



UNIVERSIDAD DEL BÍO-BÍO
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

**ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO
MICROBIOLÓGICO PARA IDENTIFICAR POTENCIALES
PATOGENOS QUE ATACAN AL PINO INSIGNE EN LA
REGION DEL BÍO-BÍO.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO EN RECURSOS NATURALES**

AUTOR: CONCHA FUENTEALBA, JORGE ESTEBAN

Profesor Tutor: Jeannette Vera Araya

Profesor Cotutor: Viviana Cisterna Oyarce.

CHILLÁN, 2017

Agradecimientos

Quiero dar gracias a todos los que fueron parte de este escrito. Sin ustedes no habría sido posible terminar de redactar esta investigación. En especial:

A los docentes y funcionarios que me vieron pasar por los pasillos, que me aconsejaron y me animaron a empoderarme del tema en que se desenvuelve la tesis.

A los familiares que acompañaron y se dieron el espacio para poder avanzar en la adquisición de conocimientos en un ambiente de tranquilidad, como la de un abrazo.

A los amigos que entendieron las razones de mis faltas y a los que no dudaron en prestar de su ayuda en momentos complejos.

Gracias totales.

Índice

Agradecimientos.....	i
Resumen	iv
CAPITULO I	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Planteamiento del problema.....	5
1.3 Pregunta de Investigación.....	7
1.4 Objetivos	8
1.5 Justificación.....	8
1.6 Limitaciones del estudio	9
CAPITULO II	10
2.1 Descripción de la especie	10
2.2 Características de los hongos	11
2.2.1 Estructuras y forma de reproducción de los hongos	11
2.2.2 Hábitat de desarrollo de los hongos.....	12
2.2.3 Oxígeno y temperatura	12
2.2.4 Sustrato	12
2.2.5 Humedad	13
2.3 Hongos degradadores de la madera	13
2.3.1 Hongos que causan pudriciones	13
2.3.1.1 Hongos que causan pudrición parda	14
2.3.1.2 Hongos que causan la pudrición blanca	16
2.3.2 Hongos que causan manchas.....	18
2.3.2.1 Hongos que causan la mancha azul	19
2.4 Importancia de la descripción morfológica	20
2.5 Técnicas utilizadas para la identificación morfológica.....	21
2.5.1 Medio de cultivo	21
2.5.2 Cámaras húmedas.....	21
CAPITULO III	23
3.1 Material biológico	23

3.2 Preparación de muestras	23
3.3 Cámaras húmedas	23
3.4 Cultivo de hongos	24
3.5 Aislamiento de patógenos	25
3.6 Identificación Morfológica.....	25
CAPITULO IV	27
4.1 Aislamiento de Patógenos.....	27
4.2 Cultivo microbiológico	28
4.3 Caracterización morfológica de los patógenos encontrados	29
4.3.1 Aislamiento 01	30
4.3.2 Aislamiento 02	31
4.3.3 Aislamiento 03	32
4.3.4 Aislamiento 04	33
4.3.5 Aislamiento 05	34
4.4 Discusión.....	36
CAPITULO V	44
Conclusión.....	44
Recomendaciones.....	46
Referencias	47

Resumen

Dentro de la economía Chilena, las exportaciones tienen un rol importante, siendo la industria forestal, una de las más relevantes con una amplia gama de productos y diversas actividades económicas, con más de 6 mil empresas que participan en la industria. Las exportaciones en este sector correspondieron a casi 6.100 millones de dólares el año 2013, es decir, un 8,1% de las exportaciones totales del país. La calidad de la madera se basa en su composición estructural, la cual se ve amenazada por enfermedades que afectan a la estructura y su producción, como por ejemplo los llamados fitopatógenos.

Actualmente, el control de fitopatógenos se basa en medidas que pretenden enfrentar el deterioro de madera. Sin embargo, no existe un control preventivo de estos, a menos que sea la aplicación de pesticidas e impregnantes, con un alto impacto económico para empresa y además daños ambientales.

Una detección temprana de patógenos forestales de la madera, favorece la toma de medidas efectivas antes de que el proceso infectivo sea irreversible. Evitando la disminución en la calidad de la madera, manteniendo el valor del recurso comercia y disminuyendo la carga de pesticidas que controlan los fitopatógenos.

El objetivo general de esta investigación es establecer un protocolo de identificación de patógenos de Pino Insigne utilizando técnicas microbiológicas. Con el que es posible desarrollar un servicio de detección temprana para empresas forestales.

Se realizó una caracterización morfológica de hongos degradadores de la madera de pino Insigne. Encontrando 5 hongos pertenecientes a los géneros: *Ceratocystis* sp, *Trametes* sp, *Diplodia* sp, *Macrophomina* sp y *Schizophyllum* sp. Obteniendo como producto de la investigación, un protocolo microbiológico para la identificación morfológica de hongos degradadores de Pino Insigne.

CAPITULO I

Introducción

1.1 Antecedentes

La región del Biobío concentra la mayor parte de la industria forestal del país y el 38% de las plantaciones forestales nacionales (INFOR, 2014), la superficie de suelos potencialmente disponibles para la forestación corresponde al 9,5% de la superficie regional (3,71 millones de hectáreas) y las exportaciones en la industria corresponden a casi 6.100 millones de dólares, es decir, a un 8,1% de las exportaciones totales del país (Corma, 2014), abarcando mercados en los cinco continentes, destacando Estados Unidos, China y Japón como los más importantes (Cuneo Chile, 2007).

El Pino Insigne (*Pinus radiata* D. Don), la especie más importante para la industria forestal chilena, la cual es originaria de California, Estados Unidos y fue introducida en Chile en 1887 por un agricultor de la Octava Región, plantándolas en el cerro Caracol. Posteriormente, debido a su valor comercial, sobre todo de sus resinas, la especie se cultivó también en Lota, Chiguayante y zonas cercanas (Contesse, 1986; Serra & Garay, 1990).

El éxito del *Pinus radiata* se debe a su alta rusticidad, rápido crecimiento y fácil manejo de las plantaciones si se dan las condiciones de clima y suelo apropiado (Corma, 2014). Sin embargo, para el sector forestal, mantener la madera de *Pinus radiata* con altos estándares de calidad es un problema complejo, ya que se ve afectada por factores abióticos, como los cambios en la temperatura, radiación UV, precipitaciones y concentraciones atmosféricas de CO₂ (Garay, et. al, 2012). Estos factores climáticos alteran la fisiología de los árboles de tal forma que afectan su resistencia ante herbívoros y patógenos (Moore. B y Allard, 2008). Los factores de estrés causados por la sequía pueden impactar también en la sanidad forestal, aumentando la vulnerabilidad ante alteraciones tales como parásitos de insectos e incendios forestales (FAO 2008).

En condiciones desfavorables, la madera puede ser dañada y destruida fácilmente por factores bióticos como herbívoros, insectos, nematodos y hongos, atacando de variadas formas y causando diferentes anomalías, que al no ser detectadas tempranamente provocan irregularidades que modifican su estructura y los parámetros de calidad, originando cuantiosas pérdidas económicas (Islam *et al.* 2008).

Las precipitaciones pueden ser un factor muy importante en la epidemiología de muchos agentes patógenos que dependen de la humedad para su propagación, tales como el hongo que daña los brotes y acículas de los pinos (FAO 2008).

Un alto porcentaje (15-20%) del deterioro de la calidad de la madera es provocada por hongos, generando importantes pérdidas económicas (Días, 2008). Los hongos responsables del deterioro de la madera se les conocen como hongos Xilófagos o de pudrición, que literalmente se alimentan de madera digiriendo todas las estructuras celulares. Estos hongos en su gran mayoría suelen atacar zonas vivas con alto contenido de azúcares y almidones, como lo es la albura, pero de prosperar, pueden continuar internamente con el duramen, generando pudriciones. Los que atacan a la celulosa generan pudrición parda la que afecta a su resistencia al esfuerzo y la pudrición blanca ataca lignina lo que en algunos casos origina un cancro, el cual ataca tejidos corticales sanos, penetrando en el huésped a través de heridas de distinta naturaleza. El síntoma más característico consiste en la presencia de tumores sobre el tronco, ramas o renuevos, los cuales provocan un anillamiento impidiendo así la circulación de la savia, dando como resultado la muerte de brotes o ramas por encima de la lesión (Luley. J, 2006).

Dentro de los hongos degradadores, uno de los más importantes es el causante de la pudrición blanca, corresponde a un Basidiomicete, *Trametes versicolor* el cual es común verlo en bosques de Pinos, alimentándose de la lignina, dejando la celulosa de color blanco (Peña de la Parra, 2010), la madera se rompe en fibras, por lo que también se denomina pudrición fibrosa (Corma, 2014). La figura 1 muestra la pared

celular de una conífera y sus estructuras lignilíticas, que están infectadas por diversos patógenos que pudren y manchan la madera hasta perder su funcionalidad.

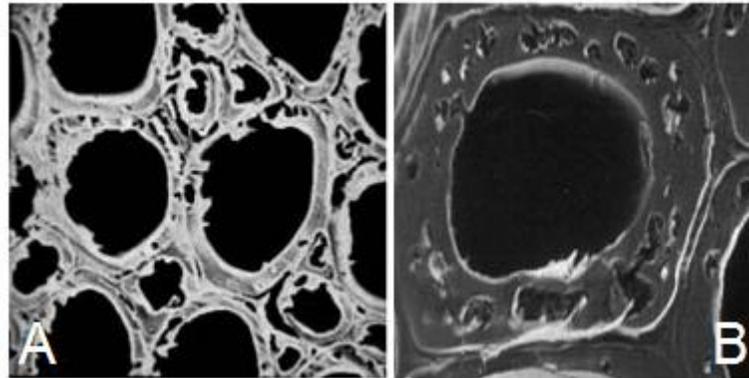


Figura 1. Sección transversal de la madera con presencia de degradación de las fibras desde el lumen hacia el interior de la célula, observada con un microscopio electrónico de barrido en aumento 1000X y 5000X respectivamente. Fuente: FAO, 2014.

Otro de los patógenos degradadores de la madera de importancia, son los hongos Cromógenos, los cuales dan lugar a la variación de color, pero no afectan en forma significativa la resistencia de la madera. Las empresas forestales se han preocupado desde hace mucho tiempo de esta clase de hongos, especialmente de las especies del género *Ceratocystis*, que pertenecen al grupo de ascomicetes, estos hongos producen el manchado de la madera del hospedante, reconociéndose por lo general, un ataque superficial o el desarrollo de una mancha (Butin y Peredo, 1986; González y Opazo, 2002). En el caso específico de los pinos, genera un serio problema denominado *mancha azul*, la cual, si bien, no afecta sustancialmente la estructura de la madera, disminuye la velocidad del secado y la madera se hace más susceptible a la pudrición, por lo tanto, se debe considerar el azulado de la madera como una advertencia para evitar problemas mayores.

El producto más empleado para evitar el manchado de la madera es el pentaclorofenato de sodio. No obstante, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG, 2016) prohibió su venta y utilización, lo cual ha creado un grave problema a los productores, quienes han debido buscar nuevos productos, menos tóxicos, los que involucran un alto costo (Mayorga, S. Col, 2000).

La Tabla 1 muestra un resumen de las principales agentes causales de las enfermedades asociadas a este tipo de madera.

Tabla 1. Hongos degradadores de la madera de Pino Insigne en Chile.

ESPECIE	NOMBRE COMUN	SINTOMATOLOGIA	LUGAR DE CHILE
<i>Ceratocystis pilifera</i>	Mancha azul	Genera una coloración azulada en la madera cortada en especial en <i>P. radiata</i>	Zona centro-sur
<i>Fusarium circinatum</i>	Cancro Resinoso	En plántulas: amarillo y seca de acículas inferiores. En cuello produce un cancro. En Adultos se forman chancros secretores de resina	Zona sur
<i>Neonectria fuckeliana</i>	Revirado del pino	En el tronco, áreas longitudinales hundidas numerosas costillas. Corteza de algunos árboles se pueden desarrollar fructificaciones del hongo, de color anaranjado.	Zona centro-sur
<i>Laetiporus sulphureus</i>	Pollo de los bosques	Pudrición cúbica marrón en el duramen en las raíces, La base y el vástago. Al principio, la madera está descolorida amarillento a rojo. Luego se vuelve de color marrón rojizo y quebradizo.	Zona centro-sur
<i>Macrophomina phaseolina</i>	Pudrición carbonosa	En el campo, las plantas adultas muestran lesiones de color gris ceniciento en el tallo, el pecíolo y las vainas, que corresponden a estructuras de supervivencia del hongo conocidas como picnidios	Zona centro-sur
<i>Schizophyllum commune</i>		Genera pudrición blanca en la madera, debilitando la estructura	Zona sur

		de la célula vegetal	
<i>Sphaeropsis sapinea (Diplodia pinea)</i>	marchitez de los brotes	Suele permanecer como saprófito, varios factores como la sequía, daños físicos y otros estreses de origen medioambiental, pueden desencadenar su carácter parásito y generar infecciones severas.	Zona centro sur
<i>Trametes versicolor</i>	Hongo cola de pavo	Descompone lignina de troncos y ramas muertas, dejando una pudrición marrón.	Zona centro-sur

1.2 Planteamiento del problema

Los monocultivos forestales son en sí mismos generadores de plagas y/o enfermedades, ya que al estar compuestos por una sola especie, se dan las condiciones idóneas para que alguna especie de hongo o insecto pueda propagarse de manera muy rápida sin barreras por toda la masa forestal, de esta manera se puede convertir rápidamente en una grave amenaza para el cultivo en su conjunto (Dajoz, 2001). Los monocultivos que poseen una alta densidad de plantación dan lugar a las condiciones para la propagación de enfermedades fúngicas (Iturrutxa & Ganley 2007). Además, la deficiencia nutricional de los terrenos por pérdidas de suelo, terminan por debilitar las plantaciones y favorecen la aparición de estas y otras enfermedades (Muñoz *et al.* 2003).

Actualmente, el control de hongos patógenos de la madera se basa en medidas que pretenden enfrentar su deterioro, entre algunas medidas para enfrentar este problema, está el control preventivo desarrollado en todo tipo de aduanas a nivel nacional, consiste en una declaración e inspección de los productos ingresados al país, con el objetivo de prevenir la introducción de enfermedades exóticas, plagas cuarentenarias y especies invasoras de todo tipo, para evitar daños a la producción del país, los que finalmente se traducen en pérdidas económicas, se suma a lo anterior, la disminución de la confianza de los mercados en los cuales Chile participa (SAG, 2016).

Una vez que se ha verificado la introducción del patógeno en la madera, comienza el control activo, destacando el manejo silvícola con el fin de evitar la propagación de los hongos fitopatógenos. Complementariamente, a la actividad anterior, están los controles químicos y biológicos que intentan reducir el daño (Lignum, 2014). Un último recurso para aplicar a la madera ya cortada es el método de impregnación, en donde se aplican preservantes y, retardantes de fuego o ambos, con el fin de controlar el deterioro por hongos y destrucción por combustión (Seminario Impregnación de Pino Radiata en Chile, 2008).

La mayoría de los impregnantes son de naturaleza química y de uso indiscriminado, por ejemplo, un compuesto a base de Cobre, Cromo y Arsénico, llamado CCA, es el preservante hidrosoluble para maderas más utilizado a nivel mundial, ya que penetra profundamente y perdura por largo tiempo en la madera tratada a presión (Osmose, 2015). Sin embargo, parte de este producto químico puede pasar de la madera al suelo circundante a través del tiempo y también puede desprenderse de la madera y pegarse a la piel del que la ha rozado o tocado. (Osmose, 2015). Desde 2003, la Comunidad Europea limita el uso de este protector a aplicaciones industriales en las que sea estructuralmente necesario y no haya probabilidades de entrar en contacto con personas (Barreiro. S & Hirsch. T, 2011).

Estos productos químicos o el uso de estos está fiscalizado por el Servicio Agrícola y Ganadero, SAG, a través del Departamento de Plaguicidas y Fertilizantes, que regula la fabricación, importación, exportación, distribución, comercio, uso y manejo de estos productos según El Decreto Ley N°3.557 de 1980 (SAG, 2016).

Una detección temprana de patógenos en la madera, acompañado de medidas de control de estos, puede favorecer la toma de medidas efectivas y agilizar la mitigación antes de que el desarrollo infectivo sea irreversible. Pudiendo evitar la propagación dentro de lugares de acopio, transporte y comercialización, logrando de esa forma la contención del daño provocado a la masa forestal. Debido a esto, una importante innovación en la detección de los patógenos de la madera, es la identificación morfológica de estos fitopatógenos, que por sí solo, como herramienta de detección es muy útil e innovadora con respecto a lo existente en el mercado

actual y además es la base para estandarizar un servicio de detección molecular de patógenos forestales.

Estas técnicas de detección generan una fuente de información a las empresas forestales, permitiendo elevar los estándares de inocuidad de la madera a nivel nacional e internacional, limitar el uso de pesticidas e impregnantes gracias a la focalización de estos, además de una aplicación eficiente de controladores biológicos lo que reduciría el gasto de las empresas, además de disminuir la contaminación química ambiental.

1.3 Pregunta de Investigación

¿Qué técnicas microbiológicas permiten la identificación temprana de patógenos en madera de Pino Insigne?

Preguntas específicas

¿Cuáles son los patógenos degradadores y manchadores de la madera de Pino Insigne de mayor importancia en la región del Biobío?

¿La metodología diseñada sirve para la caracterización morfológica de patógenos forestales degradadores de madera de *Pinus radiata*?

Para responder la pregunta de investigación se plantea la siguiente hipótesis de trabajo:

Es posible diseñar un protocolo microbiológico para la identificación de potenciales patógenos que atacan al Pino Insigne, en la Región del Bío-Bío.

1.4 Objetivos

Objetivo general:

El objetivo general de esta investigación es:

Establecer un protocolo microbiológico para la detección e identificación de potenciales patógenos que atacan al Pino Insigne en la Región del Bío Bío.

Objetivos específicos:

- 1.- Realizar una búsqueda bibliográfica acerca de los principales patógenos causantes de las enfermedades en madera de Pino Insigne en Chile.
- 2.- Describir morfológicamente patógenos presentes en madera de pino insignie a través de técnicas microbiológicas.
- 3.- Validar las técnicas microbiológicas utilizadas en la identificación morfológica de los hongos degradadores de la madera.

1.5 Justificación

En la actualidad un tema muy importante es la eficiencia de los recursos en el desarrollo tecnológico, más aún, en el ámbito forestal que tiene un alto costo económico y generación de daños ambientales, debido a que se ocupan impregnantes químicos y plaguicidas dañinos para el ambiente a toda la madera de exportación sin excepción.

Es necesario evitar el sobreconsumo de impregnantes en la industria forestal, mejorar las técnicas de detección de patógenos con el fin de tener un control en la inocuidad de la madera y realizar una detección temprana de estos fitopatógenos. Además de la aplicación consiente de estos productos basados en la carga microbiológica real de la madera y finalmente asegurar a los productores madereros mediante un análisis de laboratorio la real condición sanitaria de su producto y así asegurar sus características comerciales durante el tiempo.

1.6 Limitaciones del estudio

Las limitaciones que presenta ese estudio son diversas, una de las más importantes es la cantidad de variables que tiene el hecho de trabajar con microorganismos, ya que es necesario tener conocimientos y experiencia en la metodología de cultivo de hongos, debido a que en algunos casos es difícil encontrar la forma más adecuada de aislarlos e identificarlos, además de generar una base bibliográfica de las características morfológicas y estados que poseen los hongos patógenos forestales. Otra de las limitantes, es que al trabajar con microorganismos, estos pueden estar presentes, pero en estado de latencia.

Es importante también en este estudio, el aspecto económico, ya que es posible que las empresas no estén dispuestas a destinar presupuesto para realizar un muestreo y posterior análisis, lo que se resuelve con un correcto plan de marketing del servicio a entregar que asegure que el costo del análisis es inferior a las pérdidas por desconocimiento de la carga de patógenos. También existe la posibilidad de que las empresas no estén dispuestas a someter sus muestras a análisis de patógenos, debido a sus políticas internas, ante lo cual las políticas de privacidad de las empresas deben ser consideradas, además la información de cada servicio debe ser altamente confidencial y desarrollar protocolos de trabajo que aseguren el resguardo de la información de cada cliente.

CAPITULO II

Marco Teórico

2.1 Descripción de la especie

El Pino Insigne es un árbol talla media a alta, aproximadamente de unos 30 metros de altura, posee un crecimiento rápido en climas templados como es la zona centro de Chile, alcanzando un diámetro de tronco de alrededor de 1 metro, con un ciclo de vida de 25 a 35 años. Está dividido en tres sistemas, raíz tronco y copa. La función de la raíz es anclar y estabilizar la planta en el terreno, así como de la absorción de agua y sales minerales del suelo; el tronco es el soporte mecánico de la copa, en donde se desarrolla la conducción de los minerales absorbidos por la raíz hasta la parte superior, donde se lleva a cabo el proceso de la fotosíntesis, fundamental para la vida de las plantas (Robles y Echenique, 1983).

El ciclo de vida del pino representa el de la mayoría de las coníferas, como muestra la figura 2. Siendo las gimnospermas, plantas que producen semillas desnudas o expuestas, no encerradas dentro de un fruto (González. A, 2012).

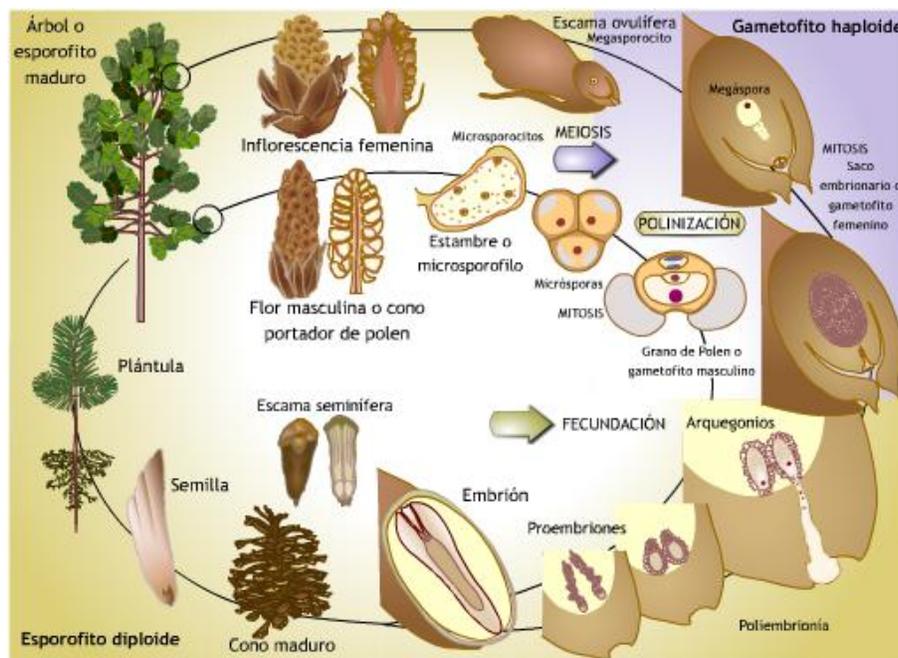


Figura 2: Esquema del ciclo de vida del Pino Insigne y las estructuras de reproducción (Gonzalez. A, 2012).

La relevancia económica del Pino Insigne radica en su madera, de la cual se obtienen diversos productos tales como: tableros y chapas, papel, astillas, postes y polines, la que es principalmente un producto de exportación. Las propiedades físicas de esta madera la vuelven atractiva para su uso comercial, pero a su vez, la elevada contracción volumétrica la hace susceptible al ataque de diferentes agentes biológicos, por lo cual es importante realizar un secado cuidadoso, controlando los parámetros temperatura y humedad (Maderas Aguirre, 2016).

Como se indicó anteriormente, un importante factor en la baja calidad de la madera de pino insignie, se debe a ataques fúngicos. Los hongos realizan la tarea de desintegrar la materia orgánica presente en la naturaleza, son organismos unicelulares o multicelulares, con núcleos definidos, no poseen clorofila, de tal forma que deben tomar sus nutrientes de otros seres orgánicos (Cuesta. J, 2013).

2.2 Características de los hongos

Los hongos son generalmente considerados como una clase de organismos altamente especializados (Zaid, 2004). Pertenecen al reino Fungi, no poseen la capacidad de sintetizar azúcar y almidón a partir del dióxido de carbono presente en la atmósfera, así que buscan materia orgánica para alimentarse, (Ainsworth. C, 1976). Debido a su alta adaptabilidad, pueden degradar prácticamente cualquier material orgánico obtenido de plantas o animales (Findlay, 1967).

Sin la acción de los hongos, la vida sobre la tierra desaparecería por falta de dióxido de carbono, fertilización y aireación del suelo. Sin embargo, cuando el hongo de la madera ataca a un árbol o producto de madera, esta pierde su valor comercial lo que genera pérdidas económicas (Stegel y Sisler, 1977).

2.2.1 Estructuras y forma de reproducción de los hongos

Los hongos se reproducen por cuerpos microscópicos llamados esporas, desarrolladas en gran cantidad. En condiciones adecuadas de humedad y temperatura, las esporas germinan dando origen a una hifa, que en conjunto forman una trama de tejido denominada micelio, una vez que el hongo ha desarrollado suficiente micelio, forma cuerpos fructíferos (esporóforos) en el que se producirán nuevas esporas, para así completar el ciclo.

2.2.2 Hábitat de desarrollo de los hongos

Son cuatro las condiciones esenciales para el desarrollo de los hongos: la existencia de sustrato, humedad, temperatura y oxígeno donde en general, la ausencia o eliminación de cualquiera de estos requerimientos evitaría o inhibiría en gran medida el crecimiento del hongo cabe destacar que el oxígeno no ser necesario en hongos con metabolismo fermentativo.

2.2.3 Oxígeno y temperatura

Los hongos, como seres vivos necesitan respirar, es decir, producir la oxidación de los azúcares que utilizan para crecer y para su suministro de energía. Como resultado de su respiración los hongos producen dióxido de carbono. (Findlay, 1967). Al igual que las plantas, crecen más rápido en climas cálidos que en climas fríos. La tasa de crecimiento de los hongos aumenta gradualmente desde temperaturas cercanas a la de congelación hasta un rango óptimo entre 24° y 32°C.

En el caso de los hongos pudridores, si la temperatura aumenta sobre los 32°C, la tasa de crecimiento disminuye (Ramírez, 2001).

A temperaturas bajo el punto de congelación, los hongos pasan a un estado de latencia, no así al superar los 38°C que para la mayoría de los hongos es letal (Eslin y Clark, 1979).

2.2.4 Sustrato

Es necesario tener una fuente constante de carbono para la síntesis de los constituyentes protoplasmáticos, además de otros elementos como hidrógeno, nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre. A diferencia de las plantas superiores, el hongo utiliza una fuente de carbono orgánico en lugar de dióxido de carbono (Smith, 1970). Su crecimiento también se ve afectado por el grado de acidez o alcalinidad del sustrato. En general, los hongos prosperan en materiales que son ligeramente ácidos, con pH entre 4,5 y 5,5, como el normal de las maderas. Los hongos de pudrición producen generalmente cantidades apreciables de ácidos orgánicos como resultado de su crecimiento, lo que tiende a aumentar la acidez del sustrato en el que se desarrollan (Findlay, 1967).

2.2.5 Humedad

Es el factor más importante para el desarrollo de los hongos en la madera, con humedad superior a 28-30% los hongos se desarrollan con mayor facilidad, cuando la madera contiene una humedad inferior al 20% queda inmune al ataque de patógenos degradadores (Smith, 1970).

2.3 Hongos degradadores de la madera

Los efectos de la pudrición de madera generan cambios químicos y físicos en la estructura, entre los cambios químicos se puede mencionar la transformación de la celulosa en glucosa por acción de las enzimas hidrolíticas de los hongos, y la descomposición de la lignina mediante enzimas oxidativas, provocando pudrición café y blanca en el caso del área forestal, y los efectos desarrollados a nivel de la madera se pueden clasificar en dos tipos de daño: pudriciones y manchas (Zaid, 2004).

2.3.1 Hongos que causan pudriciones

La pudrición es considerada una enfermedad de mucha importancia, porque causa un deterioro progresivo de las paredes celulares y de la resistencia de la madera y puede interrumpir el flujo de savia en la albura cuando las células mueren o reaccionan al avance de la pudrición. Puede afectar a las raíces lignificadas, troncos, y ramas. (Luley, 2006)

Existen diferentes formas pudrición, en las que destaca la pudrición blanca y pudrición marrón. Estas pudriciones ocasionan un ataque enzimático en la madera, debilitándola al degradar la celulosa y la lignina de las paredes celulares y sustrayendo la lignina de entre sus células (ISA Hispana, 2015). El ataque fúngico sobre la celulosa en las paredes celulares reduce la resistencia al pandeo, mientras que la degradación de la lignina afecta a la resistencia a la compresión de la madera (Luley, 2006). Es importante destacar que una pérdida significativa de esta resistencia ya ocurre incluso antes de que la pudrición sea detectada en la madera (Wilcox, 1978).

2.3.1.1 Hongos que causan pudrición parda

La pudrición parda es provocada por los hongos pertenecientes a la división de los Basidiomicetes, los cuales depolimerizan y metabolizan la celulosa y hemicelulosa, al igual manera alteran la lignina aunque no la metabolizan (Luley, 2006). Caracteriza a la pudrición parda, una rápida pérdida en el grado de polimerización de la celulosa total, esta se contrae formando hendiduras perpendiculares u oblicuas que le dan una apariencia cubicada. La figura 3 muestra cómo actúa la pudrición parda, generando pérdida de peso y una estructura quebradiza, similar a la apariencia de un material pulverulento oscuro (Juarez. E, 1995).



Figura 3: Madera de pino Insigne con presencia de pudrición parda (Fuente: Shaner *et al.*, 1999).

En este grupo de hongos causante de la pudrición parda, encontramos a ***Macrophomina phaseolina***, agente causal de la enfermedad “pudrición carbonosa de la raíz”, que ataca alrededor de 500 especies de plantas entre cultivos agrícolas y forestales. En Chile, el patógeno fue detectado en viveros de *Pinus radiata* D. Don y en los años siguientes en plantaciones jóvenes de la especie. Entre los factores más importantes para el desarrollo de la enfermedad están las altas temperaturas y el bajo contenido de humedad del suelo (Shaner *et al.*, 1999). El patógeno infecta a la plantas dentro de un amplio rango de temperaturas (20 a 35 °C) y está influenciado por condiciones de estrés hídrico (Kending *et al.*, 2000). Los primeros síntomas se observan en la plántula, a la altura de los cotiledones y posteriormente el patógeno comienza a avanzar hacia el cuello de la raíz como se observa en la figura 4. Posteriormente ocurre la necrosis y muerte del tejido en toda la plántula (Castellanos, 2016). En el campo, las plantas adultas que desarrollan esta enfermedad, muestran

lesiones de color gris ceniciento en el tallo, que corresponden a estructuras de supervivencia del hongo conocidas como picnidios(FAO, 2006).



Figura 4. Tallo de madera atacado por *Macrophomina phaseolina*, Imagen tomada de Howard F. Schwartz, Colorado State University, Bugwood.org

Otro hongo que causa pudrición parda, es *Diplodia pinea (sphaeropsis sapinea)*, el cual es el agente causal de la “Muerte regresiva de los pinos”. Pertenece al grupo de los Ascomycetes (Hibbett *et al.* 2007), es uno de los hongos que genera mayores pérdidas económicas al sector forestal de *Pinus radiata* (Iturrutxa 2001& Muñoz, 2003). Los daños producidos por este hongo pueden llegar a producir la muerte de los árboles infectados. Aunque *Diplodia pinea* suele permanecer como saprófito, varios factores como la sequía, daños físicos y otros estreses de origen medioambiental, pueden desencadenar su carácter parásito y generar infecciones severas (Swart *et al.*, 1987). Entre los primeros síntomas se puede ver que las acículas y los brotes nuevos se tornan de color marrón, se atrofian y se retuercen. La decoloración marrón comienza en la base de las acículas y avanza hasta la punta. Es posible que aparezcan canchales resinosos en los tallos más joven y la aparición de resina en las zonas infectadas (Hortanswers, 2014). Posteriormente se presenta necrosis del follaje, lo que ocurre meses después de la penetración e incubación de la enfermedad. Este hongo puede atacar plantaciones de *P. radiata* de distintas edades (Peterson, 1981).

Otro de los hongos que causan pudrición parda, es *Fusarium circinatum*, agente causal del cancro resinoso de los pinos (pitch canker). Fue caracterizado por primera

vez por Heptig y Roth en 1946, en Carolina del Norte, sobre *Pinus virginiana*. El género al que pertenece este hongo, se caracteriza por la producción de macroconidias y microconidias en mono o polifialides y clamidosporas. Durante años, la identificación de las especies se ha realizado por características morfológicas debido a la singularidad de las estructuras que desarrolla, por ejemplo el tipo de esporas, forma, tamaño, etc. *Fusarium circinatum*, es uno de los agentes patógenos más virulentos de las coníferas, siendo capaz de infectarla por diferentes vías directas, como por ejemplo, heridas o insectos vectores, además de las vías indirectas que sería el agua o el viento. Se caracteriza por generar coloraciones en las acículas que parten de un color amarillo, hasta pardo, lo que finalmente resulta en su caída, como muestra la siguiente figura. Además, el eje central del árbol generan chancros exudantes de resina, desde donde proviene su nombre común (Aegerter & Gordon, 2006).



Figura 5. Tallo de madera atacado por *Fusarium circinatum*. (Fuente: Grassamericano.com).

Debido al estado cuarentenario de *Fusarium circinatum* el cultivo y manipulación de este patógeno forestal está prohibido, según la ley Chilena a cargo del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG).

2.3.1.2 Hongos que causan la pudrición blanca

La pudrición blanca es una forma de degradación biológica de la madera cuyo resultado es el blanqueamiento de ésta (Eaton *et al*, 1993), la cual es causada por hongos basidiomicetos que degradan y metabolizan todos los polímeros estructurales de la madera. Los hongos causantes esta pudrición, producen enzimas

lignolíticas, inespecíficas y altamente oxidativas. La figura 6 muestra la capacidad de esos hongos para degradar variado material orgánico (Carabajal, 2014).



Figura 6. Madera con aspecto que semeja un material fibroso, fractura con facilidad y con una significativa pérdida de peso. (Fuente: Blog símbolo calidad, 2014).

Una de las especies fúngicas que provoca podredumbre blanca, es el ***Trametes versicolor*** el cual fructifica sobre madera de árboles planifolios, coníferas, e incluso sobre algunos frutales (Fungipedia, 2014). En fases avanzadas de pudrición, las paredes celulares de la madera, son extensamente erosionadas, y con frecuencia se observan numerosas perforaciones en las paredes de las células adyacentes (Akhtar *et al*, 1997), como muestra la figura 7. Es un hongo muy frecuente, cosmopolita, y puede fructificar en cualquier época del año si las condiciones ambientales son adecuadas, por eso su complejidad a la hora de querer mitigar su efecto degradador.



Figura 7. Tronco cortado con ataque de pudrición blanca producida por ***Trametes versicolor*** (Fuente: Red Demon, 2012).

Otro agente causal de la pudrición blanca, es el ***Schizophyllum commune***, perteneciente al grupo de los Basidiomicetes, posee un carpóforo de pequeñas dimensiones, que generalmente no supera los 3 cm en su zona más ancha, su morfología se asocia a una concha o de abanico. Normalmente se encuentra agrupado, aunque a veces desarrolla carpóforos individuales (Micoroda, 2015).

Schizophyllum commune, es una de las setas más comunes y abundantes que hay en la tierra, fructifica sobre madera o restos leñosos de todo tipo de árboles y tiene la capacidad de estar presente en el ambiente todo el año, como muestra la figura 8 (Fungipedia, 2010).



Figura 8. Tronco de *Pinus radiata* con presencia de cuerpos fructíferos de ***Schizophyllum commune*** (Fuente: Blog Sporesmouldsandfungi, 2013).

El efecto que provoca este tipo de pudrición es la degradación y metabolización de la holocelulosa (celulosa y hemicelulosa), además de alterar la estructura de la lignina. El daño se presenta con mayor frecuencia en la madera de angiospermas donde la madera en estado avanzado de pudrición suave suele adquirir coloración blanquesina (Juárez, 1995).

2.3.2 Hongos que causan manchas

Las manchas en la madera de pino insigne, son generadas por hongos cromógenos correspondientes al grupo de Ascomycetes, los cuales producen cambios aparentes en la coloración de la madera, puesto que las manchas se originan a partir de la difracción de la luz en sus filamentos coloreados, y estas pueden apreciarse de colores azul, negro, rojo, castaño, amarillo o gris. Estos hongos poseen un ciclo de

vida corto, y al cabo de una semana pueden infectar madera en rollo, aserrada o astillada, con un importante cambio en el sentido estético (Forest Products Laboratory, 1999), como se muestra en la figura 9. La importancia en este tipo de hongos es su forma de dispersión, ya que la infección se ve facilitada por corrientes de aire o transmitida por insectos que diseminan sus esporas.



Figura 9. Madera apilada y trozada con infección de hongos cromógenos. (Fuente: InfoMaderas, 2013).

2.3.2.1 Hongos que causan la mancha azul

En la madera cortada de Pino Insigne, es usual la aparición de hongos cromógenos de coloración azul en la zona de la albura, en los casos donde su humedad es superior al 18-22% (Arriaga *et al.* 1994, Rodríguez y Arriaga 1988).

La especie de hongo cromógeno más común en Chile, denominada como “La mancha azul” (Butin, 1973), es causada por el hongo *Ceratocystis pilífera*, este hongo utiliza el contenido fitocelular, del pino para su desarrollo, crece vigorosamente en troncos recién cortados y madera aserrada, lo que a veces resulta en una decoloración desagradable a la vista. La madera afectada es inaceptable para muchos usos finales, lo que representa una enorme pérdida de valor económico. Además, aumenta la posibilidad de sufrir restricciones cuarentenarias (Wood export Chile, 2016).

En materia de protección de la madera aserrada, se han utilizado diversas sustancias, que son aplicadas por inmersión o aspersion. Todos estos compuestos anti manchas contienen compuestos químicos, que son actualmente

objeto de restricción por aspectos ambientales, por lo que el control biológico de la mancha azul aparece como una alternativa ambientalmente compatible (Quarmby, 2001).

Como se dijo anteriormente, los estudios realizados se han orientado fundamentalmente al control de la mancha, dejando de lado los aspectos relacionados con los agentes causales de la misma (Osorio, 1985). Es debido a esto que el estudio debe ir dirigido hacia la identificación de los patógenos que están causando daño, para focalizar la aplicación de tratamientos en la madera, evitando el sobre consumo de estos.

2.4 Importancia de la descripción morfológica

La clasificación de los hongos está basada en las diversas formas de los cuerpos fructíferos, que generalmente se desarrollan en la superficie externa del sustrato en donde el hongo crece (Osorio, 1985). Es por eso que la identificación morfológica de microorganismos es muy importante y ha sido una herramienta fundamental para la biología, en especial en el estudio de hongos, que son microorganismos imposibles de diferenciar a simple vista, salvo que sea por estructuras macroscópicas como es el caso de sus cuerpos fructíferos.

El método de identificación de hongos es a través de claves dicotómicas, las que se basan en definiciones de los caracteres morfológicos, macroscópicos o microscópicos; de ella parten dos soluciones posibles, en función de si tienen o no determinado carácter, repitiéndose el proceso de definiciones de características, hasta llegar al organismo en cuestión. En el caso de los hongos, se debe diferenciar características micro y macroscópicas, como el tamaño y forma de las estructuras que se desarrollan, como es el caso fructificaciones o de estructuras sexuales como las esporas (Haro y Melic, 2002). Además de la formas y medidas de las esporas, conidias, peritecios, conexiones en hebilla, que son características distintivas entre los hongos inclusive a nivel de especie (Pfenning & Abreu, 2000).

2.5 Técnicas utilizadas para la identificación morfológica

Para realizar una identificación morfológica es necesario seguir un protocolo, el cual cuenta con variados pasos en los que destacan los siguientes:

2.5.1 Medio de cultivo

Es una solución que permite el desarrollo de microorganismos, son ampliamente utilizados en el área de la microbiología, los cuales contienen los nutrientes suficientes para asegurar el desarrollo y reproducción de los microorganismos que generalmente necesitan carbono, nitrógeno, vitaminas, oligoelementos, etc. Además de un pH ligeramente ácido que varía entre 6-6,3 para facilitar su crecimiento e inhibir al mismo tiempo el desarrollo de otros microorganismos, además de emular el pH ácido del Pino, para así adecuarse a las exigencias de los hongos degradadores de la madera (Cañedo. V & Ames. T, 2004).

El medio de cultivo debe dar las condiciones de humedad para el desarrollo de los hongos, porque cuando ésta comienza a disminuir, la formación de micelio también disminuye y el hongo tiene que asegurar su perpetuidad formando estructuras propagativas (esporas, conidias) y de conservación (clamidosporas).

Existen diferentes tipos de medios de cultivo, los cuáles pueden ser sólidos, líquidos, o semilíquidos entre otras, para conseguir un medio sólido se debe agregar una sustancia solidificante como el agar, el cual no tiene valor nutritivo sino que sirve simplemente para mantener la humedad por un tiempo prolongado. (FAO, 2001)

Existe la posibilidad de añadir antibióticos antibacterianos al medio de cultivo para inhibir el crecimiento de bacterias saprofitas que suelen contaminar las muestras, siendo uno de los más utilizados, el cloranfenicol.

2.5.2 Cámaras húmedas

Se define como cámara húmeda a un sistema cerrado, capaz de mantener una atmósfera saturada de humedad bajo condiciones estables de temperatura. Posee múltiples aplicaciones entre las cuales destaca la simulación ambiental, envejecimiento acelerado, control de calidad, estabilidad de productos e

investigación de especies animales y vegetales (Cardona. J *et. al*, 2013). Además es un buen método simulador de la madera embarcada durante un tiempo prolongado.

En el caso de los hongos, les proporciona las condiciones de temperatura y humedad necesarias para aumentar su metabolismo. En este caso se utilizan recipientes plásticos cerrados con papel absorbente humedecido con agua destilada, separando la muestra y el papel con una malla plástica, de modo que no tengan contacto directo.

CAPITULO III

Materiales y métodos

Este trabajo de investigación se realizó en los Laboratorios de Fitopatología del Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA Quilamapu, Chillán y en el Laboratorio de Ingeniería en Recursos Naturales de la Universidad del Bío-Bío, Campus Fernando May.

3.1 Material biológico

La madera se obtuvo a partir de muestras colectadas en la empresa Arauco S.A Planta Nueva Aldea, pertenecientes a la especie *Pinus radiata*. Se tomaron muestras aleatorias dentro de un terreno destinado al almacenaje de madera, una vez seleccionado los trozos de madera, se dispusieron en bolsas herméticas rotuladas y fueron trasladadas al Laboratorio en frío.

3.2 Preparación de muestras

Se tomaron trozos de madera de las muestras colectadas y se redujeron a un tamaño de aproximadamente 4 cm de largo, luego de esto, se guardaron y rotularon en bolsas plásticas individuales, a 4°C hasta el momento de su utilización.

3.3 Cámaras húmedas

Las muestras se limpiaron con una brocha para eliminar el exceso de tierra, fueron lavadas con una solución comercial de hipoclorito al 1%, enjuagadas dos veces con agua destilada por 30 segundos y secadas con papel absorbente previamente esterilizado.

Para el favorecer desarrollo de los hongos presentes en las muestras, estas se dispusieron en cámaras húmedas desinfectadas de 40 x 30 x 20 cm con tapa hermética. Donde se incubaron durante 7 días a temperatura ambiente, previo al sembrado cultivo en medio.

3.4 Cultivo de hongos

Para preparación el medio sólido se dispuso de placas Petri de vidrio de 10 cm de diámetro, las cuales fueron esterilizadas a 121°C por 15 minutos en el autoclave del departamento de ciencias básicas de la Universidad del Bío-Bío.

En la investigación se usaron dos medios de cultivo sólido, Agar Agua y PDA (Agar de papa y dextrosa).

Para la preparación de Agar agua, se disolvió el preparado de agar agar en agua destilada a una concentración de 15 g/L en un frasco de rosca de 500 mL. Para el agar PDA, se disolvió en agua destilada a una concentración de 39 g/L. con el fin de aumentar la solubilidad del soluto, se dejó a *baño María* hasta que la solución quedó homogénea.

Para comprobar si el material autoclavado llegó a la temperatura y presión de vapor esperada, se utilizó un trozo de cinta indicadora de vapor, de ese modo, si la cinta cambia de color por una reacción química de liberación de plomo, se afirma que llegó a la temperatura esperada.

Luego cuando la temperatura está a aproximadamente 50°C se procedió a trabajar bajo campana, donde se esterilizó el lugar de trabajo con Etanol al 70% y se utilizó un mechero para generar un campo estéril. Luego se prepararon las placas, llenándolas con una fina capa de agar, se dejaron enfriar y se sellaron con parafilm para su posterior uso.

En esta parte de la metodología se utilizó medio de cultivo Agar agua, el cual tiene la ventaja de que al no poseer nutrientes extras, evita el crecimiento de microorganismos no deseados en el estudio y además de retarda el ciclo de vida de los hongos, haciendo más fácil su manipulación y posterior aislamiento.

Para controlar la contaminación en los medios de cultivo, se utilizó cloranfenicol a una concentración de 0,05 g/L. como antibiótico para evitar el crecimiento de bacterias en las placas.

Una vez seleccionados las muestras de interés, se llevaron a una cámara de flujo laminar para realizar el cultivo. Con el extremo de una jeringa de 1mL se tomó punta de hifas, microesclerocios, exudados de peritecios o parte de cuerpos fructíferos según lo recomienda la bibliografía para hacer el sembrado, luego se rotularon, se sellaron con *Parafilm* y se llevaron a una estufa a 20°C por aproximadamente 7 días.

3.5 Aislamiento de patógenos

Para purificar los patógenos cultivados en medio Agar agua, se dispusieron las placas presentes en la estufa y fueron colocadas bajo una cámara de flujo laminar, donde se esterilizó con Etanol al 70% la zona de trabajo, además de utilizar un mechero. Con la ayuda de una lupa estereoscópica, se aislaron los hongos de interés con una jeringa de 1 mL, tomando punta de hifa y sembrándola en placas Petri con medio sólido PDA. Posteriormente se rotularon de acuerdo a la observación morfológica de las colonias, se sellaron con *Parafilm* y se llevaron nuevamente a cultivo en una estufa a 20°C por aproximadamente 7 días.

3.6 Identificación Morfológica

Una vez obtenidos los cultivos puros de los hongos de interés, cada aislamiento se cultivó en triplicado, utilizando dos para la caracterización morfológica uno para reserva. A partir de los aislamientos puros realizados, se procedió la identificación morfológica.

Para realizar la descripción macroscópica se utilizó un protocolo fitopatológico con el fin de obtener un resultado preciso en el lenguaje. Además de la utilización de una cámara fotográfica. En el caso de la descripción de estructuras reproductivas de mayor tamaño se utilizó una Lupa estereoscópica con un ocular milimétrico para la realización de las medidas.

A partir del micelio que se desarrollaba en la superficie de la placa Petri se recogió una porción con una jeringa de 1 mL, se realizaron preparaciones, las que fueron observadas en un microscopio óptico de campo claro de la marca Heitz, con visor milimétrico, con el propósito de describir de manera precisa las estructuras observadas.

La identificación, se centró en la búsqueda de estructuras vegetativas y reproductivas, de acuerdo a cada aislado, utilizando claves dicotómicas, artículos científicos etc, que están descritos para cada género en los resultados.

CAPITULO IV

Resultados

4.1 Aislamiento de Patógenos

Tras el cultivo en cámara húmeda se seleccionaron los trozos de madera con mayor crecimiento microbiológico para realizar el aislamiento de fitopatógenos. Una vez seleccionados las muestras de interés se realizaron los análisis macroscópicos y microscópicos para su identificación con el uso de claves dicotómicas.

La figura 10 muestra las cámaras de cultivo tras 7 días de incubación, los ensayos se realizaron en triplicado independiente para cada muestra seleccionada.



Figura 10. Cámaras húmedas, Laboratorio de fitopatología del INIA.

Posteriormente se realizó un análisis macroscópico con una lupa estereoscópica con el fin de ver las diferentes estructuras que se formaron en la madera con patógenos. De esta observación se obtiene información sobre el crecimiento de microesclerocios, micelio de diferentes coloraciones, el crecimiento de cuerpos fructíferos y el desarrollo de diferentes coloraciones en la madera, como se muestra en la figura 11.

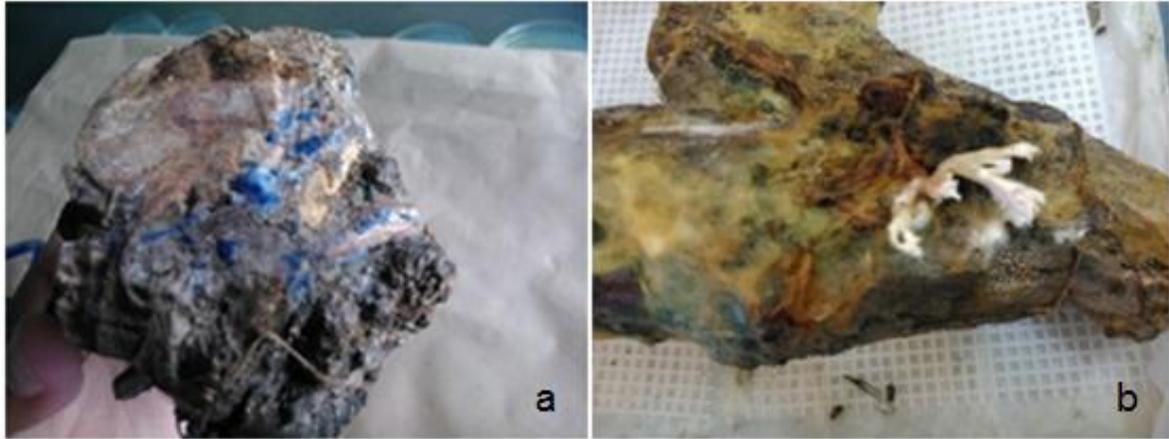


Figura 11. En la fotografía 11a se observa un trozo de madera con presencia de mancha azul, lo que hace presumir que exista algún hongo del género *Ceratocystis*. En la fotografía 11b, se observa un trozo de madera de Pino Insigne con desarrollo de un cuerpo fructífero de color blanco.



Figura 12. En la fotografía 12a, se observa el crecimiento de micelio blanco ramificado que es de lento crecimiento, en la fotografía 12b, se observa la presencia de picnidios en la corteza.

4.2 Cultivo microbiológico

Se procedió a la siembra de los microorganismos en placas de Petri que contenían medios de cultivos Agar agua bajo una cámara de flujo laminar. Las estructuras de los hongos se sembraron en el centro de la placa, posteriormente fueron dispuestas en una cámara de incubación a 20°C por 7 días. Luego para aislar las cepas y asegurar un sembrado monospórico se sembró punta de hifa de las cepas en PDA. Realizándose al menos 30 cultivos en placas Petri, de los diferentes hongos encontrados en las muestras de madera de Pino Insigne. Destacando el crecimiento

de 5 hongos de interés para el estudio. La siguiente figura muestra el crecimiento de los hongos en las placas Petri.

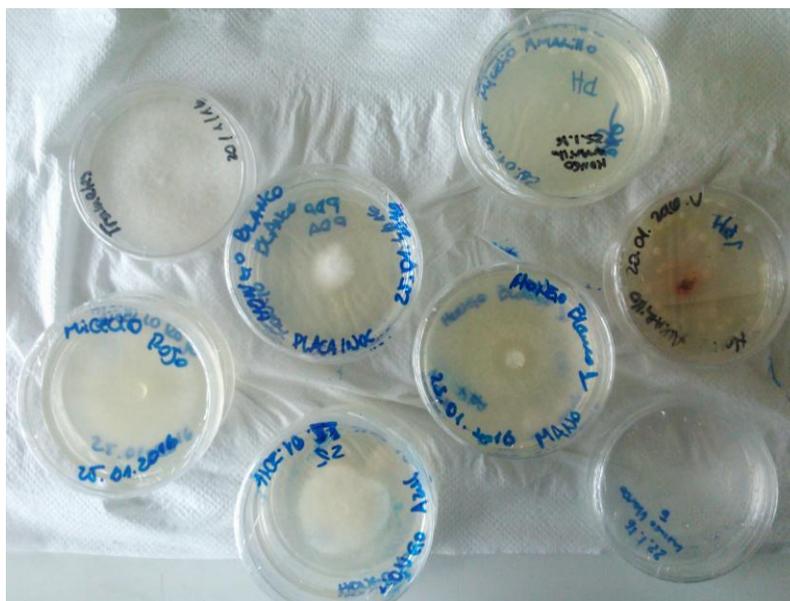


Figura 13. Placas Petri utilizadas en el cultivo de estructuras reproductivas de hongos presentes en madera de Pino Insigne.

4.3 Caracterización morfológica de los patógenos encontrados

Una vez aislados los hongos de interés, se procedió al análisis macroscópico y microscópico de las cepas, con el fin de caracterizar los patógenos degradadores de la madera de Pino Insigne. La técnica microbiológica utilizada para las descripciones fue la realización de preparaciones con porta y cubre objetos. Estas se hicieron sobre una gota de agua destilada y con la ayuda de una jeringa se extrajo una pequeña parte de las estructuras a analizar, posteriormente se llevaron al microscopio óptico utilizando los diferentes objetivos. Es muy importante el uso de claves dicotómicas para la correcta identificación.

Cabe destacar que no fue necesaria la utilización de tinciones como por ejemplo, lactofenol o floxina, debido a que la identificación fue en general de baja complejidad, no se pretendía diferenciar dos especies de un mismo género. En algunos casos, con la lupa estereoscópica bastó para la identificación del fitopatógeno.

4.3.1 Aislamiento 01

Se tomó un trozo de la corteza con crecimiento de picnidios, los cuales fueron sembrados con la punta de una jeringa de 1mL en Agar agua. Luego se tomó punta de hifa de la placa Petri y fue aislado en una placa con medio de cultivo PDA.

Descripción macroscópica

La colonia desarrolló un micelio rastrero denso, que se distribuye de manera regular sobre el medio solido PDA, en un comienzo mostró una coloración gris y al cabo de una semana se tornó más oscuro, como muestra la figura 14.

Descripción microscópica

Al cabo de una semana se empezaron a desarrollar microesclerocios de forma esférica a irregular, de coloración negra, de textura lisa, duros y de 80-130 μm de diámetro. No se observó la formación de picnidios en medio de cultivo PDA.

Para observar los picnidios se utilizó el tejido infectado presente en las muestras de las cámaras húmedas, donde los picnidios hallados fueron usualmente solitarios, globosos y de coloración negra, con un tamaño que oscilaba entre 160-260 μm y con ostiolo truncado. La aparición de conidios maduros se produjo de manera esporádica, presentando una coloración café, con una pared de consistencia granular y con apéndices mucoides como muestra la Figura 14b.

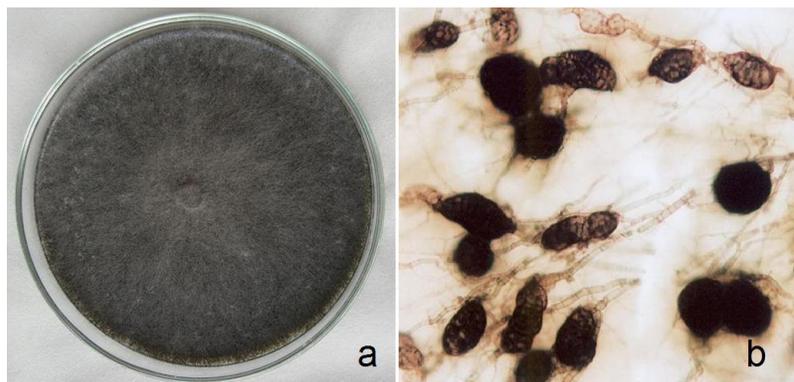


Figura 14: Fotografía 14a, muestra el crecimiento micelio de crecimiento uniforme, con coloración gris oscuro en una placa Petri con agar PDA. La fotografía 14b muestra la formación de microesclerocios vistos al microscopio objetivo 40X.

Las características de las colonias y de las estructuras de reproducción asexual coincidieron con las descripciones de *Macrophomina sp.* según las claves dicotómicas reportadas por Crous *et al.* 2006.

4.3.2 Aislamiento 02

Se tomó un trozo de la corteza con signos de descomposición, presencia de picnidios de coloración negra, los cuales fueron sembrados con la punta de una jeringa de 1mL en Agar agua. Luego se tomó punta de hifa de la placa Petri y fue aislado en una placa con medio de cultivo PDA.

Descripción macroscópica

La colonia desarrollada en la placa Petri 002 muestra el desarrollo un micelio aéreo abundante de color blanquecino al comienzo de su desarrollo, tornándose de color gris oscuro al cabo de una semana.

Descripción microscópica

Se observa micelio septado, conidios elípticos de color café oscuro, bicelulares de 20 μm x 35 μm , que se encuentran dentro de picnidios aislados globosos de una coloración más oscura.

Las características de las colonias y de las estructuras de reproducción asexual coincidieron con las descripciones de *Diplodia sp.* Según las claves dicotómicas reportadas por Barnett y Hunter (1972) y Sutton (1973). La Figura 15 muestra las estructuras presentes el cultivo donde destaca el crecimiento de picnidios.

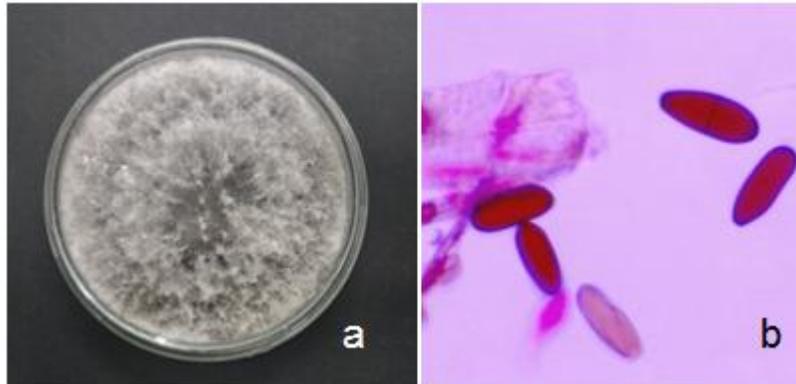


Figura 15: Fotografía 15a muestra una placa de PDA con crecimiento uniforme de micelio de coloración gris oscuro veloso, a su derecha en la fotografía 15b se muestra la presencia de picnidios vistos de manera microscópica en el objetivo 40X.

4.3.3 Aislamiento 03

Se tomó un trozo de micelio con blanco cremoso, el cual se sembró con la punta de una jeringa de 1mL en Agar agua. Luego se tomó punta de hifa de la placa Petri y fue aislado en una placa con medio de cultivo PDA.

Descripción macroscópica

Al cabo de una semana el hongo en la placa mostró crecimiento homogéneo del micelio, el haz tuvo una tonalidad blanquecina y de gran densidad, el envés tuvo una tonalidad amarilla cremosa.

Descripción microscópica

La muestra presentó esporas de 2 μm x 5 μm aproximadamente, ligeramente curvas, cilíndrica lisa, hialina. La Figura 16 muestra las estructuras presentes el cultivo donde destaca el crecimiento de esporas.

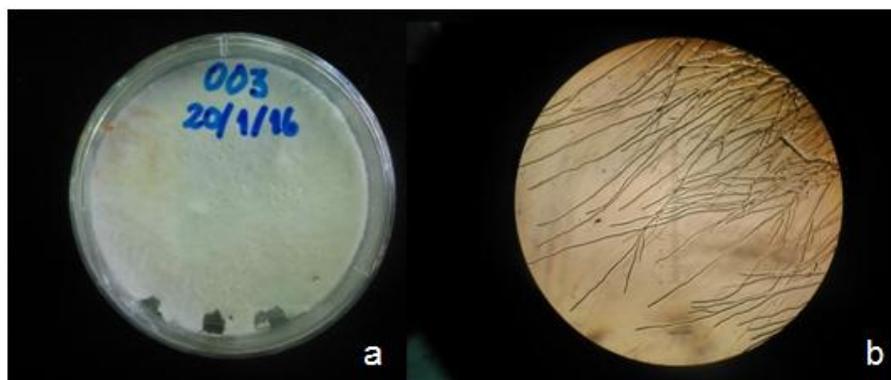


Figura 16. Fotografía 16a muestra el crecimiento de un micelio blanco cremoso en una placa Petri con medio de cultivo PDA. A su derecha, en fotografía 16b se observa las conexiones en hebilla vistas en un microscopio en el objetivo 40X.

Las características de las colonias y de las estructuras de reproducción asexual coincidieron con las descripciones de *Trametes sp.* Según las claves descritas por Sutton (1973).

4.3.4 Aislamiento 04

Se tomó un trozo de la corteza con micelio de coloración azul y la presencia de peritecios, de los cuales se tomó su exudado y se sembró con la punta de una jeringa de 1mL en Agar agua. Luego se tomó punta de hifa de la placa Petri y fue aislado en una placa con medio de cultivo PDA.

Descripción macroscópica

El cultivo en la placa Petri mostró una colonia que en un principio tuvo una apariencia algodonosa, que al cabo de 2 a 3 días se tornó de una coloración pardo oscuro, posteriormente se tornó más oscura, crece formando un cordón constituido por varias hifas.

Descripción microscópica

Posee hifas que están sumergidas en el medio de cultivo son de color café oscuro que se encuentran ramificadas, de pared delgada, septadas con un diámetro de 1,5 a 3,8 μm .

Para la observación del estado perfecto del hongo se utilizaron peritecios, los cuales se desarrollaron superficialmente el medio de cultivo. La base del peritecio es globosa, de una coloración negra, de 130 a 245 μm de diámetro. Acompañado con hifas septadas, de coloración parda. Se observó además, como muestra la figura 17, el cuello del peritecio, presentó una forma delgada, de coloración negra, en la mayoría de los casos se encontraba erecto, de 500 a 1750 μm de largo.

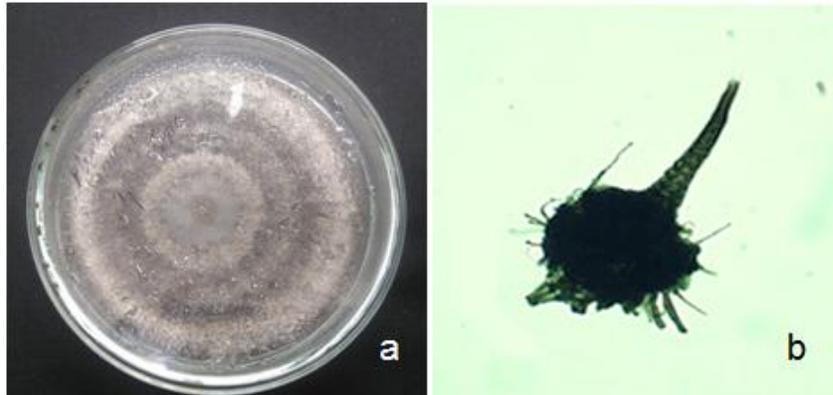


Figura 17: Fotografía 17a izquierda muestra una placa de PDA con crecimiento de micelio de coloración blanquecina, a su derecha la fotografía 17 b muestra un peritecio visto en un microscopio óptico en el objetivo 40X.

Las características de las colonias y de las estructuras de reproducción asexual coincidieron con las descripciones de ***Ceratocystis sp.*** Según las claves dicotómicas reportadas según Hunt 1969 y Upadhyay 1981.

4.3.5 Aislamiento 05

El cultivo del hongo se realizó a partir de un trozo del cuerpo fructífero que se encontró bajo y sobre la corteza de la muestra.

Descripción macroscópica

Al cabo de una semana el envés mostró crecimiento irregular del micelio de coloración blanquecina, que al cabo de una semana se tornó de coloración amarilla cremosa, el revés mostró una tonalidad amarilla cremosa uniforme.

Descripción microscópica

Posee clamp conection o conexiones en hebilla, como muestra la figura 17. Con esporas de forma cilíndrica con bordes suaves, de un tamaño que varía entre 5.0-7.0 x 2-2,5 μm . Sin presencia de cistidios.

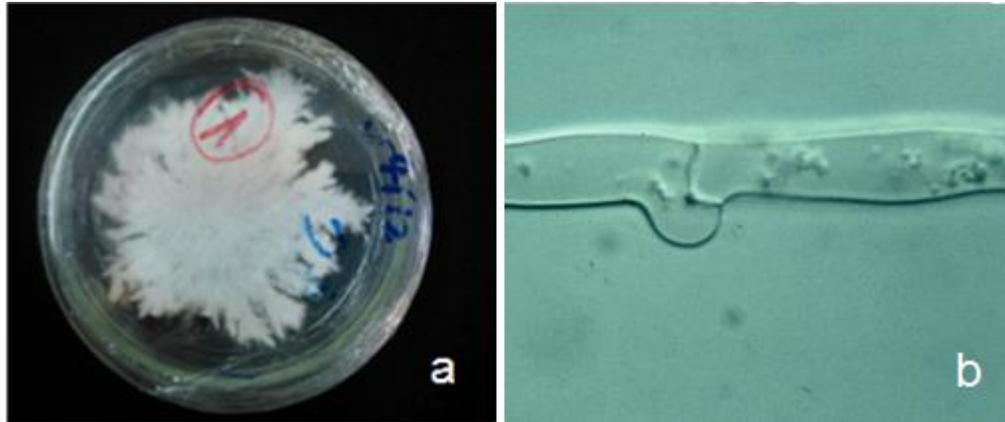


Figura 18. Fotografía izquierda 18a muestra una placa de PDA con crecimiento de micelio de coloración blanquecina irregular, a su derecha una fotografía 18b muestra conexiones en hebilla vistas en un microscopio con el objetivo 100X.

Las características de las colonias y de las estructuras coincidieron con las descripciones de *Schizophyllum sp.* Según las claves dicotómicas reportadas según Seaver 1951, Guzmán 1970, Moser 1978.

4.4 Discusión

En la presente investigación se realizó una búsqueda bibliográfica acerca de los principales patógenos causantes de las enfermedades en madera de pino insigne en Chile. Encontrando a 8 patógenos de importancia, *Sphaeropsis sapinea* (*Diplodia pinea*), *Trametes versicolor*, *Ceratocystis pilífera*, *Fusarium circinatum*, *Neonectria fuckeliana*, *Laetiporus sulphureus*, *Macrophomina phaseolina* y *Schizophyllum commune*.

Posteriormente se realizó la búsqueda de estos patógenos en muestras de madera de Pino Insigne, mediante técnicas microbiológicas, donde se describieron e identificaron morfológicamente 5 cepas, pertenecientes a los géneros; *Ceratocystis*, *Trametes*, *Diplodia*, *Macrophomina* y *Schizophyllum*.

Las descripciones se llevaron a cabo gracias a claves dicotómicas y descripciones hechas en artículos científicos.

En el caso del aislamiento 01, se comparó los resultados con una descripción, según Santos G. Leyva-Mir et, al. 2015. Donde los microesclerocios observados en la base de los tallos de caña de azúcar presentaron forma irregular, color negro y la superficie lisa. Los microesclerocios fueron de forma esférica a irregular, negros, lisos y de 85-130 μm de diámetro. Los picnidios observados en la base de los tallos de caña de azúcar presentaron forma irregular, color negro y la superficie lisa. Los picnidios que se encontraron globosos, negros, de 165-260 μm y con ostiolo truncado. No existiendo diferencias significativas en los tamaños de las estructuras, por ende se condice y se reafirma la descripción morfológica desarrollada en la investigación para *Macrophomina*.

El valor de *Macrophomina phaseolina* a nivel fitopatológico se debe a que es el agente causal de enfermedades a más de 500 cultivos, encontrándose presente en cultivos económicamente importantes, como son las legumbres y en especial, en la soya, siendo una de las cinco enfermedades más importantes en esa especie, provocando enormes pérdidas económicas anuales en los principales países productores. Sin embargo se han reportado varias pérdidas en importantes especies

forestales como *Pinus sp.* Produciendo pudrición del tallo y raíz en bosques de coníferas, árboles frutales y malezas (Seymour, 1969).

En viveros de Florida, Estados Unidos, se reportaron pérdidas de 20 millones de plántulas de pino durante el año 1976 atribuidas a la pudrición carbonosa de la raíz (Seymour y Cordell 1979). Aunque *Macrophomina phaseolina* es mayormente una enfermedad de los pinos en viveros, se ha observado en asociación con otros hongos generando la mortalidad en plantaciones de pino ya maduras (Barnard y Gilly 1986).

En el caso del aislamiento 02, se comparó los resultados con una descripción, según Mattes. H, Col., 2010 al realizar un análisis microscópico de las fructificaciones y de los cortes transversales de acículas infectadas, observó picnidios oscuros y esporas hialinas, amarillentas, café oscuro, de pared gruesa, de forma ovoide. Con un tamaño medio de los picnidios que varió entre 250 a 300 μm y esporas con un tamaño medio de 18 x 30 μm . No existiendo diferencias significativas en los tamaños de las estructuras, por ende se condice y se reafirma la descripción morfológica desarrollada en la investigación para el Genero *Diplodia*.

Una especie de ese género es *Diplodia pinea*, que comúnmente se le conoce como un hongo saprófito, pero dependiendo algunos factores climáticos, puede convertirse en parásito y generar infecciones severas. Por eso su clasificación como un patógeno oportunista, esta especie aprovecha heridas o cicatrices, siendo la humedad su medio más favorable (SAG, 2009).

Esta enfermedad puede causar considerables daños en el caso de producirse infecciones sucesivas, ya que retrasa el crecimiento de los arboles. Con respecto a sus síntomas, hacen que sea fácil confundirlo con la enfermedad causada por *Fusarium circinatum* (FAO, 2008).

Los ataques a *Pinus radiata* son comunes, donde se puede desarrollar fácilmente, pudiendo generar la muerte de los individuos en aproximadamente 2 años. No obstante, en ensayos actuales, se demostró que las especies de *Pinus pinaster* y

Pinus nigra muestran una resistencia superior a esta enfermedad. (Martínez-Hilders. A & Laurentin. H, 2012).

En el caso del aislamiento 03, se comparó los resultados con una descripción, según la descripción que realizó Lloyd, L (1921). El himenio está formado por unos tubos cortos y blanquecinos que con la edad se hacen amarillentos o cremosos; los poros son al principio blancos, pequeños y redondeados, pero se hacen más angulosos al madurar. Las esporas son cilíndricas, ligeramente curvas, de 5.5-7 μm x 2 μm .

Una especie de este Género es *Trametes versicolor*, cuya importancia radica en su actividad enzimática, propia de los hongos descomponedores de madera, teniendo aplicaciones ecológicas e industriales, ya que su complejo enzimático especializado de peroxidasas, lacasas y celulasas, como la celobiosa deshidrogenasa (CDH), participa dentro del ciclo del carbono (Fernandes. C & Loguercio-Leite, M 2005).

Por otra parte, pueden causar grandes perjuicios a nivel económico en la industria maderera, ya que al alterar los componentes celulares cambian las propiedades físicas y químicas de la madera. Produciendo pérdidas de madera por no cumplir los requisitos establecidos en el mercado maderero, lo que finalmente conlleva a pérdidas económicas. (Wainwright. M, 1995).

En el caso del aislamiento 04, se comparó los resultados con una descripción, según Osorio. M 1985, El estado perfecto está representado por un peritecio desarrollado superficialmente en el medio de cultivo, excepcionalmente aparece levemente sumergido. La base del peritecio es globosa, de color negro, de 140 a 250 μm de diámetro.

El cuello del peritecio es delgado, de color negro, en general erecto salvo en algunos casos donde se presenta levemente curvado, de 600 a 1800 μm de largo, con un diámetro de 18 μm en su punta y de 18 a 32 μm en su base.

Al comparar las dos descripciones se observa que las estructuras descritas por Osorio son un 9% más grandes y esto se puede deber a el medio de cultivo utilizado. Ya que en su caso tanto para los aislamientos como para el manejo de cultivos puros se

utilizaron placas Petri que contenían Agar-Malta al 2,5%, en la proporción señalada por Hunt (1956).

En Chile, existen varios tipos de madera de uso común que sufren esta alteración, siendo la especie *Pinus radiata*, donde se manifiesta con mayor frecuencia e intensidad. En madera de especies autóctonas del país, se han realizado estudios para determinar los agentes manchadores (Butin 1968; Butin, Peredo 1968) en cambio en pino insigne no ha ocurrido tal cosa y los estudios realizados solo se han orientado fundamentalmente al control de la mancha, dejando de lado los aspectos relacionados con los agentes causales de la misma.

Sin embargo, investigaciones más modernas señalan que algunos hongos manchadores como el *Ceratocystis pilífera*, ocasionan cierto grado de degradación de la pared celular y por lo tanto cambios en las propiedades de resistencia de la madera (Encinas *et al.*, 1998). Es por eso que la madera con manchas está más propensa a sufrir posteriores ataques de pudrición.

En el caso del aislamiento 05, se comparó los resultados con una descripción, según la descripción realizada por Volk, T (2000), el *Schizophyllum commune* se identifica fácilmente por las branquias de su cuerpo fructífero en forma de abanico que mide entre 1 a 4.5 cm de ancho con una coloración gris blanquecino en su superficie. Las basidiosporas son $5,0-7,5 \times 2,3 \mu\text{m}$ y la presencia de conexiones en hebilla.

Schizophyllum commune es un hongo lignícola que forma cuerpos fructíferos coriáceos y delgados en forma de concha de hasta 5 cm de diámetro, blancos e hirsutos por encima y con un margen revoluto, irregularmente lobado, que esconde la cara inferior. A diferencia de la mayoría de setas, los cuerpos fructíferos se mantienen por un año entero. Se secan en condiciones de sequedad, pero se rehidratan si vuelve el tiempo húmedo (Institut d'Estudis Catalans, 2010) puede causar una rápida podredumbre en la madera. Siendo un hongo cosmopolita que puede afectar cualquier especie de árbol, preferentemente caducifolios, del bosque o de los cultivos por igual.

Como se muestra en la discusión, existieron 3 hongos de importancia descritos e bibliografías como patógenas recurrentes que no se encontraron ni identificaron

morfológicamente en las muestras de la empresa Arauco.SA. Estos corresponden a las especies *Laetiporus sulphureus* y *Neonectria fuckeliana* no se encontraron teniendo como hipótesis que:

1.- No existe presencia de esos hongos en las muestras recolectadas.

2.- No se utilizó el medio de cultivo necesario para su desarrollo, este punto es muy importante pues es la principal limitante de las técnicas microbiológicas actuales. Esto se puede solucionar realizando análisis moleculares para estos patógenos dado que de esta manera, no se requiere de condiciones de cultivo particulares o no se requiere del microorganismo vivo o viable para su detección.

El tercer hongo que no se aisló fue *Fusarium circinatum*, el cual desde 2002 la EPPO (Organización Europea para la Protección de las Plantas) lo considera un organismo de cuarentena, debido a su gran potencial de daño en caso de introducción en el territorio europeo. Este patógeno, originario de Norteamérica y se encuentra actualmente ampliamente distribuido por Latinoamérica.

A fines del año 2001 se detecta por primera vez en el país la presencia del hongo *Fusarium circinatum* en tres viveros de *Pinus radiata* de la Región del Bío-Bío. Debido al daño potencial que este hongo puede causar a las plantaciones comerciales forestales presentes en el país, el SAG a través de la resolución N° 1.742 de 2003 y sus modificaciones (resoluciones N° 1.424 de 2008, N° 4.310 de 2008 y N° 1.754 de 2011) declaró a esta plaga bajo control oficial para las especies y variedades de *Pinus* spp. y *Pseudotsuga* spp. y establecieron medidas fitosanitarias para los viveros positivos a la plaga. El estricto control del SAG ha evitado la dispersión de la plaga a plantaciones, circunscribiéndola a determinados viveros, en los cuales se aplica un riguroso control fitosanitario (SAG, 2011).

Al estar en estado cuarentenario, *Fusarium circinatum* tiene su cultivo y manipulación prohibida, según la ley Chilena a cargo del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). Debido a esta situación, si se cultivaba y aislaba esta cepa, habría que eliminarla, por ende la descripción morfológica no fue posible de realizar. Pero cabe destacar la

importancia de este fitopatógeno, como uno de los más importantes para el rubro forestal.

Existen muy pocos datos de las pérdidas económicas a causa de los hongos, pero algunas empresas forestales manejan valores estimados para algunas plagas. Como por ejemplo, el caso de *Neonectria fuckeliana*, se ha estimado que puede generar una pérdida de US\$4.228 por hectárea afectada (Lignum, 2014). Siendo necesario tomar medidas efectivas, como por ejemplo el desarrollo de un protocolo microbiológico, para la identificación y control de patógenos que atacan la madera.

En materia de control de fitopatógenos, en los últimos años, la investigación de controladores biológicos en hongos manchadores se orientó a la utilización de cepas albinas de *Ophiostoma* spp., donde se desarrolló un producto comercial, denominado *Cartapip TM*. Este producto hecho a base de una cepa albina de *O. piliferum*, es capaz de prevenir las pérdidas ocasionadas por los hongos manchadores, además de mejorar la eficiencia del proceso de pulpaje en *P. taeda* y *P. virginiana* (Farrell, Col. 1993). Estos resultados, generaron el interés de investigadores en Nueva Zelanda y Chile por utilizar cepas albinas nativas de *Ophiostoma* spp., para la aplicación en *P. radiata* (Blanchette. Col, 2000). Los estudios realizados en Chile arrojaron que las cepas albinas de *O. piliferum* alcanzaron protección de al menos 70% durante ocho semanas, en piezas de madera aserrada mantenidas a la intemperie (Navarrete, 2008). Estos primeros resultados indican el potencial de uso del Control Biológico del manchado de madera mediante aislamientos albinos de *Ophiostoma*.

La complicación que tuvo la búsqueda de fitopatógenos forestales fue tener muestras limitadas de madera de pino insigne. Por ende el desarrollo de cámaras húmedas fue indispensable para el crecimiento de los microorganismos presentes en la madera, pero a su vez, al cabo de unas tres semanas, las muestras mostraban tal deterioro y contaminación de diferentes hongos que era imposible seguir buscando más hongos, ya que al momento de cultivar, era común el desarrollo de más de un microorganismo, obteniendo cultivos impuros.

El análisis dicotómico tiene un grado de inexactitud a la hora de realizar la descripción debido a diversos factores, con la posibilidad de confundirse con otra clase de hongo (Hernansaez, 1971).

Al comparar la tabla de fitopatógenos más importantes en Chile y los patógenos aislados en la investigación, se da cuenta de la relevancia que tiene la realización de la identificación morfológica, donde se aislaron 5 de un total de 8 patógenos de importancia económica en Chile. Lo que afirma la presencia de estos hongos en el país. Además, de la investigación posee implicancias prácticas, por ejemplo el desarrollo de un protocolo microbiológico para la identificación de hongos degradadores de la madera.

El protocolo microbiológico consta de 6 pasos, los cuales son: La recopilación del material biológico, preparación de muestras, utilización de cámaras húmedas, cultivo de hongos de interés, luego el aislamiento monospórico de los hongos para la posterior identificación morfológica en base a claves dicotómicas.

La detección estimula el uso de fungicidas, por ende es beneficioso desarrollar un tratamiento ojalá biológico para disminuir o evitar la aparición de patógenos y de esa forma limitar el uso de químicos contaminantes.

Para poder desarrollar un protocolo de identificación para las empresas forestales, es necesario contar con un método de toma de muestras rápido y eficiente, obteniendo resultados representativos con respecto al tamaño de los troncos de madera acerrada. Es posible realizar muestreo aleatorio simple, con los métodos utilizados en Ecología, ocupando herramientas estadísticas para darle peso a la selección de muestras a analizar. Es posible, además de utilizar los trozos de madera acerrada como muestras, realizar toma de muestras a partir de viruta o aserrín, lo que proporcionaría un método más rápido para seleccionar las muestras, utilizando el material sobrante en las cuchillas y cepillos de los aserraderos.

Tal como se pretende utilizar el protocolo microbiológico para identificar hongos degradadores de madera de *Pinus radiata*, también es posible ocuparlo para identificar hongos degradadores de la madera de otras especies forestales, como por

ejemplo otras especies del Genero Pinus o incluso del Genero Eucaliptus, que también son de importancia para el rubro forestal Chileno.

El protocolo de identificación de hongos degradadores de Pino Insigne, nombrado anteriormente podría ser utilizado no solo para hongos descritos, sino que también en nuevas especies, utilizando técnicas moleculares, como por ejemplo la técnica Metagenoma, que es el estudio del material genético, que es recuperado directamente de muestras ambientales (De la Puente, R. 2013), la cual permite la amplificación de todo el material genético presente en las muestra, con el fin de realizar un Blaster con la información de las secuencias amplificadas y compararlas con la que se encuentra en el Genbank. De esa forma, si existen secuencias amplificadas que no se logran identificar, se puede afirmar que se está en presencia de una especie desconocida. Pero esta investigación tiene como fin poder utilizar partidores específicos de los hongos degradadores, es por eso que se requiere saber con exactitud los patógenos que se buscan en la madera, de lo contrario la identificación tomaría mucho tiempo.

CAPITULO V

Conclusión

A partir de bibliografía consultada se puede concluir que son 8 los principales patógenos en la madera de Pino Insigne presentes en Chile, que causan importantes daños y pérdidas económicas en la industria forestal.

Se aislaron e identificaron morfológicamente 5 hongos degradadores de la madera de Pino Insigne, pertenecientes al género *Ceratocystis* sp., *Trametes* sp, *Diplodia* sp, *Macrophomina* sp y *Schizophyllum* sp.

El protocolo utilizado en la identificación morfológica de patógenos forestales de Pino Insigne, tuvo resultados satisfactorios, donde destaca el uso de medios de cultivo, cámaras húmedas, uso de claves dicotómicas etc.

Un producto obtenido en la investigación es la implementación de un protocolo microbiológico para la identificación morfológica de 5 hongos degradadores de la madera de Pino Insigne.

Es posible utilizar este protocolo para otras especies forestales como por ejemplo, otros especies de del Genero *Pinus* o incluso en el Género *Eucaliptus*, que son de importancia para las forestales.

Estos resultados son muy preliminares como para elevar estándares comerciales en el area forestal, pero son un primer paso para la implementación de un protocolo para la identificación molecular de patógenos forestales, ya que estos hongos pueden ser utilizados como control positivo en una eventual identificación mediante partidores específicos.

Siendo necesario realizar el diseño de los partidores, posteriormente, la extracción de ADN a cada hongo encontrado. Posteriormente se deben hacer ensayos con madera comercial, estableciendo un método eficaz de muestreo, con el fin de minimizar el error al momento de realizar los análisis a la madera. De esa forma se podrá obtener un método para una detección temprana de patógenos forestales,

favoreciendo la toma de medidas efectivas y agiliza así, los procesos de control antes de que el desarrollo infectivo sea irreversible.

Generando eventualmente, la disminución en la utilización de pesticidas e impregnantes y generando beneficios económicos para la empresa, además de la reducción de contaminantes liberados al ambiente.

Recomendaciones

- Es indispensable la utilización de técnicas de conservación luego de los aislamientos de hongos.
- Realizar el sembrado de hongos en diferentes medios de cultivo, con el fin de ver el comportamiento de las estructuras frente al cambio de alimentación.
- Resaltar la importancia de la técnica de hacer cámaras húmedas a la hora de cultivar hongos en madera de Pino Insigne

Referencias

- 1.- Aegerter, B & Gordon, T (2006). Rates of pitch canker induced seedling mortality among *Pinus radiata* families varying in levels of genetic resistance to *Gibberella circinata* (anamorph *Fusarium circinatum*). *Forest Ecology and Management* 235: 14-17 p
- 2.- Ainsworth, C (1976). *Introduction to the History of Mycology*, Cambridge, 132 p
- 3.- Amffal (2015). *Control y Aplicación de Pesticidas. Manejo de reglamentación de control y aplicación de pesticidas con certificación ISO 14001.*
- 4.- Agrupación de Ingenieros Forestales por el bosque nativo (2008). *Informe de Monitoreo Forestal. Valdivia, Chile. Agosto de 2008. 8-9 p*
- 5.- Aguilar, A. Lanfranco, M (1988). Aspectos biológicos y sintomatológicos de *Sirex Noctilio Fabricius* (Hymenoptera-Siricidae): Una revisión. *Bosque (Valdivia)*. 1988, vol.9, no.2 citado en Diciembre 2015. 87-91 p
- 6.- Akhtar, M. Blanchette, R. Kent, T (1997). *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology, "Fungal Delignification and Biomechanical Pulping of wood"*. Vol. 57: 159-195 p
- 7.- Araya, J (2003). Efectos de la actividad forestal en la población indígena mapuche. *Observatorio Latinoamericano de conflictos ambientales*. Consultado en Diciembre 2015. <http://www.olca.cl/oca/chile/plantacion.pdf>
- 8.- Blanchette. R et, al. (2000). Development of a successful program for biological control of blue stain in wood products. *Maderas: Ciencia y Tecnología* 2(2):130-139.
- 9.- Barba, C (1961). Tesis: Estudio Morfológico y pruebas de patogenicidad de varias cepas de *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA Centro Tropical de Investigación Y Enseñanza para Graduados Turrialba, Costa Rica.
- 10.- Barnard, E & Gilly, S (1986). Charcoal root rot of pines. *Plant Pathology Circular* N° 290.

- 11.- Barreiro, S & Hirsch, T (2011). Protección de la madera. Facultad de Arquitectura, Diseño y Urbanismo. Universidad de la República, Montevideo. Uruguay. 38-40 p
- 12.- Butin, H. Peredo, H. (1968). Mancha en madera de especies chilenas y sus agentes. Valdivia, Universidad Austral de Chile. Facultad de Ingeniería Forestal. Publicación Científica N° 9. 8 p.
- 13.- Butin, H., Zycha, H. (1973). Forstpathologie: fuer Studium und Praxis. Stuttgart, Germany, Thieme. 177 p.
- 14.- Campbell N. *et al.* (2001). Biología, conceptos y relaciones. Edición Prentice Hall. 302-304 p.
- 15.- Cañedo, V & Ames, T.(2004). Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Lima, Perú; Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú, 62 p
- 16.- Castellanos, G *et al.* (2016). *Macrophomina phaseolina*, Manejo del hongo en el laboratorio. Fitopatología del frijol. Centro internacional de agricultura tropical CIAT. 3 p
- 17.- Carabajal. M (2014). Degradación de compuestos fenólicos por el hongo causante de pudrición blanca *Trametes versicolor*. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 10 p
- 18.- Cardona. J *et al* (2013). Cámara de Ambiente Controlado para la Supervivencia de Plantas e Insectos. Facultad de Ingeniería Eléctrica y Electrónica. 53 p
- 19.- Crous P. *et al.* (2006). Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Stud Mycol.* Edition 55. 35-53 p
- 20.- Contesse, D. (1986). Apuntes y consideraciones para la historia del pino radiata en Chile. 351-372 p.

- 21.- CORMA. (2003). Centro de transferencia tecnológica de pino Radiata. Compendio de directrices para la enseñanza de la ingeniería. Proyecto Corfo-Fontec. 12 p.
- 22.- CORMA. (2014). Corma proyecta exportaciones forestales por US\$5500 millones para el 2015 .Consultado en Enero de 2016 <http://www.corma.cl/corma-al-dia/comunicados/corma-proyecta-exportaciones-forestales-por-us-5-550-millones-para-el-2015>
- 23.- CORMA. (2015). Empresas y perfil del sector. Consultado en internet en Diciembre de 2015, <http://www.corma.cl/perfil-del-sector/empresas>.
- 24.- Cuesta, J. (2013). Ecología y hábitat de los hongos. Hongos saprófitos. Asociación Micológica El Rayo. Recuperado en Octubre de 2016 en http://www.amanitacesarea.com/guia_ecologia2.html
- 25.- Dajoz, R. (2001). Entomología Forestal. Los insectos y el bosque. Madrid-Barcelona México. Ediciones Mundi-Prensa. 548 p
- 26.- De la Puente, R. (2013). Metagenómica. Esa valiosa desconocida Journal of Feelsynapsis (JoF). ISSN 2254-3651. 60-65 p
- 27.- Deacon. J (2002). Modern Mycology 3 ed, Blackwell Science
- 28.- Desk Api Cuneo Chile. (2007). Estudio de mercado industria forestal en Chile "Recurso forestal". 4-15 p.
- 29.- Días, R. (2008). Importancia de los hongos degradadores de la madera. Consultado el Noviembre de 2015. <http://blog.reforestamosmexico.org/?p=874>
- 30.- Eaton, R & Hale, M (1993). Wood. Decay, Pests and Protection. Chapman Hall, London. 546 p.
- 31.- FAO (2006). Manual de campo. Plagas y enfermedades de eucaliptus y pinos en el Uruguay. Ministerio de ganadería y pesca. 43-45 p
- 32.- FAO (2008). Manual de Plagas y Enfermedades del Bosque Nativo en Chile, Enfermedades. 179-191 p

- 33.- Farrell. R et, al. (1993). CartapipTM: a biopulping product for control of pitch and resin acid problems in pulp mills. *Journal of Biotechnology* 30:115-122 p
- 34.- Fernandes. C & Loguercio-Leite. M (2005). In vitro wood decay of *Eucalyptus grandis* by the basidiomycete fungus *Phellinus flavomarginatus* *International Biodeterioration and Biodegradation*. 187-193 p
- 35.- Findlay. W (1967). *Timber pests and Diseases*. Pergamon Press. 1º Edición. London, England. 280 p.
- 36.- French, R. & Hebert. T (1982). *Métodos de investigación fitopatológica*. Primera edición. Serie de libros y material educativo. No. 43, 290 p.
- 37.- Fungipedia. (2014). *Catálogo de cetas y hongos: Trametes versicolor*. Asociación micológica fungipedia <http://www.fungipedia.org/hongos/trametes-versicolor.html>
- 38.- Fungipedia. (2010). *Schizophyllum commune*. Asociación micológica fungipedia <http://www.fungipedia.org/hongos/schizophyllum-commune.html>
- 39.- Gacitúa A et, al (2009). Efecto de la densidad de inóculo y humedad del suelo en la incidencia de la pudrición carbonosa de la raíz (*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.) En plántulas de *Pinus radiata* D. Don. Centro de Biotecnología. Laboratorio de Patología Forestal, Universidad de Concepción. 1-11 p
- 40.- Garay M, R, & Henríquez A, M. (2012) Tratamiento químico de acetilación en madera de *Pinus radiata*. *Maderas. Ciencia y tecnología*, 14(1), 103-113 p.
- 41.- Hibbett, D. et, al. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111: 509–547 p
- 42.- Hortanswers (2014). *Fungal Disease, Diplodia Tip Blight & Canker Diplodia pinea (Sphaeropsis sapinea)*. University of Illinois Extension. Recuperado en Octubre de 2016 <http://extension.illinois.edu/hortanswers/detailproblem.cfm?PathogenID=48>
- 43.- Hunt, H. (1956) *Taxonomy of the genus Ceratocystis*. *Lloydia* 19. 58 p.

- 44.- Iturrutxa, E. (2001). Evaluación del estado de las masas forestales de *Pinus radiata* en las provincias de Bizkaia y Araba. Informe técnico del Proyecto de Sanidad Forestal 2001. Neiker-Tecnalia. Vitoria. Gobierno Vasco 199 p.
- 45.- Iturrutxa, E & Ganley, (2007). Dispersión por vía aérea de esporas de *Diplodia pinea* en tres localidades de la cornisa cantábrica. *Boletín Sanidad Vegetal y Plagas* 33: 383- 390 p.
- 46.- INFOR. (2014). Catastro de la Industria Forestal. Base de datos del área de información forestal y análisis económico. Sede Metropolitana, Instituto Forestal Chile. 3-4 p.
- 47.- INTA. (2011). Hongos patógenos de Pinos en la Patagonia y su asociación con plagas entomológicas. Cuadernillo nº 12, 4 p.
- 48.- Islam, M. et, al. (2008). Comparative Study Between Full Cell and Passive Impregnation Method of Wood Preservation for Laser Incised Douglas fir lumber. *Wood Sci Technol.* 42(4): 343-350 p.
- 49.- Juárez, E. (1995). La Madera en arqueología. Facultad de antropología. Universidad Veracruzana. 54-61 p
- 50.- Kending, R. et, al. (2000). Effect of irrigation and soil water stress on densities of *Macrophomina phaseolina* in soil and roots of two soybean cultivars. *Plan Dis.* 84: 895-900 p
- 51.- Leyva-Mir, G et, al. (2015). Caracterización morfológica y molecular de aislados de *Macrophomina phaseolina* asociados a caña de azúcar en México. *Revista argentina de microbiología*, 47(2), 143-147.
- 52.- Lignum (2014). Plagas forestales: Controladas, pero al acecho. Revisada en Diciembre 2015. <http://www.lignum.cl/reportajes/plagas-forestales-controladas-pero-al-acecho/>
- 53.- Lloyd, L (1921). *Trametes versicolor*, *Mycological Notes*, no. 65: 1045

- 54.- Luley. C (2006). Identificación del tipo de pudrición de la madera y hongos xilófagos en árboles urbanos, Arborist news. Recuperado en Octubre de 2016 de <http://www.isahispana.com/treecare/articles/decay-fungi.aspx>
- 55.- Madan R. et, al.(2002) Use of fatty acids for identification of AM fungi and estimation of the biomass of AM spores in soil. Soil Biol Biochem 34: 125-128 p
- 56.- Martínez-Hilders, A & Laurentin, H. (2012). Caracterización fenotípica y molecular de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. proveniente de la zona de producción de ajonjolí en Venezuela. *Bioagro*, 24(3), 187-196 p
- 57.- Mayorga, S. et, al. (2000). Escarabajos de corteza y mancha azul: Situación en Chile. Instituto de Silvicultura, Facultad de Ciencias Forestales Universidad Austral de Chile.
- 58.- Maderas Aguirre, (2016). Ficha técnica de la especie: Pino Insignis. Explotación forestal, aserradero, almacén y tratamientos de la madera. Recuperado de internet en Octubre de 2016 http://www.maderasaguirre.com/materia_prima/pino_insignis.html
- 59.- Mc-Manus, E. Schuffer, C. (2008). “La Ulexita y sus derivados como alternativa al CCA para la impregnación del Pino Radiata”. Seminario Impregnación de Pino Radiata en Chile, CORMA. 9-10 p.
- 60.- Micoroda. (2015). *Schizophyllum commune*, Hongo común. Catálogo, Asociación micológica de la Roda. Recuperado en octubre de 2016 <http://www.micoroda.es/catalogo/schizophyllum-commune>
- 61.- Moore, B & Allard, G (2003). Los impactos del cambio climático en la Sanidad Forestal. Documento de trabajo sobre sanidad forestal y bioseguridad forestal, FAO. 14 p
- 62.- Muñoz, C et, al. (2003). Sanidad forestal. Guía en imágenes de plagas, enfermedades y otros agentes presentes en los montes. Madrid. Mundi-Prensa. 575 p.

- 63.- Navarrete J, *et al.* (2008). Control biológico de la mancha azul en madera aserrada de *Pinus radiata* D. Don. Americas Regional Meeting, Playa Flamingo, Guanacaste.
- 64.- Olmos. A *et al.* (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de enfermedades infecciosas y microbiología Clínica 15-17 p
- 65.- Osmose. (2015). Madera tratada con CCA. Información de seguridad para el consumidor. <http://www.osmose.cl/cca/>
- 66.- Osorio, M (1985). *Ceratocystis pilifera*, Hongo causante de la mancha azul en la madera de *Pinus radiata*. Bosque 6 (2): 116-119 p
- 67.- Peterson, W. (1981). Diplodia blight of pines. Phytopathology 67 (1): 511-514p
- 68.- Pfenning, L & Abreu, L. (2000). Hongos del suelo saprófitos y patógenos de plantas 73-84
- 69.- Peña de la Parra, A (2010). Determinación de la capacidad de dos cepas de hongos Basidiomycota para degradar celulosa en chips de pinus radiata. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias, Escuela de Ciencias. 14 p
- 70.- Quarmby, A. (2001). DRRG Pub. Dry Rot Research Group. University of Alberta and Dundee. Scotland. 145 p.
- 71.- Rey, A. & Riesco, G. (2012). Influencia del azulado (mancha azul) en la densidad y estabilidad dimensional de la madera de *Pinus sylvestris*. *Maderas. Ciencia y tecnología*, 14(1), 115-125 p
- 72.- Robles F. & Echenique R. (1983). Estructuras de Madera. Edición. Limusa Mexico, 12 p
- 73.- SAG. (2003). Desarrollo de planes de emergencia o contingencia para el control y erradicación de plagas cuarentenarias: IV Patrimonio Fitosanitario Nacional. Cuenta Pública 2001. Publicado el 6 Agosto, 2003. 12-26 p.

- 74.- SAG. (2011). Fusarium circinatum Recuperado en Octubre de 2016 de www.sag.gob.cl/ambitos-de-accion/fusarium-circinatum
- 75.- SAG. (2015). Inocuidad y biotecnología, plaguicidas y fertilizantes. Fiscalización. Servicio Agrícola y Ganadero, Chile. Recuperado el 10 de Febrero de 2016. <http://www.sag.cl/ambitos-de-accion/fiscalizacion/>
- 76.- SAG. (2016). ¿Por qué no se pueden ingresar algunos productos de origen animal y vegetal a Chile? Ingreso o salida de Chile. Recuperado el 20 de Octubre de 2016. <http://www.sag.cl/ambitos-de-accion/por-que-no-se-pueden-ingresar-algunos-productos-de-origen-animal-y-vegetal-chile>
- 77.- Sanfuentes E. (2009). Epidemiología del daño foliar del pino (DFP) y ciclo biológico de P. pinifolia: Bases para una estrategia de control integrado. Laboratorio de Patología forestal, Publicado el 2009. 13-14 p
- 78.- Seymour, C. (1969). Charcoal rot of nursery-grown pines in Florida. *Phytopathology*, 59(1): 89-92
- 79.- Seymour, C & Cordell, C (1979). Control of charcoal root rot with methyl bromide in forest nurseries. *So, Jour, Appl, For*, 3: 104-108.
- 80.- Shaner, G et, al. (1999). Charcoal rot of soybeans. Department of Botany and Plant Pathology. Purdue University. W. Lafayette. Recuperado en Octubre de 2016 de <http://www.agr.com.purdue.edu/Agcom/Pubs/menu.htm>
- 81.- Swart, W. et, al. (1985). Sphaeropsis sapinea, with special reference to its occurrence on Pinus spp. in South Africa. *South African Forestry Journal* 135: 1-8 p
- 82.- Upadhyay, H (1981). A monograph of Ceratocystis and Ceratocystiopsis. Georgia, University of Georgia Press. 176 p.
- 83.- Volk, T. (2000). Schizophyllum commune, the split gill fungus, perhaps the world's most widespread fungus. Recuperado en Octubre de 2016 de http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/feb2000.html

84.- Wainwright. M, (1995). Introducción a la biotecnología de hongos Editorial Acribia.

85.- Wilcox, W. (1978) Review of the literature on the effects of early stages of decay on wood strength. Wood and Fiber 9:252–257 p

86.- Wood export Chile. (2015). Mancha azul. Pacific forest. recuperado en Noviembre de 2016 de <http://woodexportchile.com/es/caracteristicas-madera/mancha-azul/>

87.- Wottitz, C, & Moreno, G. (2011). Fijación química del preservante CCA-C en la madera de Pinus elliottii Parte 1: Influencia de la temperatura y de la humedad relativa. Maderas. Ciencia y tecnología, 13(1), 85-103 p