

Influencia de los medios de cultivo sobre la virulencia (*) de las cepas de hongos xilófagos

M. T. DE TROYA, A. NAVARRETE, R. DE LA VEGA y J. E. GARCÍA DE LOS RÍOS

Las Normas europeas que establecen la metodología a seguir para determinar la eficacia de productos fungicidas aplicados a la madera, fijan la utilización de una serie de cepas de especies de hongos, a la vez que proponen otros optativos y/o complementarios.

Los cultivos de estos hongos pueden perder la virulencia durante su permanencia en las micotecas, lo que llevaría a producir en su uso en la aplicación de la norma específica para determinar la eficacia de los fungicidas, resultados erróneos.

Por ello, en este trabajo se estudian la influencia que, diferentes medios de cultivo, tienen sobre la virulencia de las cepas de hongos que se conservan en las micotecas.

M. T. DE TROYA, A. NAVARRETE, R. DE LA VEGA y J. E. GARCÍA DE LOS RÍOS. Centro de Investigación Forestal, INIA, Apdo. 8111, 28080 Madrid. Universidad San Pablo, Urb. Montepríncipe, Boadilla del Monte, Madrid.

Palabras clave: Virulencia, hongos xilófagos.

INTRODUCCION

La integración de España en la Comunidad Económica Europea supone un gran esfuerzo en el campo de la adecuación y control de calidad de nuestros productos a las exigencias comunitarias.

El Comité Europeo de Normalización (CEN) se encarga desde hace años, de diseñar las normas necesarias para determinar la eficacia de los protectores de la madera contra los agentes xilófagos, en base a los trabajos cooperativos de diversos Centros de Investigación Europeos. Aparte de los insectos, los agentes bióticos más estudiados son los hongos de pudrición, basidiomicetos (Figuras 1 y 2) y ascomicetos xilófagos (Fi-

gura 3), y las normas actualmente vigentes para el estudio de la eficacia de productos protectores contra ellos son: la EN-113 «Determinación de la eficacia de protectores de madera contra hongos Basidiomicetos xilófagos cultivados en medio de agar», y las normas experimentales ENV-839 «Determinación de la eficacia preventiva contra hongos basidiomicetos xilófagos», y ENV-807 «Método de laboratorio para determinar la eficacia preventiva de un tratamiento de protección de la madera en contacto con el suelo, contra hongos de pudrición blanda y otros microorganismos».

Los textos de las tres normas añaden un anexo donde se detallan las técnicas de conservación de las cepas de hongos que obligatoriamente han de utilizarse; textualmente en sus apartados «Mantenimiento de las cepas», dice: «El mantenimiento de las cepas (periodicidad de las resiembras, alternancias de los medios de cultivo, etc.)

(*) Los autores entienden en este artículo, el término «virulencia» como «capacidad enzimática degradativa».



Fig. 1.—Madera atacada por hongos xilófagos causantes de pudrición fibrosa.

Fig. 2.—Madera atacada por hongos xilófagos causantes de pudrición cúbica.



Fig. 3.—Madera atacada por hongos xilófagos causantes de pudrición blanda.



debe hacerse según las indicaciones de los laboratorios de que proceden». Y en sus anexos correspondientes: «La conservación de los cultivos de origen ha de hacerse sobre un medio que contenga 2,0% de agar, 4,0 a 5,0% de extracto de malta y 1,0% de serrín en tubos en posición inclinada a temperatura de 6 a 10 °C. Las resiembras deben hacerse cada seis meses».

A pesar de que la metodología a seguir por los distintos Centros de Investigación que usan la normativa y las cepas de las especies a ensayar son las mismas, se han obtenido resultados diferentes debido a la pérdida de virulencia que presentan estos hongos a lo largo del tiempo (DIROL, 1986; KERNER, 1986; NAVARRETE y TROYA, 1986). Esta pérdida de virulencia pudiera ser debida a una inhibición metabólica de las enzimas degradativas, al ser mantenidos los hongos en cultivos artificiales de agar-malta, y no ponerlos en contacto periódicamente con su sustrato natural, la madera.

Por todo ello, el objetivo de este trabajo ha sido estudiar la influencia de variaciones de los ingredientes de los medios de cultivo (agar, malta y serrín), en el mantenimiento de la virulencia de los hongos más comúnmente utilizados en las normas mencionadas, con el fin de seleccionar la combinación que ofrece mejores condiciones para la conservación de la micoteca y para su posterior uso en los ensayos de eficacia fungicida.

MATERIAL Y METODOS

Las especies de hongos utilizadas fueron: *Gloeophyllum trabeum* (Persoon ex Fries) Murrill., cepa BAM 109, y *Postia placenta* (Fries) M. J. Lars. et Lomb., cepa FPRL 280, especies causantes de pudrición cúbica; *Trametes versicolor* (L.: Fries) Lloyd, cepa CTB 863 A, productor de la pudrición fibrosa; y *Chaetomium globosum* Kunze, cepa 1A CTFT, una de las especies más virulentas que causan la pudrición blanda.

Los medios de cultivo ensayados fueron (Figura 4):

- Medio A: Agar-malta (agar 2,0%, malta 4,0%) con serrín de pino o haya, mezclados en condiciones estériles.
- Medio B: Agar-malta (agar 2,0%, malta 4,0%), con serrín de pino o haya, repartido sobre la superficie del medio.
- Medio C: Agar-malta (agar 2,0%, malta 4,0%), sin serrín.

El serrín para las especies causantes de pudrición cúbica se hizo a partir de albura de *Pinus sylvestris* L., y para las especies productoras de las pudriciones fibrosa y blanda, a partir de madera de *Fagus sylvatica* L.

Los hongos procedentes de la micoteca se sembraron en placas Petri con agar-malta (agar 2,0%, malta 4,0%), y se dejaron incubar a 22 ± 2 °C de temperatura y 65 ± 5 % de humedad relativa. Una vez desarrollados, en estas condiciones, se tomaron inóculos del micelio de avance que fueron sembrados en tubos de ensayo conteniendo los medios de cultivo, A, B y C, descritos, y dejándolos incubar en las mismas condiciones que en la siembra anterior.

Se hicieron tres reinoculaciones cada 28 días en los mismos medios, y una vez finalizado el último período de incubación se transfirió cada cultivo a placas Petri de agar-malta (agar 2,0%, malta 4,0%) durante otros 28 días. Los hongos se sembraron en los recipientes de cultivo sobre agar-malta (agar 2,0%, malta 4,0%) descritos en la normativa, a partir del micelio de avance de dichas placas. Una vez cubierta la superficie del medio, se pusieron en contacto con probetas (50 × 25 × 15 mm) de albura de *Pinus sylvestris* L. las cepas productoras de pudrición cúbica, y de *Fagus sylvatica* L. las causantes de las pudriciones fibrosa y blanda.

El número de repeticiones fue de ocho, para cada medio de cultivo y hongo.

La virulencia de las cepas sembradas en cada tipo de medio, se evaluó mediante el porcentaje de pérdida de peso sufrido por las probetas tras 16 semanas de incubación en las mismas condiciones de humedad y temperatura seguidas a lo largo del ensayo.

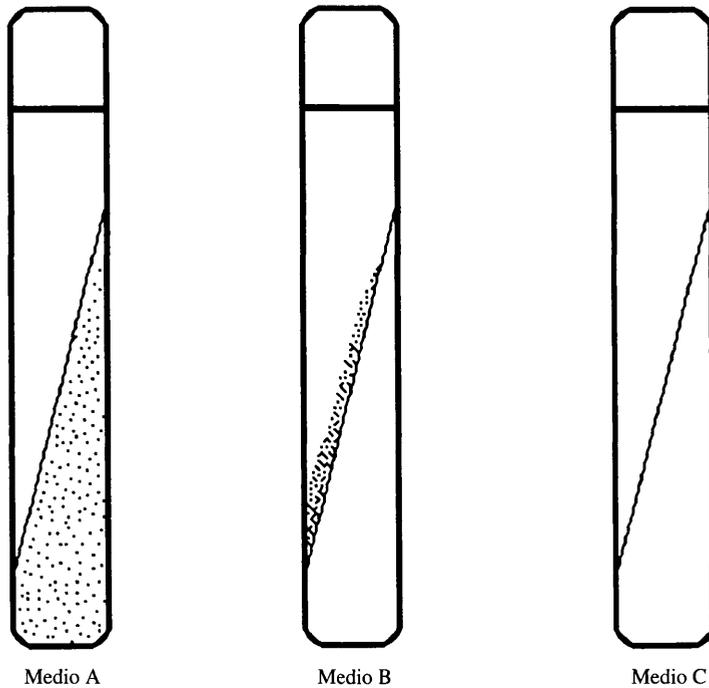


Fig. 4.—Disposición del serrín para los medios A, B y C en los tubos de ensayo.

RESULTADOS

Las medias y desviaciones típicas de los porcentajes de pérdida de peso para cada hongo y medio de cultivo se recogen en el Cuadro 1, y vienen reflejados en la Figura 5.

En la tabla de resultados destacan las bajas pérdidas de peso producidas por el *Chaetomium globosum*. Este hecho es debido al tipo de pudrición producida por este hongo, que origina una degradación superficial intensa, cuya profundización en la ma-

Cuadro 1.—Valores medios y desviaciones típicas de las pérdidas de peso (%) sufridas por las probetas tras el ataque de los hongos previamente desarrollados en los medios de cultivo A, B y C

Hongo	Pérdida de peso de las probetas (%)					
	A		B		C	
	Media	Desviación típica	Media	Desviación típica	Media	Desviación típica
<i>P. placenta</i>	4,20	0,9	15,30	1,1	30,70	1,3
<i>G. trabeum</i>	25,20	1,4	27,40	1,9	29,50	1,6
<i>T. versicolor</i>	30,57	3,5	29,64	4,4	29,79	6,8
<i>C. globosum</i>	1,45	0,7	0,96	0,1	1,02	0,2

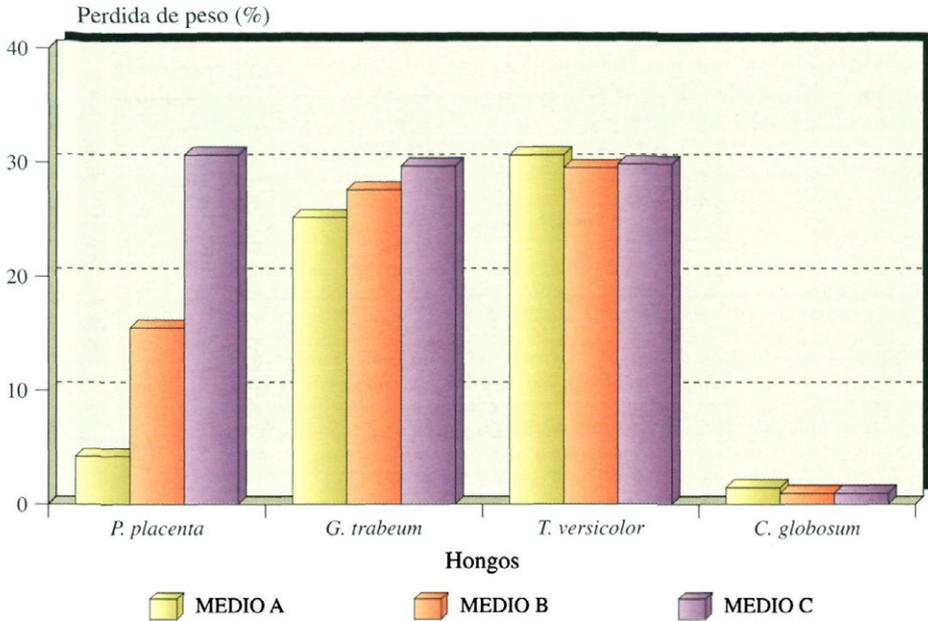


Fig. 5.—Medias de los porcentajes de las pérdidas de peso sufridas por las probetas de madera tras el ataque de los hongos desarrollados en los medios A, B y C

dera es más lenta que para el resto de las pudriciones.

CONCLUSIONES

Las pérdidas de peso sufridas por las probetas de madera en los tres medios de cultivo ensayados, han puesto de manifiesto que no existe ningún medio sobre el que, los cuatro hongos estudiados posean una virulencia marcadamente superior a la que presentan sobre los otros dos medios.

No obstante, con el que se obtienen los resultados más satisfactorios es el agar-malta (C). En efecto, para el *Trametes versicolor* y el *Chaetomium globosum* no se aprecian diferencias de comportamiento sobre los tres sustratos, para el *Gloeophyllum trabeum* las pérdidas de peso son ligeramente superiores cuando se utiliza agar-malta, y para la *Postia placenta*, las pérdi-

das de peso obtenidas sobre este medio son dobles de las obtenidas utilizando el serrín de pino repartido sobre la superficie del agar-malta (B), y siete veces superiores a las correspondientes al serrín mezclado con el agar-malta (A).

Estos resultados corroboran la tesis sostenida por gran número de investigadores, de volver a exigir el agar-malta sin serrín, tradicionalmente utilizado en los cultivos de hongos xilófagos en laboratorio, como medio de cultivo para el mantenimiento en las micotecas de los hongos utilizados en la aplicación de las normas de ensayo para la determinación de la eficacia fungicida de los protectores de la madera.

El hecho de que no existan para todos los hongos estudiados diferencias significativas en las pérdidas de peso obtenidas en función del sustrato utilizado, parece indicar que en la pérdida de virulencia que experimentan las cepas mantenidas en micotecas, intervie-

nen otros elementos, como pueden ser la temperatura (NAVARRETE y TROYA, 1986), las atmósferas contaminadas, la humedad relativa, etc.; que podrían llegar a ser factores limitantes de la actividad fúngica.

No obstante, es un hecho que la virulencia de las cepas de los hongos xilófagos, se recupera poniendo en contacto el hongo en cuestión con su sustrato natural, la madera (TROYA y NAVARRETE, 1992).

ABSTRACT

TROYA, M. T. DE; NAVARRETE, A.; VEGA, R. DE LA y GARCÍA DE LOS RÍOS, J. E., 1995: Techniques of conservation of a micoteque. Influence on the virulence of wood decay fungi strains. *Bol. San. Veg. Plagas*, 21(3): 439-445.

The European Standarization about the effectiveness of the fungicides products demand the utilization of certain fungal strains for the determination of the toxic values of the preservatives. These fungi can be susceptible to loose their virulence during the time if the fungi collection is not mantained according the guides gives in the Standards. For this, in this work the conservation techniques of the fungi collection, as well as the influence that the different inoculation systems and culture media can interfere on the virulence of the strains, are defined.

Key words: Virulence, wood decay fungi.

REFERENCIAS

- ANÓNIMO, 1986: EN-113. Determiantion of toxic values of wood preservatives against wood destroying basidiomycetes cultured on an agar medium. European Committee for Standarization, Bruselas.
- ANÓNIMO, 1993: ENV-807. Determination of toxic effectiveness against soft rotting micro-fungi and other soil inhabiting micro-organisms. European Committee for Standarization, Bruselas.
- ANÓNIMO, 1993: ENV-839. Determination of the preventive efficacy against wood destroying basidiomycete fungitoxic effectiveness against soft rotting micro-fungi and other soil inhabiting micro-organism. European Committee for Standarization, Bruselas.
- DIROL, D., 1986: Virulence tests with fungal strains used in EN-113 CEN ring test. Results with *Coniophora puteana* (Schum ex Fr.) Karst. *Int. Res. Gr. on Wood Preserv. Doc.*, n.º 2.249.
- KERNER, W., 1986: Virulence testing of cultures of different origins of the test fungus *Coriolus versicolor* strain CTB-863 A. *Int. Res. Gr. on Wood Preserv. Doc.*, n.º 2.267.
- NAVARRETE, A. y TROYA, M. T., 1986: Temperature influence on the growing velocity and cellulolytic activities of *Poria placenta* strains from several locations. *Int. Res. Gr. on Wood Preserv. Doc.*, n.º 2.263.
- TROYA, M. T. y NAVARRETE, A., 1992: Nota sobre análisis de la virulencia de *Coniophora puteana* (Schumacher ex Fries) Karsten, *Gloeophyllum trabeum* (Persoon ex Fries) Murrill y *Postia placenta* (Fr.) M. J. Lars. et Lomb. en diferentes medios de cultivo. *Investigación Agraria, Sistemas y recursos Forestales*, 1(1): 103-105.

(Aceptado para su publicación: 21 febrero 1995)