



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

CAMPUS IZTACALA

**“ESTUDIO COMPARATIVO DE PRUEBAS PARA
DETERMINAR TIPO DE PUDRICION DE HONGOS
XILOFAGOS”**

T E S I S
Que para obtener el Título de:
B I O L O G A
p r e s e n t a
ROSA VERONICA VIVANCO CHAVEZ



**DIRECTOR DE TESIS
M. en C. Luis Manuel Pinzón Picaseño**

Los Reyes, Iztacala

1994



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

CAMPUS IZTACALA

"ESTUDIO COMPARATIVO DE PRUEBAS PARA DETERMINAR
TIPO DE PUDRICION DE HONGOS XILOFAGOS"

R E P O R T E : D E T E S I S .

A L U M N A : P . de B . ROSA VERONICA VIVANCO CHAVEZ

No . C U E N T A : 8230800-9

D I R E C T O R : M . EN C . LUIS MANUEL PINZON PICASENO

1994

A TI, porque siempre estás conmigo....

A ROBERTO, porque el agradecimiento así como el amor, se dice, se siente y se comparte.

A MIS HERMANOS, porque las batallas no se ganan cuando no se lucha.

A ALEJANDRO, porque a pesar de tu corta edad, me identifico contigo y me ayudas aún sin saberlo a seguir adelante.

A TODAS AQUELLAS PERSONAS, que de una manera u otra me ayudaron a llegar a esta meta, de manera especial a mi compañera Ma. Elena Ruíz Rodríguez y a mi profesora Irene Frutis Molina.

DEDICO ESTA TESIS CON TODA MI HUMILDAD PERO TAMBIEN CON TODO MI
RESPECTO Y ORGULLO **A MI MADRE**, POR HABERME DADO LA VIDA Y POR
ENSEÑARME, AUN SIN PROPONERSELO, A SER VALIENTE Y TENAZ.

Mi más sincero agradecimiento al M. en C. Luis M. Pinzón-Picaseño por haber dirigido esta tesis, por su tiempo, enseñanza, confianza y amistad.

" El tiempo de cosechar con éxito lo sembrado no llega nunca para los cobardes y los mediocres "

GRACIAS.

Finalmente, deseo expresar mi agradecimiento al Laboratorio de Biodeterioro y Preservación de Productos Forestales, Departamento de Botánica, Instituto de Biología, UNAM, por las facilidades otorgadas para la realización del presente estudio.

CONTENIDO

1. RESUMEN	4
2. INTRODUCCION	5
2.1 Generalidades y Antecedentes	5
2.1.1 Los hongos xilófagos, definición e importancia	5
2.1.2 Requerimientos fisiológicos y ambientales de los hongos xilófagos	5
2.1.3 Tipos de pudrición	7
2.1.4 Acción enzimática sobre la madera	9
2.1.5 Importancia del tipo de pudrición y de las pruebas de laboratorio	12
2.1.6 Historia del desarrollo de pruebas de laboratorio para diferenciar el tipo de pudrición	13
2.1.7 Estudios realizados en México	20
2.2 Objetivos y finalidades	22
3. MATERIALES Y METODOS	23
3.1 Procedencia de los hongos para ensayo	23
3.2 Obtención de suficiente inóculo	23
3.3 Pruebas para determinar el tipo de pudrición	24
3.3.1 Método de cultivo de Bavendamm (1928) en extracto de malta agar con ácidos gálico y tánico	24
3.3.2 Método de cultivo de Preston-McLennan (1948) en extracto de malta agar con colorantes rojo neutro y violeta de genciana	25
3.3.3 Método de cultivo de Jorgensen-Vejlby (1953) en extracto de malta agar con extracto de col roja (Col I)	26
3.3.4 Método de cultivo modificado de Jorgensen-Vejlby en extracto de malta agar con extracto de col roja, (Col II)	28
3.3.5 Método de cultivo de Badcock (1964) con aserrín de pino y de liquidámbar	28
3.3.6 Método de cultivo de Ruiz Rodríguez y Pinzón Picaseño (1986) en extracto de malta agar con aserrín-guayacol	29
4. RESULTADOS Y DISCUSION	32
4.1 Prueba de Bavendamm	32
4.1.1 Acido gálico	32
4.1.2 Acido tánico	34
4.2 Prueba de Preston-McLennan	39
4.2.1 Rojo neutro	39
4.2.2 Violeta de genciana	43

4.3 Prueba de Jorgensen-Vejlby (Col I)	47
4.4 Prueba modificada de Jorgensen-Vejlby (Col II)	50
4.5 Prueba de Badcock	54
4.5.1 Aserrín de pino	54
4.5.2 Aserrín de liquidámbar	58
4.6 Prueba de Ruiz Rodríguez-Pinzón Picaseño (aserrín- guayacol)	65
4.7 Análisis comparativo	69
5. CONSIDERACIONES FINALES	75
6. LITERATURA CONSULTADA	78

1. RESUMEN

El presente trabajo comprendió la recopilación bibliográfica de trabajos dispersos sobre metodologías para la determinación del tipo de pudrición que causan los hongos xilófagos, la selección de aquellas técnicas que por su factibilidad fueran las más adecuadas y ensayarlas experimentalmente de una manera comparativa, estimando su confiabilidad, sencillez metodológica y economía, pretendiendo recomendarlas como herramientas útiles para la obtención de este tipo de información.

Se ensayaron 6 métodos, 3 de ellos con dos variantes, es decir, un total de 9 posibilidades o variantes:

- Prueba de Bavendamm (ACIDO GALICO),
- Prueba de Bavendamm (ACIDO TANICO),
- Prueba de Preston-McLennan (ROJO NEUTRO),
- Prueba de Preston-McLennan (VIOLETA DE GENCIANA),
- Prueba de Jorgensen-Vejlby (COL I),
- Prueba modificada de Jorgensen-Vejlby (COL II),
- Prueba de Badcock (ASERRIN DE PINO),
- Prueba de Badcock (ASERRIN DE LIQUIDAMBAR),
- Prueba de Ruiz Rodríguez-Pinzón Picaseño (ASERRIN-GUAYACOL).

En todos los casos se utilizaron 5 hongos de pudrición blanca y 5 hongos de pudrición morena para comparar las reacciones respectivas. Los métodos consistieron básicamente en observar la ocurrencia de cambios en la coloración del sustrato o del reactivo, ocasionados por la reacción de éstos con los productos enzimáticos fungales propios a cada tipo de pudrición.

Fue calculado un índice porcentual de confiabilidad para cada variante y fueron analizadas las ventajas y desventajas técnicas propias de cada uno de los métodos. La prueba de Ruiz Rodríguez-Pinzón Picaseño (aserrín-guayacol) resultó ser la más confiable, con un índice de 100%; la prueba de Jorgensen-Vejlby en sus 2 variantes (Col I y Col II), así como la prueba de Badcock con aserrín de pino, calificaron con un índice de 90% de confiabilidad; por lo cual, estas 4 posibilidades son ampliamente recomendadas para determinar el tipo de pudrición que causan los hongos xilófagos. La prueba de Badcock con aserrín de liquidámba y las 2 variantes de la prueba de Preston-McLennan (rojo neutro y violeta de genciana), así como la prueba de Bavendamm en su variante con ácido gálico, alcanzaron un 70% de confiabilidad, mientras que la prueba de Bavendamm en su variante con ácido tánico obtuvo el menor índice con 60%, por lo que no son recomendadas.

Finalmente, los resultados obtenidos son confrontados con los de pruebas similares, se discute la problemática de la interpretación de resultados, así como posibilidades de aplicación de las variantes recomendadas y se plantean opciones para futuros ensayos.

2. INTRODUCCION

2.1 Generalidades y Antecedentes.

2.1.1 Los hongos xilófagos, definición e importancia.

Los hongos xilófagos difieren de otros organismos fúngicos, por su capacidad enzimática para degradar tejidos lignocelulósicos, como los constituyentes estructurales de la madera, utilizando las paredes celulares de los tejidos y las sustancias almacenadas en las cavidades celulares, como almidones, azúcares, etc. (Hunt y Garrat, 1962; Tsoumis, 1968). A la alteración que causan estos organismos se le llama pudrición de la madera.

Los hongos xilófagos son importantes biológicamente por participar en el reciclaje de elementos en la biósfera y económicamente por causar deterioro en la madera en uso, en almacenamiento o en el árbol. Aunque localmente algunos insectos pueden causar grandes pérdidas, a nivel global los hongos xilófagos son los principales agentes biodegradadores y biodeterioradores de la madera.

2.1.2 Requerimientos fisiológicos y ambientales de los hongos xilófagos.

Los hongos xilófagos requieren de condiciones adecuadas para su desarrollo y aunque éstas son amplias, variando inclusive de una especie a otra, sus requerimientos esenciales son: disponibilidad de alimento, grado suficiente de humedad, aporte de oxígeno y una temperatura favorable. Una variación o supresión de alguno o varios de éstos requerimientos, puede alterar o inhibir su desarrollo e inclusive eliminarlos (Davidson, 1960; Hunt y Garrat, 1962; Tsoumis, 1968; Panshin y De Zeeuw, 1970).

La celulosa, las hemicelulosas y la lignina son los compuestos más utilizados por los hongos xilófagos, los cuales secretan enzimas para degradar dichos nutrientes, convirtiéndolos en compuestos simples, solubles y fácilmente asimilables. Los azúcares del tipo hexosas son los más consumidos y dentro de éstos, la glucosa, aunque en su ausencia, son capaces de utilizar una amplia variedad de carbohidratos como la fructosa y la manosa (Cartwright y Findlay, 1958; Henningson, 1965; Hudson, 1972).

En cuanto al contenido de humedad en la madera, éste ha sido considerado como el factor regulador del desarrollo de los hongos más importante (Tsoumis, 1968). Sin embargo, es difícil determinar el óptimo de humedad para el crecimiento de estos organismos, ya que ellos producen una considerable cantidad de agua, como resultado de la descomposición química de la madera. Se ha observado un buen desarrollo, cuando el contenido de humedad está por arriba del punto de saturación de la fibra (punto en el que las cavidades celulares están exentas de humedad, mientras que las paredes están totalmente saturadas), es decir, alrededor de 35% a 50% del peso seco de la madera (Cartwright y Findlay, 1958).

Los hongos xilófagos, igual que otros organismos, obtienen su energía por el proceso de respiración, intercambiando CO_2 (bióxido de carbono) por oxígeno, siendo capaces de tolerar una baja presión de éste último, pero son esencialmente organismos aerobios (Findlay, 1967; Panshin y De Zeeuw, 1970).

Existe una relación natural entre la cantidad de agua o humedad en la madera y la proporción de oxígeno que ésta contenga, con la capacidad de los hongos para producir pudrición, ya que la madera con un bajo grado de humedad retarda el proceso de pudrición al disminuir la difusión enzimática; y si la madera está totalmente saturada de agua, carece de aire suficiente para el intercambio gaseoso y los hongos se inhiben o mueren (Hunt y Garrat, 1962).

Por lo que respecta a la temperatura, existe una óptima, donde cada especie de hongo se desarrolla rápidamente y una temperatura máxima y otra mínima donde su crecimiento es ínfimo. El óptimo de temperatura para muchas especies de hongos xilófagos es de 25-30 °C . Una temperatura por abajo o por arriba de éstos límites, puede no matar al organismo, pero sí retardar su desarrollo, obteniéndose un mayor efecto letal con altas temperaturas que con las bajas (Cartwright y Findlay, 1958; Henningsson, 1965; Tsoumis, 1968; Panshin y De Zeeuw, 1970).

2.1.3 Tipos de Pudrición.

Los hongos xilófagos pueden producir 3 tipos básicos de pudrición de la madera: *pudrición blanca*, *pudrición morena* y *pudrición suave*, de acuerdo a su actividad enzimática e inducción de cambios en coloración y consistencia de la madera, así como a la forma de penetración hifal de las paredes celulares.

La *pudrición blanca* es causada principalmente por hongos basidiomicetes y algunos grupos de ascomicetes, los cuales degradan principalmente lignina, aunque también celulosa y hemicelulosas. En estadios iniciales, ocurre un oscurecimiento de la madera, que luego va decolorándose al paso del tiempo, y simultáneamente van formándose unos trazos oscuros caprichosos (que son capas pseudoesclerociales) llamados líneas zonales, para finalmente convertirse en una blanda masa esponjosa o fibrosa (Tsoumis, 1968; Panshin y De Zeeuw, 1970; Manion, 1981).

Los hongos de pudrición blanca atacan tanto a madera de gimnospermas como de angiospermas, penetrando a los elementos celulares vía punteaduras de las células o directamente a través de la pared celular, gracias a la secreción de enzimas (Wilcox, 1965; Highley, 1979). Producen una erosión gradual de todos los constituyentes de la pared celular, formando cavidades, algunas veces mayores que el diámetro de las hifas. De la estructura de la

pared celular, la capa S₃ es degradada primero y progresivamente las capas S₁ y S₂ (Panshin y De Zeeuw, 1970).

El segundo tipo, la *putridión morena*, está comúnmente asociada con la madera de gimnospermas (aunque se llega a encontrar también en la de angiospermas), y es causada por hongos basidiomicetes, que degradan primero la celulosa y las hemicelulosas de las paredes celulares, dejando porciones de lignina casi intacta (Panshin y De Zeeuw, 1970; Manion, 1981). La madera se torna paulatinamente de un color café oscuro, y en los estadios finales es quebradiza y con la apariencia de una tapia de ladrillos oscuros o de cubos carbonizados, fácilmente desmenuzables con los dedos (Cartwright y Findlay, 1958; Boyce, 1961).

Las hifas de estos hongos penetran las paredes celulares transversalmente a través de las punteaduras o por formación directa de perforaciones y cavidades (Hardie, 1980). Dichas hifas proliferan en los lúmenes de las células, desde donde liberan enzimas que se difunden por toda la pared secundaria (Wilcox, 1965; Highley y Kirk, 1979). En madera de angiospermas, atacan carbohidratos en la capa S₂, luego en la S₁ y finalmente en la S₃, dejando casi intactos a los componentes de la lámina media. Sin embargo, en la madera de gimnospermas, las 3 capas de la pared secundaria son atacadas simultáneamente (Panshin y De Zeeuw, 1970).

Por último, la *putridión suave* es caracterizada por un ablandamiento y desgaste superficial de la madera expuesta a humedad persistente, en algunos casos, la madera se oscurece y fragmenta cuando se seca (Savory, 1954; Levy, 1965). Los hongos involucrados son grupos de ascomicetes y hongos imperfectos que degradan principalmente celulosa, dejando a la lignina casi intacta en la pared secundaria (Findlay, 1967; Tsoumis, 1968; Manion, 1981).

Este tipo de pudrición se presenta tanto en gimnospermas como angiospermas, pero en estas últimas, el daño es más extenso y rápido, atacando preferencialmente fibras. En cualquier caso, es degradada básicamente la capa S₂. En general, las hifas de estos hongos producen en las paredes celulares cavidades paralelas a las microfibrillas celulósicas de la madera, encontrándose confinadas a la capa S₂ de la pared secundaria (Savory, 1954; Levy, 1965; Scheffer y Cowling, 1966; Panshin y De Zeeuw, 1970).

Se han descrito los tres tipos básicos de pudrición que pueden ser causados por toda la gama de hongos xilófagos, para no dejar incompleto el tema y evitar así posibles dudas con respecto a su clasificación o de sus diferencias, pero es conveniente aclarar que la temática del presente trabajo y de la principal literatura consultada se refiere exclusivamente a dos tipos de pudrición, la blanca y la morena causadas por basidiomicetes.

2.1.4 Acción enzimática sobre la madera.

Los hongos xilófagos pueden causar pudriciones, gracias a su capacidad de secretar enzimas que penetran el complejo lignina-holocelulosa de las paredes celulares de la madera, característica exclusiva de algunos grupos de basidiomicetes, de ascomicetes y de hongos imperfectos. Para comprender esta acción sobre la madera, es necesario aclarar cómo está constituido dicho complejo, así como las variantes que se presentan en los distintos tipos de pudrición:

La celulosa es una gran cadena de polímeros lineales de aproximadamente 10,000 unidades de glucosa (ó 5000 unidades de celobiosa) unidas con enlaces β -1,4 glucosídicos. Varias cadenas se pueden unir por puentes de hidrógeno, formando celulosa cristalina, alternando con zonas de celulosa amorfa (no cristalina), en las que están asociados depósitos de hemicelulosas. Esta organización forma las microfibrillas

helicoidales de la pared celular que presentan un ángulo con orientación específica entre las diferentes capas de la pared celular (Panshin y De Zeeuw, 1970).

Al estudiar la degradación de celulosa causada por hongos de pudrición blanca, se han detectado varios grupos enzimáticos involucrados: las enzimas del grupo C₁ así como enzimas C_x (endo-1,4-β-glucanasa) causan hidrólisis de los enlaces 1,4-β-glucosídicos que unen las cadenas de celulosa cristalina produciendo polímeros cortos (Eriksson, Pettersson y Westermarck, 1975; Manion, 1981). Por otra parte la superficie expuesta de celulosa no reducida puede ser entonces hidrolizada por otra enzima C_x (exo-1,4-β-glucanasa) produciendo celobiosa, la cual puede ser dividida a glucosa por una β-glucosidasa (Eriksson, 1978, citado por Highley, 1979; Manion, 1981). También se ha detectado la oxidación de celobiosa por 2 vías: en presencia de una hemoproteína, la oxidasa-celobiosa, requiriendo de oxígeno como aceptor de electrones, y por la celobiosa-quinona oxidoreductasa, donde quinones o radicales fenoxi sirven como aceptores de electrones, obteniéndose como producto por ambas enzimas celobiono-μ-lactona; donde una glucosa-oxidasa ha sido implicada en el proceso total oxidando glucosa a gluconolactona (Eriksson, Pettersson y Westermarck, 1975; Eriksson, 1978, citado por Highley, 1979).

Los hongos de pudrición morena pueden utilizar dos sistemas de degradación de celulosa, uno enzimático con celulasas convencionales que rompen las uniones glucosídicas, aunque su actividad es mínima en la celulosa cristalina insoluble, junto con la enzima carboximetil-celulasa que degrada la celulosa soluble. Un segundo mecanismo no es enzimático sino un sistema de peróxido de hidrógeno y hierro (H₂O₂/Fe⁺⁺), ya que estos organismos producen suficiente peróxido para degradar celulosa con hierro presente en la madera, penetrando la microestructura de la pared celular secundaria, hidrolizando las uniones glucosídicas de la

celulosa o predisponiéndola para que sea degradada por celulasas convencionales (Koenigs, 1972; Highley y Kirk, 1979).

Por su parte, la lignina es un complejo polímero amorfo constituido por eslabones básicos de fenilpropano, que se encuentra rodeando las fibrillas de celulosa (Manion, 1981). Su degradación no ha sido muy comprendida ya que ninguna enzima ha sido aislada y caracterizada, pero por análisis químico de la madera parcialmente podrida se presume que tanto en hongos de pudrición blanca como morena el polímero podría ser degradado por oxigenasas extracelulares las cuales oxidan las moléculas de fenilpropano causando demetilación con rompimiento de anillos aromáticos y formación de productos alifáticos de bajo peso molecular; así como la presencia de deshidrogenasas, las cuales están probablemente involucradas en la oxidación de los grupos alcohol. Tanto los hongos de pudrición blanca como morena tienen la capacidad de degradar lignina aunque estos últimos parecen no tener enzimas que rompan los anillos aromáticos para llevar a cabo una completa degradación del polímero de lignina y por lo tanto no pueden metabolizarla (Kirk, 1975; Highley y Kirk, 1979; Manion, 1981).

Por lo que respecta a las hemicelulosas, éstas son un variado grupo de polisacáridos de pentosas o hexosas con ácidos urónicos, unidos por enlaces β -1,4 glucosídicos (Hudson, 1972; Eggins y Allsopp, 1975). Se encuentran entremezcladas con la celulosa amorfa y alrededor de las regiones de celulosa cristalina. Su degradación por hongos de pudrición blanca y morena ha sido poco estudiada, sin embargo, se sabe que son degradadas por endoenzimas (manasas, xylanasas) que producen cadenas cortas, las cuales, a su vez, son hidrolizadas en azúcares simples por β -glucosidasas (manosidasas, xilosidasas y glucosidasas), y aunque se sabe de la participación de exoenzimas, éstas no han sido determinadas (Highley y Kirk, 1979; Manion, 1981).

2.1.5 Importancia del tipo de pudrición y de las pruebas de laboratorio.

El conocimiento de la fisiología de la acción que ejercen los hongos xilófagos en la madera, evidentemente es importante tanto en aspectos básicos como prácticos. Por ello, la determinación del tipo de pudrición viene a tener un gran valor como método de diagnóstico de problemas de biodeterioro, en la identificación de especies, y hasta en la toma de decisiones taxonómicas, o simplemente para ampliar el conocimiento sobre cada hongo.

Mediante la observación directa de la madera podrida en estados avanzados, es factible determinar el tipo de pudrición presente, considerando su aspecto, color y consistencia. Sin embargo, esto requiere de la habilidad y experiencia del investigador, corriéndose el riesgo de dar por verdaderos tipos de pudriciones erráticos, por ejemplo, cuando la pudrición es incipiente no hay una clara diferenciación entre ambos tipos; o, cuando la madera ha estado expuesta al fuego, una pudrición blanca puede parecer morena; o una pudrición morena, por efecto del intemperismo puede parecer blanca, pues la humedad excesiva reblandece la madera y la radiación solar intensa la aclara. Además, puede haber colonización por hongos causantes de uno y otro tipo de pudrición en el mismo substrato.

Para superar estos problemas, desde fines del siglo pasado, se le ha venido dando gran importancia al diagnóstico de tipo de pudrición en el laboratorio, con los organismos causales en cultivo micelial en estado puro, para determinar confiablemente el tipo de pudrición que estos organismos causan. Aunque se han desarrollado una gran cantidad de técnicas para este fin, todavía se piensa que hace falta probar nuevas posibilidades, pues cada vez se le va dando mayor prioridad a aquellas que metodológicamente sean sencillas, económicas, de corta duración, que den reacciones propias para cada uno de los tipos de

putrefacción, además de que las reacciones puedan ser lo suficientemente evidentes y precisas para que cualquier persona, aunque cuente con pocos recursos o experiencia, así como de literatura especializada, puedan realizar dichas técnicas.

2.1.6 Historia del desarrollo de pruebas de laboratorio para diferenciar el tipo de putrefacción.

Las pruebas para determinar el tipo de putrefacción que causan los hongos xilófagos, históricamente se han derivado del descubrimiento y postulación de las enzimas. Una breve reseña histórica de los descubrimientos hechos por Bertrand y Bourquelot a fines del siglo pasado (1894-1896) se ha resumido del trabajo de Boidin (1951). Al estudiar la savia del árbol de la laca oriental (*Rhus verniciflua*), se descubrió que contenía, entre otros, dos componentes; un fenol llamado "lacol" y otro que en presencia de oxígeno catalizaba su oxidación, al que se le llamó "lacasa" que fue la primer enzima oxidante que se descubría. Esta enzima también catalizaba la oxidación del ácido gálico, el pirogalol y el tanino. Luego, se precisó la constitución química de los substratos fenólicos sensibles a esta oxidasa. También, se trató de detectar la presencia de esta enzima en otras plantas y en hongos, en estos últimos también se buscó la presencia de otros fermentos. Lograron la extracción de sustancias azulantes en especies de *Boletus* y un principio ennegrecedor en *Russula nigricans*, al cual se le llamó "tirosina" y se descubrió una segunda enzima oxidante que al actuar sobre este principio recibió el nombre de "tirosinasa". Se encontró que en algunas especies de *Russula* ocurrían "lacasa" y "tirosinasa" simultáneamente. Finalmente, en colaboración con Harlay investigaron sobre la presencia de estas enzimas en otros basidiomicetes.

Estos trabajos tuvieron repercusión, pues por un lado atrajeron la atención de los bioquímicos sobre las enzimas oxidantes, y por

otro lado, la de los micólogos para utilizar reacciones de color en los hongos para su determinación.

A partir de estos estudios, se han hecho crecer hongos de pudrición conocida, sobre diversos medios que sean sensibles (que produzcan alguna reacción) a la producción de enzimas propias a cada tipo de pudrición.

En 1928, Bavendamm ensayó con unos cuantos hongos xilófagos frente a varias sustancias fenólicas contenidas en malta agar y encontró que las especies de pudrición blanca con ácido gálico y ácido tánico producían una zona o "corona" café oscura de difusión; mientras que las especies de pudrición morena no la producían. Consideró que esta reacción se debía a la oxidación de los ácidos por una enzima y la llamó "reacción de la oxidasa". Desde entonces, se le conoce a su método clásico como "la prueba de Bavendamm" o la "reacción de Bavendamm".

Campbell (1938) incluyó la prueba de Bavendamm junto con características culturales del micelio para identificar aislamientos de hongos xilófagos. Esterilizaba los ácidos individualmente en una fracción de agua y luego los mezclaba con el medio ya esterilizado, o espolvoreaba el ácido sobre agar recién vertido a cajas Petri.

Davidson, Campbell y Blaisdell (1938) comprobaron la efectividad de la prueba de Bavendamm con 210 hongos, encontrando que el 80% de los hongos de pudrición morena daban reacción negativa, mientras que el 96% de los de pudrición blanca dieron reacción positiva, el resto daban reacciones erráticas. Estos autores añadían cada ácido sin esterilizar en agua recién esterilizada y lo mezclaban al resto del medio ya esterilizado produciéndose consecuentemente muchas contaminaciones.

Posteriormente, Preston y McLennan (1948), proponen utilizar colorantes incorporados al medio de cultivo, para determinar el tipo de pudrición de hongos xilófagos. Recomiendan 2 colorantes, rojo neutro y violeta de genciana, por lo evidente de sus reacciones, además de ventajas metodológicas como el que se puedan esterilizar junto con el medio de cultivo. Las reacciones positivas (decoloración del medio de cultivo) son asociadas a la oxidación de los colorantes, producida por enzimas extracelulares tipo "lacasa" provenientes de hongos causantes de pudrición blanca. Las reacciones negativas (ausencia de decoloración del medio de cultivo), son asociadas con la enzima "tirosinasa" de hongos de pudrición morena.

Fähraeus en 1949 (según Nobles, 1958) probó medios de agar con varios fenoles y aminos, encontrando que el rango de substratos oxidados por hongos de pudrición blanca coincide bien con el rango de la enzima "lacasa", por lo que al sistema enzimático (aún desconocido) que degrada la lignina se le llama o asocia con esta enzima.

Law (1950) obtuvo y purificó extractos del micelio de hongos de pudrición blanca y morena, para probar su acción sobre varios substratos, encontrando evidencias de que puede haber varias fenoloxidasas, las de los hongos de pudrición morena son más parecidas a la "tirosinasa", pero los hongos de pudrición blanca producen una fenoloxidasa diferente, más parecida a la "lacasa", responsable de la decoloración de los colorantes usados como reactivos en varios métodos, y además, una fuerte actividad debida a una "peroxidasa", añadiendo el tercer elemento enzimático asociado a la pudrición blanca.

Boidin (1951) ensayó diversos indicadores oxidables por la supuesta "lacasa" que fueran tan confiables como la prueba de Bavendamm y resistentes a la esterilización. Propuso usar guayacol (0.2%) en malta agar con un buffer de ácido cítrico y fosfato de

potasio (pH 4.5). Vaciaba el medio a tubos de cultivo, los esterilizaba e inoculaba y observaba resultados a los 7 días de incubación.

En 1952, Lindeberg y Fähræus probaron extractos de micelio y medios líquidos de *Polyporus zonatus* y *P. versicolor*, hongos de pudrición blanca, coincidiendo otra vez en que las fenoloxidasas producidas por el micelio eran de tipo "lacasa", pero postulando además que son extracelulares en su ocurrencia. Con estos datos se sintetiza el concepto en los trabajos posteriores de "la reacción de la oxidasa o fenoloxidasa o polifenoloxidasa extracelular".

Lindeberg y Holm (1952), determinan la presencia de fenoloxidasas en cuerpos fructíferos y micelio de 9 especies de hongos, utilizando como reactivos compuestos fenólicos tales como tirosina, hidroquinona, p-cresol y catecol. Concluyendo que tanto la "tirosinasa" como la "lacasa" son enzimas intra y extracelulares, aunque el grado de secreción de la "tirosinasa" es menor comparado con el de la "lacasa", por lo que quizás sólo esta última sea la responsable de la oxidación extracelular de los compuestos fenólicos.

En 1953, Higuchi y Kitamura utilizan compuestos fenólicos como tirosina y p-cresol para detectar "tirosinasa" y alfa-naftol para detectar "lacasa" en 29 especies de hongos xilófagos; donde la solución de tirosina fue oxidada tanto por hongos de pudrición morena como blanca, y la solución de alfa-naftol sólo fue oxidada por hongos de pudrición blanca; determinando además que el contenido y grado de secreción de "tirosinasa" es menor comparado con la "lacasa".

Utilizando sustratos más naturales, Jorgensen y Vejlbj (1953), determinan que el extracto de col roja de color púrpura y adicionado al medio de cultivo sin esterilizar, se torna en amarillo por efecto de hongos causantes de pudrición blanca y en

rojo por hongos de pudrición morena. En esta reacción los autores suponen que el producto oxidado es una antocianina-rubrobrasicina.

Posteriormente, Nobles en 1958a propone utilizar como reactivo una solución alcohólica de goma de guayaco aplicada a medios de cultivos de hongos xilófagos para determinar el tipo de pudrición. La solución de goma de guayaco produce una zona azulosa en el medio donde se hacen crecer hongos que producen enzimas oxidasas tipo lacasa y que posteriormente fueron asociados en su mayoría como hongos causantes de pudrición blanca, mientras que las especies que no producen ninguna reacción en el medio fueron asociadas con un tipo de pudrición morena.

Otro método ampliamente utilizado, es el de Badcock, aunque originalmente se trató de un medio de cultivo a base de aserrín, propuesto para hacer crecer y fructificar hongos xilófagos (Badcock, 1941, 1943), el mismo autor lo propone como método para determinar el tipo de pudrición de los hongos xilófagos en un escrito mimeografiado fechado en 1964, añadiendo que es una alternativa más recomendable que el reactivo de guayaco. Como este método no fue formalmente publicado por su autor, se recomienda consultar las descripciones del mismo que han sido presentadas por Hudson (1972) y Carey (1975). Sin embargo, estos autores no mencionan algunos de los ingredientes (almidón, sacarosa y ceniza) que Badcock incluye en su fórmula de 1941. Como se verá más adelante, es importante incluir aquí las descripciones de las reacciones que dan los autores mencionados. Según Hudson (1972), se utiliza aserrín de madera de gimnospermas o de angiospermas, según la procedencia del hongo: después de unos 14 días de incubación, los hongos de pudrición morena gradualmente obscurecerán el aserrín; mientras que los hongos de pudrición blanca decolorarán al aserrín, después de producir una coloración café inicial. Según Carey (1975), sin especificar el tipo de aserrín, la reacción se producirá dentro del lapso de una quincena: los hongos de pudrición morena obscurecerán el aserrín

gradualmente; los hongos de pudrición blanca inicialmente formarán una zona de color café intenso que se desplace del punto de inoculación conforme crece el micelio, y sea seguida por decoloramiento.

Ahora bien, según la descripción original de Badcock (1964), en aserrín de gimnospermas (como el que recomienda de abeto noruego), los hongos de pudrición blanca producen una reacción caracterizada por una coloración café fuerte o café amarillenta desde los 3 ó 4 días de incubación; pero si en un plazo de 10 días no ocurre esta coloración, esto es indicación de una pudrición morena. Mientras que, en aserrín de madera de angiospermas (como el de haya), los hongos de pudrición blanca producirán una decoloración del medio, después de unas 3 semanas, en lugar de la reacción color café. Estos contrastes en la descripción de las reacciones serán ampliados más adelante.

Los estudios anteriores se realizaron *in vitro*, es decir, con cultivos puros de hongos xilófagos, desarrollados sobre un sustrato diferencial. Sin embargo, Nobles (1958b) también aplicó su solución alcohólica de resina de guayaco *in situ*, es decir, directamente sobre los cuerpos fructíferos frescos y en la madera con pudrición activa, obteniendo un rápido azulamiento con los hongos de pudrición blanca pero no con los de pudrición morena.

Por su parte, Harkin, Larsen y Obst en 1974, comprobaron que un reactivo más específico, la siringaldazina, aplicada también sobre fructificaciones y su substrato, permite detectar confiablemente a la "lacasa", o sea pudrición blanca, si se produce una coloración rosada, roja o púrpura.

De la misma forma que los autores antes mencionados, Gilbertson, Lombard y Canfield (1975) aplicaron una solución alcohólica de resina de guayaco directamente sobre fructificaciones fungales. Aunque aclaran que este reactivo no es

específico para la "lacasa", puesto que puede reaccionar con "tirosinasa" y "peroxidasa", confirmaron que la producción de una tinción azulosa es confiable para identificar hongos de pudrición blanca, y la ausencia de reacción, para identificar hongos de pudrición morena; haciendo comparaciones posteriores con pruebas en cultivos puros de los mismos ejemplares, obtuvieron resultados similares.

Recientemente Pinzón-Picaseño *et. al.* (1982), recomiendan al método de Badcock (1964) aunque siguiendo la composición del medio como la apuntan Hudson (1972) y Carey (1975), es decir, sin añadir almidón, sacarosa ni ceniza y utilizando aserrín de pino en lugar del de abeto noruego o de haya (como originalmente es sugerido), teniendo como consecuencia que las reacciones difieren un poco de las descritas por los tres autores antes mencionados, de modo que, un obscurecimiento del medio colonizado por el micelio indica la presencia de hongos de pudrición blanca; y un aclaramiento del aserrín colonizado por el micelio, la de hongos de pudrición morena. Confrontando esto con lo expuesto tres y cuatro párrafos atrás, podría ser que las descripciones de las reacciones con la prueba de Badcock varíen según la fórmula, el tipo de aserrín y la experiencia del observador.

Finalmente, Ruiz Rodríguez y Pinzón-Picaseño (1986), proponen utilizar un nuevo método con aserrín en extracto de malta agar y añadiendo gotas de guayacol al micelio, en substitución del recomendado por Nobles (1958), considerando que la combinación es confiable para determinar el tipo de pudrición, porque la presencia de madera en el medio deberá estimular la producción del sistema enzimático degradador de la lignina. Consideran una reacción positiva de pudrición blanca al formarse una tinción de magenta a violada sobre el medio de cultivo, y pudrición morena la ausencia de dicha reacción.

2.1.7 Estudios realizados en México.

En México, una corriente relativamente reciente ha consistido en llevar a cabo estudios para caracterizar fisiológicamente a los hongos xilófagos como organismos deterioradores o degradadores de la madera, aplicando pruebas para determinar tipo de pudrición, evaluando su agresividad hacia la madera, y, a veces, estimando su tolerancia a preservadores de madera.

En la mayoría de estos trabajos, para determinar tipo de pudrición se utilizó el método de Badcock con aserrín de pino según la fórmula de Hudson y Carey ya citada (López Guerrero, 1979; Véliz Avila, 1982; Pinzón-Picaseño, *et. al.*, 1982; Hernández Jiménez, 1984; Pinzón-Picaseño y Véliz Avila, 1984; Pinzón-Picaseño y Hernández Jiménez, 1987 y Pereyra Venegas, 1988). En todos ellos se coincide en que dicha prueba es confiable, ya que se obtuvieron resultados que fueron verificados al confrontarlos bibliográficamente, pudiéndose diferenciar los dos tipos de pudrición por reacción propia y no por la presencia o ausencia de alguna de ellas, además de ser muy económica, aunque con la desventaja de que es una prueba larga que requiere un promedio de 4 semanas de incubación para obtener resultados confiables; sin embargo, se recomienda que, en el caso de reacciones dudosas, se repita la prueba o se empleen otros métodos conocidos.

Por su parte, Herrera Campos (1985), aunque sigue lineamientos parecidos a los trabajos anteriores, incluyendo la prueba de Badcock, pero siguiendo la sugerencia mencionada, adiciona la prueba de Bavendamm con ácidos gálico y tánico, concluyendo que aunque hubo reacciones dudosas con ácido gálico, así como variaciones en el crecimiento micelial al utilizar ambos ácidos, las dos pruebas pueden ser consideradas útiles para determinar tipo de pudrición.

Finalmente, en el trabajo de Ruiz Rodríguez (1991) para determinar con mayor seguridad el tipo de pudrición que causarían aislamientos de hongos asociados a pudriciones en árboles, y contar con un dato que ayudara a su identificación, se utilizaron varias pruebas: el método de Badcock, el de Bavendamm con ácidos gálico y tánico, así como el de Ruiz Rodríguez-Pinzón Picaseño de aserrín-quayacol, concluyéndose que los 3 métodos producen reacciones concordantes, aunque se tienen 3 reacciones dudosas con los dos primeros métodos (2 aislamientos en ácido gálico y 1 aislamiento con aserrín de Badcock), por lo cual se determina que el método de aserrín-quayacol resultó más práctico, confiable y fácil de interpretar, no obstante, también se recomienda la utilización de más de un método para poder determinar de manera precisa el tipo de pudrición.

El panorama anterior evidencia que hasta el momento no se han realizado trabajos con el fin específico de realizar pruebas comparativas de las técnicas descritas dispersamente en la literatura.

2.2 Objetivos y finalidades.

El presente trabajo tiene como finalidad general, aportar datos experimentales que conlleven a establecer una metodología multiopcional y más confiable para determinar el tipo de pudrición causado por hongos xilófagos, ya sea como una característica útil para la identificación de los hongos, un elemento crítico para el diagnóstico de problemas de biodeterioro o procesos de biodegradación, o bien, para aportar información que contribuya de manera importante al conocimiento de dichos organismos.

Los objetivos específicos de este trabajo se enlistan a continuación:

1 Seleccionar, de los métodos consultados bibliográficamente, aquellos que ofrezcan las mejores expectativas experimentales para determinar tipo de pudrición.

2 Experimentar los diversos métodos seleccionados con hongos xilófagos causantes de pudriciones conocidas blanca y morena.

3 Realizar una comparación estimativa de las ventajas y desventajas técnicas, así como la confiabilidad de los resultados de cada método a ensayar.

4 Recomendar el método o los métodos que presenten las mejores posibilidades para determinar tipo de pudrición en hongos xilófagos.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Procedencia de los hongos para ensayo.

Se utilizaron 10 especies de hongos (5 de pudrición blanca y 5 de pudrición morena, ver Tabla 1), provenientes de la colección de cultivos de macromicetos xilófagos del Princes Risborough Laboratory, Building Research Establishment, Reino Unido. La selección de especies fue basada en la abundancia con que son citadas en la literatura, por lo que los datos de su tipo de pudrición son fidedignos; y de las cepas en particular, porque han sido empleadas en otros ensayos similares, de modo que sus características de crecimiento en medio de cultivo y comportamiento como degradadores de la madera son conocidos.

3.2 Obtención de suficiente inóculo.

Con el fin de obtener un crecimiento micelial vigoroso, homogéneo y de la misma edad, y para obtener la cantidad suficiente de inóculo para cada prueba, previo a cada uno de los ensayos realizados, se procedió a la resiembra de las cepas de la colección en medio de cultivo EMA (extracto de malta agar, Ulloa y Hanlin, 1978), en cajas Petri de vidrio ya esterilizadas (10 x 2 cm), y luego a su incubación durante 2 semanas a 26° C y obscuridad en "cámaras húmedas" (cajas de acrílico tipo camisera, según propia denominación, marca CIPSA; con una plataforma de rejillas de plástico y agua destilada esterilizada en el fondo).

Todas las maniobras de ensayo fueron realizadas en una campana microbiológica con flujo laminar de aire estéril, para evitar contaminaciones.

3.3 Pruebas para determinar el tipo de pudrición.

De los métodos consultados bibliográficamente, fueron seleccionados seis, por ser metodológicamente los más prácticos, ya que no requieren de aparatos sofisticados, los reactivos utilizados son sumamente económicos y de fácil adquisición, además tienen la ventaja de que las reacciones esperadas son fácilmente interpretables para el observador.

Los seis métodos de laboratorio se describen a continuación.

3.3.1 Método de cultivo de Bavendamm (1928) en extracto de malta agar con ácidos gálico y tánico.

Se procedió a preparar el medio de acuerdo a la siguiente fórmula:

Extracto de malta _____	15.0 g
Agar bacteriológico _____	20.0 g
Acido gálico (o tánico) ____	5.0 g
Agua destilada _____	1000.0 ml

El extracto de malta, el agar y 850 ml de agua destilada fueron colocados en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml, los 250 ml de agua destilada restantes fueron colocados en un matraz Erlenmeyer de 500 ml y ambos matraces fueron esterilizados en autoclave por 20 min a 121° C y 103.4 kPa*. Una vez transcurrido el tiempo de esterilización, y aún caliente, al agua destilada del segundo matraz, le fue añadido el ácido gálico (o tánico), agitándose bien hasta su disolución, y la solución fue mezclada (aún caliente) con el medio de extracto de malta agar del primer matraz, vaciándose luego en cajas Petri estériles. El medio con ácido gálico adquiere un color miel, y blanco perla con ácido tánico. Las cajas se dejaron en prueba de esterilidad por 3 días,

al cabo de la cual, 3 cajas por cepa fueron inoculadas (con micelio desarrollado en previo inóculo) con discos recortados con sacabocados (10 mm), colocándolos en un orificio central previamente realizado con el mismo sacabocados. Se dejaron sin inocular dos cajas, una por cada ácido utilizado, que sirvieron como testigos. Todas las cajas fueron colocadas en las "cámaras húmedas", por un período de incubación de 14 días.

Las lecturas fueron tomadas cada 7 días, donde los hongos de pudrición blanca tornarían el medio a tonalidades café alrededor del inóculo y los hongos de pudrición morena no causarían ninguna tinción en el medio de cultivo.

* 103.421 kPa es equivalente a 15 lb/pul², según el Sistema Internacional de Unidades S.I., adoptado en México bajo la norma titulada "Nomenclatura y Simbología de las Unidades de Medida" publicada por la Dirección de Pesas y Medidas de la Secretaría de Comercio (citado por García Díaz, 1984).

3.3.2 Método de cultivo de Preston-McLennan (1948) en extracto de malta agar con colorantes rojo neutro y violeta de genciana.

Se utilizaron los colorantes rojo neutro y violeta de genciana, ya que son los más recomendados en el método original por no presentar inconvenientes al esterilizarse y mezclarse con el medio, además de proporcionar las reacciones más evidentes.

La composición del medio con colorante (rojo neutro o violeta de genciana) fue la siguiente:

Extracto de malta _____	25.0	g
Agar bacteriológico _____	18.0	g
Colorante _____	0.07	g
Agua destilada _____	1000.0	ml

Una vez preparado, el medio fue colocado en matraces Erlenmeyer de 1000 ml en proporción de 500 ml cada uno, se esterilizó (a 121^o C y 103.4 kPa por 20 min), fue vaciado en cajas Petri estériles, y éstas se dejaron en prueba de esterilidad por 3 días. Posteriormente, se les hicieron unas cavidades centrales con sacabocados asepsizado (10 mm) y se inocularon con discos obtenidos con sacabocados de la misma distancia radial de las colonias desarrolladas en la fase previa, según el crecimiento de cada cepa. Como repeticiones, por cada colorante se inocularon 3 cajas por cepa, más 2 cajas testigo sin inocular, y se dejaron en fase de crecimiento en "cámaras húmedas", bajo las condiciones ya descritas.

Las lecturas fueron tomadas cada 7 días durante 3 semanas, una decoloración de los medios de cultivo, inicialmente de color rojo y violeta, indicaría la reacción positiva, correspondiente a pudrición blanca; y la ausencia de decoloración, a la reacción negativa, correspondiente a pudrición morena.

3.3.3 Método de cultivo de Jorgensen-Vejlby (1953) en extracto de malta agar con extracto de col roja (Col I).

El extracto de col roja (*Brassica oleraceae* var. *capitata*) fue preparado de la siguiente manera:

Hojas de col roja	_____	1000 g
Agua destilada	_____	1000 ml
Dextrosa	_____	40 g

La col se cortó en trozos medianos, tratando de eliminar las partes duras o secas. Se colocaron los pedazos en un matraz Erlenmeyer y se les agregaron 500 ml de agua destilada, poniéndose a hervir por 10 min. Al término de la ebullición, el extracto obtenido fue filtrado a través de un embudo Buchner, vaciándose a

otro matraz Erlenmeyer (también de 1000 ml). Los trozos de la col fueron regresados del embudo al matraz inicial, se les añadieron 250 ml de agua destilada, y se volvieron a hervir por 10 min más, filtrándose también este segundo extracto, el cual fue agregado al filtrado anterior y se aforó la mezcla a 1000 ml con agua destilada, fue entonces cuando se le añadió la dextrosa. El extracto fue esterilizado en autoclave por 20 min a 121° C y 103.4 kPa, colocándose 500 ml en cada matraz.

En el método original, propuesto por los autores antes citados, son utilizados tubos con papa-dextrosa-agar al 2% (inclinados), los cuales son inoculados e incubados un tiempo, adicionando luego sobre el micelio 5 ml de extracto de col roja (sin esterilizar) y son dejados nuevamente en incubación por un período de 12 a 96 horas para tomar las lecturas.

Sin embargo, para fines de comparación con todos los ensayos a realizar en este proyecto, se utilizaron cajas Petri de vidrio ya estériles, a las cuales se agregó medio EMA (extracto de malta agar) esterilizado por 20 minutos a 121° C y 103.4 kPa y se dejaron en prueba de esterilidad a 26° C y en obscuridad. Al cabo de 3 días, tres cajas por cepa fueron inoculadas con micelio obtenido en la fase de previo inóculo, en forma de discos del cultivo obtenidos con sacabocados de 10 mm de diámetro colocados en los orificios previamente realizados. Dos cajas no fueron inoculadas ya que sirvieron como testigos. Todas las cajas se dejaron en fase de crecimiento por 14 días en las "cámaras húmedas", a 26° C y en obscuridad. Al cabo de este período, se agregaron 5 ml de extracto de col roja a todas las cajas, con y sin micelio, dejándose incubar por 6 días más, y se tomaron lecturas a los 2, 3 y 6 días. Con este método, el extracto de col inicialmente púrpura se tornaría amarillo con los hongos de pudrición blanca, y rojo con los de pudrición morena.

3.3.4 Método de cultivo modificado de Jorgensen-Vejlby en extracto de malta agar con extracto de col roja (Col II).

Con el propósito de realizar ensayos comparativos con las pruebas de ácido gálico, ácido tánico y con las de colorantes, como reactivos principales, se procedió a realizar una modificación del método anterior, incorporando el extracto de col al medio de cultivo, de la siguiente manera:

Se esterilizaron en autoclave por 20 min a 121^o C y 103.4 kPa un matraz Erlenmeyer de 1000 ml con medio EMA, pero únicamente con 500 ml de agua destilada (en lugar de los 1000 ml normales), y en otro matraz, el extracto de col roja detallado anteriormente.

Una vez esterilizados (medio y extracto independientemente) y semifríos, al matraz con el medio EMA le fue añadido el extracto de col aforando hasta 1000 ml. La mezcla fue vaciada en cajas Petri de vidrio estériles, dejándose en prueba de esterilidad por 3 días. Posteriormente, fueron inoculadas con el micelio desarrollado en la fase de previo inóculo utilizando discos obtenidos con sacabocados (10 mm de diám.), de manera similar a las pruebas anteriores. Se emplearon 3 cajas por cepa, dejándose sin inocular 2 cajas que sirvieron como testigos. Todas las cajas fueron colocadas, para la fase de crecimiento, en "cámaras húmedas" bajo las condiciones de incubación ya mencionadas. Se realizaron 4 lecturas, a los 3, 7, 14 y 21 días de incubación. Las reacciones esperables serían similares a las del método anterior.

3.3.5 Método de cultivo de Badcock (1964) con aserrín de pino y de liquidámbar.

Para este ensayo se utilizaron tanto aserrín de madera de gimnosperma (pino) como de angiosperma (liquidámbar), para cada una de las cepas, de acuerdo a la siguiente fórmula:

Aserrín de pino o liquidámbar	_____	1000 g
Harina de maíz	_____	30 g
Harina de hueso	_____	20 g
Agua destilada	_____	(la necesaria)

El aserrín, tanto de madera de pino como de liquidámbar, fue secado al aire y tamizado en malla de 2 mm, mezclándose con las harinas y con el agua destilada hasta obtener 200-300% de contenido de humedad (cuando fácilmente se pueden formar "terrones"); el medio fue colocado en tubos de cultivo de vidrio (2.4 X 20 cm), sin comprimir demasiado, dejando 2 cm libres de la boca del tubo al aserrín, para poder colocar un tapón de algodón. Los tubos con medio fueron esterilizados en autoclave durante una hora a 121° C y 103.4 kPa. Posteriormente, sin necesidad de prueba de esterilidad, fueron inoculados con un bloque de 1 cm² (obtenido con sacabocados) con micelio de la misma distancia radial de la colonia para cada cepa, desarrollado en la fase de previo inóculo. Fueron utilizados 2 tubos por cepa y por tipo de aserrín, dejando 4 tubos sin inocular (2 con aserrín de pino y 2 con aserrín de liquidámbar) como testigos. Los tubos fueron colocados en posición inclinada (sobre soportes de metal) dentro de "cámaras húmedas", bajo las mismas condiciones ambientales de los otros ensayos, dejándose en incubación durante 8 semanas.

Las lecturas fueron tomadas cada 7 días. Las reacciones esperables consistirían en que los hongos de pudrición blanca obscurecerían el aserrín, y los hongos de pudrición morena ocasionarían su aclaramiento.

3.3.6 Método de cultivo de Ruiz Rodríguez y Pinzón Picaseño (1986) en extracto de malta agar con aserrín-guayacol.

En este procedimiento se utilizó al guayacol como reactivo principal, preparando el medio de extracto de malta agar con aserrín de la siguiente manera:

Extracto de malta _____	30.0 g
Agar bacteriológico _____	15.0 g
Aserrín de pino _____	4.0 g
Agua destilada _____	1000.0 ml

El aserrín de pino (secado al aire) fue tamizado con malla No. 40 (0.42 mm), y mezclado con las demás sustancias, colocándose en matraces Erlenmeyer de 1000 ml (500 ml en cada matraz); los cuales fueron esterilizados en autoclave por 20 min a 121^o C y 103.4 kPa, vaciándose posteriormente en cajas Petri de vidrio estériles, que fueron dejadas en prueba de esterilidad por 3 días en "cámaras húmedas" de la manera usual. Luego fueron inoculadas 3 cajas Petri por cepa con discos extraídos con sacabocados de los cultivos desarrollados previamente, adicionando 2 cajas sin inocular como testigos. Después de un período de incubación de 21 días, bajo las mismas condiciones para su crecimiento, les fueron agregadas 3 gotas de guayacol por caja.

Se observó el desarrollo de la reacción desde el momento mismo de agregar las gotas de guayacol hasta transcurridos 3 días, de producirse una tinción magenta a violada en el medio de cultivo, esto indicaría la respuesta de hongos causantes de pudrición blanca, y la ausencia de estas tinciones, la de hongos de pudrición morena.

TABLA I

Hongos para ensayo

Nombre del hongo	No. de cepa*	Tipo de pudrición
<i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.: Wallr.) Pat.	FPRL 20-C	Blanca
<i>Phellinus pini</i> (Thore.: Fr.) A. Ames.	FPRL 45-A	Blanca
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (L.: Fr.) Murrill.	FPRL 150-A	Blanca
<i>Schizophyllum commune</i> Fr.: Fr.	FPRL 5	Blanca
<i>Trametes versicolor</i> (L.: Fr.) Pilát.	FPRL 28-A	Blanca
<i>Fomitopsis pinicola</i> (Sw.:Fr.) P. Karst.	FPRL 98	Morena
<i>Laetiporus sulphureus</i> (Bull.: Fr.) Murrill.	FPRL 29	Morena
<i>Lentinus lepideus</i> (Fr.: Fr.) Fr.	FPRL 7-B	Morena
<i>Merulius lacrymans</i> (Wulf.) Fr.	FPRL 12-C	Morena
<i>Oligoporus placentus</i> (Fr.) Gilbn. & Ryv.	FPRL 304-D	Morena

* El número de cepa corresponde a la lista de cultivos de macromicetos degradadores de madera del Princess Risborough Laboratory, Building Research Establishment, Reino Unido (Forest Products Research Laboratory, 1969).

4. RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados fueron reunidos en las tablas 2 a 10, con el propósito de visualizar las reacciones obtenidas en cada una de las pruebas ensayadas, de acuerdo a la presencia de tinciones o cambios de coloración en micelio y medio de cultivo, correspondientes a cada tipo de pudrición ante los substratos diferenciales: ACIDO GALICO, ACIDO TANICO, ROJO NEUTRO, VIOLETA DE GENCIANA, EXTRACTO DE COL (COL I, COL II), ASERRIN DE PINO, ASERRIN DE LIQUIDAMBAR y ASERRIN-GUAYACOL. Empleando como material biológico 10 hongos xilófagos (ver tabla 1); tomando como referencia básica las descripciones de los autores de las técnicas así como los "testigos o controles" correspondientes a cada caso, para comprobar y contrastar los cambios de coloración observados.

4.1 Prueba de Bavendamm.

En la tabla 2 y la placa 1, se tienen las reacciones producidas por los 10 hongos xilófagos, según el método de Bavendamm (1928), al utilizar ácido gálico y ácido tánico en medio EMA al término de 2 semanas de incubación. Donde la producción de una tinción ámbar-café en el medio de cultivo alrededor del inóculo o de la colonia, como un halo, indicó la presencia de hongos de pudrición blanca; y, la ausencia de esta reacción, la de hongos de pudrición morena, considerando que inicialmente el medio de cultivo EMA con ácido gálico era de color miel y el medio EMA con ácido tánico era de color gris perla.

4.1.1 Acido gálico.

Se observa en la tabla 2 y fotos 1-2, que sólo dos hongos de pudrición blanca dieron reacción positiva con esta prueba, *Ph. pini* y *T. versicolor*, mostrando un medio con halo café oscuro.

G. applanatum y *S. commune*, también hongos de pudrición blanca, respondieron con una reacción dudosa ya que no mostraron ninguna tinción en el medio de cultivo durante las 2 semanas de incubación.

Respecto al color micelial de los cuatro hongos anteriores, sólo *T. versicolor* presentó un color de micelio distinto al inicial de blanco-cremoso a crema-café claro, a las 2 semanas de incubación.

Por su parte, *P. sanguineus*, hongo de pudrición blanca, no tuvo ningún crecimiento micelial ni tinción en su medio de cultivo en ninguna de las 3 repeticiones realizadas, por lo cual se considera que este hongo no responde bajo las condiciones de esta variante. La ausencia de reacción no se atribuye a su inhabilidad para crecer en este medio porque se han dado casos en los que sí ocurrió reacción positiva aún sin desarrollo del inóculo (Herrera Campos, 1985).

Davidson *et al.* (1938) incluyeron en su trabajo tres de estas especies, encontrando con ácido gálico las reacciones siguientes: *Ph. pini* (+), *S. commune* (-), *T. versicolor* (+). En el presente trabajo coinciden los resultados con los obtenidos por estos autores, pues también con *S. commune* se obtuvieron reacciones dudosas. En México, Herrera Campos (1985), con una cepa de *T. versicolor* (citada como *P. versicolor*), y Ruiz Rodríguez (1991) con la misma cepa empleada en el presente trabajo, obtuvieron similares resultados (+).

Respecto a los cinco hongos de pudrición morena, (*F. pinicola*, *L. sulphureus*, *L. lepideus*, *O. placentus* y *S. lacrymans*), en esta prueba no presentaron ninguna tinción en el medio de cultivo, tampoco se observaron cambios en su coloración micelial durante el periodo de incubación, lo cual corresponde a lo esperado (tabla 2; fotos 3-4). Cabe mencionar que *S. lacrymans* aunque no presentó

crecimiento en este medio, esto no invalida su determinación correspondiente como de pudrición morena, por lo explicado arriba para el caso de *P. sanguineus*.

Con ácido gálico los autores mencionados (Davidson *et al.* 1938) obtuvieron estas reacciones: *F. pinicola* (-), *L. sulphureus* (-) y *L. lepideus* (+ y -); los resultados del presente trabajo coinciden con los de estos autores, aunque aquí, *L. lepideus* dio una reacción (-) en sus 3 repeticiones; así que todas las reacciones estuvieron acordes a este tipo de pudrición. En la prueba de Herrera Campos (1985) *F. pinicola* dio ambas reacciones (+ y -) y en la de Ruiz Rodríguez (1991) este hongo dio sólo (-).

Las cajas testigo con medio EMA conteniendo ácido gálico, de color miel, no presentaron ningún cambio en su coloración durante el periodo de incubación.

En este ensayo, se tomaron como representativos los resultados obtenidos a las 2 semanas de incubación, por presentar las reacciones más evidentes, aunque desde la primera semana ya se tenían resultados semejantes pero las reacciones eran tenues aún.

4.1.2 Acido tánico.

En la tabla 2 y fotos 5-6, se muestra que cuatro de los cinco hongos de pudrición blanca dieron reacciones positivas con esta prueba (*G. applanatum*, *Ph. pini*, *S. commune* y *T. versicolor*), mostrando un medio con halo café oscuro en *G. applanatum*, *Ph. pini* y *T. versicolor*, mientras que *S. commune* presentó también un medio con halo pero de color crema. El color micelial de estos hongos no mostró ningún cambio durante el periodo de incubación.

Por su parte *P. sanguineus*, hongo de pudrición blanca, al igual que en ácido gálico, su reacción no pudo ser determinada ya que no

presentó tinción en su medio de cultivo, considerándose aquí que el hongo tampoco responde con este ácido, además de no presentar crecimiento micelial, ver la explicación correspondiente a este hongo en la sección de ácido gálico.

Con ácido tánico los autores que probaron extensivamente el método de Bavendamm (Davidson *et al.* 1938) obtuvieron estas reacciones: *Ph. pini* (+), *S. commune* (+) y *T. versicolor* (+); coincidiendo los resultados del presente trabajo con los antes mencionados. En los trabajos mexicanos se obtuvieron reacciones similares con aislamientos de *T. versicolor* (Herrera Campos, 1985 y Ruiz Rodríguez, 1991).

En los hongos de pudrición morena, *L. sulphureus* y *S. lacrymans* no se presentó ningún tipo de tinción en su medio de cultivo, ni variación en su color micelial, como era esperado. No ocurriendo lo mismo con *F. pinicola*, *O. placentus* y *L. lepidus*, que presentaron un medio con halo crema los dos primeros y halo café claro el último; mientras que el micelio de *L. lepidus* cambió de color blanco a crema-café claro y *O. placentus* y *F. pinicola* no mostraron cambios en su color micelial (ver tabla 2), por lo cual la reacción de estos tres hongos en esta prueba fue clasificada como dudosa. Conviene recordar que *S. lacrymans* aunque tampoco presentó crecimiento en este medio, su determinación como hongo de pudrición morena, se acepta como válida por lo ya explicado en los resultados con ácido gálico (ver tabla 2 y fotos 7-8).

Utilizando este ácido, Davidson *et al.* (1938) obtuvieron las siguientes reacciones para 3 de las especies aquí ensayadas: *F. pinicola* (-), *L. sulphureus* (-), *L. lepidus* (+ y -). En los resultados actuales con el primero y con el último hongo se presentaron reacciones dudosas, el último caso coincide con el de estos autores. Las cepas de *F. pinicola* probadas en México con este ácido dieron las reacciones (-) esperadas (Herrera Campos, 1985; Ruiz Rodríguez, 1991).

Las cajas testigo con medio EMA conteniendo ácido tánico, de color gris perla, no presentaron ningún cambio en su coloración durante el periodo de incubación.

Con este ácido también se tomaron como representativos los resultados obtenidos a las 2 semanas de incubación, por presentar las reacciones más evidentes que en la primer semana y para comparar las observaciones simultáneamente con las del ácido gálico.

TABLA 2. Características del medio de cultivo y miceliales de 10 hongos xilófagos, utilizando tanto ACIDO GALICO como ACIDO TANICO EN MEDIO EMA (Bavendam, 1928), en 1-2 semanas de incubación, determinando su tipo de pudrición de acuerdo a la reacción obtenida.

HONGO	No. CEPA	ACIDO GALICO		ACIDO TANICO	
		REACCIONES 1-2 SEMANAS	PUDRICION	REACCIONES 1-2 SEMANAS	PUDRICION
<i>Ganoderma applanatum</i>	FPRL 20-C	medio sin tinción micelio blanco	DUDOSA	medio con halo café oscuro micelio blanco-cremoso	BLANCA
<i>Phellinus pini</i>	FPRL 45-A	medio con halo café oscuro micelio amarillo-café	BLANCA	medio con halo café oscuro micelio amarillo-café	BLANCA
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	FPRL 150-A	medio sin tinción micelio sin crecimiento	NO DETERMINADA	medio sin tinción micelio sin crecimiento	NO DETERMINADA
<i>Schizophyllum commune</i>	FPRL 5	medio sin tinción micelio blanco	DUDOSA	medio con halo crema micelio blanco	BLANCA
<i>Trametes versicolor</i>	FPRL 28-A	medio con halo café oscuro micelio crema-café claro	BLANCA	medio con halo café oscuro micelio blanco-cremoso	BLANCA
<i>Fomitopsis pinicola</i>	FPRL 98	medio sin tinción micelio blanco	MORENA	medio con halo crema micelio blanco-cremoso	DUDOSA
<i>Laetiporus sulphureus</i>	FPRL 29	medio sin tinción micelio naranja	MORENA	medio sin tinción micelio naranja	MORENA
<i>Leotinus lepidus</i>	FPRL 7-B	medio sin tinción micelio blanco	MORENA	medio con halo café claro micelio crema-café claro	DUDOSA
<i>Oligoporus placensus</i>	FPRL 304-D	medio sin tinción micelio blanco-cremoso	MORENA	medio con halo crema micelio blanco	DUDOSA
<i>Serpula lacrymans</i>	FPRL 12-C	medio sin tinción micelio sin crecimiento	MORENA	medio sin tinción micelio sin crecimiento	MORENA

PLACA 1. Fotos 1-8. Características del medio de cultivo y micelias de los hongos xilófagos en la Prueba de Bavendamm (1928), utilizando Acido Gálico y Acido Tánico como reactivo principal.

Foto 1. Acido Gálico. Hongos de pudrición blanca: testigo; *T. versicolor* FPRL 28-A; *Ph. pini* FPRL 45-A; *P. sanguineus* FPRL 150-A; *S. commune* FPRL 5; *G. applanatum* FPRL 20-C; a 1 semana de incubación.

Foto 2. Acido Gálico. Hongos de pudrición blanca: testigo; *P. sanguineus* FPRL 150-A; *S. commune* FPRL 5; *G. applanatum* FPRL 20-C; *Ph. pini* FPRL 45-A; *T. versicolor* FPRL 28-A; a 2 semanas de incubación.

Foto 3. Acido Gálico. Hongos de pudrición morena: testigo; *L. lepideus* FPRL 7-B; *F. pinicola* FPRL 98; *L. sulphureus* FPRL 29; *S. lacrymans* FPRL 12-C; *O. placentus* FPRL 304-D; a 1 semana de incubación.

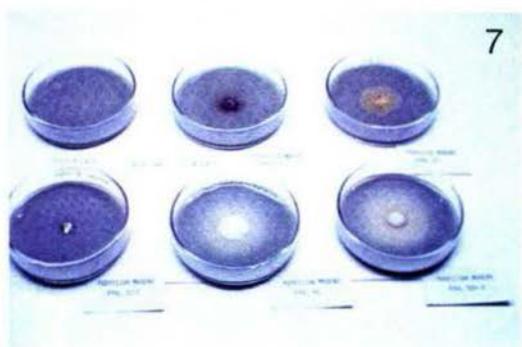
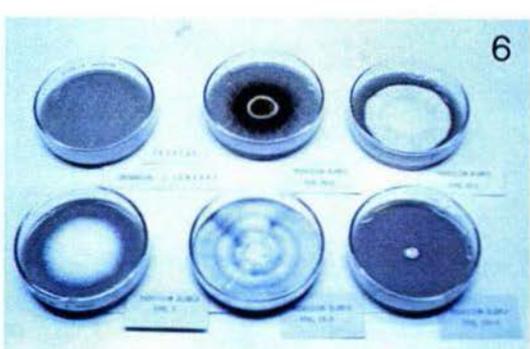
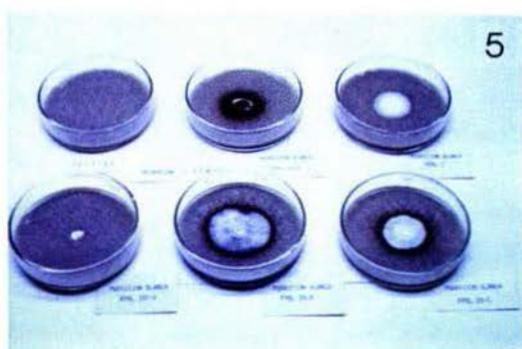
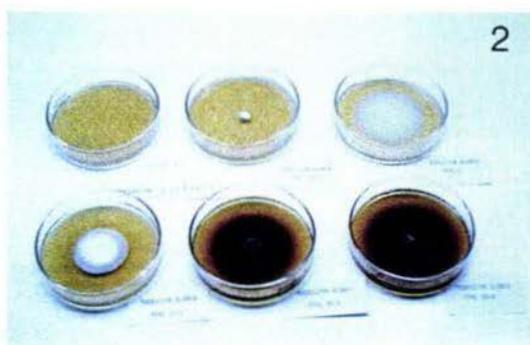
Foto 4. Acido Gálico. Hongos de pudrición morena: testigo; *F. pinicola* FPRL 98; *S. lacrymans* FPRL 12-C; *O. placentus* FPRL 304-D; *L. lepideus* FPRL 7-B; *L. sulphureus* FPRL 29; a 2 semanas de incubación.

Foto 5. Acido Tánico. Hongos de pudrición blanca: testigo; *Ph. pini* FPRL 45-A; *S. commune* FPRL 5; *P. sanguineus* FPRL 150-A; *T. versicolor* FPRL 28-A; *G. applanatum* FPRL 20-C; a 1 semana de incubación.

Foto 6. Acido Tánico. Hongos de pudrición blanca: testigo; *Ph. pini* FPRL 45-A; *G. applanatum* FPRL 20-C; *S. commune* FPRL 5; *T. versicolor* FPRL 28-A; *P. sanguineus* FPRL 150-A; a 2 semanas de incubación.

Foto 7. Acido Tánico. Hongos de pudrición morena: testigo; *L. lepideus* FPRL 7-B; *L. sulphureus* FPRL 29; *S. lacrymans* FPRL 12-C; *F. pinicola* FPRL 98; *O. placentus* FPRL 304-D; a 1 semana de incubación.

Foto 8. Acido Tánico. Hongos de pudrición morena: testigo; *S. lacrymans* FPRL 12-C; *F. pinicola* FPRL 98; *L. sulphureus* FPRL 29; *O. placentus* FPRL 304-D; *L. lepideus* FPRL 7-B; a 2 semanas de incubación.



4.2 Prueba de Preston-McLennan.

4.2.1 Rojo neutro.

En la tabla 3 y placa 2, se pueden observar las reacciones producidas por los diez hongos xilófagos, desarrollados durante 3 semanas en medio EMA con el colorante rojo neutro, según el método de Preston y McLennan (1948). Donde el tipo de pudrición blanca fue identificado por una decoloración del medio de cultivo originalmente de color rojo intenso y la pudrición morena al no producirse tal decoloración.

Así, se tiene que sólo cuatro hongos de pudrición blanca (*G. applanatum*, *Ph. pini*, *P. sanguineus* y *T. versicolor*) dieron reacción positiva (fotos 9-10). *G. applanatum* (fotos 11-12) decoloró el medio desde la primera semana, presentando también una coloración micelial blanca-rojiza a partir de la segunda semana de incubación. Se observaron decoloraciones tenues del medio de cultivo desde la segunda semana con *Ph. pini*, *P. sanguineus* y *T. versicolor*, los cuales no presentaron alteración en su color micelial por la presencia del colorante.

Por lo que respecta al quinto hongo de pudrición blanca, *S. commune*, se obtuvieron resultados dudosos en sus 3 repeticiones, ya que no se presentó ninguna decoloración en el medio de cultivo durante las 3 semanas de incubación y aunque su micelio presentó una coloración blanca-rojiza a partir de la segunda semana, su reacción ante esta prueba fue considerada como dudosa.

En su técnica, Preston y McLennan (1948) emplearon dos de los hongos utilizados aquí, encontrando lo siguiente: *G. applanatum* (+) y *T. versicolor* (+); donde los resultados del presente trabajo concuerdan con los de estos autores.

En cuanto a los hongos de pudrición morena (fotos 13-14), cuatro de ellos (*L. sulphureus*, *L. lepideus*, *O. placentus* y *S. lacrymans*) no presentaron ninguna decoloración en el medio, aunque como se aclara oportunamente en la tabla 3, *L. lepideus* mostró una reacción dudosa en una de sus 3 repeticiones, ya que el medio se decoloró ligeramente desde la segunda semana de incubación.

Por lo que respecta a cambios en su coloración micelial (ver tabla 3), se observa que *L. lepideus*, *L. sulphureus* así como *S. lacrymans* no presentaron ningún cambio durante las 3 semanas de incubación, mientras que *O. placentus* a la tercera semana presentó un micelio de color crema-café claro.

Por su parte *F. pinicola*, hongo de pudrición morena, en sus 3 repeticiones mostró una reacción dudosa desde la segunda semana de incubación, ya que presentó un medio ligeramente decolorado, así como un micelio café claro-rojizo a partir de la tercera semana de incubación, por lo cual su reacción en esta prueba fue considerada como dudosa.

Los autores de la técnica no utilizaron ninguna de las especies de hongos de pudrición morena que se emplearon en este estudio.

Las cajas testigo no presentaron ninguna alteración en el medio de cultivo de color rojo intenso, manteniéndose así durante el periodo de incubación.

TABLA 3. Características del medio de cultivo y miceliales de 10 hongos xilófagos, utilizando ROJO NEUTRO EN MEDIO EMA (Preston-Mc Lennan, 1948), en 3 períodos de incubación, determinando su tipo de pudrición de acuerdo a la reacción obtenida.

HONGO	No. CEPA	REACCIONES			PUDRICION
		1 SEMANA	2 SEMANAS	3 SEMANAS	
<i>Ganoderma applanatum</i>	FPRL 20-C	medio decolorado en el centro micelio blanco-cremoso	medio decolorado en el centro micelio blanco-rojizo	medio decolorado en el centro micelio blanco-rojizo	BLANCA
<i>Phellinus pini</i>	FPRL 45-A	medio sin decoloración micelio amarillo-café	medio ligeramente decolorado micelio amarillo-café	medio ligeramente decolorado micelio amarillo-café	BLANCA
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	FPRL 150-A	medio sin decoloración micelio blanco-cremoso	medio ligeramente decolorado micelio blanco-cremoso	medio ligeramente decolorado micelio blanco-cremoso	BLANCA
<i>Schizophyllum commune</i>	FPRL 5	medio sin decoloración micelio blanco	medio sin decoloración micelio blanco-rojizo	medio sin decoloración micelio rojizo	DUDOSA
<i>Trametes versicolor</i>	FPRL 28-A	medio sin decoloración micelio blanco	medio decolorado en el centro micelio blanco	medio decolorado irregularmente micelio blanco-cremoso	BLANCA
<i>Fomitopsis pinicola</i>	FPRL 98	medio sin decoloración micelio blanco	medio ligeramente decolorado micelio blanco	medio ligeramente decolorado micelio café claro-rojizo	DUDOSA
<i>Laetiporus sulphureus</i>	FPRL 29	medio sin decoloración micelio naranja	medio sin decoloración micelio naranja	medio sin decoloración micelio naranja	MORENA
<i>Lentinus lepideus</i>	FPRL 7-B	medio sin decoloración micelio blanco	medio sin decoloración* micelio blanco-cremoso	medio sin decoloración* micelio blanco-cremoso	MORENA
<i>Oligoporus placentus</i>	FPRL 304-D	medio sin decoloración micelio blanco	medio sin decoloración micelio blanco	medio sin decoloración micelio crema-café claro	MORENA
<i>Serpula lacrymans</i>	FPRL 12-C	medio sin decoloración micelio blanco-cremoso	medio sin decoloración micelio blanco-cremoso	medio sin decoloración micelio blanco-cremoso	MORENA

* De las 3 repeticiones realizadas, dos de ellas mostraron las características anteriormente descritas y la última presentó un medio ligeramente decolorado.

PLACA 2. Fotos 9-14. Características del medio de cultivo y miceliales de los hongos xilófagos en la Prueba de Preston-McLennan (1948), utilizando como reactivo principal colorante Rojo Neutro.

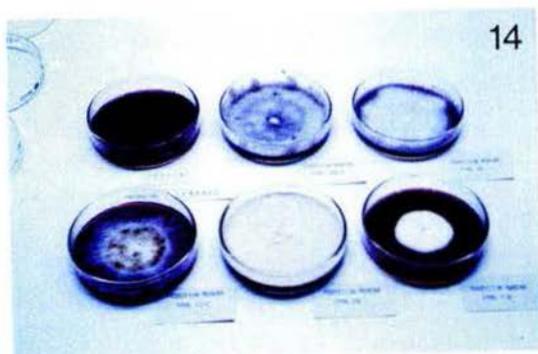
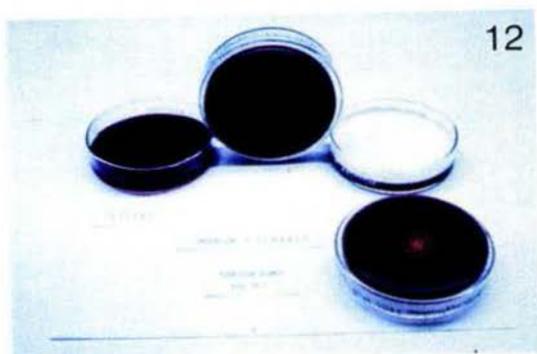
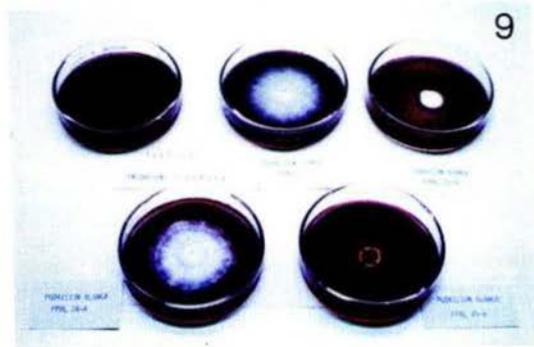
Foto 9. Hongos de pudrición blanca: testigo; *S. commune* FPRL 5; *P. sanguineus* FPRL 150-A; *T. versicolor* FPRL 28-A; *Ph. pini* FPRL 45-A; a 1 semana de incubación.

Foto 10. Hongos de pudrición blanca: testigo; *P. sanguineus* FPRL 150-A; *Ph. pini* FPRL 45-A; *T. versicolor* FPRL 28-A; *S. commune* FPRL 5; a 3 semanas de incubación.

Fotos 11-12. Testigo y reacciones observadas en 3 repeticiones del hongo de pudrición blanca *G. applanatum* FPRL 20-C, a 1 y 3 semanas de incubación, respectivamente.

Foto 13. Hongos de pudrición morena: testigo; *O. placentus* FPRL 304-D; *L. sulphureus* FPRL 29; *L. lepideus* FPRL 7-B; *F. pinicola* FPRL 98; *S. lacrymans* FPRL 12-C; a 1 semana de incubación.

Foto 14. Hongos de pudrición morena: testigo; *O. placentus* FPRL 304-D; *F. pinicola* FPRL 98; *S. lacrymans* FPRL 12-C; *L. sulphureus* FPRL 29; *L. lepideus* FPRL 7-B; a 3 semanas de incubación.



4.2.2 Violeta de genciana.

Utilizando el colorante violeta de genciana en medio EMA, según el método de Preston y McLennan (1948), en la tabla 4 y placa 3, se tienen las características miceliales y del medio de cultivo de los diez hongos xilófagos, durante 3 semanas de incubación total. Donde una decoloración del medio de color violeta inicial, indicaría la respuesta de hongos causantes de pudrición blanca, y de no producirse ésta, la de hongos de pudrición morena.

En esta tabla y en las fotos 15-18, se observa que con los cinco hongos de pudrición blanca (*G. applanatum*, *Ph. pini*, *P. sanguineus*, *S. commune* y *T. versicolor*) se dieron reacciones positivas decolorándose el medio de cultivo desde la primera semana de incubación (excepto con *P. sanguineus* que reaccionó a partir de la segunda semana). *G. applanatum* (fotos 17-18) presentó además un micelio blanco-violado desde la primera semana de incubación mientras que los otros 4 hongos de pudrición blanca no presentaron ninguna variación en su color micelial durante el periodo de incubación.

Con *G. applanatum* y *T. versicolor*, Preston y McLennan (1948) obtuvieron reacciones positivas; similares los resultados del presente trabajo con los de estos autores.

Por lo que respecta a los cinco hongos de pudrición morena (fotos 19-20), se tienen 3 resultados dudosos, con *F. pinicola* y *L. sulphureus* los que desde la primera semana mostraron una decoloración del medio de cultivo, así como *O. placentus* en la tercera semana de incubación; aunque hay que señalar que una repetición de *F. pinicola* no presentó decoloración del medio en el transcurso del periodo de incubación.

Por su parte, *L. lepidus*, hongo de pudrición morena, reaccionó formando un halo café-rojizo, es decir, se obscureció el medio de

cultivo a partir de la segunda semana de incubación, presentando cambios en su coloración micelial de blanco a crema-café (ver tabla 4); ocurriendo algo semejante con *S. lacrymans*, el cual a la tercera semana reaccionó presentando un halo violeta-azuloso (oscuro) en el medio de cultivo, aunque su color micelial no tuvo cambios. Aunque ambos hongos presentaron este tipo de reacción, lo cual no era esperado, por no ser un aclaramiento o decoloración sino un obscurecimiento, se considera que dieron reacciones aceptables para esta prueba.

Los autores de esta técnica no utilizaron ninguna de las especies de hongos de este tipo de pudrición que se emplearon en el presente trabajo, por lo que no se pueden comparar resultados.

Las cajas testigo no tuvieron ningún cambio en la coloración violeta inicial del medio de cultivo, permaneciendo así durante el periodo de reacción.

TABLA 4. Características del medio de cultivo y miceliales de 10 hongos xilófagos, utilizando VIOLETA DE GENCIANA EN MEDIO EMA (Preston-Mc Lennan, 1948), en 3 períodos de incubación, determinando su tipo de pudrición de acuerdo a la reacción obtenida.

HONGO	No. CEPA	REACCIONES			PUDRICION
		1 SEMANA	2 SEMANAS	3 SEMANAS	
<i>Ganoderma applanatum</i>	FPRL 20-C	medio ligeramente decolorado micelio blanco-violado	medio ligeramente decolorado micelio blanco-violado	medio decolorado micelio blanco-violado	BLANCA
<i>Phellinus pini</i>	FPRL 45-A	medio decolorado con halo azuloso micelio amarillo-café	medio decolorado con halo azuloso micelio amarillo-café	medio decolorado con halo azuloso micelio amarillo-café	BLANCA
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	FPRL 150-A	medio sin decoloración micelio blanco-cremoso	medio decolorado con halo azuloso micelio blanco-cremoso	medio decolorado con halo azuloso micelio blanco-cremoso	BLANCA
<i>Schizophyllum commune</i>	FPRL 5	medio decolorado en el centro micelio blanco	medio decolorado en el centro micelio blanco	medio decolorado con halo azul-rosáceo micelio blanco	BLANCA
<i>Trametes versicolor</i>	FPRL 28-A	medio decolorado en el centro micelio blanco	medio decolorado en el centro micelio blanco	medio decolorado en el centro micelio blanco	BLANCA
<i>Fomitopsis pinicola</i>	FPRL 98	medio ligeramente decolorado en el centro* micelio blanco	medio ligeramente decolorado* micelio blanco	medio ligeramente decolorado* micelio blanco	DUDOSA
<i>Laetiporus sulphureus</i>	FPRL 29	medio ligeramente decolorado en el centro micelio naranja	medio decolorado micelio naranja	medio decolorado micelio naranja	DUDOSA
<i>Lentinus lepideus</i>	FPRL 7-B	medio sin decoloración micelio blanco	medio con halo café-rojizo micelio blanco-cremoso	medio con halo café-rojizo micelio crema-café	MORENA
<i>Oligoporus placentus</i>	FPRL 304-D	medio sin decoloración micelio blanco	medio sin decoloración micelio blanco	medio decolorado en el centro micelio blanco-cremoso	DUDOSA
<i>Serpula lacrymans</i>	FPRL 12-C	medio sin decoloración micelio blanco-cremoso	medio sin decoloración micelio blanco-cremoso	medio con halo violeta-azuloso micelio blanco-cremoso	MORENA

* De las 3 repeticiones realizadas, dos de ellas mostraron las características anteriormente descritas y la última presentó un medio sin decoloración.

PLACA 3. Fotos 15-20. Características del medio de cultivo y miceliales de los hongos xilófagos en la Prueba de Preston-McLennan (1948), utilizando como reactivo principal colorante Violeta de Genciana.

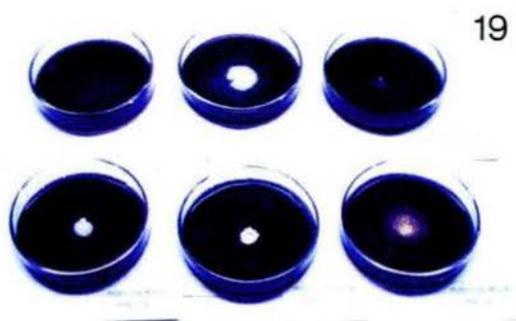
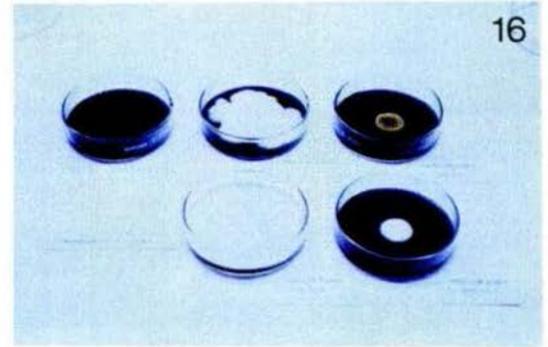
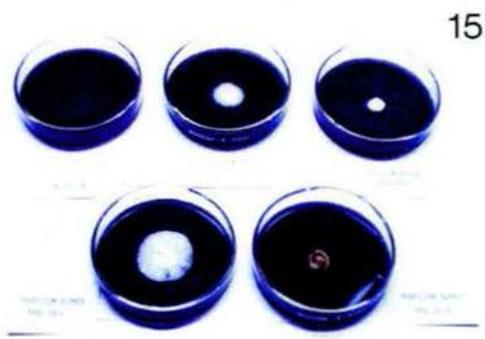
Foto 15. Hongos de pudrición blanca: testigo; *S. commune* FPRL 5; *P. sanguineus* FPRL 150-A; *T. versicolor* FPRL 28-A; *Ph. pini* FPRL 45-A; a 1 semana de incubación.

Foto 16. Hongos de pudrición blanca: testigo; *S. commune* FPRL 5; *Ph. pini* FPRL 45-A; *T. versicolor* FPRL 28-A; *P. sanguineus* FPRL 150-A; a 3 semanas de incubación.

Fotos 17-18. Testigo y reacciones observadas en 3 repeticiones del hongo de pudrición blanca *G. applanatum* FPRL 20-C, a 1 y 3 semanas de incubación, respectivamente.

Foto 19. Hongos de pudrición morena: testigo; *F. pinicola* FPRL 98; *O. placentus* FPRL 304-D; *L. lepideus* FPRL 7-B; *S. lacrymans* FPRL 12-C; *L. sulphureus* FPRL 29; a 1 semana de incubación.

Foto 20. Hongos de pudrición morena: testigo; *O. placentus* FPRL 304-D; *L. sulphureus* FPRL 29; *L. lepideus* FPRL 7-B; *S. lacrymans* FPRL 12-C; *F. pinicola* FPRL 98; a 3 semanas de incubación.



4.3 Prueba de Jorgensen-Vejlby (Col I).

En la tabla 5 y placa 4, se pueden observar los resultados obtenidos según la prueba de Jorgensen y Vejlby (1953) a los 3 y 6 días de reacción después de adicionar 5 ml de extracto de col roja (*Brassica oleraceae* var. *capitata*) sobre el micelio previamente desarrollado por 2 semanas en medio EMA, donde un viraje de color del extracto sobrenadante e infiltrado en el medio de cultivo (inicialmente de color púrpura) hacia tonalidades amarillas, indicaría la presencia de hongos causantes de pudrición blanca, y hacia tonalidades rojizas, la de hongos causantes de pudrición morena.

Así, se tiene que los cinco hongos de pudrición blanca (*G. applanatum*, *Ph. pini*, *P. sanguineus*, *S. commune* y *T. versicolor*) dieron reacciones positivas por inducir una coloración amarillenta del sustrato desde los 3 días de añadido el reactivo (fotos 21-22), siendo más evidente a los 6 días de reacción. *T. versicolor* dio la tonalidad más evidente, ya que desde los 3 días de reacción se presentó una tinción totalmente amarilla. Por su parte, *S. commune*, presentó tonalidades azul-verdosas con zonas amarillas en el micelio así como en el medio de cultivo. *P. sanguineus* también ocasionó un viraje en el medio con zonas azul-verdosas a los 3 días, aunque a los 6 días éste cambió a color amarillo intenso; *G. applanatum* y *Ph. pini* dieron las reacciones más tenues, observándose el medio blanquizco y amarillo pálido, respectivamente.

De los cinco hongos anteriores, sólo *S. commune* presentó cambios en su coloración micelial por el extracto de col añadido al cultivo, durante los 6 días de reacción (ver tabla 5).

Tres de estas 5 especies de pudrición blanca, fueron estudiadas por Jorgensen y Vejlby (1953), quienes obtuvieron las siguientes reacciones: *Ganoderma applanatum* (+), *Schizophyllum commune* (+) y

Trametes versicolor (+); coincidiendo los resultados del presente trabajo con los obtenidos por estos autores.

Por lo que respecta a los hongos de pudrición morena (foto 23), cuatro de ellos (*F. pinicola*, *L. sulphureus*, *L. lepideus* y *O. placentus*) reaccionaron virando el color del extracto en el medio hacia diversas tonalidades rojizas, a partir de los 3 días de reacción, intensificándose a los 6 días (ver tabla 5). Las tonalidades iban desde el café claro-rojizo en *L. lepideus* hasta el rojo intenso en *O. placentus*, dando este último la reacción más evidente. Tiñéndose el micelio de color semejante al medio en algunos hongos como *L. lepideus*, el cual presentó un micelio crema-café claro, así como *F. pinicola* y *O. placentus* con un micelio blanco-rojizo; *L. sulphureus* no presentó ningún cambio en su coloración micelial.

Por su parte, *S. lacrymans*, hongo de pudrición morena, dio reacciones dudosas en sus 3 repeticiones por formar un halo amarillo pálido en el medio a los 3 días y café claro-verdoso a los 6 días de reacción, como si se tratara de un hongo de pudrición blanca.

Jorgensen y Vejlbj (1953) utilizaron 4 de estas especies, encontrando los siguientes resultados: *F. pinicola* (-), *L. sulphureus* (-), *L. lepideus* (+) y *S. lacrymans* (-). Coincidiendo los resultados del presente trabajo con las reacciones de los dos primeros hongos arriba mencionados; mientras que *L. lepideus* a los autores citados les reaccionó de manera contraria, aquí reaccionó adecuadamente; inversamente, *S. lacrymans* dio una reacción correcta en el trabajo citado y aquí su reacción fue dudosa.

Las cajas testigo permanecieron sin cambio, es decir, con un medio de cultivo de color miel con el extracto líquido sobrenadante de color púrpura, manteniendo dichas coloraciones durante los 6 días de reacción.

TABLA 5. Características del medio de cultivo y miceliales de 10 hongos xilófagos, en 2 periodos de reacción, utilizando EXTRACTO DE COL ROJA (*Brassica oleracea* var. *capitata*) ADICIONADO AL MICELIO PREVIAMENTE DESARROLLADO POR 2 SEMANAS EN MEDIO EMA, COL I, (Jorgensen-Vejlby, 1953), determinando su tipo de pudrición de acuerdo a la reacción obtenida.

REACCIONES				
HONGO	No. CEPA	3 DIAS	6 DIAS	PUDRICION
<i>Ganoderma applanatum</i>	FPRL 20-C	medio amarillo pálido micelio blanco-cremoso	medio blanquizzo micelio blanco-cremoso	BLANCA
<i>Phellinus pini</i>	FPRL 45-A	medio con halo amarillo pálido micelio amarillo-café	medio con halo amarillo pálido micelio amarillo-café	BLANCA
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	FPRL 150-A	medio con zonas azul-verdosas micelio blanco-cremoso	medio amarillo intenso micelio blanco-cremoso	BLANCA
<i>Schizophyllum commune</i>	FPRL 5	medio azul-verdoso con zonas amarillas micelio azul-verdoso	medio azul-verdoso con zonas amarillas micelio azul-verdoso	BLANCA
<i>Tremetes versicolor</i>	FPRL 28-A	medio amarillo micelio blanco-cremoso	medio amarillo micelio blanco-cremoso	BLANCA
<i>Fomitopsis pinicola</i>	FPRL 98	medio naranja-rojizo micelio blanco-rojizo	medio rojo claro micelio blanco-rojizo	MORENA
<i>Laetiporus sulphureus</i>	FPRL 29	medio café claro-rojizo micelio naranja	medio rojizo micelio naranja	MORENA
<i>Lentinus lepideus</i>	FPRL 7-B	medio amarillo-café rojizo micelio crema	medio café claro-rojizo micelio crema-café claro	MORENA
<i>Oligoporus placentus</i>	FPRL 304-D	medio rojo claro micelio blanco-rojizo	medio rojo intenso micelio blanco-rojizo	MORENA
<i>Serpula lacrymans</i>	FPRL 12-C	medio con halo amarillo pálido micelio blanco-cremoso	medio café claro-verdoso micelio crema	DUDOSA

4.4 Prueba modificada de Jorgensen-Vejlby (Col II).

Teniendo como objetivo el realizar un estudio comparativo de diversas pruebas para determinar el tipo de pudrición que causan los hongos xilófagos, en este método se utilizó el mismo extracto de col roja (*Brassica oleraceae* var. *capitata*) pero mezclándolo con el EMA después de la esterilización, obteniéndose un medio de cultivo de color café-canela. Se hicieron crecer en éste los diez hongos xilófagos y se observaron sus reacciones durante 21 días de incubación total, donde un viraje del color del medio de cultivo a tonalidades amarillas, indicaría la presencia de hongos de pudrición blanca, y a tonalidades rojizas, la reacción de hongos de pudrición morena (placa 4, foto 24).

En la tabla 6, se observa que los cinco hongos de pudrición blanca (*G. applanatum*, *Ph. pini*, *P. sanguineus*, *S. commune* y *T. versicolor*), dieron reacción positiva por presentar una coloración amarilla el medio de cultivo, desde los 3 días, como en *Ph. pini*, *G. applanatum* y *T. versicolor*. Estos dos últimos dieron las reacciones más evidentes, ambos con un halo amarillo intenso. Por su parte, *P. sanguineus* y *S. commune* desde los 7 días presentaron un medio amarillo pálido, aunque este último con tonalidades amarillo-verdosas a partir de los 14 días, hasta quedar el medio totalmente verdoso a los 21 días de incubación. Las fotos 25 y 26 muestran los cultivos a los 14 días de incubación.

El micelio de los cinco hongos anteriores no presentó ninguna variación en su coloración, durante el periodo de incubación.

Con respecto a los hongos de pudrición morena (foto 27), cuatro de ellos (*F. pinicola*, *L. sulphureus*, *L. lepideus* y *O. placentus*) presentaron un medio de coloración rojo-guinda con tonalidades café, de los cuales, *F. pinicola*, *L. sulphureus* y *O. placentus* (el cual dio la reacción más evidente con un medio rojo-guinda) reaccionaron desde los 3 días de incubación, y hacia los 7 días *L.*

lepideus. El color micelial de los cuatro hongos anteriores no presentó ninguna alteración al crecer en este medio con el extracto (ver tabla 6). Así que estos hongos respondieron adecuadamente ante esta prueba.

Por su parte *S. lacrymans*, también hongo de pudrición morena, igual que en la prueba de COL I, dio reacciones dudosas en sus 3 repeticiones, ya que presentó coloraciones amarillas-cafés del medio de cultivo a partir de los 7 días de incubación.

Las cajas testigo no presentaron variación en su medio de cultivo de color café-canela, durante los 21 días de incubación.

Comparativamente, las dos opciones COL I y Col II aportan resultados similares con los 10 hongos de ensayo.

TABLA 6. Características del medio de cultivo y miceliales, de 10 hongos xilófagos, utilizando EXTRACTO DE CUL ROJA (*Breasia oleracea* var. *capitata*) EN MEDIO EMA, COL II, (modificado de Jorgensen-Vejlby, 1953), en 4 periodos de incubación, determinando su tipo de pudrición de acuerdo a la reacción obtenida.

HONGO	No. CEPA	REACCIONES				PUDRICION
		3 DIAS	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS	
<i>Guadernia applanatus</i>	FPRL 20-C	medio con halo amarillo micelio blanco	medio con halo amarillo intenso micelio blanco-cremoso	medio con halo amarillo intenso micelio blanco-cremoso	medio con halo amarillo intenso micelio blanco-cremoso	BLANCA
<i>Phellinus pini</i>	FPRL 45-A	medio con halo amarillo micelio amarillo	medio con halo amarillo intenso micelio amarillo-café	medio con halo amarillo intenso micelio amarillo-café	medio con halo amarillo intenso micelio amarillo-café	BLANCA
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	FPRL 150-A	medio sin halo micelio crema	medio con halo amarillo pálido micelio crema	medio con halo amarillo pálido micelio crema	medio con halo amarillo micelio crema	BLANCA
<i>Schizophyllum commune</i>	FPRL 5	medio sin halo micelio blanco	medio con halo amarillo pálido micelio blanco-cremoso	medio amarillo-verdoso micelio blanco-cremoso	medio verdoso micelio blanco-cremoso	BLANCA
<i>Tremetes versicolor</i>	FPRL 28-A	medio con halo amarillo intenso micelio crema	medio con halo amarillo intenso micelio crema	medio con halo amarillo intenso micelio crema	medio con halo amarillo intenso micelio crema	BLANCA
<i>Fomitopsis pinicola</i>	FPRL 98	medio con halo rojo-guinda micelio blanco	medio con halo rojo-guinda micelio blanco	medio rojo-guinda micelio crema	medio rojo-guinda micelio crema	MORENA
<i>Laetiporus sulphureus</i>	FPRL 29	medio con halo rojo-guinda micelio naranja	medio con halo rojo-guinda micelio naranja	medio rojo-café claro micelio naranja	medio rojo-café claro micelio naranja	MORENA
<i>Lentinus lepideus</i>	FPRL 7-B	medio sin halo micelio blanco	medio con halo rojizo micelio blanco	medio rojo-café micelio crema	medio café claro micelio crema	MORENA
<i>Oligoporus placentus</i>	FPRL 304-D	medio con halo rojo-guinda micelio blanco	medio con halo rojo-guinda micelio blanco	medio rojo-guinda micelio crema	medio rojo-guinda micelio crema	MORENA
<i>Serpula lacrymans</i>	FPRL 12-C	medio sin halo micelio blanco	medio con halo amarillo pálido micelio crema	medio con halo amarillo micelio crema	medio con halo amarillo-café micelio crema	DUDDOSA

PLACA 4. Fotos 21-27. Características del medio de cultivo y miceliales de los hongos xilófagos en la Prueba de Jorgensen-Vejlby (1953), así como en la Prueba modificada de los mismos autores (Col I y Col II, respectivamente) utilizando como reactivo principal Extracto de Col Roja.

Foto 21. Col I. Hongos de pudrición blanca: testigo; *S. commune* FPRL 5; *T. versicolor* FPRL 28-A; *P. sanguineus* FPRL 150-A; a 3 días de reacción.

Foto 22. Col I. Hongos de pudrición blanca: *Ph. pini* FPRL 45-A; *G. applanatum* FPRL 20-C; testigo; a 3 días de reacción.

Foto 23. Col I. Hongos de pudrición morena: testigo; *O. placentus* FPRL 304-D; *F. pinicola* FPRL 98; *L. sulphureus* FPRL 29; *S. lacrymans* FPRL 12-C; *L. lepideus* FPRL 7-B; a 3 días de reacción.

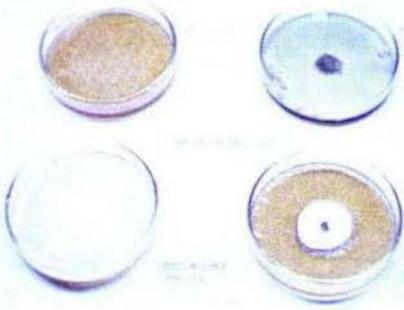
Foto 24. Col II. Testigo y comparación de las reacciones inducidas por un hongo de pudrición morena *F. pinicola* FPRL 98 y uno de pudrición blanca *T. versicolor* FPRL 28-A; 7 días de incubación.

Foto 25. Col II. Hongos de pudrición blanca: testigo; *P. sanguineus* FPRL 150-A; *S. commune* FPRL 5; *T. versicolor* FPRL 28-A; a 14 días de incubación.

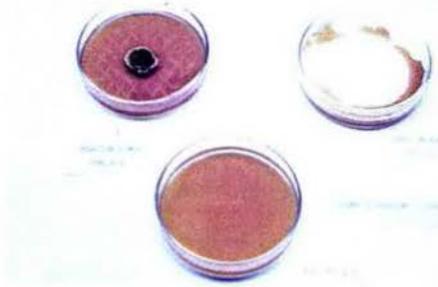
Foto 26. Col II. Hongos de pudrición blanca: *G. applanatum* FPRL 20-C; *Ph. pini* FPRL 45-A; testigo; a 14 días de incubación.

Foto 27. Col II. Hongos de pudrición morena: testigo; *L. sulphureus* FPRL 29; *S. lacrymans* FPRL 12-C; *O. placentus* FPRL 304-D; *L. lepideus* FPRL 7-B; *F. pinicola* FPRL 98; a 14 días de incubación.

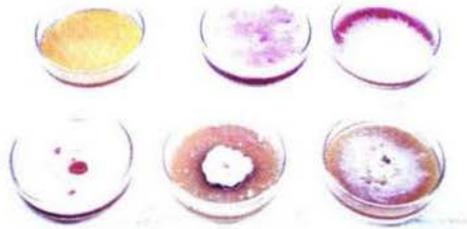
21



22



23



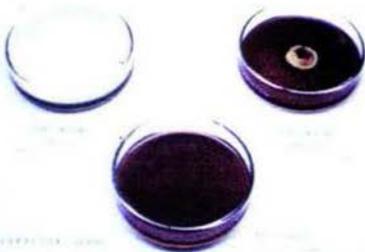
24



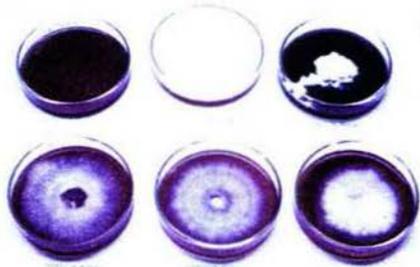
25



26



27



4.5 Prueba de Badcock.

4.5.1 Aserrín de pino.

En la tabla 7, son mostradas las características del medio de cultivo y miceliales de los diez hongos xilófagos desarrollados en aserrín de pino como sustrato principal, según el método de Badcock (1964), en 4 periodos de incubación. Un obscurecimiento del aserrín, originalmente de color amarillo-café claro, indicaría la presencia de hongos de pudrición blanca, y un aclaramiento del aserrín, correspondería a hongos de pudrición morena. El aspecto de los cultivos a las 4 semanas, se observa en la placa 5, fotos 28-32 y a las 8 semanas en la placa 6, fotos 33-36.

Se puede observar en la tabla 7, que cuatro hongos de pudrición blanca (*G. applanatum*, *Ph. pini*, *S. commune* y *T. versicolor*), mostraron en el medio de cultivo, un obscurecimiento. Este fue café en *G. applanatum* y *T. versicolor* a partir de la segunda semana de incubación, y a la octava semana el obscurecimiento adquirió tonalidades café-rojizas (fotos 33-34). *Ph. pini* reaccionó con un ligero obscurecimiento café del medio a partir de la cuarta semana (foto 30). Con el mismo tiempo de incubación *S. commune* presentó un medio obscurecido color café que se mantuvo sin cambios hasta las 8 semanas de incubación (foto 28).

Respecto al quinto hongo de pudrición blanca, *P. sanguineus*, su reacción en esta prueba fue considerada dudosa, ya que en la cuarta semana de incubación presentó un medio ligeramente obscurecido (foto 28), sin embargo en la sexta y octava semanas el medio se fue aclarando en lugar de seguir obscureciéndose (foto 33). Saliendo de la regla general aplicada a los demás hongos con esta prueba, podría decirse que este caso presentó también una reacción interpretable como positiva de pudrición blanca tomando en cuenta la descripción de las reacciones que da originalmente Badcock en 1964; pero con el fin de homogenizar los criterios, lo

que es importante en este tipo de pruebas, se conserva el estatus de dudosa para esta reacción.

No se tienen datos originales de Badcock, pero en México, López Guerrero (1979) ensayó esta técnica con los mismos hongos (especies y aislamientos) utilizados en el presente trabajo encontrando los siguientes resultados: *G. applanatum* (+), *Ph. pini* (+), *P. sanguineus* (+), *S. commune* (no determinada) y *T. versicolor* (+). Los resultados actuales sólo discrepan en que para *P. sanguineus* la reacción fue dudosa y para *S. commune* la reacción sí fue adecuada (+). Por su parte, Herrera Campos (1985) y Ruiz Rodríguez (1991) con aserrín de pino obtuvieron reacciones (+) para aislamientos de *T. versicolor*.

En cuanto a los cinco hongos de pudrición morena (*F. pinicola*, *L. sulphureus*, *L. lepideus*, *O. placentus* y *S. lacrymans*), todos produjeron un aclaramiento general del medio colonizado por las hifas desde la segunda semana de incubación. Aunque *F. pinicola* y *L. sulphureus* presentaron zonas rojizas a la octava semana el aclaramiento del medio de aserrín fue tan típico que su reacción ante esta prueba fue considerada como adecuada para pudrición morena. Las fotos 31 y 32 muestran el aspecto de los cultivos a las 4 semanas de incubación, las fotos 35-36 a las 8 semanas.

En el ensayo de López Guerrero (1979) se registraron reacciones de pudrición morena (-) para cuatro de los hongos y dudosa para *S. lacrymans*, mientras que en los resultados del presente trabajo todos estos hongos dieron reacción de pudrición morena (-). Herrera Campos (1985) y Ruiz Rodríguez (1991) ensayaron con *F. pinicola* obteniendo reacción (-).

En general, el color micelial de los 10 hongos no presentó ninguna alteración durante las 8 semanas de incubación.

Los tubos testigo no presentaron ninguna variación en la coloración amarilla-café claro del medio de aserrín, durante el periodo de incubación.

TABLA 7. Características del medio de cultivo y miceliales de 10 hongos xilófagos, utilizando como sustrato principal ASERRIN DE PINO (Badcock, 1964), en 4 períodos de incubación, determinando su tipo de pudrición de acuerdo a la reacción obtenida.

REACCIONES						
HONGO	No. CEPA	2 SEMANAS	4 SEMANAS	6 SEMANAS	8 SEMANAS	PUDRICION
<i>Ganoderma applanatum</i>	FPRL 20-C	medio obscurecido café micelio blanco	medio obscurecido café micelio blanco	medio obscurecido café micelio blanco-cremoso	medio obscurecido café-rojizo micelio blanco-cremoso	BLANCA
<i>Phellinus pinis</i> *	FPRL 45-A	medio sin cambio micelio amarillo-café	medio ligeramente obscurecido micelio amarillo-café	medio obscurecido café micelio amarillo-café	medio obscurecido café micelio amarillo-café	BLANCA
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	FPRL 150-A	medio sin cambio micelio blanco	medio ligeramente obscurecido micelio blanco	medio ligeramente aclarado micelio blanco	medio ligeramente aclarado micelio blanco	DUDOSA
<i>Schizophyllum commune</i>	FPRL 5	medio sin cambio micelio blanco	medio obscurecido café micelio blanco	medio obscurecido café micelio blanco	medio obscurecido café micelio blanco	BLANCA
<i>Trametes versicolor</i>	FPRL 28-A	medio obscurecido café micelio blanco	medio obscurecido café micelio blanco	medio obscurecido café micelio blanco	medio obscurecido café-rojizo micelio blanco	BLANCA
<i>Fomitopsis pinicola</i> *	FPRL 98	medio aclarado micelio blanco	medio aclarado micelio blanco	medio aclarado micelio blanco	medio con zonas claras y rojizas micelio blanco	MORENA
<i>Laetiporus sulphureus</i> *	FPRL 29	medio aclarado micelio naranja	medio aclarado micelio naranja	medio aclarado micelio naranja	medio con zonas claras y rojizas micelio naranja	MORENA
<i>Lentinus lepideus</i> *	FPRL 7-B	medio aclarado micelio blanco	medio aclarado micelio blanco	medio aclarado micelio blanco	medio aclarado micelio blanco	MORENA
<i>Oligoporus placentus</i> *	FPRL 304-D	medio aclarado micelio blanco	medio aclarado micelio blanco	medio aclarado micelio blanco	medio aclarado micelio blanco	MORENA
<i>Serpula lacrymans</i> *	FPRL 12-C	medio aclarado micelio blanco	medio aclarado micelio blanco	medio aclarado micelio blanco	medio aclarado micelio blanco	MORENA

Los organismos marcados con asterisco (*) indican una cierta afinidad hacia maderas de gimnospermas.

4.5.2 Aserrín de liquidámbar.

Utilizando aserrín de liquidámbar como sustrato principal, según el método de Badcock (1964), en la tabla 8 se muestran las características del medio de cultivo y miceliales de los diez hongos xilófagos, en 4 periodos de incubación. Aún cuando en México no se tiene experiencia directa de esta prueba utilizando aserrín de madera de angiospermas, se estableció *a priori* que, así como con aserrín de pino, un obscurecimiento del medio de cultivo, en este caso de color café inicial, indicaría la respuesta de hongos de pudrición blanca, y un aclaramiento del medio de cultivo, la de hongos de pudrición morena.

Tres de los cinco hongos de pudrición blanca (*Ph. pini*, *S. commune* y *T. versicolor*), obscurecieron el medio de cultivo. Dos de ellos, *S. commune* y *T. versicolor*, desde la segunda semana de incubación y *Ph. pini* a partir de la cuarta semana, permaneciendo dichas tonalidades hasta las 8 semanas de incubación (fotos 37, 39, 43, 44).

G. applanatum, el cuarto hongo de pudrición blanca, respondió con una reacción dudosa, ya que en la segunda semana presentó un medio ligeramente obscurecido, aclarándose paulatinamente a partir de la cuarta a la octava semana cuando presentó un medio con zonas claras y oscuras (fotos 38, 43). Este caso coincide con lo explicado en la prueba anterior con aserrín de pino para *P. sanguineus*.

Por su parte *P. sanguineus*, el hongo restante de pudrición blanca, no tuvo ninguna reacción, con un medio de cultivo sin cambio durante las 8 semanas de incubación (fotos 37, 44), es decir que el aserrín no se aclaró ni se obscureció, por lo cual su respuesta en esta prueba no pudo ser determinada (ver tabla 8).

En cuanto a los hongos de pudrición morena (fotos 40-42, 45, 46), cuatro de ellos (*F. pinicola*, *L. sulphureus*, *L. lepideus* y *O. placentus*), reaccionaron causando un aclaramiento del medio de cultivo desde la segunda semana de incubación, acentuándose dichas tonalidades durante las 8 semanas de incubación, con la excepción de *O. placentus* que causó el aclaramiento a partir de la cuarta semana (foto 40) y a las 8 semanas presentó el medio aclarado con zonas rojizas, pero cuyo aclaramiento fue típico de pudrición morena (foto 45).

El quinto hongo de pudrición morena, *S. lacrymans*, mostró desde la cuarta semana de incubación un medio ligeramente oscurecido como si se tratara de un hongo de pudrición blanca (fotos 40, 46), por lo cual su reacción en esta prueba fue considerada como dudosa (ver fotos 40 y 46).

En general, el color micelial inicial de los 10 hongos, no presentó ninguna alteración durante el periodo de incubación.

Los tubos testigo no presentaron ninguna variación en la coloración café del medio de aserrín, durante todo el periodo de incubación.

Con la variable de aserrín de liquidámbar no existen trabajos publicados por lo que no es posible confrontar resultados.

Como puede observarse en las tablas 7 y 8, algunos hongos están marcados con asterisco (*), ésto indica que estos organismos se desarrollan mejor en madera de gimnospermas o de angiospermas, por lo cual en este trabajo se probaron los diez hongos tanto en aserrín de madera de pino como en aserrín de madera de liquidámbar, con el propósito de observar su comportamiento en ambos sustratos. Según las observaciones aquí realizadas, se determinó que, en cuanto a la cantidad de desarrollo micelial, los organismos se comportan de manera similar en ambos sustratos, sin

embargo en lo referente a una mejor visualización del cambio en coloración, se encontró que en el aserrín de pino las reacciones son más evidentes por su color claro inicial (amarillo-café claro), lo cual no sucede con liquidámbar ya que este aserrín (de color café-canela inicial) se oscurece visiblemente al ser esterilizado en autoclave, por lo cual las reacciones, especialmente las que involucran un oscurecimiento, no son tan evidentes.

TABLA 8. Características del medio de cultivo y miceliales de 10 hongos xilófagos, utilizando ASERRIN DE LIQUIDAMBAR como sustrato principal (Badcock, 1964), en 4 periodos de incubación, determinando su tipo de pudrición de acuerdo a la reacción obtenida.

HONGO	No. CEPA	REACCIONES				PUDRICION
		2 SEMANAS	4 SEMANAS	6 SEMANAS	8 SEMANAS	
<i>Ganoderma applanatum</i> *	FPRL 20-C	medio ligeramente oscurecido micelio blanco	medio ligeramente aclarado micelio blanco	medio ligeramente aclarado micelio blanco-cremoso	medio con zonas claras y oscuras micelio blanco-cremoso	DUDOSA
<i>Phellinus pini</i>	FPRL 45-A	medio sin cambio micelio amarillo-café	medio oscurecido café micelio amarillo-café	medio oscurecido café micelio amarillo-café	medio oscurecido café micelio amarillo-café	BLANCA
<i>Pycnoporus sanguineus</i> *	FPRL 150-A	medio sin cambio micelio blanco	medio sin cambio micelio blanco	medio sin cambio micelio blanco	medio sin cambio micelio blanco	NO DETERMINADA
<i>Schizophyllum commune</i> *	FPRL 5	medio oscurecido café micelio blanco	medio oscurecido café micelio blanco	medio oscurecido café micelio blanco	medio ligeramente oscurecido micelio blanco	BLANCA
<i>Trametes versicolor</i> *	FPRL 28-A	medio ligeramente oscurecido micelio blanco	medio ligeramente oscurecido micelio blanco	medio ligeramente oscurecido micelio blanco	medio ligeramente oscurecido micelio blanco	BLANCA
<i>Fomitopsis pinicola</i>	FPRL 98	medio ligeramente aclarado micelio blanco	medio aclarado micelio blanco	medio aclarado micelio blanco	medio aclarado micelio blanco	MORENA
<i>Laetiporus sulphureus</i>	FPRL 29	medio ligeramente aclarado micelio crema	medio aclarado micelio naranja	medio aclarado micelio naranja	medio aclarado micelio naranja	MORENA
<i>Lentinus lepideus</i>	FPRL 7-B	medio aclarado micelio blanco	medio aclarado micelio blanco	medio aclarado micelio blanco	medio aclarado micelio blanco	MORENA
<i>Oligoporus placentus</i>	FPRL 304-D	medio sin cambio micelio blanco	medio ligeramente aclarado micelio blanco	medio ligeramente aclarado micelio blanco	medio aclarado con zonas rojizas micelio blanco	MORENA
<i>Serpula lacrymans</i>	FPRL 12-C	medio sin cambio micelio blanco	medio ligeramente oscurecido micelio blanco	medio ligeramente oscurecido micelio blanco	medio ligeramente oscurecido micelio blanco	DUDOSA

Los organismos marcados con asterisco (*) indican cierta afinidad hacia maderas de angiospermas.

PLACA 5. Fotos 28-32. Características del medio de cultivo y miceliales de los hongos xilófagos en la Prueba de Badcock (1964), utilizando como reactivo principal Aserrín de Pino.

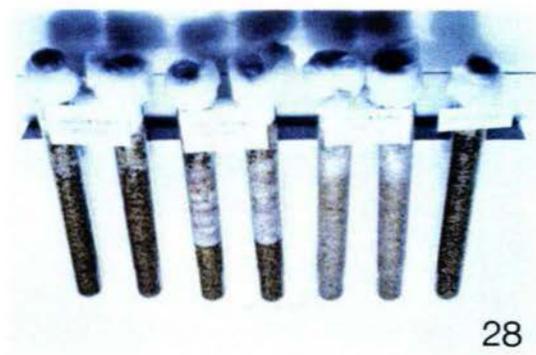
Foto 28. Hongos de pudrición blanca: *P. sanguineus* FPRL 150-A; *T. versicolor* FPRL 28-A; *S. commune* FPRL 5; testigo; a 4 semanas de incubación.

Foto 29. Testigo y reacciones observadas en 2 repeticiones del hongo de pudrición blanca *G. applanatum* FPRL 20-C; a 4 semanas de incubación.

Foto 30. Testigo y reacciones observadas en 2 repeticiones del hongo de pudrición blanca *Ph. pini* FPRL 45-A; a 4 semanas de incubación.

Foto 31. Hongos de pudrición morena: *L. sulphureus* FPRL 29; *L. lepideus* FPRL 7-B; *S. lacrymans* FPRL 12-C; testigo; a 4 semanas de incubación.

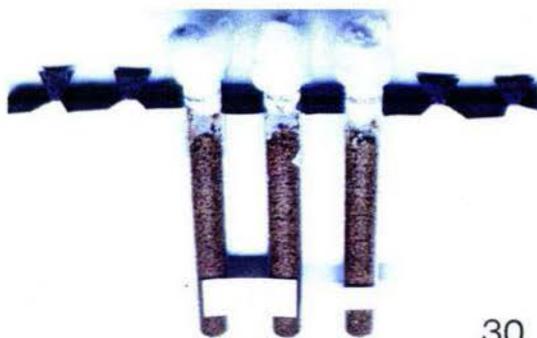
Foto 32. Hongos de pudrición morena: *O. placentus* FPRL 304-D; *F. pinicola* FPRL 98; testigo; a 4 semanas de incubación.



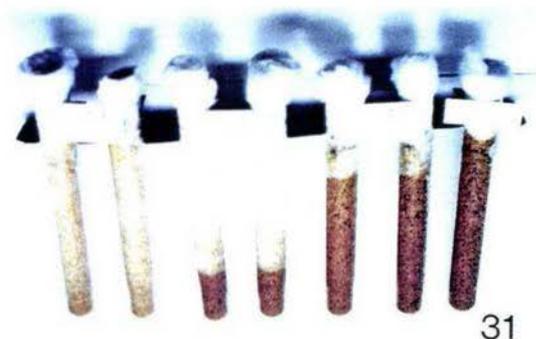
28



29



30



31



32

PLACA 6. Fotos 33-40. Características del medio de cultivo y miceliales de los hongos xilófagos en la Prueba de Badcock (1964), utilizando como reactivo principal Aserrín de Pino (cont...) y Aserrín de Liquidámbar.

Foto 33. Aserrín de Pino. Hongos de pudrición blanca: *T. versicolor* FPRL 28-A; *P. sanguineus* FPRL 150-A; *S. commune* FPRL 5; testigo; a 8 semanas de incubación.

Foto 34. Aserrín de Pino. Hongos de pudrición blanca: *G. applanatum* FPRL 20-C; *Ph. pini* FPRL 45-A; testigo; a 8 semanas de incubación.

Foto 35. Aserrín de Pino. Hongos de pudrición morena: *F. pinicola* FPRL 98; *L. sulphureus* FPRL 29; *S. lacrymans* FPRL 12-C; testigo; a 8 semanas de incubación.

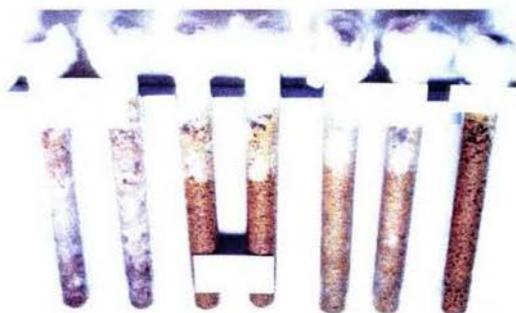
Foto 36. Aserrín de Pino. Hongos de pudrición morena: *L. lepideus* FPRL 7-B; *O. placentus* FPRL 304-D; testigo; a 8 semanas de incubación.

Foto 37. Aserrín de Liquidámbar. Hongos de pudrición blanca: *S. commune* FPRL 5; *T. versicolor* FPRL 28-A; *P. sanguineus* FPRL 150-A; testigo; a 4 semanas de incubación.

Foto 38. Aserrín de Liquidámbar. Testigo y reacciones observadas en 2 repeticiones del hongo de pudrición blanca *G. applanatum* FPRL 20-C; a 4 semanas de incubación.

Foto 39. Aserrín de Liquidámbar. Testigo y reacciones observadas en 2 repeticiones del hongo de pudrición blanca *Ph. pini* FPRL 45-A; a 4 semanas de incubación.

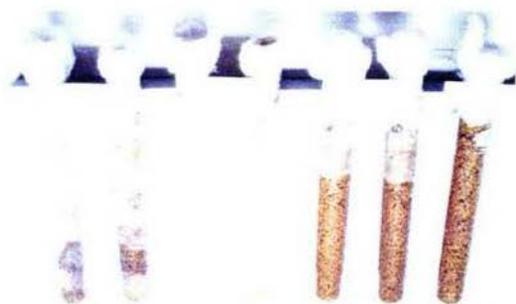
Foto 40. Aserrín de Liquidámbar. Hongos de pudrición morena: *F. pinicola* FPRL 98; *O. placentus* FPRL 304-D; *S. lacrymans* FPRL 12-C; testigo; a 4 semanas de incubación.



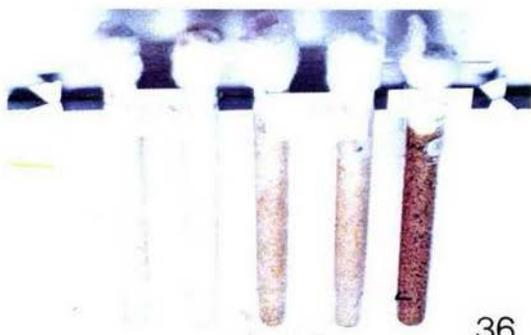
33



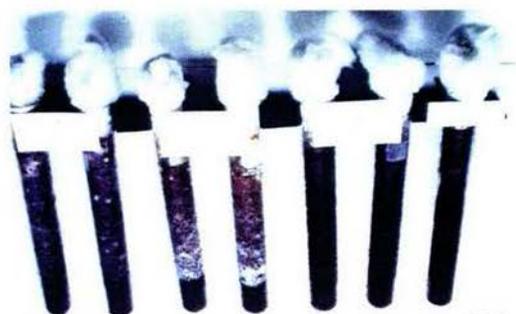
34



35



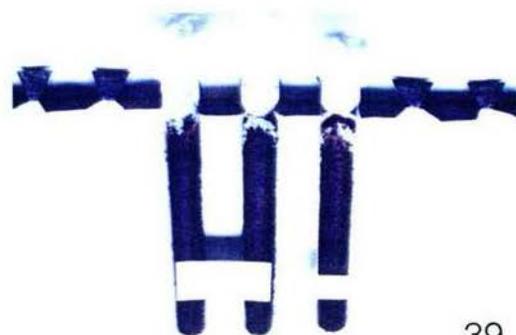
36



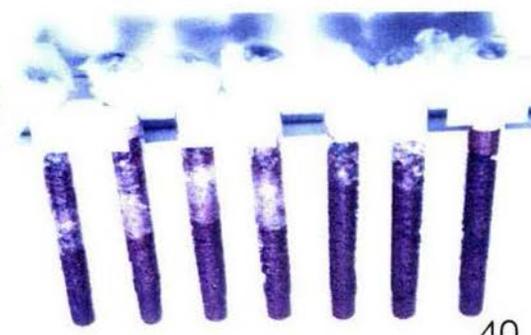
37



38



39



40

PLACA 7. Fotos 41-46. Características del medio de cultivo y miceliales de los hongos xilófagos en la Prueba de Badcock (1964), utilizando como reactivo principal Aserrín de Liquidámbar (cont...).

Foto 41. Testigo y reacciones observadas en 2 repeticiones del hongo de pudrición morena *L. lepideus* FPRL 7-B; a 4 semanas de incubación.

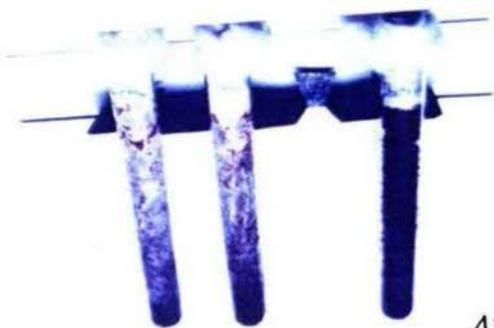
Foto 42. Testigo y reacciones observadas en 2 repeticiones del hongo de pudrición morena *L. sulphureus* FPRL 29; a 4 semanas de incubación.

Foto 43. Hongos de pudrición blanca: *G. applanatum* FPRL 20-C; *Ph. pini* FPRL 45-A; testigo; a 8 semanas de incubación.

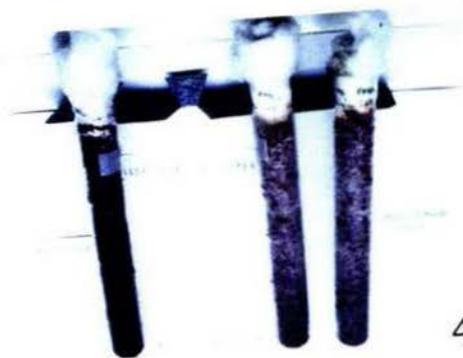
Foto 44. Hongos de pudrición blanca: *T. versicolor* FPRL 28-A; *P. sanguineus* FPRL 150-A; *S. commune* FPRL 5; testigo; a 8 semanas de incubación.

Foto 45. Hongos de pudrición morena: *L. lepideus* FPRL 7-B; *O. placentus* FPRL 304-D; testigo; a 8 semanas de incubación.

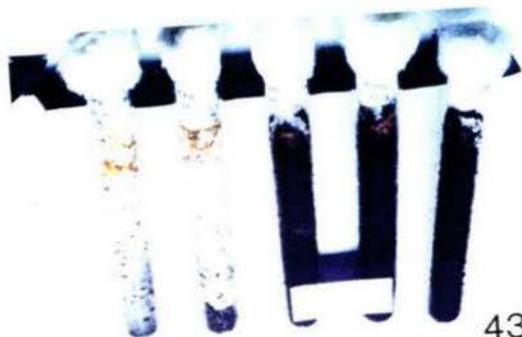
Foto 46. Hongos de pudrición morena: *S. lacrymans* FPRL 12-C; *L. sulphureus* FPRL 29; *F. pinicola* FPRL 98; testigo; a 8 semanas de incubación.



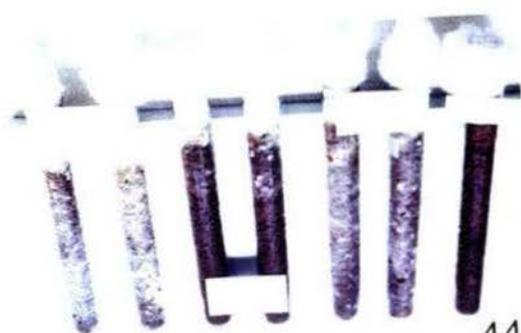
41



42



43



44



45



46

4.6 Prueba de Ruiz Rodríguez-Pinzón Picaseño (aserrín-guayacol).

La tabla 9, muestra las características del medio de cultivo y miceliales de los 10 hongos xilófagos después de añadir 3 gotas de guayacol sobre el micelio previamente desarrollado durante 3 semanas en medio EMA con aserrín de pino, según el método de Ruiz Rodríguez y Pinzón Picaseño (1986). Dichos autores determinan como organismos causantes de pudrición blanca, a aquellos en los que en el medio en que se desarrollaron, inicialmente de color ambarino, se produce una reacción con tonalidades magenta a violada con el guayacol, y como organismos de pudrición morena, si no hay tinción. Sin embargo, en el presente trabajo no se aplica la misma terminología a dichas tonalidades, para el EMA-aserrín inicial se utiliza color miel, y a las reacciones correspondientes a pudrición blanca, se ha preferido denominarlas café claro y púrpura-rojo toscano (tomando como referencia los colores Prismacolor Nos. 931 y 937 para designar al color púrpura y al rojo toscano, respectivamente, por ser los más ambiguos).

Según esta tabla, los cinco hongos de pudrición blanca (*G. applanatum*, *Ph. pini*, *P. sanguineus*, *S. commune* y *T. versicolor*), dieron reacción positiva, obteniéndose en el medio de cultivo zonas de reacción con tonalidades café claro, o púrpura-rojo toscano, algunos desde el primer día de reacción, como *G. applanatum*, *Ph. pini* y *T. versicolor*, este último dio la reacción más evidente de color púrpura-rojo toscano intenso; a los 3 días de reacción, *P. sanguineus* y *S. commune* presentaron una reacción de color café claro (ver fotos 47-48). Los hongos mostraron zonas miceliales de color variado: púrpura-rojo toscano, *G. applanatum*; café-rojizo, *Ph. pini* y *T. versicolor*; crema con zonas cafés, *S. commune*; mientras que *P. sanguineus* no mostró cambio en su micelio, de color blanco-cremoso (ver tabla 9).

Ruiz Rodríguez y Pinzón Picaseño (1986) y Ruiz Rodríguez (1991) obtuvieron reacciones positivas con el mismo aislamiento de *T.*

versicolor; coincidiendo los actuales resultados con los obtenidos por estos autores.

Por su parte, los cinco hongos de pudrición morena (*F. pinicola*, *L. sulphureus*, *L. lepideus*, *O. placentus* y *S. lacrymans*) en esta prueba no presentaron ninguna tinción en el medio de cultivo ni en su micelio durante los 3 días de reacción siguientes a la adición del guayacol (ver foto 49).

Las reacciones obtenidas en esta prueba, fueron similares a las obtenidas por Ruiz Rodríguez y Pinzón Picaseño (1986) y Ruiz Rodríguez (1991), utilizando varias cepas de *F. pinicola* incluyendo la misma cepa que se utilizó aquí.

Las cajas testigo no tuvieron ningún cambio en la coloración miel del medio de cultivo, permaneciendo así durante el periodo de reacción.

TABLA 9. Características del medio de cultivo y miceliales, de 10 hongos xilófagos, en 2 períodos de reacción, al añadir 3 GOTAS DE GUAYACOL SOBRE EL MICELIO DESARROLLADO PREVIAMENTE (3 semanas) EN MEDIO EMA CON ASERRIN (Ruiz Rodríguez-Pinzán Picaseño, 1986), determinando su tipo de pudrición de acuerdo a la reacción obtenida.

HONGO	No. CEPA	REACCIONES		
		1 DIA	3 DIAS	PUDRICION
<i>Ganoderma applanatum</i>	FPRL 20-C	medio púrpura-rojo toscano micelio crema con zonas púrpura-rojo toscano	medio púrpura-rojo toscano micelio púrpura-rojo toscano	BLANCA
<i>Phellinus pini</i>	FPRL 45-A	medio con halo púrpura-rojo toscano micelio amarillo-café	medio con halo púrpura-rojo toscano micelio café-rojizo	BLANCA
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	FPRL 150-A	medio sin tinción micelio blanco-cremoso	medio café claro micelio blanco-cremoso	BLANCA
<i>Schizophyllum commune</i>	FPRL 5	medio sin tinción micelio blanco	medio café claro micelio crema con zonas café	BLANCA
<i>Trametes versicolor</i>	FPRL 28-A	medio púrpura-rojo toscano micelio café-rojizo	medio púrpura-rojo toscano micelio café-rojizo	BLANCA
<i>Fomitopsis pinicola</i>	FPRL 98	medio sin tinción micelio blanco	medio sin tinción micelio blanco	MORENA
<i>Laetiporus sulphureus</i>	FPRL 29	medio sin tinción micelio naranja	medio sin tinción micelio naranja	MORENA
<i>Lentinus lepideus</i>	FPRL 7-B	medio sin tinción micelio blanco	medio sin tinción micelio blanco-cremoso	MORENA
<i>Oligoporus placentus</i>	FPRL 304-D	medio sin tinción micelio blanquizzo	medio sin tinción micelio blanquizzo	MORENA
<i>Serpula lacrymans</i>	FPRL 12-C	medio sin tinción micelio blanco	medio sin tinción micelio blanco-cremoso	MORENA

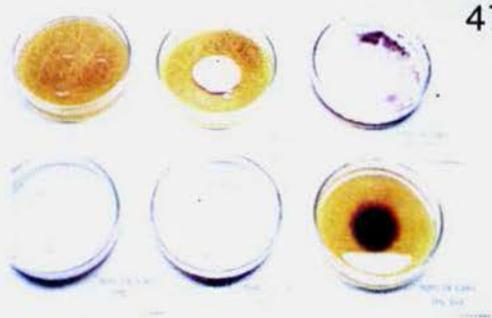
PLACA 8. Fotos 47-49. Características del medio de cultivo y miceliales de los hongos xilófagos en la Prueba de Ruiz Rodríguez-Pinzón Picaseño (1986), utilizando Aserrín y Guayacol.

Foto 47. Hongos de pudrición blanca: testigo; *P. sanguineus* FPRL 150-A; *T. versicolor* FPRL 28-A; *S. commune* FPRL 5; *G. applanatum* FPRL 20-C; *Ph. pini* FPRL 45-A; a las 2 horas con 30 minutos de reacción.

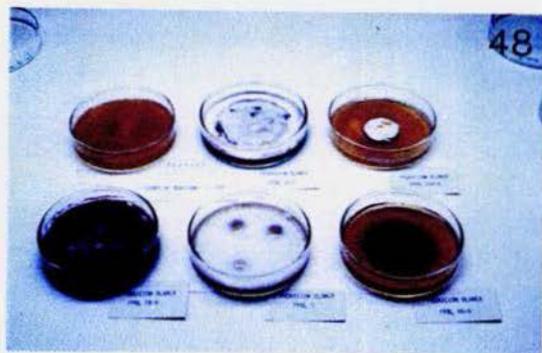
Foto 48. Hongos de pudrición blanca: testigo; *G. applanatum* FPRL 20-C; *P. sanguineus* FPRL 150-A; *T. versicolor* FPRL 28-A; *S. commune* FPRL 5; *Ph. pini* FPRL 45-A; a 1 día de reacción.

Foto 49. Hongos de pudrición morena: testigo; *S. lacrymans* FPRL 12-C; *L. lepideus* FPRL 7-B; *O. placentus* FPRL 304-D; *F. pinicola* FPRL 98; *L. sulphureus* FPRL 29; a 1 día de reacción.

47



48



49



4.7 Análisis comparativo.

Con el propósito de analizar cuál o cuáles pruebas ofrecen mejores expectativas para determinar de la manera más confiable y práctica el tipo de pudrición en los hongos xilófagos, se proponen a continuación dos enfoques:

- 1.- Un índice porcentual calculado de acuerdo a los resultados obtenidos respecto al número de hongos ensayados, el cual refleja el grado de confiabilidad obtenido en este trabajo en cada una de las pruebas realizadas, y,
- 2.- Las ventajas y desventajas técnicas observadas experimentalmente en cada una de ellas.

1.- Para poder visualizar los resultados obtenidos con las 6 pruebas realizadas, con sus variantes, es decir, en total 9 posibilidades, éstos fueron reunidos en la tabla 10, la cual indica que la prueba de **Aserrín-guayacol** es la más confiable, ya que fue la única donde no hubo ninguna reacción dudosa, puesto que los 5 hongos de pudrición blanca dieron reacción positiva y los 5 hongos de pudrición morena dieron reacción negativa a la formación de tinciones en el medio de cultivo, por lo cual en este trabajo se le consideró con una confiabilidad del 100 %.

Posteriormente se tienen las pruebas de Col I y Col II con un 90 % de confiabilidad cada una de ellas, ya que en ambas se obtuvieron reacciones dudosas con un solo hongo, *S. lacrymans*, en sus 3 repeticiones realizadas.

Así mismo, la prueba de Badcock en su variante de **Aserrín de pino**, también muestra tener un 90 % de confiabilidad ya que también con sólo un hongo, aunque diferente, *P. sanguineus*, se dieron reacciones dudosas en sus 2 repeticiones.

Por su parte, la variante de **Aserrín de liquidámbar** tuvo un 70 % de confiabilidad, ya que con dos hongos, *G. applanatum* y *S. lacrymans*, se dieron reacciones dudosas en sus 2 repeticiones, y con un tercer hongo, *P. sanguineus*, no se tuvo ningún tipo de reacción aunque sí hubo crecimiento micelial; obsérvese que este mismo hongo en la prueba de **Aserrín de pino** dio una reacción dudosas.

Las variantes con **Rojo neutro** y **Violeta de genciana**, en la prueba de Jorgensen-Vejlby tuvieron también un 70 % de confiabilidad ya que tres organismos en cada una de ellas dieron reacciones dudosas. En la variante con **Rojo neutro**, los hongos *S. commune* y *F. pinicola* expusieron reacciones dudosas en sus 3 repeticiones, mientras que *L. lepideus* sólo dio reacción dudosa en una de sus 3 repeticiones. Por su parte, con **Violeta de genciana**, los hongos *L. sulphureus* y *O. placentus* produjeron reacciones dudosas en sus 3 repeticiones y *F. pinicola* en 2 de las 3 repeticiones.

Por último, las variantes con **Acido gálico** y **Acido tánico** de la prueba de Badcock mostraron un 70 % y 60 % de confiabilidad respectivamente. Con **Acido gálico** los hongos *G. applanatum* y *S. commune* dieron reacciones dudosas en sus 3 repeticiones; mientras que, *P. sanguineus*, no presentó crecimiento micelial en sus 3 repeticiones, y no se observó ninguna reacción. Así mismo, en **Acido tánico** los hongos *F. pinicola*, *L. lepideus* y *O. placentus* dieron reacciones dudosas en sus 3 repeticiones; y, por su parte, *P. sanguineus* (de la misma forma que con **Acido gálico**), no produjo ni reacción ni crecimiento micelial en sus 3 repeticiones.

2.- Con respecto a las ventajas y desventajas desde el punto de vista técnico, según un orden preferencial, en primer lugar habría que ubicar a la prueba de **Aserrín-guayacol**, pues además de tener un 100 % de confiabilidad, tiene la ventaja de proporcionar una fácil interpretación de las reacciones producidas, ya que la

tinción producida por el guayacol en el medio de cultivo donde se desarrollaron los hongos de pudrición blanca fue muy evidente; también es conveniente por la facilidad y economía para la adquisición de dicho reactivo en cualquier droguería; en cuanto al tiempo requerido, éste fue de 39 días en total, incluyendo la fase de desarrollo micelial y los periodos de incubación y de reacción. Sin embargo, de la misma forma que diversas pruebas, tiene la desventaja de no ofrecer una reacción propia para pudrición morena, además de que es relativamente laborioso porque se requiere la obtención de aserrín de madera para preparar el medio de cultivo.

Siguiendo con las pruebas de Col I y Col II, ambas proporcionan resultados equivalentes con un 90 % de confiabilidad, éstas tienen la ventaja de dar una reacción propia y bien definida para cada tipo de pudrición, siendo fácil la interpretación de la reacción producida, además de utilizar un producto natural, la col roja (*Brassica oleraceae* var. *capitata*), vegetal sumamente accesible en cualquier mercado a un precio económico. En cuanto a su metodología, ésta es similarmente sencilla, porque el extracto de col roja se puede preparar con poco esfuerzo el mismo día que el medio EMA, o bien se puede preparar con anticipación, ya que el extracto se conserva en refrigeración por 3 meses sin perder sus propiedades originales (Jorgensen y Vejlby, 1953). El tiempo total requerido para estas 2 pruebas fue de 34 y 35 días respectivamente.

Las variantes de Aserrín de pino y Aserrín de liquidámbar, con un 90 % y 70 % de confiabilidad respectivamente, tienen la ventaja de utilizar aserrín de madera como sustrato principal (selectivo para los hongos lignícolas), lo cual confiere veracidad a las reacciones, así como la de dar una reacción propia para cada tipo de pudrición; pero la interpretación de los resultados puede no ser tan fácil, por lo que se recomienda especialmente la utilización de cepas control de los dos tipos de pudrición. Aunque

la prueba es económica, metodológicamente se complica porque requiere de la preparación del aserrín y de la obtención de las harinas de hueso y de maíz para preparar el medio de cultivo; sin embargo, su principal desventaja está en el tiempo requerido para su realización, que en este trabajo fue de 42 a 70 días (6 a 10 semanas), para obtener reacciones evidentes.

Por su parte, las opciones de **Rojo neutro** y **Violeta de genciana**, ambas con un 70 % de confiabilidad, tienen la ventaja de que su metodología es la más sencilla de todas las ensayadas, ya que el colorante (rojo neutro o violeta de genciana) es colocado directamente al medio EMA y juntos (colorante y medio) son esterilizados. El colorante violeta de genciana es sumamente económico y fácil de adquirir en cualquier droguería, lo cual no ocurre con el colorante rojo neutro ya que su precio es elevado y no se consigue tan fácilmente. Ambas pruebas requieren de un tiempo total de 35 días (5 semanas), sin embargo tienen la desventaja de no dar una reacción propia a cada tipo de pudrición y no poderse interpretar fácilmente las reacciones, ya que no son muy evidentes, por lo cual, se recomienda particularmente la utilización de testigos para detectar comparativamente los cambios que se vayan produciendo.

Finalmente se tienen las alternativas de **Acido gálico** y **Acido tánico**, con 70 % y 60 % de confiabilidad, respectivamente. Ambas pruebas tienen las ventajas de que el tiempo necesario para su realización es en total de 28 días (4 semanas, siendo el menor tiempo requerido en comparación con las 7 opciones anteriores), de que las reacciones son bastante evidentes y que su metodología no es tan complicada. Sin embargo, aunado al bajo porcentaje de confiabilidad y que no dan una reacción propia para pudrición morena, presentan otras desventajas, como el costo y la accesibilidad de ámbos ácidos.

Como se ha mencionado en cada caso, con excepción de la técnica de aserrín-guayacol, en todas las otras opciones, al confrontar resultados con los de otros trabajos hubo coincidencias y discrepancias, incluyendo casos en los que la reacción en el presente trabajo fue más correcta que en el ensayo de la descripción original. Esto puede deberse a consecuencia del azar o del error experimental, pero principalmente debe interpretarse como debido al uso de material biológico diferente, específicamente, los aislamientos empleados.

TABLA 10.- Compilación de resultados obtenidos en 9 posibilidades metodológicas, utilizando sustratos diferenciales, para determinar el tipo de pudrición de 10 hongos xilófagos (utilizando 2 ó 3 repeticiones por hongo), de acuerdo a la reacción obtenida y su comparación bibliográfica.

HONGO	NO. CEPA	SUSTRATOS DIFERENCIALES										PUDRICION	
		ACIDO GALICO	ACIDO TANICO	ROJO NEUTRO	VIOLETA GENCIANA	COL I	COL II	ASERRIN PINO LIQUIDAMBAR	ASERRIN GUAYACOL	EXPERIMENTAL	BIBLIOGRAFICA		
		A	B	C	D	E	F	G	H				
<i>Ganoderma applanatum</i>	FPRL 20-C	???	+++	+++	+++	+++	+++	++	??	+++	BLANCA	BLANCA	
<i>Phellinus pini</i>	FPRL 45-A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	BLANCA	BLANCA	
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	FPRL 150-A	0 0 0	0 0 0	+++	+++	+++	+++	??	**	+++	BLANCA	BLANCA	
<i>Schizophyllum commune</i>	FPRL 5	???	+++	???	+++	+++	+++	++	++	+++	BLANCA	BLANCA	
<i>Trametes versicolor</i>	FPRL 28-A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	BLANCA	BLANCA	
<i>Fomitopsis pinicola</i>	FPRL 98	---	???	???	??-	---	---	--	--	---	MORENA	MORENA	
<i>Laetiporus sulphureus</i>	FPRL 29	---	---	---	???	---	---	--	--	---	MORENA	MORENA	
<i>Lentinus lepideus</i>	FPRL 7-B	---	???	?--	---	---	---	--	--	---	MORENA	MORENA	
<i>Oligoporus placentus</i>	FPRL 304-D	---	???	---	???	---	---	--	--	---	MORENA	MORENA	
<i>Serpula lacrymans</i>	FPRL 12-C	---	---	---	---	???	???	--	??	---	MORENA	MORENA	

A,B: (+)= Tinción crema-café obscuro del medio de cultivo, pudrición blanca. (-)= Sin reacción, pudrición morena.

(0)= Sin crecimiento micelial y sin reacción. (?)= Reacción dudosa.

C,D: (+)= Decoloración del medio de cultivo, pudrición blanca. (-)= Sin reacción, pudrición morena. (?)= Reacción dudosa.

E,F: (+)= Tinción amarilla del medio de cultivo, pudrición blanca. (-)= Tinción roja del medio de cultivo, pudrición morena. (?)= Reacción dudosa.

G: (+)= Oscurecimiento del aserrín, pudrición blanca. (-)= Aclaramiento del aserrín, pudrición morena.

(*)= Con crecimiento micelial y sin reacción. (?)= Reacción dudosa.

H: (+)= Tinción café claro a púrpura-rojo toscano del medio de cultivo, pudrición blanca. (-)= Sin reacción, pudrición morena.

5. CONSIDERACIONES FINALES

A pesar de que la madera es un valioso recurso natural renovable, en México pocas prácticas se realizan para mejorar los métodos de diagnóstico y preservación ante los problemas de pudrición, siendo que el mayor deterioro es causado por los hongos xilófagos. Esto hace que las investigaciones en el campo del biodeterioro de la madera, como el determinar el tipo de pudrición que causan los hongos xilófagos, haya sido uno de los objetivos en diversos estudios fisiológicos integrales de dichos organismos, utilizando alguno de los métodos más recomendados.

Sin embargo, hasta el momento, no se había realizado en México ningún trabajo donde se tuviera como objetivo principal, presentar una recopilación de trabajos dispersos en la bibliografía, seleccionar metodologías confiables, técnicamente sencillas, económicas, de fácil interpretación, y ensayar comparativamente tales métodos experimentales. Todo esto con el propósito de poder llegar a recomendar de una manera plena y confiable, aquellas técnicas que por sus ventajas puedan ser más útiles como herramientas para la determinación del tipo de pudrición que causan los hongos xilófagos en la madera.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo y del análisis de las ventajas y desventajas técnicas propias a cada método, se recomiendan confiablemente 4 de las 9 posibilidades ensayadas:

- 1.- Prueba de Ruiz Rodríguez-Pinzón Picaseño (ASERRIN-GUAYACOL) (con una confiabilidad del 100%).
- 2.- Prueba de Jorgensen-Vejlby (COL I),
- 3.- Prueba modificada de Jorgensen-Vejlby (COL II), y
- 4.- Prueba de Badcock (ASERRIN DE PINO) (con 90% de confiabilidad, cada una de las 3 pruebas anteriores).

Es necesario considerar que, se debe tomar una actitud objetiva al momento de realizar las observaciones para ser imparcial y no dar por positiva una reacción errática o dudosa simplemente por ser la esperada. Tan importante como mantener una postura crítica al analizar los resultados obtenidos en cada una de las pruebas utilizadas, es el confrontarlos con la información de otros trabajos similares.

Cuando se tienen resultados erráticos o dudosos en una prueba de laboratorio, hay que tener en cuenta que los factores involucrados pueden ser considerados desde dos puntos de vista: metodológicos, es decir, que probablemente la prueba no es apta para todos los organismos, ya sea en cuanto a tipo y concentración del reactivo, tiempo de reacción, composición del medio de cultivo, tiempo de incubación, temperatura de incubación, entre otros; o bien, biológicos, es decir, desde el punto de vista del organismo fúngico, cuando éste no produce las enzimas o cantidad suficiente de ellas para poder ser detectadas mediante esos reactivos adicionados al medio de cultivo.

Siendo objetivamente realistas, se debe aceptar, como lo han hecho prácticamente todos los autores, que ninguna técnica ha probado ser hasta ahora infalible para todos los hongos, ya sean especies o aislamientos. Los resultados del método aserrín-guayacol han sido certeros hasta el momento, pero esto sólo sirve para afirmar que se trata de una prueba prometedora. Por ello, habrá que enfatizar la recomendación de utilizar varias pruebas para obtener datos totalmente fidedignos.

Con base en los resultados obtenidos, se desea plantear la posibilidad de utilizar las cuatro técnicas recomendadas, ya sea como una herramienta en el laboratorio para la caracterización fisiológica de hongos xilófagos cuyo tipo de pudrición no se conoce o sea dudoso (como ya se ha venido realizando), donde este

dato contribuiría mucho al conocimiento de su biología; para el diagnóstico de problemas de biodeterioro de madera en almacén o en servicio, o bien de degradación en árboles, permitiendo determinar el tipo de daño que está ocurriendo; como base y complemento en estudios fungísticos, pues este dato es de gran ayuda en la determinación de las especies y descripción de las mismas, e incluso para la toma de decisiones taxonómicas.

Se propone también que de preferencia sean utilizados como controles organismos típicos a cada uno de los tipos de pudrición para que la reacción sea más evidente y fácil de interpretar, esto es más necesario en algunas de las opciones, como ya se indicó; así como el uso de testigos no inoculados (blancos).

Finalmente, considerando que este trabajo puede servir de pauta para que en futuros ensayos se prueben nuevas metodologías, se propone la utilización de extractos de otros productos vegetales como el betabel (*Beta vulgaris* L.), la flor morada de bugambilia (*Bougainvillea spectabilis* Choisy), y la cebolla morada (*Allium cepa* L.), como posibles reactivos, ya que éstos tienen la característica (como el extracto de col roja utilizado en este trabajo) de contener antocianinas (pigmentos rojos o azules presentes en diversos órganos de algunos vegetales) que pudieran cambiar su coloración al reaccionar con los sistemas enzimáticos producidos por los hongos xilófagos, permitiendo así la detección de los dos tipos de pudrición, la blanca y la morena.

6. LITERATURA CONSULTADA

- BADCOCK, E. C., 1941. New methods for the cultivation of wood-rotting fungi. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 25: 200-205.
- BADCOCK, E. C., 1943. Methods for obtaining fructifications of wood-rotting fungi in culture. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 26: 127-132.
- BADCOCK, E. C., 1964. Description of cultures. Escrito mimeografiado, 2 p.
- BAVENDAMM, W. T., 1928. Über das vorkommen und den nachweis von oxydasen bei holzerstörenden pilzen. *Zeitschr. f. Pflanzenkrank. u. Schutz.* 38: 257-276.
- BOIDIN, P. J., 1951. Recherche de la tyrosinase et de la laccase chez les Basidiomycètes en culture pure. Milieux différentiels. Intérêt systématique. *Rev. Mycol.* 16(3): 173-197.
- BOYCE, J. S., 1961. *Forest pathology*. Mc Graw-Hill. N.Y., 572 p.
- CAMPBELL, W. A., 1938. The cultural characteristics of the species of *Fomes*. *Bull. Torrey Bot. Club* 65(1): 31-69.
- CAREY, J. K., 1975. Isolation and characterization of wood-inhabiting fungi. In: LOVELOCK, D. C. y R. S. GILBERT (Eds.). *Microbial aspects of the deterioration of materials*. Academic Press. Londres, pp. 23-38.
- CARTWRIGHT, K. St. G. y W. P. K. FINDLAY, 1958. *Decay of timber and its prevention*. Her Majesty's Stat. Off. Londres, 332 p.
- DAVIDSON, R. W., 1960. The cause and prevention of deterioration in wood. *Proceedings Wood Pole Institute*, Jun. Colorado State University. 17 pp.
- DAVIDSON, R. W., W. A. CAMPBELL y D. J. BLAISDELL, 1938. Differentiation of wood-decaying fungi by their reactions on gallic or tannic acid medium. *J. Agric. Res.* 57(9): 683-695.
- EGGINS, H. D. W. y D. ALLSOPP, 1975. Biodeterioration and biodegradation by fungi. In: SMITH, J. E. y D. R. BERRY (Eds.). *The filamentous fungi. Vol. 1. Industrial Mycology*. Arnold. Londres, pp. 300-319.
- ERIKSSON, K. E., B. PETERSSON y V. WESTERMARK, 1975. Enzymic mechanisms of cellulose degradation caused by the rot fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*). In: LIESE, W. (Ed.), *Biological transformation*

of wood by microorganisms. Springer-Verlag. Berlín, pp. 143-152.

- FINDLAY, W. P. K., 1967. *Timber pests and diseases.* Pergamon Press. Oxford, 280 p.
- GARCIA DIAZ, R., 1984. *Sistema internacional de unidades.* Ed. Limusa. México, D.F., 331 p.
- GILBERTSON, R. L., F.F. LOMBARD y E. R. CANFIELD, 1975. *Gum guaiac in field tests for extracellular phenoloxidases of wood-rotting fungi and other Basidiomycetes.* U.S.D.A., For. Serv., Res. Pap. FPL 269. 24 p.
- HARDIE, K., 1980. A review of strength testing as a measure of biodeterioration of wood and wood based materials. *Int. Biodetn. Bull.* 16(1): 1-8.
- HARKIN, J. M., M. J. LARSEN y J. R. OBST, 1974. Use of syringaldazine for detection of laccase in sporophores of wood rotting fungi. *Mycologia* 66(3): 469-476.
- HENNINGSSON, B., 1965. Physiology and decay activity of the birch conk fungus *Polyporus betulinus* (Bull.) Fr. *Stud. Forest. Suec.* 34: 1-77.
- HERNANDEZ JIMENEZ, J., 1984. *Tipo de pudrición, agresividad y tolerancia a la creosota de algunos hongos xilófagos.* Tesis Profesional de Biólogo. ENEP-Iztacala, UNAM. Los Reyes Iztacala, 49 p.
- HERRERA CAMPOS, M. A., 1985. *Estudios in vitro del micelio de y la pudrición ocasionada por dos poliporáceos xilófagos: Fomes pinicola y Polyporus versicolor.* Tesis Profesional de Biólogo. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F., 94 p.
- HIGHLEY, T. L. y T. K. KIRK, 1979. Mechanisms of wood decay and the unique features of heartrots. *Phytopath.* 69(10): 1151-1157.
- HIGUCHI, T. y K. KITAMURA, 1953. Biochemical study of wood-rotting fungi (II). Relation between Bavendamm's reaction and tyrosinase. *J. Jap. Forest. Soc.* 35: 350-354.
- HUDSON, H. J., 1972. *Fungal saprophytism.* Arnold. Londres, 67 p.
- HUNT, G. M. y G. A. GARRAT, 1962. *Preservación de la madera.* Ed. Salvat. Barcelona, 486 p.
- JORGENSEN, E. y K. VEJLBY, 1953. A new polyphenoloxidase test. *Physiol. Pl.* 6: 533-537.

- KIRK, K., 1975. Chemistry of lignin degradation by wood-destroying fungi. *IN: LIESE, W. (Ed.). Biological transformation of wood by microorganisms.* Springer-Verlag. Berlín, pp. 153-164.
- KOENIGS, J. W., 1972. Production of extracellular hydrogen peroxide and peroxidase by wood-rotting fungi. *Phytopath.* 62: 100-110.
- LAW, K., 1950. Phenol oxidases in some wood-rotting fungi. *Ann. Bot., n.s.* 14(53): 69-78.
- LEVY, J. F., 1965. The soft rot fungi: their mode of action and significance in the degradation of wood. *IN: PRESTON, R. D. (Ed.). Advances in botanical research. Vol. 2.* Academic Press. Londres, pp. 323-357.
- LINDBERG, G. y G. FAHRAEUS, 1952. Nature and formation of phenoloxidases in *Polyporus zonatus* and *P. versicolor*. *Physiol. Pl.* 5: 277-283.
- LINDBERG, G. y G. HOLM, 1952. Occurrence of tyrosinase and laccase in fruit bodies and mycelia of some Hymenomycetes. *Physiol. Pl.* 5: 100-114.
- LOPEZ GUERRERO, M. T., 1979. *Caracterización de algunos cultivos de hongos causantes de la pudrición de la madera.* Tesis Profesional de Biólogo. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F., 76 p.
- MANION, P. D., 1981. *Tree disease concepts.* Prentice-Hall. Englewood, 97 p.
- NOBLES, M. K., 1958a. A rapid test for extracellular oxidase in cultures of wood-inhabiting Hymenomycetes. *Canad. J. Bot.* 36(1): 91-99.
- NOBLES, M. K., 1958b. Cultural characters as a guide to the taxonomy and phylogeny of the Polyporaceae. *Canad. J. Bot.* 36: 883-926.
- PANSHIN, A. J. y C. DE ZEEUW, 1970. *Textbook of wood technology. Vol. 1.* Mc Graw-Hill. Nueva York, 705 p.
- PEREYRA VENEGAS, J., 1988. *Prueba indicadora en laboratorio de tipo de pudrición y agresividad de algunos hongos xilófagos del Estado de México sobre cuatro maderas comerciales.* Tesis Profesional de Biólogo. ENEP-Iztacala, UNAM. Los Reyes Iztacala, 43 p.
- PINZON-PICASEÑO, L. M., M. T. LOPEZ GUERRERO, F. A. VELIZ AVILA y J. D. MARTINEZ MARCIAL, 1982. Métodos para el estudio de algunas características de los hongos xilófagos como

organismos degradadores de la madera. *Bol. Soc. Mex. Mic.* 17: 147-157.

- PINZON-PICASENO, L. M. y J. HERNANDEZ JIMENEZ, 1987. Tipo de pudrición y agresividad hacia la madera de pino y liquidámbar de algunos hongos xilófagos mexicanos. *An. Inst. Biol. UNAM, 57 (1986) Ser. Botánica* (No. Unico): 1-10.
- PINZON-PICASENO, L. M. y F. A. VELIZ AVILA, 1984. Tipo de pudrición y agresividad hacia la madera en cuatro cepas de hongos xilófagos mexicanos. *Bol. Soc. Mex. Mic.* 19: 65-72.
- PRESTON, A. y E. I. McLENNAN, 1948. The use of dyes in culture media for distinguishing brown and white wood-rotting fungi. *Ann. Bot., n.s.* 12(45): 53-64.
- RUIZ RODRIGUEZ, M. E., 1991. *Estudios fisiológicos integrales con hongos de importancia forestal: acción xilofágica y comportamiento en cultivo*. Tesis Profesional de Biólogo. ENEP-Iztacala, UNAM. Los Reyes Iztacala, 152 p.
- RUIZ RODRIGUEZ, M. E. y L. M. PINZON-PICASENO, 1986. Ensayo de un nuevo método para determinar el tipo de pudrición que causan los hongos xilófagos de importancia forestal. *Resúmenes del Segundo Congreso Nacional de Micología*, Oaxtepec, Mor. p. 125.
- SAVORY, J. G., 1954. Breakdown of timber by Ascomycetes and fungi imperfecti. *Ann. appl. Biol.* 41(2): 336-347.
- SCHEFFER, T. C. y E. B. COWLING, 1966. Natural resistance of wood to microbial deterioration. *Annual Rev. Phytopathol.* 4: 147-170.
- TSOUMIS, G., 1968. *Wood as raw material*. Pergamon Press. Oxford, 267 p.
- ULLOA, M. y R. T. HANLIN, 1978. *Atlas de micología básica*. Ed. Concepto. México, D.F., 158 p.
- VELIZ AVILA, F. A., 1982. *Caracterización de 22 cepas de hongos basidiomicetos causantes de pudrición en la madera*. Tesis Profesional de Biólogo. ENEP-Iztacala, UNAM. Los Reyes Iztacala, 109 p.
- WILCOX, W. W., 1965. Fundamental characteristics of wood decay indicated by a sequential microscopical analysis. *For. Prod. J.* 25(7): 255-259.