



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias Forestales

**Asociación hongos-insectos xilófagos presentes en
muestras de maderas ingresadas en el Laboratorio
Regional del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) - Osorno**

Patrocinante: Srta. Mónica Gutiérrez A.

Co-Patrocinante: Sr. Moisés Osorio O.

Trabajo de Titulación presentado
como parte de los requisitos para optar
al Título de **Ingeniero Forestal**.

MARÍA SOLEDAD REYES CAPURRO

VALDIVIA

2007

CALIFICACIÓN DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

		Nota
Patrocinante:	Srta. Mónica Gutiérrez A.	<u>6,96</u>
Co-Patrocinante:	Sr. Moisés Osorio O.	<u>6,5</u>
Informante:	Sra. Angélica Aguilar V.	<u>6,4</u>

El patrocinante acredita que el presente Trabajo de Titulación cumple con los requisitos de contenido y de forma contemplados en el reglamento de Titulación de la Escuela. Del mismo modo, acredita que en el presente documento han sido consideradas las sugerencias y modificaciones propuestas por los demás integrantes del Comité de Titulación.

Srta. Mónica Gutiérrez A.

Dedicado a mis padres, Juan Pablo y Cecilia,
quienes siempre me han apoyado
en cada decisión y
en todo momento de mi vida;
han sido el pilar fundamental
que me ha ayudado y me ha entregado
la fuerza para terminar
esta importante etapa.

A mis hermanos Juan Pablo y Alejandra
por ser grandes ejemplos de esfuerzo,
trabajo, amor y solidaridad.

A Panchito (Q.E.P.D.), mi angelito y
querido ahijado,
quien fue el mejor ejemplo de lucha y
entrega durante su intenso y
corto paso por nuestra familia.

Gracias a mis profesores y a los que hicieron de profesores, especialmente a la Srta. Mónica Gutiérrez, gracias por su paciencia y por darse el tiempo para acompañarme en este trabajo.

Al profesor Moisés Osorio por sus consejos y apoyo; y también por los tensos momentos, que luego de haberlos vivido creo entender su finalidad.

A la profesora Angélica Aguilar por sus consejos más allá de los propios para este trabajo.

Gracias a todos mis compañeros y amigos que estuvieron conmigo durante estos años, que me acompañaron en todo momento, compartiendo mis alegrías, desafíos y también tiempos difíciles.

Gracias por darse el tiempo de conocerme y comprenderme, especialmente a *Nacho* que llegó al final de este ciclo, pero que afortunadamente fue así...para seguir juntos en esta nueva etapa que comienza...

ÍNDICE DE MATERIAS

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1 El recurso forestal Chileno	2
2.2 Importancia de los hongos e insectos como causantes de daño en el bosque	2
2.3 Asociación hongos-insectos xilófagos	3
2.3.1 <i>Escarabajos de ambrosía</i>	4
2.3.2 <i>Escarabajos de corteza</i>	5
2.3.3 <i>Hongos de pudrición</i>	7
3. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	9
3.1 Selección de muestras	9
3.2 Aislamiento de hongos asociados a galerías	9
3.3 Identificación de cultivos puros	10
3.3.1 <i>Métodos alternativos para inducir la esporulación de hongos</i>	10
Agar aserrín.	10
Agar Quaker.	10
Probetas de madera.	11
Trozos de tejido vegetal en agar agua.	11
Rodajas de papa.	11
3.3.2 <i>Identificación taxonómica de los cultivos esporulados</i>	12
3.4 Análisis de los resultados	13
4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN RESULTADOS	14
4.1 Caracterización de los daños en las muestras de madera	14
4.1.1 <i>Muestras de Madera con pudrición</i>	14
4.1.2 <i>Muestras de madera con manchas</i>	15
4.1.3 <i>Muestras de madera con pudrición y mancha</i>	16
4.1.4 <i>Registro de los aislamientos obtenidos</i>	16
4.2 Identificación de los aislamientos de hongos esporulados	17
4.2.1 <i>Penicillium sp.</i>	17
4.2.2 <i>Trichoderma sp.</i>	18
4.2.3 <i>Fusarium sp.</i>	20
4.2.4 <i>Otros géneros de hongos aislados</i>	22
4.2.5 <i>Efecto de los métodos de inducción de esporulación en la identificación de hongos de madera</i>	25
5. CONCLUSIONES	28
6. BIBLIOGRAFÍA	30
ANEXOS	
1. <i>Abstract and keywords</i>	
2. <i>Secuencia gráfica de muestras de maderas procesadas</i>	
3. <i>Secuencia gráfica de medios generales de cultivo para realizar</i>	

- aislamientos y medios específicos para inducir la esporulación
4. Secuencia fotográfica de las estructuras de algunas de las especies de hongos identificadas
 5. Cuadro resumen con los registros del número de aislamientos obtenidos en medios generales de cultivo (AEM y PDA)

RESUMEN EJECUTIVO

En Chile el recurso forestal es muy susceptible al daño por insectos y hongos tanto en bosques naturales como en las crecientes plantaciones con especies exóticas. En Europa se han realizado muchos estudios acerca de la biología de ciertos insectos, sus estructuras y la posible asociación que existe entre ellos y los hongos que se han podido aislar desde las galerías provocadas por éstos como desde sus propios cuerpos. Sin embargo en Chile no existen estudios de este tipo donde se analice esta posible asociación hongo-insecto.

Los objetivos de este trabajo fueron los siguientes: Caracterizar en forma macroscópica y registrar gráficamente la presencia de manchas o pudriciones producidas por hongos en muestras de madera que presentaban daños por insectos; aislar e identificar los agentes fungosos presentes y relacionar los daños producidos por estos insectos con los hongos identificados en dichas muestras.

Para ello entre los meses de Abril y Julio de 2006, se recibieron para análisis, en el Laboratorio Regional del SAG, Osorno, muestras provenientes de las actividades de Vigilancia y Control de Plagas Forestales y de las intercepciones en los controles fronterizos terrestres y marítimos realizados por el Servicio Agrícola y Ganadero en la Décima Región. Las que correspondían tanto a madera de especies nativas como exóticas, madera elaborada y órganos del árbol (ramas o fuste).

La metodología se basó en sembrar trozos de madera sacados desde las galerías provocadas por los insectos que tuvieran presencia de manchas o de pudrición, en medios de cultivos generales Agar Extracto de Malta (AEM) y Agar Papa Dextrosa (PDA) para aislar e identificar el hongo en placas Petri, ya que son los medios utilizados en laboratorio y descritos en la literatura para el aislamiento de estos microorganismos. Las colonias desarrolladas se repicaron a un nuevo medio de cultivo para obtener colonias puras. Los cultivos se dejaron en estufa de incubación a 24°C hasta ver el desarrollo de la colonia. Una vez obtenidos los cultivos puros se procedió a su identificación siguiendo las claves taxonómicas. Éstos se repicaron a medios específicos si era necesario para su identificación, lo cual se determinó de acuerdo a la bibliografía. Además se utilizaron cinco métodos alternativos al AEM y PDA, para inducir la esporulación de los cultivos que no esporularon y por lo tanto no pudieron ser identificados. Los métodos alternativos correspondieron a agar/aserrín, agar Quaker, probetas de madera, tejido vegetal (acículas y pecíolos) y rodajas de papa.

Las muestras procesadas presentaban galerías producidas por insectos con manchas y/o pudriciones asociadas a estos daños, los que fueron registrados gráficamente. Encontrándose que el 61% de las muestras presentaban mancha, el 29% pudrición, pero también se registraron muestras que presentaban conjuntamente pudrición y mancha, y otras que sólo mostraban *Penicillium* spp., en igual proporción (5%).

Dentro de las muestras con pudrición, el mayor porcentaje de galerías fue ocasionado por insectos de la familia Curculionidae, en el caso de las muestras que presentaban mancha, el 39% de los daños fueron ocasionados por insectos de la familia Cerambycidae, y en las muestras que presentaban manchas y pudrición en las galerías, el 67% de ellas estaban asociadas también a insectos de la familia Cerambycidae.

Del total de aislamientos, el 75% correspondió a hongos, el 13% a bacterias y el 12% restante no presentó desarrollo de microorganismos en medios de cultivo generales (PDA y AEM).

En base a las características morfológicas sobre medios de cultivo generales y específicos y utilizando claves taxonómicas se logró identificar a nivel de género y en algunos casos a nivel de especie, los agentes fungosos presentes en las galerías.

Del total de aislamientos realizados los con mayor frecuencia fueron *Trichoderma* spp. con un 42%, *Penicillium* spp. con 30% y *Fusarium* spp. con un 6%.

También se identificó dentro de los aislamientos obtenidos *Graphium* sp., asociado a galerías de *Psepholax dentipes* y *Chilecomadia valdiviana*, probablemente presente como estado anamorfo de *Ceratocystis* sp., hongo descrito en asociaciones simbióticas con insectos del orden Coleoptera.

Dentro de los métodos generales para aislar e identificar los hongos asociados a galerías de madera, el medio AEM fue el más eficaz, mientras que como método alternativo para inducir la esporulación del hongo el tejido vegetal (acículas) resultó tener un mejor resultado, con un 80% de los cultivos esporulados.

Con los resultados obtenidos es muy difícil determinar si los hongos aislados en las galerías fueron realmente transmitidos por el insecto, por lo tanto para complementar estos resultados sería recomendable a futuro realizar aislamientos a partir de los insectos de las galerías en el caso que éstos estuvieran presentes.

Palabras clave: asociación hongo-insecto, galerías, pudriciones, *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp., *Graphium* sp.

1. INTRODUCCIÓN

En los ecosistemas forestales la asociación entre insectos y hongos, es una relación común y ecológicamente importante; esta asociación puede tener un gran impacto en la composición de especies vegetales, en la sucesión y también en la productividad.

El daño provocado por insectos xilófagos, se puede producir en árboles en pie, en madera recién cortada o en madera aserrada, en material seco almacenado y madera en uso, y la importancia económica de este daño, se traduce en la pérdida del valor comercial, siendo rechazada la materia prima para su uso industrial y con ello se restringe la apertura de nuevos mercados, por lo que en el país, se la destina a construcción de viviendas de menor calidad.

Por otro lado desde el punto de vista productivo, los hongos también provocan una merma de la productividad y calidad de los bosques, sobre todo aquellos que son causantes de la pudrición blanca, porque remueven la lignina por lo que la madera pierde su resistencia. Desde un punto de vista ecológico esto no es tan grave, por el contrario ayudan a la sucesión vegetal, sobre todo en los bosques naturales.

La importancia ecológica de la relación hongo-insecto xilófago radica en la capacidad que tienen muchas especies de insectos, que debido a sus hábitos pueden infectar árboles vivos y vigorosos con hongos, los que potencialmente pueden provocar la muerte al árbol.

Los hongos en muchas de las asociaciones con insectos se benefician porque sus esporas son transmitidas e introducidas en la madera por el insecto, mientras que éste es beneficiado en su colonización por la habilidad del hongo para debilitar los elementos de la madera.

De acuerdo a estos antecedentes el objetivo general de este Trabajo de Titulación fue analizar información acerca de la posible asociación entre hongos e insectos que se detecten en muestras de maderas provenientes de las actividades de Vigilancia y Control de Plagas Forestales del Servicio Agrícola y Ganadero de la Décima Región. Con este fin se determinaron los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar en forma macroscópica y registrar gráficamente la presencia de manchas o pudriciones producidas por hongos en muestras de madera que presenten daños por insectos.
- Aislar e identificar los agentes fungosos presentes en las muestras.
- Relacionar los daños producidos por los insectos presentes en las muestras de madera con los hongos identificados en dichas muestras.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 El recurso forestal chileno

Chile es un país con una gran variedad de recursos naturales, presentes a lo largo de todo el territorio. Históricamente el sector minero ha sido el más importante, no obstante en las últimas décadas otras áreas de la economía han aumentado considerablemente su nivel de participación en el ingreso nacional, siendo el sector forestal uno de los de mayor crecimiento (Rojas y Gallardo, 2004).

Los bosques naturales y las plantaciones con especies exóticas son la materia prima en la que se sustenta el sector forestal chileno y que lo han posicionado en un lugar relevante de la economía nacional, registrándose en el último tiempo cifras históricas en materia de divisas obtenidas por concepto de exportaciones forestales, que superan los tres mil millones de dólares. Gran parte del éxito de la producción forestal está sustentada, entre otros factores, en la buena condición sanitaria de los bosques y en la existencia de un sistema cuarentenario nacional orientado a la detección oportuna de plagas y enfermedades que impactan o pueden impactar negativamente sobre este recurso y a la aplicación inmediata de medidas de control (Rojas y Gallardo, 2004).

Según la Corporación Nacional Forestal (CONAF), los bosques nativos cubren en Chile una superficie aproximada de 13,4 millones de hectáreas, lo que representa el 17,8% de la superficie del territorio nacional. En tanto, las plantaciones forestales, principalmente de *Pinus radiata* y especies del género *Eucalyptus*, abarcan una superficie que supera los 2,1 millones de hectáreas equivalentes al 2,8% de la superficie del territorio nacional. Por su parte, el bosque mixto alcanza una superficie de 87.625 hectáreas, lo que corresponde al 0,12% de la superficie del territorio nacional (CONAF, 2005).

2.2 Importancia de los hongos e insectos como causantes de daño en el bosque

El aumento del intercambio comercial con otros países y la progresiva llegada de un mayor número de turistas, ha tenido como consecuencia un aumento de nuevas plagas y enfermedades forestales en el país. Esto se refleja a través de numerosas especies de insectos introducidos, que dañan los bosques.

Muchos insectos perforadores, están íntimamente asociados con hongos manchadores que causan la decoloración de sus galerías; algunas avispas de la madera dependen de los hongos de descomposición para completar su ciclo de vida (INFOR, 2006).

La CONAF, dentro del manejo de plagas y enfermedades forestales, que actualmente se entiende como una parte del manejo sustentable de los recursos forestales, realiza múltiples actividades relacionadas con la protección sanitaria del

recurso forestal, como difusión, transferencia tecnológica, fomento de investigación y capacitación. La CONAF actúa en forma conjunta con otras instituciones privadas y públicas, una de éstas es el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), quien se encarga de manejar todas las plagas consideradas como cuarentenarias (CONAF, 2003). El SAG está llevando a cabo el proyecto de Vigilancia y Control de Plagas Forestales, el cual tiene como objetivo central evitar el ingreso de organismos exóticos en las plantaciones y bosques nativos, a través de la detección oportuna y control de las plagas cuarentenarias forestales, como asimismo contribuyendo en el sistema cuarentenario nacional mediante las acciones de control fitosanitario a los embalajes de madera (SAG, 2006).

2.3 Asociación hongos-insectos xilófagos

En los ecosistemas forestales, esta asociación puede tener un gran impacto en la composición de especies vegetales, en la sucesión y por último en la productividad.

En la naturaleza se encuentran tres tipos de asociaciones simbióticas: mutualismo, comensalismo y parasitismo. El mutualismo es un tipo de simbiosis que se refiere a la asociación de dos organismos vivos en la cual ambos se benefician, el comensalismo es una asociación entre dos organismos que viven juntos en la cual uno se beneficia y el otro no resulta beneficiado ni perjudicado, mientras que el parasitismo es una asociación en la cual un organismo se beneficia a expensas del otro (Barbosa y Wagner, 1989).

Las relaciones simbióticas son usualmente clasificadas como endosimbiosis (viviendo dentro del organismo) o ectosimbiosis (viviendo fuera del organismo). Esta clasificación es independiente de la naturaleza de la asociación, por lo tanto una relación endosimbiótica puede ser mutualista, comensalista o parasítica (Barbosa y Wagner, 1989).

Existen dos tipos de simbiosis entre hongos e insectos, ectosimbiosis, en el caso de las levaduras (hongos unicelulares), éstas han sido reportadas en algunos escarabajos de ambrosía, de preferencia *Endomyces* spp. para el limexílido *Hylecoetus* y formas relacionadas para *Ips* spp., *Corthylus* spp. y *Platypus* spp. (Graham, 1967); y endosimbiosis, la que puede ocurrir intra o extracelularmente en micetomas adjuntas al intestino medio de las larvas, éstas se han encontrado en numerosos anóbidos, pero en pocos cerambícidos; en ambos grupos, su función parece ser la de asistir en la digestión de los componentes más complejos de la madera, como lo son las celulosas, y quizás la de sintetizar algunas sustancias esenciales parecidas a las vitaminas, entre ellas los esteroides (Crowson, 1984).

Hay estudios donde se ha probado que la cantidad de descendencia que pueda tener el insecto *Xyleborus ferrugineus* depende de la especie de hongo que éste use como alimento. Norris (1979) determinó que con el hongo primario de ambrosía *Fusarium solani* la descendencia fue máxima pero con el hongo secundario de ambrosía *Cephalosporium* sp. se redujo un 50% y con *Graphium* sp. un 70%.

El daño provocado por insectos xilófagos, se puede producir en árboles en pie, en madera verde, en rollizo o en madera aserrada, en material seco almacenado y madera en uso.

En la mayoría de los casos, el daño es producido por las larvas de estos insectos, las cuales perforan la madera para obtener alimento y protección, abriendo galerías o agujeros característicos. En ocasiones también las formas adultas toman parte activa en el deterioro (INFOR, 2006).

2.3.1 *Escarabajos de ambrosía*

Con este nombre se denomina a varias especies pertenecientes a la familia Scolytidae, Lymexilidae y Platypodidae (esta última no presente en Chile). Estos escarabajos perforan la madera (albura y duramen) de árboles caídos o en proceso de decadencia. Tanto las larvas como los adultos se alimentan de hongos de ambrosía que cultivan ellos mismos en sus galerías (Rojas y Gallardo, 2004).

En la relación mutualista hongos-escarabajos de ambrosía, los hongos se benefician de la asociación con el insecto porque sus esporas son transmitidas e introducidas en la madera. El contenido de humedad y nutrientes de la madera permite el rápido crecimiento y penetración de la hifa. En general el contenido de humedad debe ser mayor al 20% y para el caso de los hongos que producen la mancha azul, el contenido de humedad que requieren para prosperar muy bien se encuentra entre el 20 y 140%, con respecto al peso seco de la madera (Parra *et al.*, 2001).

El insecto es beneficiado por la habilidad del hongo para debilitar los elementos de la madera antes de incubar los huevos. Esto facilita la construcción de las galerías por las larvas, las que se alimentan de los hongos.

La relación hongo-escarabajo de ambrosía es menos específica que la de los escarabajos de corteza, ya que es suficiente que el hongo pueda desarrollarse sobre el hospedero para que los escarabajos de ambrosía puedan alimentarse en una especie forestal determinada (Rojas y Gallardo, 2004).

Las esporas del hongo son llevadas por el adulto en estructuras especializadas para su mantención llamadas micangias; estas esporas son inoculadas en las galerías, generalmente iniciadas por las hembras (Rojas y Gallardo, 2004).

En algunas especies de hongos de ambrosía, a veces las células de ambrosía que se encuentran en las micangias no germinan por razones desconocidas. En muchos casos, las células de ambrosía están mezcladas con levaduras, a veces con contaminantes de rápido crecimiento como por ejemplo hongos del azulado, y algunas especies de *Cephalosporium* o *Fusarium* (Francke-Grosmann, 1963).

Es evidente que una verdadera relación simbiótica mutualista ocurre en la asociación entre escarabajos de ambrosía y sus hongos, el insecto vive del hongo y éste se

mantiene vivo y es transportado dentro de las micangias de las hembras (Francke-Grosmann, 1963). Koch (1962) establece que el hongo provee al insecto no sólo de nutrientes sino también de importantes vitaminas las cuales están ausentes en la madera.

Una importante característica de los hongos de ambrosía es su pleomorfismo. Muchos pueden crecer tanto como hifa formando un micelio extendido, como en forma de “ambrosía”, o en forma de levadura. El micelio se ramifica en el xilema y floema, pero usualmente sólo esporula en las galerías de los escarabajos.

Usualmente hay una especie de hongo, que es el hongo de ambrosía primario, dominando en la galería, pero también pueden presentarse otros hongos de ambrosía secundarios o auxiliares, junto con bacterias. Todos juntos forman un complejo microbiano simbiótico (Haanstad y Norris, 1985).

2.3.2 *Escarabajos de corteza*

Se denomina así a los escolítidos que se alimentan de la corteza ya sea de las trozas provenientes de la cosecha, de árboles caídos o del árbol en pie (Rojas y Gallardo, 2004).

En la relación hongos-escarabajos de corteza, participan muchas especies de escolítidos que se alimentan del floema y que están asociados a hongos en sus galerías. Las hifas penetran la madera y causan decoloración; causan daños que se suponen no afectan la pared celular, ya que no poseen enzimas para degradar la pared celular. Consumen los carbohidratos presentes en el tejido parenquimático que no están estructuralmente unidos a la célula (Encinas, 2004).

La asociación entre hongos manchadores y escarabajos de corteza podría desarrollarse por los similares requerimientos de calidad del hospedante (Francke-Grosmann, 1967).

Entre los Ascomycotina, los *Ophiostomatales*, con ascocarpos y ascosporas adaptadas a la dispersión por insectos, son la mejor asociación conocida de escarabajos de corteza (Harrington, 1993).

Dowding (1984) ha sugerido que la relación entre los escarabajos de corteza y los hongos de esporas pegajosas (*Ophiostomatales*) es de hecho una relación entre el hongo y los artrópodos que se alimentan de los hongos, los cuales son dependientes del escarabajo de corteza. La dependencia de estos insectos sobre los *Ophiostomatales* no ha sido bien probada. Algunas de las especies del género *Ophiostoma* asociadas a escarabajos de corteza, que matan a los árboles, son fitopatógenos. Éstas causan lesiones que se expanden alrededor de los puntos de ataque del escarabajo y colonizan la albura. Se piensa que ellas contribuyen a la muerte del árbol, porque disminuyen la capacidad de defensa del huésped y crean un ambiente favorable para el desarrollo de las crías de los escarabajos (Berryman, 1972).

Los Hongos Imperfectos con esporas diseminadas por viento son aislados comúnmente desde el tejido floemático y xilemático atacado por escarabajos de corteza y desde ellos mismos (Moore, 1971; Whitney, 1971; Carpenter *et al.*, 1988).

Las especies de *Penicillium* y *Trichoderma* son de esporas secas y parecen ser "hongos maleza" sin más que una relación de tipo comensal con escarabajos y podrían ser usados como una fuente suplementaria de alimento (Beaver, 1989).

Existen hongos imperfectos que comúnmente son encontrados en las galerías de los escarabajos y son aislados desde éstos, sin embargo se sabe poco acerca de su relación en la biología de los escarabajos (Harrington, 1993).

A diferencia de los hongos de pudrición, los hongos manchadores no producen un daño estructural en la madera, sólo causan una decoloración pero no otro tipo de daño. Estos hongos manchadores crecen en la savia azucarada de árboles vivos o de trozas (Burg, sf).

Los depredadores que se alimentan de hongos, de dípteros, de escarabajos, de ácaros y de otros animales pequeños están presentes en las galerías de los escarabajos de corteza y podrían ser importantes vectores de los *Ophiostomatales* (Leach *et al.*, 1934; Hetrick, 1949; Dowding, 1973, 1984; Bridges y Moser, 1983; Moser, 1985; Carpenter *et al.*, 1988; Levieux *et al.*, 1989). Las esporas de *Ophiostoma* spp. adquiridas pasivamente podrían adherirse al exoesqueleto del escarabajo de corteza o podrían ser ingeridas y pasar a través del tracto digestivo (Francke-Grosman, 1967). En algunos de los géneros de escarabajos de corteza las micangias, podrían ser colonizadas por especies de *Ophiostoma* (Francke-Grosman, 1963, 1967; Farris, 1969; Whitney y Farris, 1970; Barras y Perry, 1972; Whitney y Cobb, 1972; Beaver, 1989).

Ophiostoma sp. podría estar asociada con insectos perforadores además de los escarabajos de corteza. *Ophiostoma huntii* y *Leptographium wageneri* var. *ponderosum* son transportados principalmente por escarabajos de corteza pero también han sido aislados desde cerambícidos o desde sus galerías (Goheen y Cobb, 1978; Harrington, 1988).

La mayoría de los hongos involucrados en asociaciones mutualistas, sólo se les conoce en su estado imperfecto (Deuteromycotina). Donde el estado perfecto es conocido, la mayoría pertenece a los Ascomycotina. Los hongos manchadores asociados en forma mutualista con escarabajos de corteza, en su mayoría son miembros del género de los Plectomycetes *Ceratocystis* (Francke-Grosman, 1967; Whitney, 1982). Algunas especies de *Ceratocystis* se cree que también pueden ocurrir como hongos de ambrosía (Francke-Grosman, 1967). Otro importante género de hongos de ambrosía incluye los Hyphomycetes *Fusarium*, *Cephalosporium* y *Ambrosiella*, y Hemiascomycetes filamentosos como *Endomycopsis*.

2.3.3 Hongos de pudrición

De acuerdo al autor existen tres tipos de pudrición provocadas por hongos: pudrición blanda, pudrición blanca y pudrición parda (Burg, sf).

Los hongos de pudrición blanda pueden degradar lignina, celulosa y hemicelulosa dejando a la madera afectada como esponjosa. Para que se produzca este tipo de pudrición el agua debe estar siempre presente (Burg, sf).

Los hongos de pudrición blanca degradan la lignina, removiéndola y dejando la celulosa. La madera afectada por hongos de pudrición blanca es blanquecina y fibrosa. La mayoría de los hongos que causan esta pudrición son Basidiomycetes. Estos hongos forman rizoides finos y frágiles (Burg, sf).

Los hongos de pudrición parda degradan sólo la celulosa de la madera. En este proceso modifican la lignina pero no la utilizan como alimento. La madera podrida es de color café y con fracturas longitudinales y transversales, que le dan una apariencia de cubos. Sólo algunos hongos pueden provocar este tipo de pudrición y todos pertenecen a los Basidiomycetes. Este tipo de pudrición ocurre usualmente en madera que está en contacto con suelo húmedo u otras fuentes continuas de agua (Burg, sf).

Una vez que los escarabajos de corteza u otros insectos perforadores penetran en la corteza, la entrada de saprófitos y de hongos que no son transportados se hace más fácil (Käärik, 1974; Schowalter *et al.*, 1992). Algunos organismos son capaces de degradar los contenidos celulares y causar leves pudriciones, como lo son algunos *Ophiostoma*, otros Ascomycetes, Deuteromycetes y algunas bacterias. *Heterobasidion annosum*, *Armillaria* spp. y otros Basidiomycetes pudridores poseen enzimas con las cuales son capaces de degradar la celulosa y/o lignina (Käärik, 1974; Rayner y Todd, 1979). Ambos géneros de patógenos son capaces de colonizar el xilema, pero no causan una apreciable pudrición de madera (Harrington, 1993).

En la relación insectos-hongos de pudrición, la mortalidad del árbol causada por los Hymenomycetes pudridores de raíces puede ocurrir dentro de unos pocos años una vez ocurrida la infección, o los árboles infectados pueden sobrevivir por décadas o siglos. *Heterobasidion annosum* y *Armillaria* spp. son los más importantes pudridores de raíces en coníferas. Algunas especies de *Armillaria*, en algunos hospederos pueden colonizar y matar el cambium de las raíces mientras la pudrición de la madera avanza, mientras otros hospederos pueden morir en cosa de meses o años (Hodges, 1969; Rizzo y Harrington, 1988).

Entre los hongos importantes en predisponer a las coníferas al ataque de los escarabajos de corteza, los pudridores de raíces parecen ser los más relevantes.

También existen hongos no pudridores, dentro de este grupo *Leptographium wagneri* es el más importante en predisponer a las coníferas a los escarabajos de corteza.

Leptographium wageneri es llevado por escarabajos de corteza que se alimentan de raíces, principalmente por *Hylastes* spp. (Goheen y Cobb, 1978; Harrington *et al.*, 1985; Witcosky *et al.*, 1986), aunque los gorgojos que se alimentan de raíces también podrían ser importantes (Witcosky *et al.*, 1986). Desde los conidióforos que se encuentran dentro de las galerías provocadas por los insectos, se producen las conidias en una gota pegajosa que se forma en la punta del conidióforo. Si escarabajos que están contaminados desde nidos que se están desarrollando en árboles enfermos son atraídos desde rodales alterados, se podrían iniciar nuevos centros de infección, podrían cavar en el suelo hasta encontrar las raíces adecuadas para reproducirse o alimentarse, y perforar las raíces de los árboles vivos (Harrington *et al.*, 1985).

3. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Este trabajo de investigación se llevó a cabo con un total de 100 muestras de maderas forestales correspondientes tanto a especies nativas como exóticas y a órganos del árbol (por ejemplo rama, fuste) como a madera elaborada (Anexo 2). Dichas muestras eran procedentes de las actividades de Vigilancia y Control de Plagas Forestales y de las intercepciones en los controles fronterizos terrestres y marítimos realizados por el Servicio Agrícola y Ganadero en la Décima Región, entre los meses de Abril a Julio del 2006. Las muestras fueron procesadas en la unidad de Fitopatología del Laboratorio Regional SAG Osorno.

3.1 Selección de muestras

Se seleccionaron aquellas muestras que presentaban galerías producidas por insectos xilófagos con manchas o pudriciones asociadas a este daño, las cuales fueron fotografiadas para tener un registro de los daños y se hizo una caracterización en forma macroscópica (Anexo 3).

3.2 Aislamiento de hongos asociados a galerías

Una vez seleccionadas las muestras y caracterizados los daños se procedió a realizar aislamientos de hongos asociados a las manchas o pudriciones presentes en las galerías provocadas por los insectos. Para este propósito con un bisturí se seccionaron trozos de tejido desde la zona de avance de las lesiones, éstos fueron desinfectados en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% (producto comercial Clorinda) por 5 minutos, posteriormente se enjuagaron dos veces en agua destilada estéril y se secaron en una toalla de papel filtro estéril (Anexo 4).

Para realizar los aislamientos de los hongos se utilizaron dos medios de cultivo, Agar Papa Dextrosa (PDA) (catálogo Merck 1.10130.0500) y Agar Extracto de Malta (AEM) (catalogo Merck 1.05398.0500) contenidos en placas Petri de 9 cm de diámetro.

Una vez desinfectados y secados los trozos de tejido se extrajeron pequeños trozos con un bisturí estéril (esterilizado previamente con alcohol al 70% y posteriormente flameado) los cuales se sembraron en los medios de cultivo a utilizar. Se sembraron 3 placas Petri por cada medio de cultivo, sembrando en cada una de ellas 4 trozos de madera ubicados en forma equidistante sobre la superficie del medio de cultivo, totalizando 12 aislamientos en medio PDA y 12 aislamientos en medio AEM. Posteriormente las placas fueron incubadas en una estufa de cultivo a 24°C por siete días. Transcurrido este período las placas se revisaron para visualizar la presencia de colonias fungosas desarrolladas a partir del tejido sembrado.

Se registró en una base de datos los tipos de colonias fungosas desarrolladas en cada uno de los aislamientos realizados por cada medio de cultivo utilizado, así como también fueron registradas la presencia de colonias bacterianas o la ausencia de

microorganismos en cada uno de los aislamientos efectuados, realizando con estos resultados tablas y gráficos de frecuencia.

Todas las colonias fungosas desarrolladas fueron purificadas, repicándolas a un nuevo medio de cultivo equivalente al cual fueron aisladas originalmente (PDA o AEM). Una vez obtenidos los cultivos puros, éstos se almacenaron a 4°C para su conservación hasta el momento en que se procedió a realizar su identificación mediante claves taxonómicas.

3.3 Identificación de cultivos puros

Una vez obtenidos los cultivos puros se observaron bajo lupa y se hicieron preparaciones microscópicas para verificar la presencia de estructuras reproductivas que permitieran su identificación taxonómica (Anexo 5). Los cultivos se separaron en dos grupos en base a la presencia o ausencia de estructuras reproductivas. Aquellos que presentaban este tipo de estructuras fueron identificados taxonómicamente de acuerdo a sus características morfológicas macro y microscópicas, mientras que aquellos que no produjeron estructuras reproductivas en medio PDA y AEM fueron sometidos a cinco métodos alternativos para promover la esporulación y posteriormente fueron identificados taxonómicamente en base a sus características morfológicas.

3.3.1 Métodos alternativos para inducir la esporulación de hongos

Se utilizaron cinco métodos alternativos al AEM y PDA, para inducir la esporulación de aquellos cultivos que no presentaron estructuras reproductivas:

Agar aserrín.

A partir de los cultivos puros mantenidos en PDA o AEM se extrajo un trozo de micelio el cual fue transferido al centro de una placa Petri con medio agar aserrín (4,8% de agar y 3% de aserrín). El medio fue preparado utilizando aserrín de madera de la misma especie forestal de la cual el hongo fue aislado. Se sembraron tres placas Petri para cada una de los cultivos puros analizados. Una vez realizada la siembra, las placas fueron incubadas a temperatura ambiente bajo régimen de 12 horas de oscuridad y 12 horas de luz negra UV. Se observó periódicamente la presencia de esporulación de las colonias.

Agar Quaker.

A partir de los cultivos puros mantenidos en PDA o AEM se extrajo un trozo de micelio el cual fue transferido al centro de una placa Petri con medio agar quaker (2% de agar con 3% de Quaker). Se realizaron dos repeticiones por cada cultivo del hongo. Una vez realizada la siembra, las placas fueron incubadas en oscuridad en estufa de incubación a 24°C, observando periódicamente la presencia de esporulación de las colonias.

Probetas de madera.

A partir de los cultivos puros mantenidos en PDA o AEM se extrajeron con un sacabocado cuatro discos de micelio de 0,8 mm de diámetro los cuales fueron transferidos en cada costado de una probeta de madera de 70 x 20 x 7 mm de acuerdo a las dimensiones definidas por la American Society for Testing and Materials (ASTM) para la prueba de productos antimanchas. Se utilizaron probetas de la misma especie de madera de la cual el hongo fue aislado. Previo a su uso fueron esterilizadas en autoclave por 15 minutos a 1 atmósfera de presión (121°C), al interior de un vaso precipitado tapado con gasa y papel de envolver. Una vez inoculada la probeta, ésta fue introducida al interior de una cámara húmeda confeccionada con una placa Petri plástica de 9 cm de diámetro con papel absorbente estéril y una rejilla plástica en su interior, humedeciendo el papel absorbente con 2 ml de agua destilada estéril y sellando la tapa de la placa con Parafilm. Se realizaron tres repeticiones por cada cultivo del hongo. Las cámaras húmedas fueron incubadas en una estufa de cultivo a 24°C observando periódicamente la presencia de esporulación del hongo sobre las probetas.

Trozos de tejido vegetal en agar agua.

Este método se basó en la utilización de acículas de pino (*Pinus radiata*) o pecíolos de maqui (*Aristotelia chilensis*) previamente esterilizados en autoclave por 15 minutos a 1 atmósfera de presión (121°C). Se utilizaron tejido de estas dos especies forestales en aquellas colonias fungosas aisladas desde pino y maqui. Estos tejidos vegetales fueron ubicados al interior de placas Petri con agar agua (al 2%). Se ubicaron tres acículas por placas Petri y nueve trozos de pecíolo por cada placa Petri. Sobre cada acícula se pusieron tres trozos de micelio de la colonia del hongo y sobre cada pecíolo se ubicó un trozo de micelio. Se sembró una placa por cada colonia del hongo. Posteriormente las placas se incubaron bajo un régimen de 12 horas luz negra UV y 12 horas oscuridad a temperatura ambiente, observando periódicamente la presencia de esporulación del hongo.

Rodajas de papa.

Para realizar esta inoculación se desinfectaron tubérculos de papa en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 0,5% por 5 minutos, posteriormente los tubérculos fueron cortados en rodajas de aproximadamente 2 cm de espesor, con un cuchillo previamente desinfectado en alcohol al 70%, luego se procedió a extraer con un sacabocado de 0,8 mm de diámetro, un disco de médula desde el centro de la rodaja, en el orificio producido se introdujo un disco de micelio de la colonia del hongo extraído con un sacabocado de 0,8 mm de diámetro, ubicando el micelio en contacto con la médula de la papa. Una vez inoculada la rodaja de papa, ésta fue introducida individualmente al interior de una cámara húmeda confeccionada con una placa Petri plástica de 9 cm de diámetro con papel absorbente estéril y una rejilla plástica en su interior, humedeciendo el papel absorbente con 1 ml de agua destilada estéril y sellando la tapa de la placa con Parafilm. Se realizaron tres repeticiones por

cada cultivo del hongo. Las cámaras húmedas fueron incubadas en una estufa de cultivo a 24°C, observando periódicamente la presencia de esporulación del hongo sobre las rodajas.

3.3.2 *Identificación taxonómica de los cultivos esporulados*

Una vez obtenida la estructuras reproductivas (esporulación) de cada uno de los cultivos puros aislados, se procedió a realizar la identificación taxonómica a nivel de género en base a las características morfológicas macro y microscópicas del hongo utilizando las claves taxonómicas de Ellis (1980, 1993), Barnett y Hunter (1998), Sutton (1998) y Piontelli y Toro (2003).

Se realizaron además identificaciones a nivel de especie para aquellos cultivos pertenecientes a los géneros *Fusarium*, *Trichoderma* y *Penicillium*.

Para la identificación de especies de *Fusarium*, se realizaron cultivos monospóricos a partir de las colonias puras mantenidas en AEM o PDA, para ello a cada colonia del hongo se le agregó 5 ml de agua destilada estéril y se procedió a agitar la placa, luego se extrajo con un pipeta estéril 1 ml del agua realizando tres diluciones seriadas en tubos con 9 ml de agua destilada estéril (10^{-1} a 10^{-3}). Posteriormente de cada tubo (dilución) se realizó una siembra de 100 μ l con una micropipeta estéril en una placa Petri con Agar Agua (agar al 2%). Las siembras fueron realizadas con un asa de vidrio estéril esparciendo los 100 μ l de cada dilución sobre toda la superficie de la placa, realizando una siembra por cada dilución. Las placas fueron incubadas en una estufa de cultivo a 24°C, a las 18 horas de incubación se revisó la germinación de las esporas bajo microscopio estereoscopio (oculares 25X) tomando con una aguja estéril un trozo de agar agua que contenía una espора individual germinando, ésta fue transferida a una placa Petri con medio de cultivo PDA. Cada placa fue dividida en cuatro cuadrantes y en cada uno de ellas se sembró una espора individual. Se sembraron tres placas por cada cepa de *Fusarium*, teniendo doce posibilidades de que se desarrolle una colonia monospórica. Las placas fueron incubadas en una estufa de cultivo a 24°C hasta la obtención de colonias monospóricas del hongo. Una vez obtenida la colonia, ésta fue sembrada en tres medios de cultivo: PDA, Agar Clavel (agar al 2% para un litro de agua) y Synthetic Nutrient Agar (SNA) (KH_2PO_4 1gr, KNO_3 1gr, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5gr, KCl 0,5gr, glucosa 0,2gr, sacarosa 0,2gr, agar 20gr, para un litro de agua destilada) sobre los cuales fue posible determinar las principales características morfológicas para la identificación taxonómica de especies de *Fusarium* de acuerdo a lo descrito por Booth (1997).

Para la identificación de especies de *Trichoderma*, a partir de los cultivos obtenidos en medio PDA y AEM se extrajo con un sacabocado de 0,9 cm de diámetro un disco de micelio el cual fue sembrado individualmente al centro de una placa Petri de 9 cm de diámetro con medio AEM al 2%. Cada cultivo fue incubado en una estufa de cultivo a 24°C durante cinco días. Al cabo de este período se midió el diámetro de crecimiento de la colonia y se observó su coloración y forma. Se realizaron

preparaciones microscópicas para observar la morfología de los conidióforos y conidias, su color, forma y tamaño observando además la presencia de clamidosporas, se volvieron a realizar mediciones de crecimiento de la colonia a los diez días de incubación. Para la identificación de las especies de *Trichoderma* se utilizó la clave interactiva descrita por Samuels *et al.*, (2006).

Para la identificación de especies de *Penicillium*, se realizaron siembras en medio Agar Czapeck (K_2HPO_4 1gr, $NaNO_3$ 2gr, $MgSO_4$ 0,5gr, KCl 0,5gr, FeS_2 0,01gr, sacarosa 30gr, agar 15gr, para un litro de agua destilada) incubando las placas en una estufa de cultivo a 24°C, se midió el diámetro de las colonias a los 5, 10 y 15 días de crecimiento y se caracterizó la forma y color de las colonias. Se realizaron preparaciones microscópicas para observar la morfología de los conidióforos y conidias, su color, forma y tamaño realizando la identificación en base a las claves taxonómicas descritas por Domsch y Gams (1993) y Piontelli y Toro (2003).

3.4 Análisis de los resultados

Una vez identificados los hongos obtenidos en cada una de las muestras y aislamientos realizados se correlacionó su presencia con los insectos xilófagos presentes en dichas muestras, de tal manera de determinar si existe alguna asociación entre determinada especie de hongo con determinado insecto xilófago. La identificación taxonómica de los insectos o daños entomológicos presentes en las muestras, fue realizada por Eladio Rojas P. entomólogo del Laboratorio Regional del SAG Osorno.

4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Caracterización de los daños en las muestras de madera

Las muestras procesadas presentaban galerías producidas por insectos con manchas y/o pudriciones asociadas a estos daños.

Estos daños se registraron a través de fotografías (Anexo 3), encontrándose que más de la mitad de las muestras presentaban mancha y que una menor proporción poseía pudrición, pero también se registraron muestras que tenían en forma conjunta pudrición y mancha, y otras que presentaban galerías con presencia de *Penicillium* sp., en igual frecuencia (figura 1). Estas últimas también fueron sometidas a aislamientos ya que a simple vista la galería presentaba una coloración más oscura, en la cual pudiera estar presente algún hongo de interés. A partir de los aislamientos realizados a las muestras que tenían sólo galerías, se obtuvo *Trichoderma* sp., *Chaetomium* sp., *Penicillium* sp. y *Paecilomyces* sp.; sin embargo no se podría saber con claridad si estos hongos están asociados al insecto que hizo el daño, estaban presentes en la muestra, o llegaron como contaminantes a través del aire, ya que se sabe que estos géneros aislados son saprófitos sin una relación simbiótica de ningún tipo.

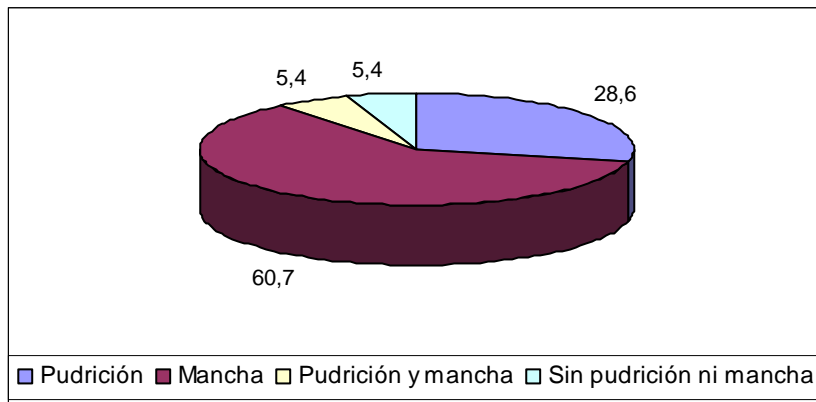


Figura 1. Frecuencia (%) de pudriciones y/o manchas en maderas asociadas a galerías producidas por insectos.

4.1.1 Muestras de madera con pudrición

En las muestras que presentaban daños de pudrición, la estructura física de la madera se veía alterada, ya que presentaban una coloración amarillenta o blanca y las fibras de la madera estaban sueltas o “desarmadas” (Anexo 3). Cabe señalar que en algunas muestras el insecto estaba presente en la galería y en aquellas en las cuales no estaba presente, se identificó la familia del insecto en base al tipo de galería.

Los resultados obtenidos demostraron que de las muestras con pudrición la mayor proporción estaban asociadas a galerías producidas por insectos de la familia Curculionidae, dentro de esta familia destaca la especie *Psepholax dentipes*; un menor porcentaje de las muestras tenían daños de la familia Cerambycidae, seguido por los daños o presencia de insectos de la familia Scolytidae y dentro de ésta se logró identificar la especie *Xyleborinus saxeseni*. En menores proporciones se encontraron daños de Termopsidae y Cossidae (figura 2).

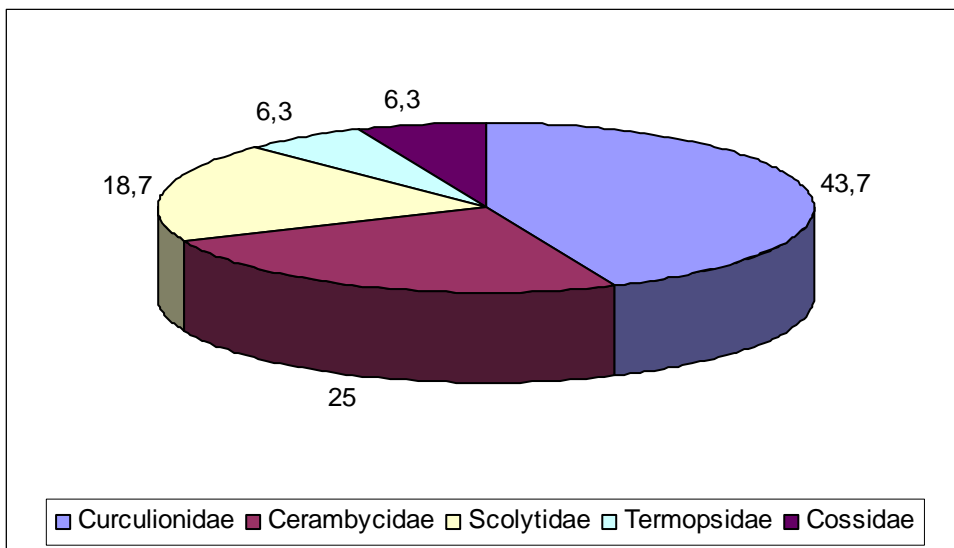


Figura 2. Porcentaje de familias de insectos presentes en maderas con pudriciones en las galerías

4.1.2 Muestras de madera con manchas

En el caso de las muestras que poseían sólo manchas, la madera se veía afectada nada más que en su coloración, presentando un tono azulado o negro (Anexo 3). En este tipo de daño la mayor cantidad de éstos fueron ocasionados por insectos de la familia Cerambycidae, luego los daños producidos por la familia Scolytidae, identificándose la especie *Gnathotrupes* sp., insecto nativo. Por último la menor cantidad de los daños de insectos fue provocado por la familia Curculionidae y dentro de ella se identificaron las especies *Psepholax dentipes* y *Rhyephenes maillei*, insectos también nativos. También se identificaron daños en menor proporción de la familia Platypodidae, insectos no presentes en Chile, dichos daños estaban presentes en muestras de madera interceptadas en controles fronterizos del país (figura 3).

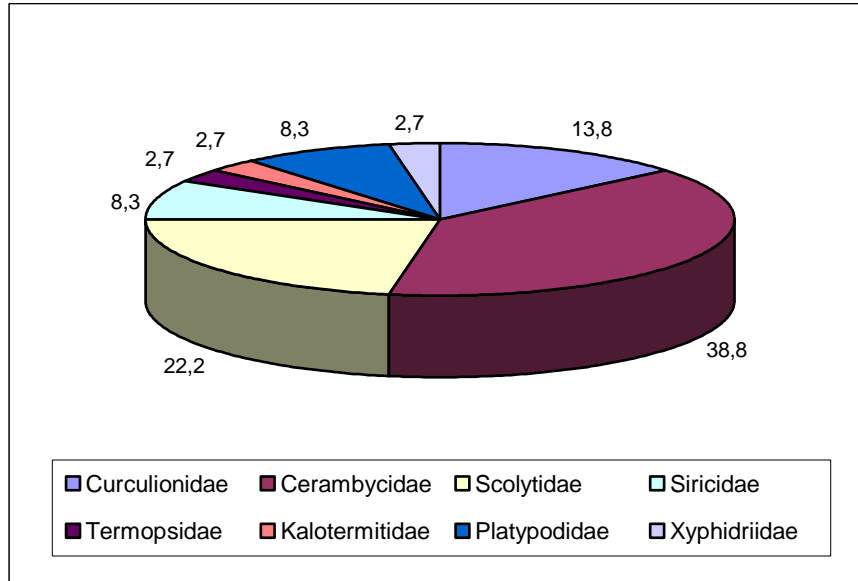


Figura 3. Porcentaje de familias de insectos presentes en maderas con manchas en las galerías

4.1.3 Muestras de madera con pudrición y mancha

En las muestras procesadas hubo una cantidad menor donde se encontró mancha y pudrición conjunta y otras en igual proporción donde se presentaba la galería sin pudrición o manchas (Anexo 3).

Dentro de las muestras que presentaban manchas y pudrición en las galerías el 66,7% de ellas estaban asociadas a insectos de la familia Cerambycidae y el 33,3% a insectos de la familia Curculionidae; mientras que la totalidad de aquellas muestras donde no existían síntomas de mancha o pudrición, estaban asociadas a la familia Cerambycidae, observándose sobre la superficie de la mayor parte de la galerías esporulación de *Penicillium* sp..

4.1.4 Registro de los aislamientos obtenidos

Dentro del total de aislamientos realizados, se desarrollaron varios tipos de microorganismos, como bacterias y por supuesto hongos, pero también hubo casos en que no hubo presencia de algún tipo de microorganismo. Del total de aislamientos, el 75% correspondió a hongos, el 13% a bacterias y el 12% restante no presentó desarrollo de microorganismos, en medios de cultivo generales (PDA y AEM), como se muestra en la figura 4. El número de aislamientos desarrollados por medio de cultivo general con su respectivo daño o presencia de insecto, por muestra, se resume en el Anexo 6.

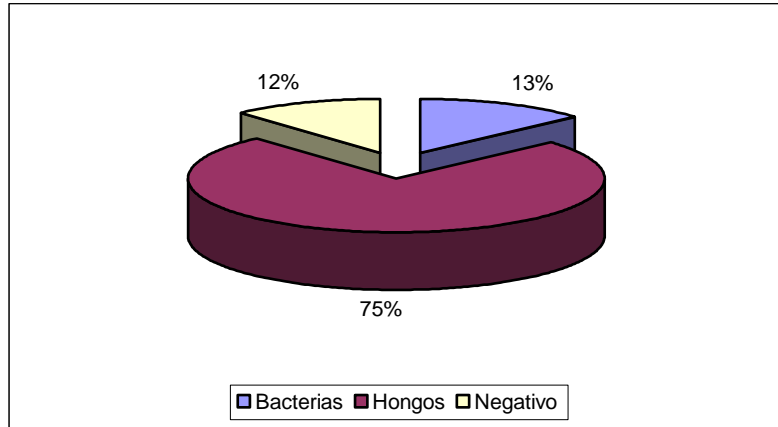


Figura 4. Frecuencia de microorganismos obtenidos a partir de los aislamientos realizados en PDA y AEM.

4.2 Identificación de los aislamientos de hongos esporulados

Sólo algunas especies de los hongos aislados fue posible clasificarlas e identificarlas debido a que esporularon con mayor facilidad en los medios de cultivos generales AEM y PDA, entre éstas destacan como las más frecuentemente aisladas especies de los géneros *Penicillium*, *Trichoderma* y *Fusarium*.

4.2.1 *Penicillium* sp.

De acuerdo a la clave seguida y a observaciones microscópicas se pudo determinar que algunas de las colonias que morfológicamente se asemejaban al género *Penicillium*, resultaron ser del género *Paecilomyces*, comprobando a través de la bibliografía que estos dos grupos son muy similares morfológicamente por lo que se pueden confundir (Anexo 5). Además, fue muy común la presencia de *Cladosporium* sp., con colonias de coloración verde olivácea, hongo saprófito común en muchos tejidos vegetales (Barnett y Hunter, 1998). Varias de las especies se repitieron en más de uno de los aislamientos realizados.

Es importante señalar que la identificación taxonómica de los hongos a nivel de especies es una tarea compleja, especialmente la de las especies de *Penicillium*, principalmente por la gran cantidad de especies descritas para este género y la variabilidad de sus formas. Por lo anterior la identificación realizada en este trabajo es sólo una aproximación a posibles especies de este género, ya que no han sido confirmadas por algún especialista.

En el cuadro 1 se presenta un resumen de las principales características morfológicas de las especies de *Penicillium* identificadas en este estudio, determinándose que el crecimiento entre las especies varió de 0,39 a 0,64 cm a los 15 días. Siendo la especie que más rápido creció *Penicillium simplicissimum* y la que alcanzó el menor diámetro fue *Penicillium chrysogenum*.

Cuadro 1. Características morfológicas de especies de *Penicillium* identificadas en muestras de madera

Especie probable	Diámetro promedio a los 15 días (cm)	Textura de la colonia	Conidióforo
<i>P. chrysogenum</i>	0,39	Aterciopelado	Monoverticilado
<i>P. jensenii</i>	0,56	Funiculosa	Monoverticilado
<i>P. nigricans</i>	0,41	Aterciopelada	Biverticilado
<i>P. simplicissimum</i>	0,64	Aterciopelada	Monoverticilado
<i>P. waksmanii</i>	0,47	Funiculosa	Monoverticilado

4.2.2 *Trichoderma* sp.

Todas las especies de *Trichoderma* identificadas se desarrollaron muy rápido alcanzando en su mayoría, los 9 cm de diámetro a los 5 días de inoculadas en medio de cultivo.

En relación a sus características morfológicas en el cuadro 2 se presentan las características microscópicas, relacionadas con la morfología de las conidias (Anexo 5). En términos generales se puede apreciar que todas las posibles especies identificadas son iguales en la forma, ornamentación, pigmentación, largo y ancho de las conidias, excepto por *T. longibrachiatum*, la cual presentó el mayor largo y el menor ancho de conidia, además de su forma oblonga lo cual también la diferencia de las demás especies, las que son globosa-subglobosa.

Cuadro 2. Características morfológicas de las conidias de las diferentes especies de *Trichoderma* presentes en muestras de madera

Especie probable	Conidia					
	Forma	Largo (µm)	Ancho (µm)	Proporción Largo/ancho	Ornamentación	Pigmentación
<i>T. asperellum</i>	globosa-subglobosa	3,88	3,13	2,15	Suave	verde o verde grisáceo
<i>T. troviride</i>	globosa-subglobosa	3,35	3,22	1,04	Suave	verde o verde grisáceo
<i>T. harzianum</i>	globosa-subglobosa	3,44	3,2	1,08	Suave	verde o verde grisáceo
<i>T. longibrachiatum</i>	oblongo	5,19	2,88	1,8	Suave	verde o verde grisáceo
<i>T. viride</i>	globosa-subglobosa	4,4	4,27	1,27	Suave	verde o verde grisáceo

En el cuadro 3, se presentan las mediciones realizadas a las fiálides, determinándose que el largo de las especies identificadas presenta una escasa variación que fluctúa entre 7,75 y 10,88 µm. Por otro lado la diferencia entre los anchos y la base de las fiálides varía en no más de 0,16 y 0,2 µm respectivamente, por lo cual se puede concluir que no existe una gran variación en el tamaño de la fiálide entre las especies identificadas.

Cuadro 3. Características morfológicas de las fiálides de las diferentes especies de *Trichoderma* identificadas en muestras de madera

Especie de <i>Trichoderma</i>	Características de las fiálides				
	Largo (µm)	Ancho (µm)	Base (µm)	Célula soporte (µm)	Relación largo/ancho
<i>T. asperellum</i>	9	2,53	2,33	20,6	2,95
<i>T. atroviride</i>	10,88	2,63	2,4	10,63	4,22
<i>T. harzianum</i>	10,5	2,69	2,4	9,22	3,86
<i>T. longibrachiatum</i>	7,75	2,6	2,2	7,5	2,99
<i>T. viride</i>	9,83	2,64	2,39	15,77	3,68

De igual manera que en el cuadro anterior, en el cuadro 4 se ve que las relaciones entre el largo de la fiálide y la célula soporte, y la relación del ancho entre las mismas varía en 0,32 y 0,2 µm respectivamente, lo que demuestra que las especies identificadas son bastante similares en sus dimensiones; presentando además todas las especies fiálides intercalares.

Cuadro 4. Relaciones de las medidas de fiálides de las diferentes especies de *Trichoderma* identificadas en muestras de madera

Especie de <i>Trichoderma</i>	Fiálides		
	Relación largo fiálide/largo célula soporte	Relación ancho fiálide/ancho célula soporte	Presencia fiálides intercalares
<i>T. asperellum</i>	0,66	0,93	+
<i>T. atroviride</i>	0,81	1,13	+
<i>T. harzianum</i>	0,96	1,06	+
<i>T. longibrachiatum</i>	0,88	1,05	+
<i>T. viride</i>	0,64	0,97	+

Con los análisis realizados en la Unidad de Entomología, se pudo determinar cuáles fueron los insectos que estaban asociados a las muestras donde se aislaron las especies de *Trichoderma* (cuadro 5).

Cuadro 5. Familias y/o especies de insectos asociadas a las muestras de madera con presencia de *Trichoderma* sp.

Familia de insecto	Especies de insectos	Frecuencia de aislamientos de <i>Trichoderma</i>	
		Nº aislamientos	Porcentaje %
Cerambycidae		24	26,09
Scolytidae	<i>Xyleborinus saxeseni</i> , <i>Gnathotrupes</i> sp., <i>Trypodendron</i> sp.*	21	22,83
Platypodidae	<i>Platypus</i> sp.*	16	17,39
Curculionidae	<i>Psepholax dentipes</i>	15	15,95
Siricidae	<i>Sirex noctilio</i> y <i>Urocerus gigas</i>	7	7,61
Anobiidae	<i>Ernobius</i> sp.	4	4,35
Buprestidae		2	2,17
Termopsidae		1	1,1
Kalotermitidae		1	1,1
Lyctidae		1	1,1

*: Insectos muertos, no presentes en Chile. Identificados en muestras interceptadas en controles fronterizos.

En las muestras analizadas con presencia de *Trichoderma* se identificaron 10 familias de insectos, determinándose que la mayor cantidad de daños o partes de insectos encontrados, corresponden a la familia Cerambycidae, seguida por la familia Scolytidae, en la cual se identificaron las especies *Xyleborinus saxeseni*, *Gnathotrupes* sp. y *Trypodendron* sp., este último no presente en Chile e identificado en estado muerto sobre una muestra interceptada en una barrera. En tercer lugar de importancia se determinó la familia Platypodidae y dentro de ésta, la especie *Platypus* sp. interceptada en muestras de barrera figura como el principal representante de esta familia. En cuarto lugar figura la familia Curculionidae, siendo *Psepholax dentipes* el principal representante de esta familia. También es importante destacar la presencia de las especies *Sirex noctilio* y *Urocerus gigas* representantes de la familia Siricidae. Finalmente en menor proporción se encontraron las familias Termopsidae, Kalotermitidae y Anobiidae, entre otras, que en suma conformaron un 3,3% del total de familias de insectos asociadas a especies de *Trichoderma*.

4.2.3 *Fusarium* sp.

La identificación de estas especies se realizó mediante el apoyo bibliográfico de las claves de Booth (1977) determinándose las dimensiones de las macro y microconidias, tipos de conidióforos y presencia de clamidosporas (cuadro 6) (Anexo 5).

Cuadro 6. Características microscópicas de las especies del género *Fusarium* aisladas en muestras de madera

Probable Especie	Microconidias		Conidióforos	Macroconidias			Clamidosporas
	Tamaño (μ)	Falsas cabezas	Monofiálides	Largo (μ)	Ancho (μ)	N° septas	
<i>Fusarium avenaceum</i>	2,88 x 12,25	+	+	63,3	2,55	3 - 5	+/-
<i>Fusarium culmorum</i>	muy pocas, casi ninguna	+	+	33,85	6,45	2 - 5	+
<i>Fusarium equiseti</i>	2,75 x 12,63	+	+	54,9	3,3	3 - 6	+
<i>Fusarium oxysporum</i>	2,67 x 7,14	+	+	36,9	4,76	3 - 6	+
<i>Fusarium solani</i>	3,67 x 8,82	+	+	47,55	5	2 - 6	+

+: Presentes; +/- = Variable

En relación a las características macroscópicas, referidas al diámetro de crecimiento y coloración de la colonia, en el cuadro 7 se observa que estos caracteres son homogéneos entre las especies de *Fusarium* aisladas en este estudio, sólo se determinaron diferencias en el diámetro de crecimiento de las colonias, siendo el mínimo de 4,3 cm y el máximo de 9 cm alcanzado este último por la especie de *F. culmorum*.

Cuadro 7. Características macroscópicas de las especies del género *Fusarium* aisladas en muestras de madera

Especie de <i>Fusarium</i>	Colonia			
	Diámetro de crecimiento a los 4 días (cm)	Color micelio aéreo	Color envés de la colonia	Color esporodoquios
<i>Fusarium avenaceum</i>	5,2 - 5,5	Blanco-café rojizo	Café	Naranja
<i>Fusarium culmorum</i>	9	Blanco-amarillento	Rojo oscuro	Naranja
<i>Fusarium equiseti</i>	3,4 - 4,0	Blanco-rojo Amarillo-café	Café	Naranja
<i>Fusarium oxysporum</i>	5,3 - 5,5	Blanco-damasco	Café claro-amarillo	Naranja-damasco
<i>Fusarium solani</i>	4,3 x 4,4	Blanco-violáceo	Café-amarillo	Blanco-crema

De acuerdo a los resultados obtenidos, se pudo determinar que las especies del género *Fusarium* se asocian mayoritariamente con insectos del orden Coleoptera (cuadro 8).

Cuadro 8. Insectos asociados a muestras de madera con presencia de *Fusarium* spp.

Especie de <i>Fusarium</i>	Insecto asociado al daño
<i>F. equiseti</i>	Col., Platypodidae*
<i>F. culmorum</i>	Col., Platypodidae*
<i>F. avenaceum</i>	Presencia de Collembola, Entomobryidae sin daño
<i>F. solani</i>	Col., Cerambycidae: <i>Callisphyrus semicaligatus</i>
	Isop., Termopsidae: <i>Porotermes quadricollis</i>
	Col., Scolytidae: <i>Xyleborus</i> sp.*
<i>F. oxysporum</i>	Col., Platypodidae*
	Col., Cerambycidae

*: Insectos muertos no presentes en Chile. Identificados en muestras interceptadas en controles fronterizos.

En relación a la asociación de especies de *Fusarium* e insectos del orden Coleoptera en maderas, estudios realizados por Norris (1979), mencionan a la especie *Fusarium solani*, como un hongo de ambrosía primario relacionado con una especie del género *Xyleborus*, lo cual es coincidente con los resultados de este estudio, ya que un 75% de las muestras presentaban daños asociados a insectos del orden Coleoptera. Este autor además señala que dependiendo del hongo que utilice el insecto como alimento la cantidad de descendencia que pueda tener éste se verá afectada, y en el caso específico de *F. solani* se ha visto que tal cantidad es máxima.

4.2.4 Otros géneros de hongos aislados

Como se puede ver en la figura 6, la mayor proporción de especies fúngicas aisladas corresponden a las del género *Trichoderma* y *Penicillium*, que de acuerdo a Baker (1963) y a Whitney (1982), se han encontrado y aislado a partir de las galerías de los escarabajos, pero se sospecha que su relación no es más que del tipo comensalista, y que en realidad los insectos los utilicen como una fuente de alimento suplementaria, sin ser de vital importancia (Beaver, 1989). Según estos autores estos hongos tienden a ocurrir en galerías viejas o abandonadas, sin embargo en este trabajo no todos los aislamientos realizados provenían de maderas viejas.

Entre otras especies aisladas en este estudio, los aislamientos del género *Graphium* sp. podrían tener una relevancia mayor, ya que corresponderían al estado anamorfo del género *Ceratocystis* (Anexo 5). Algunas especies de este género provocan el manchado de la madera, entre las cuales algunas son de considerable significancia económica, como por ejemplo, las que causan la mancha azul en *Pinus* spp., especialmente frecuentes y temidas (Butin y Peredo, 1986). Estos hongos manchadores producen manchas profundas en la madera, imposibles de eliminar mediante cepillado. Es por esto que para su control se hace necesario el uso de un producto protector químico (Butin y Peredo, 1986).

En el estudio realizado por Norris (1979), también se comprobó que, así como algunos hongos aumentan la cantidad de crías que pueda tener el insecto si es que se alimentan de por ejemplo *Fusarium solani*, existen otras especies de hongos como *Graphium* sp. que reducen hasta en un 70% la cantidad de descendencia que pueda tener la especie *Xyleborus ferrugineus*. No obstante en *Dendroctonus frontalis* se ha determinado que la ausencia del hongo simbionte (*Ceratocystis minor*) asociado al insecto provoca una disminución en la sobrevivencia de la cría y retarda su desarrollo. Sin embargo, también es evidente que el hongo manchador asociado, *C. minor* puede ser detrimental para el desarrollo de *D. frontalis* (Barras, 1970; Franklin, 1970). Al parecer es el estado sexual del hongo el que hace indeseable el floema para este insecto, por esta razón en las galerías larvales, la formación de ascocarpos es prevenida o retrasada por el hongo frente a la presencia de las larvas del escarabajo. El hongo por lo tanto prolifera en su estado conidial (carácter "ambrosial") el cual sirve como alimento para las larvas (Barras y Taylor, 1973).

En la figura 5 se puede apreciar que del total de hongos aislados, los del género *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp. y *Fusarium* spp. presentaron una mayor frecuencia de aparición, totalizando un 77,6% de los hongos aislados. Mientras que las especies de *Epicoccum nigrum*, *Chaetomium* sp., *Botrytis cinerea*, *Graphium* sp., *Hainesia* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Phomopsis* sp. y *Paecilomyces* sp., entre otras, representan el restante 22,4% del total, tal como se aprecia en la figura 6.

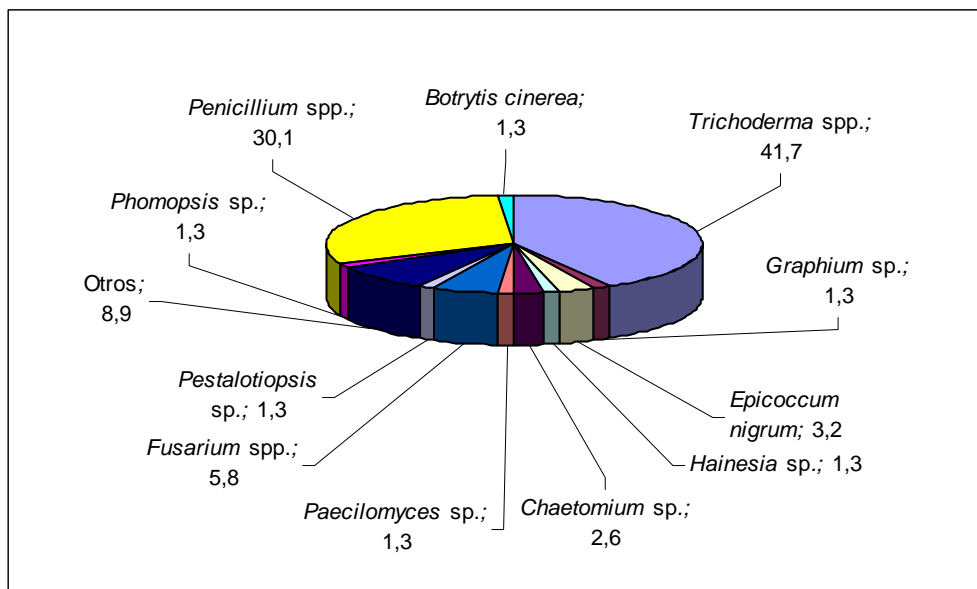


Figura 5. Porcentaje de hongos obtenidos en los aislamientos de muestras de madera

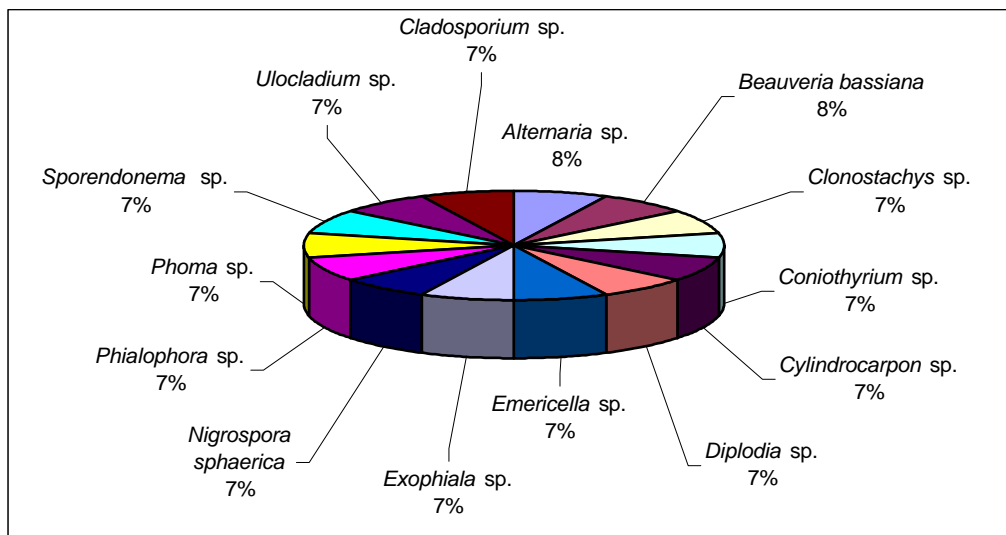


Figura 6. Frecuencia de aislamientos de otros hongos (8,9%) obtenidos desde las muestras de madera.

Es interesante mencionar que dentro de los hongos con menor frecuencia de aislamiento se encontró *Beauveria bassiana*, especie conocida como patógena para los escarabajos de corteza (Moore, 1971; Whitney, 1971), y específicamente para *Ips amitinus* e *Ips typographus* (Mills, 1983), en Europa, siendo ocasionalmente importante en la vida y dinámica poblacional de los escarabajos (Beaver, 1989) y *Diplodia sp.* especie descrita como manchador de madera rolliza, aserrada o astillada. El color gris-azulado que ocasiona este hongo se origina por las células café oscuras que posee, las que se ubican en los radios medulares de la madera y que se encuentran allí antes del elaborado de ella, haciendo inútil en este caso el tratamiento antimancha (Butin y Peredo, 1986).

De los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que los géneros *Penicillium* y *Trichoderma* fueron encontrados con mayor frecuencia asociados a galerías de insectos. Ambos son hongos imperfectos que producen conidias que son diseminadas por la lluvia o llevadas por el viento (esporas secas) y sus actividades no dependen del insecto como su vector (Verrall, 1941; Dowding, 1970, 1973). Estos géneros de hongos comúnmente son aislados desde el tejido floemático y xilemático atacado por escarabajos de corteza o desde los mismos escarabajos (Moore, 1971; Whitney, 1971; Carpenter *et al.*, 1988).

Dentro de los géneros de hongos aislados con menor frecuencia pero de reconocida asociación simbiótica con insectos, destacan dos aislamientos de *Graphium sp.*, probablemente presentes como anamorfo de algunas especies de *Ceratocystis*, resulta interesante la presencia de este hongo asociada al curculiónido *Psepholax dentipes*, ya que se sabe muy poco respecto a la biología y a la existencia de alguna relación con hongos por parte de este insecto. En relación a esto Francke-Grosmann (1967) señala, que la mayoría de los hongos involucrados en asociaciones

mutualistas sólo se les conoce su estado anamorfo (Deuteromycotina) y en el caso que el estado perfecto sea conocido, la mayoría pertenece a los Ascomycotina.

No obstante, también se encontró un aislamiento de *Graphium* sp. asociado al lepidóptero *Chilecomadia valdiviana*, lo cual es inusual ya que no existe evidencia de que este insecto tenga alguna relación con un hongo simbiote. Lo cual puede hacer suponer que el hongo ya estaba presente en la muestra, quizás en un estado inicial de colonización, ya que la madera no presentaba síntomas de mancha.

En el cuadro 9 se presenta un resumen de las diferentes especies y géneros de hongos aislados en las muestras de madera y los insectos identificados en dichas muestras.

Cuadro 9. Asociación hongos- insectos presentes en muestras de madera

Hongo	Insecto (Orden, familia, género y/o especie)
<i>Alternaria alternata</i>	Restos adulto Col., Platypodidae*
<i>Beauveria bassiana</i>	Larva y adulto <i>Callisphyris semicaligatus</i>
<i>Botrytis cinerea</i>	Larva Col. Cerambycidae
<i>Chaetomium</i> sp.	Col., Curculionidae, Col., Platypodidae*, Col., Cerambycidae
<i>Cladosporium</i> sp.	Obreros y soldados Isop., Termopsidae: <i>Porotermes quadricollis</i>
<i>Clonostachys</i> sp.	Larvas y adultos <i>Rhyephenes maillei</i>
<i>Coniothyrium</i> sp.	Col., Platypodidae*
<i>Cylindrocarpon</i> sp.	Col, Scolytidae: <i>Gnathotrupes</i> sp.
<i>Diplodia</i> sp.	Larva Col. Curculionidae <i>Psepholax dentipes</i>
<i>Emericella</i> sp.	Col, Platypodidae*
<i>Epicoccum nigrum</i>	Restos adulto Col., Platypodidae, Platypus sp. *, Col., Scolytidae <i>Trypodendron</i> spp. *, Col., Anobiidae
<i>Exophiala</i> sp.	Col., Cerambycidae
<i>Graphium</i> sp.	Larva Col., Curculionidae: <i>Psepholax dentipes</i> , Lepidoptera, <i>Chilecomadia valdiviana</i>
<i>Hainesia</i> sp.	Larva y adulto Col., Curculionidae: <i>Psepholax dentipes</i>
<i>Nigrospora sphaerica</i>	Restos Col, Scolytidae
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	Larva Col. Curculionidae <i>Psepholax dentipes</i>
<i>Phialophora</i> sp.	Col., Scolytidae
<i>Phoma</i> sp.	Restos larva Col., Lyctidae
<i>Phomopsis</i> sp.	Larva Col. Cerambycidae
<i>Sporendonema</i> sp.	Col, Cerambycidae
<i>Ulocladium</i> sp.	Col., Platypodidae*, Resto larva Col., Buprestidae, Restos Isoptera

*: Insectos muertos no presentes en Chile. Identificados en las muestras interceptadas en controles fronterizos.

4.2.5 Efecto de los métodos de inducción de esporulación en la identificación de hongos de madera

La mayoría de los hongos (60% aproximadamente) se pudo identificar a partir de los cultivos sembrados en PDA o AEM (Anexo 6), sin embargo también hubo una

cantidad importante de hongos que fue necesario sembrarlos utilizando métodos alternativos de esporulación. Los géneros *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp. y *Penicillium* spp. aislados en forma más frecuente esporularon en medio PDA o AEM. Como se puede ver en el cuadro 10, sólo una pequeña proporción de los cultivos lograron esporular en PDA.

Cuadro 10. Medios de cultivo generales utilizados para la esporulación de hongos

Géneros de hongos inducidos a esporulación e identificados	Medios generales	
	PDA	AEM
<i>Beauveria bassiana</i>	-	+
<i>Botrytis cinerea</i>	-	+
<i>Cladosporium</i> sp.	-	+
<i>Clonostachys</i> sp.	-	+
<i>Coniothyrium</i> sp.	-	+
<i>Emericella</i> sp.	-	+
<i>Exophiala</i> sp.	-	+
<i>Fusarium</i> spp.	+	+
<i>Graphium</i> sp.	-	+
<i>Paecilomyces</i> sp.	+	+
<i>Penicillium</i> spp.	+	+
<i>Phialophora</i> sp.	-	+
<i>Phoma</i> sp.	-	+
<i>Sporendonema</i> sp.	-	+
<i>Trichoderma</i> spp.	+	+

(+): Presencia de esporulación

(-): Ausencia de esporulación

Por otro lado hubo algunos hongos que no esporularon en los medios de cultivo generales después de más de tres semanas, sin embargo cuando se utilizaron otros métodos alternativos, se logró ver esporulación (cuadro 11). Tal es el caso de *Alternaria* sp., *Diplodia* sp., *Nigrospora sphaerica* y *Ulocladium* sp. Por otra parte algunos hongos resultaron ser identificados en más de un medio como por ejemplo *Chaetomium* sp. el que esporuló en probetas y acículas en distintos tiempos y en el caso de *Pestalotiopsis* sp. se obtuvo esporulación en probetas y acículas.

Cuadro 11. Medios de cultivos específicos utilizados en la inducción de la esporulación de los hongos aislados de muestras de madera

Géneros de hongos inducidos a esporulación e identificados	Medios específicos					
	Agar/aserrín	Probetas	Rodajas papa	Tejido vegetal		Agar Quaker
				Acícula	Pecíolo	
<i>Alternaria</i> sp.	-	-	-	+	-	-
<i>Chaetomium</i> sp.	-	+	-	+	-	-
<i>Cylindrocarpon</i> sp.	+	-	-	-	-	-
<i>Diplodia</i> sp.	-	-	-	-	+	-
<i>Epicoccum nigrum</i>	-	+	-	+	-	-
<i>Hainesia</i> sp.	+	-	-	-	-	-
<i>Nigrospora sphaerica</i>	-	-	-	+	-	-
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	-	+	-	+	-	-
<i>Phomopsis</i> sp.	-	-	-	-	+	-
<i>Ulocladium</i> sp.	-	-	-	+	-	-

(+): Presencia de esporulación

(-): Ausencia de esporulación

Dentro de los métodos probados, el agar/aserrín no fue tan eficaz, sólo se obtuvieron esporulación de los géneros *Cylindrocarpon* sp. y *Hainesia* sp. probablemente por la presencia de compuestos polifenólicos que contienen las partículas de aserrín, las que en muchos casos inhibirían el desarrollo de los hongos¹. En el caso de las probetas de madera éstas resultaron menos eficaces como método de esporulación ya que menos de la mitad de los cultivos esporularon. La inoculación en rodajas de papa no dio resultado ya que presentó problemas de contaminación bacteriana, organismos propios de la papa que son muy difíciles de eliminar, incluso después de desinfectarlas. El método con acículas o pecíolos resultó ser bastante bueno, ya que la mayoría de los cultivos esporularon en un promedio de 2 semanas, sin embargo hubo algunos en que no se logró más que desarrollo de micelio y por lo tanto no se pudieron identificar. En agar Quaker se sembraron aquellos cultivos que presentaban micelio aéreo negro en PDA o AEM, sin embargo en ninguno de ellos se logró la esporulación de los hongos.

En conclusión el AEM resultó ser el mejor medio de cultivo general para identificar los hongos aislados en madera y entre los métodos alternativos para inducir la esporulación el tejido vegetal de acículas resultó ser el mejor método, ya que sobre éste el hongo demoró menos tiempo en esporular (en promedio 2 semanas).

¹ Valenzuela, E. 2006. UACH. Instituto de Microbiología (Comunicación personal)

5. CONCLUSIONES

A través de una caracterización macroscópica de las muestras de madera, se pudo caracterizar un 28,6% de pudriciones, asociadas mayoritariamente a galerías producidas por curculiónidos y un 60,7% de manchas asociadas mayoritariamente a galerías producidas por cerambícidos.

Se determinó además que un 5,4% de las muestras con galerías presentó manchas y pudriciones en forma conjunta, determinándose que de este total un 67% fueron provocadas por cerambícidos y un 33% por curculiónidos.

Por medio de los aislamientos realizados desde las galerías de las muestras de madera, se pudo comprobar que un 75% presentaban hongos asociados a las galerías, un 13% presentaban bacterias y un 12% no presentaban microorganismos asociados a éstas.

En base a las características morfológicas sobre medios de cultivo generales y específicos y utilizando claves taxonómicas se logró identificar a nivel de género y en algunos casos a nivel de especie, los agentes fungosos presentes en las galerías. Del total de aislamientos obtenidos se determinó que la mayor proporción de hongos presentes en las muestras de madera correspondían a los géneros *Trichoderma* spp. (41,7%) y *Penicillium* spp. (30,1%), los cuales probablemente estarían presentes como “hongos maleza”, sin una relación simbiótica con insectos.

Un 26,09% de las muestras de donde se aisló *Trichoderma* spp. tenían galerías provocadas por cerambícidos, siendo la familia con mayor frecuencia, mientras que las familias Termopsidae, Kalotermitidae y Lyctidae en conjunto suman un 3,3%, siendo las menos frecuentes en estos aislamientos.

Entre los hongos aislados en madera se lograron identificar distintas especies del género *Fusarium* (6% del total), dentro de los cuales destaca la especie *Fusarium solani* asociada a galerías de *Xyleborus* sp., especie descrita como hongo de ambrosía de este insecto.

Del total de aislamientos del género *Fusarium* se encontró que un 75% estaban asociados a galerías de insectos de la familia Coleoptera.

Entre los aislamientos obtenidos se identificó *Graphium* sp., asociado a galerías de *Psepholax dentipes* y *Chilecomadia valdiviana*, probablemente presente como estado anamorfo de *Ceratocystis* sp., hongo descrito en asociaciones simbióticas con insectos del orden Coleoptera.

Dentro de los métodos generales para aislar e identificar los hongos asociados a galerías de madera, el medio AEM fue el más eficaz, mientras que como método alternativo para inducir la esporulación del hongo el tejido vegetal (acículas) resultó tener un mejor resultado, con un 80% de los cultivos esporulados.

Con los resultados obtenidos es muy difícil determinar si los hongos aislados en las galerías fueron realmente transmitidos por el insecto, por lo tanto para complementar estos resultados sería recomendable a futuro realizar aislamientos a partir de los insectos de las galerías en el caso que éstos estuvieran presentes.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Baker, J.M. 1963. Ambrosia beetles and their fungi, with particular reference to *Platypus cylindrus* Fab. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 13: 232-265.
- Barbosa, P.; M. Wagner. 1989. Symbiotic Associations of Forest Insects, Microorganisms, and Trees. Capítulo 5. **In:** Barbosa, P. and Wagner, M. Introduction to Forest and Shade Tree Insects. USA, Academic Press. pp. 119-149.
- Barnett, H.L.; B. Hunter. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 4^a Ed. 218 p.
- Barras, S.J. 1970. Antagonism between *Dendroctonus frontalis* and the fungus *Ceratocystis minor*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 63: 1187-1190.
- Barras, S.J.; T.J. Perry. 1972. Fungal symbionts in the prothoracic mycangium of *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Scolytidae). *Z. Ang. Entomol.* 71: 95-104.
- Barras, S.J.; J.J. Taylor. 1973. Varietal *Ceratocystis minor* identified from mycangium of *Dendroctonus frontalis*. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 50: 293-305.
- Beaver, R.A. 1989. Insect-fungus relationships in the bark and ambrosia beetles. Capítulo 5. **In:** "Insect-Fungus Interactions" (N. Wilding, N.M. Collins, P.M. Hammond y J.F. Webber, eds.). Academic Press, London. pp. 121-143.
- Berryman, A.A. 1972. Resistance of conifers to invasion by bark beetle-fungus associations. *BioScience* 22: 598-602.
- Booth, C. 1977. Fusarium Laboratory Guide to the Identification of the Major Species by C. Booth. Commonwealth Mycological Institute. 58 p.
- Bridges, J.R.; J.C. Moser. 1983. Role of phoretic mites in transmission of bluestain fungus, *Ceratocystis minor*. *Ecol. Entomol.* 8: 9-12.
- Burg, H. S/F .Wood Decaying Fungi. An Insight on Types and Roles in Wood Decay. EMLabEnvironmental.
(Disponible en : https://www.scrthq.org/secure/documents/wooddecaying_fungi.pdf. Consultado el: 14 de Mayo de 2006).
- Butin, H; H.L. Peredo. 1986. Hongos parásitos en coníferas de América del Sur con especial referencia a Chile. J. Cramer. Berlin, Stuttgart. 100p.
- Carpenter, S.E.; M.E. Harmon; E.R. Ingham; R.G. Kelsey,.; J.D. Lattin y T.D. Schowalter. 1988. Early patterns of heterotroph activity in conifer logs. *Proc. Royal Soc. Edinburgh* 94B: 33-43.

- CONAF. 2003. Sanidad Forestal. (Disponible en: http://www.conaf.gob.cl/?page=home/contents&seccion_id=97efad964ab6d7e6ce7209e8981e9d72&unidad=0&. Consultado el 29 de Abril de 2006).
- CONAF. 2005. Bosque Nativo. (Disponible en: http://www.conaf.cl/?page=home/contents&seccion_id=178e0a9c44e6d8637a5fdf76832ca2aa&unidad=0&pagina=. Consultado el 27 de Abril de 2006).
- Crowson, R. 1984. The associations of Coleoptera with Ascomycetes. Chapter 11. *In*: Wheeler, Q. and Blackwell, M. (eds.). Fungus-Insect Relationships. New York, Columbia University Press. pp. 256-285.
- Domsch, K.H.; W. Gams; T. H. Heidi. 1993. Compendium of Soil Fungi. Vol. I. IHW-Verlag. 859 p.
- Dowding, P. 1970. Colonization of freshly bared pine sapwood surfaces by staining fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 52: 399-412.
- Dowding, P. 1973. Effects of felling time and insecticide treatment on the interrelationship of fungi and arthropods in pine logs. *Oikos* 24: 422-429.
- Dowding, P. 1984. The evolution of insect-fungus relationships in the primary invasion of forest timber. *En*: J.M. Anderson, A.D.M. Raynor y D.W.H. Walton (eds.) Invertebrate-Microbial Interactions. New York, Cambridge University Press. pp. 133-153.
- Ellis, M. 1980. Dematiaceous Hyphomycete. CAB. International. Commonwealth, Mycological Institute. UK. England. 608 p.
- Ellis, M. 1993. More Dematiaceous Hyphomycete. CAB. International. Commonwealth Mycological Institute. UK. England. 507 p.
- Encinas, O. 2004. Conservación de Maderas. *In*: Taller de Tratamiento de Maderas. Trujillo, (Venezuela), Febrero 14 de 2004. (Disponible en: <http://webdelprofesor.ula.ve/forestal/oencinas/cursosofrecidos/museosalvalero2004/contcursosalvalero/CursoSalvadorValero4partes.pdf>. Consultado el: 13 de Mayo de 2006).
- Farris, S.H. 1969. Ocurrance of mycangia in the bark beetle *Dryocoetes confuses* (Coleoptera: Scolytidae). *Can. Entomol.* 101: 527-532.
- Francke-Grosmann, H. 1963. Some new aspects in forest entomology. *Annu. Rev. Entomol.* 8: 415-438.
- Francke-Grosmann, H. 1967. Ectosymbiosis in wood-inhabiting insects. *In* S.M. Henry (ed.) Symbiosis. Vol II. New York, Academic Press. pp. 141-205.

- Franklin, R. T. 1970. Observations on the blue stain-southern pine beetle relationship. *J. Georgia Entomol. Soc.* 5: 53-57.
- Goheen, D.J.; F.W., Jr. Cobb. 1978. Occurrence of *Verticicladiella wagneri* and its perfect state, *Ceratocystis wagneri* sp. Nov., in insect galleries. *Phytopathology* 68: 1192-1195.
- Graham, K. 1967. Fungal-insect mutualism in trees and timber. *Annual Review of Entomology* 12: 105-126.
- Haanstad, J.O. ; D.M. Norris. 1985. Microbial symbionts of the ambrosia beetle, *ploterinus politus*. *Mocrob. Ecol.* 11: 267 276.
- Harrington, T.C.; F.W., Jr. Cobb; J.W. Lownsberry. 1985. Activity of *Hylastes nigrinus*, a vector of *Verticicladiella wagneri*, in thinned stands of Douglas-fir. *Can. J. For. Res.* 15: 519-523.
- Harrington, T.C. 1988. *Leptographium* species, their distributions, hosts and insect vectors. **In:** T.C. Harrington y F.W. Cobb, Jr., (eds.) *Leptographium Root Diseases on Conifers*. St. Paul, MN. American Phytopathological Society Press. pp 1-39.
- Harrington, T.C. 1993. Biology and Taxonomy of Fungi Associated with Bark Beetles. Chapter 3. **In:** T.D. Schowalter; G.M. Filip. *Beetle-pathogen interactions in conifer forests*. Department of Plant Pathology, Iowa State University, Ames, IA, USA. pp. 37-58.
- Hetrick, L.A. 1949. Some overlooked relationships of southern pine beetle. *J. Econ. Entomol.* 42: 466-469.
- Hodges, C.S. 1969. Modes of infection and spread of *Fomes annosus*. *Annu. Rev. Phytopath.* 7: 247-266.
- INFOR. 2006. Folleto de Difusión "Defendamos nuestra madera" (Disponible en: http://www.laaldeaforestal.cl/manual/contenido/industria/uso_optimo/inm03212_1.htm. Consultado el: 4 de Mayo de 2006).
- Käärik, A.A. 1974. Decomposition of wood. **In:** "Biology of Plant Litter Decomposition" (C.H. Dickinson and G.J.F. Pugh, eds.). Academic Press, London. pp. 129-174.
- Koch, A. 1962. Grundlagen und Probleme der Symbioseforschung. *Med. Grundlagenforschung.* 4: 63-156.
- Leach, J.G.; L.W. Orr; C. Christensen. 1934. The inter-relationship of bark beetles and bluestaining fungi in felled Norway pine timber. *J. Agric. Res.* 49: 315-341.

- Levieux, J.; F. Lieuteir; J.C. Moser; T.J. Perry. 1989. Transportation of phytopathogenic fungi by the bark beetle *Ips sexdentatus* Boerner and associated mites. *J. Appl. Entomol.* 108: 1-11.
- Mills, N.J. 1983. The natural enemies of scolytids infesting conifer bark in Europe in relation to the biological control of *Dendroctonus* spp. in Canada. *CIBC Biocontrol News Info.* 4: 305-328.
- Moore, G.E. 1971. Mortality factors caused by pathogenic bacteria and fungi of the southern pine beetle in North Carolina. *J. Invert. Pathol.* 17: 28-37.
- Moser, J.C. 1985. Use of sporothecae by phoretic tarsonemus mites to transport ascospores of coniferous bluestain fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 84: 750-753.
- Norris, D. M. 1979. The mutualistic fungi of xyleborine beetles. *In*: "Insect-Fungus Symbiosis" (L.R.Batra, ed.). Halsted Press, Chichester, Sussex. pp 53-63.
- Piontelli, E.; A. Toro. 2003. Manual de Identificación para microhongos comunes en alimentos. Universidad Católica de Valparaíso. Escuela de Medicina. Cátedra de Micología. 207 p.
- Parra, P.; M. González; J.C. Valencia; J. Faúndez. 2001. Manual para la certificación sanitaria Forestal. (Disponible en: [http:// www.infor.cl/](http://www.infor.cl/). Consultado el 17 de Mayo de 2006).
- Rayner, A.D.M.; N.K. Todd. 1979. Population and community structure and dynamics of fungi in decaying wood. *Adv. Bot. Res.* 7: 333-420.
- Rizzo, D.M. ; T.C. Harrington. 1988. Root and butt rot fungi on balsam fir and red spruce in the White Mountains, New Hampshire. *Plant Dis.* 72: 329-331.
- Rojas, R. y R. Gallardo. 2004. Manual de Insectos asociados a maderas en la zona sur de Chile. Servicio Agrícola y Ganadero. Santiago, Chile. 63p
- SAG. Proyecto de Vigilancia y control de plagas Forestales. (Disponible en: http://www.sag.gob.cl/portal/page?_pageid=133,60728&_dad=portal&_schema=PORTAL. Consultado el: 25 de Mayo de 2006).
- Samuels, G.J., Chaverri, P., Farr, D.F., & McCray, E.B. (n.d.) *Trichoderma* Online, Systematic Botany & Mycology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved October 7, 2006, from <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm> (Consultado el: Agosto, 2006).
- Schowalter, T.D.; B.A. Caldwell; S.E. Carpenter; R.P. Griffiths; M.E. Harmon; E.R. Ingham; R.G. Kelsey; J.D. Lattin; A.R. Moldenke. 1992. Decomposition of fallen trees: effects of initial conditions and heterotroph colonization rates. *In*:

"Tropical Ecosystems: Ecology and Management" (K.P. Singh and J.S. Singh, eds), Wiley Eastern Ltd., New Delhi. pp. 373-383.

Sutton, B. 1998. The Coelomycete: Fungi imperfecti with picnidia acervuli and stromata. CABI Publishing. New York. NY. 696 p.

Verrall, A.F. 1941. Dissemination of fungi that stain logs and lumber. *J. Agric. Res.* 63: 549-558.

Whitney, H.S. 1982. Relationships between bark beetles and symbiotic organisms. **In:** "Bark Beetles in North American Conifers" (J. B. Mitton y K. B. Sturgeon, eds), Univ. of Texas Press, Austin. pp. 183-211.

Whitney, H.S.; S.H. Farris. 1970. Maxillary mycangium in the mountain pine beetle. *Science* 167: 54-55.

Whitney, H.S. 1971. Association of *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae) with blue stain fungi and yeast during brood development in lodgepole pine. *Can. Entomol.* 103: 1495-1503.

Whitney, H.S.; F.W., Jr. Cobb. 1972. Non-staining fungi associated with the bark beetle *Dendroctonus brevicomis* (Coleopteras: Scolytidae) on *Pinus ponderosa*. *Can. J.Bot.* 50: 1943-1945.

Witcosky, J.J.; T.D. Schowalter; E.M. Hanse. 1986. *Hylastes nigrinus* (Coleoptera: Scolytidae), *Pissodes fasciatus*, y *Steremnius carinatus* (Coleoptera: Curculionidae) as vectors of black stain root disease of Douglas-fir. *Environ. Entomol.* 15: 1090-1095.

ANEXOS

Anexo 1

Abstract

Abstract

In Chile the forest resources are subject to the action of insects and fungi damaging natural forests and increasing plantations with exotic species. In Europe there have been several studies on the biology of certain insects, their structure and their possible existing association among themselves and the fungi that have been able to isolate from the galleries provoked by them as from their own bodies. However, in Chile there are no studies whereby such association is analyzed.

The objectives of this work were the following: To characterize macroscopically and to register graphically the presence of spots or rotting produced by fungi in samples of wood that present damage from insects, to isolate and to identify the present fungous agents in the samples and to relate the damage produced by the present insects in the samples of wood with the fungi identified in the above mentioned samples.

Between April and July, 2006, samples were received in the Regional Laboratory of the SAG, Osorno. The samples to be analyzed came from the Phytosanitary Forest Alertness activities and from maritime and terrestrial customs controls at the borders in the X Region performed by SAG. The sample encompassed native and exotic species and ply wood as organs of the tree (branches or shaft).

The methodology was based in sowing chunks of wood extracted from the galleries provoked by the insects that had presence of fungi, in means of general cultures Agar Extracto of Malta (AEM) and Agar Papa Dextrose (PDA) to isolate and to identify the fungi, in Petri plates, since they are the means used in laboratory and described in the literature for the isolation of these microorganisms. The developed colonies were replicated to a new way of culture to obtain pure colonies. The cultures were left in incubation at 24°C until development of the colony. Once obtained the pure cultures one proceeded to their identification following the taxonomic keys. In accordance with the bibliography, these boasted to specific means for their identification, should that be required. In addition, 5 alternative and more specific methods were utilized, in order to induce the sporulation of the cultures that did not sporulate in AEM and PDA, and therefore could not be identified. The alternative methods corresponded to agar/sawdust, agar Quaker, manometers of wood, vegetal tissue (needles and leaf stalk), and potato tracks.

The processed samples presented galleries produced by insects with spots and /or rotting associated with these damages, which were registered graphically. Considering that 61 % of the samples presented spot, 29 % rotting, but also samples were registered by rotting and spot, and others who only were presenting *Penicillium* spp., in equal proportion (5 %).

Within the samples with rotting, the majority of galleries were caused by insects of the family Curculionidae. The family Cerambycidae caused damage 38% of the damage in samples presenting spot. 67% of the samples presenting spots and rotting in the galleries were associated with the family Cerambycidae. Out of all the isolations, 75% corresponded to fungi, 13% to bacteria and 12%

remaining did not present development of microorganisms, in general means of culture (PDA and AEM).

On the basis of the morphologic characteristics on general and specific means of culture and using taxonomic keys it was identified, at the genre level and in some cases the specie level, the fungous agents present in the galleries.

Out of all the realized isolations those who presented the major frequency of appearance were *Trichoderma* spp. with 42%, *Penicillium* spp. with 30% and 6% of *Fusarium* spp.

Among the obtained isolations *Graphium* sp. was identified, associated galleries of *Psepholax dentipes* and *Chilecomadia valdiviana*, probably present as anamorphic state of *Ceratocystis* sp., described fungi in symbiotic associations with insects of the Coleoptera order.

Within the general methods to isolate and to identify the fungi associated with galleries of wood, the AEM method was the most effective, whereas the alternative method to induce the sporulation of fungi the vegetal tissue (needles) proved to have better results, with 80% of the cultures with sporulation.

With the obtained results it is very difficult to determine whether the isolated fungi in the galleries were transmitted by insects, therefore to complement these results would be advisable to perform future isolations from the insects of the galleries in the case that these were present.

Key words: association fungi-insect, galleries, rotting, *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Graphium* sp.

Anexo 2

Procedencia de las muestras procesadas

Ce Nº muestra	Especie	Coordenadas		Año	Oficio/Fecha	Fecha recepción	Fecha muestreo	Tipo de muestra	Remitida por	Procedente	Origen
		Norte	Este								
1	Eucalipto (<i>E. nitens</i>)	Sin información		2003	Sin información						
2	Arrayán (<i>Luma apiculata</i>)	5494905	743269	2006	HE 1261	15-mar	09-mar	Tronco	Osorno	Barrera C. Samoré	Prosp. Forestal
3	Maqui (<i>Aristotelia chilensis</i>)	5495004	743201	2006	HE 1262	15-mar	09-mar	Tronco	Osorno	Barrera C. Samoré	Prosp. Forestal
4	Maqui (<i>Aristotelia chilensis</i>)	5494986	743201	2006	HE 1263	15-mar	09-mar	Tronco	Osorno	Barrera C. Samoré	Prosp. Forestal
5	Luma (<i>Amomyrtus luma</i>)	5495197	743435	2006	HE 1263	13-mar	10-mar	Tronco	Osorno	Barrera C. Samoré	Vigilancia
6	Ulmo (<i>Eucryphia cordifolia</i>)	5495273	743522	2006	HE 1263	13-mar	10-mar	Tronco	Osorno	Barrera C. Samoré	Vigilancia
7	Maqui (<i>Aristotelia chilensis</i>)	5494605	745112	2006	HE 1349	24-mar	15-mar	Tronco	Osorno	P.N. Puyehue	Prosp. Forestal
8	Ulmo (<i>Eucryphia cordifolia</i>)	5495114	745134	2006	HE 1349	24-mar	15-mar	Tronco	Osorno	P.N. Puyehue	Prosp. Forestal
9	Maqui (<i>Aristotelia chilensis</i>)	5495124	745105	2006	HE 1349	24-mar	15-mar	Ramas	Osorno	P.N. Puyehue	Prosp. Forestal
10	Coihue (<i>Nothofagus dombeyi</i>)	5495179	745014	2006	HE 1349	24-mar	15-mar	Tronco	Osorno	P.N. Puyehue	Prosp. Forestal
11	Ulmo (<i>Eucryphia cordifolia</i>)	5495481	743875	2006	HE 1349	24-mar	15-mar	Tronco	Osorno	P.N. Puyehue	Prosp. Forestal
12	Maqui (<i>Aristotelia chilensis</i>)	5494989	743160	2006	HE 1349	24-mar	15-mar	Tronco	Osorno	P.N. Puyehue	Prosp. Forestal
13	Ulmo (<i>Eucryphia cordifolia</i>)	Sin información						Sin información			
14	Radal (<i>Lomatia hirsuta</i>)			2003	nº protocolo402	28-ene	28-ene	Hojas	Río Negro	Winfried Schrapler	Denuncia
15	Maqui (<i>Aristotelia chilensis</i>)	5494225	743228	2006	HE1263	15-mar	08-mar	Tronco	Osorno	Barrera C. Samoré	Vigilancia
16	Fuinque (<i>Lomatia ferruginea</i>)	5494225	743228	2006	HE1263	15-mar	08-mar	Tronco	Osorno	Barrera C. Samoré	Vigilancia
17	Tepa (<i>Laureliopsis philippiana</i>)	5494905	743269	2006	HE1263	15-mar	08-mar	Planta	Osorno	Barrera C. Samoré	Vigilancia
18	Chilco (<i>Fuchsia magellanica</i>)	5494905	743269	2006	HE1263	15-mar	08-mar	Tronco	Osorno	Barrera C. Samoré	Vigilancia
19	Arrayán (<i>Luma apiculata</i>)	5494832	743246	2006	HE1263	15-mar	09-mar	Ramas	Osorno	Barrera C. Samoré	Vigilancia
20	Ulmo	5494889	743189	2006	HE1263	15-mar	09-mar	Planta	Osorno	Barrera	Vigilancia

	<i>(Eucryphia cordifolia)</i>									C. Samoré	
21	Tepa <i>(Laureliopsis philippiana)</i>	5494866	7432202	2006	HE1263	15-mar	09-mar	Planta	Osorno	Barrera C. Samoré	Vigilancia
22	Tiaca <i>(Caldcluvia paniculata)</i>	5495244	743487	2006	HE1263	29-mar	10-mar	Tronco	Osorno	Barrera C. Samoré	Vigilancia
23	Maqui <i>(Aristotelia chilensis)</i>	5495150	743353	2006	HE1263	29-mar	10-mar	Planta	Osorno	Barrera C. Samoré	Vigilancia
24	Eucalipto <i>(E. globulus)</i>			2006	ORD 127	27-mar	23-mar	Astillas	Pto. Montt	Forestal del Sur, Sn. José de Calbuco	Inspección de Exportación
25	Pino oregón <i>(P. menziesii)</i>	Sin información		2006	ORD S/N	03-abr	29-mar	Madera	Valdivia	Oficina SAG Valdivia	Defensa
26	Álamo	5528472	661330	2006	HE 1393	03-abr	29-mar	Arbol	Osorno	Harold Glimond, Fdo. El Laurel	Prosp. Forestal
27	Álamo	5528940	655527	2006	HE 1393	03-abr	16-mar	Tronco	Osorno	Jorge Momberg, Fdo. Los Robles	Prosp. Forestal
28	Álamo	5524208	667670	2006	HE 1393	03-abr	22-mar	Tronco	Osorno	Hugoberto Carrillo, Fdo. Metahue	Prosp. Forestal
29	Eucalipto <i>(E. nitens)</i>	5505647	662169	2006	HE 1393	03-abr	28-mar	Tronco	Osorno	Univ. De Los Lagos	Prosp. Forestal
30	Madera embalaje				HE 1458	13-mar	01-mar	Mad. embalaje	Osorno	SODIMAC	Record intercepción
31	Madera embalaje				HE 1458	13-mar	01-mar	Mad. embalaje	Osorno	SODIMAC	Record intercepción
32	Madera embalaje				HE 1458	13-mar	07-mar	Mad. embalaje	Osorno	Easy	Record intercepción
33	Madera embalaje				HE 1458	13-mar	07-mar	Mad. embalaje	Osorno	Easy	Record intercepción
34	Madera embalaje				HE 1458	13-mar	07-mar	Mad. embalaje	Osorno	Easy	Record intercepción
35	Madera embalaje				HE 1458	13-mar	07-mar	Mad. embalaje	Osorno	Easy	Record intercepción
36	Madera embalaje				HE 1458	13-mar	07-mar	Mad. embalaje	Osorno	SODIMAC	Record intercepción
37	Madera embalaje				HE 1458	13-mar	07-mar	Mad. embalaje	Osorno	SODIMAC	Record intercepción
38	Madera embalaje				HE 1458	13-mar	07-mar	Mad. embalaje	Osorno	SODIMAC	Record intercepción
39	Madera embalaje				HE 1458	13-mar	07-mar	Mad. embalaje	Osorno	SODIMAC	Record intercepción
40	Madera embalaje				HE 1458	13-mar	14-mar	Mad. embalaje	Osorno	SODIMAC	Record intercepción
41	Madera embalaje				HE 1458	13-mar	14-mar	Mad. embalaje	Osorno	SODIMAC	Record intercepción
42	Madera embalaje				HE 1458	13-mar	14-mar	Mad. embalaje	Osorno	SODIMAC	Record intercepción
43	Madera embalaje				HE 1458	13-mar	14-mar	Mad.	Osorno	SODIMAC	Record

								embalaje			intercepción
44	Madera embalaje				HE 1458	13-mar	17-mar	Mad. embalaje	Osorno	Easy	Record intercepción
45	Madera embalaje				HE 1458	13-mar	17-mar	Mad. embalaje	Osorno	Easy	Record intercepción
46	Madera embalaje				HE 1458	13-mar	17-mar	Mad. embalaje	Osorno	Easy	Record intercepción
47	Madera embalaje				HE 1458	13-mar	17-mar	Mad. embalaje	Osorno	Easy	Record intercepción
48	Madera embalaje				HE 1458	13-mar	17-mar	Mad. embalaje	Osorno	Easy	Record intercepción
49	Madera embalaje				HE 1458	13-mar	30-mar	Mad. embalaje	Osorno	Saesa	Record intercepción
50	Madera embalaje				HE 1458	13-mar	01-abr	Mad. embalaje	Osorno	Easy	Record intercepción
51	Madera embalaje				HE 1458	13-mar	01-abr	Mad. embalaje	Osorno	Easy	Record intercepción
52	Madera embalaje				HE 1458	13-mar	01-abr	Mad. embalaje	Osorno	Easy	Record intercepción
53	Madera embalaje				HE 1458	13-mar	01-abr	Mad. embalaje	Osorno	Easy	Record intercepción
54	Madera embalaje				HE 1458	13-mar	01-abr	Mad. embalaje	Osorno	Easy	Record intercepción
55	Madera embalaje				HE 1528	27-abr	04-abr	Mad. embalaje	Osorno	SODIMAC	Record intercepción
56	Madera embalaje				HE 1528	27-abr	04-abr	Mad. embalaje	Osorno	SODIMAC	Record intercepción
57	Madera embalaje				HE 1528	27-abr	04-abr	Mad. embalaje	Osorno	SODIMAC	Record intercepción
58	Madera embalaje				HE 1528	27-abr	04-abr	Mad. embalaje	Osorno	SODIMAC	Record intercepción
59	Madera embalaje				HE 1528	27-abr	04-abr	Mad. embalaje	Osorno	SODIMAC	Record intercepción
60	Madera embalaje				HE 1528	27-abr	04-abr	Mad. embalaje	Osorno	SODIMAC	Record intercepción
61	Madera embalaje				HE 1528	27-abr	20-abr	Mad. embalaje	Osorno	Saesa	Record intercepción
62	Madera embalaje				HE 1528	27-abr	20-abr	Mad. embalaje	Osorno	Saesa	Record intercepción
63	Madera embalaje				HE 1528	27-abr	20-abr	Mad. embalaje	Osorno	Saesa	Record intercepción
64	Madera embalaje				HE 1528	27-abr	20-abr	Mad. embalaje	Osorno	Saesa	Record intercepción
65	Madera embalaje				HE 1528	27-abr	20-abr	Mad. embalaje	Osorno	Saesa	Record intercepción
66	Madera embalaje				HE 1528	27-abr	19-abr	Mad.	Osorno	SODIMAC	Record

								embalaje			intercepción
67	Madera embalaje				HE 1528	27-abr	19-abr	Mad. embalaje	Osorno	SODIMAC	Record intercepción
68	Madera embalaje				HE 1528	27-abr	19-abr	Mad. embalaje	Osorno	SODIMAC	Record intercepción
69	Madera embalaje				HE 1528	27-abr	20-abr	Mad. embalaje	Osorno	Easy	Record intercepción
70	Madera embalaje				ORD 648	20-jun	15-jun	Mad. embalaje	Valdivia	Sin información	Record intercepción
71	Madera embalaje				HE 1597	09-may	04-may	Mad. embalaje	Osorno	SODIMAC	Record intercepción
72	Madera embalaje				HE 1597	09-may	04-may	Mad. embalaje	Osorno	SODIMAC	Record intercepción
73	Madera embalaje				HE 1597	09-may	04-may	Mad. embalaje	Osorno	SODIMAC	Record intercepción
74	Madera embalaje				HE 1597	09-may	05-may	Mad. embalaje	Osorno	Easy	Record intercepción
75	Trozo madera				ORD 25	11-abr	25-mar	Trozo madera	Valdivia	Barrera Hua-Hum	Record intercepción
76	Madera embalaje				HE 621	15-may	10-may	Mad. embalaje	Pto. Montt	No indica procedencia	Record intercepción
77	Madera embalaje				HE 1683	22-may	05-may	Mad. embalaje	Osorno	Easy	Record intercepción
78	Madera embalaje				HE 1683	22-may	05-may	Mad. embalaje	Osorno	Easy	Record intercepción
79	Madera embalaje				HE 1683	22-may	05-may	Mad. embalaje	Osorno	Easy	Record intercepción
80	Madera embalaje				HE 1683	22-may	05-may	Mad. embalaje	Osorno	Easy	Record intercepción
81	Madera embalaje				HE 1683	22-may	05-may	Mad. embalaje	Osorno	Easy	Record intercepción
82	Madera embalaje				HE 1683	22-may	05-may	Mad. embalaje	Osorno	Easy	Record intercepción
83	Madera embalaje				HE 1683	22-may	05-may	Mad. embalaje	Osorno	Easy	Record intercepción
84	Madera embalaje				HE 1683	22-may	05-may	Mad. embalaje	Osorno	Easy	Record intercepción
85	Madera embalaje				HE 1683	22-may	05-may	Mad. embalaje	Osorno	Easy	Record intercepción
86	Madera embalaje				HE 1683	22-may	05-may	Mad. embalaje	Osorno	Easy	Record intercepción
87	Madera embalaje				HE 1683	22-may	05-may	Mad. embalaje	Osorno	Easy	Record intercepción
88	Madera embalaje				HE 1683	22-may	05-may	Mad. embalaje	Osorno	Easy	Record intercepción
89	Madera embalaje				HE 621	15-may	10-may	Mad.	Pto.	No indica procedencia	Record

								embalaje	Montt		intercepción
90	Madera embalaje				HE 254	22-may	19-may	Mad. embalaje	Pto. Montt	Luyere S.A.	Record intercepción
91	Madera aserrada				ORD 214	22-may	23-may	Mad. exportación	Pto. Montt	Soc. Cons. E Inm. Maisons Ltda.-Paritao Alto	IE
92	Madera embalaje				HE 300	07-jun	05-jun	Mad. embalaje	Pto. Montt	Transec	Record intercepción
93	Madera embalaje				ORD 565	14-jun	08-jun	Mad. embalaje	Valdivia	Saesa	Record intercepción
94	Madera embalaje				HE 621	15-may	10-may	Mad. embalaje	Pto. Montt	No indica procedencia	Record intercepción
95	Madera embalaje				ORD 565	14-jun	08-jun	Mad. Embalaje	Valdivia	Homecenter Sodimac	Record intercepción
96	Madera embalaje				HE 1897	22-jun	01-jun	Mad. Embalaje	Osorno	Easy	Record intercepción
97	Madera embalaje				HE 1897	22-jun	15-jun	Mad. Embalaje	Osorno	Construmart	Record intercepción
98	Madera embalaje				HE 1897	22-jun	01-jun	Mad. Embalaje	Osorno	Construmart	Record intercepción
99	Madera embalaje				HE 1897	22-jun	01-jun	Mad. Embalaje	Osorno	SODIMAC	Record intercepción
100	Madera embalaje				HE 1897	22-jun	01-jun	Mad. Embalaje	Osorno	SODIMAC	Record intercepción

Anexo 3

Secuencia gráfica y caracterización macroscópica
de muestras de maderas procesadas



Figura 1 y 2. Muestra de fainque (*Lomatia ferruginea*) con pudrición y orificios causados por *Psepholax dentipes*



Figura 3 y 4. Muestra de madera de embalaje con mancha y galerías provocadas por insectos del orden Coleoptera, familias Cerambycidae y Scolytidae



Figura 5 y 6. Muestra de ulmo (*Eucryphia cordifolia*) con mancha y pudrición; y con galerías causadas por *Psepholax dentipes*



Figura 7 y 8. Muestra de madera de embalaje sin pudrición ni mancha y con daño de insectos del orden Coleoptera, familia Cerambycidae

Muestra (Pudrición)

Descripción: Presenta Orificios redondos y galerías transversales a la fibra. Los orificios tienen una mancha de color negra a su alrededor. Además tiene manchas blancas-grises y la madera pareciera estar degradada como el efecto que producen los hongos de pudrición.

Muestra (Pudrición)

Descripción: Presenta orificios de forma circular, galerías de forma y longitud irregular (forma más bien alargadas, algunas más largas que otras) con aserrín compacto. Algunas galerías tienen una tonalidad café muy oscuro y en otras un tono más pardo. En un extremo de la muestra (sentido longitudinal) se puede apreciar un tono negruzco en la madera, alrededor de las galerías, es decir, en la madera en sí, no tan solo dentro de la galería. Desde afuera hacia el centro de la muestra se ve desde el color blanco pasando por distintas tonalidades de café hasta llegar a un café negruzco.

Muestra (Mancha)

Descripción: Esta muestra a diferencia de las otras presenta el ataque concentrado en un solo sector y en menor intensidad, con una galería central a partir de la que salían otras laterales, en este caso las galerías presentaban un calor notoriamente más negro en su interior, sólo alrededor del daño se ve la madera de un color más negro, pero todo el resto se ve blanco o aparentemente con daño más leve.

Muestra (pudrición y mancha)

Descripción: La madera presenta galerías irregulares, anchas, algunas con aserrín blanco, amarillo, café-grisáceo o de color anaranjado. En algunas galerías además de aserrín se ven astillas de la misma madera que están envueltas con el mismo aserrín. La madera se ve con manchas blanquecinas- grisáceas.

Muestra (Galerías con *Penicillium* sp.)

Descripción: Presenta orificios ovalados y en su interior se nota de un color verdoso, sin algún tipo de degradación o alteración física de la madera.

Anexo 4

Secuencia gráfica de medios generales de cultivo para
realizar aislamientos y medios específicos
para inducir la esporulación



Figura 1. Trozos de madera sembrados en placas Petri con medio de cultivo AEM



Figura 2. Trozos de madera sembrados en placas Petri con medio de cultivo PDA

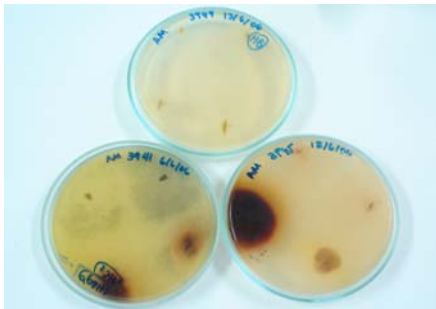


Figura 3. Colonias obtenidas a partir de los trozos de madera sembrados

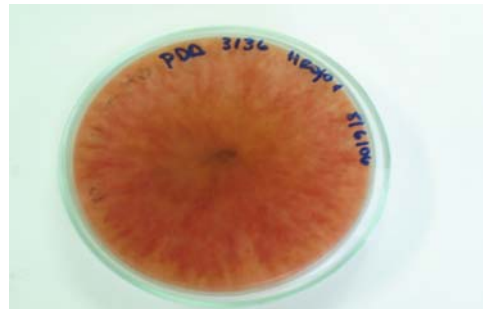


Figura 4. Colonia de *Fusarium culmorum* purificada



Figura 5. Colonia de *Clonostachys* sp. sembrada en agar aserrín



Figura 6. Hongo sembrado en probetas de madera

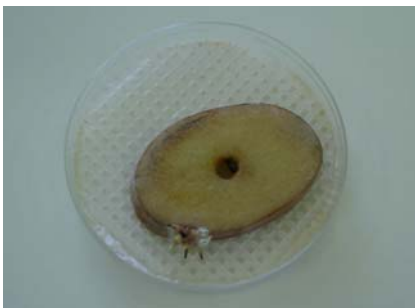


Figura 7. Hongo sembrado en rodaja de papa



Figura 8. Agar agua con tejido vegetal (acículas de pino)



Figura 9. Agar agua con tejido vegetal de (peciolos de maqui)



Figura 10. Medio Agar Clavel para identificación de especies de *Fusarium*

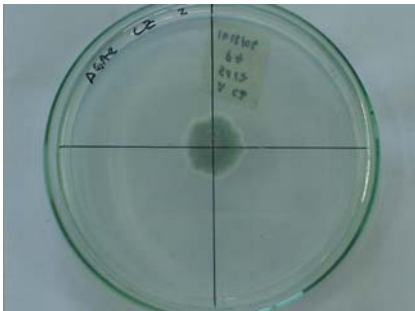


Figura 11. Medio Agar Czapeck para identificación de *Penicillium* spp.

Anexo 5

Secuencia fotográfica de las estructuras
de algunas de las especies de hongos identificadas

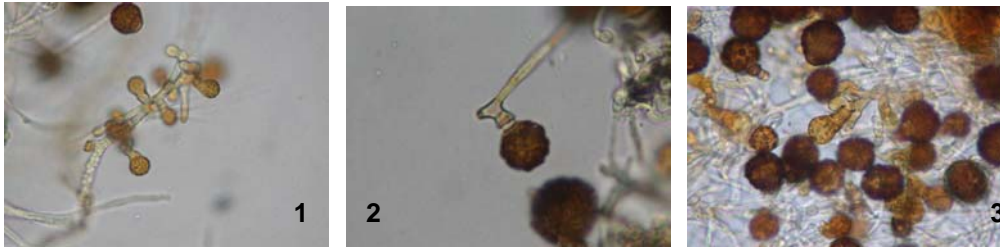


Figura 1. Conidióforo de *Epicoccum nigrum*; 2. y 3. Conidias de *E. nigrum*.

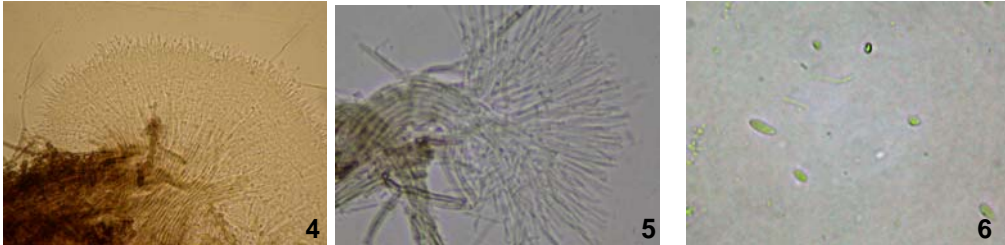


Figura 4 y 5. Sinematas de *Graphium* sp.; 6. Conidias de *Graphium* sp.



Figura 7. Conidióforo de probable *Penicillium nigricans*; 8. Conidias de probable *P. nigricans*

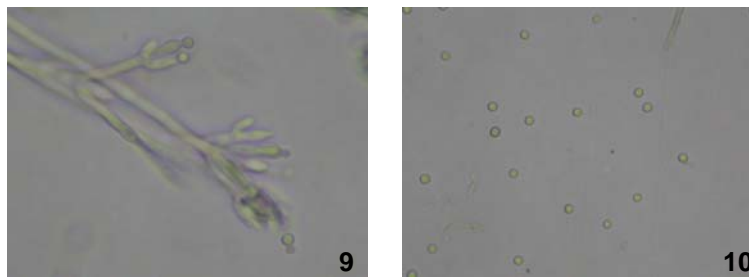


Figura 9. Conidióforo de probable *Penicillium griseofulvum*; 10. Conidias de probable *P. griseofulvum*

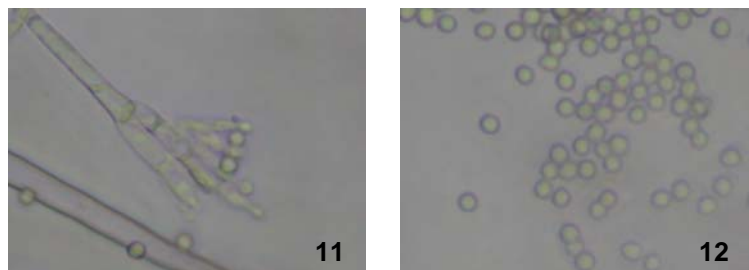


Figura 11. Conidióforo de probable *Penicillium spinulosum*; 12. Conidias de probable *P. spinulosum*

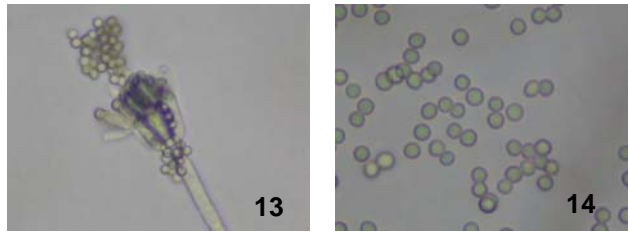


Figura 13. Conidióforo de probable *Penicillium simplicissimum*;
14. Conidias de probable *P. simplicissimum*

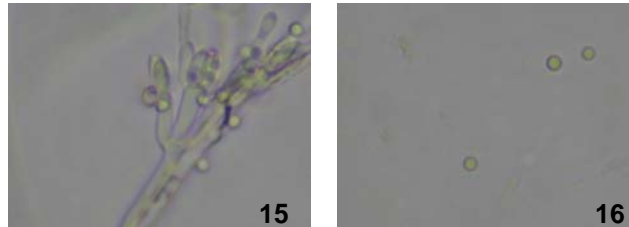


Figura 15. Conidióforo de probable *Penicillium crysogenum*;
16. Conidias de probable *P. crysogenum*

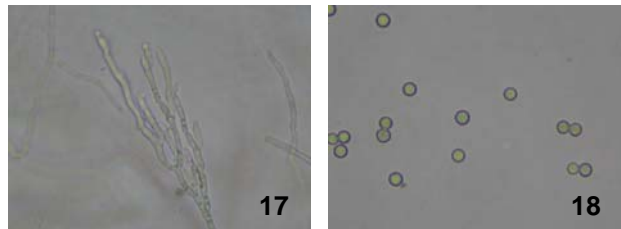


Figura 17. Conidióforo de probable *Penicillium jensenii*;
18. Conidias de probable *P. jensenii*

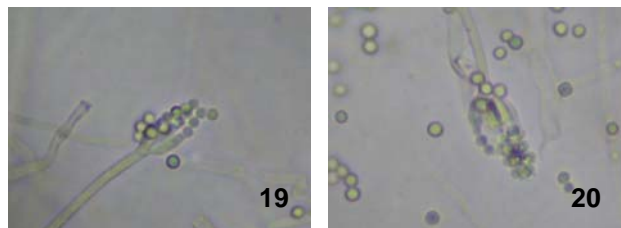


Figura 19. Conidióforo de probable *Penicillium waksmanii*;
20. Conidias de probable *P. waksmanii*



Figura 21 y 22. Conidióforo de probable *Cladosporium* sp.; 23. Conidias de probable *Cladosporium* sp.

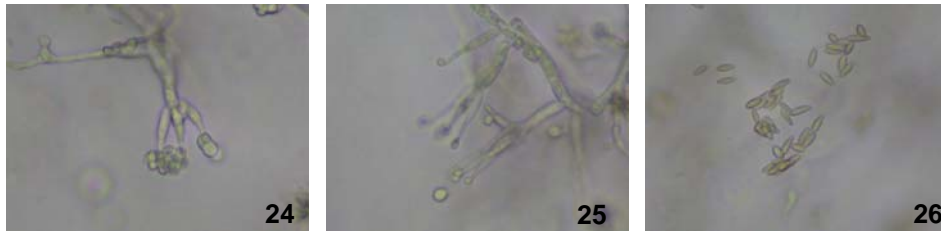


Figura 24 y 25. Conidióforos de *Paecilomyces* sp.; 26. Conidias de *Paecilomyces* sp.



Figura 27. Conidióforo de probable *Trichoderma longibraquiatum*; 28. Conidias de probable *T. longibraquiatum*; 29. Clamidosporas de probable *T. longibraquiatum*

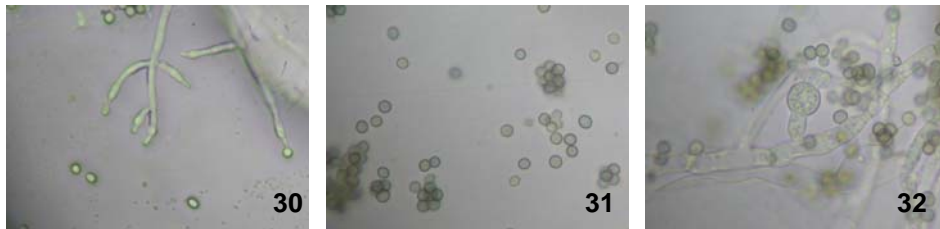


Figura 30. Conidióforos de probable *Trichoderma viride*; 31. Conidias de probables *T. viride*; 32. Clamidosporas de probable *T. viride*

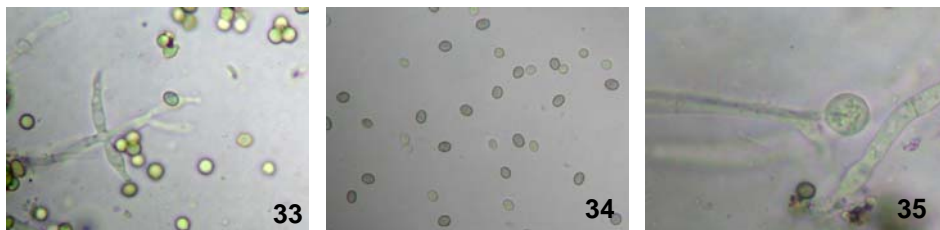


Figura 33. Conidióforo de probable *Trichoderma asperellum*; 34. Conidias de probable *T. asperellum*; 35. Clamidosporas de probable *T. asperellum*



Figura 36. Conidióforo de probable *Trichoderma atroviride*; 37. Conidias de probable *T. atroviride*; 38. Clamidosporas de probable *T. atroviride*

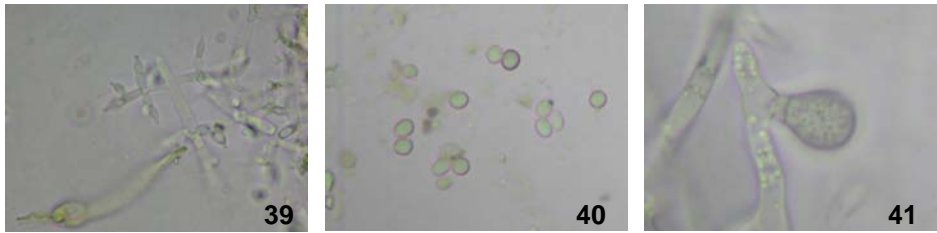


Figura 39. Conidióforo de probable *Trichoderma harzianum*; 40. Conidias de probable *T. harzianum*; 41. Clamidosporas de probable *T. harzianum*



Figura 42. Conidióforos de *Fusarium culmorum*; 43. Macroconidias de *F. culmorum*; 44. Clamidosporas de *F. culmorum*



Figura 45. Conidióforos de *Fusarium solani*; 46. Macroconidias de *F. solani*; 47. Clamidosporas y microconidias de *F. solani*

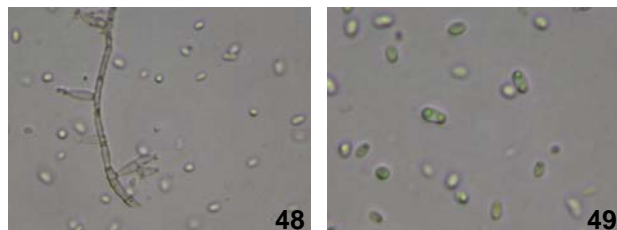


Figura 48. Conidióforo de *Phialophora* sp.; 49. Conidias de *Phialophora* sp.

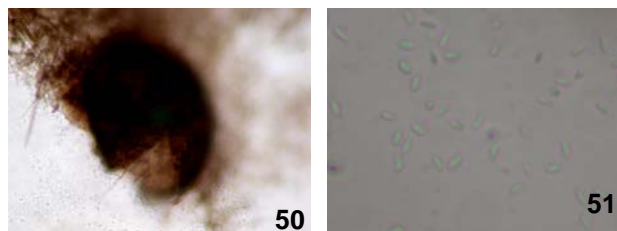


Figura 50. Picnidio de *Coniothyrium* sp.; 51. Conidias de *Coniothyrium* sp.

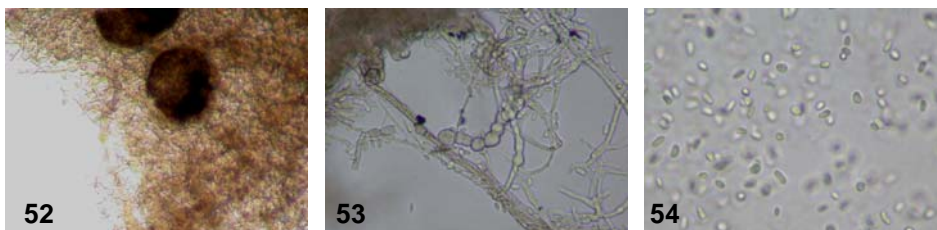


Figura 52. Picnidio de *Phoma* sp.; 53. Conidióforo de *Phoma* sp.; 54. Conidias de *Phoma* sp.

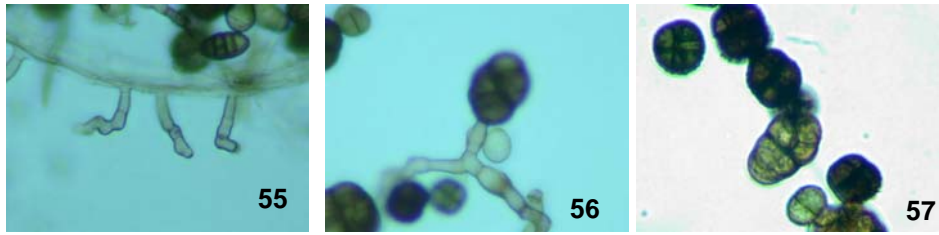


Figura 55. Conidióforo de *Ulocladium* sp.; 56 y 57. Conidias de *Ulocladium* sp.



Figura 58. Picnidio de *Diplodia* sp.; 59 y 60. Conidias de *Diplodia* sp.

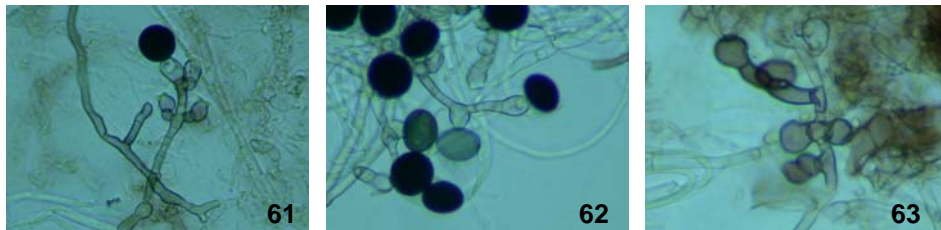


Figura 61, 62 y 63. Conidióforos y conidias de *Nigrospora sphaerica*

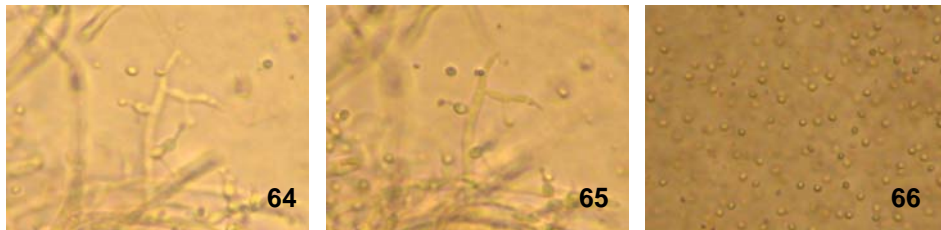


Figura 64 y 65. Conidióforos y conidia de *Baeuveria bassiana*; 66. Conidias de *B. bassiana*

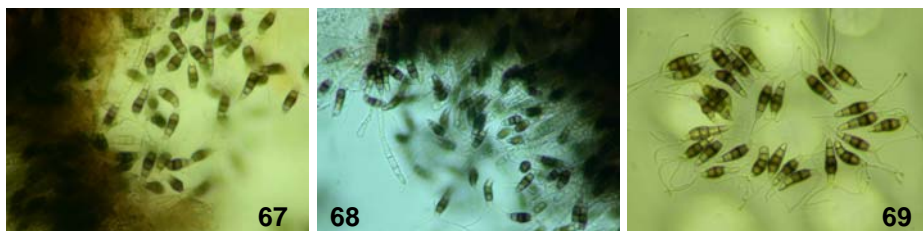


Figura 67 y 68. Acérvulos y conidias de *Pestalotiopsis* sp.; 69. Conidias de *Pestalotiopsis* sp.

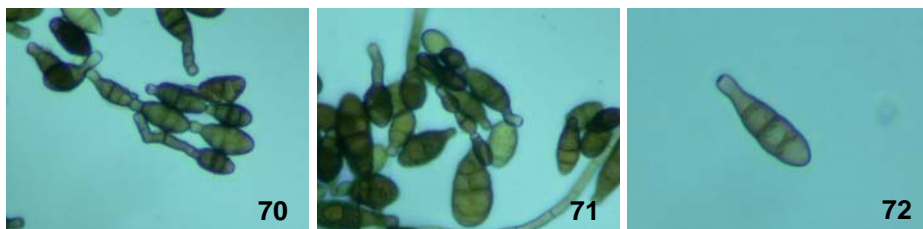


Figura 70. Conidióforo de *Alternaria alternata*; 71 y 72. Conidias de *A. alternata*



Figura 73. Estroma y conidias de *Hainesia* sp.

Anexo 6

Cuadro resumen con los registros del número de aislamientos
obtenidos en medios generales de cultivo
(AEM y PDA)

Número de aislamientos desarrollados en cada medio de cultivo general, con su respectivo insecto causante del daño o presente en las muestras analizadas.

Nº muestra	Presencia de insecto o daño provocado por el insecto	Nº aislamientos desarrollados en medio de cultivo		% colonias desarrolladas en PDA y AEM
		PDA	AEM	AEM
1	Daño y presencia Lep., Cossidae, <i>Chilecomadia valdiviana</i>	12	9	87,5
2	Daño Col., Cerambycidae	11	12	95,8
3	Presencia larva Col. Cerambycidae	5	6	45,8
4	Daño Col., Cerambycidae. Presencia larva Col., Curculionidae <i>Psepholax dentipes</i>	2	9	45,8
5	Daño Col., Cerambycidae	7	10	70,8
6	Daño Hym., Xyphidiidae(lar)	10	10	83,8
7	Daño Col., Scolytidae. Presencia <i>Gnathotrupes</i> sp.	3	3	25
8	Daño Col., Scolitidae, Col., Cerambycidae, Col. Curculionidae. Presencia larva y adulto <i>Psepholax dentipes</i>	10	0	41,6
9	Daño Col., Curculionidae. Presencia larva <i>Psepholax dentipes</i>	12	12	100
10	Daño Col., Cerambycidae. Presencia larva y adulto <i>Callisphyrus semicaligatus</i>	10	6	66,6
11	Daño Col., Cerambycidae, Col. Curculionidae. Presencia adulto <i>Psepholax dentipes</i>	10	11	87,5
12	Daño Col., Curculionidae. Presencia larva <i>Psepholax dentipes</i>	3	0	12,5
13	Daño Col., Cerambycidae	0	0	0
14	Daño Col., Scolytidae	8	9	70,8
15	Daño Col., Curculionidae. Presencia larva <i>Psepholax dentipes</i>	11	5	66,6
16	Daño Col., Curculionidae,. Presencia adulto <i>Psepholax dentipes</i>	4	1	20,8
17	Daño Col., Curculionidae. Presencia larva <i>Psepholax dentipes</i>	10	10	83,3
18	Daño Col., Curculionidae. Presencia restos de adultos <i>Psepholax dentipes</i>	12	12	100
19	Daño Col., Curculionidae. Presencia larva <i>Psepholax dentipes</i>	11	7	75
20	Daño Col., Curculionidae. Presencia restos de adultos <i>Psepholax dentipes</i>	7	11	75
21	Daño Col., Curculionidae. Presencia adulto <i>Psepholax dentipes</i>	12	12	100
22	Daño Col., Cerambycidae	10	11	87,5
23	Daño Col., Curculionidae. Presencia larva y adulto <i>Psepholax dentipes</i>	9	6	62,5
24	Presencia Collembola, Entomobryidae, sin daño	11	5	66,6

25	Daño Hym., Siricidae. Presencia adulto <i>Urocerus gigas</i>	10	5	62,5
26	Daño Col., Curculionidae. Presencia larva y adulto <i>Rhyephenes maillei</i>	8	11	79,1
27	Daño Isop., Termopsidae. Presencia obreros y soldados <i>Porotermes quadricollis</i>	4	1	20,8
28	Daño Isop., Termopsidae. Presencia obreros y soldados <i>Porotermes quadricollis</i>	11	11	91,6
29	Daño Lep., Cossidae. Presencia exuvio pupal <i>Chilecomadia valdiviana</i>	1	1	8,3
30	Presencia obreras Isoptera, Kalotermitidae, adultos muertos Col., Carabidae	4	2	25
31	Daño Col., Scolytidae	2	5	29,1
32	Daño Col., Cerambycidae y Col., Scolytidae. Presencia resto de larva muerta Col., Cerambycidae y Col., Scolytidae	1	1	8,3
33	Daño Col., Cerambycidae	12	12	10
34	Daño Col., Cerambycidae	11	12	95,8
35	Daño Col., Platypodidae*. Presencia pupa muerta Col., Cerambycidae	5	9	58,3
36	Daño Col., Scolytidae. Presencia resto de larva muerta Col., Scolytidae	10	10	83,3
37	Daño Col., Cerambycidae	4	4	33,3
38	Daño Col., Platypodidae. Presencia restos adultos Col., Platypodidae <i>Platypus</i> sp*.	11	11	91,6
39	Daño Col., Platypodidae*. Presencia resto larva Col., buprestidae. Restos Isoptera	11	12	95,8
40	Daño Col., Platypodidae. Presencia adulto muerto Col., Platypodidae*	5	7	50
41	Daño Col., Cerambycidae	0	0	0
42	Daño Col., Scolytidae. Presencia adultos muertos Col., scolytidae, <i>Xyleborus</i> sp.	3	1	16,6
43	Daño Col., Cerambycidae	12	12	100
44	Daño Col., Cerambycidae	1	7	33,3
45	Daño Col., Scolytidae. Presencia restos adulto Col., Scolytidae	0	0	0
46	Daño Col., Cerambycidae	10	9	79,1
47	Daño Col., Platypodidae. Presencia restos adulto Col., Platypodidae*	8	12	83,3
48	Daño Col., Lymexilidae	1	1	8,3
49	Daño Col., Scolytidae, Presencia <i>Xyleborus saxeseni</i>	12	11	95,8

50	Daño Col., Cerambycidae. Presencia larva muerta Col., Cerambycidae	7	4	45,8
51	Daño Col., Platypodidae. Presencia restos adulto Col., Platypodidae, <i>Platypus</i> sp.	12	0	50
52	Daño Col., Platypodidae. Presencia adulto muerto Col., Platypodidae*	12	9	87,5
53	Daño Col., Platypodidae. Presencia adulto muerto Col., Platypodidae*	0	0	0
54	Daño Col., Platypodidae. Presencia restos adulto Col., Platypodidae*	1	0	4,1
55	Daño Col., Platypodidae; Col., Scolytidae. Presencia restos Col, Platypodidae: <i>Platypus</i> sp.*; restos Col., Scolytidae <i>Xyleborus</i> sp.	11	5	66,6
56	Daño Col., Lyctidae. Presencia restos larva Col., Lyctidae	1	0	4,1
57	Daño Col., Scolytidae. Presencia restos Col., Scolytidae	0	4	16,6
58	Daño Col., Scolytidae. Presencia adulto Col., scolytidae	5	5	41,6
59	Daño Col., Platypodidae. Presencia restos Col., Platypodidae*	9	9	75
60	Daño Hym., Siricidae. Presencia restos exuvio larval <i>Urocerus</i> <i>gigas</i>	5	0	20,8
61	Daño Hym., Siricidae. Presencia macho adulto muerto <i>Sirex</i> <i>noctilio</i>	10	8	75
62	Daño Col., Cerambycidae. Presencia larva muerta Col., Cerambycidae	9	2	45,8
63	Daño Col., Scolytidae. Presencia restos adulto Col., Scolytidae	12	10	91,6
64	Daño Hym., Siricidae. Presencia restos larva <i>Sirex noctilio</i>	5	0	20,8
65	Daño Col., Cerambycidae. Presencia adulto Col., Cerambycidae	11	7	75
66	Daño Col., Cerambycidae. Presencia restos adulto.	12	11	95,8
67	Daño Col., Scolytidae	8	9	70,8
68	Daño Col., Cerambycidae	1	6	29,1
69	Daño Col., Buprestidae. Presencia larva muerta	11	12	95,8
70	Daño Col., Platypodidae. Presencia restos Col., Platypodidae*	10	7	70,8
71	Daño Col., Scolytidae: <i>Xyleborus</i> sp. Presencia adulto muerto.	3	5	33,3
72	Daño Col., Platypodidae. Presencia restos Col., Platypodidae*	2	4	25
73	Daño Col., Scolytidae	3	0	12,5
74	Daño Col., Cerambycidae	8	12	83,3
75	Negativo a insectos	7	7	58,3
76	Daño Col., Platypodidae*	0	0	0
77	Daño Col., Anobiidae. Presencia restos larva muerta Col., Anobiidae	8	11	79,1

78	Daño Col., Cerambycidae	0	4	16,6
79	Daño Col., Cerambycidae	2	4	25
80	Daño Col., Scolytidae: <i>Gnathotrupes</i> sp.	8	10	75
81	Daño Col., Platypodidae: <i>Platypus</i> sp.*	11	1	50
82	Daño Col., Scolytidae: <i>Gnathotrupes</i> sp.	12	9	87,5
83	Daño Col., Scolytidae. Presencia restos Col., Scolytidae	6	9	54,1
84	Daño <i>Ips</i> sp.	8	12	83,3
85	Daño Col., Cerambycidae. Presencia restos Col., Cerambycidae	11	8	79,1
86	Daño Col., Anobiidae: <i>Ernobius</i> sp.	6	11	70,8
87	Daño Col., Scolytidae: <i>Gnathotrupes</i> sp.	0	0	0
88	Daño Col., Cerambycidae. Presencia larva viva Col., Cerambycidae	0	0	0
89	Daño Col., Platypodidae*	0	10	41,6
90	Daño Col., Cerambycidae	1	0	4,1
91	Presencia restos cutícula <i>U. gigas</i>	3	1	16,6
92	Daño Col., Scolytidae	12	12	100
93	Daño Col., Platypodidae*	10	10	83,3
94	Daño Col., Scolytidae: <i>Xyleborus</i> sp	5	6	45,8
95	Daño Col., Cerambycidae	12	11	95,8
96	Presencia restos Col., Platypodidae*	12	12	100
97	Presencia larva viva Col., Cerambycidae	12	9	87,5
98	Presencia restos Col., Platypodidae*, Restos Col., Scolytidae	6	11	70,8
99	Daño Col, Scolytidae: <i>Trypodendron</i> sp.*	12	4	66,6
100	Presencia restos Col., Platypodidae*	8	0	33,3

*: Insectos muertos no presentes en Chile. Identificados en muestras interceptadas en controles fronterizos.