

Crecimiento *in vitro* de *Lactarius deliciosus* en medio de cultivo BAF y MNM

Daniel Chávez^{*(1)}, Guillermo Pereira⁽¹⁾, Ángela Machuca⁽¹⁾

⁽¹⁾Laboratorio de Biotecnología de Hongos. Departamento Forestal, Campus Los Ángeles, Universidad de Concepción. J. A. Coloma 0201, Casilla 341, Los Ángeles, Chile, *dachavez@udec.cl

RESUMEN

Lactarius deliciosus (L. Gray) es un hongo ectomicorrícico que crece asociado a *Pinus radiata*, constituyendo sus cuerpos fructíferos un producto muy apetecido desde el punto de vista gastronómico en la alta cocina. Desde esta perspectiva es un hongo que puede entregar valor agregado al bosque, siendo necesario entonces, conocer y caracterizar su comportamiento en laboratorio, y posteriormente, en las inoculaciones en viveros. En el presente estudio se aisló *Lactarius deliciosus* a partir de carpóforos jóvenes, recolectados de plantaciones de *Pinus radiata* de la Comuna de Ninhue, Provincia de Ñuble, VIII Región. Dicha cepa se caracterizó *in vitro*, en dos medios de cultivo sólido, Melin-Norkrans-modificado (MNM) y Aneurina-Acido fólico-Agar (BAF), incubándose a 24 °C en oscuridad, en donde se determinó velocidad de crecimiento radial (mm/día), y en medio de cultivo líquido BAF, se evaluó crecimiento miceliar, variación del pH y determinación del consumo de azúcares en el medio. Todos los medios de cultivos empleados (sólidos y líquidos) fueron ajustados a pH 5,8. Los resultados del estudio muestran un mayor incremento en velocidad media de crecimiento radial en el medio de cultivo BAF, mostrando diferencias significativas respecto al medio de cultivo MNM. La producción de biomasa miceliar en el medio líquido aumentó progresivamente a medida que avanzaban los días de incubación, induciendo ello una disminución moderada del pH del medio de cultivo, y un aumento en el consumo de azúcar producto del crecimiento del hongo.

Palabras clave. *Lactarius deliciosus*, velocidad crecimiento, variación de pH, azúcares reductores.

INTRODUCCIÓN

La adecuada selección de los hongos micorrícicos y su posterior manipulación debe ser una preocupación permanente de viveristas y silvicultores para obtener plantas forestales de calidad. Al respecto, se debe considerar que no todos los hongos micorrícicos funcionan de igual forma en un ambiente determinado, como tampoco, un hongo concreto es el más efectivo en todos los ambientes (Honrubia *et al.*, 1992; Pereira, 2002, Pereira y Chávez, 2007). Es fundamental por tanto conocer bien la biología de las especies fúngicas y sus exigencias ecológicas para utilizar la más adecuada según los distintos ecosistemas donde se ubicarán las plántulas micorrizadas (Honrubia *et al.*, 1992). El crecimiento de hongos en medios de cultivo sólidos es uno de los métodos más utilizados para estudiar la fisiología de los microorganismos debido a que el diámetro de las colonias y la velocidad de crecimiento radial son parámetros muy empleados en bioensayos y en investigaciones fisiológicas (Trinci, 1969, Pirt, 1975, Santiago-Martínez *et al.*, 1995; Vázquez-García *et al.*, 2002). Por otra parte, el conocimiento de las características biológicas y fisiológicas de los micelios de los hongos ensayados, así como la especificidad que presentan con determinados hospedantes, son fundamentales a la hora de elegir las especies idóneas para inoculaciones controladas en vivero. Por lo anteriormente señalado se ha decidido en este estudio, determinar la velocidad media de crecimiento radial de *L. deliciosus* en medios de cultivo BAF y MNM, como también la producción de biomasa miceliar, disminución del pH y consumo de azúcares reductores en el medio de cultivo BAF.

MATERIALES Y METODOS

El hongos ectomicorrícico utilizado en este estudio corresponden a *Lactarius deliciosus* L. Gray, especie recolectada en plantación de *Pinus radiata* de la Provincia de Ñuble, VIII Región, Chile. Este hongo fue aislado en laboratorio a partir de los cuerpos fructíferos e identificado de acuerdo a características macroscópicas y microscópicas (Valenzuela, 1998; Gerhardt *et al.*, 2000; Lazo, 2001). Los medios de cultivo utilizados fueron Melin-Norkrans-modificado (MNM) (Marx, 1969) y Aneurina-Acido fólico- Agar (BAF) (Honrubia *et al.*, 1995), con pH ajustado a 5,0, 7,0, y 9,0, agregando HCl o KOH, según correspondiera.

Determinación de la velocidad de crecimiento radial de Lactarius deliciosus. A partir de colonias en crecimiento activo fueron extraídos discos de agar micelio de 5 mm de diámetro, los que se transfirieron a placas de Petri de 10 cm de diámetro, con medio de cultivo MNM y BAF. Las placas de Petri se incubaron en estufa a $24 \pm 1^\circ \text{C}$ durante 30 días, tiempo durante el cual se midió el crecimiento radial de las colonias con regla graduada y se caracterizó el crecimiento de la cepa fúngica. Finalizado el periodo de evaluación se ajustaron los datos mediante una ecuación de regresión (Harnett, 1987) con la finalidad de determinar la pendiente de la curva de crecimiento y el promedio de crecimiento por día (mm/día) (Santiago-Martínez, 1992, Santiago-Martínez *et al.*, 1995, Vázquez-García *et al.*, 2002).

Producción de biomasa en medio líquido, disminución de pH y consumo de azúcares reductores. De los cultivos stock de la especie fúngica fueron retirados 4 discos de agar-micelio (5 mm diámetro) para ser transferidos a matraces Erlenmeyer (100 ml) que contenían 60 ml de medio líquido BAF con pH 5,8, tapados con paño de fibra sintética y papel kraft, previamente esterilizados a 121°C durante 15 minutos. Posteriormente, los matraces fueron incubados en oscuridad a $24 \pm 1^\circ \text{C}$. Cada diez días (de un total de cincuenta) se evaluó la producción de biomasa miceliar, para ello se procedió a recuperar la biomasa producida, filtrando el medio a través de papel filtro, previamente pesado. La masa miceliar retenida en el papel filtro, fue llevada a la estufa a 60°C por 24 horas con el fin de determinar su peso seco, además, se evaluó la disminución de pH a través de un pHímetro marca HANNA instrument modelo HI 8424 en el medio de cultivo y se determinó el consumo de azúcares reductores a través del método que utiliza el reactivo DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (Miller, 1959).

Análisis estadístico. Para los análisis estadísticos fue utilizado el software *Statistica* versión 6.0. Para determinar que especie produjo la mayor velocidad media de crecimiento, mayor disminución de pH y mayor consumo de azúcar reductores, se utilizó un experimento factorial. Un análisis de varianza (One-way ANOVA $P < 0,05$) fue aplicado para un diseño completamente aleatorio. Para establecer los tratamientos en los que existieron diferencias estadísticas se aplicó la prueba de Tukey (Steel y Torrie, 1989) para comparaciones múltiples, con nivel de significancia de $P < 0,05$. Todos los ensayos fueron realizados en triplicado para la especie fúngica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*Caracterización de colonias de **Lactarius deliciosus** (L.: Fr.) S.F. Gray.* Micelio de color crema-anaranjado. Micelio aéreo blanquecino a grisáceo, escaso y de aspecto fibroso, con puntos de color verde irregularmente distribuidos. Algunas cepas presentan una coloración verde muy patente en toda la superficie de la colonia. Margen irregular, blanco-crema. Reverso de coloración no uniforme, crema-anaranjado. El micelio de esta especie ha sido caracterizado por varios autores. Al respecto las características de los aislamientos realizados coinciden en morfología y coloración de los micelios con Oort (1981) y Torres (1992), quienes trabajaron con el medio nutritivo BAF.

Velocidad de crecimiento radial. Los resultados muestran que la especie de hongo ectomicorrícico estudiada presenta un comportamiento diferente en crecimiento en los medio de cultivo probado (Figura 1). Se observa que *L. deliciosus* logra la mayor velocidad de crecimiento en el medio de cultivo BAF (1,14 mm/día), mientras que el menor desarrollo se presenta en el medio MNM (0,32 mm/día). Los resultados encontrados son estadísticamente diferentes si se compara el crecimiento de *L. deliciosus* en ambos medios de cultivo probados (BAF y MNM).

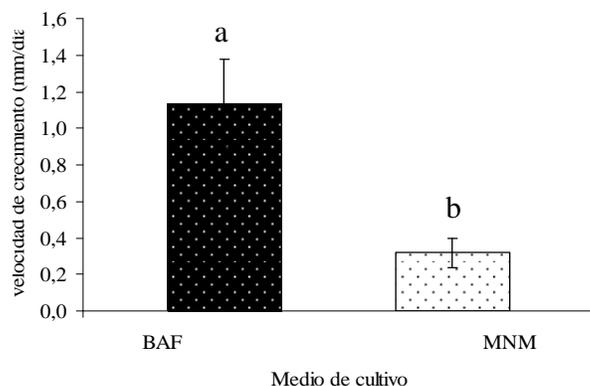


Figura 1. Crecimiento de *L. deliciosus* en medio de cultivo BAF y MNM.

Producción de biomasa. Los resultados de la figura 2 muestran que *L. deliciosus* en condiciones estáticas presenta un buen crecimiento de biomasa en medio líquido (BAF). Para éstas condiciones se presenta el mayor crecimiento en biomasa entre los 40 y 50 días de cultivo (56,4 y 70,4 mg, respectivamente). Los resultados observados son estadísticamente diferentes si se

compara el crecimiento de *L. deliciosus* obtenido a los 50 días, respecto de los 10, 20 y 30 días de cultivo, como también el crecimiento de biomasa de 40 días, respecto a los 10 y 20 días. Por otra parte entre los periodo de 40 y 50 días de evaluación no se observan diferencias estadísticas significativas en el crecimiento de la biomasa miceliar en condiciones estáticas.

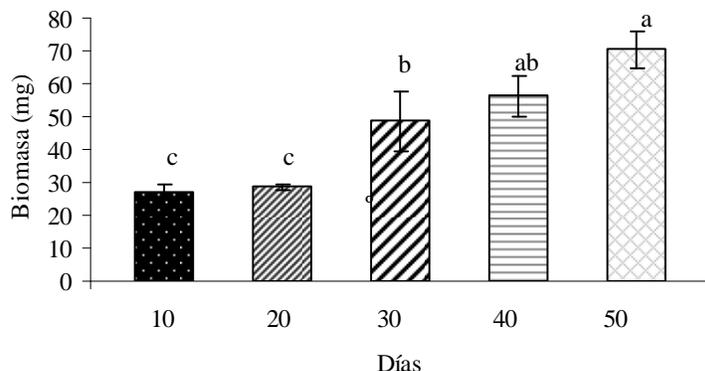


Figura 2. Producción de biomasa miceliar de *L. deliciosus* en medio de cultivo BAF en condiciones estáticas, con pH ajustado a 5,8.

Variación del pH en el medio de cultivo. Los resultados indican que la especie *L. deliciosus* provoca cambios en el pH del medio de crecimiento, respecto del pH inicial, tendiendo éstas hacia la acidez a medida que transcurre el periodo de cultivo (Figura 3), observándose diferencias estadísticas significativas entre diferentes periodos de evaluación. Ello probablemente se pueda explicar por la generación, por parte del micelio del hongo en la producción de ácidos orgánicos y la absorción de iones, lo que provocaría la acidificación del medio de cultivo.

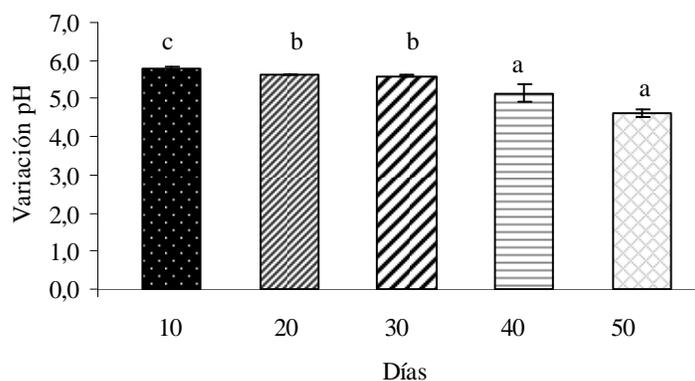


Figura 3. Disminución del pH del medio a 50 días de incubación en el medio de cultivo BAF, con pH inicial ajustado a 5,8.

Consumo de Azúcares reductores. En el período de incubación de *L. deliciosus* se determinó el consumo de azúcares en el medio de cultivo cada diez días, a través del método que utiliza el reactivo DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) y que permite determinar el consumo de azúcares en la forma de azúcares reductores (Miller, 1959).

Tabla 1. Concentración de azúcares reductores en los medios de cultivo a los 50 días de incubación de *L. deliciosus*

Azúcares reductores (mg/ml)	
Concentración inicial día	BAF
0	11,7
10	11,6 ± 0,24
20	11,1 ± 0,02
30	10,8 ± 0,02
40	10,6 ± 0,25
50	10,4 ± 0,02

Valores corresponden al promedio de tres repeticiones ± DE.

Los resultados de la tabla 1 indican que en el medio de cultivo BAF se produce una disminución gradual en la concentración de azúcares reductores producto del crecimiento miceliar de *L. deliciosus* en condiciones estáticas de cultivo. Se observa que el mayor consumo de azucares reductores se produce a los 50 días cultivo de *L. deliciosus*, lo que se relacionó con la mayor producción de biomasa miceliar del hongo en estudio.

CONCLUSIONES

La especie *L. deliciosus* logra la mayor velocidad media de crecimiento radial en el medio de cultivo BAF.

El mayor crecimiento miceliar en condiciones estáticas se presentó entre los 40 y 50 días de incubación en el medio de cultivo BAF.

El crecimiento de la biomasa miceliar de *L. deliciosus* produce disminución de pH del medio, como también, disminución de azucares reductores.

BIBLIOGRAFÍA

- Gerhardt E, J Vila, X Llimona. 2000. Hongos de España y de Europa. Barcelona, España. Omega. 957 p.
- Harnett, D. 1987. Introducción al análisis estadístico. Editorial Iberoamericana. Delaware. EE.UU. 712 pp.
- Honrubia M, P Torres, G Díaz, A Morte. 1995. Biotecnología Forestal: Técnicas de micorrización y micropropagación de plantas. Murcia, España. 84 p.
- Lazo W. 2001. Hongos de Chile. Atlas micológico. Santiago, Chile. 223 p.
- Marx D H. 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. *Phytopathol.* **59**: 153-163.
- Miller GL. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. Vol. 31, Nº. 3: 426 – 428 pp.
- Oort AJP. Nutritional requirements of *Lactarius* species, and cultural characters in relation to taxonomy. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, Oxford, New York, 1981.
- Pereira G., D. Chávez, 2007. Hongos Ectomicorrícicos como herramienta silvícola para incorporar valor agregado al bosque. Universidad de Concepción, Facultad Ciencias Forestal. Alternativas de Diversificación Productiva Forestal en el Secano Costero de la Provincia de Ñuble. pp 55-69.
- Pirt SJ. 1975. Principles of microbes and cell cultivation. London, Blackwell Scientific Publications Ltd. Oxford.
- Santiago-Martínez G, L Varela, A Estrada-Torres, V Cuaxilo. 1995. Efecto de seis medios de cultivo sobre el crecimiento de tres cepas de *Pisolithus tinctorius*. *Revista Mexicana de Micología* 11:57-68.
- Santiago-Martinez G., L. VARELA, A. ESTRADA-TORRES, V. CUAXILO. 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 M.G., 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.
- Steel R., J. Torrie. 1989. Bioestadística: Principios y procedimientos. Segunda edic. McGraw Hill. México. 662 p.
- Torres P. Estudio de las micorrizas del pino carrasco (*Pinus halepensis* Miller). Tesis doctoral (inéd.). Murcia 1992.
- Trinci APJ. 1969. A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. J Gen Microbiol. Vol 57:11-24.
- Valenzuela E. 1998. Guía de campo para setas (Agaricales) de la Isla Teja, Valdivia. Valdivia, Chile. 50 p
- Vázquez-García A, G Santiago-Martínez, A Estrada-Torres. 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* 73:1-15.
- Vazquez-Garcia A., G. Santiago-Martinez, A. Estrada-Torres. 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.



UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES
4° CONGRESO CHILENO DE CIENCIAS FORESTALES

Aceptación para publicación en plataforma virtual

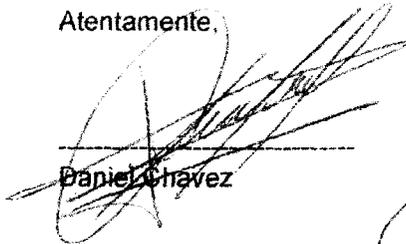
Señores
Comisión Organizadora
4° Congreso Chileno de Ciencias Forestales
Universidad de Talca, Chile.

Estimados Señores

Quien suscribe, autores de la ponencia: "Crecimiento in vitro de *Lactarius deliciosus* en medio de cultivo BAF y MNM." autorizan a los organizadores del 4° Congreso Chileno de Ciencias Forestales, a la publicación del texto completo en la plataforma virtual *Dspace* de la Biblioteca de la Universidad de Talca, permitiendo con ello a su acceso a través de la Internet.

El texto, que se envió en formato Word, será transformado a formato pdf para su publicación. Su difusión estará disponible hasta el mes de Octubre del 2010.

Atentamente,



Daniel Chavez



Guillermo Perera



Angela Machuca

Talca, junio de 2009.