



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas
Área Botánica

**Producción de biomasa micelial de *Lactarius quieticolor*
y *Rhizopogon roseolus* en cultivo líquido para la
micorrización controlada de especies de *Pinus***

DANIEL EDUARDO CHÁVEZ MATAMALA
CONCEPCIÓN-CHILE
2015

Profesor Guía: Götz Palfner
Dpto. de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

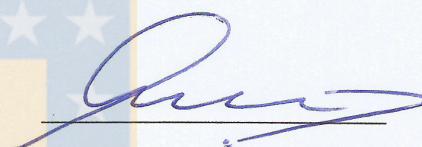
La tesis de “Doctorado en Ciencias Biológicas Área Botánica” titulada “Producción de biomasa miceliar de *Lactarius quieticolor* y *Rhizopogon roseolus* en cultivo líquido para la micorrización controlada de especies de *Pinus*” del Sr. Daniel Eduardo Chávez Matamala y realizada bajo la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, ha sido aprobada por la siguiente comisión de evaluación:

Comisión Evaluadora:

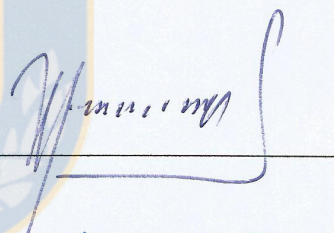
Götz Palfner (Profesor guía)
Dr. Recursos Naturales



Ángela Machuca Herrera (Profesor co-guía)
Dr. En Ciencias, Mención Bioquímica



Víctor Hernández Santander
Dr. En Ciencias Ambientales

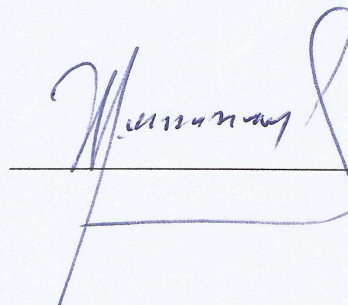


Guillermo Pereira Cancino
Dr. Ingeniero de Montes



Director de Postgrado:

Víctor Hernández Santander
Dr. En Ciencias Ambientales





Dedicatoria

A Dios por permitirme llegar a esta etapa de mi vida

A mi esposa Carola y mi hijo Agustín

A mis padre Sergio y María

A mis hermanos María Isabel y Sergio Alejandro

A mi familia y amigos que siempre estuvieron ahí para apoyarme

AGRADECIMIENTOS

- ✓ A mis Directores de tesis Dra. Ángela Machuca Herrera y Dr. Götz Palfner orientadores de las investigaciones del presente trabajo, por todo su tiempo y exigencia, para mejorar lo alcanzado, gracias.
- ✓ Al Dr. Götz Palfner, por permitirme utilizar el Laboratorio de Micología y el Fungario en la Facultad de Ciencias Biológicas y Oceanográficas lugar donde se encuentra depositado el material fúngico recolectado, gracias.
- ✓ Al equipo de investigación de los Doctores Mario Honrubia García y Dra. Asunción Morte de la Universidad de Murcia-España su buena disposición en recibirme y apoyarme en el desarrollo de mi Estancia Doctoral, gracias.
- ✓ Al Departamento de Ciencias y Tecnología Vegetal, Campus Los Ángeles, por permitirme utilizar las instalaciones y realizar las investigaciones en el Laboratorio de Biotecnología de Hongos.
- ✓ Al Laboratorios de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas y al Laboratorio de Genómica y Biotecnología Acuícola del Centro de Biotecnología (Dr. Víctor Hernández y Dr. Cristian Gallardo), gracias.
- ✓ A la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) por la Beca Doctoral 21110038 (2011-2014), por el Financiamiento de Tesis 2013-2014, por el Financiamiento de mi estadía Doctoral en Murcia, España y por el apoyo a los congresos Nacionales e Internacionales realizados durante mis estudios Doctorales, gracias.
- ✓ Agradecer a la Dirección de Posgrado de la UdeC por el apoyo económico para poder realizar mi Pasantía Doctoral en España durante los meses de Octubre 2013-Febrero 2014 y por el apoyo para participar del ALAM-2014, en Colombia.
- ✓ Finalmente agradecer a Dios su eterna fidelidad y a mis dos grandes amores Carola y Agustín que sin ellos nada de esto hubiese sido posible (Los Amo).
- ✓ Finalmente termino diciendo lo que expreso el escritor de Proverbios 9:10 “El principio de la sabiduría es el temor de Jehová; y el conocimiento del Santo es la inteligencia.”

A todos ellos, Gracias...

INDICE

Página

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Micorrizas.....	2
1.1.1 Clasificación de micorrizas.....	3
1.1.2 Ectomicorrizas.....	4
1.1.3 Absorción de agua y nutrientes.....	5
1.1.4 El género <i>Pinus</i> en Chile	5
1.1.5 Hongos ectomicorrícicos	6
1.2. Géneros <i>Lactarius</i> y <i>Rhizopogon</i> en Chile.....	7
1.3. Hongos ectomicorrícicos generadores de valor agregado al bosque.....	8
1.4. Tipo de inóculos fúngicos y micorrización controlada en vivero.....	10
1.5. Producción de biomasa miceliar en biorreactor.....	13
1.6. Experiencia del cultivo de hongos ectomicorrícicos en Chile.....	15
1.7. Problema Científico.....	16
2. Objetivo General	17
2.1 Objetivos específicos	17
3. Hipótesis de Trabajo	18
CAPÍTULO II. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y FILOGENIA MOLECULAR DE <i>Lactarius</i> SECCIÓN <i>Deliciosi</i> Y <i>Rhizopogon</i> sp.	19
1. Introducción.....	20
2. Metodología.....	21

3. Resultados..... 26

4. Discusión..... 33

CAPÍTULO III: OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO DE *Lactarius quieticolor* y *Rhizopogon roseolus* PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA MICELIAR..... 37

1. Introducción..... 38

2. Metodología..... 39

3. Resultados..... 46

4. Discusión..... 54

CAPÍTULO IV: METABOLITOS SECUNDARIOS PRODUCIDOS POR EL HONGO COMESTIBLE *Lactarius quieticolor*..... 58

1. Introducción..... 59

2. Metodología..... 60

3. Resultados..... 64

4. Discusión..... 67

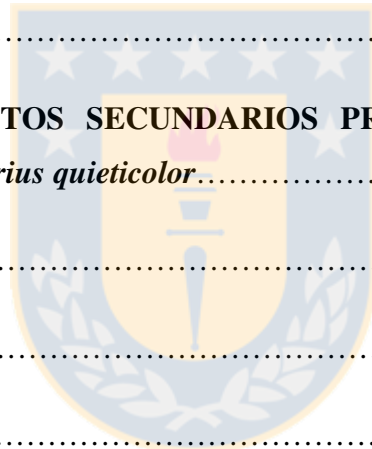
CAPÍTULO V: MICORRIZACIÓN DE ESPECIES DE *Pinus* CON *L. quieticolor* y *R. roseolus*..... 70

1. Introducción..... 71

2. Metodología..... 72

3. Resultados..... 77

4. Discusión..... 83



CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES GENERALES.....	88
CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA.....	90
CAPÍTULO VIII: ANEXOS.....	110
Anexo 1. Trabajo 2014 Publicado en revista Bosque (ISI).....	111
Anexo 2. Trabajo 2014 Publicado en revista African Journal of Microbiology Research (ISI).....	112
Anexo 3. Trabajos presentados en Congresos Nacionales e Internacionales.....	113
Año 2011 XXXIII Congreso de la Sociedad de Microbiología de Chile.....	114
Año 2012 XXXIV Congreso de la Sociedad de Microbiología de Chile.....	116
Año 2013 XXXV Congreso de la Sociedad de Microbiología de Chile.....	120
Año 2014 XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología ALAM 2014.....	122



CAPÍTULO I

Figura 1 Izquierda: Desarrollo de la extensión del micelio y rizomorfos de <i>Suillus bovinus</i> en simbiosis con una plántula de <i>Pinus sylvestris</i> (Smith y Read 2008). Derecha: Ampliación de estructura del manto micorrícico (Rovira et al. 1983).....	4
Figura 2 Diferentes tipos de inóculos micorrícicos. a) Inóculo esporal, b) Inóculo miceliar sólido en mezcla de turba-vermiculita, c) inóculo miceliar en Polímeros de alginato y d) Inóculo miceliar líquido.....	13

CAPÍTULO II

Figura 1 Mapa mostrando los sitios de recolección de <i>L. quieticolor</i> y <i>R. roseolus</i> en las regiones del Maule y Bío-bío. A la derecha se muestran fotos de los cuerpos fructíferos recolectados en campo.....	22
Figura 2 Macro y micromorfología de <i>Lactarius</i> sp. a) basidiomas, b) esporas, c) esporas, d) cistidios y basidios.....	27
Figura 3 Macro y micromorfología de <i>Rhizopogon</i> sp. a) basidiomas, b) esporas, c) basidios, cistidios inmaduros, esporas y paráfisis.....	28
Figura 4 Árbol de Maximum likelihood (Secuencias de la región ADNr ITS1F/ ITS4) y taxones seleccionados: <i>Lactarius sección Deliciosi</i> (Nuytinck et al. 2007).....	30
Figura 5 Árbol de Maximum likelihood (Secuencias de la región ADNr ITS1F/ ITS4) y taxones seleccionados: <i>Rhizopogon</i> sp. (Martin y García 2009).....	31

CAPITULO III

Figura 1 Niveles bajos, medios y altos de las tres variables consideradas.....	43
Figura 2 Procedimiento para encapsular micelio. a) Licuadora (mezclar alginato de sodio + turba molida + micelio), b) Solución de alginato de sodio + turba molida + micelio, c) Bomba peristáltica (para traslado de material de b a d) y d) Recipiente con CaCl ₂ (formación de pellet (bolitas de alginato)).....	45
Figura 3 Velocidad media de crecimiento radial y producción de biomasa miceliar de los hongos (A) <i>L. quieticolor</i> y (B) <i>R. roseolus</i> en los medios de cultivo sólidos BAF y	

MMN, utilizando como fuente de carbono manitol, glucosa y sacarosa (10 g L⁻¹). Periodo de incubación 30 días. Letras iguales sobre las barras no presentan diferencias significativas..... 46

Figura 4 Producción de biomasa miceliar de (A) *L. quieticolor* y (B) *R. roseolus* en los medios de cultivo líquido BAF y MMN, utilizando como fuente de carbono manitol, glucosa y sacarosa (10 g L⁻¹). Periodo de incubación 30 días. SFC: medio de cultivo sin fuente de carbono. Letras iguales sobre las barras no presentan diferencias significativas.. 47

Figura 5 Cinética de crecimiento a pH 5.5 por *L. quieticolor* (izquierda) y *R. roseolus* (derecha) en condición de agitación y estática. μ : tasa específica de crecimiento. Tdup: Tiempo de duplicación celular..... 48

Figura 6 Superficie de respuesta para *L. quieticolor* (A-C) y para *R. roseolus* (D-F) cultivados en medio líquido BAF durante 30 días..... 51

Figura 7 Cultivo de micelio en biorreactor Biostat C Cubas de 1 L..... 53

Figura 8 Siembra y viabilidad del encapsulado en medio MMN sólido. a) Bolas de alginato en agua desionizada estéril, b) Siembra en medio de cultivo sólido, c) viabilidad..... 53

CAPITULO IV

Figura 1 Cromatograma CG-MS de los principales metabolitos obtenidos a partir del caldo de cultivo de *L. quieticolor* creciendo en un biorreactor LIFLUS GX (5 L) (A) propanodioico (3-oxo-1-ciclopentano-1-il) (15,8 min), (B) ácido decanoico (8,5 min).... 65

Figura 2 Perfiles GC-MS de metabolitos principales obtenidos a partir del caldo de cultivo de *L. quieticolor* creciendo en matraces Erlenmeyer; señales principales corresponden a: (A) Cubenol, (B) Escualeno, (C) 1,4-dimetil-7- (1-metiletil) -Azulene.... 66

Figura 3 Actividad anti-fúngica de *L. quieticolor* LD2. a) Control, b) 100 μ g y c) 200 μ g..... 67

CAPITULO V

Figura 1 Esquema para la producción de plantas micorrizadas..... 73

Figura 2 Síntesis micorrícica *in vitro* de *Pinus radiata* con *R. roseolus*. La inoculación se realizó utilizando discos de agar-micelio..... 75

Figura 3 Atributos morfológicos de las plantas de *P. radiata* y *P. ponderosa* sometidas a los diferentes tratamientos A-H. (A-C) Altura (cm) de *P. radiata* y *P. ponderosa*. (B-D) Diámetro a la altura del cuello (mm) de *P. radiata* y *P. ponderosa*. Letra iguales sobre las barras indican que no presentan diferencias significativas entre los tratamientos (Duncan $P < 0,05$)..... 77

Figura 4 Plantas de *P. radiata* (a) y *P. ponderosa* (b) una vez finalizado el experimento (5 meses desde la inoculación). De izquierda a derecha tratamientos A al H..... 78

Figura 5 Producción de biomasa aérea y radicular (peso seco) de las plantas de *Pinus radiata* (izquierda) y *P. ponderosa* (derecha) sometidas a diferentes tratamientos. Letra iguales sobre las barras indican que no presentan diferencias significativas entre los tratamientos (Duncan $P < 0,05$)..... 79

Figura 6 Porcentaje de micorrización (%) de las plantas de *Pinus radiata* (izquierda) y *P. ponderosa* (derecha) obtenido en los distintos tratamientos. Los valores seguidos por la misma letra por especie no presentan diferencias significativas ($P < 0,05$). Los tratamientos A y B controles sin y con fertilizante no presentaron micorrización de contaminantes. sm: sin micorrizas..... 80

Figura 7 Cepellón de *P. radiata* micorrizado con *R. roseolus* al cabo de 5 meses..... 81

Figura 8 Macro y micromorfología de micorrizas sintetizadas de *L. quieticolor* y *R. roseolus* con *P. radiata*. a-c: *L. quieticolor*, a) sistema micorrícico, b) manto fúngico con patrón celular plectenquimático, y c) manto fúngico con hifa laticífera, d-f: *R. roseolus*, d) sistema micorrícico, e) manto fúngico con patrón celular plectenquimático y f) Hifas superficiales con presencia de cristales..... 82

CAPÍTULO I:

Tabla 1 Características importantes de los diferentes tipos de micorrizas.....	3
---	---

CAPÍTULO II

Tabla 1 Colección usada en este estudio.....	24
Tabla 2 Listado de especímenes analizados, sitios, codificación, año de recolecta y coordenada geográfica utilizados para el análisis filogenético.....	26
Tabla 3 Secuencias de ITS más cercanas entre <i>Lactarius quieticolor</i> - <i>Rhizopogon roseolus</i> y otras Russulaceae and Boletaceae, respectivamente. Hongos obtenidos por la búsqueda BLAST en la base de datos GenBank.....	32
Tabla 4 Matriz de distancia genética para (a) <i>Lactarius sp.</i> and (b) <i>Rhizopogon sp.</i>	33
Tabla 5 pH de suelos en diferentes sectores de recolecta (metodología según Steubing et al. 2001).....	34

CAPÍTULO III

Tabla 1 Diseño de matriz utilizada para cada experimento con las variables codificadas.....	41
Tabla 2 Valores experimentales y predichos para la biomasa expresado en g L ⁻¹	49
Tabla 3 Coeficientes del modelo.....	50
Tabla 4 Análisis de regresión para biomasa (modelo de superficie de respuesta cuadrática ajustada).....	50

CAPÍTULO IV

Tabla 1 Metabolitos detectados en el caldo de cultivo de <i>Lactarius quieticolor</i> creciendo en biorreactor LIFLUS GX (5 L) en orden decreciente de abundancia.....	64
Tabla 2 Metabolitos detectados en el caldo de cultivo de <i>Lactarius quieticolor</i> creciendo en matraces erlenmeyer.....	66

CAPÍTULO V

Tabla 1 Ensayos de Inoculación con *L. quieticolor* y *R. roseolus* bajo condiciones controladas.....

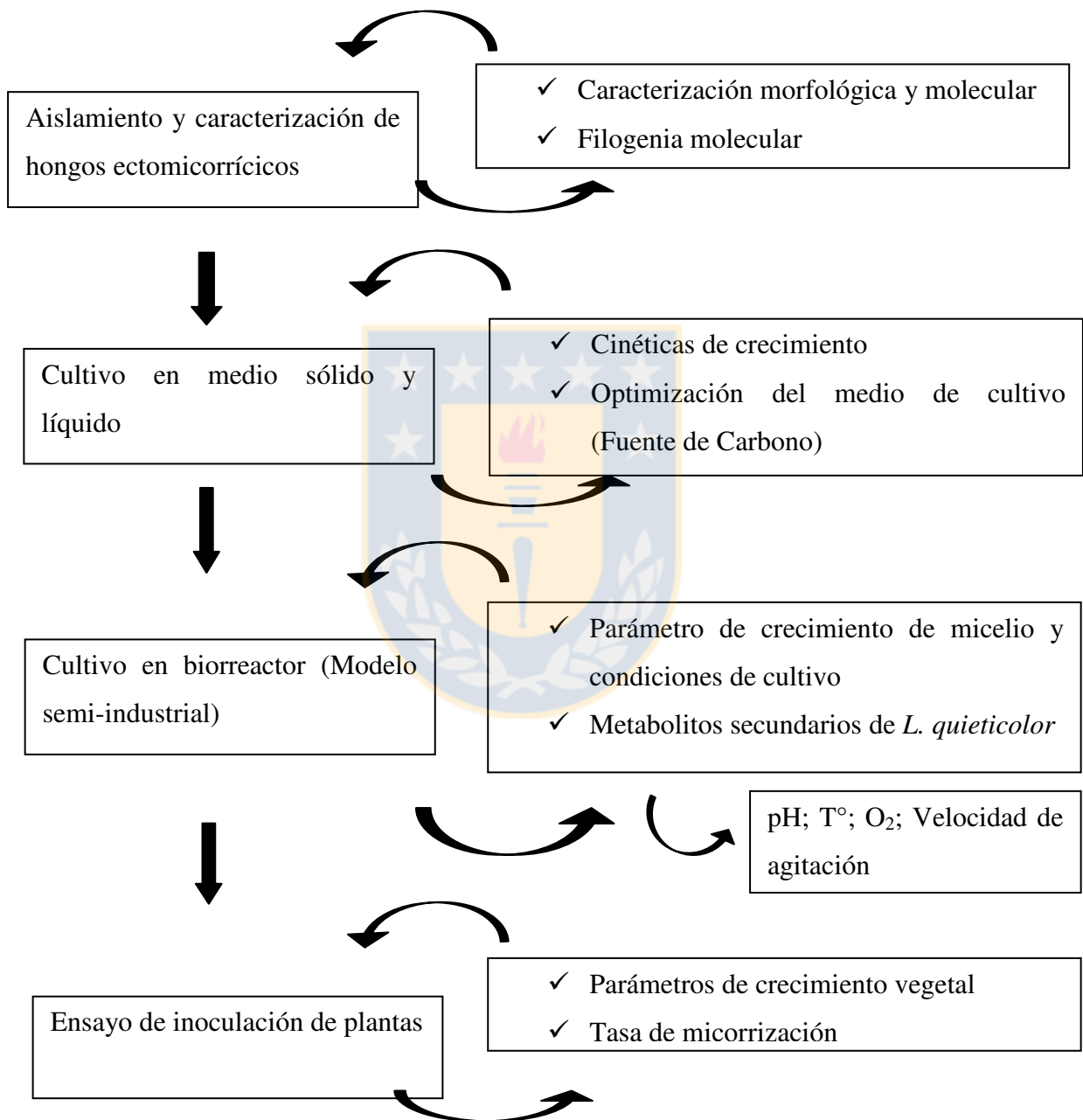
74



RESUMEN

Las especies fúngicas *Lactarius quieticolor* y *Rhizopogon roseolus* son simbiontes micorrícicos específicos del género *Pinus* y pueden ser cultivadas en condiciones axénicas, siendo necesario conocer y evaluar su dinámica de crecimiento *in vitro*. Se estudió la producción de biomasa micelial de *L. quieticolor* y *R. roseolus* en cultivo líquido y se evaluó su eficiencia en la formación de micorrizas en plantas de *Pinus radiata* y *Pinus ponderosa*. *L. quieticolor* fue recolectada de plantaciones adultas de *P. radiata* de la Provincia de Concepción, BíoBío y Cauquenes y *R. roseolus* de plantaciones juveniles de *P. radiata* de la Provincia del BíoBío y Cachapoal. De ambas especies, se aislaron cepas previa identificación a nivel macro, microscópico y molecular. Una vez identificadas las especies fúngicas se llevó a cabo el proceso de optimización de la producción de biomasa en medio líquido considerando el pH inicial (3,5 a 5,5), concentración de fuente de carbono (20 a 40 g/L) y temperatura (20 a 28 °C), para ello, se utilizó la metodología de superficie de respuesta (MSR) y el diseño de Box–Behnken. Para ambas especies se escaló su producción en biorreactor y para el caso de *L. quieticolor* (hongo comestible) se evaluó la presencia de metabolitos secundarios extracelulares. Finalmente el potencial de micorrización de las especies fúngicas se analizó bajo condiciones controladas de laboratorio donde se evaluó y caracterizó la formación de micorrizas entre los hongos en estudio con los fitobiontes, y la aplicación de fertilizantes químicos. Los resultados permitieron identificar la especie *L. quieticolor* por primer vez en Chile y corroborar la especie *R. roseolus*. La optimización permitió establecer el máximo de crecimiento en medio líquido para ambas especies fúngicas arrojando un aumento de la producción de biomasa de 1,2 g L⁻¹ a 3,25 g L⁻¹ para *L. quieticolor* (pH 5,5, 24°C y 20 g L⁻¹ de glucosa) y de 3,02 a 8,6 g L⁻¹ para *R. roseolus* (pH 5,5, 28°C y 30 g L⁻¹ de manitol), respecto a un cultivo control (pH 5,5, 24°C y 10 g L⁻¹ de glucosa) para ambos hongos ectomicorrícicos. En biorreactor se obtuvieron rendimientos de 3,42 y 8,5 g L⁻¹ para *L. quieticolor* y *R. roseolus*, respectivamente, respaldando con ello el modelo. Los principales metabolitos producidos y extraídos de *L. quieticolor* con amberlita XAD-2 fueron el ácido propanodioico (3-oxo-1-ciclopentano-1-il) (37%) y derivados de hidroquinona (17%), mientras que con SPE el metabolito principal fue el ácido decanoico (93%). Se comprobó que la presencia de fertilizantes químicos disminuye la tasa de formación de micorrizas por *L. quieticolor* y *R. roseolus* en *Pinus* spp., sin embargo, la aplicación de hongos ectomicorrícicos como *R. roseolus* estimula el crecimiento de las especies vegetales *P. radiata* y *P. ponderosa*, a un grado mayor al alcanzado en este estudio con el fertilizante comercial Basacote 6M, por lo que la selección de buenas cepas fúngicas podrían ir en reemplazo de la aplicación de fertilizantes químicos.

ESQUEMA RESUMEN DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN



CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO



1. INTRODUCCIÓN

Los hongos son organismos vivos eucariotas, la mayoría de ellos pertenecientes al Reino Fungi. No poseen cloroplastos, por lo cual se alimentan de sustancias orgánicas, es decir, son organismos heterótrofos. Por otra parte, poseen paredes celulares compuestas por quitina, a diferencia de las paredes celulares de las plantas que están compuestas principalmente por celulosa. Además, las esporas se dispersan por diferentes medios como aire, agua o suelo, y en su generalidad, los hongos verdaderos (Eumycota) están compuestos de un cuerpo vegetativo filamentoso, dotado de una gran capacidad de transporte interno de sustancias (Izco et al. 2004). Los hongos contemplan un grupo heterogéneo, polifilético, con organismos pertenecientes al menos a tres líneas evolutivas diferentes. Actualmente se clasifica el Reino Fungi, en 5 divisiones: Chytridiomycota, Zygomycota, Glomeromycota, Ascomycota y Basidiomycota (Izco et al. 2004; Webster y Weber 2007), dentro de ellas las divisiones Ascomycota y Basidiomycota son conocidas como hongos superiores, los cuales generan cuerpos fructíferos durante su ciclo reproductivo.

1.1 Micorrizas

Desde el punto de vista biológico las micorrizas han sido definidas como asociaciones mutualistas entre ciertos hongos y las raíces de las plantas, en la que ambos miembros de la asociación se benefician y potencian con el transporte y absorción de agua y nutrientes, influyendo tanto en la estructura como en la estabilidad de las comunidades vegetales (Bolan 1991; Maldonado y Ramírez 1997; Miyasaka y Habte 2003). Se trata de uno de los tipos de simbiosis más extendidos en la biosfera, ya que en torno al 90 % de las plantas terrestres son capaces de establecer algún tipo de micorrizas (Smith y Read 2008). El hongo ayuda a la planta a absorber agua y nutrientes minerales del suelo y a cambio la planta le cede al hongo compuestos hidrógeno-carbonados derivados de la fotosíntesis (Miyasaka y Habte 2003; Read y Pérez-Moreno 2003; Pérez Moreno y Read 2004). El mantenimiento de esta asociación simbiótica se debe principalmente al papel crucial que el hongo desempeña en la nutrición mineral de la planta colonizada. Así, es posible pensar,

que fue probablemente el establecimiento de esta simbiosis lo que permitió la colonización de la superficie terrestre por las plantas (Redecker et al. 2000, Pérez-Moreno y Read 2004; Honrubia 2009). Sin embargo, las micorrizas no sólo se limitan a mejorar la nutrición mineral de las plantas, sino que también contribuyen a la protección de las mismas frente a patógenos del suelo y además le brinda a las plantas una mayor tolerancia a diversos tipos de estrés abiótico (salino, hídrico o por metales) (Van Tichelen et al. 2001; Azcón-Aguilar et al. 2002; Ruiz-Lozano 2003).

1.1.1 Clasificación de Micorrizas

Las micorrizas según Smith y Read (2008) se clasifican en siete tipos: endomicorrizas o micorrizas arbusculares, ectomicorrizas, ectendomicorrizas, arbutoides, monotropoides, ericoides y orquideoides, siendo las micorrizas arbusculares y las ectomicorrizas las más extendidas en comunidades forestales (Allen et al. 2003; Smith y Read 2008). Cada tipo posee características distintivas relacionadas con la morfología funcional y tipo de micobiontes/fitobiontes que participan en su formación, que se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1 Características importantes de los diferentes tipos de micorrizas.

Tipos de Micorrizas	Micorriza			Micorriza Arbutoide	Micorriza Monotropoide	Micorriza Ericoide	Micorriza Orquidoide
	Arbuscular	Ectomicorriza	Ectendomicorriza				
Colonización intracelular	+	-	+	+	+	+	+
Manto Fúngico	-	+	+0 ⁻	+0 ⁻	+	-	-
Red de Hartig	-	+	+	+	+	-	-
Fitobionte aclorofílico	-(+)	-	-	-	+	-	+†
Taxones de hongos	Glomero	Basidio/Asco (Glomero)	Basidio/Asco	Basidio	Basidio	Asco	Basidio
Taxones de plantas	Brio Pterido Gimno Angio	Gimno Angio	Gimno Angio	Ericales	Monotropoidea	Ericales Brio	Orquidiales

(Smith y Read 2008)

† Todas las orquídeas son aclorofílicas en la fase inicial de plántula. La mayoría de las especies de orquídeas son verdes cuando adultas. Los taxones de hongos abreviados corresponden a Glomeromycota, Ascomycota y Basidiomycota y los taxones de plantas a Briofita, Pteridofita, Gimnospermas y Angiospermas. Entre paréntesis se indica condición rara.

1.1.2 Ectomicorrizas

Una raíz en simbiosis con hongos ectomicorrícicos se caracteriza por la presencia de tres componentes estructurales funcionales: una funda o un manto de tejido fungoso que cubre la raíz absorbente y el ápice radical, un crecimiento laberíntico de hifas hacia el interior entre las células epidérmicas y corticales llamado red de Hartig, y un micelio periférico que forma conexiones esenciales tanto con el micelio extraradical en el suelo, como también, con los carpóforos de los hongos que forman las ectomicorrizas (Figura 1) (Rovira et al. 1983; Smith y Read 2008). Las estructuras anatómicas del manto y de los micelios que emanan de él varían entre familias, géneros o incluso entre especies de hongos, siendo diagnósticas para la caracterización e identificación de ectomicorrizas (Agerer 1987-2002, Ingleby et al. 1990; Goodman et al. 1998). Este tipo de órganos es también claramente distinguible de todos los otros tipos de micorrizas sobre la base de la ausencia de penetración intracelular por el hongo.

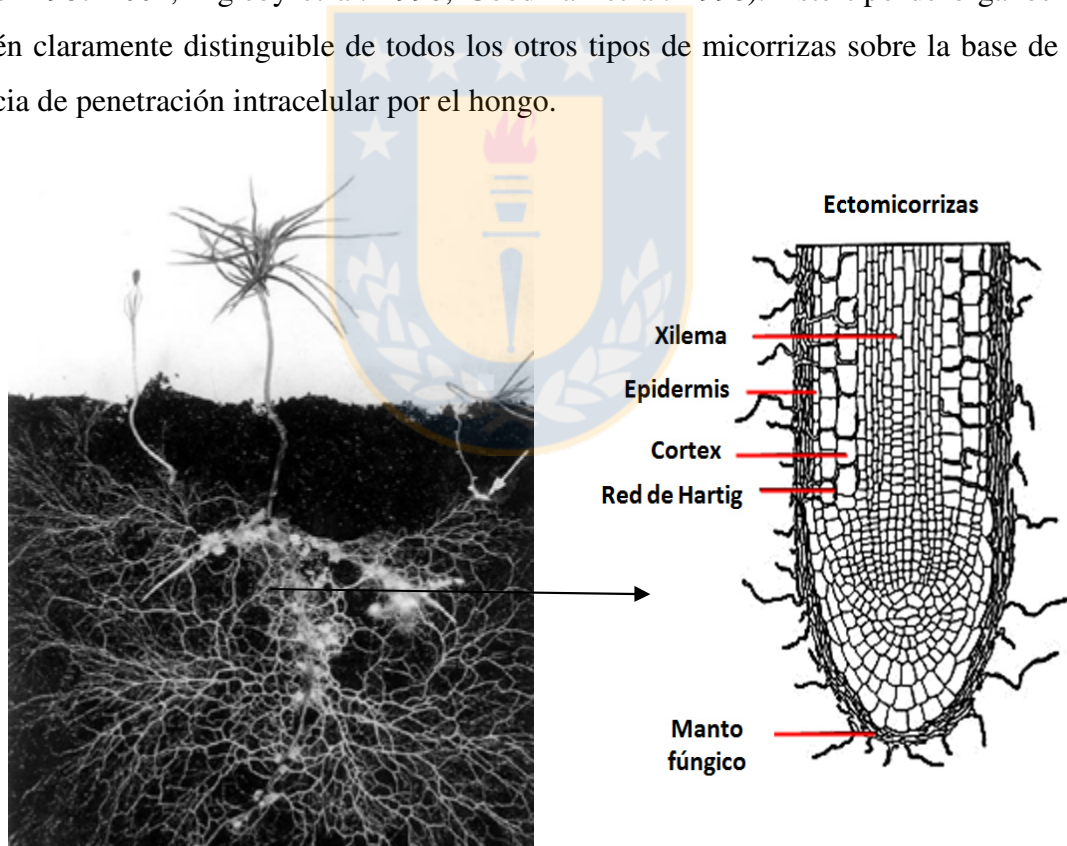


Figura 1 Izquierda: Desarrollo de la extensión del micelio y rizomorfos de *Suillus bovinus* en simbiosis con una plántula de *Pinus sylvestris* (Smith y Read 2008). Derecha: Ampliación de estructura del manto micorrícico (Rovira et al. 1983).

1.1.3 Absorción de agua y nutrientes

Los hongos micorrícicos asociados a las raíces de las plantas juegan un papel fundamental en la absorción y el transporte de agua y nutrientes, ya que el micelio fúngico funciona como una extensión del sistema radical permitiendo aumentar la superficie de absorción (Allen 2007; Lehto y Zwiazek 2011). La absorción de agua y capacidad de transporte entre los hongos micorrícicos y la planta hospedera puede estar relacionada con la capacidad de las diferentes especies ectomicorrícicas (ECM) para producir rizomorfos (cordones miceliarios), los cuales pueden diferir tanto estructural como funcionalmente (Agerer 2001). Los mecanismos directos para mejorar las relaciones de agua incluyen al menos la absorción de agua por el micelio externo y la función de las acuaporinas, presentes en las membranas plasmáticas de los hongos, grupo de proteínas que funcionan como canales que pueden conducir a un aumento de la conductancia hídrica de la raíz (Dietz et al. 2011, Maurel y Plassard 2012). Sin embargo, en algunas condiciones, las ectomicorrizas pueden no tener efecto, o un efecto negativo en la conductancia hidráulica del sistema radical, razones que aún no están completamente dilucidadas (Lehto y Zwiazek 2011).

1.1.4 El género *Pinus* en Chile.

El género arbóreo *Pinus* es uno de los más importantes desde el punto de vista forestal, tanto por la cantidad de especies como por el valor económico que tienen muchas de ellas en sus países de origen y en los lugares donde han sido introducidas. El género está formado por unas 94 especies distribuidas en el hemisferio Norte en regiones de clima templado, llegando a regiones subtropicales y tropicales a través de cadenas de alta montaña (Price et al. 1998; Rosas-Avila 2008). Son árboles siempreverdes, de grandes dimensiones. Las ramas se ordenan en verticilos dándole al árbol un aspecto piramidal, sobre todo cuando joven. En Chile se han introducido alrededor de 24 especies del género *Pinus* (Rodríguez y Rodríguez 1981). Dentro de ellas, *Pinus radiata* D. Don (pino insigne) es la más representativa en el país llegando a 1,5 millones de hectáreas plantadas en el territorio nacional, siendo su madera altamente demandada por la industria (Fritz 2004; INFOR 2010). Esta especie se encuentra concentrada en las regiones de Maule, Biobío y

Araucanía (INFOR 2010). Por otra parte, entre las coníferas de rápido crecimiento que se presentan como alternativa para el desarrollo comercial de plantaciones, recuperación de terrenos deforestados y erosionados en el cono sur, destaca el pino ponderosa (*Pinus ponderosa* Dougl. ex. Laws.). Esta es una de las especies más plantadas en el oeste de la Patagonia Argentina (Gonda y Mondino 1995) y en la XI Región de Chile (Donoso 2008), alcanzando en la actualidad una superficies más de de 25.000 ha, siendo importantes desde el punto de vista económico (INFOR 2010). Es por tal motivo que se trabajó con estas dos especies vegetales en simbiosis con hongos ectomicorrícicos con la finalidad de potenciar su desarrollo en la etapa de viverización y por todo su ciclo de vida. Vale destacar que los inóculos biológicos son inocuos para el medio ambiente y una vez aplicados y en simbiosis con los sistemas radicales de las plántulas son sustentables en el tiempo y significarán un valor agregado para la certificación internacional.

1.1.5 Hongos ectomicorrícicos

Los hongos ectomicorrícicos tienen una distribución limitada entre las especies vegetales. Sólo entre el 3 y 5% de las plantas establecen este tipo de micorriza (Barea 1991, Honrubia et al. 1992); sin embargo, su importancia forestal es enorme no sólo por la amplia distribución de las familias de plantas de uso maderable con las que forman simbiosis, sino también por los diversos grupos fúngicos que desarrollan esta asociación (Honrubia et al. 1992; Estrada-Torres y Santiago-Martínez 2003; Smith y Read 2008) y que incluye muchas especies de gran valor como hongos comestibles. La mayoría de los hongos formadores de ectomicorrizas pertenecen a la división Dicotryomycota, subdivisión Basidiomycotina y Ascomycotina, e incluyen muchas de las especies, tanto de fructificación epígea como hipógea, que están presentes en los bosques (Etayo y De Miguel 1998; Reyna 2000; Pera y Parladé 2005, Guerin-Laguette et al. 2014).

1.2 Géneros *Lactarius* y *Rhizopogon* en Chile.

Lactarius (Russulales, Basidiomycota) (Nuytinck et al. 2007) *Rhizopogon* (Boletales, Rhizopogonaceae) (Grubisha et al. 2002) son géneros de hongos ectomicorrícicos de gran importancia a nivel mundial por su asociación con numerosas especies arbóreas de uso forestal (Rincón et al. 2001; Martínez et al. 2007; Palfner 2011; Guerin-Laguette et al. 2003 y 2014). *Lactarius*, es un género muy diverso con aproximadamente 350 especies descritas en todo el mundo (Kirk et al. 2001), formando simbiosis con árboles de diferentes géneros y familias, principalmente de las Betulaceas, Fagaceas y Pinaceas (Palfner 2011; Guerin-Laguette et al. 2003 y 2014). Aunque Chile carece de especies nativas del género *Lactarius*, se han descrito algunas especies adventicias identificadas como *Lactarius pubescens* (asociada a *Betula*), *L. controversus* (asociada a *Populus*) y una especie comestible de la sección Deliciosi, identificada históricamente como *Lactarius deliciosus* (Mikola 1969; Singer 1969; Godoy 1989; Lazo 2001; Palfner 2011). Esta especie se encuentra en plantaciones de *P. radiata*, distribuida desde la zona central a la zona austral de Chile (Lazo 2001), y es apetecida por su valor culinario alcanzando importantes precios en mercados europeos (Voces et al. 2012). Por otra parte, el género *Rhizopogon* a pesar de no poseer valor gastronómico, contiene más de 100 especies (Martín 1996) y es muy común en plantaciones de *Pinus*, dada su asociación micorrícica prácticamente exclusiva a este género. Por ello, representa un componente biológico importante del ecosistema forestal, principalmente en el establecimiento de plantaciones. Este género se distribuye en plantaciones entre Coquimbo y Magallanes, fructificando en mayor cantidad en los meses de abril a junio (Furci 2007). Sin embargo, la identidad de estos dos taxones en Chile sólo ha sido determinada a nivel morfo-anatómico (Garrido 1986; Lazo 2001), no existiendo caracterizaciones moleculares, por lo que los resultados de este trabajo contribuyen a la clasificación morfológica y también molecular de dichas especies descritas en nuestro país. La elección de las especies fúngicas para el presente estudio se basó en diferentes criterios de selección. Uno de ellos es que ambas especies poseen forma de fructificación diferente. La especie de *Lactarius* descrita en Chile posee crecimiento epígeo, es decir, el desarrollo del basidioma lo realiza sobre el suelo, en cambio *Rhizopogon* es un hongo hipógeo cuyo basidioma lo desarrolla bajo el suelo o semienterrado. Esto es interesante, ya que al tener

distintas formas de desarrollo pudiesen tener comportamientos diferenciados al momento de ser aplicados como inóculos micorrícicos en vivero. Otro de los criterios utilizados para la selección de estas especies fúngicas es que en forma natural se asocian en diferentes estadios de crecimiento de la planta. Especies de *Rhizopogon* son consideradas pioneras (“early stage”) que se asocia en estados juveniles y *Lactarius* es considerada una especie colonizadora tardía (“late stage”), que se asocia a plantaciones más adultas (Garrido 1986; Visser 1995; Twieg et al. 2007; Palacios et al. 2012), lo que de igual forma pudiese incidir en la efectividad de la micorrización que tendrían las especies vegetales al ser inoculadas con estos hongos en vivero. Sobre todo para *Lactarius* ya que al ser un hongo “late stage” probablemente los requerimientos nutricionales sean diferentes y exista una baja asociación micorrícica. Por otro lado, estudios anteriores (Chávez et al. 2009-2014; Pereira et al. 2014) han permitido tener buenos desarrollos miceliales bajo condiciones *in vitro* lo que permite su replicación en laboratorio.

Una de las preguntas más frecuentes que se realizan en investigaciones con hongos ectomicorrícicos es ¿cuál es la importancia de que las plantas vayan micorrizadas al sitio de plantación, si en forma natural existen hongos micorrícicos con los cuales se pueden asociar? La respuesta está dada por la importancia que pudiesen tener como productos forestales no madereros (PFNM). Ejemplo de ello es lo que ha sido demostrado para *L. deliciosus* en Nueva Zelanda (Guerin-Laguette et al. 2014), donde plantas micorrizadas con dicho hongo fueron establecidas y al cabo de 2 años comenzó la fructificación, proyectando fructificaciones de hasta 300 Kg/ha a partir del tercer año de producción (año 5 del establecimiento). A pesar que *Lactarius* ha sido considerada una especie “late stage” en forma natural, se puede acelerar el proceso de fructificación a través de la incorporación del hongo desde la etapa de viverización.

1.3 Hongos ectomicorrícicos generadores de valor agregado al bosque.

Dentro de la gran variedad de bienes y servicios asociados a los ecosistemas forestales, existe un grupo de productos tangibles a los que tradicionalmente no se les ha prestado toda la importancia que merecen (Benítez-Badillo et al. 2009). Ellos son los llamados Productos Forestales No Madereros (PFNM), los que de acuerdo con la Organización para

la Alimentación y la Agricultura (FAO) se pueden definir como “productos de origen biológico distintos a la madera, derivados de los bosques, de otras tierras arboladas o de árboles fuera del bosque” (FAO 1999). Este amplio concepto abarca tanto productos de origen vegetal como animal. En Chile el uso de los PFNM tiene un gran significado social, no sólo como fuente de alimentación directa, sino también, por la fuerte incorporación de mano de obra no calificada que es utilizada para su recolección y procesamiento (www.pfnm.cl), sobre todo en la época de baja actividad agrícola (Marshall et al. 2006; Montoya et al. 2008). Se debe tener en cuenta además que esta actividad se realiza en el ámbito de comunidades rurales, comunidades campesinas y de personas de bajos ingresos (Honrubia et al. 2008). Entre estos PFNM se encuentran los hongos micorrícicos comestibles de importancia ecológica, económica y cultural en las zonas en donde se desarrollan (Garibay-Origel et al. 2009), los que además de presentar un beneficio directo para el hombre (Villarreal-Ruiz y Pérez-Moreno 1989; Mariaca et al. 2001; Salas et al. 2003; Estrada-Martínez et al. 2009), significan para la planta una estrategia nutricional que le permite, en muchos casos, mejorar su crecimiento y desarrollo en campo (Van Tichelen et al. 2001; Dunabeitia et al. 2004; Ortega et al. 2004; Castrillon et al. 2015). Al respecto, la creciente afición por los recursos micológicos experimentada en las últimas décadas ha posicionado a los hongos entre los productos forestales con mayor potencial para el desarrollo de las zonas rurales (Alvarado-Castillo y Benítez 2009; Ruiz-Pérez et al. 2004), situándose en determinadas zonas en segundo lugar de importancia tras los aprovechamientos madereros (Lázaro 2008); estimando inclusive en EE.UU que la venta de hongos puede ser casi tan importante como los ingresos obtenidos por la madera (Pilz y Molina 2002). Dentro de la gran variedad de hongos micorrícicos comestibles se encuentran las especies del género *Lactarius* sección *Deliciosi* (Nuytinck et al. 2007), las que engloban varias especies de setas comestibles destacando entre ellas *L. deliciosus* hongo micorrícico que crece asociado a especies del género *Pinus*, siendo reportado creciendo bajo condiciones controladas en simbiosis con *P. pinea* (Rincón et al. 1999), *P. pinaster* y *P. sylvestris* (Parladé et al. 2004), *P. halepensis*, *P. nigra*, *P. oocarpa*, *P. ayacahuite*, *P. hartwegii*, *P. pseudostrobus* y *P. rudis* (Díaz et al. 2007), *P. halepensis* (Díaz et al. 2009), *P. pinaster* (Parladé et al. 2011), y *P. radiata* (Guerin-Laguette et al. 2003 y 2014). Por sus propiedades culinarias, se comercializan con el nombre de

rovellones o níscalos en países como España y Francia (Voces et al. 2012). Esta especie presenta por sus precios y mercados un enorme potencial desde el punto de vista económico en zonas con vocación forestal. En España este género tiene gran importancia en los mercados, suponiendo más de la mitad del total de setas silvestres vendidas anualmente en Mercabarna, alcanzando en los años 2006 y 2007 ventas de 256 y 404 toneladas anuales, respectivamente, sólo en España (Voces et al. 2012). Bajo esta perspectiva cobra mayor relevancia la micorrización controlada de plantas en vivero que permitan a las futuras masas forestales ser productoras de un recurso renovable, lo que puede significar entradas económicas importantes para pequeños y medianos agroforestadores, a temprana edad del bosque, y por gran parte de la vida de éste. Los hallazgos de Wang y Hall (2002), Wang et al. (2003) y (Guerin-Laguette et al. 2014), en Nueva Zelanda apoyan lo anteriormente mencionado, describiendo la producción de cuerpos fructíferos de *L. deliciosus* después de 3 años y después de 18 meses en campo, respectivamente. Por otra parte, a pesar de que *Rhizopogon* spp. es comestible en los primeros estadios de crecimiento, sus cuerpos fructíferos no son comercializados en Chile. Sin embargo, es un hongo ectomicorrícico de colonización temprana en vivero, por lo que su uso irá en pleno beneficio de la especie vegetal asociada, dada la abundancia de la especie y la fácil preparación y aplicación de inóculo esporal de *Rhizopogon* para la inoculación en vivero.

1.4 Tipos de inóculos fúngicos y micorrización controlada en vivero.

Actualmente, es posible seleccionar el hongo que se empleará para inocular una determinada especie vegetal, el tipo de inóculo y el método de aplicación más adecuado para favorecer la formación de las ectomicorrizas y el crecimiento de las plántulas (Grove y Malajczuk 1994; Repáč 2011). Los resultados publicados principalmente en España con coníferas inoculadas con hongos de los géneros: *Hebeloma*, *Laccaria*, *Pisolithus*, *Rhizopogon*, *Scleroderma* o *Suillus*, demostraron que la micorrización controlada con hongos seleccionados mejora los procesos de repoblación en distintas situaciones ambientales, como el establecimiento de plantaciones en suelos forestales productivos, tanto con especies autóctonas como alóctonas de rápido crecimiento, la repoblación de

suelos agrícolas abandonados, o la revegetación de suelos áridos de la zona mediterránea, altamente erosionados (Jonsson et al. 2001, Rincón et al. 2001, Pera y Parladé 2005). Para inducir la formación de ectomicorrizas existen tres tipos de inóculos disponibles: bruto, esporal y miceliar (Honrubia et al. 1992; Parladé et al. 1993; Pera et al. 1993, Peñuela y Ocaña 2000; Morte y Honrubia 2009; Chávez et al. 2009; Repáč 2011) (Figura 2), cada uno de ellos con ventajas y desventajas. El inóculo bruto es el método más simple y ampliamente usado, comprende todo los propágulos existentes en el suelo (micelio, esporas, fragmentos de raíces micorrizadas, etc.). Este tipo de inóculo se obtiene directamente del suelo del bosque, por lo que su uso resulta poco práctico; dado que requiere grandes volúmenes de suelo provocando una gran alteración en las zonas de extracción. Además se corre el riesgo de introducir malas hierbas, patógenos o enfermedades y no se conocen las especies de hongos simbioses que formarán las micorrizas ni la cantidad y calidad del inóculo introducido (Borchers and Perry 1990; Honrubia et al. 1992; Querejeta et al. 1998; Wallander et al. 2005). El inóculo esporal se obtiene a partir de basidiomas, y pueden ser aplicados en seco o mezclado con agua (Rincón et al. 2001; Chen et al. 2006). La preparación consiste en remover el suelo adherido a los carpóforos, posteriormente éstos se cortan en pequeños trozos y finalmente se agrega agua, homogenizando por un espacio de cinco segundos en blender (licuadora) a velocidad baja o alta hasta que las esporas sean liberadas (Parladé et al. 1996 y 1999; Rincón et al. 2001; Hortal et al. 2008; Becerra et al. 2009). Este sistema ha sido ampliamente utilizado, ya que es relativamente fácil de aplicar mezclándolo con el suelo antes de la plantación, o en el riego (Honrubia et al. 1992). A pesar que este método puede ser aplicado fácilmente pues no requiere de tecnologías sofisticadas, implica varios factores altamente variables que dificultan su aplicación estandarizada, tales como la cantidad de cuerpos fructíferos cosechables y la viabilidad de sus esporas. La concentración de esporas requeridas se prepara por dilución, y el conteo esporal se realiza utilizando hemocitómetro (Repáč 2011). El número aproximado de esporas obtenidas por gramo de basidioma o ascoma deshidratado es de 10^7 a 10^{10} (Parladé et al. 1996; Rincón et al. 2001) o de 1,1 millones de basidiosporas por miligramo (Marx y Bryan 1975). Chen et al. (2006) obtuvieron una concentración de 10^5 esporas. ml^{-1} y Rincón et al. (2001) 10^3 - 10^8 esporas. 10 ml^{-1} . El método preferible del inóculo miceliar permite varias alternativas de producción, por

ejemplo el micelio del hongo crecido en un sustrato enriquecido con solución nutritiva sea este sólido (Hortal et al. 2009; Rossi et al. 2007) o líquido (Gange et al. 2005; Rossi et al. 2007) y crecimiento miceliar del hongo encapsulado en polímeros de alginato (Le Tacon et al. 1985; Honrubia et al. 1992; Pera 1992; Morte y Honrubia 2009). Cabe señalar, además, que este método presenta ciertas desventajas referidas a los altos costos y la manipulación, ya que su implementación en vivero requiere de una adecuación tecnológica e instalaciones sofisticadas (Honrubia et al. 1992). Sin embargo, su efectividad es más alta dependiendo de la especie fúngica que se trabaje (Chávez et al. 2009). La formulación del inóculo aplicado influye en la efectividad de la micorrización controlada de las plantas de vivero. Al respecto Chávez et al. (2009) utilizaron tres tipos de inóculos de las especies fúngicas *Suillus bellini*, *S. luteus*, y *Rhizopogon luteolus*: a) inóculo esporal (IE), b) inóculo miceliar sólido (IMS) (crecido en un sustrato de turba y vermiculita suplementado con medio nutritivo), y c) Inóculo miceliar líquido (IML), para la micorrización de *P. radiata* en contenedores. Los autores concluyeron que el efecto del tipo de inóculo sobre la planta micorrizada varía según la especie fúngica estudiada. Para *R. luteolus*, el inóculo más efectivo para obtener plantas micorrizadas fue el IMS e IML; en cambio, para *S. luteus* fue el IML. *S. bellinii* no presentó diferencias en la aplicación de los distintos inóculos, por lo que se recomendó utilizar el IE tomando en consideración el bajo costo y la facilidad de su preparación. Como se señaló anteriormente, existen distintos métodos, ampliamente documentados en la literatura para la producción de inóculo miceliar con distintas especies fúngicas (Brundrett et al. 1996). No obstante, para integrar la micorrización controlada en la producción viverística forestal se necesita industrializar un método factible para obtener estos micelios a escala comercial.

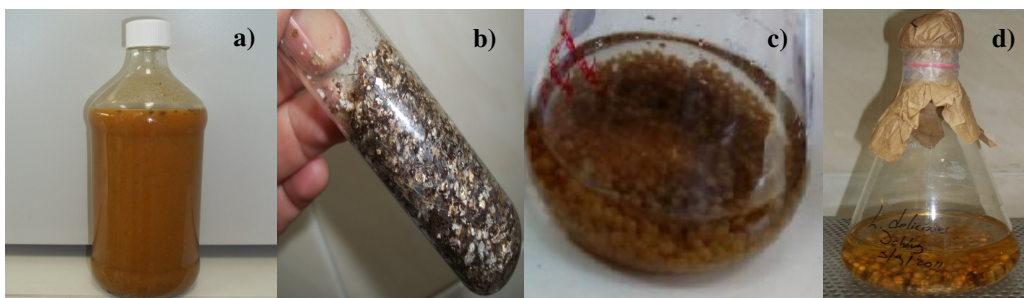


Figura 2 Diferentes tipos de inóculos micorrícicos. a) Inóculo esporal, b) Inóculo miceliar sólido en mezcla de turba-vermiculita, c) inóculo miceliar en Polímeros de alginato y d) Inóculo miceliar líquido.

1.5 Producción de biomasa miceliar en Biorreactor.

La producción de biomasa miceliar para la obtención de inóculo fúngico se puede llevar a cabo utilizando medio de cultivo líquido en matraces (Brundrett et al. 1996; Honrubia et al. 1995), pero, si esta producción se quiere llevar a escala comercial es necesario utilizar métodos que permitan en menor tiempo generar un gran volumen de biomasa miceliar. La producción de biomasa miceliar a gran escala ha sido demostrada para algunas especies de hongos ectomicorrícicos (Marx y Kenney 1982; Marx et al. 1982; Pera y Parladé 2005; Travieso 2009). Sin embargo, muchas veces el elevado costo, la difícil manipulación y los tiempos requeridos para obtener grandes cantidades de biomasa a través de procedimientos tradicionales, son factores limitantes que impiden la estandarización de su uso en la micorrización controlada para la producción de plantas en vivero. Dentro de los métodos utilizados para la producción de inóculo fúngico, la fermentación líquida en biorreactores o sólida en vermiculita son los procedimientos más frecuentes para producir micelio en grandes cantidades (Kuek 1994; Durand 1995; Pera y Parladé 2005; Rossi et al. 2007). Ambos tipos de fermentación (líquida o sólida) demuestran tener ventajas y desventajas, y el rendimiento en biomasa dependerá en gran medida de la especie de hongo ectomicorrícico en estudio. Muchas veces se señala como una de las principales desventajas del cultivo en estado sólido frente a la fermentación líquida, la dificultad en el control de algunos parámetros importantes que afectan el crecimiento, como son el tamaño de las partículas de sustrato, la oxigenación, el pH y la temperatura de incubación (Rossi et

al. 2007). En este sentido, la fermentación líquida en biorreactores aparece como una técnica donde muchas de las desventajas anteriores pueden ser resueltas, mediante un ajuste y control automatizado de las variables de crecimiento como pH, temperatura, velocidad de agitación y cantidad de oxígeno disuelto, además, de mejorar la mezcla con nutrientes y diluir exudaciones auto inhibidoras, obteniendo micelios de alta calidad (Yang y Liau 1998; Tang y Zhong 2002). Entre los tipos más comunes de biorreactores utilizados en la mayoría de los estudios están el biorreactor con tanque agitado, donde la agitación se realiza mecánicamente a través de un rotor con aspas ubicado en el centro del fermentador y accionado por un motor, que permite controlar la velocidad de la agitación (Rossi et al. 2007). El otro tipo de biorreactor, menos utilizado en el cultivo de hongos ectomicorrícicos, es el conocido como “air lift”, donde la agitación del cultivo es producida por corrientes de aire inyectado que circulan dentro del fermentador (Chisti 1989; Rossi et al. 2007). Sólo algunas especies de hongos ectomicorrícicos han sido utilizadas para generar protocolos de producción de biomasa miceliar en biorreactor, para la micorrización controlada de un gran número de plantas de interés forestal. Algunas de las primeras especies cultivadas en biorreactor y descritas en la literatura fueron *Hebeloma cylindrosporum* (Le Tacon et al. 1985), *Laccaria laccata* (Sasek 1989; Kuek 1996), *S. luteus* (Sasek 1989), *Pisolithus tinctorius* (Pradella et al. 1990) y *Cenococcum geophilum* (Job 1996). A pesar de estos estudios, el mayor problema en el trabajo con biorreactores aun reside en la falta de conocimientos respecto a la bioquímica, fisiología y cinética del crecimiento de hongos ectomicorrícicos bajo condiciones de fermentación líquida en biorreactor (Rossi et al. 2007). En estudios de rendimiento con *S. grevillei* fueron obtenidos valores de biomasa considerados significativos en periodos cortos de tiempo (0,25 g/L día de biomasa miceliar), realizándose controles apropiados de pH y concentración de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo (Baroglio et al. 2000). Al respecto, Rossi et al. (2002), describieron por primera vez la cinética de crecimiento de *P. microcarpus* utilizando un biorreactor del tipo “air lift”, con rendimientos superiores a los obtenidos en anteriores estudios (0,48 g/L día). Entre los escasos estudios de optimización de la producción de biomasa miceliar en biorreactor destacan los trabajos realizados por Carrillo (2000), Carillo et al. (2004), Rossi (2006) y Oliveira et al. (2006), siendo que estos últimos autores han obtenido rendimientos superiores a 1 g/L día de biomasa miceliar. Un

aspecto no considerado en la mayoría de los cultivos en biorreactor es que junto con aumentar el rendimiento de biomasa miceliar, se obtienen grandes cantidades de caldo de cultivo que frecuentemente son descartados como desecho al finalizar la fermentación. Sin embargo, estos caldos de cultivo podrían contener enzimas extracelulares y metabolitos secundarios de gran interés y valor comercial (antibióticos, enzimas etc.). De esta forma, el cultivo en biorreactor permitiría no sólo la obtención de grandes cantidades de biomasa miceliar, sino también de metabolitos de interés comercial, lo que le daría un valor agregado al caldo considerado hasta el momento como un subproducto de desecho. Para ello, se hace necesaria la caracterización química de estos caldos con el objetivo de identificar metabolitos de interés.

1.6 Experiencias del cultivo de hongos ectomicorrícicos en Chile.

A pesar que en Chile se han realizado experiencias en donde se han determinado algunos parámetros como tipo de medios de cultivos, pH y temperatura adecuados para realizar las masificaciones de micelio de algunas especies fúngicas, la información y estudios aun son muy escasos. Pereira et al. (2007), demostraron que el pH óptimo para el cultivo *in vitro* de *R. luteolus* varía desde 5,8 a 6,8, midiendo la velocidad y el área de crecimiento. Chávez et al. (2007), estudiaron el crecimiento *in vitro* de cuatro especies de hongos ectomicorrícicos en cultivo sólido y líquido, bajo condiciones controladas en el laboratorio. Las especies utilizadas fueron *R. luteolus*, *Scleroderma verrucosum*, *S. bellini* y *S. luteus*, las cuales fueron cultivadas durante 30 días en medio Melin Norkrans modificado (MMN) a $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Los resultados mostraron que la especie *R. luteolus*, presentó los mejores resultados en cuanto a velocidad media de crecimiento, producción de biomasa y colonización de sustrato, lo que indica el alto potencial que posee esta especie para ser utilizada en micorrización controlada en viveros forestales. Travieso (2009), trabajando con *S. luteus*, mostró el crecimiento de este hongo en frascos agitados y fermentador de tanque agitado a una temperatura de 23°C , obteniendo aproximadamente 3 g/L de biomasa seca en el crecimiento realizado en frascos y cerca de 0,6 g/L de biomasa en el crecimiento realizado en el reactor de tanque agitado. Riquelme (2011), estudió el medio de cultivo MMN, para optimizar el crecimiento de *R. roseolus*. En la experiencia se modificó el medio de cultivo

variando su composición en relación a la cantidad de fuente de nitrógeno utilizada de 0,25, 0,75 y 1,3 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. El mayor crecimiento del hongo se obtuvo con el medio que contenía 0,75 g/L, produciendo 2,03 g/L de biomasa en 22 días de cultivo, resultado que fue superior a los obtenidos con otros medios utilizados. Además se estudió la influencia del pH en el crecimiento, utilizando soluciones amortiguadoras (buffers) de fosfato y citrato, las cuales se agregaron al medio que contenía 0,75 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Los mejores resultados fueron obtenidos con el medio que contenía buffer citrato, con el cual se obtuvo 3,19 g/L de biomasa. Santelices et al. (2012), estudiaron el efecto del origen geográfico de las cepas (tres localidades de la Región del Maule, Chile), del medio de cultivo (MMN y extracto de malta), y del pH (5,0; 5,8; y 6,5), en la dinámica de crecimiento *in vitro* de *S. luteus* durante 37 días. Los resultados indicaron diferencias significativas en la velocidad de crecimiento y diámetro de las colonias, como consecuencia de la procedencia del material fúngico. Sin embargo, no encontraron diferencias significativas entre los medios de cultivo ni los diferentes valores de pH. Esto confirmó, para *S. luteus* que es posible emplear un medio de cultivo más sencillo de preparar como MEA 2%, con el propósito de producir una cantidad adecuada de biomasa micelial para futuros programas de micorrización con *S. luteus*.

1.7 Problema Científico.

A pesar de los estudios mencionados anteriormente y que dejan en evidencia que la variabilidad de las condiciones de cultivo son de vital importancia para lograr producir una mayor cantidad de biomasa fúngica para programas de micorrización en vivero, se hace necesario llevar a cabo procesos de optimización basado en diseños experimentales adecuados para lograr un óptimo de producción. Además, vale hacer mención que en la mayoría de los trabajos desarrollados en Chile no se ha llevado a cabo una identificación molecular de las diferentes especies fúngicas utilizadas cuya importancia radica en una caracterización precisa de cepas de diferente orígenes geográfico (ecotipos, dada la variación intraespecífica) por lo que en algunos casos se podrían estar realizando estudios de micorrización controlada con especies fúngicas que no corresponden, a las identificadas a través de técnicas convencionales. La presente investigación quiere suplir esa necesidad,

abarcando la identificación taxonómica y molecular de los carpóforos y aislados del género *Lactarius* descrita en Chile y de aislados del género *Rhizopogon*. Por otra parte, se espera poder contribuir en el conocimiento de los metabolitos secundarios presentes en los caldos de cultivo de la especie comestible *L. quieticolor* y evaluar la viabilidad de los micelios producidos tanto en la síntesis micorrícica como en los parámetros de crecimiento de plántulas de *Pinus radiata* y *P. ponderosa*.

A partir de lo anterior se plantean los siguientes objetivos:

2. Objetivo General

Estudiar la producción de biomasa miceliar de cepas definidas de los basidiomicetes ectomicorrícicos *Lactarius quieticolor* y *Rhizopogon roseolus* en medio de cultivo líquido optimizando los parámetros de cultivo pH inicial, temperatura y fuente de carbono y evaluar su eficiencia en la micorrización de plantas de *Pinus radiata* y *Pinus ponderosa*.

2.1 Objetivos Específicos

1. Caracterizar morfológica y molecularmente las especies seleccionadas de los géneros *Lactarius* y *Rhizopogon* a partir de carpóforos recolectados en campo y de cultivos miceliar.
2. Optimizar las condiciones de cultivo líquido de las especies seleccionadas de los géneros *Lactarius* y *Rhizopogon* para la producción de biomasa miceliar en matraz.
3. Evaluar la producción de biomasa miceliar en biorreactor bajo las condiciones previamente optimizadas.
4. Determinar la presencia de metabolitos secundarios en los caldos producidos en biorreactor.
5. Evaluar el efecto de la micorrización con inóculo miceliar de las especies seleccionadas de los géneros *Lactarius* y *Rhizopogon* en parámetros de crecimiento de *P. radiata* y *P. ponderosa* y comparar dicho efecto con el uso del fertilizante químico Basacote 6M.


3. Hipótesis de Trabajo

De acuerdo a los antecedentes presentados resulta de interés dilucidar bajo qué parámetros de crecimiento en medio de cultivo líquido (pH inicial, concentración de fuente de carbono y temperatura) se logra optimizar la producción de biomasa miceliar de especie de los géneros *Lactarius* y *Rhizopogon*. El conocimiento de las variables de mayor importancia en la producción de biomasa permitirá definir las mejores condiciones de cultivo para el escalamiento de la producción de inóculo miceliar en biorreactor (5 L), y de esta forma conseguir producir mayores cantidades de biomasa en periodos cortos de tiempo (hasta 20 días) para la micorrización controlada de plántulas de *P. radiata* y *P. ponderosa*. Por otro lado, el análisis de la posible presencia de metabolitos de interés industrial en los caldos que se producen como subproducto del cultivo en biorreactor, podría permitir darle un uso eficiente a los grandes volúmenes de caldo de cultivo que actualmente se descartan.

Dentro de este contexto se plantean las siguientes hipótesis;

H₁: La optimización de las condiciones (pH, concentración de fuente de carbono y temperatura) de cultivo en medio líquido de *L. quieticolor* y *R. roseolus* permitirá obtener más de 2 g/L de biomasa fúngica seca lograda por cultivo tradicional, maximizando la cantidad de inóculo miceliar en biorreactor.

H₂: La inoculación de *P. radiata* y *P. ponderosa* con *L. quieticolor* y *R. roseolus* estimulará el crecimiento del tallo y del sistema radical de las especies vegetales de forma similar a lo que se obtiene cuando se aplica fertilizante comercial Basacote 6M en la viverización de plantas.



CAPÍTULO II. CARACTERIZACIÓN
MORFOLÓGICA Y FILOGENIA
MOLECULAR DE *Lactarius sección
Deliciosi Y Rhizopogon sp.*

1. Introducción

A nivel global existe un número estimado de 10.000 especies de hongos formadores de ectomicorrizas, la gran mayoría de ellos pertenecientes a la división Basidiomycota (Taylor y Alexander 2005). Tanto Russulales como Boletales son órdenes de basidiomicetes ectomicorrícicos de gran importancia a nivel mundial por su asociación con numerosas especies arbóreas de uso forestal. *Lactarius* Pers. es un género muy diverso del orden Russulales con aproximadamente 450 especies descritas en todo el mundo (Kirk et al. 2008). Aunque Chile carece de especies nativas del género *Lactarius*, al menos tres especies adventicias se han establecido (*Lactarius controversus* (Pers.) Pers, *L. pubescens* (Fr.) Fr. y *L. deliciosus* (L.) Gray) (Palfner 2011). La especie identificada históricamente como *L. deliciosus* es una de las más citadas, tanto por formar ectomicorrizas con la especie forestal más importante en Chile, *P. radiata* D. Don, como por su valor culinario, alcanzando importantes valores en mercados europeos (Godoy 1989; Lazo 2001; Voces et al. 2012). Mientras el género *Lactarius* se asocia a diversos géneros arbóreos, tanto coníferas como latifoliadas, *Rhizopogon* Fr. & Nordholm está estrictamente especializado en la familia Pinacea (Molina y Trappe 1994). Dentro del orden Boletales, el género *Rhizopogon* contiene más de 100 especies (Martín 1996) y para el área de plantación forestal en Chile se han descrito las especies *Rhizopogon luteolus* Fr. & Nordholm, *R. rubescens* (Tul. & C. Tul.) Tul. & C. Tul. y *R. roseolus* (Corda) Th. Fr. (Garrido 1986). A pesar de no poseer valor gastronómico en Chile, *R. roseolus* es un hongo comestible muy popular en Japón, conocido como “shoro”, pero factores como la deforestación, el mal manejo forestal, y la recolección indiscriminada han provocado disminuciones en la producción de este hongo (Nagasawa 2000; Shimomura et al. 2008). *Rhizopogon* es un género colonizadores multi-etapa, que fructifica de manera abundante en plantaciones de pino (Visser 1995; Molina y Trappe 1994; Torres y Honrubia 1994). Los géneros *Lactarius* y *Rhizopogon* son, por lo tanto, componentes importantes del ecosistema forestal (Pérez Moreno y Read 2004), siendo vital para el establecimiento de plantaciones. La identidad de estos taxones en Chile sólo ha sido determinada a nivel morfoanatómico y no se ha determinado la identidad mediante herramientas moleculares, que permitan verificar su identidad. Nuytinck et al. (2007), publicó una filogenia molecular del género *Lactarius*

sección *Deliciosi* a nivel mundial, basándose en las secuencias de ADN de la región ITS y del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y Grubisha et al. (2002) publicaron la filogenia de *Rhizopogon* a partir de ADN de la región ITS, sin embargo, ninguno de esos estudios incluyó taxones provenientes de Chile. Basado en las secuencias conocidas del género *Lactarius* y *Rhizopogon* el presente trabajo tiene por objetivo verificar mediante análisis filogenético molecular, complementado con descripción morfoanatómica, la identidad taxonómica de las especies existentes en Chile. Esto resulta esencial para la producción de inóculo micorrízico a partir de cepas definidas, y también para la caracterización inequívoca y el seguimiento de setas comestibles (*Lactarius*).

2 Metodología

Especies de Hongos ectomicorrízicos: Las especies fúngicas utilizadas en este estudio correspondieron a los basidiomicetos *Lactarius quieticolor* Romagn. y *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th. Fr., pertenecientes a las familias Rusulaceae y Boletaceae, respectivamente (figura 1). Basidiomas de *L. quieticolor* fueron recolectados de bosque adulto de *P. radiata* de la Provincia de Concepción sector Campus UdeC (36°49'38.51" S, 73°02'06.27" O.), BíoBío sector Santa Bárbara (37° 48' 23.26" S., 71° 40' 45.94" O) y Cauquenes sector Chanco (35°50'40.75" S, 72°29'17.16" O); cuerpos fructíferos de *R. roseolus* fueron recolectados de plantaciones juveniles de *P. radiata* de la Provincia del BíoBío, Los Ángeles sectores de Llano Blanco (37°34'16.99" S, 72°10'12.27" O), y Aeródromo (37°23' 8.47" S, 72°25'11.72 O) en 2011. Además se analizaron cultivos vivos de *Rhizopogon* pertenecientes a la colección de cepas del Laboratorio de Biotecnología de Hongos (LBH), del Campus Los Ángeles, de la Universidad de Concepción, que se originan a partir de material recogido en los sectores de San Pedro de la Paz (73°09'12.76 "S ; 36°58'55.21 "O) y Machalí (34 ° 17'11.11" S, 70 ° 40'37.26 "O) en 2005. Las especies fueron aisladas en el LBH a partir de los cuerpos fructíferos en medios de cultivo Melin-Norkrans-modificado (MNM) (Marx, 1969) y Biotina-Aneurina-Ácido fólico (BAF) (Mosse 1960). La identificación de las especies se realizó de acuerdo a características macroscópicas, microscópicas (Moreno et al. 1996; Valenzuela, 1998; Gerhardt et al. 2000; Keizer 2000; Lazo 2001) y moleculares de los carpóforos

recolectados (Stange et al. 1998). Los basidiomas frescos se documentaron con fotografías digitales, antes de ser deshidratados y depositados en la colección de hongos de la Universidad de Concepción Fungario (CONC-F).

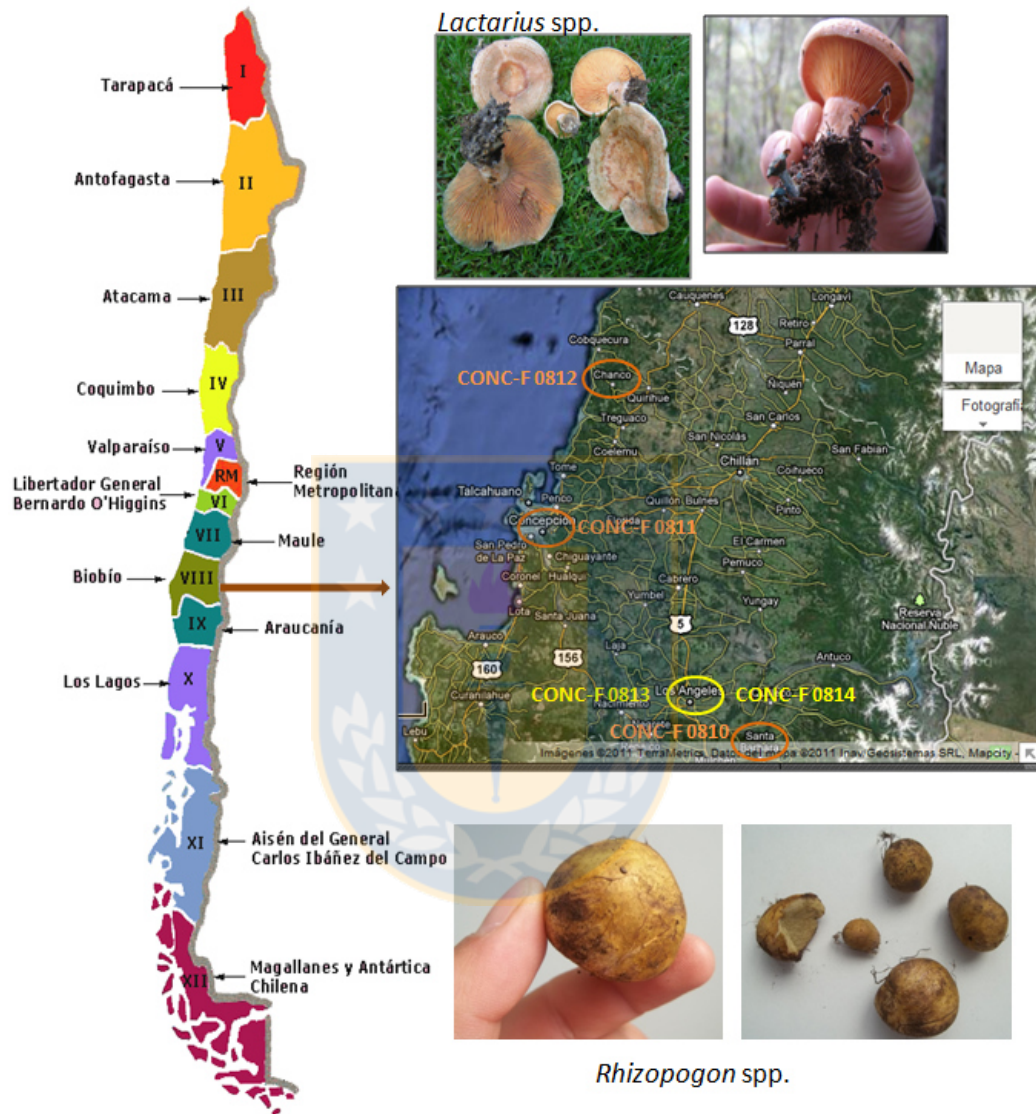


Figura 1 Mapa mostrando los sitios de recolección de *L. quieticolor* y *R. roseolus* en las regiones del Maule y Biobío. A la derecha se muestran fotos de los cuerpos fructíferos recolectados en campo.

Identificación macro y microscópica: Los basidiomas recolectados fueron trasladados en contenedores plásticos al LBH donde se analizaron macroscópicamente y se documentaron en estado fresco mediante fotografías digitales (cámara Kodak EasyShare C195). Los

cuerpos fructíferos fueron deshidratados en una estufa de secado a 50°C durante 48 h e incorporados en la colección de hongos del Herbario de la Universidad de Concepción (CONC-F). Para el análisis microscópico se usó material deshidratado. Pequeñas secciones fueron colocadas en solución de KOH 4% (análisis de basidios, cistidios), o reactivo Melzer (análisis de esporas) sobre portaobjeto y observadas a 1000x (objetivo de inmersión) con un microscopio Leitz Dialux (Leitz, Wetzlar, Alemania), equipado con cámara lúcida para dibujar cistidios, basidios y esporas (Palfner 2011).

Identificación molecular, extracción de ADN, PCR y secuenciación: Para la extracción de ADN, amplificación y secuenciación de ITS (región de ADN ribosomal), se utilizaron aproximadamente 200 mg de carpóforos o de micelio cultivado en medio BAF. El material fúngico fue molido con un homogenizador Bio-Gen PRO200 (PRO Scientific, CT, USA) junto al buffer de extracción CTAB en tubos eppendorf de 1,5 mL. La extracción de ADN se realizó según Stange et al. (1998). La concentración del ADN purificado se determinó a través de la lectura de absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro ND1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, EE.UU.). La región ITS ribosómico se amplificó por reacción de PCR con los partidores ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') (Gardes y Bruns 1993) / ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al. 1990). El ensayo de PCR se realizó en un volumen final de 12,5 µl. Cada reacción se realizó con buffer de PCR 1X (Fermentas, Maryland, EE.UU.), 0,2 µg/µl de BSA, 200 µM dNTP, 1,5 mM de Mg₂Cl, 0,5 µM de cada uno de los primers, 0,1 U/µl de Taq polimerasa (Fermentas), y 50 ng/µl de ADN. La amplificación se realizó en un termociclador Verity (Applied Biosystems Inc., San Diego, EE.UU.). Las condiciones de PCR fueron de 3 min de desnaturalización a 95°C seguido por 35 ciclos de 50 s de desnaturalización a 94°C, 50 s de “annealing” a 56°C, 1 min de extensión a 72°C, con una extensión final de 10 min a 72° C. Los productos PCR fueron visualizados a través de gel de electroforesis y documentados utilizando un sistema de imagen digital (Discovery, Inc. Ultralum, Claremont, EE.UU.). Los productos de PCR fueron secuenciados bidireccionalmente en un secuenciador automático ABI 3700 (Applied Biosystems) por MacroGen Inc. (Seúl, Corea). Con el fin de confirmar la identidad de cada muestra, se compararon las secuencias consenso obtenidas, con las existentes en la

base de datos de secuencias del GenBank [NCBI] (Altschul et al. 1997) mediante búsquedas BLAST (secuencias altamente similares).

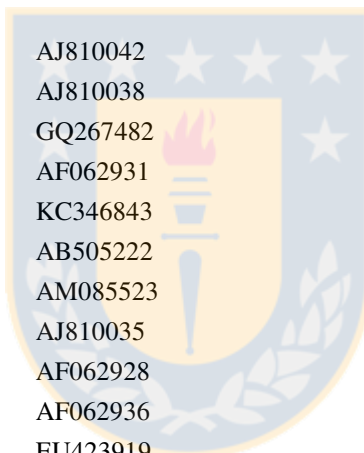
Análisis de la secuencia de ADN: La Tabla 1 muestra las secuencias de referencia de *Lactarius* spp. sección *Deliciosi* y *Rhizopogon* spp. recuperados de GenBank que se utilizaron para el análisis filogenético con el programa Geneious Pro 5.1 (Geneious, Auckland, Nueva Zelanda). Árboles Maximum likelihood se construyeron utilizando el software Geneious ® 7.1.7 utilizando un “bootstrap” de 1000. Para el cladograma de *Lactarius* se utilizó como outgroup *L. fuliginosus* y *S. luteus* para *Rhizopogon*.

Tabla 1 Colección usada en este estudio.

Especies	Número de acceso GenBank	País de origen
<i>L. quieticolor</i>	DQ922498, DQ422002	Sweden
	EF685092, DQ922492	Belgium
	AF140269, DQ658867	Germany
	JQ888185	United Kingdom
<i>L. horakii</i>	EF685069, EF685070	Indonesia
<i>L. hatsudake</i>	EF685062	Japan
	EF685063	China
	EF685098	Thailand
<i>L. semisanguifluus</i>	DQ116910, DQ116911	Spain
	AY332553	Belgium
	AY332555	Sweden
<i>L. deliciosus</i>	EF685053	China
	DQ922485	Sweden
	AY332557	Slovakia
	DQ922486	Italy
<i>L. deliciosus</i> var. <i>olivaceosordidus</i>	EF685059, EF685058	USA
<i>L. deliciosus</i> var. <i>detririmus</i>	EF685095, EF685050	USA
	EF685060	Sweden
<i>L. deliciosus</i> var. <i>areolatus</i>	EF685054	USA
<i>L. laeticolor</i>	EF685077	Japan
	EF685091	Korea
<i>L. fuliginosus</i>	AY606947	Germany
<i>R. roseolus</i>	AJ966744	Estonia
	AJ419209, AJ810062,	
	AJ810055, AJ810070,	
	AJ419211	Spain

Continuación...

Especies	Número de acceso GenBank	País de origen
<i>R. roseolus</i>	AJ419210	Portugal
	DQ068964	Lithuania
	AF058315, AJ810045	USA
<i>R. rubescens</i>	DQ068965	Lithuania
	AM085528	Spain
	AF158018, AJ810043, AJ810034	USA
	GQ267485, GQ267486, JX907816	New Zealand Latvia
<i>R. mohelnensis</i>	AJ810039	Czech Republic
<i>R. sardous</i>	AM085529	Italy
<i>R. graveolens</i> f. <i>pomaceus</i>	AJ810037	Continuation... Czech Republic
<i>R. pseudoroseolus</i>	AJ810042	USA
<i>R. luteorubescens</i>	AJ810038	USA
	GQ267482	New Zealand
<i>R. vulgaris</i>	AF062931	USA
<i>R. abietis</i>	KC346843	USA
Rhizopogon sp.	AB505222	Japon
<i>R. fragrans</i>	AM085523	USA
<i>R. vinicolor</i>	AJ810035	USA
<i>R. ochraceorubens</i>	AF062928	USA
<i>R. luteolus</i>	AF062936	Sweden
	EU423919	Spain
<i>Suillus luteus</i>	JQ888209	United Kingdom



3. Resultados

Lactarius quieticolor

Los ejemplares de basidiomas evaluados fueron depositados en el herbario CONC-F bajo los códigos de acceso presentados en la tabla 2.

Tabla 2 Listado de especímenes analizados, sitios, codificación, año de recolecta y coordenada geográfica utilizados para el análisis filogenético

Especies	Sitio	Codificación y Año de recolecta	Coordenadas Geográficas
<i>Lactarius</i>	Concepción-Campus UdeC	CONC-F 0811-2011	36°49'38.51" S, 73°02'06.27" O.
	Santa Bárbara-Agua blanca	CONC-F 0810-2011	37° 48' 23.26" S., 71° 40' 45.94" O
	Chanco-Los Ruiles	CONC-F 0812-2011	35°50'40.75" S, 72°29'17.16" O
<i>Rhizopogon</i>	Los Angeles- Llano Blanco	CONC-F 0814-2011	37°34'16.99" S, 72°10'12.27" O
	Los Angeles- Aeródromo	CONC-F 0813-2011	37°23' 8.47" S, 72°25'11.72 O
	San Pedro de la Paz -Escuadrón	LBH Rh. ESC.-2005	73°09'12.76 "S ; 36°58'55.21 "O
	Machalí-El teniente	LBH Rh. C-1-2005	34 ° 17'11.11" S, 70 ° 40'37.26 "O

Características macroscópicas (Figura 2a)

Pileo de hasta 25 cm de diámetro, sombrero plano-convexo hasta infundibiliforme, color rosado-grisáceo con manchas verdes, hasta anaranjado opaco, láminas adnadas o ligeramente decurrentes, apretadas, arqueadas, algo aserradas, contexto quebradizo y carnoso. Pie corto con respecto al sombrero, cilíndrico hasta levemente atenuado hacia la base, contexto quebradizo de hasta 7 cm de longitud por 3 cm de diámetro, macizo, después hueco Contexto blanco, con latex anaranjado, tornándose verde al oxidarse.

Características microscópicas

Esporas subglobosas a ovaladas 6.8-7.1-7.9- x 9.2-8.9-9.7 μm (figura 2 b y c), hialinas con ornamentación amiloide verrucosa hasta reticulada. Basidios clavados, tetrasporados, 48-55-65 x 6-7-10 μm , basidiolos 28-30-35 x 6-7-9 μm . Queilocistidios presentes de dos formas: fusiformes a subulados 32-40-47 x 2-3-5 μm y cilíndricos con 2 o 3 septos, 25-27-31 x 1,5-2-4 μm (figura 2d).

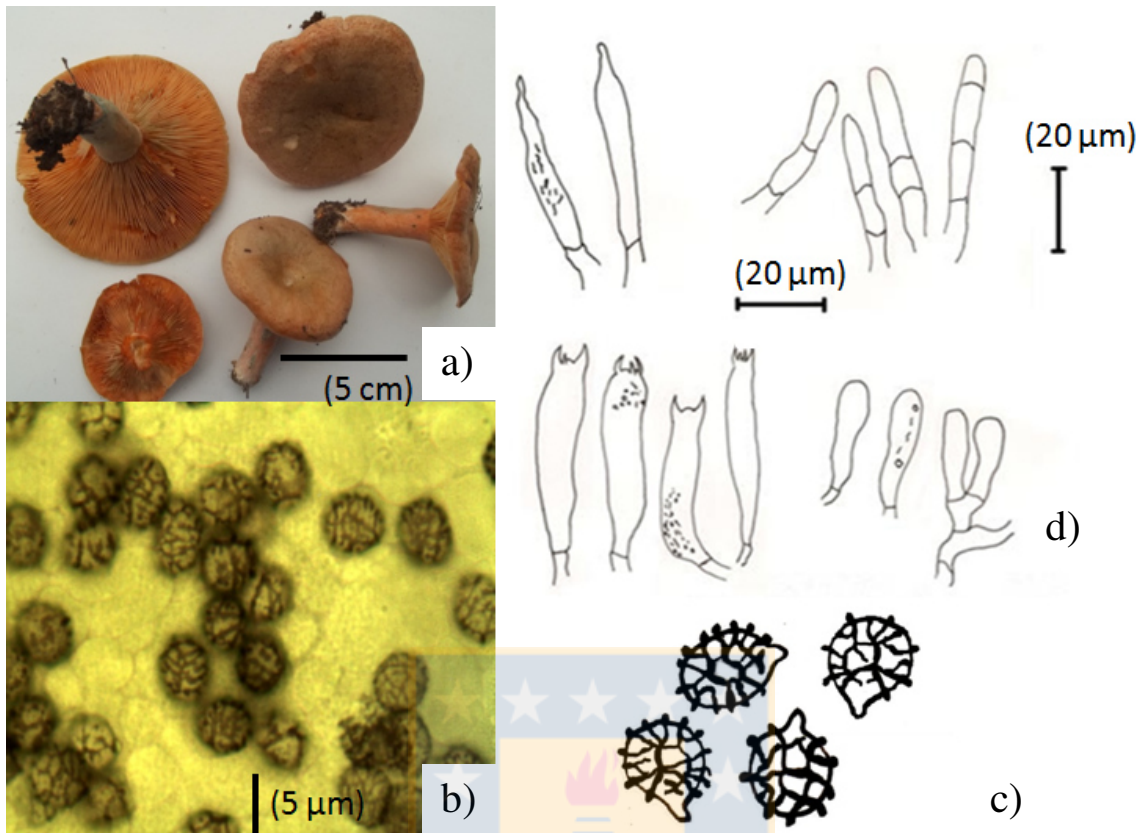


Figura 2 Macro y micromorfología de *Lactarius* sp. a) basidiomas, b) esporas, c) esporas, d) cistidios y basidios.

Rhizopogon roseolus

Los ejemplares de basidiomas examinados fueron depositados en el herbario CONC-F bajo los códigos de acceso presentados en la tabla 2.

Características macroscópicas (Figura 3a)

Basidiocarpos semihipógeos subglobosos de 1,7-3,5 cm de diámetro. Peridio liso, fino menor de 0,5 mm en grosor, inseparable de la gleba, de color pardo amarillento. Basidiomas de colección CONC-F 0813 cambian a rosado al roce, basidiomas de colección CONC-F 0814 sin este cambio de color, base con rizomorfos adheridos al peridio.

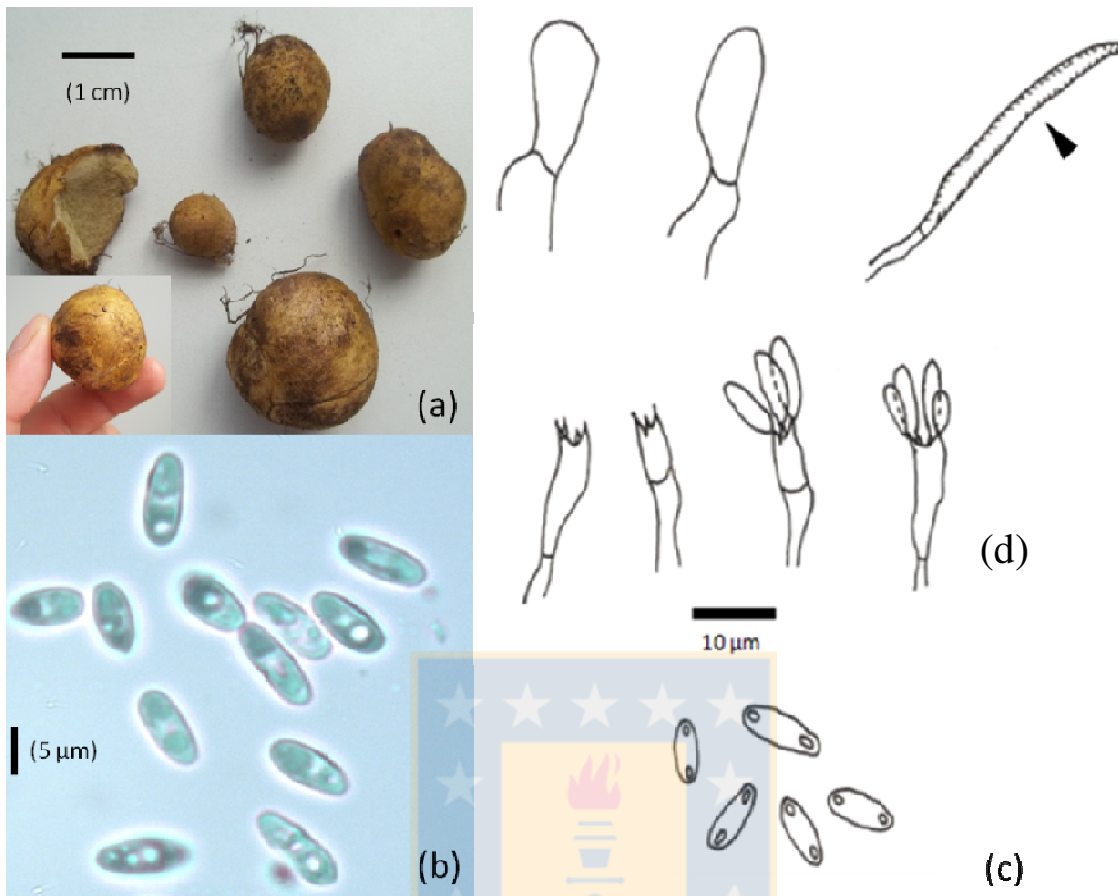


Figura 3 Macro y micromorfología de *Rhizopogon* sp. a) basidiomas, b) esporas, c) basidios, cystidios inmaduros, esporas y paráfisis.

Características microscópicas

Esporas elípticas, hialinas, de $2.3\text{-}2.5\text{-}2.9 \times 6.7\text{-}7.3\text{-}8.4 \mu\text{m}$ (figura 3 b y c), gutuladas, con 1-4 gúttulas, basidios $17\text{-}20\text{-}25 \times 3\text{-}5\text{-}8 \mu\text{m}$ con 4 o 6 esporas, basidiolos inmaduros $13\text{-}15\text{-}18 \times 6\text{-}7\text{-}8 \mu\text{m}$; paráfisis $12\text{-}15\text{-}18 \times 5\text{-}7\text{-}9 \mu\text{m}$ (figura 3d).

Análisis Molecular

Secuencias ITS obtenidas para *Lactarius* sp. y *Rhizopogon* sp. se compararon con secuencias de referencia disponibles en la base de datos de GenBank. Para *Lactarius*, las tres secuencias obtenidas en este estudio se compararon con 29 secuencias obtenidas desde GenBank. En el caso de *Rhizopogon* las cuatro secuencias obtenidas fueron comparadas con 39 secuencias de la base de datos. Para *Lactarius* sp. (figura 4) el árbol reveló con buen

soporte de bootstrap que los taxones chilenos CONC-F 0810; CONC-F 0811; CONC-F 0812 están más emparentados a taxones europeos, agrupándose con un 95% de bootstrap con secuencias de *L. quieticolor* (distancia génica 0.0) y similitud en BLAST de un 99% (tabla 3), y con una mayor distancia génica de *L. deliciosus* (0.028-0.031 tabla 4a). Para *Rhizopogon* (figura 5), los taxones estudiados CONC-F 0813, CONC-F 0814, LBH Rh. ESC. y LBH Rh. C-1, se agrupan con un 87% de bootstrap junto a una secuencia de *R. rubescens* (nombre aceptado *Rhizopogon roseolus* (Index Fungorum)) de New Zealand (distancia $\leq 0,007$), con una distancia génica > 0.1 de las secuencias de *R. luteolus*. Al analizar en BLAST la identidad de *Rhizopogon* de los cuatro sectores estudiados se pudo corroborar que presentan mayor afinidad con *R. rubescens* 98 y 99%, respectivamente.



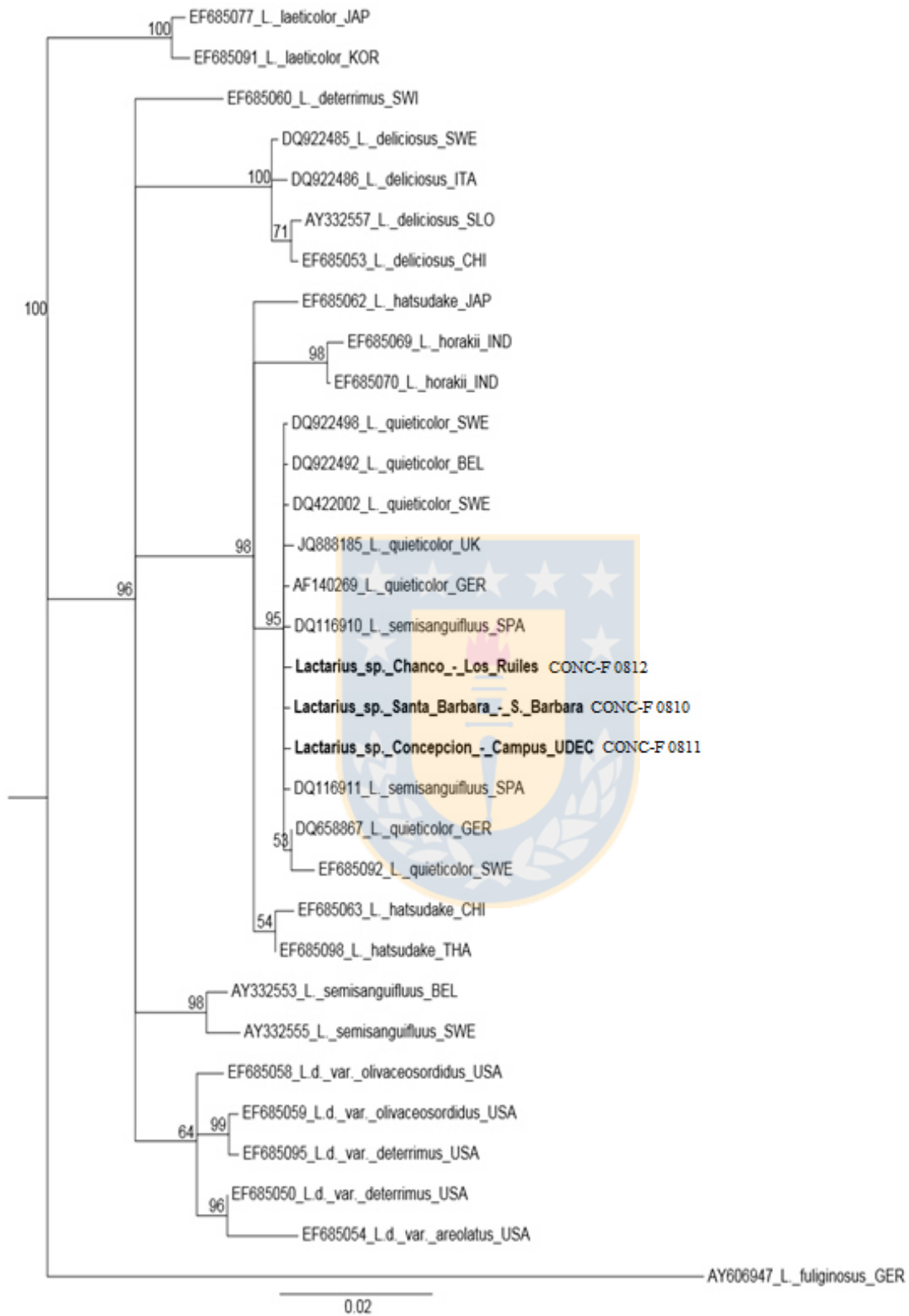


Figura 4 Árbol de Maximum likelihood (Secuencias de la región ADNr ITS1F/ ITS4) y taxones seleccionados: *Lactarius* sección *Deliciosi* (Nuytinck et al. 2007).

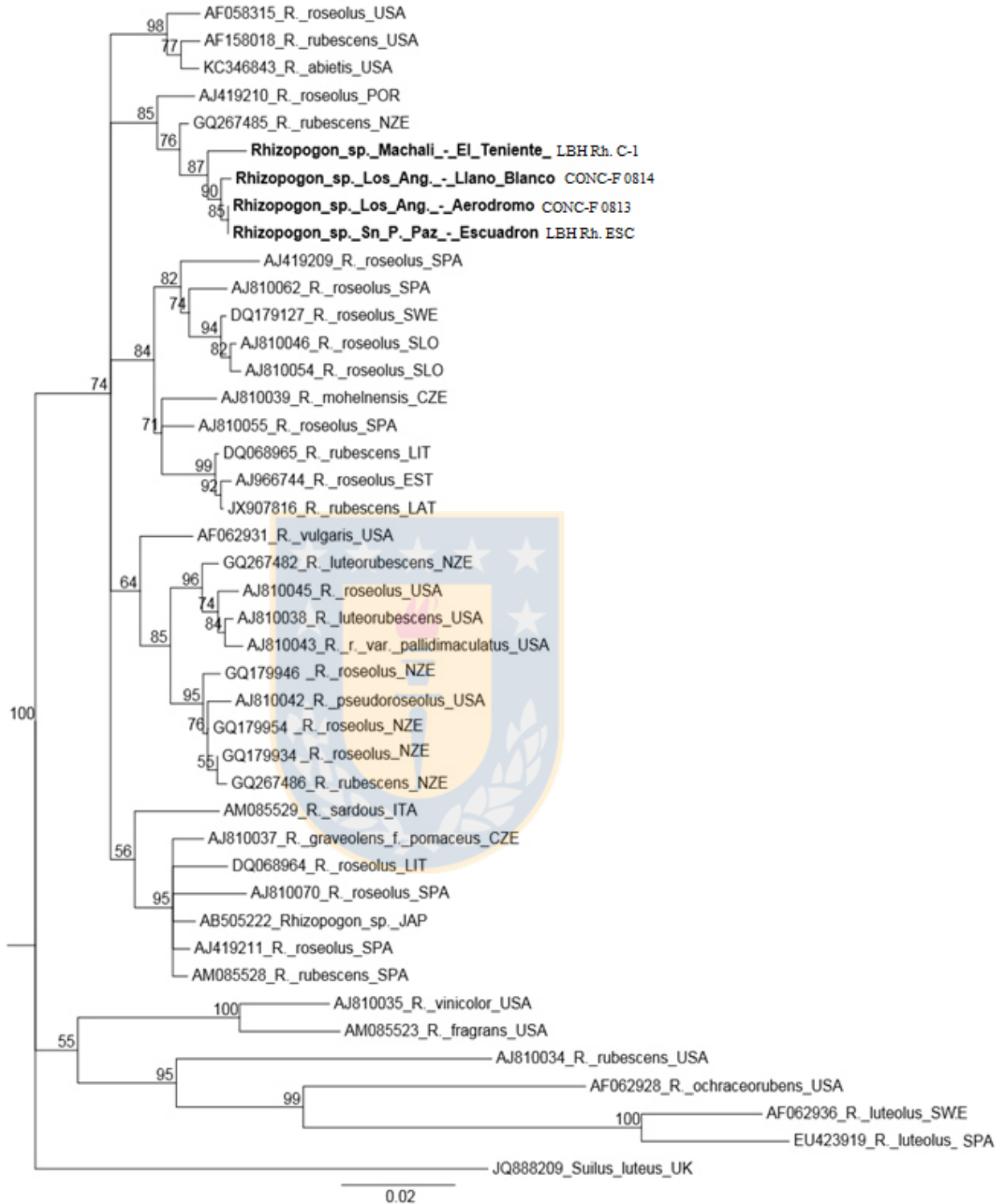


Figura 5 Árbol de Maximum likelihood (Secuencias de la región ADN_r ITS1F/ ITS4) y taxones seleccionados: *Rhizopogon* sp. (Martin y García 2009).

Tabla 3 Secuencias de ITS más cercanas entre *Lactarius quieticolor*- *Rhizopogon roseolus* y otras Russulaceae and Boletaceae, respectivamente. Hongos obtenidos por la búsqueda BLAST en la base de datos GenBank

<i>Lactarius sp.</i>	Taxón	GenBank Número de acceso	E-value	Identidad
Chanco - Los Ruiles	<i>Lactarius quieticolor</i>	JQ888185	0.0	99%
CONC-F 0812-2011	<i>Lactarius quieticolor</i>	DQ422002	0.0	99%
	<i>Lactarius quieticolor</i>	AF140269	0.0	99%
	<i>Lactarius quieticolor</i>	DQ658867	0.0	99%
	<i>Lactarius quieticolor</i>	EF685092	0.0	98%
	<i>Lactarius quieticolor</i>	JQ888185	0.0	99%
Concepción - Campus UDEC	<i>Lactarius quieticolor</i>	JQ888185	0.0	99%
CONC-F 0811-2011	<i>Lactarius quieticolor</i>	DQ422002	0.0	99%
	<i>Lactarius quieticolor</i>	AF140269	0.0	99%
	<i>Lactarius quieticolor</i>	JQ888185	0.0	99%
Santa Bárbara - Santa Bárbara	<i>Lactarius quieticolor</i>	JQ888185	0.0	99%
CONC-F 0810-2011	<i>Lactarius quieticolor</i>	DQ422002	0.0	99%
	<i>Lactarius quieticolor</i>	AF140269	0.0	99%
	<i>Lactarius quieticolor</i>	EF685092	0.0	98%
	<i>Lactarius quieticolor</i>	DQ658867	0.0	98%
<i>Rhizopogon sp.</i>				
Los Ángeles - Aeródromo	<i>Rhizopogon rubescens</i> *	GQ267485	0.0	99%
CONC-F 0813-2011	<i>Rhizopogon rubescens</i>	JX907816	0.0	97%
	<i>Rhizopogon sp. K259</i>	AB505222	0.0	97%
	<i>Rhizopogon luteorubescens</i>	GQ267482	0.0	97%
	<i>Rhizopogon abietis</i>	KC346843	0.0	97%
	<i>Rhizopogon rubescens</i>	GQ267485	0.0	98%
Los Ángeles - Llano Blanco	<i>Rhizopogon rubescens</i>	GQ267485	0.0	98%
CONC-F 0814-2011	<i>Rhizopogon sp. K259</i>	AB505222	0.0	97%
	<i>Rhizopogon rubescens</i>	JX907816	0.0	96%
	<i>Rhizopogon luteorubescens</i>	GQ267482	0.0	96%
	<i>Rhizopogon rubescens</i>	GQ267486	0.0	96%
	<i>Rhizopogon rubescens</i>	GQ267485	0.0	98%
Machalí - El Teniente	<i>Rhizopogon rubescens</i>	GQ267485	0.0	98%
LBH Rh. C-1-2005	<i>Rhizopogon rubescens</i>	JX907816	0.0	96%
	<i>Rhizopogon sp. K259</i>	AB505222	0.0	96%
	<i>Rhizopogon luteorubescens</i>	GQ267482	0.0	96%
	<i>Rhizopogon abietis</i>	KC346843	0.0	95%
	<i>Rhizopogon rubescens</i>	GQ267485	0.0	99%
San Pedro de la Paz - Escuadrón	<i>Rhizopogon rubescens</i>	GQ267485	0.0	99%
LBH Rh. ESC.-2005	<i>Rhizopogon rubescens</i>	JX907816	0.0	97%
	<i>Rhizopogon sp. K259</i>	AB505222	0.0	97%
	<i>Rhizopogon luteorubescens</i>	GQ267482	0.0	97%
	<i>Rhizopogon abietis</i>	KC346843	0.0	97%

* *Rhizopogon rubescens* = *Rhizopogon roseolus*

Tabla 4 Matriz de distancia genética para (a) *Lactarius sp.* and (b) *Rhizopogon sp.*

a)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Lactarius_sp._Chanco_-_Los_Ruiles										
Lactarius_sp._Concepcion_-_Campus_UDEC	0.000									
Lactarius_sp._Santa_Barbara_-_S._Barbara	0.000	0.000								
JQ888185_L._quieticolor_UK	0.000	0.000	0.000							
DQ422002_L._quieticolor_SWE	0.000	0.000	0.000	0.000						
DQ116910_L._semisanguifluus_SPA	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000					
EF685062_L._hatsudake_JAP	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009				
EF685069_L._horakii_IND	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.014			
EF685053_L._deliciosus_CHI	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.030	0.041		
DQ922486_L._deliciosus_ITA	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.033	0.041	0.003	
AY332555_L._semisanguifluus_SWE	0.033	0.033	0.033	0.033	0.033	0.033	0.031	0.042	0.030	0.033
b)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 <i>Rhizopogon sp.</i> Machalí-El Teniente										
2 <i>Rhizopogon sp.</i> Sn P. Paz-Escuadrón	0.000									
3 <i>Rhizopogon sp.</i> Los Ang.-Aerodromo	0.000	0.000								
4 <i>Rhizopogon sp.</i> Los Ang.-Llano Blanco	0.003	0.003	0.003							
5 GQ267485 <i>R. rubescens</i> NZE	0.007	0.007	0.007	0.010						
6 AJ419210 <i>R. roseolus</i> POR	0.017	0.017	0.017	0.013	0.010					
7 AB505222 <i>Rhizopogon sp.</i> JAP	0.025	0.025	0.025	0.022	0.018	0.018				
8 AJ810062 <i>R. roseolus</i> SPA	0.032	0.032	0.032	0.032	0.025	0.029	0.029			
9 GQ267482 <i>R. luteorubescens</i> NZE	0.036	0.036	0.036	0.036	0.029	0.032	0.027	0.036		
10 AF062936 <i>R. luteolus</i> SWE	0.147	0.147	0.147	0.151	0.139	0.143	0.141	0.146	0.143	
11 EU423919 <i>R. luteolus</i> SPA	0.149	0.149	0.149	0.153	0.141	0.145	0.143	0.148	0.145	0.025

4. Discusión

El objetivo de este estudio fue verificar mediante análisis filogenético molecular la identidad sistemática de los taxones de *Lactarius* y *Rhizopogon* descritos en el centro-sur de Chile. Los análisis moleculares obtenidos permitieron identificar la presencia de una nueva especie fúngica asociada a *P. radiata* no descrita en Chile identificada como *Lactarius quieticolor* Romagn., generando duda respecto de la identidad de “*L. deliciosus*” (Garrido 1986, Lazo 2001). No obstante, dado lo acotado de este estudio (tres sitios analizados) no se descarta la posibilidad de tener en nuestro país la presencia de la especie descrita históricamente como “*L. deliciosus*” en el centro sur de Chile, para ello, se necesita incluir una zona geográfica más amplia donde fructifica este hongo.

Al comparar la morfología de *L. deliciosus* y *L. quieticolor* se puede apreciar que son prácticamente iguales desde el punto de vista microscópico (Kranzlin 2005), su principal diferencia se encuentra en el color del carpóforo. *Lactarius quieticolor* presenta una tonalidad opaca a diferencia del color naranja fuerte que presentan los cuerpos fructíferos de *L. deliciosus*, diferencia que es ambigua dependiendo de quien la recolecte. Otra diferencia y más significativa se relaciona con el ambiente ecológico en que se desarrolla (Kranzlin 2005). *Lactarius deliciosus* en forma natural se desarrolla en suelos alcalinos y ricos en nutrientes (Kranzlin 2005) a diferencia de los suelos de Chile donde fueron recolectados los carpóforos de *L. quieticolor*, pH que fluctúan entre 5.1-5.6 (tabla 5). Sin embargo, *Lactarius deliciosus* posee cierta adaptabilidad a pH levemente ácidos bajo condiciones *in vitro* obteniendo tasas de crecimiento óptimo a pH 6 (Daza et al. 2005; Guerin-Laguette et al. (2000). Además, otros autores, consideran que *L. quieticolor* es una variedad de *L. deliciosus*.

Tabla 5 pH de suelos en diferentes sectores de recolecta (metodología según Steubing et al. 2001)

Especie	Comuna	Sector	pH suelos en agua
<i>Lactarius</i>	Concepción	Campus UdeC	5,1
<i>Lactarius</i>	Santa Bárbara	Santa Bárbara	5,4
<i>Lactarius</i>	Chanco	Los Ruiles	5,2
<i>Rhizopogon</i>	Los Ángeles	Aeródromo	5,6
<i>Rhizopogon</i>	Los Ángeles	Llano Blanco	5,5
<i>Rhizopogon</i>	San Pedro de la Paz	Escuadrón	5,4
<i>Rhizopogon</i>	Cachapoal	Codelco	5,1

Rhizopogon es un género muy complejo y difícil de identificar desde el punto de vista morfológico por lo que el respaldo molecular resulta decisivo (Martín 2009). En Europa se han descrito 21 especies de *Rhizopogon* (Martín 1996), siendo la especie *R. roseolus* (Corda) Th. Fr. sensu M.P. Martín la más abundante. Sin embargo, la taxonomía de *R. roseolus* ha sido controversial y otros autores están en desacuerdo sobre el concepto de especie (Martín 1996, Grubisha et al. 2002). El género *Rhizopogon* se ha considerado como cosmopolita siempre asociado a *Pinus* spp. con capacidad de crecer en diferentes ambientes

y un amplio rango de pH. En este estudio los basidiomas recolectados se encontraron en suelos relativamente pobres en nutrientes (arenales) con pH que fluctúan entre 5,1 y 5,6 (tabla 5).

Una característica morfológica considerada como clave para la identificación de *R. roseolus* es que al ser frotado presenta un color rojizo. Sin embargo, la cepa *Rhizopogon* sector Llano blanco al ser frotada no presentó dicha característica, lo que llevó a pensar que pudiese corresponder a *R. luteolus*, pero los resultados moleculares corroboraron que los aislamientos de los cuatro sectores correspondieron a *R. roseolus*. Por lo que queda de manifiesto que sólo una identificación morfológica no es suficiente. Actualmente, el nombre *R. rubescens* es una sinonimia de *R. roseolus* (www.indexfungorum.com), por lo que el nombre correcto para designarlo es *R. roseolus*.

Rhizopogon spp. de los cuatro sectores analizados en este estudio se asociaron al clado compuesto por *R. roseolus* (Fig. 3b) y al compararlas en el BLAST todas las secuencias presentan una mayor similitud ($\geq 98\%$) con *R. rubescens* (nombre aceptado = *R. roseolus*) (tabla 3). Por lo que se confirma la abundancia y dispersión de esta especie en Chile (Lazo 2001).

La alta similitud y la menor distancia génica que los taxones de *Lactarius* presentaron con *L. quieticolor* permiten proponer que las secuencias DQ116910 y DQ116911 correspondientes a *L. semisanguifluus* (España) que se agruparon juntas en un clado a *L. quieticolor* pudiesen tener una mala asignación de nombre en la base de datos BLAST ya que se encuentran con una mayor distancia génica (0,033) de *L. semisanguifluus* de Suecia, secuencias previamente incluidas en la revisión más completa de *Lactarius* sección *Deliciosi* (Nuytinck et al. 2007)

Desde el punto de vista micogeográfico existe una discrepancia entre el origen del hospedero *P. radiata* de Norteamérica y el origen del hongo simbionte dejando abierta varias interrogantes que resolver. Una de ellas, es como *L. quieticolor* llega a colonizar *P. radiata* en Chile, siendo originario de Eurasia y no de California (EE.UU) de donde es originario su hospedero?. Las primeras citas de *L. "deliciosus"* en Chile son de los años 60 (Mikola 1969, Singer 1969) y probablemente ha estado presente en Chile desde incluso antes. Se piensa que la introducción de esta especie fue a través de otras especies de *Pinus*

(*P. sylvestris*, *P. ponderosa*) por colonos del sur para uso ornamental (Rodríguez y Rodríguez 1981).

La más reciente y extensiva filogenia del grupo *Lactarius* se refiere a Nuytinck et al. (2007) de un total de 89 muestras incluidas en su estudio filogenético 30 especies son representativas de *Lactarius* sect. *Deliciosi*, concluyendo que ninguno de los especímenes de América del Norte identificados como *L. deliciosus* son conespecíficos con los *L. deliciosus* Europeos. Las secuencias de *L. quieticolor* utilizados por Nuytinck fueron ubicados en el clado C en conjunto con *L. horaki* y *L. hatsudake* al igual que las secuencias de este estudio (fig 3a), presentando una similitud de un 99% con *L. quieticolor* (tabla 3). Para la filogenia de *Rhizopogon* el estudio más actualizado es el de Martín y García (2009), basado en 1458 colecciones previamente identificadas como *R. roseolus* (Martín 1996). Otros estudio realizados por Grubisha et al. (2002) ubica a *R. roseolus* (= *rubescens*) en el clado C subgénero *Roseoli* separado de las otras especies de la sección *Rhizopogon* clados A (*R. fuscorubens*, *R. luteolus*, *R. occidentalis*, *R. ochraceorubens*, *R. succosus*, *Rhizopogon succosus* y *R. luteolus*) y clado B (*R. evadens*, *R. subsalmonius*). Resultados similares se encontraron para las especies *R. roseolus* y *R. luteolus* cuya distancia génica fue > 0.1 (tabla 4b y fig 3b). Sin embargo, Grubisha et al. (2002) dejan de manifiesto la complejidad del grupo mostrando cinco clados indicativos de 5 posibles especies filogenéticas.

Finalmente en ninguno de los trabajos realizados para los géneros *Lactarius* o *Rhizopogon* a nivel mundial se presentan antecedentes de especies fúngicas recolectadas en Chile o en Sudamérica, por lo que el presente estudio complementa la información de estas especies a nivel mundial y es pionera en investigación de estos hongos en Chile.

CAPÍTULO III
Optimización de las condiciones de
cultivo de *Lactarius quieticolor* y
Rhizopogon roseolus para la
producción de biomasa miceliar.

1. Introducción

La simbiosis micorrícica mitiga los efectos negativos de factores bióticos (ej. ataque de patógenos) y abióticos (ej. sequía, salinidad, metales pesados) sobre el crecimiento vegetal y mejora la estructura del suelo promoviendo su agregación (Brazanti et al. 1999; Adriaensen et al. 2003; Barea et al. 2011, Sousa et al. 2012). Se ha comprobado además que los hongos ectomicorrícicos aumentan el crecimiento de plantas en vivero y su sobrevivencia al ser trasplantadas a plantaciones en campo (Van Tichelen et al. 2001; Dunabeitia et al. 2004; Ortega et al. 2004; Sebastiana et al. 2013, Chávez et al. 2014; Castrillon et al. 2015). *Pinus radiata* D. Don (Pino insigne) ocupa más de 1,5 millones de hectáreas plantadas en el territorio nacional, siendo una de las especies madereras más importantes en Chile (Mead 2013). En el país existen alrededor de 32 especies fúngicas micorrícicas asociadas a plantaciones de pino (Garrido 1986), encontrándose en diferentes estadios de crecimiento de la plantación (Palacios et al. 2012). Dentro de los hongos ectomicorrícicos de importancia en la zona centro sur de Chile asociado a plantaciones exóticas destacan por su potencial biotecnológico las especie *Suillus luteus* (L.) S. F. Gray (Santelices et al. 2012; Gonzales et al. 2015), *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th. Fr. (Travieso 2011) y *Lactarius quieticolor* Romagn. (Pereira et al. 2014; Chávez et al. 2015). Todas estas especies forman asociaciones con *P. radiata* en forma natural, sólo que *R. roseolus* es un colonizador temprano (“early stage”) y *L. quieticolor* un colonizador tardío (“late stage”). De ahí la importancia de incorporar el componente biológico a través de la inoculación de las plantas en vivero sobre todo con especies de interés comercial como el hongo comestible *L. quieticolor* desde temprana edad de la planta, con la finalidad de generar un enriquecimiento con productos forestales no madereros (PFNM) en las plantaciones. Actualmente se han desarrollado diferentes tipos de inóculo para la aplicación de estas especies en vivero, siendo el inóculo miceliar con el que se obtienen los mayores porcentajes de micorrización (Chávez et al. 2009, Pereira et al. 2014). Por otro lado, los rendimientos en biomasa miceliar obtenidos a través de cultivo sumergido tradicional son relativamente bajos, por lo que existe un interés creciente en mejorar la producción de biomasa a través del manejo de algunas de las variables de cultivo como pH, temperatura, concentración de nutrientes y velocidad de agitación, entre otras. Diseños experimentales

estadísticos tales como el diseño de Box- Behnken (BB) y la metodología de superficie de respuesta (RSM) ayudan particularmente a visualizar el efecto combinado de las variables mencionadas (Chacín 2000). Como una herramienta estadística y matemática la RSM ayuda a: la construcción de modelos, identificar los factores eficaces, evaluar las interacciones, seleccionar las condiciones óptimas de las variables de estudio y cuantificar las relaciones entre una o más medidas de respuestas, además, de permitir una respuesta consistente con un número limitado de experimentos (Avishek y Arun 2008; Liyana-Pathirana y Shahidi 2005). Dentro de este contexto, el objetivo de este estudio fue determinar las condiciones óptimas de pH, temperatura y concentración de fuente de carbono para la producción de biomasa miceliar de los hongos ectomicorrícicos *L. quieticolor* y *R. roseolus* en medio de cultivo líquido. Posterior a la optimización, las variables seleccionadas fueron escaladas en bioreactor (Biostat C Cubas de 1 L) y la biomasa miceliar fue encapsulada en polímeros de alginato para evaluar su viabilidad *in vitro*.

2. Metodología

Selección del medio de cultivo y fuente de carbono para *L. quieticolor* y *R. roseolus* a partir de cultivo sólido y líquido

Este ensayo se realizó con la finalidad de seleccionar el mejor medio de cultivo y fuente de carbono para el crecimiento de *L. quieticolor* (LBH-Lq-C2) y *R. roseolus* (LBH-Rr-LLB2). Para el cultivo de los hongos se utilizaron los medios de cultivo BAF y MNM. Las fuentes de carbono utilizadas fueron sacarosa, glucosa y manitol (10 g/L). En la preparación de todos los medios de cultivo se utilizó agua desionizada. El pH de los medios fue ajustado a 5,8 agregando HCl o KOH, según fuera necesario. Placas de Petri (9 cm) fueron preparadas con 20 mL de los medios MNM y BAF e inoculadas en el centro con un disco de agar-micelio (5 mm diámetro) de las dos especies fúngicas. Las placas inoculadas se incubaron en oscuridad durante 30 días a una temperatura constante de 24 ± 1 °C (estufa marca Binder), periodo durante el cual se midió el crecimiento radial de las colonias a intervalos de tiempo. Finalizado el periodo de evaluación se ajustaron los datos mediante una ecuación de regresión (Harnett 1987; Vázquez-García et al. 2002;

Santiago-Martínez et al. 2003) con la finalidad de determinar la pendiente de la curva de crecimiento que correspondió a la velocidad media de crecimiento radial (mm/día) (Santiago-Martínez 1992; Santiago-Martínez et al. 1995; Vázquez-García et al. 2002). Además, al finalizar el ensayo se determinó la biomasa miceliar de las colonias fúngicas producidas bajo las diferentes condiciones de cultivo disolviendo el contenido de cada placa en horno microonda (marca Recco) a potencia media por 3-5 min (Chapman et al. 1990; modificado). Los micelios fúngicos fueron recuperados por filtración, sobre papel filtro previamente pesado, y lavados varias veces con agua destilada caliente para facilitar la eliminación de los restos de medio de cultivo. Los micelios recuperados fueron secados en estufa Jouan a 60 °C, hasta alcanzar peso constante (mg). Paralelamente, se realizó el mismo ensayo en medio de cultivo líquido determinando la producción de biomasa a través del peso seco (mg), evaluando si existen diferencias entre los tipos de cultivo. Para cada ensayo se utilizaron tres réplicas por tratamiento. La selección del medio de cultivo y fuente de carbono para cada hongo en estudio, se llevó a cabo a través de la biomasa producida (peso seco) tanto en medio sólido como líquido.

Cinética de crecimiento de *L. quieticolor* y *R. roseolus* en medio de cultivo líquido

Una vez seleccionado el medio de cultivo y la fuente de carbono en la etapa anterior, se procedió a obtener las curvas de crecimiento en medio líquido a 24°C bajo condiciones estáticas (estufa de incubación) y agitadas (incubadora con agitación orbital, 120 r.p.m. SI-300), a fin de determinar el tiempo de crecimiento (días), donde se produce la máxima cantidad de biomasa miceliar. Los ensayos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 100 mL de capacidad con 40 mL de medio de cultivo. Los matraces se inocularon con 1 disco de agar micelio (5 mm) del hongo previamente cultivado en placas. Se realizaron análisis seriados durante 30 días donde se cuantificó la biomasa en triplicado. Para ello, cada 5 días se retiraron tres matraces de los ensayos y además de la biomasa, se cuantificó la variación de pH en el tiempo (Musilek et al. 1969; Rossi, 2006). A partir de esta etapa se seleccionó el tiempo de cultivo y la condición (agitada) de cultivo en que se llevó a cabo el proceso de optimización.

Optimización del crecimiento de *L. quieticolor* y *R. roseolus*

La optimización del crecimiento de las especies fúngicas en medio de cultivo líquido se llevó a cabo bajo agitación orbital (120 r.p.m.) y las variables pH, temperatura y fuente de carbono fueron evaluadas (Tabla 1 y Fig. 1). Con la finalidad de evaluar el efecto de las diferentes concentraciones de fuente de carbono (20 a 40 g L⁻¹ de glucosa o manitol, según correspondiera) en el crecimiento de los hongos se utilizó medio BAF cuya composición en g L⁻¹ fue: CaCl₂ 0,2, KH₂PO₄ 0,75, MgSO₄ x 7H₂O 0,5, MnSO₄ 0,005, ZnSO₄ 0,001, FeCl₃ x 7H₂O 0,01, peptona 6,315, extracto de levadura 0,2, tiamina 0,0005, biotina 0,00001, inositol 0,05 y ácido fólico 0,0001. La fuente de carbono fue glucosa para *L. quieticolor* y manitol para *R. roseolus*, de acuerdo a los resultados de los ensayos anteriores. La optimización se llevó a cabo en triplicado utilizando matraces Erlenmeyer (100 mL) conteniendo 40 mL de medio de cultivo y dos discos de agar micelio (5 mm diámetro) como inóculo, con un tiempo de cultivo total de 30 días.

Tabla 1 Diseño de matriz utilizada para cada experimento con las variables codificadas

Ensayo N°	pH	Temperatura (°C)	Glucosa/Manitol (g L ⁻¹)
1	3.5 (-1)	20 (-1)	30 (0)
2	5.5 (1)	20 (-1)	30 (0)
3	3.5 (-1)	28 (1)	30 (0)
4	5.5 (1)	28 (1)	30 (0)
5	3.5 (-1)	24 (0)	20 (-1)
6	5.5 (1)	24 (0)	20 (-1)
7	3.5 (-1)	24 (0)	40 (1)
8	5.5 (1)	24 (0)	40 (1)
9	4.5 (0)	20 (-1)	20 (-1)
10	4.5 (0)	28 (1)	20 (-1)
11	4.5 (0)	20 (-1)	40 (1)
12	4.5 (0)	28 (1)	40 (1)
13	4.5 (0)	24 (0)	30 (0)
14	4.5 (0)	24 (0)	30 (0)
15	4.5 (0)	24 (0)	30 (0)

* 15 tratamientos con 3 repeticiones cada uno

Para la optimización se utilizó la metodología de superficie de respuesta (Wiley 1995; Chacín 2000; Montgomery 2002). Dicha metodología permite predecir la respuesta del

sistema respecto a cada uno de los factores considerados dentro de la región experimental. El proceso de optimización implica tres pasos principales: realizar los experimentos diseñados estadísticamente, estimar los coeficientes de un modelo matemático y la predicción de la respuesta, y la comprobación adecuada del modelo. En el presente estudio las variables fueron pH, temperatura y concentración de glucosa/manitol dependiendo de la especie fúngica utilizada, mientras que la respuesta observada fue la biomasa total después del período de incubación. La respuesta predicha (Y) por el modelo puede ser expresada en forma general a partir de la ecuación 1.

$$Y = B_0 + \sum_{i=1}^k B_i X_i + \sum_{i=j=1}^k B_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

En el presente estudio k toma el valor de 3 debido a que hay tres variables involucradas (pH, temperatura y concentración de fuente de carbono) por lo que la ecuación (1) se convierte en:

$$Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_3 + B_{12} X_1 X_2 + B_{13} X_1 X_3 + B_{23} X_2 X_3 + B_{11} X_1^2 + B_{22} X_2^2 + B_{33} X_3^2 \quad (2)$$

Donde, X_1 , X_2 y X_3 son las variables de entrada pH, temperatura y concentración de glucosa/manitol, respectivamente; B_0 es una constante; B_1 , B_2 y B_3 coeficientes lineales; B_{12} , B_{13} y B_{23} coeficientes de producto cruzado o interacción; B_{11} , B_{22} y B_{33} son coeficientes cuadráticos. Los valores bajo, medio y alto de cada variable (pH, temperatura y concentración de glucosa/manitol) fueron codificados como -1, 0 y 1, respectivamente, como se esquematiza en la Fig. 1 y se muestran junto con el diseño de experimento Box-Behnken en la Tabla1, los que fueron obtenidos a partir del programa Modde 4.0 (Umetri, Umeå, Sweden).

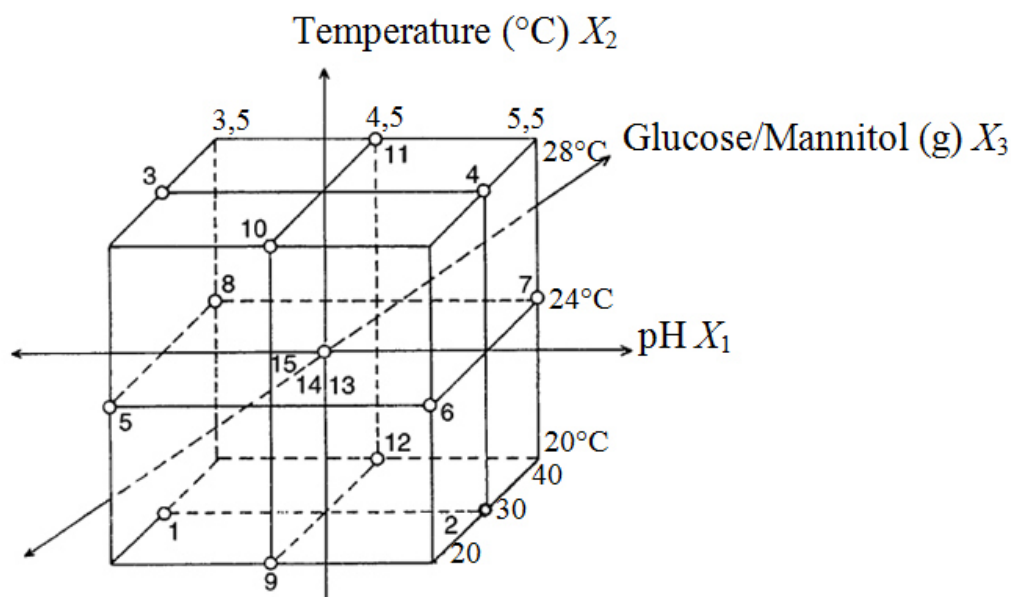


Figura 1 Niveles bajos, medios y altos de las tres variables consideradas.

Para la determinación de los coeficientes de regresión de cada uno de los términos, de las funciones que describen el comportamiento de la respuesta “biomasa” para *L. quieticolor* y *R. roseolus*, en los intervalos establecidos para las variables del planeamiento multifactorial, se utilizó el método estadístico de los mínimos cuadrados. El coeficiente de determinación (R^2) es la fracción de la variación de la respuesta explicada por el modelo. El coeficiente de predicción (Q^2) es la fracción de la variación de la respuesta que se puede predecir por el modelo y proporciona el mejor resumen del ajuste del modelo. Q^2 es una subestimación de la bondad de ajuste del modelo. Valores cercanos a 1 son ideales para validar el modelo.

Producción de biomasa miceliar de *L. quieticolor* y *R. roseolus* en biorreactor Braun BIOSTAT® C

Una vez realizada la optimización de la producción de biomasa miceliar en matraz se llevaron a cabo cultivos en biorreactor de tanque agitado bajo las condiciones de pH, temperatura y concentración de fuente carbono previamente establecidas (*Lactarius*: pH 5,5, 24 °C y 20 g L⁻¹ de glucosa; *Rhizopogon*: pH 5,5, 28°C y 30 g L⁻¹ de manitol) con la finalidad de producir biomasa miceliar y evaluar la efectividad del modelo. Estos ensayos

se llevaron a cabo en un biorreactor Braun BIOSTAT[®] C (1 L de capacidad), conteniendo 600 mL de medio de cultivo e inoculado con 50 mL de inóculo miceliar de cada especie, producido en medio de cultivo (seleccionado en etapas anteriores) durante 14 días en condiciones agitadas. El volumen total de trabajo dentro del vaso del biorreactor después de la adición del inóculo fue de 650 mL. Otras variables de cultivo como oxígeno disuelto y velocidad de agitación fueron ajustadas a 60% y 120 rpm, respectivamente y mantenidas constantes en el biorreactor durante todo el periodo de crecimiento (Rossi 2007). El periodo del cultivo fue de 14 días.

Encapsulación del micelio: La encapsulación del micelio se realizó con parte de la biomasa cosechada del cultivo en el biorreactor (Morte y Honrubia 2009). Para ello, se añadió el micelio (10 g/L en peso fresco) a una disolución de alginato de sodio (Sigma Aldrich) de viscosidad media (10 g/L) y turba (20 g/L) previamente esterilizadas durante 20 min/120°C. Los tres componentes (micelio + alginato + turba) se mezclaron y trituraron en una batidora estéril con varios pulsos (4-8) de 2 s. Dicha mezcla, en agitación, se añadió gota a gota a través de un tubo de silicona de 4 mm de diámetro en un recipiente con una solución de 100 g/L de CaCl₂·2H₂O estéril con ayuda de una bomba peristáltica (Fig. 2) con la finalidad de polimerizar el micelio (Le Tacon et al. 1985; Pera et al. 1994; Morte y Honrubia 2009).

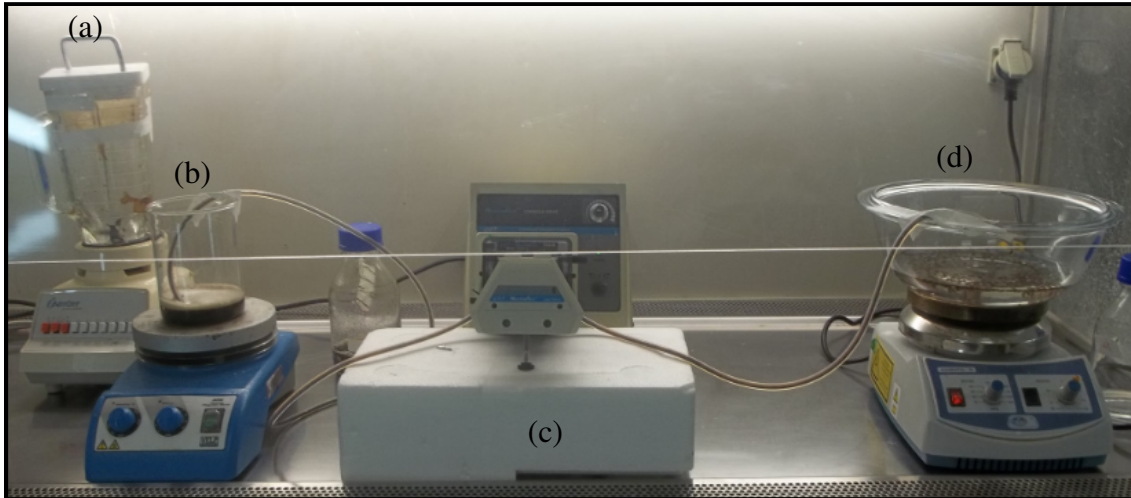


Figura 2 Procedimiento para encapsular micelio. a) Licuadora (mezclar alginato de sodio + turba molida + micelio), b) Solución de alginato de sodio + turba molida + micelio, c) Bomba peristáltica (para traslado de material de b a d) y d) Recipiente con CaCl_2 (formación de pellet (bolitas de alginato)).

Análisis de los datos

Las variables evaluadas fueron la velocidad media de crecimiento radial (mm día^{-1}) y biomasa para medio sólido y líquido. Para los parámetros evaluados se aplicó un análisis factorial (Steel y Torrie 1989). Los factores analizados fueron medio de cultivo (BAF y MMN) y diferentes fuentes de carbono (glucosa, sacarosa y manitol). Los datos se sometieron a un análisis de varianza y la comparación de medias se calculó según la prueba Tukey ($P < 0,05$) (Steel y Torrie 1989). Para el análisis de datos se utilizó el software Statistica versión 6.0.

Para la optimización, los datos de biomasa expresados en g L^{-1} recogidos durante los 15 experimentos se sometieron a un análisis de regresión utilizando la metodología de superficie de respuesta (Chacín 2000) empleando el diseño de Box- Behnken (Box y Behnken 1960).

3. Resultados

Al analizar la velocidad de crecimiento radial y la producción de biomasa de *L. quieticolor* y *R. roseolus* en cultivo sólido se observaron diferentes respuestas que dependieron del medio de cultivo y fuente de carbono utilizada (Fig. 3).

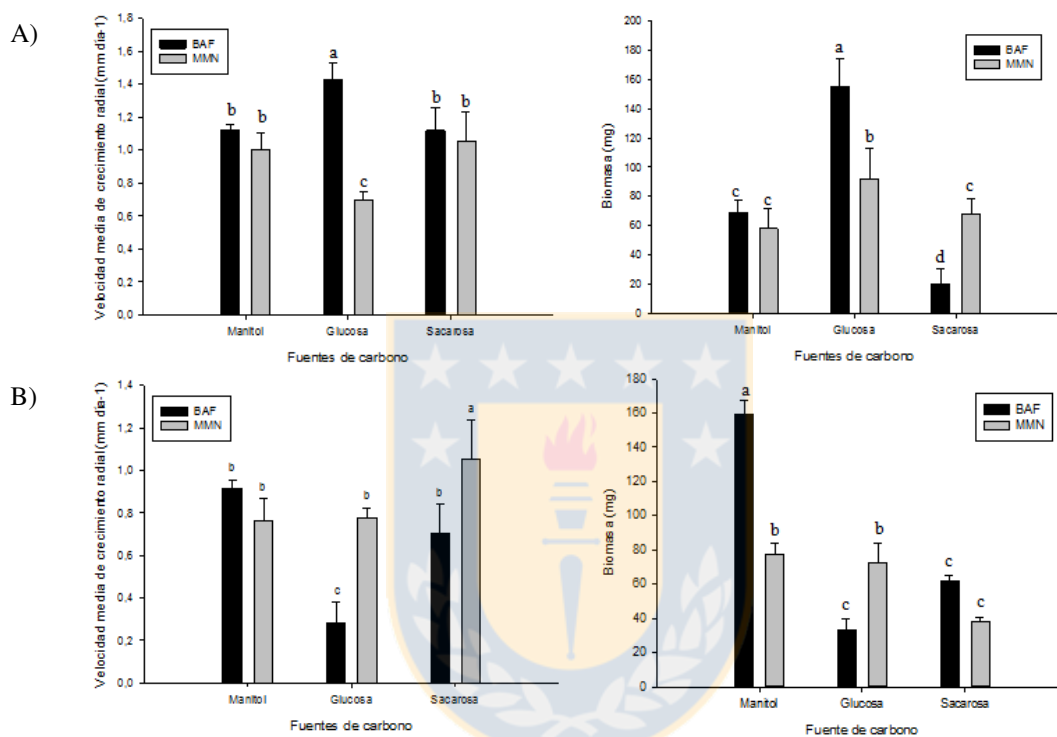


Figura 3 Velocidad media de crecimiento radial y producción de biomasa micelial de los hongos (A) *L. quieticolor* y (B) *R. roseolus* en los medios de cultivo sólidos BAF y MMN, utilizando como fuente de carbono manitol, glucosa y sacarosa (10 g L⁻¹). Periodo de incubación 30 días. Letras iguales sobre las barras no presentan diferencias significativas.

Las mayores velocidades de crecimiento radial para *L. quieticolor* ocurrieron en BAF-glucosa (1,43 mm.día⁻¹) mientras que para *R. roseolus* en MMN-sacarosa (1,05 mm día⁻¹), presentando diferencias significativas con todos los demás tratamientos. Evaluando la producción de biomasa se puede demostrar que *L. quieticolor* produjo mayor cantidad de biomasa en BAF-glucosa (155 mg), mismo medio donde se obtuvo la mayor velocidad de crecimiento. En cambio *R. roseolus* presentó la mayor producción de biomasa en BAF-manitol (163,3 mg), a diferencia de lo que se observó cuando se evaluó la velocidad media

de crecimiento radial, detectándose diferencias significativas ($P < 0,05$) con todos los demás tratamientos.

En términos de producción de biomasa micelial de *L. quieticolor* y *R. roseolus* en medio de cultivo líquido (Fig. 4), se repite la tendencia observada en medio sólido. *L. quieticolor* presentó la mayor producción de biomasa en BAF-glucosa (47 mg), equivalente a $1,2 \text{ g L}^{-1}$, presentando diferencias significativas con todos los demás tratamientos. Para *R. roseolus* al igual que en medio sólido el mejor medio de cultivo y fuente de carbono fue BAF-manitol (115 mg) equivalente a $3,02 \text{ g L}^{-1}$.

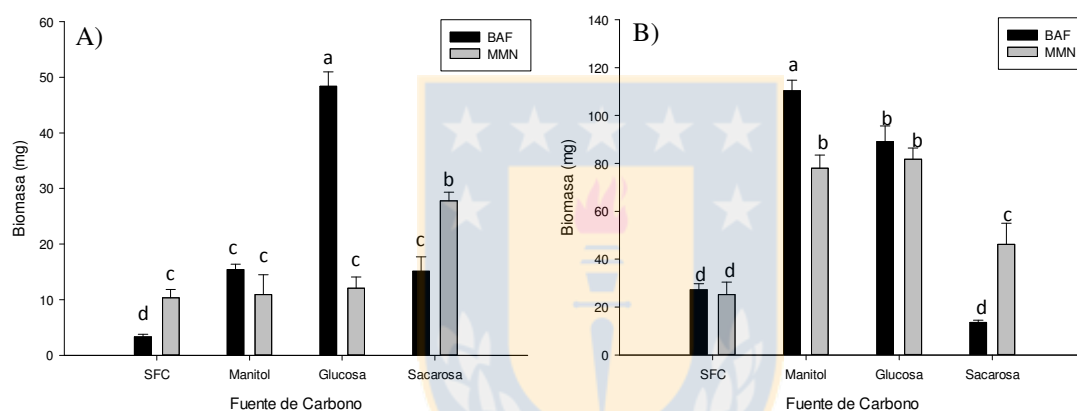


Figura 4 Producción de biomasa micelial de (A) *L. quieticolor* y (B) *R. roseolus* en los medios de cultivo líquido BAF y MMN, utilizando como fuente de carbono manitol, glucosa y sacarosa (10 g L^{-1}). Periodo de incubación 30 días. SFC: medio de cultivo sin fuente de carbono. Letras iguales sobre las barras no presentan diferencias significativas.

A partir de los primeros ensayos se logró seleccionar el medio de cultivo BAF para las dos especies fúngicas y la fuente de carbono glucosa para *Lactarius* y manitol para *Rhizopogon*. Con respecto a la cinética de crecimiento de *L. quieticolor* y *R. roseolus*, los resultados indican que las dos especies fúngicas presentaron buen crecimiento en medio líquido, tanto bajo condiciones estáticas como agitadas. Al comparar ambas condiciones de cultivo (agitación, estática) para las dos especies fúngicas se observó que la condición agitada favoreció la mayor producción de biomasa micelial (Fig. 5).

Se observa que desde el día 15 al 30 *L. quieticolor* aumentó su producción de biomasa bajo agitación constante con una velocidad específica de μ : 0,09 mm y 7 días de duplicación

celular respecto a los 13 días en condiciones estáticas. Por otra parte, *R. roseolus*, presentó un aumento considerable en la producción de biomasa en condición agitada entre los 20 y 25 días de cultivo, con una velocidad específica de μ : 0,121 mm y un tiempo de duplicación celular de 6 días, mientras que en condiciones estáticas la duplicación se generó al día 8. A partir de la cinética de crecimiento se establecieron 30 días de cultivo, con agitación para los ensayos de optimización.

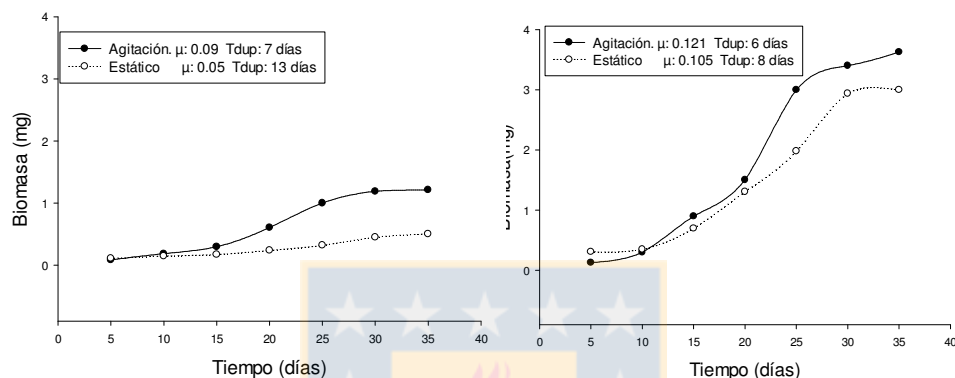


Figura 5 Cinética de crecimiento a pH 5.5 por *L. quieticolor* (izquierda) y *R. roseolus* (derecha) en condición de agitación y estática. μ : tasa específica de crecimiento. Tdup: Tiempo de duplicación celular.

Optimización

El crecimiento de los hongos ectomicorrícicos *L. quieticolor* y *R. roseolus* son sensible a pequeñas alteraciones en los factores como el pH, la temperatura y la concentración de la fuente de carbono. El efecto de estos factores en el crecimiento de los hongos se estudió en relación con el total de biomasa producida expresado en $g L^{-1}$. *L. quieticolor* presentó abundante crecimiento con el tratamiento 6 ($3.25 g L^{-1}$ de biomasa, $0,11 g L^{-1}.día$) y para *R. roseolus* los valores más altos de la biomasa se obtuvieron con el tratamiento 4 ($8.60 g L^{-1}$, $0,28 g L^{-1}.día$), a los 30 días de evaluados los ensayos (Tabla 2).

Tabla 2 Valores experimentales y predichos para la biomasa expresado en g L-1.

Ensayo n°	<i>Lactarius quieticolor</i>		<i>Rhizopogon roseolus</i>	
	Real	Predicho	Real	Predicho
1	1.21	1.34	5.86	6.18
2	2.79	2.88	6.66	7.03
3	0.90	0.81	5.97	5.61
4	1.80	1.67	8.60	8.29
5	2.01	1.66	4.41	4.27
6	3.25	2.94	7.08	6.89
7	1.58	1.90	5.90	6.09
8	2.67	3.02	6.86	7.00
9	2.37	2.59	6.08	5.92
10	1.30	1.73	6.69	7.20
11	3.20	2.76	8.33	7.82
12	2.10	1.88	7.07	7.23
13	2.27	2.29	6.65	6.72
14	2.27	2.29	6.60	6.72
15	2.32	2.29	6.92	6.72

La ecuación de regresión obtenida después del análisis de la varianza permite obtener la biomasa producida como una función de los tres factores en estudio. Por lo tanto la respuesta predicha Y se puede conseguir mediante la resolución de la ecuación de segundo grado (2), y se obtiene:

$$Y_1 = 2.29 + 0.600X_1 - 0.435X_2 + 0.080X_3 - 0.240X_1^2 - 0.375X_2^2 + 0.328X_3^2 - 0.170X_1X_2 - 0.038X_1X_3 - 0.006X_2X_3 \quad (3)$$

$$Y_2 = 6.72 + 0.883X_1 + 0.173X_2 + 0.485X_3 - 0.464X_1^2 + 0.517X_2^2 - 0.195X_3^2 + 0.458X_1X_2 - 0.427X_1X_3 - 0.468X_2X_3 \quad (4)$$

Donde Y_1 e Y_2 es la biomasa predicha de *L. quieticolor* y *R. roseolus*, respectivamente. Los coeficientes de la ecuación 3 y 4 se enumeran en la tabla 3.

El resumen del análisis de la varianza para la variable respuesta biomasa se muestra en la tabla 4.

Tabla 3 Coeficientes del modelo.

Variables	Biomasa	
	<i>L. quieticolor</i>	<i>R. roseolus</i>
B_0	2.290	6.720
B_1	0.600	0.883
B_2	-0.435	0.173
B_3	0.080	0.485
B_{11}	-0.240	-0.464
B_{22}	-0.375	0.517
B_{33}	0.328	-0.195
B_{12}	-0.170	0.458
B_{13}	-0.038	-0.427
B_{23}	-0.006	-0.468
Q^2	0,73	0,74
R^2	0,85	0,85

El análisis ANOVA para la producción de biomasa (g/L) indica que el modelo para ambas especies es válido, la superficie de respuesta muestra una distribución de Fisher para la regresión de 21.20 y 21.8 y para la falta de ajuste es de 10,76 y 10,69 para *L. quieticolor* y *R. roseolus* respectivamente, en tanto para la distribución de la probabilidad muestra para las dos especies fúngicas valores para la regresión y falta de ajuste inferiores a $P < 0,001$. Por lo tanto, la superficie de respuesta para la biomasa en la etapa de optimización es estadísticamente confiable. Para ambas especies se presenta un coeficiente de correlación $R^2 = 0,85$.

Tabla 4 Análisis de regresión para biomasa (modelo de superficie de respuesta cuadrática ajustada).

Fuente	<i>L. quieticolor</i>				<i>R. roseolus</i>			
	SC	g l	MC	Valor F ($P < 0.001$)	SC	g l	MC	Valor F ($P < 0.001$)
Modelo	17.3	9	1.920	21.2	38.62	9	4.291	21.8
Residuo	3.170	35	0.090		6.867	35	0.196	
Falta de ajuste	2.88	3	0.963	10.76	3.44	3	1.14	10.69
Error	0.28	32	0.008		3.43	32	0.107	
Correlación total	20.276	44			45.48	44		

El gráfico de superficie de respuesta ayuda a evaluar el efecto de cualquier combinación de dos factores en el crecimiento de los hongos en estudio. Por lo tanto, los efectos de la interacción pH/temperatura; glucosa o manitol/temperatura, y pH/glucosa o manitol, se pudo conseguir.

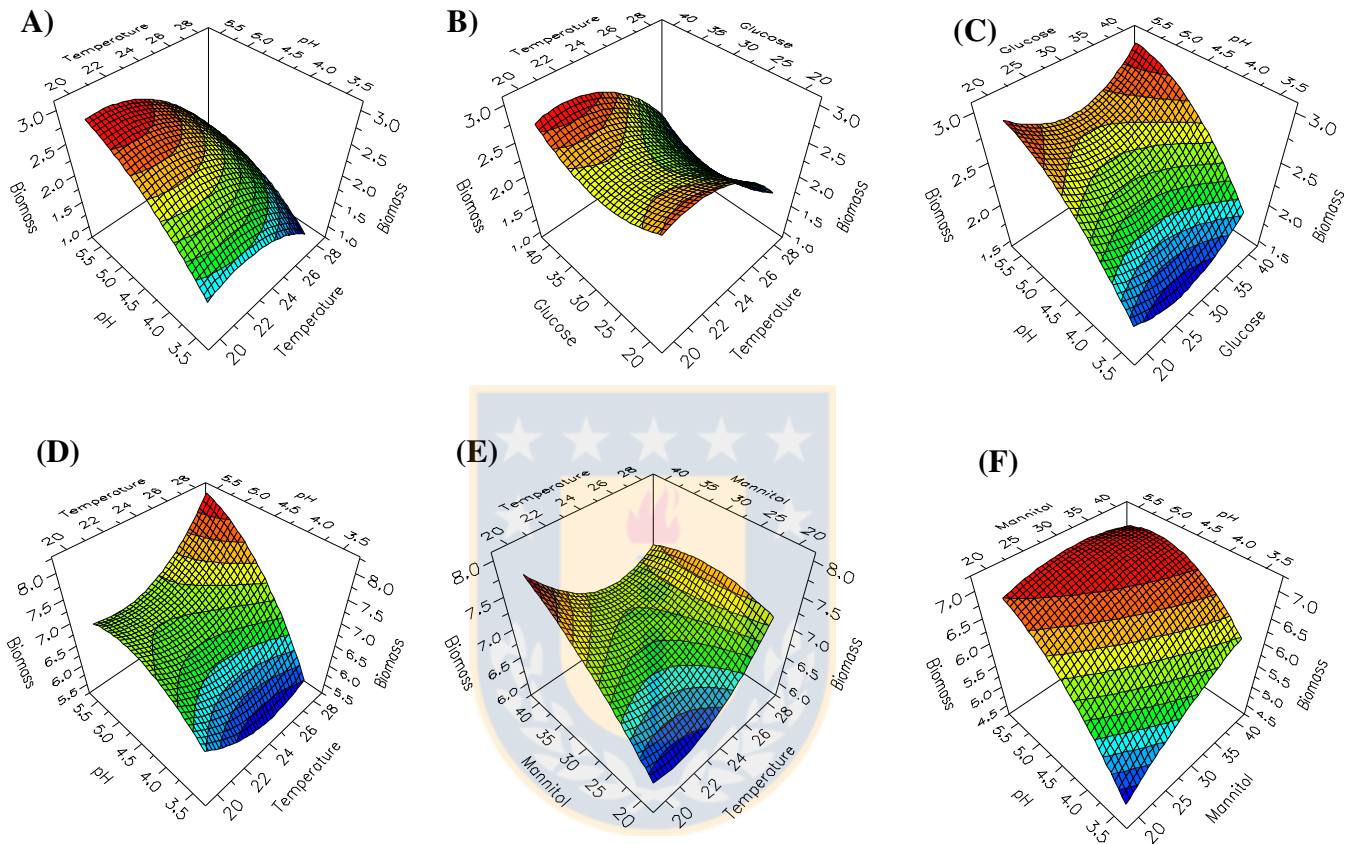


Figura 6 Superficie de respuesta para *L. quieticolor* (A-C) y para *R. roseolus* (D-F) cultivados en medio líquido BAF durante 30 días.

Los resultados muestran que al interactuar el pH y la temperatura (Fig. 6A) se observa que a medida que aumenta el pH (5-5.5) y disminuye la temperatura (24-20°C) se incrementa la biomasa. Por otro lado, al disminuir la temperatura (24-20°C) y existir un aumento en la concentración de glucosa para *L. quieticolor* la producción de biomasa miceliar se ve incrementada (Fig. 6B). Finalmente, al interactuar el pH y la glucosa se observan valores máximos de biomasa a mayor pH y al utilizar 20 o 40 g L⁻¹ de glucosa, mostrando una disminución de la biomasa cuando se utilizan 30 g L⁻¹ de glucosa (Fig. 6 C). En la Fig. 6D

se observa que a medida que aumenta el pH desde 4,5 a 5,5 y existe un aumento en la temperatura (28°C) se observan valores óptimos de producción de biomasa para *R. roseolus*. Cuando interaccionan las diferentes concentraciones de manitol con la temperatura (Fig. 6 E) se observa que la biomasa se incrementa cuando existe una menor temperatura y una mayor concentración de fuente de carbono. Por último, cuando interaccionan el pH y las diferentes concentraciones de manitol (Fig. 6 F), se observa una relación directamente proporcional aumentando la biomasa a medida que aumenta el pH y la fuente de carbono.

El escalamiento en biorreactor resultó exitoso (Fig. 7) obteniéndose rendimientos en gL^{-1} de 3,42 y 8,5 para *L. quieticolor* y *R. roseolus*, respectivamente, equivalentes a una producción de 0,24 y 0,61 $\text{gL}^{-1}\cdot\text{día}$ valores muy cercanos a los obtenidos en la etapa de optimización, sin embargo, dada las condiciones controladas de pH, agitación y aireación 60% en la cuba de fermentación, la variable tiempo de cultivo es la que más se beneficia con una reducción de un 53,3% (de 30 a 14 días), respaldando con ello el modelo de optimización.

Cuando se estudió la viabilidad del micelio encapsulado (Fig. 8) se pudo corroborar que a los 5 días de sembrados los pellet de *R. roseolus* comenzaron a germinar logrando al día 15 prácticamente completar la placa Petri. En cambio, *L. quieticolor* fue más lento comenzando a germinar al día 12. Lo que indica el potencial que posee esta forma de mantenimiento del micelio para los hongos ectomicorrícicos evaluados.



Figura 7 Cultivo de micelio en biorreactor Biostat C Cubas de 1 L.

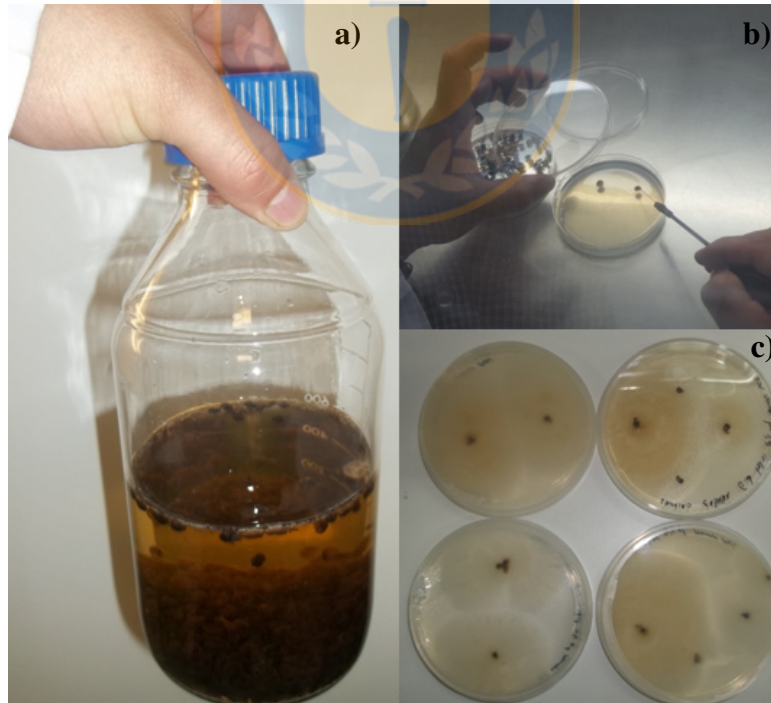


Figura 8 Siembra y viabilidad del encapsulado en medio MMN sólido. a) Bolas de alginato en agua desionizada estéril, b) Siembra en medio de cultivo sólido, c) viabilidad.

4. Discusión

El uso de modelos estadísticos para optimizar la producción de biomasa fúngica y la obtención de metabolitos se ha incrementado en los últimos tiempos, y ejemplo de ello son los trabajos realizados con el hongo entomopatógeno *Cordyceps militaris* para la producción de biomasa (Hsieh et al. 2007; Cui y Yuan 2011), y con los hongos saprófitos *Lentinus squarrosulus* (Ahmad et al. 2013) para la producción de micelio y exopolisacáridos, *Ganoderma lucidum* para la obtención de compuestos fenólicos (Zárate-Chaves et al. 2013) y *Pleurotus* sp. para la producción de enzimas (Saravanakumar et al. 2010). En cambio, en hongos ectomicorrícicos los trabajos de optimización de la producción de biomasa o metabolitos usando modelos estadísticos son escasos (Srinivasan et al. 2000; Liu et al. 2008). Para estos últimos, varios criterios de selección son requeridos especialmente cuando el objetivo final es la producción de grandes cantidades de biomasa para la inoculación de plantas a gran escala. Dentro de los criterios de selección destacan las variables pH, concentración y tipo de fuente de carbono y temperatura de cultivo, las cuales son de gran significancia en la producción de la biomasa miceliar. En el presente estudio se utilizaron el azúcar alcohol manitol, la hexosa glucosa, y el disacárido sacarosa como fuentes de carbono, observándose que *L. quieticolor* produjo la mayor cantidad de biomasa en medio BAF-glucosa, en tanto que *R. roseolus* presentó la mayor producción de biomasa en el mismo medio BAF, pero en presencia de manitol. Bajo estas condiciones la biomasa producida por *R. roseolus* fue aproximadamente más del doble de la producida por *L. quieticolor*. Aunque ambas especies son ectomicorrícicas mostraron una clara diferencia en cuanto a los requerimientos de fuentes de carbono para la óptima producción de biomasa bajo condiciones controladas. *L. quieticolor* es un hongo epígeo de habito agaricoide, en cambio, *R. roseolus* es un hongo hipógeo (falsa trufa), y aunque la parte vegetativa (micelio) se encuentre siempre bajo el suelo sus requerimientos nutricionales no necesariamente son los mismos. Se ha reportado que especies ectomicorrícicas poseen capacidad saprofítica como el caso de especies de los géneros *Paxillus* y *Tuber* (Reyna 2000). Estudios realizados en los hongos ectomicorrícicos *Infundibulicybe geotropa* (Bull.) Harmaja, *Tricholoma anatolicum* H.H. Doğan&Intini y *L. deliciosus* (L.) Gray, todos de fructificación epígea, mostraron que la mayor producción de biomasa miceliar por *I. geotropa* se obtenía utilizando fructosa, en cambio con *T. anatolicum* y *L. deliciosus* esto

ocurría utilizando glucosa (Akata et al. 2012). Esto último concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio para *L. quieticolor*. Para *R. roseolus*, que aunque produjo la mayor cantidad de biomasa en manitol, cuando fue cultivado en glucosa la cantidad de biomasa fue alta pero significativamente inferior a manitol. La glucosa es una fuente de carbono fácilmente metabolizada por la mayoría de los microorganismos, la cual incorporan en el metabolismo para la producción rápida de energía para los procesos celulares (Deacon 2006; Jonathan y Fasidi 2001). Es conocido que los hongos ectomicorrícicos transforman los azúcares producidos y obtenidos desde las plantas (sacarosa, glucosa y fructosa) en manitol o trehalosa para incorporarlas a su metabolismo (Smith y Read 2008). El manitol cumple importantes funciones como forma de almacenamiento de carbono y poder reductor, además de almacenarse en vacuolas para regulación del pH celular (Deacon 2006). Un mejor aprovechamiento de manitol por *R. roseolus* podría explicar la mayor producción de biomasa fúngica en comparación con *L. quieticolor*.

La temperatura de cultivo es otro de los factores externos que juegan un papel significativo en el crecimiento de los hongos ectomicorrícicos. La mayoría de los hongos son mesofílicos, es decir, crecen comúnmente en un rango de temperatura entre 10-40°C (Deacon 2006), y en este grupo se encuentra la mayoría de los hongos ectomicorrícicos. Dentro del rango de temperatura de crecimiento se pueden observar diferentes grados de tolerancia y muchas veces el aumento de la temperatura puede provocar una disminución en el crecimiento fúngico y, a veces el cese total (Srinivasan et al. 2000). Una excepción dentro de los hongos ectomicorrícicos es el caso de *P. tinctorius* con capacidad de crecer a temperaturas entre 40 y 42 °C, con un punto de muerte térmica de las hifas a 45°C (Hung y Chein 1995). Para las dos especies en estudio las temperaturas óptimas para la producción de biomasa fueron encontradas dentro del rango normal de los hongos mesofílicos, siendo la temperatura óptima de *R. roseolus* (28°C) (poco común para especies hipógeas), siendo superior a la de *L. quieticolor* (24°C). Las temperaturas óptimas que presentan estas dos especies fúngicas las hace buenas candidatas para la producción de biomasa a gran escala en biorreactor, debido al bajo requerimiento energético que se necesita para mantener el control de temperatura durante el cultivo.

El pH óptimo de *R. roseolus* y *L. quieticolor* para la producción de biomasa fue de 5.5, lo que se relaciona con los valores del pH del suelo donde estas especies se desarrollan, que corresponden a suelos levemente ácidos. Al respecto, Teoh et al. (2010; 2012) estudiando el efecto del pH, estrés por agua y temperatura de ocho especies ectomicorrícicas, obtuvo diferentes producciones de biomasa variando de acuerdo a la especie fúngica estudiada, llegando algunas especies como *R. roseolus* and *S. collinitus* a crecer incluso a pH 2,5 y con un alto estrés hídrico (−13,85 y −15,45 bar), lo que destaca el potencial que posee *R. roseolus* para programas de inoculación de plantas en vivero.

Al evaluar la cinética de crecimiento se pudo corroborar que la condición de agitación favoreció la producción de biomasa fúngica, lo que estaría relacionado con una oxigenación homogénea dentro de los matraces y al mismo tiempo con una fragmentación continua del micelio generando nuevos puntos de crecimiento activo, además de permitir una mayor transferencia de masa de los nutrientes hacia los hongos (Wang et al. 2012). La mayor velocidad específica de crecimiento (μ) para *L. quieticolor* y *R. roseolus* se registró en agitación (0,09 y de 0,12 día⁻¹, respectivamente), siendo estas velocidades superiores a las presentadas en condiciones estáticas. El tiempo de duplicación celular (T_{dup}) es el tiempo que media entre dos duplicaciones sucesivas, y en este caso dependió de la condición de cultivo y de la especie fúngica. Para *L. quieticolor* y *R. roseolus* el tiempo máximo de duplicación celular fue de 7 y 6 días, respectivamente, bajo condición agitada, muy por debajo de los 13 y 8 días bajo condición estática.

La SRM permitió determinar las condiciones óptimas dentro de la región experimental ensayada obteniendo un aumento de la producción de biomasa de 1,2 para 3,25 g L⁻¹ en el caso de *L. quieticolor* a pH 5,5, 24°C de temperatura de cultivo y 20 g L⁻¹ de concentración de glucosa. Para *R. roseolus* el aumento de biomasa fue de 3,02 para 8,6 g L⁻¹ a pH 5,5, 28°C de temperatura de cultivo y 30 g L⁻¹ de concentración de manitol. Esto corresponde a un incremento semejante de 2,71 y 2,85 veces en la producción de biomasa para *L. quieticolor* y *R. roseolus*, respectivamente, bajo condiciones optimizadas. Para el hongo ectomicorrícico *P. tinctorius* (Liu et al. 2008) se encontró un rango óptimo de crecimiento a pH 5,8-6 y a una temperatura de 29-30°C, cuando fue cultivado entre 40-45 días y en estas condiciones la máxima producción de biomasa fue de 1,13 g L⁻¹, muy por debajo de lo encontrado para *L. quieticolor* y *R. roseolus*, esto debido principalmente al lento

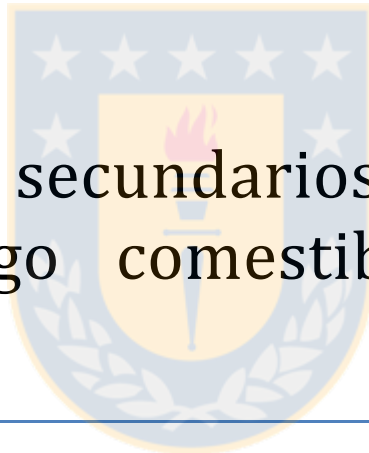
crecimiento que posee *P. tinctorius* en medios de cultivo artificiales (Liu et al. 2008). Otros procesos de optimización de biomasa han encontrado un incremento de 1,4 veces en la producción de biomasa por el hongo saprofita *Coriolus versicolor* y de 1,9 veces en el hongo entomopatógeno *C. militaris* (Ahmad et al. 2013). Esto resalta la importancia de la utilización de modelos de optimización para producir biomasa fúngica.

Si bien los estadígrafos, coeficiente de correlación R^2 y predictividad Q^2 (Tabla 3) representan el índice de explicación de la variabilidad total encontrada en la respuesta y el índice de predicción que presenta el modelo, respectivamente, éstos no entregan información acerca de la confiabilidad del modelo. Para ello, es necesario que el F de regresión (modelo) sea mayor que el F de falta de ajuste. Además, debe cumplirse que el valor P de la regresión sea menor que 0,05 (Montgomery 2002). Bajo estos supuestos el análisis ANOVA (Tabla 4 A y B) para la producción de biomasa (g L^{-1}) indica que el modelo para ambas especies fúngicas fue satisfactorio. Por lo tanto, la superficie de respuesta para la biomasa en la etapa de optimización fue estadísticamente confiable. El gráfico de superficie de respuesta ayuda a evaluar el efecto de cualquier combinación de dos factores en el crecimiento de los hongos en estudio, por lo tanto, para los efectos de interacción del pH-temperatura, fuente de carbono-temperatura, y pH-fuente de carbono, se pudo conseguir una respuesta favorable. A través del proceso de optimización utilizando SRM fue posible establecer las condiciones de concentración de fuente de carbono, pH del medio de cultivo y temperatura de cultivo para la máxima obtención de biomasa en medio líquido y bajo condiciones agitadas con *R. roseolus* y *L. quieticolor*, previa determinación del mejor medio de cultivo y tipo de fuente de carbono.

Cuando se escaló la producción de biomasa a biorreactor Biostat C se pudo obtener valores muy cercanos a los obtenidos por el diseño con la ventaja de reducir el tiempo de cultivo dada las variables controladas dentro de la cuba de fermentación (ej. pH constante, oxigenación, fragmentación del micelio generando nuevos puntos de crecimiento, T° estable) al igual que lo obtenido por Rossi (2006 y 2007) y Travieso (2011). Finalmente la encapsulación del micelio resultó exitosa siendo una alternativa de mantención del micelio fúngico o como una forma de aplicación de inóculo en la viverización de plantas.

CAPITULO IV

Metabolitos secundarios producidos
por el hongo comestible *Lactarius*
quieticolor



1. Introducción

Los hongos ectomicorrícicos comestibles son una fuente de nutrientes esenciales: proteínas, carbohidratos, vitaminas y de fibra dietética, indispensables para el funcionamiento normal del organismo (Cheung 2010). Para enriquecer las comunidades de hongos ectomicorrícicos (HEMC) en plantaciones forestales y aumentar su producción de setas, se han desarrollado técnicas para su cultivo axénico, posterior inoculación de plantas en vivero y establecimiento en campo para obtener los cuerpos fructíferos. Dentro de los métodos utilizados para la producción de inóculo fúngico, la fermentación líquida, en biorreactores, o sólida, utilizando vermiculita, son los procedimientos más frecuentes para producir micelio en grandes cantidades (Kuek 1994; Durand 1995; Pera y Parladé 2005). Entre los tipos más comunes de biorreactores utilizados en la mayoría de los estudios está el biorreactor con tanque agitado (Rossi 2006). Sólo algunas especies de hongos ectomicorrícicos han sido utilizadas para generar el volumen de inóculo necesario para la micorrización controlada de un gran número de plantas de interés forestal. Entre tales especies destacan *Hebeloma cylindrosporum* Romagn. (Le Tacon et al. 1985), *Laccaria laccata* Scop. Cooke (Sasek 1989; Kuek 1996), *Suillus luteus* L. ex Fr. (Sasek 1989; Travieso 2009), *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch (Pradella et al. 1990) y *Cenococcum geophilum* Fr. (Job 1996). Un aspecto poco considerado es que junto con aumentar el rendimiento de biomasa miceliar, se obtienen grandes cantidades de caldo de cultivo que frecuentemente son descartados como subproducto de desecho al finalizar la fermentación. Sin embargo, estos caldos de cultivo podrían contener enzimas extracelulares o metabolitos secundarios de gran interés y valor comercial (por ejemplo: ácidos orgánicos, antibióticos, polisacáridos, etc.) (Wang et al. 2012; Zárate-Chavez et al. 2013). La producción de metabolitos secundarios ha sido bien estudiada en hongos micorrícicos y saprófitos comestibles desde cuerpos fructíferos, orientado a encontrar efectos nutraceuticos a los carpóforos para las personas que los consumen (Barros et al. 2007;). La escasa literatura publicada de metabolitos secundarios de *L. quieticolor* desde caldo de cultivo hacen necesario estudiar los metabolitos secundarios producidos por el micelio y secretado al medio extracelular, proyectando que los caldos serían un buen subproducto para la obtención de estos metabolitos.

Jikay (2007), ha revisado los compuestos químicos producidos por más de 100 hongos micorrícicos y saprófitos (basidiomicetos y ascomicetos), reportando que se han aislado más de 300 compuestos, incluyendo 150 terpenos, fenoles y compuestos nitrogenados desde cuerpos fructíferos. Muszyńska et al. (2011), identificaron y cuantificaron por primera vez varios compuestos indólicos a partir de cuerpos fructíferos de cuatro hongos comestibles comerciales (*Agaricus bisporus* J.E. Lange, *Cantharellus cibarius* Fr., *Lactarius deliciosus* L. Gray y *Leccinum rufum* (Schaeff.) Kreisel), concluyendo que la serotonina y la melatonina eran los únicos compuestos comunes en todas las especies y los bajos contenidos de L-triptófano, triptamina y 5-hidroxitriptófano detectados confirmaban el uso seguro de estas especies para el consumo humano (Bedry et al. 2001 y Wurst et al. 2002). El género *Lactarius* está bien documentado en cuanto a la presencia de metabolitos en los cuerpos fructíferos principalmente del tipo sesquiterpenos (Sterner et al. 1985), lactaranos (Zhang 1996) y pigmentos (Yang et al. 2006). Ayer y Trifonov (1994), trabajando con *L. deliciosus* cultivado en medio líquido en matraz encontraron ácido anofínico, un nuevo chroman 4-one, dipéptidos cíclicos, ergosterol y una mezcla de ácidos grasos, a pesar de trabajar con medios de cultivo no específicos para hongos ectomicorrícicos (extracto de malta/levadura) y a 18 °C. La presencia de metabolitos secundarios en los caldos de cultivo de *L. quieticolor*, permitiría darles un uso a los grandes volúmenes de caldo de fermentación obtenidos como subproducto en la producción de biomasa miceliar que hasta el momento son descartados como desecho. En este trabajo se caracterizaron los principales metabolitos secundarios producidos por *Lactarius quieticolor* cultivado en medio líquido en biorreactor y la actividad antifúngica de los principales metabolitos fue también determinada. La producción de metabolitos secundarios por *L. quieticolor* en biorreactor fue además comparada con la producción en matraces.

2. Metodología

Hongo ectomicorrícico

Los carpóforos de la especie *Lactarius quieticolor* Romagn., fueron recolectados en plantaciones adultas de *Pinus radiata* en la comuna de Concepción (Cerro Universidad de

Concepción), Provincia de Concepción, Región del Bío-bío, Chile (36°49'38.51" S y 73°02'06.27" O), a 40 m.s.n.m. Cultivos puros de *L. quieticolor* fueron obtenidos en el Laboratorio de Biotecnología de Hongos (LBH) de la Universidad de Concepción, Campus Los Ángeles, a partir de los cuerpos fructíferos. La identificación de la especie se realizó de acuerdo a características macroscópicas y microscópicas de los carpóforos recolectados (Moreno et al. 1996; Valenzuela 1998; Gerhardt et al. 2000; Keizer 2000; Lazo 2001) y molecular (Capítulo 2). La cepa (LBH-Lq-C2) ha sido mantenidas en medio BAF y MMN pH 5,5 a 24 °C en estufa de incubación.

Producción de pre-inóculo miceliar

Dos matraces Erlenmeyer (500 mL) con 250 mL de medio líquido MNM, con 10 mg/ml de glucosa como fuente de carbono y pH ajustado a 5,8, fueron esterilizados a 121°C/1 atm durante 15 min. Posteriormente, los matraces fueron inoculados con 6 discos de agar-micelio (5 mm diámetro) de *L. quieticolor* obtenidos de cultivos stock, bajo cámara de flujo laminar e incubados en oscuridad a 24±1°C durante 2 semanas en condiciones agitadas (120 rpm). Estos cultivos fueron utilizados como pre-inóculo para el cultivo en biorreactor.

Cultivo de *L. quieticolor* en biorreactor

La fermentación se llevó a cabo en un biorreactor LIFLUS GX con capacidad de 5 L. Previa esterilización de cada uno de los accesorios del biorreactor, se procedió a la calibración del electrodo de pH, bombas peristálticas para dispensar ácido (HCl 1 M) y base (NaOH 1 M) y sensor de temperatura. El electrodo de oxígeno fue calibrado después de la etapa de esterilización del vaso del biorreactor. La esterilización del vaso del biorreactor conteniendo 2,0 L del medio de cultivo MNM, glucosa 10 g/L y pH para 5,5 se realizó durante 15 min. Después de la esterilización y cuando el medio de cultivo alcanzó una temperatura aproximada de 40°C, bajo condiciones de asepsia se adicionó estreptomycin (0,05 g/L) con la finalidad de evitar contaminación bacteriana. Cuando la temperatura alcanzó 25°C aproximadamente, se procedió a la inoculación del biorreactor con 0,5 L del pre-inóculo líquido preparado previamente. El volumen total de trabajo dentro del vaso del biorreactor después de la adición del inóculo fue de 2,5 L. Las variables pH, temperatura, oxígeno disuelto y velocidad de agitación, fueron ajustadas a 5,8, 24°C,

60% y 120 rpm, respectivamente, y mantenidas constantes en el biorreactor durante todo el periodo de crecimiento. El periodo de incubación fue de 20 días y al finalizar el cultivo fue determinada la cantidad de biomasa miceliar como peso fresco del micelio (g).

Determinación de metabolitos secundarios producidos por *L. quieticolor*

A los 20 días de fermentación en biorreactor bajo condiciones controladas, 2,3 L de caldo de cultivo fueron separados de la biomasa miceliar por filtración en papel Whatman N° 3 y luego extraídos mediante adsorción en fase sólida empleando amberlita XAD-2 y extracción en fase sólida (SPE). Una parte del caldo de cultivo (2 L) se mezcló con 40 g de amberlita y se dejó en agitación durante 1 h a 150 rpm. Posteriormente, la mezcla se acondicionó en una columna de vidrio (70x5cm) y se eluyó con 150 ml de acetona. Para la extracción SPE se utilizaron 300 ml de caldo de cultivo filtrado en cartuchos ODS-C 18 AccuBond II (Agilent Technologies) y posteriormente eluidos con 20 ml de metanol.

Los extractos acetónicos y metanólicos fueron caracterizados mediante GC-MS en cromatografo Agilent 7890A con detector de masas 5975, equipado con columna capilar de sílica fundida, tipo HP5-MS, de 30 m, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor de film, bajo las siguientes características: Temperaturas: inyector: 250°C; detector (masas): 280°C; horno: inicial 100°C por 5 min, incrementando a 8°C/min hasta 250°C manteniendo por 15 min. Detector usado en modo scan entre 50 y 500 amu. Flujo de gas carrier (helio de grado electrónico) a 1ml/min. La caracterización fue realizada mediante comparación con base de datos NIST ®. La presencia de ácidos orgánicos de bajo peso molecular fue determinada directamente en el caldo de cultivo a través de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en un equipo con detector de arreglo de diodos Agilent Serie 1100 utilizando una columna BP-OA 2000-0 Benson Polimeric. Como fase móvil se utilizó ácido fosfórico 0,2% (v/v), con un flujo de 0,5 mL/min, y la detección se realizó a 210 nm.

Cultivo de *L. quieticolor* en matraces Erlenmeyer

Tres matraces Erlenmeyer (500 mL) con 200 mL de medio líquido MNM, con 10 mg/ml de glucosa como fuente de carbono y pH ajustado a 5,5, fueron esterilizados a 121°C/1 atm durante 15 min. Posteriormente, los matraces fueron inoculados con cuatro discos de agar-micelio (5 mm diámetro) de *L. quieticolor* obtenidos de cultivos stock, bajo cámara de flujo

laminar e incubados en oscuridad a $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante ocho semanas en condiciones estáticas para luego la biomasa producida ser separada del caldo de cultivo por filtración en papel. El caldo de cultivo fue extraído utilizando sólo la técnica SPE metanólico descrita anteriormente. El caldo de cultivo residual fue extraído con acetato de etilo para posteriormente ser concentrado y analizado por CG-masa.

Ensayo de actividad anti-fúngica con extractos totales

Extractos metanólicos (LD_1) y en acetato de etilo (LD_2) de los caldos de cultivo de *L. deliciosus* obtenidos a través de SPE fueron concentrados en rota vapor y secados a 40°C para posteriormente ser utilizados para evaluar su actividad anti-fúngica sobre *Botrytis cinerea* Pers.: Fr., *Fusarium oxysporum* Schlechtend., *Penicillium notatum* Westling y *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc. Para ello, se utilizó la técnica de difusión en agar. Se diluyó 1 mg de extracto seco en 1 ml de etanol y se utilizó papel de filtro (Whatman 5 mm de diámetro) impregnado con 10 y 20 μl de los extractos (LD_1 y LD_2 , respectivamente, correspondientes a 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los discos impregnados fueron colocados sobre placas de Petri con medio PDA (papa-dextrosa-agar) inoculadas con esporas de los respectivos hongos. Como control negativo se utilizó el disco de papel impregnado 10 μl del solvente.

3. RESULTADOS

Metabolitos producidos por *L. quieticolor* cultivado en biorreactor

Los extractos fúngicos obtenidos en los cultivos en biorreactor y en matraces fueron analizados mediante cromatografía de gas con detección de masa. Los principales metabolitos detectados por CG-Masa en el extracto acetónico y metanólico se presentan en tabla 1.

Los metabolitos presentes con mayor porcentaje en los extractos acetónicos fueron el ácido propanodioico (3-oxo-1-ciclopentano-1-il) (Fig. 1A), derivados de hidroquinona y ergosterol, mientras que en la extracción metanólica SPE fué el ácido decanoico (Fig . 1B).

Tabla 1 Metabolitos detectados en el caldo de cultivo de *Lactarius quieticolor* creciendo en biorreactor LIFLUS GX (5 L) en orden decreciente de abundancia.

Extracción con Acetona usando Amberlita XAD-2	(%)	Extracción metanólica SPE	(%)
Ácido Propanodioico (3-oxo-1-cyclopentane-1-yl)	37	Ácido Decanoico	93
Derivado de Hidroquinonas	17	3,4-2-h-coumarin, 4,4,5,6,8-pentamethyl	1.73
Ergosterol	10	Derivado desde hydroxinaftaleno	<1
2 metil 1,3 cyclohexanedione	3.6	Ácido Hexadecanoico methyl ester	<1
Ácido Benzoico	2.3		
Sesquiterpeno (5 hidroxy 7 -oxbicyclo [4.1.0] hept 3 en 2 one)	1.5		

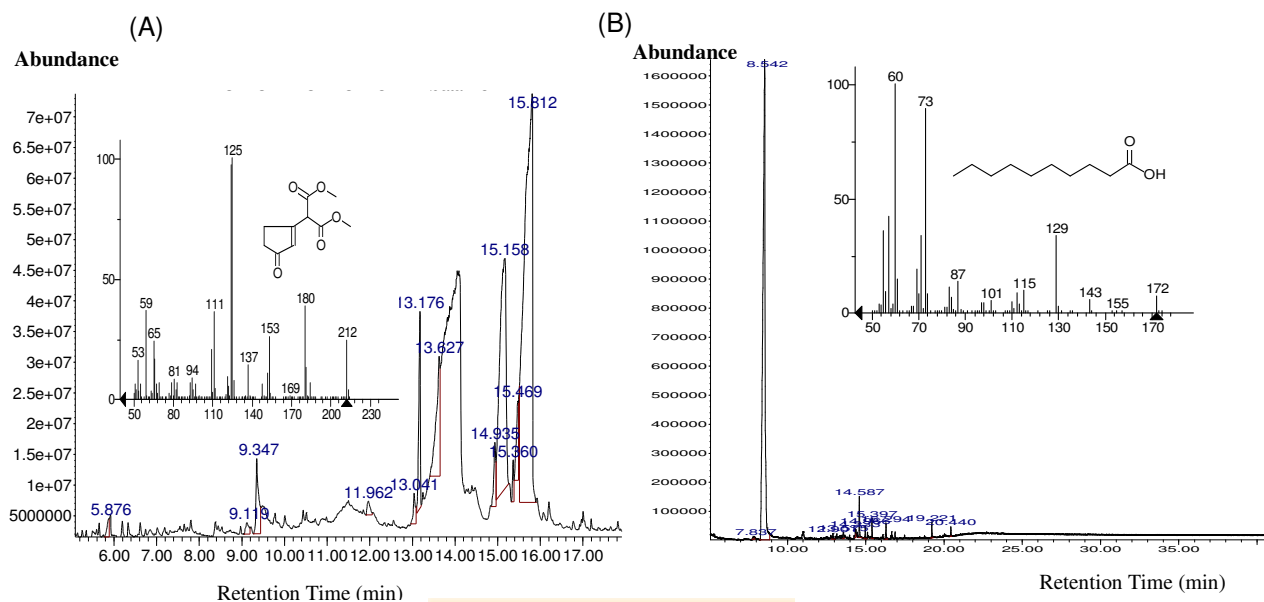


Figura 1 Cromatograma CG-MS de los principales metabolitos obtenidos a partir del caldo de cultivo de *L. quieticolor* creciendo en un biorreactor LIFLUS GX (5 L) (A) propanodioico (3-oxo-1-ciclopentano-1-il) (15,8 min), (B) ácido decanoico (8,5 min).

Además de la determinación de los metabolitos secundarios, se analizó la presencia de ácidos orgánicos de bajo peso molecular en el caldo de cultivo de *L. quieticolor* a través de HPLC. Bajo las condiciones de cultivo en biorreactor sólo fue posible detectar la presencia de ácido oxálico en concentración de 20 µg/mL y ácido Fumárico 4 µg/mL.

Metabolitos producidos por *L. quieticolor* cultivado en matraces

Como resultado del cultivo de *L. quieticolor* en matraces bajo condiciones de agitación, durante 8 semanas, se detectó la presencia de otros metabolitos (Tabla 2), entre los cuales destacan el cubenol (sesquiterpeno), escualeno (terpeno) y azuleno (pigmento) (figura 2 a, b y c).

Tabla 2 Metabolitos detectados en el caldo de cultivo de *Lactarius quieticolor* creciendo en matraces erlenmeyer.

Extracción metanólica	(%)	Extracción con acetate de etilo	(%)
2,4-Dimethyl-5,6-dimetoxi-8-aminoquinoline	11.9	2-(2-butoxyethoxy)-Ethanol acetate	32.19
Cubenol	5.28	2,4-bis(1-phenylethyl) phenol	8.5
Escualeno	3.37	1,4-dimethyl-7-(1-methylethyl)-Azulene	2.38
Chromone, 2,2,6,8-tetramethyl	2.83		
10-octadecenoic acid, methyl ester	2.4		
Ácido esteárico	1.6		

Los metabolitos fueron extraídos del caldo de cultivo solamente por SPE.

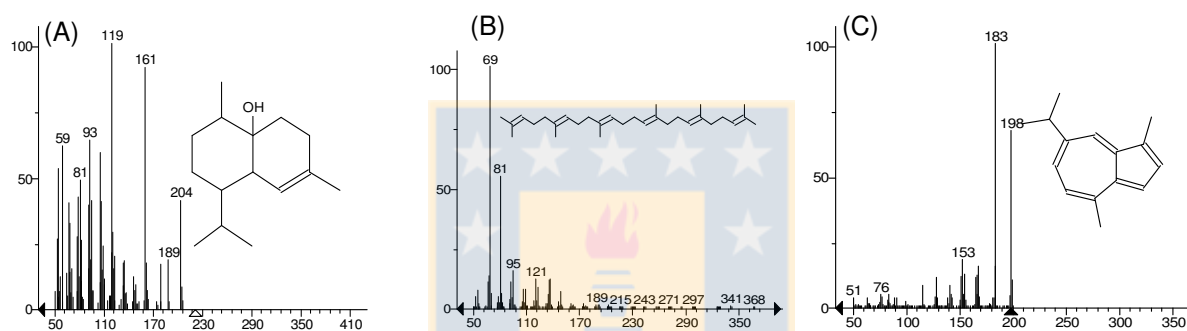


Figura 2 Perfiles GC-MS de metabolitos principales obtenidos a partir del caldo de cultivo de *L. quieticolor* creciendo en matraces Erlenmeyer; señales principales corresponden a: (A) Cubenol, (B) Escualeno, (C) 1,4-dimetil-7- (1-metiletil) -Azulene.

Actividad antifúngica

La actividad antifúngica de los extractos LD₁ y LD₂ obtenidos de los cultivos de *L. quieticolor* en matraz fue evaluada a través del ensayo con discos de papel. Ambos tipos de extractos no presentaron actividad antifúngica, independiente de la concentración utilizada, contra las cepas ensayadas, excepto el extracto LD₂ contra *Penicillium notatum*. Sin embargo, el porcentaje de inhibición del crecimiento con este hongo fue sólo del orden del 5% para los discos impregnados con 10 µl y de 10 % para los discos impregnados con 20 µl del extracto de *L. deliciosus*.

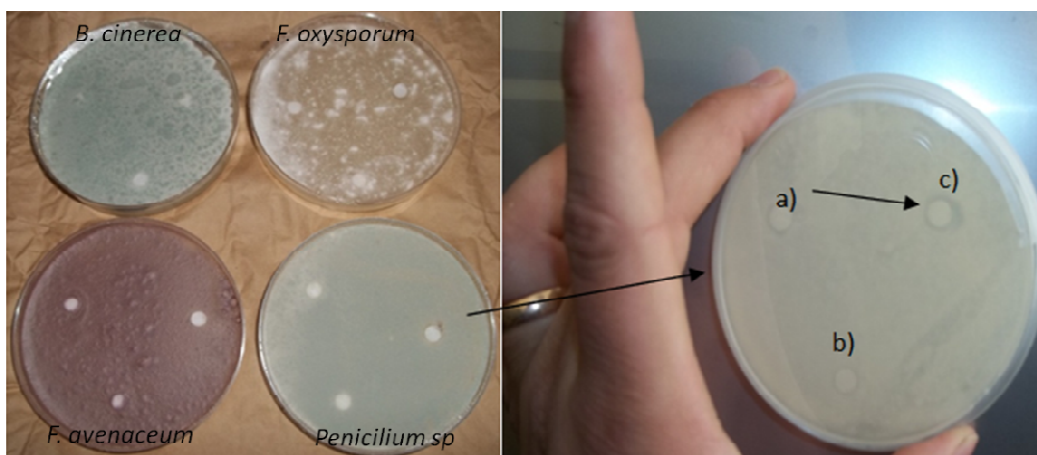


Figura 3 Actividad anti-fúngica de *L. quieticolor* LD2. a) Control, b) 100 μ g y c) 200 μ g

4. DISCUSIÓN

El cultivo en biorreactor ofrece varias ventajas, destacando entre ellas el control de los parámetros de cultivo dentro del vaso del fermentador. Chapman et al. (1990), sugirieron que los hongos ectomicorrícicos tenían un crecimiento limitado en medio líquido. Sin embargo, en estos resultados esta técnica es factible y favorece el crecimiento de *L. quieticolor* coincidiendo con el trabajo de otros autores para otros hongos ectomicorrícicos (Kuek 1996; Carrillo 2000; Carrillo et al. 2004; Rossi 2006; Oliveira et al. 2006; Travieso 2009). *Lactarius quieticolor* sigue pautas bien marcadas en su crecimiento. En primer lugar, se establece una fase de aclimatación y adaptación del micelio al cultivo. En esta etapa no se observa un aumento en la biomasa miceliar (4 días). Una segunda fase de crecimiento exponencial aproximadamente del día 5 al 17 que coincide con un descenso del pH y aumento del consumo de álcali, que se propaga hasta que queda saturado el cultivo, momento en que se inicia la fase de saturación con inhibición del crecimiento óptimo de la fase exponencial, similar a lo reportado por Carrillo (2000), para *L. deliciosus*. En este estudio se han obtenido 12 g de biomasa fúngica en 20 días de cultivo, con un promedio de 0,66 g/L.día considerándose una buena cantidad para la textura poco densa que presenta el micelio de *L. quieticolor*. Ensayos de producción de micelio en otros hongos se han obtenido producción de 0,25 g/L día⁻¹ de biomasa miceliar para *Suillus grevillei* (Baroglio

et al. 2000) y con *Rhizopogon nigrescens*, se han obtenido rendimientos superiores a 1 g/L día⁻¹ de biomasa miceliar (Rossi 2006; Oliveira et al. 2006).

La alta actividad metabólica del hongo en estudio ha permitido obtener importantes metabolitos en el caldo de cultivo, alguno de ellos tienen uso industrial como el ácido decanoico o cáprico (93%), un ácido graso saturado cuyo uso principal se centra en la producción de perfumes y sustancias aromatizantes, agentes humectantes y aditivos alimentarios (Cermak et al. 2007), así como protección contra la corrosión de acero galvanizado (Lebrini et al. 2009). Actualmente, también es utilizado como una nanoestructura para la microextracción de pesticidas de aguas naturales (Moral et al. 2012) y utilizado en la formulación de nanopartículas para el transporte de insulina en el tracto intestinal (Du et al. 2014). Ahora, es necesario poder realizar otros experimentos para separar estos metabolitos y poder generar protocolos para optimizar su producción y evaluar su posible uso en la industria.

Por otra parte, se han encontrado otros metabolitos como el cubenol, un sesquiterpeno que presenta un grupo OH. Al respecto, la presencia de un grupo OH, es un desacoplador eficiente de la membrana plasmática bacteriana creando inestabilidad y es a menudo letal (Hammond y Lambert 1981). Esto permite suponer que los extractos obtenidos en este estudio pueden presentar actividad antibacteriana debido a la presencia de este compuesto.

Los ácidos orgánicos oxálico y fumárico detectados a través de HPLC se encuentran naturalmente en plantas y hongos, son de gran importancia biológica ya que forman parte de diferentes rutas biológicas entre las que destaca el Ciclo de Krebs (Casañas et al. 2003). Actualmente el ácido Fumárico es usado en la industria alimenticia en producto como los refrescos en polvo (Restrepo 2004).

La actividad antifúngica presentada por los extractos totales de *L. quieticolor* frente a *Penicillium notatum*, fue baja comparada con la actividad antifúngica presentada por extractos de plantas (Timothy et al. 2012). Sin embargo esto puede estar dado por la baja concentración que se utilizó en el ensayo (10 y 20 µg/mL). Se ha observado que *L. deliciosus* disminuye la germinación de esporas de *Penicillium implicatum* e inhibe el crecimiento del micelio de *Pythium regulare* y *Rhizoctonia praticola* (Park 1970), lo que pudiese explicar la inhibición del crecimiento presentada por *Penicillium notatum* en este estudio. Aparte de los carotenoides, sólo unos pocos terpenoides son compuestos

coloreados. El color del carpóforo lesionado, así como del látex de varias especies de *Lactarius* (Russulaceae) cambia de color por sesquiterpenos. El látex de la mayoría de las especies de *Lactarius* Sect. Dapetes particularmente de *L. deliciosus* y especies afines es de color anaranjado cambiando a verde al oxidarse, por ejemplo en heridas o basidiomas senescentes. Estos cambios de color son debido a sesquiterpenos derivados del azuleno. Los compuestos responsables de estos cambios de color en *L. deliciosus* son el 1,4-dimetil-7-(1-methylethenyl) azuleno (azul lactarazuleno) y 4-metil-7-(1-methylethenyl) azuleno-1-carbaldehído (rojo-violeta lactaroviolin) (Velíšek and Cejpek 2011), el primero de ellos confirmado en la cepa chilena de *L. quieticolor* estudiada.

Finalmente, se puede concluir que el caldo de cultivo de *L. quieticolor* producido en biorreactor produce metabolitos secundarios de interés como el ácido decanoico.





CAPÍTULO V
Micorrización de especies de *Pinus* con
L. quieticolor y *R. roseolus*.

1. Introducción

El género *Pinus* es uno de los más utilizados en silvicultura a nivel mundial, tanto por la cantidad de especies como por el valor económico que tienen muchas de ellas en sus países de origen y en los lugares donde han sido introducidas (Zobel et al. 1987; Zobel y Talbert 1992; Muñoz 2008). Dentro de ellas, *Pinus radiata* (pino insigne) D. Don es la más representativa en Chile llegando actualmente a 1,5 millones de hectáreas plantadas en el territorio nacional, siendo su madera altamente demandada por la industria forestal (Fritz 2004; INFOR 2010). Las mayores superficies plantadas se encuentran en las regiones de Maule, Biobío y Araucanía (INFOR 2010). En la zona Sur y Austral, la especie preferida por su rápido crecimiento y su eficiencia en la recuperación de terrenos deforestados es *Pinus ponderosa* Dougl. ex. Laws. alcanzando en la actualidad superficies de terreno importantes desde el punto de vista económico (Donoso 2008). Ambas especies se asocian a hongos ectomicorrícicos bajo condiciones naturales para proveerse de nutrientes esenciales, principalmente nitrógeno, fósforo y agua (Smith y Read 2008). Numerosos estudios han demostrado la superioridad de las plántulas micorrizadas frente a las no micorrizadas en términos de establecimiento y supervivencia en campo (Gagnon et al. 1988; Stenström et al. 1990 y 1997; Honrubia et al. 1991; Krasowski et al. 1999; Jumpponen 2001; Van Tichelen et al. 2001; Dunabeitia et al. 2004; Ortega et al. 2004; Castrillon et al. 2015). Sin embargo, el manejo de la micorrización bajo sistemas que reciben fertilización requiere un estudio detallado para cada caso, dado que existen reportes contradictorios sobre el efecto inhibitorio de la fertilización sobre la micorrización, dependiendo de las especies arbóreas y fúngicas involucradas (Wallander and Nylund 1992; Colpaert et al. 1992; Arnebrant 1994; Le Tacon et al. 1997; Khasa et al. 2001; Menkis et al. 2005; Díaz et al. 2010). En el presente estudio se evaluó el efecto de la inoculación de los hongos ectomicorrícicos *Lactarius quieticolor* y *Rhizopogon roseolus* en forma independiente y combinada, además, de la aplicación de fertilizantes Basacote 6M. Se hipotetiza que la inoculación de *P. radiata* y *P. ponderosa* con *L. quieticolor* y *R. roseolus* estimulará el crecimiento del tallo y del sistema radical de las especies vegetales de forma similar a lo que se obtiene cuando se aplica fertilizante comercial Basacote 6M en la viverización de plantas.

2. Metodología

Especies fúngicas

Como inóculo para la inducción controlada de simbiosis ectomicorrícica en *Pinus radiata* y *P. ponderosa* en vivero se usaron *Lactarius quieticolor* LBH-Lq-C2 y *Rhizopogon roseolus* LBH-Rr-LLB2, de la colección de cultivos del Laboratorio de Biotecnología de Hongos, Campus Los Ángeles, de la Universidad de Concepción,.

Preparación del inóculo miceliar líquido (IML).

De los cultivos almacenados (colonias activas) de *L. quieticolor* y *R. roseolus*, se retiraron cuatro discos de agar-micelio (7 mm de diámetro) por separado, para ser transferidos a matraces Erlenmeyer (500 mL) que contenían 250 mL de medio líquido BAF según proceso de optimización (Capítulo III). Los matraces fueron tapados con algodón y alusa, previamente autoclavados a 121° C durante 15 min., en autoclave marca Huxley modelo HL-340. Posteriormente, los matraces fueron incubados en oscuridad a 24 ± 1° C durante 20 días en condiciones estáticas. Luego la biomasa producida fue cosechada y triturada en licuadora manual con agua destilada (suspensión miceliar), y posteriormente utilizada como fuente de inóculo miceliar líquido (IML), con una dosis de 10 mL por planta en concentración de 1:10 v/v (1 mL de micelio fresco diluido en 10 mL de agua destilada).

Producción de plantas, micorrización y evaluación de parámetros de crecimiento de *P. radiata* y *P. ponderosa*

Semillas de *P. radiata* y *P. ponderosa* fueron sembradas en almácigos de 75 cc conteniendo como sustrato mezcla de turba-vermiculita-perlita en proporción 2:1:1, previamente esterilizado por 1 h, por tres días consecutivos (Figura 1). Una vez germinadas las semillas (20-30 días) y desarrollado el sistema radicular secundario de las plántulas, se trasplantaron a tubetes de 180 cc (aerotubos), con el mismo sustrato, momento en el cual se inocularon con las suspensiones miceliales 10 mL/planta de los hongos en estudio en forma individual (*Lactarius* o *Rhizopogon*) o mezclas de inóculos (*Lactarius* + *Rhizopogon*). Se aplicó además fertilizante en forma independiente (sólo fertilizante) o en interacción con los inóculos fúngicos (fertilizante + hongos) (Tabla 1),

aplicando 220 mg/planta, equivalente a 35 mg de N (Díaz et al. 2010). Los nutrientes suplementados fueron N-P-K (16% N, 12% P₂O₅, 12% K₂O, 2% MgO, 5% S) (Basacote 6M). Las plantas fueron mantenidas en cámara de crecimiento (controlando temperatura a 24 °C, con fotoperiodo de 16/8 luz/oscuridad y entre un 50-70 % de humedad relativa) y regadas dos veces por semana a capacidad de campo. A cinco meses de la inoculación de *P. radiata* y *P. ponderosa*, se procedió a su evaluación, tomando en consideración crecimiento en altura (desde el cuello hasta el brote apical, cm), diámetro a la altura del cuello (DAC, mm), biomasa aérea (g) y biomasa radicular (g) en peso seco. Una vez obtenidas las muestras de biomasa aérea y radicular de las plantas de *P. radiata* y *P. ponderosa*, estas fueron secadas a 60 °C en estufa durante 48 h para posteriormente ser pesadas en balanza de precisión hasta obtener peso constante, determinando así la biomasa como peso seco (g).

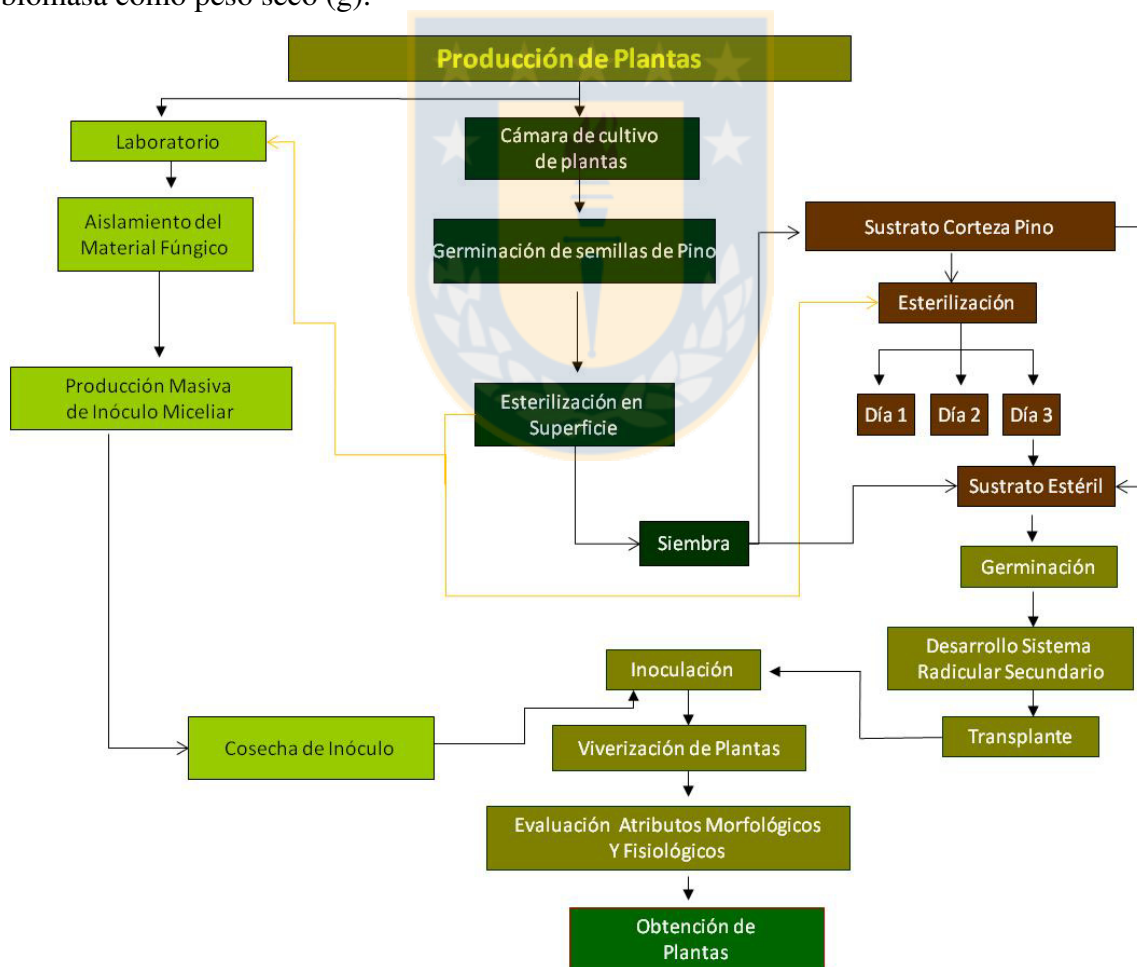


Figura1 Esquema para la producción de plantas micorrizadas.

Tabla 1 Ensayos de Inoculación con *L. quieticolor* y *R. roseolus* bajo condiciones controladas.

	Tratamiento	Especie Fúngica	Especie Vegetal	Réplicas
A	Sin inocular (Control)	-	<i>P. radiata</i>	10
		-	<i>P. ponderosa</i>	10
B	Fertilización (Control)	Basacote	<i>P. radiata</i>	10
			<i>P. ponderosa</i>	10
C	Inoculación	<i>L. quieticolor</i>	<i>P. radiata</i>	10
			<i>P. ponderosa</i>	10
D	Inoculación	<i>R. roseolus</i>	<i>P. radiata</i>	10
			<i>P. ponderosa</i>	10
E	Inoculación	<i>L. quieticolor</i> + <i>R. roseolus</i>	<i>P. radiata</i>	10
			<i>P. ponderosa</i>	10
F	Fertilización e Inoculación	<i>L. quieticolor</i> + Basacote	<i>P. radiata</i>	10
			<i>P. ponderosa</i>	10
G	Fertilización e Inoculación	<i>R. roseolus</i> + Basacote	<i>P. radiata</i>	10
			<i>P. ponderosa</i>	10
H	Fertilización e inoculación	<i>L. quieticolor</i> + <i>R. roseolus</i> + Basacote	<i>P. radiata</i>	10
			<i>P. ponderosa</i>	10

Evaluación del porcentaje de micorrización

La evaluación del porcentaje de micorrización se realizó de acuerdo a la cantidad de ápices micorrizados existentes en plántulas de *P. radiata* y *P. ponderosa* según la metodología descrita por Brundrett et al. (1996). A los cinco meses se recogieron cuatro plantas por tratamiento y se observaron 150 ápices radicales por planta (Parladé et al. 1996). Los porcentajes de micorrización se clasificaron de acuerdo a Tateishi et al. (2003). Para ello, se cuantificaron los ápices micorrizados bajo lupa binocular marca Olympus modelo SZ2-ILST. También se analizaron los tratamientos control y sólo fertilización (Tabla 1, A y B) con la finalidad de descartar posibles contaminantes en los sistemas radicales.

Síntesis micorrícica *in vitro* con *P. radiata*

Semillas de *P. radiata* fueron germinadas bajo condiciones controladas en cámara de germinación (24 °C con fotoperiodo de 16/8 luz/oscuridad) y las plántulas posteriormente fueron esterilizadas en superficie de acuerdo a Mroginskin y Roca (1993). Una vez esterilizadas las plántulas fueron puestas en placas petri cuadradas de 12 x 12 cm en

triplicado conteniendo medio MS (Murashige y Skoog 1962) con contenido de sacarosa reducido (2,5 g/L). Una vez desarrollado el sistema radical secundario de las plántulas fueron inoculadas con discos de agar-micelio de los hongos *L. quieticolor* y *R. roseolus* con la finalidad de evaluar y caracterizar la síntesis micorrícica en el tiempo. Los sistemas planta-hongo fueron incubados por 30 días en quintuplicado. Cada placa albergó tres plántulas de *Pinus* Fig. 2.



Figura 2 Síntesis micorrícica *in vitro* de *Pinus radiata* con *R. roseolus*. La inoculación se realizó utilizando discos de agar-micelio.

Análisis estadístico

El experimento se realizó bajo un diseño completamente aleatorio, con 8 tratamientos y diez repeticiones. Se incluyeron dos tratamientos testigo: planta-sustrato (turba-vermiculita-perlita en proporción 2:1:1, Tratamiento A) y planta-sustrato-fertilizante (Basacote, Tratamiento B). Se midieron la altura, el diámetro, la biomasa aérea, biomasa radicular y porcentaje de micorrización de las plantas tratadas con hongos ectomicorrícicos y control. A los valores porcentuales de micorrización se les realizaron transformaciones de variable angular dividiendo el valor porcentual por 100 y aplicando

arcsen y la comparación de medias se calculó según la prueba Duncan ($P < 0,05$) (Steel y Torrie 1989). Para ello se utilizó el software Statistica versión 6.0.

Modelo estadístico lineal aplicado al diseño

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \quad i = 1, \dots, a \quad j = 1, \dots, n$$

Donde:

μ : es un efecto constante, común a todos los niveles, denominado media global.

τ_i : es el efecto sobre la respuesta debido al tratamiento i-esimo y,

ε_{ij} : es el termino de error experimental



3. Resultados

En general, los tratamientos a los que fueron sometidas las plántulas principalmente las de *P. radiata* en cámara de cultivo tuvieron efectos positivos en el crecimiento en altura de las plantas (Fig. 3a). La aplicación del tratamiento E (*L. quieticolor* + *R. roseolus*) provocó los mayores crecimientos en altura y diámetro, sin diferencias significativas para la altura con los tratamientos D, F y G. Sin embargo, entre el tratamiento E y los tratamientos A-C y H si se observaron diferencias significativas.

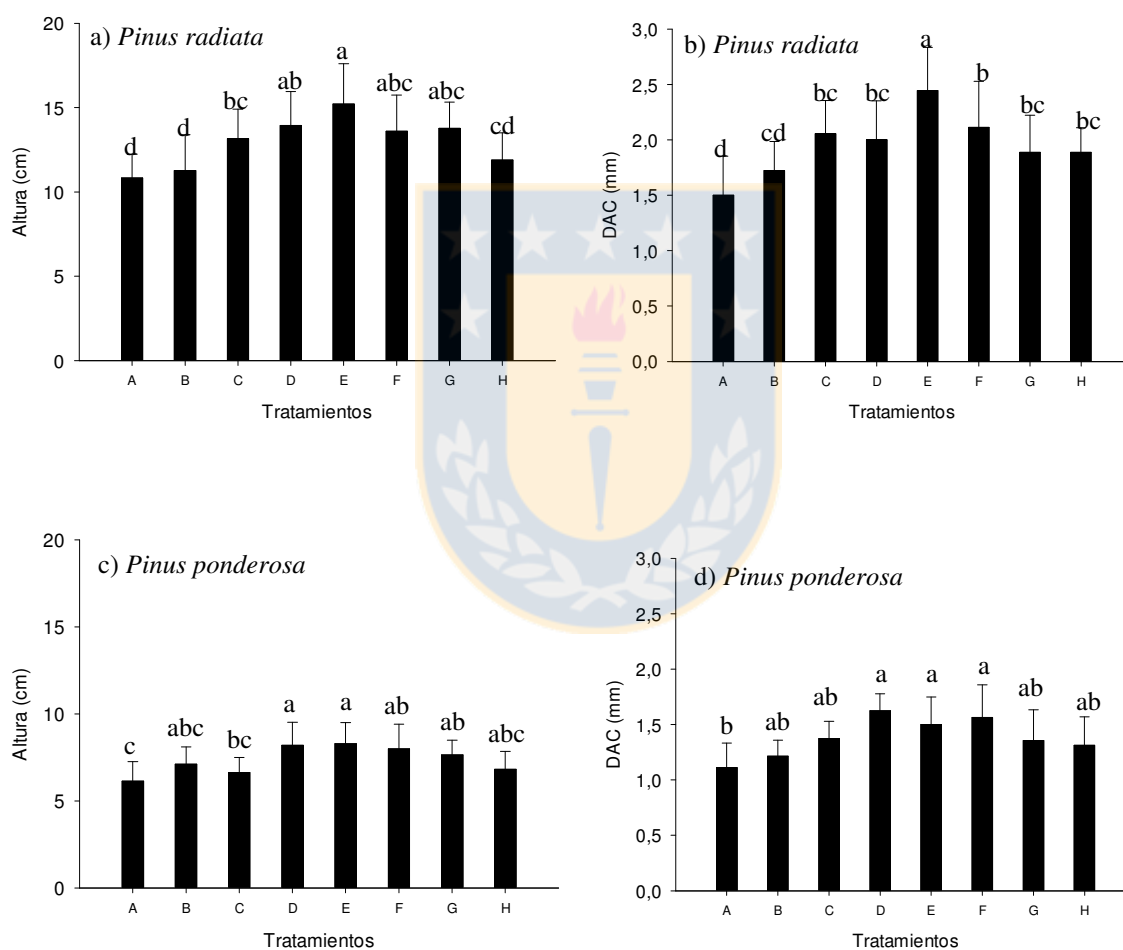


Figura 3 Atributos morfológicos de las plantas de *P. radiata* y *P. ponderosa* sometidas a los diferentes tratamientos A-H. (A-C) Altura (cm) de *P. radiata* y *P. ponderosa*. (B-D) Diámetro a la altura del cuello (mm) de *P. radiata* y *P. ponderosa*. Letra iguales sobre las barras indican que no presentan diferencias significativas entre los tratamientos (Duncan $P < 0,05$).

Para *P. ponderosa* no se observaron diferencias significativas en la altura de las plantas sometidas a los tratamientos C-H con respecto al tratamiento donde sólo se aplicó fertilizante (tratamiento B) (Fig. 3c).

Cuando se evaluó el DAC para *P. radiata*, el tratamiento E presentó el mayor incremento (Fig. 3 b) existiendo diferencias significativas respecto a todos los demás tratamientos. La tendencia de *P. ponderosa* fue diferente, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos B-H, pero sí en los tratamientos D-F respecto al control (A). En general *Pinus ponderosa* presentó menores tasas de crecimiento en altura y DAC en comparación con *P. radiata* (Figura 4).

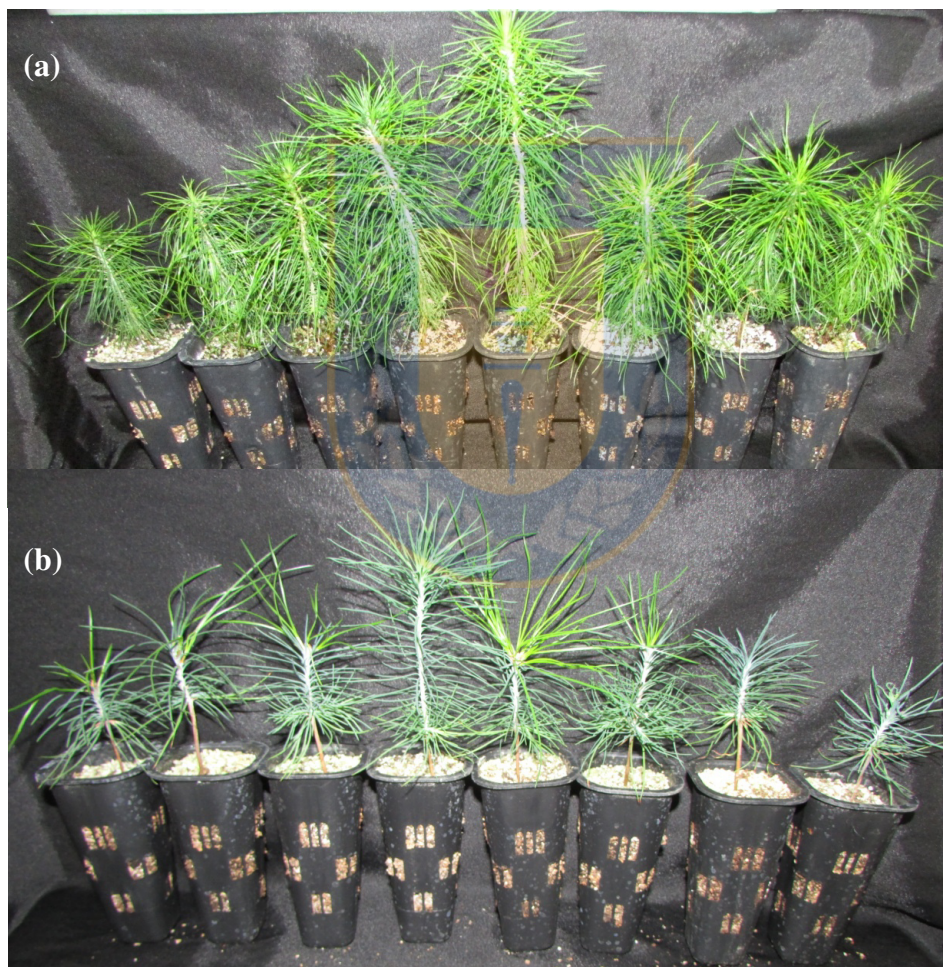


Figura 4 Plantas de *P. radiata* (a) y *P. ponderosa* (b) una vez finalizado el experimento (5 meses desde la inoculación). De izquierda a derecha tratamientos A al H.

Al evaluar la cantidad de biomasa (g) en las plantas de *P. radiata* y *P. ponderosa* sometidas a los diferentes tratamientos, se observó que el tratamiento E para ambas especies generó la mayor cantidad de biomasa aérea y radical, presentando diferencias significativas con todos los demás tratamientos (Fig. 5). Sin embargo, la cantidad de biomasa producida fue inferior en *P. ponderosa*. Se observó además, que para *P. radiata* la aplicación de fertilizante produce un aumento significativo en la biomasa aérea y radical (tratamiento B), respecto al control (tratamiento A). Para *P. ponderosa* en cambio no se observaron diferencias significativas entre el tratamiento control (A) y el tratamiento con fertilizante (B).

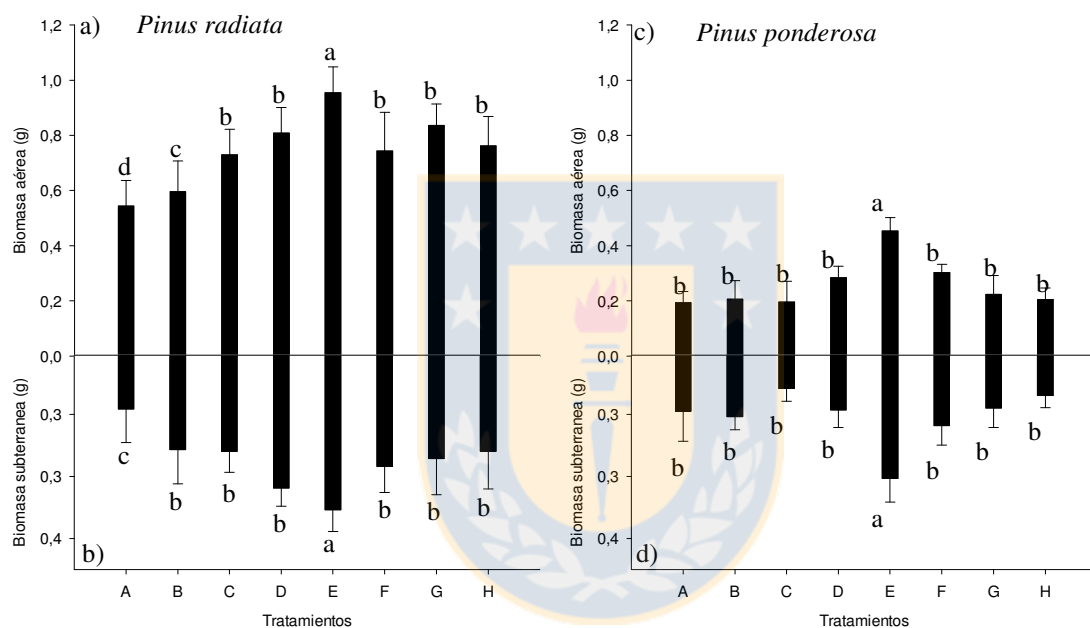


Figura 5 Producción de biomasa aérea y radicular (peso seco) de las plantas de *Pinus radiata* (izquierda) y *P. ponderosa* (derecha) sometidas a diferentes tratamientos. Letra iguales sobre las barras indican que no presentan diferencias significativas entre los tratamientos (Duncan $P < 0,05$).

El grado de micorrización fue evaluado en las plantas de *P. radiata* y *P. ponderosa* sometidas a los diferentes tratamientos con los hongos ectomicorrícicos *L. quieticolor* y *R. roseolus*. Los mayores porcentajes de micorrización fueron observados en las plantas de *P. radiata* inoculadas con *R. roseolus* (Fig. 6, tratamientos D, E, G y H), alcanzando valores entre 45 y 80 % y en el caso de *P. ponderosa* valores entre 30 y 65 % de micorrización.

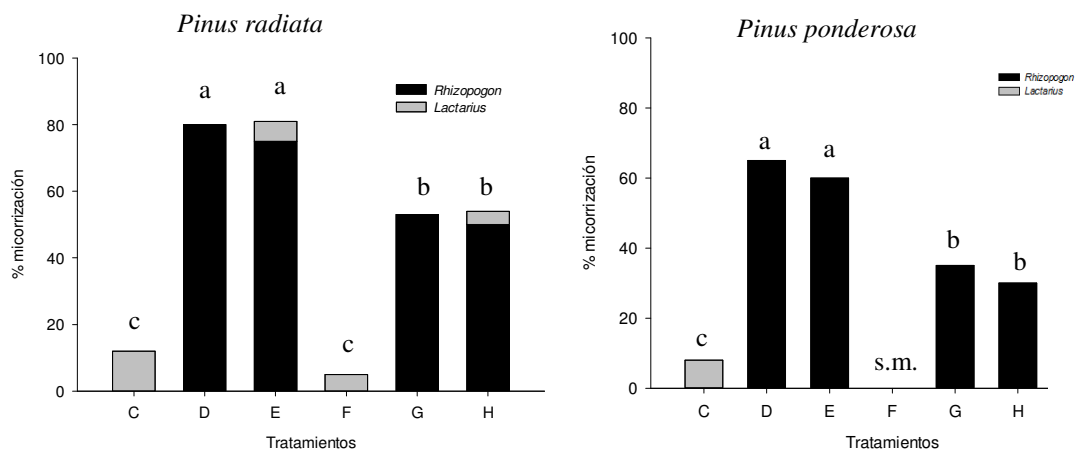


Figura 6 Porcentaje de micorrización (%) de las plantas de *Pinus radiata* (izquierda) y *P. ponderosa* (derecha) obtenido en los distintos tratamientos. Los valores seguidos por la misma letra por especie no presentan diferencias significativas ($P < 0,05$). Los tratamientos A y B controles sin y con fertilizante no presentaron micorrización de contaminantes. sm: sin micorizas.

En las plantas inoculadas con *L. quieticolor* se observaron muy bajos porcentajes de micorrización con valores entre 2,5 y 10 % de micorrización en el caso de *P. radiata*. Se observa, que en ambas especies vegetales los porcentajes de micorrización tanto de *R. roseolus* como de *L. quieticolor* disminuyen significativamente cuando fueron mezclados con fertilizantes químicos (tratamientos F-G-H), llegando incluso a no observarse síntesis micorrícica con *L. quieticolor* en *P. ponderosa* (tratamiento F) (Fig. 6). Para ambas especies vegetales, la aplicación de los tratamientos D y E generaron la mayor micorrización en especial con el hongo *R. roseolus*, generándose una colonización completa del cepellón (Fig. 7), presentando diferencias significativas con los demás tratamientos.

L. quieticolor presentó una estructura micorrícica dicotómica de tonalidad anaranjada con presencia escasa de cordones miceliarios, desarrollándose un patrón celular plectenquimático e hifas laticíferas (transportadoras de latex) color naranja. A su vez, *R. roseolus*, presentó puntas dicotómicas, con ramas cortas, simples, múltiples (coraloides) o formando cabezuelas, color blanco, con abundantes cordones miceliarios (rizomorfos), manto plectenquimático e hifas con presencia de cristales hialinos adheridos (Fig. 8).



Figura 7 Cepellón de *P. radiata* micorrizado con *R. roseolus* al cabo de 5 meses.

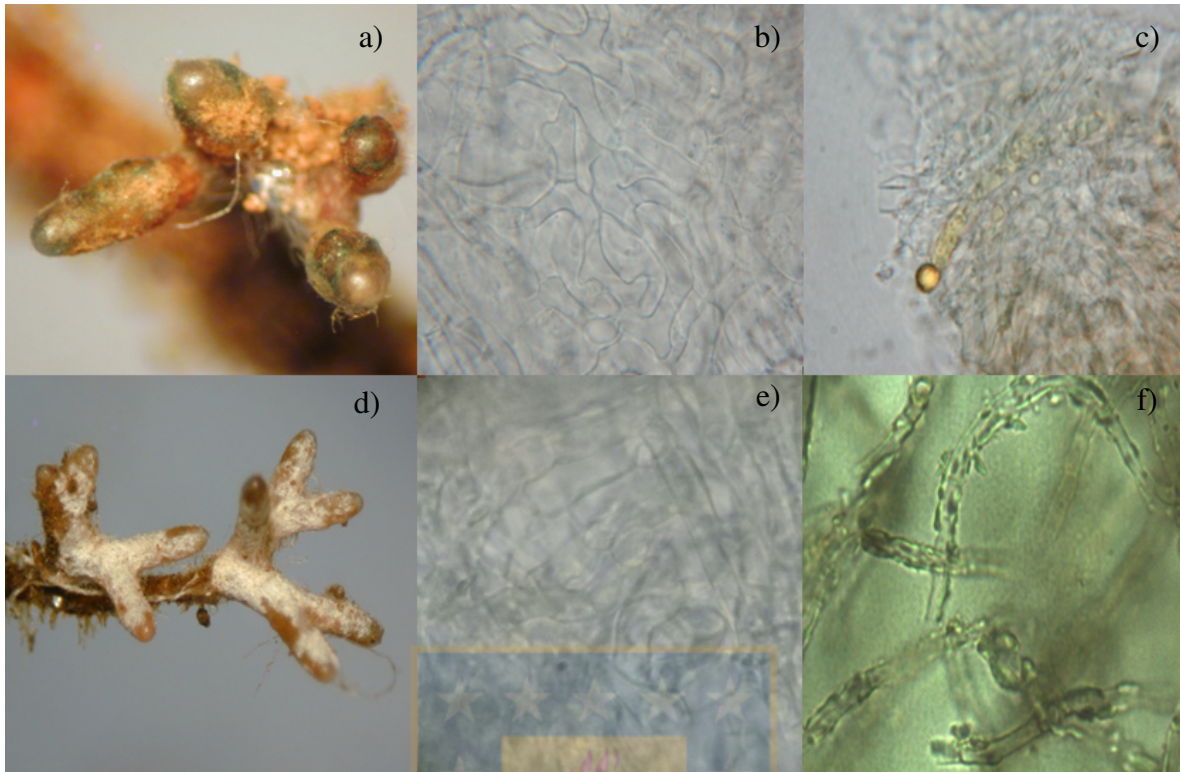


Figura 8 Macro y micromorfología de micorrizas sintetizadas de *L. quieticolor* y *R. roseolus* con *P. radiata*. a-c: *L. quieticolor*, a) sistema micorrícico, b) manto fúngico con patrón celular plectenquimático, y c) manto fúngico con hifa laticífera, d-f: *R. roseolus*, d) sistema micorrícico, e) manto fúngico con patrón celular plectenquimático y f) Hifas superficiales con presencia de cristales.

Síntesis micorrícica *in vitro*

Paralelo a la evaluación de las plantas en cámara de crecimiento se evaluó la síntesis micorrícica bajo condiciones *in vitro* con *P. radiata*. Una vez inoculadas las plantas con discos de agar-micelio para *R. roseolus* a partir del día 12 se comenzó a observar la unión del micelio con las raíces secundarias y al día 15 se comenzó a observar la síntesis micorrícica. *L. quieticolor* fue más lento en crecimiento observándose unión del micelio a partir del día 22 y síntesis micorrícica posterior al mes de la inoculación. El porcentaje de plántulas formando micorrizas con *R. roseolus* fue de un 85 % en cambio para *L. quieticolor* solo de un 15%.

4. Discusión

Las relaciones no patogénicas entre microorganismos micorrícicos y una planta hospedera incrementan el crecimiento y la resistencia a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico (Van Tichelen et al. 2001; Azcón-Aguilar et al. 2002; Ruiz-Lozano 2003; Smith y Read 2008). Entre los microorganismos no patogénicos se encuentran los hongos ectomicorrícicos que poseen un enorme potencial para el establecimiento de especies vegetales en campo. Estos beneficios se relacionan principalmente con la absorción de agua y nutrientes, un uso más eficiente del agua, mayor tasa de fotosíntesis y una mayor protección contra los patógenos (Harley y Smith 1983; Lehto 2011). Otro de los beneficios es que el micelio extraradical puede conectar a varias plantas, incluso de distintas especies, formando una importante red subterránea de transporte entre diferentes plantas de la comunidad vegetal, la que ayuda a minimizar las pérdidas de nutrientes del ecosistema (Simard et al. 2002; Pérez Moreno y Read 2004). Por lo tanto, se espera que las plantas micorrizadas desde el vivero puedan superar el estrés de la plantación (Shock de trasplante) en comparación con las plantas no micorrizadas (Zhu et al. 2008; Luo et al. 2009).

En la actualidad existe una variedad de trabajos relacionados con la inoculación de plantas con hongos ectomicorrícicos en vivero, obteniéndose diferentes resultados cuando se aplican en forma independiente o en combinación con otros hongos o con la aplicación de fertilizantes químicos e incluso en diferentes periodos de la viverización (Walker 2001; Quoreshi 2003; González-Ochoa et al. 2003; Barroetaveña et al. 2004; Duñabeitia et al. 2004; Baltasar et al. 2007; Martínez et al. 2007; Chávez et al. 2009; Sousa et al. 2010; Barroetaveña et al. 2012; Chávez et al. 2014). Si bien, la relación costo-beneficio es más alta asociado a la producción de inoculantes fúngicos (debido al equipamiento que se requiere para su producción) en comparación con la aplicación de fertilizantes químicos, éstos se aplican una sola vez y pueden ser autosustentables en el tiempo a diferencia de la fertilización química que es requerida con mayor frecuencia (Peñuela y Ocaña 2000; Quoreshi 2003).

En el presente trabajo se inocularon plántulas de *P. radiata* y *P. ponderosa* con los hongos ectomicorrícicos *L. quieticolor* y *R. roseolus* en forma independiente y en forma combinada, además, de la aplicación del fertilizante químico Basacote 6 M. Al evaluar el efecto de la inoculación en los parámetros de crecimiento se apreció que la aplicación de

los hongos ectomicorrícicos en presencia o ausencia de fertilizante, estimuló en general el crecimiento de las plantas en altura, DAC y la biomasa aérea o radicular. Al respecto, Sousa et al. (2010) encontró que la inoculación con una mezcla de micelio de *S. bovinus*, *Laccaria laccata* y *L. deterrimus* y con una mezcla de esporas de *P. tinctorius* y *Scleroderma citrinum* mejora el estado nutricional y el crecimiento de las plantas, sin la necesidad de usar fertilizante. Por otra parte, Chávez et al. (2014), evaluando el efecto de la interacción de hongos ectomicorrícicos y saprófitos encontraron que el inoculante formulado con la mezcla *Corioloopsis rigida* y *R. luteolus* produjo las plantas de *P. radiata* con mayores índices de calidad bajo condiciones de invernadero, siendo una alternativa viable para su utilización como potencial biofertilizante en la producción de especies vegetales forestales. Esto concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo donde se obtienen buenos resultados sin la aplicación de fertilizantes químicos, lo que deja de manifiesto que una buena selección de inóculo fúngico para programas de inoculación de plantas es factible. Carrillo (2000), encontró que la aplicación de inoculantes fúngicos no genera un mayor crecimiento en las plantas de *Pinus halepensis*, sin embargo, señala que todas las plantas micorrizadas en sus ensayos cumplen los criterios de calidad de planta forestal, según la normativa española para *Pinus halepensis*, tales como una altura mínima de 10 cm y un diámetro de cuello de raíz de 2 cm (Peñuelas, 1999).

Cuando se evaluó la micorrización en ambas especies vegetales, se observó que la especie fúngica *R. roseolus* produjo porcentajes de micorrización altos, comparado con *L. quieticolor* cuyos porcentajes de micorrización fueron bajos, viéndose disminuida la micorrización en forma significativa cuando se aplicó fertilizante químico, llegando incluso *L. quieticolor* a no micorrizar las plantas de *P. ponderosa* (Fig. 6 derecha tratamiento F). Una de las causantes de la baja micorrización presentada por *L. quieticolor* pudiese ser atribuido al tipo de inóculo aplicado y al sustrato utilizado para el cultivo de las plantas. Pera y Parlade (2005), afirman que la formulación y la dosis del inóculo aplicado influyen en la efectividad de la inoculación controlada de las plantas en vivero. Al respecto, Cifuentes (2013) utilizando diferentes sustratos (corteza de pino, mezcla de vermiculita/perlita/turba (VPT), VPT + trumao y corteza de pino + trumao) no logró síntesis micorrícica con *Lactarius* gr. *deliciosus* aplicando inóculo miceliar líquido, sin embargo, si logró síntesis con el inóculo miceliar sólido en mezcla de

vermiculita/perlita/turba (VPT) y VPT + trumao, estos resultados concuerdan con los encontrados por Parladé et al. (2004), para las especies *P. pinaster* y *P. sylvestris* utilizando inóculo vegetativo de *L. deliciosus* crecido en sustrato sólido. Sin embargo, los resultados de micorrización encontrados en el presente trabajo concuerdan con los encontrados por Díaz et al., (2009) para la especie *P. halepensis*, quienes trabajaron con dosis de 10 ml/planta de micelio líquido. Honrubia et al. (1997) señala que el sustrato debe adaptarse de manera que permita una aireación y drenaje suficientes para el buen desarrollo del micelio fúngico. Además, según resultados de Arrieta & Terés (1993) y Sánchez et al., (2008) la corteza de pino es ligeramente ácida, lo que también pudo afectar negativamente el desarrollo del hongo ya que, como se puede observar en el proceso de optimización (Capítulo III), a un pH más ácido existe una disminución en el desarrollo del micelio fúngico.

Al respecto Díaz et al. (2010), estudiando dosis crecientes de nitrógeno en plántulas de *P. halepensis* encontraron que dosis altas de fertilización produjeron una reducción significativa de la micorrización de las plántulas, recomendando evitar las dosis altas de fertilizantes para obtener plantas micorrizadas con *P. halepensis*. Por otra parte, Martínez et al. (2007) estudió la aplicación de esporas de *R. roseolus* en diferentes etapas de la viverización de *Pinus ponderosa* obteniendo en la tercera etapa de la viverización (etapa de endurecimiento, caracteriza por una disminución de la aplicación de fertilizantes químicos) buenas tasas de micorrización, resultados que se correlacionan con los presentados en este estudio para *R. roseolus*.

Otra de las causas de la baja micorrización presentada por *L. quieticolor* en los ensayos realizados puede estar dada por la condición natural como se desarrolla el género *Lactarius*, catalogado como colonizador tardío “late-stage” (Visser 1995), asociándose a árboles de edad adulta, siendo una de las razones por las cuales genera bajos porcentajes de micorrización en las plántulas de *P. radiata* y *P. ponderosa*. Además, para especies de los géneros *Lactarius* y *Russula* se ha descrito una capacidad saprofítica con producción de enzimas de tipo oxidasas extracelulares, lo que le permitiría no depender completamente de la asociación micorrícica. En cambio, todas las especies del orden Boletales a las cuales pertenece *Rhizopogon* carecen de esta función (Agerer et al. 2000). Sin embargo, en otros estudios Guerin-Laguette et al. (2000, 2003) estudiaron la formación de ectomicorrizas

entre *L. deliciosus* y *Pinus sylvestris* logrando altas tasas de micorrización y estimulando hasta en 325% el crecimiento en altura. Esto también se correlaciona con el tipo de exploración de sus ectomicorrizas (ECM). Agerer (2001) propuso una clasificación de las ECM en “tipos exploratorios” basada en la cantidad y grado de diferenciación del micelio extramatricial, clasificación que constituye una herramienta importante para la caracterización de los patrones exploratorios y uso de recursos de las comunidades fúngicas ectomicorrícicas. Según esta clasificación las ECM se pueden dividir en: tipo exploratorio de contacto con un manto liso y pocas hifas; tipo exploratorio de corta distancia, con muchas hifas emergentes pero sin rizomorfos; y tipo exploratorio de media y larga distancia, cuya característica típica es la existencia de rizomorfos, masas densas de hifas con estructura diferenciada. Los dos últimos tipos exploratorios están basados en el grado de diferenciación de sus rizomorfos que varían desde indiferenciados a altamente diferenciados, siendo estos últimos unas estructuras optimizadas para el transporte de nutrientes a larga distancia. La mayoría de las especies de los géneros *Russula* y *Lactarius* pertenecen al tipo de exploración de contacto, sólo algunas especies de *Lactarius* son de exploración de media distancia (Agerer 2001) lo que ayudaría a entender la baja micorrización presentada por *L. quieticolor* en este trabajo. Las ectomicorrizas de ambos géneros en su mayoría son hidrófilas y esto es crucial para explorar con éxito el sustrato en sus inmediaciones. El género *Rhizopogon* en cambio, es considerado un colonizador temprano “Early-Stage”, conocido por formar ectomicorrizas del tipo exploratoria de media y larga distancia (Agerer 1999) resultados que permiten respaldar los altos porcentajes de micorrización obtenidos en este estudio, dada la rápida colonización del sustrato y de las raíces nuevas de las plántulas. Otros estudios también muestran que especies de *Rhizopogon* son colonizadores comunes en bioensayos de suelo desde bosques perturbados y no perturbados (Jones et al. 1997; Taylor y Bruns, 1999). Esporas de *Rhizopogon* pueden persistir como inóculos viable por largos períodos de tiempo, incluso en ausencia del hospedero (Horton et al. 1998), en cambio, las esporas de *Lactarius* son de pared delgada no melanizadas y por lo tanto de corta duración en condiciones de alta irradiación y baja humedad (Kranzlin 2005).

A través de la asociación simbiótica mutualística entre el hongo y las raíces de las plantas los hongos ectomicorrícicos ayudan a la captura de fósforo no disponible para las plantas,

por lo tanto, al existir una cantidad suficiente de fósforo disponible (como lo que entrega Basacote 6 M 12%) no estaría siendo necesaria la asociación con los hongos ectomicorrícicos ensayados, viéndose esto reflejado en una disminución de la micorrización en los tratamientos que contemplaban aplicación de fertilizante, siendo más marcado en la especie *L. quieticolor*. Al respecto, Peñuela y Ocaña (2000) señalan que el uso de fertilizantes de lenta liberación está especialmente contraindicado cuando se busca lograr altas tasas de micorrización.

La principal ventaja de la utilización de fertilizantes en plántulas de vivero depende del suministro de nutrientes, lo que acelera su producción (Peñuela Rubira 1993; Landis et al. 2000; Peñuela y Ocaña 2000). Sin embargo, hay algunas amenazas ambientales asociadas, debido a la lixiviación de sustancias químicas, y desventajas económicas, ya que los fertilizantes pueden ser una fracción financiera importante en los costes de producción de planta (Souza et al. 2010; Landis 2000; Peñuela y Ocaña 2000).

Se ha documentado que la composición de especies fúngicas cambia en una cronosecuencia dada la edad de los árboles, la composición vegetacional, la calidad del sitio y los nutrientes del suelo (Avis et al. 2003; Palfner et al. 2005; Twieg et al. 2007-2009; Palacios et al. 2012). Se ha comprobado también, que la micorrización inducida desde el vivero con especies de hongos ectomicorrícicos comestibles permiten una fructificación a partir del 3-5 año de establecidas las plantas micorrizadas en campo (Guerin-Laguette et al. 2014), de esta forma se estaría llevando a cabo un enriquecimiento de especies fúngicas que poseen interés más allá del ecológico, como son los productos forestales no madereros (PFNM) que puede entregar un recurso rentable para pequeños y medianos propietarios a través de la recolecta de setas.

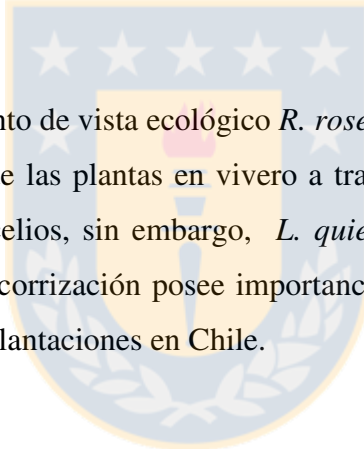
Finalmente este trabajo permite concluir que los hongos ectomicorrícicos juegan un rol fundamental en la calidad de la planta, incorporando el componente biológico como una estrategia de minimizar e incluso sustituir el uso de fertilizantes químicos en viveros forestales, siendo una tecnología de producción limpia, sustentable en el tiempo y amigable con el medio ambiente.

CAPITULO VI: CONCLUSIONES GENERALES

El presente estudio, fue realizado con hongos ectomicorrícicos provenientes de diferentes sectores de la zona centro sur de Chile. *Lactarius quieticolor* fue recolectado de plantaciones adultas de *P. radiata* de la Provincia de Concepción, BíoBío y Cauquenes y *R. roseolus* de plantaciones juveniles de *P. radiata* de la Provincia del BíoBío (sectores Llano Blanco, Aeródromo y Escuadrón) y Cachapoal (Codelco), cuyos resultados indican que:

1. La identificación molecular del género *Lactarius* permitió re-definir una especie de hongo ectomicorrícico común en plantaciones de *P. radiata*, siendo citada por primera vez en Chile: *Lactarius quieticolor*.
2. La optimización de las condiciones de cultivo *in vitro* de *L. quieticolor* y *R. roseolus* permitió aumentar la producción de biomasa miceliar para este tipo de organismos de 1,2 a 3,25 g L⁻¹ para *L. quieticolor* (pH 5,5, 24°C y 20 g L⁻¹ glucosa) y de 3,02 a 8,6 g L⁻¹ para *R. roseolus* (pH 5,5, 28°C y 30 g L⁻¹ manitol), en relación al cultivo control (pH 5,5, 24°C y 10 g L⁻¹ glucosa).
3. Los principales metabolitos identificados en el caldo de cultivo de *L. quieticolor* fueron el ácido propanodioico (3-oxo-1-ciclopentano-1-il) (37%), derivados de hidroquinona (17%), y el ácido decanoico (93%), lo que sugiere que el caldo de *L. quieticolor* podría ser utilizado para obtener metabolitos secundarios de interés industrial, como el ácido decanoico.
4. En el ensayo de micorrización controlada de *P. radiata* y *P. ponderosa* el porcentaje de colonización de *L. quieticolor* fue bajo, proponiendo que la viverización de especies de *Pinus* inoculadas con este hongo debe ser más extensa (12 a 14 meses) para favorecer el desarrollo fúngico. Sin embargo, el aumento de biomasa radical y aérea fue mayor en el ensayo de inoculación combinada (*Lactarius quieticolor* + *Rhizopogon roseolus*) que en los ensayos de inoculación con las especies individuales, lo que indica un efecto potenciador importante de *L. quieticolor*, independiente de su escasa presencia visible en el sistema radical.

5. *R. roseolus* a pesar de no tener valor comercial como hongo comestible presenta ventajas comparativas con *L. quieticolor*, pues alcanza un alto porcentaje de micorrización.
6. *R. roseolus* es una especie con un enorme potencial para masificar su micelio en laboratorio y ser usada en programas de inoculación de plantas en vivero, generando un aumento en el crecimiento de las especies vegetales *P. radiata* y *P. ponderosa*.
7. Cuando se aborda el concepto de calidad de planta sólo se abarcan patrones morfológicos como altura y diámetro a la altura del cuello (DAC) sin embargo, a través de todo el estudio realizado es necesario considerar el componente biológico a través de la incorporación de los hongos ectomicorrícicos asociado a los sistemas radicales ya que pueden ser de vital ayuda al establecimiento y supervivencia en campo.
8. Finalmente desde el punto de vista ecológico *R. roseolus* cumple un rol fundamental en mejorar la calidad de las plantas en vivero a través de las diferentes formas de exploración de sus micelios, sin embargo, *L. quieticolor* a pesar de no presentar altos porcentajes de micorrización posee importancia como PFNM dando un valor agregado a las futuras plantaciones en Chile.



CAPITULO VII: BIBLIOGRAFÍA

- Adriaensen K, Van Der L, Van Laere A, Vangronsveld J, Colpaert J (2003) A zinc-adapted fungus protects pines from zinc stress. *New Phytology* 161:549–555.
- Agerer R (1987-2002) *Colour Atlas of Ectomycorrhizae*. Einhorn-Verlag. Schwäbisch Gmünd.
- Agerer R (1999) Never change a functionally successful principle: the evolution of Boletales s. l. (Hymenomycetes, Basidiomycota) as seen from below-ground features. *Sendtnera* 6: 5–91.
- Agerer R (2001) Exploration types of ectomycorrhizae. A proposal to classify ectomycorrhizal mycelial systems according to their patterns of differentiation and putative ecological importance. *Mycorrhiza* 11: 107-114.
- Agerer R, Schloter M, Hahn C (2000) Fungal enzymatic activity in fruitbodies. *Nova Hedwigia* 71: 315 – 336.
- Ahmad R, Al-Shorgani NK, Hamid AA, Wan Yusoff WM, Daud F (2013) Optimization of medium components using response surface methodology (RSM) for mycelium biomass and exopolysaccharide production by *Lentinus squarrosulus*. *Advance Bioscience Biotechnology* 4:1079–1085
- Akata I, Kalyoncu F, M HalilSolak, Erbil K (2012) Growth of mycelium of three ectomycorrhizal macrofungi, *Infundibulicybe geotropa*, *Tricholoma anatolicum* and *Lactarius deliciosus* in culture media containing various carbon sources. *African Journal Microbiology Research* 6:3042–3046.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller, Lipman DJ (1997) Gapped LAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402.
- Alvarado-Castillo 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: 531–539.
- Allen MF (2007) Mycorrhizal fungi: highways for water and nutrients in arid soils. *Vadose Zone Journal* 6(2): 291–297.

- Allen TR, Millar T, Berch SM, Berbee ML (2003) Culturing and direct DNA extraction find different fungi from the same ericoid mycorrhizal roots. *New Phytologist* 160 1: 255–272.
- Avishek M, Arun G (2008) Enhanced production of exocellular glucanase from *Leuconostoc dextranicum* NRRL B-1146 using response surface methodology. *Bioresource Technology* 99:3685–3691
- Avis PJ, McLaughlin DJ, Dentinger BC, Reich PB (2003) Long-term increase in nitrogen supply alters above- and below-ground ectomycorrhizal communities and increases the dominance of *Russula* spp. in a temperate oak savanna. *New Phytology* 160:239–253.
- Ayer A, Trifonov L (1994) Aromatic compounds from liquid cultures of *Lactarius deliciosus*. *Journal Natural Product* 57:839–841.
- Azcón-Aguilar C, Jaizme-Vega MC, Calvet C (2002) The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the control of soil-borne plant pathogens. In *Mycorrhizal technology in agriculture*. Birkhäuser Verlag, Germany, pp 187-197.
- Baltasar M, Barroetaveña C, Rajchenberg M (2007) Influencia del régimen de fertilización y del momento de inoculación en la micorrización de *Pinus ponderosa* en la etapa de vivero. *Bosque* 28(3): 226-233.
- Barea JM (1991) Vesicular-Arbuscular mycorrhizae as modifiers of soil fertility. *Advances in soil Science* 15: 1-40.
- Barea JM, Palenzuela J, Cornejo P, Sánchez-Castro I, Navarro-Fernández C, López-García A, Azcón R, Ferrol N, Azcón-Aguilar C (2011) Ecological and functional roles of mycorrhizas in semi-arid ecosystems of Southeast Spain. *Journal Arid Environmental* 75: 1292–1301.
- Baroglio C, Bosco F, Specchia V (2000) Biomass production of the mycorrhizal fungus *Suillus grevillei*: Effect of pH and ammonium. *Microbios* 103:163–177.
- Barroetaveña C, Bassani VN, Rajchenberg M (2012) Inoculación micorrízica de *Pinus ponderosa* en la Patagonia Argentina: colonización de las raíces, descripción de morfotipos y crecimiento de las plántulas en vivero. *Bosque* 33(2): 163-169.

- Becerra AG, Menoyo E, Lett I, Li CY (2009) *Alnus accuminata* in dual symbiosis with *Frankia* and two different ectomycorrhizal fungi (*Alpova austroalnicola* and *Alpova diplophloeus*) growing in soilless growth medium. *Symbiosis* 47:85–92.
- Bedry R, Baudrimont I, Deffieux G (2001). Wild-mushroom intoxication as a cause of rhabdomyolysis. *New England Journal of Medicine* 345:798–802.
- Benítez-Badillo G, Alvarado-Castillo G, Nava-Tablada ME, Pérez-Vázquez A (2013) Análisis del marco regulatorio en el aprovechamiento de los hongos silvestres comestibles en México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*.
- Bolan NS (1991) A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Journal Plant and soil. New Zealand* 134: 189 – 207.
- Borchers SL, Perry DA (1990) Growth and ectomycorrhiza formation of Douglas-fir seedlings grown in soils collected at different distances from pioneering hard-woods in southwest Oregon clear-cuts. *Can J For Res* 20:712–721.
- Box GEP, Behnken DW (1960) Some new three level designs for the study of quantitative variable. *Technometrics* 2:455–463.
- Branzanti M, Rocca E, Pisi A (1999) Effect of ectomycorrhizal fungi on chestnut ink disease. *Mycorrhiza* 9:103–109.
- Brundrett M, Bougher N, Dell B, Grove T, Malajczuk N (1996) Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. *ACIAR Monograph*, 32. Canberra, Australia. 374 pp.
- Carrillo C (2000) Producción de inóculo de hongos ectomicorrícicos y micorrización controlada de *Pinus halepensis* Miller en vivero. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, España. 241p.
- Carrillo C, Díaz G, Honrubia M (2004) Improving the production of ectomycorrhizal fungus mycelium in a bioreactor by measuring the ergosterol content. *Engineering in Life Sciences* 4:43–45.
- Casaña R, Rodriguez E, Gonzales M, Marrero A, Díaz C (2003) Contenido de ácidos orgánicos en cinco variedades de papatas cultivadas en Tenerife (España). *Ciencia y Tecnología de alimentos* 4(1) 16-21.

- Castrillón M, León JD, Carvajal D, and Osorio NW (2015) Effectiveness of single and combined ectomycorrhizal inocula on three species of *Pinus* at nursery. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 46:169–179.
- Cermak SC, John AL, Evangelista RL (2007). Enrichment of decanoic acid in cuphea fatty acids by molecular distillation. *Industrial Crops and Products* 26:93–99.
- Chacín F (2000) Diseño y análisis de experimentos para generar superficies de respuesta, Maracay: Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Venezuela.
- Chapman WK, Berch S, Ballard T (1990) *In vitro* growth of ectomycorrhizal fungi on dilute agar. *Mycologia* 82:526–527.
- Chávez D, Pereira G, Machuca A (2007) Crecimiento *in vitro* de cuatro especies de hongos ectomicorrícicos recolectados en plantaciones de *Pinus radiata*. *Agrociencia* 23(2): 79-84.
- Chávez D, Pereira G, Machuca A (2009) Efecto de tipos de inóculos de tres especies fúngicas en la micorrización controlada de plántulas de *Pinus radiata*. *Bosque* 30(1): 4-9.
- Chávez D, Pereira G, Machuca A (2014) Estimulación del crecimiento en plántulas de *Pinus radiata* utilizando hongos ectomicorrícicos y saprobios como biofertilizantes. *Bosque* 35:57–63.
- Chávez D, Machuca Á, Hernandez V, Palfner G, Becerra J (2015) Secondary metabolites from the culture broth of *Lactarius quieticolor* growing in a bioreactor. *Afr. J. Microbiol. Res.* 9:581-587.
- Cheung PCK (2010) The nutritional and health benefits of mushrooms. *Food and Nutrition Bulletin* 35:292–299.
- Chen YL, Kang LH, Dell B (2006) Inoculation of *Eucalyptus urophylla* with spores of *Scleroderma* in a nursery in south China: comparison of field soil and potting mix. *For Ecol Manage* 222:439–449
- Chisti MY (1989) *Airlift Bioreactors*, Elsevier Applied Sciences, London, UK, 345 pp.
- Colpaert JV, Van Assche JA, Luijters K (1992) The growth of the extramatrical mycelium of ectomycorrhizal fungi and the growth response of *Pinus sylvestris* L. *New Phytol* 120:127–135.

- Cui JD, Yuan LQ (2011) Optimization of Culture Conditions on Mycelial Grown in Submerged Culture of *Cordyceps militaris*. International Journal of Food Engineering 7:1556–3758.
- Daza A, Manjón J, Aguilar A, Bernedo M, Camacho M, Romero L, Santamaría C (2005) Crecimiento *in vitro* y capacidad micorrícica de varios aislamientos de *Laccaria deliciosus*. IV Congreso Forestal Español. Tomo 4. pp: 182-188. Zaragoza, España.
- Deacon J (2006) Fungal Biology, 4th ed., Blackwell Publishing Ltda.
- Díaz, G.; R. Flores y M. Honrubia. 2007. “*Laccaria indigo* and *L. deliciosus* form mycorrhizae with Eurasian or Neotropical *Pinus* species”. Sydowia 59: 32-45.
- Díaz G, Carrillo C, Honrubia M (2010) Mycorrhization, growth and nutrition of *Pinus halepensis* seedlings fertilized with different doses and sources of nitrogen. Annals of Forest Science 67 (2010) 405.
- Dietz S, Von Bulow J, Beitz E, Nehls U (2011) The aquaporin gene family of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*: lessons for symbiotic functions. New Phytologist 190: 927–940.
- Du X, Zhang J, Zhang Y, Li S, Lin X, Tang X, Zhang Y, Wang Y (2014) Decanoic acid grafted oligochitosan nanoparticles as a carrier for insulin transport in the gastrointestinal tract. Carbohydrate Polymers 11:433–441.
- Duñabeitia MK, Hormilla S, Garcia-Plazaola JI, Txarterina K, Arteché U, Becerril JM (2004) Differential responses of three fungal species to environmental factors and their role in the mycorrhization on *Pinus radiata* D. Don. Mycorrhiza 14: 11-18.
- Durand A (1995) The IRNA-Dijon reactors: design and applications. Abstract of II International Symposium on Solid State Fermentation. Montpellier, Francia.
- Donoso MA (2008) Evaluación de prácticas silvícolas en plantaciones de *Pinus ponderosa* (Dougl. ex Laws) en la XI Región de Aysén. Tesis Doctoral, Universidad de Chile.
- Estrada-Torres A, Santiago-Martínez G (2003) Avances en el Estudio de la ectomicorriza en el Estado de Tlaxcala, México. Universidad Autónoma de Tlaxcala. Tlaxcala, México. 76 p.
- 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.

- Etayo, M., A. De Miguel. 1998. Estudio de las Ectomicorrizas en una Trufera Cultivada Situada en Olóriz. Publ. Biol. Universidad de Navarra, Pamplona, España. Ser. Bot., 11: 55-114.
- FAO (1999) Los Productos Forestales no Madereros y la Generación de Ingresos, en Unasylva - No. 198 Actividades forestales de la FAO, Hacia una definición uniforme de los productos forestales no madereros. <http://www.fao.org/docrep/x2450s/x2450s00.htm#Contents>
- Furci G, Nascimento G (2007) Fungi Austral. Guía de campo de los hongos más vistosos de Chile. 200 p.
- Fritz, A. 2004. Manual La Construcción de Viviendas en Madera. Santiago, Chile. CORMA. 643 p.
- Gagnon J, Langlois CG, Fortin JA (1988) Growth and ectomycorrhiza formation of containerized black spruce seedlings as affected by nitrogen fertilization, inoculum type, and symbiont. Canadian Journal of Forestry Research 18: 922-929.
- Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhiza and rusts. Molecular Ecology 2: 113-118.
- Garrido N (1986) Survey of ectomycorrhizal fungi associated with exotic trees in Chile. Nova Hedwigia 43: 423-442.
- Garibay-Origel, R.; M. Martínez-Ramos y J. Cifuentes. 2009. “Disponibilidad de esporomas de hongos comestibles en los bosques de pino-encino de Ixtlán de Juárez-Oaxaca”. Revista Mexicana de Biodiversidad 80(2): 1-11.
- Gerhardt E, Vila J, Llimona X (2000) Hongos de España y de Europa. Omega, Barcelona.
- Guerin-Laguette A, Cummings N, Butler RC, Willows A, Hesom-Williams N, Li S, Wang Y (2014) *Lactarius deliciosus* and *Pinus radiata* in New Zealand: towards the development of innovative gourmet mushroom orchards. Mycorrhiza 24:511–523.
- Godoy R (1989) Beeinflussung der mykorrhiza von Repräsentanten der Krautschicht eines MelicoFagetum durch gasförmige Immissionen. Dissertation, University of Giessen.
- Gonda H, V Mondino (1995) Producción Acelerada de Plantines de Pino Ponderosa y Pino Oregón en los Andes Patagónicos. Anales Volumen 1. Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico (C.I.E.F.A.P.), 242 p.

- González-Ochoa AI, Heras J, Torres P, Sánchez-Gómez E (2003) Mycorrhization of *Pinus halepensis* Mill. and *Pinus pinaster* Aiton seedlings in two commercial nurseries. *Annals of Forest Science* 60: 43–48.
- Goodman D, Durall D, Trofymow T, Berch S (1998) A manual of concise descriptions of North American ectomycorrhizae. *Mycorrhiza* 8, 57–59.
- Grove TS, Malajczuk N (1994) The potential for management of ectomycorrhiza in forestry. In: Robson, A. D.; Abbot, L. and Malajczuk, N. (ed.), *Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 201-210. p.
- Grubisha LC, Trappe JM, Molina R, Spatafora JW (2002) Biology of the ectomycorrhizal genus *Rhizopogon*. VI. Re-examination of infrageneric relationships inferred from phylogenetic analyses of ITS sequences. *Mycologia* 94:607-619.
- Guerin-Laguette A, Cummings N, Butler RC, Willows A, Hesom-Williams N, Li S, Wang Y (2014) *Lactarius deliciosus* and *Pinus radiata* in New Zealand: towards the development of innovative gourmet mushroom orchards. *Mycorrhiza* 24(7):511-23.
- Hammond S, Lambert P (1981) *Antibiotics and Antimicrobial action*. Edward Arnold, London.
- Harley JL, Smith SE (1983) *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London.
- Harnett D (1987) *Introducción al análisis estadístico*. Editorial Iberoamericana. Delaware. EE.UU. 712 pp.
- Honrubia et al. 1991
- Honrubia M, Pereira G, Morte A, Machuca A (2008) Recursos micológicos como elemento estratégico para la diversificación de la productividad forestal y el desarrollo rural. *Revista Chile Forestal* N° 335: 47-49.
- Honrubia M (2009) Las micorrizas: una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años. *Anales Jard. Bot. Madrid* 66: 133-144
- Honrubia M, Torres P, Díaz G y Morte A (1995) *Biología forestal: Técnicas de micorrización y micropropagación de plantas*. Universidad de Murcia, Murcia.
- Honrubia M, Torres P, Díaz G, Cano A (1992) *Manual para micorrizar plantas en viveros forestales*. Ministerio de Agricultura, pesca y alimentación. ICONA. Madrid 47 pp.

- Hortal S, Pera J, Parladé J (2008) Tracking mycorrhizas and extraradical mycelium of the edible fungus *Lactarius deliciosus* under field competition with *Rhizopogon* spp. *Mycorrhiza* 18:69–77.
- Horton TR, Cazares E, Bruns TD (1998) Ectomycorrhizal, vesicular-arbuscular and dark septate fungal colonization of bishop pine (*Pinus muricata*) seedlings in the first 5 months of growth after wildfire. *Mycorrhiza* 8: 11–18.
- Hsieh Ch, Tsai KL, Shih IL (2007) Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris*. *The Biochemical Engineering Journal* 33:193–201.
- Hung L, Chein CY (1995) Physiological studies on two ectomycorrhizal fungi *Pisolithus tinctorius* and *Suillus bovinus*. *Trans Mycol Soc Japan* 19:121–122.
- Index Fungorum <http://www.indexfungorum.org>
- Infor (2010) Estadísticas forestales chilenas 2008. Santiago, Instituto Forestal (INFOR), Ministerio de Agricultura. Chile www.infor.cl.
- Ingleby K, Mason PA, Last FT, Fleming LV (1990) Identification of ectomycorrhizas. ITE Research, De la Bastide and Kendrick Publication no. 5. HMSO, London.
- Izco J, Barreno E, Brugues M, Costa M, J.A. et al. (2004) Botánica. segunda edición. 906 pp. McGraw-Hill – Interamericana de España, S. A. U., Madrid, España.
- Jikay L (2007) Biologically active substances from higher fungi. *Sci. found in China* 15:46–48.
- Job D (1996) Environmental growth requirements for submerged cultures of the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum* Fr. *Cryptogamie Mycologie* 17:165–174.
- Jonathan SG, Fasidi IO (2001) Effect of carbon, nitrogen and mineral sources on growth of *Psathyrella atroumbonata*, Pegler. A Nigerian edible mushroom. *Food Chem* 72:479–483.
- Jones CG, Lawton JH, Shachak M (1997) Ecosystem engineering by organisms: why semantics matters. *Trends in Ecology and Evolution*, 12: 275–276.
- Jonsson LM, Nilsson DA, Zachrisson O (2001) Context dependent effects of ectomycorrhizal species richness on tree seedling productivity. *Oikos* 93: 353-364.

- Jumpponen A (2001) Dark septate endophytes-are they mycorrhizal?. *Mycorrhiza* 11: 207–211.
- Khasa P, L Sigler, P Chakravarty, BP Dancik, L Erickson, D Mc Curdy (2001) Effect of fertilization on growth and ectomycorrhizal development of container-grown and bare-root nursery conifer seedlings. *New Forests* 22(3): 179-197.
- Keizer GJ (2000) *Enciclopedia de las Setas*. Libsa, Madrid.
- Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers JA (eds) (2001) *Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi*. 9th edition. CABI Publishing, Wallingford.
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA (2008) *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*, 10a ed., CABI Publishing, Egham, Surrey, Reino Unido.
- Kranzlin F (2005) *Fungi of Switzerland*. Verlag Mykologia, Lucerne.
- Krasowski M, Owens J, Tackaberry L, Massicotte H (1999) Above- and below-ground growth of white spruce seedlings with roots divided into different substrates with or without controlled release fertilizer. *Plant Soil* 217:131-143.
- Kuek C (1994) Issues concerning the production and use of inocula of ectomycorrhizal fungi in increasing the economic productivity of plantations. In : *Management of mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry*. A.D. Robson, L.K. Abbott & N. Malajczuk (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 221-230.
- Kuek C (1996) Shake-flask culture of *Laccaria laccata*, an ectomycorrhizal basidiomycete. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45:319–326.
- Kuiters AT (1990) Role of phenolic substances from decomposing forest litter in plant-soil interactions. *Acta Botanica Neerlandica* 39:329–348.
- Lázaro A (2008) El aprovechamiento micológico como vía de desarrollo rural en España: las facetas comercial y recreativa. *Anales de geografía* 28: 111–136.
- Lazo W (2001) *Hongos de Chile*. Atlas Micológico. Universidad de Chile, Santiago.
- Landis TD. 2000. Manual de viveros para la producción de especies forestales en contenedor. In Landis TD, RW Tinus, SE McDonald, JP Barnett. *Manual Agrícola*. Volumen N° 4. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, Forest Service. p. 1-67.

- Le Tacon F, Jung G, Mugnier J, Michelot P, Mauperin C (1985) Efficiency in a forest nursery on ectomycorrhizal fungus inoculum produced in a fermentor and entrapped in polymeric gels. *Canadian Journal of Forestry Research* 63:1664–1668.
- Le Tacon F, D Mousain, J Garbaye, D Bouchard, JL Churin, C Argillier, JM Amirault, B Genere (1997) Mycorrhizes, pépinières et plantations forestières en France. *Rev. For. Fr.* 49: 131-154.
- Lebrini M, Fontaine G, Gengembre L, Traisnel M, Lerasle O, Genet N (2009) Corrosion protection of galvanized steel and electroplating steel by decanoic acid in aqueous solution: Electrochemical impedance spectroscopy, XPS and ATR-FTIR. *Corrosion Science* 51:1201–1206.
- Lehto T, Zwiazek J (2011) Ectomycorrhizas and water relations of trees: a review. *Mycorrhiza* 21:71–90.
- Liu RS, Li DS, Li HM, Tang YJ (2008) Response surface modeling the significance of nitrogen source on the cell growth and *Tuber* polysaccharides production by submerged cultivation of Chinese truffle *Tuber sinense*. *Process Biochemistry* 43:868–878.
- Liyana-Pathirana C, Shahidi F (2005) Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using surface response methodology. *Food Chemistry* 9:347–356.
- Luo Z, Li K, Jiang X, Polle A (2009) Ectomycorrhizal fungus (*Paxillus involutus*) and hydrogel affect performance of *Populus euphratica* exposed to drought stress. *Annual Forestry Science* 66: 106.
- Maldonado JM, Ramírez GA (1997) Efecto de la inoculación con hongos micorrizógenos en almácigos de café (coffea arábica) Variedad Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Tesis, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Medellín pp. 3 – 83.
- Martín MP (1996) The genus *Rhizopogon* in Europe. Sociedad Catalana de Micología, Barcelona.
- Martín MP, García M (2009) How many species in the *Rhizopogon roseolus* group?. *Mycotaxon* 109:111-128.
- Martínez DB, Barroetaveña C, Rajchenberga M (2007) Influencia del régimen de fertilización y del momento de inoculación en la micorrización de *Pinus ponderosa* en la etapa de vivero. *Bosque* 28: 226-233.

- Marx DH (1969) The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infection. 1. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 59:153-163.
- Marx DH, Bryan WC (1975) Growth and ectomycorrhizal development of Loblolly pine seedlings in fumigated soil infested with the fungal symbiont *Pisolithus tinctorius*. *For Sci* 21:245–254.
- Marx DH, Kenney DS (1982) Production of ectomycorrhizal inoculum. In: Schenck N. C. (ed.). *Methods and principles of mycorrhizal research*. American Phytopathology Society, St. Paul, MN. pp. 131-146.
- Marx DH, Ruehle JL, Kenney et al. (1982) Commercial vegetative inoculum of *Pisolithus tinctorius* and inoculation techniques for development of ectomycorrhizae on container-grown tree seedlings. *Forestal Science* 28: 373-340.
- 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.
- Marshall E, Schreckenber K, Newton AC (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. Cambridge, Reino Unido: Centro Mundial de Vigilancia de la Conservación del PNUMA (UNEP-WCMC).
- Maurel C, Plassard C (2012) Aquaporins: for more than water at the plant–fungus interface?. *New Phytologist* (2011) 190: 815–817.
- Mead DJ (2013) Sustainable management of *Pinus radiata* plantations, vol 170: FAO Forestry Paper, Rome.
- Menkis A, Vasiliauskas R, Taylor AFS, Stenlid J, Finlay R (2005) Fungal communities in mycorrhizal roots of conifer seedlings in forest nurseries under different cultivation systems, assessed by morphotyping, direct sequencing and mycelial isolation. *Mycorrhiza* 16: 33–41.
- Miyasaka S, Habte M (2003) Plant mechanisms and mycorrhizal symbiosis to increase phosphorus uptake efficiency. *Journal Series Nro. 4468*, College of tropical Agriculture and Human resources, Hawaii, Honolulu; pp. 1101 – 1133.

- Mikola P (1969) Mycorrhizal fungi of exotic forest plantations. *Karstenia* 10:169-175.
- Montgomery DC (2002) *Diseño y Análisis de Experimentos*. 2nd ed., Limusa, Wiley, México.
- Montoya A, Hernández N, Mapes C, Kong A, Estrada-Torres A (2008) The collection and sale of wild mushrooms in a community of Tlaxcala, Mexico. *Economic Botany*, 62: 413–424.
- Moral A, Caballo C, Sicilia M, Rubio S (2012). Highly efficient microextraction of chlorophenoxy acid herbicides in natural waters using a decanoic acid-based nanostructured solvent prior to their quantitation by liquid chromatography–mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 709:59–65.
- Moreno B, Jiménez F, Gómez J, Infante F (1996) *Setas de Andalucía*. Centro Andaluz Del Libro, Sevilla.
- Morte A, Honrubia M (2009) Biotechnology for the industrial production of ectomycorrhizal inoculum and mycorrhizal plants. En: *Text Book on Molecular Biotechnology*. Ajit Varma and Neeraj Verma (eds.). Chapter 30. pp. 691-704. I.K. International Publishing House Pvt. Ltd. New Delhi, Mumbai, Bangalor (India).
- Morina R, Trappe JM (1994) Biology of the ectomycorrhizal genus, *Rhizopogon*. I. Host associations, host-specificity and pure culture syntheses. *New Phytol* 126: 653–675.
- Moser M (1960) Die Gattung *Phlegmacium*. *Die Pilze Mitteleuropas* 4. J. Bad Heilbrunn.
- Mroginski LA, Roca WM (1993) Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. En: *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. Cali, Colombia: CIAT, pp. 19-40.
- Muñoz, M. 2008. *Silvicultura de Pinus radiata* D. Don. Talca- Chile. Editorial Universidad de Talca. Colección Académica.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiology Plant* 15:473-497.
- Musilek V, Cerna J, Sasek V, Semerdziev M, Von Dracek M (1969) Antifungal antibiotic of the Basidiomycete *Oudemansiella mucida*. *Folia Microbiology* 14: 377-387.
- Muszynska B, Sułkowska-Ziaja K, Ekiert H (2011) Indole compounds in fruiting bodies of some edible Basidiomycota species. *Food Chemistry* 125:1306–1308.

- Nagasawa E (2000) Cultivation of *Rhizopogon rubescens* in the seashore pine forest (in Japanese). Japanese Society of Sand Dune Research 47: 140-143.
- Nuytinck J, Verbeken A, Miller SL (2007) Worldwide phylogeny of *Lactarius* section *Deliciosi* inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. Mycologia 99:820–832.
- Oliveira LP, Rossi MJ, Furigo J, Silva-Filho G, Oliveira V (2006) Viability and infectivity of an ectomycorrhizal inoculant produced in an airlift bioreactor and immobilized in calcium alginate. Brazilian Journal Microbiology 37:251–255.
- Ortega U, Dunabeitia M, Menéndez S, González-Murúa C, Majada J (2004) Effectiveness of mycorrhizal inoculation in the nursery on growth and water relations of *Pinus radiata* in different water regimes. Tree Physiology 24: 65-73.
- Palacios Y, Hernández C, Palfner G (2012) Comunidad ectomicorrícica en una cronosecuencia de *Pinus radiata* (Pinophyta: Pinaceae) en la VIII Región de Chile. Revista Chilena de Historia Natural 85: 61–71.
- Palfner G, CASANOVA MA, READ DJ (2005) The mycorrhizal community in a forest chronosequence of Sitka spruce [*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.] in Northern England. Mycorrhiza 15: 571-579.
- Palfner G (2011) Primer registro de *Russula pectinatoides* Peck (Basidiomycota, Russulaceae) para Chile. Gayana Botánica 68: 333-337.
- Parladé J, Pera J, Alvarez IF (1996) Inoculation of containerized *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus pinaster* seedlings with spores of five species of ectomycorrhizal fungi. Mycorrhiza 6:237–245.
- Parladé J, Alvarez IF, Pera J (1999) Coinoculation of containerized Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and maritime pine (*Pinus pinaster*) seedlings with the ectomycorrhizal fungi *Laccaria bicolor* and *Rhizopogon* spp. Mycorrhiza 8:189–195.
- Park JY (1970) Antifungal effect of an ectotrophic mycorrhizal fungus, *Lactarius* spp. associated with Baswood seedlings. Canadian Journal of Microbiology 16:798–800.
- Pera J (1992) Selección de hongos ectomicorrícicos para *Pinus pinaster* Ait para su aplicación en reforestación. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.

- Pera J, Parladé J (2005) Inoculación controlada con hongos ectomicorrícicos en la producción de plantas destinadas a repoblaciones forestales: estado actual en España. *Investigación Agraria, Sistema y Recursos Forestales* 14: 419-433.
- Pérez-Moreno J, Read DJ (2004) Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia*, 29: 239-247.
- Pereira G, Campos JL, Chávez D, Anabalón L, Arriagada C (2014) Caracterización del crecimiento micelial del hongo ectomicorrícico *Lactarius* aff. *deliciosus* y su simbiosis con plántulas de *Pinus radiata*. *Revista Quebracho* 22:30–39.
- Pereira G, Herrera J, Machuca A, Sánchez M (2007) Efecto del pH sobre el crecimiento *in vitro* de hongos ectomicorrícicos recolectados de plantaciones de *Pinus radiata*. *Bosque* 28(3): 215-219.
- Peñuelas Rubira, JL (1993) Calidad de la planta forestal para el plan de reforestación de tierras agrícolas. *Montes* 33: 84-97.
- Peñuelas J (1999) La calidad de la planta forestal. Calidad morfológica, fisiológica y genética. Normas de calidad. Control de calidad. En: I Curso Básico de Viveros y Producción de Planta Forestal. Guadalajara.
- Peñuelas J, Ocaña L (2000) Cultivo de Plantas Forestales en Contenedor. Madrid, España. Ediciones Mundi-Prensa. 190 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, 3–16.
- Pradella JG, Zuccolo M, Lopes S, Oliveia M (1990) *Pisolithus tinctorius* vegetative mycelia production: effects of nitrogen sources and cultivation in stirred tank fermenter. *Revista de Microbiología* 22:7–11.
- Price AR, Liston A, Strauss H (1998) Phylogeny and systematic of *Pinus* in: *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press. USA. Pp 49-68.
- Querejeta JJ, Roldán A, Albaladejo J, Castillo V (1998) The role of mycorrhizae, site preparation, and organic amendment in the afforestation of a semi-arid mediterranean site with *Pinus halepensis*. *For Sci* 44:203–211.
- Quoreshi AM (2003) Nutritional preconditioning and ectomycorrhizal formation of *Picea mariana* (Mill.) B.S.P. Seedlings. *Eurasian Forest Research* 6: 1-63.

- Read DJ, Pérez-Moreno J (2003) Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems-a journey towards relevance?. *New Phytol.* 157: 475-492.
- Redecker D, Kodner R, Graham LE (2000) Glomalean Fungi from the Ordovician. *Science* 289: 1920-1921.
- Repáč I (2011) Diversity and biotechnology of ectomycorrhizae. *Soil Biology* 25(1) 43-63.
- Restrepo M (2004) Sinergia entre edulcorantes no calóricos y el ácido Fumárico. *Revista Lasallista de Investigación* 1(2): 46-53.
- Reyna S (2000) Trufa, truficultura y selvicultura trufera. 229 p. Ediciones Mundiprensa, Madrid, España.
- Riquelme C (2011) Estudio del medio de cultivo melin-norkrans (MMN) para el crecimiento de hongo ectomicorrícico *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th. Fr. Universidad San Sebastián. Concepción. Chile.
- Rincon A, Álvarez IF, Pera J (2001) Inoculation of containerized *Pinus pinea* L. seedlings with seven ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 11: 265-271.
- Rodriguez G, Rodriguez R (1981) Las especies de pinaceae cultivadas en Chile. *Bosque* 4: 25-43.
- Rossi MJ (2006) Tecnología para producción de inoculantes de hongos ectomicorrícicos utilizando cultivo sumergido en biorreactor Airlift. Dissertation, Universidad Federal de Santa Catarina.
- Rossi MJ, Furigo J, Vetúria, Oliveira V (2007) Inoculant Production of Ectomycorrhizal Fungi by Solid and Submerged Fermentations. *Food Technology and Biotechnology* 45:277–286.
- Rossi MJ, Souza JAR, Oliveira VL (2002) Inoculant production of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* in an airlift bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59: 175-181.
- Rosas-Avila (2008) Ecogeografía del género *Pinus* (Linnaeus, 1753) en la subcuenca Tecuntepec – Apulco, México. Tesis de maestría Instituto politécnico nacional, México.
- Rovira AD, Bowen CD, Foster RC (1983) The significance of rhizosphere microflora and mycorrhizas in plant nutrition. En *Inorganic Plant Nutrition* (Encyclopedia of Plant

- Physiology, New Serie, Vol 15B). A. Läuchli y RL Bielek, eds., Springer Berlin. pp 61-93.
- Ruiz-Lozano JM (2003) Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. *New perspectives for molecular studies. Mycorrhiza* 13: 309-317.
- Ruiz-Pérez, M., Belcher, B., Achdiawan, R., Alexiades, M., Aubertin, C., Caballero, J., ... Youn, Y. (2004). Markets drive the specialization strategies of forest peoples. *Ecology and Society*, 9(2), 4.
- Salas V, Brito A, Molina C (2003) Recolección de frutos silvestres: oficio de mujeres en la región del Bío-bío. Santiago de Chile, Chile. Oxfam. 135 p.
- Santelices R, Espinoza S, Brunel N, Palfner G (2012) Effect of the geographical origin, culture media, and pH on the growth dynamic of the edible ectomycorrhizal mushroom *Suillus luteus*. *Ciencia e investigación agraria* 39(2):369-376.
- Santiago-Martínez G, Várela L, Estrada-Torres A, Cuaxilo V (1995) Efecto de seis medios de cultivo sobre el crecimiento de tres cepas de *Pisolithus tinctorius*. *Revista Mexicana de Micología*, 11: 57-68.
- Santiago-Martínez MG (1992) Pruebas de crecimiento, síntesis *in vitro* y caracterización de 10 cepas de hongos ectomicorrizógenos. Tesis de maestría, Facultad de ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Saravanakumar K, Saranya R, Sankaranarayana A, Kaviyaran V (2010) Statistical designs and response surface technique for the optimization of extra cellular Laccase enzyme production by using *Pleurotus* sp. *Recent Research in Science and Technology* 2:104–111.
- Sasek V (1989) Submerged cultivation of ectomycorrhizal fungi. *Agriculture, Ecosystems and environmental* 29: 441-447.
- Sebastiana M, Pereira VT, Alcântara A, Pais MS, Silva AB (2013) Ectomycorrhizal inoculation with *Pisolithus tinctorius* increases the performance of *Quercus suber* L. (cork oak) nursery and field seedlings. *New Forests* 44:937–949.
- Simard SW, Jones MD, Durall DM (2002) Carbon and nutrient fluxes within and between mycorrhizal plants. En: van derHeijden, M.G.A., Sanders, I.R. (Eds.), *Mycorrhizal Ecology*, pp. 33–74, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany.
- Singer R (1969) Mycoflora Australis. *Beih. Nova Hedwigia* 29: 1–406.

- Smith SE, Read DJ (2008) Mycorrhizal Symbiosis. 3rd ed. Academic Press, London, UK.
- Sousa NR, Albina RF, Oliveira RS, Castro PM (2010) Ectomycorrhizal fungi as an alternative to the use of chemical fertilisers in nursery production of *Pinus pinaster*. *Journal of Environmental Management* 30: 1-6.
- Sousa NR, Franco AR, Oliveira RS, Castrom PM (2012) Ectomycorrhizal fungi as an alternative to the use of chemical fertilisers in nursery production of *Pinus pinaster*. *Journal of Environmental Management* 95:269–274.
- Shimomura N, Aimi T, Matsumoto T, Maekawa N, Otani H (2008) Ultrastructure of developing basidiospores in *Rhizopogon roseolus* (= *R. rubescens*). *Mycoscience* (2008) 49:35–41
- Srinivasan M, Natarajan K, Nagajaran G (2000) Growth optimization of an ectomycorrhizal fungus with respect to pH and temperature *in vitro* using Design of Experiments. *Bioprocess Engineering* 22:267–273.
- Stange C, Prehn D, Arce-Johnson P (1998) Isolation of *Pinus radiata* genomic DNA suitable for RAPD analysis. *Plant Molecular Biology Reporter* 16:1–8.
- Steel R, Torrie J (1989) Bioestadística: Principios y procedimientos. México DF, México. 2ª ed. McGraw Hill. 662 p.
- Stenström E, Damm E, Unestam T (1997) Le role des mycorhizes dans la protection des arbres forestiers contre les agents pathogenes du sol. *Rev. For. Fr.* 49: 121-128.
- Stenström E, Ek M, Unestam T (1990) Variation in field response of *Pinus sylvestris* to nursery inoculation with four different ectomycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Forestry Research* 20: 1796-1803.
- Sterner O, Bergman R, Kihlberg J, Wickberg B (1985) The sesquiterpenes of *Lactarius vellereus* and their role in a proposed chemical defense system. *Journal of Natural Product* 48:279–288.
- Steubing L, Godoy R, Alberdi M (2001) Métodos de Ecología vegetal. Editorial Universitaria, Chile.
- Tateishi T, K Yokoyama, N Konho, H Marumotot (2003) Estimation of mycorrhizal colonization of the roots of Oak seedlings inoculated with an ectomycorrhizal fungus *Laccaria amethystea*. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 49 (4): 641-645.

- Taylor DL, Bruns TD (1999) Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: minimal overlap between the mature forest and resistant propagule communities. *Molecular Ecology* 8: 1837–1850.
- Taylor AFS, Alexander IAN (2005) The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. *Mycologist* 19 (3):102-112
- Teoh YP, Don MM (2012) Optimization of Parameters for Mycelia Growth by *Schizophyllum commune* and a Kinetic Model Study of its Growth Morphology. *Journal Applied Science* 12:1100-1105.
- Teoh YP, Don MM, Ujang S (2010) Cellulase Production by *Pycnoporus sanguineus* on Oil Palm Residues through Pretreatment and Optimization Study. *Journal Applied Science* 10:1036-1043.
- Timothy SY, Wazis CH, Adati RG and Maspalma ID (2012) Antifungal Activity of Aqueous and Ethanolic Leaf Extracts of *Cassia Alata* Linn. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2:182–185.
- Torres P, M Honrubia (1994) Basidiospores viability in stored slurries. *Mycological Research* 98: 527-530.
- Travieso R (2009) Producción del hongo ectomicorrícico *Suillus luteus* (Linnaeus ex Fries) Gray en reactor agitado. Universidad San Sebastián. Concepción. Chile.
- Twieg B, Durall D, and Simard SW (2007) Ectomycorrhizal fungal succession in mixed temperate forests. *New Phytologist* 176: 437–447.
- Valenzuela E (1998) Guía de campo para setas (*Agaricales*) de la Isla Teja, Valdivia. Universidad Austral de Chile, Valdivia.
- Van Tichelen KK, Colpaert JV, Vangronsveld J (2001) Ectomycorrhizal protection of *Pinus sylvestris* against copper toxicity. *New Phytologist* 150: 203-213.
- Vazquez-Garcia A, Santiago-Martinez G, Estrada-Torres A (2002) Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrizógenos. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Botánica*, 73(1): 1-15.
- Velišek J, Cejpek K (2011) Pigments of higher fungi: a review. *Czech. Journal of Food Science* 29:87–102.

- Visser S (1995) Ectomycorrhizal fungal succession in jack pine stands following wildfire. *New Phytologist* 129:389-401.
- Villarreal-Ruiz L, Pérez-Moreno J (1989) Los hongos comestibles silvestres de México, un enfoque integral. *Micología Neotropical Aplicada*, 2, 77–114.
- Voces R, Diaz-Balteiro L, Alfranca O (2012) Demand for wild edible mushrooms. The case of *Lactarius deliciosus* in Barcelona (Spain). *Journal of Forest Economics* 18: 47–60.
- Wallander H, Nylund JE (1992) Effects of excess nitrogen and phosphorous starvation on the extrametrical mycelium of ectomycorrhizas of *Pinus sylvestris* L. *New Phytol* 120:495–503.
- Wallander H, Fossum A, Rosengren U, Jones H (2005) Ectomycorrhizal fungal biomass in roots and uptake of P from apatite by *Pinus sylvestris* seedlings growing in forest soil with and without wood ash amendment. *Mycorrhiza* 15:143–148.
- Walker RF (2001) Growth and nutritional responses of containerized sugar and Jeffrey pine seedlings to controlled release fertilization and induced mycorrhization. *Forest Ecology Management* 149: 163–179.
- Wang F, Jianchun Z, Limin H, Shiru J, Jianming B, Shuang N (2012) Optimization of Submerged Culture Conditions for Mycelial Growth and Extracellular Polysaccharide Production by *Coriolus versicolor*. *Journal of Bioprocessing and Biotechniques* 2:1–5.
- Wang Y, Hall IR (2002) The cultivation of *Lactarius deliciosus* and *Rhizopogon rubescens* (shoro) in New Zealand. Edible mycorrhizal mushrooms and their cultivation. In Proceedings of the 2nd International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms, Christchurch, New Zealand, 3–6 July 2001. Edited by I.R. Hall, Y. Wang, E. Danell, and A. Zambonelli. New Zealand Institute for Crop & Food Research Limited, Christchurch.
- Wang Y, Hall IR, Dixon C, Hance-Holloy M, Strong G, and Barclay C (2003) Potential of cultivation of *Lactarius deliciosus* (saffron milk cap) in NZ. In Proceedings of the 3rd International Workshop on Edible Mycorrhizal Mushrooms, Victoria, British Columbia, Canada, 3–6 August 2003. Edited by S. Berch. South Vancouver Island Mycological Society, Vancouver. p. 50.
- Webster J, Weber RWS (2007) Introduction to Fungi. Cambridge University Press, New York.

- White TJ, Bruns TD, Lee S, and Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (eds. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.S. Sninsky and T.J. White) Academic Press, New York: 315-322.
- Wiley J (1995) Metodología de superficie de respuesta. Process and product Optimization Using Designed Experiments, New York.
- Wurst M, Kysilka R, Flieger M (2002) Psychoactive tryptamines from basidiomycetes. *Folia Microbiologica* 47:3–27.
- Yang XL, Luo DQ, Dong ZJ, Liu LK (2006) Two new pigments from the fruiting bodies of the Basidiomycete *Lactarius deliciosus*. *Helvetica Chimica Acta* 89:988–990.
- Zárate-Chaves C, Romero-Rodríguez MC, Niño-Arias FC, Robles-Camargo J, Linares-Linares M, Rodríguez-Bocanegra MX, Gutiérrez-Rojas I (2013) Optimizing a culture medium for biomass and phenolic compounds production using *Ganoderma lucidum*. *Braz J Microbio* 44:215–223.
- Zhang J, Feng XZ (1996) Subvellerolactone C, a new lactarane sesquiterpene from *Lactarius subvellerus*. *Chinese Chemical Letters* 7:1097–1099.
- Zhu J, Li F, Xu M, Kang H, and Wu X (2008) The role of ectomycorrhizal fungi in alleviating pine decline in semiarid sandy soil of northern China: an experimental approach. *Annals of Forest Science* 65 (2008) 304.
- Zobel B, Talbert J (1992) Técnicas de Mejoramiento Genético de Árboles Forestales. Editorial Limus. Noriega Editores.
- Zobel B, Wyk G, Stahl P (1987) Growing exotic forests. John Wiley & Sons, New York USA. 508 p.



VIII
ANEXOS

ANEXO I

Trabajo 2014 publicado en revista Bosque (ISI)

BOSQUE 35(1): 57-63, 2014 DOI: 10.4067/S0717-92002014000100006

Estimulación del crecimiento en plántulas de *Pinus radiata* utilizando hongos ectomicorrícicos y saprobios como biofertilizantes

Stimulation of *Pinus radiata* seedling growth using ectomycorrhizal and saprophytic fungi as biofertilizers

Daniel Chávez **, Guillermo Pereira ^a, Ángela Machuca ^a

*Autor de Correspondencia: ^aUniversidad de Concepción, Campus Los Ángeles, Departamento de Ciencias y Tecnología Vegetal, Laboratorio de Biotecnología de Hongos, J. A. Coloma 0201, Los Ángeles, Chile, tel.: 56-43- 405293, danielchavez@udec.cl

SUMMARY

Free-living mycorrhizal-arbuscular and saprophytic fungi have been reported to be able to promote the growth of some plants. However, the combined use of ectomycorrhizal and saprophytic fungi as growth stimulators for forest species has not been much studied to date. To study the effectiveness of different biological inoculants prepared with the ectomycorrhizal fungi *Suillus luteus* and *Rhizopogon luteolus* and the saprophytic fungi *Corioloopsis rigida* and *Trichoderma harzianum*, in both isolated and combined form, as potential biofertilizers for the growth of *Pinus radiata* seedlings in greenhouse conditions, *P. radiata* plants were transplanted to individual containers with pine bark composted as substrate and inoculated with spore inoculum of ectomycorrhizal fungi and solid mycelial inoculum of saprophytic fungi produced on wheat grains. When the assays were completed (10 months), the percentage of mycorrhization and some morphological parameters of the plants were measured to determine quality indices. The biological inoculants formulated with the saprophytic fungi or with the mixture of saprophytic and ectomycorrhizal fungi stimulated plant growth compared to the controls (plants without fungal inoculation). In addition, the presence of wheat grains in the inocula promoted the stimulating effect produced by the fungi on the growth of *P. radiata*. The inoculant formulated with the *C. rigida*-*R. luteolus* mixture produced *P. radiata* plants with higher quality indices under greenhouse conditions, and its use as a potential biofertilizer represents a viable alternative in the production of forest plant species.

Key words: fungi, plant quality index, morphological growth parameters.

ANEXO II

Trabajo 2015 publicado en revista African Journal of Microbiology Research (ISI)

academicJournals

Vol. 9(9), pp. 581-587, 4 March, 2015
DOI: 10.5897/AJMR2014.7169
Article Number: 571459351025
ISSN 1996-0808
Copyright © 2015
Author(s) retain the copyright of this article
<http://www.academicjournals.org/AJMR>

African Journal of Microbiology Research

Full Length Research Paper

Secondary metabolites from the culture broth of *Lactarius quieticolor* growing in a bioreactor

Daniel Chávez^{1*}, Víctor Hernández², Ángela Machuca¹, Götz Palfner² and José Becerra²

¹Departamento de Ciencias y Tecnología Vegetal, Campus Los Ángeles, Universidad de Concepción, J. A. Coloma 0201, Casilla 341, Los Ángeles, Chile.

²Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile.

Received 2 October, 2014; Accepted 16 February, 2015

In this work, the main secondary metabolites in *Lactarius quieticolor* cultivated in a bioreactor were determined to find a possible use for its broths, which are eliminated as waste products after fermentation. The broths were extracted for adsorption in solid phase using amberlite XAD-2 and solid-phase extraction (SPE), and the extracts were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. The main metabolites extracted with XAD-2 were propanedioic acid (3-oxo-1-cyclopentane-1-yl) (37%) and hydroquinone derivatives (17%), whereas with SPE the main metabolite was decanoic acid (93%), suggesting that *L. quieticolor* broths could be used to obtain secondary metabolites of industrial interest, like decanoic acid.

Key words: Decanoic acid, ectomycorrhizal fungus, edible mushrooms, organic acids.

ANEXO III
TRABAJOS PRESENTADOS EN
CONGRESOS NACIONALES E
INTERNACIONALES



AÑO 2011
XXXIII CONGRESO
SOCIEDAD DE MICROBIOLOGIA DE CHILE

Determinación de metabolitos secundarios en el caldo de cultivo de *Lactarius deliciosus* producido en biorreactor.

Secondary metabolites from the culture broth of *Lactarius deliciosus* growing in bioreactor.

Chávez D.¹, Hernandez V.², Becerra J.², Machuca A.¹, Pereira G.¹, Palfner G.²

¹Laboratorio de Biotecnología de Hongos. Departamento de Ciencia y Tecnología Vegetal, Campus Los Ángeles, Universidad de Concepción. J. A. Coloma 0201, Casilla 341. Los Ángeles-Chile. Tel: (043)-405293. E-mail: danielchavez@udec.cl

²Departamento de Botánica. Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas. Universidad de Concepción, Casilla 160-Concepción-Chile.

Lactarius deliciosus es un hongo ectomicorrízico comestible de interés en las prácticas forestales, debido al beneficio en productividad que representa su asociación con plantas de *Pinus radiata*. Debido a esto, se han desarrollado técnicas de producción de inóculo miceliar a gran escala, como el cultivo en biorreactor. Sin embargo, una vez obtenido el micelio, un gran volumen de caldo de cultivo es eliminado como producto de desecho. El presente trabajo tiene por objetivo determinar los principales metabolitos secundarios producidos por *Lactarius deliciosus* cultivado en biorreactor, con la finalidad de dar un posible uso al caldo de cultivo. A los 20 días de fermentación en biorreactor, bajo condiciones controladas, el caldo de cultivo fue separado de la biomasa por filtración y posteriormente extraído mediante adsorción en fase sólida empleando amberlita XAD-2 y SPE. Los extractos fueron evaluados mediante cromatografía de gas con detección de masa. Los principales metabolitos extraídos por XAD-2 son ácido propanodioico (37%), derivados de hidroxiquinonas (17%), sesquiterpenos (5 hidroxy 7-oxabicyclo[4.1.0] hept 3 en 2 one) (1,5%), 2 metil 1,3 ciclo hexanediona (3,6 %) y ácido benzoico (2,3%), ergosterol (10%) y otros metabolitos no identificados. La utilización de SPE permitió obtener ácido decanoico (93%), 3,4-2-H-coumarin, 4,4,5,6,8-pentamethyl (1,73%), y derivados de hidroxí naftaleno y ácido hexadecanoico (< 1%). Estos datos permiten concluir que el caldo de cultivo de *L. deliciosus*, puede tener un uso en la obtención de metabolitos secundarios de interés industrial como el ácido decanoico. Estudios en desarrollo permitirán evaluar la actividad biológica de algunos de estos metabolitos.

Financiamiento. Se agradece el apoyo de la BECA CONICYT-2011.



Determinación de metabolitos secundarios en el caldo de cultivo de *Lactarius deliciosus* producido en biorreactor



Chávez D.¹, Hernández V.², Becerra J.², Machuca A.¹, Pereira G.¹, Palfner G.²

¹Laboratorio de Biotecnología de Hongos, Departamento de Ciencia y Tecnología Vegetal, Campus Los Ángeles, Universidad de Concepción. J. A. Coloma 0201, Casilla 341. Los Angeles-Chile. Tel: (043)-405293. E-mail: danielchavez@udec.cl

²Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Casilla 160-Concepción-Chile.

INTRODUCCIÓN

Lactarius deliciosus es un hongo ectomicorrízico comestible de interés en las prácticas forestales, debido al beneficio en productividad que representa su asociación con plantas de *Pinus radiata*. Debido a esto, se han desarrollado técnicas de producción de inóculo micelial a gran escala, como el cultivo en biorreactor¹. Sin embargo, una vez obtenido el micelio, un gran volumen de caldo de cultivo es eliminado como producto de desecho. El presente trabajo tiene por objetivo determinar los principales metabolitos secundarios producidos por *Lactarius deliciosus* cultivado en biorreactor, con la finalidad de dar un posible uso al caldo de cultivo.

METODOLOGÍA

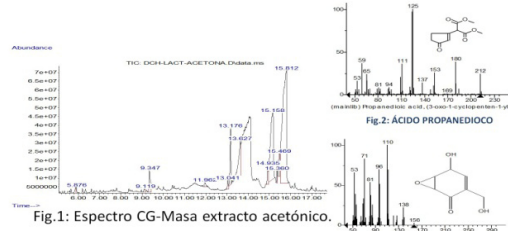


Fig. 2: ÁCIDO PROPANEDIICO

Fig. 3: SESQUITERPENO

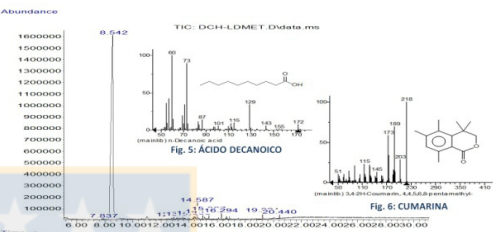


Fig. 4: Espectro CG-Masa extracto metanólico.

Ensayos en paralelo de producción de micelio en matraz han permitido identificar otros metabolitos de interés (Tabla 2) como el Cubenol (Fig. 7) un sesquiterpeno que presenta actividad antibacteriana³ y 2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaene, 2,6,10,15,19,23-hexamethyl (Escualeno Fig. 8) que presenta actividad anti fúngica. Estudios en desarrollo permitirán evaluar la actividad biológica de los extractos totales.

Tabla 2: Metabolitos de *L. deliciosus* producido en Matraz

Extracción Metanólica	Extracción Acetato de Etilo
Cubenol	Ethanol, 2-(2-butoxyethoxy)-, acetate
Ciclobutano,tetrakis(metileno)	Anilene, 1,4-dimetil-1-(1-metil)etil-
2,4-Dimetil-5,6-dimetil-8-aminoquinolina	Benzene, 1-[[4-(propyl)oxy]phenyl]ethyl] 4-propyl-
ácido 10-octadecenoico, éster metílico	2,4-bis(1-phenylethyl)phenol
Ácido Octadecenoico, metil ester	
2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaene, 2,6,10,15,19,23-hexamethyl	

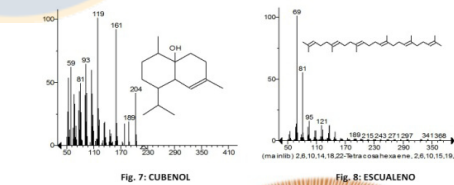


Fig. 7: CUBENOL

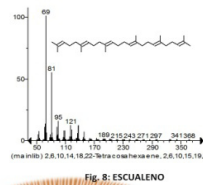


Fig. 8: ESCUALENO

RESULTADOS

Los principales metabolitos producidos por *L. deliciosus* cultivado en biorreactor se presentan en la tabla 1.

Tabla 1: Metabolitos de *L. deliciosus* producido en Biorreactor.

Extracción Acetónica con amberlita XAD-2	Extracción Metanólica SPE
Ácido Propanoico (37%) Fig. 2	Ácido decanoico (93%) Fig. 5
Derivados de Hidroquinonas (17%) Fig. 3	3,4-2-h-coumarin, 4,4,5,6,8-pentamethyl (1,73%) Fig. 6
Sesquiterpenos (5 hidroxy 7-oxibicyclo [4.1.0] hept 3 en 2 one) (1,5%)	Derivado de hidroxi naltaleno (<1%)
2 metil 1,3 ciclo hexanediol (3,6%)	Ácido hexadecenoico (<1%)
Ácido Benzoico (2,3%)	
Ergosterol (10%)	

Agradecimiento: BECA CONICYT 2011

CONCLUSIÓN

✓ El caldo de cultivo de *L. deliciosus*, puede ser usado en la obtención de metabolitos secundarios de interés industrial como el ácido decanoico, cuyo uso fundamental está centrado en la manufactura de ésteres para perfumes y sabores frutales, así como intermediario en aditivos para alimentos, lubricantes, tintes, hules, látex, plásticos y productos farmacéuticos.

✓ *L. deliciosus* cambia el patrón de producción de metabolitos secundarios dependiendo de la condición de cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

- Carrillo, 2000. Producción de inóculo de hongos ectomicorrízicos y micorrización controlada de *Pinus heulepensis* miller en vivero.
- Lazo, W. Hongos de Chile, atlas micológico. Fac. de Cs. de la U de Chile, 2001
- S. Hammond Y P. Lambert. 1981. Los antibióticos y la acción antimicrobiana.



AÑO 2012

XXXIV Congreso Chileno de Microbiología

Afinidad filogenética de *Lactarius* sección *deliciosi* en el centro-sur de Chile

Phylogenetic affinity of *Lactarius* section *deliciosi* in southern central Chile

Chávez D¹, Machuca A¹, Torres-Mellado GA², Gallardo-Escárate C³ Palfner G².

¹Laboratorio de Biotecnología de Hongos. Departamento de Ciencias y Tecnología Vegetal, Campus Los Ángeles, Universidad de Concepción. J. A. Coloma 0201, Casilla 341. Los Ángeles-Chile. Tel: (043)-405293. E-mail: danielchavez@udec.cl

² Laboratorio de Micología y Micorrizas, Departamento de Botánica. Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas. Universidad de Concepción, Casilla 160-Concepción-Chile.

³ Laboratorio de Genómica y Biotecnología Acuícola, Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile

Lactarius (Russulales, Basidiomycota) es un género de hongos ectomicorrícicos de gran importancia a nivel mundial por su asociación con numerosas especies arbóreas de uso forestal. Aunque Chile carece de especies nativas de este género, se ha establecido una especie adventicia y comestible, identificada históricamente como *Lactarius deliciosus*, en plantaciones de *Pinus radiata*. Sin embargo, la identidad de este taxón sólo ha sido determinada a nivel morfo-anatómico. El objetivo de esta investigación fue verificar mediante análisis filogenético molecular su identidad sistemática. La hipótesis de trabajo es que considerando el hospedero, *Pinus radiata*, el taxón chileno es descendiente de *Lactarius deliciosus* de Norteamérica. Se recolectaron carpóforos en tres sitios de las Regiones VII y VIII (Cauquenes, Concepción, Santa Bárbara) y se realizó extracción de ADN tanto desde los carpóforos como de cultivos miceliarios. La región ITS del ADN ribosomal fue amplificada y secuenciada usando los partidores ITSF1 e ITS4. Con las secuencias obtenidas y las de otros *Lactarius* spp. de la sección *deliciosi* de distintas partes del mundo disponibles en la base de datos GenBank, se construyó un árbol filogenético con el método de neighbor-joining. El cladograma reveló con buen soporte de bootstrap que el taxón chileno está más relacionado a los taxones afines euroasiáticos que a sus contrapartes norteamericanas, formando un clado común con *Lactarius hatsudake*, *L. quieticolor* y *L. horakii*. En base de nuestros datos sugerimos el nombre *L. quieticolor* para la designación correcta del *Lactarius* sección *deliciosi* en plantaciones de *Pinus radiata* en Chile.

MODALIDAD: ORAL



Afinidad filogenética de *Lactarius sección deliciosi* en el centro-sur de Chile

Chávez D¹, Machuca A¹, Torres-Mellado GA², Gallardo-Escárate C³ Palfner G².

¹Laboratorio de Biotecnología de Hongos. Departamento de Ciencias y Tecnología Vegetal, Campus Los Ángeles, Universidad de Concepción. J. A. Coloma 0201, Casilla 341. Los Ángeles-Chile. Tel: (043)- 405293. E-mail: danielchavez@udec.cl

²Laboratorio de Micología y Micorrizas, Departamento de Botánica. Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas. Universidad de Concepción, Casilla 160-Concepción-Chile.

³Laboratorio de Genómica y Biotecnología Acuícola, Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile



23 al 26 de noviembre de 2012, Centro de Convenciones, Hotel Villa del Río, Valdivia - Chile



Efecto del medio de cultivo y fuente de carbono en el crecimiento *in vitro* de los hongos ectomicorrícicos *Lactarius deliciosus* y *Rhizopogon luteolus*.

Effect of culture media and carbon sources on *in vitro* growth of ectomycorrhizal fungi *Lactarius deliciosus* and *Rhizopogon luteolus*.

Chávez D.¹, Machuca A.¹, Palfner G.²

¹Laboratorio de Biotecnología de Hongos.

Departamento de Ciencias y Tecnología Vegetal, Campus Los Ángeles, Universidad de Concepción. J. A. Coloma 0201, Casilla 341. Los Ángeles-Chile. Tel: (043)- 405293. E-mail: danielchavez@udec.cl

²Departamento de Botánica. Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas. Universidad de Concepción, Casilla 160-Concepción-Chile.

Lactarius deliciosus y *Rhizopogon luteolus* son simbioses micorrícicas específicas del género *Pinus* y pueden ser cultivados en laboratorio bajo condiciones axénicas. Para ello, se hace necesario evaluar su dinámica de crecimiento *in vitro*, con la finalidad de optimizar el cultivo miceliar. En este trabajo se evaluó el efecto de dos medios de cultivo y tres fuentes de carbono sobre la morfología y producción de biomasa miceliar por *L. deliciosus* y *R. luteolus*. Cultivos puros de ambos hongos fueron obtenidos a partir de carpóforos recolectados en plantaciones de *P. radiata*, luego de su identificación a nivel micro y macroscópico. Las especies fueron cultivadas en medio Melin-Norkrans-modificado (MNM) y Biotina-Aneurina-Ácido fólico (BAF) conteniendo glucosa, sacarosa o manitol (10 g/L). Los cultivos fúngicos presentaron diferencias en la coloración del micelio, abundancia de micelio aéreo, y presencia de exudados; mientras que el análisis microscópico reveló variación en la presencia de hifas laticíferas en *L. deliciosus*. Las mayores velocidades de crecimiento radial para *L. deliciosus* y *R. luteolus* ocurrieron en BAF-glucosa (1,43 mm.día⁻¹) y MMN-sacarosa (1,05 mm.día⁻¹), respectivamente. El área de colonización siguió el mismo patrón que la velocidad de crecimiento en las dos especies. *L. deliciosus* produjo mayor cantidad de biomasa en BAF-glucosa (155 mg), mismo medio donde se obtuvo la mayor velocidad de crecimiento. Para *R. luteolus* la mayor producción de biomasa se obtuvo en BAF-manitol (163,3 mg). Estos resultados permitirán establecer las condiciones óptimas para obtener micelio de *L. deliciosus* y *R. luteolus*, con fines de micorrización de plantas de *Pinus*.

Palabras claves: velocidad de crecimiento, biomasa fúngica, hifas laticíferas.

Financiamiento: Beca Conicyt 2011; Proyecto Fondecyt N°1110656.

MODALIDAD: POSTER



Efecto del medio de cultivo y fuente de carbono en el crecimiento *in vitro* de los hongos ectomicorrícicos *Lactarius gr. deliciosus* y *Rhizopogon sp.*



Chávez D.¹, Machuca A.¹, Palfner G.²
danielchavez@udec.cl

¹Laboratorio de Biotecnología de Hongos, Departamento de Ciencia y Tecnología Vegetal, Campus Los Ángeles, Universidad de Concepción.
²Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción.

INTRODUCCIÓN

Las especies fúngicas *Lactarius gr. deliciosus* y *Rhizopogon sp.* son simbiontes micorrícicos específicos del género *Pinus* y pueden ser cultivados en condiciones axénicas, siendo necesario entonces, conocer y evaluar su dinámica de crecimiento *in vitro* con la finalidad de optimizar el cultivo micelial. En este trabajo se evaluó el efecto de dos medios de cultivo y tres fuentes de carbono sobre la morfología y producción de biomasa micelial por *Lactarius gr. deliciosus* y *Rhizopogon sp.*, en condiciones sólidas y líquidas.

METODOLOGÍA

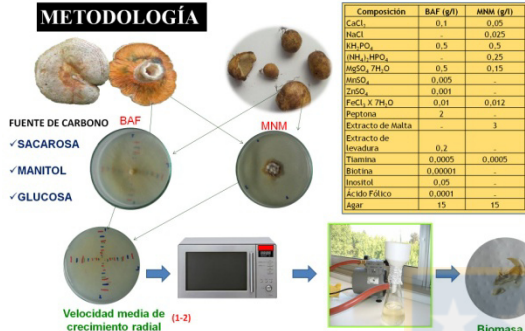


Figura 2: Biomasa micelial obtenida en cultivo líquido de *Rhizopogon sp.* y *Lactarius gr. Deliciosus* en 31 días de cultivo.

RESULTADOS

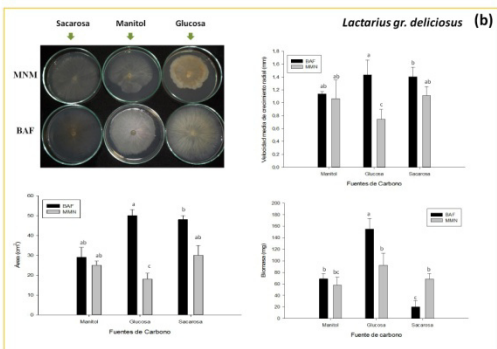
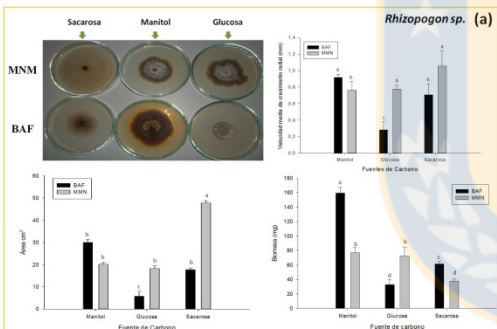


Figura 1: Velocidad media de crecimiento radial, área de colonización y producción de biomasa micelial de (a) *Rhizopogon sp.* y (b) *Lactarius gr. deliciosus* en los medios de cultivo sólidos BAF y MMN, utilizando como fuente de carbono sacarosa, glucosa y manitol (10 g/L). Periodo de incubación 31 días.

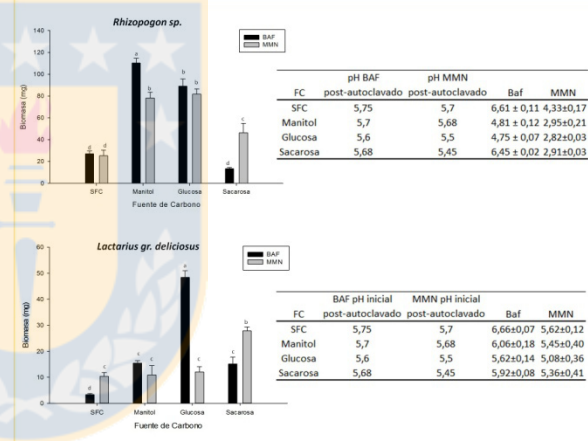


Figura 3: Crecimiento micelial de *Rhizopogon sp.* y *Lactarius gr. deliciosus* en medio líquido con distintas fuentes de carbono.

CONCLUSIÓN

Se concluye que para *Rhizopogon sp.* se obtiene mayor producción de biomasa micelial en medio de cultivo BAF-Manitol como fuente de carbono y para *Lactarius gr. deliciosus* en BAF-Glucosa. Estos resultados concordaron tanto en medio sólido como en medio líquido, permitiendo establecer las condiciones óptimas para obtener micelio de *Rhizopogon sp.* y *Lactarius gr. deliciosus*, con fines de micorrización de plantas de *Pinus*.

BIBLIOGRAFÍA

- HARNETT D. 1987. Introducción al análisis estadístico. Editorial Iberoamericana. Delaware. EE.UU. 712 pp.
- VAZQUEZ-GARCIA A., SANTIAGO-MARTINEZ G., ESTRADA-TORRES A. 2002. Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrizógenos. Anales del Instituto de Biología, Univ. Nacional Autónoma de México. Serie Botánica; 73(1): 1-15.
- CHAPMAN, W. K., S. M. BERCH Y T. M. BALLARD. 1990. In vitro growth of ectomycorrhizal fungi on dilute agar. Mycologia; 82:526-527.

Agradecimiento: Los autores agradecen el financiamiento del proyecto FONDECYT N°1110656 y a la BECA CONICYT 2011

AÑO 2013

XXXV CONGRESO CHILENO DE MICROBIOLOGÍA

Competencia *in vitro* entre el hongo comestible *Lactarius quieticolor* y *Rhizopogon roseolus*

In vitro* competition between the edible fungus *Lactarius quieticolor* and *Rhizopogon roseolus

Daniel Chávez^{1,2}, Arlene Fuentes¹, Götz Palfner², Angela Machuca¹

¹ Laboratorio de Biotecnología de Hongos. Departamento de Ciencias y Tecnología Vegetal, Campus Los Ángeles, Universidad de Concepción, Juan Antonio Coloma 0201, Los Ángeles, Chile.

² Laboratorio de Micorrizas. Departamento de Botánica. Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas. Universidad de Concepción, Casilla 160-Concepción-Chile.

Lactarius quieticolor es un hongo ectomicorrícico de colonización tardía en plantaciones de *Pinus radiata* y sus carpóforos apetecidos desde el punto de vista gastronómico. Resulta interesante evaluar si esta especie tiene la capacidad de competir *in vitro* con *Rhizopogon roseolus*, un hongo cosmopolita de colonización multi-etapa que también fructifica de manera abundante en plantaciones de *P. radiata*. Las especies fueron cultivadas en medio sólido Melin-Norkrans-modificado (MNM) y Biotina-Aneurina-Ácido fólico (BAF), utilizando sacarosa y glucosa como fuentes de carbono. Placas de Petri (9 cm) conteniendo medio de cultivo fueron inoculadas con un disco de agar micelio de cada especie a 3 cm de distancia uno de otro. En otro ensayo se favoreció el crecimiento de uno de los hongos por 15 días para luego inocular el otro, posible competidor. Todos los ensayos se realizaron en triplicado a 24°C durante 30 días y la velocidad de crecimiento radial (mm.día⁻¹) fue registrada. Cuando se enfrentaron ambas especies en MNM-sacarosa y BAF-glucosa *R. roseolus* (0,42 y 0,37 mmdía⁻¹) presentó diferencias significativas en comparación con *L. quieticolor* (0,096 y 0,16 mmdía⁻¹). Cuando *R. roseolus* creció primero por 15 días la disminución del crecimiento provocada sobre *L. quieticolor* en ambos medios fue aún más drástica. Cuando fue *L. quieticolor* el que creció primero presentó mayor crecimiento (0,19 mm.día⁻¹) con diferencias significativas respecto a *R. roseolus* en BAF-glucosa (0,11 mmdía⁻¹). El potencial de colonización de los hongos *in vitro* (competencia) se vió afectado dependiendo del tipo de medio y fuente de carbono utilizados.

Palabras Claves:; Hongos ectomicorrícicos; veocidad de crecimiento; MNM; *P. radiata*.

Agradecimiento Financiamiento: Beca de Doctorado Conicyt 2011 Sr. Daniel Chávez Matamala. Folio: 21110038.

MODALIDAD: POSTER



Competencia *in vitro* entre el hongo comestible *Lactarius quieticolor* y *Rhizopogon roseolus*



Daniel Chávez^{1,2}, Arlene Fuentes¹, Götz Palfner², Angela Machuca¹

¹ Laboratorio de Biotecnología de Hongos, Departamento de Ciencias y Tecnología Vegetal, Campus Los Angeles, Universidad de Concepción, Juan Antonio Coloma 0201, Los Angeles, Chile.

² Laboratorio de Micorrizas, Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Casilla 160- Concepción-Chile.

INTRODUCCIÓN

Lactarius quieticolor pertenece a la familia Russulaceae, orden Russulales, es un hongo ectomicorrícico de colonización tardía, crece asociado a coníferas (Pinto *et al.* 2006), y en Chile crece asociado a *Pinus radiata*. Este hongo es conocido por su alta demanda para su consumo desde el punto de vista gastronómico. Otro hongo ectomicorrícico es *Rhizopogon roseolus* perteneciente a la familia Rhizopogonaceae, orden Boletales, sus cuerpos fructíferos también son comestibles, pero no es muy apreciado como un alimento (Pinto *et al.* 2006). Es un hongo cosmopolita de colonización multi-etapa que también fructifica de manera abundante en plantaciones de *P. radiata*.

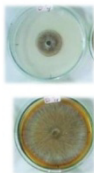
L. quieticolor y *R. roseolus* desempeñan un papel ecológico importante en las plantaciones de pino (Pinto *et al.* 2006) y desde el punto de vista económico *L. quieticolor* le entrega un valor agregado a través de la recolecta de setas. Los sistemas de modelo *in vivo* el cual consiste en inocular hongos en las raíces de plantas de vivero (Wang y Hall 2004) se han mostrado en varios estudios (Bledsoe *et al.* 1982, McAfee y Fortin 1985). Sin embargo, estudios de competencia son escasos en la literatura (Parladé *et al.* 2007 y Hortal *et al.* 2008). Por tanto, es necesario conocer el comportamiento *in vitro* de los hongos ya que se lograría conocer bien la biología de la especie fúngica y con más precisión el comportamiento de éstos al tener interacción intraespecífica o interespecífica dentro de su hábitat al ser inoculados en especies forestales, por lo que resulta interesante evaluar si *L. quieticolor* tiene la capacidad de competir *in vitro* con *Rhizopogon roseolus*, y así mejorar los programas de inoculación de plantas en vivero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las especies fueron cultivadas en medio sólido Melin-Norkrans-modificado (MNM) y Biotina-Aneurina-Ácido fólico (BAF), utilizando sacarosa y glucosa como fuentes de carbono. Placas de Petri (9 cm) conteniendo medio de cultivo fueron inoculadas con un disco de agar micelio de cada especie a 3 cm de distancia uno de otro. En otro ensayo se favoreció el crecimiento de uno de los hongos por 15 días para luego inocular el otro, posible competidor. Todos los ensayos se realizaron en triplicado a 24°C durante 30 días y la velocidad de crecimiento radial (mm.día⁻¹) fue registrada.

Ensayos de competencia y velocidad de crecimiento

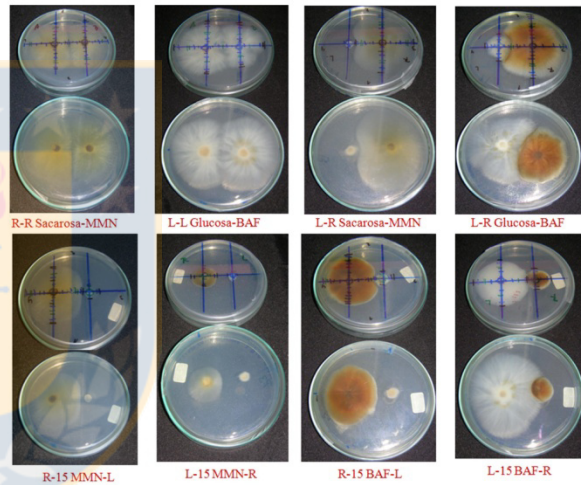
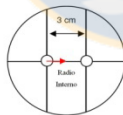
Ensayo	Hongo A	Hongo B	Medio	Replicas
1	<i>Rhizopogon</i>	<i>Rhizopogon</i>	MMN-sacarosa	3 placas
2	<i>Lactarius</i>	<i>Lactarius</i>	BAF-glucosa	3 placas
3	<i>Rhizopogon</i>	<i>Lactarius</i>	MMN-sacarosa	3 placas
4	<i>Rhizopogon</i>	<i>Lactarius</i>	BAF-glucosa	3 placas
5	<i>Rhizopogon</i>	* <i>Lactarius</i>	MMN-sacarosa	3 placas
6	<i>Lactarius</i>	* <i>Rhizopogon</i>	MMN-sacarosa	3 placas
7	<i>Rhizopogon</i>	* <i>Lactarius</i>	BAF-glucosa	3 placas
8	<i>Lactarius</i>	* <i>Rhizopogon</i>	BAF-glucosa	3 placas



L. quieticolor



R. roseolus



Quando se realizan cultivos intraespecíficos (R-R o L-L) no se observan diferencias en las velocidades medias de crecimiento radial, sin embargo, si se enfrentan R-L en MMN-sacarosa y BAF-glucosa *R. roseolus* presenta diferencias significativas en comparación a *L. quieticolor* presentando un notable aumento del crecimiento y una marcada disminución de *L. quieticolor*.

Quando *R. roseolus* crece por 15 días en MMN-sacarosa y BAF-glucosa y posteriormente se inocula *L. quieticolor* la inhibición del crecimiento de *L. quieticolor* es drástica y la velocidad de crecimiento de *R. roseolus* llega a valores similares a los cultivos intraespecíficos (R-R). La situación se revierte cuando inicialmente crece *L. quieticolor* por 15 días y posteriormente se inocula con *R. roseolus* ya que *R. roseolus* disminuye su velocidad de crecimiento de manera significativa en el medio BAF, sin embargo, en medio MMN su velocidad de crecimiento alcanza valores cercanos a los de *L. quieticolor*.

RESULTADOS

Tabla 1: Velocidad media de crecimiento radial en los diferentes tratamientos mono e interespecífico.

Medio	Fuente de Carbono	R		L		R		L*		L		R*	
		R	L	R	L	R	L	R	L	R	L		
MNM	Sacarosa	0,35a	0,33a	nd	nd	0,42a	0,096b	0,33a	0,06b	0,17a	0,17a		
BAF	glucosa	nd	nd	0,28a	0,25a	0,37a	0,16b	0,37a	0,05b	0,19a	0,11b		

* Inoculados 15 días después. Evaluación final 30 días. nd: no determinado

CONCLUSIÓN

El potencial de colonización de los hongos *in vitro* (competencia) se vió afectado dependiendo del tipo de medio y fuente de carbono utilizados.

CITAS BIBLIOGRÁFICAS

Pinto P, Pajares J, Diez J. 2006. *Springer Science* 32:323-334
 Wang Y, Hall IR. 2004. *Can J Bot* 82:1063-1073
 Bledsoe C, Tennyson K, Lopushinsky W. 1982. *Can J Forest Res* 12(3):720-723
 McAfee B, Fortin J. 1985. *Can J Bot* 64:848-852
 Parladé J, Hortal S, Pera J, Galipienso L. 2007. *J Biotechnol* 128:14-23

AÑO 2014

**XXII CONGRESO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGIA ALAM 2014, 4
CONGRESO COLOMBIANO DE MICROBIOLOGÍA 4 CCM 2014, CARTAGENA
DE INDIAS COLOMBIA**

Optimización del crecimiento miceliar de los hongos ectomicorrícicos *Lactarius quieticolor* y *Rhizopogon roseolus* utilizando metodología de superficie de respuesta

Daniel Chávez¹, Ángela Machuca¹, Carolina Aguirre², Götz Palfner³

¹Laboratorio de Biotecnología de Hongos. Departamento de Ciencias y Tecnología Vegetal, Campus Los Ángeles, Universidad de Concepción, Casilla 341, Los Ángeles, Chile

²Laboratorio de Biocatálisis y Biorrecursos, Departamento de Desarrollo Químico, Facultad de Ciencias. Universidad Católica Sma. Concepción. Casilla 297, Concepción, Chile

³Laboratorio de Micología y Micorrizas, Departamento de Botánica. Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas. Universidad de Concepción, Casilla 160, Concepción, Chile.

Resumen

Introducción: La simbiosis micorrícica mejora la salud de las plantas aumentando la protección contra factores biótico, abióticos y mejorando la estructura del suelo. Se ha estudiado además que los hongos ectomicorrícicos *Lactarius quieticolor* y *Rhizopogon roseolus* favorecen el crecimiento de plantas en vivero y ayudan al establecimiento de plantaciones en campo. Actualmente se han desarrollado diferentes tipos de inóculo para la aplicación de estas especies en vivero siendo con la aplicación del inóculo miceliar líquido donde se obtienen los mayores porcentajes de micorrización, sin embargo, los rendimientos de los micelios obtenidos son bajos por cultivo sumergido tradicional.

Objetivo: El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de las variables operacionales pH, temperatura y concentración de glucosa/Manitol (g L^{-1}) para maximizar el crecimiento de los hongos ectomicorrícicos bajo cultivo líquido, para su futuro escalamiento en biorreactor.

Materiales y Métodos: Se utilizó el diseño Box-Behnken (BB) y la metodología de superficie de respuesta (RSM), estableciéndose las condiciones óptimas dentro de la región experimental ensayada.

Resultados: Se consiguió un aumento de la producción de biomasa de 1.2 g L^{-1} a 3.25 g L^{-1} (pH 5.5, temperatura 24°C y 20 g L^{-1} de glucosa) para *L. quieticolor* y de 3.02 a 8.6 g L^{-1} (pH 5.5, temperatura 28°C y 30 g L^{-1} de manitol) para *R. roseolus*, considerando como control una condición de cultivo de pH 5.5, temperatura 24°C y 10 g L^{-1} de glucosa para ambos hongos ectomicorrícicos.

Conclusiones: Estos resultados permitirán ser aplicadas en ensayos de producción de biomasa fúngica en biorreactor y posteriores inoculaciones de plantas de *P. radiata* en vivero.

Palabras claves: Biomasa, Diseño de Box- Behnken, Fuente de Carbono, Cinética.

Financiamiento: Beca Doctoral Conicyt 21110038

MODALIDAD: POSTER



Optimización de la producción de biomasa por los hongos ectomicorrízicos *Lactarius quieticolor* y *Rhizopogon roseolus* utilizando metodología de superficie de respuesta.

Chávez D.¹, Machuca A.¹, Aguirre C.², Palfner G.³

danielchavez@udec.cl

¹Laboratorio de Biotecnología de Hongos, Departamento de Ciencia y Tecnología Vegetal, Campus Los Angeles, Universidad de Concepción.
²Laboratorio de biocatálisis y biorrecursos, Environmental Chemistry Department, Faculty of Sciences, Universidad Católica Sma. Concepción, Chile.
³Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción.



ABSTRACT: Different types of inoculum have been developed for the application of the ectomycorrhizal fungi *Lactarius quieticolor* and *Rhizopogon roseolus* in nursery, and of these the highest percentages of mycorrhization have been obtained with liquid mycelial inoculum. However, the mycelial biomass yields produced with these fungi through traditional submerged culture are generally low. Therefore, the aim of this study was to optimize the variables pH, temperature and carbon source concentration required for maximum biomass production by the ectomycorrhizal fungi *Lactarius quieticolor* and *Rhizopogon roseolus* in liquid culture medium. The Box-Behnken (BB) design and response surface methodology were used to establish the optimum conditions in the experimental area, with an increase in biomass production of 1.2 g L⁻¹ for 3.25 g L⁻¹ for *L. quieticolor* (pH 5.5, 24°C and 20 g L⁻¹ glucose) and 3.02 for 8.6 g L⁻¹ for *R. roseolus* (pH 5.5, 28°C and 30 g L⁻¹ manitol) compared to a control culture (pH 5.5, 24°C and 10 g L⁻¹ glucose) for both fungi. This optimization is the first step needed to scale biomass production by *L. quieticolor* and *R. roseolus* in bioreactors. Keywords: Biomass, Box- Behnken design, Carbon source, kinetics.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Selección de medio de cultivo y fuente de carbono



2. Cinética de crecimiento

84 matraces Erlenmeyer de 100 mL (42 para cada especie fúngica y 21 por condición de cultivo), conteniendo 40 mL de medio de cultivo, fueron inoculados con 2 discos de agar micelial (5 mm) de la especie fúngica correspondiente. Cada 5 días la biomasa micelial fue cosechada y recuperada por filtración en papel filtro y el peso seco fue determinado a 60°C durante 48 h. Todos los ensayos fueron realizados en triplicado.

3. Optimización

Diseño experimental

Para la optimización se utilizó la metodología de superficie de respuesta MSR [1, 2], que permite predecir la respuesta del sistema respecto a cada uno de los factores considerados dentro de la región experimental.

- El proceso de optimización**
- Realización de los experimentos diseñados estadísticamente
 - Estimación de los coeficientes de un modelo matemático y predicción de la respuesta.
 - Comprobación adecuada del modelo

La respuesta predicha (Y) por el modelo puede ser expresada en forma general a partir de la ecuación (1).

$$Y = B_0 + \sum_{i=1}^k B_i X_i + \sum_{i,j=1}^k B_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

En el presente estudio k toma el valor de 3 debido a que hay tres variables involucradas (pH, temperatura y concentración de fuente de carbono) por lo que la ecuación (1) se convierte en:

$$Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_3 + B_{12} X_1 X_2 + B_{13} X_1 X_3 + B_{23} X_2 X_3 + B_{11} X_1^2 + B_{22} X_2^2 + B_{33} X_3^2 \quad (2)$$

Donde, X_1, X_2 y X_3 son las variables de entrada pH, temperatura y concentración de fuente de carbono, respectivamente; B_0 es una constante; B_1, B_2 y B_3 coeficientes lineales; B_{12}, B_{13} y B_{23} coeficientes de producto cruzado o interacción; B_{11}, B_{22} y B_{33} son coeficientes cuadráticos.

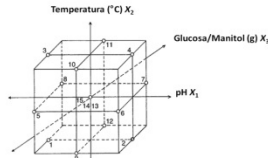


Figura 1: Niveles bajo, medio y alto de las tres variables bajo optimización [3] (Temperatura, pH y concentración de fuente de carbono)

Table 1 Diseño experimental de Box-Behnken con 3 factores.

Ensayo N°	pH	Temperatura (°C)	Glucosa/Manitol (g L ⁻¹)
1	3.5(-1)	20(-1)	30(0)
2	5.5(+1)	20(-1)	30(0)
3	3.5(-1)	28(+1)	30(0)
4	5.5(+1)	28(+1)	30(0)
5	3.5(-1)	24(0)	20(-1)
6	5.5(+1)	24(0)	20(-1)
7	3.5(-1)	24(0)	40(+1)
8	5.5(+1)	24(0)	40(+1)
9	4.5(0)	20(-1)	20(-1)
10	4.5(0)	28(+1)	20(-1)
11	4.5(0)	20(-1)	40(+1)
12	4.5(0)	28(+1)	40(+1)
13	4.5(0)	24(0)	30(0)
14	4.5(0)	24(0)	30(0)
15	4.5(0)	24(0)	30(0)

15 tratamientos con 3 repeticiones cada uno



RESULTADOS

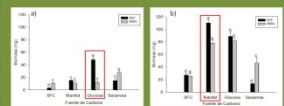


Figura 2: Selección de medio de cultivo y fuente de carbono para a) *L. quieticolor* y b) *R. roseolus*

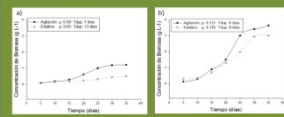


Figura 3: Cinética de crecimiento a pH 5.5 por (a) *L. quieticolor* y (b) *R. roseolus* en agitación y estático. μ : Velocidad específica de crecimiento 1/di; Tiempo de duplicación celular

Table 2 Valores de biomasa experimental y predicho expresados en g L⁻¹.

Ensayo N°	<i>L. quieticolor</i>		<i>R. roseolus</i>	
	Actual	Predicho	Actual	Predicho
1	1.21	1.14	5.86	6.18
2	2.79	2.88	6.66	7.03
3	0.90	0.81	5.97	5.61
4	1.80	1.67	8.60	8.29
5	2.01	1.66	4.41	4.27
6	3.25	2.94	7.08	6.89
7	1.58	1.90	5.90	6.09
8	2.67	3.02	6.86	7.00
9	2.37	2.59	6.08	5.92
10	1.30	1.73	6.69	7.20
11	3.20	2.76	8.33	7.82
12	2.10	1.88	7.97	7.23
13	2.27	2.29	6.65	6.72
14	2.27	2.29	6.60	6.72
15	2.32	2.29	6.92	6.72

Table 3 Coeficientes del modelo

Variables	Biomasa	
	<i>L. quieticolor</i>	<i>R. roseolus</i>
B_0	2.290	6.720
B_1	0.600	0.883
B_2	-0.435	0.173
B_3	0.080	0.485
B_{11}	-0.240	-0.464
B_{12}	-0.375	0.317
B_{13}	0.328	-0.195
B_{22}	-0.170	-0.428
B_{23}	-0.038	-0.427
B_{33}	-0.066	-0.468
R^2	0.73	0.74
R^2_{adj}	0.88	0.85

Table 4 Análisis de regresión para la producción de biomasa.

Modelo	A) <i>L. quieticolor</i> y B) <i>R. roseolus</i> .			
	Suma de Cuadrado	Grado de Libertad	Media Cuadrática	Valor F
(A)	17.3	9	1.920	21.2
(B)	38.62	9	4.291	21.8
Residual	3.170	35	0.090	
Falta de ajuste	2.88	3	0.963	10.76
Error	0.28	32	0.008	3.41
Correlación	3.41	32	0.107	10.69
total	20.276	44		
	45.48	44		

$$Y_1 = 2.29 + 0.600X_1 - 0.435X_2 + 0.080X_3 - 0.240X_1^2 - 0.375X_2^2 + 0.328X_3^2 - 0.170X_1X_2 - 0.038X_1X_3 - 0.066X_2X_3$$

$$Y_2 = 6.72 + 0.883X_1 + 0.173X_2 + 0.485X_3 - 0.464X_1^2 + 0.517X_2^2 - 0.195X_3^2 + 0.458X_1X_2 - 0.427X_1X_3 - 0.468X_2X_3$$

Y_1 : Ecuación para *L. quieticolor* y Y_2 : Ecuación para *R. roseolus*.

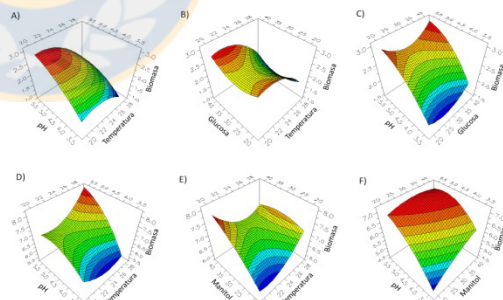


Figura 4: Curvas de superficie de respuesta de la biomasa micelial desde *L. quieticolor* (A-C) y *R. roseolus* (D-F). Se muestra la interacción entre (A y D) pH y Temperatura, (B-E) Fuente de carbono y temperatura, y (C y F) pH y fuente de carbono.

CONCLUSIONES

- A través de la Metodología de Superficie de Respuesta fue posible optimizar la producción de biomasa por ambos hongos en medio de cultivo líquido y bajo condiciones de agitación (120 rpm).
- La mayor producción de biomasa por *R. roseolus* se obtuvo en medio BAF, con 30 g L⁻¹ de manitol, a pH 5.5 y 28 °C, y para *L. quieticolor* en medio BAF, con 20 g L⁻¹ de glucosa, a pH 5.5 y 24 °C.
- Estas condiciones optimizadas serán utilizadas en una etapa siguiente de cultivo de los hongos en biorreactores, con el fin de obtener grandes cantidades de biomasa de *R. roseolus* y *L. quieticolor* para la micorrización controlada de plantas de *Pinus radiata* in vivo.

Referencias

- [1]. Chacín, F. (2000) Diseño y análisis de experimentos para generar superficies de respuesta, Maracay: Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Venezuela.
- [2]. Montgomery, D.C. (2002) Diseño y Análisis de Experimentos. 2nd ed., Limusa, Wiley, México.
- [3]. Srinivasan, M., Natarajan, K., & Nagajaran, G. (2000) Bioprocess Eng. 22, 267-273.

Agradecimientos:



Beca Doctoral. Folio: 21110038.
Sr. Daniel Chávez Matamala

