



---

## **Universidad de Valladolid**

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS  
AGRARIAS**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGRÍCOLA Y  
FORESTAL**

### **TESIS DOCTORAL:**

**“Aprovechamiento de Residuos Agroforestales,  
con particular interés en los originados en  
explotaciones de Nuez Pecán (*Carya illinoensis*), por  
medio del cultivo de Hongos Saprófitos Saludables  
Ibéricos”**

**Presentada por *María Virginia Ozcariz  
Fermoselle* para optar al grado de Doctora por  
la **Universidad de Valladolid****

**Dirigida por:  
Dr. Juan Andrés Oria de Rueda Salgueiro  
Dr. Tomás Girbés Juan**

## RESUMEN

El presente proyecto de investigación tuvo como objetivo estudiar el potencial de aprovechamiento de residuos agroforestales, con particular interés en los restos generados en explotaciones de nuez pecán (*Carya illinoensis* (Wang.) K. Koch) en la Península Ibérica. Primero se estudiaron las características de los tres residuos lignocelulósicos: cáscara de nuez pecán (CP), pericarpio de nuez pecán (PP) y astillas de ramas de podas de nuez pecán (AP). Posteriormente se procedió a evaluar su potencial como sustrato sólido para el cultivo de hongos saprófitos. Para ello se formularon siete sustratos diferentes: CP, PP, AP; combinaciones pareadas (1:1) y triple (1:1:1). Las especies saprofitas utilizadas fueron *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., especie comestible con alto valor nutricional y *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., estirpe medicinal de amplio espectro. Se validaron los residuos como sustratos viables para el cultivo de dos especies de hongos saprofitos nutracéuticos, mediante el estudio de colonización de los sustratos formulados. Se analizaron la eficiencia biológica (EB), la producción (P) y la eficiencia biológica en seco (EBS) de los carpóforos recolectados de cada hongo de origen peninsular. Se compararon los resultados obtenidos con los rendimientos obtenidos con otros residuos empleados en estudios anteriores. También se evaluó el contenido fenólico de las setas cultivadas y sus diferencias por tipo de sustrato. Los resultados obtenidos brindan una alternativa ecológica, potenciando los beneficios globales de la producción de pecán, mediante el uso de los residuos lignocelulósicos para obtener productos de alto valor añadido en forma de hongos nutracéuticos.

Palabras Clave: *Carya illinoensis*; residuos lignocelulósicos; *Pleurotus ostreatus*; *Ganoderma lucidum*; contenido fenólico.

## ABSTRACT

This research project aimed to study the potential use of agroforestry waste, with particular interest in studying the remains generated on pecan nuts farms (*Carya illinoensis* (Wang.) K. Koch) from the Iberian Peninsula. Firstly, it was studied the characteristics of the pecan lignocellulosic waste: pecan nut shell (CP), pecan nut pericarp (PP) and wood-chips of pruning branches of pecan nut (AP). Subsequently, it was evaluated its potential as a solid substrate for the cultivation of saprophytic fungi. Seven formulations of waste of pecan were used as solid substrate: pecan shells (CP), pecan pericarp (PP), wood-chips (AP); the paired combinations (1:1) and triple (1:1:1). The saprophytes species used were *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., edible species with high nutritional value and *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., a broad spectrum medicinal strain. Residues were validated as viable substrates for growing two species of nutraceuticals saprophytic fungi, by studying colonization of formulated substrates. The biodegradation capacity of *G. lucidum* and *P. ostreatus* was estimated by mycelial growth rate, biological efficiency (EB), production (P) and dry biological efficiency (EBS). Notably, all substrates formulations were suitable for both fungus growth and mushroom yield. The results obtained in this study are compared to yields on other wastes used in previous studies. The phenolic content of cultivated mushrooms and their differences by type of substrate was also evaluated. The results support the viability of an environmentally friendly alternative that increase the global benefits of the pecan farms, converting lignocellulosic waste into nutraceutical mushrooms with high market value.

Keyword: *Carya illinoensis*; lignocellulosic waste; *Pleurotus ostreatus*; *Ganoderma lucidum*; phenolic content.

## **Agradecimientos**

Este trabajo se ha llevado a cabo en el Departamento de Ingeniería Agrícola y Forestal, Campus de Palencia y en Laboratorio de Nutrición y Bromatología, Facultad de Medicina, de la Universidad de Valladolid. Ha sido financiado con la beca doctoral del programa EUROTANGO, de cooperación internacional de Erasmus-Mundus. También gracias al Programa Erasmus+, ha sido posible realizar mi estancia doctoral internacional en el Centro de Ecología Funcional de la Universidad de Coimbra, bajo la tutoría de la Dra. Anabela Marisa Azul.

Deseo agradecer a los profesionales que me acompañaron para hacer posible mi investigación Dr. Juan Andrés Oria de Rueda Salgueiro, Dr. Tomás Girbes Juan, Dra. Anabela Marisa Azul, Raúl Fraile Fabero y Dr. Luis Acuña. También a los que me acompañaron durante mi carrera universitaria de Ingeniería Industrial en la Universidad Nacional de Rosario, en los estudios de Máster en Investigación en Ingeniería para el Desarrollo Agroforestal del Departamento de Ingeniería Agrícola y Forestal, Universidad de Valladolid, Campus de Palencia y especialmente al Programa de Doctorado de Investigación en Ingeniería para el Desarrollo Agroforestal, coordinador Dr. Salvador Hernández Navarro e integrantes de la comisión.

En especial me gustaría dedicar esta Tesis a mi familia, mi amado esposo Diego y futura hija, padres y hermanos, porque siempre han confiado en mis capacidades y por haberme apoyado en todo momento. A mis padres Carlos Guillermo y Adriana del Valle, a mis hermanos María del Valle, Mariano Alberto, María Victoria, María Mercedes y Santiago Joaquín; mis cuñados y mis preciosos sobrinos Tiago, Alejo, Mateo y Emilia. Mi querida abuela Nené y mis abuelos QEPD. Y mis amigos.

*“...la degradación ambiental y  
la degradación humana y ética  
están íntimamente unidas.”*

**Papa Francisco**  
(*Laudato Sí*, 2015)

## Abreviaturas

|         |   |
|---------|---|
| %       | Tanto por ciento  |
| μ       | Micra   |
| AC      | Antes de Cristo   |
| Ac.     | Ácido   |
| cm      | Centímetros   |
| DE      | Desviación estándar   |
| DTG     | Termogravimetría Diferencial o curva DTC, % en peso/min                   |
| EB      | Eficiencia biológica  |
| EBS     | Eficiencia biológica en seco  |
| eq.     | Equivalente   |
| ETSIIAA | Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias                          |
| FAO     | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura |
| g       | Gramo   |
| GL      | <i>Ganoderma lucidum</i>  |
| h       | Hora  |
| INTA    | Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria                             |
| mg      | Miligramos  |
| min     | Minuto  |
| mm      | Milímetros  |
| °C      | Grados Celsius  |
| P       | Producción  |
| p/p     | Peso sobre peso   |
| p/p     | Peso sobre peso   |
| pH      | Medida de la acidez o la alcalinidad de una disolución                    |

|      |   |
|------|---|
| ph   | Peso húmedo                                       |
| PO   | <i>Pleurotus ostreatus</i>                        |
| ps   | Peso seco   |
| USDA | Departamento de Agricultura de los Estados Unidos |
| UV   | Ultra Violeta                                     |
| UVa  | Universidad de Valladolid                         |
| v/v  | Volumen sobre volumen                             |

# ÍNDICE

|                                   |     |
|-----------------------------------|-----|
| RESUMEN .....                     | i   |
| ABSTRACT.....                     | ii  |
| Agradecimientos .....             | iii |
| Abreviaturas.....                 | v   |
| ÍNDICE.....                       | vii |
| Índice de tablas.....             | xi  |
| Índice de figuras.....            | xii |
| INTRODUCCIÓN .....                | 1   |
| Definición del Problema .....     | 1   |
| Interés Científico y Social.....  | 3   |
| OBJETIVOS .....                   | 4   |
| General .....                     | 4   |
| Específicos .....                 | 4   |
| ANTECEDENTES .....                | 5   |
| CARACTERIZACIÓN DEL PECÁN .....   | 5   |
| Sus Orígenes.....                 | 5   |
| Características Botánicas.....    | 5   |
| Agro-climatología.....            | 8   |
| Requerimientos del suelo .....    | 9   |
| Producción Mundial del Pecán..... | 9   |
| Nueces .....                      | 11  |
| RESIDUOS DE PECÁN.....            | 14  |
| Composición y estructura .....    | 15  |
| Cáscara .....                     | 15  |
| Pericarpio y Ramas de Poda.....   | 17  |

|  |    |
|--|----|
| Aprovechamientos actuales de los residuos .....                      | 17 |
| HONGOS .....   | 19 |
| Hongos micorrícicos.....   | 20 |
| Hongos saprófitos .....  | 22 |
| Hongos parásitos .....   | 23 |
| <i>P. ostreatus</i> .....  | 25 |
| Degradador de sustratos y biorremediador.....                        | 26 |
| <i>G. lucidum</i> .....  | 32 |
| MATERIALES Y MÉTODOS .....   | 36 |
| MATERIAL DE LABORATORIO .....  | 36 |
| Laboratorios de Ecofisiología.....                                   | 36 |
| Laboratorios de Nutrición y Bromatología.....                        | 38 |
| METODOLOGÍA .....  | 40 |
| Técnicas de laboratorio de microbiología para cultivo de hongos..... | 40 |
| Utilización de cámara de flujo laminar .....                         | 40 |
| Pecán .....  | 41 |
| Caracterización de los residuos.....                                 | 41 |
| Determinación del pH.....  | 42 |
| Determinación de la humedad .....                                    | 42 |
| Determinación de cenizas.....  | 43 |
| Análisis de contenido fenólico .....                                 | 44 |
| Cepas.....   | 46 |
| Comercial .....  | 46 |
| Recolección de carpóforos silvestres en la Península Ibérica .....   | 46 |
| Identificación taxonómica .....                                      | 47 |
| Aislamiento del micelio.....   | 48 |

|  |    |
|--|----|
| Crecimiento del micelio .....                                      | 48 |
| Preparación y conservación del blanco de hongo.....                | 49 |
| Crecimiento del Blanco de Hongo .....                              | 49 |
| Preparación del sustrato .....                                     | 50 |
| Cultivo.....   | 50 |
| Rendimientos.....  | 51 |
| Análisis del contenido fenólico .....                              | 51 |
| Análisis estadístico.....  | 52 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....                                       | 53 |
| Caracterización de los residuos de Pecán.....                      | 53 |
| Determinación de pH, Humedad y Cenizas .....                       | 53 |
| Determinación de contenido fenólico (método Folin–Ciocalteu) ..... | 53 |
| Cepas.....   | 55 |
| Hábitats ibéricos de <i>P. ostreatus</i> .....                     | 55 |
| Colección de <i>P. ostreatus</i> .....                             | 56 |
| Hábitats ibéricos de <i>G. lucidum</i> .....                       | 61 |
| Colección de <i>G. lucidum</i> .....                               | 63 |
| Cultivo de Hongos Nutracéuticos .....                              | 70 |
| <i>P. ostreatus</i> .....  | 70 |
| Crecimiento del blanco de hongo .....                              | 70 |
| Colonización micelial del sustrato de pecán .....                  | 71 |
| Características morfológicas .....                                 | 71 |
| Rendimientos.....  | 72 |
| Análisis de fenoles totales .....                                  | 75 |
| <i>G. lucidum</i> .....  | 77 |
| Crecimiento del blanco de hongo.....                               | 77 |

|   |     |
|---|-----|
| Colonización micelial del sustrato de pecán ..... | 77  |
| Características morfológicas .....                | 78  |
| Rendimientos.....                                 | 79  |
| Análisis de fenoles totales .....                 | 82  |
| CONCLUSIONES .....                                | 84  |
| CONCLUSION.....                                   | 86  |
| BIBLIOGRAFÍA .....                                | 88  |
| ANEXO I: GLOSARIO.....                            | 107 |

## Índice de tablas

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Nombres alternativos del fruto y árbol de <i>C. illinoensis</i> por país .....   | 6  |
| Tabla 2. Composición nutricional de la nuez pecán, (USDA, 2012).....  | 11 |
| Tabla 3. Composición nutricional de cáscara de nuez pecán (Pinheiro do Prado y cols., 2009) .....   | 15 |
| Tabla 4. Análisis elemental de cáscara de nuez pecán .....  | 16 |
| Tabla 5. Análisis de la biomasa de cáscara de nuez pecán (Antal y cols., 2000) 16   |    |
| Tabla 6. Análisis de la biomasa del pericarpio y ramas de poda de plantaciones de pecán .....   | 17 |
| Tabla 7. Trufas comestibles estudiadas sobre plantaciones de <i>C. illinoensis</i> ..   | 22 |
| Tabla 8. Composición nutricional de 100 g de seta de ostra (FAO 2001).....  | 26 |
| Tabla 9. Sustratos utilizados para el cultivo de seta comestible <i>P. ostreatus</i> .....  | 28 |
| Tabla 10. Sustratos utilizados para el cultivo de seta medicinal <i>G. lucidum</i> .....  | 34 |
| Tabla 11. Formulación de sustratos (cáscara de nuez pecán-CP, pericarpio de nuez pecán-PP y astillas de ramas de pecán-AP) .....                      | 50 |
| Tabla 12. Caracterización de pH, humedad y cenizas de los residuos de pecán (CP, PP y AP), dadas en $M \pm DE$ (media $\pm$ desviación estándar)..... | 53 |
| Tabla 13. Contenido fenólico de los residuos de pecán, en ps (peso seco) .....  | 54 |
| Tabla 14. Origen y características de los hábitats de cepas Ibéricas de <i>P. ostreatus</i> en estudio .....  | 60 |
| Tabla 15. Origen y características de los hábitats de cepas Ibéricas de <i>G. lucidum</i> en estudio.....   | 68 |
| Tabla 16. Características morfológicas del cultivo de PO1 sobre formulaciones de sustratos de pecán .....   | 72 |
| Tabla 17. Características morfológicas del cultivo de GL1 para las 7 formulaciones de sustratos, dadas en $M \pm DE$ .....                            | 79 |

## Índice de figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Importación media de nueces en la UE, período 1997-2001, (FAO, 2003).....  | 1  |
| Figura 2. Plantación de nuez pecán de unos 20 años de edad, Finca de Alejandro Ferrazzi, localidad Colón, Entre Ríos, Argentina.....   | 6  |
| Figura 3. Países productores de nuez pecán .....   | 10 |
| Figura 4. Porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), poliinsaturados (PUFA) y saturados (SFA) de aceites extraídos de cinco frutos secos comestibles, (Domínguez-Avila y cols., 2015) .....   | 12 |
| Figura 5. Nueces pecán de 6 cultivares originarios de Texas (Villareal-Lozoya y cols., 2007) .....   | 13 |
| Figura 6. Productos artesanales de nuez pecán de productores de Colón (Entre Ríos, Argentina).....   | 13 |
| Figura 7. Nuez pecán ( <i>C. illinoensis</i> ), cáscara y pericarpio (Foto Viveros ANJU).....  | 14 |
| Figura 8. Residuos de a) cáscaras y b) ramas de podas acopiados en las plantaciones, Finca de Alejandro Ferrazzi, Colón, Entre Ríos, Argentina.....  | 14 |
| Figura 9. DTG de cáscara de nuez pecán (Miranda y cols., 2009).....  | 16 |
| Figura 10. Setas detectadas en plantaciones argentinas de pecán.....   | 24 |
| Figura 11. <i>Ganoderma</i> sp. sobre restos de ramillas, valvas y nueces pecan, en Finca del productor Alejandro Ferrazzi, localidad Colón, Entre Ríos, Argentina .....   | 33 |
| Figura 12. Materiales y equipos para el proceso de cultivos de hongos.....   | 38 |
| Figura 13. Preparación de residuos de, a) nueces con pericarpios secos antes de clasificar, b) nueces con cáscaras en bandeja para prensar, c) prensa mecánica para abrir nueces y prensar cáscaras y pericarpios d) cáscaras troceadas..... | 41 |
| Figura 14. a) Ramas de poda, b) troceadora de biomasa y c) astillas de ramas de pecán.....   | 42 |
| Figura 15. Cazoletas de acero inoxidable con residuos de pecán en desecador .  | 43 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 16. Preparación de las muestras y obtención de las cenizas a) Mufla, b) muestra en crisoles de porcelana antes de la incineración, c) muestras incineradas y d) pesada de las cenizas ..... | 43 |
| Figura 17. Reacción de Folin – Ciocalteau. Girbés y Jiménez (2010) .....   | 45 |
| Figura 18. Tubos de extractos de residuos con reactivos b) baño a 50°C y c) espectrofotómetro UV calibrado .....   | 45 |
| Figura 19. Réplica del micelio comercial de cepa PO1 en placa Petri .....  | 46 |
| Figura 20. Características microscópicas del a) <i>P. ostreatus</i> (Breitenbach y Kränzlin, 1991) y b) <i>G. lucidum</i> (Bernicchia, 2005).....  | 47 |
| Figura 21. Método utilizado para medir el crecimiento del micelio en placas Petri.....   | 49 |
| Figura 22. Recta patrón de la reacción de ácido gálico con el reactivo de Folin – Ciocalteau .....   | 54 |
| Figura 23. Cubetas para medir el contenido fenólico de los residuos de pecán .   | 54 |
| Figura 24. Contenido fenólico de los residuos de pecán, en peso seco. Las diferentes letras en las columnas representan las diferencias significativas, $P < 0.05$ ....                            | 55 |
| Figura 25. a) Fotografía del hábitat (Carlos Rojo de Blas), b) carpóforo PO2..   | 57 |
| Figura 26. a) Fotografía de primordios en su hábitat y b) carpóforos PO3 en crecimiento .....  | 58 |
| Figura 27. a) Fotografía del hábitat, b) carpóforo PO4 .....   | 58 |
| Figura 28. a) Fotografía del hábitat, b) carpóforo PO5 .....   | 59 |
| Figura 29. a) Fotografía del hábitat, b) carpóforo PO6, (Carlos Rojo de Blas)..  | 60 |
| Figura 30. Ratio de crecimiento micelial de las diferentes cepas Ibéricas de <i>P. ostreatus</i> . Las medias con distinta letra son significativamente diferentes, ( $P < 0.05$ )...              | 61 |
| Figura 31. a) Fotografía del hábitat (Alvaro Rodrigo), b) carpóforos GL1 y c) GL2.....   | 64 |
| Figura 32. a) y c) Fotografía de los hábitats, b) y d) carpóforos GL3 y GL4.....   | 65 |
| Figura 33. a) Fotografía del hábitat, b) carpóforo GL5 .....   | 66 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 34. a) Fotografía del hábitat, b) carpóforo GL6 .....  | 66 |
| Figura 35. a) Fotografía del hábitat, b) carpóforo GL7 .....  | 67 |
| Figura 36. a) Fotografía del hábitat, b) carpóforo GL8 (Raúl Fraile Fabero)....   | 68 |
| Figura 37. Ratio de crecimiento micelial de las diferentes cepas Ibéricas de <i>G. lucidum</i> . Las medias con distinta letra son significativamente diferentes, (P< 0.05).... | 69 |
| Figura 38. Crecimiento diario del blanco de hongo en frascos, de la cepa PO1  | 70 |
| Figura 39. Colonización micelial para las 7 formulaciones de sustratos. Las medias con distinta letra son significativamente diferentes, (P< 0.05) .....                        | 71 |
| Figura 40. Carpóforos de PO1 cultivados en tubos .....  | 72 |
| Figura 41. a) Eficiencia biológica, b) producción y c) eficiencia biológica en seco del cultivo de PO1 sobre residuos de pecán .....  | 73 |
| Figura 42. EB del presente estudio (barras negras), comparadas con otros estudios (barras blancas).....   | 74 |
| Figura 43. EBS del presente estudio (barras negras), comparadas con otro estudio (barras blancas) .....   | 75 |
| Figura 44. Contenido fenólico de los <i>P. ostreatus</i> cultivados sobre 7 formulaciones de sustratos de pecán .....   | 76 |
| Figura 45. Crecimiento diario del blanco de hongo en frascos, de la cepa GL1  | 77 |
| Figura 46. Colonización micelial para las 7 formulaciones de sustratos. Las medias con distinta letra son significativamente diferentes, (P< 0.05) .....                        | 78 |
| Figura 47. Carpóforos de GL1 cultivados en tubos.....   | 79 |
| Figura 48. a) Eficiencia biológica, b) producción y c) eficiencia biológica en seco del cultivo de GL1 sobre residuos de pecán.....   | 80 |
| Figura 49. EB del presente estudio (barras negras), comparadas con otros estudios (barras blancas).....   | 81 |
| Figura 50. EBS del presente estudio (barras negras), comparadas con otro estudio (barras blancas) .....   | 81 |
| Figura 51. Contenido fenólico de los <i>G. lucidum</i> cultivados sobre 7 formulaciones de sustratos de pecán .....   | 83 |

## INTRODUCCIÓN

### Definición del Problema

La creciente demanda de los frutos secos, debido a sus inigualables propiedades nutritivas, que hacen de ellos hoy en día un alimento saludable, han llevado a los mercados mundiales, a incrementar notablemente sus importaciones (Gómez y cols., 2005) (fig. 1).

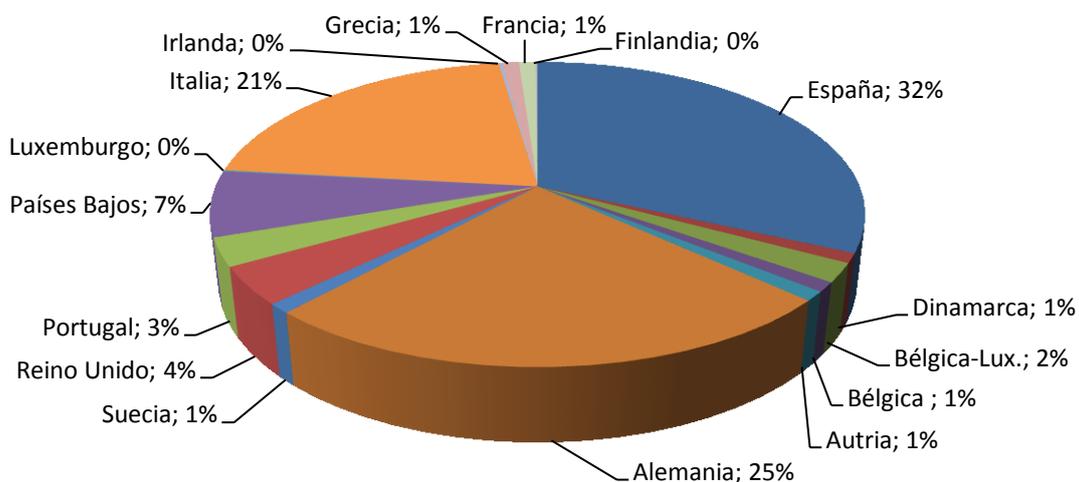


Figura 1. Importación media de nueces en la UE, período 1997-2001, (FAO, 2003)

A su vez, las ventajas comparativas de los cultivos de la nuez pecán (*Carya illinoensis*), en relación con otros cultivos de su misma especie, hacen atractivo incrementar los conocimientos para poder estudiar las zonas propicias en las cuales esta juglandácea está incrementando sus áreas cultivadas en el mundo. Interesa estudiar el aprovechamiento de un modo integral de los residuos obtenidos de esta dinámica foresto-industrial.

Por otra parte, el uso de la biomasa para la generación de nuevos materiales y bio-productos puede acarrear grandes beneficios económicos y medioambientales. En los últimos años se ha centrado el interés mundial en la búsqueda de alternativas para la gestión y la utilización de la elevada cantidad de residuos lignocelulósicos derivados de

las actividades agroforestales. Las alternativas de aprovechamiento implementadas hasta el momento se han enfocado fundamentalmente hacia su recuperación energética (Cerda, 1998). Sin embargo, considerando su alto contenido en fuentes de carbono lignocelulósicos (Bonatti y cols., 2004), resulta interesante explorar las posibilidades de estos residuos como sustrato para el cultivo y producción de setas nutraceuticas (comestibles y medicinales). La crisis energética, el deterioro del medio ambiente y el crecimiento demográfico ponen de manifiesto la importancia de producir alimentos proteicos de calidad, de manera sustentable y en equilibrio con la conservación de la naturaleza. Los hongos comestibles constituyen una importante fuente de alimento, y algunos países en vías de desarrollo los consideran una alternativa novedosa para la obtención de alimentos de bajo costo (Wang y cols., 2004).

El *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. es la seta comestible más cultivada en China, país que produce más de 5 millones de toneladas anuales (2011), representando el 80 % de la producción mundial (Zhang y cols., 2014). Entre los hongos medicinales, el que encabeza la lista de mayor interés, se encuentra el *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., conocido comúnmente en China con el nombre de "Ling zhi", y en Japón con el nombre de "Reishi". En estos países ha sido ampliamente usado como ingrediente en muchos alimentos y materia prima para el desarrollo de medicamentos (Lakhanpal y Rana, 2005) debido a sus comprobados efectos como estimulador del sistema inmunológico y a su actividad anticancerígena (Berovič y cols., 2003; Paterson, 2006), entre otros. Además, la utilización de residuos generados en plantaciones de nuez pecán (*C. illinoensis*) como sustrato sólido para la producción de hongos saprófitos, puede potenciar de un modo sustentable las explotaciones de pecán de forma integral.

El objetivo de este estudio es evaluar el potencial de los residuos de plantaciones de nuez pecán como sustrato viable para el cultivo de hongos saprófitos de especial interés para el hombre, analizando la composición de los residuos lignocelulósicos, los rendimientos y calidad de los cuerpos fructíferos de *P. ostreatus* y *G. lucidum* tras su cosecha.

## **Interés Científico y Social**

El interés científico de esta investigación radica en brindar una metodología y evaluar una composición de sustratos sólidos para obtener carpóforos de *P. ostreatus* y *G. lucidum*, con los residuos lignocelulósicos de *C. illinoensis*. Por otra parte, radica en la validación científica de un aprovechamiento con valor agregado, el cultivo de hongos nutraceuticos, consiguiendo productos finales de alto valor nutraceutico y de gran interés comercial y social.

Desde el punto medioambiental, dicho aprovechamiento cierra un sistema productivo con reducida huella de carbono, ya que el sustrato gastado no se incinera y sirve como abono a la agricultura del lugar. Todo esto lleva a potenciar tanto a los productores de nuez pecán, como a la obtención de un destino final de los residuos de gran valor socio-económico y ambiental. Otro interés social radica en el fortalecimiento y diversificación de un sector agroforestal estacional como es el caso del pecán, donde al incorporar el cultivo de hongos en su sistema productivo, puede generar una estabilidad anual.

Por otro lado se plantea la idea de un aprovechamiento productivo utilizando la biodiversidad disponible en el lugar. Es por ello que se persigue recolectar cepas silvestres en la Península Ibérica para, con posterioridad, cultivar hongos saprobios usando residuos disponibles en ese mismo territorio.

## OBJETIVOS

### General

El objetivo principal es evaluar el potencial de residuos lignocelulósicos, originarios de plantaciones de *C. illinoensis*, como sustrato sólido para el cultivo de hongos saprófitos nutracéuticos. En particular, se analizan los residuos lignocelulósicos del pecán y su potencialidad de ser utilizados como sustrato sólidos para la producción de setas comestibles de *P. ostreatus* y setas medicinales de *G. lucidum*, evaluando los rendimientos y el contenido total de sustancias reductoras de los cuerpos fructíferos, tras su cosecha. Se ha buscado especialmente, con trabajo de campo, conseguir estirpes de hongos autóctonas y residuos forestales de origen de la Península Ibérica. De esta forma se apoya la conservación de la biodiversidad y se persigue el desarrollo sostenible, evitando el ingreso de estirpes y materiales exóticos.

### Específicos

- Caracterización de los residuos:
  - Localización cultivos de nuez pecán en la Península Ibérica y el Mundo.
  - Evaluación de los residuos generados en las explotaciones.
  - Composición de los residuos lignocelulósicos.
  - Aprovechamientos actuales de los residuos.
  
- Estudio del cultivo de setas:
  - Obtención y caracterización de cepas autóctonas de *P. ostreatus* y *G. lucidum* en la Península Ibérica.
  - Dar a conocer la potencialidad que tienen nuestras cepas ibéricas de *G. lucidum* y *P. ostreatus*, sus características y hábitats autóctonos.
  - Cultivo de seta de ostra, *P. ostreatus*, especie comestible.
  - Cultivo de reishi, *G. lucidum*, especie medicinal.
  - Análisis de contenidos fenólicos (capacidad reductora total) de las fructificaciones de ambas especies en los diferentes sustratos sólidos.
  - Análisis sustentable de la utilización de residuos lignocelulósicos de pecán como sustrato sólido para el cultivo de hongos nutracéuticos.

## **ANTECEDENTES**

### **CARACTERIZACIÓN DEL PECÁN**

#### **Sus Orígenes**

La nuez pecán, también llamada nuez americana, es el fruto de la *C. illinoensis* (Wangenheim) K. Koch, árbol de hoja caduca de la familia *Juglandaceae* originario del centro y norte de América. Esta especie se extiende desde el Valle del Río Mississippi y sus afluentes, por buena parte del Este, Centro y Sureste de los Estados Unidos (Indiana, Iowa, Misisipi y Texas) hasta buena parte del norte y centro de México (Chihuahua, Coahuila, Tamaulipas, Nuevo León, Guanajuato, Jalisco, Oaxaca y Veracruz) (Peterson, 1990). Es higrófila y propia de clima continental suave en dominios de bosques caducifolios mesófilos de tipo apalachense (Ruiz de la Torre, 2006).

El origen de su uso como alimento es muy antiguo y data de la Prehistoria. Con la llegada de las primeras poblaciones humanas se utilizaría con seguridad como alimento. De hecho, se han encontrado restos de semillas y hojas de pecán junto a herramientas humanas del año 6.100 AC en el interior de la Cueva de Baker (Baker's Cave), en el llamado Río del Diablo en la localidad de Valverde, estado de Texas (Dering, 1977; Hester, 1981). Los indios de numerosas tribus norteamericanas apreciaban muchos estos frutos en su alimentación, llegando a desplazarse anualmente largas distancias para su recogida e intercambio. Incluso se dedicaban a producir una bebida alcohólica por fermentación, llamada "powcohicora" (McWilliams, 2013).

#### **Características Botánicas**

El pecán (*C. illinoensis*) o nogal americano pertenece a la familia de las Juglandáceas (*Juglandaceae*), siendo el árbol más alto y desarrollado dentro del género *Carya* y correspondiente a la especie *illinoensis*. A la nuez se la conoce comúnmente con el nombre de nuez pecán, pacana, pecán o picán (tabla 1). La palabra pecán procede del indígena americano náhuatl *paccan* o *pakana* que alude a una nuez que requiere una piedra para partirse (Real Academia Española, 2014). Numerosas tribus americanas apreciaban sus frutos. Poco tiempo después del Descubrimiento de América, en el viaje del español Hernando de Soto por tierras americanas en 1541, el cronista habla de unos

nogales que por la detallada descripción del fruto no deja ninguna duda que se trata de *C. illinoensis* (Peattie, 1950; Villanueva, 2000). Los conquistadores españoles ya del siglo XVI escriben en numerosos textos sobre la generalizada utilización y comercialización de sus frutos como alimento de todos los indios de la zona de Colorado, Nuevo Méjico. Arizona, Tejas, etc.



*Figura 2. Plantación de nuez pecán de unos 20 años de edad, Finca de Alejandro Ferrazzi, localidad Colón, Entre Ríos, Argentina.*

*Tabla 1. Nombres alternativos del fruto y árbol de *C. illinoensis* por país*

| <b>País</b>        | <b>Idioma</b> | <b>Nombre común</b>  |
|--------------------|---------------|--|
| Alemania           | alemán        | Pekan, Pekannuss   |
| Argentina, Uruguay | español       | Nuez pecán, Pecán  |
| Brasil, Portugal   | portugués     | Noz pecã, Nogueira-pecã, Pecan   |
| España             | español       | Nuez pacana, Picán   |
| Francia            | francés       | Noix de pécan, Pacanier  |
| Italia             | italiano      | Noce pecan, Pecan  |
| México             | español       | Pecán, nogal pecanero o americano o de cuilpan (árbol), Picán, Pacano<br><br>Nuez pecanera, encarcelada, pacana, pecana o nuez pacana (fruto) (“pacana” es voz indígena náhuatl de donde proceden todos los demás derivados) (Diccionario de la Real Academia Española, 2013). |
| USA, Inglaterra    | inglés        | Pecan nut  |

El árbol alcanza corrientemente una altura de 25 m (de forma excepcional llega a los 45 m) y puede llegar a superar los 100 años de edad, produciendo en ese momento más de 100 Kg de nueces por planta (Frusso, 2007). La corteza es de color pardo claro o pardo-grisácea, delgada y que se desprende en pequeñas placas. Brotes pardo rojizos con llamativas lenticelas de color pardo anaranjado. Los ramillos son de médula maciza, al contrario que otras especies de nogales. Las yemas terminales son alargadas, puntiagudas y de color pardo amarillento. Las hojas son compuestas, alternas e imparipinnadas formadas por 9 a 17 folíolos de forma oblongo-lanceolada, lampiños y de borde aserrado, de 8 a 18 cm de longitud.

Las inflorescencias masculinas son amentos o gatillos de 6 a 12 cm de longitud con las anteras amarillentas. Las flores femeninas son amarillentas, pelosas y agrupadas en espigas.

El fruto es seco, de tipo drupa, de forma ovoidea u oblonga con pico apical y midiendo de 3-5 cm de largo, constituida por un embrión, un endocarpo liso y delgado de color pardo claro en la madurez (cáscara de la nuez), un epicarpo y mesocarpo carnosos, los cuales al madurar se abren formando cuatro valvas longitudinales (denominado en conjunto como “ruezn”). De forma silvestre se presenta vecería o variación interanual, por la que cada 2 a 4 años tiene lugar una cosecha especialmente abundante. Se multiplica fácilmente por semilla. Los árboles también se injertan sobre patrones silvestres más resistentes.

El pecán produce una madera dura, semipesada y elástica, de duramen pardo oscuro y una delgada albura de color blanquecino. Es de buena calidad, empleándose en ebanistería fina (troncos gruesos) y parquetes (troncos delgados), así como mangos de herramientas y madera terciada. Las ramas se aprecian como leña y biomasa.

El fruto, la conocida nuez pecán o pacana, constituye su principal aprovechamiento, muy productivos, de especial valor agroforestal y económico (Peattie, 1950). Las nueces de cultivares comerciales de pecán presentan una relación en peso entre la parte comestible y la cáscara algo más favorable que la nuez común: nuez pecán 48-55% de peso parte comestible frente a la nuez europea 40-48% de peso parte comestible (Frusso, 2007).

Se trata de un árbol de valor ornamental, tanto en su región natural de origen como en zonas litorales de muchas áreas, constituyendo grandes árboles copudos de gran belleza aunque de crecimiento lento (Ruiz de la Torre, 2006).

En la Península Ibérica se encuentra desde hace unos cuatro siglos, pues se introdujo en los parques de jardines señoriales de las costas de Málaga (conocido allí como nogal americano o picán) y Valencia ya en el siglo XVII, tradicionalmente comercializados sus frutos por vendedores callejeros y en las ferias populares (Ruiz de la Torre, 2006).

### **Agro-climatología**

El pecán si bien se adapta a una gran variedad de climas, el cultivo con éxito económico es más restringido (Conti y cols., 2008). El mínimo de precipitación anual que tolera es de 750 mm, mientras que el máximo se ubica en 2.000 mm. Durante la etapa de crecimiento del fruto deben producirse por lo menos 500 mm de precipitación. La temperatura media del verano puede alcanzar 27°C, con valores extremos entre 41 y 46°C. La temperatura media del invierno varía entre -1 y 10°C, con extremos entre -18 y -29°C; (Peterson, 1990).

El período medio libre de heladas, correspondiente al número de días entre la última helada del año y la primera del año siguiente, debe oscilar como mínimo entre 180 y 220 días, preferentemente superar los 240 días. Esto se debe a que es un árbol de hojas caducas y debe satisfacer cierto requerimiento de frío en el período de reposo. Para esta especie, está dado por el número de horas inferiores a 7°C, que se establecen como mínimo en 400 horas (Wood y Payne, 1993).

Un buen aprovechamiento de estas disponibilidades agroclimáticas posibilitó la emergencia de países del Hemisferio Sur (ver figura 3) como principales productores de esta especie en contra-estación con respecto a los países del Hemisferio Norte con grandes extensiones de cultivos desde hace décadas, en especial Estados Unidos y México.

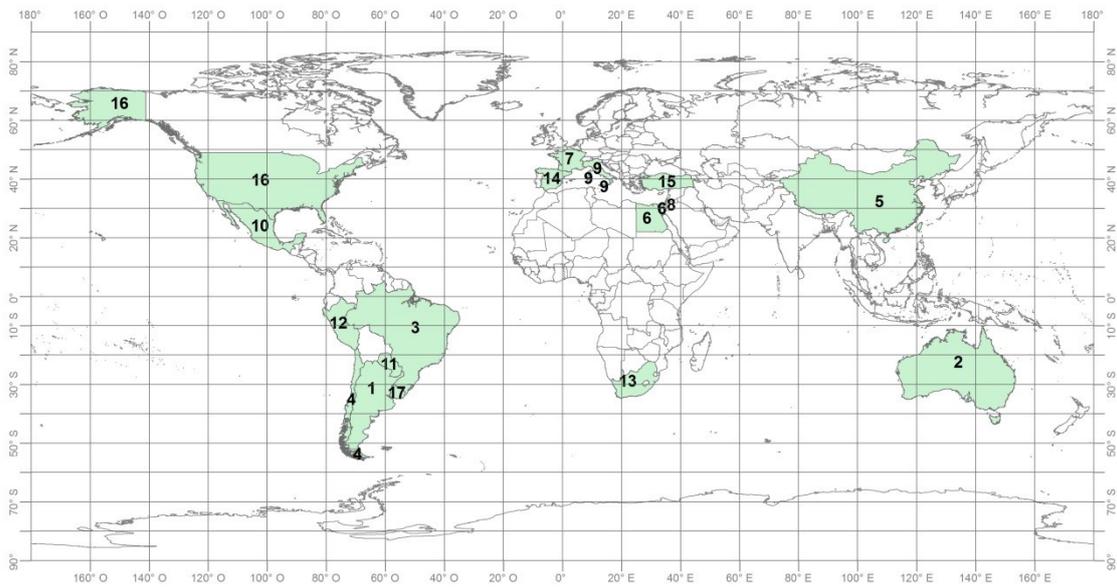
## **Requerimientos del suelo**

Los requerimientos de los suelos para las explotaciones de pecán en condición de secano, según Herrera, (1990) y Conti (2008) son las siguientes:

- Profundidad del suelo: mayor de 100 cm.
- Textura del horizonte sub-superficial: franco.
- Alcalinidad sódica: PSI menor del 15% en el perfil.
- Salinidad: suelos no salinos a débilmente salinos.
- Drenaje: bien drenado y moderadamente bien drenados.
- Anegamiento: sin peligro y muy poco.
- Rocosidad: menor al 20%.
- Humedad del suelo: régimen údico.
- Temperatura del suelo: régimen térmico.

## **Producción Mundial del Pecán**

Los principales países productores de nuez pecán del mundo son los Estados Unidos (72%) y México (25%). En la campaña del año 2012-2013, la producción total de fruto en toneladas, con cáscara, fue de 163.556 (Estados Unidos) y 80.273 (en México) (Pecan - YS Trading Comp., 2015). Otros productores menores son Australia, Sudáfrica, Israel, Brasil, Argentina, Perú y Egipto, entre otros (fig. 3). En lo que respecta a la Unión Americana, los principales estados productores son Georgia, Texas y Nuevo México con el 68% de la producción total para ese país. Por otra parte, en los estados de Chihuahua, Nuevo León y Coahuila se concentra alrededor del 80% de la producción total para México, (Fundación Produce, 2002).



| Países                     | Referencia                             |
|----------------------------|--|
| Argentina <sup>1</sup>     | Wakeling y cols., 2001                 |
| Australia <sup>2</sup>     | Wakeling y cols., 2001                 |
| Brazil <sup>3</sup>        | Pinheiro do Prado y cols., 2009        |
| Chile <sup>4</sup>         | Wakeling y cols., 2001                 |
| China <sup>5</sup>         | Kamal-Eldin y Moreau, 2009             |
| Egypt <sup>6</sup>         | El-Hawary y cols., 2013                |
| France <sup>7</sup>        | Rosales-Castro y Reyes-Navarrete, 2006 |
| Israel <sup>8</sup>        | Wakeling y cols., 2001                 |
| Italy <sup>9</sup>         | Benucci y cols., 2012                  |
| Mexico <sup>10</sup>       | Pinheiro do Prado y cols., 2009        |
| Paraguay <sup>11</sup>     | Nyczepir y Wood, 2008                  |
| Peru <sup>12</sup>         | Kamal-Eldin y Moreau, 2009             |
| South Africa <sup>13</sup> | Wakeling y cols., 2001                 |
| Spain <sup>14</sup>        | Rosales-Castro y Reyes-Navarrete, 2006 |
| Turkey <sup>15</sup>       | Dalkılıç, 2013                         |
| United State <sup>16</sup> | Wakeling y cols., 2001                 |
| Uruguay <sup>17</sup>      | Nyczepir y Wood, 2008                  |

Figura 3. Países productores de nuez pecán

## Nueces

El fruto de la nuez pecán es rico en ácidos insaturados y su consumo regular puede mejorar el perfil de lípidos en suero y el estado antioxidante en los seres humanos (Ros, 2009). Esta evidencia ha sido bien documentada desde la Food and Drug Administration (FDA), que señaló que el consumo de frutos secos, incluyendo las nueces pecán, pueden reducir el riesgo de enfermedades del corazón (Domínguez-Avila y cols., 2015). La nuez pecán ha reflejado producir beneficios para la salud por su considerable contenido en ácidos grasos mono y polinsaturados, fitosteroles, tocoferoles y otros micronutrientes (Domínguez-Ávila y cols., 2013). A la vez, la fracción que no está compuesta de lípidos también es rica en compuestos bioactivos, incluyendo ácidos fenólicos (ácido elágico y gálico), flavonoides (flavan-3-oles, catequinas, antocianinas y proantocianidinas tipo A), estilbenos, lignanos, fitoesteroles, taninos hidrolizables y condensados (Prado y cols., 2013; de la Rosa y cols., 2014) (tabla 2). Estos principios activos están asociados con acción anti-inflamatoria, antihyperlipidémica (Abdelrahman y cols., 2008) y presentan también propiedades antitumorales (Dai y Mumper, 2010).

*Tabla 2. Composición nutricional de la nuez pecán, (USDA, 2012)*

| <b>Nutrientes<br/>(100 g)</b> | <b>Media</b> | <b>Minerales<br/>(mg/100 g)</b> | <b>Media</b> | <b>Vitaminas<br/>(100 g)</b> | <b>Media</b> |
|-------------------------------|--------------|---------------------------------|--------------|------------------------------|--------------|
| Agua (g)                      | 3,52         | Calcio                          | 70           | Riboflavina (mg)             | 0,130        |
| Energía (Kcal.)               | 691          | Hierro                          | 2,53         | Niacina (mg)                 | 1.167        |
| Proteína (g)                  | 9,17         | Magnesio                        | 121          | Vitamina B6 (mg)             | 0,210        |
| Lípidos (g)                   | 71,97        | Fosforo                         | 277          | Vitamina A (mcg-RAE)         | 3            |
| Carbohidratos (g)             | 13,86        | Potasio                         | 410          | Vitamina A (IU)              | 56           |
| Fibra (g)                     | 9,6          | Sodio                           | 0            | Vitamina E (mg)              | 1,40         |
| Azúcar (g)                    | 3,97         | Zinc                            | 4,53         | Vitamina K (µg)              | 3,5          |
|                               |              |                                 |              | Vitamina C (mg)              | 1,1          |
|                               |              |                                 |              | Tiamina (mg)                 | 0,660        |

A la nuez pecán se la suele llamar “La Reina” de los frutos secos, debido a su alto contenido de ácidos grasos mono y polinsaturados, comparado con el resto de este tipo de frutos (fig. 4).

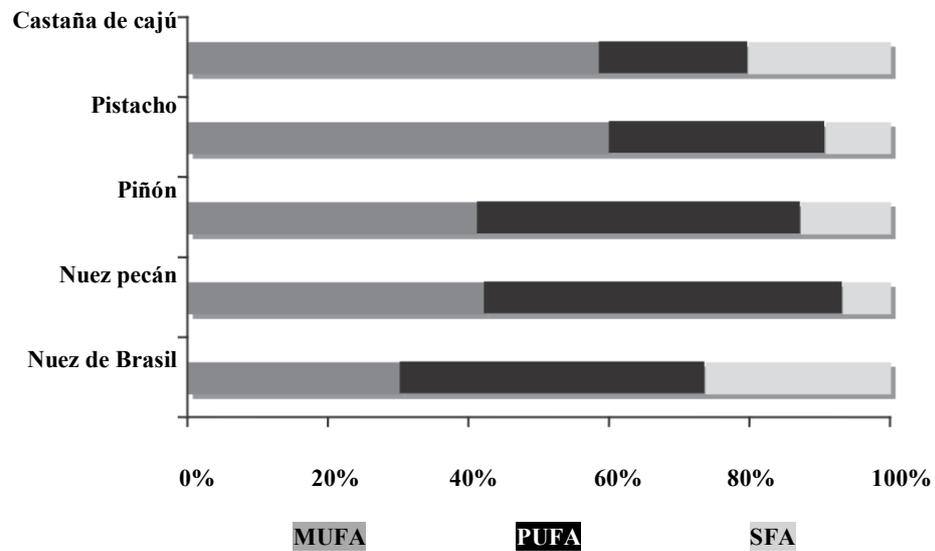


Figura 4. Porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), polinsaturados (PUFA) y saturados (SFA) de aceites extraídos de cinco frutos secos comestibles, (Dominguez-Avila y cols., 2015)

Existen diversos cultivares de nuez pecán, estando registrados del orden de unos 500 en todo el mundo (Ruiz de la Torre, 2006). En la figura 5 se pueden observar 6 ejemplares, originarios del estado americano de Texas, donde se pueden apreciar visualmente sus diferencias morfológicas.

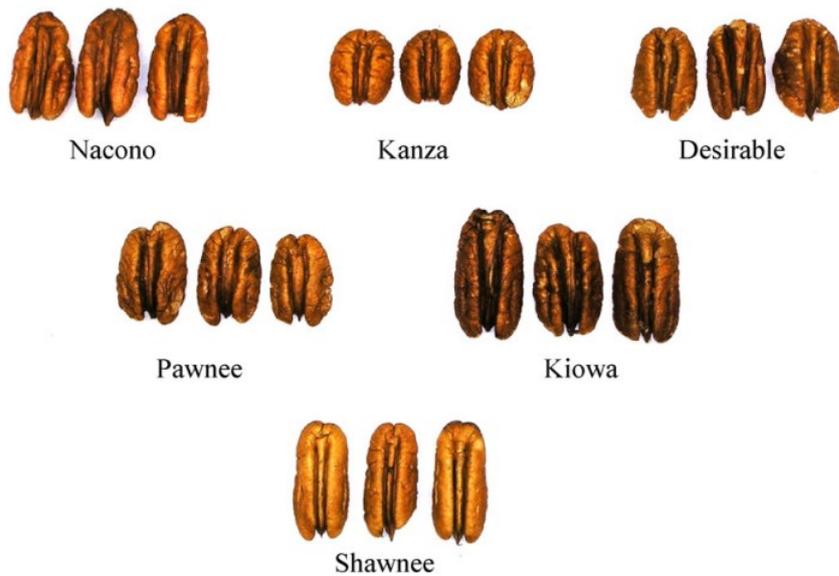


Figura 5. Nueces pecán de 6 cultivares originarios de Texas (Villareal-Lozoya y cols., 2007)

La nuez pecán puede llegar al consumidor en diferentes productos y presentaciones, partiendo desde la nuez con cáscara, nuez pelada, nuez garrapiñada, nuez en almíbar, hasta licor de nuez, aceite de nuez pecán y helados artesanales e industriales (fig. 6). También se elabora con el fruto un aceite muy apreciado en cosmética (Ruiz de la Torre, 2006).



Figura 6. Productos artesanales de nuez pecán de productores de Colón (Entre Ríos, Argentina)

## RESIDUOS DE PECÁN

En el mundo, en el año 2012, se produjeron un total 7 millones de toneladas de nueces aproximadamente, de las cuales 187 mil toneladas se cosecharon en la UE, y un 13% de las mismas en la Península Ibérica (FAO, 2012). Tan solo el procesado o adecuación para el consumo de las mismas, generan una cantidad de residuos en forma de cáscaras equivalentes en peso al 50% de la producción, lo que representa la muy elevada cantidad de 3,5 millones de toneladas en el mundo (fig. 8a). Adicionalmente, el manejo anual de las plantaciones de estos árboles, exige la poda de ramas en la época invernal lo cual genera a su vez considerables cantidades de residuos leñosos por árbol (fig. 8b). A estos residuos hay que añadirles los restos de los pericarpios, también llamados rueznos, compuestos por 4 valvas superficiales, que caen al madurar los frutos, sobre el otoño (fig. 7).



Figura 7. Nuez pecán (*C. illinoensis*), cáscara y pericarpio (Foto Viveros ANJU)



a



b

Figura 8. Residuos de a) cáscaras y b) ramas de podas acopiados en las plantaciones, Finca de Alejandro Ferrazzi, Colón, Entre Ríos, Argentina

## Composición y estructura

### Cáscara

Pinheiro do Prado y colaboradores (2009), han analizado la composición nutricional de la cáscara de nuez pecán, de acuerdo a la determinación oficial (AOAC, 2005) (tabla 3).

Tabla 3. Composición nutricional de cáscara de nuez pecán (Pinheiro do Prado y cols., 2009)

| <b>Componente<br/>(g/100 g)</b> | <b>Media ± SD<br/>(n =3)</b> |
|---------------------------------|------------------------------|
| Proteínas                       | 2,2 ± 0,04                   |
| Humedad                         | 16,8 ± 0,1                   |
| Lípidos totales                 | 1,1 ± 0,1                    |
| Minerales                       | 1,4 ± 0,03                   |
| Fibras Totales                  | 48,6 ± 0,06                  |
| Fibras solubles                 | 3,1 ± 0,09                   |
| Fibras insolubles               | 45,4 ± 0,4                   |
| Carbohidratos                   | 29,6                         |
| Valor calórico (kcal/100 g)     | 331                          |

Por su parte, Miranda y cols. (2009), determinaron el contenido de elementos de C, H, N, O y S, por medio de la formula empírica utilizando un equipo de Análisis Elemental CHONS de la marca Perkin Elmer (tabla 4). Asimismo, Antal y cols. (2000), utilizaron un equipo de Análisis Elemental CHONS marca Huffman y la metodología empleada fue acorde a la ASTM D 1762-84 (tabla 4).

Tabla 4. Análisis elemental de cáscara de nuez pecán

| C     | H     | N     | S     | O     | Cenizas | Carbón Fijo | Referencia              |
|-------|-------|-------|-------|-------|---------|-------------|-------------------------|
| % p/p   |             |                         |
| 47,31 | 6,44  | 0,66  | 0,12  | 45,47 | 0,93    | 28,79       | Miranda y cols., (2009) |
| 55,27 | 4,56  | 0,84  | 0,09  | 34,75 | 5,85    | 34,9        | Antal y cols., (2000)   |

Tabla 5. Análisis de la biomasa de cáscara de nuez pecán (Antal y cols., 2000)

| Glucosa | Xilosa | Galactosa | Arabinosa | Manosa | Celulosa | Hemicelulosa | Lignina |
|---------|--------|-----------|-----------|--------|----------|--------------|---------|
| % p/p   | % p/p  | % p/p     | % p/p     | % p/p  | % p/p    | % p/p        | % p/p   |
| 6,2     | 3,1    | 1,2       | 0         | 0      | 5,6      | 3,8          | 70,0    |

El análisis de termogravimetría de Carrillo Pedraza (2010), permite conocer las etapas de degradación de cada componente de la biomasa, ya que se estudian a diferentes tasas de calentamiento, tal como muestra la figura 9. El análisis térmico muestra la degradación de la cáscara de nuez dividida en tres etapas, las cuales muestran los principales componentes: hemicelulosa con temperaturas de degradación de 200-310°C, celulosa 250-350°C y lignina a temperaturas mayores de 350°C.

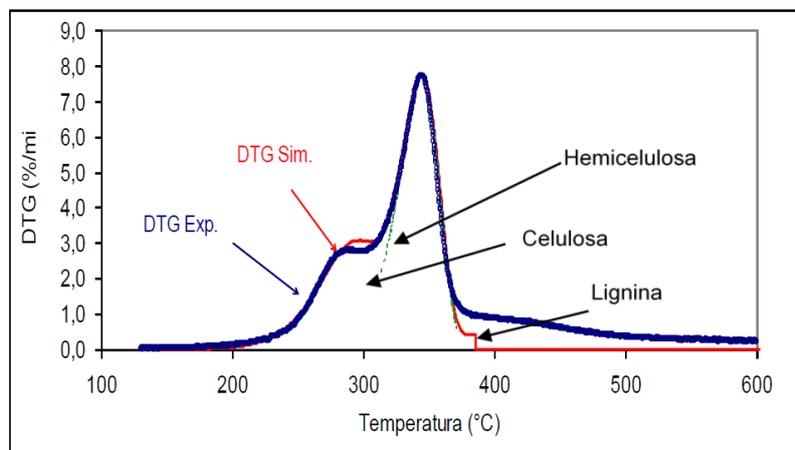


Figura 9. DTG de cáscara de nuez pecán (Miranda y cols., 2009)

## Pericarpio y Ramas de Poda

El pericarpio de la nuez pecán está constituido principalmente por lignina y un alto contenido de grupos de ácidos (fenólicos y carboxílicos) esto favorece la absorción de adsorbatos catiónicos como el plomo (Hernández-Montoya y cols., 2011). Incluso se han encontrado estudios donde indican que el contenido de polifenoles puede llegar a ser entre 6 a 18 veces mayores que el de las nueces de *C. illinoensis* (Padilla y cols., 2008). También se ha visto que las ramas de poda poseen propiedades como herbicida natural y efecto alelopático (Stafne y cols., 2009).

Tabla 6. Análisis de la biomasa del pericarpio y ramas de poda de plantaciones de pecán

| Residuo    | Celulosa<br>% p/p | Hemicelulosa<br>% p/p | Lignina<br>% p/p | Cenizas<br>% p/p | Referencia                      |
|------------|-------------------|-----------------------|------------------|------------------|---------------------------------|
| Pericarpio | 30                | 26                    | 41               | 1,7              | Hernández-Montoya y cols., 2011 |
| Ramas      | 38,7              | 30,2                  | 23,3             | 0,4              | Pettersen, 1984                 |

## Aprovechamientos actuales de los residuos

Las alternativas de aprovechamiento implementadas hasta el momento se han enfocado fundamentalmente en su recuperación energética como biomasa (Cerde, 1998). Sin embargo, este tipo de utilización puede no ser la mejor solución, debido a que no tiene en consideración sus propiedades, tales como su alto contenido en fuentes de carbono lignocelulósicas (Antal y cols., 2000; Bonatti y cols., 2004; Hernández-Montoya y cols., 2011) y sus altas concentraciones de taninos y fenoles (De La Rosa y cols., 2011; Mian y Rodríguez Kábana, 1982). Es por ello que resulta interesante explorar otras posibilidades de uso que puedan generar grandes beneficios económicos y medioambientales. En algunos de los estudios realizados se da a conocer la posibilidad de uso de la cáscara de nuez pecán como materia prima para la obtención de biocombustibles de segunda generación (Ozcariz Fermoselle y cols., 2012). También es muy valorado el uso de los residuos de cáscaras y pericarpios de nuez pecán para la obtención de carbón activado para biorremediación (Pendyal y cols., 1999; Ahmenda y cols., 2000; Hernández-Montoya y cols., 2011). Se ha comprobado que las infusiones de

cáscaras de nuez pecán poseen un elevado contenido de antioxidantes y fenoles, siendo su consumo común entre pobladores del sur de Brasil (Pinheiro do Prado y cols., 2009). Asimismo, se probó el poder antimicrobiano de estas cáscaras para el control de bacterias sobre alimentos cárnicos (Babu y cols., 2013). También se ha estudiado el potencial de los restos de poda de árboles jóvenes de pecán como abono orgánico y su eficacia en el control de malezas (Stafne y cols., 2009).

Por otra parte, los productores de explotaciones de la *C. illinoensis* y gobiernos involucrados ya han puesto de manifiesto la necesidad de búsquedas de alternativas de usos de los desechos lignocelulósicos generados, tales como leña, maderas y cáscaras, de manera de aumentar el valor agregado para los productores y obtener nuevos bio-productos (González Álvarez y cols., 2010).

## HONGOS

Los hongos son organismos heterótrofos, sin clorofila y que se nutren de materia orgánica. Se caracterizan por presentar un sistema vegetativo filamentososo (micelio) constituido por elementos cilíndricos (hifas) que pueden adquirir especialización para constituir estructuras de función reproductora o conservadora (Alexopoulos y cols., 1996).

Históricamente, a nivel popular y en la botánica clásica se han englobado los hongos dentro de los vegetales a causa de su consistencia, apariencia externa y su inmovilidad. Se les considera talófitas sin clorofila, para separarlos de las algas, talófitas con clorofila. Sin embargo, su condición de organismos heterótrofos y sus paredes celulares de quitina los distingue de los organismos vegetales, y el hecho de presentar una reproducción por esporas los aleja de los animales. Por todos estos motivos se les considera un grupo aparte por parte de los científicos desde el año 1969. En esa fecha, el ecólogo vegetal estadounidense Whittaker publica en la revista *Science* su separación del Reino *Fungi* (Hongos) del Reino *Plantae* de las Plantas, donde postula su división de los seres vivos en cinco reinos, en los cuales los hongos constituyen un reino propio separado, el Reino Fungi (Whittaker, 1969; Izco, 1997). La principal justificación de Whittaker para que los hongos no deban ser considerados propiamente plantas, es que poseen glucógeno que es un hidrato de carbono animal, reserva energética de los animales y presentan quitina en las paredes vegetales, como los insectos (Izco, 1997). No obstante, a nivel global, en la Naturaleza los hongos se relacionan en los ecosistemas con las plantas de modo primordial, estableciendo interconexiones y relaciones profundas y mucho más afines a los vegetales que a los animales. De hecho, el mismo Whittaker (1975) consideraba la conexión hongos-plantas como de una sorprendente cercanía y no de una separación radical.

Los hongos juegan un papel fundamental en la naturaleza, entregando a las plantas nutrientes, agua y protección pero también descomponiendo la materia orgánica, dejando así disponibles los nutrientes inmóviles (Pereira y cols., 2014). Los estilos de vida fúngicos pueden clasificarse ya sea como simbióticos, saprófitos, parásitos o una peculiar combinación de estos tipos (Hudson, 1986). Las asociaciones pueden ser parasitarias (cuando un organismo se beneficia a expensas de otro), mutualistas (ambos organismos se benefician), o comensalistas (en los que no se produce pérdida evidente para cualquiera de los organismos, con o sin un aparente aumento de uno de ellos)

(Rodríguez y Redman, 1997). Como ya hemos dicho, se trata de organismos carentes de clorofila, por lo que deben conseguir alimento a partir de otros seres vivos o de restos de materia orgánica. Los tres tipos de hongos juegan un papel fundamental en el funcionamiento del ecosistema y constituyen, en ocasiones, un recurso forestal de gran valor como comestibles y medicinales (Wang y Hall, 2004).

La *C. illinoensis* se relaciona a diversa escala con hongos de los distintos tipos. En primer lugar con los micorrícicos en su nutrición, pero también con hongos saprobios y parásitos capaces de vivir sobre sus estructuras y ecosistema.

Vamos a considerar más detalladamente los distintos grupos de hongos según su ecología: micorrícicos, saprófitos o saprobios y parásitos.

### **Hongos micorrícicos**

Los hongos micorrícicos establecen eficaces asociaciones simbióticas con las plantas vasculares. De esta simbiosis de tipo mutualístico se benefician tanto el hongo como la planta. Por un lado, la planta suministra al hongo carbohidratos y vitaminas procedentes de la fotosíntesis, así como un nicho ecológico. A cambio, el hongo ayuda a la planta a absorber agua y nutrientes minerales, suministrándole antibióticos y otras sustancias orgánicas complejas convenientes para la planta (Azcon-Aguilar y Barea, 1980; Smith y Read, 2008).

Asimismo, numerosos estudios han demostrado que los hongos micorrícicos proporcionan otros múltiples beneficios a la planta, jugando un complejo papel, imprescindible en el funcionamiento de los ecosistemas de todo tipo, en donde se incluyen bosques, matorrales y praderas. La micorriza proporciona al hongo resistencia frente a organismos patógenos, especialmente a nivel radicular (Duchesne y cols., 1989; Smith y Read, 2008). Además, a causa de los entramados miceliarios que se extienden por grandes volúmenes del suelo, se mejoran considerablemente las condiciones estructurales de éste y por tanto su productividad (Molina y Amaranthus, 1990; Fernández-Toirán y cols., 2006). Además, la estabilidad y resistencia de un ecosistema ante cualquier perturbación puede mantenerse y aumentar gracias a poseer una comunidad de elevada diversidad micológica. Las distintas especies realizan un gran

número de funciones ecológicas que, en conjunto, mejoran ostensiblemente la capacidad de recuperación de dicho ecosistema (Sarrionandia, 2006).

El caso particular de las especies de la familia *Juglandaceae* es de especial interés ya que estas leñosas incluyen tanto especies ecto como endomicorrícicas. Estos árboles incluyen géneros endomicorrícicos (género *Juglans* y *Pterocarya*) y ectomicorrícicos (género *Carya*) (Azcon-Aguilar y Barea, 1980; Wang y Qiu, 2006; Smith y Read, 2008; Bainard y cols., 2011). Asimismo, la *C. illinoensis* se asocia con distintos hongos micorrícicos. En esta investigación se ha encontrado en plantaciones argentinas especies, como *Laccaria* sp. y *Scleroderma* sp.

### **Producción de trufas en simbiosis con las raíces de Pecán**

El nogal americano o pecán (*C. illinoensis*) se puede asociar de forma micorrícica con varias especies apreciadas del género *Tuber*, por lo que se trata de un árbol potencialmente muy valioso para la producción de trufas. En los últimos años se ha comprobado que las trufas del género *Tuber* son dominantes en las ectomicorrizas de las plantaciones comerciales de *C. illinoensis* (Bonito y cols., 2011a)

Una especie descubierta asociada formando ectomicorrizas con *C. illinoensis* es *Tuber texense* Heimsch descubierta asociada a este árbol (Heimsch 1958), en donde se dio a conocer que el pecán es capaz de producir de forma destacada trufas. Trappe y cols. (1996) sinonimizó como *Tuber lyonii* Butters a *Tuber texense*, considerándola ampliamente distribuida en 13 estados americanos. Esta trufa no es apreciada aunque sí lo son otras especies eurasiáticas como *Tuber aestivum* y *Tuber borchii* que sí pueden asociarse al pecán de una manera práctica, eficaz y rentable (Bonito y cols., 2011a). Por esta razón estos hongos comestibles añadirían un valor adicional a las plantaciones de pecán para fruto, ya que para la producción de estas trufas se requiere un marco de plantación alto que corresponde con el marco ideal para la producción de la nuez pecán.

A continuación se indican las especies del género *Tuber* que se han localizado asociadas a *C. illinoensis* en plantaciones (tabla 7).

Tabla 7. Trufas comestibles estudiadas sobre plantaciones de *C. illinoensis*

| Trufa                 | Referencia            |
|-----------------------|-----------------------|
| <i>Tuber aestivum</i> | Benucci y cols., 2012 |
| <i>Tuber borchii</i>  | Benucci y cols., 2012 |
| <i>Tuber indicum</i>  | Bonito y cols., 2011b |
| <i>Tuber lyonii</i>   | Bonito y cols., 2011a |
| <i>Tuber texense</i>  | Beuchat y cols., 1993 |

### Hongos saprófitos

El estilo de vida fúngico saprobio o saprófito es considerado más primitivo que los tipos de vida simbióticos y se refieren a los hongos que viven de la materia orgánica muerta (Cooke y Rayner, 1984). Estos hongos obtienen sus nutrientes y productos químicos necesarios a partir de la materia orgánica muerta y son necesarios en la dinámica y resiliencia de los ecosistemas (Meyer, 1993).

Los hongos saprobios representan un grupo muy numeroso de especies. Se consideran los más abundantes en la Naturaleza (Smith y Read, 2008). Se nutren a partir de materia orgánica muerta muy diversa, pudiendo ser de diferente naturaleza como maderas o restos leñosos (en el caso de los hongos lignícolas), humus, excrementos (hablamos así de especies coprófilas), musgos, turba, carbón, cadáveres de animales, etc. Ésta naturaleza les otorga una indudable importancia ecológica en los ciclos naturales de los ecosistemas al garantizar la transformación de la materia orgánica muerta y, por lo tanto, el reciclaje de los nutrientes en los ecosistemas (Rudawska, 2000).

Sobre las maderas, ramas y hojarasca de *C. illinoensis* pueden crecer numerosos hongos saprofitos (Teviotdale y cols., 2002). Generalmente son *Aphylliphorales* los que producen pudriciones en los troncos de árboles viejos como los conocidos *Fomes fomentarius*, *Polyporus squamosus*, *Ganoderma australe*, *Trametes versicolor* y especies del género *Poria* (Hepting, 1971; Dreistadt y cols., 2004). En el presente trabajo se ha localizado sobre *C. illinoensis* argentinas especies como *Trametes troggii*, *Schizophyllum commune*, *Panellus sp*, *Lycoperdon cfr. umbrinum*.

Se ha citado a *Poria spiculosa* como agente de daños sobre troncos, muy extendido en los árboles silvestres de pecán en Estados Unidos (Toole, 1959; Teviotdale y cols., 2002).

### **Hongos parásitos**

Los hongos parásitos se desarrollan sobre los tejidos de otros seres vivos. Viven a costa de sus huéspedes, ya sean animales o vegetales, provocando enfermedades y a veces la muerte. Los más abundantes son los que viven a expensas de diversas plantas herbáceas y arbóreas, aunque existen hongos especializados en vivir a costa de los carpóforos de otros hongos macromicetos (por ejemplo *Peckiella lateritia* que invade las láminas de *Lactarius deliciosus*) o incluso de insectos (Bastardo del Val y cols., 2002). Existen parásitos facultativos, que son capaces de desarrollarse sobre materia orgánica muerta o medios artificiales, y parásitos obligados que requieren tejidos vivos y no pueden desarrollarse sobre medios artificiales (Cuesta, 2003). Estos hongos provocan daños más o menos graves a las plantas sobre las que se desarrollan, pudiéndoles causar incluso la muerte. Existen algunos casos que, por su especial virulencia y poder destructivo, se convierten en plagas muy perjudiciales para las masas forestales. En otros casos, como sucede con la mayoría de las especies fúngicas patógenas, actúan como elementos activos que contribuyen a la selección natural, ya que eliminan a los individuos enfermos y más débiles favoreciendo el desarrollo de los más fuertes (Izco, 1997; Luoma y cols., 2004). Además, los hongos parásitos constituyen una de las más importantes medidas disponibles para el control integrado de enfermedades (Jones y cols., 2001).

Algunos hongos se comportan como sapro-parásitos de amplio espectro, en un principio se comportan como parásitos y luego continúan con la descomposición del árbol (Alexopoulos y cols., 1996).

Existen numerosos hongos parásitos que crecen sobre *C. illinoensis* (Hepting, 1971; Westcott, 1960; Sinclair y Lyon, 2006). Entre los más comunes podemos considerar los siguientes:

- *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Pythium irregulare*, productores de necrosis en las raíces de las plántulas y árboles jóvenes del pecán (Teviotdale y cols., 2002).

- *Elsinoe randii*, que suele causar daños a las plántulas jóvenes de los viveros, aunque normalmente aparece simplemente como pequeñas manchas rojizas sobre las hojas, agujereándolas en los bordes (Westcott, 1960).
- *Cladosporium effusum* (“pecan scab”), factor limitante en la producción de frutos en las plantaciones del sureste de Estados Unidos (Hepting, 1971; Teviotdale y cols., 2002).
- *Gnomonia nerviseda*, *G. caryae* y *G. caryae* var. *pecanae* (“liver spot”) bastante comunes (Toole, 1965; Teviotdale y cols., 2002; Sinclair y Lyon, 2006).
- *Microstroma juglandis* da lugar a las llamadas “escobas de bruja” pero sin causar daños serios (Teviotdale y cols., 2002; Sinclair y Lyon, 2006).
- *Cercospora halstedii*, estadio conidial de *Mycosphaerella dendroides* (Westcott, 1960; Teviotdale y cols., 2002; Sinclair y Lyon, 2006).
- *Mycosphaerella caryigena* (“downy spot”) (Sinclair y Lyon, 2006).
- *Hypoxylon atropunctatum*. (Teviotdale y cols., 2002).
- Entre las especies parásitas que causan enfermedades en las raíces destacan *Clitocybe tabescens* (actual *Armillaria tabescens*), *Phymatotrichum omnivorum* (“Texas root rot”) y *Helicobasidium purpureum* (“violet root rot”). (Teviotdale y cols., 2002; Sinclair y Lyon, 2006).



*Laccaria sp.*

*Lycoperdon sp.*

*Schizophyllum commune*



*Panellus sp.*

*Trametes trogii*

Figura 10. Setas detectadas en plantaciones argentinas de pecán

## ***P. ostreatus***

El *P. ostreatus* es un hongo basidiomicete que pertenece a la clase *Homobasidiomicete*, que está determinada por la existencia de hongos con estructuras de reproducción de tipo basidios septados y que producen esporas que no generan esporas secundarias. Aquí se incluye dentro de la subclase *Agaricomycetidae*, cuyas setas presenta un himenóforo principalmente laminado, y la familia *Pleurotaceae*, de especies principalmente lignícolas, de láminas decurrentes o adnadas, pie a menudo excéntrico o inexistente y consistencia bastante coriácea (Courtecuisse, 2005).

El género *Pleurotus* en España incluye 8 especies lignícolas sarpotróficas o parásitas que provocan una pudrición blanca. La esporada es de color blanco o lila pálido, no amiloideas. Las esporas son oblongas y lisas y carecen de poro germinativo (Gerhardt y cols., 2000).

El *P. ostreatus* presenta un sombrero de 40 a 200 (250) mm de diámetro, con forma de lengua o espátula al comienzo, luego en forma de concha convexo a dimidiado, falveliforme y deprimido en la zona central. Los colores son muy variables, de crema a beige, marrones, de blanquecino a negruzco pasando por una gama de grises. El margen del sombrero es liso o curvado hacia las láminas. La carne es blanca a blanquecino grisácea, delgada, fibrinosa radialmente, tenaz. De olor y sabor fresco, a políporo. Presenta las láminas blanquecinas a crema, confluyentes en el pie y más o menos decurrentes. El pie es rudimentario, lateral, tenaz, completo. De 10-20 (40) x 10-25 mm. Habitualmente crece fasciculado o imbricado (Breitenbach y Kränzlin, 1991). La microscopía del hongo se puede apreciar en la figura 20.

El *P. ostreatus* se encuentra de forma natural sobre troncos vivos o muertos de planifolios, en especial sobre hayas, álamos y sauces. Es muy raro de localizar en coníferas. Fructifica sobre todo tras las primeras heladas nocturnas suaves. (Gerhardt y cols., 2000).

El nombre común de *P. ostreatus* es el de seta gris de chopo, debido a que se recoge principalmente en ese hábitat. También se puede encontrar en jardines de ciudad, sobre madera de frondosas, en fardos de paja abandonados en terrenos agrícolas, en cepas de viñas, *Juglans*, *Ulmus*, *Cistus* (cepas viejas) e incluso *Ilex*, como se ha observado en campo dentro del área de estudio.

Las setas *P. ostreatus* presentan un alto valor nutricional debido a su alto contenido en proteínas, fibra y presentar carbohidratos metabolizables (Sales-Campos y cols., 2011). La composición nutricional general puede verse en la tabla 8.

Tabla 8. Composición nutricional de 100 g de seta de ostra (FAO 2001)

| Agua<br>(g) | Calorías<br>(Cal) | Grasas<br>(g) | Carbohidratos<br>(g) | Proteínas<br>(g) | Fibra<br>(g) | Cenizas<br>(g) |
|-------------|-------------------|---------------|----------------------|------------------|--------------|----------------|
| 90,7        | 32,4              | 0,043         | 5,67                 | 2,13             | 0,396        | 0,54           |

También presenta propiedades como alimento funcional, promoviendo la salud del consumidor, ya que es rico en polifenoles, betaglucanos y antioxidantes (Lam y Okello, 2015) y contiene en su composición lovastatin, una inhibidor de la síntesis de colesterol (Gunde-Cimerman y Cimerman, 1995), por lo que su consumo permite reducir el nivel de colesterol en sangre.

El *P. ostreatus* es uno de los hongos comestibles de mayor importancia a nivel mundial, produciéndose en el mundo, más de 6 millones de toneladas, la mayor parte en China (Zhang y cols., 2014). El incremento de su cultivo se ha acelerado en los últimos años, puesto que en 1999 la producción mundial no alcanzaba las 880.000 tn anuales (Chang, 1999; Royse, 2003). Al crecer como saprófito y descomponedor sobre numerosos sustratos y residuos lignocelulósicos agroforestales, su valor socioeconómico y ecológico resulta de sumo interés.

### **Degradador de sustratos y biorremediador**

El *Pleurotus ostreatus* produce una gran cantidad de enzimas lacasas en el medio donde vive, destinadas a la degradación de la lignina, el control de la virulencia y regular la morfología. Estas enzimas son capaces de degradar compuestos orgánicos persistentes, permitiendo que el hongo se haya utilizado en la degradación y tratamiento de desechos sólidos de diversa índole, como por ejemplo en vertidos industriales o restauración de terrenos contaminados (Singh, 2006). Así, el *P. ostreatus* es capaz de reducir la cantidad de PCBs en un sustratos contaminados (Beaudette y cols., 1998;

Kubatova y cols., 2001), permite la limpieza de suelos contaminados con aceites (Yateem y cols., 1998), elimina pesticidas como el lindano (Rigas y cols., 2005) y reduce la cantidad de fenoles en el medio y otros compuestos tóxicos (Martirani y cols., 1996).

Gran cantidad de residuos lignocelulósicos han sido estudiados como sustrato para la producción de setas de *P. ostreatus* (Tabla 9). Estos potenciales sustratos son producidos en explotaciones agrícolas e industriales y frecuentemente ocasionan problemas ambientales y/o estéticos. Utilizar estos residuos agroforestales para la producción de setas puede minimizar el deterioro medioambiental, ser una fuente directa de ingresos y de trabajo (FAO, 2001), transformados en alimento.

Tabla 9. Sustratos utilizados para el cultivo de seta comestible *P. ostreatus*

| Formulación de sustratos |   |  |                 | EB (%) | Origen cepa  | Referencia                  |
|--------------------------|---|--|-----------------|--------|--|-----------------------------|
| Óptima (%)               | Sustratos testeados   | Aditivos   | Micelio (%)     |        |  |                             |
| PA50+MHL50               | Malas hierbas de: <i>Leonotis sp.</i> (MHL), <i>Sida acuta</i> , <i>Parthenium argentatum</i> , <i>Ageratum conyzoides</i> , <i>Cassia sophera</i> , <i>Tephrosia purpurea</i> y <i>Lantana cámara</i> , paja de arroz (PA) | ninguno  | 20 <sup>b</sup> | 139    | Nueva Delhi, India*  | Das y Mukherjee, 2007       |
| PT50+RP50                | Paja de trigo (PT), residuos de papel (RP), hojas de: tilo, <i>Populus tremula</i> , <i>Picea orientalis</i> y avellana, paja de arroz, serrín de <i>Fagus orientalis</i> , grano de trigo, pasto                           | Yeso   | 4 <sup>b</sup>  | 121,2  | Ankara, Turquía <sup>§</sup>   | Yildiz y cols., 2002        |
| RT100                    | Rastrojo de tomate <i>Lycopersicum esculentum</i> (RT), sarmiento <sup>1</sup> de <i>Vitis vinifera</i> , paja de trigo   | ninguno  | 5 <sup>b</sup>  | 118,5  | Méjico <sup>§</sup>  | Sánchez y cols., 2008       |
| PT90+ST10                | Paja de trigo, salvado de trigo (ST), residuo de algodón, cáscara de maní   | CaCO <sub>3</sub>  | 3 <sup>b</sup>  | 116,70 | Grecia <sup>§</sup>  | Philippoussis y cols., 2001 |
| CSG100                   | Cáscaras de semillas de girasol (CSG)   | Mn(II), NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , CaSO <sub>4</sub> , CaCO <sub>3</sub> | 10 <sup>a</sup> | 112,2  | Francia; México; EUA; Rep. Checa   | Curvetto y cols., 2002      |
| PCe100                   | Paja de cebada(PCe), viruta de pino   | ninguno  | 5 <sup>b</sup>  | 106,04 | Europa, México, Guatemala, Hong Kong, Japón, Checoslovaquia <sup>§</sup> | Merlo y Mata, 2005          |
| SV50+FK50                | Paja de trigo y cebada, sarmientos <sup>1</sup> de <i>Vitis vinifera</i> (SV), alperujo <sup>1</sup> , fibra de Kenaf <i>Hibiscus cannabinus</i> (FK)   | Yeso   | 3 <sup>b</sup>  | 105,9  | España <sup>§</sup>  | Giménez y cols., 2008       |

| Formulación de sustratos |   |                              |                  | EB (%) | Origen cepa                            | Referencia                    |
|--------------------------|---|------------------------------|------------------|--------|--|-------------------------------|
| Óptima (%)               | Sustratos testeados   | Aditivos                     | Micelio (%)      |        |  |                               |
| PT100                    | Paja de trigo   | CaCO <sub>3</sub>            | 3 <sup>a</sup>   | 95,3   | Brasil; Argentina <sup>§</sup>         | Carabajal y cols., 2012       |
| PDe70+PC30               | Pasto de <i>Digitaria decumbes</i> (PDe), pulpa de café (PC)  | Ca(OH) <sub>2</sub>          | 5 <sup>b</sup>   | 93,83  | Chiapas, México <sup>§</sup>           | Hernández y cols., 2003       |
| CJM78+RSC18+4Ca          | Paja de trigo, residuos de <i>Simmondsia chinensis</i> (RSC), cáscara de <i>Jatropha macrocarpa</i> (CJM) | CaCO <sub>3</sub> (Ca)       | 10 <sup>b</sup>  | 89,7   | Galicia, España <sup>§</sup>           | Fracchia y cols., 2009        |
| PC100                    | Paja de trigo, pulpa de café  | ninguno                      | 5 <sup>b</sup>   | 86,5   | Xalapa, México <sup>§</sup>            | Salmones y cols., 2005        |
| PT50+OR50                | Orujillo <sup>1</sup> (OR), paja de trigo   | ninguno                      | 10 <sup>b</sup>  | 85     | Bélgica; España; Portugal <sup>§</sup> | Ruiz-Rodríguez y cols., 2010  |
| CU80+ST20                | Capacho de uchuva (CU), cáscara de arvejas, tusa de maíz, salvado de trigo, serrín de roble               | Sacarosa y CaCO <sub>3</sub> | 3 <sup>b</sup>   | 76,1   | Colombia <sup>§</sup>                  | López-Rodríguez y cols., 2008 |
| SCT84+SA12+CA2           | Cáscara de arroz (CA), salvado de arroz (SA), serrín compostado de <i>Triplochito scleroxylon</i> (SCT)   | CaO                          | 0,5 <sup>b</sup> | 75,3   | Mauritania <sup>§</sup>                | Frimpong–Manso y cols., 2011  |
| PCe100                   | Paja de cebada  | ninguno                      | -                | 71,9   | Cruza Europea y EUA <sup>§</sup>       | Salmones y cols., 1997        |
| CC100                    | Cáscara de café (CC)  | Selenio de sodio             | -                | 66     | Brasil <sup>§</sup>                    | Da Silva y cols., 2012        |
| S100                     | Serrín (S), paja de trigo, hojas  | CaCO <sub>3</sub>            | 5 <sup>a</sup>   | 64,69  | Paquistán <sup>§</sup>                 | Shah y cols., 2004            |

| Formulación de sustratos |   |                           |                  |        |                                      |                                     |
|--------------------------|---|---------------------------|------------------|--------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| Óptima (%)               | Sustratos testeados   | Aditivos                  | Micelio (%)      | EB (%) | Origen cepa                          | Referencia                          |
| SCT88+SA12               | Serrín compostado de <i>Triplochito scleroxylon</i> , salvado de arroz, hoja de maíz, cáscara de banana, cáscara de arroz, pasto de <i>Pennisetum purpureum</i> , rastrojo de maíz, paja de arroz | CaO                       | 0,5 <sup>b</sup> | 61,04  | Rep. De Mauricio <sup>§</sup>        | Obodai y cols., 2003                |
| S80+ST20                 | Serrín y salvado de trigo   | ninguno                   | -                | 59,1   | Bangladés <sup>§</sup>               | Ahmed y cols., 2013                 |
| SCT88+SA12               | Serrín compostado de <i>Triplochito scleroxylon</i> , salvado de arroz  | CaO, fertilizante NKP     | 0,5 <sup>b</sup> | 50,93  | Suiza; Rep. De Mauricio <sup>§</sup> | Obodai y cols., 2004                |
| PT90+ST10                | Orujillo <sup>1</sup> , paja de trigo, salvado de trigo   | CaCO <sub>3</sub>         | 5 <sup>a</sup>   | 50,7   | Denizli, Turquía <sup>§</sup>        | Kalmis y cols., 2008                |
| BC25+RC25+TM25+SE25      | Bagazo de la caña de azúcar (BC), residuos de café usado (RC), tallo de maíz (TM), serrín de establos (SE)  | CaCO <sub>3</sub>         | 5 <sup>a</sup>   | 48,4   | Bogotá, Colombia <sup>§</sup>        | Garzón-Gómez y Cuervo-Andrade, 2008 |
| CY40+MM40+10EP           | Cáscara de yuca (CY), mazorcas de maíz (MM), estiércol de pollo (EP)  | CaO                       | 0,5 <sup>b</sup> | 42,7   | Rep. De Mauricio <sup>§</sup>        | Kortei y cols., 2014                |
| PK60+MF10+VF10+CA10      | Pasto kikuyo (PK), maní forrajero (MF), vaina de frijol (VF), cáscara de algodón (CAI)  | CaO, yeso, aceite vegetal | 10 <sup>b</sup>  | 40,03  | Colombia <sup>§</sup>                | Molina y cols., 2005                |
| PT100                    | Paja de trigo, astillas de eucaliptus, astillas de chopo  | ninguno                   | 5 <sup>b</sup>   | 32,94  | Santa Cruz, Chile <sup>§</sup>       | Varnero y cols., 2010               |
| SCh63+CRA25+SA12         | Serrín de chopo (SCh), salvado de arroz, Compost de residuos de alimentos (CRA)   | ninguno                   | 1,5 <sup>a</sup> | 17,5   | Corea <sup>§</sup>                   | Chae y Ahn, 2013                    |

|                   |   |         |                | EBS  |                    |                    |  |
|-------------------|---|---------|----------------|------|--------------------|--------------------|--|
|                   |   |         |                | (%)  |                    |                    |  |
| <b>GCA50+ST50</b> | Grano de cerveza agotado (GCA), salvado de trigo, salvado de arroz, salvado de maíz, subproducto de la producción de frijol crudo | ninguno | 8 <sup>b</sup> | 13,2 | Japón <sup>§</sup> | Wang y cols., 2001 |  |

\* = cepa silvestre; § = cepa comercial; 1 = ver glosario anexo1; a = sobre peso seco de sustrato; b = sobre peso húmedo de sustrato

## ***G. lucidum***

*G. lucidum* (Curtis: Fries) Karsten, s.l. (sensu lato), es un hongo descomponedor de la madera frecuente en los bosques de gran parte del mundo. Es un conocido hongo medicinal y nutracéutico cuyos preparados reciben el nombre de “Lingzhi” en China, “Yeongji” en Corea y “Reishi” en Japón, denominaciones utilizadas actualmente en gran parte del mundo. Es muy apreciado desde la antigüedad para promover la salud y la longevidad (Shiao, 2003) en la medicina tradicional china y oriental pero se ha extendido su uso a nivel global en los últimos años. Se han comprobado sus positivos efectos sobre la salud, tales como una fuerte actividad antioxidante y elevación de las defensas con actividad inmunomoduladora (Lin y cols., 2006; Xu y cols., 2009; Shi y cols., 2013) y reconocida capacidad antitumoral (Paterson, 2006). También posee propiedades antialérgicas, analgésicas, antifúngicas, antiinflamatorias, antivirales, antiparasitarias, antidiabéticas, hepatoprotectoras, reguladora de la tensión arterial, tónico nervioso, etc (Paterson, 2006). También se ha citado su valor para prevenir distintas enfermedades, tales como bronquitis, elevados niveles de colesterol y azúcar en sangre, etc (Chu y cols., 2012). Sus cuerpos fructíferos son los que presentan efectos terapéuticos que incluyen virtudes antivirales, antibacterianas, reguladoras de la presión arterial, para la diabetes, las alergias y efectos hepatoprotectores (Deepalakshmi y Mirunalini, 2011).

El *G. lucidum* se considera especie cosmopolita pues se encuentra ampliamente extendida por el mundo en diversos tipos de bosques de latifolios en regiones templadas o templado-cálidas de Europa, América, Asia, Australia y África (Arora, 1986; Gilbertson y Ryvardeen, 1986). Este es un hongo de estrategia vital saprofita que excepcionalmente se comporta como parásito. En la naturaleza se localiza principalmente sobre madera de frondosas pero que raramente puede aparecer en coníferas (Bernichia, 2005). En el Hemisferio Norte fructifica sobre todo en restos muertos de árboles de la familia *Fagaceae* y *Betulaceae* correspondientes a los géneros *Quercus*, *Fagus*, *Carpinus*, etc. Existen especies similares creciendo en coníferas como *Ganoderma tsugae*, *Ganoderma oregonense*, entre otras (Gilbertson y Ryvardeen, 1986). La gran diversidad ecológica y genética existente hace que algunos autores la consideren como un complejo de estirpes y la denominen actualmente como *G. lucidum complex* (Zhou y cols., 2015).

Existen diversos estudios de los cultivos de hongos comestibles y medicinales sobre residuos sólidos agroforestales lignocelulósicos. Interesa de modo particular el cultivo del *G. lucidum*. El primer cultivo artificial del hongo fue realizado en 1971, en la India (Singh y cols., 2014). Se ha estudiado el cultivo de *G. lucidum* sobre restos de rastrojos de maíz (Shahzadi y cols., 2014), serrín con paja de arroz (Veena y Pandey, 2011), cáscaras de semillas de girasol (González Matute y cols., 2002), residuos de fabricación de té (Peksen y Yakupoglu, 2009), bagazo de la caña de azúcar (Manavalan y cols., 2012) residuos de soja (Hsieh y Yang, 2004), residuos de pescados (Lakshmi, 2013) y diferentes tipos de serrín (chopo, haya, carpe, roble) (Erkel, 2009a; Azizi y cols., 2012; Jo y cols., 2013) (tabla 10). Los residuos de nuez pecán (*C. illinoensis*), no han sido testeados al momento como sustratos para el cultivo de *G. lucidum*, ni para otro tipo de hongos saprófitos. Vale agregar que en el recorrido de plantaciones de este nogal, en zonas del Litoral Argentino, se han identificado algunas especies saprobias o saprófitas, dentro de las que se encontraron carpóforos de *Ganoderma sp.* (fig. 3). La especie *G. lucidum* ya fue catalogada en esa región anteriormente (Bazzalo y Wright, 1982; Gottlieb y Wright, 1999).



Figura 11. *Ganoderma sp.* sobre restos de ramillas, valvas y nueces pecan, en Finca del productor Alejandro Ferrazzi, localidad Colón, Entre Ríos, Argentina

Tabla 10. Sustratos utilizados para el cultivo de seta medicinal *G. lucidum*

| Formulación de sustratos |  |  |                  | EB (%) | Origen cepa                   | Referencia               |
|--------------------------|--|--|------------------|--------|-------------------------------|--------------------------|
| Óptima (%)               | Sustratos testeados  | Aditivos   | Micelio (%)      |        |                               |                          |
| BC100                    | Bagazo de la caña de azúcar (BC)   | CaCO <sub>3</sub>  | 10 <sup>b</sup>  | 80±15  | Tamil Nadu, India*            | Manavalan y cols., 2012  |
| SM80+ST20                | Serrín de <i>Dalbergia sissoo</i> , serrín de mango (SM), serrín de chopo, salvado de trigo (ST), salvado de arroz, harina de maíz                                     | Yeso y CaCO <sub>3</sub>   | 1-4 <sup>a</sup> | 58,57  | Himachal Pradesh, India*      | Mehta y cols., 2014      |
| SC80+RFT20               | Residuos de fábrica de té (RFT), serrín de carpe (SC), salvado de trigo  | Sacarosa y CaCO <sub>3</sub>                                       | 0,8 <sup>b</sup> | 34,9   | Denizli, Turquía <sup>§</sup> | Peksen y Yakupoglu, 2009 |
| MS22.5+PA67.5+RB10       | Mezcla de serrín (MS), paja de arroz (PA), salvado de arroz (SA)   | ninguno  | 6 <sup>b</sup>   | 29,9   | Rajasthan, India*             | Veena y Pandey, 2011     |
| SCh58+SH29+GC13          | Serrín de chopo (SCh) y de haya (SH), grano de centeno (GC)  | NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> y CaCO <sub>3</sub> | 3-7 <sup>b</sup> | 25,5   | No indicado <sup>§</sup>      | Petre y Teodorescu, 2009 |
| SAN90+ HG10              | Serrín de <i>Alnus nepalensis</i> (SAN), <i>Shorea robusta</i> , <i>Dalbergia sissoo</i> , salvado de arroz, salvado de trigo, harina de maíz, harina de garbanzo (HG) | Yeso y CaCO <sub>3</sub>   | -                | 22,62  | Imadole, Nepal <sup>§</sup>   | Gurung y cols., 2012     |
| TCh100                   | Tronco de chopo (TCh)  | Extracto de malta  | -                | 22     | Uttarakhand, India*           | Singh y cols., 2014      |
| SCh80+ST20a              | Serrín de chopo, roble, haya, salvado de trigo, arroz, maíz  | Yeso y CaCO <sub>3</sub>   | -                | 20,85  | Marmara, Turquía*             | Erkel, 2009a             |
| SCh80+ST20b              | Serrín de chopo, salvado de trigo  | Melaza y harina de gluten de maíz                                  | -                | 20,37  | Marmara, Turquía*             | Erkel, 2009b             |

| Formulación de sustratos |  |  |                                 |                |                                       |                               |
|--------------------------|--|--|---------------------------------|----------------|---------------------------------------|-------------------------------|
| Óptima (%)               | Sustratos testeados  | Aditivos   | Micelio (%)                     | EB (%)         | Origen cepa                           | Referencia                    |
| <b>SCh94.5+EM5.5</b>     | Serrín de chopo, haya, carpe, salvado de trigo, extracto de malta (EM)   | CaCO <sub>3</sub> , yeso y KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>         | 2 <sup>b</sup>                  | 18,68          | Mashhad, Irán <sup>§</sup>            | Azizi y cols., 2012           |
| <b>PA67+CA25+SA8</b>     | Paja de arroz, cáscara de arroz (CA), salvado de arroz   | Aceite de oliva  | 5 <sup>a</sup> u 8 <sup>a</sup> | 13,8           | Guelph, Ontario, Canadá <sup>§</sup>  | Potemsky y cols., 2014        |
| <b>BC100</b>             | Residuos de pescado, turba de coco, virutas de madera, bagazo de la caña de azúcar   | ninguno  | -                               | 12,95          | Tamil Nadu, India <sup>*</sup>        | Lakshmi, 2013                 |
| <b>CSG85+ST5</b>         | Cáscaras de semillas de girasol (CSG), salvado de trigo, malta   | Yeso y CaCO <sub>3</sub>   | -                               | 10             | Olympia, WA, USA <sup>§</sup>         | González-Matute y cols., 2002 |
|                          |  |  |                                 | <b>EBS (%)</b> |                                       |                               |
| <b>PF80+ST20</b>         | Paja de avena, paja de frijol (PF), pasto de <i>Brachiaria</i> y de <i>Tifton</i> , serrín de <i>Eucalyptus</i> , salvado de trigo | CaCO <sub>3</sub>  | 1,2 <sup>b</sup>                | 6,7            | Botucatu, Brasil <sup>§</sup>         | Carvalho y cols., 2015        |
| <b>SAC50+VG30+ST20</b>   | Serrín de tallos de <i>Acacia confusa</i> (SAC), vinaza de grano (VG), salvado de trigo  | NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> y CaCO <sub>3</sub> | 10 <sup>b</sup>                 | 5,36           | Hsinchu, Taiwán <sup>§</sup>          | Yang y cols., 2003            |
| <b>CRA15+SA17+SR68</b>   | Compost de residuos de alimentos (CRA), salvado de arroz y serrín de roble (SR)  | NaCl y Ca  | 1 <sup>b</sup>                  | 3,4±0.2        | Chuncheon, Corea del Sur <sup>§</sup> | Jo y cols., 2013              |

\* = cepa silvestre; § = cepa comercial; a = sobre peso seco de sustrato; b = sobre peso húmedo de sustrato

---

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

En el presente trabajo se analizan los residuos de pecán recogidos en Málaga y estudiados en los laboratorios de la Universidad de Valladolid. Paralelamente se recogen cepas autóctonas de hongos saprobios en su hábitat natural. Posteriormente se procede al cultivo controlado de estos hongos sobre diferentes formulaciones de sustratos. Se analiza la evolución en el tiempo, rendimientos, interés ecológico y contenido fenólico, entre otros aspectos, de los cultivos realizados.

### **MATERIAL DE LABORATORIO**

#### **Laboratorios de Ecofisiología**

El Laboratorio de Ecofisiología, de la ETSIIAA de Palencia (Campus Universitario de La Yutera) cuenta con el equipamiento necesario para llevar a cabo los procesos de identificación, aislamiento y cultivo de hongos del presente trabajo de investigación.

#### Equipos

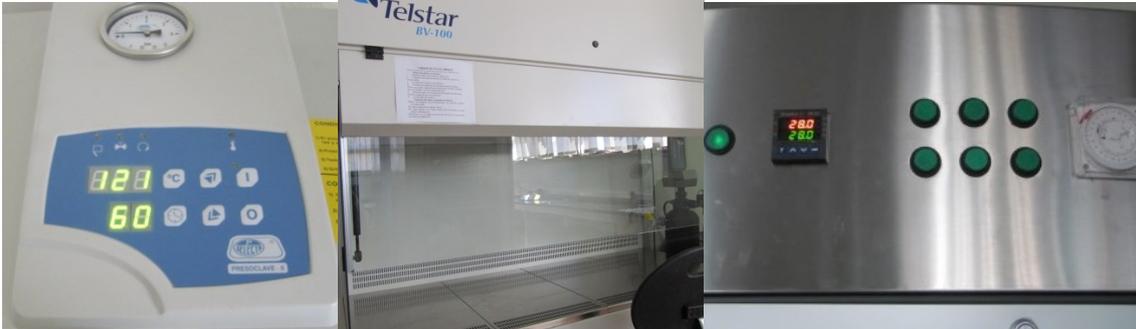
- Balanza de precisión marca GRAM modelo STA-220E con calibración interna. Capacidad de pesaje 220 g. Legibilidad 0.1 mg.
- Balanza de precisión marca BLAUSCAT modelo AH-3100. Capacidad de pesaje 3100 g. Legibilidad 0.1 g.
- Balanza de precisión marca PCE modelo BS 3000. Capacidad de pesaje 3000 g. Legibilidad 0.1 g.
- Placa con agitador magnético analógico, marca SELECTA P, modelo AGITAMATIC-N. Potencia 630W. Temperatura máxima: 350°C. Velocidad: 60-1600rpm.
- Autoclave vertical marca SELECTA P, modelo PRESOCALVE-II. Con control de temperatura y ciclo por microprocesador y purgado atmosférico. Regulación electrónica de la temperatura y tiempo con lectura digital. Temperaturas desde 115°C hasta 134°C (0,62 a 2 bar).

- 
- Campana de Flujo Laminar marca TELSTAR, modelo BV-100. Filtros (impulsión) HEPA/ULPA H14 de eficiencia: > 99.999% (DOP) Clase 10. Ventiladores centrífugos de alta eficacia con regulación de la velocidad. Equipada con lámpara germicida U.V.
  - Desmineralizador de agua marca DAFA, modelo FE 300 DÚO, con controlador y display.
  - Cámara multifunción para ensayos de crecimiento de laboratorio con humedad controlada, marca CLIMAS, modelo GROW/HR 1300. Capacidad de 1300 litros.
  - Estufa de secado marca MEMMERT, modelo HPP. Temperatura máxima: 70°C.
  - pHímetro marca pH-meter basic 20 + CRISON
  - Cámara de germinación Ibercex
  - Frigoríficos marca Electrolux y Whirlpool
  - Prensa mecánica
  - Termómetro FW21/BRAND

#### Material fungible e insumos

- Tamices marca C.I.S.A
- Botellas para autoclave
- Tubos de ensayo 16 mm x 180 mm
- Placas Petri 90 mm
- Medio de cultivo PDA (patata, dextrosa, agar) BioLife E-500
- Carbonato cálcico marca Panreac
- Sulfato de calcio marca Panreac
- Tijeras
- Pinzas de acero inoxidable
- Bisturí
- Parafilm M
- Papel de filtro convencional
- Papel albal
- Imanes agitadores
- Guantes de látex estériles

- Frascos Erlenmeyers de vidrio de diferentes volúmenes.
- Alcohol 96°
- Mecheros de alcohol
- Alcohol de quemar



Autoclave vertical

Campana de Flujo Laminar

Cámara multifunción



Desmineralizador

Estufa de secado

Material de esterilidad

*Figura 12. Materiales y equipos para el proceso de cultivos de hongos*

Todos los procesos de cultivo se realizaron con agua desmineralizada.

## **Laboratorios de Nutrición y Bromatología**

El Laboratorio de Nutrición y Bromatología, de la Facultad de Medicina cuenta con los equipos y materiales fungibles para evaluar las características y propiedades estudiadas en sustratos y setas cultivadas.

---

## Equipos

- Agitador de tubos “vortex” marca Raypa
- Agitador magnético ACS-160 marca J.Jimeno S.A.
- Balanza de precisión marca KERN ABS
- Balanza marca KERN 572
- Baño de agua marca Velp Scientifica (multistirrer 6)
- Molinillo marca Moulinex
- Centrifuga marca Labnet Spectrafuge 24D
- Congelador -24°C marca Fagor
- Disgregador marca MICCRA D-9 /RT
- Equipo de agua Elix Millipore
- Espectrofotómetro marca HELIOS modelos Epsilon Thermo Scientif
- Estufa marca P.SELECTA 150 litros
- Mufla CARBOLITE marca J. Jimeno. S.A.
- pHmetro modelo pH-meter basic 20 + marca CRISON
- Pipetas automáticas modelo Proline Plus marca Biohit
- Desecador marca Raypa

## Material fungible

- Botellas de vidrio de diversos volúmenes, desde 5 ml hasta 2 litros
- Cazoletas de acero inoxidable
- Crisoles de porcelana
- Cronómetro
- Cubetas de poliestireno para espectrofotometría visible de 3 ml
- Embudos
- Espátulas
- Frascos Erlenmeyers de vidrio de diferentes volúmenes
- Gradillas para tubos Falcon y para microtubos
- Guantes anticalóricos
- Guantes de látex
- Imanes agitadores y mangos imantados
- Matraces Erlenmeyer de diferentes volúmenes

- 
- Microtubos de plástico de 1,5 y 2 ml
  - Papel de filtro convencional marca Afora
  - Parafilm M
  - Pinzas de acero inoxidable
  - Pipetas de plástico estériles de 5, 10 y 25 ml
  - Probetas de vidrio y de plástico de diferentes volúmenes
  - Puntas de pipeta automática
  - Tijeras
  - Tubos Falcon de 15 y 50 ml
  - Vasos de precipitados de vidrio y plástico de diferentes volúmenes.

#### Reactivos químicos

- Ácido gálico Sigma Ref. G7384-100G.
- Carbonato sódico Sigma Ref. S2127-1KG
- Reactivo de Folin-Ciocalteu Fluka Ref. 47641
- Tampón de extracción (NaCl 0,28 M, fosfato monosódico 5 mM pH=7,5)

Todas las soluciones se preparan con agua tipo Elix Millipore.

## **METODOLOGÍA**

### **Técnicas de laboratorio de microbiología para cultivo de hongos**

#### **Utilización de cámara de flujo laminar**

Para garantizar un ambiente controlado se siguió el siguiente procedimiento: Una vez encendida la cámara de flujo laminar, se higienizó por dentro con alcohol y rollo de papel de laboratorio. Luego se colocó dentro de la cámara uno a uno los utensilios a utilizar en ese proceso, también limpios e higienizados, y se encendió la luz UV durante 20 minutos como mínimo para terminar la esterilización.

En los casos en que es necesario dejar material dentro para atemperar, se deja también con la luz UV, para evitar contaminaciones con otros hongos y/o bacterias. Este procedimiento se utiliza tanto para la preparación de medios de cultivo, el llenado de placas Petri, aislado de setas silvestres, preparado de blancos de hongo e inoculado de sustratos.

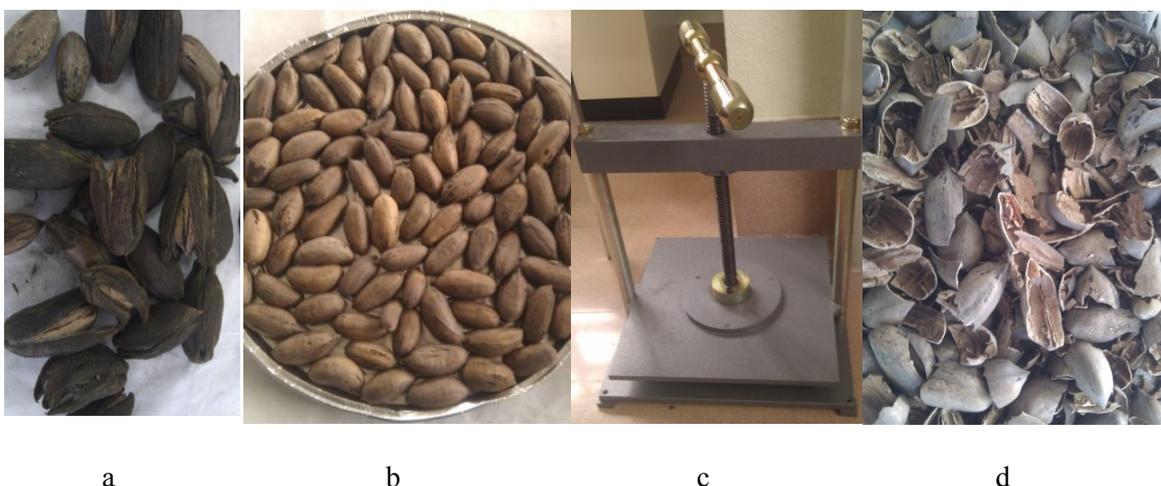
---

## Pecán

### Caracterización de los residuos

Los materiales utilizados en este estudio son procedentes de residuos forestales de nuez pecán del Valle de Guadalhorce, de la provincia de Málaga, España. Los mismos fueron recogidos en diciembre de 2012, en la plantación Haza del Palmar (Coín, Málaga, España). La misma cuenta con 4 ha de plantaciones de 16 años de edad y con certificación ecológica.

Los residuos se clasificaron en 3 categorías: cáscaras de nuez pecán (CP), pericarpio de nuez pecán (PP) y las ramas de poda de los árboles de nuez pecán (AP). Primero se limpiaron de otros restos orgánicos, sin interés en este estudio (fig. 13). Luego se trocearon las ramas y se prensaron las cáscaras y los pericarpios (fig. 13 y 14). Posteriormente se secaron a 35°C para su conservación.



*Figura 13. Preparación de residuos de, a) nueces con pericarpios secos antes de clasificar, b) nueces con cáscaras en bandeja para prensar, c) prensa mecánica para abrir nueces y prensar cáscaras y pericarpios d) cáscaras troceadas.*



Figura 14. a) Ramas de poda, b) troceadora de biomasa y c) astillas de ramas de pecán

### **Determinación del pH**

Se midió el pH del agua del primer escurrido de hidratación de cada sustrato (CP, PP y AP) y los subsiguientes escurridos del agua de hidratación de los residuos, que fueron cambiados 2 veces, cada 8 hs. Para ello, antes de cada medición se calibró el pH metro, siguiendo los pasos anteriormente descriptos. Se procede a estimar el pH de cada residuo en cada paso con 4 tomas de muestras.

### **Determinación de la humedad**

La humedad de los residuos de pecán (CP, PP y AP), o el contenido de agua, es la pérdida de masa que experimentan éstos, después de someterlo a un proceso de desecación. La desecación se realizó sobre muestras de 2 g de residuos de pecán, en cápsulas de acero inoxidable, en una estufa termorregulada a 130°C durante 90 minutos. Posteriormente se dejaron atemperar en el desecador (Fig. 15). Una vez que las muestras se encontraron a temperatura ambiente, se procedió a pesarlas.



Figura 15. Cazoletas de acero inoxidable con residuos de pecán en desecador

### Determinación de cenizas

Las cenizas es el residuo resultante que queda luego de una incineración completa de los componentes orgánicos, de cada uno de los residuos (CP, PP y AP). Estas se obtuvieron a partir de muestras de 1g de cada residuo previamente desecadas y colocadas en crisoles de porcelana. La calcinación se realizó en una mufla a una temperatura de 535°C y durante 14 horas.

La incineración es completa cuando el resultado es un residuo de color blanco. En los casos en los que después de transcurrir las 14 horas no se consigue este residuo sino un residuo negro o gris oscuro, se añade 1 ml de agua destilada y se coloca en la mufla hasta obtener un residuo de color blanco (Fig. 16).

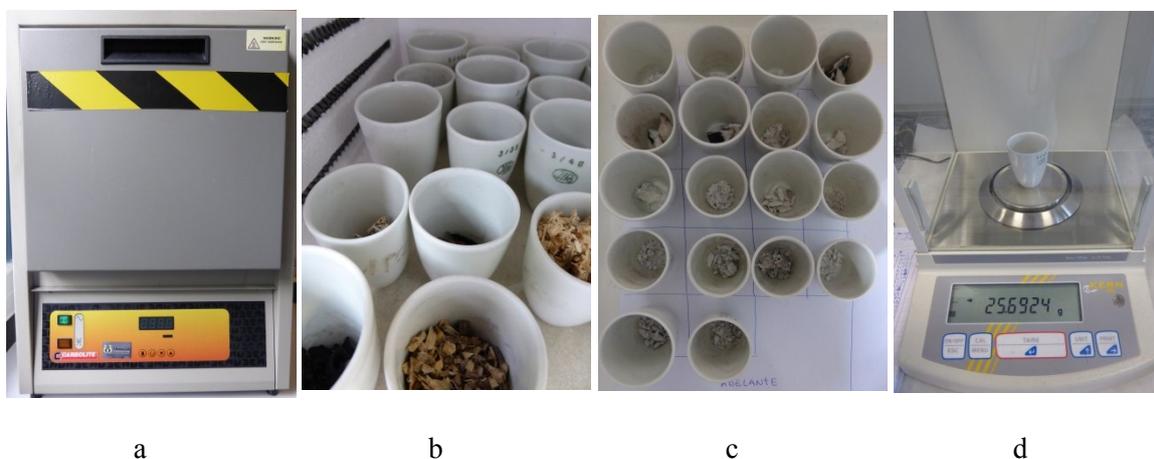


Figura 16. Preparación de las muestras y obtención de las cenizas a) Mufla, b) muestra en crisoles de porcelana antes de la incineración, c) muestras incineradas y d) pesada de las cenizas

---

## **Análisis de contenido fenólico**

Para medir la capacidad reductora total de los residuos se utilizó el método de Folin – Ciocalteu. Previamente a su evaluación se necesita preparar los extractos correspondientes.

### **Obtención de Extractos**

Para la obtención de los extractos se partió de muestras de residuos de cáscaras (CP), pericarpios (PP) y astillas de ramas de nuez pecán (AP). Los residuos se trituraron en un molinillo para granos de café. Los extractos se preparan en disoluciones de 1:20 sobre tampón de extracción (NaCl 0,28 M, fosfato monosódico 5 mM pH=7,5). Se preparó el baño a 75°C y se dejó la mezcla durante 8 minutos. Inmediatamente después se colocaron en hielo. Posteriormente centrifugaron durante 3 min a 10.000 r.p.m. (se equilibran previamente los tubos) en centrífuga, para separar el sobrenadante. El resto del extracto se conserva a -20°C de temperatura, para futuros ensayos.

### **Método de Folin – Ciocalteu**

Los fenoles reaccionan con el reactivo de Folin - Ciocalteu dando un color azul característico. El reactivo de Folin - Ciocalteu es una mezcla comercial y contiene mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con restos fenólicos presentes en las proteínas (tirosinas) y en compuestos como ácido gálico y sus derivados, flavonoides, etc (Aldavero-Peña, 2014).

El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, es el que medimos a una longitud de 760 nm (Singleton y Rossi, 1965).

Este reactivo mide la capacidad reductora total de una muestra, no solo el nivel de compuestos fenólicos. Para realizar la recta patrón se añadió la cantidad de agua destilada correspondiente, así como la cantidad (20 µl, 40 µl, 60 µl y 80 µl) de ácido gálico 2,5 mM. Se añadieron a cada tubo 600 µl de solución de carbonato sódico al 7,5

% y se agitaron los tubos en el “vortex”. Posteriormente se añadieron a cada tubo 200  $\mu$ l de reactivo de Folin-Ciocalteu y se agitó nuevamente (Basterrechea-Elizgaray, 2013).

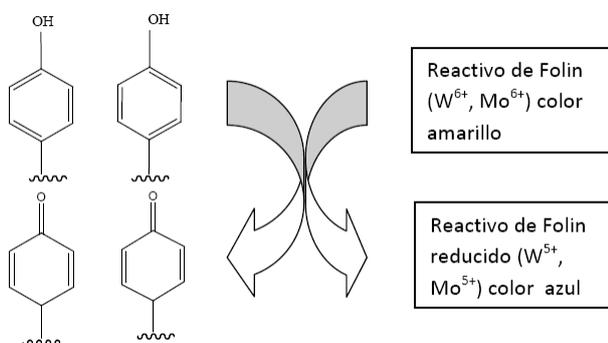


Figura 17. Reacción de Folin – Ciocalteu. Girbés y Jiménez (2010)

Los tubos se colocaron en una gradilla en un baño de agua a 50°C, durante 10 minutos (Fig. 18). Seguidamente se midió la absorbancia de las disoluciones a la longitud de 760 nm en el espectrofotómetro.

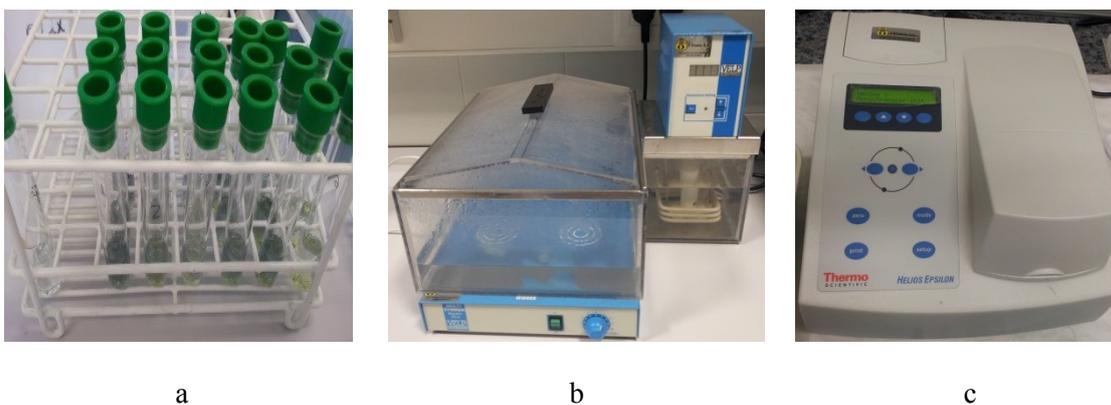


Figura 18. Tubos de extractos de residuos con reactivos b) baño a 50°C y c) espectrofotómetro UV calibrado

La medida de los diferentes extractos se realiza sustituyendo en el método, el patrón de ácido gálico, por un volumen de extracto. Para los cálculos debemos tener en cuenta el volumen de extracto utilizado y el volumen de extracto de partida (extracto crudo). Los resultados se interpolan en la curva de calibrado de 2,5 mM de ácido gálico y se expresan en  $\mu$ g equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco.

---

## Cepas

Todas las cepas utilizadas en dicho estudio son autóctonas de la Península Ibérica.

## Comercial

El *P. ostreatus* (PO1) fue suministrado por Micelios Fungisem (La Rioja), sobre blanco de hongo en semillas de trigo. Se aisló el micelio en placas Petri de 90 mm de diámetro con medio de cultivo PDA (patata, dextrosa y agar) y se incubaron en la cámara de cultivo a temperatura controlada de 25°C. Posteriormente se conservaron las placas en frigorífico a 4°C, cada 7 meses se replican las placas para su óptima conservación.



Figura 19. Réplica del micelio comercial de cepa PO1 en placa Petri

## Recolección de carpóforos silvestres en la Península Ibérica

Las setas silvestres de *P. ostreatus* y *G. lucidum* fueron recolectadas mayormente por los integrantes, M<sup>a</sup> Virginia Ozcariz Fermoselle, Raúl Fraile Fabero, y colaboradores, Carlos Rojo de Blas y Álvaro Rodrigo, de la Cátedra de Micología de la Universidad de Valladolid. Fueron recogidos entre el 2012 y 2014, en el centro-norte de la Península Ibérica. Se describen para cada estirpe el hábitat donde fueron hallados, su fecha de recolección y su localización.

## Identificación taxonómica

Posteriormente fueron clasificadas por el experto Raúl Fraile Fabero siguiendo las claves y descripciones taxonómicas. La descripción del basidiomiceto se realizó de acuerdo a sus características macro, micro y culturales mediante el uso de manuales estándar de los autores Breitenbach y Kränzlin (1991), para *P. ostreatus* y de Polyporaceae (Bernichia, 2005) y descripciones de Zhou y cols. (2014), para el *G. lucidum*, (fig. 20). Se compararon el color de la colonia, la morfología, estructura de las hifas e himenio y su estructura portante (Nithya y cols., 2014). Posteriormente se procedió a identificar las cepas de *G. lucidum* por amplificación y secuenciación de la región ITS (Internal Transcribed Space) del DNA ribosómico (Zheng y cols., 2009). Por último, se codificaron las cepas con la inicial PO (*P. ostreatus*) y GL (*G. lucidum*), según corresponda, seguido del número de orden de recolección.

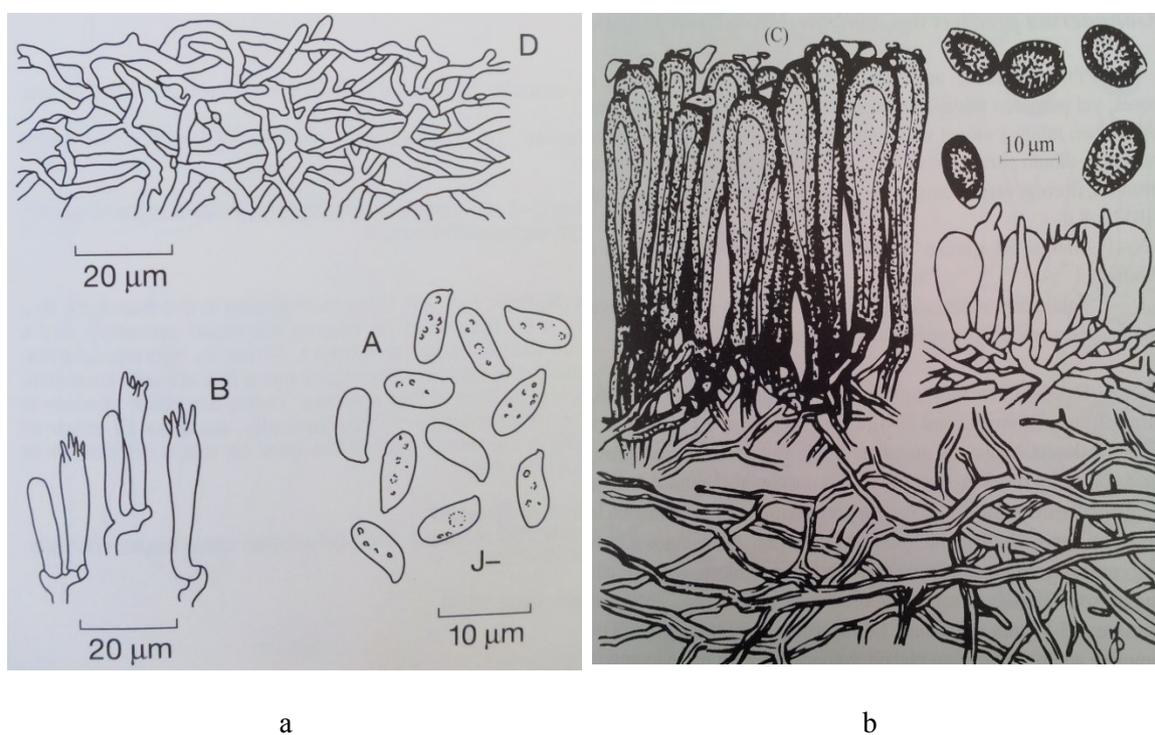


Figura 20. Características microscópicas del a) *P. ostreatus* (Breitenbach y Kränzlin, 1991) y b) *G. lucidum* (Bernicchia, 2005)

---

## **Aislamiento del micelio**

Las cepas de *G. lucidum* silvestre y *P. ostreatus* silvestres recolectadas, dentro de las 24 hs, se aislaron en ambiente controlado, dentro de la cámara de flujo laminar. Se utilizó la técnica de réplica por medio del tejido, extrayéndose un fragmento del mismo entre la parte superior del sombrero y las láminas y/o esponja. Inmediatamente se colocaron en medio de cultivo PDA (patata, dextrosa y agar), en placas Petri de 90 mm. Se incubaron en cámara de cultivo a 25°C durante 15 días. Posteriormente se conservaron las placas en frigorífico a 4°C y cada 7 meses se replican las placas para su óptima conservación.

## **Crecimiento del micelio**

Se midió el crecimiento radial del micelio en placas Petri de 90 mm de diámetro con medio de cultivo PDA, partiendo de una réplica del aislamiento de la cepa original (grado 2 del micelio). Se inocularon 10 placas, por cepa, en la parte central, con un cuadrado de micelio de 1 mm de lado. Posteriormente se marcaron las placas con 3 rectas (A, B y C) que se cruzan en el centro del micelio a 60° cada una (Jayasinghe y cols., 2008; Imtiaj y cols., 2009). Se incubaron en cámara de cultivo a 25°C en total oscuridad. El crecimiento se estimó sobre el promedio de las 3 rectas (fig. 21). El indicador utilizado es la media (M) repetida de crecimiento por día;  $M = (A+B+C)/3$ .

Al terminar la colonización en cada placa, se la dio vuelta y se rotuló, colocándose el día y especie. Las placas se guardaron en el frigorífico a 4°C, para conservar las cepas.

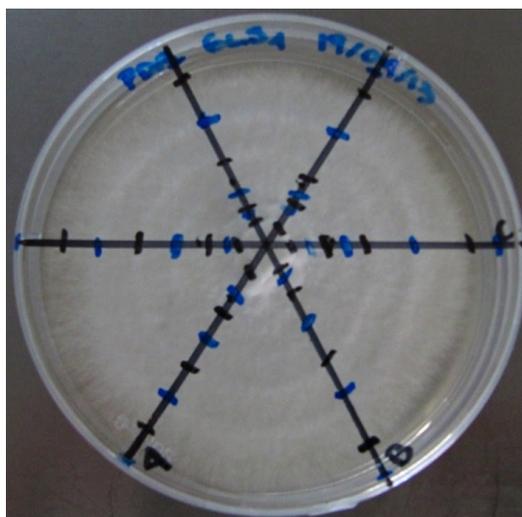


Figura 21. Método utilizado para medir el crecimiento del micelio en placas Petri

### **Preparación y conservación del blanco de hongo**

La preparación del blanco de hongo se llevó a cabo en frascos de vidrio según las siguientes proporciones: 59,1 % de grano de trigo duro integral biológico, 40% de agua destilada, 0,1 % de  $\text{CaCO}_3$  y 0,8 % de  $\text{CaSO}_4$  sobre peso seco, (Curvetto y cols., 2002; Varnero y cols., 2010). Luego se colocaron en autoclave a  $121^\circ\text{C}$  por 45 minutos (Stamets, 2000). Se seleccionaron los micelios PO1 cepa comercial ibérica de *P. ostreatus* y GL1 cepa silvestre de *G. lucidum*. Se procedió a inocular los frascos con una dosis de micelio (grado 2) del 5 %, procedente de placas Petri. La incubación se llevó a cabo a  $25^\circ\text{C}$ , hasta su colonización. Se repitió el procedimiento para obtener blanco de hongo de segunda generación (grado 2), partiendo de una réplica del anterior.

### **Crecimiento del Blanco de Hongo**

El blanco de hongo de grado 2 se utilizó para obtener los nuevos blancos de hongos en frascos de vidrio, con similares proporciones y procedimiento anterior descrito, solo que se trazaron 3 rectas verticales alrededor de los frascos. Se midieron los días que tardó el micelio en colonizar los granos, con 5 réplicas para cada cepa (PO1 y GL1).

---

## Preparación del sustrato

Los residuos de pecán (CP, PP y AP) se tamizaron entre 2,5 mm y 5 mm. Se prepararon de forma independiente, se lavaron y luego se hidrataron con agua destilada por 24 horas, con una renovación de agua cada 8 horas. Se procedió a escurrir el excedente hasta obtener una humedad entre 60% y 70%. Se adicionó 0,1 % de CaCO<sub>3</sub> sobre peso seco, a cada residuo (Yang y cols., 2003; Manavalana y cols., 2012). Los sustratos utilizados se presentan en 7 combinaciones diferentes, una de cada sustrato independiente (CP, PP y AP), su combinación al 50 % entre dos de ellos (1:1) y al 33% (1:1:1). Las combinaciones de sustratos se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Formulación de sustratos (cáscara de nuez pecán-CP, pericarpio de nuez pecán-PP y astillas de ramas de pecán-AP)

| Residuos | Formulación de los sustrato |     |     |                   |
|----------|-----------------------------|-----|-----|-------------------|
|          | Mezcla (% p/p)              |     |     | Aditivo (%)       |
|          | CP                          | PP  | AP  | CaCO <sub>3</sub> |
| CP       | 100                         |     |     | 1                 |
| PP       |                             | 100 |     | 1                 |
| AP       |                             |     | 100 | 1                 |
| CP+PP    | 50                          | 50  |     | 1                 |
| CP+AP    | 50                          |     | 50  | 1                 |
| AP+PP    |                             | 50  | 50  | 1                 |
| AP+CP+PP | 33                          | 33  | 33  | 1                 |

## Cultivo

El cultivo se lleva a cabo en tubos de 16 mm de diámetro interior y 180 mm de longitud, con 130 mm de carga de sustrato (Philippoussis y cols., 2007; González Matute y cols., 2002; Curvetto y cols., 2002; Hsieh y Yang, 2004; Yang, 2003). Se esterilizaron en autoclave a 121°C por 45 minutos (Yang y cols., 2003; Jo y cols., 2013).

---

Al enfriarse, se inocularon con una dosis de 5% de blanco de hongo en la parte superior del tubo y se taparon con parafilm. La incubación se realizó en cámara de cultivo a 25°C en total oscuridad, hasta su colonización. Durante la colonización del micelio, se midió su crecimiento diario marcando su avance sobre 3 rectas a lo largo de los tubos, utilizando el mismo indicador (M) que para el crecimiento micelial en placas. El ratio “Colonización del micelio (mm/día)”, que se utilizó para medir la colonización está dado por los 130 mm que debió recorrer el micelio, sobre los días medios que tardó en invadir el correspondiente sustrato (Jayasinghe y cols., 2008; Imtiaj y cols., 2009). Luego de la colonización de los tubos, se colocaron en el frigorífico a 4°C por 48 hs, dándole un shock térmico para propiciar la fructificación (Yildiz y cols. 2002; Philippoussis y cols., 2007). Seguidamente, se colocaron en la cámara de cultivo a temperatura de 25°C, con una humedad controlada de 85 % y un fotoperiodo de 10 horas de luz diarias (700-500 lux, con tubos fluorescentes). Se realizaron 3 repeticiones de cada formulación del sustrato, para cada cepa empleada.

### **Rendimientos**

Los rendimientos se miden mediante tres indicadores. La eficiencia biológica (EB), que corresponde al peso acumulado de los carpóforos frescos / el peso del sustrato seco por 100. La producción (P), se calcula mediante peso acumulado de las setas frescas sobre el peso del sustrato húmedo por 100. La eficiencia biológica en seco (EBS) se mide mediante el peso acumulado de los carpóforos secos / el peso del sustrato seco por 100.

### **Análisis del contenido fenólico**

El contenido fenólico de los carpóforos cultivados se midió mediante el método de Folin – Ciocalteu, para las 7 formulaciones de sustrato, siguiendo el método descrito para los residuos de nuez pecán.

---

## **Análisis estadístico**

Los datos presentados son la media de los resultados de al menos tres repeticiones de cada tipo de ensayo, con un error estándar menor al 5 %. El análisis de la varianza (ANOVA) y el análisis de medidas repetidas se pusieron a prueba por el software STATGRAPHICS Centurion 14.0. Las diferencias significativas entre los tratamientos se compararon mediante la prueba de (LSD) de Fisher al nivel del 95,0 % de confianza.

Para recolectar, procesar y analizar los resultados obtenidos de los ensayos en placas, tubos y análisis de fenoles totales se utilizó el software Microsoft Office Excel 2010, como también para obtener la recta patrón requeridas para el método de Folin – Ciocalteau.

Para exponer los resultados gráficos se utilizó el programa de software Graph Pad Prism 5.

---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se detallan los resultados del presente estudio.

### Caracterización de los residuos de Pecán

#### Determinación de pH, Humedad y Cenizas

En la tabla siguiente se detallan en las primeras 3 columnas los datos de pH, producto del agua desionizada de los 3 escurridos del proceso de hidratación, para los residuos de cáscaras de nuez pecán (CP), pericarpio de nuez pecán (PP) y ramas de poda de los árboles de nuez pecán (AP) (Tabla 12). En la siguiente columna de la tabla 12, se muestra el porcentaje de humedad de cada residuo, referidas en peso fresco. Por último en la tabla se expresan las cenizas resultantes de la incineración de las muestras de los residuos. Los resultados de cenizas expresados en porcentaje de peso de cenizas sobre peso seco de los residuos, están relacionadas con el contenido de minerales de cada uno.

Tabla 12. Caracterización de pH, humedad y cenizas de los residuos de pecán (CP, PP y AP), dadas en  $M \pm DE$  (media  $\pm$  desviación estándar)

| Residuo | pH              |                 |                 | Humedad (%)     | Cenizas (% p/p)              |
|---------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------------------|
|         | 1° escurrido    | 2° escurrido    | 3° escurrido    |                 |                              |
| CP      | 6,05 $\pm$ 0,02 | 5,58 $\pm$ 0,04 | 6,17 $\pm$ 0,09 | 9,98 $\pm$ 0,78 | 1,42 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup> |
| PP      | 5,76 $\pm$ 0,02 | 5,76 $\pm$ 0,01 | 5,94 $\pm$ 0,01 | 6,44 $\pm$ 0,04 | 6,36 $\pm$ 0,62 <sup>a</sup> |
| AP      | 6,11 $\pm$ 0,02 | 5,22 $\pm$ 0,01 | 5,74 $\pm$ 0,12 | 9,97 $\pm$ 7,12 | 1,12 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup> |

Referencia:  $M \pm DE$  con la misma letra no son significativamente diferentes,  $P < 0.05$ .

Se observa que hay una diferencia significativa en las cenizas de pericarpio de nuez pecán, con respecto a las cáscaras y astillas de ramas. El valor obtenido es superior al observado anteriormente 1,7 % p/p (Hernández-Montoya y cols., 2011).

#### Determinación de contenido fenólico (método Folin-Ciocalteu)

Inicialmente se realizó la recta patrón con ácido gálico. Los experimentos se realizaron por triplicado y se calculó el valor medio de las diferentes absorbancias. En la

figura 22 se representa la recta patrón de absorbancias en la longitud de 760 nm frente a diferentes volúmenes de ácido gálico 2,5 mM.

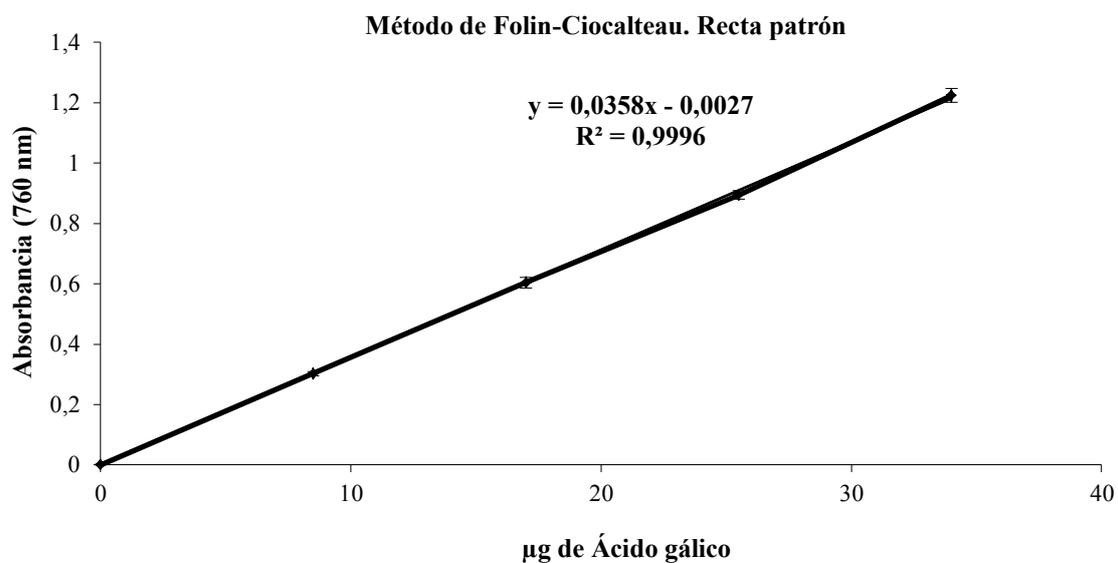


Figura 22. Recta patrón de la reacción de ácido gálico con el reactivo de Folin – Ciocalteu

Para medir las muestras de extractos sustituimos el patrón por 50 µl de extracto crudo de cada residuo de pecán. Los resultados se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Contenido fenólico de los residuos de pecán, en ps (peso seco)

| Residuo | µg eq. Ac. Gálico/g en ps |      |
|---------|---------------------------|------|
|         | Media                     | DE   |
| CP      | 10,28                     | 1,22 |
| PP      | 4,97                      | 2,31 |
| AP      | 6,18                      | 2,18 |

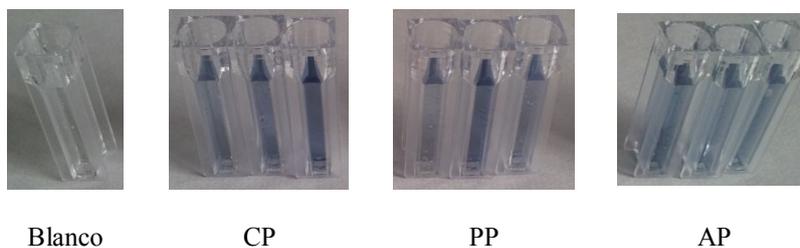


Figura 23. Cubetas para medir el contenido fenólico de los residuos de pecán

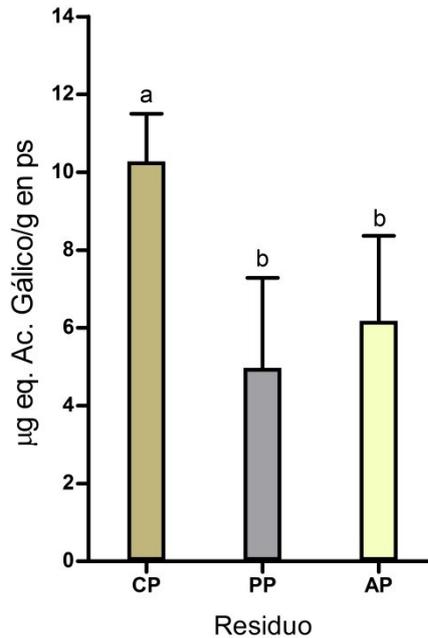


Figura 24. Contenido fenólico de los residuos de pecán, en peso seco. Las diferentes letras en las columnas representan las diferencias significativas,  $P < 0.05$ .

Se observa en la figura 24 que las cáscaras de pecán presentan diferencias significativas en contenido fenólico, respecto a los otros dos residuos en estudio (PP y AP). Las cáscaras de pecán poseen un elevado contenido de fenoles de aplicación práctica. Esto coincide con el estudio de Pinheiro do Prado y cols. (2009) donde han estudiado las propiedades antioxidantes de las cáscaras para su aplicación como infusión.

## Cepas

### Hábitats ibéricos de *P. ostreatus*

El *P. ostreatus* (Jacq.) P. Kumm posee 135 citas oficiales en la Península Ibérica, localizadas en 10 bases de datos Peninsulares (GBIF, 2015). De ellas, 66 cuentan con *exsiccata* propia en sus respectivos herbarios.

En la Península Ibérica encontramos citas desde el nivel del mar (Valencia) hasta los 1.360 metros de altura (Valverde de la Sierra, León), perteneciente a la colección de cepas en estudio.

---

Exceptuando los climas de alta montaña, hay información de recolecciones en un abanico climático muy amplio: mediterráneo, eurosiberiano u oceánico, continental y árido. Existen procedencias de *P. ostreatus* recolectadas en la Sierra de Grazalema, área de mayor pluviometría de la Península en un solo año, y en zonas con menos de 100 mm de precipitación anual como el Valle de Ucanca, en la isla de Tenerife, que estando fuera del área de estudio sirve de referencia como ejemplo de plasticidad ecológica del taxón.

En bibliografía se citan como hábitat naturales los troncos vivos y muertos de planifolios, en especial sobre hayas (*Fagus sylvatica*), álamos (*Populus*) y sauces (*Salix*) siendo muy raro de localizar en coníferas. Fructifica sobre todo tras las primeras heladas nocturnas suaves (Gerhardt y cols., 2000). La base de datos de la Cátedra de Micología de la Universidad de Valladolid (Fraile y Oria de Rueda, 2015) dispone de datos de recolecciones sobre: *Cistus ladanifer*, *Populus alba*, *Quercus faginea*, *Salix sp.*, *Populus nigra* y *Populus x canadensis*. Es frecuente encontrarlo sobre fardos de paja abandonados en terrenos agrícolas.

Otros hábitats donde se ha recolectado la seta ostra en Castilla y León son cepas de viñas (*Vitis vinifera*), nogal (*Juglans regia*) y olmo común (*Ulmus minor*). También hemos localizado esta seta en pino negral (*Pinus pinaster*), olmo siberiano (*Ulmus pumila*) y acebo (*Ilex aquifolium*). Estos tres últimos hábitats pertenecen a cepas de la colección en estudio del presente trabajo.

### **Colección de *P. ostreatus***

La siguiente colección es producto de este trabajo de investigación y se encuentra almacenado en la Cátedra de Micología.

#### **PO1**

La primera cepa en estudio PO1 corresponde a la cepa comercial de Micelios Fungisem, de La Rioja, la cual, según datos brindados por la propia empresa, proviene de una estirpe originaria del norte de España.

---

## PO2

La estirpe silvestre PO2 se recolectó el 2 de octubre de 2012 en Los Llares, Arenas de Iguña (Cantabria), en bosque cerrado de *Fagus sylvatica* con muy escaso sotobosque con presencia puntual de plantas como *Anemone nemorosa*, *Helleborus viridis*, *Euphorbia amygdaloides*, *Melica uniflora* y *Oxalis acetosella*. El hayedo presenta una fracción de cabida cubierta del 100 %. El carpóforo recolectado fue encontrado en un tocón de madera de haya.



a

b

Figura 25. a) Fotografía del hábitat (Carlos Rojo de Blas), b) carpóforos PO2

## PO3

La estirpe silvestre PO3 se recolectó el 15 de noviembre de 2012 sobre un tocón de un olmo de Siberia (*Ulmus pumila*), cortado varios años antes. Este tocón está localizado en el jardín de la Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias, en el Campus de Palencia. El tocón se encuentra en una zona de vega con césped de *Lolium perenne*.



a

b

Figura 26. a) Fotografía de primordios en su hábitat y b) carpóforos PO3 en crecimiento

#### PO4

La estirpe silvestre PO4 se recolectó, mediante la colaboración del Centro de Ecología Funcional de la Universidad de Coimbra, en Oliveira do Hospital, Coimbra, Portugal, en hábitat de *Pinus pinaster* con una fracción de cabida cubierta del 30 % sobre madera de esta especie. El sotobosque con presencia de gramíneas variadas (*Avenula sulcata*, *Agrostis truncatula*, *Agrostis castellana*) y cistáceas arbustivas (*Cistus psilosepalus* y *Halimium lasianthum*).



a



b

Figura 27. a) Fotografía del hábitat, b) carpóforos PO4

---

## P05

La estirpe silvestre PO5 se recolectó en el Acebal de Valverde de la Sierra, León, España, el 9 de septiembre de 2013 sobre madera de acebo (*Ilex aquifolium*). Este pequeño bosque de acebos consta de 2 manchas muy densas junto al arroyo Cireña y servía de refugio para el ganado del pueblo (actualmente en desuso). El acebal apenas presenta vegetación en su interior aunque incluye gramíneas resistentes a la sombra como *Melica uniflora* y *Brachypodium sylvaticum*. El suelo está cubierto de hojas secas de los acebos y rocas recubiertas de musgo. El denso acebal se localiza dentro de una pradera de diente de tipo montano (Región Eurosiberiana).



a



b

Figura 28. a) Fotografía del hábitat, b) carpóforos PO5

## P06

El *P. ostreatus* silvestre PO6 fue recolectado en los Pirineos. Se recogió el 21 de octubre de 2013, en el paraje de La Fuente del Paco, Villanua (provincia de Huesca, España) en un bosque de *Abies alba* mezclado con algunos ejemplares de *Fagus sylvatica*. El sotobosque incluye la presencia de las plantas *Oxalis acetosella*, *Festuca altissima*, *Milium effusum*, *Pyrola uniflora*, *Orthilia secunda*, *Prenanthes purpurea* y *Goodyera repens*. El suelo del bosque es más o menos profundo, el clima eurosiberiano húmedo y la altitud de unos 1200 m. El carpóforo fructificaba sobre madera de *Fagus sylvatica*.

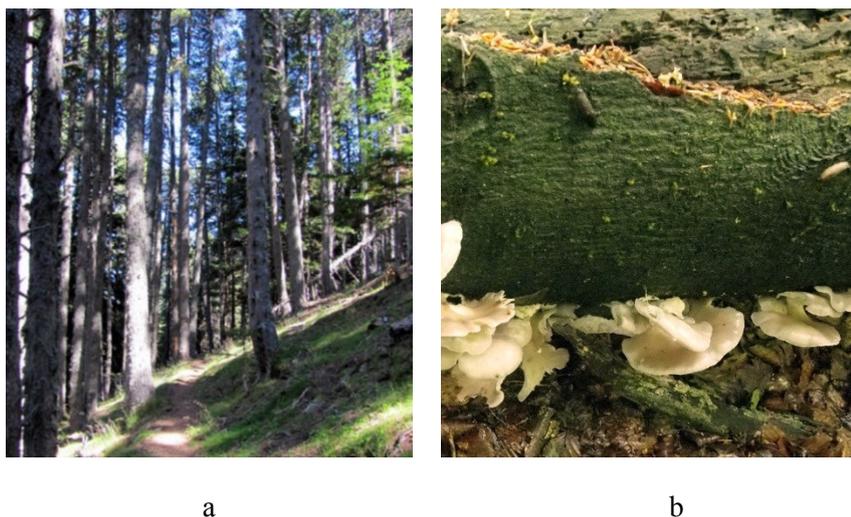


Figura 29. a) Fotografía del hábitat, b) carpóforos PO6, (Carlos Rojo de Blas)

Tabla 14. Origen y características de los hábitats de cepas Ibéricas de *P. ostreatus* en estudio

| Código | Cepa   |  | Hábitat                |                | Fecha      |
|--------|--|--|------------------------|----------------|------------|
|        | Origen   |  | Sustrato               | Característica |            |
| PO1    | Fungisem, La Rioja, España                     |  | -                      | Cepa comercial | 07/2012    |
| PO2    | Los Ilares, Aranas de Iguña, Cantabria, España |  | <i>Fagus sylvatica</i> | Silvestre      | 02/10/2012 |
| PO3    | Campus Palencia, Palencia, España              |  | <i>Ulmus pumila</i>    | Silvestre      | 15/11/2012 |
| PO4    | Oliveira do Hospital, Coimbra, Portugal        |  | <i>Pinus pinaster</i>  | Silvestre      | 05/12/2012 |
| PO5    | Valverde de la Sierra, León, España            |  | <i>Ilex aquifolium</i> | Silvestre      | 09/09/2013 |
| PO6    | Fuente del Paco, Villanua, Huesca, España      |  | <i>Fagus sylvatica</i> | Silvestre      | 21/10/2013 |

---

## Crecimiento de cepas

El ratio del crecimiento del micelio ( $\text{mm.día}^{-1}$ ) sobre placas Petri en medio de cultivo PDA, para cada una de las cepas de la colección de *P. ostreatus* Ibéricas se puede observar en la figura 30.

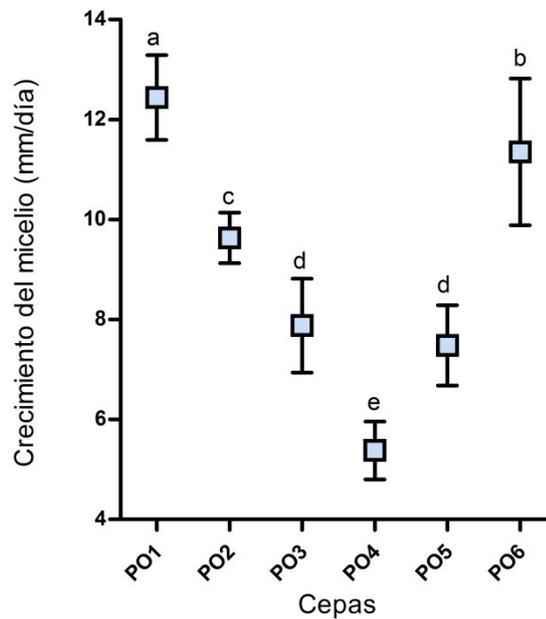


Figura 30. Ratio de crecimiento micelial de las diferentes cepas Ibéricas de *P. ostreatus*. Las medias con distinta letra son significativamente diferentes, ( $P < 0.05$ ).

Se observa que hay diferencias significativas en la mayoría de las cepas, con excepción de las cepas PO3 y PO5. La cepa comercial PO1 es la que arrojó un mayor crecimiento micelial, es por ello que se eligió este micelio para las siguientes fases de cultivo.

## Hábitats ibéricos de *G. lucidum*

El *G. lucidum* es un hongo saprófito, excepcionalmente parásito (Moreno y cols., 2004; Bernicchia, 2005). Esta especie es cosmopolita, y en Europa se ha citado sobre restos de leñosas pertenecientes a los géneros *Castanea*, *Celtis*, *Populus*, *Fraxinus*, *Platanus*, *Fagus*, *Acer*, *Tilia*, *Quercus*, *Robinia* y en la conífera *Picea abies* (Ryvarden,

---

1990, Bernicchia, 2005). Es muy frecuente como saprófita en bosques esclerófilos mediterráneos (Moreno y cols., 2004).

El *G. lucidum*, sobre todo, está ligado en la naturaleza a raíces muertas y enterradas de frondosas, especialmente de los géneros *Quercus* y *Castanea* (Maublanc, 1921; de la Parra y cols., 2008), está muy ampliamente distribuida en la Península Ibérica, tanto en la Región mediterránea como en la eurosiberiana (Tellería, 1980). Esta autora, María Teresa Tellería, en su tesis doctoral publicada y primera obra monográfica de los *Aphylophorales* españoles, incluye citas de la especie en las provincias de Cádiz (Sierra de Grazalema), Madrid y Navarra (Echarri Aranaz), indicando que se había citado “abundantemente en la bibliografía”, “creciendo frecuentemente sobre distintas especies del género *Quercus* como *Q. robur*, *Q. suber*, *Q. ilex* y *Q. rotundifolia*” (Tellería, 1980). Un aspecto interesante es el recalcar que llega a crecer en el sureste ibérico, la región europea más seca, como es el caso de la provincia de Almería (Calonge y Oria de Rueda, 1988) en donde se encontró en *Q. ilex rotundifolia* en la localidad de Bacares. En la provincia de Granada se encuentra frecuentemente en encinas en áreas montañosas, como Sierra Elvira y la Alfaguara (Ortega y cols., 1982).

En Cataluña se considera termófila y mediterránea, frecuente en las zonas bajas asociada a raíces y ramas enterradas de encinas, alcornoques y robles (Vidal y cols., 1995, Muñoz, 1996). Desde la Cátedra de Micología de la UVa también se la ha localizado y herborizado en los encinares mediterráneos calcícolas de Montpellier (sur de Francia, en la región colindante con Cataluña). También aparece en los alzinares (*Q. ilex ilex*) de Mallorca y Menorca (Aguasca y cols., 1992) donde se observan ejemplares de carpóforos de pequeño tamaño y muy similares a los de la zona de Montpellier.

El equipo de la Cátedra de Micología ha observado esta especie por todas las provincias de la comunidad autónoma de Castilla y León, desde zonas bajas asociada a restos enterrados de *Q. ilex* y *Q. suber* a unos 200-800 m en su mayoría, pero alcanza zonas a unos 1000 m de altitud asociadas a restos enterrados de *Q. pyrenaica* en la provincia de Zamora (Otero de Centenos). En Salamanca se encuentra tanto en *Q. ilex* como en *Q. pyrenaica* (Calonge y cols., 2000). En Navarra se encuentra sobre todo en *Q. ilex* y algo menos en *Q. pubescens*, mucho más raramente en *Fagus sylvatica* y otras especies (García Bona, 2000). En ambientes mediterráneos y más secos está ligada de forma casi exclusiva a raíces y leños enterrados. En la Región eurosiberiana, de

---

ambientes más lluviosos se puede observar más frecuentemente sobre troncos y tocones (Gerhardt, 1995).

De la provincia de Madrid aparecen citas por toda la provincia, como en el Monte del Pardo, la Casa de Campo, asociada a raíz de encina (Arranz, 1988). En Guadalajara aparece en diversas localidades asociadas a *Q. ilex* y *Q. pyrenaica* (Carballal, 1974). También se ha citado en *Q. pyrenaica* en las provincias de Toledo y Ciudad Real (Moreno y cols., 2004).

En Aragón se ha localizado en zonas con encinas y robles, pero en lugares relativamente más altos, huyendo de las comarcas áridas y continentales. Se han localizado numerosas citas en el atlas regional, como son las estribaciones de los Pirineos, Moncayo y Albarracín, entre los 800 y 1600 m de altitud (Sánchez, 2012).

En Asturias se observa frecuentemente creciendo en el suelo sobre restos enterrados de raíces de castaño. En Extremadura se encuentra ampliamente distribuida en los encinares.

En el norte de Europa se encuentra también *G. lucidum*, pero en este caso es frecuente bajo coníferas, en concreto *Picea abies* (Ryvarden, 1991). Una especie sumamente parecida y de pie cilíndrico y bien marcado es *Ganoderma carnosum* Pat. que crece asociada a *Abies alba* y frecuente en los abetales alpinos y pirenaicos (Breitenbach y Kräntzlin, 1986; Palazón, 2001; Bernicchia, 2005). Sobre *Larix decidua* aparece otra similar: *Ganoderma valesiacum* Boudot (Bernicchia, 2005).

### **Colección de *G. lucidum***

La siguiente colección es producto de este trabajo de investigación y se encuentra almacenado en la Cátedra de Micología.

#### **GL1 y GL2**

Los carpóforo GL1 e GL2 aislados en Robledo de Chavela, Madrid, España se recolectaron a 300 metros de distancia una de otra, en diferentes fechas (octubre de 2012 y abril de 2013, respectivamente), en bosque de *Pinus pinaster* en estrato superior con 10-12 metros de altura, *Quercus ilex subsp. ballota* y *Juniperus oxycedrus* en un

---

estrato medio con 5-8 metros de altura, y matorrales de *Cistus ladanifer*, *Rosmarinus officinalis*, *Daphne gnidium* y *Pistacia terebinthus*, junto a la regeneración de las 3 especies arbóreas. El bosque se mantiene limpio con podas y clareos, a la vez que se le somete a pastoreo de ganado vacuno de 3 a 6 meses al año. El suelo es ácido, muy arenoso y rico en materia orgánica. La roca madre es granito y aflora en numerosos puntos, generando zonas más umbrías y frescas, pero con una profundidad de suelo muy variable.

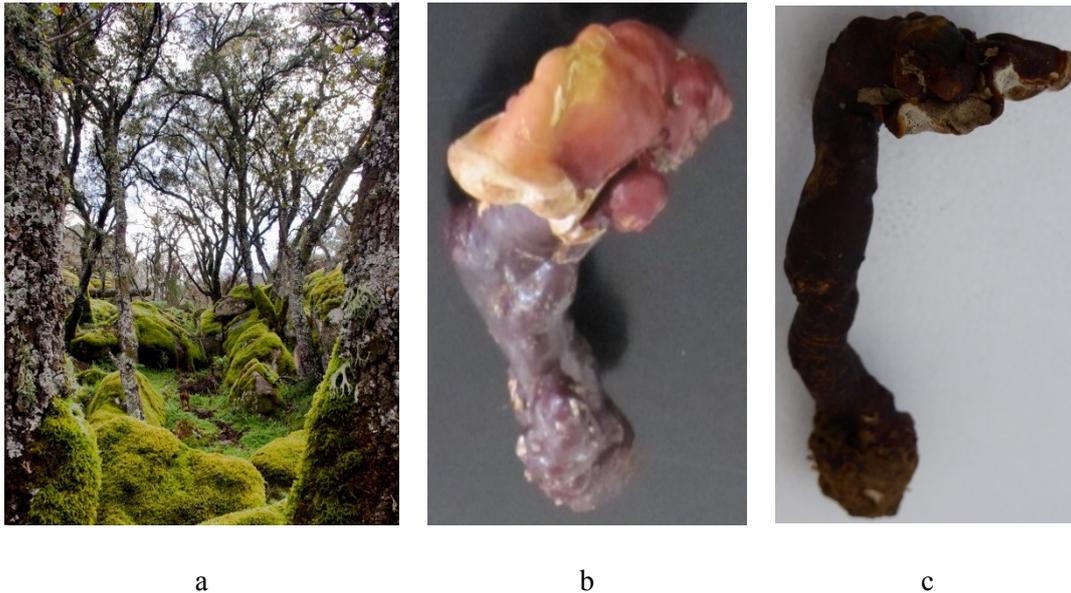


Figura 31. a) Fotografía del hábitat (Alvaro Rodrigo), b) carpóforos GL1 y c) GL2

### GL3 y GL4

Las estirpes GL3 e GL4 se recolectaron en Valdespina, Palencia, España, sobre madera de *Quercus faginea* en junio de 2013, a 1 km de distancia respectivamente. Bosque de quejigar monoespecífico (*Q. faginea*), con abundancia de espinares, *Crataegus monogyna*, *Rosa canina*, *Lonicera etrusca*, *Galium aparine*, *Juncus effusus* y *Scirpus holoschoenus*. Suelos cubiertos de gramíneas (*Avenula bromoides*, *Bromus erectus*, *Festuca ampla*, *Brachypodium phoenicoides*, etc), con cobertura 100 %, zona encharcada en invierno, muy húmeda. Presencia de ganado ovino, así como de corzo (*Capreolus capreolus*) y jabalí (*Sus scropha*).



a



b



c



d

Figura 32. a) y c) Fotografía de los hábitats, b) y d) carpóforos GL3 y GL4

## GL5

La cepa de *G. lucidum* GL5, fue recolectada en junio del 2013 en Villajimena, provincia de Palencia, España, sobre raíces y restos mixtos de *Quercus faginea* y *Quercus ilex, subsp. ballota*. Monte de encinar quejigar Mediterráneo, con presencia de *Crataegus monogyna*, *Lavandula latifolia*, *Thymus zygis*, *Asphodelus spp.*, *Rhamnus saxatilis*, *Thapsia villosa*. Encinar calizo con terreno pedregoso, el monte se mantiene con podas y aclareos bianuales. Abundantes pastos. Presencia de ganado ovino, de corzo y jabalí.



a



b

Figura 33. a) Fotografía del hábitat, b) carpóforo GL5

## GL6

La cepa GL6 se recolectó el 2 de noviembre de 2013 en la Comarca de Tierra de Campos, en Villaldevin. El carpóforo se encontraba sobre restos radicales de Encinar (*Q. ilex*, subsp. *ballota*). Encinar sobre terreno básico y pedregoso. El monte se mantiene con podas y aclareos bianuales. Presencia de abundancia de pastos y brotes de encinar desde raíz, *Asphodelus* sp. en abundancia, espino blanco (*Crataegus monogyna*), *Thapsia villosa*, *Cistus laurifolius*, *Agrostis castellana*, *Festuca ampla*, *Stipa gigantea*, *Rumex intermedius*, *Bromus madritensis*, *cardos* *Eryngium campestre*, *Asparagus acutifolius*. Presencia de liebres, ganado ovino y jabalís.



a



b

Figura 34. a) Fotografía del hábitat, b) carpóforo GL6

---

## GL7

La cepa GL7 se recolectó el 10 de noviembre de 2013 en Encinar de Monte el Viejo, Palencia. Zona de clima mediterráneo de transición continental. Terreno pedregoso de carácter básico. Monte de uso recreativo por parte de la ciudad de Palencia. Sotobosque con elevada diversidad de arbustos, pastos y rebrote de encinas. *Rosa sp.*, *Ramnus saxatilis*, *Lonicera etrusca*, *Cistus laurifolius*, *Thymus zygis*, *Thymus mastighophorus*, *Asparagus acutifolius*, *Genista scorpius*, *Ligustrum vulgare*, *Agrostis castellana*, *Bromus sp.* Zona con abundante presencia de Jabalís.

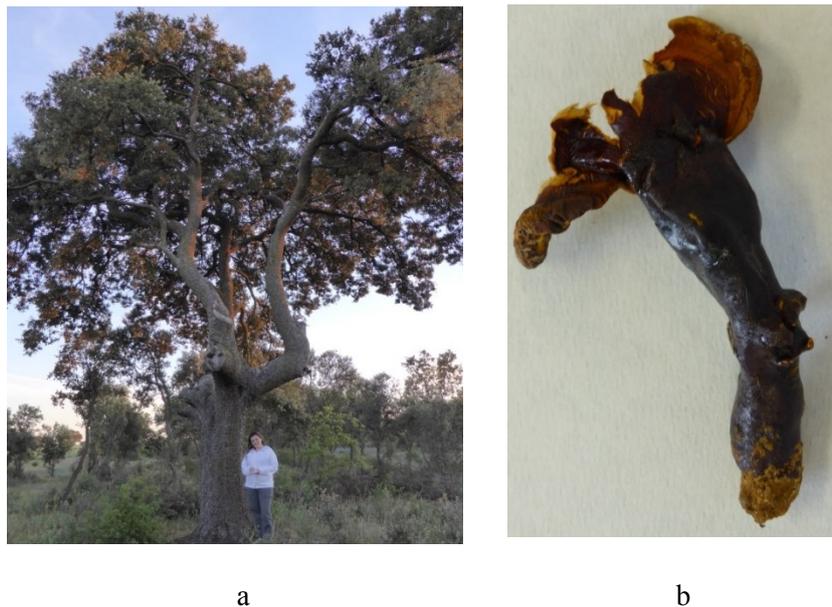


Figura 35. a) Fotografía del hábitat, b) carpóforo GL7

## GL8

El carpóforo de *G. lucidum* GL8, fue recolectado en noviembre de 2014 en Perales, provincia de Palencia, España, sobre *Quercus ilex*, subsp. *ballota*. Monte de encinar mezclado con carrascas (*Q. faginea*). Arbustos de *Cistus laurifolius*, espinares de *Crataegus monogyna* y *Rosa canina*. Otras plantas presentes en el sotobosque son *Lavandula pedunculata*, *Asphodelus sp.*, *Thymus zygis*, *Erygium campestre*. El terreno presenta enclaves ácidos dentro de la gran superficie caliza, con elevada diversidad micológica. Se mantiene con podas y aclareos bianuales. Presencia abundante de ganado ovino así como conejos, liebres y jabalíes.



a



b

Figura 36. a) Fotografía del hábitat, b) carpóforo GL8 (Raúl Fraile Fabero)

Tabla 15. Origen y características de los hábitats de cepas Ibéricas de *G. lucidum* en estudio

| Código | Cepa                               |  | Hábitat                          |            | Fecha |
|--------|------------------------------------|--|----------------------------------|------------|-------|
|        | Origen                             | Sustrato natural   | Característica                   |            |       |
| GL1    | Robledo de Chavela, Madrid, España | <i>Quercus ilex</i> subsp. ballota   | Terreno ácido                    | 20/10/2012 |       |
| GL2    | Robledo de Chavela, Madrid, España | <i>Quercus ilex</i> subsp. ballota   | Terreno ácido                    | 30/04/2013 |       |
| GL3    | Vladespina, España                 | Palencia, <i>Quercus faginea</i>   | Terreno básico                   | 24/06/2013 |       |
| GL4    | Valdespina, España                 | Palencia, <i>Quercus faginea</i>   | Terreno básico                   | 24/06/2013 |       |
| GL5    | Villajimena, España                | Palencia, Mixto: <i>Quercus faginea</i> y <i>Quercus ilex</i> , subsp. ballota | Terreno básico                   | 25/06/2013 |       |
| GL6    | Villaldevin, España                | Palencia, <i>Quercus ilex</i> subsp. ballota                                   | Terreno básico                   | 02/11/2013 |       |
| GL7    | Palencia, España                   | Palencia, <i>Quercus ilex</i> subsp. ballota                                   | Terreno básico                   | 10/11/2013 |       |
| GL8    | Perales, España                    | Palencia, <i>Quercus ilex</i> subsp. ballota                                   | Terreno básico con zonas neutras | 19/11/2014 |       |

## Crecimiento de cepas

El ratio del crecimiento micelial en  $\text{mm.día}^{-1}$ , en placas Petri con PDA ( $n=10$ ), para cada una de las cepas de la colección de *G. lucidum* Ibéricas se observa en la figura 37.

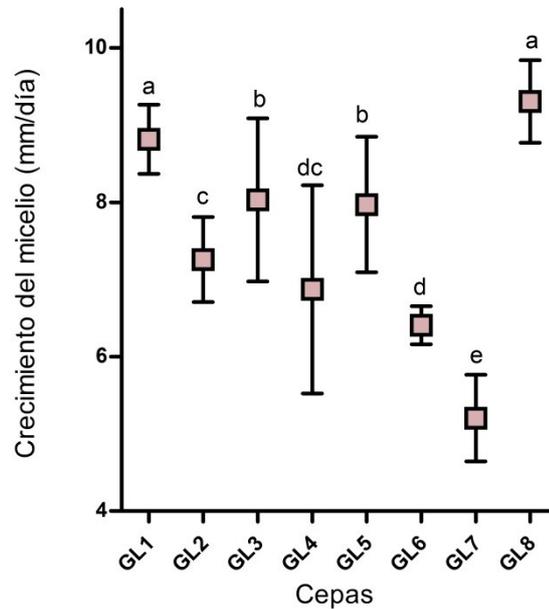


Figura 37. Ratio de crecimiento micelial de las diferentes cepas Ibéricas de *G. lucidum*. Las medias con distinta letra son significativamente diferentes, ( $P < 0.05$ )

Se puede observar que hay 5 grupos con diferencias significativas (fig. 37). Las cepas GL1 y GL8 mostraron un mayor crecimiento micelial, respecto al resto de cepas silvestres. Se escogió la GL1 para las siguientes fases de cultivo, por ser una de las que ofreció un mayor crecimiento y por ser más homogénea en su crecimiento (menor desviación estándar) entre GL1 y GL8. Las cepas GL1 y GL2 como las GL3 y GL4, presentan entre ellas diferencias significativas en su crecimiento micelial, a pesar de proceder del mismo hábitat y separadas apenas unos metros de distancia, indicando que son seres diferentes. Esta situación es indicadora de la diversidad de *G. lucidum* en la Península Ibérica, y especialmente en ambientes mediterráneos.

---

## Cultivo de Hongos Nutracéuticos

### *P. ostreatus*

#### Crecimiento del blanco de hongo

El crecimiento micelial del blanco de hongo en mm por día, de la cepa PO1, se muestra en la siguiente figura 38.

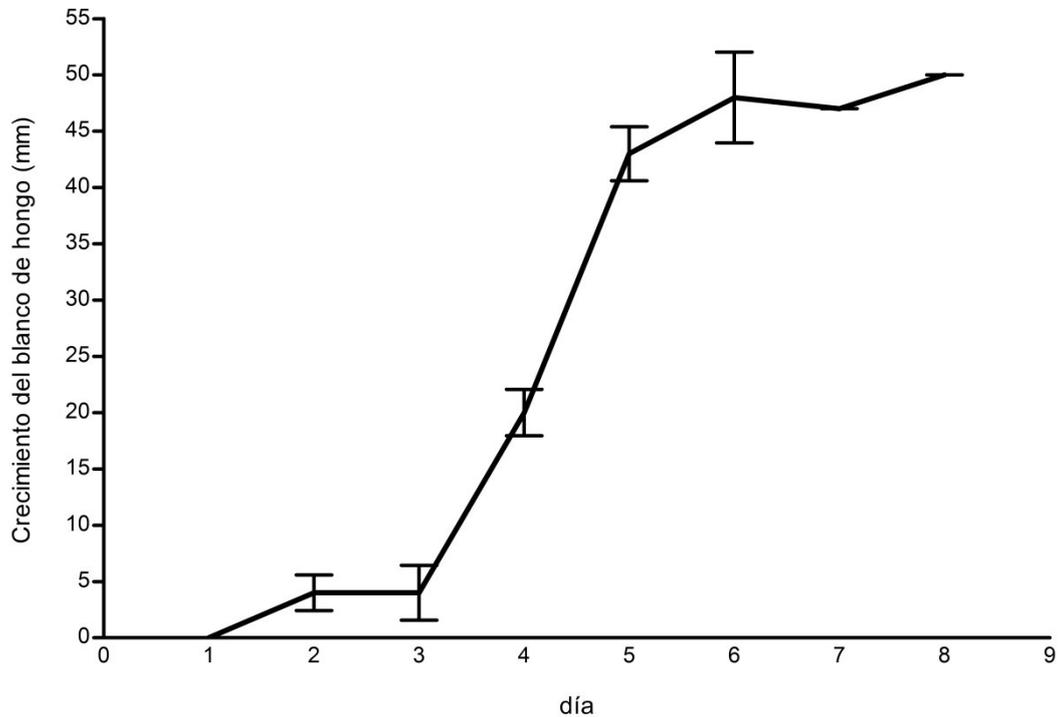


Figura 38. Crecimiento diario del blanco de hongo en frascos, de la cepa PO1

Su crecimiento coincide con la típica curva de crecimiento sigmoidea de un microorganismo, donde la primera fase es de latencia, posteriormente presenta un crecimiento exponencial. Por último, es paralela al eje horizontal, que indica que el crecimiento disminuye debido a la menor nutrición, por colonizar completamente los granos de trigo. Esto muestra que es una especie de un comportamiento homogéneo claramente previsible.

## Colonización micelial del sustrato de pecán

En la siguiente gráfica se muestra la colonización micelial por  $\text{mm}\cdot\text{día}^{-1}$  en tubos, para cada una de las formulaciones de sustratos, indicando su media y desviación estándar (fig. 39).

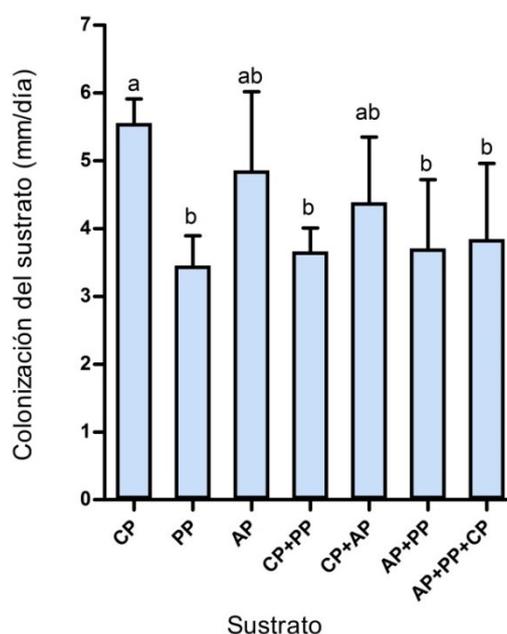


Figura 39. Colonización micelial para las 7 formulaciones de sustratos. Las medias con distinta letra son significativamente diferentes, ( $P < 0.05$ )

Como se puede observar en la figura 39, ninguno de los tratamientos presenta una resistencia para ser utilizado como sustrato de hongo de pudrición blanca, *P. ostreatus*. Si bien se observa una diferencia significativa entre la colonización de las distintas formulaciones de sustratos, destacándose la formulación de 100% cáscaras de pecán.

## Características morfológicas

En la tabla 16 se detallan las características morfológicas del cultivo de *P. ostreatus*, dadas por la cepa PO1, para las 7 formulaciones de sustratos de residuos de pecán. En la figura 40 se pueden observar los cuerpos fructíferos de la cepa PO1 cultivados en tubos.

Tabla 16. Características morfológicas del cultivo de PO1 sobre formulaciones de sustratos de pecán

| Sustrato | Nº Fructificaciones | Nº Carpóforos | Ø Sombrero (cm) | Pie (cm)  |
|----------|---------------------|---------------|-----------------|-----------|
| CP       | 1 ± 0,0             | 1 ± 0,0       | 0,8 ± 0,2       | 1,9 ± 1,4 |
| PP       | 2 ± 1,2             | 4 ± 2,5       | 0,9 ± 0,5       | 4,6 ± 1,9 |
| AP       | 2 ± 0,6             | 2 ± 1,2       | 0,5 ± 0,4       | 3,8 ± 1,1 |
| CP+PP    | 2 ± 0,0             | 2 ± 0,6       | 0,7 ± 0,4       | 3,8 ± 0,4 |
| CP+AP    | 3 ± 0,6             | 4 ± 1,2       | 0,6 ± 0,2       | 3,7 ± 1,1 |
| AP+PP    | 3 ± 0,6             | 3 ± 1,0       | 1,0 ± 0,2       | 4,8 ± 1,1 |
| AP+CP+PP | 3 ± 0,0             | 5 ± 1,4       | 0,8 ± 0,1       | 5,9 ± 1,6 |

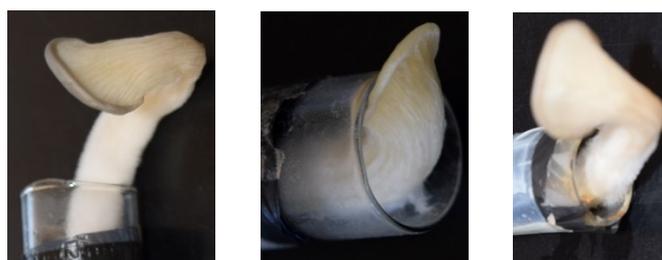


Figura 40. Carpóforos de PO1 cultivados en tubos

En la tabla 16 se puede observar que en todas las formulaciones de sustratos de residuos de pecán se han recolectado setas. Como se observa, a medida que aumenta el número de tipos de residuos mezclados, incrementa el número de fructificaciones, algo que puede resultar de interés práctico para el cultivo. El tiempo total de todo el proceso de colonización, fructificaciones y recolecciones fue de 3 meses.

Por otro lado, la humedad de los carpóforos cultivados en el presente estudio, varió entre un 81 % y un 99 %, siendo su media del 93 %.

## Rendimientos

Los rendimientos obtenidos del cultivo de *P. ostreatus*, cepa PO1, sobre las 7 formulaciones de sustratos de pecán se pueden observar en la figura 41.

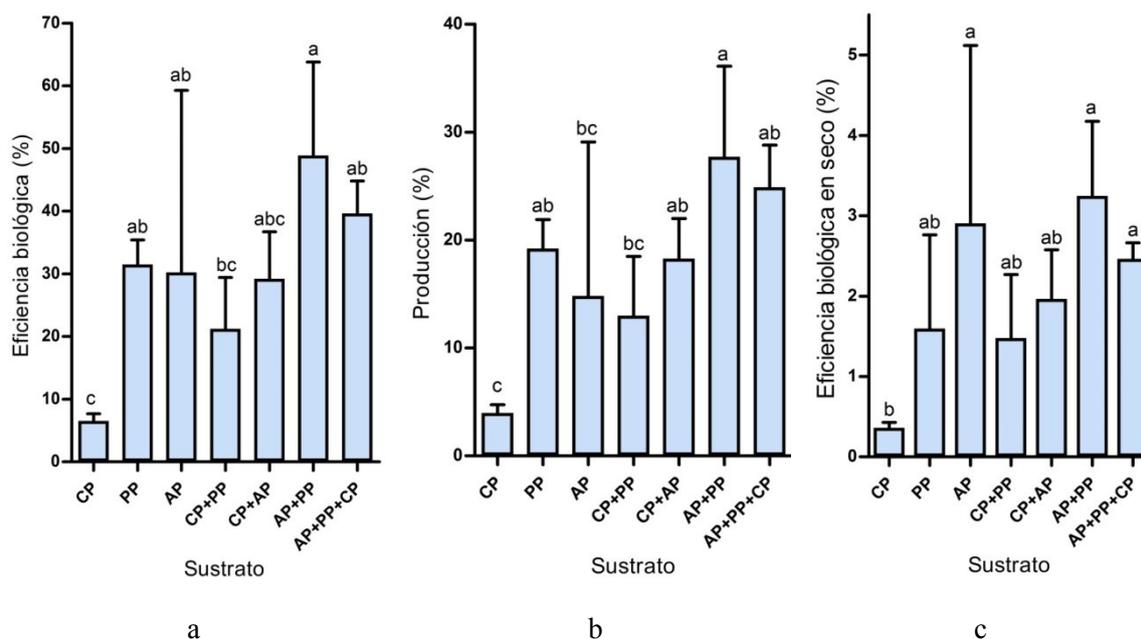


Figura 41. a) Eficiencia biológica, b) producción y c) eficiencia biológica en seco del cultivo de *PO1* sobre residuos de pecán

El rango de EB que arrojaron los cultivos de *PO1* es de 6,5 %, para sustrato CP y de 48,9 %, para AP+PP. Los valores recogidos para el indicador P, varían entre 4 % y 27,8 %. El indicador basado en setas secas, EBS, varió entre 0,4 % y 3,2 %, siendo valores muy pequeños debido a que el *P. ostreatus* es una seta con un alto porcentaje de agua (93 %).

Por otra parte, en otros estudios, se ha visto que al cultivar diferentes cepas de *P. ostreatus* bajo las mismas condiciones puede haber diferencias significativas en la eficiencia biológica. En el caso de Salmones y colaboradores (2005) fueron estudiadas dos cepas comerciales, los resultados para la primera estirpe IE-38 fue de  $76,6 \pm 28,1$  % de EB, mientras que la estirpe IE-49 arrojó un  $86,5 \pm 40,9$  % de EB, no llegando a ser una diferencia significativa. Pero Philippoussis y cols. (2001) en su estudio vieron diferencias significativas, entre la cepa P69 con 70,61 % de EB y la KH35 con 116,7 % de EB. Sobre sustrato de cáscara de girasol también se observaron diferencias, donde se evaluaron 5 cepas de diferentes procedencias; Rep. Checa (112,2 % de EB), Illinois, EUA (105,3 % de EB), Francia (94,1 % de EB), California, EUA (80,6 % de EB) y México (60,4 % de EB) (Curvetto y cols., 2002). Merlo y Mata (2005) estudiaron 2 sustratos y 10 cepas de diferentes orígenes (Europa, México, Guatemala, Hong Kong, Japón, Checoslovaquia), consiguiendo obtener diferencias significativas en la mayoría

de los casos, con eficiencias que van desde 27,98 % a 106,04 %, reportando la misma diferencias para ambos sustratos estudiados. Incluso en otro estudio que se realizaron cruza de cepas, utilizando una cepa original de Europa con otra de EUA, obteniéndose 4 inóculos diferentes (IE-179, IE-179IV, IE-179V e IE-179I) analizándose sus respectivas productividades, resultando ser las EB diferentes significativamente, siendo los valores 71,9 %, 63,5 %, 34,7 % y 16,8 %, respectivamente (Salmones y cols., 1997). Todo esto puede indicarnos que para el caso del cultivo del *P. ostreatus* con diferentes cepas, su previo análisis con un sustrato control, puede ahorrarnos tiempo y recursos.

### Rendimientos comparativos

En las figuras 42 y 43 se observan las eficiencias biológicas y eficiencias biológicas en seco, respectivamente, de los estudios anteriores relevados a nivel mundial, comparados con los obtenidos en el cultivo de la cepa PO1 sobre las 7 formulaciones de sustratos de pecán.

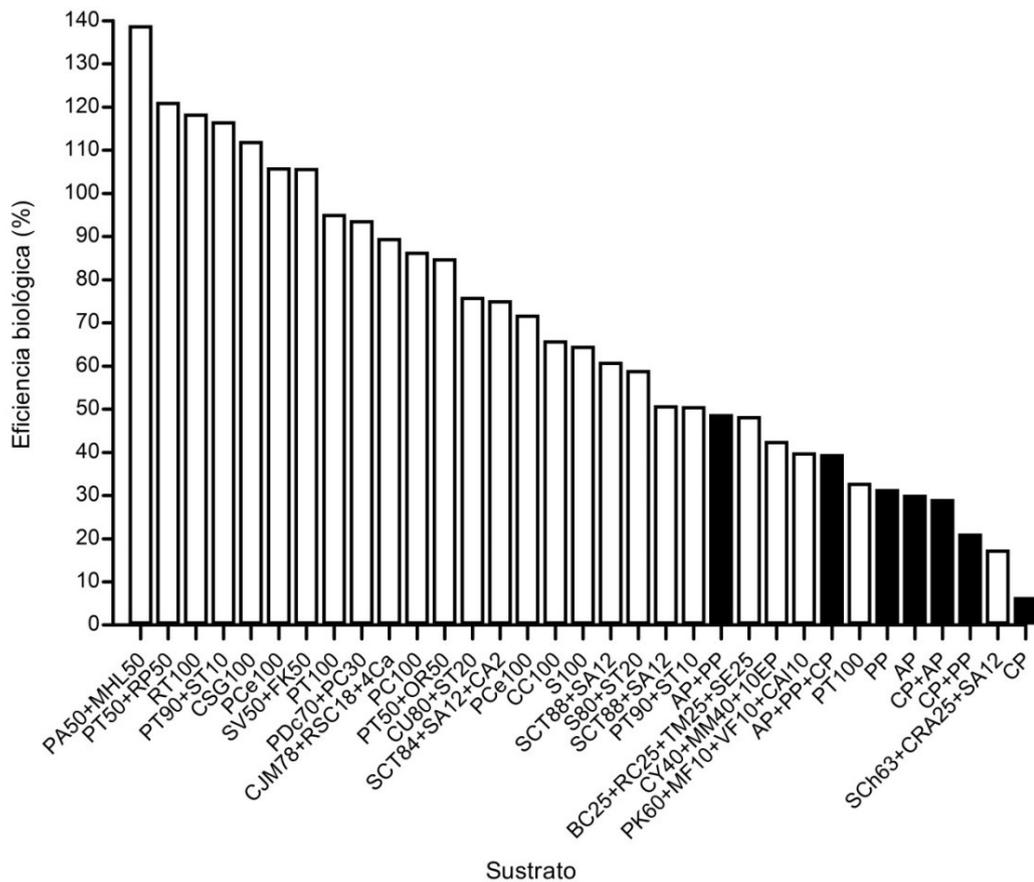


Figura 42. EB del presente estudio (barras negras), comparadas con otros estudios (barras blancas)

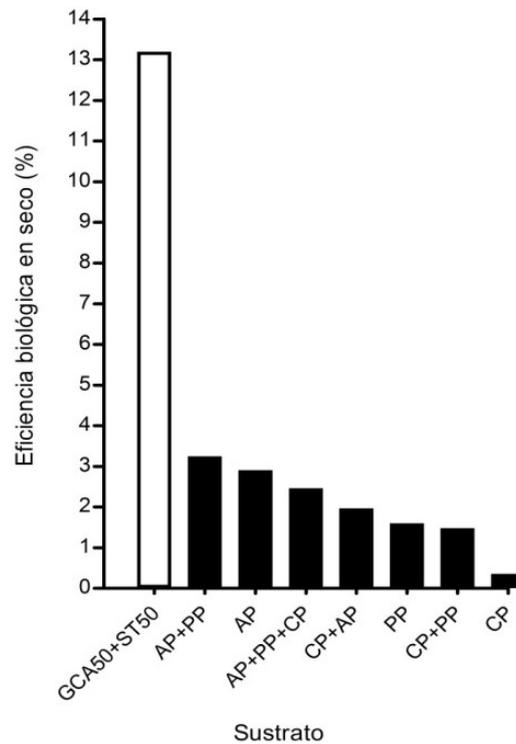


Figura 43. EBS del presente estudio (barras negras), comparadas con otro estudio (barras blancas)

Se observa que las EB de esta investigación se sitúan sobre la última mitad de rendimientos (fig. 42). Lo mismo ocurre con las EBS al comparar los resultados con los de Wang y cols. (2001) (fig. 43). Vale aclarar que el objeto en estudio es el cultivo de *P. ostreatus* sobre residuos de pecán en bruto, para que sean aprovechados de un modo ecológico e integral. También se observa que las mayores EB están dadas sobre formulaciones con un 50 % o más de paja de diferentes cereales y otros residuos de similar estructura. Para maximizar los rendimientos productivos del cultivo de *P. ostreatus* sobre residuos de pecán, se podrían mezclar los mismos con un porcentaje elevado de residuos de biomasa agrícola, disponibles en la zona.

### **Análisis de contenido fenólico**

En la siguiente gráfica se muestra el contenido fenólico que presentan las setas seca de *P. ostreatus* con respecto a las diferentes formulaciones de sustratos de pecán utilizadas para su cultivo (fig. 44).

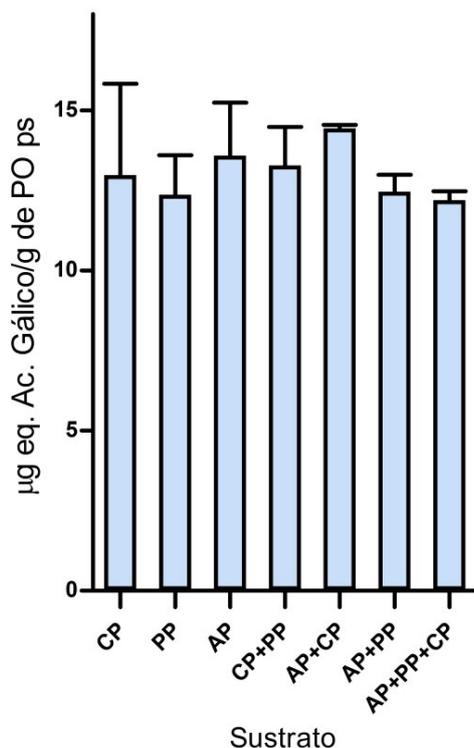


Figura 44. Contenido fenólico de los *P. ostreatus* cultivados sobre 7 formulaciones de sustratos de pecán

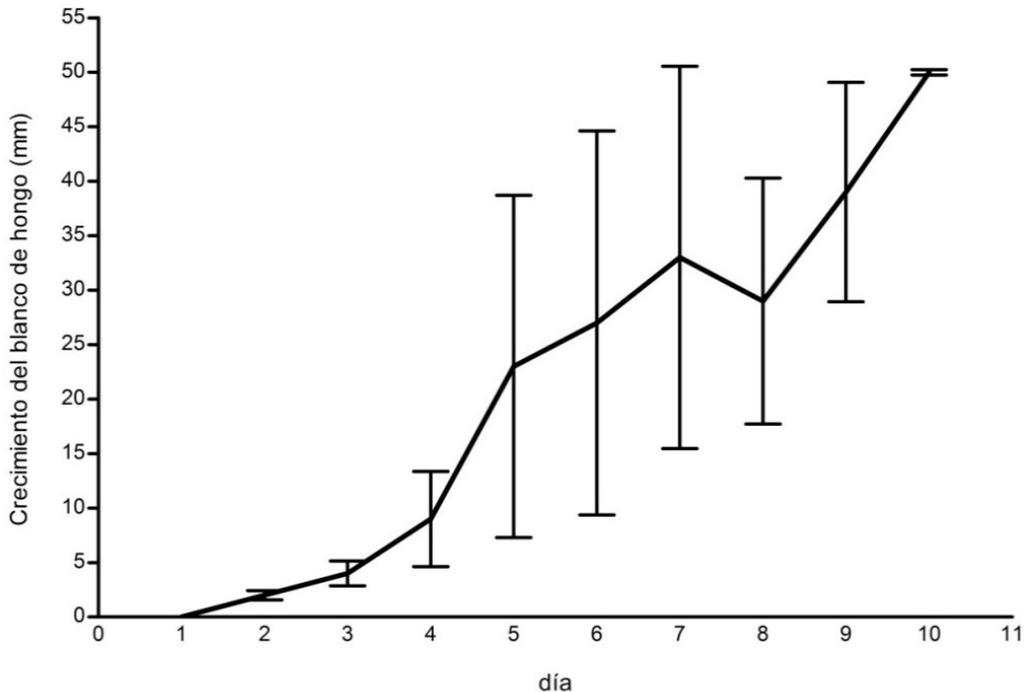
Se observa que no hay una diferencia significativa, en contenido fenólico, con respecto a las 7 formulaciones de sustrato de pecán utilizados para cultivar el *P. ostreatus* (PO1), en estudio (fig. 44). Los resultados de contenido fenólico obtenidos por Mishra y cols. (2013) fueron menos de la mitad a los obtenidos en el presente estudio, al estudiar el micelio de dichos hongos. Asimismo, el contenido fenólico sobre seta seca de *P. ostreatus* es alto independientemente del sustrato de residuos de pecán que se utilice. Este mismo resultado lo observó Ruiz-Rodriguez y cols., (2010) al variar la proporción del orujillo en la formulación del sustrato, partiendo también de un sustrato con alto contenido fenólico. Se puede decir que para este análisis de fenoles el comportamiento del *P. ostreatus* es ecléctico, respecto al sustrato de pecán con que se cultive.

---

## ***G. lucidum***

### **Crecimiento del blanco de hongo**

El crecimiento micelial del blanco de hongo en mm por día, de la cepa GL1, se puede observar en la siguiente figura (fig. 45).



*Figura 45. Crecimiento diario del blanco de hongo en frascos, de la cepa GL1*

Para GL1 la curva de crecimiento también coincide con una función sigmoidea de un microorganismo, pero presenta una mayor variabilidad en cada punto diario analizado, comparado con la cepa PO1.

### **Colonización micelial del sustrato de pecán**

En la figura 46 se observa la colonización micelial de la cepa GL1, en  $\text{mm}\cdot\text{día}^{-1}$  en tubos, para cada una de las 7 formulaciones de sustratos de pecán en estudio.

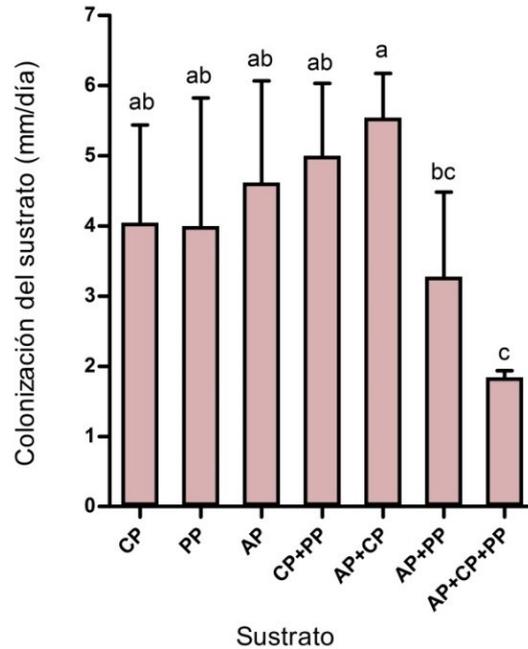


Figura 46. Colonización micelial para las 7 formulaciones de sustratos. Las medias con distinta letra son significativamente diferentes, ( $P < 0.05$ )

Como se puede observar en la figura 46, ninguno de los tratamientos presenta una resistencia para ser utilizado como sustrato de hongo de pudrición blanca por parte del *G. lucidum* (GL1). La colonización de los sustratos de pecán solo presentan diferencias significativas entre las formulaciones de sustratos AP+CP versus AP+PP y AP+CP+PP, siendo significativamente más rápido el primero, con un tiempo de crecimiento medio de 23.67 días ( $\pm 2.89$ ) que tardó en recorrer los 13 cm lineales de tubo. Los crecimientos lineales obtenidos en general, son semejantes a los estudiados sobre cáscaras de semillas de girasol (González Matute y cols., 2002) y sobre vinaza con salvado de trigo y arroz (Yang y cols., 2003). Si bien los resultados de crecimiento sobre cáscara no son los más rápidos (11.39 cm/30 días), cabe destacar que se han obtenido valores similares por Eun-Young y cols. (2013) en tratamientos similares con otros residuos estudiados (12.2-10.8 cm/30 días).

### Características morfológicas

En la tabla 17 se detallan las características morfológicas del cultivo de *G. lucidum*, para la cepa GL1, sobre las 7 formulaciones de sustratos de residuos de pecán.

Tabla 17. Características morfológicas del cultivo de GL1 para las 7 formulaciones de sustratos, dadas en  $M \pm DE$

| Sustrato | Nº Fructificaciones | Nº Carpóforos | Ø Sombrero (cm) | Pie (cm)      |
|----------|---------------------|---------------|-----------------|---------------|
| CP       | $2 \pm 0,0$         | $2 \pm 0,0$   | $1,2 \pm 0,1$   | $1,3 \pm 0,5$ |
| PP       | $1 \pm 0,6$         | $1 \pm 0,6$   | $0,9 \pm 0,6$   | $0,9 \pm 0,5$ |
| AP       | $2 \pm 0,6$         | $2 \pm 0,6$   | $1,5 \pm 0,8$   | $2,6 \pm 0,5$ |
| CP+PP    | $1 \pm 0,0$         | $1 \pm 0,0$   | $3,1 \pm 1,0$   | $1,1 \pm 0,8$ |
| CP+AP    | $2 \pm 0,0$         | $2 \pm 0,6$   | $1,7 \pm 1,1$   | $1,6 \pm 1,6$ |
| AP+PP    | $2 \pm 0,0$         | $2 \pm 0,0$   | $1,6 \pm 0,6$   | $1,8 \pm 1,0$ |
| AP+CP+PP | $1 \pm 0,0$         | $1 \pm 0,0$   | $1,9 \pm 1,8$   | $2,9 \pm 1,9$ |



Figura 47. Carpóforos de GL1 cultivados en tubos

En la tabla 17 se puede observar que en todas las formulaciones de sustratos de pecán se han recolectado setas. El tiempo total de todo el proceso de colonización, fructificaciones y recolecciones fue de 12 meses.

Por otra parte, la consistencia de los carpóforos de *G. lucidum* es leñosa (fig. 47) y la humedad varió ampliamente entre un 28 % y un 86 %, siendo su media del 67 %. A modo comparativo es interesante resaltar que la humedad del *P. ostreatus* cultivado en el presente trabajo es del 93%.

## Rendimientos

Los rendimientos obtenidos del cultivo de *G. lucidum*, cepa GL1, sobre las 7 formulaciones de sustratos de pecán se pueden observar en la figura 48.

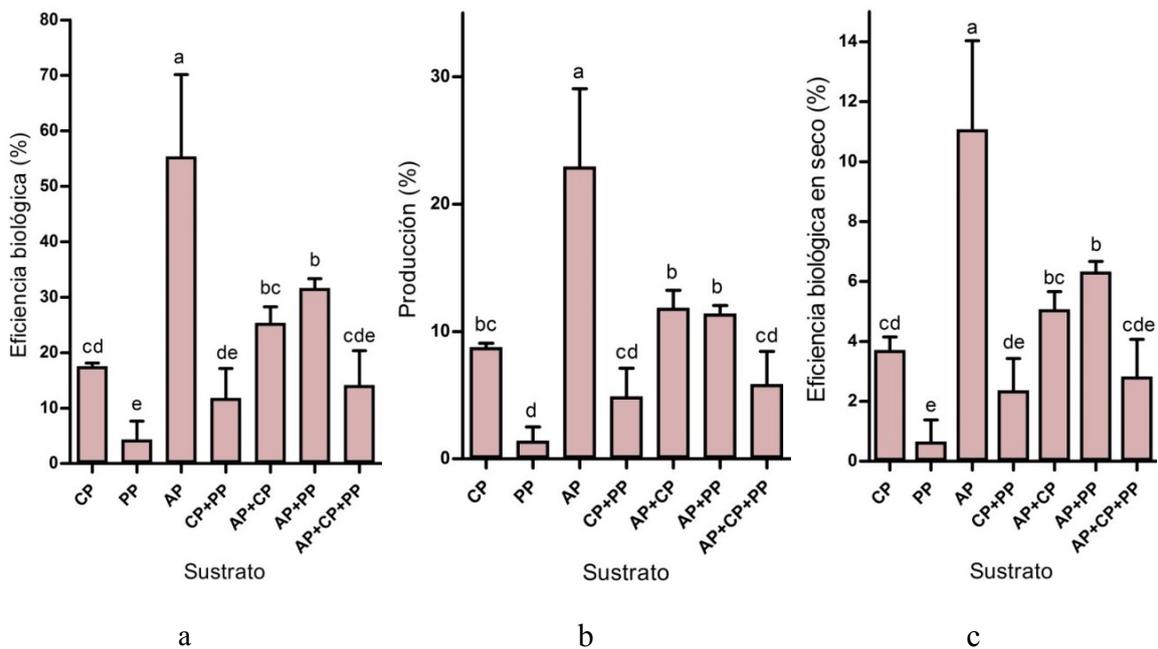


Figura 48. a) Eficiencia biológica, b) producción y c) eficiencia biológica en seco del cultivo de GL1 sobre residuos de pecán

Se observan que existen diferencias significativas en los diferentes rendimientos estudiados, para el cultivo de *G. lucidum* sobre formulaciones de sustratos de pecán (fig. 48). El rango de EB que arrojaron los cultivos de GL1 es de 4,36 %, para el sustrato PP y de 55,42 %, para AP. Los valores recogidos para el indicador P, varían entre 1,43 % y 22,97 %. El indicador basado en setas secas, EBS, varió entre 0,66 % y 11,08 %. Para el cultivo de *G. lucidum* es relevante estudiar su eficiencia biológica en seco (EBS), debido a que se comercializa directamente la seta seca en diferentes presentaciones (en polvo, cápsulas, en trozos o dentro de otros productos). Para el caso de la valva la EB es muy reducida, frente a las demás formulaciones, pero si se la combina con las astillas de ramas de poda de pecán, su rendimiento aumenta notablemente, llegando a alcanzar la segunda mejor eficiencia (fig. 48).

### Rendimientos comparativos

En las figuras 49 y 50 se observan las eficiencias biológicas y eficiencias biológicas en seco, respectivamente, de los estudios anteriores relevados a nivel mundial, comparados con los obtenidos para el cultivo de la cepa GL1 sobre las 7 formulaciones de sustratos de pecán.

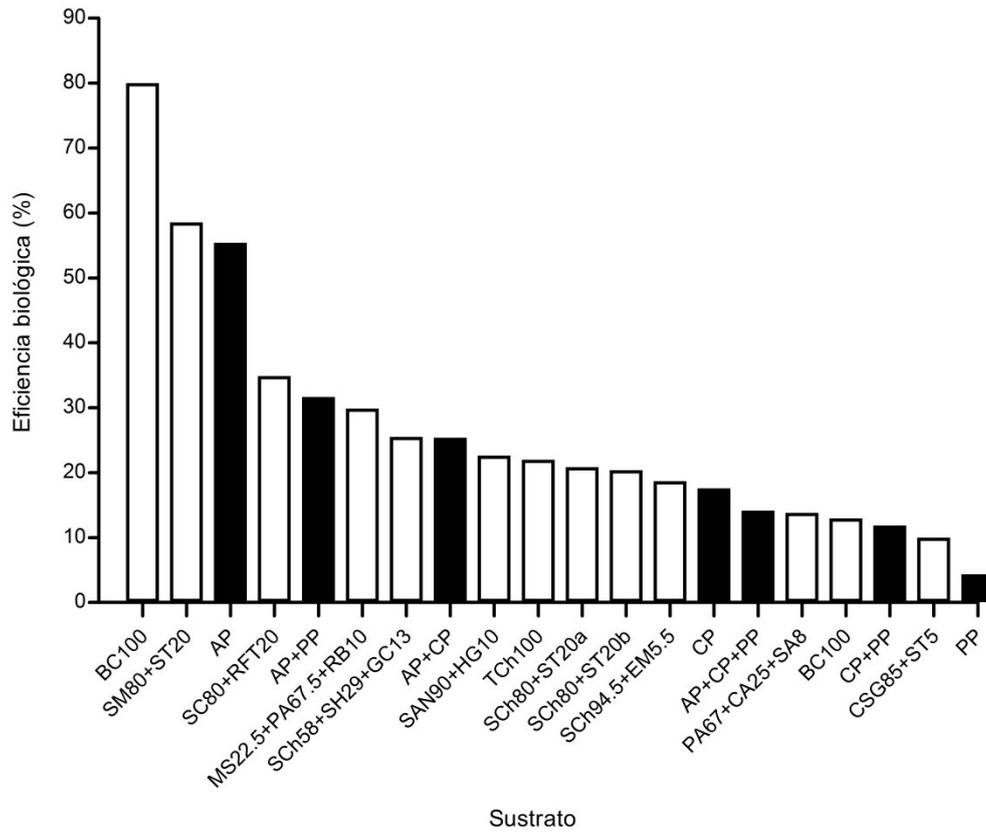


Figura 49. EB del presente estudio (barras negras), comparadas con otros estudios (barras blancas)

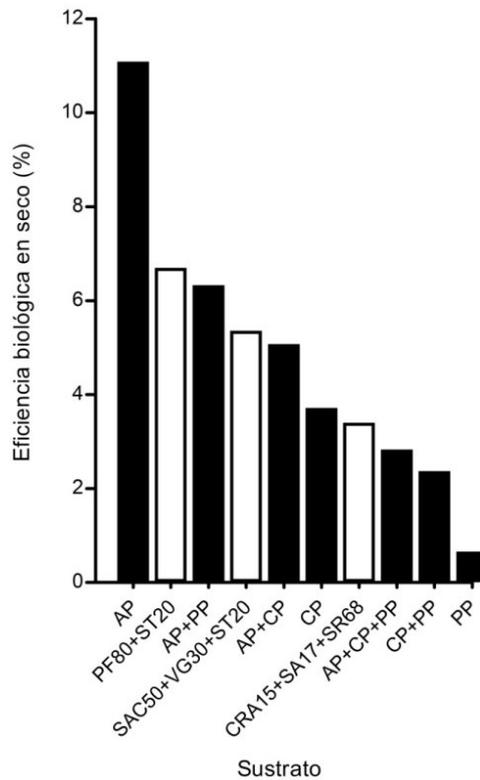


Figura 50. EBS del presente estudio (barras negras), comparadas con otro estudio (barras blancas)

---

El *G. lucidum* se ha cultivado sobre una amplia variedad de residuos lignocelulósicos, incluyéndose los rastrojos de maíz (Shahzadi y cols., 2014), aserrín de paja de arroz (Veena y Pandey, 2011), cáscaras de semillas de girasol (González Matute y cols., 2002), los residuos de té (Peksen y Yakupoglu, 2009), sobre el bagazo de la caña de azúcar (Manavalan y cols., 2012), residuos de la soja (Hsieh and Yang, 2004), restos de pescados (Lakshmi, 2013) y diferentes tipos de aserrines de maderas (chopo, haya, carpe, roble) (Erkel, 2009a; Azizi y cols., 2012; Jo y cols., 2013) (ver tabla 10).

La formulación de sustrato de astillas de ramas de poda de pecán AP, con 55,42 % de EB, está posicionada como uno de los mejores sustratos utilizados para cultivar *G. lucidum* a nivel mundial (fig. 49), solo presentando mejores resultados el cultivo sobre bagazo de caña de azúcar (BC100), con 80±15% de EB (Manavalan y cols., 2012), y el aserrín de mango con salvado de trigo (SM80+ST20), con 58,57 % de EB (Mehta y cols., 2014). Así mismo, las formulaciones AP+PP, con 31,7% de EB, y CP+AP, con 25,4% de EB, ambas figuran entre las mejores diez formulaciones de residuos agroforesto-industriales para obtener carpóforos de *G. lucidum*. El único aditivo utilizado en todas las formulaciones del presente estudio fue el regulador de pH  $\text{CaCO}_3$  (1 %). La mejor EBS obtenida es de 11% para la formulación AP, comparada con los estudios a nivel mundial (fig. 50).

### **Análisis de contenido fenólico**

En la siguiente gráfica se muestra el contenido fenólico que presentan las setas seca de *G. lucidum* con respecto a las diferentes formulaciones de sustratos de pecán utilizadas para su cultivo (fig. 51).

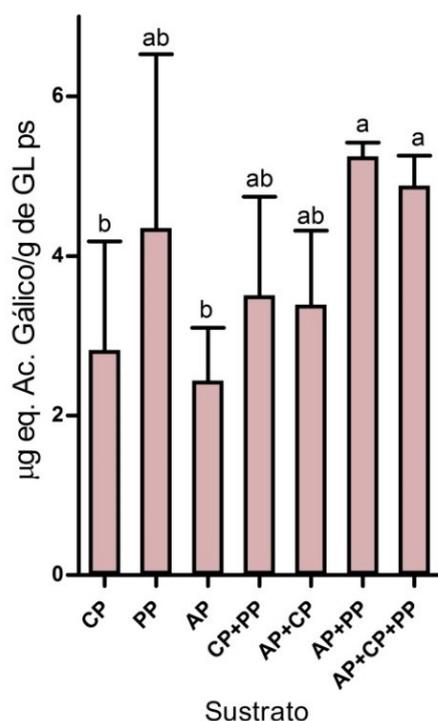


Figura 51. Contenido fenólico de los *G. lucidum* cultivados sobre 7 formulaciones de sustratos de pecán

Se observa que en contenido fenólico, hay dos grupos de formulaciones utilizadas para cultivar el *G. lucidum*, que presentan diferencia significativa (fig. 51). Los mayores contenidos fenólicos se encuentran en los sustratos AP+PP y AP+CP+PP (letra “a” de figura 51), presentando CP y AP las menores concentraciones (letra “b” en figura 51). El resto de las formulaciones no presentan diferencias estadísticas significativas. Čilerdžić y cols. (2014) que utilizaron paja de trigo como sustrato, observaron concentraciones fenólicas distintas para las diferentes cepas de *G. lucidum*.

---

## CONCLUSIONES

1. Se ha conseguido por primera vez demostrar el cultivo de hongos nutracéuticos (*P. ostreatus* y *G. lucidum*) sobre residuos lignocelulósicos de pecán.
2. Adicionalmente a este logro, tanto los residuos forestales utilizados como las cepas fúngicas recolectadas y cultivadas son todas originarias de la Península Ibérica, persiguiendo un objetivo de sustentabilidad y conservación de la biodiversidad autóctona.
3. El presente trabajo brinda una caracterización integral de los residuos lignocelulósicos (cáscaras, pericarpios y ramas de poda) generados en las explotaciones de pecán (*C. illinoensis*). Se ha comprobado un elevado contenido fenólico de los mismos, con especial importancia en la cáscara de pecán.
4. Se ha comprobado que dos pares de cepas de estirpes de *G. lucidum*, que se encuentran a menos de 1 km de distancia presentan un crecimiento micelial estadísticamente diferente. Esta situación nos indica la diversidad de *G. lucidum* en la Península Ibérica, especialmente en ambientes mediterráneos.
5. Las siete formulaciones de sustratos usadas para ambos cultivos, tanto de *P. ostreatus*, como de *G. lucidum*, no presentaron resistencia para la colonización de los mismos, por parte del micelio de dichos hongos.
6. La formulación AP+PP para el cultivo de la cepa PO1 maximizó los rendimientos en eficiencia biológica, con un 48,9 %. Esta aplicación demuestra el uso práctico de los residuos de pecán, para la producción del hongo comestible *P. ostreatus*. Para optimizar los rendimientos productivos solo haría falta formular el sustrato con un elevado contenido de residuos de biomasa agrícola.

- 
7. La formulación AP para el cultivo de la cepa GL1 maximizó los rendimientos en eficiencia biológica, con un 55,4 %. Las eficiencias biológicas logradas en este estudio, para la producción de *G. lucidum* se encuentran entre las más altas registradas científicamente a nivel mundial. Esto avala el uso práctico y exitoso de residuos de pecán para la producción de estas setas tan apreciadas en el mercado nutracéutico.
  8. El contenido fenólico de las setas cultivadas de *P. ostreatus* no presentan diferencias estadísticas para ninguna de las 7 formulaciones de sustratos de pecán utilizadas.
  9. Se han logrado distinguir dos grupos en cuanto a diferencias significativas de contenido fenólico en los carpóforos de *G. lucidum* cultivados sobre las formulaciones de sustratos de pecán. Destacan de forma sobresaliente los sustratos AP+PP y AP+CP+PP, que llegan a duplicar las concentraciones de fenoles de otros sustratos en estudio.
  10. La aplicación integral de la presente investigación devela el gran valor de los residuos del pecán y su aprovechamiento, desde un punto de vista socio-económico y ambiental. Estos resultados obtenidos, potencian los beneficios globales de la producción de pecán, utilizando los residuos lignocelulósicos para obtener productos de alto valor añadido en forma de apreciados hongos nutracéuticos.

---

## CONCLUSION

1. It has been shown for the first time, the nutraceuticals growing mushrooms (*P. ostreatus* and *G. lucidum*) on pecan lignocellulosic waste (shells, pericarps and wood-chips).
2. Additionally, the forest waste used and fungal strains collected and cultured are native to the Iberian Peninsula, following a goal of sustainability and conservation of native biodiversity.
3. This study presents a comprehensive analysis of the characterization, biodegradation and use of lignocellulosic wastes generated on pecan *C. illinoensis* farms for its use, for the first time, as solid substrates for mycological culture.
4. It has been proved that two pairs of strains of *G. lucidum*, which are less than 1 km away, have a statistically different mycelial growth rate. This shows the diversity of *G. lucidum* on the Iberian Peninsula, especially in Mediterranean environments.
5. The seven substrates formulations used for crops, *P. ostreatus* and *G. lucidum*, presented no resistance to being colonized by these fungi.
6. The AP + PP substrate formulation maximize yields for PO1 strain culture with a biological efficiency of 48.9 %. This application demonstrates the practical use of pecan waste for the production of edible fungus *P. ostreatus*. To optimize production yields it would only need to make the substrate formulation with a high content of agricultural biomass waste.
7. The AP substrate formulation maximizes the performance of the cultivation of a GL1 strain with a biological efficiency of 55.4 %. Biological efficiencies achieved in this study, for the production of *G. lucidum*, are among the highest recorded scientifically worldwide. This supports the practical and successful use of pecan waste for the

---

production of these mushrooms so appreciated in the nutraceutical market.

8. The phenolic content of *P. ostreatus* cultivated mushrooms has no statistical differences for any of the 7 substrate formulations of pecan used.
9. It was possible to distinguish two groups with significant differences in phenolic content for the fruiting bodies of *G. lucidum* cultivated on pecan substrates formulations. It can be highlighted the AP+PP and AP+CP+PP substrate formulations that have reached double phenol concentrations than the others substrates.
10. The full implementation of this research reveals the great value of pecan residues in socio-economic and environmental terms. These results enhance the overall benefits of the pecan production. It uses lignocellulosic waste to obtain valuable products in the form of nutraceutical fungi, with important properties for the health and quality of people life.

---

## BIBLIOGRAFÍA

Abdelrahman, E.H., Salama, M.M., Abdallah, H.M., Sleem, A.A., 2008. Pharmacognostical study of *C. illinoensis* (Wangenh) K. Koch (Juglandaceae). Al Azhar J. Bio. Med. Sci. 28, 222–243.

Aguasca, M., Llistosella, J., Siquier, J. L., Constantino, C. (1992). Contribució a la flora dels macromicets de L'illa De Mallorca. Fol. Bot. Misc., 8: 5-43.

Ahmed, M., Abdullah, N., Ahmed, K. U., Bhuyan, M. H. M. (2013). Yield and nutritional composition of oyster mushroom strains newly introduced in Bangladesh. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 48(2), 197-202.

Ahmenda, M., Marshall, W.E., Rao, R.M., (2000). Production of granular activated carbons from select agricultural by-products and evaluation of their physical, chemical and adsorption properties. Bioresource Technology 71, 113–123.

Aldavero-Peña, C. (2014). Estudio de la capacidad antioxidante y el contenido en  $\beta$ -(1,3-1,6-) glucanos de diversas setas comestibles de Castilla y León. Tesis Doctoral Universidad de Valladolid.

Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., Blackwell, M. (1996). Introductory Mycology. Fourth Edit. John Wiley & Sons Inc.

Antal, M. J., Allen, S. G., Dai, X., Shimizu, B., Tam, M. S., Gronli, M. (2000). Attainment of the Theoretical Yield of Carbon from Biomass. Industrial & Engineering Chemistry Research 39, 4024-4031.

AOAC 2005. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the AOAC. 18th. Ed. AOAC, Arlington, VA.

Arora, D. (1986). Mushrooms demystified. Ten Speed Press. Berkeley. 959 pp.

Arranz, D. (1988). Hongos de la Casa de Campo. Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid 13: 221-226.

Azcon-Aguilar, C., Barea, J. M. 1980. Micorrizas. Investigacion y Ciencia 47: 8-16.

Azizi, M., Tavana, M., Farsi, M., Oroojalian, F. (2012). Yield performance of Lingzhi or reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.) P. Karst.

---

(Higher Basidiomycetes), using different waste materials as substrates. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 14(5).

Babu, D., Crandall, P. G., Johnson, C. L., O'Bryan, C. A., & Ricke, S. C. (2013). Efficacy of antimicrobials extracted from organic pecan shell for inhibiting the growth of *Listeria* spp. *Journal of food science*, 78(12), M1899-M1903.

Bainard, L. D., Klironomos, J. N., Gordo, A. M. (2011). The mycorrhizal status and colonization of 26 tree species growing in urban and rural environments. *Mycorrhiza* 21:91-96.

Bastardo del Val, J., García Blanco, A., Sanz Carazo, M. (2002). *El gran libro de las setas de Castilla y León*. Ed. El Norte de Castilla. 320 pp.

Basterrechea-Elizgaray, J. B. (2013). Capacidad antioxidante y antirradicalaria, y nuevas lectinas SELblo y ebulina blo presentes en las inflorescencias del saúco enano (*Sambucus ebulus* L). Tesis Doctoral Universidad de Valladolid.

Bazzalo, M. E., Wright, J. E. (1982). Survey of the Argentine species of the *Ganoderma lucidum* complex. *Mycotaxon* 16, 295–325.

Beaudette, L.A., S. Davies, P.M. Fedorak, O.P. Ward, and M.A. Pickard (1998) Comparison of gas chromatography and mineralization experiments for measuring loss of selected polychlorinated biphenyl congeners in cultures of white rot fungi. *Appl. Environ. Microbiology* 64: 2020–2025.

Benucci, G.M., Bonito, G, Baciarelli, Falini L, Bencivenga M. (2012). Mycorrhization of pecan trees (*C. illinoensis*) with commercial truffle species: *Tuber aestivum* Vittad. and *Tuber borchii* Vittad. *Mycorrhiza* .22(5):383-392.

Bernichia A. (2005). *Fungi Europaei. Polyporaceae s.l.* Edizioni Candusso, 10, Alassio, Italy. 808pp.

Berovič, M., Habijanič, J., Zore, I., Wraber, B., Hodžar, D., Boh, B., Pohleven, F. (2003). Submerged cultivation of *G. lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. *J. Biotechnol.* 103, 77–86.

Beuchat, L. R., Brenneman, T. B., Dove, C. R. (1993). Composition of the pecan truffle (*Tuber texense*). *Food chemistry*, 46(2), 189-192.

---

Bonatti, M., Karnopp, P., Soares, H.M., Furlan, S.A. (2004). Evaluation of *P. ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristic when cultivated in different lignocelulosic wastes. Food Chemistry: 88, 425-428.

Bonito, G., Brenneman, T., Vilgalys, R. (2011a). Ectomycorrhizal fungal diversity in orchards of cultivated pecan (*C. illinoensis*; Juglandaceae). Mycorrhiza 21 (7): 601-612.

Bonito, G., Trappe, J. M., Donovan, S., Vilgalys, R. (2011b). The Asian black truffle *Tuber indicum* can form ectomycorrhizas with North American host plants and complete its life cycle in non-native soils. Fungal Ecology, 4(1), 83-93.

Breitenbach, J., Kränzlin, F. (1986). Champignons de Suisse. Tome 2, Champignons sans lames. Edition Mykologia. Lucerna.

Breitenbach, J., Kränzlin, F. (1991). Fungi of Switzerland, Vol. 3. Agarics. 1st part, Boletes and Agarics, Strobilomycetaceae, Boletaceae, Paxillaceae, Gomphidiaceae, Hygrophoraceae, Tricholomataceae, Polyporaceae (Lamellate).

Calonge F. D. (2011). Hongos medicinales. Editorial Paraninfo.

Calonge, F. D., Marcos, B., Hernández, E., Calabrese, G. M. (2000). Hongos recolectados en encinares (*Quercus ilex* subsp. *ballota*), melojares (*Q. pyrenaica*) y pinares (*Pinus sylvestris*) de algunas localidades de Salamanca.

Calonge, F.D. y Oria de Rueda, J.A. (1987). Aportación a la micoflora de la provincia de Almería. Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid 12: 93-106.

Camarena Gómez y Sanjuán López. (2005). Comercialización de la Nuez Pecán en el Mercado Europeo. Revista Mexicana de Agronegocios, julio-diciembre, 2005/vol. IX, número 017. Universidad Autónoma de la Laguna, Torreón, México.

Carabajal, M., Levin, L., Albertó, E., Lechner, B. (2012). Effect of co-cultivation of two *Pleurotus* species on lignocellulolytic enzyme production and mushroom fructification. International Biodeterioration & Biodegradation, 66(1), 71-76.

Carballal, R. (1974). Macromycetes de Guadalajara. Anal. Inst. Cavanilles 31: 27-48.

---

Carrillo Pedraza (2010). Estudio del proceso de pirolisis de biomasa para obtener nanopartículas de carbón. Tesis Doctoral Universidad Autónoma de Nuevo León.

Carvalho, C. S. M., Sales-Campos, C., de Carvalho, L. P., de Almeida Minhoni, M. T., Saad, A. L. M., Alquati, G. P., & de Andrade, M. C. N. (2015). Cultivation and bromatological analysis of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst cultivated in agricultural waste. *African Journal of Biotechnology*, 14(5): 412-418.

Cerda, I. (1998) Trayectoria del sector forestal chileno: Sus logros y desafíos. Instituto Forestal. Santiago de Chile, 3-91.

Chae, H. J., and Ahn, J. H. (2013). Optimization of rice bran and food waste compost contents in mushroom culture medium to maximize mycelial growth rate and fruit body yield of *Pleurotus ostreatus*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 80, 66-70.

Chang, S. T. (1999). World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. in China. *International J. Med. Mush.* 1: 291–300.

Chu T. T. W., Benzie I. F. F., Lam C. W. K., Fok B. S. P., Lee K. K. C., Tomlinson B. (2012). Study of potential cardioprotective effects of *G. lucidum* (Lingzhi): results of a controlled human intervention trial. *The British Journal of Nutrition* 107(7):1017–1027.

Ćilerdžić, J., Vukojević, J., Stajić, M., Stanojković, T., & Glamočlija, J. (2014). Biological activity of *Ganoderma lucidum* basidiocarps cultivated on alternative and commercial substrate. *Journal of ethnopharmacology*, 155(1), 312-319.

Conti, H., Moschini, R., Cazenave, G. (2008). Zonificación agroclimática del pecán en región Pampeana y Noreste Argentino. XII Reunión Argentina de Agrometeorología, 8 al 10 de octubre de 2008. San Salvador de Jujuy – Argentina.

Cooke, R. C. and Rayner, A. D. M. (1984). *Ecology of Saprophytic Fungi*. Longman, New York.

Courtecuisse, R. (2005). *Guía de los hongos de la Península Ibérica, Europa y norte de África: 1751 especies descritas e ilustradas*. Editorial Omega.

- 
- Cuesta, J. (2003). Ecología de los hongos. *Foresta*, 23: 22-34.
- Curvetto, N. R., Figlas, D., Devalis, R., Delmastro, S. (2002). Growth and productivity of different *Pleurotus ostreatus* strains on sunflower seed hulls supplemented with N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and/or Mn (II). *Bioresource Technology*, 84(2), 171-176.
- Da Silva, M. C., Naozuka, J., da Luz, J. M. R., de Assunção, L. S., Oliveira, P. V., Vanetti, M. C., Bazzolli, D. M. S. & Kasuya, M. C. (2012). Enrichment of *Pleurotus ostreatus* mushrooms with selenium in coffee husks. *Food chemistry*, 131(2), 558-563.
- Dai, J., Mumper, R.J., (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15, 7313–7352.
- Dalkılıç, Z. (2013). Effects of drying on germination rate of pecan seeds. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 11, 3-4.
- Das, N., Mukherjee, M. (2007). Cultivation of *Pleurotus ostreatus* on weed plants. *Bioresource Technology*, 98(14): 2723-2726.
- De la Parra, B., Olaizola, J., Santos del Blanco, L., Fraile, R., Oria de Rueda, J.A. (2008). Guía de Setas. Páramos y Valles palentinos. Adri Páramos y Valles. 202 pp.
- De La Rosa, L. A., Alvarez-Parrilla, E., Shahidi, F. (2011). Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Kernels and Shells of Mexican pecan (*Carya illinoensis*). *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 59, 152–162.
- De la Rosa, L. A., Vazquez-Flores, A. A., Alvarez-Parrilla, E., Rodrigo-García, J., Medina-Campos, O. N., Ávila-Nava, A., Gnzález-Reyes, S., Pedraza-Chaverri, J. (2014). Content of major classes of polyphenolic compounds, antioxidant, antiproliferative, and cell protective activity of pecan crude extracts and their fractions. *Journal of Functional Foods*, 7, 219-228.
- Deepalakshmi K., Mirunalini, S. (2011). Therapeutic properties and current medical usage of medicinal mushroom: *Ganoderma lucidum*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Reserch*, 2: 1922-1929.
- Dering, P. (1977). Dering, J. P. (1977). Baker Cave plant macrofossil report. Unpublished manuscript on file with the Baker Cave Project Texas Archeological Research Laboratory, University of Texas at Austin. Texas at Austin.

---

Domínguez-Avila, J. A., Alvarez-Parrilla, E., López-Díaz, J. A., Maldonado-Mendoza, I. E., Gómez-García, M.D.C., de la Rosa, L. A. (2015). The pecan nut (*Carya illinoensis*) and its oil and polyphenolic fractions differentially modulate lipid metabolism and the antioxidant enzyme activities in rats fed high-fat diets. *Food Chem.* 168, 529–537.

Dreistadt, S. H., J. K. Clark, and M. L. Flint. (2004). *Pests of Landscape Trees and Shrubs*. Oakland: Univ. Calif. Agric. Nat. Res. Publ. 3359.

Duchesne, L. C., Ellis, B. E., Peterson, R. L., (1989). Disease suppression by the ectomycorrhizal fungus *Paxilus involutus*. *New Phytologist* 113: 163-171.

El-Hawary, S. S., Zaghloul, S. S., El-Halawany, A. M., El-Bishbishy, M. H. (2013). Comparative study of volatile oil content and antimicrobial activity of pecan cultivars growing in Egypt. *Journal of medicinal food*, 16(11), 1022-1029.

Erkel, E. I. (2009a). The effect of different substrate mediums on yield of *G. lucidum* (Fr.) Karst. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 7: 841-844.

Erkel, E. I. (2009b). Yield performance of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst cultivation on substrates containing different protein and carbohydrate sources. *African Journal of Agricultural Research* 4(11): 1331-1333.

FAO (2012) [<http://faostat.fao.org>]

Fernández-Toirán, M., Ágreda, T., Olano, J. M. (2006) Stand age and sampling year effect on the fungal fruiting body community in *Pinus pinaster* forests in central Spain. *Canadian Journal of Botany*, 84(8): 1249-1258.

Fracchia, S., Aranda Rickert, A., Terrizzano, E. (2009). Cultivo de una cepa comercial de *Pleurotus ostreatus* en desechos de *Simmondsia chinensis* y *Jatropha macrocarpa*. *Revista Mexicana de Micología*, 29: 37-42.

Fraile, R. y Oria de Rueda, J. A. (2015). Banco de Datos de Biodiversidad de la Catedra de Micología de la Universidad de Valladolid. ETSIIAA. Palencia.

Frimpong–Manso, J., Obodai, M., Dzomeku, M., & Apetorgbor, M. M. (2011). Influence of rice husk on biological efficiency and nutrient content of *P. ostreatus* (Jacq. ex. Fr.) Kummer.

---

Frusso, E. A. (2007). Características morfológicas y fenológicas del pecán. En: R.S. Lavado y E.A. Frusso. Producción de Pecán en Argentina. Capítulo III.

Fundación Produce A.C., INIFAP Sonora. (2002). Cadena Agroalimentaria/Agroindustrial Nogal Pecadero.

García-Bona, L. M. (2015). Catálogo micológico de Navarra. Gorosti.

Garzón-Gómez, J. P. G., Cuervo-Andrade, J. L. (2008). Producción de *Pleurotus ostreatus* sobre residuos sólidos lignocelulósicos de diferente procedencia. NOVA Publicación en Ciencias Biomédicas, 6(10): 126-140.

GBIF.org (1st October 2015) GBIF Occurrence Download <http://doi.org/10.15468/dl.zq7exl>.

Gerhardt, E. (1995). Handbuch Pilze. BLV. Munchen. 900 pp.

Gerhardt, E., Vila, j., Llimona, X. (2000). Hongos de España y Europa. Ediciones Omega S.A. Plató 26, Barcelona.

Gilbertson, R.L., Ryvarden, L., (1986). North American Polypores 1. Fungiflora, Oslo.

Giménez, A. P., Zamora, M. A. P., Núñez, J. P. (2008). Utilización de fibra de kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) en la elaboración de sustratos específicos para cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kummer. Revista Iberoamericana de Micología, 25(1), 57-61.

Girbés, T., Jiménez, P. (2010). Cuaderno de Prácticas de Fundamentos de Alimentación y Nutrición. Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid.

Gómez, D. M. C., López, A. I. S., El, E. N., Europeo, M. (2005). Comercialización de la nuez pecán en el mercado Europeo. Rev. Mex. Agronegocios IX, 0–21.

González Álvarez, M., Salcedo Martínez, S. M., Vargas López, V. R., Pérez Quintanilla, J. N., Bonilla y Fernández, M. N. (2010). Cultivo del Nogal Pecanero *C. illinoensis* (Wangenheim) K. Koch en Nuevo León. Primera edición 2010. ISBN: 978-607-433-515-6.

---

González-Matute, R., Figlas, D., Devalis, R., Delmastro, S., Curvetto, N. (2002). Sunflower Seed Hulls as a main nutrient source for cultivating *Ganoderma lucidum*. *Micología Aplicada International* 14(2): 1-6.

Gottlieb, A. M., Wright, J. E. (1999). Taxonomy of *Ganoderma* from southern South America: subgenus *Ganoderma*. *Mycological Research*, 103(06), 661-673.

Gunde-Cimerman, N., Cimerman, A. (1995). *Pleurotus* fruiting bodies contain the inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase—lovastatin. *Experimental mycology*, 19(1), 1-6.

Gurung, O. K., Budathoki, U., & Parajuli, G. (2013). Effect of Different Substrates on the Production of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) Karst. *Our Nature*, 10(1): 191-198.

Heimsch, C. (1958) The first recorded truffle from Texas. *Mycologia* 50:657–660.

Hepting, G. H. (1971). Diseases of forest and shade trees of the United States. U.S. Department of Agriculture, Agriculture Handbook 386. 658 p.

Hernández, D., Sánchez, J. E., Yamasaki, K. (2003). A simple procedure for preparing substrate for *Pleurotus ostreatus* cultivation. *Bioresource Technology*, 90(2), 145-150.

Hernández-Montoya, V., Mendoza-Castilloa, D. I., Bonilla-Petriciolet, A., Montes-Moránb, M.A., Pérez-Cruz, M.A. (2011). Role of the pericarp of *Carya illinoensis* as biosorbent and as precursor of activated carbon for the removal of lead and acid blue 25 in aqueous solutions. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 92, 143–151.

Herrera, E. (1990). Selecting soil and Site for a Pecan Orchard. Guide H-New Mexico State University, Cooperative Extension Service (USA).

Hester, T. R. (1981). Late Paleo Indian occupations at Baker Cave, southwestern Texas. *Bull. Tex. Arch. Soc.* 53:101 119.

Hsieh, Ch., Yang, F. C. (2004). Reusing soy residue for the solid-state fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Bioresource Technology* 91: 105–109.

Hudson, H. (1986). *Fungal Biology*. Edward Arnold.

---

Imtiaj, A., Jayasinghe, Ch., Lee, G. W., Lee, T. S. (2009). Comparative study of environmental and nutritional factors on the mycelial growth of edible mushrooms. *Journal of Culture Collections* 6: 97-105.

Imtiaj, A., Jayasinghe, Ch., Lee, G. W., Lee, T. S. (2009). Comparative study of environmental and nutritional factors on the mycelial growth of edible mushrooms. *Journal of Culture Collections* 6: 97-105.

Izco, J. (Coord.) (1997). *Botánica*. 2ª Edición. Mac Graw Hill Interamericana. Madrid. 906 pp.

Jayasinghe, C., Imtiaj, A., Hur, H., Lee, G. W., Lee, T. S., Lee, U. Y. (2008). Favorable culture conditions for mycelial growth of Korean wild strains in *Ganoderma lucidum*. *Mycobiology*, 36(1): 28-33.

Jo, E. Y., Cheon, J. L., Ahn, J. H. (2013). Effect of food waste compost on the antler-type fruiting body yield of *Ganoderma lucidum*. *Mycobiology*, 41(1): 42-46.

Jones, R. K., Simone, D. M., Von Broembsen, S. L., Dutky, E. (2001). Integrated disease management. En: Jones, R. K., Benson, D. M. Editors, *Diseases of Woody Ornamentals and Trees in the Nurseries*, APS Press, Minnesota, 376-383.

Kalmis, E., Azbar, N., Yıldız, H., Kalyoncu, F. (2008). Feasibility of using olive mill effluent (OME) as a wetting agent during the cultivation of oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on wheat straw. *Bioresource Technology*, 99(1): 164-169.

Kamal-Eldin, A., & Moreau, R. A. (2009). Tree nut oils. *Gourmet and health-promoting speciality oils*, 127-149.

Khatun, S., Islam, A., Cakilcioglu, U., Chatterjee, N. C. (2012). Research on mushroom as a potential source of nutraceuticals: A review on Indian perspective. *American Journal of Experimental Agriculture*. 2(1):47-73.

Kortei, N. K., Dzagbafia, V. P., Obodai, M. (2014). Assessing the effect of composting cassava peel based substrates on the yield, nutritional quality, and physical characteristics of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kummer. *Biotechnology research international*, 2014.

Kubatova, A., Erbanova, P., Eichlerova, I., Homolka, L., Nerud, F., Šašek, V. (2001). PCB congener selective biodegradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in contaminated soil. *Chemosphere*, 43(2), 207-215.

---

Lakhanpal, T. N. and Rana, M. (2005). Medicinal and nutraceutical genetic resources of mushrooms. *Plant Genetic Resources*, 31: 288-303.

Lakshmi, S. S. (2013). In vivo Utilization of Seafood Processing Waste for Cultivation of the Medicinal Mushroom (*Ganoderma lucidum*) using Agro-Industrial Waste. *Asian Journal Pharmaceutical and Clinical Research* 6(4): 51-54.

Lam, Y. S., Okello, E. J. (2015). Determination of Lovastatin,  $\beta$ -glucan, Total Polyphenols, and Antioxidant Activity in Raw and Processed Oyster Culinary-Medicinal Mushroom, *Pleurotus ostreatus* (Higher Basidiomycetes). *International journal of medicinal mushrooms*, 17(2): 117-128.

Lin, K., Y. Kao, H. Kuo, W. Yang, A. Chou, H. (2006). Reishi polysaccharides induce immunoglobulin production through the TLR4/TLR2-mediated induction of transcription factor blimp-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 281: 24111–24123.

López-Rodríguez, C., Hernández-Corredor, R., Suárez-Franco, C., Borrero, M. (2008). Evaluación del crecimiento y producción de *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de Cundinamarca. *Universitas Scientiarum*, 13(2): 128-137.

Luoma, D. L., Eberhart, J. L., Molina, R., Amaranthus, M. P. (2004). Response of ectomycorrhizal fungus sporocarp production to varying levels and patterns of green-tree retention. *Forest Ecology and Management*, 202: 337-354.

Manavalan, T., Manavalan, A., Thangavelua, K. P., Heeseb, K. (2012). Secretome analysis of *Ganoderma lucidum* cultivated in sugarcane bagasse. *Journal of Proteomics* 77: 298–309.

Martirani, L., P. Giardina, L. Marzullo, and G. Sannia (1996) Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Res.* 30: 1914–1918

Maublanc, A. (1921). *Les Champignons comestibles et vénéneux*, Ed. Paul Lechevalier.

McWilliams, J. (2013). *The Pecan: A history of America's native nut*. University of Texas Press. 180 pp.

---

Mehta, S., Jandaik, S., Gupta, D. (2014). Effect of cost effective substrates on growth cycle and yield of *Ganoderma lucidum* from North Western Himalaya. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 16(6): 585-591.

Merlo, R. P., Mata, G. (2005). Cultivo y selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius* en viruta de pino: obtención de nuevas cepas y evaluación de su producción. *Revista mexicana de micología*, (020), 53-59.

Meyer, O. (1993). Functional groups of microorganisms. In *Biodiversity and Ecosystem Function*. (E. Schulze and H. A. Mooney, eds), pp. 67-96. Springer Verlag.

Mian, I. H., Rodríguez Kábana, R. (1982). Organic amendments with high tannin and phenolic contents for control of *Meloidogyne arenaria* in infested soil. *Nematropical* 12(2): 221-234.

Milla Santamaría, A. (2007). Introducción al cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus*. Publicaciones INEA.

Miranda R.C., Guevara K. V., Sosa C. A., Rodríguez M. E. (2009). Obtención de bio-combustibles mediante pirólisis de cáscara de nuez pecanera (*Carya illinoensis*), 35-40.

Mishra, K. K., Pal, R. S., Arunkumar, R., Chandrashekara, C., Jain, S. K., & Bhatt, J. C. (2013). Antioxidant properties of different edible mushroom species and increased bioconversion efficiency of *Pleurotus eryngii* using locally available casing materials. *Food chemistry*, 138(2), 1557-1563.

Molina, A. M. G., Cardona, N. V., Alzate, S. R., DLeón, J. G. S., Holguín, E. S. (2005). Evaluación de algunos residuos orgánicos como sustrato para el cultivo de hongos comestibles. *Corporación Universitaria Lasallista*.

Molina, R., Amaranthus, M. (1990). Rhizosphere biology: ecological linkages between soil processes, plant growth, and community dynamics. In *Symposium on Management and Productivity of Western Montane Forest Soils*, Boise, ID.

Moreno, G., Galán, R., Llarandi, E., Raitviir, A. (2004). Estudio de los hongos que fructifican en el Parque nacional de Cabañeros (Ciudad real). *I. Bol. Soc. Micol Madrid* 28: 229-258.

Muñoz López, C. (1996). Micoflora y patología del alcornoque (*Quercus suber*). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.

---

Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K., Dalai, A. K. (2010). Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:578–597.

Nithya, M., Ambikapathy, V., Panneerselvam, A. (2014). Collection, identification, phytochemical analysis and phyto toxicity test of wood inhabiting fungi *Ganoderma lucidum* (Curt.Fr.)P.Karst. *Hygeia: Journal for drugs and medicines* 6 (1):31-39.

Nyczeper, A. P., Wood, B. W. (2008). Interaction of Concurrent Populations of *Meloidogyne partityla* and *Mesocriconema xenoplax* on Pecan. *Journal of Nematology*, 40(3), 221–225.

Obodai, M., Cleland-Okine, J., Vowotor, K. A. (2003). Comparative study on the growth and yield of *Pleurotus ostreatus* mushroom on different lignocellulosic by-products. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(3), 146-149.

Obodai, M., Vowotor, K. A., Marfo, K. (2004). Performance of various strains of *Pleurotus* species under Ghanaian conditions. *Mushworld publication*, (16).

Ortega, A., Galan, R., Tellería, M.T. (1982). Aportación al estudio de los hongos de Andalucía VII. Catálogo de *Aphylophorales* de la provincia de Granada. *Bol. Soc. Micol. Castellana* 7: 53-68.

Orzua, M.C., Mussatto, S. I., Contretas-Esquivel, J. C., Rodriguez, R., de la Garza, H., Teixeira, J. A. (2009). Exploitation of agro industrial wastes as immobilization carrier for solid-state fermentation. *Industrial Crops and Products* 30: 24–27.

Ozcariz Fermoselle, M. V., da Silva Lacerda, V., Correa Guimaraes, A., Hernández Navarro, S., Navas Gracia, L. M., Martín Ramos, P., Pérez Lebeña, E., Martín Gil, J. (2012). Conversion of native cellulose into 5-hydroxymethylfurfural in ionic liquids with catalyzed microwave-promoted hydrolysis. *International Conference on Agricultural Engineering CIGR. Valencia, Spain.*

Padilla, F. C., Rincón, A. M., Bou-Rached, L. (2008). Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 58(3), 303-308.

---

Paterson, R. (2006). Ganoderma: A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry*, 67: 1985–2001.

Peattie, D. C. (1950). A Natural History of trees of Eastern and central North America. Houghton Mifflin Company. The Riverside Press Cambridge. 606 pp.

Pecan - YS Trading Comp.(2015). Estimated world Pecans production:  
<http://ystradingcompany.com/files/attach/images/935/404/001/a3b69aca4d76dafa6ccc4a016fec03f6.jpg>

Peksen, A., Yakupoglu, G. (2009). Tea waste as a supplement for the cultivation of *Ganoderma lucidum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(4): 611-618.

Pendyal, B., Johnsb, M.M., Marshall, W.E., Ahmedna, M., Rao, R.M. (1999). Removal of sugar colorants by granular activated carbons made from binders and agricultural by-products. *Bioresource Technology* 69, 45–51.

Pereira, G., Campos, J. L., Chávez, D., Anabalón, L., & Arriagada, C. (2014). Caracterización del crecimiento micelial del hongo ectomicorrícico *Lactarius aff. deliciosus* y su simbiosis con plántulas de *Pinus radiata*. *Quebracho-Revista de Ciencias Forestales*, 22(1-2), 30-39.

Peterson, J. K. (1990). *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch pecan. In: Burns, Russell M.; Honkala, Barbara H., technical coordinators. *Silvics of North America*. Vol. 2, 10 pp.

Petre, M., Teodorescu, A. (2009). Biotechnology for in vitro growing of edible and medicinal mushrooms on wood wastes. *Annals of Forest Research*, 52(1): 129-136.

Petterson, R. C. (1984). The Chemical composition of wood. In: Rowell, R. M., ed. *The chemistry of solid wood*. Advances in chemistry series 207. Washington, DC. American Chemical Society, chapter 2.

Philippoussis, A., Diamantopoulou, P., Israilides, C. (2007). Productivity of agricultural residues used for the cultivation of the medicinal fungus *Lentinula edodes*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 59: 216-219.

Philippoussis, A., Zervakis, G., Diamantopoulou, P. (2001). Bioconversion of agricultural lignocellulosic wastes through the cultivation of the edible mushrooms

---

*Agrocybe aegerita*, *Volvariella volvacea* and *Pleurotus* spp. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 17(2): 191-200.

Pinheiro do Prado, A. C., Monalise Aragão, A., Fett, R., Block, J. M. (2009). Antioxidant properties of Pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] Shell infusion. Grasas y Aceites 60 (4):330-335.

Postemsky, P. D., Delmastro, S. E., & Curvetto, N. R. (2014). Effect of edible oils and Cu (II) on the biodegradation of rice by-products by *Ganoderma lucidum* mushroom. International Biodeterioration and Biodegradation, 93: 25-32.

Prado, A. C. P. Do, Manion, B. A., Seetharaman, K., Deschamps, F. C., Barrera Arellano, D., Block, J. M. (2013). Relationship between antioxidant properties and chemical composition of the oil and the shell of pecan nuts [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch]. Ind. Crops Prod. 45, 64–73.

Real Academia de la Lengua Española (2013). Diccionario de la lengua Española. 2 tomos. Editorial Espasa Calpe. Madrid.

Real Academia Española (2014). Diccionario de la lengua española, 23.<sup>a</sup> ed.: Editorial Espasa. Madrid

Rigas, F., V. Drista, R. Marchant, y cols. (2005) Biodegradation of lindane by *Pleurotus ostreatus* via central composite design. Environ. Int. 31: 191–196.

Rodriguez, R. J., Redman, R. S. (1997). Fungal life-styles and ecosystem dynamics: biological aspects of plant pathogens, plant endophytes and saprophytes. Adv. Bot. Res. 24, 169–193.

Ros, E. (2009). Nuts and novel biomarkers of cardiovascular disease. The American journal of clinical nutrition, 89(5), 1649S-1656S.

Rosales-Castro, M. and Reyes-Navarrete, G. M. (2006). Contenido polifenólico en corteza y hojas de nogal morado (*Carya illinoensis*) y su actividad antirradicales libres. IV Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica, México.

Royse, D.J. (2003). Cultivation of oyster mushroom. Pennsylvania University. College of Agricultural Sciences Agricultural Research and Cooperative Extension.

Rudawska, M. (2000). The role of mycorrhizae in the protecting forest trees from soil pathogens. Sylwan, 144: 27-39.

---

Ruiz de la Torre, J. (2006). Flora Mayor. Ministerio de Medio Ambiente. Madrid. 1758 pp.

Ruiz-Rodriguez, A., Soler-Rivas, C., Polonia, I., Wichers, H. J. (2010). Effect of olive mill waste (OMW) supplementation to Oyster mushrooms substrates on the cultivation parameters and fruiting bodies quality. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64(7), 638-645.

Ryvarden, L. (1991). Genera of polipores. Nomenclature and taxonomy. *Synopsis fungorum* 5: 1-353.

Sales-Campos, C., Medina, L., Teixeira, M., Nogueira, M.C. (2011), Physiochemical analysis and centesimal composition of *Pleurotus ostreatus* mushroom grown in residues from the Amazon. *Food Science and Technology (Campinas) Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 31(2).

Salmones, D., Gaitán-Hernández, R., Pérez, R., Guzmán, G. (1997). Estudios sobre el género *Pleurotus*. VIII. Interacción entre crecimiento micelial y productividad. *Revista Iberoamericana de Micología*, 14, 173-176.

Salmones, D., Mata, G., Waliszewski, K. N. (2005). Comparative culturing of *Pleurotus* spp. on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. *Bioresource technology*, 96(5): 537-544.

Sánchez, A., Esqueda, M., Gaitán-Hernández, R., Córdova, A., Coronado, M. L. (2008). Uso potencial del rastrojo de tomate como sustrato para el cultivo de *Pleurotus* spp. *Revista mexicana de micología*, 28(SPE.), 17-24.

Sánchez, C. (2012). Setas. Guías de Campo de Aragón. Prames. Zaragoza.

Sarrionandia, E. (2006). Estudio de las micocenosis de macromicetos de los encinares del País Vasco. Tesis Doctoral. Universidad del País. Vasco. 325 p.

Shah, Z. A., Ashraf, M., Ishtiaq, C. M. (2004). Comparative study on cultivation and yield performance of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on different substrates (wheat straw, leaves, saw dust). *Pakistan Journal of Nutrition*, 3(3): 158-160.

Shahzadi, T., Anwar, Z., Iqbal, Z., Anjum, A., Aqil, T., Bakhtawar, Afzal, A., Kamran, M., Mehmood, S., Irshad, M. (2014) Induced Production of Exoglucanase, and  $\beta$ -Glucosidase from Fungal Co-Culture of *T. viride* and *G. lucidum*. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 5: 426-433.

- 
- Shi M1, Zhang Z, Yang Y. (2013). Antioxidant and immunoregulatory activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharide (GLP). *Carbohydr Polym.* 95(1):200-206.
- Shiao, M. (2003). Natural products of the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*: Occurrence, biological activities, and pharmacological functions. *The Chemical Record*, 3: 172–180.
- Sierra, E., López, E., Pérez, S. (2007). Agroclimatología del Pecán (*Carya illinoensis*) en la Argentina. En: R.S. Lavado y E.A. Frusso. Producción de Pecán en Argentina. Capítulo IV.
- Sinclair, W. A., Lyon, H. H. (2006). Diseases of trees and shrubs, 2nd edn Richard Shattock Pub. Cornell University Press. 1000 pp.
- Singh, H. (2006). Biorremediation: Fungal remediation. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken.
- Singh, S., Harsh, N.S.K., Gupta, P.K. (2014). A novel method of economical cultivation of medicinally important mushroom, *Ganoderma lucidum*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Reserch* 5(5): 2033-2037.
- Singleton, V.L; Rossi J.A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16 (3): 144-158.
- Smith, S.E., Read, D. J. (2008). Mycorrhizal symbiosis, 3<sup>a</sup> Edic. Academic Press. Elsevier.
- Stafne, E. T., Rohla, Ch. T., Carroll, B. L. (2009). Pecan shell mulch impact on ‘Loring’ peach tree establishment and first harvest. *HortTechnology* 19(4): 775-780.
- Stamets, P. (2000). Growing gourmet and medicinal mushrooms (Vol. 3). Berkeley: Ten Speed Press.
- Tellería, M.T. (1980). Contribución al estudio de los Aphylophorales españoles. *Biblioteca Mycologica* n° 74. Editorial. J. Cramer. Vaduz.
- Teviotdale, B. L., Michailides, T. J., Pscheidt, J. W. (2002). Compendium of nut crop diseases in temperate zones. American Phytopathological Society.
- Toole, E. R. (1959). Canker rots in southern hardwoods. USDA Forest Service, Forest Pest Leaf. 33.

---

Toole, E. R. (1965). Pecan (*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch). In silvics of forest trees of the United States. p. 121-123. H. A. Fowells, comp. U.S. Department of Agriculture, Agriculture Handbook 271. Washington, DC.

Trappe, J. M., Jumpponen, A. M., Cázares E. (1996). NATS truffle and truffle-like fungi. 5. *Tuber lyonii* (= *T. texense*), with a key to the spiny-spored *Tuber* species groups. Mycotaxon 60:365–372.

Varnero, M. T., Quiroz, M. S., Álvarez, C. H. (2010). Utilización de residuos forestales lignocelulósicos para producción del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*). Información tecnológica, 21(2): 13-20.

Veena, S. S., Pandey, M. (2011). Paddy Straw as a Substrate for the Cultivation of Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.) P. Karst. In India. International Journal of Medicinal Mushrooms 13(4): 397-400.

Vidal, J.M., Pérez de Gregorio, M.A., Ginés, C., J. Puigvert, Carbó, J., Torrent, A. (1995). Bolets de les comarques gironines. Caixa de Girona.

Vieira, F. R., Nogueira de Andrade, M. C. and Teixeira de Almeida Minihoni, M. (2013). Growth of *Pleurotus ostreatus* in culture media based on formulated straw or grass. African Journal of Agricultural, Vol. 8(20): 2345-2352.

Villanueva, Cañedo, L. (2000). Hernando de Soto. Diputación Provincial de Badajoz. 350 pp.

Villarreal-Lozoya, J. E., Lombardini, L., Cisneros-Zevallos, L. (2007). Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars. Food Chemistry, 102(4), 1241-1249.

Wakeling, L. T., Mason, R. L., D'Arcy, B. R., Caffin, N. A. (2001). Composition of pecan cultivars Wichita and Western Schley [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koh] grown in Australia. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(3): 1277-1281.

Wang, D., Sakoda, A., Suzuki, M. (2001). Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. Bioresource Technology, 78(3), 293-300.

Wang, Y. & Hall, R. (2004). Edible ectomycorrhizal mushrooms: challenges and achievements. Canadian Journal of Botany, 82: 1063-1073.

---

Wang, Y. L. Qiu. (2006). Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16: 299–363.

Westcott, C. 1960. Plant disease handbook. 2d ed. Van Nostrand, Princeton, NJ. 825 p.

Whittaker, R. H. (1969). New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. *Science*, 163: 150-194.

Whittaker, R. H. (1975). *Communities and Ecosystems*. Macmillan Pub. Inc.

Wood, B. W., Payne, J. A. (1993). Pecan-an emerging crop. *WANATCA Yearbook*, 17, 14-19.

Xu, J., W. Liu, W.B. Yao, X.B. Pang, D.K. Yin, X.D. Gao (2009). Carboxymethylation of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* enhances its antioxidant activities in vitro. *Carbohydrate Polymers*, 78 (2): 227–234

Yang, F. Ch., Hsieh, Ch., Chen, H. M. (2003). Use of stillage grain from a rice-spirit distillery in the solid state fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry* 39: 21-26.

Yateem, A., M.T. Balba, and N. Al-Awadhi (1998) White rot fungi and their role in remediating oil-contaminated soil. *Environ. Int.* 24: 181–187

Yildiz, S., Yildiz, U. C., Gezer, E. D., Temiz, A. (2002). Some lignocellulosic wastes used as raw material in cultivation of the *Pleurotus ostreatus* culture mushroom. *Process Biochemistry* 38: 301-306.

Zhang, Y., Geng, W., Shen, Y., Wang, Y., Dai, Y. C. (2014). Edible Mushroom Cultivation for Food Security and Rural Development in China: Bio-Innovation, Technological Dissemination and Marketing. *Sustainability*, 6(5): 2961-2973.

Zheng, L., Jia, D., Fei, X., Luo, X., Yang, Z. (2009). An assessment of the genetic diversity within *Ganoderma* strains with AFLP and ITS PCR-RFLP. *Microbiological Research* 164(3): 312-21.

Zhou LW, Cao Y, Wu SH, Vlasák J, Li DW, Li MJ, Dai YC.(2015). Global diversity of the *Ganoderma lucidum* complex (*Ganodermataceae*, *Polyporales*) inferred

---

from morphology and multilocus phylogeny. *Phytochemistry* 114: Special Issue: Ganoderma Phytochemistry: 7-15.

---

## ANEXO I: GLOSARIO

- Alperujo: (“pulpa” de alperujo): residuo pulverulento del agotamiento del alperujo de aceituna tras la segunda extracción con disolventes (Giménez y cols., 2008).
- Nutracéutico: el término “nutracéutico” fue inventado por Stephen de Felice, en 1979. Se define como un alimento o parte de los alimentos, que proporciona beneficios medicinales o de salud, incluyendo la prevención y tratamiento de enfermedades (Lakhanpal y Rana, 2005).
- Orujillo: es un subproducto de la producción de aceite de orujo formado por los desechos de la parte sólida de la aceituna, en el proceso de fabricación del aceite de oliva.
- Ruezno: Cubierta externa a la cáscara leñosa, de consistencia blanda y color verde a pardo oscuro. también llamado técnicamente pericarpio, que en el caso del pecán está formada de 4 valvas.
- Sarmientos de vid: es el vástago o rama de la cepa de vid, de donde brotan las hojas, los zarcillos y los racimos (Real Academia Española, 2014).