios mutuos, incluidos en un sólo sistema analítico, ya que los conceptos cambian con el tiempo, conforme lo hace el conocimiento y las bases teóricas e ideológicas. Por ello, se considera que la domesticación, para el caso de los hongos silvestres comestibles, implica una serie de interrelaciones y asociaciones co-evolutivas entre el hombre y el ambiente, que se han desarrollado en diferentes direcciones a través del tiempo y en varios niveles de organización (individual, ecosistema, comunidad), y que a su vez dependen del desarrollo y la cultura de los pueblos que la practican (Bye, 1993; Hernández, 1993; Jakuba *et al.*, 2008).

Por tanto, la domesticación puede ser considerada como una innovación cultural, con un gradiente de intensificación paulatina de las relaciones entre el ser humano y el entorno ecológico (Bell y Walker, 1992).

En este sentido, el concepto tradicional de domesticación se ve rebasado, por lo que es necesario la creación de una propuesta que integre términos socioculturales y biológico ambientales, ya que el proceso de domesticación no se desarrolla únicamente en respuesta a presiones de subsistencia de los grupos sociales (alimentación), sino que también es un proceso social y simbólico en el que la naturaleza es integrada a un sistema cultural (Bell y Walker, 1992). Es decir, que los hongos no sólo representan una fuente de alimento, sino que integran parte de los usos y costumbres y estrategias de sustento de los pueblos que los utilizan y consumen como productos medicinales, tradicionales, rituales y religiosos (Velandia *et al.*, 2008).

Con base en lo anterior, la intención del presente trabajo es discutir, analizar y proponer el concepto de domesticación para el caso de los hongos silvestres comestibles, a la luz del análisis del concepto tradicional, el conocimiento micológico y la integración de los hongos silvestres a los agroecosistemas

2.2. La domesticación tradicional: el caso de los hongos comestibles

La cantidad de especies que conforman el reino fungi es enorme. Se han estimado a nivel mundial, 1.5 millones de especies. La forma más sencilla de clasificar a estos organismos es por su tamaño, en micromicetos y macromicetos (Barney,

2000). Dentro del primer grupo, se considera a las levaduras como los primeros microorganismos en ser domesticados para la elaboración de quesos, cerveza u otros productos alimenticios, ocupando en la actualidad lugares importantes dentro de procesos biotecnológicos (Solbrig, 2004). Otro ejemplo de los micromicetos es la utilización de *Penicillium* spp. en la medicina y de *Saccharomyces* spp. en la elaboración de bioenergéticos, aplicación que se vislumbra como una de las más prometedoras a futuro (Ometto *et al.*, 2009).

En cuanto a los macromicetos u hongos superiores, existen 10,000 especies que producen cuerpos fructíferos (Barney, 2000; Kües y Liu, 2000). De éstos, la mitad tiene algún grado de comestibilidad, pero sólo 2,000 especies (pertenecientes a 31 géneros), son consideradas altamente comestibles. De esta cifra, alrededor de 100 se cultivan experimentalmente, 50 poseen valor económico en el mercado y sólo 30 son comercialmente cultivadas. No obstante, Martínez-Carrera *et al.* (2010) y Bruhn (1998) mencionan que únicamente 10 especies se cultivan a nivel industrial, mientras Chang y Miles (2004) indican que son sólo 6 especies; éstos datos revelan el porcentaje ínfimo de especies de hongos cultivados y domesticados (Figura 2.1). En México, Guzmán (1998), estima que hay más de 200,000 especies de hongos, pero sólo el 4% son conocidas y Garibay-Orijel *et al.* (2006) consideran que se consumen aproximadamente 300 especies de hongos silvestres, los cuales no han sido domesticados bajo el concepto tradicional.

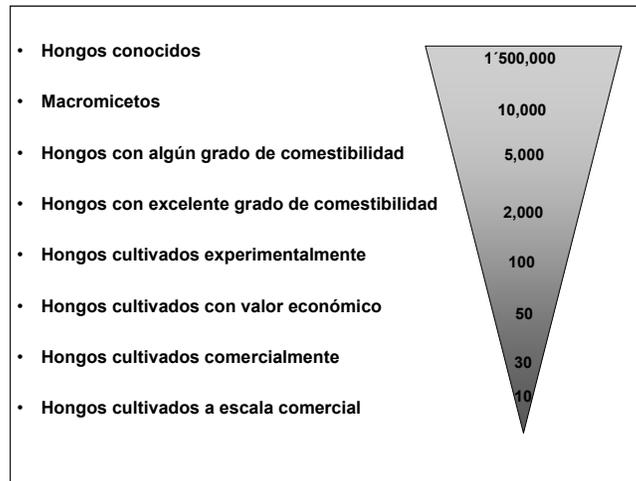


Figura 2.1. Especies de hongos conocidos, domesticados y producidos a escala comercial. Fuente: Elaborado con datos de Bruhn (1998); Barney (2000); Kües y Liu (2000) y Chang y Miles (2004) Martínez-Carrera *et al.*, (2010).

Los primeros hongos superiores que fueron domesticados fueron *Auricularia aurícula* en China alrededor del año 600 A.C. simulando sus condiciones naturales de reproducción (Chang y Miles, 2004); y el hongo shiitake (*Lentinula edodes*) alrededor del año 1100 D.C. (Barney, 2000). A estos le siguió el champiñón (*Agaricus bisporus*), que fue domesticado en Francia en 1650, y cuya producción comercial inició en el año 1880, hasta convertirse en el hongo más conocido y cultivado comercialmente en Europa y América. Por otro lado, los hongos conocidos como setas (*Pleurotus* spp) se domesticaron en el siglo pasado, alrededor de 1917, empleando micelio silvestre para su inoculación en troncos, siendo posible su cultivo a gran escala hasta el año de 1969 en Hungría (Mora y Martínez-Carrera, 2007).

En la actualidad el champiñón ocupa el primer lugar a nivel mundial en cuanto a producción y consumo, seguido de Shiitake que es muy popular en las culturas asiáticas y en tercer lugar los hongos setas (Barney, 2000). De tal manera, que

estas tres especies constituyen el 70% de la producción mundial (Bruhn, 1998; Martínez-Carrera, 1998; Chang y Miles, 2004).

Respecto a otras especies, debido a sus interrelaciones ecológicas (saprófitos, micorrízicos o facultativos) no ha sido posible su domesticación bajo el concepto tradicional, por ello se siguen obteniendo mediante recolección. Esto implica constantes variaciones en los volúmenes colectados en su medio natural y un alto valor de mercado. Esta situación ha planteado la necesidad de investigar su cultivo y generar los principios para su domesticación, existiendo estudios en *Cantharellus cibarius* Fr. (Suchilillo), *Boletus edulis* (Mazayel), *Tricholoma matsutake* (Matsutake), *Morchella* spp (morillas) entre otros (Estrada-Martínez *et al.*, 2009; Kües y Liu, 2000).

Diversas investigaciones han demostrado que es posible obtener hongos en condiciones naturales, a través de su inoculación directa en campo o con el uso de plantas micorrizadas (Morcillo y Sánchez, 2004; Kües y Liu, 2000). Al respecto destacan los trabajos realizados en diferentes especies de trufas (*Tuber melanosporum*, *T. uncinatum*, *T. borchii*) que han sido obtenidas mediante la siembra de plantas micorrizadas (Morcillo y Sánchez, 2004); así como la producción del cuerpo fructífero de *Tricholoma matsutake* (Iwase, 1997) y *Cantharellus cibarius* (Danell y Camacho, 1997). No obstante, existen hongos silvestres comestibles de gran importancia económica, como la trufa blanca italiana (*Tuber Magnatum Pico*), sobre la que no se reportan resultados exitosos (Morcillo y Sánchez, 2004). Lo anterior, muestra que la domesticación y el cultivo de hongos silvestres,

especialmente micorrízicos, es posible y puede darse a escala comercial (Kües y Liu, 2000).

2.3. Conocimiento micológico y el proceso de domesticación

A nivel mundial existe un amplio conocimiento micológico, ya que los hongos tuvieron un profundo impacto en la dieta y costumbres de muchas culturas antiguas como los griegos, romanos, celtas y sumerios (Matthews, 2008). Estas civilizaciones desarrollaron una profunda comprensión de varias especies de hongos (por ejemplo *Amanita caesarea*, como especie comestible y *Amanita muscaria* como alucinógeno), conformando un amplio conocimiento etnomicológico. No obstante, éstas no pueden ser consideradas como especies domesticadas dentro del concepto formal, ya que no cumplen con condiciones tales como la incorporación de características útiles para su producción, uniformidad genética y consecuentemente una estrecha dependencia de los cuidados del hombre.

En México, de igual manera, se desarrolló una amplia comprensión sobre los hongos comestibles. Este conocimiento, data desde épocas prehispánicas y ha pasado de generación a generación hasta nuestros días, lo que ha dado lugar a una gran tradición micófaga, donde los hongos no sólo representan una fuente de alimento, sino un importante elemento cultural a través de sus usos medicinales y rituales (Mata *et al.*, 2005; Estrada-Martínez *et al.*, 2009), como lo muestran evidencias arqueológicas, fósiles y representaciones pictóricas de diferentes culturas prehispánicas (Figura 2.2). La importancia de los hongos es tal, que forma parte de la cosmovisión y vida cotidiana de muchas culturas indígenas de México.



Figura 2.2. *Xochipilli* no sólo representa al “Príncipe de las flores” sino más específicamente al príncipe de las flores embriagantes; esto es de los hongos, llamados en la poesía náhuatl "flores" y "flores que intoxican". El pedestal sobre el que está sentado tiene un diseño que representa cortes de sombreretes de *Psilocibe aztecorum*, hongo alucinógeno que únicamente crece en las faldas del volcán Popocatepetl, donde fue encontrada esta estatua. Fuente: Velandia (2008).

Este conocimiento etnomicológico ha sido registrado desde la época de la colonia por Fray Bernardino de Sahagún en su *Historia General de las Cosas en la Nueva España* (Códice Florentino), hasta nuestros días en el *Pharmacoteon* (Ott, 1996). En ambos documentos, se describe al género *Psilocybe*, conocido en la época prehispánica como *Teonanácatl*, el cual los Aztecas consideraban un hongo sagrado.

Estos registros forman parte de la integración del conocimiento a través del tiempo de las diferentes interrelaciones del hombre con su entorno, en este caso, con los hongos silvestres.

2.4. Los hongos silvestres y su integración a los agroecosistemas

Actualmente existe un gran deterioro de los bosques y selvas de todo el país, que altera drásticamente, no sólo a las poblaciones fúngicas sino también a su entorno social y cultural (Estrada-Martínez *et al.*, 2009), por lo que debe reconocerse a la recolección de hongos silvestres comestibles en el contexto de los agroecosistemas, ya que integra elementos ambientales y humanos, así como la forma, dinámica y función de sus interrelaciones.

Este agroecosistema presenta componentes económicos que representan una alternativa productiva y de ingresos para las comunidades que habitan regiones boscosas del país. También incluye aspectos ecológicos, ya que este tipo de aprovechamiento es menos perjudicial que otros métodos extractivos y contribuye a la subsistencia e ingreso de los hogares rurales (Ruiz *et al.*, 2004) y sociales, pues es una rica tradición transgeneracional (Tacón y Palma, 2006), que permanece activa de manera vertical (de padres a hijos) y horizontal (entre gente de la misma generación) (Mariaca *et al.*, 2001). De tal forma, que se mantiene el conocimiento empírico y un equilibrio entre la alimentación, fuente de ingresos, conservación del ambiente, organización social, usos y costumbres (Alvarado y Benítez, 2009).

De esta forma, la diversidad étnica y de recursos bióticos existente en las diferentes regiones agroecológicas de México, permite que se realice el aprovechamiento de los recursos con una visión particular y distinta, que conforma la estrategia de supervivencia de muchos grupos indígenas (Solbrig, 2004). Así mismo, la recolección de hongos ha originado sistemas de producción estables que han

demostrado ser compatibles con la conservación a largo plazo, lo cual es una forma de contribución a la sustentabilidad (Toledo, 1992).

2.5. El concepto de domesticación en el caso de los hongos silvestres comestibles

Con los elementos expuestos anteriormente, se puede decir que la domesticación de los hongos silvestres comestibles, se ha venido realizando como un proceso en el que la naturaleza ha sido integrada al sistema sociocultural de los pueblos, a través del establecimiento de los principios básicos para la obtención de sus fructificaciones a partir del manejo de las condiciones naturales de propagación. Por lo cual la propuesta para el concepto de domesticación en el caso de los hongos silvestres comestibles es la siguiente:

Es un proceso histórico y social que forma parte de los sistemas de producción rural, que tiene componentes económicos, ecológicos y socioculturales, así como funciones y retroalimentación entre sus componentes (como se mostró brevemente en su reconocimiento como agroecosistema), la cual se da a través la intervención del ser humano, para la obtención de fructificaciones mediante un conocimiento profundo del manejo de las condiciones naturales de propagación. Por ejemplo, a través de su selección y manejo, inoculación directa en campo, el uso de plantas micorrizadas y el manejo del entorno.

La propuesta de este concepto es una abstracción de las propiedades fundamentales del proceso de recolección y se propone con el fin de que a través de la investigación, sea enriquecido o desechado, hasta encontrar la mejor

representación de este fenómeno, ya que al ser un proceso construido por el hombre, se encuentra sujeto a enfoques y especializaciones (Goode y Hatt, 2002).

El reconocimiento de la domesticación de los hongos silvestres, desde este punto de vista, contribuiría a valorar la diversidad de este recurso, dar impulso a un modelo productivo que favorezca el uso de su diversidad y la conservación del ambiente, al reconocimiento de los agroecosistemas tradicionales (los cuales han desempeñado un papel importante en el aprovechamiento y producción sustentable de los hongos silvestres comestibles) que han representando una importante forma de conservación del recurso *in situ* (Hernández, 1993). Además impulsaría un proceso de domesticación con un enfoque que guarde el equilibrio entre conservación y desarrollo (Díaz *et al.*, 2004).y el diseño e implementación de nuevas alternativas productivas que sean competitivas en un esquema de mercado.

2.6. Avances en la domesticación de morilla

Aunque existen ciertos avances en la domesticación de las morillas, aún se siguen cosechando en su medio silvestre (Barney, 2000). La falta de identificación precisa de las condiciones adecuadas para su fructificación ha sido factor clave para impedir el establecimiento de protocolos para el cultivo artificial de *Morchella*. A pesar de esto, se han generado patentes (Pat. 4.594.809 y 4.757.640) que han sido cuestionadas debido a su baja productividad y la malformación de cuerpos fructíferos, así como su discontinuidad en la producción (Barnes y Wilson, 1998; Stott y Mohammed, 2004; Molina *et al.*, 1993). Los avances en la domesticación de

la morilla, se encuentran relacionados a su ciclo de vida y a las estructuras llamadas esclerocios, cuya importancia ha sido demostrada por Ower *et al.* (1982) y por Volk y Leonard (1989), quienes encontraron que estas estructuras pueden ser producidas bajo condiciones controladas para formar ascocarpos.

En trabajos recientes, Alvarado *et al.* (2008) han encontrado que la diferenciación del micelio en esclerocios posiblemente se produce por efecto de los elementos nutritivos u otras sustancias contenidas en el sustrato donde crece, logrando producir estas estructuras en tiempos relativamente cortos. Estos aportes podrían incidir en la domesticación de este hongo en dos vertientes: produciendo esclerocios en masa para su diferenciación y fructificación en condiciones controladas; y a través de su inoculación en campo, como se ha hecho con otros hongos micorrízicos.

A pesar de ello aún es necesario hacer más ensayos, sobre todo en cuanto a las condiciones ambientales necesarias para la diferenciación de esclerocios y la formación de cuerpos fructíferos, dado que esto representa el mayor reto para la generación de sistemas productivos de *Morchella*.

2.7. Conclusiones

La domesticación de los hongos silvestres comestibles, es un proceso histórico y social que debe sistematizarse y continuarse a de mediano y largo plazo con un enfoque interdisciplinario e integral, considerando los avances tecnológicos, manejo y conocimiento etnomicológico.

La domesticación de hongos silvestres comestibles, particularmente de los micorrízicos (que viven en simbiosis con otros organismos) es actualmente una necesidad, generada por su demanda en los mercados nacionales e internacionales. Por tanto, es necesario construir un entendimiento, de cada especie en particular, el medio que los rodea y sus interacciones, con especial atención al manejo empírico y su integración a los agroecosistemas tradicionales. Lo anterior puede, en un futuro no muy lejano, dar pie a su cultivo *in vitro* o semicultivo *in situ* (Sierra, 2010).

La domesticación de los hongos silvestres comestibles, con fines de producción puede apoyar a la preservación de las especies que se encuentran en estados de vulnerabilidad, ya que la sobreexplotación es la práctica considerada como el mayor problema relacionado con la pérdida de los recursos naturales, pudiendo provocar lo que se conoce como erosión intragenética (Dalglish y Jacobson, 2005). Por lo que la domesticación, junto con el manejo del entorno y gestión de los recursos con un enfoque integral, puede ser una forma de aprovechamiento sustentable (Munyanziza, 1996).

2.8. Literatura citada

Alvarado G, Benítez G (2009) El enfoque de agroecosistemas como una forma de intervención científica en la recolección de hongos silvestres comestibles. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 10(3):531-539.

Alvarado-Castillo G, Mata G, Martínez-Carrera D, Nava ME, Platas DE (2008) Obtención de esclerocios de *Morchella esculenta* en diferentes medios de cultivo. *Interciencia* 33(7): 528-531.

- 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. 14 p.
- Barney DL (2000) Growing Mushrooms Commercially, Risks and Opportunities University of Idaho, College of Agriculture. 8 pp. <http://www.cals.uidaho.edu/edComm/pdf/CIS/CIS1077.pdf> (Consultado 18 Octubre 2009).
- Bell M, Walker JC (1992) Late quaternary environmental change: physical and human perspectives. Longman Scientific & Technical. Essex. 272 p.
- Bruhn JN (1998) What Do We Still Need to Know About Commercial Production of Forest-Grown Specialty Fungi? *In: North American Conference On Enterprise Development Through Agroforestry: Farming the Agroforest for Specialty Products* pp: 150-158. <http://www.nfs.unl.edu/documents/SpecialtyForest/Bruhn.pdf> (Consultado 18 Octubre 2009).
- Bye R (1993) The role of humans in the diversification of plants in México. *In: Ramamoorthy T., Bye R, Lot A, Fa J. (eds). Biological diversity of México: Origins and distribution.* Oxford University Press. New York. 707-732 p.
- Chang ST, Miles PG (2004) Mushroom cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. Second edition, CRC Press Washington D.C. 451 p.
- Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas y Fundación Produce Tlaxcala, A.C. (2003) Programa estratégico para el desarrollo de la producción, transformación y comercialización de hongos comestibles en el estado de Tlaxcala, México. 47 p.
- Dalgleish HJ, Jacobson KM (2005) A first assessment of genetic variation among *Morchella esculenta* (Morel) populations. *Journal of Heredity* 96:396-403.
- Danell E, Camacho FJ (1997) Successful cultivation of the golden chanterelle. *Nature* 385: 303.
- Díaz R, Cicció JF, Ocampo RA (2004) Domesticación de recursos naturales nativos en condiciones agroecológicas en el trópico húmedo en el Caribe de Costa Rica. *In: Canuto JC, Costabeber JA(eds). Agroecología. Conquistando la Soberanía Alimentaria, Brasil.* pp 193-212.
- Estrada-Martínez E, Guzmán G, Cibrián TD, Ortega PR (2009) Contribución al conocimiento etnomicológico de los hongos silvestres comestibles en los mercados regionales y comunidades de la sierra nevada (México). *Interciencia* 34 (1):25-33.

- Garibay-Orijel R, Caballero J, Estrada-Torres A, Cifuentes J (2006) People using macrofungal diversity in Oaxaca, México. *Fungal Div.*21:41-67.
- Goode W, Hatt P (2002) *Métodos de investigación social*. Ed. Trillas. México. 469 pp.
- Gortari de EE, Garza T, Dagum C, Hodara J, Varsavsky O (1969) El problema de predicción en ciencia sociales. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Sociales. 228 pp.
- Guzmán G (1994) Los hongos en la medicina tradicional de Mesoamérica y de México. *Revista Iberoamericana de Micología* 11:81-85.
- Guzmán G (1998) Análisis cualitativo y cuantitativo de la diversidad de los hongos en México. In: Halffter G. (Comp.) *La Diversidad Biológica de Iberoamérica Vol. II. Acta Zoológica Mexicana. Vol. Especial*. Instituto de Ecología y Secretaría de Desarrollo Social. Xalapa, Veracruz, México. pp. 111-175.
- Harlan JR (1992) Origin and processes of domestication. *In: Chapman GP (ed) Grass evolution and domestication*. Cambridge University Press. Cambridge. 159-166 p.
- Hernández XE (1993) Aspects of plant domestication in México: a personal view. *In: Ramamoorthy TP, Bye R, Lot A, Fa J. (eds). Biological diversity of México: origins and distribution*. Oxford University Press. New York. pp 733-753.
- International Union for Conservation of Nature (2008) IUCN Definitions. http://cmsdata.iucn.org/downloads/en_iucn__glossary_definitions.pdf (Consultado 18 Octubre 2009).
- Iwase K (1997) Cultivation of mycorrhizal mushroom. *Food Rev Int.* 13: 431-442.
- Jakuba T, Kottferová J, Mareková, Ondrasovic M, Ondrasovicová O (2008) Ecology and domestication. *Folia Veterinaria* 52 (2): 83-84.
- Jarvis MC, Miller AM, Sheahan J, Ploetz K, Ploetz J, Watson RR, Palma R, Pascario CA, García AJ, López RA, Orr B (2004) Edible Wild Mushrooms of the Cofre De Perote Region, Veracruz, Mexico: An Ethnomycological Study of Common Names and Uses. *Economic Botany* 58: 111-115.
- Kües U, Liu Y (2000) Fruiting body production in basidiomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54:414-152.
- Mariaca MR, Silva PLC, Castaños MCA (2001) Proceso de recolección y comercialización de hongos comestibles silvestres en el valle de Toluca, México. *Ciencia Ergo Sum* 8:30-40.

- Martínez-Carrera, D, Curvetto N, Sobal M, Morales P, Mora VM (2010) Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales. COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP, Puebla. 648 pp.
- Mata G, Trigos A, Salmones D (2005) Aportaciones de Gastón Guzmán al conocimiento de los hongos alucinógenos. *Revista Mexicana de Micología* 21: 1-3.
- Matthews DF (2008) *Fungi in the Ancient World: How mushrooms, mildews, molds, and yeast shaped the early civilizations of Europe, the Mediterranean, and the Near East.* APS Press. 152 p.
- 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.
- Mora, VM, Martínez-Carrera D (2007) Investigaciones básicas, aplicadas y socioeconómicas sobre el cultivo de setas (*Pleurotus*) en México. Capítulo 1.1, 17 pp. *In:* Sánchez JE, Martínez-Carrera D, Mata G, Leal H (Eds.) *El Cultivo de Setas Pleurotus spp. en México.* ECOSUR-CONACYT, México, D.F.
- Morcillo M, Sánchez M (2004) ¿Por qué es tan difícil cultivar hongos micorrízicos comestibles? *Terralia* 45:80-85.
- Munyanziza E (1996) Domestication of Mushrooms from the Miombo Woodland: Current Status and Crucial Issues for Agroforestry. *Non-Wood Forest Products* 9. FAO, Rome. 296 p.
- Ometto AR, Zwicky-Hauschild M, Nelson-Lopes W (2009) Lifecycle assessment of fuel ethanol from sugarcane in Brazil. *Int J. Life Cycle Assess.* 12 p.
- OttJ (1996) *Pharmacotheon.* Ed los Libros de la Liebre de Marzo. Barcelona, España. 629 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.

- Ruiz PM, Belcher B, Achdiawan R, Alexaides M, Aubertin, C, Caballero J, Campbell B, Clement C, Cunningham T, Fantini A, de Foresta H, García-Fernández C, Gautam KH, Hersch-Martínez P, de Jong W, Kusters K, Kuty MG, López C, Fu M, Martínez-Alfaro MA, Fair TR, Ndoye O, Ocampo R, Rai N, Ricker M, Schereckenberg K, Shackleton S, Shanley P, Sunderland T, Youn Y (2004) Markets drive the specialization strategies of forest peoples. *Ecology and Society*9: 1-29.
- Sierra S (2010) Los hongos comestibles y su cultivo. Historia, desarrollo actual y perspectivas en México y el mundo. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 8 pp.
- Solbrig O (2004) Ventajas y desventajas de la agrobiotecnología *In*: Bárcena A, Katz A, Morales J, y Schaper M. (Eds.), Los transgénicos en América Latina y el Caribe: un debate abierto. Cap. II. CEPAL Chile. pp. 33-69.
- Stott K, Mohammed C (2004) Specialty mushroom production systems: maitake and morels. (Project No UT-30All) Rural Industries Research and Development Corporation. Australia. 86 p.
- Tacón A, Palma J (2006) La comercialización de los productos forestales no madereros: una oportunidad para el manejo comunitario y la valoración del bosque nativo. *Revista Bosque Nativo*39: 253-266.
- Toledo VM (1992) What is ethnoecology? origins, scope and implications of a rising discipline. *Etnoecológica* 1: 5-21.
- Toledo VM (1999) El otro zapatismo. Luchas indígenas de inspiración ecológica en México. *La Paz y la Tierra: ecología, zapatismo y modernidad alternativa*. http://biblioteca.hegoa.ehu.es/system/ebooks/8962/original/El_otro_Zapatismo.pdf (Consultado: 15 de Febrero 2011).
- Velandia C, Galindo L, Matheus K (2008) Micolatría en la iconografía prehispánica de América del sur *Int. J. S. Am. Archaeol.* 3: 6-13
- Volk TJ, Leonard TJ (1989) Physiological and environmental studies of sclerotium formation and maturation in isolates of *Morchella crassipes*. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 3095-3100.

CAPÍTULO III OBTENCIÓN DE ESCLEROCIOS DE *Morchella* MEDIANTE LA SUPLEMENTACIÓN DE GRANO²

Gerardo Alvarado-Castillo, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2011

Los hongos comestibles del género *Morchella* son importantes a nivel nacional e internacional por su alto valor comercial. Sin embargo, su producción artificial es aún un reto, a pesar de que existen patentes para su cultivo. Diversos estudios coinciden en que la obtención de esclerocios es uno de los aspectos necesarios a desarrollar para lograr su domesticación y producción comercial, por lo cual el objetivo de este estudio fue adaptar una metodología para la producción en masa de estas estructuras. Este trabajo consta de dos experimentos, en el primero se evaluó el crecimiento micelial de cinco cepas de *Morchella* empleando cuatro tipos de granos (maíz, avena, trigo y centeno). Se encontró que el centeno tuvo una respuesta altamente significativa en todas las cepas y de éstas la más productiva fue la CP508 (17.90 cm²). En el segundo experimento se evaluó el efecto de la suplementación del centeno para la producción de esclerocios, para lo cual se usaron modificaciones al método del frasco de Ower (Pat: 4,594,809, Junio 1986). Bajo las condiciones del experimento se concluye que no existió una respuesta del efecto barrera y el medio pobre-rico en la producción de esclerocios, por lo que la diferenciación y formación de estas estructuras puede deberse a factores como elementos nutritivos y promotores del crecimiento contenidos en la compost.

Palabras clave: compost, efecto barrera, medio pobre-rico, método de Ower

² Publicado en inglés (2011) en *Interciencia* 36 (10):768-773 (Anexo C).

Morchella SCLEROTIA PRODUCTION THROUGH GRAIN
SUPPLEMENTATION

Gerardo Alvarado-Castillo, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2011

Edible fungi of genus *Morchella* are important at national and international level because of their high commercial value. Nevertheless, their artificial production is still a challenge, although the patents of their cultivation are being held. Different studies agree that the obtaining of sclerotia is one of the necessary aspects for achieving their domestication and commercial production. This study consists of two experiments. In the first, mycelial growth of five *Morchella* strains was assessed using four types of grains (maize, oats, wheat, and rye), assuming that the higher mycelial growth, the more abundant sclerotia production is. It was found that rye had the highest response in all the strains, and the greater growth was in CP508 (17.90 cm²). In the second experiment, the effect of rye supplementation for sclerotia production was evaluated, using modifications to the jar method of Ower *et.al.* (Pat: 4,594,809, June 1986), observing that the RCG treatment (rye supplemented with compost and gypsum) was the best; likewise, the most productive strain in this experiment was CP506 (8.47 g), obtaining sclerotia between the third and fourth week of inoculation in all treatments. Under experiment conditions, a response of barrier effect and of the nutrient-poor medium in sclerotia production did not become evident; therefore, the differentiation and formation of these structures may be due to factors such as nutritious elements and growth promoters contained in the compost.

Key words: barrier effect, compost, Jar Method of Ower; nutrient-poor medium

3.1. Introducción

Los ascomicetos del género *Morchella* son hongos comestibles, económicamente importantes y de alto valor comercial a nivel nacional e internacional. Aunque se han generado patentes para su producción comercial (Ower, 1982, Ower *et al.*, 1986), su obtención aún depende básicamente de su recolecta en campo. Su producción bajo condiciones controladas presenta todavía serias dificultades, teniéndose una baja productividad y malformación de cuerpos fructíferos (Barnes y Wilson, 1998; Stott y Mohammed, 2004; Molina *et al.*, 1993).

Los avances en el proceso de domesticación del género *Morchella* coinciden en que los esclerocios, estructuras de resistencia que le permiten al hongo sobrevivir en condiciones adversas, son fundamentales en su reproducción y producción del cuerpo fructífero (Ower, 1982; Ower *et al.*, 1986; Ower *et al.*, 1988; Stott y Mohammed, 2004), tanto en condiciones naturales como controladas (Volk y Leonard 1990; Pilz *et al.*, 2007). En otras palabras, la producción de esclerocios ha sido establecida como uno de los principios para la domesticación de este hongo (Stott y Mohammed, 2004).

El método más conocido para la obtención de esclerocios es el descrito por Ower *et al.* (1986) quienes usaron el método del frasco, que consiste en llenar la mitad de un frasco con grano de trigo como sustrato, cubierto con una capa de aluminio perforada (que servirá como barrera física) y el remanente es llenado con una capa

de suelo dividida en una zona nutritiva y otra no nutritiva (medio pobre-rico). En los años 1989 y 1990, Volk y Leonard realizaron modificaciones a este método, obteniendo esclerocios en un lapso promedio de cuatro semanas. De igual manera, Amir *et al.* (1993) obtuvieron dichas estructuras en medios de cultivo y Buscot (1993) reportó dos tipos de éstos: los de crecimiento lateral, producidos por la interrupción del crecimiento micelial por las paredes de vidrio de las cajas Petri y los de crecimiento terminal, producidos por envejecimiento del medio de cultivo. También se ha descrito su formación en medios de cultivo (Philippoussis y Balis 1995; Faris, 1996), y su función de almacenaje de nutrientes (Buscot 1989; Buscot y Bernillon, 1991), coincidiendo estos trabajos en que la producción en masa de los esclerocios puede servir como “semilla” en los experimentos de domesticación (Singh *et al.*, 1999).

Ower *et al.* (1986) y Buscot (1993) indican que se requiere de una barrera física, una zona no nutricional (medio pobre-rico) o condiciones adversas, para que el micelio detenga su crecimiento y se diferencie en estructuras compactas que irán madurando hasta formar esclerocios. No obstante, ensayos recientes en medios de cultivo indican que el efecto barrera y el medio pobre-rico, no son necesariamente los promotores de la diferenciación del micelio y que ésta ocurre posiblemente por efecto de los elementos nutritivos u otras sustancias contenidas en el sustrato donde crece (Alvarado *et al.*, 2008).

En síntesis, la producción de *Morchella* depende de la formación de esclerocios. Sin embargo, su obtención sigue siendo uno de los problemas científicos y tecnológicos

que requieren ser superados para su domesticación y producción intensiva en condiciones controladas (Stott y Mohammed, 2004). Por lo cual, el objetivo de este trabajo fue evaluar de entre cuatro granos de diversas gramíneas, cuál es el más adecuado para el crecimiento micelial de *Morchella*, y determinar el efecto de la suplementación de nutrimentos a dichos granos en la producción de esclerocios, a través de modificaciones al método de frasco propuesto por Ower (1986).

Se realizaron dos experimentos, el primero para evaluar el crecimiento micelial de las cepas en diversos granos bajo el supuesto de que existen granos alternos al trigo (usado convencionalmente) que responden mejor para la producción de esclerocios, y que un mayor desarrollo micelial provee una mayor formación de esclerocios, y de esta forma determinar el grano más apropiado para su producción. En el segundo experimento, se evaluó la suplementación del grano, a través de modificaciones al método de Ower *et al.*, (1986), bajo el supuesto de que la adición de nutrimentos al grano tendrá efectos positivos en la producción de esclerocios, y que no son necesarias condiciones adversas (medio pobre-rico) para la obtención de estas estructuras.

3.2. Materiales y métodos

Material biológico

Las cepas de *Morchella* utilizadas fueron las siguientes: CP509, CP507, CP508, CP499 y CP506. La primera (*M. esculenta*) se importó de los Estados Unidos y las cuatro restantes (*M. conica*) fueron colectadas en el Estado de México en un bosque de pino (LN 19° 18' 08.73", LW100° 01' 46.30"). Estas cepas fueron identificadas a

través de un análisis de amplificación de genes de la región ITS (*Internal Transcript Spacer*) del ADN ribosomal (Ver Anexo D) y se encuentran resguardadas en el Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles y Medicinales (CREGENHC), del Colegio de Postgraduados (COLPOS, *Campus Puebla*) y en el Cepario del INECOL bajo las siguientes equivalencias: CP509=IE-750, CP507=IE-815, CP508=IE-817, CP499=IE-816 y CP506=IE-814. Todas ellas bajo condiciones de crioconservación.

Medio de cultivo

Las cepas se sembraron en medio de cultivo con extracto de compost, el cual se obtuvo de compost para champiñón de la planta productora Riojal (Las Vigas, Veracruz, México), colocando 1,2 kg en 4 l de agua destilada e hirviendo la mezcla a fuego lento durante 15 min con agitación constante, en una proporción de 800 ml, además de 20 g de malta (Bioxon[®]) + 20 g de agar (Bioxon[®]), que fueron aforados a un litro. El medio de cultivo se esterilizó bajo condiciones convencionales, se inoculó con cada cepa y se incubaron a 26 °C en oscuridad. Estos produjeron esclerocios *in vitro* en un lapso de tres semanas.

Tratamientos y diseño experimental

El primer experimento consistió en evaluar el crecimiento micelial de cinco cepas de *Morchella* (CP509, CP507, CP508, CP499 y CP506) en cuatro tipos de grano (maíz, avena, trigo y centeno), para determinar el grano más apropiado para la producción de esclerocios. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 10 repeticiones por tratamiento. El testigo fue el trigo, ya que se utiliza comúnmente en la producción de esclerocios de *Morchella* y otros hongos. Los diversos granos se

remojaron hasta obtener un porcentaje de humedad del 60% y posteriormente fueron esterilizados durante 30 minutos a 120 °C a 15 lb de presión. Se introdujeron 10 g de grano por caja Petri y se colocó un implante circular de 0.5 mm de diámetro por cada cepa, incubando a 27 °C en condiciones de oscuridad, durante nueve días. Se determinó el crecimiento micelial (cm²) trazando la superficie de crecimiento cada tercer día para cada réplica. La superficie de crecimiento se determinó con el apoyo del programa Arc View GIS 3.12.

El segundo experimento, consistió en evaluar la producción de esclerocios, a través de la suplementación del grano con diferentes compuestos, utilizando modificaciones al método del frasco de Ower *et al.* (1986). Para ello se adicionaron al centeno (grano que mostró los mejores resultados en comparación con el trigo, empleado usualmente en este método) diferentes elementos que teóricamente apoyan el crecimiento de *Morchella*, como son: estiércol (Volk y Leonard ,1990), compost (Staments, 1993; Faris *et al.*, 1996; Alvarado *et al.*, 2008), cenizas (Pilz *et al.*, 2007) y micronutrientes (Alvarado *et al.*, 2008), descritos en el Cuadro 3.1.

Cuadro 3.1. Tratamientos evaluados en la producción de esclerocios de *Morchella*

Tratamiento	Características
CEMC	90 g centeno + 10 g estiércol de caballo +1 g micronutrientes +10 g compost +0.2 g CaCo ₃
CAMC	80 g centeno +10 g arena +1 g micronutrientes +4.5 g cenizas
CCY	100 g centeno +10 g compost +1 g yeso
TC	100 g centeno

Los tratamientos se realizaron con y sin una barrera física (hoja de aluminio perforada) para determinar la influencia del efecto barrera en la formación de esclerocios. La modificación en este caso fue el empleo de bolsas de polipropileno que fueron colocadas en contenedores plásticos transparentes (250 ml) para que tomaran una forma cilíndrica (en lugar de frascos), donde se agregó una capa de 100 g de suelo (pH 6.5 y 21% de humedad), esterilizado durante 30 minutos bajo las condiciones convencionales; sin una división que lo diferenciara en un medio pobre-rico. El testigo utilizado fue grano de centeno sin suplementación (TC). Los tratamientos se dispusieron en un diseño experimental completamente al azar con 10 repeticiones y se incubaron en condiciones de obscuridad a 26 °C, durante cuatro semanas.

La variable registrada fue peso fresco de los esclerocios, los cuales fueron cosechados uno por uno, retirando residuos de suelo con un pincel de cerdas suaves. Además, se calculó la eficiencia productiva (EP) para cada tratamiento, dividiendo el peso fresco de los esclerocios de cada muestra entre el peso seco del sustrato (34.5 g) y multiplicado por 100 (Chang y Miles, 1989; Volk y Leonard, 1989). Este es un método de campo, comúnmente usado en la industria de hongos comestibles.

Los análisis estadísticos realizados fueron análisis de varianza y pruebas de comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$), utilizando el programa STATISTICA® (2000), para determinar la respuesta de cada una de las variables en forma particular, así como sus diferentes interacciones.

3.3. Resultados

A continuación se exponen los resultados para cada experimento y en función de las variables registradas.

Crecimiento micelial

En el primer experimento, el crecimiento micelial en los diferentes tipos de grano mostró diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $P < 0.05$), siendo el centeno (28.6 cm^2) el de mayor crecimiento de todas las cepas analizadas, seguido de la avena (15.2 cm^2), trigo (6.5 cm^2) y maíz (4.5 cm^2). Por ello, se eligió el grano de centeno para el segundo experimento (evaluación de la suplementación de grano). Así mismo, la cepa con mayor respuesta entre tratamientos (Tukey, $P < 0.05$), fue la CP508 (17.90 cm^2) con respecto a las demás (CP507, 16.44 cm^2 ; CP499, 14.95 cm^2 ; CP506, 10.75 cm^2 y CP509, 8.45 cm^2).

En cuanto a la interacción entre granos y cepas se observaron diferentes grupos estadísticos (Tukey, $P < 0.05$). El mayor crecimiento se presentó en los tratamientos en centeno y los más bajos en maíz, independientemente de la cepa. La cepa con mayor crecimiento fue la CP508 en todos los tipos de grano. Aunque el resto de las cepas tuvo diferente crecimiento, éste varió según el tipo de grano. Sin embargo, las cepas CP509, CP499 y CP506 mostraron de manera generalizada un menor crecimiento (Figura 3.1).

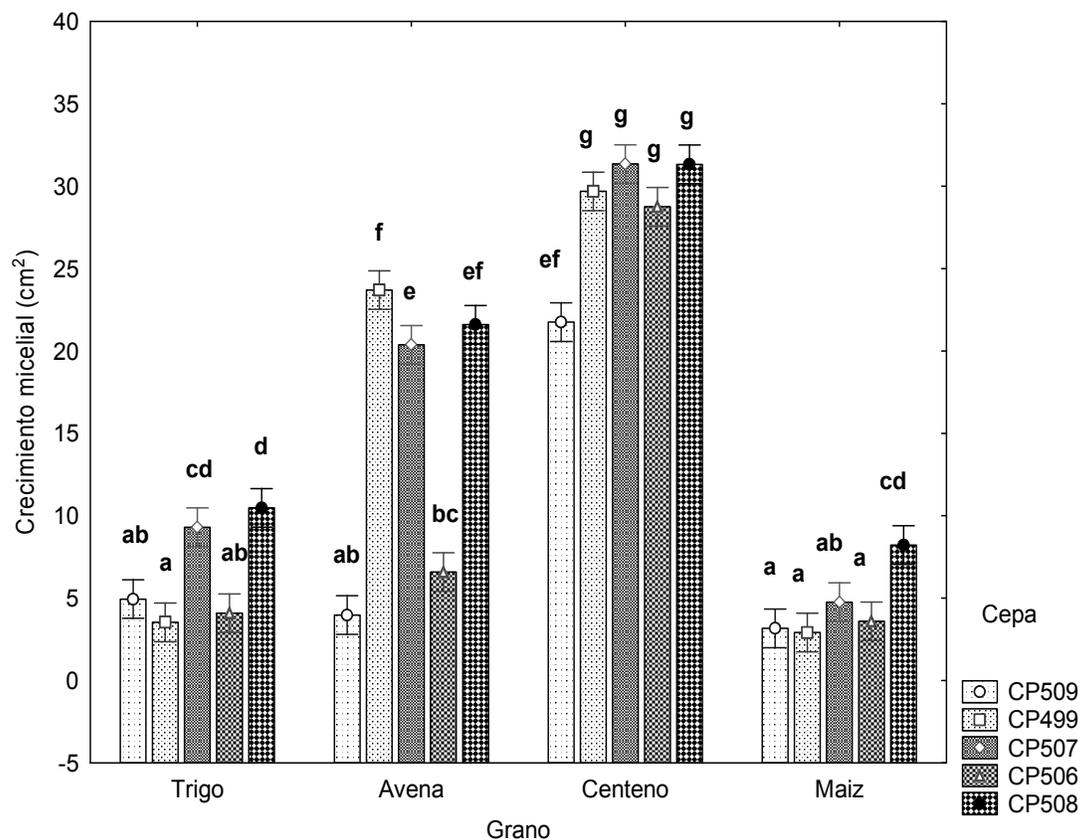


Figura 3.1. Crecimiento micelial en diferentes tipos de grano en las cinco cepas estudiadas. Tratamientos con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey, $P < 0.05$).

Producción de esclerocios

El segundo experimento mostró diferencias significativas (Tukey, $P < 0.05$) para el efecto de la suplementación entre tratamientos, efecto barrera y cepas. El tratamiento con el valor más alto fue el CCY (10.93 g), respecto a los otros (CAMC=5.97 g; CEMC=4.55 g; y TC=3.06 g). Los tratamientos sin barrera (7.91 g) presentaron mayor producción de esclerocios que los que tuvieron barrera (5.35 g) (Figura 3.2) y la mejor cepa para la producción de estas estructuras fue la CP506 (8.47 g), seguida de un segundo grupo estadísticamente similar que incluye las

cepas CP507 (5.82 g); CP499 (7.21 g) y CP508 (8.30 g), siendo la cepa CP509 (4.90 g) la que presentó el más bajo rendimiento.

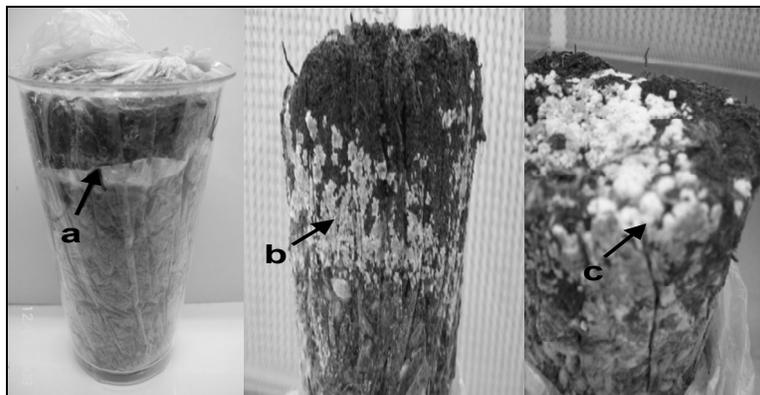


Figura 3.2. Producción de esclerocios a través de modificaciones al método del frasco de Ower *et al.* (1986); **(a)** Barrera física (hoja de aluminio perforada) separando el grano de la capa de suelo; **(b)** Esclerocios creciendo a través de la interfase del suelo en tratamientos sin barrera, obtenidos a la tercera semana de incubación; **(c)** Esclerocios a 28 días después de la inoculación.

La interacción entre tratamientos y el efecto barrera mostró diferencias significativas (Tukey, $P < 0.05$) siendo el mejor el CCY tanto sin (13.05 g) como con barrera (8.85 g), contrariamente el tratamiento con menor producción de esclerocios fue el TC, que representa el testigo del experimento (Figura 3.3).

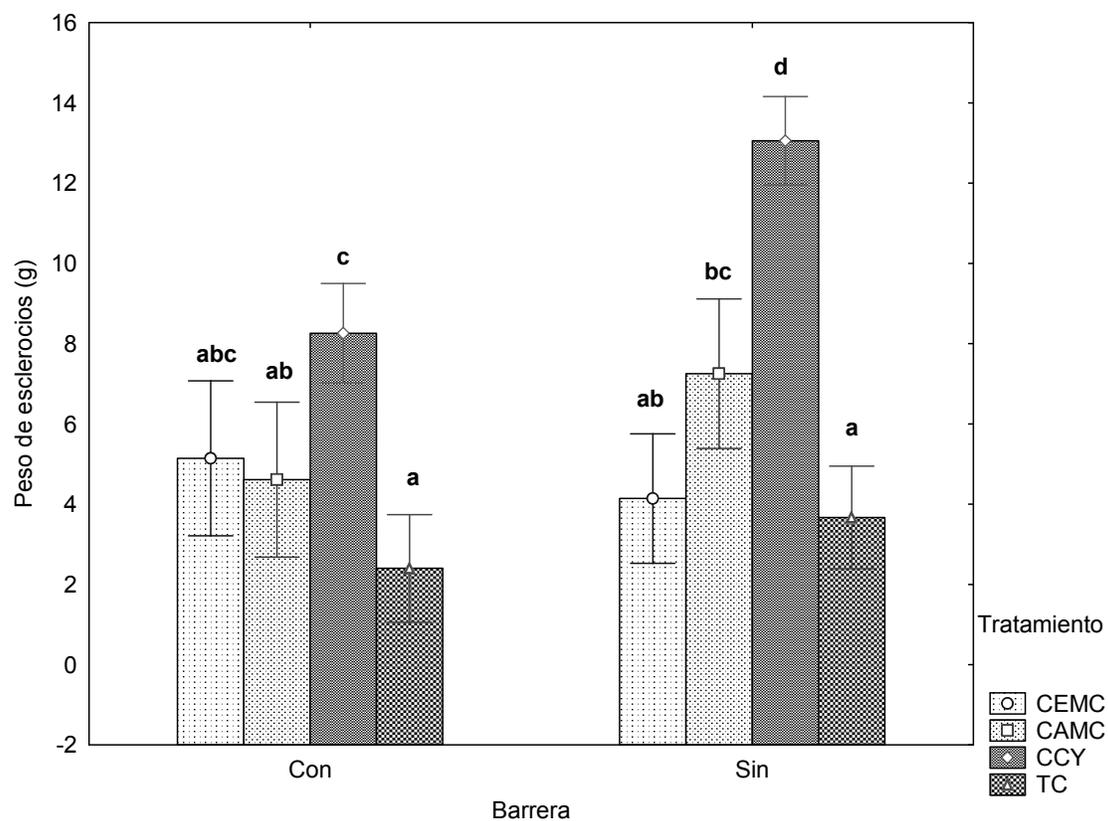


Figura 3.3. Producción de esclerocios en diferentes tratamientos con y sin una barrera física. Tratamientos con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey, $P < 0.05$).

La interacción entre cepas y el efecto barrera arrojó diferencias estadísticas (Tukey, $P < 0.05$) y evidenció tratamientos estadísticamente similares, encontrándose una mayor respuesta de todas las cepas en los tratamientos sin barrera (Figura 3.4), siendo la CP506 (10.95 g) sin barrera la que presentó una mayor producción de esclerocios.

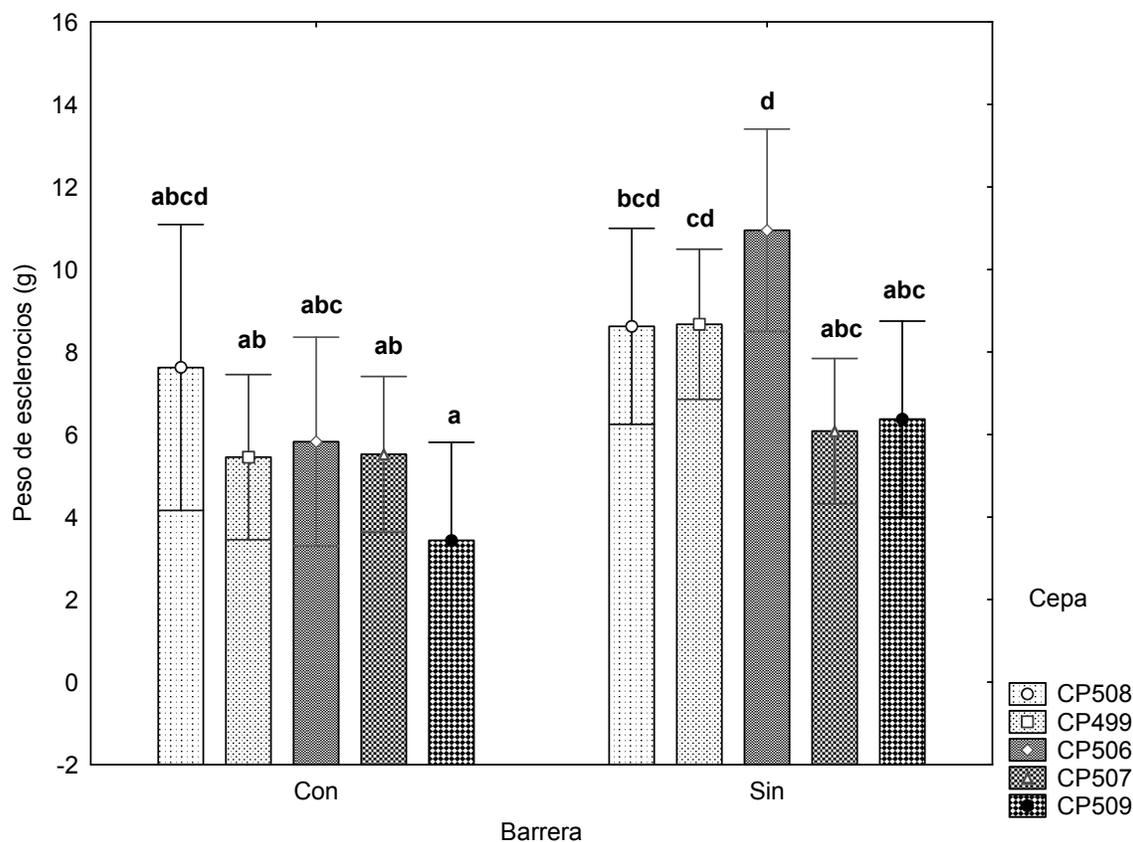


Figura 3.4. Producción de esclerocios en diferentes cepas con y sin una barrera física. Tratamientos con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey, $P < 0.05$).

Se encontró que la producción de esclerocios está relacionada con la interacción tratamientos y cepas (Figura 3.5). Ejemplo de ello es que los tratamientos CEMC y CAMC, no produjeron esclerocios para las cepas CP506 y CP509. Se encontró que el mejor tratamiento fue CCY (100 g centeno +10 g compost +1 g yeso) y que éste presentó la mayor producción de esclerocios para todas las cepas.

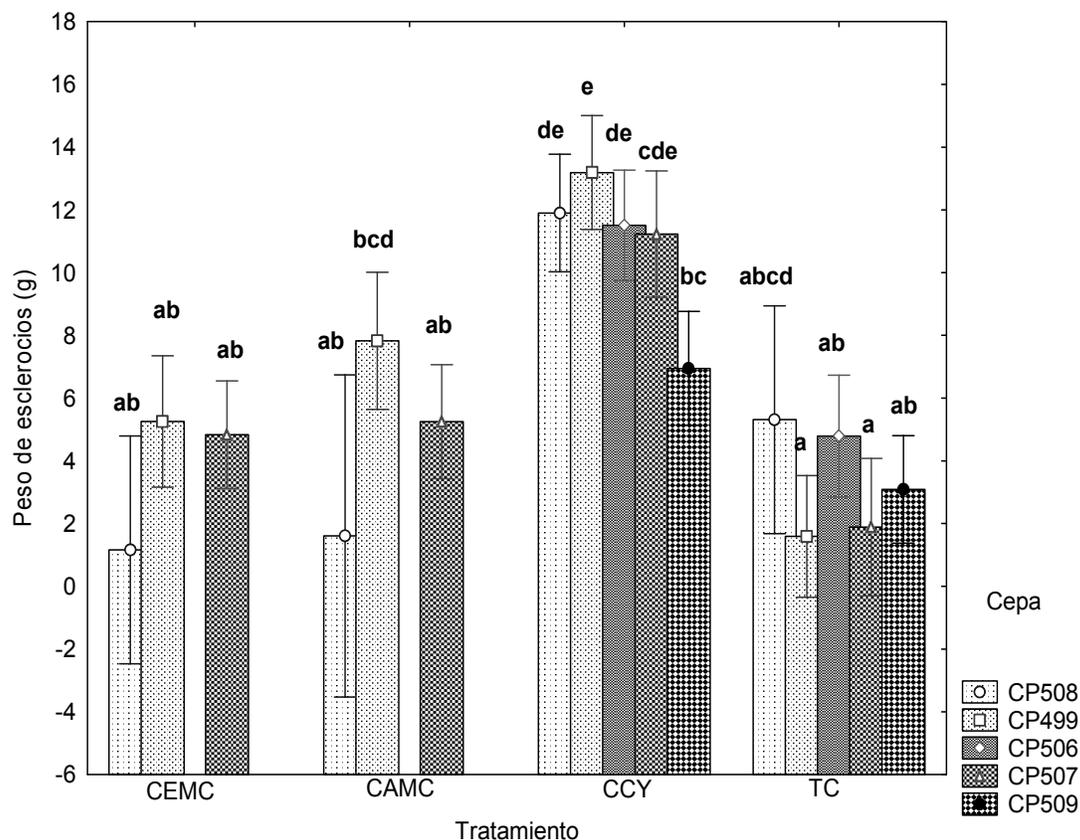


Figura 3.5. Producción de esclerocios en diferentes tratamientos con diferentes cepas. Tratamientos con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey, $P < 0.05$).

Eficiencia productiva (EP)

Se encontró que el tratamiento que presentó la mayor EP fue el CCY (31.70%) seguido del CAMC (17.32%), CEMC (13.19%) y TC (8.88%), respectivamente. En cuanto al efecto barrera, la EP fue mayor para los tratamientos sin barrera (22.93%) respecto a los que sí la presentaban (15.50%). En cuanto a las cepas estudiadas, hubo grupos estadísticamente diferentes. El de mayor EP estuvo formado por las cepas CP506 (24.56%), CP508 (24.07%) y CP499 (20.92%) y el de menor EP por las cepas CP507 (16.87%) y CP509 (14.21%). Finalmente las interacciones (Cuadro 3.2.), muestran que el tratamiento CCY con y sin barrera tuvo la mayor eficiencia,

produciendo los esclerocios de mayor tamaño y peso (Figura 3.6). En cambio, el tratamiento TC presentó los resultados más bajos. Respecto a la interacción entre cepas y barrera se encontró que la mayor EP correspondió a CP506 sin barrera y la menor a CP509 con barrera.

Cuadro 3.2. Prueba de medias de la eficiencia productiva de los esclerocios de *Morchella*

Tratamiento	Barrera	Peso fresco promedio de esclerocios (g)*	Eficiencia productiva (%)
CCY	Sin	13.06	37.8
	Con	8.26	23.9
CAMC	Sin	7.25	21.0
	Con	4.61	13.4
CEMC	Sin	4.14	12.0
	Con	5.14	14.9
TC	Sin	3.67	10.6
	Con	2.40	7.0
Cepa			
CP508	Sin	8.62	25.3
	Con	7.62	22.4
CP499	Sin	8.67	25.5
	Con	5.45	16.0
CP506	Sin	10.95	32.2
	Con	5.83	17.1
CP507	Sin	6.08	17.9
	Con	5.52	16.2
CP509	Sin	6.37	18.7
	Con	3.43	10.1

*Cada valor es el promedio de 10 réplicas. Valores con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey, $P < 0.05$).

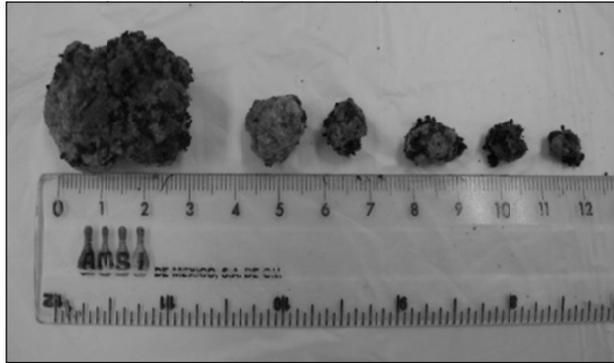


Figura 3.6. Esclerocios obtenidos a los 28 días después de la inoculación en tratamiento CCY

3.4. Discusión

La importancia de los esclerocios está descrita en el ciclo de vida de *Morchella*, pues estas estructuras son un paso obligado para su fructificación (Volk y Leonard, 1990). En condiciones naturales permiten al hongo sobrevivir en situaciones adversas como la pobre nutrición, escasez de humedad, temperaturas extremas (Volk y Leonard, 1990), lluvias intensas, inviernos prolongados (Ower, 1982) e inundaciones y nevadas (Stamets, 1993). Así mismo, posibilitan la asociación con raíces secundarias de arbustos y hierbas como respuesta a desastres naturales (principalmente incendios) (Pilz *et al.*, 2007).

La producción de esclerocios ha sido aprovechada para obtener cuerpos fructíferos bajo condiciones controladas de cultivo (Ower, 1982, Volk y Leonard 1990; Pilz *et al.*, 2007), por lo que diversos autores coinciden en que la obtención de los

esclerocios, es uno de los aspectos necesarios para lograr su domesticación y producción comercial, (Ower, 1982, Volk y Leonard 1990; Stott y Mohammed, 2004).

A pesar de las aplicaciones científicas y comerciales que representa el conocimiento preciso del ciclo de vida de *Morchella*, sólo ha sido descrito en forma general (Volk y Leonard, 1990), por lo que no indica diferencia entre especies y no distingue entre condiciones naturales o artificiales. Además, existe confusión entre los diferentes grupos taxonómicos de este hongo (Pilz *et al.*, 2007; Masaphy, 2010), así como en sus interacciones ecológicas (saprofitos, micorrízicos o facultativos) (Dahlstrom *et al.*, 2000),

Para la producción de esclerocios de *Morchella* se han utilizado diversos granos. Sin embargo, no se ha determinado claramente cuál es el más adecuado, a pesar de ser un factor importante en la producción de esclerocios. En este sentido, el grano debe ser manejable, disponible, barato y efectivo para su utilización a gran escala (Volk y Leonard, 1989). El más usado a la fecha es el trigo (Ower, 1982, Ower *et al.*, 1986, Singh *et al.*, 1999); también se han hecho ensayos con granos de maíz y avena (Papinutti y Lechner, 2008) sin resultados sobresalientes. En la presente investigación, se encontró que el centeno fue la mejor opción, lo cual coincide con los resultados de Volk y Leonard (1989), pues además de las características mencionadas, conservó su estructura, no presentó contaminación y permitió un crecimiento acelerado de todas las cepas estudiadas.

En cuanto al crecimiento micelial la cepa CP508 (17.90 cm²) tuvo estadísticamente el mayor desarrollo, en consecuencia se esperaba que tuviera la mayor producción de esclerocios. Sin embargo, resultó una de las cepas menos productivas (8.30 g), cuando se esperarían que hubiera una relación directa entre el crecimiento micelial y la producción de esclerocios, sin embargo, esto no se encuentra reportado en la literatura. Asimismo, la cepa que produjo la mayor cantidad de esclerocios (CP506) tuvo un bajo desempeño en cuanto a su crecimiento micelial. Esto sugiere que el desarrollo micelial no necesariamente está relacionado con la producción de esclerocios, y que la producción de estas estructuras depende de diferentes condiciones e interacciones. En cuanto a las especies estudiadas, *M. esculenta* (CP509) tuvo el desempeño más bajo en todas las evaluaciones, en comparación con *M. conica* que expresó mayor potencial en estos experimentos, especialmente las cepas CP506 y CP508.

Respecto a las modificaciones realizadas al método del frasco de Ower *et al.*, (1986), se encontró que el uso de bolsas de polietileno es una opción factible en la producción de esclerocios, coincidiendo con Singh *et al.* (1999). El empleo de dichos contenedores fue más sencillo y a un precio más accesible. Este material no tuvo ningún efecto negativo sobre la producción de las cepas estudiadas, a diferencia de lo encontrado por Volk y Leonard (1989) y Buscot (1993) que indican que no se formaron esclerocios en bolsas de polietileno, en comparación con los frascos de vidrio. Los mismos autores sugieren que las paredes de los frascos contribuyen a la formación de esclerocios, lo cual es poco probable, y no se han realizado experimentos que demuestren lo contrario, además de que muy probablemente,

materiales inertes como el vidrio no pueden tener algún efecto sobre la producción de esclerocios.

El suelo se utilizó como una capa única y homogénea y no como sustrato pobre–rico como lo indica Ower *et al.* (1986, 1988), lo cual facilitó su manejo en laboratorio, encontrándose que no es necesario diferenciarlo en un medio pobre–rico (dividido en diferentes capas) para la formación y producción de esclerocios. Este trabajo evidenció que las modificaciones propuestas al método de Ower *et al.* (1986) facilitan las operaciones y manejo en laboratorio.

En cuanto a la producción de esclerocios, los resultados indican que la suplementación del grano (en este caso de centeno) con diferentes elementos nutritivos, ayudó a que se formen dichas estructuras en todas las cepas estudiadas. Este principio coincide con los trabajos de Volk y Leonard (1989), quienes suplementaron con diferentes elementos como peptona, extracto de malta y elementos traza como fuente nutrimental, encontrando una respuesta positiva.

Bajo las condiciones del presente experimento, se obtuvieron buenos resultados con el tratamiento CCY, cuyo componente principal es la compost, que es un producto barato y fácil de conseguir. Además de que posiblemente contenga elementos nutritivos y promotores del crecimiento que contribuyen a inducir la formación de esclerocios sin la necesidad de un efecto barrera o condiciones adversas exógenas (Alvarado *et al.*, 2008). Dichas características podrían promover su uso a mayor

escala, dada su accesibilidad en comparación con los nutrientes puros que son utilizados generalmente en medios de cultivo *in vitro*.

Los tratamientos sin barrera son los que tuvieron la mayor producción de esclerocios, tanto para tratamientos como para cepas estudiadas. Este resultado difiere de investigaciones previas, donde se indica que la barrera física y un medio pobre-rico son necesarios para inducir la formación de esclerocios, (Buscot, 1993; Ower *et al.*, 1986; Volk y Leonard, 1989 y 1990). Es posible que sean otros los factores que promueven la formación de esclerocios como las condiciones nutrimentales, niveles de pH, agotamiento de oxígeno u otros compuestos contenidos en el sustrato.

En este sentido, Buscot (1993) encuentra que la producción de esclerocios ocurre en medios de cultivo cuando el crecimiento micelial es interrumpido físicamente por el borde de la caja Petri o por las paredes de vidrio de un frasco (Volk y Leonard 1989, 1990). Un efecto similar podría haber sucedido entre la interfase del grano suplementado y el suelo, lo que provocó la diferenciación del micelio en esclerocios, sin que necesariamente esto represente una condición adversa, aunque también pudo deberse a otros factores, como las condiciones nutrimentales u otros compuestos contenidos en el grano suplementado.

En otras especies como *Sclerotia rofsii* Sacc, los esclerocios también pueden ser inducidos artificialmente mediante estrés oxidativo, a través de la adición de peróxido de hidrógeno al medio de cultivo (Hadar *et al.*, 1981), por medio de

altastemperaturas (Georgiou *et al.*, 2006), daño mecánico al micelio (Carrol, 1991; Hadar *et al.*, 1981), así como factores nutricionales que llevan al micelio a la agregación celular y formación de esclerocios. Cada uno de estos agentes o sus combinaciones podrían de alguna forma explicar la biogénesis de los esclerocios (Georgiou *et al.*, 2006). Por lo que las cepas de *Morchella* pudieron producir los esclerocios simplemente en respuesta a alguna condición adversa.

Cabe destacar que las anteriores condiciones, no son las únicas que pueden dar lugar a la formación de esclerocios, pues en la naturaleza estos aparecen como resultado de la estimulación por fenómenos como incendios, disrupción del suelo, (Vogel, 1988; Stamets, 1993), lluvias intensas o inviernos prolongados (Ower, 1982). Por lo que la producción de esclerocios también se relaciona con las habilidades de reproducción de los hongos ante condiciones naturales adversas, lo cual ha sido identificado tanto en Ascomicetos como Basidiomicetos (Georgiou *et al.*, 2006).

Lo anterior hace suponer que la barrera como condición adversa, no es necesariamente precursora en la formación de esclerocios ya que se obtuvieron esclerocios en las cinco cepas estudiadas. Además que las modificaciones propuestas y descritas pueden proporcionar una producción de esclerocios en tiempos relativamente cortos a un bajo costo de operación, pues la aparición y crecimiento de los esclerocios tomó un lapso de 21 a 28 días después de la inoculación, lo cual coincide con lo descrito por Volk y Leonard (1989). Este tiempo fue mucho más corto que el reportado por otros estudios donde se requirieron hasta 70 días para la obtención de esclerocios (Singh *et al.*, 1999). Finalmente, los

resultados en la eficiencia productiva coinciden con los obtenidos para la producción de esclerocios y la mayor EP se encontró en los tratamientos sin barrera. Así mismo, *M. conica* tuvo una mayor producción de esclerocios en comparación con *M. esculenta*.

Las modificaciones realizadas para la obtención de esclerocios abren la posibilidad de dar cumplimiento a la primera condición para la domesticación de *Morchella*, ya sea bajo condiciones controladas o para su introducción en hábitat naturales. Esto último como una estrategia de conservación y repoblamiento en ambientes naturales. Las investigaciones futuras deben proveer el conocimiento necesario para un desarrollo tecnológico, a través de métodos económicos y efectivos para la producción de *Morchella*, tal como ha sucedido con otras especies de hongos comestibles. Sin embargo, son necesarias otras investigaciones que permitan esclarecer las dudas en la morfogénesis de los esclerocios y su papel en el ciclo de vida de las diferentes especies de *Morchella*, ya que para entender la dinámica de reproducción de dichos hongos es necesario comprender sus adaptaciones, ciclo de vida, modos de nutrición y estrategias reproductivas. En el futuro dichos aspectos pueden ser líneas de investigación potenciales para la producción de estos hongos de manera práctica y a gran escala.

3.5. Conclusiones

El crecimiento micelial no está directamente relacionado con la producción de esclerocios. El efecto de la suplementación de grano apoya la formación de esclerocios, tanto con barrera como sin ella, lo cual abre un abanico de posibilidades

para futuros experimentos para la producción de esclerocios de este hongo bajo condiciones controladas.

3.6. Literatura citada

- Alvarado-Castillo G, Mata G, Martínez-Carrera D, Nava ME, Platas DE (2008) Obtención de esclerocios de *Morchella esculenta* en diferentes medios de cultivo. *Interciencia* 33(7): 528-531.
- 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. 14 p.
- Buscot F (1989) Field observations on growth and development of *Morchella rotunda* and *Mitrophora semilibera* in relation to forest soil temperature. *Canadian Journal of Botany* 67: 589-593.
- Buscot F (1993) Mycelial differentiation of *Morchella esculenta* in pure culture *Mycological Research* 97: 136-140.
- Buscot F, Bernillon J (1991) Mycosporins and related compounds in field and cultured mycelial structures of *Morchella esculenta*. *Mycological Research* 95: 752-754.
- Chang ST, Miles PG (1989) Edible mushrooms and their cultivation. CRC Press Inc, Boca Raton, Fla USA. 345 p.
- Danell E, Camacho FJ (1997) Successful cultivation of the golden chanterelle. *Nature* 385: 303.
- 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 Production*. Penn. State University, USA. pp 393-399.
- Iwase K (1997) Cultivation of mycorrhizal mushroom. *Food Rev. Int.* 13: 431-442.
- 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.
- Papinutti L, Lechner B (2008) Influence of the carbon source on the growth and lignocellulolytic enzyme production by *Morchella esculenta* strains. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 35: 1715–1721.
- Philippoussis A, Balis C (1995) Studies on the morphogenesis of sclerotia and subterranean mycelial network of ascocarp in *Morchella* species. Mushroom Science 14: 47-855.
- Pilz D, McLain R, Alexander S, Villarreal-Ruiz L, Berch S, Wurtz T, Parks C, McFarlane E, Baker B, Molina R, Smith JE (2007) Ecology and management of morels harvested from the forests of western North America. Gen. Tech. Rep. PNW-GTR-710. Portland, OR: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station. 161 p.
- Singh SK, Dhar BL, Verma RN (1999) Mass production of carpogenic sclerotial spawn in *Morchella esculenta*- An attempt at its domestication *In*: The 3rd International Conference - World Society of Mushroom Biology and Mushroom Products. Penn. State University, USA. pp 1-11.
- Stamets P (1993) Growing Gourmet and Medicinal Mushroom Third edition pp 401-418.
- Stott K, Mohammed C (2004) Specialty mushroom production systems: maitake and morels. (Project No UT-30All) Rural Industries Research and Development Corporation. Australia. 86 p.
- Volk TJ, Leonard TJ (1989) 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.

CAPÍTULO IV FORMACIÓN DE ESCLEROCIOS DE *Morchella esculenta* Y

*Morchella conica in vitro*³

Gerardo Alvarado-Castillo, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2011

Las morillas (*Morchella* spp.) son hongos con un alto valor gastronómico y de mercado, que aún presentan problemas técnicos para cultivarse. Estos producen estructuras de resistencia conocidas como esclerocios, los cuales tienen una función central en su ciclo de vida y en la producción de cuerpos fructíferos, siendo punto clave para su domesticación. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue identificar las etapas y procesos de formación de esclerocios *in vitro*. Se utilizaron las cepas CP-509 (*M. esculenta*) y CP-499 (*M. conica*), que se inocularon a un medio de cultivo suplementado con compost. Se observó la morfogénesis de los esclerocios mediante un microscopio óptico y se identificaron siete etapas, siendo: 1. Crecimiento de hifas principales, 2. Crecimiento y ramificación de hifas secundarias, 3. Entrelazamiento de hifas secundarias, 4. Formación de masas compactas, 5. Crecimiento de masas compactas, 6. Formación de esclerocios y 7. Crecimiento y maduración de esclerocios. Se observó la formación de clamidosporas durante la formación de esclerocios, lo que sugiere que *Morchella* presenta diversas estrategias de reproducción y supervivencia ante diferentes condiciones ambientales. Se concluye que la formación de estas estructuras se origina por procesos reiterativos de crecimiento y entrelazamiento de las hifas principales.

Palabras clave: clamidosporas; conidios; estrategias; micelio; morilla

³ Enviado a la Revista Mexicana de Micología (en revisión).

SCLEROTIA FORMATION IN *Morchella esculenta* (L. Fr.) Pers. AND

Morchella conica Pers. Ex Fr. *in vitro*

Gerardo Alvarado-Castillo, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2011

Morels (*Morchella* spp) are fungi with a high gastronomical and market value, which still have difficulty to cultivate. These produce structures of resistance known like sclerotia, which have a central roll in their life cycle and production of fruiting bodies, being a key point for his domestication. The aim of this work was to identify the stages and processes of formation of these structures. The strains CP-509 (*M. esculenta*) and CP-499 (*M. conica*) were used and cultivated in the culture media supplemented with compost. During the formation of sclerotia seven stages were identified: 1. Hyphal growth, 2. Growth and branching primary mycelia, 3. Secondary mycelia interweaving, 4. Formation of compact masses, 5. Growth of compact masses, 6. Formation of sclerotia, and 7. Growth and maturation of sclerotia. The formation of chlamydospores and conidia was observed during the formation of sclerotia, which suggests that *Morchella* displays diverse strategies of reproduction and survival in different environmental conditions. It can be concluded that the formation of these structures originates by reiterative processes of growth and interweaving of mycelium.

Key words: chlamydospore, conidia, morel, mycelium, strategies

4.1. Introducción

Los esclerocios son estructuras de resistencia que forman los hongos con el fin de acumular reservas y sobrevivir a condiciones adversas, para posteriormente diferenciarse y fructificar cuando exista un entorno adecuado (Ower *et al.*, 1988; 1986; Volk y Leonard, 1990). En las especies del género *Morchella*, los esclerocios se forman a partir del micelio, cuyas hifas crecen repetidamente y se dispersan hasta formar una masa interconectada entre sí, que se conoce comúnmente como micelio primario (Ower *et al.*, 1988; 1986; Volk y Leonard, 1990), el cual es multinucleado y donde cada célula es una copia múltiple de un único núcleo haploide (homocariótico) (Pilz *et al.*, 2007). Los esclerocios también pueden ser producto del cruzamiento entre micelios distintos, a través de un proceso de anastomosis, es decir, el entrecruzamiento de hifas a manera de reproducción sexual, y a través de la unión de su contenido citoplasmático (plasmogamia), dando lugar a micelio secundario, diploide, heterocarionte y multinucleado (Volk y Leonard, 1990; Pilz *et al.*, 2007).

El micelio secundario tiene gran cantidad de núcleos (40-50) (Pilz *et al.*, 2007), incluso pueden llegar hasta 65 (Volk y Leonard, 1990); el promedio oscila de 10 a 15 núcleos, lo cual le confiere estabilidad genética, citológica y somática (Volk y Leonard, 1989a), de tal manera que al diferenciarse y fructificar, producirá progenie meiotica recombinante (ascosporas), totalmente fértil (Pilz *et al.*, 2007). Ambos micelios (primario y secundario) pasarán por una serie de ramificaciones que se irán compactando hasta formar esclerocios (Volk y Leonard, 1989a; 1990; Amir *et al.*, 1993; Buscot, 1993).

En trabajos experimentales, relacionados con la producción controlada de las especies de *Morchella*, se ha señalado que para la formación de esclerocios son necesarias condiciones adversas, por ejemplo una barrera física que interrumpa el crecimiento micelial (Ower, 1982; Buscot, 1993; Volk y Leonard, 1989a; 1990), o condiciones nutrimentales limitadas (Ower *et al.*, 1986; Amir *et al.*, 1992; Buscot, 1993). Pero también, se reporta la formación de esclerocios cuando se suplementan los medios de cultivo y sustratos con elementos nutritivos (Volk y Leonard, 1989b; Alvarado *et al.*, 2008).

La formación de esclerocios inicia con cambios metabólicos en el micelio, provocados por la translocación de compuestos de carbono a partir de una fuente de nutrientes, y probablemente ésta translocación se deba a una serie de hifas conductoras especializadas. Además la formación de esclerocios involucra factores endógenos y exógenos tales como el mantenimiento de un balance fisiológico interno y condiciones ambientales (Willetts y Bullock, 1992), que promueven la iniciación de estas estructuras multihifales.

Los esclerocios tienen la capacidad de permanecer latentes (Willetts y Bullock, 1992), funcionar como almacén de nutrientes (Amir *et al.*, 1992) y diferenciarse para producir un cuerpo fructífero cuando las condiciones ambientales sean adecuadas (Volk y Leonard, 1990; Güller *et al.*, 2005; Pilz *et al.*, 2007), permitiendo así la reproducción de *Morchella*. Aunque la biología de los esclerocios no ha sido explicada completamente (Güller *et al.*, 2005), se han descrito de manera general tres patrones de formación. 1) Disperso, el cual se forma a partir de hifas esparcidas pero interconectadas entre sí (Willetts y Bullock, 1992), 2) Terminal, que se da por la

repetida ramificación y alargamiento de las hifas principales (Volk y Leonard, 1990) y 3) Lateral, que resulta a partir de ramificaciones accesorias que se conectan entre sí (Amir *et al.*, 1993).

En otras especies como *Sclerotia roofsi* Sacc, estas estructuras también pueden ser inducidas mediante estrés oxidativo, a través de la adición de peróxido de hidrógeno al medio de cultivo (Hadar *et al.*, 1981), por medio de altas temperaturas (Georgiou, 2006), daño mecánico al micelio (Carrol, 1991; Hadar *et al.*, 1981), así como factores nutricionales que llevan al micelio a la agregación celular. Cada uno de estos agentes o sus combinaciones podrían de alguna forma explicar la biogénesis de los esclerocios (Georgiou, 2006). Dichas teorías están relacionadas con las habilidades de reproducción de los hongos ante condiciones ambientales adversas y han sido identificadas tanto en Ascomicetos como Basidiomicetos.

En este sentido, la fase de formación de esclerocios se considera fundamental, pues diversos estudios han demostrado que estas estructuras tienen un papel determinante en la obtención de fructificaciones de *Morchella*, tanto en condiciones naturales como controladas (Ower *et al.*, 1986; Masaphy, 2005; Pilz *et al.*, 2007). De tal manera que es la primera condición para su domesticación (Stott y Mohammed, 2004). Sin embargo, sigue siendo uno de los problemas científicos y tecnológicos que requieren ser superados, de ahí la importancia de conocer los aspectos que determinen la formación, crecimiento y maduración de los esclerocios (Amir *et al.*, 1992), así como clarificar su papel en el ciclo de vida de *Morchella* (Correa de Restrepo y Peñuela, 2002). En este contexto, el objetivo del presente estudio fue

obtener esclerocios mediante cultivo *in vitro* e identificar las diferentes etapas y estructuras durante su formación.

4.2. Materiales y métodos

Material biológico

El material biológico utilizado fueron las cepas CP-509 [*Morchella esculenta* (L. Fr.) Pers.] y CP-499 (*Morchella conica* Pers. Ex Fr.) resguardadas en el Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles y Medicinales (CREGENHC), del Colegio de Postgraduados (COLPOS, *Campus* Puebla) y en el cepario del INECOL como las cepas IE-750 e IE-816 respectivamente, la primera proviene de Estados Unidos, se importó de la casa comercial Fungi Perfecti^R y la segunda fue colectada en el Estado de México en un bosque de pino (LN 19° 18' 08.73", LW 100° 01' 46.30").

Medio de cultivo

El medio de cultivo se elaboró utilizando modificaciones al proceso propuesto por Mata y Rodríguez-Estrada (2005), utilizando 20 g de malta, 20 g de agar y 800 ml de extracto de compost aforados a un litro de agua destilada. El extracto se obtuvo colocando 1.2 k de compost para producción de champiñón en cuatro litros de agua destilada, hirviendo la mezcla durante 15 minutos a fuego lento y filtrándola para obtener el extracto.

El medio de cultivo se inoculó con cada cepa y se incubó en condiciones de obscuridad a 26 °C durante 3, 6, 9 y 12 días, realizando cinco repeticiones para cada

día. A cada medio de cultivo se le colocaron cuatro cubreobjetos, esterilizados a fuego directo y distribuidos de manera uniforme, con la finalidad de obtener crecimiento sobre ellos, para removerlos después de los periodos mencionados y observar el desarrollo micelial y la formación de esclerocios, examinándolos directamente en un microscopio óptico 1000X modelo K7 (Zeiss^R).

Tinción

Se realizaron tinciones con azul de lactofenol para observar las estructuras del hongo con un mayor contraste. Este colorante fue elegido debido a su capacidad para teñir materiales aniónicos, entre los cuales se encuentra el núcleo y otras estructuras internas (Correa de Restrepo y Peñuela, 2002).

4.3. Resultados

No se encontraron diferencias morfológicas entre las especies estudiadas (*M. esculenta* y *M. conica*). Las etapas identificadas en la formación de esclerocios de *Morchella* (Cuadro 4.1.) iniciaron con el crecimiento y proliferación de hifas principales (Figura 4.1a), las cuales produjeron hifas secundarias que se ramificaron (Figura 4.1b), se entrelazaron entre sí (Figura 4.1c) e integraron masas hifales, que a su vez formaron estructuras compactas (Figura 4.1d), mismas que continuaron su crecimiento (Figura 4.1e). La masa formada incrementó su tamaño hasta dar lugar a los primeros esclerocios (Figura 4.1f) que maduraron y aumentaron su tamaño, integrando células de su periferia hacia el centro (Figura 4.2a) y obteniendo durante este periodo su pigmentación característica de color ocre. En este estudio se

encontró que el patrón de formación de los esclerocios corresponde a un tipo terminal.

Las primeras tres etapas (Cuadro 4.1.) se refieren principalmente a la colonización del medio de cultivo, en las cuales las hifas crecen, ramifican y entrelazan entre sí, (Figura 4.2b) siendo evidente su condición multinucleada (15 núcleos en promedio) (Figura 4.1c), probablemente resultado de la fusión de micelio genéticamente distinto, lo que sugiere la condición heterocarionte de las cepas estudiadas (Volk y Leonard, 1990, Pilz *et al.*, 2007), aspecto importante para que los esclerocios tengan potencial para fructificar (Pilz *et al.*, 2007).

Cuadro 4.1. Etapas en la formación de esclerocios

Fase	Etapas	Descripción	Tiempo desde la inoculación (h)	Duración de cada etapa (h)
Crecimiento micelial	1	Crecimiento de hifas principales	24-72	48
	2	Crecimiento y ramificación de hifas secundarias	72-120	48
Formación de masas miceliales	3	Entrelazamiento de hifas secundarias	120-168	48
	4	Formación de masas compactas	168-216	48
	5	Crecimiento de masas compactas	216-264	48
Formación de esclerocios	6	Formación de esclerocios	264-288	24
	7	Crecimiento y maduración de esclerocios	288-336	48

A partir de la etapa cuatro, se observó la formación de estructuras especializadas que se identificaron como clamidosporas (Figura 4.1f y 4.2c), que se desarrollaron en las extremidades del micelio, como agregados de hifas vegetativas. Las

clamidosporas presentan paredes celulares gruesas y han sido descritas como estructuras de resistencia asexual, las cuales según Ower *et al.* (1988) técnicamente son una clase de conidios.

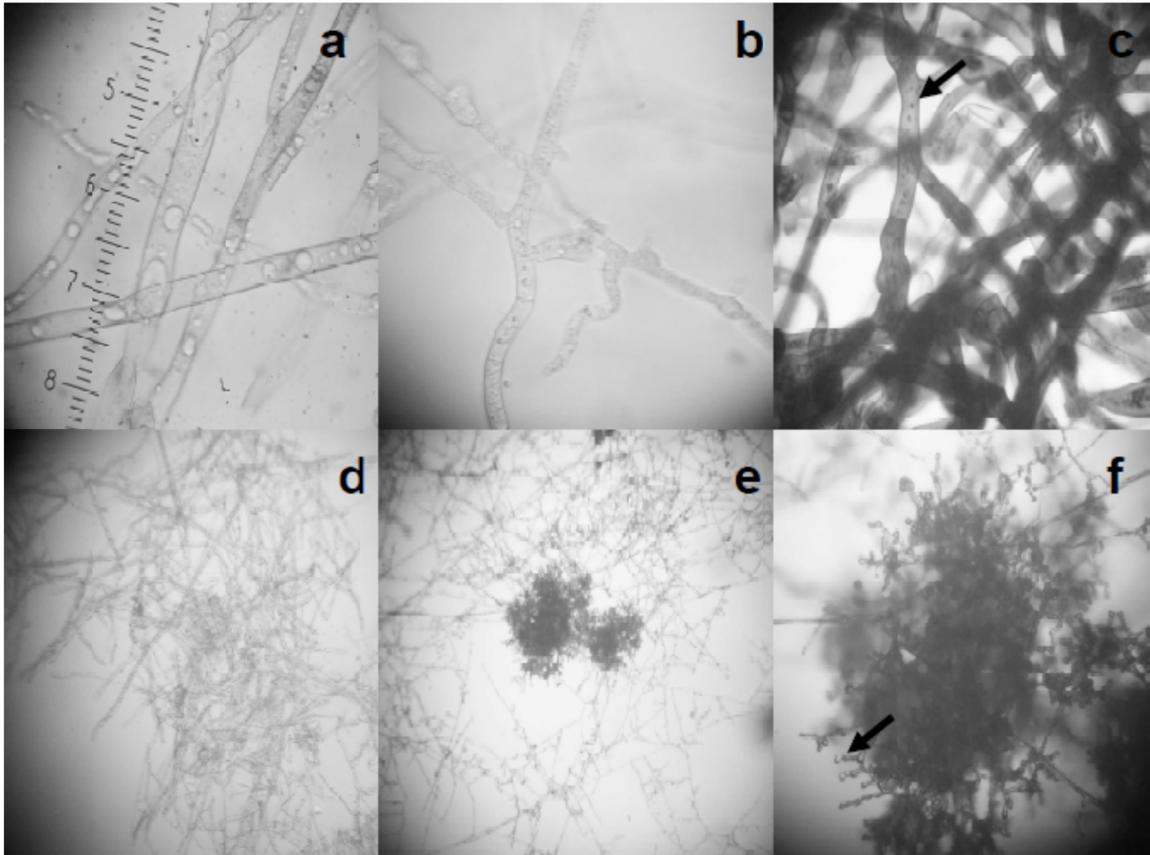


Figura 4.1. Etapas de la formación de esclerocios en *Morchella*. **a.** Crecimiento de hifas principales. **b.** Hifas secundarias ramificadas. **c.** Hifas multinucleadas entrelazadas. **d.** Inicio de la formación de masas hifales. **e.** Crecimiento de la masa hifal. **f.** Inicio de la formación de esclerocios, en donde se observan la formación de clamidosporas

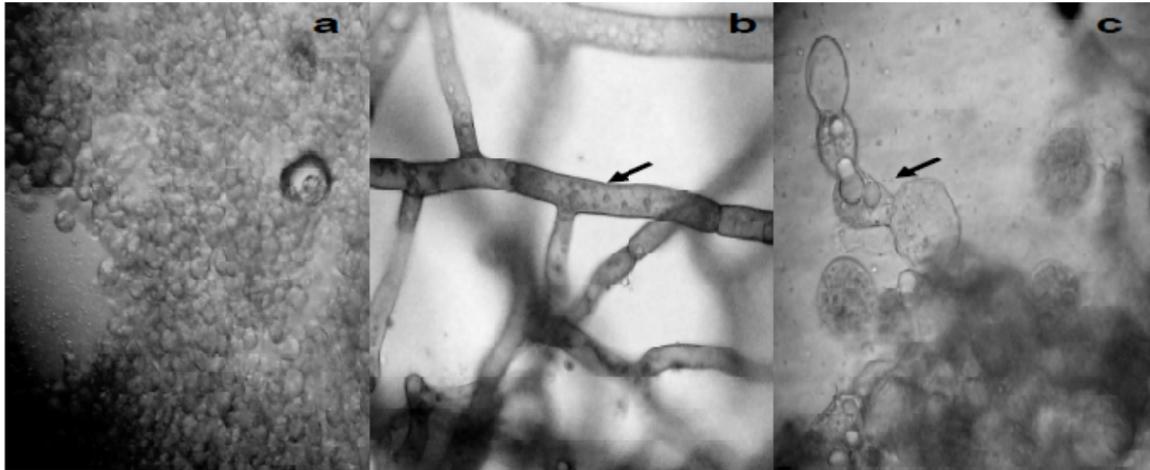


Figura 4.2. Etapas en la formación de esclerocios de *Morchella in vitro*. **a.** Integración de células de la periferia hacia el centro para la formación de esclerocios. **b.** Entrelazamiento de las hifas de *Morchella*. **c.** Clamidosporas en los esclerocios de *Morchella*.

4.4. Discusión

Las investigaciones realizadas sobre la formación de esclerocios en algunas especies de hongos, señalan que éstos pueden seguir diferentes rutas de desarrollo, pero comúnmente involucran el engrosamiento, ramificación y septación de hifas principales (Smits y Noguera, 1988) que dan lugar a los esclerocios. En este estudio se encontró cierta similitud en las etapas de formación de esclerocios descritas por Amir *et al.* (1993), quienes mencionan cinco etapas principales: 1. Crecimiento de hifas (en la cual este trabajo coincide plenamente); 2. Formación inicial (que en este estudio abarca las etapas de crecimiento, ramificación y entrelazamiento de hifas secundarias); 3. Desarrollo de esclerocios (que en este caso comprende las etapas de formación, crecimiento de masas compactas y formación de esclerocios); 4. Maduración de esclerocios (coincidente con las observaciones del presente estudio) y 5. Formación de esclerocios secundarios (que no fue observada en este trabajo, ya

que en la formación de esclerocios no existieron otras estructuras adyacentes), así mismo, el tiempo de aparición de estas estructuras (12-14 días) fue similar.

Uno de los aspectos importantes no considerados por Amir *et al.* (1993), es la ramificación y entrelazamiento de hifas, etapa que fue descrita por Volk y Leonard (1989b, 1990) y Güler y Arkan (2000), en la que reportan que la formación de esclerocios inicia de la repetida ramificación y plasmogamia de hifas (micelio secundario), característica necesaria para que los esclerocios tengan el potencial para fructificar (Pilz *et al.*, 2007).

El origen del esclerocio (ya sea que este se produzca a partir de micelio primario o secundario), tiene relación con la fructificación, pues existe la duda de que un micelio primario pueda producir esclerocios fértiles que puedan diferenciarse en un cuerpo fructífero, ya que Pilz *et al.* (2007) indican que esto no es posible, pues al tener su origen en una estructura haploide, provocaría estructuras estériles que no podrían fructificar.

En este sentido como lo indican Ower *et al.* (1986; 1988) el micelio de *Morchella* puede presentar procesos autógamos y heterógamos que consiguen derivar en la fructificación del mismo, ya que los hongos logran reproducirse sexual y asexualmente (Miles y Chang, 1997). De hecho, en basidiomicetes estos procesos han sido descritos como homotalismo primario, en el que micelio homocariótico, mediante un complejo sistema de genes que se cruzan y fusionan, producen un micelio heterocariótico fértil (heterotálico); y como heterotalismo secundario en

donde el micelio puede formar cuerpos fructíferos sin una cruza (Miles y Chang, 1997; Kües y Liu, 2000).

Así mismo, la condición multinuclear de *Morchella* (Volk y Leonard, 1990; Pilz *et al.*, 2007) puede dar lugar a estructuras genéticas estables (Volk y Leonard, 1989b), por lo cual, es posible que en la naturaleza y en condiciones controladas, la recombinación del micelio producido por cada ascospora, tenga el potencial para fructificar, sin que necesariamente tenga que haber un proceso de cruzamiento sexual como lo señalan Pilz *et al.* (2007). Lo expuesto, sugiere que los esclerocios, no importando su origen, tienen el potencial para fructificar.

En este sentido, se observó en el presente estudio, que la formación de esclerocios fue producto de un proceso de entrelazamiento de la hifas multinucleadas (probablemente heterocariontes), lo cual sería determinante en el potencial de fructificación, ya que esta característica le confiere al micelio la capacidad de adaptación a un amplio rango de condiciones ecológicas y ambientales (Volk y Leonard, 1989b; Buscot, 1992; Pilz *et al.*, 2007).

Durante la formación de masas compactas (etapa 4) se observó la formación de estructuras identificadas como clamidosporas, las cuales también han sido descritas como una clase de conidios (Ower, 1982; Ower *et al.*, 1986; 1988), que pueden ser resultado de las hifas que desarrollaron estas estructuras de manera independiente. Por tanto, es posible que el micelio haya producido tanto esclerocios como clamidosporas como un mecanismo de supervivencia, ya que ambas estructuras son capaces de producir cuerpos fructíferos. Las clamidosporas según Amir *et al.* (1993)

y Pilz *et al.* (2007) son asexuales y son el resultado de la modificación de hifas simples, las cuales representan un medio de propagación clonal.

De igual forma, Pilz *et al.* (2007), describieron que *Morchella* produce clamidosporas con el objetivo de producir esporas para su dispersión (estrategia de supervivencia), además, desempeñan un papel importante en el almacenamiento de energía (Lin y Heitman, 2005) que podría ser necesaria en la esporulación sexual bajo condiciones ambientales adversas.

La producción de clamidosporas, es una estrategia similar a la utilizada por otros hongos que producen “mildius polvosos”. En *Morchella*, a esta etapa se le ha dado el nombre de *Costantinella cristata* Matr. (Pilz *et al.*, 2007), la cuales una característica de la reproducción asexual de *Morchella*, que ha sido reportada comúnmente en su cultivo artificial, ya que en condiciones naturales es poco probable que ocurra (Stamets, 2000).

En la etapa de formación de esclerocios, se observaron estructuras uniformemente reticuladas sin presentar zonas de tejidos diferenciables, como se señala para *Sclerotinia spp.* y *Sclerotium rolfsii* Sacc. (Hadar *et al.*, 1981), ni estructuras con alguna complejidad morfológica (Smits y Noguera, 1988). Los esclerocios en su etapa madura revelaron una serie de células isodiamétricas compactas con paredes gruesas (Figura 4.2a), que indican la capacidad de tolerar condiciones adversas como baja temperatura o desecación (Amir *et al.*, 1993), lo que permite ser una estructura de resistencia capaz de fructificar cuando se presenten las condiciones adecuadas.

Aunque no se hicieron pruebas de contenido de carbohidratos, es posible que diferencias en el contenido de éstos, se encuentren relacionados con la diferenciación del micelio en esclerocios (Amir *et al.*, 1993), pues como lo sugieren Amir *et al.* (1994), un aumento en la masa del esclerocio es proporcional a la disminución en el contenido de azúcares en el micelio y el medio en el que se desarrolla: lo cual apunta a una relación fuente-demanda, donde el esclerocio actúa como almacén de la translocación de nutrientes del micelio, que sirve de fuente.

4.5. Conclusiones

En general, el desarrollo de los esclerocios, coincide con las etapas descritas en trabajos previos, sin embargo, se encontró que la formación de estas estructuras se origina por procesos reiterativos de crecimiento y entrelazamiento de las hifas principales. Además, se identificó la formación de clamidosporas, lo cual sugiere que este hongo tiene más de una estrategia de dispersión y supervivencia. Aunque existen aún dudas sobre el ciclo de vida de *Morchella*, el presente estudio permitió un mayor acercamiento y entendimiento de la formación de los esclerocios, por lo que se espera que la información generada sea de utilidad para la manipulación del hongo bajo condiciones controladas. Sin embargo, son necesarias otras investigaciones que permitan esclarecer las dudas en la morfogénesis de los esclerocios y su papel en el ciclo de vida de las especies de *Morchella*, ya que para entender la dinámica de reproducción de dichos hongos es necesario entender sus adaptaciones, ciclo de vida, modos de nutrición y estrategias reproductivas.

4.6. Literatura citada

- Amir R, Levanon D, Hadar Y, Chet I (1992) Formation of sclerotia by *Morchella esculenta*: relationship between media composition and turgor potential in the mycelium. *Mycological Research* 96 (II): 943-948.
- Amir R, Levanon D, Hadar Y, Chet I (1993) Morphology and physiology of *Morchella esculenta* during sclerotial formation. *Mycological Research* 97 (6): 683-689.
- Buscot, F. 1992. Ecological and biological strategies of morels. *Cryptogamie Mycologie* 13: 171–179.
- Buscot F (1993) Mycelial differentiation of *Morchella esculenta* in pure culture *Mycological Research* 97: 136-149.
- Carrol DR (1991) Induction of sclerotia in *Sclerotium rolfsii* by short low-temperature treatment. *Journal of General Microbiology* 137:1063-1066.
- Correa de Restrepo M, Peñuela A (2002) Aspectos de la biología de un hongo del género *Rhizoctonia* y de su interacción *in vitro* con *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Acta Biológica Colombiana* 7(1): 41-52.
- Georgiou CD, Patsoukis N, Papapostolou I, Zervoudakis G (2006) Sclerotial metamorphosis in filamentous fungi is induced by oxidative stress. *Integrative and Comparative Biology* 4(6): 691-712.
- Güler P, Arkan O (2000) Cultural characteristics of *Morchella esculenta* mycelium on some nutrients. *Turkey Journal Biology* 24: 783–794.
- Güller P, Bozcuk S, Mutlu F, Sorkun K (2005) Propolis effect on sclerotial formations of *Morchella conica* PersPak. *J. Bot.* 37(4): 1015-1022.
- Hadar Y, Henis Y, Chet I (1981) The potential for the formation of sclerotia in submerged mycelium of *Sclerotium rolfsii*. *Journal of General Microbiology* 122:137-141.
- Lin X, Heitman J (2005) Chlamyospore Formation during Hyphal Growth in *Cryptococcus neoformans*. *Eucaryotic Cell* 4(10):1746-1754.
- 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.
- Pilz D, McLain R, Alexander S, Villarreal-Ruiz L, Berch S, Wurtz TL, Parks CG, McFarlane E, Baker B, Molina R, Smith JE (2007) Ecology and management of morels harvested from the forests of western North America. Gen. Tech. Rep. PNW-GTR-710. Portland, OR: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station. 161 p.
- Stamets P (2000) Growing gourmet and medicinal mushrooms. Third edition. Ten Speed Press. Berkeley, California USA. 574 p.
- Smits GB, Noguera R (1988) Ontogenia y morfogénesis de esclerocios y picnidios de *Macrophomina phaseolina*. Agronomía Tropical 38(4-6): 69-78
- Volk TJ, Leonard TJ (1989a) 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 (1989b) Experimental studies on the morel Heterokaryon formation between monoascosporeous strains of *Morchella*. Mycologia 81(4): 523-531.
- Volk TJ, Leonard TJ (1990) Cytology of the life-cycle of *Morchella*. Mycological Research 94: 399-406.
- Willetts HJ, Bullock S (1992) Developmental biology of sclerotia. Mycological Research 96(10): 801-816

CAPÍTULO V. INDUCCIÓN DE LA FRUCTIFICACIÓN DE *Morchella esculenta* Y *Morchella conica* MEDIANTE LA APLICACIÓN DE ESTRÉS

Gerardo Alvarado-Castillo, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2011

Los hongos del género *Morchella* son de los más apreciados a nivel mundial, pero los intentos para cultivarlos han tenido limitado éxito. Los avances obtenidos indican la importancia de los esclerocios en la obtención de fructificaciones, las cuales a menudo son producidas por la alteración drástica de las condiciones ambientales. El objetivo de este trabajo fue determinar el crecimiento de cuerpos fructíferos de *Morchella* a través de la estimulación de esclerocios por medio de estrés en condiciones controladas, bajo la hipótesis de que estas condiciones adversas inducirán la fructificación. Las condiciones extremas fueron frío e inundación del sustrato. Se utilizaron las cepas CP499, CP508 (*M. conica*) y CP509 (*M. esculenta*). Se estimó la producción de esclerocios por cepa, encontrando diferencias estadísticas (Tukey, $P < 0.05$). El valor más alto se presentó en la CP499 (85.0%), la segunda fue la CP509 (78.9%) y la más baja la CP508 (62.9%). El efecto del estrés en la formación de fructificaciones fue negativo, pero se observó la formación de agregados miceliales que corresponden a la primera etapa de formación de primordios, los cuales fueron evaluados, encontrando que el efecto del frío fue mejor a las 2 semanas de refrigeración y que las horas de inundación del sustrato tuvieron el mejor efecto en los periodos de 0 horas y 8 horas. Esto sugiere que las situaciones de estrés ayudan a la diferenciación del micelio.

Palabras clave: cultivo, diferenciación, inducción, primordios

OBTAINING FRUITING BODIES OF *Morchella esculenta* (L.) Pers. AND *Morchella conica* Pers. THROUGH INDUCTION OF STRESS

Gerardo Alvarado-Castillo, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2011

The fungi of *Morchella* genus is one of the fungi highly appreciated at world-wide. Many attempts have been realized to artificially produce them, but its success has been pretty limited. Nevertheless, the advances gained have emphasized the importance of the sclerotia to obtaining the fruitbodies, which very often are formed under stress condition of the surrounding environment. The aim of this work was to determine the growth of fruitbodies of *Morchella* through the stimulation of sclerotia by stress in controlled conditions. The hypothesis was that adverse conditions of high humidity and low temperature will induce the fruition. The cold and water saturation of the substrate were chosen as extreme conditions. Strains CP499, CP508 (*M.conica*), and CP509 (*M.esculenta*) were used, to obtain sclerotia through modifications to the Jar method of Ower *et al.*, (1986). The production of sclerotia was considered, finding statistical differences (Tukey, $P < 0.05$). The highest value appeared in the CP499 (85,0%), second it was the CP509 (78,9%) and but low the CP508 (62,9%). The effect of stress in the formation of fruitbodies was negative, but the mycelial aggregate formation was observed and it is the first stage of formation of primordia, which were evaluated, finding that the effect of the cold was better to the two weeks (Tukey, $P < 0.05$) and that the hours of saturation of the substrate had the best effect in the periods of 0 hours and 8 hours. This suggests that stress situations help the differentiation of the mycelium.

Key words: culture, differentiation, induction, primordial

5.1. Introducción

Los hongos del género *Morchella*, son de los más apreciados a nivel mundial (Masaphy, 2005; Amir *et al.*, 1992), por lo cual se han realizado numerosos intentos para cultivarlos artificialmente. Sin embargo, al igual que muchas otras especies, no se ha logrado inducir la fructificación bajo condiciones de cultivo, ya que el conocimiento de los procesos biológicos de iniciación y desarrollo del mismo es limitado (Kües y Liu, 2000). Es particularmente incipiente el conocimiento preciso del ciclo de vida de *Morchella* (Ower, 1982), los factores que disparan la diferenciación e iniciación de los cuerpos fructíferos (Motato *et al.*, 2006) y sus interrelaciones ecológicas, ya que acorde a las condiciones ambientales puede comportarse como hongo saprofito, micorrízico o facultativo (Staments, 1993). En el futuro es posible que el conocimiento de los modelos de producción de otros hongos puedan apoyar en un mejor entendimiento para el cultivo de esta especie (Kües y Liu, 2000).

A la fecha se han realizado varias investigaciones que han intentado cultivar *Morchella* bajo condiciones controladas, la primera con relativo éxito fue la de Ower (1982). Sin embargo, a más de 20 años, aún existen dificultades para producir este hongo de forma masiva, a pesar de los esfuerzos de investigadores y productores (Masaphy, 2005). Dichos trabajos han puntualizado la importancia de los esclerocios para la fructificación de *Morchella*. Este descubrimiento subrayó la necesidad de determinar las condiciones óptimas para la formación, crecimiento y maduración de estas estructuras bajo condiciones controladas (Ower, 1982; Ower *et al.*, 1986; Volk y Leonard, 1989; Amir *et al.*, 1992). Por este motivo, Stott y Mohammed (2004) establecieron la obtención de esclerocios como la primera condición para la

domesticación de *Morchella*. Se ha demostrado también que un cultivo simple de ascosporas puede producir cuerpos fructíferos, aunque las ascosporas tendrían que ser multinucleadas (Pilz *et al.*, 2007) para dar lugar a esclerocios heterocariontes que podrían diferenciarse en un hongo maduro. También se ha registrado la fructificación de homocariontes (Ower *et al.*, 1986). Sin embargo, el conocimiento en los procesos de inducción de la fructificación sigue siendo insuficiente (Miles y Chang, 1997).

En *Morchella*, como en muchos otros hongos, las condiciones ambientales son determinantes en la formación de cuerpos fructíferos (Kües y Liu, 2000). La situación ambiental óptima para el crecimiento micelial y la sucesiva fructificación usualmente es muy distinta entre especies, pero la inducción de la fructificación a menudo es producida por la alteración drástica de las condiciones ambientales (Kües y Liu, 2000). Estas situaciones han sido perfeccionadas para ciertos hongos, los cuales se clasifican como cultivados.

En el cultivo de hongos, en general, el micelio vegetativo se induce a fructificar mediante estímulos externos como luz, disminución de la temperatura y aumento de la humedad relativa. Sin embargo, aún no está claramente establecido qué factores activan la iniciación de tal diferenciación (Motato *et al.*, 2006). En este sentido, se tienen reportes sobre la adaptación de las Morillas para la producción de fructificaciones en masa después de incendios forestales como una estrategia reproductiva (Pilz *et al.*, 2007), obteniéndose una cuantiosa producción como resultado de dichas circunstancias extremas (Greene *et al.*, 2010). También se han reportado otras situaciones que fuerzan a la reproducción en masa de *Morchella*,

tales como el daño a los árboles asociados a este hongo, inundaciones, inviernos, etc., lo que sugiere que el estrés producido por condiciones adversas es necesario para obtener abundantes fructificaciones.

Por lo anterior, es importante desarrollar experimentos sobre cómo inducir su fructificación bajo condiciones controladas, de ahí que el objetivo de investigación fue evaluar el efecto del estrés causado por el frío e inundación del sustrato, en la diferenciación y fructificación de esclerocios de *Morchella*, bajo el supuesto de que dichas condiciones de estrés son necesarias para detonar el proceso.

5.2. Materiales y métodos

Se eligieron como condiciones extremas bajas temperaturas e inundación. La primera bajo el supuesto de que el micelio de *Morchella* tiene la habilidad de crecer y competir en suelos fríos (Schmidt, 1983), pues estudios previos muestran que es una característica común entre los ascomicetos. Lo cual sugiere que es una de las estrategias reproductivas de este hongo (Pilz *et al.*, 2007). En cuanto a la inundación, se estima que promueve la fructificación debido al estrés causado por un drenaje inadecuado del sustrato (Stamets, 1993; Royse, 1997; Barnes y Wilson, 1998).

Cepas y condiciones de cultivo

Se utilizaron las cepas CP499 (*M. conica*), CP509 (*M. esculenta*) y CP508 (*M. conica*), las cuales se preservan bajo condiciones de crioconservación en el Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles y Medicinales (CREGENHC),

del Colegio de Postgraduados (COLPOS, *Campus* Puebla) y en el Cepario del INECOL bajo las siguientes equivalencias: CP499=IE-816, CP509=IE-750, y CP508=IE-817.

Las cepas se sembraron en condiciones controladas, en medio de cultivo con compost, utilizando 800 ml de extracto de compost para champiñón, obtenido a partir de 1.2 kg en 4 l de agua destilada e hirviendo la mezcla a fuego lento durante 15 min con agitación constante, al cual se le adicionó 20 g de malta (Bioxon^R), 20 g de agar (Bioxon^R), y se esterilizó bajo condiciones convencionales. Posteriormente se inoculó 0.5 cm² de cada cepa y se incubó en una cámara de incubación FELISA^R a 26 °C en condiciones de oscuridad durante tres semanas.

Tratamientos y diseño experimental

Para la obtención de los esclerocios se utilizaron modificaciones al método de Ower *et al.* (1986), basado en lo propuesto por Alvarado *et al.*, (2011). Estas consistieron en la suplementación de grano, para lo cual se utilizaron 100 g de centeno que fue remojado durante 24 hrs hasta obtener un 60% de humedad, a esto se le agregó 10 g de compost para champiñón obtenida de la planta Riojal (Las Vigas, Veracruz, México) y 1 g de yeso. Esta mezcla se colocó en bolsas de polipropileno y se esterilizó bajo condiciones convencionales durante 30 minutos. Posteriormente se inoculó esta mezcla con tres secciones de 1 cm² de cada cepa, distribuidas uniformemente. Las bolsas fueron colocadas en contenedores plásticos transparentes cuadrados y bajo condiciones asépticas se adicionaron 150 g de tierra negra, esterilizada durante 30 minutos en condiciones convencionales (Figura 5.1).



Figura 5.1. Modificaciones al Método del frasco de Ower *et al.* (1986)

Bolsas y contenedores fueron sellados e incubados en condiciones de oscuridad a 26 °C durante cuatro semanas.

Las variables registradas fueron: 1) la producción de esclerocios con ayuda de una regla de referencia (plantilla creada para tal fin dividida en cuadrantes de 1 cm²) y 2) el porcentaje de aparición de esclerocios, para lo cual fue elegido al azar uno de los lados de la caja, estimando la producción de esclerocios para cada cepa. Sólo se consideraron los esclerocios maduros que presentaron pigmentación y eran detectables a simple vista (Figura 5.2). Este factor se registró bajo el supuesto de que a mayor producción de esclerocios, habría una mayor probabilidad de diferenciación en cuerpos fructíferos. Los datos se registraron cada tercer día para su posterior análisis estadístico.



Figura 5.2. Esclerocios maduros y pigmentados obtenidos a cuatro semanas de incubación

Una vez obtenidos los esclerocios, se realizó una segunda evaluación, aplicando los diferentes tratamientos para las tres cepas estudiadas. Estos consistieron en cuatro niveles de estrés por frío (6 ± 1 °C), refrigerando las muestras en 0, 1, 2 y 4 semanas y cuatro niveles de inundación (saturación del sustrato con agua purificada) por 0, 8, 12 y 24 horas, dando un total de 48 tratamientos en un diseño experimental completamente al azar con 10 repeticiones.

Una vez realizados los tratamientos, los contenedores se abrieron e incubaron en una cámara para fructificación a 18-22 °C, y una humedad relativa (HR) de 80-90%, en un ciclo circadiano. Se realizaron revisiones cada tercer día para registrar la formación de primordios.

Los datos sobre la producción de esclerocios y formación de primordios fueron analizados a través de análisis de varianza y pruebas de comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$), utilizando el programa STATISTICA® (2000), para determinar la

respuesta de cada una de las variables por tratamiento, así como las diferentes interacciones.

5.3. Resultados

Producción de esclerocios

En la producción de esclerocios para cada cepa se encontraron diferencias estadísticas (Tukey, $P < 0.05$). El valor más alto se presentó en la cepa CP499 (85.0%), y fue menor en la CP509 (78.9%) y CP508 (62.9%).

Iniciación de primordios

A pesar de que no hubo diferenciación en cuerpos fructíferos, se observó en algunos tratamientos la formación de agregados miceliales que corresponden con la descripción realizada por Masaphy (2005) para las primeras etapas de formación de primordios (Figura 5.3). Con base en estas observaciones se realizó el análisis estadístico correspondiente encontrando diferencias significativas (Tukey, $P < 0.05$) para el efecto de las cepas, frío e inundación (horas de saturación del sustrato), tal como se muestra en la Figura 5.4.

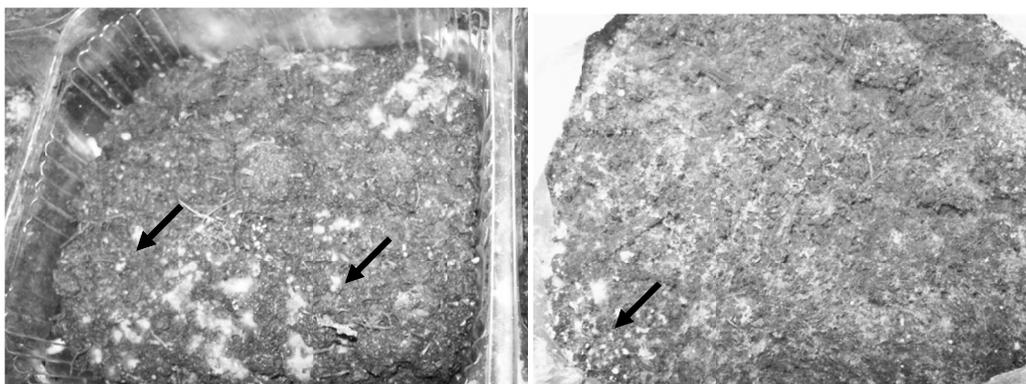


Figura 5.3. Agregados miceliales descritos por Masaphy (2005)

La cepa que tuvo la mejor respuesta –estadísticamente significativa- en la formación de esclerocios fue la CP499 (1.56), seguida de la CP509 (1.43); la más baja fue la CP508 (1.0). En cuanto al efecto del frío, se observó que a las 2 semanas de refrigeración se formaron más esclerocios (1.91). El resto de los tratamientos fueron estadísticamente similares (0 semanas=1.00; 1 semana= 1.33; 4 semanas=1.08). Mientras que para las horas de inundación del sustrato el mejor efecto fue para 0 horas (1.5) y 8 horas (1.75), los cuales fueron estadísticamente similares respecto al segundo grupo de los tratamientos de 12 (1.08) y 24 (1.00) horas.

Las interacciones entre cepas y condiciones de frío mostraron diferencias significativas (Tukey, $P < 0.05$), obteniéndose el mejor resultado con las cepas CP499 y CP509 a 2 semanas de refrigeración (Figura 5.4). La cepa CP508 prácticamente no presentó respuesta a esta interacción.

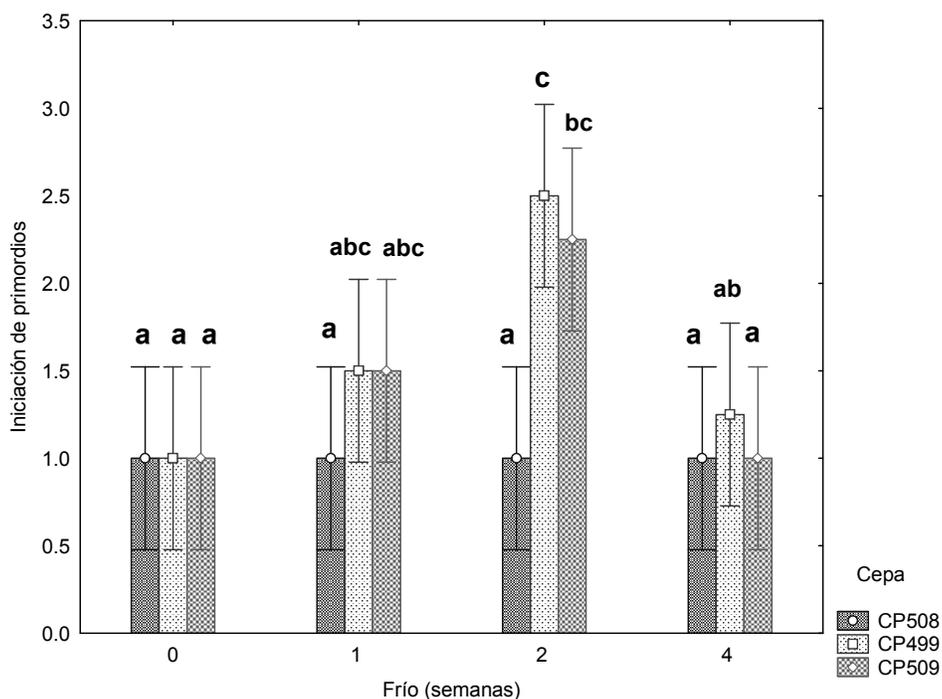


Figura 5.4. Interacciones entre cepas y frío respecto a la iniciación de primordios

En cuanto a la interacción entre cepas y horas de inundación del sustrato, se encontró que la mejor respuesta se tuvo con la cepa CP499 a 8 horas de inundación. Cabe resaltar que la cepa CP508 no presentó respuesta ante estas condiciones (Figura 5.5), y no hubo respuesta de ninguna de las cepas evaluadas a 12 y 24 horas de inundación.

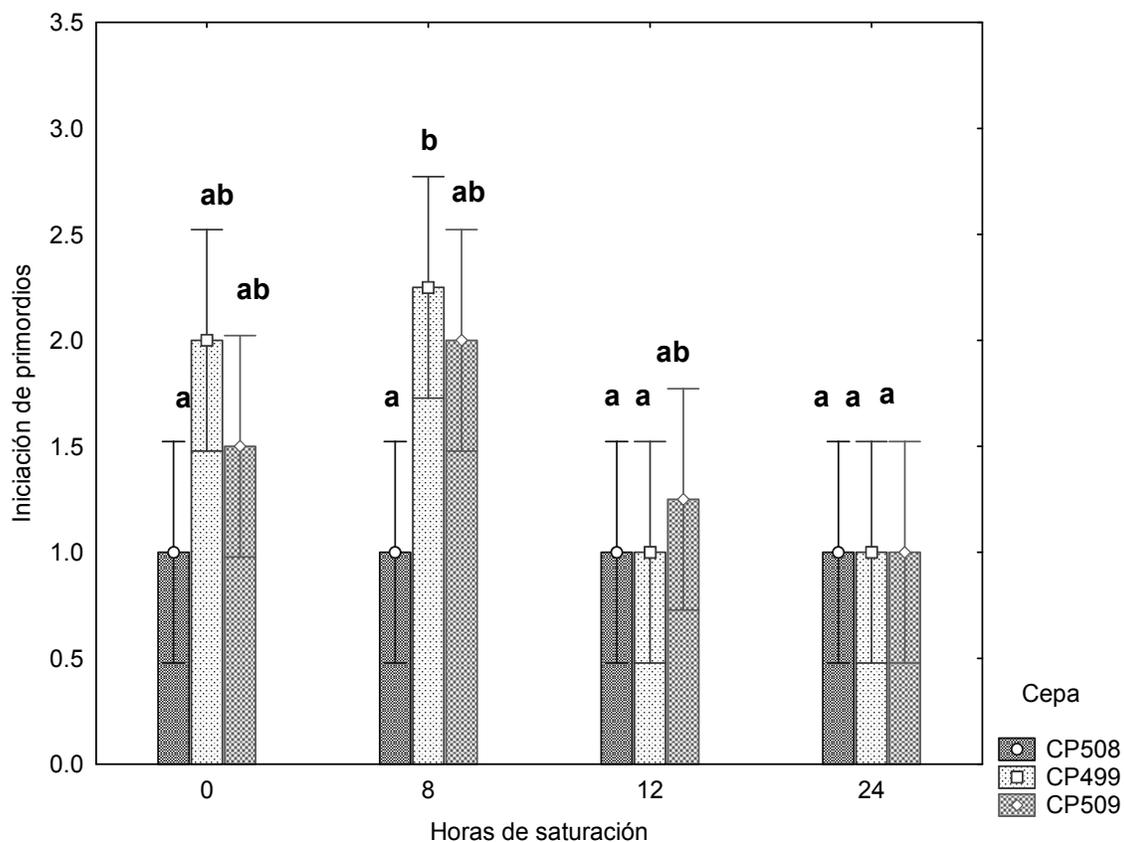


Figura 5.5. Interacción entre cepas y horas de inundación del sustrato respecto a la iniciación de primordios

Las respuestas para la primera etapa de formación de primordios, respecto a la interacción entre frío y horas de inundación, mostraron diferencias significativas (Tukey, $P < 0.05$), en donde se formaron tres grupos estadísticos. El mejor de ellos

corresponde al tratamiento de 2 semanas de frío y 0 horas de inundación (Figura 5.6).

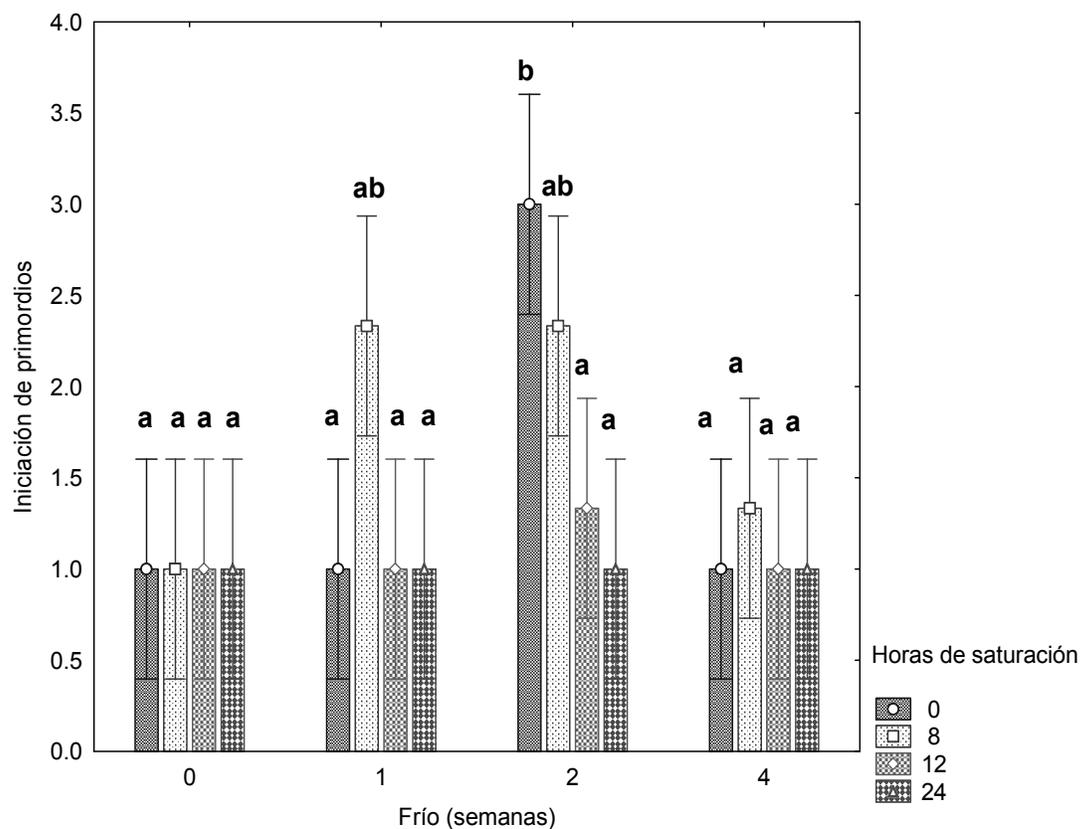


Figura 5.6. Interacción entre frío y horas de inundación respecto a la iniciación de primordios

Finalmente, las interacciones entre las cepas y las diferentes condiciones de frío e inundación del sustrato, mostraron diferencias estadísticas (Tukey, $P < 0.05$), encontrándose que la inundación del sustrato en tiempos mayores a 8 horas (tratamientos de 12 y 24 horas) no tuvo respuesta en la etapa inicial de formación de primordios. De igual manera, se encontró que el factor frío sólo presentó respuesta con 1 y 2 semanas de refrigeración. Así mismo, las cepas que presentaron algún

tipo de respuesta bajo estas condiciones de estrés fueron la CP499 y CP509 (Figura 5.7).

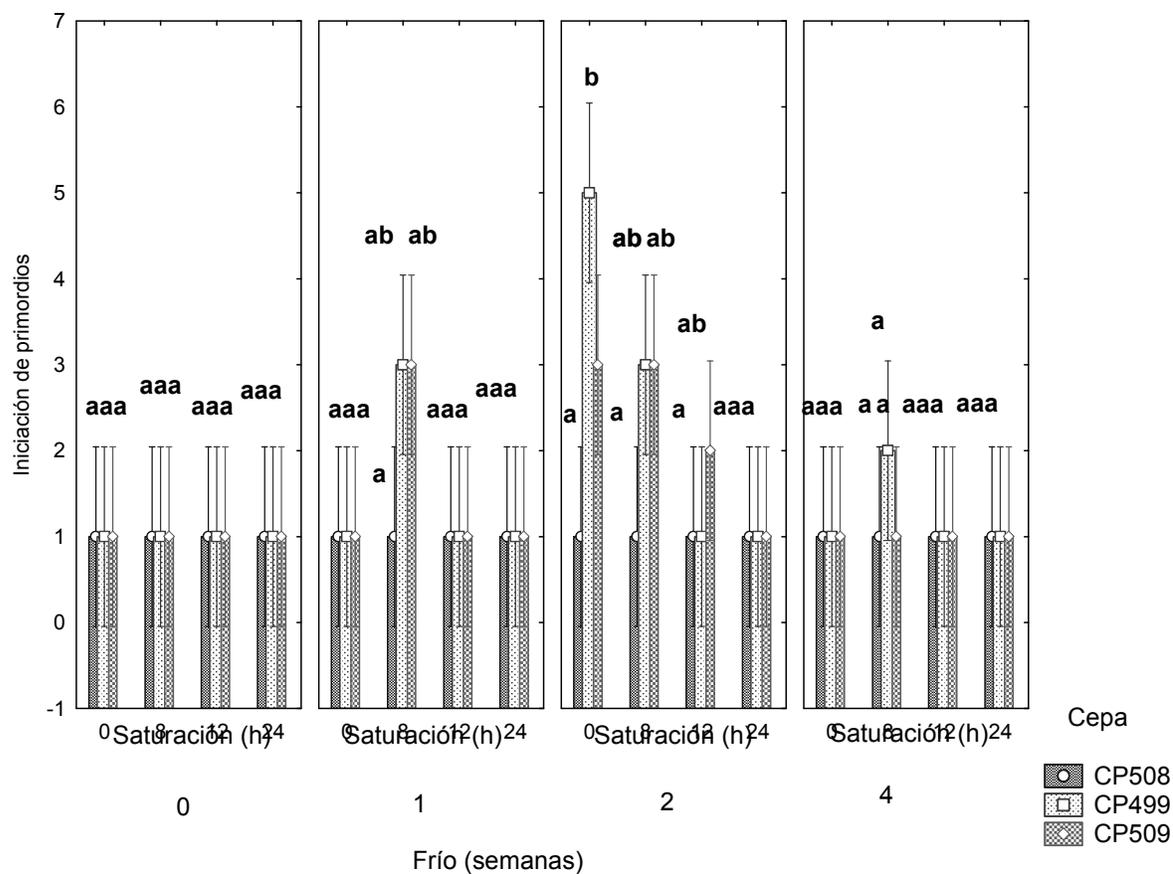


Figura 5.7. Interacciones entre cepas, condiciones de frío e inundación del sustrato respecto a la iniciación de primordios

5.4. Discusión

La relación existente entre la producción de esclerocios y la respuesta en la iniciación de la etapa de formación de primordios fue directamente proporcional, ya que los tratamientos con la cepa CP499 (*M. conica*) fueron los que produjeron mayor cantidad de esclerocios, también presentaron la mayor respuesta a las condiciones de estrés. Por otro lado, la cepa CP508 (*M. esculenta*) tuvo el más bajo porcentaje de esclerocios y presentó la más baja respuesta a los tratamientos de frío e

inundación. No obstante, esto puede ser indicativo del grado de tolerancia de cada una de las cepas evaluadas.

A pesar de las condiciones de estrés a las que fueron sometidas, se obtuvieron esclerocios con todas las cepas estudiadas, sin embargo, los resultados obtenidos no son los esperados en la diferenciación de esclerocios en cuerpos fructíferos. Es posible que esto se deba a dos razones principales: 1) que el nivel de estrés fue demasiado y provocó un proceso irreversible de muerte y 2) que los primordios obtenidos no tuvieron las condiciones ambientales adecuadas y como consecuencia abortaron.

Estos primordios, observados en algunos tratamientos, corresponden con el crecimiento micelial y formación de agregados descritos por Masaphy (2005), que conforman la etapa inicial de formación de primordios, la cual se considera fue producida por efecto del estrés impuesto.

La condición de estrés que parece tener mayor efecto en la primera etapa de formación de primordios es el frío, presentándose la mejor respuesta a las dos semanas de refrigeración, sin embargo, a un periodo mayor se inhibe la respuesta de los esclerocios. Algo similar sucede con el efecto de inundación del sustrato, pues los mejores resultados ocurren entre 0 y 8 horas, después de los cuales se inhibe la formación de primordios.

Los resultados obtenidos en cuanto al efecto del frío e inundación del sustrato, coinciden con lo mencionado por Schmidt (1983), Stamets (1993), Pilz *et al.* (2007) y

Greene *et al.* (2010;) en relación a que las condiciones de estrés disparan la diferenciación del micelio de *Morchella*. Sin embargo, no se pudo identificar el tratamiento óptimo para inducir la diferenciación del micelio en cuerpos fructíferos. Las causas por las que no se promovió la inducción a la fructificación, pudieran explicarse por el hecho de que los tratamientos se llevaron bajo condiciones ambientales uniformes, mientras que en condiciones naturales (*in situ*) oscilan de tal forma que en algún punto, los diferentes factores ambientales se conjugan, para dar lugar a una combinación particular que dispara la diferenciación del micelio y esclerocios de *Morchella* en cuerpos fructíferos.

Lo anterior confirma lo establecido por Kues y Liu (2000), quienes indican que no sólo es el poco entendimiento de los procesos celulares, genéticos y fisiológicos, lo que ha frenado el cultivo de los hongos, sino también el escaso conocimiento de los factores ambientales que dirigen la iniciación y desarrollo del cuerpo fructífero, lo que particularmente ha limitado el éxito en la producción comercial de *Morchella*.

Rodríguez (2007) ha identificado algunos disparadores de la fructificación en basidiomicetos como champiñones y setas, mediante un modelo (Figura 5.8) donde propone interacciones entre el CO₂, la temperatura, el O₂ y la luz, de tal manera que en la fase vegetativa los niveles de CO₂ y temperatura son altos y los de O₂ y luz se mantienen bajos; pero en la fase reproductiva esta relación se invierte, siendo los altos niveles de O₂ y luz los disparadores de la fructificación. Sin embargo, en *Morchella*, el amplio rango de hábitats y el corto periodo (días) en el que aparecen los ascocarpos, limitan la posibilidad de contar con información respecto a su ciclo

de vida y han generado controversias respecto a la iniciación de su fructificación (Masaphy, 2005).

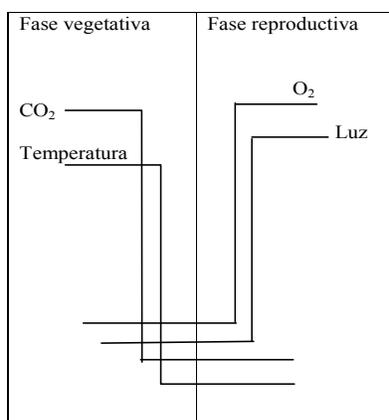


Figura 5.8. Condiciones para la diferenciación entre la fase vegetativa y la de fructificación. Fuente: Modificado de Rodríguez (2007).

En basidiomicetos, después del crecimiento vegetativo, el desarrollo y diferenciación de cuerpos fructíferos es generalmente inducido por una reducción de temperatura que puede llegar hasta 5 °C. Por ejemplo, en *Agaricus bisporus* el punto de inducción se da entre 16-18 °C; en *Cantharellus cinereus* entre los 25-28 °C, en *Flammulina velutipes* en 18 °C. Además, influyen otros parámetros como son la concentración de CO₂, humedad, pH, humedad relativa y luz, los cuales pueden variar aún entre cepas de la misma especie y en ocasiones dependen de la presencia de otros organismos. Por ejemplo, muchas cepas de *Agaricus* sólo fructifican cuando están asociadas con *Pseudomonas* o ante estímulos como el daño mecánico (Kües y Liu, 2000). Es decir, que para los procesos de iniciación de la fructificación se requiere de una combinación de factores físicos y biológicos que en la práctica resulta difícil replicar bajo condiciones controladas.

Finalmente, a pesar de que se identificó la formación de nudos hifales (agregación y cohesión de las hifas superficiales en forma de cabeza de alfiler) (Masaphy, 2005) como resultado de la germinación de esclerocios (Ower, 1982) en la primera etapa de la diferenciación y fructificación de *Morchella*, estos no llegaron a madurar para formar ascocarpos. Sin embargo, el modelo implementado para el cultivo de esta especie, podría generar sistemas productivos más eficientes en el futuro (Rodríguez, 2007) o representar una base para adoptar otros modelos de producción, como los desarrollados para el cultivo de especies micorrízicas por medio de su inoculación en campo. Tal es el caso de *Cantharellus cibarius* que ha sido inoculado en bosques, obteniéndose fructificaciones al año siguiente (Danell y Camacho, 1997) o de *Tricholoma matsutake*, el cual, sin embargo, ha tenido limitado éxito (Iwase, 1997).

5.5. Conclusiones

Las condiciones de estrés evaluadas tienen efecto positivo en la diferenciación de los esclerocios de *Morchella*. Sin embargo, después de cierto límite parecen inhibir dicho proceso. En otras palabras, el estrés, por sí solo no es capaz de promover la obtención de ascocarpos, sino que este proceso depende de la interacción de múltiples factores ambientales que se encuentran en el hábitat natural del hongo y que no fue posible reproducir bajo condiciones experimentales.

Dado que la fructificación de *Morchella* depende de una interacción muy particular entre diversas condiciones ambientales, que es difícil obtener bajo condiciones controladas, una posible alternativa puede ser su inoculación en campo, lo cual

podría ser una nueva línea de investigación a explorar para la producción de esta especie.

5.6. Literatura citada

Alvarado-Castillo G, Mata G, Pérez-Vázquez A, Martínez-Carrera D, Nava-Tablada ME, Gallardo-López F, Osorio-Acosta F (2011) *Morchella sclerotia* production through grain supplementation. *Interciencia* 36(10):768-773.

Amir R, Levanon D, Hadar Y, Chet I (1992) Formation of sclerotia by *Morchella esculenta*: relationship between media composition and turgor potential in the mycelium. *Mycol. Res.* 96 (II): 943-948.

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. 14 p.

Danell E, Camacho FJ (1997) Successful cultivation of the golden chanterelle. *Nature* 385: 303.

Greene D, Hesketh M, Pounden E (2010) Emergence of morel (*Morchella*) and pixie cup (*Geopyxis carbonaria*) ascocarps in response to the intensity of forest floor combustion during a wildfire. *Mycologia* 102(4): 766-773.

Iwase K (1997) Cultivation of mycorrhizal mushroom. *Food Rev. Int.* 13: 431-442.

Kües U, Liu Y (2000) Fruiting body production in basidiomycetes. *Appl Microbiol Biotechnol* 54: 141-152.

Masaphy S (2005) External ultrastructure of fruit body initiation in *Morchella*. *Mycol. Res.* 109 (4): 508–512.

Miles GP, Chang ST (1997) Mushroom biology: concise basics and current developments. World Scientific Publishing. London UK, 163 p.

Motato KE, Mejía GAI, León PA (2006) Evaluación de los residuos agroindustriales de plátano (*Musa paradisiaca*) y aserrín de abarco (*Cariniana piriformes*) como sustratos para el cultivo del hongo *Pleurotus djamor*. *Vitae* 13 (1): 93-96

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.
- Pilz D, McLain R, Alexander S, Villarreal-Ruiz L, Berch S, Wurtz TL, Parks CG, McFarlane E, Baker B, Molina R, Smith JE (2007) Ecology and management of morels harvested from the forests of western North America. Gen. Tech.Rep. PNW-GTR-710. Portland, OR: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station. 161 p.
- Rodríguez G (2007) Cultivo de hongos comestibles. Fruticultura y Diversificación 52: 10-15.
- Royse DJ (1997) Specialty mushroom: consumption, production and cultivation. Revista Mexicana de Micología 13: 1-11
- Schmidt E (1983) Spore germination of and carbohydrate colonization by *Morchellaesculenta* at different soil temperatures. Mycologia 75: 870–875.
- Stamets P (1993) Growing Gourmet and Medicinal Mushroom Third edition pp 401-418.
- Stott K, Mohammed C (2004) Specialty mushroom production systems: maitake and morels. (Project No UT-30All) Rural Industries Research and Development Corporation. Australia. 86 p.
- 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.
- Willetts HJ, Bullock S (1992) Developmental biology of sclerotia Mycol. Res. 96 (10): 801-816.

CONSTRATACIÓN DE HIPÓTESIS

La finalidad de esta sección es contrastar las hipótesis de acuerdo a los resultados encontrados en esta investigación, particularmente con los resultados obtenidos en los Capítulos III y V. Se inicia con las hipótesis particulares, las cuales en su conjunto permitirán la comprobación de la hipótesis general. La primera indica que la producción y formación de esclerocios están supeditadas a las condiciones nutricionales del sustrato donde se desarrolla, esta hipótesis no se rechaza, puesto que los resultados del Capítulo III muestran que la suplementación del grano con materiales orgánicos presentó efectos positivos, con respecto al testigo, en la producción de esclerocios, ya que el tratamiento con centeno, compost y yeso (CCY) presentó la mayor eficiencia productiva (31.70%).

La segunda hipótesis, relacionada con la formación de cuerpos fructíferos a través del estímulo por condiciones extremas de temperatura y humedad, en los esclerocios, descrita en el Capítulo V, no se rechaza, pues a pesar de que no se obtuvieron los resultados esperados, ya que no se logró la fructificación de *Morchella*, se observó que las condiciones de estrés tienen influencia en la primera etapa de formación de primordios y de éstas la que tiene mayor efecto es el frío.

Con base en lo anterior la hipótesis general de que la formación y producción de esclerocios y cuerpos fructíferos de *Morchella* bajo condiciones artificiales, están en función de las condiciones adversas y nutricionales del medio donde se desarrolla no se rechaza, puesto que los experimentos realizados indican que la formación de esclerocios está influenciada por estas dos condiciones.

CONCLUSIONES GENERALES

De acuerdo a las reflexiones realizadas y a los resultados obtenidos se concluye que el enfoque de agroecosistemas en la recolección de hongos silvestres comestibles, representa una forma viable de intervención científica, ya que es un marco analítico que tiene múltiples facetas e interacciones, acordes a la complejidad del fenómeno estudiado. Que la investigación de los hongos comestibles debe abordarse de manera integral, para entender las interacciones sociedad-naturaleza y lograr que el aprovechamiento de los hongos constituya una estrategia de mejora económica sustentable para las comunidades rurales. El enfoque de Agroecosistemas puede generar conocimiento pertinente que favorezca el balance ambiental, la sostenibilidad de los ecosistemas, la preservación del conocimiento empírico y el desarrollo de una legislación pertinente para la gestión del recurso. Esto tanto a través del enfoque cuantitativo, para generar estudios y estadísticas que contribuyan a la elaboración de esquemas de apoyo para este sector como por medio del enfoque cualitativo para el rescate, sistematización y difusión del conocimiento etnomicológico. Así la generación de conocimiento científico de forma interdisciplinaria y sinérgica coadyuvará a conciliar el aprovechamiento y la conservación de estos recursos naturales para las futuras generaciones.

Una de las formas de intervención científica para el aprovechamiento sustentable de los hongos silvestres comestibles es la definición de las bases conceptuales (como se realizó para el caso de la domesticación), a partir de las cuales sea posible establecer estrategias que aborden integralmente el problema de la sobreexplotación del recurso, ya sea a través de la gestión adecuada del mismo o

mediante la generación de técnicas para su reproducción en condiciones controladas.

En cuanto al desarrollo de la fase técnica se concluye que la suplementación con materia orgánica tiene efectos positivos en la producción de esclerocios. Esta aportación permite obtener estas estructuras de manera sistemática y repetible en grandes cantidades, con lo cual se puede aseverar que se da cumplimiento a la primera condición para su domesticación y representa un avance en el conocimiento del tema. Así mismo, se concluye, con base en el estudio de los esclerocios, que estos presentan diversas estrategias de reproducción y supervivencia, teniendo la capacidad de presentar procesos autógamos y heterógamos que le confieren el potencial para fructificar.

Finalmente, en el estudio de la determinación de las condiciones para la diferenciación y fructificación de los esclerocios, se identificó que la inducción de estrés propicia la formación de agregados miceliales que corresponden a la primera etapa de formación de primordios, lo cual indica que es posible obtener fructificaciones. Sin embargo, los primordios guardan un equilibrio muy delicado, el cual en este caso se vio alterado, provocando el aborto de los mismos. Así mismo, no se encontró la interacción adecuada entre diversas condiciones ambientales o de estrés, ya que los tratamientos se realizaron bajo condiciones uniformes, situación que no sucede en la naturaleza.

Encontrar las condiciones ideales para la producción de este hongo, sigue siendo el reto más grande, por lo cual es necesario continuar con las investigaciones, para

entender la dinámica de reproducción de *Morchella*, sus adaptaciones y ciclo de vida.

En base a lo expuesto, resulta importante dar continuidad a la línea de investigación desarrollada en el presente trabajo, así como explorar nuevas líneas de investigación, tanto en *Morchella* como en otros hongos, a través de estrategias de producción *in vitro* e *in situ*, aprovechando el vasto conocimiento etnomicológico, el conocimiento científico generado y las modernas herramientas de la biotecnología.

RECOMENDACIONES GENERALES

En el caso particular de *Morchella* es necesario continuar con las investigaciones enfocadas a la determinación de las condiciones que disparan la diferenciación y fructificación de los esclerocios, así mismo, implementar ensayos de inoculación de estas estructuras en campo, a través de la identificación de zonas potenciales mediante el uso de sistemas de información geográfica.

Es importante realizar estudios en el estado de Veracruz relacionados con la productividad de los bosques en términos de biodiversidad, estabilidad y rentabilidad financiera en base al aprovechamiento de productos forestales no maderables (incluidos los hongos) y generar estadísticas confiables para integrar este sector en el diseño de políticas públicas y esquemas de apoyo institucional.

ANEXOS

A. Datos de las especies recolectadas para la investigación

Lugar de recolección	Identificación	Especie	Coordenadas		Altitud msnm	Tipo de vegetación
			LN	LW		
Estado de México	CP499	<i>Morchella conica</i> Pers.	19° 18' 08.73"	100° 01' 46.30"	2711	Bosque de pino
Estado de México	CP506	<i>Morchella conica</i> Pers.	19° 18' 09.94"	100° 01' 48.86"	2708	Bosque de pino
Estado de México	CP507	<i>Morchella conica</i> Pers.	19° 18' 10.77"	100° 01' 49.37"	2701	Bosque de pino
Estado de México	CP508	<i>Morchella conica</i> Pers.	19° 18' 10.83"	100° 01' 46.75"	2720	Bosque de pino

B. Portada del Artículo producido del Capítulo I

Tropical and Subtropical Agroecosystems, 10 (2009): 531 - 539

*Tropical and
Subtropical
Agroecosystems*

FORO [FORUM]

EL ENFOQUE DE AGROECOSISTEMAS COMO UNA FORMA DE
INTERVENCIÓN CIENTÍFICA EN LA RECOLECCIÓN DE HONGOS
SILVESTRES COMESTIBLES

[AGROECOSYSTEMS APPROACH AS A MECHANISM OF SCIENTIFIC
INTERVENTION IN THE HARVEST OF EDIBLE WILD MUSHROOMS]

Gerardo Alvarado-Castillo^{1*} and Griselda Benitez²

¹*Colegio de Postgraduados Km. 88.5 Carr. Fed. Xalapa-Veracruz Tepetates,
Municipio de Manlio Fabio Altamirano, Veracruz, México.*

E-mail: alvaradoc@colpos.mx.

²*Instituto de Ecología A.C. Km. 2.5 carr. antigua a Coatepec 351,
Congregación El Haya, Xalapa, Veracruz, CP.91070 México. Apartado Postal 63.*

E-mail: griselda.benitez@inecol.edu.mx.

**Corresponding author*

RESUMEN

El presente ensayo tiene el propósito de proveer un marco de referencia y revisión del estado que guardan las múltiples facetas e interacciones existentes en el proceso de recolección de hongos silvestres comestibles como un elemento natural de los ecosistemas. Es decir, su relación e interacciones en el contexto biológico, económico y social. Los hongos silvestres son un recurso que ha sido escasamente estudiado y apenas empieza a ser reconocido, por lo que éste trabajo pretende mostrar su valor como producto no tradicional y como una parte importante del ecosistema, que representa una alternativa viable para el desarrollo de las comunidades, lo que a su vez puede incentivar a los dueños y poseedores del bosque para el fomento y protección de sus recursos. Al igual que cualquier otro producto, los hongos silvestres obedecen a las fuerzas de mercado, y actualmente su demanda es poco predecible y dinámica a nivel nacional e internacional; tal situación presenta oportunidades y retos que deben ser atendidos, por lo que se propone la intervención científica y la aplicación de nuevos enfoques para lograr un equilibrio entre las necesidades del ser humano y la protección y conservación de los recursos naturales.

Palabras clave: Recolección de hongos; agroecosistemas; sustentabilidad; servicios ambientales; PFSNM.

INTRODUCCIÓN

Los hongos silvestres comestibles forman parte de lo que se ha denominado Productos Forestales No Maderables (PFSNM). Varios millones de hogares en todo el mundo dependen de su recolección, como un aporte en su alimentación e ingresos. La FAO calcula que 80% de la población en países en

SUMMARY

This essay aims to provide a framework and review on the status of the multiple facets and interactions in the process of harvesting wild edible mushrooms as a natural element of ecosystems. This means, its relationship and interactions in the biological, economic and social context. Wild fungi are a resource that has been poorly studied. This essay attempts to show its value as a nontraditional product and important part of the ecosystem, representing a viable alternative for community development, which can also influence owners and users of the forest to promote and protect its resources. Like any other product, wild mushrooms are subject to market forces, and their demand is fairly predictable and dynamic at the national and international levels with scientific intervention and application of new approaches such as the harvest of non-timber forest products, a balance may be achieved between the needs of human beings and the protection and conservation of natural resources.

Key words: Harvesting; wild mushrooms; agroecosystems; sustainability; environmental services; NTFP.

desarrollo utiliza los PFSNM, entre ellos los hongos para satisfacer sus necesidades nutricionales y de salud (FAO, 2007).

Recientemente los gobiernos e instituciones han comenzado a valorar la importancia que tienen estos productos en la alimentación y mejora de ingresos de comunidades rurales (Zamora-Martínez y Nieto

C. Portada del Artículo producido del Capítulo III

Morchella SCLEROTIA PRODUCTION THROUGH GRAIN SUPPLEMENTATION

Gerardo Alvarado-Castillo, Gerardo Mata, Arturo Pérez-Vázquez, Daniel Martínez-Carrera, Martha Elena Nava Tablada, Felipe Gallardo-López and Francisco Osorio-Acosta

SUMMARY

Edible fungi from the *Morchella* genus are important at national and international level because of their high commercial value. Nevertheless, their artificial production still represents a challenge, even though patents for their cultivation do exist. A number of studies point out that obtaining sclerotia is a necessary part of the process for domestication of the genus and commercial production. This study consists of two experiments. In the first one, mycelial growth was assessed for five strains of *Morchella* using four different grains (maize, oats, wheat and rye), assuming that greater mycelial growth implies a more abundant production of sclerotia. For all the strains tested the highest response was obtained with rye and the most extensive growth was observed in CP508 (17.90cm²). In the se-

cond experiment, the effect of rye supplementation on sclerotia production was evaluated using modifications to the jar method of Ower et al. (USPat. 4,594,809; June 1986). The treatment with rye supplemented with compost and gypsum (RCG) led to the best result, and the most productive strain in this experiment was CP506 (8.47g). Sclerotia were obtained between the third and fourth week following inoculation, in all treatments. Under the experimental conditions of this study, no barrier effect became evident and no effect of the nutrient-poor medium in sclerotia production was found. Therefore, it may be that the differentiation in the formation of sclerotia is due to factors such as the presence of nutritious elements and growth promoters contained in the compost.

Introduction

The ascomycetes from the *Morchella* genus are edible mushrooms that are economically important and of high commercial value, both nationally and internationally. Although patents have been registered for commercial production (Ower, 1982; Ower et al., 1986), their 'production' is still dependent on manual picking in the field. Their production under controlled conditions still has difficulties, with low productivity and malformations in fruiting bodies (Molina et al., 1993; Barnes and Wilson, 1998; Stott and Mohammed, 2004).

Advances in the process of domestication of *Morchella*

have promoted the view that sclerotia are resistant structures that permit the fungus to survive in adverse conditions and are essential for reproduction and the production of the fruiting body (Ower, 1982; Ower et al., 1986, 1988; Stott and Mohammed, 2004) under both natural and controlled conditions (Volk and Leonard, 1990; Pilz et al., 2007). The production of sclerotia has been established as a precursor for the domestication of this fungus (Stott and Mohammed, 2004).

The best known method for obtaining sclerotia was described by Ower et al. (1986), who patented the jar method. This method involves filling a jar half full of wheat grain as a

substrate, covering it with a layer of perforated aluminum to act as a physical barrier, and then filling the remainder with a layer of soil divided into sections with nutritious and non-nutritious, or nutrient-poor, media. In 1989 and 1990 Volk and Leonard made adjustments to this method, obtaining sclerotia in an average time of four weeks. Similarly, Amir et al. (1993) obtained them in culture medium, and Buscot (1993) described two types of growth: lateral growth, produced by mycelial growth breaking through the glass walls of the Petri dishes, and terminal growth, produced in aging culture media. Formation in culture medium has also been

documented (Philippoussis and Balis, 1995; Faris et al., 1996), as well as the role this plays in storing nutrients (Buscot, 1989; Buscot and Bernillon, 1991). All these studies point to the view that the mass production of sclerotia offers the possibility of it serving as 'seed' for domestication experiments (Singh et al., 1999).

Ower et al. (1986) and Buscot (1993) indicated that either a physical barrier, a non-nutrient (nutrient-poor medium) area or some adverse conditions are required, in such a way that the mycelium stops growing and transforms itself, to become a compact structure that will mature and transform into sclerotia. However, recent studies in

KEYWORDS / Barrier Effect / Compost / Jar Method of Ower / *Morchella* / Nutrient-poor Medium /

Received: 08/12/2010. Modified: 09/27/2011. Accepted: 09/29/2011.

Gerardo Alvarado-Castillo. Doctoral Candidate, Tropical Agro-ecosystems Program, Colegio de Postgraduados (COLPOS), Campus Veracruz, Mexico.

Gerardo Mata. Doctor in Agro-resources Sciences. Institut National Polytechnique de Toulouse, France. Researcher, Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz, Mexico.

Arturo Pérez Vázquez. Ph.D., Imperial College, University of London, UK. Professor-Researcher, COLPOS, Veracruz, Mexico. Address: Cerrada Las Orquídeas, Mza. 20, Lote 20, Tolome, Mpio. Paso de Ovejas, Ver., México C.P. 91675. e-mail: parturo@colpos.mx

Daniel Martínez-Carrera. Ph.D., King's College, University of London, UK. Professor-Researcher, COLPOS, Puebla, Mexico.

Martha Elena Nava Tablada. Doctor in Sociology, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Mexico. Professor-Researcher, El Colegio de Veracruz, Mexico.

Felipe Gallardo-López. Doctor in Sciences in Tropical Agro-ecosystems, COLPOS, Veracruz, Mexico. Professor Researcher, COLPOS, Veracruz, Mexico.

Francisco Osorio-Acosta. Ph.D., University of California at Riverside, EEUU. Professor-Researcher, COLPOS, Veracruz, Mexico.

D. Análisis del ITS (*Internal Transcribed Spacers*) del ADN de *Morchella*

Introducción

La amplificación de regiones específicas de ADN se realiza usando temperatura y una enzima polimerasa termoestable junto con fluorescencia etiquetada en una secuencia específica del ADN, y esto sirve para caracterizar una especie e identificarla. Así mismo, sirve para establecer la filogenia entre especies similares e identificar líneas de parentesco entre especies.

Justificación

Dado que algunos de los ejemplares de *Morchella* fueron recolectados en campo, no se tenía la certeza de la especie a la que pertenecían, por lo que se buscó a través de este análisis, determinar consistentemente su género y especie, además de descartar posible contaminación durante el proceso de inoculación.

Materiales y Métodos

Material biológico. Las cepas de *Morchella* estudiadas son las que están depositadas en el Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles y Medicinales (CREGENHC), del Colegio de Postgraduados (COLPOS, *Campus* Puebla) (Cuadro 1). Mismas que se emplearon en la presente investigación.

Extracción, amplificación y análisis de la región ITS (Internal Transcribed Spacers) del ADNr. Las cepas fueron cultivadas en medio completo líquido con extracto de levadura (composición: dextrosa, 20 g; peptona, 2 g; extracto de levadura, 2 g; MgSO₄·7 H₂O, 0.5 g; KH₂PO₄, 0.46 g; K₂HPO₄, 1 g; agua destilada: 1,000 ml), a

25°C, cosechando y deshidratando el micelio en tubos Eppendorf con un liofilizador (Labconco, Freezone 4.5, E.U.A.).

La extracción del ADN genómico se realizó de acuerdo con la técnica de Challen *et al.* (1995). La cantidad y calidad del ADN genómico obtenido se determinó por electroforesis en gel de agarosa (1%), con tinción de bromuro de etidio. La región ITS1-5.8S-ITS2 se amplificó empleando los iniciadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.*, 1990). Las reacciones de amplificación (50 µl) se llevaron a cabo con un *AmpliTaq Gold PCR kit* (Applied Biosystems, E.U.A.), las cuales contenían lo siguiente: mezcla integrada (*master mix*, 25 µl), iniciador ITS-1 (10 mM, 5 µl), iniciador ITS-4 (10 mM, 5 µl), muestra de ADN (50 ng, 2 µl), y agua (13 µl). Las reacciones se colocaron en el termociclador (Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems), sometiéndolas a un protocolo de un ciclo inicial (95°C, 1 min), seguido de 25 ciclos adicionales (94°C, 30 s; 50°C, 45 s; 72°C, 5 min).

Los productos amplificados se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa (1%) con bromuro de etidio y se purificaron con el *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN, Alemania). El fragmento de ADN purificado fue secuenciado por *SeqWright DNA Technology Services* (E.U.A.). La alineación comparativa de las secuencias entre las cepas estudiadas se realizó con el programa MEGA4 (E.U.A.; Tamura *et al.*, 2007), incluyendo información de la base de datos internacional del *European Bioinformatic Institute* (EBI, Cambridge, Inglaterra) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Cepas y secuencias estudiadas de *Morchella*, tanto nativas como extranjeras.

Muestras de cepas nativas			
Origen	Código	Especie	Número EBI
Estado de México	CP499	<i>Morchella</i> sp.	-
Estado de México	CP506	<i>Morchella</i> sp.	-
Estado de México	CP507	<i>Morchella</i> sp.	-
Estado de México	CP508	<i>Morchella</i> sp.	-
Veracruz	-	<i>Morchellaesculenta</i> (L.) Pers.	AJ698475
Muestras de cepas extranjeras			
Alemania		<i>Morchella conica</i> Pers.	AJ544195
Alemania		<i>Morchella conica</i>	AJ544196
Alemania		<i>Morchella conica</i>	AJ544197
Alemania		<i>Verpa conica</i> (O.F. Müll.) Sw.	AJ698470
China		<i>Morchella conica</i>	DQ257345
E.U.A.	CP509 (IE-750)	<i>Morchellaesculenta</i>	-
Francia		<i>Morchellaesculenta</i>	U51851
Israel		<i>Morchella conica</i>	AJ544198
Polonia		<i>Morchella conica</i>	AM269501
Polonia		<i>Morchella esculenta</i>	AM397272
Suiza		<i>Morchella conica</i>	U51852

La nomenclatura de las especies corresponde al *Index Fungorum*

Las matrices generadas se alinearon por el método estándar múltiple, empleando Clustal_X. Las secuencias se uniformaron, excluyendo regiones con alineaciones ambiguas o faltantes, y se analizaron por el método de Máxima Parsimonia. El soporte del agrupamiento filogenético del dendrograma fue evaluado por análisis de *bootstrap* (1,000 réplicas).

Resultados y Discusión

Las 16 secuencias estudiadas tuvieron un total de 196 posiciones informativas, de las cuales 136 fueron informativas para el análisis de parsimonia. El árbol consenso se muestra en la Figura 1, el cual demostró que las cepas mexicanas CP-499, CP-506, CP-507, y CP-508 pertenecen al género *Morchella*, ya que conformaron un

grupo monofilético mayor junto con las especies *M. conica* y *M. esculenta* identificadas por Kellner *et al.* (2007) y Wipf *et al.* (1996).

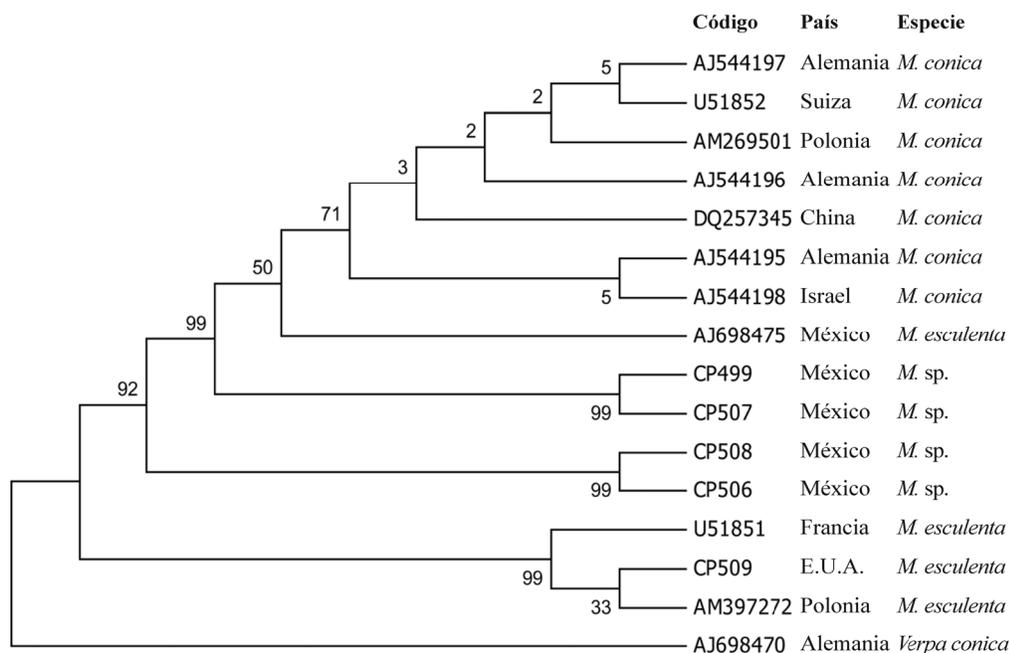


Figura 3.1. Árbol consenso generado a partir de los 140 árboles más parsimoniosos (longitud= 263), analizando secuencias de la región ITS1-5.8S-ITS2 de las cepas mexicanas de *Morchella*

Este árbol consenso fue generado a partir de los 140 árboles más parsimoniosos (longitud= 263), analizando secuencias de la región ITS1-5.8S-ITS2 de las cepas mexicanas de *Morchella* estudiadas en comparación con secuencias de referencia depositadas en la base de datos, incluyendo a *Verpa conica* como grupo externo.

Los valores del árbol consenso son: índice de consistencia= 0.919492, índice de retención= 0.949868, e índice de composición= 0.881246 (0.873396) para todos los sitios (se muestra entre paréntesis el valor de los sitios informativos para el análisis

de parsimonia). Los valores de *bootstrap* se muestran arriba de las ramas (1,000 réplicas). Las especies de *Morchella* corresponden a aquellas reconocidas por Kellner *et al.* (2007) y Wipf *et al.* (1996). El código de las cepas equivale a la clave del CREGENHC, COLPOS, o al número de acceso en el EBI, Inglaterra (EBI). Todas las secuencias del ADN están registradas en la base de datos del CREGENHC.

Dichas cepas se agruparon en dos sublinajes independientes con alto nivel de soporte, indicando cierta relación con de las secuencias correspondientes a *M. esculenta*, y amplia distancia genética de aquellas procedentes de *M. conica* (Cuadro 2).

Cuadro 2. Secuencias de la región ITS del ADN de *Morchella*, comparadas con la base de datos del GenBank.

Registro en el CP	No. de acceso EBI	Especie similar	Porcentaje de identidad
CP-509	EU086776	<i>M. esculenta</i>	97
	EU086775	<i>M. esculenta</i>	97
	U51851	<i>M. esculenta</i>	97
	AM397272	<i>M. esculenta</i>	97
	AJ543741	<i>M. esculenta</i>	97
CP-507	AJ698475	<i>M. esculenta</i>	89
	U51852	<i>M. conica</i>	88
	DQ257344	<i>M. conica</i>	88
	DQ257343	<i>M. conica</i>	88
	AJ544198	<i>M. conica</i>	88
CP-508	DQ257345	<i>M. conica</i>	83
	DQ257344	<i>M. conica</i>	83
	DQ257343	<i>M. conica</i>	83
	AJ544196	<i>M. conica</i>	83
	AJ544198	<i>M. conica</i>	84
CP-499	AJ544198	<i>M. conica</i>	90
	AJ544197	<i>M. conica</i>	90
	AJ544195	<i>M. conica</i>	90
	EF080999	<i>M. conica</i>	89
	AJ544194	<i>M. conica</i>	89

Registro en el CP	No. de acceso EBI	Especie similar	Porcentaje de identidad
CP-506	DQ257345	<i>M. conica</i>	78
	DQ257344	<i>M. conica</i>	78
	AJ698475	<i>M. esculenta</i>	78
	AJ544196	<i>M. conica</i>	78
	U51852	<i>M. conica</i>	79

Aunque la secuencia AJ698475 de *M. esculenta* corresponde a una recolección de Huatusco, Estado de Veracruz, México, las cepas del presente estudio CP-499, CP-506, CP-507, y CP-508 representan una especie diferente, cuya identificación requiere de un análisis molecular de un mayor número de cepas y de diferentes regiones del país.

Conclusiones

Con base en los resultados se concluye que las cepas analizadas corresponden a especies del género *Morchella*.

Literatura citada

- Challen MP, Moore AJ, Martínez-Carrera CD (1995) Facile extraction and purification of filamentous fungal DNA. *BioTechniques* 18: 7-8.
- Kellner H, Luis P, Buscot F (2007) Diversity of laccase-like multicopper oxidase genes in Morchellaceae: identification of genes potentially involved in extracellular activities related to plant litter decay. *FEMS Microbiology Ecology* 61: 153-163.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA). *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322. *In: PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications*. Eds. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ. Academic Press, San Diego.
- Wipf D, Munch JC, Botton B, Buscot F (1996) DNA polymorphism in morels: complete sequences of the internal transcribed spacer of genes coding for rRNA in *Morchella esculenta* (yellow morel) and *Morchella conica* (black morel). *Applied and Environmental Microbiology* 62: 3541-3543.