



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

***Clonostachys rosea* COMO POSIBLE AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO
DE *Diplodia* Y *Ophiostoma* EN MADERA DE *Pinus radiata* D. Don**

Memoria de Título presentada a la Facultad de Ciencias Forestales de la
Universidad de Concepción para otorgar al título profesional de Ingeniera en
Biotecnología Vegetal

POR: Neus Alondra Andrade Fonseca

Profesor Guía: Dr. Vicente Andrés Hernández Castillo

Enero, 2026

Concepción, Chile

© 2026, Neus Alondra Andrade Fonseca

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento

***Clonostachys rosea* COMO POSIBLE AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO
DE *Diplodia* Y *Ophiostoma* EN MADERA DE *Pinus radiata* D. Don**



Profesor Guía

Vicente Andrés Hernández Castillo

Profesor Asistente

Ingeniero en Madera, PhD in Forestry.



Profesor Co-Guía

Eugenio Alfredo Sanfuentes Von Stowasser

Profesor Titular

Ingeniero Forestal, Dr en Fitopatología.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. METODOLOGÍA.....	10
2.1 Obtención de los aislados.....	10
2.2 Ensayo de manchado.....	11
2.3 Screening de antagonistas.....	13
2.4 Efecto de la oportunidad de aplicación de <i>Clonostachys rosea</i>	16
2.5 Determinación de los mecanismos de antagonismo.....	20
2.5.1 Cultivos duales.....	20
2.5.2 Actividad de compuestos volátiles.....	22
2.5.3 Metabolitos difusibles.....	24
III. RESULTADOS ESPERADOS.....	26
IV. BIBLIOGRAFÍA.....	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Enumeración de tratamientos para screening de cepas de <i>Clonostachys rosea</i>	15
Tabla 2: Enumeración de tratamientos para ensayo factorial de control biológico en madera, con los factores agente aplicado (cepas de <i>Clonostachys rosea</i>) y oportunidad de aplicación (1: preventiva; 2: co-inoculación; 3: curativa).....	18

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1: Fórmula utilizada para calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento radial, donde r_1 corresponde al radio de crecimiento del hongo manchador en el tratamiento control y r_2 al radio de crecimiento al enfrentarse con el antagonista (Wu <i>et al.</i> , 2025).	21
--	----

RESUMEN

Chile se destaca por su desarrollo forestal, especialmente por el cultivo de *Pinus radiata*, que representa cerca del 55% de la superficie nacional de plantaciones. Dada su importancia, es fundamental abordar los factores que amenazan su producción, entre los cuales el manchado de la albura constituye uno de los más relevantes. Este problema postcosecha es causado por la colonización de diversos hongos, entre los cuales se incluyen los hongos ophiostomatoides y especies de la familia Botryosphaeriaceae, cuya pigmentación se asocia al crecimiento de hifas melanizadas en el xilema. Si bien no existe evidencia de que estos afecten las propiedades mecánicas de la madera, sí provoca un daño económico a la industria forestal, ya que el material afectado debe venderse a un precio inferior. La madera aserrada destinada a la exportación debe cumplir con los más altos estándares de calidad, lo que a menudo implica la aplicación de tratamientos químicos para prevenir el manchado, los cuales pueden ser perjudiciales para el medioambiente. El control biológico, mediante el uso de bioproductos producidos en laboratorio, surge como una estrategia prometedora para reducir la huella ambiental. En este estudio se cuantificará la capacidad de manchado de hongos pertenecientes a los géneros *Diplodia* y *Ophiostoma*, y se

evaluará la actividad antagónica del ascomiceto *Clonostachys rosea*. Finalmente, se espera establecer la capacidad de biocontrol del antagonista sobre los hongos causantes del manchado.

ABSTRACT

Chile has a well-developed forestry sector, particularly the cultivation of *Pinus radiata*, which accounts for approximately 55% of the national plantation area. Given its importance, it is essential to address the factors that threaten its production, among which sapwood staining represents one of the most significant. This post-harvest problem is caused by the colonization of various fungi, including ophiostomatoid fungi and species of the family Botryosphaeriaceae, whose pigmentation is associated with the growth of melanized hyphae in the xylem. Although there is no evidence that these fungi affect the mechanical properties of wood, they do cause economic losses to the forestry industry, as affected material must be sold at a lower price. Sawn timber intended for export must meet the highest quality standards, which often involves the application of chemical treatments to prevent staining; however, these treatments can be harmful to the environment. Biological control, through the use of laboratory-produced bioproducts, emerges as a promising strategy to reduce the environmental footprint. In this study, the staining capacity of fungi belonging to the genera *Diplodia* and *Ophiostoma* will be quantified, and the antagonistic activity of the

ascomycete *Clonostachys rosea* will be evaluated. Finally, the biocontrol potential of the antagonist against wood-staining fungi is expected to be established.

I. INTRODUCCIÓN

Chile es un país que cuenta con más de 75 millones de hectáreas, de las cuales el 23,9% son bosques. En específico, existen 3,1 millones de hectáreas ocupadas por plantaciones forestales, que corresponde al 4,2% de la superficie nacional (CONAF, 2024). El Instituto Nacional Forestal indica que, hasta diciembre del 2022, la especie *Pinus radiata* era la más presente con un 54,6% de esta superficie (INFOR, 2024a).

Las plantaciones forestales son fuente de una alta variedad de productos, ya sea para la industria primaria o para la industria secundaria. Durante el año 2023 el consumo de trozas de *P. radiata* llegó a ser más de 25 millones de metros cúbicos de sólido seco sin corteza (m³ ssc). De esto, las trozas se dividen principalmente en la producción de pulpa, madera aserrada, astillas, tableros y chapas. En el mismo año se destinaron 13,2 millones de m³ ssc para la producción de madera aserrada, de los cuales el 30%

fue exportado y comercializado a un valor mayor que en el mercado nacional. A modo de ejemplo, en el año 2023 el valor de exportación fue de 231 US\$/m³, mientras que en el mercado interno fue de 168 US\$/m³ (INFOR, 2024b).

Tras la cosecha, las trozas quedan expuestas a diversos factores que pueden afectar su calidad. Dentro de los daños abióticos se encuentra el intemperismo, descomposición química, degradación térmica y daño mecánico. Los daños bióticos son causados principalmente por insectos (isópteros, coleópteros e himenópteros) y por microorganismos, en especial hongos y bacterias (Zabel & Morrell, 2020c).

El manchado es un daño que puede ser de origen biótico o abiótico, y se define como patrones de color anormales que se desarrollan dentro o en la superficie de la madera. La mancha azul, uno de los muchos tipos de manchado, es causada por hongos con hifas pigmentadas que crecen en la albura de la madera, consumiendo las proteínas, ácidos grasos y otros compuestos almacenados en los radios xilemáticos (Zabel & Morrell, 2020b). Estos microorganismos no consumen celulosa ni lignina, que son los componentes principales de la pared celular, y se trasladan a través de los radios xilemáticos y punteaduras (Mohali, 1993). Hasta la fecha no se tiene evidencia de que comprometan las propiedades mecánicas de la madera.

Los hongos manchadores, también conocidos cromógenos, requieren ciertas condiciones para desarrollarse. En primer lugar, el agua es necesaria en sus funciones vitales. Esta es utilizada en los procesos de hidrólisis y difusión.

Existe una diferencia conceptual entre los tipos de agua que hay en la madera, siendo el agua ligada aquella que está adsorbida a las traqueidas mediante fuerzas físicas, y el agua libre la que se encuentra dentro de los lúmenes celulares, disponible para ser utilizada por los microorganismos. Otros factores que influyen en la supervivencia y crecimiento de estos hongos son la presencia de oxígeno, la temperatura y el pH (Zabel & Morrell, 2020a).

El ciclo reproductivo de estos hongos depende de la especie, pero suele ser en su fase anamórfica en la que causa más daño. Las esporas de hongos ophiostomatoides son pegajosas, por lo que su dispersión se ve ampliamente potenciada en presencia de insectos vectores (Wingfield *et al.*, 2017). En Chile, se encontró que los escotílicos barrenadores introducidos *Hylurgus ligniperda* y *Hylastes ater* están asociados a cinco especies de hongos ophiostomatoides en plantaciones de *P. radiata* (Zhou *et al.*, 2004). Estos insectos tienen un historial de coevolución con los hongos, lo que los llevó a desarrollar estructuras especializadas para ayudar a la diseminación de esporas. Estas estructuras, llamadas micangios, tienen una superficie pegajosa que atrapa a las esporas y las transporta con facilidad (Zhou *et al.*, 2007). Otros autores postulan que las esporas pegajosas son capaces de adherirse a otras zonas del cuerpo del insecto, indicando que el micangio no es esencial para la diseminación (Beaver, 1989).

Una vez que las trozas ingresan al aserradero, deben ser procesadas rápidamente para limitar el desarrollo del manchado (Böhm *et al.*, 2023). Durante el acopio, la permanencia de trozas con contenido de humedad superior al 20% y temperaturas cálidas permiten la colonización de hongos manchadores. Posteriormente, durante el aserrado, las sierras pueden actuar como vectores de diseminación, transfiriendo esporas y segmentos de micelio desde trozas colonizadas hacia madera sana (Szewczyk *et al.*, 2020).

Los tratamientos aplicados a la madera para mantener su durabilidad ante agentes bióticos son secado y baño antimancha. El proceso de secado puede ser al aire o en hornos de secado (Spavento & Refort, 2022). Cuando es al aire, este tarda meses. Durante ese tiempo la madera es susceptible a daños por causas abióticas, como radiación UV o temperaturas extremas. El secado en horno es una forma de acelerar el proceso. Este tratamiento consiste en introducir la madera verde en hornos de secado, dentro de los cuales circulan corrientes de aire caliente (Córdoba, 2005). Este proceso demora desde un par de horas hasta un par de semanas, dependiendo de la especie y el espesor de la madera (Pérez *et al.*, 2007). Considerando que los hornos de secado son equipos costosos y difíciles de transportar, la capacidad de secado se transforma en una limitante para controlar el manchado.

En el baño antimancha se sumerge la madera recién aserrada en contenedores con soluciones fungicidas (Keil & Taraborelli, 2022). En el año 2023, 2,2 millones m³ fueron tratados con este método, que corresponde al 32,3% de la producción nacional (INFOR, 2024c).

A través del tiempo se han utilizado distintas formulaciones de productos antimancha. Hasta el año 1999 se aplicaba pentaclorofenato de sodio (PCP-Na), sin embargo, fue prohibido por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) porque era perjudicial para la salud humana y para el medio ambiente (Montes *et al.*, 2001).

Como alternativa al PCP-Na surgió el fungicida comercial Antiblu®CC, compuesto por carbendazima y clorotalonilo. La carbendazima está prohibida en la Unión Europea y se asocia a mutaciones, pérdida de fertilidad y/o daño al feto, toxicidad acuática aguda y bioacumulación. Por otro lado, el clorotalonilo es frecuentemente utilizado en la industria agrícola, y según los autores Zhu *et al.* (2014) es tóxico para las larvas de *Apis mellifera*, importantes himenópteros polinizadores.

Otro producto alternativo es el tribromofenol (TBF), que tiene una estructura química similar al PCP-Na y ha mostrado buenos resultados controlando la mancha azul. Gutiérrez (2004) reportó la presencia de TBF en el agua de punteras de cuatro aserraderos, presuntamente contaminadas por

lixiviación del producto, y evidenció que este compuesto tiene un efecto irritante de mucosas, ojos y piel en las personas expuestas. El Instituto de Salud Pública (ISP) ofrece cuantificación de tribromofenol en orina y en sangre para trabajadores, lo que sugiere la posibilidad de que existan futuras restricciones en su uso.

El quinolinolato de cobre es un fungicida actualmente utilizado contra hongos manchadores, mohos y hongos de pudrición. Sin embargo, al ser un compuesto cúprico, es posible que la acumulación en madera produzca patrones de descoloración en su superficie (Montes *et al.*, 2001). Los productos comerciales con este componente son declarados como nocivos para la salud, ya que es irritante de mucosas, ojos y piel en las personas expuestas. En altas concentraciones, es tóxico para los organismos acuáticos.

Ante la creciente preocupación medioambiental, se hace necesario encontrar métodos alternativos para controlar el manchado. El control biológico, o biocontrol, es definido como el uso de organismos vivos o parte de estos para mejorar alguna problemática. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, se entiende por agente de control biológico "*a natural enemy, antagonist or competitor, or other organism, used for pest control*" (FAO, 2017, 2023)

El control biológico se ha estudiado como una opción para proteger la madera del manchado y de otros procesos de deterioro postcosecha. Esta estrategia se basa en la utilización de microorganismos antagonistas capaces de reducir la severidad del daño. Para esto, pueden utilizar mecanismos de competencia, antibiosis o micoparasitismo, que finalmente llevan a la inhibición del crecimiento del manchador o a la interferencia en su establecimiento (Kües *et al.*, 2007; Vanneste *et al.*, 2002). La eficacia del control biológico en madera verde depende en gran medida del momento de aplicación, siendo generalmente más eficaz de forma preventiva (Payne *et al.*, 2000).

Clonostachys rosea (teleomorfo *Bionectria ochroleuca*), anteriormente llamado *Gliocladium roseum* o *Penicillium roseum*, es un hongo ascomicete generalista cosmopolita (Schroers *et al.*, 1999). Pertenece al filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, clase Sordariomycetes, subclase Hypocreomycetidae, orden Hypocreales y familia Bionectriaceae. Este hongo se ha probado contra múltiples patógenos de plantas, entre los cuales destacan *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp. y *Ganoderma boninense* (Nagaraj & Kolanthasamy, 2025). El mecanismo de control utilizado por *C. rosea* depende tanto del hospedero como del organismo a controlar, pero su actuar biocontrolador se suele atribuir a la secreción de enzimas extracelulares que degradan paredes celulares (glucanasas, proteinasas y quitinasas), producción de metabolitos secundarios antibióticos y la inducción de resistencia en la planta (Sun *et al.*, 2020).

Yang and Rossignol (1999) probaron el control de *C. rosea* en *in vitro* y en troncos en campo. En placas con medio de cultivo, el antagonista suprimió por completo el crecimiento de *Alternaria alternata* tras tres semanas de incubación. En campo, los troncos de *Picea mariana* tratados con *C. rosea* redujeron la incidencia del manchado de un 25% a 13,2%, mientras que en *P. banksiana* este valor disminuyó de 22,8% a 8,4%.

Yang *et al.* (2007) aplicaron *C. rosea* en la cosecha de *Populus tremula*, *Betula alleghaniensis* y *Acer rubrum* destinados a la manufactura de paneles. Tras cinco meses apilados en el aserradero, los troncos no tratados estaban severamente degradados por mohos, hongos manchadores y de pudrición. En estos, el daño variaba de un 55% a un 83%. Al aplicar *C. rosea* ese porcentaje disminuyó a 4-16%. Se encontró que los paneles fabricados con troncos tratados tenían menor capacidad de hinchazón y absorción de agua, además de mayor resistencia a moho superficial.

Dados los antecedentes, se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿cómo afecta el controlador biológico *Clonostachys rosea* a la severidad del manchado en madera de *Pinus radiata*? La hipótesis es que las cepas de *Clonostachys rosea* disminuyen el porcentaje de cobertura del manchado en madera de *Pinus radiata* en aplicaciones preventivas. En consecuencia, la

hipótesis nula se aceptará en caso de que las cepas de *Clonostachys rosea* no disminuyan dicho porcentaje.

Para responder a la hipótesis se formuló el objetivo general de esta investigación, que será evaluar la eficacia de *Clonostachys rosea* como agente biocontrolador de hongos manchadores en madera de *Pinus radiata* en condiciones controladas. Se plantean tres objetivos específicos: comparar la capacidad de manchado de distintos hongos manchadores en madera de *Pinus radiata*; determinar el efecto de *Clonostachys rosea* en la reducción del manchado en madera de *Pinus radiata* en función del tiempo de inoculación respecto a los hongos manchadores; y evaluar los posibles mecanismos de antagonismo ejercidos por *Clonostachys rosea* contra hongos manchadores.

II. METODOLOGÍA

2.1 Obtención de los aislados

Se utilizarán 15 cepas de *C. rosea*, facilitadas por el Laboratorio de Patología Forestal de la Universidad de Concepción. Como hongos manchadores se utilizará una cepa de *D. sapinea*, proporcionada por el Laboratorio de Patología Forestal, y una cepa de *Diplodia seriata*, perteneciente al cepario del Laboratorio Silvotecnológico de la Madera de la Universidad de Concepción. Además, se incluirán cuatro cepas de *Ophiostoma* spp. provenientes del Laboratorio Silvotecnológico de la Madera, de las cuales dos fueron originalmente proporcionadas por la Unidad de Desarrollo Tecnológico (UDT).

2.2 Ensayo de manchado

Se evaluará la capacidad de manchado de seis hongos de distintas especies de los géneros *Diplodia* y *Ophiostoma* (*D. sapinea*; *D. seriata*; *O. ips*, *O. ips* UDT; *Ophiostoma* sp.; *Ophiostoma* UDT).

Se confeccionarán probetas de albura de *P. radiata* de 7 mm x 20 mm x 70 mm, según las dimensiones estandarizadas en la norma D4445 (ASTM International, 2023). Estas se dispondrán dentro de cámaras húmedas en placas Petri, cubiertas en la base con papel absorbente humedecido con agua destilada estéril. Sobre estas se instalarán mallas para evitar el contacto directo entre las muestras de madera y la superficie húmeda.

Sobre cada segmento de madera se posicionará un disco de micelio de 10 mm obtenido desde la zona de crecimiento activo de colonias de manchadores en agar extracto de malta (MEA, por sus siglas en inglés) con 14 días de crecimiento (Yang, 1999). Las placas se incubarán en oscuridad a 21 °C y se evaluarán a las dos y cuatro semanas, midiendo el área de manchado (mm²) con el programa ImageJ.

El control consistirá en posicionar un disco de agar papa dextrosa sobre la superficie de la madera. El diseño experimental será completamente aleatorio, considerando como unidad experimental la placa Petri con 10 repeticiones.

Se comparará la superficie manchada mediante ANOVA o Kruskal-Wallis en caso de que los datos no resulten paramétricos. Los análisis se realizarán por separado para los géneros *Diplodia* y *Ophiostoma*. En base a estos resultados, se seleccionará el hongo con mayor capacidad de manchado de cada género para continuar con los bioensayos.

2.3 Screening de antagonistas

Se realizará un screening utilizando 15 cepas de *C. rosea*. Se preparará inóculo líquido de *C. rosea* por el método de barrido en placa, agregando 10 mL de ADE a placas Petri de agar papa dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) con 14 días de crecimiento. La concentración del inóculo se ajustará a 1×10^7 con/mL utilizando un hematocitómetro.

La capacidad de biocontrol de *C. rosea* se evaluará sumergiendo probetas de 7 mm x 20 mm x 70 mm en inóculo líquido durante 60 segundos, siguiendo una versión modificada de la norma D4445 (ASTM International, 2023). Posteriormente, las probetas se dispondrán dentro de cámaras húmedas y se incubarán a 21 °C durante siete días. Luego de este período se inoculará un disco de micelio del hongo manchador, obtenido desde la zona externa de cultivos con 14 días de crecimiento. Las cámaras húmedas se incubarán a 21 °C en oscuridad. La evaluación se realizará a las cuatro semanas midiendo el área manchada.

Se considerarán dos tratamientos control. En ambos, las probetas serán inicialmente sumergidas en ADE. Luego, en uno de los controles se inoculará un disco de PDA, mientras que en el otro se inoculará un disco de micelio del hongo manchador.

El diseño experimental será completamente aleatorio, con 17 tratamientos (Tabla 1). La unidad experimental será la placa Petri y se realizarán tres repeticiones.

Tabla 1: Enumeración de tratamientos para screening de cepas de *Clonostachys rosea*.

Tratamiento	Hongo
1	Control (ADE-ADE)
2	Control (ADE-manchador)
3	A10
4	ANT11
5	CBF265
6	CBF704
7	CBF934
8	CBF1447
9	CBF1580
10	CBF1591
11	CBF1728A
12	CBF1774
13	CBF2028
14	CBF2040
15	CBF2067
16	CBF2113
17	CBF2120

Los datos del área manchada se analizarán mediante ANOVA o Kruskal-Wallis en caso de que los datos sean no paramétricos. Los análisis se realizarán por separado para cada manchador. A partir de estos resultados, se seleccionarán las tres cepas de *C. rosea* más eficaces en la disminución del área manchada para continuar con el siguiente bioensayo.

2.4 Efecto de la oportunidad de aplicación de *Clonostachys rosea*

Se preparará inóculo líquido de las tres mejores cepas de *C. rosea* para cada manchador, elegidas anteriormente en función de su capacidad de reducir el área manchada. Para esto, se agregarán 10 mL de ADE a cultivos con 14 días de crecimiento. La concentración de inóculo se ajustará a 1×10^7 con/ml utilizando un hematocitómetro.

La actividad antagonista de *C. rosea* se evaluará considerando distintas oportunidades de aplicación: tratamientos preventivos (siete días antes de la inoculación del manchador), co-inoculaciones y tratamientos curativos (siete días después de la inoculación del manchador). Para aplicar *C. rosea*, las probetas de albura se sumergirán en suspensiones de conidias durante 60 segundos. La inoculación del hongo manchador se realizará ubicando un disco de micelio de 10 mm obtenido desde la zona de crecimiento activo de colonias en PDA con 14 días de crecimiento (ASTM International, 2023; Behrendt *et al.*, 1995; Singh y Chittenden, 2021).

Las probetas se mantendrán en cámaras húmedas a 21 °C en oscuridad. La evaluación se realizará a las dos y cuatro semanas, midiendo el área cubierta por manchado.

Se considerarán tres controles. En dos de ellos las probetas serán inicialmente sumergidas en ADE. Luego, en uno de los controles se inoculará un disco de PDA, mientras que en el otro se inoculará un disco de micelio del hongo manchador. El tercer control será aplicando un tratamiento químico antimancha (oxina de cobre).

El diseño experimental será factorial y completamente aleatorio. Los factores serán el agente aplicado (seis niveles: tres cepas de *C. rosea* y tres controles) y la oportunidad de aplicación (tres niveles: preventiva, co-inoculación o curativa) (Tabla 2). La unidad experimental será la placa Petri y se realizarán cinco repeticiones.

Tabla 2: Enumeración de tratamientos para ensayo factorial de control biológico en madera, con los factores agente aplicado (cepas de *Clonostachys rosea*) y oportunidad de aplicación (1: preventiva; 2: co-inoculación; 3: curativa).

Tratamiento	Agente aplicado	Oportunidad de aplicación
1		1
2	Control ADE-PDA	2
3		3
4		1
5	Control ADE-manchador	2
6		3
7		1
8	Control químico	2
9		3
10		1
11	<i>Clonostachys rosea</i> 1	2
12		3
13		1
14	<i>Clonostachys rosea</i> 2	2
15		3
16		1
17	<i>Clonostachys rosea</i> 3	2
18		3

Los datos del área cubierta por manchado se analizarán mediante un ANOVA factorial de dos vías, considerando la cepa de *C. rosea* y la oportunidad de aplicación. En caso de que los datos no tengan una distribución normal se

utilizarán métodos no paramétricos equivalentes. Este análisis se realizará de forma independiente para cada hongo manchador.

2.5 Determinación de los mecanismos de antagonismo

2.5.1 Cultivos duales

Se cortarán discos de micelio de 10 mm de diámetro desde la zona de crecimiento activo de las tres mejores cepas de *C. rosea* para cada manchador (elegidas anteriormente en función de su capacidad de reducir el área manchada) y de los hongos manchadores. Los discos se posicionarán sobre placas Petri con PDA manteniendo una separación de 60 mm entre ellos. En el control se posicionará el disco de micelio del hongo manchador y un disco de PDA (Hincal y Yalcin, 2023).

El ensayo será revisado cada 24 horas con el objetivo de capturar el entrelazamiento entre las hifas de *C. rosea* con las del hongo manchador. Las interacciones serán observadas y descritas utilizando microscopía óptica de luz.

Cuando los hongos manchadores colonicen las placas completas en el tratamiento control, se medirá su crecimiento radial en milímetros. Esto será transformado a un porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PIRG) siguiendo la fórmula presentada en la Figura 1.

$$PIRG(\%) = \frac{r1 - r2}{r1} * 100$$

Figura 1: Fórmula utilizada para calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento radial, donde $r1$ corresponde al radio de crecimiento del hongo manchador en el tratamiento control y $r2$ al radio de crecimiento al enfrentarse con el antagonista (Wu *et al.*, 2025).

El diseño experimental será completamente aleatorio, considerando como unidad experimental la placa Petri que contará con cinco réplicas. La variable independiente será la cepa de *C. rosea* y la variable dependiente el PIRG.

Los valores de PIRG se analizarán mediante ANOVA, considerando como factor la cepa de *C. rosea* (en cuatro niveles: tres cepas antagonistas y un control). En caso de que los datos resulten no paramétricos, se aplicará Kruskal-Wallis.

2.5.2 Actividad de compuestos volátiles

Se realizará un ensayo de inhibición del crecimiento por compuestos volátiles, posicionando en el inferior placas Petri con 14 días de crecimiento de las tres mejores cepas de *C. rosea* para cada manchador (elegidas anteriormente en función de su capacidad de reducir el área manchada) en PDA, e invirtiendo sobre estas placas recién inoculadas de los hongos manchadores. Las placas se sellarán y se incubarán a 21 °C. En los controles, las placas del hongo manchador serán invertidas sobre placas Petri sin inocular (Schwarze *et al.*, 2012).

El ensayo se considerará finalizado cuando el crecimiento del hongo manchador ocupe por completo la placa Petri en el tratamiento control.

Al término del ensayo, se medirá el crecimiento radial del hongo manchador en cada tratamiento, con el que se calculará PIRG siguiendo la fórmula de la Figura 1.

El diseño experimental será completamente aleatorio, considerando como unidad experimental la placa Petri que contará con cinco réplicas. La variable independiente será la cepa de *C. rosea* y la variable dependiente el PIRG.

Los valores de PIRG se analizarán mediante ANOVA, considerando como factor la cepa de *C. rosea* (en cuatro niveles: tres cepas antagonistas y un control). En caso de que los datos resulten no paramétricos, se aplicará Kruskal-Wallis.

2.5.3 Metabolitos difusibles

Se medirá la capacidad biocontroladora de los metabolitos producidos por el antagonista. Para esto, se preparará un extracto de metabolitos de las tres mejores cepas de *C. rosea* para cada manchador (elegidas anteriormente en función de su capacidad de reducir el área manchada). El extracto se elaborará cultivando el antagonista en medio caldo papa dextrosa y se mantendrá en agitación durante siete días. Posteriormente, el cultivo será filtrado primero a través de una gasa estéril y luego mediante una jeringa con un filtro de 0,2 μm . En placas Petri se verterán 18 mL de PDA y 2 mL de extracto de *C. rosea*. Finalmente, se ubicará un disco de micelio del hongo manchador en el centro de cada placa y se medirá el PIRG siguiendo la fórmula de la Figura 1 (Marques *et al.*, 2018).

El diseño experimental será completamente aleatorio, considerando como unidad experimental la placa Petri que contará con cinco réplicas. La variable independiente será la cepa de *C. rosea* y la variable dependiente el PIRG.

Los valores de PIRG se analizarán mediante ANOVA, considerando como factor la cepa de *C. rosea* (en cuatro niveles: tres cepas antagonistas y un control). En caso de que los datos resulten no paramétricos, se aplicará Kruskal-Wallis.

III. RESULTADOS ESPERADOS

En el presente documento se establecieron los antecedentes y la metodología para evaluar el potencial biocontrolador de *C. rosea* frente al manchado en madera de *Pinus radiata*.

El uso de agentes de control biológico se plantea como una alternativa viable a los métodos químicos tradicionales, especialmente en un contexto donde se busca reducir el impacto medioambiental. En particular, *C. rosea* es una opción prometedora en madera por su efecto antagónico de amplio espectro.

La metodología permitirá conocer el mecanismo de acción que el antagonista ejerce sobre el hongo manchador, evaluando tanto la interacción directa entre hifas como el rol de compuestos volátiles y metabolitos difusibles. Se espera que *C. rosea* reduzca significativamente el manchado en tratamientos preventivos, y que los mecanismos utilizados sean competencia de nutrientes y antibiosis.

Esta investigación busca establecer una base para que futuros estudios puedan optimizar la producción y evaluar el desempeño de este antagonista en condiciones de campo.

IV. BIBLIOGRAFÍA

- ASTM International. (2023). *Standard Test Method for Fungicides for Controlling Sapstain and Mold on Unseasoned Lumber (Laboratory Method)* (ASTM D4445-23).
- Beaver, R. (1989). Insect-fungus relationships in the bark and ambrosia beetles.
- Behrendt, C. J., Blanchette, R. A., & Farrell, R. L. (1995). Biological control of blue-stain fungi in wood. *Phytopathology*, 85(1), 92-97.
- Böhm, S., Baier, P., Kirisits, T., & Kanzian, C. (2023). *Blue-stain development on Norway spruce logs under alpine conditions* (Vol. 57). <https://doi.org/doi:10.14214/sf.23054>
- CONAF. (2024). *Catastro de los Recursos Vegetacionales de Chile al año 2024*.
- Córdoba, R. (2005). Conceptos básicos sobre el secado de la madera. *Kurú: Revista Forestal*, 2(5), 88-92.
- FAO. (2017). Guidelines for the export, shipment, import and release of biological control agents and other beneficial organisms In: International Standard for

Phytosanitary Measures No. 3. Rome. FAO on behalf of the Secretariat of the International Plant Protection Convention.

FAO. (2023). Glossary of phytosanitary terms. In. Rome: International Standard for Phytosanitary Measures No. 5. Rome. FAO on behalf of the Secretariat of the International Plant Protection Convention.

Gutiérrez, M. (2004). *Distribución, exposición, riesgos ambientales y ocupacionales del tribromofenol empleado en baño antimanchas*. Universidad de Concepción.

Hincal, S., & Yalcin, M. (2023). Biological control of some wood-decay fungi with antagonistic fungi. *Biodegradation*, 34(6), 597-607. <https://doi.org/10.1007/s10532-023-10045-2>

INFOR. (2024a). Anuario Forestal 2024. *Boletín Estadístico*, 199, 290.

INFOR. (2024b). *El Sector Forestal Chileno 2024*.

INFOR. (2024c). La Industria del Aserrío 2024. *Boletín Estadístico*, 202.

Keil, G. D., & Taraborelli, C. (2022). Capítulo 3. Proceso de aserrado: sierras y mecanismos complementarios. In U. d. I. Plata (Ed.), *Industrialización de la madera. Transformación mecánica y química: tecnologías y puesta en valor sustentable*.

- Kües, U., Mai, C., Militz, H., & Kües, U. (2007). Biological Wood Protection against Decay, Microbial Staining, Fungal Moulding and Insect Pests. *Wood production, wood technology, and biotechnological impacts*, 273-294.
- Marques, E., Martins, I., & Mello, S. C. M. d. (2018). Antifungal potential of crude extracts of *Trichoderma* spp. *Biota Neotropica*, 18(1). <https://doi.org/10.1590/1676-0611-bn-2017-0418>
- Mohali, S. (1993). Estudio histológico de madera de pino caribe con manchado azul causado por *Botryodiplodia theobromae*. *Fitopatología Venezolana*, 6, 14-17.
- 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.
- Nagaraj, G., & Kolanthasamy, E. (2025). Unveiling the antimicrobial and biocontrol potential of the Ascomycete fungus, *Clonostachys rosea*: A review. *The Microbe*, 6. <https://doi.org/10.1016/j.microb.2024.100226>
- Payne, C., Bruce, A., & Staines, H. (2000). Yeast and Bacteria as Biological Control Agents Against Fungal Discolouration of *Pinus sylvestris* Blocks in Laboratory-Based Tests and the Role of Antifungal Volatiles. *Holzforschung*, 54(6), 563-569. <https://doi.org/10.1515/HF.2000.096>

- Pérez, P., Ananias, R. A., & Hernandez, G. (2007). Estudio experimental del secado de renovales de canelo *Drimys winteri*. *Maderas. Ciencia y Tecnología*, 9, 59-70. <https://doi.org/10.4067/S0718-221X2007000100005>
- Schroers, H.-J., Samuels, G. J., Seifert, K. A., & Gams, W. (1999). Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. *Mycologia*, 91(2), 365-385. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061028>
- Schwarze, F. W. M. R., Jauss, F., Spencer, C., Hallam, C., & Schubert, M. (2012). Evaluation of an antagonistic *Trichoderma* strain for reducing the rate of wood decomposition by the white rot fungus *Phellinus noxius*. *Biological Control*, 61(2), 160-168. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.01.016>
- Singh, T., & Chittenden, C. (2021). Synergistic Ability of Chitosan and *Trichoderma harzianum* to Control the Growth and Discolouration of Common Sapstain Fungi of *Pinus radiata*. *Forests*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/f12050542>
- Spavento, E. M., & Refort, M. M. (2022). Capítulo 5. Valor agregado en madera aserrada: secado y remanufactura. In U. d. I. Plata (Ed.), *Industrialización de la madera. Transformación mecánica y química: tecnologías y puesta en valor sustentable*.

- Sun, Z. B., Li, S. D., Ren, Q., Xu, J. L., Lu, X., & Sun, M. H. (2020). Biology and applications of *Clonostachys rosea*. *J Appl Microbiol*, 129(3), 486-495. <https://doi.org/10.1111/jam.14625>
- Szewczyk, G., Jankowiak, R., Mitka, B., Bożek, P., Bilański, P., Kulak, D., Barycza, A., & Kunys, G. (2020). Development of blue stain in mechanically harvested Scots pine (*Pinus sylvestris*) logs during storage. *Canadian Journal of Forest Research*, 50(1), 42-50. <https://doi.org/10.1139/cjfr-2019-0112>
- Vanneste, J. L., Hill, R. A., Kay, S. J., Farrell, R. L., & Holland, P. T. (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. <https://doi.org/10.1017/S0953756201005020>
- Wingfield, M. J., Barnes, I., de Beer, Z. W., Roux, J., Wingfield, B. D., & Taerum, S. J. (2017). Novel associations between ophiostomatoid fungi, insects and tree hosts: current status—future prospects. *Biological Invasions*, 19(11), 3215-3228. <https://doi.org/10.1007/s10530-017-1468-3>
- Wu, X., Yang, S., Li, J., Qiu, J., & Qin, L. (2025). Study of the Antagonism of Biocontrol Strains Against the Blue-Stain Fungus of Rubberwood. *Journal of Fungi*, 11(1), 55. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/jof11010055>

- Yang, D.-Q. (1999). Staining Ability of Various Sapstaining Fungi on Agar Plates and on Wood Wafers. *Forest Products Journal*, 49(11/12), 78.
- Yang, D.-Q., Wang, X.-M., & Wan, H. (2007). Biological protection of hardwood logs destined for panel manufacturing using *Gliocladium roseum* against biodegradation. *Biocontrol*, 52, 559–571. <https://doi.org/10.1007/s10526-007-9069-1>
- Yang, D. Q., & Rossignol, L. (1999). Evaluation of *Gliocladium roseum* Against Wood-Degrading Fungi in vitro and on Major Canadian Wood Species. *Biocontrol Science and Technology*, 9(3), 409-420. <https://doi.org/10.1080/09583159929677>
- Zabel, R. A., & Morrell, J. J. (2020a). Chapter Four - Factors affecting the growth and survival of fungi in wood (fungal ecology). In R. A. Zabel & J. J. Morrell (Eds.), *Wood Microbiology (Second Edition)* (pp. 99-128). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819465-2.00004-8>
- Zabel, R. A., & Morrell, J. J. (2020b). Chapter Fourteen - Wood molds, stains and discolorations. In R. A. Zabel & J. J. Morrell (Eds.), *Wood Microbiology (Second Edition)* (pp. 363-383). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819465-2.00014-0>
- Zabel, R. A., & Morrell, J. J. (2020c). Chapter Two - Wood deterioration agents. In R. A. Zabel & J. J. Morrell (Eds.), *Wood Microbiology (Second Edition)*

(pp. 19-54). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819465-2.00002-4>

Zhou, X., Burgess, T. I., de Beer, Z. W., Lieutier, F., Yart, A., Klepzig, K., Carnegie, A., Portales, J. M., Wingfield, B. D., & Wingfield, M. J. (2007). High intercontinental migration rates and population admixture in the sapstain fungus *Ophiostoma ips*. *Mol Ecol*, 16(1), 89-99. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03127.x>

Zhou, X. D., de Beer, Z. W., Ahumada, R., Wingfield, B. D., & Wingfield, M. J. (2004). Fungal Diversity *Ophiostoma* and *Ceratocystiopsis* spp. associated with two pine- infesting bark beetles in Chile. *Fungal Diversity* 15, 261-274.

Zhu, W., Schmehl, D. R., Mullin, C. A., & Frazier, J. L. (2014). Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. *PLoS One*, 9(1), e77547. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077547>