



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas -Programa de Doctorado en Ciencias
Biológicas, Área Botánica

**Hongos asociados a escarabajos lignícolas en bosque de
Nothofagus: su aplicación en control biológico de
Ophiostoma y en spalting**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, Área Botánica

**FELIPE ALBERTO GALLEGUILLOS GUAJARDO
CONCEPCIÓN-CHILE**

2016

Profesor Guía: Gotz Palfner
Dpto. de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

Hongos asociados a escarabajos lignícolas en bosque de *Nothofagus*: su aplicación en control biológico de *Ophiostoma* y en spalting

Comisión Evaluadora:

Götz Palfner (Profesor guía)

Dr. Recursos Naturales (Dr. rer. nat.)

Víctor Hernández Santander (Profesor co-guía)

Dr. en Ciencias Ambientales

Viviane Jerez (Comisión evaluación)

Dra. en Ciencias Biológicas mención Zoología

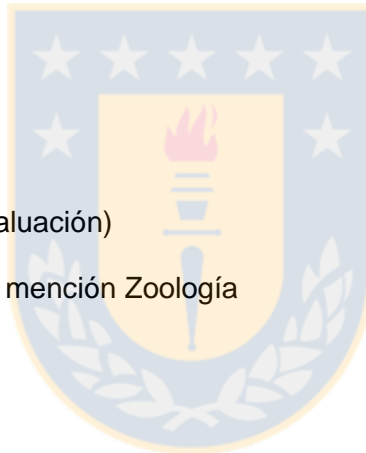
Jeff Garnas (Comisión evaluación)

Dr. Ecology and Evolution,

Director de Postgrado:

Víctor Hernández Santander

Dr. en Ciencias Ambientales



Agradecimientos

A mi madre, por todo lo realmente importante y que no es cuantificable....

- A mi profesor guía, Dr. Götz Palfner, por permitirme utilizar el Laboratorio de Micología y Micorrizas y tener siempre buena disposición para la interacción.
- Al Laboratorio de Productos Naturales y especialmente al Dr. Víctor Hernández que siempre fue un soporte y apoyo en todo el período de tesis.
- A la Dra. Viviane Jerez y todo su apoyo para la finalización de este trabajo.
- Al Dr. Jeff Garnas por recibirme en su laboratorio del Forestry Agriculture and Biotechnology Institute (FABI) y por toda la enseñanza recibida en este período.
- A la Dra. Sara Robinson de Oregon University por su apoyo en la elaboración del trabajo y en las asesorías en spalting.
- Al Dr. Jose Navarrete del Departamento de Ciencias y Tecnología de la Madera de la Universidad del BioBio, por la facilitación de una cepa manchadora de madera.
- A CONAF, Proyecto Bosque Nativo 065/2012 por fondos y apoyo logístico que permitió la toma de muestras en la Reserva Altos de Lircay.
- Al soporte recibido de la beca MECESUP.
- A todos los encarnados y desencarnados que apoyaron y motivaron el trabajo.

TABLA DE CONTENIDOS	Página
Resumen	vi
Capítulo I. Marco Teórico - Mini-Revisión: Control de hongos manchadores de madera del orden Ophiostomatales en coníferas	1
Resumen.....	2
1.1 La madera y sus amenazas biológicas	3
1.2 Hongos manchadores del orden Ophiostomatales	4
1.3 Manchado de madera causado por hongos	6
1.4 Productos químicos aplicados al control de hongos manchadores de madera.....	7
1.5 Control biológico de hongos manchadores de madera	8
1.6 Avances moleculares aplicados a hongos manchadores	9
1.7 Conclusiones	12
1.8 Bibliografía.....	15
2 Hipótesis	22
3 Objetivo General.....	22
4 Objetivos específicos.....	22
 CAPITULO II. Hongos asociados a coleópteros lignícolas en el bosque Maulino subandino	 23
Resumen.....	24
2.1 Introducción.....	26
2.2 Metodología.....	28
2.3 Resultados.....	30
2.4 Discusión.....	36
2.5 Bibliografía	40
 CAPÍTULO III. Hongos aislados de insectos lignícolas: fuente de organismos para el control biológico del manchado de madera producido por <i>Ophiostoma</i> sp	 47
Resumen.....	48
3.1 Introducción.....	49
3.2 Metodología.....	51
3.3 Resultados.....	53

3.4 Discusión.....	59
3.5 Bibliografía.....	62
CAPÍTULO IV. Potential use of native fungi for value-added spalting in Chile.....	67
Abstract.....	68
4.1 Introduction.....	69
4.2 Methods.....	72
4.3 Results.....	75
4.4 Discussion.....	78
4.5 Bibliography.....	81
CAPÍTULO V. Discusión General.....	86
CAPÍTULO VI. Anexos.....	90

Lista de Figuras

Figura 1. Cap 1. Crecimiento de hongos manchadores en madera de coníferas.....	4
Figura 2 Cap 1. Crecimiento de hongo manchador en galerías de escarabajo de corteza...6	
Figura 1. Cap 2. <i>Oligocara intermedia</i> (Tenebrionidae) y su galería recolectados en <i>Nothofagus obliqua</i>	30
Figura 2. Cap 2. Algunos hongos seleccionados para la identificación molecular según su en placas morfología.....	32
Figura 3. Cap 2. Número de especies de los principales grupos fúngicos asociados a los exoesqueletos y sus galerías.....	35
Figura 1. Cap 3. Ensayos de confrontación en placas con las cepas seleccionadas A. <i>Trichoderma samuelsii</i> B. <i>Trichoderma album</i> C. <i>Trichoderma viride</i> D. <i>Arthrinium</i> sp. El hongo manchador fue inoculado al lado izquierdo. Los ensayos se realizaron en duplicado.....	54
Figura 2. Cap 3. Caracterización morfológica del hongo <i>Trichoderma álbum</i> y la especie de <i>Ophiostoma</i> sp. a/b: Cultivo, Hifas y conidióforos de <i>Trichoderma album</i> . c/d: Cultivo y Conidios de <i>Ophiostoma</i> sp.....	54
Figura 3. Cap 3. Resultados del manchado externo en las pruebas de inoculación en <i>Pinus radiata</i>	56
Figura 4. Cap 3. Experimento de inoculación con micelio y extractos sobre la actividad del hongo manchador en madera de <i>Pinus radiata</i>	58

Figure 1. Cap 4. Coloration produced on *Pinus radiata* and *Nothofagus obliqua*. A: zone lines caused by the mix of fungi *Trametes versicolor*, *Ophiostoma* sp. and *Phialocephala* sp. on *Nothofagus obliqua* B: Blue stain caused by *Ophiostoma* sp on *Pinus radiata*. C: coloration produced on *Nothofagus obliqua* with the mix of strains *Ophiostoma* sp, *Eurotium* sp. and *Phialocephala* sp.....76

Figure 2. Cap 4. Coloration produced on *Pinus radiata*. A and B: External and internal coloration achieved by *Eurotium* sp.....77

Figure 3. Cap 4. Colonization and growth of fungal structures after mixed cultures of *Ophiostoma* sp, *Eurotium* sp. and *Phialocephala* sp. were applied on *Nothofagus obliqua*.77

Lista de Tablas

Tabla 1. Cap 1 Composición química y principales características de productos antimanchas.....13

Tabla 1. Cap 2 Especie arborea hospedera y número de especies fúngicas aisladas en insectos y galerías.....30

Tabla 2. Cap 2. Resultados de identificación BLASTn de hongos aislados de individuos de escarabajos lignícolas.....32

Tabla 3. Cap 2. Resultados de identificación BLASTn de hongos aislados de galerías de escarabajos lignícolas.....33

Tabla 1. Cap 3.Resultados de identificación BLASTn de los hongos seleccionados en las pruebas de antagonismo en placas.....55

Tabla 2. Cap 3. Experimentos de inoculación con micelio y extractos totales sobre probetas de madera de *Pinus radiata*. (a) antagonista (hongo y extracto) inoculado 15 días antes que manchador, (b) antagonista (hongo y extracto) inoculado al mismo tiempo que manchador (c) hongo manchador inoculado 15 días antes que antagonista (hongo y extracto). El valor final corresponde al promedio de coloración. El control positivo corresponde a la incubación del hongo manchador.....57

Table 1. Cap 4. Isolation source, host tree species and similarity (Blast) of the fungi used in the study. (*). Strain provided by Laboratory of Natural Products Chemistry from University of Concepción.....75

Table 2. Cap 4. Inoculation (monoculture and mixed culture) and incubation time on wood. P.s: *Phialocephala* sp., E.s: *Eurotium* sp., O.p: *Ophiostoma* sp., T.v: *Trametes versicolor*, B.a: *Bjerkandera adusta*.....77

RESUMEN

En los ecosistemas boscosos existen numerosos hongos que colonizan madera muerta de árboles nativos, en muchos casos asociados a coleópteros especializados que forman sus galerías en la albura. La identificación de hongos asociados a estos escarabajos es de especial importancia en Chile i) por el desconocimiento de este tipo de relaciones y ii) por el potencial uso para control biológico y otras aplicaciones.

De interés particular en este contexto son los Ascomicetes del orden Ophiostomatales, especies que provocan manchas en madera talada (manchado azul de madera). Estos hongos se alimentan de compuestos celulares simples, no involucrando los componentes estructurales de la madera como la celulosa y lignina, por lo tanto la madera no sufre daños estructurales, pero es considerado un problema estético, causando importantes pérdidas económicas en la industria maderera. Por esta razón, y sumado a los problemas que ocasionan los productos químicos usados para el control de estos hongos, es fundamental la búsqueda de métodos alternativos como el control biológico, siendo los ambientes boscosos nativos una posible fuente de hongos con propiedades antagonistas. Por otra parte, el fenómeno del manchado de madera se puede utilizar de forma provechosa para la coloración controlada de madera por medio de hongos, proceso recientemente conocido como "Spalting", agregando valor a los productos madereros que son considerados de calidad secundaria y sirviendo de materia prima para la industria maderera a pequeña escala como la mueblería y artesanía.

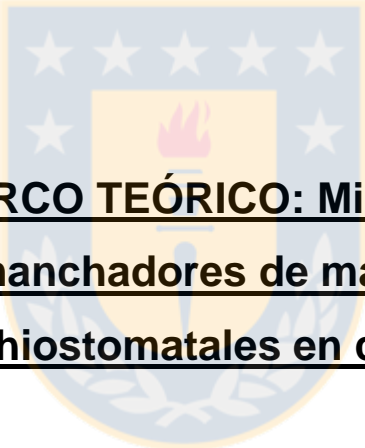
El proyecto consideró la identificación de hongos de las divisiones Ascomycota y Basidimycota asociados a coleópteros de madera en descomposición de las familias Tenebrionidae y Lucanidae y sus galerías en bosque nativo de *Nothofagus obliqua* y *Nothofagus dombeyi* (Mirb.) Oerst, de la Reserva Altos de Lircay, VII Región. Aparte de la identificación morfológica de los micelios cultivados, se realizó la identificación molecular por medio de PCR y secuenciación en base a la región correspondiente al espaciador interno transcrito (ITS) correspondiente al rDNA. Una vez identificados los hongos, se evaluó su potencial acción antagonista, tanto en forma de co-cultivo como mediante aplicación de extractos totales, siendo sometidos a pruebas de inhibición en placas y probetas de madera de *Pinus radiata* inoculada con una especie manchadora *Ophiostoma* sp. Como complemento, y con algunas de las especies ya caracterizadas y con capacidad de sintetizar pigmentos en cultivo sólido, se evaluó la capacidad de colorear madera, tanto de forma

externa como interna de *Pinus radiata* D. Don y *Nothofagus obliqua* bajo condiciones controladas de laboratorio.

Como resultado de la caracterización molecular y morfológica, las especies fúngicas fueron clasificados en los siguientes grupos i) basidiomicetos causantes de pudrición ii) Endófitos iii) Hypocreales iv) Mucorales y algunas especies sin similaridad molecular clara en las bases de datos disponibles. Dentro de los grupos de importancia como antagonistas en placas, se destacaron los hongos del orden Hypocreales, *Trichoderma*, con 3 representantes *T. samuelsii*, *T. viride*, *T. album* y el hongo endófito *Arthrimum* sp, los cuales fueron usados en las pruebas de antagonismo en probetas de madera. Los mejores resultados de inhibición se obtuvieron cuando se inoculó el hongo antagonista previo al hongo manchador, inhibiendo por completo el crecimiento del manchador. A diferencia de los ensayos de co-cultivo, los extractos totales también mostraron actividad antimancha máxima cuando fueron inoculados al mismo tiempo que el antagonista.

En las pruebas de coloración controlada de madera de *Pinus radiata* y *Nothofagus obliqua*, se seleccionaron los hongos causantes de blanqueamiento *Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta* y los hongos que presentaron pigmentos en placas: *Phialocephala* sp, *Eurotium* sp y *Ophiostoma* sp. En madera de *Pinus radiata* se obtuvo coloraciones negras, azules y rojas tanto de forma externa como interna, pero no blanqueamiento ni líneas de inhibición, mientras que en la madera nativa se obtuvo una dominancia de colores negros y azules, así como líneas de inhibición. El estudio contribuyó a la obtención de colores y diseños únicos en las maderas, permitiendo la futura agregación de valor a productos considerados como secundarios en la industria maderera.

Los resultados del proyecto contribuyeron a la caracterización de las comunidades de hongos asociados a coleópteros de madera en descomposición en bosque de *Nothofagus spp*, siendo un avance para el conocimiento de la diversidad de este grupo particular. A su vez, el estudio permitió la obtención de algunos hongos y extractos eficientes en el control del hongo manchador *Ophiostoma* sp, siendo la investigación base para la futura formulación de un producto biológico para la minimización de las pérdidas económicas causadas por hongos manchadores en la industria forestal. Por otro lado, el estudio permitió la obtención de una plataforma científica para la coloración de madera por medio de hongos 'spalting' pionera en el país, permitiendo futuras pruebas a mayor escala y su aplicación en la industria maderera.



CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO: Mini-Revisión: Control de
hongos manchadores de madera del orden
Ophiostomatales en coníferas

Resumen

La madera es susceptible a agentes biológicos que alteran su estética. En este contexto, el manchado azul de madera es considerado un importante problema para las empresas forestales y madereras. Este fenómeno es mayormente producido por hongos del orden Ophiostomatales, los cuales atacan principalmente a coníferas alrededor del mundo, causando importantes pérdidas económicas y ecológicas. En este documento se analizan las alternativas para el control de hongos manchadores, ya que tradicionalmente se han utilizado compuestos químicos que son tóxicos para el medioambiente. Por este motivo, se han testeado productos biológicos de baja toxicidad y fácil degradación natural, como hongos y bacterias. En este contexto, los avances en la biología molecular de hongos manchadores y sus principales antagonistas son clave en el entendimiento de las etapas de desarrollo y los mecanismos de síntesis de coloración. Estas nuevas investigaciones permitirán la creación de nuevas soluciones al manchado de madera.

Abstract

Wood is susceptible to agents that alter their aesthetic. In this context, wood stain is considered a problem for timber and wood-processing industry. This phenomenon is mostly produced by fungi of the order Ophiostomatales, mainly attacking conifers around the world causing considerable losses. This document analyze alternative forms to control sapstein. Traditionally, chemicals compounds toxic to the environment have been used. Therefore, alternative products more compatible with the environment are sought such as the biological control. In this context, advances in molecular biology of staining fungi and their main antagonists are important steps for understanding the developmental stages and mechanism of synthesis of color. This research will enable the creation of new solutions to the problem.

1.1 La madera y sus amenazas biológicas

La estructura de la madera de las gimnospermas está constituida por diferentes tipos de células, las traqueidas que conducen los líquidos verticalmente y son las encargadas del soporte mecánico, las células radiales que conducen líquidos horizontalmente y almacenan nutrientes, los radios parenquimáticos y las traqueidas radiales. A nivel bioquímico la madera está formada por celulosa, hemicelulosa, lignina y otros componentes. Las diferencias entre estos compuestos y sus proporciones dan lugar a los diferentes usos de madera (Schirp *et al.* 2003). Entre los principales usos de la madera se encuentran, la construcción, combustible y la producción de papel. A nivel mundial existe una demanda creciente, siendo EE.UU, Canadá, Brasil y Rusia, los principales países exportadores. (Corma.cl).

Formando parte importante de biomasa y necromasa en ecosistemas boscosos, la madera es susceptible a agentes biológicos que alteran su estructura, entre los más relevantes se encuentran los hongos causantes de pudrición, degradando la estructura de la madera (Son *et al.* 2010, Abdelkader y Hamed 2012) y los agentes que alteran su estética, como ocurre, principalmente con los Ascomicetos del orden Ophiostomatales. Estos últimos no degradan la celulosa ni la lignina de la pared celular, por lo tanto, no afectan las propiedades mecánicas de la madera (Schirp *et al.* 2003, Ruiz y Lanfranco 2008, Nkuekam *et al.* 2012). Sin embargo, el problema surge, porque el hongo en ciertas condiciones de humedad y temperatura expande rápidamente y la madera adquiere una coloración indeseada de la albura, con tonos que varían entre azul y negro (Figura 1), pasando a ser madera considerada de calidad secundaria, sufriendo una importante merma de su valor económico para las empresas forestales de coníferas. (Seifert 1993). Cabe destacar, además, que los mercados internacionales tienen normativas que impiden la entrada de estos productos por su potencial riesgo de contaminación (Lanfranco *et al.* 2004).

1.2 Hongos manchadores del orden Ophiostomatales

Las especies del orden Ophiostomatales tienen variados rasgos morfológicos y han sido encontrados en muchos ecosistemas (Wingfield *et al.* 1993, Wingfield *et al.* 1999, De Beer *et al.* 2003, Seifert *et al.* 2013). El grupo ha experimentado múltiples cambios en su clasificación. A modo general, la mayoría de especies sexuales de *Ophiostoma* spp forma peritecios oscuros con base bulbosa lisa y con cuellos largos que expulsan masas de ascosporas unicelulares, hialinas y pegajosas, adaptadas para la dispersión por insectos (Harrington 1987, Jacobs y Winfield 2001, Moreno *et al.* 2015).



Figura 1. Crecimiento de hongos manchadores en madera de coníferas. (elaboración propia)

De forma más actual y utilizando marcadores moleculares nucleares y ribosomales en muestras que representaron los grupos morfológicos representantes del género, se encontró que los hongos del orden Ophiostomatales se dividen en tres líneas monofiléticas bien soportadas, con sus estados sexuales, *Ophiostoma*, *Grosmania* y *Ceratocystiopsis* y sus estados asexuados, que incluyen: *Leptographium*, *Hyalorhinochlamydia*, *Pesotum* y *Sporothrix*. Con un gran número de especies (Zipfel *et al.* 2006), que junto con algunos hongos del género *Ceratocystis spp* (Macroascales), son considerados agentes causantes de manchado de madera en coníferas alrededor del mundo (Thwaites *et al.* 2005, Popa *et al.* 2012, Six y Wingfield 2011, Ploetz *et al.* 2013). Así como también, son causantes de otras importantes patologías, como el marchitamiento negro de raíces y el marchitamiento vascular del Ulmo (Schweigkofler *et al.* 2005, Díaz *et al.* 2013).

Los hongos Ophiostomatales atacan principalmente coníferas en decaimiento y son comúnmente transportados por Coleópteros, entre estos, los más estudiados han sido los escarabajos de corteza, los cuales dispersan el hongo en sus galerías (Figura 2) donde se desarrollan (Popa *et al.* 2012, Ploetz *et al.* 2013). Aunque también pueden ser dispersados por factores abióticos como viento y lluvia (Popa *et al.* 2012). Entre las principales características de estos hongos, se encuentra la producción de esporas adhesivas que permiten su dispersión por medio de la unión al exoesqueleto de los escarabajos. (Popa *et al.* 2012). En Chile existen aislamientos de *Ophiostoma spp* a partir de escarabajos de corteza introducidos (Scolytidos) y de madera de *Nothofagus spp* y *Pinus radiata* (Butin y Aguilar 1984, Osorio 1985, Zhou *et al.* 2004).



Figura 2. Crecimiento de hongo manchador en galerías de escarabajo de corteza (elaboración propia).

1.3 Manchado de madera causado por hongos

El manchado azul de madera es formado por el crecimiento de hongos que tienen hifas con paredes celulares oscuras, otorgando una coloración que varía entre azul y negro (Figura 1). El compuesto involucrado es la melanina, una molécula que se encuentra en un amplio rango de organismos, desde bacterias hasta humanos (Eisenman y Casadevall 2012). La melanina es formada por la polimerización oxidativa de compuestos fenólicos e indólicos. Entre las funciones biológicas, se conoce que confiere resistencia y protección ante agentes físicos adversos como la radiación ultravioleta, virulencia de patógenos y aumento en la turgencia de la hifa (Bell y Wheeler 1986, Langfelder *et al.* 2003, Eisenman y Casadevall 2012).

La biosíntesis de melanina por hongos, es producida por dos rutas metabólicas. La primera es por sustratos endógenos, vía 1,8-dihydroxynaphthalene (DHN), siendo la molécula precursora, el Acetil CoA o Malonil coA. El primer paso para la formación de 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene (1,3,6,8-THN) es catalizado por la enzima policetido sintasa (PKS). Las policetido sintasas pertenecen a una gran familia de enzimas que se encuentran genéticamente organizadas en operones (Schumann y Hertweck 2006), con funciones en la producción de diferentes metabolitos secundarios como: toxinas, antibióticos, pigmentos y moléculas de comunicación. Luego de una serie de reacciones de reducción, deshidratación y polimerización, se producen otros intermediarios, hasta formar la melanina. La segunda ruta metabólica, menos común de encontrar en hongos, es vía L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-dopa), la biosíntesis comienza con la molécula de L-dopa o tirosina (Eisenman y Casadevall 2012). A su vez, otras especies del complejo *Sporothrix spp* son capaces de sintetizar un compuesto coloreado llamado Pyomelanin, como resultado del catabolismo de la tirosina, encontrándose posiblemente involucrado en funciones de patogenicidad (Almeida *et al.* 2012). Estos compuestos coloreados se presentan como un importante problema en la industria maderera, siendo urgente investigar nuevos y mejores métodos de inhibición y control.

1.4 Productos químicos aplicados al control de hongos manchadores de madera.

En la industria maderera, el desarrollo de las manchas en la madera se encuentra asociado principalmente a la fase de postcosecha (principalmente en el acopio). Por lo tanto, es indispensable una buena gestión de los procesos (minimizar tiempos de la madera en terreno y asegurar una buena circulación de aire). Esta gestión no es simple a nivel industrial, siendo importante el uso de métodos alternativos para el control de los hongos.

En el control químico, generalmente se utilizan compuestos que son diluidos en agua, donde la madera a tratar es completamente sumergida por un período específico de tiempo establecido por el producto, proceso llamado como baño antimanchas. En este sentido, se han utilizado diferentes compuestos, entre los que se destacan, los compuestos fenólicos clorados como el Pentaclorofenol (PCP) y el Pentaclorofenato de sodio (PCP-Na). En Chile, estos compuestos se encuentran prohibidos desde el año 1999, por su alta toxicidad y impacto negativo en el medio ambiente (Lanfranco *et al.* 2004 VER). Además, la comunidad Europea y países con una amplia trayectoria forestal, como EE.UU y Nueva Zelanda también han prohibido su uso y comercialización (Unep 1995).

Posteriormente en nuestro país se utilizó el tribromofenol (2,4,6 TBP), compuesto clasificado como tóxico, no biodegradable en el medioambiente (Gutiérrez *et al.* 2002) y con efectos nocivos en animales. Siendo prohibido a nivel internacional desde el año 2005 (Montes *et al.* 2001). También se han investigado otras formulaciones alternativas, probando una batería de compuestos, pero con resultados menos efectivos que el Pentaclorofenato de sodio (Montes *et al.* 2001). También, en una simulación de un proceso de exportación de madera de *Pinus radiata*, se probaron 3 productos antimanchas, obteniendo el mejor resultado con el producto llamado Combo Antiblu (mezcla de antiblu 375 y Antiblu CC), aunque no inhibiendo por completo el desarrollo de hongos manchadores (Vives *et al.* 2004). En este sentido, la tendencia actual es el uso de productos alternativos, con la mezcla de diferentes compuestos en una formulación (Tabla 1), buscando disminuir la toxicidad y maximizar los rendimientos. Sin embargo, por su naturaleza química, estos compuestos continúan siendo tóxicos y peligrosos. Por esto, se hace indispensable la utilización de compuestos de menor toxicidad, siendo, el control biológico y los compuestos de origen vegetal una alternativa promisoría.

1.5 Control biológico de hongos manchadores de madera

Debido al impacto negativo causado por los productos químicos, se han investigado alternativas que disminuyan el impacto nocivo sobre el medioambiente y los trabajadores. Esto ha sido posible por la utilización de controladores biológicos (Lee y Oh 2000). El concepto de control biológico está basado en el uso de organismos antagonistas, esto significa, que reduzcan o inhiban la actividad de un organismo por medio de mecanismos biológicos (Gradinger *et al.* 2009). Existen intentos probando la actividad de hongos antagonistas a manchadores, como la especie *Phlebiopsis gigantea* (Behrendt *et al.* 2001). Pero las investigaciones han dado un énfasis especial en cepas albinas de *Ophiostoma piliferum* y *Ceratocystis resinífera*, productos comercialmente llamados como 'Cartapip-97' y 'Kasper' (Behrendt *et al.* 1994, Morin *et al.* 2005), con resultados de inhibición del crecimiento de hongos manchadores sobre 24 semanas con el producto Kasper. Esta inhibición se debe principalmente a su mecanismo de acción por competencia en la colonización del sustrato. En Chile se han investigado las variantes al crecimiento dimórfico (micelio-levadura) en cultivo líquido y el efecto en la permeabilidad de pino radiata de cepas albinas (Hernández *et al.* 2011; Berrocal *et al.* 2012).

Además, algunas cepas de hongos filamentosos (Hypocreales, *Trichoderma* spp) han sido utilizadas como controladores de manchadores, con buenos resultados, principalmente por sus mecanismos de: i) síntesis de compuestos volátiles (antibiosis) ii) capacidad de producir una amplia variedad de enzimas extracelulares como celulasas y quitinasas (micoparasitismo) iii) rápido crecimiento y colonización de sustratos. Además, sus hifas tienen la capacidad de penetrar y crecer en la albura de la madera (Benitez *et al.* 2004, Chittenden y Singh 2009, Gradinger *et al.* 2009, Infante *et al.* 2009), demostrando inhibir el crecimiento de hongos manchadores por un período de 10 a 12 semanas sobre bloques de madera (Gradinger *et al.* 2009). En Nueva Zelanda se probó una gran cantidad de hongos y bacterias con actividad anti manchas, seleccionando algunas cepas del género *Trichoderma* spp para pruebas en terreno. (Vanneste *et al.* 2002) Además, han sido eficaces en el control de *Ophiostoma novo-ulmi* (Díaz *et al.* 2013), agente causal del marchitamiento del Olmo, con importantes daños alrededor del mundo.

A su vez, otras formas alternativas de control, mediante compuestos bioactivos como el compuesto llamado massoiolactona, aislado de *Trichoderma* spp, con capacidad de inhibir directamente el crecimiento de hongos manchadores han sido aislados de hongos antagonistas (Ayer y Kawahara 1995, Vanneste *et al.* 2002, Gradinger *et al.* 2009, Lee *et al.* 2013). También, se han utilizado metabolitos de levaduras, cianobacterias y extractos crudos de bacterias del tipo *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*, separando lipopeptidos con

actividad antimanchas, pertenecientes a las familias surfactin e iturin, con actividad antifúngica dada por la interacción de los compuestos con los fosfolípidos constituyentes de la membrana citoplasmática, incrementando su permeabilidad por la formación de poros (Zulpa *et al.* 2003, Velmurugan *et al.* 2009) con resultados prometedores en algunas cepas. Otros intentos de protección a través de los compuestos naturales extraíbles de maderas de mayor resistencia y durabilidad son buenos candidatos (Kirker *et al.* 2013, Singh y Singh 2012). Otra estrategia, la cual es el tema de esta investigación es la caracterización de hongos asociados al exoesqueleto y galerías de escarabajos lignícolas, habitantes de bosques de *Nothofagus* spp de la zona centro-sur de Chile, logrando su aislamiento y caracterización. Uno de los resultados más importantes fue la identificación de algunas cepas de *Trichoderma* spp antagonistas a hongos manchadores de madera (Galleguillos *et al.* datos no publicados).

Estas alternativas biológicas presentan la ventaja de ser biodegradables y de baja toxicidad para el medioambiente y los seres vivos. A pesar de las ventajas inherentes del control biológico, existen complicaciones para llevar estas aplicaciones a nivel industrial, esto por el volumen de esporas a inocular, sus formas de aplicación y la efectividad en terreno debido a las condiciones ambientales que afecta el crecimiento de los hongos en la madera (Vanneste *et al.* 2002). Otro punto de relevancia es en el caso de usar cepas antagonistas, éstas deben ser aisladas preferentemente en la misma zona geográfica del hongo manchador, evitando el riesgo de una posible introducción de especies foráneas con posibles consecuencias no controladas en el nuevo ecosistema (Garnas *et al.* 2012, Ploetz *et al.* 2013).

1.6 Avances moleculares aplicados a hongos manchadores

La biología molecular ha permitido grandes avances en la micología. En este sentido, el control de hongos manchadores *Ophiostoma* spp tuvo su punto de partida con la transformación genética mediante protoplastos de los hongos *O. piceae* y la cepa albina *O. piliferum* con la proteína verde fluorescente (GFP), permitiendo comprender el mecanismo de colonización en la madera, por medio de microscopía fluorescente y confocal (Lee *et al.* 2002). Posteriormente, un método de transformación de *O. piceae* y *Grosmannia clavigera* mediante *Agrobacterium tumefaciens* resultó exitosa, confirmando la integración en el ADN genómico, abriendo nuevas perspectivas para las futuras investigaciones en la mutación de las rutas metabólicas claves en los procesos de coloración (Tanguay y Breuil 2003, Wang *et al.* 2009).

Por las pérdidas económicas causadas por la coloración de estos hongos, un objetivo de estudio, ha sido la caracterización de los mecanismos moleculares involucrados en la biosíntesis de melanina. En este sentido, se ha realizado la mutagenesis insertacional, mediante la integración genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, obteniendo una cepa albina, resultado de la selección de una mutación del gen codificante para la enzima clave en la biosíntesis de melanina, poliketido sintase, PKS1 (Tanguay *et al.* 2007).

Además, se ha realizado modificación a través del silenciamiento por ARN (ARNi), siendo un método de resistencia natural contra ácidos nucleicos de virus, elementos transponibles (tramposones) y transgenes, actuando a nivel post transcripcional, (Nakayashiki *et al.* 2005). Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en plantas y animales (Muthamilarasan y Prasad 2013, Kubowicz *et al.* 2013), pero en menor grado, en hongos filamentosos (Nunes *et al.* 2011). Este mecanismo se ha utilizado para interferir la enzima de la biosíntesis de melanina, (PKS1), de los hongos *O. piceae* y *O. floccosum*, reduciendo los niveles de expresión de los transcritos y disminuyendo la pigmentación (Tanguay *et al.* 2006). A su vez, existen resultados positivos en la interferencia y mutación puntual en el gen PKS1 del hongo *Ceratocystis resinífera* (Loppnau *et al.* 2004, Tanguay *et al.* 2006).

A estos avances, se han sumado las iniciativas como 'The Canadian genome Project', creado el año 2001, para la búsqueda, identificación y análisis de los genes controladores del ciclo de vida del patógeno *O. novo-ulmi* y el manchador de madera *O. piceae*, mediante bibliotecas de marcadores de secuencias expresadas (ESTs) (Bernier *et al.* 2004). El proyecto fue continuado con la identificación de marcadores moleculares de *O.novo-ulmi*, estudiando la expresión de genes en diferentes condiciones de desarrollo, seguido por la comparación estructural y funcional (Bernier 2004).

Luego, se realizó la primera secuenciación completa del hongo patógeno *Grosmannia clavigera*, usando la tecnología Sanger, 454 (Diguistini *et al.* 2009), seguido por la secuenciación del saprófito manchador *O.piceae*, comparando su genoma y transcriptoma con *G.clavigera*, confirmando diferentes mecanismos y estrategias de vida (Haridas *et al.* 2013). Esto, sumado a la secuenciación y anotación de *O.ulmi* (Khoshaftar *et al.* 2013). En la actualidad, el DOE Genome Institute, está desarrollando iniciativas para la secuenciación de otros hongos del orden Ophiostomatales que incluyen, *O.minus*, *O montium* y *Sporotrix schenckii*. Así como también, para secuenciar el transcriptoma de *O.piliferum*.

Por otro lado, en relación a los avances en los mecanismos de control biológico, se ha obtenido el genoma completo de la especie *Trichoderma reesei*, hongo conocido por sus facultades como antagonista (Martinez *et al.* 2008) y *Trichoderma citrinoviride*.

Complementando la información, se realizó el análisis del transcriptoma de los mecanismos involucrados en el micoparasitismo, encontrando diferentes estrategias de ataque en especies *Trichoderma* spp (Atanasova *et al.* 2013). Otras iniciativas para la secuenciación de otras especies de *Trichoderma* spp se encuentran en desarrollo en DOE Genome Institute. Estas investigaciones son muy importantes para el entendimiento de los mecanismos moleculares involucrados en los procesos de patogenicidad y antagonismo.



1.7 Conclusiones

A pesar de los esfuerzos realizados para el control de hongos manchadores de madera, el problema continúa pendiente a nivel mundial, existiendo una ingente necesidad para el desarrollo de nuevos métodos de control, compatibles con el medioambiente, eficientes y con precios razonables. Las características ideales de un hongo candidato a antagonista son: i) la incapacidad de pigmentar el sustrato ii) que no degrade la estructura de la madera iii) su habilidad de crecer rápidamente y sobrevivir en la madera, compitiendo por el sustrato y iv) Capacidad de permanencia en el tiempo.

Una solución alternativa al problema del manchado en la industria, es la correcta gestión de las etapas del esquema productivo de la madera, (cosecha, acopio y transporte) realizándose idealmente en fechas específicas del año (cuando la temperatura sea más baja) y acortando el tiempo de permanencia en terreno, minimizando las condiciones que permiten el crecimiento de hongos. Esto sumado a la correcta disposición del material remanente de podas y raleos que pueden actuar como hábitat de escarabajos e inóculos de hongos.

Sin duda, las áreas de investigación como la genómica y transcriptómica, junto con el manejo masivo de datos, apoyado por la bioinformática, permitirán entender los mecanismos de acción de los hongos manchadores y sus antagonistas, entre los que se encuentran: i) las formas de síntesis y degradación de la melanina ii) los mecanismos moleculares de ataque de los antagonistas más importantes en terreno iii) las señales moleculares de desarrollo en algunas cepas particulares. Sumado a los avances en las metodologías de transformación genética y el análisis comparativo de genomas y metagenomas.

Estas nuevas investigaciones permitirán la creación de soluciones, imponiendo límites al problema del manchado de madera en la industria forestal de pináceas, idealmente con la búsqueda de productos naturales i) eficientes y de largo tiempo de permanencia en la fase postcosecha en la industria madera ii) con una alta actividad antagonista en diferentes latitudes geográficas iii) con especies y compuestos que no alteren las especies nativas en el lugar de aplicación. Permitiendo en un futuro cercano, minimizar el problema del manchado azul en las industrias madereras.

Tabla 1. Composición química y principales características de productos antimanchas
(Montes *et al.* 2001 Vives *et al.* 2004).

Nombre	Composición Química	Principal Característica
MTB+TCMTB	methylene/bisthiocyanate+thiocyanomethyl thio-benzotihiazole	Contra <i>Ceratocystis pilífera</i>
Quinilinato de cobre	Cobre 8-hidroxiquinolato	Baja toxicidad, la madera adquiere tono verdoso
Wolsin® FL-14	Propiconazol	
Wolsin FL 12215®	Propiconazol+ácido bórico+Adyuvantes	Evaluado en Nueva Zelanda
Siniesto B®	Di-yodo metil tolisulfone+amonio cuaternario	Biodegradable
NP-1®	Didecil dimetil amonio sulfato+ 3-yodo propinil butil carbamato	Biodegradable
Sentry®	Methylene bisthiocyanate+Ochthilnone	Producido en Nueva Zelanda
Antiblu ® CC	Clorotalonil+Carbenzima	
Tribromofenol (TBP)	PCP-Na (3 mol bromo en vez 5 cloro)	Tóxico
Lentrex WT(Chlorpyrifos)	Organofosforados	Control General de Plagas
Actellic 50 EC® (Pirimifos Metil)	Organofosforados	Control General de Plagas
Karate 25CS (Lamdacihalotrina)	Piretroides	Insecticida
Nipacide P 508	Quinolinolato de Cobre	Usado en <i>Pino radiata</i>

Nipacide P 750	Tetracloroisofalonnitrilo	Refuerzo antimancha
Goldazim 500 SC	Carbendazima	Refuerzo madera verde



1.8 BIBLIOGRAFÍA.

- Abdelkader S, M Hamed. 2012. In-vitro studies on Wood degradation in soil by soft-rot fungi: *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 78:98-102.
- Almeida R, S Frases, G De Sousa Araújo, M Marques, G Gerfen, N Zancopé-Oliveira. 2012. Biosynthesis and functions of a melanoid pigment produced by species of the Sporotrix complex in the presence of L-Tyrosine. *Applied and Environmental Microbiology* 78(24):8623-8630.
- Atanasova L, S Le Crom, S Gruber, F Coulpier, V Seidl-Seiboth, C Kubicek, S Druzhinina. 2013. Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. *BMC Genomics* 14:121.
- Ayer W, N Kawahara. 1995. Lecythophorin, a potent inhibitor of Blue-Stain fungi, from the Hyphomycetous fungus *Lecythophora hoffmannii*. *Tetraedron Letters*, 44:7953-7956.
- Behrendt C, R Blanchette, R Farrell. (1994). Biological control of blue-stain fungi in wood. *The American Phytopathological Society* 21:92-97.
- Behrendt C, R Blanchette. 2001. Biological control of Blue-Stain in pulpwood: mechanism of control used by *Phlebiopsis gigantea*. *Holzforschung*. 55:238-245.
- Bell A, M Wheeler. 1986. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annual review Phytopatology*. 24:411-51.
- Benítez T, A Rincon, M Limón, A Codón. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7:249-260.
- Berrocal A, J Navarrete, C Oviedo. 2012. Efecto de diferentes condiciones de crecimiento en el dimorfismo levadura-micelio de la cepa albina PcF2A29 de la especie *Ophiostoma Piceae*. *Maderas, Ciencia y Tecnología* 14(1):91-102.
- Bernier L, C Breuil, W Hintz, P Horgen, V Jacobi, J Dufour, M Aoun, G Bouvet, S Kim, S Diguistini, P Tanguay, J Eades, S Burgues, P De la Bastide, M Pinchback, Y Tadesse. 2004. The Canadian *Ophiostoma* genome project. *Investigación Agraria* 13(1):115-117.

- Bernier L. 2004. Genomics of Ophiostomatoid fungi: the first two thousand genes. *Phytoprotection*. 85:39-43.
- Butin H, A Aguilar. 1984. Blue stain fungi on Nothofagus from Chile. Including two new species of *Ceratocystis* Ellis & Halst. *Phytopathologische Zeitschrift*. 109:80-89.
- Chittenden C, T Singh. 2009. In vitro evaluation of combination of *Trichoderma harzianum* and chitosan for the control of sapstain fungi. *Biological Control*. 50:262-266.
- De Beer ZW, HF Glen, BD Wingfield, MJ Wingfield. 2003. *Ophiostoma quercus* or *Ophiostoma querci*?. *Mycotaxon*. 86: 211–214.
- Diguistini S, N Liao, D Platt, G Robertson, M Seidel, S Chan, M Marra, C Hamelin, J Bohlmann, C Breuil, S Jones. 2009. De novo genome sequence assembly of a filamentous fungus using Sanger, 454 and Illumina sequence data. *Genome Biology*. 10: R94.
- Díaz G, A Córcoles, A Asencio, P Torres. 2013. In vitro antagonism of *Trichoderma* and naturally occurring fungi from elms against *Ophiostoma novo-ulmi*. *Forest Pathology* 43:51-58.
- Eisenman H, A Casadevall. 2012. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 93:931-940.
- FAO/UNEP. (1995). Prior Informed Consent Decision Guidance Document: Pentachlorophenol, Rome/Genova, 13.
- Galleguillos F, G Palfner, V Jerez, V Hernandez. Aislamiento y caracterización de hongos de escarabajos lignícolas antagonistas a hongos manchadores de madera. En preparación.
- Garnas J, B Hurley, B Slippers, M Wingfield. 2012. Biological control of forest plantation pest in an interconnected world requires greater international focus. *International Journal of Pest Management* 58(3): 211-223.
- Gradinger C, T Biosselet, D Stratev, T Ters, K Messner, K Fackler. 2009. Biological control of sapstain fungi: From laboratory experiments to field trials. *Holzforschung* 63:751-759.

- Gutiérrez M, J Becerra, R Barra. 2002. Tribromofenol empleado en aserraderos: Métodos de análisis, características físicas-químicas y presencia en componentes ambientales. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* 47:4.
- Haridas S, Y Wang, L Lim, M Alamouti, S Jackman, R Docking, G Robertson, J Bohlmann, C Breuil. 2013. The genome and transcriptome of the pine saprophyte *Ophiostoma piceae*, and a comparison with the bark beetle-associated pine pathogen *Grosmannia clavigera*. *BMC Genomics* 14:373.
- Harrington TC. 1987. New combinations in *Ophiostoma* of *Ceratocystis* species with *Leptographium* anamorphs. *Mycotaxon*. 28: 39–43.
- Hernández V., Avramidis S., Navarrete J. 2011. Albino strains of *Ophiostoma* spp. fungi effect on *radiata pine* permeability. *The European Journal of Wood and Wood Products* 70: 551-556.
- Infante D, B Martínez, N González, Y Reyes. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal* 1:14-21.
- Jacobs K, MJ Wingfield. 2001. *Leptographium* species – Tree Pathogens, Insect Associates, and agents of blue-stain. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- Kirker G, A Blodgett, R Arango, P Lebow, C Clausen. 2013. The role of extractives in naturally durable wood species. *International Biodeterioration & Biodegradation* 82:53-58.
- Khoshraftar S, S Hung, S Khan, Y Gong, V Tyagi, J Parkinson, M Sain, A Moses, D Christendat. 2013. Sequencing and annotation of the *Ophiostoma ulmi* genome. *BMC Genomics* 14:162.
- Kubowicz P, D Zelazczyk, E Pekala. 2013. RNAi in clinical studies. *Current Medicinal Chemistry* 20(14):1801-1816.
- Lanfranco D, S Ide, H Peredo. 2004. An analysis of health risk reduction in Chilean primary forest products for export. *Forestry* 77: 3
- Langfelder K, M Streibel, B Jahn, G Haase, AA Brakhage. (2003). Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology* 38:143-158.

- Lee J, E Oh. 2000. Potentials for Biological Control of Blue Stain on Woods Caused by Ophiostomatoid Fungi. *Plant Pathology Journal* 16(4): 200-205.
- Lee S, H Kim, C Breuil. 2002. The use of the green fluorescent protein as a biomarker for sapstain fungi. *Forest Pathology* 32:153-161.
- Lee Y, J Hong, H Lee, B Ahn, G Kim, J Kim. 2013. Phylogenetic analysis of the genus *Fusarium* and their antifungal activity against wood-decay and sapstain fungi. *Holzforschung* 67:473-478.
- Loppnau P, P Tanguay, C Breuil. 2004. Isolation and disruption of the melanin pathway polyketide syntase gene of the softwood deep stain fungus *Ceratocystis resinifera*. *Fungal Genetics and Biology* 41:33-41.
- Martinez D, RM Berka, B Henrissat, M Saloheimo, M Arvas, SE Baker, J Chapman, O Chertkov, P Coutinho, D Cullen, EG Danchin, IV Grigoriev, P Harris, M Jackson, CP Kubicek, CS Han, I Ho, LF Larrondo, AL de leon, JK Magnuson, S Merino, M Misra, B nelson, N Putnam, B Robbertse, AA Salamov, M Schmoll, A Terry, N Thayer, AW Parvinem, CL Schoch, J Yao, R Barabote, MA Nelson, C Detter, D Bruce, CR Kuske, G Xie, P Richardson, DS Rokhsar, SM Lucas, E M Rubin, ND Coleman, M Ward, TS Brettin. 2008. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nature Biotechnology* 26(5):553-60.
- Montes P, H Peredo, D Lanfranco, S Ide, H Dolz. 2001. Una revisión de los productos alternativos al pentaclorofenato de sodio y bromuro de metilo utilizados en el sector forestal. *Bosque* 22(1): 85-93.
- Moreno O, G Sanchez, J Marmolejo, K Pérez, C Moreno. 2015. Diversidad de hongos Ophiostomatoides en pinos de la sierra Fría de Aguascalientes, México, asociados con *Dendroctonus mexicanus*. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 86:1-8.
- Morin C, P Tanguay, C Breuil, D Yang, L Bernier. 2005. Bioprotection of spruce logs against Sapstain using an albino strain of *Ceratocystis resinifera*. *Phytopathology* 96:526-533.
- Muthamilarasan M, M Prasad. 2013. Plant innate immunity: An updated insight into defense mechanism. *Journal of Biosciences* 38 (2):433-449.
- Nkuekam G, Z Wilhelm de Beer, M Wingfield, J Roux. 2012. A diverse assemblage of Ophiostoma species, including two new taxa on eucalypt trees in South Africa. *Mycological Progress* 11:515-533.

- Nunes C, K Sailsbery, R Dean. 2011. Characterization and application of small RNAs and RNA silencing mechanisms in fungi. *Fungal Biology Reviews* 25:172-180.
- Osorio M. 1985. *Ceratocystis pilifera* hongo causante de mancha azul en la madera de Pinus radiata. *Bosque*: 6:116-119.
- Popa V, E Deziel, R Lavalley, E Bauce, C Guertin. 2012. The complex bark beetle symbiotic relationship with microorganisms: a potencial practical approach for biological control in forestry. *Society of Chemical Industry* 23:12-23.
- Ploetz R, J Hulcr, M Wingfield, Z Wilhelm de Beer. 2013. Destructive tree diseases associated with ambrosia and bark beetles: Black swan events in tree pathology?. *Plant Disease* 95(7): 856-872.
- Schirp A, R Farrel, B Kreber. 2003. Effects of New Zealand sapstaining fungi on structural integrity of unseasoned radiate pine. *Holz Als Roh-Und Werkstoff* 61:369-376.
- SchumennJ, C Hertweck. 2006. Advances in cloning, functional analysis and heterologous expression of fungal polyketide syntase genes. *Journal of Biotechnology* 124:690-703.
- Schweigkofler W, W Otrrosina, S Smith, D Cluck, K Maeda, K Peay, M Garbelotto. 2005. Detection and quantification of *Leptographium wagneri*, the cause of black-stain root disease from bark beetles (Coleoptera: Scolytidae) in Northern California using regular and real-time PCR. *Canadian Journal of Forestry Research* 35:1798-1808.
- Seifert K. 1993. Sapstein of commercial lumber of *Ophiostoma* and *Ceratocystis*. In: Wingfield MJ, Seifert KA, JF Webber. (eds) *Ceratocystis and Ophiostoma: taxonomy, ecology, and pathogenicity. American Phytopathological Society, St Paul.* 141-151.
- Seifert KA, De Beer ZW, MJ Wingfield. 2013. Ophiostomatoid fungi, Expanding Frontiers. *Biodiversity Series.* 12:245-322.
- Singh T, A Singh. 2012. A review of natural products as wood protectant. *Wood Science Technology.* 46, 851-870.
- Six D, M Wingfield. 2011. The role of phytopathogenicity in bark beetle-fungus symbioses: A challenge to the classic paradigm. *Annual Review of Entomology.* 56:255-72.

- Son E, J Kim, Y Lim, A Yeung, C Yang, C Breuil. 2010. Diversity and decay ability of basidiomycetes isolated from lodgepole pines killed by the mountain beetle. *Journal of Microbiology* 57:33-41.
- Tanguay P, C Breuil. 2003. Transforming the sapstain fungus *Ophiostoma piceae* with *Agrobacterium tumefaciens*. *Canadian Journal of Microbiology*. 49:301-304.
- Tanguay P, S Bozza, C Breuil. 2006. Assessing RNAi frequency and efficiency in *Ophiostoma floccosum* and *O.Piceae*. *Fungal Genetics and Biology* 43: 804-812.
- Tanguay P, P Loppnau, C Morin. 2006. A spontaneous albino mutant of *Ceratocystis resinifera* results from a point mutation in the poliketide syntase gen PKS1. *Canadian Journal of Microbiology* 52:501-507.
- Tanguay P, K Tangent, C Breuil. 2007. Identifying pigmentation-related genes in *Ophiostoma piceae* using *Agrobacterium* mediated integration. *Phytopathology* 97(9):1040-1048.
- Thwaites J, R Farrell, S Duncan, S Reay, R Blanchette, E Hadar, Y Hadar, T Harrington, D Mcnew. 2005. Survey of potential sapstain fungi on *Pinus radiata* in New Zealand. *New Zealand Journal of Botany* 43:653-663.
- Vanneste J, R Hill, S Kay, R Farrell, P Holland. 2002. Biological control of sapstain fungi with natural products and biological control agents: a review of the work carried out in New Zealand. *Mycological Research* 106(2): 228-232.
- Velmurugan N, M Sook Choi, S Han, Y Lee. 2009. Evaluation of antagonistic activities of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* against wood-staining fungi: In vitro and in vivo experiments. *The Journal of Microbiology* 47(4):385-392.
- Vives I, S Ide, H Peredo. 2004. Ensayos de eficacia cuarentenaria de tres formulaciones de antimanchas comercializadas en Chile para un proceso simulado de exportación de madera aserrada de *Pinus radiata*. *Bosque* 25(3):79-87.
- Wang Y, S Diguistini, T Wang, J Bohlmann, C Breuil. 2009. *Agrobacterium*-mediated gene disruption using split-marker in *Grosmannia clavigera*, a mountain pine beetle associated pathogen. *Current Genetics* 56(3): 297-307.
- Wingfield, M.J., K.A. Seifert, J.F. Webber. (eds.). 1993. *Ceratocystis and Ophiostoma: Taxonomy, ecology, and pathogenicity*. APS Press. St. Paul, MN. 293 p.

- Wingfield BD, CD Viljoen, MJ Wingfield. 1999. Phylogenetic relationships of ophiostomatoid fungi associated with *Protea* infructescences in South Africa. *Mycological Research* 103: 1616–1620.
- Zhou X, ZW De Beer, R Ahumada, B Wingfield, MJ Wingfield. 2004. Ophiostoma and Ceratocystiopsis spp. Associated with two pine-infesting bark beetles in Chile. *Fungal Diversity* 15, 253-266.
- Zipfel R, ZW de Beer, K Jacobs, B Wingfield, MJ Wingfield. 2006. Multi-gene phylogenies define Ceratocystiopsis and Grosmannia distinct from Ophiostoma. *Studies in Mycology* 55:75-97.
- Zulpa G, M Zaccaro, F Boccazzi, J Parada, M Storni. 2003. Bioactivity of intra and extracellular substances from cyanobacteria and lactic acid bacteria on “wood blue stain” Fungi. *Biological Control* 27:345-348.



2 HIPÓTESIS

- i) En la comunidad de hongos asociados a coleópteros lignícolas en bosque de *Nothofagus dombeyi* y *Nothofagus obliqua* de la Reserva Altos de Lircay, VII Región, se encuentran especies antagonistas a hongos manchadores de madera del orden Ophiostomatales, causantes de pérdidas económicas en la industria maderera.
- ii) En la comunidad de tales hongos cultivables, se encuentran especies capaces de producir coloración de madera (Spalting) de *Pinus radiata* D.Don y *Nothofagus obliqua* bajo condiciones de laboratorio.

3 Objetivo general

Caracterizar la comunidad de hongos cultivables asociados a coleópteros lignícolas, pertenecientes a las familias Tenebrionidae y Lucanidae en bosques de *N. dombeyi* y *N.obliqua*, probando sus propiedades como antagonistas contra el manchador de madera *Ophiostoma sp* y su capacidad para la coloración controlada de madera.

4 Objetivos específicos

- i) Aislar y cultivar especies fúngicas de las divisiones Ascomycota y Basidiomycota asociadas a coleópteros lignícolas y sus galerías en bosque de *N.dombeyi* y *N.obliqua*, en la Reserva Altos de Lircay, VII Región.
- ii) Caracterizar e identificar las especies cultivadas mediante microscopía y análisis molecular de la región ITS del ADN ribosomal.
- iii) Seleccionar hongos eficaces para el control del hongo manchador *Ophiostoma sp*, mediante ensayos de confrontación directa en placas y la aplicación de micelio y extractos totales en probetas de madera de *Pinus radiata*.
- iv) Probar la capacidad de algunas cepas aisladas y caracterizadas para colorear madera (Spalting) de *Pinus radiata* y *Nothogafus obliqua* bajo condiciones de laboratorio.



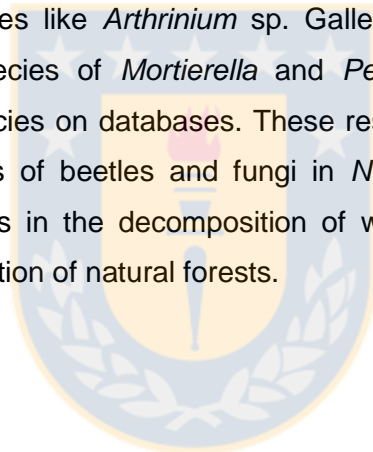
**CAPÍTULO II. Hongos asociados a coleópteros lignícolas en
el bosque Maulino subandino**

RESUMEN

Los coleópteros xilófagos se encuentran en estrecha relación con hongos simbios, interacción que ayuda por una parte a los insectos en el metabolismo de los componentes de la madera y por otra a los hongos en el transporte de esporas y propágulos vegetativos en el exoesqueleto del artrópodo. En este último caso, no existen estudios demostrando el transporte de estructuras reproductivas fúngicas en insectos en nuestro país. El trabajo consideró el aislamiento y la identificación molecular de hongos de las divisiones Ascomycota, Basidiomycota y zygomycetes asociados al exoesqueleto de coleópteros lignícolas y sus galerías en bosque de *Nothofagus obliqua* y *Nothofagus dombeyi*, de la Reserva Nacional Altos de Lircay, VII Región. Los resultados indican que las especies de coleópteros tenebrionidos *Oligocara intermedia* y *Heliofugus impressus* y los lucánidos *Chilostoma cucullatus* y *Pycnosiphorus philippi* son capaces de transportar esporas en sus estructuras externas y muestran una dominancia fúngica específica, tanto en su exoesqueleto, como en las galerías que excavan en la madera en descomposición. Los hongos cultivables asociados al exoesqueleto son Basidiomicetos causantes de pudrición como *Trametes versicolor*, *Stereum hirsutum* y *Bjerkandera adusta*; Hypocreales, con algunas especies de *Trichoderma*; Mucorales con especies de *Absidia* spp y Ascomicetos endófitos como *Arthrinium* sp, mientras que las especies asociadas a galerías pertenecen al orden Mucorales, con *Mortierella* spp y algunas especies de *Penicillium* spp y *Phialocephala* sp. Ambas asociaciones presentan especies no claramente identificadas en las bases de datos disponibles. Estos resultados son importantes para la comprensión de las relaciones y funciones de los escarabajos y hongos en bosques de *Nothofagus* spp., demostrando la importancia de los factores bióticos en la descomposición de madera, tema a considerar en la gestión y conservación de bosques nativos.

Abstract

Mycophagous beetles are in close symbiotic relationship with fungi, which help the insects in the digestion and facilitation of wood components and receive the benefit of spore transport from the arthropods. In the latter case, no studies exist demonstrating the transport of fungal structures on insects in Chile. This work considered the isolation and molecular identification of fungi belonging to Ascomycota, Basidiomycota and Zygomycetes, associated with the exoskeleton of lignicolous beetles on *Nothofagus obliqua* and *Nothofagus dombeyi*, in the National Reserve Altos de Lircay, VII Region, Chile. The results showed that species of tenebrionid beetles *Oligocara intermedia* and *Heliofugus impressus* and stag beetles *Chilostoma cucullatus* are capable of carrying spores on their external structures. Species composition of fungal consortia isolated from exoskeletons of beetles was different from consortia isolated from galleries. The culturable fungi associated to the exoskeleton are Basidiomycetes causing white rot such as *Trametes versicolor*, *Stereum hirsutum* and *Bjerkandera adusta*; Hypocreales, with species of *Trichoderma*; Mucorales with *Absidia* spp and endophytic Ascomycetes like *Arthrinium* sp. Gallery-associated species belong to the order Mucorales, with species of *Mortierella* and *Penicillium*. Both associations yielded previously unidentified species on databases. These results are important for understanding the relationships and roles of beetles and fungi in *Nothofagus* forest, demonstrating the importance of biotic factors in the decomposition of wood, an issue to be considered in the management and conservation of natural forests.



2.1 INTRODUCCIÓN

Bosques naturales o sometidos a un manejo semi-natural presentan un alto contenido de necromasa leñosa en forma de trozas y tocones, la cual es habitada por una amplia variedad de agentes biológicos que se alimentan de sus nutrientes. La madera está constituida principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina que aportan una abundante fuente de carbono, pero es muy pobre en nitrógeno y elementos traza (Ayres *et al.* 2000, Warren *et al.* 2002), por lo cual existe una biota especializada en este tipo de sustrato que se caracteriza por interacciones como sucesiones y/o asociaciones simbióticas, estableciendo una cadena de degradación donde un organismo aprovecha los catabolitos o nichos producidos por otro organismo para su alimentación y/o reproducción. Un ejemplo emblemático y de distribución global es la asociación entre insectos taladradores y hongos xilófagos donde los hongos asociados proveen al insecto nutrientes que son esenciales para su desarrollo (Lanfranco *et al.* 2001, Tanahashi *et al.* 2009, Ploetz *et al.* 2013). Entre estos insectos destacan Hymenopteros de las familias Siricidae y coleópteros de las familias Cerambycidae, Curculionidae, Lucanidae y Tenebrionidae. (Paulsen 2005, Vidal 2007).

En este escenario, la colonización de la madera por hongos permite principalmente el incremento en la degradación de la madera por la pre-digestión enzimática y la detoxificación de compuestos de defensa propios de la madera (Gamauf *et al.* 2007, Li *et al.* 2012). La madera es colonizada por una amplia diversidad de hongos de las divisiones Ascomycetos y Basidiomycetos (Boddy y Heilmann-Clausen 2008) y entre ellos son de especial interés los hongos causantes de pudrición, ya que degradan los componentes estructurales de la madera (Rajchenberg 1997, Son *et al.* 2010, Abdelkader y Hamed 2012). Otros hongos son conocidos por su asociación a insectos, incluso con especies fitopatógenas, capaces de atacar y matar árboles vivos como es el caso de *Amylostereum aerolatum* simbiote de *Sirex noctilio* (Hayek *et al.* 2013).

En los últimos años, diversos estudios han validado la importancia de la simbiosis entre hongos e insectos con miras a comprender estas interacciones de un punto de vista ecológico y evolutivo (Six 2013). Las relaciones ecto y endosimbióticas entre coleópteros y hongos son muy diversas y complejas, ya que los insectos pueden facilitar la dispersión y colonización de esporas en otros sitios (Persson *et al.* 2011, Soo Park *et al.* 2014) y permiten la digestión interna de nutrientes por parte de los insectos (Zhang *et al.* 2003, Nguyen *et al.* 2006, Suh *et al.* 2006, Berkov *et al.* 2007) e incluso algunos escarabajos de corteza como los Scolytinae han desarrollado estructuras especializadas para el transporte de hongos llamados micangios. Estos insectos son capaces de transportar y diseminar las esporas de hongos manchadores de madera del orden Ophiostomatales, agentes causantes del

manchado azul de madera talada, siendo considerados como un problema en las industrias madereras alrededor del mundo (Moon *et al.* 2012, Hofstetter *et al.* 2006, Six y Wingfield 2011). Algunos estudios, han demostrado que coleópteros de la familia Lucanidae se alimentan de los hongos pudridores en la madera donde se desarrollan y otros coleópteros se asocian a los cuerpos fructíferos de macromicetes como el escarabajo del grano *Tribolium castaneum* Herbst y algunas especies del género *Eledonoprius*, ambos de la familia Tenebrionidae (Tanahashi *et al.* 2009, Ahmad *et al.* 2013, Carpaneto *et al.* 2013).

En nuestro país existe una zona de alta biodiversidad llamada "hot spot", ubicada entre los 30° y 40° en latitudes N y S y contiene un 30% de especies endémicas exclusivas y el 52% de las que se encuentran en el país (Arroyo *et al.* 2010). Estos puntos son considerados como zonas críticas de diversidad en el mundo. En esta zona se encuentra la Reserva Altos de Lircay, ubicada en la Región del Maule, provincia de Talca en la comuna de San Clemente. La reserva cuenta con una diversidad de especies vegetales, destacándose el género *Nothofagus*. Que domina los bosques templados y subantárticos en el territorio nacional (Berg y Promis 2011). Colonizando madera en descomposición de algunas especies de *Nothofagus* se encuentran descritos algunos insectos, como los escolítidos de ambrosia *Gnathotrupes* spp, *Lyctus chilensis* Gerber (escarabajo pulverizador de madera), *Hadrobegmus* sp (Frailecillo), *Holopetrus chilensis* Blanchard (Taladrador del roble), entre otros (Rojas y Gallardo 2004).

Con estos antecedentes y destacando la importancia de la biodiversidad en esta zona, nuestro objetivo de estudio fue el aislamiento y la caracterización molecular de los hongos asociados al exoesqueleto y galerías excavadas por insectos lignícolas en bosques de *Nothofagus obliqua* y *Nothofagus dombeyi* de la Reserva Nacional Altos de Lircay, Región del Maule, Provincia de Talca. Las principales preguntas a responder son: ¿los insectos asociados a la madera transportan esporas de hongos en sus estructuras externas? y ¿cuál es la posible implicancia de esta simbiosis en los procesos de descomposición de bosques de *Nothofagus* spp?.

2.2 METODOLOGÍA

Toma de muestras

En el mes de abril del año 2013, se recolectaron un total de 32 individuos vivos y 8 galerías de coleópteros de las familias Lucanidae (8 individuos y 3 galerías) y Tenebrionidae (24 individuos y 5 galerías) en madera muerta correspondiente a troncos caídos con corteza y en estado avanzado de descomposición en bosque de *Nothofagus obliqua* y *Nothofagus dombeyii* (**Tabla 1**), localizado en la Reserva Nacional Altos de Lircay, Region del Maule, coordenadas referenciales del área de muestreo: 35° 36' 13", 71° 02' 54", altitud 1420 msnm. La reserva posee una gran diversidad de especies vegetales, con dominancia del género *Nothofagus* y otras especies subdominantes como el ciprés de la cordillera, arrayán, quillay en el estrato arbóreo. Las muestras se mantuvieron en tubos Eppendorf de 1.5 mL y fueron procesados el mismo día de la recolección. Para la determinación de los coleópteros se revisó literatura especializada: Paulsen 2005, Grossi y Paulsen 2009, Vidal y Guerrero 2007.

Aislamiento de hongos

Los insectos fueron mantenidos a temperatura de ambiente y lavados en agua destilada por 30 segundos. Luego fueron deslizados y aplastados suavemente sobre un medio de cultivo sólido (MEA 2%, extracto de malta), compuesto de 20 g extracto de malta, y 20 g de agar suplementado con 200 mg de streptomycin en 1 L de agua destilada. En el caso de las galerías, se sacaron de forma integral con un cuchillo, y luego se incubaron en cámaras húmedas por 7 días, para permitir el desarrollo de micelio, una parte del cual se sembró directamente sobre medio de cultivo sólido (MEA 2%). En caso de crecimiento de más de una especie de hongo sobre el medio, se procedió a repicar los hongos en medio sólido hasta su aislamiento individual. La selección de los cultivos para secuenciación se realizó según la morfología de las colonias.

Extracción de ADN y amplificación por PCR

La extracción de ADN de las muestras se realizó según la metodología descrita por Doyle y Doyle (1990). Para la amplificación de la región correspondiente al espaciador interno transcrito (ITS) del ADN ribosomal, se utilizaron los partidores universales para hongos ITS1F-ITS4, descritos en White *et al.* (1990). La amplificación del ITS se realizó por medio de Reacción en Cadena de Polimerasa, según las siguientes condiciones: 94°C por 4 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C 40 segundos, 60°C 40 segundos, 72°C 1 minuto y un paso de elongación final de 72°C 10 minutos.

Secuenciación del producto de PCR

Los productos de PCR obtenidos fueron enviados a la empresa MacroGen, Korea, para su secuenciación. Luego, se evaluó la identidad y cobertura con las secuencias disponibles en la base de datos de GenBank, usando el algoritmo BLAST (Altschul *et al.* 1997) disponible en el sitio Web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.



2.3 RESULTADOS

Los coleópteros y las galerías utilizadas para los aislamientos, corresponden a dos especies de la familia Tenebrionidae, *Oligocara intermedia* Peña & Barria y *Heliofugus impressus* Guerin, 183 y tres especies de la familia Lucanidae, *Chileistomus cucullatus* Blanchard, *Pycnosiphorus philippi* Westwood y una especie aún no determinada (**Figura 1, Tabla 1**).



Figura 1. *Oligocara intermedia* (Tenebrionidae) y su galería recolectados en *Nothofagus obliqua*.

Tabla 1: Especie arborea hospedera y número de especies fúngicas aisladas en insectos y galerías.

Familia Coleoptera	Número de insectos por hospedero	Número de coleópteros (Individuos)	Número de especies de hongos aislados	Número de galerías	Número de especies de hongos aislados
Tenebrionidae	<i>N. dombeyii</i> (17) <i>N.obliqua</i> (7)	24	16	5	9
Lucanidae	<i>N. dombeyii</i> (3) <i>N.obliqua</i> (5)	8	6	3	2

A partir de los insectos y de sus galerías, se aislaron un total de 33 cepas de hongos, siendo clasificados de forma preliminar en grupos, según su morfología en placas (Figura 2).

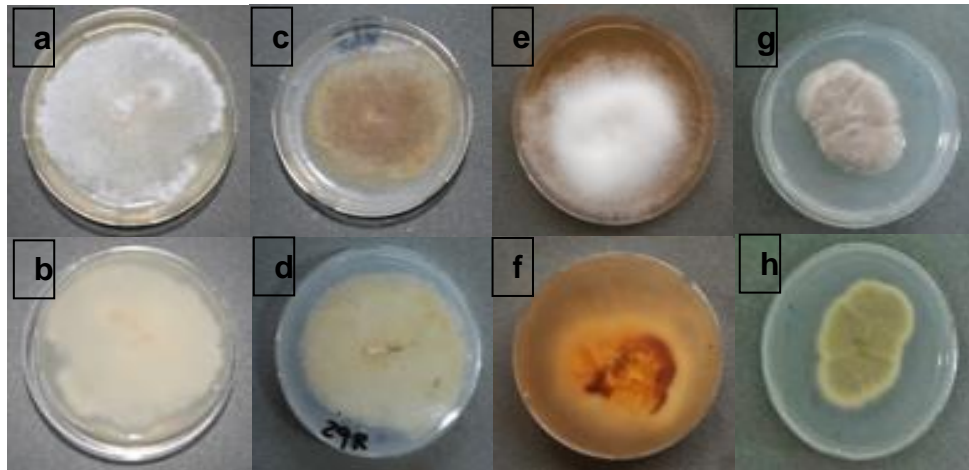


Figura 2. Algunos hongos seleccionados para la identificación molecular según su morfología en placas. De izquierda a derecha: (a/b) *Hypocrea* sp., (c/d) *Absidia glauca*, (e/f) *Eurotium amstelodani*, (g/h) *Umbelopsis isabellina*. Foto superior y inferior, frente y reverso de placas respectivamente.

Luego, se tomaron representantes de cada grupo y se amplificó la región correspondiente al espacio interno transcrito (ITS), obteniendo secuencias que fueron comparadas con la herramienta BLASTn y clasificadas en base al % de identidad. La división Zygomycota, Mucorales fue el grupo más frecuente, tanto en los aislamientos a partir de insectos como en las galerías. (Tabla 2 y 3).

Tabla 2. Resultados de identificación BLASTn de hongos aislados de individuos de escarabajos lignícolas.

Fuente aislado	Origen madera	código cepa	Nombre GenBank	Clase y Orden de la especie	% identidad
Lucanidae	<i>N. obliqua</i>	9L	<i>Absidia glauca</i> strain CBS	Zygomycetes, Mucorales	98
Lucanidae	<i>N. dombeyii</i>	13L	<i>Absidia glauca</i> strain FSU330	Zygomycetes, Mucorales	97
Tenebrionidae	<i>N. obliqua</i>	29T	<i>Absidia glauca</i> strain CHT0106	Zygomycetes, Mucorales	99
Tenebrionidae	<i>N. dombeyi</i>	11T	<i>Absidia psychrophilia</i> strain FSU4745	Zygomycetes, Mucorales	97
Tenebrionidae	<i>N. dombeyi</i>	58T	<i>Absidia glauca</i> strain CBS 100.48	Zygomycetes, Mucorales	96
Tenebrionidae	<i>N. obliqua</i>	16T	Fungal sp. 9DI1-9A (<i>Bjerkandera adusta</i>)	Agaricomycetes, Polyporales	99
Tenebrionidae	<i>N. dombeyi</i>	23T	<i>Trametes versicolor</i>	Agaricomycetes, Polyporales	99
Tenebrionidae	<i>N. dombeyi</i>	31	<i>Cylindrobasidium</i> sp.	Agaricomycetes, Agaricales	99
Lucanidae	<i>N. obliqua</i>	15L	Uncultured fungus clone LX042767 (<i>Stereum hirsutum</i>)	Agaricomycetes, Russulales	99
Lucanidae	<i>N. obliqua</i>	23L	<i>Trametes versicolor</i>	Agaricomycetes, Polyporales	99
Tenebrionidae	<i>N. obliqua</i>	5T	Fungal endophyte isolate 9084	-	99
Tenebrionidae	<i>N. obliqua</i>	18T	<i>Arthrinium</i> sp	Sordariomycetes, Incertae sedis	99
Tenebrionidae	<i>N.</i>	51T	Ascomycota sp.	-	99

		<i>dombeyi</i>	GPO_LL_03_D10		
Lucanidae	<i>N. obliqua</i>	53L	<i>Trichoderma álbum</i>	Sordiaromycetes, Hypocreales	99
Tenebrionidae	<i>N. obliqua</i>	56T	<i>Trichoderma samuelsii</i>	Sordiaromycetes, Hypocreales	100
Tenebrionidae	<i>N. dombeyi</i>	30T	<i>Trichoderma viride</i>	Sordiaromycetes, Hypocreales	100
Lucanidae	<i>N.dombeyi</i>	17L	<i>Mortierella verticillata</i>	Zygomycetes, Mucorales	100
Tenebrionidae	<i>N.obliqua</i>	19T	<i>Mortierella verticillata</i>	Zygomycetes, Mucorales	100
Tenebrionidae	<i>N.obliqua</i>	25T	<i>Penicillium citreonigrum</i>	Eurotiomycetes, Eurotiales	99
Tenebrionidae	<i>N.dombeyi</i>	24T	<i>Blastobotrys adenivorans</i>	Saccharomycetaceae, Saccharomycetales	85
Tenebrionidae	<i>N. obliqua</i>	59T	<i>Botryosphaericeae sp</i>	Dothideomycetes, Botryosphaeriales	98
Tenebrionidae	<i>N.obliqua</i>	60T	<i>Eurotium amstelodani</i>	Eurotiomycetes, Eurotiales	99
Tenebrionidae	<i>N.obliqua</i>	68T	<i>Beauveria bassiana</i>	Sordariomycetes, Hypocreales	99
Tenebrionidae	<i>N.obliqua</i>	69T	<i>Beauveria sp</i>	Sordariomycetes, Hypocreales	97

Tabla 3. Resultados de identificación BLASTn de hongos aislados de galerías de escarabajos lignícolas

Fuente aislado	Origen madera	código cepa	Nombre GenBank	Clase y Orden de la especie	% identidad
Galería Tenebrionidae	<i>N. obliqua</i>	33T	<i>Umbelopsis isabellina</i>	Zygomycetes, Mucorales	99
Galería Tenebrionidae	<i>N.dombeyi</i>	8T	<i>Umbelopsis ramanniana</i> strain CBS	Zygomycetes, Mucorales	99
Larva Tenebrionidae	<i>N.obliqua</i>	32T	Uncultured fungus clone TF4	-	84
Galería Tenebrionidae	<i>N.dombeyi</i>	20T	Uncultured fungus clone TF4	-	98
Larva Lucanidae	<i>N.obliqua</i>	14L	<i>Mucor fragilis</i> strain G6	Zygomycetes, Mucorales	99
Galería Tenebrionidae	<i>N.obliqua</i>	35T	Uncultured fungus clone S166	-	98
Galería Tenebrionidae	<i>N.dombeyi</i>	50T	Uncultured fungus clone S166	Agaricomycetes, Polyporales	98
larva Tenebrionidae	<i>N.obliqua</i>	34T	<i>Penicillium</i> sp	Eurotiomycetes, Eurotiales	99
Galería Tenebrionidae	<i>N.dombeyi</i>	57T	<i>Penicillium angulare</i> isolate NRRL	Eurotiomycetes, Eurotiales	100
Galería, Tenebrionidae	<i>N.obliqua</i>	1T	Ascomycete sp.	-	96
Galería Tenebrionidae	<i>N.obliqua</i>	61T	<i>Phialocephala dimorphospora</i>	Leotiomycetes, Helotiales	99

Los hongos aislados directamente de los insectos, se clasificaron en los siguientes grupos i) Absidia, *Absidia spp* ii) Causantes de pudrición (Basidiomicetos), iii) Endófitos de plantas iv) *Trichoderma spp* v) Otros, *Botryosphaericeec* sp y *Eurotium spp*, vi) Grupos no definidos en base de datos. (Tabla 2, Figura 3). Mientras que, los hongos aislados de las galerías

corresponden a i) (*Umbelopsis spp*, *Mucor sp*), ii) *Penicillium*, *Penicillium spp*, iii) Otros, *Phialocephala spp* y iv) Grupos no definidos en base de datos. (Tabla 3, Figura 3).

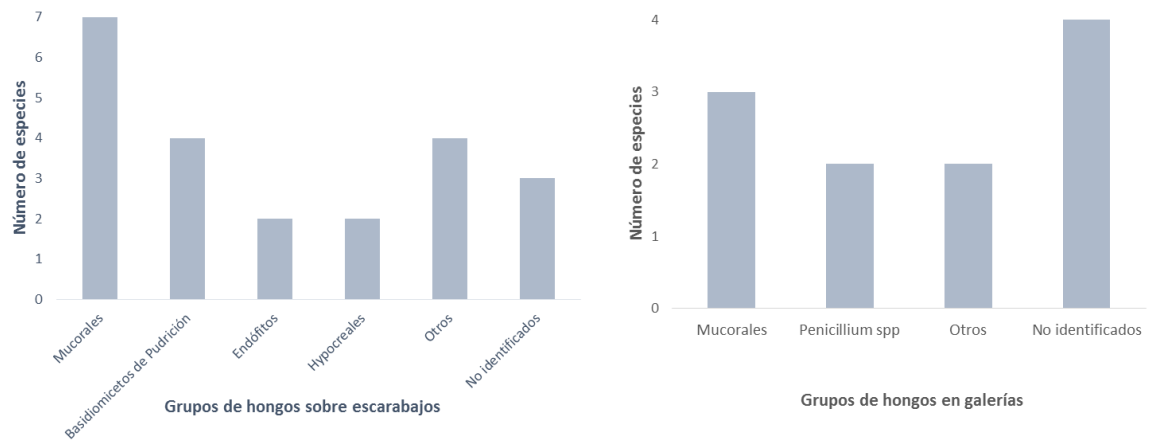
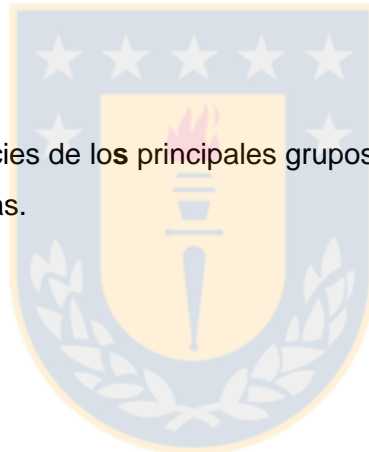


Figura 3. Número de especies de los principales grupos fúngicos asociados a los exoesqueletos y sus galerías.



2.4 DISCUSIÓN

Para la caracterización molecular de los hongos, utilizamos el espacio interno transcrito (ITS), el cual ha sido validado como marcador molecular para diferenciar especies fúngicas (Begerow *et al.* 2010, Schoch *et al.* 2012). El ITS ha sido usado en una amplia variedad de metodologías de investigación. Entre estas, se encuentra el proyecto barcoding “tree of life” y la secuenciación masiva que han permitido mejorar el conocimiento de las comunidades fúngicas en suelos de bosques, encontrando una abundante biodiversidad (Hoffmann *et al.* 2007, Buée *et al.* 2009).

Entre las relaciones más estudiadas, se encuentran las asociaciones entre insectos con bacterias y hongos, siendo estos últimos, factores importantes en algunos casos de muerte de árboles alrededor del mundo (Six y Wingfield 2011, Moon *et al.* 2012, Ploetz *et al.* 2013). A pesar de la relevancia de este tipo de relaciones simbióticas (Margulis y Fester 1991, Six 2013), poca importancia se ha dado al estudio de las comunidades fúngicas asociadas a los insectos de madera en descomposición.

La detección de hongos asociados al exoesqueleto de los insectos muestreados, se explica porque estos organismos habitan y recorren trozas de madera (Tanahashi *et al.* 2009), captando las esporas fúngicas que se encuentran sobre la madera y en la superficie del suelo y habitado principalmente por hongos saprófitos (Osorno 2007). En nuestro estudio, asociados al exoesqueleto de los insectos detectamos hongos saprófitos de los géneros *Absidia* y *Mortierella* (Zygomycetes, Mucorales) (Tabla 2, Figura 3). También se registró la presencia de Basidiomicetes de pudrición blanca, como *Trametes versicolor*, *Stereum hirsutum* y *Bjerkandera adusta*, los cuales cumplen importantes funciones de reciclaje de nutrientes en los ecosistemas forestales (Son *et al.* 2010, Rajchenberg y Robledo 2013), Otros hongos identificados, corresponden a hongos endófitos como *Arthrinium* sp y un hongo identificado en la base de datos como fungal endophyte 9084, que según Persoh (2013), tendrían una gran diversidad de especies aún desconocidas y son una importante fuente de metabolitos secundarios (Lin *et al.* 2012, Abrahao *et al.* 2013), Los hongos endófitos habitan plantas vivas, pero no se descarta la llegada de estructuras reproductivas a madera o suelo, pudiendo ser asociadas a los exoesqueletos de escarabajos. También se encontraron tres especies del género *Trichoderma* spp (Hypocreales), taxones comunes en suelos y ampliamente usados como agentes de biocontrol (Benitez *et al.* 2004, Atanasova *et al.* 2013) y en menor abundancia hongos del género *Penicillium* spp.

En Chile existe una carencia de estudios sobre la biodiversidad de hongos asociados a insectos lignícolas. Este tema es de mucho interés en la zona Centro-Sur, especialmente porque esta zona es considerada como “hotspot” de biodiversidad a nivel mundial, sus bosques nativos muestran un alto grado de endemismo, facilitando la posibilidad de encontrar una diversidad y relaciones de especies aún desconocidas. Tanto en los hongos asociados a insectos como a sus galerías, encontramos algunas especies previamente no identificadas ó con un bajo porcentaje de identidad genética con las bases de datos disponibles, esto no lo consideramos inusual, ya que en la actualidad, una gran parte de la biodiversidad de hongos sobre la tierra permanece como desconocida (Blackwell 2011, Scheffers *et al.* 2012). Este hecho se podría deber a la falta de rigurosidad de las bases de datos de secuencias, es decir, la identificación incompleta o falta de especies secuenciadas para la comparación (Nilsson *et al.* (2006). Aunque es un punto importante, creemos que los estudios de hongos asociados a escarabajos y sus galerías son sistemas altamente específicos, facilitando la detección de especies endémicas aún no descritas y sin información en las bases de datos moleculares.

El transporte de hongos por medio de escarabajos de corteza (Scolytidos) ha sido confirmado por Persson *et al.* (2011), quien estudió los hongos asociados a insectos, galerías y madera. Los autores encontraron 21 especies de hongos, con una relación del 50% entre las especies de hongos aislados de los insectos y la corteza y algunas especies de hongos de pudrición asociadas a galerías y escarabajos. En nuestro caso, no observamos esta relación de especies con las galerías, en las que los hongos dominantes pertenecen al género *Umbelopsis*, (Mucorales), hongo de madera en descomposición y las especies, *Umbelopsis ramanniana* y *Umbelopsis isabellina*, especie explotada en procesos biotecnológicos por su capacidad de producir ácidos grasos (Meeuwse *et al.* 2012).

Las especies de hongos encontradas sólo en las galerías y no en el exoesqueleto, se podría deber a la producción de metabolitos de defensa contra organismos invasores. A modo general, la mayor distribución de algunas especies de hongos, se puede relacionar a mejores estrategias de dispersión y a una mayor tolerancia a estrés ambiental (Desprez-Loustau *et al.* 2007). En este sentido, estudios recientes han permitido la secuenciación de algunos Zigomicetes, demostrando su capacidad genética para colonizar sustratos antes que sus competidores (Parsoonia 2013). Para comprobar este hecho, es preciso estudiar los hongos aislados de las galerías por separado, verificando la producción de metabolitos con potencial actividad fungicida.

Los insectos que habitan los bosques nativos cumplen importantes funciones ecológicas, siendo agentes importantes en la degradación de la madera, tema considerado para la gestión y conservación natural de bosques (Jonsell *et al.* 2007, Bertheau *et al.* 2010, Wu *et al.* 2012, Brin *et al.* 2013). En este sentido, los estudios indican que los taxones de coleópteros estudiados cumplen una importante función en la dispersión de los hongos, hecho confirmado por la movilidad de esporas de un hongo de la familia Polyporaceae por parte de insectos (Soo Park *et al.* 2014). En nuestra investigación, la mayoría de los hongos detectados corresponden a saprófitos asociados principalmente a la superficie de la madera, debido a esto, no se descarta que los insectos habitantes de las trozas sean capaces de transportar en sus exoesqueletos esporas o paquetes de micelio de hongos, posiblemente facilitando la degradación de material lignícola en otros sitios y también, la dispersión de otras especies fúngicas. Los insectos estudiados cumplen fases de su desarrollo (huevo y larva) en galerías que excavan en la madera, este hecho también posibilitaría la interacción con algunos hongos saprófitos. Como continuación del estudio recomendamos validar el transporte específico de esporas con una mayor cantidad de insectos y el posible transporte específico de hongos.

Los actuales cambios en la biodiversidad de los bosques, se debe principalmente a factores antropogénicos; en este sentido el cambio climático global con el incremento de la temperatura, afectará de manera importante a las poblaciones de insectos y también a sus hongos simbioses, causando potenciales daños ecológicos (Hulcr y Dunn 2011); esto ha llevado a incluir datos de los simbioses en los modelos de predicción de invasiones biológicas (Six 2013). Sin embargo y a pesar de la importancia de los organismos simbioses, poco interés se ha dado al efecto de las alteraciones sobre la comunidad de hongos asociados a insectos habitantes de madera en descomposición.

Los trabajos realizados hasta el momento, han sido enfocados en especies fúngicas como los escarabajos de corteza, debido a su importancia económica por ser agentes dispersores de hongos manchadores de madera del orden Ophiostomatales y con algunas especies consideradas fitopatógenas (Linnakoski *et al.* 2010, Popa *et al.* 2012, Six 2013). También los escarabajos de ambrosia han sido ampliamente estudiados debido a sus capacidad de cultivar hongos que transportan en estructuras especializadas llamadas micangios (Ploetz *et al.*, 2013). En nuestras especies estudiadas no existe información sobre relaciones con hongos en estructuras como micangios o invaginaciones que permitirían el transporte específico de hongos, esta falta de información se debe principalmente a que las especies no tienen impacto económico comparado con algunos Scolitydos como los escarabajos de corteza.

Otros estudios realizados por Laaksonen *et al.* (2008), Nordén *et al.* (2013) elaboraron una lista de hongos habitantes de madera, las que han sido catalogadas en lista roja (alto riesgo), por su alta especificidad y baja abundancia natural. En este sentido, nuestros resultados a nivel molecular indican que en el ambiente de bosque nativo, existirían nuevas especies de hongos, lo que será confirmado por estudios morfológicos y otros marcadores moleculares, según sea necesario. En nuestro criterio, estas especies deben ser estudiadas en profundidad, para verificar su abundancia y potencial función en el ecosistema, para así, ser consideradas en la gestión y conservación del bosque nativo.



2.5 BIBLIOGRAFÍA

- Abdelkader S, M Hamed. 2012. In-vitro studies on Wood degradation in soil by soft-rot fungi: *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 78:98-102.
- Abrahao M, G Molina, G Pastore. (2013). Endophytes: Recent developments in biotechnology and the potencial for flavour production. *Food Research International*. 52:367-372.
- Ahmad F, G Daglish, A Ridley, P Burrill, G Walter. (2013). Short-range location by *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera:Tenebrionidae) demonstrates a strong preference for fungi associated with cotton seed. *Journal of Stored Products Research*.52:21-27.
- Altschul S, T Madden, A Schaffer, J Zhang, Z Zhang, W Miller, D Lipman. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 268:3389-3402.
- Arroyo M, Marquet P, Marticorena C, Simonetti J, Cavieres L, Squeo F, Rozzi R, Massardo F. 2010. El hotspot Chileno, prioridad mundial para la conservación. *Diversidad de Ecosistemas, ecosistemas terrestres*.
- Atanasova L, S Le Crom, S Gruber, F Couplier, V Seidl-Seiboth, C Kubicek, S Druzhinina. 2013. Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. *BMC Genomics* 14:121.
- Ayres M, R Wilkens, C Ruel, M Lombardero, E Vallery. (2000). Nitrogen budges of phloem-feeding bark beetles with and without symbiotic fungi. *Ecology*. 81:2198-2221.
- <http://www.barcodeoflife.org>.
- Benítez T, A Rincon, M Limón, A Codón. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. 7:249-260.
- Berkov A, J Feinstein, J Small, M Nkamany, P Centeno. (2007). Yeast isolated from Neotropical wood-boring beetles in SE Peru. *Biotropica*. 39(4):530-538.
- Biedermann P, K Klepzig, M Taborsky, D Six. (2013). Abundance and dynamics of filamentous fungi in the complex ambrosia gardens of the primitively eusocial beetle

- Xyleborinus saxenii Ratzeburg (Coleopteran: Curculionidae, Scolytinae). *FEMS Microbiology Ecology*. 83:711-723.
- Boddy L, J Heilmann-Clausen. (2008). Chapter 12 basidiomycete community development in temperate angiosperm wood. 28:211-237.
 - Blackwell M. (2011). The fungi:1,2,3...5.1 million species?. *American Journal of Botany*. 98 (3): 426-438.
 - Begerow D, H Nilsson, M Unterseher, W Maier. (2010). Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Applied Microbiological Biotechnology*. 87:99–108.
 - Berg G, A Promis. (2011). Conservación de los bosques nativos de Chile- Un análisis al informe FAO sobre la evaluación de los recursos forestales nacionales. *Bosque Nativo* 48:9-11.
 - Bertheau C, E Bronckerhoff, M Roux, F Leutier, H Jactel. (2010). Novel insect-tree associations resulting from accidental and intentional biological ‘invasions’: a meta-analysis of effects on insect fitness. *Ecology Letters*. 13:506-515.
 - Buée M, M Reich, C Murat, E Morin, R Nilsson, S Uroz, F Martin. (2009). 454 pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist*. 184:449-456.
 - Brin A, C Bouget, L Valladares, H Brustel. (2013). Are stumps important for the conservation of saproxylic beetles in managed forest?-Insights from a comparison of assemblages on logs and stump in oak-dominated forest and pine plantations. *Insect Conservation and Diversity*. 6:255-264.
 - Carpaneto G, S Chiari, P Audisio, P Leo, A Liberto, N Jansson, A Zauli. (2013). Biological and distributional overview of the genus Eledonoprius (Coleoptera: Tenebrionidae): Rare fungus-feeding beetles of European old-growth forest. *European Journal of Entomology*. 110(1):173-176.
 - Cwielong P, M Rajchenberg. (1995). Wood-rottingfungi on Nothofagus-pumilio in Patagonia, Argentina. *European Journal of Forest Pathology*. 25(1):47-60.
 - Dai Y, B Cui, H Yuan, B Li. (2007). Pathogenic Wood-decaying fungi in China. *Forest Pathology*. 37:105-120.

- Desprez-Loustau M, C Robin, M Buée, R Courtecuisse, J Garbaye, F Suffert, I Sache, D Rizzo. (2007). The fungal dimension of biological invasions. *Trends in Ecology and Evolution*. 22:472-480.
- Doyle J, L Doyle. (1990). Isolation of plant of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15.
- Gamauf C, B Metz, B Seiboth. (2007). Degradation of plant cell wall polymers by fungi. *Mycota*.4:325-340.
- Grossi, P, M.J. Paulsen. 2009. Generic limits in South American stag beetles: taxa currently misplaced in *Sclerostomus* Burmeister (Coleoptera: Lucanidae: Lucaninae: Sclerostomini). *Zootaxa* 2139: 23–42.
- Hajek, A., Ch. Nielsen, R M. Kepler, S. J. Long, and L. Castrillo. 2013. Fidelity Among Sirex Woodwasps and Their Fungal Symbionts. *Microbial Ecology*. 65(3): 753–762.
- Henle K, K Davies, M Kleyer, C Margules. (2004). Predictors of species sensitivity to fragmentation. *Biodiversity and Conservation*. 13:207-251.
- Hoffmann K, S Discher, K Voigt. (2007). Revision of the genus *Absidia* (Mucorales, Zygomycetes) based on physiological, phylogenetic, and morphological characters; thermotolerant *Absidia* spp. Form a coherent group, Mycocladiaceae fam.nov. *Mycological Research*.1169-1183.
- Hofstetter R, J Cronin, K Klepzig, J Moser, M Ayres. (2006). Antagonism, mutualisms and commensalisms affect outbreak dynamics of southern pine beetle. *Oecologia*. 147:679-691.
- Hulcr J, R Dunn. (2011). The sudden emergence of pathogenicity in insect-fungus symbioses threatens naïve forest ecosystems. *Proceedings of Royal Society*. 278:2866-2873.
- Jonsell M, J Hansson, L Wedno. (2007). Diversity of saproxylic beetle species in logging residues in Sweden- Comparisons between tree species and diameters. *Biological Conservation*. 138:89-99.
- Jordal B, A Cognato. (2012). Molecular phylogeny of bark and ambrosia beetles reveals multiple origins of fungus farming during periods of global warming. *BMC Evolutionary Biology*.12:133-140.

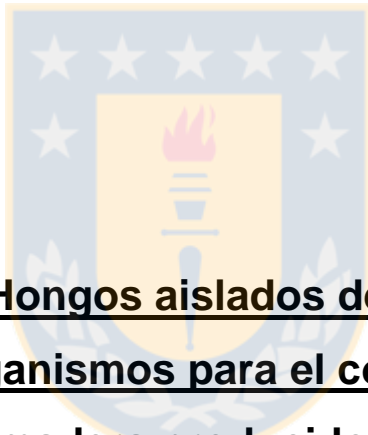
- Klut S, A Kruess, T Tschardtke. (2002). Insects as vector of plant pathogens: mutualistic and antagonistic interaction. *Plant Animal Interactions*. 133:193-199.
- Laaksonen M, E Peuhu, G Varkonyi, J Siitonen. (2008). Effects of habitat quality and landscape structure on saproxylic species dwelling in boreal spruce-swamp forest. *Oikos*. 117:1098-1110.
- Lanfranco D, S Ide, C Ruiz, H Peredo, I Vives. (2001). Insectos asociados a trozas de *Pinus radiata*, *Eucalyptus globulus*, y *Laurelia philippiana* en la octava y décima región de Chile. *Bosque*. 22:69-75
- Li X, G Wheeler, J Ding. (2012). A leaf-rolling weevil benefits from general saprophytic fungi in polysaccharide degradation. *Arthropod-Plant Interactions*. 6: 417-424.
- Lin Y, C Cun, Z Long. (2012). Current perspectives on the volatile-producing fungal endophytes. *Criticals Reviews in Biotechnology*. 32(4): 363-373.
- Linnakoski R, Z.W De Beer, J Ahtiainen, E Sidorov, P Niemela, A Pappinen, M.J Wingfield. (2010). *Ophiostoma* spp. Associated with pine-and spruce-infesting bark beetles in Finland and Russia. *Persoonia*. 25:72-93.
- Maddison W, M Donoghue, D Maddison. (1984). Outgroup analysis and parsimony. *Systematic Zoology*. 33:83-103.
- Margulis L, R Fester. (1991). Symbiosis as a source of evolutionary innovation: Speciation and morphogenesis. *MIT Press*, Boston.
- Meeuwse P, P Akbari, J Tramper. (2012). Modeling grown, lipid accumulation and lipid turnover in submerged batch cultures of *Umbelopsis isabellina*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 35(4):591-603.
- Moon M, J Park, S Seo, K Kim. (2012). Microstructure of the prothoracic mycangia in the ambrosia beetle *Platypus koryoensis* (Coleoptera: Curculionidae:Platypodinae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 15:51-57.
- Nguyen N, S Suh, C Marshall, M Blackwell. (2006). Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeast, *Spathaspora passalidarum* gen.sp.nov.and *Candida jeffriesii* sp.nov. *Mycological Research*.110:1232-241.

- Nilsson R, M Ryberg, E Kristiansson, K Abarenkov, K Larsson. (2006). Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence database: a fungal perspective. *PLS ONE*.1:59.
- Nordén J, R Penttila, J Siitonen, E Tomppo, O Ovaskainen. (2013). Specialist species of Wood-inhabiting fungi struggle while generalists thrive in fragmented boreal forest. *Journal of Ecology*.101:701-712.
- Olsson J, T Johansson, B Johnson, J Hjaltén, M Edman, L Ericson. (2012). Landscape and substrate properties affect species richness and community composition of saproxylic beetles. *Forest Ecology and Management*. 286:108-120.
- Ostry M, G Laflamme. 2009. Fungi and diseases – natural components of healthy forest. *Botany-Botanique*. 87(1):22-25.
- Osorno T. (2007). Ecology of ligninolytic fungi associated with leaf litter decomposition. *Ecology Research*. 22:955-974.
- Paulsen M.J. 2005. A revision of the southern South American stag beetles of the genus *Sclerostomus* Burmeister (Coleoptera: Scarabaeoidea: Lucanidae). *Zootaxa* 1060: 1–26
- Persoh D. (2013). Factors shaping community structure of endophytic fungi-evidence from the Pinus-Viscum-System. *Fungal Diversity*. 60(1): 55-69.
- Persson Y, K Ihrmark, J Stenlid. (2011). Do bark beetles facilitate the establishment of rot fungi in Norway spruce?. *Fungal Ecology*. 4: 262-269.
- Popa V, E Deziel, R Lavalley, E Bauce, C Guertin. (2012). The complex bark beetle symbiotic relationship with microorganisms: a potencial practical approach for biological control in forestry. *Society of Chemical Industry*. 23:12-23
- Ploetz R, J Hulcr, M Wingfield, W Z de Beer. (2013). Destructive tree diseases associated with ambrosia and bark beetles: Black swan events in tree pathology. *Plant Disease*. 95:7.
- Rajchenberg M, G Robledo. (2013). Pathogenic polypores in Argentina. *Forest Pathology*. 3:171-184.
- Rajchenberg M. (1997). Los hongos pudridores de *Nothofagus pumilio* (Lenga): identificación de los cultivos puros. *Bosque* 17:87-100

- Rojas E, R Gallardo. 2004. Manual de insectos asociados a maderas en la zona centro sur de Chile. Servicio Agrícola y Ganadero.
- Ronquist, F, J.P Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 19, 1572–1574.
- Scheffers B, L Joppa, S Pimm, W Laurance. (2012). What we know and don't know about Earths missing biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution*. 27(9):501-510.
- Schoch L, K Seifert, S Huhndorf, V Robert, J Spouge, A Levesque, W Chen. 2012. Fungal barcoding consortium. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *PNAS Microbiology*. 16:6241-246.
- Six D. (2013). The bark beetle Holobiont: Why microbes matter. *Journal of Chemical Ecology*. 39:989-1002.
- Six D, M.J Wingfield. (2011). The role of phytopathogenicity in bark beetle-fungus symbioses: A challenge to the classic paradigm. *Annual Review of Entomology*. 56:255-72
- Son E, J Kim, Y Lim, A Yeung, C Yang, C Breuil. (2010). Diversity and decay ability of basidiomycetes isolated from lodgepole pines killed by the mountain beetle. *Journal Microbiology*. 57:33-41
- Soo Park M, J Fong, H Lee, S Shin, S Lee, N Lee, Y Woon Lim. (2014). Determination of coleopteran insects associated with spore dispersal of *Cryptoporus volvatus* (Polyporaceae: Basidiomycota) in Korea. *Journal of Asia.Pacific Entomology*. 17:647-651.
- Suh S, J McHugh, M Blackwell. (2006). The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeast. *Mycological Research*. 109:261-265.
- Tanahashi M, N Matsushita, K Togashi. (2009). Are stag beetles fungivorous?. *Journal of Insect Physiology*. 55:983-988.
- Tanahashi M, K Kubota, M Matsushita, K Togashi. (2010). Discovery of mycangia and the associated xylose-fermenting yeast in stag beetles (Coleoptera: Lucanidae). *Naturwissenschaften*. 97: 311-317.
- Vidal P, M.Guerrero. 2007. Los Tenebrionidos de Chile. Ediciones Universidad Católica de Chile. 478 pp.

- Warren JM, A Lee, F Booker. (2002). Mineral nutrition resin flow and phloem phytochemistry in loblolly pine. *Tree Physiology*. 19:655-663.
- White T, T Bruns, S Lee, J Taylor. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), *PCR protocols: a guide to methods and application*: 315–322. Academic Press, San Diego, USA.
- Wu J, H Pan, S Yang, X Niu. (2013). Tree species and elevation influence the assemblage composition of saproxylic beetles in subtropical forest of east China. *Forest Ecology and Management*. 292:29-38.
- Zhang N, S Suh, M Blackwell. (2003). Microorganisms in the gut of beetles: evidence from molecular cloning. *Journal of Invertebrate Pathology*.84:226-233.





**CAPÍTULO III. Hongos aislados de insectos lignícolas:
fuente de organismos para el control biológico del
manchado de madera producido por *Ophiostoma* sp.**

Resumen

El manchado azul de madera es considerado un problema para la industria maderera, este fenómeno es producido principalmente por hongos del orden Ophiostomatales. Para su control, tradicionalmente se han utilizado compuestos químicos que son tóxicos para el medioambiente. Por este motivo, se buscan productos alternativos que sean compatibles con el medio ambiente como los productos biológicos. La investigación testeó el uso de 4 hongos (*Trichoderma* spp y *Arthrimum* sp) aislados de insectos de madera habitantes en bosque de *Nothofagus* spp, tanto en forma de micelio como sus extractos totales en medio líquido, para el control de una cepa de *Ophiostoma* manchadora de madera. Los resultados muestran que las cepas testeadas son capaces de inhibir el desarrollo del manchador, especialmente si el agente controlador se inocula antes del establecimiento del manchador y en el caso de los extractos, incubado previo y al mismo tiempo del manchador. La investigación realizada es la base para el uso de estos organismos en la futura formulación de un producto biológico para la prevención del manchado de madera a nivel nacional.



3.1 INTRODUCCIÓN.

La industria maderera en Chile se encuentra en un constante crecimiento, con plantaciones de especies nativas de *Nothofagus* spp, destacándose *Nothofagus dombeyi* y *Nothofagus alpina* (Donoso y Soto., 2010) y con plantaciones de la especie introducida *Pinus radiata* D. Don, extendiéndose a lo largo de la zona Centro-Sur. (Berg y Promis., 2011). La producción de madera se ve afectada por agentes biológicos que alteran su estructura o su estética, en este último caso, los hongos del orden Ophiostomatales son considerados una amenaza por su rápida colonización y crecimiento en coníferas, otorgando una coloración que varía entre azul y negro, dejando madera considerada de calidad secundaria y de menor valor económico. (Ruiz y Lanfranco, 2008).

Los hongos del orden Ophiostomatales se dividen en tres géneros, con sus teleomorfos *Ophiostoma*, *Grosmania* y *Ceratocystiopsis* y sus anamorfos que incluyen: *Leptographium*, *Graphium*, *Pesotum* y *Sporothrix*. (Zipfel *et al.*, 2006), siendo los principales agentes causantes de manchado de madera alrededor del mundo (Popa *et al.*, 2012 ; Six y Wingfield., 2011). Así como también, de otras patologías importantes como el marchitamiento vascular del ulmo (Díaz *et al.*, 2013). Entre las principales características de estos hongos, se encuentra su capacidad de penetrar la albura, manchando profundamente la madera.

Para el control de hongos manchadores, tradicionalmente se han utilizado compuestos químicos, entre los que destacan los compuestos organoclorados, como el Pentaclorofenol (PCP) y el Pentaclorofenato de sodio (PCPNa), en Chile, prohibidos desde el año 1999 por su impacto negativo para el medioambiente y los trabajadores (Lanfranco *et al.*, 2004). Además, la comunidad Europea y países con una amplia trayectoria forestal han prohibido su uso (FAO/UNEP.,1995). Posteriormente se utilizó el Tribromofenol (2,4,6 TBP), compuesto también tóxico y de difícil degradación (Gutierrez *et al.*, 2002). En nuestro país se han investigado algunas formulaciones alternativas, probando una batería de compuestos químicos, pero con resultados menos efectivos que el PCP (Montes *et al.*, 2001). Por la naturaleza y estabilidad química de estos compuestos, se hace indispensable la utilización de compuestos de menor toxicidad y de fácil degradación en el medioambiente.

La alternativa que está tomando cada vez más adeptos es el control biológico, concepto basado en el uso de organismos antagonistas, que reduzcan o inhiban la actividad de un organismos por medio de mecanismos biológicos (Gradinger *et al.*, 2009). En este contexto, existen estudios que prueban la actividad de hongos antagonistas a manchadores, como la

especie *Phlebiopsis gigantea* (Behrendt *et al.*, 2001). Otras investigaciones realizadas han dado un énfasis especial en cepas albinas de *Ophiostoma piliferum* y *Ceratocystis resinifera*, encontrándose como productos comerciales, llamados Cartapip-97 y Kasper respectivamente (Behrendt *et al.*, 1994; Morin *et al.*, 2005). En Chile existen estudios relacionado al crecimiento dimorfo (micelio-levadura) y sobre el efecto en la permeabilidad de cepas albinas (Hernandez *et al.*, 2011; Berrocal *et al.*, 2012) Otras formas alternativas de control, mediante compuestos con actividad antimanchas han sido aislados de hongos (Ayer y Kawahara., 1995 ; Vanneste *et al.*, 2002), cianobacterias y bacterias (Zulpa *et al.*, 2003). Estos productos presentan la ventaja de ser biodegradables y de muy baja toxicidad para el medioambiente.

De interés particular, son algunos hongos filamentosos (Hypocreales, *Trichoderma spp.*) que han sido ampliamente utilizados como biocontroladores (Benitez *et al.*, 2004; Chittenden y Singh., 2009; Gradinger *et al.*, 2009; Infante *et al.*, 2009), demostrando ser eficaces en el control del crecimiento de manchadores en bloques de madera (Gradinger *et al.*, 2009). En Nueva Zelanda, se seleccionaron algunas cepas de *Trichoderma spp* para pruebas de antagonismo en terreno inhibiendo el desarrollo de manchadores. (Vanneste *et al.*, 2002). A su vez, recientemente se ha dado especial atención al descubrimiento y aplicación de hongos endófitos, encontrando una gran biodiversidad, con un alto potencial para la obtención de metabolitos con actividad biológica (Hoffman., 2008; Sumara & Miller., 2009; Suryanarayanan., 2013).

El bosque nativo de la zona centro sur de Chile es considerado como punto crítico de biodiversidad a nivel mundial "Hotspot", sugiriendo un alto potencial para el aislamiento y cultivo de hongos endémicos para ser utilizados como antagonistas de hongos manchadores de madera. En este sentido, se ha trabajado principalmente con especies de amplia distribución mundial como algunas especies de hongos albinos del género *Ophiostoma spp* y algunas especies específicas de *Trichoderma spp* (Benitez *et al.*, 2004; Morin *et al.*, 2005; Chittenden y Singh., 2009)

El trabajo realizado, incluye la prueba de la capacidad antagónica en forma de micelio y extracto total de algunas especies de *Trichoderma* y *Arthrimum*, aislados de insectos lignícolas en bosques de *Nothofagus spp*, contra el hongo manchador de madera *Ophiostoma sp*. Se evaluó la inhibición *in vitro* por medio de confrontación en placas y pruebas en probetas de madera de *Pinus radiata*. La principal pregunta de investigación fue, dentro de los hongos aislados: ¿existen especies o extractos con capacidad de inhibir el crecimiento del hongo manchador en madera de *Pinus radiata*?

3.2 METODOLOGÍA

Toma de muestras y aislamiento de hongos

Escarabajos de las familias (Lucanidae, N=2 y Tenebrionidae N=3) fueron recolectados vivos en madera muerta correspondiente a troncos caídos con corteza y en estado avanzado de descomposición en bosque de *Nothofagus spp.* localizado en la Región del Maule, Reserva Nacional Altos de Lircay, Talca. Estos fueron mantenidos en tubos Eppendorf a temperatura ambiente. Luego fueron lavados en agua destilada por 30 segundos y fueron deslizados y aplastados directamente sobre medio de cultivo sólido (MEA 2%, extracto de malta, suplementado con 200mg/l de streptomycin). La selección primaria de los cultivos se realizó según el tipo de morfología en placas.

Extracción de ADN y amplificación por PCR

La extracción de ADN de las muestras se realizó a partir de micelio, según la metodología descrita por (Doyle & Doyle, 1990). Para la amplificación de la región correspondiente al espaciador interno transcrito (ITS), se utilizaron los partidores universales (ITS1F-ITS4), descritos en (White *et al.*, 1990). La amplificación del ITS se realizó según las siguientes condiciones: 94°C por 4 minutos, seguido por 30 ciclos de (94°C 40 segundos, 60°C 40 segundos, 72°C 1 minuto) y un paso de elongación final de 72°C 10 minutos.

Secuenciación del producto de PCR

Los productos de PCR obtenidos fueron enviados a la empresa MacroGen, Corea, para su secuenciación. Luego, se evaluó la identidad y cobertura con las secuencias disponibles en la base de datos de GenBank, usando el algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1997) disponible en el sitio Web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Ensayo de confrontación monoxénica en placas

Se inocularon discos de micelio de 1.5 cm de los hongos *Trichoderma* spp FN1 y *Arthrinium* sp FN2 y del hongo manchador *Ophiostoma* sp N1, en los extremos opuestos de placas con medio sólido. Las placas se dejaron por un período de 10 días a temperatura ambiente. Luego se evaluó el porcentaje de inhibición midiendo el crecimiento radial y se observó la formación de barreras de inhibición según Díaz *et al.*, (2013). En todos los experimentos se inocularon placas control para cada hongo de modo axénico. La cepa de *Ophiostoma* utilizada, fue conseguida en el Departamento de Tecnología de la Madera de la Universidad

del Bio Bío, Concepción. Los hongos nativos aislados son mantenidos en el cepario del laboratorio de Micología y Micorrizas.

Obtención de extractos totales

Los hongos fueron cultivados en medio líquido (MEA 2% suplementado con streptomicina) y incubados a temperatura ambiente y agitación constante (100 rpm) por un período de 21 días. Posteriormente, se realizó la separación del micelio del medio de cultivo por filtración en papel Whatman N°4. Para la extracción de metabolitos, el medio de cultivo y el micelio se trataron de forma separada con una mezcla de Acetato de Etilo-Hexano (1:1). En el caso del micelio, se llevó a un baño de ultrasonido por 30 minutos. Para mejorar la extracción, el procedimiento se repitió 2 veces. Luego los extractos obtenidos se concentraron en un rotavapor y posteriormente se redisolviaron en metanol según Hernández & Rangel (2012).

Pruebas de inhibición en probetas de madera.

La prueba de inhibición en madera, se realizó con los hongos previamente utilizados en las pruebas de confrontación, los ensayos fueron realizados en trozos de madera (7 x 2 por 0.9 cm) de *Pinus radiata* previamente esterilizados a 50°C en una cámara de incubación marca KOTTERMAN por 8 horas. Los hongos se crecieron en medio de cultivo sólido (MEA 2%), y una vez alcanzado su crecimiento, el micelio se resuspendió en agua destilada para su inoculación (0,1 gr inóculo/1 mL, 10^6 ufc/ml) según (Behrendt *et al.*, 1994). El diseño del experimento se realizó de la siguiente manera i) La inoculación del hongo nativo ó la aplicación del extracto total 15 días antes que el hongo manchador ii) La inoculación de ambos hongos ó extracto total del hongo nativo simultáneamente iii) La inoculación del hongo nativo ó aplicación del extracto total 15 días después del hongo manchador. Para las pruebas con extractos, estos fueron concentrados en rotavapor y resuspendidos en metanol, luego se realizaron diluciones del extracto en valores de 200, 1000 y 2000ppm, para el cálculo de la concentración mínima inhibitoria según la norma ASTM D4445-10. Todos los experimentos se realizaron en placas petri plásticas cerradas y el sustrato utilizado para la mantención de humedad fue vermiculita previamente esterilizada con agua destilada (15 gr vermiculita en 50 mL de agua destilada). Las cámaras se dejaron incubando según los tiempos de los experimentos descritos anteriormente. En todos los experimentos se usó un control negativo/positivo y para verificar una posible degradación, se pesó la madera al inicio y finalizado el experimento. Los resultados fueron obtenidos en porcentaje de coloración medido cualitativamente usando una escala de 1 a 5 según norma ASTM y fue transformado

en porcentajes para cada caso, siendo el 100% correspondiente al control positivo. Las pruebas se realizaron en triplicado.

Análisis estadísticos de datos

Para evaluar si el tipo de hongos, tratamiento con micelio o extractos y tipo de experimento (Exp1-2-3) producen cambios en el porcentaje de manchado se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de tres vías. Previo al análisis se evaluaron los supuestos de normalidad, y se evaluó la homogeneidad de varianza. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos, posteriormente al existir diferencias significativas se realizó una prueba post-hoc HSD de Tukey para comparar las medias entre cada tratamiento. Para todas las pruebas estadísticas se utilizó el paquete estadístico STATISTICA Versión 7.0 sobre Windows.

3.3 RESULTADOS

Las pruebas de confrontación en placas que se realizaron con las cepas seleccionadas presentaron una marcada actividad antagonista que fue medida por el crecimiento del hongo manchador después de 12 días de cultivo monoxénico. Los crecimientos del hongo manchador no superaron los 2,5 cm en el caso de confrontación con los hongos *Trichoderma* y alcanzaron 4 cm en el caso de *Arthrinium* sp (**Dato no mostrado**). Algunos de estos hongos, según su morfología en placas, rápido crecimiento y estructuras microscópicas, fueron previamente asociados al género *Trichoderma* spp (**Figura 2**). En los ensayos de confrontación no se formaron líneas de antagonismo (**Figura 1**).

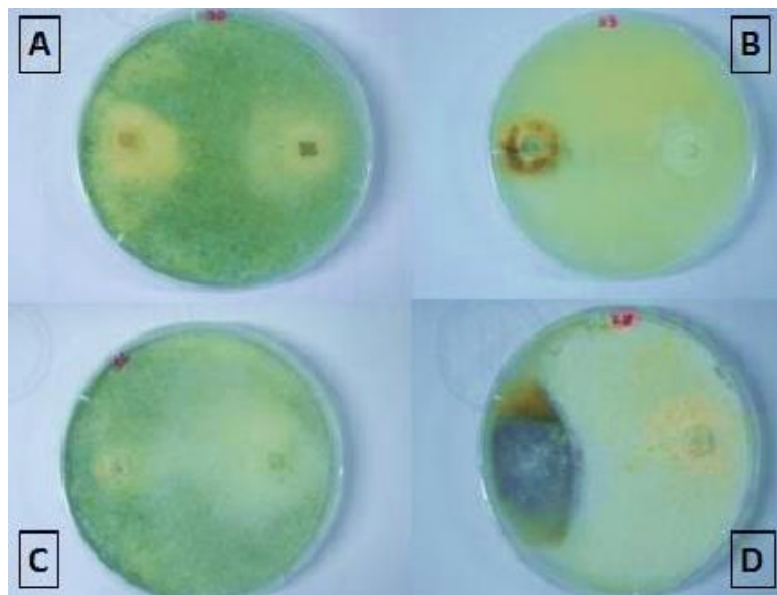


Figura 1. Ensayos de confrontación en placas con las cepas seleccionadas A. *Trichoderma samuelsii* B. *Trichoderma album* C. *Trichoderma viride* D. *Arthrinium* sp. El hongo manchador fue inoculado al lado izquierdo. Los ensayos se realizaron en duplicado.

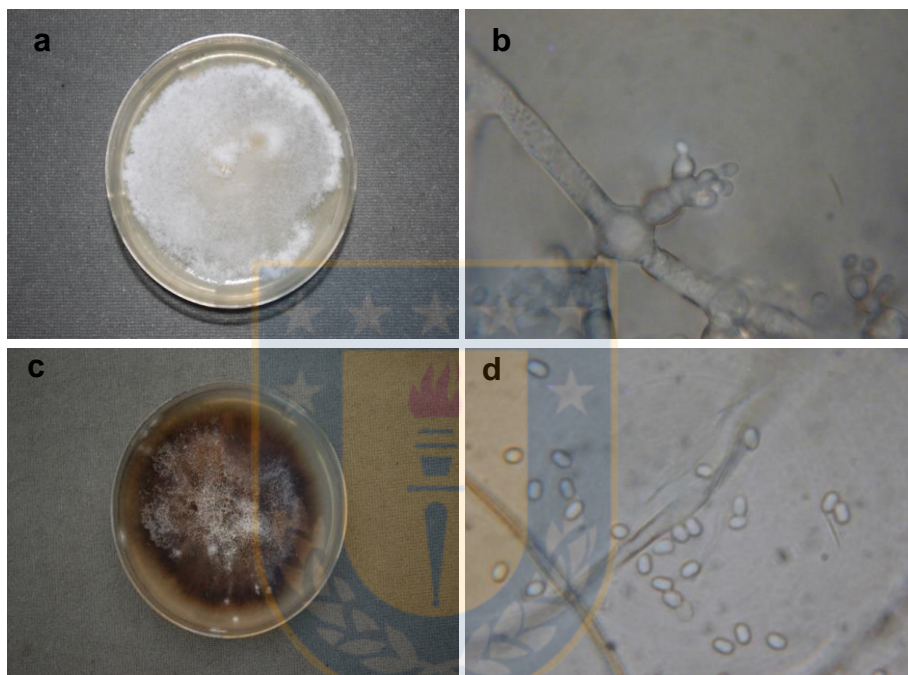


Figura 2. Caracterización morfológica del hongo *Trichoderma álbum* y la especie de *Ophiostoma* sp. a/b: Cultivo, Hifas y conidióforos de *Trichoderma album* . c/d: Cultivo y Conidios de *Ophiostoma* sp .

La caracterización molecular de las cepas seleccionadas se realizó por medio de amplificación por PCR y posterior secuenciación del espacio interno transcrito (ITS). Los resultados obtenidos de la caracterización molecular fueron 3 especies de género *Trichoderma* y una especie de hongo cercano a *Arthrinium* sp, hongo descrito como endófito de madera (Tabla 1).

Fuente aislado	Nombre Genbank	% Identidad Blast	Numero de acceso	Tamaño secuencia (pb)
	<i>Trichoderma</i>			535
Tenebrionidae	<i>samuelsii</i>	100	JN715592.1	
Tenebrionidae	<i>Trichoderma viride</i>	100	HM037962.1	552
	<i>Hypocrea sp JZ-2</i>			565
	(<i>Trichoderma</i>	99		
Lucanidae	<i>álbum</i>)		HQ637334.1	
Tenebrionidae	<i>Arthrinium sp</i>	99	HQ328041.1	540

Tabla 1. Resultados de identificación BLASTn de los hongos seleccionados en las pruebas de antagonismo en placas.

Luego de la caracterización molecular se realizaron las pruebas en probetas de *Pinus radiata* (**Figura 3**). Los ensayos de inoculación del hongo nativo y los extractos 14 días antes del manchador mostraron una inhibición completa de la coloración externa y interna causada por la cepa *Ophiostoma sp*, solo el ensayo con la especie *Arthrinium sp*. presentó un grado menor de manchado. Obteniendo diferencias significativas $p < 0.05$ comparado con los experimentos de inoculación al mismo tiempo y después de establecido el manchador (Tabla 2).

La inoculación conjunta del hongo antagonista y del manchador resultó en distintos grados de inhibición del crecimiento del manchador, según la cepa testeada (Tabla 2; Figura 4). Logrando una inhibición del manchado comparado con el control. En el caso de los extractos, estos lograron inhibir completamente el efecto del hongo manchador con excepción de la especie *Arthrinium sp*. (Tabla 2).



Figura 3. Resultados del manchado externo en las pruebas de inoculación en *Pinus radiata*. a: Inhibición de la coloración con inóculo miceliar de *Trichoderma viride*. b) Inhibición de la coloración con inóculo miceliar de *Trichoderma album*. c) Inhibición de la coloración con extracto total de *Arthrinium* sp. Exp 1-2-3: Formas de inoculación. Las muestras se presentan en duplicado.

La inoculación del hongo antagonista, después de establecido el hongo manchador resultó en una menor inhibición del crecimiento del manchador, según la cepa probada (Tabla 2; Figura 3). En los experimentos con inóculo miceliar, existió una alta actividad del manchador y con diferencias entre la coloración interna y externa $p > 0.05$. Los extractos presentaron una más alta inhibición del manchado, con diferencias entre la coloración interna y externa. En todos los experimentos realizados no existió degradación de la madera (pérdida de peso) al final del proceso.

Inoculación	(a) Experimento1		(b) Experimento2		(c)Experimento3	
	Antagonista/Manchador		Antagonista=Manchador		Manchador/Antagonista	
Hongos	Coloración externa (%)	Coloración interna (%)	Coloración externa (%)	Coloración interna (%)	Coloración externa (%)	Coloración interna (%)
<i>Trichoderma viride</i>	0	0	24 +/- 4.5	15.3+/-3.2	75.3+/-2.5	35.6+/-5.1
<i>Trichoderma samuelsii</i>	0	0	15+/-5	6.3+/-3.2	68.3+/-7.6	36.6+/-7.6
<i>Trichoderma album</i>	0	0	41+/-5.2	12+/-4.5	70+/-4.5	23.6+/-8.1
<i>Arthrinium sp</i>	1.6+/-2.7	5.6+/-4.8	75.3+/-4.7	46.3+/-6.5	84.3+/-4.0	51+/-2.6
Control +	86+/-3.5	55+/-3.9	84+/-4.6	50+/-4.2	86+/-4.5	54+/-3.7
Extractos						
<i>Trichoderma viride</i>	0	0	0	0	57.3+/-2.0	26+/-3.5
<i>Trichoderma samuelsii</i>	0	0	0	0	66+/-6.0	28.6+/-3.5
<i>Trichoderma album</i>	0	0	0	0	79.6+/-3.2	39+/-5.2
<i>Arthrinium sp</i>	1.6+/-2.7	5.6+/-4.8	6.66+/-6.1	1.3+/-2.2	74.6+/-6.1	20.3+/-5.1
Control +	84+/-4.0	52+/-3.7	82+/-3.2	56+/-3.6	87+/-5.6	50+/-6.1

Tabla 2. Experimentos de inoculación con micelio y extractos totales sobre probetas de madera de *Pinus radiata*. (a) antagonista (hongo y extracto) inoculado 15 días antes que manchador, (b) antagonista (hongo y extracto) inoculado al mismo tiempo que manchador (c) hongo manchador inoculado 15 días antes que antagonista (hongo y extracto). El valor final corresponde al promedio de coloración. El control positivo corresponde a la incubación del hongo manchador.

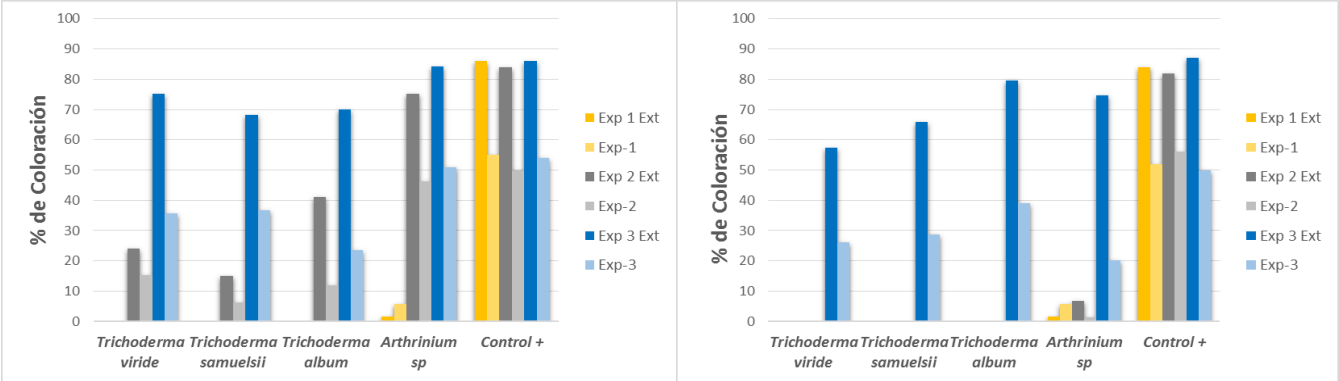
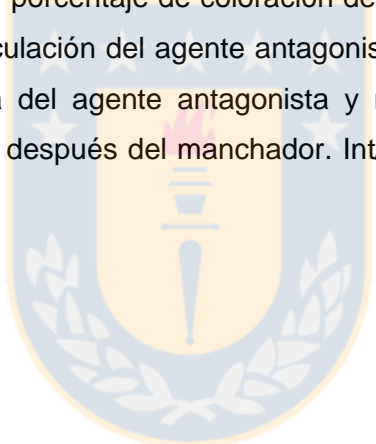


Figura 4. Experimento de inoculación con micelio y extractos sobre la actividad del hongo manchador en madera de *Pinus radiata*. De izquierda a derecha: porcentaje de coloración de la inoculación con hongos y porcentaje de coloración de la inoculación con extractos totales. Exp 1: Experimento de inoculación del agente antagonista 15 días antes que el manchador. Exp2: Inoculación conjunta del agente antagonista y manchador. Exp 3: Inoculación del agente antagonista 15 días después del manchador. Int/Ext: coloración interna y externa de la madera.



3.4 DISCUSIÓN

La asociación de hongos con insectos lignícolas en bosque nativo mantiene una diversidad de especies, describiéndose algunas sucesiones temporales sobre madera en descomposición (Nordén *et al.*, 2013; Tian *et al.*, 2014), existiendo una alta especialización por la diferenciación y extensión del micelio que facilita la competencia por los nutrientes en la madera (Rayner y Webber 1983), así como por la capacidad de secretar metabolitos secundarios con actividad biológica (Keswani *et al.*, 2014).

Los hongos manchadores de madera se encuentran distribuidos alrededor del mundo (Six y Wingfield., 2011). En Chile se han identificado algunos hongos del orden Ophiostomatales (Butin & Aguilar., 1984; Osorio., 1985; Zhou *et al.*, 2004). El desarrollo y manchado de estos hongos se encuentra asociado principalmente a la fase de postcosecha de la madera, con períodos donde la madera queda a la intemperie bajo condiciones ambientales de humedad y temperatura que favorecen su desarrollo (Ciefap., 2013). Estos hongos son considerados agentes dañinos en la industria forestal, manchando la madera mermando su valor económico, siendo la prevención del manchado un tema de importancia para las empresas. La cepa *Ophiostoma* sp utilizada en las pruebas de laboratorio fue aislada en plantaciones de *Pinus radiata* de la Región del Biobío y presenta una alta actividad manchadora tanto de forma externa como interna en la madera.

Dentro de los métodos para el control de hongos manchadores, tradicionalmente se han utilizado compuestos químicos, pero las regulaciones a estos productos son cada vez más exigentes, por lo tanto, se hace indispensable la búsqueda de alternativas, como los productos biológicos, siendo cada vez más demandados en países con un alto desarrollo agrícola como Brasil, existiendo un mercado que se incrementa cada año (Bettiol y Morandi., 2009; Bettiol., 2011). Un buen producto debe poseer ciertas características como i) capacidad de colonizar el sustrato de forma rápida, ii) presentar metabolitos secundarios con actividad biológica y iii) idealmente ser aplicados en los ambientes donde se aislaron, evitando una posible introducción de especies con consecuencias no controladas. Estos productos presentan la ventaja de ser biodegradables y de baja toxicidad para el medioambiente y los seres vivos, generalmente no alterando el equilibrio natural del sistema

Dentro de los organismos utilizados en nuestro estudio, los hongos del género *Trichoderma* spp, han sido ampliamente utilizados como controladores biológicos, debido a sus mecanismos de i) síntesis de compuestos volátiles (antibiosis) ii) producción de enzimas extracelulares celulasas, quitinasas y su rápida colonización (Benitez *et al.*, 2004 Chittenden y Singh., 2009; Schuster and Schmoll., 2010). Así como, por su capacidad de sintetizar una

amplia gama de metabolitos secundarios (Reino et al., 2008; Mukherjee et al., 2012; Keswani et al., 2014), secretando compuestos con actividad antifúngica, tanto de forma intracelular como extracelular (Hosseyini-Moghaddam y Soltani., 2014). Nuestros resultados con el uso de estos hongos para el control biológico en forma miceliar, indican que las cepas de *Trichoderma* spp son capaces de inhibir el crecimiento del hongo manchador, alcanzando altos porcentajes de inhibición del color de forma externa y interna, especialmente cuando se inoculó previo al establecimiento del manchador, posiblemente por la rápida colonización en la madera y la producción de metabolitos con actividad biológica (Tabla 2). Este resultado concuerda al estudio de Gradinger et al., (2009), que demostró el uso de *Trichoderma* spp para la inhibición del crecimiento de hongos manchadores por un período de 10 a 12 semanas sobre bloques de madera.

Los extractos totales tienen actividad sobre el hongo manchador cuando la inoculación fue realizada, tanto de forma previa, como en conjunto con el hongo manchador (Tabla 2, Figura 3) alcanzando inhibiciones del 100% del color externo y interno en la inoculación del antagonista *Trichoderma* spp antes del manchador y la inoculación conjunta. Dentro del grupo *Trichoderma* spp. son conocidas algunas moléculas con actividad antifúngica, como las konigininas, viridifunginas y viridinas (Cutler et al., 1999; Keswani et al., 2014) y otros compuestos como el viridenepoxydiol y suzukalicina-A, ambos antifúngicos y producidos por la cepa *Trichoderma viride* (Evidente et al., 2003; Krause et al., 2006). Nuestros extractos de *Trichoderma* spp tienen la capacidad de secretar algunos compuestos activos extracelulares y intracelulares (en el medio de cultivo y micelio), capaces de inhibir el desarrollo de manchadores. Con una mayor actividad biológica en los compuestos extraídos del medio de cultivo (Tabla 2), esto es posible, porque en el cultivo líquido existió un crecimiento acelerado, llegando a la fase estacionaria de crecimiento (cuando se secretan la mayor parte de los metabolitos de defensa) rápidamente, en comparación al inóculo de micelio. Estos resultados se complementarán con la futura caracterización química de los compuestos que forman los extractos.

Los métodos de control biológico de hongos manchadores por cepas albinas han sido probados con concentraciones de inóculo inicial de 10^5 y 10^7 ufc/ml en diferentes latitudes con resultados de protección de hasta 6 meses (Behrendt et al., 1994, Morin et al., 2005), el uso de hongos del género *Trichoderma* y sus metabolitos han sido utilizados en bloques de madera y en terreno con resultados de protección de hasta 3 meses (Vanneste et al., 2002 Gradinger et al., 2009). También se han probado alternativas como aceites esenciales de pino con resultados de inhibición por 6 meses (Vanneste et al., 2002): Nuestras especies de *Trichoderma* tanto en micelio como en extracto lograron una inhibición del 100% del

manchador por el tiempo que duro el experimento (4 semanas). En relación al tiempo, de inhibición, no sabemos el período de inhibición máxima, por lo tanto recomendamos repetir el experimento y dejarlo por un período más largo de tiempo, así como hacer más replicas de los experimentos para entregar mayor soporte a los datos estadísticos. El inóculo miceliar se utilizó a una concentración de 10^6 , rango similar a las concentraciones utilizadas en cepas albinas. Los extractos fueron utilizados a una concentración de 1000 ppm, siendo concentraciones que permitirían su uso comercial. Dentro de las ventajas del uso de extractos esta la fácil aplicación en terreno y no existe el riesgo de introducción de especies exóticas que puedan alterar el medioambiente.

Los hongos endófitos presentan una alta biodiversidad de especies (Persoh, 2013), conociéndose una amplia variedad de compuestos con actividad antifúngica, incluyendo fenoles, terpenos y alcaloides (Kumar y Kaushik., 2012; Suryanayanan 2013). Nuestra cepa se encuentra descrita como endófito y según la herramienta BLASTn se encuentra dentro de la división Ascomycetes, Xylariales, *Arthrinium* sp. Género diverso y con algunas especies capaces de secretar compuestos antimicrobianos en cultivo líquido (Ye Shen et al., 2014). A pesar de estos antecedentes, tanto el inóculo en forma de micelio, como el extracto de la cepa *Arthrinium* presentó una menor actividad antimancha comparado con los extractos de *Trichoderma* spp. (Tabla 2, Figura 3). Debiéndose posiblemente porque las condiciones de cultivo utilizadas no facilitan la síntesis de compuestos antifúngicos activos. En este sentido se recomienda el uso de otros medios de cultivo y la caracterización química de los compuestos.

A pesar de sus ventajas inherentes, los productos usados como controladores biológicos tienen algunos puntos a considerar, por lo que se recomienda el uso de cepas antagonistas aisladas en la misma zona geográfica del hongo manchador, evitando el riesgo de una posible introducción de especies foráneas, con posibles consecuencias no controladas en el nuevo ecosistema (Garnas et al., 2012; Ploetz et al., 2013). En este sentido, se confirma que los hongos y extractos estudiados fueron capaces de inhibir el crecimiento de manchadores, especialmente los hongos del género *Trichoderma* spp son buenos candidatos para la futura formulación de un producto biológico para la prevención del manchado de madera en la industria nacional, idealmente por su aplicación inmediatamente después de la cosecha, tanto por medio de micelio, como de extracto total.

3.5 BIBLIOGRAFÍA.

- Altschul S, Madden T, Schaffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 268:3389-3402.
- Ayer W, Kawahara N. (1995). Lecythophorin, a potent inhibitor of Blue-Stain fungi, from the Hyphomycetous fungus *Lecythophora hoffmannii*. *Tetraedron Letters*, 44:7953-7956.
- Butin H, Aguilar A. (1984). Blue stain fungi on Nothofagus from Chile. Including two new species of *Ceratocystis* Ellis & Halst. *Phytopathologische Zeitschrift* 109:80-89.
- Behrendt C, Blanchette R, Farrell. (1994). Biological control of blue-stain fungi in wood. *The American Phytopathological Society*.21:92-97.
- Behrendt C, Blanchette R. (2001).Biological control of Blue-Stain in pulpwood: mechanism of control used by *Phlebiopsis gigantea*. *Holzforschung*. 55:238-245.
- Benítez T, Rincon A, Limón M, Codón A. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. 7:249-260.
- Berg G, Promis A. (2011). Conservación de los bosques nativos de Chile- Un análisis al informe FAO sobre la evaluación de los recursos forestales nacionales. *Bosque Nativo* 48:9-11.
- Berrocal A, J Navarrete, C Oviedo. (2012). Efecto de diferentes condiciones de crecimiento en el dimorfismo levadura-micelio de la cepa albina PcF2A29 de la especie *Ophiostoma Piceae*. *Maderas, Ciencia y Tecnología* 14(1):91-102.
- Bettiol W, Morandi M. (2009). Biocontrol de doenças de plantas: uso e perspectivas. Embrapa Meio Ambiente.
- Bettiol W. (2011). Biopesticides use and research in Brazil. *Outlooks on Pest Management*. 32: 280-283
- Chittenden C, Singh T. (2009). In vitro evaluation of combination of *Trichoderma harzianum* and chitosan for the control of sapstain fungi. *Biological Control*.50:262-266.
- CIEFAP. (2013). Cronograma de cosecha para lograr trozas libres de manchas de albura. Boletín informativo.

- Cutler H, Cutler S, Ross S, Sayed K, Dugan F, Barlett M, Parker S. (1999). Koninginin G, a new metabolite from *Trichoderma aureoviride*. *Journal of Natural Products*. 62(1):137-139.
- Díaz G, Córcoles A, Asencio A, Torres P. (2013). In vitro antagonism of *Trichoderma* and naturally occurring fungi from elms against *Ophiostoma novo-ulmi*. *Forest Pathology*. 43:51-58.
- Donoso P, Soto D. (2010). Plantaciones con especies nativas en el centro-sur de Chile: experiencias, desafíos y oportunidades. *Revista Bosque Nativo*. 47:10-17.
- Doyle J, Doyle L. (1990). Isolation of plant of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15.
- Evidente A, Cabras A, Maddau L, Serra D, Andolfi A, Motta A. (2003). Viride Pyronone, a new antifungal 6 substituted 2H-pyran-2-one produced by *Trichoderma viride*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 51: 6957-6960.
- FAO/UNEP. (1995). Prior Informed Consent Decision Guidance Document: Pentachlorophenol, Rome/Genova, 13.
- Garnas J, Hurley B, Slippers B, Wingfield M. (2012). Biological control of forest plantation pest in a interconnected world requires greater international focus. *International Journal of Pest Management*. 58(3): 211-223.
- Gutierrez M, Becerra J, Barra R. (2002). Tribromofenol empleado en aserraderos: Métodos de análisis, características físico-químicas y presencia en componentes ambientales. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*.47.4
- Gradinger C, Biosselet T, Stratev D, Ters T, Messner K, Fackler K. (2009). Biological control of sapstain fungi: From laboratory experiments to field trials. *Holzforschung*. 63:751-759
- Hernández R, Rangel E. (2012). Búsqueda de cepas de antagonistas a hongos causantes de marchitez vascular en tomate. *Revista Electrónica de Divulgación de la Investigación*.Vol 2.
- Hernández V., Avramidis S., Navarrete J. (2011). Albino strains of *Ophiostoma* spp. fungi effect on radiata pine permeability. *The European Journal of Wood and Wood Products*. 70: 551-556.

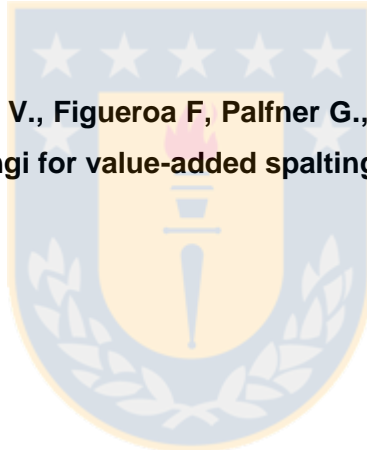
- Hoffman M., Arnold E. (2008). Geographic locality and host identity shape fungal endophyte communities in cupressaceous trees. *Mycological Research*. 112 (3): 331-344.
- Hosseini-Moghaddam, MS, Soltani J. (2014). Bioactivity of endophytic *Trichoderma* fungal species from the plant family Cupressaceae. *Annals of Microbiology*. 64(2):753-761.
- Infante D, Martínez B, González N, Reyes Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*. 1:14-21.
- Keswani C, Mishra S, Sarma B, Singh H. (2014). Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98:533-544.
- Krause C, Kirschbaum J, Jung G, Brueckner H. (2006). Sequence diversity of the peptaibol antibiotic suzukacilin-A from the mold *Trichoderma viridie*. *Journal of Peptide Science*. 12:321-327.
- Kumar, S. and N. Kaushik. (2012). Metabolites of endophytic fungi as novel source of biofungicide: a review. *Phytochemical Reviews*. 11:507-522.
- Laaksonen M, Peuhu E, Varkonyi G, Siitonen J. (2008). Effects of habitat quality and landscape structure on saproxylic species dwelling in boreal spruce-swamp forest. *Oikos*. 117:1098-1110.
- Lanfranco D, Ide S, Peredo H. (2004). An analysis of health risk reduction in Chilean primary forest products for export. *Forestry*. 77(3): 193-203.
- Mukherjee M, Mukherjee P, Horwitz B, Zachow C, Berg G, Zeilinger S. (2012). *Trichoderma*-plant-pathogen interactions: advances in genetics of biological control. *Indian Journal of Microbiology*. 52(4):522-529.
- Montes P, Peredo H, Lanfranco D, Ide S, Dolz H. (2001). Una revisión de los productos alternativos al pentaclorofenato de sodio y bromuro de metilo utilizados en el sector forestal. *Bosque* 22(1): 85-93
- Morin C, Tanguay P, Breuil C, Yang D, Bernier L. (2005). Bioprotection of spruce logs against Sapsstain using an albino strain of *Ceratocystis resinifera*. *Phytopathology*. 96:526-533

- Nordén J, Penttilä R, Siitonen J, Tomppo E, Ovaskainen O. (2013). Specialist species of Wood-inhabiting fungi struggle while generalists thrive in fragmented boreal forest. *Journal of Ecology*.101:701-712.
- Osorio M. (1985). *Ceratocystis pilifera* hongo causante de mancha azul en la madera de *Pinus radiata*. *Bosque*: 6:116-119
- Persoh D. (2013). Factors shaping community structure of endophytic fungi-evidence from the *Pinus-Viscum*-system. *Fungal Diversity*.22(5):10-14.
- Popa V., Deziel E, Lavalley R, Bause E Guertin C. (2012). The complex bark beetle symbiotic relationship with microorganisms: a potential practical approach for biological control in forestry. *Society of Chemical Industry*. 23:12-23.
- Ploetz R, Hulcr J, Wingfield M, Wilhelm de Beer Z. (2013). Destructive tree diseases associated with ambrosia and bark beetles: Black swan events in tree pathology?. *Plant Disease*.95 (7).
- Rayner, A.D.M. and J.F. Webber. (1983). Interspecific mycelial interactions-an overview. In: Jennings DH, Rayner ADM (eds). The ecology and physiology of the fungal mycelium, British Mycological Society Symposia no 8:383-417
- Reino J, Guerrero R, Hernandez-Galan R, Collao I. (2008). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry*. 7(1):89-123.
- Ruiz C, Lanfranco D. (2008). Los escarabajos de corteza en Chile: una revisión de la situación actual e implicancias en el comercio internacional. *Bosque*. 29(2):109-114.
- Schuster A., Schmoll M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology Biotechnology*. 87:787-799.
- Schweigkofler W, Orosina W, Smith S, Cluck D, Maeda K, Peay K, Garbelotto M. (2005). Detection and quantification of *Leptographium wagneri*, the cause of black-stain root disease from bark beetles (Coleoptera: Scolytidae) in Northern California using regular and real-time PCR. *Canadian Journal Research*. 35:1798-1808.
- Six D.,Wingfield M. (2011). The role of phytopathogenicity in bark beetle-fungus symbioses: A challenge to the classic paradigm. *Annual Review of Entomology*. 56:255-72.
- Sumarah M, Miller J. (2009). Anti-insect secondary metabolites from fungal endophytes of conifer trees. *Natural Product Communications*. 4: 1497–1504.

- Suryanarayanan. T. (2013). Endophyte research:going beyond isolation and metabolite documentation. *Fungal Ecology*. 6: 561-568.
- Tian B, Wang C, Lv R, Zhou J, Li X, Zheng Y, Jin X, Wang M, Ye Y, Huang X, Liu P. (2014). Community structure and succession regulation of fungal consortia in the lignocellulose-degrading process on natural biomass. *The Scientific World Journal*. 9:1-9.
- Vanneste J, Hill R, Kay S, Farrell R, Holland P. (2002). Biological control of sapstain fungi with natural products and biological control agents: a review of the work carried out in New Zealand. *Mycological Research*. 106(2): 228-232.
- Ye Shen X, Cheng Y, Cai C, Fan L, Gao J., Hou C. (2014). Diversity and antimicrobial activity of culturable endophytic fungi isolated from Moso bamboo sedes. *PLOS One*. 9(4):
- White T, Bruns T, Lee S, Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), *PCR protocols: a guide to methods and application*: 315–322. Academic Press, San Diego, USA.
- Zipfel R, Wilhelm de Beer Z, Jacobs K, Wingfield B, Wingfield J. (2006). Multi-gene phylogenies define *Ceratocystiopsis* and *Grosmannia* distinct from *Ophiostoma*. *Studies in Mycology*. 55:75-97.
- Zhou X, De Beer ZW, Ahumada R, Wingfield BD, Wingfield MJ. (2004). *Ophiostoma* and *Ceratocystiopsis* spp. Associated with two pine-infesting bark beetles in Chile. *Fungal Diversity*. 15, 253-266.
- Zulpa G, Zaccaro M, Boccazzi F, Parada J, Storni M. (2003). Bioactivity of intra and extracellular substances from cyanobacteria and lactic acid bacteria on “wood blue stain” fungi. *Biological Control*. 27:345-348.

CAPÍTULO IV. Potential use of native fungi for value-added spalting in Chile

**Galleguillos F, Hernandez V., Figueroa F, Palfner G., Hernandez V., Robinson S. (2015).
Potential use of native fungi for value-added spalting in Chile. *Forest Journal Products*.**



Abstract

Chile is host to several types of temperate forests, many of which are plantations of moderate to low value woods. In an effort to explore potential methods of adding value to radiata pine and southern beech, these woods were inoculated with native Chilean fungi to determine if spalting could be induced under a reasonable time frame. Results showed that pine spalted more readily than beech, both internally and externally. *Ophiostoma* sp. and *Phialocephala* sp. performed the best in terms of spalting. In addition, a new red-staining fungus was discovered: *Eurotium* sp. Both wood species did show some level of spalting and all the captured fungi produced some visual effects. It is concluded that two of the major plantation trees of Chile, radiata pine and southern beech, are suitable for controlled spalting and that native Chilean fungi can be used for this process. These results open a new method for increasing the value of Chilean plantation timber and can be done entirely on a local scale, without reliance on materials or organisms from North America.

Resumen

Chile tiene varios tipos de bosques, entre estos se encuentran plantaciones de madera de bajo valor. Para explorar potenciales métodos de adición de valor a *Pino radiata* y *Nothofagus obliqua*, la madera fue inoculada con hongos nativos para determinar spalting en un período razonable de tiempo. Los resultados mostraron que la madera de pino logró coloraciones externas y internas más rápido que *Nothofagus*. Los hongos *Ophiostoma* sp. and *Phialocephala* sp. mostraron los mejores rendimientos, también un hongo *Eurotium* sp. fue capaz de producir un pigmento rojo. Ambas especies de madera mostraron niveles de spalting y todos los hongos fueron capaces de producir algún efecto visual. Con esto se concluye que *pino radiata* y *Nothofagus obliqua* son sustratos para producir spalting y que hongos nativos pueden ser utilizados para este propósito. Los resultados posibilitan un nuevo método para incrementar valor a las plantaciones y pueden ser realizadas a escala local sin necesidad de contar con materiales o organismos de Norteamérica.

4.1 Introduction

Many of the forests in Chile are temperate, with a similar biodiversity to North American Pacific Northwest forests. Past logging practices in Chile have altered the dominant forest types to plantations, primarily of radiata pine (*Pinus radiata* D. Don), eucalyptus (*Eucalyptus* spp.) and southern beech (*Nothofagus* spp.). Much of the lumber from these forests is not used for decorative work, instead being chipped for pulp or exported for a variety of low-cost purposes.

A new method for adding value to otherwise low-value timber species in North America is of inducing spalting, a process that adds color to wood and thereby also additional value through fungal inoculation (Robinson et al. 2013a). Recent patents have even been filed to protect some of the developed processes, including inoculating the wood with mycelium of spalting species in a controlled chamber to produce spalted veneers (Beakler 2007, 2012, 2013). Spalted wood has a long history of use in decorative arts and crafts, an example of which is the green stained wood of *Chlorociboria* species in designs of intarsia during the Renaissance in Italy in the 15th century (Blanchette et al. 1992).

Although spalted wood has been utilized for centuries, it is only recently that the term has been defined and the process understood and induced under laboratory conditions. The term “spalting” was defined by Robinson et al. (2007), and includes all types of wood pigmentation produced internally in wood by fungi. Primarily, fungal melanins (Langfelder et al. 2003, Eisenman and Casadevall 2012) and xylindein from *Chlorociboria* species (Robinson and Laks 2010) are the most well known for their production of black zone lines or green stain, respectively. Superficial pigments produced by molds such as *Penicillium* spp. are not included in this definition, although in specific cases they may be considered (Robinson and Laks 2010a). Interestingly, although the basic mechanisms of spalting have been understood for many years in terms of wood decay, the research to control and improve the amount of produced pigment has been carried out only in recent years and it has been undertaken by only a small group of researchers (Robinson 2012).

The pigmentation mechanisms of spalting have been usually divided into three categories i) changes produced on wood by structural modification of lignin caused by white rot fungi (bleaching); ii) the production of zone lines due to inter or intra fungal antagonism or changes in environmental conditions; and iii) the production of colored pigments capable of penetrating the wood (Robinson 2012).

The fungi utilized in spalting studies can be classified according to the mechanisms employed to alter the wood. Pigmentation occurs in two ways i) when pigments attached to the cell wall of the fungus accumulate in high enough amounts to cause a visible color change and ii) when pigments are secreted extracellularly and move into the wood (Bell and Wheeler 1986). The Ascomycete fungi in the *Chlorociboria* genus have been heavily utilized for producing a blue-green color in wood. These fungi secrete xylindein, which produces a penetrating green pigment (Edwards and Kale 1965, Blackburn et al. 1965, Giles et al. 1990, Saikawa et al. 2000). Other fungi used are Ascomycetes of the genus *Ophiostoma* spp. that have the capacity to synthesize melanin inside the hyphae and grow through the sapwood, producing colors that range from black to blue (Seifert 2003), and the fungus *Scytalidium cuboideum* (Sacc. & Ellis) Sigler & Kang (formerly known as *Arthrographis cuboidea*) that produces colors between rose and red, and occasionally blue (Golinski et al. 1995).

The induction of antagonism lines (zone lines) has been achieved with monocultures by means of the species *Xylaria polymorpha* (Pers.) Grev. (Ascomycete) and *Trametes versicolor* (L.) Lloyd (Basidiomycete), and with the antagonistic reactions between *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta* (Willd.) P. Karst on sugar maple (*Acer saccharum* Marsh) (Robinson et al. 2007). No structural differences have been found between the zone lines produced naturally and those produced under controlled, laboratory conditions (Qin et al. 2011). Among the group of wood decaying fungi that cause bleaching, *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta* (Robinson et al. 2007, Robinson et al. 2009, Robinson 2012) have been utilized on different types of substrates, achieving unique designs and colorations.

The wood species thus far investigated for induced spalting have been mainly high quality woods such as sugar maple (*Acer saccharum* Marsh), basswood (*Tilia americana* L.), yellow birch (*Betula alleghaniensis* Britt.) and American elm (*Ulmus americana* L.) (Robinson et al. 2007, Robinson et al. 2009a, Robinson et al. 2011a, Tudor et al. 2012). Minimal research has been conducted on wood of medium and low economic value, such as, tree of heaven (*Ailanthus altissima* (Mill) Swingle), Norway maple (*Acer platanoides* L.), silver maple (*Acer saccharinum* L.), trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) and on the wood of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.), aimed at generating added value through spalting (Robinson et al. 2011). Little research has been conducted on conifers, with the sole study done by Robinson et al. (2013), resulting in additional coloration on already blue stained wood. Due to the fact that spalting is a process in an initial stage of development and by the noticeable variation related to strains and substrates, active researchers in this field have recommended continued experimentation on other wood species.

With the noted low diversity of tree species commonly found in Chilean plantation forests, and the relatively low value of the wood harvested from such forests, it is of interest to determine 1) if these types of forests are host to fungi capable of spalting and 2) noting the huge variability in fungal preference for wood species in terms of spalting, if radiata pine and southern beech are well suited to laboratory-induced spalting using native Chilean fungi. The results of this research will help determine if Chile hosts compatible wood and fungal species that can be studied and eventually utilized for commercial-scale spalting. Discovery and cultivation of successful fungi on Chile's low value wood species could have a large economic impact on the forestry sector in this country, both in terms of native uses and exports.



4.2 Methods

Fungi collection

Fungi for this study were collected in two ways – isolated from the natural environment and from already established culture collections of native fungi. For natural isolations, fungi were cultured from Lucanidae and Tenebrionidae beetles (sample size of eight for the former, ten from the latter). The beetles were found on *Nothofagus obliqua* (A.DC.) F. M Vázquez & R. A. Rodr. and *Nothofagus dombeyii* (Mirb. Oerst.) from trees in the Maule Region, Altos de Lircay National Reserve, Talca. Collected beetles were maintained in 1.5 ml Eppendorf tubes and processed the same day of collection.

To culture the fungi, the beetles were kept at room temperature (21 C) and rinsed with sterile water for 30 seconds using forceps to remove large particulates. They were then rolled across 2% malt extract agar with sterile forceps. The media was supplemented with 200 mg streptomycin in 1 L of distilled water to control bacterial growth. The growth of the fungi was carried out by incubation on plates for seven days in a dark drawer at 21 C.

Monocultures were achieved through standard isolation procedures where continual reculturing occurred until only one species remained (airborne molds such as *Penicillium* were selected against). The resulting pure strains were genetically sequenced. Isolates were selected for use in continuing experimentation based on their capacity to produce intra and extra-cellular colored extracts on the media during the incubation time of three weeks.

Identification of isolated fungi

The extraction of the DNA was carried out from the mycelium using the CTAB method (Doyle and Doyle 1990). The amplification of the region corresponding to the internal transcribed spacer (ITS) of ribosomal DNA was carried out using the primers ITS1-ITS4 described by White et al. (1990). The amplification of the polymerase chain reaction (PCR) was followed by the following thermocycling pattern: 94°C for 5 min (1 cycle), 94°C for 40 s, 60°C for 40 s, 72°C for 1 min (30 cycles) and 72°C for 10 min (1 cycle).

The PCR products were sent directly for sequencing to Macrogen (Seoul, Korea). Then, the identity and coverage was evaluated with the sequences on the database GenBank using the algorithm BLAST (Altschul et al. 1997).

The isolated species sequenced and selected for the inoculation assays were: *Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta*, *Phialocephala* sp., *Eurotium* sp. and *Ophiostoma* sp. A

second *Ophiostoma* isolate (hereafter referred to as 'O2') was cultured from a collection at the Laboratory of Natural Products Chemistry of Concepción University (**Table 1**). All fungi were kept on 2% malt extract agar (MEA) and stored at 4°C before inoculated onto the wood. In order to keep the initial characteristic of fresh fungi, the cultures were transferred to a new plate every 3 months. *Ophiostoma* sp. was selected from a culture collection due to its known blue staining effects on wood. It was hoped this species would serve as a sort of 'control' for the other species tested, in that if the *Ophiostoma* sp. did not produce blue stain, it would be apparent there was an issue with testing conditions, not the fungi.

Wood

Twelve clear, unstained sapwood blocks of *Pinus radiata* were cut into 4 x 1.5 x 1 cm and three 10 x 4.5 x 4 cm, and six *Nothofagus obliqua* was only cut into blocks measuring 14.5 x 4.5 x 4 cm. *Nothofagus* tests were limited due to the wood's dark color and the improbability that any developed staining would be visible. Instead, a mixed culture was applied on *Nothofagus* in an attempt to produce enough color for a significant color change. Blocks were sterilized at 121°C for 20 min and conditioned 7 hours at 40°C degrees until a consistent humidity in the chamber was reached (model KOTTERMANN 2716). The blocks were weighed before and after conditioning and placed in sterile plastic boxes with sterile vermiculite (40g with 60 ml water), according to the modified protocol by Robinson et al. (2009).

Inoculation and incubation

The selected fungi were inoculated in both monoculture and co-culture (mixed cultures) as described above (Table 2). Strips of agar with actively growing mycelium (1.5 x 1.5 cm) were placed on the transverse face, mixed cultures were placed on one transverse face with one or two fungi and on the opposite end with a different fungus on *Pinus radiata* and *Nothofagus obliqua* wood. Specimens were incubated at laboratory conditions, 25°C +/- 2 and an ambient relative humidity of 80% +/-3%, in the dark, for a period of 8 and 12 weeks on *Pinus radiata* and *Nothofagus obliqua*, wood, respectively, according to a modification of the protocol by Robinson et al. (2011). Experiments were performed in triplicate and with wood without fungus as a negative control.

Data analysis

After incubation, blocks were removed from the plates and cleaned with a sponge in order to remove the mycelium and vermiculite debris from the surface. They were then dried at 40°C overnight in an incubation chamber model KOTTERMANN 2716 and weighed in order to determine weight loss. The stain was measured on both the external and internal faces of the wood to visually measure the change of color against the respective negative controls with photos using the program ImageJ 2.0 (Robinson et al. 2011). The internal faces were evaluated by cutting each block in half, then scanning and color reading one internal face. Results were expressed as mean percentage of color change in relation to the negative control. Data were analyzed using a two-way analysis of variance (ANOVA) with fungus and wood species as the independent variables and external and internal coloration as dependent variables. Tukey HSD was run to determine the location of the significant difference. The statistical procedures were performed using the Program STATISTICA version 7.0. Before analysis data were verified to a normal distribution.



4.3 Results

There were 31 fungal strains in total, isolated from the beetle species. Table 1 shows the fungi used to spalt, as well as their isolation source and similarity. In general, spalting was more prevalent on pine than on beech.

Source of isolation (type of beetle)	Host tree species	Type of fungus	% similarity (Blast)
Tenebrionidae	<i>N. dombeyii</i>	<i>Trametes versicolor</i>	100
Tenebrionidae	<i>N.obliqua</i>	<i>Bjerkandera adusta</i>	99
Lucanidae	<i>N.obliqua</i>	<i>Phialocephala</i> sp.	99
Tenebrionidae	<i>N.obliqua</i>	<i>Eurotium</i> sp.	98
Tenebrionidae	<i>N.dombeyii</i>	<i>Ophiostoma</i> sp	92
Culture collection (*)	-	<i>Ophiostoma</i> sp.	-

Table 1: Isolation source, host tree species and similarity (Blast) of the fungi used in the study. (*). Strain provided by Laboratory of Natural Products Chemistry from University of Concepción.

External spalting

External spalting was highest on pine, with the exception of the combination of *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta*, which did not differ significantly in amount from the *Eurotium* pairing on beech (40% and 51%, respectively). *Ophiostoma* on pine produced significantly more external spalting than any of the aforementioned fungi or fungal pairings ($P < 0.0001$), but its amount was not significantly different from *Phialocephala* (80.3%), the O2 isolate (70.3%), or *Eurotium* (70%). Visually, bleaching occurred from *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta* on the outer surface of the pine. Zone lines were only present in the mixed cultures on beech (Figure 1A). *Eurotium* produced a red stain both externally and internally in the wood (Figure 2A-B), and *Phialocephala* sp. produced a heavy black stain externally and internally.

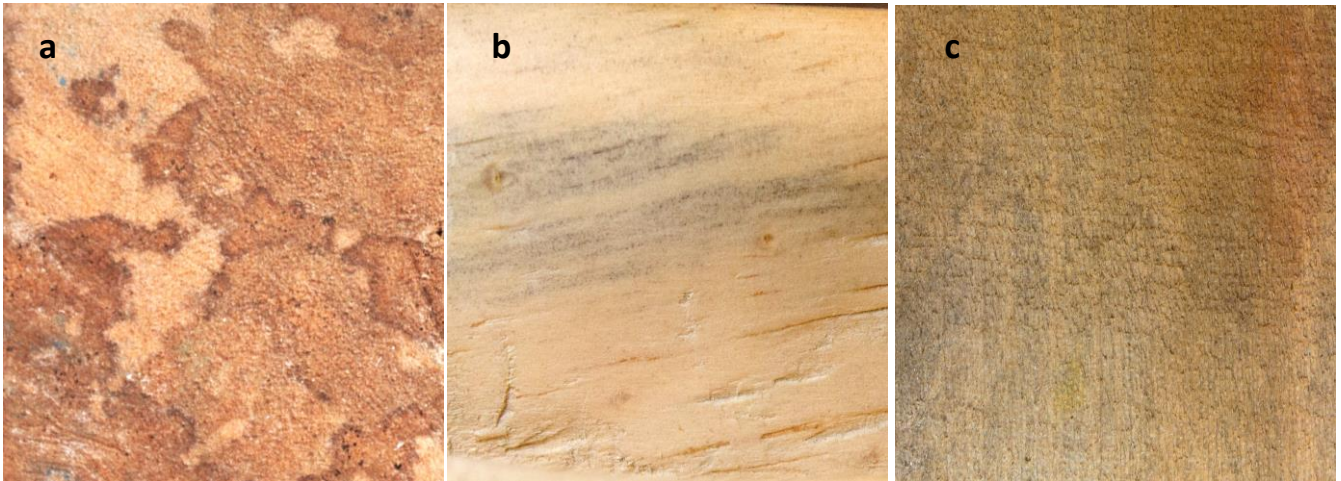


Figure 1: Coloration produced on *Pinus radiata* and *Nothofagus obliqua*. A: zone lines caused by the mix of fungi *Trametes versicolor*, *Ophiostoma* sp. and *Phialocephala* sp. on *Nothofagus obliqua* B: Blue stain caused by *Ophiostoma* sp on *Pinus radiata*. C: coloration produced on *Nothofagus obliqua* with the mix of strains *Ophiostoma* sp, *Eurotium* sp. and *Phialocephala* sp.

Wood	Fungus	Incubation time (weeks)
<i>Pinus radiata</i>	P.s	8
	E.s	8
	O.p	8
	T.v/B.a	8
	O.p	8
<i>Nothofagus</i>		
<i>obliqua</i>	P.s/O.p/Es	12
	P.s/O.p/T.v	12

Table 2: Inoculation (monoculture and mixed culture) and incubation time on wood. P.s: *Phialocephala* sp., E.s: *Eurotium* sp., O.p: *Ophiostoma* sp., T.v: *Trametes versicolor*, B.a: *Bjerkandera adusta*.

Internal spalting

Results of the two-way ANOVA found *Ophiostoma* (71%) and *Phialocephala* (71%) produced significantly more color ($P < 0.0001$) on pine than any other fungus. *Eurotium* (49.3%) produced the next significant amount on pine, followed by the O2 isolate (30.3%). The combinatory pairings on beech produced the least amount of spalting (20.7% for each), while the combination of *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta* did not produce any internal spalting.

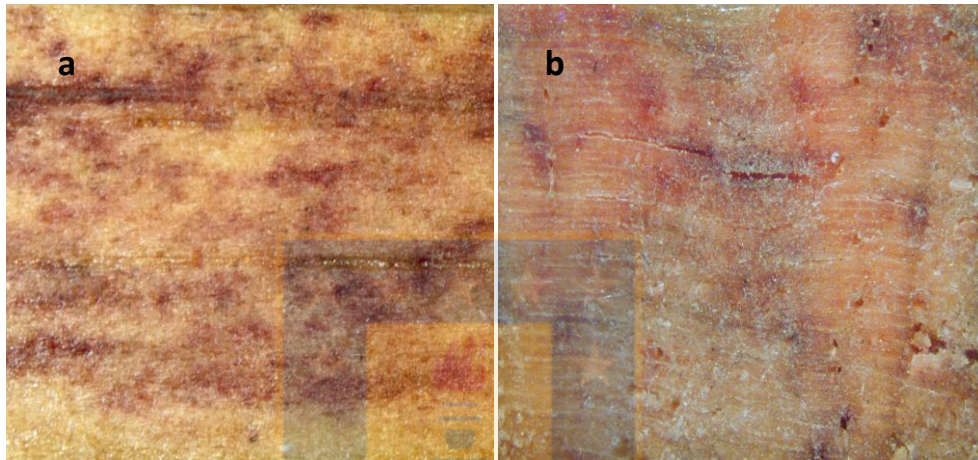


Figure 2: Coloration produced on *Pinus radiata*. A and B: External and internal coloration achieved by *Eurotium* sp.



Figure 3: Colonization and growth of fungal structures after mixed cultures of *Ophiostoma* sp, *Eurotium* sp. and *Phialocephala* sp. were applied on *Nothofagus obliqua*.

4.4 Discussion

The threshold established for what constitutes 'successful' spalting varies depending upon spalting type, with higher percentages generally desired for pigments, and lower percentages being allowed for zone lines (Robinson et al. 2014). All fungi that were tested on wood blocks achieved external spalting well above 30%, and only the combination of *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta* failed to produce any internal spalting on radiata pine. It is interesting that this pairing failed to produce internal spalting, as it is one of the pairings identified as ideal in several other papers (Robinson 2012). The likely cause of this discrepancy is wood species – both *T. versicolor* and *B. adusta* are white rot fungi, common to hardwoods, and previous spalting work has only looked at these two fungal species on hardwoods.

In terms of native fungi that were isolated from the beetles, *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta* are commonly utilized spalting fungi (Robinson et al. 2007, Robinson et al. 2009, Qin et al. 2011) and strains of *Ophiostoma* spp. are known to cause blue stain (Popa et al. 2012). Several new species of spalting fungi were also found:

- i) Species of the ascomycete genus *Phialocephala* have been described as dark septate endophytes and wood-decaying fungi (Saikkonen 2007, Tian et al. 2010) with an extensive biodiversity and abundance in woody plants (Saikkonen 2007), and are reported to have a beneficial interaction with *Nothofagus* spp. (Salgado et al. 2013) with occasional pathogenic effects on its plant hosts (Tellenbach et al. 2011).
- ii) The ascomycete genus *Eurotium* is found in grain products, fruits, hypersaline waters and forest soil (Butinar et al. 2005, Fraga et al. 2010). Some species are known to produce bioactive compounds, but are not directly pathogenic (Wu et al. 2014).

Eurotium spp. are able to produce pigments related to anthraquinones, which are synthesized mainly in the mycelium (Anke et al. 1980, Hamasaky et al. 1980, Smetanina et al. 2007, Wu et al. 2014). The isolate used in this study produced a red pigment similar to the red/pink pigments produced by *Scytalidium cuboideum*, a fungal species heavily utilized in spalting (Robinson et al. 2011). Both of these pigments are able to stain deeply and spread inside the sapwood (Figure 2B), with *Eurotium* spp. doing so quite well on *Pinus radiata*. This fungus could likely be used in a similar manner as *S. cuboideum*, as an 'over stain' for bluestained

pine (Robinson et al. 2013) to turn the blue color into a purple and red combination, thereby increasing its marketability (Robinson et al. 2013).

In terms of blue stain, the *Ophiostoma* species isolated created a deep blue color on *Pinus radiata* (Figure 1). The ease with which the fungus was able to pigment the wood might be related to the natural adaptation of *Ophiostoma* fungi to colonize *Pinus* species, but also to anatomical features like homogeneity of parenchymatic tissues, where the presence of tracheids and intercellular spaces favor a greater growth of the mycelial hyphae (Lee et al. 2002, Hudgins et al. 2005) and appearance of deep stain. Another fungus that was isolated, *Phialocephala* sp. is able to form melanin in its structures (Grunig et al. 2011). In our tests, the melanin was able to enter inside the sapwood, producing an intense black coloration in both woods (Figure 1B-C).

For the wood species *Nothofagus obliqua*, less overall spalting was produced by the fungi. In general, the pigments that worked the best on this wood came from the black/blue colors, characteristics of the fungi *Ophiostoma* sp. and *Phialocephala* sp. In the first triple inoculation test, the red pigment of *Eurotium* did not get produced. This selective staining may be due to the development of a system of secondary metabolites (Suryanarayanan 2013), since endophytes produce a variety of antifungal compounds including phenolics, terpenoids and alkaloids (Kumar and Kaushik 2012). It is known that some strains of *Ophiostoma* spp. have not been completely inhibited by highly aggressive antagonists (Zulpa et al. 2003, Diaz et al. 2013), which is likely why our *Ophiostoma* species was able to grow in the presence of the other fungi (Figure 3).

In the second mixed culture on *Nothofagus obliqua*, an inhibition of the growth of *Trametes versicolor* was achieved. A study on beech (*Fagus sylvatica* L.) by (Dowson et al. 1988) utilized an inoculated pairing with basidiomycete decomposers and showed a complete replacement, with only one living strain at the end of the test. In our mixed culture, antagonism between interfungal mycelia could have some correlation with the form and specialization of mycelial outgrowth for resource capture and space (Rayner and Webber 1983, Boddy 2000). No weight loss in the wood was observed. Unfortunately, bleaching and zone lines were detected only in the initial inoculation zone.

In the present study, spalting potential of native Chilean fungi on plantation wood was confirmed under controlled conditions in both monocultures and mixed cultures inoculated onto *Pinus radiata* and *Nothofagus obliqua* wood. These new combinations of fungi on previously untested wood species provides an additional method of adding value via spalting, and will be particularly relevant for obtaining products with new designs for the wood industry,

especially furniture. This research represents the pilot initiative for spalting research in Chile, a country which relies heavily on its crop-forest industry, but which has the capacity to move into the decorative woods market given the opportunity. Future research will focus on identifying additional fungi capable of spalting, and methods that can optimize and scale the process of laboratory spalting.



4.5 Bibliography

- Altschul, S., T. Madden, A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 268:3389-3402.
- Anke, H., I. Kolthoum, and H. Laatsch. 1980. Metabolic products of microorganisms.192. The anthraquinones of the *Aspergillus glaucus* group. II. Biological activity. *Arch. Microbiol.*126: 231–236.
- Beakler B. 2007. Patent number US 8287971. Spalted wood veneers, spalted engineered wood flooring and method of making. Armstrong World Industries, Inc.
- Beakler B. 2012. Patent number US 8399075. Spalted wood veneers and spalted engineered wood flooring. Armstrong World Industries, Inc.
- Beakler B. 2013. Application number 20130153,114. Method of producing spalted wood veneers and method of producing spalted wood products. Armstrong World Industries, Inc.
- Bell, A.A. and M.H. Wheeler. 1986. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24(1):411-451.
- Blackburn, G.M., D.E Ekong, A.H. Neilson, and L. Todd. 1965. Xylindein. *Chimia.* 19:208-212.
- Blanchette, R.A., A.M. Wilmering, and M. Baumeister. 1992. The use of green-stained wood caused by the fungus *Chlorociboria* in intarsia masterpieces from the 15th century. *Holzforschung.* 46:225-232.
- Boddy L. 2000. Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. *FEMS Microbiol Ecol.* 31:185-194.
- Butinar, L., P. Zalar, J.C. Frisvad, and N. Gunde-Cimerman. 2005. The genus *Eurotium*-members of indigenous fungal community in hypersaline waters of salterns. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51:155-166.
- Díaz, G., A.I. Córcoles, A.D. Asencio, and M.P. Torres. 2013. In vitro antagonism of *Trichoderma* and naturally occurring fungi from elms against *Ophiostoma novo-ulmi*. *Forest Pathol.* 43:51-58.

- Dowson, C.G., A.D.M. Rayner, and L. Boddy. 1988. The form and outcome of mycelial interactions involving cord-forming decomposer basidiomycetes in homogeneous and heterogeneous environments. *New Phytol.*109:423-432.
- Doyle, J. and L. Doyle. 1990. Isolation of plant of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15.
- Edwards, R. and N. Kale. 1965. The structure of xylindein. *Tetrahedron.*21:2095-2107.
- Eisenman, H. and A. Casadevall. 2012. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Appl. Microbiol. Biot.*93:931-940.
- Fraga, M.E., M.G. Pereira, D.J. Barbosa, and P. Maruzanete. 2010. Diversity of isolated *Trichocomaceae* from soil in two forest ecosystems. *Cienc Flores.* 20(1):167-175.
- Giles, R.G.F., I.R. Green, and V.I. Hugo. 1990. Model studies toward xylindein precursors. *S. Afr. J. Chem.* 43:28-33.
- Golinski, P., T.P. Krick, R.A. Blanchette, and C.J Mirocha. 1995. Chemical characterization of a red pigment (5,8-dihydroxy-2, 7-dimethoxy-1, 4-naphthalenedione) produced by *Arthrographis cuboidea* in pink stained wood. *Holzforschung.* 49:407-410.
- Grunig, C.R., V. Queloz, and T.N. Sieber. 2011. Structure of diversity in dark septate endophytes: from species to genes. In: Pirttila A.M., Frank, A.C (Eds.), *Endophytes of Forest Trees: Biology and Applications. Forest Sci, Vol.80.*
- Hamasaki, T., M. Fukunaga, Y. Kimura, and Y. Hatsuda. 1980. Isolation and structures of two new metabolites from *Aspergillus ruber*. *Agr. Biol. Chem. Tokio.* 44:1685–1687.
- Hudgins, J.W., G. McDonald, P. Zambino, N. Klopfenstein and V. Franceschi. 2005. Anatomical and cellular responses of *Pinus monticola* stem tissues to invasion by *Cronartium ribicola*. *For. Path.* 35:423-443.
- Kumar, S. and N. Kaushik. 2012. Metabolites of endophytic fungi as novel source of biofungicide: a review. *Phytochemical Reviews.* 11:507-522.
- Qin, L., M. Guo, J. Qiu, and C. Liu. 2011. Study on the formation of wood zone line pattern induced by fungi. *Adv. Mat. Res.* 190:197–198.

- Langfelder, K., M. Streibel, B. Jahn, G. Haase, and A.A. Brakhage. 2003. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet. Biol.* 38:143-158.
- Lee, S., S.H. Kim, and C. Breuil. 2002. The use of the green fluorescent protein as a biomarker for sapstain fungi. *Forest Pathol.*32:153-161.
- Popa, V., E. Deziel, R. Lavalley, E. Bauce, and C. Guertin. 2012. The complex bark beetle symbiotic relationship with microorganisms: a potential practical approach for biological control in forestry. *Pest Manag Sci.* 68:963-975.
- Rayner, A.D.M. and J.F. Webber. 1983. Interspecific mycelial interactions-an overview. In: Jennings DH, Rayner ADM (eds). The ecology and physiology of the fungal mycelium, British Mycological Society Symposia no 8:383-417.
- Robinson, S.C., D.L. Richter, and P.E. Laks. 2007. Colonization of sugar maple by spalting fungi. *Forest Prod. J.* 57(4):24–32.
- Robinson, S.C., D.L. Ritchter, and P.E. Laks. 2009. Effect of substrate on laboratory spalting of sugar maple. *Holzforchung.* 63:491-495.
- Robinson, S.C., P.E. Laks, and J. Turnquist. 2009a. A method for digital color analysis of spalted wood using Scion Image software. *Materials.* 2: 62-75.
- Robinson, S.C. and P.E. Laks. 2010. Wood species affects laboratory colonization rates of *Chlorociboria* sp. *Int. Biodeter. Biodegr.* 64:305-308.
- Robinson, S.C. and P.E. Laks. 2010a. Culture age and wood species affect zone line production of *Xylaria polymorpha*. *The Open Mycol J.* 4:18–21.
- Robinson, S.C., D. Tudor, and P.A. Cooper. 2011. Wood preference of spalting in urban hardwood species. *Int. Biodeter. Biodegr.* 65:1145-49.
- Robinson, S.C., P.E. Laks, and D.L. Richter. 2011a. Stimulation spalting in sugar maple using sub-lethal doses of copper. *Eur J Wood and wood Prod.* 69:527-532.
- Robinson, S.C. 2012. Developing fungal pigments for “painting” vascular plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93:1389-94.
- Robinson, S.C., D. Tudor, G. MacDonald, Y. Mansourian, and P.A Cooper. 2013. Repurposing mountain pine beetle blue wood for art through additional fungal colonization. *Int. Biodeter. Biodegr.* 85:372-374.

- Robinson, S.C., D. Tudor, S. Hipson, H. Snider, S. Ng, E. Korshikov and P.A Cooper. 2013a. Methods of inoculating *Acer* spp., *Populus tremuloides*, and *Fagus grandifolia* logs for commercial spalting applications. *J. Wood. Sci.* 59:351-357.
- Robinson, S.C., Weber, G., Hinsch, E., Vega Gutierrez, S., Pittis, L, and S. Freitas. 2014. Utilizing extracted fungal pigments for wood spalting – a comparison of induced fungal pigmentation to fungal dyeing. *J. Coating. Tech. Res.* Article ID 759073, doi: 10.1155/2014/759073.
- Saikawa, Y., T. Watanabe, K. Hashimoto, and M. Nakata. 2000. Absolute configuration and tautomeric structure of xylindein, a blue-green pigment of *Chlorociboria* species. *Phytochemistry*.55:237-240.
- Saikkonen, K. 2007. Forest structure and fungal endophytes. *Fungal Biol. Rev.* 21:67-74.
- Salgado, M.E.S., C. Barroetaveña, and M. Rajchenberg. 2013. Occurrence of dark septate endophytes in *Nothofagus* seedlings from Patagonia, Argentina. *Southern Forest.* 75(2):97-101.
- Seifert, K.A. 1993. Sapstain of commercial lumber by species of *Ophiostoma* and *Ceratocystis*. In: *Ceratocystis and Ophiostoma; Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity*. Eds M.J. Wingfield, K.A. Seifert, J.F. Webber. *American Phytopathological Society*, St. Paul, MN. pp. 141–151.
- Suryanarayanan, T. 2013. Endophyte research:going beyond isolation and metabolite documentation. *Fungal Ecol.* 6:561-568.
- Smetanina, O.F., A.I. Kalinovskii, Y.V. Khudyakova, N.N. Slinkina, M.V. Pivkin, and T.A. Kuznetsova. 2007. Metabolites from the marine fungus *Eurotium repens*. *Chem. Nat. Compd.* 43(4): 395-398.
- Tellenbach, C., C.R. Grunig, and T.N. Sieber. 2011. Negative effects on survival and performance on Norway spruce seedlings colonized by dark septate root endophytes are primarily isolate-dependent. *Environ. Microbiol.* 13:2508-2517.
- Tian, B.T., Q.G. Huang, Y. Xu, C.X. Wang, R.R. Lv, and J.Z. Huang. 2010. Microbial community structure and diversity in a native forest wood-decomposed hollow-stump ecosystem. *World J. Microb. Biot.* 26:233-240.

- Tudor, D., S.C. Robinson, and P.A. Cooper. 2012. The influence of pH on pigment formation by lignicolous fungi. *Int. Biodeter. Biodegr.* 80:22-28.
- White, T., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), *PCR protocols: a guide to methods and application*: 315–322. Academic Press, San Diego, USA.
- Wu, M.D., M.J. Cheng, S.Y. Hsieh, and G.F. Yuan. 2014. Chemical constituents of the fungus of *Eurotium chevalieri* BCRC 07F0022. *Chem. Nat. Compd.* 49(6):1175-1176.
- Zulpa, G., M.C. Zaccaro, F. Boccazzi, J.L. Parada, and M. Storni. 2003. Bioactivity of intra and extracellular substances from cyanobacteria and lactic acid bacteria on “wood blue stain” fungi. *Biol. Control.* 27: 345-348.



CAPÍTULO V. DISCUSIÓN GENERAL

Se aislaron hongos asociados a escarabajos lignícolas en la Reserva Altos de Lircay, ubicada en la Región del Maule que es considerada como zona de biodiversidad particularmente alta a nivel mundial (“Hotspot”) siendo un lugar de importancia para la posible identificación de especies fúngicas endémicas. La mayor parte de los estudios previos han sido enfocados en especies fúngicas asociadas a escarabajos de corteza, esto debido a la importancia económica por ser agentes dispersores de hongos manchadores de madera del orden Ophiostomatales y con algunas especies consideradas fitopatógenas. También los escarabajos de ambrosia han sido ampliamente estudiados debido a sus capacidad de transportar los hongos asociados en estructuras especializadas llamadas micangios. Nuestro estudio utilizó coleopteros asociados a madera en avanzado estado de descomposición de las familias Tenebrionidae y Lucanidae, los cuales no presentan un impacto económico importante, explicando la falta de estudios previos de hongos asociados a estos escarabajos en Chile. Se encontró una alta diversidad de hongos cultivables y se identificaron algunas especies para ser utilizadas en diferentes aplicaciones i) como antagonistas de hongos manchadores de madera ii) para producir spalting en madera exótica y nativa y con especies de hongos no identificados en las bases de datos, las cuales creemos son muy importantes para su futura identificación y evaluación de su función en el medioambiente.

Los escarabajos de madera en descomposición y sus galerías recolectados en la zona de estudio mantienen una diversidad considerable de hongos, entre estos se destacan hongos saprófitos y algunos de pudrición, como *Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta* y *Stereum hirsutum*. Este hecho facilitaría el transporte de esporas fúngicas a otros sitios, facilitando la descomposición de la madera y los ciclos naturales del bosque nativo. También se identificaron especies de hongos conocidos por su capacidad de producir metabolitos secundarios de interés comercial, como la cepa *Umbelopsis isabelina*, conocida por la producción de ácidos grasos para su uso en la producción de biocombustibles, hongos capaces de colorear madera como *Eurotium* sp, *Trametes versicolor* y *Phialocephala* sp y algunas especies de *Trichoderma* y *Beauveria*, conocidos por sintetizar una amplia variedad de metabolitos con actividad antifúngica y ampliamente utilizados como agentes de biocontrol.

El manchado de madera es un problema en las industrias madereras, este tipo de manchado es resultado del crecimiento de hongos que son capaces de colorear la albura de la madera, resultando un producto que es considerado como secundario para su venta. En este sentido, la investigación testeó una alternativa de “control biológico” con una batería de hongos y sus extractos totales, con capacidad de inhibir el desarrollo del manchado y no alterando la estructura de la madera.

Los hongos y los extractos totales de hongos aislados pertenecientes al género *Trichoderma*, (*Trichoderma viride*, *Trichoderma samuelsii* y *Trichoderma álbum*) fueron capaces de inhibir el desarrollo del hongo manchador de madera *Ophiostoma* sp., tanto en los ensayos de confrontación directa en placas y en probetas de madera de *Pinus radiata*. Las inhibiciones más completas del manchado resultaron cuando el agente controlador en forma de micelio fue inoculado antes del establecimiento del hongo manchador y en el caso de los extractos, cuando se inocularon antes y simultáneamente con el hongo manchador. Por el corto tiempo que duro el experimento, (30 días máximo) recomendamos verificar la inhibición en madera por períodos mas largos. Los resultados generados por el estudio son la línea base para la creación de un producto para ser utilizado en las industrias madereras del país y especialmente en la Región del Biobío.

A pesar de las ventajas inherentes de los productos biológicos en base a hongos, estos presentan algunos inconvenientes y riesgos como i) la posible introducción de especies foráneas en el ambiente a aplicar ii) La baja efectividad en condiciones no controladas debido a la interacción con otros microorganismos ó la radiación UV. Por esto, se recomienda que los productos biológicos presenten ciertas características, como la capacidad de colonizar el sustrato de forma rápida, que presenten metabolitos secundarios con actividad biológica y que idealmente sean aplicados en los ambientes donde se aislaron, evitando una posible introducción de especies exóticas con consecuencias no controladas. Por todas estas características, nuestras especies de *Trichoderma* y especialmente los extractos totales presentan una mejor efectividad, no presentando los riesgos mencionados en los productos basados en hongos, siendo buenos candidatos para ser utilizadas en una formulación contra hongos manchadores a nivel nacional.

A pesar de considerarse un problema, el manchado de madera se puede tomar como una oportunidad de agregar valor a los productos madereros, en este sentido nuestra investigación obtuvo tinciones de madera por medio de hongos (Spalting) en madera de *Pinus radiata* y en madera de *Nothofagus obliqua*. Las coloraciones y diseños fueron obtenidos por pigmentos capaces de penetrar en la albura de la madera, con coloraciones rojas dadas por la inoculación de la especie *Eurotium* sp., azules por *Ophiostoma* sp., negro por *Phialocephala* sp. y la producción de líneas de antagonismo.

La coloración de *Pinus radiata* presentó coloraciones rojas y negras profundas en la madera, no presentando líneas de antagonismo, este resultado negativo con las líneas se debe a que la madera de esta especie es muy susceptible a degradación por hongos de pudrición, siendo alterada en cortos tiempos. En el caso de la coloración de madera utilizando la especie *Nothofagus obliqua* resultó positiva en la formación de líneas de antagonismo y blanqueamiento con el cultivo mixto con los hongos *Trametes versicolor*, *Phialocephala* sp y *Eurotium* sp. En el caso de la incubación con los hongos *Ophiostoma* sp, *Phialocephala* sp y *Eurotium* sp se produjeron coloraciones rojas y negras. La selección de los hongos utilizados en las pruebas fue teniendo en consideración dos puntos i) la capacidad de producir pigmentos extracelulares en el medio de cultivo sólido como *Eurotium* y *Phialocephala* y ii) la información bibliográfica validando algunas cepas como productoras de spalting como las cepas *Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta* y *Ophiostoma*. Estos resultados posibilitan la coloración de maderas exótica y nativa a mayor escala para su aplicación. Esto sumado a que la investigación es pionera en el país y se realizó en la Región del Biobío, zona de mayor actividad maderera del país.

Por estos motivos, creemos que los resultados obtenidos son la plataforma para el desarrollo del spalting aplicado a nivel nacional, con diseños exclusivos en la madera, posibilitando la obtención de productos madereros como muebles a pequeña escala de alto valor en el mercado. La investigación generó una publicación en la revista ISI Forest Products Journal con el título de "Potential use of native fungi for value-added spalting in Chile".

La investigación descrita tiene impacto directo en el conocimiento de la biodiversidad de hongos asociados a escarabajos lignícolas habitantes del bosque nativo de la Reserva Altos de Lircay, Séptima región, Chile. Siendo el primer estudio del país en describir esta particular asociación. Dentro de la comunidad de hongos se encontraron especies capaces de inhibir el crecimiento de un hongo manchador de madera del género *Ophiostoma* y otras especies capaces de teñir madera de *Pinus radiata* y *Nothofagus obliqua* bajo condiciones de laboratorio. Ambas aplicaciones descritas tienen el potencial de generar productos comerciales con una interesante demanda, como los productos de control biológico de manchadores de madera y muebles con diseños exclusivos.



CAPÍTULO VI. ANEXOS.

TRABAJOS PUBLICADOS.



Forest Products Journal

Potential use of native fungi for value-added spalting in Chile

Felipe Galleguillos¹, Victor Hernández², Fabian Figueroa³, Goetz Palfner⁴, Vicente A. Hernandez⁵, and Sara Robinson⁶

^aUniversidad de Concepcion, Student PhD, Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepcion
^bLaboratory of Natural Products Chemistry Department of Botany, Faculty of Natural and Oceanographic Sciences Universidad de Concepcion Concepcion, 4070409 Chile

International Biodeterioration & Biodegradation 107 (2016) 154–157



Contents lists available at ScienceDirect

International Biodeterioration & Biodegradation

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ibiod



Fungal pigments from spalting fungi attenuating blue stain in *Pinus* spp.



Vicente A. Hernandez ^{a,*}, Felipe Galleguillos ^a, Sara Robinson ^b

^a Biotechnology Center, University of Concepcion, Chile

^b Wood Science and Engineering Department, Oregon State University, USA