

Cultivo in vitro de hongos tipo sombrero

Aníbal Ignacio Fuentes Palacios, Sebastian Rodriguez, Tamara Matute, Isaac Núñez, Daniel Nuñez, Daniela Torres

Abstract

Este protocolo describe los pasos para propagar *in vitro* hongos tipo **sombrero** (Ver [este](#) protocolo para hongos tipo **terrazza**). Este protocolo ha sido desarrollado bajo la guía de Phil Ross (Mycoworks; <https://www.mycoworks.com>).



Citation: Aníbal Ignacio Fuentes Palacios, Sebastian Rodriguez, Tamara Matute, Isaac Núñez, Daniel Nuñez, Daniela Torres Cultivo in vitro de hongos tipo sombrero. **protocols.io**

[dx.doi.org/10.17504/protocols.io.ng4dbyw](https://doi.org/10.17504/protocols.io.ng4dbyw)

Published: 19 Mar 2018

Before start

Al muestrear se debe recolectar todo el cuerpo fructífero que sea posible, cuidando estípites y volvas del hongo.

Las muestras deben ser cultivadas lo antes posible luego de su recolección para aumentar las probabilidades de éxito. Si bien la duración del hongo antes de su descomposición dependerá de las condiciones de almacenaje y el hongo en sí, se recomienda realizar los cultivos dentro de las 24 horas siguientes a la recolección.

El cultivo de las muestras debe hacerse en condiciones de esterilidad.

Finalmente, cabe recordar que si bien, muchos de los hongos que se puedan recolectar son cultivables por este método, existen varios que serán difícilmente cultivable o no podrán ser cultivados. Dado lo anterior, es importante sacar siempre varias muestras y seguir los pasos con la mayor precisión posible para aumentar las probabilidades de éxito.

Materials

- ✓ Bisturí estéril by Contributed by users
- ✓ Pinzas by Contributed by users
- ✓ Mechero by Contributed by users
- ✓ Placas petri by Contributed by users
- ✓ Medio PDA by Contributed by users
- ✓ Cinta by Contributed by users
- ✓ Parafilm by Contributed by users

Protocol

Extracción de tejido

Step 1.

Existen dos métodos para este paso. De ser posible, se recomienda hacer ambos métodos en paralelo para aumentar las probabilidades de un correcto aislamiento.

METODO 1:

Mediante el uso de un bisturí estéril (y pinzas de ser necesario) se debe cortar un pequeño trozo del pie del hongo. Para evitar contaminación con otros microorganismos, el trozo debe ser del centro del

pie y no haber estado en contacto nunca con el ambiente. Para lo anterior se recomienda cortar un pequeño cubo y cortar un cubo cada vez más pequeño desde el anterior, con el fin de obtener parte del hongo que efectivamente no haya estado en contacto con el ambiente. Es importante entonces asegurar que cada corte se realice con un bisturí previamente esterilizado, ya que de lo contrario estaremos arrastrando microorganismos desde el exterior del pie en el bisturí.

METODO 2:

Pegar el trozo de sombrero de hongo bajo la tapa una placa petri. Lo anterior puede hacerse con cinta o algún pegamento instantáneo. El trozo de sombrero debe ser pegado por su lado superior con el fin de dejar expuestos los poros o lamelas del hongo. Es importante asegurarse que el trozo cortado sea lo suficientemente delgado como para no tocar el agar al cerrar la tapa. Las lamelas o poros deben quedar sobre el agar y no tocarlo para que las esporas caigan sobre éste.

Placas

Step 2.

Colocar el pequeño trozo obtenido en una placa de PDA. Es recomendable colocar múltiples trozos para aumentar la probabilidad de éxito. Todas las placas deben ser correctamente selladas con parafilm para evitar su deshidratación.

Primera Incubación

Step 3.

Incubar las placas a temperatura ambiente y privadas de luz durante un tiempo variable 1-15 días. Durante este periodo es necesario revisar las placas diariamente hasta comprobar el crecimiento del micelio dentro o sobre el agar (generalmente de color blanco). El micelio debe ser comparado con el de las otras muestras del mismo hongo cultivadas para confirmar el correcto cultivo.

Traspaso a nueva placa

Step 4.

Una vez se compruebe la aparición del micelio, se debe cortar mediante un bisturí estéril un trozo de agar con micelio y colocar dentro de una placa nueva de PDA.

Segunda incubación

Step 5.

Incubar las placas a temperatura ambiente y privadas de luz durante un tiempo variable 1-15 días (dependiendo del hongo). Durante este periodo es necesario revisar las placas diariamente hasta comprobar el crecimiento puro del micelio dentro o sobre el agar. En el caso de que la muestra se vea contaminada por microorganismos no deseados (eg: otro hongo) se debe repetir los pasos 4 y 5 hasta que en la placa solo aparezca el micelio deseado.

Almacenamiento

Step 6.

Una vez aislado el micelio, las placas pueden ser almacenadas a 4°C durante 2-3 meses. Luego de dicho tiempo es necesario recrecer los hongos en nuevas placas para asegurar su viabilidad.