

Universidad ORT Uruguay
Facultad de Ingeniería

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BASIDIOMICETOS Y SU
APLICACIÓN EN PROCESOS CIRCULARES**

Entregado como requisito para la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología

Josefina Böcking, 210372 - Clara Vitola, 222124

Tutores: Mariana Umpierrez, Eliana Nervi

2022

Declaración de autoría

Nosotras, Josefina Böcking y Clara Vitola, declaramos que el trabajo que se presenta en esa obra es de nuestra propia mano. Podemos asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizábamos el trabajo final de carrera de Ingeniería en Biotecnología;
- Cuando hemos consultado el trabajo publicado por otros, lo hemos atribuido con claridad;
- Cuando hemos citado obras de otros, hemos indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente nuestra;
- En la obra, hemos acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, hemos explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por nosotros;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Josefina Böcking



Clara Vitola

Montevideo, 19 de agosto 2022

Agradecimientos

En primer lugar, queremos agradecer a todos los involucrados en el desarrollo de este trabajo. Por un lado al equipo del laboratorio de Biotecnología de ORT por su apoyo en buenos y malos momentos. A Toto por el espacio brindado para desarrollarnos en lo personal y profesional. Por otro lado, a Verónica Gunther, Joaquín de Fungus y al equipo de Botijas Bier por los recursos aportados que fueron vitales para el desarrollo de este proyecto. A Sebastián Rodríguez, por los consejos y predisposición a apoyarnos con los materiales necesarios.

Un reconocimiento especial para nuestras tutoras, Mariana y Eliana, por su dedicación, paciencia y constante motivación a lo largo de este proyecto. Desde las salidas de campo, hasta las horas en el laboratorio, su impulso fue clave.

Finalmente, a nuestras familias y amigos. Por su apoyo incondicional y acompañamiento, fueron un motor de empuje a lo largo de toda la carrera.

Muchas gracias.

Resumen

El estudio de los hongos que pertenecen al filo de los basidiomicetos es de suma importancia dado que estos son los principales degradadores de materia orgánica, reciclando carbono, nitrógeno y manteniendo el balance ecológico. Es por esto que son buenos candidatos para reciclar y transformar desechos agroindustriales en productos con valor agregado, y los descartes de su producción pueden aprovecharse en un proceso circular.

El uso de setas con fines alimenticios y medicinales ha crecido localmente en los últimos años, impulsando su estudio y caracterización. En este trabajo se recolectaron 46 muestras de setas de basidiomicetos en 8 puntos del país y se puso a punto un protocolo para el aislamiento del micelio en placa, empleando el fungicida benomilo en una concentración de 2 mg/L para disminuir la presencia de *Trichoderma spp.* Dicho esto, se logró el aislamiento del 20% de las muestras estudiadas que se identificaron mediante el uso de *DNA barcoding*, secuenciando la región ADNr ITS y genes codificantes para proteínas como RPB2, factor de elongación-1 α y β -tubulina. A las muestras aisladas se les realizó un *screening* en medios sólidos para evaluar la producción de enzimas de interés como lascasas, lipasas y fosfatasas, y se evaluaron potenciales especies para la degradación de glifosato.

Se seleccionó *Pleurotus ostreatus* como modelo para el diseño de un sistema de fructificación sostenible. Identificándose el problema de la ineficiente disposición actual de algunos residuos agroindustriales como el bagazo de cerveza y café, es que se plantea la incorporación de los mismos como sustrato para el crecimiento de *P. ostreatus*. Se evaluaron los tiempos de cosecha y las eficiencias biológicas (EB) de los sustratos conteniendo 10%, 20% y 30% de bagazo de cerveza (BC). Las condiciones con 20% y 30% registraron eficiencias biológicas de 28,6% y 27,7% respectivamente, muy similares a la condición control cuya EB fue de 30,1%. Por esto, se diseñó un sistema productivo con un sustrato conteniendo 30% BC utilizado soportes de fructificación reutilizables. Finalmente, se planteó la incorporación en el suelo de las camas postcosecha provenientes de la fructificación en cultivos de alfalfa y trébol. Se encontró que una proporción 1:2 de turba: sustrato inhibe el desarrollo de la parte aérea de la planta en alfalfa, y que 1:8 no afecta el crecimiento del cultivo. En trébol se estableció que la condición 1:8 favorece el desarrollo de la planta y podría utilizarse para disminuir la cantidad de NPK aplicado al suelo.

Palabras clave

Basidiomicetos, identificación, ITS, Factor de elongación α , RPB2, lacasas, lipasas, fosfatasas, *Pleurotus ostreatus*, fructificación, residuos agroindustriales, bagazo de cerveza, proceso circular.

Índice

1.	Introducción.....	8
1.1.	Reino fungi y sus generalidades.....	8
1.2.	Basidiomicetos.....	8
1.2.1.	Ciclo reproductivo.....	8
1.2.2.	Subclases del filo.....	10
1.2.3.	Condiciones de crecimiento y desarrollo.....	10
1.3.	Micología en Uruguay.....	11
1.4.	Metodologías moleculares para la identificación a nivel de especie.....	11
1.4.1.	<i>DNA barcoding</i>	12
1.5.	Usos y aplicaciones.....	13
1.5.1.	Relevancia nutricional y sus beneficios para la salud.....	13
1.5.2.	Hongos como agentes biorremediadores.....	14
1.6.	Producción de hongos.....	15
1.6.1.	<i>Pleurotus ostreatus</i>	15
1.6.2.	Sustratos utilizados para la producción de hongos.....	15
1.6.3.	Variedad de soportes empleados para la fructificación.....	16
1.6.4.	Producción a escala industrial.....	16
1.7.	Economía circular.....	17
1.7.1.	Residuos generados en la producción de <i>P. ostreatus</i>	17
2.	Objetivos.....	19
2.1.	Objetivos específicos.....	19
3.	Materiales y Métodos.....	20
3.1.	Recolección de muestras y aislamientos de cultivos puros.....	20
3.1.1.	Salidas de campo y recolección de hongos.....	20
3.1.2.	Preparación de medios de cultivo.....	20
3.1.3.	Puesta a punto de protocolo de aislamiento de especies recolectadas en placa. 21	
3.2.	Identificación de las muestras aisladas por métodos moleculares.....	21
3.2.1.	Extracción de ADNg.....	21
3.2.2.	Amplificación mediante PCR tiempo final de distintas regiones del ADNg.....	23
3.2.3.	Visualización de los resultados de PCR tiempo final.....	25
3.2.4.	Secuenciación.....	25
3.2.5.	Análisis de las secuencias obtenidas.....	25
3.2.6.	Generación de los árboles filogenéticos.....	25

3.3.	Caracterización de las especies identificadas	26
3.3.1.	Producción de lacasa	26
3.3.2.	Producción de enzimas solubilizadoras de fosfatos	26
3.3.3.	Producción de lipasas	26
3.3.4.	Tolerancia al glifosato	26
3.4.	Diseño de un sistema de fructificación de <i>Pleurotus ostreatus</i>	27
3.4.1.	Aislamiento y confirmación de la cepa de <i>Pleurotus ostreatus</i>	27
3.4.2.	Evaluación del crecimiento de <i>P. ostreatus</i> en bagazo de cerveza	27
3.4.3.	Evaluación del crecimiento de <i>P. ostreatus</i> en bagazo de café	27
3.4.4.	Curva de crecimiento de <i>P. ostreatus</i>	28
3.4.5.	Preparación del inóculo de <i>Pleurotus ostreatus</i>	28
3.4.6.	Preparación de las distintas condiciones de sustrato a evaluar para la fructificación	28
3.4.7.	Inoculación de las bolsas	29
3.4.8.	Colonización del sustrato	29
3.4.9.	Fructificación.....	29
3.4.10.	Evaluación de fructificación en botellas de vidrio y contenedores de plástico	
	30	
3.5.	Incorporación de las camas post cosecha de la producción de <i>Pleurotus ostreatus</i> como mejorador de suelo.....	31
3.5.1.	Ensayo con semillas de alfalfa	31
3.5.2.	Ensayo con semillas de trébol blanco	33
3.6.	Análisis estadístico.....	34
4.	Resultados y discusión.....	35
4.1.	Obtención de los aislamientos.....	35
4.1.1.	Puesta a punto de la concentración de benomilo	35
4.1.2.	Recolección de muestras	37
4.1.3.	Aislamiento de las muestras.....	38
4.2.	Identificación de aislamientos.....	39
4.2.1.	Desarrollo de árboles filogenéticos a partir de las secuencias obtenidas de las regiones ITS.....	42
4.2.2.	Identificación con genes codificantes para proteínas.....	44
4.2.3.	Identificación de los principales contaminantes encontrados.....	49
4.2.4.	Extracción ADNg a partir de la seta.....	50
4.3.	Caracterización de los aislamientos	52
4.3.1.	Identificación de las cepas productoras de lacasas	53
4.3.2.	Identificación de las cepas productoras de lipasas	55

4.3.3.	Identificación de las cepas productoras de fosfatasas.....	55
4.3.4.	Evaluación de la capacidad de distintos hongos de micorremediar glifosato ...	57
4.4.	Diseño de sistema de fructificación	58
4.4.1.	Obtención de la cepa de <i>P. ostreatus</i> y curva de crecimiento	58
4.4.2.	Selección del sustrato	59
4.4.3.	Preparación del inóculo.....	62
4.4.4.	Colonización del micelio y formación de primordios	63
4.4.5.	Eficiencias biológicas	66
4.4.6.	Soportes reutilizables	68
4.4.7.	Escalado teórico del sistema de fructificación propuesto.....	69
4.5.	Evaluación de la aplicación del pan post cosecha como biofertilizante.....	73
4.5.1.	Ensayo con semillas de alfalfa	74
4.5.1.1.	Evaluación de los valores de clorofila de las plantas de alfalfa	75
4.5.2.	Semillas de trébol blanco	76
5.	Modelo de negocios	80
5.1.	Aplicación del modelo de CANVAS a la producción de gírgolas grises	81
5.2.	Validación del problema y del producto	82
5.3.	Estimación de costos	83
6.	Conclusiones.....	84
7.	Referencias bibliográficas	86
8.	Anexo.....	92
8.1.	Anexo 1: Gel de agarosa para β -tubulina	92
8.2.	Anexo 2: Esporada de <i>Gymnopilus spectabilis</i>	92
8.3.	Anexo 3: Resultado de la secuenciación de los aislamientos	93
8.4.	Anexo 4: Guía de basidiomicetos recolectados	96

1. Introducción

1.1. Reino fungi y sus generalidades

Los hongos se encuentran dentro del reino fungi, el cual constituye el segundo grupo de organismos más grande y con más riqueza filogenética, estimándose la existencia de 3 millones de especies (1). Son organismos eucariotas pluri o unicelulares y se reproducen de forma sexual y/o asexual. Muchos de estos son aerobios obligados o facultativos, además de ser quimiótrofos secretores de enzimas que degradan una amplia variedad de sustratos orgánicos (2). Suelen crecer con células elongadas y polarizadas, llamadas hifas, que pueden contar o no con la presencia de septo. Estos organismos se encuentran en cada rincón del planeta, jugando un rol crucial en la biogeoquímica global, principalmente reciclando carbón y movilizándolo nitrógeno, fósforo entre otros elementos (3). Las variedades de sus funciones son muy amplias: se encuentran especies con la capacidad de formar asociaciones simbióticas con las plantas por medio de las micorrizas, otras son capaces de producir compuestos de gran valor agregado para su aplicación en la industria, mientras otras especies pueden ser la solución a los problemas ambientales y alimenticios que se encuentran en la sociedad actual. Dado la gran cantidad de especies y aplicaciones, es esencial contar con un sistema de clasificación de las mismas. Siguiendo las reglas taxonómicas, se crearon nueve filos dentro del reino fungi: *Opisthokonta*, *Chytridiomycota*, *Neocallimastigomycota*, *Blastocladiomycota*, *Zoopagomycota*, *Mucoromycota*, *Glomeromycota*, *Basidiomycota* y *Ascomycota* (3).

1.2. Basidiomicetos

El filo de los basidiomicetos es reconocido por su forma macroscópica ya que forman llamativos cuerpos fructíferos. Se han encontrado basidios de hasta 3 metros de largo y 2 metros de ancho (4). Igualmente, su forma predominante es el micelio, constituido por hifas entrelazadas que liberan enzimas para la digestión de nutrientes y absorción de moléculas. Para que se pueda dar la evolución de micelio a cuerpo fructífero, las células deben pasar por un proceso de diferenciación que se genera en respuesta a la interacción de su propia genética con factores extrínsecos como la temperatura, luz, humedad y señales químicas (5). Los cuerpos fructíferos de los basidiomicetos tienen morfologías muy variadas según la especie, varias de ellas son comestibles y de gran interés nutricional. Generalmente contienen una estructura similar a un sombrero llamada basidiocarpo donde se encuentran las estructuras que producirán las esporas sexuales para su reproducción. Este trabajo se centrará en el estudio de los basidiomicetos y sus aplicaciones en diversos sectores de la biotecnología.

1.2.1. Ciclo reproductivo

Aquellos hongos que se reproducen tanto de manera sexual como asexual se los conoce como hongos perfectos, los cuales comparten las siguientes características: esporas con una pared celular que contiene quitina y β -glucano, unicelulares, presencia de una ruta biosintética de aminoácidos para la formación de lisina y presencia de crestas mitocondriales aplanadas (6, 3). Con relación a la reproducción asexual, se da principalmente gracias a la formación de esporas (esporulación), las cuales van a permitir la formación de micelio una vez que estas germinan. Por otro lado, la reproducción sexual, involucra la fusión de dos células sexuales o gametos compatibles, provenientes de dos cepas de

alcalinizar el medio, disminuye tanto la biomasa obtenida como las UFC (Unidades Formadoras de Colonias) fúngicas (16).

1.2.3.1. Formación de cuerpos fructíferos

Como se mencionó anteriormente, para que se dé la fructificación se tiene que iniciar la diferenciación del micelio. Esto se tiene que ver favorecido por las condiciones ambientales y nutrientes disponibles. El micelio debe tener acceso a una cantidad de sustrato suficiente antes de fructificar, almacenando fuentes de carbono y nitrógeno que se destinarán a la formación del cuerpo fructífero. Se ha encontrado que algunas fuentes de carbono como los polisacáridos favorecen la producción de estos, mientras que otras como la glucosa la reprimen. La tasa con la que el hongo es capaz de hidrolizar carbohidratos es lo que determina la habilidad del mismo de promover la fructificación. Además, la formación de cuerpos fructíferos en algunos basidiomicetes se ve favorecida por el aporte de proteína como fuente de nitrógeno. Para la fructificación se requieren mayores cantidades de carbono que de nitrógeno donde la relación C:N óptima varía entre 30:1 y 5:1 (5).

Por otro lado, varios factores ambientales como la humedad y los niveles de CO₂ afectan la fructificación. Los valores óptimos varían según la especie, aunque en general necesitan de un balance entre una humedad relativa alta para que sea suficiente para el desarrollo de los primordios, aunque no tan elevada que reduzca la aireación.

1.3. Micología en Uruguay

La fauna micótica en Uruguay ha sido poco estudiada hasta el momento, donde hay un escaso conocimiento de la diversidad y función de las especies existentes en dicho país. La mayoría de los trabajos que hacen referencia a la micota uruguaya, son en base a hongos fitopatógenos, los de maderas enterradas o los endófitos. En lo que respecta a los hongos descomponedores de madera, los estudios son aún más limitados (4).

Un claro ejemplo con relación a los registros de la fauna micótica en dicho país se puede ver reflejado en el trabajo realizado por *Morera et al.* En el mismo hacen hincapié en el registro casi nulo que hay de los tipos de hongos en Uruguay. Este estudio hace referencia al género *Ganoderma* y buscan evaluar la diversidad de estos en un período de dos años (2017-2018), donde mediante recolecciones de muestras provenientes de diversos ecosistemas y análisis a través de *DNA barcoding*, logran identificar *G. martinicense*, *G. meizicanum*, *G. platense*, entre otros (17).

1.4. Metodologías moleculares para la identificación a nivel de especie

Dada la alta variedad de especies que se encuentran en el filo presentado, la identificación exacta y precisa es de vital importancia. La identificación morfológica basándose únicamente en los caracteres fenotípicos es ampliamente utilizada, pero presenta enormes limitaciones principalmente para clasificar un organismo a nivel de especie. Con este método, se pueden obtener resultados diferentes según el operario, dado que los caracteres morfológicos a estudiar son limitados y pueden ser engañosos a causa de hibridación, especiación y la evolución convergente (18). Es por estas limitaciones que

surgieron métodos basados en secuencias de ADN para la identificación de especies. Para esto, se crearon bancos genéticos que contienen las secuencias de ADN de los taxones conocidos y las ponen a disposición de los usuarios para comparar con la secuencia estudiada, creando así el *DNA barcoding* (1).

1.4.1. DNA barcoding

El código de barras de ADN (o *DNA barcoding*) es una metodología molecular utilizada para identificar diferentes especies usando marcadores genéticos cortos. Uno de los marcadores más utilizados son la región nrITS (espaciador transcrito interno nuclear ribosómico) o la subunidad nuclear ribosomal larga 28S (LSU). Se seleccionó la región nrITS por ser la porción de ADNr cistron con más rápida evolución y alta variación, lo que permite diferenciar los organismos a nivel de especie. Comprende aproximadamente 600 pares de bases, y se cuenta con *primers* específicos y validados (19).

La región nrITS fue denominada como el *barcode* oficial para la identificación de hongos en 2011. Es el ADN espaciador que se encuentra entre el gen de la subunidad pequeña de ARNr y el gen de la subunidad grande de ARNr. En la figura 3 se observa el contexto de la región ITS, que está compuesta por regiones variables (ITS1 e ITS2), y una región altamente conservada entre ellas (5.8S). Está flanqueada por el ARNr 18S en el extremo 5' de ITS1 y por el ARNr 28S en el extremo 3' de ITS 2. Estas regiones flanqueantes, así como 5,8S, son altamente conservadas y por lo tanto permiten el diseño de *primers* universales para amplificar distintas porciones de la región ITS.

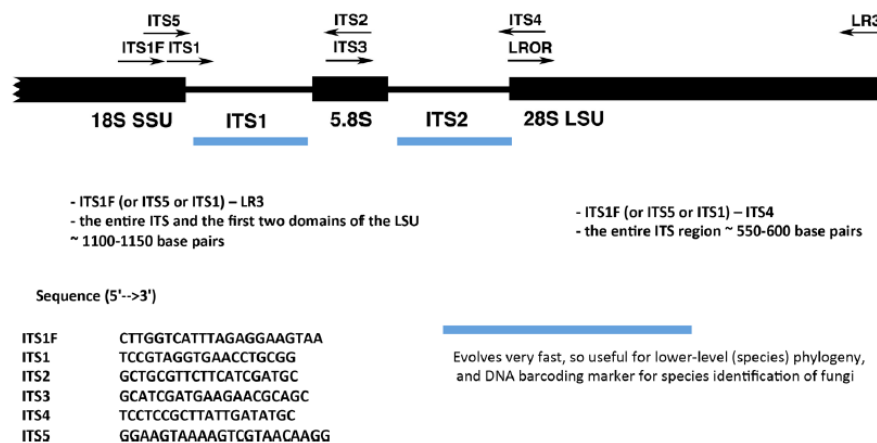


Figura 3: Mapa de la región ITS con las posiciones de los *primers* universales utilizados para su amplificación (18)

De todas formas, si bien la implementación de esta estrategia ha sido de gran utilidad para la identificación de hongos, no siempre se obtienen resultados exitosos, particularmente en los siguientes géneros: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, y *Trichoderma*. Dadas ciertas limitaciones encontradas, en algunos casos se combina la amplificación de la región *barcode* con otras regiones de interés taxonómico denominadas *barcodes* secundarios, como algunos genes codificantes de proteínas (20). Estos tienen la capacidad de actuar como *barcode* por la presencia de intrones, que pueden evolucionar más rápidamente en comparación al ADNr ITS. Además, estos genes facilitan el

reconocimiento de homología y convergencia ya que se encuentran en una sola copia y tienen menor variación en el largo ya que acumulan menores mutaciones en los exones (18).

Algunas de las regiones codificantes de proteínas estudiadas como *barcode* son: *TEF1alpha* (EF-1 α) el cual codifica para el factor de elongación 1 *alpha* y es utilizado para *Trichoderma*, *RPB1* o *RPB2* para especies como *Aspergillus* o *Penicillium* que codifican para subunidades de la enzima ARN polimerasa I y II respectivamente (21, 18), β -tubulina para *Pleurotus spp.* o *Lentinula spp.* y por último *minichromosome maintenance protein MCM7*. Para evaluar el potencial de *barcode* de estos genes se estudia el *barcode gap*, donde un *barcode gap* claro hace referencia a una diferencia significativamente mayor entre las secuencias de cepas de diferentes especies que entre las secuencias de cepas de la misma especie (22). Se buscará aplicar estos *barcodes* secundarios en la identificación de basidiomicetos.

1.5. Usos y aplicaciones

El interés de identificar correctamente a qué especie pertenece un hongo y sus características, es para poder evaluar qué potenciales aplicaciones biotecnológicas se podrían explotar. La búsqueda de biodiversidad fúngica y las colecciones de hongos son muy valiosas, estimándose que aún queda por describir alrededor del 92 % de los hongos en todo el mundo (23, 24). Esto es debido a que los hongos son un producto con diversos usos, comenzando como alimentos terapéuticos ya que pueden prevenir enfermedades como la hipertensión o el cáncer. Más específicamente dentro de los basidiomicetos, más de 3000 especies de hongos son aptas para el consumo humano, pero solo 100 son cultivadas de forma comercial de las cuales 10 son usadas a escala industrial. En consecuencia, el valor económico de la venta de hongos está aumentando gracias al valor que los mismos aportan en el ámbito nutricional, medicinal, entre otros (25).

Por otro lado, otra gran ventaja que presentan estos organismos es su capacidad biorremediadora ya que pueden degradar diversos sustratos, como son los lignocelulósicos, gracias al repertorio de enzimas que estos poseen .

1.5.1. Relevancia nutricional y sus beneficios para la salud

El consumo de hongos comestibles es una práctica que se realiza desde la antigüedad, pero junto con el desarrollo tecnológico se fue perfeccionando el cultivo de los mismos hasta llegar a un sistema de producción masivo que permite la distribución de los hongos a nivel mundial. El contenido neto de los nutrientes presentes en este alimento varía de acuerdo a la especie, pero comparten algunas características como un contenido de agua de aproximadamente 90%, un contenido proteico entre el 27 y 48% y contienen los nueve aminoácidos esenciales incluyendo la lisina, triptófano y metionina que suelen escasear en vegetales (26). Tienen un bajo contenido de carbohidratos, estos componen entre un 4 y 6% de su biomasa y entre 2 - 8% corresponde a lípidos (27). Además, son una fuente de vitaminas (A, C, D, B y K) y minerales vitales como calcio, fósforo y hierro con buena biodisponibilidad, conteniendo en algunos casos el doble de estos minerales que carnes rojas.

Los factores mencionados hacen que el consumo de hongos se haya distribuido ampliamente, siendo un foco importante en las comunidades vegetarianas y veganas, donde son utilizados como fuente de proteína y vitaminas importantes como B12. De todas formas, el valor nutricional depende de varios factores más allá de la especie, como puede ser: sustrato en donde crece el hongo, condiciones ambientales, etapa en la que se lo cosecha, entre otros (28).

Además del aporte nutricional, el consumo de hongos es ampliamente utilizado como tratamiento medicinal. Esto se debe a compuestos bioactivos como polisacáridos (β -d glucanos), triterpenoides y más. Los efectos medicinales reportados son antitumorales, antioxidantes, antialérgicos. Los hongos comestibles con propiedades medicinales son especies de los géneros *Lentinula*, *Hericium*, *Grifola*, *Flammulina*, *Pleurotus* y *Tremella* (27).

1.5.2. Hongos como agentes biorremediadores

Los hongos saprófitos tienen la capacidad de degradar ciertos contaminantes orgánicos como los lignocelulósicos lo cual se da principalmente gracias a la liberación de enzimas extracelulares al ambiente y así obtener un subproducto como fertilizante (29). Un ejemplo de estas enzimas son las lacasas, las cuales son de gran interés en la industria ya que pueden degradar compuestos tóxicos de gran complejidad. La industria de las papeleras suele utilizar esta enzima para llevar a cabo el biopulpeo (proceso por el cual se elimina la lignina de la celulosa), en los textiles se utiliza para el blanqueo y en lo que respecta a la biorremediación estas enzimas pueden oxidar contaminantes orgánicos tóxicos además de otros xenobióticos (30). Esta enzima se puede encontrar en especies del tipo *Pleurotus sp.* o *Trametes sp.* (31).

Otra enzima ampliamente mencionada y requerida son las lipasas las cuales se utilizan en diversas industrias como la alimenticia para generar emulsionantes, la farmacéutica para la producción de cosméticos y medicamentos, y las de síntesis química donde encontramos usos desde el tratamiento de efluentes hasta la producción de detergentes. Este amplio espectro de aplicaciones se debe a que esta enzima es capaz de hidrolizar enlaces ésteres de sustratos que no son solubles en agua, en otras palabras puede hidrolizar triglicéridos para generar glicerol, diglicéridos o ácidos grasos libres (32). Si bien mayoritariamente esta enzima es extraída de hongos filamentosos como *Aspergillus spp.* y *Cándida spp.*, existen reportes que indican la presencia de esta en hongos pertenecientes al filo basidiomiceto como *P. ostreatus* o *S. commune* (33, 34).

En último lugar, la enzima fosfatasa se encarga de hidrólisis del grupo fosfato presente en el sustrato de interés, dando como resultado fósforo como ion fosfato y un grupo hidroxilo. Esta enzima si bien es producida por diversos microorganismos, es más eficiente aquella proveniente de los hongos, ya que al solubilizar el fósforo, permite un aumento en los rendimientos productivos del suelo. Si bien esta se encuentra mayoritariamente en hongos como *Penicillium spp.* o *Aspergillus spp.*, se han encontrado también en basidiomicetos como *Trametes versicolor* (35, 36). Las fosfatasas son de gran interés, específicamente en la era de generar una agricultura sostenible, principalmente por el hecho de que se puede reducir el uso de fertilizantes químicos, así como también la degradación de herbicidas organofosforados como el glifosato cuyo uso genera efectos negativos en la salud del suelo (37).

1.6. Producción de hongos

Dados los beneficios nutricionales y medicinales de los hongos, es que estos se comenzaron a cultivar y producir de forma industrial para su consumo. Si bien se identificaron hasta 2166 especies de hongos comestibles que fueron recolectados en 85 países, el mercado de producción de hongos comestibles está dominado por 3 especies: Champiñones (*Agaricus bisporus*), Shiitake (*Lentinula edodes*) y Gírgolas u ostras (*Pleurotus spp.*) (38). Cada una de estas especies tiene particularidades y especificaciones para su producción, pero en términos generales comparten el mismo proceso: obtención del sustrato donde crece el hongo, desarrollo de la semilla, inoculación del sustrato, colonización, fructificación y cosecha (39).

1.6.1. *Pleurotus ostreatus*

El cultivo del género *Pleurotus* es el tercero con mayor distribución a nivel mundial en lo que respecta a los hongos comestibles. Se encuentra dentro del grupo de los hongos de descomponedores de madera blanca. *P. ostreatus*, especie que genera las gírgolas grises, crece sobre madera dura en el bosque y puede tolerar un amplio rango de temperaturas (20-30°C, necesitando un *shock* frío para la inducción de la fructificación de al menos 5°C) (40). Su producción suele darse a gran escala por su bajo costo y variedad de sustratos que se pueden emplear (41).

Esta especie de hongos tiene un gran atractivo debido a varias razones. Tiene la capacidad de producir proteínas de alta calidad a partir de un sustrato del tipo lignocelulósico y además, gracias a la producción extensiva de biomasa, tienen un gran potencial para la micorremediación por la biosorción de compuestos como metales pesados (42). Su importancia se debe también a la presencia de componentes medicinales (43). Dentro de estos, los que se destacan son los β -glucanos, con propiedades antineoplásicas, antioxidativas e inmunoestimuladoras; péptidos, con efectos antivirales contra HIV; entre otros (44).

En lo que respecta al mercado global de *P. ostreatus*, en 2021 el mismo rondaba los USD 2.44 billones y se espera que llegue a USD 3.05 billones para el 2029, lo que estimaría un crecimiento de un 5.20% en el período 2022-2029. Las razones asociadas a este aumento son, por un lado, el aumento en la demanda de alimentos y la concientización de su consumo. Por el otro, se lo relaciona con ventajas productivas que se puede dar en esta industria con la biotecnología con el fin de mejorar los rendimientos en términos de tamaño, biomasa entre otros (45).

1.6.2. Sustratos utilizados para la producción de hongos

Con relación al sustrato utilizado, el mismo depende del tipo de hongo que se quiera cosechar, por lo que es de gran relevancia encontrar aquel que brinde las correctas condiciones para el desarrollo del mismo. Dentro de los elementos básicos deben de tener entre 1 - 2% de nitrógeno, deben de tener una concentración precisa de magnesio, potasio, calcio, sulfuro y fósforo, pH levemente ácido y una humedad relativa de entre 50 - 70%. En vistas de aprovechar la capacidad de estos hongos de degradar compuestos lignocelulósicos es que se plantea la incorporación de residuos de este tipo al sustrato. Se

ha demostrado que *P. ostreatus* tiene la capacidad de crecer en una variedad de residuos agroindustriales como paja de arroz, trigo y maíz, agujas de pino, aserrín, residuos de papel y cartón y más (40). Dentro de estos se destaca el bagazo de café, bagazo de cerveza y el aserrín, en los que se centrará este trabajo. Con relación al primero, diversos estudios concluyen que el aporte de este es beneficioso para el hongo, aunque se debe de evaluar el porcentaje de cafeína absorbido por el mismo de forma de poder determinar si es apto para su consumo (46). De todas formas, una de las principales ventajas que presenta el café, es que este sustrato no necesita ser esterilizado ya que enseguida de usado se encuentra pasteurizado (47).

Por otro lado, el bagazo de cerveza (BC) es el residuo generado en la producción de cerveza durante la maceración y filtrado del mosto. Se estima que la producción en Uruguay de este residuo (en 2020) fue de 1,242 toneladas, siendo el mayor subproducto generado en esta industria (48). Se trata de un residuo rico en nutrientes, por lo tanto una correcta disposición y aprovechamiento del mismo es importante. Contiene aproximadamente 17% de celulosa, 28% polisacáridos y 28% lignina. Al no encontrarse usos económicamente interesantes para estos residuos, comúnmente se utilizan como fuente de alimento para animales o para compost (49). Debido a su contenido de glutamina, lípidos y azúcares que favorecen el crecimiento de los hongos, se propone la utilización del BC como sustrato para el crecimiento de los mismos.

1.6.3. Variedad de soportes empleados para la fructificación

Para la fructificación generalmente se utilizan bolsas de plástico, aunque se pueden utilizar botellas de vidrio, baldes de plástico entre otros (50). Las bolsas de plástico son las más utilizadas debido a que son las más accesibles en el mercado y se obtienen buenos rendimientos de cosecha. Existen diversos tamaños y una vez agregado el sustrato pueden ser esterilizadas para luego inocular con el hongo en cuestión. En cuanto a su diseño, en la boca de las mismas se les agrega un algodón de manera de formar un tapón y así permitir la respiración del micelio y su desarrollo. De todas formas, estas bolsas no son reutilizables y se transforman rápidamente en un residuo a gestionar.

Otra alternativa para esta tarea es el uso de contenedores de plástico. A la hora de elegir este formato, se debe de tener en cuenta que tipo de hongo utilizar, donde el que más se recomienda es *P. ostreatus* o *H. erinaceus*. Dentro de las principales ventajas de utilizar este soporte es que puede ser reutilizable a diferencia de las bolsas, aunque la gran desventaja es que son más propensos a contaminarse (51).

1.6.4. Producción a escala industrial

En el año 2020, el tamaño del mercado global de hongos fue de USD\$ 58.8 billones, y se estima que este número aumente a aproximadamente USD\$ 86.5 billones para el año 2027 (52). Estas proyecciones son muy atractivas y están impulsadas por desarrollo científico, así como automatización de procesos para reducir costos además del aumento en las poblaciones veganas y vegetarianas que son grandes consumidoras de este producto.

Un estudio realizado por *Freundt et al.* que busca evaluar la posibilidad de producir y comercializar hongos comestibles tanto a nivel nacional (Perú) como internacional, establece que todas las etapas de producción se las puede adaptar para que sean aplicables a escala industrial (53).

1.7. Economía circular

Visto que las características de los hongos presentadas se encuadran en un contexto de biorremediación y revalorización de residuos, se plantea análisis del proceso productivo de *P. ostreatus* como punto de entrada para la incorporación de residuos. Este es uno de los objetivos de la Economía Circular (EC), un modelo económico que apunta al uso eficiente de los recursos a través de la minimización de los desechos generados, extensión de la vida útil y valor a largo plazo, reducción de los materiales primarios y circuitos cerrados de productos dentro de los límites de la protección ambiental y beneficios socioeconómicos (54). Para esto, el modelo plantea una serie de objetivos clave para comenzar a migrar hacia una EC también conocidas como las 10 R donde se encuentran: Recuperación, reciclaje, reducir, repensar, entre otras.

Con este sistema, se replantea la manera de montar una industria. De esta forma, el proceso productivo planteado debe tener en cuenta desde un principio los residuos que genera, ser optimizado para minimizar las cantidades, tener destinos finales adecuados para cada tipo de residuo y valorizarlos. Al aplicarlo a la producción de *P. ostreatus*, se debe definir qué materias primas entran al proceso y en qué se transforman.

1.7.1. Residuos generados en la producción de *P. ostreatus*

Los componentes que entran al proceso en la producción de *P. ostreatus* son: sustrato empleado, agua, soporte de elección, energía eléctrica para el funcionamiento de los equipos necesarios y la cepa de interés. Una vez cosechadas las setas, se deben gestionar los residuos restantes, es decir la mezcla del sustrato colonizado por el micelio, conocido como pan o camas post cosecha, y el soporte de fructificación. Se estima que se generan 5 kg de sustrato descarte por cada kg de hongo producido (55). Siendo el principal residuo generado, el correcto tratamiento del mismo es necesario, no solo porque la acumulación de los mismos favorece el desarrollo de mohos y colonias de insectos, sino que es un residuo aprovechable gracias a su contenido nutricional y enzimático (55). Existen alternativas para tratar estos residuos, con el objetivo de evitar la disposición final o el quemado de los mismos ya que esto genera un deterioro en el medio ambiente, los mismos van desde usarlos para compost o como alimento para animales.

1.7.1.1. Biofertilizantes y compost

Para el aprovechamiento de los panes post cosecha, se plantea su aplicación como fertilizante o compost. Se ha visto que el uso del pan de hongos como compost para plantas, actúa como mejorador de la fertilidad del suelo, ya sea por el aumento en la concentración total de nitrógeno y la materia orgánica del mismo, como sus propiedades fisicoquímicas. Un estudio realizado por *Pathak et al.* concluye que esta aplicación es de gran interés para el agro además de que se evitaría el uso de agroquímicos tradicionales (56).

Dado lo mencionado anteriormente, en este trabajo se propone la recolección de basidiomicetos locales, su aislamiento y caracterización en cuanto a producción de enzimas para evaluar sus potenciales aplicaciones. Además, se plantea la producción de *P. ostreatus* según el modelo de economía circular, utilizando como sustrato residuos agroindustriales como aserrín proveniente de la industria forestal, bagazo de cerveza y bagazo de café. También analizará el potencial como biofertilizante del pan post cosecha. En la figura 4 se visualiza una representación esquemática del proceso planteado tomando como ejemplo el uso de bagazo de cerveza en la producción del hongo comestible *P. ostreatus*.



Figura 4: Esquema del sistema circular de producción de *Pleurotus ostreatus* planteado

2. Objetivos

El objetivo general de este proyecto es el aislamiento, la identificación y caracterización de hongos basidiomicetos y la evaluación de los mismos en aplicaciones de circularidad de procesos.

2.1. Objetivos específicos

El proyecto se divide en 3 ejes, en primer lugar, el estudio de los basidiomicetos recolectados en Uruguay, por otro el diseño de un sistema de fructificación utilizando *P. ostreatus* como modelo y finalmente la aplicación de los panes post cosecha como fertilizantes. Los objetivos específicos son los siguientes:

- 1) Aislar, identificar y caracterizar hongos locales mediante métodos moleculares
- 2) Evaluar el desarrollo y crecimiento de un hongo modelo (*P. ostreatus*) en distintos sustratos incorporando residuos como el bagazo de café y cerveza, así como también el escalado del sistema
- 3) Evaluar la capacidad de las camas post cosecha como promotoras de crecimiento de plantas a escala de laboratorio

3. Materiales y Métodos

3.1. Recolección de muestras y aislamientos de cultivos puros

3.1.1. Salidas de campo y recolección de hongos

Se realizaron salidas de campo en distintos puntos del país en el mes de setiembre de 2021 y en febrero del 2022, más específicamente el departamento de Canelones (localidades: Parque Roosevelt y Cesar Mayo Gutiérrez) y el departamento de Rocha (localidades: Santa Isabel y La Paloma), donde se recolectaron setas para su posterior aislamiento en placa. A las muestras recolectadas se les asignó un código en referencia a su lugar de origen seguido de un número: "HR" hace referencia a las muestras recolectadas en el Parque Roosevelt, "LP" a La Paloma/Pedreira y "HG" a las muestras obtenidas en Cesar Mayo Gutiérrez. Se trabajó con un total de 46 muestras: 12 HG, 20 LP, 6 HG y 8 muestras correspondientes a Arequita, Jaureguiberry, Costa Azul y Parque Lussich. Durante la recolección se trabajó con guantes y bisturíes estériles para evitar la contaminación de las setas. Las muestras recolectadas se almacenaron en frascos estériles de tapa rosca. Se tomaron fotografías *in situ* de las muestras, así como de los alrededores de la misma.

3.1.2. Preparación de medios de cultivo

Se prepararon medios de cultivo necesarios para el aislamiento de los hongos recolectados. Se trabajó con *Potato Dextrose Agar* 36 g/L (PDA, BD Difco) y *Malt Extract Broth Agar* 20 g/L (MEA, Sigma Aldrich). Los medios se esterilizaron en autoclave a 121°C por 21 minutos.

Para reducir la presencia de contaminantes, se preparó un stock de gentamicina, un antibiótico de amplio espectro, a una concentración de 25 mg/mL, así como también un stock del fungicida Benomilo de concentración 0,5 mg/mL. La preparación de este último consiste en disolver Benomilo (Agro Regional S.R.L., SUPERTLATE lote 0191221) 50% puro en Etanol 70%. Una vez preparados los stocks, se pasan por un filtro de tamaño de poro 0,22 µm.

Tanto el antibiótico como el fungicida se agregaron a los medios de cultivos autoclavados una vez que estos se enfriaron para así plaquearlos en placas de Petri. Se trabajó con una concentración de gentamicina de 50 mg/ml de acuerdo con las especificaciones del fabricante (*Thermo Fischer, Gentamicin Reagent Solution 50 mg/ml*, código de producto: 15750060).

3.1.2.1. Puesta a punto de la concentración de benomilo para el aislamiento de basidiomicetos

Se preparó el medio *Potato Dextrose Agar* (PDA) suplementado con las siguientes concentraciones de Benomilo: 0,5 mg/L, 1 mg/L, 2mg/L y 4 mg/L. Se trabajó con un stock de benomilo a 0,5 mg/mL diluido en EtOH 70%. El benomilo fue filtrado con un filtro de 0,22 µm antes de ser agregado al PDA previamente autoclavado.

Para cada cepa evaluada, se inocularon 5 placas: 4 con las concentraciones de benomilo previamente mencionadas y una placa de PDA sin agregado de benomilo que actuó como control. Se registró el área del micelio durante 7 días.

3.1.3. Puesta a punto de protocolo de aislamiento de especies recolectadas en placa.

Se siguió el siguiente protocolo para el aislamiento de las muestras en placas (i-v):

- i) Eliminar los restos de tierra, hojas e insectos de las setas recolectadas
- ii) Desinfectar superficialmente las setas con peróxido de hidrógeno al 30%.
- iii) Realizar cortes del himenio de la muestra con bisturí estéril, procurando seleccionar las secciones de laminillas más limpias o menos expuestas al ambiente.
- iv) Los fragmentos seleccionados se colocan en placas de Petri con PDA como en MEA. Cada muestra se plaquea por duplicado en un medio nutriente suplementado con antibiótico (gentamicina) y el fungicida benomilo.
- v) A medida que se observa el crecimiento del micelio, se realizan aislamientos en nuevas placas de PDA y MEA, eliminando el antibiótico y fungicida utilizado.

A su vez, se realizó la esporada (“*spore print*”) de algunas de las muestras recolectadas para su identificación morfológica. Se siguió el protocolo de *Choi et al. (57)*, consistiendo en colocar agar-agua con el antibiótico cloranfenicol, en una placa de Petri y en la tapa de la misma, colocar una porción de la seta de forma tal que las esporas precipitan en el agar-agua. En la figura 5 se muestra un esquema, donde el sustrato corresponde al hongo.

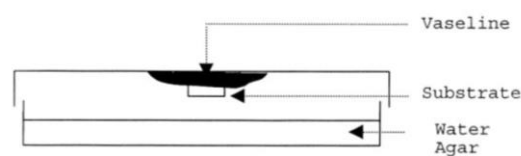


Figura 5: Esquema de la técnica utilizada para obtener las esporadas de las setas recolectadas

3.2. Identificación de las muestras aisladas por métodos moleculares

3.2.1. Extracción de ADNg

3.2.1.1. Extracción de ADNg de aislamientos puros utilizando Kit comercial

Una vez obtenidos los aislamientos, se realizaron cultivos de los mismos en medio líquido *Yeast Sucrose* (YES) o Caldo Extracto de Malta (ME). La extracción de ADNg se realizó según el protocolo

de Zymo Research presente en el Kit *Quick- DNA™ Fungal/ Bacterial Miniprep* donde en vez de realizar la elución con el *buffer* correspondiente, se utilizó agua libre de nucleasas (58).

3.2.1.2. Extracción de ADNg a partir de cuerpo fructíferos utilizando Kit comercial

A partir de las muestras ambientales recolectadas, se buscó realizar la extracción de ADNg directamente desde el cuerpo fructífero con el objetivo de evitar contaminaciones y acortar tiempos. Para esto, desinfectó la muestra con Peróxido de Hidrógeno 30%, se fragmentó la muestra con bisturí y se siguió el protocolo del Kit *Quick- DNA™ Fungal/ Bacterial Miniprep* (58).

3.2.1.3. Extracción con cloroformo e isopropanol

A su vez se realizaron extracciones de ADNg según el protocolo descrito a continuación (i-xiv). Se utilizó *buffer* de lisis: 100 mM Tris-HCl (pH 8.4), 200 mM NaCl, 100 mM EDTA (0.5 M pH 8) y 2% CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio). Las extracciones se conservaron en freezer a -4°C.

- i) Agregar 5 mL de medio YES a tubo falcon de 50 mL e inocular con muestra.
- ii) Una vez crecido el micelio, tomarlo con pinza estéril y secarlo.
- iii) Agregar nitrógeno líquido (N₂) y moler el micelio con varilla de vidrio.
- iv) Agregar 600 µL de *buffer* de lisis precalentado a 65°C. Incubar a 65°C por 30 minutos.
- v) Agregar 600 µL de cloroformo y agitar 5 veces.
- vi) Centrifugar a 13000 g por 10 minutos
- vii) Tomar 400 µL de la fase superior y pasar a tubo de 1,5 mL.
- viii) Repetir paso e, f y g
- ix) Agregar un volumen de isopropanol frío. Invertir e incubar 20 minutos a -80°C.
- x) Centrifugar a 13000 g por 10 minutos.
- xi) Descartar sobrenadante y lavar el pellet con 600 µL EtOH 70%
- xii) Centrifugar a 13000 g por 10 minutos.
- xiii) Remover el sobrenadante y secar el pellet
- xiv) Resuspender pellet en 50 µL de H₂O libre de ADNsas.

3.2.2. Amplificación mediante PCR tiempo final de distintas regiones del ADNg

3.2.2.1. Amplificación de ITS1-ITS4

La identificación de los hongos recolectados se realizó mediante la amplificación de la región *barcoding* ITS. Para ello, se utilizó el ITS1 *forward* (5'-TCCGTA GGTGAACCT-3') e ITS4 *reverse* (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Se trabajó con dos *masters mix*, uno para la enzima Taq DNA Polymerase de *Thermo Scientific* (EP0402, 5U/μL) y otro para la enzima Taq DNA Polymerase de NEB (M0273S, 5 U/ μL). En la tabla 1 se presenta la composición de cada uno de ellos.

Tabla 1: Composición de los mixes empleados para la amplificación con *primers* ITS1-ITS4

Componentes	X 1 Reacción <i>Thermo</i> (μL)	X1 Reacción NEB (μL)
Taq Buffer 10x	5	2,5
DNTPS	2,5 μL 2 mM c/u	0,5 μL 10 mM c/u
<i>Primer Forward</i> ITS1 (10 mM)	1	0,5
<i>Primer Reverse</i> ITS4 (10 mM)	1	0,5
MgCl ₂	2	-
Taq (5U/ μL)	0,3	0,125
ADN Molde	1	1
H ₂ O	12,2	19,875
Volumen final	25	25

El ciclado utilizado para la enzima taq de *Thermo Scientific* comenzó con una desnaturalización inicial a 95°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, un *annealing* a 55°C seguido de por 72°C por 1 minuto cada uno. En último lugar, se realizó una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Por otro lado, cuando se trabajó con la enzima taq de NEB, el ciclado comenzó con una desnaturalización de 95°C seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, un *annealing* de 55°C seguido de 68°C con un tiempo de 1 minuto cada uno. En la última etapa se realizó una extensión final de 68°C por 5 minutos.

3.2.2.2. Puesta a punto de la amplificación con *primers* para β-tubulina

Se utilizó como *primer forward* el B36F (5'-CACCCACTCCCTCGGTG-3') y como reverso el B12R (B12R 5'-CATGAAGAAGTGAAGACGCGGGAA-3'). El *master mix* utilizado se detalla en la tabla 2.

Tabla 2: Composición del *mix* para la amplificación de β -tubulina con los *primers* B36F y B12R

Componentes	X 1 Reacción (μ L)
Taq <i>Buffer</i>	10
DNTPS 2mM c/u	5
<i>Primer Forward</i> B36F	2
<i>Primer Reverse</i> B12R	2
MgCl ₂	4
Taq <i>Thermo</i>	0,6
Molde	2
H ₂ O	24,4
Volumen final	50

El ciclado consistió en una desnaturalización inicial a 94°C, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, *annealing* a 50-62°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos. Se realizó una extensión final a 72°C por 10 minutos. Con este par de *primers* se ensayaron las siguientes temperaturas de *annealing*: 55°C, 62°C, 50°C, 54°C y 58°C.

3.2.2.3. Amplificación con *primers* para factor de elongación α (EF α)

Para la amplificación del factor de elongación α (EF α) se utilizó el *primer forward* EF595F (5'-CGTGACTTCATCAAGAACATG-3') y EF1160R (5'-CCGATCTTGTAGACGTCCTG-3') como *primer reverse* (59). El *mix* utilizado se detalla en la tabla 3.

Tabla 3: Composición del *mix* para la amplificación de EF α con los *primers* EF595F y EF1160R.

Componentes	X 1 Reacción (μ L)
Taq <i>Buffer</i> X10	5
DNTPS 25 mM c/u	0,5
<i>Primer Forward</i> EF595F	1
<i>Primer Reverse</i> EF1160R	1
Taq NEB	0,125
Molde	1
H ₂ O	42,25
Volumen final	50

El ciclado consistió en una desnaturalización a 94°C por 4 minutos, seguido de 36 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto y 72°C por un minuto. Finalmente, se realizó una etapa de extensión a 72°C por 10 minutos.

3.2.2.4. Puesta a punto de la amplificación con *primers* RPB2

Como *primer forward* se utilizó fRPB2-5 F (5'- GAYGAYMGWGATCAYTTYGG- 3') y como *reverse* bRPB2-7.1R (5'-CCCATRGCYTGYYTTCATDGC-3') (60). Se utilizó el mismo *master mix* presentado en la tabla 3, cambiando los *primers* correspondientes.

El ciclado utilizado fue el siguiente: desnaturalización inicial por 4 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 94°C por 40 segundos, *annealing* 52-57°C por 40 segundos y extensión por un minuto a 72°C. Se finalizó con una extensión a 72° por 7 minutos.

Se evaluaron las siguientes temperaturas de *annealing*: 57°C, 52°C, 53°C, 54°C y 55°C.

3.2.3. Visualización de los resultados de PCR tiempo final

Los resultados de la amplificación se observaron por medio de una electroforesis en gel de agarosa. Se prepararon geles de 1% agarosa en *buffer* TAE 0,5X, se utilizó SYBR Green como agente intercalante. Los geles se corrieron a 100 V por 40 minutos en *buffer* TAE 0,5X. Se utilizó el marcador de peso molecular *GeneRuler DNA Ladder Mix* (*Thermo Scientific*, #SM0331) (61). Se visualizaron los geles con transiluminadores de luz ultravioleta.

3.2.4. Secuenciación

Las muestras que presentaron una banda de amplificación en los geles de agarosa fueron enviadas a Macrogen Inc para su secuenciación por electroforesis capilar (CES).

3.2.5. Análisis de las secuencias obtenidas

Una vez obtenidas las secuencias de las amplificaciones, se descargaron y se editaron con el *software* BioEdit. Se eliminaron los nucleótidos de los extremos de las secuencias, alrededor de 40 nucleótidos variando según la calidad de la secuencia obtenida. Luego, se realizó el reverso complementario de la secuencia correspondiente al *primer reverse*, y se alineó con la secuencia correspondiente al *primer forward* con la función *ClustalW multiple alignment*. Para obtener la secuencia consenso sin *gaps*, se utilizó la herramienta "*CAP contig assembly program*" que devuelve un *contig* sin *gaps* ni nucleótidos degenerados. Con dicho *contig* se realizó un *BLASTn* en *NCBI*, aplicando el filtro *taxid:fungi*.

3.2.6. Generación de los árboles filogenéticos

Se descargaron las secuencias de las especies de referencia de *NCBI* a través del *Accession Number*. A su vez, se contó con los *contigs* generados a partir de los datos de secuenciación obtenidos. Estos se procesaron utilizando el *software* MEGA. En primer lugar, se alinearon las secuencias de ADN, seleccionando *Neighbor Joining* como *Cluster Method*. Finalmente, se construyó el árbol con las secuencias alineadas con un *Bootstrap Method* de 1000 y delección completa de los *gaps*.

3.3. Caracterización de las especies identificadas

Se trabajó con tres medios de cultivo distintos para la caracterización de los aislamientos. En primer lugar, los medios suplementados con guaiacol y ABTS permiten evaluar cualitativamente la producción de la enzima lacasa. Por otro lado, el medio Pikovskaya se utiliza para determinar la presencia de enzimas solubilizadoras de fosfatos y finalmente se preparó el medio para detección de lipasas. Los cuatro medios mencionados se esterilizan por autoclave a 121°C por 21 minutos. Adicionalmente se evaluó la capacidad de los hongos identificados de degradar glifosato.

3.3.1. Producción de lacasa

Se preparó PDA con 500 ppm (4mM) de guaiacol el cual es previamente filtrado para su esterilización. Para el de ABTS, se preparó el siguiente medio: glucosa (10 g/L), KH₂PO₄ (2 g/L), MgSO₄·7H₂O (0,5 g/L), CaCl₂·2H₂O (0,1 g/L), tartrato de amonio (0,2 g/L), agar (20 g/L) y ABTS (0,04 g/L). Este último fue preparado en H₂O miliQ y es filtrado para su esterilización. Se mantuvo cubierto de la luz y se agregó luego del enfriado del medio.

3.3.2. Producción de enzimas solubilizadoras de fosfatos

Se siguió el protocolo establecido por *HIMEDIA LABS* el cual consiste en: 0,5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de dextrosa, 5 g/L de fosfato de calcio, 0,5 g/L de sulfato de amonio, 0,2 g/L de cloruro de potasio, 0,1 g/L de sulfato de magnesio, 0,1 mg/L de sulfato de manganeso, 0,1 mg/L sulfato de hierro y por último 15 g/L de agar (62).

3.3.3. Producción de lipasas

Se preparó un medio con las siguientes concentraciones: 15 g/L de TSB como de Agar y 10 mL/L de gliceriltbutirato. Una vez que se agregan estos dos componentes, previo al agregado de agua, se debió generar una emulsión.

3.3.4. Tolerancia al glifosato

Se evaluó el crecimiento de los hongos previamente aislados en medio PDA suplementado con 1mM y 10mM de glifosato el cual fue esterilizado utilizando filtros de 0,22µm. Cada cepa se evaluó por duplicado.

Para evaluar la capacidad del hongo de utilizar glifosato como fuente de fósforo, se trabajó con el medio MS1 en cual consistía de: NH₄Cl 2 g/L; MgSO₄ 0,2g/L; K₂SO₄ 0,5g/L; FeSO₄ 2,5g/L; de CaCl₂, CuSO₄, H₃BO₃, ZnSO₄, MnCl₂, NiSO₄ y Na₂MoO₄ 50ml; 1g/L de glifosato y 10g/L de glucosa. Se resuspendió en agua y se ajustó el pH a 6. Para esterilizar, se autoclava a 121°C por 21 minutos.

3.4. Diseño de un sistema de fructificación de *Pleurotus ostreatus*

3.4.1. Aislamiento y confirmación de la cepa de *Pleurotus ostreatus*

Se partió de una semilla de *Pleurotus ostreatus*, la cual fue seccionada con bisturí estéril en cabina de flujo laminar. Se tomaron secciones del centro de la semilla para evitar contaminaciones que podrían estar presentes en la superficie. Los fragmentos seleccionados se rehidrataron con H₂O estéril y se colocaron en placas de PDA por duplicado. A los 5 días de la inoculación de las placas, se realiza un cultivo puro siguiendo el siguiente protocolo (i-v):

- i) Preparar solución Tween 0,1% en agua y autoclavar a 121°C por 21 minutos.
- ii) Tomar 3 mL de Tween 0,1% y colocar en tubo falcon de 15 mL.
- iii) Tomar una ansada del micelio y colocar en el tubo falcon. Vortex por un minuto.
- iv) Con un ansa estéril, tocar la mezcla de Tween 1% y micelio. Dispersar en una nueva placa de medio de cultivo realizando una línea en el centro de la placa y luego realizar cortes diagonales con la misma ansa.
- v) A las 48 horas, se remueven los fragmentos de medio de cultivo que presentan crecimiento de micelio y se colocan en placas independientes, obteniéndose cultivos puros.

Una vez obtenido el cultivo puro de *Pleurotus ostreatus*, se inoculó ME líquido con el mismo y se realizó una extracción de ADNg con el Kit *Quick- DNA™ Fungal/ Bacterial Miniprep* (58). Se amplificó la región ITS1-ITS4 como se indica en la tabla 1, se visualizó el resultado por medio de un gel de agarosa 1% y se envió a secuenciar a la empresa Genexa. Los resultados de la secuenciación se analizaron como se indica en la sección **3.2.5**.

3.4.2. Evaluación del crecimiento de *P. ostreatus* en bagazo de cerveza

Para evaluar la velocidad de crecimiento de *P. ostreatus* en sustratos con distintas proporciones de bagazo de cerveza, se trabajó con placas de Petri de plástico de 30 cm de diámetro. Para ello, se prepararon las condiciones de sustrato descritas en la tabla 4 (Control 0% bagazo, 10%, 20% y 30%). Se colocó el sustrato autoclavado en las placas correspondientes y se inocularon con discos de agar conteniendo *P. ostreatus*. Se realizaron 3 placas por condición y se midió el área del micelio a lo largo del tiempo, hasta que el micelio colonizó la totalidad de la placa.

3.4.3. Evaluación del crecimiento de *P. ostreatus* en bagazo de café

A la hora de evaluar la capacidad de crecimiento del hongo ostra en el bagazo de café, se trabajó con las siguientes mezclas 0%, 30%, 60%. Con relación a las mismas, se prepararon previamente sin incorporación del sustrato y se autoclavaron a 121°C por 1 hora. Una vez finalizado, se incorporó el café. Como se trabajó con el bagazo generado el mismo día, se evaluó el ensayo con el café en dos condiciones: por un lado, se agregó la cantidad de café correspondiente sin autoclavar ni pasteurizar.

Por otro lado, se pasteuriza el bagazo de café agregando agua a 100°C al contenedor hasta llenar su capacidad, drenando el exceso de agua a las 6 horas.

Este ensayo se realizó en placas de Petri de 30 cm, se inocularon con discos de agar conteniendo *P. ostreatus*, se sellaron con Parafilm y se las dejó a temperatura ambiente. Se midió el área del micelio a lo largo del tiempo, hasta que el mismo colonizó la totalidad de la placa.

3.4.4. Curva de crecimiento de *P. ostreatus*

Se prepararon 14 matraces con extracto de malta líquido y se inocularon con discos de *P. ostreatus*. Dichos matraces se mantuvieron en un *shaker* a 25°C con una agitación de 110 rpm. Se tomaron 3 matraces cada 4 días para determinar la biomasa generada a lo largo del tiempo. Se pasó el medio a través de un papel de filtro y se secó el mismo. Una vez estabilizado el peso seco y se restó el peso del papel inicial obteniendo la biomasa seca neta.

3.4.5. Preparación del inóculo de *Pleurotus ostreatus*

Se trabajó con 6 matraces con medio ME con un volumen final de 150ml y se los inoculó con *P. ostreatus*. Los mismos se colocaron en un *shaker* a 25°C con una agitación de 110 rpm y se dejaron en esta condición por 12 días.

3.4.6. Preparación de las distintas condiciones de sustrato a evaluar para la fructificación

El objetivo del ensayo es incorporar residuos industriales en el sustrato y evaluar diferencias en la velocidad de crecimiento, colonización del sustrato y rendimiento de fructificación obtenido. Los sustratos consistían en una mezcla de aserrín de eucalipto, salvado de trigo, cal y bagazo de cerveza (BC) en distintas proporciones. Se trabajó con 30%, 20% y 10% de bagazo, además de contar con un control sin bagazo (0%). Para cada condición se prepararon triplicados. Cada bolsa midió 17 cm de largo por 30 cm de alto. En la tabla 4 se detalla la composición de cada sustrato.

Tabla 4: Detalle del contenido de cada condición de sustrato evaluada para la fructificación de *P. ostreatus*

% BC	BC (g)	Salvado de trigo (g)	Aserrín (g)	Cal (g)
Control (0%)	0	100	390	10
10%	50	100	340	10
20%	100	100	290	10
30%	150	100	240	10

En primer lugar, se partió de 1490 g de aserrín, se lo humedeció con 2800 mL de agua y lo mismo se realizó con el salvado de trigo, el cual se pesó 500 g y se le agregaron 500 mL de agua. Se prepararon 500 g para cada condición evaluada además de complementarlas con 80 mL de agua para que las mezclas cuenten con mayor humedad. A continuación, se procedió a agregarles algodón en la entrada

de las bolsas y se las cerró con bandas elásticas. Esto no solo permitió la inoculación con el hongo posteriormente, sino que también la respiración del mismo. Las mismas se autoclavaron a 121°C por 1 hora.

3.4.7. Inoculación de las bolsas

Las bolsas se inocularon con los matraces de ME inoculados con *P. ostreatus* crecido por 12 días. A la hora de inocular, se trabajó con pipetas estériles de plástico y se les agregó 3 mL de inóculo líquido a cada bolsa. Se trabajó en cabina de flujo laminar.

3.4.8. Colonización del sustrato

Una vez inoculadas las bolsas, se almacenaron a temperatura ambiente (23°C), cubiertas de la exposición de la luz por 26 días, monitoreando periódicamente el crecimiento del micelio.

3.4.9. Fructificación

Una vez que las bolsas se encontraron completamente colonizadas por el hongo, a los 26 días de su inoculación, se trasladaron a la cámara de fructificación. Esta consistió en una estantería de 80 cm de largo, 50 cm de ancho y 180cm de alto, cubierta por una lona con dos cierres para facilitar el acceso al interior. Para la circularización de aire, se colocaron dos extractores, uno en la esquina superior izquierda de la lona y el segundo en el costado inferior derecho. Se colocaron luces led blancas en el interior de la lona que se encendían durante 10 h cada día. Se colocó un humidificador ultrasónico (HUMIPRO) para mantener la humedad necesaria para la fructificación. Finalmente, se colocó un medidor de temperatura y porcentaje de humedad y una bandeja con perlita en el estante inferior.

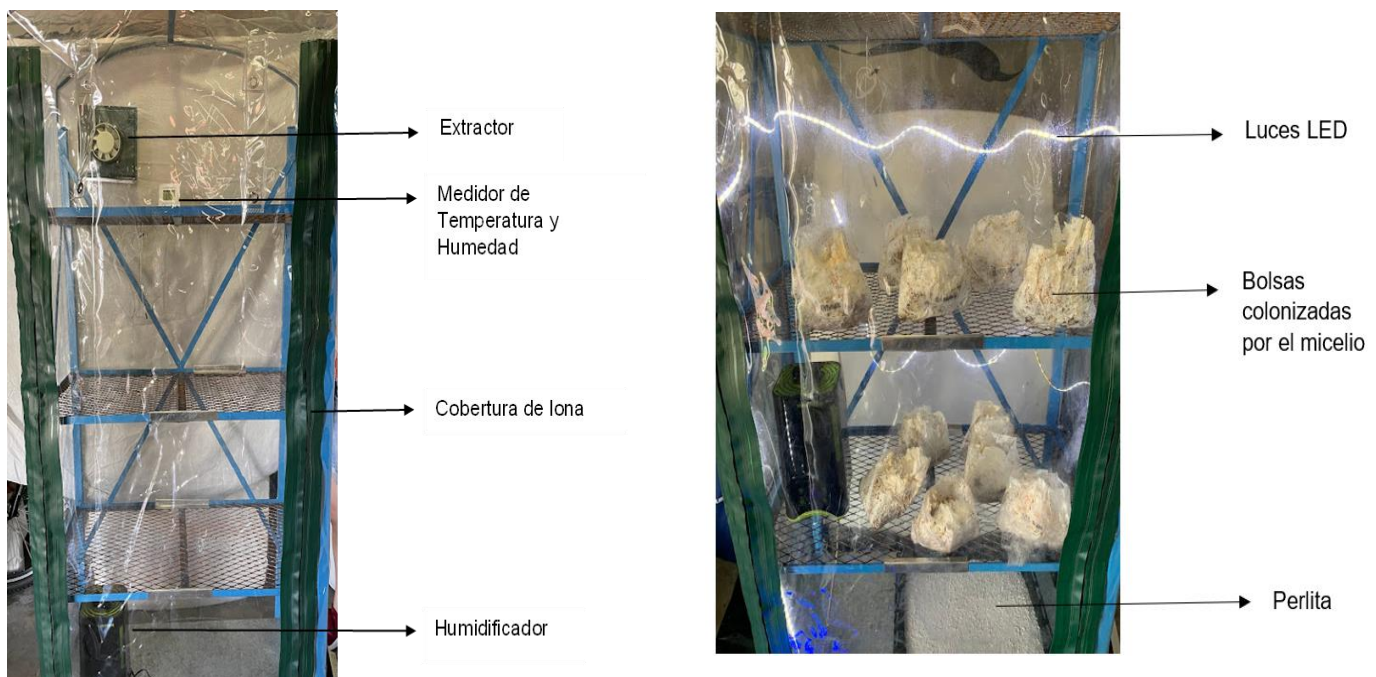


Figura 6: Fotografía de la carpa de fructificación en operación, detallando los componentes visibles

Las condiciones de operación de la cámara fueron las siguientes: Temperatura entre 15 y 23 °C, humedad entre 80-90%, fotoperíodo 10 horas luz, 14 horas de oscuridad, recircularización de aire 2 veces por día.

Una vez que la carpa se encontraba en funcionamiento, se colocaron las bolsas. Previamente, se les realizó un corte transversal para eliminar el tapón de algodón, permitir la entrada de humedad y la formación de los primordios (ver figura 7).



Figura 7: representación del corte realizado para la formación de los primeros primordios.

Se registró el tiempo transcurrido hasta la formación de los primeros primordios en cada condición, así como la cantidad de setas cosechadas, su peso fresco y medidas (largo y ancho del basidiocarpo). Luego de realizada la primera cosecha para cada condición, se mantuvo la carpa en funcionamiento para evaluar los rendimientos obtenidos tras varias cosechas sucesivas. Se calculó la eficiencia biológica para cada bolsa utilizando la siguiente ecuación:

$$(Biomasa cosechada) \div (Peso seco del sustrato) * 100$$

3.4.10. Evaluación de fructificación en botellas de vidrio y contenedores de plástico

Con el fin de buscar otras alternativas para el crecimiento y fructificación del hongo *P. ostreatus* donde a su vez se pudiera apostar a la reutilización de distintos envases, se trabajó con botellas de vidrio y contenedores de plástico reutilizables. Para la esterilización de estos últimos se lavaron con hipoclorito al 1% y etanol 70% y se dejaron con luz ultravioleta por 1 hora mientras que las botellas de vidrio se autoclavaron con el sustrato.

Para este ensayo se trabajó con la condición de sustrato de 20% de bagazo por lo que se prepararon 500 g de peso seco el cual consistió de 100 g de bagazo, 100 g de salvado, 290 g de aserrín y 10 g de CaCO₃. A esta mezcla se agregaron 900 mL de agua. Los soportes se inocularon con 3 ml de medio líquido con *P. ostreatus* en crecimiento durante 12 días.

El esquema general de trabajo con *P. ostreatus* para su aislamiento, caracterización y producción se esquematiza en la figura 8.

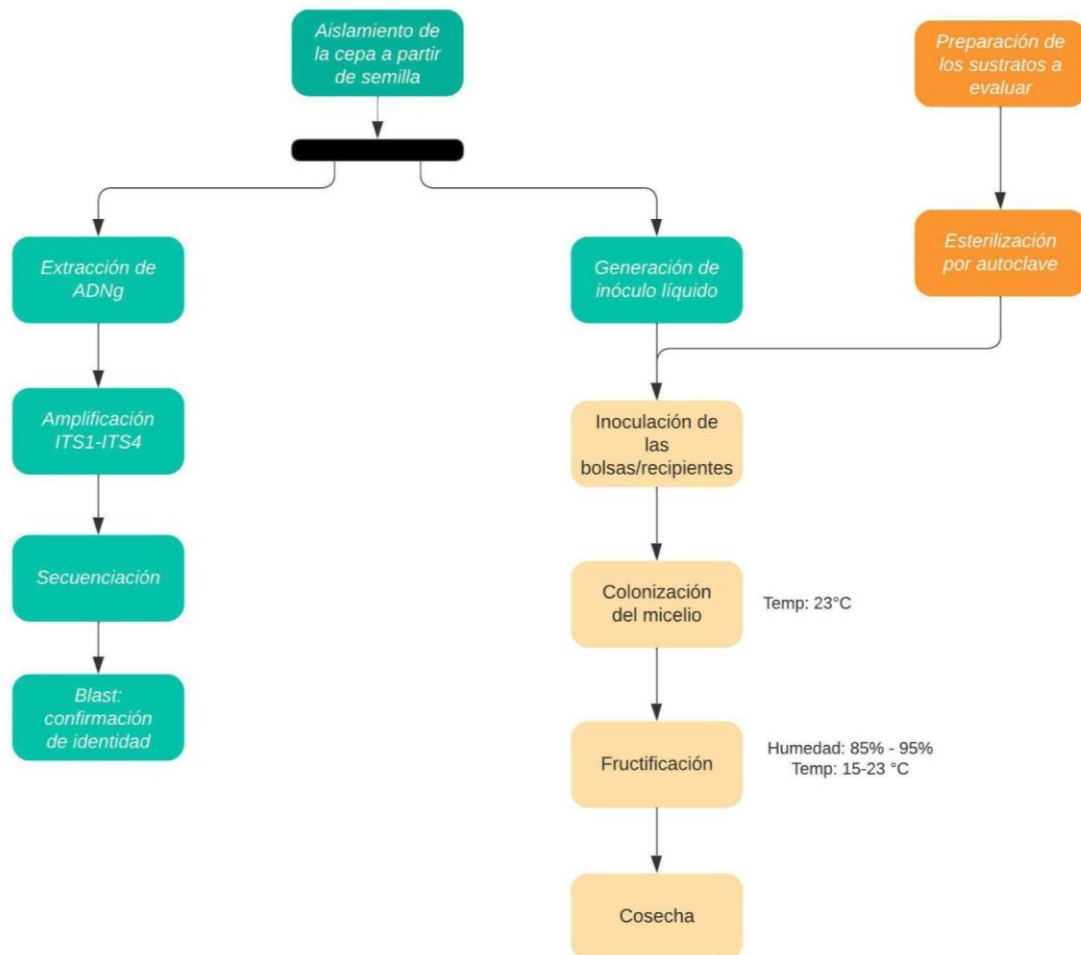


Figura 8: Esquema del proceso de aislamiento, identificación, inoculación, y fructificación de *P. ostreatus*

3.5. Incorporación de las camas post cosecha de la producción de *Pleurotus ostreatus* como mejorador de suelo

3.5.1. Ensayo con semillas de alfalfa

3.5.1.1. Germinación de semillas

Se trabajó con semillas de alfalfa esterilizadas previamente. Para ello, se realizó una dilución de hipoclorito puro al 1% el cual fue incorporado en un tubo falcon con las semillas y se agitó durante 4 minutos. Pasado este tiempo, se removió el hipoclorito y se agregó agua destilada para lavar, repitiendo 5 veces el lavado.

A continuación, se colocaron 14 semillas tratadas en dos placas con medio MS y se dejaron germinar en zona de cultivo de plantas por 48 h, cubiertas de la luz. Se evaluó la germinación de las semillas.

3.5.1.2. Crecimiento de plantas de alfalfa en tierra con distintas proporciones de sustrato de hongo *Pleurotus ostreatus*

Se evaluaron 3 condiciones distintas con relación a la concentración de sustrato utilizada para la inoculación de turba. Las mismas fueron 1:2, 1:4 y 1:8, así como también se contó con un control para comparar los resultados. Para cada condición evaluada, se colocaron 10 semillas germinadas de alfalfa en cada maceta. Las cuatro condiciones mencionadas anteriormente fueron realizadas por triplicados de manera de tener resultados significativos.

Se prepararon 450 gramos de cada mezcla correspondiente para luego dividirla en 150 gramos por cada maceta. El pan post cosecha utilizado fue proporcionado por un productor de *P. ostreatus* y se trata de una mezcla con viruta de madera, paja de trigo y cal 1%. En la tabla 5 se resumen las cantidades pesadas de turba y sustrato de hongo para cada condición.

Tabla 5: Detalle de la preparación de las condiciones de suelo utilizadas para el crecimiento de alfalfa

Condición	Turba (g)	Sustrato con micelio (g)
1:8	525	75
1:4	450	150
1:2	300	300
Control	600	0

Luego del preparado de las mezclas turba: sustrato, se siembran las semillas de alfalfa germinadas, se colocan en un ciclo de luz 12 h ON 12 h OFF y se riegan de forma uniforme cada 24 horas. Se observó el crecimiento de las plantas durante 25 días. Pasado este tiempo, se cosecharon para así evaluar clorofila A y B, peso y medidas (total, parte aérea y raíces). Con relación a lo primero, se procedió a utilizar la parte aérea de la planta por lo que las raíces fueron descartadas. Dicha región fue incorporada en tubos de vidrio con tapa rosca con 4 mL de una solución 90:10 acetona-agua y se dejaron en la heladera por 48 horas. Pasado el tiempo de incubación, se removió la solución presente en dichos tubos para medir la absorbancia a 665 nm, 649 nm y 730 nm y así determinar la concentración de clorofila A, B y la total, adicionalmente se cuenta con un blanco compuesto por 90:10 de acetona-agua. Las ecuaciones utilizadas fueron las establecidas por *Wassie et al.*, donde "Chl" hace referencia a clorofila (63). Las mismas se detallan a continuación.

$$Chl\ a\ (mg \cdot g^{-1}\ FW) = (13,95 \times D665 - 6,88 \times D649) \times 0,005 \div W$$

$$Chl\ b\ (mg \cdot g^{-1}\ FW) = (24,96 \times D649 - 7,32 \times D665) \times 0,005 \div W$$

$$Total\ Chl\ (mg \cdot g^{-1}\ FW) = (18,08 \times D649 + 6,63 \times D665) \times 0,005 \div W$$

3.5.2. Ensayo con semillas de trébol blanco

3.5.2.1. Germinación de las semillas

Se procedió a esterilizar las semillas de dicho cultivo con hipoclorito 1% al igual que en el ensayo con las semillas de alfalfa. Una vez estériles, se utilizó el medio *water-agar* (10g/L) para la germinación de 10 semillas por placa (15 placas en total). Dado que esta etapa se realiza en ausencia de luz, las placas se envolvieron en papel y se dejaron germinar por 7 días.

3.5.2.2. Crecimiento de las plantas de trébol en tierra con distintas proporciones de sustrato de *P. ostreatus*

Se evaluaron 6 condiciones diferentes: control turba (CT), control con sustrato (CS), control con NPK (C + NPK), 1:4 de sustrato en turba, 1:8 de sustrato en turba y 1:4 de sustrato en tierra con NPK. Se agregaron 8 semillas germinadas a cada maceta proveniente de cada condición establecida.

Con relación al sustrato del hongo utilizado, se trabajó con uno propio obtenido en los ensayos de fructificación de *P. ostreatus*. Se prepararon 450 g de cada mezcla para luego repartirla en 3 macetas por cada condición. Adicionalmente, en el caso que se trabajó con NPK, el agregado del mismo se realizó de acuerdo a las pautas establecidas por el fabricante siendo el mismo *Denucio*.

Luego de preparadas las mezclas, se sembraron las semillas se colocaron en un ciclo de luz 12 h ON 12 h OFF y se regaron cada 24 horas. El agregado de NPK en las condiciones correspondientes se realizó en dos etapas. La primera aplicación se realizó al momento de sembrar las semillas, y la segunda a los 20 días desde su siembra.

Tabla 6: Detalle de la composición de los distintos suelos en los que se evaluó el crecimiento de trébol blanco

Condición	Turba (g)	Sustrato con micelio (g)	NPK
1:8	450	150	N/A
1:4	525	75	N/A
1:4 + NPK	525	75	1 medida (*)
Control NPK	600	0	2 medidas (*)
Control solo turba	600	0	N/A
Control sustrato	525	75	N/A

(*) Cada medida incorporada es por maceta.

Luego de pasados 24 días de desarrollo, se cosecharon para así evaluar clorofila A, B y total, peso y medidas de la parte aérea, raíces y total. En lo que respecta a lo primero, se procedió a utilizar solamente la parte superior de la planta por lo que las raíces fueron descartadas. A partir de esta región, se pesaron 400 mg aproximadamente de biomasa y se incorporó en tubos de vidrio con tapa de rosca los cuales contenían una solución de 90:10 acetona/agua y se dejaron en la heladera *overnight*. Pasado

este tiempo, se filtró el líquido presente en estos tubos para así medir la absorbancia a 622 nm, 645 nm y 470 nm con el fin de determinar la concentración de clorofila A, B y total. Las ecuaciones utilizadas para calcular lo mencionado anteriormente fueron las establecidas por *Asma et al.*, donde “*Chl*” hace referencia a clorofila, y se detallan a continuación (64).

$$\text{Chl a (mg}\cdot\text{L}^{-1}) = (11,75 \times D662 - 2,35 \times D645)$$

$$\text{Chl b (mg}\cdot\text{L}^{-1}) = (18,61 \times D645 - 3,96 \times D662)$$

$$\text{Total Chl (mg}\cdot\text{L}^{-1}) = (7,79 \times D661 + 16,26 \times D645)$$

3.6. Análisis estadístico

Los resultados arrojados de los ensayos anteriores se analizaron utilizando la matriz estadística ANOVA con un *p value* menor a 0,05 utilizando el software GraphPad Prism.

4. Resultados y discusión

4.1. Obtención de los aislamientos

4.1.1. Puesta a punto de la concentración de benomilo

Con el objetivo de minimizar el crecimiento bacteriano se suplementó el medio de cultivo con gentamicina, antibiótico aminoglucósido de amplio espectro que actúa sobre bacterias Gram-negativas aerobias. Análogamente, se busca utilizar un fungicida al cual los basidiomicetos sean resistentes. Es así que se trabajó con benomilo, un potente fungicida utilizado en la agricultura cuyo modo de acción consiste en unirse a la β -tubulina de los hongos evitando la polimerización microtubular. De esta forma interfiere con varios procesos celulares como la mitosis, meiosis, transporte intracelular de moléculas y mantenimiento de la forma de la célula. Se encontró que el crecimiento de varios hongos micorrizas así como varias especies del género *Trichoderma* se ven afectadas por el fungicida (65). Principalmente, se reportó que la mayoría de los basidiomicetos son resistentes al benomilo. Dicha resistencia puede ser la consecuencia de un número de mutaciones, como la no absorción del mismo o mutaciones en el gen de β -tubulina (66).

Dado lo mencionado anteriormente, se buscó evaluar la concentración de benomilo a emplear en el medio de cultivo. Para esto se prepararon placas de PDA suplementadas con distintas concentraciones de Benomilo (0,5 mg/L, 1mg/L, 2mg/L y 4 mg/L) y se inocularon distintas especies de hongos filamentosos y basidiomicetos (*Fusarium equiseti*, *Alternaria alternata*, *Trichoderma hazarium*, *Trichoderma koningiopsis*, *Trametes villosa*, *P. sanguineus*), utilizando como control placas de PDA sin agregado de fungicida. En la figura 9 se observan las placas correspondientes a *T. koningiopsis*, *T. hazarium* y *T. villosa* y su respuesta a las distintas concentraciones de benomilo evaluadas.

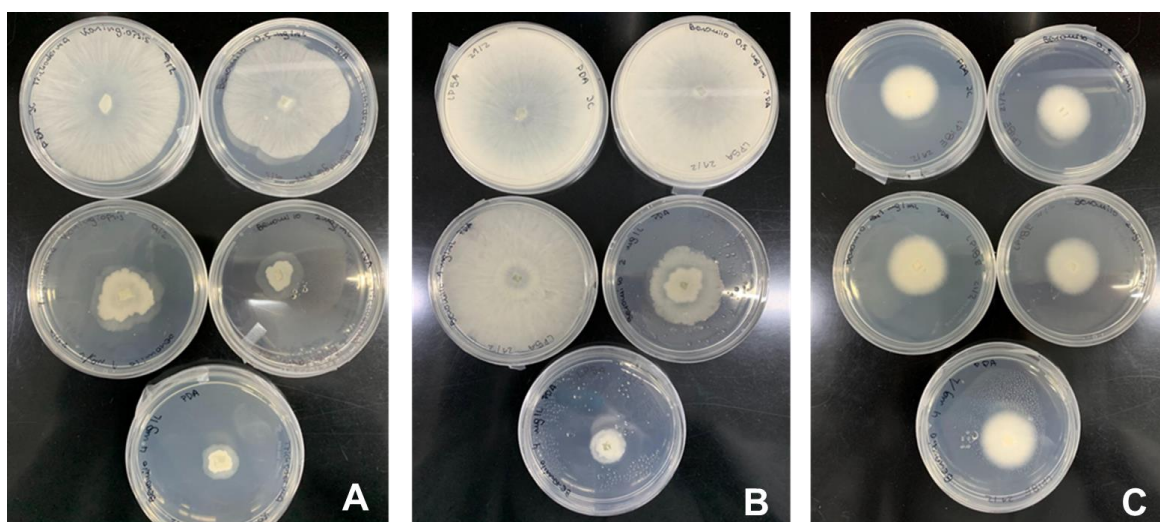


Figura 9: Placas de PDA suplementadas con concentraciones crecientes de benomilo: 0 mg/L, 0,5 mg/L, 1mg/L, 2mg/L y 4 mg/L. A. *Trichoderma koningiopsis*. B. *Trichoderma hazarium*. C. *Trametes villosa*.

En la tabla 7 se muestran los resultados del efecto del benomilo en las especies estudiadas. En primer lugar, se observa que los basidiomicetos analizados (*Trametes villosa* y *P. sanguineus*) no se ven afectados por el fungicida, confirmando la resistencia previamente establecida. Por otro lado, se observa que las dos especies de *Trichoderma* estudiadas se ven inhibidas ante la presencia de benomilo.

Tabla 7: Resumen de los efectos de benomilo en distintos hongos según la concentración. “-”: Ausencia de inhibición. “+”: Presencia de inhibición

Especie	Inhibición (mg/L de benomilo)				
	0	0,5	1	2	4
<i>T. villosa</i>	-	-	-	-	-
<i>P. sanguineus</i>	-	-	-	-	-
<i>F. equiseti</i>	-	-	-	-	-
<i>A. alternata</i>	-	-	-	-	-
<i>T. hazarium</i>	-	-	-	+	+
<i>T. koningiopsis</i>	-	+	+	+	+

Teniendo en cuenta las áreas del micelio obtenidas en las diferentes concentraciones, y comparando con el control (PDA sin fungicida), el crecimiento de *T. koningiopsis* se ve disminuido en un 92% y 95% cuando se trabaja con 2 y 4 mg/L de benomilo respectivamente, mientras que en el caso de *T. hazarium* el desarrollo se ve reducido en un 75% y 95% teniendo en cuenta el mismo criterio de concentraciones mencionadas anteriormente. Esto conlleva a decir que efectivamente dicho fungicida estaría inhibiendo el crecimiento de los hongos cuando se trabaja con concentraciones superiores a 2 mg/L del mismo.

Está reportado que concentraciones de 1 y 2 mg/L de benomilo inhiben el crecimiento de *Trichoderma koningii*, lo que se observa también para *T. hazarium* y *T. koningiopsis* (65). Por lo tanto se continúa el aislamiento de las muestras ambientales con una concentración de 2 mg/L de benomilo, que mostró una inhibición del crecimiento mayor a 1 mg/L.

En base a lo observado se confirmó la resistencia de los basidiomicetos estudiados al benomilo, y se puso a punto la concentración a utilizar para evitar el crecimiento de *Trichoderma* (2 mg/L), uno de los principales contaminantes que se encuentra en el suelo. De todas formas, este fungicida no es eficaz contra otras especies que se pueden presentar como *Alternaria alternata* y *Fusarium equiseti*.

4.1.2. Recolección de muestras

En el **Anexo 4** se encuentra el detalle de las muestras recolectadas, indicando el punto de recolección, fotografías de la seta y características principales. Se mapearon los sitios de recolección y se diseñó un *heatmap* en el cual se detallan las zonas en donde se recolectaron mayor cantidad de hongos (figura 10).

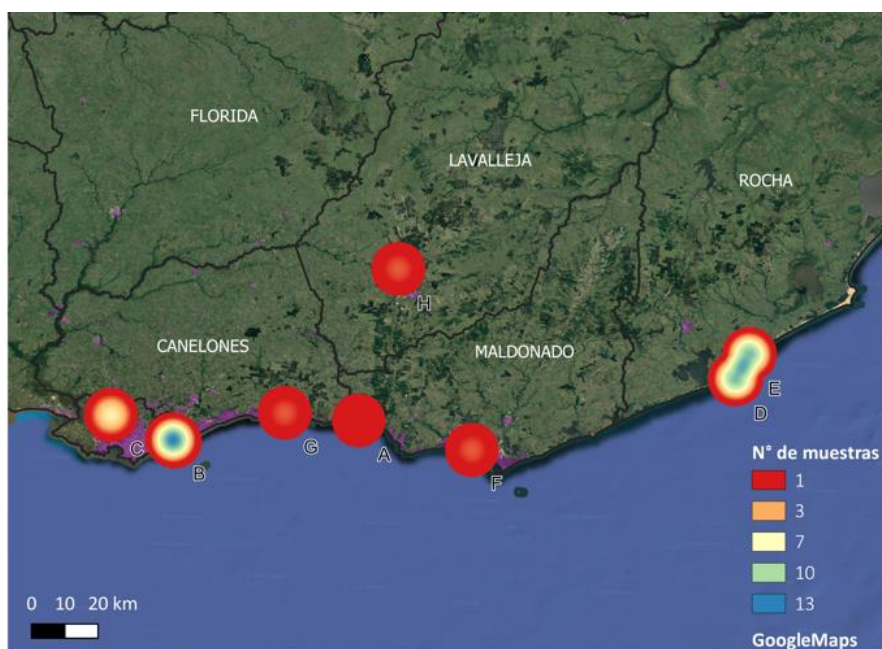


Figura 10: Heatmap a partir de los sitios de recolección de muestras de hongos basidiomicetos en Uruguay. A) Costa Azul B) Parque Roosevelt C) César Mayo de Gutiérrez D) La Paloma E) Santa Isabel F) Parque Lussich G) Jaureguiberry H) Arequita.

Con relación a los lugares donde se recolectaron más hongos se destacan César Mayo de Gutiérrez, el Parque Roosevelt, La Paloma y Santa Isabel. Los lugares a los que se recurrieron en estas localidades consistían de bosques de pino o eucaliptus por lo que era de esperar una gran diversidad de hongos debido al beneficio alimenticios que estos pueden incorporar de estos catalogándolos como simbiontes o saprófitos. Con relación a lo primero, implica la generación de asociaciones conocidas como micorrizas, la cual es beneficiosa para ambas partes. Algunos basidios conocidos por generar este tipo de vínculos son: *Boletus spp.*, *Lactarius spp.* (67). Por otro lado, con relación a lo segundo, se debe principalmente a la capacidad de degradar materia orgánica como forma de alimentación (68).

Los mismos fueron recolectados entre agosto y setiembre posterior a días de lluvia lo que, asociado a la humedad de la tierra y del clima, favorece el crecimiento de los hongos. Adicionalmente, otro factor que favorece el crecimiento es la presencia de pinocha en el suelo, lo que permite que se mantenga la humedad, así como también mayor porcentaje de materia orgánica para degradar (69). Existen varios basidiomicetos reportados que se benefician en gran medida de este sustrato, un ejemplo son las especies pertenecientes al género *Gymnopus spp.* En las imágenes presentes en la figura 11, se puede ver el crecimiento de estos hongos sobre pinocha o ramas de pino.



Figura 11: Fotografías de los basidiocarpos recolectados de diferentes sitios. A) Parque Roosevelt. B) La paloma. C) Santa Isabel.

4.1.3. Aislamiento de las muestras

Dado que las células que componen los cuerpos fructíferos de los basidiomicetes son totipotentes, es decir que pueden diferenciarse en distintos tipos celulares, es que es posible el aislamiento *in vitro* del micelio a partir de una seta madura ya diferenciada (5). A partir de las 46 muestras recolectadas, se lograron aislar, mediante protocolos en placa, 56 hongos con micelio con distintos fenotipos macro y microscópicos. Esto quiere decir que de la misma muestra en varias ocasiones se aisló más de un hongo. De estos aislamientos, se identificó que el micelio de 9 de ellos correspondía con la seta original mediante métodos moleculares, representando un porcentaje de aislamiento de los basidiomicetos de interés de 20%.

Aquellos casos en los que no se logró obtener un aislamiento a partir de la muestra recolectada o este no coincidió con la muestra original, fueron vinculados principalmente a dificultades causadas por el estado de la seta al momento de su recolección. Al tratarse de muestras ambientales, están expuestas a una gran cantidad de factores externos como insectos, tierra, parásitos y esporas de otros hongos que interfieren en su aislamiento. Se observó que aquellas muestras con mayor tiempo desde su fructificación y que tuvieron presencia de insectos fueron las que presentaron menor éxito en el aislamiento del hongo basidiomiceto. Se identificaron factores claves que podrían aumentar el porcentaje de éxito en los aislamientos si fueran considerados a la hora del muestreo, siendo la correcta elección de las muestras a recolectar de gran importancia para obtener resultados deseados. Idealmente se deben seleccionar setas jóvenes que están comenzando a liberar las esporas. En el caso de basidiomicetos que presentan sombrero, se deberían seleccionar aquellas cuyo velo está en proceso de apertura, de forma que las laminillas se encuentren protegidas del ambiente. A su vez, deben estar limpias, es decir con la menor presencia de insectos y tierra posible. Si bien durante el protocolo de aislamiento se realizó una descontaminación superficial de las muestras, en algunos casos no se lograron eliminar contaminantes que se encontraban dentro del tejido del basidiocarpo, aumentando las dificultades para su aislamiento.

4.2. Identificación de aislamientos

El espaciador transcrito interno (ITS) es el marcador de ADN de referencia para la identificación de organismos en el reino fungi. Su estudio permite identificar el organismo por su alta variabilidad entre especies, fácil amplificación, diseño de *primers* universales y cantidad de secuencias disponibles en las bases de datos. Es por esto que se utilizó el par de *primers* ITS1 e ITS4 para la identificación de las muestras aisladas a partir de las setas recolectadas. En la figura 12 se observa el resultado de una electroforesis en gel de agarosa 1% realizado para visualizar la amplificación con dichos *primers*.

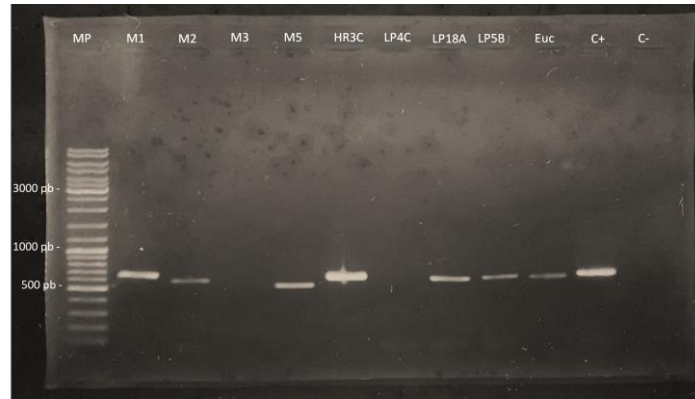


Figura 12: Gel de agarosa 1% mostrando los resultados de la amplificación de la región ITS con los *primers* ITS1-ITS4.

Se logró la amplificación de todas las muestras estudiadas con este par de *primers*, tanto las extraídas con el Kit comercial como por medio de extracción con isopropanol-cloroformo, obteniéndose amplicones de entre 700 y 500 pares de bases correspondiendo a la región de interés. Las muestras que no mostraron banda de amplificación en la figura 12 fueron reprocesadas, lográndose así la amplificación. Se analizaron las secuencias de los amplicones obtenidos con la herramienta *BLASTn* de *NCBI*. Para las búsquedas en *BLAST*, se le asignó una especie a la muestra cuando se contaba con un *query coverage* mayor a 80% y un porcentaje de identidad entre 97% y 100% (18). Finalizado el análisis, se determinó que se logró el correcto aislamiento en placa de las siguientes nueve especies de basidiomicetos descritas en la tabla 8.

Tabla 8. Resultados obtenidos de la secuenciación de los amplicones obtenidos con los *primers* ITS1-ITS4 de las muestras ambientales. En todos los casos se registró un *Query Coverage* 99% y un *E-value* de 0.0.

Código asignado	Nombre científico	Porcentaje de Identidad	Largo de secuencia (pb)	Número de Acceso
Shiitake	<i>Lentinula edodes</i>	99,59%	757	KY494571.1
LP2A	<i>Trametes sanguinea</i>	100%	746	MF314444.1
LP18B	<i>Trametes villosa</i>	100%	585	KF850162
HG1	<i>Flavodon flavus</i>	100%	582	MH211817.1
HG6	<i>Physisporinus lineatus</i>	99,19%	614	MH268063.1
PO	<i>Pleurotus ostreatus</i>	99,53%	708	MK542618.1
HG2A	<i>Ganoderma sp.</i>	99,84%	619	MW541380.1
HG5C	<i>Phlebopus mexicanus</i>	96,91%	706	KM676000.1
M1	<i>Fomitopsis spp.</i>	100%	603	KR605772.1

Dentro de los basidiomicetos obtenidos, se encuentran dos de los hongos más comercializados a nivel mundial: *Lentinula edodes* conocido como shiitake y *Pleurotus ostreatus* conocido como ostras o gírgolas grises. Estas son setas que tienen un gran valor comercial por su importancia nutricional. Cabe destacar que la muestra de shiitake fue obtenida a partir de setas comerciales.

En la figura 13, se ilustran las setas de los hongos identificados provenientes de la recolección.



Figura 13: Fotografías de los basidiomicetes que se lograron aislar e identificar mediante secuenciación de la región ITS. A: *Lentinula edodes*. B: *Trametes sanguinea*. C: *Trametes villosa*. D: *Flavodon flavus*. E: *Physisporinus lineatus*. F: *Ganoderma sp.* G: *Phlebopus mexicanus*. H: *Pleurotus ostreatus*.

Por otro lado, se identificó *Trametes sanguinea*, también conocido como *Pycnoporus sanguineus*. Se trata de un hongo de podredumbre blanca que crece en troncos caídos. No es un hongo comestible, pero su importancia radica en la capacidad de degradar compuestos lignocelulósicos. Además, este hongo produce pigmentos y metabolitos con potencial farmacéutico como cinnabarina, compuesto con actividad antimicrobiana. Tiene usos medicinales como antiparasitario y antiinflamatorio (70). Por lo tanto, gracias a los diversos metabolitos y enzimas de valor agregado que es capaz de producir este hongo, se lo considera un recurso biotecnológico de gran potencial.

De forma similar, *Trametes villosa* además de ser un hongo de podredumbre blanca también presenta potencial como biorremediador de pigmentos sintéticos por la mineralización de pentaclorofenol y hexachlorobenzeno (71). Igual que *T. sanguinea*, estos hongos tienen la capacidad de producir lacasas lo que permite ampliar las aplicaciones de esta especie.

Además de los basidiomicetos mencionados, se identificó una especie parásita de boletos, denominada *Hypomyces chrysospermus*. En este caso se destaca la importancia de la correcta identificación de las especies, ya que la muestra fue clasificada por sus características morfológicas como “falsa trufa”, cuando de trataba realmente de un boleto que presentaba una infección avanzada de este parásito. Las infecciones suelen comenzar en la superficie de los poros observándose un moho blancuzco, una vez que se propaga por toda la seta comienza a virar de color de blanco hacia amarillo hasta tornarse rojizo y es imposible reconocer la seta original (72). Dicho esto, algunos elementos a tener en cuenta cuando se desea identificar mediante técnicas de biología molecular, es de gran relevancia la correcta elección de la muestra de partida, siendo preferible setas jóvenes. La temperatura en el momento de la recolección puede conllevar a que el hongo en cuestión no se encuentre en las condiciones deseables dado que se puede encontrar seco, si la temperatura es elevada (73). Adicionalmente, siguiendo la línea de infecciones de hongos debido a otro hongo, los pertenecientes al género *Trichoderma spp.*, son considerados grandes parásitos de hongos como el *P. ostreatus*, formando como característica principal, moho de color verde en el cuerpo de estas setas (74).

4.2.1. Desarrollo de árboles filogenéticos a partir de las secuencias obtenidas de las regiones ITS

Los árboles filogenéticos son representaciones esquemáticas de organismos biológicos que están conectados por una descendencia común. El análisis de estos se puede hacer de diversas maneras, en este caso se utilizó *neighbor joining* el cual es un método rápido y actúa mejor cuando la divergencia entre secuencias es baja (75).

En cuanto a los componentes de los árboles filogenéticos, por un lado, se encuentran los nodos terminales (organismos de interés), nodos internos (ancestro común entre dos o más taxones), las ramas (unen los nodos internos) y la raíz (ancestro común que comparten todos los taxones) (76). De todas formas, en los árboles presentados no se incluyó un ancestro común.

4.2.1.1. Árbol filogenético para el género *Trametes spp.* y *Fomitopsis spp.*

En la figura 14 se describe el árbol filogenético que relaciona las secuencias de las muestras aisladas e identificadas en comparación a secuencias de referencia. A su vez, se agregaron los géneros *Alternaria* y *Fusarium* como grupo externo. En primer lugar, se debe de resaltar cómo los dos géneros *Trametes* y *Fomitopsis* se separan, debido principalmente al tipo de hifa que presentan, donde en los *Trametes spp.* posee un sistema hifal trimítico y *Fomitopsis spp.* dimítico. Lo que se debe de destacar es que nuestras secuencias de interés, provenientes de las muestras M1 y LP2 se encuentran ubicadas dentro de ramas correspondientes al género de las mismas, siendo *Fomitopsis sp.* para la primera y *Trametes spp.* para las últimas dos. De esta forma se confirmaría la identificación realizada por la secuenciación de la amplificación de la región ITS.

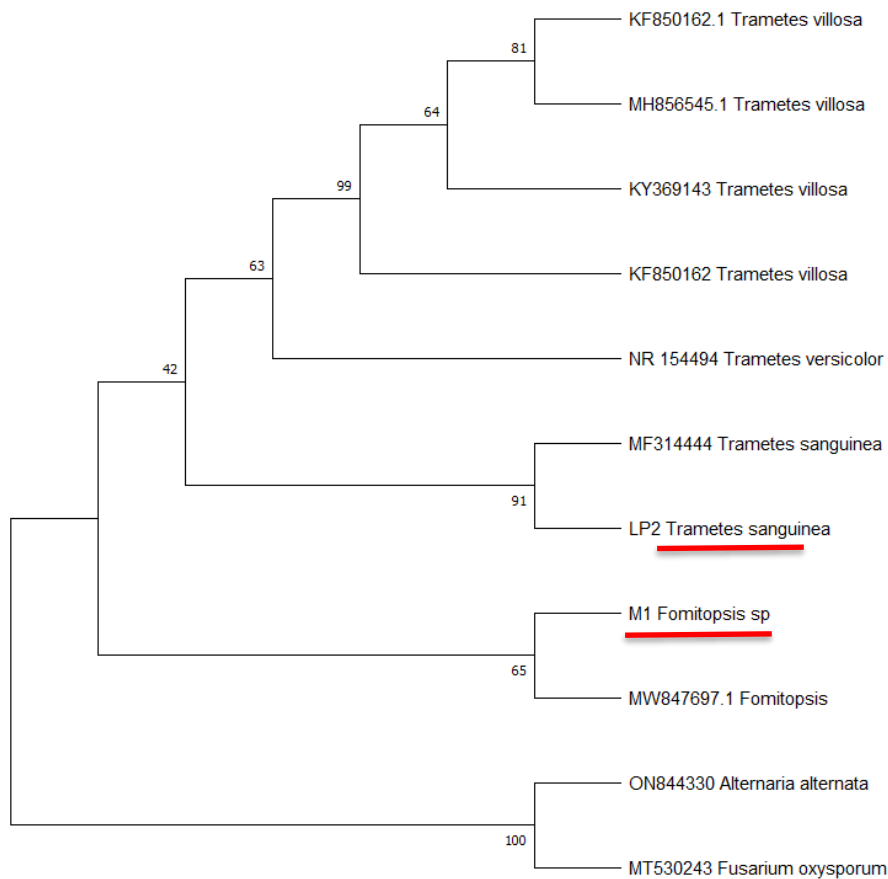


Figura 14: Árbol filogenético mostrando las relaciones evolutivas entre las secuencias de ADNr ITS de las especies del género *Trametes spp.* y *Fomitopsis spp.* Se utilizó la herramienta MEGA para la construcción del árbol, con un *bootstrap* de 1000. Los *contigs* generados se encuentran subrayados mientras que los organismos de referencia están indicados por el *Accession Number*.

Por otro lado, esto también se realizó para el género *Ganoderma spp.* el cual se puede ver detallado en la figura 15.

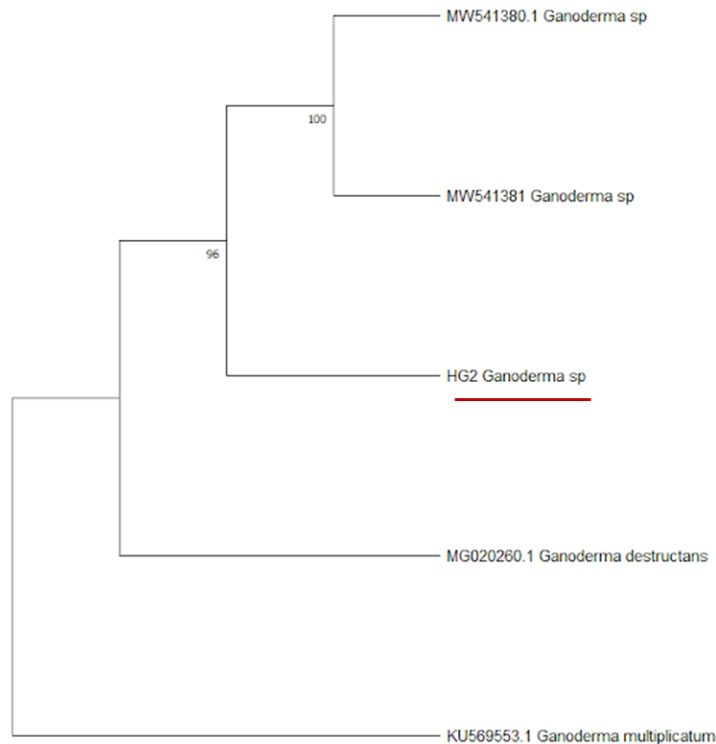


Figura 15: Árbol filogenético mostrando las relaciones evolutivas entre las secuencias de ADNr ITS de las especies del género *Ganoderma spp.* Se utilizó la herramienta MEGA para la construcción del árbol, con un *bootstrap* de 1000. Los *contigs* generados se encuentran subrayados mientras que los organismos de referencia están indicados por el *Accesion Number*.

La secuencia obtenida de la muestra HG2A, la cual a través del *BLAST* se identificó como *Ganoderma spp.*, se utilizó para corroborar la correlación de la misma en este árbol al compararla con secuencias de referencia. Como se puede ver en el árbol de la figura 15, la misma se encuentra posicionada junto a secuencias de referencia correspondientes a dicho género.

Como resultado los árboles filogenéticos realizados corroboran la identificación de las muestras secuenciadas.

4.2.2. Identificación con genes codificantes para proteínas.

Como se mencionó anteriormente, la identificación a través de la región ITS presenta sus limitaciones, es por eso que se evaluó la capacidad de usar otros genes para la identificación molecular, específicamente genes codificantes para proteínas.

El factor de elongación-1 α (EF-1 α) es una proteína altamente conservada que está involucrada en la traducción, uniéndose a aminoacil-ARNt y transportándose a sitio A del ribosoma (77). Se ha demostrado que esta proteína tiene el potencial de ser una herramienta para la clasificación taxonómica de algunas especies como *Fusarium*, por lo tanto, para continuar explorando el potencial de esta región

se buscó analizar los resultados obtenidos de la amplificación de este gen y compararlos con el *barcode* de referencia (ITS) de las muestras de basidiomicetos obtenidos (78).

Para ello, en primer lugar, se puso a punto la PCR con una temperatura de *annealing* de 55°C. Así, se obtuvieron las siguientes bandas de amplificación entre 500 y 700 pares de bases.



Figura 16: Gel de agarosa 1% mostrando las bandas de amplificación de EF-1 α

Si bien EF-1 α es una proteína ubicua que se encuentra ampliamente distribuida entre los eucariotas, se reportó que varios linajes no cuentan con la misma, sino que cuentan con una proteína similar denominada EF-L la cual cumple con las mismas funciones (77). Se propuso que EF-L reemplazó a EF-1 α en varias ocasiones independientes a lo largo de la evolución eucariota y que la transferencia génica lateral entre eucariotas puede estar involucrada en la evolución de EF-L. Dicho esto, es posible que las muestras analizadas que no se haya logrado amplificar EF-1 α contengan esta variación de la proteína. Aunque se hayan encontrado resultados prometedores para la utilización de EF-1 α como gen *barcode*, la ausencia del mismo en algunos linajes presenta una limitante importante para su aplicación. Es por esto que se evalúa también el potencial de otros genes.

El gen de copia única RPB2 codifica para la segunda subunidad de mayor tamaño de la ARN polimerasa II. En comparación a EF-1 α , el gen RPB2 contiene menos intrones y más conservados (79). El gen contiene 5 exones y 4 intrones que generalmente se conservan en basidiomicetos (80).

Los *primers* utilizados fueron f5F y b7.1R, como se observa en la figura 17 amplifican aproximadamente 1200 pb que corresponden al exón 4 y los intrones 3 y 4. Se lograron obtener bandas de amplificación una vez puesta a punto la PCR con una temperatura de *annealing* de 52°C

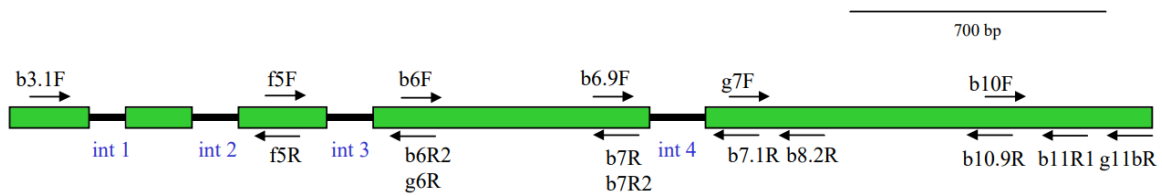


Figura 17: Mapa del gen RPB2 indicando las posiciones de los *primers* más comúnmente usados para su amplificación (75).

En la figura 18 se presentan las bandas de amplificación del par de *primers* f5F y b7.1R.

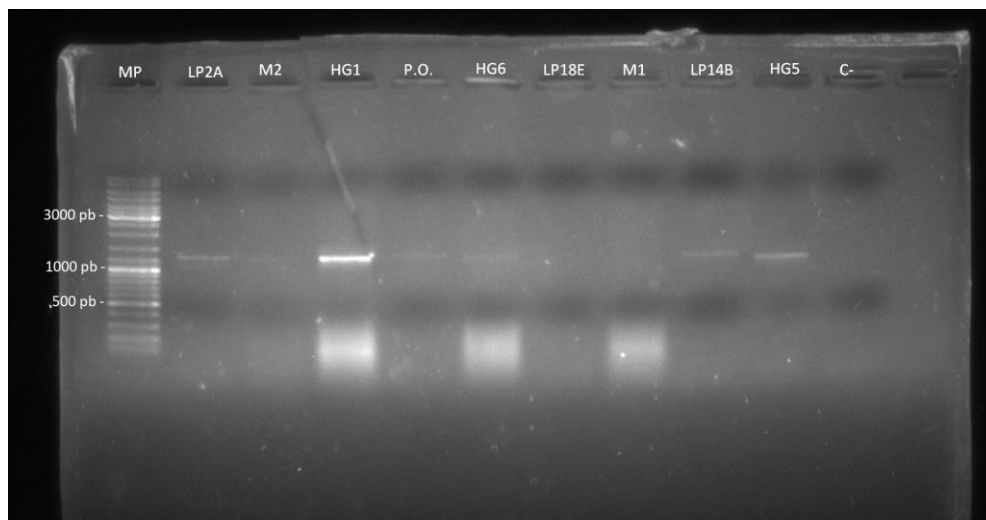


Figura 18: Gel de agarosa 1% mostrando las bandas de amplificación del gen RPB2 con los *primers* b5F y b7.1R

Finalmente, se evaluó la amplificación del gen codificante para β -tubulina con el fin de comparar los resultados obtenidos. Se logró amplificar únicamente dos muestras con los *primers* empleados como se observa en el Anexo 1, LP18A y LP20 previamente identificados como *Trichoderma koningiopsis* y *Fusarium equiseti* mediante ITS. Por lo tanto, no se secuenciaron dichos amplicones.

En la tabla 9, se presenta una comparación de los *BLASTn* realizados con los distintos pares de *primers* para la identificación de especies de hongos.

Tabla 9: Resumen de la comparación de los resultados de *BLASTn* obtenido (nombre científico y porcentaje de identidad) con las secuencias de los amplicones con los distintos pares de *primers*.

Código asignado	ITS 1 - ITS 4		EF-1 α		RBP2	
	Nombre Científico	% de identidad	Nombre Científico	% de identidad	Nombre Científico	% de identidad
Shiitake	<i>Lentinula edodes</i>	99,59%	<i>Lentinula edodes</i>	97,83%	-	-
LP2A	<i>Trametes sanguinea</i>	100%	<i>Trametes sanguinea</i>	97,30%	<i>Trametes sanguinea</i>	98,51%
LP18B	<i>Trametes villosa</i>	100%	<i>Trametes villosa</i>	94,91%	-	-
LP5B	<i>Trichoderma harzianum</i>	100%	<i>Trichoderma zelocharzianum</i>	100%	-	-
M5	<i>Neopestalotia clavispora</i>	100%	<i>Neopestalotia oopsis sp.</i>	99,73%	-	-
LP14B	<i>Fusarium oxysporum</i>	100%	-	-	<i>Fusarium oxysporum</i>	99,91%
HG1	<i>Flavodon flavus</i>	100%	-	-	<i>Odontoefibula orientalis</i>	92,02%
M3	<i>Penicillium sp.</i>	100%	<i>Arcopilus sp.</i>	100%	-	-
M1	<i>Fomitopsis sp.</i>	100%	<i>Fomitopsis sp.</i>	99,77%	-	-
PO	<i>Pleurotus ostreatus</i>	99,53%	<i>Pleurotus ostreatus</i>	100%	<i>Pleurotus ostreatus</i>	100%
HG5B	<i>Penicillium sp.</i>	99,12%	<i>Penicillium rolfsii</i>	98,84%	<i>Penicillium annulatum</i>	99,34%

Con el fin de corroborar de forma más exacta la identificación de las muestras recolectadas, es que se procede a comparar los resultados obtenidos de las secuenciaciones realizadas con diferentes *primers* específicos para esta tarea, lo cual se encuentra presente en la tabla 9.

En primer lugar, con relación a las muestras correspondientes a basidiomicetes, se destaca *P. ostreatus* y *T. sanguinea* las cuales obtienen porcentajes de identidad cercanos al 100% en los tres pares de

primers utilizados para identificarlas. En cuanto a *L. edodes*, *T. villosa* y *Fomitopsis sp.* se obtienen resultados similares cuando se trabaja con las regiones correspondientes a ITS1 - ITS4 y EF-1 α , confirmándose de esta manera la identidad de estas muestras.

Otro dato a destacar es con relación a la muestra correspondiente a HG1. En primer lugar, los resultados obtenidos del análisis de la región ITS arrojan que se trata de la especie *Flavodon flavus* mientras que del análisis con RBP2 se obtiene *Phanerochaete sp.* y *Odontoefibula orientalis*. Estos, si bien son distintos en cuanto a género, los tres comparten orden siendo el mismo *Polyporales*.

A partir de las secuencias obtenidas de la región codificante para EF-1 α se procedió a realizar un árbol filogenético y así comparar las muestras obtenidas con datos de referencia, esto se puede ver en la figura 19. Con relación a esto, se debe destacar el hecho de que se obtienen ramas específicas para cada género y que las muestras de referencia se correlacionan con las obtenidas en la práctica. Adicionalmente, se debe de mencionar el hecho de que la muestra correspondiente a *T. villosa* se encuentra junto a la de referencia correspondiente a esta especie y a su vez está separada de *T. sanguinea*, de distinta manera de lo que se observó al realizar el árbol con los resultados de la secuenciación de la región ITS. Esto nos permite establecer cómo es de gran relevancia realizar prácticas de identificación con varios pares de *primers* de forma de asegurar la identidad de la especie. Similar a esto se puede ver en el trabajo realizado por *Thompson et al.*, en donde evalúan formas en la cual se puede mejorar la sensibilidad del alineamiento de múltiples secuencias, donde destacan que los métodos tradicionales de alineamiento se basan en que las secuencias homólogas están relacionadas evolutivamente. Estos presentan dos grandes problemas que hacen que el desarrollo de árboles filogenéticos no se desarrolle de forma confiable (81).

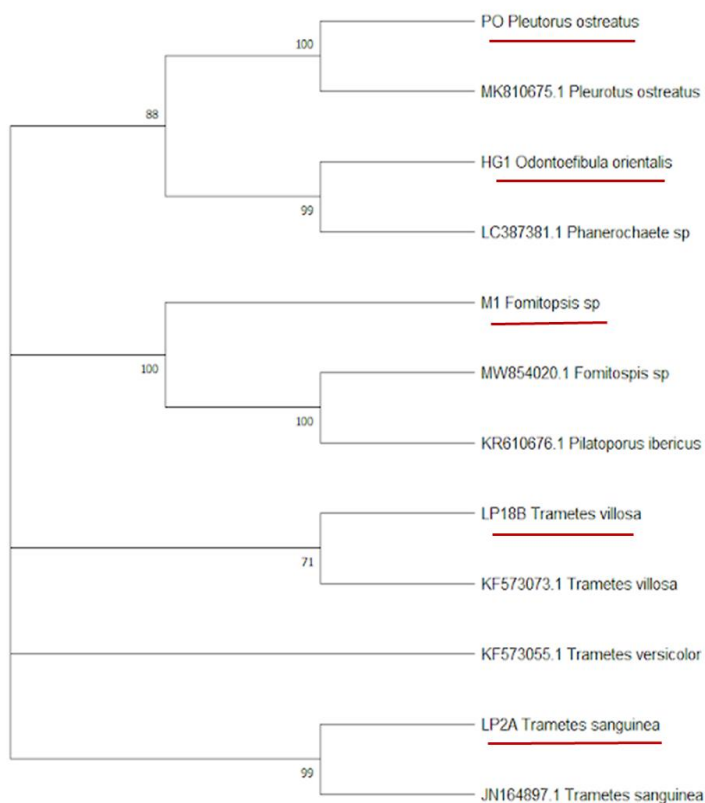


Figura 19: Árbol filogenético mostrando las relaciones evolutivas entre las secuencias del gen EF-1 α . Se utilizó la herramienta MEGA para la construcción del árbol, con un *bootstrap* de 1000. Los *contigs* generados se encuentran subrayados mientras que los organismos de referencia están indicados por el *Accesion Number*.

4.2.3. Identificación de los principales contaminantes encontrados

Durante el proceso de aislamiento, se encontraron varios contaminantes. En la tabla 10 se pueden ver los contaminantes principales encontrados.

Tabla 10: Hongos filamentosos obtenidos de las muestras ambientales recolectadas.

Género	Cantidad de especies
<i>Trichoderma spp.</i>	8
<i>Umbelopsis spp.</i>	4
<i>Mucor spp.</i>	3
<i>Fusarium spp.</i>	3
<i>Penicillium spp.</i>	2

Como se estableció anteriormente, los hongos que pertenecen al género *Trichoderma* se encuentran muy presentes en el suelo e interfieren con el aislamiento de los basidiomicetos. En primer lugar, se

debe de mencionar el hecho de que *Trichoderma spp.* tienen la capacidad de adaptarse al sustrato de forma más acelerada en comparación a los basidiomicetes, lo que permite un crecimiento más rápido. Por último lugar, de acuerdo al trabajo realizado por *Humeres Valenzuela*, se debe de mencionar el hecho de que los hongos filamentosos suelen aprovecharse de los basidiomicetes ya sea mediante el uso de las hifas de estos como sustrato o sino debido a la liberación de toxinas con efectos negativos en los mismos (82). Se observa que la mayoría de los contaminantes encontrados pertenecen a este género, pero fueron fácilmente reconocidos por la utilización del fungicida benomilo. Al crecerse en placas de PDA suplementadas con benomilo, se pudo reconocer los efectos del mismo sobre el micelio e identificar qué se trataba de un hongo perteneciente a la familia *Hypocreaceae*.

En segundo lugar, se identificaron *Umbelopsis spp.* como contaminantes presentes en las muestras de interés, principalmente las especies *Umbelopsis isabellina* y *ramanniana*. Se trata de *Zygomycetes* saprófitos que se encuentran comúnmente en el suelo y las raíces de las plantas (83). Adicionalmente, estos hongos presentan resistencia al benomilo, por lo tanto, no se logró una inhibición exitosa del crecimiento de los mismos (84). Vale destacar que tanto *Umbelopsis isabellina* como *ramanniana* presentan interés industrial, ya que son hongos oleaginosos, es decir que son capaces de producir y acumular lípidos ya que contiene el gen diacylglicerol acyltransferasa 2A (85).

El tercer contaminante identificado fue *Mucor spp.*, zigomiceto de crecimiento rápido que se encuentra en la naturaleza y es común que se encuentre invadiendo placas de medio de cultivo en laboratorios (86). Las especies encontradas en este trabajo fueron *Mucor circinelloides*, *hiemalis* y *fragilis*.

Si bien en este trabajo se evaluó únicamente la actividad antifúngica del benomilo, existen otros como los pertenecientes a la clase de los azoles, los cuales se encargan de suprimir la síntesis de ergosterol, utilizado principalmente para prevenir la presencia de *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.* y *Alternaria spp.* Dentro de esta clase tenemos al triciclazol o al difenoconazol (87). Teniendo en cuenta esto, a la hora de realizar aislamientos en placa de muestras ambientales, se podría combinar con diversos antifúngicos de forma de poder reducir los contaminantes allí presentes sabiendo cuales son y con qué frecuencia se encuentran.

4.2.4. Extracción ADNg a partir de la seta

Para poder identificar molecularmente una muestra ambiental, se requiere de varios pasos previo a la secuenciación, los cuales implican principalmente el crecimiento de éstas en placas con medios de cultivos con antibióticos y antifúngicos específicos que buscan asegurar un cultivo puro. Como se estableció anteriormente, la tarea de obtener el micelio del hongo a partir de una muestra ambiental es trabajosa y muchos factores pueden influir en el resultado final. En varios casos, no fue posible obtener el micelio de interés por la calidad de la muestra y las características de la misma. Por este motivo es que no se logró la identificación molecular en estos casos.

De todas formas, con el objetivo de buscar una forma alternativa de identificar las muestras que no se pueden aislar y sortear etapas, se evaluó la capacidad de poder realizarlo a través de una extracción de ADNg directa de la seta. Dicho esto, se extrajeron 3 muestras y posteriormente amplificaron para

así secuenciarlas. En la figura 20 se puede ver el gel correspondiente a la corrida con las extracciones de las fructificaciones (HG2.F, PO.F y GANO.F). En la misma se ve una banda clara en los carriles correspondientes a estas muestras, indicando que se encuentra el ADN molde de un solo organismo en la muestra, salvo para la muestra identificada como GANO.F en la que se observa una banda difusa que puede indicar que se encuentra más de una especie en la muestra y se amplificaron varias regiones ITS con distinto tamaño. Dado que no pasa por distintas etapas de aislamiento hasta llegar a cultivo puro como se hace en los métodos tradicionales, si la muestra se encuentra contaminada tanto por otra especie de hongo u otros organismos como bacterias o levaduras, eso va a interferir en el proceso y se observará en el gel como en este caso.

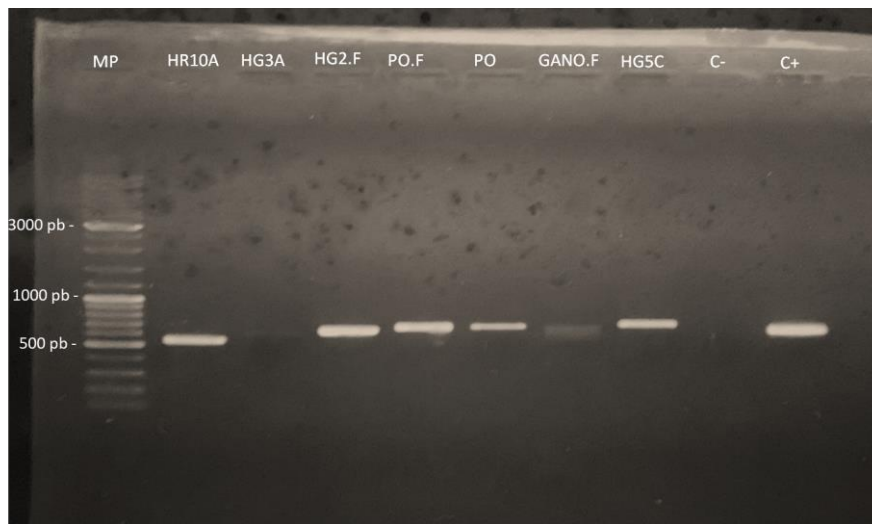


Figura 20: Gel de agarosa 1% mostrando las bandas de amplificación con los *primers* ITS1-ITS4. HG2F, POF y GANOF, hace referencia a extracciones de las fructificaciones.

Al aplicar la herramienta *BLASTn* en la plataforma de *NCBI*, se logró identificar dos de las tres especies evaluadas. En la tabla 11 se ven los resultados obtenidos de la secuenciación.

Tabla 11: resultados obtenidos de la secuenciación de las muestras extraídas a partir de los cuerpos fructíferos

Código asignado	Nombre científico	Query Cover	E Value	Porcentaje de identidad	Largo de secuencia (pb)	Número de Acceso
PO.F	<i>Pleurotus ostreatus</i>	99%	0,0	99,53%	715	MK542618.1
GANO.F	N/A	-	-	-	-	-
HG2A	<i>Ganoderma sp.</i>	100%	0,0	99,84%	619	MW541380.1

Los resultados obtenidos del *BLASTn* se correlacionan en el caso de PO.F y HG2A.F con los obtenidos en la tabla 11 los cuales hacen referencia a las extracciones a partir de muestras proveniente de aislamientos de placas de Petri. En cuanto a la muestra correspondiente a GANO.F, no se obtuvieron

secuencias claras ya que presentaban mucho ruido, lo que puede deberse a que se optó por una parte de la muestra contaminada por algún otro hongo. Este factor se suele sortear cuando se realiza a través de placas, ya que las mismas vienen de un proceso de aislamiento con el fin de tener un cultivo puro.

Se demostró que, por un lado, la extracción de ADNg a partir de muestras ambientales es posible con el Kit empleado. Además, la PCR tiempo final con los *primers* ITS1 e ITS4 no presenta inhibición al utilizar este tipo de muestra y se obtuvieron secuencias limpias en dos de los tres casos estudiados, permitiendo la identificación. Por lo tanto, esta técnica representa una opción para la identificación molecular de setas cuando no es posible el aislamiento. Es relevante destacar que su efectividad estará sujeta a la calidad de la seta en cuestión, ya que si ésta presenta contaminantes no se logrará el resultado deseado. Con relación a estos, se hace referencia a hongos filamentosos como *Trichoderma spp.* el cual es propenso a infectar otros basidiomicetos o levaduras las cuales pueden amplificarse utilizando el *primer* ITS 1 (88).

4.3. Caracterización de los aislamientos

Si bien la caracterización mediante técnicas de biología molecular brinda información acerca de con qué tipo de hongos estamos tratando, es de gran utilidad encontrar otras estrategias que brinden más información sobre los mismos. Una forma es mediante un screening con diversos medios de cultivo que sean indicadores para la producción de enzimas de interés. A raíz de esto se puede profundizar aún más teniendo en cuenta qué hongos son capaces de producir ciertas enzimas y qué utilidad se le puede dar a los mismos.

Este trabajo se centró en determinar, de aquellos basidiomicetos identificados anteriormente, cuales producen las enzimas lipasas, lacasas y fosfatasas gracias a la relevancia que presentan estas en diversas industrias. En la tabla 12 se detallan los resultados obtenidos de dicho *screening*.

Tabla 12: Resultados obtenidos de los hongos evaluados para lacasas, lipasas y fosfatasas.

Especie	Enzima evaluada		
	Lipasas	Lacasas	Fosfatasas
<i>Lentinula edodes</i>	+	+	+
<i>Trametes sanguinea</i>	-	+	-
<i>Pilatoporus sp.</i>	-	+	-
<i>Trametes villosa</i>	-	+	+
<i>Flavodon flavus</i>	-	+	-
<i>Physisporinus lineatus</i>	+	+	+
<i>Umbelopsis isabellina</i>	+	N/A	N/A
<i>Fomitopsis sp.</i>	+	+	-
<i>Pleurotus ostreatus</i>	+	+	-
<i>Ganoderma sp.</i>	N/A	+	+
<i>Phlebopus mexicanus</i>	N/A	+	+
<i>Aspergillus awamori</i>	N/A	-	+

4.3.1. Identificación de las cepas productoras de lacasas

Para evaluar la presencia de dicha enzima en los hongos aislados se trabajó con dos medios distintos. El agente indicador utilizado fue por un lado ABTS y por otro guaiacol (89, 90). En lo que respecta al primero, este cambio de color se debe a que en presencia de la lacasa este compuesto es oxidado al catión ABTS, cuyo formato solo se puede ver en sustratos fenólicos, dando como resultado un color verdoso (91). Por otro lado, el guaiacol es oxidado en presencia de dicha enzima lo que genera que el medio se tiñe de un color rojizo (92).

En la figura 21 se puede ver una representación de lo que serían hongos que fueron capaces de producir lacasas.

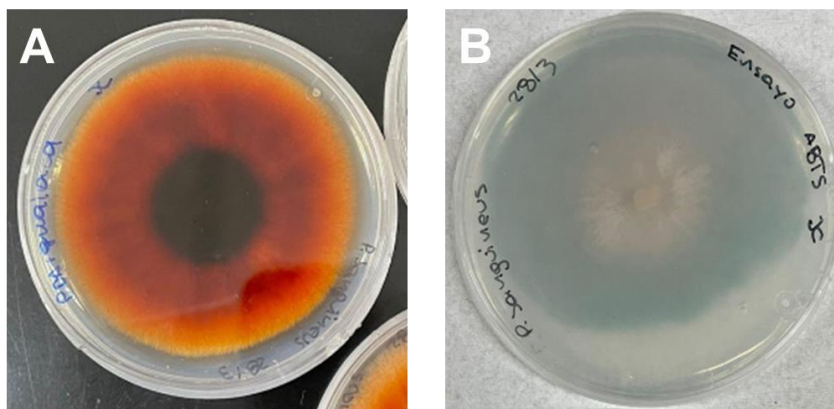


Figura 21: Resultados obtenidos de placas positivas para la presencia de lacasas correspondientes a *P. sanguineus*. A) Presencia de lacasas identificadas con guaiacol. B) Presencia de lacasas identificadas con ABTS.

En primer lugar, se debe de mencionar que se trabajaron con estos dos medios de forma de tener un control en cuanto a aquellas muestras que resultaron ser productoras de dicha enzima. Con relación al ensayo con ABTS, este es un compuesto químico altamente utilizado en el área de la enzimología, específicamente gracias a su gran sensibilidad por lo que, a concentraciones bajas de este compuesto, ya se podría ver una tinción en las placas debido a la presencia de lacasas.

En cuanto a los resultados obtenidos, se podría estimar que la amplia vastedad de los hongos evaluados son capaces de producir de forma extracelular esta enzima. De todas formas, se puede denotar una excepción a la regla, siendo esta que *A. awamori* no se denoto un cambio de color en el medio de cultivo lo que indicaría una ausencia de dicha enzima. Esto no se correlaciona con lo encontrado en bibliografía ya que ensayos como el de *Abduh et al.* en el cual, gracias a la presencia de lacasas en *A. awamori*, evalúan el tiempo óptimo de fermentación sólida de dicho hongo en corteza de canela con el fin de degradar el contenido lignocelulósico (93). Este género es conocido por sus propiedades de degradar este tipo de residuos, además del potencial que tienen de sobre expresar dicha enzima cuando se realizan ensayos de clonado o expresiones heterólogas de diversos genes (94). De todas formas, esta no expresión se puede deber al hecho de que dicha enzima se encontraba inactiva, como es el caso del trabajo realizado por *Clutterbuck et al.* en el cual evaluaron la falta de lacasas en unas mutantes de *Aspergillus* que emitían esporas amarillas (95).

En cuanto a aquellos en los que se denota la presencia de la enzima, se correlaciona con el hecho de que son hongos conocidos por ser descomponedores de madera, por lo que la presencia de lacasas es esencial para degradar este tipo de sustratos (96). Un ejemplo de estos es el *Trametes villosa* donde en el trabajo realizado por *Yaver et al.* logran caracterizar y purificar dos lacasas obtenidas de dicho hongo *P. ostreatus* donde *El-Batal et al.* evaluaron la producción de esta enzima y su posible aplicación en la síntesis de nanopartículas de oro (97, 98).

4.3.2. Identificación de las cepas productoras de lipasas

En lo que respecta a la presencia de lipasas, se trabajó con un medio específico el cual, en presencia de esta, se forma un halo transparente alrededor de donde se encontraba el hongo en cuestión. Esto se debe a la hidrólisis del tributirato presente en el medio gracias al accionar de las lipasas (99). En la figura 22 se puede ver un resultado positivo y negativo para la misma.

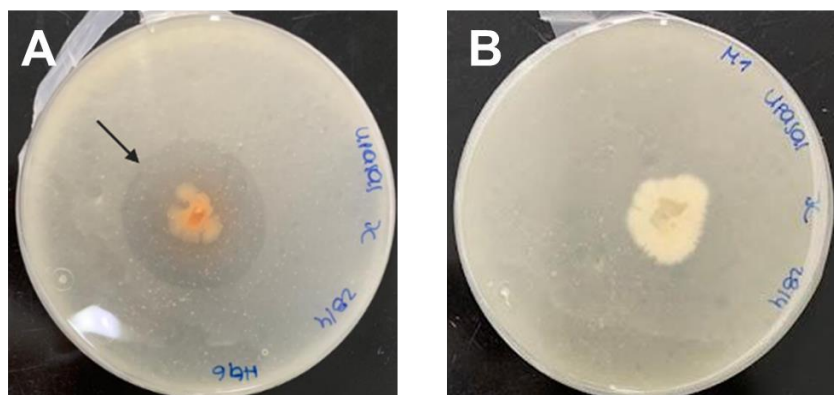


Figura 22: Placas con medio para lipasas. A) Muestra de hongo (*P. lineatus*) positiva para dicha enzima B) Muestra negativa para la presencia de lipasas (*Fomitopsis sp.*).

En lo que respecta a este ensayo, se utilizó un control positivo el cual correspondía a *U. isabellina*, un hongo filamentoso que se lo conoce por sus capacidades de sintetizar biodiesel a partir de lípidos (100).

Dentro de los basidiomicetes capaces de producir esta enzima, se pueden encontrar *L. edodes*, *P. lineatus*, *P. ostreatus* y *Fomitopsis sp.* mientras que *T. sanguinea*, *P. ibericus*, *T. villosa* y *F. flavus* no contarían con la misma (resultados presentes en la tabla 12). En cuanto a los primeros, se correlacionan con lo encontrado en bibliografía. El shiitake es conocido en la industria gastronómica japonesa gracias a su capacidad de reducir la acumulación de grasas mediante la inhibición de la síntesis de ácidos grasos gracias a esta enzima y *Wijayati et al.* utiliza lipasas aisladas del hongo ostra con el fin de sintetizar un surfactante y así reducir las trazas contaminantes que tienen los tradicionales (101, 102). Así mismo, en cuanto a los hongos pertenecientes al género *Fomitopsis sp.* se describe la presencia de esta enzima, específicamente, en el trabajo realizado por *Hima et al.*, donde evalúan la actividad de este hongo sobre diferentes residuos agroindustriales (103).

4.3.3. Identificación de las cepas productoras de fosfatasa

A la hora de evaluar la presencia de enzimas solubilizadoras de fosfato, se trabajó con el medio indicador *Pikovsakaya* el cual tiene como fuente de P fosfato de calcio, gracias al cual, en presencia de la enzima en cuestión, se formará un halo transparente debido a la solubilización de dicho elemento. En la figura 23 se muestra la representación de una placa positiva y negativa para enzimas solubilizadoras de fosfato.

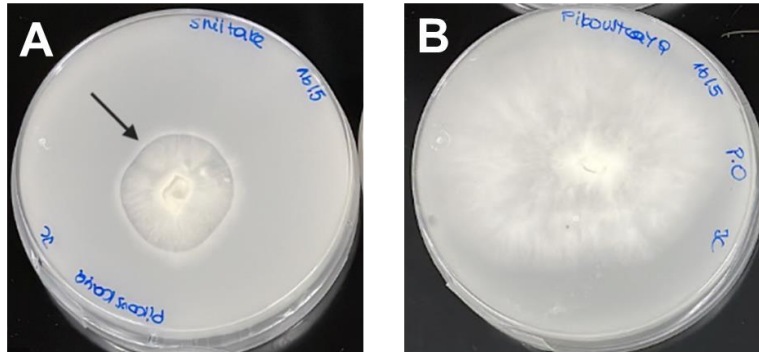


Figura 23: Placas correspondientes al ensayo realizado con medio *Pikovsakaya*. A) Muestra correspondiente al hongo shiitake positiva para fosfatasa B) Muestra correspondiente a *P. ostreatus* negativa para dicha enzima

Tal y como se ve en la tabla 12, las muestras que corresponden positivas para la presencia de fosfatasa son: *L. edodes*, *T. villosa*, *Ganoderma sp.*, *P. mexicanus* las cuales corresponden a basidios y *A. awamori* el cual se utilizó como control positivo ya que es un hongo filamentoso aislado del suelo con potencial solubilizador de fósforo. Este fue obtenido del laboratorio ORT el cual fue aislado de la rizosfera del suelo (104).

En cuanto a los resultados obtenidos, el estudio realizado por *Pal et al.* el cual evaluó el uso de hongos como biofertilizantes en India, concluye que el *P. portentosus*, también conocido como boleto negro, al ser un hongo micorrítico, este resulta ser uno atractivo para su uso, lo cual se puede deber a la presencia de dicha enzima (105). Este resultado se correlaciona con el obtenido con *P. mexicanus* ya que pertenecen al mismo género de hongos. Siguiendo esta línea, *Narh Mensah et al.* realizaron la caracterización y eficiencia bioquímica de *Lentinus spp.* y *Ganoderma spp.* con el fin de evaluar sus capacidades para ser utilizados como biofertilizante para tomates, concluyen que gracias a la potencial de los mismos de solubilizar fósforo, esto estimularía el crecimiento de dicho cultivo (106). Esto es similar a lo obtenido en este ensayo, ya que como se ve en la tabla 12 ambas muestras pertenecientes a estos géneros resultaron positivas para la presencia de fosfatasa y presentan el potencial de estimular el crecimiento de los cultivos solubilizando fósforo.

Para concluir la caracterización enzimática, hay que tener en cuenta que, como se mencionó anteriormente, estas enzimas son de gran relevancia para diversas industrias por lo que identificar otras especies con la capacidad de producirlas es de gran interés. Algo a destacar es que estas enzimas no solo se pueden extraer directamente de la seta, sino como en el caso de la fosfatasa, se pueden encontrar en el pan post cosecha. Este se podría aplicar directamente en los suelos para favorecer la solubilización de fósforo, o se podría extraer la enzima, purificarla y caracterizarla con mayor detalle para su posterior aplicación en productos agropecuarios.

4.3.4. Evaluación de la capacidad de distintos hongos de micorremediar glifosato

Una vez establecida la importancia de las enzimas de los basidiomicetos estudiados, principalmente aquellos de podredumbre blanca, es que se buscó demostrar una posible aplicación en micorremediación. Se ha demostrado que enzimas lignocelulósicas como las lacasas y manganeso peroxidasa (MnP) tienen la capacidad de degradar glifosato a AMPA, el cual es uno de los pesticidas más distribuido actualmente (107). Por esto es que se buscó evaluar la capacidad de los hongos caracterizados de crecer en presencia de dicho herbicida. Se realizó un *screening* para encontrar aquellos aislamientos que toleran la presencia del pesticida en dos concentraciones diferentes, 1mM y 10 mM. Se suplementan placas de PDA con estas concentraciones para determinar si hay inhibición por parte del glifosato en el crecimiento de las distintas muestras. En la tabla 13 se pueden ver los resultados obtenidos del ensayo de inhibición de glifosato.

Tabla 13: Resultados obtenidos de la prueba de inhibición del glifosato. “+” hace referencia a que hay crecimiento.”-” es ausencia de crecimiento.

Especie	PDA + 1mM Glifosato	PDA+ 10mM Glifosato
<i>T. villosa</i>	+	N/A
<i>P. ostreatus</i>	+	N/A
<i>U. isabellina</i>	+	+
<i>A. awamori</i>	+	+
<i>Fomitopsis spp.</i>	+	+
<i>P. lineatus</i>	-	-
<i>F. flavus</i>	+	+
<i>T. sanguineus</i>	+	+

De las muestras analizadas, se observa que todas presentan crecimiento en presencia de las diferentes concentraciones de glifosato, a excepción de *P. lineatus* el cual a lo largo de los días no mostró desarrollo de micelio en la placa. Además, fue *Trametes sanguinea* la muestra que presentó una colonización completa de la placa más temprana. De todas formas, en lo que respecta a las muestras que mostraron tolerancia frente al herbicida, esto no implica directamente que el glifosato sea degradado en alguna medida, sino que este no alteraría en la velocidad de crecimiento de dichos basidiomicetos. Para evaluar la micorremediación del pesticida, se seleccionan 3 muestras correspondientes a *T. sanguinea*, *Fomitopsis sp*, *F. flavus*, dado que presentaron un crecimiento más acelerado en el ensayo anterior, y se inocularon en placas de medio MS1 que contienen glifosato como fuente de fósforo.

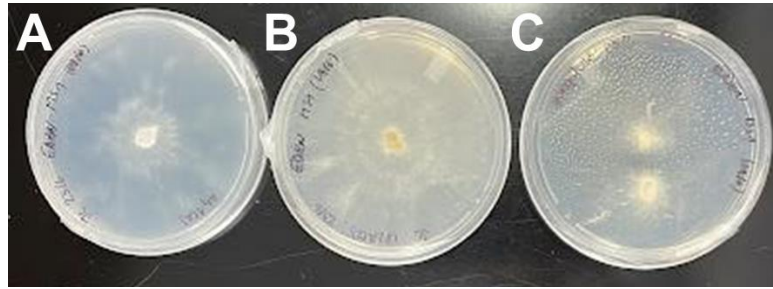


Figura 24: resultados obtenidos de las muestras evaluadas en medio MS1. A) *Fomitopsis* sp. B) *T. sanguinea* C) *F. flavus*.

Los resultados arrojados de este ensayo, indicarían que las tres muestras evaluadas son capaces de utilizar glifosato como fuente de fósforo, ya que lograron crecer en un medio de cultivo con ausencia de este nutriente. Según bibliografía, las lacasas producidas por estos hongos pueden degradar el glifosato presente, liberando así el grupo fosfato. Esta degradación fue observada por *Pizzul et al.* que además lograron aumentar el porcentaje de glifosato degradado con el agregado de Tween 80 debido a una reacción de peroxidación lipídica (107). Por otro lado, se ha reportado que algunas especies son capaces de degradar el glifosato a AMPA y utilizar este último como fuente de fósforo (108). Dado que *Trametes sanguinea* presentó mayor crecimiento en placa en comparación a las dos muestras evaluadas, como se observa en la figura 24, se selecciona esta especie como candidata para ensayos de degradación medio líquido. Como perspectivas a futuro, teniendo la posibilidad de detectar por medio del HPLC la concentración de glifosato y el AMPA generado, se continuaría este trabajo midiendo las concentraciones a lo largo del tiempo.

4.4. Diseño de sistema de fructificación

4.4.1. Obtención de la cepa de *P. ostreatus* y curva de crecimiento

Para obtener la cepa de *Pleurotus ostreatus*, se realizó el aislamiento a partir de una semilla rehidratada. Se obtuvo un cultivo puro y se confirmó la identidad por medio de secuenciación del amplicón obtenido con los *primers* ITS1 e ITS4 (resultados de la amplificación en la figura 25).

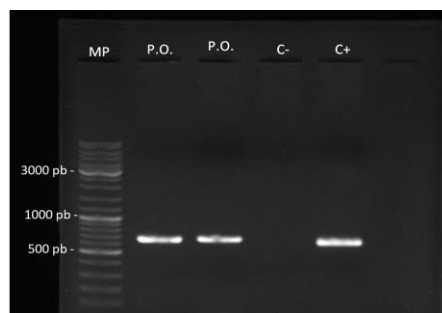


Figura 25: Gel de agarosa 1% con las bandas de amplificación de *P. ostreatus* con los *primers* ITS1-ITS4.

Una vez identificada la especie mediante la herramienta *BLAST*, se preparó el sustrato y el inóculo necesario.

4.4.2. Selección del sustrato

4.4.2.1. Evaluación del sustrato conteniendo granos de café molido

Con el fin de aprovechar la capacidad de *P. ostreatus* de degradar residuos agroindustriales, se evaluó su crecimiento en varios sustratos conteniendo distintas proporciones de granos de café molidos. Este residuo se genera principalmente en cafeterías y restaurantes, y al presentar un alto contenido de fenoles y cafeína, sus potenciales segundos usos se ven restringidos. Generalmente se suele utilizar para compost, alimento de ganado y algunos han comenzado a incorporar como sustrato para el crecimiento de hongos (109). Además, como los granos molidos se exponen a altas temperaturas durante el proceso de preparación del café, se evaluaron distintos métodos de esterilización de los mismos.

En primer lugar, se incorporaron los granos molidos en el día a la mezcla de aserrín autoclavada. En este caso, se evaluaron las condiciones con 30%, 60% y 100% de café. A los 3 días de inoculadas las placas, se observa contaminación en la mayoría de ellas. En la figura 26A, se observa la contaminación presente en la placa luego de 8 días de inoculación.

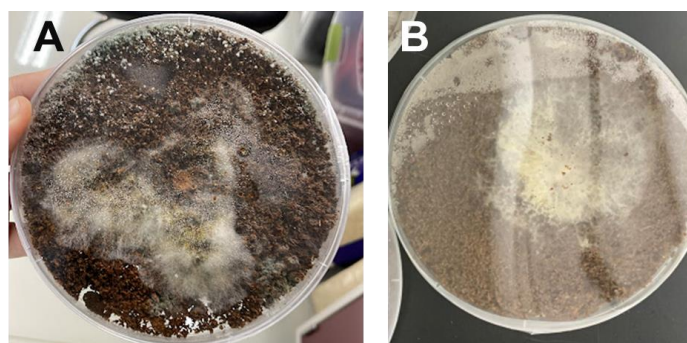


Figura 26: Placas de bagazo de café contaminadas. A) Placa de 60% café realizada con granos molidos sin esterilizar. B) Placa de 60% de bagazo de café pasteurizada.

Dicho esto, se repitió el ensayo sometiendo a los granos molidos a un proceso de pasteurización. Se evaluaron las mismas proporciones de café y se agregó un control sin café con el fin de comparar resultados. En la figura 27 se ve el desarrollo del micelio a lo largo de los días.

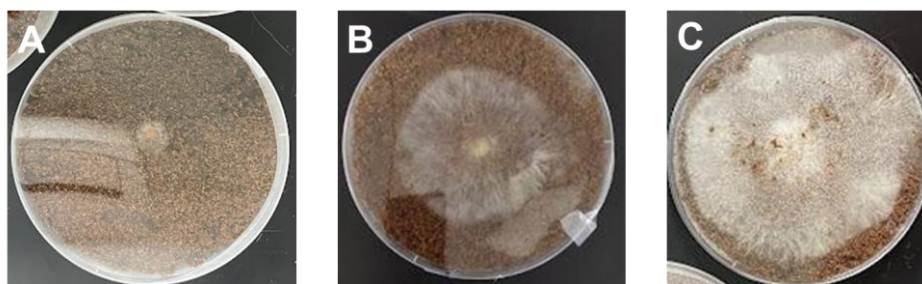


Figura 27: Desarrollo del micelio de *P. ostreatus* en 30% de bagazo de café. A) día 0 B) día 8 C) día 11

Con relación a las concentraciones elegidas, se trabajó con estas ya que se buscaba elegir porcentajes que permitieran un mayor aprovechamiento del residuo en cuestión. De todas formas, el micelio no logró colonizar en la condición conteniendo 100% café y se descartaron las placas. Se continuó el ensayo con las condiciones restantes, correlacionando con bibliografía donde se reporta que no había desarrollo de micelio en concentraciones cercanas al 90% de café (46). Esto se debe por un lado, a que se ha demostrado que la cafeína presente en este residuo inhibe el crecimiento del micelio (110).

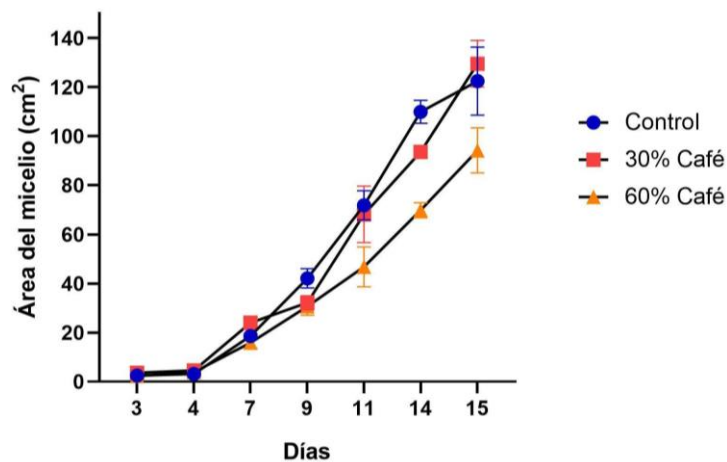


Figura 28: Evolución en el tiempo del área del micelio según el porcentaje de café presente en el sustrato.

Este ensayo se llevó a cabo exclusivamente en placa, de forma de determinar si el bagazo de café estimula o no el desarrollo del micelio. En cuanto a los resultados obtenidos, cuando se utiliza 60% de dicho sustrato, la velocidad de colonización del micelio es más lenta en comparación al control. Adicionalmente estas placas presentaron mayor contaminación como se puede ver en la figura 26 B.

La mayor presencia de contaminantes en esta condición se puede deber a que al contener más porcentaje de café, esto podría acarrear mayores trazas de hongos filamentosos que no son los de interés dado una ineficiente pasteurización. Adicionalmente como se puede ver en la figura 28, la curva de crecimiento asociada al sustrato con 60% de café es más lenta en comparación al resto de las condiciones. Esto se relaciona con lo evaluado por *Chai et al.* en el cual estudian la capacidad de utilizar café (en distintas proporciones) con el fin de fructificar dos especies de *Pleurotus* distintas (*P. pulmonarius* y *P. floridanus*). En el mismo concluyen que en los casos en que las formulaciones contenían un porcentaje de café mayor a 50% w/w, el desarrollo del micelio se veía enlentecido (46). Además, se vio que en las concentraciones más altas de café la actividad de las lacasas disminuye en algunas especies, afectando la capacidad de degradar el sustrato (111).

De todas formas, siguiendo la línea del trabajo realizado por *Chai et al.*, la velocidad de crecimiento sería dependiente de la concentración de café utilizada, siendo estas inversamente proporcional entre sí (46). Resultados similares tienen *Bitew Tarko et al.* en cuál ven que en el ensayo con mayor proporción de café en comparación a los otros componentes el sustrato, el desarrollo del micelio se

veía enlentecido. Mientras que la eficiencia biológica o rendimientos productivos era ampliamente mayor en aquellas con más café llegando a tener más gramos de hongo por cosecha (112).

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, aquella con 60% de café se esperaba obtener mayores rendimientos productivos en un período más largo de tiempo. En este trabajo no se logró observar lo establecido, principalmente por los niveles de contaminación presente en las placas. Si bien el método para la esterilización de este sustrato tiende a ser por pasteurización, este podría haber sido la razón por la cual los resultados no fueron los esperados ya que la misma no habría sido eficiente. El estudio realizado por *Mateus et al.* evalúan diferentes formas de producir hongos de forma rápida y económica utilizando bagazo de café como sustrato variando la forma y tiempo de esterilización de este. Los mismos obtienen que en aquellos casos donde se hierva el café a tiempos menores que 4 horas, se encuentra mayor presencia de contaminantes que al esterilizarse por autoclave (113). La temperatura del agua y la cantidad de tiempo que estuvo la misma en contacto con el café, pudieron haber sido unos de los factores que alteraron los rendimientos productivos de esta condición en nuestro ensayo.

4.4.2.2. Evaluación del crecimiento de *P. ostreatus* en sustratos conteniendo bagazo de cerveza

Se evaluó el crecimiento del micelio en otro residuo industrial de relevancia: el bagazo de cerveza (BC). Para esto, se colocaron los distintos sustratos en placas de Petri de 30 cm de diámetro, se inocularon con discos de agar y se midió el área del micelio a lo largo de los días.

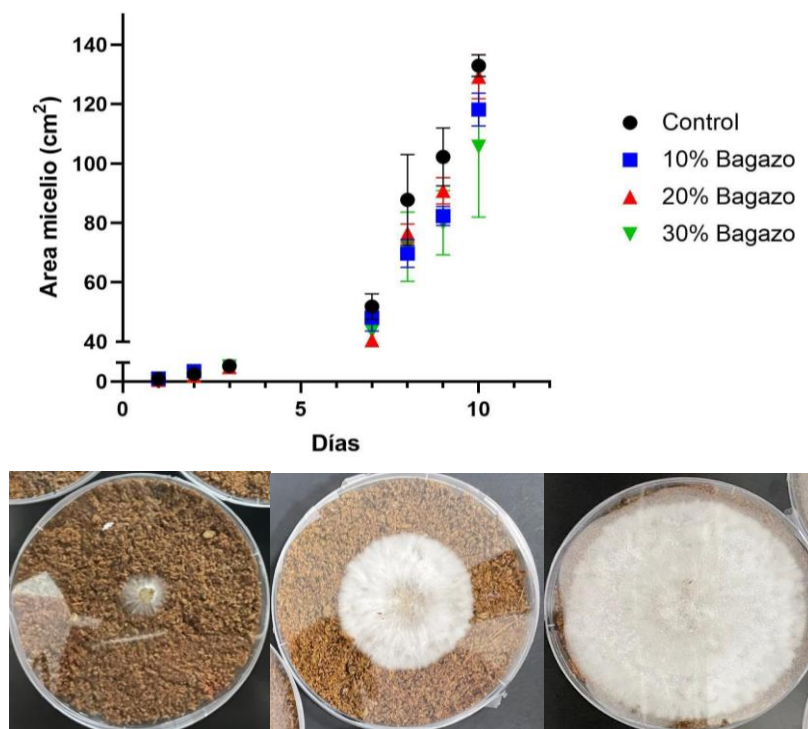


Figura 29: Gráfica de la evolución del área del micelio en función del tiempo según la proporción de BC en el sustrato (arriba) y fotografías de las placas (abajo)

En la figura 29 se observa la evolución del área del micelio en el tiempo según el sustrato. Si bien no se logró detectar con precisión el momento del comienzo de la fase exponencial de crecimiento, se estima que se encuentra entre el día 4 y 6 desde la inoculación. Por otro lado, se denota que las 4 condiciones de sustrato siguen la misma tendencia de crecimiento. La condición que al día 10 presenta menor área de micelio es 30% BC, de todas formas el desvío estándar de este dato es considerable y comprende los datos obtenidos para las otras condiciones. Utilizando otro método para la evaluación de la velocidad de crecimiento, *Gregori et al.* observaron la misma tendencia con proporciones similares de BC (49). Por lo tanto, ya que el agregado de BC no afecta el crecimiento del micelio y no se observó contaminación, se continúa el diseño del sistema de fructificación con estos sustratos.

4.4.3. Preparación del inóculo

En cuanto a la forma de inoculación del sustrato, existen diversos enfoques que pueden llevarse a cabo. Por un lado, la preparación de la semilla que consiste en micelio crecido en granos de cereales cocidos previamente. Una vez colonizados la totalidad de los granos, se utiliza la semilla para inocular el sustrato. Por otro, se puede inocular con cultivo líquido, que consiste en micelio crecido en medio de cultivo líquido. El estudio llevado a cabo por *Silveira et al.*, donde se evaluaron las diferencias de rendimientos obtenidas con inóculo líquido y sólido, determinó que se observan diferencias significativas entre las cosechas sucesivas al utilizar un inóculo sólido, pero no se observan diferencias entre los dos métodos de inoculación (114). Por lo tanto, se concluyó que se puede utilizar tanto inóculo líquido como sólido para la producción de *P. ostreatus* con una proporción de inoculación de 5% en peso seco.

En este caso, se seleccionó trabajar con inóculo líquido para acortar los tiempos de producción, reducir pasos y costos. Para esto, se realizó una curva de crecimiento de la cepa de *Pleurotus ostreatus* en un caldo de extracto de malta para estimar con cuánta biomasa se inocula cada bolsa.

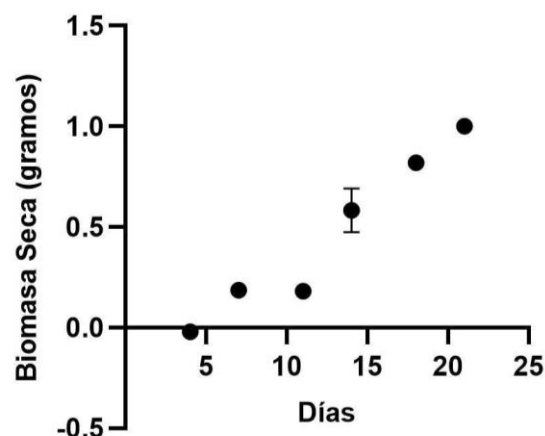


Figura 30: Curva de crecimiento de *P. ostreatus* en biomasa seca a lo largo de 22 días

En primer lugar, en la curva de crecimiento obtenida (figura 30) no se logró visualizar la fase estacionaria por lo tanto debería realizarse nuevamente durante un periodo de tiempo más prolongado.

De todas maneras, sí se logró visualizar la fase exponencial de crecimiento que comienza el día 11. Es importante que al momento de la inoculación el micelio se encuentre en la fase exponencial de crecimiento para obtener la mayor velocidad de colonización del sustrato y mejores rendimientos. Es por esto que la inoculación del sustrato se realizó con el micelio crecido durante 12 días en el caldo extracto de malta. Interpolando a partir de la curva de crecimiento, pasados los 12 días de inoculado el medio, se estima una concentración de 2,2 mg/mL de biomasa seca.

4.4.4. Colonización del micelio y formación de primordios

Luego de 26 días de la inoculación de las bolsas, se observó la colonización completa del micelio representada en la figura 31. Se realizó un corte transversal de la bolsa para permitir la circulación de oxígeno y que la humedad entre en contacto con el micelio para la estimulación de la formación de primordios. Estos últimos se comienzan a observar luego de 5 días en la carpa de fructificación en las bolsas conteniendo 10% y 20% de BC. Tanto para la condición control (sin agregado de BC) y la condición conteniendo 30% del mismo, los primordios se observaron a los 7 días de colocados en la carpa.

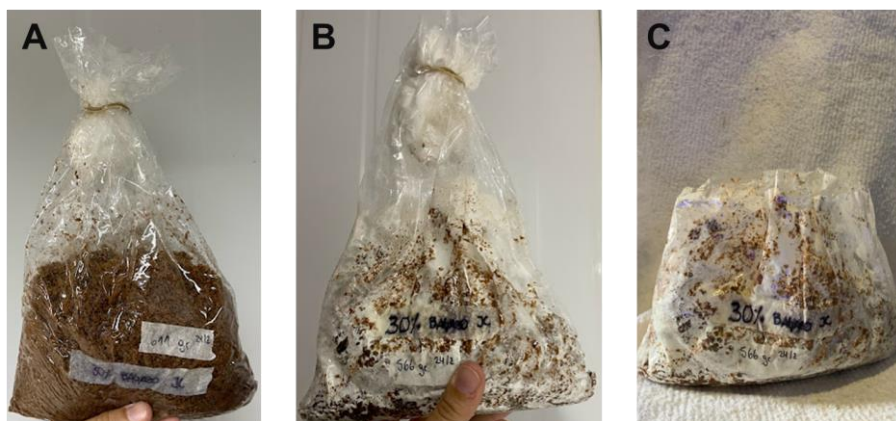


Figura 31: Evolución de la colonización del micelio. A) Día 0 B) Día 17 post inoculación C) 22 días desde el día inoculado.

En la figura 32 se presentan los días de cosechas para las tres cosechas sucesivas realizadas para cada condición.

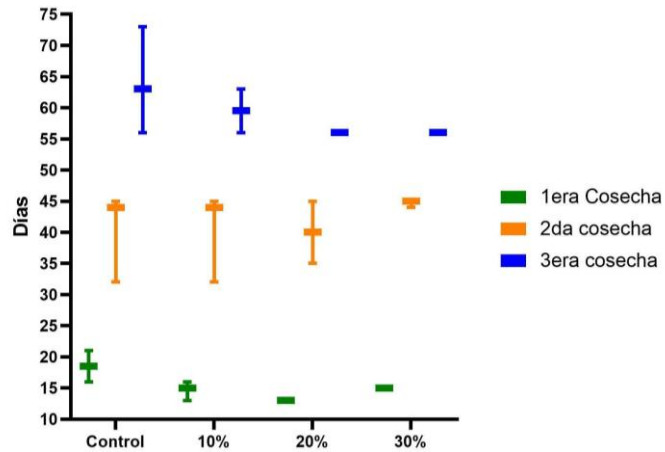


Figura 32: Días transcurridos desde el ingreso a la carpa de fructificación hasta la cosecha de las primeras setas maduras para cada condición.

En la figura 32 se observa que la condición que presenta cuerpos fructíferos maduros más tempranamente es 20% BC. La primera cosecha se obtuvo a los 13 días de ingresadas las bolsas a la carpa de fructificación, mientras que la condición que se cosechó más tarde fue el control, a los 18 días en promedio. En la segunda cosecha, se observa una variabilidad mayor entre las condiciones, dado que cada réplica se cosechó en distintos tiempos. Igualmente, la condición que presentó un tiempo de cosecha menor en promedio fue nuevamente 20% BC, con un promedio de 39 días. Finalmente, en la tercera cosecha se continúa percibiendo la misma tendencia, siendo la condición de 20% y 30% que presentan cosecha más temprana (56 días para ambas) y el control una cosecha más tardía (63 días en promedio).

Estos resultados demuestran que la condición control presenta una fructificación más tardía en comparación a las que contienen BC. Se descarta que esto se deba a la velocidad de crecimiento del micelio según el sustrato, ya que en la figura 29 no se observa que la colonización varíe según el contenido de BC al realizar el ensayo en placa.

Los factores que pueden afectar la fructificación son muy variados. Por un lado, se encuentran los factores extrínsecos como la temperatura, humedad, ciclo de luz, aireación y formato de fructificación. Estos últimos se mantuvieron invariables entre los distintos sustratos, ya que todas las bolsas se encontraban en la misma carpa de fructificación con las mismas condiciones ambientales. Por otro lado, dentro de los factores intrínsecos se encuentra la composición del sustrato, pH, contenido de agua, tamaño de partícula e inóculo (40). En este ensayo se trabajó de forma tal de mantener la menor variabilidad posible de estos últimos factores, asegurándose de homogeneizar el contenido de humedad entre las condiciones ($74\% \pm 3\%$), utilizando el mismo inóculo para cada bolsa y la misma materia prima. Es así que la única variable restante es la composición de sustrato. La única diferencia entre estos es la presencia de BC y la proporción del mismo, lo que lleva a pensar que algún componente de este residuo promueve la fructificación de *P. ostreatus* en las condiciones ensayadas.

Además de evaluar los tiempos de fructificación, se analizó la cantidad de biomasa cosechada por condición. En la figura 33.A. Se observa la biomasa en peso fresco cosechada por condición y por cosecha. Las setas cosechadas tienen un contenido de agua de 84,6% (\pm 4,3%).

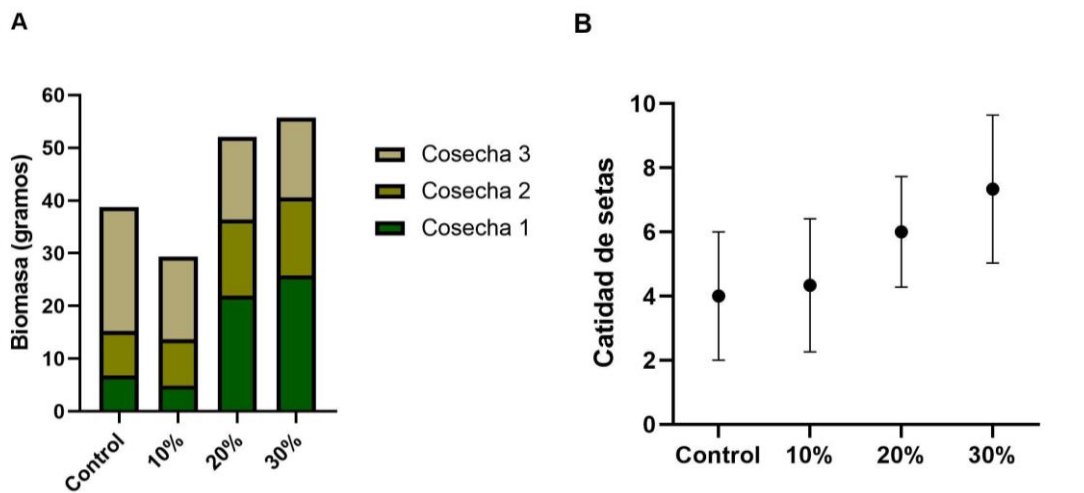


Figura 33: A. Resumen de la biomasa obtenida en las tres cosechas realizadas para cada condición. B. Promedio de la cantidad de setas cosechadas por condición.

Se observa que la condición en la que se obtuvo mayor cantidad de biomasa en peso fue 30% BC, con 56 gramos totales, seguida de 20% BC con 52 gramos. A su vez, se observa que el 46% y 42% respectivamente de la biomasa total se obtuvo en la primera cosecha. Análogamente, para la condición control y 10% BC se obtuvo en primer lugar menos cantidad de biomasa cosechada que en las condiciones anteriormente mencionadas, 38 gramos y 30 gramos respectivamente. Contrariamente a las condiciones con mayor porcentaje de BC, en la primera cosecha se obtuvo un porcentaje bajo de la biomasa total, cosechando la mayor cantidad en la tercera cosecha.

Esto es acorde a lo estipulado anteriormente, ya que el BC parecería estimular la fructificación temprana de *Pleurotus ostreatus*, dado que en las condiciones que contienen una mayor proporción de BC se obtiene un mayor porcentaje de la biomasa total en la primera cosecha. En el contexto de un proceso productivo donde el objetivo es cosechar la mayor cantidad de biomasa lo más rápido posible, el sustrato más adecuado parecería ser 30% BC.

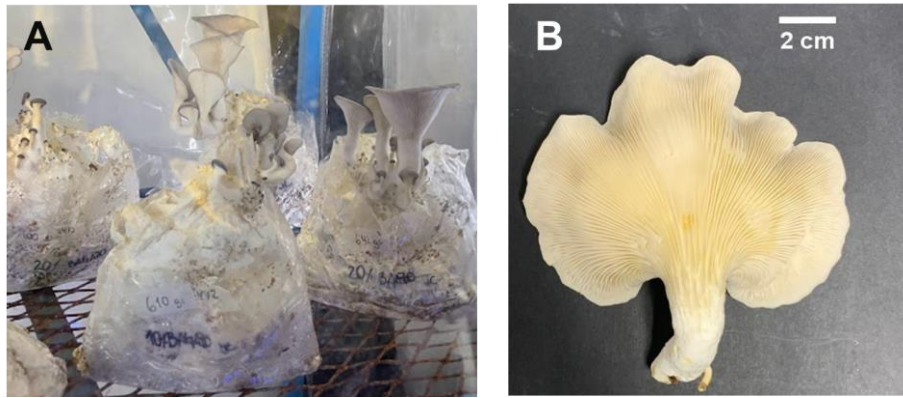


Figura 34: A. Bolsas en la carpa de fructificación. B. Seta cosechada

Dentro de los componentes del BC que podrían afectar la fructificación se encuentran los polisacáridos. Se reporta que el BC contiene celulosa, arabinoxilano, (1–3,1–4)- β -dglucano y trazas de almidón. Los primeros dos polisacáridos comprenden entre el 25 y 28% (p/p) del BC (115). Se ha demostrado que *P. ostreatus* consume durante su desarrollo micelial compuestos fácilmente degradables como hemicelulosa y oligosacáridos y durante la formación de cuerpos fructíferos disminuye el porcentaje relativo de pectinas, oligosacáridos y lignina del sustrato (116). Finalmente, sabiendo que oligo y polisacáridos son fuentes de carbono especialmente favorables para la fructificación, se puede determinar que los efectos observados del agregado de BC al sustrato se podrían deber a los polisacáridos presentes en el residuo que promueven la formación de cuerpos fructíferos (5). Resultaría interesante analizar en detalle la composición del BC utilizado y el consumo de nutrientes del micelio durante el proceso.

4.4.5. Eficiencias biológicas

La forma de calcular la efectividad de la cepa y el sustrato evaluado es utilizando la eficiencia biológica. Esta determina qué porcentaje del peso seco del sustrato se obtuvo como biomasa fresca. En la tabla 14, se presentan las eficiencias biológicas obtenidas para cada una de las tres réplicas realizadas por condición y su promedio.

Tabla 14: Eficiencias Biológicas obtenidas para cada condición

Condición	Eficiencia Biológica de cada réplica (%)	Promedio
	35,3	
Control	32,1	30,1 (± 6,5)
	22,7	
	20,0	
10%	25,5	17,9 (± 8,8)
	8,1	
	26,3	
20%	35,2	28,6 (± 5,8)
	24,3	
	36,6	
30%	29,5	27,7 (± 9,8)
	17,1	

Si bien se encuentra reportado que con un contenido de 10% BC se logró obtener una eficiencia biológica mayor en comparación a otras proporciones de BC, no es posible comparar de forma directa estos resultados ya que no se especifica el formato de fructificación, si se trabajó con bolsas, cómo se realizó el corte de las mismas para favorecer la formación de primordios, no se trabajó con la misma cepa de *P. ostreatus* y las materias primas utilizadas tienen distinta composición (49).

En las condiciones que se realizó este ensayo, se obtuvo que para el control, 20% BC y 30% BC el promedio de las eficiencias biológicas de las réplicas son muy similares (30,1%, 28,6% y 27,7% respectivamente). Por otro lado, se registró una baja eficiencia biológica en la condición 10% BC (17,9% en promedio) en comparación a las anteriores. Las razones asociadas a este bajo porcentaje se deben en primer lugar al estado de las bolsas cuando se encontraban fructificando. Las mismas estaban en presencia de moho (hongos filamentosos como *Aspergillus spp.*), que por bibliografía se sabe que están implicados en una disminución en los rendimientos productivos. El micelio de estos crece de forma más acelerada que el de *Pleurotus sp* (40).

Estos resultados indican que la incorporación de BC al sustrato en una proporción de 20 o 30% no solo es posible, sino que se obtienen EB similares al sustrato estándar compuesto por aserrín y salvado de trigo a lo largo de tres cosechas. Además de esto, se encuentra que el agregado de este residuo estimula la fructificación más temprana de *P. ostreatus* como se mencionó anteriormente. Evidenciada esta promoción de la fructificación, es que se plantea evaluar el rendimiento a lo largo de dos cosechas

en vez de tres, de esta forma reduciendo el tiempo de producción y disminuyendo la pérdida de bolsas de sustrato a causa de la contaminación. De esta forma, se destaca que la eficiencia biológica para las condiciones 20% y 30% BC a lo largo de dos cosechas son respectivamente 20,7% ($\pm 3,8$) y 24,1% ($\pm 6,3$), mientras que para las condiciones Control y 10% BC son 11,3% ($\pm 0,5$) y 11,4% ($\pm 3,3$) respectivamente. En este caso, si se evidencia una diferencia significativa entre las condiciones 20% y 30% respecto al control y 10% BC, permitiendo así tener eficiencias más elevadas y reducir el tiempo de producción. A futuro, se podría evaluar si esta tendencia se continúa observando a mayores proporciones de BC o si se observa un estancamiento o efecto negativo en la producción a determinada proporción de este residuo.

4.4.6. Soportes reutilizables

Si bien las bolsas son el soporte de fructificación más distribuido para la producción de hongos, son el principal residuo generado en el proceso después de las camas post cosecha. Existen distintas opciones de bolsas, pero la mayoría de ellas no son biodegradables presentando un problema mayor para su disposición. Dicho esto, se busca reemplazar este soporte para minimizar la generación de residuos. Para esto se plantean dos tipos de soportes reutilizables: botellas de vidrio y contenedores de plástico. El primero se trata de una botella con tapa de plástico a la cual se le realizaron dos orificios: uno de 2 cm de diámetro que se tapa con algodón para permitir la respiración del micelio, y otro de 1 cm de diámetro que se cubre con silicona para la inoculación con jeringa. La botella tiene una apertura de 7 cm de diámetro. La ventaja de este soporte es que se puede autoclavar junto con el sustrato, pero por otro lado, ofrece una sola apertura para la fructificación limitando la cantidad de hongos que se pueden obtener por cosecha. El recipiente de plástico por otro lado presenta 4 aperturas circulares de 4 cm de diámetro, dos en cada cara del recipiente. Además, cuenta con dos aperturas de 1 cm de diámetro en cada costado para favorecer el flujo de oxígeno y la respiración. En la figura 35 se muestran los dos tipos de soportes mencionados anteriormente.

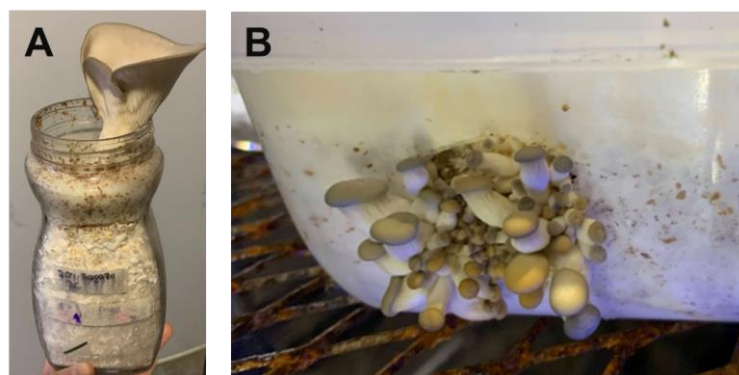


Figura 35: Imágenes de los soportes reutilizables empleados. A) Botella de vidrio. B) Contenedor de plástico

Para este experimento, se utilizó el sustrato 20% previamente analizado ya que presenta los tiempos de cosecha más rápidos. Cada recipiente se evaluó por duplicado, y se observó formación de primordio en cada réplica. Dicho esto, se logró cosechar setas frescas de una sola réplica de cada soporte. Estas

cosechas se realizaron de manera única, a diferencia del ensayo en el cual se analizó la composición de los sustratos donde se realizaron tres cosechas sucesivas. La razón para ello está asociada, principalmente, a problemas con el control de la temperatura en la carpa de fructificación. Los hongos pertenecientes al género *Pleurotus spp.* requieren de una temperatura de entre los 18 - 20°C para la formación de los primordios (117); a la hora de evaluar estos recipientes, se registraron temperaturas menores a las mencionadas anteriormente, por lo que el desarrollo de estos se vio disminuido. Dicho esto, se calcularon las eficiencias biológicas obtenidas utilizando por un lado las botellas de vidrio como soporte y por otro los contenedores de plástico. Se registró una EB de 18% y 16,5% respectivamente, obtenidas según lo recolectado en una única cosecha.

En la figura 33.A. se observa que en el sustrato 20% BC se obtuvo en la primera cosecha el 42% de la suma de biomasa durante las 3 cosechas. Estimando que se observaría la misma tendencia en estos soportes ya que se trata del mismo sustrato, tras 3 cosechas se obtendría una EB de 39% para los contenedores de plástico y 42,4% para las botellas de vidrio. Por lo tanto, se determina que este tipo de recipiente reutilizable es una opción a considerar para reducir los desechos generados en la producción de *P. ostreatus*.

4.4.7. Escalado teórico del sistema de fructificación propuesto

A lo largo del trabajo se propuso un método de inoculación, se estudió el rendimiento de distintos sustratos y se evaluaron distintos soportes para la fructificación de *P. ostreatus*. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, a continuación se propone un sistema de fructificación focalizado en la recircularización de residuos y la reducción de generación de los mismos. Se plantea trabajar con bloques de sustrato de 5 kg, volumen 10 veces mayor al trabajado.

Para la preparación del inóculo, se debe tener en cuenta el volumen de medio de cultivo líquido necesario. En este trabajo se utilizó un inóculo líquido de 0,012 mg biomasa seca/ gramos sustrato a inocular. Por lo tanto, para inocular 5 kg se necesitan 60 mg de biomasa seca. Sabiendo que al crecer la cepa de *P. ostreatus* por 12 días en medio ME se obtienen 2,2 mg biomasa seca/ mL, según la curva de crecimiento de la figura 30, se necesitan 60 mL de inóculo por bloque de sustrato. Este método de inoculación necesita de algunos equipamientos de laboratorio como matraces, autoclave y *shaker* con regulación de temperatura. En el caso de no contar con los elementos anteriores, o si se busca reducir costos, la inoculación con semilla es una alternativa. En este caso se inocula con una relación de biomasa peso seco de 5% (114).

En cuanto al sustrato a emplear, el análisis realizado indica que tanto la condición 20% BC como 30% BC presentan tiempos cosecha más tempranos, buena eficiencia biológica y principalmente se observa que se obtiene mayor cantidad de biomasa en las primeras cosechas. Este último factor es de gran relevancia ya que con este sistema se busca la producción de la mayor cantidad de biomasa en el menor tiempo posible. Dicho esto, se selecciona el sustrato 30% BC por contener la mayor proporción de este residuo manteniendo altas EB.

Dado que el enfoque de este sistema productivo es la minimización de los residuos generados, se opta por el soporte de contenedor plástico. Al contar con cuatro aperturas, este sistema ofrece mayor superficie para la formación de primordios y por lo tanto formación de cuerpos fructíferos. Además, permite la posibilidad de almacenar un contenedor encima del otro, optimizando el espacio en la sala de fructificación. Si bien las EB de los contenedores se estimaron utilizando un sustrato 20% BC, se observó que las EB para los sustratos 20% BC y 30% BC tras 3 cosechas es muy similar (28,6% y 27,7%). Por lo tanto, se estima que se obtendría la misma EB en los contenedores utilizando un sustrato de 30% BC que la EB obtenida con 20% BC.

Dicho esto, según los resultados obtenidos anteriormente se estiman los siguientes datos: con un sustrato de 30% BC utilizando los contenedores como soporte, se estima una EB de 39% a lo largo de 3 cosechas sucesivas, recuperando el 42% de la biomasa total en la primera cosecha a los 15 días de ingresar a la sala de fructificación. Si bien el escalado del proceso no siempre se permite calcular de forma lineal, se puede estimar que en total durante 3 cosechas esto se traduce a 1,95 kg de biomasa fresca cosechada por contenedor, 820 gramos de esta en la primera cosecha. En la figura 36 se presenta el diseño propuesto.

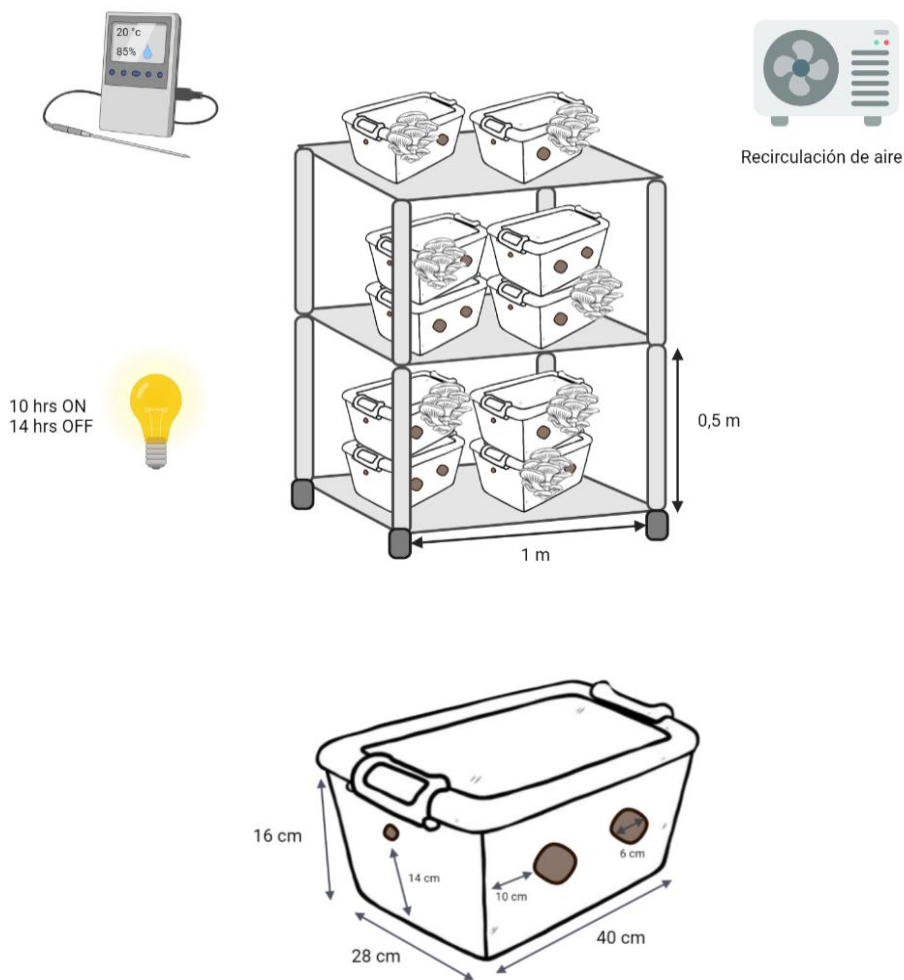


Figura 36: Representación de la sala de fructificación (arriba) y los contenedores reutilizables propuestos (abajo) para la producción de *P. ostreatus*.

Si bien la utilización de este tipo de recipientes necesita de una inversión inicial importante, se requiere únicamente de una instancia de inversión. Por otro lado, el uso de bolsas de un solo uso no solo genera residuos difíciles de gestionar, sino que además requiere de inversiones recurrentes para mantener el stock de las mismas. Esto junto con la mano de obra son los mayores costos económicos del proceso (118).

De todas formas, con este sistema hay que tener en cuenta que se deben esterilizar el sustrato y el soporte por separado, ya que el contenedor plástico no es un material autoclavable. La esterilización del mismo se realiza con hipoclorito 2% y luz UV por 30 minutos. Luego, se cubren las aberturas con gata o algodón estéril y se agrega el sustrato y se inocula. Para inducir la formación de primordios, se retiran las coberturas de las perforaciones.

En la figura 37 se presenta un esquema de la totalidad del proceso productivo propuesto, indicando la entrada de materias primas, salida de producto y equipos necesarios. Dentro de estos últimos se encuentra la sala de fructificación, que hace referencia a un espacio cerrado que mantenga las condiciones ambientales de humedad y temperatura necesarias. Para esto, se necesita un humidificador, aire acondicionado, extractor y sistema de luminaria automático.

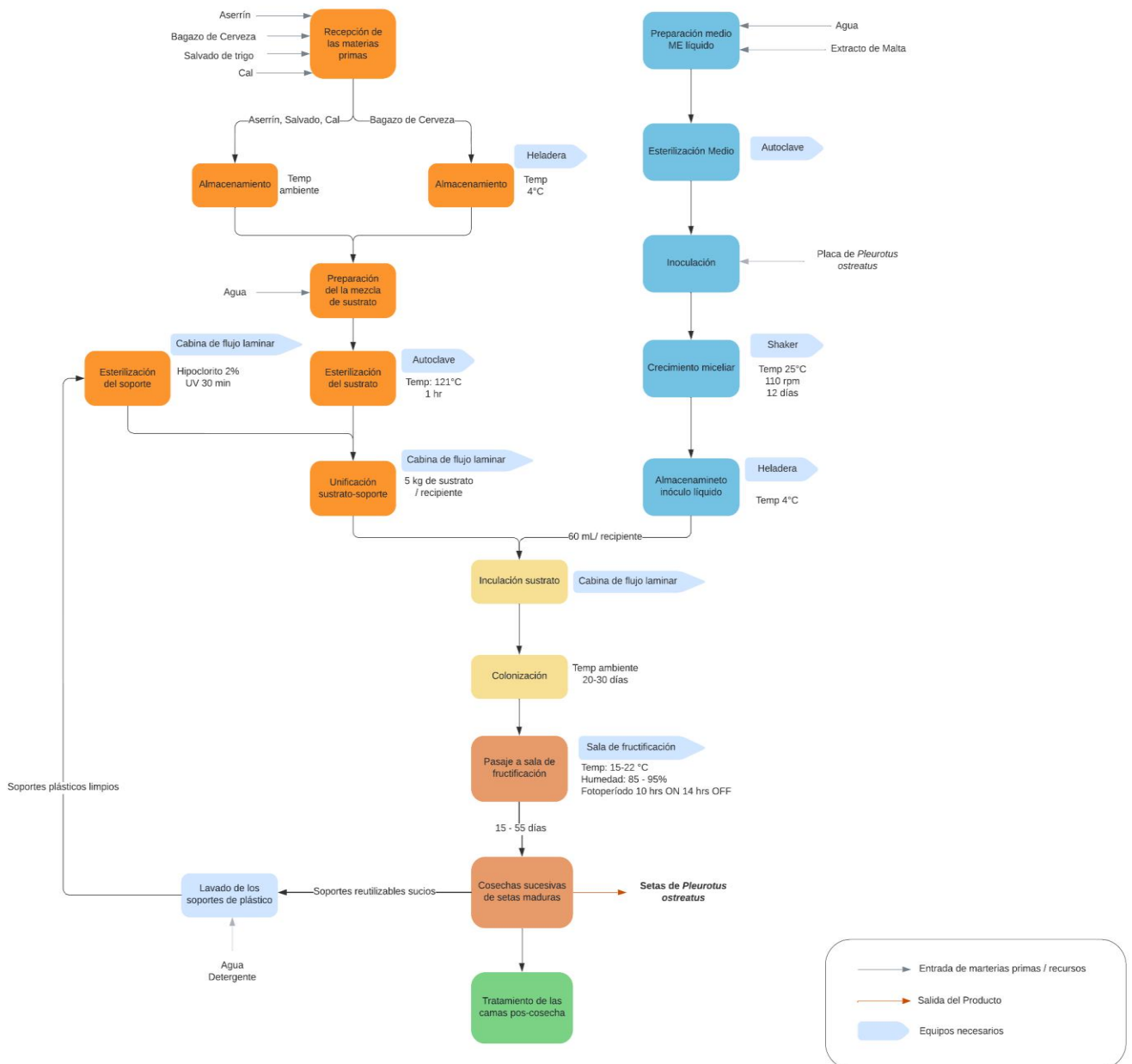


Figura 37: Esquema del proceso planteado para la producción de *Pleurotus ostreatus* indicando las materias primas empleadas y equipos necesarios

4.5. Evaluación de la aplicación del pan post cosecha como biofertilizante

Uno de los residuos obtenidos en la producción de hongos, es el sustrato colonizado por el micelio, llamado pan o camas post cosecha. Las cantidades generadas en esta industria son elevadas,

generándose 5 kg de descarte de sustrato por kilogramo de hongo producido (119). Por este motivo, es de vital importancia implementar aplicaciones para este residuo.

Es así que en este ensayo se plantea evaluar el efecto del pan post cosecha en el desarrollo de dos variedades de plantas: alfalfa y trébol blanco. Se seleccionaron cultivos forrajeros por la superficie que estos ocupan, permitiendo así la aplicación de un mayor volumen de residuos.

4.5.1. Ensayo con semillas de alfalfa

En este ensayo se evaluaron 3 condiciones distintas variando la proporción de pan de hongo incorporado, sembrando la misma cantidad de semillas de *Medicago sativa* en cada una. Luego de 24 días de crecimiento de estos cultivos en los distintos suelos, se evaluó biomasa y largo aéreo y radicular de las mismas.

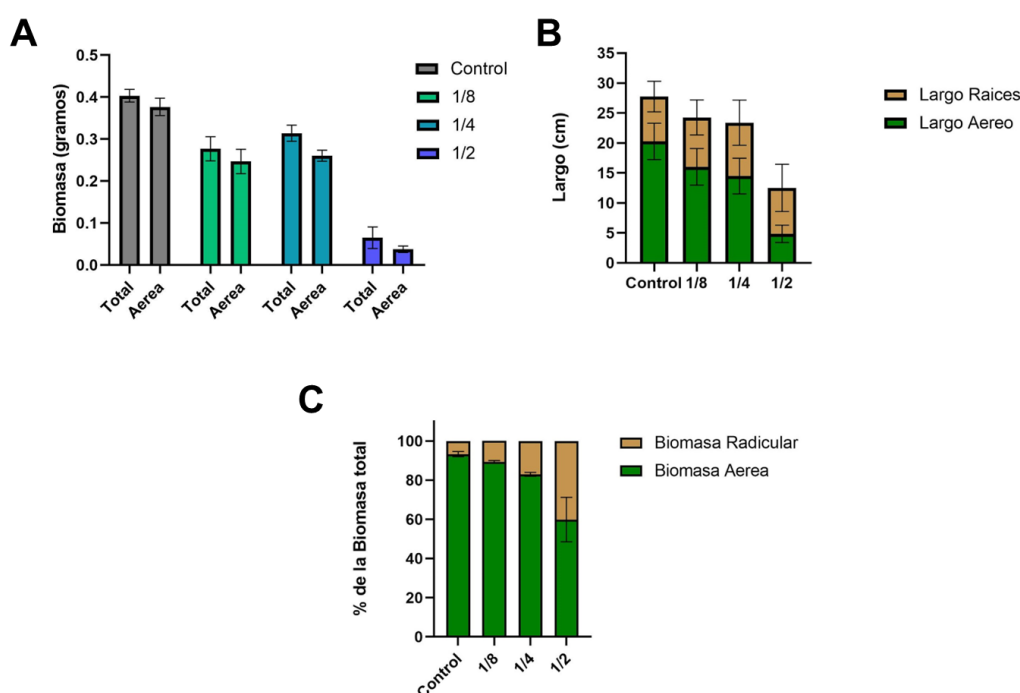


Figura 38: Gráficas correspondientes al ensayo de plantas de alfalfa. A) Biomasa aérea y total (en gramos) obtenidas por condición. B) Medidas de largo total, parte aérea y raíces en cada mezcla C) Porcentaje de biomasa radicular y aérea en comparación a la biomasa total.

En relación a la biomasa total en comparación a la biomasa aérea, como se puede ver en la figura 38.A, el control fue la condición con mayor biomasa total obtenida (0,4 gramos). Por otro lado, la condición 1:2 que contiene la mayor cantidad de sustrato agregado, reporta valores de biomasa hasta 4 veces menor al control, indicando una diferencia significativa con el test estadístico ANOVA (p valor 0,0007). En cuanto a las mezclas 1:8 y 1:4, ambas obtienen resultados similares entre sí que no representan diferencias significativas con el test ANOVA (p valor 0,76), obteniéndose 0,13 y 0,1 gramos de biomasa menos en comparación al control respectivamente. Sabiendo que el único factor que difiere entre las condiciones evaluadas es la presencia del pan post cosecha y en qué proporciones se añadió, se

denota que pareciera haberse encontrado una proporción crítica (1:2) donde la presencia del residuo afecta negativamente el desarrollo de la planta. Esto también se ve reflejado en la figura 38.B donde se presentan las medidas de las plantas cosechadas. Por un lado, se observa que todas las condiciones promedian un largo de raíces similar (8 cm). Sabiendo que el largo de las raíces es un factor asociado al estrés abiótico en estas plantas, y que bajo estas condiciones estas tienden a alargarse, es que se puede relacionar con los resultados obtenidos (120). Si bien, no se observó un cambio en el largo de las raíces, sí se denota el estrés en el largo del follaje de la condición 1:2. Con el mismo largo radicular, se obtuvo únicamente el 20% del largo aéreo en comparación con el control. Por lo tanto, se deduce que la planta en la condición 1:2 se encuentra bajo estrés, que favorece el alargamiento de las raíces pero no así el del follaje. Esto se correlaciona con lo visto en la figura 38.C donde se presenta el porcentaje de la biomasa total que corresponde a biomasa aérea y radicular. Se observa que la condición 1:2 sigue la tendencia establecida anteriormente ya que presenta un porcentaje de biomasa radicular en comparación a la total mucho mayor al resto de las condiciones (40%). Vale aclarar que el pan utilizado contenía fragmentos de paja de gran tamaño que pueden haber causado este tipo de estrés. De acuerdo a la bibliografía, se sabe que las plantas cuando están sometidas a algún tipo de estrés abiótico, el desarrollo de la parte aérea se puede ver enlentecido o inhibido, pero no así la radicular donde hasta en algunos casos puede aumentar (121).

Resultados similares a este, son obtenidos en el trabajo realizado por *Wiafe-Kwagyan et al.* Si bien en este evalúan el desarrollo de tomate y morrón con el pan de hongo, concluyen que concentraciones muy elevadas de este sustrato puede generar menores valores en lo que respecta a la altura de la planta y/o cantidad de hojas (122). Por lo tanto, se podría decir que existe una concentración límite a la cual el pan de hongo actuaría de forma contraproducente para el desarrollo del cultivo, en este trabajo la misma fue de 1:2.

Establecida la concentración crítica de pan en el suelo, se continúa el análisis con las condiciones 1:8 y 1:4. En cuanto a las medidas de las plantas cosechadas en estas condiciones, que se observan en la figura 38.B, se obtuvieron longitudes tanto aéreas como radiculares idénticas (15 y 8 cm respectivamente). En comparación al control, este presenta 5 cm más en promedio de la parte aérea, pero este valor se encuentra dentro de los desvíos de las medidas, por lo que no se puede establecer con claridad una diferencia. La misma tendencia se observa en la figura 38.C ya que las tres condiciones presentan porcentajes de biomasa aérea mayores a 80%, significativamente más elevados que la condición $\frac{1}{2}$.

En resumen, se estableció que al emplear una mezcla de turba:pan post cosecha de *Pleurotus ostreatus* 1:2, se inhibe el desarrollo de la parte aérea de la planta, significando una concentración crítica del residuo. De todas formas, al disminuir la concentración de pan en el suelo, no se presenta dicha inhibición, habilitando la incorporación del residuo en estas condiciones.

4.5.1.1. Evaluación de los valores de clorofila de las plantas de alfalfa

Con el fin de determinar específicamente los efectos fisiológicos que el pan de hongo puede generar en el desarrollo del cultivo de alfalfa, se pasó a evaluar los valores de clorofila a, b y total obtenida en

cada condición. La clorofila es el principal pigmento fotosintético y se ha visto que en aquellos casos donde se utiliza pan de hongo como mejorador de suelo, se obtienen valores de clorofila más elevados que al no agregarlo (123). En la tabla 15 se observan los resultados obtenidos en dichas instancias.

Tabla 15: Efecto del pan de hongo en el contenido de clorofila en el cultivo de alfalfa

Condición	Clorofila A (mg/g)	Clorofila B (mg/g)	Clorofila total (mg/g)
Control	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,122 ± 0,04
1:8	0,240 ± 0,01	0,155 ± 0,07	0,394 ± 0,1
1:4	0,245 ± 0,02	0,146 ± 0,02	0,391 ± 0,07
1:2	0,122 ± 0,04	0,08 ± 0,03	0,206 ± 0,07

Como se puede ver en la tabla 15, al centrarse específicamente en los valores de clorofila total, las condiciones que reportan mayor clorofila por gramo de biomasa son 1:8 y 1:4 (0,394 y 0,391 mg/g). Por otro lado, la condición 1:2 reporta cantidades de clorofila menores (0,206 mg/g), correlacionando con los efectos del estrés establecidos previamente. Finalmente, la condición que presentó menor clorofila por gramos de biomasa fue el control (0,122 mg/g). Roy *et al.* observaron la misma tendencia de aumento de la clorofila al suplementar el suelo con el pan postcosecha, esto se puede utilizar como un indicador de la salud de la planta (123). Por lo tanto, se confirma que el agregado del pan post cosecha en proporciones 1:4 y 1:8 no solo es posible sin afectar la biomasa producida, sino que favorece la salud del cultivo dado los resultados de clorofila obtenidos. De todas formas, se realizó nuevamente el ensayo con un pan post cosecha proveniente del ensayo de fructificación, utilizando otro cultivo y agregando más condiciones para validar lo observado.

4.5.2. Semillas de trébol blanco

Otro cultivo utilizado para evaluar las propiedades del pan de hongo fue el trébol blanco (*Trifolium repens*). Este se destaca en Uruguay, debido a su facilidad de producción, su alto valor nutritivo y su adaptación a suelos ligeramente ácidos y con exceso de humedad (124). Al mismo se le suele agregar NPK como fertilizante con el fin de estimular el crecimiento del cultivo aportándole al mismo nitrógeno, fósforo y potasio.

En cuanto a los fertilizantes, existe una creciente demanda en la producción de alimentos que sean realizados bajo prácticas amigables con el medioambiente, donde uno de los principales elementos a sustituir es los fertilizantes químicos por los orgánicos. La razón principal de ello está asociada al deterioro que estos pueden generar en el suelo, desde una reducción en cuanto a la calidad así como también un aumento en la acidificación del mismo (125).

Teniendo en cuenta el ensayo anterior donde se estableció que una proporción 1:2 de turba:pan inhibe el crecimiento de la parte aérea de la planta, se evaluaron distintas condiciones en este caso. En este ensayo se procedió a evaluar 3 condiciones con agregado de pan postcosecha (1:4, 1:8 y 1:4 + NPK)

y se las comparó con 3 controles: turba (CT), turba suplementada con NPK (Control NPK) y turba suplementada con el sustrato utilizado para fructificar al hongo sin inocular (CS) compuesto por aserrín, salvado de trigo y cal. Se buscó evaluar si el fertilizante (NPK) sumado al pan de hongo genera una promoción de crecimiento para lograr disminuir las cantidades de fertilizante aplicadas al cultivo. El control del sustrato sin inocular se utilizó para evaluar si el sustrato en sí afecta el crecimiento de la planta para asegurarse que los efectos observados se deben únicamente al agregado de sustrato con micelio. Se realizaron triplicados de cada condición, pero se debe de mencionar que de las condiciones $\frac{1}{4}$ y $\frac{1}{4} + \text{NPK}$ se lograron cosechar dos macetas mientras que de las otras condiciones se utilizaron las tres.

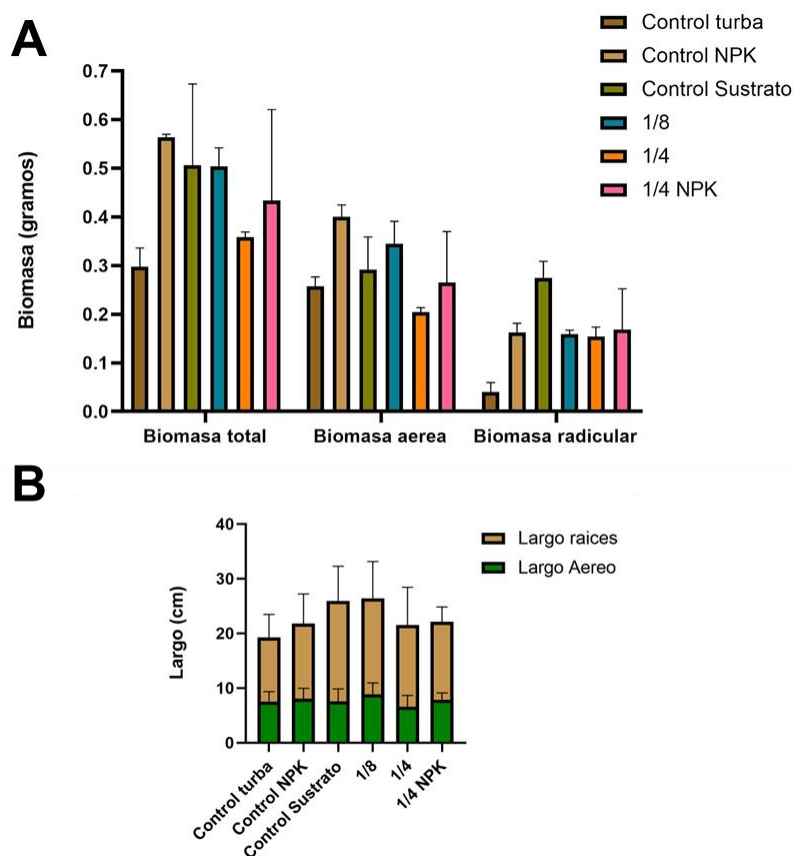


Figura 39: Gráficas correspondientes al ensayo con trébol blanco en las diferentes condiciones ensayadas. A) Biomasa total, aérea y radicular en gramos. B) Largo en cm de las raíces y de la parte aérea

Una vez cosechadas las macetas, se pesó la biomasa total y la aérea, además de medir cada planta. En la figura 39.A, se presentan los valores de biomasa tanto total, aérea como radicular obtenidas en cada condición. En cuanto a la biomasa total, se destacó que la condición control NPK alcanzó la mayor biomasa promedio por planta (0,56 gramos), seguida por CS, 1:8 y 1:4 + NPK, que reportaron valores de 0,5; 0,5 y 0,46 gramos respectivamente. En el caso del control sustrato y 1:4 + NPK, es importante destacar que se obtuvieron desvíos estándar altos, indicando una gran variedad en la biomasa medida.

Aun así, el promedio de los mismos permite analizar estos resultados. La condición que demostró promediar menos biomasa por planta fue CT, reportando 0,3 gramos por planta.

En cuanto a la biomasa aérea, la condición Control NPK y 1:8 de pan fueron las que tuvieron mayores gramos de biomasa aérea por planta (0,4 gramos y 0,35 gramos en promedio). La condición 1:4 es la que tuvo valores inferiores en comparación a la totalidad de las condiciones, obteniendo 0,2 gramos de biomasa aérea/planta, seguida por CT con 0,26 gramos/planta. Esta diferencia fue analizada utilizando el método estadístico ANOVA, a través de la cual se puede estimar que existe una diferencia significativa (p de 0,005) entre la biomasa aérea y radicular en las diferentes condiciones evaluadas. El cultivo de trébol tiene altos requerimientos nutricionales, por lo que se lo suele acompañar con el agregado de fertilizantes como es el NPK (126). Esto se observa claramente en los resultados obtenidos, ya que la condición que contiene únicamente turba es la que reporta menores valores de biomasa. El agregado de NPK mejora notoriamente la biomasa obtenida por planta, al igual que el agregado de 1:8 de pan post cosecha. Al analizarlo a través de ANOVA, se denota una diferencia significativa con un p value de 0,0007 para el primero y 0,0003 para el segundo en comparación al CT. Esto indicaría que el agregado de hongo podría aportar propiedades interesantes y así actuar como biofertilizante.

Sabiendo que el cultivo de trébol necesita de suplementos según los resultados obtenidos, es que se buscó disminuir la concentración de fertilizante a aplicar. Esto se denota en la condición 1:4+NPK, donde se aplicó la mitad de la concentración del fertilizante utilizada en el control NPK. Las principales diferencias entre 1:4 y 1:4+NPK se dieron en cuanto a la biomasa generada, ya que como se observa en la figura 39.B, las medidas de las plantas en estas condiciones fueron iguales (6,5 cm parte aérea y 14,5 cm raíces). De todas formas la matriz estadística ANOVA, a la hora de evaluar la parte foliar y las raíces de estas dos condiciones, describe la presencia de una diferencia significativa con un p value de 0,0039. Esta particularidad podría estar asociada con el hecho de que las muestras evaluadas presentan un gran desvío estándar, lo que podría influir en que a la hora de analizar la gráfica presente en la figura 39.B, no se describa dicha diferencia. En cuanto a biomasa, si bien 1:4+NPK presentó una variabilidad significativa en las medidas, el promedio de estas reporta una biomasa 0,1 gramos mayor. Esta diferencia se observa en la biomasa aérea. Esta es la parte de interés ya que es la que se cosecha, por lo tanto se busca promover la producción de la misma. Por lo tanto, la mezcla de suplementos de hongo y fertilizante promueven el desarrollo del follaje en mayor medida que al utilizar la misma concentración de hongo sola. A la hora de evaluar la diferencia significativa entre la condición 1:4 y 1:4 + NPK, el p value obtenido es mayor a 0,05, por lo que esta no podría asegurarse. La razón principal de ello es la cantidad de datos que se cuenta para analizar estas condiciones, donde en ambos casos se contó con dos macetas lo cual es menor al límite de datos necesarios para realizar este análisis estadístico.

Vale aclarar que con la condición 1:8 se obtienen mayores valores de biomasa que con 1:4+NPK. Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado con relación al efecto de la mezcla de hongo y fertilizante, se podría suponer que al suplementar la condición 1:8 con la mitad del fertilizante recomendado, se observaría una promoción aún mayor del cultivo de trébol. Además, se ha encontrado

que la incorporación de las camas post cosecha en cultivos puede tener un efecto contra las plagas más comunes, como es el caso de *F. oxysporum* en plantaciones de echalotes (*Allium ascalonicum*). Se vio que la incorporación del pan post cosecha de *P. ostreatus* reduce en un 67% la enfermedad causada por este patógeno (127), valorizando aún más la aplicación del residuo en el suelo.

4.5.2.1. Valores de clorofila del trébol blanco

Al igual que cuando se trabajó con el cultivo de alfalfa, se procedió a evaluar los valores de clorofila del trébol. Estos valores se los podría llamar como indicadores de la calidad de la planta y diversos estudios los utilizan para determinar propiedades de inoculantes o fertilizantes y sus efectos en el desarrollo del cultivo (128).

Tabla 16: Efecto del pan de hongo en el contenido de clorofila en el cultivo de trébol

Condición	Clorofila A (mg/planta)	Clorofila B (mg/planta)	Clorofila total (mg/planta)
Control	0,169 ± 0,02	0,023 ± 0,009	0,192 ± 0,03
Control + NPK	0,242 ± 0,09	0,013 ± 0,008	0,254 ± 0,09
Control + sustrato	0,176 ± 0,05	0,025 ± 0,01	0,200 ± 0,06
1:8	0,238 ± 0,07	0,103 ± 0,05	0,268 ± 0,09
1:4	0,146 ± 0,02	0,037 ± 0,005	0,183 ± 0,01
1:4 + NPK	0,218 ± 0,07	0,053 ± 0,01	0,271 ± 0,09

En la tabla 16 se presentan los resultados de clorofila A, B y total en mg de clorofila/planta. Se observa que las condiciones 1:8 y 1:4 + NPK reportan mayores valores de clorofila por planta que en las restantes 4 mezclas. Como los valores de clorofila total son un indicador de la calidad del cultivo, se espera que estos posean mejores capacidades fotosintéticas y así desarrollarse de mejor manera. Por lo tanto, como se estableció anteriormente, el agregado de NPK no solo favorece la formación de biomasa, sino que también mejora la calidad del cultivo.

Además, se observa que en las dos condiciones con agregado de NPK, se obtienen valores elevados de clorofila total por planta (0,271 y 0,254 mg/planta), donde es importante destacar que la diferencia entre estas condiciones no es únicamente el agregado de sustrato con micelio, sino que también la cantidad de fertilizante añadida. La condición 1:4 fue suplementada con la mitad de fertilizante que el control+NPK, y aun así se observaron mejoras en la calidad del cultivo al mismo nivel. Por lo tanto, se detecta el potencial de utilizar esta técnica para disminuir las cantidades de NPK vertidas en el suelo (129).

Sabiendo la cantidad de pan incorporada en cada maceta y el área que representa cada una de ellas, se puede estimar que cantidad de pan se aplicaría por hectárea. Dado que se aplicaron 18,75 gramos de pan por maceta de 706 cm² (15 cm de diámetro), esto se traduce a 2.655 kg de pan por hectárea.

Si bien se deben realizar pruebas de campo para poner a prueba su aplicación en estas condiciones, la incorporación al suelo del pan post cosecha en una proporción turba:pan de 1:8 parece ser una aplicación redituable tanto en cuanto a los efectos del mismo en el desarrollo del cultivo como en las cantidades aplicadas.

5. Modelo de negocios

La alimentación saludable es uno de los factores más relevantes en la sociedad en el día de hoy. Cada vez son más las personas que buscan consumir alimentos orgánicos, optando por una alimentación más consciente. En 2020 la consultora Opción realizó una encuesta con el fin de evaluar los hábitos alimenticios de la sociedad uruguaya en épocas de pandemia y se vio que la misma cambió con respecto a años anteriores. Se destacó la concientización del consumidor sobre los efectos de la alimentación y el aumento de las tendencias saludables (130). Dentro de los productos considerados saludables, uno de los cuales encabeza esta lista son los hongos. La razón principal para catalogarlo de esta forma es por sus aportes nutricionales desde alto contenido proteico pero bajo en carbohidratos (27). El consumo de los mismos se ha visto en aumento junto con la concientización de los consumidores, generando en la actualidad más de 6,2 millones de toneladas cuyo valor se aproxima a los 30 billones de dólares (131).

En Uruguay, se consumen y comercializan varias especies de hongos ya sea silvestres (crecen en montes de pino y eucaliptus) o los cultivados como el shiitake, champiñón o el portobello (132). Dicho esto, las variedades de hongos comestibles que se encuentran en los principales supermercados son muy limitadas. Más específicamente, no se encuentran proveedores de setas de *P. ostreatus*, también conocido como gírgolas grises, que puedan abastecer a los vendedores de variedades gourmet de este tipo de hongo.

Dicho esto, se plantea un modelo de negocios para la venta de hongos gourmet, específicamente gírgolas grises, para abastecer un nicho de mercado que en la actualidad se encuentra insatisfecho. Se propone una circularidad en el proceso donde se aprovechan los residuos emitidos por dos grandes industrias como son la cervecera y la forestal, utilizando de estas el bagazo de cerveza y el aserrín, respectivamente. Adicionalmente, se utilizará el pan de hongo, residuo en la producción de las gírgolas, con el fin de incorporarlo en suelos destinados a la agricultura. Para ello se realizaron diversas tareas de validación y de esquematización, con el fin de poder establecer la existencia del problema y la puesta a punto del modelo de negocio.

5.1. Aplicación del modelo de CANVAS a la producción de gírgolas grises

CANVAS fue desarrollado por Alexander Osterwalder y se trata de determinar y crear modelos innovadores y así generar valor para los clientes. En este se describen 9 bloques en los cuales se describen características esenciales para el desarrollo del negocio. Dicho esto, en la figura 40, se detalla el modelo del CANVAS para la producción y venta de gírgolas grises.



Figura 40: Modelo de negocios CANVAS para la venta de hongos.

Como se puede ver en la figura 40, en la misma se establecen los principales aspectos del negocio y su propuesta de valor. Por un lado, se propone que los clientes sean mercados, restaurantes y clientes independientes y la forma de llegar a estos o los canales de distribución serían por un lado las redes sociales y páginas web y por el otro establecer un servicio de cadetería o centro pick up. Dicho esto, la estructura de costos se centrará en la producción de los hongos y los costos de producción asociados como materias primas, distribución y publicidades; mientras que las fuentes de ingresos se relacionan con la venta de los hongos.

Los socios o aliados clave son esenciales para formar alianzas estratégicas para colaborar en diversos temas como compartir experiencias o recursos. En este caso, se destacan principalmente las empresas generadoras de residuos y las empresas de distribución. Con relación a la primera, nos centraremos específicamente en cervecerías artesanales ya que, a diferencia de empresas más grandes, generalmente no tienen un plan establecido en cuanto al reciclaje del bagazo de cerveza y también en aserraderos cuyo residuo principal, aserrín, si bien hay tendencias de utilizarlo para producir biodiesel por ejemplo, los volúmenes que se generan son relativamente altos por lo que encontrar varios usos para el mismo es de gran interés (133).

En cuanto a las actividades clave, más allá de lo que implica la producción de las góndolas y lo relacionado con investigación y desarrollo, se considera que el marketing o publicidad es esencial para la venta del producto. De esta forma se esperaría una mayor difusión del producto, así como también concientizar y educar al cliente en cuanto a su consumo.

5.2. Validación del problema y del producto

Para validar la existencia del problema y de la solución, se planteó una serie de encuestas distribuidas a través de distintas redes sociales con el fin de abarcar diversos sectores en cuanto a la población uruguaya. En la misma se buscaba evaluar la existencia de una falta en cuanto a las variedades de hongos, la incorporación de este alimento en la dieta de los encuestados y en el caso de no incorporarlos, las razones para ello. Adicionalmente se evaluó qué tipo de hongos suelen consumir, así como también la posibilidad de vender un kit de autocultivo.

En cuanto a los datos recolectados, se lograron encuestar aproximadamente 300 personas, donde la gran mayoría provenían de los departamentos de Montevideo y Salto. De estos, el 80% incorpora hongos en su dieta, mientras que el restante 20% no lo hace porque no sabe cómo cocinarlos (50%) o por la poca accesibilidad al producto (27%), o porque directamente no le gustan (32%). Por otro lado, los que sí consumen lo hacen en formato de hongos frescos, enlatados o al escabeche. Dentro las variedades más consumidas se destacan: los champiñones (94%) y el shiitake (38%). Cuando se les preguntó dónde compran los hongos, la gran mayoría lo hacía en supermercados, almacenes naturales o ferias, así como también restaurantes. Algo a destacar, es que existen quienes los consumen propios de su recolección o de producción propia.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, existe un gran interés por parte de los encuestados en cuanto al consumo de hongos, aquellos que no lo hacen se debe principalmente a la falta de conocimiento. Con relación a esto, se evaluó cuál era la percepción que tenían las personas encuestadas y se vio que, si bien la gran mayoría denota elementos positivos, destacan la falta de conocimiento o lo poco promocionado que se encuentra este alimento en Uruguay. Teniendo en cuenta esto, es que resalta la relevancia de realizar campañas de concientización o educación, haciendo énfasis en formas de cocción o que hongos consumir, así como también los beneficios para la implicados en esto. Es por esto que consideramos que la tarea de marketing y publicidad es de gran importancia para fomentar el consumo de hongos como son las gírgolas grises.

Por otro lado, cuando hablamos de puntos de venta, es relevante mencionar la posibilidad de ofrecer este producto en restaurantes. Dicho esto, se lograron encuestar 5 restaurantes de los cuales 4 ofrecen hongos en su menú. De estos, solo 1 se centra en comida vegana/vegetariana, contando a su vez con una gran variedad de hongos (principalmente de recolección) desde *Pleurotus sp.*, *Lactarius sp.*, *Boletus sp.* entre otros, mientras que los restantes 3 se centran mayoritariamente en champiñones. En cuanto a estos, se vio que existe una falta de especies de hongos (específicamente *Pleurotus sp.*) por parte de los proveedores, lo que hace llamativo ofrecer este producto a los mismos.

5.3. Estimación de costos

Para poner en marcha el sistema de producción planteado en la figura 37, se requiere una inversión inicial que cubra el costo de los equipos necesarios, dos contenedores para la producción, donde en uno de ellos se realiza la preparación del sustrato y del inóculo (*upstream*) y el otro se equipará como sala de fructificación. En la tabla 17 se presentan los costos de la puesta en marcha del proceso.

Tabla 17: Costos estimados para la puesta en marcha del sistema de fructificación diseñado

Etapa	Detalle	Costo (USD)
Inversión inicial	Contenedores	13.000
	Equipos <i>upstream</i>	9.600
	Acondicionamiento sala de fructificación	5.000
	Soporte de fructificación	800
Costos fijos	Recursos (luz, agua)	1.500 / mes
	Mano de obra	2.800 / mes
Costos unitarios	Sustrato	30 / lote
	Empaque	15 / lote

Se parte de la base de que se producen lotes de 10 bloques de 5 kg cada uno cada 10 días. Cada lote produce 20 kg de hongo fresco luego de 3 cosechas, según los resultados obtenidos, alrededor de 50 días. La unidad de venta consiste en una bandeja de 200 gramos de setas, por lo que se producen 100 unidades por lote. Se calcula un precio de 7,3 USD por unidad. Se estima la producción de 50 lotes por semestre, traduciéndose a 360 kg de seta lista para comercializar, o 1800 unidades.

Contando con una inversión inicial de aproximadamente 29.000 USD, y una capacidad de producción de 50 lotes por semestre, según el flujo de caja planteado el período de repago es de tres años y medio.

6. Conclusiones

Según el objetivo planteado en este trabajo, se logró el aislamiento, identificación y caracterización de las muestras recolectadas en distintos puntos del país. Se diseñó un sistema de fructificación utilizando como hongo modelo a *P. ostreatus*, incorporando el residuo de bagazo de cerveza al sustrato y planteando una aplicación del residuo generado en el proceso, esté siendo las camas post cosecha.

En cuanto al aislamiento del micelio de las muestras en placa, se puso a punto un protocolo de tratamiento de las muestras y medios de cultivo a utilizar. Se recolectaron 46 basidiomicetos de los cuales se logró aislar e identificar el 20% de ellos mediante métodos moleculares, donde el 80% restante hace referencia a contaminantes ambientales presentes en la muestra que no se lograron eliminar. En el caso de las muestras que no se lograron aislar, se evaluó realizar extracciones de ADNg directamente a partir del cuerpo fructífero para lograr su identificación mediante métodos moleculares. Para esto es de vital importancia la correcta elección de la muestra de partida, procurando seleccionar aquellas que no contengan contaminantes visibles o parásitos. La identificación de todas las muestras aisladas se realizó utilizando la región ADNr ITS, corroborando la identidad de los basidiomicetos con los genes codificantes para proteínas; RPB2 y factor de elongación-1 α . Además, se establecieron las relaciones filogenéticas de las muestras y se corroboró la pertenencia de cada muestra al género correspondiente. Por lo tanto, se determina que es posible el uso de estos genes tanto individualmente como combinados con otras regiones *barcoding* para la identificación de basidiomicetos, pero no en todos los casos es posible la amplificación de los mismos con un único par de *primers*.

Dentro de aquellos basidiomicetos que pudieron ser identificados, se procedió a realizar un *screening* en medio de cultivo sólido para la detección de lacasas, fosfatasas y lipasas. De las muestras estudiadas, el 90% presentaron producción de la primera enzima, el 55% producción de la segunda y 54% de la tercera. Estas enzimas cuentan con gran interés a nivel industrial y encontrar organismos que las producen puede aportar beneficios económicos para las mismas. A su vez se evaluaron potenciales basidiomicetos para la degradación de glifosato, identificándose como candidato principal *Trametes sanguinea*.

Se seleccionó *P. ostreatus* como hongo modelo para el diseño de un sistema de fructificación utilizando como sustrato bagazo de cerveza en distintas proporciones y aserrín. En cuanto a los tiempos de cosecha, se encontró que las condiciones con 20% y 30% de BC presentan setas maduras más tempranamente que el control y 10% BC. Además, estas dos condiciones generan más biomasa en la primera cosecha en comparación a las últimas dos que reportan mayor cantidad de biomasa en la tercera cosecha. En la misma línea, en cuanto a las eficiencias biológicas de cada condición, se encontró que el control, 20% y 30% BC reportan EB similares (30,1%, 28,6% y 27,7% respectivamente)

mientras que la EB de 10% se vio disminuida por la presencia de insectos (17,9%). Con el fin de evitar el uso de bolsas plásticas desechables para la fructificación, se utilizaron distintos formatos de recipientes reutilizables de vidrio y plástico. Se estimó que las EB de estos luego de tres cosechas serían 42% y 39% respectivamente. Es así que se escaló el sistema de fructificación utilizando los contenedores de plástico como soporte.

Finalmente, se propuso una aplicación para las camas post cosecha generadas durante la fructificación de *P. ostreatus*. Estas se incorporaron al suelo de cultivos de alfalfa y trébol blanco en distintas proporciones. Se determinó que una proporción 1:2 de turba: sustrato en alfalfa inhibe el desarrollo de la parte aérea de la planta pero que una proporción 1:8 no afecta el desarrollo de la misma en cuanto a la biomasa generada y mejora la calidad del cultivo dados los valores de clorofila obtenidos. En cuanto al cultivo de trébol, en primer lugar se confirmó que este cuenta con requerimientos nutricionales específicos que actualmente son cubiertos por la incorporación de fertilizante NPK. Dicho esto, a la hora de evaluar la incorporación de pan de hongo, se vio que la concentración 1:8 de este, aportaría beneficios al cultivo ya que este se desarrolló de forma similar que la condición a la cual se le incorporó dicho fertilizante. Adicionalmente, se evaluó la posibilidad de combinar el agregado de 1:4 de pan postcosecha y la mitad de la concentración de NPK recomendada, observándose mayor biomasa al combinar el pan post cosecha con el fertilizante. Dicho esto, se podría asumir que la incorporación de una menor proporción de NPK a la utilizada comúnmente más una relación 1:8 de pan de hongo, se esperaría obtener una mayor promoción del cultivo. Teniendo en cuenta que el uso del fertilizante puede afectar la calidad del suelo como también los cursos de agua, estos resultados no solo reflejan la posibilidad de aplicar el pan post cosecha en cultivos utilizando una proporción 1:8 de turba/pan, sino que también estimula la agricultura sostenible mediante la disminución de la cantidad de fertilizante necesaria.

7. Referencias bibliográficas

1. Lücking R, Aime MC, Robbertse B, Miller AN, Ariyawansa HA, Aoki T, Cardinali G, Crous PW, Druzhinina IS, Geiser DM, et al. Unambiguous identification of fungi: where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding? *IMA Fungus* 2020 11:1. 2020; 11(1):1–32.
2. Estrada Salazar GI, Ramírez Galeano MC. *Micología General*. Castaño Trujillo C, editor. Manizales: Centro Editorial Universidad Católica de Manizales ; 2019.
3. Naranjo-Ortiz MA, Gabaldón T. Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews*. 2019;94(6):2101–2137.
4. Martínez S. Comunidades de Basidiomycetes lignícolas en bosques nativos de Uruguay y factores que condicionan su composición [dissertation]. Montevideo, Facultad de Ciencias – Ingeniería. 2014
5. Boddy L, Frankland J, van West P, editores. *Ecology of saprotrophic basidiomycetes*. British Mycological Society Symposia Series. 1st Edition. Londres: Academic Press; 2008
6. LibreTexts, Fungi reproduction [Internet]. University of California; Junio 2022 [citado 2022 Ago 9]. Disponible desde: [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Introductory_and_General_Biology/Book%3A_General_Biology_\(Boundless\)/24%3A_Fungi/24.01%3A_Characteristics_of_Fungi/24.1C%3A_Fungi_Reproduction](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Introductory_and_General_Biology/Book%3A_General_Biology_(Boundless)/24%3A_Fungi/24.01%3A_Characteristics_of_Fungi/24.1C%3A_Fungi_Reproduction)
7. Ali MZ. Reproduction of Fungi. June 2013:1–10.
8. Panawala L. Difference Between Plasmogamy and Karyogamy Difference Between Plasmogamy and Karyogamy. *EPEDIAA*. 2017 Mar 31:1–10.
9. Ahmadjian V, Alexopoulos CJ, Moore D. Fungus - Sexual reproduction. Editors of Encyclopaedia Britannica. *Encyclopaedia Britannica*. Londres, 2018.
10. Oberwinkler F. Evolutionary trend in Basidiomycota. *STAPFIA*. 2012; 96; 45-104
11. Kuhar F, Castiglia V, Papinutti L. Reino Fungi: morfologías y estructuras de los hongos Introducción. *Revista Boletín Biológica*. 2013; 28(7):11–18.
12. Redhead S, Arora D, Stamets P, Trappe J, Watling R, Tylutki E, Norvell L, editores. *The journal of wild mushrooming*. Chicago: Mushroom The Journal of Wild Mushrooming, NFP; 2018
13. Carillo L. *Microbiología General*. 1era. Ed. Buenos Aires; Asociación Cooperadora de la Facultad de Ciencias Agrarias; 2015
14. Hibbett DS. A phylogenetic overview of the Agaricomycotina. *Mycologia*. 2006, 98(6):917–925.
15. Uitzil Colli MO. Ectomicorrizas: las redes sociales y nutricionales ocultas en el bosque tropical. *Revista de Biología Tropical*. 2019; 29(5)
16. Moreira Neto SL, Matheus DR, Gomes Machado KM. Influence of pH on the growth, laccase activity and RBBR decolorization by tropical basidiomycetes. *Brazilian Archives of biology and technology*. 2009; 52(2); 1075-1082.
17. Morera G, Lupo S, Alaniz S, Robledo & G. Diversity of the Ganoderma species in Uruguay. *Neotropical Biodiversity*. 2021;7(1):570–585.
18. Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, Oberlies NH. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*. 2017; 80(3):756–770.
19. Horn IR, Verleg PA, Ibrahim NZ, Soeleman K, van Kampen F, Ruesen MO, Reulen NM, Breij H, Bakker RJ, Gravendeel B. Mushroom DNA barcoding project: Sequencing a segment of the 28S rRNA gene. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 2020;48(4):404–410.
20. Stielow JB, Lévesque CA, Seifert KA, Meyer W, Irinyi L, Smits D, Renfurm R, Verkley GJM, Groenewald M, Chaduli D, et al. One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia*. 2015; 35(1):242–263
21. Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, Oberlies NH. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*. 2017 ;80(3):756–770.
22. Xu J. Fungal DNA barcoding1. *Genome*. 2016;59(11):913–932.
23. Hyde KD, Xu J, Rapior S, Jeewon R, Lumyong S, Niego AGT, Abeywickrama PD, Aluthmuhandiram JVS, Brahamanage RS, Brooks S, et al. The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Diversity* 2019 97:1. 2019;97(1):1–136.
24. Hawksworth DL, Lücking R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiology Spectrum*. 2017;5(4).
25. Temesgen T. Application of Mushroom as Food and Medicine. *Advances in Biotechnology & Microbiology*. 2018;11(4).

26. Thakur MP. Advances in mushroom production: key to food, nutritional and employment security: A review. *Indian Phytopathology*. 2020; 73(3):377–395.
27. Wani BA, Bodha RH, Wani AH. Nutritional and medicinal importance of mushrooms. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010;4(24):2598–2604.
28. Uju Obiakor -Okeke P N NL. Nutritional Profile of Three Different Mushroom Varieties Consumed in Amaifeke, Orlu Local Government Area, Imo State, Nigeria. 2014;31.
29. Gorems Woldemariam W. Mushrooms in the Bio-Remediation of Wastes from Soil. 2019; 76.
30. Paredes-Juárez AK, Villegas-Villareal E, Díaz-Godínez R, Díaz-Godínez G. Applications of laccase enzymes of *Pleurotus ostreatus*. *Mexican Journal of Biotechnology*. 2017; 2(1):134–144.
31. Osma JF, Toca-Herrera JL, Rodríguez-Couto S. Uses of Laccases in the Food Industry. *Enzyme Research*. 2010; 2: 1-8
32. Colla LM, Lazzarotto Primaz A, Benedetti S, Loss RA, de Lima M, Oliveira Reinhr C, Bertolin TE, Vieira Costa JA. Selection of Lipase-Producing Microorganisms through Submerged Fermentation. 2010:1–6.
33. Berger RG, Ersoy F. Improved Foods Using Enzymes from Basidiomycetes. *Processes*. 2022;10(4). 1-20
34. Singh MK, Singh J, Kumar M, Thakur IS. Novel lipase from basidiomycetes *Schizophyllum commune* ISTL04, produced by solid state fermentation of *Leucaena leucocephala* seeds. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2014;110:92–99
35. Valenzuela E, Toro V, Martínez O, Pinochet D. Determinación de fosfatasa en hongos de praderas . *Boletín Micológico*. 2005; 20:1–7.
36. Lebrun JD, Demont-Caulet N, Cheviron N, Laval K, Trinsoutrot-Gattin I, Mougin C. Secretion profiles of fungi as potential tools for metal ecotoxicity assessment: A study of enzymatic system in *Trametes versicolor*. *Chemosphere, Elsevier*, 2011, 82(3), 340-345.
37. Jauregui J, Valderrama B, Albores A, Vazquez-Duhalt R. Microsomal transformation of organophosphorus pesticides by white rot fungi. *Biodegradation*. 2003;14(6):397–406
38. Li H, Tian Y, Menolli N, Ye L, Karunaratna SC, Perez-Moreno J, Rahman MM, Rashid MH, Phengsintham P, Rizal L, et al. Reviewing the world's edible mushroom species: A new evidence-based classification system. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2021; 20(2):1982–2014.
39. Kadhila-muandingi NP. Mushroom cultivation: A beginners guide second edition. *Namibian Indigenous Fungi*. 2020;9.
40. Bellettini MB, Fiorda FA, Maieves HA, Teixeira GL, Ávila S, Hornung PS, Júnior AM, Ribani RH. Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2019; 26(4): 633–646.
41. Melanouri EM, Dedousi M, Diamantopoulou P. Cultivating *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* mushroom strains on agro-industrial residues in solid-state fermentation. Part I: Screening for growth, endoglucanase, laccase and biomass production in the colonization phase. *Carbon Resources Conversion*. 2022;5(1):61–70.
42. Kapahi M, Sachdeva S. Mycoremediation potential of *Pleurotus* species for heavy metals: a review. *Bioresources and bioprocessing*. 2017; 4 (32); 1-9.
43. Garzón Gómez JP, Cuervo Andrade PhD JL. Producción de *Pleurotus ostreatus* sobre residuos sólidos lignocelulósicos de diferente procedencia. *Nova*. 2008; 6(10):126-140.
44. Golak-Siwulska I, Kałużewicz A, Spiżewski T, Siwulski M. Bioactive compounds and medicinal properties of Oyster mushrooms (*Pleurotus* sp.). *Folia Horticulturae*. 2018; 30(2): 11-21.
45. Data bridge, Market research. Global oyster mushroom cultivation market – Industry trends and forecast to 2029. Vancouver (Canada); Abril 2022 [citado 2022 Agt 9]. Disponible: <https://www.databridgemarketresearch.com/reports/global-oyster-mushroom-cultivation-market>
46. Chai WY, Krishnan UG, Sabaratnam V, Tan JBL. Assessment of coffee waste in formulation of substrate for oyster mushrooms *Pleurotus pulmonarius* and *Pleurotus floridanus*. *Future Foods*. 2021; 4: 1-9
47. Fan L, Soccol AT, Pandey A, Soccol CR. Cultivation of *Pleurotus* mushrooms on Brazilian coffee husk and effects of caffeine and tannic acid. *Micologia Aplicada International*. 2003; 15(1): 15-21
48. Orfilia M de los Á. De residuo de la cerveza a harina para los panes: ¿qué aporta el bagazo de cebada? . *Ciencia Gastronómica*. 2021 [citado 9 Agt 2022]. Disponible: <https://www.elpais.com.uy/vida-actual/residuo-cerveza-harina-panes-aporta-bagazo-cebada.html>
49. Gregori A, Švagelj M, Pahor B, Berovič M, Pohleven F. The use of spent brewery grains for *Pleurotus ostreatus* cultivation and enzyme production. *New Biotechnology*. 2008;25(2–3):157–161.
50. Jong E, Sayner A. A complete guide to mushroom substrate [Internet]. GroCycle. Devon (United Kingdom): [citado 2022 Agt 9]. Disponible: <https://grocycle.com/mushroom-substrate/>

51. Jong E, Sayner A. A complete guide to mushroom in buckets [Internet]. GroCycle. Devon (United Kingdom): [citado 2022 Agt 9]. Disponible: <https://grocycle.com/growing-mushrooms-in-buckets/>
52. IMARC Group. Mushroom Market: Global industry trends, share, size, growth, opportunity and forecast 2022-2027. Wyoming (United States of America); 2021 [citado 2022 Agt 9]. Disponible: <https://www.imarcgroup.com/mushroom-market>
53. Freundt-Espinosa P. Producción y comercialización de hongos comestibles para el mercado nacional e internacional. Programa Académico de Economía. 2003; 1: 1–175.
54. Morsetto P. Targets for a circular economy. Resources, Conservation and Recycling. 2019;153: 1-12.
55. Tuhy L, Samoraj M, Witkowska Z, Wilk R, Chojnacka K. Using spent mushroom substrate as the base for organic-mineral micronutrient fertilizer - Field tests on maize. BioResources. 2015; 10(3):5709–5719.
56. Pathak P, Singh C, Chaudhary N, Rathi A, Vyas D. Fertilizing with spent mushroom compost. Recent Trends Mushroom Biol. 1st ed., Delhi: Global books Organisation. 2021
57. Choi YW, Hyde KD, Ho WWH. Single spore isolation of fungi. Fungal Diversity. 1999; 3: 29–38.
58. ZymoResearch. Quick-DNATM Fungal/Bacterial Miniprep Kit. 2021. 2 Report No.: 2.
59. Pristas P, Gaperova S, Gaper J, Judova J. Genetic variability in *Fomes fomentarius* reconfirmed by translation elongation factor 1- α DNA sequences and 25S LSU rRNA sequences. Biologia (Poland). 2013;68(5):816–820.
60. Liu Y, Wang S, Yin Y, Xu F. Evaluation of genetic diversity of Chinese *Pleurotus ostreatus* cultivars using DNA sequencing technology. Annals of Microbiology. 2012; 63(2): 571–576.
61. Thermo Scientific. GeneRuler DNA Ladder Mix. 2018. p. 1–3.
62. HIMEDIA. Pikovskayas Agar . Technical Data. 2015
63. Wassie M, Zhang W, Zhang Q, Ji K, Chen L. Effect of Heat Stress on Growth and Physiological Traits of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) and a Comprehensive Evaluation for Heat Tolerance. Agronomy 2019, Vol. 9, Page 597. 2019;9(10):597.
64. Asma M, Lingakumar K. Jasmonate foliar spray induced vegetative growth and pigment composition in *Vigna radiata* L. Wilczek. International Journal of Advanced Research. 2015;3(1):664–669.
65. El-Mougith AA. Effect of benomyl on the growth and lipid composition of *Trichoderma koningii*. Folia Microbiologica 1999;44(1):41–44.
66. Brandt ME. Filamentous Basidiomycetes in the Clinical Laboratory. Current fungal infection reports. 2013; 7(3): 219–223.
67. Ideas medioambientales. La importancia de los hongos en los ecosistemas forestales [Internet]. Castilla-La Mancha (España): Biodiversidad, Consultoría Agroforestal; Junio 2015 [citado 2022 Agt 9]. Disponible: <https://ideasmedioambientales.com/la-importancia-de-los-hongos-en-los-ecosistemas-forestales/>
68. Díaz Moreno R, Marmolejo JG, Valenzuela R. Flora micológica de bosques de pino y pino-encino en Durango, México. Ciencia UANL. 2005; 8(3): 362–369.
69. Osono T, Hitose D. Colonization and lignin decomposition of pine needle litter by *Lophodermium pinastri*. Forest Pathology. 2010; 41(2): 156–162.
70. Pineda-Insuasti JA, Gómez-Andrade S, Soto-Aroyave FJ, Mora-Muñoz ES, Álvarez-Ramos SE. Producción de *Pycnoporus* spp. y sus metabolitos secundarios: Una revisión. ICIDCA. 2017; 51(2): 60–69.
71. Yamanaka R, Soares CF, Matheus DR, Machado KMG. Lignolytic enzymes produced by *Trametes villosa* ccb176 under different culture conditions. Brazilian Journal of Microbiology. 2008; 39(1): 78.
72. Bonito Lab. *Hypomyces chrysospermus*. [Internet]. East Lansing (Michigan): Michigan state university; Febrero 2021 [citado 2022 Agt 9]. Disponible: <https://web.archive.org/web/20200920140103/https://bonito.psm.msu.edu/2018/09/hypomyces-chrysospermus/>
73. Martínez-Ibarra E, Gómez-Martín MB, Arnesto-López XA. Climatic and Socioeconomic Aspects of Mushrooms: The Case of Spain. Sustainability. 2019; 11(1): 1-21.
74. Innocenti G, Montanari M, Righini H, Roberti R. *Trichoderma* species associated with green mould disease of *Pleurotus ostreatus* and their sensitivity to prochloraz. Plant Pathology. 2018. 68(2); 392-398
75. Díaz Granda JL. Caracterización molecular y análisis filogenético de hongos microscópicos asociados a manchas foliares en hojas de uvilla (*Physalis peruviana* L.) en varias localidades del cantón Quito, Pichincha [dissertation]. Quito: Pontificia Universidad Católica del Ecuador; 2016.
76. Mendoza-Revilla J. Aportes de la filogenética a la investigación médica. Revista Medica Herediana. 201; 23(2): 119-127.

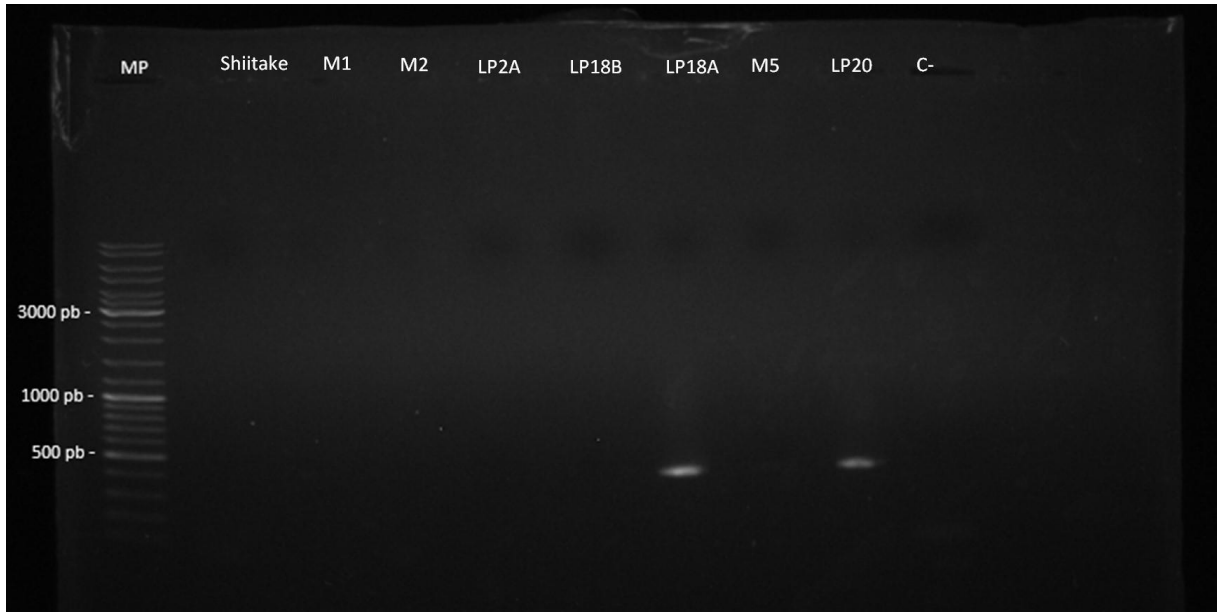
77. Keeling PJ, Inagaki Y. A class of eukaryotic GTPase with a punctate distribution suggesting multiple functional replacements of translation elongation factor 1 α . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004 ;101(43):15380–15385.
78. Kristensen R, Torp M, Kosiak B, Holst-Jensen A. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. *Mycological research*. 2005 ;109(2): 173–186.
79. Brandon Matheny P, Wang Z, Binder M, Curtis JM, Lim YW, Henrik Nilsson R, Hughes KW, Hofstetter V, Ammirati JF, Schoch CL, et al. Contributions of *rpb2* and *tef1* to the phylogeny of mushrooms and allies (Basidiomycota, Fungi). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2007; 43(2): 430–451.
80. Matheny P. PCR primers to amplify and sequence *rpb2* (RNA polymerase II second largest subunit) in the Basidiomycota (Fungi). Biology Department. 2006;1: 1-4
81. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research*. 1994; 22(22): 4673-4680.
82. Humeres Valenzuela CA. Evaluación de la capacidad biocontroladora de dos cepas nativas de *Trichoderma* spp. Sobre aislados de hongos Basidiomycetes asociados a muerte de brazos en Kiwi. Talca: Universidad de Talca; 2004.
83. The Fungal Genomics Resource. *Umbelopsis isabellina* AD026 [Internet]. Los Angeles (California). The Regents of the University of California; 2014 [citado 2022 Agt 9]. Disponible: <https://mycocosm.jgi.doe.gov/Umbisa1/Umbisa1.home.html>
84. Benny GL. Methods Used by Dr. R. K. Benjamin, and Other Mycologists, to Isolate Zygomycetes. *A Journal of Systematic and Floristic Botany*. 2008; 26(1): 1-26.
85. Lardizabal K, Effertz R, Levering C, Mai J, Pedroso MC, Jury T, Aasen E, Gruys K, Bennett K. Expression of *Umbelopsis ramanniana* DGAT2A in Seed Increases Oil in Soybean. *Plant Physiology*. 2008;148(1):89-96.
86. Rodríguez B. *Mucor* spp. Atlas de identificación micologica. 2016 Mar 17
87. Brauer VS, Rezende CP, Pessoni AM, De Paula RG, Rangappa KS, Nayaka SC, Gupta VK, Almeida F. Antifungal Agents in Agriculture: Friends and Foes of Public Health. *Biomolecules*. 2019; 9(10): 1-21.
88. Tadesse BT, Abera AB, Tefera AT, Muleta D, Alemu ZT, Wessel G. Molecular Characterization of Fermenting Yeast Species from Fermented Teff Dough during Preparation of Injera Using ITS DNA Sequence. *International Journal of Food Science*. 2019; 4(7): 1-7.
89. More SS, Renuka PS, Pruthvi K, Swetha M, Malini S, Veena SM. Isolation, Purification, and Characterization of Fungal Laccase from *Pleurotus* sp. *Enzyme Research*. 2011; 11(1). 1-7.
90. Kalra K, CHauhan R, Sachdeva S, Shavez M. Isolation of laccase producing *Trichoderma* spp. and effect of PH and temperature on its activity . *International Journal of ChemTech Research*. 2013: 2229–2235.
91. Gramss G. Reappraising a controversy: Formation and role of the azodication (ABTS 2+) in the laccase-ABTS catalyzed breakdown of lignin. *Fermentation*. 2017; 3(2). 1-18
92. Abd El Monssef RA, Hassan EA, Ramadan EM. Production of laccase enzyme for their potential application to decolorize fungal pigments on aging paper and parchment. *Annals of Agricultural Sciences*. 2016; 61(1): 145–154.
93. Yusuf Abduh M, Yulianto R, Avima D, Abednego Kurio W, Alfianny R. Solid-State Fermentation Of Cinnamon Bark Using *Aspergillus Awamori* To Increase Cinnamon Oil Yield Extracted Using Hydrodistillation, Maceration, And Soxhlet Extraction. *Natural Volatiles & Essential Oils*. 2021; 8(6): 1575–1588.
94. Brijwani K, Rigdon A, Vadlani P v. Fungal Laccases: Production, Function, and Applications in Food Processing. *Enzyme Research*. 2010; 10: 1-10
95. Clutterbuck AJ. Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. *Journal of general microbiology*. 1972; 70(3): 423–435.
96. Abdel-Hamid AM, Solbiati JO, Cann IKO. Insights into Lignin Degradation and its Potential Industrial Applications. *Advances in Applied Microbiology*. 2013; 8(2): 1–28.
97. Yaver DS, Xu F, Golightly EJ, Brown KM, Brown SH, Rey MW, Schneider P, Halkier T, Mondorf K, Dalbøge H. Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996; 62(3) :834–841.
98. El-Batal AI, Elkenawy NM, Yassin AS, Amin MA. Laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its application in synthesis of gold nanoparticles. *Biotechnology Reports*. 2015; 5(1): 31–39.

99. Lizano Chehin OA. Caracterización Bioquímica de la actividad Lipolítica de *Pseudoalteromonas Atlantica* Aislada de la Bahía de Paracas [dissertation]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2012.
100. Papanikolaou S, Aggelis G. Sources of microbial oils with emphasis to *Mortierella* (*Umbelopsis*) *isabellina* fungus. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2019; 35(4): 1–19.
101. Shimizu T, Mori K, Kobayashi H, Tsuduki T. Japanese mushroom consumption alters the lipid metabolomic profile of high-fat diet-fed mice. *Heliyon*. 2020; 6(7): 1-7
102. Wijayati N, Masubah K, Supartono. Oyster mushroom's lipase enzyme entrapment on calcium alginate as biocatalyst in the synthesis of lauryl diethanolamide. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 2017;172(1). 1-7
103. Hima SL, Nidadavolu B, Bollam Krishna, Metuku R, Samantha D, Pabba S, Maringanti SC. Enzymatic and biological activities of *Fomitopsis feei* in broth media supplemented with agricultural wastes. *Journal of recent advances in applied sciences*. 2011; 26: 19–26.
104. Machado F. Generación de un bioinoculante en base a hongos solubilizadores de fosfato autóctonos a escala de laboratorio [dissertation]. Montevideo: ORT; 2017.
105. Pal S, Singh HB, Farooqui A, Rakshit A. Fungal biofertilizers in Indian agriculture: perception, demand and promotion. *Journal of Eco-friendly Agriculture*. 2015;10(2):101–113.
106. Narh Mensah DL, Duponnois R, Bourillon J, Gressent F, Prin Y. Biochemical characterization and efficacy of *Pleurotus*, *Lentinus* and *Ganoderma* parent and hybrid mushroom strains as biofertilizers of attapulgitite for wheat and tomato growth. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2018; 16: 63–72.
107. Pizzul L, Castillo M, Stenström J. Degradation of glyphosate and other pesticides by ligninolytic enzymes. *Biodegradation*. 2009; 20(6); 756-759.
108. Spinelli V, Ceci A, Bosco CD, Gentili A, Persiani AM. Glyphosate-Eating Fungi: Study on Fungal Saprotrophic Strains' Ability to Tolerate and Utilise Glyphosate as a Nutritional Source and on the Ability of *Purpureocillium lilacinum* to Degrade It. *Microorganisms*. 2021; 9(11); 1-21.
109. Afriliana A, Hidayat E, Mitoma Y, Masuda T, Harada H. Studies on composting spent coffee grounds by *Aspergillus* sp an *Penicillium* sp in aerobic static batch temperature control. *Scientific Research Publishing*. 2021; 10: 91-112.
110. Carrasco-Cabrera CP, Bell TL, Kertesz MA. Caffeine metabolism during cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) with spent coffee grounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019; 103(14): 5831–5841.
111. González Bautista E, Gutierrez E, Dupuy N, Gaime-Perraud I, Ziarelli F, Farnet da Silva AM. Pre-treatment of a sugarcane bagasse-based substrate prior to saccharification: Effect of coffee pulp and urea on laccase and cellulase activities of *Pycnoporus sanguineus*. *Journal of Environmental Management*. 2019; 239: 178–186.
112. Bitew Tarko D, Mandefro Sirna A. Substrate optimization for cultivation of *Pleurotus ostreatus* on lignocellulosic wastes (coffee, sawdust, and sugarcane bagasse) in Mizan–Tepi University, Tepi Campus, Tepi Town. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. 2018: 14-20.
113. Mateus DN, Marliane CS da S, Joao GSS, Juliana S da S, Yutaka T, Maria CMK. *Pleurotus ostreatus*, mushrooms production using quick and cheap methods and the challenges to the use of coffee husk as substrate. *African Journal of Microbiology Research*. 2017;11(31):1252–1258
114. Silveira MLL, Furlan SA, Ninow JL. Development of an alternative technology for the oyster mushroom production using liquid inoculum. *Food Science and Technology*. 2008; 28(4): 858–862.
115. Steiner J, Procopio S, Becker T. Brewer's spent grain: source of value-added polysaccharides for the food industry in reference to the health claims. *European Food Research and Technology*. 2015; 3(241): 303–315.
116. Rodríguez GE, Martínez DA, Buglione MB, Filippi MV, Agüero MS. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. : Fr.) Kummer on pear pomace: Evaluation of productivity and chemical composition of the biodegraded substrate. *Anales de Biología*. 2018;(40):21–30.
117. Díaz Muñoz K, Guajardo MC, Alberto C, Torres L, Luis &, Gil Ramírez A, Betzabet C, Vásquez B, Cabos Sánchez J. Producción de *Pleurotus ostreatus* (*Pleurotaceae*) ICFC 153/99 cultivado sobre diferentes residuos lignocelulósicos. *Arnaldoa*. 2019; 26(3): 1177–1184.
118. Mamiro DP, Mamiro PS, Mwatawala MW. Oyster mushroom (*Pleurotus* spp.) cultivation technique using re-usable substrate containers and comparison of mineral contents with common leafy vegetables. *Journal of Applied Biosciences*. 2014; 80(1): 7071–7080.
119. Grimm D, Wösten HAB. Mushroom cultivation in the circular economy. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018; 102(18): 7795–7803.
120. Zheng G, Fan C, Di S, Wang X, Xiang C, Pang Y. Over-Expression of *Arabidopsis* EDT1 Gene Confers Drought Tolerance in Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Frontiers in Plant Science*. 2017; 8. 1-14

121. Abdul Jaleel C, Manivannan P, Wahid A, Farooq M, Jasim Al-Juburi H, Somasundaram R, Panneerselvam R. Drought Stress in Plants: A Review on Morphological Characteristics and Pigments Composition. *International Journal of Agriculture & Biology*. 2009; 11(1):100–105.
122. Wiafe-Kwagyan M, Odamtten GT. Use of *Pleurotus eous* Strain P-31 Spent Mushroom Compost (SMC) as Soil Conditioner on the Growth and Yield Performance of *Capsicum annum* L. and *Solanum lycopersicon* L. Seedlings under Greenhouse Conditions in Ghana. *Tropical Life Sciences Research*. 2018; 29(1): 100-105
123. Roy S, Barman S, Chakraborty U, Chakraborty B. Evaluation of Spent Mushroom Substrate as biofertilizer for growth improvement of *Capsicum annum* L. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. 2015; 3(3): 022–027.
124. INIA, Trébol Blanco [Internet]. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria; 2017 [citado 2022 Agt. 9]. Disponible: <http://www.inia.org.uy/productos/cvforrajeras/tblancoes.html>
125. NING C chuan, GAO P dong, WANG B qing, LIN W peng, JIANG N hao, CAI K zheng. Impacts of chemical fertilizer reduction and organic amendments supplementation on soil nutrient, enzyme activity and heavy metal content. *Journal of Integrative Agriculture*. 2017; 16(8): 1819–1831
126. Acuña HP. Fertilización de praderas de trebol blanco y ballica inglesa, resultados recientes sobre la respuesta a nitrógeno, fósforo, potasio y azufre. 1985; 25. 1-7
127. Yusidah I, Istifadah N. The abilities of spent mushroom substrate to suppress basal rot disease (*Fusarium oxysporum* f.sp cepae) in shallot . Article in *International Journal of Biosciences*. 2018; 13(1): 440–448.
128. Cedeño Solorzano CJ, Torres García A, Héctor Ardisana EF. Respuestas de crecimiento, contenido de clorofila y rendimiento a la aplicación de lixiviado de vermicompost de estiércol bovino en el pimiento (*Capsicum annum* L. híbrido Quetzal). *La Técnica: Revista de las Agrociencias*.. 2020:11. 11-20
129. Latsague M, Sáez P, Mora M. Efecto de la fertilización con nitrógeno, fósforo y potasio, sobre el contenido foliar de carbohidratos, proteínas y pigmentos fotosintéticos en plantas de *Berberidopsis corallina* Hook.f. *Gayana. Botánica*. 2014; 71(1): 37–42.
130. IMPULSA INDUSTRIA. Investigación de hábitos y comportamiento de consumo de alimentos en Uruguay. Montevideo; 2020. 1-123
131. Cano-Estrada A, Romero-Bautista L. Valor económico, nutricional y medicinal de hongos comestibles silvestres. *Revista chilena de nutrición*. 2016; 43(1):75–80.
132. Hongos Comestibles. Observatorio Granjero. 2018:1; 1–6.
133. ANII financia proyecto para producir biocombustible con residuos de aserradero de pino [Internet]. *Revista Forestal*. 2022 Jul 29 [citado 2022 Agt 9]. Disponible desde: <http://www.revistaforestal.uy/paso-y-pasara/anii-financia-proyecto-para-producir-biocombustible-con-residuos-de-aserradero-de-pino.html>

8. Anexo

8.1. Anexo 1: Gel de agarosa para β -tubulina



Anexo 1: Gel de agarosa 1% mostrando las bandas de amplificaciones obtenidas utilizando las *primers* B36F y B12R para la amplificación de gen β -tubulina.

8.2. Anexo 2: Esporada de *Gymnopilus spectabilis*



Anexo 2: Esporada de *Gymnopilus spectabilis*

8.3. Anexo 3: Resultado de la secuenciación de los aislamientos

>Secuencia parcial ITS1-IST4 aislamiento Shiitake

TGATATGCTTAAGATCAGCGGGTACATCCTACCATGATTTGAGGTCAAGCAAATAAGTTATATATA
GTCAATCAAGACAGTTAGAAAGCGGAACTTCCCTTTTTCTCCAATGAATAGAACAGATTGAGCAAA
CTAAATGCAACAACCCAAACCAATAGAGCTTTATTATTGTAAGGTTCCACCAAATGTAGATAATTA
TCACACCAAGGTTAGAATAACAAAACAGGGTCCCACTAATAAATTTAAGAGGAGCTGACAAAC
GCCTGCAAGCCTCCAACATCCAAGCTTTAATAAGTAAAACTTATAAAGTTGAGAATTTAATGACA
CTCAAACAGGCATGCCCTCCGGAATACCAGAGGGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTGATGATTC
ACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAGCCAAG
AGATCCGTTGCTGAAAGTTGTATTAAGTTTAAAGGGTCAATAAAGTCCCAATAACAAGATCATTCT
ATAACATACTTCAATGGTTTATAAGAACATAGAAGCCTTGTCAACTAGTCTTTTCAAGTAACTCATA
ATGAGCACCTTCAAAAACCCGATGAAAGAACTCTACAAAAGTGCACAGGTGGATGAATAGAAA
TCGGAGGAGGATGTGCACATACCCAAAGGCCAGCAACAATCCACCACCAAAAAATTCAATAATGA
TCCTTCCG

>Secuencia parcial EF-1 α aislamiento Shiitake

GTGGTACTGGTGAGTTTGGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGCCAGACTCGTGAACACGCTCTGCT
CGCCTTACCCTTGGTGTGCGTCAACTCATCGTCGCCGTCAACAAGATGGACACCACCAAAGTTT
GTATTTTTTGTCTTGGCCCTCTTGTTCGTGAACTGCATTGCTTATGATCGCTACAATCCATCCAGT
GGAGCGAGGACCGATTCAACGAAATTATCAAGGAACTTCTACCTTTATCAAAAAGGTGCGCTAC
AACCCAAAGGCTGTTGCATTGCTTCTATTTCTGGATGGCACGGTGACAACATGTTGGAGGAGTC
CGTCAACATGCCCTGGTACAAGGGATGGACCAAAGAGACCAAGGCCGGTGTGTTAAGGGAAAG
ACTCTTCTCGATGCTCTTGATGCTA

>Secuencia parcial ITS1-IST4 aislamiento LP2A *T. sanguineus*

GGTTTGGCGTGGGCTTCGGGGCCTCCGGGCTCTGAGGCATTCTGCCGGCCTATGTATCACTACA
AACACATAAAGTAACAGAATGTATTCGCGTCTAACGCATTTAAATACAACCTTCAGCAACGGATCT
CTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAG
TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAG
TGTCATGGAATTCTCAACCCACACGTCCTTGTGATGTTGCCGGCTTGGATTTGGAGGCTTGCTGG
G

>Secuencia parcial EF-1 α aislamiento LP2A *T. sanguineus*

GGTACCGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGCCAGACCCGCGAGCACGCTCTCCTTG
CCTTACCCTCGGTGTCAGGCAGCTCATCGTCGCCGTCAACAAGATGGACACCACGAAGTTTCG
TACTTCTTCTGAAAATTTTTCAGCAACGAGACTGTAAGCTCATTTTGTACGCAGTGGTCCGAGGAC
CGTTTCAACGAAATCGTCAAGGAGACGTCCACCTTCATCAAGAAGGTCCGGCTACAACCCCAAGG
CGGTTCCCTTTGTCCCATCTCCGGCTGGCACGGCGACAACATGTTGGAGGAGTCCACCAACAT
GCCCTGGTACAAGGCTGGACCAAGGAGACGAAGGCTGGTGTGTTGCA

>Secuencia parcial RPB2 aislamiento LP2A *T. sanguineus*

TCAGGTGCTCAACCGCTACACCTATGCGTCGACATTATCGCACTTGCCTGCGTCAATACCCCTC
TCGGTCGTGAAGGCAAGATCGCCAAGCCGCGTCAACTGCACAACACTCACTGGGGAATGGTTTG
CCCTGCCGAGACGCCGAAGGACAGGCTTGCCTGCTCGTGAAGAATTTGCTGCTCATGTCCTGT
ATCTCTGTTGGTTCCCTCTCGGCGCCTGTCATCGAGTCTTGGAGGAGTGGGGTCTCGAGTCCC
TCGAAGAGAACGCACACTCGTCAACGCCATGCACGAAGGTCTTTGTCAACGGTGTGTTGGATGGG
TGTTACCGCGATCCCGCAACCTAGTGAAGACGATCAAGAAGCTGCGTCGGAAGGACGACATC
AGCCCAGAGGTGTCTGCTGTTGCGGACATCCGAGAGCGCAACTTCGCCTCTACACGGACGCTG
GTCGTGTCTGTGACCCCTCTTCATCGTCGAGAACCAGCAGCTGCTCCTCCAGAAACGACATATC
GAGAACCTCGTCCGCGGCAAGGAGGACCCCGATTTGAGTACAAGTGGGACAACCTCATCAAGG
ATGGTGTGATCGAGTTGCTGGATGCGGAGGAAGAGGAGACGGTGTGATGATCTGTATGACGCCCGA

GGATCTCGAGAACTCTAGGCTGCAGGCTGCCGGCATTGACCCTCACGCGGACACCGAGTTTCGAC
CCGTCCGCGCGATTGAAGGCACCGACGAACGCGCATACTTGGACGCACTGCGAGATTCACCCTA
GCATGATCCTCGGTGTCTGTGCAAGTATCATCCCCT

>Secuencia parcial ITS1-IST4 aislamiento LP18B *T. villosa*

GTAGTCCTACCTGATTTGAGGTCAGATGTTATAAAATTGTCCTAATGGACGGTTAGAAGCTCGCCA
AAACGCTTACGGTCACAGCGTAGACAATTATCACACTGAGAGCCGATCCGCACGGAATCAAGCT
AATGCATTCAAGAGGAGCCGACCGTTACGGCCAGCAAGCCTCCAATCCAAGCCCATAGATCAC
AAGGATTTATGGGTTGAGAATTTTCATGACACTCAAACAGGCATGCTCCTCGGAATACCAAGGAGC
GCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCG
CTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGCTGAAAAGTTGTATTAAGATGCGTTAG
ACGCGTTTACATTCTGATACTTTAAGAGTTTGTAGTGTACATAGGTGCGGCAGAATGCTTCTGACCC
GGAGGCCAGAAACCCACGCCAACCTACAGTAAGTGCACAGGTGTAGAGTGGATGAGCAGGGCG
TGCACATGCCTCGGAAGGCCAGCTACAACCCGTTTCAAACCTCGTTAATGATCCT

>Secuencia parcial EF-1α aislamiento LP18B *T. villosa*

GTGGTACCGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGCCAGACCCGCGAGCACGCCCTCC
TTGCCTTACCCTCGGTGTCAGGCAGCTCATCGTCGCCGTCAACAAGATGGACACCACGAAGGT
TCGTTTGATTGCGCGCCACGCGCTCACGCCGCGCTAACTTTCGTTCTACAGTGGTCCGAGGACC
GTTTCAACGAAATCGTCAAGGAGACGTCCACCTTCATCAAGAAGGTGCGGTACAACCCCAAGGC
GGTTGCGTTCGTCCTCATCTCCGGCTGGCACGGCGACAACATGTTGGAGGAGTCCACCAAGTGC
GTATATGCCGTGTCATTTCTCATGAAGCTACGTCTAACAGCCACACAGCATGCCGTGGTACAAGG
GCTGGACCAAGGAGACCAAGGCTGGTGTGCTCAAGGGCAAGACCCTCCTCGATGCCATCGACG
CGATC

>Secuencia parcial ITS1-IST4 aislamiento HG1

TAAGTTCAGCGGGTAGTCCCGCCTGATTTGAGGTCAGATGTCAAAGTAAATTGTCCAGTGAAGGA
CGATTAGAAGCGAGACACCAATGATGCTTCAACTAACAGCGCAGATAATTATCACACTGATAG
CGAGAGGCAAACGTTACGCTAATGCATTTAAGAGGAGCCGACTAACGAGAGCCAGCACAACT
CCAAGTCCAAGCCTTCAGTAACAAAAGTTATAAAGGTTGAGAATACCATGACACTCAAACAGGCG
TGCTCCCCGGAATACCAGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCTGCA
ATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGCTG
AAAGTTGTATATAGATGCGTTATACGCAAGATTACATTCTAAAACCTGAAGCGTTTGTAGTGAACA
TAGGAAGGCTTCCAGCTCGCAGAGCGAACCTTTCACCGACCTACAATAAGTGCACAGAGGTTGA
GAGTGGATGAGCAGGGCGTGCACATGCCTCAGATAGAGACCAGCTACAACCCGTTCAAACCTCG
TTAATGATCCTTCCGCGAG

>Secuencia parcial RPB2 aislamiento HG1

GACACGTACCTGGTTGTGATCGGGGAAAGGAATGATGCTGGCGCAGACACCCAAGATCATACTC
GGGTGAATTTACAGTGAGTCCATGCATGAGCCATCGGTATATTCTTGAGACGCGCCGAAGGGT
CGAAACCTTCATCGCCTTCGCGAGGAGGTTTCGATGCCTTGAGCCTGCAAGCGAGCGTTGTGCGAG
ATCCTCCGGTGTGCATGCAGATCATAACGGTCTCCTCTTCTCCTGCGTCCAGCAACTCGATAATCC
CGTCTTGATGAGGTTGTTCCAAGTGTACGGCTTATTGTGCAATTCGCTTCGCTGTTGAGCTTC
CGGTTGCCGTTCTCGTCTACTGCGGAACACCGTTGGTGACCCACTCAATGTGTTTCTTGCGGA
GAGTGAGCTGGTTGTTCTCCAGATGAAGAGCGGGCGGCAAACACGTCCTGCATCGGTGTACAG
GCGCAGCTCGGTTACGGATGTCCCGGACAACCGAAACTTCGGGACTGATGTGCTCCTTACGA
CGGAGTTTCTTGATGGTCCCTAACAGGTTTCGAGGATCACGGTGCACACCCATCCAAACACCATT
GACGAAGACCTTTGTGCAAGGCGTAGCTGCATGTGCATTCTTTCGAGTGACTCGAGGCCCCAC
TCCTCCAAGAACTCGATGACGGGTGCTGAGAGGGAGCCGACGGAGATACATGACATGAGGGAC
AGGTTCTTGACAAGACCGCAGGCTTGTCTTCGGGAGTCTCGGCAGGACAAACCATAACCCCAAT
GCGTGTGTTGTAGCTGACGCGGCTTAGCGATCTTGCCCTCTCGTCCAAGCGGAGTGTGCAACG
ACGAAGATGTGAAAGCGTGCACGCATAGGTATACCGATTTCAGCACCTGAGAGACACCAGCCTTG
GCGGACATCGACTTCTTCTGGTCACCCCAGTTACCGGTGGCGAGTGAATACTTCAAGCCATTAGT

GATTGTATTATGCTTGACAGCGAGCGACAGGTTGAATTCTTTGTGGGTTTCGACACACTGCACTAT
GTTCAATACATGGGCCAGAATACGAGGGAAACATGCACGCACCTTCTGGAGGTACCGATAGACA
TCACGCGTCA

>Secuencia parcial ITS1-IST4 aislamiento HG6

TATGCTTAAGTTCAGCGGGTAGTCCTACCTGATTTGAGGTCAGAAGTCAAATGAATTGTCCTTGAC
GACAGTTTGAAGCATGAATCTATGACACTCAGACACAGTGCAGATAATTATCACACTGAGCATGAA
GTGAACATTCATACTGATACATTTGAGAGGAGCAGGTACCTGCAAGGTTCCAGCAATAGCCTCCA
AGTCCAATATCACCAGAGTCTTACAAAGACCTGGAGAATTGAGAATACCATGACACTCAAACAGG
CATGCTCCTTGAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTGATGATTCACTGAATTCTG
CAATTCACATTACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGC
TGAAAGTTGTATAAAAATGTGTATTTACACAATAAACATTCTGAACTGATTTATAAGTTTGTAAAAAC
ACAGAGCAGCTGCAAACCAAGTGACACAGGTCACCCAATCTACAAGCTATTCTATGAAAGGTGCA
CAGAGGTTTGAATGCTTATGAGCAGGCGTCACTTGCTTTTCAGCCAGCACAACTGACCCAATT
GGAATTCAATAATGATCCTTCCGC

>Secuencia parcial ITS1-IST4 aislamiento M1 *Fomitopsis sp.*

TCTTCATTGACTTTGCTCTGGTTGGAGGCCCTCCTATGTATCATCACAACTACTTCAGTTTAAAG
AATGTA CTCTTGCCTAACGCATTTAAATACA ACTTT CAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATC
GATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCT
TTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATGGAATTCTC
AACTCTATTTGCTTTTGTGAATAGAGCTTGGATTTGGAGGTTTATTGCTGGTACTTGTGATCGGCT
CCTCTTGAATGCATTAGCTCGAACCTTTGCGGATCAGCTATCGGTGTGATAATTGTCTACGCCGT
GCAGTGAAGCATATCAATGGGCTCGGCTTCCAATCGTCCTTTACTGGACAATGACTTTGACCTTG
A

>Secuencia parcial EF-1α aislamiento M1 *Fomitopsis sp.*

CTGGTGAGTTCGAGGCCGGTATTTCCAAGGACGGTCAGACTCGCGAGCACGCCCTCCTTGCCTT
CACCTCGGTGTCAGGCAGCTCATTGTCGCCATCAACAAGATGGACACCACCAAGGTTTGTATG
TTAGTAGAGTTGTAAAATTCCATATCATTGACGCTCTTGCAGTGGAGCGAGGACCGCTTCAACGA
AATCGTCAAGGAGACGTCCACCTTCATCAAGAAGGTTGGCTACAACCCTAAGGCTGTCTGCTTCG
TTCCATCTCCGGCTGGCACGGCGACAACATGTTGGAGGAGTCCACCAAGTAAGTGATGCAGGT
AATCTACGATGTGATCTAGCCACTGACTATATGCGTATTGTGTAGCATGCCTTGGTACAAGGGCT
GGACTAAGGAGACGAAGGCTGGTGTGGTCAAGGGCAAGACTCTCCTCGACGCGA

>Secuencia parcial ITS1-IST4 aislamiento *P. ostreatus*

CTCCTTCCTTTTTTAAATGCTTAAGTTCAGCGGGTAGTCCTACCTGATTTGAGGTCAAATTGTCAA
ATTGTCCTTGCAGGACGATTGGAGAGCTGGACTCTATTCATGCGTGCTATTGATGAGTGATAATTAT
CACATCATGCGCAGAGGCAATGAGAAGTCTGCTAATGCATTTAAGAGGAGCCGACCTGTCAAG
GCCAGCAGCCCCAACAATCCAAACATCACAATTGGA AAAAAAACCAAAGTGAGTTTGAGAATTTA
ATGACACTCAAACAGGCATGCCCTCGGAATACCAAGGGGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTGCA
TGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGA
GCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTATTATGGTTTATAGGCACAAGGCCATTAAATGACATTC
GTAGACATACTTTGGGGTGTGTTAAGTAAATAGACTGTGTTGTCACACCGAGACGTTTAAATCCC
AGCAAACCAAGTCTGACGACTTGAAAGACGACTTCACAGATCTATCAAAGTTTACAGGTGGTTG
AAAGACTAGTGAAGCGTGACATGCCCTAGAGGCCAGCAACA ACTCCATAGTGAATTCAT

>Secuencia parcial EF-1α aislamiento *P. ostreatus*

GAAGCTGGTATCTCCAAGGATGGCCAGACCCGTGAACACGCTCTCCTTGCCTTACCCTCGGTG
TCCGTCAACTCATCGTTGCCATCAATAAGATGGACACCACCAAGGTTTGTGACTCGCATTTATTAG
TTGTGACTCGGCGTCTGAAA ACTTGCACAGTGGAGCGAGGACCGATTCAACGAAATCATCAAGG
AAACCTCCA ACTTCATCAAGAAGGTGCGCTACAACCCCAAGGCCGTTGCCTTCGTCCCATCTCA
GGATGGCACGGTGATAACATGTTGGAGGAGTCCACCAAGTAAGTACCCATATGATTGATCTAAAG

AGGCAATGATCTTACCATTTTCCAGCATGACATGGTACAAGGGCTGGACCAAGGAGACCAAGGC
CGGTGTCGTCAAGGGCAAGACCCTCCTCGATGC

>Secuencia parcial RPB2 aislamiento *P. ostreatus*

TGATCCGGGAAGGGAATGATACTCGCGCAAATACCAAGTATCATACTTGGGTGAATTTTCGCAATG
AGTCCATGTATGCGCGTGGTACTCGCCTTCAAGCGAGCGGCGGGGTGATACTCTCCATCGTTC
ACCCTCGTATCAACACCAGCGTGCTGCAATCGGGAGTTCTCCAGATCCTCCGGGGTCATGGAAA
TCATAACCGTCTCCTCCTCTTCGGCATCCAACATCTCTATAACACCACTCCTGATGAGACCGTCCC
ACTTGAATGGCTCGCCCGCATCATCAACGGTTTGGTTAAGCCAGCGGATGTGCTTCTTCTGCAAG
CAGCAATTGATGATTCTCAACGATGAACAGCGGCCTGCAAACACGCCCGGCGTCAGTGTACACC
CTAAGCTCCTTTTCTCGGATGTCTCGCACAACAGAGACTTCGGGACTGATGTCTGCTTTTCTGCG
AAGCTTCTTCAGCGTTTTGACCAGATTGGCTGGGTCCCTATGTACACCCATCCAAACACCATTAAC
GAAGACCTTCGTACACGGTATAGATGAATGCGCGTTCTCTTCGAGGGACTCCAGCCCCACTCCT
CCAAGAATTCTATGACAGGCGCAGAGATGGAGCCGACAGAGATGCATGACATGAGGGCAAGATT
CTTGACCAGGCCACACGCTTGACCTTCGGGGTCTCCGCAGGACACACCATAACCCCAATGAGTA
TTGTGCAGTTGACGAGTTTTGGCGATCTTCCCTTACGACCCAGGGGCGTGTTCAGCGACGCA
GATGTGAAAGAGTCGACGCGTAAGTGTATCGATTTAGCACTTGAGACACGCCGCTTTCGAGGA
CATCGACTTCTTCTGATCTCCCCAGTTCCCTGTTGCCAGGGAATACTTTAGACCGTTGGTGATTGT
CTGATGTTTGACGGCCAATGTGAGGTTGAATTCCTTATGCGTTTTCCACGCACTTCGTGCAAGGTG
AGCAAATGGAGGCCACAGTGACAAGGCAAGTTACCTT

>Secuencia parcial ITS1-IST4 aislamiento HG2 *Ganoderma sp.*

GATATGCTTAAGTTCAGCGGGTAGTCCTACCTGATTTGAGGTCAGAGGTCATAAAGCTGTCTCCA
AGTGAGACGGTTGGAAGCTCGCCCAAAGTGCTTACGGTCGCGGCGTAGACAATTATCACACCG
ACAGCCAATTCGCAAGGAACCAAGCTAATGCATTTAAGAGGAGCCGACCAAGAACGGCCAGCAA
GCCTCCAAGTCCAAGCCTACAAACCACAAAAGCTCGTAGGTTGAAGATTTTCATGACACTCAAACA
GGCATGCTCCTCGGAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTC
TGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTT
GCTGAAAGTTGTATATAGATGCGTTACATCGCAATACACATTCTAATACTTTATAGGGTTTTGTATA
AACGCAGGCACAGACACGATTCACAAGCCCGGTGAAGGGCCATTGCACGATCTGAAGCCCACA
GTAAGTGCACAGGTGTAGAGTGGATGAGCAGGGCGTGACATGCCTCGGAAGGCCAGCTACAA
CCCAGTCAAAACTCGATAATGATCCTTCCGC

>Secuencia parcial ITS1-IST4 aislamiento HG5 *Phlebopus mexicanus*

AAGGGGGGAGGACTGTCGCTGGCATGTTGACATGCATGTGCACGTAAGTACCCCTTTCTTTCTT
TCGGCAAAACACCGTCACACCTGTGCACCTGTCGTAGGCTTTTCTCCTACTAGGGGAAGGACCT
ATGTCTCTCCATCACACGCATGTCTACAGAATGTCTAGTTGATAATGGGAAAAATCGTAATACAAC
TTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTAATGT
GAATTGCAGATTTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCTCCTTGGTATTCCGAGG
AGCATGCCTGTTTGAAGTGCATTCGTATCCTCAACCCATGCCTGGATTGACTTCGAGGCGTGGCT
TGGACTTGGGAGTTGCCGGCGACTCGACTTCGGGACGTGCGCTCTTCTTAAAGCATTAGCAAG
GGGGGATGGTGGTGGCAAGACCGACCTTCGACGTGATAATGATCGTCGTGCTCGGGATGCACG
AATTAACCGTCCTTTGCTTCCAAATCG

8.4. Anexo 4: Guía de basidiomicetos recolectados

GUÍA DE HONGOS

Referencias:



Hongo apto para el consumo



Hongo con propiedades desconocidas.



Usos medicinales



No se recomienda su consumo por:
- Olor
- Textura
- Ocasional reacciones



Hongo tóxico. No apto para su consumo



Nombre científico: *Agaricus Blazei Murrill*
Comúnmente conocido como "Champiñón del sol"
Código asignado: **HR1**
Ubicación: Parque Roosevelt, Canelones

Nombre científico: *Agaricus campestris*
Comúnmente conocido como "Champiñón del campo"
Código asignado: **HR2**
Ubicación: Parque Roosevelt, Canelones



Nombre científico: *Clathrus Ruber*
Comúnmente conocido como "Hongo Jaula Roja"
Código asignado: **HR3**
Ubicación: Parque Roosevelt, Canelones

Nombre científico: *Tricholoma equestre*
Comúnmente conocido como "Seta de los caballeros"
Código asignado: **HR4**
Ubicación: Parque Roosevelt, Canelones



Nombre científico: *Amanita gemmata*
Comúnmente conocido como "Amanita con gemas"
Código asignado: **HR5**
Ubicación: Parque Roosevelt, Canelones

Nombre científico: *Lycoperdon curtisii*
Comúnmente conocido como
Código asignado: **HR6**
Ubicación: Parque Roosevelt, Canelones



Comestible cuando joven



Nombre científico: *Thelephora terrestris*
Crece en el suelo, bajo pinos
Código asignado: **HR7**
Ubicación: Parque Roosevelt, Canelones

Nombre científico: sin identificar
Código asignado: **HR8**
Ubicación: Parque Roosevelt, Canelones



Nombre científico: *Agrocibe sp.*
Comúnmente conocido como
Código asignado: **HR9**
Ubicación: Parque Roosevelt, Canelones

GUÍA DE HONGOS

Nombre científico: *Amanita phalloides*
 Comúnmente conocido como "Orojona mortal"
 Código asignado: **HR10**
 Ubicación: Parque Roosevelt, Canelones



Comestible cuando joven



Nombre científico: *Bovista dermoxantha*
 Comúnmente conocido como
 Código asignado: **HR11**
 Ubicación: Parque Roosevelt, Canelones

Nombre científico: *Amanita citrina*
 Comúnmente conocido como "Amanita limón"
 Código asignado: **HR12**
 Ubicación: Parque Roosevelt, Canelones



Nombre científico: *Lactarius deliciosus*
 Comúnmente conocido como "Rovellon" u "Hongo Delicioso"
 Código asignado: **LP1**
 Ubicación: Santa Isabel, Rocha



Nombre científico: *Trametes sanguineus*
 Comúnmente conocido como "Yesquero Bermellón"
 Código asignado: **LP2**
 Ubicación: Santa Isabel, Rocha



Nombre científico: *Suillus granulatus*
 Comúnmente conocido como "Boleto Granulado"
 Código asignado: **LP3**
 Ubicación: Santa Isabel, Rocha



Nombre científico: *Lepista sp.*
 Código asignado: **LP4**
 Ubicación: Santa Isabel, Rocha



Nombre científico: *Hypoholoma puiggarii*
 Código asignado: **LP5**
 Ubicación: Santa Isabel, Rocha

Nombre científico: *Amanita sp.*
 Comúnmente conocido como
 Código asignado: **LP6**
 Ubicación: Santa Isabel, Rocha



Nombre científico: *Clitocybe gibba*
 Comúnmente conocido como "Hongo señorita"
 Código asignado: **LP7**
 Ubicación: Santa Isabel, Rocha

GUÍA DE HONGOS

Nombre científico: *Calvatia gigantea*
 Comúnmente conocido como "Hongo Bola"
 Código asignado: **LP8**
 Ubicación: Santa Isabel, Rocha



Seta joven (LP14)

Nombre científico: *Coprinus comatus*
 Estadio maduro
 Código asignado: **LP9**
 Ubicación: Santa Isabel, Rocha



Nombre científico: *Fomes fasciatus*
 Código asignado: **LP10**
 Ubicación: Santa Isabel, Rocha



Nombre científico: *Aseroë rubra*
 Comúnmente conocido como "Hongo estrella"
 Código asignado: **LP11**
 Ubicación: Santa Isabel, Rocha

Nombre científico: *Callistosporium donadinii*
 Comúnmente conocido como
 Código asignado: **LP12**
 Ubicación: Santa Isabel, Rocha



Nombre científico: *Laccaria fraterna*
 Comúnmente conocido como "Laccaria del Eucaliptus"
 Código asignado: **LP13**
 Ubicación: Santa Isabel, Rocha



Nombre científico: *Schizophyllum commune*
 Comúnmente conocido como
 Código asignado: **LP15**
 Ubicación: Santa Isabel, Rocha




Comestible
 cuando joven



Nombre científico: *Pisolithus arhizus*
 Estadio maduro
 Código asignado: **LP17**
 Ubicación: Santa Isabel, Rocha

Nombre científico: *Trametes villosa*
 Comúnmente conocido como
 Código asignado: **LP18**
 Ubicación: Santa Isabel, Rocha



Nombre científico: *Flavodon flavus*
 Código asignado: **HG1**
 Ubicación: César Mayo Gutiérrez

GUÍA DE HONGOS

Nombre científico: *Ganoderma* sp.
Comúnmente conocido como
Código asignado: **HG2**
Ubicación: César Mayo Gutiérrez



Nombre científico: *Ganoderma lucidum*
Comúnmente conocido como
Código asignado: **HG3**
Ubicación: César Mayo Gutiérrez

Nombre científico: *Ganoderma*
Comúnmente conocido como
Código asignado: **HG4**
Ubicación: César Mayo Gutiérrez



Nombre científico: *Phlebopus mexicanus*
Comúnmente conocido como "Boletal del Monte"
Código asignado: **HG5**
Ubicación: César Mayo Gutiérrez



Nombre científico: *Physisporinus lineatus*
Comúnmente conocido como
Código asignado: **HG6**
Ubicación: César Mayo Gutiérrez



Nombre científico: *Lentinula edodes*
Comúnmente conocido como Shitake
Código asignado: **Shitake**



Nombre científico: *Gymnopilus spectabilis*
Comúnmente conocido como "Hongo chivito"
Código asignado: **"Hongo eucalyptus"**
Ubicación: Parque Roosevelt, Canelones

