

**USO DE ÁCIDOS GÁLICO Y TÁNICO, ASERRÍN Y ASERRÍN-GUAYACOL EN PRUEBAS DE LABORATORIO PARA DETERMINAR EL TIPO DE PUDRICIÓN QUE CAUSAN HONGOS XILÓFAGOS AISLADOS DE OYAMEL <sup>1</sup>**

por María Elena Ruiz<sup>2</sup> y  
Luis Manuel Pinzón-Picaseño<sup>2</sup>

**USE OF GALLIC AND TANNIC ACIDS, SAWDUST AND SAWDUST-GUAIACOL IN LABORATORY TESTS FOR ROT-TYPE DETERMINATION OF WOOD-DECAYING FUNGI ISOLATED FROM MEXICAN FIR**

**ABSTRACT**

Part of a diagnosis on Mexican fir wood-decay problems at the Nevado de Toluca National Park, State of Mexico, was to determine rot-type of isolates from typical cases with three laboratory methods: the classical Bavendamm's test, Badcock's method, and a new sawdust-guaiacol technique. Seven isolates were brown-rotters (NT-1, NT-2, NT-3, NT-6A, NT-6B, NT-6C and NT-7), whereas one isolate was a white-rotter (NT-5). Only eight out of 151 repetitions gave dubious reactions, six after the Bavendamm's test, two with Badcock's method, and none with the sawdust-guaiacol technique. Background and practical details of each method are discussed. Rot-type results were useful for the identification of the brown-rot isolates as *Fomitopsis pinicola*, the white-rotter as *Heterobasidion annosum*, and also for the diagnosis of decay problems in trees.

**KEY WORDS:** Wood-decay; *Abies religiosa*; *Fomitopsis pinicola*; *Heterobasidion annosum*.

**RESUMEN**

Como parte del diagnóstico de problemas de pudrición de la madera en oyameles del Parque Nacional Nevado de Toluca, Estado de México, a los hongos aislados de casos típicos se les determinó el tipo de pudrición que causan, aplicando tres métodos de laboratorio: la prueba clásica de Bavendamm, el método de Badcock y una nueva técnica de aserrín-guayacol. Siete aislamientos fueron causantes de pudrición morena (NT-1, NT-2, NT-3, NT-6A, NT-6B, NT-6C y NT-7) y uno de pudrición blanca (NT-5). De 151 repeticiones en total, sólo ocho dieron reacción dudosa, seis con la prueba de Bavendamm y dos con la prueba de Badcock; con la técnica de aserrín-guayacol no hubo reacciones dudosas. Se discuten antecedentes y aspectos prácticos de cada método. Los resultados fueron de utilidad para identificar a los aislamientos de pudrición morena como *Fomitopsis pinicola*, al de pudrición blanca como *Heterobasidion annosum*, así como para contribuir al diagnóstico de este tipo de problemas en árboles.

**PALABRAS CLAVE:** Pudrición de madera; *Abies religiosa*; *Fomitopsis pinicola*; *Heterobasidion annosum*.

<sup>1</sup> Parte de la tesis profesional de la primera autora, Escuela Nacional de Estudios Profesionales-Iztacala, UNAM (1991).

<sup>2</sup> Laboratorio de Biodeterioro y Preservación de Productos Forestales, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal 70-233, Coyoacán, México, D.F. 04510.

Recibido: 1 de junio, 1995. Aceptado: 22 de noviembre, 1995.

Solicitud de sobretiros: Luis M. Pinzón-Picaseño<sup>2</sup>.

## INTRODUCCIÓN

Para el diagnóstico de problemas de pudrición de la madera en árboles, la determinación del tipo de pudrición que inducen los hongos causales es fundamental, y de gran ayuda también para la identificación de los aislamientos que no provienen de fructificación o teleomorfo.

Los macromicetes xilófagos pueden producir dos tipos básicos de pudrición, reconocibles a simple vista por cambios de coloración y consistencia en la madera. Al diferenciarlos, se obtiene información sobre la actividad enzimática u otros aspectos biológicos de la especie causal y el efecto de los hongos en la madera. Desafortunadamente, las inspecciones de campo, a menudo, son insuficientes para la realización de un diagnóstico confiable, debido a que las características de las pudriciones no son diferenciables en estadios tempranos, o pueden estar alteradas por factores bióticos y abióticos, como coexistencia de diversas especies fúngicas, color y densidad de la madera, fuego e intemperismo.

Para determinar confiablemente el tipo de pudrición que causan los hongos xilófagos, se pueden realizar pruebas sencillas con aislamientos en cultivo puro. Bavendamm (1928), fue quien primero ensayó esta opción con diversas sustancias fenólicas, estableciendo su prueba clásica, basada en detectar las "oxidases extracelulares" de la pudrición blanca por medio de una reacción de coloración en malta agar conteniendo ácidos gálico, o tánico. Con tal prueba, Davidson *et al.* (1938), encontraron que de 210 cepas, 96% de los hongos asociados a pudrición blanca dieron reacción positiva, y 80% de los hongos asociados a pudrición morena no presentaron reacción, lo que demuestra su efectividad. Campbell (1938) y Nobles (1948) incorporaron este método a la descripción de las características culturales del micelio para identificar aislamientos de hongos xilófagos, disolviendo los ácidos en el medio, o bien, espolvoreándolos sobre placas recién preparadas. El problema principal de esta prueba radica en lo cuestionable de la esterilización de los ácidos, y en consecuencia, la incidencia de contaminaciones.

Muchas otras técnicas se han descrito desde entonces, algunas enfocadas a resolver el problema de la esterilización. Preston y McLennan (1948), probaron 18 colorantes de varios grupos químicos esterilizables con malta agar, observando que los hongos de pudrición blanca causaban decoloración de todos ellos, pero sólo la violeta de genciana y el rojo neutro, daban resultados comparables a los de la prueba de Bavendamm. Otro medio resistente a la esterilización fue diseñado por Boidin (1951), con malta agar, buffer de ácido cítrico y fosfato de potasio (pH 4.5) y guayacol (0.2%), resultando tan confiable como los ácidos gálico y tánico. También, Kirk y Kelman (1964), usaron medios de cultivo conteniendo diversos fenoles, encontrando que el 1-Naftol, era el más efectivo.

Por su parte, Jorgensen y Vejby (1953), probaron extracto de col roja incorporado al medio, o añadido a cultivos ya desarrollados, descubriendo que su color púrpura era cambiado a amarillo por las especies que producen "oxidasa extracelular", o a rojo por las especies que no la producen, por lo que su método es más seguro, pues se evita la confusión entre los casos de pudrición morena (usualmente registrados como reacciones negativas) y aquellos hongos que no producen reacción alguna bajo las condiciones de la prueba.

Nobles (1958), propuso un método más sencillo, que consiste en añadir unas gotas de goma de guayaco en solución alcohólica sobre el micelio de hongos incubados durante tres semanas en malta agar, obteniendo una tinción azul con los de pudrición blanca.

Un método diferente fue propuesto por Schánél (1967), utilizando una hidroquinona y un aminoácido, para inducir la aparición de un pigmento rojo con hongos de pudrición blanca y lograr estimaciones cuantitativas por medio de colorimetría. Su método resultó mucho más sensible que la exposición de cultivos a vapores de guayacol, o la aplicación directa de guayacol en solución acuosa (0.1%).

Otros investigadores han preferido la madera como sustrato para sus pruebas. Etheridge (1957), utilizó un medio de cultivo líquido con harina de madera de *Picea glauca* (Moench) Voss., y caseína hidrolizada, obteniendo una zona de difusión de color café en los casos de pudrición blanca. Hudson (1972), Carey (1975) y Pinzón-Picaseño *et al.* (1982), describen otra prueba basada en el medio de aserrín formulado por Badcock (1941) para el cultivo de hongos xilófagos e inducir su fructificación, que consiste en distinguir entre hongos de pudrición blanca y morena, por cambios de coloración diferentes en el aserrín colonizado. Como se discutirá más adelante, la autoría de este método corresponde a Badcock, según un documento fechado en 1964.

En el Ejido Loma Alta del Parque Nacional Nevado de Toluca, Estado de México, se ha realizado una serie de trabajos con el fin de diagnosticar problemas de pudrición de la madera en oyameles (*Abies religiosa* [H.B.K.] Schl. et Cham.). Una evaluación de campo demostró su alta incidencia (López Barajas, 1987). Otra fase, consistió en el estudio de los caracteres culturales de los aislamientos obtenidos de casos típicos, para la identificación y descripción de los presuntos hongos causales (Ruiz Rodríguez y Pinzón-Picaseño, 1994). La contribución actual forma parte de dicha serie, tiene como objetivos determinar el tipo de pudrición que causan tales aislamientos con tres pruebas de laboratorio, incluyendo la técnica de aserrín-guayacol innovada por los autores (Ruiz Rodríguez y Pinzón-Picaseño, 1986), así como discutir algunos aspectos históricos y metodológicos de las técnicas, y la conveniencia de su aplicación para el diagnóstico de pudriciones en árboles.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los datos de la zona de procedencia, así como el método de aislamiento de las cepas empleadas, se describen en un trabajo previo (Ruiz Rodríguez y Pinzón-Picaseño, 1994). La tabla 1, sintetiza los datos de los aislamientos del Ejido Loma Alta del Parque Nacional Nevado de Toluca, Estado de México. Se utilizaron además dos cepas de procedencia extranjera como controles: una de pudrición blanca, *Trametes versicolor* FPRL-28A (en las tres pruebas), y otra de pudrición morena, *Fomitopsis pinicola* FPRL-98 (en dos de las pruebas); sus datos de origen aparecen en un catálogo (Forest Products Research Laboratory, 1969).

**Método de Bavendamm:** Se emplearon ácido gálico viejo, ácido tánico viejo y ácido tánico nuevo, incorporados por separado en medio de cultivo (extracto de malta, 15 g; agar, 20 g; ácido en polvo, 5 g; agua destilada, 1,000 ml). El extracto de malta y el agar en un matraz Erlenmeyer con 850 ml de agua destilada, y el ácido disuelto en otros 150 ml en diferente matraz, fueron esterilizados en autoclave a 121°C y 103.4 kPa, durante 20 minutos; después de enfriarse un poco, ambas partes fueron mezcladas y el medio vertido a cajas Petri de vidrio esterilizadas. Las placas se incubaron por tres días, como prueba de esterilidad. Entonces, fueron inoculadas con discos (9 mm Ø) de los 8 aislamientos previamente desarrollados, durante 14 días, en extracto de malta agar (EMA) normal. Se designaron 3 repeticiones por ácido y aislamiento, incluyendo como

control solamente a *Trametes versicolor* FPRL-28A, y un testigo sin inocular por cada ácido. Los cultivos se incubaron en cajas de plástico acrílico (tipo camisera marca CIPSA) durante 7 días a 26°C y en oscuridad.

**Método de Badcock:** Se utilizó un medio de cultivo compuesto de: aserrín de pino, 1,000 g; harina de maíz, 30 g; harina de hueso, 20 g; y agua destilada, 2,500 ml. El aserrín, secado al aire, fue tamizado en malla de 2 mm, añadidas las harinas y luego el agua, mezclando hasta obtener una pasta grumosa. Tubos de cultivo de 25 X 200 mm, fueron llenados con la pasta sin comprimirla mucho, tapados con algodón, y esterilizados en autoclave a 121°C y 103.4 kPa, durante 1 h. La inoculación se efectuó con bloques (1 cm<sup>2</sup>) del micelio desarrollado en EMA durante 14 días. Se utilizaron dos tubos por cada aislamiento y los hongos control (*Trametes versicolor* FPRL-28A y *Fomitopsis pinicola* FPRL-98), y uno sin inocular, como testigo. Los tubos, inclinados sobre soportes de aluminio dentro de las cajas de acrílico con agua destilada en el fondo, se incubaron durante 7 semanas a 26°C, oscuridad y alta humedad relativa.

**Método de aserrín-guayacol:** Para esta técnica, se empleó medio de cultivo (extracto de malta, 20 g; agar, 15 g; agua destilada, 1,000 ml) adicionado con 0.4% de aserrín de oyamel secado al aire y tamizado en malla de 0.42 mm, obtenido de tablas mediante taladro eléctrico con un accesorio para desbastar. El medio fue esterilizado en autoclave a 121°C y 103.4 kPa, durante 20 minutos y vertido a cajas Petri de vidrio esterilizadas. Concluida la prueba de esterilidad de 3 días, las placas fueron inoculadas con discos (9 mm Ø), utilizando el micelio predesarrollado 14 días en EMA normal. Los cultivos se incubaron durante 3 semanas a 26°C, alta humedad relativa y oscuridad en cajas camiseras con agua destilada en el fondo. Al término de este período, a las 5 repeticiones de cada aislamiento, incluyendo los controles (*Trametes versicolor* FPRL-28A y *Fomitopsis pinicola* FPRL-98), se les agregaron de 2 a 3 gotas de guayacol sin diluir, comprado en droguería.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Método de Bavendamm:** Con este método, los resultados fueron obtenidos a los 7 días de incubación. La reacción positiva (+) de pudrición blanca se determinó al presentarse un halo amplio de intenso color ámbar a café oscuro en el medio, alrededor del inóculo, o de la colonia. La ausencia total de un halo de este tipo se registró como reacción negativa (-), interpretada como pudrición morena. La aparición de halos pequeños del mismo color fue considerada como reacción dudosa o errática (?). La Figura 1 muestra estas reacciones.

De acuerdo con lo anterior, se registran los resultados de esta prueba en la tabla 2 (columnas de Bavendamm). El aislamiento NT-5, identificado como *Heterobasidion annosum* y la cepa control (*Trametes versicolor* FPRL-28A) fueron los únicos que causaron reacción positiva (+) en los tres ácidos: gálico viejo, tánico viejo y tánico nuevo. Por su parte, los aislamientos NT-2, NT-6A, NT-6B, NT-6C y NT-7, así como la cepa control FPRL-98, correspondientes a *Fomitopsis pinicola*, presentaron reacción negativa (-) en todas sus repeticiones con los tres ácidos. Pero, en los otros aislamientos de *F. pinicola* no sucedió lo mismo, en el NT-1 con ácido gálico viejo, y en el NT-3 tanto en ácido gálico como tánico viejos, dos de sus tres repeticiones mostraron una leve tinción en el borde de la colonia, por lo que están señaladas con reacción dudosa (?); mientras que, la tercera repetición de cada grupo sí presentó reacción negativa (-); y con ácido tánico

nuevo, todas las repeticiones de estas cepas presentaron reacción negativa (-), propia de pudrición morena. Los testigos sin inocular de ambos ácidos, no presentaron cambios.

Para esta prueba, los ácidos disueltos fueron esterilizados por separado del medio, y luego mezcladas las porciones. Bavendamm (1928) no aclara si se esterilizan, o no, los ácidos. Campbell (1938) esterilizó los ácidos aparte del medio. Según otras referencias (Davidson *et al.* 1938; Nobles, 1958; Ulloa y Hanlin, 1978), los ácidos no se deben esterilizar sino solamente disolver en una porción de agua del medio previamente esterilizada. Sin embargo, el tratamiento seguido aquí no provocó alteraciones perceptibles en los ácidos, ni desnaturalización del agar al mezclarse, tampoco causó cambios en las tinciones, pues éstas se presentaron tal y como las describe su autor (*op. cit.*).

Los ácidos gálico y tánico con que se contaba inicialmente tenían un tiempo de almacenamiento en el laboratorio superior a los 20 años, pero eran los únicos disponibles y parecían en buen estado. En el momento de iniciar la prueba se incluyó ácido tánico de un frasco recién adquirido, por lo que se les denominó a los primeros "viejos" y al último "nuevo". Este hecho fortuito, permitió detectar que las tinciones ligeras deberían interpretarse como reacciones erráticas o dudosas (?), puesto que no ocurrieron con el reactivo más confiable (el ácido tánico nuevo), lo cual evitó interpretarlas erróneamente como pudrición blanca (ver los datos de los aislamientos NT-1 y NT-3 de la tabla 2) y descartar que se debieran a la esterilización, puesto que solamente ocurrieron con los ácidos viejos, y no con el ácido nuevo.

Comparativamente, de entre las tres técnicas, ésta tiene como ventajas que las reacciones positivas son muy conspicuas y fáciles de interpretar, aún para un observador no experimentado; el tiempo de incubación final es corto (1 semana); y la preparación de los medios de cultivo es menos complicada, aun cuando se requiere uno por cada ácido y esterilizar los ingredientes por separado. Sus inconvenientes consisten en la ausencia de una reacción propia para determinar pudrición morena, la ocurrencia de reacciones dudosas, y el costo relativamente alto de los reactivos utilizados. Esta prueba clásica es ampliamente aceptada como método de rutina en muchos laboratorios. A pesar de que aquí se obtuvieron seis observaciones dudosas, puesto que fueron debidas a la antigüedad de los ácidos, los autores se inclinan a continuar recomendándola. Se sugiere aplicarla utilizando reactivos frescos y, al menos, una cepa control de pudrición blanca, para verificar la funcionalidad de los ácidos en caso de que todos los aislamientos por ensayar resultaran de pudrición morena.

**Método de Badcock:** En el medio de aserrín, la reacción de pudrición blanca (+) se caracterizó por obscurecimiento del aserrín a tonalidades café con zonas rojizas, y la de pudrición morena (-) por aclaramiento ligero del aserrín colonizado por el micelio, dando una reacción propia (ver Fig. 2).

Los datos de la columna de Badcock en la tabla 2, provienen de observaciones tomadas a las 7 semanas de incubación. Sólo el aislamiento NT-5 (*Heterobasidium annosum*) y la cepa control (*Trametes versicolor* FPRL-28A) dieron reacciones de pudrición blanca (+). Esto ocurrió desde la primer lectura, tomada a las 4 semanas, pero fueron más intensas a las 7 semanas. Sólo la cepa NT-2 de *Fomitopsis pinicola* provocó ligeros obscurecimientos rojizos (ver Fig. 2), por lo que las reacciones fueron estimadas como dudosas (?). El resto de los aislamientos de *F. pinicola*, incluyendo la cepa control FPRL-98, dieron reacciones de pudrición morena (-) en las dos lecturas

realizadas, si bien, la reacción fue más evidente en la segunda lectura. En el aserrín de los testigos sin inocular, no ocurrieron cambios.

En este método, se utilizó aserrín de pino substituyendo al de la técnica original, esto parece ocasionar diferencias en las reacciones y en el tiempo requerido para detectarlas con respecto a lo descrito en la literatura, por lo que se ha cuestionado su uso. El medio original fue creado inicialmente para vigorizar el crecimiento de hongos xilófagos e inducir su fructificación en cultivo, preparado con aserrín de pinabete (*Picea* sp.), o de haya (*Fagus* sp.), y una mezcla (llamada "acelerador") compuesta de varios ingredientes, principalmente harinas de hueso y de maíz, con almidón de papa, sacarosa y ceniza de albura de pino (Badcock, 1941).

Más tarde, en un escrito mimeográfico fechado en 1964, Badcock presenta información muy importante, pues recomienda un método que considera más confiable que el de guayaco para distinguir tipo de pudrición, usando como medio aserrín de pinabete noruego (*Picea abies* Karst.) enriquecido con su "acelerador", donde los hongos de pudrición blanca originan una reacción intensa de color café amarillento a los 3 ó 4 días de incubación, y los hongos de pudrición morena no causan tal reacción en un lapso de 10 días; por el contrario, en aserrín de angiospermas (como el haya) los hongos de pudrición blanca inducen aclaramiento. En ese escrito, Badcock también explica que, si los hongos sólo crecen en madera de angiospermas, se emplee aserrín de *Fagus* sp.; si únicamente atacan al cedro rojo del oeste (*Thuja plicata* D. Don.), sean cultivados en una mezcla de aserrín de esta especie con el de abeto noruego; y en aserrín de encino (*Quercus* spp.), si son específicos de tal género. Según lo anterior, el documento de 1964 demuestra que Badcock es el autor de esta técnica para determinar tipo de pudrición y no solamente del medio de cultivo, hecho que, como se verá más adelante, no aclaran otros autores (quizá porque no fue descrito en una publicación formal), y es él mismo quien aconseja el uso de diferentes tipos de aserrín y advierte de variaciones en las reacciones debido a ello.

Los autores que han recomendado este medio de aserrín sólo incluyen en su fórmula las harinas de maíz y de hueso. Hudson (1972), no hace alusión a que el medio o método sean de Badcock, sólo indica usar aserrín de angiospermas, o de gimnospermas, dependiendo de la procedencia del hongo; según él, después de 14 días de incubación los hongos de pudrición blanca producen una coloración oscura en el aserrín y luego lo aclaran, mientras que los de pudrición morena lo oscurecen gradualmente. Por su parte, Carey (1975) cita a Badcock (1941) como autor del medio de cultivo pero no del método. Ella dice que las reacciones ocurren dentro de un plazo de 15 días; su descripción de las coloraciones coincide con la de Hudson (1972), aunque precisa que la zona de color oscuro formada por los hongos de pudrición blanca es intensa y se aleja del punto de inoculación conforme crece el micelio, añadiendo que estas reacciones son más fáciles de detectar con aserrín de color claro como el de abeto (*Picea* sp.) o el de haya (*Fagus* sp.). Ambos autores ya reconocen una reacción propia para la pudrición morena.

Pinzón-Picaseño *et al.* (1982), siguieron las indicaciones de Hudson (1972) y Carey (1975), excepto en que usaron aserrín de pino y registraron las reacciones a las 3 y 4 semanas. Diferenciaron pudrición blanca cuando el aserrín presentó un tono más oscuro en la zona colonizada por el micelio, y pudrición morena si el tono era más claro en el aserrín colonizado, atribuyendo al tipo de aserrín las diferencias entre estas reacciones y las descritas por los autores consultados, pero sin comprobarlo, pues no disponían de los datos del escrito de Badcock (1964) para apoyar tal suposición. Utilizando también aserrín de pino, Pinzón-Picaseño y Véliz Ávila

(1984) y Pinzón-Picaseño y Hernández Jiménez (1987), diagnosticaron pudrición blanca por oscurecimiento castaño en el aserrín y pudrición morena por decoloración del aserrín. En estos casos, aun con tiempos de incubación largos (hasta 6 semanas), con los hongos de pudrición blanca no se percibió el aclaramiento del sustrato posterior a la reacción de oscurecimiento que señala Badcock (1964), por lo que no se presenta el riesgo de confundir las reacciones.

Las reacciones observadas en estos últimos estudios, aunque fueron producidas por hongos tropicales, son equivalentes a las obtenidas en el presente trabajo, así que no varían con la especie o procedencia de los hongos, sino que son constantes. Esto, aunado a la información de Badcock (1964), permite concluir que la diferencia en las reacciones producidas y el mayor tiempo requerido para su observación, efectivamente se deben al aserrín de pino. Por lo anterior, una vez establecido que las reacciones obtenidas con aserrín de pino son confiables, su uso es recomendable, debido a que es mucho más fácil adquirir madera de este grupo en México.

En comparación con las otras pruebas, ésta es la más económica y sencilla por el costo de sus ingredientes y la preparación del medio de cultivo. Sobre todo, es muy confiable porque cada tipo de pudrición es determinado por su propia reacción y por utilizar madera como sustrato específico para hongos xilófagos. Sin embargo, las reacciones pueden no ser suficientemente claras sin previa experiencia, e incluso ser dudosas, como ocurrió aquí en dos repeticiones. Debido a que las características de las reacciones pueden variar según el aserrín que se emplee, es muy recomendable incluir cepas control de cada tipo de pudrición, así como testigos no inoculados. La principal desventaja de este método se debe a su mayor duración (4 a 7 semanas). En suma, ésta es una de las opciones más recomendables cuando se desee aplicar varios métodos.

**Método de aserrín-guayacol:** En este caso, el guayacol fue goteado sobre las colonias a las 3 semanas de incubación y los resultados observados después de 30 a 60 minutos. La formación de tinciones violadas a moradas en el micelio y medio de cultivo, caracterizó la reacción de pudrición blanca (+). La pudrición morena fue interpretada por ausencia de reacción (-). La figura 3 muestra las reacciones.

La columna de aserrín-guayacol en la tabla 2, indica que todos los aislamientos de *Fomitopsis pinicola* del Nevado de Toluca, así como la cepa control de la misma especie (FPRL-98), mostraron reacciones negativas (-) correspondientes a pudrición morena; en cambio, el aislamiento de *Heterobasidion annosum* (NT-5) de la misma localidad y la cepa control de *Trametes versicolor* (FPRL-28A) presentaron reacciones positivas (+) de pudrición blanca. No ocurrieron reacciones dudosas, así que este método dio mejores resultados que los de Bavendamm y de Badcock.

Esta técnica fue desarrollada por los autores en sustitución de la prueba de Nobles (1958), a la cual se asemeja mucho. Ella utilizó goma de guayaco (marca Fisher), diluyendo 0.5 g en 30 ml de alcohol 95° (Aprox. 1.7%); de esta solución añadía 2 a 3 gotas sobre el micelio de hongos incubados por tres semanas en malta agar. Con este reactivo, los hongos asociados a pudrición blanca producen en pocos minutos una reacción de tinción azul, mientras que con los hongos asociados a pudrición morena no ocurre tal reacción (*op. cit.*).

La goma de guayaco o guayacán es obtenida de manera industrial principalmente de *Guaiacum sanctum* L. y *G. officinale* L., *Zygophyllaceae* (Bovant, 1888; Barceló, 1979; Niembro Rocas, 1986), pero desafortunadamente, es difícil obtenerla como reactivo en México. Por ello, en lugar de esta goma, fue utilizado un derivado, el guayacol, que por su uso medicinal aún

extendido, es fácil de conseguir en muchas droguerías de nuestro país, hasta en pequeñas poblaciones.

Por la consistencia de los resultados obtenidos en comparación con los otros dos métodos, la técnica de aserrín-guayacol demostró ser confiable, aunque todavía hace falta ensayarla con muchas especies de hongos. Además, es conveniente por economía y disponibilidad del reactivo. Considerando el tiempo requerido (3 semanas), queda en un nivel intermedio con respecto a los métodos de Bavendamm y de Badcock. Por otro lado, debe señalarse que la preparación del aserrín para el medio de cultivo es relativamente complicada. El mayor inconveniente de este método consiste en que no se produce una reacción propia para pudrición morena. Al emplearla, se sugiere el uso de cepas control de pudrición blanca, para asegurar la observación de por lo menos un caso de reacción positiva.

Durante la realización de los tres métodos de laboratorio, que comprendieron un total de 151 repeticiones, sólo ocho casos dieron reacción dudosa: con la prueba de Bavendamm, dos repeticiones del aislamiento NT-1 y cuatro del NT-3; y con la prueba de Badcock, dos casos del aislamiento NT-2. Con la prueba de aserrín-guayacol no hubo reacciones dudosas. Así, el empleo de métodos diferentes ayudó a resolver incertidumbres. Entonces, de los ocho aislamientos obtenidos de casos típicos de pudrición en oyameles de una zona del Nevado de Toluca, los siete asociados al duramen (NT-1, NT-2, NT-3, NT-6A, NT-6B, NT-6C y NT-7), son causantes de pudrición morena; y la cepa NT-5, única aislada de madera de albura, induce pudrición blanca. Estos datos fueron esenciales para la descripción de los caracteres culturales por el método de Nobles (1965) y la identificación de los aislamientos (Ruiz Rodríguez y Pinzón-Picaseño, 1994).

Para los fines del diagnóstico perseguido, se comprueba que los daños típicos de pudrición del duramen de los oyameles de la zona muestreada se deben a pudrición morena, y que el agente causal es *Fomitopsis pinicola* (Sw.: Fr.) P. Karst. Los hongos que causan este tipo de pudrición metabolizan solamente a la holocelulosa (celulosa y hemicelulosas asociadas) de las paredes de las células leñosas (Cowling, 1961), usualmente colonizan y degradan más rápida y extensamente la madera, ésta pierde peso, sufre oscurecimientos cafés a rojizos y agrietamiento cubicado, parecidos a la carbonización, volviéndose frágil y quebradiza por lo que su resistencia mecánica se altera drásticamente (Panshin y De Zeeuw, 1970; Scheffer, 1973). En consecuencia, se trata de un problema grave pues la pudrición morena induce mayores pérdidas en menor tiempo. Aunque a menudo *F. pinicola* es considerado un patógeno, según conceptos más precisos (ver Cooke, 1977), en realidad se trata de un simbionte neutro facultativo por ser habitante de la madera muerta, tanto de un organismo vivo como de uno muerto, e incluso de sus detritos (Mounce, 1955); ésto, aunado a la abundante fructificación de la especie hace temer que la incidencia de casos se incremente progresivamente. *Heterobasidium annosum* (Fr.) Bref., fue obtenido de la albura de un tronco derribado que mostraba indicios de pudrición pero no lo suficientemente distintivos para diagnosticarla, las pruebas de tipo de pudrición dieron la primera indicación de que se trataba de una especie diferente, una causante de pudrición blanca. Los hongos de este tipo, metabolizan tanto a la holocelulosa como a la lignina (Cowling, 1961), al disponer de mayor proporción de nutrientes por volumen, colonizan y degradan con menor rapidez y extensión pero de una manera más completa, causando decoloración y mayor pérdida de peso en la madera, tornándola esponjosa o fibrosa y fácilmente desmenuzable, reduciendo notablemente su resistencia mecánica (Panshin y De Zeeuw, 1970; Scheffer, 1973). *H. annosum* causa una variante alveolada



de pudrición blanca (white pocket rot), es reconocido como patógeno (Cartwright y Findlay, 1958; Boyce, 1961), aunque aplicando los conceptos de Cooke (1977), se trataría de un simbiote antagonístico facultativo por tener la capacidad de vivir tanto saprofiticamente como parasiticamente, en este último caso, actuando como un organismo necrotrófico pues frecuentemente causa la muerte de su hospedero (Robbins, 1984). Su identificación fue inesperada ya que en los recorridos de campo no se detectaron teleomorfos de esta especie y tampoco estaba incluido en un listado micoflorístico de la zona (Colón Téllez, 1987). Al parecer, ocurre independientemente a *F. pinicola*, con mucha menor frecuencia y escasa fructificación, pero su presencia constituye una amenaza potencial para el arbolado.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen cumplidamente a la Dra. Janice K. Carey de la Sección de Micología del Princes Risborough Laboratory, Building Research Establishment, Reino Unido, la donación de las cepas control empleadas y de literatura.

#### LITERATURA CITADA

- Badcock, E.C., 1941. New methods for the cultivation of wood-rotting fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 25: 200-205.
- Badcock, E.C., 1964. Description of cultures. Forest Products Research Laboratory, Department of Scientific and Industrial Research, Princes Risborough (Escrito mimeografiado, 26-Feb-1964, 2 p.).
- Barceló, J.R., 1979. *Diccionario Terminológico de Química*. Alhambra, Madrid.
- Bavendam, W., 1928. Über das Vorkommen und den Nachweis von Oxydasen bei holzerstörenden Pilzen. *Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 38: 258-276.
- Boidin, J., 1951. Recherche de la tyrosinase et de la laccase chez les Basidiomycètes en culture pure. Milieux différentiels. Intérêt systématique. *Rev. Mycol.* 16: 173-197.
- Bovant, E., 1888. *Nuevo Diccionario de Química*. Esparsa, Barcelona.
- Boyce, J.S., 1961. *Forest Pathology*. Mc. Graw-Hill, New York.
- Campbell, W.A., 1938. The cultural characteristics of species of *Fomes*. *Bull. Torrey Bot. Club* 65: 31-69.
- Carey, J.K., 1975. Isolation and characterization of wood-inhabiting fungi. In: Lovelock, D.C., R.S. Gilbert (eds.), *Microbial Aspects of the Deterioration of Materials*. Academic Press, London, pp. 23-38.
- Cartwright, K.St.G., W.P.K. Findlay, 1958. *Decay of Timber and its Prevention*. Her Majesty's Stationery Office, London.
- Colón Téllez, L., 1987. Estudio florístico ecológico de los hongos (macromicetos) en el Parque Nacional Nevado de Toluca. Tesis de Licenciatura, ENEP-Iztacala, UNAM, Los Reyes Iztacala.
- Cooke, R., 1977. *The Biology of Symbiotic Fungi*. Wiley, Chichester.
- Cowling, E.B. 1961. Comparative biochemistry of the decay of sweetgum sapwood by white-rot and brown-rot fungi. *USDA, For. Ser., For. Prod. Lab. Tech. Bull.* 1258, 79 p.
- Davidson, R.W., Campbell, W.A., D.J. Blaisdell, 1938. Differentiation of wood-decaying fungi by their reactions on gallic or tannic acid medium. *J. Agric. Res.* 57: 683-695.
- Etheridge, D.E., 1957. Differentiation of white and brown-rot fungi by an oxidase reaction. *Nature* 179: 921-922.
- Forest Products Research Laboratory, 1969. *List of Cultures of Wood-rotting Macrofungi*. Ministry of Technology, Forest Products Research Laboratory, Princes Risborough 17 p.
- Hudson, H. J. 1972. *Fungal Saprophytism*. E. Arnold. London.
- Jorgensen, E., K. Vejlbj, 1953. A new polyphenol oxidase test. *Physiol. Pl.* 6: 533-537.
- Kirk, T.K., A. Kelman, 1964. Color formation on phenol-containing media as related to lignine breakdown by wood-rotting basidiomycetes. *Phytopath.* 54: 897-898.

- López Barajas, R., 1987. Evaluación de los daños causados por pudriciones del duramen en oyamel (*Abies religiosa* [H. B. K.] Schlecht et Cham.) en el Ejido Loma Alta, Nevado de Toluca, Zinacantepec, Estado de México. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México, D. F.
- Mounce, I., 1955. Studies in forest pathology. II. The Biology of *Fomes pinicola* (Sw.) Cooke. *Canada Department of Agriculture Bulletin No. 111, n.s.*, 54 p.
- Nicmbro Rocas, A., 1986. *Árboles y Arbustos Útiles de México*. Limusa, México, D. F.
- Nobles, M.K., 1948. Studies in forest pathology VI. Identification of cultures of wood-rotting fungi. *Can. J. Res. 26. Sect. C. Bot. Sci.*: 281-431.
- Nobles, M.K., 1958. A rapid test for extracellular oxidase in cultures of wood-inhabiting hymenomycetes. *Can. J. Bot. 36*: 91-99.
- Nobles, M.K., 1965. Identification of cultures of wood-inhabiting hymenomycetes. *Can. J. of Bot. 43*: 1097-1139.
- Panshin, A.J., C. De Zeeuw, 1970. *Textbook of Wood Technology. Vol. 1. Structure, Identification, Uses, and Properties of the Commercial Woods of the United States and Canada*. McGraw-Hill, New York.
- Pinzón-Picaseño, L.M., J. Hernández Jiménez, 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*: 1-10.
- Pinzón-Picaseño, L.M., M.T. López Guerrero, F.A. Véliz Ávila, J.D. Martínez 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.
- Pinzón-Picaseño, L.M., F.A. Véliz Ávila, 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., E.I. McLennan, 1948. The use of dyes in culture media for distinguishing brown and white wood-rotting fungi. *Ann. Bot. n.s. 12*: 53-64.
- Robbins, K., 1984. Annosus root rot in Eastern conifers. *USDA., For. Ser., Forest Insects & Disease Leaflet 76*. 10 p.
- Ruiz Rodríguez, M.E., 1991. Estudios fisiológicos integrales con hongos de importancia forestal: acción xilofágica y comportamiento en cultivo. Tesis de Licenciatura. ENEP-Iztacala, UNAM, Los Reyes, Iztacala.
- Ruiz Rodríguez, M.E., L.M. Pinzón-Picaseño, 1986. Ensayo de un nuevo método para determinar el tipo de pudrición que causan hongos xilófagos de importancia forestal. *II Congreso Nacional de Micología*. Universidad Autónoma de Morelos. Oaxtepec, Mor. 25-29 de noviembre, 1986. Resúmenes p. 125.
- Ruiz Rodríguez, M.E., L.M. Pinzón-Picaseño, 1994. Caracteres culturales de *Fomitopsis pinicola* y *Heterobasidion annosum*, hongos xilófagos de importancia forestal asociados a pudriciones en oyamel. *Bol. Soc. Bot. México 54*: 225-250.
- Scháncl, L., 1967. A new polyphenoloxidase test for distinguishing between wood-rotting fungi. *Rev. Appl. Mycol. 46*: 262.
- Scheffer, T.C., 1973. Microbiological degradation and the causal organisms. In: Nicholas, D.D. (ed.). *Wood Deterioration and its Prevention by Preservative Treatments. Vol. 1. Degradation and Protection of Wood*. Syracuse Univ. Press, Syracuse.
- Ulloa, M., R.T. Hanlin, 1978. *Atlas de Micología Básica*. Ed. Concepto. México, D. F.

Tabla 1. Cepas aisladas de árboles de *Abies religiosa* (H.B.K.) Schl. y Cham., con problemas de pudrición, en el Ejido Loma Alta, Parque Nacional Nevado de Toluca, Estado de México.

HONGO	CEPA	ÁRBOL	PROCEDENCIA DEL AISLAMIENTO
<i>F. pinicola</i>	NT-1	Árbol 1	Fructificación en duramen, árbol en pie
<i>F. pinicola</i>	NT-2	Árbol 1	Fructificación en duramen, árbol en pie
<i>F. pinicola</i>	NT-3	Árbol 1	Madera interna, duramen, árbol en pie
<i>H. annosum</i>	NT-5	Árbol 2	Madera externa, albura, árbol derribado
<i>F. pinicola</i>	NT-6A	Árbol 3	Fructificación en duramen, tronco caído
<i>F. pinicola</i>	NT-6B	Árbol 3	Fructificación en duramen, tronco caído
<i>F. pinicola</i>	NT-6C	Árbol 3	Fructificación en duramen, tronco caído
<i>F. pinicola</i>	NT-7	Árbol 4	Fructificación en duramen, tocón

Tabla 2. Reacciones obtenidas con tres métodos para determinar tipo de pudrición en 8 hongos aislados de oyameles del Parque Nacional Nevado de Toluca, Estado de México, y 2 cepas testigo\* de procedencia extranjera.

HONGO	PRUEBA DE BAVENDAMM			MÉTODO DE BADCOCK	MÉTODO ASERRÍN GUAYACOL	TIPO DE PUDRICIÓN
	ÁCIDO GÁLICO VIEJO	ÁCIDO TÁNICO VIEJO	ÁCIDO TÁNICO NUEVO			
<i>F. pinicola</i> NT-1	? ? -	---	---	--	-----	Morena
<i>F. pinicola</i> NT-2	---	---	---	? ?	-----	Morena
<i>F. pinicola</i> NT-3	? ? -	? ? -	---	--	-----	Morena
<i>H. annosum</i> NT-5	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+ + + + +	Blanca
<i>F. pinicola</i> NT-6A	---	---	---	--	-----	Morena
<i>F. pinicola</i> NT-6B	---	---	---	--	-----	Morena
<i>F. pinicola</i> NT-6C	---	---	---	--	-----	Morena
<i>F. pinicola</i> NT-7	---	---	---	--	-----	Morena
<i>F. pinicola</i> FPRL-98*	**	**	**	--	-----	Morena
<i>T. versicolor</i> FPRL-28A*	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+ + + + +	Blanca

(+) = Reacción positiva; (-) = Ausencia de reacción; (?) = Reacción dudosa; (\*\*\*) = No ensayado.

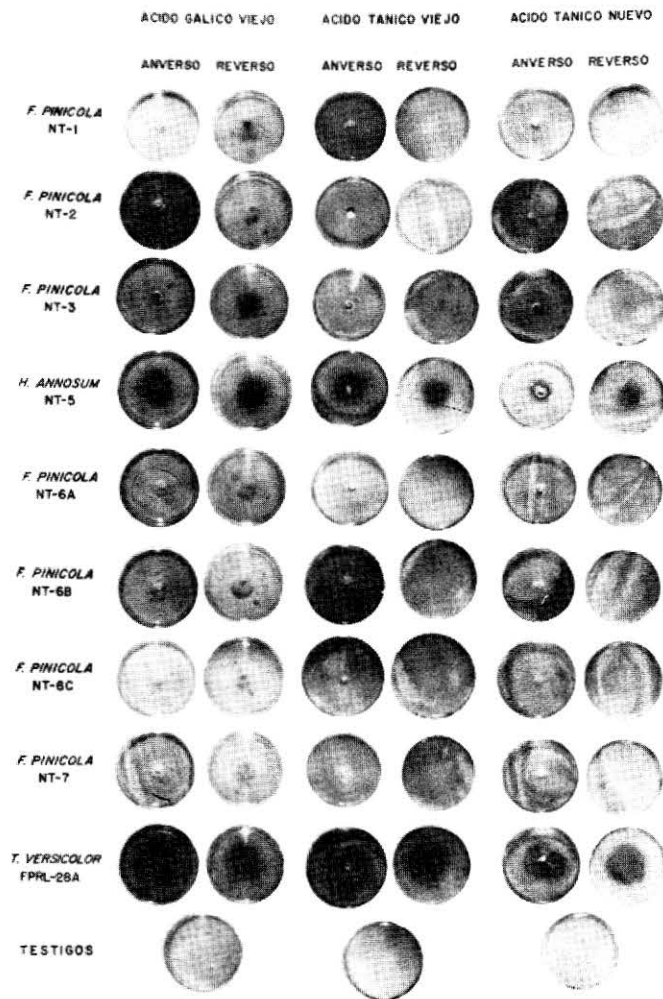


Fig. 1. Método de Bavendamm. Vista de dos repeticiones por variable que muestra comparativamente los resultados obtenidos a la semana de incubación: sin reacción (-), aislamientos NT-2, NT-6A, NT-6B, NT-6C y NT-7; reacción dudosa (?), aislamientos NT-1 y NT-3; reacción positiva (+), aislamiento NT-5 y cepa control FPRL-28A.

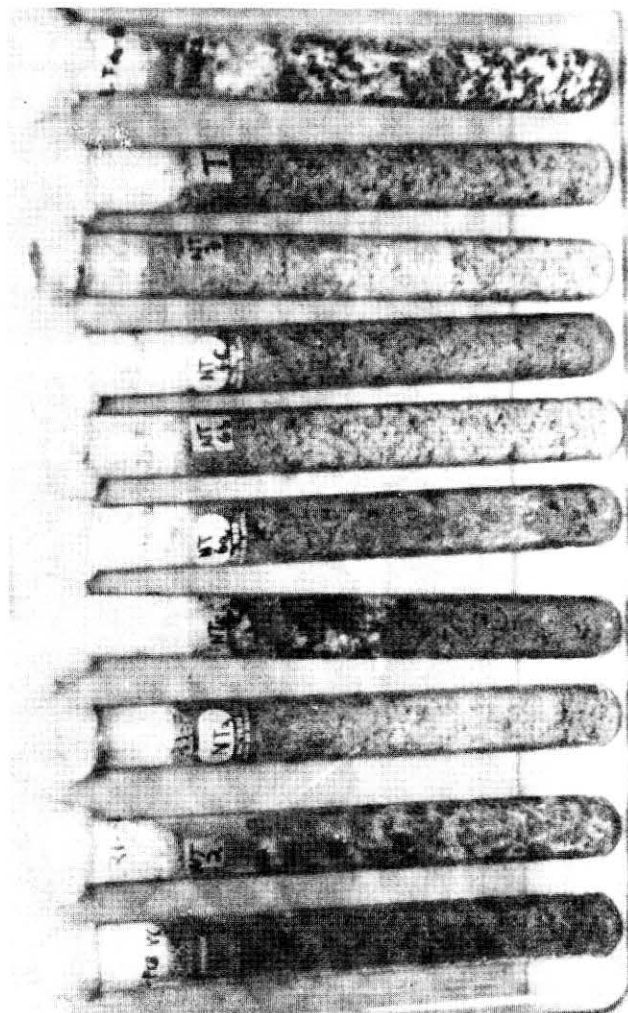


Fig. 2. Método de Badcock. Aspecto de las reacciones de una repetición por variable a las 7 semanas de incubación: reacción de pudrición morena (-), aislamientos NT-1, NT-3, NT-6A, NT-6B, NT-6C y NT-7; reacción dudosa (?), aislamiento NT-2; reacción de pudrición blanca (+), aislamiento NT-5 y cepa control FPRL-28A.

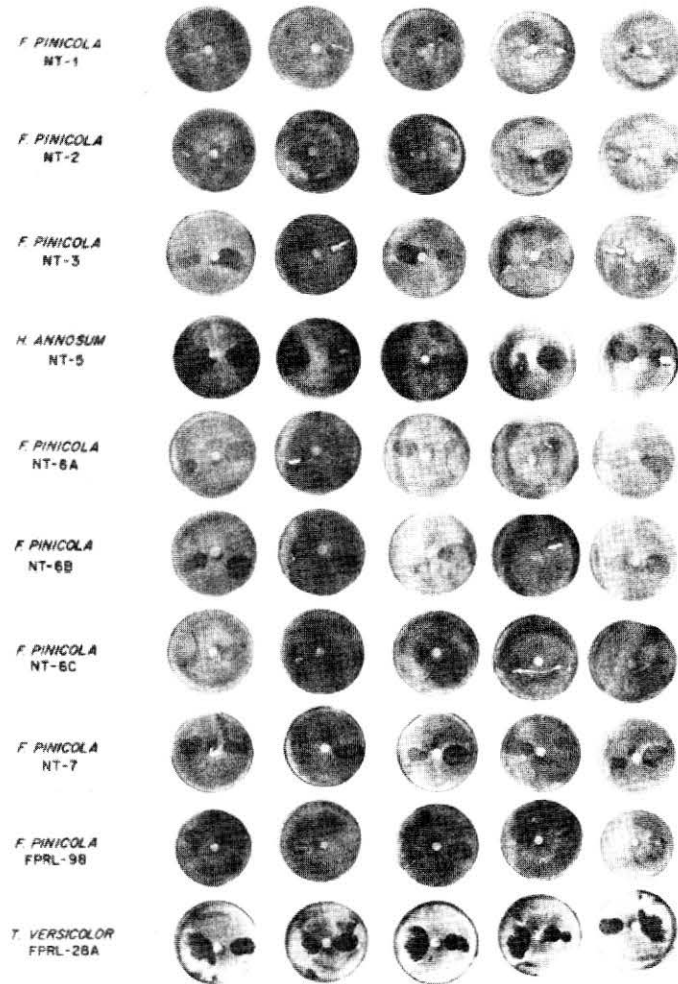


Fig. 3. Método de Aserrín-guayacol. Panorámica de todas las repeticiones a las 3 semanas de incubación y después de aplicado el guayacol: sin reacción (-), aislamientos NT-1, NT-2, NT-3, NT-6A, NT-6B, NT-6C, NT-7 y cepa control FPRL-98; reacción positiva (+), aislamiento NT-5 y cepa control FPRL-28A.