



## EVALUACIÓN DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS DE LA PATAGONIA ARGENTINA PARA EL CULTIVO DEL HONGO COMESTIBLE *LENTINULA EDODES* (BASIDIOMYCOTA)

Assessment of lignocellulosic residues from Patagonia argentina for cultivation of the edible mushroom *Lentinula edodes* (Basidiomycota)

Juan M. Roggero Luque<sup>1,2</sup>, Maximiliano Rugolo<sup>1,2</sup> & Carolina Barroetaveña<sup>1,2,3</sup>

**Resumen:** Este trabajo evaluó la tasa de crecimiento micelial (Kr) y la producción de basidiomas de dos cepas comerciales del hongo shiitake *Lentinula edodes* (B05 y M3790) en formulaciones compuestas de residuos lignocelulósicos procedentes de actividades agrícolas y agroindustriales de la región andina de Patagonia Norte y de materiales leñosos de plantas invasoras. Las formulaciones consistieron de un sustrato base, como chips de madera de sauce (ChS), chips de madera de rosa mosqueta (ChRM), pelusa de rosa mosqueta (PRM) o virutas de lenga (VL), mezclado con un suplemento, como salvado de trigo (ST) o bagazo de cebada cervecera (BC). Las dos cepas evaluadas mostraron mayores Kr con ChRM-ST. La producción de basidiomas tuvo lugar lo largo de 1 a 4 oleadas, durante un máximo de 124 días. Las máximas eficiencias biológicas (EB) se obtuvieron con la cepa M3790, destacándose ChS (118,86%) y VL (88,73%), ambos suplementados con ST. La cepa B05 alcanzó las máximas EB con ChS-ST (54,72%) y con ChRM-BC (50,43%). Los resultados obtenidos especialmente con ChRM y ChS, sumado a su abundancia en Patagonia argentina, sugieren que estos materiales pueden ser aprovechados como sustratos para la producción comercial de shiitake, actividad aún no desarrollada a gran escala en la región.

**Palabras clave:** Bagazo de cebada, chips de madera, desechos agrícolas y forestales, hongos comestibles, shiitake, viruta de lenga.

**Summary:** This work assessed the mycelial growth rate (Kr) and basidiome production of two commercial strains of shiitake mushroom *Lentinula edodes* (B05 and M3790) in formulations composed of lignocellulosic residues from agricultural and agroindustrial activities in Northern Andean Patagonia and woody materials from invasive plants. The formulations consisted of a base substrate, such as willow wood chips (ChS), rosehip wood chips (ChRM), rosehip fluff (PRM) or southern beech shavings (VL), mixed with a supplement, such as wheat bran (ST) or malting barley bagasse (BC). Both strains showed the highest Kr with ChRM-ST. Basidiome production took place over 1 to 4 flushes for a maximum of 124 days. The highest biological efficiencies (EB) were obtained with strain M3790, particularly using ChS (118.86%) and VL (88.73%), both supplemented with ST. Strain B05 showed the highest EB in ChS-ST (54.72%) and in ChRM-BC (50.43%). The results obtained, especially in ChRM and ChS, in addition to their abundance in Argentinian Patagonia, suggest that these materials can be used as substrates for the commercial production of shiitake, an activity that is still not developed on a large scale in this region.

**Key words:** Agricultural-forestry waste, beer spent grain, edible mushrooms, shiitake, southern beech shavings, wood chips.

<sup>1</sup> Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico, ruta 259, Km 16.24 (9200), Esquel (Chubut), Argentina. E-mail: [maxirugolo@gmail.com](mailto:maxirugolo@gmail.com)

<sup>2</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

<sup>3</sup> Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Fac. Ingeniería, sede Esquel, Argentina.

## Introducción

*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, comúnmente conocido como “shiitake”, es un hongo comestible procedente del este de Asia que es altamente consumido por su exquisito sabor y aroma (Gao et al., 2020). Además de su valor culinario, posee importantes propiedades nutricionales. Con base en su peso seco, puede contener hasta 59% de carbohidratos, 23% de proteínas, 10% de fibra dietaria y 4% de lípidos, destacándose el ácido linoleico (Mizuno, 1995). Es una buena fuente de vitaminas, contiene minerales, y casi todos los aminoácidos esenciales para la nutrición humana, con cantidades significativas de alanina, arginina, lisina y leucina (Sharma et al., 2013; Mata et al., 2020). También se han reportado compuestos bioactivos (polisacáridos, esteroides, compuestos fenólicos, etc.) con propiedades biológicas benéficas con actividad antitumoral, antiviral, hipocolesterolémica e inmunomoduladora (Chang et Miles, 2004; Li et al., 2017).

Actualmente es el hongo comestible más cultivado a nivel mundial, representando 22% de la producción global (Mata et al., 2020). Aunque se cultiva mayormente en China y otros países asiáticos, su producción se ha expandido a otros países como Estados Unidos, Canadá, Australia, España, Francia y también a países de América Latina (Mata et al., 2020). En Argentina, la producción de shiitake se inició en la década de 1990 y actualmente es llevada a cabo a pequeña escala empleando mayormente el sistema tradicional de cultivo en troncos naturales (Pire et al., 2001; Sánchez et al., 2018).

En países donde se cultiva comercialmente, el método de cultivo en troncos ha sido paulatinamente reemplazado en las últimas décadas por un sistema de cultivo intensivo en bolsas, que utiliza como sustratos diversos residuos lignocelulósicos de actividades agrícolas, silvícolas y agroindustriales, aprovechando la capacidad biodegradadora de la especie (Mata et al., 2002; Philippoussis et al., 2007). El sustrato base más popular es el aserrín, principalmente obtenido de árboles de madera dura como los robles (*Quercus* spp.) (Philippoussis et al., 2003). En

regiones donde el aserrín es un subproducto escaso o ausente, se han desarrollado sustratos alternativos a partir de residuos generados por otras producciones agrícolas, por ejemplo cereales, café, cacao, algodón, maní o vides (Philippoussis et al., 2003; Chang et Miles, 2004; Sharma et al., 2013).

En Argentina, la producción de shiitake se desarrolla en menor proporción con relación al champiñón y a la “gírgola” [*Pleurotus* spp. (Fr.) P. Kumm.] (Sánchez et al., 2018), aunque existe un interés creciente de cultivar esta especie usando el sistema de bloques sintéticos de sustrato. En los valles andinos de la Patagonia argentina localizados a lo largo de las provincias de Neuquén, Río Negro y Chubut, se desarrolla una amplia variedad de actividades agrícolas y agroindustriales (Madariaga, 2009). El bagazo de cebada cervecera es un subproducto rico en fibras y proteínas (Mussatto et al., 2006), y es abundante debido al auge de la producción de cervezas artesanales en la región (Colino et al., 2017). Por otra parte, la lenga [*Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser] es uno de los recursos forestales nativos más importantes de Patagonia, con 132.174 ha de bosques productivos sólo en la provincia de Chubut (Bava et López Bernal, 2006). Adicionalmente, la rosa mosqueta (*Rosa rubiginosa* L.) y diferentes especies de sauce (*Salix* L. spp.) son plantas exóticas que han expandido exitosamente su distribución en toda la región patagónica y representan una amenaza a los ecosistemas nativos debido a su comportamiento invasor (Barros Biscari, 2010; Thomas et al., 2015). Asimismo, los frutos de rosa mosqueta son utilizados para la producción de dulces, té y licores, y del procesamiento de sus frutos se genera un residuo conocido como “pelusa”, descartada o utilizada como fertilizante (Barros Biscari, 2010).

Los residuos lignocelulósicos que se generan de diversas actividades productivas ofrecen nuevas oportunidades para el desarrollo de sustratos alternativos para el cultivo de hongos comestibles, con base en la evaluación de su disponibilidad, costo y composición química. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el crecimiento micelial y la eficiencia

biológica de *Lentinula edodes* utilizando sustratos formulados a partir de materiales lignocelulósicos disponibles en la región norte de los Andes patagónicos en Argentina.

## Materiales y Métodos

Los experimentos fueron llevados a cabo entre agosto de 2017 y enero de 2018 en los Laboratorios del Área de Protección Forestal, Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico (CIEFAP) en Esquel (Chubut), Argentina.

### *Cepas*

Se emplearon dos cepas comerciales de *L. edodes*. La cepa B05 fue proporcionada por el Centro PyME-ADENEU (Neuquén, Argentina), mientras que la cepa M3790 fue adquirida del banco de cepas Mycelia (Nevele, Bélgica). Ambas cepas fueron mantenidas en medio PDA (papa, dextrosa y agar) a 4 °C hasta su utilización en este trabajo. Además, las dos cepas evaluadas fueron incorporadas al cepario del Laboratorio de Producción de Blanco de Hongos Comestibles del CIEFAP.

### *Materiales utilizados*

Para los experimentos de crecimiento micelial y de producción de shiitake se emplearon los siguientes cinco materiales lignocelulósicos, recolectados en las localidades de Esquel, Trevelin, Aldea Escolar y Lago Puelo (provincia de Chubut, Argentina): viruta de “lenga” (VL), pelusa de “rosa mosqueta” (PRM), chips de “rosa mosqueta” (ChRM), chips de madera de sauce (ChS) y bagazo de cebada cervecera (BC). La VL fue obtenida a partir del cepillado de madera en el área de carpintería del CIEFAP, mientras que los ChRM y ChS se obtuvieron mediante la trituración de ramas en fragmentos de 1 a 5 cm en una máquina trituradora FEMA, equipada con un motor de 13 HP y capacidad máxima de diámetro de entrada de 90 mm. La PRM fue proporcionada por productores de dulces y mermeladas de la localidad de Lago Puelo; se trata de un residuo generado después del secado y molienda de la cáscara de los frutos

de rosa mosqueta y consiste de numerosos pelos y espinillas que rodean a las semillas. El BC fue proporcionado por cervecerías artesanales de Esquel y Trevelin. Todos los materiales fueron secados en estufa a 65 °C hasta peso seco constante.

### *Análisis químico de los materiales lignocelulósicos y formulación de sustratos*

De cada material se molió una muestra de 20 g. Los análisis se efectuaron en el Laboratorio de Análisis Químicos, LANAQUI (CERZOS-CONICET, Bahía Blanca, Argentina). Para la determinación del contenido total de nitrógeno (N) se utilizó el método semi-micro Kjeldahl, empleando un destilador Bucchi M662. La determinación de carbono (C) se llevó a cabo con el método de combustión en seco mediante un determinador de carbono Leco CR-12 (Leco Corporation, Estados Unidos). Para las determinaciones se utilizaron patrones y estándares certificados por Chem-Lab, Zedelgem B-8210, Bélgica. La composición química (macro y microelementos) de estos mismos residuos lignocelulósicos fue analizada en un trabajo anterior, y puede ser consultada en Roggero Luque et al. (2021).

Luego se llevó a cabo la formulación de los sustratos, cuyo contenido de nitrógeno se ajustó en 0,8% (Lin et al., 2015). Cada formulación consistió en la combinación de un sustrato base, un suplemento y materiales inertes (carbonato de calcio o sulfato de calcio). Los materiales utilizados como sustratos base fueron ChS (C= 43,02%; N= 0,43%), ChRM (C= 48,51%; N= 0,67%), VL (C= 47,53%; N= 0,13%) y PRM (C= 45,45%; N= 0,45%), mientras que como suplementos se emplearon BC (C= 46,46%; N= 2,90%), o salvado de trigo, en adelante ST (N= 2,01%), este último comúnmente utilizado en mezclas de sustrato para cultivo de hongos comestibles (Silva et al., 2005). Las diferentes formulaciones de sustrato se resumen en la Tabla 1.

### *Evaluación de la tasa de crecimiento del micelio*

El crecimiento lineal del micelio se evaluó siguiendo a Zervakis et al. (2001). Se utilizaron tubos de corrida de vidrio (200 mm longitud × 20 mm diámetro interno) rellenos

**Tabla 1.** Formulaciones de sustrato para experimentos de crecimiento micelial y fructificación en las cepas B05 y M3790 de *Lentinula edodes*.**Table 1.** Substrate formulations for mycelial growth and fruiting experiments on B05 and M3790 strains of *Lentinula edodes*.

Formulación	Abreviatura	N (%)
76% Chip de sauce + 24% Salvado de trigo	ChS-ST	0,81
85% Chip de sauce + 15% Bagazo de cebada cervecera	ChS-BC	0,8
63% Viruta de lenga + 37% Salvado de trigo	VL-ST	0,83
76% Viruta de lenga + 24% Bagazo de cebada cervecera	VL-BC	0,8
77,50% Pelusa de rosa mosqueta + 22,50% Salvado de trigo	PRM-ST	0,8
85% Pelusa de rosa mosqueta + 15% Bagazo de cebada cervecera	PRM-BC	0,82
90% Chip de rosa mosqueta + 10% Salvado de trigo	ChRM-ST	0,8
94% Chip de rosa mosqueta + 6% Bagazo de cebada cervecera	ChRM-BC	0,8

uniformemente con 10 g de cada formulación (ajustando el contenido de humedad entre 56% y 68%), tapando los extremos con algodón y esterilizados en autoclave 90 min a 121 °C. Una vez enfriados, cada tubo se inoculó en flujo laminar con un disco de agar de 20 mm de diámetro tomado de la periferia de colonias con crecimiento activo de 7 días, en medio PDA enriquecido con 5% aserrín de álamo. Se inocularon 3 tubos por cada cepa y formulación. La incubación se realizó en oscuridad a 24 °C.

El crecimiento micelial se registró diariamente desde el día siguiente de la inoculación, midiendo el frente de avance del micelio a partir del inóculo y promediando las medidas de cuatro puntos equidistantes. La tasa de crecimiento micelial (Kr), expresada en milímetros por día (mm/d), se calculó a partir del séptimo día desde la inoculación. Además, se contabilizó el número de días para completar la colonización del sustrato, o tiempo de colonización (TC).

#### Ensayos de cultivo

**Preparación de inóculo.** Se llenaron hasta la mitad frascos de vidrio de 360 cc con granos de trigo hervidos 20 min en agua destilada y sulfato de calcio (2% del peso fresco del grano), que se esterilizaron 90 min en autoclave a 121 °C. Una vez enfriados, se inocularon con dos discos de 20 mm de diámetro de medio PDA

colonizado con el micelio, y se incubaron en oscuridad cuatro semanas a 24 °C.

**Preparación de sustrato, inoculación e incubación.** Los componentes de cada formulación se mezclaron en seco y se mantuvieron 24 h en remojo con agua destilada. Luego se drenó el exceso de agua, hasta lograr 56% a 68% de contenido de humedad. Se prepararon bolsas con 150 g (peso seco) de cada sustrato, cerrándolas con tapones de algodón sostenidos por un cuello de PVC (cloruro de polivinilo) de 5 cm. Se las esterilizó 90 min en autoclave a 121 °C; una vez templadas fueron inoculadas bajo flujo laminar (7% p/p sobre la base del peso fresco del sustrato) e incubadas en oscuridad a 24 °C, 70% a 80% de humedad ambiente, durante 100 días (momento en el cual comenzaron a emerger primordios). Cada tratamiento se realizó por triplicado.

**Evaluación de la producción de basidiomas.** Después de la completa colonización del sustrato, las bolsas con sustrato inoculadas (desde ahora bloques) se trasladaron a dos cámaras de cultivo (BIOTEC EF105), una destinada a la cepa B05 y otra para la cepa M3790, con controles de temperatura, humedad, aireación y fotoperíodo. Las condiciones ambientales para la fructificación se establecieron según indicaciones de los proveedores: 19 °C a 20 °C para la cepa B05, y

16 °C a 17 °C para la cepa M3790, fotoperíodo de 12 h luz-oscuridad, humedad ambiental entre 85% y 95% y ciclos de aireación cada 4 h. Las bolsas se cortaron longitudinalmente cada 5-7 cm, y a lo largo de toda la superficie de contacto entre bolsa y bloque, para permitir la emergencia de primordios. Los bloques se regaron por aspersión suave 4 veces al día para contribuir al mantenimiento de la humedad ambiental de las cámaras y evitar la desecación del sustrato. Los basidiomas se cosecharon manualmente cuando los márgenes del píleo estuvieran levemente convexos. Luego de finalizada la primera oleada, los bloques de sustrato se dejaron descansar durante 10 días, entre 20 °C y 24 °C y manteniendo la humedad ambiental entre 85% y 95%. La inducción de la segunda oleada se llevó a cabo mediante la inmersión de los bloques en agua fría durante 12 h. Luego de la inmersión, se drenó el exceso de agua de los bloques y se colocaron en sus respectivas cámaras, reestableciendo las condiciones de fructificación mencionadas anteriormente. Para las oleadas subsiguientes, se llevó a cabo este mismo procedimiento. Para cada bloque de sustrato se registró el número de días hasta la primera cosecha (teniendo como punto de partida el momento de la inducción), la duración de la cosecha (expresado en días), la duración total del ciclo de cultivo (desde la inoculación del sustrato hasta el último día de cosecha), tamaño y peso de los basidiomas, y se calculó el porcentaje de eficiencia biológica (EB) mediante la siguiente fórmula:

$$EB (\%) = \frac{\text{peso fresco de los basidiomas}}{\text{peso seco del sustrato}} \times 100$$

#### *Análisis de datos*

Para la evaluación de la tasa de crecimiento del micelio se aplicó un diseño factorial, con tres réplicas por tratamiento (8 formulaciones y 2 cepas). Las diferencias de Kr y el TC se evaluaron con ANOVA trifactorial completo y balanceado (considerando los factores fijos “cepa”, “sustrato base” y “suplemento”, y la interacción entre los mismos), y prueba pos-hoc de Tukey con un nivel de significación de 5%.

En los ensayos de cultivo, la pérdida de algunos bloques de sustrato por contaminación con mohos condujo a un diseño factorial

incompleto y desbalanceado. Las diferencias de EB y de los caracteres morfológicos de los basidiomas se evaluaron mediante ANOVA con un procedimiento Modelo Lineal Generalizado (modelo MLG), considerando los factores fijos “cepa”, “sustrato base” y “suplemento”, y la interacción entre los mismos, y prueba pos-hoc LSD de Fisher con un nivel de significación de 5%. En caso de interacción significativa, se realizaron análisis de contrastes ortogonales para comparar los valores medios de los niveles de los factores involucrados en dichas interacciones. En caso de interacción no significativa, en todos los análisis, el ANOVA se volvió a correr removiendo el efecto de la interacción.

Además, se realizó un análisis de correlación de Spearman entre el parámetro Kr y los parámetros EB y período entre inducción y la primera cosecha, con un nivel de significación de 1%. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Infostat ver. 2017 (Di Rienzo et al., 2017).

## **Resultados**

### *Tasa de crecimiento micelial (Kr) y tiempo de colonización (TC) en tubos de corrida*

Los valores de Kr y TC de las cepas B05 y M3790 en diferentes formulaciones de sustrato se resumen en la Tabla 2. La Kr presentó un valor medio de  $2,83 \pm 0,56$  mm/d para la cepa B05 y de  $2,84 \pm 0,48$  mm/d para la cepa M3790, y las diferencias entre las dos cepas fueron no significativas (Tabla 3). En relación al sustrato base, los valores más altos y más bajos de Kr fueron coincidentes entre cepas para las mismas formulaciones y las diferencias registradas fueron significativas (Tabla 3). Las mayores Kr fueron registradas en ChRM, destacándose ChRM-ST, mientras que las menores Kr fueron registradas en PRM, en particular PRM-BC (Tabla 2). En cuanto al suplemento utilizado, las mayores Kr se observaron en formulaciones suplementadas con ST, y las diferencias con respecto a BC fueron significativas (Tabla 3).

Las diferencias en Kr entre las dos cepas fueron independientes del tipo de sustrato base (interacción no significativa entre cepa-

**Tabla 2.** Tasa de crecimiento micelial (Kr) y tiempo de colonización (TC) de las cepas B05 y M3790 de *Lentinula edodes* en diferentes formulaciones de sustrato.**Table 2.** Mycelial growth rate (Kr) and colonization time (TC) of B05 and M3790 strains of *Lentinula edodes* on different substrate formulations.

Cepa	Formulación	Kr (mm/d)	TC (días)
B05	ChS-ST	3,05 <sup>cd</sup> (0,19)	18,00 <sup>efg</sup> (1,00)
	ChS-BC	2,96 <sup>cd</sup> (0,06)	20,33 <sup>de</sup> (1,15)
	VL-ST	2,80 <sup>d</sup> (0,10)	24,00 <sup>abc</sup> (0)
	VL-BC	2,74 <sup>d</sup> (0,12)	26,00 <sup>a</sup> (0)
	PRM-ST	2,27 <sup>e</sup> (0,12)	20,33 <sup>de</sup> (0,58)
	PRM-BC	1,86 <sup>f</sup> (0,12)	22,33 <sup>bcd</sup> (1,15)
	ChRM-ST	3,72 <sup>a</sup> (0,09)	16,00 <sup>g</sup> (0)
	ChRM-BC	3,24 <sup>bc</sup> (0,21)	17,67 <sup>efg</sup> (1,15)
M3790	ChS-ST	2,91 <sup>cd</sup> (0,09)	20,33 <sup>de</sup> (2,31)
	ChS-BC	2,98 <sup>cd</sup> (0,11)	22,00 <sup>bcd</sup> (1,00)
	VL-ST	2,90 <sup>cd</sup> (0,08)	24,67 <sup>ab</sup> (1,15)
	VL-BC	2,73 <sup>d</sup> (0,09)	26,67 <sup>a</sup> (0,58)
	PRM-ST	2,25 <sup>e</sup> (0,03)	20,00 <sup>de</sup> (1,00)
	PRM-BC	2,06 <sup>ef</sup> (0,18)	21,33 <sup>cd</sup> (0,58)
	ChRM-ST	3,48 <sup>ab</sup> (0,04)	16,33 <sup>fg</sup> (0,58)
	ChRM-BC	3,41 <sup>ab</sup> (0,03)	19,33 <sup>def</sup> (1,53)

**Referencias:** Las medias seguidas por una misma letra en la misma columna y para la misma cepa no presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ); los números entre paréntesis corresponden a los desvíos estándar.

sustrato base), y también de la interacción entre estos dos factores y el suplemento (interacción no significativa entre cepa-sustrato base-suplemento). Al considerar las cepas en estudio, se observó que la Kr fue dependiente del tipo de suplemento (interacción significativa cepa-suplemento) (Tabla 3); el análisis de contrastes mostró diferencias significativas para la cepa B05 ( $F= 30,93$ ;  $P= < 0,0001$ ). También se observó una interacción significativa entre sustrato base y suplemento (Tabla 3); el análisis de contrastes mostró que las diferencias fueron significativas para formulaciones compuestas por ChRM ( $F= 16,78$ ;  $P= 0,0003$ ), y por PRM ( $F= 20,01$ ;  $P= 0,0001$ ).

El TC presentó un valor medio de  $20,58 \pm 3,31$  días para la cepa B05 y de  $21,33 \pm 3,23$  para la cepa M3790, y las diferencias entre ambas cepas fueron significativas (Tabla 3). También se observaron diferencias significativas entre los diferentes sustratos base (Tabla 3), y se registraron los menores TC en ChRM (particularmente en ChRM-ST) y los mayores TC en las dos formulaciones compuestas por VL (Tabla 2). En cuanto al suplemento utilizado las diferencias fueron significativas (Tabla 3), con menores TC en formulaciones suplementadas con ST (Tabla 2). Para el TC, se observaron interacciones no significativas entre cepa-suplemento, entre sustrato base-suplemento y entre cepa-sustrato

**Tabla 3.** Análisis de la varianza para parámetros de crecimiento micelial (Kr, TC) y de fructificación (EB, diámetro de píleo, longitud de pie) de las cepas B05 y M3790 de *Lentinula edodes*.

**Table 3.** Analysis of variance for mycelial growth (Kr, TC) and fruiting parameters (EB, pileus diameter, stipe length) of B05 and M3790 strains of *Lentinula edodes*.

	Kr (mm/d)		TC (días)			
	F	P	F	P		
<b>C</b>	0,06	0,82	7,05	0,01		
<b>SB</b>	248,68	1 × 10 <sup>-4</sup>	137,52	1 × 10 <sup>-4</sup>		
<b>S</b>	23,83	1 × 10 <sup>-4</sup>	137,52	1 × 10 <sup>-4</sup>		
<b>C × SB</b>	1,09	0,37	3,8	0,02		
<b>C × S</b>	6,07	0,02	0	>0,99		
<b>SB × S</b>	3,63	0,02	0,21	0,89		
<b>C × SB × S</b>	2,77	0,06	0,62	0,61		
	EB (%)		Diámetro de píleo (mm)		Longitud de pie (mm)	
	F	P	F	P	F	P
<b>C</b>	10,13	3,2 × 10 <sup>-3</sup>	8,03	0,01	2,25	0,14
<b>SB</b>	9,51	1 × 10 <sup>-4</sup>	2,13	0,11	3,04	0,04
<b>S</b>	15,2	4 × 10 <sup>-4</sup>	1,09	0,3	1,23	0,27
<b>C × SB</b>	2,82	0,06	1,5	0,24	2,57	0,08
<b>C × S</b>	3,86	0,06	0,58	0,46	0,24	0,63
<b>SB × S</b>	5,3	4,3 × 10 <sup>-3</sup>	1,38	0,27	1,07	0,38
<b>C × SB × S</b>	0,5	0,68	0,37	0,77	0,9	0,46

**Referencias:** C = cepa; SB = sustrato base; S = suplemento; Kr = tasa de crecimiento micelial; TC = tiempo de colonización. Los valores P < 0,05 indican diferencias estadísticamente significativas.

base-suplemento, pero significativa entre cepa-sustrato base (Tabla 3). En este último caso, el análisis de contrastes mostró diferencias de TC significativas entre las cepas B05 y M3790 para formulaciones compuestas por ChS ( $F=12,54$ ;  $P=0,0011$ ).

El aspecto del micelio presentó diferencias entre las diferentes formulaciones de sustrato, y también entre las dos cepas analizadas. En formulaciones compuestas por ChS y por ChRM, el micelio presentó un aspecto más denso, blanquecino y vigoroso, y esto fue más notorio para la cepa M3790 en relación a la cepa B05; mientras que las formulaciones

compuestas por PRM y VL permitieron el crecimiento de micelio con un aspecto relativamente menos denso.

#### Experimentos de fructificación

La etapa de fructificación se produjo a lo largo de 1 a 4 oleadas según la formulación (Tabla 4). La duración promedio de esta etapa fue de 54,10 días, variando desde 1 día en VL-BC, en PRM-ST y PRM-BC con la cepa B05, hasta 89 días en VL-ST con la cepa M3790. En la cepa B05, el período entre inducción y primera cosecha varió entre 10 días en ChS-ST, hasta 33 días en las

**Tabla 4.** Duración de diferentes etapas del cultivo de las cepas B05 y M3790 de *Lentinula edodes* sobre diferentes formulaciones de sustrato.**Table 4.** Length of different cultivation stages of B05 and M3790 strains of *Lentinula edodes* on different substrate formulations.

Cepa	Formulación	Duración total del ciclo de cultivo <sup>a</sup>	Días hasta la primer cosecha <sup>b</sup>	Duración de la cosecha	Número máximo de oleadas
B05	ChS-ST	184,67 (56,44)	10 (0)	75,67 (56,44)	3
	ChS-BC	197,50 (17,68)	26	85	4
	VL-ST	183	11	73	3
	VL-BC	132,50 (31,82)	32,50 (31,82)	1 (0)	1
	PRM-ST	133 (24,04)	33 (24,04)	1 (0)	1
	PRM-BC	133 (18,38)	33 (18,38)	1 (0)	1
	ChRM-ST	171,67 (46,20)	22 (20,78)	50,67 (34,96)	3
	ChRM-BC	202,67 (8,50)	21,67 (16,07)	82 (16,70)	3
M3790	ChS-ST	195,67 (28,71)	18,33 (9,29)	78,33 (37,87)	4
	ChS-BC	183,67 (34,08)	14 (2,65)	70,67 (33,23)	3
	VL-ST	201 (14,93)	12,67 (2,08)	89,33 (16,65)	3
	VL-BC	164,67 (7,77)	42,67 (11,55)	23 (19,16)	3
	PRM-ST	178 (14,14)	19,33 (11,85)	56 (28,28)	4
	PRM-BC	132,67 (21,08)	12 (1,73)	21,67 (20,31)	2
	ChRM-ST	200,33 (13,20)	27,33 (22,50)	74 (35,55)	4
	ChRM-BC	186 (43,59)	23 (10,39)	64 (50,48)	3

**Referencias:** <sup>a</sup>Desde la inoculación; <sup>b</sup>desde la inducción; los números entre paréntesis corresponden a los desvíos estándar.

formulaciones compuestas por PRM. Para la cepa M3790, este período varió entre 12 días en PRM-BC y 43 días en VL-BC (Tabla 4).

Las máximas EB se obtuvieron con la cepa M3790 (Tabla 5), siendo estas diferencias significativas con respecto a la cepa B05 (Tabla 3). Para la cepa M3790, las mayores EB se registraron en ChS-ST, en VL-ST, y también en ChS-BC y ChRM-ST. Para la cepa B05, la máxima EB se obtuvo en VL-ST, seguidas de ChRM-BC y ChS-ST. Las menores EB se obtuvieron en PRM-BC y PRM-ST para la cepa B05, y en VL-BC y PRM-BC para la cepa M3790 (Tabla 3). Las diferencias entre sustratos base fueron significativas y también respecto del suplemento usado (Tabla 4), con EB significativamente mayores en sustratos

suplementados con ST. Las diferencias entre sustratos base y suplementos fueron independientes de la cepa (interacciones no significativas entre cepa-sustrato base, entre cepa-suplemento, y entre los tres factores). Al considerar las formulaciones compuestas por un mismo sustrato base, la EB varió dependiendo del suplemento (interacción significativa entre sustrato base-suplemento) (Tabla 3); el análisis de contrastes mostró diferencias significativas entre las formulaciones compuestas por ChS ( $F= 9,42$ ;  $P= 0,0021$ ) y las compuestas por VL ( $F= 19,24$ ;  $P= < 0,0001$ ).

Algunos bloques sufrieron contaminación por mohos, mayormente luego de someterlos a inmersión en agua para inducir oleadas subsiguientes a la primera, y debieron ser

**Tabla 5.** Parámetros de producción de las cepas B05 y M3790 de *Lentinula edodes* en diferentes formulaciones de sustrato.**Table 5.** Production parameters of B05 and M3790 strains of *Lentinula edodes* on different substrate formulations.

Cepa	Formulación	EB (%)	Diámetro píleo (mm)	Longitud pie (mm)
B05	ChS-ST	54,72 <sup>c</sup> (19,01)	45,60 <sup>a</sup> (19,67)	42,62 <sup>abc</sup> (12,16)
	ChS-BC	36,89 <sup>cde</sup> (36,88)	47,65 <sup>a</sup> (4,49)	42,68 <sup>abc</sup> (5,06)
	VL-ST	64,87 <sup>bc</sup>	57,61 <sup>a</sup>	53,30 <sup>a</sup>
	VL-BC	11,50 <sup>e</sup> (11,93)	sin datos	sin datos
	PRM-ST	3,62 <sup>e</sup> (2,95)	37,25 <sup>ab</sup>	37,00 <sup>abcd</sup>
	PRM-BC	3,02 <sup>e</sup> (1,53)	21,28 <sup>b</sup> (4,35)	21,78 <sup>d</sup> (6,47)
	ChRM-ST	36,04 <sup>cde</sup> (15,20)	39,08 <sup>ab</sup> (13,32)	41,68 <sup>abc</sup> (4,13)
	ChRM-BC	55,60 <sup>c</sup> (4,72)	51,82 <sup>a</sup> (5,12)	49,62 <sup>a</sup> (6,01)
M3790	ChS-ST	118,86 <sup>a</sup> (21,26)	58,62 <sup>a</sup> (3,20)	41,62 <sup>abc</sup> (1,55)
	ChS-BC	58,20 <sup>bc</sup> (12,67)	56,63 <sup>a</sup> (10,84)	44,58 <sup>ab</sup> (9,31)
	VL-ST	88,73 <sup>ab</sup> (29,53)	54,41 <sup>a</sup> (3,33)	41,67 <sup>abc</sup> (7,22)
	VL-BC	21,40 <sup>cde</sup> (19,41)	43,35 <sup>a</sup> (3,70)	31,86 <sup>bcd</sup> (9,34)
	PRM-ST	34,48 <sup>cde</sup> (2,83)	53,57 <sup>a</sup> (13,47)	35,08 <sup>abcd</sup> (7,14)
	PRM-BC	28,02 <sup>cde</sup> (8,02)	44,55 <sup>a</sup> (3,87)	30,12 <sup>cd</sup> (3,91)
	ChRM-ST	50,43 <sup>cd</sup> (22,16)	51,73 <sup>a</sup> (8,01)	35,33 <sup>abcd</sup> (12,17)
	ChRM-BC	37,25 <sup>cde</sup> (28,22)	51,58 <sup>a</sup> (13,77)	30,94 <sup>cd</sup> (7,51)

**Referencias:** Las medias seguidas por una misma letra en la misma columna y para la misma cepa no presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ); los números entre paréntesis corresponden a los desvíos estándar.

descartados. Para ambas cepas, resultaron afectados todos los bloques compuestos por PRM. En las restantes formulaciones, se observaron contaminaciones en bloques con VL (un bloque de VL-BC para cada cepa, y dos bloques de VL-ST para la cepa B05) y una menor incidencia en ChS (un bloque de ChS-BC para la cepa B05) y en ChRM (un bloque de ChRM-BC para la cepa M3790). Además, para la cepa B05, un bloque de ChS-BC y otro de ChRM-ST fueron retirados ya que se desarmaron durante la inmersión. Otro inconveniente observado fue la incompleta colonización de bloques de sustrato compuestos por VL, más pronunciada en los suplementados con BC.

No se encontró una correlación significativa entre Kr y el período comprendido entre la inducción y la primera cosecha ( $\rho = -0,22$ ;  $P = 0,16$ ), ni entre Kr y EB ( $\rho = 0,36$ ;  $P = 0,02$ ) considerando un nivel de significación de 1%.

#### *Caracteres morfológicos*

Los píleos fueron significativamente de mayor tamaño en la cepa M3790 (Tabla 3); el valor medio para la cepa M3790 fue de 51,80 mm (variando entre 43,35 mm en VL-BC y 58,62 mm en ChS-ST), y para la cepa B05 de 42,82 mm (variando entre 21,28 mm en PRM-BC y 57,61 mm en VL-ST) (Tabla 5). En relación a los sustratos base y a los

suplementos, las diferencias en diámetro de píleo fueron no significativas (Tabla 3).

El pie de los basidiomas fue más corto en la cepa M3790, con una longitud media de 36,40 mm (variando entre 30,12 mm en PRM-BC y 44,58 mm en ChS-BC), y de 41,40 mm en la cepa B05 (variando entre 21,78 mm en PRM-BC y 53,30 mm en VL-ST) (Tabla 5). Aunque la longitud del pie fue en promedio menor para la cepa M3790, las diferencias entre cepas fueron no significativas, aunque resultaron significativas entre los diferentes sustratos base (Tabla 3), registrándose los pies más cortos en PRM (21,78 mm en PRM-BC para la cepa B05; 30,12 mm y 35,08 mm en PRM-BC y PRM-ST, respectivamente, para la cepa M3790).

En la Tabla 3 se observa que, para los caracteres morfológicos analizados, las diferencias entre formulaciones que comparten el mismo sustrato base fueron independientes del tipo de suplemento utilizado (interacción no significativa entre sustrato base-suplemento para longitud del pie y diámetro del píleo). Asimismo, las diferencias observadas fueron independientes del tipo de cepa (interacciones no significativas entre cepa-sustrato base, entre cepa-suplemento, y entre los tres factores).

### Discusión

Las mayores EB de shiitake en las formulaciones testeadas en este trabajo se alcanzaron con materiales leñosos en forma de chips (ChS, ChRM) o viruta (VL). Las EB obtenidas en ChS variaron entre 36,89% y 118,86%, y fueron superiores a las EB de hasta 25% en aserrín de *Salix babylonica* L. obtenidas por Pire et al. (2001). Dichos autores también evaluaron los rendimientos del shiitake en aserrín de lenga, obteniendo EB de hasta 52%, mientras que en este trabajo se obtuvieron EB entre 64,87% y 88,73% en VL utilizando ST como suplemento. Diversos factores pueden explicar estas diferencias de rendimiento, entre ellas el tamaño de partícula del sustrato (Royse et Sánchez-Vázquez, 2001); la cepa utilizada (Royse et Bahler, 1986); el método de inducción de la fructificación (Ohga, 1999; Chen, 2001), sea por inmersión en agua (usado

en este trabajo) o por descenso de temperatura [usado por Pire et al. (2001)]; o el porcentaje de suplemento utilizado en la mezcla de sustrato (Moonmoon et al., 2011; Rossi et al., 2003; Sharma et al., 2013). Entre los factores arriba mencionados, se evidencia que el tipo de cepa utilizado puede afectar la EB como lo sugieren los valores más elevados registrados para la cepa M3790. Por otra parte, el mayor porcentaje de suplemento utilizado en las mezclas de sustrato basadas en ChS (con 24% ST o 15% BC) y VL (con 37% ST) puede explicar las EB superiores en este trabajo respecto a los resultados obtenidos por Pire et al. (2001) en formulaciones con 10% de ST y 10% semillas de mijo. Se debe considerar que una mayor proporción de suplementos permite incrementar los rendimientos, pero también se incrementa el riesgo de contaminación por mohos competidores, cuyas esporas se encuentran en el aire (Albertó, 2008), por lo que se recomienda el uso de dichas proporciones sólo en sustrato esterilizado (Mata et al., 2020). Los reportes previos de cultivo de shiitake en bolsas con sustratos formulados han mostrado EB variables, entre 2% y 112% (Pire et al., 2001; Martínez-Guerrero et al., 2012), por lo que los resultados aquí presentados se ubican sobre los máximos registrados.

Este trabajo constituye el primer estudio de cultivo de shiitake a partir de materiales lignocelulósicos obtenidos de rosa mosqueta. El desempeño de las cepas B05 y M3790 en ChRM fue aceptable, exhibiendo altas Kr con crecimiento micelial vigoroso, y EB entre 36% y 55% utilizando bajos porcentajes de suplementos en la mezcla de sustrato (no mayor al 10% de su composición, ver Tabla 2). Estos resultados (considerando la alta disponibilidad de rosa mosqueta en la región) hacen del ChRM un residuo promisorio para cultivo de shiitake, y futuros ensayos de cultivo podrían ajustar las mezclas de sustrato con diferentes proporciones de suplemento con el fin de aumentar la EB. En contraparte, los bajos rendimientos obtenidos en PRM se agravaron por la elevada incidencia de contaminaciones; además, este residuo contiene numerosas pequeñas espinas que pueden ocasionar molestias en la piel de los operarios que lo manipulen, o molestias respiratorias debido a su volatilidad en estado

seco (Barros Biscari, 2010). Estas condiciones, sumadas a las lentas tasas de colonización descritas anteriormente, hacen del PRM un residuo inadecuado para el cultivo de shiitake, al menos como componente mayoritario en la formulación de un sustrato.

El ST es usualmente empleado como suplemento con el fin de optimizar el crecimiento vegetativo y los rendimientos durante la cosecha (Silva et al., 2005), y los resultados de este trabajo mostraron que estimuló en mayor medida el crecimiento micelial y la producción de basidiomas con respecto al BC. Los resultados observados usando BC como suplemento, particularmente cuando se combinó con ChS y ChRM, indican que puede ser utilizado como suplemento alternativo al ST para cultivo de shiitake.

La determinación del crecimiento micelial en tubos de corrida ha mostrado ser de gran utilidad para evaluar en forma rápida la aptitud de los materiales lignocelulósicos para el cultivo de hongos comestibles (Philippoussis et al., 2003). Aunque no garantiza una correlación con la producción de basidiomas en estadios posteriores del cultivo (en este trabajo se halló una correlación no significativa entre Kr y EB), un rápido crecimiento micelial resulta de importancia para evitar que los organismos antagonistas colonicen y contaminen el sustrato (Martínez-Guerrero et al., 2012). Las diferencias observadas en la apariencia del micelio en las diferentes formulaciones de sustrato, con aspecto más denso y blanquecino en ChRM y ChS, podrían atribuirse a condiciones más favorables y a una capacidad del hongo de explotar los recursos nutritivos de estos sustratos; mientras que un micelio más claro y laxo pueden indicar que el medio es nutricionalmente pobre o desfavorable (Worrall et al., 1992; Zervakis et al., 2001). En forma general, los sustratos que mostraron un aspecto más denso del micelio fueron los que exhibieron mayores EB, como también se observó en trabajos previos con esta especie (Worrall et al., 1992; Sharma et al., 2013). Por otra parte, una menor Kr en PRM en relación a los restantes residuos analizados puede ser atribuida al pequeño tamaño de sus partículas y a la compactación de este residuo al ser

humedecido. La compactación del sustrato reduce la porosidad y la capacidad del hongo de realizar un adecuado intercambio gaseoso, afectando el crecimiento del micelio (Ali et al., 2013).

En tubos de corrida, la Kr no guardó relación con el período comprendido entre la inducción y la primera cosecha en ensayos de fructificación. En este sentido, la aparición temprana de basidiomas podría ser explicada por algunas características del sustrato que no fueron consideradas en este trabajo, como el contenido de hemicelulosa (Philippoussis et al., 2003), menores proporciones C/N y celulosa: lignina (Philippoussis et al., 2007) y la disminución del pH (Gaitán-Hernández et al., 2015).

Las dos cepas utilizadas produjeron píleos mayores de 30 mm de diámetro en las formulaciones de sustrato evaluadas (a excepción de las formulaciones con PRM para la cepa B05), aunque la cepa M3790 se destacó por la formación de píleos con diámetros mayores de 50 mm y pies más cortos. Los basidiomas con píleos mayores de 30 mm de diámetro son aptos para la venta, mientras que los mayores de 50 mm de diámetro poseen mayor valor comercial (Rossi et al., 2003). Asimismo, los basidiomas con pies cortos tienen mayor demanda comercial (Sharma et al., 2018). Los resultados del presente trabajo son comparables a los reportados por otros autores (Philippoussis et al., 2007; Moonmoon et al., 2011; Xu et al., 2020), aunque las dimensiones obtenidas en este trabajo con VL y ChS fueron menores que las observadas por Pire et al. (2001) en aserrines procedentes de la madera de estos árboles. Algunos autores (Royse et al., 1986) hallaron una interacción entre el tiempo de incubación de los bloques, el genotipo y el tipo de sustrato con la EB en cultivos de *L. edodes*, mostrando que mayores tiempos de incubación permiten un incremento en las EB y en el tamaño de los basidiomas para diferentes cepas cultivadas sobre virutas de maderas duras con diferentes suplementos. En este sentido, futuros ensayos podrían ser diseñados considerando estos factores con el objetivo de comprender la causa del comportamiento observado.

## Conclusión

Los residuos lignocelulósicos analizados en este trabajo pueden ser considerados como sustratos alternativos para el cultivo de *Lentinula edodes*, principalmente ChS y ChRM, debido a su alta disponibilidad en Patagonia y por los altos rendimientos obtenidos durante la cosecha. El uso de VL como sustrato arrojó buenos resultados pero a costa de un elevado porcentaje de suplemento en su composición. Los futuros trabajos sobre este residuo deben estar enfocados en su combinación con otros materiales lignocelulósicos, y mediante el uso de cepas de *L. edodes* que exhiban un crecimiento micelial vigoroso y mejores rendimientos durante la cosecha, utilizando proporciones menores de suplementos. En el caso de la PRM, se desaconseja su utilización en formulaciones compuestas mayoritariamente por este residuo, pero se puede replantear su empleo en combinaciones con otros residuos lignocelulósicos que puedan proporcionar una mayor aireación a la formulación del sustrato. Por otra parte, el uso de BC como suplemento alternativo al ST podría ser aceptable en zonas de la Patagonia donde este residuo se encuentre ampliamente disponible. Por último, el comportamiento diferencial de las dos cepas analizadas en las diferentes formulaciones resalta la necesidad de evaluar un número mayor de genotipos de esta especie con el objetivo de identificar cepas que exhiban los mejores rendimientos en diferentes mezclas de sustrato formulados a partir de los residuos agrícolas disponibles en la región.

## Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por subsidios del Fondo de Innovación Tecnológica Regional 007/13. Roggero Luque se desempeñó como consultor profesional contratado para dicho proyecto. Rugolo es becario postdoctoral cofinanciado por el Consejo Nacional de Investigaciones de Argentina (CONICET) y la Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la Provincia del Chubut (SCTeIP). Barroetaveña es miembro de la Carrera de Investigación Científica del CONICET.

## Bibliografía

- ALBERTÓ, E. (2008). Cultivo intensivo de los hongos comestibles. Hemisferio Sur, Buenos Aires.
- ALI, N., TABI, A. N. M., ZAKIL, F. A., FAUZAI, W. N. F. M. & HASSAN, O. (2013). Yield performance and biological efficiency of empty fruit bunch (EFB) and palm pressed fibre (PPF) as substrates for the cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Journal Teknologi* 64: 93-99. <https://doi.org/10.11113/jt.v64.1243>
- BARROS BISCARI, R. M. (2010). Los saberes colectivos locales como factores del anclaje territorial. El SIAL de la Rosa Mosqueta rubiginosa de la Patagonia Argentina. En 116<sup>th</sup> Seminar Spatial Dynamics in Agri-food Systems: Implications for Sustainability and Consumer Welfare, pp. 1-9. European Association of Agricultural Economists. Parma, Italia. <https://dx.doi.org/10.22004/ag.econ.95326>
- BAVA, J. O. & LÓPEZ BERNAL, P. M. (2006). Cortas de selección en grupo en bosques de lenga de Tierra del Fuego. *Quebracho* 13: 77-86.
- COLINO, E., CIVITARESI, H. M., CAPUANO, A., QUIROGA, J. M. & WINKELMAN, B. (2017). Análisis de la estructura y dinámica del complejo cervecero artesanal de Bariloche, Argentina. *Revista Pilquen Sección Ciencias Sociales* 20: 79-91.
- CHANG, S. T. & MILES, P. G. (2004). *Mushrooms: Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact*. 2da ed. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- CHEN, A. W. (2001). Cultivation of *Lentinula edodes* on synthetic logs. *Mushroom Growers' Newsletter* 10: 3-9.
- DI RIENZO, J. A., CASANOVES, F., BALZARINI, M. G., GONZÁLEZ, L., TABLADA, M. & ROBLEDO, C. W. (2017). InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional Córdoba, Argentina. Disponible en <http://www.infostat.com.ar> (Consulta 15 junio 2021).
- GAITÁN-HERNÁNDEZ, R. & SALMONES, D. (2015). Uso de residuos lignocelulósicos para optimizar la producción de inóculo y la formación de carpóforos del hongo comestible *Lentinula boryana*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6: 1639-1652. <https://dx.doi.org/10.29312/remexca.v6i7.556>
- GAO, S., HUANG, Z., FENG, X., BIAN, Y., HUANG, W. & LIU, Y. (2020). Bioconversion of rice straw agro-residues by *Lentinula edodes* and evaluation of non-volatile taste compounds in mushrooms. *Scientific Reports* 10: 1-8. <https://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-58778-x>

- LI, W., CHEN, W., YANG, Y., ZHANG, J., FENG, J., YU, H., ZHOU, S., LI, X. & LIU, Y. (2017). Effects of culture substrates on taste component content and taste quality of *Lentinula edodes*. *International Journal of Food Science & Technology* 52: 981-991. <https://dx.doi.org/10.1111/ijfs.13362>
- LIN, Y., GE, X., LIU, Z. & LI, Y. (2015). Integration of shiitake cultivation and solid-state anaerobic digestion for utilization of woody biomass. *Bioresource Technology* 182: 128-135. <https://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.102>
- MADARIAGA, M. (2009). Sistema de soporte de decisiones para la producción agrícola de los valles cordilleranos patagónicos (SSD). *Presencia* 53: 16-20.
- MARTÍNEZ-GUERRERO, M. A., SIHUANCA, D., MACÍAS-LÓPEZ, A., PÉREZ-LÓPEZ, R. I., MARTÍNEZ-MADRIGAL, J. D. & LÓPEZ-OLGUÍN, J. F. (2012). Characterization and production of shiitake (*Lentinula edodes*) in Mexico using supplemented sawdust. *African Journal of Biotechnology* 11: 10582-10588. <https://dx.doi.org/10.5897/AJB12.266>
- MATA, G., GAITÁN-HERNÁNDEZ, R., PÉREZ-MERLO, R. & ORTEGA, C. (2002). Improvement of shiitake spawn for culturing on pasteurized wheat straw. En SÁNCHEZ, J.E., HUERTA, G. & E. MONTIEL, (eds.), *Mushroom biology and mushroom products*, pp. 303-309. Universidad Autónoma de Morelos, Cuernavaca, México.
- MATA, G., GAITÁN-HERNÁNDEZ, R. & SALMONES, D. (2020). El cultivo de shiitake: tecnología e innovación en la producción de un alimento y medicina ancestral. Instituto de Ecología, A. C., Xalapa, México.
- MIZUNO, T. (1995). Shiitake, *Lentinus edodes*: functional properties for medicinal and food purposes. *Food Reviews International* 11: 109-128. <https://dx.doi.org/10.1080/87559129509541022>
- MOONMOON, M., SHELLY, N. J., KHAN, M. A., UDDIN, M. N., HOSSAIN, K., TANIA, M. & AHMED, S. (2011). Effects of different levels of wheat bran, rice bran and maize powder supplementation with sawdust on the production of shiitake mushroom (*Lentinus edodes* (Berk.) Singer). *Saudi Journal of Biological Sciences* 18: 323-328. <https://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2010.12.008>
- MUSSATTO, S. I., DRAGONE, G. & ROBERTO, I. C. (2006). Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science* 43: 1-14. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2005.06.001>
- OHGA, S. (1999). Effect of water potential on fruit body formation of *Lentinula edodes* in sawdust-based substrate. *Journal of Wood Science* 45: 337-342. <https://dx.doi.org/10.1007/BF00833500>
- PHILIPPOUSSIS, A. N., DIAMANTOPOULOU, P. A. & ZERVAKIS, G. I. (2003). Correlation of the properties of several lignocellulosic substrates to the crop performance of the shiitake mushroom *Lentinula edodes*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19: 551-557. <https://dx.doi.org/10.1023/a:1025100731410>
- PHILIPPOUSSIS, A. N., DIAMANTOPOULOU, P. A. & ISRAILIDES, C. (2007). Productivity of agricultural residues used for the cultivation of the medicinal fungus *Lentinula edodes*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 59: 216-219. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.10.007>
- PIRE, D. G., WRIGHT, J. E. & ALBERTÓ, E. (2001). Cultivation of shiitake using sawdust from widely available local woods in Argentina. *Micologia Aplicada International* 13: 87-91.
- ROGGERO LUQUE, J. M. *EX AEQUO*, RUGOLO, M. *EX AEQUO*, RAJCHENBERG, M., & BARROETAVEÑA, C. (2021). Assessment of lignocellulosic residues from Northern Patagonian Andes (Argentina) for cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Universitas Scientiarum* 26: 159-177. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC262.aolr>
- ROSSI, I. H., MONTEIRO, A. C., MACHADO, J. O., ANDRIOLI, J. L. & BARBOSA, J. C. (2003). Shiitake (*Lentinula edodes*) production on a sterilized bagasse substrate enriched with rice bran and sugarcane molasses. *Brazilian Journal of Microbiology* 34: 66-71. <https://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822003000100014>
- ROYSE, D. J. & BAHLER, C. C. (1986). Effects of genotype, spawn run time and substrate formulation on biological efficiency of shiitake. *Applied and Environmental Microbiology* 52: 1425-1427. <https://dx.doi.org/10.1128/AEM.52.6.1425-1427.1986>
- ROYSE, D. J. & SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, J. E. (2001). Influence of substrate wood-chip particle size on shiitake (*Lentinula edodes*) yield. *Bioresource Technology* 76: 229-233. [https://dx.doi.org/10.1016/s0960-8524\(00\)00110-3](https://dx.doi.org/10.1016/s0960-8524(00)00110-3)
- SÁNCHEZ, J. E., ZIED, D. C. & ALBERTÓ, E. (2018). Edible mushroom production in the Americas. En 9th International conference on mushroom biology and mushroom products, pp. 2-11. World Society of Mushroom Biology and Mushroom Products, Shanghai, China.
- SHARMA, S., KHANNA, P. K. & KAPOOR, S. (2013). Effect of supplementation of wheat bran on the production

- of shiitake (*Lentinus edodes* (Berk) Peglar) using wheat straw and sawdust substrates. *The Bioscan* 8: 817-820.
- SHARMA, V. P., ANNEPU, S. K., BARH, A., SHIRUR, M. & KAMAL, S. (2018). Genetic divergence and cluster analysis in shiitake genotypes based on yield related traits with commercial breeding significance to shorten the production period. *International Journal of Vegetable Science* 24: 424-431. <https://dx.doi.org/10.1080/19315260.2018.1433264>
- SILVA, E. M., MACHUCA, A. & MILAGRES, A. M. F. (2005). Effect of cereal brans on *Lentinula edodes* growth and enzyme activities during cultivation on forestry waste. *Letters in Applied Microbiology* 40: 283-288. <https://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01669.x>
- THOMAS, L. K., MOSNER, E. & LEYER, I. (2015). River dynamics and invasion: distribution patterns of native and invasive woody vegetation at the Río Negro, Argentina. *Riparian Ecology and Conservation* 2: 45-57. <https://dx.doi.org/10.1515/remc-2015-0001>
- WORRALL, J. J. & YANG, C. S. (1992). Shiitake and oyster mushroom production on apple pomace and sawdust. *HortScience* 27: 1131-1133. <https://dx.doi.org/10.21273/HORTSCI.27.10.1131>
- XU, S., WANG, F., FU, Y., LI, D., SUN, X., LI, C., SONG, B. & LI, Y. (2020). Effects of mixed agro-residues (corn crop waste) on lignin-degrading enzyme activities, growth, and quality of *Lentinula edodes*. *RSC Advances* 10: 9798-9807. <https://dx.doi.org/10.1039/c9ra10405d>
- ZERVAKIS, G., PHILIPPOUSSIS, A., IOANNIDOU, S. & DIAMANTOPOULOU, P. (2001). Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosic substrates. *Folia Microbiologica* 46: 231. <https://dx.doi.org/10.1007/bf02818539>