



**Universidad Nacional de La Plata**

Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales

**HONGOS COMESTIBLES SILVESTRES EN PATAGONIA,  
ARGENTINA: IDENTIFICACIÓN MOLECULAR, EVALUACIÓN Y  
SELECCIÓN DE MÉTODOS DE PRESERVACIÓN POSTCOSECHA**

Tesis Doctoral

**Lic. Gabriela Celeste González**

**Directoras:**

Dra. Carolina Barroetaveña

Dra. Maria Belén Pildain

**Profesor asesor:**

Dr. Mario Carlos Nazareno Saparrat

**Lugar de trabajo:** Área de Fitopatología y Microbiología Aplicada, Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico (CIEFAP), Esquel, Chubut

## Contenido

Agradecimientos .....	5
RESUMEN .....	7
ABSTRACT .....	10
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	13
El bosque Andino Patagónico .....	13
Los hongos como objeto de estudio .....	15
Diversidad de especies de HSC en Patagonia Argentina.....	17
Métodos de conservación post-cosecha .....	20
OBJETIVO GENERAL.....	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
ORGANIZACIÓN DE LA TESIS .....	23
CAPÍTULO 1: ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y MORFOLÓGICO DEL GÉNERO <i>FISTULINA</i> .....	24
Resumen del capítulo.....	25
Introducción.....	25
Objetivos .....	27
Materiales y métodos .....	28
Aislamientos fúngicos .....	28
Estudios morfológicos .....	34
Extracción de ADN.....	34
Condiciones de PCR.....	34
Análisis filogenéticos.....	35
Resultados.....	36
Filogenia molecular .....	36
Taxonomía.....	41
Clave para especies del género <i>Fistulina</i> .....	48
Discusión .....	51
Notas sobre las especies de <i>Fistulina</i> en la Patagonia.....	53
Conclusiones .....	55
CAPÍTULO 2: ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y MORFOLÓGICO DEL GÉNERO <i>RAMARIA</i> .....	57
Resumen del capítulo.....	58
Introducción.....	58
Objetivos .....	62
Materiales y métodos .....	63
Especímenes estudiados .....	63
Estudios morfológicos.....	65

Extracción de ADN, condiciones de PCR y secuenciación .....	68
Análisis filogenéticos.....	74
Resultados.....	75
Filogenia molecular .....	75
Taxonomía.....	79
Discusión .....	93
Conclusiones .....	98
<b>CAPÍTULO 3: IMPACTO DE MÉTODOS DE SECADO SOBRE EL CONTENIDO FENÓLICO TOTAL Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE <i>FISTULINA ANTARCTICA</i> Y <i>RAMARIA PATAGONICA</i> .....</b>	<b>100</b>
Resumen del capítulo.....	101
Introducción.....	102
Objetivos .....	107
Materiales y Métodos .....	107
Recolección y procesamiento de muestras .....	107
Contenido de humedad .....	108
Proceso de deshidratado .....	108
Preparación de extractos de compuestos bioactivos .....	111
Contenido total de fenoles (TPC) .....	111
Evaluación de la actividad antioxidante.....	111
Análisis estadístico .....	113
Material de transferencia .....	113
Resultados.....	114
Contenidos de humedad y comportamiento durante el deshidratado.....	114
Efecto sobre el Contenido Total de Fenoles .....	116
Actividad antioxidante .....	117
Material de transferencia .....	122
Discusión .....	123
Conclusiones .....	127
<b>CAPÍTULO 4: EFECTO DE LA FERMENTACIÓN ÁCIDO LÁCTICA DE DOS HONGOS SILVESTRES COMESTIBLES DE LA PATAGONIA ARGENTINA .....</b>	<b>130</b>
<b>CAPÍTULO 4. Efecto de la fermentación ácido láctica de dos hongos silvestres comestibles de la Patagonia Argentina.....</b>	<b>131</b>
Resumen del capítulo.....	131
Introducción.....	132
Objetivos .....	136
Materiales y métodos .....	136
Materias primas .....	136

Preparación de cultivos iniciadores .....	137
Preparación de los hongos fermentados .....	137
Recuento microbiano y determinación de pH .....	139
Cuantificación del contenido total de fenoles .....	143
Actividad antioxidante .....	144
Análisis estadístico .....	144
Aislamiento e investigación genotípica de BAL.....	145
Aislamiento e identificación genotípica de levaduras .....	146
Evaluación sensorial.....	146
Resultados.....	147
Recuento microbiano.....	149
Contenido total de fenoles y actividades antioxidantes.....	154
Aislamiento e identificación de especies de BAL.....	156
Aislamiento e identificación de especies de levaduras.....	158
Análisis sensorial.....	163
Discusión .....	165
Conclusiones .....	168
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS GENERALES.....	170
BIBLIOGRAFÍA GENERAL.....	172
PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESO REALIZADAS EN EL MARCO DE ESTA TESIS .....	189

## Agradecimientos

Esta tesis es producto del trabajo conjunto de muchas personas. Agradezco a mis directoras, Carolina y Belén, por su apoyo y confianza y el aporte constante a mi formación.

A mi profesor asesor, Mario Saparrat por su acompañamiento académico a la distancia.

A los doctores Mario Rajchenberg y Maximiliano Rugolo por su valioso acompañamiento en mi formación profesional.

Al CIEFAP, por ser la institución que me brindó el espacio y las herramientas para llevar a cabo cada etapa de este proyecto.

A mis compañerxs todxs del área de Fitopatología y Microbiología Aplicada por el aguante y la ayuda incondicional.

A mis amigas de la oficina, que han formado parte de cada día con la mejor o la peor de las ondas.

A mis amigxs de la facu que se convirtieron en compañerxs de trabajo, Brenda y Mariano.

A mis amigxs de afuera.

A mi familia por el afecto constante.

A Alma, por ser la motivación de cada día.

A todxs ustedes, muchas gracias!



**HONGOS COMESTIBLES SILVESTRES EN PATAGONIA,  
ARGENTINA: IDENTIFICACIÓN MOLECULAR, EVALUACIÓN Y  
SELECCIÓN DE MÉTODOS DE PRESERVACIÓN POSTCOSECHA**

## RESUMEN

Los bosques de Nothofagaceae de la región Andino Patagónica hospedan abundantes especies de hongos, muchas de ellas con potencial valor alimenticio, medicinal y tecnológico comprobado. El aprovechamiento sostenible de los hongos comestibles silvestres es una actividad prometedora y que brinda identidad a la región, sin embargo su consumo por partes de las comunidades locales se restringe a unas pocas especies. Dentro de las más utilizadas se encuentran *Fistulina antarctica* Speg. (lengua de vaca), *Ramaria patagonica* (Speg.) Corner (changle) y varias dentro del género *Cyttaria*. Además, estas han sido incorporadas a los platos ofrecidos por chefs regionales debido a que son sumamente interesantes desde sus cualidades sensoriales (colores, texturas, aromas). Estas novedosas especies, han sido recientemente incorporadas al Código Alimentario Argentino (CAA) y si bien registran usos tradicionales de larga data, su estudio en el ámbito científico es incipiente. La presente tesis aborda aspectos aún no explorados en los géneros *Ramaria*, *Fistulina* y *Cyttaria*, con el objetivo de aportar información necesaria para su correcta determinación y propiedades asociadas, y para su conservación y manejo sostenible; asimismo, se investigaron opciones de procesamiento post-cosecha, contemplando sus propiedades, seguridad alimentaria y ventanas de comercialización. Un objetivo inicial, dada su comestibilidad, fué precisar las relaciones filogenéticas infragenéricas y la clasificación taxonómica de *Ramaria* y *Fistulina*. Se realizaron muestreos dentro de cuatro Parques Nacionales patagónicos donde se recolectaron ejemplares de ambos taxones, tratando de cubrir el amplio espectro de variación morfológica detectado durante 3 años consecutivos. El género *Fistulina* comprende hongos especializados en la degradación de la madera, que se desarrollan tanto en árboles en pie como en tocones. En la región de la Patagonia, se han identificado dos especies claramente diferenciables por el color de sus basidiomas: *F. antarctica*, de tonalidad roja, y *F. endoxantha*, de color amarillo. Mediante estudios macro y microscópicos, respaldados por análisis moleculares, se describió una tercera especie, *F. pumiliae*. Esta última se caracteriza por la tonalidad ocrácea de sus basidiomas y su exclusiva relación con un hospedante específico (*Nothogagus pumilio*). El género *Ramaria* exhibe una gran diversidad y una extensa distribución global, con más de 230 especies descritas. En la región Patagónica se han reportado hasta el

momento 18 especies usando morfo-anatomía, aunque su diversidad y relaciones filogenéticas permanecían en gran medida desconocidas. Mediante la combinación de análisis morfológicos y el empleo de herramientas moleculares, se confirmó la presencia de seis especies de *Ramaria* en las áreas estudiadas. Entre estas se incluyen las especies endémicas *R. patagonica* y *R. inedulis*, así como *R. botritis*. Además, se ha registrado por primera vez en Argentina la presencia de *R. paraconcolor*. Asimismo, se describieron dos nuevas especies para la ciencia, *R. flavinedulis* y *R. dentrophora*. Este estudio amplía el conocimiento sobre la diversidad de *Ramaria* en la región y contribuye al entendimiento de su ecología y evolución a nivel global.

Otro aporte fue el estudio de métodos que permitan extender el tiempo de vida útil de los hongos durante el periodo postcosecha. Debido a su alta actividad acuosa y rápida tasa respiratoria, los hongos son conocidos por ser alimentos altamente perecederos. Sumado a esto, los hongos silvestres en Patagonia experimentan un período de fructificación restringido a los meses de abril-mayo u octubre-noviembre dependiendo de las especies y de condiciones meteorológicas de cada temporada. Esta limitación temporal impide su disponibilidad durante otros momentos del año por lo cual el desarrollo de protocolos adecuados para su conservación postcosecha resulta indispensable. En este aspecto métodos simples y de fácil aplicación como el congelado y el secado constituyen los más ampliamente utilizados, por lo que se evaluó el impacto del secado a diferentes temperaturas, el liofilizado y el congelado en la composición de fenoles totales y capacidad antioxidante de *F. antarctica* y *R. patagonica*. Los resultados mostraron que el contenido de fenoles totales fue significativamente mayor para las fructificaciones frescas congeladas y secadas a 60 °C en *R. patagonica*. Además, la congelación fresca, la liofilización y los métodos de 60 °C mostraron la mayor inhibición de los radicales libres. En todos los casos la bioactividad fue significativamente mayor en *R. patagonica*. Estos resultados se tradujeron en materiales de transferencia tecnológica como protocolos de tratamiento postcosecha para ser empleados a escala familiar con bajo requerimiento tecnológico.

Otro de los aspectos abordados en la presente tesis fue la implementación del proceso de fermentación láctica como método de preservación de hongos comestibles, que se basa en la acción de las bacterias del ácido láctico (BAL), que convierten los azúcares en ácido láctico. El ácido láctico reduce el pH de los alimentos, haciéndolos inhóspitos para los microorganismos patógenos. Además, numerosos estudios mencionan que la

fermentación láctica de hongos comestibles puede mejorar las propiedades nutricionales y funcionales de los hongos. Para ello, se sometieron a fermentación láctica fructificaciones de dos especies ampliamente distribuidas y de abundante fructificación, *Fistulina antarctica* y *Cyttaria hariotii*, utilizando 3 cepas de BAL como cultivos iniciadores. Se determinó la evolución del pH, calidad microbiana y actividad antioxidante de hongos frescos, blanqueados y fermentados, durante las etapas de fermentación y almacenamiento refrigerado. Asimismo, se realizó una prueba de aceptabilidad de las características sensoriales de los hongos. Más allá de su naturaleza exploratoria, los resultados de esta investigación sugieren que la fermentación láctica constituye un método de preservación post-cosecha útil que mantiene o mejora los atributos de las fructificaciones y es de fácil aplicación. Además, la presencia de BAL viables en los alimentos fermentados podría mejorar las propiedades promotoras de la salud del producto final. Estos hallazgos podrían ser aplicables en la puesta en valor de otras especies de HSC de interés gastronómico, fortaleciendo el uso sostenible de los hongos silvestres como recurso para la soberanía alimentaria y para el desarrollo local.

**Palabras clave:** bioactividad, conservación, especies endémicas, filogenia, Funga patagónica, morfología, Nothofagaceae, recursos forestales no madereros, taxonomía.

## ABSTRACT

The Nothofagaceae forests of the Andean-Patagonian region host abundant fungal species, many with proven potential for food, medicinal, and technological purposes. The sustainable utilization of wild edible fungi is a promising activity that adds identity to the region; however, the consumption by local communities is restricted to a few species. Among the most commonly used are *Fistulina antarctica* Speg. (beefsteak fungus), *Ramaria patagonica* (Speg.) Corner (coral fungus), and various species within the *Cyttaria* genus. Additionally, regional chefs have incorporated these species into dishes due to their captivating sensory qualities (colors, textures, aromas). These novel species, along with many others, have recently been included in the Argentine Food Code (CAA), and although they have longstanding traditional uses, their scientific study is still in its early stages.

This thesis addresses aspects not yet explored in the genera *Ramaria*, *Fistulina* and *Cyttaria*, with the aim of providing valuable necessary information for their correct determination and associated properties, and for their conservation and sustainable management; Likewise, post-harvest processing options were investigated, considering their properties, food safety and marketing windows. An initial objective, given their edibility, was to precisely classify *Fistulina* and *Ramaria* genera taxonomically. Sampling was carried out within four Patagonian National Parks where specimens of both taxa were collected, covering all the morphological variability detected during three consecutive years. The genus *Fistulina* comprises specialized wood-rotter species, developing on both standing trees and stumps. Two distinguishable species have been described for Patagonia, *F. antarctica* with a red hue, and *F. endoxantha* with yellow basidioma. Through macro and microscopic studies, supported by molecular analyses, a third species, *F. pumiliae*, was described. This species is characterized by the ochre tone of its basidiomes and its specific and exclusive association with *N. pumilio*.

The *Ramaria* genus exhibits great diversity and a wide global distribution, with over 230 described species. In the Patagonian region, 18 species have been recorded so far (using only morpho-anatomy), but until recently, their diversity and phylogenetic relationships were largely unknown. By combining morphological analyses and molecular tools the presence of six *Ramaria* species in the studied areas was confirmed. These include endemic species like *R. patagonica* and *R. inedulis*, as well as *R. botritis*.

Additionally, the presence of *R. paraconcolor* was recorded for the first time in Argentina, and two new species, *R. flavinedulis* and *R. dentrophora*, were described. This study expands knowledge of *Ramaria* diversity in the region and contributes to understanding their ecology and evolution.

Another challenge was studying methods to extend fungi's shelf life during the post-harvest period. Due to their high water activity and rapid respiratory rate, fungi are known to be highly perishable foods. In addition, wild fungi in Patagonia have a limited fruiting period, typically restricted to the months of April-May depending on seasonal weather conditions. This temporal limitation hinders their availability during the rest of the year, becoming essential to the development of appropriate post-harvest conservation protocols. In this regard, simple and easily applicable methods such as freezing and drying are the most widely used in the region. The impact of drying at different temperatures, freeze-drying, and freezing on the total phenolic content and antioxidant capacity of *F. antarctica* and *R. patagonica* was evaluated. The results showed that the total phenolic content was significantly higher for fresh frozen and dried fructifications at 60 °C in *R. patagonica*. Additionally, fresh freezing, lyophilization, and 60 °C methods showed the highest inhibition of free radicals. In all cases, bioactivity was significantly higher in *R. patagonica*. These results allowed the development of post-harvest treatment protocols/recommendations for family-scale use with low technological requirements.

Another aspect addressed in this thesis was the implementation of the lactic acid fermentation process as a method of preserving edible fungi, based on the action of lactic acid bacteria that convert sugars into lactic acid. Lactic acid reduces the pH of foods, making them inhospitable for pathogenic microorganisms. Moreover, numerous studies mention that lactic acid fermentation of edible fungi can improve their nutritional and functional properties. To accomplish this task, fructifications of *Fistulina antarctica* and *Cyttaria hariatii*, widely distributed and abundant species, were subjected to lactic acid fermentation using three lactic acid bacteria strains as starter cultures. The evolution of pH, microbial quality, and antioxidant activity of fresh, blanched, and fermented fungi during fermentation and refrigerated storage stages was determined. Additionally, a sensory acceptability test for these products was conducted. Despite its exploratory nature, the results of this research suggest that lactic acid fermentation is an interesting post-harvest preservation method that maintains or enhances the attributes of fructifications and is easily applicable. Furthermore, the presence of viable

lactic acid bacteria in fermented foods could improve the health-promoting properties of the final product. These findings could be applicable in the valorization of other edible fungal species with gastronomic interest, strengthening the sustainable use of wild mushrooms as a resource for food sovereignty and local development.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

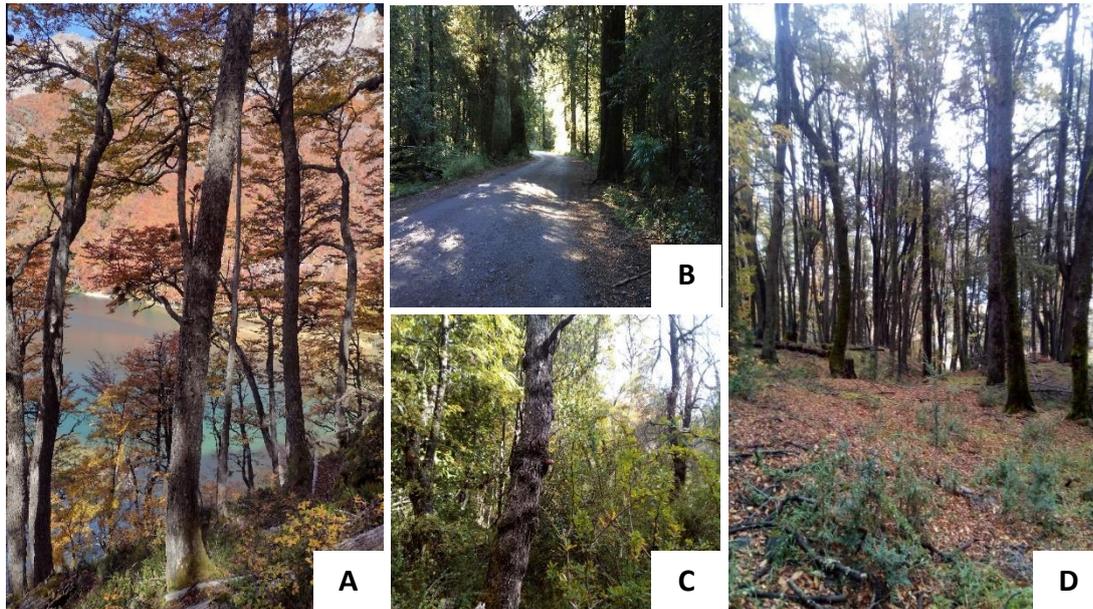
### El bosque Andino Patagónico

La familia Nothofagaceae es una de las más interesante dentro del orden Fagales debido a su distribución austral de especies vivas y extensos restos fósiles (Hill 2001; Torres *et al.* 2009; Vento y Agraín 2018). Desde 1991, la evidencia acumulada respalda el reconocimiento de cuatro géneros dentro de Nothofagaceae: *Lophozonia*, *Fuscospora*, *Brassospora* y *Nothofagus* (Hill y Read 1991; Manos 1997; Setoguchi *et al.* 1997; Heenan y Smitsen 2013); con una distribución gondwanica, las especies ocurren en Sudamérica, Australia, Nueva Zelanda, Nueva Guinea y Nueva Caledonia. La región Andino-Patagónica, a lo largo de la porción más austral de la cordillera de los Andes en América del Sur, sustenta bosques dominados por especies de Nothofagaceae Kuprian (Cabrera 1976), distribuidas entre los 30 y 56 grados de latitud sur a ambos lados de la cordillera de los Andes. La región comprende 11 especies de Nothofagaceae de tres géneros: *Nothofagus*, *Lophozonia* y *Fuscospora*, formando

extensos bosques monoespecíficos y mixtos (Dimitri y Orfila 1985; Donoso Zegers 2006; Heenan y Smissen 2013). En Argentina las especies presentes son: *Nothofagus pumilio*, *N. antarctica*, *N. dombeyi*, *N. betuloides*, *Lophozonia obliqua* y *L. alpina* (Fig.1). *Nothofagus pumilio* (Poepp. & Endl.) Krasser se distribuye desde los 35 hasta los 56 grados de latitud sur a ambos lados de los Andes, ocupando el límite superior del bosque de montaña. *Nothofagus antarctica* (G. Forst.) Oerst. comparte la distribución de *N. pumilio*, pero debido a su resistencia a la sequía, está presente principalmente en la zona ecotonal entre el bosque y la estepa. *Lophozonia obliqua* (Mirb.) Heenan & Smissen y *L. alpina* (Poepp. & Endl.) Heenan & Smissen tienen distribuciones más restringidas, creciendo desde los 30 hasta los 41 grados de latitud sur y desde los 35 hasta los 40.5 grados de latitud sur, respectivamente, tanto en Chile como en Argentina. *Nothofagus dombeyi* (Mirb.) Oerst., de hoja perenne, crece desde los 30 hasta los 47 grados de latitud sur en Argentina y Chile, constituyendo el principal tipo de bosque en áreas con alta humedad, cerca de lagos y márgenes de ríos, tanto en formaciones puras como asociado con todas las demás especies de Nothofagaceae excepto *N. betuloides* (Mirb.) Oerst.; esta última se distribuye desde los 40 hasta los 56 grados de latitud sur (Dimitri y Orfila 1985; Donoso Zegers 2006). Chile tiene otras cinco especies restringidas al lado oeste de los Andes: *Fuscospora alessandri* (Espinosa) Heenan & Smissen, *L. glauca* (Phil.) Heenan & Smissen, *L. macrocarpa* (A. DC.) Heenan & Smissen y el híbrido *L. x leonii* Espinosa, todas con distribuciones muy acotadas (desde los 35 hasta los 36.5 grados de latitud sur), y *N. nitida* (Phil.) Krasser.

La diversidad de estos bosques ofrece ambientes y nichos ecológicos propicios para el desarrollo de un elevado número de especies de hongos, muchas de ellas con

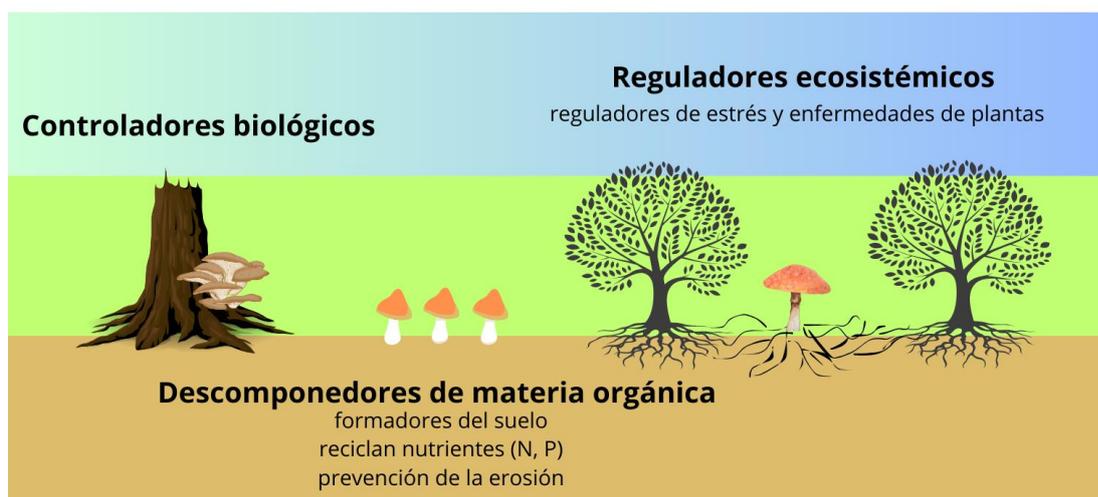
interesantes características debido a sus propiedades organolépticas y su valor nutricional (Toledo *et al.* 2016; Rugolo *et al.* 2022).



**Fig. 1-** Bosques Andinos Patagónicos dominados por: (A) *Nothofagus pumilio*; (B) *N. dombeyi*; (C) *N. antarctica* y (D) *Lophozonia alpina* y *L. obliqua*.

#### Los hongos como objeto de estudio

La diversificación en los usos de los bosques en cuanto a variedad y calidad de productos que ofrecen, sumado al rol de los mismos como proveedores de bienes y servicios ambientales, incluyendo la regulación hídrica, la diversidad biológica y la belleza paisajística, plantean un escenario único para la discusión sobre el uso sustentable de estos recursos (Mónaco *et al.* 2020). Los hongos son un componente estructural y funcional importante en los ecosistemas naturales (Fig. 2). Muchos de ellos son responsables del ciclo de nutrientes al degradar polímeros muy complejos como la lignina y la celulosa e incluso son capaces de degradar plásticos o descontaminar aguas residuales. También son grandes aliados de las plantas con las cuales se asocian de forma simbiótica, dando lugar a las micorrizas, desempeñando un papel fundamental en el equilibrio y la sanidad de los bosques (Pérez Moreno *et al.* 2020). Otro grupo importante lo constituyen los hongos patógenos forestales capaces de atacar árboles en pie (Rajchenberg 2006) y responsables de la pérdida de grandes volúmenes maderables.



**Fig. 2** - Los hongos en los ecosistemas (Modificado de Cajsa Lithell).

A lo largo de la historia de la humanidad los hongos han formado parte de muchas civilizaciones y han sido utilizados como alimento, medicina y como elementos sagrados. La evidencia más antigua del consumo de hongos por parte de humanos se remonta a la Edad de Piedra; sin embargo, los hongos generan sentimientos contrastantes en las personas. Estos sentimientos positivos (micofilia) o negativos (micofobia) forman parte de la cultura de un grupo social determinado. Argentina es en general un país micofóbico ya que el consumo de hongos comestibles *per capita* es de 100/g/persona/año, 40 veces menor que en Europa (Albertó *et al.* 2010; Barroetaveña & Pildain 2022). Pese a esto, existe actualmente una tendencia de consumo creciente, asociada a una mayor conciencia sobre una dieta saludable, mayor acceso a la información sobre los beneficios que brindan los hongos y mayor oferta (Postemsky *et al.* 2022).

Los hongos comestibles son alimentos con un equilibrado balance de carbohidratos, proteínas, grasas y fibra, así como también vitaminas y minerales. Entre los hongos comestibles y medicinales, algunas especies se recolectan directamente en la naturaleza (silvestres), mientras que otras se pueden cultivar en troncos naturales o sintéticos (cultivados). Los hongos comestibles con mayor presencia en el mercado proceden del cultivo en sustratos artificiales, constituyendo un aporte relevante a la economía circular, dado que los mismos se formulan en base a productos secundarios o residuos lignocelulósicos de diversas industrias. Los hongos silvestres comestibles (HSC) por su parte constituyen un Producto Forestal No Maderero (PFNM), valorados por sus cualidades en la alimentación y la salud, representando además una fuente de ingresos de familias rurales en todo el mundo (Boa 2005).

## Diversidad de especies de HSC en Patagonia Argentina

América del Sur posee una gran diversidad de HSC, pero los registros antiguos de consumo tradicional son escasos y su potencial hoy en día continúa siendo desconocido para la mayor parte de la población argentina. Una posible explicación de esta pérdida de conocimientos tradicionales es la aniquilación de las comunidades nativas sudamericanas por parte de los conquistadores españoles y portugueses (Pérez Moreno *et al.* 2020). Barroetaveña & Pildain (2022) atribuyen esta situación a una serie de procesos históricos convergentes, destacando que uno de los factores más significativos fue la llegada de inmigrantes a un continente con especies de hongos desconocidas, donde las alternativas alimenticias se focalizaron en la cría de ganado. Además, señalan que el proceso de migración desde áreas rurales a centros urbanos ha contribuido al contacto limitado con el entorno silvestre y sus recursos. Sumado a esto, las poblaciones originarias, como resultado de la colonización, se vieron obligadas a migrar mayormente hacia tierras más pobres, en áreas más secas con menor disponibilidad de hongos silvestres, o a nutrir las periferias de centros urbanos, contribuyendo todo ello a la pérdida de sus prácticas y saberes ancestrales.

La región Andino-patagónica de Argentina posee una gran riqueza en hongos silvestres de enorme interés científico y cultural, con usos potenciales vinculados al desarrollo local. Muchos de ellos son endémicos y más de 30 especies son comestibles (Barroetaveña & Toledo 2020; Barroetaveña & Pildain 2022). En el año 2023, 21 especies han sido incorporadas al Código Alimentario Argentino (CAA), lo que permite su ingesta y también su procesamiento como subproductos (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca y Secretaría de Calidad en Salud, Resolución Conjunta 3/2023). Sin embargo, tradicionalmente la cosecha y el consumo de especies nativas ha sido en gran medida limitado a *Morchella* spp. y en menor proporción a *Cyttaria darwinii* Berk., *C. hariatii* E. Fisch. y *Grifola gargal* Singer (Deschamps 2002; Boa 2005; Albertó *et al.* 2010; Molaes *et al.* 2019). Otra especie muy consumida y comercializada en la región es *Suillus luteus* (L.) Roussel, asociada a plantaciones de coníferas exóticas (Barroetaveña 2006; Molaes *et al.* 2019). Estudios que abordan el uso tradicional de los HSC como recurso alimentario por parte de las comunidades locales también incluyeron a *Fistulina antarctica* Speg., *Ramaria patagonica* (Speg.) Corner, *Agaricus campestris* L., *Calvatia* spp. *Coprinus comatus* (O.F. Müll.) Pers. y otras especies de *Cyttaria* (Molaes *et al.* 2019). *Grifola sordulenta* (Mont.) Singer, *Fistulina endoxantha* Speg., *Aleuria aurantia* (Pers.) Fuckel, *Cortinarius xiphidipus* M.M. Moser y E. Horak,

*Cortinarius magellanicus* complex y *Lepista fibrosissima* Singer han sido también reportadas como comestibles (Toledo 2016; Toledo *et al.* 2016a; Barroetaveña & Toledo 2020) (Fig. 3).



**Fig. 3-** Especies silvestres comestibles más destacadas de la Patagonia Argentina. A: *Aleurodiscus vitellinus*; B: *Fistulina antarctica*; C: *Fistulina endoxantha*; D: *Morchella* sp.; E: *Cortinarius magellanicus*; F: *Grifola sordulenta*; G: *Cyttaria hariatii*; H: *Pleurotus ostreatus*; I: *Ramaria patagonica*; J: *Hydropus duseni*; K: *Coprinus comatus*.

La determinación previa al consumo de estas especies se realiza sólo considerando las características morfológicas requeridas por las claves dicotómicas. Sin embargo, muchas veces la variabilidad morfo-anatómica que presentan algunas especies entre sus ejemplares puede deberse a la presencia de nuevos taxones en diferentes regiones. En este sentido, detectar y caracterizar la base genética de estas diferencias fenotípicas constituye un aporte importante para el correcto análisis de comestibilidad y propiedades de las especies. La generación de estos datos resulta fundamental para entender la diversidad y la ecología de estas especies (Bhunjun *et al.* 2021). Los estudios moleculares utilizan técnicas como la secuenciación de ADN, que facilita la determinación precisa de taxones y la resolución de sus relaciones filogenéticas. Esta herramienta es ampliamente utilizada para resolver preguntas taxonómicas y evolutivas. Por ejemplo, los análisis de secuencias de los genes ribosomales ITS (Internal Transcribed Spacer) han demostrado ser altamente efectivos en la diferenciación de especies de hongos que antes se consideraban como una sola especie (Schoch *et al.* 2012). Además, la investigación sobre la variabilidad intraespecífica tiene implicaciones prácticas. Ejemplo de esto es el sistema *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th. Fr. - *Pinus radiata* D. Don, donde se detectó que las

fructificaciones provenientes de Nueva Zelanda poseen características comestibles inferiores a las provenientes de Japón, disminuyendo su precio de mercado. Los estudios moleculares permitieron determinar las diferencias filogenéticas entre los aislamientos japoneses y neozelandeses de *R. roseolus* que explicaban las propiedades morfológicas y biológicas relacionadas con su valor gourmet (Visnovsky *et al.* 2010).

Por otro lado, inferir las relaciones filogenéticas es un aspecto importante dado que ayudan a reconstruir la historia de parentescos, identificar ancestros comunes y en este sentido a responder preguntas evolutivas. Desafortunadamente, los datos disponibles en la actualidad sobre diversidad genética de la Funga del bosque patagónico son escasos y muchas de las especies comprenden problemas taxonómicos sin resolver. En la mayoría de los casos las inferencias taxonómicas solo incluyen a las especies del hemisferio norte y esto dificulta su correcta identificación y llevan a un error sistemático y distribucional de los taxones (Oyarzún *et al.* 2021). Un ejemplo claro es el caso de *Ramaria flava* (Schaeff.) Quél., conocida como “changle”, descrita para Europa y registrada en los bosques patagónicos, y que constituye una de las especies más consumidas en época otoñal en la región. Muchos ejemplares con basidiomas amarillos coraloides son identificados como *R. flava*, sin embargo su presencia en los bosques andinos patagónicos está siendo cuestionada y solo un abordaje filogenético podrá dar respuestas a esta controversia.

En los últimos años diferentes investigaciones han revisado géneros con especies comestibles de Patagonia, incluyendo el análisis taxonómico comparativo y filogenético (Pildain *et al.* 2014, Salgado Salomón *et al.* 2018, Pildain *et al.* 2019, González *et al.* 2021, Pildain *et al.* 2021, Salgado Salomón *et al.* 2021, Rajchenberg *et al.* 2021, Rugolo *et al.* 2023). La mayoría de estos trabajos han resultado en la detección y descripción de nuevas especies para la ciencia. Este conocimiento nos permite asignar correctamente y de modo más preciso características nutricionales, funcionales y medicinales a cada especie, y distinguir eventualmente especies comestibles de otras tóxicas o indigestas, lo que resulta crucial para garantizar la seguridad alimentaria. Los estudios filogenéticos y bioquímicos combinados podrían identificar especies con mejores propiedades comestibles (como aporte proteico) o nutraceuticas (como capacidad antioxidante). Esto, a su vez, abriría nuevas oportunidades para el manejo micosilvicultural que favorezca la fructificación de determinadas especies, o el cultivo de especies seleccionadas hasta ahora de recolección silvestre.

## Métodos de conservación post-cosecha

Los hongos son alimentos perecederos y su vida útil es relativamente corta debido a que carecen de una capa de células que evite la pérdida de agua, tienen una frecuencia respiratoria elevada y contienen una cantidad importante de agua (Castellano-Reyes *et al.* 2021). La degradación de los hongos tiene lugar en el periodo postcosecha, manifestándose mediante pérdidas de humedad, decoloración, ablandamiento, así como la disminución de nutrientes y sabor. Los factores que inciden en este proceso de degradación pueden dividirse en internos, tales como la actividad de agua, la frecuencia respiratoria y la actividad microbiana; y externos, como la temperatura de almacenamiento, la humedad relativa y los daños mecánicos (Zhang *et al.* 2018) (Fig. 4). En consecuencia, los hongos sufren una rápida disminución de la calidad poco después de la cosecha por lo que las condiciones postcosecha así como los tratamientos culinarios afectan significativamente su calidad.



**Fig. 4** - Factores que afectan en la calidad en los hongos comestibles durante el periodo postcosecha. Modificado de Guo *et al.* 2023.

Sumado a esto, el consumo y comercio de los hongos silvestres comestibles en Patagonia están condicionados por una alta estacionalidad y disponibilidad fluctuante. Toledo *et al.* (2014) evaluaron las variables ambientales asociadas a la ecología de diversas especies silvestres comestibles, destacando que *Fistulina antarctica*, *Ramaria patagonica*, *Cortinarius magellanicus* y *Aleurodiscus vitellinus* presentaron los periodos de fructificación más prolongados, desde mediados de marzo hasta mediados de abril,

mientras que el resto de las especies presentaron ventanas más acotadas. Reportaron además que durante las tres temporadas analizadas, las especies más productivas en términos de peso fresco fueron *R. patagonica* y *F. antarctica* (Fig. 5).



**Fig. 5** - Basidiomas de las especies endémicas *F. antarctica* (A) y *R. patagonica* (B) fructificando en sus ambientes naturales.

Debido a todo lo antes expuesto, la posibilidad de preservar a corto plazo la cosecha de hongos silvestres, y aprovechar de manera eficiente su disponibilidad estacional almacenando los excedentes que no pueden consumirse o comercializarse en fresco, requieren de la aplicación de tratamientos eficientes de postcosecha. Los métodos de preservación postcosecha pueden dividirse en tres categorías principales: (1) térmicos, (2) físicos y (3) químicos (Fig. 6) Dentro del primer grupo encontramos el secado y la congelación, que son los métodos más eficientes y ampliamente utilizados. En la deshidratación la reducción del contenido de agua minimiza el deterioro al tiempo que preserva la textura y el sabor (Pei *et al.* 2014) mientras que la congelación presenta la ventaja de retener el valor nutricional así como las cualidades sensoriales como color, olor y sabor. Además, debido a que el agua se convierte en hielo, se reduce en gran medida la actividad de microbios y actividades enzimáticas (Yao *et al.* 2023). Los métodos físicos incluyen procesos de atmósfera modificada y radiaciones ionizantes. Mientras que los métodos químicos son aquellos en los que se incluyen lavados con sustancias antimicrobianas ( $H_2O_2$ , ácido cítrico o EDTA), revestimientos y ozono (Zhang *et al.* 2015).



**Fig. 6** - Clasificación de los métodos de preservación postcosecha más utilizados en hongos comestibles.

Existen otros métodos menos habituales pero que en los últimos años han tomado relevancia por ser eficaces, económicos y simples. Uno de ellos es la fermentación láctica. Se trata de un proceso de conservación de alimentos basado en la acción de las bacterias ácido lácticas (BAL), que convierten los azúcares en ácido láctico (Pescuma *et al.* 2008). El ácido láctico reduce el pH de los alimentos, haciéndolos inhóspitos para los microorganismos patógenos. Además, numerosos estudios mencionan que la fermentación láctica de hongos comestibles puede mejorar las propiedades nutricionales y funcionales de los hongos (Jabłońska-Ryś *et al.* 2016a; Jabłońska-Ryś *et al.* 2016b; Zheng *et al.* 2018; Perveen *et al.* 2023). Para los HCS de Patagonia se han testeado métodos de conservación simples, difundidos y con bajo requerimiento tecnológico como son el refrigerado, el escaldado y congelado y el deshidratado (Toledo *et al.* 2016; Barroetaveña *et al.* 2020). Actualmente existe un interés en realizar investigaciones que garanticen maximizar su vida útil y aprovechar su potencial productivo como alimentos identitarios de la región. Teniendo en cuenta todo lo planteado esta tesis presenta los siguientes objetivos generales y particulares.

## OBJETIVO GENERAL

- **Caracterizar genéticamente y evaluar métodos de preservación postcosecha de dos hongos comestibles silvestres endémicos de bosques de *Nothofagaceae* de la Patagonia, Argentina.**

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- **Dilucidar la posición taxonómica de las especies de los géneros *Fistulina* y *Ramaria* usando técnicas moleculares y análisis morfo anatómicos.**
- **Determinar los parámetros de secado óptimos de *F. antarctica* y *R. patagonica*.**
- **Evaluar y seleccionar métodos de preservación postcosecha de hongos comestibles silvestres identitarios de Patagonia, que maximicen la durabilidad y el mantenimiento de las características organolépticas y bioactivas, asegurando su inocuidad microbiológica.**

## ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

El trabajo realizado se detalla en cuatro capítulos:

Capítulo I. Análisis filogenético y morfológico del género *Fistulina*

Capítulo II. Análisis filogenético y morfológico del género *Ramaria*

Capítulo III. Impacto de métodos de secado sobre el contenido fenólico total y actividad antioxidante de *Fistulina antarctica* y *Ramaria patagonica*

Capítulo IV. Efecto de la fermentación ácido láctica de dos hongos silvestres comestibles de la Patagonia Argentina

CAPÍTULO 1: ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y MORFOLÓGICO DEL GÉNERO  
*FISTULINA*

## CAPÍTULO 1. Análisis filogenético y morfológico del género *Fistulina*.

### Resumen del capítulo

*Fistulina* Bull. es un género poroide de hongos degradadores de madera, que incluye especies anuales y comestibles. Actualmente se aceptan nueve especies en las regiones templadas de Europa, China, América y Australia. En la Patagonia, Argentina, *F. antarctica* y *F. endoxantha* crecen en madera viva y muerta, así como en tocones de árboles nativos de Nothofagaceae, y son reconocidos como hongos comestibles con uso ancestral por parte de los pueblos originarios Mapuche-Tehuelche. En este estudio, se presenta un detallado informe de *Fistulina* en la Patagonia (Argentina) basado en un análisis integrado de características filogenéticas, macro y micro morfológicas, y relaciones con el hospedante. Los genes espaciador interno transcrito (ITS) y la subunidad grande del ADN ribosomal nuclear (28S) también conocida como LSU-rDNA fueron analizados conjuntamente para identificar especímenes de Argentina y examinar sus relaciones filogenéticas con otras especies de *Fistulina*. Los análisis filogenéticos revelaron que las especies patagónicas forman un grupo fuertemente respaldado junto con especies del Hemisferio Sur. Dentro de este grupo, las colecciones patagónicas formaron tres linajes a nivel de especie: el linaje de *F. antarctica*; el linaje de *F. endoxantha* (en una posición basal del grupo del Hemisferio Sur) y un nuevo grupo filogenético caracterizado como una nueva especie *Fistulina pumiliae*, representada por colecciones patagónicas que crecen exclusivamente en *Nothofagus pumilio*. El nuevo taxón se distingue por basidiomas de color ocre a marrón y por esporas más grandes en comparación con las otras especies. Las tres especies patagónicas también presentan diferentes asociaciones con el hospedante, siendo *F. antarctica* la especie más polífaga. Además, se presenta una clave para las especies de *Fistulina* de los hemisferios norte y del sur.

Palabras clave: lengua de vaca, lengua de vaca amarilla, pudrición castaña. *Fistulina antarctica*, *Fistulina endoxantha*, Nothofagaceae

### Introducción

*Fistulina* Bull [especie tipo *F. hepatica* (Schaeff.) With.] es un género de hongos que crecen en la madera en descomposición y que incluye especies anuales, muchas de ellas comestibles, caracterizadas por basidiomas carnosos con himenio poroide compuesto por tubos libres. Presentan un sistema de hifas monomítico y basidiosporas

ovoides o elipsoidales (Withering 1792; Wright 1961; Rajchenberg 2006). Estudios moleculares demostraron que *Fistulina* formaba un linaje monofilético bien respaldado dentro de Schizophyllaceae (Agaricales, Basidiomycota) y se agrupaba con *Schizophyllum* Fr. (Bodensteiner *et al.* 2004; Binder *et al.* 2005; Matheny *et al.* 2006). A lo largo de los años, se han descrito 22 especies de *Fistulina*, pero actualmente solo se aceptan nueve: *F. hepatica*, *F. subhepatica* B.K. Cui & J. Song y *F. guzmanii* Brusis, de las regiones templadas de Europa, China y América del Norte y Central, y *F. spiculifera* (Cooke) D.A. Reid, *F. rosea* Mont., *F. africana* Van der Byl, *F. tasmanica* B.K. Cui & Y.F. Sun, *F. antarctica* Speg. y *F. endoxantha* Speg., reportadas en el Hemisferio Sur (Montagne 1856; Spegazzini 1887, 1921; Van der Byl 1928; Reid 1963; Brusis 1972; Sun *et al.* 2019).

La taxonomía de *Fistulina* en América del Sur fue estudiada por Spegazzini (1887), Wright (1961), Singer (1969) y, más recientemente, por Rajchenberg (2006), quien resumió la morfología y biología de las especies de la Patagonia. Los bosques en el sur de Argentina y Chile albergan dos taxones endémicos conocidos, *F. antarctica* (comúnmente conocido como "lengua de vaca") y *F. endoxantha* ("lengua de vaca amarilla"), ambas crecen en madera muerta y viva, así como en tocones de árboles nativos de Nothofagaceae (Wright 1961; Singer 1969; Rajchenberg 2006) (Fig. 7).



**Fig. 7-** Basidiomas de *Fistulina antarctica* (A) y *F. endoxantha* (B) creciendo sobre tocones de *Nothofagus dombeyi* y *Lophozonia alpina* respectivamente.

Tanto *F. antarctica* como *F. endoxantha* son reconocidos como comestibles, con usos tradicionales por parte de la comunidad Mapuche (Crovetto 1982; deMöesbach 1992; Smith-Ramírez 1997; Molares *et al.* 2020). Estudios bioquímicos recientes han revelado que son bajos en grasa, ricos en proteínas y carbohidratos, y tienen una alta actividad

antioxidante (Toledo *et al.* 2016; Rugolo *et al.* 2022), resaltando su potencial como alimentos funcionales y fuentes de compuestos bioactivos.

Estas especies de *Fistulina* de la Patagonia se distinguen de las especies del Hemisferio Norte por sus píleos de color rojo parduzco a rosa intenso en *F. antarctica* y amarillo intenso, con un matiz ocre, en *F. endoxantha*. Además, presentan basidiosporas mucho más grandes y de paredes engrosadas, así como elementos cistidioides esclerificados en la boca de los tubos (Rajchenberg 2006). Por otro lado también pueden encontrarse gloeopleuras (hifas especializadas con contenido acuoso u oleoso) con características importantes para la identificación. Hibbett y Binder (2002), Bodensteiner *et al.* (2004) y Matheny *et al.* (2006) incluyeron secuencias de ADN de *Fistulina* de Argentina y determinaron sus relaciones filogenéticas con otros taxa del género. A pesar de haber incluido un número limitado de aislamientos, estos trabajos ya evidenciaban diferencias filogenéticas que permiten distinguir entre las especies del Hemisferio Norte y Sur.

### Objetivos

- **Prospectar y coleccionar basidiomas de *Fistulina* spp. cubriendo su variabilidad en cuanto a aspecto general, hospedantes y distribución en la Patagonia norte y centro.**
- **Obtener cultivos axénicos.**
- **Realizar un análisis filogenético del género completo.**
- **Establecer una clave dicotómica del género.**

### Hipótesis

1 La variabilidad morfológica de *Fistulina* en la Patagonia son mayores de lo actualmente registrado, indicando la posible presencia de especies no descritos previamente.

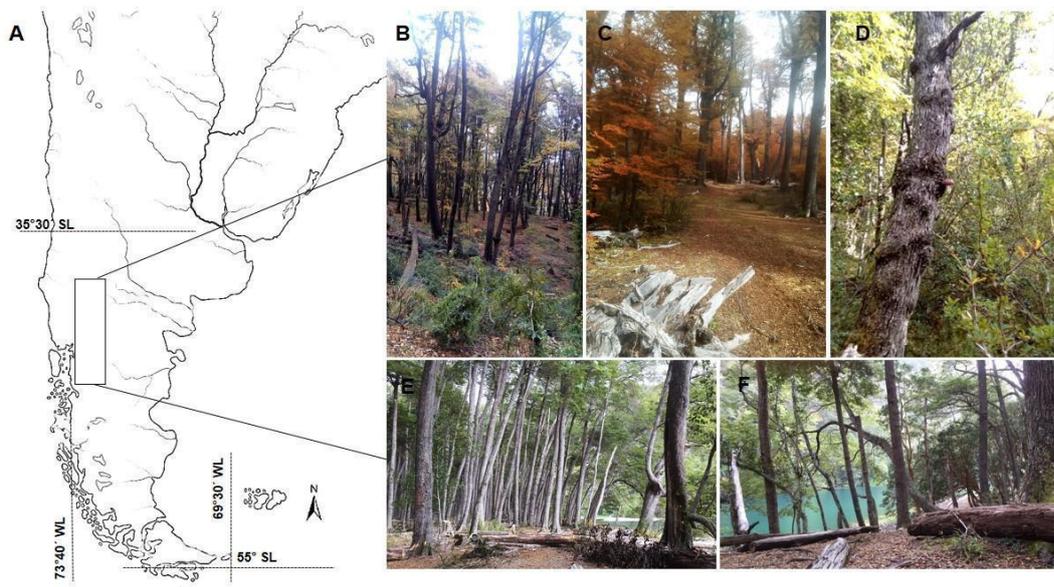
2 El análisis filogenético del género *Fistulina* revelará relaciones evolutivas claras y divergencia genética entre las especies de la Patagonia y otras regiones del mundo.

3 La elaboración de una clave dicotómica permitirá la identificación precisa y confiable de las especies de *Fistulina* en la Patagonia.

## Materiales y métodos

### Aislamientos fúngicos

Los especímenes fueron prospectados y recolectados en áreas protegidas de bosques nativos dominados por Nothofagaceae en la Patagonia Argentina, en las provincias de Chubut, Río Negro y Neuquén durante los otoños de 2019 y 2020 (Fig. 8, Tabla 1).



**Fig. 8** - Área de estudio en el sur de Argentina. A: Mapa que muestra los tipos de bosques de donde se recolectaron los especímenes de *Fistulina*; B: Tipo de bosque de *Lophozonia alpina*; C: Tipo de bosque de *Nothofagus pumilio*; D: Tipo de bosque de *N. antarctica*; E, F: Tipo de bosque de *N. dombeyi*.

Para tal fin se contó con los permisos de colecta necesarios gestionados en la Asociación de Parques Nacionales (APN) y las autoridades de aplicación provinciales según correspondía. Los especímenes fueron fotografiados *in situ* o en el laboratorio mientras estaban frescos. Además se relevaron datos geográficos (coordenadas, altitud), hospedante y matriz de vegetación circundante. Se obtuvieron cultivos fúngicos a partir de los basidiomas transfiriendo pequeños fragmentos del contexto o estípite a placas de Petri que contenían agar de extracto de malta al 2 % (MEA) que consiste en: 30 g de extracto de malta y 15 g de agar-agar disueltos en 1000 mL de agua (pH final: 4,8-5,5). Los cultivos se depositaron en la Colección de Cultivos del Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico (CIEFAP). Los especímenes fueron secados y preservados en el Herbario Centro Forestal CIEFAP (HCFC; actualizado continuamente) [Index Herbariorum \(TDWG\)](#).

**Tabla 1** - Lista de especies, fuentes, localidades y números de acceso al GenBank para las secuencias utilizadas en este estudio. Los aislamientos recopilados durante este estudio y las nuevas secuencias se indican con negrita.

Especie	Espécimen	Ubicación	Hospedante	Accesión al GenBank No.	
				ITS	nLSU
<i>Fistulina antarctica</i>	GM19001	Lago Lácar, Parque Nacional Lanín	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	MW462937
	GM19002	Lago Lácar, Parque Nacional Lanín	<i>Nothofagus dombeyi</i>	MW462906	MW462940
	GM19003	Lago Lácar, Parque Nacional Lanín	<i>Nothofagus antarctica</i>	MW462910	-
	GM19004	Lago Lácar, Parque Nacional Lanín	<i>Nothofagus antarctica</i>	-	-
	GM19005	Lago Lácar, Parque Nacional Lanín	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	MW462926
	GM19006	Río Arrayanes, Parque Nacional los Alerces	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	MW462949
	GM19007	Río Arrayanes, Parque Nacional los Alerces	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	MW462944
	GM19008	Futalaufquen, Parque Nacional los Alerces	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	MW462934
	GM19009	Los Hitos, PN Lago Puelo	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	-
	GM19010	Lago Rivadavia, Parque Nacional los Alerces	<i>Nothofagus antarctica</i>	-	MW462935
	GM19011	Lago Rivadavia, Parque Nacional los Alerces	<i>Nothofagus antarctica</i>	-	MW462941
	GM19012	Lago Rivadavia, Parque Nacional los Alerces	<i>Nothofagus antarctica</i>	-	-
	GM19014	Lago Rivadavia, Parque Nacional los Alerces	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	-
	GM19015	Lago Rivadavia, Parque Nacional los Alerces	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	MW462938
	GM19019	Lago Rivadavia, Parque Nacional los Alerces	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	-
	GM19022	Lago Rivadavia, Parque Nacional los Alerces	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	MW462950
	GM19024	Futalaufquen, Parque Nacional los Alerces	<i>Nothofagus dombeyi</i>	MW462908	-
	GM19039	Puerto Blest, PN Nahuel Huapi	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	MW462952

GM19043	Puerto Blest, PN Nahuel Huapi	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	MW462947
GM19045	Puerto Blest, PN Nahuel Huapi	<i>Nothofagus dombeyi</i>	MW462913	-
GM19049	Puerto Blest, PN Nahuel Huapi	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	MW462942
GM19051	Puerto Blest, PN Nahuel Huapi	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	MW462939
GM19053	Puerto Blest, PN Nahuel Huapi	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	MW462951
GM19066	Kruggen, Parque Nacional los Alerces	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	MW462936
GM19070	Futalaufquen, Parque Nacional los Alerces	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	MW462946
GM19072	Menendez, Parque Nacional los Alerces	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	MW462948
GM19075	Menendez, Parque Nacional los Alerces	<i>Nothofagus dombeyi</i>	MW462907	MW462927
GM19076	Chucaos, PN Los Alerces	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	MW462931
GM19081	Queñi, Parque Nacional Lanín	<i>Nothofagus dombeyi</i>	MW462909	MW462928
GM19083	Queñi, Parque Nacional Lanín	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	-
GM19086	Queñi, Parque Nacional Lanín	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	MW462943
GM19092	Queñi, Parque Nacional Lanín	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	MW462932
GM19098	Queñi, Parque Nacional Lanín	<i>Nothofagus dombeyi</i>	MW462912	MW462945
GM19107	Quillén, Parque Nacional Lanín	<i>Nothofagus dombeyi</i>	MW462911	MW462930
GM19108	Quillén, Parque Nacional Lanín	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	MW462929
GM19119	Centinela, Parque Nacional los Alerces	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	-
GM19120	Centinela, Parque Nacional los Alerces	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	-
GM19122	Manso, PN Nahuel Huapi	<i>Nothofagus antarctica</i>	-	-
GM19128	Manso, PN Nahuel Huapi	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	-
161	Arrayanes, Parque Nacional los Alerces	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	-
1015	Los Hitos, PN Lago Puelo	<i>Nothofagus antarctica</i>	MW462921	MW462925
168	Arrayanes, Parque Nacional los Alerces	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	-

	20001	Chubut, Esquel, Nahuel Pan	<i>Nothofagus antarctica</i>	-	-
	20002	Chubut, Huemules	<i>Nothofagus pumilio</i>	-	-
	20008	Chubut, Esquel, "Tres arroyos"	<i>Nothofagus antarctica</i>	-	-
	20009	Chubut, Esquel, "Tres arroyos"	<i>Nothofagus antarctica</i>	-	-
	20010	Chubut, Esquel, "Tres arroyos"	<i>Nothofagus antarctica</i>	-	-
	20011	Chubut, Trevelin, Sierra colorada	<i>Nothofagus pumilio</i>	-	-
	20014	Chubut, Arroyo Fontana	<i>Nothofagus pumilio</i>	-	-
	1021	Los Hitos, PN Lago Puelo	<i>Nothofagus antarctica</i>	<b>MW462922</b>	-
	12523	A° Braese, Parque Nacional Lago Puelo	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	-
	20017	C° La torta, PN Los Alerces	<i>Nothofagus pumilio</i>	-	-
	181	7 Lagos, PN Nahuel Huapi	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	-
	132	A° Braese, PN Los Alerces	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	-
	MR11955	Arrayanes, PN Los Alerces	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	-
	MR10812	Rivadavia, PN Los Alerces	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	-
	MR10741	Menendez, PN Los Alerces	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	-
	MR10585	Cascada Yrigoyen, PN Los Alerces	<i>Nothofagus dombeyi</i>	-	-
	MR10698	Chubut, Río Futaleufú	<i>Nothofagus antarctica</i>	-	-
	CBS701.85	Argentina	unknown	DQ486702	AY293181
	REG550	Chile	unknown	-	AY571002
<i>Fistulina pumiliae</i>	GM19057	Chubut, Bagilt Reserva Provincial	<i>Nothofagus pumilio</i>	<b>MW462915</b>	-
	GM19058	Chubut, Bagilt Reserva Provincial	<i>Nothofagus pumilio</i>	<b>MW462916</b>	-
	GM19059	Chubut, Bagilt Reserva Provincial	<i>Nothofagus pumilio</i>	-	-
	GM19077	C° La torta, PN Los Alerces	<i>Nothofagus pumilio</i>	<b>MW462917</b>	<b>MW462954</b>
	GM19078	C° La torta, PN Los Alerces	<i>Nothofagus pumilio</i>	<b>MW462918</b>	<b>MW462955</b>

	<b>GM19018</b>	<b>Rivadavia, PN Los Alerces</b>	<b><i>Nothofagus pumilio</i></b>	<b>MW462914</b>	<b>MW462953</b>
	20003	Chubut, Huemules	<i>Nothofagus pumilio</i>	-	-
	20004	Chubut, Huemules	<i>Nothofagus pumilio</i>	-	-
	20005	Chubut, Huemules	<i>Nothofagus pumilio</i>	-	-
	20006	Chubut, Huemules	<i>Nothofagus pumilio</i>	-	-
	20007	Chubut, Huemules	<i>Nothofagus pumilio</i>	-	-
	20012	Chubut, Arroyo Fontana	<i>Nothofagus pumilio</i>	-	-
	20013	Chubut, Arroyo Fontana	<i>Nothofagus pumilio</i>	-	-
	20015	Chubut, Arroyo Fontana	<i>Nothofagus pumilio</i>	-	-
	20016	Chubut, Esquel, CAM La Hoya	<i>Nothofagus pumilio</i>	-	-
	159	Chubut province, Reserva Provincial Bagilt	<i>Nothofagus pumilio</i>	-	-
	183	7 Lakes, PN Lanín	<i>Nothofagus pumilio</i>	-	-
	MR10689	Chapelco, "PN Lanín	<i>Nothofagus pumilio</i>	-	-
	MR10511	Chubut, Lago La Plata	<i>Nothofagus pumilio</i>	-	-
	MR10415	Chubut, Lago Rosario	<i>Nothofagus pumilio</i>	-	-
	MR10404	Chubut, Lago Rosario	<i>Nothofagus pumilio</i>	-	-
	MR10573	Chubut, Huemules	<i>Nothofagus pumilio</i>	-	-
	MR10444	Cerro el Triana	<i>Nothofagus pumilio</i>	-	-
	MR10453	Dedal, PN Los Alerces	<i>Nothofagus pumilio</i>	-	-
	MR10636	Cerro el Triana	<i>Nothofagus pumilio</i>	-	-
	MR10449	Cerro el Triana	<i>Nothofagus pumilio</i>	-	-
<b><i>Fistulina endoxantha</i></b>	<b>GM19079</b>	<b>Queñi, Parque Nacional Lanín</b>	<b><i>Nothofagus oblicua</i></b>	<b>MW462919</b>	<b>MW462956</b>
	<b>GM19089</b>	<b>Queñi, Parque Nacional Lanín</b>	<b><i>Nothofagus alpina</i></b>	<b>MW462920</b>	<b>MW462957</b>
	<b>GM19093</b>	<b>Queñi, Parque Nacional Lanín</b>	<b><i>Nothofagus alpina</i></b>	<b>-</b>	<b>MW462933</b>

	<b>GM19099</b>	<b>Lacar, Parque Nacional Lanín</b>	<b><i>Nothofagus alpina</i></b>	-	<b>MW462958</b>
	<b>GM19100</b>	<b>Lacar, Parque Nacional Lanín</b>	<b><i>Nothofagus alpina</i></b>	-	<b>MW462959</b>
	202	Chachín, PN Lanín	<i>Nothofagus oblicua</i>	-	-
	197	Chachín, PN Lanín	<i>Nothofagus oblicua</i>	-	<b>MW462960</b>
	142	Pto. Pucará, PN Lanín	<i>Nothofagus alpina</i>	<b>MW462923</b>	<b>MW462961</b>
	201	Chachín, PN Lanín	<i>Nothofagus oblicua</i>	-	-
	200	Chachín, PN Lanín	<i>Nothofagus oblicua</i>	<b>MW462924</b>	<b>MW462962</b>
	146	Pucará, PN Lanín	<i>Nothofagus oblicua</i>	-	-
	MR10692	Lolog, PN Lanín	<i>Nothofagus alpina</i>	-	-
	MR10691	Lolog, PN Lanín	<i>Nothofagus alpina</i>	-	-
	CIEFAP115	Argentina	Desconocido	-	AY571003
<b><i>Fistulina tasmanica</i></b>	CUI16605	Mount Wwllington, Tasmania	<i>Eucalyptus</i> sp.	MK986821	MK986823
	CUI16635	Mount Wwllington, Tasmania	<i>Eucalyptus</i> sp.	MK986822	MK986824
<b><i>Fistulina hepatica</i></b>	REG593	USA	Desconocido	AY571038	AY571004
	DSH 93-183	USA	Desconocido	-	AY293182
<b><i>Fistulina subhepatica</i></b>	CUI 11130	Dazhongshan Nature Reserve, China	Angiosperma	KJ925059	KJ925054
	CUI 13216	Yunnan Province, China	<i>Castanopsis</i> sp.	KJ925060	KJ925055
<b><i>Pseudofistulina radicata</i></b>	G1080	USA	Desconocido	-	MK278531
<b><i>Fistulina pallida</i></b>	CBS 508 63	USA	Desconocido	AY571039	AY571005
<b><i>Porodisculus pendulus</i></b>	HHB- 13576	USA	Desconocido	-	AY293204
	DAOM198417	USA	Desconocido	-	AF261593
<b><i>Schizophyllum radiatum</i></b>	UTHSCDI14-1	España	Desconocido	LT217539	LT217571
<b><i>Schizophyllum comune</i></b>	NBRC 4928	Japón	Desconocido	AB733163	AB733339

#### Estudios morfológicos

La descripción de los basidiomas y la terminología seguida fueron las de Wright (1961), Singer (1969) y Rajchenberg (2006). Las distintas secciones del basidioma se midieron en KOH al 3% y floxina al 1%. Las mediciones de las basidiosporas ( $n = 30$ ) se expresan como  $L \times W$  ( $L =$  longitud media de las basidiosporas como el promedio aritmético de todas las basidiosporas  $\pm$  SD,  $W =$  ancho medio de las basidiosporas como el promedio aritmético de todas las basidiosporas  $\pm$  SD),  $Q$  como la variación media entre  $L/W$  entre los especímenes estudiados, y  $n/s =$  número de basidiosporas medidas a partir de un número determinado de especímenes. Se caracterizaron las macro y micromorfologías de los cultivos. Los aislamientos se cultivaron en placas de Petri con agar de extracto de malta al 2% y se mantuvieron a 25 °C en la oscuridad siguiendo los métodos de Rajchenberg y Greslebin (1995) y Nobles (1965).

#### Extracción de ADN

El ADN genómico total se extrajo siguiendo un protocolo de extracción de CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) modificado de Doyle y Doyle (1990). El mismo consistió en colocar las muestras en tubos eppendorf de 1.5 mL con 500  $\mu$ L de CTAB; luego se sometieron los tubos a dos ciclos de temperatura (65 °C durante 7 min) y agitación con vórtex (30 seg); a continuación se añadió a cada tubo 500  $\mu$ L de cloroformo isoamílico (24:1), para finalmente centrifugar a 10.000 rpm durante 15 min. A continuación se recuperó el sobrenadante, se añadieron 200  $\mu$ L de etanol puro y se los colocó a -20 °C durante 24 h. Pasado ese tiempo las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm durante 15 min, se descartó el sobrenadante y se hicieron dos lavados con etanol. Los pellets de ADN se secaron a temperatura ambiente y se resuspendieron en 70  $\mu$ L de agua ultrapura. La integridad del ADN se examinó en geles de agarosa al 0,8%.

#### Condiciones de PCR

Se analizaron dos regiones génicas: los pares de cebadores LROR-LR7 (Vilgalys y Hester 1990) e ITS1-ITS4 (Gardes y Bruns 1993) se utilizaron para amplificar LSU y la región completa ITS (ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2), respectivamente. Los componentes de reacción de PCR para la amplificación de ambas regiones incluyeron 12,5  $\mu$ L de MasterMix (Promega, Madison, WI, EE. UU.); 0,5  $\mu$ L de cada cebador (10  $\mu$ M); se usó 1  $\mu$ L de ADN como molde y agua

purificada para completar el volumen final de 25  $\mu$ L. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (MyCycler™, BioRad) de la siguiente manera: 95 °C durante 3 min, 34 ciclos de 94 °C durante 40 seg, 54 °C durante 45 seg, 72 °C durante 1 min, seguido de 72 °C durante 10 min para la región ITS. Para LSU, el programa de amplificación incluyó una desnaturalización a 94 °C durante 1 min, seguida de 34 ciclos de 94 °C durante 30 seg, 50 °C durante 60 seg, 72 °C durante 1,5 min, y una etapa final de extensión a 72 °C durante 10 min (Sun *et al.* 2019). Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1.2% (p/v) teñido con GelRed™ Nucleic Acid Stain (Biotium Inc., Hayward, CA, EE. UU.) y las bandas se visualizaron bajo iluminación UV. Los productos de PCR se purificaron y secuenciaron en Macrogen (Seúl, Corea del Sur). Las secuencias generadas en este estudio se enviaron a GenBank (LSU: MW462925 a MW462962; ITS: MW462906 a MW462924) (Tabla 1).

#### Análisis filogenéticos

Las secuencias generadas en este estudio fueron editadas manualmente con MEGA v.X (Kumar *et al.* 2018). Se recuperaron secuencias adicionales de GenBank. Las secuencias de *Schizophyllum radiatum* UTHSCDI14-1 (LT217539/LT217571) y *S. commune* NBRC 4928 (AB733163/AB733339) se seleccionaron como grupos externos siguiendo a Song *et al.* (2015) y Sun *et al.* (2019). El alineamiento de los conjuntos de datos de secuencias ITS y LSU se realizó automáticamente con MAFFT (Kato y Standley 2013) y se inspeccionaron visualmente y ajustaron manualmente con MEGA v.X. Las posiciones de nucleótidos ambiguamente alineadas sin un patrón de alineación discernible en el conjunto de datos se identificaron y eliminaron de los análisis filogenéticos subsiguientes con Gblocks 0.91b (Castresana 2000). Los alineamientos se incorporaron a TreeBASE (ID de estudio 16018).

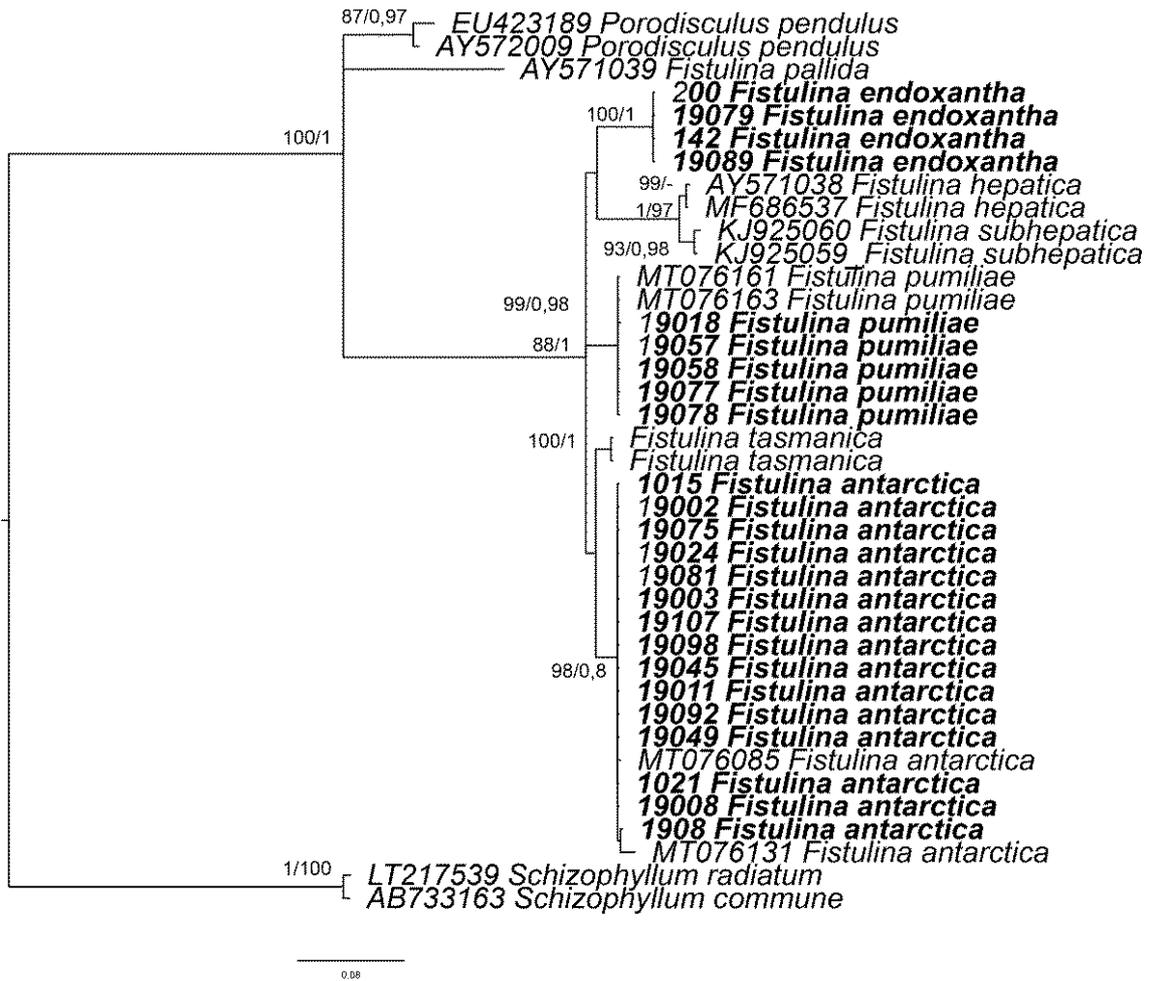
Las relaciones filogenéticas se infirieron con criterios de máxima verosimilitud (ML) y análisis bayesiano (BA) para ambos conjuntos de datos y de forma concatenada. Los mejores modelos de evolución se determinaron con AIC (Akaike 1974) implementado en jModelTest (Darriba *et al.* 2012), y se utilizaron para ambos análisis ML y BA. El soporte de las ramas se determinó con el remuestreo no paramétrico implementado en RAxML 7.2.8 (Stamatakis 2014), utilizando los parámetros predeterminados, ejecutados en la CIPRES

(ciberinfraestructura para investigación filogenética) Science Gateway 3.1 (Miller *et al.* 2010; [www.phylo.org/sub\\_sections/portal](http://www.phylo.org/sub_sections/portal)) con estadísticas de re-muestreo calculadas a partir de 1000 réplicas de bootstrap. Los análisis filogenéticos bayesianos se realizaron con MrBayes. 3.2.6 (Ronquist *et al.* 2012) con 10 millones de generaciones, con cuatro cadenas y árboles muestreados cada 100 generaciones. El soporte de las ramas se evaluó utilizando probabilidades a posteriori (BPP) calculadas a partir del conjunto posterior de árboles después de alcanzar la estacionalidad.

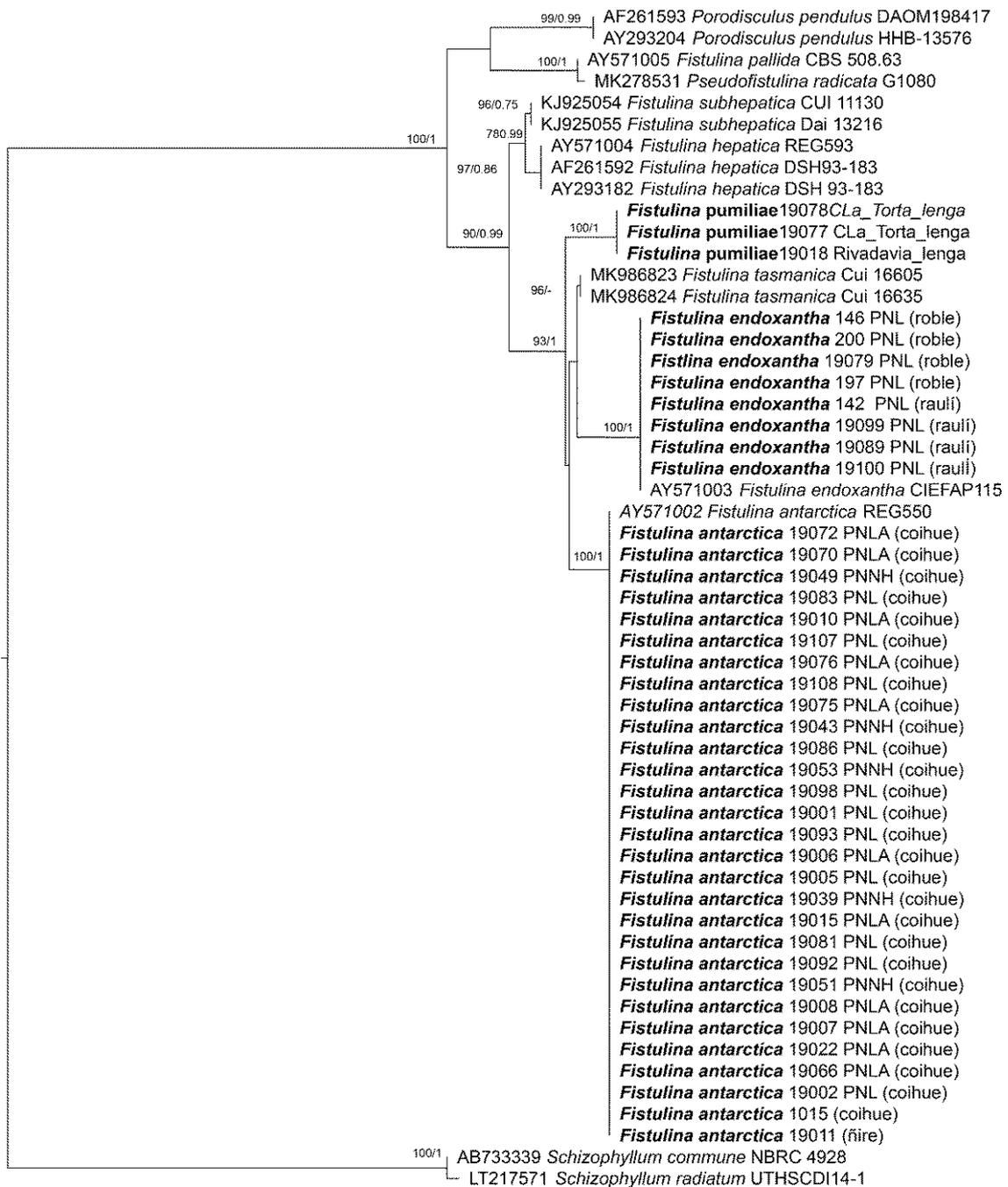
## Resultados

### Filogenia molecular

Se obtuvieron un total de 24 secuencias para ITS y 40 secuencias para LSU. El conjunto de datos ITS incluyó 32 secuencias, lo que resultó en una alineación con 610 caracteres, incluyendo *gaps*, de los cuales 513 fueron constantes. El conjunto de datos LSU incluyó 55 secuencias, lo que resultó en una alineación con 610 caracteres, incluyendo *gaps*, de los cuales 513 fueron constantes. Tanto los análisis de BI como ML arrojaron la misma topología de árbol para ambos set de datos. Por lo tanto, solo se muestran los árboles bayesianos con valores BPP ( $\geq 0.95$ ) y MLB  $\geq 65\%$  (Figs. 9 y 10).



**Fig. 9** - Posición filogenética de las colecciones patagónicas de *Fistulina* basada en ITS, utilizando análisis de máxima verosimilitud (ML) y análisis bayesiano.

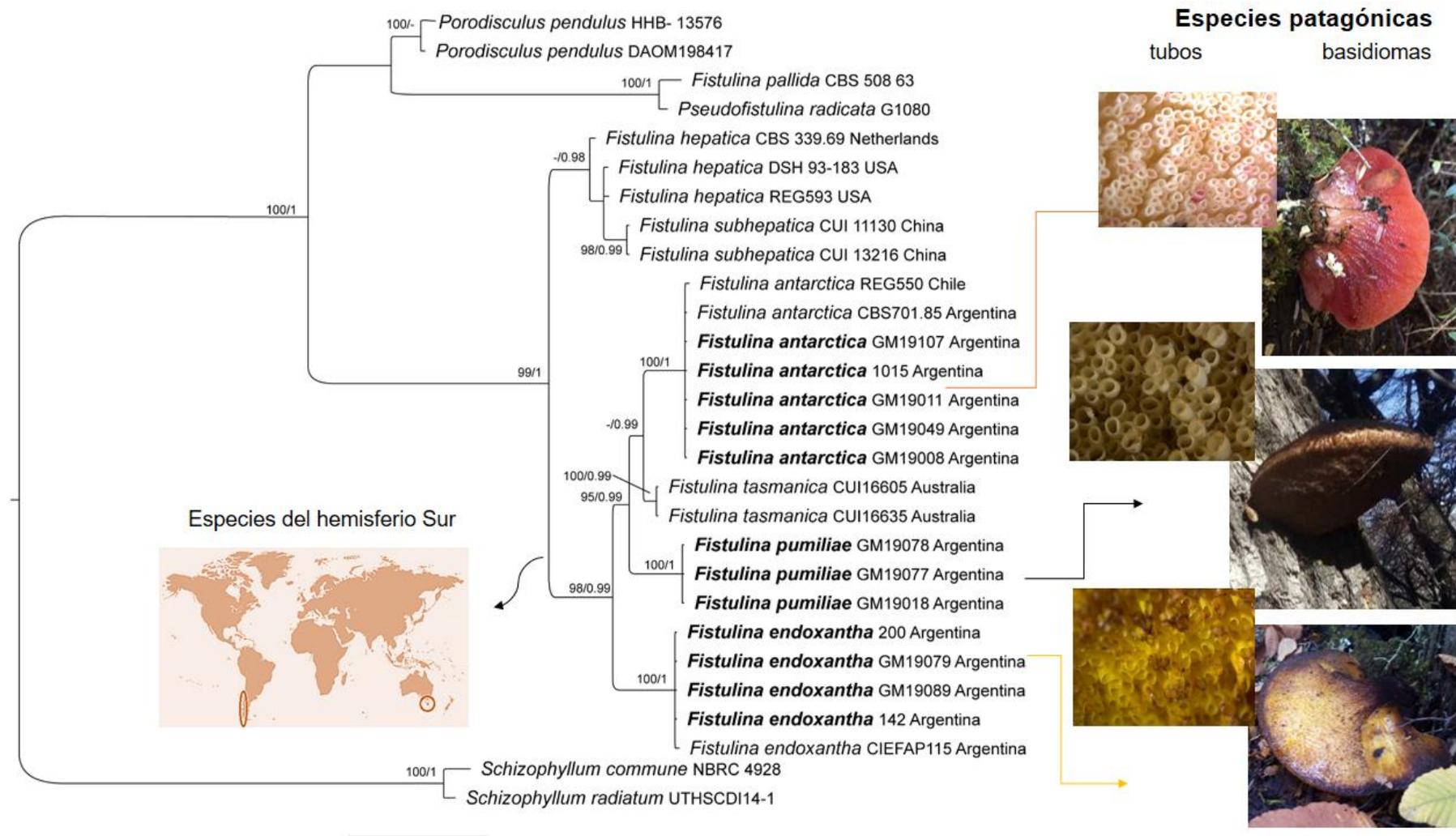


**Fig. 10** - Posición filogenética de las colecciones patagónicas de *Fistulina* basada en LSU, utilizando análisis de máxima verosimilitud (ML) y análisis bayesiano.

El conjunto de datos concatenado de ITS y LSU incluyó 30 colecciones, con una longitud alineada de 1261 caracteres, incluyendo gaps, de los cuales 866 caracteres eran constantes. Los conjuntos de datos finales de ITS y LSU contenían 25 secuencias de ITS y 27 secuencias de LSU, respectivamente, de

30 muestras que representan 28 taxa internos y los grupos externos. Se generaron cincuenta y siete nuevas secuencias de ITS y LSU para este estudio (Tabla 1). El mejor modelo para la partición combinada de ITS y LSU fue un modelo GTR+I+G. La desviación estándar promedio de las frecuencias de división de BI fue 0.001282. Los árboles generados a partir de ambos conjuntos de datos utilizando análisis ML y BI fueron congruentes. El árbol bayesiano con valores de BPP ( $\geq 95\%$ ) y MLB ( $\geq 75\%$ ) se muestra en la Fig. 11.

El árbol filogenético (Fig. 11) reveló que las especies patagónicas pertenecen al núcleo "*Fistulina* s.s." (ML = 100%, BPP = 0.99) y forman un grupo fuertemente respaldado junto con Especies del Hemisferio Sur (ML = 100, BPP = 1). Dentro de este grupo, las colecciones patagónicas formaron tres linajes de nivel de especie fuertemente respaldados: el linaje de *F. antarctica*, junto con otra secuencia extraída de las bases de datos para esta especie (ML = 94%, BPP = 1.00), un nuevo linaje representado completamente por colecciones patagónicas encontradas en *Nothofagus pumilio* (ML = 100%, BPP = 1.00), y el linaje de *F. endoxantha*, que presentó una posición basal en el clúster del Hemisferio Sur.



**Fig. 11** - Posición filogenética de las colecciones patagónicas de *Fistulina* basada en conjuntos de datos combinados de ITS y LSU, utilizando análisis de máxima verosimilitud (ML) y análisis bayesiano. Se indican los valores de bootstrap mayores a 75% y valores de probabilidad posterior superior a 0.95.

*Fistulina antarctica*, *F. tasmanica* y el nuevo linaje de *N. pumilio* se agruparon en un grupo bien respaldado. Por otro lado, las especies registradas en el Hemisferio Norte (*F. hepatica* y *F. subhepatica*) forman un clado diferente y fuertemente respaldado (ML = 100%, BPP = 0.97). El presente análisis también muestra que *F. pallida* Berk. & Ravenel resulta fuera de "*Fistulina* s.s." y se agrupa con *Pseudofistulina radicata* (Schwein.) Burds. con un buen respaldo (ML = 100%, BPP = 1.00), de acuerdo con varios autores (Wright 1961; Fidalgo y Fidalgo 1962; Guzmán 1987). *Fistulina pallida* es sinónimo de *P. radicata*, siendo este último el nombre válido. Esta especie se encuentra en climas tropicales y subtropicales, y su uso etnobiológico es muy importante en países como México (Guzmán 1987).

#### Taxonomía

***Fistulina pumiliae*** G. González, Barroetaveña & Pildain sp. nov. Figs. 12 y 13.

MycoBank no.: MB 839048 GenBank no.: MW462917–MW462954

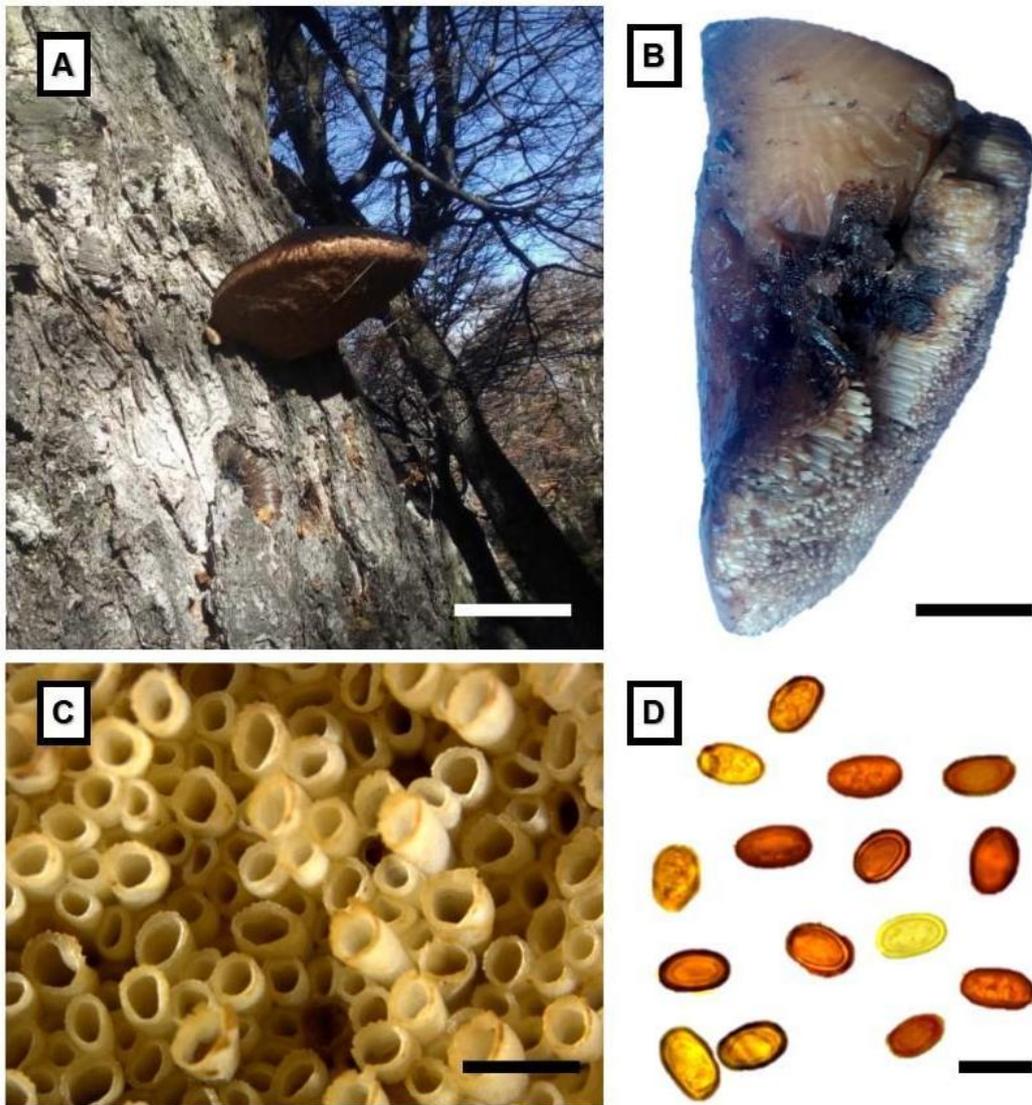
Etimología: *pumiliae* — en referencia a *Nothofagus pumilio*, el hospedante asociado.

Diagnóstico: *Fistulina pumiliae* se caracteriza por basidiomas de color ocre o marrón, de hasta 18.5 cm de longitud × 13.5 cm de ancho × 5.5 cm de grosor, dimidiada-flabelada hasta unguilada; por basidiosporas elipsoides de paredes gruesas (6–)8.7–10 × (4–)5.3–7 µm, y por elementos cistidioides de hasta 150 × 20 µm, con ornamentación acanalada, algunos con contenido castaño, asociados a la madera de *N. pumilio* vivo.

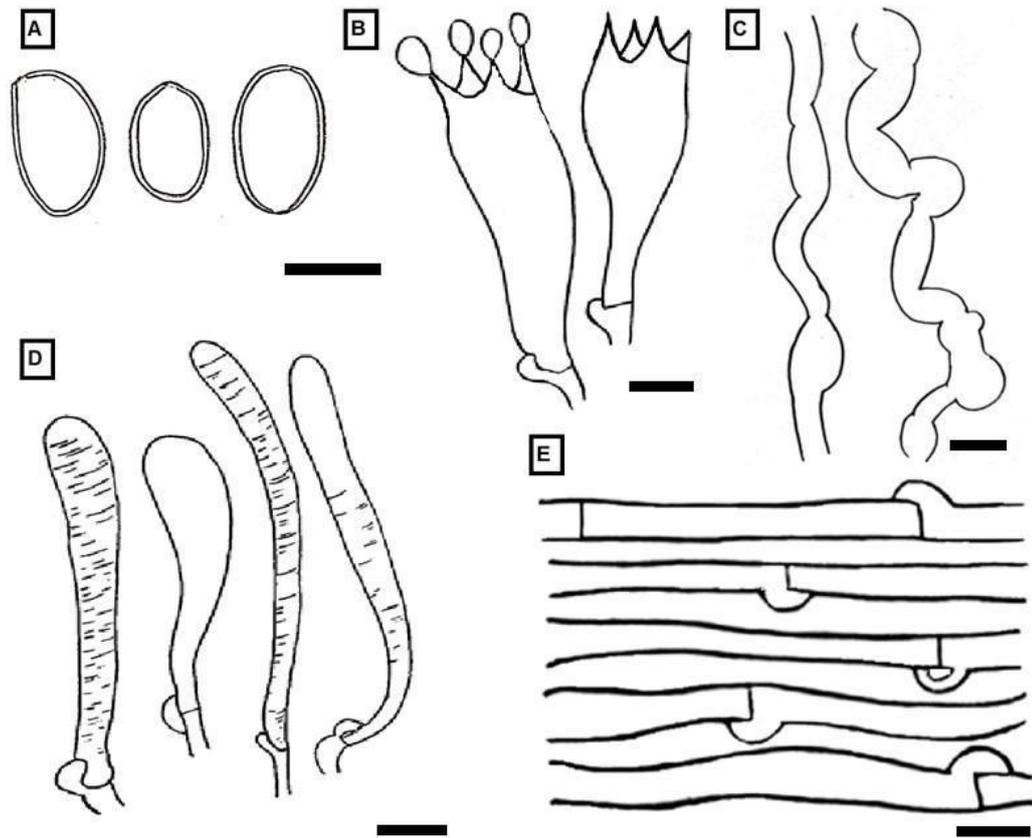
Holotipo: Argentina, Parque Nacional Los Alerces, Cerro La Torta, – 42.4129 lat – 71.465276 long, en *Nothofagus pumilio* vivo (Nothofagaceae), 12.5.2019, leg. G. González

Descripción: Basidiomas anuales, solitarios, pileados, sésiles a lateralmente subestipitados, unguilados o dimidiato-flabelados, carnosos cuando están frescos, de hasta 18.5 cm de longitud × 13.5 cm de ancho × 5.5 cm de grosor en la base. Superficie pileal lisa y glabra, a veces formando escamas o pequeñas verrugas, de ocre a marrón pálido cuando está fresca, tornándose marrón oscuro a casi negra al secarse. Superficie poroidal de color marrón claro o beige, que se torna marrón tabaco a marrón oscuro cuando está seca; poros 1–2/mm, compuestos por tubos fácilmente separables. Contexto carnoso y fibroso cuando

está fresco, tornándose coriáceo al secarse, de color crema, a veces atravesado por fibras miceliales castañas desde la base hasta el margen, con olor fúngico dulce y afrutado, de hasta 10 cm de grosor. Tubos de hasta 1 cm de longitud.



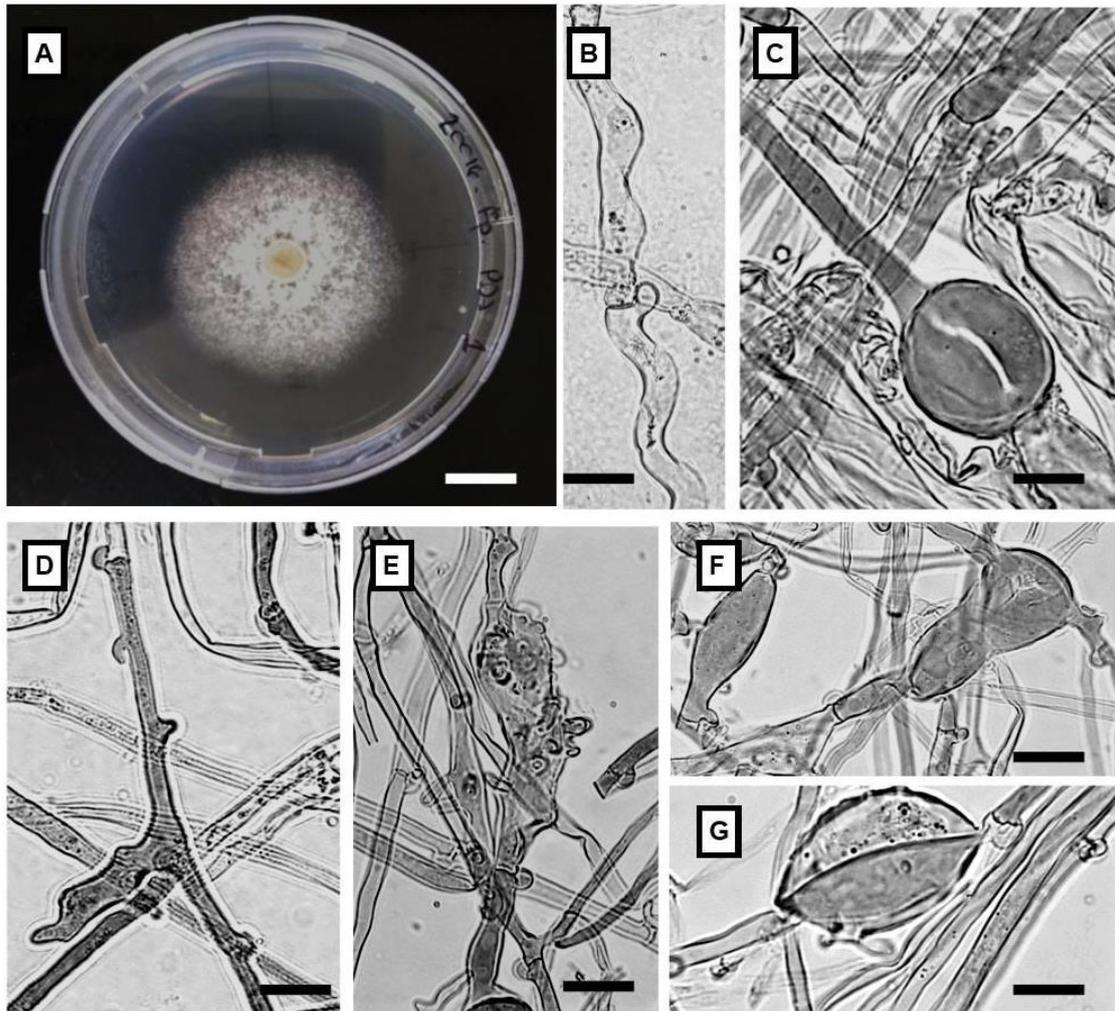
**Fig. 12** - *Fistulina pumiliae* sp. nov., características morfológicas (Holotipo HCFC 1330). A: Basidiomas de *Fistulina pumiliae* creciendo en el tronco de *Nothofagus pumilio*; b: sección transversal de los basidiomas; c: tubos; d: basidiosporas en KOH al 3%. Barra de escala: a 5 cm; b 1 cm; c 1 mm; d 10  $\mu$ m.



**Fig. 13** - *Fistulina pumiliae*, caracteres microscópicos. A: Basidiosporas; b: basidios; c: hifas gloeopleuras; d: elementos cistidioides de los bordes del disepimento; e: hifas de la trama. Barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ .

Características del cultivo:

La masa micelial es aterciopelada, lanosa, un poco densa, heterogénea, blanca, escasa y con un margen regular. La superficie del micelio está compuesta por hifas generativas fibuladas, de 2.5–9  $\mu\text{m}$  de diámetro, hasta 15  $\mu\text{m}$  en la fíbula, incoloras, y con paredes finas a ligeramente engrosadas. El micelio sumergido está compuesto por hifas generativas con fíbulas y hifas dilatadas de paredes delgadas, de hasta 14  $\mu\text{m}$  de diámetro. También se observaron hifas vacuoladas. Se presentan clamidosporas, globoideas, subgloboideas a ovoides, alargadas o clavadas, terminales e intercalares, de 12–20  $\times$  4–15  $\mu\text{m}$  (Fig. 14).



**Fig. 14 - *Fistulina pumiliae*:** características microscópicas de cultivo. A: Cultivo HCFC 1338 en MEA; B: hifa generativa; C: hifa generativa con ramas laterales cortas; D: ramas digitiformes de hifas vacuoladas; E–G clamidosporas globosas, rectangulares y elipsoidales. Barra de escala: A = 1 cm; E–G = 5  $\mu$ m.

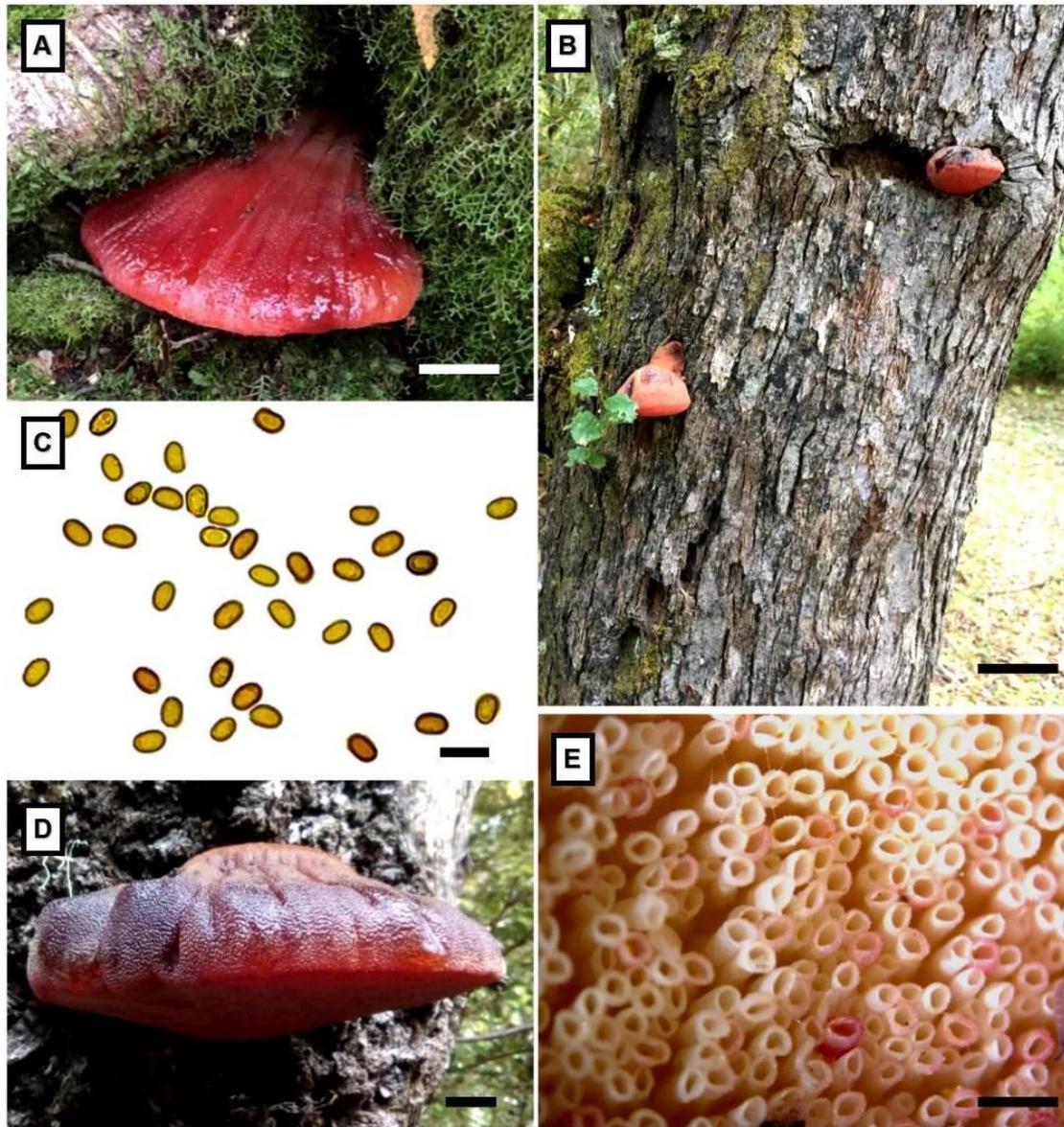
**Observaciones:** Difiere de *Fistulina antarctica* en la morfología de sus basidiomas y en el mayor tamaño de las esporas. Rajchenberg (2006) señaló que los especímenes de *F. antarctica* que crecen en *N. pumilio* tienden a ser más gruesos, con un contexto carnoso, de color rosa oscuro a marrón claro, considerándolos como variaciones dentro de la misma especie. *Fistulina endoxantha* tiene basidiomas con un color amarillo intenso y esporas más grandes que *F. pumiliae*, y está exclusivamente asociada con *Lophozonia alpina* y *L. obliqua*. *Fistulina tasmanica* fue descrita en Tasmania creciendo en troncos de *Eucalyptus* vivos y se caracteriza por sus basidiomas de color vino a rojizo, con esporas más pequeñas (5.4–6  $\times$  3.4–4  $\mu$ m) que *F. pumiliae* (Sun *et al.* 2019).

***Fistulina antarctica*** Speg., Bol. Acad. Nac. Cienc. Córdoba 31: 8, 1887 (LPS)  
Fig.15.

*Fistulina hepatica* (Schaeff.: Fr.) With. var. *antarctica* (Speg.) J.E. Wright, Rev. Invest. Agropec. INTA ser. 5 Pat.Veg. 9: 130, 1972. Descripciones: Spegazzini (1887), Wright (1961) y Rajchenberg (2006).

Especímenes examinados: Argentina, Neuquén, Parque Nacional Lanín, – 40.159489 lat – 71.4135 long, en *Nothofagus dombeyi*, 26.3.2019, leg. M. Rugolo GM19001 (HCFC 1347); – 40.1393 lat – 71.4742 long, en *N. dombeyi*, 16.5.2019, leg. M. Rugolo GM19002 (HCFC 1346); – 40.1389 lat – 71.4753 long, en *N. antarctica*, 26.3.2019, leg. M. Rugolo GM19003; – 40.135143 lat – 71.708383 long, en *N. dombeyi*, 16.5.2019, leg. G. González GM19081 (HCFC 1343); – 40.138467 lat – 71.713125 long, en *N. dombeyi*, 16.5.2019, leg. G. González GM19086 (HCFC 1342); – 40.39803 lat – 71.663755 long, en *N. dombeyi* Argentina, Los Alerces National Park, – 42.742318 lat – 71.734537 long, on *N. dombeyi*, 14.4.2019 leg. G. González GM19007 (HCFC 1344); – 42.667402 lat – 71.687785 long, on *N. antarctica*, 16.4.2019, leg. G. González GM19011 (HCFC 1345); – 42.608097 lat – 71.893768 long, on *N. dombeyi*, 10.5.2019, leg. G. González GM19075 (HCFC 1340); Arrayanes river, on *N. dombeyi*, 30.03.2000, leg. M. Rajchenberg MR11955 (HCFC 265); Rivadavia lake, on *N. dombeyi*, 03.1994, leg. M. Rajchenberg MR10812 (HCFC 281); Menendez lake, on *N. dombeyi*, 15.03.1993, leg. M. Rajchenberg MR10741 (HCFC 279); Yrigoyen cascade, on *N. dombeyi*, 27.03.1992, leg. M. Rajchenberg MR10585 (HCFC 273). Argentina, Nahuel Huapi National Park, – 41.010035 lat – 71.821942 long, on *N. dombeyi*, 19.4.2019, leg. M. Rugolo GM19049 (HCFC 1339). Argentina, Chubut province, on *N. antarctica*, 30.04.1992, leg. M. Rajchenberg MR10698 (HCFC 278). Argentina, Tierra del Fuego, Isla de los Estados, 1887, leg. C. Spegazzini (LPS 24915, holotype of *Fistulina antarctica*).

**Observaciones:** los especímenes estudiados presentan variaciones en cuanto a la forma, tamaño y coloración de los basidiomas; además, el tamaño y color de los tubos (crema, rosa, amarillo) también mostraron variación. Sin embargo, las características micromorfológicas (sistema de hifas, tamaño y forma de las basidiosporas) no mostraron variaciones significativas.



**Fig. 15** - *Fistulina antarctica*. A, D: Basidiomas creciendo en *Nothofagus dombeyi*; B: basidiomas; C: basidiomas creciendo en *N. antarctica*; E: tubos. Barra de escala: A, D = 2 cm; B = 5 cm; C = 10  $\mu$ m; E = 1 mm.

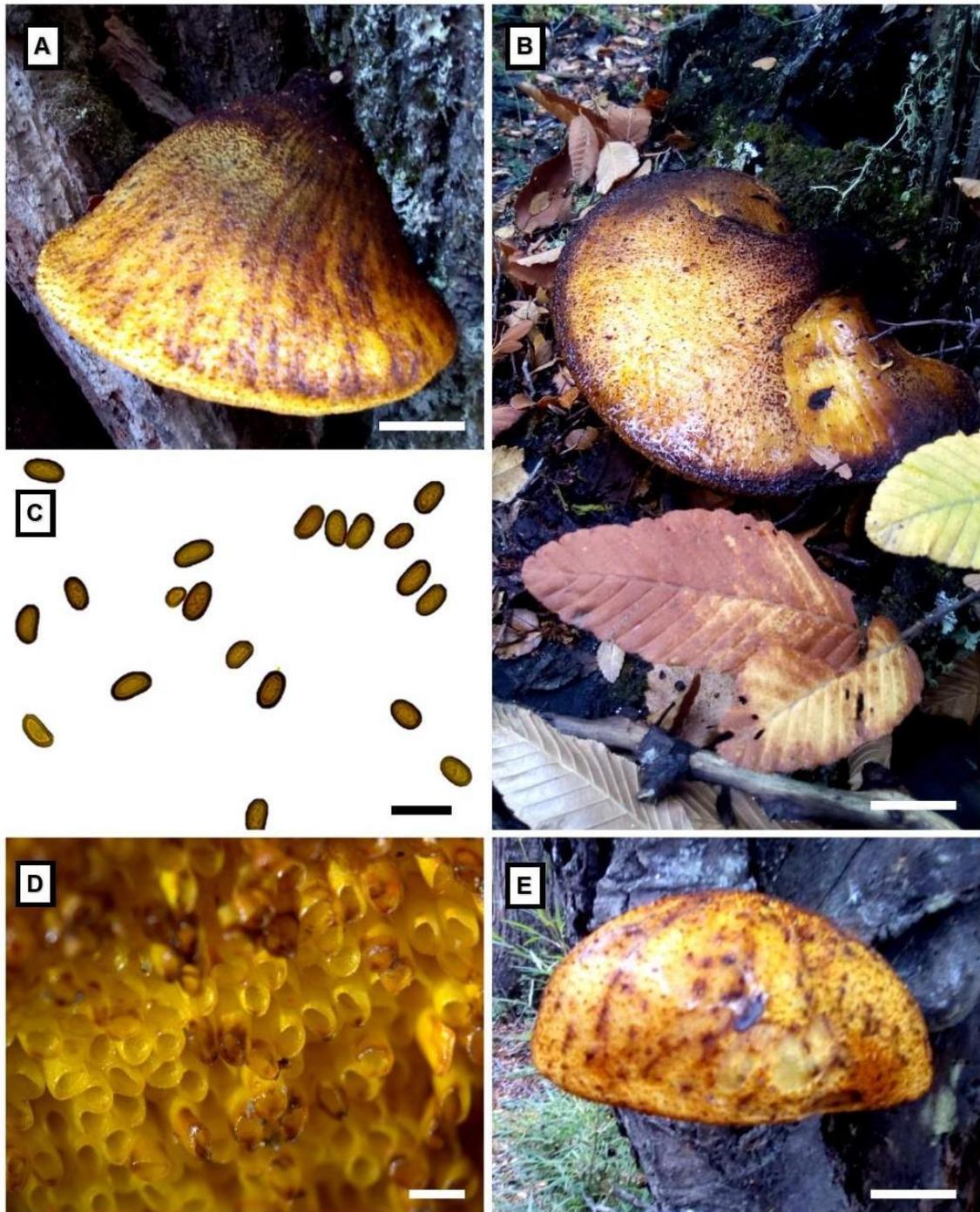
*Fistulina endoxantha* Speg. Bol. Acad. Nac. Cienc. Córdoba 25:23, 1921 (LPS)  
Fig. 16.

*Fistulina hepatica* (Schaeff.: Fr.) With. var. *endoxantha* (Speg.) J.E. Wright, Fl. Criptog. de Tierra del Fuego 11(3): 16, 1975.

Descripciones: Spegazzini (1921), Wright (1961) y Rajchenberg (2006).  
Ejemplares examinados: Argentina, Parque Nacional Lanín, -40.159489 lat - 71.378866 long, en *Lophozonia alpina*, 17.5.2019, leg. G. González GM19100 (HCFC 1325); -40.158159 lat - 71.377715 long, en *L. alpina*, 17.5.2019, leg. G. González GM19099; -40.13096 lat - 71.657868 long, en *L. alpina*, 16.5.2019, leg.

G. González GM19093; -40.133187 lat - 71.671842 long, en *L. alpina*, 16.5.2019, leg. G. González GM19089 (HCFC 1327); -40.13212 lat - 71.65836 long, en *L. obliqua* 16.5.2019, leg. G. González GM19079 (HCFC 1326). Argentina, Parque Nacional Lanín, Lago Lolog, en *Lophozonia alpina*, 13.04.1992, leg. M. Rajchenberg MR10691 (HCFC 276); *ibid.*, en *Lophozonia alpina*, 13.04.1992, leg. M. Rajchenberg MR10692 (HCFC 267). Chile, Victoria, Mariluán, leg. J.A. Campo, 20.3.1918 (LPS 24916, holotipo de *Fistulina endoxantha*).

Observaciones: no se encontraron diferencias con respecto a las descripciones de Rajchenberg (2006).



**Fig. 16** - *Fistulina endoxantha*. A–B, E: Basidiomas creciendo en *Lophozonia alpina*; C: basidiosporas; D: tubos. Barra de escala: A, B, E = 2 cm; C = 10  $\mu$ m; D = 1 mm.

Clave para especies del género *Fistulina*

1 Superficie de poros carmesí, rojo brillante o púrpura-rojo en especímenes jóvenes que se desvanecen ligeramente o se vuelven marrones al secarse... 2

1\* Superficie de poros blanca, amarillenta, crema, rosa o rojiza cuando está fresca y se vuelve marrón rojiza o marrón a marrón oscuro al secarse... 3

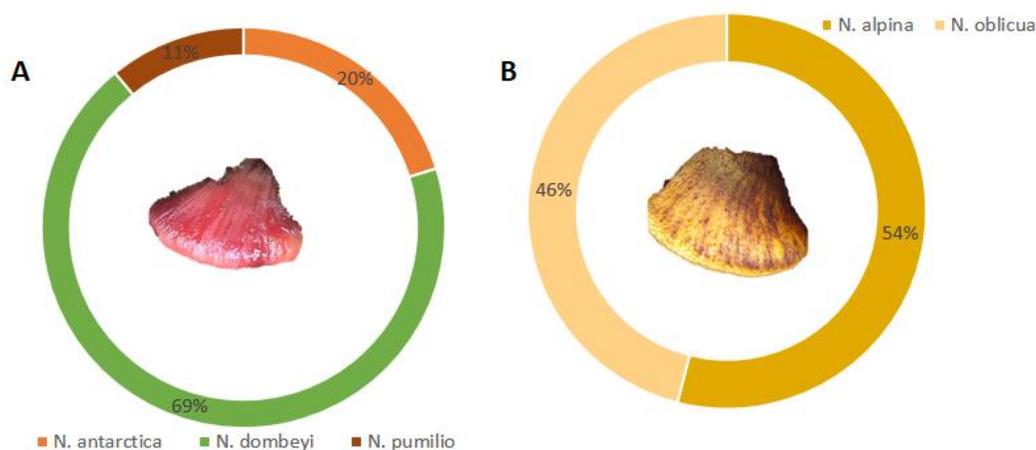
- 2 Basidiomas sésiles... **1. *F. rosea***
- 2\* Basidiomas lateralmente estipitados... **2. *F. guzmanii***
- 3 Superficie del píleo con protuberancias rugosas elevadas como bultos... **3. *F. africana***
- 3\* Superficie del píleo ligeramente acanalada radialmente, lisa, glabra, a veces formando escamas o pequeñas verrugas... 4
- 4 Basidiosporas de hasta 6 µm de largo... 5
- 4\* Basidiosporas más largas de 6 µm de largo... 7
- 5 Basidiosporas sin color, ovoides, de pared delgada... **4. *F. hepatica***
- 5\* Basidiosporas sin color o amarillentas, elipsoidales, de pared gruesa... 6
- 6 Píleo de hasta 3 cm de ancho; superficie del píleo cubierta de espículas cortas y dispersas... **5. *F. spiculifera***
- 6\* Píleo más ancho que 4 cm; superficie del píleo lisa o radialmente estriada... **6. *F. subhepatica***
- 7 Poros 3–5/mm, basidiosporas sin color o amarillas, amarillo dorado o castañas... 8
- 7\* Poros 6–7/mm, basidiosporas sin color... **7. *F. tasmanica***
- 8 Basidiomas y contexto amarillos; elementos cystidioides con paredes gruesas y verrugosas... **8. *F. endoxantha***
- 8\* Basidiomas y contexto rosa rojizo, ocráceo o marrón claro a oscuro; elementos cystidioides cilíndricos o fusoides, con paredes delgadas o gruesas, ornamentación lisa o acanalada dispuesta en círculos... 9
- 9 Basidiosporas (5,5–) 6–7,5 × (4–) 4,5–5,5 (–6) µm; basidiomas y contexto rosa rojizo... **9. *F. antarctica***
- 9\* Basidiosporas (6–) 8,7–10 × (4–) 5,3–7 µm; basidiomas y contexto ocráceo o marrón claro a oscuro... **10. *F. pumiliae***

Se examinaron un total de 99 colecciones; se recolectaron 69 ejemplares de *Fistulina* spp. en otoño de 2019 y 2020 en bosques de *N. dombeyi*, *N. pumilio*, *N. antarctica*, *Lophozonia alpina* y *L. obliqua*; se revisaron otras 30 colecciones

de herbario. El 62% de las muestras correspondieron a *F. antarctica*. Esta especie se encontró en *N. dombeyi*, *N. antarctica* y *N. pumilio*. *Fistulina endoxantha* se encontró en *L. alpina* y en *L. obliqua*. Finalmente, *F. pumiliae* sólo se encontró creciendo en *N. pumilio* (Tabla 2, Fig. 17).

**Tabla 2** - Huéspedes asociados y frecuencia de especies de *Fistulina* en la Patagonia, Argentina.

Especie	Hospedante				
	<i>Nothofagus antarctica</i>	<i>Nothofagus dombeyi</i>	<i>Nothofagus pumilio</i>	<i>Lophozonia obliqua</i>	<i>Lophozonia alpina</i>
<i>F. antarctica</i>	13	43	4	-	-
<i>F. endoxantha</i>	-	-	-	6	7
<i>F. pumiliae</i>	-	-	24	-	-



**Fig. 17** - Porcentaje de ocurrencia de las especies *Fistulina antarctica* (A) y *F. endoxantha* (B) en los diferentes hospedantes.

En cuanto a los estudios de cultivos puros, el micelio de las especies de *Fistulina* de la Patagonia está compuesto por hifas delgadas, escasamente ramificadas, regularmente septadas e incoloras, con presencia de clamidosporas, en acuerdo con descripciones previas (Wright y Deschamps 1972; Rajchenberg y Greslebin 1995). *Fistulina pumiliae*, en particular, presenta (a) hifas generativas con fíbulas de hasta 9  $\mu\text{m}$  de diámetro, (b) hifas vacuoladas a veces con ramas digitiformes y (c) hifas ensanchadas con septos simples, de hasta 14  $\mu\text{m}$  de diámetro, observadas solo en el micelio sumergido (Fig. 6). No se encontraron características culturales distintivas entre las tres taxas patagónicas.

## Discusión

En este estudio se presentan características morfológicas, características de cultivo, asociaciones de hospedadores y análisis filogenético de especímenes de *Fistulina* de la Patagonia, y se propone una nueva especie. El árbol filogenético inferido a partir del conjunto combinado de secuencias mostró que *F. pumiliae* formaba una especie distinta, en el núcleo "*Fistulina* s.s.", con un fuerte respaldo. Se demostró que las especies pertenecientes al hemisferio sur están estrechamente relacionadas y se agrupan en una línea monofilética fuertemente respaldada. *Fistulina pumiliae* se agrupó como un linaje hermano de *F. antarctica* y *F. tasmanica*. Esto refleja una mayor relación biogeográfica de la Patagonia con Australia, Nueva Zelanda, Nueva Guinea y Nueva Caledonia, que con el resto del continente americano (Crisci *et al.* 1991; Rajchenberg 2006) y evidencia una biota sureña particular. A futuro sería útil incorporar colecciones de *Fistulina* de otras áreas que permitan hacer una revisión general del género, especialmente de Australia, e incluir en caso de ser posible el estudio de los materiales tipo no estudiados, con comparaciones morfológicas y de secuencias de ADN.

En nuestras inferencias filogenéticas, se demostró que *F. pallida* (CBS 508 63) es coespecífica con *Pseudofistulina radicata* (G1080). Esta última se describió como *F. radicata* y, años más tarde, Fidalgo & Fidalgo (1958) la describieron como *F. brasilensis* en Brasil. Posteriormente, la transfirieron al nuevo género *Pseudofistulina* (Fidalgo & Fidalgo 1962), lo cual fue aceptado por Burdsall (1971). *Fistulina spiculifera* de Australia parece tener esporas más largas y estrechas que *F. hepatica* (Reid 1963), pero sin secuencias de ADN disponibles, no se pueden realizar caracterizaciones moleculares. Reid (1963) señaló que esta especie está más relacionada con *F. hepatica* que con las otras especies sudamericanas.

Según Song *et al.* (2015), *Fistulina* se caracteriza morfológicamente por un hábito de crecimiento anual, superficie del píleo color rojizo a castaño, tubos libres pero estrechamente agrupados, un sistema hifal monomítico y basidiosporas ovoides. Además, nuestros resultados muestran que presenta una gran variabilidad macro-morfológica, con basidiomas que varían ampliamente en color y tamaño. Las especies sudamericanas parecen adquirir tamaños más grandes, pudiendo alcanzar los 30 cm de diámetro. Esta característica es un

atributo interesante considerando su comestibilidad y merece futuros estudios. Otra característica distintiva de las especies sudamericanas es el color de las paredes de las esporas, que varía desde incoloro hasta amarillento o castaño, un rasgo no encontrado en otras especies del género, y sus paredes gruesas, una característica que contrasta con el tipo genérico *F. hepatica*.

El estudio de las microestructuras de las especies de *Fistulina* se realizó tradicionalmente en basidiomas herborizados (Wright 1961; Fidalgo y Fidalgo 1962; Reid 1963; Brusis 1972; Song *et al.* 2015; Sun *et al.* 2019). En contraste, los cultivos puros han sido escasamente analizados, con estudios restringidos solo a especies patagónicas (Wright y Deschamps 1972; Rajchenberg y Greslebin 1995; Rajchenberg 2006; Toledo & Barroetaveña 2017). Teniendo en cuenta su comestibilidad y el potencial de ser domesticadas para la producción, los estudios de cultivo ofrecen información básica sobre la tasa de crecimiento vegetativo, la temperatura de crecimiento óptima y la morfología de la cepa, necesaria para la selección de cepas productivas (Gaitán-Hernández & Rodríguez 2008; Bran *et al.* 2009; Suárez y Holguín 2011; León-Avendaño *et al.* 2013; Toledo & Barroetaveña 2017; Ye *et al.* 2019). En cuanto a otras especies del género, *F. hepatica* se reconoce principalmente por una superficie de píleo de color marrón rosado a marrón más rojizo o marrón purpúreo y basidiosporas más pequeñas y de pared delgada que cualquier otra especie descrita de *Fistulina* (Wright 1961; Brusis 1972; Song *et al.* 2015). Geográficamente, *F. hepatica* se encuentra en las regiones templadas de Europa y América del Norte y Central, generalmente asociada a árboles vivos de *Castanea* y *Quercus* (Brusis 1972; Song *et al.* 2015; Sun *et al.* 2019). Reid (1963) describió *F. spiculifera* en Victoria, Australia, caracterizada por una superficie de píleo cubierta con espículas cortas y dispersas. Esta característica es similar a las "escamas" presentes en *F. pumiliae*; sin embargo, *F. spiculifera* se caracteriza por su píleo ungulado o aplanado de hasta 3 cm y esporas elípticas (Reid 1963; Cunningham 1965; Sun *et al.* 2019).

La especie *F. guzmanii* descrita por Brusis (1972) sobre *Mimosa galeottii* Benth. en México, difiere en varias características de *F. hepatica*, como el color del himenio, que es de color rojo brillante o púrpura-rojo; un tamaño más pequeño y el hospedero y hábitat. Se describieron dos especies más: *F. rosea* (1856) y *F. africana* (1928), aunque con descripciones incompletas y sin registros

posteriores, excepto en Gryzenhout (2010) donde *F. africana* se describe brevemente. La posición filogenética y la validez taxonómica de *Fistulina africana*, *F. rosea*, *F. spiculifera* y *F. guzmanii* aún deben aclararse.

Estudios recientes basados en análisis filogenéticos del conjunto de datos combinados ITS + LSU describieron dos nuevas especies de *Fistulina*. *F. subhepatica* de China, en árboles muertos de *Lithocarpus* (Fagaceae) (Song *et al.* 2015), y *F. tasmanica* de Tasmania, Australia, en troncos muertos de *Eucalyptus* vivos (Sun *et al.* 2019). *Fistulina subhepatica* es morfológicamente similar a *F. hepatica*; sin embargo, difiere de esta última al tener basidiosporas más grandes, fíbulas e hifas generativas del contexto de pared delgada (Núñez y Ryvarden 2001; Song *et al.* 2015). *Fistulina tasmanica* se distingue por la forma de ostra a forma de abanico de sus basidiomas, la superficie del himenio rosada cuando está fresca, poros pequeños (6–7 poros/mm) y un sistema hifal monomítico con hifas generativas fibuladas (Sun *et al.* 2019).

En relación con los hospedantes, la familia *Nothofagaceae* es una de las más interesantes dentro del orden Fagales debido a la distribución austral de las especies vivas y a los extensos restos fósiles (Ancibor 1991; Hill 1992; Hill y Jordan 1993; Hill 2001; Torres *et al.* 2009; Vento y Agraín 2018). Debido a ello, las implicaciones biogeográficas y sistemáticas se revisan continuamente para comprender su evolución y patrones de distribución. Desde 1991, las evidencias acumuladas respaldan el reconocimiento de cuatro géneros dentro de *Nothofagaceae*: *Lophozonia*, *Fuscospora*, *Brassospora* y *Nothofagus* (Hill y Read 1991; Manos 1997; Setoguchi *et al.* 1997; Heenan y Smitsen 2013). Vento y Agraín (2018) mostraron que *Lophozonia* en América del Sur podría ser un representante más antiguo y un grupo hermano de los géneros restantes de *Nothofagus*. Nuestros resultados mostraron que la línea de *F. endoxantha* es un grupo hermano al resto de las especies de *Fistulina* del hemisferio sur (Fig. 2). Estos resultados son congruentes, lo que podría indicar una asociación antigua y coevolución tanto del hospedante como de las especies degradadoras.

#### Notas sobre las especies de *Fistulina* en la Patagonia

El color de los basidiomas es una característica distintiva para las especies de *Fistulina* en la Patagonia que facilita una identificación segura en el campo. Características microscópicas como el tamaño y el color de las basidiosporas y la forma de los elementos cistidioides también son muy útiles y distintivas. En

cuanto a la variabilidad morfológica que caracteriza al género (Wright 1961), nuestros resultados muestran una gran plasticidad morfológica, especialmente para *F. antarctica*. Los basidiomas pueden presentar formas dimidiadas, dimidiado-flabeladas o unguladas (Rajchenberg 2006), algunos alcanzando hasta 36 cm de diámetro. También se han encontrado variaciones en la morfología del estípite, desde un pseudopié más o menos desarrollado hasta totalmente ausente. Además, observamos que *F. antarctica* tiene poros que son primero de color rojizo o rosa en especímenes jóvenes, volviéndose amarillentos pálidos o de color crema a medida que maduran; en *F. pumiliae* y *F. endoxantha*, este rasgo no presenta grandes variaciones a lo largo del desarrollo del basidioma. Ocasionalmente, se encuentran basidiomas de *F. antarctica* cubiertos por una sustancia gelatinosa o viscosa. Dado que todas estas variaciones fenotípicas también se han detectado entre colecciones tomadas del mismo hospedante, posibles razones relacionadas que deberían confirmarse podrían ser: (1) parte del hospedante donde se desarrollan los basidiomas (fuste/raíz); (2) estado del hospedante (vivo/muerto/tocón); (3) condiciones del sitio (humedad, altitud, cobertura del dosel). Numerosas investigaciones han informado sobre la plasticidad fenotípica tanto en caracteres micro- como macro-morfológicos de especies sudamericanas. Tal es el caso de *Ganoderma lucidum*, estudiada por Gottlieb y Wright (1999) donde se observó que las características morfológicas y de cultivo eran altamente variables. Del mismo modo, Peabody *et al.* (2003) sugirieron que factores ambientales (temperaturas, ph y hospedante) podrían estar implicados en la determinación de la variabilidad del número, tamaño y forma de los basidiomas de *Armillaria gallica*. Otros estudios han demostrado que la pendiente, la orientación y los tipos de vegetación afectan en gran medida la plasticidad fenotípica en *Thelephora* sp. (Ramírez-López *et al.* 2013).

*Fistulina antarctica* se encontró creciendo en el tallo y las raíces de tres especies de *Nothofagus*: *N. dombeyi*, *N. antarctica* y *N. pumilio*. *Nothofagus antarctica* es la especie sudamericana de *Nothofagus* con la mayor variación morfológica y la mayor tolerancia ecológica (Ramírez *et al.* 1985; Veblen *et al.* 1996; Donoso *et al.* 2006; Peri *et al.* 2013). Esta variación también se observó en las fructificaciones de *F. antarctica* asociadas a ella, mostrando variabilidad en el color, tamaño, forma y aspecto general del himenio. Los basidiomas de *Fistulina antarctica* asociados a *N. dombeyi* generalmente presentaban una capa gelatinosa en la

superficie y un alto contenido de agua. Los basidiomas de *Fistulina endoxantha* se encontraron en árboles vivos de *L. alpina* y *L. obliqua*, siguiendo la distribución geográfica de sus hospedantes, restringida al norte de la Patagonia (Sabatier *et al.* 2011). *Fistulina pumiliae* solo se encontró en tallos de árboles vivos de *N. pumilio*. Los resultados de este estudio muestran que *F. antarctica* es la especie más variable fenotípicamente, sugiriendo que esto está vinculado con sus amplias asociaciones de hospedantes y la fructificación en una amplia gama de ambientes.

Numerosos estudios han informado sobre el alto valor nutricional (abundancia de proteínas, carbohidratos, minerales esenciales) de los hongos silvestres comestibles (Diez y Álvarez 2001; Ouzouni y Riganakos 2007; Barros *et al.* 2008; Kalač 2009; Kalač 2013; Wang *et al.* 2014). Esto también se ha encontrado en especies comestibles silvestres de la Patagonia, incluidas las especies de *Fistulina* (Toledo *et al.* 2016; Rugolo *et al.* 2023). Sin embargo, sería necesario evaluar características que otorguen una mayor aceptación, como las propiedades sensoriales de los basidiomas (color, sabor, textura y aromas). Claramente, *F. antarctica* podría ser una especie interesante como recurso comestible, especialmente por habitar varios hospedantes y debido a su alta frecuencia de fructificación (Toledo *et al.* 2014; Barroetaveña y Toledo 2016; Molina *et al.* 2020). En vista de lo anterior, la información taxonómica y ecológica de estas especies puede sentar las bases para desarrollar opciones de manejo micosilvícola para aumentar su productividad en bosques naturales, junto con protocolos de domesticación para cultivar estos hongos en troncos o sustratos a base de madera en interiores. Después de un cultivo exitoso, este grupo de hongos podría producirse como un producto gourmet único de los bosques patagónicos.

### Conclusiones

- La nueva especie descrita, *F. pumiliae*, se asocia exclusivamente con *Nothofagus pumilio*. Esta nueva especie se distingue por sus basidiomas de color ocre a marrón y esporas más grandes en comparación con otras especies dentro del género.
- Se confirma la existencia de tres linajes de *Fistulina* en Patagonia Argentina: *F. antarctica*, *F. endoxantha* y la nueva especie *F. pumiliae*.

Estas tres especies se agruparon filogenéticamente con otras especies pertenecientes al hemisferio sur.

- Se encontró que *F. antarctica* es la especie más polífaga, creciendo sobre tres especies de *Nothofagus* (*N. dombeyi*, *N. antarctica*, *N. pumilio*), mientras que *F. endoxantha* se asocia con *Lophozonia alpina* y *L. obliqua* y *F. pumiliae* exclusivamente con *N. pumilio*.
- Se propone que la asociación antigua entre *Fistulina* y sus hospedantes Nothofagaceae en el hemisferio sur podría indicar un proceso de co-evolución entre estos hongos y sus hospedantes.
- La clave dicotómica generada de características macro y micromorfológicas permite identificar a todas las especies aceptadas de *Fistulina* en los hemisferios norte y sur.

## CAPÍTULO 2: ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y MORFOLÓGICO DEL GÉNERO *RAMARIA*

## CAPÍTULO 2. Análisis filogenético y morfológico del género *Ramaria*.

### Resumen del capítulo

Dentro de la amplia diversidad de especies fúngicas de los bosques Andino Patagónicos, las especies de *Ramaria sensu lato* son algunas de las más atractivas debido a sus basidiomas de tamaño medio y coloridos con forma de coral. El género fue reconocido como parafilético y actualmente se divide en cuatro subgéneros: *Ramaria*, *Laeticolora*, *Lentoramaria* y *Echinoramaria*. En la Patagonia (Argentina y Chile), se han reportado 18 especies de *Ramaria* asociadas con Nothofagaceae; sin embargo, su diversidad y relaciones filogenéticas son en gran medida desconocidas. Este estudio presenta un relato detallado de *Ramaria* en la Patagonia, basado en un análisis integrador de características filogenéticas, macro y micro morfológicas. Se analizaron los genes espaciador interno transcrito (ITS) y ADN ribosomal 28S nuclear (LSU) para identificar especímenes de Argentina y examinar sus relaciones filogenéticas con otras especies de *Ramaria*. Los análisis filogenéticos revelaron seis especies de *Ramaria* en la Patagonia Argentina: *R. patagonica*, *R. botrytis*, *R. inedulis*, *R. paraconcolor* y dos nuevos grupos filogenéticos propuestos como nuevas especies a partir de nuestros resultados: *R. flavinedulis* y *R. dendrophora*. *Ramaria flavinedulis* produce basidiomas de color amarillo brillante o amarillo anaranjado con un estipe compuesto fusionado y retorcido, basidios simples-septados y basidiosporas elipsoides a cilíndricas. *Ramaria dendrophora* presenta basidiomas de color amarillo pálido a rosa pálido y basidiosporas ornamentadas con verrugas conspicuas e irregulares. Este estudio aumentó el conocimiento sobre la diversidad filogenética y la taxonomía de *Ramaria* en los bosques de los Andes de la Patagonia en comparación con lo encontrado en otras regiones.

Palabras clave: changles · Gomphales · Nothofagaceae · Sudamérica · dos nuevos taxones

### Introducción

*Ramaria* Fr. ex Bonord. (Gomphaceae, Gomphales) es un género de basidiomicetos no lamelares y ampliamente distribuido (Marr y Stuntz 1973; Petersen 1981; Humpert *et al.* 2001), que incluye un notable número de especies con diferentes estilos de vida. Se ha confirmado que muchas especies son ectomicorrícicas, y se ha sugerido que esto es compartido por todas las especies

terricolas de *Ramaria* (Humpert *et al.* 2001). Otras especies son saprófitas, lignícolas o húmicas (Marr y Stuntz 1973; Exeter *et al.* 2006). Inicialmente, *Ramaria* fue tratada como un subgénero dentro de *Clavaria* Vaill. Ex. L. (Coker 1923; Doty 1944) hasta que Corner (1970) la elevó al rango de género. Con más de 230 especies descritas en todo el mundo, es el género más diverso dentro de los Gomphales, siendo *R. botrytis* (Pers.) Ricken la especie tipo.

Diferentes estudios basados en datos morfológicos y moleculares (Humpert *et al.* 2001; Hosaka *et al.* 2006; Giachini *et al.* 2010) coinciden en el estado parafilético de *Ramaria*. Además, sus caracteres macro y micro morfológicos son tan variables que las especies no pueden diferenciarse fácilmente sólo en función de los caracteres morfológicos (Nouhra *et al.* 2005). Sin embargo, el género comparte las siguientes características típicas: basidiomas altamente ramificados; sistemas hifales mono a dimiticos con hifas generativas con fíbulas o septos simples. Las hifas son en su mayoría gutuladas, y las basidiosporas son de color amarillo a ocráceo o marrón con paredes lisas o con ornamentación equinulada, verrucosa-reticulada o estriada (Corner 1950; Marr & Stuntz 1973; Petersen 1981; Humpert *et al.* 2001). Actualmente, el género se divide en cuatro subgéneros (Marr & Stuntz 1973; Exeter *et al.* 2006; Humpert *et al.* 2001; Knudson 2012): (I) *Ramaria* subg. *Ramaria*, (II) *Ramaria* subg. *Laeticolora* Marr y D.E. Stuntz, (III) *Ramaria* subg. *Lentoramaria* Corner, y (IV) *Ramaria* subg. *Echinoramaria* Corner (Marr & Stuntz 1973; Humpert *et al.* 2001; Exeter *et al.* 2006; Hanif *et al.* 2019). *Ramaria* subg. *Ramaria* incluye especies con basidiomas grandes que crecen en el suelo, a menudo con apariencia de coliflor, hifas generativas con fíbulas y esporas estriadas (Humpert *et al.* 2001; Knudson 2012). *Laeticolora* es el subgénero más significativo y complejo (Exeter *et al.* 2006), también con cuerpos fructíferos grandes y terrícolas, pero con o sin hifas con fíbulas y esporas lisas o verrugosas (Corner 1950; Humpert *et al.* 2001; Knudson 2012). Las especies de ambos subgéneros a menudo tienen basidiomas de colores brillantes (Exeter *et al.* 2006). Las especies de *Lentoramaria* crecen en madera en descomposición y tienen ornamentación esporal lisa o verrucosa y las hifas generativas fibuladas. El subgénero *Echinoramaria* es el más fácilmente distinguible debido a la ornamentación espinosa de las esporas, siempre presenta hifas generativas con fíbulas y basidiomas relativamente pequeños (Humpert *et al.* 2001). Los cuerpos

fructíferos de *Lentoramaria* y *Echinoramaria* tienen colores neutrales, entre castaño y crema (Exeter *et al.* 2006).

En la Patagonia (Argentina y Chile), se ha informado que *Ramaria* está asociada con Nothofagaceae (Spegazzini 1921, Singer 1969, Barroetaveña *et al.* 2019), pero su diversidad y relaciones filogenéticas son en gran medida desconocidas.

**Tabla 3 - Especies de *Ramaria* registradas para Patagonia.**

<b>Especie</b>	<b>sinónimos</b>	<b>Hábitat</b>	<b>Distribución</b>	<b>Comestibilidad</b>	<b>Referencia</b>
<i>R. stricta</i>		madera	Distribución mundial	no comestible	Singer 1969
<i>R. flava</i>	<i>Clavaria flava</i> var. <i>chilensis</i> Speg.	-	de chillán hasta Aysén, CHILE	comestible	Spegazzini 1987 Lazo 2001
<i>R. flaccida</i>	-	suelo	Chile central, Argentina	no comestible tóxica	Lazo 2001
<i>R. aurea</i>	-	suelo	Magallanes, Chile	no comestible	Minter y Lopez 2006
<i>R. aurantiaca</i>	-	suelo	-	comestible	Singer 1969
<i>R. subaurantiaca</i>	-	suelo, raíces	amplia, Chile y Argentina austral	no comestible	Singer 1969 Lazo 2001
<i>R. holorubella</i>	-	-	Sudamérica	-	Singer 1969
<i>R. flavobrunnescens</i>	-	-	Distribución mundial	no comestible tóxica	Singer 1969
<i>R. zipelli</i>	-	suelo	-	no comestible	Singer 1969
<i>R. strasseri</i>	-	-	Neuquén, Argentina	-	Singer 1969
<i>R. subtilis</i>	-	suelo	Distribución mundial	no comestible	Singer 1969
<i>R. moelleriana</i>	-	madera semipodrida	Amplia, Chile central y austral, Argentina	no comestible	Lazo 2001
<i>R. obtusissima</i>	-	-	-	no comestible	-
<i>R. acutissima</i>		suelo	Región de los Ríos, Chile	-	Minter y López 2006
<i>R. botrytis</i>	-	-	Distribución mundial	comestible	
<i>R. valdiviana</i>	-	suelo	Valdivia	comestible	Singer 1969
<i>R. patagonica</i>	-	suelo	Chubut, Río Negro, Neuquén, Tierra del Fuego	comestible	Gamundi & Horak 1993
<i>R. inedulis</i>	<i>R. holorubella</i>	suelo	Río Negro, Argentina	no comestible	Singer 1969

Actualmente, se informan 18 especies para la región (Tabla 3): *R. stricta* (Pers.) Quél., *R. flava* (Schaeff.) Quél., *R. flaccida* (Fr.) Bourdot, *R. aurea* (Schaeff.) Quél., *R. aurantiaca* Corner, *R. subaurantiaca* Corner, *R. holorubella* (G.F. Atk.) Corner, *R. flavobrunnescens* (G.F. Atk.) Corner, *R. zipelli* (Lév.) Corner, *R. strasserii* (Bres.) Corner, *R. subtilis* (Coker) Schild, *R. moelleriana* (Bres. & Roum.) Corner, *R. obtusissima* (Peck) Corner, *R. acutissima* (Berk.) Corner, *R. botrytis* (Pers.) Ricken, *R. valdiviana* Singer, *R. patagonica* (Speg.) Corner y *R. inedulis* Singer, las últimas tres consideradas endémicas. *Ramaria patagonica*, tradicionalmente llamada "changle", es muy apreciada por las comunidades locales debido a su sabor y textura (Molares *et al.* 2019). Estudios bioquímicos han revelado su alto contenido de proteínas y carbohidratos, junto con una alta actividad antioxidante, destacando su potencial como alimento funcional y fuente de compuestos bioactivos (Toledo *et al.* 2016; Rugolo *et al.* 2022).

Dada la comestibilidad de varias especies de *Ramaria*, el análisis de su variabilidad morfológica y filogenética intraespecífica en los bosques andinopatagónicos de Argentina constituye una contribución importante para su correcta identificación, uso y propiedades asociadas.

### Objetivos

- **Prospectar y recolectar ejemplares de *Ramaria* spp. cubriendo la diversidad morfológica, de sustratos y ambientes dentro de su distribución en la Patagonia.**
- **Realizar un análisis macro y micro morfológico que permita caracterizar las colectas obtenidas y realizar descripciones completas.**
- **Analizar la posición taxonómica de las especies detectadas en patagonia que incluya un análisis filogenético del género completo abordado en conjunto con las características morfológicas.**

### Hipótesis

H1 La diversidad morfológica de *Ramaria* en la Patagonia está subestimada y una prospección exhaustiva revelará la existencia de especies no descritas previamente.

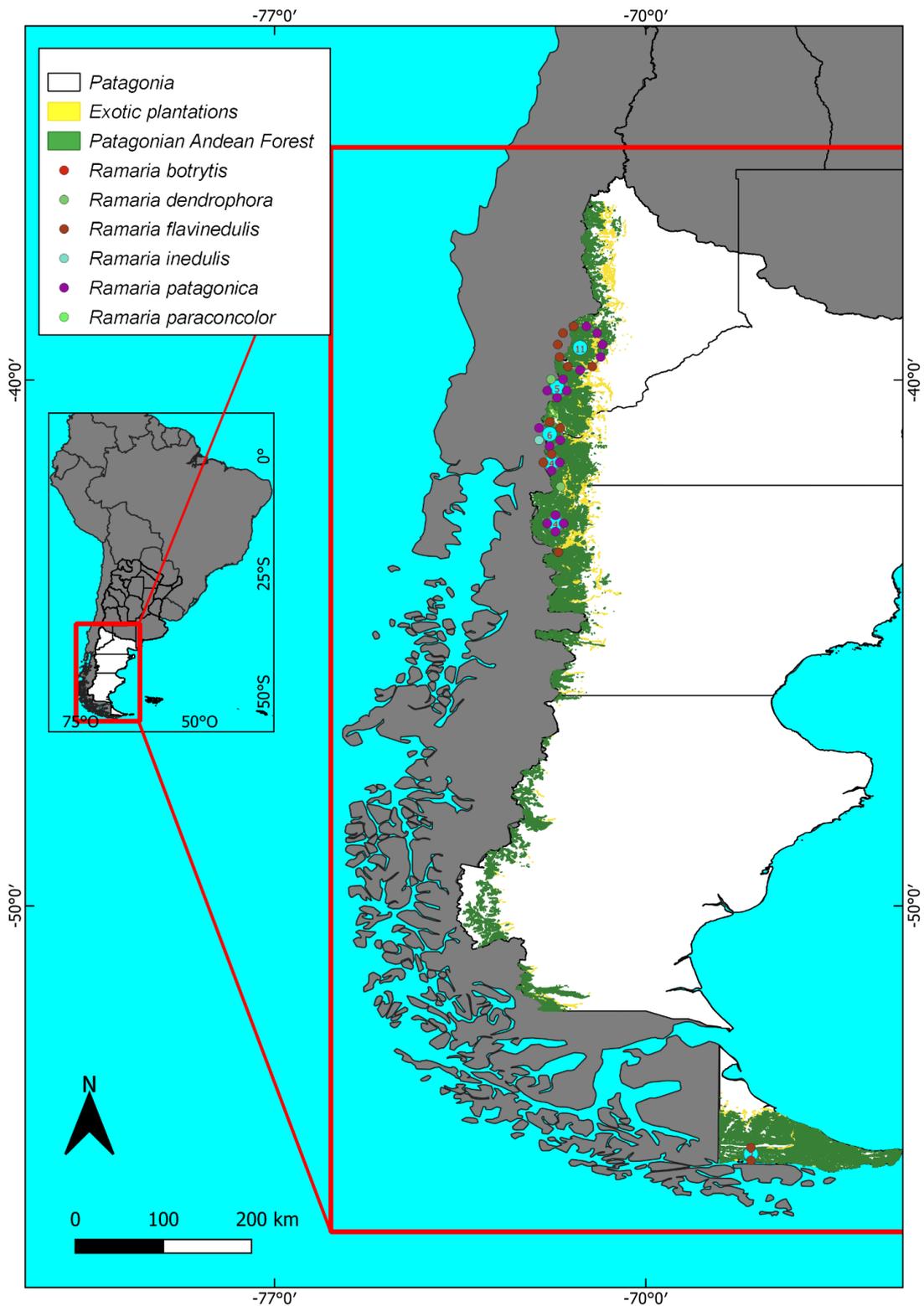
H2 Las características macro y micro-morfológicas de *Ramaria* en la Patagonia mostrarán una variabilidad significativa que permitirá la identificación de nuevas especies.

H3 Las especies de *Ramaria* recolectadas en la Patagonia podrían formar clados monofiléticos definidos, permitiendo esclarecer la relación evolutiva entre las especies locales y las de otras regiones del mundo.

## Materiales y métodos

### Especímenes estudiados

Se recolectaron un total de 48 basidiomas de *Ramaria* spp. durante el otoño de 2019 y 2020 en las provincias patagónicas de Chubut, Río Negro, Neuquén y Tierra del Fuego (Fig. 18), siendo todos referenciados con GPS y registrados en permisos de captura emitidos por las autoridades correspondientes. La mayoría de los especímenes fueron fotografiados *in situ* o en el laboratorio mientras estaban frescos. Cada sitio de recolección fue caracterizado por las especies dominantes de árboles circundantes (Fig. 19). Los basidiomas fueron secados al aire para análisis posteriores y las colecciones de referencia se depositaron en el Herbario del Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico (HCFC; Thiers, actualizado continuamente).



**Fig. 18** - Área de estudio en el sur de Argentina. Mapa que muestra los tipos de bosques de donde provienen los especímenes.



**Fig. 19** - Sitios de aparición de basidiomas de *Ramaria* spp.

#### Estudios morfológicos

Los especímenes examinados se presentan en la Tabla 4, incluyendo aquellos del herbario del Instituto de Botánica Carlos Spegazzini (LPS) y el Herbario de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (BAFC). Se registraron la morfología (estípite, tipo de ramificación y ápice), color, tamaño y forma, junto con la reacción positiva al sulfato férrico (FSW) en las superficies himeniales (Exeter *et al.* 2006). Se registraron la forma y el tamaño de las basidiosporas y basidios, así como la presencia/ausencia de fíbulas. Las mediciones de las basidiosporas se expresan como  $L \times W$  ( $L$  = longitud media de las basidiosporas como el promedio aritmético de todas las basidiosporas  $\pm$  SD,  $W$  = ancho medio de las esporas como el promedio aritmético de todas las basidiosporas  $\pm$  SD),  $Q$  como la variación media en las relaciones  $L/W$  entre los especímenes estudiados y  $n/s$  = número de basidiosporas medidas de un número dado de especímenes. Además, se obtuvieron micrografías de SEM utilizando un microscopio electrónico de barrido (FEI Quanta 200) en el Laboratorio de Caracterización de Materiales del Instituto Balseiro (San Carlos de Bariloche, Argentina).

**Tabla 4** - Lista de especímenes de *Ramaria* analizados morfológicamente, que incluye el recolector, país de origen, año de recolección, número de voucher del herbario y número de Genbank para las secuencias generadas en este estudio.

<b>Taxon</b>	<b>Colector</b>	<b>Origen</b>	<b>Año</b>	<b>voucher</b>
<i>R. patagonica</i>	G. González & M. Rugolo	Argentina, PNLA	2019	GM19016 (HCFC 5584)
<i>R. patagonica</i>	G. González & M. Rugolo	Argentina, PNLA	2019	GM19017 (HCFC 5585)
<i>R. patagonica</i>	G. González & M. Rugolo	Argentina, PNLA	2019	GM19026 (HCFC 5586)
<i>R. patagonica</i>	G. González & M. Rugolo	Argentina, PNLA	2019	GM19030 (HCFC 5587)
<i>R. patagonica</i>	G. González & M. Rugolo	Argentina, PNLA	2019	GM19032 (HCFC 5588)
<i>R. patagonica</i>	G. González & M. Rugolo	Arg, PNNH	2019	GM19042 (HCFC 5589)
<i>R. patagonica</i>	G. González & M. Rugolo	Argentina, PNLA	2019	GM19064 (HCFC 5590)
<i>R. patagonica</i>	G. González	Argentina, PNL	2019	GM19087 (HCFC 5591)
<i>R. patagonica</i>	G. González	Argentina, PNL	2019	GM19084 (HCFC 5592)
<i>R. patagonica</i>	G. González	Argentina, PNL	2019	GM19095 (HCFC 5593)
<i>R. patagonica</i>	G. González	Argentina, PNL	2019	GM19085 (HCFC 5594)
<i>R. patagonica</i>	G. González	Argentina, PNL	2019	GM19088 (HCFC 5595)
<i>R. patagonica</i>	G. González	Argentina, PNL	2019	GM19102 (HCFC 5596)
<i>R. patagonica</i>	G. González	Argentina, PNL	2019	GM19103 (HCFC 5597)
<i>R. patagonica</i>	G. González	Argentina, PNL	2019	GM19104 (HCFC 5598)
<i>R. patagonica</i>	G. González	Argentina, PNL	2019	GM19106 (HCFC 5599)
<i>R. patagonica</i>	C. Toledo	Chile	2013	403 (HCFC 5600)
<i>R. patagonica</i>	M. Rajchenberg	Chile, Collao	2019	12659 (HCFC 5601)
<i>R. patagonica</i>	M. Rajchenberg	Chile, Collao	2019	12645 (HCFC 5602)
<i>R. patagonica</i>	M. Rajchenberg	Chile, Collao	2019	12647 (HCFC 5603)

<i>R. patagonica</i>	G. González	Arg, PNNH	2019	GM19129 (HCFC 5605)
<i>R. patagonica</i> (co-type)	Spegazzini	Argentina, Ush	1951	LPS 2235
<i>R. flavinedulis</i>	G. González & M. Rugolo	Arg, PNNH	2019	GM19035 (HCFC 5604)
<i>R. flavinedulis</i>	G. González	Argentina, PNL	2019	GM19111 (HCFC 5606)
<i>R. flavinedulis</i>	G. González	Argentina, PNL	2019	GM19112 (HCFC 5607)
<i>R. flavinedulis</i>	G. González	Argentina, PNL	2019	GM19113 (HCFC 5608)
<i>R. flavinedulis</i>	G. González	Argentina, PNL	2019	GM19114 (HCFC 5609)
<i>R. flavinedulis</i>	G. González	Argentina, PNL	2019	GM19117 (HCFC 5610)
<i>R. flavinedulis</i>	M. Rajchenberg	Chile, Collao	2019	12649 (HCFC 5611)
<i>R. flavinedulis</i>	G. González	Arg, PNNH	2019	GM19125 (HCFC 5612)
<i>R. flavinedulis</i>	G. González	Arg, PNNH	2019	GM19126 (HCFC 5613)
<i>R. flavinedulis</i>	G. González	Argentina, TDF	2019	1U (HCFC 5614)
<i>R. flavinedulis</i>	G. González	Argentina, TDF	2019	3U (HCFC 5615)
<i>R. dendrophora</i>	M. Rugolo	Argentina, PNL	2020	GG20020 (HCFC 5616)
<i>R. dendrophora</i>	G. González	Argentina, PNL	2019	GM19094 (HCFC 5617)
<i>R. botrytis</i>	G. González & M. Rugolo	Argentina, PNLA	2019	GM19013 (HCFC 5618)
<i>R. botrytis</i>	G. González & M. Rugolo	Argentina, PNLA	2019	GM19020 (HCFC 5619)
<i>R. botrytis</i>	G. González & M. Rugolo	Arg, PNNH	2019	GM19044 (HCFC 5620)
<i>R. botrytis</i>	G. González & M. Rugolo	Arg, PNNH	2019	GM19046 (HCFC 5621)
<i>R. botrytis</i>	G. González	Arg, PNNH	2019	GM19124 (HCFC 5622)
<i>R. botrytis</i>	G. González	Arg, PNNH	2019	GM19127 (HCFC 5623)
<i>R. botrytis</i>	M. Rajchenberg	Chile, Collao	2019	12646 (HCFC 5624)

<i>R. inedulís</i>	G. González & M. Rugolo	Arg, PNNH	2019	GM19047 (HCFC 5625)
<i>R. inedulís</i>	M. Rajchenberg	Chile, Collao	2019	12648 (HCFC 5626)
<i>R. inedulís</i>	Singer	Arg, PNNH	1969	BAFC 50087
<i>R. paraconcolor</i>	G. González	Argentina, PNL	2019	GM19082 (HCFC 5627)
<i>R. paraconcolor</i>	G. González	Argentina, PNLA	2022	GG22001 (HCFC 5628)
<i>R. paraconcolor</i>	G. González	Argentina, PNLA	2022	GG22002 (HCFC 5629)

PNL: Parque Nacional Lanín; PNNH: Parque Nacional Nahuel Huapi; PNLP: Parque Nacional Lago P Los Alerces National Park.

#### Extracción de ADN, condiciones de PCR y secuenciación

La extracción de ADN se realizó siguiendo un protocolo de extracción de CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) de Doyle (1991). Los pellets de ADN se secaron al aire y se resuspendieron en 70 µL de agua ultrapura. La integridad del ADN se examinó en geles de agarosa al 0,8%. Se analizaron dos regiones genéticas: los pares de cebadores LR0R-LR7 (Vilgalys y Hester, 1990) e ITS1-ITS4 (Gardes y Bruns, 1993) se utilizaron para amplificar la región parcial del rDNA 28S y la región completa ITS, respectivamente. Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la amplificación de ambas regiones incluyeron 12,5 µL de MasterMix (Promega, Madison, Wisconsin), 0,5 µL de cada cebador (10 µM) y 1 µL de ADN molde, completando el volumen con agua destilada esterilizada. El volumen final de la reacción fue de 25 µL. La PCR se llevó a cabo en un termociclador (MyCycler™, BioRad) siguiendo los métodos de Dutta *et al.* (2015) para la región ITS que consiste en: un paso de desnaturalización inicial de 94°C (4 min); luego una repetición de 35 ciclos que incluyeron un paso de desnaturalización de 94 °C (1 min), 56 °C (1 min) y un paso de elongación a 72 °C (1 min); y por último, un paso final de elongación a 72 °C (7 min). En el caso de la región LSU se siguió el protocolo de ciclado propuesto por Humpert *et al.* (2001) que consiste en: un paso de desnaturalización inicial de 94 °C (1 min), luego una repetición de 34 ciclos que incluyeron un paso de desnaturalización de 94 °C (1 min), 45 °C (1 min) y un paso de elongación a 72 °C (1 min) y por último, un paso final de elongación a 72 °C (5 min).

Para verificar la concentración de los productos de PCR, se utilizó una placa Multiskan™ SkyHigh µDrop (Thermo Fisher Scientific, EE. UU). Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados por MacroGen Corporation (Seúl, Corea). Los datos de secuencia generados en este estudio fueron editados manualmente con MEGA X (Kumar *et al.* 2018), y se obtuvieron secuencias adicionales de GenBank. Todas las secuencias analizadas en este estudio se depositaron en GenBank (Tabla 5).

**Table 5** - Especímenes de *Gomphales* utilizados en los análisis filogenéticos, que incluyen números de voucher del herbario, país de origen y números de acceso al GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

Especie	voucher	Origen	N° acceso GENBANK		
			ITS	LSU	ITS+LSU
<i>Clavariadelphus mucronatus</i>	OSC_1064138	USA	-	-	EU526000
<i>Clavariadelphus pistillaris</i>	AR09762	Mexico	-	-	KT874979
<i>Gallacea eburnea</i>	PDD:95772	New Zealand			HQ533040
<i>Ganoderma resinaceum</i>	C45	China	KX371982	-	-
<i>Gautieria caudata</i>	OSC41323S	USA	AF377057	-	-
<i>Gautieria graveolens</i>	16988	Italy	-	-	JF908017
<i>Gautieria parksiana</i>	SNF236USA	USA	AF377059	-	-
<i>Gloeocantharellus aculeatus</i>	FLOR_47977	Brazil	-	-	KU884895
<i>Gloeocantharellus echinosporus</i>	CGE_16041	Solomon Islands	-	-	KU884899
<i>Gomphus clavatus</i>	MA-Fungi 48085	Spain	AJ292292	-	-

<i>Gomphus ludovicianus</i>	TFB14476	USA	-	-	KJ655570
<i>Hysterangium setchellii</i>	29.3	USA	-	-	DQ365634
<i>Kavinia alboviridis</i>	CFMR:DLL2011 -131	USA	KJ140634	-	-
<i>Kavinia himantia</i>	CFMR:DLL2011 -079	USA	KJ140598	-	-
<i>Lactarius</i> sp.	PDD:113066	New Zealand	-	-	MW68386 4
<i>Lentaria byssiseda</i>	TENN61159	USA	-	-	FJ596788
<i>Lentaria micheneri</i>	RRD6 (TENN)	USA	-	-	MF773634
<i>Phaeoclavulina argentea</i>	AGK_042	USA	-	-	JQ408234
<i>Ramaria abetonensis</i>	MCVE:28638	Italy	NR155721	-	-
<i>Ramaria abietina</i>	MA-Fungi 48119	Spain	AJ408383	-	-
<i>Ramaria acrisiccescens</i>	OSC87692	USA	AY102858	-	-
<i>Ramaria admiratia</i>	TENN_691	USA	NR137862	-	-
<i>Ramaria amyloidea</i>	OSC_67046	USA	KP658114	-	-
<i>Ramaria apiculata</i>	17678	Italy	MK801295	-	-
<i>Ramaria apiculata</i> var. <i>brunnea</i>	CBS_148.74	USA	MH860839	-	-
<i>Ramaria araiospora</i>	OSC 108707	Germany	-	-	EU846298
<i>Ramaria aurea</i>	AGK_025	USA	-	-	JQ408226
<i>Ramaria aurea</i>	MA-Fungi 48120	Germany	AJ408387	-	-

<i>Ramaria boreimaxima</i>	H:I. Kytovuori 96-525	Finland	NR158898	-	-
<i>Ramaria botrytis</i> T	AMB n. 18201	Italy	KY626151	-	-
<i>Ramaria botrytis</i>	MA-Fungi 47951	Spain	AJ2922942	-	-
<i>Ramaria botrytis</i>	snf213	USA	AF377055	-	-
<i>Ramaria botrytis</i>	GM19044	Argentina	OP177707	OP177871	-
<i>Ramaria botrytis</i>	GM19124	Argentina	OP177708	OP177872	-
<i>Ramaria botrytis</i>	12646	Chile	OP177709	OP177873	-
<i>Ramaria botrytis</i> f. <i>musicolor</i> T	ZT Myc 57160	Italy	KY626144	-	-
<i>Ramaria botrytis</i> var. <i>aurantiiramosa</i>	WTU-F-043053	USA	-	-	KX574471
<i>Ramaria botrytis</i> var. <i>aurantiiramosa</i>	OSC 140667	USA	-	-	JX310410
<i>Ramaria calvodistalis</i>	TENN_69095	USA	NR137861	-	-
<i>Ramaria</i> <i>celerivirescens</i>	OSC 140471	USA	-	-	JX310392
<i>Ramaria</i> <i>celerivirescens</i>	OSC_140471	USA	-	-	JX310392
<i>Ramaria claviramulata</i>	WTU-F-043055	USA	-	-	KX574472
<i>Ramaria claviramulata</i>	WTU-F-043055	USA	-	-	KX574472
<i>Ramaria conjunctipes</i>	OSC:110613	USA	KC346861	-	-
<i>Ramaria coulterae</i>	OSC 69929	USA	-	-	EU669320
<i>Ramaria curta</i>	MA-Fungi 48081	Spain	AJ408359	-	-

<i>Ramaria curta</i>	MA-Fungi 48029	Spain	AJ408358	-	-
<i>Ramaria cystidiophora</i>	UBCOGTR0419 s	Canada	-	-	EU597077
<i>Ramaria dendrophora</i>	GM19094	Argentina	OP177715	OP177879	-
<i>Ramaria dendrophora</i>	GM20020	Argentina	OP177716	OP177880	-
<i>Ramaria fennica</i>	AMB n. 17522	Italy	MK682678	-	-
<i>Ramaria fennica</i>	AMB n. 17522	Italy	MK682678	-	-
<i>Ramaria flaccida</i>	MA-Fungi 48076	Spain	AJ408371	-	-
<i>Ramaria flava</i>	AMB 17393	Italy	MK493035	-	-
<i>Ramaria flava</i>	JLH MyCoPortal 6604751	USA	-	-	MK578702
<i>Ramaria flavescens</i>	AMB 17404	Italy	MK493036	-	-
<i>Ramaria flavinedulis</i>	GM19056	Argentina	OP177717	OP177881	-
<i>Ramaria flavinedulis</i>	GM19117	Argentina	OP177718	OP177882	-
<i>Ramaria flavinedulis</i>	GM19042	Argentina	OP177719	OP177883	-
<i>Ramaria flavinedulis</i>	GM19035	Argentina	OP177720	OP177884	-
<i>Ramaria flavinedulis</i>	GM19105	Argentina	OP177721	OP177885	-
<i>Ramaria flavobrunnescens</i>	MA-Fungi 48059	Spain	AJ408379	-	-
<i>Ramaria foetida</i>	AGK_058	USA	-	-	JQ408239
<i>Ramaria formosa</i>	17542	Italy	-	-	MK723992

<i>Ramaria fumosiavellanea</i>	WTU-F-063048	USA	MK169345	-	-
<i>Ramaria gelatiniaurantia</i>	OSC_65737	USA	KP658144	-	-
<i>Ramaria gracilis</i>	420526MF0958	China	-	MG712386	-
<i>Ramaria gracilis</i>	AMB n. 18210	Italy	-	MF288937	-
<i>Ramaria inedulis</i>	GM19047	Argentina	OP177722	OP177886	-
<i>Ramaria inedulis</i>	12648	Chile	OP177723	OP177887	-
<i>Ramaria largentii</i>	AH:48019	Spain	-	-	MF564302
<i>Ramaria luteovernalis</i>	MCVE_28637	Italy	NR155720	-	-
<i>Ramaria magnipes</i>	WTU-F-063057	USA	-	-	MK169351
<i>Ramaria obtusissima</i>	TFB14473	USA	-	-	KJ655554
<i>Ramaria patagonica</i>	403	Argentina	OP177710	OP177874	-
<i>Ramaria patagonica</i>	GM19026	Argentina	OP177711	OP177875	-
<i>Ramaria patagonica</i>	GM19032	Argentina	OP177712	OP177876	-
<i>Ramaria patagonica</i>	GM19106	Argentina	OP177713	OP177877	-
<i>Ramaria patagonica</i>	GM19095	Argentina	OP177714	OP177878	-
<i>Ramaria pseudoflava</i>	AMB_17392	Italy	-	-	MK493046
<i>Ramaria rainierensis</i>	KA12-1702	South Korea	KR673634	-	-
<i>Ramaria rasilisporoides</i>	WTU-F-043029	USA	MK169346	-	-
<i>Ramaria rubella</i>	OSC_115946	USA	EU669317	-	-
<i>Ramaria rubribrunnescens</i>	OSC 119676	USA	-	-	EU652352

<i>Ramaria rubribrunnescens</i>	OSC 66051	USA	-	-	KY354750
<i>Ramaria spinulosa</i>	M 0127250	Germany	MF288926	-	-
<i>Ramaria stricta</i>	CBS_165.48	Germany	-	-	MH856299
<i>Ramaria stricta</i> var. <i>concolor</i>	CBS 153.74	USA	-	MH872579	-
<i>Ramaria</i> var. <i>stricta</i>	M-405	unknown	-	AF213117	-
<i>Ramaria stricta</i> var <i>concolor</i>	AGK 011	USA	-	-	JQ408221
<i>Ramaria stricta</i> var <i>concolor</i>	AGK 010	USA	-	-	JQ408220
<i>Ramaria paraconcolor</i>	GM19082	Argentina	-	OP177888	-
<i>Ramaria stuntzii</i>	OSC_73315	USA	-	-	KP658122
<i>Ramaria subtilis</i>	AH:48020	Spain	-	-	MF564300
<i>Ramaria suecica</i>	OSC_115933	USA	KP658148	-	-
<i>Ramaria thiersii</i>	OSC_112045	USA	KY354761	-	-
<i>Ramaria velocimutans</i>	WTU-F-063045	USA	-	-	KX574487
<i>Ramaria verlotensis</i>	WTU-F-063047	USA	-	-	KX574480
<i>Ramaricium polyporoideum</i>	TENN:065654	USA	-	-	MF992160
<i>Turbinellus floccosus</i>	PKSR1	India	-	-	KJ411951
<i>Turbinellus floccosus</i>	OSC 70574	USA	-	-	EU846244

#### Análisis filogenéticos

Se infirió una filogenia molecular a partir del conjunto de datos combinados de ITS y LSU. Los conjuntos de datos de secuencias ITS y 28S fueron alineados por separado con MAFFT (Kato y Standley 2013) y se inspeccionaron

visualmente y ajustaron manualmente con MEGAX. La selección de secuencias se basó en Humpert *et al.* (2001), Giachini *et al.* (2010), Das *et al.* (2016), Martín *et al.* (2020) y los mejores resultados de NCBI BLAST. Se seleccionaron miembros de Russulales (*Lactarius* sp. MW6838641) y Ganodermataceae (*Ganoderma resinaceum* KX3719821) que claramente permanecen fuera del clado de Gomphales/Phallales (Hosaka *et al.* 2006) como grupo externo. Los modelos evolutivos para ambas particiones se estimaron de forma independiente utilizando el criterio de información de Akaike (AIC; Akaike 1974) implementado en jModelTest (Darriba *et al.* 2012; <http://darwin.uvigo.es>). Se seleccionaron los modelos *General Time Reverse* (GTR) con variación de tasas distribuida gamma entre sitios (GTR + G) y una proporción de sitios invariables (GTR + G + I) para ITS y 28S, respectivamente. El conjunto de datos concatenado se dividió por región génica y se analizó con el método de máxima verosimilitud (ML) e inferencia bayesiana (BI). Se ejecutó ML a través de RAxML 8.2.10 (Stamatakis 2014) con 1000 iteraciones de bootstrap y un modelo GTRGAMMA bajo los parámetros predeterminados (Stamatakis 2014). Los análisis de BI se realizaron utilizando MrBayes 3.2.7a (Ronquist *et al.* 2012) con cuatro cadenas y árboles muestreados cada 100 generaciones. El soporte de las ramas se evaluó utilizando probabilidades a posteriori calculadas a partir del conjunto posterior de árboles después de alcanzar la estacionariedad. Además, se construyeron dos conjuntos de datos distintos: uno de ITS (para *R. botrytis*) y otro de LSU (para *R. stricta*—*R. paraconcolor*). El mejor modelo de evolución de nucleótidos para los conjuntos de datos se seleccionó utilizando AIC como se implementa en jModelTest. Se seleccionaron modelos GTR + G para ITS y GTR + G + I para 28S. Los análisis filogenéticos se realizaron de la misma manera que para el otro conjunto de datos. Las alineaciones se enviaron a TreeBASE (<https://treebase.org>) (ID del estudio 30289).

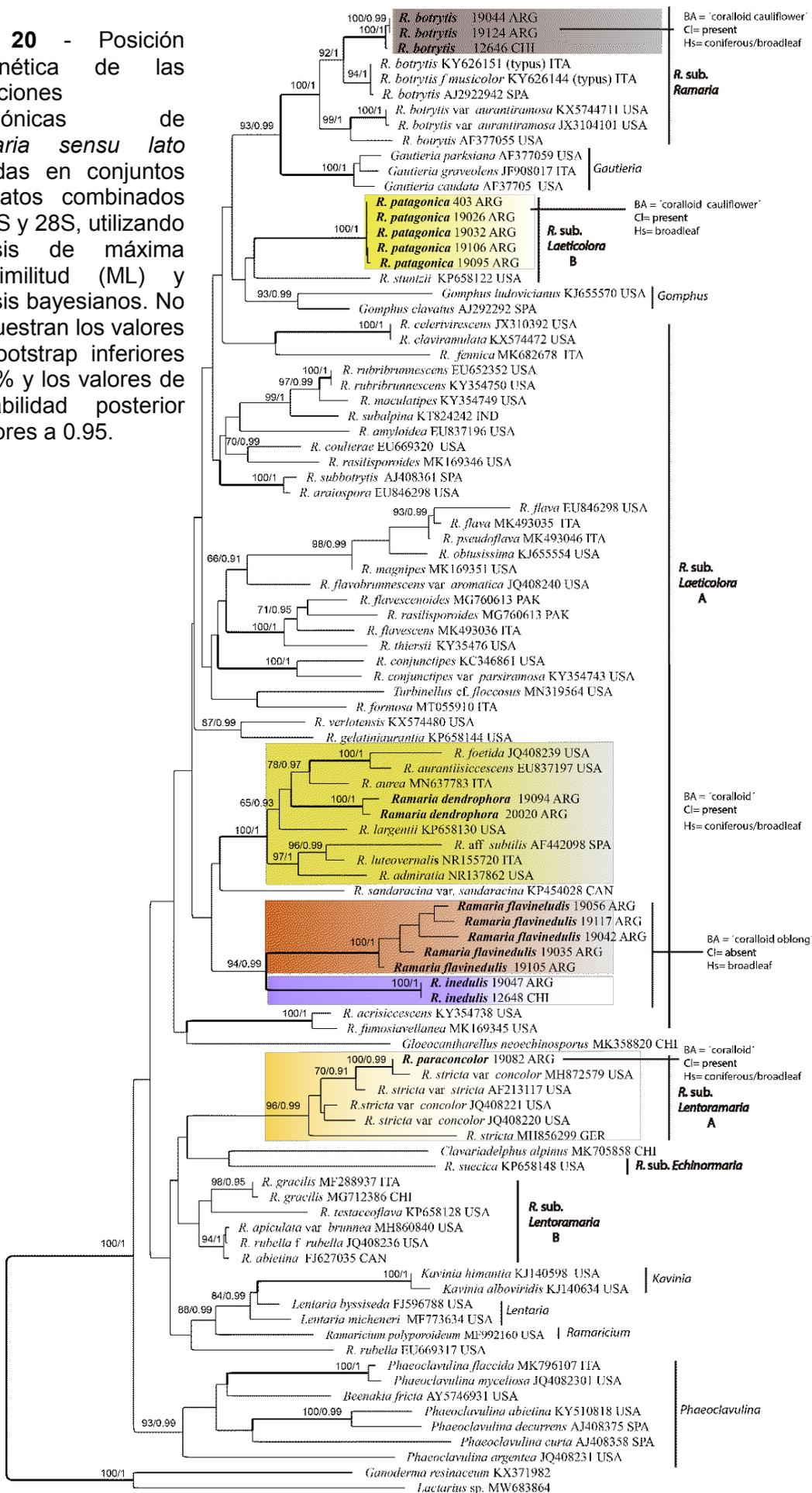
## Resultados

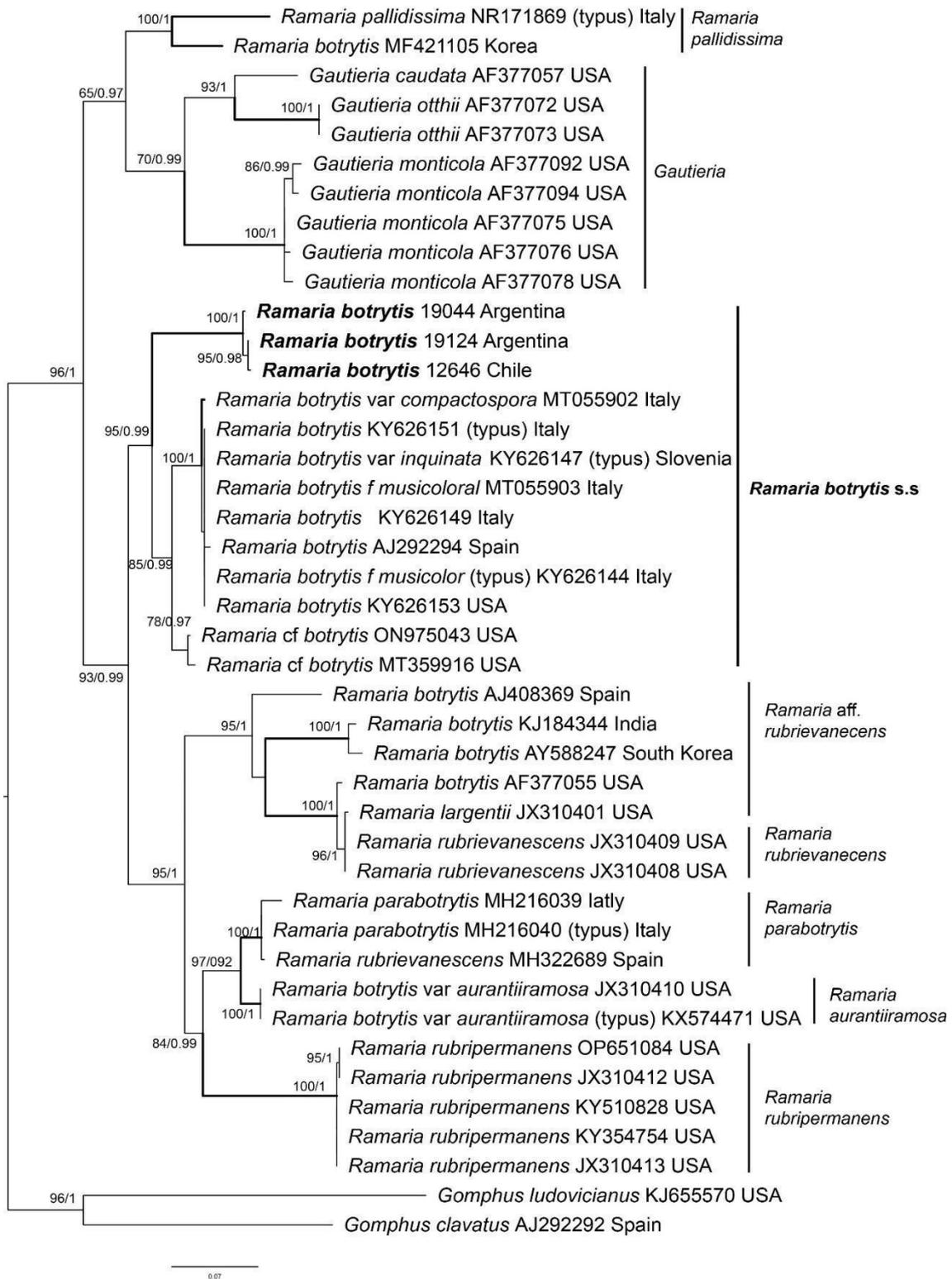
### Filogenia molecular

El análisis filogenético de *Ramaria s.l.* de la Patagonia se presenta en la Figura 20. Los conjuntos combinados de ITS y LSU incluyeron 97 secuencias y comprendieron 1028 caracteres, incluyendo *gaps*, de los cuales 183 caracteres fueron constantes. La desviación estándar promedio de las frecuencias divididas en el BI fue 0.015439. El conjunto de datos ITS incluyó 42 secuencias, lo que resultó en una alineación con 665 caracteres, incluyendo huecos, de los cuales

339 fueron constantes. El conjunto de datos LSU incluyó 29 secuencias, lo que resultó en una alineación con 285 caracteres, incluyendo *gaps*, de los cuales 214 fueron constantes. Tanto los análisis de BI como ML arrojaron la misma topología de árbol. Por lo tanto, solo se muestra el árbol bayesiano con valores BPP ( $\geq 0.95$ ) y MLB  $\geq 65\%$ . En el árbol filogenético obtenido se observan seis especies presentes en la Patagonia Argentina, agrupadas dentro de los subgéneros *Ramaria*, *Laeticolora* y *Lentoramaria*. *Ramaria patagonica* y *R. inedulis* se secuenciaron por primera vez, mientras que se agregaron nuevas colecciones de *R. botrytis* y *R. paraconcolor*. Las especies patagónicas de *R. botrytis* comprendieron un nuevo clado con un muy buen soporte (BPP: 1.00 MLB: 100%). Las inferencias filogenéticas del conjunto de datos ITS (Fig. 21) recuperaron topologías similares a partir del conjunto de datos combinado. *Ramaria botrytis* muestra una subestructura distintiva dentro del clado. Las colecciones de América del Sur, América del Norte y Europa identificadas como *R. botrytis* se agrupan en diferentes subclados con un fuerte soporte estadístico dentro del subgénero *Ramaria*. Además, esta especie formó un grupo bien respaldado con el gasteroide *Gautieria* (no ramarioide) (BPP: 1 MLB: 96%). El árbol concatenado (Fig. 20) muestra que *R. patagonica* forma un linaje monofilético con un soporte significativo (BPP: 1.00 MLB: 100%). El análisis filogenético confirmó la posición de la nueva especie propuesta *R. dendrophora* dentro de *R.* subgen. *Laeticolora* (BPP: 1.00 MLB: 100%) con especies de Europa y EE. UU. como *R. aurea* (Schaeff.) Quél. *R. lagentii* Marr y D.E. Stuntz y *R. admiratia* R.H. Petersen. *Ramaria inedulis* y *R. flavinedulis*, la otra nueva especie propuesta, constituyen una nueva línea representada completamente por colecciones patagónicas también dentro del subg. *Laeticolora* (BPP: 0.99 MLB: 94%). Las colecciones patagónicas de *R. paraconcolor* se agrupan dentro de subg. *Lentoramaria* (A). El análisis del conjunto de datos de LSU (Fig. 22) mostró que el clado de *R. paraconcolor* estaba respaldado significativamente e incluye especímenes identificados como *R. stricta* y *R. aff. gracilis* y otros especímenes, todos del hemisferio norte.

**Fig. 20** - Posición filogenética de las colecciones patagónicas de *Ramaria sensu lato* basadas en conjuntos de datos combinados de ITS y 28S, utilizando análisis de máxima verosimilitud (ML) y análisis bayesianos. No se muestran los valores de bootstrap inferiores al 65% y los valores de probabilidad posterior inferiores a 0.95.





**Fig. 21** - Posición filogenética de las colecciones patagónicas de *Ramaria botrytis* basada en ITS, utilizando análisis de máxima verosimilitud (ML) y análisis bayesianos. No se muestran valores de bootstrap inferiores al 65% y valores de probabilidad posterior inferiores a 0,95.



**Fig. 22** - Posición filogenética de las colecciones patagónicas de *Ramaria paraconcolor* basada en LSU, utilizando análisis de máxima verosimilitud (ML) y análisis bayesianos. No se muestran los valores de bootstrap inferiores al 65% y valores de probabilidad posterior inferiores a 0,95.

### Taxonomía

***Ramaria dendrophora*** G.C. González, Barroetaveña & Pildain, sp. nov. Fig. 23.

Mycobank no.: 846327

GenBank no.: rDNA ITS: OP177716 LSU: OP177880.

Etimología: *dendrophora* en referencia a su apariencia de un árbol.

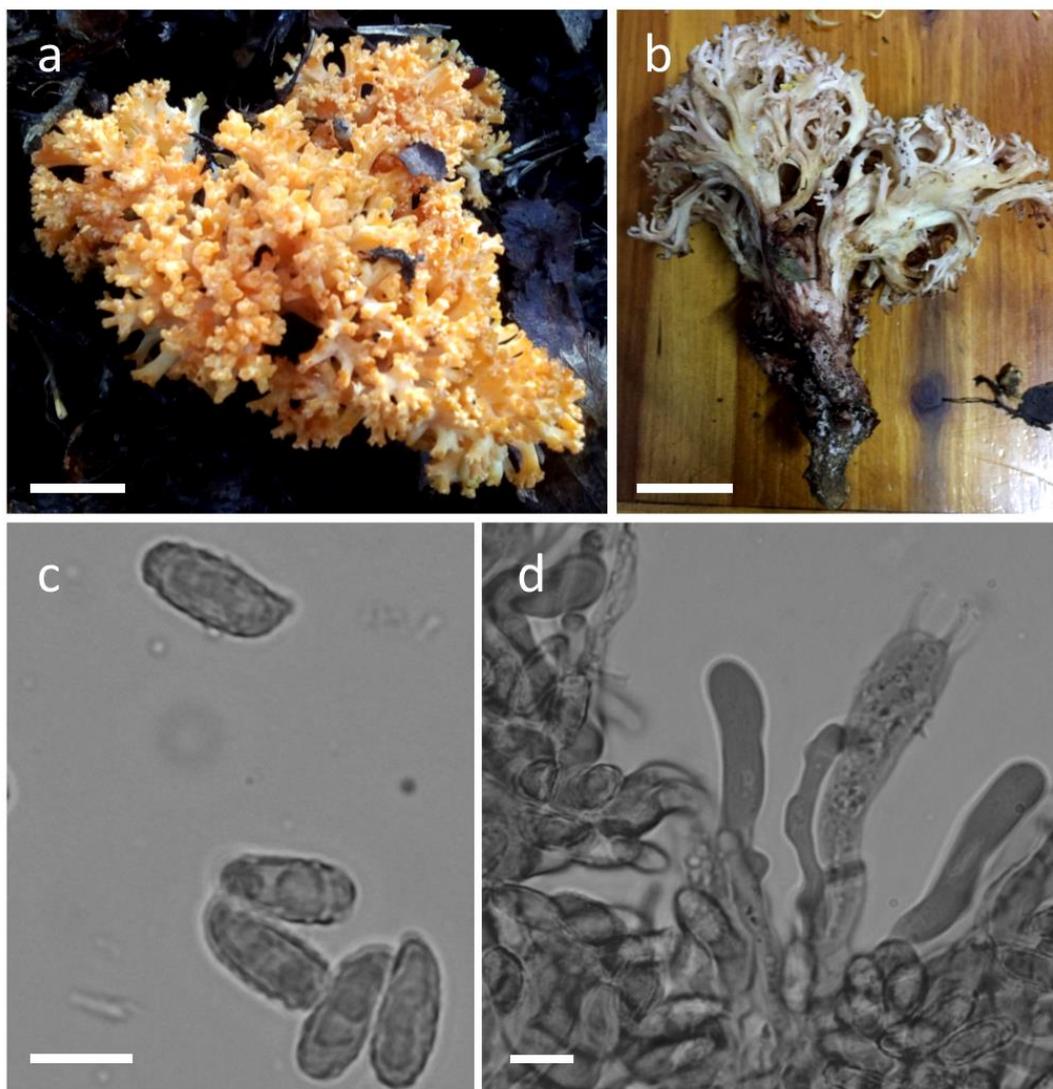
Diagnóstico: Este taxón se caracteriza morfológicamente por basidiomas de color amarillo pálido a rosa pálido con 8-10 cm de alto × 7-10 cm de ancho en el punto más ancho. Basidiosporas (10-)11-12(-13) × (4-)4,8-5 μm, ornamentadas con verrugas conspicuas e irregulares. El himenio del contexto se vuelve inmediatamente verde con sulfato ferroso.

Holotipo: Argentina, Chubut, Lago Puelo, Río Azul, -42.10298—71.80094, alt 230 m, en el suelo en el bosque de *Nothofagus dombeyi* con *Diostea juncea* y presencia de *Pinus* spp. exóticos. Mayo de 2020, leg. M. Rugolo GM20020 (HCFC 5616).

Otros especímenes estudiados: Argentina, Neuquén, Parque Nacional Lanín, Lago Queñi -40.145763 -71.617588, 15.5.2019. leg. G. González GM19094 (HCFC 5617).

Descripción: Basidiomas solitarios a gregarios, con 8–10 cm de alto × 7–10 cm de ancho en el punto más ancho, ramificados repetidamente dicotómicamente en 5–6 hileras, amarillo pastel cuando son jóvenes, volviéndose más claros con la madurez; ápices agudos a subagudos, amarillos cuando son jóvenes, volviéndose amarillo pálido o rosa pálido después de magulladuras o en la madurez. Estípite ≥ 2(–3) cm de alto, compuesto a fasciculado en grupos de 2–5, emergiendo de una base común. Contexto opaco, que se vuelve ligeramente verdoso con FeSO<sub>4</sub>, IKI–. Sistema de hifas monomítico, hifas generativas simples septadas, ramificadas, paredes lisas e hialinas; pié basal con hifas de la trama de 5–7 μm de ancho e infladas hasta 10 μm, ramificadas, de pared delgada, compacta y paralelamente dispuestas, hialinas; hifas de la trama de las ramas de 2.5–6 μm de ancho; hifas gloeopleuricas presentes, de hasta 8 μm de ancho, entrelazadas de forma compacta, de pared delgada, hialinas, profundamente tenidas con floxina. Himenio a lo largo de todo el basidioma. Sabor suave, olor a hongo. Basidios 34–65(–70) × 8–11 μm, clavados, simples septados, ligeramente granuloso en contenido, tetraesporados; esterigmas 5–7 μm de largo. Basidiosporas 30–60 × 7–10 μm, clavadas alargadas, lisas, hialinas, contenido homogéneo. Esporas basidiales elipsoides, (10-)11-12(-13) × (4-)4.8-5 μm, densamente verrugadas, con 1–varias gutulas.

Ecología: Creciendo bajo *Nothofagus dombeyi*, *Austrocedrus chilensis*, y bosque mixto con *Diostea juncea* o cerca de *Pinus* sp. introducido, ocurre durante la temporada de lluvias durante el otoño (abril a junio).



**Fig. 23** - *Ramaria dendrophora* sp. nov., características morfológicas (Holotipo HCFC 5617). A y B: basidioma; C: basidiosporas; D: basidio. Barra de escala: A = 1 cm, B = 2 cm, C – D = 10  $\mu$ m.

***Ramaria flavinedulis*** G.C. González, Barroetaveña & Pildain, sp. nov. Fig. 24.

Mycobank no.: 846326

GenBank no.: rDNA ITS: OP177720 LSU: OP177885.

Etimología: *flavinedulis*, en referencia a su color amarillo (flavi = amarillo en latín) y su similitud morfológica y proximidad filogenética con *Ramaria inedulis*.

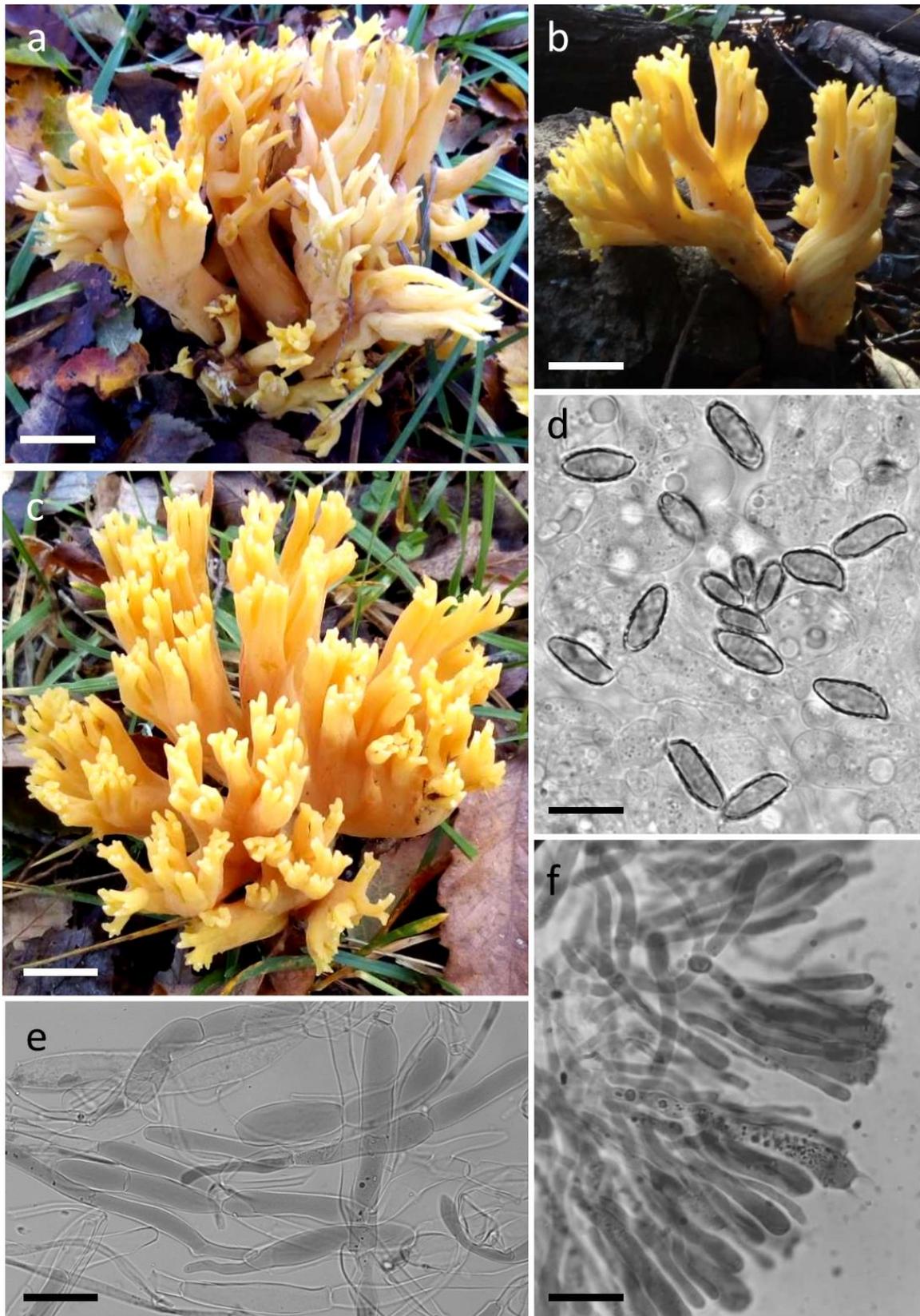
Diagnóstico: Esta especie produce basidiomas de color amarillo brillante con un estipe compuesto, retorcido y fusionado, tanto el estipe como el himenio reaccionan positivamente con sulfato ferroso. Ápices concoloros con las ramas o más brillantes de color amarillo ("maíz" o "girasol"). Basidios septados simples. Esporas basidiales elipsoides a cilíndricas  $(10-11-12(-15) \times (4-)4.8-5(-6) \mu\text{m}$ , verrucosas.

Holotipo: ARGENTINA. Río Negro, Parque Nacional Nahuel Huapi, Puerto Blest, -41.030435 -71.804487, alt 810 m, en el suelo en el bosque de *Nothofagus dombeyi* con *Chusquea culeou* y *Ribes magellanicum*, mayo de 2019, GM19035 (HCFC 5604).

Otros especímenes estudiados: Argentina, Ushuaia, -54.715102 -68.016357 15.6.2019. leg. G. González, GM1 U (HCFC 5614); ibid. -54.7242 -68.0169 15.6.2019. leg. G. González GM3 U (HCFC 5615). Chile, Bío Bío, Concepción, mercado El Collao, 5.2019 leg. M. Rajchenberg 12649 (HCFC 5611).

Descripción: Basidiomas solitarios o gregarios, de hasta 7 cm de alto, cerosos, ramificados repetidamente, dicotómicos, coraloideos. Estípites  $\geq 3(-4)$  cm de alto, compuesto a fasciculado en grupos de 2-5; a veces tortuoso, con la apariencia de varios estípites fuertemente soldados. Ramas en 3-4 hileras, de color amarillo pastel a brillante cuando son jóvenes, volviéndose pálidas con la madurez; ápices redondeados a agudos, concoloros con las ramas o más brillantes ("maíz" o "girasol") amarillo. Contexto opaco, que se vuelve verdoso con  $\text{FeSO}_4$ . Sistema de hifas monomítico, hifas generativas simples septadas, ramificadas, lisas, hialinas; hifas de la trama del tallo basal de 4-6  $\mu\text{m}$  de ancho, ramificadas, de pared delgada, dispuestas de manera paralela y compacta, hialinas; hifas gloeopleurales dispersas en el subhimenio de hasta 5  $\mu\text{m}$  de ancho; hifas de la trama de las ramas de 7-10  $\mu\text{m}$  de ancho, completamente entrelazadas. Sistema gloeoplérico representado por hifas cortas con hinchazones ocasionales de hasta 11  $\mu\text{m}$  de diámetro, de pared delgada, hialinas. Himenio anfígeno a lo largo de todo el basidioma. Basidios 55-65(-70)  $\times$  10-14  $\mu\text{m}$ , clavados, simples septados, multigutulados, tetraesporados; esterigmas 7-10  $\mu\text{m}$  de largo. Basidiolos 30-50  $\times$  8-10  $\mu\text{m}$ , alargadas clavadas, lisas, hialinas. Basidiosporas elipsoides a cilíndricas,  $(10-11-12(-15) \times (4-)4,8-5(-6) \mu\text{m}$ , cianófilas, con ornamentación densamente verrugosa.

Ecología: Crece bajo *Nothofagus dombeyi*, *N. pumilio*, *N. antarctica* (G. Forst.) Oerst., *Lophozonia obliqua* y *L. alpina* en bosques subalpinos. Fructifica durante la temporada de lluvias durante el otoño (abril a junio).



**Fig. 24** - *Ramaria flavinedulis* sp. nov., características morfológicas (Holotipo HCFC 5604). A–C: basidioma; D: basidiosporas; E: sistema de gloeropleuras; F: basidio. Barras de escala: a = 1 cm, b = 2 cm, c = 1 cm, d = 12  $\mu$ m, e = 20  $\mu$ m, f = 15  $\mu$ m.

***Ramaria botrytis*** (Pers.) Ricken, Vademecum für Pilzfreunde: 253 (1918). Figs. 25 y 27, Tabla 6.

Descripciones: Exeter *et al.* 2006.

Especímenes estudiados: Argentina, Chubut, Parque Nacional Los Alerces, -42.671467 -71.696326 16.4.2019 leg. G. González GM19013 (HCFC 5618); *ibid.* -42.671284 -71.696159 16.4.2019 leg. G. González GM19020 (HCFC 5619); *ibid.* GM19044 (HCFC 5620) leg. G. González. Río Negro, Parque Nacional Nahuel Huapi, Puerto Blest, -41.014611 -71.820895 19.4.2019 leg. G. González GM19046 (HCFC 5621); *ibid.* -41.566491 -71.772655 GM19124 (HCFC 5622); *ibid.* -41.56608 -71.77379 GM19127 (HCFC 5623).

Ecología: *Ramaria botrytis* es comúnmente conocida como el "coliflor rosa". Se ha registrado en Europa, Asia y América. Los especímenes de la Patagonia fueron recolectados en stands dominados por *Nothofagus dombeyi* (Mirb.) Oerst., *Chusquea culeou* E. Desv. y *Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz.

Breve descripción de los especímenes patagónicos: Este taxón presenta basidiomas robustos de (12–)10–9(10) cm de altura × (10)8–7(6) cm de ancho. El estípite es opaco, blanco a rosado blanco con una base masiva y el contexto es blanco, ambos carnosos, fibrosos a firmes cuando están frescos. Ramificaciones en 4–5 hileras, las ramas primarias son de color carne pálido y las ramas terminales presentan un "tinte rosa" a rojo pálido, compactas y con forma de coliflor; ápices redondeados con un color más intenso que las ramas (blanco rojizo a magenta) y concoloros en la madurez. Las basidiosporas son elípticas, apiculadas, gutuladas, de (10)12–14(15) × (4)5–5.5(6) μm, fuertemente cianofílicas, de pared delgada, con ornamentación verrugosa alineada para formar surcos longitudinales. Los basidios miden de 20 a 30 × 4 a 10 μm, fibulados, claviformes, tetrasporadas, con esterigmas de 8 a 10 μm de longitud. El himenio contextual se torna inmediatamente verde con sulfato férrico. Sabor dulce y olor fúngico suave.

Observaciones: No se encontraron diferencias reconocibles de las descripciones de especímenes de otras regiones. Los resultados de nuestro estudio son consistentes con estudios previos que demostraron que *Gautieria* está estrechamente relacionada con *Ramaria* subg. *Ramaria*. *Gautieria* es un género secuestrado en Gomphales y se considera coraloide/ramaroide con placas

tramales que crecen hacia afuera desde una base central estéril, dando como resultado la formación de lóculos. Además, las especies de *Gautieria* y *Ramaria* sub. *Ramaria* tienen esporas con crestas similares. Dada esta evidencia, serían apropiados análisis moleculares y taxonómicos más profundos de ambos géneros para una mejor definición de la relación entre *Ramaria* subg. *Ramaria* y *Gautieria*. Se informa que *Ramaria botrytis* crece principalmente en bosques montanos de coníferas; sin embargo, colecciones patagónicas se encontraron asociadas con bosques de *Nothofagus*.

***Ramaria inedulis*** Singer, Beihefte zur Nova Hedwigia 29: 384 (1969). Figs. 25 y 27, Tabla 6.

Descripción: Singer (1969) Ejemplares estudiados: Argentina, Río Negro, Parque Nacional Nahuel Huapi, Puerto Blest, -41.014493 -71.820832 19.4.2019 leg. G. González GM19046 (HCFC 56625). Chile, Bío Bío, Concepción, mercado El Collao, 5.2019 leg. M. Rajchenberg 12649 (HCFC 56626). Argentina, Río Negro, Parque Nacional Nahuel Huapi, Laguna Frías, 21.03.1993 leg. R. Singer 3106 BAFC.

Ecología: Esta es una especie rara; el material tipo proviene de Río Negro, Argentina. Los especímenes recolectados en este estudio se encontraron creciendo en el suelo en un ambiente húmedo dentro de una matriz forestal adulta dominada por *N. dombeyi* (coihue) además de *Saxegothaea conspicua* Lindl. (mañío), *Weinmannia trichosperma* Cav. (tineo), *Raukua laetevirens* (Gay) Frodin (arrayán del diablo) y *Chusquea culeou*.

Breve descripción de los especímenes patagónicos: Basidioma coraloide y alargado, gris o morado en la madurez y gris claro cuando es joven, volviéndose blanco hacia la base del pie; puntas largas y finas con ramificación dicotómica y tricotómica. Estípites lisos y radiantes hacia la base. Basidiosporas cilíndricas a elipsoidales, 11–12.2(15) × 4.9–5(6) µm, ornamentadas con verrugas. Basidios simples septados. La reacción del contexto del pie y el himenio con FeSO<sub>4</sub> es negativa. Sabor suave y olor no característico.

Observaciones: Las esporas medidas en este estudio son más grandes que en la descripción original de la especie: 11–13 (13.5) × (3.8)–4.5–5.5 µm (Singer 1969), verificado después de estudiar el material tipo en LPS.



**Fig. 25** - Basidiomas de las especies de *Ramaria* de Patagonia. A y B: *R. paraconcolor* (HCFC 5627- HCFC 5628) ; C y F: *R. botrytis* (HCFC 5619 - HCFC 5620); D y E: *R. patagonica* (HCFC 5590); G: *R. inedulis* (HCFC 5616).  
 Barra de escala: A–C = 1 cm, D–F = 2 cm, G = 1.

***Ramaria patagonica*** (Speg.) Corner. Figs. 25 y 27, Tabla 6.

Descripciones: Spegazzini (1887); Corner (1957). Singer 1969

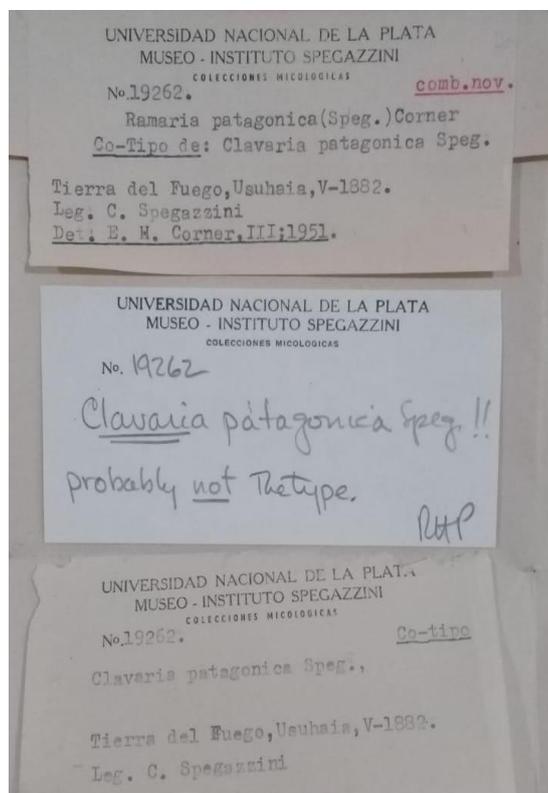
Ejemplares estudiados: Argentina, Chubut, Parque Nacional Los Alerces, -42.671467 -71.696326 16.4.2019 leg. G. González GM19016 (HCFC 5584); ibid. -42.668245 -71.693692 leg. G. González 16.4.2019 GM19017 (HCFC 5585); ibid. -42.661578 -71.696027 leg. G. González 16.4.2019 GM19026 (HCFC 5586); ibid. -42.8976561 - 71.725332 leg. G. González; ibid. -42.897661 - 71.725332 leg. G. González 16.4.2019 GM19064 (HCFC 5586). Río Negro, Parque Nacional Nahuel Huapi, Puerto Blest, -41.029108 -71.810438 19.4.2019 leg. G. González GM19030 (HCFC 5587); ibid. -41.030832 -71.809927 leg. G. González 16.4.2019 GM19032 (HCFC 5588); ibid. -41.564123 -71.776667 leg. G. González 11.6.2019 GM19129 (HCFC 5605). Neuquén, Parque Nacional Lanín, Lago Queñi, -40.14673 -71.719567 leg. G. González 16.5.2019 GM19084 (HCFC 5592); ibid. -40.13613 -71.707702 16.5.2019 leg. G. González GM19087 (HCFC 5591); ibid. -40.144993 -71.618112 16.5.2019 leg. G. González GM19095 (HCFC 5593); ibid. -40.145051 -71.618210 16.5.2019 leg. G. González GM19088 (HCFC 5595); ibid. -39.370488 -71.234857 18.5.2019 leg. G. González GM19102 (HCFC 5596); ibid. -39.377074 -71.234413 18.5.2019 leg. G. González GM19103 (HCFC 5597); ibid. -39.377075 -71.234413 18.5.2019 leg. G. González GM19104 (HCFC 5598); ibid. -39.370795 - 71.234415 18.5.2019 leg. G. González GM19106 (HCFC 5599). Tierra del Fuego, Ushuaia, 5.1882 leg. Spegazzini (LPS19262). Chile, Bío Bío, Concepción, mercado El Collao, 5.2019 leg. M. Rajchenberg 12659 (HCFC 5601).

Ecología: Fructifica en otoño (abril a junio), en suelos húmedos, gregaria y raramente solitaria, cerca de especies forestales nativas como *Nothofagus dombeyi*, *N. pumilio*, *N. antarctica*, *Lophozonia alpina* y *L. obliqua*, mezclada con *Chusquea culeou*, *Ribes magellanicum* y *Raukua laetevirens*. En la descripción original, Spegazzini registra a *Senecio* spp. como la vegetación preponderante.

Breve descripción de los especímenes patagónicos: Morfológicamente se distingue por un basidioma coraloide, robusto/masivo, de 8.5–12 cm de alto × 5–9 cm de ancho, suave a amarillo pálido, con 3 a 4 estratos ramificados; estípite de 4–8 cm de alto, liso, radiante y ramificado, unificado hacia la base,

densamente ramificado hacia el ápice. Ápices redondeados, cuspidados, ligeramente inflados, concolores, con una punta tricótoma (o 4-5 ótoma). Contexto blanco, sólido, no gelatinoso. Basidiosporas elipsoidales a cilíndricas, (9)10–12(13) × 4–5 µm, cianofílicas, apiculadas, ornamentadas con verrugas dispuestas irregularmente.

Observaciones: Las basidiosporas medidas en este estudio son más grandes que las de la descripción original de la especie: 4–8 × 4–5 µm (Spegazzini 1921), verificado después de estudiar el material tipo en LPS. Según Singer (1969), las basidiosporas (7.7–9 × 3.3–5 µm) presentan una ornamentación espinulosa, pero en las colecciones analizadas en este estudio, la ornamentación es claramente verrugosa (Fig. 27). Sin embargo, esta divergencia podría deberse a que no recolectamos materiales de la Provincia de Tierra del Fuego (donde fue descrita esta especie). Aunque se revisaron pequeños fragmentos de la colección tipo (Fig. 26) que permitieron obtener las medidas de las esporas, el escaso material disponible dificultó la posibilidad de extraer ADN, por lo que no fue posible realizar una comparación molecular. La breve descripción aquí proporcionada es una revisión conceptual de esta especie.



**Fig. 26** - Notas sobre la colección número 19262 correspondiente al material tipo de *Ramaria patagonica* (Speg.) Corner revisado en las instalaciones del Instituto Spegazzini.

***Ramaria paraconcolor*** Franchi & M. Marchetti Fig. 25, Tabla 6.

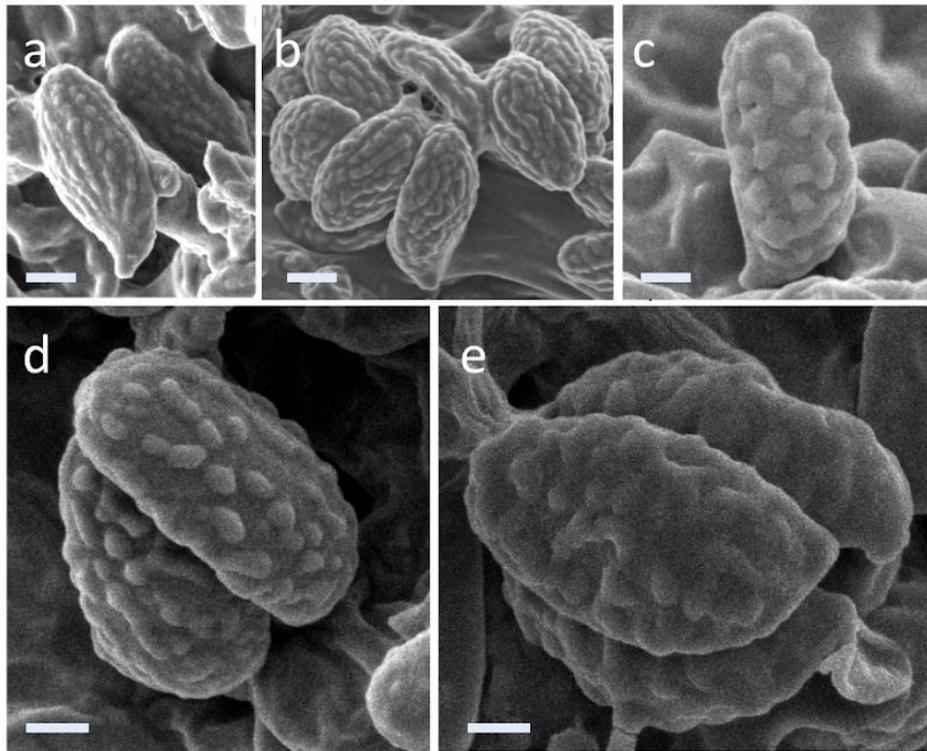
Descripciones: Martin *et al.* (2020).

Ejemplares estudiados: Argentina, Neuquén, Parque Nacional Lanín, Lago Queñi, -40.134847 -71.70817 leg. G. González 16.5.2019 GM19082 (HCFC 5627). Chubut, Parque Nacional Los Alerces, -42.771216 -71.730788; *ibid.* -42.661578 -71.696027 leg. G. González 16.4.2019 GM22001 (HCFC 5628); *ibid.* -42.661578 -71.696027 leg. G. González 16.4.2019 GM22002 (HCFC 5629).

Ecología: Esta especie tiene un hábito lignícola y fue descrita en Italia. Las colecciones patagónicas provienen de bosques nativos compuestos principalmente por *Nothofagus* spp. o *Lophozonia* spp., *Lomatia hirsuta* y *Chusquea culeou*, fructificando gregariamente en madera en un estado avanzado de descomposición, enterrada bajo tierra cerca de la superficie.

Breve descripción de los especímenes patagónicos: Basidioma pequeño, de hasta 8 cm de longitud y 4 cm de grosor, de color amarillo pálido a marrón canela; presenta ramas finas, con algún tono de canela en la parte inferior y que se vuelven amarillentas hacia las puntas, y ápices largos, finos y dicotómicos. Basidiosporas verrugosas (8)–9.6–10 × (–4)4.4–5 µm. Contexto opaco, que se vuelve inmediatamente verdoso con FeSO<sub>4</sub>. Sabor amargo y olor no distintivo.

Observaciones: Dentro del subgénero *Lentoramaria*, especies similares con crecimiento leñoso son: *R. stricta*, *R. concolor* (Corner) R.H. Petersen, *R. rubella* (Schaeff.) R.H. Petersen, *R. gracilis* y *R. gracilioides*. *R. paraconcolor* tiene esporas con un Q promedio de 2, más alto que el de las otras especies.



**Fig. 27** - Fotografías de microscopio electrónico de barrido (SEM) de basidiosporas de *Ramaria*. A: *R. botrytis*; B: *R. inedulis*; C: *R. patagonica*; D: *R. dendrophora*; E: *R. flavinedulis*. Barras de escala: a = 2  $\mu\text{m}$ , b = 3  $\mu\text{m}$ , c = 1  $\mu\text{m}$ ; d y e = 2  $\mu\text{m}$ .

**Tabla 6** - Resumen de características macro y microscópicas de especies patagónicas de *Ramaria*.

Taxon	Apariencia	Ápices	Reacción FeSO <sub>4</sub>	Fíbulas	Tamaño de basidiosporas	Forma/ornamentación de las basidiosporas
<i>R. botrytis</i>	Ramarioide, robusto/masivo, ramificado, coliflor, rosado.	Redondeada, roja a magenta	+++	sí	(10)12–14(15)×(4)5–5.5(6)	Elípticas, estriadas
<i>R. patagonica</i>	Ramarioide, robusto/masivo, muy ramificado, amarillo pálido	Redondeada, cuspidada, concoloro, tricotómico o más puntas	++	sí	(9)10–12(13)×4–5	Elipsoidales a cilíndricas, verrugosas
<i>R. dendrophora</i>	Ramarioide, ramificado, amarillo cuando joven, luego rosa pálido	Gruesa, corta y redondeada, concolora, tricotómica o más ramificada	-	no	(10)11.3–12×(4)4.3–5	Elipsoidales a cilíndricas. densamente verrugosas
<i>R. flavinedulis</i>	Ramarioide, oblonga, estipite fusionado compuesto, amarillo brillante	Delgado, dicotómica, concoloro o con ramas más brillantes	+	no	(10)12.5(15)×4–4.8(5)	Elipsoidales, arrugadas
<i>R. inedulis</i>	Oblongo, gris/ violáceo	Alargado, delgado, concoloro, dicotómico o tricotómico	-	no	11–12.2(15)×4.95–5(6)	Cilíndricas a elipsoidales, verrugosas
<i>R. paraconcolor</i>	Ramarioide, oblongo, amarillo pálido a marrón canela	Delgado, concoloro, dicotómico	+++	sí	(8–)9.6–10 × (4–) 4.4–5	Elipsoidales, verrugosas

## Discusión

Este estudio proporciona una primera estimación de la diversidad filogenética de *Ramaria* en el sur de América del Sur. La distinción clara de las especies de *Ramaria* de la Patagonia es de gran relevancia, dada la abundancia de estos hongos, su papel en la ecología de los bosques de Nothofagaceae y la comestibilidad de algunas de ellas. Se revisaron 48 colecciones, se estudiaron seis especies de *Ramaria s. l.*, incluyendo la descripción de dos nuevas especies. Este estudio respalda investigaciones anteriores (Humpert 2001, Giachini 2004, Giachini *et al.* 2010) que indican que *Ramaria* en un sentido amplio es un taxón parafilético. Además, el análisis filogenético indicó que *R. subg. Laeticolora* y *R. subg. Lentoramaria* son parafiléticos.

Detectamos tres especies de *Ramaria* ya descritas de Argentina en la zona estudiada en el lado este de los Andes Patagónicos: *R. patagonica*, *R. aurantiaca* y *R. inedulis* (Spegazzini 1887, Corner 1957; Singer 1969). En cuanto a *R. patagonica*, la descripción original reportó esporas más pequeñas (Spegazzini 1921) que este estudio, verificado al revisar el material tipo en LPS. Nuestros resultados indicaron que esta especie endémica es una de las más frecuentes (23 colecciones), abundantes y conspicuas de *Ramaria s. l.* en los bosques de Nothofagaceae de Argentina, ampliamente distribuida en diferentes sitios forestales asociados con varias especies de Nothofagaceae (Toledo *et al.* 2014; Barroetaveña *et al.* 2019; Barroetaveña & Toledo 2020). Esta especie no solo se considera un hongo comestible de alta calidad nutricional (Barroetaveña & Toledo 2020), sino que también es conocida por su actividad antioxidante y alto contenido de compuestos fenólicos (Toledo *et al.* 2016, Rugolo *et al.* 2022). Nuestros resultados también revelan la posición filogenética de esta especie, que formó una entidad taxonómica definida e independiente dentro de los Gomphales. Basándonos en estos resultados, podría tratarse de otro género, aunque esta confirmación requiere el análisis de otros genes.

*Ramaria inedulis* se distingue morfológicamente por sus ramas de color gris a morado con ápices finos y brillantes. Esta especie solo se encontró en suelos con alta humedad, y nuestros hallazgos coinciden con su distribución en el Bosque Valdiviano. Aunque se describió como no comestible (Singer 1969),

según comentarios populares, es comestible y se puede encontrar en los mercados de Chile (Gomez 2015).

Otras especies reportadas en Argentina, como *R. aurea*, *R. flava*, *R. strasseri* y *R. moelleriana*, (Spegazzini 1921, Singer 1969, Lazo 2001) no se encontraron en nuestros muestreos. Sus registros se basan en determinaciones morfológicas y nuestros especímenes no se vinculan con sus descripciones. Aún queda por establecer si estas especies, descritas para América del Norte o Europa, están realmente presentes en la Patagonia. Algunas de estas especies se registraron a partir de colecciones únicas y no se han vuelto a encontrar. En el caso de *Ramaria flava*, una especie muy citada especialmente en Chile (Lazo 2001, Deschamps 2002, Furci George-Nascimento 2007), no se agrupó con ninguna de las colecciones analizadas en este trabajo; sin embargo, es morfológicamente similar a *R. flavinedulis*. Esto podría deberse a que muchos taxones con basidiomas amarillos fueron identificados anteriormente como *R. flava*, como fue el caso en Europa (Petersen 1988). Se necesitan más muestreos e investigaciones para desentrañar la presencia de *R. flava* en la Patagonia, ya sea una identificación errónea o una introducción de especies ectomicorrícicas que ha cambiado de hospedantes, como es el caso de *Amanita muscaria* en los bosques de Nothofagaceae de Australia y Argentina (Dunk *et al.* 2012, Giles *et al.* 2021). En cuanto a *R. aurantiaca* Corner (1957), descrita de Neuquén y Tierra del Fuego y luego considerada como *R. subaurantiaca* var. *aurantiaca* (Corner) Singer (Singer 1969), tampoco se detectó en este estudio. Su característica distintiva es el basidioma naranja, aunque no hay secuencias disponibles. Ninguno de nuestros especímenes coincidió con la descripción original; además, algunas de sus características morfológicas (hifas simples septadas, tamaño de basidiospora) son compartidas con *R. flavinedulis*.

*Ramaria flavinedulis* presenta un fuerte agrupamiento filogenético y caracteres morfo-anatómicos distintivos. Esta nueva especie se agrupó con *R. inedulis* como su especie más estrechamente relacionada. Ambas comparten similitudes en características morfológicas, como un basidioma oblongo, carne de color blanco, hifas simples septadas y tamaño de basidiosporas (12.5–15 µm). Basándonos en estos resultados y la evidencia de que este clado está compuesto solo por colecciones patagónicas (BPP: 0.99 MLB: 94), es probable

que estas dos especies hayan divergido de un solo ancestro en Nothofagaceae exclusiva del hemisferio sur. En este sentido, el hemisferio sur alberga muchos linajes fúngicos únicos, ausentes en el Hemisferio Norte (Tedersoo & Smith 2013, Tedersoo *et al.* 2014; González *et al.* 2021; Rugolo *et al.* 2023). Esto debería confirmarse incorporando al estudio colecciones australianas.

Este estudio también muestra que la nueva especie *R. dendrophora* está estrechamente relacionada con especies de *Ramaria* del Hemisferio Norte según la filogenia (BPP: 1.00 MLB: 100%). *Ramaria aurea* (reportada para la Patagonia) y *R. largentii* tienen similitudes morfológicas como basidiomas compactos, basidiosporas largas y verrugosas y hifas con fíbulas. Sin embargo, *R. dendrophora* difiere al tener basidiomas amarillos en su juventud que se vuelven de color rosa pálido al madurar, y al presentar una reacción inmediata al sulfato férrico.

En cuanto a *R. botrytis*, la especie tipo de *Ramaria*, muestra múltiples linajes crípticos según la filogenia del ITS. Los datos del análisis molecular demuestran claramente que abarca al menos tres linajes filogenéticos. Nuestro estudio reveló un fuerte agrupamiento entre especímenes de diferentes regiones adaptados a diversos hospedantes (angiospermas y gimnospermas). Las colecciones patagónicas se encontraron fructificando en sitios de alta humedad asociadas con *N. dombeyi* y *N. antarctica*, pero no con bosques de *Lophozonia*. Las colecciones de Patagonia se agruparon en un linaje diferente al de la secuencia del material tipo de *R. botrytis* (proveniente de Italia). Sin embargo, no se encontraron diferencias morfológicas con la descripción de *R. botrytis* de Corner (1950). Especies que no pueden distinguirse fácilmente según la morfología, pero que forman linajes filogenéticos distintos según marcadores moleculares, a menudo se denominan especies crípticas. Se ha propuesto esto en varios géneros fúngicos, incluidos los basidiomicetos *Fomes*, *Serpula* y *Fusarium* (Steenkamp *et al.* 2002; Carlsen *et al.* 2011; Balasundaram *et al.* 2015).

Especialmente cuando se trata de morfoespecies que tienen una distribución geográfica extensa y forman asociaciones con diversos hospedantes, como es el caso de *R. botrytis*, puede resultar problemático detectar los límites de las especies sólo mediante características morfológicas. Por lo tanto, se deben seleccionar múltiples variables y rasgos significativos y representativos para la

distinción y diferenciación confiable de especies que representan diferentes linajes.

En cuanto a *R. stricta* - *R. paraconcolor*, como se muestra en los análisis de LSU, están estrechamente relacionadas y se pueden distinguir dos grupos filogenéticos: uno para *R. stricta* y *R. concolor*, y otro para *R. gracilioides* y *R. paraconcolor*. Los vouchers de Argentina identificados como *R. paraconcolor* se agruparon dentro del segundo clado representado principalmente por secuencias de EE. UU. y Europa. Esta especie crece en madera en descomposición, presenta rizomorfos dimíticos y está estrechamente relacionada con *R. gracilioides* y *R. gracilis* (Franchi & Marchetti 2020). Los especímenes de la Patagonia se encontraron en bosques mixtos dominados por *Nothofagus dombeyi*, *Lophozonia obliqua*, *Lomatia hirsuta* y *Chusquea culeou*, en madera muerta, tocones o troncos, presentando basidiomas amarillos/canela, similares a especímenes recolectados en Italia, aunque con esporas más grandes.

Las especies de *Ramaria* desempeñan dos roles ecológicos importantes y diferenciados. Por un lado, todas las especies terrícolas se sugieren como micorrícicas (Humpert *et al.* 2001; Knudson 2012) y, por otro lado, las especies con hábito lignícola actúan como saprófitas, y podrían representar una forma ancestral dentro de Gomphales (Humpert *et al.* 2001). En este sentido, asumimos que *Ramaria botrytis*, *R. flavinedulis*, *R. inedulis*, *R. patagonica* y *R. dendrophora* son micorrícicas. No obstante, sería de utilidad que futuras investigaciones, mediante el muestreo de puntas de raíces bajo sus cuerpos fructíferos, síntesis de la micorriza en plantines puedan validar esta hipótesis.

Nuestros resultados no mostraron una estructura gondwánica en la filogenia, como fue el caso con otros géneros estrictamente asociados a Nothofagaceae, como *Cyttaria* spp. (Ascomycota) y *Nothofagus* spp. (Peterson & Pfister, 2010). Además, estudios previos mostraron que las especies de los géneros *Fistulina*, *Armillaria*, *Postia* y *Grifola* (Pildain *et al.* 2009; Pildain & Rajchenberg 2013; González *et al.* 2021; Rugolo *et al.* 2023) pertenecientes al Hemisferio Sur se agrupan en un linaje monofilético fuertemente respaldado. No encontramos ninguna evidencia de conexión entre las *Ramarias* del Hemisferio Sur lo cual es coherente considerando la polifilia de este género. Sin embargo, el agrupamiento

entre las especies *R. flavinedulis* y *R. inedulis* antes discutido podría llevar a pensar que se trata de especies endémicas propias de Patagonia. Por otro lado, los hongos que se encuentran en el Hemisferio Sur aún están en gran medida subrepresentados en las bases de datos públicas, y los datos sobre su diversidad y distribución aún están incompletos.

Se ha informado que las especies de *Ramaria* no son específicas del hospedante, y el cambio entre Pinaceae y árboles latifoliados ocurre con frecuencia (Petersen *et al.* 2014). Este es el caso de varias especies como *R. botrytis*, *R. aurea*, *R. flava*, *R. formosa* (Pers.) Quél, *R. fumigata* (Peck) Corner, *R. largentii* y *R. ochraceovirens* (Jungh.) Donk, que forman micorrizas con especies de *Abies*, *Cedrus*, *Fagus*, *Larix*, *Picea*, *Pinus* y *Quercus* (Corner 1950, Trappe 1962, Exeter *et al.* 2006, Scattolin *et al.* 2008, Knudson 2012). Las especies de *Ramaria* registradas en la Patagonia siguen este mismo patrón, ya que nuestros resultados no indicaron ninguna asociación específica de especies con sus hospedantes arbóreos. Nuestros resultados también sugieren que las especies ectomicorrícicas de *Ramaria* en la Patagonia son generalistas dentro de Nothofagaceae. Los especímenes se encontraron principalmente en bosques dominados por el siempreverde *N. dombeyi*, coincidiendo con los hallazgos de Singer (1969), Lazo (2001) y Valenzuela (2003), y en menor medida, estuvieron asociados con *N. antarctica*, *N. pumilio* y especies de *Lophozonia*. Barroetaveña *et al.* (2019) demostraron que *N. dombeyi* presenta el mayor número de especies ectomicorrícicas, incluyendo especies de *Ramaria*, probablemente debido a su amplia distribución en Patagonia (Donoso Zegers 2006), principalmente en áreas con alta humedad, como la proximidad a lagos y márgenes de ríos o cañones protegidos, formando densos bosques que protegen del viento, con condiciones favorables para la fructificación fúngica. Además de la cobertura forestal dominante, los basidiomas se encontraron a menudo cerca de *Chusquea* spp., coincidiendo con los registros de Valenzuela (2003) y Gómez (2015).

Los resultados de este trabajo, que amplían la diversidad específica del género *Ramaria* para Sudamérica, junto con el continuo registro de ejemplares con morfologías variadas en zonas no muestreadas en este estudio, sugieren que aún podrían descubrirse más especies de *Ramaria* en la Patagonia. A pesar de la introducción de elementos del bosque Valdiviano en algunas áreas del sur de

Argentina, es probable que las especies de *Ramaria* en Chile sean mucho más diversas que las de Argentina. La información taxonómica y ecológica ampliada sobre estas especies constituye herramientas esenciales para planificar y ejecutar programas de conservación, especialmente relevantes por tratarse de especies endémicas con distribuciones restringidas. Además, sientan las bases necesarias para estudios futuros sobre propiedades alimenticias y bioactivas de los diferentes taxa. Asimismo, sientan las bases para desarrollar opciones de manejo micosilvícola para aumentar su productividad en bosques naturales, y permitir la certera inoculación de plantines con especies particulares, con fines de restauración ecológica integral de bosques o bien para la producción intensiva de basidiomas en mico-huertos forestales. Futuras investigaciones deben centrarse en áreas poco representadas, como el sur de Chile, para aclarar los patrones biogeográficos de las especies de *Ramaria* en el sur de América del Sur y proporcionar un marco más completo de la evolución de *Ramaria* y las relaciones filogenéticas con géneros relacionados.

#### Conclusiones

- Se estableció una primera filogenia que muestra las relaciones y disposición de las especies de *Ramaria* de los bosques de la Patagonia en relación con las encontradas en todo el mundo.
- Se confirma la parafilia del género y la presencia de seis especies en los bosques andinos patagónicos: *R. patagonica*, *R. inedulis*, *R. botrytis*, *R. paraconcolor* y dos nuevas especies: *R. flavinedulis*, destacada por basidiomas de color amarillo brillante con estípites retorcidos y esporas verrugosas y *R. dendrophora*, caracterizada por tener basidiomas de color amarillo pálido y esporas con verrugas irregulares.
- *Ramaria patagonica* se destaca como la especie más frecuente y de mayor tamaño dentro de *Ramaria* s.l en la región de la Patagonia Argentina. La posición filogenética de esta especie sugiere la posibilidad de constituir un género independiente dentro de Gomphales, sin embargo, se requiere un análisis más exhaustivo de genes para confirmar esta hipótesis.
- *R. botrytis* presentó linajes crípticos, con las colecciones patagónicas en un clado diferente al de la colección tipo.

- *R. inedulis* y el nuevo *R. flavinedulis* formaron un nuevo linaje representado únicamente por colecciones patagónicas.

CAPÍTULO 3: IMPACTO DE MÉTODOS DE SECADO SOBRE EL  
CONTENIDO FENÓLICO TOTAL Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE  
*FISTULINA ANTARCTICA Y RAMARIA PATAGONICA*

### **CAPÍTULO 3.** Impacto de métodos de secado sobre el contenido fenólico total y actividad antioxidante de *Fistulina antarctica* y *Ramaria patagonica*.

#### Resumen del capítulo

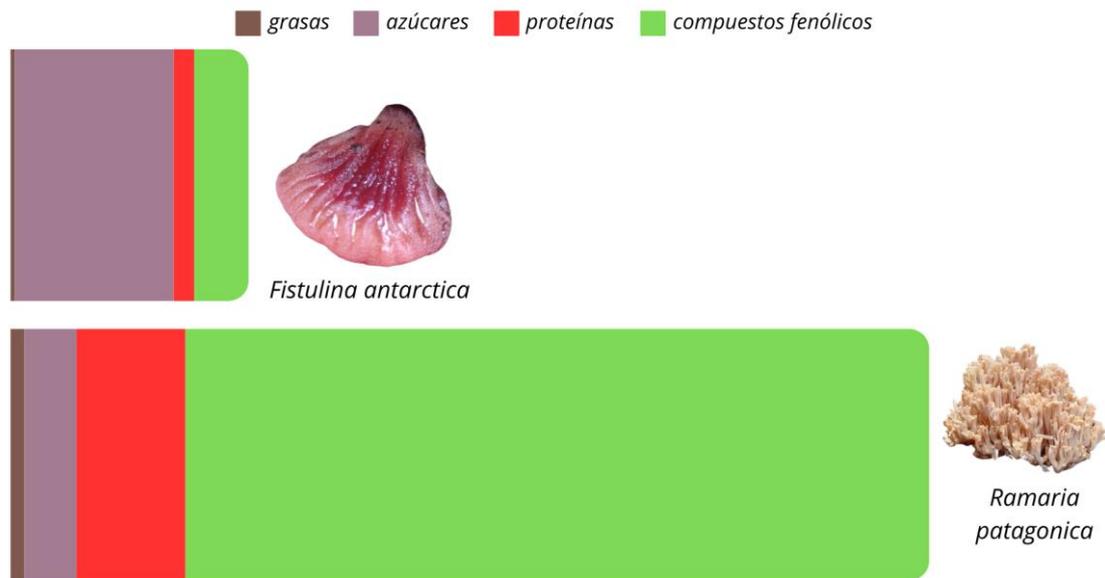
Este estudio explora los efectos de diversos métodos de secado en el contenido fenólico total (TPC) y la actividad antioxidante de dos hongos comestibles silvestres, *Fistulina antarctica* y *Ramaria patagonica*, que se encuentran en los bosques andinos de la Patagonia. Ambos hongos son conocidos por sus propiedades nutricionales y medicinales y han sido consumidos tradicionalmente por las comunidades locales. La investigación evalúa el impacto de las temperaturas de secado al aire (50 °C, 60 °C, 70 °C), congelado y el liofilizado en el TPC y la actividad antioxidante. Los resultados indican que las muestras liofilizadas y frescas congeladas generalmente muestran un mayor TPC y actividad antioxidante en comparación con las muestras secadas al aire. En particular, se recomienda el secado a 60 °C para ambas especies para equilibrar el tiempo de secado y la preservación de la bioactividad. Los hallazgos proporcionan información valiosa para optimizar los métodos de conservación postcosecha y mejorar la comercialización de estos hongos nativos de la Patagonia.

Palabras clave: bioactividad, DPPH, hongos comestibles, Patagonia, conservación post-cosecha.

## Introducción

Los bosques andino patagónicos albergan una amplia variedad de especies de hongos silvestres que poseen un gran potencial como fuentes de alimentos comestibles, ofreciendo tanto un alto valor nutricional como propiedades medicinales (Barroetaveña & Toledo 2020). En estos bosques, algunas especies han sido reconocidas por las comunidades mapuches por su uso tradicional, destacadas cualidades sensoriales y prometedoras posibilidades económicas (Molares *et al.* 2020). Entre ellas, se encuentran *Fistulina antarctica*, conocida como lengua de vaca, y *Ramaria patagonica*, conocida como changle, las cuales tienen una larga historia de consumo documentada. Estudios recientes han analizado la composición nutricional de estos hongos silvestres comestibles (HSC) en Argentina y Chile, centrándose en sus perfiles de ácidos grasos y orgánicos, azúcares solubles, compuestos fenólicos, ergosterol, así como en su potencial antioxidante y antimicrobiano (Toledo *et al.* 2016; Rugolo *et al.* 2020; Jacinto-Azevedo *et al.* 2021).

*Fistulina antarctica* contiene bajos niveles de grasa ( $0.83 \pm 0.01$  g/100 g peso seco), azúcares ( $28.68 \pm 0.58$  g/100 g peso seco), proteínas ( $3.71 \pm 0.07$  g/100 g peso seco) y compuestos fenólicos ( $9.85 \pm 0.09$  µg/100g peso seco), en comparación con *R. patagonica* que también presenta bajos niveles de grasa ( $2.51 \pm 0.10$  g/100 g peso seco) y azúcares ( $9.41 \pm 0.35$  g/100 g peso seco), pero altos niveles de proteínas ( $19.68 \pm 0.64$  g/100 g peso seco) y compuestos fenólicos ( $134.39 \pm 2.10$  µg/100g peso seco) (Toledo *et al.* 2016; Rugolo *et al.* 2022) (Fig. 28).



**Fig. 28** - Propiedades nutricionales y compuestos fenólicos de las especies en estudio. Extraído de Rugolo *et al.* (2022), los barras esquematizan la composición nutricional aproximada (g/100 g) y contenido de fenoles (mg/g).

Los compuestos fenólicos son una categoría significativa de sustancias bioactivas que poseen propiedades antioxidantes, antibacterianas y antiinflamatorias. Estas sustancias tienen el potencial de mejorar los mecanismos de defensa naturales en los seres humanos (Souilem *et al.* 2017; Gasecka *et al.* 2020). Las propiedades antioxidantes de estas moléculas bioactivas son cruciales para prevenir el daño causado por los radicales libres; numerosos estudios han informado que esta actividad está relacionada con su contenido fenólico (Barros *et al.* 2008; Kumar *et al.* 2021). Los compuestos antioxidantes neutralizan las especies reactivas del oxígeno (ROS), las cuales son responsables del daño a proteínas, lípidos y material genético. Los efectos antioxidantes de los hongos pueden evaluarse mediante diversos ensayos *in vitro* (ABTS, DPPH, FRAP, LIP) (Fig. 29).



**Fig. 29** - Mecanismo de acción antioxidante de los hongos y sus compuestos bioactivos.

Entre las especies patagónicas, *R. patagonica* presentó el mayor contenido de compuestos fenólicos, con 50.82 mg GAE/g de extracto (Toledo *et al.* 2016), con cantidades comparativamente altas de ácido protocatecuico (Rugolo *et al.* 2022), y los resultados más efectivos en todas las pruebas de actividad antioxidante en comparación con otros HCS (Toledo *et al.* 2016; Rugolo *et al.* 2022). En cambio, *Fistulina antarctica* mostró la actividad antioxidante más baja en la prueba de actividad captadora de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), la inhibición de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y la prueba de inhibición de la decoloración de la  $\beta$ -caroteno (Toledo *et al.* 2016), en la inhibición de la hemólisis oxidativa (OxHLIA) y la prueba de inhibición de TBARS (Rugolo *et al.* 2022), también con bajos contenidos de fenoles de 7.82 mg GAE/g (Toledo *et al.* 2016) y 1.30 mg GAE/g de extracto (Rugolo *et al.* 2022).

Los hongos son conocidos por su perecibilidad y vida útil relativamente corta debido a la falta de una cubierta protectora, una alta tasa respiratoria y un contenido significativo de agua (Castellanos Reyes *et al.* 2021; Dawadi *et al.*

2022). Estos factores los hacen susceptibles a diversos procesos de deterioro, incluido el daño mecánico, la contaminación microbiana, la pérdida de peso y el pardeamiento enzimático (Castellanos Reyes *et al.* 2021). Como resultado, los hongos experimentan un rápido deterioro en calidad poco después de la cosecha, por lo que las condiciones postcosecha, así como los tratamientos culinarios, afectan significativamente su calidad (Barros *et al.* 2007; Fernandes *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2018). Los hongos *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus* suelen durar de uno a tres días a temperatura ambiente y de cinco a siete días cuando se refrigeran (Castellanos Reyes *et al.* 2021). La vida útil máxima en condiciones de refrigeración convencional (a 4 °C) fue de 4 días para *F. antarctica* y 8 días para *R. patagonica* (Barroetaveña *et al.* 2020). Esto implica un problema con la distribución y comercialización en fresco. Además, dado que los hongos silvestres comestibles de la Patagonia tienen una estacionalidad estricta de fructificación (abril y mayo para estas especies), su consumo durante el resto del año se realiza mediante la preservación por secado.

La deshidratación se ha convertido en un proceso eficiente y ampliamente utilizado para la conservación de hongos con el fin de prolongar su vida útil (Giri & Prasad 2007; Pei *et al.* 2014; Yadav & Negi 2021), al reducir el contenido de agua para minimizar el deterioro microbiano y preservar la textura y los sabores (Pendre *et al.* 2011; Xu *et al.* 2019; Barroetaveña *et al.* 2020), y constituye el método postcosecha más extendido utilizado para los HSC en la Patagonia (Molares *et al.* 2020). Sin embargo, los cambios que los alimentos pueden experimentar con este método han motivado la búsqueda de otras técnicas de preservación que mantengan la calidad y preserven los compuestos bioactivos (Pei *et al.* 2014; Barroetaveña *et al.* 2020).

El secado por aire caliente (HD) y la liofilización (FD) son dos de los métodos más utilizados para secar hongos (Kotwaliwale *et al.* 2007; Wang *et al.* 2014; Yang *et al.* 2019). El secado por aire caliente implica exponer los hongos a aire caliente en circulación, lo que provoca la evaporación de la humedad y su posterior secado. Este método es relativamente simple y rentable; sin embargo, este proceso puede provocar pérdidas de bioactividad (Fernandes *et al.* 2013; Wang *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2018; Xu *et al.* 2019; Gąsecka *et al.* 2020; Yang *et al.* 2023). Por otro lado, la liofilización es un método más avanzado y

especializado. Involucra congelar los hongos y luego someterlos a un ambiente de vacío, donde el agua congelada experimenta sublimación (cambio directo de sólido a gas). FD es conocida por su capacidad para retener el color, la textura y las propiedades nutricionales originales de los hongos. Es adecuada para compuestos sensibles al calor (como fenoles, tocoferoles, carotenoides y ácido ascórbico con propiedades antioxidantes) y resulta en hongos secos de alta calidad; sin embargo, es un proceso más costoso y que requiere tiempo, además de equipos y experiencia especializados (Huang *et al.* 2011, 2012; Wang *et al.* 2014).

La selección de un método de secado ideal para los hongos se basa en el objetivo de minimizar el tiempo de secado y el consumo de energía, reduciendo así los costos, al tiempo que se garantiza la calidad deseada del producto final (Yadav & Negi 2021). Sin embargo, la elección entre los métodos depende de varios factores, incluidos los recursos disponibles y consideraciones de costo.

Por lo tanto, para seleccionar el proceso de secado más apropiado y analizar la relación costo/beneficio implicada en la readaptación tecnológica de prácticas tradicionales, es necesario analizar las pérdidas de bioactividad vinculadas a los métodos de deshidratación y a diferentes temperaturas de deshidratación. Mediante el uso de técnicas adecuadas, se vuelve posible mantener la integridad de estos compuestos bioactivos y metabolitos secundarios, prolongando así la vida útil de los hongos (Castellanos Reyes *et al.* 2021).

Maximizar las propiedades bioactivas y organolépticas de los hongos silvestres y ampliar su ventana de disponibilidad, favorecerá su valor de mercado en base a calidad, y permitirá su incorporación en el desarrollo efectivo de una micogastronomía identitaria regional, en conjunción con el desarrollo de ofertas micoturísticas, como alternativas de desarrollo local. Para lograr esto, es necesario contar con información sólida sobre diferentes técnicas de conservación postcosecha y métodos de almacenamiento que permitan la venta de productos de calidad con propiedades bioactivas similares a las de los productos frescos.

## Objetivos

- **Evaluar el impacto de la temperatura de deshidratado en el tiempo y sus efectos sobre el encogimiento de las fructificaciones de *F. antarctica* y *R. patagonica***
- **Evaluar el efecto de la temperatura de deshidratación y de la liofilización en el contenido fenólico total (CFT) y la actividad antioxidante de *F. antarctica* y *R. patagonica*.**
- **Analizar en combinación ambos resultados para elegir la opción más beneficiosa en función de objetivos, disponibilidades y costos y elaborar protocolos de transferencia tecnológica.**
- **Elaborar una guía de recomendaciones de protocolos postcosecha.**

## Hipótesis

- 1 Mayor temperatura de deshidratación disminuye el tiempo de secado y no altera el encogimiento del producto seco.
- 2 Mayores temperaturas de deshidratación disminuirán los valores de TPC y actividad antioxidante, respecto del producto fresco.
- 3 Los hongos liofilizados preservan la TPC y capacidad antioxidantes más cercana al hongo fresco.

## Materiales y Métodos

### Recolección y procesamiento de muestras

Las muestras de *F. antarctica* y *R. patagonica* silvestres (Fig. 30) se recolectaron en el Parque Nacional Los Alerces (PNLA) en abril y mayo de 2022, contando con los permisos de colecta correspondientes. Los cuerpos fructíferos frescos de ambas especies se limpiaron inicialmente y se cortaron en trozos pequeños (aproximadamente 2–3 mm) el día de la cosecha para determinar el contenido de humedad fresca; el resto se dividió en porciones de 250 g para los tratamientos de secado en estufa. Las muestras se utilizaron inmediatamente en fresco para los tratamientos de temperatura de deshidratado en estufa y se congelaron a -80 °C hasta la liofilización. Los experimentos se llevaron a cabo en el área de Fitopatología y Microbiología Aplicada del Centro de Investigación Forestal (CIEFAP).



**Fig. 30** - Muestras de los hongos comestibles silvestres estudiados. (A) *Fistulina antarctica* (B) *Ramaria patagonica*.

#### Contenido de humedad

El contenido de humedad inicial del material fresco se midió mediante el método del horno (Valiente *et al.* 2016). En resumen, una cantidad conocida de muestras frescas se colocó en placas de Petri en un horno deshidratador (Dalvo Instruments, Modelo UBF575, Argentina) a 102 °C, se secó hasta peso constante, se retiró y enfrió en un desecador, para luego ser pesado con una balanza de precisión (Explorer Ohaus, EE. UU.; 0.0001 g). El contenido de humedad se estableció mediante la siguiente fórmula:

$$X(\text{db}) = \text{g H}_2\text{O} / \text{g SS}$$

Donde X(db) es el contenido de humedad en base seca y SS es sólido seco. Se realizaron tres réplicas para cada tratamiento.

#### Proceso de deshidratado

Para el experimento de deshidratado se aplicaron tres temperaturas (50 °C, 60 °C, 70 °C) utilizando un horno con aire forzado comercial (Numak DHG-9203A), manteniendo constante la velocidad de flujo de aire en 0.8 m/s y con una humedad relativa del aire del 7 %. Las pérdidas de peso de las muestras parcialmente deshidratadas se obtuvieron mediante pesajes discontinuos utilizando una balanza analítica digital (Explorer Ohaus, EE. UU.;  $\pm 0,0001$  g) (Fig. 31). Siguiendo a Valiente *et al.* (2016), las muestras se secaron hasta alcanzar una condición de equilibrio. El peso seco final se determinó en una estufa de secado de aire forzado (TECNODALVO) a 102 °C, hasta peso constante, utilizando la mencionada balanza. El contenido de humedad relativa se calculó como:

$$X_r = (x/x_0)$$

donde  $x$  es el contenido de humedad en el tiempo  $t$  y  $x_0$  es el contenido de humedad inicial, dependiendo del tiempo de secado ( $t$ ).

Además, se determinó de forma relativa el % de reducción del tamaño utilizando un calibre y midiendo espesor y largo (para *Fistulina*) y espesor (en la base de la ramificación) y largo (para *Ramaria*) antes y después de someterlas al proceso de deshidratado para cada temperatura.



**Fig. 31** - Proceso de deshidratado. (A) Pesadas discontinuas; (B y C) Mediciones con calibre para el cálculo de % de reducción de volumen; (D y E) Porciones de los hongos en estudio (*R. patagonica* y *F. antarctica*, respectivamente) antes de someterlos al deshidratado.

Para el experimento de liofilización, las fructificaciones frescas se empaquetaron en tubos centrífugos de plástico (50 ml), se congelaron a  $-80 \pm 1$  °C durante 24

h, se retiraron y se colocaron inmediatamente en el liofilizador (BiOBASE, Serie BK-FD10) durante 72 h. La temperatura del condensador se fijó en  $-64\text{ }^{\circ}\text{C}$  y el vacío se mantuvo a 20 Pa. Se realizaron tres réplicas para cada tratamiento.

#### Preparación de extractos de compuestos bioactivos

Las muestras secas o liofilizadas y molidas (2 g equivalentes a 20 g de fresco-congelado) se extrajeron utilizando 50 mL de una solución de etanol/agua (80:20 v/v) durante 2 h a temperatura ambiente en un agitador (IKA-MAG, Tipo RCT, Alemania). Los extractos se concentraron en un evaporador rotativo, se liofilizaron y se almacenaron antes de su uso (Fig. 32). Luego, las muestras se volvieron a disolver en metanol a una concentración de 5 mg/mL para el análisis de compuestos bioactivos. Todos los análisis se realizaron por triplicado.



**Fig. 32** - Preparación de extractos: agitación (a), filtrado (b), liofilizado (C).

#### Contenido total de fenoles (TPC)

La concentración de TPC se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.* 1999). Se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de reactivos Folin-Ciocalteu a 500  $\mu\text{L}$  del extracto y se mezclaron. Se siguió el protocolo de Valiente *et al.* (2016). La absorbancia se midió a 765 nm utilizando un espectrofotómetro Multiskan Sky High (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU). Se utilizó un estándar de ácido gálico (mg/l). Los resultados se expresaron en miligramos de ácido gálico equivalente por 100 gramos de hongos frescos o secos, en base seca (mg GAE/100 g).

#### Evaluación de la actividad antioxidante

##### Actividad de eliminación de radicales ABTS

La actividad de eliminación de radicales ABTS se determinó utilizando el método reportado por Gassecka *et al.* (2015) con algunas modificaciones. En resumen, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de solución ajustada de ABTS a 20  $\mu\text{L}$  de cada extracto. La

absorbancia se midió a 734 nm después de 10 min de incubación. Los controles contenían 50 µL de agua destilada. La actividad de eliminación de radicales ABTS (RSA) se estimó mediante la fórmula:

$$\text{ABTS RSA (\%)} = [(A0 - A1) / A0] \times 100$$

Donde A1 es el valor de absorbancia de las muestras y A0 es el valor de absorbancia de la solución de ABTS sin muestras.

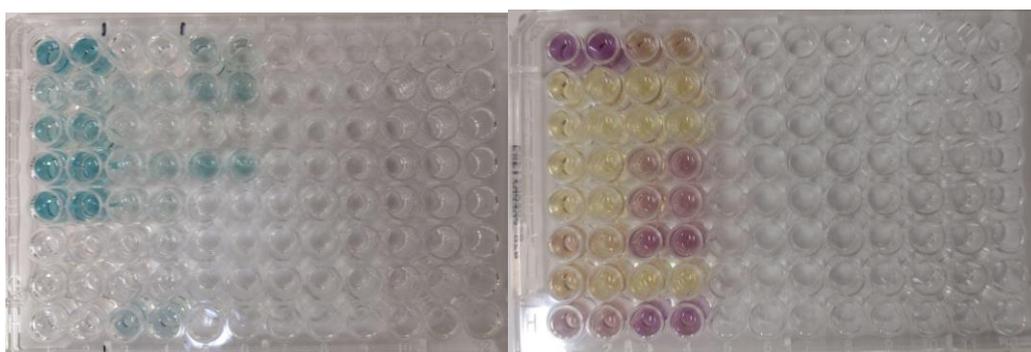
### **Actividad de eliminación de radicales DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)**

La capacidad de eliminación de radicales DPPH se evaluó según el método modificado de Blois (1958). En resumen, se añadieron 270 µL de solución de DPPH de metanol 0.06 mM a 30 µL de extracto etanólico de las especies de hongos en una placa de 96 pocillos (Fig. 33). La mezcla se agitó vigorosamente y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 60 min. La absorbancia se midió a 515 nm después de 60 min de incubación, a temperatura ambiente.

El efecto de eliminación de radicales DPPH se calculó de la siguiente manera:

$$\text{DPPH RSA (\%)} = (A0 - A1) / A0 \times 100 \%,$$

donde A1 es el valor de absorbancia de las muestras y A0 es el valor de absorbancia de la solución de DPPH sin muestras.



**Fig. 33** - Placas de 96 pocillos donde se realizaron las lecturas cuantificación de fenoles totales con Folin (A) y actividad antioxidante con DPPH (B). En ambas técnicas los cambios de color (de concentrado a pálido) medidas mediante cambios en la absorbancia permiten cuantificar la reacción.

### **Ensayo de poder antioxidante reductor de hierro (FRAP)**

El poder reductor se determinó según Kozaski *et al.* (2011). La absorbancia de 200 µL de la solución mezclada se midió a 700 nm. El blanco fue la solución con todos los reactivos sin extracto de hongos. Una absorbancia más alta indica un mayor poder reductor. Se utilizó una curva de calibración entre 0 y 30 mg/mL de ácido ascórbico (AA) para expresar los resultados como equivalentes de AA en 100 mL.

### **Inhibición de la peroxidación lipídica (LIP)**

Se utilizó el método de dieno conjugado, con algunas modificaciones, para la determinación de la actividad antioxidante (Lingnert *et al.* 1979). La absorbancia se registró a 234 nm a diferentes tiempos de incubación: 0, 24 y 48 h. Las muestras se incubaron a 37 °C, 150 rpm, sin luz. Se utilizó un blanco sin extracto de hongos. La actividad antioxidante proporcional se calculó de la siguiente manera:

$$[(\Delta A0 - \Delta A1) / \Delta A0] \times 100$$

donde  $\Delta A0$  fue la diferencia en la absorbancia entre 0 y 24 h de incubación de la reacción de control y  $A1$  fue la diferencia en la absorbancia en presencia de la muestra. El ácido ascórbico se utilizó como control positivo. Un valor del 100% indicó una capacidad inhibidora más fuerte.

#### [Análisis estadístico](#)

Se analizaron tres muestras de cada tratamiento para cada especie fúngica. Las mediciones se realizaron por triplicado y los datos resultantes de los experimentos se recopilaron y analizaron utilizando el software estadístico InfoStat (versión 2008, Grupo InfoStat, Argentina). Los resultados presentados en tablas y figuras muestran el valor medio de tres réplicas y su desviación estándar correspondiente. Las diferencias entre los valores medios se evaluaron mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA), seguido de la prueba post hoc de Tukey con un nivel de significancia del 0.05 y un intervalo de confianza del 95% ( $p < 0.05$ ).

#### [Material de transferencia](#)

En base a los resultados obtenidos y en combinación con información de base de las especies utilizadas se elaboró una guía con distintos protocolos de tratamiento postcosecha.

## Resultados

### Contenidos de humedad y comportamiento durante el deshidratado

El contenido de humedad fresca de *F. antarctica* y *R. patagonica* fue de  $90,65 \pm 3,7 \%$  y  $91,5 \pm 1 \%$  respectivamente. El contenido de humedad de las especies analizadas en función del tiempo de deshidratado ( $X_r = X/X_0$ , fijando una humedad relativa de  $X_r = 0,01$ ) para diferentes temperaturas se presenta en la Figura 2. El tiempo de deshidratación fue significativamente menor a  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  en ambas especies (Tabla 7).

**Tabla 7** – Tiempos de secado a diferentes temperaturas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

	Tiempo de secado (h)		
	50 °C	60 °C	70 °C
<i>F. antarctica</i>	$9,75 \pm 1,06b$	$7,37 \pm 0,53b$	$3,62 \pm 0,17a$
<i>R. patagonica</i>	$3,87 \pm 0,18b$	$2,37 \pm 0,70b$	$1,62 \pm 0,77a$

Se detectó una diferencia notable en el tiempo de deshidratado entre las especies, dado que *Fistulina antarctica* requiere casi el doble del tiempo de deshidratado en comparación con *R. patagonica* (Fig. 34).

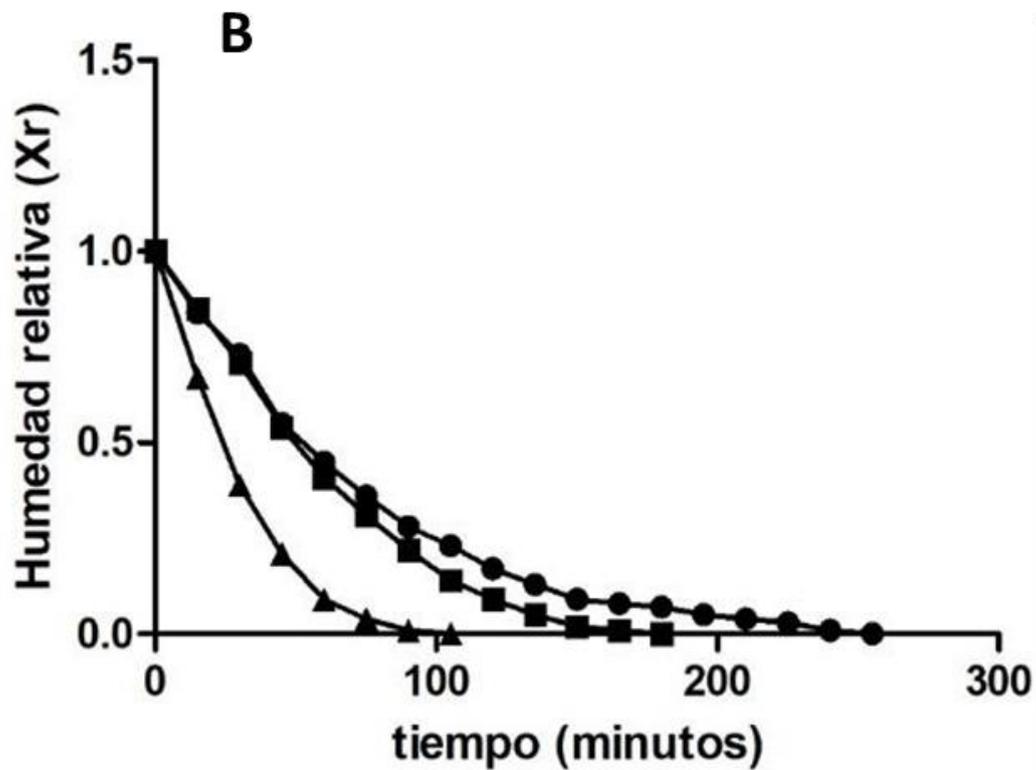
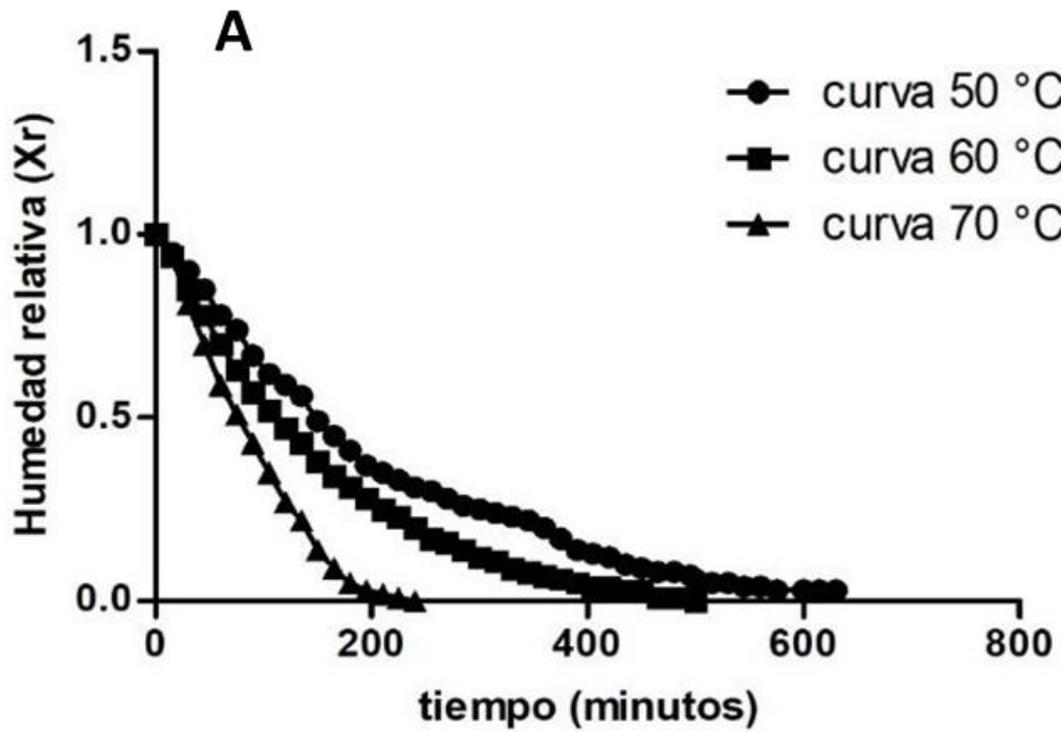


Fig. 34 - Curvas de deshidratado a las temperaturas probadas para *Fistulina antarctica* (A) y *Ramaria patagonica* (B).

Para *F. antarctica* el porcentaje de reducción luego del proceso de deshidratación fue de 59, 58 y 70 % a 50, 60 y 70 °C, respectivamente; mientras que *R. patagonica* se redujo en un 41, 39 y 47 % a 50, 60 y 70 °C, respectivamente (Fig. 35).

## Deshidratado a 60 °C →



**Fig 35** - Encogimiento y aspecto general de *F. antarctica* (A) y *R. patagonica* (B) antes y después del proceso de deshidratado a 60 °C.

### Efecto sobre el Contenido Total de Fenoles

Los tratamientos de fresco-congelado y deshidratación a 60 °C presentaron los valores significativamente más altos de TPC para *R. patagonica* ( $14,78 \pm 0,09$  y

13,67 ± 0,43 mg GAE / mg de extracto, respectivamente), seguidos por los demás tratamientos aunque sin diferencias significativas entre ellos. En cambio, para *F. antarctica*, las muestras liofilizadas presentaron el valor significativamente más alto (8,66 ± 0,16 mg GAE / mg de extracto), seguidas por los tratamientos de fresco-congelado (7,93 mg GAE / mg de extracto) y luego las 3 temperaturas de deshidratación, entre ellas la de 60° con valor significativamente mayor (Tabla 8).

Las mayores pérdidas en cuanto a fenoles ocurren en *F. antarctica* en las tres temperaturas de deshidratado evaluadas (Tabla 8), siendo la mayor pérdida a 70 °C (39,47 % de pérdida con respecto a los valores de TPC fresco-congelados). En *R. patagonica* la mayor pérdida ocurre a 50 °C, con respecto a las muestras fresco-congeladas (con una reducción del 35,45 %).

#### Actividad antioxidante

Para el ensayo de ABTS las muestras deshidratadas a 60 °C mostraron diferencias significativas con respecto a las otras temperaturas. Para DDPH y FRAP, el deshidratado a 70 °C mostró los menores % de actividad, mientras que el las muestras deshidratadas a 50 y 60 °C no presentaron diferencias significativas con respecto al liofilizado. Para el ensayo ILP, no se detectó actividad para ninguna de las muestras secas de *F. antarctica*. Los extractos de *Ramaria patagonica* (concentración de 5 mg/mL) mostraron notables efectos de eliminación de radicales ABTS y DPPH, así como FRAP e ILP en el rango del 72,90 al 99,55 %, para todos los tratamientos ensayados. Los métodos de fresco-congelado, liofilizado y 60 °C mostraron los mejores resultados de inhibición de radicales libres en comparación con los otros tratamientos de deshidratado (Tabla 8). Para ABTS y DPPH los resultados en las muestras liofilizadas y las deshidratadas a las tres temperaturas no mostraron diferencias significativas entre sí. Para FRAP las muestras deshidratadas a 50 y 70 °C mostraron la mayor reducción de actividad antioxidante, con diferencias significativas respecto al resto de los tratamientos (Tabla 9). En el ensayo de ILP las muestras deshidratadas a 60 °C mostraron incluso mejores resultados que las liofilizadas a las 24 h, mientras que a las 48 h las muestras frescas-congeladas y liofilizadas fueron las que presentaron mayor actividad, seguidas por las deshidratadas a 60

y 70 °C, siendo las deshidratadas a 50 °C las que mostraron las mayores reducciones.

**Tabla 8** - Actividad antioxidante en hongos frescos congelados, deshidratados (50, 60 y 70 °C) y liofilizados. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Nd: no detectado.

	TPC (mg GAE/mg extracto)	ABTS (% de inhibición)	RSA (%)	FRAP (mg AAE/100 ml)	ILP (%)	
					t 24	t 48
<b><i>F. antarctica</i></b>						
Frescos-congelados	7,93 ± 0,64c	79,75 ± 0,58bc	68,94 ± 1,99c	43,01 ± 0,21ab	39,02 ± 1,30a	27,71 ± 0,80a
50° C	5,03 ± 0,20a	63,00 ± 3,77a	47,21 ± 4,75b	24,77 ± 6,28ab	Nd	Nd
60° C	5,57 ± 0,10b	70,73 ± 7,90ab	48,39 ± 0,44b	32,86 ± 2,50ab	Nd	Nd
70° C	4,80 ± 0,11a	57,05 ± 1,74a	24,31 ± 0,55a	24,58 ± 1,99a	Nd	Nd
liofilizados	8,66 ± 0,16d	82,35 ± 0,11c	43,41 ± 7,64b	38,88 ± 1,20a	37,36 ± 0,90a	82,35 ± 0,11a
<b><i>R. patagonica</i></b>						

Frescos-congelados	14,78 ± 0,09b	99,03 ± 0,87b	99,31 ± 4,23b	98,08 ± 0,70b	97,72 ± 0,90c	99,03 ± 0,87c
50° C	9,54 ± 0,43a	90,77 ± 1,06a	81,25 ± 1,66a	72,90 ± 6,64a	86,57 ± 0,80cd	81,82 ± 0,20b
60° C	13,67 ± 0,43b	91,59 ± 1,83a	82,58 ± 0,66a	97,60 ± 2,28b	93,09 ± 1,30bc	85,52 ± 1,20a
70° C	11,11 ± 0,34a	92,83 ± 0,29a	81,57 ± 0,55a	89,02 ± 8,90ab	82,79 ± 0,90a	83,51 ± 2,10a
liofilizados	10,52 ± 0,5 a	90,01 ± 1,16a	82,43 ± 0,44a	96,54 ± 2,06b	92,51 ± 0,80b	99,55 ± 1,20c

---

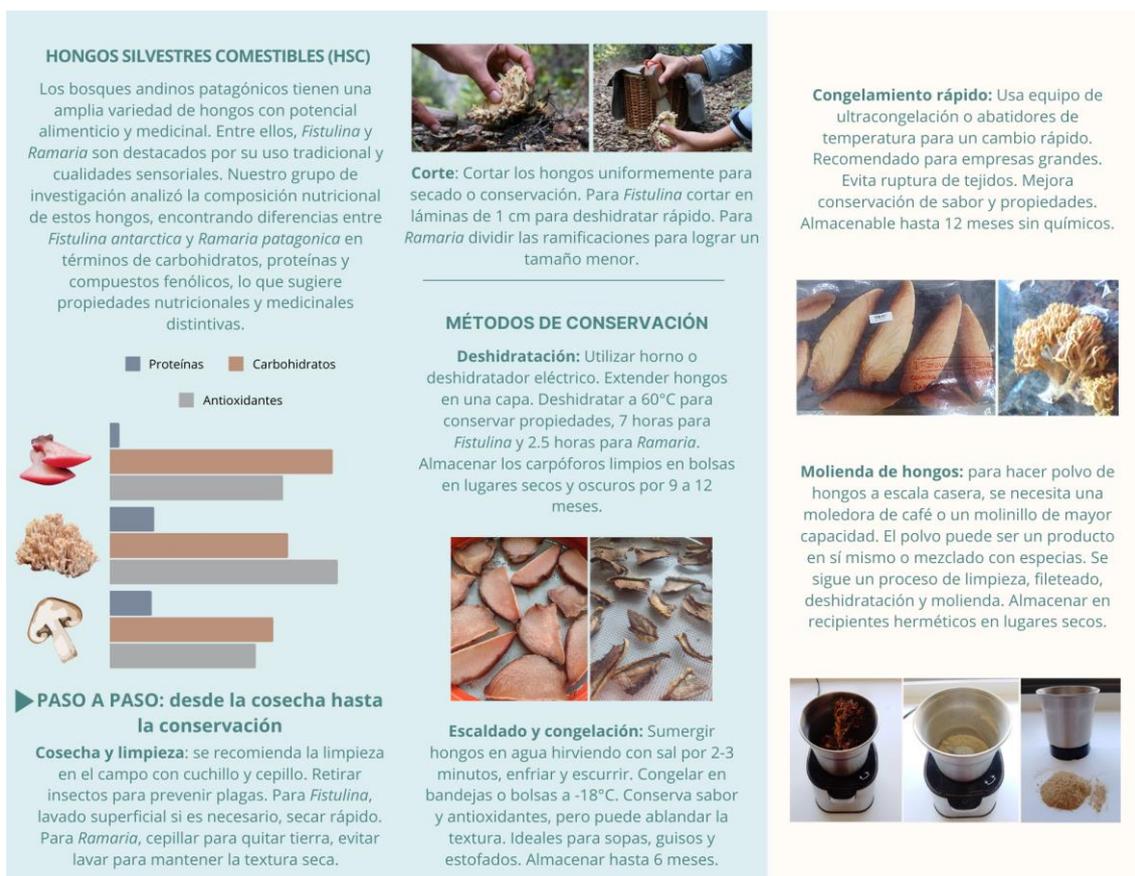
**Tabla 9** - Porcentaje de pérdida de TPC y actividad antioxidante para los diferentes métodos de secado. nd = no detectado. rnd= no se detectó reducción.

Especie	Método de secado	Reducción en TPC (%) (comparados con los frescos congelados)	Reducción en la actividad antioxidante (%) (comparados con los frescos congelados)				
			ABTS	DPPH	FRAP	ILP	
						t 24	t48
<i>F. antarctica</i>	50 °C	36,57	21,00	31,52	43,33	nd	nd
	60 °C	29,76	11,31	29,80	23,59	nd	nd
	70 °C	39,47	28,46	64,73	42,85	nd	nd
	liofilizado	rnd	rnd	37,03	9,60	4,25	19,34
<i>R. patagonica</i>	50 °C	35,45	8,34	18,18	25,67	11,41	17,38
	60 °C	7,51	7,51	16,84	0,49	4,73	13,64
	70 °C	24,83	6,26	17,86	9,23	15,28	15,67
	liofilizado	28,82	9,11	16,99	1,57	5,33	rnd

## Material de transferencia

Se elaboró un tríptico disponible en formato digital para difusión general sobre recomendaciones de tratamiento postcosecha de *F. antarctica* y *R. patagonica* (Fig. 36), incorporando los resultados de este capítulo. Proporciona información actualizada, en lenguaje accesible sobre cómo manejar adecuadamente estas especies luego de la cosecha, a fin de generar un producto de alta calidad que maximice su valor en el mercado. Los destinatarios son personas vinculadas a la actividad: productores, recolectores y educadores.

<p><b>FISTULINA ANTARCTICA (LENGUA DE VACA)</b></p> <p>Especie endémica degradadora del bosque Andino Patagónico que fructifica en otoño. Su carne es rojiza, gelatinosa a firme, de textura carnosa. Aroma fúngico suave, frutal y sabor dulce. Es rica en carbohidratos, fructosa y trehalosa.</p>  <hr/> <p><b>RAMARIA PATAGONICA (CHANGLE)</b></p> <p>Especie endémica micorrízica del bosque Andino Patagónico que fructifica en otoño. Su carne es amarilla pálida, de textura cartilaginosa, crocante. Aroma fúngico suave, frutal y sabor dulce amaderado. Rica en proteínas. Tiene gran capacidad antioxidante y es alta en compuestos fenólicos (ácidos gálico, p-hidroxibenzoico, p-cumárico y cinámico).</p> 	<p></p> <p><b>Buenas prácticas de recolección</b></p>  <p>Cortar con un cuchillo afilado en la base para dejar el micelio en el sustrato.</p> <p>Transportar en canasto para evitar aplastamiento y facilitar dispersión de esporas.</p> <p>Evitar bolsas de plástico para prevenir descomposición.</p> <p>No mezclar especies distintas en el mismo recipiente.</p> <p>Recolectar solo lo necesario y evitar hongos muy maduros o inmaduros.</p> <p>Escaneando este código QR podrás acceder a más material informativo sobre estas y otras especies de HSC.</p> 	<p></p> <p><b>RECOMENDACIONES DE TRATAMIENTO POSTCOSECHA CON ÉNFASIS EN HONGOS SILVESTRES COMESTIBLES DE LOS GÉNEROS FISTULINA Y RAMARIA</b></p>  <p>Autoras: Gabriela González, María Belén Pildain, Carolina Barroetaveña</p> <p>¿Cómo puedo conservar los hongos luego de la cosecha y obtener un producto de alta calidad?</p>
---	---	--



**Fig. 36-** Tríptico informativo sobre los métodos de preservación postcosecha de los hongos silvestres comestibles *F. antarctica* y *R. patagonica*.

### Discusión

La información generada sobre las prácticas postcosecha de hongos silvestres comestibles mediante la aplicación de diferentes tratamientos destinados a prolongar su vida útil contribuye significativamente a su comercialización, facilitando y extendiendo los plazos de distribución. La humedad de los basidiomas frescos de ambas especies estudiadas fue muy similar a la reportada para otras especies de los respectivos géneros. El contenido de humedad para *Fistulina hepatica* determinado por Heleno *et al.* (2009) fue de 87,51 %, 3,5 % más bajo que para *F. anctartica*, mientras que para *Ramaria aurea* se reportó 88,5 % y para *R. botrytis* del 89,8 % (Barros *et al.* 2008) 3,28 y 1,86 % más bajo que para *Ramaria patagonica* respectivamente. Otras especies comestibles también han mostrado valores cercanos de contenido de humedad: *Flammulina velutipes* 90,7 % (Pereira *et al.* 2012), *Lactarius deliciosus* 90,0 % (Barros *et al.* 2007), *Lentinula edodes* 88,4 % (Tian *et al.* 2016), *Lepista nuda* 93,8 % (Barros *et al.* 2008), y *Pleurotus ostreatus* 91,5 % (Ozouni *et al.* 2009). Si bien el contenido de agua de ambas especies es muy similar entre ellas, el tiempo de deshidratado en *R. patagonica* fue casi la mitad que para *F. antarctica*. La forma

coralina de la primera, con ejes cilíndricos de 0,5 cm de diámetro en promedio, puede explicar la diferencia encontrada con *F. antarctica*, que presenta basidiomas gruesos (de 4 a 10 cm de espesor), que se filetearon en láminas de 5 mm de grosor. El menor tiempo de deshidratado (3,62 h y 1,62 h a 70 °C para *F. antarctica* y *R. patagonica*, respectivamente) es una ventaja en comparación con informes anteriores sobre otros hongos comestibles con consumo y producción a nivel mundial; no existen datos previos sobre el deshidratado de especies de los géneros *Fistulina* y *Ramaria*. En el caso de *Hericium erinaceus*, el tiempo de deshidratado a 40 °C y 70 °C reportado fue de 12 y 7 h, respectivamente (Gąsecka *et al.* 2020); para *Agaricus bisporus*, el tiempo de deshidratado fue de 8,6 y 2,6 h a 50 °C y 75 °C, respectivamente (Izli *et al.* 2014), mientras que para *Lentinula edodes* fue de 7,5 h a 60 °C (Wang *et al.* 2014) y para *Pleurotus ostreatus* fue de 8, 7 y 6 h a 50 °C, 60 °C y 70 °C, respectivamente (Bhattacharya *et al.* 2015). La velocidad del aire durante el proceso de deshidratación desempeña un papel crucial pero a menudo no se reporta. Ajustar esta velocidad influye directamente en la eficiencia del proceso y, en consecuencia, en los tiempos y características finales de los hongos.

En cuanto al contenido de fenoles totales, nuestros resultados concuerdan con estudios previos, que reportaron valores elevados para *R. patagonica* (Toledo *et al.* 2016; Jacinto Acevedo *et al.* 2021; Rugolo *et al.* 2022). Esta característica fue también hallada en otras especies de *Ramaria*, como *R. flava*, *R. subaurantiaca* (Jacinto Acevedo *et al.* 2021) y *R. botrytis* (Rugolo *et al.* 2022). Los contenidos de TPC fueron aproximadamente el doble en las muestras de *R. patagonica* respecto de *F. antarctica*, y variaron significativamente entre tratamientos de fresco-congelado, liofilizado y deshidratado, aunque con patrones diferentes. Los valores mucho más bajos de *F. antarctica* también concuerdan con estudios previos (Toledo *et al.* 2016; Rugolo *et al.* 2022). Estudios previos determinaron la composición de los compuestos fenólicos; para *F. antarctica* los principales compuestos hallados fueron ácido gálico ( $3,14 \pm 0,05 \mu\text{g}/100\text{g}$  peso seco) y ácido p-hidroxibenzoico ( $6,71 \pm 0,25 \mu\text{g}/100\text{g}$  peso seco), mientras que para *R. patagonica* fueron ácido gálico ( $4,56 \pm 0,06 \mu\text{g}/100\text{g}$  peso seco), ácido p-hidroxibenzoico ( $126,42 \pm 2,16 \mu\text{g}/100\text{g}$  peso seco) y ácido p-cumárico ( $3,41 \pm 0,01 \mu\text{g}/100\text{g}$  peso seco) (Jacinto Azevedo *et al.* 2021; Rugolo *et al.* 2022).

La inhibición de los radicales libres para los extractos de *F. antarctica* mostró una tendencia decreciente en el siguiente orden: muestras liofilizadas (con el mejor % de actividad de inhibición en los ensayos ABTS e ILP), muestras fresco-congeladas (con el mejor % de actividad de inhibición en los ensayos DPPH y FRAP), y muestras secadas a temperatura creciente. La actividad antioxidante del extracto metanólico se evaluó mediante diferentes ensayos, debido a que ningún método único puede proporcionar una evaluación completa en general (Thaipong *et al.* 2016). Los niveles más altos de compuestos fenólicos en los hongos tienden a estar correlacionados con una mayor actividad antioxidante (Tabla 8), como se informó en estudios anteriores (Barros *et al.* 2007). Esta relación sugiere que los compuestos fenólicos presentes en los hongos contribuyen significativamente a sus propiedades antioxidantes. En este trabajo, los hongos frescos-congelados y liofilizados mostraron el mayor contenido de fenoles y propiedades antioxidantes y, en algunos casos, el deshidratado a 60 °C no mostró diferencias significativas con ellos. De acuerdo con informes anteriores (Gassecka *et al.* 2020), el deshidratado generalmente resulta en una disminución en el contenido total de fenoles y la actividad antioxidante en extractos de basidiomas *Leccinum scabrum* (Bull.) y *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers., con el nivel más alto de reducción de compuestos a 70 °C. Los antioxidantes naturales, como los compuestos fenólicos, son altamente susceptibles a la degradación cuando se exponen a temperaturas elevadas. Cuando el ácido p-hidroxibenzoico, el compuesto principal en *F. antarctica* y *R. patagonica*, sufre descarboxilación, pierde sus propiedades bioactivas lo cual puede tener un efecto directo sobre su propiedad antioxidante (Castada *et al.* 2020). En concordancia con Radzki *et al.* (2014), quienes estudiaron hongos comestibles silvestres de Polonia, nuestros ensayos mostraron que el deshidratado con aire caliente puede tener un impacto positivo o negativo en los fenoles y la actividad antioxidante respecto de los hongos frescos, dependiendo del método de medición antioxidante utilizado y/o la especie de hongo en cuestión; la ocurrencia de efectos negativos fue más notable en este método, respecto de la liofilización. En este último, el deshidratado se realiza a bajas temperaturas, minimizando el daño térmico a los nutrientes sensibles al calor, y por lo tanto, siendo más efectivo para mantener la actividad bioactiva/antioxidante (García Amezcua *et al.* 2016).

La alta actividad antioxidante de *Ramaria patagonica* concuerda con investigaciones previas (Toledo *et al.* 2016; Rugolo *et al.* 2022), que lo posicionan entre los mejores de más de veinte especies comestibles patagónicas. Otras especies de *Ramaria*, como *R. aurea* y *R. botrytis*, también demostraron tener una alta actividad antioxidante (Barros *et al.* 2008; Pereira *et al.* 2012). Por su parte, *F. antarctica*, presentó comparativamente con *R. patagonica* una menor actividad antioxidante (diferencias significativas en todos los casos), en acuerdo con estudios anteriores (Toledo *et al.* 2016; Rugolo *et al.* 2022), probablemente debido al bajo contenido de fenoles totales en los extractos de sus basidiomas. En consonancia, los resultados de otra investigación con extractos de *Fistulina hepatica* (hongo filete de carne) mostraron que exhiben una alta actividad pro-oxidante debido a las cantidades de ácido ascórbico, a pesar de la buena capacidad para actuar como eliminador del radical DPPH (Ribeiro *et al.* 2007).

La inhibición de los radicales DPPH disminuyó del 69 al 24 % para *F. antarctica* y del 99 al 81 % para *R. patagonica* después del deshidratado a 70 °C en comparación con las muestras fresco-congeladas. En este sentido, nuestros resultados coinciden con reportes de fuerte disminución en la capacidad para eliminar los radicales DPPH durante el deshidratado a esta temperatura (en comparación con los hongos frescos) en las especies *H. erinaceus* y *L. scabrum* (Gąsecka *et al.* 2020), *P. colossus* (Liaotrakoon *et al.* 2018), *G. frondosa* (Sim *et al.* 2017) y para *P. ostreatus* y *A. bisporus* (Reid *et al.* 2017). El deshidratado a 60 °C, en cambio, resultó la mejor temperatura dentro de las testeadas para conservar la capacidad antioxidante para ambas especies. Esto concuerda con los reportado para *P. ostreatus*, para el cual 60 °C fue la mejor temperatura para preservar el contenido de fenoles, antioxidantes y color en las muestras, mientras que 70 °C afectaron negativamente al TPC (Valiente *et al.* 2016). Otro trabajo demostró que el deshidratado a 60 °C de *Boletus edulis* no causó cambios en la capacidad antioxidante respecto de los hongos frescos (Jaworska *et al.* 2014).

Los aminoácidos libres totales aumentan con el secado a 60 °C en comparación con otras temperaturas de deshidratado o liofilizado según lo reportado por Yang *et al.* (2019). Esto podría atribuirse a una desnaturalización proteica más efectiva que a otras temperaturas, dejando disponibles aminoácidos individuales que de otra forma permanecerán ligados a estructuras proteicas estables. Se ha

demostrado que los extractos de ciertos hongos comestibles presentaban una actividad antioxidante atribuida en gran medida a su contenido de aminoácidos libres (Ferreira *et al.* 2009, Cheung *et al.* 2003). Toda esta evidencia junto con los resultados obtenidos en este capítulo sugiere que el proceso de deshidratación a 60 °C podría estar favoreciendo la liberación de compuestos fenólicos y aminoacídicos con capacidad antioxidante.

Por otro lado, la liofilización es un método muy efectivo a la hora de preservar los valores de TPC y la capacidad antioxidante de los hongos. Además, estudios previos indican que la capacidad de rehidratación es más elevada en hongos liofilizados en comparación con aquellos deshidratados por calor (Jaworska *et al.* 2014; Martínez-Soto *et al.* 2001), lo que lo convierte en un método ventajoso a la hora de generar productos de alto valor agregado. Sin embargo, los costos del proceso de liofilización son elevados debido a los gastos asociados con la compra y gasto energético del equipo necesario. Se trata de una tecnología que puede ser rentable para quienes requieren conservar grandes cantidades de alimentos, debido a que como se mencionó anteriormente, conservan la calidad nutricional y extienden la vida útil mucho mejor que otros métodos. En este sentido, un resultado destacable de este trabajo fue que en algunos casos tanto el contenido de fenoles como la capacidad antioxidante de las muestras deshidratadas a 60 °C no mostraron diferencias significativas con las muestras liofilizadas. Esto podría deberse a que si bien el liofilizado preserva mejor la estructura tridimensional de las proteínas y otros compuestos susceptibles al calor, puede no ser tan eficaz en la liberación de aminoácidos libres u otros compuestos aromáticos, ya que implica la sublimación del agua a temperaturas muy bajas, lo que limita la desnaturalización proteica (Dong *et al.* 2022). Por estas razones, el deshidratado a 60 °C se recomienda como un método ventajoso en relación a otros, por su accesibilidad, menores costos y los buenos resultados en cuanto a la preservación de la bioactividad.

## Conclusiones

- Las especies de hongos comestibles silvestres analizadas, *Fistulina antarctica* y *Ramaria patagonica*, mostraron un alto contenido de humedad (90,65% y 91,5% respectivamente), similar a otros hongos comestibles.

- *Ramaria patagonica* mostró un contenido fenólico total significativamente mayor y una mejor capacidad antioxidante que *Fistulina antarctica*.
- El método de liofilización y el deshidratado a 60°C mantuvieron mejor el contenido de compuestos fenólicos totales y la actividad antioxidante en ambas especies en comparación con las otras temperaturas de deshidratado. Además, el porcentaje de reducción en tamaño después del proceso de deshidratación fue menor a 60°C en relación con las otras temperaturas ensayadas en ambas especies.
- *Fistulina antarctica* experimentó una pérdida significativa de compuestos fenólicos a todas las temperaturas de deshidratado evaluadas (50 °C, 60 °C y 70 °C) en comparación con la muestra fresca congelada. Mientras que *Ramaria patagonica* sufrió una pérdida significativa de compuestos fenólicos a 50 °C, 70 °C y mediante liofilización, pero el deshidratado a 60 °C no presentó diferencias significativas respecto a la muestra fresca congelada.
- Se recomiendan tanto la liofilización como el secado a 60 °C como los métodos más adecuados para estas especies, considerando el mantenimiento de la bioactividad.
- El secado de ambas especies a 60 °C resulta muy conveniente considerando conjuntamente el tiempo/gasto de energía implicado, la preservación de la bioactividad y la simplicidad de la técnica.
- La generación y difusión de material de transferencia resulta fundamental para la educación y el desarrollo de buenas prácticas para el aprovechamiento de hongos silvestres comestibles. Este material también facilita la adopción de técnicas sostenibles y seguras, contribuyendo a la conservación de estas especies y al desarrollo económico local.
- Perspectivas a futuro podrían incluir investigaciones más detalladas sobre la cinética de secado de diferentes especies de hongos, utilizando modelos matemáticos avanzados para optimizar las condiciones de deshidratado.
- La hipótesis de que tanto el deshidratado como la liofilización de los hongos silvestres estudiados son métodos efectivos para conservar sus

propiedades bioactivas ha sido respaldada por los resultados de este estudio.

- Se demostró que mayor temperatura de deshidratación disminuye el tiempo de secado y que la mayor temperatura testeada (70 °C) disminuye los valores de TPC y actividad antioxidante respecto de las otras temperaturas y del producto fresco.
- Se demostró que en algunos casos la temperatura de deshidratación de 60 °C preservó mejor los TPC y capacidad antioxidante que los hongos sometidos a un proceso de liofilización.

## CAPÍTULO 4: EFECTO DE LA FERMENTACIÓN ÁCIDO LÁCTICA DE DOS HONGOS SILVESTRES COMESTIBLES DE LA PATAGONIA ARGENTINA

## **CAPÍTULO 4.** Efecto de la fermentación ácido láctica de dos hongos silvestres comestibles de la Patagonia Argentina.

### Resumen del capítulo

El creciente consumo de hongos comestibles se vincula al actual interés por acceder a alimentos naturales y nutritivos. *Fistulina antarctica* es un hongo comestible de cosecha otoñal exclusiva que se consume fresco o procesado fuera de temporada, mientras que *Cyttaria hariatii* fructifica en primavera y tiene un alto registro de uso tradicional. La vida útil de los hongos puede prolongarse por deshidratado, enlatado, escaldado y congelado. Una alternativa, es la elaboración de fermentos en los cuales la materia prima es fermentada por levaduras y bacterias lácticas (BAL). El objetivo de este trabajo fue evaluar el proceso de fermentación de los cuerpos fructíferos de *Fistulina antarctica* y *Cyttaria hariatii*, incorporando distintas cepas de BAL (aisladas de flores y frutas de la Patagonia y de gránulos de kéfir) para optimizar el proceso, prolongar su vida postcosecha, aumentar la concentración de compuestos fenólicos y preservar/mejorar sus cualidades organolépticas. Para ello, los hongos fueron lavados, cortados (1 cm aproximadamente), blanqueados o no (frescos; fermentación espontánea) y sumergidos en una solución estéril de sacarosa (2%, p/v) y NaCl (2%, p/v). Los hongos blanqueados fueron inoculados al 2% (v/v) con *Lactocaseibacillus paracasei* GB6 (frutos) y K4 (kéfir) o *Leuconostoc citreum* F4 (flores). Todos fueron incubados a 20°C durante 7 días y conservados a 4°C durante 30 días. Como control se usaron hongos frescos (fermentación libre) y blanqueados sin inocular. El pH inicial disminuyó luego de la fermentación para ambas especies y se mantuvo constante durante la vida postcosecha. Las BAL inoculadas crecieron entre 1,0 y 1,7 U log para *F. antarctica* y entre 0,7 y 1,41 para *C. hariatii* luego de 7 días de incubación, siendo mayores los recuentos para GB6 (9,1 y 8,14 log ufc/ml para *F. antarctica* y *C. hariatii* respectivamente). Luego de 30 días de almacenamiento los recuentos de BAL en *F. antarctica* disminuyeron principalmente en los hongos frescos (fermentación libre) y blanqueados (6,63 y 7,19 log ufc/ml, respectivamente), observándose una mayor sobrevivencia en el caso de los hongos inoculados con GB6 (8,9 log ufc/ml). Para *C. hariatii* los recuentos en GB6 y F4 aumentaron a los 30 días (9,01 y 8,12 respectivamente). En todos los casos en *F. antarctica* se observó la presencia de levaduras, aunque sólo en la fermentación espontánea (hongos frescos)

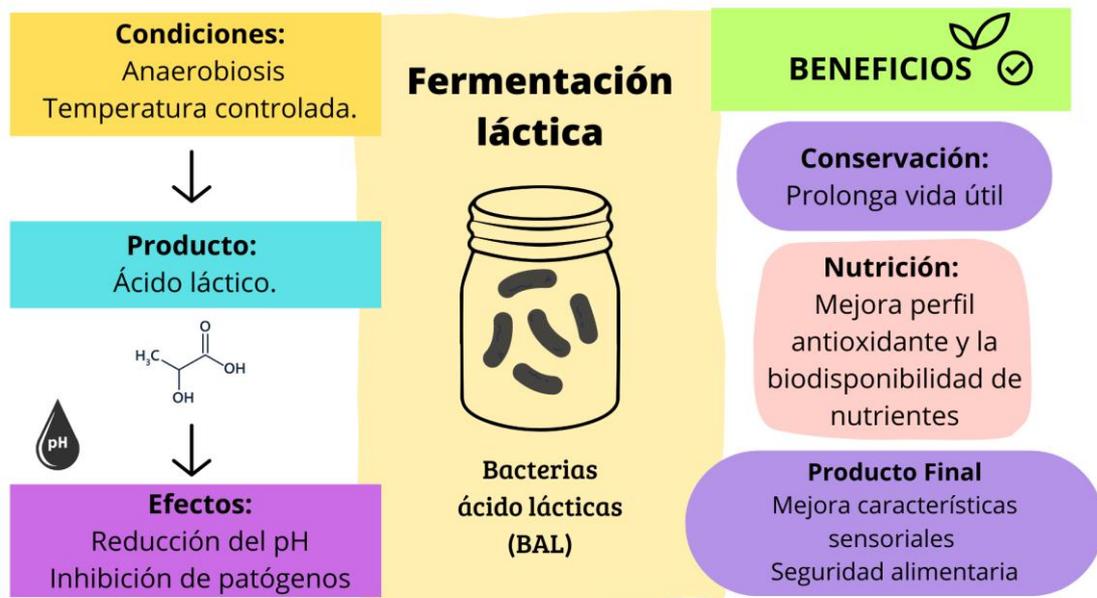
crecieron luego de 15 días de almacenamiento (1,01 U log), disminuyendo a los 30 días y alcanzando valores similares a los de los hongos blanqueados e inoculados. En *C. hariatii* solo se detectaron levaduras para los tratamientos frescos y blanqueados. El uso de las diferentes cepas no produjo ningún impacto significativo ( $p > 0,05$ ) en el contenido total de fenoles en *F. antarctica*, mientras que para *C. hariatii* todos los valores aumentaron en los tratamientos inoculados. En cuanto al color y apariencia, los hongos inoculados mostraron mejores características (colores más claros y menor turbidez); mientras que la textura fue mejor cuando fueron fermentados con GB6. En cuanto al sabor las mejores valoraciones fueron obtenidas para los hongos fermentados con GB6 y F4. Las bacterias ácido lácticas testeadas en este trabajo demostraron ser efectivas en el proceso de fermentación y podrían utilizarse como cultivos iniciadores para prolongar la vida postcosecha tanto de *F. antarctica* como de *C. hariatii* mediante fermentación láctica.

Palabras clave: *Cyttaria*, lengua de vaca, *Fistulina*, bacterias ácido lácticas, levaduras, conservación, postcosecha.

### Introducción

El consumo global de Hongos Silvestres Comestibles (HSC) ha experimentado un aumento en los últimos años debido a su significativo potencial en futuras cadenas de valor relacionadas con los bosques. Estos hongos realizan valiosas contribuciones tanto a la nutrición humana como al mundo culinario (Pérez Moreno *et al.* 2021). Dentro de la gran diversidad de especies de hongos comestibles, como se ha mencionado en otros capítulos, se han reconocido especies de hongos específicas por su rica tradición de uso (Molares *et al.* 2019), características sensoriales excepcionales (Barroetaveña *et al.* 2020; Barroetaveña *et al.* 2024) y perspectivas económicas prometedoras (Barroetaveña y Pildain 2020). Entre ellas, especies de los géneros *Fistulina* y *Cyttaria* registran las mayores valoraciones en cuanto a su importancia cultural (Molares *et al.* 2019). Sin embargo, su fructificación es estrictamente estacional y la duración de la temporada es muy variable de acuerdo a las condiciones particulares de cada año (Toledo *et al.* 2014), lo que implica que la cosecha debe realizarse intensivamente en los momentos precisos de mayor oferta. Por otra parte, dado que los hongos tienen contenidos muy altos de humedad (entre 80 y 90% de su peso fresco) y poseen texturas frágiles, son susceptibles a la

degradación microbiana y a daños físicos y mecánicos durante el periodo postcosecha, lo cual determina una vida útil para el consumo y la comercialización extremadamente limitada (Kotwaliwale *et al.* 2007). La fermentación láctica de hongos comestibles representa un medio doméstico económico y efectivo de preservación con una larga historia y tradición, especialmente en las culturas de Asia Oriental como China y Corea (Jabłońska-Ryś *et al.* 2016, 2019). Estos productos hacen parte integral de la dieta y la cultura culinaria de estas regiones. En tiempos recientes, ha habido un creciente interés en este método debido a sus potenciales beneficios para la salud (Yi *et al.* 2021). Este proceso de preservación de alimentos depende de la acción de bacterias lácticas, que convierten los azúcares en ácido láctico (Wood 1997; Pescuma *et al.* 2008). El ácido láctico reduce el pH de los alimentos, volviéndolos inhóspitos para bacterias patógenas y otros microorganismos que podrían causar deterioro o enfermedades transmitidas por alimentos. Numerosos estudios mencionan que la fermentación láctica no solo conserva los hongos, sino que también puede mejorar sus propiedades nutricionales y funcionales. Se ha demostrado que puede aumentar el contenido de proteínas y compuestos fenólicos, y mejorar la digestibilidad del producto alimenticio (Zheng *et al.* 2018), dado que las bacterias ácido lácticas degradan macronutrientes como carbohidratos y proteínas, lo que resulta en alteraciones en la composición nutricional de la matriz alimentaria (Tao *et al.* 2022). Este proceso genera como resultado la biotransformación de los alimentos y conlleva la liberación de péptidos antioxidantes y la alteración de los compuestos fenólicos (Summer *et al.* 2024) (Fig. 37). Además, los hongos fermentados son considerados una valiosa fuente de probióticos, que tienen el potencial de mejorar la digestión, fortalecer el sistema inmunológico y reducir el riesgo de enfermedades crónicas (Jabłońska-Ryś *et al.* 2020).



**Fig. 37-** Esquema general del proceso de fermentación láctica y sus beneficios.

Los factores clave que influyen en la fermentación, además de la matriz alimentaria, son la temperatura, la concentración de sal y el tiempo de fermentación. El monitoreo y control de estos parámetros es crucial para obtener las características deseadas del producto final. El pH es un indicador clave del progreso de la fermentación; su reducción refleja el aumento del contenido de ácido láctico y constituye un factor importante para la prolongación de la vida útil del producto y la seguridad microbiana (Liu *et al.* 2016; Jabłońska-Ryś *et al.* 2016). Las bacterias lácticas, junto con las levaduras y mohos, son comúnmente reconocidas como las principales categorías de microorganismos que participan activamente en el proceso de fermentación (Zheng *et al.* 2017). Las levaduras desempeñan un papel importante en las fermentaciones de alimentos, contribuyendo a la producción de compuestos aromáticos y texturales que mejoran la calidad sensorial y nutricional de productos como el pan, el vino y la cerveza (Hutkins 2008). El aislamiento e identificación de los microorganismos asociados y su evolución durante la fermentación es indispensable para optimizar y controlar el proceso, garantizar la seguridad alimentaria, y mejorar la calidad del producto final, además de aportar valiosa información científica y biotecnológica (Cocolin & Ercolini 2007).

Existen dos tipos de fermentaciones: las controladas y las libres o espontáneas. Estas últimas dependen de los microorganismos presentes de manera natural en la materia prima. Sin embargo, cuando son efectivas, pueden generar

calidades y características del producto final variables e impredecibles. Por otra parte, en ocasiones las fermentaciones libres con hongos frescos pueden dar lugar a características organolépticas no deseadas o al desarrollo de microorganismos deteriorantes. Las fermentaciones controladas, en contraposición, utilizan cultivos iniciadores específicos, lo que permite un control más preciso sobre los parámetros de fermentación y asegura una mayor calidad del producto final (Pescuma *et al.* 2008). El uso de cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) seleccionadas garantiza un proceso repetible y produce un producto terminado con alta calidad sensorial. En el caso de la fermentación láctica de hongos, el uso de cultivos iniciadores específicos no solo mejora la seguridad y la calidad del producto, sino que también puede maximizar los beneficios funcionales y nutricionales, optimizando el proceso de fermentación para la obtención de productos más saludables y de alta calidad (Liu *et al.* 2016). Por ello, la fermentación láctica de hongos comestibles es una tecnología prometedora para la producción de alimentos funcionales, suplementos nutricionales y productos nutraceuticos (Perveen *et al.* 2023). Esta tecnología no solo preserva la calidad y seguridad de los hongos, sino que también potencia sus beneficios para la salud, representando un avance significativo en la ciencia de los alimentos y la nutrición. La mayor parte de la materia seca de los hongos comestibles (del 35% al 70%) son carbohidratos (Guillamón *et al.* 2010), lo que constituye el ingrediente más importante para el uso de los hongos como materia prima en el proceso de fermentación láctica. Los carbohidratos fúngicos incluyen mono y disacáridos, alcoholes de azúcar, polisacáridos (incluyendo glucanos), glucógeno y quitina. En este sentido, estudios previos han demostrado que los carbohidratos son el nutriente más abundante en varias especies de hongos silvestres de Patagonia, destacándose *Fistulina antarctica* y *Cyttaria hariatii* por tener algunos de los valores más altos, mientras que en términos de contenido de azúcares totales *F. antarctica* reveló los valores más altos (Toledo *et al.* 2016; Rugolo *et al.* 2022).

Por lo antes expuesto, este capítulo busca indagar sobre el proceso de fermentación láctica controlada de *Fistulina antarctica* y *Cyttaria hariatii*, dos especies endémicas, culturalmente paradigmáticas, ampliamente distribuidas y disponibles en los bosques de *Nothofagus* de Patagonia, como herramientas para aprovechar su abundante fructificación estacional, agregarles valor y sostener su oferta fuera de temporada.

## Objetivos

- **Evaluar el curso del proceso de fermentación controlada de ambas especies basado en la evaluación del pH, y recuentos microbiológicos de bacterias ácido lácticas y levaduras en las materias primas, productos intermedios y finales.**
- **Evaluar el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de las materias primas, productos intermedios y productos finales.**
- **Aislar e identificar bacterias ácido lácticas y levaduras en los diferentes tiempos de fermentación.**
- **Evaluar las propiedades organolépticas de los productos fermentados**

## Hipótesis

1 El pH de las fermentaciones disminuirá con el tiempo y cambiará de acuerdo a las bacterias inoculadas.

2 Las bacterias inoculadas permanecen viables a lo largo del proceso de fermentación.

3 Los valores de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante variarán con las cepas inoculadas y serán mayores que en el hongo fresco.

4 El proceso de fermentación en los hongos genera productos seguros, con mejorada capacidad antioxidante y características sensoriales aceptables.

## Materiales y métodos

### Materias primas

Los cuerpos fructíferos frescos de los hongos *Fistulina antarctica* y *Cyttaria hariatii* fueron recolectados en el Parque Nacional "Los Alerces" y procesados dentro de las 6 h posteriores a la cosecha.



**Fig. 38** – Muestras de los hongos silvestres comestibles estudiados. (A) *Fistulina antarctica* (B) *Cyttaria hariotii*.

#### Preparación de cultivos iniciadores

Se utilizaron tres cepas de bacterias ácido lácticas (BAL): *Lactocaseibacillus paracasei* Collins (K4) aislada a partir de granos de kéfir, *Leuconostoc citreum* Weiss (F4) y *Lactocaseibacillus casei* Jensen (GB6) ambas aisladas de frutos y flores de *Berberis microphylla* Forster (calafate), respectivamente. Las cepas fueron provistas por el equipo de trabajo liderado por la Dra. Micaela Pescuma (colección personal).

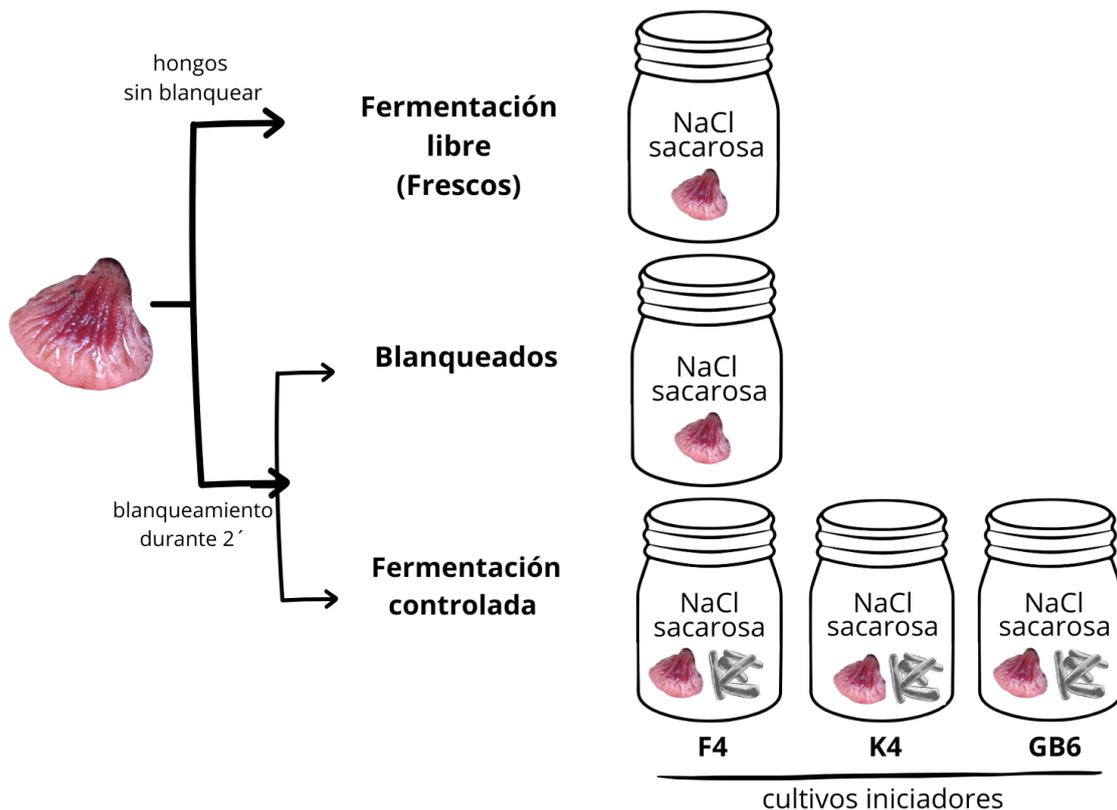
#### Preparación de los hongos fermentados

Antes de la fermentación los hongos se limpiaron y se lavaron en agua fría, luego se cortaron en láminas de aproximadamente 1 cm de espesor para luego blanquearlos (escaldarlos) en agua hirviendo (96 - 98 °C) durante 2 min (Fig. 39). Se colocaron 100 g de los hongos en frascos de vidrio de 500 ml a los cuales se les agregó un 2% de NaCl (p/p) y un 2% de sacarosa con una relación sólido-líquido de 2:1 (p/v). Se añadieron los cultivos iniciadores (F4, K4 y GB6) con una población inicial de BAL de aproximadamente 7,00 log cfu/ml (ver recuento microbiano) y las mezclas se incubaron a 20 °C durante 7 días en condiciones anaeróbicas.



**Fig. 39** - Proceso de preparación de los hongos fermentados.

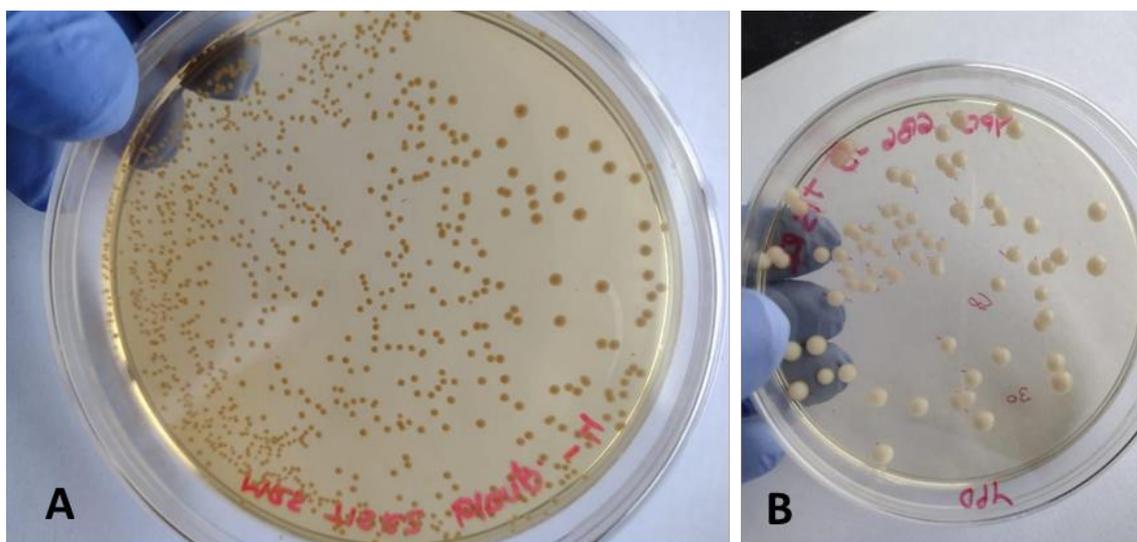
Además, se realizaron como controles un tratamiento de fermentación libre (hongos frescos sin blanquear y sin añadir cultivo iniciador) y un tratamiento donde se aplicó un blanqueado pero sin agregado de cultivo iniciador (blanqueado) (Fig. 40). Todas las fermentaciones se realizaron por triplicado.



**Fig. 40** - Esquema general sobre el diseño experimental seguido en el proceso de fermentaciones. Se muestran los cinco tratamientos realizados: fermentación libre, blanqueado y fermentaciones controladas inoculadas con los tres cultivos iniciadores.

#### Recuento microbiano y determinación de pH

De cada frasco se tomó 1 ml de jugo de hongos fermentados extraído de forma esterilizada, que se resuspendió en 0,10% (p/v) de solución fisiológica estéril para realizar posteriormente al menos cinco diluciones seriadas. La presencia de bacterias lácticas se determinó en agar MRS (Peptona de carne 10 g; Extracto de levadura 5 g; Glucosa 20 g; Fosfato Dipotasio 2 g; Acetato de Sodio 5 g; Citrato Triamonio 2 g; Sulfato de Magnesio 0,2 g; Sulfato de Manganeso 0,05 g; Agar-agar 10 g (Fórmula por litro) pH final:  $6,5 \pm 0,2$ ) suplementado con cicloheximida (0,1 g/L) (Fig.41a). La presencia de levaduras y mohos se determinó sembrando en agar YPD (Extracto de levadura 10 g; Peptona 20 g; Dextrosa 20 g y Agar 15 g (Fórmula por litro) pH final:  $6,5 \pm 0,2$ ) con cloranfenicol (0,1 g/L) (Fig.41b).

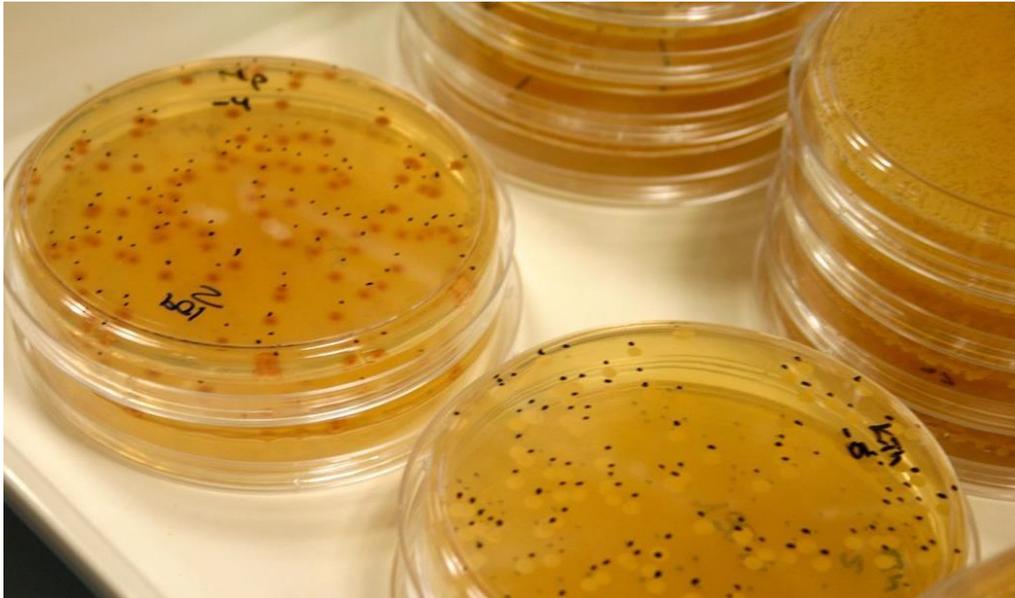


**Fig. 41** - Cultivo de bacterias ácido lácticas en medio MRS (A) y levaduras en YPD (B).

Las placas MRS se incubaron a 30 °C durante 2–3 días y las placas YPD a 25 °C durante 2 días. Luego de la incubación se realizó el conteo de colonias visibles en las placas (Fig. 42). Se registró el número de colonias y se calculó la concentración original de microorganismos usando la siguiente fórmula:

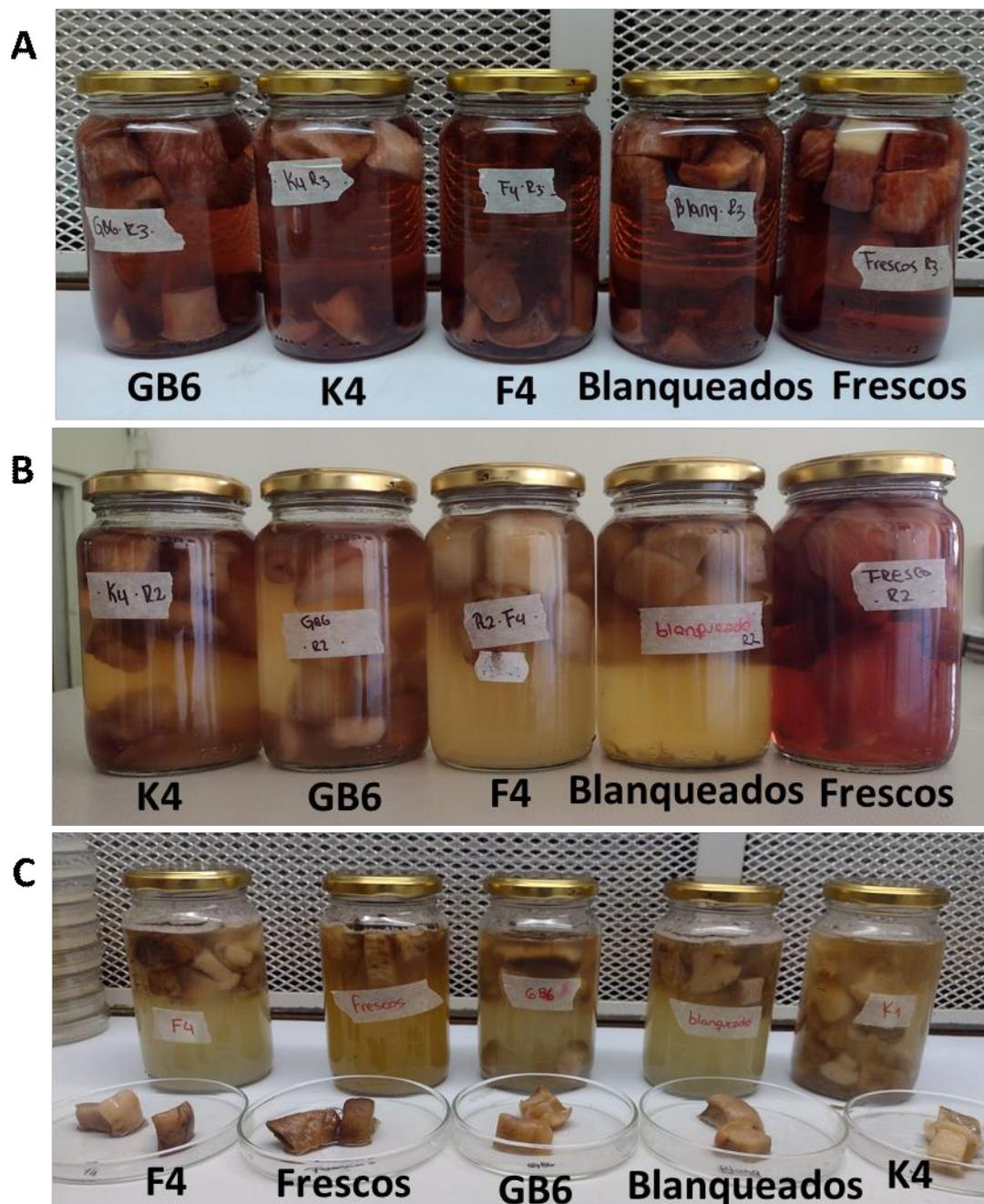
$$\text{UFC/ml} = \frac{\text{Número de colonias contadas} \times \text{Factor de dilución}}{\text{Volumen inoculado en mL}}$$

Los resultados se presentan en logaritmo base 10 para simplificar la interpretación de datos microbiológicos. Los recuentos microbiológicos se llevaron a cabo en los días 0 y 7 (T0 y T7) de la fermentación y después de 15 y 30 días (T15 y T30) de almacenamiento refrigerado.

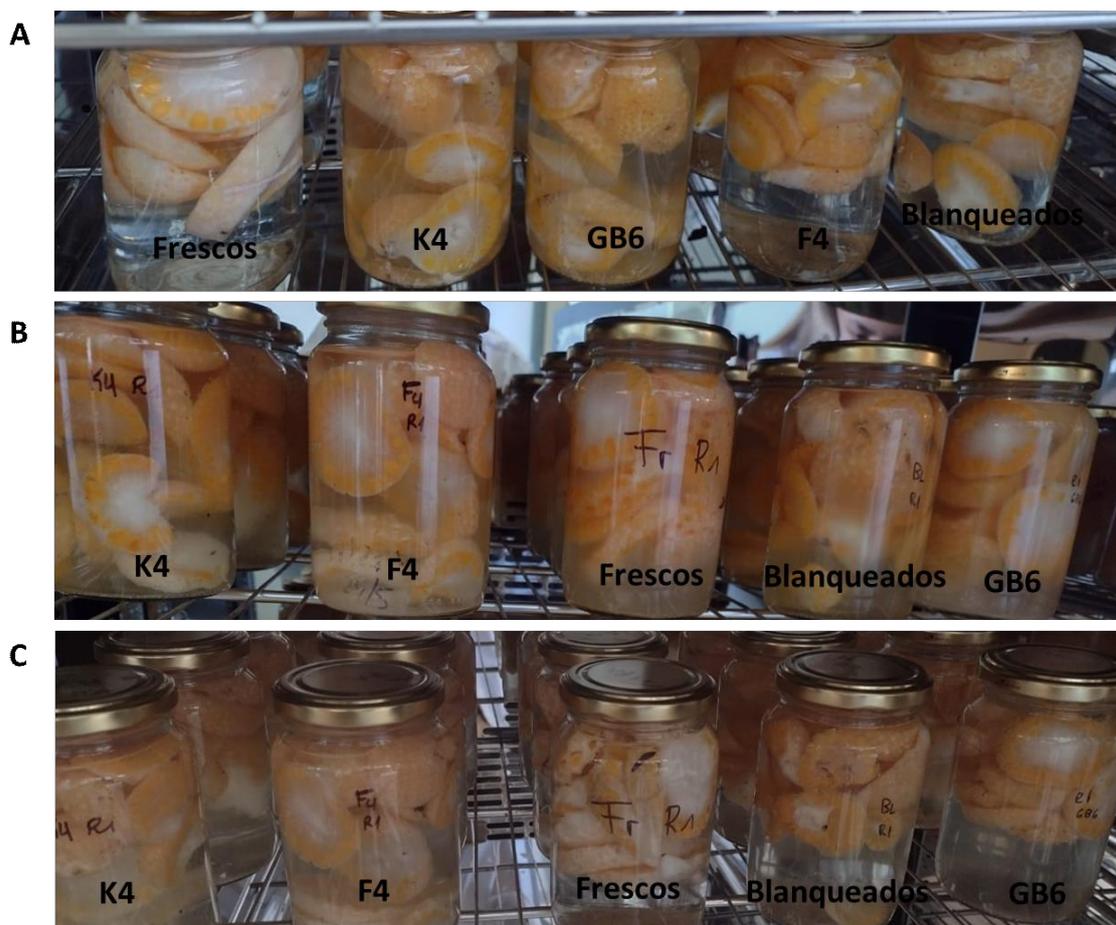


**Fig. 42** - Conteo en placas de bacterias ácido lácticas cultivadas en MRS.

Se monitoreó la evolución del pH en los días 0 y 7 (T0 y T7) de la fermentación y después de 15 y 30 días (T15 y T30) de almacenamiento refrigerado (Figs. 43 y 44).



**Fig. 43** - Fermentaciones de *F. antarctica* en diferentes tiempos: antes de la fermentación (A), a las 24 h (B) y a los 7 días (C).



**Fig. 44** - Fermentaciones de *C. hariatii* en diferentes tiempos: antes de la fermentación (A), a las 24 h (B) y a los 7 días (C).

#### Cuantificación del contenido total de fenoles

Los compuestos fenólicos totales se determinaron en las muestras fermentadas de 0 y 7 días (T0 y T7) mediante el método descrito por Singleton, Orthofer y Lamuela-Raventós (1999), con algunas modificaciones. En resumen, 10  $\mu$ L de los hongos fermentados licuados se diluyeron a un volumen final de 1 mL con agua destilada, y se agregaron 100  $\mu$ L del reactivo Folin-Ciocalteu (diluido 1:2 en agua destilada). Las mezclas de reacción obtenidas se mantuvieron 2 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Luego, se añadieron 400  $\mu$ L de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 15,90% (p/v) y las muestras se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad durante 20 min. Se llenó una microplaca de 96 pocillos con 200  $\mu$ L de cada muestra y se leyó la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro de microplacas Multiskan Sky High (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU). Los valores obtenidos se correlacionaron con una curva de calibración predeterminada de ácido gálico ( $R^2 = 0,98$ ) y se expresaron en mg de equivalente de ácido gálico (GAE) por 100 mL (mg GAE/100 mL).

#### Actividad antioxidante

La capacidad antioxidante total de los hongos fermentados a 0 y 7 días de fermentación se determinó mediante la aplicación de una actividad mejorada de captación de radicales DPPH y el método de decoloración del catión radical ABTS. La actividad de captación de radicales ABTS se determinó utilizando el método reportado por Gąsecka *et al.* (2015) con algunas modificaciones. Brevemente, se añadieron 200 µL de solución de ABTS ajustada a 20 µL de cada extracto. Luego, la mezcla se incubó a 23 °C durante 10 min y la absorbancia se midió inmediatamente a 734 nm. Los controles contenían 50 µL de agua destilada. La actividad de captación de radicales ABTS (RSA) se calculó mediante la ecuación:

$$\text{ABTS RSA (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A1 es el valor de absorbancia de la solución con diferentes concentraciones de muestras. A0 es el valor de absorbancia de la solución ABTS sin muestras.

La capacidad de captación de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) se evaluó según el método modificado de Blois (1958). En resumen, se preparó una solución de 0,06 mM de DPPH en alcohol metílico y se añadieron 270 µL de esta solución a 30 µL de extracto etanólico de especies de hongos en una placa de 96 pocillos. La mezcla se agitó vigorosamente y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 60 min. Luego, se midió la absorbancia a 515 nm. El efecto de captación de radicales DPPH se calculó de la siguiente manera:

$$\text{DPPH RSA (\%)} = (A_0 - A_1)/A_0 \times 100$$

donde A1 es el valor de absorbancia de la solución con diferentes muestras y A0 es el valor de absorbancia de la solución DPPH sin muestras.

#### Análisis estadístico

Todas las variables medidas hasta acá reflejan los resultados de tres repeticiones para todos los ensayos realizados. Los resultados se expresaron como valores medios y desviación estándar (DE). El análisis de la varianza se realizó mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), y las diferencias

entre las medias de las muestras se analizaron mediante la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 0.05.

#### Aislamiento e investigación genotípica de BAL

Las BAL presuntivos (al menos 5 colonias con el mismo color, morfología, borde, superficie y elevación) se recogieron de agar MRS. Los aislados se purificaron mediante subcultivo sucesivo y la pureza se verificó microscópicamente. Los gram positivos (método de KOH de Gregersen) se almacenaron en caldo con un 20% (v/v) de glicerol a -18 °C hasta su posterior uso. El ADN genómico total se extrajo siguiendo el protocolo de extracción de CTAB (bromuro de cetil trimetil amonio) modificado de Doyle y Doyle (1990) tal como se explicó en el Capítulo 1 de la tesis (pag. 32). Los pellets de ADN se secaron al aire y se volvieron a suspender en 70 µL de agua ultrapura. La integridad del ADN se examinó en geles de agarosa al 0,8%. La diferenciación de cepas se realizó mediante el análisis de RAPD-PCR (PCR de amplificación al azar de ADN polimórfico) en reacciones de 25 µL con cebadores individuales P16, M13 y M14 (Ellis *et al.* 1999). Un cultivo representativo para cada grupo se amplificó y analizó mediante secuenciación del gen 16S ARNr utilizando el par de cebadores 27F y 1492R (Weisburg *et al.* 1991) según lo descrito por Francesca *et al.* (2016). Los componentes de la reacción incluían: cebadores 10 mM (0,5 µL), MasterMix (Promega, Madison, WI, EE. UU.) (12,5 µL), 1 µL de ADN como molde y agua purificada para completar el volumen final de 25 µL. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (MyCycler™, BioRad) de la siguiente manera: desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, 35 ciclos de desnaturalización 95 °C durante 30 s, *annealing* a 50 °C durante 1 min, extensión a 72 °C durante 2,5 min, seguido de una extensión final a 72 °C durante 10 min. Los productos de PCR se purificaron y secuenciaron en MACROGEN (Seúl, Corea del Sur). La asignación taxonómica se realizó contrastando las secuencias obtenidas en la base de datos GenBank mediante el algoritmo BLAST. Se utilizó la herramienta en línea del sitio web del Centro Nacional para la Información Biotecnológica de los Estados Unidos NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Altschul *et al.*, 1997) seleccionando la opción de búsqueda de nucleótido-nucleótido (Standard Nucleotide BLAST). Los consensos entre el 90-98 % de identidad se consideraron coincidencias a nivel de género, mientras que las identidades por encima del 98 % se trataron como coincidencias a nivel específico.

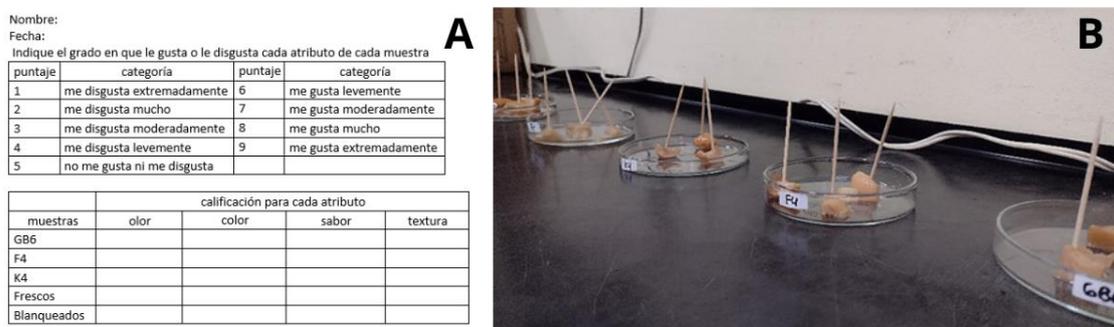
#### Aislamiento e identificación genotípica de levaduras

Las levaduras se aislaron del medio YPD. La extracción de ADN se realizó como se detalló anteriormente para bacterias. Todos los aislamientos seleccionados se agruparon preliminarmente mediante análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de la región, siguiendo a Esteve-Zarzoso *et al.* (1999). Para ello, primero se realizó una PCR que contenía: 0,5 µL de cebador ITS1 (10 mM), 0,5 µL de cebador ITS4 (10 mM), MasterMix (Promega, Madison, WI, EE. UU.) (12,5 µL); 1 µL de ADN como molde y agua purificada para completar el volumen final de 25 µL. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (MyCycler™, BioRad) de la siguiente manera: desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 min, temperatura de annealing a 55,5 °C durante 2 min y extensión a 72 °C durante 2 min y una extensión final a 72 °C durante 10 min. Luego, los productos de PCR se digirieron con las endonucleasas de restricción CfoI, HaeIII y HinfI (Boehringer Mannheim) utilizando la siguiente reacción (volumen final 20 µL): enzima de restricción (0,5 µL); solución buffer 10X (2 µL); ADN amplificado (15 µL). Un aislamiento por grupo se identificó a nivel de especie mediante la secuenciación de la región D1/D2 con los cebadores NL1 y NL4 (Kurtzman & Robnett 1997). Los componentes de la reacción incluían: cebadores 10 mM (0,5 µL), MasterMix (Promega, Madison, WI, EE. UU.) (12,5 µL), 1 µL de ADN como molde y agua purificada para completar el volumen final de 25 µL. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (MyCycler™, BioRad) de la siguiente manera: 95 °C durante 2 min, 35 ciclos de 94 °C durante 60 seg, 55,5 °C durante 1 min, 72 °C durante 2 min, seguido de 72 °C durante 10 min. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1,2% teñido con GelRed Nuclein Acid Stain (Biotium Inc., Hayward, CA, USA), y las bandas se visualizaron bajo iluminación UV. Los productos de PCR se purificaron y secuenciaron en Macrogen (Seúl, Corea del Sur). La asignación taxonómica se realizó como se explicó anteriormente para las BAL.

#### Evaluación sensorial

Las evaluaciones sensoriales se realizaron sobre las fermentaciones controladas (fermentadas por 7 días y almacenadas por 18 días) utilizando una prueba afectiva para determinar la aceptabilidad (grado de gusto o disgusto) del producto (Liria 2007). Se utilizó un panel no entrenado constituido por 5 personas

del Centro de Investigación CIEFAP. Las muestras fueron codificadas con números aleatorios y se asignaron calificaciones de aceptabilidad para apariencia, sabor, textura y color en una escala hedónica de 9 puntos (9 = gusta extremadamente, 5 = ni gusta ni disgusta, 1 = disgusta extremadamente) siguiendo la metodología de Jabłońska-Ryś et al (2016) (Fig. 45). Los resultados se analizaron calculando un promedio de las valoraciones junto con el desvío estándar y se realizó un análisis de Kruskal-Wallis para detectar diferencias significativas entre los hongos fermentados con BAL. Las diferencias entre las medianas de las muestras se analizaron mediante comparaciones de a pares utilizando el Software InsoStat (Version 2008).



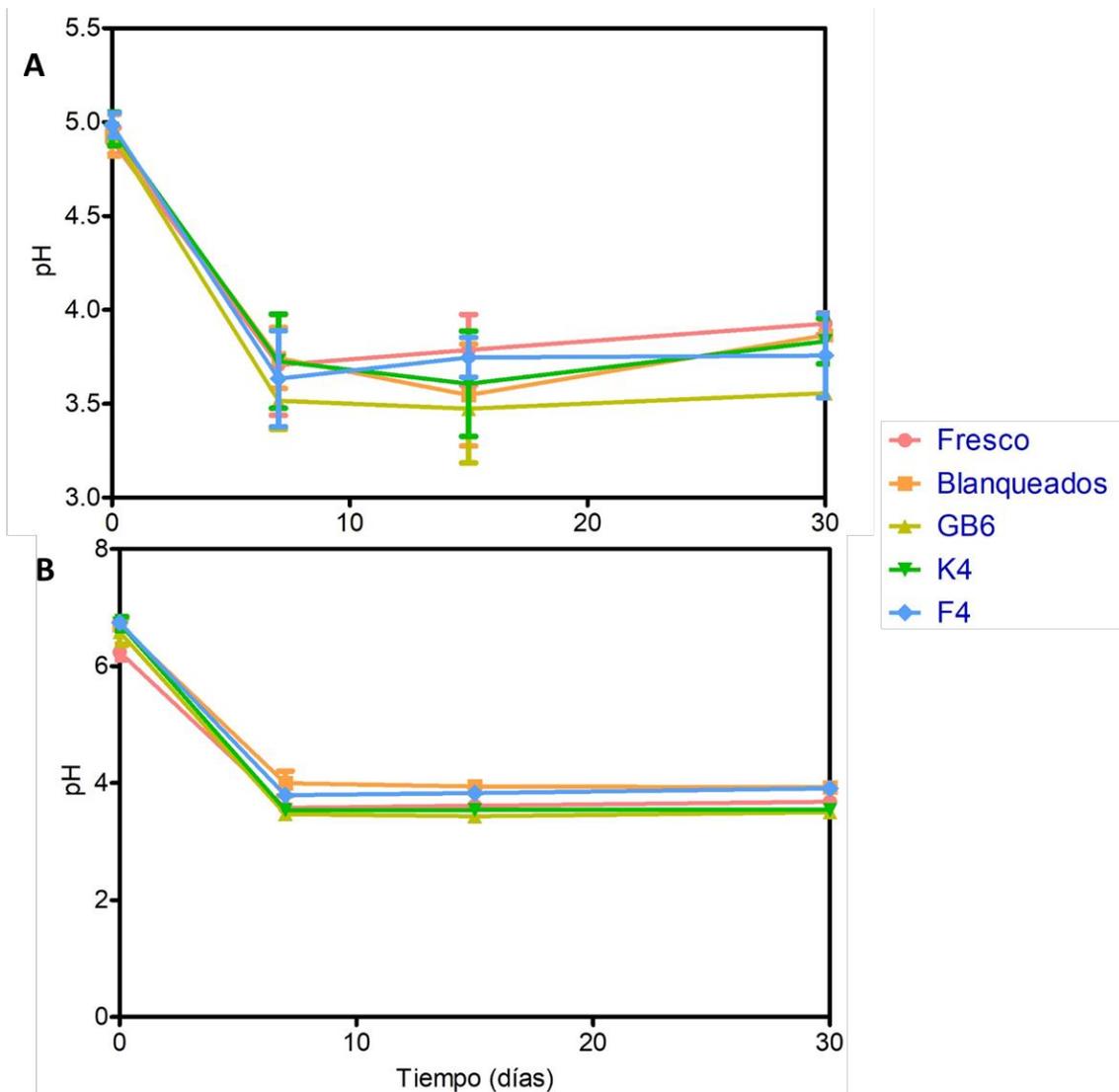
**Fig. 45** - Evaluación sensorial: Ficha de escala de aceptabilidad utilizada (A); Muestras de hongos fermentados listos para ser evaluados por el panel no entrenado (B).

## Resultados

### Determinación del pH y recuento microbiológico

Para las fructificaciones fermentadas de *Fistulina antarctica*, el valor inicial de pH osciló entre 4,9 y 4,98; después de 7 días de fermentación todas las cepas inoculadas redujeron aproximadamente 1,2 unidades de pH (Fig. 46a). Las fructificaciones fermentadas de *Cyttaria hariatii* presentaron valores iniciales de pH entre 6,2 y 6,7, y después de 7 días de fermentación, todos los tratamientos disminuyeron en promedio aproximadamente 2,9 unidades de pH (Fig. 46b). La capacidad acidificante de las cepas BAL no mostró diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) después de 7 días de fermentación en *F. antarctica* pero si en *C. hariatii* (Tabla 10). La cepa GB6 mostró la mayor capacidad acidificante ( $\Delta\text{pH} = 1,34$  y  $3,08$  para *F. antarctica* y *C. hariatii*, respectivamente) con valores de pH significativamente menores en ambas especies. Por otro lado, la cepa F4 mostró

la más baja capacidad acidificante ( $\Delta\text{pH} = 1,13$  y  $2,84$  para *F. antarctica* y *C. hariatii*, respectivamente).



**Fig. 46.** Efecto del proceso de fermentación láctica sobre el pH en: (A) *Fistulina antarctica*, and (B) *Cyttaria hariatii*.

**Tabla 10** – Medición de pH en los diferentes tratamientos a los distintos tiempos del proceso de fermentación y almacenamiento.

	pH			
	Tiempo (días)			
	0	7	15	30
<b><i>Fistulina antarctica</i></b>				
Tratamientos				
Fresco	4,90 ± 0,05a	3,71 ± 0,14a	3,79 ± 0,10a	3,93 ± 0,07b
Blanqueado	4,93 ± 0,5a	3,74 ± 0,13a	3,78 ± 0,14a	3,87 ± 0,09ab
GB6	4,93 ± 0,05a	3,52 ± 0,11a	3,47 ± 0,15a	3,56 ± 0,07a
K4	4,98 ± 0,2a	3,68 ± 0,10a	3,75 ± 0,13a	3,76 ± 0,06ab
F4	4,96 ± 0,1a	3,73 ± 0,14a	3,61 ± 0,15a	3,83 ± 0,07ab
<b><i>Cyttaria hariatii</i></b>				
Fresco	6,24 ± 0,14a	3,58 ± 0,11ab	3,61 ± 0,07ab	3,69 ± 0,04a
Blanqueado	6,70 ± 0,12a	4,00 ± 0,12ab	3,94 ± 0,06c	3,94 ± 0,05b
GB6	6,58 ± 0,13a	3,47 ± 0,10a	3,43 ± 0,05a	3,50 ± 0,04a
K4	6,73 ± 0,14a	3,54 ± 0,11ab	3,54 ± 0,07ab	3,54 ± 0,03a
F4	6,74 ± 0,14a	3,79 ± 0,12ab	3,83 ± 0,06bc	3,91 ± 0,04b

\* Las diferencias de los valores medios a cada tiempo entre los diferentes tratamientos indicados con diferentes letras son estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

#### Recuento microbiano

El recuento de bacterias lácticas viables aumentó rápidamente al principio del proceso de fermentación y luego se mantuvo estable (Fig. 47) en todos los casos para ambas especies. La población inicial de bacterias lácticas de los hongos blanqueados fue baja (3,75 y 4 log cfu/ml para *F. antarctica* y *C. hariatii*, respectivamente), aumentando bruscamente a 8,4 y 6,96 log cfu/ml, respectivamente en 7 días. Esto fue similar a lo observado en la fermentación de

hongos frescos, con 5,56 y 4,68 log cfu/ml al inicio, y un aumento a 8,08 y 7,37 log cfu/ml luego de 7 días, para *F. antarctica* y *C. hariatii*, respectivamente. Las bacterias lácticas inoculadas crecieron entre 1,0 – 1,7 y 0,76 – 1,4 U luego de 7 días de incubación para *F. antarctica* y *C. hariatii* respectivamente. Los recuentos fueron más altos para GB6 en ambas especies (9,13 y 8,14 log cfu/ml para *F. antarctica* y *C. hariatii*, respectivamente). Como era esperable, la cepa GB6, con valores de pH más bajos, arrojó los mayores recuentos. En *F. antarctica* si bien a los 7 días no hubo diferencias significativas entre los tratamientos frescos, blanqueados e inoculados, se observó una supervivencia significativamente mayor a los 30 días en los tratamientos inoculados y blanqueados con respecto al fresco (Tabla 11). Para los tres procesos de fermentación con bacterias inoculadas, en ambas especies estudiadas, se alcanzó una población satisfactoria de bacterias lácticas (>7 log cfu/ml) durante los 30 días de almacenamiento. Este resultado también se observó en los tratamientos de blanqueado para *F. antarctica* y frescos y blanqueados en *C. hariatii*.

**Tabla 11** – Recuentos de BAL en los diferentes tratamientos a los distintos tiempos del proceso de fermentación y almacenamiento.

	<b>BAL (log cfu/ml)</b>			
	Tiempo (días)			
	0	7	15	30
<b><i>Fistulina antarctica</i></b>				
Tratamientos				
Fresco	5,56 ± 0,28b	8,08 ± 0,3a	7,84 ± 0,29ab	6,63 ± 0,3a
Blanqueado	3,75 ± 0,3a	8,47 ± 0,38a	7,90 ± 0,28ab	7,19 ± 0,45ab
GB6	7,39 ± 0,27c	9,13 ± 0,31a	9,12 ± 0,2b	8,89 ± 0,3b
K4	7,48 ± 0,31c	8,95 ± 0,32a	8,94 ± 0,29ab	8,45 ± 0,37ab
F4	6,82 ± 0,2bc	7,81 ± 0,35a	7,65 ± 0,3ab	7,34 ± 0,29ab
<b><i>Cyttaria hariatii</i></b>				
Fresco	4,68 ± 0,4ab	7,37 ± 0,5a	7,91 ± 0,12a	7,57 ± 0,14a
Blanqueado	4,00 ± 0,6a	6,96 ± 0,5a	7,83 ± 0,15a	7,68 ± 0,17ab
GB6	6,94 ± 0,6b	8,14 ± 0,69a	8,85 ± 0,1b	9,01 ± 0,16c
K4	6,19 ± 0,49ab	7,60 ± 0,56a	8,57 ± 0,15b	8,51 ± 0,17bc
F4	6,76 ± 0,6ab	7,49 ± 0,49a	7,75 ± 0,1a	8,12 ± 0,1ab

\* Las diferencias entre los valores medios de cada tiempo en los diferentes tratamientos indicados con diferentes letras son estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

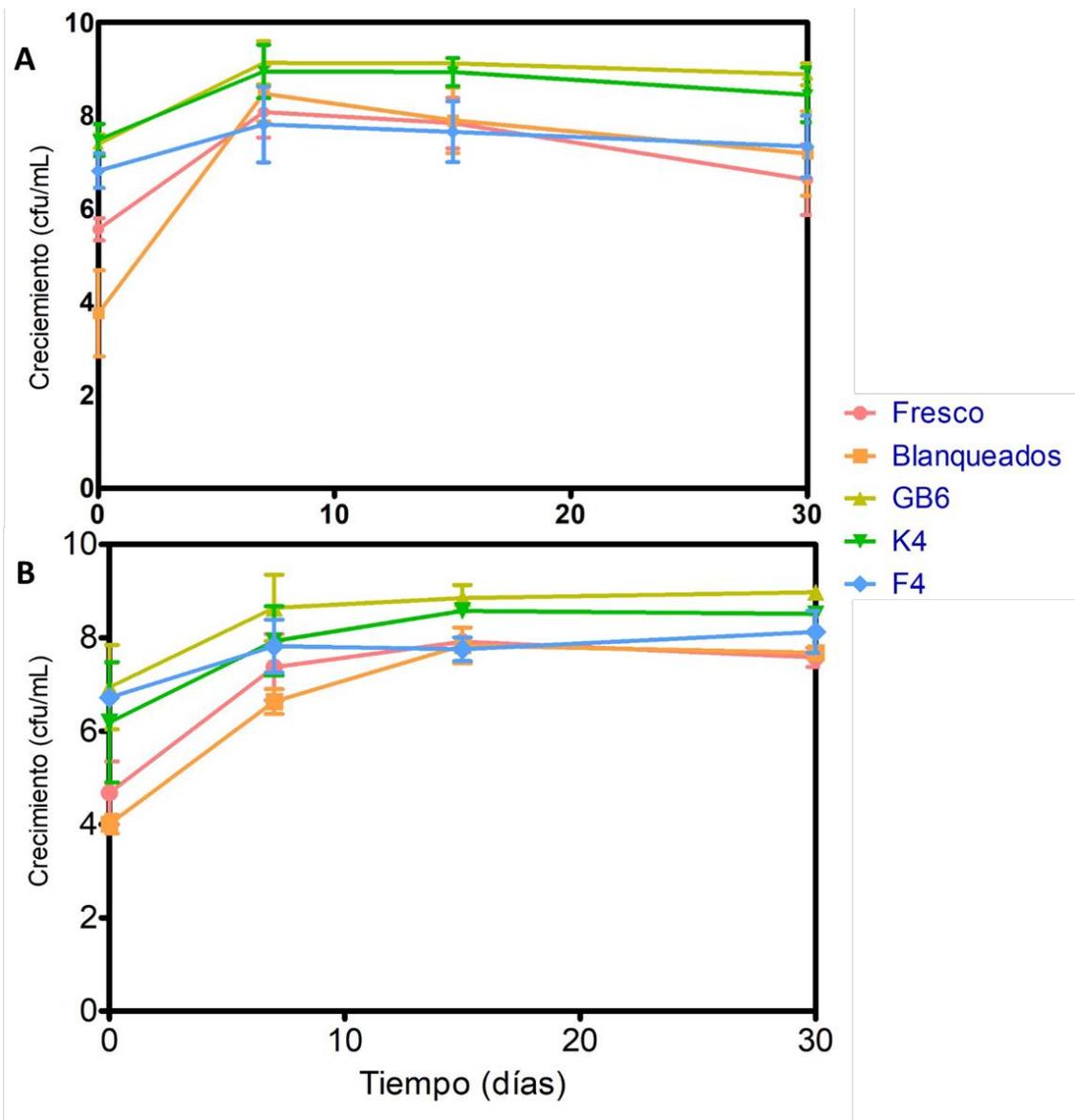
En relación a las levaduras, en *Fistulina antarctica* se observó su presencia en todos los tratamientos (Tabla 12), aunque sólo en los hongos frescos crecieron después de 15 días de almacenamiento (1,01 U log), disminuyendo después de 30 días y alcanzando valores similares a los de hongos blanqueados e inoculados con bacterias lácticas. A los 30 días de almacenamiento los tratamientos blanqueados y GB6 también bajan, mientras que K4 y F4 muestran un leve aumento en los recuentos, sin embargo no se detectaron diferencias significativas en ninguno de los casos (Tabla 12). Para los hongos fermentados

de *C. hariatii*, solo se detectaron levaduras en los tratamientos frescos (3,01 U log) y blanqueados (3,61 U log) durante los 30 días de seguimiento, y no se detectó crecimiento en los tratamientos inoculados con bacterias lácticas (Fig. 48). Los recuentos entre los tratamientos frescos y blanqueados arrojaron diferencias significativas desde el inicio hasta los 15 días del proceso, posteriormente, ambos alcanzaron valores similares sin diferencias significativas.

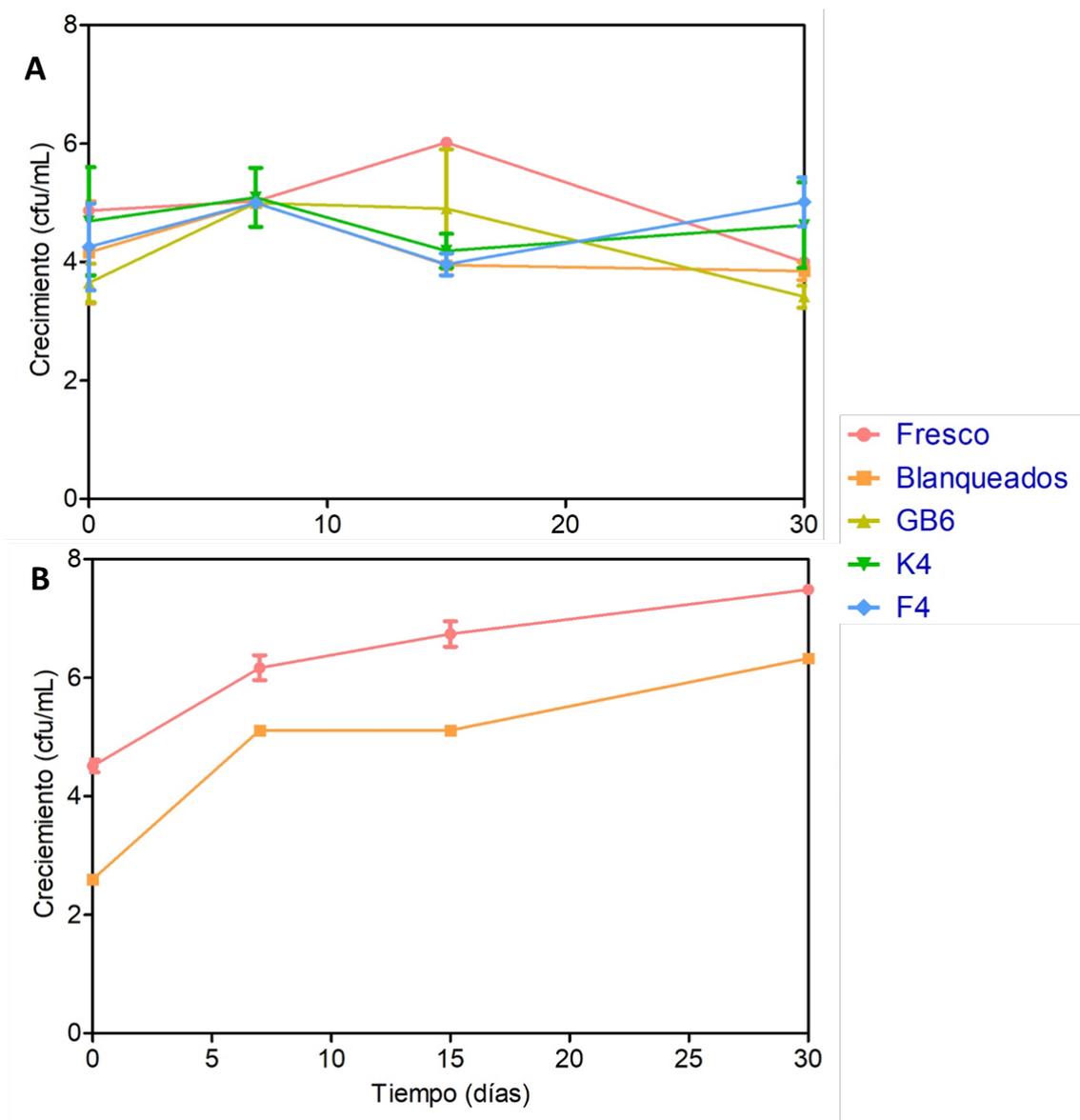
**Tabla 12** – Recuentos de levaduras en los diferentes tratamientos a los distintos tiempos del proceso de fermentación y almacenamiento.

	<b>Levaduras (log cfu/ml)</b>			
	<b>Tiempo (días)</b>			
	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>15</b>	<b>30</b>
<b><i>Fistulina antarctica</i></b>				
Tratamientos				
Fresco	4,87 ± 1,08a	5,03 ± 1,52a	6,02 ± 0,09a	4,00 ± 0,01a
Blanqueado	4,17 ± 0,76a	5,00 ± 1,51a	3,95 ± 0,07a	3,85 ± 0,21a
GB6	3,65 ± 0,62a	5,00 ± 1,51a	4,90 ± 1,41a	3,42 ± 0,26a
K4	4,69 ± 0,76a	4,43 ± 0,87a	4,19 ± 0,41a	4,62 ± 1,25a
F4	4,26 ± 0,62a	5,00 ± 1,51a	3,96 ± 0,26a	5,02 ± 0,59a
<b><i>Cyttaria hariatii</i></b>				
Fresco	4,51 ± 0,09a	6,74 ± 0,15a	6,74 ± 0,15a	7,52 ± 0,14a
Blanqueado	2,55 ± 0,11b	5,11 ± 0,15b	5,12 ± 0,15b	6,16 ± 0,12a

\* Las diferencias entre los valores medios indicados con diferentes letras en cada columna son estadísticamente significativas (p<0,05).



**Fig. 47** - Efecto del proceso de fermentación en el crecimiento de bacterias ácido lácticas en (A) *Fistulina antarctica*, y (B) *Cyttaria hariotii*.



**Fig. 48** - Efecto del proceso de fermentación en el crecimiento de levaduras en (A) *Fistulina antarctica* y (B) *Cytaria harioti*.

#### Contenido total de fenoles y actividades antioxidantes

Los cuerpos fructíferos de *F. antarctica* mostraron TPC más altos que *C. harioti*, con valores de 546,69 frente a 251,33 mg de GAE/100 ml, respectivamente (Tabla 13). El proceso de blanqueo contribuyó a una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en el contenido de fenoles en los cuerpos fructíferos de ambos hongos, evidenciado por los valores significativamente más altos del tratamiento sin blanqueo. El proceso de fermentación láctica no tuvo un efecto significativo ( $p > 0,05$ ) en el TPC de los cuerpos fructíferos fermentados, en comparación con los hongos blanqueados sin inocular. El uso de las diferentes cepas no produjo ningún impacto significativo ( $p > 0,05$ ) en el contenido total de fenoles en *F.*

*antarctica*, mientras que para *C. hariatii* todos los valores aumentaron en los tratamientos inoculados y fueron más altos en las muestras fermentadas con F4 y K4, que mostraron valores no significativamente diferentes al fresco.

**Tabla 13.** Contenido de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de *F. antarctica* y *C. hariatii* para todos los tratamientos, antes y después de la fermentación.

	TPC (mg/ GAE/100ml)		ABTS (% de inhibición)		DPPH RSA (% de inhibición)	
	T0	T7	T0	T7	T0	T7
<i>F. antarctica</i>						
Fresco	546,69 ± 0,17 <sup>c</sup>	687,87 ± 0,10 <sup>b</sup>	13,73 ± 1,68 <sup>a</sup>	20,30 ± 1,04 <sup>b</sup>	43,63 ± 2,6 <sup>ab</sup>	68,55 ± 6,40 <sup>b</sup>
Blanqueado	412,53 ± 0,09 <sup>a</sup>	448,64 ± 0,01 <sup>a</sup>	13,65 ± 0,31 <sup>a</sup>	14,01 ± 3,20 <sup>a</sup>	44,6 ± 3,20 <sup>ab</sup>	23,31 ± 1,40 <sup>a</sup>
GB6	465,66 ± 0,10 <sup>ab</sup>	384,45 ± 0,10 <sup>a</sup>	12,53 ± 1,90 <sup>a</sup>	20,22 ± 2,84 <sup>b</sup>	37,37 ± 1,19 <sup>a</sup>	21,73 ± 5,20 <sup>a</sup>
K4	435,51 ± 0,01 <sup>ab</sup>	404,33 ± 0,70 <sup>a</sup>	12,16 ± 0,40 <sup>a</sup>	13,13 ± 2,95 <sup>a</sup>	42,54 ± 3,90 <sup>a</sup>	30,85 ± 3,19 <sup>a</sup>
F4	470,47 ± 0,10 <sup>b</sup>	436,94 ± 0,10 <sup>a</sup>	14,25 ± 2,90 <sup>a</sup>	14,33 ± 1,47 <sup>a</sup>	57,47 ± 3,37 <sup>b</sup>	39,05 ± 0,91 <sup>ab</sup>
<i>C. hariatii</i>						
Fresco	251,33 ± 6,8 <sup>b</sup>	339,06 ± 1,7 <sup>b</sup>	27,07 ± 2,12 <sup>a</sup>	26,42 ± 1,01 <sup>a</sup>	47,82 ± 1,25 <sup>a</sup>	44,28 ± 0,12 <sup>a</sup>
Blanqueado	158,07 ± 6,7 <sup>a</sup>	184,94 ± 1,3 <sup>a</sup>	25,14 ± 4,00 <sup>a</sup>	29,71 ± 3,09 <sup>a</sup>	46,17 ± 2,92 <sup>a</sup>	42,85 ± 2,43 <sup>a</sup>
GB6	178,61 ± 2,1 <sup>ab</sup>	199,17 ± 2,6 <sup>a</sup>	24,28 ± 2,02 <sup>a</sup>	25,71 ± 1,02 <sup>a</sup>	46,72 ± 3,22 <sup>a</sup>	43,49 ± 1,72 <sup>a</sup>
K4	189,05 ± 1,3 <sup>ab</sup>	238,69 ± 3,1 <sup>ab</sup>	29,28 ± 4,20 <sup>a</sup>	28,57 ± 3,06 <sup>a</sup>	49,45 ± 2,89 <sup>a</sup>	44,62 ± 0,59 <sup>a</sup>
F4	218,23 ± 2,7 <sup>ab</sup>	231,57 ± 2,6 <sup>ab</sup>	25,71 ± 0,20 <sup>a</sup>	26,71 ± 1,01 <sup>a</sup>	45,25 ± 1,95 <sup>a</sup>	44,20 ± 4,65 <sup>a</sup>

\* Las diferencias entre los valores medios de cada tiempo y método en los diferentes tratamientos indicados con diferentes letras en la misma columna son estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). T0: tiempo cero; T7: a los 7 días.

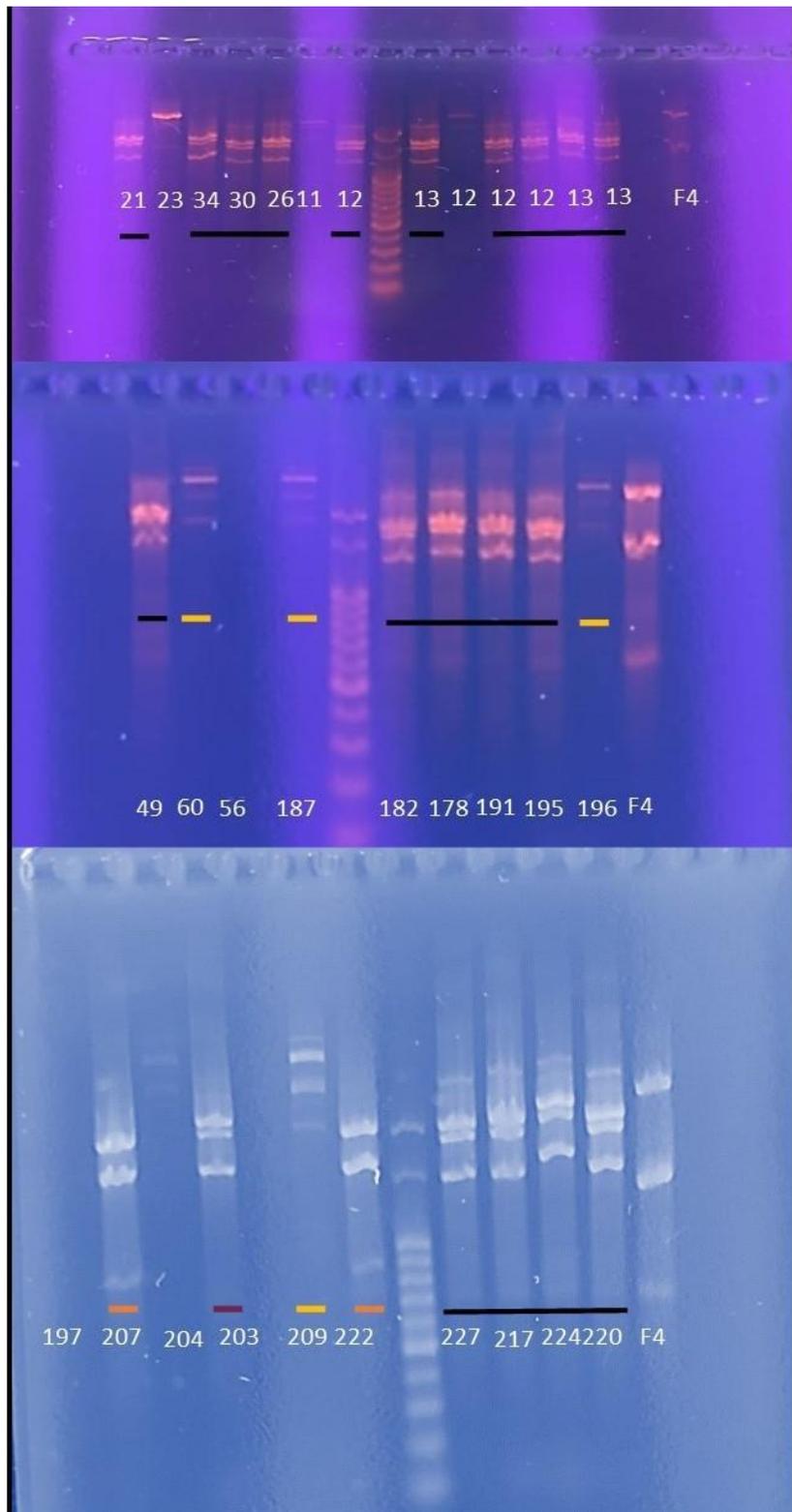
En relación a la evaluación de las actividades antioxidantes no se observaron diferencias significativas antes de la fermentación entre el tratamiento con blanqueo y hongos frescos ( $p > 0,05$ ) respecto de los inoculados para ambas especies analizadas. En la evaluación mediante el método de ABTS se observó que el porcentaje de inhibición para *F. antarctica* aumentó luego del proceso de fermentación en todos los tratamientos, siendo la cepa GB6 la que presentó valores significativamente más altos ( $p < 0,05$ ), alcanzando al de los hongos

frescos. Sin embargo, el porcentaje de inhibición medido por la técnica de DPPH luego de la fermentación mostró que los valores de inhibición disminuyeron en todos los casos, excepto para los hongos frescos donde el aumento en la actividad fue 57% mayor en T7 (68,55%). Los valores fueron significativamente inferiores en todos los tratamientos inoculados, respecto de las fructificaciones frescas de *F. antarctica*, excepto para las fructificaciones inoculadas con F4 (Tabla 13).

Para *C. hariatii*, no hubo una influencia significativa ( $p>0,05$ ) del proceso de fermentación en las actividades antioxidantes en ninguno de los casos. Tampoco se detectaron diferencias significativas ( $p>0,05$ ) de los hongos fermentados respecto de los hongos frescos o blanqueados (Tabla 13).

#### Aislamiento e identificación de especies de BAL

Se aislaron un total de 154 colonias para el ensayo con *Fistulina antarctica* y 28 para el ensayo con *Cyttaria hariatii*, en ambos casos de las diluciones más altas de suspensiones celulares en MRS. Debido al elevado número de aislamientos en el ensayo de *F. antarctica*, alrededor de un 20% de los cultivos representativos fueron sometidos a análisis RAPDs que permitió la identificación de tres grupos diferentes (Fig. 49). El análisis del gen 16S rRNA confirmó que dos de las cepas aisladas correspondían al complejo de especies *Lacticaseibacillus paracasei* y *Lacticaseibacillus casei*. En el ensayo de fermentación de *C. hariatii* la técnica RAPDs permitió identificar cuatro grupos, y el posterior análisis del gen 16S rRNA confirmó que tres de ellos correspondían a las especies *Lactobacillus paracasei*, *Lacticaseibacillus casei* y *Leuconostoc citreum* (Tabla 14).



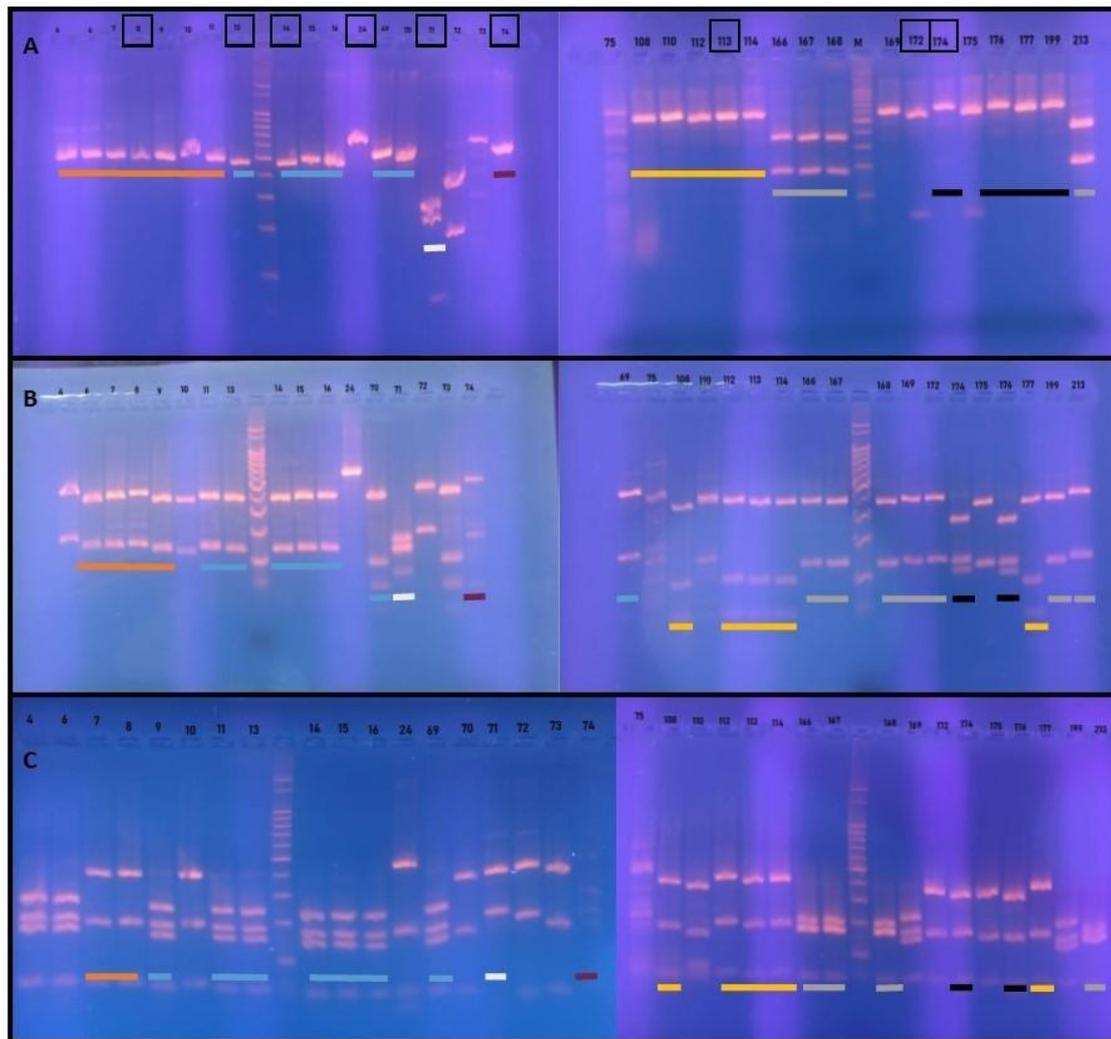
**Fig. 49** - Resultados de RAPDs con el cebador m13 para la los aislamientos bacterianos obtenidos de la fermentación de *F. antarctica* a diferentes tiempos. Se indican los agrupamientos con diferentes colores

**Tabla 14** - Resultados BLASTn de las diferentes cepas de BAL aisladas en los diferentes tratamientos antes y después del proceso de fermentación.

	<b>Tratamiento</b>	<b>Especie</b>	<b>% identidad</b>	<b>% cobertura</b>
<i>F. antarctica</i>	T0 F4	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	99,75	99
	T0 K4	<i>Lacticaseibacillus casei</i>	99,75	98
	T0 GB6	<i>Lacticaseibacillus casei</i>	99,75	99
	T7 BL	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	99,63	100
	T7 K4	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	98,88	99
	T7 Fr	<i>Lacticaseibacillus casei</i>	99,87	99
	T7 GB6	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	99,76	99
<i>C. harii</i>	T0 GB6	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	99,4	99
	T0 K4	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	99,88	99
	T0 F4	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	100	99
	T7 GB6	<i>Lacticaseibacillus casei</i>	99,18	99
	T7 GB6	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	98,6	99
	T7 F4	<i>Leuconostoc citreum</i>	99,41	99

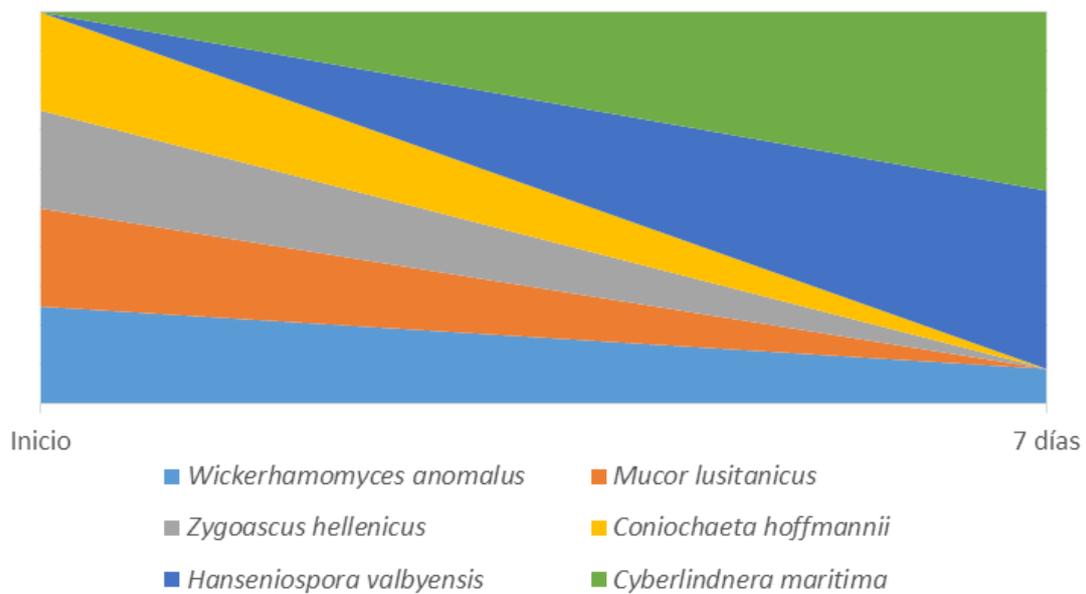
#### Aislamiento e identificación de especies de levaduras

Se aislaron un total de 67 colonias de levaduras para el ensayo de *F. antarctica* y 26 para el ensayo de *C. harii*. Los aislamientos se agruparon en seis grupos en el caso de las fermentaciones de *F. antarctica* y tres grupos para *C. harii* según los perfiles de RFLP (Fig. 50).



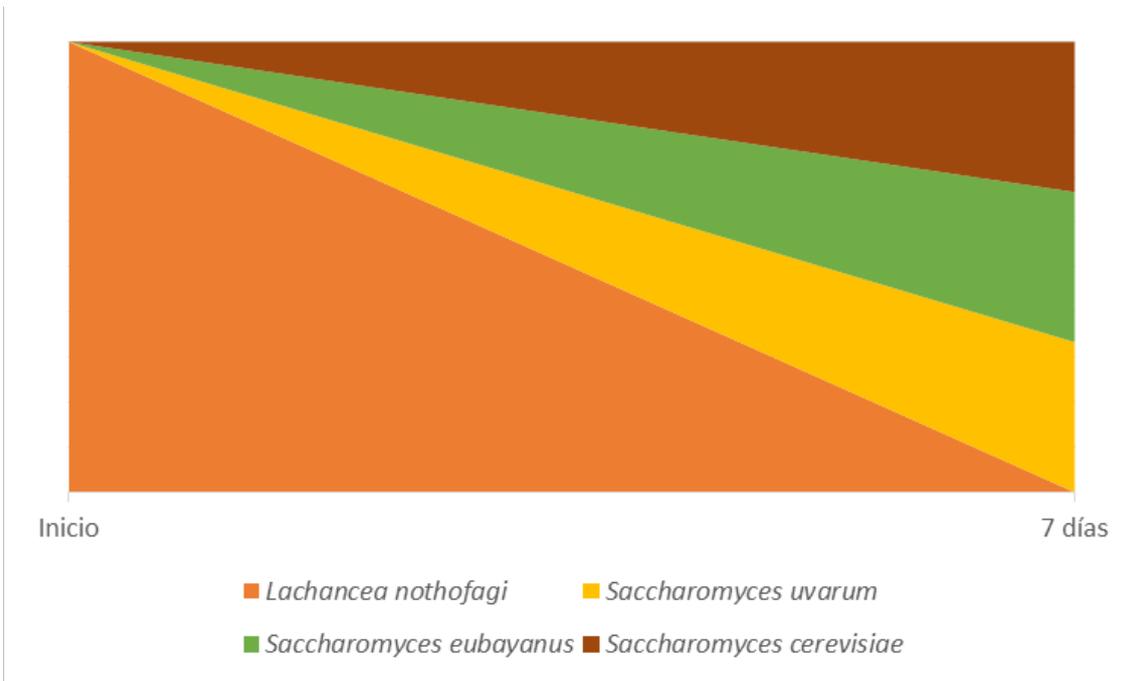
**Fig. 50** - Resultados de RFLP para los aislamientos de levaduras obtenidos de la fermentación de *F. antarctica* a diferentes tiempos con las enzimas CfoI (A) HaeIII(B) y HinfI (C). Se indican los agrupamientos con diferentes colores y las cepas seleccionadas en recuadros negros.

La secuenciación del dominio D1/D2 del gen ARNr 26S confirmó la identificación de la levadura *Wickerhamomyces anomalus* en la fermentación de las fructificaciones de *F. antarctica* inoculadas con K4 y F4. Para las fermentaciones espontáneas, se identificó la presencia de *Mucor lusitanicus* antes del proceso de fermentación y de *Hanseniospora valbyensis* después de la fermentación. Asimismo, se detectó *Coniochaeta hoffmannii* y *Zygoascus hellenicus* antes de la fermentación con F4, aunque no se encontró en las muestras posteriores al proceso fermentativo. Además, se observó la especie *Cyberlindnera maritima* en las fermentaciones con K4 (Fig. 53) (Tabla 15). Esta sucesión de levaduras durante el proceso fermentativo se puede ver en la Fig. 51.

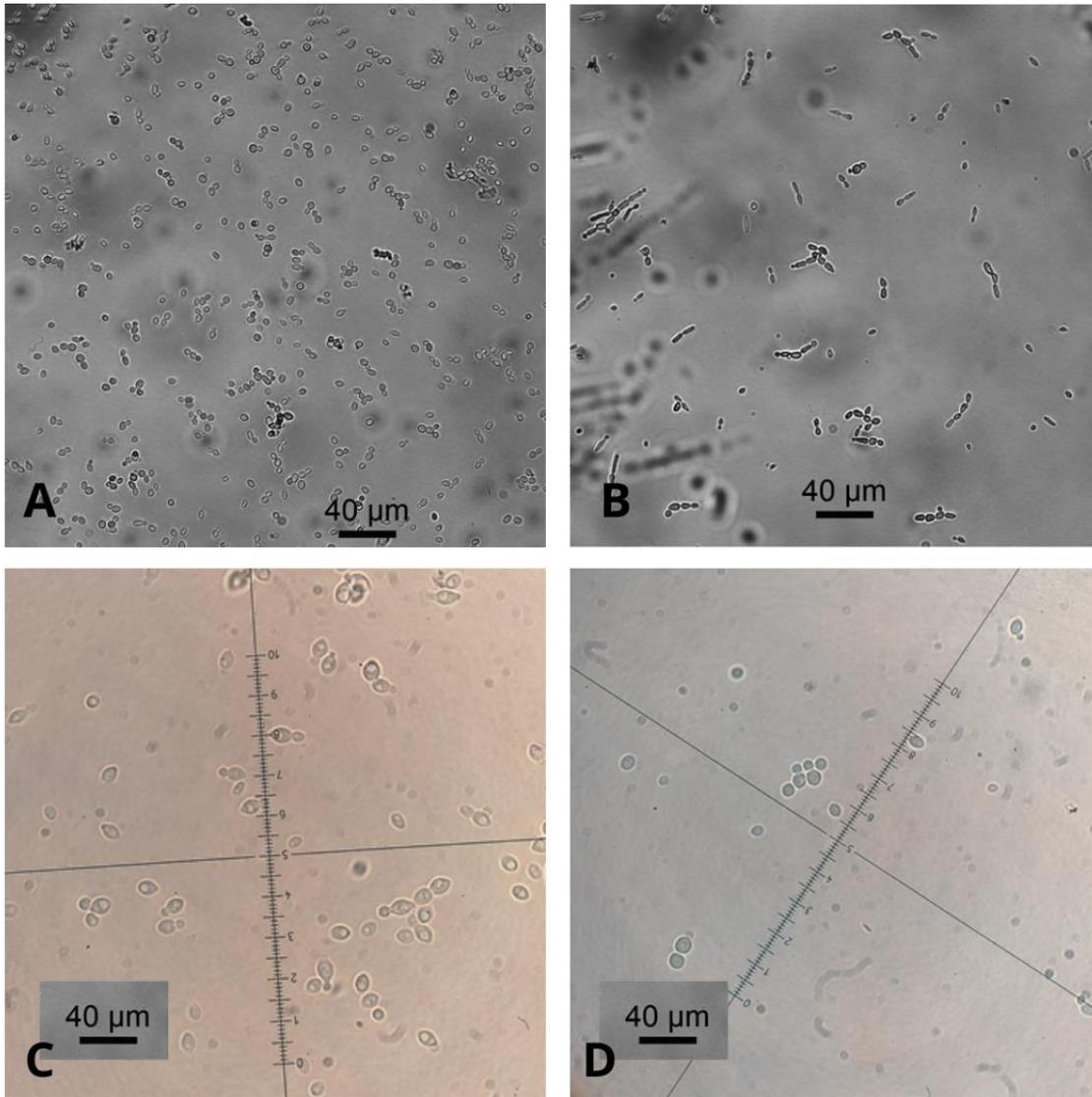


**Fig. 51** - Dinámica de la sucesión de levaduras durante las fermentaciones de *F. antarctica*. Se grafica solo presencia/ausencia.

En *C. hariatii*, antes de la fermentación, *Lachancea nothofagi* estaba presente en la fermentación espontánea e inoculado con F4, pero no se encontró después de la fermentación en ninguno de los casos. Después de la fermentación, se encontraron *Saccharomyces uvarum*, *S. eubayanus* y *Saccharomyces cerevisiae*. La sucesión de estas levaduras durante el proceso fermentativo se puede observar en la Fig. 52.



**Fig. 52** - Dinámica de la sucesión de levaduras durante las fermentaciones de *C. hariatii*. Se grafica solo presencia/ausencia.



**Fig. 53** - Levaduras aisladas de la fermentación de *F. antarctica*: *Wickerhamomyces anomalus* (A), *Zygoascus hellenicus* (B), *Hanseniospora valbyensis* (C) y *Cyberlindnera maritima* (D).

**Tabla 15** - Resultados BLASTn de las diferentes cepas de levaduras aisladas en los diferentes tratamientos antes y después del proceso de fermentación.

	<b>Tratamiento</b>	<b>Especie</b>	<b>% identidad</b>	<b>% cobertura</b>
<b><i>F. antarctica</i></b>	T0 K4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99.65	98
	T0 Fr	<i>Mucor lusitanicus</i>	99.13	97
	T0 F4	<i>Zygoascus hellenicus</i>	99.47	96
	T0 F4	<i>Coniochaeta hoffmannii</i>	99.47	96
	T0 F4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99.45	98
	T7 Fr	<i>Hanseniospora valbyensis</i>	99.65	96
	T7 K4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99.64	96
	T7 K4	<i>Cyberlindnera maritima</i>	97.24	85
<b><i>C. hariatii</i></b>	T0 Fr	<i>Lachancea nothofagi</i>	99.65	95
	T0 F4	<i>Lachancea nothofagi</i>	99.5	95
	T7 Fr	<i>Saccharomyces uvarum</i>	99.48	97
	T7 Fr	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99.31	97
	T7 Fr	<i>Saccharomyces eubayanus</i>	99.31	97

#### Análisis sensorial

En el caso de *Fistulina antarctica*, las mejores características de color y apariencia (colores más claros y menor turbidez) correspondieron a las fructificaciones inoculadas con K4; la textura fue mejor cuando fueron inoculadas con GB6, y en cuanto al sabor, las mejores valoraciones se correspondieron con los tratamientos inoculados con los con GB6 y F4 (Fig. 54a), sin embargo no se detectaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para ninguno de los atributos evaluados en los diferentes tratamientos (Tabla 16).

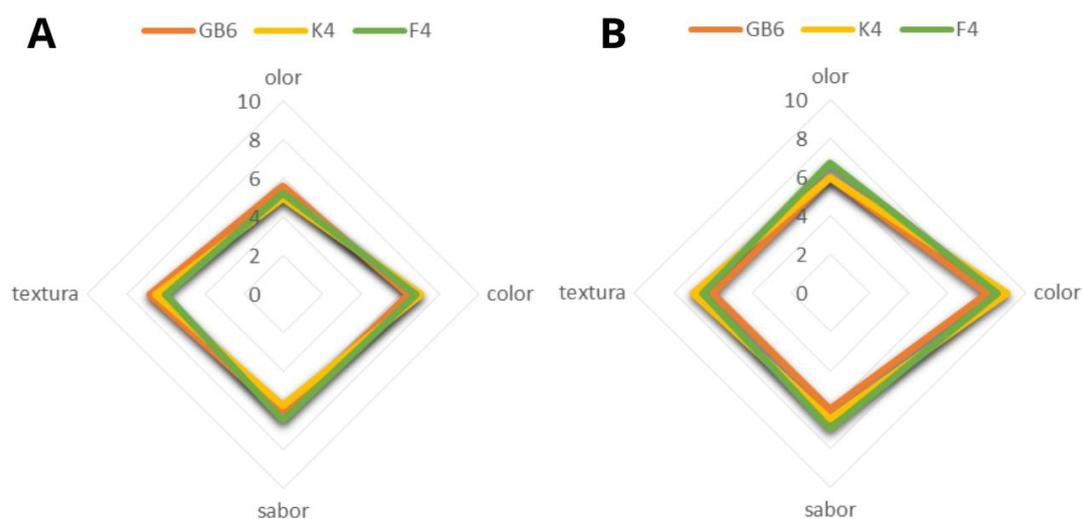
*Cyttaria hariatii* obtuvo mejores valoraciones que *F. antarctica* para todos los atributos testados en los tres tratamientos. El color fue el atributo mejor valorado (naranja intenso, muy bien conservado). En el caso del sabor, las mejores valoraciones las obtuvo el tratamiento inoculado con F4, significativamente mayor al resto ( $p < 0,05$ ), mientras que la mejor textura fue para los hongos

inoculados con K4, aunque sin diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto de los inoculados con GB6 y F4 (Tabla 16; Fig. 54b).

**Tabla 16** - Valoraciones de los atributos testeados por el panel de jueces no entrenados. Se muestran las medias y el desvío estándar.

Tratamiento	Atributos			
	olor	color	sabor	textura
<b><i>F. antarctica</i></b>				
GB6	5,6 ± 1,34a	6,4 ± 1,14a	6,0 ± 1,22a	6,8 ± 1,79a
K4	5,2 ± 0,45a	7,0 ± 1,22a	5,8 ± 0,24a	6,8 ± 1,79a
F4	5,4 ± 0,55a	6,8 ± 0,84a	6,6 ± 1,14a	6,0 ± 1,00a
<b><i>C. hariatii</i></b>				
GB6	6,4 ± 0,55a	7,6 ± 1,14a	6,4 ± 0,55a	6,9 ± 0,55a
K4	6,4 ± 0,55a	8,6 ± 1,14a	6,4 ± 0,55a	7,4 ± 0,55a
F4	7,2 ± 0,84a	8,4 ± 0,55a	7,4 ± 0,55b	6,8 ± 0,84a

\* Las diferencias entre los valores medios de cada atributo en los diferentes tratamientos indicados con diferentes letras son estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).



**Fig. 54** - Puntajes sensoriales para los hongos fermentados inoculados de *F. antarctica* (A) y *C. hariatii* (B).

## Discusión

Este es el primer trabajo que indaga sobre el proceso de fermentación de especies de hongos silvestres de Patagonia, analizando la microbiota involucrada. En este estudio, se comprobó que el pH de los hongos fermentados permaneció estable durante al menos 30 días de almacenamiento refrigerado, sin embargo no se almacenaron durante un período prolongado. Investigaciones previas han demostrado que los hongos fermentados permanecen microbiológicamente estables durante seis meses cuando se almacenan continuamente a 5°C después del proceso de fermentación (Jabłońska-Ryś *et al.* 2005). Las bacterias ácido lácticas testeadas en este trabajo demostraron ser efectivas en el proceso de fermentación y podrían utilizarse como cultivos iniciadores para prolongar la vida postcosecha tanto de *F. antarctica* como de *C. hariatii* mediante fermentación láctica.

Los aislamientos BAL obtenidos desde los tratamientos previamente inoculados (K4, F4 y GB6) mostraron que *Lactocaseibacillus paracasei* (K4) dominó las fermentaciones de ambas especies de hongos, incluso en tratamientos donde no había sido utilizada como iniciador. Esta especie se considera parte del complejo *Lactobacillus casei* (LCG): *Lactocaseibacillus casei* (GB6), *Lactocaseibacillus paracasei* (K4) y *Lactocaseibacillus rhamnosus*. La diferenciación dentro de este grupo suele ser difícil mediante métodos fenotípicos y genotípicos convencionales, por lo cual continuamente se desarrollan nuevos métodos para distinguir estas tres especies estrechamente relacionadas (Hill *et al.* 2018), incluyendo la secuenciación de genes de proteínas específicas o técnicas avanzadas de bioinformática analizando genomas completos (Wuyts *et al.* 2017; Skrzypczak *et al.* 2020). En este estudio las asignaciones taxonómicas solo se realizaron por secuenciación del gen 16S rRNA. Futuros estudios podrían incluir pruebas de mayor complejidad que permitan determinaciones más precisas teniendo en cuenta que gran parte de las investigaciones han demostrado que estas especies de bacterias desempeñan un papel muy importante en diversas aplicaciones para mejorar la calidad de los alimentos, extender la vida útil y promover la salud a través de sus efectos probióticos (Hill *et al.* 2018). En las fermentaciones de *C. hariatii*, se recuperó *Leuconostoc citreum* (F4) después del proceso de fermentación en el tratamiento inoculado con esta cepa. Esto sugiere que *Leuconostoc citreum* puede sobrevivir y proliferar en las condiciones específicas del medio,

contribuyendo así al perfil microbiano y posiblemente a las características organolépticas del producto final. Esta especie es conocida por su capacidad de producir exopolisacáridos y compuestos aromáticos que mejoran la textura y el sabor de los productos fermentados (Müller *et al.* 2021). Estas características son altamente valoradas en la industria alimentaria por su contribución a la calidad y aceptación del producto final.

Cabe destacar que *L. casei* fue detectada en la fermentación espontánea (control fresco) y *L. paracasei*, en los blanqueados sin inocular (control solo blanqueado) en *F. antarctica*. Ambas especies, usadas como inoculantes en los tratamientos estudiados, proliferaron de manera espontánea en los controles. Es importante resaltar que los valores de pH y los recuentos de BAL realizados indican que estos hongos albergan naturalmente una cantidad significativa de estos microorganismos. Futuros estudios deberían abordar el análisis completo de las cepas que participan en la fermentación libre (espontánea) de ambos hongos, analizando la evolución de sus recuentos en el tiempo, a fin de seleccionar aquellas con potencial para la elaboración de fermentos. Como se mencionó anteriormente, el uso de cepas locales puede ofrecer beneficios extras, como mejor adaptación ambiental a la región o al propio sustrato, lo que puede resultar en procesos de fermentación más eficientes (Yan *et al.* 2023). Estudios anteriores con fructificaciones de *Agaricus bisporus* fermentadas de forma espontánea resultaron una fuente valiosa de nuevos aislados de BAL con potencial funcional (Skrzypczak *et al.* 2020).

Respecto de las levaduras encontradas, la especie *W. anomalus*, ampliamente distribuida en la naturaleza, se destaca por producir una amplia gama de metabolitos aromáticos, que pueden contribuir a la complejidad del sabor del vino (Walker 2011; Padilla *et al.* 2018). Esta levadura fue encontrada en todos los tratamientos testeados sobre *F. antarctica*, pero no se encontró luego del proceso de fermentación, excepto para las fermentaciones espontáneas. Esto podría ser resultado de la competencia por nutrientes o la formación de subproductos que resulten inhibidores, como por ejemplo un ambiente ácido generado por las altas concentraciones de ácido láctico. No obstante, esta especie desempeña un papel crucial como levadura iniciadora en fermentaciones y en las sucesiones de levaduras. Los resultados obtenidos indican que, en combinación con las bacterias ácido lácticas, *W. anomalus* puede

contribuir significativamente a la creación de un ambiente microbiano óptimo al inicio de la fermentación. Esta combinación facilita la actividad de las BAL, mejorando la estabilidad y seguridad del producto fermentado. Estos hallazgos coinciden con estudios previos, como los realizados por Satora *et al.* (2014), que han demostrado la efectividad de *W. anomalus* en la estabilización y seguridad de fermentaciones alimentarias.

Una especie presente en la fermentación de *C. hariatii* fue *Lachancea nothofagi*, descrita a partir de aislamientos de corteza, exudados y fracción ectomicorrizofera del suelo de *Nothofagus antarctica*, *Lophozonia alpina* y *N. pumilio* (Mestre *et al.* 2010). Actualmente está siendo estudiada por su potencialidad como promotora del crecimiento vegetal en la producción de compuestos similares a auxinas (Mestre & Fontenla 2021). Otras especies aisladas de las fermentaciones espontáneas de *C. hariatii* fueron *Saccharomyces uvarum*, *S. cerevisiae* y *S. eubayanus*, especies con amplios registros de fermentación de diferentes productos (Tosi *et al.* 2009; Libkind *et al.* 2011; Rodríguez *et al.* 2014; Wang *et al.* 2015). Las tres especies estuvieron presentes después de la fermentación. Rodríguez *et al.* (2017) demostraron la capacidad de *S. uvarum* para producir una amplia gama de compuestos aromáticos, que podría estar involucrada en fermentaciones tradicionales de la Patagonia Norte, como la *chicha* o el *mudai*. Por su parte, *S. eubayanus* fue descubierto en 2011 en los bosques de Nothofagaceae (Libkind *et al.* 2011) y se identificó como uno de los progenitores del híbrido utilizado en la producción de cerveza lager, *S. pastorianus*. Actualmente, se utiliza en la elaboración de esta variedad de cerveza y otros productos, aprovechando su criotolerancia para mejorar la eficiencia y la calidad de la fermentación a bajas temperaturas. Además, estudios recientes han explorado su potencial para la creación de nuevas cepas híbridas, lo que podría llevar a innovaciones en la industria cervecera y otras aplicaciones biotecnológicas (Sampaio 2022).

Las levaduras asociadas al proceso de fermentación obtenidas de ambos hongos también podrían ser evaluadas en fermentaciones controladas para determinar su potencial funcional. Futuros estudios deberían también analizar la estabilidad de los tratamientos que demostraron resultados favorables, evaluando su comportamiento durante períodos de almacenamiento de hasta seis meses o más.

La fermentación láctica de hongos no se considera un método competitivo cuando se compara con los dos métodos de conservación más populares para esta materia prima, que son el secado y la congelación, descritos previamente en esta tesis. Por ejemplo, la congelación conserva eficazmente los compuestos de bioactividad de los hongos frescos, lo que lo convierte en un método de conservación recomendado en numerosos estudios (Fernandes *et al.* 2013; Pei *et al.* 2014; Yang *et al.* 2019; González *et al.* 2023). Sin embargo, la fermentación se destaca como rentable para el procesamiento de alimentos, pues resulta en productos duraderos sin necesidad de conservantes químicos o aplicación de métodos de decontaminación térmica (Jabłońska-Ryś *et al.* 2020), siendo de fácil aplicación a escala familiar. Por otro lado, la fermentación láctica puede mejorar el sabor, aroma, textura y valor nutricional de los hongos comestibles y, en algunos casos, como se ha mencionado previamente, este proceso puede aumentar los niveles de compuestos bioactivos como fenoles, vitaminas y fibra. Sin embargo, los resultados de este estudio no mostraron un aumento en la cantidad de fenoles totales. Futuros estudios deberían abordar la medición de otros compuestos con potencial bioactivo, como la fibra o los betaglucanos estructurales, para evaluar completamente el impacto de la fermentación láctica en las propiedades biológicas de los hongos fermentados. Asimismo, la exploración, selección y utilización de cultivos iniciadores locales podría maximizar los beneficios de la fermentación láctica tanto en la mejora de las propiedades bioactivas como en las características sensoriales de los fermentos (Liu *et al.* 2018; Tamang *et al.* 2020). Los principales desafíos del proceso incluyen la estandarización del proceso de fermentación, un control de calidad consistente que garantice inocuidad microbiológica y la aceptación por parte de los consumidores.

### Conclusiones

- En este trabajo se demostró que las bacterias utilizadas como cultivos iniciadores fermentan con éxito las fructificaciones de las especies de hongos comestibles *F. antarctica* y *C. hariatii*, con un alto recuento de células viables, demostrando ser sustratos adecuados para este tipo de procesos.
- Este trabajo constituye el primer reporte sobre aislamientos de levaduras de *F. antarctica* y de *C. hariatii*, con potencialidad para ser usadas en fermentaciones controladas mixtas. Esto resulta importante para pensar

en iniciadores específicos que permitan optimizar el proceso de fermentación, mejorando tanto la seguridad como la calidad de los productos fermentados.

- Los resultados de este estudio apoyan la hipótesis de que la adición de bacterias ácido-lácticas es un proceso que puede utilizarse para preservar hongos silvestres comestibles en Patagonia. Esta técnica asegura la frescura, calidad y seguridad para el consumo de los hongos testeados, contribuyendo al agregado de valor de estos recursos silvestres estacionales y por ende al desarrollo económico y la innovación en la región.
- Con más investigación y optimización, este método podría establecerse como un estándar en la preservación de hongos. En este sentido futuros estudios deberían considerar la utilización de otras especies de hongos comestibles, nuevas especies BAL y levaduras aisladas de los hongos a fermentar, y diferentes condiciones de fermentación para enriquecer y ampliar la aplicabilidad de los resultados aquí presentados. .

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS GENERALES

Los hongos silvestres comestibles son productos altamente atractivos y prometedores en el mundo actual. El interés por ellos surge de la necesidad de encontrar soluciones que nos permitan recuperar el conocimiento tradicional, aprovechar recursos regionales disponibles y renovables, fomentar/acceder a dietas y hábitos de consumo más saludables y promover el desarrollo de economías regionales. Además, los hongos comestibles silvestres como productos forestales no madereros desempeñan un papel crucial en la conservación de los ambientes boscosos, ya que son considerados una alternativa viable para el aprovechamiento de los recursos sin comprometer la integridad del ecosistema. Pensar en los HSC no solo como un recurso alimenticio con posibilidad de incorporarlo en la actividad gastronómica, sino también como una estrategia para la preservación a largo plazo de nuestros valiosos recursos forestales, resalta la necesidad de conocer su diversidad. En este sentido, las técnicas moleculares en conjunto con los métodos morfológicos y anatómicos convencionales utilizados en esta tesis constituyeron una herramienta clave al momento de describir nuevas especies y verificar la existencia de otras. Esta tesis aporta nueva información taxonómica, filogenética y morfológica sobre los géneros *Fistulina* y *Ramaria* mediante el uso de un enfoque integrativo. El hallazgo, la descripción y caracterización de nuevas especies de hongos (*F. pumiliae*, *R. dendrophora* y *R. flavinedulis*) nos brinda la posibilidad de explorar nuevos recursos con aplicaciones no solo alimentarias y gastronómicas sino también bioactivas o medicinales. La combinación de estos esfuerzos de investigación proporciona un marco integral de trabajo tendiente a resguardar los recursos disponibles y también a optimizar sus posibles usos.

En esta tesis se realizó una evaluación de métodos de deshidratado y fermentación, con el objetivo de identificar técnicas óptimas para la preservación de la bioactividad de estos productos en entornos con distintas posibilidades económicas. La combinación de métodos más complejos como la liofilización y técnicas más simples como la deshidratación, junto con la optimización de los

procesos fermentativos evaluados ofrecen un enfoque completo y diversificado para la preservación de hongos comestibles silvestres. Todos los métodos de preservación ensayados (deshidratado, congelado, liofilizado y fermentado) mostraron que pueden utilizarse para extender los tiempos de vida útil, preservar los compuestos bioactivos y generar productos finales de calidad con aplicaciones potenciales. Los hallazgos sugieren que tanto el proceso de liofilización como el secado a 60 °C resultan métodos eficientes a la hora de mantener la calidad organoléptica y la bioactividad de estas especies, y por ende la posibilidad de mantener sus cualidades como alimentos funcionales, ofreciendo soluciones viables tanto en áreas con recursos limitados como para aquellas con acceso a una tecnología más avanzada. El deshidratado constituye un método simple y rápido lo que lo convierte en ideal para pequeños productores y negocios familiares. Sería interesante avanzar a futuro en investigaciones que involucren otras especies de hongos silvestres de las más de 30 reportadas y actualmente incorporadas en el código alimentario nacional, determinando variaciones en las condiciones de deshidratado para afinar las recomendaciones sobre este método de conservación. Además, podrían probarse las bacterias lácticas evaluadas en este estudio junto con nuevas cepas a identificar, sumando las levaduras halladas con potencial para la producción de fermentos.

Finalmente, los resultados aquí presentados abren un abanico de posibilidades en los tratamientos de postcosecha y agregado de valor para estos valiosos recursos silvestres, que pueden contribuir al desarrollo sostenible de las comunidades locales vinculadas al bosque patagónico, potenciando las economías regionales y promoviendo el uso integral y sostenible de los diversos ambientes forestales de Patagonia.

## BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Akaike H (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE transactions on automatic control* 19(6):716–723.
- Albertó E, Curvetto N, Deschamps J, González Matute R, & Lechner B (2010) Hongos Silvestres y de Cultivo en Argentina: Historia, regiones y sistemas de producción, hongos silvestres de valor económico, consumo, mercado interno y externo, legislación, oferta tecnológica e investigación y desarrollo. Hacia un desarrollo sostenible del sistema de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: avances y perspectivas en el siglo XXI, 19:333-58.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, & Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17):3389-3402.
- Balasundaram SV, Engh IB, Skrede I, & Kauserud H (2015) How many DNA markers are needed to reveal cryptic fungal species?. *Fungal Biology* 119(10):940–945.
- Barroetaveña C, & Toledo C V (2020) Diversity and ecology of edible mushrooms from Patagonia native forests, Argentina. *Mushrooms, humans and nature in a changing world: Perspectives from ecological, agricultural and social sciences* 297-318.
- Barroetaveña C, Salomón MES, & Bassani V (2019) Rescuing the ectomycorrhizal biodiversity associated with South American *Nothofagaceae* forest, from the 19th century naturalists up to molecular biogeography. *Journal of Forest Research* 92(5):500–511. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpz047>
- Barroetaveña C, López S, & Pildain MB (2020) Cocinar Con Hongos Silvestres. Descripción Nutricional, Propiedades, Modos de Consumo y Preservación de Los Hongos Silvestres de Patagonia. CIEFAP, Esquel, Argentina, 85 pág.
- Barroetaveña C, González G, Tejedor E, Toledo C & Pildain MB (2024). Sensory characteristics and volatile organic compound profile of Wild Edible Mushrooms from Patagonia, Argentina (BAJO REVISIÓN).

- Barros L, Baptista P, Correia DM, Morais JS, Ferreira ICFR (2007) Effects of Conservation Treatment and Cooking on the Chemical Composition and Antioxidant Activity of Portuguese Wild Edible Mushrooms. *J. Agric. Food Chem.*, 55:4781–4788.
- Barros L, Venturini BA, Baptista P, Estevinho LM, Ferreira IC (2008) Chemical Composition and Biological Properties of Portuguese Wild Mushrooms: A Comprehensive Study. *J. Agric. Food Chem.*, 56:3856–3862.
- Bhattacharya M, Srivastav PP, Mishra HN (2015) Thin-layer modeling of convective and microwave-convective drying of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *J. Food Sci. Technol*, 52:2013–2022.
- Bhunjun CS, Phillips AJ, Jayawardena RS, Promptuttha I, & Hyde KD (2021) Importance of molecular data to identify fungal plant pathogens and guidelines for pathogenicity testing based on Koch's postulates. *Pathogens*, 10(9), 1096.
- Binder M, Hibbett DS, Larsson KH, Larsson E, Langer E, Langer G (2005) La distribución filogenética de formas resupinadas en los principales clados de hongos formadores de cuerpos fructíferos (Homobasidiomycetes). *Systematics and Biodiversity* 3:113-157.
- Blois MS (1958) Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181:1199–1200.
- Boa E (2005) Los Hongos Silvestres Comestibles: Perspectiva Global de Su USO E Importancia Para la Poblacion (Productos Forestales No Madereros) (No. 17). Food & Agriculture Org.
- Bodensteiner P, Binder M, Moncalvo JM, Agerer R, Hibbett DS (2004) Relaciones filogenéticas de homobasidiomicetos cefaloidales. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33:501-515.
- Brusis OA (1972) Una nueva especie de *Fistulina* de México. *Mycologia* 64:1248-1252
- Burdsall HH (1971) Notas sobre algunos lignícolas basidiomicetos del sureste de Estados Unidos. *Jour. Elisha Mitch. Soc.* 87:239-245.
- Cabrera AI (1976) Regiones fitogeográficas argentinas. *Enciclopedia argentina de agricultura y jardinería*, 2:1-85.

- Carlsen T, Engh IB, Decock C, Rajchenberg M, & Kauserud H (2011) Multiple cryptic species with divergent substrate affinities in the *Serpula himantioides* species complex. *Fungal Biology* 115(1):54–61.
- Castada HZ, Sun Z, Barringer SA, Huang X (2020) Thermal degradation of p-Hydroxybenzoic acid in Macadamia Nut oil, olive oil, and corn oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 93:289–300.
- Castellanos-Reyes K, Villalobos-Carvajal R, Beldarrain-Iznaga T (2021) Fresh Mushroom Preservation Techniques. *Foods*, 10:2126.
- Cheung LM, Cheung PC, & Ooi VE (2003) Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food chemistry*, 81(2):249-255.
- Cocolin L & Ercolini D (Eds.) (2007) *Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods*. Springer Science & Business Media.
- Coker WC (1923) *The Clavarias of the United States and Canada*. University North Carolina Press, Chapel Hill NC.
- Corner EJM (1950) *A monograph of Clavaria and allied genera*. *Annals of Botany Memoirs*. Oxford University Press, London.
- Corner EJM (1957) Some Clavarias from Argentina. *Darwiniana* 11:193–206.
- Corner EJM (1970) Supplement to "A Monograph of Clavaria and allied Genera". *Beih Nova Hedwing* 33:1–299.
- Crisci JV, Cigliano MM, Morrone JJ, Roig-Juñent S (1991) Historical biogeography of southern South America. *Systematic Zoology* 40:152–171.
- Crovetto RM (1982) Breve panorama de las plantas utilizadas por los indios de Patagonia y Tierra de Fuego. *Universidad Católica Nuestra Señora de la Asunción*.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, & Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9:772–772
- Das K, Hembrom ME, Arun KD, Arvind P, Soumitra P, & Acharya K (2016) *Ramaria subalpina* (*Gomphaceae*): a new edible fungus from India. *Phytotaxa*, 246(2):137–144

- Deschamps JR (2002) Hongos silvestres comestibles del Mercosur con valor gastronómico. Documentos de trabajo, Universidad de Belgrano. Retrieved April 26, 2023, from <http://repositorio.ub.edu.ar/handle/123456789/433>
- de Möesbach EW (1992) Botánica indígena de Chile. C. Aldunate y C. Villagrán. (Eds.). Ed. Andres Bello. Santiago de Chile.
- Dimitri MJ & Orfila EN (1985) Tratado de morfología y sistemática vegetal.
- Dong Y, Yan W, Zhang YQ. Effects of Spray Drying and Freeze Drying on Physicochemical Properties, Antioxidant and ACE Inhibitory Activities of Bighead Carp (*Aristichthys nobilis*) Skin Hydrolysates (2022). *Foods*. 11(14):2083. doi:10.3390/foods11142083
- Donoso Zegers C (2006) Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina: Autoecología. Marisa Cuneo ediciones
- Doty MS (1944) *Clavaria*, the species known from Oregon and the Pacific Northwest. Oregon State College, Corvallis, 91 pp.
- Doyle J (1991) DNA protocols for plants. In: GMHewitt, AWB Johnston, JPW Young (Eds.), *Molecular Techniques in Taxonomy*. Nato ASI Series (Series H: Cell Biology), vol. 57 Doty. Berlín, (pp. 283–293). Heidelberg: Springer
- Dunk CW, Lebel T, & Keane PJ (2012) Characterisation of ectomycorrhizal formation by the exotic fungus *Amanita muscaria* with *Nothofagus cunninghamii* in Victoria, Australia. *Mycorrhiza* 22(2):135–147
- Dutta AK, Wilson AW, Antonín V, & Acharya K (2015) Taxonomic and phylogenetic study on gymnopoid fungi from Eastern India. I. *Mycological Progress* 14(10):1–18
- Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F, & Querol A (1999) Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8 S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic and evolutionary microbiology*, 49(1):329-337
- Exeter RL, Norvell L, & Cazares E (2006) *Ramaria* of the Pacific Northwestern United States. U. S Department of the Interior, Bureau of Land Management. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=GB2021457125>

- Ellis RJ, Thompson IP, & Bailey MJ (1999) Temporal fluctuations in the pseudomonad population associated with sugar beet leaves. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28(4):345-356.
- Fernandes Â, Barros L, Barreira JC, Antonio AL, Oliveira MBP, Martins A, Ferreira IC (2013) Effects of different processing technologies on chemical and antioxidant parameters of *Macrolepiota procera* wild mushroom. *LWT-Food Sci. Technol.* 54:493–499.
- Ferreira IC, Barros L, & Abreu R (2009) Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, 16(12):1543-1560.
- Fidalgo O, Fidalgo K (1958) A new *Fistulina* from Brazil. *Mycologia*:145-146.
- Fidalgo O, Fidalgo K (1962) A new genus based on *Fistulina brasiliensis*. *Mycologia* 54:342–352.
- Furci George-Nascimento GM (2007) *Fungi Austral: Guía de campo de los hongos más vistosos de Chile*. CORMA.
- Gaitán-Hernández R, Rodríguez B (2008) Crecimiento micelial de cepas silvestres nativas de *Lepista nuda*, en medios de cultivo con diferentes suplementos orgánicos. *Revista Mexicana de Micología* 26:41–49.
- Gardes M & Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2:113–118.
- Garcia-Amezquita L, Welte-Chanes J, Vergara-Balderas F, Bermudez-Aguirre D. (2016) Freeze-Drying: The Basic Process in *Encyclopedia of Food and Health*; Caballero, B., Finglas, P., Toldra, F., Eds.; Academic Press: New York, NY, USA, pp. 104–109.
- Gąsecka M, Mleczek M, Siwulski M, Niedzielski P, Kozak L (2015) The effect of selenium on phenolics and flavonoids in selected edible white rot fungi. *LWT-Food Sci. Technol.* 63:726–731.
- Gąsecka M, Siwulski M, Magdziak Z, Budzyńska S, Stuper-Szablewska K, Niedzielski P, & Mleczek M (2020) The effect of drying temperature on bioactive compounds and antioxidant activity of *Leccinum scabrum* (Bull.) Gray and *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers. *Journal of food science and technology*, 57:513-525.

- Giachini AJ (2004) Systematics of the *Gomphales*: the Genus *Gomphus* Pers. sensu lato. PhD Dissertation, Oregon State University. [file:///C:/Users/cbarroetavena/Downloads/Giachini Admir J 2004.pdf](file:///C:/Users/cbarroetavena/Downloads/Giachini%20Admir%20J%202004.pdf)
- Giachini AJ, Hosaka K, Nouhra E, Spatafora J, & Trappe JM (2010) Phylogenetic relationships of the *Gomphales* based on nuc- 25S-rDNA, mit-12S-rDNA, and mit-atp6-DNA combined sequences. *Fungal Biology* 114:224–234. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2010.01.00>
- Giles PV, Salgado Salomón ME, & Barroetaveña C (2021) ¿Está *Amanita muscaria* invadiendo los bosques de *Nothofagus dombeyi* en Patagonia, Argentina? XXXVIII Jornadas Argentina de Botánica. <https://botanicaargentina.org.ar/wp-content/uploads/2021/07/Resu%CC%81menes-aceptados-para-publicar.pdf>
- Gomez JVL (2015) Caracterización de hongos comestibles del género *Ramaria*, asociados a bosques siempreverdes en el predio Llancahue, Región de Los Ríos. Degree Thesis, Universidad Austral de Chile. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2015/fifl435c/doc/fifl435c.pdf>
- González GC, Barroetaveña C, Visnovsky SB, Rajchenberg M, & Pildain MB (2021) A new species, phylogeny, and a worldwide key of the edible wood decay *Fistulina* (*Agaricales*). *Mycological Progress* 20(5):733–746.
- Gottlieb AM, Wright JE (1999) Taxonomy of *Ganoderma* from southern South America: subgenus *Ganoderma*. *Mycological Research* 103: 661–673. <https://doi.org/10.1017/S0953756298007941>
- Gryzenhout M (2010) Hongos de Sudáfrica. Struik Nature, Ciudad del Cabo, Sudáfrica.
- Guillamón E, García-Lafuente A, Lozano M, Rostagno MA, Villares A, & Martínez JA (2010) Edible mushrooms: role in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia*, 81(7):715-723.
- Guo Y, Chen X, Gong P, Wang R, Qi Z, Deng Z, ... & Li N (2023) Advances in postharvest storage and preservation strategies for *Pleurotus eryngii*. *Foods*, 12(5):1046.
- Guzmán G (1987) Distribución y etnomicología de *Pseudofistulina radicata* en Mesoamérica, con nuevas localidades en México y su primer registro en Guatemala. *Revista Mexicana de Micología* 3: 29-38.

- Hanif M, Khalid AN, & Exeter RL (2019) *Ramaria flavescentoides* sp. nov. with clamped basidia from Pakistan. *Mycotaxon* 134(2):399–406.
- Heenan PB, Smitsen RD (2013) Revised circumscription of *Nothofagus* and recognition of the segregate genera *Fuscospora*, *Lophozonia*, and *Trisyngyne* (Nothofagaceae). *Phytotaxa* 146:1–31.
- Heleno SA, Barros L, Sousa MJ, Martins A, Ferreira IC (2009) Study and characterization of selected nutrients in wild mushrooms from Portugal by gas chromatography and high performance liquid chromatography. *Microchem. J.*, 93:195–199.
- Hibbett DS, Binder M (2002) Evolución de morfologías complejas de cuerpos fructíferos en homobasidiomicetos. *Proceedings of the Royal Society of London B* 269:1963-1969
- Hill D, Sugrue I, Tobin C, Hill C, Stanton C and Ross RP (2018) The *Lactobacillus casei* Group: History and Health Related Applications. *Front. Microbiol.* 9:2107. doi: 10.3389/fmicb.2018.02107
- Hosaka K, Bates ST, Beever RE, Castellano MA, Colgan III W, Dominguez LS, ... & Trappe JM (2006) Molecular phylogenetics of the gomphoid-phalloid fungi with an establishment of the new subclass *Phallomycetidae* and two new orders. *Mycologia* 98(6):949–959.
- Huang L-L, Zhang M, Mujumdar AS, Lim R-X (2011) Comparison of four drying methods for re-structured mixed potato with apple chips. *J. Food Eng.*, 103:279–284.
- Huang L-L, Zhang M, Wang L-P, Mujumdar AS, Sun D-F (2012) Influence of combination drying methods on composition, texture, aroma and microstructure of apple slices. *LWT Food Sci. Technol.*, 47:183–188.
- Humpert AJ, Muench EL, Giachini AJ, Castellano MA, & Spatafora JW (2001) Molecular phylogenetics of *Ramaria* and related genera: evidence from nuclear large subunit and mitochondrial small subunit rDNA sequences. *Mycologia* 93:465–477. <https://doi.org/10.2307/3761733>
- Hutkins RW (2008) *Microbiology and technology of fermented foods*. John Wiley & Sons.

- Izli N, Yildiz G, Ünal H, Isik E, Uylaşer V (2014) Effect of different drying methods on drying characteristics, colour total phenolic content and antioxidant capacity of Goldenberry (*Physalis peruviana* L.) Int. J. Food Sci. Technol, 49:9–17.
- Jabłońska-Ryś E, Kalbarczyk J, Sztaba A. The use of starter cultures of lactic and propionic acid bacteria in the process of button mushrooms fermentation (2005). pp. 23-24. In: Abstracts: 5th Jubilee Scientific Conference, Food Quality and Safety: Determinants of Raw Materials, Technology, Manufacturing and Legal. November 17-18, Białobrzegi, Poland.
- Jabłońska-Ryś E, Sławińska A, & Sz wajgier D (2016)a Effect of lactic acid fermentation on antioxidant properties and phenolic acid contents of oyster (*Pleurotus ostreatus*) and chanterelle (*Cantharellus cibarius*) mushrooms. Food science and biotechnology, 25:439-444.
- Jabłońska-Ryś E, Sławińska A, Radzki W, & Gustaw W (2016)b Evaluation of the potential use of probiotic strain *Lactobacillus plantarum* 299v in lactic fermentation of button mushroom fruiting bodies. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 15(4):399-407.
- Jaworska G, Pogon K, Bernas E, Skrzypczak A (2014) Effect of Different Drying Methods and 24-Month Storage on Water Activity, Rehydration Capacity, and Antioxidants in *Boletus edulis* Mushrooms. Dry. Technol., 32:291–300.
- Katoh K & Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30:772–780.
- Knudson AG (2012) The Genus *Ramaria* in Minnesota. Msc Thesis, University of Minnesota. [https://conservancy.umn.edu/bitstream/handle/11299/122161/Knudson\\_Alicia\\_February2012.pdf;jsessionid=E8F8F8C4A049862EE070EED63D2601FF?sequence=1](https://conservancy.umn.edu/bitstream/handle/11299/122161/Knudson_Alicia_February2012.pdf;jsessionid=E8F8F8C4A049862EE070EED63D2601FF?sequence=1)
- Kotwaliwale N, Bakane P, Verma A (2017) Changes in textural and optical properties of oyster mushroom during hot air drying. *J. Food Eng.*, 78:1207–1211.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, & Tamura K (2018) MEGA X: Molecular biology and evolution 35:1547–1549.
- Kumar K, Mehra R, Guiné RPF, Lima MJ, Kumar N, Kaushik R, Ahmed N, Yadav AN, Kumar H (2021) Edible Mushrooms: A Comprehensive Review on Bioactive Compounds with Health Benefits and Processing Aspects. *Foods*, 10:2996.

- Kurtzman CP, & Robnett C. 1997. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5'end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *Journal of clinical microbiology*, 35(5):1216-1223
- Lazo W (2001) *Hongos de Chile. Atlas Micológico*. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias.
- Liaotrakoon W, Liaotrakoon V (2018) Influence of drying process on total phenolics, antioxidative activity and selected physical properties of edible bolete (*Phlebopus colossus* (R. Heim) Singer) and changes during storage. *Food Sci. Technol.*, 38:231–237.
- Lidhoo CK, Agrawal YC (2008) Optimizing temperature in mushrooms drying. *J. Food Process. Preserv.*, 32:881–897.
- Libkind D, Hittinger CT, Valério E, Gonçalves C, Dover J, Johnston M, ... & Sampaio JP (2011) Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(35):14539-14544.
- Liria MR (2007). *Guía para la evaluación sensorial de alimentos*. Cali: CIAT
- Liu SQ, Holland R, Crow VL, & Teh KH (2018) Selection and application of lactic acid bacteria strains as starter cultures in fermented foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(2):290-309. doi:10.1111/1541-4337.12324.
- Manos PS (1997) Systematics of *Nothofagus* (Nothofagaceae) based on rDNA spacer sequences (ITS): taxonomic congruence with morphology and plastid sequences. *American Journal of Botany* 84:1137–1155.
- Marr CD & Stuntz DE (1973) *Ramaria* of Western Washington. *Bibliotheca Mycologica* 38:1–232
- Martin, MP, Daniels PP, Erickson D, & Spouge JL (2020) Figures of merit and statistics for detecting faulty species identification with DNA barcodes: A case study in *Ramaria* and related fungal genera. *PloS one* 15(8) e0237507
- Martínez-Soto G, Ocanna-Camacho R, & Paredes-López O (2001) Effect of pretreatment and drying on the quality of oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus*). *Drying Technology*, 19(3-4):661-672.

- Matheny PB, Curtis JM, Hofstetter V, Aime MC, Moncalvo JM, Ge ZW y col. (2006) Principales clados de Agaricales: descripción filogenética basada en múltiples locus. *Mycologia* 98:982-995.
- Mestre MC, Ulloa JR, Rosa CA, Lachance MA, & Fontenla S (2010) *Lachancea nothofagi* sp. nov., a yeast associated with Nothofagus species in Patagonia, Argentina. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(9):2247-2250.
- Mestre MC, & Fontenla S (2021) Yeast communities associated with ectomycorrhizal fungi in different Nothofagus forests of northwestern Patagonia. *Symbiosis*, 84(2):179-193.
- Molares S, Toledo CV, Stecher G, & Barroetaveña C (2020) Traditional mycological knowledge and processes of change in Mapuche communities from Patagonia, Argentina: A study on wild edible fungi in *Nothofagaceae* forests. *Mycologia* 112(1):9–23.
- Mónaco MH, Peri PL, Medina FA, Colomb HP, Rosales VA, Berón F, ... & Gómez Campero G (2020) *Deforestación de los bosques nativos de Argentina: causas, impactos y propuestas de desarrollo alternativas*. Colegio de Graduados en Ciencias Forestales de Santiago de Estero.
- Montagne JFC (1856) Séptima centuria de plantas celulares nuevas, tanto indígenas como exóticas. *Annales des Sciences Naturelles Botanique* 5:333-374.
- Müller DC, Mischler S, Schönlechner R, & Miescher Schwenninger S (2021) Multiple techno-functional characteristics of *Leuconostoc* and their potential in sourdough fermentations. *Microorganisms*, 9(8):1633.
- Nouhra ER, Horton TR, Cazares E, & Castellano M (2005) Morphological and molecular characterization of selected *Ramaria* mycorrhizae. *Mycorrhiza* 15(1):55–59
- Núñez M, Ryvarden L (2001) Políporos del este de Asia 2. Polyporaceae s.lato. *Synopsis Fungorum* 14:341-342.
- Ouzouni PK, Petridis D, Koller W-D, Riganakos KA (2009) Nutritional value and metal content of wild edible fungi collected from west Macedonia and Epirus, Greece. *Food Chem.*, 115:1575–1580.

- Oyarzún PA, Toro JE, Nuñez JJ, Suárez-Villota EY, & Gardner JP (2021) Blue mussels of the *Mytilus edulis* species complex from South America: The application of species delimitation models to DNA sequence variation. *PLoS one*, 16(9), e0256961.
- Padilla B, Gil JV, & Manzanares P (2018) Challenges of the non-conventional yeast *Wickerhamomyces anomalus* in winemaking. *Fermentation*, 4(3):68.
- Pei F, Yang WJ, Shi Y, Sun Y, Mariga AM, Zhao LY., Fang Y, Ma N, An XX, Hu QH (2014) Comparison of Freeze-Drying with Three Different Combinations of Drying Methods and Their Influence on Colour, Texture, Microstructure and Nutrient Retention of Button Mushroom (*Agaricus bisporus*) Slices. *Food Bioprocess. Technol*, 7:702–710.
- Pereira E, Barros L, Martins A, Ferreira IC (2012) Towards chemical and nutritional inventory of Portuguese wild edible mushrooms in different habitats. *Food Chem.*, 130:394–403.
- Pérez-Moreno J, Guerin-Laguette A, Arzú RF, & Yu FQ (Eds.) (2020) *Mushrooms, humans and nature in a changing world: Perspectives from ecological, agricultural and social sciences*. Berlin, Germany: Springer.
- Pérez- Moreno J, Guerin- Laguette A, Rinaldi AC, Yu F, Verbeken A, Hernández- Santiago F, & Martínez- Reyes M (2021) Edible mycorrhizal fungi of the world: What is their role in forest sustainability, food security, biocultural conservation and climate change?. *Plants, People, Planet*, 3(5):471-490.
- Perveen I, Bukhari B, Sarwar A, Aziz T, Koser N, Younis H, ... & Skoufos I (2023) Applications and efficacy of traditional to emerging trends in lacto-fermentation and submerged cultivation of edible mushrooms. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-20.
- Pescuma M, Hébert EM, Mozzi F, & de Valdez GF (2008) Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: Evolution of carbohydrates and protein content. *Food microbiology*, 25(3):442-451.
- Petersen RH (1981) *Ramaria* Subgenus *Echinoramaria*. *Bibliotheca Mycologica* 79:1–261
- Petersen RH, Hughes K, & Justice J (2014) Two new species of *Ramaria* from Arkansas. *Mycology* 8:17–29.

- Petersen, RH (1988) Contribution toward a monograph of *Ramaria* VII. New taxa and miscellany. *Mycologia* 80(2):223–234.
- Peterson KR & Pfister DH (2010) Phylogeny of *Cyttaria* inferred from nuclear and mitochondrial sequence and morphological data. *Mycologia* 102(6):1398–1416.
- Pildain MB & Rajchenberg M (2013) The phylogenetic position of *Postia* sl (*Polyporales*, Basidiomycota) from Patagonia, Argentina. *Mycologia* 105(2):357–367.
- Pildain MB, Visnovsky SB, & Barroetaveña C (2014) Phylogenetic diversity of true morels (*Morchella*), the main edible non-timber product from native Patagonian forests of Argentina. *Fungal Biology*, 118(9-10):755-763.
- Pildain MB, Coetzee MPA, Rajchenberg M, Petersen RH, Wingfield MJ, & Wingfield BD (2009) Molecular phylogeny of *Armillaria* from the Patagonian Andes. *Mycological Progress* 8(3):181–194.
- Postemsky P, Bidegain M, González Matute R, Figlas D, Caprile D, Salazar-Vidal V & Saparrat M. (2022) Mushroom Production in the Southern Cone of South America: Bioeconomy, Sustainable Development and Its Current Bloom. In *Biochemical Engineering and Biotechnology of Medicinal Mushrooms* (pp. 77-106). Cham: Springer International Publishing.
- Radzki W, Slawinska A, Jablonska-Rys E, Gustaw W (2014) Antioxidant Capacity and Polyphenolic Content of Dried Wild Edible Mushrooms from Poland. *Int. J. Med. Mushrooms*, 16:65–75.
- Rajchenberg M (2006) Los políporos (Basidiomycetes) de los bosques Andino Patagónicos de Argentina. *Bibliotheca Mycologica*: 131-139.
- Reid DA (1963) Nuevos registros interesantes de Basidiomycetes australasianos V. *Kew Bulletin* 17: 267-308.
- Reid T, Merjury M, Takafira M (2017) Effect of cooking and preservation on nutritional and phytochemical composition of the mushroom *Amanita zambian*. *Food Sci. Nutr.*, 5:538–544.
- Ribeiro B, Valentão P, Baptista P, Seabra RM, Andrade PB (2007) Phenolic compounds, organic acids profiles and antioxidative properties of beefsteak fungus (*Fistulina hepatica*). *Food Chem. Toxicol.*, 45:1805–1813.

- Rodríguez ME, Pérez-Través L, Sangorrín MP, Barrio E & Lopes CA (2014) *Saccharomyces eubayanus* and *Saccharomyces uvarum* associated with the fermentation of *Araucaria araucana* seeds in Patagonia. *FEMS yeast research*, 14(6):948-965
- Rodríguez ME, Perez-Traves L, Sangorrín MP, Barrio E, Querol A, & Lopes CA (2017) *Saccharomyces uvarum* is responsible for the traditional fermentation of apple chicha in Patagonia. *FEMS Yeast Research*, 17(1), fow109.
- Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, & Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology* 61:539–542
- Rugolo M, Barroetaveña C, Barrett MD, Mata G, Hood IA, Rajchenberg M, & Pildain MB (2023) Phylogenetic relationships and taxonomy of *Grifola* (*Polyporales*). *Mycological Progress* 22(1) 7. <https://doi.org/10.1007/s11557-022-01857-2>
- Rugolo M, Mascoloti Spréa R, Dias MI, Pires TC, Añibarro-Ortega M, Barroetaveña C, ... & Barros L (2022) Nutritional composition and bioactive properties of wild edible mushrooms from native *Nothofagus* Patagonian forests. *Foods* 11(21):3516. <https://doi.org/10.3390/foods11213516>.
- Sampaio JP (2022) *Saccharomyces eubayanus*—a tale of endless mysteries. *FEMS Yeast Research*, 22(1), foac058.
- Salomón MES, Dresch P, Horak E, Galleguillos F, Barroetaveña C, & Peintner U (2018) The enigmatic *Cortinarius magellanicus* complex occurring in Nothofagaceae forests of the Southern Hemisphere. *Fungal biology*, 122(11):1077-1097.
- Salgado Salomón ME, Barroetaveña C, Niskanen T, Liimatainen K, Smith ME, & Peintner U (2021) Loose ends in the *Cortinarius* phylogeny: five new myxotelamonoid species indicate a high diversity of these ectomycorrhizal fungi with South American Nothofagaceae. *Life*, 11(5):420.
- Satora P, Tarko T, Sroka P, & Blaszczyk U (2014) The influence of *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast on the fermentation and chemical composition of apple wines. *FEMS yeast research*, 14(5):729-740.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca y Secretaría de Calidad en Salud. (2023). Resolución Conjunta 3/2023. *Boletín Oficial de la República Argentina*. Resolución RESFC-2023-3-APN-

SCS#MS, Ciudad de Buenos Aires, 14 de marzo de 2023. Expediente N° EX-2020-33465331-APN-DLEIAER#ANMAT.

- Setoguchi H, Ono M, Doi Y, Koyama H, Tsuda M (1997) Molecular phylogeny of Nothofagus (Nothofagaceae) based on the atpB-rbcL intergenic spacer of the chloroplast DNA. *Journal of Plant Research* 110:469–484.
- Scattolin L, Di Marino E, Bodensteiner P, & Agerer R (2008) *Sistotrema* is a genus with ectomycorrhizal species confirmation of what sequence studies already suggested. *Mycological Progress* 7(3):169–176.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, ... & White MM (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the national academy of Sciences*, 109(16):6241-6246.
- Sim KY, Liew JY, Ding XY, Choong WS, Intan S (2017) Effect of vacuum and oven drying on the radical scavenging activity and nutritional contents of submerged fermented Maitake (*Grifola frondosa*) mycelia. *Food Sci. Technol.*, 37:131–135.
- Singer R (1969) *Mycoflora australis*. Beihefte Nova Hedwigia 29. Cramer, Lehre, Germany.
- Singer R (1969) *Mycoflora Australis*. Beihefte Nova Hedwigia 29:1-405.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 299:152–178.
- Skrzypczak K, Gustaw K, Jabłońska-Ryś E, Sławińska A, Gustaw W, & Winiarczyk S (2020) Spontaneously fermented fruiting bodies of *Agaricus bisporus* as a valuable source of new isolates of lactic acid bacteria with functional potential. *Foods*, 9(11):1631.
- Smith-Ramírez C (1997) Algunos usos indígenas tradicionales de la flora del bosque templado. En: Armesto JJ, Villagrán C & Arroyo M K (Eds.). Editorial Universitaria. *Ecología de los bosques nativos de Chile*. Santiago de Chile, pp. 389-404.
- Song J, Han ML, Cui BK (2015) *Fistulina subhepatica* sp. nov. from China inferred from morphological and sequence analyses. *Mycotaxon* 130:47-56.

- Souilem F, Fernandes Â, Calhelha RC, Barreira JC, Barros L, Skhiri F, Martins A, Ferreira IC (2017) Wild mushrooms and their mycelia as sources of bioactive compounds: Antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties. *Food Chem*, 230:40–48.
- Spegazzini CL (1887)a *Fungi patagonici novi vel critici*. Buenos Aires: P. E. Coni.
- Spegazzini CL (1887)b *Fungi Patagonici*. *Boletín de la Academia Nacional de Ciencias en Córdoba*, 11:5–64.
- Spegazzini CL (1921) *Mycetes Chilenses*. *Boletín de la Academia Nacional de Ciencias en Córdoba*, 25:1–124
- Stamatakis A (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30(9):1312–1313
- Steenkamp ET, Wingfield BD, Desjardins AE, Marasas WF & Wingfield MJ (2002) Cryptic speciation in *Fusarium subglutinans*. *Mycologia* 94(6):1032–1043
- Sümer EN, Verheust Y, Özçelik B, & Raes K (2024) Impact of Lactic Acid Bacteria Fermentation Based on Biotransformation of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Mushrooms. *Foods*, 13(11):1616.
- Sun YF, Liu S, Cui BK (2019) Morphological and phylogenetic analyses reveal a new species of *Fistulina* (Fistulinaceae, Agaricales) from Australia. *Phytotaxa* 420: 233-240.
- Tamang J., Cotter PD, Endo A, Han NS, Kort R, Liu SQ, ... & Hutkins R (2020) Fermented foods in a global age: East meets West. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(1):184-217. doi:10.1111/1541-4337.12520.
- Tao R, Chen Q, Li Y, Guo L, Zhou Z (2022) Physicochemical, Nutritional, and Phytochemical Profile Changes of Fermented Citrus Puree from Enzymatically Hydrolyzed Whole Fruit under Cold Storage. *LWT*, 169, 114009.
- Tedersoo L & Smith ME (2013) Lineages of ectomycorrhizal fungi revisited: foraging strategies and novel lineages revealed by sequences from belowground. *Fungal biology reviews* 27(3–4):83–99

- Tedersoo L, Bahram M, Põlme S, Kõljalg U, Yorou NS, Wijesundera R, ... & Abarenkov K (2014) Global diversity and geography of soil fungi. *Science*, 346 1256688. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1256688>.
- Tian Y, Zhao Y, Huang J, Zeng H, Zheng B (2016) Effects of different drying methods on the product quality and volatile compounds of whole shiitake mushrooms. *Food Chem.*, 197:714–722.
- Toledo CV, Barroetaveña C, & Rajchenberg M (2014) Fenología y variables ambientales asociadas a la fructificación de hongos silvestres comestibles de los bosques andino-patagónicos en Argentina. *Revista mexicana de biodiversidad* 85(4):1093–1103
- Toledo CV, Barroetaveña C, Fernandes Â, Barros L, & Ferreira IC (2016) Chemical and antioxidant properties of wild edible mushrooms from native *Nothofagus* spp. forest, Argentina. *Molecules* 21(9):1201.
- Torres T, Cisterna M, Llanos A, Galleguillos H, Le Roux JP (2009) Nuevos registros de *Nothofagus* Bl. en Sierras Baguales, Última Esperanza, Patagonia, Chile. XII Congreso Geológico Chileno. Extended Abstracts, 12–19. Universidad de Chile, Santiago de Chile.
- Tosi E, Azzolini M, Guzzo F, & Zapparoli G (2009) Evidence of different fermentation behaviours of two indigenous strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* isolated from Amarone wine. *Journal of Applied Microbiology*, 107(1): 210-218.
- Trappe JM (1962) Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. *The Botanical Review* 28(4):538–606
- Valenzuela E (2003) Hongos comestibles silvestres colectados en la X región de Chile. *Boletín Micológico* 18. <https://doi.org/10.22370/bolmicol.2003.18.0.374>.
- Valiente L, Ohaco E, Michelis A (2016) Antioxidant capacity of frozen *Pleurotus ostreatus* during convective drying. *Micol. Apl. Int.*, 28:1–10.
- Van der Byl PA (1928) Descripción de algunos hongos sudafricanos no nombrados previamente. IV. *South African Journal of Science* 25:185-187.
- Vento B, Agraín FA (2018) Phylogenetic relationships and timecalibration of the South American fossil and extant species of southern beeches (*Nothofagus*). *Acta Palaeontologica Polonica* 63:815–825.

- Vilgalys R & Hester M (1990) Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172:4238–4246.
- Visnovsky SB, Guerin-Laguette A, Wang Y, Pitman AR (2010) Traceability of marketable Japanese shoro in New Zealand: using multiplex PCR to exploit phylogeographic variation among taxa in the *Rhizopogon* subgenus *Roseoli*. *Applied and Environmental Microbiology* 76:294–302.
- Walker, G.M. *Pichia anomala*: Cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* 2011, 99:25–34.
- Wang H, Zhang M, Mujumdar AS (2014) Comparison of Three New Drying Methods for Drying Characteristics and Quality of Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes*). *Dry. Technol.*, 32:1791–1802.
- Wang C, Mas A, & Esteve-Zarzoso B (2015) Interaction between *Hanseniaspora uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 206:67-74
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, & Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2):697-703.
- Withering W (1792) *A botanical arrangement of British Plants: including the uses of each species in medicine, diet, rural economy and the arts. With an Easy Introduction to the Study of Botany*, Vol. 3.
- Wood, B.J.B., 1997. *Microbiology of Fermented Foods*. Blackie Academic & Professional, London.
- Wright JE (1961) Del género *Fistulina* en el hemisferio occidental. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 9: 217-228.
- Wright JE, Deschamps J (1972) Basidiomicetos xilófagos de los bosques andinopatagónicos. *Rev. Invest. Agropecuarias INTA ser. 5*:111–197.
- Wuyts S, Wittouck S, De Boeck I, Allonsius CN, Pasolli E, Segata N, & Lebeer S (2017) Large-scale phylogenomics of the *Lactobacillus casei* group highlights taxonomic inconsistencies and reveals novel clade-associated features. *MSystems*, 2(4):10-1128.

- Xu L, Fang X, Wu W, Chen H, Mu H, Gao H (2019) Effects of high-temperature pre-drying on the quality of air-dried shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*). Food Chem., 285:406–413.
- Yadav D, Negi PS (2021) Bioactive components of mushrooms: Processing effects and health benefits. Food Res. Int., 148, 110599.
- Yao J, Chen W, & Fan K (2023) Novel Efficient Physical Technologies for Enhancing Freeze Drying of Fruits and Vegetables: A Review. Foods, 12(23):4321.
- Yan MQ, Feng J, Liu YF, Hu DM, & Zhang JS (2023) Functional components from the liquid fermentation of edible and medicinal fungi and their food applications in China. Foods, 12(10): 2086.
- Yang X, Zhang Y, Kong Y, Zhao J, Sun Y, Huang M (2019) Comparative analysis of taste compounds in shiitake mushrooms processed by hot-air drying and freeze drying. Int. J. Food Prop, 22:1100–1111.
- Yi C, Li Y, Zhu H, Liu Y, Quan K (2021) Effect of *Lactobacillus plantarum* Fermentation on the Volatile Flavors of Mung Beans. LWT, 146:111434.
- Zheng HG, Chen JC, & Ahmad I (2018) Preservation of King Oyster Mushroom by the use of different fermentation processes. Journal of Food Processing and Preservation, 42(1), e13396.

## PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESO REALIZADAS EN EL MARCO DE ESTA TESIS

### **Trabajos publicados en revistas internacionales**

**GONZÁLEZ, G. C.**, RUGOLO, M., FINIMUNDY, T. C., OHACO, E., PILDAIN, M. B., & BARROETAVERÑA, C. (2023). Impact of Air-and Freeze-Drying Methods on Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of *Fistulina antarctica* and *Ramaria patagonica* Fructification. Applied Sciences, 13(15):8873.

**GONZÁLEZ, G. C.**, BARROETAVERÑA, C., VISNOVSKY, S. B., RAJCHENBERG, M., & PILDAIN, M. B. (2023). *Ramaria* species in *Nothofagus* forests of Patagonia, with the description of two new species. Mycological Progress, 22(8):60.

**GONZÁLEZ, G. C.**, BARROETAVEÑA, CAROLINA; VISNOVSKY, SANDRA B.; RAJCHENBERG, MARIO; PILDAIN, MARÍA BELÉN. (2021) A new species, phylogeny, and a worldwide key of the edible wood decay *Fistulina* (Agaricales). *Mycological Progress*, 20:733-746.

### **Trabajos enviados (bajo revisión)**

BARROETAVEÑA, C., **GONZÁLEZ, G. C.**, TEJEDOR-CALVO, E., TOLEDO, C, PILDAIN, M. B. (2024). Sensory characteristics and volatile organic compound profile of Wild Edible Mushrooms from Patagonia, Argentina (en MYCOLOGIA).

### **Capítulo de libro**

SALAZAR-VIDAL, V., DIBÁN, MJ., RUGOLO, M., **GONZÁLEZ, G.**, BARROETAVEÑA, C., URRUTIA, E., URRUTIA, H. (2024). Chapter 2. Diversity, Phylogeny, and Taxonomic of Forest Fungal Communities. In: *Forest Fungi: Biodiversity, Conservation, Mycoforestry and Biotechnology*. Academic Press, 1st Edition (aceptado).

### **Demás tipos de producción C-T publicada**

MAXIMILIANO RUGOLO; **GABRIELA CELESTE GONZÁLEZ**; PABLO MASERA; BARROETAVEÑA CAROLINA. Los aportes nutricionales de los hongos comestibles del Parque Nacional Nahuel Huapi. 2023. MACROSCOPIA. Bariloche, Argentina. ISSN 1853-2705.

### **Trabajos presentados en congresos**

#### ***Presentación oral***

- **GABRIELA CELESTE GONZÁLEZ**; MAXIMILIANO RUGOLO; MARIA BELEN PILDAIN; CAROLINA BARROETAVEÑA. ***Ramaria patagonica*: POST-HARVEST CONSERVATION OF AN ENDEMIC MUSHROOM OF GASTRONOMIC AND CULTURAL INTEREST**. Esquel 2024. Revista. Resumen. Workshop. The 11th International Workshop on Edible Mycorrhizal Mushrooms.

#### ***Presentación de póster***

- **GABRIELA CELESTE GONZALEZ**; CAROLINA BARROETAVEÑA; MARIA BELÉN PILDAIN. **CRYPTIC DIVERSITY IN *Ramaria*: NEW PERSPECTIVES FROM PATAGONIA USING MOLECULAR**

- CHARACTERS.** Esquel 2024. Revista. Resumen. Workshop. The 11th International Workshop on Edible Mycorrhizal Mushrooms.
- CAROLINA BARROETAVEÑA; **GABRIELA CELESTE GONZÁLEZ**; YAMILA ARIAS; MAXIMILIANO RUGOLO; SOLEDAD MOLARES; MARIA BELEN PILDAIN. Puesta en valor del recurso fúngico para comunidades criollas y mapuche-tehuelche de Patagonia. Argentina. Misiones. 2023. Revista. Resumen. Jornada. Jornadas de Desarrollo Rural.
  - BARROETAVEÑA, CAROLINA; YAMILA ARIAS; **GABRIELA CELESTE GONZÁLEZ**; SOLEDAD MOLARES; MARIA BELEN PILDAIN. Los hornos deshidratadores familiares como herramienta de agregado de valor a PFM de los paisajes forestales de Patagonia andina. Argentina. Misiones. 2023. Revista. Resumen. Jornada. Jornadas de Desarrollo Rural.
  - **GABRIELA CELESTE GONZALEZ**; MAXIMILIANO RUGOLO; MARIA BELEN PILDAIN; CAROLINA BARROETAVEÑA. Los hongos comestibles como medio de transferencia, vinculación e innovación. Misiones. 2023. VII Congreso Nacional de Conservación de la Biodiversidad.
  - JUAN MONGES; **GABRIELA CELESTE GONZÁLEZ**; MAXIMILIANO RUGOLO; YAMILA ARIAS; BARROETAVEÑA CAROLINA. El laboratorio de producción de blanco más austral de Argentina. Bahía Blanca. 2022. II Convención Internacional de Hongos Comestibles y Medicinales.
  - **GABRIELA CELESTE GONZALEZ**; MAXIMILIANO RUGOLO; MARIA BELEN PILDAIN; BARROETAVEÑA CAROLINA. Ensayos de crecimiento micelial y evaluación de la degradación de maderas por *Fistulina antarctica*. Bahía Blanca. 2022. II Convención Internacional de Hongos Comestibles y Medicinales.
  - **GABRIELA CELESTE GONZALEZ**; MAXIMILIANO RUGOLO; ELIZABETH OHACO; MARIA BELEN PILDAIN; BARROETAVEÑA CAROLINA. Estudio del deshidratado de dos hongos silvestres

comestibles de Patagonia: efecto de la temperatura sobre la capacidad antioxidante. Córdoba. 2022. III Reunión de Argentina de Micología.

- **GABRIELA CELESTE GONZALEZ;** BRENDA ANAHÍ SEDE LUCENA; MICAELA PESCUA; MARIA BELEN PILDAIN; BARROETAVERÑA CAROLINA. Fermentación láctica para diversificar la oferta de productos de un hongo comestible silvestre endémico de Patagonia. Bariloche. 2022. VI Jornadas Forestales Patagónicas.
- **GABRIELA CELESTE GONZALEZ;** BARROETAVERÑA CAROLINA; MARIA BELEN PILDAIN. Diversidad genética del género *Ramaria* en los bosques Patagónicos de Argentina. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. Septiembre 2021.
- **GABRIELA CELESTE GONZALEZ;** BARROETAVERÑA CAROLINA; RAJCHENBERG MARIO; MARIA BELEN PILDAIN. *Fistulina pumiliae* a new species associated with *Nothofagus pumilio* in Patagonia (Argentina). Chile. Santiago de Chile. 2021. Libro. Resumen. Congreso. X Congreso Latinoamericano de Micología. Universidad de Chile.
- **GABRIELA CELESTE GONZALEZ;** MARIA BELEN PILDAIN; SANDRA VISNOVSKY; CAROLINA BARROETAVERÑA. Genetic diversity of the genus *Ramaria* in the Patagonian Andes forest. Japón. Nagano. 2019. Revista. Resumen. Workshop. The 10th International Workshop on Edible Mycorrhizal Mushrooms.
- **GONZALEZ, GABRIELA CELESTE;** BRENDA ANAHÍ SEDE LUCENA; MICAELA PESCUA; MARIA BELEN PILDAIN; BARROETAVERÑA, CAROLINA. Fermentación láctica del hongo silvestre andinopatagónico *Fistulina antarctica* como alternativa de preservación poscosecha y agregado de valor. Argentina. Posadas. 2021. Libro. Resumen. Simposio. 6º Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos. Universidad Nacional de Misiones.