

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
CAMPUS LOS ÁNGELES
ESCUELA DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA VEGETAL**



**EFECTO DEL PH Y MEDIO DE CULTIVO EN EL CRECIMIENTO *IN VITRO* DE
Tuber borchii Vittad. AISLADO DE ESTRUCTURAS RADICULARES DE
Quercus ilex.**

**MEMORIA DE TÍTULO PARA OPTAR AL
TÍTULO DE INGENIERO EN
BIOTECNOLOGÍA VEGETAL.**

ROCIO JAZMÍN CARRASCO FERNÁNDEZ.

**LOS ÁNGELES -CHILE.
2021.**

**“Efecto del pH y medio de cultivo en el crecimiento *in vitro* de *Tuber borchii*
Vittad aislado de estructuras radiculares de *Quercus ilex*”**

Alumna

**Rocío Carrasco Fernández
Ingeniero en Biotecnología Vegetal**

Profesor Guía

**Dr. Guillermo Pereira Cansino
Profesor Asociado
Ingeniero Forestal**

Evaluador Externo

**Dr. Daniel Chávez Matamala
Profesor Asistente
Ingeniero Forestal**

Evaluador Externo

**Dr. Cristian Atala Bianchi
Profesor Asistente
Biólogo**

Jefe de Carrera

**Pedro Quiroz Hernández
Profesor Instructor
Ingeniero (E) Forestal**

Director de Departamento

**M.Sc. Pablo Novoa Barra
Profesor Asistente
Ingeniero (E) Forestal**



AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco a la Universidad de Concepción por haberme aceptado y permitido ser parte de ella; por abrirme las puertas al mundo de la ciencia para lograr estudiar mi carrera. También agradezco a todos los docentes que brindaron sus conocimientos, apoyo y sabiduría a lo largo de mis estudios universitarios.

Agradezco también a mi Profesor Guía de Tesis por brindarme la oportunidad de recurrir a sus capacidades y conocimientos científicos, así como también haber tenido toda la paciencia del mundo para guiarme durante el desarrollo de la tesis.

Para finalizar agradezco a todos los que me dieron su apoyo y ánimo durante mi formación académica, especialmente a mi queridísima amiga Susana Araya.



ÍNDICE DE CONTENIDOS.

CAPÍTULOS	PÁGINA
I. RESUMEN/ ABSTRATC.....	8
II. INTRODUCCIÓN.....	9
III. MARCO TEÓRICO.....	11
3.1 Aspectos generales de la Trufa blanquecina (<i>T. borchii</i> Vittad).....	11
3.2 Descripción morfológica.....	12
3.3 Ecología de <i>T. borchii</i> Vittad.....	14
3.4 Factores que pueden afectar el desarrollo micelial de <i>T. borchii</i> Vittad.....	15
3.5 Perspectivas futuras.....	15
IV. HIPÓTESIS.....	19
V. OBJETIVOS.....	19
5.1 Objetivo general.....	19
5.2 Objetivos específicos.....	19
VI. METODOLOGÍA.....	20
6.1 Aislamiento del micelio.....	21
6.2 Caracterización macroscópica y microscópica de micelio de cultivos puros y morfoanatomía de la ectomicorriza.....	21
6.3 Ensayo: Efecto del pH y medio de cultivo en el crecimiento micelial de <i>Tuber borchii</i> Vittad.....	22
a. Preparación de soluciones Buffer.....	22
b. Medios de cultivo.....	23
c. Establecimiento del ensayo.....	24
d. Cuantificación del crecimiento.....	26
e. Análisis estadístico.....	24
VII. RESULTADOS.....	27
7.1 Caracterización macroscópica y microscópica de micelio de cultivos puros y morfoanatomía de la ectomicorriza.....	27
7.2.1 Ensayo: Velocidad media de crecimiento radial.....	30
7.2.2 Ensayo: Área media de crecimiento.....	31
7.2.3 Ensayo: .Biomasa media.....	32
VIII. DISCUSIÓN.....	33
8.1 Caracterización macroscópica y microscópica de micelio de cultivos puros y morfoanatomía de la ectomicorriza.....	33

	8.2 Ensayo: Efecto del pH y medio de cultivo en el crecimiento micelar de <i>Tuber borchii</i> Vittad.....	35
IX.	CONCLUSIÓN.....	37
X.	BIBLIOGRAFÍA.....	38
XI.	ANEXO.....	45



ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1.....	13
Figura 2.....	13
Figura 3.....	14
Figura 4.....	20
Figura 5.....	26
Figura 6.....	28
Figura 7.....	29
Figura 8.....	30
Figura 9.....	31
Figura 10.....	32
Figura 11.....	45
Figura 12.....	45

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1.....	24
Tabla 2.....	29



LISTA DE ABREVIATURAS.

ECM: Ectomicorriza.

Hongo-ECM: Hongo ectomicorrícico.

BAF: Biotina Aneurina Ácido Fólico-Agar.

MNM: Melin Norkrans Modificado.



I. RESUMEN.

Tuber borchii Vittad, la trufa blanquilla, es un hongo hipogeo comestible, cuya ecología y fisiología es relativamente poco conocida. Esta trufa se puede desarrollar en suelos calcáreos, aunque también se le ha encontrado creciendo en suelos ácidos. En el presente trabajo se evaluó el efecto del pH y el medio de cultivo en el crecimiento micelial de colonias activas de esta trufa bajo condiciones *in vitro*. Para ello, dos medios de cultivo fueron empleados, BAF (biotina-aneurina-ácido fólico agar) y MNM (Melin Norkrans Modificado), con cinco niveles de pH (6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0). La cepa utilizada se aisló de estructuras radiculares de plántulas de *Quercus ilex* (previamente micorrizadas con *Tuber borchii*). Los resultados indican que el pH del medio tiene un efecto significativo en el crecimiento micelial, independiente del medio de cultivo empleado. El mayor crecimiento se obtuvo en el medio de cultivo BAF a pH 6.5 y 7.0. Estos resultados pueden contribuir a una futura domesticación y producción de trufa blanquilla en Chile.

I. ABSTRACT.

Tuber borchii Vittad, the white truffle, is an edible hypogeous mushroom whose ecology and physiology is relatively poorly understood. This truffle can grow in calcareous soils, although it has also been found growing in acid soils. In the present work, the effect that pH and the culture medium may have on the mycelial growth of active colonies of this truffle under *in vitro* conditions is evaluated. For this, two culture media were used, BAF (biotin-aneurin-folic acid agar) and MMN (Modified Melin and Norkrans), with five pH levels (6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0). The strain used was isolated from root structures of *Quercus ilex* seedlings (previously mycorrhized with *Tuber borchii*). The results indicate that the pH of the medium has a significant effect on mycelial growth, independent of the culture medium used. The highest growth was obtained in the BAF culture medium at pH 6.5 and 7.0. These results may contribute to a future domestication and production of white truffle in Chile.

II. INTRODUCCIÓN.

Las especies del género *Tuber* son hongos ECM ascomicetos que forman asociaciones ECM con variedades de géneros de árboles, como: *Abies*, *Alnus*, *Carpinus*, *Castanea*, *Corylus*, *Picea*, *Pinus*, *Quercus* y *Tilia* (Nakano et al. 2020). En todo el mundo, este género contiene más de 86 especies (Bonito y Smith 2016; Nakano et al. 2020). Sus cuerpos fructíferos son conocidos como “trufas”; algunas de ellas son comestibles y poseen un gran valor en el mercado, tales como: *T. magnatum* (trufa blanca), *T. melanosporum* (trufa negra del Périgord), *T. aestivum* (trufa de verano) y *T. borchii* (trufa bianchetto) (Brown y Zambonelli 2008).

El cultivo artificial de trufas tradicionalmente se realiza mediante el establecimiento de plántulas inoculadas con la esporada del cuerpo fructífero de la trufa de interés; sin embargo, el uso reciente de plántulas inoculadas con micelio de cultivo puro posee ventajas sobre la primera, como por ejemplo, la producción constante de plántulas micorrizadas de calidad uniforme, la colonización más rápida en las plantas huésped; y además permite la selección de cepas adecuadas para apareamiento compatible, la combinación de asociaciones a huéspedes y adaptación a condiciones ecológicas (Zambonelli et al. 2015, Leonardi et al. 2017, Nakano et al. 2020)

Tuber borchii Vittad es una especie de trufa comestible blanquecina que establece simbiosis ectomicorrícica con árboles y arbustos. Este hongo se encuentra principalmente en Europa y también se cultiva fuera de este continente. Crece en climas Templado, frío y mediterráneo. Se encuentra en suelos de características subalcalina y ácido (Lancellotti y Franceschini, 2013, Murat et al. 2018). Posee importancia ecológica debido a que muchos árboles viven en simbiosis con la especie, ayudando al funcionamiento de los ecosistemas (Zambonelli 2016). *T. borchii* o también conocida como “Bianchetto” se encuentra dentro del grupo de “trufas verdaderas” debido a su fructificación comestible. Es de la división ascomycota y es un hongo hipogeo. Al igual que las otras trufas comestibles, se encuentra comúnmente en suelos calcáreos con pH entre 7 y 8; sin embargo, también se puede encontrar en suelos de pH más ácido (Gardin 2005, Jaillard et al. 2014).

De acuerdo a estudios realizados, el pH del suelo es uno de los factores más importantes para el desarrollo y crecimiento micelial, formación de ECM y la producción de trufas (Pereira et al. 2007, Cepeda 2010, Nakano et al. 2020). Posee influencia en el tipo de organismo que se va a desarrollar sobre el suelo; y además es un factor limitante para la actividad de muchos microorganismos (Ramos y Zúñiga 2008, Yun et al. 2016). Por un mismo lado, el hongo micorrízico *T. borchii* es capaz de soportar suelos más ácidos en comparación a otras especies de trufas (Gardin 2005, 2016, Murat et al. 2018, Li et al. 2019).

En la actualidad se han realizado investigaciones para determinar las condiciones óptimas de requerimientos nutricionales y condiciones de crecimiento en el cultivo micelial de trufas; no obstante, falta evidencia clara y específica que indique el nivel de pH ideal para el cultivo micelial de *T. borchii* (Kamal 2011, Hu et al. 2013, Nadim et al. 2016, Arenas et al. 2018, Nakano et al. 2020).

Otro factor que se debe considerar en la producción de inóculo micelial de hongos ectomicorrízicos es el medio de cultivo, debido a que en ambientes controlados este factor puede ser determinante en la heterogeneidad o escaso rendimiento de los cultivos (Santelices et al. 2012, Gonzáles et al. 2015). Al respecto, los medios de cultivo más utilizados en hongos ectomicorrízicos son BAF (biotina-aneurina- ácido fólico) y MNM (Melin-Norkrans modificado). Estos medios han sido probados con distintas especies de hongos ECM y se han obtenido diversos resultados (Pereira et al. 2007, Chávez et al. 2009, Hernández et al. 2014).

La presente investigación busca dilucidar el efecto que pueden tener los medios del cultivo y su valor de pH sobre el crecimiento *in vitro* de *T. borchii*.

III. MARCO TEÓRICO.

3.1. Aspectos generales de la Trufa blanquecina (*T. borchii* Vittad).

Tuber borchii Vittad es una trufa que se clasifica taxonómicamente en el Reino Fungi, División *Eumycota*, Filo *Ascomycota*, Clase *Pezizomycetes*, Familia *Tuberaceae*, Género *Tuber*, y Especie *Tuber borchii* Vittad. Además de ésta, existe una gran variedad de especies de Género *Tuber*, las que en su conjunto se denominan trufas, entre las cuales destacan: *Tuber melanosporum* Vittadini (trufa negra de Périgord), *Tuber brumale* Vittadini (trufa negra de otoño), *Tuber aestivum* Vittadini (trufa negra de verano), entre otras (Zambonelli, 2016).

Existen cerca de 70 especies de trufas, sin embargo, solo algunas poseen interés económico. *T. borchii* es una trufa con gran potencial culinario debido a sus propiedades organolépticas, muy similares a la preciada trufa blanca (*Tuber magnatum* Vittad) (Zambonelli et al. 2015, Morcillo et al., 2017). Se ha estado desarrollando en países como Italia, Nueva Zelanda, Australia y recientemente en Chile (Zambonelli et al., 2016) y tras una serie de investigaciones se ha podido constatar que posee afinidad con especies arbóreas como el avellano (*Corylus avellana*), encino (*Quercus ilex*), alcornoque (*Quercus suber*) y pino piñonero (*Pinus pinea*) (Morcillo et al. 2017).

Tuber borchii, a diferencia de otras trufas de interés económico, posee una elevada plasticidad ecológica, siendo éste uno de los puntos interesantes para su cultivo (Zambonelli et al., 2002, Azul et al. 2014, Murat et al. 2018). Esta trufa se desarrolla en climas templado, frío y mediterráneo, con pluviometrías entre 600 a 1.600 mm; su fructificación se produce en otoño. Se puede desarrollar de manera óptima en un rango de pH de 6 a 8, en suelos calizos-arenosos típicos de zonas litorales (Zambonelli et al., 2002, Gardin, 2005).

3.2 Descripción morfológica.

El hongo *T. borchii* está formado por el micelio, cuerpo fructífero o carpóforo y las ascas; los cuales contienen en su interior de dos a tres esporas de color ocre marrón, con una red regular y diminuta. El peridio de la trufa (o corteza) es liso, de color claro, variable de blanco ocre a rojizo. Su cuerpo fructífero presenta forma tuberiforme o subglobosa, con un rango de dimensiones que puede variar desde el tamaño de una avellana al de una naranja. La gleba, el interior del carpóforo, es donde se encuentran las esporas las cuales se encuentran en cantidad de dos esporas por asca; posee color marrón, con venas blancas anchas y pequeñas (Figura 1) (Gardin, 2005).

Las estructuras micorrícicas pueden ser observadas en los sistemas radiculares. Ellas son de color marrón rojizo y posee ramificaciones cruciformes en un patrón monopoidal-pinado (Figura 2) (Chu-Chou y Grace, 1983, Zambonelli et al., 2002, Benucci et al., 2011). Las puntas son rectas, simples y cilíndricas o en forma de maza, con extremos redondeados. El color de las ECM puede variar considerablemente a medida que se desarrolla; de amarillo claro con tonos gris pálido en las más jóvenes, a ocre oscuro o marrón en las más viejas. Poseen una longitud de $1,68 \pm 0,07$ mm y $0,23 \pm 0,01$ mm de diámetro (Benucci et al., 2011). La superficie es brillante con espinas cortas más frecuentes en las partes distales; las células corticales son visibles. Las micorrizas de esta especie de trufa presentan un manto pseudoparenquimático en forma de puzle del que emanan cistidios (Miguel y Sáez, 2005). Las células epidermoides del manto poseen un área media de $113,67 \pm 4,37$ μm^2 y perímetro medio de $55,96 \pm 1,27$ μm (Lancellotti et al., 2014); éstas células presentan formas variables de elipsoide e isodiamétrico a irregular rectangular y alargado (Benucci et al., 2011). Los cistidios del manto son rectos, hialinos, de paredes delgadas con puntas redondeadas; con $82,15 \pm 3,75$ μm de largo, y $3,71 \pm 0,12$ - μm de ancho en la base (Figura 3) (Chu-Chou and Grace, 1983).

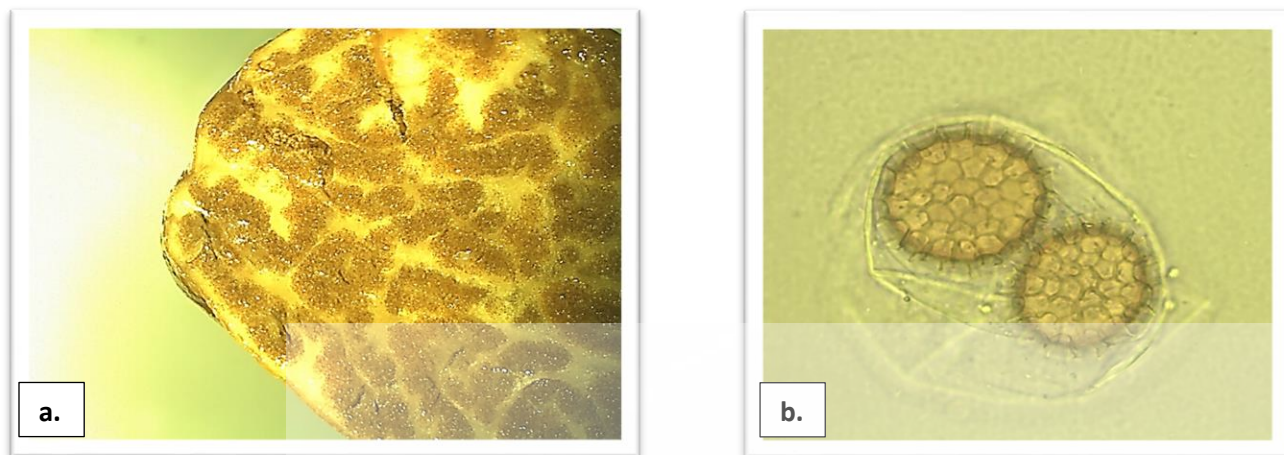


Figura 1: **a.** Ascocarpo de *T. borchii* Vittad: frecuentemente irregular y globoso; superficie lisa y de color marrón ocre. **b.** Asca con 2 esporas de *T. borchii*: elipsoides; amarillo claro a marrón claro; superficie reticulada estrecha; tamaño de malla muy constante para cada espora.

(Fuente: Laboratorio de Biotecnología de Hongos, Universidad de Concepción, Campus Los Ángeles).



Figura 2: Características anatómicas y morfológicas de la ectomicorriza de *T. borchii* Vittad junto con *Carya illinoensis*. Se muestra la ECM abundante, simple y ramificada.

(Fuente: Benucci *et al.*, 2011).

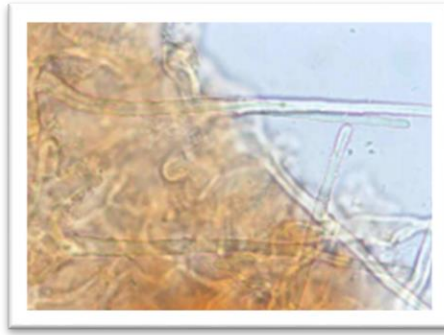


Figura 3: Aspecto de los cistidios de *T. borchii* Vittad sobre manto pseudoparenquimatoso (Fuente: Clavería y De Miguel 2005).

3.3. Ecología de *T. borchii* Vittad.

Tuber borchii o Bianchetto es una especie que se encuentra ampliamente distribuida por Italia, Portugal, España y Nueva Zelanda (Hall et al., 2007). Su distribución natural es de Reino Unido a Hungría, y desde Polonia a Sicilia (Murat et al., 2018). Sus principales hospedadores son robles de hoja perenne, como por ejemplo: alcornoque (*Quercus suber* L.), encino (*Quercus ilex* L.), kermes (*Quercus coccifera* L.), pino piñonero (*Pinus pinea* L.), pino valsaín (*Pinus sylvestris* L.) y pino marítimo (*Pinus pinaster* Ait.). También se pueden encontrar asociaciones con otras especies como: robles (*Quercus cerris* L., *Quercus pubescens* Willd., *Quercus robur* L.), alerce (*Larix* spp) y haya (*Fagus* spp). Esta especie de trufa, además, se encuentra de preferencia en suelos tipo calcáreo arenoso, con drenaje libre, pH alrededor de 6 a 8 (Zambonelli et al., 2002 Zambonelli et al., 2018). Otra característica destacable, es que esta trufa posee mayor plasticidad ecológica que otras especies de trufa económicamente importantes; por lo tanto, puede existir una mayor posibilidad de sitios para el cultivo exitoso de esta trufa (Gardin, 2005, Nocentini y Mazzei 2006).

3.3.1. Principal ambiente de *T. borchii* Vittad.

Según Gardin (2005), el entorno más productivo para el crecimiento de ésta especie, es en bosques de pinos costeros, situados en cordones de dunas marítimas y de arena de origen reciente. *T. borchii* se puede encontrar asociado a *Pinus pinea* L. o *Pinus pinaster* Ait hacia el mar o en áreas de nueva colonización por vegetación natural en las primeras dunas arenosas. En presencia de *Pinus pinea* L, se suele encontrar vegetación arbustiva y herbácea, con un grado de cobertura medio. En éste entorno, los carpóforos suelen estar entre 30 a 35 cm de profundidad en suelos calizos. Por otro lado, los incendios no excesivamente destructivos pueden aumentar la producción de *T. borchii*, ya que dan las condiciones edáficas y ecológicas más favorables como: la elevación de pH del suelo y la disminución de cobertura de arbustos y árboles. Otro factor relevante es la cobertura arbórea, la cual no debe ser demasiado densa; en efecto, en ambientes con más baja cobertura arbórea y condiciones adecuadas, los carpóforos de *T. borchii* adquieren un mayor tamaño y son más abundantes (Zambonelli et al., 2002, Gardin, 2005, Hall et al., 2007).

3.4. Factores que pueden afectar el desarrollo micelial de *T. borchii* Vittad.

3.4.1. El pH.

Tuber borchii es un hongo hipogeo que posee un ciclo de vida complejo, en el cual el micelio establece simbiosis con las raíces de sus hospedadores. Existen muchos factores abióticos (pH, composición del suelo, precipitación y temperatura a nivel de suelo) y bióticos (hongos, bacterias, meso-fauna, planta hospedante) que pueden influenciar su ciclo de vida, especialmente la formación de micelio, debido a que es la etapa inicial del ciclo de vida de la trufa (Matamala 2010, Nadim et al. 2016, Leonardi et al. 2019).

En los suelos, el pH es una propiedad química de mucha importancia porque indica que tan ácida o alcalina es la solución de éste, que es de donde las raíces y los microorganismos del suelo toman sus nutrientes. Está fuertemente relacionado con la disponibilidad de una amplia gama de nutrientes, como P, K, Ca, Mg, Zn, Mn, Cu y Fe

(William 2012, Osorio 2012). Para el cultivo de trufas, existen diferentes supuestos niveles de pH ideales específicos para cada especie. Generalmente necesitan suelo calcáreo con rangos de pH entre 6 a 8; no obstante, *T. borchii* también es capaz de soportar suelos ligeramente más ácidos en comparación a otras especies de trufas (Gardin 2005, Nadim et al. 2016, Murat et al. 2018, Li et al. 2019). Actualmente se han realizado muchas investigaciones para determinar las condiciones óptimas de requerimientos nutricionales y condiciones de crecimiento en el cultivo micelial de trufas (Kamal 2011, Hu et al. 2013, Nadim et al. 2016, Arenas et al. 2018, Nakano et al. 2020); sin embargo, falta evidencia clara y específica que indique el nivel de pH ideal para el cultivo micelial de *T. borchii*. Al respecto, investigaciones acerca del cultivo micelial de trufas, indican que éstas poseen la capacidad de cambiar el pH del medio a su favor cuando es ajustado de manera artificial (Nadim et al. 2016, Arenas et al. 2018); por lo que es necesario utilizar soluciones buffer para estabilizar el pH de los medios, y de ésta manera identificar el rango real que favorece el crecimiento micelial de *T. borchii*.

3.4.2. Medio de cultivo.

En la propagación micelial, el crecimiento de las cepas de hongos ectomicorrícicos es afectado por las condiciones de cultivo, principalmente el pH y composición de los medios. El estudio del comportamiento y requerimientos de estos microorganismos en cultivo puro, constituye la base de la producción de inóculo para usos posteriores (Hatakeyama y Ohmasa, 2004, Díaz, Flores y Honrubia, 2009, Hernández, Carrazana y Rosas, 2014).

El factor tipo de “medio de cultivo” puede ser determinante en el cultivo de micelios, debido a que los hongos requieren como fuente de energía y carbono, compuestos orgánicos preformados (Blanca y Rodríguez 2006). Las moléculas simples como monosacáridos, aminoácidos y ácidos orgánicos, se obtienen desde la membrana celular; las moléculas más complejas deben degradarse antes de ser absorbidas por la membrana, por medio de enzimas extracelulares (enzimas hidrolíticas) (Walker y White 2018). Entre las diferentes fuentes de carbón que utilizan los hongos se encuentran la lignina, celulosa, pectina, almidón, lípidos, gelatina,

urea y aminoácidos (Blanca y Rodríguez 2006). Por lo tanto, los componentes de los medios de cultivo afectan el desarrollo y crecimiento micelial de las ectomicorrizas. Acorde a esto, se sabe que los hongos ECM poseen poca habilidad para descomponer polisacáridos; glucosa, monosacáridos y disacáridos, y posteriormente pueden utilizarse para el crecimiento (Hernández et al.,2014).

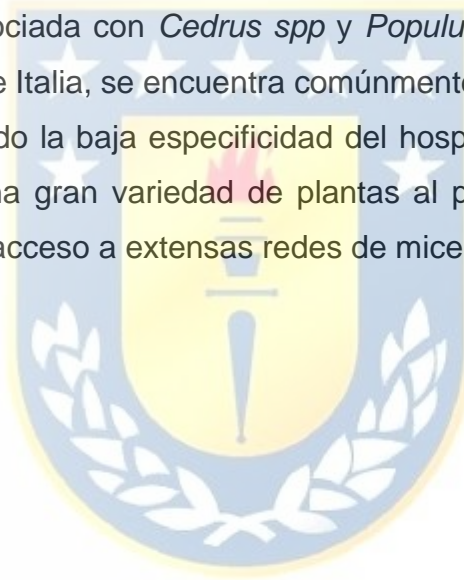
Los medios de cultivo más utilizados en hongos ectomicorrícicos, ya sea para el aislamiento (medios sólidos) o para la producción de micelio (medios líquidos), son el BAF (biotina-aneurina- ácido fólico) y MNM (Melin-Norkrans modificado). Estos medios han sido probados con distintas especies de hongos ECM y se han obtenido diversos resultados respecto al éxito de crecimiento y desarrollo del micelio (Blanca y Rodríguez 2006, Pereira et al. 2007, Chávez et al. 2009, Hernández et al. 2014). La principal diferencia que radica entre los medios MMN y BAF es la concentración de glucosa como fuente principal de carbono, seguido de una serie de concentraciones de diversos micro y macronutrientes, siendo mucho mayor en el medio de cultivo BAF (Rodríguez, 2006). Al respecto, no hay investigaciones sobre las diferentes variables de respuestas en el aislamiento de *T. borchii* en ambos medios de cultivo.

3.5 Perspectivas futuras.

Un enfoque innovador para el cultivo de trufas sería el uso de inóculo micelial seleccionado, adaptado a condiciones climáticas, edáficas y huéspedes específicos (Zambonelli et al. 2015). Las mayores limitaciones de la aplicación comercial de esta técnica es la dificultad de aislar y mantener el micelio en cultivo puro; así como producir biomasa micelial a gran escala (lotti et al., 2002; lotti et al., 2012). Además, el subcultivo prolongado en condiciones axénicas en ausencia de raíces hospedantes da como resultado la pérdida de viabilidad. Se deben desarrollar protocolos de criopreservación adecuados para mantener la viabilidad del cultivo (lotti et al., 2012). En el pasado, otro limitante en el uso de inoculantes miceliales era la falta de conocimiento sobre la sexualidad de la trufa, lo que resulta en la producción de plantas incapaces de producir fructificaciones del hongo (trufas). Esto se debe a que los cultivos puros de micelio se

aíslan de la gleba de los cuerpos fructíferos y por lo tanto, sólo llevan el tipo de apareamiento materno (Zambonelli et al. 2015).

Las plantaciones de *T. borchii* pueden considerarse forestaciones de usos múltiples con producción micológica (trufa). Este aspecto puede hacer que su cultivo sea económicamente sustentable y represente una alternativa prometedora para las tierras marginales y en particular, para las zonas mediterráneas y no mediterráneas, inadecuadas para el cultivo de las trufas primordiales (*T. melanosporum* y *T. magnatum*) (Zambonelli et al. 2018). *T. borchii* establece simbiosis con una gran variedad de especies, habitualmente forma ECM con especies de *Pinaceae* y *Fagaceae*, pero también se ha encontrado asociada con *Cedrus spp* y *Populus spp*. (Zambonelli et al. 2002). En las zonas litorales de Italia, se encuentra comúnmente asociada a *P. pinea*, *P. pinaster* y *Q. ilex*. Considerando la baja especificidad del hospedador de *T. borchii*, su cultivo podría beneficiar a una gran variedad de plantas al proporcionar nutrientes y recursos hídricos a través del acceso a extensas redes de micelios (Murat et al. 2018).



IV. HIPOTESIS.

El crecimiento micelial de *T. borchii* Vittad bajo condiciones *in vitro* es afectado por los medios de cultivo probados (MMN y BAF) y el manejo de pH empleado (6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0).

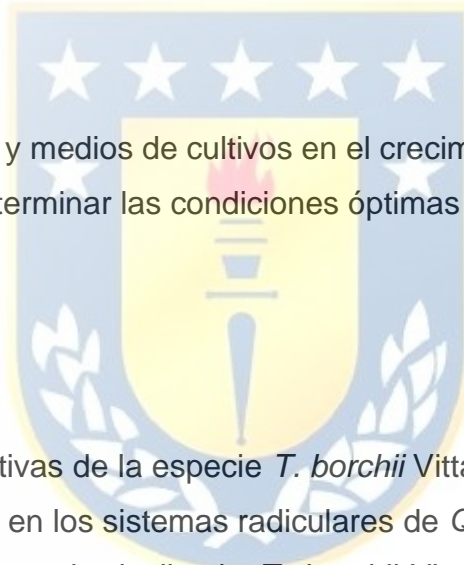
V. OBJETIVOS.

5.1. Objetivo general.

Evaluar la influencia del pH y medios de cultivos en el crecimiento *in vitro* de colonias de *T. borchii* Vittad para determinar las condiciones óptimas de cultivo de esta trufa.

5.2. Objetivos específicos.

1. Aislar colonias vegetativas de la especie *T. borchii* Vittad a partir de estructuras micorrícicas formadas en los sistemas radiculares de *Quercus ilex*.
2. Identificar y caracterizar el micelio de *T. borchii* Vittad comparándola con la literatura.
3. Evaluar influencia de pH y medio de cultivo en el crecimiento *in vitro* de *T. borchii* Vittad.



VI. METODOLOGÍA.

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología en Hongos, Campus Los Ángeles, Universidad de Concepción, dividiéndose las actividades en dos etapas, las que se describen en el siguiente diagrama de flujo (Figura 4).

Diagrama de flujo del estudio.

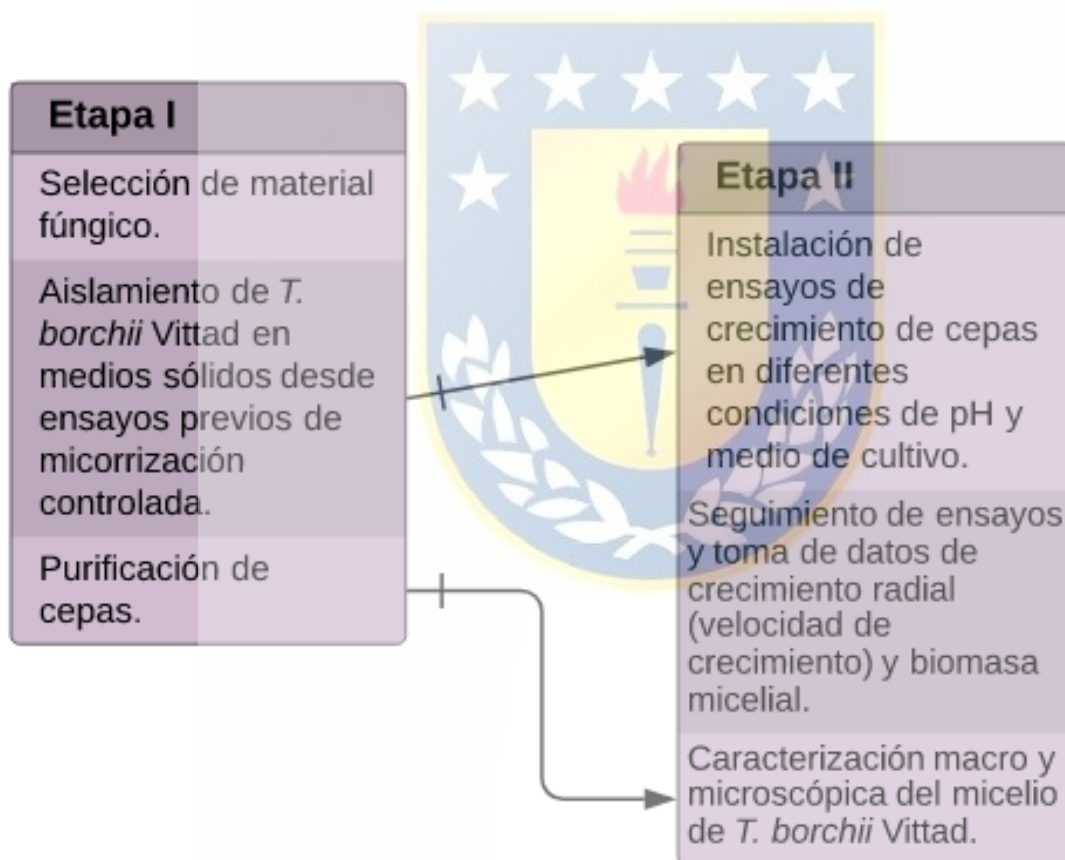


Figura 4: Etapas y actividades del desarrollo del estudio.

6.1 Aislamiento del micelio.

Esta etapa se inició con la selección del material fúngico (raíces micorrizadas de *Q. ilex*) y su aislamiento en medio sólido. Se escogieron de manera aleatoria dos plantas de *Q. ilex* (obtenidas de ensayos previos de micorrización controlada con inóculo esporal de *T. borchii* del Laboratorio de Biotecnología de Hongos Campus Los Ángeles de la Universidad de Concepción). Para ello, las plantas de *Q. ilex* se sacaron cuidadosamente del contenedor con todas las raíces finas. Luego se lavó cada planta en agua corriente para separar la mayor parte del sustrato adherido a las raíces. Para cada sistema radicular se constató la presencia de estructuras micorrícicas. Posteriormente, con ayuda de una lupa binocular, se cortaron fragmentos de raíz de 0.5 a 1 cm de longitud que poseían estructuras micorrícicas. Se lavaron cuidadosamente con agua estéril cuatro veces con intervalos de 20 min. Luego fueron desinfectadas superficialmente 20 segundos con H₂O₂ al 35%, y posteriormente lavadas tres veces con agua estéril con intervalos de 20 min. Finalmente, las estructuras micorrícicas, una vez desinfectadas superficialmente, se colocaron en un medio de cultivo MMN a pH 6.8 en placas Petri y se incubaron (en la incubadora marca Binder) a 24°C hasta obtener el crecimiento puro y activo de colonias del micelio (38 días). Para ello se siguió la metodología de Kumar y Satyanarayana (2002) con modificaciones.

6.2 Caracterización macroscópica y microscópica de micelio de cultivos puros y morfoanatomía de la ectomicorriza.

A partir de los sistemas radiculares pertenecientes a material vegetal (*Q. ilex*), se seleccionaron ápices radicales micorrizados por medio de un microscopio de disección con luz incidente del Laboratorio de Biotecnología de Hongos Campus Los Ángeles de la Universidad de Concepción, modelo Olympus SZ2-ILST, acoplado a una cámara digital e iluminador de fibra óptica. Con estos equipos se realizó la observación y registro fotográfico de las estructuras micorrícicas. Se registraron color, textura del manto fúngico, presencia o ausencia de rizomorfos, la textura del micelio externo observado sobre los ápices ectomicorrícicos, forma y ramificación de la ECM. Sólo se utilizó material fresco.

La caracterización morfológica del manto, hifas y los cistidios se realizó utilizando un microscopio de transmisión de luz de alta resolución, modelo Olympus Cx30. Para la caracterización de las hifas, se tomaron muestras de las colonias y se fijaron en un portaobjetos. Enseguida se realizó una tinción utilizando Rojo Congo 2% y Safranina 0,5% para dos muestras diferentes. Se examinaron las hifas en un microscopio de transmisión de luz con alto aumento (100x en aceite de inmersión) (Pereira et al. 2014). Los datos métricos de las hifas teñidas (ancho y largo entre septos), fueron obtenidos para realizar la identificación y caracterización de la especie, comparando los resultados obtenidos con los de la literatura. Las series medidas fueron 30 unidades, obteniendo el promedio de las mismas, desviación estándar; medidas mínimas y máximas, utilizando el programa InfoStat.

6.3 Ensayo: Efecto del pH y medio de cultivo en el crecimiento micelial de *Tuber borchii* Vittad

Esta etapa comenzó con el establecimiento del Ensayo 1 a partir de cultivo micelial obtenido en la Etapa I. Este ensayo consistió en experimentos independientes, donde se evaluó el efecto del tipo de medio de cultivo (MMN y BAF) y los diferentes niveles de pH del medio (6.0, 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0).

a) Preparación de soluciones Buffer.

Se inició con la preparación de soluciones buffer para los diferentes medios de cultivo. Para esto, se utilizó la metodología aplicada por Gomori (1948) con modificaciones. En la preparación de la solución Buffer Fosfato, se pesó 27,6 g de fosfato de sodio monobásico y se disolvió en 200 ml de agua desionizada; y 53.6 g de fosfato de sodio bibásico para disolverlo en 200 ml de agua desionizada (concentración de ambas soluciones, 1M). Posteriormente se tomaron 87.7 ml de solución de fosfato de sodio monobásico y 12.3 ml de fosfato de sodio bibásico y se procedió a diluir en 200 ml de agua desionizada. El pH final del Buffer fue de 6.0 y se utilizó para ajustar el pH de los medios Aneurina-Ácido fólico-Agar (BAF) y Melin-Norkrans-modificado (MMN). Para la preparación de la solución Buffer-Tris, se pesó 6.05 g de Buffer-Tris y se disolvió en 50

ml de agua desionizada (concentración, 1M), posteriormente se diluyó en 200 ml de agua desionizada. El pH final de Buffer-Tris fue de 9.0 y se utilizó para ajustar el pH de los medio BAF y MMN. El potenciómetro utilizado en éste procedimiento es marca EXTECH modelo 321990, provisto de un electrodo de pH para medio líquido.

b) Medios de cultivo.

Los medios de cultivo utilizados fueron MMN y BAF (Cuadro 2) (Rodríguez, 2006). El ajuste de pH de los medios de cultivo se realizó utilizando un electrodo de pH tradicional con Buffer Fosfato para pH 6.0 y 6.5, y Buffer-Tris para pH 7.0, 7.5 y 8.0 antes de autoclave. El pH inicial del medio MMN fue de 6.67, para ajustarlo a pH 6.0 y 6.5 se le agregaron 5 y 0.5 ml de Buffer Fosfato pH 6.0, respectivamente. Posteriormente, para ajustar a pH 7.0, 7.5 y 8.0, se agregó 0.5, 1.2 y 1.9 ml de Buffer-Tris pH 9.0, respectivamente. Para ajustar el pH del medio BAF (pH inicial 5.78) se realizó un procedimiento similar, agregando 0.1, 0.4, 0.7, 1.3 y 1.7 ml de Buffer-Tris pH 9.0 para pH 6.0 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0 respectivamente. Cada medio de cultivo con distinto pH, tuvo un volumen final de 100 ml.

Tabla 1: Composición de medio de cultivo.

Reactivo	Concentración g / L	
	BAF	MMN
KH_2PO_4	0.5	50
CaCl_2	0.1	---
MnSO_4	0.005	---
Peptona	2.0	---
Extracto de levadura	0.2	---
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	---	25
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	---	5
NaCl	---	2.5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	15
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0094	16.66
Glucosa	30	10
Tiamina	0.0005	1
Biotina	0.00001	---
Mio-inositol	0.05	---
Ácido Fólico	0.0001	---
Agar	15	15
Agua destilada	1 L	1 L

(Fuente: Rodríguez, 2006).

c) Establecimiento del ensayo:

El ensayo se estableció en el Laboratorio de Biotecnología de Hongos Campus Los Ángeles de la Universidad de Concepción. Cada medio de cultivo testado se dispensó en placas de Petri de 9 cm de diámetro en cantidades de 20 ml aproximadamente. Una vez esterilizado (autoclave 121 °C y 1 atm de presión). Posteriormente, discos de agar-micelio (5 mm de diámetro), obtenidos de los cultivos stock de *T. borchii* fueron transferidos a las placas con los medios MMN y BAF, según tratamientos asignados (pH 6.0 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0). Para cada tratamiento se realizaron 5 réplicas. Las placas fueron

incubadas a 24 ± 1 °C (incubadora marca Binder) durante 33 días, período en el cual se midió cada tres días el crecimiento radial de las colonias.

d) *Cuantificación de crecimiento:*

Se cuantificó la velocidad de crecimiento, crecimiento radial y biomasa (peso seco). El crecimiento radial promedio de los cultivos miceliales de *T. borchii* evaluados se registró para cada uno de los valores de pH y medios de cultivos utilizados. Las placas se incubaron durante 33 días y se midió el crecimiento radial de las colonias cada 3 días en el dorso de las placas, en cuatro direcciones que pasaban por el centro de las colonias (Figura 4). Se midió con un pie de metro digital. El crecimiento radial fue el promedio de la distancia de crecimiento de los cuatro puntos radiales marcados, al que no se le agregó el crecimiento promedio de las mediciones anteriores. Los datos obtenidos fueron ajustados mediante la ecuación de regresión lineal para calcular la pendiente de la curva de crecimiento, correspondiente a la tasa de crecimiento promedio de cada tratamiento (Pereira et al. 2014).

Después del periodo de cultivo, se evaluó la biomasa micelial producida en cada tratamiento. Para esto, se fundió cada medio de cultivo con su respectivo micelio en un microondas durante 50 segundos; con la finalidad de separar el agar del material fúngico. Posteriormente, se procedió a extraer cada micelio desde el agar derretido, por medio de un proceso de filtración con una bomba de vacío, donde se utilizó un embudo de Büchner con un papel filtro circular (pesado con anterioridad). Se lavó con agua caliente para eliminar los restos de agar del micelio. Una vez obtenido el micelio sobre el papel filtro, se dispuso en un horno a 90°C por 72 horas para obtener su peso seco. Luego el papel filtro con el micelio se pesó, y la biomasa fue calculada por diferencia de peso entre el papel filtro y el peso del papel filtro + micelio (Pereira et al. 2014, Garcia et al. 2017).



Figura 5. Diagrama del reverso de una placa Petri que ilustra el método utilizado para la medición de la variable crecimiento radial promedio de la cepa de *T. borchii* Vittad cultivada *in vitro*. Las mediciones se realizaron en el sentido de las manecillas del reloj iniciando en el punto (1). (Fuente: Elaboración propia).

e) *Análisis estadístico:*

El estudio se estableció bajo un diseño factorial de 2 x 5, considerando 5 réplicas para cada tratamiento. En cada caso, los factores considerados para los análisis fueron: medio de cultivo y pH, con 2 y 5 niveles respectivamente. Se evaluó la interacción de ellos. Las evaluaciones se realizaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA) mediante el software estadístico InfoStat versión 2018/P. Las pruebas de homogeneidad de varianzas fueron evaluadas mediante la prueba Levene ($P \leq 0,05$). El supuesto de normalidad de los residuos se evaluó mediante la prueba de Shapiro- Wilks ($P \leq 0,05$). Para detectar diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey ($P \leq 0,05$).

VII. RESULTADOS.

7.1. Caracterización macroscópica y microscópica de micelio de cultivos puros y morfoanatomía de la ectomicorriza.

Los resultados de la caracterización de estructuras micorrícicas de *T. borchii* aisladas de *Q. ilex* se observan en la Figura 6. Dichas estructuras presentan características cruciformes de aspecto anaranjado con algunas terminaciones color marrón y espinas cortas en las terminaciones. La ramificación de la ECM fue desde monopodial pinada a monopodial piramidal; las terminaciones espinosas no presentaron ramificaciones (Figura 6a). Las puntas de la ECM individuales son ligeramente curvadas, cilíndricas, en forma de maza con terminaciones redondeadas; el color varió desde amarillo claro con tonos gris pálido al oscuro ocre o pardusco (Figura 6b). En la figura 6c y 6d se aprecian estructuras de los cistidios aciculares, hialinos y redondeados; y manto pseudoparenquimático externo respectivamente. Los cistidios presentaron forma de aguja: simples o conectado en la base, lisos, incoloros y no septados (Figura 6c); estaban bien distribuidos en toda la superficie de la ECM, preferiblemente en la proximidad del ápice. El manto pseudoparenquimático estaba compuesto en su gran mayoría por células más o menos lobuladas, las celdas del manto eran poligonales, con bordes redondeados, el aspecto del manto era amarillento. Las células epidermoides poseían una estructura similar a un rompecabezas de patrón regular o irregular; alguna de las celdas fueron de forma variable, variando de elipsoide e isodiamétrico, a irregular rectangular y alargado (Figura 6d).

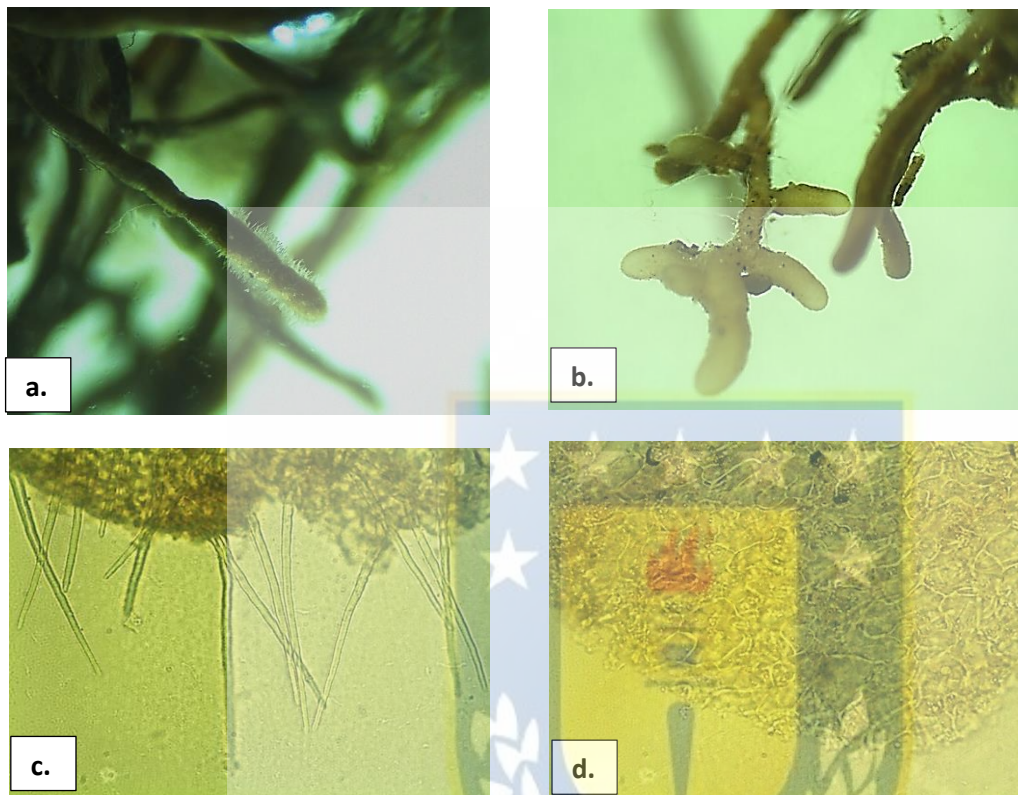


Figura 6: **a.** Aspecto de la superficie de la micorriza con espinas cortas. **b.** Micorriza con estructura cruciforme, anaranjado, cubierta por cistidios en la superficie. **c.** Aspecto del manto y los cistidios aciculares, recto e hialinos. **d.** Detalle del manto en forma de puzle.

En la figura 7a, se muestra la colonia miceliar de *T. borchii* aislada desde estructuras micorrícicas de *Q. ilex*. En la Figura 7b se aprecia las características del micelio aislado: aspecto de las hifas teñidas con safranina, ramificadas en ángulo de 90°, septadas y no fibuladas; las hifas eran curvadas, ramificadas en ángulo recto o en Y, amarillentas, con septos no fibulados. En la Figura 7c, se aprecia el cuerpo de Woronin de aspecto globoso ubicado entre septos, característico de especies del genero *Tuber* y *Pezizales*. Por último en la Figura 7d, se muestra la estructura de las hifas teñidas con rojo Congo, con una ramificación en ángulo recto. Los resultados de medidas de las hifas obtenidos en el programa InfoStat informaron los siguientes datos: Largo promedio de hifas entre septos:

36,7 μm ; min: 22,5 μm ; máx.: 57,5 μm ; D.E: 10,1 μm ; ancho promedio de hifas: 5,8 μm ; min. 3,7 μm ; máx.: 7,5 μm ; D.E: 1,1 μm (Tabla 3).

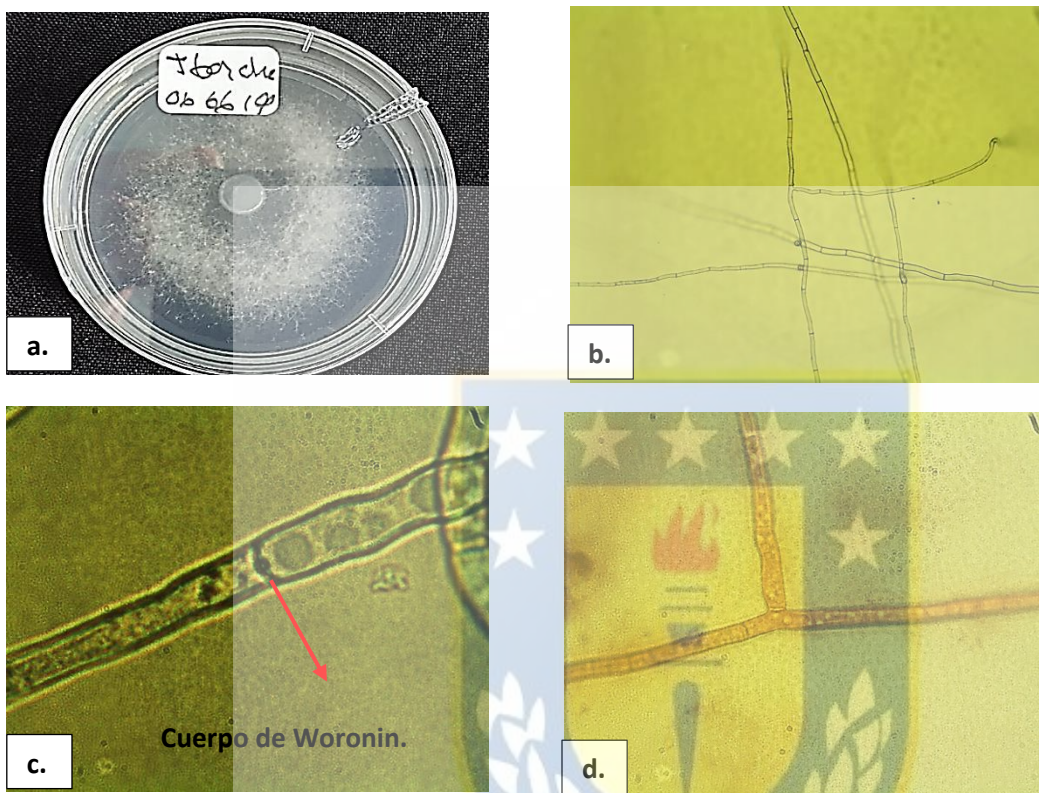


Figura 7: *T. borchii* **a.** Aspecto del micelio aislado en placa de Petri. **b.** Aspecto de las hifas ramificadas en ángulo recto y los septos. **c.** Detalle de cuerpo de Woronin de forma globosa ubicado entre septos. **d.** Aspecto de las hifas teñidas con rojo Congo, ramificación en ángulo recto.

Tabla 2: Medidas de las hifas de *T. borchii* en el desarrollo de las colonias asiladas.

	Mínimo	Máximo	Promedio
Largo entre septos.	22,5 μm	57,5 μm	36,7 \pm 10,1 μm
Ancho.	3,7 μm	7,5 μm	5,8 \pm 1,1 μm

7.2 Efecto del pH y medio de cultivo en el crecimiento micelar de *Tuber borchii* Vittad.

7.2.1. Velocidad media de crecimiento radial: Los resultados muestran que la variación del pH en los diferentes medios de cultivo tuvieron efecto sobre la velocidad media de crecimiento radial del micelio de *T. borchii* (Figura 8). Se observa en la Figura 8 que, la velocidad máxima para el crecimiento micelar de esta especie se encontró en tratamientos a pH 6.5 y 7.0 en medio de cultivo BAF (2,80 y 2,27 mm/ día, respectivamente) y pH 6.5 para medio de cultivo MMN (1,45 mm/ día). Los mayores resultados en BAF alcanzaron significancia estadística al ser comparados con los tratamientos a pH 6.0, 7.5 y 8.0, donde se encontraron las tasas de velocidad de crecimiento más bajas (0,85, 0,91 y 0,55 mm/ día, respectivamente). Para el medio de cultivo MMN, no se encontraron diferencias significativas a pH 6.0, 7.0, 7.5 y 8.0, donde obtuvieron los más bajos rendimientos. Se puede observar que para ambos medios de cultivo, la velocidad de crecimiento disminuye al aumentar los valores de pH sobre 6.5. La velocidad de crecimiento micelar de *T. borchii* presentó una mayor velocidad crecimiento en medio de cultivo BAF, alcanzando diferencias estadísticamente significativas respecto al medio MMN a pH 6.5 y 7.0.

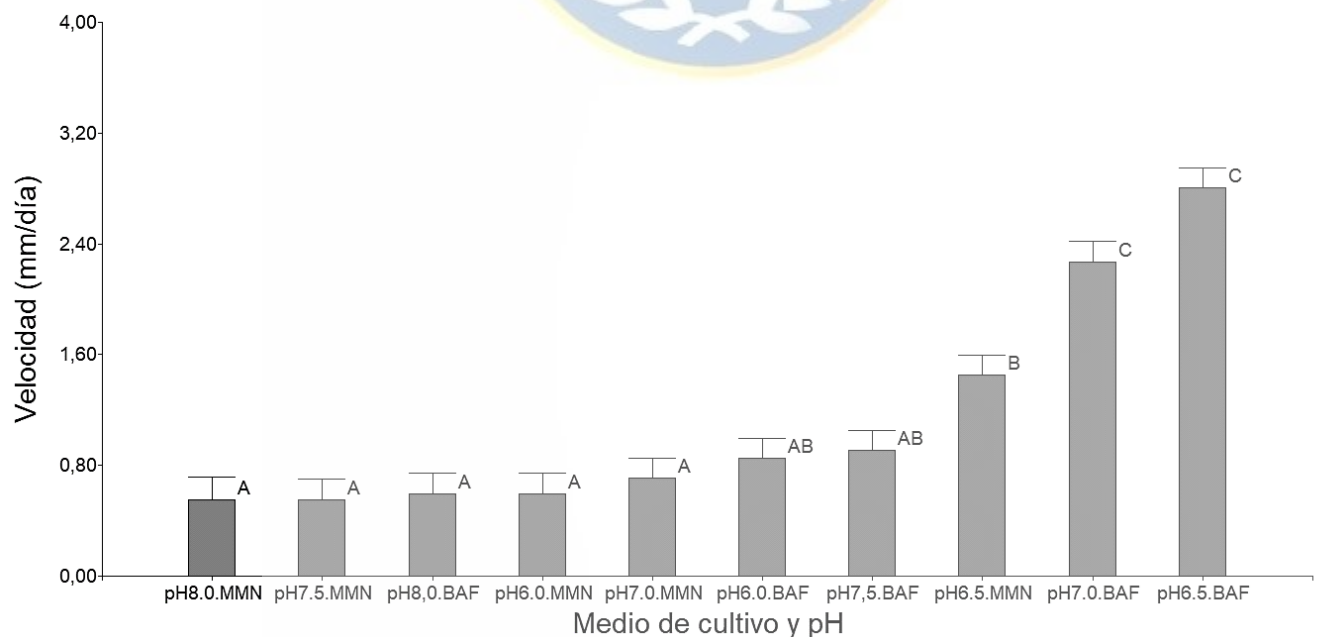


Figura 8. Efecto del pH y medio de cultivo en la velocidad media de crecimiento radial micelar de *T. borchii*. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey, $P < 0,05$). Los datos representan la media \pm la desviación estándar de cinco réplicas por tratamiento.

7.2.2. Área media de crecimiento: el área de crecimiento medio del micelio de *T. borchii* también resultó afectado por las variaciones de pH en ambos medios de cultivo (Figura 9). Se observa en la Figura 9 que, a pH 6.5 se alcanzó el mayor área de crecimiento en ambos medios de cultivo (33,05 y 28,33 mm², para BAF y MMN respectivamente), alcanzando diferencias estadísticamente significativas en comparación a pH 6.0, 7,5 y 8,0 donde se obtuvieron las menores áreas de crecimiento para ambos medios de cultivo. También se puede observar que a pH 7.0, en BAF se obtuvo mayor rendimiento respecto al medio MMN. En éste caso se puede observar para ambos medios de cultivo que, al aumentar los niveles pH sobre 6.5, el crecimiento radial se ve disminuido. Por último, se alcanzó una mayor área de crecimiento medio en el medio de cultivo BAF, lográndose diferencia estadística a pH 6.5 y 7.0 respecto al tratamiento con MMN a pH 6.5 y 7.0.

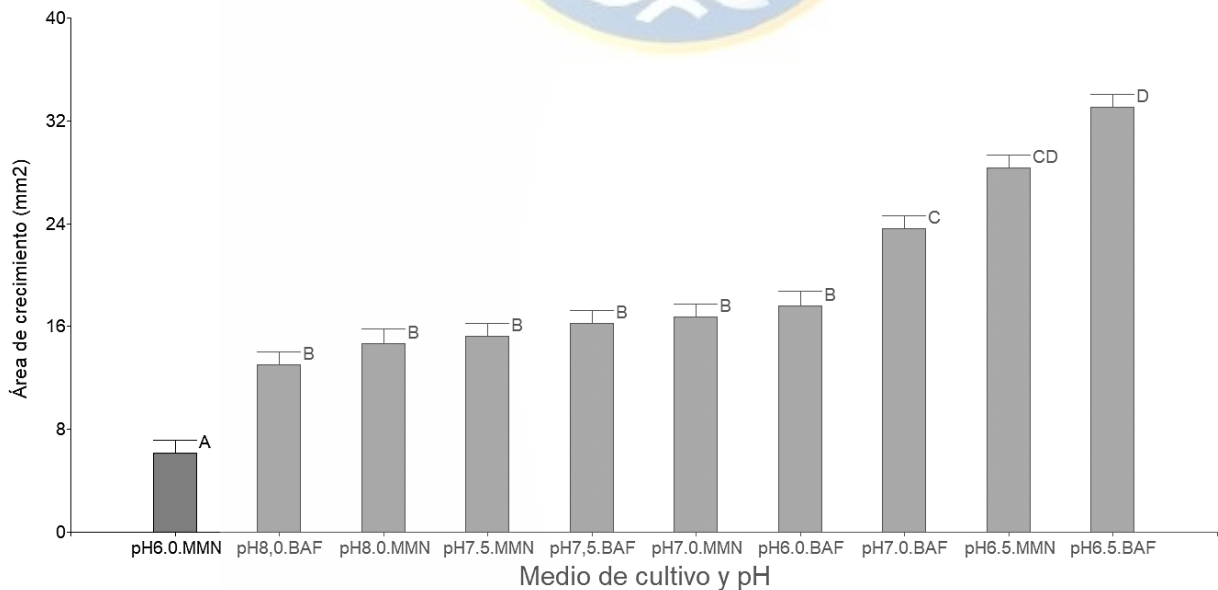


Figura 9. Efecto del pH y medio de cultivo en área de crecimiento del micelio de *T. borchii*. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey, $P < 0,05$). Los datos representan la media \pm la desviación estándar de cinco réplicas por tratamiento.

7.2.3. Biomasa media: La biomasa de cada tratamiento también se vio afectada por el medio de cultivo y sus respectivas variaciones en los niveles de pH (Figura 10). Se observa que los mayores pesos en biomasa se obtuvieron a pH 6.5 en medio BAF y MMN (0,13 y 0,10 gr respectivamente). El peso de biomasa más bajo obtenido fue en medio MMN a pH 6.0 (0,01 gr), seguido de MMN pH 7.0, BAF pH 6.0, BAF pH 8.0, MMN pH 7.5, BAF pH 7.5, BAF pH 7.0 y MMN pH 8.0, donde se encontraron diferencias estadísticamente significativa respecto a MMN pH 6.5 y BAF 6.5.

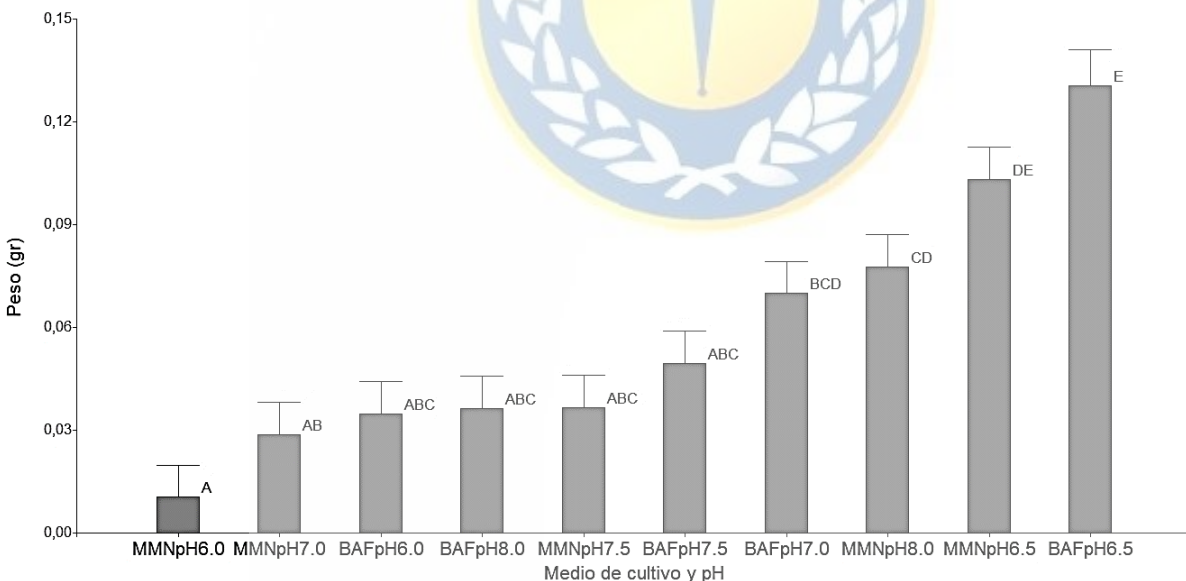


Figura 10. Efecto del pH y medio de cultivo en el peso de la biomasa del micelio de *T. borchii*. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey, $P < 0,05$). Los datos representan la media \pm la desviación estándar de cinco réplicas por tratamiento.

VIII. DISCUSIÓN.

8.1 Caracterización macroscópica y microscópica de micelio de cultivos puros y morfoanatomía de la ectomicorriza.

Las dificultades para aislar y cultivar el micelio de diferentes especies *Tuber* habrían limitado la capacidad para estudiar este grupo de hongos ectomicorrícicos comercialmente importante (Hall et al., 1988). Sisti et al., 1998 y Giomaro et al., 2000, afirman que la gran mayoría de los estudios sobre especies de *Tuber* se han restringido a experimentos en macetas o experimentos de campo que empleaban plantas inoculadas con inóculos esporales. La capacidad para aislar el micelio de *T. borchii* y cultivarlo en medios específicos bajo condiciones controladas de laboratorio (lejos de la planta huésped) permite realizar diferentes estudios, tales como: requerimientos de nutrientes del micelio, pH más adecuado para su crecimiento y estudios sobre su fisiología. La micorrización de plantas utilizando inóculo esporal de *Tuber*, en algunos casos, ha tenido problemas de contaminación, generalmente con especies de *Tuber* que no son de interés comercial (Sisti et al., 1998, Iotti et al. 2012, Zambonelli et al. 2015), por lo que conlleva una gran ventaja aislar el micelio de *T. borchii*, ya que permite la producción de plantas inoculadas a gran escala no contaminadas con otras especies de hongos ECM, o patógenos.

Las estructuras micorrícicas de *T. borchii* encontradas en los sistemas radiculares de *Q. ilex* de donde se aisló la especie coincidieron con las características que describe la literatura. En general, *T. borchii* es una ECM que posee características típicas y constantes, tales como: color anaranjado de la ECM, superficie con espinas cortas, el manto con células epidermoides en forma de puzle, y los cistidios en forma de punzón (Giomaro et al. 2000, Clavería y De Miguel 2005, Lancellotti et al., 2014). La ramificación cruciforme de la ECM de *T. borchii* es una característica típica de especies *Tuber* (Molina y Trappe, 1982). Suelen ser estructuras cortas y en forma de maza, con ramas frecuentes, irregulares, a menudo cortas; éstas características se pudieron apreciar al aislar la ECM y observarla en la microscopio de disección (Figura 6: a y b). El manto pseudoparenquimático posee la particularidad de ser marrón amarillo, a menudo

oscurecido por la densidad de la cubierta; con estructuras irregulares interconectadas, tal y como se puede observar en la Figura 6d. La superficie del manto se encuentra cubierta por numerosos cistidios rectos, hialinos y no septados de paredes delgadas con puntas redondeadas (Chu-Chou and Grace, 1983). Estas características macroscópicas y microscópicas se pudieron observar bajo lupa y microscopio de alta resolución, lo que permitió constatar que la especie correspondía a *T. borchii*.

En las colonias aisladas de las estructuras de *T. borchii*, se pudo observar bajo microscopio, hifas curvadas, ramificadas en ángulo de 90° o en forma de Y, con septos no fibulados (Miguel, 2005). Las medidas de las hifas (largo entre septos y ancho) son congruentes y se mantienen en el rango de medidas de hifas de *T. borchii* descritas por Iotti y Zambonelli (2002). Se observó la presencia del cuerpo de Woronin entre los septos de las hifas (Figura 7c). El cuerpo de Woronin es un orgánulo proteico unido a la membrana, y se encuentra exclusivamente en la división Ascomycota (Healy y Kovács, 2010). Li y Kimbrough (1995) informaron que los cuerpos globosos de Woronin se encuentran comúnmente cerca de los tabiques de células vegetativas de los Pezizales, y raramente se encuentran en las hifas ascógenas, además informaron que no se encuentran cuerpos de Woronin hexagonales en las Pezizaceae.

Las características encontradas y descritas en éste trabajo coinciden mayoritariamente con las descritas en la literatura, sin embargo es preciso destacar que *T. borchii* comparte características similares con *T. brumale* Vittad, lo que puede hacer difícil su distinción usando técnicas tradicionales. Según algunos autores, una manera efectiva para poder identificar efectivamente la especie *T. borchii* es mediante la característica de sus cistidios incoloros y largos. Otra característica que hace posible su identificación, es la superficie del manto pseudoparenquimático, grueso y amarillento, con estructuras irregulares interconectadas en forma de puzle (Giomaro et al. 2000, Benucci et al. 2011, Boutahir 2013). La forma más precisa en la identificación de la especie es utilizando técnicas moleculares tales como: PCR, electroforesis y aislamiento de ADN (Amicucci et al. 2000; Iotti et al. 2002; Hartanti et al. 2021), lo cual no fue posible en esta oportunidad por costo, tiempo y logística necesaria, debido al problema de la pandemia que nos aqueja.

8.2 Ensayo: Efecto del pH y medio de cultivo en el crecimiento micelial de *Tuber borchii* Vittad.

El pH del suelo es reconocido como uno de los factores más importantes para el crecimiento micelial, la formación de ECM y la producción de cuerpos fructíferos *in situ* de trufas (García et al. 2002, Casermeiro et al. 2006, Pruett et al. 2009). Los datos sobre las condiciones óptimas de pH para el crecimiento de micelios son necesarios para cada especie de *Tuber* (Nakano et al. 2020). Algunas especies de trufas, principalmente de Europa, se han estudiado para determinar las condiciones óptimas de pH para su crecimiento *in vitro*. Los estudios han demostrado que las especies *Tuber* europeas, como *T. magnatum* y *T. melanosporum*, crecen bien a niveles de pH medios entre 6.5 y 7.0 (Kamal 2011, Nadim et al. 2016); sin embargo, existe información limitada sobre las condiciones óptimas de pH para crecimiento *in vitro* de *T. borchii*. En este estudio se investigó la influencia del pH y medio de cultivo en el crecimiento micelial *in vitro* de *T. borchii* para determinar las condiciones óptimas, y proyectar estos resultados a posible respuesta del cultivo en condiciones de campo.

En algunos casos las condiciones del medio de cultivo pueden provocar efectos poco significativos sobre el crecimiento de los hongos (Santelices et al., 2012). En este trabajo, el crecimiento *in vitro* del micelio de *T. borchii* se vio afectado por el medio de cultivo BAF y MMN, y sus diferentes niveles de pH. De ambos medios de cultivo, BAF obtuvo mejor rendimiento respecto a velocidad de crecimiento, área de crecimiento y biomasa total, alcanzando mejores rendimientos a pH ácido-neutro (pH 6.5 y 7.0); y menor rendimiento al incrementar los niveles de pH, como también disminuirlo, al bajar el pH bajo 6.5. Al respecto, se han realizado estudios similares con cepas de hongos ectomicorrícicos donde se encuentran resultados favorables de crecimiento en condiciones de acides, en lugar de alcalinidad (García et al. 2002, Barros et al., 2006, Pereíra et al., 2007). Estudios sugieren que las especies de hongos ectomicorrícicos se desarrollan mejor en condiciones acidófilas, debido a que se encuentran naturalmente en suelos ácidos, con una alta acumulación de materia orgánica, donde el amonio es su principal fuente de nitrógeno inorgánico (Lazarević et al., 2016). Otras investigaciones sostienen que las trufas pueden crecer en un rango de pH de 6.8 a 8.0 (Chevalier y Frochot, 1997). En éste

caso el micelio de *T. borchii* logró resultados más productivos a un nivel de pH ácido neutro, entre 6.5 y 7.0.

El tipo de medio de cultivo es otra condición que de manera general afecta el comportamiento de los hongos, aunque en algunas especies puede no provocar cambios significativos (Flores y Honrubia, 2000). En éste experimento, se demostró que para *Tuber borchii*, el medio de cultivo más favorable para su crecimiento micelar es BAF, debido a que se encontraron diferencias significativas en la velocidad de crecimiento respecto al medio de cultivo MMN. Estas diferencias se encontraron a niveles de pH ácido-neutro (pH 6.5 y 7.0), donde las mayores velocidades de crecimiento en cultivo BAF fueron entre 2,27 y 2,80 mm/ día, en comparación al cultivo MMN, donde su mayor velocidad de crecimiento fue de 1,45 mm/ día a pH 6.5. Respecto al área de crecimiento y biomasa total, se obtuvo mayor rendimiento en el medio de cultivo BAF cuando su pH se encontraba a 6.5. Estudios similares con hongos ectomicorrícicos coinciden que con medio de cultivo MMN se obtiene bajos rendimientos en comparación a otros medios más nutritivos (Pereira et al., 2007, Hernández, Carrazana y Rosas, 2014). En general, los hongos ECM poseen poca habilidad para descomponer polisacáridos, por lo que tienen un desarrollo lento en medios de cultivo artificiales (Ohta, 1997); por lo tanto, se suelen utilizar monosacáridos como la glucosa para el crecimiento del micelio (Kusuda et al., 2007). Una explicación para el menor rendimiento en el cultivo MMN, es que posee más bajo contenido de glucosa que el medio de cultivo BAF (10 g·litro⁻¹ para MMN y 30 g·litro⁻¹ para BAF) (Rodríguez B, 2006, Hernández, Carrazana y Rosas, 2014). Por otro lado, se sugiere utilizar el medio de cultivo MMN para la conservación y mantenimiento de las cepas, debido a que producen un crecimiento más lento del micelio, y por lo tanto, el cambio en el medio de cultivo será más tardío al estipulado (Brundrett et al., 1996). En éste caso, el medio de cultivo BAF sería el indicado para la producción de micelio a mayor escala, pues indujo una mayor velocidad, área de crecimiento y biomasa.

IX. CONCLUSIÓN.

Es posible aislar la especie *T. borchii* Vittad directamente desde estructuras micorrícicas presentes en sistemas radiculares de *Q. ilex*, bajo condiciones controladas de laboratorio.

El tipo de medio de cultivo y su pH son determinantes en las respuestas del crecimiento miceliar de *T. borchii* Vittad bajo condiciones *in vitro*.

El micelio de *T. borchii* Vittad se desarrolla adecuadamente tanto en el medio de cultivo BAF como MMN, sin embargo, el mayor crecimiento se logra en el medio BAF en rangos de pH 6.5 y 7.0.

Los resultados permiten sugerir que para la producción masiva de micelio de *T. borchii* Vittad se puede emplear el medio de cultivo BAF, y que para el mantenimiento de repiques sucesivos de colonias, se podría utilizar el medio de cultivo MMN.

En ambos medios de cultivo se obtienen mayores rendimientos en niveles de pH 6.5 y 7.0; por tanto, pareciera ser un nivel óptimo un pH ligeramente ácido para la masificación *in vitro* de ésta micorriza.



X. BIBLIOGRAFÍA.

- Amicucci A, Guidi C, Zambonelli A, Potenza L, Y VS (2000) Multiplex PCR for the identification of white *Tuber* species. FEMS Microbiology Ecology 189:265–269
- Arenas F, Navarro-ródenas A, Chávez D, Gutiérrez A, Pérez-gilabert M (2018) Mycelium of *Terfezia claveryi* as inoculum source to produce desert truffle mycorrhizal plants. Mycorrhiza 28(7):691-701.
- Azul A.M, Trovao J, Morcillo M, Rubini A, Trusso A, Belfiori B, Paolocci F, Freitas H, Riccioni C (2014). First insights on *Tuber borchii* distribution in both natural forests and experimental truffle fields in Portugal. IWEMM, Marrakesh.
- Barros L, Baptista P (2006) Influence of the culture medium and pH on the growth of saprobic and ectomycorrhizal mushroom mycelia. Minerva Biotecnologica 18:165–170
- Benucci GM, Bonito G, Falini LB, Bencivenga M (2011) Mycorrhization of Pecan trees (*Carya illinoensis*) with commercial truffle species: *Tuber aestivum* Vittad and *Tuber borchii* Vittad. Mycorrhiza. <https://doi.org/10.1007/s00572-011-0413-z>
- Bonito GM, Smith ME (2016) General Systematic Position of the Truffles: Evolutionary Theories. Soil Biology and Biochemistry 3–15. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-31436-5>
- Boutahir S (2013) Nuove biotecnologie per la produzione di piante micorrizzate con tartufo. Università degli Studi di Bologna 23-35
- Brown GT, Zambonelli A (2008) Taming the Truffle. Forest Ecosystem and Society 59:69
- Brundrett M, Bougher N, Dell B, Grove T, Malajczuk N (1996) Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. <https://doi.org/10.13140/2.1.4880.5444>.
- Casermeiro MAB, Hernando JB, Hernando IB (2006) Soil factors that influence the fruiting of *Tuber melanosporum* (black truffle). Australian Journal of Soil Research 44:731–738
- Cepeda J (2010) Capitulo I Historia de la fertilidad de suelos 1 Introducción. UASD

- Chávez D, Guillermo P, Ángela M (2009) Efecto de tipos de inóculos de tres especies fúngicas en la micorrización controlada de plántulas de *Pinus radiata* Effect of inoculum type of three fungal species on the controlled. BOSQUE 30:4–9
- Chevalier G, Frochot H (1997) La maîtrise de la culture de la truffe. The International Tropical Timber Organization 201–213
- Chu-Chou M, Grace LJ (1983) Characterization and identification of mycorrhizas of Douglas fir in New Zealand. European Journal of Forest Pathology 13:251–260 . <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.1983.tb00126.x>
- Clavería V, De Miguel A. (2005) Los géneros *Tuber* y *Genea* una formación natural. Publicaciones de Biología 16:41–51
- Flores R, Honrubia M (2000) *Boletellus* y *Suillus* y formación de primordios de *B .edulis* en cultivo puro. Revista mexicana de micología 30:1–7
- García L, Pérez J, Ríos D, Saez P, AtalaBianchi C, Sánchez M, Pereira G. (2017) *In vitro* growth of actomycorrhizal fungi associated with *Pinus radiata* plantations in Chile. Revista Fitotecnia Mexicana 40(4)
- Gardin L (2005) I tartufi minori in Toscana Gli ambienti di crescita dei tartufi marzuolo e scorzone
- García V, Martínez S, Torres E (2002) Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrizógenos. Botánica 73:1–15
- Giomaro A, Zambonelli A, Sisti D, Cecchini M, Evangelista V, Stocchi V (2000) Anatomical and morphological characterization of mycorrhizas of five strains of *Tuber borchii* Vittad. Mycorrhiza 10:107–114
- Gomori BG (1948) Preparation of Buffers for Use in Enzyme Studies. General preparative procedures. pp 138–146
- Gonzáles M, Quiroz I, Chung P, Edison G (2015) Determinación de medios de cultivo y pH para la *in vitro* de cepas de *Suillus luteus* Aubl .asociadas a *Pinus radiata* D . Don y *Scleroderma citrinum* Pers asociadas a *Eucalyptus globulus* Labill. Revista Avore 39:105–113 <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/0100->

67622015000100010

mycorrhization of *Pinus radiata* seedlings. *BOSQUE* 30:4–9

Hall I, Brown G, Byars J (1988) The black truffle: its history, uses and cultivation. New Zealand Ministry of Agriculture & Fisheries. New Zealand 107(2)

Hall IR, Brown GT, Zambonelli A (2007) Taming the truffle. Portland, Oregon

Hartanti A, Susanti F, Prasasty V, Radiastuti N (2021) Culturable endophytic fungal diversity in cassava tubers of Indonesia. *Biodiversitas* 22:1250–1260 . <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220322>

Healy R, Kovács G (2010) Ultrastructural observations on the ascomata and ascospores of the truffle *Mattiolomyces terfezioides*. *Botany*. <https://doi.org/10.1139/B09-094>

Hernández M, Carrazas J, Rosas M, López M, Ramón R, Norma E (2014) Efecto del medio de cultivo en el desarrollo de. *Rchscfa* 102–107 . <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2013.06.021>

Hu S, Yang X, Wei W, Guo X (2013) Study on the Ecological Environmental Conditions of Truffle with Analysis of Biomaterials. *Advanced Materials Research* 648:389–393 . <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.648.389>

Iotti M, Amicucci A, Stocchi V, Zambonelli A (2002) Morphological and molecular characterization of mycelia of some *Tuber* species in pure culture. *New Phytologist* 155:499–505

Iotti M, Leonardi M, Oddis M, Salerno E, Baraldi E, Zambonelli A (2012) Development and validation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Tuber magnatum* in soil. *BMC Microbiology* 12:1–9

Jaillard B, Barry-etienne D, Colinas C, Miguel A De, Genola L, Libre A, Neveu P, Oliach D, Saenz W, Saez M, Salducci X, Souche G, Sourzat P, Villeneuve M (2014) Alkalinity and structure of soils determine the truffle production in the Pyrenean Regions. *Forest Systems* 365–377 . <https://doi.org/10.5424/fs/2014232-04933>

- Kamal S (2011) Effect of nutrient sources and plant hormones on mycelial morphology of the black perigord truffle *Tuber melanosporum*. Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7). pp 509–515
- Kumar S, Satyanarayana T (2002) Isolation of Ectomycorrhizal Fungi : Methods
- Kusuda M, Ueda M, Konishi Y (2007) Effects of carbohydrate substrate on the vegetative mycelial growth of an ectomycorrhizal mushroom, *Tricholoma matsutake*, isolated from *Quercus*. Mycoscience 48:358–364 . <https://doi.org/10.1007/s10267-007-0384-2>
- Lancellotti E, Iotti M, Zambonelli A, Franceschini A (2014) Characterization of *Tuber borchii* and *Arbutus unedo* mycorrhizas. Mycorrhiza 24:481–486 . <https://doi.org/10.1007/s00572-014-0564-9>
- Lazarević J, Stojičić D, Keča Nenad (2016) Effects of temperature, pH and carbon and nitrogen sources on growth of *in vitro* cultures of ectomycorrhizal isolates from *Pinus heldreichii* forest. Forest Systems 25:1–10 . <https://doi.org/10.5424/fs/2016251-07036>
- Leonardi P, Iotti M, Donati S, Lancellotti E, Amicucci A, Zambonelli A (2017) Morphological and functional changes in mycelium and mycorrhizas of *Tuber borchii* due to heat stress. Fungal Ecology 29:20–29 . <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2017.05.003>
- Leonardi P, Murat C, Puliga F, Iotti M, Zambonelli A, Lorraine U De, Iam UMR (2019) Ascoma genotyping and mating type analyses of mycorrhizas and soil mycelia of *Tuber borchii* in a truffle orchard established by mycelial inoculated plants. Environmental Microbiology 00:2–12 . <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14777>
- Li L, Kimbrough J (1995) Septal ultrastructure in three species of tuber (hypogeous pezizales). Plant Science 156:849–856
- Li X, Zhang X, Yang M, Yan L, Kang Z, Xiao Y, Tang P, Ye L, Zhang B, Zou J, Liu C (2019) *Tuber borchii* Shapes the Ectomycorrhizosphere Microbial Communities of *Corylus avellana*. Mycobiology 47:180–190 . <https://doi.org/10.1080/12298093.2019.1615297>

Matamala P (2010) Ensayos de micorrización en *Pinus radiata* D. Don, utilizando el hongo *Tuber magnatum* Pico. Tesis. Universidad Austral de Chile

Morcillo, M.; Vilanova, X.; Sanches, M.; Navarrete, N (2014) *Tuber borchii* micorrhization depending on host tree and on stage of inoculation. First International Congress on Trufficulture, Teruel, Spain. DOI: 10.13140/RG.2.1.2024.3286

Miguel D, Sáez Y (2005) Algunas micorrizas competidoras de plantaciones truferas. Pamplona, España

Molina R, Trappe J (1982) Lack of mycorrhizal specificity by the ericaceous host *Arbutus menziesii* and *Arctostaphylos uva ursi*. *New Phytologist* 90:495–509

Morcillo, M. *et al.* (2017) Viabilidad y rentabilidad de una plantación de pino piñonero (*Pinus pinea*) micorrizado con trufa, *Montes*, (June).

Murat C, Kuo A, Barry KW, Clum A, Dockter RB, Fauchery L, Iotti M, Kohler A, Labutti K, Lindquist EA, Lipzen A, Morin E, Wang M, Grigoriev I V, Zambonelli A, Martin FM (2018) Crossm Draft Genome Sequence of *Tuber borchii* Vittad a Whitish Edible Truffle. *American Society for microbiology* 6:1–2

Nadim M, Saidi N, Hasani IW, Banna YY EI, Samir O, Assad MEH, Shamekh S (2016) Effects of some environmental parameters on Mycelia Growth of Finnish truffle *Tuber Maculatum*. *International Journal of Engineering and Applied Sciences (IJEAS)* 3:1–5

Nakano S, Kinoshita A, Obase K, Nakamura N, Furusawa H, Noguchi K, Yamanaka T (2020) Mycoscience Influence of pH on *in vitro* mycelial growth in three Japanese truffle species: *Tuber japonicum*, *Tuber himalayense* and *Tuber longispinosum*. *Mycoscience* 61:58–61 . <https://doi.org/10.1016/j.myc.2019.12.001>

Nocentini G, Mazzei T (2006) La Toscana dei tartufi

Ohta A (1997) Ability of ectomycorrhizal fungi to utilize starch and related substrates. *Mycoscience* 38:403–408

Osorio NW (2012) Laboratorio de Suelos pH del suelo y disponibilidad de nutrientes. El

concepto del pH. Medición del pH del suelo. Suelos ácidos y aluminio. Manejo Integral del Suelo y Nutrición Vegetal 1:4–7

Pereira G, Herrera J, Machuca Á, Sánchez M (2007) Efecto del pH sobre el crecimiento *in vitro* de hongos ectomicorrícicos recolectados de plantaciones de *Pinus radiata*. Effect of pH on the *in vitro* growth of ectomycorrhizal fungi collected from *Pinus radiata* plantations. BOSQUE 28:215–219

Pereira G, Campos L, Chávez D, Anabalón L, Arriagada C (2014) Caracterización del crecimiento miceliar del hongo ectomicorrícico *Lactarius aff. deliciosus* y su simbiosis con plántulas de *Pinus radiata*. Quebracho 22 (1,2):30–39

Pruett G, Bruhn J, Mihail J (2009) Greenhouse production of Burgundy truffle mycorrhizae on oak root. New Forests 37:43:52 . <https://doi.org/10.1007/s11056-008-9108-5>

Ramos E, Zúñiga D (2008) Efecto de la humedad, temperatura y pH del suelo en la actividad microbiana a nivel de laboratorio. Soil microbial activity in response to different conditions of moisture, temperature or pH. Ecología Aplicada 7:124–130

Rodriguez B (2006) Selección e identificación de especies de hongos ectomicorizógenos del estado de Hidalgo más competentes en medio de cultivo sólido. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

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*. Forestry 32:369–376

Sisti D, Giomaro G, Zambonelli A, Rossi I, Ceccaroli B, Citterio, Stocchi V, Benedetti P (1998) *In vitro* mycorrhizal synthesis of micropropagated *Tilia platyphyllos* Scop. plantlets with *Tuber borchii* Vittad mycelium in pure culture. Plant Biotechnology as a Tool 379–387

Walker G, White N (2018) Introduction to Fungal Physiology. En: Introduction to Fungal Physiology. pp 1–35

William P (2012) The role of pH in *Tuber aestivum* syn. *uncinatum* mycorrhiza development within commercial orchards. Acta Mycologica 47:161–167

- Yadav MK, Chandra R (2014) Effect of culture media, pH and temperature on mycelial growth of *Agaricus bisporus* strains. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 8:2–5
- Yun Y, Wang H, Man B, Xiang X, Zhou J, Qiu X, Dillon JG (2016) The Relationship between pH and Bacterial Communities in a Single Karst Ecosystem and Its Implication for Soil Acidification. *Front Microbiol* 7:23–32 .
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01955>
- Zambonelli A, Iotti M, Giomaro G, Hall I, Stocchi V (2002) *T. borchii* cultivation: an interesting perspective. Edible mycorrhizal mushrooms and their cultivation. Proceedings of the Second International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms.
- Zambonelli A, Iotti M, Hall I (2015) Current status of truffle cultivation : recent results and future perspectives. *Micologia Italiana* 44:31–40 . <https://doi.org/10.6092/issn.2465-311X/5593>
- Zambonelli A, Iotti M (2016) True Truffle (*Tuber* spp) in the world. *Soil Biology and Biochemistry*: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-31436-5>
- Zambonelli, A. et al. (2018) “Preliminary results on *Tuber borchii* Vittad. ecological studies”, (March 2019), pp. 3–4. doi: 10.13140/RG.2.2.24298.57289

XI. ANEXO.

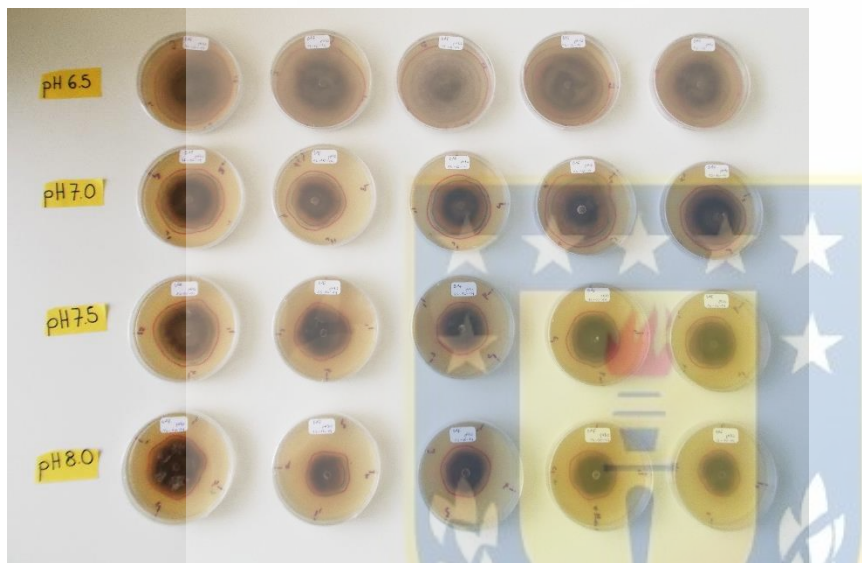


Figura 11. Tratamiento de seis niveles de pH y medio de cultivo BAF.

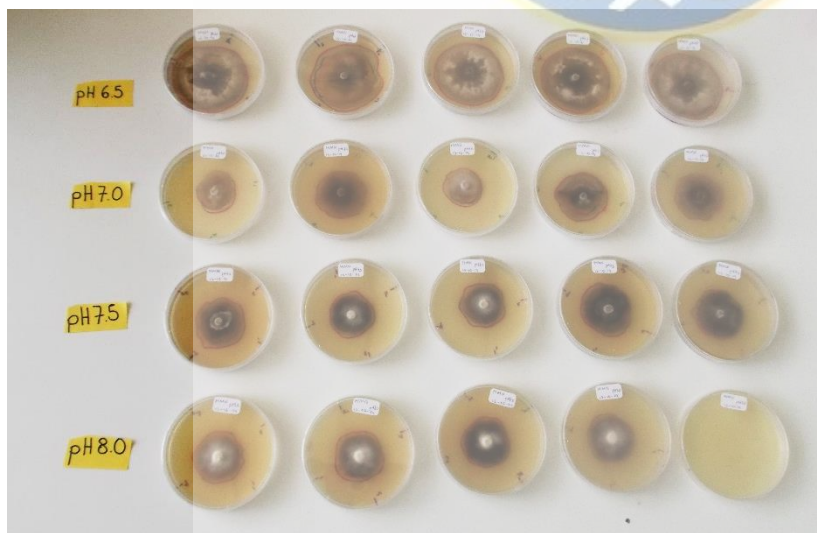


Figura 12. Tratamiento de seis niveles de pH y medio de cultivo MMN.