

Formación de esclerocios en *Morchella esculenta* y *M. conica in vitro*

Gerardo Alvarado-Castillo¹, Gerardo Mata², Arturo Pérez-Vázquez¹, Daniel Martínez-Carrera³
Martha Elena Nava-Tablada⁴, Felipe Gallardo-López¹, Francisco Osorio-Acosta¹

¹ Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz, Tepetates, Veracruz, México. ² Instituto de Ecología A.C., Xalapa, Veracruz, México. ³ Colegio de Postgraduados, Campus Puebla, Cholula, Puebla, México. ⁴ El Colegio de Veracruz, Xalapa, Veracruz, México

Sclerotia formation in *Morchella esculenta* and *M. conica in vitro*

Abstract. The strains IE-750 (*M. esculenta*) and IE-816 (*M. conica*) were used and cultivated in a culture media supplemented with compost. Seven stages were identified during sclerotia formation process: 1. Hyphal growth, 2. Primary mycelia growth and branching, 3. Secondary mycelia interweaving, 4. Formation of compact masses, 5. Growth of compact masses, 6. Sclerotia formation, and 7. Sclerotia growth and maturation. Chlamydospores and conidia were also observed during sclerotia formation process, suggesting *Morchella* displays diverse reproduction and survival strategies under different environmental conditions.

Key words: morels, chlamydospores, conidia, mycelium, strategies

Resumen. Se identificaron las etapas y procesos de formación de esclerocios de *Morchella esculenta* y *M. conica in vitro*, cultivadas en un medio de cultivo suplementado con composta, utilizando las cepas IE-750 (*M. esculenta*) e IE-816 (*M. conica*). En la morfogénesis observada se identificaron siete etapas: 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. También se observó la formación de *clamidosporas* durante la formación de esclerocios, lo que sugiere que *Morchella* presenta diversas estrategias de reproducción y sobrevivencia ante diferentes condiciones ambientales.

Palabras clave: morillas, clamidosporas, conidios, micelio, estrategias

Received 16 May 2011; accepted 22 April 2012.

Recibido 16 de mayo 2011; aceptado 22 de abril 2012.

Introducción

Las morillas (*Morchella* spp.) son hongos comestibles, de alto valor comercial a nivel nacional e internacional, que aún tienen dificultad para cultivarse. Estos hongos producen estructuras de resistencia conocidas como esclerocios, los cuales tienen un rol central en su ciclo de vida y en la producción de cuerpos fructíferos, siendo un punto clave para su domesticación. La función de estas estructuras es acumular

reservas y sobrevivir a condiciones adversas, para posteriormente diferenciarse y fructificar cuando exista un entorno adecuado (Ower *et al.*, 1986, 1988; Volk y Leonard, 1990). En las especies del género *Morchella*, los esclerocios se forman a partir del micelio originado por la germinación de una ascospora, conocido comúnmente como micelio primario, el cual presenta hifas multinucleadas y donde cada célula es una copia múltiple de un único núcleo haploide (homocariótico), que crecen repetidamente y se dispersan hasta formar una masa interconectada entre sí (Pilz *et al.*, 2007).

Autor para correspondencia: Gerardo Mata
gerardo.mata@jnecol.edu.mx

Los esclerocios también pueden formarse a partir de micelio secundario, producto del cruzamiento entre micelios distintos, a través de un proceso de anastomosis, es decir, el entrecruzamiento de hifas y de la unión de su contenido citoplasmático (plasmogamia), originando un micelio diploide, heterocarionte y multinucleado (Volk y Leonard, 1990; Pilz *et al.*, 2007), el cual puede tener una gran cantidad de núcleos (40-50) (Pilz *et al.*, 2007), que pueden llegar hasta 65 (Volk y Leonard, 1990) y cuyo promedio oscila de 10 a 15 núcleos. Esto le proporciona al micelio secundario estabilidad genética, citológica y somática (Volk y Leonard, 1989a), de tal manera que al diferenciarse y fructificar, producirá progenie meiótica recombinante (ascosporas), totalmente fértiles (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 en la formación de esclerocios son necesarias situaciones adversas (Ower, 1982; Buscot, 1993; Volk y Leonard, 1989a; 1990), como condiciones nutrimentales limitadas o una barrera física que interrumpa el crecimiento micelial (Ower *et al.*, 1986; Amir *et al.*, 1992; Buscot, 1993) o la suplementación de medios de cultivo y sustratos con elementos nutritivos (Volk y Leonard, 1989b; Alvarado-Castillo *et al.*, 2008). Aunque también pueden ser inducidos mediante estrés oxidativo (Hadar *et al.*, 1981), por medio de altas temperaturas (Georgiou *et al.*, 2006) o daño mecánico al micelio (Carrol, 1991; Hadar *et al.*, 1981).

La formación de esclerocios se inicia con cambios metabólicos en el micelio, provocados por la translocación de compuestos de carbono a partir de una fuente de nutrientes, y probablemente efectuada por una hifa conductora especializada. Además el proceso involucra factores endógenos y exógenos tales como el mantenimiento de un

balance fisiológico interno y condiciones ambientales que promueven la iniciación de estas estructuras (Willets y Bullock, 1992).

Los esclerocios tienen la capacidad de permanecer latentes (Willets y Bullock, 1992), funcionar como almacén de nutrientes (Amir *et al.*, 1992) y en condiciones adecuadas diferenciarse para producir un cuerpo fructífero (Volk y Leonard, 1990; Güller *et al.*, 2005; Pilz *et al.*, 2007) participando en la propagación 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, originado a partir de hifas esparcidas pero interconectadas entre sí (Willets y Bullock, 1992), 2) Terminal, que se da por la ramificación repetida y alargamiento de las hifas principales (Volk y Leonard, 1990) y 3) Lateral, que se origina a partir de ramificaciones accesorias que se conectan entre sí (Amir *et al.*, 1993).

La formación de esclerocios es fundamental, pues diversos estudios han demostrado que 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), por lo que su producción en forma abundante y sistemática es la primera de dos condiciones para su domesticación (Stott y Mohammed, 2004), 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), por lo que los objetivos de este estudio fueron obtener esclerocios mediante cultivo *in vitro* e identificar las diferentes etapas y estructuras durante su formación.

Materiales y métodos

Material biológico

Se estudiaron dos cepas: IE-750 [*Morchella esculenta* (L. Fr.) Pers.] proveniente de Estados Unidos, adquirida de la empresa Fungi Perfecti e IE-816 [*Morchella conica* Pers. Ex Fr.], colectada en el Estado de México en un bosque de pino (LN 19° 18' 08.73", LW 100° 01' 46.30"), aislada a partir de una porción del estípite del hongo. Ambas se conservan en el Cepario de Hongos del Instituto de Ecología, A.C., en medio de cultivo con extracto de malta y agar.

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, utilizado para el cultivo de champiñón (*Agaricus bisporus*), aforados a un litro de agua destilada. El extracto se obtuvo colocando 1.2 k de compost en cuatro litros de agua destilada, hirviendo la mezcla durante 15 minutos a fuego lento y filtrándola posteriormente para obtener el extracto.

Se vertieron 20 mL del medio de cultivo en cajas Petri de 10 cm de diámetro. Se inoculó el centro de cada caja con un implante de 0.5 cm² de cada cepa y se colocaron cuatro cubreobjetos, esterilizados a fuego directo y distribuidos de manera uniforme, con la finalidad de obtener crecimiento

sobre ellos. Se incubó en condiciones de obscuridad a 26 °C durante 3, 6, 9 y 12 días, realizando cinco repeticiones para cada día. Se removieron los cubreobjetos después de los periodos mencionados, examinándolos directamente en un microscopio óptico 1000X modelo K7 (Zeiss[®]) para observar el desarrollo micelial y la formación de esclerocios.

Tinción

Una vez que crecieron las estructuras sobre los cubreobjetos (micelio y esclerocios según la etapa de crecimiento), se realizaron tinciones con azul de lactofenol, dada la capacidad de este colorante para teñir materiales aniónicos, entre los cuales se encuentra el núcleo y otras estructuras internas (Correa de Restrepo y Peñuela, 2002).

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* (Tabla 1) iniciaron con el crecimiento y proliferación de hifas principales (Figura 1a), la cuales produjeron hifas secundarias que se ramificaron (Figura 1b), se entrelazaron entre sí (Figura 1c) e integraron masas hifales, que a su vez formaron estructuras compactas (Figura 1d), mismas que continuaron su crecimiento (Figura 1e). La masa formada

Tabla 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
Formación de esclerocios	5	Crecimiento de masas compactas	216-264	48
	6	Formación de esclerocios	264-288	24
	7	Crecimiento y maduración de esclerocios	288-336	48

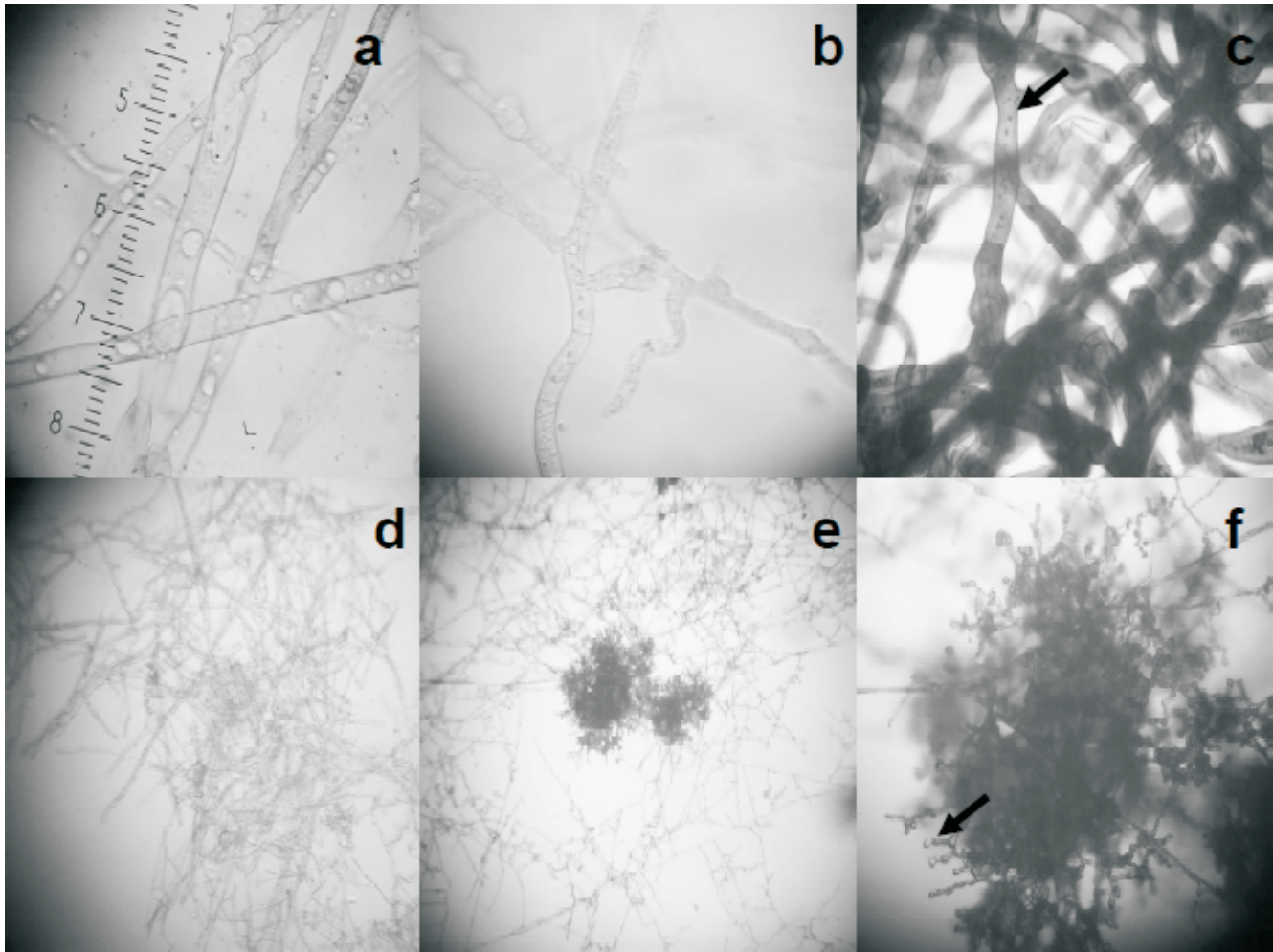


Figura 1. Etapas de la formación de esclerocios en *Morchella*. **a.** Crecimiento de hifas principales. **b.** Hifas secundarias ramificadas. **c.** Hifas multinucleadas entrelazadas. **d.** Inicio de la formación de masas hifales. **e.** Crecimiento de la masa hifal. **f.** Inicio de la formación de esclerocios, en donde se observan la formación de clamidosporas.

incrementó su tamaño hasta dar lugar a los primeros esclerocios (Figura 1f) que maduraron y aumentaron su tamaño, integrando células de su periferia hacia el centro (Figura 2a). 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 se refieren principalmente a la colonización del medio de cultivo, en las cuales las hifas crecen, ramifican y entrelazan entre sí, (Figura 2b), estas hifas son multinucleadas (15 núcleos en promedio) (Figura 1c), 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).

A partir de la etapa cuatro, se observó la formación de estructuras especializadas que se identificaron como clamidosporas (Figura 1f y 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.

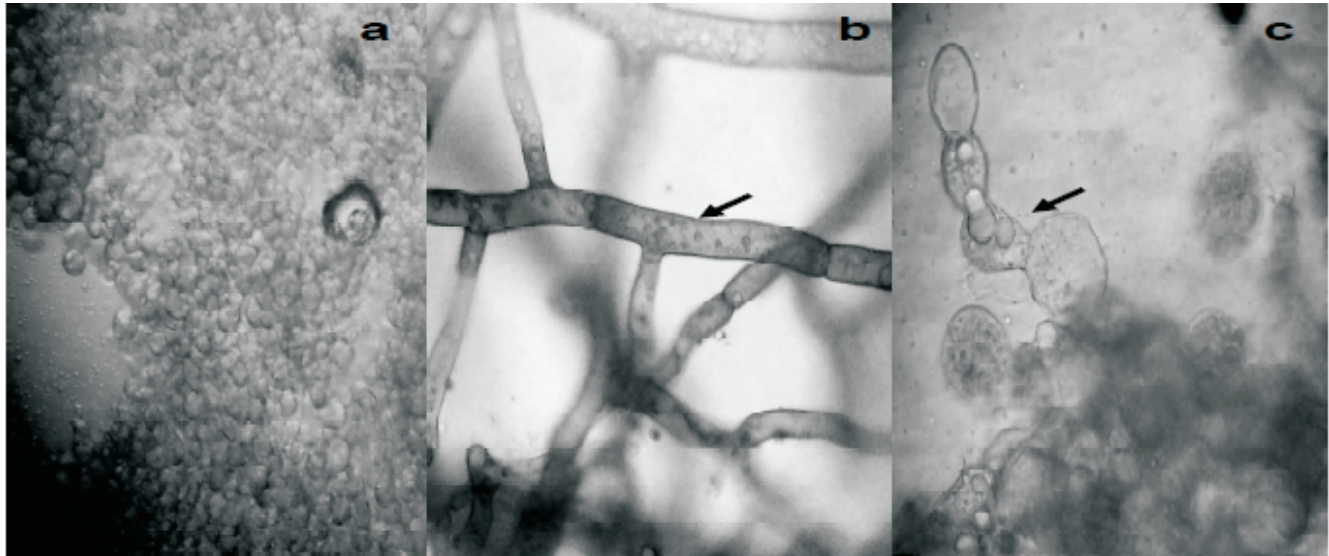


Figura 2. Etapas en la formación de esclerocios de *Morchella* *in vitro*. **a.** Integración de células de la periferia hacia el centro para la formación de esclerocios. **b.** Entrelazamiento de las hifas de *Morchella*. **c.** Clamid esporas en los esclerocios de *Morchella*.

Discusión

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 abarcaría 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 de este estudio) y 5. Formación de esclerocios secundarios (lo cual no fue observado en este trabajo, ya que en la formación de esclerocios, no existen otras estructuras adyacentes), así mismo, el tiempo de aparición de estas estructuras (12-14 días) fue similar.

Lo anterior coincide con lo descrito por Smits y Noguera (1988), que señalan que la formación de esclerocios en algunas especies de hongos puede seguir diferentes rutas de desarrollo, pero comúnmente involucran el engrosamiento, ramificación y septación de hifas principales

que dan lugar a los esclerocios, sin embargo, 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 manifiestan que la formación de esclerocios inicia de la repetida ramificación y plasmogamia de hifas que dan origen al micelio secundario, característica necesaria para que, según Pilz *et al.* (2007), los esclerocios tengan el potencial para fructificar.

Esto tiene relación con el origen del esclerocio (ya sea a partir de micelio primario o secundario), pues existe la duda de que un micelio primario pueda producir esclerocios que logren diferenciarse en un cuerpo fructífero, ya que al ser una estructura haploide, produciría estructuras estériles que no podrían fructificar (Pilz *et al.* 2007). Con los resultados obtenidos en este trabajo no es posible afirmar o negar esta hipótesis puesto que no se usaron cultivos monospóricos y no se han reportado trabajos utilizando este tipo de cultivos. Sin embargo, (Ower *et al.*, 1986, 1988), sugieren que el micelio de *Morchella* puede presentar procesos autógamos y heterógamos (Ower *et al.*, 1986, 1988), que pueden derivar en la fructificación del hongo.

Estos procesos en los basidiomicetes se denominan:

1) homotalismo, comportamiento sexual que permite obtener cuerpos fructíferos a partir de la germinación de una sola espora; y 2) heterotalismo, condición en donde la formación de cuerpos fructíferos requiere del cruzamiento de dos micelios compatibles (Miles y Chang, 1997; Kues y Liu, 2000). La condición multinuclear observada en ambas cepas de *Morchella* (Volk y Leonard, 1990; Pilz *et al.*, 2007), puede dar lugar a estructuras genéticas estables (Volk y Leonard, 1989b), lo cual le conferiría 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 generación de estructuras que fueron identificadas como clamidosporas, estas estructuras también fueron identificadas por Ower (1982) y Ower *et al.* (1986; 1988) y fueron descritas como una clase de conidios. Éstas se desarrollaron a partir de hifas independientes. Las clamidosporas según Amir *et al.* (1993) y Pilz *et al.* (2007) son asexuales y son el resultado de la modificación de hifas simples, y representan un medio de propagación clonal y 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. De igual forma, Pilz *et al.* (2007), describieron que *Morchella* produce estas estructuras con el objetivo de producir esporas para su dispersión, como una estrategia de sobrevivencia.

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., la cual se observó que coincide con lo señalado por Pilz *et al.* (2007), pues las hifas formaron estructuras a manera de conidios en forma individual (aunque también pueden ser agrupados). Esta es 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). Por tanto es posible especular, con base en la literatura, que el micelio haya producido tanto esclerocios como clamidosporas como un mecanismo de sobrevivencia.

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 2a), que indican que estos ya son capaces de tolerar condiciones adversas como baja temperatura o desecación (Amir *et al.*, 1993, 1994), lo que permite ser una estructura de resistencia capaz de fructificar cuando se presenten las condiciones adecuadas.

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. Se identificó la formación de clamidosporas, las cuales dan lugar y forman parte de los esclerocios, lo cual no había sido previamente reportado y sugiere que estos hongos tienen más de una estrategia de dispersión y sobrevivencia. Aunque el esclerocio ha sido considerado una estructura de resistencia, en este trabajo fue obtenido bajo condiciones apropiadas, ya que las cepas no se sometieron a estrés, lo que sugiere que la formación de dichas estructuras, no sólo es causada por condiciones adversas y que podría tener otro tipo de función como el almacenamiento de nutrientes.

Aunque aún existen dudas sobre el ciclo de vida de *Morchella*, este 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. En este sentido es necesario continuar con 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 estos hongos es necesario entender sus adaptaciones, ciclo de vida, modos de nutrición y estrategias reproductivas.

Agradecimientos

Se agradece al Colegio de Postgraduados Campus Veracruz, a la Red de Manejo Biotecnológico de Recursos del INECOL y al CONACYT, por la implementación y financiamiento de esta investigación. Alvarado-Castillo agradece la beca otorgada por CONACYT para la realización de estudios doctorales.

Literatura citada

- Alvarado-Castillo, G., G. Mata, D. Martínez-Carrera, M.E. Nava, D.E. Platas, 2008. Obtención de esclerocios de *Morchella esculenta* en diferentes medios de cultivo. *Interciencia* 33: 528-531.
- Amir, R., D. Levanon, Y. Hadar, I. Chet, 1992. Formation of sclerotia by *Morchella esculenta*: relationship between media composition and turgor potential in the mycelium. *Mycological Research* 96: 943-948.
- Amir, R., D. Levanon, Y. Hadar, I. Chet, 1993. Morphology and physiology of *Morchella esculenta* during sclerotial formation. *Mycological Research* 97: 683-689.
- Amir, R., D. Levanon, Y. Hadar, I. Chet, 1994. The role of source-sink relationships in translocation during sclerotial formation by *Morchella esculenta*. *Mycological Research* 98: 1409-1414.
- 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, D.R., 1991. Induction of sclerotia in *Sclerotium rolfsii* by short low-temperature treatment. *Journal of General Microbiology* 137:1063-1066.
- Correa de Restrepo, M., A. Peñuela, 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: 41-52.
- Georgiou, C.D., N. Patsoukis, I. Papapostolou, G. Zervoudakis, 2006. Sclerotial metamorphosis in filamentous fungi is induced by oxidative stress. *Integrative and Comparative Biology* 4: 691-712.
- Güler, P., O. Arkan, 2000. Cultural characteristics of *Morchella esculenta* mycelium on some nutrients. *Turkey Journal Biology* 24: 783-794.
- Güller, P., S. Bozcuk, F. Mutlu, K. Sorkun, 2005. Propolis effect on sclerotial formations of *Morchella conica* Pers. *Pakistan Journal of Botany* 37: 1015-1022.
- Hadar, Y., Y. Henis, I. Chet, 1981. The potential for the formation of sclerotia in submerged mycelium of *Sclerotium rolfsii*. *Journal of General Microbiology* 122:137-141.
- Kües, U., Y. Liu, 2000. Fruiting body production in basidiomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54: 141-152.
- Lin, X., J. Heitman, 2005. Chlamydospore formation during hyphal growth in *Cryptococcus neoformans*. *Eucaryotic Cell* 4:1746-1754.
- Masaphy, S., 2005. External ultrastructure of fruit body initiation in *Morchella*. *Mycological Research* 109: 508-512.
- Mata, G., A. Rodríguez-Estrada, 2005. Studies on laccase and biomass production *in vitro* and culture of a Mexican wild strain of *Agaricus bisporus* (J.Lge) Imbach: a comparison with commercial strains. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 7: 431-432.
- Miles, G.P., S.T. Chang, 1997. *Mushroom biology: concise basics and current developments*. World Scientific Publishing, London UK.
- Ower, R.D., 1982. Notes on the development of the morel ascocarp: *Morchella esculenta*. *Mycologia* 74: 142-144.
- Ower, R.D., G.L. Mills, J.A. Malachowski, 1986. Cultivation of *Morchella* U.S. Patent No: 4,594,809.
- Ower, R.D., G.L. Mills, J.A. Malachowski, 1988. Cultivation of *Morchella* U.S. Patent No: 4,757,640.
- Pilz, D., R. McLain, S. Alexander, L. Villarreal-Ruiz, S. Berch, T.L. Wurtz, C.G. Parks, E. McFarlane, B. Baker, R. Molina, J.E. Smith, 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.
- Smits, G.B., R. Noguera, 1988. Ontogenia y morfogénesis de esclerocios y picnidios de *Macrophomina phaseolina*. *Agronomía Tropical* 38: 69-78.
- Stamets, P., 2000. *Growing gourmet and medicinal mushrooms*. Third edition. Ten Speed Press, Berkeley, California USA.
- Stott, K., C. Mohammed, 2004. *Specialty mushroom production systems: maitake and morels*. (Project No UT-30AII) Rural Industries Research and Development Corporation, Australia.
- Volk, T.J., T.J. Leonard, 1989a. Physiological and environmental studies of sclerotium formation and maturation in isolates of *Morchella crassipes*. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 3095-3100.
- Volk, T.J., T.J. Leonard, 1989b. Experimental studies on the morel Heterokaryon formation between monoascospore strains of *Morchella*. *Mycologia* 81: 523-531.
- Volk, T.J., T.J. Leonard, 1990. Cytology of the life-cycle of *Morchella*. *Mycological Research* 94: 399-406.
- Willets, H.J., S. Bullock, 1992. Developmental biology of sclerotia. *Mycological Research* 96: 801-816.