



ARTÍCULO

Evaluación del crecimiento miceliar *in vitro* de *Butyriboletus loyo* (Phillippi) Mikšik bajo diferentes niveles de pH y medios de cultivo.

Patricio Chung Guin-Po¹¹ Instituto Forestal, sede Biobío. Chile. pchung@infor.clDOI: <https://doi.org/10.52904/0718-4646.2025.619>

Recibido: 11.12.2024; Aceptado 20.12.2024.

RESUMEN

Se estudia el comportamiento, bajo condiciones de cultivo *in vitro*, de 2 cepas de la especie micorrícica comestible *Butyriboletus loyo*, asociada principalmente a especies del género *Nothofagus*. Se evaluó el efecto de tres medios de cultivo (PDA= Extracto de Papa, Dextrosa, Agar; MMN= Medio Melin-Norkrans; y BAF= Biotina Aneurina ácido Fólico) y cinco niveles de pH (4,5; 5,0; 5,5; 6,0 y 6,5) sobre las variables: crecimiento radial (CR); velocidad media de crecimiento (VMC); y biomasa (B). La cepa IF1402002 evidenció una interacción muy significativa entre medio de cultivo y pH ($\alpha=0,01$), obteniendo mayor biomasa en el medio BAF asociado a niveles de pH entre 4,5 y 5,5. La cepa IF1418001 solo mostró efectos muy significativos del medio de cultivo, el que se manifestó para todas las variables estudiadas, obteniendo sus mayores valores en el medio BAF. Comparaciones entre valores promedios del CR, VMC y B, muestran alta correlación entre estos parámetros para las cepas estudiadas.

Palabras clave: *Butyriboletus loyo*, cepas, pruebas de crecimiento, *in vitro*

SUMMARY

The *in vitro* behavior of 2 strains of the edible mycorrhizal species *Butyriboletus loyo*, mainly associated with species of the genus *Nothofagus*, was studied. The effect of three culture media (PDA= Potato Extract, Dextrose, Agar; MMN= Melin-Norkrans medium; and BAF= Biotin Aneurine Folic Acid) and five pH levels (4.5; 5.0; 5.5; 6.0 and 6.5) on the variables: radial growth (CR); average growth rate (VMC); and biomass (B) were evaluated. Strain IF1402002 evidenced a highly significant interaction between culture medium and pH ($\alpha=0.01$), obtaining higher biomass in BAF medium associated with pH levels between 4.5 and 5.5. Strain IF1418001 only showed very significant effects of the culture medium, which was manifested for all the variables studied, obtaining its highest values in the BAF medium. Comparisons between average values of CR, VMC and B, show high correlation between these parameters for the strains studied.

Key words: *Butyriboletus loyo*, strains, growth testing, *in vitro*

INTRODUCCIÓN

Numerosos hongos silvestres comestibles del bosque han conformado el recurso micológico utilizado por los pueblos originarios como parte de su alimentación. El legado y sabiduría ancestral de estos pueblos se ha mantenido en la actualidad, difundiéndose esta cultura micológica en muchas zonas del país, debido a su gran importancia económica, social y cultural.

A nivel mundial se han descrito cerca de 100.000 especies de hongos (Hawksworth, 2001), de un total estimado de entre 2,2 y 3,8 millones de especies (Hawksworth & Luecking, 2017). Dentro de estos, se han descrito científicamente más de 2.000 especies comestibles (Boa, 2004). En Chile se han registrado más

de 3.000 especies de hongos (Mujica & Vergara, 1980), identificándose unas 53 especies silvestres comestibles (Valenzuela, 2003), cifras que en la actualidad se ha ido incrementando.

Entre los hongos comestibles del bosque chileno se encuentra la especie *Butyriboletus loyo* (Sin: *Boletus loyo*) (Figura 1), perteneciente a la familia *Boletaceae*, la más destacada y diversa entre los basidiomycetes y que comprende más de 70 géneros en el mundo (Wang *et al.*, 2022). Este corresponde a un hongo ectomicorrízico nativo y endémico del cono sur de Sudamérica, que está presente en los bosques nativos asociándose a las especies *Nothofagus obliqua*, *N. dombeyi*, *N. alpina* y *N. glauca* (Riquelme *et al.*, 2019; Palma *et al.*, 2021). Sus cuerpos fructíferos poseen un sombrero de color rojo-burdeo que a veces sobrepasan los 30 cm diámetro, divisándolos principalmente en los meses de otoño, creciendo en forma solitario o en grupos pequeños (Montenegro, 2016). Habita entre las regiones del Maule y Los Lagos, dentro del bosque templado en zonas húmedas y oscuras, desde el nivel del mar hasta los 1.300 m aproximadamente (Riquelme *et al.*, 2019) Por sus cualidades gastronómicas, es muy requerido y ampliamente recolectado para su consumo o venta como hongo fresco (González, 2020), en conserva o como deshidratado en ferias locales.

Respecto al género *Butyriboletus*, este fue establecido por Arora & Frank (2014) para acomodar a *Boletus* sect. *Appendiculati* (Wang, *et al.* 2022). Estos corresponden a un grupo económicamente importante de hongos ectomicorrízicos, los cuales se caracterizan por un píleo de color rojizo a marrón y un himenóforo amarillo, que generalmente se tiñe de azul cuando se lesiona el tejido, un estípite reticulado amarillo, sabor suave y pulpa firme teñida de amarillo que puede o no volverse azul cuando se expone (Arora & Frank, 2014) (Figura 1).



Figura 1. Carpóforo juvenil (Izq.) y maduro (Der.) de *Butyriboletus loyo*.

Esta especie fúngica, además de su relevancia económica como PFNM, posee un rol de importancia ecológica dentro de los ecosistemas forestales. Por lo mismo, actividades o eventos antrópicos o naturales, que alteren el suelo en el bosque tendrían un importante impacto en el desarrollo y supervivencia de estos hongos. Por lo anterior, estas modificaciones medioambientales junto a la disminución y fragmentación de los bosques de *Nothofagus*, la creciente pérdida de hábitat y la constante explotación para el consumo humano, han determinado que esta especie se encuentre actualmente clasificada En Peligro (EN) bajo el Reglamento de Clasificación de Especies Silvestres (RCE), (Ministerio Medio Ambiente, 2014, cit. por González, 2020) y ratificada su condición a nivel internacional por la UICN (Palfner *et al.*, 2022).

En los últimos años la recolección y comercialización de hongos silvestres se ha incrementado, debido a su importancia como una actividad motora en el desarrollo local de varias comunas del país, donde la ruralidad y la búsqueda de empleos han generado presión sobre un recurso fúngico económicamente valioso, llegando incluso a la sobrexplotación que afecta la permanencia o abundancia de estas especies

en su rango de distribución natural. La actividad de recolección y posterior venta de este producto fúngico, ha ayudado en parte a mejorar el bienestar económico de sus habitantes, al crear nichos de trabajo, ayudando a mitigar la migración hacia las áreas urbanas y contrarrestar el despoblamiento de las zonas rurales (Ortega, 2012).

En este sentido, los hongos silvestres comestibles presentan un considerable valor, económico, social y cultural, relevando la importancia de realizar investigación para preservarlos y maximizar la producción de sus carpóforos en forma sustentable en el tiempo. Así, para llegar a determinar las condiciones ideales para el establecimiento y desarrollo del hongo, es necesario hacer investigación que permita desarrollar una estrategia de conservación del material y su cultivo.

B. loyo junto a especies arbóreas del género *Nothofagus* han desarrollado una estrategia nutricional que les aseguran un beneficio mutuo a través de la simbiosis ectomicorrícica, que comprende la formación de un tipo de entidad simbiótica entre el hongo y las raíces de la planta. La asociación simbiótica raíz-hongo, entre las que se encuentran las ectomicorrizas, es el resultado de la evolución conjunta entre plantas y hongos, siendo una norma más que una excepción en la nutrición de las plantas terrestres (Trappe, 1977; 1987; Brundrett & Cairney, 2002). Esta ectomicorriza 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 que contienen humus, que en capas inferiores del suelo mineral (Brundrett *et al.*, 1996); ella cumple una importante función en el ciclo de nutrientes de los ecosistemas forestales.

Las ectomicorrizas funcionan gracias a su extensa red de micelios, como un sistema de absorción que se extiende por el suelo y proporciona a la planta agua y nutrientes como el nitrógeno y fósforo; el hongo por su parte recibe de la planta azúcares y carbohidratos provenientes de la fotosíntesis. Su presencia aumenta la resistencia de las plántulas a situaciones adversas, como la sequía, temperaturas extremas del suelo, valores extremos de pH y protección frente al ataque de hongos patógenos, áfidos y nemátodos. Estos hongos simbiotes también proporcionan hormonas estimulantes del crecimiento, contribuyendo a aumentar considerablemente el crecimiento y longevidad de las raíces (Slankis, 1973 *cit. por* Ipinza y Serrano, 1982).

La simbiosis entre hongos ectomicorrícicos y especies forestales afines, constituye una ventajosa oportunidad para implementar líneas de investigación y desarrollo innovativos, que conjuguen 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 ectomicorrícicos 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 fúngicas adaptadas a condiciones medioambientales específicas (Chung, 2020).

Para determinar las condiciones ideales para que se establezca y desarrolle el hongo, en conjunto con su planta hospedante, se ha efectuado investigación respecto al desarrollo de una planta ideal inoculada que pueda desarrollar esta simbiosis y producir cuerpos frutales comestibles posterior a las labores de plantación.

Para inocular plantas con hongos ectomicorrícicos específicos, se deben desarrollar protocolos que posibiliten el contacto y exitosa unión hongo-planta, que dé lugar a las formaciones ectomicorrícicas. Para ello, uno de los aspectos importantes, es la elaboración de material inoculante y dentro de este, la cepa de hongo previamente seleccionada y masificada bajo parámetros ambientales y químicos fijadas en laboratorio, como son el pH y la disponibilidad de nutrientes.

Para seleccionar cepas en el campo de las micorrizas, se requiere disponer de un banco de cultivos puros con cepas nacionales que forman estas asociaciones y desde donde poder abastecerse y seleccionar material de acuerdo a características específicas de uso. Es así, que el Instituto Forestal ha establecido uno de tales bancos, con el propósito de generar una masa crítica de cultivos para elaborar productos que permitan generar diversos formatos de material inoculante fúngico, para utilizarlos en la producción de

plantas, e incorporar alternativa como la de mejorar la rentabilidad de plantaciones forestales a través de una producción de hongos ectomicorrícicos comestibles de alto valor económico y social. Para elaborar inoculantes fúngicos de hongos micorrícicos a gran escala, es necesario definir la composición óptima del medio de cultivo, tomando en cuenta las diferentes cepas y una gran variación de condiciones del suelo (Islam & Ohga, 2013).

Atendiendo a lo expuesto, el presente trabajo busca investigar el desempeño de la especie *Butyriboletus loyo*, utilizando 2 cepas bajo diferentes condiciones controladas de cultivo en condiciones *in vitro*, evaluando el efecto de 3 medios de cultivo (PDA, MMN y BAF) y 5 niveles de pH (4,5; 5,0; 5,5; 6,0 y 6,5) sobre el crecimiento radial, velocidad media de crecimiento y biomasa seca producida por cada una de las cepas.

MATERIAL Y MÉTODO

Para la realización de este estudio se utilizaron 2 cepas de *Butyriboletus loyo* procedentes del banco de cepas del Instituto Forestal de Chile (INFOR) y cuyo material fue colectado en bosques con predominio de *Nothofagus obliqua*, en 2 localidades de la región de Los Ríos (**Cuadro 1**).

Los cultivos puros fueron obtenidos de acuerdo a la técnica descrita por Molina & Palmer (1982), a partir del sombrero de un esporocarpo joven, cultivado sobre medio MMN, bajo oscuridad y a una temperatura de 23°C.

Cuadro 1. Cepas de *Butyriboletus loyo* colectadas en bosques de *Nothofagus obliqua*.

Cepa	Lugar de recolección	Tipo de Suelo	Altitud (msnm)	Exposición
IF1402002	Región de los Ríos Camino a la Unión. Sector Los Ulmos. UTM: 18G 0662659, 5559799	Limo arcilloso	299	Plana
IF1418001	Región de los Ríos Cerro Nancul Panguipulli UTM: 18H 0722158, 5596926	Trumao	586	Nor-este

En una etapa posterior, el material original aislado de cada cepa fue masificado en discos de Petri con medio BAF, a pH 5,5 e incubados a una temperatura de 23°C en oscuridad. Para ello, se extrajo del material original discos de 5 mm, los que fueron puestos en el centro de placas de Petri con 20 ml del medio de cultivo por 60 días, período en el cual se generó suficiente tejido micelial para ser utilizados en la instalación de este estudio.

Durante el estudio se evaluó el comportamiento de cada cepa en términos de su crecimiento radial (CR) en milímetros; velocidad media de crecimiento (VMC) en mm/día; y producción de biomasa seca (B) en mg, en tres medios de cultivo (PDA, MMN y BAF) con 5 niveles de pH (4,5; 5,0; 5,5; 6,0 y 6,5). La evaluación se efectuó en un ensayo con diseño completamente aleatorizado donde se probó 15 tratamientos de estructura factorial, correspondientes a las combinaciones de los 5 niveles de pH por los 3 medios de cultivo analizados. Cada tratamiento se repitió 5 veces y los resultados se evaluaron mediante análisis de varianza a nivel de cepa y de especie.

Para la instalación del ensayo, los medios de cultivos usados fueron: Extracto de papa dextrosa agar (PDA) (Difco, Bencton Dickinson and Company, USA); Melin-Norkrans modificado (MMN) (Marx, 1969); y Biotina Aneurina Ácido Fólico (BAF) (Moser, 1960) (**Cuadro 2**). 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, estos fueron llevados a una cámara de flujo laminar

marca Filtromet modelo H24302, de fabricación nacional, donde se vació con jeringa 20 ml de medio en los discos de Petri de 90 x 15 mm usados en el ensayo. Los discos con el medio de cultivo se enfriaron 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 5 mm desde los discos conteniendo el material miceliar madre. Cada segmento fue colocado en el centro de cada disco de Petri para cada uno de los tratamientos, procediendo luego a sellarlos con cintas de parafilm y posteriormente marcarlos 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 sus segmentos miceliar respectivos, estos se ubicaron en una cámara de crecimiento marca Forma Scientific modelo 3744, en oscuridad y a 23°C de temperatura.

Cuadro 2. Formulación de medios BAF, MMN y PDA utilizados para el montaje del ensayo.

Nutrientes	Composición de Medios de Cultivo		
	MMN	BAF	PDA
Carbohidratos	Extracto de levadura	0,2 g	
	Extracto de papa		4 g
	Extracto de Malta	2 g	
	Peptona		2 g
	D - Glucosa	10 g	30 g
Nutrientes minerales	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,25 g	
	FeCl ₃ • 6 H ₂ O		10 mg
	ZnSO ₄ • 7H ₂ O		1 mg
	MnSO ₄ • 4 H ₂ O		5 mg
	KH ₂ PO ₄	0,5 g	0,5 g
	MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,15 g	0,5 g
	CaCl ₂	0,05 g	100 mg
	FeCl ₃	1,2 ml (sol. 1%)	
	NaCl	0,025 g	
	Vitaminas	Tiamina HCl	0,01 mg
Biotina			0,001 mg
Ácido Fólico			0,1 mg
Inositol			50 mg
Agua Destilada		1.000 ml	
pH		4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5	
Agar		15 g	

Para medir el crecimiento radial (CR) se usó un pie de metro digital marca Ubermann. Cada medición 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 15 días por un lapso de 60 días. En cada medición de crecimiento radial se descontó el radio correspondiente al segmento de agar inicial utilizado para realizar la inoculación.

Para obtener los valores de biomasa seca (B) al final del período de evaluación, se procedió a extraer 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. \(2003\)](#), consistente en extraerlo por calentamiento en baño maría, el posterior enjuague de la colonia con agua caliente, y finalmente el secado de la colonia en estufa a 60 °C, 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 2**).



Figura 2. Confección de medios de cultivo (a); Ajuste de pH del medio de cultivo (b); Esterilización del medio (c); Esterilización del ambiente y discos de Petri dentro de Cámara de Flujo Laminar (d); Vaciado de medios a discos de Petri (e); Enfriado de medio de cultivo (f); utilización de sacabocado para obtención de inóculo estandar (g); instalación de inóculos en discos de Petri para cada medio y nivel de pH (h); ubicación de placas de Petri con ensayo en sala de crecimiento (i); medición del crecimiento en base al diámetro en dos ejes (j); separación de agar del micelio para determinar peso seco (k); pesaje de micelio en seco (l).

Para determinar la velocidad media de crecimiento (VMC) de las cepas, los datos obtenidos de mediciones de crecimiento radial cada 15 días por 60 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 análisis de los datos se realizó mediante análisis de varianza (ANDEVA), utilizando 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 $P \leq 0,05$.

RESULTADOS

A Nivel de Cepa

Los resultados de los análisis de varianza de la cepa IF1402002 indican efectos muy significativos ($\alpha=0,01$) de ambos factores (medio y pH), así como de su interacción, sobre las tres variables estudiadas (CR, VMC y B). En tanto que para la cepa IF1418001, sólo se observó respuestas estadísticamente significativas del factor medio de cultivo para las tres variables estudiadas (**Cuadro 3**).

Cuadro 3. Significancia estadística del efecto de los factores medio de cultivo y pH sobre las variables respuesta crecimiento radial, velocidad media de crecimiento y producción de biomasa seca para dos cepas de *Butyriboletus loyo*. (Efectos significativos $p \leq 0,05$).

Cepa	Factor	Variables respuesta		
		Crecimiento radial	Velocidad media de crecimiento	Biomasa Seca
IF1402002	Medio	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**
	pH	<0,0001**	<0,0001**	0,0001**
	Medio x pH	0,0005**	0,0028**	<0,0001**
IF1418001	Medio	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**
	pH	0,7557	0,8942	0,3024
	Medio x pH	0,2516	0,0692	0,5196

- *Crecimiento radial (CR)*

Se observa interacción significativa entre los factores para la cepa IF1402002, logrando el mayor crecimiento radial en los medios BAF y MMN con pH entre 4,5 a 5,5, sin diferenciarse estadísticamente entre ellos. En términos absolutos, la cepa logra su valor mayor en medio BAF con pH 5 ($26,02 \pm 1,23$ mm). Respecto a las interacciones, los valores promedios más bajos corresponden a los tratamientos que involucran al medio PDA. En la cepa IF1418001 solamente hubo efecto significativo del factor medio de cultivo, siendo BAF donde se logra el mayor crecimiento radial ($21,48 \pm 1,41$ mm) (**Cuadro 4**).

- *Velocidad Media de Crecimiento (VMC)*

La VMC presentó un comportamiento similar al de la variable anterior. La cepa IF1402002 logró su máxima velocidad de crecimiento ($0,39 \pm 0,02$ mm/día) en medio BAF con pH 5, monto que no difiere significativamente del obtenido en medio MMN con todos sus niveles de pH y en medio BAF con pH 4,5 y 5,5. El crecimiento estadísticamente más lento ocurrió en el medio PDA. La cepa IF1418001 presentó una conducta similar a la obtenida para la variable CR, con diferencias significativas solamente a nivel de medios de cultivo, con BAF como el medio con crecimiento más rápido (con $0,34 \pm 0,02$ mm/día) (**Cuadro 5**).

Cuadro 4. Efecto del medio de cultivo y pH sobre el crecimiento radial (mm) en dos cepas de *Butyriboletus loyo*.

Cepa IF1402002					Cepa IF1418001			
pH	Medio de Cultivo			Efecto	Medio de Cultivo			Efecto
	PDA	MMN	BAF	pH	PDA	MMN	BAF	pH
4,5	9,16 (0,42)	20,52 (2,60)	22,35 (4,85)	17,34^{bc} (6,72)	18,17 (1,42)	15,26 (0,95)	21,88 (1,88)	18,46^a (3,15)
5,0	7,97 (0,80)	23,17 (1,29)	26,02 (1,23)	19,05^c (8,27)	17,31 (3,50)	14,94 (0,71)	21,95 (1,27)	17,77^a (3,35)
5,5	8,46 (0,98)	20,66 (3,48)	24,14 (2,45)	17,75^{bc} (7,34)	14,70 (4,57)	16,69 (1,00)	21,35 (1,49)	17,58^a (3,90)
6,0	7,91 (0,60)	19,82 (3,82)	17,86 (4,35)	15,19^{ab} (6,23)	15,91 (6,81)	17,83 (0,73)	21,16 (1,64)	18,54^a (4,53)
6,5	6,63 (0,28)	18,53 (2,92)	13,98 (1,28)	13,05^a (5,36)	16,01 (3,53)	18,61 (0,71)	21,13 (1,06)	18,60^a (2,97)
Efecto Medio	8,02^a (1,04)	20,54^b (3,11)	20,87^b (5,34)	16,48 (7,00)	16,42^a (4,14)	16,66^a (1,64)	21,48^b (1,41)	18,19 (3,55)

Promedio
(Desviación estándar)

Cuadro 5. Efecto del medio de cultivo y pH sobre la velocidad media de crecimiento (mm/día) en dos cepas de *Butyriboletus loyo*.

Cepa IF1402002					Cepa IF1418001			
pH	Medio de Cultivo			Efecto	Medio de Cultivo			Efecto
	PDA	MMN	BAF	pH	PDA	MMN	BAF	pH
4,5	0,16 (0,01)	0,35 (0,05)	0,34 (0,08)	0,28^{bc} (0,10)	0,28 (0,03)	0,26 (0,02)	0,35 (0,03)	0,30^a (0,05)
5,0	0,14 (0,01)	0,38 (0,02)	0,39 (0,02)	0,30^c (0,12)	0,27 (0,04)	0,25 (0,01)	0,35 (0,02)	0,29^a (0,05)
5,5	0,15 (0,01)	0,35 (0,06)	0,37 (0,02)	0,29^{bc} (0,11)	0,23 (0,06)	0,29 (0,02)	0,34 (0,02)	0,29^a (0,06)
6,0	0,14 (0,01)	0,33 (0,07)	0,27 (0,05)	0,25^{ab} (0,09)	0,25 (0,09)	0,30 (0,01)	0,34 (0,02)	0,30^a (0,06)
6,5	0,13 (0,01)	0,31 (0,06)	0,23 (0,02)	0,22^a (0,09)	0,25 (0,05)	0,31 (0,01)	0,34 (0,02)	0,30^a (0,05)
Efecto Medio	0,14^a (0,01)	0,34^b (0,05)	0,32^b (0,08)	0,28 (0,14)	0,26^a (0,05)	0,28^b (0,03)	0,34^c (0,02)	0,18 (0,09)

Promedio
(Desviación estándar)

- *Biomasa seca(B)*

En la cepa 1402002 la mayor producción de biomasa seca se logró en el medio BAF. con pH 5 ($119,42 \pm 23,35$ mg), seguido de lo logrado en el mismo medio con valores de pH de 5,5 y 4,5, no presentando diferencias estadísticamente significativas entre ellos, y en contraposición a lo que se observó con las demás interacciones. En relación a la cepa IF1418001, el análisis estadístico arroja nula influencia de la variable nivel de pH, no existiendo interacciones entre los factores analizados. Sólo se presenta para esta cepa la influencia del factor medio de cultivo, observando al medio BAF con una producción de biomasa seca mayor, logrando un valor promedio de $157,98 \pm 21,68$ con un valor máximo de $165,64 \pm 18,37$ mg con pH de 5,0. Este medio presenta, además, diferencias significativas con los medios de cultivo PDA y MMN, siendo este último el que obtuvo los montos promedios de biomasa más bajos (**Cuadro 6**).

Cuadro 6. Efecto del medio de cultivo y pH sobre la producción de biomasa seca (mg) en dos cepas de *Butyriboletus loyo*.

Cepa IF1402002					Cepa IF1418001			
pH	Medio de Cultivo			Efecto	Medio de Cultivo			Efecto
	PDA	MMN	BAF	pH	PDA	MMN	BAF	pH
4,5	46,32 (8,71)	48,38 (5,3)	102,56 (27,55)	65,75^b (31,19)	147,84 (8,42)	64,38 (6,18)	164,68 (29,39)	125,63^a (48,34)
5,0	41,86 (7,34)	45,08 (4,16)	119,42 (23,35)	68,79^b (39,39)	143,66 (39,49)	70,02 (1,51)	165,64 (18,37)	126,44^a (48,31)
5,5	48,34 (6,24)	46,98 (6,66)	112,58 (22,96)	69,30^b (34,42)	115,86 (43,74)	69,16 (3,12)	157,06 (11,97)	114,03^a (44,41)
6,0	47,86 (8,52)	53,90 (11,14)	68,98 (22,07)	56,91^{ab} (16,73)	113,64 (57,31)	71,78 (2,19)	152,44 (27,64)	112,62^a (48,17)
6,5	41,70 (7,54)	48,24 (10,16)	48,38 (15,95)	46,11^a (11,35)	104,74 (35,95)	75,14 (4,47)	150,10 (21,67)	109,99^a (39,08)
Efecto Medio	45,22^a (7,64)	48,52^a (7,87)	90,38^b (34,66)	61,37 (29,27)	125,15^b (40,8)	70,10^a (5,04)	157,98^c (21,68)	117,74 (45,09)

Promedio
(Desviación estándar)

- **Correlación entre variables**

La dependencia lineal entre las variables, expresada en el coeficiente de correlación de Pearson, indica que en la cepa IF1402002 se verifica una altísima correlación (0,99) entre CR y VMC y una alta correlación entre CR y B (0,60), al igual que entre VMC y B (0,52). Por otro lado, para la cepa IF1418001, se obtuvo un índice entre CR y B de 0,79 y de 0,68 para las variables VMC y B, los que muestran una alta correlación, en tanto que para las variables CR y VMC fue de 0,97, valor que define de igual forma una fuerte correlación entre estas variables (**Cuadro 7**).

Cuadro 7. Matriz de correlación (Pearson) entre variables de crecimiento para dos cepas de *Butyriboletus loyo* (bajo la diagonal cepa IF1402002; sobre la diagonal cepa IF1418001)

	CR	VMC	B
CR	1,00	0,97	0,79
VMC	0,99	1,00	0,68
B	0,60	0,52	1,00

(CR= Crecimiento radial; VMC= Velocidad media de crecimiento; B= Biomasa).

A Nivel de Especie

Los ANDEVA de los datos obtenidos a nivel de especie arrojan diferencias muy significativas para $\alpha=0,01$ sólo a nivel del factor medio de cultivo con efectos sobre las variables CD, VMC y B (**Cuadro 8**). En tanto que los análisis no muestran diferencias significativas entre los diferentes niveles de pH, ni en la interacción medio x pH para las tres variables analizadas.

- **Crecimiento radial (CR)**

Se observó un efecto estadísticamente significativo del medio de cultivo, no así del pH, ni de la interacción entre estos dos factores. El mayor crecimiento del hongo se produjo en el medio de cultivo BAF. ($21,18 \pm 3,88$ mm) (**Cuadro 9**).

Cuadro 8. Significancia estadística del análisis de varianza (ANDEVA) para los valores medios obtenidos de las variables crecimiento radial, velocidad media de crecimiento y biomasa a nivel de la especie *Butyriboletus loyo*.
* Efectos significativos ($P \leq 0,05$)

Factor	Variables respuesta		
	Crecimiento radial	Velocidad media de crecimiento	Biomasa Seca
Medio	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**
pH	0,1267	0,1332	0,2843
Medio x pH	0,3215	0,2281	0,6264

Cuadro 9. Efecto del medio de cultivo y pH sobre el crecimiento radial (mm) en *Butyriboletus loyo*.

pH	Medio de cultivo			Efecto pH
	PDA	MMN	BAF	
4,5	13,66 (4,85)	17,89 (3,33)	22,15 (3,47)	17,90^a (5,19)
5,0	12,64 (5,47)	19,06 (4,45)	23,54 (2,95)	18,41^a (6,23)
5,5	11,58 (4,53)	18,67 (3,19)	22,75 (2,41)	17,67^a (5,77)
6,0	11,91 (6,21)	18,82 (2,80)	19,87 (3,69)	16,87^a (5,62)
6,5	11,32 (5,48)	18,57 (2,00)	17,58 (3,95)	15,82^a (5,11)
Efecto Medio	12,22^a (5,19)	18,60^b (3,14)	21,18^c (3,88)	17,33 (5,6)

Promedio
(Desviación estándar)

- *Velocidad Media de Crecimiento (VMC)*

Hubo diferencias significativas solo entre medios de cultivo, en tanto el efecto del pH y de la interacción medio x pH no fue significativo. Se obtuvo mayor velocidad de crecimiento en los medio BAF ($0,33 \pm 0,06$ mm/día) y MMN ($0,31 \pm 0,05$ mm/día), en tanto en el medio PDA se obtuvo el crecimiento significativamente más lento (**Cuadro 10**).

- *Biomasa (B)*

A nivel de medios de cultivo, la mayor producción de biomasa seca se verificó en el medio BAF ($124,18 \pm 44,54$ mg). En términos absolutos el valor máximo se presentó en ese mismo medio con pH 5,0 ($142,53 \pm 44,54$ mg), pero que no fue estadísticamente diferente respecto a los montos de biomasa seca obtenidos en los otros valores de pH dentro del mismo medio (**Cuadro 11**).

- *Correlación entre variables*

En relación al coeficiente correlación de Pearson, se obtuvieron para las variables CR y B un índice de 0,56, mientras que para las variables VMC y B fue de 0,49, indicando una correlación alta. En tanto que, para las variables CR y VMC, se obtuvo un índice de 0,98, indicando una fuerte correlación (**Cuadro 12**).

Cuadro 10. Efecto del medio de cultivo y pH sobre la velocidad media de crecimiento (mm/día) en *Butyriboletus loyo*.

pH	Medio de cultivo			Efecto pH
	PDA	MMN	BAF	
4,5	0,22 (0,07)	0,30 (0,06)	0,35 (0,05)	0,29^a (0,08)
5,0	0,20 (0,08)	0,32 (0,07)	0,37 (0,03)	0,30^a (0,09)
5,5	0,19 (0,06)	0,32 (0,05)	0,35 (0,02)	0,29^a (0,08)
6,0	0,20 (0,08)	0,31 (0,05)	0,31 (0,05)	0,27^a (0,08)
6,5	0,19 (0,07)	0,31 (0,04)	0,28 (0,06)	0,26^a (0,08)
Efecto Medio	0,20^a (0,07)	0,31^b (0,05)	0,33^b (0,06)	0,28 (0,08)

Promedio
(Desviación estándar)

Cuadro 11. Efecto del medio de cultivo y pH sobre la producción de biomasa seca (mg) en *Butyriboletus loyo*.

pH	Medio de cultivo			Efecto pH
	PDA	MMN	BAF	
4,5	97,08 (54,11)	56,38 (10,03)	133,62 (42,32)	95,69^a (50,25)
5,0	92,76 (59,96)	57,55 (13,47)	142,53 (31,40)	97,61^a (52,30)
5,5	82,10 (46,20)	58,07 (12,68)	134,82 (29,11)	91,66^a (45,15)
6,0	80,75 (51,90)	62,84 (12,09)	110,71 (49,91)	84,77^a (45,36)
6,5	73,22 (41,28)	61,69 (15,99)	99,24 (56,53)	78,05^a (43,07)
Efecto Medio	85,18^b (49,74)	59,31^a (12,71)	124,18^c (44,54)	89,46 (47,28)

Promedio
(Desviación estándar)

Cuadro 12. Matriz de correlación (Pearson) entre variables de crecimiento de *Butyriboletus loyo*.

	CR	VMC	B
CR	1,00	-	-
VMC	0,98	1,00	-
B	0,56	0,49	1,00

(CR= Crecimiento radial; VMC= Velocidad media de crecimiento; B= Biomasa).

DISCUSIÓN

El análisis de los resultados evidenció cierta variación en la estrategia con que cada cepa enfrentó los cambios de medio de cultivo y nivel de pH. En lo que respecta al desempeño de la cepa IF1402002, se obtuvo montos promedios para las variables CR, VMC y B que se vieron afectadas por los efectos provocados por las interacciones entre los factores medio de cultivo y nivel de pH. Un comportamiento distinto se observó para la cepa IF1418001, donde el tipo de medio de cultivo fue el único factor que produjo efectos significativos sobre esta cepa para todas las variables analizadas. A nivel de especie, se repite el comportamiento observado para la cepa IF1418001. Este comportamiento ha sido observado antes, reportándose en múltiples ocasiones diferencias entre aislados de una misma especie. Es así como estudios para evaluar el efecto de factores ambientales sobre el desarrollo de distintas cepas de una misma especie micorrízica, generan resultados muy variables, debido principalmente a los diferentes requerimientos ambientales dados por la variabilidad genética que presentan dichos microorganismos y por las condiciones del sitio donde se han desarrollado (Chung, 2021). Al respecto, Díaz *et al.*, (2009) observaron similitudes y diferencias de crecimiento entre cepas de *Boletus edulis* y de otras varias especies del género *Boletus*, mencionando que estas variaciones de comportamiento pueden tener su origen en la variabilidad genética de las mismas. Este aspecto es señalado también por Dahlberg y Stenlid (1995), quienes afirman que las variaciones pueden ocurrir entre poblaciones de hongos de una misma especie, incluso de una misma localidad.

Respecto al comportamiento de las cepas de *B. loyo* frente a los cambios de pH y medio de cultivo, Murrieta *et al.* (2014) mencionan que, en la propagación micelial, el crecimiento de las cepas de hongos ectomicorrízicos se ve afectado por las condiciones de cultivo, principalmente por el pH, temperatura y composición de los medios, situación que se confirma en los resultados del presente estudio. Sobre lo mismo, Islam y Ohga (2013) indican que para llegar a elaborar inoculantes fúngicos a gran escala, uno de los aspectos a definir es precisamente la composición óptima del medio de cultivo para cada hongo, considerando las diferentes cepas y la variación de condiciones ambientales. Complementariamente, Pereira *et al.* (2007) concluyeron que el mejor comportamiento que presentan los hongos cultivados *in vitro* se produce en medios de cultivo cuyo pH es similar a aquel registrado en los suelos en donde éstos se encontraban creciendo en forma natural, por lo que las condiciones de pH del sector de colecta del material fúngico deben ser considerada para optimizar el cultivo y propagación de los hongos en laboratorio.

El crecimiento radial de las cepas fue mayor en los medios de cultivo MMN y BAF, particularmente con pH entre 4,5 y 5,5, y fue menor en medio PDA. Análogamente, los estudios de Garza *et al.* (2018) con varias cepas de *Boletus luridellus*, también evidencian diferencias de crecimiento radial entre los medios MMN y PDA, siendo mayor en el medio más complejo (MMN). De igual forma, Díaz *et al.* (2009) indican que ensayos con distintas especies del género *Boletus* presentaron un crecimiento variable de las cepas de cada especie dentro de un mismo medio, comportamiento que coincide parcialmente con lo señalado en este trabajo.

El crecimiento radial en el medio PDA se caracterizó por escaso desarrollo de micelio aéreo, formando diámetros pequeños y con micelio muy denso. Esta estrategia de crecimiento fue observada por Sánchez *et al.* (2001), quienes mencionan que esta forma de crecimiento ocurre por estrés, lo que suele formar colonias con pequeños diámetros e hifas muy densas. Estos autores, citando a Boxman *et al.* (1986), afirman 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 un 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 tanto que, 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. Por último, Olaizola *et al.* (2023) señalan que cepas que en su desarrollo producen gran cantidad de micelio aéreo laxo, no son buenos indicadores para medir el desempeño de una especie o cepa en base a área de crecimiento, siendo el uso de la biomasa un indicador de respuesta más indicado para estimar el crecimiento.

Las cepas de *Butyriboletus loyo* crecieron a distinta velocidad (VMC) en los diferentes medios de cultivo utilizados. Para la cepa IF1402002 el crecimiento más rápido se evidenció en el medio BAF con pH entre 4,5 y 5,5 y en MMN para todo el rango de pH; en la cepa IF1418001 la mayor velocidad de crecimiento se obtuvo en el medio BAF, coincidentemente con el análisis a nivel de especie. Al respecto, para especies del género *Boletus* Díaz *et al.* (2009) observaron una velocidad de crecimiento más alta en un medio más complejo como es el MMN, observando un bajo crecimiento en medio PDA.

La producción de biomasa seca de ambas cepas fue mayor en el medio BAF. Los resultados de la cepa IF1402002, fueron influenciados por el efecto de la interacción medio de cultivo x pH, logrando la mayor biomasa seca en medio BAF con pH ente 4,5 y 5,5. Este comportamiento es mencionado por Willenborg *et al.* (1990), quienes afirman que los hongos ectomicorrícicos tienen una naturaleza acidófila cuando crecen en condiciones de cultivos puros. Efectivamente, durante el desarrollo del micelio *in vitro* de hongos ectomicorrícicos se producen una serie de ácidos orgánicos y la absorción de iones, lo que provocaría la acidificación del medio (Hung & Trappe, 1983; García-Rodríguez *et al.*, 2006). Por su parte, la cepa IF1418001, a diferencia de la cepa anterior, no evidenció diferencias en su biomasa ante los distintos niveles de pH, observándose solamente un efecto significativo del medio de cultivo. Existen variadas opiniones en relación al comportamiento de las cepas, así, en especies acidófilas no hubo relación entre los niveles de pH y la producción de biomasa (Sánchez *et al.*, 2001), sin embargo, Hung & Trappe (1983) señalan que los rangos de pH que generan un buen crecimiento varían drásticamente entre especies y entre cepas dentro de las especies.

Para optimizar la relación planta-hongo-sitio se debe considerar tanto el efecto individual como la interacción de los factores medio de cultivo y pH, situación que permitirá optimizar el crecimiento de las especies fúngicas en laboratorio y mejorar la micorrización de las plantas en vivero. Adicionalmente, se deberá elegir el sitio más adecuado para que el hongo y la planta micorrizada expresen su máximo potencial.

Es necesario aumentar el conocimiento sobre las especies micorrícicas que crecen en los bosques nativos chilenos, y de esta forma poder seleccionar aquellas especies y cepas que sean idóneas para trabajos de micorrización en vivero y así potenciar su posterior crecimiento en campo. A su vez, en laboratorio se requiere estudiar las metodologías y condiciones de cultivo (pH, temperatura y composición de los medios) más adecuadas para cada cepa y especie de interés, y así obtener en periodos cortos de tiempo producciones masivas de inóculos que puedan ser utilizadas a escala operacional en las actividades de micorrización en viveros forestales. Se debe destacar que la especie en estudio, *Butyriboletus loyo*, es uno de los componentes fúngicos de los bosques de *Nothofagus* en Chile, encontrándose actualmente en peligro, con una presencia variable dependiendo de las condiciones edafoclimáticas de los sitios y del estado de degradación de estas masas forestales. Esta especie se considerada de gran valor culinario y con una gran importancia económica, ecológica, cultural y social, condición que les confiere ser consideradas como especie de importancia para su conservación y en trabajos de micorrización controlada.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos con dos cepas de *Butyriboletus loyo*, sugieren que el medio de cultivo BAF es el más apto para los trabajos de multiplicación miceliar, particularmente en un rango de pH entre 4,5 y 5,5. No obstante, varias investigaciones con especies afines reportan buen crecimiento en el medio MMN (Águeda *et al.*, 2008; Díaz *et al.*, 2009; Garza *et al.*, 2018; Olaizola *et al.*, 2023). En el presente estudio el medio MMN generó un buen desempeño de las cepas de *B. loyo*, en cuanto a crecimiento radial y velocidad media de crecimiento, pero no fue una buena alternativa para la generación de biomasa.

El medio de cultivo más adecuado para un hongo ectomicorrícico es el que le suministra los mismos nutrientes que le brindaría su hospedante durante la simbiosis. Esto marcaría el éxito o fracaso en el cultivo de estas especies bajo condiciones controladas (Molina & Palmer, 1982).

La cepa IF1418001, procedente de la zona precordillerana de Panguipulli en la región de Los Ríos, fue la que presentó la mayor producción de biomasa seca, siendo una cepa candidata para utilizarla en

programas de micorrización. La cepa IF1402002, de la misma región, pero de una procedencia geográficamente distante (Los Ulmos, cerca de Valdivia), tuvo un comportamiento que contrasta con el de la primera.

Si bien las cepas presentaron rendimientos distintos bajo ciertas condiciones de cultivo, su selección final para ser utilizadas en actividades de micorrización de plantas dependerá de su desempeño en vivero y su comportamiento en campo. El efecto de factores como el pH sobre el crecimiento *in vitro* de los hongos, debe interpretarse con precaución, ya que el desempeño de estos puede verse afectado por una serie de otros factores, entre ellos la duración del experimento, las fuentes de nitrógeno, la inclusión de sales de hierro antes o después del autoclavado del medio, y varios otros (Hung & Trappe, 1983). Estos mismos autores señalan que en igualdad de condiciones, un aislado que crezca razonablemente bien en un amplio rango de valores de pH sería más apropiado para trabajos de masificación e inoculación en vivero, que otro que crezca bien solo en un rango restringido, como es el caso de la cepa IF1418001. Experimentos con distintas especies de hongos micorrícicos indican que una variación de pH es determinante en el comportamiento de las especies de hongos micorrícicos *in vitro* (Pereira *et al.*, 2007), tal como fue observado para la cepa IF1402002.

Para mejorar el conocimiento sobre el comportamiento de los hongos, y sus diferentes cepas, se requerirá estudios que no solo identifiquen medios para cepas específicas, sino que además consideren sus requerimientos climáticos.

Es importante continuar con estudios que determinen condiciones óptimas de cultivo, relacionando parámetros como el pH, la temperatura y la composición del medio de crecimientos más adecuados para cada especie y cepa de interés. Como lo indican Lotti *et al.* (2012) los medios de cultivo son específicos para cada especie, muchos hongos ectomicorrícicos se pueden cultivar en medios de cultivo sintéticos y semisintéticos, pero sus tasas de crecimiento son extremadamente variables debido a los requerimientos propios de cada especie.

Dentro de un ambiente determinado los hongos micorrícicos se encuentran en constante interacción con diversos factores medio ambientales que pueden afectarlos. A nivel de cepa o ecotipo, estos poseen sus propias limitaciones frente a determinadas condiciones del medio (Sianard, *et al.*, 2010). El estudio de los factores que inciden en la nutrición y crecimiento de los hongos (pH, medios de cultivos, temperatura, etc.) es necesario para conocer el comportamiento de los mismos, el que diferirá al interactuar con dichos factores (Honrubia *et al.*, 1992; Vázquez- García *et al.*, 2002). Este conocimiento específico para cada hongo y/o cepa en particular, permitirá reunir información con miras a perfeccionar la producción de micelios de hongos ectomicorrícicos.

Finalmente, esta investigación entrega resultados en un área en que existe escasa información para *B. loyo*, la que servirá de insumo para futuros trabajos tendientes a optimizar su masificación miceliar y facilitar la producción de material inoculante para plantas de *Nothofagus*, aportándoles las bondades que le confiere la micorrización y posterior producción de hongos comestibles de valor.

REFERENCIAS

- Águeda, B., Parladé, J., Fernández, L., Cisneros, O., De Miguel, A., Modrego A., Martínez, F. & Pera, J. (2008). Mycorrhizal synthesis between *Boletus edulis* species complex and rockroses (*Cistus sp.*). *Mycorrhiza*, 18(8): 443-449. <https://doi.org/10.1007/s00572-008-0192-3>
- Arora, D. & Frank, F.L. (2014). Clarifying the butter Boletes, a new genus *Butyriboletus*, is established to accommodate *Boletus* sect. *Appendiculati*, and six new species are described. *Mycologia*, 106(3): 464-480. <https://doi.org/10.3852/13-052>
- 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 p.

- Boxman, A., Sinke, R. & Roelofs, J. (1986).** Effects of NH₄⁺ on the growth and K⁺(⁸⁶Rb) 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 32. 374 + x p.
- Brundrett, M. y Cairney, J. (2002).** Ectomycorrhizas 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
- 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>
- Dahlberg, A. & Stenlid, J. (1995).** Spatio-temporal patterns in ectomycorrhizal populations. *Canadian Journal of Botany*, N°73. Pp:1222-1230. <https://doi.org/10.1139/b95-382>
- Daza, A., Manjón, J., Aguilar, A., Bernedo, M., Camacho, M., Romero, L. & Santamaría, C. (2005).** Crecimiento *in vitro* y capacidad micorrízica de varios aislamientos de *Lactarius deliciosus*. IV Congreso Forestal Español. Tomo 4. Pp: 182-188. Zaragoza, España.
- Díaz, G., Flores, R. & Honrubia, M. (2009).** Descripción de cultivos miceliarios de Boletales neotropicales y europeos (*Boletus* grupo *edulis*, *Boletellus* y *Suillus*) y formación de primordios de *B. edulis* en cultivo puro. *Revista Mexicana de Micología*, N°30. Pp:1-7.
- Garza, F., García, J., Quiñones, M., Guevara, G., Valenzuela, R., Carrillo, A., Sánchez, L. et al. (2018).** *Boletus luridellus* (Murr.) Murril y *Quercus fusiformis* Small: cultivo, síntesis de micorrizas y producción de esporomas en invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 9(50): 361-378. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v9i50.238>.
- García-Rodríguez, J.L., Pérez-Moreno, J., Aldrete, A., Cetina-Alcalá, V. & Vaquera-Huerta, H. (2006).** Caracterización del hongo silvestre ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Cooke et Couch en cultivo y en simbiosis con eucalipto y pino. *Agrociencia*, N°40. Pp: 665-676.
- González, C. (2020).** Estimación de la distribución potencial actual de las especies de hongos silvestres comestibles (*Butyriboletus loyo*, *Ramaria* sp., *Cyttaria espinosae* y *Grifolia garga*) en la región de Los Ríos, con énfasis en la comuna de Panguipulli. Memoria de Título para optar al título de geógrafa. Universidad de Chile, Facultad de Arquitectura y Urbanismo, Escuela de Pregrado, Carrera de Geografía. 67 p.
- 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>
- Iotti, M., Piattoni, F. & Zambonelli, A. (2012).** Techniques for Host plant Inoculation with truffles and other edible ectomycorrhizal mushrooms. En: Zambonelli, A. & Bonito, G.M. (Eds). *Edible Ectomycorrhizal Mushrooms*, *Soil Biology*, N°34. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-33823-6_9
- Ipinza, R. & Serrano, M. (1982).** Micorrización artificial sobre pino insigne en la Estación Experimental Pantanillo - Las Brisas (VII Región). *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*. Vol. 2013, Article ID 317903, 12 pages. Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2013/317903>
- 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. En: Schenck, N.C. (Ed). *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. American Phytopathological Soc. St. Paul.
- Montenegro, I. (2016).** Caracterización del sistema de recolección de hongos silvestres comestibles de la organización de mujeres campesinas "Domo Peuma", Comuna de Paillaco, Región de Los Ríos. Memoria de título para optar al título profesional de Ingeniero en Recursos Naturales Renovables. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Escuela de Pregrado. Carrera de Ingeniería en Recursos Naturales Renovables. 151 p. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/151005>
- 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. & Vergara, C. (1980).** *Flora Fungosa Chilena*. Segunda Edición revisada y actualizada por Oehrens, E. Universidad de Chile, Facultad de Agronomía. Ciencias Agrícolas N° 5, Editorial Universitaria. Santiago, Chile, 308 p.
- Murrieta-Hernández, D.M., Noa-Carrazana, J.C., Mata-Rosas, M., Pineda-López, M., Zulueta-Rodríguez, R. & Flores-Estévez, N. (2014).** Efecto del medio de cultivo en el desarrollo de *Suillus granulatus* (L.) Roussel y *S. brevipes* (Pk.) Kuntze. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 20(1): 101-107. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2013.06.021>
- Olaizola, J., Santamaría, O. & Diez, J. (2023).** *In Vitro* growth of nine edible ectomycorrhizal fungi under a range of pH conditions. *Bioagro*, 35(2): 159-166. <https://doi.org/10.51372/bioagro352.8>
- Ortega, (2012).** Análisis de factores influyentes en la gestión del recurso micológico. Tesis Doctoral. Universidad de Valladolid, Escuela Universitaria de Ingeniería Agraria de Soria, Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales. 108 p.
- Palfner, G., Casanova, A., Salazar, V., Riquelme, A. & Santelices, R. (2022).** Hongos no liquenizados: Diversidad, funciones, conservación y usos. En: San Martín, J. (Ed). *Los bosques relictos del ruil: Ecología, biodiversidad, conservación y restauración*. ISBN N°78-956-410-577-2.
- 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. *INFOR*. <https://doi.org/10.52904/20.500.12220/31353>
- 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*, N°28. Pp:215-219. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002007000300005>
- Riquelme, C., Dibán, M. & Salazar, V. (2019).** Revisión del género *Boletus* L. (*Boletales*, *Bacidiomycota*) en Chile. *Boletín Micológico*, 34(1): 28-42. <https://doi.org/10.22370/bolmicol.2019.34.1.1754>
- Sánchez, F., Honrubia, M. & Torres, P. (2001).** Effects of pH, water stress and temperature on *in vitro* culture of ectomycorrhizal fungi from Mediterranean forests. *Cryptogamie Mycologie*, N°22. Pp: 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. En: Marks, G.C. & Kozlowski, T.T. *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 Phytopathol.*, 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.
- 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>
- 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.
- Wang, Y., Tuo, Y-L., Wu, D-M., Gao, N., Zhang, Z-H, Rao, G., Wang, X-M. et al. (2022).** Exploring the relationships between four new species of Boletoid fungi from Northern China and their related species. *Journal Fungi*, 8, 218. <https://doi.org/10.3390/jof8030218>
- 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>