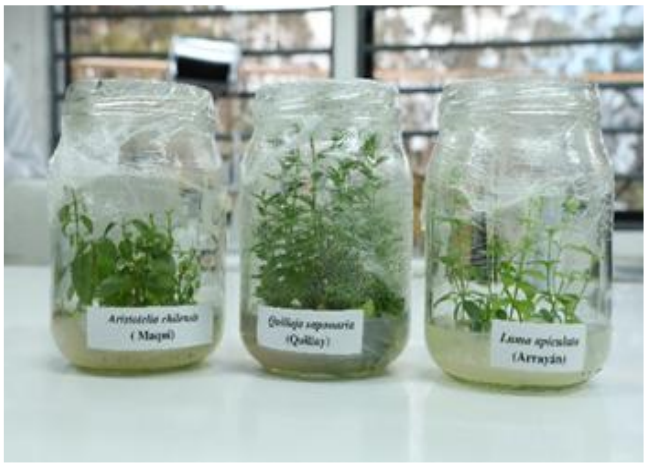
Documento de Divulgación N° 76



BANCOS DE GERMOPLASMA DE PLANTAS Y HONGOS
INSTITUTO FORESTAL

Boletín Anual 2025

Ministerio de Agricultura
Gobierno de Chile

INSTITUTO FORESTAL
2025

INFOR

Las fotografías e imágenes incorporadas en tapas o textos de la presente publicación provienen de archivos institucionales o fueron obtenidas o elaboradas durante el desarrollo de las actividades del trabajo que originan esta publicación.

Documento de Divulgación N° 76

BANCOS DE GERMOPLASMA DE PLANTAS Y HONGOS INSTITUTO FORESTAL

Boletín Anual 2025

Laura Koch Zuñiga y Patricio Chung Guin-Po[1]

[1] Investigadores Instituto Forestal lkoch@infor.cl pchung@infor.cl

INSTITUTO FORESTAL
Sucre 2397, Ñuñoa
Santiago,CHILE
F. 223667115
www.infor.cl

ISBN N° 978 956 318 294 - 1
Registro de Propiedad Intelectual N° 2025 A 5387

Se autoriza la reproducción parcial de esta publicación siempre y cuando se efectúe la cita correspondiente:

Koch Zúñiga, Laura y Chung Guin-Po, Patricio (2025). Bancos de Germoplasma de Plantas y Hongos Instituto Forestal. INFOR. Boletin Anual 2025. Instituto Forestal, Chile. Documento de Divulgación N° 76. 38 p. https://doi.org/10.52904/20.500.12220/32837

INDICE

INTRODUCCIÓN **7**

CAPITULO 1. BANCO GERMOPLASMA VEGETAL IN VITRO…… 9

ANTECEDENTES…….… 9

INFRAESTRUCTURA…….…… 9

COLECCIONES CONSERVADAS…….…….. 11

PROCEDIMIENTOS DE CONSERVACIÓN…….……..……. 15

DIFUSIÓN Y TRANSFERENCIA DEL CONOCIMIENTO……. 16

CONSIDERACIONES FINALES…… 18

CONTACTO…….……. 18

SERVICIOS……..... 18

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN EJECUCIÓN……... 19

REFERENCIAS……. 19

CAPITULO 2. BANCO MICOLÓGICO…….……21

ANTECEDENTES …….……..21

INFRAESTRUCTURA…….…… ...23

COLECCIONES CONSERVADAS…….……..24

PROCEDIMIENTOS DE CONSERVACIÓN…….……..……24

DIFUSIÓN Y TRANSFERENCIA DEL CONOCIMIENTO……31

CONSIDERACIONES FINALES……..33

CONTACTO…….……34

SERVICIOS…….....34

REFERENCIAS……...34

APÉNDICE. LISTADO DE ESPECIES Y CANTIDAD DE CEPAS POR REGIÓN PRESENTES EN EL BANCO DE HONGOS DEL INSTITUTO FORESTAL ……. ……37

INTRODUCCIÓN

El Instituto Forestal es el organismo de investigación forestal del Estado, tiene su origen en 1961 como un proyecto de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agriculrura (FAO) y el Gobierno de Chile. En 1965 es creado por el Gobierno de Chile como uno de los Instituto Tecnológicos de la Corporación de Fomento de la Producción (CORFO) y más recientemente es adscrito al Ministerio de Agricultura. Hoy está estructurado en cinco grandes Áreas de Investigación, con objetivos de largo plazo, enfocadas en la Información y Economía Forestal, el Inventario y Monitoreo de los Ecosistemas Forestales, la Silvicultura y Manejo de los Ecosistemas Forestales, la Diversificación Forestal y la Tecnología y Productos de la Madera. Cada una de estas Áreas organizadas en Líneas de Investigación en temas más específicos y con objetivos de corto y mediano plazo.

Una de las Líneas de Investigación del Área de Silvicutura y Manejo de los Ecosistemas Forestales es la de Conservación y Mejoramiento Genético,ámbito de trabajo que existe en INFOR desde los años 80 del siglo pasado, a partir de los resultados de proyectos anteriore, como los de Introducción de Especies Forestales de Rápido Crecimiento, de Manejo de Eucaliptos y otros, a partir de los cuales se dio inicio a programas de mejoramiento genético para 7 especies del género *Eucalyptus* que habían exhibído comportamiento de interés en las inciativas previas. Para tal efecto se introdujo desde Australia colecciones completas de semillas representativas del área de distribución natural de tales especies. Estos programas paralelamente requirieron mejorar tanto las ténicas de producción de plantas como las de establecimiento de plantaciones en terreno, de modo de asegurar su supervivencia y estimular un rápido crecimiento que permitiera realizar en el menor tiempo posible *rankings* genéticos e índices de selección del mejor material genético para características de interés productivo.

Con posterioridad, esta misma planificación y metodología se utilizó en varias especies nativas de interés maderero, como raulí, roble, coihue, lenga y laurel, entre otras, y de especies de uso tradicional en el mundo, como pino oregón, pino ponderosa y especies del género Acacia. En todos los casos se generó material genético valioso susceptible de clonación, que era necesario preservar con fines de investigaciones posteriores o para emprendimientos de terceros. En este marco nace en los años 90 el Laboratorio de Micropropagación de INFOR y su respectivo Banco de Germoplasma Vegetal *in vitro*.

Además, ante la necesidad de conocer la importancia de los microrganismos en la funcionalidad ecológica y productiva de los ecosistemas forestales, en el año 1999, se comienza a trabajar en el área de los hongos,mediante la captura y elaboración de inóculos biológicos de hongos ecto y endomicorrícicos para su aplicación en especies exóticas y nativas. Desde esa fecha hasta la actualidad, se ha generado una serie de proyectos que han tenido como línea base: (i) La investigación para el desarrrollo de Inóculos biológicos basados en hongos micorrícicos para mejorar la supervivencia y crecimiento de las plantas forestales nativas y exóticas; (ii) El estudio de hongos micorrícicos comestibles; y (iii) Investigaciones en el ámbito de los hongos saprófitos comestibles nativos y exóticos. Durante el transcurso de dichos proyectos se generó a partir del año 2003 el Laboratorio de Micología, con un alto nivel de equipamiento que ha permitido desarrollar diversas investigaciones y asesorias en proyectos relacionados en el área de los hongos. Paralelamente, se creó el Banco de Cepas Fúngicas, donde se guandan más de 60 especies y 550 cepas de macrohongos, para fines de investigación e iniciativas productivas.

En el presente boletín anual se presentan algunos antecedentes de los Bancos de Germoplasma (de plantas y hongos) que INFOR mantiene en su sede Biobío, detallándose aspectos de su infraestructura, servicios, material resguardado y los datos de contacto de los investigadores involucrados.

CAPITULO 1
BANCO DE GERMOPLASMA VEGETAL *IN VITRO*

ANTECEDENTES

Los métodos de conservación *ex situ* surgen a partir de las complicaciones y deficiencias que derivan de la aplicación de medidas de conservación de especies en sus hábitats naturales y del hecho de reconocer que tales medidas de conservación *in situ* no resultan suficientes para luchar contra la reducción de la diversidad biológica.

Los sistemas de conservación *ex situ*, entendidos como la mantención de los organismos o germoplasma de estos fuera de su hábitat natural, surgen como una medida complementaria a los mecanismos de conservación *in situ* y buscan el resguardo de los recursos genéticos fundamentalmente a través de operaciones de almacenamiento y propagación de colecciones de germoplasma representativos de la variabilidad que se desea preservar.

En el caso de las plantas, estas se conservan en colecciones de campo y jardines botánicos, mientras que el germoplasma se mantiene en bancos de semillas, de polen, bancos *in vitro,* bancos de genes o de ADN (Glowka *et al*., 1996; Seguel, 2001; Phartyal *et al*., 2002).

El objetivo del almacenamiento *ex situ* es garantizar la viabilidad y la información del material almacenado, permitiendo de esta forma que se disponga de un efectivo resguardo del germoplasma obtenido en las campañas de recolección de las muestras representativas de la variabilidad genética que se desea conservar. Estas colecciones, adecuadamente almacenadas y administradas, permitirán, además de conservar los recursos genéticos, mejorar el conocimiento de las características anatómicas, fisiológicas y bioquímicas del material almacenado, y proporcionar propágulos para su utilización en programas educativos, de investigación, de mejora genética y de restauración, entre otros (Cano, 2013).

La conservación *in vitro* constituye parte esencial de la estrategia general de conservación e intercambio de recursos genéticos en el mundo. Entre otras ventajas, ofrece la posibilidad de almacenar un gran número y variedad de muestras en un área reducida, además de garantizar la sanidad de las muestras e incrementar la posibilidad del intercambio de material vegetal.

Diversos autores mencionan que las técnicas basadas en biotecnología, como el cultivo *in vitro,* son métodos eficientes para la conservación de germoplasma (Dong & Dunstan, 1999; Benson *et al*., 2011). Estos métodos pueden considerarse como herramientas para la conservación *ex situ*, siendo utilizados preferentemente para la preservación del germoplasma que es cultivado en forma clonal.

Engelmann & Takagi (2000) señalan que la conservación de germoplasma *in vitro* permite: mantener duplicados seguros de los genotipos de interés, disponer de numerosos genotipos en un espacio reducido, producir vitroplantas en un período de tiempo relativamente corto y facilitar la manipulación del material vegetal, dado que su desarrollo fisiológico es homógeneo. Además, el método tiene la ventaja de preservar los tejidos en un estado juvenil, aspecto que es esencial para permitir la propagación vegetativa, a gran escala de los genotipos resguardados (Watt *et al*., 2000).

Considerando lo anterior, la conservación de la diversidad genética de especies arbóreas mediante técnicas *in vitro* ha sido ampliamente explorada y utilizada en programas de conservación *ex situ*, como método de resguardo de recursos genéticos forestales.

Para aplicar estas técnicas a la conservación de germoplasma vegetal es importante tener presente que su implementación también puede presentar inconvenientes, principalmente derivados de una posible pérdida de estabilidad genética del material en cuestión (Lynch 1999).

El Instituto Forestal (INFOR), con el fin de conservar germoplasma manteniendo su juvenilidad e integridad genética, ha implementado un banco activo de germoplasma vegetal *in vitro* en el Laboratorio de Micropropagación de la linea de Conservación y Mejoramiento Genético, que funciona en su sede Biobío. Se ha desarrollado así diversos programas de mejoramiento genético y conservación de especies exóticas y nativas, contando hoy con un gran número de árboles superiores de distintas especies forestales de valor comercial y ecológico. Estos árboles han sido seleccionados en base a sus características de crecimiento, rectitud y forma del fuste, y en algunos casos, también se han utilizado criterios de resistencia a estreses abióticos, como tolerancia al déficit hídrico y compuestos químicos. Dado que el diferencial de selección de estos ejemplares es muy elevado, su productividad potencial es sustancialmente mayor a la obtenida en plantaciones comerciales sin selección de material genético.

Algunos de los genotipos más valiosos de dichos programas de mejoramiento han sido rejuvenecidos mediante el uso de técnicas de organogénesis y hoy se cuenta con protocolos específicos de micropropagación para la producción de vitroplantas que, en una etapa posterior, pueden ser masificadas a escala operacional a través de técnicas de enraizamiento de estacas o macropropagación. En su actual modalidad de funcionamiento, el banco permite efectuar conservación *in vitro* de germoplasma forestal a corto y mediano plazo.

El objetivo del laboratorio de micropropagación es prestar servicios de propagación a los proyectos institucionales de investigación, desarrollando estudios de protocolos para la multiplicación *in vitro* de especies o genotipos específico de interés comercial, fruto forestal o ecológico, y paralelamente de la mantención del material vegetal a través de la conservación del banco de germoplasma *in vitro*.

INFRAESTRUCTURA

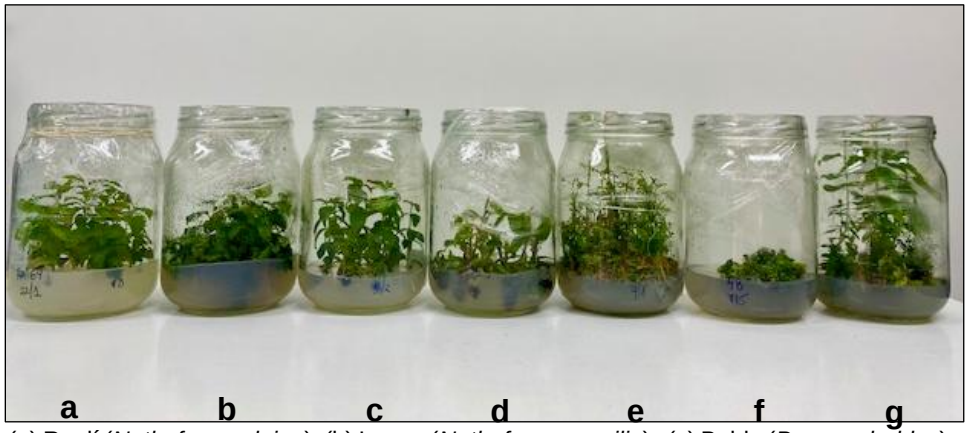
Las instalaciones del laboratorio y banco de conservación están especialmente diseñadas y equipadas para el adecuado desarrollo de las actividades asociadas a la propagación y mantenimiento *in vitro* de la colección del banco de germoplasma.

El equipamiento incluye autoclave, destilador de agua, hornos de secado, balanzas semi analíticas, pH-metros, agitadores, lupa estereoscópica, cámaras de flujo laminar, salas de crecimiento y conservación, más todo el complemento de insumos, reactivos y accesorios asociados a esta técnica (Figura 1.1).

Figura 1.1. Instalaciones del Laboratorio Micropropagación Banco Germoplasma *In Vitro*

COLECCIONES CONSERVADAS

Actualmente en el banco de conservación *in vitro* se mantiene germoplasma viable de 80 árboles selectos, pertenecientes a tres especies nativas (*Nothofagus alpina*, *Nothofagus pumilio y Peumus boldus*) y cuatro especies exóticas (*Castanea sativa*, *Eucalyptus camaldulensis, Eucalyptus globulus y Acacia melanoxylon*) (Figura 1.2). En todos los casos se trata de árboles de características superiores identificados en los programas de mejoramiento genético de INFOR, en función de atributos de propósito general, como crecimiento, rectitud, forma del fuste y sanidad, y en algunas especies también se han aplicado criterios de resistencia a estreses abióticos, como tolerancia al déficit hídrico y variables fenotípicas y químicas de interés comercial.



(a) Raulí (*Nothofagus alpina*), (b) Lenga (*Nothofagus pumilio*) , (c) Boldo (*Peumus boldus*), (d) Castaño (*Castanea sativa*), (e) Aromo australiano (*Acacia melanoxylon*), (f) *Eucalyptus globulus* y (g) *Eucalyptus camaldulensis.*

Figura 1.2. Especies Forestales Conservadas en Banco de Germoplasma *In Vitro* de INFOR.

Las colecciones conservadas en el banco de germoplasma *in vitro* de INFOR se resumen en el Cuadro 1.1.

Cuadro 1.1. Resumen de Colecciones en el Banco de Germoplasma *In Vitro* de INFOR

Especie	Clones (N°)	Criterio de Selección	Uso
Nothofagus alpina	34	Volumen y forma	Madera
Nothofagus pumilio	2	Volumen y forma	Madera
Castanea sativa	4	Volumen y forma	Madera
Eucalyptus globulus	19	Volumen y forma	Madera
Eucalyptus camaldulensis	8	Volumen y forma	Madera
Acacia melanoxylon	3	Volumen y forma	Madera y Bioenergía
Peumus boldus	10	Compuestos activos	Hojas
TOTAL	**80**		

- *Nothofagus alpina* (raulí)

El material vegetal representado en el banco corresponde a treinta y cuatro árboles plus adultos, con edades que fluctúan entre 40 y 100 años, los cuales fueron seleccionados en rodales naturales, en función de su manifiesta superioridad en atributos de crecimiento y forma, lo que los constituyen en individuos especialmente deseables para el establecimiento de plantaciones con fines de producción maderera. Los árboles seleccionados se encuentran localizados en toda el área de distribución natural de la especie, que abarca desde los 35° hasta los 41°de latitud Sur.

- *Nothofagus pumilio* (lenga)

Los árboles conservados en el banco corresponden a dos individuos juveniles seleccionados en un ensayo de progenies establecido en la Reserva Forestal Coyhaique. En este caso la selección se basó en la evaluación genética cuantitativa del ensayo, utilizando un índice de selección para la variable altura. A su vez el ensayo donde se efectuó la selección representa a las progenies de polinización abierta de árboles adultos seleccionados en bosques naturales de tres procedencias de lenga en la región de Aysén.

- *Peumus boldus* (boldo)

El material vegetal conservado representa a diez individuos adultos seleccionados por su alta productividad química (alto contenido de alcaloides, flavonoides y aceites esenciales), localizados en la en Rauco, Región del Maule.

- *Castanea sativa* (castaño)

En el banco se preservan explantes de cuatro individuos seleccionados en plantaciones forestales adultas de entre 40 y 60 años de edad ubicadas entre las regiones del Biobío y Los Lagos. Los individuos representados corresponden a árboles plus que exhibían crecimientos superiores a la media de sus rodales, así como excelentes atributos de sanidad y forma de fuste. En todos los casos se trata de plantaciones establecidas y manejadas con fines forestales y no de plantaciones frutales.

- *Eucalyptus globulus*

En el banco se conserva germoplasma *in vitro* de un total de 19 árboles plus. La mayoría de ellos fueron seleccionados en plantaciones establecidas en condiciones de secano, entre las regiones de Coquimbo y Biobío, y corresponden a individuos que exhibían características superiores de volumen y forma en ambientes en que las limitaciones hídricas restringen el crecimiento de la especie. Adicionalmente, se incluyen individuos de sobresalientes características productivas identificados en las evaluaciones genéticas de los ensayos de procedencias y progenies australianas que constituyen las poblaciones bases del programa de mejoramiento genético para eucaliptos desarrollado por el Instituto Forestal.

- *Eucalyptus camaldulensis*

El banco conserva material genético (explantes *in vitro*) de ocho árboles plus, seleccionados por su capacidad para exhibir superioridad productiva en terrenos con limitaciones hídricas en las regiones de Valparaíso y Metropolitana.

- *Acacia melanoxylon* (aromo australiano)

El banco conserva germoplasma *in vitro* de cuatro árboles plus adultos, seleccionados en función de su superioridad en volumen y forma de fuste en rodales prospectados en las regiones de Biobío a Los Lagos.

Adicionalmente, a medida que se generan y ejecutan nuevas iniciativas de proyectos de investigación, en el laboratorio de micropropagación se desarrollan nuevos protocolos para las especies de interés para incorporarlas en al Banco de Germoplasma *in vitro.* Como es el caso de quillay (*Quillaja saponaria*) y arrayán (*Luma apiculata*).

- *Quillaja saponaria* (quillay)

Dentro del marco del proyecto "Innovación para el uso de la Inducción de Mutagénesis para mejorar la tolerancia a la sequía de especies forestales nativas y exóticas frente al cambio climático", uno de los resultados principales es aumentar la disponibilidad de material genético mejorado de *Quillaja saponaria* para ser usado por pequeños y medianos propietarios forestales, apicultores y viveros forestales de la región del Biobío para fines de plantación, restauración y rehabilitación de suelos degradados.

El material genético de quillay corresponde a tres árboles seleccionados en el sector de Yumbel y Yungay de la región del Biobío, cuyo criterio de selección fue poseer una amplia copa y abundante floración. El interés por esta especie se deriva de su contenido de saponinas, moléculas de importancia económica utilizadas con fines farmacéuticos, industriales y agronómicos.

A partir de semillas cosechadas en los individuos de quillay se evaluó la germinación *in vitro* mediante la extracción de embriones para generar un protocolo de propagación *in vitro* de semillas. Paralelamente se está avanzado en el desarrollo de protocolos de introducción *in vitro* a través de brotes apicales de la especie (Figura 1.3).

Figura 1.3. Arbol Candidato para Colecta de Semillas y posterior Propagación I*n Vitro* de *Quillaja saponaria* en Etapa de Multiplicación.

- *Luma apiculata* (arrayán).

En el marco del proyecto del Fondo de Investigación del Bosque Nativo (FIBN) “Semillas para el futuro: Fuentes semilleras con consideraciones genéticas y ecológicas de una mirtácea de alto valor melífero: *Luma apiculata* (DC.) B”, el cual busca contribuir a la conservación de la diversidad genética de la especie y al desarrollo de prácticas más sostenibles en la gestión forestal en Chile y mejorar la calidad genética, promoviendo el origen geográfico del material reproductivo forestal en iniciativas de reforestación y restauración en Chile, se estudiarán protocolos de micropropagación y organogénesis desde explantes de plantas de vivero de *Luma apiculata.*

Figura 1.4. Desinfección e Introducción a Medio *In Vitro* de Brotes de *Luma apiculata* (arrayán).

PROCEDIMIENTOS DE CONSERVACION

La introducción del material vegetal para el inicio del proceso de conservación se hace a través de técnicas de micropropagación (Figura 1.5), específicamente organogénesis somática. Para este

efecto se utilizan como explantes iniciales brotes epicórmicos*;* yemas latentes, inducidas a brotar en laboratorio bajo condiciones controladas de temperatura y humedad; y segmentos nodales. Como consideración previa, cada vez que se ingresa material al banco se registra los datos característicos de las muestras. Estos describen el origen, características geográficas y medioambientales que permiten conocer el sitio donde se realizó la cosecha.

(a) Yemas latentes de varetas de *Peumus boldus; (b)* Desarrollo de brotes epicórmicos; (c) Brotación inducida *in vitro; (d)* Multiplicación de brotes; (e) Elongación de brotes; (f) Selección de brotes para enraizar; (g) Brotes inducidos a enraizamiento; (h) Enraizamiento de brotes; (i) Aclimatación de plantas completas.

Figura 1.5. Equema de Introducción Material Vegetal *In Vitro* y Posteriores Etapas de Multiplicación, Elongación y Enraizamiento Mediante Organogénesis de Brotes Epicórmicos.

El método de conservación *in vitro* utilizado en el banco de germoplasma forestal se basa en el empleo de técnicas de crecimiento retardado, donde la conservación *in vitro* se realiza manteniendo los explantes confinados en frascos de vidrio con medio aséptico y sustancias nutritivas adecuadas para permitir la formación de brotes a un ritmo reducido, disminuyendo la división celular y el metabolismo de la planta. Este método tiene como objetivos incrementar la longevidad *in vitro* de los cultivos sin que se produzcan cambios genéticos, por tanto, no hay una detención total de los procesos celulares sino una disminución en la velocidad con que ocurren los mismos y así se reduce la frecuencia de transferencia de las plantas a medio de cultivo fresco (Roca *et al*., 1994).

Los explantes se cultivan en frascos de vidrio, que contienen medio nutritivo aséptico (Cuadro 1.2) adicionado con hormonas del tipo citocininas y, dependiendo de la especie, también con auxinas, ambas en concentraciones muy bajas, pero suficientes para permitir la formación de nuevos brotes. Normalmente los cultivos se someten a diversas modificaciones, principalmente la reducción de los niveles de minerales, la reducción del contenido de sacarosa y/o la manipulación del tipo y concentración de reguladores del crecimiento. La renovación del medio nutritivo se realiza a intervalos de más de 60 días, según el protocolo de cada especie.

Cuadro 1.2. Formulaciones de Medios Nutritivos para Conservación de Banco Germoplasma.

Especie	Descripción
Nothofagus pumilio	BTM, suplementado con 2% de sacarosa, 7g/L de agar, 022 mg/L de BAP, 0,002mg/L de ANA, 250mg/L de caseína hidrolizada y 20mg/L de Putrescina.
Nothofagus alpina	BTM, adicionado con 0,125 mg/L de BAP, 2% de sacarosa y 7 g agar.
Castanea sativa	BTM, adicionado con 0,125 mg/L de BAP, 2% de sacarosa y 7 g agar.
Acacia melanoxylon	MS, complementado con 0,1 mg/L de tiamina, 0,1 mg/L de Piridoxina, 0,5 mg/L de ácido nicotínico, 100 mg/L de Minositol, 7 g/L de agar, 2% de sacarosa,0,22 mg/L de BAP y 0,0018 mg/L de ANA.
Eucalyptus globulus y Eucalyptus camaldulensis	MS, complementado con 0,1 mg/L de tiamina, 0,1 mg/L de Piridoxina, 0,5 mg/L de ácido nicotínico, 100 mg/L de Minositol, 7 g/L de agar, 2% de sacarosa,0,22 mg/L de BAP y 0,0018 mg/L de ANA.
Peumus boldus	MS, complementado con 0,1 mg/L de tiamina, 0,1 mg/L de Piridoxina, 0,5 mg/L de ácido nicotínico, 100 mg/L de Minositol, 7 g/L de agar, 2% de sacarosa, 0,5mg/L de BAP y 0,0018 mg/L de ANA.

MS: (Murashige y Skoog, 1962)
BTM: Broad Leaved Tree Medium (Chalupa, 1983)

Las colecciones de germoplasma se mantiene en una sala de incubación con 18 a 20°C de temperatura y fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad. Las condiciones óptimas para el crecimiento lento deben determinarse antes del almacenamiento y generalmente se requiere experimentación para lograr resultados óptimos.

El comportamiento de muchos cultivos depende de la calidad, intensidad y fotoperíodo de la luz que reciben, dado que varias enzimas involucradas en el desarrollo y en el metabolismo secundario son influenciadas por la luz. Entre otras cosas la intensidad de la luz regula el tamaño de las hojas y los tallos, así como su vía de morfogénesis, y está involucrada en la formación de pigmentos y en la hiperhidratación (Moreira da Silva y Debergh, 1997).

DIFUSIÓN Y TRANSFERENCIA DEL CONOCIMIENTO

En el marco del convenio de colaboración INFOR-PlanGen, el equipo de Conservación y Mejoramiento Genético de INFOR a través de su Banco de Germoplasma vegetal *in vitro* entregó 34 clones de Raulí (*Nothofagus alpina*) al vivero PlanGen de la Región de Los Ríos. Este material genético será masificado para que esté disponible para pequeños y medianos forestadores interesados en la producción de madera y en la recuperación de ecosistemas degradados (Figura 1.6).

El germoplasma transferido fue originalmente obtenido de árboles adultos, de alrededor de 70 u 80 años, que fueron rigurosamente seleccionados entre las regiones de Biobío y Los Lagos en función de atributos de crecimiento y forma en diversos proyectos que llevó a cabo INFOR desde fines de los años 90.

Tras la selección original de los individuos de raulí, se inició el desarrollo de un protocolo *in vitro* de clonación, obteniéndose plantas clonadas que fueron establecidas en ensayos clonales en el año 2005 por INFOR. Toda esta información de propagación y los clones propiamente tales fueron resguardados por más de 20 años en el Banco de Germoplasma Vegetal *in vitro* de INFOR en su Sede Biobío. Hoy, cerca de 20 años después, estos árboles que ya no existentes en los bosques, volverán a la vida con casi 100 años a través de material *in vitro* que se espera enriquezcan nuestros los bosques de raulí.

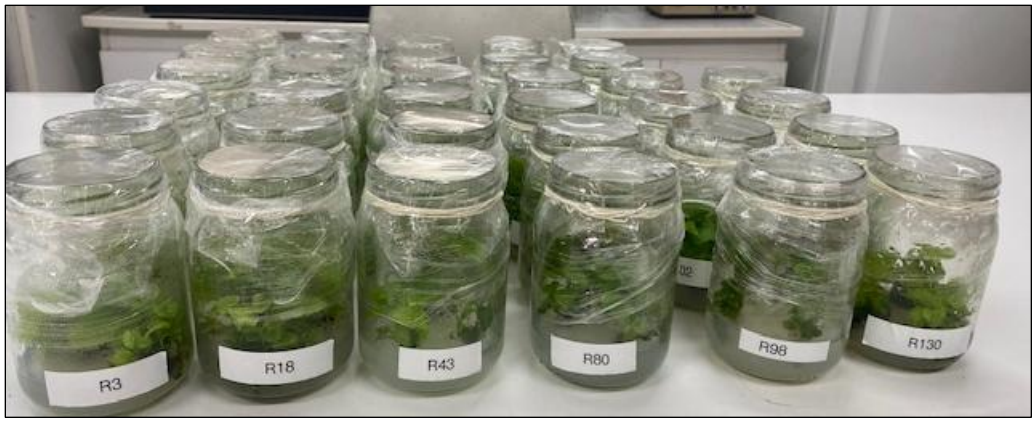


Figura 1.6. Clones de Raulí *In Vitro* Transferidos a Vivero PlanGen

Una actividad permanente en el Laboratorio de Micropropagación es la transferencia de resultados de su quehacer a delegaciones de estudiantes y pequeños propietarios, a quienes instruye respecto de las técnicas de cultivo *in vitro.* También recibe estudiantes universitarios para la realización de prácticas profesionales. (Figuras 1.7 y 1.8).

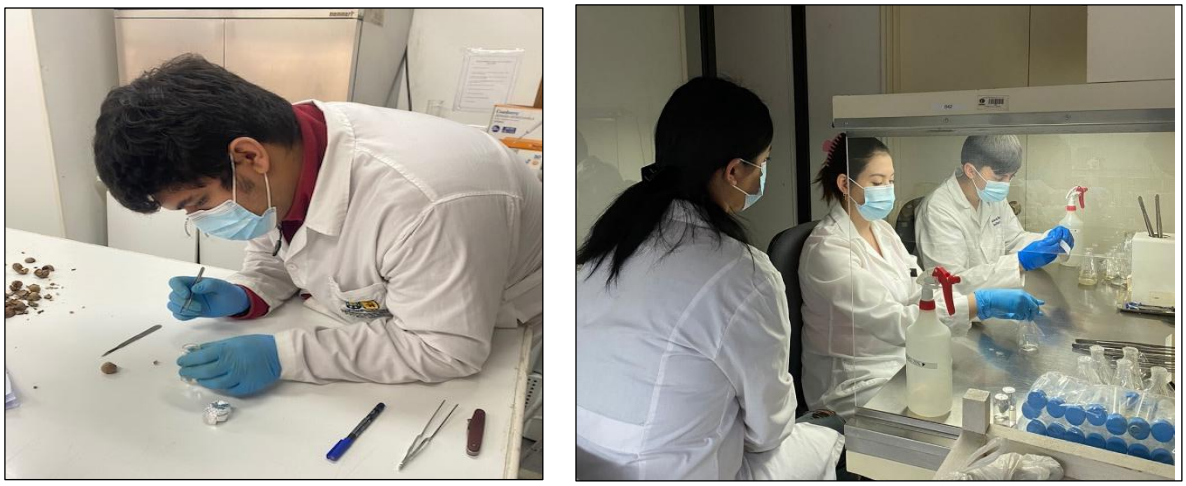


Figura 1.7. Realización de Práctica Profesional de Estudiantes Universitarios de Carreras Ingeniería en Biotecnología Vegetal (UDEC) y Técnico en Biotecnología (UTFSM).

Figura 1.8 Visita de Agricultores de la Comuna de Santa Bárbara.

CONSIDERACIONES FINALES

El éxito de la conservación *in vitro* radica en las labores cotidianas que se llevan a cabo para su buen funcionamiento. Una de las labores principales es la supervisión de las condiciones físicas de la sala de incubación (temperatura, luz, humedad, asepsia), como también en la revisión del estado fisiológico y fitosanitario del material vegetal que se está conservando.

Estos procedimientos han permitido conservar germoplasma viable en el banco de INFOR hasta la fecha. No obstante, el alto costo que han significado los permanentes subcultivos que se han requerido durante todo ese periodo confirma las ventajas y conveniencia de disponer de medios para almacenamiento criogénico.

Se recomienda a futuro evaluar el empleo de técnicas de criopreservación para el almacenamiento en el largo plazo del germoplasma, teniendo en consideración el equipamiento correspondiente, además de implementar un sistema de evaluación períodica de la viabilidad y trazabilidad de las accesiones.

CONTACTO

Laura Koch Zuñiga, Investigadora, Encargada de Laboratorio de Micropropagación de Instituto Forestal, Línea de Investigación de Conservación y Mejoramiento Genético Forestal. Calle Nueva Uno N° 3570, LT4 Michaihue, San Pedro de la Paz, Concepción. E-mail: lkoch@infor.cl.

SERVICIOS

- Desarrollo de protocolos para la micropropagación de especies forestales
- Conservación *in vitro* de germoplasma vegetal

- Capacitación en técnica de cultivo *in vitro*
- Disponibilidad de material vegetal *in vitro* para investigación o emprendimiento

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN EJECUCIÓN

- Radiación ionizante para mejorar la germinación y el crecimiento inicial de plantas de especies forestales nativas vulnerables (palma chilena, queule, belloto del sur y quillay) frente al cambio climático. Financiado por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID). Programa Idea I+D.

- Semillas para el futuro: Fuentes semilleras con consideraciones genéticas y ecológicas de una mirtácea de alto valor melífero: *Luma apiculata* (DC.) B. Financiado por el Fondo de Investigación de Bosque Nativo (FIBN, CONAF).

REFERENCIAS

Benson, E., Harding, K., Debouck, D., Dumet, D., Escobar, R., Mafla, G., Panis, B. *et al*. (2011). Refinement and standardization of storage procedures for clonal crops - Global Public Goods Phase 2: Part I. Project landscape and general status of clonal crop *in vitro* conservation technologies. System-wide Genetic Resources Programme, Rome, Italy.

Cano, M. (2013). Aplicación de la micropropagación y criopreservación a la conservación *ex sit*u de especies vegetales de interés. Tesis Doctoral Memoria presentada para aspirar al Grado de Doctora por la Universidad de Alicante. España. 28 p.

Chalupa, V. (1983). Micropropagation of conifer and broad-leaved forest trees. Communicationes Instituti Forestalis Cechosloveniae 13: 7-39.

Dong, J. & Dunstan, D. (1999). Cloning and characterization of six embryogenesis-associated cDNAs from somatic embryos of Picea glauca and their comparative expression during zygotic embryogenesis. Plant Molecular Biology, 39. Pp: 859-864.

Engelmann, F. & Takagi, H. (2000). Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. JIRCAS, Tsukuba, Japón/IPGRI, Roma.

Glowka, L., Burhenne-Guilmin, F. y Synge, H. (1996). Guía del Convenio sobre la Diversidad Biológica, UICN Gland y Cambridge. XII + 179 p.

Lynch PT. (1999). Tissue culture techniques in *in vitro* plant conservation. En: Plant: Conservation Biotechnology. Benson, E. (Ed.). Taylor & Francis, Ltd. Pp: 41-60.

Moreira da Silva, M.H. & Debergh, P.C. (1997). The effect of light quality on the morphogenesis of in vitro cultures of *Azorina vidalii* (Wats.) Feer. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 51(3): 187-193. *https://doi.org/10.1023/A:1005988621036*

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15(3): 473-497. *https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x*

Phartyal, S., Thapliyal†, R., Koedam, N. and Godefroid, S. (2002). *Ex situ* conservation of rare and valuable forest tree species through seed-gene bank. Current Science, 83(11): 1351-1357.

Roca, W., Escobar, R. & Mafla, G. (1994). Conservación de germoplasma de yuca *in vitro*. Principios y técnicas. CIAT, Cali.

Seguel, I. (2001). Conservación de recursos fitogenéticos ex situ. En: PROCISUR. Estrategia en recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur. 12 p. http://www.fagro.edu.uy/~fitotecnia/docencia/materiales%20apoyo/Conservacion_de_recursos_Fitoge - neticos.pdf. (Consulta: Noviembre, 2013).

Watt, M.P., Mycock, D., Blakeway, F. and Berjak, P. (2000). Applications of *in vitro* methods to *Eucalyptus* germplasm conservation. Southern African Forestry Journal, 187(1): 3-10. *https://doi.org/10.1080/10295925.2000.9631250*

CAPITULO 2
BANCO MICOLÓGICO

ANTECEDENTES

Los hongos cumplen un importante papel en los ecosistemas forestales, participando activamente en una diversidad de funciones y de interacciones que son fundamentales para su buen funcionamiento, presentando una gran diversidad, la que muchas veces no es tomada en cuenta al momento de actuar sobre estos ecosistemas. Sin embargo, en la actualidad se reconoce que la productividad de los bosques, su regeneración y la estabilidad del ecosistema dependen de muchos organismos dentro de los cuales se encuentran los hongos (Martínez de Aragón *et al*., 2012).

Un factor clave para el buen funcionamiento de los ecosistemas está dado por la diversidad de hongos, que actúan como movilizadores de nutrientes en base a diversas estrategias nutricionales, como degradadores, patógenos o como simbiontes. De acuerdo con Martínez de Aragón *et al.* (2012), el porcentaje de cada uno de estos tipos de hongos permite medir la sanidad del ecosistema. Estos investigadores señalan que, para un bosque mediterráneo sano, los hongos micorrícicos deben estar entre el 50 y el 66%, los saprófitos entre 40 y 60% y los parásitos entre el 0 y el 5%. En general, un porcentaje de hongos micorrícicos superior al 30% es indicador de un bosque vigoroso. Dichos investigadores han señalado, además, que el desconocimiento sobre la presencia de determinadas especies y los efectos que tienen las modificaciones sobre el clima o sobre el suelo, entre otros, pueden suponer una importante pérdida de biodiversidad que no es percibida, pero que influirá en la estabilidad y resiliencia de los ecosistemas forestales.

La ciencia de la micología ha generado adelantos en el campo agroindustrial, biotecnológico y ambiental, lo que ha permitido conocer los grandes beneficios que aportan estos microorganismos, como es en el área forestal con los hongos micorrícicos. Para facilitar el estudio de estos se han creado varias colecciones en diferentes partes del mundo en donde se conservan. Esta labor demanda una persistente vigilancia y atención por la dificultad que presenta (Ángel, 2006).

Dentro de estos recursos micológicos se encuentran las especies de hongos silvestres comestibles presentes en los bosques nativos chilenos, que en algunos casos presentan un atractivo negocio con elevados precios de venta, que generan una fuerte presión por su extracción y han significado la desaparición de muchas de sus poblaciones naturales, debido principalmente a inadecuados métodos de extracción (Tacón y Palma, 2005). Esta sobreutilización de los recursos fúngicos implica una disminución de la calidad y cantidad de los ejemplares que los componen. Los sistemas de explotación utilizados se han limitado solo a extraer la totalidad de los ejemplares sin claras posibilidades de un aprovechamiento sostenible en el tiempo, llegando incluso a la destrucción de los bosques que los albergan, como es el caso del hongo *Boletus loyo,* especie catalogada como “en peligro” (MMA, 2014).

A nivel mundial se ha 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 y 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 y Vergara, 1980), identificándose unas 53 especies silvestres comestibles (Valenzuela, 2003), cifras que en la actualidad se ha ido incrementando.

Otras especies de hongos nativos que se encuentras amenazadas por extracción son: *Grifola gargal* (gargal), *Cortinarius lebre* (lebre u hongo liebre) y varias especies de los géneros *Ramaria* (changle amarillo o rosado), *Morchella* (morchela, morilla) y *Cyttaria* (digüeñe, pinatra, llao-llao). Los cuerpos fructíferos de estas especies son recolectados por habitantes de zonas rurales para su consumo o venta. Para muchos recolectores los hongos nativos son una de sus principales fuentes de ingresos, siendo un recurso cada vez más escaso y que posee una alta demanda por sus excelentes cualidades culinarias y precio (Taller de Acción Cultural, 2003).

Existen numerosas especies fúngicas que, junto a una variedad de especies arbóreas, han desarrollado una estrategia nutricional que les asegura un beneficio mutuo a través de la simbiosis micorrícica, que comprende la formación de un tipo de entidad simbiótica entre el hongo y las raíces de la planta. La asociación simbiótica raíz-hongo 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 y Cairney, 2002). Esta micorriza 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), cumpliendo una importante función en el ciclo de nutrientes de los ecosistemas forestales.

Las micorrizas 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, y el hongo por su parte recibe de la planta azúcares y carbohidratos provenientes de la fotosíntesis. Su presencia aumenta la resistencia de las plantas 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 simbiontes 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 micorrícicos y especies forestales afines constituye una ventajosa oportunidad para implementar líneas de investigación y desarrollo innovativas, 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 condicionas ideales de establecimiento y desarrollo del 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 posteriores a las labores de plantación.

Para inocular plantas con hongos micorrícicos específicos se deben desarrollar protocolos que posibiliten el contacto y la unión exitosa hongo-planta, que dé lugar a las formaciones micorrícicas. Para ello, uno de los aspectos importantes es la elaboración de material inoculante de la cepa del hongo previamente seleccionada y masificada bajo parámetros ambientales y químicos fijados en laboratorio. Por otro lado, para elaborar inoculantes fúngicos de hongos micorrícicos a gran escala, es necesario, junto con definir la composición óptima del medio de cultivo, tomar en cuenta las diferentes cepas para una gran variación de condiciones del suelo (Islam y Ohga, 2013).

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 desde donde poder abastecerse y seleccionar material acorde 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 alternativas como la de mejorar la rentabilidad de plantaciones forestales a través de una producción de hongos ectomicorrícicos comestibles de alto valor económico y social.

En base a estos antecedentes, la implementación de acciones que permitan resguardar el patrimonio fúngico nacional, principalmente de las especies de hongos nativos, muchos de ellos endémicos, es necesaria para que en el caso de los hongos comestibles y/o medicinales su negocio no se transforme en un agente de degradación y, por el contrario, sea un incentivo para un manejo forestal sustentable y una forma de conservación de estos recursos.

En los últimos años los productos del bosque nativo, entre ellos los hongos silvestres comestibles, han concentrado la atención de diversos profesionales debido a la oportunidad que se presenta para la conservación de la biodiversidad, el desarrollo sustentable y también por los altos niveles de comercialización que han alcanzado a escala global diversos productos derivados de ellos (Saavedra, 2004).

Para el caso de las plantaciones de pino, existen importantes especies de hongos comestibles que son colectadas y comercializadas a nivel nacional e internacional. Su presencia se ve incrementada a edades de entre los 4 y 12 años, siendo las especies fúngicas típicas de estas masas vegetacionales *Suillus luteus*, *Suillus granulatus* y *Lactarius deliciosus*.

El trabajo que se ha estado llevando a cabo en el Laboratorio de Micología del Instituto Forestal en Concepción, tiene como objetivo realizar investigaciones relacionado a los hongos simbiontes, comestibles y medicinales. En forma complementaria, se continúan desarrollado actividades de captura y aislación de especies y cepas, con el propósito de contar con material suficiente para realizar dichas investigaciones. De acuerdo con lo señalado, existe un programa anual cuyo objetivo es la mantención a largo plazo, mediante subcultivos del material colectado, sumado a actividades de recolección y aislación de nuevo material fúngico, para seguir aumentando los especímenes dentro del Banco de Cepas.

INFRAESTRUCTURA

El laboratorio de Micología cuenta con una adecuada infraestructura y equipamiento para la realización de trabajos de investigación y de manejo de muestras fúngicas para los procesos de aislación y mantención del material fúngico recolectado en diversos sitios del país (Figura 2.1). Para ello, cuenta con una serie de equipos tecnológicos como: autoclaves, estufas, freezer, centrífugas, cámaras de crecimientos, cámaras de flujo laminar, destiladoras de agua, pesas analíticas y semianalíticas, refrigeradores, salas climatizadas, microscopios, lupas estereoscópicas peachímetros, entre otros equipamientos, para llevar a buen término dichos trabajos.

(a) Area Central de recepción y manejo de material y confección de medios; (b) Área de Manejo Aséptico del material fúngico; (c) Área de Crecimiento y Masificación Miceliar; (d) Planta Piloto de Cultivo de Hongos.

Figura 2.1. Áreas del Laboratorio de Micología:

COLECCIONES CONSERVADAS

Un total de 63 especies y 552 cepas de hongos obtenidos entre las regiones de O´Higgins y Los Lagos componen actualmente la colección que se conserva en el banco de cepas de INFOR. El detalle de esta colección se entrega en el Apéndice. Especies y Cantidad de Cepas por Región Presentes en el Banco de Hongos del Instituto Forestal**.**

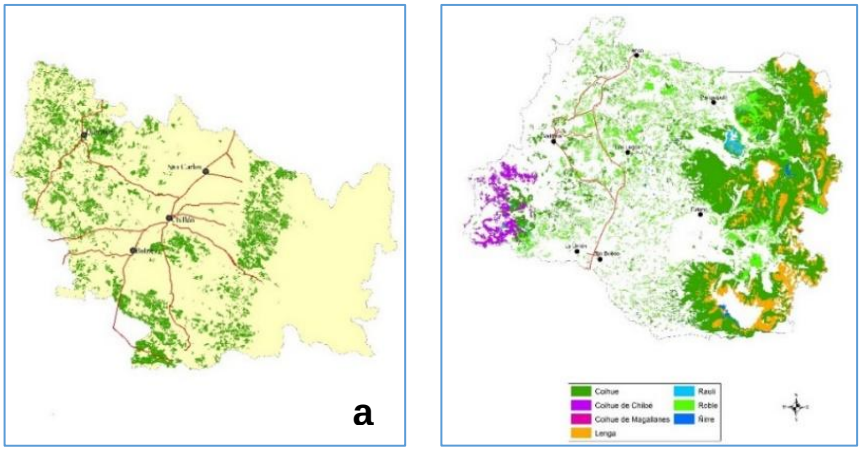
PROCEDIMIENTOS DE CONSERVACION

Incorporación de Nuevos Especímenes al Banco de Hongos

- Identificación de ambientes

Se identifican los hábitats naturales donde se desarrollan las especies fúngicas, ya sea en bosques nativos, especialmente de especies del género *Nothofagus,* o en plantaciones de especies exóticas, como *Pinus radiata, Populus spp., Salix spp. Quercus spp.* y otras. En estas especies se puede encontrar un buen número de hongos silvestres comestibles (Figura 2.2).

Además, esta actividad busca preservar tanto las especies como la variabilidad genética de las mismas, sobre todo de las especies endémicas que se encuentras en muchos ambientes dentro de los bosques nativos.



(a) Distribución de plantaciones de *Pinus radiata* en la regiön de Ñuble
(b) Distribución de las especies de *Nothofagus* en la región de los Ríos.

Figura 2.2. Ejemplo de Mapas para la Prospeccción y Colecta de Hongos.

Para la elaboración de los mapas se cuenta con el apoyo del área de Investigación, Inventario Forestal Continuo de INFOR de la sede Biobío en Concepción, quienes utilizan el “Catastro de los Recursos Vegetacionales Nativos de Chile”, actualizado por CONAF, como también la información obtenida por el Instituto Forestal del “Programa de Actualización de Plantaciones Forestales”, para la elaboración de dichos mapas

- Prospección y colecta de especímenes.

Para iniciar la prospección y colecta, es necesario la ocurrencia de precipitaciones otoñales, invernales y de primavera, junto con las temperaturas adecuadas que favorezcan la aparición de los cuerpos frutales según el ciclo reproductivo de cada especie. Algunos aparecen en otoño-invierno como loyo y changle, otros en primavera, como digüeñe y morchela. La aparición de organismos como gargal, hongo ostra, hongo del álamo o enoki como lo conocen en Japón (Figura 2.3) se ve favorecida tanto por la humedad del suelo como de la madera.

Durante la colecta se toman fotografías de los especímenes, se identifican preliminarmente en terreno y se registran los datos que caracterizan el lugar de extracción. Para esto último se utiliza una ficha previamente confeccionada para este fin (Figura 2.4). Para cada especie a colectar se extraen algunos ejemplares completos para facilitar su identificación, tratando de limpiar lo máximo posible el cuerpo fructífero de partículas de suelo y materia orgánica mediante una brocha o pincel grueso.

Posteriormente se disponen en bolsas de papel, para permitir la respiración del hongo e impedir la acumulación de humedad que deterioraría las muestras. Se identifica cada bolsa con un código de colecta en terreno. Finalmente, las bolsas ya codificadas se almacenan en contenedores plásticos con *ice pack*s, para su preservación en frío durante el viaje hacia el lugar de identificación y aislación definitiva del hongo (Figura 2.5).

(a) Digüeñe (*Cyttaria espinosae*); (b) Morchella, morilla (*Morchella conica*); (c) Changle (*Ramaria patagonica*); (d) Loyo (*Butyriboletus loyo*); (e) Hongo del álamo (*Cyclocybe aegerita*); (f) Enoki (*Flammulina velutipes*)

Figura 2.3: Algunos Hongos Silvestres Comestibles de los Bosques de Chile.

DATOS DE TERRENO

Sector N°		Identificación preliminar							
Coordenadas		**1°**			**2°**				
Región									
Tipo Suelo									
Especie asoc.				Altitud					
Fecha Colecta				Raleo-Manejo					
Edad del Rodal				Densidad					
Exposición	**N**	**S**	**E**	**O**	**NE**	**NO**	**SE**	**SO**	**P**
Otros datos									

Nombre Colector: _____

Figura 2.4. Ficha de Antecedentes para Cada Cepa Colectada

El transporte debe ser rápido, tomando no más de 2 días hasta su arribo al laboratorio para proceder a la codificación, identificación y aislación definitiva del hongo colectado (Figura 2.5). Una identificación final del hongo capturado, si fuese necesario, se realiza en base a bibliografía especializada o mediante la consulta a un especialista en taxonomía fúngica.

(a) Muestras en bolsas de papel con código para identificación del sitio; (b) Contenedor con *ice packs* para mantener muestras a 3 a 4°C; (c) Ordenación y codificación de muestras en laboratorio.

Figura 2.5. Procedimientos de Colecta de Especímenes en Terreno y Adecuación de Muestras en Laboratorio para su Procesamiento y Aislación.

- Codificación

Para ordenar los especímenes colectados, aislados e incorporados al Cepario de Hongos Comestibles del Instituto Forestal, se utiliza una codificación que permite vincular la información de terreno, los registros fotográficos y las diferentes cepas aisladas (Figuras 2.6 y 2.7). El código a aplicar es el siguiente:

IFAABBCCC

Donde:
IF: Instituto Forestal (Institución Colectora)
AA: Región de Chile
BB: Sector de Colecta
CCC: Número de la cepa

Figura 2.6. Ejemplo de Registro Fotográfico de Especímenes Recolectados con sus Cdigos de Identificación

Código	Especie probable	Sector	Coordenadas Geográficas		Región	Suelo	Altitud	Especie asociada	Mes Colecta	Año	Edad del rodal (años)	Exposición	Densidad	Raleo o Manejo	Tipo Hongo
			Latitud	Longuitud			m.s.n.m.						(arb/ha)		
IF1601001	*Agaricus campestris*	Guarilihue	18H 0701901	5949351	XVI	Arcilloso	128	*Pinus radiata*	Abril	2020	12	SE	3x4	No	S
IF1601002	*Suillus luteus*	Guarilihue	18H 0701901	5949351	XVI	Arcilloso	128	*Pinus radiata*	Abril	2020	12	SE	3x4	No	M
IF1601003	*Paxillus involutus*	Guarilihue	18H 0701901	5949351	XVI	Arcilloso	128	*Pinus radiata*	Abril	2020	12	SE	3x4	No	M
IF1601004	*Hebeloma crustuliniforme*	Guarilihue	18H 0701901	5949351	XVI	Arcilloso	128	*Pinus radiata*	Abril	2020	12	SE	3x4	No	M
IF1601005	*Volvariella speciosa*	Guarilihue	18H 0701901	5949351	XVI	Arcilloso	128	*Pinus radiata*	Abril	2020	12	SE	3x4	No	S

Figura 2.7. Ejemplo de Rgistro de Sntecedentes por Cepa Colectadas en Terreno Junto al Código de Identificación.

- Aislación de los hongos.

Se realiza bajo condiciones asépticas (*in vitro*), utilizando diversos medios nutritivos para conseguir la aislación del material fúngico, que permita conservar una muestra fúngica específica. Los medios que se utilizan en forma habitual son: BAF (Biotina Aneurina Ácido Fólico), MMN (Medio Melin-Norkrans) y PDA (Potato Dextrosa Agar), que varían de mayor a menor complejidad y costo (Cuadro 2.1).

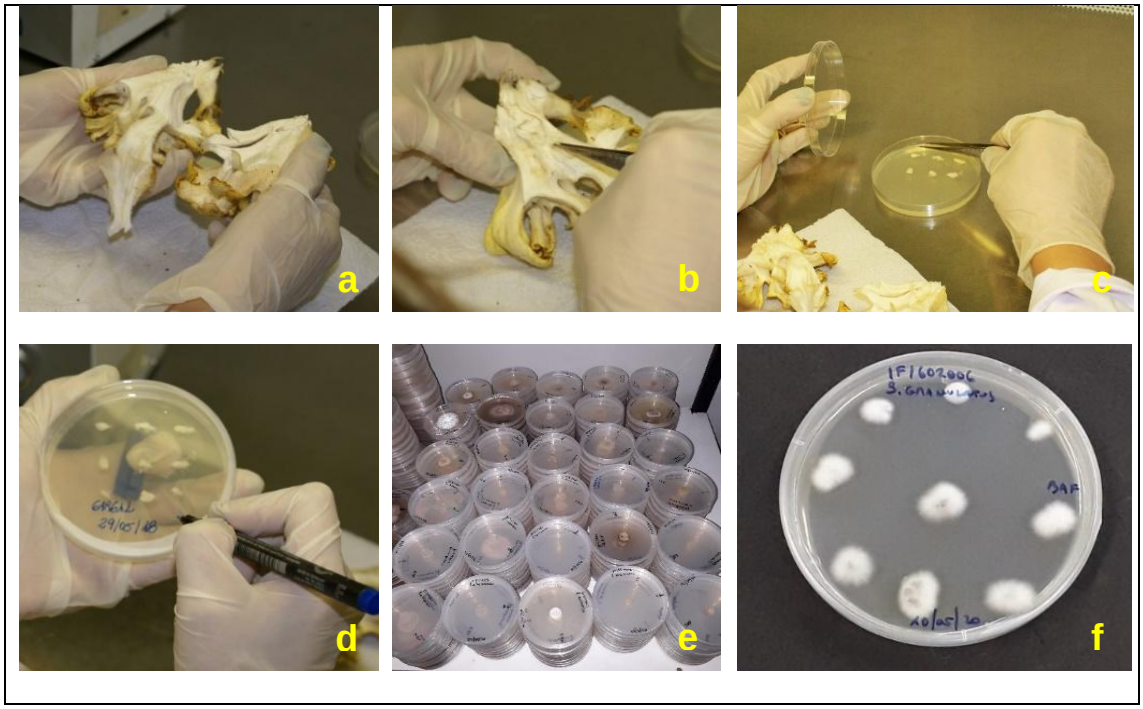
Cuadro 2.1. Formulación de los Medios de Crecimiento Utilizados.

Nutrientes	Composición de Medios de Cultivo		
	MMN	BAF	PDA
Fuentes de 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	20 g
Nutrientes Minerales			
$(NH_4)_2HPO_4$	0,25 g		
$FeCl_3 \bullet 6\ H_2O$		10 mg	
$ZnSO_4 \bullet 7H_2O$		1 mg	
$MnSO_4 \bullet 4\ H_2O$		5 mg	
KH_2PO_4	0,5 g	0,5 g	
$MgSO_4 \bullet 7H_2O$	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	0,05 mg	
Biotina		0,001 mg	
Ácido Fólico		0,1 mg	
Inositol		50 mg	
Agua Destilada	1.000 ml	1.000 ml	1.000 ml
pH	5,6	5,6	5,6
Agar	15 g	15 g	15 g

La inoculación de los medios se realiza en cámara de flujo laminar, tomando un segmento de tejido del cuerpo fructífero del hongo. Para ello, se procede a la segmentación del hongo, dejando expuesto

el tejido estéril presente en el interior, permitiendo así la extracción de pequeñas porciones de tejido, los cuales se colocan sobre el medio de cultivo. Hecho este procedimiento, las placas de Petri se sellan con papel parafilm, procediendo inmediatamente a marcar con el código de la cepa, medio de cultivo utilizado y la fecha de aislación.

Posteriormente las placas de Petri se colocan en un ambiente oscuro a 23°C de temperatura, para que se desarrolle y se verifique el crecimiento sin presencia de otros contaminantes, como bacterias u hongos indeseados (Figura 2.8).



(a) Seccionado del cuerpo fructífero para exponer tejido estéril; (b) Extracción de tejido estéril para colocarlo en medio de cultivo; (c) Tejido miceliar del hongo en medio de cultivo estéril; (d) Tejido miceliar en placa de Petri sellado con código, medio de cultivo y fecha; (e) Placas de petri con tejido aislado en cámara de crecimiento a 23°C y en oscuridad; (f) Estado de desarrollo de tejido a los 30 días de su aislamiento, sin contaminación.

Figura 2.8. Procedimientos de Manipulación y Aislación de Especímenes para su Incorporación al Banco de Cepas del Instituto Forestal

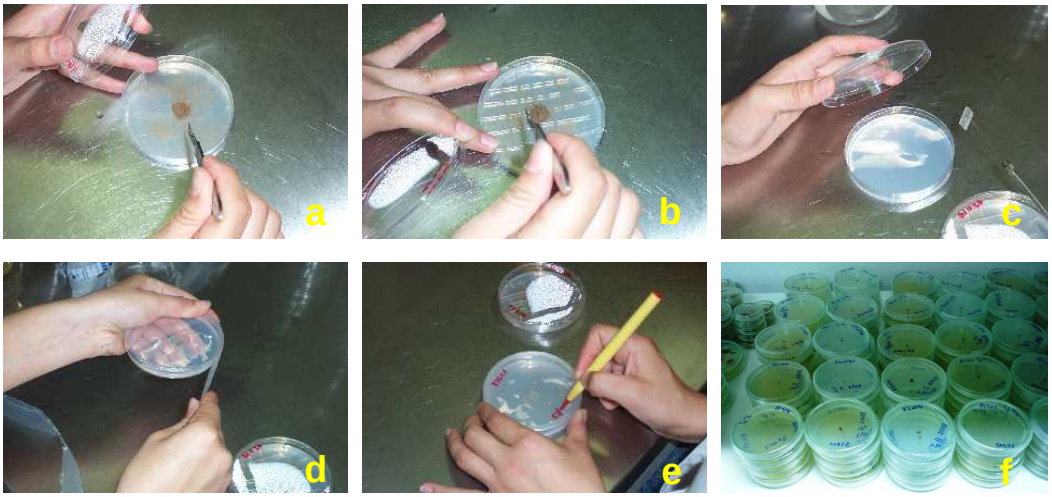
Mantención del Banco de Cepas

La transferencia a nuevo medio se realiza en cámara de flujo laminar, tomando el disco que contiene el micelio desarrollado en el antiguo medio nutritivo. El medio de este disco se corta realizando un cuadriculado de aproximadamente de 1 cm^2 sobre la superficie, en el cual cada fragmento resultante se traspasa a un disco con medio nuevo para su mantención.

Estos nuevos discos conteniendo los segmentos de agar con micelio, se sellan con parafilm y se marcan con la fecha, código de la cepa y tipo de medio.

Realizada la inoculación de los discos, estos se colocan en cámaras de crecimiento a 23ºC y en oscuridad para su desarrollo y mantención (Figura 2.9). En la actualidad el cepario cuenta con más

de 60 especies que cumplen funciones simbióticas, como parásitas o saprófitas, reuniendo un total de 570 cepas recolectadas a lo largo y ancho del país, abarcando desde la región de O´Higgins hasta la región de los Lagos (Anexo 1).



(a) Disco de Petri con cepa en medio de cultivo antiguo; (b) Corte en cuadros del agar con micelio de 1 cm^2 aproximadamente con bisturí; (c) Traspaso de trozo de agar con micelio a nuevo medio; (d) Sellado de disco de Petri con parafilm; (e) Marcación del disco de Petri con la especie, código de la cepa, medio y fecha; (f) Ubicación en sala de crecimiento.

Figura 2.9. Trabajos de Mantención de Cepas Mediante la Transferencia Periódica a Nuevo Medio.

Desarrollo de Investigación

Principalmente, se desarrollan experimentos con el propósito de recopilar antecedentes que permitan un buen desempeño de diferentes especies y cepas para ser utilizados en objetivos determinados.

En el caso de los saprófitos comestibles, se busca las mejores condiciones para el desarrollo de semillas y/o la producción de hongos utilizando diferentes sustratos, condiciones ambientales y protocolos generales de manejo para el cultivo.

Por su parte, para las especies de tipo ectomicorrícicas, se busca las mejores cepas en cuanto producción de biomasa miceliar, velocidad de crecimiento para su masificación bajo diferentes parámetros medioambientales y su comportamiento en infectividad y efectividad, bajo condiciones de cultivo axénico, de vivero y en campo (Figura 2.10).

(a) Desarrollo de material inoculante en base a tarugos de madera para hongos saprófitos; (b) Desarrollo de material inoculante en base a semillas de trigo para hongos saprófitos; (c) Desarrollo de material inoculante en base a aserrín de madera para hongos saprófitos; (d) Desarrollo de material inoculante en base a turba-vermiculita para hongos ectomicorrícicos; (e) Desarrollo de material inoculante en base a mediolíquido para hongos saprófitos; (f) Ensayos para definir medios nutritivos y nivel de pH para hongos en general; (g) Ensayos de síntesis micorricica en pino (*Pinus radiata*) con hongos ectomicorrícicos; (h) Resultados de la síntesis con la formación de micorrizas en raíces de plantas en ambiente aséptico; (i) Ensayos de síntesis micorricica en raulí (*Nothofagus alpina*) con hongos ectomicorrícicos; (j) Elaboración de prototipos de biofertilizantes; (k) Ensayos de influencia en la generación de raíces en explantes in vitro de especies madereras; (l) Ensayos de producción de hongo gargal (*Grifola gargal*) en condiciones controladas.

Figura 2.10. Diferentes Líneas de Investigación Realizadas para Hongos Saprófitos y Ectomicorrícos Comestibles.

DIFUSIÓN Y TRANSFERENCIA DEL CONOCIMIENTO

Una de las funciones anexas a la conservación de material fúngico y de investigación en temas afines es la de difundir o transferir el conocimiento a través de actividades que involucran una serie de actividades relacionadas con el tema micológico, como son la participación en charlas, talleres, capacitaciones y seminarios. Se agrega actividades de formación a nivel de escuela y universitaria, recibiendo además delegaciones de recolectores. Como parte de las actividades de difusión, el laboratorio recibe estudiantes de universidades para realizar sus prácticas o pasantías, también facilita sus dependencias para el desarrollo de estudio de tesis.

Charlas y Talleres de Capacitación y Educación.

El personal del laboratorio realiza charlas, talleres y capacitaciones a lo largo del país, llegando incluso a grupos de personas en sectores con dificultades de acceso, por su lejanía a centros urbanos (Figura 2.11).

(a) Charlas a recolectores en Temuco; (b) Chillán (c) Taller sobre el Mundo Fungi en Curacautín; (d) Charla en Universidad de Aysén en Coyhaique; (e) Capacitación en cultivo en La Junta, Los Cisnes; (f) Estudiante universitario de la UCM realizando una Pasantía; (g) Guía en el desarrollo de tesis; (h) Charlas a escuela; (i) y (j) Estudiantes de Biología de la UDEC realizando su práctica.

Figura 2.11. Talleres de Capacitación y Educación

CONSIDERACIONES FINALES

Para mantener y conservar la viabilidad y las particularidades de los hongos, es necesario desarrollar técnicas que garanticen la conservación de las características fisiológicas y morfológicas de cada aislamiento de estos microorganismos (Ángel, 2006).

Para escoger el método de conservación se debe considerar la especie que se quiere preservar, su propósito de uso, la cantidad de cepas que se desee mantener, y las facilidades de espacio, materiales y equipos disponibles para realizar esta labor (Ángel, 2006).

El Instituto Forestal ha formado un cepario de hongos, principalmente de tipo comestibles y medicinales. Cuenta también con un laboratorio equipado para la aplicación de un método alternativo de conservación a largo plazo, como es la conservación por transferencia periódica o por subcultivo, dentro del cual los intervalos de transferencia variarán según la especie a resguardar, considerando, además, el medio adecuado para cada una de ellas. Sin embargo, esta metodología de resguardo posee algunos inconvenientes, como: incremento de posibilidad de mutación con cada transferencia, con pérdidas de las características del organismo; riesgo de contaminación y alteraciones en el medio de cultivo (Garcia y Uruburu, 2010). Consciente de ello y como una forma de suplir estos inconvenientes, INFOR espera poder implementar a la brevedad un sistema de resguardo que

permita mantener la estabilidad del material a largo plazo a través de sistemas como la criopreservación.

La constitución del banco de cepas de hongos comestibles y medicinales pretende abrir una ventana hacia el conocimiento de la biodiversidad fúngica regional para la sociedad y comunidad científica. Se trata de una herramienta que puede entregar conocimiento de una parte de la flora fúngica nacional, la que podrá ser difundida en el ámbito regional, nacional e internacional. Sin embargo, esto requiere de apoyo técnico permanente para mantener y conservar el material a largo plazo, para las futuras acciones que se lleven a cabo.

El estudio de los microorganismos y de sus metabolitos, entre los cuales se encuentran los hongos, se ha transformado actualmente en un tema de gran importancia, lo que se hace evidente al considerar el gran número de aplicaciones que se les han encontrado y los significativos aportes que representan para el hombre. Por ello, es de suma importancia desarrollar metodologías que permitan la adecuada conservación de los microorganismos, de tal manera que se pueda acceder a ellos de una manera rápida, sencilla y confiable.

La información generada respecto a la presencia de especies fúngicas en sitios diversos (suelo, clima, época de aparición, situación geográfica, vegetación asociada) permitirá una mejor comprensión del comportamiento de estos hongos, lo que ayudará a los futuros trabajos en conservación y uso sostenible del recurso micológico.

CONTACTO

Patricio Chung Guin-Po, Investigador. Encargado de Laboratorio de Micología de Instituto Forestal, Línea de Investigación de Conservación y Mejoramiento Genético Forestal. Calle Nueva Uno 3570. Lote 4, Michaihue. San Pedro de la Paz, Concepción. E-mail: pchung@infor.cl.

SERVICIOS

- Desarrollo de protocolos de conservación de germoplasma micológico *in vitro*
- Capacitación en técnica de inoculación con hongos ectomicorrícicos
- Capacitación en técnicas de cultivo de hongos saprófitos comestibles
- Disponibilidad de material micológico de macrohongos *in vitro* para investigación o el emprendimiento en la producción de hongos comestibles y/o medicinales.

REFERENCIAS

Angel, D. (2006). Evaluación de técnicas de conservación para hongos filamentosos y levaduriformes en el cepario de la Pontificia Universidad Javeriana. Colombia, Bogotá. Trabajo de grado Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. 63 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 p.

Brundrett M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T. and Malajczuk, N. (1996). Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. ACIAR Monograph 32. 374 + x p.

Brundrett, M. and 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, 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 & Investigación Forestal, 26(3): 65-92. *https://doi.org/10.52904/0718-4646.2020.538*

García, M. & Uruburu, F. (2010). La conservación de cepas microbianas. Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). España, Valencia, Universidad de Valencia. *http://www.cect.org/docs/cons.pdf* (Obtenido el 26 de noviembre de 2012).

Hawksworth, D. and 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*

Ipinza, R. y 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. and Ohga, S. (2013). Effects of media formulation on the growth and morphology of ectomycorrhizae and their association with host plant. ISRN Agronomy. Volumen 2013, Article ID 317903, 12 pages. Hindawi Publishing Corporation. *https://doi.org/10.1155/2013/317903*

Martínez de Aragón, J., Oliach, D., Henriques, R. y Bonet, J. A. (2012). Manual de buenas prácticas para la gestión del recurso micológico forestal. Ediciones CTFC, 26 pp.

Ministerio de Medio Ambiente (MMA). (2014). Ficha de antecedentes de especie: *Boletus loyo* Phil. ex Speg. En: *https://clasificacionespecies.mma.gob.cl/wpcontent/uploads/2019/10/Boletus_loyo_11RCE_02_PAC.pdf*. (Consulta: diciembre, 2021).

Mujica, F. y 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.

Saavedra, J. (2004). Análisis del proceso de comercialización de semillas forestales y ornamentales en dos centros de semillas. Memoria para optar al título de Ingeniería Forestal. Universidad De Chile, Facultad de Ciencias Forestales, Escuela de Ciencias Forestales, Departamento de Manejo de Recursos Forestales. 104 p.

Tacón, A. y Palma, J. (2005). Productos Forestales no Madereros. En: Bosques y Comunidades del sur de Chile. Editado por Catalán, R; Wilken, P; Kandzior, A.; Tecklin, A. y H. Burschel. Editorial Universitaria, Chile. Pp: 253-266.

Taller de Acción Cultural (TAC). (2003). Recolectoras de frutos silvestres. Oficio de mujeres en la Región del Biobío. Santiago. Serie de Derechos Laborales. 135 p.

Trappe, J. (1977). Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. Ann Rev Phytolaphol., N°15. Pp: 203–222. *https://doi.org/10.1146/annurev.py.15.090177.001223*

Trappe, J. (1987). Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary standpoint. In: Safir, G.R. (Ed.). Ecophysiology of VA mycorrhizal plants. CRC Press, Boca Raton, FL, Pp: 5–25.

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*

APÉNDICE

LISTADO DE ESPECIES Y CANTIDAD DE CEPAS POR REGIÓN PRESENTES EN EL BANCO DE HONGOS DEL INSTITUTO FORESTAL

N°	Especies	Región de colecta							Total
		O´Higgins	Maule	Ñuble	Biobío	Araucanía	Los Ríos	Los Lagos	
1	*Agaricus arvensis*	0	0	2	0	1	0	2	**5**
2	*Agaricus campestris*	0	1	1	0	0	0	2	**4**
3	*Agaricus xanthoderma*	0	0	0	0	0	0	2	**2**
4	*Agrocybe aegerite*	0	0	1	2	0	0	0	**3**
5	*Amanita gemmata*	0	1	4	6	8	1	0	**20**
6	*Amanita muscaria*	0	0	1	14	12	4	4	**35**
7	*Amanita rubescens*	0	0	0	0	0	2	6	**8**
8	*Armillaria luteobubalina*	0	0	0	0	1	0	0	**1**
9	*Armillaria mellea*	0	0	1	0	2	0	0	**3**
10	*Boletus loyo*	0	0	1	2	1	2	0	**6**
11	*Boletus loyita*	0	0	0	0	2	2	0	**4**
12	*Bovista sp*	2	0	0	1	0	0	0	**3**
13	*Callistosporium luteo-olivaceum*	0	0	0	1	0	0	0	**1**
14	*Chalciporus piperatus*	0	0	0	2	2	0	1	**5**
15	*Clitocybula sp*	0	0	2	5	3	0	0	**10**
16	*Coprinus comatus*	0	0	0	2	0	0	0	**2**
17	*Descomyces sp*	0	0	0	5	0	0	0	**5**
18	*Flammulina velutipes*	0	1	2	1	0	1	0	**5**
19	*Ganoderma australe*	0	0	0	2	0	5	0	**7**
20	*Ganoderma sp*	0	0	0	1	2	0	0	**3**
21	*Grifola gargal*	0	0	1	3	0	13	0	**17**
22	*Gyromitra antarctica*	0	0	1	0	1	0	0	**2**
23	*Gyromitra infula*	0	0	0	0	1	0	0	**1**
24	*Gymnopilus spectabilis*	6	4	2	3	3	0	2	**20**
25	*Hebeloma crustuliniforme*	1	1	4	1	2	0	0	**9**
26	*Hidnangium carneum*	0	0	0	4	1	0	0	**5**
27	*Hypholoma sp*	0	0	1	0	0	1	0	**2**
28	*Hysterangiun sp 1*	0	0	0	6	0	0	0	**6**
29	*Hysterangiun sp 2*	0	0	0	4	0	0	0	**4**
30	*Laccaria laccata*	1	0	0	0	0	0	0	**1**
31	*Lactarius deliciosus*	1	2	4	3	5	6	3	**24**
32	*Lactarius sp*	0	0	1	0	0	0	0	**1**
33	*Lactarius torminosus*	0	0	0	1	0	0	0	**1**
34	*Lenzites betulina*	0	0	1	0	0	0	0	**1**
35	*Lycoperdon perlatum*	1	1	0	0	4	0	0	**6**
36	*Macrolepiota bonaerensis*	0	0	0	2	3	0	1	**6**
37	*Macrolepiota procera*	0	0	0	0	1	0	0	**1**
38	*Macrolepiota rachodes*	0	0	0	0	1	1	2	**4**
39	*Marasmiellus alliiodorus*	0	0	0	1	0	1	0	**2**
40	*Morchella conica*	0	0	1	0	6	0	0	**7**
41	*Morchella elata*	0	0	1	1	0	0	0	**2**
42	*Morchella esculenta*	0	0	1	1	4	1	0	**7**
43	*Morchella sp*	0	0	1	0	1	0	0	**2**
44	*Paxillus involutus*	3	0	1	2	0	0	0	**6**
45	*Paxillus panuoides*	1	2	0	2	6	0	0	**11**
46	*Phlebopus beniensis*	0	1	0	1	1	0	0	**3**
47	*Pleurotus ostreatus*	0	0	1	1	0	1	0	**3**
48	*Ramaria botrytis*	0	0	0	0	0	1	0	**1**
49	*Rhizopogon luteolus*	19	14	7	9	3	1	0	**53**
50	*Rhizopogon roseolus*	4	3	0	0	3	1	0	**11**
51	*Rhizopogon sp*	0	2	2	0	0	0	0	**4**

N°	Especies	Región de colecta							Total
		O´Higgins	Maule	Ñuble	Biobío	Araucanía	Los Ríos	Los Lagos	
52	*Russula sardonia*	0	0	0	2	1	0	1	**4**
53	*Scleroderma citrinum*	0	0	0	4	3	0	0	**7**
54	*Scleroderma sp*	0	0	0	2	0	0	0	**2**
55	*Suillus belliniii*	22	19	3	3	0	1	0	**48**
56	*Suillus granulatus*	3	5	7	3	6	0	1	**25**
57	*Suiillus luteus*	4	15	13	14	28	3	5	**82**
58	*Thelephora terrestris*	3	2	0	0	1	0	0	**6**
59	*Trametes versicolor*	0	0	1	0	0	3	0	**4**
60	*Tricholoma pessundatum*	3	2	1	3	3	0	0	**12**
61	*Tricholoma sp*	1	0	1	0	0	0	0	**2**
62	*Volvariela speciosa*	1	0	1	0	0	0	0	**2**
63	*Xylaria sp*	0	0	0	0	0	5	0	**3**
	TOTAL	**76**	**76**	**72**	**120**	**122**	**54**	**32**	**552**

INFOR

www.infor.cl