



Universidad Nacional
de San Martín

“Determinación de los parámetros de cultivo para la producción intensiva de hongos comestibles del género *Oudemansiella* (Basidiomicetes): aportes nutricionales, nutracéuticos y enzimáticos.”

Ing. María Melisa Alberti

Director: Dr. Edgardo Albertó

Laboratorio de Micología y Cultivo de Hongos Comestibles.
INTECH (UNSAM-CONICET)

Tesis para optar por el título de Doctora en Biología Molecular
y Biotecnología de la Universidad Nacional de San Martín

Chascomús, Febrero 2022

Agradecimientos

Quisiera agradecer al CONICET por el financiamiento de mi beca y por los subsidios que permitieron llevar adelante los muestreos y experimentos de este trabajo.

Agradezco a la Universidad Nacional de San Martín y al maravilloso sistema público de educación que tiene nuestro país y que hizo posible la educación de toda mi vida.

Agradezco a mi director, el Dr. Edgardo Albertó, por haber confiado en mí y haberme dado la chance de emprender este camino de la micología, enseñándome tanto y estando siempre predispuesto con infinita paciencia.

Agradezco también a mis compañerxs de laboratorio, quienes hicieron que la UBFungi que me sienta como en casa todos estos años. Les doy gracias por cada una de las enseñanzas y los aportes que hicieron tanto en este trabajo de tesis como en mi vida. Gracias por la confianza y los tan lindos momentos compartidos, pero sobre todo, muchas gracias por estar ahí cuando todo no es tan lindo.

Agradezco a toda la comunidad INTECH, de la cual prácticamente nadie quedó exento de hacer sus aportes y por lo tanto, de permitir la realización de esta tesis. Gracias principalmente a mis chicas del instituto, por la ayuda, el compañerismo, las charlas, las tan ricas comidas y por cada momento compartido.

Gracias al colectivo de MyLGBTIQ del INTECH, que trabaja para hacer de este mundo un lugar más justo.

Agradezco también a algunas personas que hicieron sus aportes desde su experiencia en la micología y desde la vida misma:

A Nicolás Niveiro, que es un genio de la taxonomía y me ayudó constatemente desde el IBONE (haciéndome reír muchísimo).

A Diego Cunha Zied, que me recibió cálidamente en el CECOG, Dracena (Brasil), durante seis meses enseñándome tanto y poniendo a disposición todo el laboratorio de excelencia que dirige. Muchas gracias también a mis compañerxs del CECOG, con quienes no tengo más que palabras de agradecimiento y amor.

Gracias infinitas a mis adoradas meninas de la república Ohana, que me abrigaron el alma.

Gracias también a todas las personas de la UNESP y de Dracena que me acompañaron durante mi estadía y se quedaron para siempre en mi corazón.

Gracias a Ronald Petersen, por haberme mandado el último ejemplar que tenía en sus manos del libro “*The Xerula/Oudemansiella Complex (Agaricales)*”.

Gracias también a Adriana Gazzola, Francina Abastante, Victoria Salinas, Yanina Briñoccoli, Carla Falero, Valeria Sander, Mario Zaparrat, Bernardo Lechner, Diego Higer, y a todas las personas que me brindaron sus conocimientos y herramientas, posibilitando llevar a cabo mis publicaciones científicas y la realización de esta tesis.

Agradezco a todas mis amigxs que tanto me enseñan, me acompañan y me completan los días.

Agradezco a mi familia, que es mi sostén en este mundo. Gracias por tanto amor incondicional, es a ustedes a quienes les dedico esta tesis.

Abreviaturas

Ác.: Ácido

APD: Ágar papa dextrosado

atm.: Atmósfera

Bas.: Basionimia

BA: Bolsas abiertas

BM: Bloques de micelio

BP: Bolsas con perforaciones

BS: *Bootstrapping*:

Diam.: Diámetro

EB: Eficiencia biológica

FR: Frascos de vidrio

Fig.: Figura

Gds.: Gramos de sustrato seco

h: Hora

MV: Máxima verosimilitud

Min.: Minuto

IB: Inferencia bayesiana

IUPAC: Unión internacional de química pura y aplicada

nm: Nanómetro

ml: Mililitro

PBP: Probabilidad Bayesiana Posterior

p/p: Peso en peso

p/v: Peso en volumen

Rfc: Fuerza centrífuga relativa

Rpm: Revoluciones por minuto

Sin.: Sinonimia

TC: Tierra de cobertura

UI: Unidades internacionales

v/v: Volumen en volumen

μM : Micromol

$\mu\text{S/m}$: Microsiemens/ metro

Índice

Abreviaturas	3
Resumen	10
Introducción general	17
Problemática demográfica y alimenticia mundial: los hongos como una fuente de proteína alternativa.	17
Producción global de hongos comestibles: historia y situación actual.	19
Producción de hongos en la Argentina: situación actual y potencial.	21
Los hongos comestibles y sus metabolitos.	23
<i>Oudemansiella</i> : ¿qué sabemos y qué falta saber?	24
Objetivo General	26
Objetivos particulares de la tesis	27
Capítulo 1. Relevamiento y estudio de las especies del género <i>Oudemansiella</i> de la Argentina	28
Introducción	29
Objetivo general	32
Objetivos específicos	33
Materiales y métodos	34
Obtención de materiales	34
Identificación morfológica	34
Análisis moleculares	35

Filogenia Molecular _____	35
Resultados _____	37
Materiales obtenidos _____	37
Clave dicotómica para <i>Oudemansiella</i> y géneros afines presentes en la Argentina. ___	39
El género <i>Oudemansiella</i> en la Argentina _____	40
Filogenia Molecular _____	53
Discusión _____	56
Conclusiones del capítulo _____	58
Capítulo 2. Estudio de los parámetros productivos para la producción intensiva de hongos pertenecientes al género <i>Oudemansiella</i> _____	59
Introducción _____	60
Objetivo general del capítulo _____	64
Objetivos específicos del capítulo _____	65
Materiales y métodos _____	66
Cepas _____	66
Temperatura óptima de crecimiento micelial _____	66
pH óptimo de crecimiento micelial _____	66
Sustrato óptimo de crecimiento micelial _____	66
Tolerancia al carbendazim (Benzimidazol) _____	67
Ensayos de cultivo _____	67
Resultados _____	72
Temperatura óptima de crecimiento micelial _____	72
pH óptimo de crecimiento micelial: _____	73

Sustrato óptimo de crecimiento micelial _____	74
Tolerancia al carbendazim _____	77
Porcentaje de inóculo óptimo para la producción de basidiomas _____	77
Sustrato óptimo para la producción de basidiomas _____	83
Sistema óptimo para la producción de basidiomas _____	87
Discusión _____	94
Conclusiones del capítulo _____	104
Capítulo 3. Composición proximal, perfil de ácidos grasos y capacidad antioxidante de hongos del género <i>Oudemansiella</i> _____	105
Introducción _____	106
Objetivo general del capítulo _____	109
Objetivos específicos del capítulo _____	110
Materiales y métodos _____	111
Cepas _____	111
Composición proximal _____	111
Perfil de ácidos grasos _____	111
Extractos metanólicos _____	112
Contenido de fenóles totales _____	113
Actividad antioxidante por el método de DPPH (2,2-difenil-1-picrylhydrazyl) _____	113
Actividad antioxidante por método de poder reductor del hierro (FRAP) _____	114
Actividad antioxidante por el método ABTS (2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) _____	114
Resultados _____	116
Composición proximal _____	116

Perfil de los ácidos grasos _____	116
Contenido de fenoles totales, actividad antioxidante por el método de DPPH, FRAP y ABTS _____	117
Discusión _____	119
Conclusiones del capítulo _____	124
Capítulo 4. Perfil lignocelulolítico de hongos del género <i>Oudemansiella</i> _____	125
Introducción _____	126
Objetivo general del capítulo _____	130
Objetivos específicos del capítulo _____	131
Materiales y métodos _____	132
Cepas _____	132
Screenings enzimáticos _____	132
Extractos enzimáticos y cuantificación de proteínas totales _____	133
Actividad CMCasa _____	134
Actividad Xilanolítica _____	135
Actividad Lacasa _____	135
Resultados _____	137
<i>Screenings</i> enzimáticos _____	137
Actividad CMCasa _____	137
Actividad Endoxilanasas _____	139
Actividad Lacasa _____	141
Discusión _____	144
Conclusiones del capítulo _____	153

Discusión General	154
Conclusiones generales de la tesis	162
Perpectivas futuras en el estudio de hongos del género Oudemansiella	164
Bibiliografía	167

Resumen

Los hongos comestibles no sólo son capaces de convertir la biomasa lignocelósica en alimentos para los seres humanos, sino que son también una fuente de nutrientes tales como proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales, conteniendo además, compuestos medicinales con grandes beneficios para la salud, lo que le da un valor nutracéutico. Por otra parte, los hongos son muy eficientes para producir proteínas comparado con las fuentes de producción de origen animal, además resultan favorables para el medio ambiente siempre que su producción sea gestionada de manera adecuada, debido a que permite emplear desechos de la agro-industria. A su vez, el cultivo de hongos cuenta con una serie de ventajas, como tener cortos períodos de producción, la inversión económica es inferior comparada a otros alimentos, requiere en general de un bajo nivel tecnológico y su cultivo es independiente de las condiciones ambientales. Por todos estos motivos, la producción de hongos comestibles debería incluirse como una alternativa dentro de un nuevo paradigma de alimentación mundial con el objeto de contribuir a la producción de comida. Con el afán de encontrar nuevas especies de hongos que puedan ser cultivados de forma intensiva y que aporten ventajas productivas o nutricionales, nos centramos en el estudio de las especies del género *Oudemansiella*, que son xilófagas y por lo tanto, cultivables en desechos lignocelulósicos. En el capítulo I de esta tesis el principal objetivo consistió en relevar y estudiar las especies del género *Oudemansiella*. Para abordar el mismo, se realizaron muestreos en diferentes parques provinciales y nacionales en el centro este y noreste de la Argentina, se caracterizaron detalladamente todos los ejemplares muestreados y cuando fue posible, se aislaron las cepas. Luego, se realizó la caracterización y diferenciación taxonómica de los materiales a nivel morfológico y molecular. Como resultados, se obtuvieron 22 colecciones a partir de las cuales se consiguieron aislar 15 cepas y se lograron obtener 20 secuencias de marcadores

moleculares ITS. A partir de análisis taxonómicos, se encontraron dos especies que fueron identificadas como *Oudemansiella canarii* y *O. cubensis*. En el capítulo II hemos evaluado la producción de las especies en estudio. Para ello, nos planteamos el objetivo principal de estudiar los parámetros productivos para la producción intensiva de hongos del género *Oudemansiella* presentes en el país. Primeramente estudiamos el crecimiento micelial a diferentes condiciones de temperaturas, pH y empleando diferentes granos de cereales. Luego, estudiamos la tasa de inoculación óptima, el sustrato de cultivo óptimo y se propuso una metodología para determinar el mejor sistema para inducción de basidiomas de *Oudemansiella*, que además podría aplicarse para cultivar cualquier hongo xilófago por primera vez. Como resultado, se concluyó que para el cultivo de oudemansiellas, la forma óptima para producir inóculo es a 25°C, a un pH inicial neutro o levemente ácido y a partir de granos de sorgo o mijo. La tasa de inculación óptima resultó ser al 10%. Se ensayaron 4 sustratos abundantes en la región: paja de trigo (*Triticum* sp.) aserrín de álamo (*Populus* sp.), aserrín de eucalipto (*Eucalyptus* sp.) y aserrín de pino (*Pinus* sp.) resultando el mejor sustrato la paja de trigo. Se ensayaron 5 sistemas de producción que son representativos de las especies más cultivadas mundialmente a saber: i) bolsas con perforaciones; ii) bolsas abiertas iii) frascos de vidrio; iv) bloques de micelio; v) bolsas con tierra de cobertura. El sistema óptimo de inducción y producción de basidiomas resultó ser el de bolsas plásticas con perforaciones. En los diferentes ensayos realizados se obtuvieron entre 1 y 4 oleadas de basidiomas, el ciclo duró entre 46 y 79 días; y los valores de EB obtenida fueron de hasta 188,52 % para *O. canarii* y hasta 142,24% para *O. cubensis*. En el capítulo III, decidimos estudiar algunas características importantes para un producto alimenticio novedoso. Con esa finalidad, nos planteamos el objetivo principal de estudiar la composición proximal, el perfil de ácidos grasos y la actividad antioxidante de los basidiomas de *Oudemansiella*. Para ello, se

tomaron muestras y se mandaron a analizar a un laboratorio de alimentos, donde se determinó la composición proximal y perfil de ácidos grasos. Por otro lado, se realizaron extractos metanólicos a partir de los cuales se determinó el contenido de fenoles totales y se midió la actividad antioxidante mediante diferentes métodos. Como resultados, se encontró que la composición proximal de ambas especies fue muy similar dando valores promedio de 12% de proteína, 23,58% carbohidratos, 8,87% de grasas, 32,05% de fibras y 11,57 % de cenizas. Respecto al perfil de ácidos grasos, los encontrados mayoritariamente en *O. canarii* fueron el ácido linoleico y el ácido oleico, mientras que en *O. cubensis* los dos principales fueron el ácido linoleico y el palmítico. El contenido de fenoles totales fue similar para ambas especies siendo el valor promedio de 3,27 mg EAG/g extracto. A su vez, se registró actividad antioxidante en los extractos metanólicos de las especies estudiadas y la misma fue variable respecto a los valores reportados para otros hongos comestibles. En el capítulo número IV, se tuvo como principal objetivo el de estudiar las enzimas lignocelulolíticas de las especies obtenidas. Para ello, se realizaron extractos enzimáticos y se midió la actividad endoglucanasa, endoxilansa y lacasa a partir de muestras de sustrato durante las fases de incubación, formación de primordios, fructificación y poscosecha. Como resultado, se determinó que tanto la actividades CMCasa y endoxilanasas son máximas durante la fructificación, mientras que la máxima actividad lacasa es detectada durante la incubación. A partir de los resultados de actividad enzimática en la fase de poscosecha, se presume que el sustrato agotado de las oudemansiellas sería una fuente óptima para el aprovechamiento de endoglucanasas y endoxilanasas que podrían ser empleadas en diferentes industrias o en procesos de bioremediación.

Queremos destacar que en este trabajo la especie *O. cubensis* fue producida en forma intensiva por primera vez a nivel global y es propuesta como una nueva especie cultivable

de hongos comestibles, mientras que *O. canarii* fue producida por primera vez en la Argentina. Dado los desarrollos aquí obtenidos, ambas especies podrán ser empleadas para su producción intensiva en el país.

Palabras claves: Hongos comestibles, Cultivo de hongos, Producción de alimentos, Sustentabilidad, Desechos agroindustriales, enzimas fúngicas.

Abstract

Edible mushrooms are not only capable of converting lignocellulosic biomass into food for humans, but they are also a source of nutrients such as proteins, lipids, carbohydrates, vitamins and minerals, and also contain medicinal compounds with great health benefits, giving them a nutraceutical value. Moreover, mushrooms are very efficient for protein production compared to animal production sources, also, they are environmentally friendly since they allow to recycling of agro-industrial wastes. Mushroom cultivation has a number of advantages, such as they have short growing periods, very low input requirements for production when compared with other food productions, independence from weather conditions and generally, they require simple production technologies. For all these reasons, the production of edible mushrooms should be included as an alternative within a new global food paradigm as a source of food production. In an effort to find new species of mushrooms that can be cultivated intensively and provide productive or nutritional advantages, we focused on the study of species of the *Oudemansiella* genus, which are xylophagous fungi and, therefore, cultivable on lignocellulosic wastes. In the first chapter of this thesis, the main aim was to survey and to study the species of the *Oudemansiella* genus. In order to address this aim, samplings were carried out in different provincial and national parks in central-eastern and northeastern of Argentina. Specimens sampled were detailed described and, when possible, strains were isolated. Then, the characterization and taxonomic identification of the collected materials both at morphological and molecular level were performed. As a result, 22 collections were found, 15 strains were isolated and 20 sequences of ITS molecular markers were obtained. Results showed that there were present only two species which were identified as *Oudemansiella canarii* and *O. cubensis*. In chapter II we focused on the cultivation of

these two species. The main objective of this chapter was to study the productive parameters for the intensive production of *Oudemansiella*. First, we studied the mycelial growth at different temperatures, pH values and using different cereal grains. Then, we evaluated the optimal inoculation rate and the optimal culture substrate. Finally, we proposed a methodology to determine the best system for *Oudemansiella* basidiomes' induction and production that could also be applied to cultivate any xylophagous mushroom for the first time. As results, we found that the optimal way to produce *Oudemansiella* spawn was at 25°C, at a neutral or slightly acid initial pH and using sorghum or millet grains. The optimum inoculation rate was 10%. Four abundant substrates in the region were tested: wheat straw (*Triticum* sp.), poplar sawdust (*Populus* sp.), eucalyptus sawdust (*Eucalyptus* sp.) and pine sawdust (*Pinus* sp.), the best lignocellulosic substrate was wheat straw. Five production systems were tested that are representative of the most cultivated species worldwide, namely: i) bags with holes; ii) open bags iii) glass jars; iv) mycelial blocks; v) bags with cover soil. The optimal system for the induction and production of basidiomes was the system of plastic bags with holes. One to four flushes were obtained; the crop cycle lasted between 46 and 79 days; and the values of EB obtained were up to 188.52 % for *O. canarii* and 142.24% for *O. cubensis*. In chapter III, we studied some features that are important for a novel food product. The main objective for this chapter was to study the proximal composition, fatty acid profile and antioxidant activity of *Oudemansiella* basidiomes obtained in culture. The proximal composition and fatty acid profile were determined in a food analysis laboratory. On the other hand, methanolic extracts were made in order to determinate the content of total phenols and the antioxidant activity by using different methods. As results, it was found that the proximal composition of both species was similar, and the average values were 12% for protein, 23.58% for carbohydrates, 8.87% for fat, 32.05% for fiber and 11.57%

for ash. Regarding the fatty acid profile, the main fatty acids found in *O. canarii* were linoleic acid and oleic acid, while in *O. cubensis* were linoleic acid and palmitic acid. The total phenol content was similar for both species and the mean value was 3.27 mg AGE/g extract. In chapter IV, we studied the lignocellulolytic enzymes produced by the species of *Oudemansiella* that we found. For this purpose, enzyme extracts were made and endoglucanase, endoxylanase and laccase activities were measured from substrate samples during the incubation, primordium formation, fruiting and postharvest phases. We concluded that both CMCase and endoxylanase activities are maximal during fruiting, while the maximum laccase activity is detected during incubation. Based on the results of enzymatic activity found in the postharvest phase, it is presumed that the spent substrate of *oudemansiellas* would be an optimal source for endoglucanases and endoxylanases that could be used in different industries or in bioremediation processes.

We remark that in this work *O. cubensis* was produced intensively for the first time in the world while *O. canarii* was produced for the first time in Argentina. From the results here obtained, both species could be used for intensive production in our country.

Key words: Edible mushrooms, Mushroom cultivation, Food production, Sustainability, Agro-industrial wastes, Fungal enzymes.

Introducción general

Problemática demográfica y alimenticia mundial: los hongos como una fuente de proteína alternativa.

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO 2017), en los próximos 50 años, el planeta necesitará producir más comida que en los últimos 10.000) se calcula que la demanda de proteína se duplicará en 2050 y habrá que alimentar a 9.000 millones de personas. En este contexto de crecimiento demográfico se observan simultáneamente dos escenarios: desnutrición y deficiencia de micronutrientes especialmente en países en vías de desarrollo e incremento de individuos con sobrepeso en los países desarrollados (Pingali *et al.* 2019). El primer escenario significa una de las necesidades de salud pública más urgentes a resolver. Paradójicamente, una parte importante de la población presenta serios problemas de sobrepeso, lo que aumenta la incidencia de varias enfermedades crónicas tales las coronarias, la diabetes tipo II y algunos tipos de cáncer (Hu 2011; Pan *et al.* 2012). En cuanto al tipo de alimentos consumidos, en los últimos años, se registró un incremento en el consumo de alimentos procesados, azúcares y grasas refinadas, y sobre todo de proteína de origen animal (Tilman y Clark 2014). La producción de proteína animal es muy costosa para el ambiente y una razón de dicho costo es la eficiencia (o ineficiencia) de la conversión de los alimentos en tejidos animales, siendo los rumiantes los animales más ineficientes para convertir alimentos en carne (Morawicki y Díaz 2018). A su vez, el progresivo aumento de alimentos de origen animal requiere también, un aumento de la superficie utilizada para la producción de forraje (Arrieta 2014) que actualmente ocupa un asombroso 75% del total de las tierras agrícolas del mundo (Foley *et al.* 2011). Además, la cría de animales tiene un profundo impacto negativo en las propiedades del

suelo (Steinfeld 2006) y en la liberación de gases de efecto invernadero (Morawicki y Díaz 2018). Por todo esto, la producción futura de proteínas a partir de fuentes alternativas a la animal representa un desafío para la salud pública y para el ambiente. Entre las alternativas se encuentran los hongos comestibles, que tienen una eficiencia muy superior de conversión de proteína por unidad de área y de tiempo, comparado con las fuentes de proteína animal (bovinos, peces y pollos) (Escobedo 2006). Otra de las ventajas de los hongos comestibles, es que debido a su naturaleza descomponedora, pueden producirse a partir de residuos lignocelulósicos. La lignocelulosa (celulosa, hemicelulosa y lignina) es el principal componente estructural de las paredes celulares vegetales y por lo tanto, es uno de los principales desechos de las actividades agroindustriales y representa la principal fuente renovable de carbono y energía del planeta. Sin embargo, debido a su estructura compleja y heterogénea, la bioconversión de dicho componente es lenta y limitada a unos pocos organismos (Ruegger *et al.* 2001). Los hongos comestibles, no sólo son capaces de convertir la biomasa lignocelulósica en alimentos para los seres humanos, también son considerados alimentos nutraceuticos. Los “nutraceuticos” (contracción de nutrición y farmacéutico) son aquellos productos alimenticios que se cree que tienen un efecto beneficioso para la salud o para la prevención de enfermedades crónicas. En la definición más amplia, el término incluye a los alimentos funcionales, a los suplementos dietarios y a los alimentos medicinales (Bidegain 2017).

El producto resultante del cultivo de hongos, es un alimento de agradable aspecto y sabor (Chang 1999). Si bien el contenido de proteína en los hongos puede variar desde 4 a 9 % para algunas especies, para otras se pueden obtener valores tan altos como hasta 44 % en peso seco (Crisan y Sands 1978). A su vez, muchos hongos poseen todos los aminoácidos esenciales en proporciones ideales para la nutrición humana (Turlo *et al.* 2008). Por otra

parte, los hongos comestibles representan una fuente de nutrientes como carbohidratos, vitaminas, y minerales, entre otros (Cuesta y Castro-Ríos 2017).

Además de su superioridad en la conversión de proteínas, si la producción de hongos comestibles es gestionada de manera adecuada, tiene un balance de cero emisiones de gases de efecto invernadero (Chang 1999). A su vez, los hongos tienen cortos períodos de producción, la inversión económica para producirlos es inferior comparada a otros alimentos, requieren, en general, un bajo nivel tecnológico y son independientes de las condiciones ambientales (Rosmiza *et al.* 2016). Por todos estos motivos, la producción de hongos comestibles podría y debería incluirse como una alternativa dentro de un nuevo paradigma de alimentación, contribuyendo a la resolución de los dos escenarios problemáticos mencionados anteriormente: producción de alimentos en países en vías de desarrollo y mejora en la calidad nutricional de los alimentos de los países desarrollados.

Producción global de hongos comestibles: historia y situación actual.

Se estima que la primera especie de hongos en ser cultivada fue *Auricularia auricula* en el año 600 d. C., luego, *Flammulina velutipes*, alrededor de los años 800-900 seguido por *Lentinula edodes* entre los años 1000-1100, todas ellas en China. *Agaricus bisporus*, por su parte, comenzó a cultivarse alrededor de los años 1650 en Francia, y los primeros reportes de las técnicas utilizadas para el cultivo datan en el 1707, siendo que las mismas no distan demasiado de las metodologías utilizadas actualmente (Singh y Mishra 2005). Sin embargo, fue en China en el año 1245 d. C. donde Chen Yen-Yu publicó uno de los primeros reportes detallados de “fungus flora”, describiendo el desarrollo, la morfología,

la influencia estacional, los métodos de cultivo, la cosecha y la preparación de comidas para 15 variedades de hongos (Wang 1987).

Actualmente, pesar de que decenas de hongos han sido domesticados y son producidos en cultivo, son pocas las especies cultivadas a gran escala: el shiitake (*L. edodes*), los hongos ostras o gírgolas (nombre sólo utilizado en la Argentina y el Uruguay) (*Pleurotus* spp.), la oreja de cerdo *A. auricula* y *A. polytricha*), los champiñones (*A. bisporus*) y el enokitake (*Volvariella* spp.) componen el 90% de la producción a nivel mundial (Fig. 1) (Royse *et al.* 2017). Cabe destacar que el champiñón, si bien actualmente ocupa el cuarto lugar, continúa siendo el más ampliamente cultivado en varios países (especialmente en Occidente) y uno de los más aceptados por los consumidores, teniendo además el mayor desarrollo tecnológico (Dhar 2017).

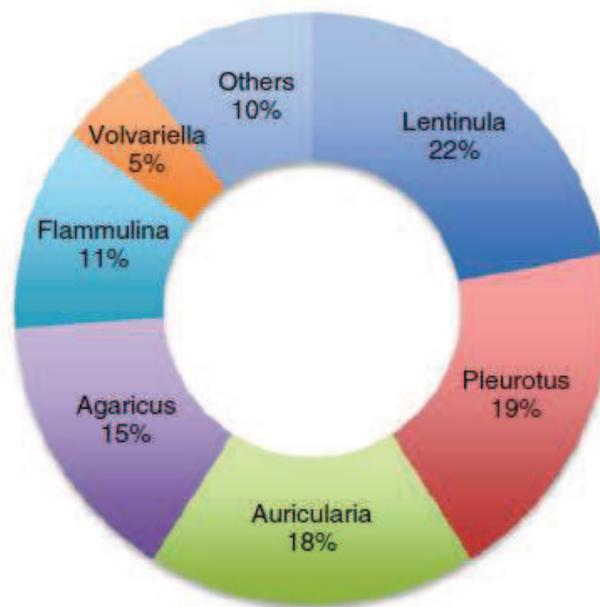


Figura 1. Producción mundial de los distintos géneros de hongos comestibles. Fuente: Royse *et al.* 2017.

En cuanto al mercado de hongos, fue valuado en 63 mil millones de dólares observándose que la producción mundial de hongos cultivables crece sostenidamente desde hace muchos años. Por ejemplo, se estima que creció más de 30 veces desde 1978, mientras que la población humana sólo creció 1,7 veces en el mismo período, lo que significa que se incrementó extraordinariamente el consumo per cápita, que pasó de ser 1 kg en 1997 a superar los 4,7 kg en el año 2013 (Royse *et al.* 2017).

Respecto a la cantidad y la producción total (incluyendo las trufas) es de 42,79 millones de toneladas, de las cuales China es el productor de casi 18,62 millones de toneladas (43%). Otros grandes productores son Japón (441 mil toneladas), Estados Unidos (385 mil toneladas), Países Bajos (267 mil toneladas), Italia (186 mil toneladas), Polonia (177 mil toneladas), Francia (144 mil toneladas), España (129 mil toneladas), Canadá (98 mil toneladas) y Reino Unido (91 mil toneladas) (FAO 2020).

En cuanto a Latinoamérica, la producción está también en continuo crecimiento y las expectativas son prometedoras. México encabeza la lista de producción con 63,7 mil toneladas, seguido por Brasil (15,6 mil toneladas), Chile (12 mil toneladas), Colombia (8 mil toneladas) y Argentina (4,5 mil toneladas) (Sánchez *et al.* 2018).

Producción de hongos en la Argentina: situación actual y potencial.

La Argentina no es un gran consumidor de hongos por una cuestión cultural, se cree que el consumo de hongos proviene de inmigrantes europeos a comienzos del siglo pasado (Albertó y Gasoni 2003). Actualmente no hay estadísticas oficiales del consumo de hongos, y los datos son estimativos e inferidos a partir del número de establecimientos de producción, la capacidad productiva y la cantidad de inóculo adquirido (Albertó y Gasoni

2003). Se estima que la producción actual ronda las 4500 toneladas (Sánchez *et al.* 2018) lo que da consumo aproximado de 100g/hab/año.

En 1941 comenzaron los primeros cultivos de champiñón (*A. bisporus*) y convirtieron a la Argentina en el primer país en Sudamérica en cultivar hongos. La producción de champiñón se concentra en unos pocos productores del centro del país. La segunda especie cultivada son las gírgolas (*Pleurotus* spp.) que por contrario del champiñón, son producidas por varios productores pequeños que trabajan en escala artesanal. En cuanto al shiitake (*L. edodes*), su cultivo comenzó hacia finales de los 90, aunque no ha prosperado demasiado en el tiempo debido a la baja aceptación por parte de los consumidores o bien a disponibilidad de shiitake seco proveniente de China a un bajo costo (Sánchez *et al.* 2018).

Como mencionamos anteriormente, los hongos comestibles pueden producirse a partir de desechos agroindustriales (Colavolpe y Albertó 2014) y esta es una de las razones que vuelve más atractiva la producción de hongos xilófagos en los países como la Argentina, donde existe una amplia disponibilidad de sustratos lignocelulósicos que pueden conseguirse a bajo costo o incluso en forma gratuita (Poppe 2005).

En la Argentina se generan unas 90 millones de toneladas de residuos agrícolas y el 80 por ciento de esos residuos corresponden a cultivos de maíz y caña de azúcar (Vanoy *et al.* 2015). Si bien no sería conveniente remover del campo la totalidad de los residuos agrícolas, debido a los beneficios que aportan al sistema de siembra directa, se estima que se puede remover hasta un 40% de dichos residuos, manteniendo los riesgos de erosión por debajo de los límites tolerables (Sheehan *et al.* 2004). Entonces, considerando la disponibilidad de 35 millones de toneladas y estimando una eficiencia biológica promedio del 50% (lo que es un valor bajo), nuestro país tiene un potencial de producción anual de 17,5 millones de toneladas de biomasa de hongos.

Los hongos comestibles y sus metabolitos.

Los basidiomicetes, son un grupo de hongos superiores adaptados a muchos climas, hábitats y sustratos, que hace que su micelio y cuerpos fructíferos (basidiomas) estén expuestos a predadores y competidores, lo que probablemente alentó el desarrollo de una variedad muy diversa de metabolitos secundarios. Entre ellos se encuentran los compuestos antibióticos, insecticidas, repelentes (Anke y Schüffler 2018), toxinas (Bresinsky y Besl 1985), compuestos alucinógenos (Schultes y Hofmann 1980), antifúngicos, nematocidas (Sidorova y Voronina 2019) y pigmentos (Gill y Steglich 1987). Muchos de estos metabolitos, sobre todo los antibióticos, son considerados una potencial fuente alternativa para tratar con bacterias que se han vuelto resistentes a varios principios activos ampliamente usados (Vallavan *et al.* 2020).

Entre las propiedades medicinales atribuibles a los hongos comestibles, se encuentran las de antitumorales (Vetchinkina *et al.* 2016), antivirales, inmunomoduladoras, hipocolesterolemicas, hipoglucémicas, antiinflamatorias, analgésicas, prebióticas, reguladores de la presión arterial y antioxidantes (Duarte Trujillo 2018). Si bien los componentes que les otorgan las propiedades medicinales a ciertos hongos no han sido totalmente clarificados, se han aislado polisacáridos tales como los hetero- β -glucanos, complejos proteicos, así como también fibra dietaria, lectinas, terpenoides, que se cree que son responsables de algunos de sus beneficios nutraceuticos (Wasser y Weis 1999). A su vez, los polifenoles, vitaminas, carotenoides y minerales, les otorgan fundamentalmente las propiedades antioxidantes (Kozarski *et al.* 2015).

Otros metabolitos de interés, que son secretados al medio para llevar a cabo la característica digestión extracelular de los hongos son las enzimas. En el caso de los hongos xilófagos, estas enzimas son capaces de degradar la celulosa y/o la lignina. Para

ello, poseen distintos sistemas enzimáticos, uno de ellos está formado por las hidrolasas responsables de la degradación de los polisacáridos como la celulosa, otro grupo está formado por las monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMO's), que catalizan la despolimerización oxidativa de polisacáridos insolubles recalcitrantes (Eibinger *et al.* 2014) y el tercer grupo es el sistema oxidativo ligninolítico que rompe los anillos de la lignina (Malherbe y Cloete 2002).

El potencial lítico de dichas enzimas les da a los hongos un interés industrial muy importante ya que pueden utilizarse como componentes de detergentes para lavar ropa, productos para la clarificación de vinos y cervezas, en la industria del papel, del bioetanol, del aceite y en proyectos de biorremediación (Kuhad *et al.* 2011; Malherbe y Cloete 2002; Ortiz *et al.* 2015; Ovando-chac *et al.* 2005; Treu y Falandysz 2017).

En el caso de la producción de hongos comestibles, el sustrato agotado constituye una fuente interesante de enzimas que podrían extraerse para ser usadas en procesos industriales (Pérez-Chávez *et al.* 2019).

***Oudemansiella*: ¿qué sabemos y qué falta saber?**

El género *Oudemansiella* Speg. incluye un grupo de basidiomicetes comestibles de pudrición blanca, pertenecientes a la familia Physalacriaceae (Alberti *et al.* 2020a; Moncalvo *et al.* 2002). Las especies de este género, están distribuidas en todo el mundo (sobre todo en zonas templadas) y se caracterizan por tener una buena apariencia, un contexto carnoso y un sabor y olor suaves lo que las vuelve atractivas para su consumo y por ende para su producción intensiva.

El género *Oudemansiella* fue estudiado en diferentes aspectos: i) su potencial de biorremediación y sus metabolitos de utilidad biotecnológica (Wang *et al.* 2018); ii) su cultivo intensivo (Xu *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2018) y iii) su posición taxonómica

(Petersen y Hughes 2010). En este último aspecto, puede decirse que el concepto del género *Oudemansiella* fue drásticamente modificado a partir de los estudios de sus marcadores moleculares, y como consecuencia de ello, el número actual de especies se redujo a 36 (Alberti *et al.* 2020b). De este modo, algunas especies ampliamente conocidas tales como *O. radicata* y *O. mucida* fueron transferidas a los géneros *Hymenopellis* y *Mucidula*, respectivamente (Petersen y Hughes 2010).

Sólo tres especies han sido reportadas en cultivo, *O. canarii* (Ruegger *et al.* 2001; Xu *et al.* 2016), *O. submucida* (Li *et al.* 2012) y *O. tanzanica* (nom prov) (Magingo *et al.* 2004); y en algunos de estos reportes, no se especificaron los sustratos utilizados ni se detallaron totalmente las metodologías empleadas, por lo que la información para su cultivo es muy escasa. En nuestro país, no se han reportado trabajos de investigación acerca de la optimización de las condiciones de cultivo para su producción intensiva. Por lo tanto, nuevos estudios sobre la caracterización y optimización de la producción de las especies de *Oudemansiella* así como también de los parámetros de crecimiento son necesarios lograr conocer su potencial como hongo comestible, y de ser oportuna, lograr la expansión como especie cultivable a nivel mundial.

Objetivo General

- Caracterizar y optimizar la producción de las especies de *Oudemansiella* para conocer e informar su potencial productivo, y de ser oportuna, proponer su inclusión dentro del acervo mundial de hongos comestibles cultivables.

Objetivos particulares de la tesis

- Relevar y estudiar las especies del género *Oudemansiella* del centro este y noreste de la Argentina.
- Estudiar los parámetros productivos para la producción intensiva de hongos pertenecientes al género *Oudemansiella*.
- Estudiar la composición proximal, perfil de ácidos grasos y capacidad antioxidante de hongos de las especies del género *Oudemansiella* encontradas en la Argentina.
- Estudiar el perfil lignocelulolítico de las especies de hongos del género *Oudemansiella* encontradas en el país.



CAPITULO 1

**Relevamiento y estudio de las especies
del género *Oudemansiella* de la Argentina**

Introducción

El género *Oudemansiella* Speg. (Basidiomycota, Physalacriaceae) fue propuesto en base a *A. platensis* Speg. (Spegazzini 1880a) y combinado en *Oudemansia* Speg. (Spegazzini 1880b). Un año más tarde, este fue reemplazado por *Oudemansiella* (Spegazzini 1881) porque *Oudemansia* era un género existente dentro de la familia de plantas Malvaceae. En la diagnosis, Spegazzini (1880b, 1881) caracteriza a este género por su estípite central sin velo, sombrero hemisférico, carnoso, no deliquescente, y laminillas membranosas, primero connatas, luego libres. Los caracteres diagnósticos para delimitar *Oudemansiella* descritos por Spegazzini (1881) eran demasiado amplios y comunes a la mayoría de los hongos agaricoides (Petersen y Hughes 2010) y con el paso de los años el concepto del género fue cambiando. Algunos autores (Cléménçon 1979; Moser 1955; Pegler y Young 1986; Singer 1962a, b; Singer 1964; Singer 1986; Yang *et al.* 2009) consideraron a *Oudemansiella* como un género amplio que incluía otros géneros como *Xerula* Maire y *Mucidula* Pat. Por el contrario, otro grupo de autores (Boekhout y Bas 1986; Boekhout 1999; Contu 2000; Corner 1994; Corner 1996; Dörfelt 1979; Horak 2005; Halling y Mueller 1999; Mueller *et al.* 2001; Petersen 2000, 2008a,b,c; Petersen y Baroni 2007; Petersen y Halling 1993; Petersen y Hughes 2005; Petersen y Methven 1994; Petersen y Nagasawa 2006; Redhead *et al.* 1987) consideraron a *Oudemansiella*, *Xerula*, y *Mucidula* como géneros separados. Un tiempo después, Yang *et al.* (2009) y Petersen y Hughes (2010) resumieron la historia taxonómica del complejo *Oudemansiella* y *Xerula*. Con el advenimiento de los estudios moleculares, *Oudemansiella* fue colocado en la familia Physalacriaceae. Petersen y Hughes (2010) completaron los previos estudios morfológicos y moleculares y propusieron cuatro géneros nuevos (*Hymenopellis* R.H. Petersen, *Paraxerula* R.H. Petersen, *Pointiculomyces* R.H. Petersen, y *Protoxerula* R.H. Petersen), y redefinieron otros géneros preexistentes (*Dactylosporina* [Cléménçon]

Dörfelt, *Mucidula*, *Oudemansiella* y *Xerula*). Finalmente, el género *Oudemansiella sensu stricto* ha quedado circunscripto a especies con pileo seco a generalmente viscido, usualmente con escamas, laminillas crémeas a blancas subdistantes, y estípites central que comúnmente no tiene anillo o bien este es rudimentario o fugáceo. Microscópicamente, las basidiosporas están caracterizadas por ser de grandes medidas, globosas a subglobosas y con esporada blanca, sus pleuro y quelocistidios están bien desarrollados y su pileipellis está compuesta por un policistodermo o ixotricodermo de hifas con formas variables que van desde desde subesféricas, esféricas, barriliformes, fusiformes o filamentosas (Petersen y Hughes 2010). A partir de estos estudios, el número de especies dentro de *Oudemansiella sensu stricto* ha sido delimitado y actualmente son 36 las especies reconocidas por el *Index Fungorum* (2022), las mismas tienen una amplia distribución mundial, pero se sitúan principalmente en las zonas tropicales a templadas (Yang *et al.* 2009).

La identificación morfológica de las especies de *Oudemansiella* es usualmente compleja y puede ser ambigua, especialmente para *O. canarii* (Jungh.) Höhnelt. y *O. cubensis* (Berk. y M.A. Curtis) R.H. Petersen, ya que comparten gran cantidad de características por lo cual han sido consideradas erróneamente como sinónimos por varios autores (Horak 1968; Niveiro y Albertó 2012; Pegler y Young 1986; Singer 1986; Wright y Albertó 2002). Por tal motivo, muchas citas y descripciones de dichas especies no deberían ser tenidas en cuenta como material de consulta para realizar tareas de identificación, al menos hasta que se lleven a cabo nuevas revisiones de los materiales de herbario. Por otro lado, los datos moleculares de las especies de *Oudemansiella* son escasos y en general no están acompañados por sus correspondientes descripciones morfológicas, motivo por el cual podrían llevar a errores de identificación. En la Argentina, las especies de *Oudemansiella sensu lato* fueron citadas por Spegazzini (1880b, 1881, 1899, 1926),

Singer (1950), Singer y Digilio (1952), Singer (1964), Raithelhuber (1979, 1987, 1991, 1995, 2004), Wright y Albertó (2002), Wright *et al.* (2008) y Wright y Wright (2005), sin embargo, no hay descripciones recientes o ilustraciones detalladas y la información prácticamente no existe. Los objetivos de este capítulo fueron describir e ilustrar las dos especies de *Oudemansiella sensu stricto* encontradas en la Argentina en base a nuevas colecciones, datos de cultivo y análisis filogenéticos de sus marcadores moleculares ITS.

Objetivo general

- Releva y estudiar las especies del género *Oudemansiella* del centro este y noreste de la Argentina.

Objetivos específicos

- Realizar muestreos y recolectar ejemplares del género *Oudemansiella* en la Argentina.
- Aislar, preservar las cepas obtenidas e incorporarlas al cepario del IIB-INTECH.
- Identificar morfológicamente las especies de los ejemplares hallados.
- Describir detalladamente la morfología de las especies halladas.
- Proponer una clave dicotómica que contribuya a la identificación de especies en la Argentina.
- Secuenciar los marcadores moleculares ITS para las especies halladas.
- Realizar un análisis filogenético a partir de las secuencias ITS utilizando información proveniente de otras bases de datos (Gen Bank).
- Aportar información genética a las bases de datos Bar Code y Gen Bank.

Materiales y métodos

Obtención de materiales

Se realizaron numerosos muestreos a lo largo de las provincias de Misiones, Corrientes y Buenos Aires. Los materiales colectados fueron fotografiados y aislados en medio de cultivo agar papa dextrosado (APD 39 g/l, Britania TM, Argentina). Las cepas aisladas fueron conservadas en la Colección de Cultivos fúngicos del INTECH (ICFC) con referencia en el *World Data Centre for Microorganisms* (WDCM) bajo el número 826. Los materiales secados fueron colocados en el freezer por una semana y luego fueron depositados en el herbario CTES.

Identificación morfológica

Para la identificación morfológica, los especímenes recolectados fueron analizados macro y microscópicamente siguiendo los criterios y la terminología propuesta por Alexopoulos y Mims (1985), Lodge *et al.* (2004) y Vellinga (1988). Para los colores, se utilizó la terminología propuesta por Kornerup y Wanscher (1978). Las observaciones microscópicas se realizaron a partir de trozos de material montados con solución al 5% KOH (v/w), floxina acuosa al 1%, azul de metileno al 1% y reactivo de Melzer para verificar reacción amiloide (Wright y Albertó 2002). Las estructuras microscópicas fueron medidas directamente a través de fotografías tomadas con el estereoscopio Zeiss Discovery V20 SteREO utilizando el software ZEN 2.6 (Blue Edition) o a partir del microscopio BX 43 Olympus usando el software Cell standard 3.0. Para las basidiosporas, “n=” indica el número de basidiosporas medidas, “x=” promedio, “Q=” el valor Q (largo/ancho), y “Qx=” el valor promedio de Q. Los nombres científicos corresponden a los aceptados por el *Index Fungorum* “Authors of Fungal Names” (Index Fungorum, 2022), y los acrónimos de los herbarios con *Index Herbariorum* (Thiers 2022). Con el

objetivo de caracterizar el desarrollo de los basidiomas desde el estado de primordio hasta la completa madurez los basidiomas fueron cultivados en bolsas con perforaciones sembradas al 10% y utilizando paja de trigo como sustrato (ver capítulo 2).

Análisis moleculares

La extracción de ADN se realizó de dos formas: (1) a partir de proyecto *Barcode of Life* siguiendo el protocolo de Ivanova y Grainger (2006), y (2) utilizando el kit EasyPure® Plant Genomic DNA siguiendo los protocolos recomendados por los fabricantes. La amplificación por PCR fue realizada siguiendo los protocolos de Ivanova *et al.* (2008). El espaciador transcrita interno (ITS, del inglés *Internal Transcribed Spacer*) fue amplificado usando el set de primers específico para basidiomicetes: ITS1-F y ITS4-B (Gardes y Bruns 1993). Para aquellas muestras procesadas a partir de proyecto *Barcode of Life*, los productos de PCR fueron secuenciados en el *Canadian Centre for DNA Barcoding* (CCDB). Para el resto de las muestras, los productos de la PCR fueron secuenciados en Macrogen, Korea.

Filogenia Molecular

El conjunto de datos fue compilado utilizando 15 secuencias nuestras y 21 secuencias seleccionadas desde GenBank, en base a los resultados del BLAST. *Hymenopellis radicata* (Rehhan: Fr.) R.H. Petersen y *Xerula pudens* (Pers.) fueron usadas como *outgroups*. La edición de las secuencias y el alineamiento fueron realizados en el BioEdit (versión 7.2.5). Las secuencias fueron alineadas bajo el criterio Clustal IW. La reconstrucción filogenética fue inferida usando estimación por máxima verosimilitud (MV) e inferencia bayesiana (IB), separadamente. El mejor modelo evolutivo para MV fue TrN+G; y fue estimado usando criterio de información bayesiana (BIC) con el

software jModelTest2 (version 1.6) (Darriba *et al.* 2012; Guindon y Gascuel 2003). El mejor modelo evolutivo para IB fue GTR+I+G. Las estimaciones de máxima verosimilitud fueron calculadas usando el software MEGA X (Kumar *et al.* 2018). El soporte estadístico para la filogenia resultante fue evaluado por bootstrapping con 1000 réplicas (Felsenstein 1985). La inferencia bayesiana fue realizada en el MrBayes 3.2.7 (Ronquist *et al.* 2012) y fue realizada con dos series simultáneas de cuatro cadenas de Markov Monte Carlo. Estas fueron realizadas para 10^6 generaciones, con un muestreo cada 100 generaciones y con un burnin de 1001 generaciones. El consenso final se basó en 17959 árboles usados para estimar las probabilidades posteriores. Se mostrará únicamente la topología del árbol de MV, indicando los valores de soporte de Probabilidad Bayesiana Posterior/*Bootstrapping* (PBP/BS) en cada nodo. Se consideró como fuerte un nodo con un valor de PBP $\geq 0,95$ y/o BS $\geq 90\%$, y como moderado a aquel cuyo BPP $\geq 0,90$ y/o BS $\geq 70\%$.

Resultados

Materiales obtenidos

Los materiales obtenidos, los lugares de colecta, los códigos de cepario y los códigos de acceso de las secuencias en las bases de datos se muestran en la Tabla 1. Todos los materiales fueron incorporados al herbario CTES y cuando fue posible fueron aislados, para ser incorporados al cepario del INTECH (ICFC). Además, se logró obtener la secuencia ITS de 20 ejemplares muestreados, y las mismas fueron incorporadas a las bases de datos GenBank y/o Barcode (Tabla 1).

Tabla 1. Listado de materiales obtenidos, lugares de colecta, códigos de cepario y códigos de accesos a las secuencias ITS en las bases de datos.

Voucher	Especie	Provincia	Lugar de colecta	Código cepario	Código Gen Bank	Código Barcode
MA2	<i>O. cubensis</i>	Corrientes	Estancia Las lagunas	852/17	MT272118	ADA083-17
MA3	<i>O. cubensis</i>	Buenos Aires	Reserva Natural Municipal Santa Catalina	863/17	MT271884	ADA105-17
MA4	<i>O. canarii</i>	Buenos Aires	Reserva Ecológica Costanera Norte	853/17	MT272117	ADA040-17
13v	<i>O. canarii</i>	Misiones	Parque Nacional Iguazú	864/17	MT271880	ADA 016-17
14v	<i>O. canarii</i>	Misiones	Parque Nacional Iguazú	865/17	MT272111	ADA056-17
15v	<i>O. canarii</i>	Misiones	Parque Nacional Iguazú	866/17	MT271881	ADA103-17
16v	<i>O. canarii</i>	Misiones	Parque Nacional Iguazú	867/17	.	ADA084-17

17v	<i>O. canarii</i>	Misiones	Parque Nacional Iguazú	868/17	.	ADA070-17
22v	<i>O. canarii</i>	Misiones	Reserva Stricta San Antonio	869/17	MT271883	ADA 011-17
68v	<i>O. canarii</i>	Misiones	Parque Provincial Moconá	870/17	MT273085	ADA085-17
93v	<i>O. canarii</i>	Misiones	Parque Provincial Moconá	871/17	.	.
33v	<i>O. canarii</i>	Misiones	San Antonio	.	MT271882	ADA039-17
36v	<i>O. canarii</i>	Misiones	San Antonio	.	MT272113	ADA063-17
43v	<i>O. canarii</i>	Misiones	Bosque de araucarias de Inta San Antonio	.	.	ADA102-17
57v	<i>O. canarii</i>	Misiones	Reserva Privada Yaguaroundí	.	.	ADA101-17
60v	<i>O. canarii</i>	Misiones	Reserva privada Yasí Yareté	.	.	ADA021-17
MA5	<i>O. canarii</i>	Corrientes	Corrientes	872/17	MT272119	.
MA6030	<i>O. canarii</i>	Misiones	Parque Provincial Moconá	875/17	MT272112	.
MA3325	<i>O. canarii</i>	Misiones	Parque Provincial Profundidad	873/17	MT272114	.
MA3326	<i>O. canarii</i>	Misiones	Parque Provincial Teyu Cuare,	874/17	MT272115	.
MA3327	<i>O. canarii</i>	Misiones	Parque Provincial Teyu Cuare	.	.	.
MA3328	<i>O. canarii</i>	Misiones	Parque Provincial Teyu Cuare	.	MT272116	.

Clave dicotómica para *Oudemansiella* y géneros afines presentes en la Argentina.

En la siguiente clave encontraremos las especies de *Oudemansiella* y las especies afines reportadas en la Argentina. Como especies afines se tuvieron en cuenta a aquellas que alguna vez fueron consideradas como pertenecientes al género pero que ahora han sido reclasificadas y trasladadas a otros géneros.

1. Basidiosporas ornamentadas.....2
- 1' Basidiosporas lisas.....3
2. Píleo de 15-85 mm diam., marrón a marrón rojizo (umbrinous), subvísido, pleurocistidios ventricosos con extremos agudos.....*Dactilosporina steffeni*
- 2' Píleo de 6-45 mm diam., marrón oscuro, seco a subvísido, pleurocistidios utriformes
.....*Dactilosporina macracantha*
3. Baidiomas con setas en la superficie.....*Xerula setulosa*
- 3'. Basidiomas sin setas.....4
4. Píleo víscido a glutinoso durante todo el desarrollo, marcadamente convexo, anillo presente.....*Mucidula mucida*
- 4'. Píleo víscido cuando joven, volviéndose seco en el desarrollo, plano a plano convexo, anillo ausente.....5
5. Pie radicante.....*Hymenopellis radicata*
- 5'. Pie no radicante.....6
6. Pileipellis compuesta por una capa superficial compuesta por un ixotricodermo de células expandidas.....*Oudemansiella canarii*

6'. Pileipellis compuesta por una capa superficial formada por un policistodermo formado por cadenas de células progresivamente infladas.....*Oudemansiella cubensis*

El género *Oudemansiella* en la Argentina

Oudemansiella canarii (Jungh.) Höhnelt. Fig. 2-3.

Sitzgber. K. Akad. Wiss., Wien, math.- nat. Kl. 118: 276. 1909.

Tipo: Indonesia, Parque Natural Java. Mt. Halimun Nat. Park, sendero bucle de Cikiniki, -1000 m de elevación, 8 de enero de 1999, DE Desjadin, DED6886 (Neotipo: SFSU, BO; Holotipo: no preservado, ex herbario Junghuhn).

Bas: *Agaricus canarii* Jungh. Praemissa in floram cryptogamicam Javae Insulae, Fasc. 1: 82. 1838.

Basidiomas gregarios en pequeños grupos, xilófagos (Fig. 2A). ***Pileo*** de hasta 65 mm de ancho, hemisférico-convexo cuando joven, luego plano-convexo a plano (Fig. 2B). Superficie marcadamente glutinosa cuando joven, embebida en un mucílago translúcido que desaparece con la madurez, siendo higrófilo marrón oscuro (7F4-6) cuando joven, que se va aclarando y secando pasando por tonos naranja-amarronados (7C4-6), amarillo-amarronados (5D-E4), finalmente crémeos (4A2-3) en el centro y crémeos (2A2) a blancos (2A1) en el margen a la madurez. Glabros u ocasionalmente con escamas más o menos organizadas en escalas (más pequeñas hacia el centro y más grandes hacia los márgenes) que van de marrón oscuras (7F4-6) a marrón claras (5D-E4) y en especímenes jóvenes se encuentran embebidas en una sustancia glutinosa. Márgenes suaves con pequeños fragmentos de velo cuando jóvenes. ***Contexto*** delgado de hasta 2 mm, blanco (2A1) a pálido (2A2), aroma farináceo que se acentúa y se vuelve dulce cuando se seca. ***Laminillas*** adnatas con pequeño diente decurrente cuando jóvenes (Fig. 2C), luego adnatas a anexas, ventricosas a ampliamente ventricosas, blancas cuando jóvenes (1A1)

y veces pálidas (2A2) a la madurez y con margen fimbriado al microscopio y lamélulas de primer y segundo orden. **Estípites** 15-80 x 4-9 mm, central (Fig. 2A-D), derecho o curvado, cilíndrico, afinándose hacia el ápice con base bulsosa a sub-bulsosa, blanco (2A1) a pálido (2A2), concoloro con las laminillas, sólido y macizo, de superficie seca, fibroso longitudinalmente con tenues remanentes de velo hacia el ápice que desaparecen a la madurez. **Desarrollo del basidioma** hemiangiocárpico (Fig. 2D). **Esporada** blanca y extremadamente abundante (Fig. 2E).

Basidiosporas 16,79-19,96 x 17,69-21,99 μm , $x = 18,11 \times 19,13 \mu\text{m}$, $Qx = 1,00-1,16$, $Qx = 1,05$, $n = 25$; globosas a subglobosas, suaves, no amiloides, hialinas, de pared delgada, con contenido multigranular y abundantes gúttulas (Fig. 3A y 3b-D). **Basidios** 40-69 x 22-35 μm , clavados, 4-esporados, hialinos, de pared gruesa (Fig. 3B). **Pleurocistidios** 146-246 x 25,75-38,00 μm , lageniformes, formados por una base globosa a subglobosa y un extremo afinado y alargado; de pared gruesa hacia la base y fina hacia el ápice, con contenido homogéneo (Fig. 3C y 3b-B). **Queilocistidios** 9-28 x 44-84 μm , clavados a ampliamente clavados, a veces pedicelados. **Trama himenoforal** con hifas de 4-35 μm de diam., subregular, pared delgada no amiloides (Fig. 3b-A). **Pileipellis** formada por dos tipos de tejidos: (1) inferior, formado por una capa más o menos himeniforme, formada por células de 9,0-13,5 μm de ancho por 67-101 μm de largo, cilíndricas a claviformes suavemente pigmentadas color oliva, de pared delgada y contenido homogéneo; (2) superficial, un ixotricodermo formado por hifas de 4,7-6,75 μm de diam. x 90-202 μm de largo, alargadas y erectas, ocasionalmente ramificadas y entrecruzadas (Fig. 3D).



Figura 2. Basidiomas de *O. canarii*. A. Aspecto general; B. Especímenes obtenidos en cultivo; C. Laminillas; D. Velo parcial; E. Esporada. Escala = 1,3 cm (A); 2,6 cm (B); 0,15 cm (C); 0,3 cm (D); 0,92 cm (E).

Escamas formadas por cadenas de células 19,28-41,14 x 28,28-51,42 μm , ampliamente fusoides basalmente y globosas a subglobosas apicalmente (Fig. 3E). *Estipitipellis* formada por un cutis de hifas de 6,65-12,75 μm de diam. alargadas y paralelas.

Caulocistidios clavados, hialinos, de pared gruesa (1,5 μm de grosor). *Fíbulas* presentes (Fig 3b-C).

Los basidiomas obtenidos en cultivos mostraron un desarrollo hemiangiocárpico (Fig. 2D). Píleo de 10-140 mm, convexo cuando joven y convexo a plano en la madurez sin escamas. Las demás características macro y microscópicas coinciden con las de los basidiomas hallados en la naturaleza y mencionadas anteriormente.

Distribución: Sur de Asia (Japón, Malasia, Papúa Nueva Guinea, Islas Salomón) y América tropical (Argentina, México, Estados Unidos) (Petersen y Hughes 2010). En Argentina, se ha reportado en las provincias de Buenos Aires, Corrientes, Misiones, y Tucumán.

Ecología: creciendo en árboles vivos, decaídos, o troncos muertos de gimnospermas y angiospermas. Solitarios o formando pequeños grupos de 1 a 5 basidiomas.

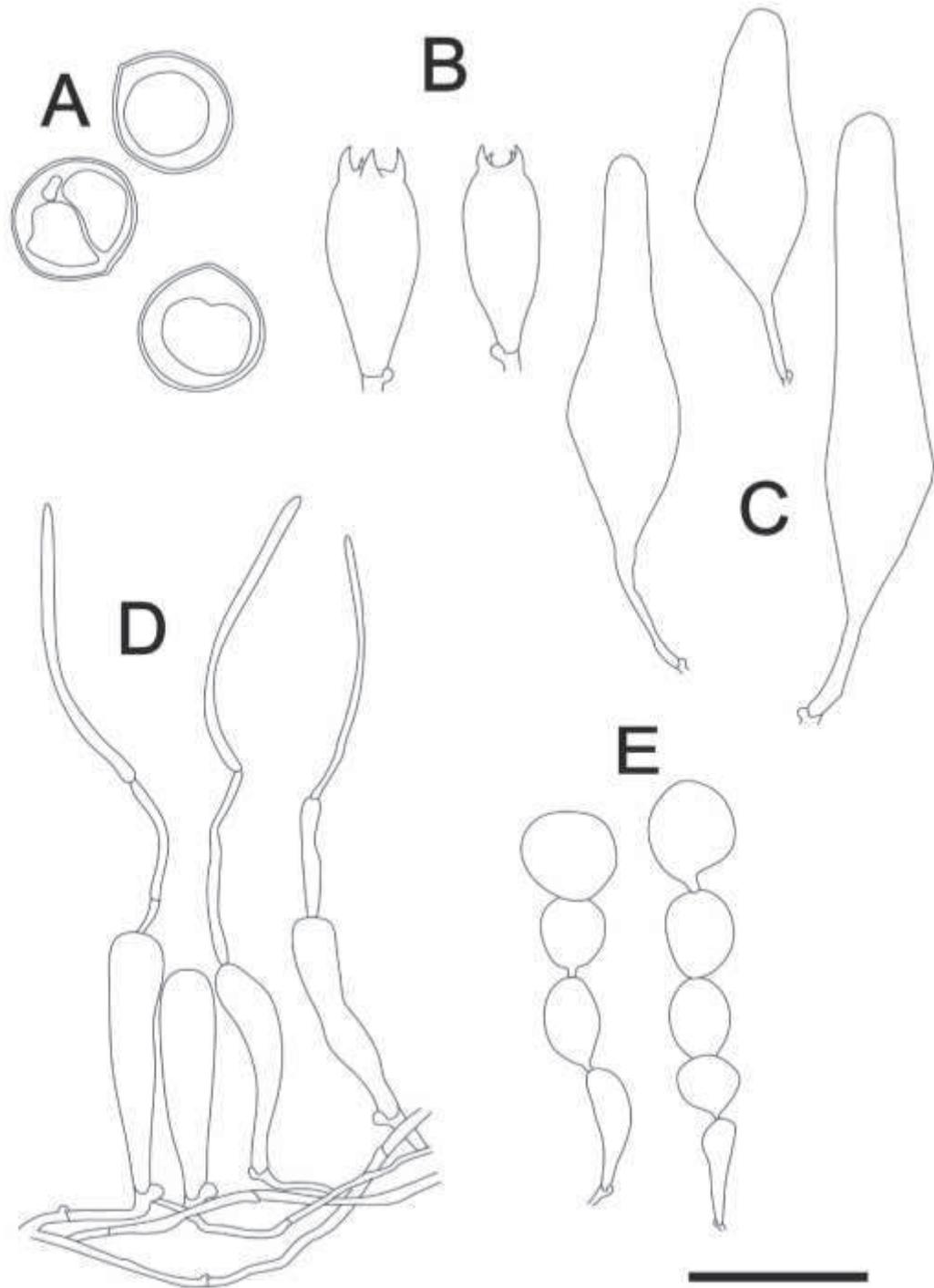


Figura 3. Características microscópicas de *O. canarii*. A. Basidiosporas; B. Basidios; C, Pleurocistidios; D. Elementos de la pileipellis; E. Elementos de las escamas. Escala= 30 μm (A); 50 μm (B, E); 70 μm (C, D).

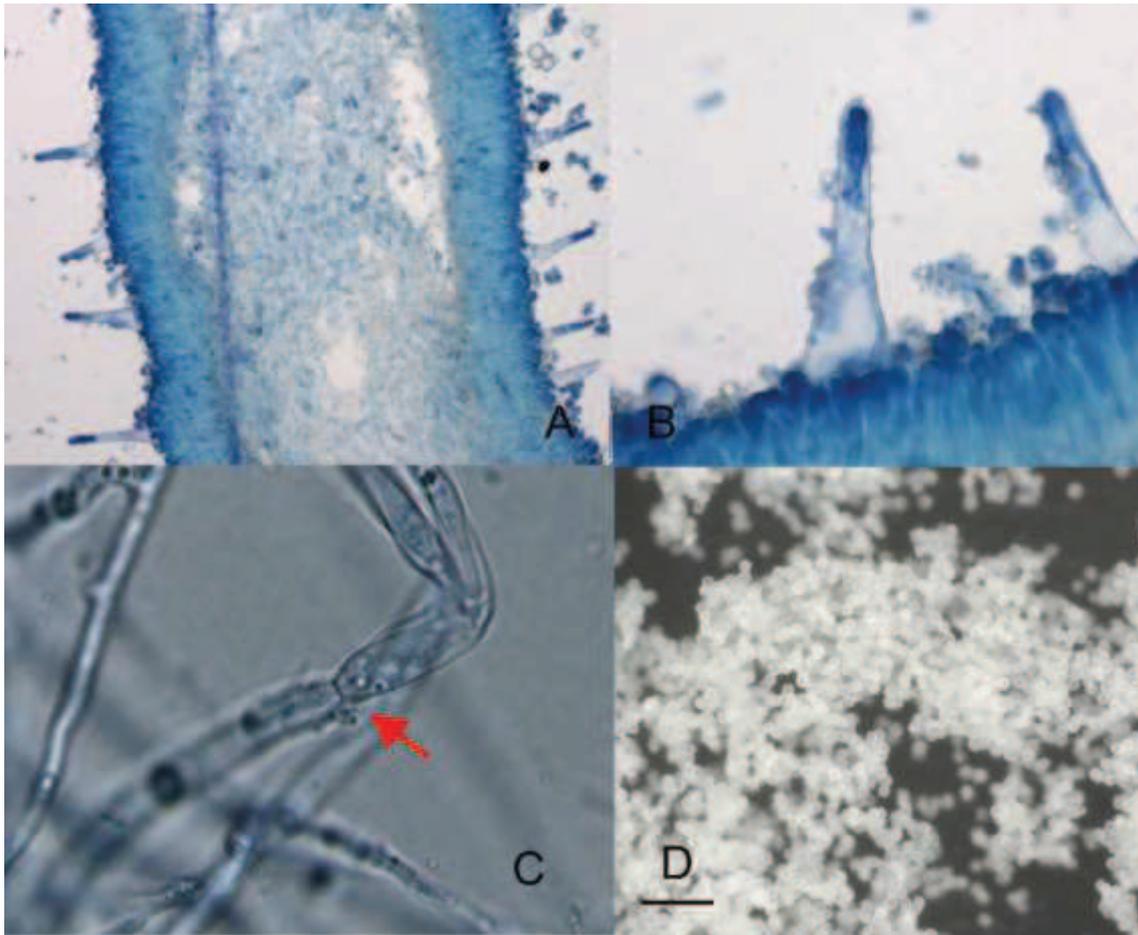


Figura 3b. Fotos de algunas estructuras microscópicas de *O. canarii*. A. Trama himenoforal y pleurocistidios; B. Pleurocistidios; C. Hifas fibuladas (la flecha señala la fibula); D. Esporas. Escala= 200 μm (A); 50 μm (B); 10 μm (C); 120 μm (D).

Especímenes examinados: ARGENTINA, Buenos Aires, Reserva Ecológica Costanera Norte, 31°38'10" S, 60°40'31" O, 4/08/2016, J. Aliaga MA4 (CTES). Corrientes, Ciudad de Corrientes, 27°27'29" S, 58°49'17" O, 26/03/2017, N. Niveiro MA5 (CTES). Misiones, General Manuel Belgrano, Reserva Natural Estricta San Antonio, 26°03'00" S, 53°43'00" O, 23/03/2017, M. Alberti 22v, 33v, 36v (CTES); INTA, Campo Anexo General Manuel Belgrano, bosque de *Araucaria angustifolia*, 26°38'29" S, 53°46'14" O, 23/03/2017, M. Alberti 43v (CTES); Guaraní, Reserva Privada Yasi Yateré, 27°13'26" S, 54°00'47" O, 23/03/2017, M. Alberti 60v (CTES); Iguazú, Parque Nacional Iguazú, cercano al CIES,

26°38'29" S, 53°46'14" O, 22/03/2017, N. Ramírez 13v, 14v, 15v, 17v (CTES), *Ib.* Estación Timbó, N. Ramírez 16v (CTES). San Ignacio, Parque Provincial Teyú Cuaré, 27°33'43,3" S, 55°35'24,2" O, 18/10/2017, N. Niveiro MA3325, MA3326, MA3327, MA3328 (CTES). Santa Ana, Parque Provincial Cañadón de Profundidad, 27°33'23,1" S, 55°42'21,1" O, 16/10/2017, N. Niveiro MA3325 (CTES). San Pedro, Parque Provincial Moconá, Chachi trail, 27°08'35" S, 53°53'12" O, 25/03/2017, M. Alberti 68v (CTES). *Ib.* 26/03/2017, M. Alberti 93v (CTES). Reserva Privada Yagurundí, 26°41'40" S, 54°15'52" O, 23/03/2017, M. Alberti 57v (CTES).

Oudemansiella canarii se caracteriza por su píleo blanco con escamas amarronadas (que están ausentes en los basidiomas obtenidos en cultivo), superficie marcadamente glutinosa y oscura cuando joven y pileipellis formada por un ixotrichodermo superficial compuesto por células expandidas montadas sobre una capa más o menos himeniforme compuesto por células cilíndricas a levemente pigmentadas de oliva. Pleurocistidios numerosos y de gran tamaño (Petersen y Hughes 2010). Una de las especies más similares respecto a la estructura de la pileipellis es *O. exannulata* (Cleland y Cheel) R.H. Petersen el este de Australia. Sin embargo, se esta se diferencia de *O. canarii* por la ausencia de escamas en la superficie del píleo y por poseer un píleo de mayor tamaño (de hasta 100 mm diam.) (Petersen y Hughes 2010). Las características macro y microscópicas de los especímenes de *O. canarii* de Argentina coinciden con las descriptas por Corner (1994) y Petersen y Hughes (2010), con mínimas diferencias. Petersen y Hughes (2010) describen basidiosporas más grandes (hasta 31 x 33 µm), con basidios con 1 a 4 esterigmas y basidiomas con coloraciones rosáceas. En este trabajo, las esporas de mayor tamaño medidas fueron de 19,96 x 21,99 µm; todos los basidios observados fueron

tetrasporados y no se observaron coloraciones rosadas en ninguno de los basidiomas examinados.

Oudemansiella cubensis (Berk. & M. A. Curtis) R. H. Petersen Fig. 4-5.

Nova Hedwigia, Beih. 137: 283. 2010.

Tipo: Cuba. Julio de 1857, C. Wright s.n. (FH).

Bas: *Agaricus (Amanita) cubensis* Berk. & M.A. Curtis. J. Linn. Soc. London 10: 282. 1869.

Sin: *Agaricus (Tricholoma) platensis* Speg. Anales Soc. Ci. Argent. 9(4): 161. 1880.

Oudemansia platensis (Speg.) Speg. Anales Soc. Ci. Argent. 10(6): 280. 1880. [*nom. gen. illeg.*, Art. 53 ICNB].

Oudemansiella platensis (Speg.) Speg. Anales Soc. Ci. Argent. 12(1): 24. 1881.

Psalliota platensis (Speg.) Herter. Estudios Botánicos Región uruguaya, III *Florula Uruguayensis Plantae Avasculares* (Montevideo): 43. 1933.

Basidiomas gregarios en pequeños grupos, xilófagos (Fig. 4A). **Pileo** de hasta 80 mm de ancho, hemisférico-convexo cuando joven, luego plano convexo a plano; glutinoso al inicio tornándose rápidamente viscido y finalmente seco a la madurez (en condiciones ambientales secas) (Fig. 4B-C); higrófono, marrón (6E5-8) cuando joven, convirtiéndose en marrón claro a medida que se deseca (6D4), marrón grisáceo (6D3), finalmente blanco anaranjado (6A2) en el centro blanco (6A1) en los márgenes a la madurez. Glabros u ocasionalmente con escamas formando escalas recurvadas (más pequeñas y concentradas en el centro y de mayor tamaño y dispersión hacia los márgenes), marrones (7E4-6) a marrón oscuras (7F4-6), variando considerablemente de tamaño (1 a 20 mm) (Fig. 4D). Márgenes suaves con pequeños fragmentos de velo remanente cuando jóvenes. **Contexto**

fino, de hasta 2 mm, blanco (2A1) a pálido (2A2), olor farináceo, el cual se acentúa y se vuelve dulce cuando se seca. *Laminillas* adnatas cuando jóvenes, luego anexas, ventricosas, subdistantes a distantes (Fig. 4E), blancas (1A1) tornándose pálidas (1A2) a pálidas amarillentas (1A3) a la madurez, lamélulas de primer y segundo orden. *Estípite* 17-80 x 4-8 mm, central, derecho o curvado, cilíndrico levemente afinado hacia el ápice, con una base bulbosa a subbulbosa, (Fig. 4A-F), blanco (2A1) a pálido (2A2), concoloro con las laminillas, sólido, macizo, fibroso longitudinalmente, de superficie seca, con pequeños remanentes de velo hacia el ápice que desaparece a la madurez. *Desarrollo del basidioma* hemiangiocárpico (Fig. 4F). *Esporada* blanca a pálida y extremadamente abundante (Fig. 4G).

Basidiosporas 14,92-20,47 x 17,08-20,2 μm ; $x = 17,7 \times 18,38 \mu\text{m}$, $Q = 1,00-1,20$, $Qx = 1,03$, $n = 25$; globosas a subglobosas, con contenido multigranular y abundantes gúttulas, no amiloides, hialinas, lisas, de pared gruesa (Fig. 5A y 5b-D). *Basidios* 45-70 x 23-36 μm , clavados, tetraesporados, hialinos, de pared gruesa (Fig. 5B). *Pleurocistidios* 140,0-190,3 x 25,38-39,24 μm , lageniformes, formados por una base globosa a subglobosa, con un extremo alargado y afinado, de pared gruesa en la base que se va afinando hacia el ápice y con contenido homogéneo (Fig. 5C y 5b-B). *Queilocistidios* de dos tipos: (1) 13-28 x 39-83 μm , fusiformes a ampliamente clavados, de pared delgada; y (2) 12-40 x 61-150 μm , muy ampliamente fusiformes y de pared gruesa.

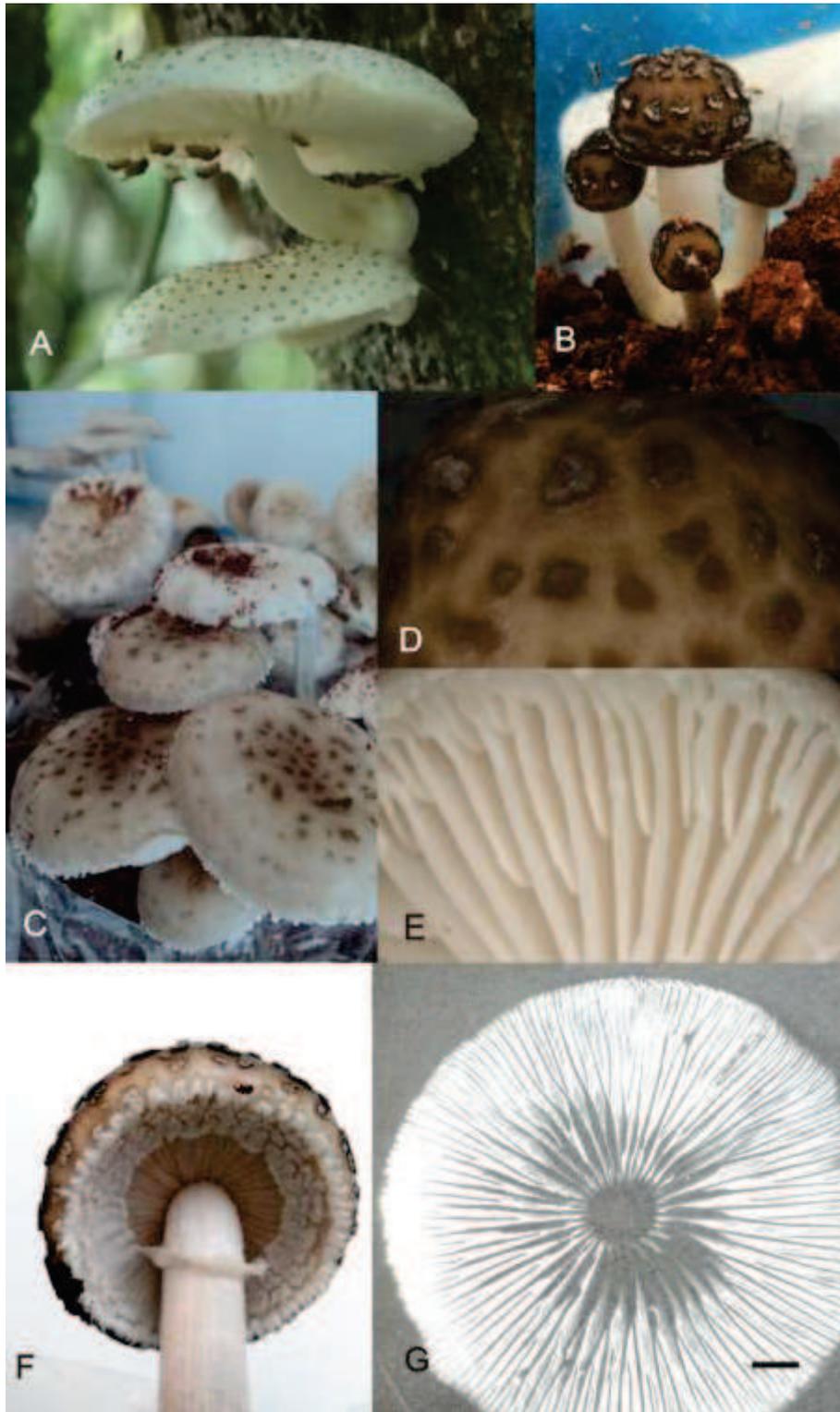


Figura 4. Basidiomas de *O. cubensis*: A. Aspecto general; B. Primordios; C. Especímenes obtenidos en cultivo; D, Detalles de las escamas del píleo; E. Laminillas; F. Velo parcial; G. Esporada. Escala = 0,75 cm (A); 1 cm (B, G); 1,75 cm (C); 0,3 cm (D, E); 0,43 cm (F).

Trama himenoforal constituida por hifas de 5-38 μm de diam., subregular de pared delgada y no amiloides (Fig. 5b-A). *Pileipellis* formada por dos tipos de tejidos: (1) inferior, una capa más o menos himeniforme formada por células de 20-80 x 8-10 μm clavadas, suavemente pigmentadas color oliva; y (2) superficial, formada por un policistodermo compuesto por cadenas de células de 6-25 μm de diam. progresivamente ensanchadas (Fig. 5D). *Escamas* formadas por cadenas de células de 20-50 μm de diam., ampliamente fusiformes (basalmente) y subglobosas o globosas (apicalmente) (Fig. 5E). *Estipitipellis* en un cutis formado por hifas de 6,68-14,63 μm de diam., lisas y dispuestas de forma paralela. *Caulocistidios* fusiformes, hialinos, de pared gruesa (1,4 μm de grosor). *Fíbulas* presentes (Fig 5b-C).

Los basidiomas obtenidos en cultivo mostraron un desarrollo hemiangiocárpico (Fig. 4G). Píleo 15-99 mm diam., convexo cuando joven y plano convexo a plano en la madurez con escamas presentes. Las otras características macro y microscópicas coinciden con las de los basidiomas hallados en la naturaleza y mencionadas anteriormente.

Distribución: Neotropical, desde el sur de Estados Unidos al norte y centro de Argentina: Argentina, Brasil, Colombia, Costa Rica, Cuba, República Dominicana, Ecuador, Estados Unidos (Petersen y Hughes 2010). En Argentina, se conoce en las provincias de Buenos Aires, Corrientes y Misiones.

Ecología: Se lo encuentra creciendo en árboles vivos o decaídos y en troncos muertos de angiospermas y gimnospermas. Solitarios o formando pequeños grupos de 1 a 4 basidiomas.

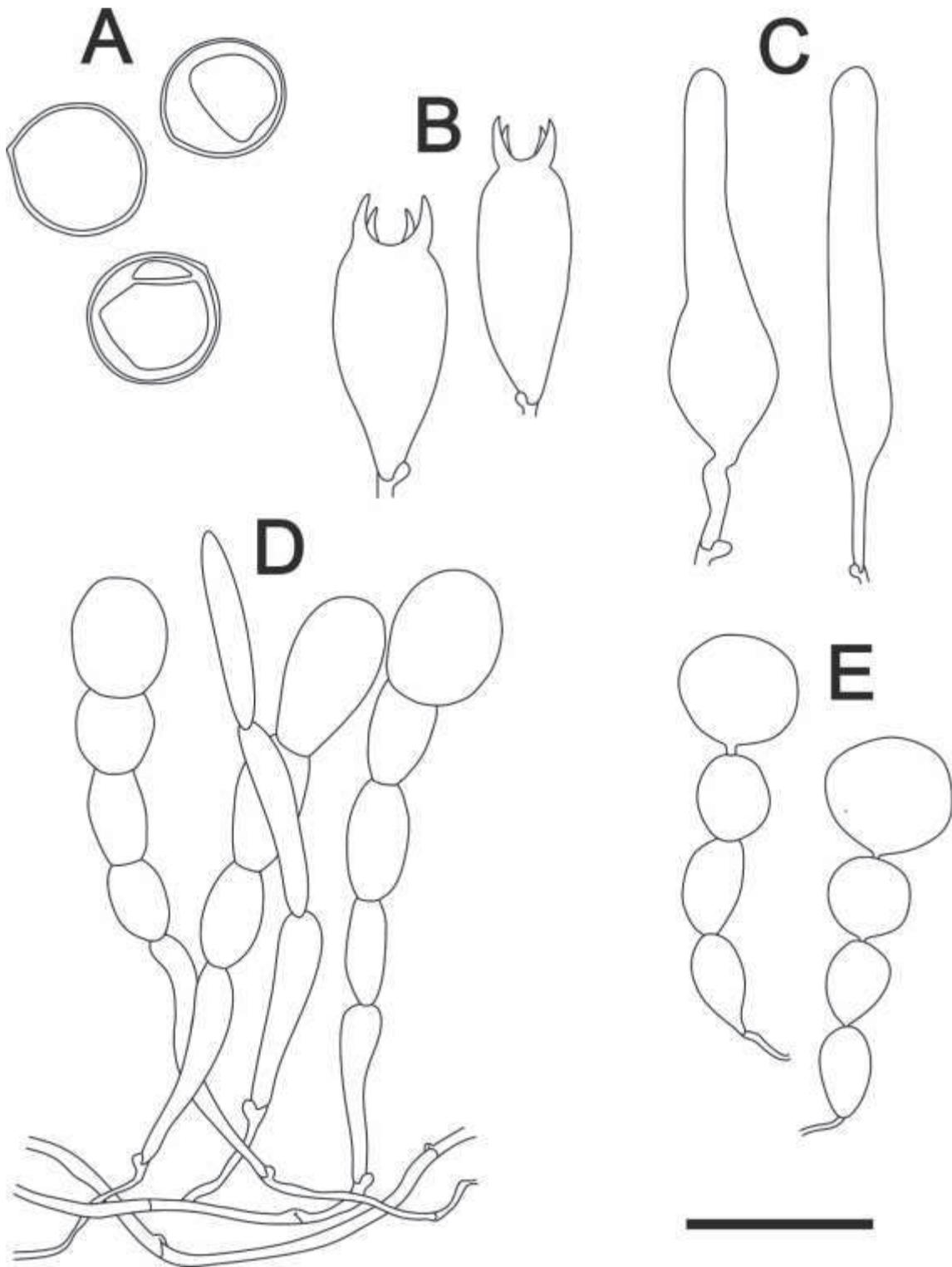


Figura 5. Características microscópicas de *O. cubensis*: A. Basidiosporas; B. Basidios; C. Pleurocistidios; D. Elementos de la pileipellis; E. Elementos de las escamas. Escala = 25 μm (A, D); 50 μm (B); 70 μm (C); 80 μm (E).

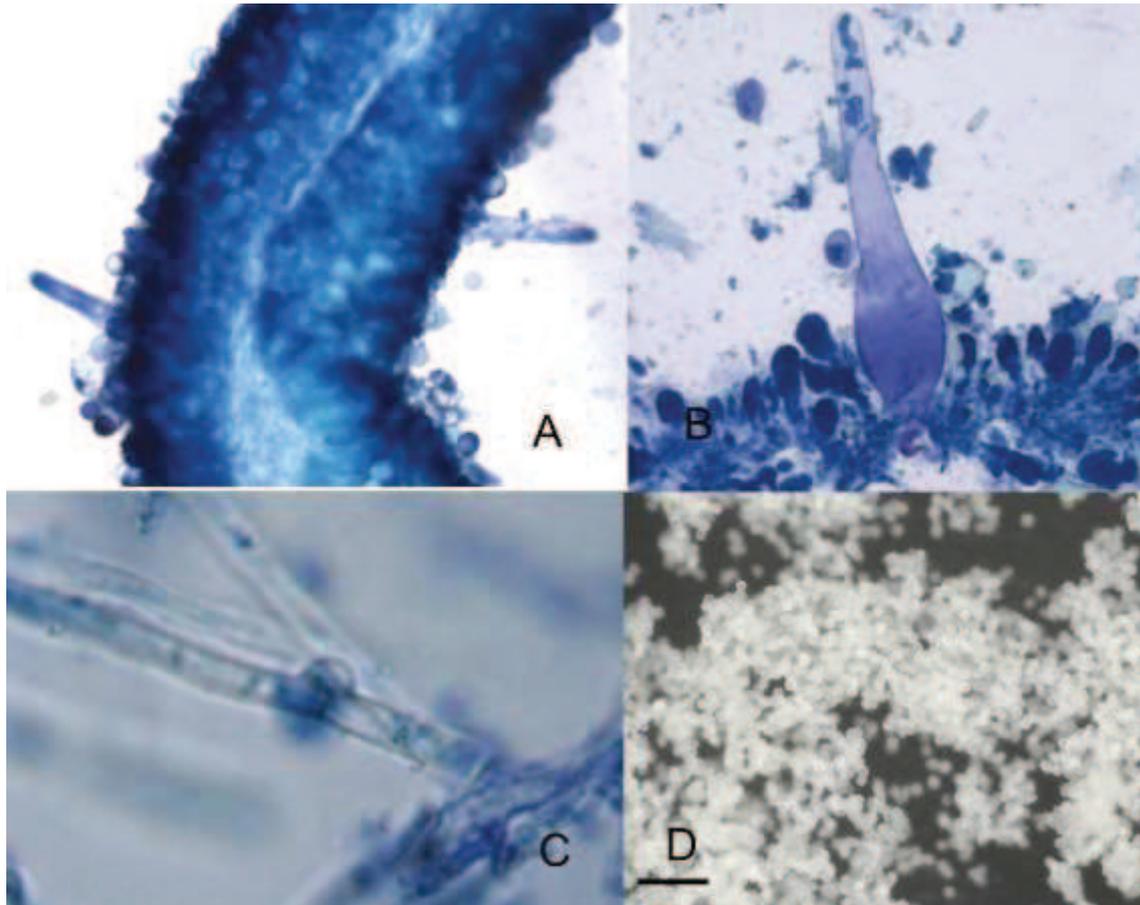


Figura 5b. Fotos de algunas estructuras microscópicas de *O. cubensis*. A. Trama himenoforal y pleurocistidios; B. Pleurocistidios; C. Hifas fibuladas; D. Esporas. Escala= 80 μm (A); 45 μm (B); 10 μm (C); 120 μm (D).

Especímenes examinados: ARGENTINA, Buenos Aires, Reserva Natural Municipal Santa Catalina, 34°46'46" S, 58°25'36" O, 27/07/2016, S. Ponce MA3 (CTES). Corrientes, San Cosme, Paso de la Patria, Estancia Las Lagunas, 27°22'15" S, 58°32'54" O, 21/04/2016, N. Niveiro MA2 (CTES).

Petersen y Hughes (2010) definen seis caracteres para separar *Oudemansiella cubensis* de otras especies similares: (1) esporas de menor tamaño, (2) basidios más largos y delgados (3) pleurocistidios más delgados que en otras especies (4) píleo inmaduro marrón oscuro en vez de gris claro, amarillo claro o rosado (5) queilocistidios conspicuos, y (6) pileipellis formada por cadenas de células. Sin embargo, el tamaño de las esporas,

los basidios, queilocistidios y pleurocistidios no son caracteres completamente exclusivos ya sus medidas se superponen en muchos casos. Los caracteres más adecuados para diferenciar esta especie son su píleo blanco a marrón claro con escamas dispersas y su pileipellis. Esta última está compuesta por un policistodermo superficial formado por cadenas de células progresivamente infladas y una capa inferior más o menos himeniforme formado por células claviformes levemente pigmentadas color oliva. *Oudemansiella apalosarca* (Berk. & Broome) Höhn. Proveniente de Sri Lanka y Oceanía (*O. australis* G. Stev. & G.M. Taylor) difiere de *O. cubensis* en su píleo sin escamas, su superficie seca y sus esporas de mayor tamaño (22-25 x 20-24 µm) (Petersen y Hughes, 2010).

Las descripciones de los ejemplares de *O. cubensis* de Argentina concuerdan con las de Petersen y Hughes (2010) y con las descripciones realizadas por Corner (1994) para *O. platensis*. En este trabajo, se reportaron esporas con un tamaño máximo de 20,47 x 20,72 µm, las cuales son menores a las reportadas por Petersen y Hughes (2010) (con tamaño máximo de 22,5 x 22 µm) y por Corner (1994) (15 x 25 µm). Además, estos autores reportaron pleurocistidios mayores a 250 µm, mientras que el largo máximo de los pleurocistidios descritos en este trabajo fue de 190,3 µm. Respecto a los basidios, Petersen y Hughes (2010) reportaron basidios de dos a cuatro esterigmas, pero en este trabajo sólo se describieron basidios tetrasporados.

Filogenia Molecular

El conjunto de datos original consistió de 36 taxa y 682 posiciones. El árbol generado a partir de IB coincidió con el generado a partir del análisis de MV. Las especies estudiadas en este trabajo fueron agrupadas en tres clados bien definidos: Clado *O. canarii* (1/91); Clado *O. cubensis* (1/84); y Clado *O. apalosarca* (1/90), en el cual fueron agrupadas las

secuencias de *O. crassifolia* y *O. australis* provenientes del continente asiático, ambas sinonimizadas a *O. apalosarca* por Petersen y Hughes (2010) (Fig. 6).

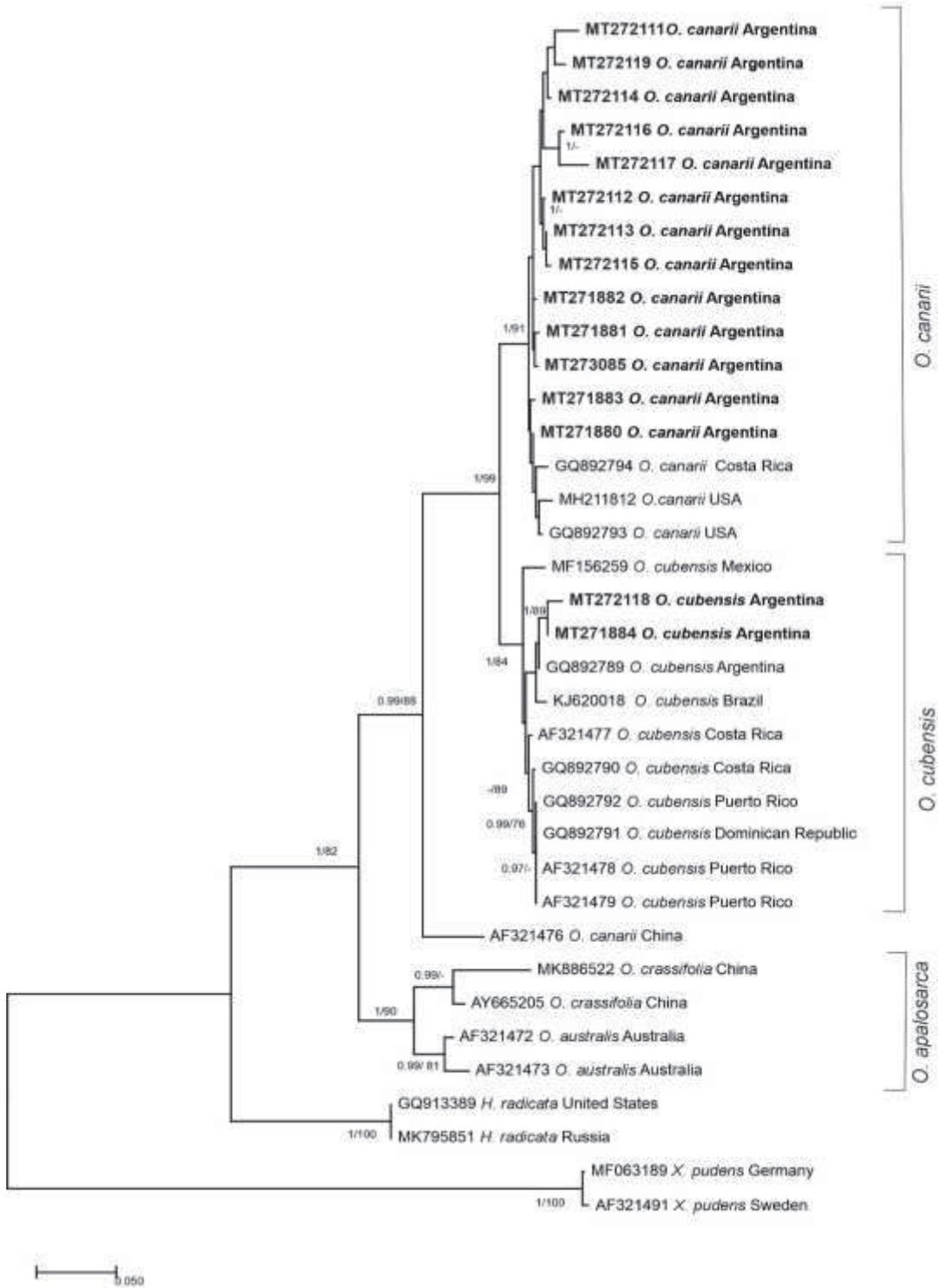


Figura 6. Filogenia molecular estimada por inferencia bayesiana en base a secuencias ITS. Se muestran los valores de probabilidades bayesianas por encima de 0,9 (BPP \geq 0,9)

y de *bootstrap* por encima de 70% ($BS \geq 70$). Las secuencias obtenidas en esta tesis se muestran en negrita.

Discusión

Tomado en consideración los trabajos publicados por Niveiro y Albertó (2012) y Petersen y Hughes (2010), siete especies de *Oudemansiella* fueron descritas para Argentina, algunas de las cuales no han sido revisadas aún. Algunas de estas especies, tales como *O. aculeata* Raith. y *O. haasiana* Raith. han sido pobremente descritas y los materiales tipo probablemente se hayan perdido. Luego de varios viajes de muestreos al centro y norte de nuestro país donde obtuvimos varios especímenes del género *Oudemansiella*, encontramos que es muy difícil la identificación a nivel de especie debido a las grandes similitudes entre ellas. Inicialmente, pensamos que el número de especies presentes iba a ser mayor, pero luego de los análisis detallados tanto morfológicos como moleculares, concluimos que sólo hay dos especies en las regiones exploradas. Sin embargo, a nivel macroscópico es difícil diferenciar estas especies, siendo necesario para ello, realizar estudios microscópicos, de cultivo o moleculares para diferenciarlas con exactitud. A nivel microscópico, estas especies pueden diferenciarse principalmente por la estructura de la pileipellis, específicamente por la capa más superficial: *O. canarii* posee un ixotricodermo compuesto por células expandidas, *O. cubensis* por su parte, tiene un policistodermo superficial formado por cadenas de células progresivamente infladas. Algunos autores consideran que la pileipellis podría ser algo variable de acuerdo con el estado de desarrollo (Corner 1994; Dörfelt 1981; Yang *et al.* 2009).

Otra diferencia morfológica hallada luego de repetidas observaciones de los basidiomas obtenidos en cultivo fue la consistencia de los primordios, los primordios de *O. canarii* son mucho más glutinosos que en *O. cubensis*. No obstante, esta característica podría ser variable según las condiciones ambientales, así como también a partir de la percepción del observador. Adicionalmente, cuando estas especies son cultivadas bajo condiciones controladas pueden ser diferenciadas por la presencia de escamas sobre el

píleo de *O. cubensis*, y la ausencia de las mismas en los basidiomas maduros de *O. canarii* (Fig. 2C, 4C-E).

Respecto al desarrollo de los basidiomas Corner (1994) reportó que el desarrollo de estas especies era gimnocárpico, sin embargo, la producción de basidiomas en cultivo nos permitió realizar la observación de numerosos especímenes de ambas especies, y de esta manera podemos afirmar que tanto *O. canarii* como *O. cubensis* tienen un desarrollo del tipo hemiangiocárpico. De acuerdo con Alexopoulos y Mims (1985), el desarrollo hemiangiocárpico se caracteriza por el hecho de que durante las fases iniciales del desarrollo del basidioma, el himenio se encuentra cubierto por el velo parcial, el cual es un tejido que conecta el pie con los márgenes del sombrero, cuando el píleo se expande, el velo parcial se rompe y puede permanecer o no, en forma de anillo.

El análisis filogenético llevado a cabo a partir de las secuencias ITS permitió separar tres clados bien soportados (Fig. 6). Nuestras secuencias fueron agrupadas en dos clados diferentes: *O. canarii* y *O. cubensis*. Estos resultados concuerdan con los hallados por Petersen y Hughes (2010), quienes también separaron ambas especies a partir de sus secuencias ITS. Los ITS demuestran ser óptimos marcadores para la filogenia molecular de estas especies que hasta el momento son las únicas dos especies pertenecientes al género *Oudemansiella sensu stricto* reportadas en la Argentina.

Conclusiones del capítulo

A partir de los estudios microscópicos, de cultivo y moleculares, podemos concluir que en las regiones exploradas hay dos especies de *Oudemansiella*: *O. canari* y *O. cubensis*. A nivel microscópico, como hemos explicado, estas especies pueden diferenciarse principalmente por la estructura de la pileipellis; en estudios de producción en cultivo pueden ser diferenciadas por la presencia de escamas sobre el píleo de *O. cubensis* y la ausencia de las mismas en *O. canarii*; mientras que mediante los análisis moleculares pueden diferenciarse a partir de marcadores ITS sin dificultad.

A close-up photograph of several white mushrooms with gills, growing from a piece of bread. The bread is partially covered in a white, fuzzy mold. The background is dark and out of focus.

CAPITULO 2

Estudio de los parámetros productivos para la producción intensiva de hongos pertenecientes al género *Oudemansiella*

Introducción

En términos generales, las etapas para la producción de hongos comestibles consisten en: adquisición o producción de inóculo, preparación del sustrato, tratamiento térmico (pasteurización o esterilización) para reducir o eliminar la carga microbiana de los sustratos, incubación, inducción y cosecha (Albertó 2008). Si bien el esquema general es el mismo para la mayoría de los hongos cultivables, cada especie de hongo comestible tiene sus particularidades y parámetros óptimos en cada etapa. Por lo tanto, cuando se desea estudiar el cultivo de una nueva especie, hay que poner a punto cada uno de los pasos del ciclo productivo, de manera tal de obtener los mejores rendimientos intentando ser lo más eficiente posible en cuanto a los recursos utilizados y los tiempos de producción. A su vez, toda la información generada respecto a la nueva especie, tanto en cuanto a similitudes y diferencias con otros hongos cultivados mundialmente, así como también, la caracterización detallada de los basidiomas obtenidos, que son el producto final para consumir y comercializar, son de vital importancia para lograr la expansión de la incipiente especie.

Siguiendo el esquema mencionado anteriormente, lo primero que debemos poner a punto cuando comenzamos a estudiar un hongo con los fines de cultivarlo, es la producción de inóculo y para ello hay que optimizar las condiciones de crecimiento micelial. El crecimiento micelial, consiste en la multiplicación del micelio sobre algún sustrato o medio de cultivo. Durante el cultivo de hongos, el crecimiento micelial tiene lugar en la fase de incubación, tanto para la producción de inóculo, que por lo general se hace sobre granos de cereales, como también durante la colonización del sustrato de producción, cuyo componente principal por lo general es paja o aserrín. La optimización de este parámetro va a estar relacionada con una mayor velocidad en la colonización de los sustratos, reduciendo los tiempos en el ciclo productivo y disminuyendo las chances de

contaminación. Son varios los factores que pueden estudiarse para optimizar el crecimiento micelial, algunos muy comúnmente estudiados son: temperatura, pH, medios de cultivo y sustratos.

Las condiciones de temperaturas moderadas y de alta humedad en las cuales se cultivan los hongos comestibles, favorecen la aparición de contaminantes de diferente naturaleza, pero principalmente, la aparición de hongos imperfectos conocidos como mohos. Los mohos compiten por el espacio y los nutrientes con la especie a cultivar y en general, lo hacen de manera más veloz y agresiva. A su vez, pueden producir metabolitos secundarios tóxicos, enzimas extracelulares, así como compuestos orgánicos volátiles (Mumpuni *et al.* 1998; Williams *et al.* 2003), que pueden disminuir sustancialmente e incluso bloquear directamente la producción comercial de hongos. Además de los tratamientos realizados sobre los sustratos para evitar su proliferación, algunos fungicidas sistémicos de amplio espectro como el carbendazim han demostrado ser eficientes inhibiendo el desarrollo de mohos contaminantes a muy bajas concentraciones, sin afectar a los hongos comestibles (Hatvani *et al.* 2012). Por lo tanto, resulta muy interesante estudiar la tolerancia de las diferentes especies a este tipo de fungicidas.

Continuando con el esquema mencionado anteriormente y una vez obtenido el inóculo, éste debe sembrarse en un sustrato lignocelulósico previamente tratado, generalmente con pasteurización o esterilización, para reducir su carga microbiana.

Para la siembra, el porcentaje de inoculación recomendado es variable para las diferentes especies. La mayoría de los cultivadores emplean porcentajes de inoculación que van del 2 al 5 % (Albertó 2008). Para el género *Pleurotus*, por ejemplo, se han reportado tasas de inoculación que van del 0,8 al 20% (Gaitán-Hernández *et al.* 2006; Sánchez y Royse 2001; Stamets 2000). Jaramillo y Albertó (2019) recomiendan el uso del 13% de inóculo para *Pleurotus*, valor con el cual obtuvieron la mayor productividad del cultivo.

Establecer la tasa de inoculación óptima, resulta fundamental a la hora de cultivar una nueva especie, ya que el inóculo es uno de los insumos que los cultivadores deben adquirir, y representa uno de los principales costos de producción.

Debido a la naturaleza heterótrofa de los hongos, los sustratos de cultivo empleados van a tener que ser capaces de proveerles todas las sustancias necesarias para permitir el crecimiento y la fructificación. La diferente composición de los materiales en cuanto a contenido de lignina, dureza, presencia de resinas, relación C/N y probablemente diferencias en los micronutrientes, van a ser determinantes en los rendimientos obtenidos, en los tiempos que conlleve cada etapa de cultivo y en las características del producto obtenido.

Luego de que se complete la colonización del sustrato, es necesario favorecer el intercambio gaseoso para estimular el desarrollo de los basidiomas (Bellettini *et al.* 2019). Son varios los sistemas de producción utilizados a nivel mundial y estos varían dependiendo de las especies. En general, cada una de las especies mayormente cultivadas tienen un sistema que es el más utilizado porque permite los mayores rendimientos, por lo tanto, para estudiar el cultivo de un hongo xilófago por primer vez, deberían evaluarse diferentes sistemas y así definir cual es el más óptimo.

En cuanto al cultivo de las oudemansiellas, únicamente tres especies *sensu stricto* han sido producidas en cultivo sobre unos pocos sustratos: *O. canarii* (Ruegger *et al.* 2001; Xu *et al.* 2016), *O. submucida* (Li *et al.* 2012) y *O. tanzanica* (nom prov) (Magingo *et al.* 2004); y la información respecto a la tecnología utilizada para su cultivo, las características del ciclo productivo o de los basidiomas obtenidos es muy escasa y se encuentra pobremente detallada.

Con el objetivo de describir la mejor metodología para el cultivo de dos especies de *Oudemansiella*, se estudiaron en primer lugar algunos parámetros importantes para el desarrollo micelial tales como temperatura y pH óptimos, tolerancia al carbendazim y los posibles sustratos para la producción de inóculo. En segundo lugar, se evaluaron y describieron aspectos relacionados a las diferentes etapas del cultivo, tales como el porcentaje de inoculación a la siembra, el sustrato óptimo para el cultivo y el mejor sistema para inducción y producción de basidiomas.

Objetivo general del capítulo

- Estudiar los parámetros productivos para la producción intensiva de las especies de hongos pertenecientes al género *Oudemansiella* halladas en el país.

Objetivos específicos del capítulo

- Determinar la temperatura y el pH óptimo para el crecimiento micelial.
- Determinar tolerancia al carbendazim durante el crecimiento micelial.
- Determinar el sustrato óptimo para el crecimiento micelial.
- Determinar el porcentaje de inoculación óptimo a la siembra.
- Determinar el sustrato lignocelulósico óptimo para la producción de basidiomas.
- Determinar el sistema óptimo para la inducción y producción de basidiomas.
- Evaluar la eficiencia biológica y algunos otros parámetros del rendimiento en función de la tasa de inoculación, el sustrato y el sistema de cultivo empleado.
- Caracterizar los basidiomas cosechados en función de la tasa de inoculación, el sustrato y el sistema de cultivo empleado.
- Evaluar las oleadas y los tiempos del ciclo de cultivo en función de la tasa de inoculación, el sustrato y el sistema de cultivo empleado.

Materiales y métodos

Cepas

Las cepas usadas fueron identificadas como *O. canarii* ICFC 853/17 (Buenos Aires, Argentina) y *O. cubensis* ICFC 852/17 (Corrientes, Argentina). Las mismas fueron aisladas e identificadas tal como se detalló en el capítulo anterior.

Temperatura óptima de crecimiento micelial

El medio de cultivo utilizado con fines de almacenamiento y repiques de rutina fue ágar papa dextrosado (APD 39 g/l, Britania TM, Argentina). Se utilizó un disco de APD de 5 mm de diam. con micelio activo y se colocó en el centro de una placa de Petri de 90 mm. Las placas fueron incubadas a 20, 25 y 30 °C. El crecimiento del micelio fue medido diariamente hasta que se completó toda la placa. Se realizaron tres réplicas de cada cepa y el crecimiento diario fue promediado.

pH óptimo de crecimiento micelial

Se tomaron dos discos de APD de 5 mm de diam. con micelio activo y se colocaron en Enlermeyers con 100 ml de medio líquido estéril de papa glucosa a pH 5, 7 y 9. Se incubaron a 20°C en shaker a 200 rpm. Luego se realizaron mediciones de peso seco del micelio (a partir del micelio deshidratado) a los 5, 10, 15 y 20 días. Se realizaron tres réplicas de cada cepa y el crecimiento diario fue promediado.

Sustrato óptimo de crecimiento micelial

Para realizar las pruebas de sustrato óptimo para producción de inóculo se hirvieron durante 5 minutos los diferentes granos: sorgo, avena, trigo y mijo con agua desmineralizada y 2% p/p de carbonato de calcio. Luego se escurrieron en papel de diario durante media hora para absorber el exceso de humedad. En cuanto al aserrín de

Eucalyptus, el mismo fue hidratado al 60% p/v con agua desmineralizada y se le adicionó 2% p/p de CaCO₃. Con estos materiales se llenaron cajas de Petri de vidrio de 90 mm, se esterilizaron en autoclave durante 2 h a 121°C y 1 atm de presión. Cuando se enfriaron, se sembraron con un disco de 5 mm de APD con micelio activo de cada cepa y se colocaron en el cuarto de incubación. Se realizaron tres réplicas de cada cepa y el crecimiento diario fue promediado.

Tolerancia al carbendazim (Benzimidazol)

Para evaluar la tolerancia al fungicida carbendazim, se sembraron discos de 5 mm de diam. con micelio activo en placas de Petri de 90 mm con APD con carbendazim en la concentración de 1ml/L (1000 ppm). Como control se comparó el crecimiento de ambas especies en placas de Petri de 90 mm con APD sin carbendazim. Se incubaron a 25°C y se observó el crecimiento micelial de los días posteriores. Se realizaron tres réplicas de cada cepa.

Ensayos de cultivo

Producción de inóculo

El inóculo fue preparado en bolsas plásticas con el siguiente contenido: 500g de granos de sorgo hidratados y 2% p/p CaCO₃. Las bolsas fueron esterilizadas en autoclave durante 2,5 h a 121 °C, enfriadas hasta alcanzar temperatura ambiente e inoculadas con un disco de APD con micelio de la cepa correspondiente. Las bolsas fueron incubadas a 25 °C en la oscuridad y agitadas periódicamente durante 21 días.

Preparación del sustrato y siembra

Los materiales lignocelulósicos fueron hidratados al 70% de humedad con agua desmineralizada (denominada tipo A, con 0,54 µS/m de conductividad aproximada) y

luego mezclados con 2% p/p de carbonato de calcio (CaCO₃). Se utilizaron bolsas de polipropileno (25 x 45 cm) o frascos de vidrio (12 cm de ancho x 10 cm de diám) que se llenaron con 500 g de sustrato y luego fueron esterilizados a 121 °C durante 2 h. Luego de alcanzar temperatura ambiente fueron inoculados con 10% p/p de inóculo en la cámara de flujo laminar (excepto en el ensayo de porcentaje de inóculo a la siembra, en el cual se inoculó al 1, 5 y 10%). Las bolsas fueron cerradas con un tapón de algodón sostenido exteriormente por un fragmento cilíndrico de PVC (cloruro de polivinilo). Para los frascos se utilizaron tapas de metal en cuyo centro se realizó un orificio de 2 cm y se cubrió con un tapón de algodón. La incubación se realizó a 25 °C en oscuridad hasta que el sustrato fue totalmente colonizado.

Sustrato óptimo para la producción de basidiomas

Se ensayaron 4 materiales lignocelulósicos para determinar el sustrato óptimo para la producción de basidiomas en bolsas de polipropileno: paja de trigo (*Triticum* sp., picada previamente hasta 3 cm de largo) aserrín de álamo (*Populus* sp.), aserrín de eucalipto (*Eucalyptus* sp.) y aserrín de pino (*Pinus* sp.). Luego de la incubación, se realizaron seis cortes en cruz (2,5 x 2,5 cm) y las bolsas fueron colocadas en el cuarto de fructificación.

Sistema óptimo para la producción de basidiomas

Luego de finalizada la etapa de incubación, se ensayaron 5 técnicas para la inducción y producción de basidiomas (Tabla 2; Fig. 7). En todos los tratamientos se utilizó paja de trigo hidratada al 70%. La tierra de cobertura fue preparada utilizando 99% de turba (Bertinat TM, Argentina) y 1% p/p de CaCO₃.

Tabla 2. Diferentes técnicas evaluadas para inducción de basidiomas de *Oudemansiella*.

Abreviatura	Nombre de la técnica	Especie modelo	Inducción	Referencias
BP	Bolsas con perforaciones	<i>P. ostreatus</i>	Se hicieron seis cortes en cruz (2,5 x 2,5 cm) sobre la bolsa	Naik y Chandra 2018; Naim <i>et al.</i> 2020; Tesfay <i>et al.</i> 2020
BA	Bolsas abiertas	<i>P. eryngii</i>	Bolsas abiertas apicalmente	Akyüz y Yildiz 2008; Hassan <i>et al.</i> 2010
FR	Frascos de vidrio	<i>F. velutipes</i>	Se retiraron las tapas	Hiramori <i>et al.</i> 2017; Tie <i>et al.</i> 2020
BM	Bloques de micelio	<i>L. edodes</i>	Las bolsas fueron removidas	Nitta <i>et al.</i> 2016; Ogawa y Yashima 2019
TC	Tierra de cobertura	<i>A. bisporus</i>	Bolsas abiertas apicalmente y colocación de una capa de 4 cm de espesor de tierra de cobertura	Khakimov <i>et al.</i> 2018; Pardo-Giménez <i>et al.</i> 2017; Zhang <i>et al.</i> 2019

Las técnicas utilizadas fueron: i) bolsas con perforaciones; ii) bolsas abiertas iii) frascos de vidrio; iv) bloques de micelio; v) bolsas con tierra de cobertura. Las técnicas seleccionadas son representativas de las especies más cultivadas mundialmente y están claramente explicadas en muchas publicaciones (Chang y Miles 1989; Stamets 2000). Brevemente: i) bolsas con perforaciones: las bolsas fueron colocadas en el cuarto de producción, seis perforaciones fueron realizados utilizando un cortador; ii) bolsas abiertas: las bolsas colonizadas fueron colocadas en el cuarto de fructificación y luego abiertas apicalmente para permitir a la formación de basidiomas; iii) frascos de vidrio: los frascos fueron colocados en el cuarto de fructificación y la tapa fue removida para inducir la formación de basidiomas; iv) bloques de micelio: las bolsas colonizadas fueron

colocados en el cuarto de fructificación, las bolsas plásticas fueron removidas dejando el bloque de sustrato expuesto; v) bolsas con tierra de cobertura: las bolsas fueron colocados en el cuarto de fructificación, abiertas apicalmente y se les colocó una capa de 4 cm de tierra de cobertura encima. Un esquema que muestra la zona donde se forman los basidiomas en cada sistema ensayado se puede observar en la Fig. 7.

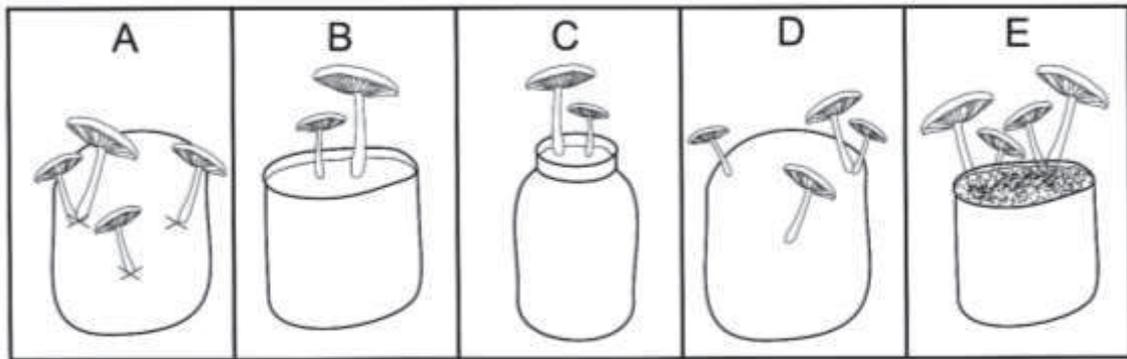


Figura 7. Esquema de las distintas técnicas evaluadas para inducción de fructificación. A. Bolsas con perforaciones (los basidiomas salen solo a través de ellas); B. Bolsas abiertas apicalmente (los basidiomas salen por arriba); C. Frascos de vidrio (los basidiomas salen por la abertura del frasco); D. Bloques de micelio (los basidiomas pueden salir en cualquier zona del bloque); E. Tierra de cobertura (los basidiomas salen sobre la tierra de cobertura).

Condiciones de la sala de cultivo

Las condiciones ambientales la sala de fructificación fueron: temperatura: 20-24 °C; humedad: 70-80%; ventilación: CO₂ menor a 500 ppm mediante incorporación de aire filtrado al cultivo; fotoperíodo: 9 h de luz y 15 h de oscuridad usando un tubo fluorescente de 20 W (400–700 nm); riego: durante 5 min, 5 veces por día a través de un sistema de aspersión. Al tratamiento de frascos de vidrio y bolsas con tierra de cobertura se les

realizó riego manual por aspersión 1 vez por día. Los basidiomas fueron cosechados diariamente, pesados y medidos.

Parámetros evaluados

Los parámetros de producción evaluados fueron: i) Eficiencia biológica EB (%), calculada como: $EB\% = \text{Peso fresco de los hongos (g)} / \text{Peso seco del sustrato (g)} \times 100$; ii) Peso total; iii) Número de hongos cosechados; iv) Peso fresco de los hongos, el cual es el peso fresco total de los hongos cosechados durante el ciclo, dividido por el número de hongos. Los parámetros evaluados del ciclo de cultivo fueron: v) Primer día de cosecha, medido desde el día de la siembra (precocidad); vi) Duración total del ciclo, medido desde el día de siembra hasta el día de la última cosecha; vii) Número de oleadas; viii) Distribución del rendimiento, el cual es porcentaje de rendimiento en cada oleada. Los parámetros morfológicos evaluados fueron: ix) Diámetro del píleo, x) Largo del estípite xi) Ancho del estípite.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizaron 8 repeticiones en todos los tratamientos. Previo al análisis estadístico se realizaron los test de Shapiro Wilks y de Levene para constatar los parámetros de normalidad y homocedasticidad, respectivamente. Los datos fueron analizados con el software InfoStat (versión 2015) a partir del análisis de varianza (ANOVA) con $p < 0,05$ y las medias fueron comparadas con el test de Tukey.

Resultados

Temperatura óptima de crecimiento micelial

El micelio de *O. canarii* creció de forma óptima a 20 y 25°C cubriendo la caja de Petri en 9 días, mientras que a 30°C el micelio demoró 2 días más para alcanzar un diámetro de 90 mm (Fig. 8). *O. cubensis* cubrió la caja de Petri en 8 días a las tres temperaturas evaluadas sin mostrar diferencias entre ellas (Fig. 9).

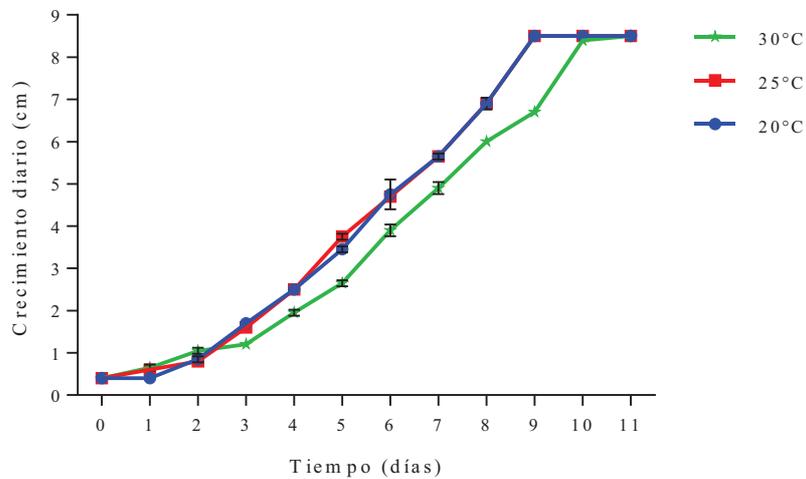


Figura 8. Temperatura óptima de crecimiento micelial de *O. canarii*. Las barras indican la desviación estándar.

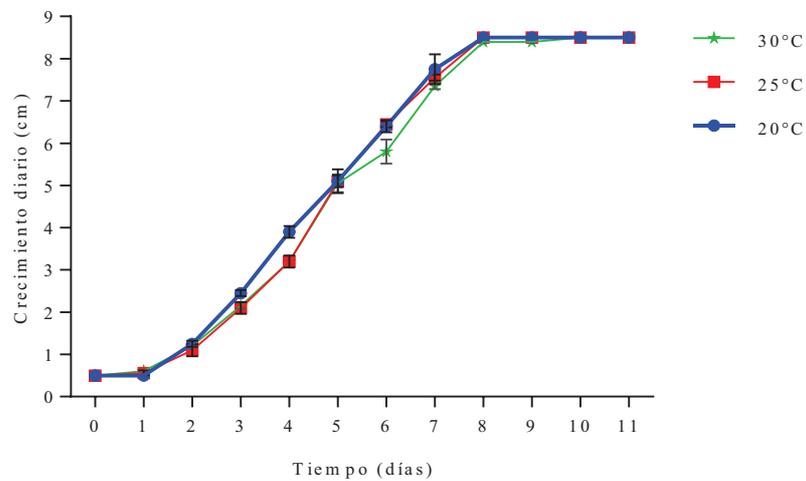


Figura 9. Temperatura óptima de crecimiento micelial de *O. cubensis*. Las barras indican la desviación estándar.

pH óptimo de crecimiento micelial:

En cada uno de los cultivos se obtuvieron esferas de micelio que fueron filtradas, secadas a peso constante y pesadas (Fig. 10). Tanto para *O. canarii* como para *O. cubensis*, el micelio alcanzó su máximo peso luego de 20 días a pH 5 y 7, sin mostrar diferencias entre ellos y dando un promedio aproximado de 0,9 g. A su vez, para ambas especies, se vio un crecimiento menor a pH 9 dando un promedio de 0,5 g a los 20 días (Fig. 11 y 12).



Figura 10. Cultivo en medio líquido. A. Biomasa de micelio en medio líquido; B. Biomasa de micelio filtrado.

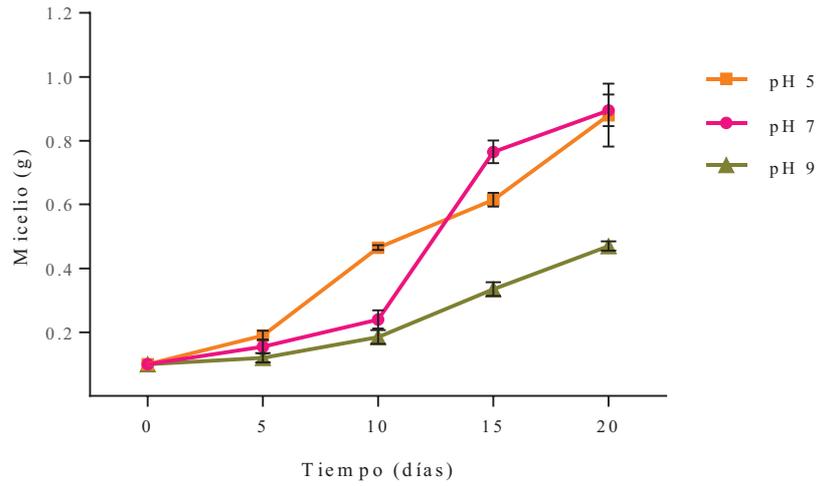


Figura 11. pH óptimo de crecimiento micelial de *O. canarii*. Las barras indican la desviación estándar.

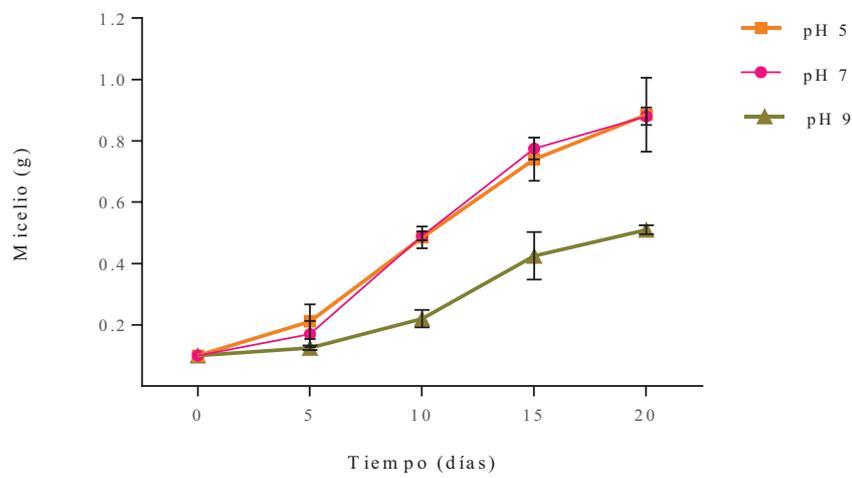


Figura 12. pH óptimo de crecimiento micelial de *O. cubensis*. Las barras indican la desviación estándar.

Sustrato óptimo de crecimiento micelial

El crecimiento del micelio en algunos de los sustratos evaluados puede verse en la Fig. 13. Para ambas especies se verificó crecimiento del micelio en todos los sustratos evaluados. Para el caso de *O. canarii* podría decirse que tanto en el mijo como el sorgo completaron la caja de Petri en la menor cantidad de días (9 días), seguido por el trigo (10 días), avena (11 días), sorgo más *Eucalyptus* (12 días) y *Eucalyptus* (13 días) (Fig. 14). En el caso de *O. cubensis*, y a partir de la velocidad de crecimiento del micelio observamos que tanto en el mijo como el sorgo, el micelio completó la caja de Petri a los 8 días, seguido por el trigo (9 días), avena y sorgo más *Eucalyptus* (10 días) y *Eucalyptus* (12 días) (Fig. 15).

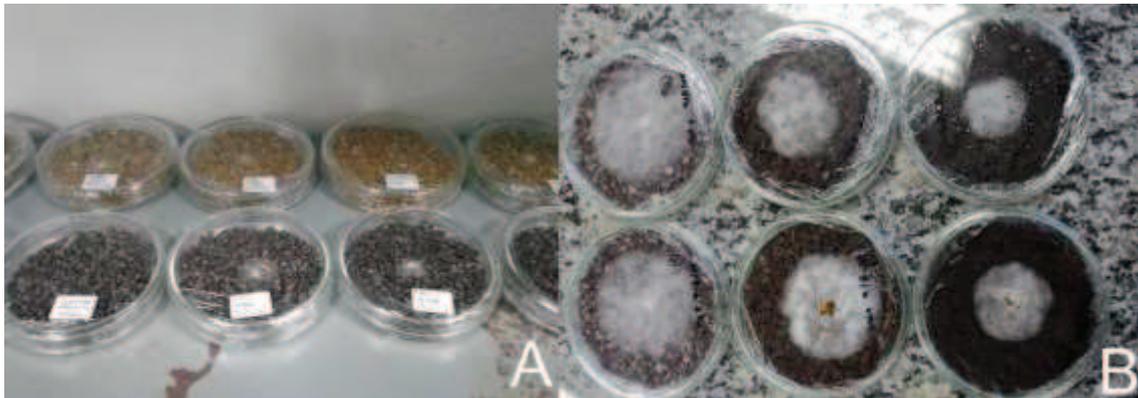


Figura 13. Determinación del sustrato óptimo para producción de inóculo. A. Placas de Petri con diferentes sustratos 48 h posteriores a la siembra; B. Placas de Petri con diferentes sustratos 7 días posteriores a la siembra.

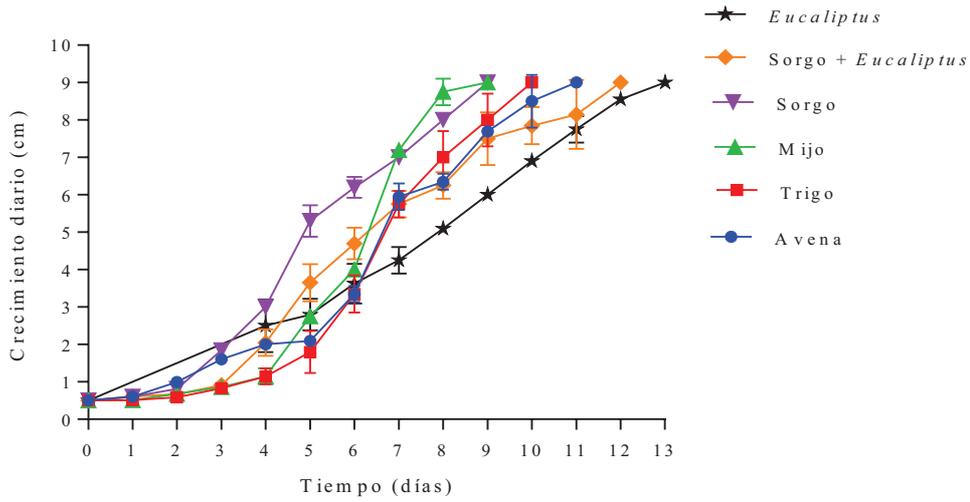


Figura 14. Sustrato óptimo de crecimiento micelial de *O. canarii*. Las barras indican la desviación estándar.

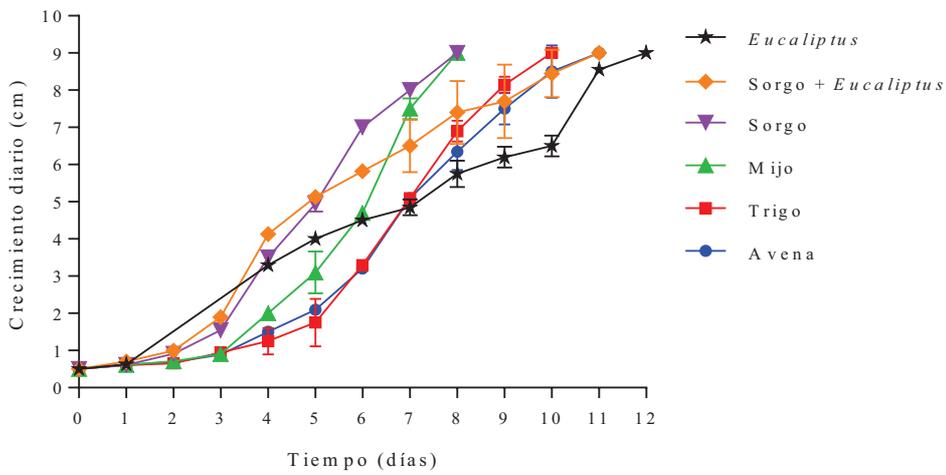


Figura 15. Sustrato óptimo de crecimiento micelial de *O. cubensis*. Las barras indican la desviación estándar.

Tolerancia al carbendazim

Se observó el crecimiento micelial normal en todas las cepas de *O. canarii* y *O. cubensis* evaluadas en medio de cultivo con carbendazim al 1%, aunque el crecimiento fue un poco más lento. El micelio tardó 15 días en colonizar las placas de Petri con medio APD más carbendazim mientras que demoró 11 días en completar las placas control.

Porcentaje de inóculo óptimo para la producción de basidiomas

Con el inóculo obtenido (Fig. 16) se llevaron a cabo los experimentos de cultivo con paja de trigo como sustrato y con diferentes porcentajes de inóculo en la siembra. Se pudo determinar que en *O. canarii* se obtuvieron valores de EB de 116,4 a 85,3%, y que no se encontraron diferencias significativas con los diferentes porcentajes de inóculo en la siembra (aunque se vio una tendencia de mayor EB a mayor % de inóculo). En *O. cubensis*, en cambio, las diferencias fueron estadísticamente significativas, la mayor eficiencia biológica (115,2%) se obtuvo con 10% de inóculo, seguido por la siembra al 5% (81,4%) y al 1% (64,88% de EB) (Fig 17).

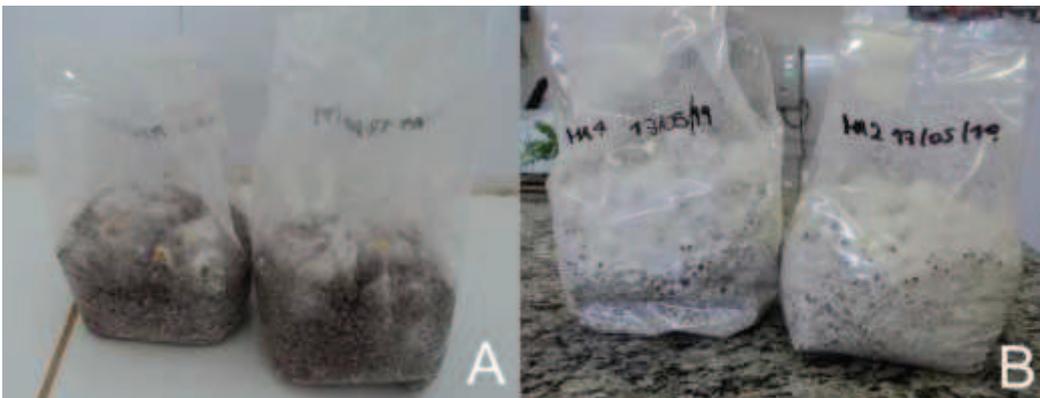


Figura 16. Producción de inóculo. A. Bolsas de inóculo 6 días posteriores a la inoculación; B. Bolsas de inóculo 21 días posteriores a la inoculación.

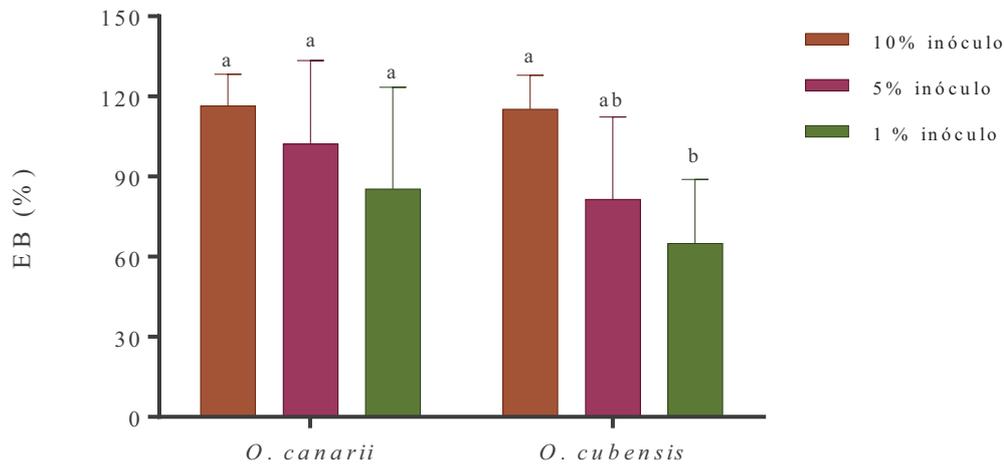


Figura 17. Eficiencia biológica de *O. canarii* y de *O. cubensis* producidas con tres tasas diferentes de inoculación. Las barras indican la desviación estándar y letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$, de acuerdo con el test de Tukey, $n = 8$.

Los basidiomas cosechados de *O. canarii* y *O. cubensis* se muestran en la Fig. 18. En cuanto a los parámetros morfológicos, no se encontraron diferencias significativas para ninguna de variables analizadas para el *O. canarii*; para *O. cubensis* se encontraron diferencias en las variables número de hongos y peso medio de los hongos (Tabla 3).



Figura 18. Cosecha de basidiomas de *Oudemansiella*. A y B. Colecta de basidiomas; C. Medición de diám. de píleo; D. Pesado de basidiomas.

En *O. canarii* el diámetro del píleo varió de 4,45, para una tasa de inoculación de 10%, a 4,90 cm para una tasa de 1%, el largo del estípite varió de 5,75 cm para una tasa de 5% a 5,94 cm para 10%, el ancho del estípite varió de 0,49 para 10% a 0,53 cm para 1%; el número de hongos promedio varió de 13,33 unidades para 1% a 18,25 unidades para 10%. El peso medio de los hongos varió desde 8,63 g para una tasa del 1% a 10,76 g para 5%. En el caso de *O. cubensis* el número de hongos promedio varió de 8,67 unidades para una tasa de inoculación de 1% que fue estadísticamente diferente a los valores de 5 y 10% (13,40 unidades). El peso medio de los hongos fue desde 8,94 g para una tasa de

inoculación del 5% que varió significativamente respecto del valor obtenido con una tasa del 1% (12,95 g) y del valor alcanzado por la tasa de inoculación al 10% (14,49 g). El diámetro del píleo varió de 4,54 cm para una tasa del 5% a 5,63 cm para 10%, el largo del estípite varió de 5,80 cm para una tasa del 5% a 6,80 cm para 10%, el ancho del estípite varió de 0,49 para una tasa del 5% a 0,53 cm para 1% (Tabla 3).

El primer día de cosecha, la duración total del ciclo, el número de oleadas y la distribución del rendimiento para los diferentes % evaluados se muestra en la Tabla 4. Respecto al primer día de cosecha, el mismo varió del día 48 a 52 para *O. canarii*. Los basidiomas producidos con tasas del 10% fueron los primeros en ser cosechados, a partir del día 31 al 48 y del 37 al 40, respectivamente. La duración total del ciclo fue de 60 a 77 días y el número de oleadas fue desde una a dos para todas las tasas de inoculación. El rendimiento (EB) se distribuyó con un mayor porcentaje en la primera oleada con tasa de inoculación del 10%, en cambio, con tasas de inoculación menores, varió de 40–100 % y de 20–100% en la primera oleada (Tabla 4). En cuanto al primer día de cosecha para *O. cubensis* fue de 50 a 56 días, dependiendo de la tasa de inoculación. Los primeros basidiomas en ser cosechados fueron los provenientes del ensayo con una tasa de inoculación del 10%. La duración total del ciclo fue de 51 a 79 días y el número de oleadas fue de 1 a 2 para todas las tasas de inoculación. El rendimiento se distribuyó con un mayor porcentaje en la primera oleada con tasa de inoculación del 10% y del 5%, en cambio, con tasa de inoculación del 1% varió de 40-100 % en la primera oleada (Tabla 4).

Tabla 3. Parámetros morfológicos y de rendimiento de *Oudemansiella canarii* y *O. cubensis* obtenidos con diferentes porcentajes de inoculación a la siembra.

Especie	% inóculo	Diam. del píleo (cm)	Largo del estípite (cm)	Ancho del estípite (cm)	Número de hongos (unidades)	Peso medio de los hongos (g)	Peso total (g)
<i>O. canarii</i>	10	^a 4,45± 0,18	^a 5,94± 0,25	^a 0,49±0,04	^a 18,25±4,86	^a 9,54±3,35	^a 163,00±16,67
	5	^a 4,73±0,12	^a 5,75±0,10	^a 0,52±0,01	^a 13,50±3,56	^a 10,76±2,21	^a 143,03±43,78
	1	^a 4,90±0,26	^a 5,79±0,26	^a 0,53±0,01	^a 13,33±5,82	^a 8,63±2,32	^a 119,50±53,36
<i>O. cubensis</i>	10	^a 5,63±1,29	^a 6,80±0,71	^a 0,51±0,05	^a 13,40±6,23	^a 14,49±6,77	^a 161,40±17,88
	5	^a 4,54±0,23	^a 5,80±0,35	^a 0,49±0,05	^a 13,40±5,86	^b 8,94±3,67	^{ab} 114,00±43,29
	1	^a 4,64±0,46	^a 6,08±0,89	^a 0,53±0,05	^b 8,67±6,38	^a 12,95±6,03	^b 90,83±33,72

Valores seguidos por diferentes letras en la misma columna y especie son diferentes significativamente con $p < 0,05$, a partir del test de Tukey, $n = 8$.

Tabla 4. Parámetros de cultivo *Oudemansiella canarii* y *O. cubensis* cultivadas con diferentes porcentajes de inoculación a la siembra.

Especie	% inocular	Primer día de cosecha	Duración total del ciclo	Número de oleadas	Distribución del rendimiento (%)	
					Oleada 1	Oleada 2
<i>O. canarii</i>	10	48 – 50	62-78	1-2	60-100	0-40
	5	49 – 50	60-77	1-2	40-100	0-60
	1	50-52	61-77	1-2	20-100	0-80
<i>O. cubensis</i>	10	50- 55	55-79	1-2	70-100	0-30
	5	51-54	51-78	1-2	60-100	0-40
	1	51-56	57-78	1-2	40-100	0-60

Sustrato óptimo para la producción de basidiomas

O. canarii alcanzó su máximo rendimiento cuando fue cultivada en paja de trigo (188,52% de EB); y se diferenció estadísticamente de los valores de EB obtenidos con aserrines de eucalipto, pino o álamo, que variaron de 46,30 a 91,12% de EB (Fig. 19). De forma similar, *O. cubensis* alcanzó su mayor rendimiento en paja de trigo (132% de EB) y el menor en aserrín de eucalipto (28,43% de EB) y en aserrín de pino (30,29% de EB). El aserrín de álamo se mostró como el segundo mejor sustrato (70,00% de EB) (Fig. 19).

Respecto a las características morfológicas de los basidiomas de *O. canarii*, se vieron diferencias significativas en todas las características morfológicas en todos los sustratos evaluados (Tabla 5). El máximo valor de diámetro de píleo fue 7,35 cm para aserrín de pino y el menor, 4,52 cm para aserrín de álamo. El mayor valor para largo del estípote fue 9,85 cm para aserrín de pino y el menor 6,11 cm para paja de trigo. Para el ancho del estípote, el máximo valor fue 0,87 cm para aserrín de pino y el menor, 0,53 para aserrín de álamo. La variable número promedio de hongos fue mayor en paja de trigo dando 25,57 unidades y menor en aserrín de pino, dando 3,00 unidades. El mayor peso de los hongos fue de 31,07 g en aserrín de pino, y el menor fue de 10,83 g para paja de trigo.

Para el caso de *O. cubensis*, de los basidiomas obtenidos en los diferentes sustratos, el número promedio de hongos fue la única variable que mostró diferencias significativas alcanzando su máximo valor de 14,5 unidades en paja de trigo y su mínimo valor de 3,2 unidades en aserrín de pino (Tabla 5). El diámetro del píleo varió de 5,70 cm para paja de trigo a 7,40 cm para aserrín de pino. El largo del estípote varió de 5,00 cm para aserrín de álamo a 5,88 cm para aserrín de pino. El ancho del estípote varió de 0,62 cm para aserrín de eucalipto a 0,66 cm para serrín de álamo. El peso medio de los hongos varió desde 12,93 g para paja de trigo a 29,34 g para aserrín de álamo.

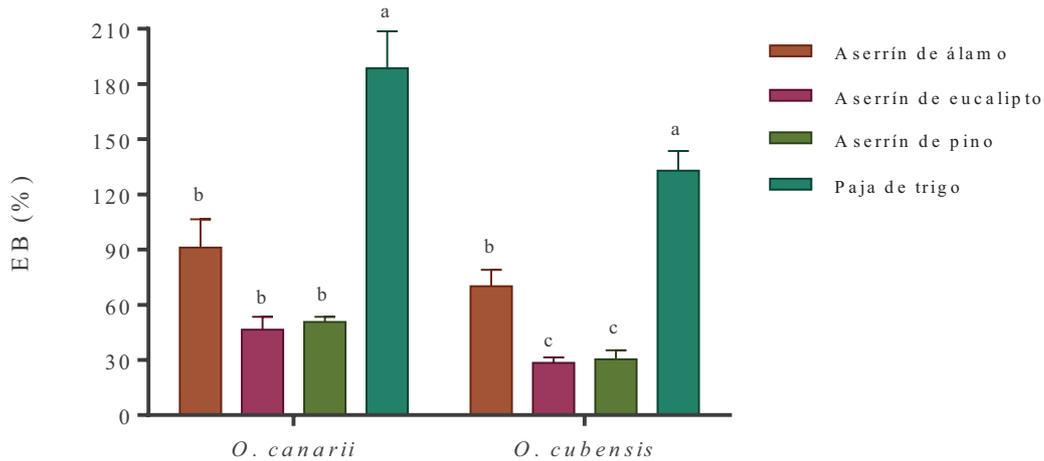


Figura 19. Eficiencia biológica de *O. canarii* y de *O. cubensis* producidas en cuatro tipos de sustratos lignocelulósicos. Las barras indican la desviación estándar y letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ de acuerdo con el test de Tukey, $n = 8$.

El primer día de cosecha, la duración total del ciclo, el número de oleadas y la distribución del rendimiento para todos los sustratos evaluados se muestra en la Tabla 6. Los sustratos fueron completamente colonizados en 21 días luego de la inoculación. El primer día de cosecha, para *O. canarii* varió de 28 a 54 días, dependiendo del sustrato. Los primeros basidiomas en ser cosechados fueron provenientes del aserrín de álamo y la paja de trigo, y a partir de los días 28 a 40 y de 40 a 43, respectivamente. La duración del período del cultivo varió de 48 a 74 días. El número de oleadas fue de 1 a 2 para la mayoría de los sustratos, excepto para la paja de trigo en la cual se vieron de 2 a 3 oleadas. Cuando el número de oleadas fue de una a dos el rendimiento se distribuyó de 42–100 % en la primera y de 0–58% en la segunda mientras que cuando las oleadas fueron de 2 a 3, la distribución del rendimiento fue de 38–84% en la primera oleada, de 11–55% en la segunda y de 0–12% en la tercera (Tabla 6).

Respecto al primer día de cosecha para *O. cubensis* el mismo varió del día 31 a 55. Los basidiomas producidos en aserrín de álamo y paja de trigo fueron los primeros en ser cosechados, del día 31 al 48 y del 37 al 40, respectivamente. La duración total del período varió de 46 a 71 días. El número de oleadas varió desde una a dos para todos los sustratos, excepto para la paja de trigo en la cual se obtuvieron de tres a cuatro oleadas. Cuando el número de oleadas fue de una a dos el rendimiento se distribuyó de 40–100 % en la primera y de 0–60% en la segunda; cuando el número de oleadas fue de tres a cuatro, el rendimiento se distribuyó de 25–70% en la primera oleada, 20–40% en la segunda, 10–20% en la tercera y 0–10% en la cuarta (Tabla 6).

Tabla 5. Parámetros morfológicos y de rendimiento de *Oudemansiella canarii* y *O. cubensis* obtenidos en los diferentes sustratos.

Especie	Sustrato	Diam. del píleo (cm)	Largo del estípite (cm)	Ancho del estípite (cm)	Número de hongos (unidades)	Peso medio de los hongos (g)	Peso total (g)
<i>O. canarii</i>	Aserrín de álamo	^b 4,52 ± 0,89	^b 6,30 ± 0,56	^b 0,53 ± 0,10	^b 12,17 ± 5,85	^b 11,27 ± 3,51	^b 127,57 ± 52,85
	Aserrín de eucalipto	^b 4,64 ± 0,73	^b 6,81 ± 0,83	^b 0,57 ± 0,10	^{bc} 6,29 ± 4,15	^b 12,06 ± 6,25	^b 64,94 ± 26,42
	Aserrín de pino	^a 7,35 ± 2,27	^a 9,85 ± 2,76	^a 0,87 ± 0,12	^c 3,00 ± 1,41	^a 31,07 ± 20,40	^b 71,03 ± 9,37
	Paja de trigo	^b 4,63 ± 0,59	^b 6,11 ± 0,88	^b 0,56 ± 0,10	^a 25,57 ± 6,21	^b 10,83 ± 3,70	^a 263,93 ± 74,73
<i>O. cubensis</i>	Aserrín de álamo	^a 6,56 ± 1,69	^a 5,00 ± 0,68	^a 0,66 ± 0,23	^b 5,20 ± 3,35	^a 29,34 ± 23,80	^b 98,00 ± 28,40
	Aserrín de eucalipto	^a 6,56 ± 2,60	^a 5,50 ± 0,61	^a 0,62 ± 0,16	^b 3,60 ± 2,97	^a 23,62 ± 22,49	^c 39,80 ± 9,34
	Aserrín de pino	^a 7,04 ± 1,88	^a 5,88 ± 2,27	^a 0,64 ± 0,34	^b 3,20 ± 1,30	^a 15,64 ± 8,01	^c 42,40 ± 15,52
	Paja de trigo	^a 5,70 ± 0,38	^a 5,32 ± 1,13	^a 0,63 ± 0,15	^a 14,50 ± 3,21	^a 12,93 ± 3,21	^a 186,17 ± 36,23

Valores seguidos por diferentes letras en la misma columna y especie son diferentes significativamente con $p < 0,05$, a partir del test de Tukey, $n = 8$.

Tabla 6. Parámetros de cultivo *Oudemansiella canarii* y *O. cubensis* cultivadas en diferentes sustratos.

Especie	Sustrato	Primer día de cosecha	Duración total del ciclo	Número de oleadas	Distribución del rendimiento (%)			
					Oleada 1	Oleada 2	Oleada 3	Oleada 4
<i>O. canarii</i>	Aserrín de álamo	28–40	60–74	1–2	42–100	0–58		
	Aserrín de eucalipto	45–54	48–71	1	100			
	Aserrín de pino	48–52	58–64	1–2	50–100	0–50		
	Paja de trigo	40–43	59–68	2–3	38–84	11–55	0–12	
<i>O. cubensis</i>	Aserrín de álamo	31–48	49–67	1–2	40–100	0–60	–	
	Aserrín de eucalipto	46–55	55–71	1–2	50–100	0–50		
	Aserrín de pino	45–55	46–55	1	100			
	Paja de trigo	37–40	63–64	3–4	25–70	20–40	10–20	0–10

Sistema óptimo para la producción de basidiomas

Para determinar la mejor técnica para inducir la producción de basidiomas de *Oudemansiella* se evaluaron cinco técnicas de producción diferentes (Tabla 2; Fig.7). *O. canarii*, obtuvo los mayores rendimientos con los sistemas de BP (Bolsas con perforiones) y TC (tierra de cobertura) obteniendo 140,30 y 121,63 % de EB, respectivamente y sin diferencias significativas entre sí. Los otros sistemas evaluados mostraron valores de EB significativamente menor, siendo: 69,52 para BA (Bolsas abiertas), 55,43 para FR (Frascos de vidrio) y 38,21% para BM (Bloques de micelio) (Fig. 20).

O. cubensis obtuvo similares resultados, mostrando los mayores rendimientos en bolsas con perforaciones (BP) alcanzando 142,24% de EB y en bolsas con tierra de cobertura (TC), logrando 117,38% de EB, sin diferencias significativas entre sí. Los menores rendimientos se encontraron en las técnicas de bloque de micelio (BM), bolsas abiertas (BA) y frascos (FR) alcanzando 37,62, 60,83 y 58,86% de EB, respectivamente, y sin diferencias significativas entre ellas.

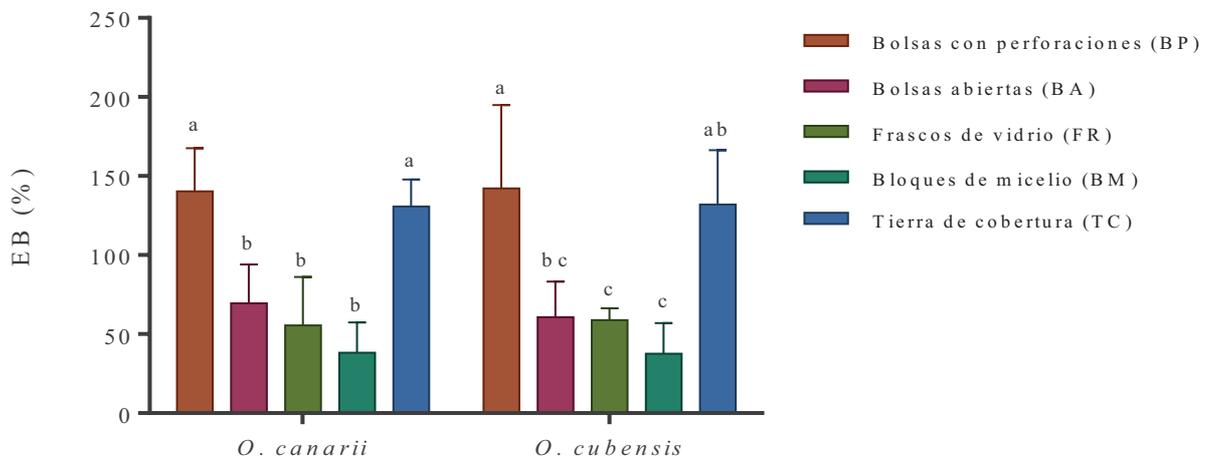


Figura 20. Eficiencia biológica de *O. canarii* y de *O. cubensis* en cinco sistemas de cultivo. Las barras indican la desviación estándar y letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ de acuerdo con el test de Tukey, $n = 8$.

Con respecto a las características morfológicas de los basidiomas obtenidos para *O. canarii*, las variables largo del estípite y número de hongos mostraron diferencias significativas (Tabla 7). El largo del estípite fue mayor en el sistema de TC y FR, alcanzando 7,98 y 7,40 cm, respectivamente. El menor valor fue obtenido por el sistema de BM con 5,19 cm. El mayor valor de número promedio de hongos fue visto en el sistema

BP con 30,38 unidades, mientras que el menor fue obtenido en el sistema de BA con 8,50 unidades. El diámetro del píleo varió desde 4,40 cm para el sistema de BA a 5,10 cm para el sistema de TC. La variable ancho del estípite varió desde 0,50 cm para el sistema BP a 0,58 para el sistema TC. El peso medio de los hongos varió de 7,07 g para el sistema BP a 13,57 g para el sistema de BA.



Figura 21. Basidiomas obtenidos. *O. cubensis* (A, B y C) y *O. canarii*. (D, E y F).

Para la especie *O. cubensis* (Fig. 21), las variables ancho del estípite, número de hongos y peso medio de los hongos mostraron diferencias significativas dependiendo del sistema de producción utilizado (Tabla 7). El sistema de BA mostró los mayores valores de ancho

de estípite alcanzando 0,82 cm y el sistema TC produjo los menores valores con 0,48 cm alcanzados. El mayor número de hongos se obtuvo con el sistema TC siendo 22,75 unidades, mientras que el menor número de hongos fue de 4,80 unidades, dado por el sistema de FR. El mayor peso medio de los hongos fue obtenido por los sistemas de BA y FR dando 25,55 y 21,06 g, respectivamente. El diámetro del píleo varió desde 4,95 cm usando el sistema BM a 7,47 cm usando el sistema BA. El largo del estípite varió desde 4,57 cm en el sistema BP a 6,17 cm usando el sistema de BA.

El primer día de cosecha, la duración del ciclo, el número de oleadas y la distribución del rendimiento de *O. canarii* y *O. cubensis* usando diferentes sistemas de cultivos, se muestran en la Tabla 8. El primer día de cosecha de *O. canarii* fue del 36 al 56, siendo el sistema de TC el primero en ser cosechado (día 36 al 42). La duración del período varió del día 59 al 77. El número de oleadas fue de uno a dos para BA y FR, de uno a tres para BM, de dos a tres para BP y de dos a cuatro para TC. Con respecto a la distribución del rendimiento, en el caso de una a dos oleadas se obtuvo de 50–100% para la primera y de 0–50% para la segunda. En el caso de 2–4 oleadas, la primera fue de 25–81%,8 la segunda de 19–65%, 0–16% la tercera y de 0–8% la cuarta varió de 25 a 54 (Tabla 8). En cuanto a *O. cubensis*, los primeros basidiomas en ser cosechados fueron producidos en el sistema TC desde el día 25 al 30, mientras que la duración del período varió de 48 a 74 días. El número de oleadas fue de una a dos para los sistemas de BA y FR, de uno a tres para BM, de dos a tres para TC y de dos a cuatro para BP. Con respecto a la distribución del rendimiento, en el caso de 1 a 2 oleadas, la distribución fue de 70–100% para la primera y de 0–30% para la segunda. En el caso de 2–4 oleadas, la primera fue de 40–70%, 18–46% la segunda, 0–60% la tercera y 0–30% la cuarta (Tabla 8).

Tabla 7. Parámetros morfológicos y de rendimiento de *O. canarii* y *O. cubensis* obtenidos con cinco técnicas de producción diferentes.

Especie	Sistema	Diam. del píleo (cm)	Largo del estípite (cm)	Ancho del estípite (cm)	Número de hongos (unidades)	Peso medio de los hongos (g)	Peso total (g)
<i>O. canarii</i>	BP	^a 4,46 ± 0,21	^b 5,23 ± 0,29	^a 0,50 ± 0,01	^a 30,38 ± 9,80	^a 7,07 ± 2,93	^a 196,43 ± 38,34
	BA	^a 4,40 ± 0,33	^b 5,47 ± 0,79	^a 0,57 ± 0,05	^b 8,50 ± 3,27	^a 13,57 ± 8,03	^b 97,33 ± 34,40
	FR	^a 5,06 ± 1,21	^{ab} 7,40 ± 2,43	^a 0,52 ± 0,04	^b 9,60 ± 7,80	^a 13,38 ± 7,74	^c 38,80 ± 21,49
	BM	^a 4,98 ± 1,06	^b 5,19 ± 1,94	^a 0,53 ± 0,13	^b 7,33 ± 4,08	^a 8,07 ± 2,74	^{bc} 53,50 ± 29,47
	TC	^a 5,10 ± 0,46	^a 7,98 ± 1,21	^a 0,58 ± 0,05	^b 18,00 ± 4,08	^a 9,65 ± 2,25	^a 170,29 ± 38,46
<i>O. cubensis</i>	BP	^a 5,39 ± 0,73	^a 4,57 ± 0,96	^{ab} 0,56 ± 0,10	^{ab} 15,86 ± 10,67	^{ab} 15,26 ± 10,67	^a 199,14 ± 73,69
	BA	^a 7,47 ± 2,58	^a 6,17 ± 1,75	^a 0,82 ± 0,39	^b 5,50 ± 5,43	^a 25,55 ± 16,96	^{bc} 85,17 ± 31,33
	FR	^a 7,10 ± 2,62	^a 4,96 ± 0,69	^{ab} 0,62 ± 0,11	^b 4,80 ± 2,28	^a 21,06 ± 11,02	^c 41,20 ± 5,26
	BM	^a 4,95 ± 1,05	^a 5,14 ± 1,95	^{ab} 0,54 ± 0,14	^b 7,00 ± 3,95	^b 9,16 ± 6,02	^c 52,67 ± 29,79
	TC	^a 5,00 ± 1,00	^a 6,03 ± 0,99	^b 0,48 ± 0,10	^a 22,75 ± 11,42	^b 7,79 ± 2,66	^{ab} 164,34 ± 63,09

Valores seguidos por diferentes letras en la misma columna y especie son diferentes significativamente con $p < 0,05$, a partir del test de Tukey, $n = 8$.

Tabla 8. Parámetros de cultivo *O. canarii* y *O. cubensis* obtenidos con cinco técnicas de producción diferentes.

Especie	Sistema	Primer día de cosecha	Duración total del ciclo	Número de oleadas	Distribución del rendimiento (%)			
					Oleada 1	Oleada 2	Oleada 3	Oleada 4
<i>O. canarii</i>	BP	40-44	69-75	2-3	60-95	5-40	0-25	
	BA	51-56	60-77	1-2	50-100	0-50		
	FR	50-53	59-77	1-2	60-100	0-40		
	BM	47-52	68-73	1-3	30-100	0-70	0-20	
	TC	36-42	59-67	2-4	25-81	19-65	0-16	0-8
<i>O. cubensis</i>	BP	37-41	59-70	2-4	40-70	18-46	0-60	0-30
	BA	46-54	48-63	1-2	70-100	0-30		
	FR	39-46	56-57	1-2	75-100	0-25		
	BM	46-50	68-71	1-3	28-100	0-72	0-16	
	TC	25-30	60-74	2-3	22-88	12-88	0-22	

Discusión

Existe muy poca información sobre el cultivo de oudemansiellas. *O. canarii* ha sido cultivada en bagazo de caña de azúcar, paja de arroz, cáscara de semilla de algodón y aserrines no especificados (Ruegger *et al.* 2001; Xu *et al.* 2016). Además, prácticamente no existen datos sobre algunos parámetros críticos de producción tales como: número de hongos cosechados, peso medio de los hongos, primer día de cosecha, duración total del período, ni tampoco de los parámetros morfológicos. En cuanto a *O. cubensis*, no existen evidencias de haber sido cultivada antes, por lo tanto, no hay información al respecto.

En cuanto a los análisis de algunos parámetros importantes para el desarrollo del micelio, después de evaluar tres temperaturas diferentes sobre el crecimiento micelial, observamos que el micelio de *O. cubensis* tiene un amplio rango de preferencia de temperaturas ya que demoró ocho días en colonizar completamente las placas de Petri en las tres temperaturas evaluadas. *O. canarii*, por su parte, mostró preferencia por las temperaturas de 20 y 25 °C respecto a 30 °C, ya que demoró dos días más en completar la placa cuando fue expuesta a ésta última. Las tasas de crecimiento aquí observadas fueron algo mayores a las observadas por Sede y Lopez (1999), quienes informaron que el micelio de *O. canarii* completó una placa de Petri con agar malta dextrosado a 25 °C en 3 semanas. Por otro lado, Carreño-Ruiz *et al.* (2014) no encontraron diferencias en el crecimiento micelial de *O. canarii* a 26 o 30 °C in APD. Basados en nuestros resultados, podemos decir que 25 °C es una temperatura adecuada para incubar ambas especies, y se corresponde con la temperatura óptima para el crecimiento micelial de la mayoría de las especies fúngicas que son intensivamente cultivadas (Stamets 2000), aunque podría haber cierta variación según las cepas seleccionadas (Zharare *et al.* 2010).

Cada hongo cultivable tiene un rango óptimo de pH para el desarrollo micelial. Se sabe que los hongos tienden a acidificar el sustrato en el que crecen debido a la liberación de diferentes componentes ácidos y en general tienen un buen crecimiento a pH neutros o levemente ácidos (Bellettini *et al.* 2019). Los resultados obtenidos en este trabajo para *O. cubensis* y *O. canarii* concuerdan con tal generalidad, ya que se observó un mayor crecimiento en rango de pH de entre 5 y 7, que disminuyó hacia pHs más alcalinos (pH 9). En la bibliografía no hay reportes para las especies en estudio, pero similarmente, Choi *et al.* (2011) evaluaron un rango de pH de 4 a 9 para el crecimiento del micelio de *Oudemansiella mucida* y obtuvieron el crecimiento más rápido en el pH 5. Kim *et al.* (2005) evaluaron el crecimiento micelial en un rango de pH de 4 a 9 para *Himenopellis radicata*, una especie de la misma familia que *Oudemansiella*, y obtuvieron el mayor crecimiento en pH 6. Por otra parte, como para poner un valor de una especie de cultivo de referencia, Kalmis *et al.* (2008), encontraron que el pH óptimo para el crecimiento micelial de *P. ostreatus* está entre 6,5 y 7,0.

Según Stamets (2000), el principal objetivo de generar inóculo en base a granos de cereales es impulsar al micelio a un estado de vigor, antes de ser colocado en el sustrato de cultivo, ya que los granos además de funcionar como un vehículo para el micelio, funcionan como un suplemento nutricional, debido a su composición rica en hidratos de carbono (Jaramillo y Albertó, 2019). Sin embargo, los granos de cereales no son la única materia prima posible para generar inóculo, Ortiz *et al.* (2017) evaluaron el uso de cápsulas de alginato para producción de inóculo y en otros países como Brasil suele utilizarse aserrín de maderas duras para producción de inóculo en reemplazo del uso de granos. Los sustratos alternativos pueden presentar ventajas como una mayor velocidad de producción en el caso del alginato o un menor costo en el caso del aserrín; además según Mata y Savoie (2005), el agregado de compuestos ricos en lignina y fenoles a los

granos para hacer inóculo genera una pre adaptación en el metabolismo del micelio otorgándole ventajas competitivas cuando posteriormente se siembra en sustratos a base de maderas. En este trabajo se encontró que todos los sustratos ensayados permitieron el desarrollo del micelio de *O. canarii* y *O. cubensis*. Para ambas especies, los granos mostraron el desarrollo micelial más rápido respecto al aserrín. Tanto en el mijo como el sorgo se completó el crecimiento en menor cantidad de días, mientras que el trigo se mostró como el segundo mejor sustrato seguido por la avena. El aserrín de eucalipto, si bien permitió el desarrollo del micelio, este creció en forma más lenta y mejoró un poco cuando se lo combinó con el sorgo. Sería interesante explorar el aserrín de otras maderas como alternativas para general inóculo de buena calidad y bajo costo.

En cuanto a medición de tolerancia al carbendazim, se observó únicamente un retraso de cuatro días en el crecimiento del micelio en placa de Petri en presencia del fungicida en relación al control. Podría decirse que estos resultados significan algo muy positivo ya que el carbendazim es uno de los fungicidas más comúnmente utilizados para el control de contaminaciones en el cultivo de hongos comestibles (Sharma *et al.* 2020).

Una vez determinadas varias cuestiones importantes relacionadas con el crecimiento micelial, nos enfocamos en evaluar algunos parámetros del cultivo propiamente dichos. En primer lugar, evaluamos tres tasas de inoculación diferentes. En ambas especies vimos una clara tendencia a la obtención de una mayor eficiencia biológica a mayor tasa de inoculación, la cual fue estadísticamente significativa en el caso de *O. cubensis* (Fig. 17). Estos resultados concuerdan con los de Jaramillo y Albertó (2019), que obtuvieron aumentos en la eficiencia biológica conforme aumentó la tasa de inoculación para *P. ostreatus*; Bhatti *et al.* (2007), por el contrario, no encontraron aumentos en los rendimientos más allá de la tasa de inoculación al 3% para *P. ostreatus* al igual que Smita

(2011), que no obtuvo diferencias significativas cuando aumentó la tasa de inoculación por encima del 8 % para el caso del hongo comestible shiitake.

Las tasas de inoculación del 5 y 10% proporcionaron además, los mayores números de hongos cosechados, sin embargo, no se encontraron diferencias explicadas por este parámetro en cuanto a las características morfológicas evaluadas. Por otra parte, los primeros hongos en ser cosechados (precocidad) fueron aquellos provenientes de los ensayos con una tasa de inoculación al 10%, lo que nos permite suponer que a esa tasa se logró una mayor velocidad en el crecimiento y se alcanzó antes la madurez del micelio. Sin embargo, como el tiempo de incubación fue el mismo para todas las bolsas (30 días) consideramos que no tenía sentido evaluar la productividad [EB / días del ciclo productivo (Royse 1985)] para cada tasa de inoculación ya que en este caso sería lo mismo que comparar las eficiencias biológicas. La medición de este parámetro, resultaría fundamental para poder estimar las ventajas reales de las diferentes tasas de inoculación, no sólo en términos de eficiencia biológica, sino también en función al tiempo y a los costos beneficios de adquirir una mayor cantidad de inóculo en pos de aumentar la productividad (Jaramillo y Albertó 2019).

Dado que hay disponibilidad en nuestra zona (región pampeana) de varios sustratos que podrían emplearse para cultivar estas especies, decidimos evaluar y comparar los parámetros de cultivo empleando algunos de ellos. Los resultados obtenidos, indicaron que todos los sustratos evaluados resultaron aptos para la producción de basidiomas de *O. canarii* y *O. cubensis*. Ambas especies mostraron un comportamiento similar en cuanto a eficiencia biológica alcanzada y preferencias de sustratos (Fig. 19). Curiosamente, a pesar de que las especies del género *Oudemansiella* son halladas creciendo naturalmente sobre maderas, ya que son organismos descomponedores primarios, se vio una clara preferencia por la paja de trigo por sobre los aserrines, obteniendo una EB de 188,52%

para *O. canarii* y de 132% para *O. cubensis* cuando fueron cultivadas en la paja de dicho cereal. Podría pensarse que una de las razones de tal comportamiento sea la relación C/N de los materiales, la cual es aproximadamente de 1000:1 en los aserrines de álamo, el pino y eucalipto (Mathers *et al.* 2007; Varnero *et al.* 2010) mientras que en la paja de trigo ronda valores de 100/1 (Zavalloni *et al.* 2011). Estos resultados son similares con los obtenidos por Xu *et al.* (2016) quienes obtuvieron las mayores EB% de *O. canarii* sobre cascara de semilla de algodón suplementada con salvado de trigo, con una relación C/N de aproximadamente 66/1, dando 113,64% de EB comparados con 85,44% de EB obtenidos en aserrín no especificado. De forma similar, Ruegger *et al.* (2001) obtuvieron las mayores eficiencias biológicas (55,66%) en bagazo de caña de azúcar suplementado con salvado de trigo, mientras que las eficiencias obtenidas en aserrín de *Eucalyptus* suplementado con salvado de trigo fueron considerablemente menores (19,51% de EB). Respecto a las características morfológicas de los basidiomas cultivados en los diferentes sustratos, observamos que *O. canarii* mostró diferencias significativas en todos los parámetros evaluados, mientras que *O. cubensis* solamente mostró diferencias en el número promedio de hongos producidos y este fue obtenido en el sustrato con mayor EB. Por lo tanto, podría decirse que los incrementos en la EB están mayoritariamente explicados por el número de hongos más que por un aumento en el peso medio de los mismos. Esta relación positiva entre rendimiento y número de hongos fue ampliamente reportada por diversos autores para otras especies (Girmay *et al.* 2016; Navarro *et al.* 2017; Zied *et al.* 2019). Cabe igualmente señalar que en el cultivo de *O. canarii* en aserrín de *Pinus*, donde el número de hongos obtenidos fue el menor, se observaron los mayores tamaños, dando un diámetro de pileo de 7,35 cm y un peso total de 31,07 g (Tabla 5). Por otra parte, comparando los diferentes parámetros de cultivo obtenidos en los diferentes sustratos (Tabla 6), se observó que fueron necesarios al menos 28 días desde

la siembra para la obtención de basidiomas de *O. canarii* y 31 días para *O. cubensis*. Los sustratos que obtuvieron la mayor precocidad fueron aserrín de álamo y paja de trigo. En esta última, en la cual se obtuvieron las mayores EB, la duración total del ciclo de cultivo fue 40 días para *O. canarii* y 37 días para *O. cubensis*. El número de oleadas fue variable según el sustrato, siendo que en ambas especies se obtuvo el mayor número de oleadas en la paja de trigo (hasta 3 o 4). Tal como ocurre en la mayoría de los hongos cultivables, la primera y segunda oleada produjeron los mayores rendimientos (Tabla 6). La suma de las dos primeras oleadas dio en promedio 95% del total cosechado. En general, la producción de hongos declina luego de cada oleada debido al agotamiento de los nutrientes disponibles, la disminución de nutrientes específicos, la proliferación de microorganismos contaminantes o la acumulación de metabolitos tóxicos o minerales (Royse *et al.* 2008). Dado que las dos primeras oleadas alcanzan casi la totalidad de la producción es recomendable solo extender el ciclo de cultivo por dos oleadas. Esto es altamente beneficioso para el productor que al ver acortado el ciclo productivo podrá reemplazar las bolsas agotadas por nuevas bolsas y de este modo, al cabo de un año el número de lotes que produzca será considerablemente mayor y por consiguiente podrá producir más kg de hongos en un mismo espacio.

Como paso siguiente, nos enfocamos en proponer una metodología para determinar cuál era la mejor manera de cultivar estas especies de *Oudemansiella* para lo cual nos enfocamos en la optimización del sistema de inducción y producción de cuerpos fructíferos. Para alcanzar este objetivo, fueron evaluadas algunas de las técnicas más extensamente usadas para cultivar los hongos más consumidos del mundo (Tabla 2). Como puede verse en esta tabla, se seleccionó una especie modelo como ejemplo de cada sistema de cultivo evaluado; esto se hizo en base al sistema más comúnmente usado, el cual no es necesariamente exclusivo de dichas especies. Con base en los resultados

anteriores, en los cuales la paja de trigo resultó ser el mejor sustrato evaluado, la misma fue seleccionada para realizar los ensayos de optimización del sistema para inducción y producción de basidiomas. Los sistemas que alcanzaron los mayores rendimientos fueron el de BA y TC para ambas especies (Fig. 20). El primero, es el sistema más frecuente para producir gírgolas (*Pleurotus* spp.) (Stamets 2000), las cuales son los segundos hongos más cultivados del mundo y en cuanto al sistema de TC, es el sistema utilizado para la producción de *Agaricus* spp. (Pardo-Giménez *et al.* 2017), el cuarto género más cultivado del mundo (Fig. 1) y el más cultivado de la Argentina y de América (Sánchez *et al.* 2018). La tierra de cobertura en el cultivo de hongos tiene varias funciones, tales como las de suministrar agua para el desarrollo de los basidiomas, constituir un soporte físico para los mismos, y en el caso de *Agaricus* spp., permite la ocurrencia de varias oleadas altamente productivas (Khakimov *et al.* 2018). Dado que los rendimientos obtenidos en ambos sistemas son similares, debido al costo adicional que implica el uso de tierra de cobertura, el sistema de BP para la producción intensiva de *Oudemansiella* spp. resultaría ser el más recomendable (Alberti *et al.* 2021b). Los demás sistemas evaluados (BA, FR y BM), parecieran ser inadecuados ya que produjeron rendimientos significativamente menores. Probablemente, los bajos valores de EB obtenidos con estos sistemas, están asociados a la deshidratación del sustrato a partir de la superficie de micelio expuesta, ya que el correcto desarrollo de los hongos es altamente dependiente de la disponibilidad constante de agua (Navarro *et al.* 2020). Hemos observado que a pesar que los niveles de humedad en el cuarto de cultivo se mantuvieron elevados, el micelio tuvo una tendencia a la desecación mientras que los sistemas de BP como el de TC, aparentemente conservaron mejor la humedad en el sustrato. Mandeel *et al.* (2005) obtuvieron las mayores eficiencias biológicas de *P. columbinus* en un sistema de bolsas con perforaciones cuando se lo comparó con otros sistemas de cultivo (bandejas de plástico, bandejas de porcelana,

bolsas tejidas de poliéster); ellos justificaron los resultados asumiendo que las bolsas de polietileno son más eficientes para retener humedad y para controlar los niveles de contaminación respecto a los demás sistemas evaluados.

La Tabla 9 resume todos los reportes previos de cultivo de todas las especies de *Oudemansiella* en diferentes sustratos y la EB obtenida en cada uno. Como puede observarse, los rendimientos obtenidos en este trabajo son mayores a los reportados, incluyendo a los valores alcanzados por Magingo *et al.* (2004) para *O. tanzanica*, el cual alcanzó 101,9% de BE en paja de arroz, 126,1% en desechos de sisal, y 145,4% en aserrín sin especificar. Respecto a *O. submucida*, Li *et al.* (2012) reportaron % de EB de 140,36% en mezclas de aserrín con cascara de semilla de algodón. Además, la EB obtenida en nuestro trabajo es altamente superior a los valores promedios de EB reportados para los hongos lignocelulósicos más cultivados del mundo. Nandni y Mishra (2018) reportaron valores de hasta 40% para *L. edodes*; Jaramillo y Albertó (2013) hasta 106,9% para *P. ostreatus*; Fanadzo *et al.* (2010) obtuvieron 71% para *P. sajor-caju*; Ahmed *et al.* (2009) obtuvieron 75,06% para *P. florida*; y Kirbag y Akyuz (2008) alcanzaron 48% de EB para *P. eryngii*.

Tabla 9. Comparación de la eficiencia biológica de especies de *Oudemansiella* cultivadas en diferentes sustratos.

Espece	Sustrato	Eficiencia Biologica (%)	Referencias
<i>O. canarii</i>	Aserrín de álamo	91,12	Este trabajo
<i>O. canarii</i>	Aserrín de eucalipto	46,39	Este trabajo
<i>O. canarii</i>	Aserrín de pino	50,74	Este trabajo
<i>O. canarii</i>	Paja de trigo	188,52	Este trabajo
<i>O. canarii</i>	Bagazo de caña de azúcar suplementado con salvado de trigo	55,66	Ruegger <i>et al.</i> 2001

<i>O. canarii</i>	Aserrín suplementado con salvado de trigo	19,51	Ruegger <i>et al.</i> 2001
<i>O. canarii</i>	Marlo de maíz suplementado con salvado de trigo	113,64	Xu <i>et al.</i> 2016
<i>O. canarii</i>	Cáscara de semilla de algodón suplementada con salvado de trigo	105,65	Xu <i>et al.</i> 2016
<i>O. canarii</i>	Aserrín suplementado con salvado de trigo	85,49	Xu <i>et al.</i> 2016
<i>O. cubensis</i>	Aserrín de álamo	70	Este trabajo
<i>O. cubensis</i>	Aserrín de eucalipto	28,43	Este trabajo
<i>O. cubensis</i>	Aserrín de pino	30,29	Este trabajo
<i>O. cubensis</i>	Paja de trigo	132,98	Este trabajo
<i>O. submucida</i>	Aserrín mezclado con cáscara de semilla de algodón	140,36	Li <i>et al.</i> 2012
<i>Oudemansiella tanzanica nom. prov.</i>	Paja de arroz	101,9	Magingo <i>et al.</i> 2004
<i>Oudemansiella tanzanica nom. prov.</i>	Desechos de sisal	126,1	Magingo <i>et al.</i> 2004
<i>Oudemansiella tanzanica nom. prov.</i>	Aserrín sin especificar	145,4	Magingo <i>et al.</i> 2004

Las características morfológicas de algunos basidiomas variaron con el sistema de cultivo. Observamos que para ambas especies cultivadas en los tratamientos BP y TC, donde se obtuvieron las mayores EB%, se cosecharon un mayor número de hongos. Este mismo patrón se observó en *P. ostreatus* en el cual los mayores rendimientos estuvieron asociados a un mayor número de hongos y ocasionalmente a un mayor número de oleadas (Jaramillo y Albertó 2019).

En cuanto al primer día de cosecha, para *O. canarii* fueron necesarios 36 días a partir de la siembra, y 25 días para *O. cubensis* cuando se utilizó el sistema de BP. Dicho sistema,

fue el segundo más precoz luego del sistema de TC. La duración total del ciclo de cultivo no varió demasiado entre los tratamientos siendo de 59 a 77 para *O. canarii* y 59 a 74 de para *O. cubensis*. Estos periodos de tiempo son similares a los estimados para el cultivo de for *Pleurotus* spp. y *A. bisporus*. Stamets (2000) reportó que son necesarios de 60–76 días para el ciclo de *P. ostreatus*. Patar *et al.* (2018) reportaron un período de 64 días para el cultivo de *P. sajor-caju* y Raghav *et al.* (2016) reportó un período de entre 67 y 85 para cultivar diferentes especies de *Pleurotus*. Para *A. bisporus* se han descrito períodos de 58–60 días (Ergun *et al.* 2007; Stamets 2000). Por otro lado, para la producción de shiitake, *L. edodes* se han reportado períodos de entre 210 y 360 días (Przybyłowicz y Doughue 1990; Royse *et al.* 1985). El hecho de que las especies de *Oudemansiella* puedan ser producidas en sistemas similares a los utilizados para *P. ostreatus* utilizando paja de trigo, les proporciona una ventaja enorme. *P. ostreatus*, comúnmente conocido como gírgola gris, gírgola parda u hongo ostra, está catalogada como la especie más sencilla, rápida, y menos costosa para el cultivo intensivo, además de que requiere un muy bajo nivel tecnológico (Alberti *et al.* 2021a; Patel *et al.* 2019). Consecuentemente, sería posible que se expanda el conocimiento sobre el cultivo de estas especies de *Oudemansiella* y que corran la misma suerte de convertirse en uno de los hongos más ampliamente cultivados.

Conclusiones del capítulo

A partir de este capítulo, definimos varios de los parámetros más importantes para el cultivo de dos especies de *Oudemansiella*, siendo este, el primer reporte de cultivo de *O. cubensis* en el mundo. Además, se propuso una metodología para determinar el mejor sistema para inducción de basidiomas de *Oudemansiella*, que podría utilizarse para cultivar cualquier hongo xilófago por primera vez.

Se determinó que el micelio de ambas especies es resistente al carbendazim. Se concluye que para el cultivo de oudemansiellas, es recomendable generar inóculo a partir de granos de sorgo o mijo a un pH inicial neutro o levemente ácido y a 25°C. La siembra debe realizarse a una tasa del 10% y se recomienda el uso de paja de trigo como sustrato en sistema de bolsas plásticas con perforaciones. Las temperaturas de fructificación se encuentran dentro del rango 20-24 C. La duración del cultivo es de entre 46 y 79 días pero puede acortarse, ya que se recomienda obtener solo las dos primeras oleadas. En las condiciones ensayadas hemos obtenido rendimientos promedio de 188,52 % para *O. canarii* y de hasta 142,24% para *O. cubensis*, siendo estos valores altos lo que permitiría soportar el cultivo comercial de estas especies.

CAPITULO 3

Composición proximal, perfil de ácidos grasos y capacidad antioxidante de hongos del género *Oudemansiella*

Introducción

Existe vasta evidencia científica sobre cómo los componentes de los alimentos y la nutrición se relacionan con la salud humana (Jones y Frongillo 2006; Spence *et al.* 2009; Tarasuk *et al.* 2018). Estos componentes incluyen tanto a los macronutrientes (proteínas, carbohidratos y lípidos) que proporcionan el principal sustento de todos los organismos heterótrofos, así como también a los micronutrientes que se constituyen por las vitaminas, los minerales y demás compuestos vinculados al correcto funcionamiento de los organismos y prevención de enfermedades.

Los hongos comestibles son considerados alimentos de alto valor nutricional ya que además de contener carbohidratos, fibras y vitaminas, son bajos en calorías, sodio, grasas, no poseen colesterol y a su vez, suelen contener proteína con todos los aminoácidos esenciales (Mattila *et al.* 2001). Los carbohidratos y las fibras representan el mayor porcentaje de su composición variando desde el 50 al 90%; las vitaminas presentes suelen ser B1, B2, B12, C, D y E (Heleno *et al.* 2010; Mattila *et al.* 2001); las proteínas pueden representar del 4,4 al 41% y los lípidos, del 1 al 9% (Kalač 2016). Respecto a estos últimos, están compuestos por los ácidos grasos, que son un conjunto amplio de moléculas con distintas características.

Los ácidos grasos omega-3 y omega-6 son nutrientes esenciales para la salud, benefician al cerebro a lo largo de toda la vida, alivian los síntomas de artritis reumatoide y depresión, lentifican el progreso de la enfermedad de Alzheimer, bajan los niveles de la glucemia en ayunas, protegen frente al desarrollo de diabetes tipo II y también frente al cáncer (Ortega *et al.* 2013). Actualmente, la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados y especialmente de ácidos grasos omega-3, está por debajo de los niveles recomendados para favorecer una salud óptima en la mayor parte de las población mundial (Gómez-

Candela *et al.* 2011). Los hongos comestibles en general, contienen una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados respecto a los saturados siendo los contenidos en general: oleico: entre 1 y 60,3%, linoleico de 0 –81,1%; linolénico: de 0–28,8% (Sande *et al.* 2019). Estos dos últimos, además de aportar energía, se pueden biotransformar, generando componentes bioactivos con variadas acciones fisiológicas. Desde este punto de vista se considera que el ácido linoleico (18:2 omega -6, LA) y el ácido α -linolénico (18:3 omega -3, ALA) son ácidos grasos esenciales (Catalán *et al.* 2015). Esta característica agrega a los hongos el valor de alimentos recomendados para dietas de personas con altos niveles de colesterol en sangre (González-Tijera *et al.* 2014).

Además de su valor nutricional, algunos hongos comestibles tienen compuestos activos con aplicaciones medicinales lo que les da la denominación de alimentos nutraceuticos. Estos compuestos que incluyen compuestos fenólicos policétidos, terpenos y esteroides (Kues y Liu 2000), se consideran responsables de las propiedades antioxidantes de los hongos comestibles. Los antioxidantes, neutralizan los radicales libres que son moléculas producidas naturalmente por nuestro organismo pero cuya acumulación está asociada a numerosas enfermedades (Khatua *et al.* 2013).

En los últimos años, la restricción en el uso de algunos antioxidantes sintéticos en la industria alimenticia, debido al hallazgo de toxicidad ocasionada por productos tales como el BHA (2-terc-butil-4-metoxifenol) y el BHT (2,6-diterc-butil-4-metilfenol) incrementó el interés por el estudio de antioxidantes naturales (Lorenzo *et al.* 2013). Numerosos autores han reportado la alta capacidad antioxidante de los hongos comestibles (Choi *et al.* 2006; Erbiai *et al.* 2021; Kozarski *et al.* 2015; Lo y Cheung 2005) de allí el interés en conocer la capacidad de especies comestibles y cultivables.

En cuanto a la información sobre el valor nutricional del género *Oudemansiella*, sólo se ha reportado el valor nutricional de *O. canarii* y *O. submúcida* (Ruegger *et al.* 2001; Xu

et al. 2016; Zhou *et al.* 2015), pero la información en general es escasa y superficial. Por ejemplo se desconoce el perfil de ácidos grasos o aminoácidos que las constituyen. De manera similar, existen algunos pocos trabajos sobre la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de *O. canarii* (Acharya *et al.* 2019; Contato *et al.* 2020), pero no se cuenta con información acerca de la actividad antioxidante y compuestos fenólicos de *O. cubensis*.

Objetivo general del capítulo

- Estudiar la composición proximal, perfil de ácidos grasos y capacidad antioxidante de las especies del género *Oudemansiella* identificadas en el país.

Objetivos específicos del capítulo

- Determinar la composición proximal de los basidiomas de *O. canarii* y *O. cubensis*.
- Determinar la composición de ácidos grasos.
- Determinar el contenido de fenoles totales.
- Determinar la actividad antioxidante por diferentes métodos analíticos.

Materiales y métodos

Cepas

Las cepas usadas fueron *O. canarii* ICFC 853/17 (Buenos Aires, Argentina) y *O. cubensis* ICFC 852/17 (Corrientes, Argentina). Las mismas fueron aisladas e identificadas tal como se detalló en el capítulo 1. Para los análisis se utilizaron basidiomas secos cultivados en paja de trigo (sembrado a una tasa del 10 % en bolsa con perforaciones, tal como se detalló en el capítulo 2).

Composición proximal

Las determinaciones de proteína, fibra y lípidos fueron llevadas a cabo en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA, La Plata, Argentina). El contenido de proteínas fue determinado utilizando el método Kjeldhal (usando un factor de conversión de 4,38); el contenido de lípidos se estimó mediante el método Soxhlet; la fibra dietaria fue determinada a partir del kit enzimático gravimétrico Megazime™ (Bray, Irlanda). El contenido de cenizas fue estimado de acuerdo con APHA (1992). El contenido de carbohidratos fue determinado por diferencia de 100 menos la suma de los porcentajes de todos los componentes mencionados anteriormente.

Perfil de ácidos grasos

Todas las determinaciones fueron llevadas a cabo en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA, La Plata, Argentina). Para la obtención de la fase lipídica se utilizó el método de Folch. Se pesó una cantidad adecuada de muestra y se le agregó 10 mL de mezcla cloroformo: metanol en relación 2:1. Se lo dejó a 4°C sin agitación toda la noche, se filtró y se adicionó 2 mL de agua destilada Mili

Q. Se centrifugó 5 min a 620 rfc (Rolco, Argentina). Se separó la fase orgánica y se evaporó el solvente con una corriente de nitrógeno quedando solamente los lípidos. Para la derivatización y metilación se transvasaron los lípidos obtenidos y se les adicionó 2 mL de una solución de HCl en metanol (5% v/v, con una pizca de sulfato de sodio como deshidratante), con el fin de solubilizar los ácidos grasos presentes. Se tapó y agitó vigorosamente, para posteriormente colocarlos en un baño con agua hirviendo por 10 min. Después de enfriar, se agregó 1 ml de agua destilada Mili Q y 1 mL de hexano. Los tubos se taparon, se agitaron y se centrifugaron por 15 min a 1333 rfc (Rolco, Argentina). Se tomó el sobrenadante con los ésteres metílicos disueltos en hexano y se filtró (0,25 μ m). Para la separación e identificación de los ácidos grasos, los ésteres metílicos (1 μ L) se inyectaron en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A (Agilent Technologies; EEUU) con detectores de ionización de llama. Se utilizó una columna capilar DB 23 (30 m, 250 μ m i.d., 0,25 mm) marca Supelco. El modo dividido fue 50:1 y el programa de temperatura del horno fue: isoterma 1 min a 50°C, de 50 a 175°C a 25°C/min, de 175 a 230°C a 4°C/min, isoterma a 230°C durante 15 min. Caudal (helio): 0,4763 mL min. Las temperaturas del inyector y del detector se mantuvieron a 250 y 280°C, respectivamente. Los ácidos grasos se identificaron al comparar con los tiempos de retención de los estándares de los esteres metílicos de ácidos grasos Supelco 37-Component FAME Mix (Sigma-Aldrich, EEUU) Y se analizó el área de los diferentes picos. Las determinaciones se analizaron por duplicado y se expresaron como gramos del ácido graso cada 100 g de lípidos.

Extractos metanólicos

Para los análisis de las propiedades antioxidantes se realizaron extractos metanólicos utilizando 1 g de basidiomas deshidratados molidos con nitrógeno líquido y suspendidos en 10 ml de metanol al 80%. Se sonicaron 5 min., se dejaron en agitación 10 min. y se

filtraron con filtro Whatman número 40, se rotaevaporaron y se pesaron los extractos semisecos. Luego, se prepararon concentraciones conocidas en metanol 80% para la realización de los ensayos.

Contenido de fenoles totales

Para medir el contenido de fenoles totales se usó el método de Zhang *et al.* (2006). En una placa de 96 pocillos se mezclaron 20 μ l de muestra con 100 μ l de reactivo Folin al 10% (Sigma Aldrich™, EEUU). Esto se mezcló y se dejó reposar 5 min. Se agregaron 80 μ l de Na₂CO₃ al 7,5% y se mezcló nuevamente. Se dejó reposar en oscuridad y a temperatura ambiente durante 2 h. Luego se midió la absorbancia a 750 nm en el lector Synergy H1 (BioTek). El blanco se realizó con metanol 80% en el lugar de la muestra. La curva de calibración se realizó con ácido gálico (de 0 a 10 μ g/ml) y a partir de la ecuación de la recta los resultados fueron expresados en equivalentes de ácido gálico (EAG/ g de peso seco).

Actividad antioxidante

Actividad antioxidante por el método de DPPH (2,2-difenil-1-picrylhydrazyl)

Para medir la capacidad reductora del radical DPPH se usó el método de Vaz *et al.* (2011). En una placa de 96 pocillos se colocaron 270 μ l del radical DPPH (2×10^{-5} molar) con 30 μ l de muestra. Se dejó reposar en oscuridad y a temperatura ambiente durante 1 h. Luego se midió la absorbancia a 515 nm en el lector Synergy H1 (BioTek). El blanco se realizó con metanol 80% en el lugar de la muestra y el control positivo se realizó con ácido ascórbico. Luego se calculó la actividad reductora DPPH con la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad reductora DPPH} = \left[\frac{\text{Abs DPPH} - \text{Abs muestras}}{\text{Abs DPPH}} \right] \times 100.$$

Donde Abs DPPH es la absorbancia de la solución de DPPH; Abs muestras es la absorbancia de los extractos a diferentes concentraciones. Luego, a partir del gráfico de actividad reductora DPPH en función de la concentración de la muestra, se calculó el IC 50 (mg/ml), que es la concentración de las muestras a la cual se reduce el 50% del radical.

Actividad antioxidante por método de poder reductor del hierro (FRAP)

Para medir la actividad reductora del hierro a partir del método FRAP se siguió la metodología de Bolanos de la Torre *et al.* (2015). Para preparar el FRAP se mezclaron TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) con HCl hasta alcanzar la concentración 10 mM. Luego se mezclaron 2,5 ml de FeCl₃ (20 mM) con 2,5 ml de TPTZ (previamente combinado con HCl) y 25 ml de buffer acetato 0,3 molar a pH 3,6. Una vez preparado el FRAP se dejó incubar 10 minutos a 37°C. Luego se tomó una placa de 96 pocillos y se mezclaron 280 µl de FRAP y 20 µl de muestra. Se incubó durante 30 min a 37°C y se midió la abs a 593 nm en el lector Synergy H1 (BioTek). El blanco se realizó con FRAP más metanol. La curva de calibración se realizó con sulfato de hierro de 0 a 0,05 mol/ml. Los resultados fueron expresados en µM Fe²⁺/mg.

Actividad antioxidante por el método ABTS (2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)

Para medir la capacidad antioxidante por el método del ABTS se utilizó el método de Smith *et al.* (2015). El stock de ABTS se formuló disolviendo ABTS en agua en una concentración de 7 mM. Luego el formuló el radical (ABTS⁺) mezclando la solución stock de ABTS con Persulfato de potasio 2,45 mM en proporción 1:1 (v/v), luego se dejó en oscuridad y a temperatura ambiente durante 12 a 16 h antes de su uso. Luego, el ABTS⁺ fue diluido en metanol 99% hasta alcanzar una absorbancia de entre 0,7 a 0,75 a 734 nm. Luego, en una placa de 96 pocillos se mezclaron 180 µl de ABTS⁺ diluido con 20 µl de las muestras. Se calculó la absorbancia a tiempo 0 y a los 6 minutos en el lector

Synergy H1 (BioTek). La actividad de barrido de radical fue calculada con la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad reductora ABTS} = \frac{[(\text{Abs ABTS} - \text{Abs muestras}) / \text{Abs ABTS}] \times 100}{1}$$

Luego, a partir del gráfico de actividad reductora de ABTS en función de la concentración de la muestra, se calculó el IC 50 (mg/ml), que es la concentración de las muestras a la cual se reduce el 50% del radical.

Diseño experimental y análisis estadístico

Todos los análisis de actividad antioxidante fueron realizados por triplicado. Previo al análisis estadístico se realizaron los test de Shapiro Wilks y de Levene para constatar los parámetros de normalidad y homocedasticidad, respectivamente. Los datos fueron analizados con el software InfoStat (versión 2015) a partir del análisis de varianza (ANOVA) con $p < 0,05$ y las medias fueron comparadas con el test de Tukey.

Resultados

Composición proximal

El contenido de proteínas, carbohidratos, grasas y fibras de *O. cubensis* y *O. canarii* fue muy similar en ambas especies y los valores se muestran en la Tabla 9. De modo de tener una referencia, los resultados obtenidos se muestran en la tabla conjuntamente con las composiciones nutricionales previamente reportadas para las especies *L. edodes*, *P. ostreatus*, *A. bisporus* y *Agrocybe cylindracea*.

Tabla 9. Contenido de proteína cruda, carbohidratos, grasas, fibras y cenizas de *O. canarii*, *O. cubensis*, *A. bisporus*, *L. edodes*, *P. ostreatus* y *A. cylindracea*.

	<i>O. canarii</i>	<i>O. cubensis</i>	<i>A. bisporus</i> ^a	<i>L. edodes</i> ^a	<i>P. ostreatus</i> ^a	<i>A. cylindracea</i> ^b
Proteínas	13,22 ± 0,63	11,50 ± 0,30	29,3	17,5	26,8	25,8
Carbohidratos	23,44 ± 0,88	23,72 ± 0,55	50	59,5	53,8	39,9
Grasas	7,30 ± 0,51	10,45 ± 0,03	3	8	1,7	2,6
Fibras	31,76 ± 0,06	32,35 ± 0,45	9,1	8	7,9	16,35
Cenizas	12,5 ± 0,28	10,65 ± 0,07	8,1	7	12,7	–

Valores expresados en g/ 100g de peso seco

^a Valores promedios tomados de Crisan y Sands. 1978; ^b Valores promedios tomados de Uhart *et al.* 2008

Perfil de los ácidos grasos

El perfil de ácidos grasos se muestra en la Tabla 10. Los dos ácidos grasos mayoritarios encontrados en *O. canarii* fueron: el ácido linoleico y el ácido oleico (49,68 % y 33,82, respectivamente) mientras que en *O. cubensis* los dos principales fueron el ácido linoleico y el palmítico (35,17 y 28,12%, respectivamente), aunque también se hallaron contenidos relativamente altos (mayores al 15%) de ácido palmítico y ácido mirístico.

Tabla 10. Perfil porcentual de ácidos grasos de *O. canarii* y *O. cubensis* expresados como ésteres metílicos.

Ácido graso y fórmula	Tipo y Familia	<i>O. canarii</i>	<i>O. cubensis</i>
Ác. Mirístico (C14:0)	- ; saturado	2,95 ± 0,2	15,43 ± 0,03
Ác. Palmítico (C16:0)	- ; saturado	6,60 ± 0,25	28,12 ± 1,05
Ác. Esteárico (C18:0)	- ; saturado	2,58 ± 0,48	2,89 ± 0,65
Ác. Oleico (C18:1 cisn9)	O-9; monoinsaturado	33,82 ± 0,09	16,78 ± 0,20
Ác. Linoleico* (C18:2 cisn6)	O-6; poliinsaturado	49,68 ± 0,10	35,17 ± 0,01
Ác. α-Linolénico* (C18:3 n3)	O-3; poliinsaturado	4,38 ± 0,02	1,6 ± 0,57

Valores expresados en g/ 100 g de lípidos.

*Ácidos grasos esenciales.

Contenido de fenoles totales, actividad antioxidante por el método de DPPH, FRAP y ABTS

En cuanto a los resultados de las propiedades antioxidantes, ambas especies mostraron valores similares de todos los parámetros analizados con excepción de la actividad ABTS la cual fue significativamente mayor en *O. canarii* respecto a *O. cubensis* (Tabla 11).

Tabla 11. Contenido de fenoles totales, capacidad reductora del DPPH, capacidad reductora del hierro y actividad ABTS de *O. canarii* y *O. cubensis*.

Espece	Contenido de fenoles totales (mg EAG/g extracto)	Capacidad reductora DPPH (IC 50 en mg/ml)	Capacidad reductora del Fe (µM Fe ²⁺ /mg)	Actividad ABTS (IC 50 en mg/ml)
<i>O. canarii</i>	^a 3,36 ± 0,06	^a 3,88 ± 0,71	^a 0,358 ± 0,04	^b 12,9 ± 0,37
<i>O. cubensis</i>	^a 3,18 ± 0,43	^a 4,37 ± 0,27	^a 0,294 ± 0,06	^a 7,64 ± 0,26
Valores seguidos por diferentes letras en la misma columna son diferentes significativamente con p < 0,05, a partir del test de Tukey, n = 8.				

Discusión

Las dos especies de *Oudemansiella* estudiadas en este trabajo, presentaron una composición proximal muy similar. Estos resultados fueron comparables a los reportados por Zhou *et al.* (2015) para *O. submucida*. Los resultados de proteínas y carbohidratos (13,22 y 23,44%, respectivamente), difieren de los de Xu *et al.* (2016) para *O. canarii* quienes obtuvieron un contenido algo mayor para ambos nutrientes (16,65-18,88 % de proteínas y 30,08-33,39% de carbohidratos). A su vez, el contenido de lípidos (7,30%) y cenizas (12,5%) fue algo mayor al obtenido por estos autores (1,64-3,04% y 7,99-8,91%, respectivamente). En cuando a las proteínas, el perfil de aminoácidos obtenido por Xu *et al.* (2016) indicó la presencia de 18 aminoácidos en *O. canarii* dentro de los cuales se encontraron a todos los esenciales lo que indica que la calidad de la proteína fúngica que aporta esta especie es alta. Hoy en día existe una porción importante de la población que se define como vegana y no consume alimentos o productos provenientes de animales. Este grupo conjuntamente con los vegetarianos, requieren de fuentes de alimentación que aporten los aminoácidos esenciales en reemplazo de la proteína animal.

Por otro lado, Ruegger *et al.* (2001) produjeron basidiomas utilizando bagazo de caña de azúcar y aserrín de eucalipto, y reportaron mayores contenidos de lípidos de (15,85-17,52%, respectivamente) y menores contenidos de cenizas (7,2-9,15 %, respectivamente).

En términos generales, el contenido de proteína de *O. cubensis* (11,50%) y *O. canarii* (13,22%) y el contenido de carbohidratos (23,72 y 23,44% respectivamente), fueron menores a los reportados para *A. bisporus*, *L. edodes*, *P. ostreatus* y *A. cylindracea* (Tabla 9). A su vez, los contenidos de fibras y grasas fueron superiores comparados con estos hongos ampliamente producidos (Tabla 9).

En general, es común observar diferencias en los perfiles hallados, estos varían no solo entre las especies evaluadas, sino entre cepas, y aún más varían cuando una misma cepa es producida en diferentes sustratos ya que tiene una disponibilidad diferente de nutrientes en cada caso.

Debido al alto contenido de lípidos encontrados en *O. canarii* y *O. cubensis*, ya que en general los hongos se caracterizan por tener muy bajo contenido de lípidos (Wani *et al.* 2010), decidimos hacer un análisis del perfil de ácidos grasos para de cierta manera evaluar la calidad de los mismos. En cuanto al perfil de ácidos grasos, resultó ser una cuestión que diferenció bastante a las dos especies estudiadas en este trabajo. Si bien tanto *O. canarii* como *O. cubensis* mostraron una prevalencia en la presencia de ácidos grasos insaturados respecto a los saturados, la suma total de insaturados *O. canarii* fue del 87,88% (siendo 33,82% ác. grasos monoinsaturados y 54,06% ác grasos poliinsaturados), mientras que para *O. cubensis* la suma de suma total de insaturados fue del 53,33% (siendo 16,78 % grasos monoinsaturados y 36,55 % ác. grasos poliinsaturados).

Los ácidos grasos predominantes en *O. canarii* fueron dos: ác. oleico (33,82 %) y linoleico (49,68%), mientras que en *O. cubensis* predominaron cuatro: ác. linoleico (35,17%), palmítico (28,12%), oleico (16,78%) y mirístico (15,43%). Cabe destacar que ambas especies contienen los ácidos grasos esenciales.

Catalán *et al.* (2015) explica que todos los ácidos grasos ejercen efectos sobre el organismo, y los efectos serán negativos o beneficiosos dependiendo del tipo de ácidos grasos que se han consumido. Es de especial importancia la relación de ácidos grasos omega-6/omega-3, la cual cuanto más alta sea, más negativo será su efecto, y, por lo tanto, el reto de la alimentación actual es obtener un valor bajo de dicha relación. Desde este punto de vista, *O. canarii* tiene una relación más baja de ácidos grasos omega-6/omega-

3 y al mismo tiempo, tiene menor cantidad de ácidos grasos saturados, por lo que podríamos decir que *O. canarii* tiene un perfil de ácidos grasos más deseable.

Este trabajo representa el primer reporte del perfil de ácidos grasos para las especies encontradas en la Argentina. Xu *et al.* (2020), caracterizaron el perfil de ácidos grasos de *Oudemansiella mucida*, la cual mostró un perfil bastante diferente, en el cual prevalecieron los ácidos palmítico (39,48%), láurico (25,74%) y oleico (15,23%), además, se encontró un menor contenido de los ácido esteárico (6,6%), mirístico (5,31%) y linoleico/ linoléico (5,33%).

En cuanto al perfil de ácidos grasos de algunos de los hongos más consumidos del mundo, *A. bisporus* contiene dos ácidos grasos principales que son linoleico (77,7%) y palmítico (11,9%); *L. edodes* contiene mayoritariamente linoleico (81,1%) y palmítico (10%); mientras que *P. ostreatus* contiene tres ácidos grasos predominantes que son el linoleico (68,9%), palmítico (11,2%) y oleico (12,3 %) (Reis *et al.* 2012).

A su vez, *A. bisporus*, contiene una relación ácido omega-6/omega-3 de 77,7/ 0,1; *L. edodes* de 81,1/ 0,1 y *P. ostreatus* de 68,9/0,1 (Reis *et al.* 2012). En todos los casos, la relación fue menor y por lo tanto, más deseable, para las dos especies estudiadas en este trabajo (49,68/4,38 para *O. canarii* y 35,17/ 1,6 para *O. cubensis*).

Con respecto a las propiedades antioxidantes, de todos los parámetros evaluados, sólo la capacidad antioxidante por ABTS mostró diferencias significativas entre ambas especies estudiadas (Tabla 11). El contenido de fenoles totales fue 3,36 mg EAG/g extracto *O. canarii* y 3,18 mg EAG/g extracto para *O. cubensis*. Estos resultados, son similares a los reportados por De Pauli (2010), quien reportó un valor de 3,74 mg EAG/g extracto para *O. canarii*. Acharya *et al.* (2016) reportaron valores un poco mayores para el extracto metanólico de *O. canarii* (5,38 mg EAG/g). Los contenidos de fenoles totales hallados para estas especies resultan ser valores levemente inferiores a los reportados para los

extractos metanólicos de otros hongos comestibles, por ejemplo, Barros *et al.* (2008), reportaron valores de 4,49 mg EAG/g extracto para *A. bisporus* y Smith *et al.* (2015) reportaron valores de 5,73 mg EAG/g y 4,02 mg EAG/g para los extractos de *L. edodes* *P. ostreatus*, respectivamente.

En cuanto a la capacidad reductora del radical DPPH, los valores de IC 50 encontrados, fueron muy similares para ambas especies, siendo 3,88 y 4,37 mg/ml para *O. canarii* y *O. cubensis*, respectivamente. Estos valores, resultaron aproximados a los hallados por De Pauli (2010) quien reportó valores de entre 2 y 4 mg/ml para *O. canarii*. Por otra parte, tanto Santos *et al.* (2020) como Acharya *et al.* (2019), reportaron valores de IC 50 de 0,8 mg/ml para *Oudemansiella* sp. y 0,9 mg/ml para *O. canarii*, lo cual significaría una mayor capacidad antioxidante, ya que cuanto menor es el IC 50, menor es la concentración necesaria para neutralizar el radical. En cuanto a los valores de IC 50 reportados para otras especies conocidas, De Pauli (2010) reportó valores de 2 mg/ml para *A. bisporus*, de 4 a 5 mg/ml para *L. edodes* y de 4 mg/ml para *P. ostreatus*.

Respecto a los resultados de capacidad reductora del Fe, *O. canarii* presentó un valor de 0,358 $\mu\text{M Fe}^{2+}/\text{mg}$, y *O. cubensis* de 0,294 $\mu\text{M Fe}^{2+}/\text{mg}$. En la bibliografía, no se encontraron registros de capacidad reductora del hierro mediante el método FRAP para especies de *Oudemansiella*, pero los valores hallados en este trabajo, indican valores bastante superiores respecto a especies cultivadas mundialmente, los cuales corresponden a 0,024 $\mu\text{M Fe}^{2+}/\text{mg}$ para *A. bisporus*, 0,0044 $\mu\text{M Fe}^{2+}/\text{mg}$ para *L. edodes*, y 0,0063 $\mu\text{M Fe}^{2+}/\text{mg}$ para *P. ostreatus* (Piljac-Žegarac *et al.* 2011).

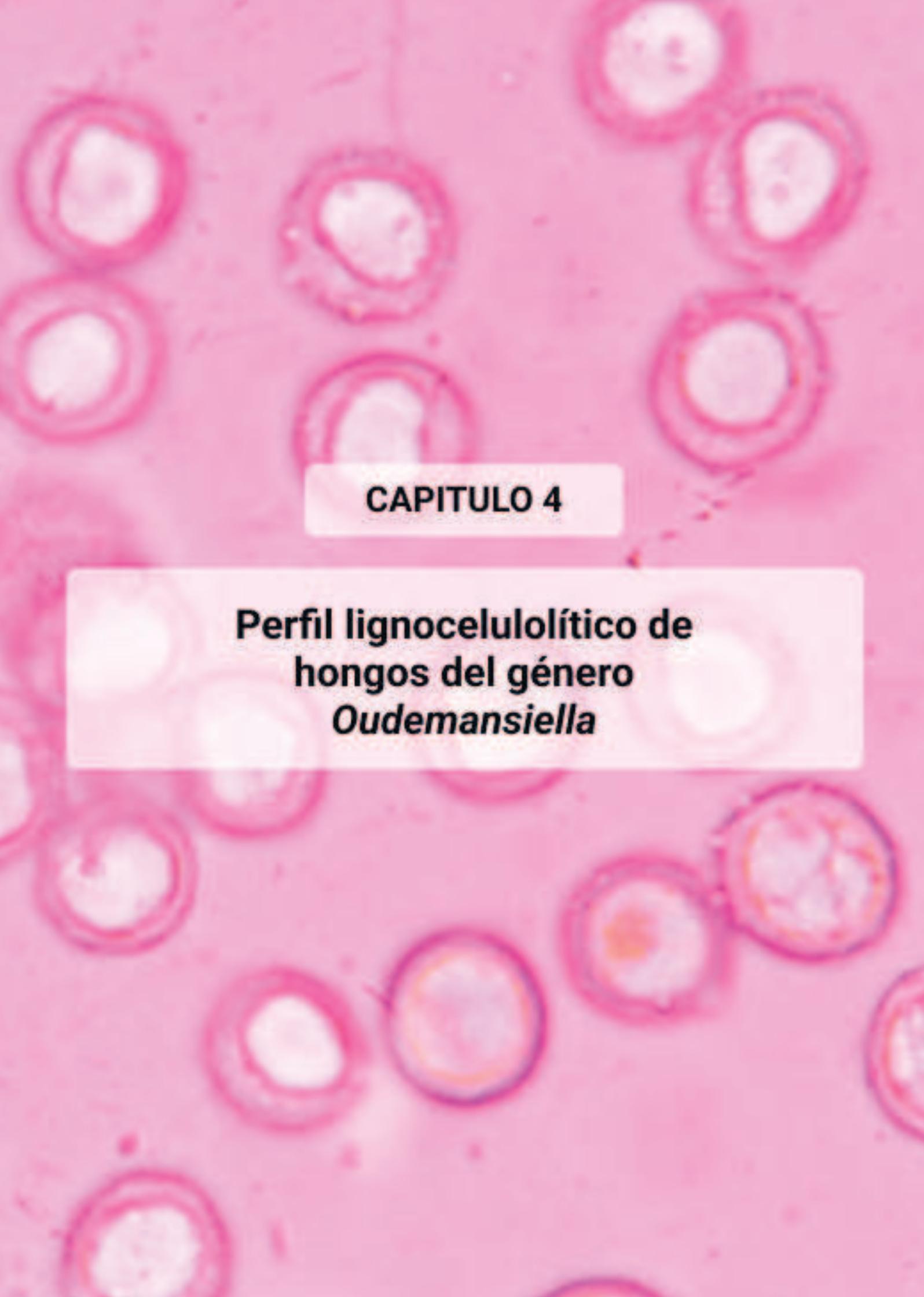
Por otro lado, en relación a la actividad antioxidante por el método ABTS, *O. canarii* mostró un valor de IC 50 de 12,9 mg/ml, mientras que para *O. cubensis* el IC 50 fue de 7,64 mg/ml. Acharya *et al.* (2019), realizaron estos análisis y obtuvieron como resultado de 12,91 μm equivalentes de TROLOX /mg, resultado que no es comparable con los

valores de esta tesis, ya que los resultados aquí fueron expresados en IC 50. Nuestros resultados, se mostraron similares a los hallados para otras especies ampliamente cultivadas como *L. edodes* (9,90 mg/ml) o *P. ostreatus* 8,90 (Smith *et al.* 2015), y menores a los hallados para *A. bisporus* (0,59 mg/ml) (Popescu *et al.* 2017).

Estos resultados revelan que las dos especies estudiadas en esta tesis poseen cierta capacidad antioxidante como efecto nutracéutico, muy similar entre sí y dependiendo del método parece ser levemente mayor o menor respecto a otras especies altamente consumidas en el mundo. Esto nos hace pensar que muy probablemente además de los polifenoles hay otras moléculas con actividad antioxidante, con diferentes capacidades de reducir a los diferentes radicales libres, que hacen a la actividad antioxidante total.

Conclusiones del capítulo

La composición proximal de las dos especies de *Oudemansiella* mostró un mayor contenido de grasas y fibras respecto a otras especies ampliamente cultivadas. *O. canarii* tiene un perfil de ácidos grasos más deseable respecto a *O. cubensis* y a su vez, ambas especies tienen una relación omega-6/omega-3 preferencial respecto a otras especies mundialmente cultivadas. Por otra parte, los extractos metanólicos de *O. canarii* y *O. cubensis* contienen moléculas fenólicas y actividad antioxidante variable dependiendo del método de estimación.



CAPITULO 4

**Perfil lignocelulolítico de
hongos del género
*Oudemansiella***

Introducción

Dada su naturaleza heterótrofa, todos los hongos requieren para su nutrición la degradación de compuestos orgánicos. Esto se puede observar en todas las formas y relaciones de las cuales los hongos participan: en el caso de los líquenes (simbiosis entre hongos y algas) u hongos formadores de micorrizas (simbiosis entre hongos y plantas) los compuestos orgánicos que son suministrados por el fitobionte son degradados por el hongo, lo mismo ocurre con los hongos saprófitos que degradan la materia orgánica del sustrato donde se desarrollan, o de los hongos parásitos que degradan la materia orgánica de su hospedante. De acuerdo a los diferentes tipos de nutrición, cada grupo de hongos cuenta con una maquinaria enzimática que libera al medio para poder realizar la digestión extracelular, tan característica del reino fungi.

Los basidiomicetes de pudrición blanca son los microorganismos degradadores de lignina y celulosa más efectivos de la naturaleza (Sasidhara y Thirunalasundari 2014) y muchos de los hongos comestibles que se cultivan comercialmente pertenecen a este grupo.

La lignocelulosa es un biopolímero complejo, constituido principalmente por azúcares como glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, entre otros. Está formada principalmente por hebras de celulosa sostenidas sobre una matriz de hemicelulosa y lignina (Devía Ulloa 2014) (Fig. 22).

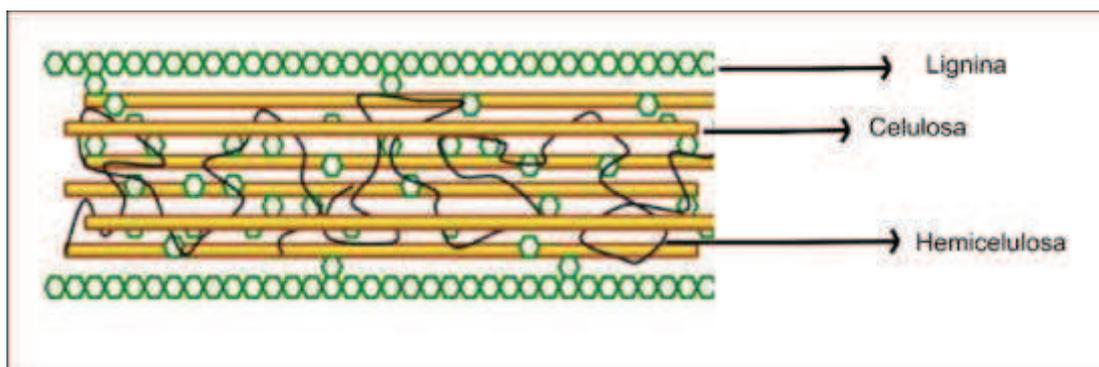


Figura 22. Esquema de la estructura de la lignocelulosa: compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignina. Fuente: Mussatto y Teixeira 2010.

La celulosa, forma aproximadamente un 50% del peso seco de la pared celular de los vegetales (Quiroz y Folch 2011). Su estructura corresponde a largas cadenas lineales, de moléculas de D-glucosa, unidas a través de un enlace glucosídico β -1,4. La celulosa está conformada por un cadenas ordenadas y cristalinas (celulosa cristalina) y sectores con cadenas más desorganizadas (zonas amorfas) que son más susceptibles a la degradación enzimática (Pérez *et al.* 2002).

La hemicelulosa constituye del 25 al 30% del peso seco de la pared celular, es un heteropolisacárido complejo cuyos principales componentes son las de pentosas (D-xilosa y L-arabinosa), hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa), y ácidos (4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico). Los xilanos son los más abundantes, representando aproximadamente un 70% del peso de la hemicelulosa y están formados por unidades de D-xilosa unidos a partir de enlaces β -1,4 (Quiroz y Folch 2011).

La lignina, es un polímero altamente resistente a la degradación química o biológica y proporciona soporte estructural a la pared celular, disminuyendo su permeabilidad y confiriéndole resistencia frente al ataque de microorganismos. Juntas, la lignina y la hemicelulosa forman una matriz amorfa que se agrega sobre las fibras de celulosa, protegiéndolas de la degradación (Sánchez 2009). La lignina es un polímero heterogéneo sintetizado a partir de precursores fenilpropanoides cuya composición y proporción varía según las especies vegetales (Prasad *et al.* 2007). Los grupos presentes en la lignina son los alcoholes coniferílico, cumarílico y sinapílico. Esta compleja estructura está unida mediante uniones Carbono- Carbono y enlaces aril-éter (Sánchez 2009).

La degradación de la celulosa involucra la acción sinérgica de varias enzimas. Por un lado, existen las enzimas llamadas en conjunto celulasas, que catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos β -1,4, que mantienen unida la cadena de celulosa y se conocen como: endoglucanasas que hidrolizan aleatoriamente enlaces glucosídicos intramoleculares; la exocelobiohidrolasa que cliva los extremos no reductores produciendo unidades de celobiosa, y la β glucosidasa que hidroliza la celobiosa separándola en dos unidades de glucosa (Coughlan y Ljungdahl 1988). Todas las celulasas son glicosil hidrolasas, enzimas que hidrolizan el enlace glucosídico mediante un mecanismo de catálisis ácido-base, bien con inversión o con retención de la configuración anomérica de la glucosa (Davies y Henrissat 1995).

Recientemente se han descubierto enzimas oxidativas que complementan y constituyen un factor significativo en la eficiencia en la despolimerización de la celulosa enzimática de biomasa lignocelulósica por hidrolasas (Forsberg *et al.* 2011; Hemsworth *et al.* 2013). Estas enzimas se conocen como monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMO's) catalizan la despolimerización oxidativa de polisacáridos insolubles recalcitrantes y su acción fue demostrada por la liberación de oligosacáridos oxidados a partir de estos polímeros (Eibinger *et al.* 2014).

En cuanto a la hemicelulosa, las xilanasas son las principales enzimas involucradas en su degradación. Este grupo incluye las endoxilanasas, que actúan sobre la cadena principal de carbohidratos hidrolizando uniones entre xilano y produciendo oligosacáridos de diferente longitud. En forma conjunta, las β -xilosidasas convierten dichos oligosacáridos en xilosa (Aro *et al.* 2005). Por otro lado, la degradación completa de la hemicelulosa, requiere de la acción sinérgica de enzimas accesorias tales como xilano esterasas, α -arabinofuranosidasas, α -4-metil glucuronosidasas, entre otras (de Vries *et al.* 2001).

La despolimerización de la lignina involucra enzimas oxidativas tales como lacasas y peroxidasas. Estas últimas son oxidoreductasas, dentro de las cuales hay dos grupos que se conocen como lignino peroxidasas y manganeso peroxidasas (Mn peroxidasas), y dependen del peróxido de hidrógeno para catalizar la hidrólisis (Pérez *et al.* 2002).

Al final del proceso de cultivo y luego de que los cultivadores cosechan todos los basidiomas, el sustrato agotado queda como remanente de producción, siendo el mismo una fuente considerable de macronutrientes, minerales y enzimas fúngicas (Corrêa *et al.* 2016; Ko *et al.* 2005). Pese al gran potencial que tienen dichas enzimas en diferentes sectores industriales y a la gran cantidad de información existente sobre la producción de enzimas a partir hongos cultivables, poco se sabe acerca de la utilización del sustrato agotado como fuente de enzimas, y por lo general es utilizado como abono para la tierra o quemado a campo abierto (Pérez-Chávez *et al.* 2019)

Respecto a la actividad lignocelulolítica de especies pertenecientes al género *Oudemansiella sensu stricto*, hasta el momento sólo se ha descrito parcialmente la actividad ligninasa para *O. mucida* (Geoffrey *et al.* 1994) y lacasa para *O. canarii* (Iark *et al.* 2019; Uber *et al.* 2022), pero nada se sabe sobre el potencial enzimático a lo largo del ciclo de cultivo de las diferentes especies.

El objetivo de este capítulo fue estudiar la producción de endoclucanasas (actividad CMCasa), endoxilanasas y lacasa en hongos del género *Oudemansiella* a lo largo del ciclo de cultivo, pero con la finalidad principal de estimar el potencial del sustrato agotado como fuente de enzimas.

Objetivo general del capítulo

- Estudiar las enzimas lignocelulolíticas de las especies de hongos del género *Oudemansiella* encontradas en la Argentina.

Objetivos específicos del capítulo

- Evaluar cualitativamente la producción de endoglucanasas, endoxilanasas, Mn-Peroxidasas y lacasa de las especies encontradas de *Oudemansiella* a partir de su cultivo *in vitro* con medios de cultivo selectivos (*Screening* enzimáticos).
- Evaluar las actividades endoglucanasa (CMCasa), endoxilanasa y lacasa durante las diferentes etapas del ciclo productivo de dos especies de *Oudemansiella*.
- Evaluar la factibilidad de aprovechamiento de las enzimas lignocelulolíticas sustrato agotado proveniente del cultivo de *Oudemansiella* como fuente de enzimas lignocelulolíticas.

Materiales y métodos

Cepas

Las cepas usadas fueron identificadas como *O. canarii*: ICFC 853/17 (Buenos Aires, Argentina) ICFC 864/17 (Misiones, Argentina) y *O. cubensis*: ICFC 852/17 (Corrientes, Argentina) y ICFC 863/17 (Buenos Aires, Argentina). Las mismas fueron aisladas e identificadas tal como se detalló en el capítulo 1.

Screenings enzimáticos

Se realizaron ensayos cualitativos para la detección de enzimas lignocelulolíticas (Celulasas, Hemicelulasas, Mn-Peroxidasas y Lacasas). Para ello, se dispusieron 20 mL de cada medio de cultivo selectivo en placas de Petri de 90 mm y en el centro de las mismas se sembró un disco de 0,5 cm de diam. con micelio activo de cada cepa. Las placas se incubaron a 25°C en oscuridad y se realizaron mediciones diarias del diámetro de crecimiento de la colonia (mm/día). A su vez, se midieron los halos de actividad en los distintos medios. Se tomaron dos mediciones por caja y todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Screening para detección de Celulasas

Para la detección de celulasas (específicamente endoglucanasas) se utilizó medio de cultivo agarizado (asparagina 4 g/L; ágar 20 g/L; medio basal 1 L), adicionado con carboximetilcelulosa (CMC) 0,1 % como principal fuente de carbono. La presencia del polisacárido residual en el medio se reveló cuando la colonia alcanzó aproximadamente la mitad de la placa, siendo que la actividad celulolítica se detectó como un halo decolorado alrededor de la colonia. Para ello se inundó la caja con solución de Rojo Congo 0,3% y luego de 10 min, se volcó el colorante y se lavó el exceso con solución de

NaCl 1 N (Magnelli y Forchiassin 1999). Cuando fue necesario, se realizó un lavado con ácido acético al 5% para aumentar el contraste (Hankin y Anagnostakis 1977).

Screening para detección de Hemicelulasas

El método de detección y revelado de halo de hemicelulasas (endoxilanasas) se realizó de la misma manera que para las celulasas excepto que el medio de cultivo fue adicionado con xilano de haya al 0,1% como fuente principal de carbono en lugar de CMC.

Screening para detección de Lacasas

Para detectar la presencia de actividad lacasa se utilizó como medio de cultivo ágar malta (extracto de malta 20 g/L y ágar 15g/L) y ABTS (2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) al 0,035% (p/v) (Montoya *et al.* 2014). La actividad positiva de la lacasa se basó en la formación de halos color violeta.

Screening para detección de Mn-Peroxidasas

Para detectar la presencia de actividad Mn-Peroxidasa se utilizó como medio de cultivo ágar malta (extracto de malta 20 g/L y ágar 15g/L) adicionado con cloruro de manganeso ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) 1 mM. La actividad positiva para Mn-Peroxidasa se evidenció por la formación de un halo de precipitado color marrón oscuro producto de la oxidación del manganeso a óxido de manganeso (MnO_2) (Jarosz-Wilkolazka *et al.* 2002).

Extractos enzimáticos y cuantificación de proteínas totales

Para los análisis enzimáticos se utilizó sustrato a base de paja de trigo (sembrado al 10% en sistemas de bolsas con perforaciones, tal como se detalla en el capítulo 2). Se tomaron muestras de sustrato en cuatro momentos diferentes representativos de las fases más importantes del ciclo productivo: finalizada la colonización del sustrato (fase de incubación), durante la formación de primordios, durante la frutificación y finalizada la

cosecha de la primera oleada de basidiomas (poscosecha). Los extractos enzimáticos realizaron colocando en un tubo 1 g de sustrato molido con nitrógeno líquido con 10 ml de buffer citrato (ácido cítrico y citrato de sodio) 0,1 M a pH 4,8 y 0,1% de tween 80. Los tubos se dejaron en agitación (200 rpm) a 4-7° durante 2h. Luego se centrifugaron a 10000 rpm durante 30 minutos. Los sobrenadantes clarificados se filtraron y se reservaron a -20°C hasta su utilización. La proteína total se cuantificó mediante el método de Bradford (Olivieri TM, Argentina) y siguiendo el protocolo para microplaca propuesto por Nouroozi *et al.* (2015). Como blancos se utilizaron los extractos desactivados a partir de hervor a 95°C durante 10 minutos.

Actividad CMCasa

La actividad de endoglucanasas se midió sobre carboximetilcelulosa (CMC) usando el protocolo para microplaca propuesto por Xiao *et al.* (2005). Se colocaron en un tubo 30 µl de extracto junto con 30 µl de CMC al 1%. Se incubaron a 50°C durante 30 minutos, se retiraron y se les añadió 60 µl de ácido dinitro salicílico (DNS), para luego incubarse a 95°C durante 5 minutos. Con la reacción finalizada, se tomó una placa de 96 pocillos, se colocaron 100 µl de cada reacción y se leyó la absorbancia a 545 nm en el lector Synergy H1 (BioTek). Se realizó una curva de calibración con glucosa. Para estimar la actividad CMCasa se siguieron los criterios de la IUPAC empleando las fórmulas propuestas en Ghose (1987), en las cuales se considera que 1 Unidad Internacional (UI) de CMCasa corresponde a la actividad enzimática que libera 1 µmol de azúcares reductores (expresado como equivalentes de glucosa) por minuto por ml de solución enzimática, en las condiciones de ensayo. Las UI se calcularon empleando la siguiente ecuación:

$$CMCasa \left(\frac{\text{Unidades}}{\text{ml}} \right) = G \times 0.37 \left(\frac{\text{Unidades}}{\text{ml}} \right)$$

Donde G son los mg de glucosa liberados durante la reacción.

Actividad Endoxilanasas

La actividad de endoxilanasas se midió sobre xilano de haya usando el protocolo para microplaca propuesto por Kim *et al.* (2014). En un tubo se colocaron 20 µl de extracto junto con 20 µl de xilano al 1%. Se incubaron a 40°C durante 60 minutos, se retiraron y se les añadió 160 µl de ácido dinitro salicílico (DNS), para luego incubarse a 95°C durante 5 minutos. Con la reacción finalizada, se tomó una placa de 96 pocillos, se colocaron 100 µl de cada reacción y se leyó la absorbancia a 545 nm en el lector Synergy H1 (BioTek). Se realizó una curva de calibración con xilosa. Para estimar la actividad endoxilanasas se siguieron los criterios de la IUPAC empleando las fórmulas propuestas en Ghose y Bisara (1987), en las cuales se considera que 1 Unidad Internacional (UI) de Endoxilanasas corresponde a la actividad enzimática que libera 1 µmol de azúcares reductores (expresado como equivalentes de xilosa) por minuto por ml de solución enzimática, en las condiciones de ensayo. Sabiendo que 1 µmol de xilosa equivale a 150,13 mg y utilizando la ecuación de la curva de calibración realizada, de Abs a 545 nm versus concentración de xilosa, fueron calculados las UI presentes en los extractos enzimáticos.

Actividad Lacasa

La actividad lacasa se midió utilizando el método del ABTS siguiendo el para microplaca propuesto por Alcalde y Bulter (2003). En un tubo se colocaron 20 µl de extracto y 180 µl de ABTS 5 mM en buffer acetato de sodio pH. Se midió la absorbancia a 420 nm y a 25°C en el lector Synergy H1 (BioTek), en tiempo inicial y luego de 5 minutos. La actividad lacasa fue calculada en unidades enzimáticas mediante la siguiente fórmula:

Unidad enzimática (UE)= $\mu\text{moles liberados/minuto}$

$$UE (\mu\text{mol/ min ml}) = \frac{\text{Abs x Vol reacción}}{\epsilon \text{ x Volumen enzima (ml)x tiempo de incubación (min)}}$$

Donde ϵ es el coeficiente de extinción molar a 420 nm que es = 36/mM cm

Diseño experimental y análisis estadístico

Para los cálculos de las actividades enzimáticas se realizaron 3 repeticiones en todos los tratamientos. Previo al análisis estadístico se realizaron los test de Shapiro Wilks y de Levene para constatar los parámetros de normalidad y homocedasticidad, respectivamente. Los datos fueron analizados con el software InfoStat (versión 2015) a partir del análisis de varianza (ANOVA) con $p < 0,05$ y las medias fueron comparadas con el test de Tukey.

Resultados

Screenings enzimáticos

En la Tabla 12 pueden verse resultados positivos para la detección de los cuatro grupos de enzimas evaluadas en medios de cultivo selectivos (Fig. 13) *O. canarii* (ICFC 853/17) y *O. cubensis* (ICFC 852/17).

Tabla 12. Halos de coloración/ degradación, obtenidos en medios de cultivo selectivos para endoglucanasas, endoxilanasas, MnP y lacasas para *O. canarii* y *O. cubensis*.

Especie	Halo de coloración/ degradación (cm)			
	Endoglucanasas	Endoxilanasas	MnP	Lacasas
<i>O. canarii</i> (ICFC 853/17)	0,5 ± 0	0,5 ± 0	2,6 ± 0,35	0,5 ± 0
<i>O. cubensis</i> (ICFC 852/17)	1,9 ± 0,17	1,6 ± 0,28	5,5 ± 0,17	1,9 ± 0,17



Figura 23. Modelo de *Screenings* realizado para la detección de algunas de las enzimas lignocelulolíticas estudiadas.

Actividad CMCasa

Se detectó actividad CMCasa en todas las etapas del ciclo de cultivo en cada cepa de las dos especies estudiadas (Tabla 13 y Fig. 24). Los resultados fueron expresados en UI/ml de extracto, UI/ gramo de sustrato seco (gds) y UI/mg de proteína (también llamada

actividad específica), para facilitar la comparación bibliográfica de resultados. Se encontraron diferencias significativas entre los valores de actividad enzimática estimados en UI/ml y en UI/gds. Para todas las cepas estudiadas, la máxima actividad CMCasa registrada fue en el momento de fructificación (de 228,36 a 83,43 UI/gds), seguido por la etapa de pos cosecha (de 54,26 a 47,63 UI/gds). A su vez, la actividad CMCasa fue intermedia durante la formación de primordios (55,15 a 5,66 UI/gds y muy baja durante el crecimiento micelial (5,21 a 0,88 UI/gds) (Tabla 13 y Fig. 24). En cuanto a las cepas, se destaca *O. canarii* ICFC 853/17, que se diferenció estadísticamente del resto, obteniendo el máximo valor durante la fructificación.

Tabla 13. UI de actividad CMCasa en diferentes momentos del ciclo de cultivo de *O. canarii* y *O. cubensis* y en diferentes unidades de medición.

Especie y cepa	Momento del ciclo	CMCasa UI/ml extracto	CMCasa UI/gds	CMCasa UI/mg proteína
<i>O. canarii</i> ICFC 853/17	Incubación	^a 0,08 ± 0,04	^a 3,27 ± 1,62	^a 0,02 ± 0,001
	Primordios	^a 0,16 ± 0,03	^a 6,54 ± 1,25	^a 0,02 ± 0,001
	Fructificación	^c 5,75 ± 0,19	^c 228,36 ± 7,5	^a 0,66 ± 0,15
	Pos cosecha	^b 1,27 ± 0,03	^b 50,73 ± 1,25	^a 1,21 ± 0,12
<i>O. canarii</i> ICFC 864/17	Incubación	^a 0,02 ± 0,01	^a 0,88 ± 0,5	^a 0,0024 ± 0,001
	Primordios	^b 1,38 ± 0,31	^b 55,15 ± 12,5	^a 0,12 ± 0,04
	Fructificación	^c 2,59 ± 0,22	^c 103,75 ± 8,75	^a 0,24 ± 0,14
	Pos cosecha	^b 1,19 ± 0,05	^b 47,63 ± 1,87	^a 0,14 ± 0,01
<i>O. cubensis</i> ICFC 852/17	Incubación	^a 0,1 ± 0,06	^a 4,7 ± 2,25	^a 0,01 ± 0,003
	Primordios	^a 0,41 ± 0,12	^a 16,26 ± 5	^a 0,13 ± 0,04
	Fructificación	^d 3,65 ± 0,41	^d 146,7 ± 16,25	^a 1,1 ± 0,07
	Pos cosecha	^b 1,36 ± 0,09	^b 54,26 ± 3,75	^a 0,2 ± 0,06
<i>O. cubensis</i> ICFC 863/17	Incubación	^a 0,13 ± 0,05	^a 5,21 ± 1,87	^a 0,02 ± 0,01
	Primordios	^a 0,14 ± 0,03	^a 5,66 ± 1,25	^a 0,05 ± 0,001
	Fructificación	^c 2,09 ± 0,19	^c 83,43 ± 7,5	^a 0,68 ± 0,7
	Pos cosecha	^b 1,29 ± 0,13	^b 51,79 ± 5,25	^a 0,24 ± 0,08
Valores seguidos por diferentes letras en la misma columna son diferentes significativamente con p < 0,05, a partir del test de Tukey, n = 8.				

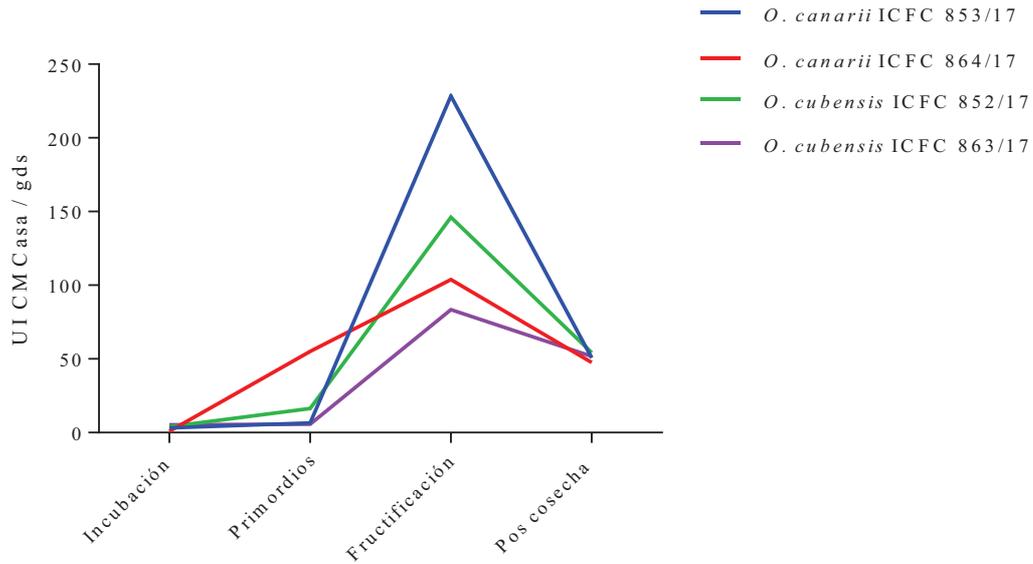


Figura 24. Actividad CMCasa (UI/ml) registrada para las diferentes etapas del ciclo de cultivo para dos cepas evaluadas de *O. canarii* y dos cepas evaluadas de *O. cubensis*.

Actividad Endoxilanasas

Se detectó actividad endoxilanasas en todas las etapas del ciclo de cultivo en cada cepa de las dos especies estudiadas (Tabla 14 y Fig. 25). Se encontraron diferencias significativas entre los valores de actividad enzimática estimados en UI/ml y en UI/gds. La máxima actividad endoxilanasas registrada fue en el momento de fructificación (154,3 a 70,17 UI/gds) y la mínima para la fase de incubación (de 4,62 a 4,96 UI/gds). A su vez, en los momentos de formación de primordios y de poscosecha se registraron valores de actividad endoxilanasas intermedios para todas las cepas evaluadas (de 53,72 a 30,1 UI/gds y de 44,45 a 18,95 UI/gds, respectivamente) (Tabla 14 y Fig. 25). Respecto a la diferencia entre cepas, se destaca *O. cubensis* ICFC 852/17, que alcanza un valor estadísticamente mayor respecto a las demás cepas durante la fructificación.

Tabla 14. UI de actividad Endoxilanasas en diferentes momentos del ciclo de cultivo de *O. canarii* y *O. cubensis* y en diferentes unidades de medición.

Especie y cepa	Momento del ciclo	Endoxilanasas UI/ml extracto	Endoxilanasas UI/gds	Endoxilanasas UI/mg proteína
<i>O. canarii</i> ICFC 853/17	Incubación	^a 0,05 ± 0,001	^a 1,96 ± 0,38	^a 0,01 ± 0,004
	Primordios	^c 0,75 ± 0,03	^c 30,1 ± 1,13	^a 0,1 ± 0,07
	Fructificación	^g 2,53 ± 0,03	^g 101,22 ± 1,13	^a 0,34 ± 0,22
	Pos cosecha	^{de} 1,11 ± 0,05	^{de} 44,43 ± 1,88	^a 0,13 ± 0,08
<i>O. canarii</i> ICFC 864/17	Incubación	^a 0,08 ± 0,01	^a 3,03 ± 0,38	^a 0,02 ± 0,001
	Primordios	^e 1,21 ± 0,06	^e 48,41 ± 2,25	^a 0,44 ± 0,03
	Fructificación	^f 1,75 ± 0,02	^f 70,17 ± 0,75	^a 0,87 ± 0,29
	Pos cosecha	^c 0,75 ± 0,03	^c 30,1 ± 1,13	^a 0,11 ± 0,04
<i>O. cubensis</i> ICFC 852/17	Incubación	^a 0,12 ± 0,07	^a 4,62 ± 2,63	^a 0,02 ± 0,001
	Primordios	^e 1,34 ± 0,06	^e 53,72 ± 2,25	^a 0,42 ± 0,03
	Fructificación	^h 3,86 ± 0,08	^h 154,3 ± 3,38	^a 0,54 ± 0,002
	Pos cosecha	^b 0,47 ± 0,01	^b 18,95 ± 0,38	^a 0,06 ± 0,01
<i>O. cubensis</i> ICFC 863/17	Incubación	^a 0,06 ± 0,01	^a 2,49 ± 0,38	^a 0,01 ± 0,001
	Primordios	^{cd} 0,87 ± 0,07	^{cd} 34,87 ± 2,63	^a 0,2 ± 0,01
	Fructificación	^g 2,74 ± 0,19	^g 109,45 ± 7,51	^a 0,19 ± 0,01
	Pos cosecha	^{bc} 0,63 ± 0,02	^{bc} 25,05 ± 0,75	^a 0,79 ± 0,08
Valores seguidos por diferentes letras en la misma columna son diferentes significativamente con $p < 0,05$, a partir del test de Tukey, $n = 8$.				

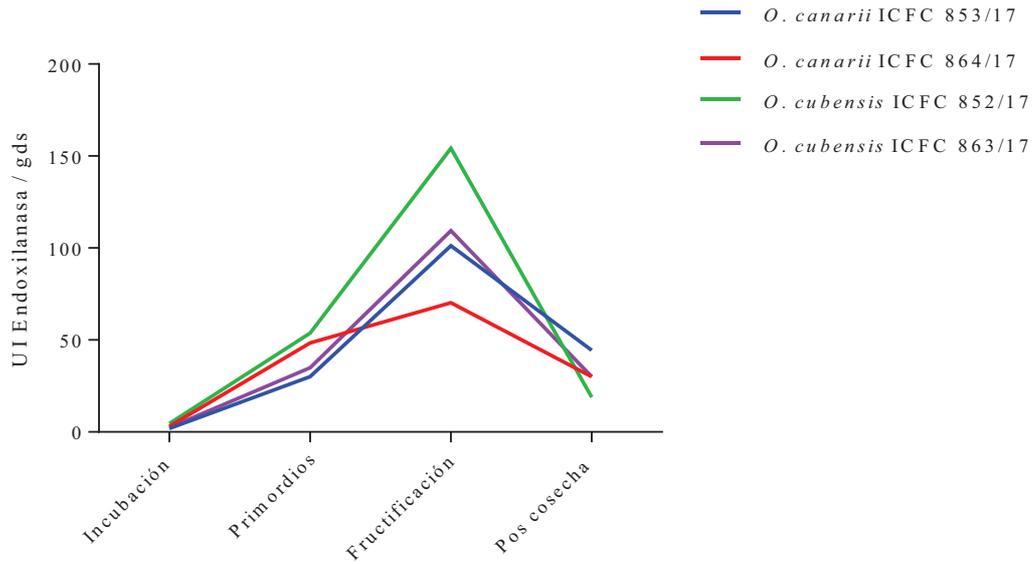


Figura 25. Actividad Endoxilanasas (UI/mg) registrada para las diferentes etapas del ciclo de cultivo para dos cepas evaluadas de *O. canarii* y dos cepas evaluadas de *O. cubensis*.

Actividad Lacasa

Se registró actividad lacasa en todas las etapas del ciclo de cultivo en cada cepa de las dos especies estudiadas excepto en los momentos de fructificación de la cepa ICFC 853/17 de *O. canarii* y de ICFC 852/17 *O. cubensis*. Se encontraron diferencias significativas entre los valores de actividad enzimática estimados en todas las unidades de medición. Para todas las cepas evaluadas, la máxima actividad lacasa registrada fue en la fase de incubación (5,62 a 1,12 UE/gds), seguida por el momento de poscosecha (de 4,56 a 2,02 UE/gds). Por el contrario, durante la formación de primordios y la fructificación, la actividad lacasa fue mínima (0,19 a 0,75 y de 0 a 0,4 UE/gds, respectivamente) (Tabla 15 y Fig. 26). En cuanto a las cepas, el valor estadísticamente mayor fue alcanzado por *O. canarii* ICFC 864/17 en la etapa de incubación.

Tabla 15. UI de actividad lacasa en diferentes momentos del ciclo de cultivo de *O. canarii* y *O. cubensis* y en diferentes unidades de medición.

Especie y cepa	Momento del ciclo	Lacasa UE/ml extracto	Lacasa UE/gds	Lacasa UE/mg proteína
<i>O. canarii</i> ICFC 853/17	Incubación	abcde $0,03 \pm 0,001$	abcde $1,12 \pm 0,08$	a $0,003 \pm 0,0002$
	Primordios	abc $0,03 \pm 0,004$	abc $0,4 \pm 0,02$	a $0,003 \pm 0,0004$
	Fructificación	-	-	-
	Pos cosecha	de $0,05 \pm 0,0007$	de $2,02 \pm 0,003$	b $0,01 \pm 0,0006$
<i>O. canarii</i> ICFC 864/17	Incubación	f $0,14 \pm 0,02$	f $5,62 \pm 0,71$	c $0,03 \pm 0,003$
	Primordios	a $0,004 \pm 0,0008$	a $0,19 \pm 0,03$	a $0,001 \pm 0,0009$
	Fructificación	abc $0,01 \pm 0,001$	abc $0,4 \pm 0,07$	a $0,004 \pm 0,0008$
	Pos cosecha	de $0,03 \pm 0,0001$	de $2,05 \pm 0,01$	a $0,003 \pm 0,0001$
<i>O. cubensis</i> ICFC 852/17	Incubación	cde $0,04 \pm 0,01$	cde $1,71 \pm 0,4$	b $0,01 \pm 0,001$
	Primordios	abcd $0,02 \pm 0,001$	abcd $0,75 \pm 0,06$	a $0,004 \pm 0,0003$
	Fructificación	-	-	-
	Pos cosecha	f $0,11 \pm 0,03$	f $4,56 \pm 1,01$	b $0,01 \pm 0,002$
<i>O. cubensis</i> ICFC 863/17	Incubación	bcde $0,04 \pm 0,003$	bcde $1,64 \pm 0,14$	a $0,004 \pm 0,0003$
	Primordios	ab $0,06 \pm 0,01$	ab $0,35 \pm 0,07$	b $0,01 \pm 0,001$
	Fructificación	a $0,003 \pm 0,0004$	a $0,12 \pm 0,04$	a $0,0001 \pm 0$
	Pos cosecha	e $0,01 \pm 0,0005$	e $2,28 \pm 0,01$	a $0,004 \pm 0,0002$
Valores seguidos por diferentes letras en la misma columna son diferentes significativamente con $p < 0,05$, a partir del test de Tukey, $n = 8$.				

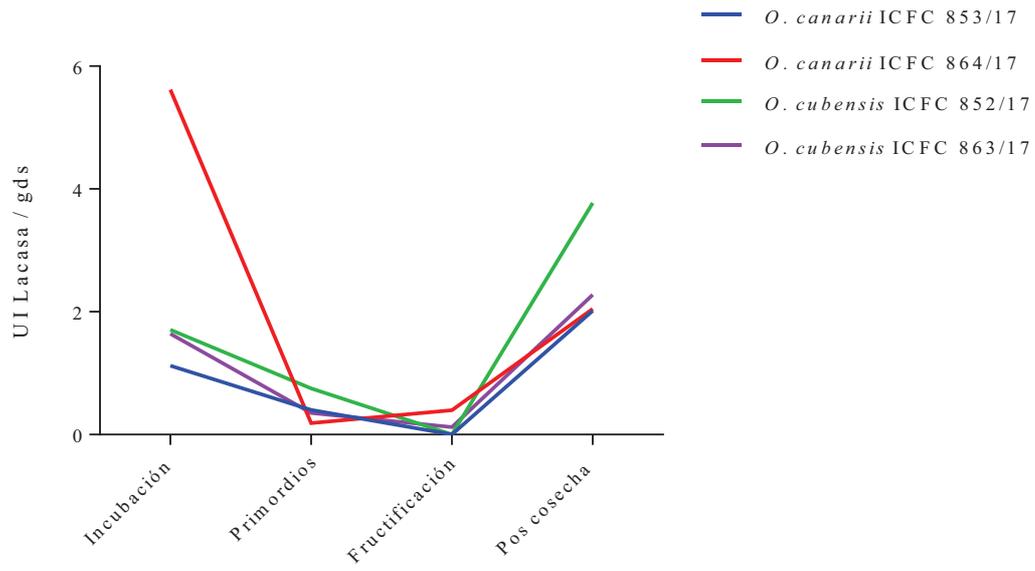


Figura 26. Actividad Lacasa (UI/ml) registrada para las diferentes etapas del ciclo de cultivo para dos cepas evaluadas de *O. canarii* y dos cepas evaluadas de *O. cubensis*.

Discusión

A partir de los *screenings* enzimáticos, y tal como era esperado, se detectó actividad enzimática para las dos especies de *Oudemansiella* estudiadas para todos los grupos enzimáticos evaluados (celulasas, hemicelulasas, mn-peroxidasas y lacasas). Si bien este tipo de ensayos podrían parecer demasiado simples, suelen resultar interesantes al momento de realizar una selección de cepas para el estudio de ciertos grupos enzimáticos ya que por ejemplo, en algunas especies se ha demostrado que la tasa de crecimiento y el halo de degradación en medio de cultivo selectivo correlacionan positivamente ($R^2=0,977$) con la producción de celulasas en fermentación en estado sólido en diferentes cepas del ascomiceto *Trichoderma* sp. (Florencio *et al.* 2012).

Respecto a los resultados de las actividades enzimáticas, y al igual que sucede con las actividades antioxidantes, la gran variación en la metodología y las condiciones experimentales empleadas por los diferentes autores vuelve muy difícil la tarea de comparar los valores obtenidos para otros tipos de hongos e incluso para las mismas especies. Se ha demostrado que pequeñas diferencias en el buffer utilizado, el pH o el tiempo de extracción, pueden afectar considerablemente los valores de actividad enzimática alcanzados (Chuwech y Rakariyatham 2014; Salcedo *et al.* 2012). A su vez, también se encuentran diferencias pequeñas (y no tanto) en las ecuaciones utilizadas para calcular las unidades enzimáticas y en las unidades de expresión de resultados, que dificultan aún más la comparación de los valores alcanzados. Pese a esto, en este trabajo de tesis se procuró utilizar las metodologías y fórmulas más ampliamente reportadas, para que, en conjunto con los recursos y tecnologías disponibles en el lugar de trabajo, se logre la máxima reproducibilidad posible en los resultados alcanzados.

Como puede verse en la tabla 13, la máxima actividad CMCasa registrada fue en el momento de fructificación (de 228,36 a 83,43 UI/gds), seguido por la etapa de pos cosecha (de 54,26 a 47,63 UI/gds), la formación de primordios (55,15 a 5,66 UI/gds), y el crecimiento micelial o incubación (5,21 a 0,88 UI/gds) (Tabla 13 y Fig. 24). De forma muy similar, Elisashvili *et al.* (2003) reportaron las actividades CMCasa para *P. ostreatus* cultivado sobre desechos de algodón, y hallaron máximos valores durante la fructificación (de 140 a 75 UI/gds); intermedios durante la formación de primordios (75 a 30 UI/gds), mientras que los valores más bajos fueron alcanzados durante el crecimiento del micelio (50 a 25 UI/gds). Esta misma tendencia fue reportada por Elisashvili *et al.* (2008) para dos cepas de *P. ostreatus* cultivado sobre paja de trigo y hojas de árboles; también, otros autores como Mata y Savoie (1998) encontraron resultados similares durante el desarrollo de seis cepas de *L. edodes* cultivadas en paja de trigo. Estos cambios en las actividad CMCasa difieren de los reportados por Zhai y Han (2018), en un estudio realizado para cinco especies de *Pleurotus* cultivadas sobre vástagos de espárragos. En este caso, encontraron la máxima actividad CMCasa durante la fase de formación de primordios (18,50 a 8,49 UI/gds), seguida por la fase de fructificación (13,50 a 5,22 UI/gds) y la etapa de incubación (5,73 a 12,60 UI/gds). Por otra parte, Lechner y Papinutti (2006), encontraron la máxima actividad de endoglucanasas (1250 U/g) y endoxilanasas (750 U/g) inmediatamente después de la última cosecha de *Lentinus tigrinus*, cultivado en paja de trigo.

Con respecto a la producción de endoxilanasas, como mencionamos anteriormente, la máxima actividad registrada fue en el momento de fructificación (154,3 a 70,17 UI/gds), seguido por la etapa de formación de primordios (de 53,72 a 30,1 UI/gds) y poscosecha (44,45 a 18,95 UI/gds). A su vez, la fase de incubación reportó la mínima actividad (de 4,62 a 4,96 UI/gds) (Tabla 14 y Fig. 25).

Elisashvili *et al.* (2003) reportaron cambios similares en las actividades endoxilanasas para *P. ostreatus* cultivado sobre desechos de algodón: se hallaron los valores máximos durante la fructificación (de 80 a 60 UI/gds); intermedios durante la formación de primordios (70 a 40 UI/gds), y los valores más bajos fueron alcanzados durante el crecimiento del micelio (60 a 25 UI/gds). Así mismo, Mata y Savoie (1998) encontraron resultados similares durante el desarrollo de seis cepas de *L. edodes* cultivadas en paja de trigo.

Por otra parte, Wood y Goodenoug (1977) hallaron resultados bastante diferentes para champiñón, para el cual encontraron la máxima actividad endoxilanasas (200 U/ml) luego de finalizada la primera oleada de producción.

En cuanto a la producción de lacasas, su máxima actividad se registró durante la incubación (5,62 a 1,12 UE/gds), seguida por el momento de poscosecha (de 4,56 a 2,02 UE/gds), formación de primordios (0,19 a 0,75 UE/ gds) y fructificación (0 a 0,4 UE/gds) (Tabla 15 y Fig. 26).

Resultados con la misma tendencia de actividad lacasa fueron hallados por Elisashvili *et al.* (2008), para dos cepas de *P. ostreatus* cultivado sobre paja de trigo y hojas de árboles; y por Mata y Savoie (1998) para el cultivo de *L. edodes* sobre paja de trigo.

Bonnen *et al.* (1994) por su parte, también encontraron la máxima actividad lacasa durante la incubación, pero se extendió temporalmente durante la formación de primordios (8,5 a 8,0 U/ g de compost) y bajó al mínimo durante la primera y segunda oleada de fructificación (1,3 a 0,4 U/ g de compost). De forma similar, Cho *et al.* (2002) cultivaron *P. ostreatus* y *P. sajor-caju* en aserrín de haya con salvado de trigo y obtuvieron la máxima actividad lacasa durante la formación de primordios (40 a 18 nkat/ μ g proteína) y la mínima durante la fructificación (0,5 a 0 nkat/ μ g proteína).

Los resultados obtenidos en este trabajo, revelan que existe una fuerte regulación de las actividades enzimáticas durante el ciclo de cultivo de *O. canarii* y *O. cubensis*, en términos generales, la actividad lacasa prevalece durante la incubación y luego de la etapa de fructificación, mientras que la actividad CMCasa y endoxilanasas prevalecen durante la formación de basidiomas. Como hemos visto, esta fuerte tendencia ha sido reportada previamente por algunos autores como Elisashvili *et al.* (2008) y Mata y Savoie (1998) para algunos basidiomicetes. Sin embargo, también se encuentran diferentes resultados, incluso para diferentes cepas de las mismas especies (Bonnen *et al.* 1994, Cho *et al.* 2002). Tales diferencias podrían estar dadas por las variaciones en sustratos, formas de cultivo y demás factores que impactan sobre la expresión de las enzimas lignocelulolíticas, así como también en la actividad individual de cada enzima dentro del complejo enzimático (Elisashvili *et al.* 2008b; Silva *et al.* 2005).

Además de la caracterización del perfil lignocelulolítico de las especies de *Oudemansiella* estudiadas en este trabajo un objetivo principal consiste en evaluar la factibilidad de utilizar el sustrato agotado proveniente del cultivo de estos basidiomicetes como fuente de enzimas. Sin embargo, para responder a ciencia cierta esa pregunta, haría falta la realización de decenas de experimentos adicionales e implicaría la consideración de múltiples factores, incluyendo los aspectos económicos. Pese a esto, y disponiendo de la información generada a partir de los análisis enzimáticos y en algunas publicaciones recientes responderemos aquí a dicho interrogante (al menos parcialmente). Se sabe que una de las principales tendencias actuales para la producción de enzimas lignocelulolíticas a partir de hongos se basa principalmente en el sistema de fermentación en estado sólido (FES). La FES se trata de un proceso con un bajo costo operacional de tecnología simple, amigable con el ambiente y en el cual la inversión de capital requerida es menor que en la fermentación en estado líquido, obteniéndose

mayores productividades (Cen y Xia 1999; Pandey 2003). Por otro lado, si consideramos exclusivamente la utilidad del sustrato agotado como fuente de enzimas, debemos enfocarnos en valores de actividades CMCasa, endoxilanasas y lacasas obtenidas en el período de poscosecha. La Tabla 16 muestra las máximas actividades lignocelulolíticas obtenidas en este trabajo, y las compara con las obtenidas a partir de microorganismos ampliamente utilizados para cada grupo enzimático.

Tabla 16. Actividades CMCasa, Endoxilanas y Lacasa para el período poscosecha de las especies estudiadas en este trabajo y comparación con actividades enzimáticas de otros microorganismos altamente reportados.

Espece y cepa	Actividad enzimática	U/ml	U/g	Método de cultivo	Referencia
<i>O. canarii</i> ICFC 853/17	CMCasa	1,27	50,73	Cultivo en paja de trigo (poscosecha)	Este trabajo
<i>O. canarii</i> ICFC 864/17		1,19	47,63	Cultivo en paja de trigo (poscosecha)	Este trabajo
<i>O. cubensis</i> ICFC 852/17		1,36	54,26	Cultivo en paja de trigo (poscosecha)	Este trabajo
<i>O. cubensis</i> ICFC 863/17		1,29	51,79	Cultivo en paja de trigo (poscosecha)	Este trabajo
<i>Aspergillus niger</i> KIJH		1,017	-	FES Raíces de Manihot esculenta	Dos Santos <i>et al.</i> 2021
<i>A. niger</i> SCBM1		-	82,7	FES Bagazo de caña de azúcar y salvado de trigo	Oliveira <i>et al.</i> 2017
<i>Trichoderma asperellum</i> MR 1		-	1,53	FES Fibra de peciolo de palmito	Ikubar <i>et al.</i> 2018
<i>T. asperellum</i> SR1-7		-	13,2	FES salvado de trigo	Raghuwanshi <i>et al.</i> 2014
<i>T. asperellum</i> UC1		-	126,87	FES Hojas de palmera	Ezeilo <i>et al.</i> 2021
<i>O. canarii</i> ICFC 853/17	Endoxilanas	1,11	44,33	Cultivo en paja de trigo (poscosecha)	Este trabajo
<i>O. canarii</i> ICFC 864/17		0,75	30,1	Cultivo en paja de trigo (poscosecha)	Este trabajo
<i>O. cubensis</i> ICFC 852/17		0,47	18,95	Cultivo en paja de trigo (poscosecha)	Este trabajo
<i>O. cubensis</i> ICFC 863/17		0,63	25,05	Cultivo en paja de trigo (poscosecha)	Este trabajo

<i>A. niger</i> KIJH		1,218	-	FES hojas de <i>Opuntia ficus-indica</i>	Dos Santos <i>et al.</i> 2021
<i>A. niger</i> KIJH		2,10	-	FES raíces de <i>Manihot esculenta</i>	Dos Santos <i>et al.</i> 2021
<i>A. tubingensis</i> NKBP-55		-	167	FES harina de copra	Prajapati <i>et al.</i> 2018
<i>T. asperellum</i> MR 1		-	6,69	FES Fibra de peciolo de palmito	Ikubar <i>et al.</i> 2018
<i>T. asperellum</i> S4F8		-	14,8	FES Bagazo de caña de azúcar	Marx <i>et al.</i> 2013
<i>O. canarii</i> ICFC 853/17	Lacasa	0,05	2,02	Cultivo en paja de trigo (poscosecha)	Este trabajo
<i>O. canarii</i> ICFC 864/17		0,03	2,05	Cultivo en paja de trigo (poscosecha)	Este trabajo
<i>O. cubensis</i> ICFC 852/17		0,11	4,56	Cultivo en paja de trigo (poscosecha)	Este trabajo
<i>O. cubensis</i> ICFC 863/17		0,01	2,28	Cultivo en paja de trigo (poscosecha)	Este trabajo
<i>Trametes versicolor</i>		-	180,2	FES silo de maíz	Singh <i>et al.</i> 2019
<i>T. versicolor</i>		-	19,34	FES salvado de trigo	Souza <i>et al.</i> 2011
<i>T. versicolor</i> CICC 14002		-	25	FES residuos de té	Xu <i>et al.</i> 2020
<i>P. ostreatus</i>		-	151,6	FES bagazo de caña de azúcar	Karp <i>et al.</i> 2015
<i>Pycnoporus sanguineus</i>		-	138,6	FES salvado de trigo con mazorca de maíz	Zimbardi <i>et al.</i> 2016

La actividad CM Casa de algunas especies de *Trichoderma* y *Aspergillus* en sistemas de FES varió desde 167 a 6,69 UI/g y en 1,017 UI/ml. La actividad CM Casa encontrada en nuestros extractos de poscosecha de *O. canarii* y *O. cubensis* alcanzaron valores intermedios dentro de este rango, variando desde 54,26 a 47,63 UI/g (y expresada en unidades líquidas la misma fue desde 1,19 a 1,36 UI/ml).

De la misma forma, la actividad endoxilanasas de algunas especies de *Trichoderma* y *Aspergillus* en sistemas de FES varió desde 1,53 a 126,87 UI/g y de 2,10 a 1,218 UI/ml. La actividad CM Casa encontrada en nuestros extractos de poscosecha de *O. canarii* y *O. cubensis* alcanzaron valores intermedios dentro de este rango, variando desde 44,33 a 18,95 UI/g (y expresada en unidades líquidas la misma fue desde 1,11 a 0,47 UI/ml).

Por el contrario, la actividad lacasa encontrada en nuestros extractos de poscosecha de *O. canarii* y *O. cubensis* alcanzaron valores dentro del rango de 4,56 a 2,02 UE/g, mientras que el rango reportado para especies productoras de lacasas como lo son *Trametes versicolor*, *P. ostreatus* y *P. sanguineus* varió desde 180,2 a 19,34 UE/g, es decir, el rango estuvo muy por encima de los valores reportados en este trabajo.

Los resultados acá reportados indican que si bien las actividades CM Casas y endoxilanasas disminuyen luego de la fructificación, durante la poscosecha siguen siendo lo suficientemente altas como para ser recuperadas a partir del sustrato agotado. De todas maneras, es necesario mencionar que en este capítulo se evaluaron las actividades enzimáticas posteriormente a la primera oleada, por lo que sería muy apropiado y necesario evaluar además, las actividades enzimáticas del sustrato agotado después de las siguientes cosechas.

Se estima que por cada kg de hongos producido se generan aproximadamente 5 kg de sustrato agotado (Pérez-Chávez *et al.* 2019), lo cual se traduce a la obtención de entre 271300 a 238150 UI de CMCasa y entre 221650 a 94750 UI de endoxilanasas por cada kg de *Oudemansiella* cosechadas.

Cabe destacar que las actividades enzimáticas de las endoglucanasas y endoxilanasas comerciales (marca Genecor™, Argentina) alcanzan una actividad enzimáticas aproximadas de 1782,1 UI/ml y 28,23 UI/ml, respectivamente (Salcedo *et al.* 2012), por lo tanto, habría que pensar en la posibilidad de concentrar aquellos extractos enzimáticos obtenidos de *Oudemansiella* que vayan a ser utilizados por su actividad endoglucanasa.

Conclusiones del capítulo

En este capítulo se determinó la capacidad CMAsa, endoxilanasas y lacasa durante el ciclo de cultivo de *O. canarii* y *O. cubensis*. Para ambas especies, las variaciones de dichas actividades fueron muy similares. La actividad CMCasa es mínima durante la incubación, aumenta durante la formación de primordios, se maximiza durante la fructificación y disminuye un poco en poscosecha. De manera muy similar, la actividad endoxilanasas es baja durante la incubación, comienza a aumentar durante la formación de primordios y se maximiza durante la fructificación, y luego, disminuye durante la poscosecha. La actividad lacasa, de forma diferente, es máxima durante la incubación, disminuye durante la formación de primordios, se hace mínima durante la fructificación, y luego, en la poscosecha aumenta nuevamente. En base a los resultados de actividad enzimática de los extractos de poscosecha se estima que el sustrato agotado de las oudemansiellas sería una fuente óptima para la extracción de endoglucanasas y endoxilanasas, al menos después de la primera cosecha.

Discusión General

Previo al inicio de nuestros estudios, en reiteradas ocasiones de viajes de campaña y en muestreos habíamos observado el crecimiento de ejemplares silvestres de *Oudemansiella* irrumpiendo sobre distintos sustratos naturales de diferentes regiones geográficas de nuestro país y de algunos otros países de Latinoamérica. Las frecuentes visualizaciones de estos ejemplares de tan agradable aspecto y aroma, sumados a su gran porte y condición xilófaga, nos motivaron a saber un poco más acerca de estas especies que hasta el momento habían sido escasamente estudiadas. Cabe destacar, que las especies lignocelulósicas son muy interesantes porque estas pueden ser cultivables en condiciones intensivas sobre desechos de la agroindustria (Albertó 2017; Stamets 2000). Esto los hace diferentes a los hongos humícolas que son mucho más difíciles de producir y que requieren de un compost selectivo para su cultivo.

Con el objetivo principal de conocer el potencial de cultivo intensivo de las especies de este género presentes en la Argentina es que comenzamos con los ensayos de muestreo e identificación de especies.

Partiendo de sucesivos muestreos en algunas provincias del norte y centro de nuestro país, logramos recolectar y aislar cepas mediante las cuales se dilucidaron, en primer lugar, los aspectos taxonómicos. Como resultados, se encontró que los materiales colectados correspondían únicamente a dos especies pertenecientes al género, determinadas como *Oudemansiella canarii* y *O. cubensis*. Observamos además que ambas especies comparten muchas características morfológicas al punto tal que se dificulta su identificación específica a ojo desnudo. Estas pueden diferenciarse cuando son cultivadas o caracterizadas molecularmente a partir de los marcadores moleculares universales empleados en hongos, los ITS. Con mínimas diferencias, las descripciones morfológicas

que hemos realizado coinciden con los reportes previos de Corner (1994) y tanto las descripciones morfológicas como los análisis moleculares, coinciden con los de Petersen y Hughes (2010). Por otra parte se definió que ambas especies tienen un desarrollo hemiangiocárpico (Alexopoulos y Mims 1985), que hasta el momento había sido reportado como gimnocárpico (Corner 1994). Esto fue posible ya que cuando estas especies son cultivadas es posible observar a los ejemplares desde su etapa de primordio a la de adulto. En cambio, cuando se recojen ejemplares en la naturaleza, debemos tener “la suerte” de encontrar varios ejemplares en diferentes estadios de desarrollo para poder definir esta variable. Con estos resultados propusimos una clave dicotómica para *Oudemansiella* y géneros afines presentes en la Argentina con el objeto que sea de utilidad para identificar más fácilmente a las especies del grupo.

Luego de darles nombres y una posición en el árbol filogenético, las cepas fueron sometidas a ensayos de cultivo que nos brindaron vasta información sobre cuestiones referidas al crecimiento micelial, tasa de inoculación, preferencias de sustratos y del sistema de inducción. Adicionalmente, se conocieron los tiempos del ciclo productivo, el número de oleadas y las características morfológicas de los basidiomas cosechados. Si bien fueron muchos los parámetros trabajados en el capítulo de producción, vale la pena destacar el parámetro de rendimiento que más interesa a nivel comercial: la eficiencia biológica. Las altas eficiencias biológicas encontradas, de hasta 188,52 % para *O. canarii* y de hasta 142,24% para *O. cubensis*, representan valores superiores a los reportados para los hongos más cultivados del mundo. En general, se considera que valores de EB que superan al 100 %, son altos y hacen a esta especie rentable (Jaramillo y Albertó 2012). A su vez, fueron similares o superiores a reportes previos dentro del género *Oudemansiella* por otros autores (Li *et al.* 2012; Magingo *et al.* 2004; Ruegger *et al.* 2001; Xu *et al.* 2016).

La domesticación de especies silvestres de hongos comestibles requiere de la resolución de varios problemas a fin de lograr rendimientos óptimos de producción que hagan este un recurso comercialmente rentable. Por ello la optimización de la producción de una cepa desconocida requiere de muchos pasos. Albertó (2017) indica:

1- Aislamiento de la cepa: el primer paso es obtener la cepa. La cepa puede obtenerse a partir de un pequeño trozo de contexto del píleo o del pie, que se cultiva en medio de cultivo agarizado. Un micólogo experto tiene que certificar que el aislamiento obtenido pertenece al espécimen recogido y descartar cualquier contaminación. También es muy importante estar absolutamente seguro de que el hongo colectado sea una especie comestible. Si hay alguna duda sobre este tema, se debe descartar la cepa. Otra opción es hacer una prueba de comestibilidad utilizando ratones o ratas.

2- Determinación de las condiciones óptimas para el crecimiento del micelio. El objetivo de este paso es obtener el mayor crecimiento en el menor tiempo posible. Para ello se deben determinar parámetros como el pH, la temperatura, los nutrientes, etc. Estas condiciones óptimas deben ser utilizadas para la producción de inóculo y el período de incubación o cualquier etapa para el crecimiento micelial.

3- Producción de inóculo. El inóculo se puede producir sembrando la cepa seleccionada sobre granos de cereales esterilizados (Sinden 1932). El tipo de grano (sorgo, trigo, avena, etc.), la humedad de los granos, también son críticos para optimizar el tiempo requerido para la producción de inóculo.

4- Selección de sustratos. Se deben ensayar diferentes tipos de sustratos para determinar cuáles son los más productivos. Si estamos trabajando con hongos xilófagos es aconsejable probar los sustratos donde crecen los hongos en la naturaleza. También es útil probar los sustratos que están disponibles y son abundantes en la zona donde se

cultivaría la especie. En primer lugar, es conveniente ensayar sustratos formulados con el 100 % de un tipo de componente (por ejemplo el 100 % de serrín de álamo) y luego sería conveniente ensayar mezclas de diferentes componentes.

5- Periodo de incubación. Se debe determinar el tiempo necesario para la colonización total del micelio. Se debe evaluar el tipo y tamaño de los contenedores (bolsas, cajas, bandejas, etc) ya que pueden influir en el crecimiento y tiempo de colonización.

6- Requerimientos de luz para la formación de primordios. Para algunas especies la luz es necesaria para la formación de primordios, para otras los primordios pueden formarse normalmente en ausencia de luz, mientras que otras especies no precisan luz para formar primordios pero sí para un desarrollo normal de cuerpos fructíferos. Colavolpe y Albertó (2014) propusieron un modelo sencillo para determinar la necesidad de luz de los hongos cultivables, mientras que Kurtzman y Martínez-Carrera (2013) estudiaron la calidad de la luz necesaria para cultivar hongos.

7- Condiciones de inducción. Se sabe que algunos factores ambientales influyen en el desencadenamiento de los mecanismos de inducción para la producción de basidiomas. Estos son la temperatura y el aumento del intercambio de aire. Por lo general, un descenso de 10 grados en la temperatura ambiente induce la formación de primordios en la mayoría de los hongos cultivables.

8- Uso de tierra de cobertura. Algunas especies humícolas requieren una capa de tierra o turba para la fructificación. La tierra de cobertura modifica la relación entre el O₂ y el CO₂ en la superficie del sustrato, proporciona agua y un soporte físico para el crecimiento de los hongos. En consecuencia, el uso de la tierra de cobertura, el uso de los diferentes componentes y el espesor de la capa deben ser estudiados en detalle (Kalberer 1985).

9- Selección de suplementos. Los suplementos son nutrientes ricos principalmente en carbohidratos o proteínas que ayudan a aumentar los rendimientos. Deben ser preferentemente de bajo costo y de fácil acceso. Hay muchos suplementos que se producen comercialmente para la producción del champiñón (*A. bisporus*), de todas formas también se pueden ensayar otros suplementos como salvado de trigo, cáscara de girasol, malta de desecho de la industria cervecera, harina de soja, etc.

10- Condiciones de producción. Hay muchos parámetros que deben ser estudiados para la producción de hongos, estos son: la temperatura óptima para la fructificación, el intercambio de aire, el riego las necesidades de luz (fotoperiodo), y el intercambio de aire (tolerancia al CO₂, velocidad de intercambio de aire, etc.).

11- Parámetros de cultivo. Se deben definir muchos parámetros del cultivo, estos son: eficiencia biológica (BE%), productividad, número de oleadas, tiempo de descanso, porcentaje de rendimiento por oleada, etc. (Salmones *et al.* 2005; Uhart *et al.* 2008).

12- Parámetros del basidioma. Son las características morfológicas de la especie, tales como el diámetro del píleo, la longitud del pie, el color, el olor, etc.

13- Poscosecha. Se trata de determinar cómo manipular, enfriar, limpiar, clasificar y envasar las especies. También es importante determinar la vida útil y cómo prolongarla (Brennan *et al.* 2000; Hammond y Nichols 1975).

14- Composición nutricional. Al tratarse de la inclusión de una nueva especie y un nuevo alimento, se debe determinar la composición nutricional. Se debe definir el contenido de proteínas, carbohidratos, grasas, fibras y cenizas. También es útil determinar qué aminoácidos, minerales y vitaminas podría aportar la nueva especie.

Las especies silvestres de hongos crecen en diferentes condiciones ambientales y diferentes sustratos, los cuales no siempre se encuentran disponibles en cantidad para una

producción intensiva. A su vez, existen diferentes metodologías de producción de los hongos que se producen comercialmente. Si bien hemos cumplido con la mayoría de los pasos necesarios para la domesticación de especies, en este trabajo además, se propone una metodología para identificar la forma óptima para la inducción de basidiomas de una especie silvestre, cultivada por primera vez. Esta metodología consiste en evaluar diferentes sistemas de cultivo utilizando como modelos aquellos que están más ampliamente difundidos para el cultivo de hongos en el mundo. Los mismos fueron: i) bolsas con perforaciones: para inducir la fructificación se realizan perforaciones con un cortador; ii) bolsas abiertas: las bolsas colonizadas son abiertas apicalmente para permitir a la formación de basidiomas; iii) frascos de vidrio: de los cuales se remueve la tapa para inducir la formación de basidiomas; iv) bloques de micelio: una vez colonizadas, se remueve totalmente la bolsa de polipropileno, dejando el bloque de sustrato expuesto; v) bolsas con tierra de cobertura: se abre la bolsa apicalmente y se coloca una capa de tierra de cobertura.

Las especies de *Oudemansiella* resultaron finalmente tener un sistema de producción óptimo como el que se aplica a las especies de *Pleurotus* (Albertí *et al.* 2021b). Este resultado contribuye a que estas especies puedan ser consideradas a nivel global para su cultivo ya que las técnicas de producción de hongos comestibles de las especies de *Pleurotus* son ampliamente conocidas (Stamets 2000) y además implementadas en muchos países de Latinoamérica (Sánchez *et al.* 2018).

Los parámetros de producción que hemos determinado como óptimos para estas dos especies aportan dos conceptos importantes y diferenciales. Uno de ellos es la temperatura de fructificación que se encuentra en los 20 y 25 °C y el otro es que consideramos que con 2 oleadas de producción es suficiente para obtener el 95 % de la cosecha. De este modo, para el primero de estos conceptos, el cultivo de estas especies propuestas aporta

a los ahorros de costo de producción en lo que a control de temperatura del cultivo se refiere. Siempre es más caro calentar que enfriar, estas especies al fructificar a temperaturas mayores permiten un ahorro de energía al no tener que bajara 5 grados la temperatura en los meses más cálidos del año y en los que se cultiva, como lo son en la región pampeana los meses de noviembre y diciembre, o marzo y abril. El segundo punto, el hecho de limitar solo el cultivo a dos oleadas, implica un acortamiento del ciclo de cultivo de 2 a 4 semanas. Esto aumenta mucho en el año la cantidad de ciclos de cultivos que se puede hacer, por consiguiente el productor obtendría mayor cantidad de kg en un tiempo menor en la misma área de cultivo.

Una vez optimizados algunos de los principales parámetros del cultivo intensivo de *Oudemansiella*, nos propusimos reportar algunos de los aspectos claves en cuanto a alimentos se trata. Pensando en alguno de los posibles aportes como producto nutracéutico, estudiamos la capacidad antioxidante de los basidiomas determinando que efectivamente poseen dicha actividad. En cuanto al perfil nutricional, se destaca su alto contenido de fibras y ácidos grasos de buena calidad com lo hemos indicado en especial en su perfil omega-6/omega-3 preferencial respecto a otras especies mundialmente cultivadas.

Como paso final, asumiendo que son múltiples los usos posibles del sustrato agotado resultante del cultivo de hongos (Pérez-Chávez *et al.* 2019) y aprovechando que la mayoría de los hongos de pudrición blanca poseen complejos sistemas de enzimas que les permiten degradar el sustrato, pensamos que este aspecto merecía un estudio profundo. Para ello, se realizaron ensayos con el fin de caracterizar los tres principales grupos responsables de la degradación de la lignocelulosa a lo largo del ciclo de cultivo y se discutió la posibilidad de aprovechar las enzimas remanentes posteriores a la etapa de fructificación. Estudiamos la actividad de endoglucanasas, endoxilanasas y lacasas

durante la incubación, formación de primordios, fructificación y luego de la primera oleada de fructificación. Como resultados, definimos los momentos de máxima y mínima actividad de estos grupos de enzimas a lo largo del ciclo de cultivo y concluimos que el sustrato agotado de *Oudemansiella* es fuente competitiva de endoglucanasas y endoxilanasas.

Pese a que son innumerables la cantidad de experimentos y perspectivas posibles cuando se aborda la tarea de investigar aquellas especies de hongos silvestres novedosas, habiendo recavado toda la información que nos fue posible con el tiempo y los recursos disponibles, concluimos este trabajo de tesis resultando que *Oudemansiella canarii* representa el primer antecedente de cultivo en la República Argentina y que *O. cubensis* es cultivada por primera vez en todo el mundo.

Finalmente, podemos afirmar que las dos especies aquí estudiadas, se muestran como prometedoras para ser cultivadas como una nueva alternativa alimenticia, siendo sus altos rendimientos, la sencillez del cultivo, la versatilidad productiva y la calidad de los productos cosechados, algunas de las principales ventajas encontradas.

Conclusiones generales de la tesis

Las conclusiones alcanzadas en este trabajo de tesis fueron las siguientes:

- En las regiones que exploramos de la Argentina encontramos tan sólo dos especies de *Oudemansiella* que fueron determinadas con técnicas morfológicas y moleculares como *O. canari* y *O. cubensis*.
- A nivel microscópico, *O. canari* y *O. cubensis* pueden diferenciarse principalmente por la estructura de la pileipellis. A nivel macroscópico, en ejemplares obtenidos en cultivo, se verifica la presencia de escamas sobre el píleo de *O. cubensis* y la ausencia de las mismas en *O. canarii*.
- Estas dos especies pueden diferenciarse a partir de marcadores moleculares ITS sin dificultad.
- Para el cultivo de oudemansiellas, es recomendable generar inóculo a partir de granos de sorgo o mijo a un pH inicial neutro o levemente ácido y a 25°C.
- La siembra para el cultivo de oudemansiellas debe realizarse a una tasa del 10% y se recomienda como sustrato paja de trigo, aunque también es posible cultivarlas sobre aserrín.
- El mejor sistema para la producción de basidiomas en *Oudemansiella* es el sistema de bolsas plásticas con perforaciones como el que se utiliza para la producción de las especies de *Pleurotus*.
- Los parámetros de producción generales son: incubación a 25 °C durante 21 días, fructificación a 20-24°C, humedad ambiental entre 70 y 80%, oleadas obtenidas entre 1 y 4 (aunque se recomienda 2 oleadas ya que se obtiene el 95 % de la producción en ese período), una duración de ciclo total entre 46 y 79 días,

obteniendo en este trabajo EB de hasta 188,52 % para *O. canarii* y de hasta 142,24% para *O. cubensis*, las que pueden ser consideradas como altas.

- Las especies ensayadas resultaron resistentes al fungicida Carbendazim que se emplea para el control de mohos contaminantes.
- La composición proximal de las dos especies de *Oudemansiella* muestra un mayor contenido de grasas y fibras respecto a otras especies ampliamente cultivadas. *O. canarii* tiene un perfil de ácidos grasos más deseable respecto a *O. cubensis* y a su vez, ambas especies tienen una relación omega-6/omega-3 preferencial respecto a otras especies mundialmente cultivadas.
- Los extractos metanólicos de *O. canarii* y *O. cubensis* contienen moléculas fenólicas y actividad antioxidante.
- Para *O. canarii* y *O. cubensis* la actividad CMCasa y endoxilanasas es máxima durante la fructificación, mientras que la máxima actividad lacasa es detectada durante la fase de incubación.
- El sustrato agotado de las oudemansiellas podría emplearse como una fuente alternativa de obtención de endoglucanasas y endoxilanasas.

Dificultades afrontadas durante esta tesis

Este trabajo de tesis se vio afectado por la pandemia ocasionada por el virus SARS-CoV-2, covid 19. La interrupción total de las actividades laborales presenciales durante el año 2020 y la reducción de la jornada laboral durante el 2021, significaron impedimento para el cumplimiento total de los experimentos planificados al inicio de esta tesis. Como consecuencia, varios experimentos muy importantes a nivel productivo tales como el *screening* de cepas o la optimización de la temperatura de fructificación, no pudieron ser llevados a cabo.

Perpectivas futuras en el estudio de hongos del género *Oudemansiella*

Como bien mencionamos en la discusión general, son muchísimas las posibilidades de experimentos y aspectos para abordar cuando se estudia el cultivo de alguna especie de hongos por primera vez. Si bien pudimos establecer algunos de los parámetros fundamentales para cultivar las oudemansiellas y logramos obtener altos rendimientos, todavía quedan muchos interrogantes para responder.

Basandonos en los lineamientos planteados en este trabajo de tesis, en primer lugar consideramos que sería muy bueno extender las zonas de muestreo hacia otras provincias, para verificar la distribución del género *Oudemansiella* para toda la Argentina y obtener nuevas cepas. Sería muy importante continuar incorporando secuencias ITS y utilizar otros marcadores moleculares, para complementar las bases de datos, ya que hasta el momento la información es bastante escasa.

Está ampliamente reportada la gran variabilidad de rendimiento que suele haber entre cepas, por lo tanto, para conocer los rendimientos potenciales de cada especie, sería fundamental realizar ensayos de cultivo con nuevas cepas de cada una de las especies estudiadas. Además, será necesario evaluar la óptima relación C/N del sustrato, realizando ensayos de cultivo con diferentes tipos y cantidades de suplementos nutricionales.

Por otro lado, aprovechando que el género *Oudemansiella* se extiende en zonas de climas templado a subtropical, sería fundamental verificar la capacidad de fructificar a temperaturas aún mayores a las ensayadas en este trabajo y de esta manera determinar el límite superior de temperatura de fructificación y sus rendimientos en estas condiciones.

En cuanto al análisis de los basidiomas cosechados, sería interesante realizar estudios vinculados a la poscosecha, como su perecibilidad de los basidiomas, temperatura de conservación, deshidratados y producción de conservas. Además sería necesario conocer el perfil de aminoácidos, para determinar con exactitud el valor nutricional de sus proteínas. Así como también, sería interesante buscar metabolitos con posibles actividades antifúngicas o antibióticas, ya sea a partir de los basidiomas o del micelio.

Respecto a las enzimas del sustrato agotado, sería pertinente analizar la actividad y estabilidad de otros grupos enzimáticos como las Mn-peroxidasas, exoglucanasas, y a su vez, verificar las actividades enzimáticas luego de varias oleadas de producción.

En cuanto al sustrato agotado, dado la cantidad de usos posibles que existen, podría evaluarse su utilización para la producción de biogás o como fertilizante agrícola y en ensayos de biorremediación entre otras cosas.

Bibliografía

Acharya K., Nandi S., Dutta A. (2019) Microanatomical and physicochemical characterization and antioxidative activity of methanolic extract of *Oudemansiella canarii* (Jungh.) Höhn. Turk Journal of Pharmaceutical Science 16(1): 76-81

Ahmed S., Kadam J., Mane V., Patil S., Baig M. (2009) Biological efficiency and nutritional contents of *Pleurotus florida* (Mont.) Singer cultivated on different agro-wastes. Natural Science 7(1): 44-48

Akyüz M., Yildiz A. (2008) Evaluation of cellulosic wastes for the cultivation of *Pleurotus eryngii* (DC. ex Fr.) Quel. African Journal of Biotechnology 7(10):1494-1499

Alberti M., Matheus L., Mendez D., Vieira W., Cunha Zied D. (2021a) Technological developmet on *Pleurotus* spp. cultivation: specific technologies used in Brazil. Brazilian Archives of Biology and Technology 64 (2)

Alberti M., N. Niveiro N., Cunha Zied D., Albertó E. (2020) Identification of *Oudemansiella canarii* and *O. cubensis* (Basidiomycota, Physalacriaceae) in Argentina using morphological, culture, and molecular analysis. Harvard Papers in Botany 25(2): 131-143

Alberti M., Niveiro N., Albertó E. (2020) *Xerula setulosa*, a Neotropical Agarical not known from Argentina. Mycotaxon 135(2): 415-423

Alberti M., Pérez-Chávez A., Niveiro N., Albertó E. (2021b) Towards an optimal methodology for basidiomes production of naturally occurring species of the genus *Oudemansiella* (Basidiomycetes). Current Microbiology 78(B)

Albertó E. (2008) Cultivo intensivo de los hongos comestibles. Hemisferio Sur, Buenos Aires

Albertó E. (2017) Naturally Occurring Strains of Edible Mushrooms: A Source to Improve the Mushroom Industry en: Zied DC, Pardo-Giménez P (eds.), Edible and medicinal mushrooms: technology and applications. John Wiley & Sons Ltd, Hoboken

Albertó E., Gasoni L. (2003). Producción de hongos en la Argentina. IDIA XXI 5: 70-76

Alcalde M., Bulter T. (2003) Colorimetric assays for screening laccases, en Frances A., Georgiou G. (Eds). Methods in Molecular Biology, vol. 230. Humana Press Inc., Totowa

Alexopoulos C., Mims C. (1985) Introducción a la micología. Omega, Barcelona

Anke T., Schüffler A. (2018). Physiology and genetics: selected basic and applied aspects, en Anke T., Schüffler, A. (Eds). Secondary Metabolites of Basidiomycetes. Springer, Cham

APHA (American Public Health Association) (1992) Standard methods for the examination of dairy products, APHA, Washington

Aro N., Pakula T., Penttilä M. (2005) Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. Fems Microbiology Reviews 29(4): 719-39

Arrieta E., 2014. Vegetarianismo en el debate político. CreateSpace Independent Publishing Platform, Córdoba

Barros L., Falcão S., Baptista P., Freire C., Vilas-Boas M., Ferreira I. (2008) Antioxidant activity of *Agaricus* sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. Food Chemistry 111, 61-66

- Bellettini M., Fiorda F., Maieves H., Teixeira G., Ávila S., Hornung P., Júnior A., Ribania R. (2019). Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp. Saudi Journal of Biological Science 26(4): 633-646
- Bhatti M., Jiskani M., Wagan K., Pathan M., Magsi M. (2007) Growth, development and yield of oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus* (jacq. Ex. Fr.) Kummer as affected by different spawn rates Pakistan Journal of Botany 39(7): 2685-2692
- Bidegain M. (2017). Optimización del cultivo de *Ganoderma lucidum*. Evaluación de actividad y desarrollo de nutracéuticos. Tesis para optar por el título de Doctor en ciencia y tecnología de los alimentos. Universidad Nacional del Sur Boekhout T. (1999) *Oudemansiella* and *Xerula*, En: Bas C., Kuyper T., Noordeloos M., Vellinga C. (Eds.) Flora Agaricina Neerlandica 4. Balkema, Brookfield.
- Boekhout T., Bas C. (1986) Notulae ad Floram Agaricinam Neerlandicam---XII. Some notes on the genera *Oudemansiella* and *Xerula*. Persoonia 13: 45-56
- Bolanos de la Torre A., Henderson T., Nigam S., Owusu-Apenten R. (2015) A universally calibrated microplate ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay for foods and applications to Manuka honey. Food Chemistry 174: 119-123
- Bonnen A., Anton L., Orth A. (1994). Lignin-Degrading enzymes of the commercial button mushroom, *Agaricus bisporus*. Applied and Environmental Microbiology 60: 960-965
- Brennan M., Le Port G., Gormley R. (2000) Post-harvest treatment with citric acid or hydrogen peroxide to extend the shelf life of fresh sliced mushrooms. LWT-Food Science and Technology 33(4): 285-289
- Bresinsky A., Besl H. (1985) Giftpilze. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart

- Carreño-Ruiz S., Cappello-García S., Gaitán-Hernández R., Cifuentes-Blanco J., Rosique-Gil E. (2014) Growth of three tropical edible fungi in culture mediums and agricultural waste. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5(8): 1447-1458
- Catalán J., Agüero S., García J. (2015) Los ácidos grasos dietarios y su relación con la salud. *Nutrición Hospitalaria* 32(3): 1362-1375
- Cen P. y Xia L. (1999) Production of cellulase by solid-state fermentation. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 65: 69-92
- Chang S. (1980) Mushrooms as human food. *BioScience* 30(6): 399-401
- Chang S., Miles P. (1989) Edible mushrooms and their cultivation. CRC Press, Hong Kong
- Cho N., Malarczyk E., Nowak G., Nowak M., Kochmanska-Rdest J., Leonowicz A., Ohga S. (2002) Changes in phenol oxidases and superoxide dismutase during fruit-body formation of *Pleurotus* on sawdust culture. *Mycoscience* 43: 267-270
- Choi M., Hae J., Lee J., Kim H., Lee T. (2011) The optimal culture conditions and antifungal activity of culture extract from *Oudemansiella mucida*. *The Korean Journal of Mycology* 39(2): 91-98
- Choi Y., Lee S., Chun J., Lee H., Lee J. (2006) Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chemistry* 99(2): 381-387
- Chuwech M., Rakariyatham N. (2014) Potential of peanut hulls as substrates for fungal cellulase bioproduction through solid state fermentation. *Khon Kaen University Research Journal* 19(Supplement Issue): 235-243
- Clémenton H. (1979) Taxonomic structure of the genus *Oudemansiella* (Agaricales).

Sydowia 32: 74-80

Colavolpe B., Albertó E. (2014) Cultivation requirements and substrate degradation of the edible mushroom *Gymnopilus pampeanus*: A novel species for mushroomcultivation.

Scientia Horticulturae 180:161-166

Contato A., Brugnari T., Sibin A., dos Reis Buzo A., Sá-Nakanishi A., Bracht L., Bersani-

Amado C., Peralta R., de Souza C. (2020) Biochemical Properties and effects on

mitochondrial respiration of aqueous extracts of basidiomycete mushrooms. Cell

Biochemistry and Biophysics 78: 111-119

Contu M. (2000) IL Genere *Xerula* (*Basidiomycotina*, *Agaricales*) nell'Italia Centro-

Meridionale de Insulare. Micologia e Vegetazione mediterranea 15: 18--39.

Corner E. (1994) *Oudemansiella*. Part 2 of On the *Agaric* Genera *Hohenbuehelia* and

Oudemansiella. Speg. Gardens' Bulletin Singapore 46: 49-75

Corner E. (1996) The agaric genera *Marasmius*, *Chaetocalathus*, *Crinipellis*,

Heimiomyces, *Resupinatus*, *Xerula* and *Xerulina* in Malesia. Nova Hedwigia Beiheft 111:

1-175

Corrêa R., da Silva B., Castoldi R., Kato C., de Sá-Nakanishi A., Peralta R., de Souza C.,

Bracht A., Peralta M. (2016) Spent mushroom substrate of *Pleurotus pulmonarius*: a

source of easily hydrolyzable lignocellulose. Folia Microbiologica 61(5): 439-48

Coughlan M., Ljungdahl L. (1988) Comparative biochemistry of fungal and bacterial

cellulolytic enzyme systems, en: Aubert J., Beguin P., Milett J. (Eds.), Biochemistry and

genetics of cellulose degradation. Academic Press, New York

Crisan E., Sands A. 1978. Nutritional value. En: Chang, S. T. y W. A Hayes, (Eds.) The

Biology and Cultivation of Edible Mushrooms. Academic Press, New York

- Cuesta M., Castro-Ríos K. (2017) Mushrooms as a strategy to reduce food insecurity in Colombia. *Nutrition and Food Science* 47(6):817-828
- Darriba D., Taboada G., Doallo R., Posada D. (2012) jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8): 772
- Davies G., Henrissat B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3(9):853-859
- De Pauli P. (2010) Avaliação da composição química, compostos bioativos e atividade antioxidante em cogumelos comestíveis. Tesis para optar por el título de Mestre em Ciência dos Alimentos, Universidad Estatal de San Pablo.
- de Vries R., Visser J. (2001) *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65: 497-522
- Devia Ulloa J. (2014) Estudio del efecto de xilanasas fúngicas en la degradación de sustratos lignocelulósicos. Tesis para optar por título de ingeniero civil en biotecnología e Ingeniero civil químico, Universidad de Chile
- Dhar B. (2017) Mushrooms and Human Civilization, en: Zied DC, Pardo-Giménez P (eds.), *Edible and medicinal mushrooms: technology and applications*. John Wiley & Sons Ltd, Hoboken
- Dörfelt H. (1979) Taxonomische Studien in der Gattung *Xerula* R. Mre. Feddes Repertorium 90: 363-388
- Dörfelt H. (1981) Taxonomische Studien in der Gattung *Xerula* R. Mre. (V). Feddes Repertorium 92: 631-674
- dos Santos B., dos Santos K., Aparecido C., Gomes J., do Val de G., Gonçalves F., Lopes P. (2021) Biomass of unconventional plants from Brazilian semiarid as substrate for

hydrolytic enzymes production by *Aspergillus niger* under solid and submerged fermentation. *Acta Scientiarum* 43: e48257

Duarte Trujillo A., Pineda Insuasti J., García Juárez M. (2018) Beta-Glucanos de *Pleurotus* y sus efectos en la salud. *Revista Biorrefinería* 1(4)

Eibinger M., Ganner T., Bubner P., Rošker S., Kracher D., Haltrich D., Ludwig R., Plank H., Nidetzky B. (2014) Cellulose surface degradation by a lytic polysaccharide monooxygenase and its effect on cellulase hydrolytic efficiency. *Journal of Biological Chemistry* 289(52):35929-35938

Elisashvili V., Chichua D., Kachlishvili E., Tsiklauri N., Khardziani T. (2003) Lignocellulolytic enzyme activity during growth and fruiting of the edible and medicinal mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kumm. (Agaricomycetideae). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 5: 193-198

Elisashvili V., Kachlishvili E., Penninckx M. (2008). Lignocellulolytic enzymes profile during growth and fruiting of *Pleurotus ostreatus* on wheat straw and tree leaves. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 55(2):157-168

Elisashvili V., Penninckx M., Kachlishvili E., Tsiklauri N. (2008b) *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. *Bioresource Technology* 99: 457-462

Ergun B., Osman N., Mehmet C., Hilmi T., Hakan S., Ferah Y. (2007) Cultivation of *Agaricus bisporus* on some compost formulas and locally available casing materials. Part I: wheat straw-based compost formulas and locally available casing materials. *African Journal of Biotechnology* 6(19): 2225-2230

Escobedo R. (2006). Producción de hongo seta (*Pleurotus ostreatus*). Sagarpa, Puebla

Ezeilo U., Wahab, R., Huyop F., David E., Lee C. (2021). Solid-state valorization of raw oil palm leaves by novel fungi *Trichoderma asperellum* UC1 and *Rhizopus oryzae* UC2 for sustainable production of cellulase and xylanase. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*

Fanadzo M., Zireva D., Dube E., Mashingaidze A. (2010) Evaluation of various substrates and supplements for biological efficiency of *Pleurotus sajor-caju* and *Pleurotus ostreatus*. *African Journal of Biotechnology* 9: 2756-2761

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations (2017) The future of food and agriculture: trends and challenges. FAO, Roma

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations (2020) Data of global mushroom production during 2004-2020. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL/visualize>. Acceso 17 de febrero 2022

Felsenstein J. (1985) Phylogenies and the comparative method. *The American Naturalist* 125(1): 1-15

Florencio C., Couri S., Sanchez Farinas C. (2012) Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. *Hindawi Publishing Corporation: Enzyme Research* 2012: 793708

Foley J., Ramankutty N., Brauman K., Cassidy E., Gerber J., Johnston M., Mueller N., O'Connell C., Ray D., West P., Balzer C., Bennett E., Carpenter S., Hill J., Monfreda C., Polasky S., Rockström J., Sheehan J., Siebert S., Tilman D., Zaks D. (2011) Solutions for a cultivated planet. *Nature* 478: 337-342

- Forsberg Z., Vaaje-Kolstad G., Westereng B., Buaes A., Stenstrom Y., MacKenzie A., Sorlie M., Horn S., Eijsink, V. (2011). Cleavage of cellulose by a CBM33 protein. *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 20(9): 1479-1483
- Gaitán-Hernández R., Salmones D., Pérez Merlo R., Mata G. (2006) Manual práctico del cultivo de setas. Aislamiento, siembra y producción. Instituto de Ecología A.C., Xalapa
- Gardes M., Bruns T. (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118
- Geoffrey D., Jindrich V., Kubátová E. (1994) Pyranose oxidase, a major source of H₂O₂ during wood degradation by *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, and *Oudemansiella mucida*. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 2524-2532
- Ghose T. (1987) Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry* 59: 257-268
- Ghose T., Bisaria V. (1987) Measurement of hemicellulase activities: Part I Xylanases. *Pure and Applied Chemistry* 59(12): 1739-1752
- Gill M., Steglich W. (1987) Pigments of fungi (Macromycetes), en: Zechmeier L. (ed) *Progress in the chemistry of organic natural products*. Springer, Heidelberg
- Girmay Z., Gorems W., Birhanu G., Zewdie S. (2016) Growth and yield performance of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr.) Kumm (oyster mushroom) on different substrates. *AMB Express*. 6(87): 1-7
- Gómez-Candela C., Bermejo-López L., Loria-Kohen V. (2011) Importance of a balanced omega 6/omega 3 ratio for the maintenance of health: nutritional recommendations. *Nutrición Hospitalaria* 26(2): 323-9

- González-Tijera M., Márquez-Fernández O., Mendoza-López M., Mata G., Trigos A. (2014) A comparison of fatty acid content in three species of the genus *Pleurotus*. *Revista Mexicana de Micología* 39: 41-45
- Guindon S., Gascuel O. (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52: 696-704
- Halling R., Mueller G. (1999) A new species and a new record for the genus *Xerula* (*Agaricales*) from Costa Rica. *Mycotaxon* 71: 105-110
- Hammond J., Nichols R. (1975) Changes in respiration and soluble carbohydrates during the post-harvest storage of mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 26(6): 835-842
- Hankin L., Anagnostakis S. (1977) Solid media containing carboxymethylcellulose to detect CX cellulose activity of micro-organisms. *Journal of General Microbiology* 98(1): 109-115
- Hassan F., Medany G., Hussein A. (2010) Cultivation of the king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*) in Egypt. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 4(1): 99-105
- Hatvani L., Sabolić P., Kocsubé S., Kredics L., Czifra D., Vágvölgyi C., Kaliterna J., Ivić D, Đermić E, and Kosalec I. (2012) The first report on mushroom green mould disease in Croatia. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 63: 481-487
- Heleno S., Barros L., Sousa M., Martins A., Ferreira I. (2010). Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity. *Food Chemistry* 119(4): 1443-1450

Hemsworth G., Davies G., Walton P. (2013). Recent insights into copper- containing lytic polysaccharide mono-oxygenases. *Current Opinion in Structural Biology* 23(5): 660-668

Hiramori C., Koh K., Kurata S., Ueno Y., Gamage S., Huang P., Ohga S. (2017) Cultivation of *Flammulina velutipes* on modified substrate using fermented apple pomace. *Advances in Microbiology* 07(11): 719-728

Horak E. (1968) Synopsis Generum *Agaricalium* (Die Gattungstypen der *Agaricales*). *Beitrage Zur Kryptogamenflora Der Schweiz* 13: 1-741

Horak E. (2005) *Röhrlinge und Blätterpilze in Europe*. Elsevier, Munich

Hu F. (2011) Globalization of diabetes: the role of diet, lifestyle, and genes. *Diabetes Care* 34(6): 1249-1257

Iark D., dos Reis Buzzo A., Garcia J., Côrrea V., Helm C., Corrêa R., Peralta R., Moreira R., Bracht A, Peralta R. (2019). Enzymatic degradation and detoxification of azo dye Congo red by a new laccase from *Oudemansiella canarii*. *Bioresource technology* 289: 121655

Ikubar M., Manan M., Salleh M, Yahya A. (2018) Solid-state fermentation of oil palm frond petiole for lignin peroxidase and xylanase-rich cocktail production. *Biotech* 8(5):259.

Index Fungorum: Authors of the Fungal Names, 2022. <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>. Acceso 28 de enero 2022

Ivanova N., Fazekas A., Hebert P. (2008) Semi-automated, membrane-based protocol for DNA isolation from plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 26: 186-198

Ivanova N., Grainger G. (2006) CCDB protocols: Pre-made frozen PCR and sequencing plates. http://ccdb.ca/site/wp-content/uploads/2016/09/CCDB_Sequencing.pdf. Acceso

28 de enero 2022

Jaramillo S., Albertó E. (2012) El despunte de caña de azúcar, sustrato altamente productivo para la producción de *Pleurotus ostreatus*, en Sánchez J., Mata G. (Eds) Hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica: Investigación y desarrollo en un entorno multicultural. El Colegio de La Frontera Sur, Tapachula

Jaramillo S., Albertó E. (2013) Heat treatment of wheat straw by immersion in hot water decreases mushroom yield in *Pleurotus ostreatus*. Revista Iberoamericana de Micología 30(2): 125-129

Jaramillo S., Albertó E. (2019) Productivity increase in the cultivation of *Pleurotus ostreatus* by the use of inoculum as supplement. Scientia Fungorum 49: e1243

Jarosz-Wilkolażka A., Kochmańska-Rdest J., Elzbieta Malarczyk, Władysław (2002) Fungi and their ability to decolourize azo and anthraquinonic dyes. Enzyme and Microbial Technology. 30(4): 566-572

Jones S., Frongillo E. (2006) The modifying effects of food stamp program participation on the relation between food insecurity and weight change in women. The Journal of Nutrition 136 (4): 1091-1094

Kalač P. (2016) Edible mushrooms: Chemical composition and nutritional value. Academic Press, Amsterdam

Kalberer P. (1985) Influence of the depth of the casing layer on the water extraction from casing soil and substrate by the sporophores, on the yield and on the dry matter content of the fruit bodies of the first three flushes of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. Scientia Horticulturae 27(1-2): 33-43

- Kalmis E., Azbar H., Yıldız H., Kalyoncu F. (2008) Feasibility of using olive mill effluent (OME) as a wetting agent during the cultivation of oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on wheat straw. *Bioresource Technology*, 99: 164-169
- Karp S., Faraco V., Amore A., Letti L., Soccol V., Soccol C. (2015) Statistical optimization of laccase production and delignification of sugarcane bagasse by *Pleurotus ostreatus* in solid-state fermentation. *Biomedical Research* (2015): 181204
- Khakimov A., Ismailov A., Murodullaeva M. (2018) Casing soils selection for cultivation of common mushroom *Agaricus bisporus* (J. E. Lange) Imbach, 1946. *Bulletin of Science Practices* 4(1): 64-71
- Khatua S., Roy T., Acharya K. (2013) Antioxidant and free radical scavenging capacity of phenolic extract from *Russula laurocerasi*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 6(4): 156-160
- Kim J., Kwon Y., Kim J., Heo S., Lee Y., Lee S., Shim W., Jung W., Hyun J., Kwon K., Kang D., Oh C. (2014). Effective microwell plate-based screening method for microbes producing cellulase and xylanase and its application. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 24(11): 1559-1565
- Kim SB., Kim SH., Lee K., Shim J., Lee MW., Shim MJ., Lee UY., Lee TS. (2005) The optimal culture conditions for the mycelial growth of *Oudemansiella radicata*. *Mycobiology* 33(4): 230-234
- Kirbag S., Akyuz M. (2008) Effect of various agro-residues on growing periods, yield and biological efficiency of *Pleurotus eryngii*. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 6(3-4): 402-405

- Ko H., Park S., Kim, S., Park, H., Park W. (2005) Detection and recovery of hydrolytic enzymes from spent compost of four mushroom species. *Folia Microbiologica* 50(2): 103-106
- Kornerup A., Wanscher J. (1978) *Methuen handbook of colour*. Eyre Methuen, London.
- Kozarski M., Klaus A., Jakovljevic D., Todorovic N., Vunduk J., Petrović P., Niksic M., Vrvic M., Van Griensven L. (2015) Antioxidants of edible mushrooms. *Molecules* 20: 19489-19525
- Kues U., Liu Y. (2000) Fruiting body production in basidiomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54: 141-52
- Kuhad R., Gupta R., Singh A. (2011) Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Research* 2011
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. (2018) MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547-1549
- Kurtzman R., Martínez C. (2013) Light, what it is and what it does for mycology. *Micología Aplicada International* 25(2): 23-33
- Lechner B., Papinutti, V. (2006) Production of lignocellulosic enzymes during growth and fruiting of the edible fungus *Lentinus tigrinus* on wheat straw. *Process Biochemistry* 41: 594–598
- Li C., Zhang L., Zhang M., Xu Z., Shang X., Tan Q. (2012) Domestication and cultivation of *Oudemansiella submucida*. *Acta Edulis Fungi* 3: 45-48
- Lo P., Cheung P. (2005) Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. *alba*. *Food Chemistry* 89(4): 533-539
- Lodge D., Ammirati J., O'Dell T., Mueller G., Huhndorf S., Wang C., Stokland J., Schmit

- J., Ryvarde n L., Leacock P., Mata M., Umaña L., Wu Q., Czederpiltz D. (2004) Terrestrial and lignicolous macrofungi, en: Mueller G., Bills G., Foster M. (Eds) Biodiversity of Fungi, inventory and monitoring methods. Elsevier Academic Press, Boston
- Lorenzo J., González-Rodríguez R., Sánchez M., Amado I., Franco D. (2013). Effects of natural (grape seed and chestnut extract) and synthetic antioxidants (butylatedhydroxytoluene, BHT) on the physical, chemical, microbiological and sensory characteristics of dry cured sausage “chorizo”. Food Research International 54: 611-620
- Magingo F., Ndeky a M., Amelia K. (2004) Cultivation of *Oudemansiella tanzanica* nom. prov. on agricultural solid wastes in Tanzania. Mycologia 96(2): 197-204
- Magnelli P., Forchiassin F. (1999) Regulation of the cellulase complex production by *Saccobolus saccoboloides*: Induction and repression by carbohydrates. Mycologia 91(2): 359-364
- Malherbe S., Cloete T. (2002) Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. Environmental Science and Biotechnology 1: 105-114
- Mandeel Q., Al-Laith A, Mohamad S. (2005) Cultivation of oyster mushrooms (*Pleurotus spp.*) on various lignocellulosic wastes. World Journal of Microbiology and Biotechnology 21: 601-607
- Marx I., van Wyk N., Smit S., Jacobson D., Viljoen-Bloom M., Volschenk H. (2013) Comparative secretome analysis of *Trichoderma asperellum* S4F8 and *Trichoderma reesei* Rut C30 during solid-state fermentation on sugarcane bagasse. Biotechnology for biofuels 6 (1):1-13

- Mata G., Savoie J. (1998) Extracellular enzyme activities in six *Lentinula edodes* strains during cultivation in wheat straw. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14: 513-519
- Mata G., Savoie J. (2005) Improvement of spawn for cultivation in alternative substrate, en: MushWorld (eds) *Mushroom Growers' Handbook 2: Shiitake Cultivation*, MushWorld, Seoul, Korea.
- Mathers H., Lowe S., Scagel C., Struve D., Case L. (2007) Abiotic factors influencing root growth of woody nursery plants in containers. *Horttechnology* 17(2): 151-162
- Mattila P., Kõnkö K., Eurola M., Pihava J., Astola J., Hietaniemi V., Kumpulainen J., Valtonen M., Piironen V. (2001) Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(5): 2343-2348
- Moncalvo J., Vilgalys R., Redhead S., Johnson J., James T., Aime M., Hofstetter V., Verduin S., Larsson E., Baroni T., Thorn R., Jacobsson S., Cléménçon H., Miller O. (2002) One hundred and seventeen clades of eu-agarics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23: 357-400
- Montoya S., Sánchez O., Levin L. (2014) Evaluación de actividades endoglucanasa, exoglucanasa, lacasa y lignina peroxidasa en diez hongos de pudrición blanca. *Biotechnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 12(2): 115-124
- Morawicki R., Diaz D. (2018) Food sustainability in the context of human behavior. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 91(2): 191-6
- Moser M. (1955) Studien zur Gattung *Oudemansiella* Speg. Schleim- und Sammetrüblinge. *Zeitschrift für Mykologie* 19: 4-11

- Mueller G., Wu Q., Huang Y., Guo S., Gomez R., Vilgalys R. (2001) Assessing biogeographic relationships between North American and Chinese macrofungi. *Journal of Biogeography* 28: 271-281
- Mumpuni A., Sharma H., Brown AE. (1998) Effect of metabolites produced by *Trichoderma harzianum* biotypes and *Agaricus bisporus* on their respective growth radii in culture. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 5053-5056
- Mussatto S., Teixeira J. (2010) Lignocellulose as raw material in fermentation processes *Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* 2: 897-907
- Naik R., Chandra R. (2018) Evaluation of different substrates on growth period and yield of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) (Jacq. Fr.) P. Kumm. *Journal of Eco-friendly Agriculture* 13(2): 92-94
- Naim L., Alsanad M., El Sebaaly Z., Shaban N., Fayssal S., Sassinea Y. (2020) Variation of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) P. Kumm. (1871) performance subjected to different doses and timings of nano-urea. *Saudi Journal of Biological Sciences* 27(6): 1573-1579
- Nandni S., Mishra S. (2018) Crop room studies in relation to yield potential of *Lentinula edodes* strains on wheat straw. *Indian Journal of Hill Agriculture* 9(1): 124-126
- Navarro M., Gea J., Pardo-Giménez A., Martínez A., Raz D., Levanon D., Danay O. (2020) Agronomical valuation of a drip irrigation system in a commercial mushroom farm. *Scientia Horticulturae* 265: 109234
- Navarro M., Merino L., Gea J. (2017) Evaluation of residue risk and toxicity of different treatments with diazinon insecticide applied to mushroom crops. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 52(3): 218-221

- Nitta T., Kamei I., Sugamoto K., Meguro S. (2016) Shiitake (*Lentinula edodes*) cultivation in sawdust media consisting of kunugi (*Quercus acutissima*) mixed with sugi (*Cryptomeria japonica*): optimization of gaseous phase rate in media by three-phase-structure analysis. *Journal of Wood Science* 62: 452-459
- Niveiro N., Albertó E. (2012) Checklist of the Argentine *Agaricales* 4. *Tricholomataceae* & *Polyporaceae*. *Mycotaxon* 121: 499-500
- Nouroozi R., Noroozi M., Ahmadizadeh M. (2015). Determination of protein concentration using bradford microplate protein quantification assay. *International Electronic Journal of Medicine* 4(1): 11-17
- Ogawa K., Yashima T. (2019) MRI visualization of shiitake mycelium growing in woodchip blocks used for shiitake mushroom cultivation. *Magnetic Resonance Imaging* 58: 90-96
- Oliveira P., Pereira J., dos Santos D., Gurgel L., Pasquini D., Baffi M. (2017). Synergistic action of an *Aspergillus* (hemi-)cellulolytic consortium on sugarcane bagasse saccharification. *Industrial Crops and Products* 109: 173-181
- Ortega A., González L., Villalobos T., Perea J., Aparicio V., López A. (2013) Fuentes alimentarias y adecuación de la ingesta de ácidos grasos omega-3 y omega-6 en una muestra representativa de adultos españoles. *Nutrición Hospitalaria* 28(6): 2236-2245
- Ortiz G., Colavolpe M., Albertó E. 2017. Artificial spawn generation based on alginate encapsulated mycelium as inoculum for mushroom cultivation. *African Journal Biotechnology* 16: 1776-1783
- Ortiz G., Guitart M., Albertó E., Fernandez Lahore M., Blasco M. (2015) Characterization, optimization and scale-up of cellulases production by *Trichoderma reesei* cbs 836.91 in solid-state fermentation using agro-industrial products. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 38(11): 2117-2128

- Ovando-chac S., Waliszewski K. (2005) Cellulases preparations and their applications in extractives processes. *Microbiology* 21: 111-120
- Pan A., Sun Q., Bernstein A., Schulze M., Manson J., Stampfer M., Willett W., Hu F. (2012) Red meat consumption and mortality: results from 2 prospective cohort studies. *Archives of Internal Medicine* 172(7): 555-63
- Pandey A. (2003) Solid-state fermentation. *Enzimas comerciales: Biochemical Engineering Journal* 13:81-84
- Pardo-Giménez A., Pardo J., Cunha Zied D. (2017) Casing materials and techniques in *Agaricus bisporus* cultivation, en: Zied DC, Pardo-Giménez P (eds.), *Edible and medicinal mushrooms: technology and applications*. John Wiley & Sons Ltd, Hoboken
- Patar U., Chandra R., Dhakad P. (2018) Comparative study on growth parameters and yield potential of two species of *Pleurotus* mushroom (*Pleurotus florida* and *Pleurotus sajor-caju*). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 7(3): 3066-3071
- Patel S., Chandra R., Dhakad P. (2019) Comparative study on growth parameters and yield potential of five species of oyster mushroom. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 8(4): 152-156
- Pegler D., Young T. (1986) Classification of *Oudemansiella* (*Basidiomycota: Tricholomataceae*), with special reference to spore structure. *Transactions of the British Mycological Society* 87(4): 583-602
- Pérez J, Muñoz-Dorado J, De-la-Rubia T, Martínez J. (2002) Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology* 5: 53-63

- Pérez-Chávez A., Mayer L., Albertó E. (2019) Mushroom cultivation and biogas production: A sustainable reuse of organic resources. *Energy for Sustainable Development* 50: 50-60
- Petersen R. (2000) *Rhizomarasmius*, gen. nov. (Xerulaceae, Agaricales). *Mycotaxon* 75: 333-342
- Petersen R. (2008a) The genus *Xerula* (Agaricales; Fungi) in Australia and New Zealand. *Nova Hedwigia* 87: 1-67
- Petersen R. (2008b) Scanning electron microscope images of basidiospores of *Xerula* (*Physalacriaceae*, Agaricales). *Mycoscience* 49: 19-34
- Petersen R. (2008c) Species of *Xerula* from sub-Saharan Africa. *Fungal Diversity* 30: 121-147
- Petersen R. Methven A. (1994) Mating systems in the *Xerulaceae*: *Xerula*. *Canadian Journal of Botany* 72: 1151-1563
- Petersen R., Baroni T. (2007) *Xerula hispida* and *Xerula setulosa* (comb. nov.), two similar subtropical New World agarics. *Mycotaxon* 101: 113-136
- Petersen R., Halling R. (1993) Mating systems in the *Xerulaceae*: *Oudemansiella*. *Transactions of the Mycological Society of Japan* 34: 409-422
- Petersen R., Hughes K. (2005) Une nouvelle espèce de *Xerula*: *Xerula limonispora*. *Bulletin Trimestriel de la Société Mycologique de France* 120: 37-49
- Petersen R., Hughes K. (2010) The *Xerula/Oudemansiella* complex (Agaricales). *Beihefte Zur Nova Hedwigia* J. Cramer, Stuttgart
- Petersen R., Nagasawa E. (2006) The genus *Xerula* in temperate East Asia. *Reports of Tottori Mycolical Institute* 43: 1-49

- Piljac-Žegarac J., Šamec D., Piljac A., Mešić A., Tkalčec Z. (2011) Antioxidant properties of extracts of wild medicinal mushroom species from Croatia. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 13(3): 257-263
- Pingali P., Aiyar A., Abraham M., Rahman A. (2019) Transforming food systems for a rising India. Palgrave Macmillan, Cham
- Popescu M., Costea T., Gîrd C., Fierăscu I., Balaci T., Fierăscu R. (2017) Antioxidant activity of romanian *Agaricus blazei* Murrill. and *Agaricus bisporus* J. E. Lange mushrooms *Farmacia* 65(39): 329-335
- Poppe J. 2005. Sustrato, en: MushWord (eds) Manual del cultivador de hongos. MushWord, Corea
- Prajapati B., Suryawansh R., Agrawal S., Ghosh M., Kango N. (2018) Characterization of cellulase from *Aspergillus tubingensis* NKBP-55 for generation of fermentable sugars from agricultural residues. *Bioresource technology* 250: 733-740
- Prasad S., Singh A., Joshi H. (2007) Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resources, Conservation and Recycling* 50:11-39
- Przybylowicz P., Donoghue J. (1990) Shiitake growers handbook. The art and science of mushroom cultivation, Kendall/Hunt Publishing Company, Dubuque
- Quiroz R., Folch, J. (2011) Plant cell wall degrading and remodeling proteins: current perspectives. *Bioteconología aplicada* 28 (4): 205-215
- Raghav D., Singh G., Agarwal N., Bhati A., Sharma S. (2016) Cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus florida*) in North Chotanagpur region of Jharkhand on locally available substrate. *Journal of Agricultural Research* 16(1): 50-52

- Raghuwanshi S., Deswal D., Karp M., Kuhad R. (2014) Bioprocessing of enhanced cellulase production from a mutant of *Trichoderma asperellum* RCK2011 and its application in hydrolysis of cellulose. *Fuel* 124:183-189
- Raithelhuber J. (1979) Die Gattung *Oudemansiella* Speg. *Metrodiana* 8(2-3): 40-51
- Raithelhuber J. (1987) *Flora Mycologica Argentina*. Hongos I. Mycosur, Stuttgart
- Raithelhuber J. (1991) *Flora Mycologica Argentina*. Hongos III. Mycosur, Stuttgart
- Raithelhuber J. (1995) Agaric Flora of South America (10). *Metrodiana* 22(1): 31-38
- Raithelhuber J. (2004) *Nueva Flora Micológica Argentina*. Mycosur, Stuttgart
- Redhead S., Ginns J., Shoemaker S. (1987) The *Xerula* (*Collybia*, *Oudemansiella*) *radicata* complex in Canada. *Mycotaxon* 30: 357-405
- Reis F., Barros L., Martins A., Ferreira I. (2012). Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: An inter-species comparative study 50(2): 0-197
- Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., Ayres D., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M., Huelsenbeck J. (2012) MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61(3): 539-542
- Royse D. (1985) Effect of spawn run time and substrate nutrition on yield and size of the shiitake mushrooms. *Mycologia* 77(5): 756-762
- Royse D., Baars J., Tan Q. (2017) Current overview of mushroom production in the world, en: Zied DC, Pardo-Giménez P (eds.), *Edible and medicinal mushrooms: technology and applications*. John Wiley & Sons Ltd, Hoboken
- Royse D., Royse L., Schisler C., Diehle D. (1985) Shiitake mushrooms consumption, production and cultivation. *Interdisciplinary Science Reviews* 10(4): 329-335

- Royse D., Sanchez J., Beelman R., Davidson J. (2008) Re-supplementing and re-casing mushroom (*Agaricus bisporus*) compost for a second crop. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 319-325
- Ruegger M., Tornisielo S., Bononi V., Capelari M. (2001) Cultivation of the edible mushroom *Oudemansiella canarii* (Jung.) Höhn. in lignocellulosic substrates. *Brazilian Journal of Microbiology* 32: 211-214
- Salcedo J., Galán J., Pardo M. (2012) Hidrólisis enzimática de residuos de la cosecha de caña de azúcar. *Revista Colombiana de Biotecnología* 14(1): 171-181
- Salmones D., Mata G., Waliszewski K. (2005) Comparative culturing of *Pleurotus spp.* on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. *Bioresource technology* 96(5): 537-544
- Sánchez C. (2009) Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotecnology Advances* 27: 185-194
- Sánchez J., Cunha Zied D., Albertó E. (2018) Edible mushroom production in the Americas, en: Abstracts of the 9th International conference on mushroom biology and mushroom products 2-11
- Sánchez J., Royse D., 2001. La biología y el cultivo de *Pleurotus spp.* Uteha-Ecosur, San Cristóbal de las Casas.
- Sande D., Pereira de Oliveira G., Fidelis M., de Almeida B., Thomaz M., Lima M., Takahashi J. (2019). Edible mushrooms as a ubiquitous source of essential fatty acids. *Food Research International* 125: 108524
- Santos N., Menezes R., Sanchez S., Epifanio N., Chaves D., Berbara R. (2020) Atividade Antioxidante Total em Cogumelos Nativos da Flona Mario Xavier, Seropédica, RJ. *Anais do XI Congresso Brasileiro de Agroecologia* 15: 2

- Sasidhara R., Thirunalasundari T. (2014). Phytochemicals and antioxidant potentials of *Pleurotus djamour*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 6(4): 950-953
- Schultes R., Hofmann A. (1980) *Pflanzen der Götter*. Hallwag, Bern
- Sede S., López S. (1999) Cultural studies of *Agrocybe cylindrica*, *Gymnopilus pampeanus* and *Oudemansiella canarii* (Agaricales). *Mycotaxon* 70: 377-386
- Sharma V., Kumar A., Kumar S., Barh A., Kama S. (2020) Substrate sterilization with thiophanate-methyl and its biodegradation to carbendazim in oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus* var. florida). *Environmental Science and Pollution Research* 27: 899-906
- Sheehan J., Aden A., Paustian K., Killian K., Brenner J., Walsh M., Nelson R. (2004) Energy and environmental aspects of using corn stover for fuel ethanol. *Journal of Industrial Ecology* 7: 117-46
- Sidorova I., Voronina E. (2019) Bioactive secondary metabolites of Basidiomycetes and its potential for agricultural plant growth promotion, en: Singh H., Keswani C., Reddy M., Sansinenea E., García-Estrada C. (eds) *Secondary metabolites of plant growth promoting rhizomicroorganisms*. Springer, Singapore
- Silva E., Machuca A., Milagres A. (2005) Evaluation the growth and enzyme production from *Lentinula edodes* strains. *Process Biochemistry* 40:161-164
- Sinden J. (1932) Mushroom spawn and method for making same. EEUU, Patente N° 1.869.517
- Singer R. (1950) Type studies in Basidiomycetes IV. *Lilloa*. 23: 147-246
- Singer R. (1962a) *The Agaricales in Modern Taxonomy*. 2nd ed. J. Cramer, Weinheim.
- Singer R. (1962b) Diagnoses fungorum novorum Agaricalium II. *Sydowia* 15: 45-83

- Singer R. (1964) *Oudemansiellinae, Macrocystidiinae, Pseudohiatulinae* in South America. *Darwiniana* 13: 146-190
- Singer R. (1986) *The Agaricales in Modern Taxonomy*. Koeltz Scientific Books, Koenigstein
- Singer R., Digilio A. (1952) Pródromo de la Flora Agaricina Argentina. *Lilloa* 25: 6-461
- Singh J., Kumar P., Saharan V., Kapoor R. (2019) Simultaneous laccase production and transformation of bisphenol-A and triclosan using *Trametes versicolor*. *Biotech* 9(4): 129
- Singh R., Mishra K. (2005) *Mushroom Cultivation*. Mushroom Research and Training Centre, Pant University of Agriculture and Technology, Uttarakhand
- Smita P. (2011) Agricultural wastes as substrate for spawn production and their effect on shiitake mushroom cultivation. *International Journal of Science and Nature* 2: 733-736
- Smith H., Richard M., Doyle S. (2015) Filamentous fungi as a source of natural antioxidants. *Food Chemistry* 185: 389-397
- Souza É., Freire I., Lima A., Silva B., Sobrinho A., Lima A., Souza J. (2011) Production of *Trametes versicolor* laccase by solid state fermentation using a fixed-bed bioreactor. *Journal of Food Agriculture and Environment* 9(2): 55-58
- Spegazzini C. (1880a) Fungi Argentini. Pugillus 1. *Anales de la Sociedad Científica Argentina* 9(4): 158-192
- Spegazzini C. (1880b) Sobré la *Oudemansia platensis*. *Anales de la Sociedad Científica Argentina* 10: 279-280
- Spegazzini C. (1881) Fungi Argentini additis nonnullis Brasiliensibus Montevideensibusque. Pugillus quartus. *Anales de la Sociedad Científica Argentina* 12: 13-30
- Spegazzini C. (1899) Fungi argentini novi v. critici. *Anales del Museo Nacional de Buenos Aires* 6: 6-365

- Spegazzeni C. (1926) Observaciones y adiciones a la micología argentina. Bol. Acad. Nac. Cienc. 28(3-4): 267-351
- Spence J., Cutumisu N., Edwards J., Raine K., Smoyer-Tomic K. (2009) Relation between local food environments and obesity among adults. BMC Public Health 9(192)
- Stamets P. (2000) Growing gourmet and medicinal mushrooms, Ten Speed Press, Hong Kong
- Steinfeld H. (2006) Environment and Development (LEAD) Initiative livestock, and food and agriculture organization. Animal production and health division. Livestock's Long Shadow: Environmental Issues and Options. FAO, Roma
- Tarasuk V., Cheng J., Gundersen C. (2018) The relation between food insecurity and mental health care service utilization in Ontario. The Canadian Journal of Psychiatry 63(8): 557-569
- Tesfay T., Godifey T., Mesfin R., Kalayu G. (2020) Evaluation of waste paper for cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) with some added supplementary materials. AMB Express 10:15
- Thiers B. (2022) Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. <http://sweetgum.nybg.org/ih/>
Acceso 28 de enero 2022
- Tie M., Li B., Sun T., Guan W., Liang Y., Li H. (2020) HPLC-ICP-MS speciation of selenium in Se-cultivated *Flammulina velutipes*. Arabian Journal of Chemistry 13(1): 416-422
- Tilman D., Clark M. (2014) Global diets link environmental sustainability and human health. Nature 515(7528): 518-22

- Treu R., Falandysz J. (2017) Mycoremediation of hydrocarbons with basidiomycetes: a review. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 52(3): 148-155
- Turlo J., Gutkowska B., Herold F., Krzyczkowski W., Błażewicz A, Kocjan R. (2008) Optimizing vitamin B12 biosynthesis by mycelial cultures of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegl. *Enzyme and Microbial Technology*. 43: 369-374
- Uber T., dos Reis A., Scaratti G., Amorim S., Helm C., Maciel G., Peralta R., Moreira R., Bracht A., Peralta R. (2022) Comparative detoxification of Remazol Brilliant Blue R by free and immobilized laccase of *Oudemansiella canarii*. *Biocatalysis and Biotransformation* 40(1):17-28
- Uhart M., Piscera M., Albertó E. (2008) Utilization of new naturally occurring strains and supplementation to improve the biological efficiency of the edible mushroom *Agrocybe cylindracea*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35(6): 595-602
- Vallavan V., Krishnasamy G., Zin, N., Abdul Latif M. (2020) A Review on Antistaphylococcal Secondary Metabolites from Basidiomycetes. *Molecules* 25 (5848)
- Vanoy V. (2015) Deshidratación catalítica de D-xilosa con sólidos ácidos para la producción de furfural. Tesis para optar por el título de doctor, Universidad Nacional del Litoral
- Varnero M., Madelaine S., Quiroz S., Álvarez C. (2010) Utilización de residuos forestales lignocelulósicos para producción del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*). *Revista Información Tecnológica* 21(2): 13-20
- Vaz J., Barros L., Martins A., Santos-Buelga C., Vasconcelos H., Ferreira I. (2011) Chemical composition of wild edible mushrooms and antioxidant properties of their water soluble polysaccharidic and ethanolic fractions. *Food Chemistry* 126(2): 610-616

- Vellinga E. (1988) Glossary. Pages 54-64 en Bas C., Kuyper T., Noordeloos M., Vellinga N. (Eds), Flora Agaricina Neerlandica. Vol. 1. A. Balkema, Brookfield
- Vetchinkina E., Shirokov A., Bucharskaya A., Navolokin N., Prilepskii A., Burov A. Maslyakova G., Nikitin V. (2016) Antitumor activity of extracts from medicinal basidiomycetes mushrooms. International Journal of Medicinal Mushrooms 18: (11) 955-964
- Wang Y., Jia J., Ren X., Li B., Zhang Q. (2018) Extraction, preliminary characterization and in vitro antioxidant activity of polysaccharides from *Oudemansiella radicata* mushroom. International Journal of Biological Macromolecules 120 (B): 1760-1769
- Wang YC. (1987). Mycology in ancient China. The Mycologist (Bulletin of the British Mycological Society) 21:59-61
- Wani B, Bodha R. H. y Wani A. H. (2010) Nutritional and medicinal importance of mushrooms. Journal of Medicinal Plants Research 4(24): 2598-2604
- Wasser S., Weis A. (1999) Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. Critical Reviews in Immunology 19(1): 65-96
- Williams J., Clarkson J.M., Mills P., Cooper RM. (2003) Saprotrophic and mycoparasitic components of aggressiveness of *Trichoderma harzianum* groups toward the commercial mushroom. Applied and Environmental Microbiology 69: 4192-4199
- Wood D. y Goodenough P. (1977) Fruiting of *Agaricus bisporus*, changes in extracellular enzyme activities during growth and fruiting. Archives of Microbiology 114: 161-165
- Wright J., Albertó E. (2002) Hongos con laminillas. Vol. 1 of Guía de hongos de la región pampeana. Literature of Latin America, Buenos Aires

- Wright J., Lechner B., Popoff O. (2008) Atlas pictórico de los hongos del Parque Nacional Iguazú. Literature of Latin America, Buenos Aires
- Wright J., Wright E. (2005) Checklist of the mycobiota of Iguazu National Park (Misiones, Argentina). Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 40(1-2): 23-44
- Xiao Z., Storms R., Tsang A. (2004) Microplate-based filter paper assay to measure total cellulase activity. Biotechnology and Bioengineering 88: 832-837
- Xu F., Li Z., Liu Y., Rong C., Wang S. (2016) Evaluation of edible mushroom *Oudemansiella canarii* cultivation on different lignocellulosic substrates. Saudi Journal of Biological Science 23(5): 607-613
- Xu L., Sun K.; Wang F., Zhao L., Hu J.; Ma H. Ding Z. (2020). Laccase production by *Trametes versicolor* in solid-state fermentation using tea residues as substrate and its application in dye decolorization. Journal of Environmental Management 270: 110904
- Yang Z., Zhang L., Mueller G., Kost G., Rexer K. (2009) A new systematic arrangement of the genus *Oudemansiella* s. str. (*Physalacriaceae*, *Agaricales*). Mycosystema 28(1): 1-13
- Zavalloni C., Alberti G., Biasiol S., Vedove G., Fornasier F., Liu J., Peressotti A. (2011) Microbial mineralization of biochar and wheat straw mixture in soil: a short-term study. Applied Soil Ecology 50(1): 45-51
- Zhai F., Han J. (2018). Decomposition of asparagus old stalks by *Pleurotus* spp. under mushroom growing conditions Scientia Horticulturae 231: 11-14
- Zhang C., Zhang G., Wen Y., Li T., Gao W., Meng F., Qiu L., Ai Y. (2019) *Pseudomonas* sp. UW4 acdS gene promotes primordium initiation and fruiting body development of *Agaricus bisporus*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 35: 163

Zhang Q., Zhang J., Shen J., Silva A., Dennis D., Barrow C. (2006) A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *Journal of Applied Phycology*. 18: 445-450

Zhang W., Liu S., Zhao Z., Kuang Y., Dong X., Ruan J. (2018) Effects of extracts of spent mushroom substrates on growth of edible fungi. *International Journal of Agriculture and Biology* 20(9): 2133-2139

Zharare G., Kabanda S., Poku J. (2010) Effects of temperature and hydrogen peroxide on mycelial growth of eight *Pleurotus* strains. *Scientia Horticulturae* 125(2): 95-102

Zhou S., Tang Q., Zhang Z., Li C., Cao H., Yang Y., Zhang J. (2015) Nutritional composition of three domesticated culinary-medicinal mushrooms: *Oudemansiella sudmuisida*, *Lentinus squarrosulus*, and *Tremella aurantialba*. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 17(1): 43-49

Zied D., Prado E., Dias E., Pardo J., Pardo-Gimenez A. (2019) Use of peanut waste for oyster mushroom substrate supplementation—oyster mushroom and peanut waste. *Brazilian Journal of Microbiology* 50: 1021-1029

Zimbardi A., Camargo P., Carli S., Neto S., Meleiro L., Rosa J., De Andrade A., Jorge J., Furriel R. (2016) A high redox potential laccase from *Pycnoporus sanguineus* RP15: Potential application for dye decolorization. *International Journal of Molecular Sciences* 17: 672

Por la presente nota, declaramos que esta es la versión final de tesis corregida, según las sugerencias realizadas por los jurados.



Dr. Edgardo Albertó



María Melisa Alberti