



ARTÍCULO

Crecimiento micelial *in vitro* de 2 cepas de *Grifola gargal* en diferentes medios de cultivo y niveles de pH.

Patricio Chung Guin Po^{1*}

¹ Instituto Forestal, sede Biobío. pchung@infor.cl

*Autor para correspondencia

DOI: <https://doi.org/10.52904/0718-4646.2023.599>

Recibido: 14.12.2023; Aceptado 22.12.2023

RESUMEN

Se estudió el comportamiento de dos cepas del hongo saprófito comestible *Grifola gargal* bajo condiciones de cultivo *in vitro*. Se analiza el crecimiento en diámetro (CD), velocidad media de crecimiento (VMC) y biomasa (B) de cultivos creciendo en los medios PDA (Papa Dextrosa Agar), BAF (Biotina Aneurina ácido Fólico), MYPA (Extracto de malta levadura agar peptona) y PGYA (peptona-extracto de levadura-glucosa) y bajo 5 niveles de pH (4,0, 4,5, 5,0, 5,5 y 6,0). Los resultados indican interacciones estadísticamente significativas entre los factores medio de cultivo y pH para las tres variables medidas. Se observa que, tanto a nivel de cepas como de especie, el medio MYPA con pH 4,5 presenta los valores más altos para CD, VMC y B. Comparaciones entre valores promedios del CD, VCM y B, muestran alta correlación entre estos parámetros para las cepas estudiadas.

Palabras clave: *Grifola gargal*, crecimiento micelial, *in vitro*.

SUMMARY

The behavior of two strains of the edible saprophytic fungus *Grifola gargal* is studied under *in vitro* culture conditions. The growth in diameter (CD), average growth speed (VMC) and biomass (B) of cultures growing in the media PDA (Potato Dextrose Agar), BAF (Biotin Aneurin Folic Acid), MYPA (Malt Extract Yeast Agar) and PGYA (peptone-yeast extract-glucose) and under 5 pH levels (4.0, 4.5, 5.0, 5.5 and 6.0). The results indicate statistically significant interactions between the medium factors culture and pH for the three variables measured. It is observed that both at the level of strains and species, the MYPA medium with a pH level of 4.5 presents the highest values for CD, VMC and B. Comparisons between average values of CD, VCM and B, show high correlation between these parameters for the strains studied.

Key words: *Grifola gargal*, mycelial growth, *in vitro*

INTRODUCCIÓN

Desde hace miles de años los recursos micológicos presentes en los bosques han sido utilizados por los pueblos originarios para su alimentación, siendo en la actualidad una costumbre que se ha ido traspasando a las nuevas generaciones. Los hongos comestibles presentes en los bosques de Chile constituyen un recurso valioso, cuyo uso como alimento o insumo comercial ha adquirido gran importancia en las zonas rurales debido a la necesidad de cubrir principalmente las necesidades económicas de muchas familias especialmente de zonas rurales, unido esto en la actualidad a un aumento en la demanda de productos de tipo orgánico y funcional.

En Chile, Valenzuela (2003) identificó unas 53 especies de hongos silvestres comestibles, cifra que en la actualidad es mucho mayor, gracias al mejor conocimiento de la población fúngica. En tanto que, a nivel mundial, de las aproximadamente 100.000 especies descritas de hongos (Hawksworth, 2001) de un total

estimado de entre 2,2 y 3,8 millones (Hawksworth & Luecking, 2017), se han podido contabilizar más de 2.000 especies de hongos de tipo comestible (Boa, 2004). De estas 2.000 especies comestibles, Savoie & Largeteau (2011) mencionan que alrededor de 80 se han cultivado experimentalmente, 40 se han cultivado económicamente, alrededor de 20 se han cultivado comercialmente y 5 o 6 han alcanzado una escala industrial en muchos países.

Dentro de las especies fúngicas comestibles presentes en Chile, se encuentra la especie *Grifola gargal* (Figura 1), descrita por Singer (1969). La especie corresponde a un hongo nativo y endémico del cono sur de Sudamérica, presentes en los bosques andino patagónicos de Chile y Argentina, que crece sobre ramas y fustes caídos o en madera muerta en pie, preferentemente en especies del género *Nothofagus*, como roble (*Nothofagus obliqua*), coigüe de Chiloé (*Nothofagus nitida*), coigüe de Magallanes (*Nothofagus betuloides*) (MMA, 2021) o en especies como la tepa (*Laurelia philipiana*) (De Bruijn *et al.*, 2008) o en tinea (*Weinmania trichosperma*) (Palma *et al.*, 2021), reportándose además, fructificaciones en *Populus nigra* en Argentina (Pozzi *et al.*, 2009). En Chile se distribuiría entre las regiones de Ñuble y Aysén (Sánchez Jardón *et al.*, 2017).



Figura 1. Aspecto de fructificación de *Grifola gargal* sobre madera muerta de roble (*Nothofagus obliqua*)

Las fructificaciones de *G. gargal* emergen en otoño, principalmente entre los meses de abril y junio. Son fructificación de gran tamaño, que pueden alcanzar los 30 cm de diámetro, compuestas por numerosos sombreros, dispuestos unos sobre otros de color blanco cremoso (Barroetaveña y Rajchenberg, 2019). Es un hongo degradador de la madera, que produce una pudrición blanca que expele un agradable olor almendrado, al igual que las fructificaciones. Además de saprófito, también puede comportarse como parásito facultativo, creciendo en algunos casos sobre árboles vivos (MMA, 2021). En Chile se consume cocido y se comercializa en fresco, en pequeñas cantidades, debido a la dificultad para encontrar sus cuerpos fructíferos, los que crecen solamente en forma silvestre.

Recientes estudios indican que *G. gargal* no solo posee importancia gastronómica, también se le reconoce como un potencial productor de benzaldehído, compuesto aromático natural de gran valor económico (Harada *et al.*, 2006); como posible fuente de Ergotioneína, compuesto medicinal de acción antioxidante y antiinflamatoria (Harada *et al.*, 2015b); o por su posible utilización para prevenir y mejorar el síndrome metabólico relacionado con la diabetes y la obesidad (Harada *et al.*, 2020).

La abundancia de cuerpos fructíferos de *G. gargal* en los bosques es baja, por lo que su extracción desde las poblaciones naturales pudiera suponer un factor de riesgo al generarse una pérdida de su diversidad

genética (erosión genética), lo que repercutiría en su supervivencia frente a los desafíos que imponen la presión antrópica y los efectos del cambio climático.

Entre los factores que explican la baja producción de cuerpos fructíferos, y que afectan la supervivencia de la especie, están: (i) la degradación o pérdida de su hábitat dado por la ocurrencia de incendios; (ii) la presión que se ejerce sobre la madera, especialmente de *Nothofagus spp* que es extraída y utilizada principalmente como combustible; (iii) la disminución de las poblaciones de *Nothofagus spp* debido a la deforestación o el reemplazo de las especies arbóreas; (iv) el empleo de técnicas de colecta inadecuadas y la presión que ejercen los recolectores; y (v) la creciente ocurrencia de condiciones ambientales extremas debido al cambio climático. De igual forma, la falta de información sobre la especie y su hábitat, amenaza su supervivencia, siendo necesario generar tal conocimiento para facilitar su conservación.

Su uso como alimento y como productor de agentes potencialmente medicinales, permite que esta especie pueda representar una alternativa productiva de gran valor tras su domesticación. Otro aspecto a considerar son los pueblos originarios que aún conservan la costumbre de recolectar hongos silvestres en el bosque nativo, práctica cultural que ha ido desapareciendo debido a la escases o desaparición de los hongos comestibles silvestres tradicionales.

En relación a lo señalado anteriormente, el presente artículo aporta información para el cultivo bajo condiciones controladas de *G. gargal*, particularmente antecedentes relativos al desempeño en condiciones de cultivo *in vitro* de diferentes cepas de *Grifola gargal* conservadas en el Banco de Cepas del Instituto Forestal. A estas cepas se les evalúa su crecimiento bajo condiciones *in vitro* bajo diferentes niveles de pH y en distintos medios de cultivo.

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizó 2 cepas de la especie *Grifola gargal* (**Figura 2**), procedentes del Banco de cepas del Instituto Forestal de Chile (INFOR) y cuyo material fue colectado en bosques con predominio de especies arbóreas del género *Nothofagus*, desde madera muerta de roble (*Nothofagus obliqua*) en dos regiones del país (**Cuadro 1**).

Los cultivos puros fueron obtenidos de aislados de acuerdo a la técnica descrita por [Molina y Palmer \(1982\)](#), generados a partir del sombrero de un esporocarpio joven y cultivados sobre medio PDA, en oscuridad y a una temperatura de 22°C.



Figura 2. Aspecto de fructificación de *Grifola gargal* de cepa F878001 (izq) y cepa IF1426001 (der).

Cuadro 1. Cepas utilizadas y antecedentes de cada una de ellas para la especie *Grifola garga*.

| Código | Región | Sector | Coordenadas | | Suelo | Altitud (msnm) | Sustrato |
|-----------|----------|-----------------|-------------|---------|--------|----------------|----------|
| | | | Lat. S | Long. O | | | |
| IF878001 | Biobío | Camino a Antuco | 19H 245304 | 5846648 | Trumao | 479 | Roble |
| IF1426001 | Los Ríos | Liquiñe | 19H 249139 | 5601670 | Trumao | 289 | Roble |

En una fase inicial, el material original de cada cepa fue activado y masificado en discos de Petri con medio de extracto de papa, dextrosa y agar (PDA). Para ello, se extrajeron del material original discos de 5 mm, los que fueron puestos en el centro de las placas conteniendo 20 ml del medio nutritivo por un lapso de 40 días, período en el cual se generó suficiente tejido miceliar para ser utilizados en la instalación del estudio respectivo.

Para la instalación del estudio, los medios de cultivos utilizados fueron Extracto de papa dextrosa agar (PDA) (Difco, Becton Dickinson and Company, USA), Biotina Aneurina Ácido Fólico (BAF) (Moser, 1960; Chung, 2020), Extracto de malta levadura agar peptona (MYPA) (Postemsky *et al.*, 2006; Postemsky, 2012) y peptona-extracto de levadura-glucosa (PGYA) (Kawade *et al.*, 2009). Cada medio se ajustó a 5 valores de pH: 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 y 6,0 con 5 repeticiones por cada unidad experimental.

Los medios de cultivos utilizados, se esterilizaron en autoclave a 121°C, a 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, estos 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 discos de Petri de 90 x 15 mm, ayudados por una jeringa de 25 ml colocando 20 ml de medio en cada uno de ellos. Posteriormente, se dejaron enfriar en ambiente estéril hasta su uso. El proceso de instalación de los ensayos se realizó con la ayuda de un sacabocado que permitió obtener segmentos circulares de 0,5 cm desde los discos que contenían el material miceliar madre. Cada segmento fue colocado en el centro de cada disco de Petri y sobre el medio de cultivo, 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 en los discos con los segmentos miceliar respectivos, estos se ubicaron en una Cámara de Crecimiento marca Forma Scientific modelo 3744, en oscuridad y a 20°C de temperatura por 21 días. Para el estudio se evaluó el comportamiento de cada cepa en términos de: crecimiento en diámetro (CD) medido en milímetros; velocidad media de crecimiento (VMC) medida en mm/día; y biomasa (B) medida en miligramos (mg). Las evaluaciones se efectuaron en los cuatro medios de cultivo y cinco valores de pH indicados.

Para realizar las mediciones del crecimiento miceliar se tomó los crecimientos en diámetro en 2 direcciones a partir del centro donde se ubicó el disco de micelio utilizado como inóculo con la ayuda de un pie de metro digital marca Ubermann. Las mediciones se realizaron cada 7 días por un lapso de 21 días para cada tratamiento, descontando de las mediciones el radio correspondiente al segmento de agar circular de 5 mm de diámetro que se utilizó para realizar la inoculación. Por otro lado, para obtener los valores de biomasa al final del período de evaluación, se procedió a extraer desde los discos de Petri, la masa miceliar producida junto con el medio de cultivo con agar, aplicando a continuación la metodología utilizada por Santiago-Martínez *et al.* (2003), que consistió en eliminar el agar por calentamiento en baño maría y luego enjuagando la colonia con agua caliente para eliminar el agar remanente y secando posteriormente en estufa a 60 °C por 48 horas hasta peso constante. Luego se procedió a pesar cada muestra, descontando el peso del papel y el peso del material inicial utilizado como inóculo, obteniendo finalmente la biomasa seca producida en cada tratamiento (**Figura 3**).

Para determinar la VMC de las cepas, los datos obtenidos de mediciones de crecimiento en diámetro cada 7 días por 21 días, se ajustaron mediante una ecuación de regresión lineal para calcular la pendiente de la curva de crecimiento y obtener el promedio de crecimiento del hongo por día (Santiago-Martínez *et al.*,

1995). Este estudio fue establecido bajo un diseño completamente al azar, considerando 5 repeticiones para cada unidad experimental. Los análisis de los datos se realizaron 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 3. (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) Instalación de ensayo con sacabocado; (f) Ensayo instalado bajo oscuridad y 20 ± 1 °C; (g) Aspecto del crecimiento de cepa de *Grifola garga* en medio PGYA y bajo distintos niveles de pH; (h) Aspecto del crecimiento de cepa de *Grifola garga* en medio PDA y bajo distintos niveles de pH; (i) Medición de crecimiento en diámetro de cepas; (j) Limpieza de tejido micelial de medio de cultivo; (k) Secado en estufa por 48 horas a 60°C de tejido micelial; (l) Pesaje para determinar biomasa producida por cada uno de los tratamientos

RESULTADOS

A Nivel de Cepa

En ambas cepas se manifestó un efecto significativo del pH, medio de cultivo e interacción de ellos, sobre las tres variables estudiadas (crecimiento en diámetro, velocidad media de crecimiento y producción de biomasa) (**Cuadro 2**).

Cuadro 2. Significancia estadística del análisis de varianza (ANDEVA) para los valores medios obtenidos de las variables crecimiento en diámetro, velocidad media de crecimiento y biomasa para cepas de *Grifola gargar.*

| CEPA | Factor | Crecimiento en diámetro (mm) | Velocidad media de crecimiento (mm/día) | Biomasa (mg/día) |
|-----------|------------|------------------------------|---|------------------|
| IF1426001 | Medio | <0,0001* | <0,0001* | <0,0001* |
| | pH | <0,0001* | <0,0001* | 0,0051* |
| | Medio x pH | <0,0001* | <0,0001* | <0,0001* |
| IF878001 | Medio | <0,0001* | <0,0001* | <0,0001* |
| | pH | <0,0001* | <0,0001* | <0,0001* |
| | Medio x pH | <0,0001* | <0,0001* | 0,0039* |

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

- *Crecimiento en Diámetro (CD)*

Se observa interacción significativa entre los factores para la cepa IF1426001. El mayor crecimiento se obtuvo con pH 4,5 en el medio MYPA ($81,06 \pm 1,28$ mm), pero no se diferenció estadísticamente de los valores restantes, excepto con los obtenidos en el medio BAF con cualquier pH, y con los obtenidos a pH 5,5 y 6,0 en cualquier medio. En la cepa IF878001 el mayor crecimiento en diámetro se obtuvo en los medios MYPA y PDA a pH 4,5 ($81,30 \pm 0,79$ y $80,97 \pm 0,92$ mm, respectivamente) aunque tampoco se diferencian en forma significativa de otros valores, a excepción principalmente del medio PGYA en casi todos los niveles de pH, y los de la mayoría de los medios con pH 5,5 y 6,0. Los valores promedios más bajos se obtuvieron para las dos cepas en el medio PDA a niveles de pH de 5,5 y 6,0. (**Cuadro 3**).

- *Velocidad Media de Crecimiento (VMC)*

Una tendencia similar a lo descrito para la variable anterior se presenta para la cepa IF1426001. La mayor velocidad de crecimiento ($3,94 \pm 0,05$ mm/día) se registró en medio MYPA con pH 4,5. En general el medio BAF y los pH, de 5,5 y 6,0 presentan valores menores. La cepa IF878001 muestra diferencias significativas entre los valores máximos ($4,01 \pm 0,05$ y $4,01 \pm 0,03$ mm/día) registrados en los medios MYPA y PDA a pH 4,5, con respecto a los medios PYGA y BAF y a los valores de pH de 5,5 y 6,0 para el medio PDA, como también para el medio MYPA asociado a los niveles de pH 4,0 y 6,0. El medio de cultivo PDA con pH 5,5 y 6,0 presentó los valores significativamente más bajos para ambas cepas (**Cuadro 3**).

- *Biomasa (B)*

Al analizar los montos promedios obtenidos de esta variable y observar los resultados a través de las interacciones entre los dos factores analizados, los mayores valores promedios obtenidos para la cepa IF1426001 fueron en el medio MYPA seguido del medio PGYA, con valores de promedios de producción de biomasa seca de $4,43 \pm 0,23$ y $4,32 \pm 0,40$ mg /día, con diferencias significativas solo con el medio BAF a pH 4,0 y 4,5 y el medio PDA para todos los niveles de pH, a excepción de 4,5. Los valores significativamente más bajos fueron para el medio PDA con pH de 5,5 y 6,0. La cepa IF878001 también muestra interacciones entre los factores evaluados, logrando la mayor biomasa con los medios MYPA a pH 4,5 y BAF a pH 5,0 ($4,28 \pm 0,11$ y $4,18 \pm 0,07$ mg/día, respectivamente). La menor producción de biomasa se presentó en el medio PDA con pH 6,0 y 5,5 (**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 en diámetro, velocidad media de crecimiento y biomasa a nivel de cepa para la especie *Grifola gargal*.

| Cepa | Medio | pH | Medio*pH | Crecimiento en diámetro (mm) | | | | Velocidad media crecimiento (mm/día) | | | | Biomasa (mg/día) | | | |
|----------------------|----------------|------------------|------------------|------------------------------|------------|------------|----------|--------------------------------------|-----------|------|-----------|------------------|-------|----|----------|
| | | | | Cepa | Medio | pH | Medio*Ph | Cepa | Medio | pH | Medio*Ph | Cepa | Medio | pH | Medio*Ph |
| IF1426001 (n=175) | PDA (n=25) | 4.0 (n=20) | PDA + 4.0 (n=5) | 46,9a | 61,9c | 71,8 ijk | 2,3a | 3,0c | 3,4 ijkl | 1,7a | 2,7a | 2,8 bcd | | | |
| | | | PDA + 4.5 (n=5) | | | 70,3 ijk | | | 3,4 ijkl | | | 2,9 bcde | | | |
| | | | PDA + 5.0 (n=5) | | | 49,1 cdef | | | 2,4 de | | | 1,6 ab | | | |
| | | | PDA + 5.5 (n=5) | | | 30,3 b | | | 1,4 b | | | 0,8 a | | | |
| | BAF (n=25) | 4.5 (n=20) | PDA + 6.0 (n=5) | 51,1b | 67,5d | 13,3 a | 2,4a | 3,2d | 0,6 a | 3,0b | 3,5b | 0,3 a | | | |
| | | | BAF + 4.0 (n=5) | | | 38,1 bc | | | 1,7 bc | | | 1,6 ab | | | |
| | | | BAF + 4.5 (n=5) | | | 44,6 cd | | | 2,1 cd | | | 2,5 bc | | | |
| | | | BAF + 5.0 (n=5) | | | 53,6 defg | | | 2,5 def | | | 3,0 bcde | | | |
| | PGYA (n=25) | 5.0 (n=20) | BAF + 5.5 (n=5) | 58,7a | 61,4c | 60,5 fg | 2,8a | 2,9c | 2,9 efghi | 3,1a | 3,1ab | 4,0 cde | | | |
| | | | BAF + 6.0 (n=5) | | | 58,9 efgh | | | 2,8 efgh | | | 3,7 cde | | | |
| | | | PGYA + 4.0 (n=5) | | | 74,3 jk | | | 3,6 kl | | | 3,5 cde | | | |
| | | | PGYA + 4.5 (n=5) | | | 74,1 jk | | | 3,5 jkl | | | 4,3 de | | | |
| | MYPY (n=25) | 5,5 (n=20) | PGYA + 5.0 (n=5) | 67,9c | 55,5b | 71,4 ijk | 3,2b | 2,6b | 3,4 ijkl | 4,0c | 3,1ab | 4,1 de | | | |
| | | | PGYA + 5.5 (n=5) | | | 66,9 hij | | | 3,2 hijk | | | 4,1 cde | | | |
| | | | PGYA + 6.0 (n=5) | | | 52,7 def | | | 2,5 defg | | | 3,8 cde | | | |
| | | | MYPY + 4.0 (n=5) | | | 63,5 fghij | | | 3,2 hijk | | | 3,1 bcde | | | |
| MYPY (n=25) | 6.0 (n=20) | MYPY + 4.5 (n=5) | 68,8c | 47,0a | 81,1 k | 3,3b | 2,2a | 3,9 l | 3,6c | 2,8a | 4,4 e | | | | |
| | | MYPY + 5.0 (n=5) | | | 71,6 ijk | | | 3,5 jkl | | | 3,7 cde | | | | |
| | | MYPY + 5.5 (n=5) | | | 64,5 ghij | | | 3,1 ghijk | | | 3,4 cde | | | | |
| | | MYPY + 6.0 (n=5) | | | 63,1 fghij | | | 3,0 fghij | | | 3,4 cde | | | | |
| IF878001 (n=175) | PDA (n=25) | 4.0 (n=20) | PDA + 4.0 (n=5) | 65,8ab | 67,3b | 78,7 gh | 3,2a | 3,3b | 3,8 ghi | 2,3a | 2,9b | 2,4 bc | | | |
| | | | PDA + 4.5 (n=5) | | | 81,0 h | | | 4,0 i | | | 3,3 cdefg | | | |
| | | | PDA + 5.0 (n=5) | | | 76,8 fgh | | | 3,7 fghi | | | 2,8 bcdef | | | |
| | | | PDA + 5.5 (n=5) | | | 52,6 b | | | 2,5 b | | | 1,9 ab | | | |
| | BAF (n=25) | 4.5 (n=20) | PDA + 6.0 (n=5) | 68,4b | 76,0c | 40,2 a | 3,2a | 3,7c | 1,9 a | 3,6c | 3,7c | 1,0 a | | | |
| | | | BAF + 4.0 (n=5) | | | 63,8 cde | | | 3,0 bcde | | | 3,2 cdefg | | | |
| | | | BAF + 4.5 (n=5) | | | 72,2 efgh | | | 3,4 efgh | | | 3,8 fg | | | |
| | | | BAF + 5.0 (n=5) | | | 73,1 efgh | | | 3,4 efgh | | | 4,2 g | | | |
| | PGYA (n=25) | 5.0 (n=20) | BAF + 5.5 (n=5) | 68,2b | 75,2 | 66,9 def | 3,3b | 3,6c | 3,1 cde | 3,1 | 3,4c | 3,7 fg | | | |
| | | | BAF + 6.0 (n=5) | | | 65,8 cdef | | | 3,1 cde | | | 3,1 cdef | | | |
| | | | PGYA + 4.0 (n=5) | | | 57,9 bcd | | | 2,8 bcd | | | 2,4 bcd | | | |
| | | | PGYA + 4.5 (n=5) | | | 69,4 efg | | | 3,3 defg | | | 3,5 defg | | | |
| | MYPY (n=25) | 5,5 (n=20) | PGYA + 5.0 (n=5) | 64,1a | 65,6b | 71,5 efgh | 3,1a | 3,1b | 3,4 efgh | 2,8b | 3,0b | 2,9 bcdef | | | |
| | | | PGYA + 5.5 (n=5) | | | 66,2 cdef | | | 3,1 cde | | | 2,6 bcde | | | |
| | | | PGYA + 6.0 (n=5) | | | 55,7 bc | | | 2,6 bc | | | 2,4 bc | | | |
| | | | MYPY + 4.0 (n=5) | | | 68,8 defg | | | 3,4 efgh | | | 3,4 cdefg | | | |
| MYPY (n=25) | 6.0 (n=20) | MYPY + 4.5 (n=5) | 74,6c | 57,2a | 81,3 h | 3,7b | 2,7a | 4,0 i | 3,7c | 2,5a | 4,3 g | | | | |
| | | MYPY + 5.0 (n=5) | | | 79,2 gh | | | 3,9 hi | | | 3,8 fg | | | | |
| | | MYPY + 5.5 (n=5) | | | 76,6 fgh | | | 3,7 fghi | | | 3,6 efg | | | | |
| | | MYPY + 6.0 (n=5) | | | 67,0 def | | | 3,2 def | | | 3,3 cdefg | | | | |

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

- *Correlaciones entre variables*

Para visualizar el grado de relación entre las variables CD, VMC y B, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (Cuadro 4), observándose una alta correlación entre las variables para ambas cepas.

Cuadro 4. Correlación entre variables crecimiento miceliar en cultivos *in vitro* de *Grifola garga*. Coeficientes de correlación de Pearson para cepa IF1426001 (sobre la diagonal) y para cepa IF8780001 (bajo la diagonal).

| | CD | VMC | B |
|-----|------|------|------|
| CD | - | 1,0 | 0,78 |
| VMC | 0,99 | - | 0,77 |
| B | 0,64 | 0,61 | - |

A Nivel de Especie

Los ANDEVA de los datos obtenidos a nivel de especie arrojan interacciones significativas para $\alpha=0,05$ entre los factores nivel de pH y medio de cultivo con efectos sobre las variables CD, VMC y B.

- *Crecimiento en diámetro (CD)*

Analizando los resultados de los valores promedios a nivel de especie, se observa interacciones significativas entre las variables medio de cultivo y nivel de pH. En este análisis, el máximo crecimiento diamétrico se obtiene para el medio MYPA a pH 4,5 (81,2 mm), seguido del medio PDA (75,6 mm) y diferenciándose significativamente del medio BAF en sus diferentes niveles de pH, entre otros promedios obtenidos que se ubican generalmente en uno o en los dos valores extremos de pH, dependiendo del medio de cultivo con que interactúe.

Los valores más bajos en cada medio de cultivo utilizado se presentaron a pH 6,0, a excepción del medio BAF que fue a pH 4,0. El medio PDA con pH 6,0 obtiene el valor más bajo de crecimiento diamétrico ($26,73 \pm 14,43$ mm) (**Cuadro 5**).

- *Velocidad Media de Crecimiento (VMC)*

Los resultados obtenidos para esta variable muestran el valor más alto con el medio MYPA a pH 4,5, seguido del medio PDA ($3,98 \pm 0,06$ y $3,71 \pm 0,42$ mm/día, respectivamente). Estos valores solo se diferencian significativamente de los obtenidos en el medio BAF en sus distintos niveles de pH (**Cuadro 5**).

- *Biomasa (B)*

El mayor valor promedio se obtuvo en el medio MYPA con pH de 4,5 ($4,36 \pm 0,19$ mg/día). Sin embargo, este valor sólo se diferenció significativamente de los obtenidos con el medio PDA en sus diferentes niveles de pH, casi como también de los valores extremos de pH en el medio PGYA y para los 2 niveles más bajos de pH en el medio BAF (**Cuadro 5**).

- *Correlaciones entre variables*

En relación al coeficiente correlación de Pearson, las variables CD y B obtiene un valor de 0,71; entre las variables VMC y B fue de 0,69; y para variables CD y VMC fue de 1,0. Las variables se encuentran altamente correlacionadas, lo que es esperable, en cuanto todas ellas son estimaciones del mismo fenómeno de crecimiento miceliar.

Cuadro 5. Efecto de los factores medio de cultivo y nivel de pH sobre los valores medios y sus desviaciones estándar obtenidos para las variables crecimiento en diámetro, velocidad media de crecimiento y biomasa a nivel de la especie *Grifola gargal*.

| Medio | pH | Medio*pH | Crecimiento en diámetro (mm) | | | Velocidad media de crecimiento (mm/día) | | | Biomasa (mg/día) | | |
|----------------|---------------|-------------------|------------------------------|--------|-----------|---|-------|------------|------------------|-------|-----------|
| | | | Medio | pH | Medio*Ph | Medio | pH | Medio*Ph | Medio | pH | Medio*Ph |
| PDA (n=50) | 4,0 (n=40) | PDA + 4.0 (n=10) | 56,4a | 64,6bc | 75,2 fg | 2,7a | 3,1bc | 3,6 fg | 2,0a | 2,8a | 2,6 cde |
| | | PDA + 4.5 (n=10) | | | 75,7 fg | | | 3,7 hi | | | 3,1 cdef |
| | | PDA + 5.0 (n=10) | | | 63,0 cdef | | | 3,1 cdefgh | | | 2,2 bc |
| | | PDA + 5.5 (n=10) | | | 41,4 b | | | 1,9 b | | | 1,4 ab |
| BAF (n=50) | 4,5 (n=40) | PDA + 6.0 (n=10) | 59,8a | 71,7d | 26,7 a | 2,8a | 3,5d | 1,3 a | 3,3b | 3,6c | 0,7 a |
| | | BAF + 4.0 (n=10) | | | 51,0 bc | | | 2,4 bc | | | 2,4 bcd |
| | | BAF + 4.5 (n=10) | | | 58,4 cde | | | 2,7 cde | | | 3,2 cdef |
| | | BAF + 5.0 (n=10) | | | 63,3 cdef | | | 2,9 cdef | | | 3,6 defg |
| PGYA (n=50) | 5,0 (n=40) | BAF + 5.5 (n=10) | 68,3cd | 60,6b | 63,7 cdef | 3,12b | 3,3cd | 3,0 cdefg | 3,4b | 3,0ab | 3,9 fg |
| | | BAF + 6.0 (n=10) | | | 62,3 cdef | | | 2,9 cdef | | | 3,4 cdefg |
| | | PGYA + 4.0 (n=10) | | | 66,1 def | | | 3,2 defgh | | | 3,0 cdef |
| | | PGYA + 4.5 (n=10) | | | 71,7 efg | | | 3,4 efghi | | | 3,9 fg |
| MYPA (n=50) | 6,0 (n=40) | PGYA + 5.0 (n=10) | 71,7c | 52,1a | 71,5 efg | 3,5c | 2,5a | 3,4 efghi | 3,6b | 2,6a | 3,5 defg |
| | | PGYA + 5.5 (n=10) | | | 66,6 def | | | 3,1 defgh | | | 3,4 cdefg |
| | | PGYA + 6.0 (n=10) | | | 54,2 bcd | | | 2,6 bcd | | | 3,1 cdef |
| | | MYPA + 4.0 (n=10) | | | 66,1 def | | | 3,3 efghi | | | 3,2 cdefg |
| MYPA (n=50) | 6,0 (n=40) | MYPA + 4.5 (n=10) | 71,7c | 52,1a | 81,2 g | 3,5c | 2,5a | 4,0 i | 3,6b | 2,6a | 4,4 g |
| | | MYPA + 5.0 (n=10) | | | 75,4 fg | | | 3,7 ghi | | | 3,8 efg |
| | | MYPA + 5.5 (n=10) | | | 70,6 efg | | | 3,4 efghi | | | 3,5 defg |
| | | MYPA + 6.0 (n=10) | | | 65,1 cdef | | | 3,1 defgh | | | 3,4 cdefg |

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

DISCUSIÓN

Las cepas estudiadas muestran pequeñas variaciones en las estrategias con que cada una de ellas enfrenta los cambios de pH y medio de crecimiento, mostrando en ciertos casos respuestas que no siguen comportamientos similares entre ellas y que estarían influenciados principalmente por las interacciones que se presentan entre los factores medioambientales estudiados y la variabilidad genética que presentan dentro de la especie, cuyos resultados se deben considerar en forma particular para cada cepa evaluada.

El pH, es uno de los factores más importantes de considerar, este influye en la disponibilidad de algunos nutrientes, influyendo en la solubilidad de las sales y vitaminas y en la actividad de las enzimas dentro del sustrato donde el hongo crece (Chung, 2021). Complementariamente, Hung & Trappe (1983) comentan que los efectos de factores como el pH sobre en el crecimiento fúngico *in vitro*, deben 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 frente a uno que crezca bien solo en un rango restringido.

El análisis de las relaciones existentes entre las variables CD, VCM y B a nivel de cepas y especie, arrojó una alta correlación entre ellas. Sin embargo, Santiago-Martínez *et al.* (1995) mencionan que los mayores crecimientos en diámetro de la cepa bajo un cultivo *in vitro* no siempre corresponden con la mayor producción de biomasa debido a variaciones en el comportamiento de cada cepa, aspecto que pudiera ser de importancia debido al frecuente empleo de este parámetro como único elemento para evaluar el crecimiento de la cepa.

En relación a la variable CD, Rajchenber (2002) obtuvo en *G. gargal* un crecimiento radial de 30 mm en un periodo de 6 semanas en medio agar malta. El resultado obtenido por este investigador, resulto menor a lo obtenido para esta investigación, en la cual a nivel de especie se obtuvo un monto de $81,18 \pm 1,01$ mm,

mientras que a nivel de cepas se obtuvo valores de $81,06 \pm 1,28$ y $81,30 \pm 0,79$ para las cepas IF1426001 y IF878001, respectivamente. Postemsky *et al.* (2006), mediante un enriquecimiento del medio MYPA con polvo de cascarilla de girasol obtuvieron un mayor crecimiento (98 mm) en un lapso de 20 días, a pH 4,0 y 18°C como temperatura de cultivo.

Respecto a la velocidad media de crecimiento, Toledo y Barroetaveña (2017), utilizando distintos medios y cepas de *G. garga* obtuvieron valores en medio PDA de 1,6 mm/día para la cepa de mayor crecimiento. INIA-FIA (2004) lograron una tasa mucho menor con 1.17 mm/día en medio de Agar- extracto de papa y levadura a 20 °C. Tales valores fueron menores a lo observado en los ensayos desarrollados en esta investigación, los que en medio MYPA con pH 4,5, a nivel de especie alcanzaron $3,98 \pm 0,06$ mm/día, en un período de 21 días; mientras que para la cepa IF1426001 fue de $3,94 \pm 0,05$ mm/día y para la cepa IF878001 de $4,01 \pm 0,05$ mm/día. Investigaciones realizadas por Postemsky *et al.* (2006), indican que en el medio MYPA se obtiene un VMC de 4,3 mm/día con pH de 4,0, lo que es levemente mayor a lo obtenido por esta investigación en el mismo medio. Sin embargo, una mejora realizada por estos mismos investigadores, con la adición de polvo de cascarilla de girasol al medio de cultivo, les permitió elevar la tasa a 4,9 mm/día.

En relación a la variable biomasa, el medio MYPA con pH de 4,5 resulta el más productivo en términos de materia seca, logrando para las cepas IF1426001 y IF878001, montos de $4,43 \pm 0,23$ y $4,28 \pm 0,11$ mg/día, respectivamente, mientras que a nivel de especie alcanzó los $4,36 \pm 0,19$. Estas cifras son ligeramente inferiores a las obtenidas por Postemsky *et al.* (2006), quienes consiguen 5,2 mg/día y que mediante enriquecimiento del medio MYPA con polvo de cascarilla de girasol, aumentan el crecimiento, llegando a 7,3 mg/día. Utilizando medios líquidos de MYP Postemsky (2012) obtuvo los mejores rendimientos a 20°C y pH 4,0, a diferencia de Harada *et al.* (2006) que alcanzaron los mejores resultados a pH 4,5 en medio líquido de PGY a 20 °C.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta investigación confirman interacciones significativas entre el medio de cultivo y el pH, siendo el medio MYPA con pH de 4,5, la combinación más efectiva para promover el crecimiento de todas las variables evaluadas. A nivel de las cepas evaluadas, hubo algunas diferencias en cuanto a preferencias en los medios asociados y niveles de pH. La cepa IF1426001 logró el mejor resultado en el medio MYPA a pH 4,5. En tanto que, la cepa IF878001 presentó promedios un tanto similares y más altos dentro de CD y VCM para los medios MYPA y PDA a pH 4,5, mientras que para la mayor producción de biomasa la obtuvo en el medio MYPA a pH 4,5 y BAF a pH 5,0. Las relaciones entre las variables CD, VMC y B, tanto a nivel de cepas como a nivel de especie mostraron una alta correlación. El conocimiento más acabado del comportamiento de cada cepa de *G. garga* bajo condiciones de cultivo específicos, requerirá de mayores estudios para definir los parámetros medioambientales adecuados para su óptimo desarrollo.

G. Garga es una especie endémica del cono Sur de América, precisamente en zonas del sur de Chile y Argentina. Sin embargo, su hábitat ha ido restringiéndose, por lo que uno de los puntos principales de este trabajo es la obtención de información de su comportamiento frente a variables medioambientales bajo condiciones controladas, con el propósito de ayudar a preservar su variabilidad genética, basado en las cepas que puedan ser capturadas y aisladas. Este aspecto es de suma importancia, debido al grado de vulnerabilidad de la especie (Furci, 2020), siendo la pérdida o degradación de los hábitats donde crece, se desarrolla y reproduce una de las causas de su vulnerabilidad. Este hongo ha sido investigado recientemente debido a las posibles cualidades medicinales, como productor de compuestos químicos de importancia comerciales o para el consumo como producto alimenticio, este último, con avances importantes realizados en Japón (Kawade *et al.*, 2009; Harada *et al.*, 2015a). En tanto que Mayett & Martínez-Carrera (2010), mencionan que, en la actualidad, los hongos silvestres comestibles concitan un gran interés social, científico, económico y tecnológico.

El posible escalamiento hacia un cultivo en ambiente controlado de esta especie, deberá contar con conocimientos relativo a sus requerimientos ambientales, nutricionales y de una adecuada identificación

de cada cepa rescatada desde su ambiente natural, cuya información se irá generando y recopilando con los avances que se logren en las investigaciones que a futuro puedan asociar cepas más productivas con condiciones ambientales específicas. Este mayor conocimiento de *G. gargal*, representa una alternativa para su domesticación, pudiendo incorporar el cultivo y con ello promover el acceso a alimentos saludables por parte de la población rural.

REFERENCIAS

- Barroetaveña, C. & Rajchenberg, M. (2019).** Hongos comestibles silvestres de la región Andino Patagónica de Argentina. Manual de campo. Manual N° 19. ISSN 1514-2256. 40 p.
- Boa, E. (2004).** Wild edible fungi. A global overview of their use and importance to people. Non-wood forest products 17. FAO, Roma, Italia. 147 pp. ISBN: 92-5-105157-7
- Chung, P. (2020).** Captura, aislación y evaluación del crecimiento de material fúngico de la región de Ñuble para su incorporación al banco de hongos comestibles del Instituto Forestal. Ciencia e Investigación Forestal INFOR Chile. 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>
- De Bruijn, J., Loyola, C., Aqueveque, P., Cañumir, J., Cortéz, M. & France, A. 2008.** Influence of heat treatment on the antioxidant properties of *Grifola gargal* hydro alcoholic extracts. Micología Aplicada Internacional, 20(1): 27-34. ISSN: 1534-2581
- Furci, G. 2020.** *Grifola gargal*. The IUCN Red List of Threatened Species 2020. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T75725863A75725878.en>
- Harada, E., Kawade, M., Meguro, S. & Kawachi, S. (2006).** The flavor compounds of *Grifola gargal*, the Chilean edible mushroom. Japanese Society of Mushroom Science and Biotechnology. Vol. 14 N° 4. Pp: 183-189.
- Harada, E., Morizono, T., Sumiya, T. & Meguro, S. (2015a).** Production of Andean-Patagonic edible mushroom *Grifola gargal* on wood-based substrates. Mycoscience 56, pp: 616-621. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2015.06.005>
- Harada, E., D'Alessandro-Gabazza, C., Toda, M., Morizono, T., Chelakkot-Govindalayathil, A., Roen, Z., Urawa, M. et al. (2015b).** Amelioration of atherosclerosis by the new medicinal mushroom *Grifola gargal* Singer. J Med Food. 18(8):872–881. <https://doi.org/10.1089/jmf.2014.3315>
- Harada, E., Morizono, T., Kanno, T., Saito, M., Kawagishi, H. (2020).** Medicinal mushroom, *Grifola gargal* (Agaricomycetes), lowers triglyceride in animal models of obesity and diabetes and in adults with prediabetes. Int. J. Med. Mushrooms 22, 79–91, <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2019033285>
- Hawksworth, D. & Luecking, R. (2017).** Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. Microbiol Spectr. 5(4). <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 105: 1422-1432. <https://doi.org/10.1017/S0953756201004725>
- Hung, L. & Trappe, J. (1983).** Growth variation between and within species of ectomycorrhizal fungi in response to pH *in vitro*. Mycologia 75:234-241, <https://doi.org/10.2307/3792807>
- INIA-FIA (2004).** Desarrollo del Cultivo del hongo silvestre gargal (*Grifola gargal*) y sus alternativas de procesamiento industrial. Proyecto Cod. FIA-PI-C-2004-1-A-018. FIA-INIA-UDEC. Informe Final. 99 p.
- Kawade, M., Harada, E., Nishioka, H. & Meguro, S. (2009).** Cultivation of *Grifola gargal*, the Chilean edible mushroom, in wood meal medium: The screening of suitable strains for cultivation. Japanese Society of Mushroom Science and Biotechnology. Vol. 17(2):75-79. https://doi.org/10.24465/msb.17.2_75
- Mayett, Y. & D. Martínez-Carrera, D. (2010).** El consumo de los hongos comestibles y su relevancia en la seguridad alimentaria de México. Capítulo 18. Pp. 293-329. En: Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-

Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI. Eds. D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales y V. M. Mora. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOSUNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEPIMINAP, Puebla.

- MMA (2021).** Ficha final de antecedentes de especie. *Grifola gargal* Singer. Ministerio de Medio Ambiente. En: https://clasificacionespecies.mma.gob.cl/wp-content/uploads/2021/03/Grifola_gargal_17RCE_FINAL.pdf
- Molina, R. & Palmer, J. (1982).** Isolation, maintenance and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. In: N. C. Schenk (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. 649p.
- Moser, M. (1960).** Die Gattung Phlegmacium. Die Pilze Mitteleuropas 4. J. Bad Heilbrunn.
- Palma, J., Claramunt, V., Molina, E., Montenegro, I. & Chung, P. (2021).** Manual para la recolección y manejo sustentable de hongos silvestres comestibles. El caso de loyo, changle, gargal y diweñe. Instituto Forestal. Santiago, Chile. Manual N° 60. 54p. <https://doi.org/10.52904/20.500.12220/31353>
- Postemsky, P. (2012).** Cultivo y Propiedades medicinales de *Grifola gargal* y *Grifola sordulenta*. Tesis de Doctorado en Biología. Depto. de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, CERZOS – CONICET, Argentina. 319 p.
- Postemsky, P., González, R., Figlas, D. & Curvetto, N. (2006).** Optimizing *Grifola sordulenta* and *Grifola gargal* growth in agar and liquid nutrient medium. Micología Aplicada Internacional, 18(1): 7-12.
- Pozzi, C., Lorenzo, L. & Rajchenberg, M. (2009).** Un hospedaje exótico del hongo comestible *Grifola gargal* (Basidiomycota, Fungi). Nota Técnica. Bol. Soc. Argent. Bot., 44(1-2): 9-10.
- Rajchenberg, M. (2002).** The genus *Grifola* (Aphyllophorales, Basidiomycota) In Argentina revisited. Bol. Soc. Argent. Bot., 37(1-2): 19-27.
- Sanchez Jardón, L., Soto, D., Torres, M., Moldenhauer, L., Solis Ehijos, M., Ojeda, J., Rosas, B. et al. (2017).** Hongusto, innovación social en torno a los hongos silvestres y cultivados en Aysén. Ediciones Universidad de Magallanes, Coyhaique, Chile. 96 p.
- 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.
- 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.
- Savoie, J. & Largeteau, M. (2011).** Production of edible mushrooms in forest: trends in development of a mycosilviculture. Applied Microbiology Biotechnology, N° 89. Pp: 971-979. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3022-4>
- Singer, R. (1969).** Mycoflora Australis. Nova Hedwigia Beiheft, N° 29. Pp:1-405.
- Toledo, C. & Barroetaveña, C. (2017).** Crecimiento micelial de especies silvestres de hongos comestibles de los bosques andino-patagónicos: Primeros pasos para su domesticación. Bol. Soc. Argent. Bot., 52(3): 435-446. <https://doi.org/10.31055/1851.2372.v52.n3.18025>
- Valenzuela, E. (2003).** Hongos comestibles silvestres colectados en la X Región de Chile. Boletín Micológico, vol. 18. Pp: 1-14. <https://doi.org/10.22370/bolmicol.2003.18.0.374>