

# HONGOS MANCHADORES DE LA MADERA ASOCIADOS A ESCOLÍTIDOS

Raquel Alonso\*

## INTRODUCCIÓN

La calidad de la madera de las coníferas muchas veces se ve afectada por la mancha azul, una decoloración de la madera provocada por el crecimiento de ciertos hongos microscópicos. Estos colonizan la albura de donde obtienen nutrientes como almidón y azúcares simples. El crecimiento del micelio de los hongos provoca una decoloración típica en la madera de color azul, negro azulado o gris amarronado pero no afecta las propiedades mecánicas de la madera ni produce podredumbre. Si bien el problema es estético, la mancha azul puede reducir significativamente el valor de la madera y en algunos casos, según sea el destino de utilización, puede ser rechazada en el mercado si la superficie afectada supera el 25%.

Los hongos manchadores pertenecen fundamentalmente a los «Ophiostomatoides», término propuesto para agrupar un conjunto de hongos de origen polifilético. Presentan características morfológicas convergentes como la producción de esporas sexuales (ascosporas) en peritecios de cuello largo y las esporas asexuales (conidios) en conidiófos agrupados. Las esporas son producidas típicamente en un mucílago pegajoso que favorecen la adhesión al cuerpo de insectos que actúan como vectores.

Los escarabajos de la corteza (Scolytinae) colonizan el floema y el cambium de las coníferas, algunas especies atacan árboles debilitados o estresados mientras otras pueden llegar a matar árboles sanos. Estos escarabajos además de provocar daño directo a los árboles, también son los principales vectores de los hongos manchadores de la madera especialmente de los géneros *Ophiostoma*, *Ceratocystis*, *Grosmannia*,

*Leptographium* y *Ceratocystiopsis*. Las esporas de estos hongos se producen a partir del micelio que coloniza las galerías y las cámaras pupales de los escolítidos y son transportados en la superficie del cuerpo de los insectos. La asociación entre los hongos ophiostomatoides y los escarabajos vectores puede ser muy estrecha (específica) o inespecífica, es decir que más de una especie de escarabajo puede transportar distintas especies de hongos.

Los escarabajos de la corteza ocasionan disturbios en los bosques naturales de coníferas del Hemisferio Norte de donde son originarios. En el Hemisferio Sur, estos insectos se han instalado en los países donde se explotan comercialmente las plantaciones de pináceas exóticas: Nueva Zelanda, Australia, Sudáfrica, Chile, Brasil y Argentina. En los últimos años, en Uruguay se ha detectado la presencia y expansión de escolítidos de origen exótico en plantaciones comerciales de *Pinus* spp. Ante este problema y debido a la falta de información sobre las especies de hongos manchadoras en Uruguay, se plantea realizar una primera prospección para estudiar los hongos manchadores asociados a escolítidos.

## OBJETIVO

Aislar e identificar los hongos productores de mancha azul asociados a escolítidos en plantaciones de *Pinus* spp. en Uruguay.

## METODOLOGÍA

Se realizaron recorridas en plantaciones ubicadas en los departamentos de Rivera (Establecimiento La Corona 6/12, 31/10 de

2012 y 28/12 de 2013, 7/14, San José (Puerto Arazatí, 1/7 y 14/11 de 2013) y Rocha (Cabo Polonio, MGAP 11/13). Se colectaron individuos de *Hylurgus ligniperda*, *Orthotomicus erosus* y *Cyrtogenius luteus* y fructificaciones (estructuras reproductoras fúngicas) presentes en las galerías y madera que presentaba signos de decoloración en diferentes épocas del año. Las muestras se colocaron en heladera hasta su procesamiento. Para el aislamiento de los hongos asociados a los insectos, éstos se colocaron en freezer a -20 °C durante 15 minutos y luego fueron colocados en placas de Petri conteniendo Agar-extracto de malta al 2 % con ciclohexamida (0,12 g) y estreptomina (0,02 g). Para el aislamiento de los hongos de corteza y madera con galerías se colocaron en cámara húmeda durante 48 horas y luego se realizó el sembrado directo de las esporas presentes en las fructificaciones en medio de cultivo Agar extracto de Malta (2 %). Para la identificación de las especies, se observaron las características macro y microscópicas de las colonias fúngicas para una clasificación primaria, considerando la pigmentación de la colonia y la morfología de peritecios y/o conidióforos y conidios. Luego se agruparon en morfotipos y se seleccionaron cepas correspondientes a cada morfotipo para realizar la identificación a nivel de especie mediante técnicas moleculares. Para ello, se realizó la extracción de ADN genómico utilizando el KIT Ultraclean® (MoBio, Carlsbad, CA), la amplificación de dos regiones diferentes (ITS y  $\beta$ T) y se envió a secuenciar en MACROGEN™. Con las secuencias obtenidas se realizó un Blast con secuencias presentes en el GenBank. Para el análisis filogenético, los alineamientos se realizaron mediante el software MAFFT 7.0 utilizando la estrategia E-INS-i. Los análisis de Máxima Parsimonia fueron realizados en PAUP 4.0. Se empleó la estrategia de búsqueda heurística utilizando el algoritmo TBR con 10.000 secuencias de adición al azar. Todos los caracteres fueron considerados del mismo peso y los gaps como caracteres faltantes. La robustez de los árboles obtenidos fue evaluada mediante 1.000 réplicas de Bootstrap. Los análisis de MV fueron reali-

zados utilizando el software PhyML 3.0. Los modelos de sustitución fueron seleccionados utilizando el criterio de información Akaike (CIA) en ModelTest 3.7. Los soportes estadísticos para cada nodo fueron estimados mediante 1.000 réplicas de Bootstrap.

## RESULTADOS

Se analizaron un total de 155 individuos adultos de *Hylurgus*, 74 de *Cyrtogenius* y 125 de *Orthotomicus*. En el caso de *Hylurgus* y *Orthotomicus*, del 100 % de los individuos se obtuvieron hongos mientras que *Cyrtogenius* presentó menor frecuencia de colonización por hongos (aproximadamente 70 %).

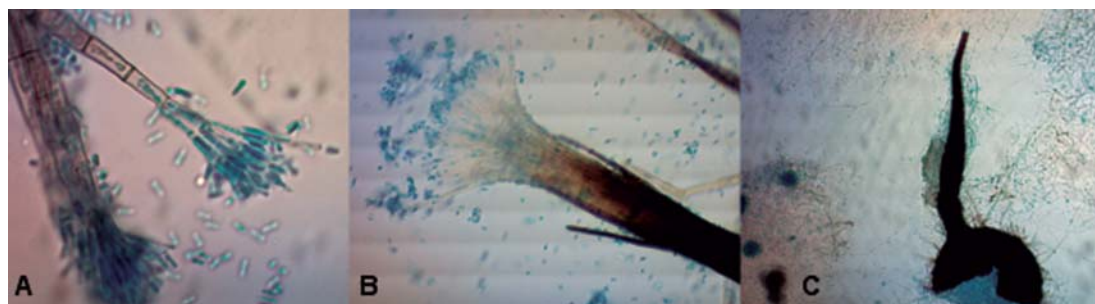
La Figura 1 muestra el aspecto de las colonias hongos emergentes en el medio de cultivo. La mayoría de los aislamientos presentaron características macromorfológicas muy similar (morfotipo 1).

La observación microscópica de este morfotipo permitió identificar a *Hyalorhinocladiella* que corresponde a la fase asexual de *Ophiostoma ips*. Los otros morfotipos aislados en menor proporción se identificaron como *Pesotum*, *Leptographium*, *Sporothrix* todos ellos anamorfos de *Ophiostoma* spp. (Figura 2).

Otra especie manchadora que no pertenece a los Ophiostomatoides encontrada



Figura 1. Colonias emergentes de *Orthotomicus erosus*.



**Figura 2.** A) *Leptographium* sp. conidióforo y conidios, B) *Pesotum* sp. conidióforo y conidios C) *Ophiostoma ips*, peritecios y ascosporas.

únicamente en Cabo Polonio es *Diplodia pinea*. El Cuadro 4 presenta algunos de los aislamientos correspondientes a diferentes regiones geográficas, diferentes hospederos y vectores. En observaciones se presenta las especies o géneros determinados morfológicamente que fueron luego identificados molecularmente.

De los aislamientos seleccionados para su identificación molecular, a 25 cepas se les secuenció la región ITS y a 15 de ellas se las pudo identificar como *Ophiostoma ips*, mientras que las 10 secuencias restantes dieron resultados confusos.

Otras diez cepas que provenían de diferentes zonas y hospedantes y que presentaban características morfológicas variables se pudieron identificar en base al análisis de dos regiones, ITS y  $\beta$ -tubulina. La Figura 3 muestra el resultado del análisis filogenético de las secuencias obtenidas. Se identificaron 4 especies *Ophiostoma abietinum*, *O. ips*, *O. quercus* y *Grosmannia radiaticola*.

Cabe destacar que en algunos casos otros hongos no manchadores fueron aislados de los insectos por su importancia como biocontroladores, es el caso de *Beauveria bassiana* y *Lecanicillium lecanii*. Los culti-

vos representantes de cada especie de hongo obtenidos en este trabajo son mantenidos en la colección del laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias.

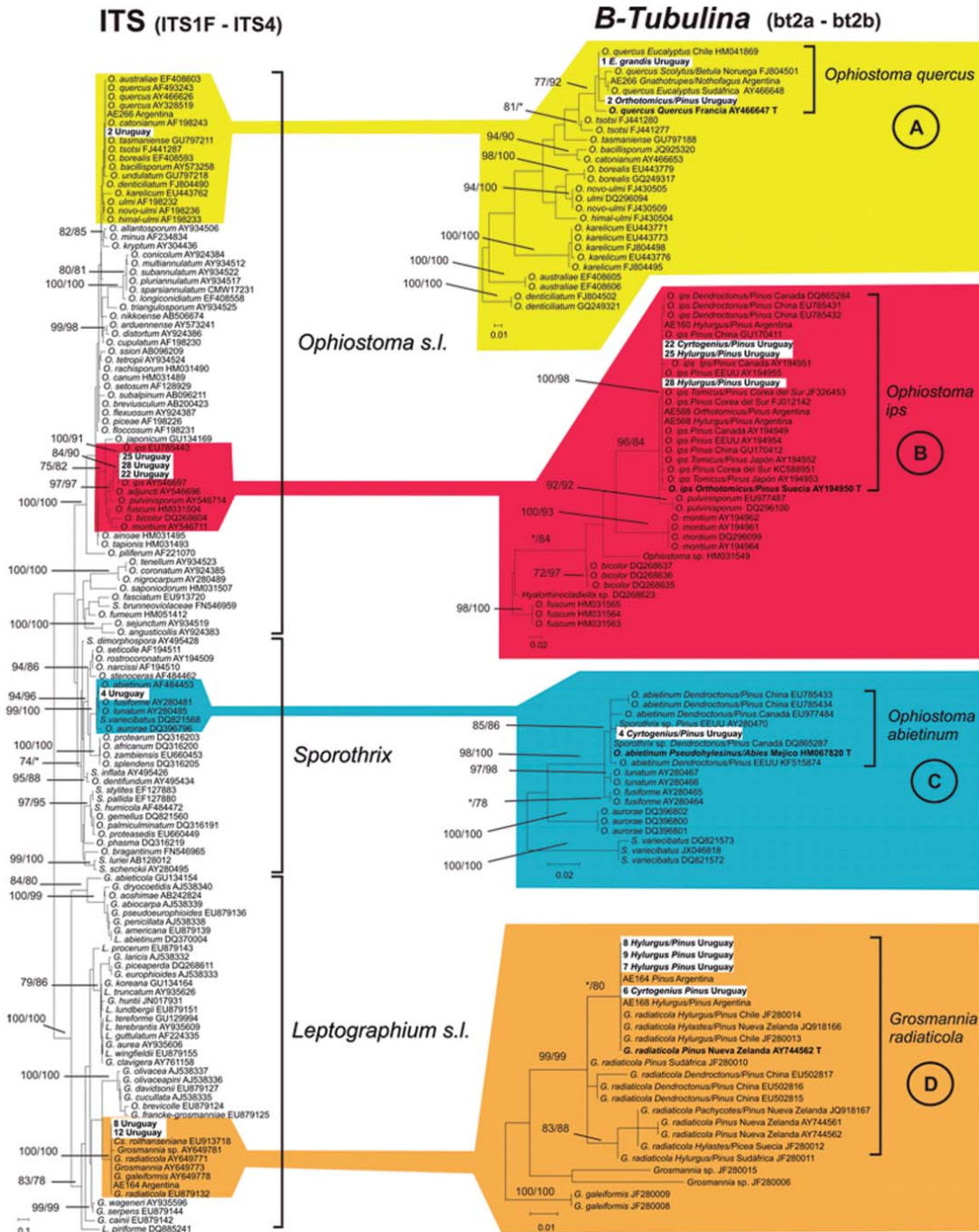
## CONCLUSIONES

Este estudio constituye el primer avance en el conocimiento de los hongos manchadores de madera presentes en Uruguay. La especie dominante fue *Ophiostoma ips*, encontrándose en todos los sitios donde se realizaron muestreos y asociada a todos los escolítidos estudiados, por lo que no se encontró especificidad por el hospedante ni por vector. Esta especie ha sido reportada en varias especies de pino asociada a *Hylurgus*, *Orthotomicus* y otras especies de escolítidos, tanto en el hemisferio Norte como en el Sur. Todas las especies fúngicas encontradas en este estudio constituyen típicos agentes causales de mancha azul. *O. ips*, *O. quercus* y *G. radiaticola* son especies frecuentes en Argentina, Chile y otros países del Hemisferio Sur. La presencia de *O. abietinum* es reportada por primera vez para el Sur de Sudamérica.

**Cuadro 4.** Aislamientos en diferentes regiones de Uruguay.

N° aislamiento	Lugar	Hospedero	Vector	Observaciones
1	Cabo Polonio	<i>E. grandis</i>		<i>Ophiostoma picea s.l.</i>
2	La Corona	<i>P. taeda</i>	<i>Cyrt/Ort</i>	<i>O. picea s.l.</i>
3	La Corona	<i>P. taeda</i>	<i>Cyrtogenius</i>	<i>Sporothrix sp.</i>
4	La Corona	<i>P. taeda</i>	<i>Cyrtogenius</i>	<i>Sporothrix sp2.</i>
5	La Corona	<i>P. taeda</i>	<i>Hylurgus</i>	<i>Sporothrix sp3</i>
6	La Corona	<i>P. taeda</i>	<i>Cyrtogenius</i>	<i>Leptographium sp1</i>
7	Arazati	<i>P. taeda</i>	<i>Hylurgus</i>	<i>Leptographium sp2</i>
8	Cabo Polonio	<i>P. taeda</i>	<i>Hylurgus</i>	<i>Leptographium sp3</i>
9	Cabo Polonio	<i>P.elliotti</i>	<i>Hylurgus</i>	<i>Leptographium sp4</i>
10	Cabo Polonio	<i>P.pinaster</i>		<i>Diplodia</i>
11	La Corona	<i>P. taeda</i>	<i>Cyrt/Ortho</i>	
12	Cabo Polonio	<i>P.taeda</i>	<i>Hylurgus</i>	<i>Leptographium sp. 5</i>
13	Arazati (AO5)	<i>P.taeda</i>	<i>Orthotomycus</i>	<i>O. ips</i>
14	Arazati (AO4)	<i>P.taeda</i>	<i>Orthotomycus</i>	<i>O.ips</i>
15	Arazati(AO12)	<i>P.taeda</i>	<i>Orthotomycus</i>	<i>O.ips</i>
16	Arazati (AH10)	<i>P.taeda</i>	<i>Hylurgus</i>	<i>O.ips</i>
17	Arazati (AH16)	<i>P.taeda</i>	<i>Hylurgus</i>	<i>O.ips</i>
18	Arazati (AH9)	<i>P.taeda</i>	<i>Hylurgus</i>	<i>O.ips</i>
19	Cabo Polonio	<i>P.taeda</i>	<i>Cyrtogenius</i>	<i>O.ips</i>
20	Cabo Polonio	<i>P.taeda</i>	<i>Cyrtogenius</i>	<i>O.ips</i>
21	Arazati	<i>P.elliotti</i>		<i>O.ips</i>
22	La Corona	<i>P.taeda</i>	<i>Cyrtogenius</i>	<i>O.ips</i>
23	La Corona	<i>P. elliotti</i>	<i>Orthotomicus</i>	<i>O.ips</i>
24	La Corona	<i>P.taeda</i>	<i>Orthotomicus</i>	<i>O.ips</i>
25	La Corona	<i>P.elliotti</i>	<i>Hylurgus</i>	<i>O.ips</i>
26	La Corona	<i>P-taeda</i>	<i>Hylurgus</i>	<i>O.ips</i>
27	La Corona	<i>P.taeda</i>	<i>Hylurgus</i>	<i>O.ips</i>
28	La Corona	<i>P.taeda</i>	<i>Hylurgus</i>	<i>O.ips</i>





Figuras (máxima verosimilitud) de las regiones ITS y B-tubulina de especies de Ophiostomatales. Las matrices fueron construidas con secuencias de referencia descargadas del GenBank y los aislamientos del presente estudio (los mismos se destacan mediante recuadros blancos). Los cultivos tipo aparecen resaltados en negra. Los valores de bootstrap por encima del 70% están indicados en cada nodo como Máxima Parsimonia/Máxima Verosimilitud, los valores inferiores se detallan con un asterisco (\*). Barra de referencia = diferencia nucleotídica total entre taxones.

Figura 3. Árbol filogenético resultante del análisis de las regiones ITS y b-tubulina.