

Biopreservantes contra el manchado azul de la madera de pino caribe

Biopreservatives against blue stain fungus in caribbean pine wood

ANDROS BRICEÑO, OSVALDO ENCINAS,
SARI MOHALI, NÉSTOR MORA y YOLY MOLINA

Universidad de Los Andes, Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales,
Grupo de Investigación en Conservación de Maderas,
Laboratorio Nacional de Productos Forestales, Mérida, Venezuela,
E-mail: oencinas@ula.ve

Recibido: 09-01-08 / Aceptado: 06-05-08

Resumen

Cepas de *Trichoderma harzianum* y *Aspergillus* sp. fueron ensayadas como agentes bioprotectores para prevenir el manchado azul de la madera de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. Pruebas *In vitro* mostraron la capacidad de estos microorganismos para inhibir el crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* y *Sphaeropsis sapinea*, principales hongos responsables del manchado azul de la madera de pino caribe en Venezuela. Evaluaciones realizadas en muestras de madera verde inoculadas con suspensiones de esporas preparadas a partir de los hongos seleccionados mostraron un control superficial, extendiéndose a la región interna de las células de la madera de pino caribe.

Palabras clave: *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Sphaeropsis sapinea*, manchado azul, control biológico.

Abstract

Several strains of *Trichoderma harzianum* and *Aspergillus* sp. were tested as potential biopreservatives against blue stain attack on *Pinus caribaea* var. *hondurensis* (Caribbean pine) wood. *In vitro* tests showed good capacity to prevent the growth of *Lasiodiplodia theobromae* and *Sphaeropsis sapinea* fungus, both produce blue stain on Caribbean pine wood in Venezuela. Evaluations carried out in small green wooden samples, inoculated with suspensions of spores prepared from these selected fungi, showed superficial control which extend to the internal regions of the wood cells of Caribbean pine wood.

Key words: *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Sphaeropsis sapinea*, blue stain, biocontrol.

1. Introducción

El manchado azul de la madera se define como el color anormal que adquiere al ser atacada por un grupo de hongos, bien sea en busca de alimentos o como un refugio seguro para desarrollar sus ciclos de vida (Uzonovic *et al.*, 1996). El manchado azul produce una coloración inaceptable en madera de alta calidad que ocasiona importantes pérdidas por ventas a menor precio, consecuencia de la disminución del valor estético de la madera manchada (Behrendt *et al.*, 1995). En Venezuela uno de los principales agentes causales del manchado azul de la madera de pino caribe (*Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*) es el hongo imperfecto *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon y Maublanc (= *Botryodiplodia theobromae* Pat.) (Mohali, 1993; Encinas, 1996); existen otros hongos reportados como manchadores de madera en el país, tal como *Diplodia mutila* Fr. apud Mont. (Mohali y Encinas, 2001) y *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko y

Sutton (= *Diplodia pinea* (Desmaz.) Kickx.) (Mohali, 1997), otras nuevas especies de *Lasiodiplodia* han sido aisladas, identificadas y reportadas como hongos endofíticos desde árboles provenientes de plantaciones forestales de acacia y eucalipto en Venezuela, como son, *Lasiodiplodia venezuelensis* Burgess, Barber y Mohali y *Lasiodiplodia crassispora* Burgess y Barber (Burgess *et al.*, 2006). Entre los efectos que produce en la madera, junto con el efecto estético, *L. theobromae* al igual que otros hongos manchadores, tiene la habilidad de aumentar la permeabilidad de la madera (Mohali, 1993; Encinas, 1996), produce un cambio adverso en su dureza de la madera, provoca pérdidas de peso apreciables con relación a su peso inicial y pérdidas de resistencia al impacto que se ubican alrededor de 30 % (Encinas, 1996).

En la protección de la madera aserrada contra los hongos de la mancha azul se han utilizado diversas sustancias químicas, que son aplicadas por inmersión o aspersión, entre las cuales se han probado antimanchas

a base de TCMBT (tiocianometiltiobenzotiasole), triazoles como el azaconazole, cyproconazole, hexaconazole y tebuconazole (Mohali, 1992; Wakeling *et al.*, 1995) y fosfato-etil-mercurio. Compuestos compatibles con el ambiente, como la dioxina de cobre (Encinas *et al.*, 1999), los cuales se han destacado en los últimos años por su eficiencia y bajos costos. Todos estos compuestos antimanchas contienen sustancias químicas, que son actualmente objeto de restricción por aspectos ambientales, por lo que el control biológico de la mancha azul aparece como una alternativa ambientalmente compatible (Quarmby, 2001). Existen resultados alentadores en este aspecto y algunos han sido comercializados, por ejemplo *Ophiostoma piliferum* en forma de Cartapip – 9TM, biocida que ha demostrado en ensayos de campo y laboratorio ser exitoso para el control biológico del manchado azul (Blanchette y Farrell, 1997). Otros ensayos de campo demuestran la posibilidad de utilizar hongos como agentes de control biológico ambientalmente compatibles (Croan, 1996; Yang y Rossignol, 1999; Uzonovic *et al.*, 1996). En Venezuela se ha asomado la posibilidad de utilizar microorganismos fúngicos para ser utilizados como agentes de control biológico, particularmente en el campo agrícola (Hernández y Arcia, 1999; Bermúdez, 1998), por lo que el presente estudio pretende demostrar la capacidad que tienen algunos microorganismos antagonicos para el control de la mancha azul en la madera de pino caribe.

2. Materiales y métodos

Para estos ensayos se seleccionaron cultivos puros de *L. theobromae* y *S. sapinea*, ambos hongos considerados como los principales causantes del manchado azul de la madera de pino caribe en Venezuela (Cuadro 1).

Los hongos utilizados en estos ensayos, como posibles agentes de biocontrol fueron *Trichoderma harzianum* suministrado por el Instituto de Investigaciones Agropecuarias IIAP-ULA; *Aspergillus* sp suministrado por la Facultad de Farmacia de la ULA y *Aspergillus niger* perteneciente al cepario del Grupo de Investigación en Conservación de Maderas (Cuadro 2).

2.1 Prueba de antagonismo

Para la realización de esta prueba se preparó un medio de cultivo consistente en 20 ml de extracto de malta

agar (MA) al 2,5 % de concentración, al cual se agregó un antibiótico (Cloranfenicol 250 mg/litro) para inhibir el crecimiento de bacterias contaminantes (Carrero y Cedeño, 2001). Una vez solidificados los medios de cultivo, fueron transferidos a las cápsulas de Petri, un disco de 5 mm de diámetro del hongo manchador y otro disco de 5 mm del hongo a evaluar con 14 días de crecimiento, los cuales se colocaron uno frente al otro a una distancia de 2 cm. Se prepararon 4 cápsulas por cada tratamiento, las cuales fueron colocadas en un ambiente controlado a 25 ± 1 °C y 75 ± 2 % de humedad relativa.

2.2 Ensayo de laboratorio

Al momento de preparar las cápsulas de evaluación se incorporaron al medio de cultivo las suspensiones de esporas de los hongos seleccionados como posibles bioprotectores o biopreservantes (De Troya y Navarrete, 1992). Las cuales fueron preparadas con 50 ml de agua destilada estéril (ADE) por cultivo desarrollado en Papa Dextrosa Agar (PDA), durante 14 días de crecimiento en cuarto de acondicionamiento a 25°C

Cuadro 1. Hongos manchadores de diferentes procedencias utilizados en este estudio.

Microorganismo	Procedencia	Código
<i>Sphaeropsis sapinea</i> Fr. Dyko y Sutton	Madera de <i>Pinus oocarpa</i> , El Valle- Estado Mérida	GICOM N° 10
<i>Lasiodiplodia theobromae</i> Griffon and Maublanc	Madera de <i>Tectona grandis</i> LABONAC- Estado Mérida	GICOM N° 13
<i>L. theobromae</i>	Madera de <i>Pinus caribaea</i> , Smurfit- Estado Portuguesa	GICOM N° 14

Cuadro 2. Microorganismos utilizados en el ensayo de biocontrol.

Microorganismo	Procedencia	Código
<i>Trichoderma harzianum</i>	IIAP	GICOM N° 24
<i>Aspergillus niger</i>	LABONAC	GICOM N° 22
<i>Aspergillus</i> sp.	FARMACIA	GICOM N° 29

± 1 °C y 75 ± 2 % de humedad relativa (Carrero y Ce-deño, 2001). Fueron preparadas en esta forma nueve suspensiones de esporas (Cuadro 3).

Transcurridas 12 horas de inoculación y una vez solidificados los medios de cultivo (MA 2,5 %) fue transferido al centro de la cápsula un disco de 5 mm de diámetro de cultivos puros de 14 días de edad del hongo seleccionado como agente de manchado. Se prepararon 4 cápsulas por cada tratamiento, las cuales fueron colocadas en un ambiente controlado a 25 ± 1 °C y 75 ± 2 % de humedad relativa. Los resultados se evaluaron cualitativamente de acuerdo a los criterios adoptados por el Proyecto IBEROEKA (1999):

- 0 : Sin desarrollo de micelio del hongo manchador.
- + : Desarrollo ligero de micelio del hongo manchador; < 25% de la cápsula
- ++ : Desarrollo medio de micelio del hongo manchador; > 25% y < 75% de la cápsula
- +++ : Desarrollo fuerte de micelio del hongo manchador; > 75% de la cápsula

Cuadro 3. Concentración de las esporas en las suspensiones ensayadas.

Microorganismo	Código	Suspensión	Concentración
<i>Aspergillus niger</i>	GICOM 22	A	$2.6 \cdot 10^5$ conidios/ml
<i>Aspergillus niger</i>	GICOM 22	B	$6.5 \cdot 10^5$ conidios/ml
<i>Aspergillus niger</i>	GICOM 22	C	$3.75 \cdot 10^4$ conidios/ml
<i>Aspergillus sp.</i>	GICOM 29	D	$4.6 \cdot 10^5$ conidios/ml
<i>Aspergillus sp.</i>	GICOM 29	E	$2.8 \cdot 10^5$ conidios/ml
<i>Aspergillus sp.</i>	GICOM 29	F	$6.8 \cdot 10^4$ conidios/ml
<i>Trichoderma harzianum</i>	GICOM 24	G	$4.3 \cdot 10^5$ conidios/ml
<i>Trichoderma harzianum</i>	GICOM 24	H	$2.5 \cdot 10^5$ conidios/ml
<i>Trichoderma harzianum</i>	GICOM 24	I	$6.0 \cdot 10^4$ conidios/ml

2.3 Ensayo exploratorio en madera

Para este ensayo se utilizó madera verde de pino caribe (*Pinus caribaea* var. *hondurensis*) proveniente del oriente del país libre de manchado azul y otros defectos, con un contenido de humedad de 111 %, cortada en secciones transversales de $5 \cdot 5 \cdot 1$ cm y

posteriormente esterilizadas usando el autoclave a 120 °C y 15 PSI durante 15 min. La aplicación de la suspensión de esporas sobre la madera de pino caribe se realizó una sola aspersión con intervalos de aplicación de 0 y 24 horas entre la suspensión de esporas del hongo seleccionado como posible controlador y la suspensión de *L. theobromae* y *S. sapinea*. La concentración conidial utilizada en este ensayo fue de $2,5 \cdot 10^5$ conidios/ml para cada uno de los microorganismos ensayados. Después de 14 días de la inoculación de las muestras de madera con las suspensiones de esporas, se realizaron observaciones visuales en cuanto a la presencia o ausencia de manchado sobre la madera tratada. Para determinar el crecimiento de *L. theobromae* y *S. sapinea* en el interior de las muestras de madera, se realizó una evaluación microscópica de la manera sugerida por Behrendt *et al.* (1995). Para ello se realizaron cortes finos sucesivos en sección longitudinal y transversal de las muestras de madera que fueron teñidos con safranina al 0,1 % en glicerol y/o azul de anilina en 50 % en ácido láctico. Las observaciones microscópicas en la madera, fueron realizadas utilizando un microscopio de luz.

3. Resultados y discusión

En las pruebas de antagonismo los microorganismos seleccionados para este ensayo presentaron muy buena capacidad para inhibir el crecimiento de los hongos manchadores, *L. theobromae* y *S. sapinea*, cuando fueron enfrentados en las cápsulas de Petri. De los tres hongos ensayados, *T. harzianum* y *Arpergillus sp* se comportaron como los mejores agentes de biocontrol, por su alta rapidez de crecimiento y capacidad de inhibir la formación de micelio en un 100 % por parte de los hongos manchadores (Figura 1). Se conoce que algunas especies de *Trichoderma* son productores de polisacaridasas, proteasas y lipasas, enzimas quitinolíticas que pueden ser usados en la degradación de las paredes celulares de hongos patógenos, tales como, endoquitinasas y quitobiosdasa, responsables de la vacuolación, granulación, coagulación y desintegración de la pared celular (Stefanova *et al.* 1999; Mortuza e Ilag, 1999). En el campo agrícola, *Trichoderma harzianum* es capaz de crecer sobre *Diathiorella sp* (fase conidial de *Botryosphaeria dothidea*), patógeno de la pudrición apical de la guayaba, deteniendo su crecimiento (Hernández y Arcia, 1999).

Al incorporar a las cápsulas las suspensiones de esporas de los microorganismos seleccionados, el crecimiento de las tres cepas de los hongos manchadores fue inhibido por completo aun en las concentraciones más bajas de *Aspergillus* sp (Figura 2). *Aspergillus niger* inhibió en gran porcentaje el desarrollo de los hongos manchadores. Las diferentes suspensiones de *T. harzianum* controlaron totalmente el desarrollo de los hongos manchadores independientemente de la concentración conidial utilizada (Figura 3). Resultados similares, aunque con menores porcentajes de control, fueron obtenidos con *T. harzianum* para el control de *Sclerotium rolfsii*, y en el caso del control de *L. theobromae* en cultivos de plátanos se reporta hasta un 66 % de control (Mortuza and Ilag, 1999).

En relación con el ensayo exploratorio en madera, las evaluaciones macroscópicas indican que las suspensiones de esporas de los hongos seleccionados, presentaron buena capacidad para inhibir el desarrollo de *L. theobromae*. Las probetas de madera tratadas con

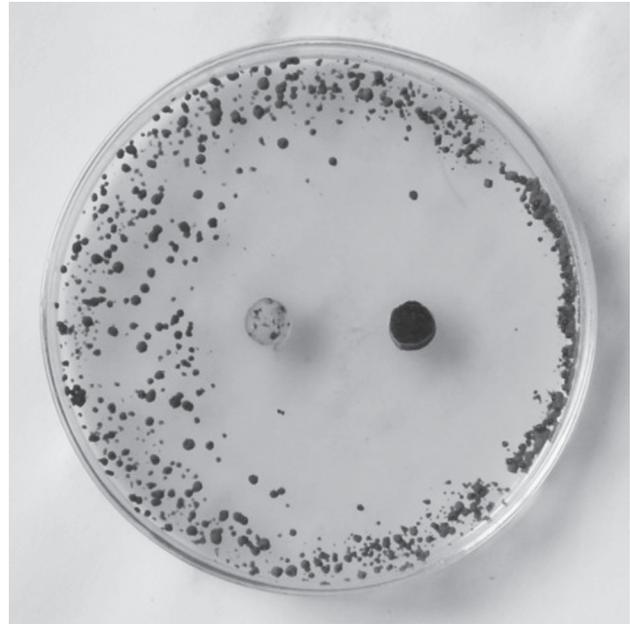


Figura 3. *T. harzianum* no permite el desarrollo de *L. theobromae*.

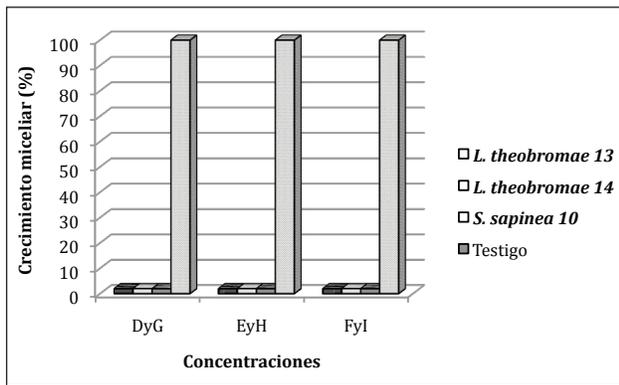


Figura 1. Crecimiento micelial de los hongos manchadores a diferentes concentraciones de *T. harzianum* y *Aspergillus* sp.

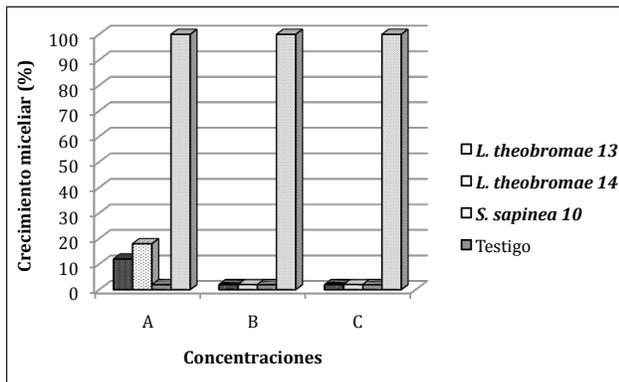


Figura 2. Crecimiento micelial de los hongos manchadores a diferentes concentraciones de *Aspergillus niger*.

las suspensiones de los hongos ensayados, no presentaron signos visuales de manchado azul a los 21 días de evaluación, independientemente del tratamiento aplicado; por el contrario, en las probetas testigo el manchado de la madera progresó rápidamente y en tan solo cuatro días se pudo observar la presencia del característico manchado azul en casi la totalidad de la probeta de madera (Figura 4). A nivel microscópico, en las secciones longitudinales de los cortes de madera tratada con los hongos como biocontrol, se pudo observar que la pared celular se encontraba en condición sana sin evidencia de ataque de hongos manchadores; se observaron hifas aisladas excepcionalmente en algunas probetas tratadas con *Aspergillus niger* en los primeros días de observación, lo que sugiere que si bien existe buen control del hongo manchador, el crecimiento del hongo no es totalmente suprimido en la etapa inicial de colonización de la madera de pino caribe. En la madera de las probetas testigos, se observó, un crecimiento micelial en el lumen celular y penetración pasiva a través de las punteaduras (Figura 5). Aunque no se observó penetración activa en las paredes celulares, pudo apreciarse, en estados avanzados del manchado, parcial separación de la lámina media, característico del ataque de *L. theobromae* en madera de pino caribe (Encinas, 1996).

Aunque no se realizaron pruebas de enzimología específica, se concluye que las cepas ensayadas como

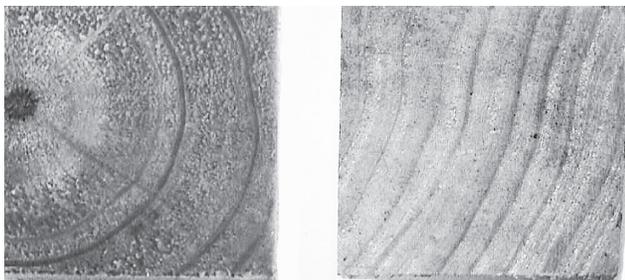


Figura 4. Madera de pino caribe tratada con *Aspergillus* sp., compárese con la madera testigo (derecha) donde está presente la mancha azul.

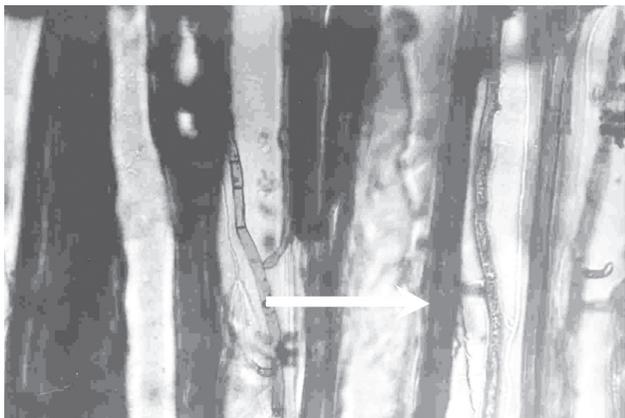


Figura 5. Corte longitudinal en madera testigo de Pino Caribe donde se observan hifas de *L. theobromae*.

biocontrol son capaces de producir metabolitos que inhiben el desarrollo de los hongos responsables del manchado azul de la madera de pino caribe en Venezuela. En este sentido es recomendable escalar los ensayos y estudiar las incidencias económicas y ambientales que puede representar el empleo de hongos como bio-preservantes de la mancha azul, particularmente el efecto en la salud humana y la fauna asociada a la madera de pino caribe.

4. Referencias bibliográficas

- BEHRENDT, C., R. BLANCHETTE y R. FARREL. 1995. Biological control of blue - stain fungi in wood. *Phytopathology* 85: 92-97.
- BERMÚDEZ, I. 1998. Evaluación del potencial fungistático de algunos microorganismos para el control de la mancha azul de Pino caribe (*Pinus caribaea*). Trabajo de grado. Maestría en Tecnología de Productos Forestales. CEFAP, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela. 97 p.

- BLANCHETTE, R. y R. FARREL, 1997. Application of biological control agents in the forest products industry. University of Minnesota. *FRI-Bulletin* 204: 81-85.
- BURGESS, T., P. BARBER, S. MOHALI, G. PEGG, W. DE BEER y M. WINGFIELD. 2006. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia* 98(3): 423-435.
- CARRERO, C. y L. CEDEÑO. 2001. Identificación y sensibilidad *In vitro* a fungicidas del agente causal de quema en acículas de plántulas de pino caribe. *Revista Forestal Venezolana* 45(1): 15-22.
- CROAN, S. 1996. Biological Control of Sapstain Fungi in Wood. *The International Research Group on Wood Preservation IRG/WP* 96-10158.
- DE TROYA, M. y A. NAVARRETE. 1992. Método rápido de laboratorio para determinar la eficacia preventiva contra hongos del azulado y mohos de madera. *Bot. San. Veg. Plagas* 18: 517-520.
- ENCINAS, O. 1996. Development and significance of attack by *Lasiodiplodia theobromae* (Pat) Griff. & Maubl. In Caribbean Pine wood and some other wood species. *Doctoral thesis*. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala. 126 p.
- ENCINAS, O., F. CASTRO y A. MÁRQUEZ. 1999. *Evaluación en bosque y aserradero de productos químicos para la prevención del manchado azul en madera de pino caribe*. Laboratorio Nacional de Productos Forestales. Informe Técnico N° 2, Mérida, Venezuela. (Mimeografiado). 47 p.
- HERNÁNDEZ, J. y M. ARCIA. 1999. *Control biológico de Dothiorella dothidea, causante de la pudrición apical del fruto de la guayaba por Trichoderma barzianum*. Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, Postgrado de Agronomía. 78 p.
- MOHALI, S. y O. ENCINAS. 2001. Association of *Diplodia mutila* with blue stain of Caribbean pine in Venezuela. *Forest Pathology* 31: 187-189.
- MOHALI, S. 1997. Primer reporte en Venezuela de *Sphaeropsis sapinea*, agente causal del manchado azul en pino caribe. *Fitopatología Venezolana* 10: 2-23.
- MOHALI, S. 1993. Estudio histológico de madera de pino caribe con manchado azul causado por *Botryodiplodia theobromae*. *Revista Fitopatología Venezolana* 6(1): 14-17.
- MOHALI, S. 1992. Aplicación de baños profilácticos para la prevención del manchado azul en madera aserrada de Pino caribe. *Revista Forestal Latinoamericana* 8: 51-64.
- MORTUZA, G. y L. ILAG. 1999. *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. y Maubl. In Banana Fruits by *Trichoderma* Species. *Biological Control* 15(3): 235-240.
- PROYECTO IBEROEKA N° 165. 1999. *Insecticida y fungicida integrado en producto único, de amplio espectro, ecotoxicológicamente neutro, para la protección de madera verde*. Informe 1° semestre. LNPF. Mérida, Venezuela. 55 p.

- QUARMBY, A. 2001. DRRG Pub. Dry Rot Research Group. University of Alberta and Dundee (Scotland). 145 p.
- STEFANOVA, M., A. LEIVA, L. LARRINAGA y M. CORONADO, 1999. Metabolic activity of *Trichoderma* spp. isolates for a control of soilborne phytopathogenic fungi. *Revista Facultad Agronomía (LUZ)* 16: 509-516.
- UZUNOVIC, A., J. WEBBER y D. DICKINSON. 1996. Development of Bluestain in Commercially Harvested Logs in Britain. *The International Research Group on Wood Preservation. IRG/WP* 96-10149
- WAKELING, R., J. WAALS, R. NARAYAN, J. FOSTER, B. PATERSON y P. MAYNARD, 1995. Fungus Cellar and Antisapstain Field Trial Studies of Six Triazole Fungicides. *The International Research Group on Wood Preservation. IRG/WP* 95-30077.
- YANG, D. y L. ROSSIGNOL, 1999. Evaluation of *Gliocadium roseum* against wood-degrading fungi in vitro and on major Canadian wood species. *Biocontrol Science and Technology* 9(3): 409-420.