



ARTÍCULO

## Crecimiento *in vitro* de cuatro cepas de *Lactarius deliciosus* bajo diferentes niveles de pH y medios de cultivo.

Patricio Chung Guin-Po<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Ingeniero Forestal. Instituto Forestal, sede Biobío. [patricio.chung@infor.cl](mailto:patricio.chung@infor.cl)

\*Autor para correspondencia

DOI: <https://doi.org/10.52904/0718-4646.2022.575>

Recibido: 02.12.2022; Aceptado 16.12.2022

### RESUMEN

Se analiza el comportamiento *in vitro* de 4 cepas de *Lactarius deliciosus*, hongo comestible asociado a plantaciones de *Pinus radiata*. Se evaluó el crecimiento radial (CR), la velocidad media de crecimiento (VMC) y la producción de biomasa (B) para cultivos creciendo *in vitro* en los medios PDA (Papa Dextrosa Agar), MNM (Medio Melin-Norkrans) y BAF (Biotina Aneurina ácido Fólico), bajo 5 niveles de pH (4,8, 5,3, 5,8, 6,3 y 6,8). A nivel de cepas, el análisis estadístico de las variables estudiadas indica interacciones entre los factores medio de cultivo y pH, con variaciones en la significancia en las respuestas obtenidas. Los mayores valores medios de CR, VMC y B se presentaron en el medio BAF y niveles de pH entre 5,3 y 6,8, pero con respuestas estadísticas de significancia variables dependiendo de la cepa analizada. Comparaciones entre las variables CR, VCM y de B, muestran una alta correlación entre ellas para las cepas estudiadas.

**Palabras clave:** *Lactarius deliciosus*, cepas, pruebas de crecimiento, *in vitro*

### SUMMARY

The *in vitro* behavior of 4 strains of *Lactarius deliciosus*, an edible fungus associated with *Pinus radiata* plantations was analyzed. Radial growth (RC), mean growth rate (MGR) and biomass production (B) were evaluated for cultures growing *in vitro* on PDA (Papa Dextrose Agar), MNM (Melin-Norkrans medium) and BAF (Biotin Aneurin Folic Acid) media, under 5 pH levels (4.8, 5.3, 5.8, 6.3 and 6.8). At the strain level, the statistical analysis of the variables studied indicated interactions between the factors culture medium and pH, with variations in the significance of the responses obtained. The highest mean values of CR, VMC and B were presented in BAF medium and pH levels between 5.3 and 6.8, but with statistical responses of varying significance depending on the strain analyzed. Comparisons between CR, VCM and B variables show a high correlation between them for the strains studied.

**Key words:** *Lactarius deliciosus*, strains, growth testing, *in vitro*

## INTRODUCCIÓN

Hace miles de años que los recursos micológicos presentes en los bosques comenzaron a ser utilizados por los pueblos originarios para su alimentación. En la actualidad es una práctica que se ha masificado en muchas zonas del país con masas forestales, y donde los hongos comestibles constituyen un recurso natural de gran importancia económica y social.

Los hongos comestibles presentes en los bosques de Chile representan un valioso producto forestal no maderero, cuya recolección genera empleo y alimentación. Por lo mismo, el recurso ha adquirido gran importancia en las zonas rurales, gracias a una demanda creciente de productos naturales de tipo orgánico y de características funcionales.

A nivel mundial se ha descrito del orden de 100.000 especies de hongos (Hawksworth, 2001), de un total estimado de entre 2,2 y 3,8 millones (Hawksworth & Luecking, 2017). Dentro de estos, se han descrito científicamente más de 2.000 especies de hongos comestibles (Boa, 2004). En Chile se han registrado más de 3.000 especies de hongos (Mujica & Vergara, 1980), identificándose unas 53 especies de hongos silvestres comestibles (Valenzuela, 2003), cifras que pudieran ser mucho mayores en la actualidad.

La diversidad de especies comestibles aumentó con la introducción de la especie maderera *Pinus radiata*, bajo cuyo dosel se desarrolla una variedad de hongos simbioses comestibles, entre los cuales destacan los de los géneros *Suillus* y *Lactarius*. Estas ectomicorrizas acompañantes del pino han sido, y siguen siéndolo, de gran importancia en el contexto social y económico de muchas familias rurales, representando en la actualidad para el país exportaciones comerciales por varios millones de dólares.

Uno de los recursos micológicos de gran valor social, comercial y culinario dentro de las plantaciones de pino es el hongo ectomicorrízico comestible *Lactarius deliciosus*, especie muy demandada en los mercados europeos, asiáticos y de África del Norte, lo que ha generado una importante fuente de ingresos para los recolectores perteneciente a estos continentes (Boa, 2004) como de otras zonas del Hemisferio Sur. Para el caso de Chile, este recurso micológico reportó en el año 2021 exportaciones por US\$ 581.844 FOB, derivados de 231 toneladas exportadas a distintos mercados, mayoritariamente al español (INFOR, 2022), siendo el formato principal de exportación el salmuerado, y lo que resta como producto congelado. Claramente, el potencial para producir este hongo en Chile, como un nuevo alimento para el mercado doméstico y, lo que es más importante, para los mercados del Hemisferio Norte fuera de temporada, es considerable (Voces *et al.*, 2009). 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 (Chávez *et al.*, 2009).

*Lactarius deliciosus* es uno de las pocas especies del hemisferio norte que se introdujo accidentalmente al hemisferio sur y que ahora se encuentra muy extendida en Australia, Chile y Sudáfrica (Wang *et al.*, 2021). En Nueva Zelanda este hongo fue introducido en 2007 para el desarrollo de su cultivo asociado a plantaciones de *Pinus radiata* (Guerin *et al.*, 2014). Sus esporocarpos generalmente se recolectan en rodales jóvenes, siendo un miembro típico de las primeras etapas de sucesión (Ortega-Martínez *et al.*, 2011). Se trata de un hongo ectomicorrízico presente solo en bosques con pináceas (Nuytinck y Verbeken, 2007), cuya proliferación de cuerpos fructíferos sucede principalmente en los meses de otoño, aunque podrían aparecer también en menor medida en la época de primavera, cuando las condiciones ambientales permiten su desarrollo. Además de su importancia económica como PFNM, posee como todo hongo micorrízico una importancia ecológica dentro de los ecosistemas forestales, por lo que cualquier actividad dentro del bosque o eventos que sean causados en forma natural o antrópica y que pudieran producir alteraciones en el suelo y en el bosque, tendrían un importante impacto en la supervivencia y fructificación de estos hongos.

La simbiosis establecida entre hongos y especies forestales constituye una ventajosa oportunidad para implementar líneas de investigación y desarrollo innovativos, que conjuguen la recuperación de suelos degradados, la restauración y enriquecimiento del bosque, mejorando el desempeño de las plantaciones, con la generación de productos intermedios de alto valor económico, ecológico y social, como son los hongos ectomicorrízicos comestibles, no obstante, su producción natural en el bosque es variable, de modo que el interés por obtener una producción alta y estable, ha motivado iniciativas para cultivarlos mediante el establecimiento de plantas inoculadas con cepas adaptadas a condiciones medioambientales específicas (Chung, 2020). En varios países se han desarrollado trabajos con *L. deliciosus*, entre ellos, en Nueva Zelanda (Wang *et al.*, 2001) y Francia (Wang *et al.*, 2012) se introdujo la especie con miras a determinar cepas ideales para realizar la micorrización de *Pinus radiata* y otras especies y su posterior establecimiento en plantaciones.

En lo que respecta a la simbiosis micorrízica, esta es una estrategia nutricional que han desarrollado la mayoría de las plantas y algunos hongos, que les asegura un beneficio mutuo. La mayor supervivencia en campo de plantas bien micorrizadas, respecto de las que no lo están, especialmente en condiciones difíciles, es un factor que define la importancia de una adecuada micorrización en vivero. La adecuada

selección de hongos y la posterior manipulación biotecnológica de las micorrizas permite obtener plantas forestales de calidad, por lo que las plantas sometidas a micorrización controlada aumentan sustancialmente su viabilidad, generando otra alternativa productiva dada por la producción de hongos silvestres comestibles de alto valor.

Las micorrizas (*mycos*=hongo, *rhiza*=raíz) constituyen entidades simbióticas entre un hongo y las raíces de una planta. El nombre fue dado por el botánico alemán Frank en 1885, aunque estas asociaciones fueron estudiadas a partir de 1910, y gracias a trabajos realizados por Mosse, en 1955, comienzan en estudios relacionados al crecimiento de vegetales e interacciones que se suceden con otros organismos del suelo (Vasco, 2003).

Se estima que alrededor del 95% de las plantas vasculares participan en este tipo de asociaciones, existiendo algunas excepciones que no llegan a formar simbiosis (Honrubia *et al*, 1992). Esta asociación simbiótica raíz-hongo es el resultado de la evolución conjunta entre plantas y hongos, siendo las micorrizas una norma en la nutrición de la mayoría de las plantas terrestres y no algo excepcional (Trappe, 1977, 1987; Brundrett y Cairney, 2002).

Las micorrizas se clasifican en varios grupos, siendo una de ellas las ectomicorrizas. Dentro de estas últimas se ubica el género *Lactarius*, que forma una relación mutualista principalmente con las raíces de plantas del género *Pinus*. Esta se forma predominantemente sobre las puntas de las raíces finas del hospedante, distribuyéndose irregularmente a través del perfil del suelo, siendo más abundante en las capas superiores del suelo con mayor contenido humus, que en las capas bajo el suelo mineral (Brundrett *et al*, 1996) y donde presta una importante función en el ciclo de nutrientes de los ecosistemas forestales.

Gracias a su extensa red de micelios, las micorrizas funcionan como un sistema de absorción que se extiende por el suelo proporcionando a las plantas agua y nutrientes como nitrógeno y fósforo; por su parte, el hongo recibe azúcares y carbohidratos provenientes de la fotosíntesis efectuada por la planta. La presencia de micorrizas aumenta la resistencia de las plantas a situaciones extremas como la sequía, temperaturas extremas del suelo, valores extremos de pH y brinda protección frente al ataque de hongos patógenos, áfidos y nemátodos. Adicionalmente, estos hongos simbioses proporcionan hormonas estimulantes del crecimiento y permite una mayor longevidad de las raíces (Slankis, 1973; *cit. por* Ipinza y Serrano, 1982).

Para determinar las condiciones ideales para que se establezca y desarrolle el hongo en conjunto con la planta, se ha hecho necesario una serie de investigaciones en torno al desarrollo de una planta ideal inoculada con el hongo, que pueda desarrollar esta simbiosis previo y posterior a las labores de plantación conjuntamente con el desarrollo de hongos comestibles.

Para realizar los trabajos de inoculación de plantas en vivero con hongos ectomicorrícicos específicos, se deben ejecutar un gran número de investigaciones para desarrollar protocolos que posibiliten el contacto y una exitosa unión hongo-planta dando lugar a las formaciones ectomicorrícicas. Para ello, uno de los aspectos de importancia, es la elaboración del material inoculante, y dentro de este, definir la cepa del hongo previamente seleccionada y masificada bajo parámetros ambientales y químicos fijados en laboratorio, como son el pH y la disponibilidad de nutriente.

Para la selección de las cepas, se hace imprescindible contar con un banco de cultivos puros desde donde poder abastecerse y seleccionar material de acuerdo a características específicas de uso. Para este efecto, el Instituto Forestal ha establecido un banco de cepas donde mantiene diversos hongos y cepas, para generar inoculantes fúngicos que puedan ser utilizados para mejorar la rentabilidad de plantaciones forestales a través de una producción de hongos ectomicorrícicos comestibles de alto valor social y económico.

Por lo tanto, para los trabajos de inoculación, con hongos micorrícicos, se requiere de inoculantes fúngicos a gran escala, por estas razones es necesario definir la composición óptima del medio de cultivo

para cada hongo tomando en cuenta las diferentes cepas y una gran variación de condiciones del suelo (Islam y Ohga, 2013).

El presente trabajo analiza el desempeño de 4 cepas de *Lactarius deliciosus* bajo diferentes condiciones controladas de cultivo *in vitro*, evaluando el efecto de 3 medios de cultivo (PDA, MMN y BAF) y 5 niveles de pH (4,8, 5,3, 5,8, 6,3 y 6,8), sobre el crecimiento radial, velocidad media de crecimiento y biomasa producida por cada una de las cepas evaluadas de esta especie. Con esto se pretende mejorar el conocimiento que permita optimizar el desarrollo de cultivos en laboratorio, para posteriormente continuar con los trabajos en vivero y en campo.

## MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizó 4 cepas de *Lactarius deliciosus* (Figura 1), procedentes del Banco de Cepas del Instituto Forestal de Chile (INFOR) y cuyo material fue colectado desde plantaciones de *Pinus radiata* en diferentes regiones del país (Cuadro 1).

Los cultivos puros fueron obtenidos de acuerdo a la técnica descrita por Molina y Palmer (1982), a partir del sombrero de un esporocarpio joven y cultivados sobre medio PDA (Extracto de papa dextrosa agar), bajo oscuridad y a temperatura de 23°C.



Figura 1. Fructificación de *Lactarius deliciosus* en bosque de pino (*Pinus radiata*)

El material original aislado de cada cepa fue masificado en discos de Petri con medio que contenía 4 g. de extracto de papa, 20 g. de dextrosa y 15 g. de agar a pH 5.6 incubados a 23°C en oscuridad. Para ello, se extrajo desde el material original discos de 5 mm, los que fueron puestos por 30 días en el centro de placas Petri conteniendo 20 ml del medio nutritivo. Durante este período se generó suficiente tejido micelial para ser utilizados en la instalación del estudio.

Para instalar el estudio, se usó los medios extracto de papa-dextrosa-agar (PDA) (Difco, Becton Dickinson and Company, USA), Melin-Norkrans (MMN) (Marx, 1969) y Biotina-Aneurina-Ácido Fólico (BAF) (Moser, 1960). Cada medio se ajustó a 5 valores de pH (4,8, 5,3, 5,8, 6,3 y 6,8). Se evaluó el comportamiento de cada cepa en relación a su crecimiento radial (CR) en milímetros, velocidad media de

crecimiento (VMC) en milímetros por día y producción de biomasa (B) en mg al finalizar el ensayo, en cada una de las combinaciones de medio y pH descritas. Se usó cinco repeticiones (placas) por cada tratamiento.

**Cuadro 1.** Identificación y punto de recolección de las cepas de *Lactarius deliciosus* usadas en el estudio

Código Cepa	Comuna	Lat S; Long O;	Altitud	Tipo de suelo	Edad rodal (años)
IF725004	Constitución, Maule	35°32'11"; 72°17'32";	353	Franco arcilloso	25
IF1608006	Cobquecura, Ñuble	36°10'28"; 72°40'06";	554	Franco arcilloso arenoso	10
IF914002	Collipulli, Araucanía	37°56'50"; 72°27'07";	242	Arcillo limoso	20
IF936001	Nueva Imperial, Araucanía	38°41'24"; 73°05'21";	71	Franco limoso	18

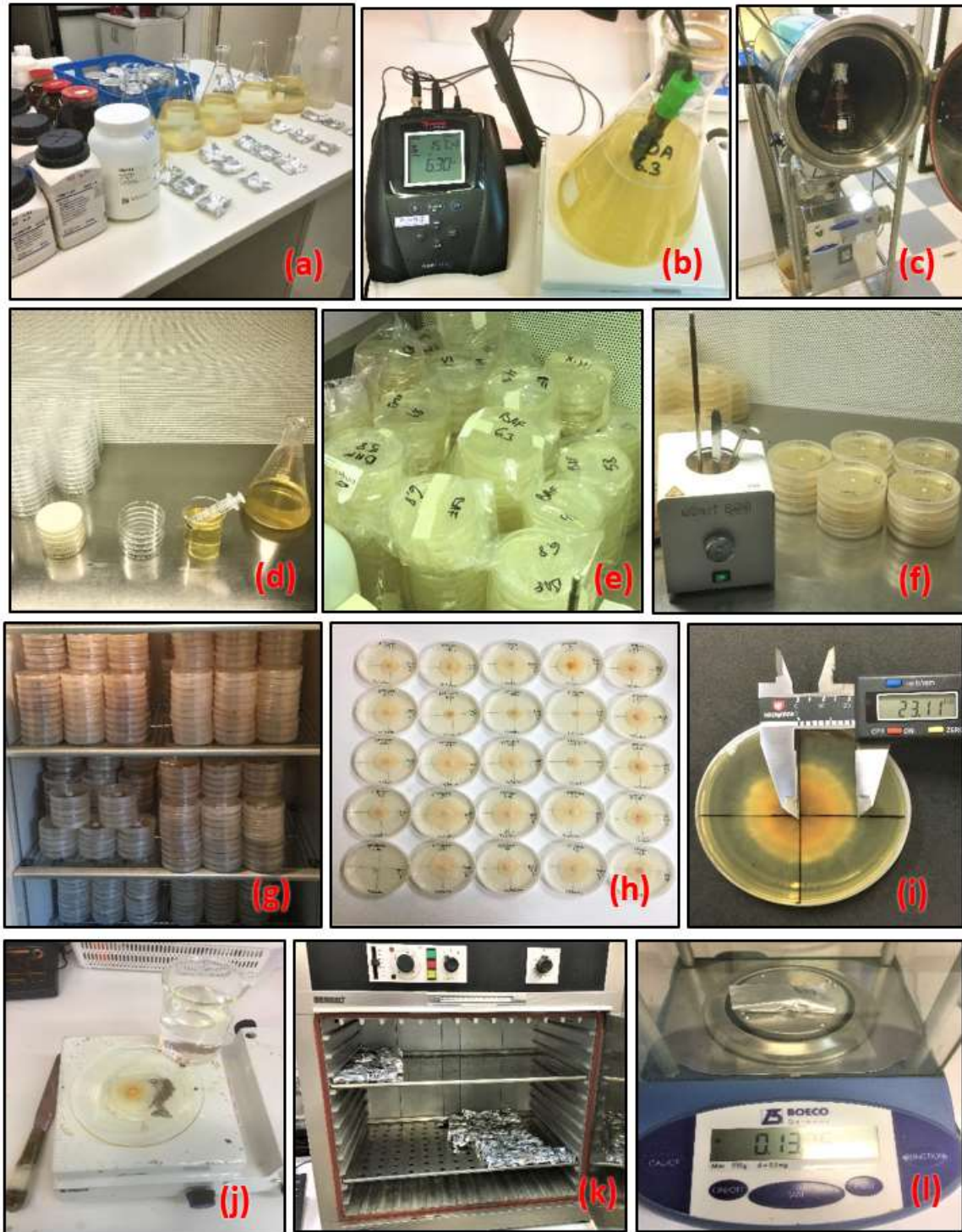
Los medios de cultivos se esterilizaron en autoclave a 121°C y 1,2 atm de presión por 30 minutos, ajustando previamente sus valores respectivos de pH con HCL o KOH 1N y con mediciones realizadas con un peachímetro marca Thermo Scientific Orion modelo Star A111. Finalizado el proceso de esterilización, los medios fueron llevados a una Cámara de Flujo Laminar marca Filtromet modelo H24302, de fabricación nacional, donde se realizó el vaciado de los medios de cultivo a placas de Petri de 90 x 15 mm, ayudados por una jeringa de 25 ml, colocando 20 ml de medio en cada placa. Posteriormente, se dejaron enfriar en ambiente estéril hasta su uso. El proceso de inoculación de los medios con las cepas de *Lactarius deliciosus* se realizó con la ayuda de un sacabocado que permitió obtener segmentos circulares de 5 mm de diámetro desde los recipientes que contenían el material miceliar madre. Cada segmento fue colocado en el centro de una placa de Petri para cada uno de los tratamientos, procediendo luego a sellarlos con cintas de parafilm y posteriormente ser marcados con el nombre de la especie, código de cepa, número de repetición, medio de cultivo, nivel de pH y fecha de instalación. Una vez finalizada la operación de instalación de los ensayos con los segmentos miceliares respectivos, estos se ubicaron en una Cámara de Crecimiento marca Forma Scientific modelo 3744, en oscuridad y a 24°C de temperatura por 35 días.

Para medir el crecimiento radial (CR) se usó un pie de metro digital marca Ubermann. Cada medición radial se realizó en 4 direcciones a partir del centro donde se ubicó el disco de micelio, registrándose el crecimiento de las cepas en cada uno de los discos de cada tratamiento cada 7 días por un lapso de 35 días. Para obtener el crecimiento cada 7 días y el CR total de cada disco de Petri con los tratamientos respectivos, a cada una de ellas se le descontó el radio correspondiente al segmento de agar circular de 5 mm de diámetro que se utilizó para realizar la inoculación.

Para obtener los valores de biomasa (B) al final del período de evaluación, se extrajo desde los discos de Petri el micelio obtenido junto con el medio con agar. Para eliminar el agar se aplicó la metodología utilizada por [Santiago-Martínez et al. \(2003\)](#), que consiste en eliminar el agar por calentamiento en baño maría y luego enjuagar la colonia con agua caliente, para posteriormente secar en estufa a 60°C por 48 horas hasta peso constante. Luego se procedió a pesar cada muestra, descontando el peso del papel y del material inicial utilizado como inóculo, obteniendo finalmente la biomasa seca producida en cada tratamiento (Figura 2).

Para determinar la velocidad media de crecimiento (VMC) de las cepas, los datos de crecimiento radial cada 7 días por 35 días, se ajustaron mediante una ecuación de regresión para calcular la pendiente de la curva de crecimiento y obtener el promedio de crecimiento del hongo por día ([Santiago-Martínez et al., 1995](#)).

El ensayo se estableció bajo un diseño completamente aleatorizado, con 5 repeticiones para cada unidad experimental. Los resultados se evaluaron mediante análisis de varianza (ANDEVA), utilizando para ello, el software estadístico INFOSTAT versión 2015p. La homogeneidad de varianza se evaluó mediante la prueba de Levene ( $P \leq 0,05$ ). En tanto que el supuesto de normalidad de los residuos se evaluó a través de la prueba de Shapiro-Wilks ( $P \leq 0,05$ ). Para detectar diferencias significativas entre los tratamientos, se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ([Montgomery, 1984](#)), con  $P \leq 0,05$ .



**Figura 2.** (a) Confección de medios de cultivo; (b) Ajuste de valores de pH; (c) Esterilización de medios de cultivo en autoclave; (d) Vaciado de medios de cultivo en placas de Petri; (e) almacenaje de medios en placas de Petri; (f) Instalación de ensayo con sacabocado; (g) Ensayo instalado bajo oscuridad y 24+/-1 °C; (h) Aspecto crecimiento de cepa de *Lactarius deliciosus* en medio BAF y bajo distintos niveles de pH; (i) Medición de crecimiento radial de cepas; (j) Limpieza de tejido micelia de medio de cultivo; (k) Secado en estufa por 48 horas a 60°C de tejido miceliar; (l) Pesaje para determinar biomasa producida por cada uno de los tratamientos

## RESULTADOS

### A Nivel de Cepas

Las cepas IF1608006, procedente de la región de Ñuble, e IF725004, procedente de la región del Maule, muestran interacciones significativas entre los factores medio de cultivo y nivel de pH con efectos sobre las variables CR, VMC y B. En las cepas procedentes de la Araucanía existe interacción entre los dos factores evaluados sólo para las variables CR y VMC (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Significancia estadística del análisis de varianza (ANDEVA) para los valores medios obtenidos de las variables crecimiento radial, velocidad media de crecimiento y biomasa para cepas de *Suillus luteus*. \* Efectos significativos ( $P \leq 0,05$ )

Cepa	Factor	Crecimiento Radial	Velocidad Media de Crecimiento	Biomasa Seca
IF1608006 (Ñuble)	Medio	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**
	pH	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**
	Medio x pH	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**
IF725004 (Maule)	Medio	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**
	pH	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**
	Medio x pH	0,0044**	0,0026**	<0,0002**
IF914002 (Araucanía)	Medio	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**
	pH	<0,0001**	<0,0001**	0,0080**
	Medio x pH	<0,0001**	<0,0001**	0,0598
IF936001 (Araucanía)	Medio	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**
	pH	<0,0001**	<0,0001**	<0,0079**
	Medio x pH	<0,0001**	<0,0001**	0,2860

- *Crecimiento radial*

La cepa IF725004 exhibe mayor crecimiento en el medio BAF con pH igual o superior a 5,3, siendo su mejor desempeño con pH 6,8 ( $16,97 \pm 0,79$  mm), y con diferencias significativas con el crecimiento obtenido a pH 4,8, como también con los demás medios de cultivo. Los valores promedios significativamente más bajos fueron en medio MMN, sin diferenciarse entre los niveles de pH, y sólo superando al crecimiento más bajo entregado por el medio PDA a pH 4,8 (Cuadro 3).

En la cepa IF1608006 el mayor crecimiento fue en los medios BAF (pH 5,3 a 6,3) y MMN (pH 6,3 y 6,8), sin diferenciarse estadísticamente entre ellos. Los montos más altos se logran en el medio BAF con pH 6,3 y MMN con pH 6,8, con valores de  $10,42 \pm 0,77$  y  $10,34 \pm 0,82$  mm, respectivamente. Los crecimientos radiales más bajos y sin diferencias significativas entre ellos, fueron obtenidos en los tres medios de cultivo con pH 4,8, como también el medio PDA con pH 5,3 y 6,8 (Cuadro 3).

En la cepa IF914002 los mayores crecimientos radiales se obtuvieron para los medios BAF y PDA con pH entre 5,3 y 6,8 para el primero, y de 5,8 a 6,3 para el segundo. Los valores promedios de CR para los medios antes señalados y dentro de los rangos de pH mencionados, no presentaron diferencias significativas entre ellos, obteniendo un valor máximo de  $15,07 \pm 3,21$  mm en el medio BAF, con pH de 6,3. Los valores menores y que no presentaron diferencias significativas entre sí fueron obtenidos en el medio PDA a pH 4,8 y 5,3, como también en el medio MMN para un rango de pH entre 4,8 y 6,3 (Cuadro 3).

En relación a la cepa IF936001, las respuestas más favorables en crecimiento radial lo presentaron los medios BAF y PDA con pH entre 5,3 y 6,8, junto al medio MMN con pH de 5,8, con valores promedios que no presentan diferencias significativas entre ellos, con un máximo valor de  $17,54 \pm 3,80$  mm para el medio BAF a pH 5,3. El menor valor lo presentó el medio MMN con pH igual o menor a 5,3 (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Efecto de los factores medio de cultivo y nivel de pH sobre los valores medios y sus desviaciones estándar obtenidos para las variables crecimiento radial, velocidad media de crecimiento y biomasa para cepas de *Lactarius deliciosus*

Cepa	Factores			Crecimiento radial (mm)				Velocidad media de crecimiento (mm/día)				Biomasa Seca (mg)				
	Medio	pH	Medio x pH	Cepa	Medio	pH	Medio x pH	Cepa	Medio	pH	Medio x pH	Cepa	Medio	pH	Medio x pH	
IF 725004 (n=75)	PDA (n=25)	4,8	4,8	8,85 ± 3,35	b	6,74 ± 3,68	3,94 ± 0,50 a	0,26 ± 0,11	b	0,20 ± 0,12	0,11 ± 0,01 a	34,12 ± 22,48	a	18,13 ± 14,10	12,2 ± 5,67 a	
		(n=15)	5,3			a	10,17 ± 1,01 cdef			0,30 ± 0,03 bcd	0,30 ± 0,03 bcd			40,0 ± 18,72 bcd		
		5,8	defg			11,43 ± 2,81 defg	0,34 ± 0,10 cde			0,34 ± 0,10 cde	42,2 ± 18,91 cd					
		6,3	cdef			10,07 ± 3,53 cdef	0,30 ± 0,12 bcd			0,30 ± 0,12 bcd	40,8 ± 10,08 bcd					
		6,8	bcde			8,65 ± 1,80 bcde	0,24 ± 0,04 abc			0,24 ± 0,04 abc	38,0 ± 6,67 bc					
		4,8	ab			5,11 ± 1,41 ab	0,14 ± 0,05 a			0,14 ± 0,05 a	10,8 ± 3,63 a					
	MMN (n=25)	5,8	5,3	9,73 ± 4,34	b	6,14 ± 2,08	5,26 ± 0,60 ab	0,28 ± 0,14	b	0,32 ± 0,14	0,14 ± 0,02 a	34,12 ± 22,48	a	13,56 ± 3,78	39,13 ± 23,25	11,2 ± 1,92 a
		(n=15)	5,8			a	5,98 ± 2,26 abc			0,17 ± 0,07 ab	0,17 ± 0,07 ab			13,6 ± 3,58 a		
		6,3	abc			5,99 ± 1,47 abc	0,16 ± 0,04 ab			0,16 ± 0,04 ab	14,0 ± 2,35 a					
		6,8	abcd			8,36 ± 2,79 abcd	0,24 ± 0,08 abc			0,24 ± 0,08 abc	18,2 ± 2,59 ab					
		4,8	defg			11,17 ± 2,72 defg	0,34 ± 0,08 cde			0,34 ± 0,08 cde	31,4 ± 17,87 abc					
		5,3	efgh			14,30 ± 2,97 fgh	0,43 ± 0,08 def			0,43 ± 0,08 def	49,0 ± 3,32 cd					
BAF (n=25)	6,3	6,8	14,20 ± 2,74	c	9,73 ± 3,72	8,36 ± 2,79 abcd	0,43 ± 0,08	c	0,28 ± 0,12	0,24 ± 0,08 abc	54,16 ± 19,56	c	34,33 ± 16,56	18,2 ± 2,59 ab		
	(n=15)	4,8			b	11,17 ± 2,72 defg			0,34 ± 0,08 cde	0,34 ± 0,08 cde			31,4 ± 17,87 abc			
	5,3	defg			14,30 ± 2,97 fgh	0,43 ± 0,08 def			0,43 ± 0,08 def	49,0 ± 3,32 cd						
	6,8	gh			15,45 ± 1,38 gh	0,46 ± 0,03 ef			0,46 ± 0,03 ef	61,6 ± 7,96 de						
	5,8	efgh			13,13 ± 1,32 efgh	0,38 ± 0,06 def			0,38 ± 0,06 def	48,20 ± 6,53 cd						
	6,8	h			16,97 ± 0,79 h	0,51 ± 0,02 f			0,51 ± 0,02 f	80,6 ± 13,83 e						
IF 1608006 (n=75)	PDA (n=25)	4,8	4,8	4,14 ± 2,03	a	2,95 ± 1,51	1,69 ± 0,33 a	0,11 ± 0,06	a	0,07 ± 0,04	0,07 ± 0,04 ab	23,04 ± 15,72	a	9,60 ± 4,93	3,6 ± 1,52 a	
		(n=15)	5,3			a	2,92 ± 1,3 ab			0,07 ± 0,04 ab	0,07 ± 0,04 ab			12,8 ± 6,46 ab		
		5,8	cde			6,32 ± 1,13 cde	0,17 ± 0,04 cde			0,17 ± 0,04 cde	42,0 ± 8,86 ef					
		6,3	bcd			5,5 ± 1,62 bcd	0,15 ± 0,05 bcd			0,15 ± 0,05 bcd	30,4 ± 10,21 cde					
		6,8	abc			4,26 ± 1,14 abc	0,11 ± 0,03 abc			0,11 ± 0,03 abc	26,4 ± 11,01 bcde					
		4,8	abc			4,2 ± 1,69 abc	0,11 ± 0,05 abc			0,11 ± 0,05 abc	12,0 ± 0,71 ab					
	MMN (n=25)	5,8	5,3	6,41 ± 2,99	a	7,21 ± 2,61	5,51 ± 1,86 bcd	0,18 ± 0,09	a	0,22 ± 0,06	0,15 ± 0,07 bcd	28,75 ± 17,37	a	21,60 ± 8,41	40,33 ± 17,92	14,8 ± 3,83 abc
		(n=15)	5,8			b	6,99 ± 1,20 def			0,20 ± 0,04 defg	0,20 ± 0,04 defg			21,0 ± 2,55 bcd		
		6,3	efgh			9,02 ± 1,03 fgh	0,26 ± 0,03 fgh			0,26 ± 0,03 fgh	26,40 ± 2,3 bcde					
		6,8	h			10,34 ± 0,82 h	0,30 ± 0,02 h			0,30 ± 0,02 h	33,8 ± 3,03 de					
		6,3	ab			2,96 ± 1,06 ab	0,07 ± 0,03 ab			0,07 ± 0,03 ab	13,2 ± 3,7 ab					
		4,8	efgh			8,91 ± 0,63 efgh	0,25 ± 0,03 efgh			0,25 ± 0,03 efgh	43,2 ± 11,9 ef					
BAF (n=25)	6,8	5,8	7,89 ± 2,89	b	7,29 ± 2,76	9,87 ± 1,18 gh	0,22 ± 0,09	b	0,20 ± 0,09	0,28 ± 0,04 fgh	41,60 ± 18,79	b	32,47 ± 8,10	58,0 ± 13,36 f		
	(n=15)	6,3			c	10,42 ± 0,77 h			0,29 ± 0,02 gh	0,29 ± 0,02 gh			56,4 ± 10,74 f			
	6,8	defg			7,27 ± 1,29 defg	0,19 ± 0,04 cdef			0,19 ± 0,04 cdef	37,2 ± 4,76 de						
	6,8	a			2,79 ± 1,50 a	0,07 ± 0,04 a			0,07 ± 0,04 a	10,6 ± 8,17 ab						
	5,3	ab			6,11 ± 1,10 ab	0,17 ± 0,04 abc			0,17 ± 0,04 abc	25,2 ± 11,61 abcd						
	5,8	ef			13,28 ± 2,82 ef	0,40 ± 0,09 e			0,40 ± 0,09 e	49,8 ± 20,61 d						
IF 914002 (n=75)	PDA (n=25)	4,8	4,8	8,40 ± 4,29	a	6,33 ± 3,41	2,79 ± 1,50 a	0,24 ± 0,13	b	0,18 ± 0,11	0,07 ± 0,04 a	35,4 ± 22,93	b	14,87 ± 10,92	10,6 ± 8,17 ab	
		(n=15)	5,3			a	6,11 ± 1,10 ab			0,17 ± 0,04 abc	0,17 ± 0,04 abc			25,2 ± 11,61 abcd		
		5,8	ef			13,28 ± 2,82 ef	0,40 ± 0,09 e			0,40 ± 0,09 e	49,8 ± 20,61 d					
		6,3	cdef			11,78 ± 2,77 cdef	0,34 ± 0,10 de			0,34 ± 0,10 de	56,8 ± 26,72 d					
		6,8	abcd			8,06 ± 1,11 bcd	0,22 ± 0,03 abc			0,22 ± 0,03 abc	34,6 ± 9,21 abcd					
		4,8	d			7,80 ± 3,47	0,23 ± 0,11			0,23 ± 0,11	23,47 ± 18,91					
	MMN (n=25)	5,8	5,3	9,04 ± 4,01	b	6,48 ± 1,63	6,45 ± 0,78 ab	0,26 ± 0,13	b	0,18 ± 0,14	0,18 ± 0,02 abc	28,43 ± 22,19	a	9,24 ± 2,85	8,0 ± 2,35 a	
		(n=15)	5,3			a	5,41 ± 0,97 ab			0,15 ± 0,03 abc	0,15 ± 0,03 abc			7,8 ± 1,1 a		
		6,3	abc			7,29 ± 1,36 abc	0,21 ± 0,05 abc			0,21 ± 0,05 abc	8,6 ± 1,67 a					
		6,8	abcd			8,10 ± 1,93 bcd	0,23 ± 0,05 bcd			0,23 ± 0,05 bcd	14,0 ± 1,58 abc					
		4,8	bcde			9,75 ± 2,72 bcde	0,30 ± 0,08 cde			0,30 ± 0,08 cde	26,0 ± 10,42 abcd					
		5,3	cdef			11,9 ± 2,88 cdef	0,36 ± 0,08 de			0,36 ± 0,08 de	37,4 ± 23,72 abcd					
BAF (n=25)	6,8	5,8	12,25 ± 3,23	b	9,32 ± 2,86	12,74 ± 2,43 def	0,37 ± 0,10	c	0,26 ± 0,09	0,38 ± 0,08 e	40,64 ± 19,86	b	30,33 ± 16,20	44,6 ± 29,8 cd		
	(n=15)	6,3			c	15,07 ± 3,21 f			0,45 ± 0,10 e	0,45 ± 0,10 e			52,8 ± 4,92 d			



Cepa	Factores			Crecimiento radial (mm)				Velocidad media de crecimiento (mm/día)				Biomasa Seca (mg)			
	Medio	pH	Medio x pH	Cepa	Medio	pH	Medio x pH	Cepa	Medio	pH	Medio x pH	Cepa	Medio	pH	Medio x pH
IF 936001 (n=75)	PDA (n=25)	6,8					11,79 ± 3,48 cdef				0,34 ± 0,12 de				42,4 ± 17,13 bcd
		4,8	4,8				6,61 ± 1,02 b				0,16 ± 0,04 a				21,2 ± 3,7 ab
		5,3	5,3				14,52 ± 2,01 cd				0,43 ± 0,07 bc				56,6 ± 17,64 abcde
		5,8	5,8				14,59 ± 2,93 cd				0,42 ± 0,10 bc				64,2 ± 22,8 bcdef
		6,3	6,3				12,78 ± 0,61 cd				0,38 ± 0,02 bc				77,2 ± 11,84 cdefg
		6,8	6,8				13,39 ± 1,06 cd				0,41 ± 0,04 bc				59,6 ± 10,64 bcde
	5,3 (n=15)	6,8					11,80 ± 6,78 b				0,34 ± 0,21 b				62,87 ± 49,78 b
	4,8	4,8					1,58 ± 0,05 a				0,04 ± 0,0011 a				1,4 ± 0,55 a
	5,8 (n=15)	5,3					8,73 ± 5,42 a				0,26 ± 0,17 a				18,72 ± 12,09 a
	5,8	5,8					15,07 ± 3,19 c				0,45 ± 0,10 c				62,33 ± 45,28 b
	6,3	6,3					12,37 ± 1,04 c				0,37 ± 0,03 bc				29,0 ± 4,06 abc
	6,8	6,8					12,43 ± 0,57 c				0,39 ± 0,02 bc				29,6 ± 2,7 abc
6,3 (n=15)	4,8					13,35 ± 2,14 b				0,39 ± 0,07 b				72,60 ± 42,13 b	
5,3	5,3					17,54 ± 3,80 d				0,52 ± 0,12 c				123,6 ± 31,97 g	
5,8 (n=25)	5,8					15,32 ± 3,37 c				0,45 ± 0,11 c				101,56 ± 44,98 c	
6,8 (n=15)	6,3					13,78 ± 1,68 b				0,42 ± 0,05 c				69,73 ± 42,64 b	
6,8	6,8					15,53 ± 1,47 cd				0,46 ± 0,04 bc				120,0 ± 30,72 fg	

(\*) Valores medios con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

- *Velocidad Media de Crecimiento:*

Para esta variable el comportamiento de la cepa IF725004 fue muy similar a lo observado para el crecimiento radial, con valores más altos en el medio BAF, principalmente con pH entre 5,3 y 6,8; este último valor de pH presentó la mayor velocidad media de crecimiento ( $0,51 \pm 0,02$  mm/día), pero sin diferenciarse significativamente de la velocidad lograda en el mismo medio con pH 5,3. El medio MMN con los diferentes niveles de pH, así como el medio PDA con pH 4,8 y 6,8, presentaron la menor velocidad media de crecimiento, sin diferencias significativas entre ellos (Cuadro 3).

Para la cepa IF1608006 se apreciaron velocidades mayores, pero sin diferencia significativas entre los medios BAF con pH entre 5,3 y 6,3 y el medio MMN unidos con pH de 6,3 y 6,8. La velocidad más alta se alcanzó en el medio MMN a pH 6,8 con  $0,3 \pm 0,02$  mm/día. Las velocidades menores se concentraron principalmente en el valor de pH 4,8 para los tres medios de cultivo, agregándose además el medio PDA con pH 5,3 y 6,8, y cuyos valores promedios no presentaron diferencias significativas entre sí (Cuadro 3).

La cepa IF914002 presentó entre las velocidades más altas, las obtenidas con el medio BAF con los distintos valores de pH, y también las conseguidas en el medio PDA con pH 5,8 y 6,3. En relación a esto valores, el valor máximo obtenido para esta variable para esta cepa fue en el medio BAF y pH 6,3 con  $0,45 \pm 0,10$  mm/día. Los valores menores y que no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos, fueron los del medio MMN con pH entre 4,8 y 6,3 y en el medio PDA con pH de 4,8, 5,3 y 6,8 (cuadro 3).

En la cepa IF936001 los mejores resultados fueron en el medio BAF con pH de 5,3 y 5,8 con  $0,52 \pm 0,12$  y  $0,50 \pm 0,13$  mm/día, respectivamente. Sin embargo, estos resultados no presentaron diferencias estadísticas significativas con lo obtenido para el mismo medio con pH 6,3 y 6,8, como también con el medio PDA para niveles de pH entre 5,3 y 6,8 y MMN con pH de 5,8 a 6,8. La menor velocidad media de crecimiento se obtuvo en los medios MMN, a pH 4,8 y 5,3 y en el medio PDA con pH 4,8 (Cuadro 3).

- *Biomasa*

Los resultados para la cepa IF725004, indican que el medio BAF con pH 6,8 y 5,8 presenta los mejores montos biomasa seca ( $80,6 \pm 13,83$  y  $61,6 \pm 7,96$  mg) con diferencias no significativas entre estos valores. Los valores más bajos y que tampoco presentaron diferencias significativas entre ellos se obtuvieron en el medio MMN en todos sus niveles de pH, al igual que para el medio PDA y BAF a pH 4,8 (Cuadro 3).

En la cepa IF1608006 se evidenció una mayor producción de materia seca en el medio BAF con pH de 5,8 y 6,3 ( $58,0 \pm 13,36$  y  $56,4 \pm 10,74$  mg, respectivamente). El medio BAF con pH 5,3 y el medio PDA con pH 5,8 obtienen valores de  $43,2 \pm 11,9$  y  $42,0 \pm 8,86$  mg, lo que no se diferencian de los valores previamente señalados. En contraposición, los medios PDA y MMN a niveles de pH 4,8 y 5,3, más el medio BAF a pH 4,8, presentaron los más bajos valores y con diferencias no significativas entre ellos (Cuadro 3).

Para la cepa IF914002 no se observó interacción de los factores medio y pH. Los medios BAF y PDA presentaron los mayores montos de materia seca y sin diferencias significativas entre ellos. El medio MMN presentó un valor de biomasa significativamente inferior al de los dos medios anteriores. La mayor cantidad de biomasa de la cepa IF914002 se obtuvo en el medio PDA con pH 6,3 ( $56,8 \pm 26,72$  mg), seguido del medio BAF con  $52,8 \pm 4,92$  mg. Respecto al factor pH, los mayores montos de biomasa seca se produjeron con el valor 6,3 ( $39,4 \pm 26,88$  mg), seguido de 5,8 y 6,8 ( $34,07 \pm 27,38$  y  $30,33 \pm 16,20$  mg, respectivamente), presentando estos 3 valores de pH diferencias no significativas entre ellos. El menor valor de biomasa ( $14,87 \pm 10,92$  mg) se obtuvo con pH de 4,8 (Cuadro 3).

En la cepa IF936001, tampoco hubo interacción entre los factores medio y pH. Se observó diferencias estadísticamente significativas en el efecto del factor medio de cultivo; el mejor resultado se obtuvo en el medio BAF, con un promedio total de materia seca de  $101,56 \pm 44,98$  mg, siendo el medio MMN el de peor desempeño con una cifra que alcanza los  $18,72 \pm 12,09$  mg. Respecto al factor pH, los medios ajustados a

4,8 obtienen un monto de biomasa seca ( $25,87 \pm 29,35$  mg) significativamente inferior al obtenido con todos los restantes valores de pH. El valor más alto de biomasa seca se logró a pH 6,3 ( $72,60 \pm 42,13$  mg de materia seca), aun cuando no resulta estadísticamente diferente de los montos de biomasa obtenidos con los restantes valores de pH, excepto con el valor 4,8 (cuadro 3).

- *Correlación entre Variables*

Atendiendo a que las 3 variables evaluadas son una manifestación del crecimiento, existe una alta correlación entre ellas, situación que se observa en las cuatro cepas estudiadas y que queda de manifiesto en los altos valores del coeficiente de correlación de Pearson, el que fluctúa entre 0,75 y 1,00 para cada par de variables comparada (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Coeficientes de correlación entre las variables crecimiento radial (CR), Biomasa (B) y velocidad media de crecimiento (VMC) para cuatro cepas de *Lactarius deliciosus* cultivadas *in vitro*.

	CR	B	VMC		CR	B	VMC
CR	--	0,90	1,00		--	0,83	0,81
B	0,78	--	0,89		0,77	--	0,99
VMC	0,99	0,75	--		1,00	0,75	--
Cepa IF725004 sobre la diagonal; Cepa IF1608006 bajo la diagonal.					Cepa IF914002 sobre la diagonal; Cepa IF936001 bajo la diagonal.		

### A Nivel de Especie

A nivel de especie, el ANDEVA de los datos obtenidos muestra la presencia de interacciones con diferencias significativas para  $\alpha=0,05$ , entre los factores medio de cultivo y nivel de pH que afectaron el nivel de respuestas de las variables CR, VCM y B (cuadro 5).

**Cuadro 5.** Significancia estadística del análisis de varianza (ANDEVA) para los valores medios obtenidos de las variables crecimiento radial, velocidad media de crecimiento y biomasa seca para la especie *Lactarius deliciosus*.

Factor	Crecimiento Radial	Velocidad Media de Crecimiento	Biomasa Seca
Medio	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**
pH	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**
Medio x pH	0,0053**	0,0036**	0,0410*

\* Efectos significativos ( $P \leq 0,05$ )

- *Crecimiento Radial*

El mayor crecimiento radial se obtuvo en el medio BAF, principalmente entre niveles de pH 5,3 y 6,8, pero sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre ellos, ni tampoco con el medio PDA a pH 5,8 y 6,3. El valor máximo fue de  $13,68 \pm 3,58$  mm, el cual se logró en el medio BAF con pH 5,8. Por el contrario, y sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre ellos, se aprecia menores crecimientos con pH de 4,8 en el medio PDA ( $3,76 \pm 2,07$  mm) y en el medio MMN con pH 4,8 y 5,3 ( $4,34 \pm 2,12$  y  $4,88 \pm 1,55$  mm, respectivamente) (cuadro 6).

**Cuadro 6.** Efecto de los factores medio de cultivo y nivel de pH sobre los valores medios y sus desviaciones estándar obtenidos para las variables crecimiento radial, velocidad media de crecimiento y biomasa para *Lactarius deliciosus*

Factores			Crecimiento radial (mm)			Velocidad media de crecimiento (mm/día)			Biomasa Seca (mg)				
Medio	pH	Medio x pH	Medio	pH	Medio x pH	Medio	pH	Medio x pH	Medio	pH	Medio x pH		
PDA (n=100)	4.8 (n=15)	4.8	8,44 ± 4,43	b	5,69	0,24 ± 0,14	b	0,09 ± 0,05	37,21 ± 22,98	b	11,90 ± 8,10		
		5.3			3,76 ± 2,07			a			0,16 ± 0,12	a	33,65 ± 21,42
		5.8			8,43 ± 4,65			cd			0,24 ± 0,15	cd	49,55 ± 19,40
	5.3 (n=15)	6.3	7,14 ± 3,39	a	11,03	0,20 ± 0,11	a	0,29 ± 0,12	15,78 ± 8,99	a	43,97		
		6.8			8,82 ± 5,00			b			0,26 ± 0,16	b	35,83 ± 34,07
		4.8			10,03 ± 3,61			def			0,12 ± 0,06	ab	8,05 ± 4,67
MMN (n=100)	5.8 (n=15)	5.3	10,69 ± 3,64	c	9,81 ± 2,42	0,31 ± 0,12	c	0,29 ± 0,08	46,02 ± 31,00	b	23,90 ± 8,61		
		5.8			4,88 ± 1,55			abc			0,13 ± 0,05	abc	10,55 ± 3,75
		6.3			8,01 ± 3,92			bcd			0,23 ± 0,13	bcd	16,90 ± 7,22
	6.3 (n=15)	6.8	12,40 ± 4,15	c	10,43	0,37 ± 0,13	c	0,41 ± 0,12	59,49 ± 37,27	c	44,53		
		4.8			8,97 ± 4,12			d			0,27 ± 0,13	de	31,40 ± 24,08
		5.3			13,16 ± 4,16			ef			0,39 ± 0,13	fg	63,30 ± 40,74
BAF (n=100)	6.8 (n=15)	5.8	12,89 ± 4,28	ef	13,68 ± 3,58	0,30 ± 0,13	b	0,39 ± 0,10	70,05 ± 38,43	b	67,25 ± 33,25		
		6.3			13,38 ± 2,90			ef			0,39 ± 0,10	fg	65,45 ± 36,77
		6.8			12,89 ± 4,28			ef			0,38 ± 0,14	efg	70,05 ± 38,43

(\*) Valores medios con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

- *Velocidad Media de Crecimiento*

Esta variable presenta un comportamiento similar al crecimiento radial, observándose crecimientos mayores en el medio BAF, principalmente entre niveles de pH 5,3 y 6,8 pero sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre ellos, ni tampoco con el medio PDA a pH 5,8 y 6,3. La velocidad máxima alcanzó a  $0,41 \pm 0,12$  mm/día en medio BAF con pH 5,8. Por el contrario, y sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre ellos, la velocidad menor se obtiene en los medios PDA con pH 4,8 ( $0,09 \pm 0,05$  mm/día) y MMN con pH de 4,8 y 5,3 ( $0,12 \pm 0,06$  y  $0,13 \pm 0,05$  mm/día, respectivamente) (cuadro 6).

- *Biomasa*

La mayor producción de biomasa se obtuvo en el medio BAF con pH entre 5,3 y 6,8, y en el medio PDA con pH de 5,8 y 6,3, pero sin diferencias estadísticas significativas entre ellos. Los valores más altos se lograron en el medio BAF con pH 6,8 ( $70,05 \pm 38,43$  mg), pH 6,3 ( $67,25 \pm 33,25$ ) y pH 5,8 ( $65,45 \pm 36,77$  mg). Se observa baja producción de biomasa seca en el medio MMN con todos los pH ensayados, también en los medios PDA y MMN con pH 4,8, sin existir diferencias significativas entre ellos. La menor producción de biomasa fue para el medio MMN con pH 4,8 ( $8,05 \pm 4,67$  mg) y 5,3 ( $10,55 \pm 3,75$  mg) (Cuadro 6).

- *Correlación entre Variables:*

Tal como se observó a nivel de cepas, a nivel de especie también existe una alta correlación entre las variables evaluadas. El coeficiente de correlación de Pearson fluctuó entre 0,80 y 1,00 de acuerdo al detalle del Cuadro 7.

**Cuadro 7.** Coeficientes de correlación entre las variables crecimiento radial (CR), Biomasa (B) y velocidad media de crecimiento (VMC) para *Lactarius deliciosus* cultivado *in vitro*.

	CR	B	VMC
CR	--	0,80	1,00
B		--	0,80
VMC			--

## DISCUSIÓN

En base a los factores y variables evaluadas para las 4 cepas de *Lactarius deliciosus*, se observó variación en la estrategia con que cada cepa enfrenta dichos cambios, influenciados ya sea por las interacciones entre los factores o por la influencia de los factores principales al no verificarse interacciones, como fue el caso de la variable Biomasa para las cepas IF914002 e IF936001. Por lo general, estos comportamientos han sido observado en varias especies, reportándose diferencias entre aislados de una misma especie. Estudios para evaluar el efecto de parámetros medioambientales sobre diferentes cepas de especies micorrícicas obtienen resultados muy variables, debido principalmente a los diferentes requerimientos medioambientales derivados de la variabilidad genéticas que presentan dichos microorganismos y de las condiciones de sitio donde se han desarrollado (Chung, 2021). Esto es reafirmado por Islam y Ohga (2013), quienes indican que para llegar a producir inoculantes fúngicos a gran escala, es necesario definir la composición óptima del medio de cultivo para cada hongo, tomando en cuenta las diferentes cepas sobre una gran variación de condiciones medioambientales. Ejemplo de ello es lo observado por Flores *et al.* (2008), al evaluar varias cepas de *L. deliciosus*, obteniendo importante variación en el crecimiento, el cual alcanza los valores más altos con pH de 4,5 o 6,5, dependiendo de la cepa estudiada. Por su parte Royo *et al.* (1998), concluyen que no es posible

determinar el medio nutritivo óptimo para cada especie fúngica estudiada debido a la existencia de interacciones significativas entre los factores cepa y medio nutritivo.

Estudios realizados por [Sánchez et al. \(2001\)](#), para analizar la influencia del pH en el crecimiento de *L. deliciosus*, en un medio MMN modificado dentro de un rango de niveles de pH 2,5 y 8,5, señalan una gran diferencia en el crecimiento en diámetro, observando crecimientos significativamente mayores en pH 6,5 a 8,5, que en el rango de 2,5 a 5,5. El mejor desempeño de pH cercano a neutro es coincidente con la tendencia mostrada en este trabajo para el mismo medio de cultivo. Los mismos investigadores obtuvieron a las 6 semanas a pH 6,5, diámetros de crecimiento que alcanzaron los 5,7 cm, utilizando hidróxido de sodio para ajustar el pH. Ese resultado es superior al obtenido en este trabajo, pero con una evaluación realizada a los 35 días, llegando a un crecimiento radial máximo de  $1,394 \pm 2,11$  cm en medio MMN a pH 5.8.

Evaluaciones del desarrollo de varias especies fúngicas, entre ellas *L. deliciosus*, en medio BAF y pH de 5,5, obtuvieron crecimientos en diámetro de 5,5 cm en 28 días ([Sánchez et al. \(2000\)](#)), monto superior a los  $1,754 \pm 3,8$  mm obtenido en CR para este medio a pH 5,3. [Daza et al. \(2005\)](#) trabajando con varias cepas de *L. deliciosus* en medio MMN modificado, observaron a los 27 días crecimientos significativamente más bajos a niveles de pH de 7 y 8, respecto a pH 6 y 5, con resultados variables dependiendo de la cepa utilizada. [Barros et al. \(2006\)](#) evaluando el desempeño de varias cepas de *L. deliciosus* en los medios MMN y PDA para distintos niveles de pH, obtuvieron a los 36 días un crecimiento radial significativamente mayor para MMN. Este resultado es coincidente sólo para la cepa IF1608006, observándose en esta un valor promedio estadísticamente significativo frente a los obtenido en el medio PDA y muy similares a lo logrado en medio BAF.

En relación al trabajo realizado, los valores obtenidos para el medio MMN muestra en su mayoría valores bajos. Respecto a esta observación, [Sánchez et al. \(2000\)](#), mencionan un lento crecimiento de esta especie en el medio MMN. Por su parte, [Daza et al. \(2005\)](#), observaron similar comportamiento con rendimientos miceliares escasos, indicando la necesidad de complementar este medio con una fuente de carbono.

En general, los resultados obtenidos para la variable CR mostraron poco desarrollo de micelio aéreo, formando diámetros pequeños con micelio muy denso y sumergido bajo el medio. Esta estrategia de crecimiento fue observada por [Sánchez et al. \(2001\)](#), mencionando que esta forma de crecer de las cepas se debe a un desarrollo por estrés, lo que suele formar colonias con pequeños diámetros e hifas muy densas. Estos autores citando a [Boxman et al. \(1986\)](#), mencionan que el crecimiento compacto junto con reducciones en el crecimiento radial es un mecanismo de protección contra condiciones desfavorables del suelo. Habría que señalar también que los mayores crecimientos en diámetro de la cepa bajo cultivo *in vitro*, no siempre corresponden con la mayor producción de biomasa, aspecto que es de importancia debido al frecuente empleo de este parámetro como único elemento para evaluar el crecimiento de la cepa ([Santiago-Martínez et al., 1995](#)).

En relación a la velocidad media de crecimiento, se observó comportamientos diferentes para las cepas de *L. deliciosus* en los medios utilizados, logrando una mayor velocidad de crecimiento en el medio BAF, mientras que el menor desarrollo lo obtuvieron en el medio MMN que presentó un crecimiento muy lento, coincidiendo con lo obtenido por [Chávez et al. \(2009\)](#). Por su parte, [Pereira et al. \(2014\)](#), reafirman lo mencionado por los anteriores investigadores y lo observado en esta investigación, logrando una velocidad de crecimiento radial mayor en medio BAF, con diferencias significativas respecto a los medios MMN y PDA, estos últimos también con diferencias significativas entre ellos.

En cuanto a la variable producción de biomasa seca, los mayores montos obtenidos en este estudio se situaron en el medio BAF con pH en el rango de 5,3 a 6,8, dependiendo de la cepa analizada. El valor máximo lo alcanzó la cepa IF936001 en medio BAF con pH 5,3 ( $123,6 \pm 31,97$  mg). Experimentos realizados por [Guerin-Laguet et al. \(2000\)](#), determinaron que pH entre 5,5 y 6,0 fue el rango óptimo para el crecimiento miceliano, con una producción de biomasa por sobre los 130 mg a los 28 días y un buen desempeño del medio nutricional BAF en contraposición al medio MMN. [Lazarevic et al. \(2016\)](#) obtuvieron una mayor producción de biomasa con pH entre 5,8 y 6,5 en medio MMN y utilizando

diferentes fuentes de carbono. Mientras que [Pereira et al. \(2014\)](#), lograron los mayores montos de biomasa (107 mg a los 30 días) con pH 5,5 en medio BAF. Montos mayores fueron obtenidos por [Sánchez et al. \(2001\)](#), pero en un período mayor de crecimiento (6 semanas), en medio MMN con pH 7,5, condición en la que obtuvo una producción de 408 mg de materia seca.

En relación a la correlación entre las variables crecimiento acumulado promedio y Biomasa, [Sánchez et al. \(2001\)](#) obtuvieron una correlación de 0,73 entre el diámetro de la cepa y los valores de peso seco, ocupando un medio MMN y diferentes ácidos para ajustar a niveles de pH entre 2,5 y 8,5. Estas observaciones son concordantes con lo obtenido en el análisis realizado a nivel de cepas y de especie, las que también mostraron una alta correlación entre todas las variables estudiadas. Sin embargo, [Daza et al. \(2005\)](#), citando a otros autores, indican que los distintos tipos de nutrientes y concentraciones podrían relacionarse con las diferentes estrategias de exploración del medio, siendo muy frecuente que la biomasa fúngica y el diámetro de crecimiento no se hallen directamente correlacionados afectando la morfología de los hongos.

## CONCLUSIONES

[Trifonov & Chakravartyn \(1990\)](#), indican que los medios nutricionales sintéticos y semi-sintéticos serían aptos para el crecimiento de *Lactarius spp.*, lo observado en este trabajo muestra un crecimiento micelial de *L. deliciosus* que resulta variable con respecto al medio de cultivo, nivel de pH y cepa utilizada. Los resultados obtenidos sugieren el medio BAF como el más apto para los trabajos de multiplicación micelial, junto con un rango de pH que varió con la cepa utilizada, pero con un marcado bajo rendimiento a nivel de pH 4,8 para las 3 variables evaluadas. Respecto al medio de mayor rendimiento, [Oort \(1981\)](#) concluye que el medio semi-sintético BAF sería el más indicado para el crecimiento micelial del género *Lactarius*, lo que coincide con lo observado.

De las 4 cepas evaluadas, la cepa IF936001 procedente de la región de la Araucanía es la que presentó los mayores valores para las 3 variables evaluadas, y con posibilidades de poder ser utilizada en los programas de micorrización, contrastando con la otra cepa de la misma región (IF914002) pero muy distantes geográficamente entre sí, como también con las obtenidas de regiones de más al norte.

Se visualiza una variación en los comportamientos frente a factores medio nutritivo y nivel de pH, por lo que se abre la necesidad de ampliar la base genética que recoja la máxima variabilidad bajo diversos ambientes, con el fin de seleccionar cepas que sean específicas para sitios determinados, ajustando protocolos que permitan maximizar la producción de biomasa micelial para la elaboración de inoculantes que ayuden a masificar los trabajos en vivero, con el objetivo de obtener plantas micorrizadas y de calidad, capaces de producir hongos comestibles, una vez que sean establecidas en terreno ([Pera et al., 1998](#)).

Considerando lo expuesto por [Molina y Palmer \(1982\)](#), respecto a que el medio adecuado para cultivar un hongo ectomicorrícico es el que le aporta los nutrientes que obtendría de su hospedante, entonces, en el contexto de los resultados obtenidos y el interés por encontrar una metodología para generar la mayor cantidad de biomasa, se puede concluir que el medio BAF es apropiado para su utilización en la producción micelial, debido a su buen desempeño en generar biomasa seca, para las cuatro cepas evaluadas.

Si bien es cierto que, bajo ciertas condiciones de cultivo, algunas de las cepas evaluadas presentaron mayor rendimiento que otras, su selección final para ser utilizadas en actividades de micorrización de plantas dependerá de su desempeño en vivero y su comportamiento en campo. [Hung y Trappe \(1983\)](#) afirman que el efecto de factores como el pH sobre el crecimiento fúngico *in vitro* debe ser interpretado con precaución, debido a que el desempeño de un hongo o cepa pueden ser afectados por una serie de otros factores que pueden hacer variar los resultados, como son la duración del experimento, las fuentes de nitrógeno, la inclusión de sales de hierro antes o después del autoclavado del medio, entre muchos otros factores. Estos mismos autores señalan que, en igualdad de condiciones, un aislado que crezca

razonablemente bien en un amplio rango de valores de pH sería preferible para trabajos de masificación e inoculación en vivero, a uno que crezca bien solo en un rango restringido.

El desarrollo de los hongos micorrícicos en un ambiente determinado se encuentran en constante interacción con diversos factores del ambiente que pueden afectarlos. Si se analiza a nivel de cepa o ecotipo, estos poseen sus propias limitaciones frente a determinadas condiciones del medio (Sianard, *et al.*, 2010). Por lo tanto, el estudio de factores que inciden en la nutrición de los hongos y su crecimiento, como lo son el pH, medio de cultivo, temperatura y otros, es necesario para conocer sus comportamientos, los que difieren al interactuar con cada uno de estos parámetros (Honrubia *et al.*, 1992; Vázquez-García *et al.*, 2002). El conocimiento de dichos parámetros para cada hongo o cepa en particular, permitirá reunir información con miras a perfeccionar la producción de micelios de hongos ectomicorrícicos.

En relación al factor pH, este juega un importante papel en el crecimiento y muchas veces se encuentra interactuando con los elementos nutritivos del medio, debido probablemente a su influencia sobre la disponibilidad de algunos nutrientes utilizados. Este efecto fue señalado por Pereira *et al.* (2007), quienes mencionan que el pH influye significativa en la disponibilidad de nutrientes, pudiendo determinar biológicamente el tipo de organismo capaz de desarrollarse en un suelo o sustrato. Willenborg *et al.* (1990), afirman que los hongos ectomicorrícicos tienen, en general, una naturaleza acidófila cuando se cultivan en condiciones de cultivo puro.

Finalmente, los resultados obtenidos en esta investigación buscan complementar otras experiencias para la especie *L. deliciosus*, tratando de recoger la variabilidad genéticas presentes en el país y analizar sus posibles respuestas frente a diversos factores medioambientales. Esta recopilación de información servirá de insumo para futuros trabajos que faciliten la óptima producción de inoculantes para su uso en la producción de plantas de *Pinus radiata*, entregando las bondades que entregan las micorrizas en conjunto con la producción de hongos comestibles de valor socioeconómico.

## REFERENCIAS

- Barros, L., Baptista, P. & Ferreira, I. (2006). Influence of the culture medium and pH on the growth of saprofitic and ectomycorrhizal mushroom mycelia. *Minerva Biotecnológica*, N° 18. Pp: 165-170. <http://hdl.handle.net/10198/824>
- Boa, E. (2004). Wild edible fungi. A global overview of their use and importance to people. Non-wood forest products 17. ISBN: 92-5-105157-7. FAO. Roma. 147 p.
- Boxman, A., Sinke, R. & Roelofs, J. (1986). Effects of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> on the growth and K<sup>+</sup>(<sup>86</sup>Rb) uptake of various ectomycorrhizal fungi in pure culture. *Water, Air Soil Pollution*, N° 31. Pp: 517-522. <https://doi.org/10.1007/BF00630870>
- Brundrett M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T. & Malajczuk, N. (1996). Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. ACIAR Monograph N° 32. 374 p.
- Brundrett, M. & Cairney, J. (2002). Ectomycorrhizal in plant communities. In: Sivasithamparam, K., Dixon, K.W. & Barret R.L. (Eds). *Microorganisms in plant conservation and biodiversity*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. Pp: 105–150. [https://doi.org/10.1007/0-306-48099-9\\_5](https://doi.org/10.1007/0-306-48099-9_5)
- Chávez, D., Pereira, G. & Machuca, A. (2009). Crecimiento in vitro de *Lactarius deliciosus* en medio de cultivo BAF y MNM. En: 4° Congreso Chileno de Ciencias Forestales. Universidad de Talca, Chile. 8 p.
- Chung, P. (2020). Captura, aislamiento y evaluación del crecimiento de material fúngico de la región de Ñuble para su incorporación al banco de hongos comestibles del Instituto Forestal. *Ciencia & Investigación Forestal*, 26(3): 65-92. <https://doi.org/10.52904/0718-4646.2020.538>
- Chung, P. (2021). Influencia de diferentes medios de cultivo y niveles de pH en el crecimiento in vitro de 6 cepas del género *Suillus*. *Ciencia & Investigación Forestal*, 27(3): 17–33. <https://doi.org/10.52904/0718-4646.2021.555>



- 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 *Lactarius deliciosus*. IV Congreso Forestal Español. Tomo 4. Pp: 182-188. Zaragoza, España.
- Flores, R., Honrubia, M. & Díaz, G. (2008).** Caracterización de cepas de *Lactarius* sección *Deliciosi* de Guatemala y su comparación con cepas europeas de *L. deliciosus*. Revista Mexicana de Micología, N° 26. Pp: 51-55. En: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=88302608>. Consulta: 25 noviembre, 2022
- Guerin-Laguette, A., Cummings, N., Butler, R., 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 N° 24. Pp: 511-523. <https://doi.org/10.1007/s00572-014-0570-y>
- Guerin-Laguette, A., Plassard, C. & Mousain, D. (2000).** Effects of experimental conditions on mycorrhizal relationships between *Pinus sylvestris* and *Lactarius deliciosus* and unprecedented fruit-body formation of the Saffron milk cap under controlled soilless conditions. Canadian Journal of Microbiology, N° 46. Pp: 790-799. <https://doi.org/10.1139/w00-059>
- Hawksworth, D. & Luecking, R. (2017).** Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. Microbiol. Spectr., 5(4). FUNK-0052-2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016>
- Hawksworth, D. (2001).** The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. Mycological Research, N° 105. Pp: 1422-1432. <https://doi.org/10.1017/S0953756201004725>
- Honrubia, M., Torres, P., Díaz, G. & Cano, A. (1992).** Manual para micorrizar plantas en viveros forestales. Madrid. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Hung, L. & Trappe, J. (1983).** Growth variation between and within species of ectomycorrhizal fungi in response to pH *in vitro*. Mycologia, N° 75. Pp: 234-241. <https://doi.org/10.2307/3792807>
- INFOR (2022).** Estadísticas Forestales. En: <https://wef.infor.cl/>. Consulta: 20 noviembre, 2022.
- Ipinza, R. & Serrano, M. (1982).** Micorrización artificial sobre pino insigne en la Estación Experimental Pantanillo - Las Brisas (VII Región). Universidad de Chile, Escuela de Cs. Forestales. Ciencias Forestales 2(2): 77-93.
- Islam, F. & Ohga, S. (2013).** Effects of media formulation on the growth and morphology of ectomycorrhizae and their association with host plant. ISRN Agronomy. Volume 2013, Article ID 317903. 12 p. Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2013/317903>
- Lazarević J., Stojičić, D. & Keča, N. (2016).** Effects of temperature, pH, carbon and nitrogen sources on growth of *in vitro* cultures of ectomycorrhizal isolates from *Pinus heldreichii* forest. Forest Systems, N° 25. Pp: 1-10. <https://doi.org/10.5424/fs/2016251-07036>
- Marx, D. H. (1969).** The influence of ectotrophic fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. Phytopathology, N° 59. Pp: 153-163.
- Molina, R. & Palmer, J. (1982).** Isolation, maintenance and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. In: Schenk, N.C. (Ed). Methods and Principles of Mycorrhizal Research. American Phytopathological Soc. St. Paul, Pp: 115-129.
- Montgomery, D. (1984).** Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons. New York. 649 p.
- Moser, M. (1960).** Die Gattung Phlegmacium. Die Pilze Mitteleuropas 4. J. Bad Heilbrunn.
- Mujica, F. & C. Vergara. (1980).** Flora Fungosa Chilena. Segunda Edición revisada y actualizada. Universidad de Chile, Facultad de Agronomía, Ciencias Agrícolas N° 5, Editorial Universitaria. Santiago. 308 p.
- Nuytinck, J. & Verbeke, A. (2007)** Species delimitation and phylogenetic relationships in *Lactarius* section *Deliciosi* in Europe. Mycol. Res., N° 111. Pp: 1285-1297. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.09.001>
- Oort, A. (1981).** Nutritional requirements of *Lactarius* species and cultural characters in relation to taxonomy. North-Holland Publishing Company, Amsterdam.

- Ortega-Martínez, P., Águeda, B., Fernández-Toirán, L. & Martínez-Peña, F. (2011). Tree age influences on the development of edible ectomycorrhizal fungi sporocarps in *Pinus sylvestris* stands. *Mycorrhiza.*, N° 21. Pp: 65-70. <https://doi.org/10.1007/s00572-010-0320-8>
- Pera, J., Álvarez, L. & Parlade, J. (1998). Eficacia del inóculo micelial de 17 especies de hongos ectomicorrícicos para la micorrización controlada de: *Pinus pinaster*, *Pinus radiata* y *Pseudotsuga menziesii*, en contenedor. *Invest. Agr.: Sist. Recur. For.* 7(1 y 2): 139-153.
- Pereira, G., Campos, J., 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*. *Quebracho – Revista de Ciencias Forestales*, 22(1-2): 30-39. En: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=48133884004>. Consulta: 24 noviembre, 2022.
- 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. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002007000300005>
- Royo, P., Fernández Toiran, M. & Fischer, C. (1998). Síntesis micorrícica de *Lactarius deliciosus* F.R. y *Pinus sylvestris*. *Invest. Agr.: Sist. Rec.*, 7 (1 y 2): 85-93.
- Sánchez, F., Honrubia, M. & Torres, P. (2000). Características culturales de algunos hongos ectomicorrícicos en cultivo puro. *Revista Iberoamericana de Micología*, N° 17. Pp: 127-134.
- Sánchez, F., Honrubia, M. & Torres, P. (2001). Effects of pH, water stress and temperature on *in vitro* cultures of ectomycorrhizal fungi from Mediterranean forest. *Cryptogamic Mycol.*, 22(4): 243-258. [https://doi.org/10.1016/S0181-1584\(01\)01076-4](https://doi.org/10.1016/S0181-1584(01)01076-4)
- Santiago-Martínez, G., Varela, 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*, N° 11. Pp: 57-68. <https://dx.doi.org/10.33885/sf.1995.3.829>
- Santiago-Martínez G., Estrada-Torres, A., Varela, L. & Herrera, T. (2003). Crecimiento en siete medios nutritivos y síntesis *in vitro* de una cepa de *Laccaria bicolor*. *Agrociencia*, 37(6): 575-584.
- Sianard, F., Pangou, S. & Mountanda, A. (2010). Influencia del pH en el desarrollo *in vitro* de cinco especies de hongos ectomicorrícicos. *Centro Agrícola*, 37(1): 23-28.
- Slankis, V. (1973). Hormonal relationships in mycorrhizal development. In: Marks, G.C. & Kozlowski, T.T. (Eds). *Ectomycorrhizae: Their Ecology and Physiology*. Academic Press. New York. Pp: 231-298.
- Trappe, J. (1977). Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. *Ann. Rev. Phytolaphol.*, N° 15. Pp: 203–222. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.15.090177.001223>
- Trappe, J. (1987). Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary standpoint. In: Safir, G.R. (Ed). *Ecophysiology of VA mycorrhizal plants*. CRC Press, Boca Raton, FL. Pp: 5-25.
- Trifonov, L. & Chakravarty, P. (1999). XIV *Lactarius* species (Mushrooms): *In vitro* culture and production of sesquiterpenes and other secondary metabolites. In: Bajaj, Y.P.S. (Eds). *Medicinal and Aromatic Plants XI. Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol 43. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-08614-8\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-662-08614-8_14)
- Valenzuela, E. (2003). Hongos comestibles silvestres colectados en la X Región de Chile. *Boletín Micológico*, N° 18. Pp: 1-14. <https://doi.org/10.22370/bolmicol.2003.18.0.374>
- Vasco, F. (2003). Aspectos Biológicos de la Unión Hongo-Planta (Micorrizas). *Boletín de ARBA*. N°12. Pp: 27-30.
- Vázquez-García, A., Santiago-Martínez, G & Estrada-Torres, A. (2002). Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrizógenos. *Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica* N° 73. Pp:1-15.

- Voces, R., Diaz-Balteiro, L. & Alfranca, O. (2009).** Demand for wild edible mushrooms. The case of *Lactarius deliciosus* in Barcelona (Spain). *Journal of Forest Economics*, N° 18. Pp: 47-60. <https://doi.org/10.1016/j.jfe.2011.06.003>
- Wang, Y., Hall, I., Dixon, C., Hance-Halloy, M., Strong, G. & Brass, P. (2001).** The cultivation of *Lactarius deliciosus* (Saffron milk cap) and *Rhizopogon rubescens* (shoro) in New Zealand. In: Hall, I.R., Wang, Y., Danell, E. & Zambonelli, A. (Eds). *Edible mycorrhizal mushrooms and their cultivation. Proceedings of the second international conference on edible mycorrhizal mushrooms.* New Zealand Institute for Crop & Food Research Limited, Christchurch.
- Wang, D., Zhang, J., Wang, Y., Zambonelli, A., Hall, I. & Xiong, W. (2021).** The cultivation of *Lactarius* with edible mushrooms. *Italian Journal of Mycology*, N° 50. Pp: 63-77. <https://doi.org/10.6092/issn.2531-7342/12908>
- Wang, Y., Cummings, N. & Guerin-Laguette, A. (2012).** Cultivation of basidiomycete edible ectomycorrhizal mushrooms: *Tricholoma*, *Lactarius*, and *Rhizopogon*. In: *Edible ectomycorrhizal mushrooms.* Springer, Berlin, Heidelberg. Pp: 281-304. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-33823-6\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-642-33823-6_16)
- Willenborg, A., Schmitz, D. & Lelley, J. 1990.** Effects of environmental stress factors on ectomycorrhizal fungi *in vitro*. *Canadian Journal of Botany*, N° 68. Pp: 1741-1746. <https://doi.org/10.1139/b90-224>