

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

**ESTUDIO DEL PROCESO DE DETERIORO CAUSADO POR HONGOS DE
PUDRICIÓN MARRÓN EN MADERA DE *EUCALYPTUS GRANDIS***

por

Valentina BENÍTEZ GONZÁLEZ

**TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de
Magister en Ciencias Agrarias Opción
Ciencias Vegetales**

MONTEVIDEO
URUGUAY
octubre 2019

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Ing. Agr. Dr. Pedro Mondino, Ing. Agr. Carlos Mantero e Ing. Agr. Dr. Jorge Franco, el 28 de diciembre de 2018. Autora: Ing. Agr. Valentina Benítez, Directora: Dra. Marcela Ibáñez.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia (Mauricio y Catalina) por el constante apoyo en el transcurso de estos años dedicados al proyecto de maestría, por la realización de las probetas de madera utilizadas en este estudio, muestreo y apeo de árboles en pie, colaboración en la realización de cortes microtómicos y por la colaboración en todo este proceso.

A mis asesores técnicos, mi directora de tesis Dra. Ing. Química Marcela Ibáñez (Centro Universitario de Tacuarembó), Ing. Agr. Carlos Mantero (Facultad de Agronomía), por su asesoramiento y constante apoyo en todo el trabajo.

Al Prof. Ing. Pablo Raimonda y colaboradores por el procesamiento de muestras en el laboratorio del Instituto de Ensayo de Materiales de Facultad de Ingeniería.

A la Estación Experimental Bernardo Rosengurtt (EEBR) y al Campus Universitario del Centro Universitario de Tacuarembó (CUT) por brindarme los materiales necesarios para llevar a cabo el ensayo, especialmente a los funcionarios Mauricio Cáceres y Nadia Silva, y a los docentes Álvaro Camargo, Michael Romero, Ximena Pintos, Francisco Báez y Mariana Pintos por colaborar durante todo el transcurso de mi proyecto.

A mis compañeros del PDU Agroforestal por la ayuda y colaboración en diferentes instancias de este proceso.

TABLA DE CONTENIDO

	página
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	VI
SUMMARY	VII
 1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	 8
1.1. BASIDIOMYCETES	10
1.2. HONGOS CAUSANTES DE PUDRICIÓN MARRÓN	12
1.2.1. <u><i>Gloeophyllum trabeum</i></u>	13
1.2.2. <u><i>Laetiporus sulphureus</i></u>	14
1.3. COMPOSICIÓN DE LOS MATERIALES	14
LIGNOCELULÓSICOS Y ORGANIZACIÓN CELULAR DE LA	
MADERA	
1.4. ANATOMÍA DE LA MADERA DE LATIFOLIADAS	17
1.5. PROCESO DE DETERIORO	19
1.6. MECANISMOS DE DEFENSA DEL ÁRBOL	21
1.7. HIPÓTESIS BÁSICA DE INVESTIGACIÓN	24
1.8. OBJETIVOS	25
1.8.1. <u>Objetivo general</u>	25
1.8.2. <u>Objetivos específicos</u>	25
 2. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	 26
2.1. MATERIAL FÚNGICO: CULTIVO Y ALMACENAMIENTO	26
DE HONGOS XILÓFAGOS	
2.2. MATERIAL LEÑOSO	26
2.3. SISTEMA HONGO-MADERA	27
2.3.1. <u>Ensayo de laboratorio</u>	27
2.3.2. <u>Ensayo de campo</u>	29

2.4. ESTRATEGIA DE SEGUIMIENTO DE DETERIORO	31
2.4.1. <u>Pérdida de peso y contenido de humedad</u>	31
2.4.2. <u>Análisis químico de la madera</u>	32
2.4.3. <u>Espectrometría FTIR</u>	33
2.4.4. <u>Análisis microscópicos</u>	34
2.4.5. <u>Análisis estadístico</u>	35
 3. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	 36
3.1. ENSAYOS DE LABORATORIO	36
3.1.1. <u>Madera seca</u>	36
3.1.1.1. Pérdida de peso y contenido de humedad	37
3.1.1.2. Análisis microscópicos	40
3.1.1.3. Análisis químicos	47
3.1.1.4. Espectrometría FTIR	49
3.1.2. <u>Madera verde</u>	53
3.1.2.1. Pérdida de peso y contenido de humedad	54
3.1.2.2. Espectrometría FTIR	56
3.1.3. <u>Análisis conjunto de tratamientos</u>	59
3.2. ENSAYOS DE CAMPO	62
3.2.1. <u>Análisis microscópicos</u>	63
3.2.2. <u>Análisis químicos</u>	69
3.2.3. <u>Espectrometría FTIR</u>	71
3.3. COMPARACIÓN ENTRE SISTEMAS HONGOS-MADERA	74
3.4. PERSPECTIVAS DE LA INVESTIGACIÓN	76
4. <u>CONCLUSIONES</u>	77
5. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	78
6. <u>ANEXOS</u>	91
6.1. INFLUENCE OF THE INITIAL MOISTURE CONTENT OF THE WOOD ON THE DECAY PROCESS BY BROWN ROT FUNGI	
6.2. ESPECTROMETRÍA FTIR DE LOS ÁRBOLES EN PIE (1-5)	

RESUMEN

La descomposición biológica de materiales lignocelulósicos, en particular la biomasa leñosa, causada por Basidiomycetes desempeña un papel esencial en el ciclo de carbono. Los hongos de pudrición marrón son tal vez los agentes más importantes que intervienen en la biodegradación de los productos de madera y la madera muerta en los ecosistemas naturales. Debido a la importancia y al impacto de este proceso, este trabajo estudió los procesos de deterioro de la madera de angiospermas (*Eucalyptus grandis*), tanto de árboles en pie como madera en servicio, ocasionados por la acción de dos hongos de pudrición marrón, *Laetiporus sulphureus* y *Gloeophyllum trabeum*. Permitió caracterizar y comparar los sistemas hongo-madera, así como también, la evolución de los procesos de deterioro, mediante distintas metodologías como ser, microscopía de fluorescencia, microscopía electrónica de barrido, microscopía óptica, pérdida de peso de la madera, análisis químico de polímeros estructurales, espectroscopía FTIR. El estudio aporta conocimientos básicos y será el punto de partida para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas, como por ejemplo, la elaboración de nuevos preservantes de madera con bajo impacto sobre el medioambiente.

Palabras clave: deterioro, hongos de pudrición marrón, madera, *Eucalyptus*

SUMMARY

STUDY OF THE DETERIORATION PROCESS CAUSED BY BROWN ROT FUNGI IN WOOD OF EUCALYPTUS GRANDIS

The biological decomposition of lignocellulosic materials, including woody biomass, caused by Basidiomycetes plays an essential role in the carbon cycle. Brown rot fungi are perhaps the most important agents involved in the biodegradation of wood products and dead wood in natural ecosystems. Because of the importance and impact of this process, this paper studies the processes of deterioration of wood of angiosperms (*Eucalyptus* spp), both standing trees and timber in service, caused by the action of two fungal brown rot, *Laetiporus sulphureus* and *Gloeophyllum trabeum*. It allowed to characterize and compare fungus-wood systems, as well as the evolution of deterioration processes, through different methodologies such as fluorescence microscopy, scanning electron microscopy, optical microscopy, wood weight loss, chemical analysis of structural polymers, FTIR spectroscopy. This study will provide basic knowledge and will be the starting point for the development of biotechnological applications, such as the development of new wood preservatives with low impact on the environment.

Keywords: deterioration, brown rot fungi, wood, *Eucalyptus*

1. INTRODUCCIÓN

La biodegradación de materiales leñosos, la fuente más abundante de la biomasa en la tierra, es uno de los procesos más importantes en bosques terrestres, siendo además un proceso que puede afectar gravemente la durabilidad de la madera (Arantes y Goodell, 2014). Dicha descomposición biológica es causada principalmente por basidiomycetes, los cuales degradan los polisacáridos de la madera de manera preferencial (holocelulosa) y oxidan parcialmente la lignina (Deacon 2006, Eriksson et al., 1990). Es por ello, que se considera que cumplen un rol esencial en el ciclo del carbono y son tal vez los agentes más importantes que intervienen en la biodegradación de los productos madereros y la madera muerta (Arantes y Goodell, 2014).

La degradación fúngica implica la descomposición exoenzimática de los componentes principales de la pared celular de la madera: celulosa, hemicelulosas y lignina. Los hongos xilófagos atacan dichos constituyentes de diferentes modos y en proporciones distintas resultando en 3 tipos de pudrición: blanca, marrón y blanda (Schwarze 2007, Schmidt 2006, Schwarze et al., 2000 Blanchette 1995).

La pudrición marrón es el tipo de deterioro más destructivo y es por esto que reduce notablemente la vida útil de la madera en uso, ocasionando grandes pérdidas económicas por la destrucción de elevadas cantidades de madera, especialmente aquellas destinadas a la construcción de viviendas (Bobadilla, 2004). La madera con este tipo de pudrición adquiere consistencia frágil, reduciéndose a polvo al presionarla entre los dedos, presenta fisuras paralelas y perpendiculares al grano que determinan un patrón de fractura cúbico. Además, la madera con este tipo de deterioro presenta una coloración castaño característica (Schmidt 2006, Green y Highley 1997, Blanchette 1995, Highley et al., 1994, Zabel y Morrell 1992), dada por la depolimerización de la celulosa y por la presencia de lignina residual o modificada. Estos hongos están conformados por una red de filamentos denominados hifas que en conjunto

conforman el micelio. Este proceso implica el involucramiento de dos sistemas. En la etapa incipiente de deterioro, los hongos utilizan un sistema basado en la presencia de radicales oxidativos capaces de provocar cambios en la estructura y química de la pared celular de la madera (Arantes et al., 2012) y un sistema enzimático difusible a través de la secreción de enzimas, capaz de degradar los diversos componentes orgánicos, inorgánicos y aromáticos presentes en la biomasa leñosa (Mahmood et al., 2017).

El éxito de la colonización de la madera depende de la habilidad del hongo, de su rápida distribución para alcanzar los carbohidratos estructurales y no estructurales de la madera y de las condiciones del sustrato y el ambiente, principalmente de la temperatura y humedad (Schmidt, 2006). Estos factores afectan directamente la capacidad de los hongos para metabolizar y degradar los componentes de la pared celular (Morris y Wang 2011, Brischke et al., 2006). Muchos autores consideran que el contenido de humedad (CH) es el factor más importante e influyente en dicho proceso (Thybring et al., 2018, Thybring 2017, Schimdt 2006, Brischke et al., 2006, Findlay 1967). Sin embargo, existen características físicas, químicas y anatómicas del sustrato que limitan el desarrollo de los hongos, lo que influye profundamente en la resistencia a la biodegradación de la madera (Papinutti et al., 2003, Curling et al., 2002).

Cuando efectivamente logran colonizar la madera y comienzan su desarrollo, producen alteraciones importantes en las características físicas y químicas de la madera infectada, dependiendo de la intensidad de la pudrición y de los efectos específicos de los hongos (Saldarriaga y Gutiérrez, 2001). Entre ellas, podemos resaltar: alteraciones de la composición química de la madera; disminución de peso; reducción de la resistencia; modificación del color natural; incremento de la inflamabilidad; disminución del poder calorífico y mayor susceptibilidad al ataque de insectos (Saldarriaga y Gutiérrez 2001, Findlay 1967).

Este proceso de deterioro ocurre tanto en madera en servicio como en árboles en pie, pudiendo en este último caso afectar las raíces, la albura o

duramen de un árbol. Esto puede desencadenar en la muerte, reducción de las hojas o en un retardo en el crecimiento de los árboles, al mismo tiempo que la madera queda dañada, lo que limita sus futuras aplicaciones industriales.

1.1. BASIDIOMYCETES

Los hongos son organismos cosmopolitas que se distribuyen ampliamente en el globo terrestre y habitan cualquier sitio que presente material orgánico, agua y una temperatura apropiada, generalmente cercana a los 25°C, aunque se pueden desarrollar en ambientes cálidos o fríos, dependiendo de su fisiología. De acuerdo a lo anterior, los hongos pueden vivir en todos los climas y altitudes, siendo particularmente diversos en bosques húmedos (Ortiz-Moreno, 2010). Todos los hongos son heterótrofos, es decir, requieren materia orgánica que utilizan como fuente de energía y de carbono para la síntesis de estructuras celulares (Maldonado, 2007). Poseen pared celular de quitina y glucanos, contienen ergosterol como esterol de membrana, se reproducen por esporas y poseen la hifa como unidad funcional (Alexopoulos et al., 1996).

Hibbett et al. (2007) en sus últimos estudios reportan la existencia de siete grandes Phyla: Chytridiomycota MJ Powell (Chytridiomycetes), Neocallimastigomycota MJ Powell, Blastocladiomycota TY. James, Microsporidia Balbiani, Glomeromycota C. Walker y A. Schuessler, Ascomycota Caval.-Sm. (Ascomycetes) y Basidiomycota R. T. Moore (Basidiomycetes). Dentro del Phyla Basidiomycota se conocen unas 30.000 especies descritas en todo el mundo, lo que representa el segundo grupo más diverso de hongos luego de los Ascomycota.

Los basidiomycetes incluyen las royas, tizones, hongos mucilaginosos, setas y halos hediondos, y se distinguen de todos los demás hongos por tener una estructura reproductiva microscópica en forma de masa, que recibe el nombre de basidio, de donde se deriva la denominación del grupo. Cada basidio contiene varias esporas haploides, generalmente cuatro, que reciben el nombre de

basidiosporas, que son producidas por procesos sexuales y meiosis (Margulis y Schwartz, 1985). La importancia de estos hongos radica en su gran capacidad de degradar materiales recalcitrantes como la lignina, por tal motivo es frecuente colectarlos asociados a árboles en descomposición. La mayoría de los basidiomycetes poseen enzimas de gran importancia biotecnológica, siendo capaces de degradar una gran número de compuestos de estructura aromática, ya que son inespecíficas y excretadas por el hongo ante la presencia del sustrato recalcitrante como única fuente de carbono (Lodge et al., 2004, (Leonowicz et al., 1999).

Para su desarrollo, estos hongos necesitan condiciones adecuadas de humedad, temperatura, oxígeno y la existencia de sustrato disponible (Stienen et al., 2014). Este suministra la fuente de carbono y energía necesaria para la síntesis de los constituyentes protoplasmáticos, además de otros elementos iónicos (H, N, O, P, S). La mayoría de los hongos tienen la capacidad de utilizar la glucosa, habiendo otros que utilizan la sacarosa, maltosa, almidón y celulosa (Smith, 1970). La fuente de carbono necesaria la obtienen de las paredes celulares y de las sustancias almacenadas en las cavidades celulares (almidones, azúcares y otros) de los hospederos (Hunt y Garrat, 1962).

Para llevar a cabo la oxidación de estos azúcares es esencial la presencia del oxígeno. Este permite que se lleve a cabo el proceso de oxidación (respiración), fundamental para el suministro de energía necesario para el crecimiento de los hongos. Como resultado de este proceso se libera dióxido de carbono, gracias al intercambio gaseoso alrededor de las hifas. Si no existiese este intercambio, el CO₂ se acumularía y se produciría la muerte del hongo por sofocación (Findlay, 1967).

Además de todos estos factores, la temperatura y el contenido de humedad del sustrato, afectan directamente al hongo y su capacidad para metabolizar y degradar las paredes celulares de la madera (Meyer y Brischke, 2015). La tasa de crecimiento de los hongos aumenta gradualmente desde temperaturas próximas a la congelación hasta un rango óptimo entre 24° y 32°C. Este

crecimiento disminuye rápidamente para la mayoría de los hongos de pudrición, a medida que la temperatura aumenta sobre los 32°C (Lomeli, 1991). Según Eslyn y Clark (1979), temperaturas mayores a 38°C son letales para la mayoría de los hongos; en cambio temperaturas bajo el punto de congelación provocan la latencia del hongo, no así su muerte.

El contenido de humedad en la madera es el factor más importante que influye en la descomposición causada por los basidiomycetes (Thybring 2017, Schmidt 2006, Findlay 1967). Un bajo contenido de agua en el sustrato resulta crítico para el desarrollo de los hongos, ya que requieren de agua líquida para el transporte de las enzimas fúngicas (Brischke y Clemens, 2014). Se acepta comúnmente, que la descomposición es limitada cuando la disponibilidad de agua se encuentra exclusivamente en las paredes celulares, y ausente en las cavidades celulares (Stienen et al., 2014, Schmidt 2006). Este contenido de humedad se denomina punto de saturación de las fibras (PSF) y oscila entre 28 y 30%, por encima de este valor de FSP se ve favorecido el crecimiento de los hongos. La madera que presenta un contenido de humedad menor al 20%, resulta inmune al ataque de estos microorganismos (Stienen et al., 2014).

Los basidiomycetes pueden dividirse en tres grandes grupos según el modo de degradación producido en las paredes celulares: i)-podredumbre blanca; ii)-podredumbre marrón y iii) podredumbre blanda. En este trabajo se profundiza en la pudrición marrón realizada exclusivamente por especies de basidiomycetes (Schwarze et al., 2000).

1.2. HONGOS CAUSANTES DE PUDRICIÓN MARRÓN

Los hongos causantes de pudrición marrón representan menos del 10 % de los basidiomycetes descomponedores de los compuestos lignocelulósicos de la madera. Éstos se consideran los agentes más importantes que intervienen en la biodegradación de los materiales lignocelulósicos (Arantes y Goodell, 2014), y los principales invasores de la biomasa forestal y de las construcciones a base de

madera (Kumar et al., 2017).

En Uruguay fueron colectadas, reportadas y determinadas más de 100 especies de hongos, pertenecientes a 65 géneros, de Hymenomycetes descomponedores de madera de *Eucalyptus* spp. La mayoría de las especies identificadas (95 especies) son causantes de podredumbre blanca y unas pocas especies (7,7%), pertenecientes a los géneros *Antrodia*, *Coniophora*, *Fomitopsis*, *Gloeophyllum* y *Laetiporus*, son causantes de podredumbre marrón (Martínez et al., 2009). Los dos últimos, son considerados muy perjudiciales para los árboles en pie, así como para las estructuras de madera, provocando pérdidas económicas directas en montes de *Eucalyptus* spp., por la pérdida de volumen o calidad de la madera (celulosa), o de árboles por deformación y quiebre. Dada la importancia de estos hongos, este estudio analiza los procesos de degradación de *Gloeophyllum trabeum* y *Laetiporus sulphureus*.

1.2.1. *Gloeophyllum trabeum*

Es una especie común en el centro y sur de Europa y América, perteneciente a la clase Basidiomycetes en el orden Gloeophyllales. En Uruguay se reportó causando daños por pudrición marrón, en montes de *Eucalyptus* (Martínez 2014, Gazzano 1994).

La gran cualidad de este hongo es la habilidad para crecer rápidamente a altas temperaturas, con una temperatura óptima en el rango entre los 35°C y 40°C. Por esta razón por lo general tiene lugar en países con clima cálido. Además, es extremadamente resistente a la desecación y se ha encontrado que sobrevive sobre los 10 años en madera que contiene sólo un 12% de humedad (Tapia, 2010).

1.2.2. Laetiporus sulphureus

Laetiporus sulphureus se distribuye en todo el mundo y se destaca por ser el hongo más importante causante de pudrición marrón, teniendo la habilidad de colonizar tanto latifoliadas como coníferas (Shwarze et al., 2000, Burdekin 1979).

Es una de las pocas especies de hongos que ataca madera en servicio, como también resulta ser un importante degradador de la madera de árboles vivos por lo cual es considerado un importante parásito de estos (Schwarze et al., 2000). En Uruguay, se reportó como una especie causante de pudrición marrón en árboles adultos (Martínez et al., 2009).

1.3. COMPOSICIÓN DE LOS MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS Y ORGANIZACIÓN DE LA PARED CELULAR DE LA MADERA

La lignocelulosa, principal componente de la biomasa, constituye aproximadamente la mitad de la materia producida por la fotosíntesis. Las lignocelulosas en la naturaleza derivan de la madera, pasturas, residuos agrícolas, desechos forestales y desechos sólidos (Pérez et al., 2002). Estos materiales están formados por tres tipos de polímeros estructurales: celulosa, hemicelulosa y lignina (Martínez et al., 2005, Pérez et al., 2002). En el caso de la madera, estos compuestos representan el 90 % de su peso (Yu et al., 2010). Se distribuyen en la pared celular, organizada en pared primaria (P), pared secundaria (S1, S2, S3) y lámina media (LM) (Figura 1) (Wagner et al., 2014).

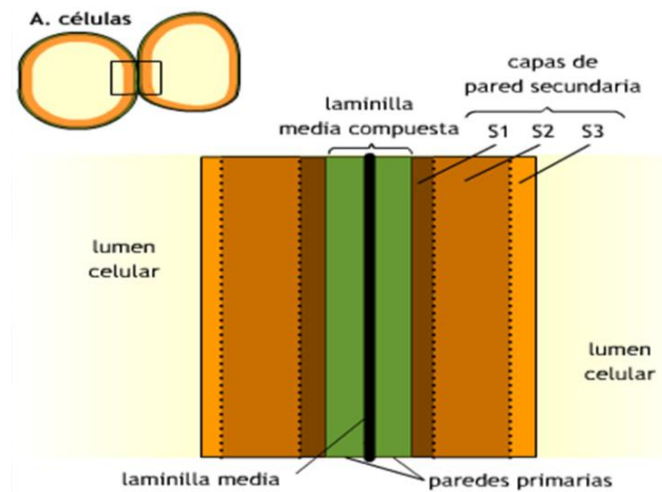


Figura 1. Pared celular

Fuente: <http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema7/7-2pared1.htm>

La celulosa es el principal componente de la madera y el biopolímero de mayor abundancia terrestre. Consiste en un polisacárido formado por unidades de β -D glucopiranosas unidas por enlaces 1-4 glucosídicos (Fengel y Wegener 1984, Reina 2010) y representa aproximadamente más del 50 % del peso seco de la madera (Martínez et al., 2005). Por ejemplo, para los eucaliptos el rango de contenido de celulosa es de 40% a 62% (Hillis y Brown, 1984). Este polisacárido se organiza en largas cadenas lineales (microfibrillas) unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals intramoleculares, formando una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática (Ovando-chacón y Waliszewski, 2005). Además, estas microfibrillas otorgan rigidez a las células vegetales (Figura 2) (Peña, 2010). La celulosa se acumula en las paredes celulares secundarias que contienen 42-50% de celulosa, y en menor proporción en la pared celular primaria (Sjöström, 1993). Las subcapas de la pared secundaria difieren entre ellas respecto al contenido de celulosa, el grado de polimerización, cristalinidad de las microfibrillas y por la orientación. También, existen diferencias en las características del biopolímero entre la pared primaria y secundaria, tales como cristalinidad y grado de polimerización. La celulosa depositada en la pared

primaria contiene bajo grado de cristalinidad y bajo grado de polimerización. Por el contrario, la celulosa presente en la pared secundaria contiene una alta cristalinidad y un alto grado de polimerización (Mellerowicz y Sundberg 2008, Sjöström, 1993).

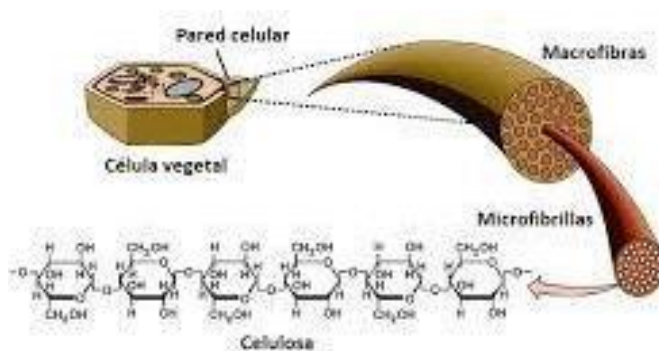


Figura 2. Estructura y disposición de la celulosa

Fuente: <http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema7/7-3pared2.htm>

La hemicelulosa es un polímero complejo de heteropolisacáridos compuesto por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) que forman cadenas ramificadas y los ácidos 4- O-metilglucurónico, D-galacturónico y D- glucurónico, los azúcares están unidos por enlaces β -1,4 y ocasionalmente por enlaces β -1,3 (Fengel y Wegener 1984; Pérez et al., 2002). El contenido de hemicelulosas en peso seco varía entre 20 y 30 % (Sjöström, 1993). Este polisacárido se distribuye en las capas de la pared celular, formando la matriz celular junto a la lignina (Wagner et al., 2014)

La lignina es uno de los biopolímeros más abundantes en las plantas y junto con la celulosa y la hemicelulosa conforma la pared celular de las mismas en una disposición regulada a nivel nano-estructural, dando como resultado redes de lignina-hidratos de carbono (Chávez-Sifontes y Domine, 2013). La molécula de lignina es una macromolécula, con un elevado peso molecular, que resulta de la unión de varios ácidos y alcoholes fenilpropílicos (cumarílico, coniferílico y sinapílico). El enlace aleatorio da origen a una estructura tridimensional, de polímero amorfo, característica de la lignina (Fonseca, 2006).

De acuerdo a los elementos estructurales la lignina puede ser clasificada en varias clases: lignina guaiacilo, que se encuentra principalmente en madera de coníferas y que es un producto de la polimerización del alcohol coniferílico, la lignina guaiacilo/siringilo, que es común en madera de latifoliadas, es un copolímero del alcohol coniferílico y alcohol sinapílico, la razón de estas unidades en la madera es de 1:2 (Ávila, 2005). Esta molécula otorga soporte estructural, rigidez, impermeabilidad y confiere protección a los azúcares estructurales (holocelulosas). A su vez, es altamente resistente a la degradación química y biológica (Aro et al., 2005). Es el principal componente de la lámina media y junto con las hemicelulosas actúa como adhesivo entre las fibras, manteniendo unidas las microfibrillas e inciden sobre el contenido de humedad (Walker, 2006).

En menor proporción encontramos los extractivos, que incluyen mono y polisacáridos, terpenos y terpenoides, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, alcoholes y fenoles (Reina 2010, Fengel y Wegener 1984).

La composición y porcentajes de estos compuestos varían de una especie a otra. Además, la composición dentro de una sola especie varía con la edad, la etapa de crecimiento y otras condiciones (Jeffries, 1994).

1.4. ANATOMÍA DE LA MADERA DE LATIFOLIADAS

La organización interna celular de las latifoliadas presenta mayor complejidad estructural que en el caso de las coníferas. El leño se encuentra compuesto por los vasos, parénquima axial y radial, fibras, traqueidas vasculares y vasicéntricas, y por caracteres anatómicos especiales: canales celulares e intercelulares, células oleicas y mucilaginosas, cristales y sílice, fibras septadas, espesamientos espiralados, entre otras (Universidad de Santiago del Estero, 2005).

En algunos árboles, la parte interna del tronco, “duramen” se distingue claramente por su color más oscuro que la zona clara que lo rodea exteriormente,

llamada “albura”. La formación del duramen se caracteriza por ciertas modificaciones anatómicas: en las latifoliadas se forma tilosis, expansiones vesiculares procedentes de las células del parénquima, que penetran en los vasos próximos y los obstruyen por completo. La formación del duramen se ve acompañada por algunos fenómenos químicos, en el caso de las latifoliadas el duramen coloreado contiene más resinas y aceites que la albura; estas sustancias penetran, en parte, en los intersticios micelares. En muchas maderas el duramen contiene sustancias solubles en agua, hidratos de carbono y polisacáridos, alcaloides y taninos que al oxidarse le dan su característico color oscuro. Encontrándose además con frecuencia, sustancias minerales, como carbonato y oxalato cálcico y ácido silícico (Benítez y Sarríes 2015, Kollman 1959).

La albura corresponde a la parte activa del tronco, presenta células parenquimáticas llenas de nutrientes y células conductoras de regiones periféricas que realizan el transporte de agua en el árbol. Las sustancias nutritivas contenidas en éstas, son en parte responsables de la mayor susceptibilidad al ataque de hongos o insectos, frecuentemente atraídos por sus contenidos (almidón, azúcares, proteínas). Debido a que el duramen es un tejido más compacto y más pobre en sustancias nutritivas, es mucho más resistente al ataque de hongos e insectos, presenta una durabilidad natural superior a la de la albura (Universidad de Santiago del Estero, 2005).

En los primeros años de crecimiento, tanto las latifoliadas como las coníferas, presentan una madera del tipo juvenil que tiene características diferentes a la madera adulta, afectando de esta forma la calidad de la madera y su transformación a nivel industrial (Cueto, 2012). Se ha encontrado para diversas especies una variación sustancial en el largo de fibra, densidad y ángulo microfibrilar entre la madera adulta y juvenil, lo que afecta directamente la resistencia y rigidez de la madera (Cueto, 2012). De acuerdo con Zobel y Talbert (1988) la presencia de madera juvenil es la principal causa de la variación en las propiedades de la madera, causando problemas en su estabilidad. Doldán (2003), reportó diferencias en el largo de fibra de la madera juvenil y adulta de *E. grandis*

con 18 años de edad. El promedio del largo de fibra para madera juvenil fue de 0,78 mm, mientras que para madera adulta fue de 1,05 mm. Además, identificó a la madera adulta como más homogénea y seguramente esta característica le otorgue mejor calidad referida a sus propiedades físicas y mecánicas.

La especie maderable utilizada en este trabajo pertenece a uno de los géneros de especies forestales de rápido crecimiento y de mayor importancia económica cultivadas en Uruguay. *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden es una de las especies forestales más importantes plantadas con destino de aserrío (Böthig et al., 2008).

1.5. PROCESO DE DETERIORO

En el proceso de pudrición marrón, la celulosa y las hemicelulosas del sustrato se descomponen, mientras que la lignina se conserva en forma ligeramente modificada (Green y Highley 1997, Rayner y Boddy 1988). Dada la degradación preferencial de los carbohidratos la madera adquiere una consistencia quebradiza, rajándose en cubos, por disminución del largo de las fibras que son cortadas, hasta que finalmente se desmenuza como polvo (Figura 3). La lignina residual modificada químicamente otorga a la madera un color y una consistencia característica de este proceso (Schwarze et al., 2000).



Figura 3. Características macroscópicas de pudrición marrón
Fuente: <http://normadera.tknika.net/es/content/pudriciones>

Los hongos descomponedores segregan enzimas capaces de originar orificios a través o entre las células de la madera y romper los constituyentes químicos en formas solubles, quedando disponibles para ser absorbidas y metabolizadas por los hongos (Calaza, 2007). Se desconoce el funcionamiento específico de estas enzimas responsables de la depolimerización difusa de la celulosa (Blanchette, 1995), pero se sabe que dichas enzimas moleculares, son relativamente grandes para difundirse en el empaquetado firme de la matriz molecular de una pared celular intacta. Es por ello, que sistemas no enzimáticos, en base a peróxido de hidrógeno formado en una fase pre-celulolítica (Koenigs, 1974a, 1974b) e iones de hierro, parecen tomar un rol importante en las etapas tempranas de la descomposición (Calaza, 2007). La producción de radicales hidroxilo y sales ferrosas se da mediante la reacción de Fenton-Haber-Weiss (Blanchette, 1995). La reacción de Fenton se basa en la reacción entre peróxidos (normalmente H_2O_2) y hierro (normalmente Fe^{2+}) en medio ácido para la formación de especies de oxígeno reactivo (ROS), principalmente el radical hidroxilo (OH) ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \bullet\text{OH} + \text{-OH}$) (Arantes y Milagres, 2009). Las enzimas celulolíticas no podrían accionar en ausencia de dicho proceso no enzimático (Hill y Papadopoulos 2001, Cowling y Kirk 1976). Estudios realizados por Kirk et al. (1975) demostraron que los radicales hidroxilos se formaron durante el crecimiento de hongos de pudrición marrón y fueron fácilmente detectados en madera atacada mediante quimioluminiscencia. La producción de ácido oxálico por hongos de pudrición marrón también se ha propuesto como un importante factor pre celulolítico que posiblemente actúa como quelante para ayudar a movilizar el hierro, el manganeso u otros iones metálicos que podrían utilizarse durante el proceso no enzimático. Se reportó la existencia de glicoproteínas de bajo peso molecular o sideróforos producidos por hongos de pudrición marrón, capaces de intervenir en los mecanismos para generar los componentes necesarios para facilitar la depolimerización (Blanchette, 1995).

Por esta razón, la degradación de la pared celular no ocurre en la vecindad inmediata de la vaina de la hifa o en el lumen celular (Green y Highley, 1997)

Los hongos causantes de pudrición marrón secretan enzimas que actúan fuera de la célula (exoenzimas), para digerir los nutrientes del ambiente o sustrato. Como mencionamos anteriormente, para acceder a esos nutrientes, deben primero difundir muy profundamente en la pared celular a través de la capa S3, para degradar la capa S2 rica en celulosa. Por lo tanto, un alto contenido de lignina tiende a retrasar la difusión de moléculas grandes (enzimas) degradadoras de celulosa en la pared celular (Highley y Murmanis 1987, Koenigs, 1974a, 1974b).

La degradación y / o modificación de la lignina por los basidiomycetes es el paso clave en la degradación de la matriz lignocelulósica (Martínez et al., 2005). Varios autores reportaron el aumento en el número de grupos fenólicos en lignina, principalmente originado por demetilación oxidativa de grupos metoxilo y en menor proporción por hidroxilación de anillos aromáticos (Highley y Murmanis 1987, Kirk et al., 1975). Estudios más recientes sugieren que los hongos de pudrición marrón presentan una alta capacidad de depolimerización, repolimerización y solubilización de la lignina (Martínez et al., 2011, Arantes y Milagres 2009, Yelle et al., 2008).

Un componente clave en la descomposición de la madera y de gran influencia para que se lleve a cabo el proceso mencionado anteriormente, es el contenido de agua, y una cantidad suficiente por encima del punto de saturación de las fibras es un requisito clave para que se lleve a cabo dicho proceso (Thybring, 2013). Durante la degradación, se incrementa el contenido de agua de la madera, debido a la respiración fúngica (Thybring, 2017).

1.6. MECANISMOS DE DEFENSA DEL ÁRBOL

Cuando se trata de árboles en pie, son muy diversas las estrategias de penetración al árbol, que van desde daño mecánico en la corteza, hasta la colonización por esporas o micelio desde las raíces hacia el duramen; generalmente vinculado a situaciones de estrés de los árboles (Schwarze et al.

2000). Las vías de entradas de los hongos causantes de pudrición marrón en árboles en pie, han sido ampliamente estudiadas. Las principales vías de ingreso derivan de heridas generadas por condiciones climáticas, viento, hielo o nieve, heridas por caída de árboles, rayos, grietas de congelación, quemaduras de sol y lesiones de la corteza en invierno, fuego, e incluso aquellas heridas generadas por la actividad del hombre (poda y raleos), por animales (pisoteo, frotación, ramoneo) o aquellas ocasionadas por insectos (Davidson y Wagener, 1954).

El daño originado por el ingreso del hongo al árbol, puede afectar las raíces, la albura o duramen de un árbol, lo cual puede desencadenar en una reducción del área foliar, un retardo en el crecimiento, o incluso la muerte. Al mismo tiempo se limitan sus futuras aplicaciones comerciales para la madera de árboles así dañados. Sin embargo, al ingreso del microorganismo, se da una interacción hospedero – hongo, donde el árbol pone en marcha diversas respuestas que intentan impedir el crecimiento del hongo, al mismo tiempo que el hongo desarrolla mecanismos para dispersarse en el árbol superando la estrategia del mismo (Shwarze et al., 2000).

La madera de árboles en pie se encuentra protegida por una serie de mecanismos de defensa cuyo fin es detener, disminuir o contrarrestar la infección. Estos mecanismos de defensa antimicrobianos pueden ser constitutivos, los cuales proveen de forma pasiva resistencia contra patógenos, o inducidos, originados como respuesta activa de la albura frente al ataque de patógenos (Ordeñana, 2002).

La primera barrera constitutiva contra el ataque de patógenos está dada por la superficie de la planta (corteza - peridermis y ritidoma), que proporciona una barrera eficaz, previniendo la entrada de la mayoría de potenciales patógenos, y mediante mecanismos constitutivos e inducidos por la corteza (Pearce, 1996). No obstante, algunos patógenos son capaces de penetrar la estructura lignocelulósica a través de los tejidos xilemáticos expuestos (Pearce, 1996). En el caso de la albura, la colonización fúngica puede verse limitada en primer lugar por las condiciones micro ambientales del tejido (alto contenido de agua y baja

disponibilidad de oxígeno) (Pearce, 1996), y en segundo lugar, por el desencadenamiento de mecanismos activos e inducidos de defensa tales como alteraciones en la pared celular (zonas de barrera o paredes multicelulares), compuestos antimicrobianos inducidos, respuestas necróticas de las células vivas y la deposición de materiales gomosos. Estas respuestas de la albura dependen de la especie, del crecimiento y de la vigorosidad del árbol (Schwarze et al., 2000).

Sumado a estos mecanismos, la estructura anatómica de la madera de latifoliadas, con una alineación axial de sus principales elementos estructurales (vasos, traqueidas y fibras), y una distribución discontinua de sus células vivas, imponen restricciones tanto en la propagación de patógenos así como también en la expresión de las respuestas de los árboles a la infección y el daño (Pearce, 1996). En algunos casos, se forman células de parénquima invaginadas (tíldes) dentro de los elementos de los vasos, que obstruyen la cavidad de los tejidos conductores del xilema (Schwarze et al., 2000). En muchas especies, las paredes celulares de las tíldes no solo están lignificadas, sino que también contienen suberina, sustancia fenólica que inhibe fuertemente la descomposición causada por hongos (Pearce, 1990). Además de la suberina, se pueden formar en las células parenquimáticas otras sustancias polifenólicas capaces de inhibir el crecimiento fúngico (Schwarze et al., 2000).

En contraste con la albura, el duramen es un tejido inactivo, con ausencia de células activas, donde es excluyente cualquier respuesta activa del árbol frente al ataque de hongos causantes de pudrición marrón (Schwarze et al., 2000).

Aquellas especies con duramen bien definido y baja relación albura/duramen son más susceptibles al ataque fúngico, dado que presentan un área de respuesta activa (albura) reducida a unos pocos anillos anuales (Schwarze et al., 2000)

La mayoría de los patógenos que habitan en la madera tienen la capacidad de permanecer activos durante muchos años, por lo cual representan una

amenaza continua. En el caso de cualquier fallo de las defensas en los márgenes de la lesión, el patógeno puede reanudar la invasión de los tejidos sanos (White y Kile, 1994).

Existen modelos que describen las lesiones en la madera de árboles en pie causada por hongos de pudrición (interacción huésped- patógeno), es decir, modelos que intentan explicar la respuesta de los árboles frente a los hongos descomponedores: podredumbre de corazón, compartimentalización o CODIT, zonas de reacción o restricciones ambientales de la colonización fúngica (Pearce, 1996). Las *zonas de reacción* son áreas decoloradas de albura originada por cambios químicos como la acumulación de sustancias que limitan el crecimiento del hongo (Pearce, 1996). Las *restricciones ambientales* sugieren que la pudrición está limitada al duramen y a la albura interna por altos contenidos de humedad y bajos niveles de oxígeno de la albura (Rayner y Boddy, 1988). El *modelo CODIT* o *compartimentalización* se desarrolló en base a la formación de estructuras anatómicas (paredes) previamente formadas o posteriores al ataque fúngico, que limitan el avance fúngico en los tejidos de los árboles (Schwarze et al., 2000). Se distinguen 4 paredes con diferente resistencia frente al avance de los hongos. La pared 1 se desarrolla en sentido axial ocluyendo el tejido vascular por encima y por debajo de la herida, disminuyendo así la infección del tejido. La pared 2 está formada por células de paredes gruesas y altamente lignificadas que retardan la infección o propagación en sentido radial. En la pared 3, las células parenquimáticas de los rayos del xilema de la albura, pueden responder a una propagación tangencial produciendo sustancias de defensa. A diferencia de las paredes 1-3, la pared 4 no solo se modifica químicamente sino anatómicamente (Schwarze et al., 2000, Pearce 1996, Pearce 1990).

1.7. HIPÓTESIS BÁSICA DE INVESTIGACIÓN

La hipótesis del estudio es que existe un patrón de deterioro de la madera de *Eucalyptus grandis* causado por hongos de pudrición marrón que es análogo

entre árboles en pie y madera en servicio.

1.8. OBJETIVOS

1.8.1. Objetivo general

Profundizar el conocimiento de los mecanismos de deterioro causados por hongos de pudrición marrón en madera de *Eucalyptus grandis*.

1.8.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar microscópicamente el proceso de deterioro de madera de *E. grandis* en servicio por hongos de pudrición marrón (*L. sulphureus* y *G. trabeum*).
2. Caracterizar microscópicamente el proceso de deterioro de madera en árboles en pie de *E. grandis* por hongos de pudrición marrón (*L. sulphureus* y *G. trabeum*).
3. Determinar la velocidad de deterioro de albura de *E. grandis* a nivel de laboratorio.
4. Estudio de las diferencias de composición química de madera de *E. grandis* en servicio y en árboles en pie, atacadas por hongos de pudrición marrón (*L. sulphureus* y *G. trabeum*).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIAL FÚNGICO: CULTIVO Y ALMACENAMIENTO DE HONGOS XILÓFAGOS

En los ensayos en laboratorio y los de campo, se utilizaron las cepas de *Gloeophyllum trabeum* (H2130 CCMFQ) y *Laetiporus sulphureus* (H3609 CCMFQ) provenientes del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química, Udelar. Las cepas se conservaron como cultivos puros en placas de Petri en medio ágar-extracto de malta (Oxoid Ltd) a 4 °C en el laboratorio Forestal del Campus Universitario de Tacuarembó, Udelar. A partir de éstos, se cultivó el micelio fúngico en placas de agar y extracto de malta en una proporción de 15g/l cada uno a 23 °C y 75% HR. Los medios se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a 121 °C y luego de inocularlos con las cepas mencionadas, se cultivaron 15 días en condiciones controladas de temperatura (28°C) y humedad (75% HR).

2.2. MATERIAL LEÑOSO

La madera utilizada en este trabajo, tanto para las probetas del ensayo de laboratorio como los árboles en pie, proviene de un bosque usado como ensayo de prueba de progenies de *E. grandis* W. Hill ex Maiden del año 1990. Es un bosque coetáneo y monoespecífico, ubicado en la Estación Experimental Bernardo Rosengurtt (EEBR) de Facultad de Agronomía, Udelar en la ruta 26 km 408 en el departamento de Cerro Largo (32°20'16.55" S, 54°26'58.16" O) (Figura 4).



Figura 4. Rodal de *Eucalyptus grandis*

2.3. SISTEMA HONGO-MADERA

Este estudio consta de dos ensayos en paralelo, un ensayo de laboratorio y otro ensayo de campo, en el bosque de *Eucalyptus grandis* descrito anteriormente, empleando distintas estrategias de seguimiento en cada caso.

2.3.1. Ensayo de laboratorio

El ensayo de laboratorio fue conducido en el laboratorio Forestal del Campus Universitario del Centro Universitario de Tacuarembó, Udelar. Se tomó como referencia la norma europea EN 113 (AENOR). Para el mismo se usaron 240 probetas de dimensiones (50 ± 1) mm x (25 ± 0.3) mm x (15 ± 0.3) mm de *Eucalyptus grandis*, provenientes de 5 árboles. Del total, 120 probetas se mantuvieron con una humedad de $46.02\% \pm 2$ (madera verde) y las otras 120 probetas se secaron hasta un contenido de humedad de $14\% \pm 2$ (madera seca). Se registró el peso inicial (M1), largo (mm), ancho (mm), espesor (mm) y se calculó densidad (g/cm^3) y volumen (cm^3).

Una vez que los hongos inoculados cubrieron las placas de Petri, se inocularon los frascos preparados previamente con 300 ml de medio de cultivo ágar-extracto de malta (Oxoid Ltd), a 15 g/l cada uno. Los mismos se

identificaron con fecha de inoculación, tipo de hongo y número de probeta. Posteriormente se llevaron a la cámara de incubación, a 25 ° C de temperatura y 70 % de humedad relativa. Se mantuvieron por un período aproximado de dos semanas para que cubrieran la totalidad de la superficie del medio de cultivo en el frasco.

Transcurrido ese período, se colocaron dos probetas de *E. grandis* por frasco, haciendo un total de 120 frascos, 30 frascos por tratamiento (1: madera seca-*L. sulphureus*; 2: madera seca- *G. trabeum*; 3: madera verde- *L. sulphureus* y 4: madera verde- *G. trabeum*). Los 120 frascos se taparon con tapa, papel secante y una goma elástica y se cultivaron en condiciones controladas a 22°C y 75% HR por un período de 10 meses (Figura 5). Además, se prepararon 4 frascos con medio de cultivo sin inocular y se les colocaron 2 probetas. Esto permite conocer el efecto del ambiente de incubación (temperatura y humedad relativa) sobre las probetas, permitiendo corregir las pérdidas de peso de las probetas en caso de ser necesario.

Una vez por mes se seleccionaron 3 frascos de forma aleatoria de cada tratamiento, de los cuales se extrajeron 5 probetas. Las mismas se limpiaron de manera de retirar el micelio que las cubría y fueron pesadas (M2). Posteriormente se secaron en una estufa de secado a $102 \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta alcanzar peso constante, y se pesaron por tercera vez (M3). Los valores de M3 fueron corregidos por el contenido de humedad inicial de las probetas. Con los datos obtenidos en cada determinación (M1, M2, M3), se calculó el porcentaje de pérdida de masa y el porcentaje de humedad.

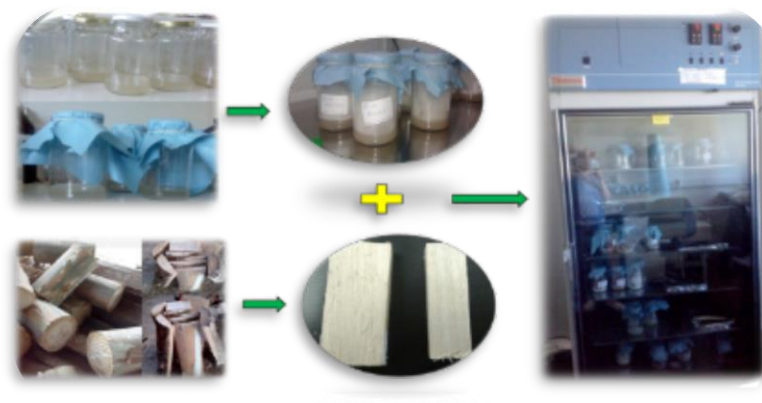


Figura 5. Armado del ensayo de laboratorio

2.3.2. Ensayo de campo

Se seleccionaron 5 árboles al azar con buen estado sanitario del bosque de *E. grandis* antes descrito y se inocularon con inóculo sólido generado a partir de cultivo puro de hongos, en placas con agar y extracto de malta en una concentración de 15 g/l cada uno. La inoculación se realizó a través de heridas realizadas con un barbiquí a una profundidad que alcanza el límite entre la albura y el duramen. Se efectuaron 3 orificios por árbol a distintas alturas (1,5 m y 0,5 m) y se marcaron los mismos con pintura blanca para facilitar las futuras evaluaciones (Figura 6). Se introdujo el inóculo en los orificios y se cubrió la zona con aserrín de manera de facilitar la respiración de los hongos y limitar el acceso de otros microorganismos. La descripción del inóculo introducido en cada árbol en las diferentes alturas se detalla en la cuadro 1.



Figura 6. Árboles inoculados con *L. sulphureus* y *G. trabeum*.

Cuadro 1. Descripción de la inoculación por árbol

Árboles	Altura de inoculación (m)	Especie de hongo
1	1,5	<i>L. sulphureus</i>
	0,5	<i>L. sulphureus</i>
	0,5	<i>G. trabeum</i>
2	1,5	<i>G. trabeum</i>
	0,5	<i>G. trabeum</i>
	0,5	<i>L. sulphureus</i>
3	1,5	<i>L. sulphureus</i>
	0,5	<i>L. sulphureus</i>
	0,5	<i>G. trabeum</i>
4	1,5	<i>L. sulphureus</i>
	0,5	<i>L. sulphureus</i>
5	1,5	<i>L. sulphureus</i>
	0,5	<i>L. sulphureus</i>

2.4. ESTRATEGIA DE SEGUIMIENTO DEL DETERIORO

El proceso de deterioro se siguió durante 10 meses para las probetas de laboratorio y 6 meses para los árboles en pie, aplicando distintas metodologías de evaluación. En el ensayo de laboratorio se utilizaron la pérdida de peso como medida del deterioro, y la microscopía (óptica, electrónica y de fluorescencia) con una frecuencia mensual; mientras que los análisis químicos y la espectrometría FTIR se realizó a los 5 y 10 meses. En el ensayo de campo se utilizaron análisis químicos, espectrometría FTIR y microscopía (óptica, electrónica y de fluorescencia) a los 3 y a los 6 meses de exposición. De los 5 árboles evaluados, los árboles 1 y 2 se muestrearon a los 3 y 6 meses, mientras que los árboles 3, 4 y 5 únicamente a los 6 meses. Como referencia se utilizó madera de albura de *E. grandis* sana, sin exposición al ataque fúngico.

2.4.1. Pérdida de peso y contenido de humedad

Se calcularon las pérdidas de peso individuales de cada probeta en cada uno de los meses de exposición a los hongos. Con los pesos registrados (M1, M2 y M3) se calculó la pérdida de peso (expresada como porcentaje del peso seco original) y el contenido de humedad, para evaluar el avance de la pudrición y la velocidad de deterioro causada por los hongos de pudrición marrón en estudio.

$$CH (\%) = \frac{M1 - M2}{M1} * 100 \qquad PP (\%) = \frac{M1 - M3}{M1} * 100$$

Donde:

CH= contenido de humedad, en %

PP= pérdida de peso, en %.

M1= peso inicial individual de cada probeta (seca y verde)

M2= peso en equilibrio higroscópico de las probetas luego de su exposición a la cepa xilófaga.

M3= peso anhidro de las probetas luego de su exposición a la cepa xilófaga

Determinada la PP (%) de las probetas, se calculó el porcentaje medio de PP.

2.4.2. Análisis químico de la madera

Se determinó el porcentaje lignina ácido soluble y los cambios en la holocelulosa, tomando como referencia la madera sana inicial. Para ello, las muestras se procesaron en un molino marca Marconi (Brasil) del laboratorio forestal de INIA Tacuarembó. Una vez finalizado este proceso se procedió a realizar los análisis químicos de las mismas. Previo al análisis de los polímeros estructurales, se realizó la extracción de los componentes no estructurales de la madera -extractivos, para disminuir o evitar errores en su cuantificación.

La determinación de extractivos se desarrolló por medio del protocolo NREL/TP-510-42619 (Determination of Extractives in Biomass), propuesto por National Renewable Energy Laboratory (Sluiter et al., 2005). Este procedimiento es un paso previo a la cuantificación de los polímeros estructurales de la madera, ya que permite la eliminación de azúcares solubles y moléculas de menor tamaño que interfieren en el análisis de azúcares y lignina. Dicho procedimiento se realizó en un equipo de extracción Soxhlet, colocando de 1 a 5 g de biomasa en un cartucho de papel, añadiendo en el balón 300 ± 5 mL de etanol procurando mantener una temperatura que permita ciclos de 6 a 10 sifones por hora, manteniéndose 24 horas. Posteriormente se dejó secar la madera libre de extractivos a temperatura ambiente durante 48 horas y se pesaron los sólidos obtenidos para la determinación del porcentaje de extraíbles.

La determinación de carbohidratos estructurales y lignina soluble de la muestra de madera se realizó siguiendo el protocolo NREL/TP-510-42618 (Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass) propuesto por National Renewable Energy Laboratory (Sluiter et al., 2008). Se colocaron en tubos de ensayo 300 mg de muestra libre de extractivos con $3,00 \pm 0,01$ mL

de H_2SO_4 al 72% m/m sometidos a baño María durante 60 ± 5 min a una temperatura de $30^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ agitando cada 10 a 15 minutos. Una vez finalizado dicho tiempo se diluyó la solución añadiendo $84,00 \pm 0,04$ mL de agua desionizada, se homogenizó y se embalo correctamente para someter a autoclavado por una hora a 121°C y posteriormente se filtró. El producto sobrenadante de la filtración se utilizó para la cuantificación lignina soluble y para la comparación de la relación del contenido de holocelulosa respecto a la madera sana inicial. Para la determinación de lignina ácido soluble se utilizó espectrofotometría UV-visible con espectrofotómetro Jasco V530 UV/VIS (USA), midiendo la absorbancia a 240 nm y desarrollando el algoritmo según el protocolo. Los azúcares se cuantificaron por cromatografía de capa fina, empleando como fase fija papel Whatman 1, y como fase móvil butanol: piridina: agua en relación 6:4:2. El revelado de las corridas de cromatografía se realizó en transiluminador UV y se fotografió con una cámara Canon PowerShot G15. Las imágenes se procesaron con el programa Adobe Acrobat Reader DC (2019), obteniendo el área de los círculos de cada una de las muestras de las corridas por cromatografía. Se realizaron tres repeticiones por cada muestra.

Los resultados de los análisis permiten comparar los parámetros evaluados al inicio de los ensayos, a los 3 meses (para las muestras provenientes de árboles en pie), a los 6 meses (para madera en servicio - probetas) y al final del ensayo. A través de las comparaciones se visualizan los cambios generados por el proceso de deterioro de pudrición marrón en los polímeros estructurales.

2.4.3. Espectrometría FTIR

Los espectros FTIR fueron obtenidos en un equipo IR Prestige -21 Shimadzu (Japón) perteneciente al Instituto de Ensayo de Materiales de la Facultad de Ingeniería, Udelar. Se trabajó con una resolución de 8 cm^{-1} y 32 scans por muestra. Se procesaron las probetas de laboratorio (verdes y secas) a los 5 y 10 meses de ensayo, y a los 3 y 6 meses las muestras de los árboles en pie. En ambos casos se tomó una muestra de madera sana como referencia y

punto de partida.

2.4.4. Análisis microscópicos

Se realizó una evaluación mensual a través del uso del microscopio óptico, electrónico de barrido (SEM) y de fluorescencia. Para ello, se realizaron cortes transversales microtómicos con un xilótomo marca Reichert-jung (Viena, Alemania) de 10-20 mm de espesor, utilizando navajas de filo bajo. Los mismos se colorearon con safranina diluida en agua destilada al 1 % (p/v), durante 3 minutos y se lavaron con abundante agua para retirar el exceso de colorante. Posteriormente se verificó su calidad mediante observación bajo microscopio óptico. Este procedimiento de preparación de muestras se utilizó para la observación bajo microscopio óptico y de fluorescencia. Esta tinción se utiliza comúnmente en tejidos lignificados como el xilema, permitiendo marcar de manera fluorescente la pared celular de la madera, produciendo fluorescencia verde / amarilla en la pared celular secundaria y fluorescencia roja / naranja en la región de laminilla media (Bond et al., 2008).

En el caso del microscopio electrónico de barrido (SEM) las muestras se prepararon como pequeños bloques (aproximadamente 5 mm en todas las dimensiones) para las probetas de laboratorio y de madera proveniente de los árboles en pie en estudio.

La observación y captura de las imágenes fotográficas de las muestras analizadas en los ensayos de campo y laboratorio fue elaborada mediante la utilización de un microscopio óptico marca Olympus CX 21 (Japón) y el software Dino Capture 2.0/ USB Dino-Lite (versión 1.3.2), un microscopio electrónico de barrido JEOL JCM-6000 PLUS (Jeol USA, incl., Massachusetts, USA) y un microscopio de fluorescencia marca Nikon Eclipse 50i (Melville, USA) equipado con un filtro de excitación de 330 -350 nm y un filtro de emisión de 420 nm.

2.4.5. Análisis estadístico

El ensayo de laboratorio presenta un diseño experimental factorial de dos niveles (especie de hongo: *L. sulphureus* y *G. trabeum*, condición de la madera: seca y verde), lo que hace un total de 4 tratamientos o condiciones de sistema hongo-madera. Es completamente al azar con 5 repeticiones por tratamiento (cada 30 días en madera seca y cada 15 días en madera verde, haciendo un total de 5 probetas por mes para ambas condiciones de madera). El análisis de datos de las variables pérdida de peso y contenido de humedad se realizó mediante análisis de varianza para madera seca, madera verde y un análisis conjunto de tratamientos, siguiendo un modelo de parcelas divididas en el tiempo, y se efectuó la comparación de medias mediante el test de Tukey. Para este análisis se asumió un nivel de confianza del 90% y una probabilidad de error de 0,10. Además se efectuó comparación de medias mediante test de Tukey de los polímeros estructurales, azúcares y lignina soluble ácida (%ASL), con un nivel de significancia de 95%.

El ensayo de campo es un diseño de bloques completos al azar tomando como variables la altura de inoculación (1.5 m y 0.5 m) y la especie de hongo (*L.sulphureus* y *G. trabeum*). En este caso se realizó comparación de medias mediante prueba de Tukey de los contenidos azúcares y lignina soluble (%ASL).

En ambos ensayos, los análisis se llevaron a cabo con software estadístico Infostat (2018, Córdoba, Argentina)

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. ENSAYOS DE LABORATORIO

3.1.1. Madera Seca

Los caracteres macroscópicos observados en la madera seca en servicio fueron color castaño, patrón de fractura cúbico, presencia de micelio, pérdida de densidad, así como fragilidad del material, principalmente en los últimos meses del ensayo. Todos estos indicadores revelan estadios avanzados de la pudrición marrón y fueron reportados por varios autores (Schwarze,2007). Estas características fueron más notorias y evidentes en el caso de la madera atacada por *L. sulphureus* (Figura 7).



Figura 7. Probetas secas de laboratorio en los últimos 5 meses de incubación.

a) Probetas secas atacadas por *L. sulphureus*, b) Probetas secas atacadas por *G. trabeum*.

L. sulphureus colonizo rápidamente la madera de probetas secas de *E. grandis* con un contenido de humedad inicial de 14,02% y una densidad promedio de 0,588 g/ cm³, cubriéndola total y uniformemente con una capa fina

de micelio después de una semana de incubación (Figura 8). En el caso de *G. trabeum* el desarrollo del micelio fue retardado y en menor proporción que *L. sulphureus*, encontrándolo en la base de las probetas en los primeros meses del estudio. Las diferencias en la presencia de micelio en la superficie de las probetas, coinciden con los resultados expresados como porcentaje de pérdida de peso, donde *L. sulphureus* presentó un metabolismo más activo.



Figura 8. Probetas cubiertas por micelio de *L. sulphureus* transcurrida una semana de exposición

3.1.1.1. Pérdida de peso y contenido de humedad

La pérdida de peso se ha utilizado tradicionalmente como una medida de los efectos de los hongos en las propiedades de la madera (Mitsubishi y Morrel, 2012). Las probetas de madera seca en diferentes períodos de exposición a la podredumbre marrón causada por *L. sulphureus* y *G. trabeum*, muestran que ambos hongos atacaron la madera de *Eucalyptus grandis* con capacidades distintas de descomposición. Se verifica que existen diferencias significativas entre éstos, al considerar un nivel de confiabilidad del 0,90, registrándose una pérdida de peso promedio de 11,55 % para *L. sulphureus* y 3,32% para *G. trabeum*.

En ambos casos se observó una tendencia al aumento de pérdida de peso con el transcurso de los meses del estudio, registrándose valores más bajos en el primer mes de ensayo (0,41 % *L. sulphureus* y 0,37 % *G. trabeum*) y valores más elevados en el último mes de evaluación (29,37 % *L. sulphureus* y 11,09 % *G. trabeum*) (Figura 9).

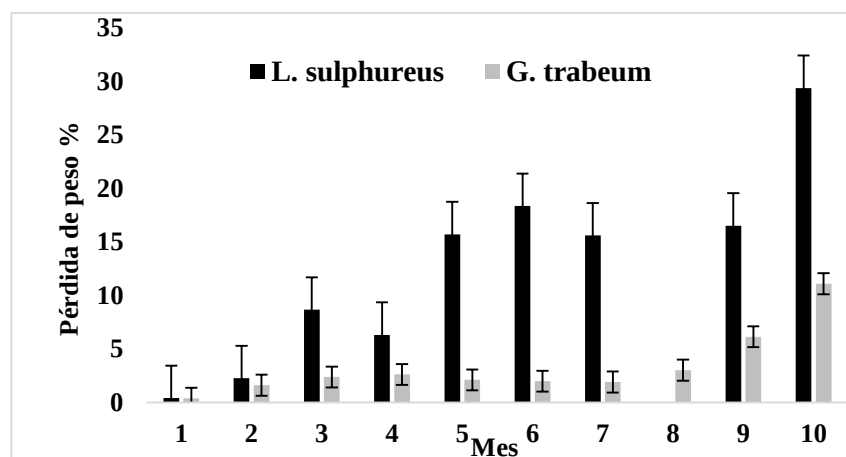


Figura 9. Variación mensual de Pérdida de peso para madera seca

Varios autores reportan el aumento de pérdida de peso a medida que transcurre el tiempo de exposición a hongos de pudrición marrón. Monrroy et al. (2011) reportaron una tendencia al aumento de pérdida de peso en madera seca de *Eucalyptus globulus* y *Pinus radiata* inoculada con *G. trabeum* y *L. sulphureus* durante un período de exposición de 8 semanas. Sin embargo, éstos reportan que *G. trabeum* provocó mayor pérdida de peso en ambas especies arbóreas. Mattos et al. (2014) reportaron un aumento en la pérdida de peso en madera de dos especies arbóreas de rápido crecimiento (*Eucalyptus saligna* y *Corymbia citriodora*) después de un año de exposición a hongos de pudrición marrón en un ensayo de campo.

Las probetas utilizadas como blancos, que fueron cultivadas sin hongos, para corregir el efecto de las condiciones de cultivo, presentaron un contenido de humedad promedio de 59,70 % y no registraron pérdidas de peso.

El contenido de humedad de la madera seca expuestas a estos dos hongos,

mostró un incremento durante el período de exposición, registrándose para *L. sulphureus* y *G. trabeum*, valores de humedad promedio 87,04 % y 73,86 % (25,26 % de CV) respectivamente. Este aumento del contenido de humedad en la madera se debe a la producción de agua, consecuencia del proceso de depolimerización de los componentes de la pared celular por la acción fúngica (Thybring, 2017).

El contenido de humedad mensual presentó oscilaciones a lo largo de los 10 meses, siendo superior el de *L. sulphureus* con respecto a *G. trabeum* en 7 meses de los 10 que abarco el estudio (Figura 10). Dadas las diferencias estadísticas en el contenido de humedad entre los hongos ($p= 0,069$), podemos inferir que *L. sulphureus* presento un metabolismo más activo que *G. trabeum*.

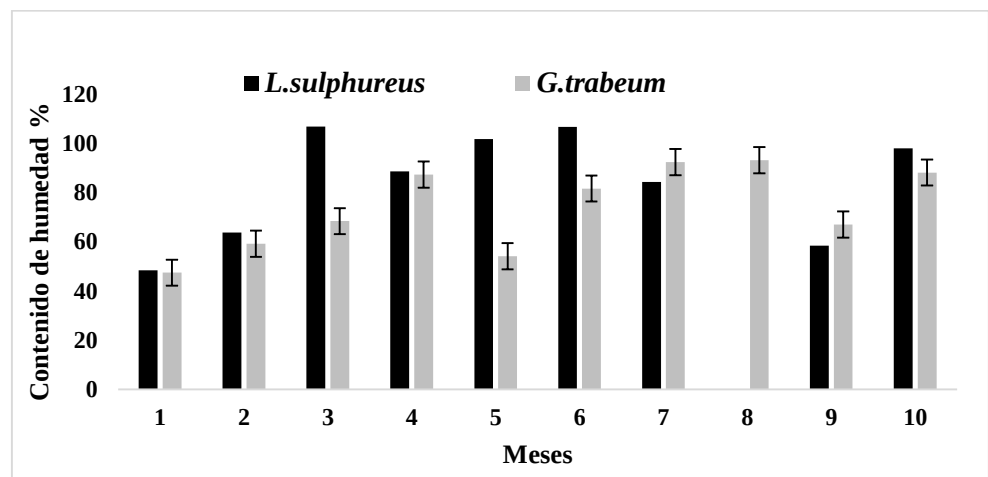


Figura 10. Variación mensual de humedad para madera seca

Es importante destacar que no se realizaron mediciones de las variables estudiadas (pérdida de peso y contenido de humedad) en el mes 8 del ensayo para *L. sulphureus*, ya que las probetas en el interior de los frascos estaban contaminadas, y su determinación comprometería el análisis de los resultados.

Durante la evaluación se encontró una alta variabilidad en los valores de las variables en estudio, principalmente para *L. sulphureus*. El análisis de covarianza demostró que la variabilidad en los valores de pérdida de peso y contenido de humedad, no está dada por la densidad y peso inicial de las

probetas, lo que lleva a inferir que la misma pudo provocarse por la interacción hongo-madera-ambiente. En el caso de madera seca, para poder analizar los cambios en la pérdida de peso, se corrigieron los valores por el arcoseno de la raíz de manera tal de reducir el coeficiente de variación.

3.1.1.2. Análisis microscópicos

A nivel microscópico, la serie de micrografías de madera deteriorada mostró que los patrones de descomposición causados por los dos hongos de pudrición marrón son muy similares teniendo en cuenta los efectos hallados en las paredes celulares. Esto coincide con el patrón de deterioro caracterizado para hongos de pudrición marrón reportado por otros investigadores (Schwarze et al., 2000, Blanchette 1995).

Los análisis de microscopía óptica realizados a las muestras de *Eucalyptus grandis* atacada por *L. sulphureus* y *G. trabeum* mostraron cambios estructurales en las células parenquimáticas de la albura de la madera, desde etapas tempranas del ataque fúngico. Estas alteraciones toman como referencia la superficie transversal de la madera antes de la exposición a los hongos (control). Dichos cambios comenzaron a partir del primer mes de incubación para los dos hongos causantes de pudrición marrón, incrementándose en el transcurso de los 10 meses.

En los primeros meses se evidenció alteraciones importantes en las diferentes reparticiones de la pared celular, principalmente debilitamiento y delaminación de la laminilla media, subcapa S1 y S2 de la pared secundaria. La subcapa S3 no se modificó por la presencia de las cepas xilófagas, seguramente por la dificultad de las enzimas de difundir hacia S3 (Eriksson et al., 1990). Sin embargo, S3 registró modificaciones al final del período de evaluación. Además, se identificaron cambios en el tamaño de los lúmenes celulares, observándose agrandamiento y deformación de los mismos y colapso o ruptura celular en las etapas más avanzadas del proceso (Figura 11 a, b). Estos hallazgos son

característicos de las maderas atacadas por hongos de pudrición marrón.

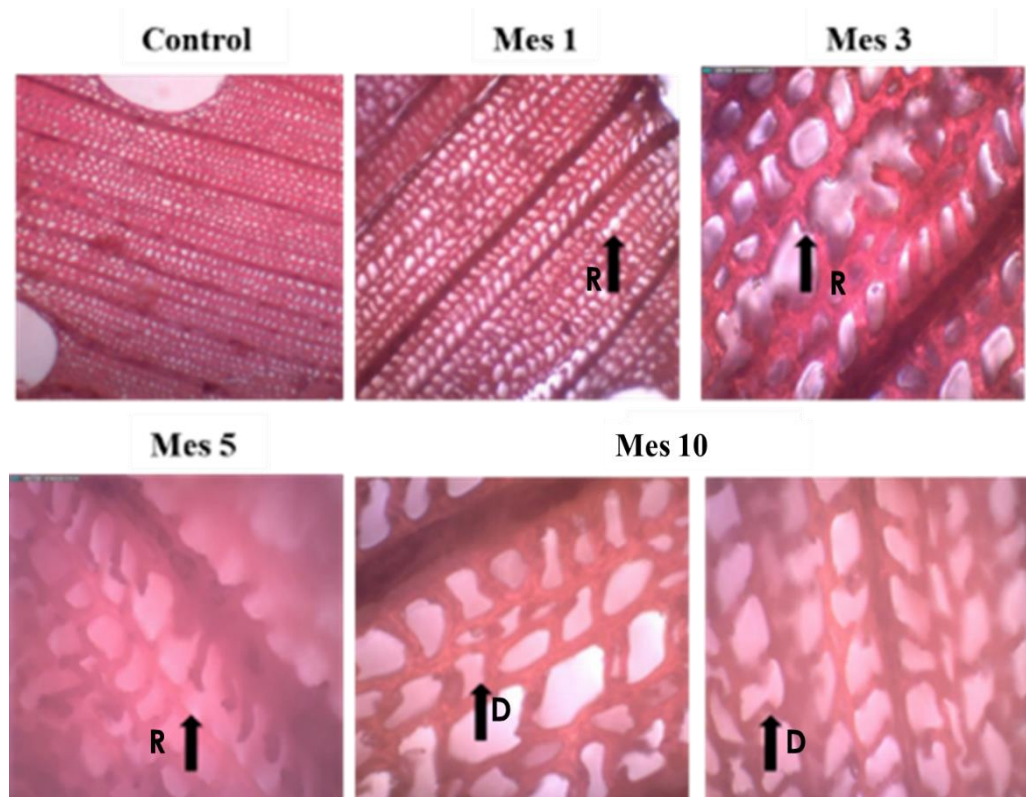


Figura 11 a. Evolución del deterioro de *L. sulphureus* a través de microscopía óptica en albura de probetas de madera de *E. grandis*. Las flechas indican deformación de lúmenes (D) y colapso o ruptura de la pared celular (R).

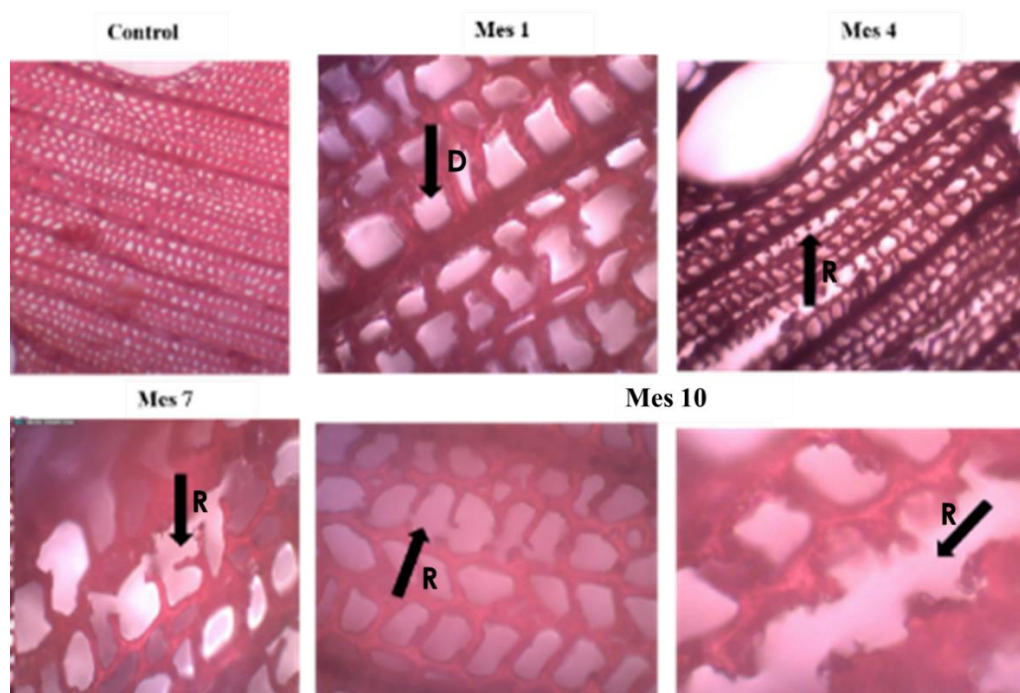


Figura 11 b. Evolución del deterioro de *G. trabeum* a través de microscopía óptica en albura de probetas de madera de *E. grandis*. Las flechas indican deformación de lúmenes (D) y colapso o ruptura de la pared celular (R).

La microscopía electrónica de barrido (SEM) permitió respaldar los resultados generados a través de microscopía óptica, observándose cambios en laminilla media y capa secundaria de la pared celular (S1, S2 y S3), siendo más notorios en las paredes celulares de las células parenquimáticas; además se observa erosión en las paredes de fibras y vasos, llegando al colapso generalizado del tejido. Se visualizó la presencia de materiales residuales y micelio en las zonas degradadas, principalmente identificado en los vasos de mayor diámetro y en etapas más avanzadas del ataque fúngico (Figura 12 a, b). Esto coincide con los reportes de Blanchette (1995), quien indica que la presencia de hifas en los primeros estadios del proceso de pudrición es escasa y dispersa dentro de los lúmenes celulares, tornándose abundantes a medida que avanza la degradación. Schwarze et al. (2000) reportaron la presencia de abundante micelio en vasos xilemáticos de la madera de *Robinia pseudoacacia*

infectada por *L. sulphureus*. La presencia micelar en el tejido infectado está relacionada directamente con las características del leño, tipos celulares, distribución, tamaño de los vasos, contenidos celulares, presencia de tilosis, grado de lignificación y contenido de extractivos (Schwarze, 2007). Estas características mencionadas muchas veces limitan o restringen el avance fúngico, y obligan a los hongos a generar nuevas estrategias para continuar con el proceso de degradación.

El patrón de deterioro encontrado mediante esta metodología (microscopía óptica y electrónica) coincide con reportes realizados por otros autores para madera de latifoliadas (Murace et al., 2017, Shwarze et al., 2000, Erikson et al., 1990). En términos generales, *L. sulphureus* presentó una velocidad de deterioro mayor, registrándose mayores alteraciones en la madera de *E. grandis* con respecto a *G. trabeum*.

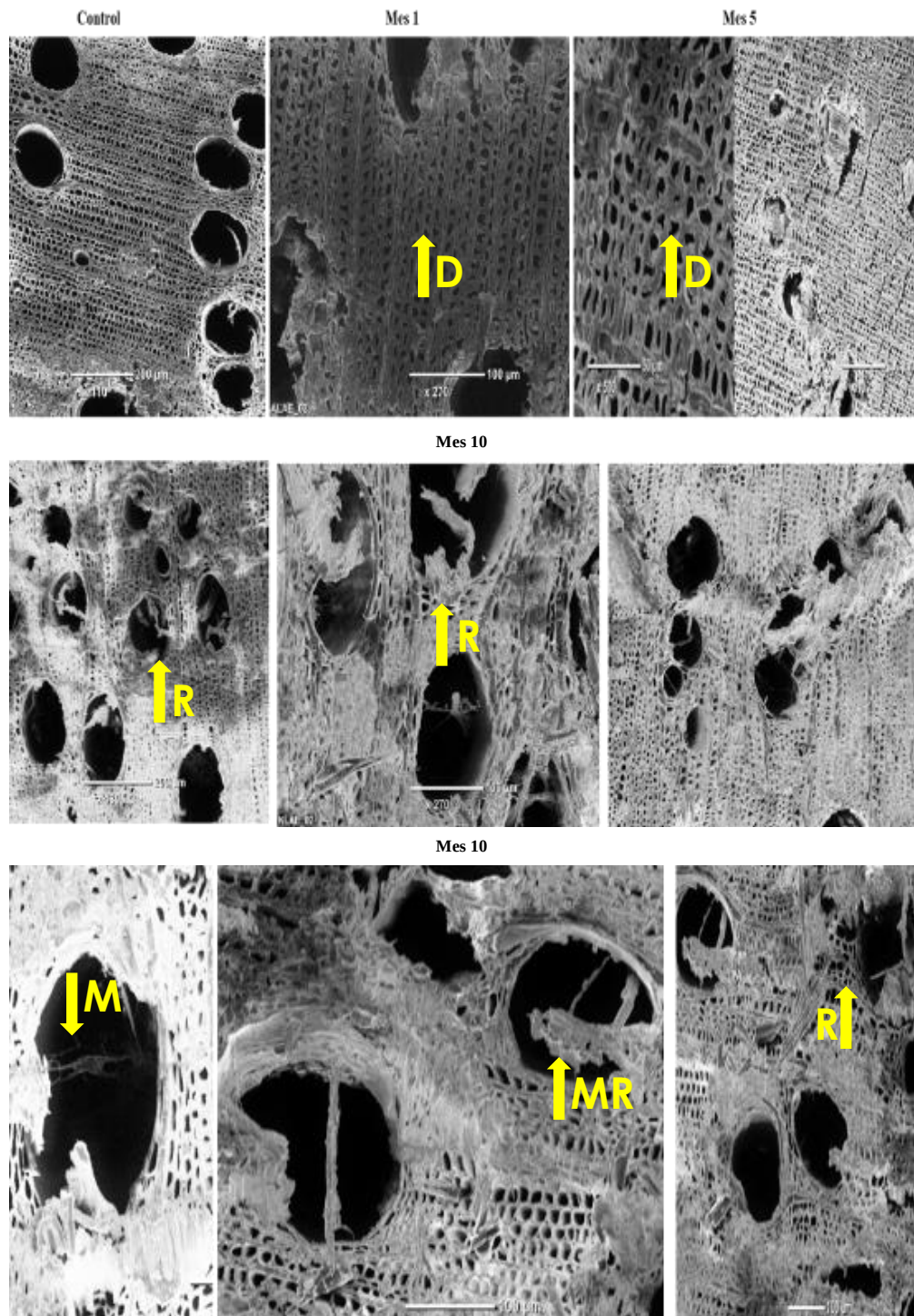


Figura 12 a. Evolución del deterioro de *L. sulphureus* a través de microscopía electrónica de barrido (SEM) en albura de probetas de madera de *E. grandis*. D: Deformación de lúmenes celulares; M: Micelio fúngico; RV: Ruptura de las paredes celulares de los vasos; MR: Material residual; R: colapso o ruptura de la pared celular.

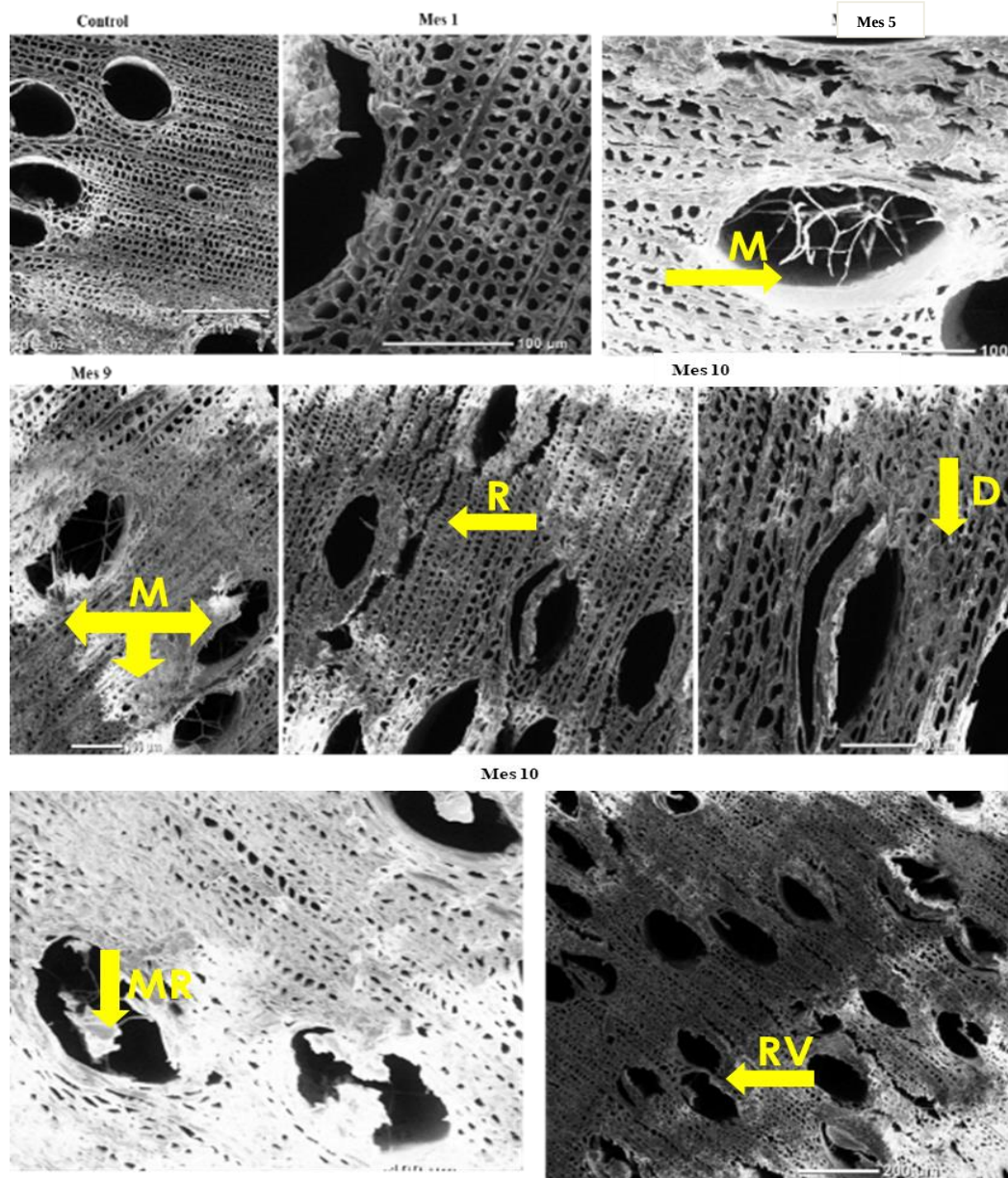


Figura 12 b. Evolución del deterioro de *G. trabeum* a través de microscopía electrónica de barrido (SEM) en albura de probetas de madera de *E. grandis*. D: Deformación de lúmenes celulares; M: Micelio fúngico; RV: Ruptura de las paredes celulares de los vasos; MR: Material residual.

En la figura 13 a y b, se presentan las imágenes de microscopía de fluorescencia para la madera atacada por ambos hongos de pudrición. Esta metodología permitió identificar los cambios en las paredes celulares y reconocer las paredes ricas en lignina y celulosa (Bond et al., 2008). Varios

autores han reportado la utilidad de esta técnica para detectar cambios en la composición química de las paredes celulares, logrando fácilmente identificar madera atacada por hongos de pudrición (Bond et al., 2008, Lowell 1981).

Para ambos hongos es notoria la diferencia en la coloración de la madera, comenzando con un naranja intenso (control) y finalizando a los 10 meses con una coloración amarilla fuerte. La coloración naranja intensa indica la presencia de lignina distribuida homogéneamente en las paredes celulares de las células de la madera. A medida que transcurre el tiempo de incubación esta coloración se va tornando amarilla fuerte, señal que la lignina presente en la madera se modificó producto del ataque fúngico. Esta modificación de la lignina se dio con la misma intensidad para ambos hongos, notándose mayor ruptura y colapso de las paredes de los vasos y de las células parenquimáticas en el caso de la madera atacada por *L. sulphureus*.

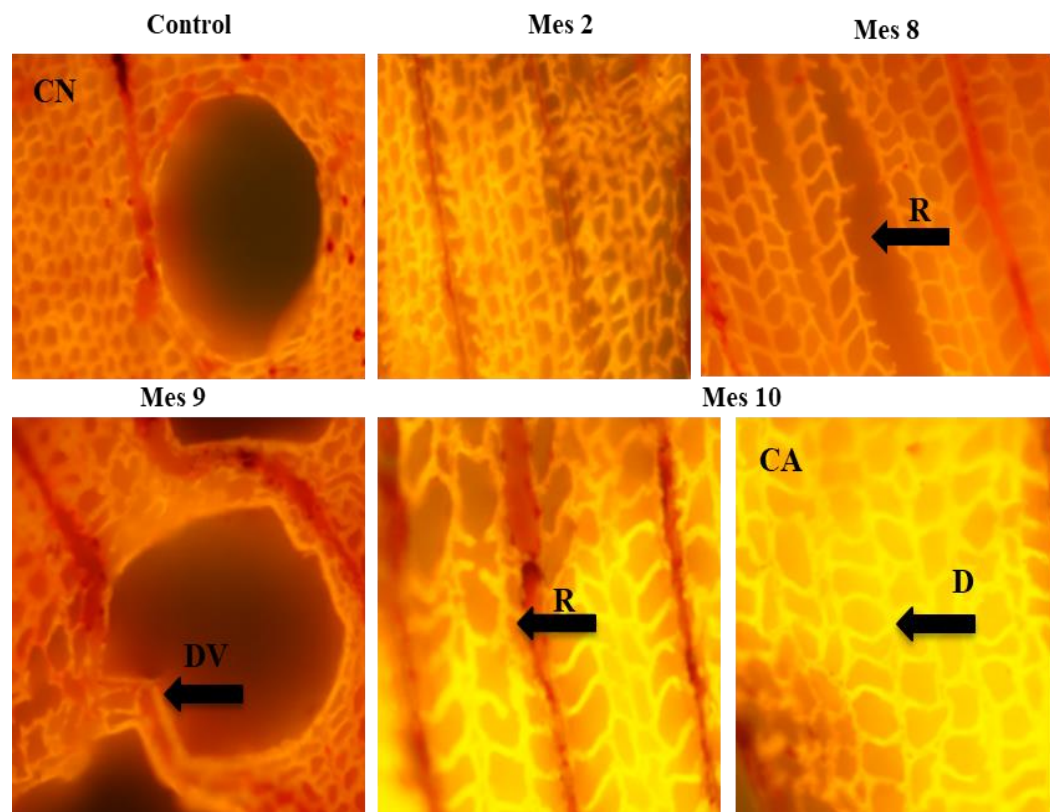


Figura 13 a. Evolución del deterioro de *L. sulphureus* a través de microscopía de fluorescencia en albura de probetas de madera de *E. grandis*. R: colapso o ruptura

de la pared celular; D: Deformación de lúmenes celulares; DV: Deformación de los vasos celulares; CN: coloración naranja; CA: coloración amarilla.

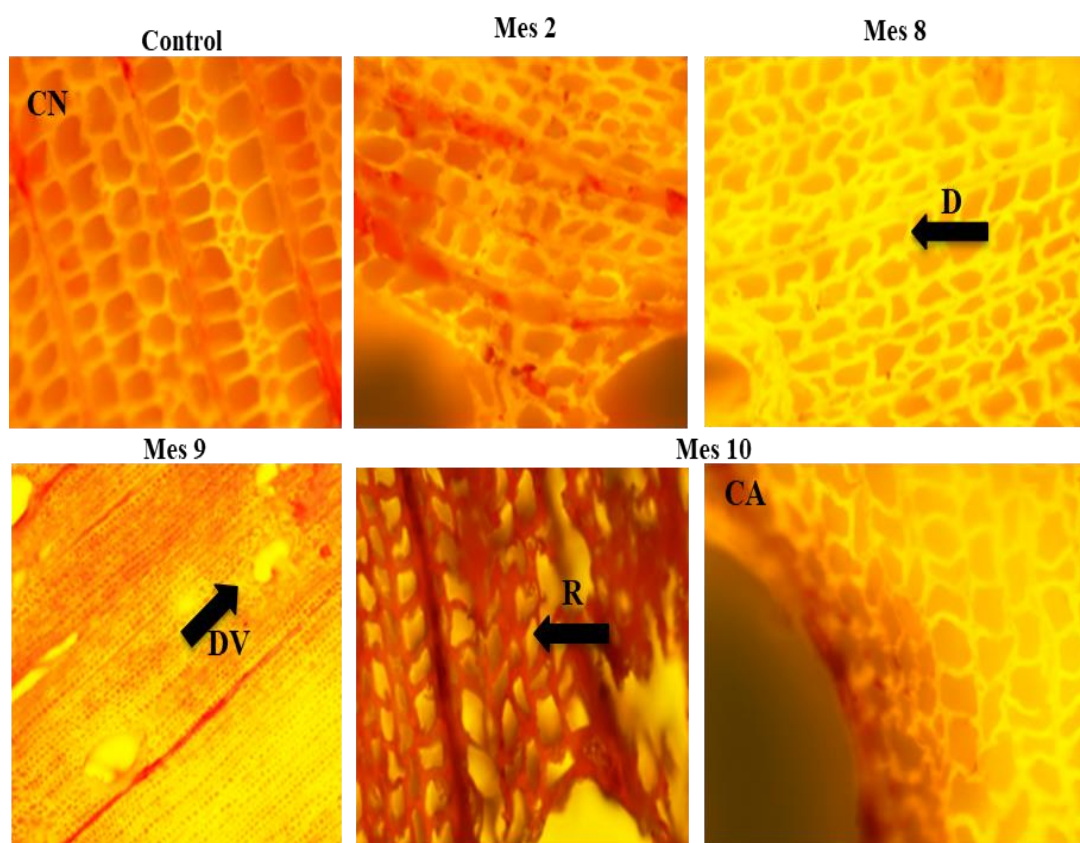


Figura 13 b. Evolución del deterioro de *G. trabeum* a través de microscopía de fluorescencia en albura de probetas de madera de *E. grandis*. R: colapso o ruptura de la pared celular; D: Deformación de lúmenes celulares; DV: Deformación de los vasos celulares; CN: coloración naranja; CA: coloración amarilla.

3.1.1.3. Análisis químicos

La madera sana de *E. grandis* libre de extractivos, presentó un contenido inicial de lignina ácido soluble (%ASL, por sus siglas en inglés) promedio de 18,08 % del peso seco de la madera. Este valor inicial cambió a lo largo de los 10 meses de estudio por la presencia de los hongos de pudrición marrón, que generaron diferencias significativas ($p=0,001$) en el contenido de %ASL que se

visualizan en la figura 14.

La madera control y la madera expuesta durante 5 meses presentaron la misma cantidad de %ASL. Estos resultados son coincidentes con lo reportados por Monrroy et al. (2011) en donde no se encontraron variaciones significativas en el contenido de lignina en madera de *E. globulus* atacada por *L. sulphureus* y *G. trabeum*, en un período de evaluación de 8 semanas de incubación, con respecto al control. Estos autores consideran que este hallazgo es consistente con el tipo de proceso de degradación provocado por los hongos de pudrición marrón.

Gráfico. % ASL en madera en servicio

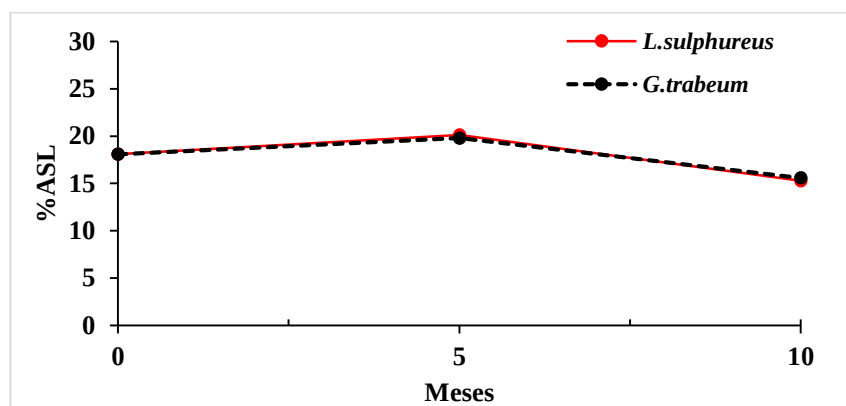


Figura 14. Porcentaje de lignina ácido soluble

La cromatografía de capa fina permitió estimar la variación del contenido de carbohidratos por la acción de los hongos, correspondiente a la holocelulosa degradada luego de la digestión ácida (Figura 15). A lo largo de los 10 meses de exposición a *L. sulphureus* y *G. trabeum*, la madera disminuyó significativamente el contenido de carbohidratos en un 23,48 % para *L. sulphureus* y 14,32 % para *G. trabeum*, con un nivel de confianza del 0,95 en ambos casos. Estudios preliminares han reportado el descenso de hemicelulosas y celulosa como resultado del proceso de descomposición causado por hongos de pudrición marrón (Monrroy et al., 2011, Curling et al., 2002). Estos cambios generados en la composición química se tornan más evidentes a medida que

avanza el proceso de deterioro (Curling et al., 2002).

Como ya se indicó, al inicio del proceso de deterioro se registraron para ambos hongos bajos porcentajes de pérdida de peso, lo que se ve reflejado en la ausencia de cambios químicos (holocelulosa) en los primeros meses de estudio con respecto al control. Irbe et al. (2011) no encontraron diferencias en el porcentaje de pérdida de peso, celulosa y lignina en las primeras etapas de pudrición en madera de *Pinus sylvestris* expuesta al hongo de pudrición marrón *Coniophora puteana*.

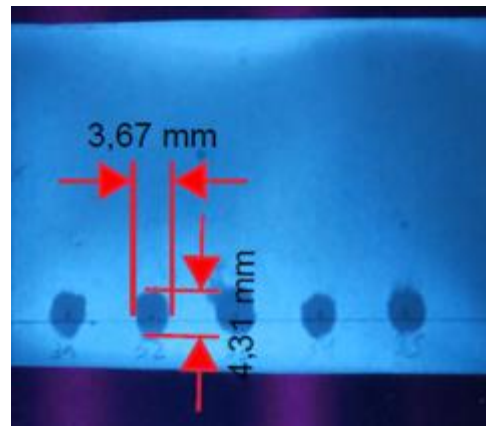


Figura 15. Cromatografía de capa fina

3.1.1.4. Espectrometría FTIR

Normalmente, FTIR es una técnica que se utiliza para detectar y cuantificar la composición química de la madera bajo diferentes tratamientos y bajo distintas circunstancias (Shi y Li, 2012), así como también, para caracterizar la química de la madera (Pandey1999, Faix 1992, Owen y Thomas, 1989) y determinar el contenido de lignina en pulpa, papel y madera (Berben et al., 1987, Rodrigues et al., 1998). Es una técnica útil ya que se requiere una preparación mínima de la muestra y se pueden analizar cantidades muy pequeñas de madera (unos pocos miligramos) en comparación con otras técnicas convencionales (Pandey y

Pitman, 2003).

En los espectros FTIR se reconocen dos regiones, la región entre 3800 y 2750 cm^{-1} que contiene siete bandas asignadas a las diferentes vibraciones del enlace OH y la denominada “*fingerprint region*” o “huella dactilar” de 1800 a 800 cm^{-1} con veintisiete bandas (Popescu et al., 2007). La mayoría de estas bandas en esta última zona tienen contribuciones de todos los componentes químicos de la madera, habiendo muy pocas de ellas asignadas a celulosa, hemicelulosa y lignina. Las principales bandas usadas para el análisis de madera se asignan a (Pandey y Nagveni 2007, Mahajan et al., 2012; Lucejko et al., 2018; Traoré et al., 2018): 1738 cm^{-1} corresponde al enlace C=O no conjugado en hemicelulosas (cetonas, carboxilos, esteres); 1596 cm^{-1} es la vibración del esqueleto aromático más estiramiento del enlace C=O; 1505 cm^{-1} es la vibración del esqueleto aromático en lignina (C=C); 1462 cm^{-1} es la deformación C-H aromático; 1375 cm^{-1} deformación C-H de celulosa y hemicelulosa; 1268 cm^{-1} anillo guaiacil más estiramiento del enlace C=O en lignina; 1244 cm^{-1} anillo siringilo más estiramiento del enlace C=O en lignina y xilano; 1158 cm^{-1} es la vibración C-O-C en celulosa y hemicelulosa; 1122 cm^{-1} corresponde al esqueleto aromático más estiramiento del enlace C-O; 898 cm^{-1} es la deformación C-H en celulosa.

Las figuras 16 y 18 muestran los espectros de *E. grandis* entre 4000 – 500 cm^{-1} y las figuras 17 y 19 los espectros comprendidos en la huella dactilar (1800-800 cm^{-1}) para los dos hongos de pudrición marrón. De acuerdo a lo esperado (Lucejko et al, 2018; Traoré et al, 2018), al comparar la madera sana (control) con la madera degradada por los hongos, a los distintos tiempos, se observa una disminución en la intensidad de la banda de los polisacáridos a 1738 cm^{-1} , 1375 cm^{-1} , 1158 cm^{-1} y 898 cm^{-1} , acompañada por un aumento en la intensidad de la banda de absorción debida a la lignina a 1596 cm^{-1} , 1505 cm^{-1} , 1462 cm^{-1} , 1268 cm^{-1} , 1245 cm^{-1} y 1125 cm^{-1} .

Una forma de visualizar el efecto de los hongos, es mediante un método

semicuantitativo, que resalta las relaciones de las intensidades de absorción de las bandas (Pandey y Pitman, 2003). Dicho método permite calcular la relación entre la intensidad de la banda de lignina de 1508 cm^{-1} contra las bandas de carbohidratos 1730 , 1370 , 1155 y 897 cm^{-1} . También se consideran los cambios en hemicelulosa (1730 cm^{-1}) y celulosa (897 cm^{-1}).

La gráfica 20 muestra para ambos hongos a los 5 meses de cultivo, un incremento en todos los cocientes que comparan lignina con los carbohidratos (I_{1508}/I_{1370} , I_{1508}/I_{1155} , I_{1508}/I_{1730} , I_{1508}/I_{897}) al comparar madera sana con deteriorada; al mismo tiempo que el cociente I_{1730}/I_{897} disminuye marcadamente lo que puede indicar un mayor deterioro en esta etapa de la hemicelulosa con respecto a la celulosa.

A los 10 meses de cultivo se observa una tendencia a la disminución de los cocientes que comparan lignina con los carbohidratos, y se mantiene la disminución de I_{1730}/I_{897} con respecto a la madera sana, lo que indica que continúa siendo marcado el deterioro de la hemicelulosa con respecto a la celulosa en ese tiempo de cultivo.

El deterioro causado por hongos de pudrición marrón resulta en un aumento significativo de la relación lignina/carbohidrato lo que es indicador de una remoción selectiva de carbohidratos durante el proceso de deterioro causado por estos hongos. Esto coincide con el análisis de lignina ácido soluble, que sufre un ligero incremento a los 5 meses de cultivo, para luego disminuir al igual que los cocientes lignina/carbohidrato de a los 10 meses de cultivo. Sin embargo, se observó en todo momento una disminución los carbohidratos.

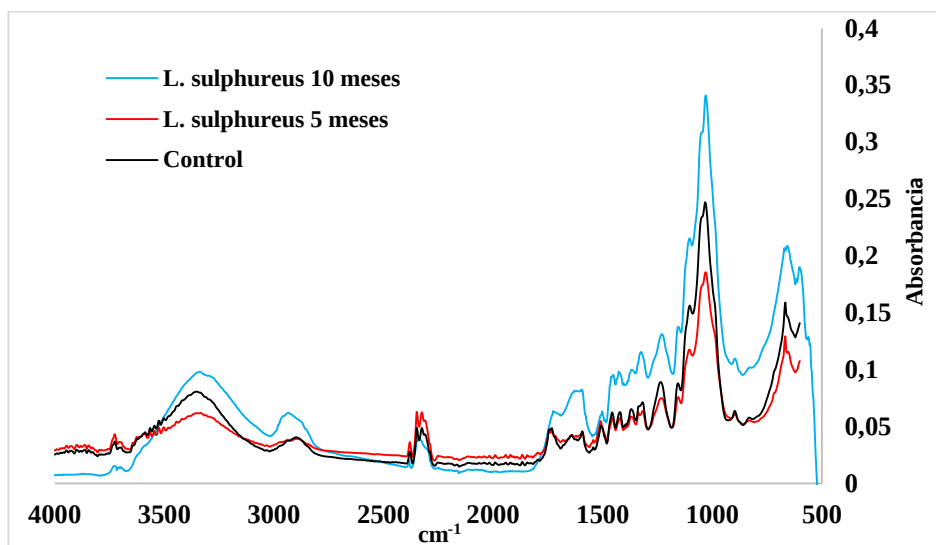


Figura 16. Espectrometría FTIR para madera atacada por *L. sulphureus*.

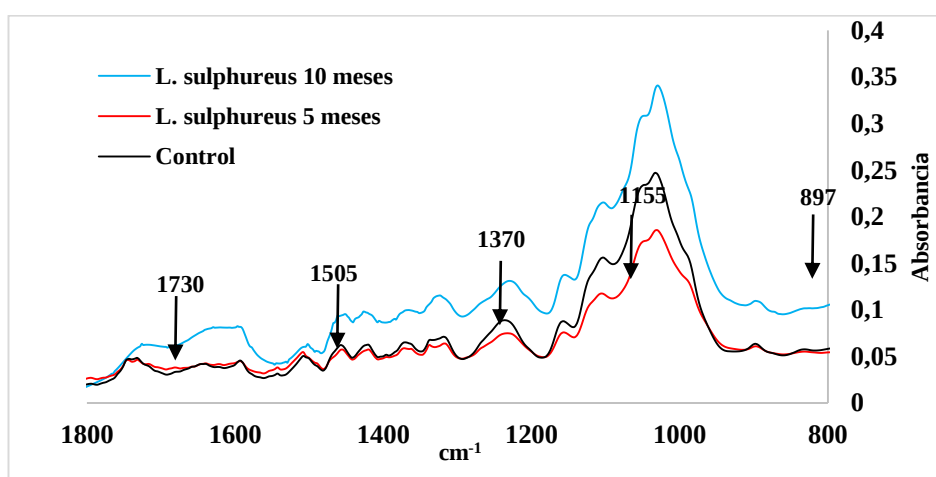


Figura 17. Huella digital (1800 a 800 cm⁻¹) para *L. sulphureus*

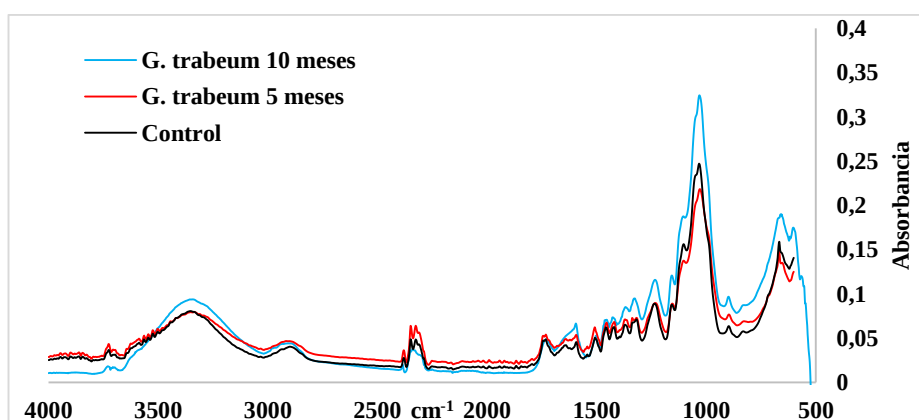


Figura 18. Espectrometría FTIR para madera atacada por *G. trabeum*

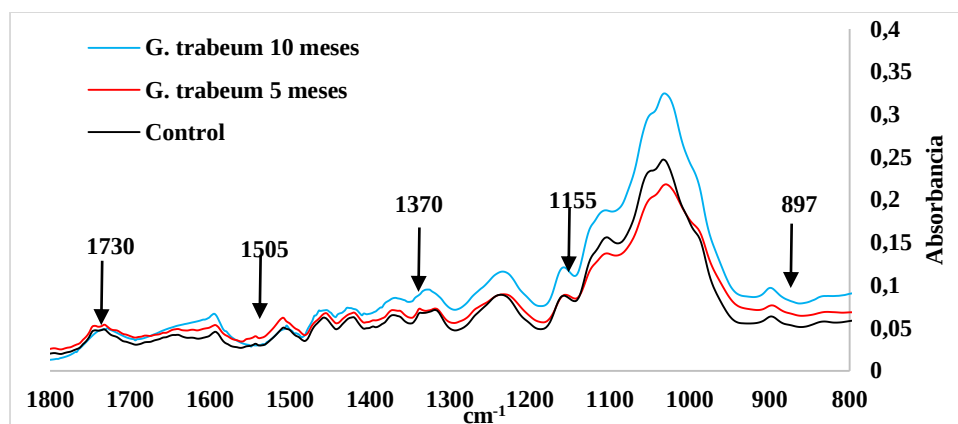


Figura 19. Huella dactilar –espectro ($1800\text{-}800\text{ cm}^{-1}$) de *G. trabeum*

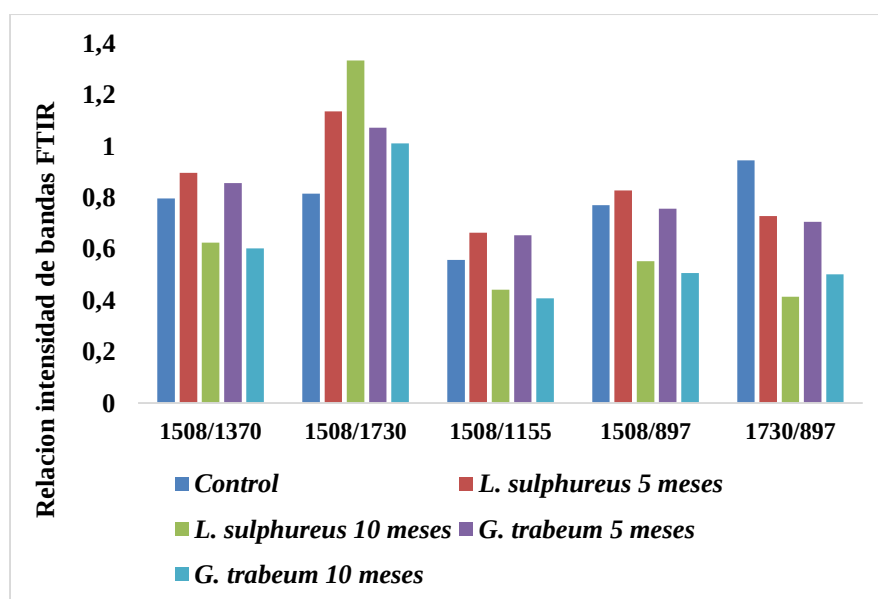


Figura 20. Relación de intensidad de bandas FTIR para madera seca.

3.1.2. Madera Verde

Al igual que en las probetas de madera seca, las probetas verdes, que son aquellas con un contenido de humedad inicial de 46, 09% y una densidad promedio de $0,488\text{ g/cm}^3$, presentaron el mismo patrón de deterioro característico de la pudrición marrón.

En este caso, los caracteres observados fueron de mayor intensidad y más evidentes que en el caso de la madera seca, siendo más agudos los daños provocado por *L. sulphureus* con respecto a *G. trabeum* (Figura 21).

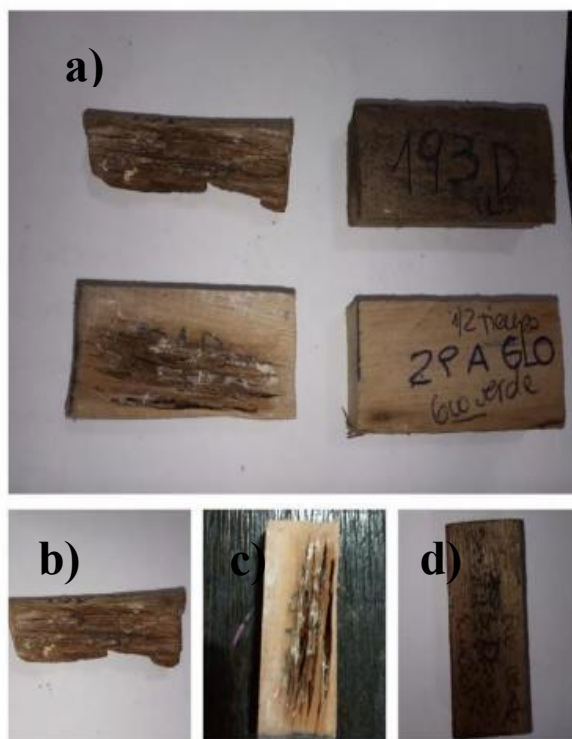


Figura 21. Probetas verdes de laboratorio luego de 12 meses de exposición. a) A la izquierda, probetas atacadas por *L. sulphureus* y a la derecha atacadas por *G. trabeum* b) y c) Probeta atacada por *L. sulphureus* con 12 meses de exposición, d) probeta atacada por *G. trabeum*.

3.1.2.1. Pérdida de peso y contenido de humedad

La pérdida de peso promedio de las probetas de madera verde registrada en 10 meses de exposición a *L. sulphureus* y *G. trabeum*, muestra que existen diferencias significativas entre éstos, al considerar un nivel de confiabilidad del 0,90, registrándose una pérdida de peso promedio de 24,52% para *L. sulphureus* y 15,11% para *G. trabeum*.

En ambos casos, se observó una tendencia al aumento de pérdida de peso con el transcurso de los meses de incubación de la madera, registrándose valores más bajos en los primeros meses de estudio y valores superiores en el último mes del ensayo (38,35 % *L. sulphureus* y 22,57 % *G. trabeum*). Si bien ambos hongos provocaron un descenso de peso de las probetas, *L. sulphureus* registró durante todo el período de exposición mayores valores promedios de pérdida de peso (Figura 22).

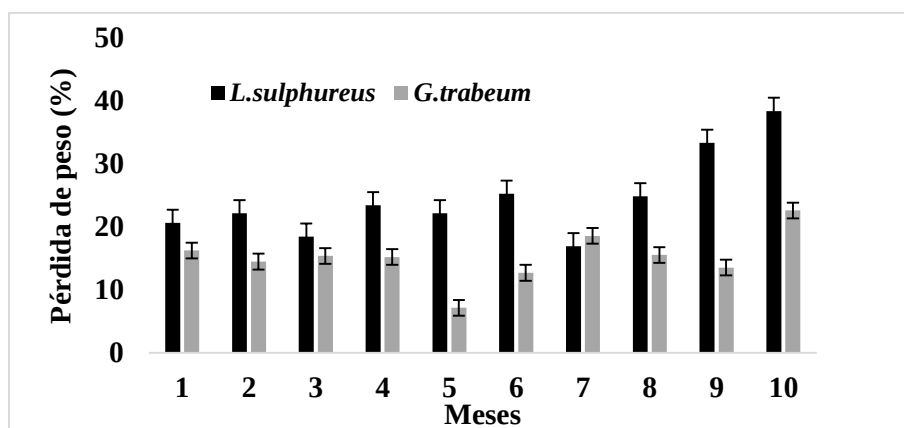


Figura 22. Variación mensual de Pérdida de peso para madera verde

Se realizaron las mismas correcciones que en el caso de madera seca para disminuir la variabilidad en los resultados (3.1.1.1). En este sentido, tampoco se identificaron los factores que generaron dicha heterogeneidad, atribuyendo la misma a la interacción del sistema hongo-madera-ambiente.

El contenido de humedad de las probetas verdes expuestas a estos dos hongos, mostró un incremento durante el período de exposición, registrándose para *L. sulphureus* y *G. trabeum*, valores de humedad promedio 69,76 % y 46,11 % respectivamente (47,03 % de CV). Zaid (2004) reportó un aumento en el contenido de humedad en probetas de *E. globulus* sometidas a incubación durante períodos de uno, dos y tres meses.

El contenido de humedad de la madera atacada se vio influenciado por la especie de hongo ($p=0,0012$), por el tiempo de exposición ($p=0,0869$) y por la interacción entre estas variables ($p=0,0186$). Si bien el contenido de humedad mensual presento varias oscilaciones a lo largo de los 10 meses, los resultados muestran valores superiores de *L. sulphureus* con respecto a *G. trabeum* en 7 meses de los 10 que abarco el estudio (Figura 23).

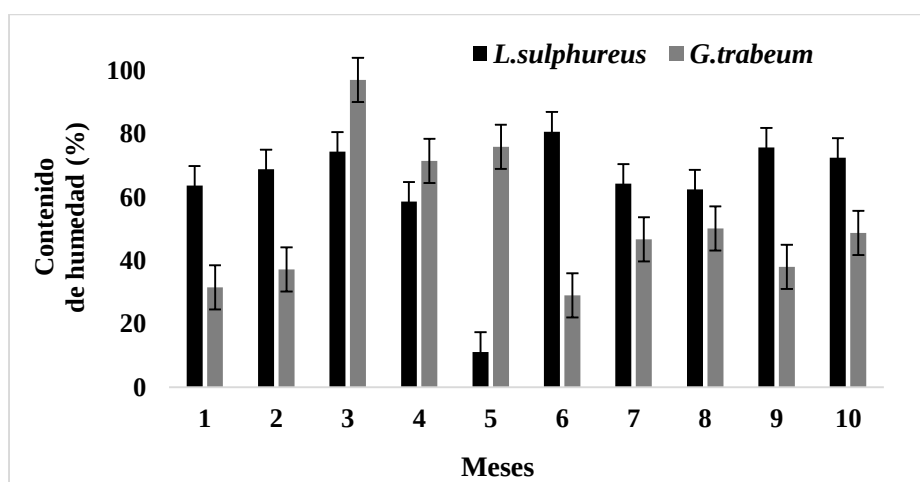


Figura 23. Variación mensual de humedad para madera verde

3.1.2.2. Espectrometría FTIR

Las figuras 24 y 26 muestran los espectros de *E. grandis* entre 4000 – 500 cm^{-1} y las figuras 25 y 27 los espectros comprendidos en la huella dactilar (1800-800 cm^{-1}) para los dos hongos de pudrición marrón. A diferencia de lo observado en los espectros de madera seca, al comparar los espectros de la madera sana (control) con la madera degradada por los hongos, a los 5 meses de cultivo, existe un ligero incremento en la intensidad de las bandas de absorción debida a los polisacáridos (1738 cm^{-1} , 1375 cm^{-1} , 1158 cm^{-1} y 898 cm^{-1}) y debida a la lignina (1596 cm^{-1} , 1505 cm^{-1} , 1462 cm^{-1} , 1268 cm^{-1} , 1245 cm^{-1} y 1125 cm^{-1}), que luego disminuyen a los 10 meses de cultivo.

Se analizan las mismas relaciones de las intensidades de absorción de la

banda de lignina a 1508 cm^{-1} contra las bandas de carbohidratos a 1730 , 1370 , 1155 y 897 cm^{-1} . También se consideran los cambios en hemicelulosa (1730 cm^{-1}) y celulosa (897 cm^{-1}) (Pandey y Pitman, 2003).

La gráfica 28 muestra que, para ambos hongos, a los 5 y a los 10 meses de cultivo, una disminución del cociente I_{1730}/I_{897} , lo que es indicador de un mayor deterioro de la hemicelulosa con respecto a la celulosa. Luego los cocientes que comparan la lignina con los carbohidratos (I_{1508}/I_{1370} , I_{1508}/I_{1155} , I_{1508}/I_{1730} , I_{1508}/I_{897}) de madera sana y deteriorada muestran un ligero aumento a los 5 meses, indicador de una remoción selectiva de carbohidratos. A los 10 meses de cultivo, se da una disminución de estos cocientes.

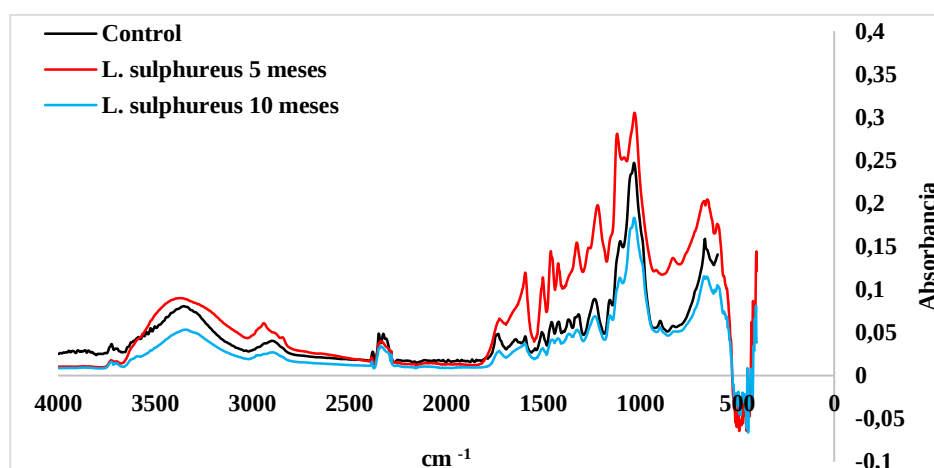


Figura 24. Espectrometría FTIR para madera atacada por *L. sulphureus*

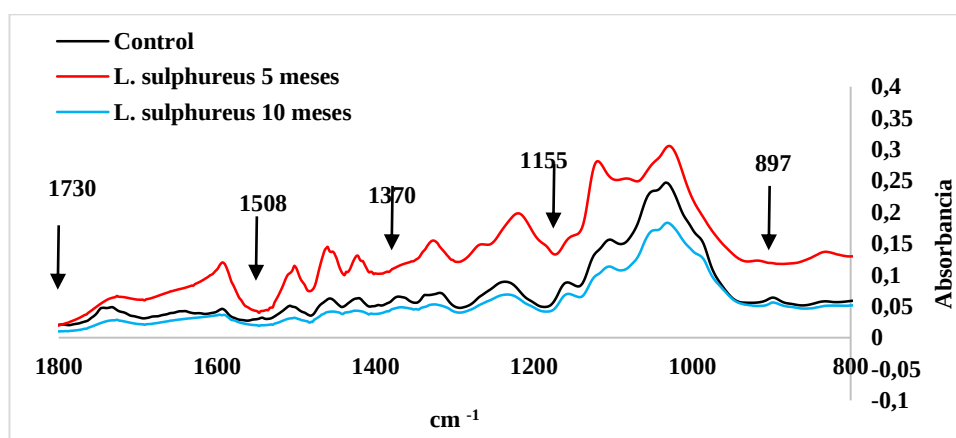


Figura 25. Huella dactilar –espectro ($1800\text{--}800\text{ cm}^{-1}$) de *L. sulphureus*

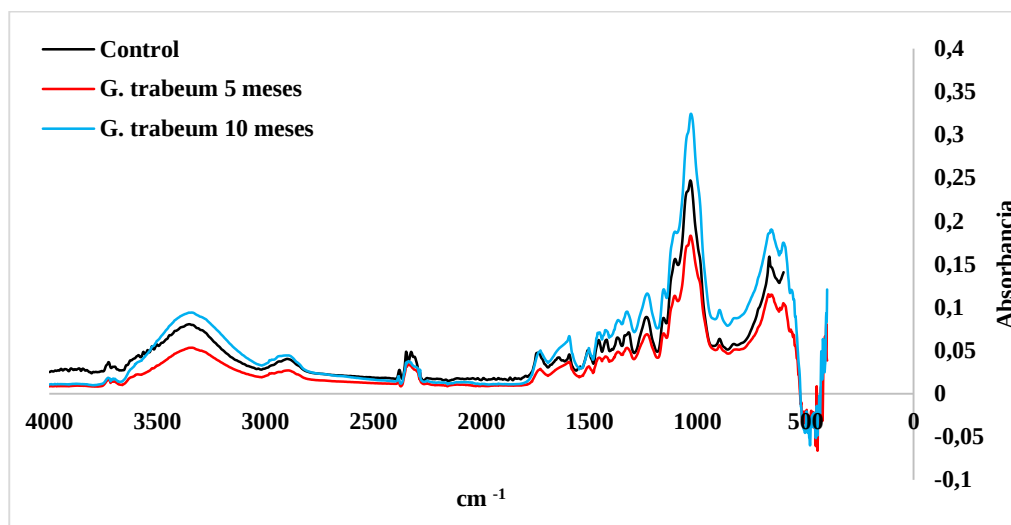


Figura 26. Espectrometría FTIR para madera atacada por *G. trabeum*

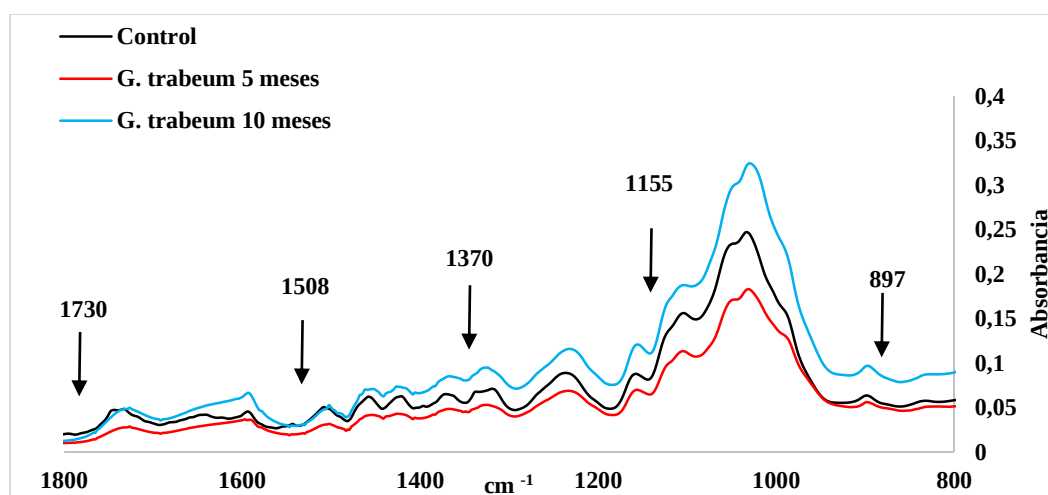


Figura 27. Huella dactilar –espectro ($1800\text{-}800\text{ cm}^{-1}$) de *G. trabeum*

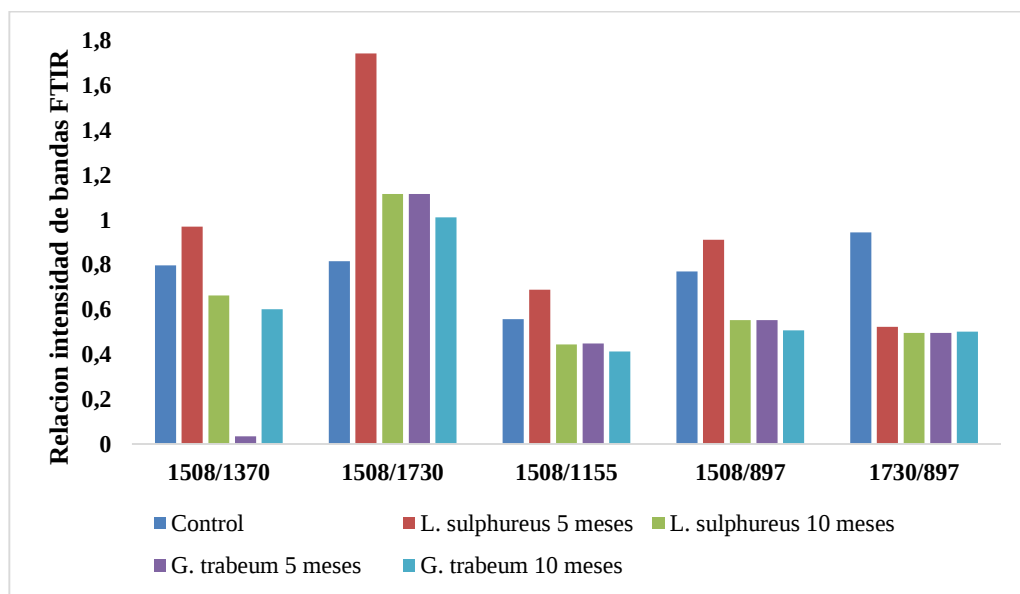


Figura 28. Relación de intensidad de bandas FTIR para madera verde

3.1.3. Análisis conjunto de tratamientos

Este análisis permitió verificar el efecto de las condiciones iniciales de la madera (referido al contenido de humedad: seca/verde) sobre la actividad de *L. sulphureus* y *G. trabeum*, en un período de incubación de 10 meses.

En lo que refiere a las condiciones iniciales de la madera, se registraron diferencias significativas para las variables contenido de humedad y pérdida de peso ($p=0,0001$). En este punto es importante destacar, que se parte de madera con un 14,02 % de humedad y se expone a los hongos en un ambiente con una humedad relativa del aire de 75 %. En estas condiciones de sustrato y con condiciones controladas de humedad, el sistema (madera-hongo) comenzó el proceso de deterioro. El inicio de la degradación comenzó a pesar de que la madera se encuentra por debajo del punto de saturación de la fibra (PSF). Si bien la madera es un material higroscópico y tiende a alcanzar el equilibrio con el ambiente que la rodea, necesita un contenido de humedad atmosférica de 95 - 100% para alcanzar el PSF (Brischke et al., 2017), por lo cual no fue posible alcanzar ese valor de humedad y el hongo comenzó su acción por debajo de este

punto crítico.

Existen muchos trabajos realizados por otros investigadores donde reportan la importancia de este punto crítico en el comienzo del ataque fúngico (Thybring et al., 2018, Stienen et al., 2014, Wälchli 1980, Ammer 1963, Brischke et al., 2017, Meyer y Brischke 2015). Brischke et al. (2017) evidencian deterioro por debajo de PSF pero a altos valores de humedad relativa del aire (mayor a 96%), en tanto que Meyer y Brischke (2015), informan deterioro por debajo del PSF, pero con madera con contenido de humedad superior al 19%. Ammer (1963) reportó un mínimo de contenido de humedad de 30% y Wälchli (1980) un rango óptimo para la acción de los basidiomycetes entre 40 y 70 %. Stienen et al. (2014) reportaron que los hongos de pudrición marrón requieren de un contenido de humedad de la madera por encima del PSF para su propagación, el desarrollo de éstos por debajo de este punto se ve retardado o inhibido. Thybring et al. (2018) afirmaron que el agua desempeña un papel esencial en la descomposición de la madera causada por hongos de pudrición marrón, y una reducción en el contenido de humedad de la pared celular puede ser una estrategia para retardar el crecimiento fúngico y aumentar la durabilidad de la misma. Esta reducción dificulta el transporte de enzimas a las paredes celulares retardando o inhibiendo el desarrollo.

En este estudio, ambas especies de hongos comenzaron su actividad en presencia de un sustrato por debajo del PSF. En los primeros 3 meses se registraron diferencias en la velocidad de deterioro causada por ambos hongos de pudrición marrón. *L. sulphureus* presentó una velocidad de deterioro mayor en comparación con *G. trabeum* (Figura 29), lo que denota un metabolismo más activo desde los comienzos de la incubación y menores exigencias ambientales para comenzar el desarrollo en la madera.

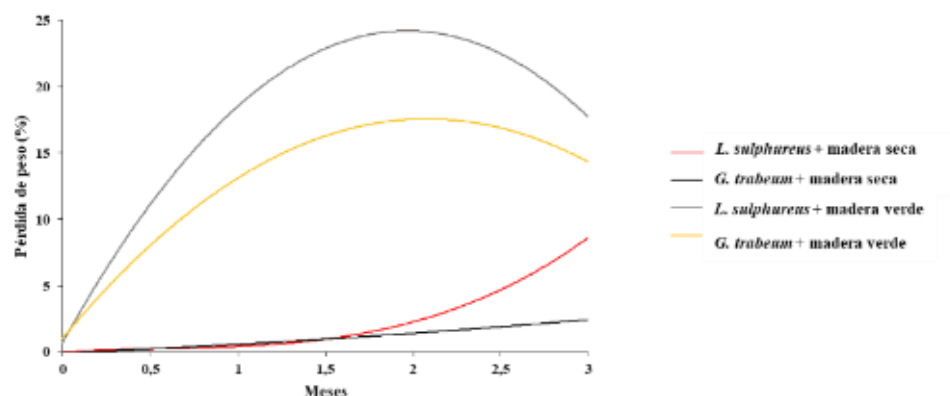


Figura 29. Velocidad de deterioro al inicio del proceso (3 meses de incubación)

La velocidad de deterioro registrada a través de la pérdida de peso y el contenido de humedad de la madera de *E. grandis*, permitió visualizar que la misma depende de la condición inicial de la madera (seca o verde) y del metabolismo de la especie de hongo involucrada. En este trabajo las condiciones que promovieron mayor velocidad de deterioro corresponden al sustrato con 46.02 % de humedad (madera verde) y al hongo xilófago *L. sulphureus*.

3.2. ENSAYO DE CAMPO

En el caso de los árboles en pie, no se observaron a simple vista síntomas que indicaran daño generado por los hongos de pudrición marrón. Al momento de realizar el muestreo se constató que los árboles presentaban un buen estado sanitario y únicamente se detectó la presencia de un abultamiento o agalla alrededor de la herida provocada por la inoculación (Figura 30) y un líquido de consistencia gomosa en el momento de la perforación con el taladro (Figura 31).



Figura 30. Abultamientos de los árboles a los 6 meses de estudio



Figura 31. Líquido de consistencia gomosa en el momento del muestreo

3.2.1. Análisis microscópicos

A nivel microscópico, se visualizaron cambios en las paredes celulares de las células parenquimáticas y los vasos a los 3 y 6 meses posteriores a la inoculación. En el primer muestreo, se detectó a través de microscopía óptica y electrónica un patrón de deterioro similar al encontrado en la madera de laboratorio, y al igual que en esta, se detectó que las regiones más expuestas y dañadas al comienzo del ataque fueron las regiones más externas de la pared celular. Además, se visualizó agrandamiento y deformación de lúmenes celulares, debilitamiento y delaminación de laminilla media, subcapa S1 y S2 de la pared secundaria, así como también rajaduras ocasionadas por la acción de *L. sulphureus* y *G. trabeum* (Figura 32 y 34). Todos estos hallazgos coinciden con los reportados por Murace et al. (2017) en un estudio donde se evaluaron las modificaciones anatómicas y químicas de árboles en pie de especies latifoliadas de arbolado urbano causadas por *L. sulphureus*.

Este patrón de deterioro es más pronunciado en la porción inferior de los

árboles (0,5 m) para los dos hongos en estudio, observándose mayores efectos del proceso sobre el tejido muestreado. Este resultado puede estar relacionado a la proporción de leño temprano y leño tardío de la madera de los árboles. Existen antecedentes del comportamiento diferencial de la degradación dentro del anillo de crecimiento anual y variaciones entre los distintos tipos celulares, debido a diferencias en el grado de lignificación de las paredes y en la disposición de las microfibrillas de celulosa (Schwarze,2007). Una mayor proporción de leño tardío conforma una barrera física que limita o retarda la difusión de los hongos de pudrición marrón, dado el grado de lignificación de las paredes (Schwarze 2007, Rayner y Boddy 1988).

A los 6 meses de infección, se mantuvieron los efectos antes descritos para los dos hongos en estudio, observándose además, colapso en las paredes de los vasos, ruptura de las paredes celulares y gran cantidad de micelio fúngico en los vasos xilemáticos (Figura 33 y 35). La presencia de grandes cantidades de micelio en los vasos fue reportada por Murace et al. (2017) y discutida con detalle para madera de laboratorio (3.1.1.2).

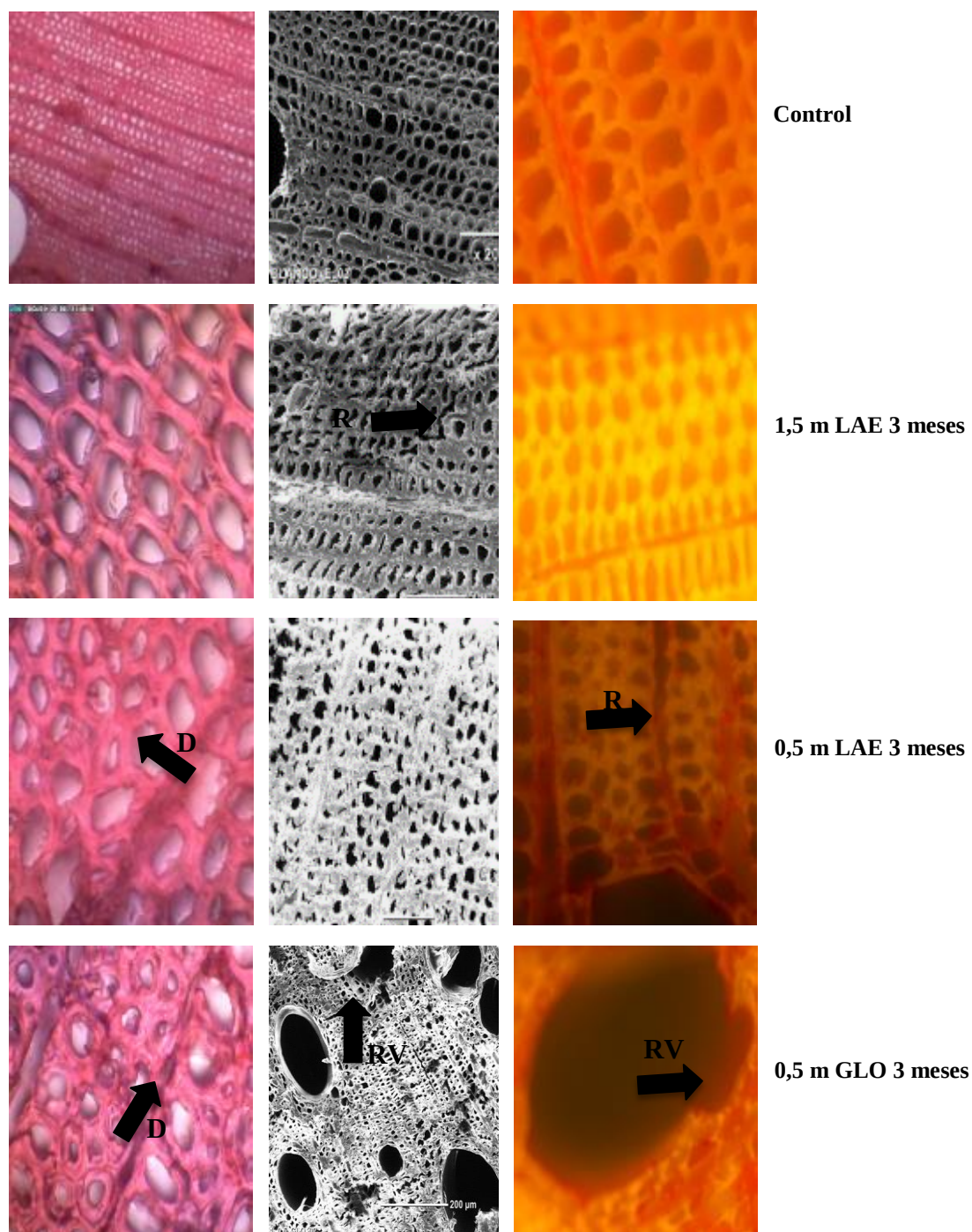


Figura 32. Distinto tipos de microscopía en árbol 1 a los 3 meses de inoculación. D: Deformación de lúmenes celulares; RV: Ruptura de las paredes celulares de los vasos; R: colapso o ruptura de pared celular.

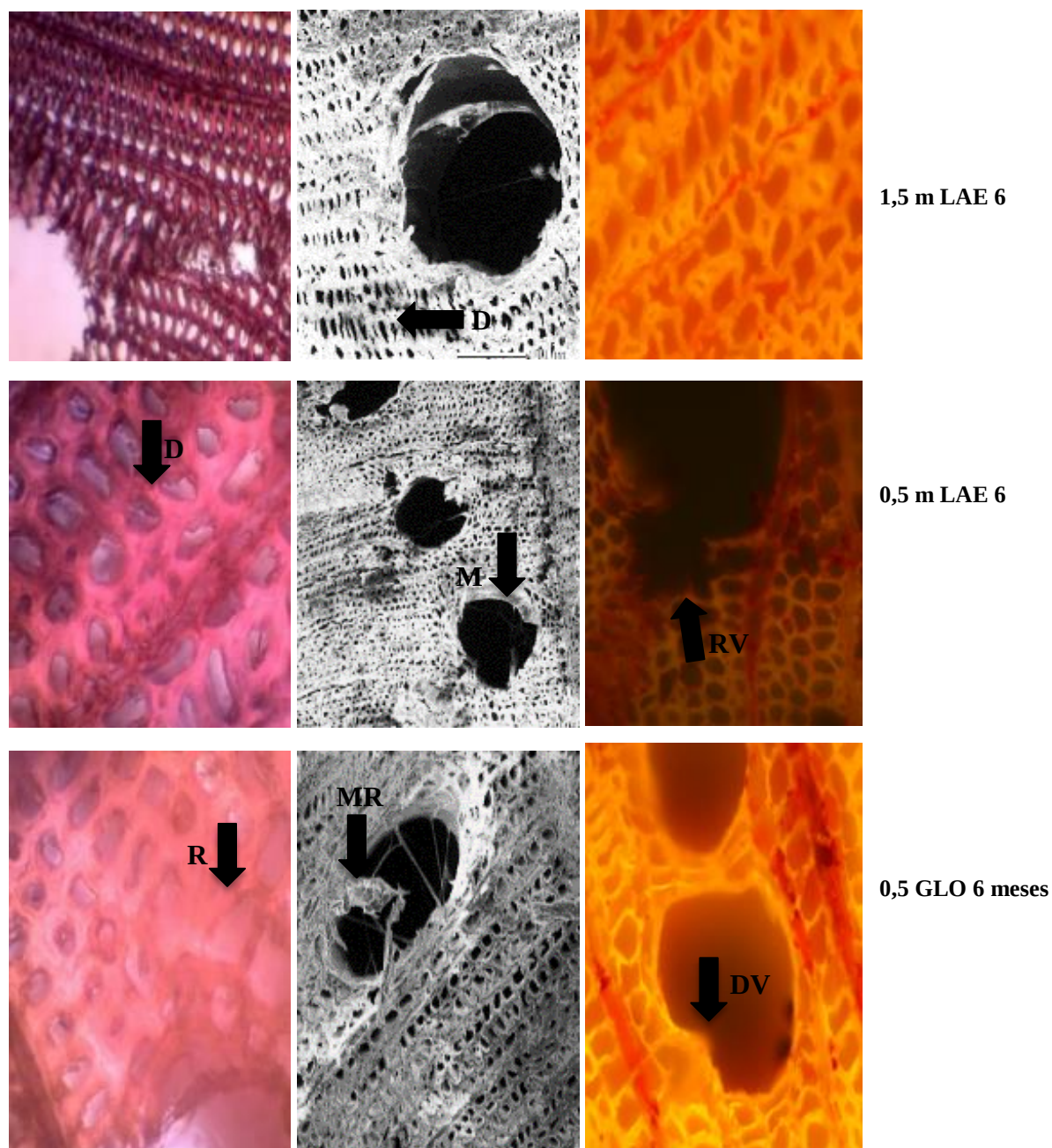


Figura 33. Distinto tipos de microscopía en árbol 1 a los 6 meses de inoculación. D: Deformación de lúmenes celulares; RV: Ruptura de las paredes celulares de los vasos; R: colapso o ruptura de pared celular. MR: Material residual; DV: Deformación de los vasos celulares; Micelio fúngico.

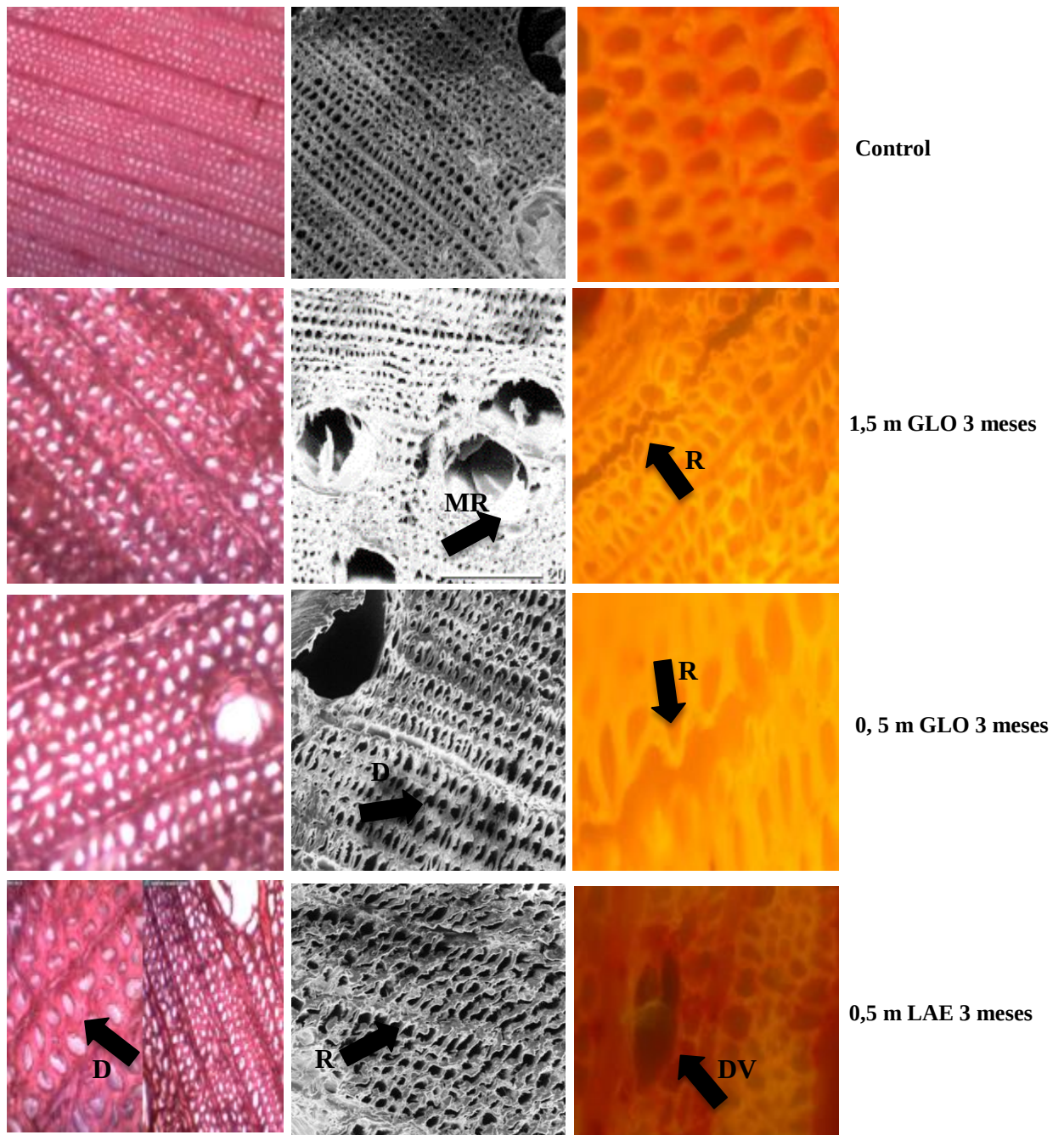


Figura 34. Distinto tipos de microscopía en árbol 2 a los 3 meses de inoculación. D: Deformación de lúmenes celulares; R: colapso o ruptura de pared celular; MR: Material residual; DV: Deformación de los vasos celulares.

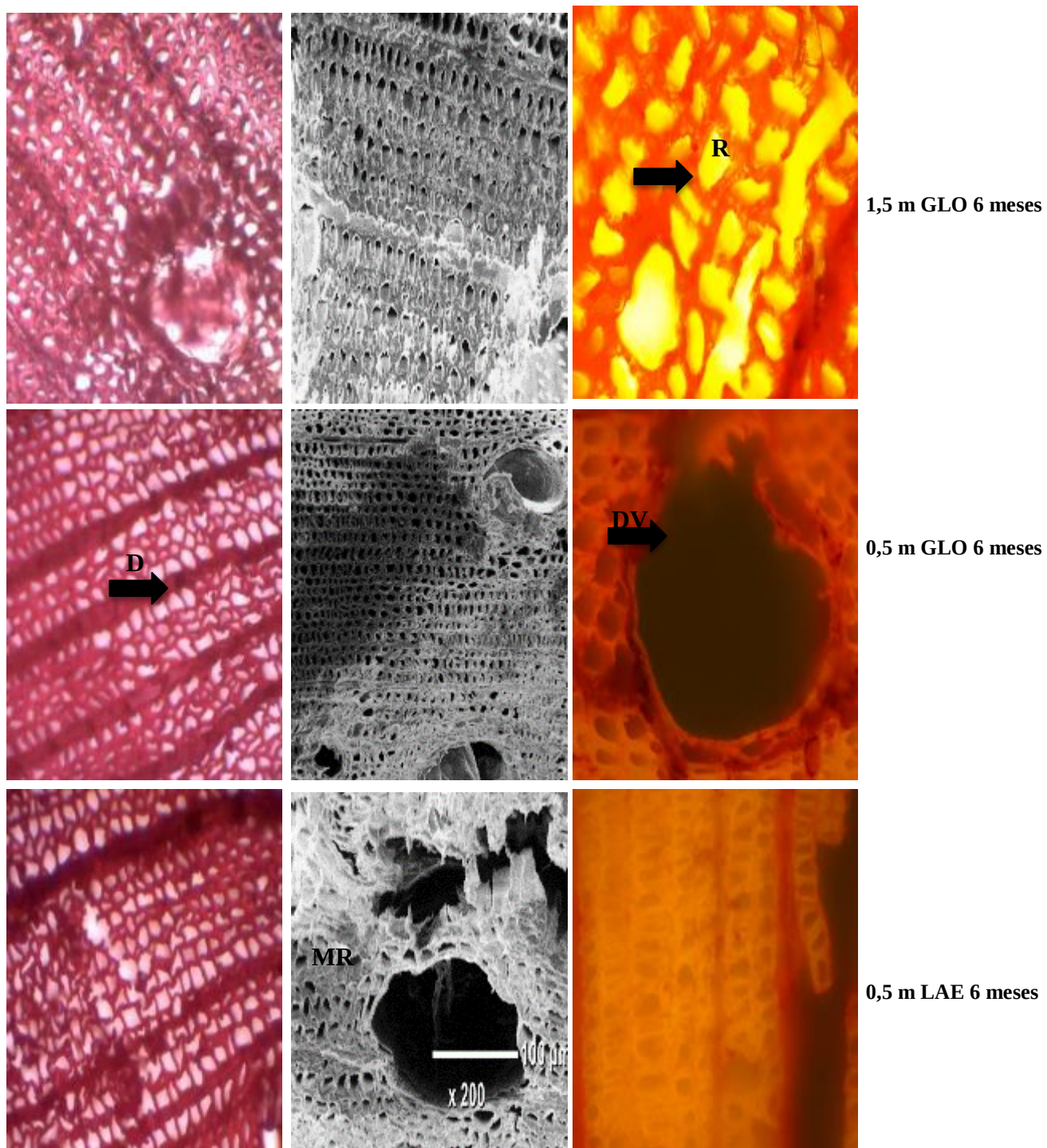


Figura 35. Distinto tipos de microscopía en árbol 2 a los 6 meses de inoculación. D: Deformación de lúmenes celulares; R: colapso o ruptura de pared celular; MR: Material residual; DV: Deformación de los vasos celulares.

Estos hallazgos se presentaron con la misma intensidad y el mismo patrón en los cinco árboles estudiados.

Mediante microscopía no se identificaron estructuras ni señales que indiquen algún mecanismo de defensa activo de la albura de los árboles. Pese a ello, el avance y la velocidad de deterioro causada por *L. sulphureus* y *G. trabeum* en los árboles en pie fue menor a la observada en la madera en servicio o de laboratorio.

3.2.2. Análisis químicos

El contenido inicial (control=árbol sano) medio de lignina ácido soluble en los árboles analizados osciló en un rango de 16, 14 % (árbol 2) y 23,85 % (árbol 1, 3,4 y 5), con un contenido promedio de humedad de las muestras de 48,41 %. Cabe destacar que estos valores se ven altamente influenciados por la altura y por la edad de los árboles (Leal et al., 2011). Todos los valores presentados son el promedio por altura (0,5 m-1,5 m) de los 5 árboles estudiados.

En este estudio no se detectaron diferencias significativas con un nivel de confianza de 0,95, a los 3 y a los 6 meses en el contenido de %ASL en las distintas alturas evaluadas (Cuadro 2). Estos resultados son coincidentes con los reportes de otros investigadores (Monrroy et al., 2011, Murace et al. 2017), ya que en este tipo de pudrición la lignina es parcialmente oxidada (Blanchette 1995, Schwarze2007).

Cuadro 2. Valores promedios % de ASL en la madera de árboles en pie atacada por *G. trabeum* y *L. sulphureus* (p=0.1158)

Hongo	Altura	Control	3 meses	6 meses
<i>G. trabeum</i>	1,5 m	22,31	18,54	17,76
	0,5 m		21,25	17,92
<i>L. sulphureus</i>	1,5 m	22,31	21,49	18,80
	0,5 m		16,45	18,64

De igual manera que se trabajó en madera de laboratorio, la cromatografía de capa fina permitió identificar las variaciones en el contenido de carbohidratos a los 3 y a los 6 meses de estudio.

L. sulphureus provocó un descenso en el contenido de carbohidratos con respecto al control, a los 3 y a los 6 meses posterior a la inoculación, para las dos alturas estudiadas. Se registraron diferencias significativas a la altura 1,5 m a los 3 meses y a los 6 meses del estudio, siendo más marcado el descenso a los 6 meses posterior a la inoculación. A la altura 0,5 m atacada por este hongo no se encontraron diferencias a los 3 y 6 meses de seguimiento (Cuadro 3). Murace et al. (2017) analizaron los cambios en el contenido de celulosa de árboles en pie de *Fraxinus pennsylvanica* Marshall (fresno americano) y *Melia azedarach* L. (paraíso) con evidencias de pudrición causada por *L. sulphureus*, y reportaron una disminución del porcentaje relativo de celulosa (60,3 % a 6,51 % para fresno americano y 47,65% a 13,06 % en el caso del paraíso).

G.trabeum registró un descenso en el contenido de carbohidratos a los 3 y 6 meses con respecto al control, sin embargo, no se registraron cambios a los 3 y 6 meses, como en el caso de *L. sulphureus*. No se encontró variabilidad en cuanto a la altura de inoculación, 0,5 m y 1,5 m registraron el mismo descenso de carbohidratos a los 3 y 6 meses posterior a la inoculación (Cuadro 3).

Cuadro 3. Valores promedios de contenido de carbohidratos en los arboles en pie atacada por *L.sulphureus* (p=0.0001) y *G.trabeum* (p=0.0001)

Hongo	Altura	Control	3 meses	6 meses
<i>G. trabeum</i>	1,5 m	17,25	10,51	10,19
	0,5 m		11,32	10,02
<i>L. sulphureus</i>	1,5 m	17,25	11,38	9,99
	0,5 m		12,51	9,81

La rápida e incipiente disminución de los azúcares de la madera determina la reducción de las propiedades de resistencia de la madera, comprometiendo así la estabilidad de los árboles en pie (Murace et al., 2017).

3.2.3. Espectrometría FTIR

La figura 36 muestra los espectros de la madera del árbol en pie a los 3 y 6 meses de inoculados con ambos hongos. Al igual que en el ensayo en laboratorio con madera seca, se utiliza para el análisis la denominada “*fingerprint region*” de 1800 a 800 cm^{-1} (Figura 37).

También se aplica el método semicuantitativo, que resalta las relaciones de las intensidades de absorción de las bandas (Pandey y Pitman, 2003). Se calcula la relación entre la intensidad de la banda de lignina de 1508 cm^{-1} contra las bandas de carbohidratos 1730, 1370, 1155 y 897 cm^{-1} para las dos alturas estudiadas (0.5 m y 1.5 m). También se consideran los cambios en hemicelulosa (1730 cm^{-1}) y celulosa (897 cm^{-1}) en ambas alturas de inoculación (Figura 38 y 39).

Se observa un comportamiento disímil entre los hongos. *L. sulphureus* no presentó actividad degradativa a los 3 meses de la inoculación, mientras que *G. trabeum* registró una tendencia a la disminución de todos los cocientes calculados, lo que evidencia un consumo selectivo de la holocelulosa. Esta situación se invierte a los 6 meses, siendo más marcada la actividad de *L. sulphureus* con respecto a *G. trabeum*, quien mantiene la actividad registrada a los 3 meses de estudio.

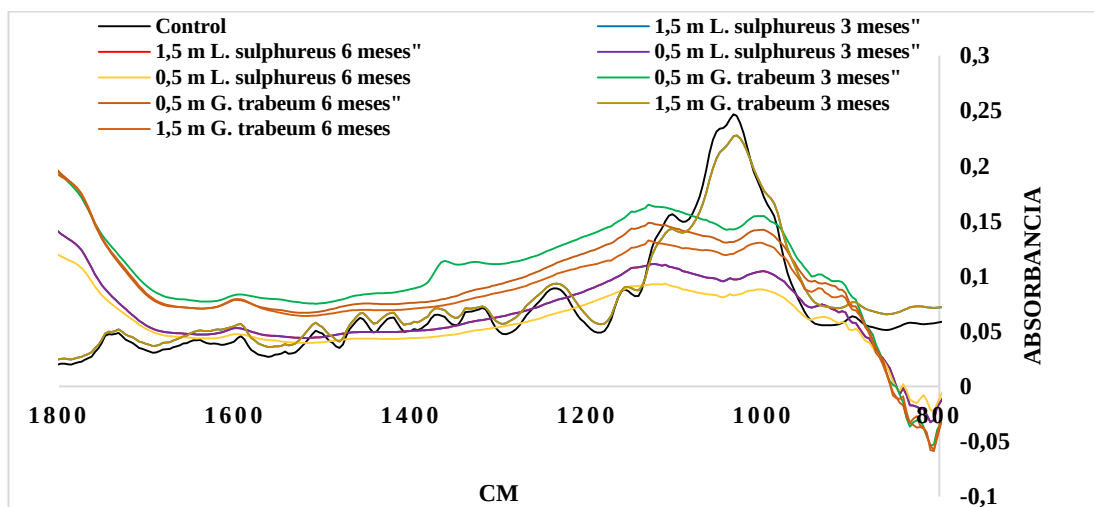


Figura 36. Espectrometría FTIR promedio de los árboles en pie

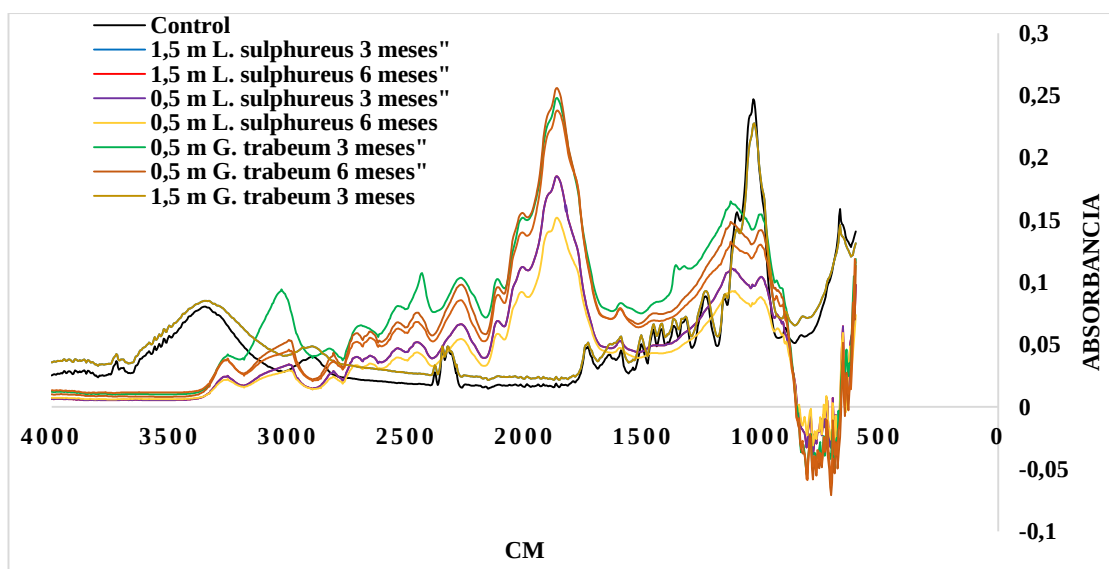


Figura 37. Huella dactilar –espectro ($1800\text{-}800\text{ cm}^{-1}$) de árboles en pie

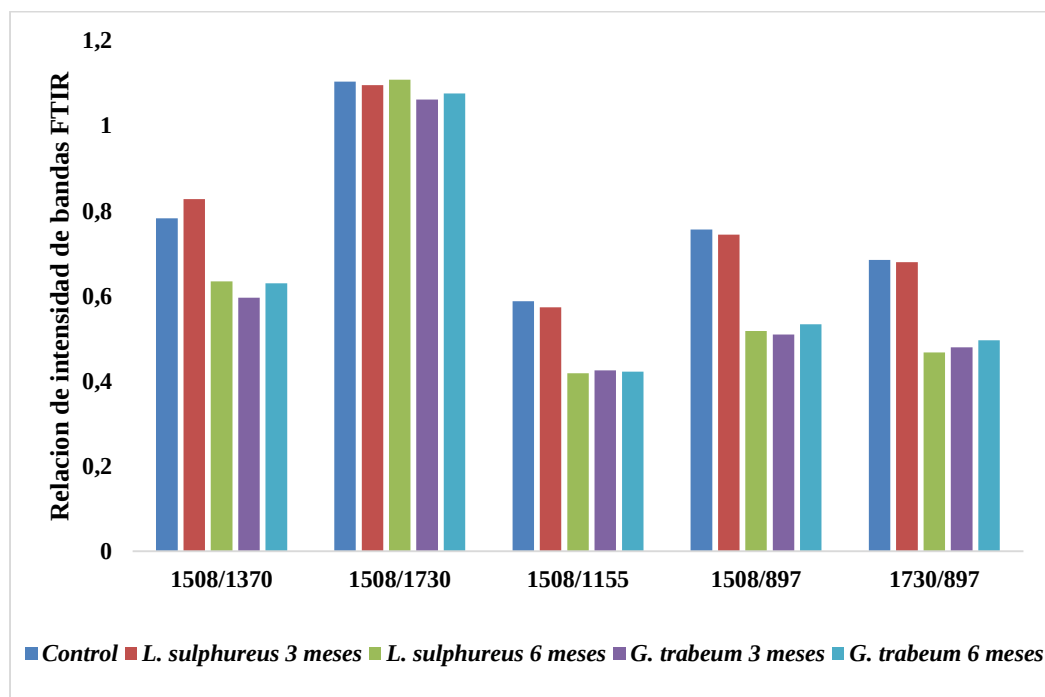


Figura 38. Relación de intensidad de bandas FTIR a 0.5 m para árboles en pie

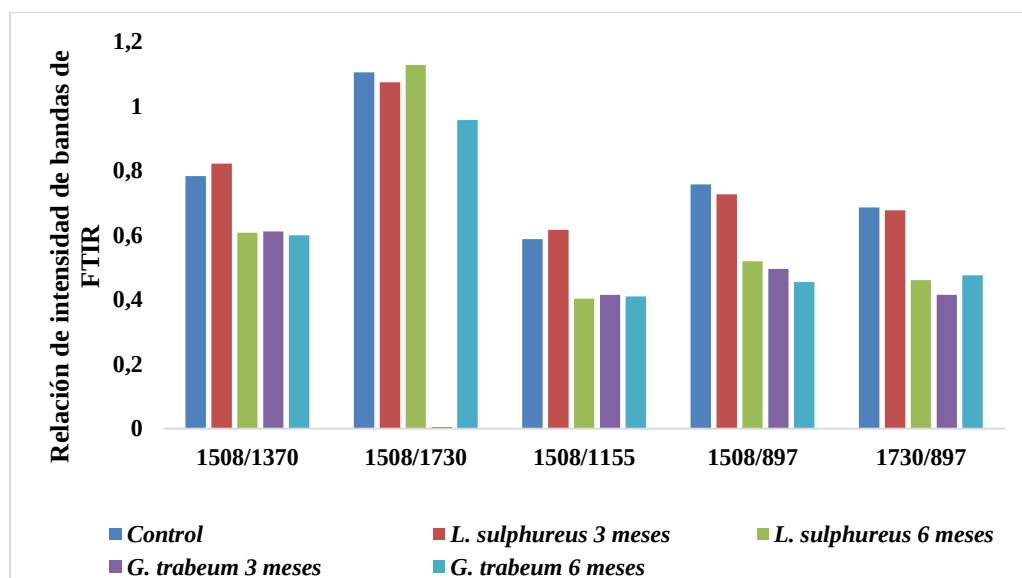


Figura 39. Relación de intensidad de bandas FTIR a 1.5 m para árboles en pie

Si bien la espectrometría FTIR no mostró cambios en la composición química de la madera atacada por *L. sulphureus* a los 3 meses de transcurrida la

inoculación, se verificó por microscopía y análisis químicos que ambos hongos registraron cambios similares en las etapas iniciales del proceso de pudrición y durante el transcurso de los 6 meses de estudio. Estos hongos atacaron y provocaron el inicio del proceso de pudrición marrón en ambas alturas y en condiciones ambientales variables dadas por el microclima del bosque (temperatura y humedad relativa del aire). El sistema hongo-madera de árboles en pie es dinámico en comparación con el sistema generado a nivel de laboratorio, por lo cual es esperable que la actividad y metabolismo de los hongos sea variable y con grandes fluctuaciones.

3.3. COMPARACIÓN ENTRE SISTEMAS DE HONGO-MADERA

Cuando comparamos ambos procesos de pudrición, notamos analogía en el proceso provocado por estos hongos en la madera de árboles en pie como la madera en servicio. Sin embargo, se identificó un proceso menos agresivo en el árbol en pie.

Al realizar el apeo de los árboles se identificaron mecanismos de defensa que posiblemente expliquen la menor agresividad y avance de *L. sulphureus* y *G. trabeum*. La figura 40 muestra claramente las evidencias de defensa activa de la albura, notándose sustancias de coloración marrón y paredes celulares rectas, lo que indica que se dio el proceso de compartimentalización o modelo CODIT. Este proceso se caracteriza por la presencia de cuatro paredes o “muros” que restringen el avance del hongo y demuestra la vigorosidad y respuesta rápida de los árboles frente a los patógenos. En situaciones de estrés, no sería posible esta respuesta del árbol y el hongo avanzaría con gran facilidad.



Figura 40. Compartimentalización en los árboles atacados por *L. sulphureus* y *G. trabeum*.

La efectividad del mecanismo de defensa del árbol apeado se verifica al visualizar el crecimiento en diámetro del árbol, una vez combatida la infección (Figura 40).



Figura 41. Avance fúngico en sentido longitudinal tangencial

La figura 41 muestra que el avance fúngico en sentido longitudinal tangencial es mayor que el observado en el plano transversal, donde era de

esperar un avance mayor a través de los radios, comportamiento que en este caso no se verifica macroscópicamente (Figura 40).

Es importante destacar que la inoculación artificial generó condiciones más favorables para el ataque fúngico, en comparación con la infección natural. Esto se debe a que las heridas generadas facilitan la colonización de hongos de pudrición marrón debido al mayor ingreso de aire y la subsiguiente pérdida de humedad de la madera (Deflorio et al., 2008). Pese a ello, cabe resaltar la respuesta de los árboles frente al proceso de deterioro.

A pesar de comprobar respuestas activas del árbol frente a la invasión fúngica, tras inoculación con *L. sulphureus* y *G. trabeum*, se verifica la hipótesis de que los patrones de deterioro de madera seguidos por ambos hongos, son análogos en árboles en pie o en servicio.

3.4. PERSPECTIVAS DE LA INVESTIGACIÓN

Como ya se mencionó, esta investigación permitió verificar que los patrones de deterioro de madera en servicio y árboles en pie son análogos. Dada la incidencia de los hongos causantes de pudrición marrón en madera en servicio y árboles en pie, es importante profundizar y sumar esfuerzos para comprender más detalladamente el proceso, como así también, progresar en el entendimiento de los procesos fisiológicos que se dan en los árboles en pie, para utilizarlo como herramienta para mitigar el impacto de esta enfermedad.

4. CONCLUSIONES

Existe una clara tendencia de aumento de pérdida de peso para los dos hongos en estudio, siendo *Laetiporus sulphureus* quien presenta una velocidad de deterioro mayor y un metabolismo más activo en la madera de *E. grandis*.

El contenido de humedad de la madera modificó la velocidad de deterioro para ambos hongos, las muestras verdes presentaron mayores valores de pérdida de peso.

Los hongos de pudrición marrón *L. sulphureus* y *G. trabeum*, son capaces de colonizar madera con un contenido promedio de humedad de 14,02%, por debajo del PSF.

Los patrones de deterioro de madera en servicio y árboles en pie, a distintas alturas, son análogos.

En el proceso de pudrición se producen cambios en la composición química de la madera, pérdida de azúcares y variaciones en el contenido de lignina, dependientes del tiempo que interactúan huésped-hospedero.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. 1996. Introductory mycology. New York : Wiley. (4ª Edición). 868 p.
- Ammer U. 1963. Untersuchungen über das Wachstum von Rotstreifepilzen in Abhängigkeit von der Holzfeuchtigkeit. Forstwissenschaftliches Centralblatt. 82 (11-12): 360–391.
- Arantes V, Goodell B. 2014. Current Understanding of Brown- Rot Fungal Biodegradation Mechanisms : A Review. En: Schultz TP, Goodell B, Darrel N. (Eds.). Deterioration and Protection of Sustainable Biomaterials. Washington: American Chemical Society. (ACS Symposium Series; 1158). 3-21.
- Arantes V, Jellison J, Goodell B. 2012. Peculiarities of brown-rot fungi and biochemical Fenton reaction with regard to their potential as a model for bioprocessing biomass. Applied Microbiology and Biotechnology. 94(2):323–338.
- Arantes V, Milagres AMF. 2009. Relevancia de compostos de baixa massa molar produzidos por fungus e envueltos na biodegradação da madeira. Química Nova. 32(6): 1586–1595.
- Aro N, Pakula T, Penttilä M. 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. FEMS Microbiology. 29 (2005): 719–739.
- Ávila HF. 2005. Biopulpaje Kraft de *Drimys winteri* (Canelo) por *Ganoderma australe*. Universidad de Concepción. *Magíster* en Ciencias forestales, química y tecnología de la madera. Concepción, Chile. Facultad de ciencias forestales. 80 p.
- Benítez V, Sarriés JM. 2015. Evaluación de la durabilidad adquirida de madera con una mezcla preservante a través de un ensayo de campo acelerado. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 34 p.

- Berben SA, Rademacher JP, Sell LO, Easty DB. 1987. Determination of lignin in wood pulp by diffuse reflectance fourier transform infrared spectrometry transform infrared spectrometry. Appleton: The Institute of Paper Chemistry. (IPC Technical Paper Series). 210: 1-15.
- Blanchette RA. 1995. Degradation of the lignocellulose complex in wood. *Canadian Journal of Botany*. 73 (Supl 1): 999–1010.
- Bobadilla EA. 2004. Durabilidad natural de la madera de cinco especies aptas para la industria de la construcción. *Magíster en Tecnología de Madera, Celulosa y Papel*. Misiones, Argentina. Universidad Nacional de Misiones. 118 p.
- Bond J, Donaldson L, Hill S, Hitchcock K. 2008. Safranine fluorescent staining of wood cell walls. *Biotechnic & Histochemistry*. 83 (3-4):161–171.
- Böthig S, Sánchez, A, Doldán J. 2008. Durabilidad natural de madera de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden de plantaciones de rápido crecimiento. *Innotec*. 3(3): 1–16.
- Brischke C, Arved S, Meyer-Veltrup L. 2017. The Minimum Moisture Threshold for Wood Decay by Basidiomycetes Revisited. A Review and Modified Pile Experiments with Norway Spruce and European Beech Decayed by *Coniophora Puteana* and *Trametes Versicolor*. *Holzforschung* 71(11): 893–903.
- Brischke C, Clemens S. 2014. Resistance based moisture content measurements on native modified and preservative treated wood. *European Journal Wood and Wood Products*. 72 (2): 289–292.
- Brischke C, Bayerbach R, Otto Rapp A. 2006. Decay-influencing factors: A basis for service life prediction of wood and wood-based products. *Wood Material Science and Engineering* 1(3-4):91–107.
- Burdekin DA. 1979. Common decay fungi in broadleaved trees. Londres: Arboricultural Leaflet, Department of the Environment. 40 p.
- Calaza P. 2007. Revisión bibliográfica y análisis comparativo de métodos de

- evaluación de riesgo de arbolado urbano. Caso particular: La Coruña. Tesis doctoral. Lugo, España. Universidad de Santiago de Compostela. 648 p.
- Chávez-Sifontes M, Domine ME. 2013. Lignina, estructura y aplicaciones : Métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Avances en Ciencias e Ingeniería*. 4(4): 15–46.
- Cowling E, Kirk T. 1976. Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates for enzymatic conversion processes. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*. 6(6): 95–123.
- Cuesto G. 2012. Influencia del raleo sobre la productividad y calidad de la madera en *Eucalyptus grandis*. *Magíster en Ciencias Agrarias*. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 59 p.
- Curling SF, Clausen CA, Winandy JE. 2002. Experimental method to quantify progressive stages of decay of wood by basidiomycete fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 49(1): 13–19.
- Davidson WW, Wagener RW. 1954. Heart rots in living trees. *The Botanical Review*. 20(2): 61–119.
- Deacon JW. 2006. *Fungal biology*. Reino Unido: Blackwell Publishing Ltd. (4ª edición). 371 p.
- Deflorio G, Johnson C, Fink S, Schwarze. FWMR 2008. Decay development in living sapwood of coniferous and deciduous trees inoculated with six wood decay fungi. *Forest Ecology and Management*. 255 (2008): 2373–2383.
- Doldán J. 2003. Indicadores de calidad de madera *Eucalyptus grandis* de Río Negro, Uruguay: contenido de humedad, densidad, contracción y largo de fibras. Montevideo: LATU. (Informe de Investigación. Serie Forestales; 9). 40 p.
- EN 113 (European Standard). 1996. Wood preservatives - Test method for determining the protective effectiveness against wood destroying basidiomycetes - Determination of the toxic values. Montevideo, Uruguay.

Instituto uruguayo de normas técnicas.

Eriksson KEL, Blanchette R, Ander P. 1990. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Berlín: Springer-Verlag. (Springer Series in Wood Science). 407 p.

Eslyn W, Clark, J. 1979. Wood bridges. Decay Inspection and Control. Washington: U.S. Department of Agriculture. 557. 32 p.

Faix O. 1992. Fourier Transform Infrared Spectroscopy. En: Lin CW, Dence SY (Eds.). Methods in Lignin Chemistry. Berlín: Springer. (Springer Series in Wood Science). 83–109.

Fengel D, Wegener G. 1984. Wood: Chemistry, Ultraestructure, Reactions. Berlín and New York: Walter de Gruyter. 613 p.

Findlay WPK. 1967. Timber pests and diseases. Londres: Pergamon Press Ltd. (1ª edición). 280 p.

Fonseca M. 2006. Determinación de la composición química de la madera de pino Candelillo (*Pinus maximinoi* H. E. Moore) procedente de la finca Río Frío, Tactic, Alta Verapaz. Ing. Quím. Guatemala, Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. 125 p.

Gazzano S. 1994. Notas sobre *Basidiomycetes* xilófilos del Uruguay. VI. Nuevos registros. Comunicaciones Botánicas del Museo de Historia Natural de Montevideo. 5(102): 1–9.

Green F, Highley TL. 1997. Mechanism of brown-rot decay: Paradigm or paradox. International Biodeterioration and Biodegradation. 39 (2–3):113–124.

Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Thorsten LH, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch, CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai YuC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW,

- Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Kõljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schüssler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycological Research*. 111(5): 509–547.
- Highley T, Micales JA., Illman, BL, Croan SC, Clausen CA, Green F. 1994. Research on biodeterioration of wood, 1987-1992. Decay Mechanisms and Biocontrol. USDA Forest Service, Research Paper FLP-RP. 529 p.
- Highley TL, Murmanis LL. 1987. Micromorphology of Degradation in Western Hmlock and Sweetgum by the white-Rot fungus *Coriolus versicolor*. *Holzforschung*. 41(2): 67–71.
- Hill CAS, Papadopoulos AN. 2001. A review of methods used to determine the size of the cell wall microvoids of wood. *Journal of the Institute of Wood Science*. 15(6): 337–345.
- Hillis WE, Brown AG. 1984. *Eucalyptus* for wood production. Australia: CSIRO, Academic Press. (1ª Edición). 434 p.
- Hunt GM, Garratt GA. 1962. Preservación de la madera. Barcelona: Salvat Editores, 1962. (1ª Edición). 486 p.
- Irbe I, Andersone I, Andersons B, Noldt G, Dizhbite, T, Kurnosova, Noupponen M, Stewart, D. 2011. Characterisation of the initial degradation stage of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) sapwood after attack by brown-rot fungus *Coniophora puteana*. *Biodegradation*. 22(4): 719–728.
- Jeffries TW. 1994. Biodegradation of lignin and hemicelluloses. En: Ratledge C (Eds.). *Biochemistry of microbial degradation*. Dordrecht: Springer. (1ª Edición). 233–234.

- Kirk TK., Chang HM, Lorenz LF. 1975. Topochemistry of the fungal degradation of lignin in birch wood as related to the distribution of guaiacyl and syringyl lignins. *Wood Science and Technology*. 9(2): 81–86.
- Koenigs J. 1974a. Hydrogen peroxide and iron: A proposed system for decomposition of wood by brown-rot basidiomycetes. *Wood and Fiber Science*. 6(1): 66–80.
- Koenigs J. 1974b. Production of hydrogen peroxide by wood-rotting fungi in wood and its correlation with weight loss, depolymerization, and pH changes. *Archives of Microbiology*. 99(1): 129–145.
- Kollman F. 1959. *Tecnología de la madera y sus aplicaciones*. Madrid: Instituto Forestal de Investigación y Experiencias al Servicio de la Madera. (2ª Edición). 789 p.
- Kumar A, Kameshwar S, Qin W. 2017. Comparative study of genome-wide plant biomass- degrading CAZymes in white rot, brown rot and soft rot fungi. *Mycology*. 9(2): 93-105.
- Leal L, Juárez V, Terán M. 2011. Composición química de la madera de *Eucalyptus grandis* Hill Ex Maiden procedente de finca Las Maravillas, Departamento de Orán, Salta. *Quebracho*. 19 (1-2): 75–83.
- Leonowicz A, Matuszewska A, Luterek J, Ziegenhagen D, Wojta -Wasilewska M, Cho NS, Hofrichter M, Rogalski J, Wasilewska W. 1999. Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 27 (2-3): 175–185.
- Lodge DJ, Ammirati JF, O'dell TE, Mueller GM, Huhndorf SM, Wang CJ, Stokland JN, Schmidt JP, Ryvarden L, Leacock PR, Mata M, Umaña L, Wu QF, Czederpiltz DL. 2004. *Terrestrial and Lignicolous Macrofungi*. En: Mueller GM, Bills GF, Foster MS (Eds.). *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*. California: Elsevier Academic Press. (1ª Edición). 127-172.

- Lomeli MG. 1991. Determinación de la durabilidad natural de las maderas de árboles tropicales (*Hura polyandra baill.*; *Enterolobium cyclocarpum* (jacq.) Griseb. Y *Cordia eleagnoides*, al ataque de los hongos xilofagos *Lentinus lepideus* Fr. Y *Laetiporus sulphureus*. Licenciado en biología. Guadalajara, México. Universidad de Guadalajara. 62 p.
- Lowell EC. 1981. Fluorescence microscopy for detecting incipient decay and estimating residual strength of wood. Master of Science. Oregon, United States. Oregon State University. 70 p.
- Lucejko J, Mattonai M, Zborowska M, Tamburini D, Cofta G, Cantisani E, Kúdela J, cartwright C, Colombini M, Ribechini E, Modugno F. 2018. Deterioration effects of wet environments and Brown rot fungus *Coniophora puteana* on pine Wood in the archaeological site of Biskupin (Poland). *Microchemical Journal*. 138:132-146.
- Mahajan S, Jeremic D, Goacher R, Master E. 2012. Mode of coniferous Wood decay by White rot fungus *Phanerochaete carnosa* as elucidated by FTIR ToF- SIMS. *Appl Microbiol Biotechnol*. 94 (5):1303-1311.
- Mahmood RT, Asad MJ, Asgher M, Gulfraz M, Mukhtar T. 2017. Analysis of lignolytic enzymes and decolorization of disperse violet S3RL, yellow brown S2RFL, red W4BS, yellow SRLP and red S3B by brown rot fungi. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*. 54(2): 407–413.
- Maldonado Y. 2007. Obtención de cepas híbridas de *Pleurotus spp.* por apareamiento de *neohaplontes* compatibles. Maestro en Ciencias de Bioprocesos. México DF, México. Instituto Politécnico Nacional. 125 p.
- Margulis L, Schwartz KV. 1985. Cinco reinos guía ilustrada de los phyla de la vida en la tierra. Barcelona : Editorial Labor S.A. (1ªEdición). 307 p.
- Martínez AT, Rencoret J, Nieto L, Jiménez-Barbero J, Gutiérrez A, Del Río JC. 2011. Selective lignin and polysaccharide removal in natural fungal decay of wood as evidenced by in situ structural analyses. *Environmental Microbiology*.

13(1): 96–107.

Martínez AT, Speranza M, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, Martínez MJ, Gutiérrez A, Del Río JC. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: Microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*. 8(3): 195–204.

Martínez S. 2014. Comunidades de Basidiomycetes lignícolas en bosques nativos de Uruguay y factores que condicionan su composición. Doctorado en Ciencias Biológicas. Montevideo, Uruguay. PEDECIBA. 166 p.

Martínez S, Luppo S, Betucci L. 2009. Basidiomycetes degradadores de madera de *Eucalyptus* en Uruguay: Identificación morfológica, cultural y molecular. Tacuarembó (Uruguay). (INIA Serie Actividades de difusión, 567). 9-19.

Mattos BD, de Cademartori PHG, Lourençon TV, Gatto DA, Magalhães WLE. 2014. Biodeterioration of wood from two fast-growing *Eucalypts* exposed to field test. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 93 (2014): 210–215.

Mellerowicz EJ, Sundberg B. 2008. Wood cell walls: biosynthesis, developmental dynamics and their implications for wood properties. *Current Opinion in Plant Biology*. 11(3): 293–300.

Meyer L, Brischke C. 2015. Fungal decay at different moisture levels of selected European-grown wood species. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 103 (2015):23–29.

Mitsuhashi J, Morrell J. 2012. Effects of Environmental Factors on Decay Rates of Selected White- and Brown-Rot Fungi. *Wood and Fiber Science*. 44(4): 343–356.

Monrroy M, Ortega I, Ramírez M, Baeza J, Freer J. 2011. Structural change in wood by brown rot fungi and effect on enzymatic hydrolysis. *Enzyme and Microbial Technology*. 49(5): 472–477.

- Morris PI, Wang J. 2011. Scheffer index as preferred method to define decay risk zones for above ground wood in building codes. *International Wood Products Journal*. 2(2):67–70.
- Murace M, Luna ML, Ciuffani MG, Perelló A. 2017. Modificaciones anatómicas y químicas en el leño de ejemplares del arbolado de la ciudad de la plata (Buenos Aires) causadas por *Laetiporus sulphureus* (basidiomycota, polyporales. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. 52 (4): 647–661.
- Ordeñana KM. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo Integrado de Plagas*. 63 (2002): 22–32.
- Ortiz-Moreno ML. 2010. Macromicetos en zona rural de Villavicencio. *Orinoquia*. 14(2): 125–132.
- Ovando-chacón SL, Waliszewski KN. 2005. Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*. 21(42): 113–122.
- Owen NL, Thomas DW. 1989. Infrared studies of “hard” and “soft” woods. *Applied Spectroscopy*. 43(3): 451–455.
- Pandey K K, Nagveni HC. 2007. Rapid characterisation of brown and white rot degraded chir pine and rubberwood by FTIR spectroscopy. *Holz Als Roh- Und Werkstoff*. 65(6): 477–481.
- Pandey KK, Pitman AJ. 2003. FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown- rot and white-rot fungi. *Biodeteriorion & Biodegradation*. 52: 151-160
- Pandey KK. 1999. A study of chemical structure of soft and harwood and wood polymers by FTIR spectrscopy. *Journal of Applied Polymer Science*. 71(May): 1969–1975.
- Papinutti VL, Diorio LA, Forchiassin F. 2003. Production of laccase and manganese peroxidase by *Fomes sclerodermeus* grown on wheat bran. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 30 (3): 157–160.

- Pearce RB. 1996. Antimicrobial defences in the wood of living trees. *New Phytologist*. 132(2): 203–233.
- Pearce RB. 1990. Occurrence of decay-associated xylem suberization in a range of woody species. *European Journal of Forest Pathology*. 20(5):275–289.
- Peña A. 2010. Determinación de la capacidad de dos cepas de hongos Basidiomycota para degradar celulosa en chip de *Pinus radiata*. Licenciado en Ciencias Biológicas. Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile. 47 p.
- Pérez J, Muñoz-Dorado J, de la Rubia T, Martínez J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin : an overview. *International Microbiology*. 5 (2): 53–63.
- Popescu CM, Popescu MC, Singurel G, Vasile C, Argyropoulos D S, Willfor S. 2007. Spectral Characterization of Eucalyptus Wood. *Applied Spectroscopy*. 61(11), 1168–1177.
- Rayner ADM, Boddy L. 1988. Fungal decomposition of wood. Its biology and ecology. Chichester: John Wiley & Sons Ltd. 587.
- Reina L. 2010. Influencia de la composición química de la madera de *Eucalyptus grandis* y *Eucalyptus globulus* en los parámetros de pulpeo Kraft. *Magíster en Ciencias Agrarias*. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 68 p.
- Rodrigues J, Faix O, Pereira H. 1998. Determination of lignin content of *Eucalyptus globulus* wood using FTIR spectroscopy. *Holzforschung*. 52(1): 46–50.
- Saldarriaga Y, Gutiérrez FP. 2001. Manual De Micología Aplicada. Colombia: Editorial Universidad de Antioquia. (1ª Edición). 97 p.
- Shi J, Li J. 2012. Wood-Forming tissue of *Pinus koraiensis* under. *BioResources*. 7(3): 3463–3475.
- Schmidt O. 2006. Wood and tree decay. Biology, damage, protection and use. Germany: Springer- Verlag Berlin Heidelberg. 329 p

- Schwarze FWMR, Engels J, Mattheck C. 2000. Fungal strategies of wood decay in trees. Rombach Verlag: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. (1ª Edición). 183 p.
- Schwarze FWMR. 2007. Wood decay under the microscope. *Fungal Biology Reviews*. 21(4): 133–170.
- Sjöström E. 1993. *Wood Chemistry: Fundamentals and Applications*. San Diego: Academics Press Inc. (2ª Edición). 293 p.
- Sluiter A, Hames R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, Crocker D. 2008. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. National Renewable Energy Laboratory. (April): 1-15.
- Sluiter A, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D. 2005. Determination of Extractives in Biomass. National Renewable Energy Laboratory. (Jan): 1–9.
- Smith W. 1970. *Tree pathology: A short introduction*. Londres: Academic Press. (1ª Edición). 324 p.
- Stienen T, Schmidt O, Huckfeldt T. 2014. Wood decay by indoor basidiomycetes at different moisture and temperature. *Holzforschung*. 68(1): 9–15.
- Tapia C. 2010. Durabilidad natural de *Eucalyptus nitens* frente al ataque de hongos xilófagos. Ing. en Maderas. Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile. 43 p.
- Thybring EE, Kymäläinen M, Rautkari L. 2018. Moisture in Modified Wood and Its Relevance for Fungal Decay. *IForest*. 11(3): 418–422.
- Thybring EE. 2017. Water relations in untreated and modified wood under brown rot and white-rot decay. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 118 (2017):134–142.
- Thybring EE. 2013. The Decay resistance of modified wood influenced by moisture exclusion and swelling reduction. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 82 (2013): 87–95.

- Traoré M, Kaal J, Martinez Cortizas A, 2018. Differentiation between pine Woods according to species and growing location using FTIR- ATR. *Wood Science and technology*. 52 (2): 487-504.
- Universidad Nacional de Santiago del Estero (Argentina). Facultad de Ciencias Forestales. 2005. *Anatomía de la Madera*. Santiago del Estero. Universidad Nacional de Santiago del Estero. 83 p.
- Wagner L, Bader TK, Eberhardsteiner J, de Borst K. 2014. Fungal degradation of softwood cell walls: Enhanced insight through micromechanical modeling. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 93 (2014): 223–234.
- Wälchli O. 1980. Der echte Hausschwamm—Erfahrungen über Ursachen und Wirkungen seines Auftretens. *Holz Als Roh- Und Werkstoff*. 38(5): 169–174.
- Walker JCF. 2006. Basic wood chemistry and cell wall ultrastructure. En: Walker JCF. *Primary Wood Processing*. Dordrecht: Springer. (2ªEdición). 23-67.
- White DA, Kile GA. 1994. Breakdown of barrier zones and prediction of the spread of discolouration and decay resulting from stem wounds in *Eucalyptus regnans* and *E. obliqua*. *Forest Pathology*. 24(2): 71–78.
- Yelle D J, Ralph J, Lu F, Hammel KE. 2008. Evidence for cleavage of lignin by a brown rot basidiomycete. *Environmental Microbiology*. 10(7): 1844–1849.
- Yu Q, Zhuang X, Yuan Z, Wang Q, Qi W, Wang W, Zhang Y, Xu J, Xu H. 2010. Two-step liquid hot water pretreatment of *Eucalyptus grandis* to enhance sugar recovery and enzymatic digestibility of cellulose. *Bioresource Technology*. 101 (13): 4895–4899.
- Zabel R, Morrell JJ. 1992. *Wood Microbiology: Decay and its prevention*. San Diego. USA: Academic Press Inc. 498 p.

Zaid LK. 2004. Estudio del biodeterioro en madera de *Eucalyptus globulus* Lab. Por método gravimétrico. Ing. de madera. Santiago, Chile. Universidad de Chile. 65 p.

Zobel B, Talbert J. 1988. Técnicas de mejoramiento genético de árboles forestales. Ciudad de México: Editorial Limusa. (1ª Edición). 545 p.

6. ANEXOS

6.1. INFLUENCE OF THE MOISTURE CONTENT OF THE WOOD IN THE DECAY PROCESS BY BROWN ROT FUNGI

Benítez Valentina a, *, Franco Jorge b, Camargo Álvaro c; Raimonda Pablo d, Mantero Carlos e, Ibáñez Claudia Marcela c

a Casa Universitaria de Cerro Largo, Udelar, Herrera 639, 37000 Cerro Largo, Uruguay

b Departamento de Biometría, Estadística y Computación - Facultad de Agronomía, Udelar

c Instituto Superior de Estudios Forestales Udelar,

d Instituto de Ensayo de Materiales, Facultad de Ingeniería, Udelar

e Departamento Forestal, Facultad de Agronomía, Udelar

Artículo a ser enviando a Internacional Biodeterioration & Bioodegradation

HIGHLIGHTS

- Initial moisture content affects the decay rate caused by Basidiomycetes
- Brown rot can start below the fiber saturation point
- Changes in cell walls originated by fungal decay were analyzed by microscopy (SEM and fluorescence)

A B S T R A C T

The biological decomposition of lignocellulosic materials caused by basidiomycetes plays an essential role in the carbon cycle. Brown rot fungi represent the most important agent in the biodegradation of wood products and standing trees of natural ecosystems. In this work the effect of the initial moisture content of *Eucalyptus grandis* sapwood on the activity of the brown-rot fungi *Gloeophyllum trabeum* and *Laetiporus sulphureus*, was studied. Their activity was evaluated for a period of 10 months, quantifying the rate of deterioration through weight loss (WL), moisture content (MC), microscopy (SEM and fluorescence) and FTIR spectrometry. The results showed increased WL through the 10 months test for both fungi, *L. sulphureus* having a higher

decay rate. For both fungi, the colonization of the wood started below the fiber saturation point. It was observed that the initial MC of the wood influenced the rate of deterioration: the wet samples showed higher WL compared to the dry samples. Changes in the chemical composition and structure of cell walls were detected. The initial moisture content of the substrate affected the development of the fungi, slowing their growth.

Key words: wood biodegradation, brown rot, *Eucalyptus grandis*, moisture content, weight loss

1. Introduction

Wood has been widely used for construction. However, its biological origin makes it vulnerable to attacks by decomposing fungi, particularly to the ones that cause brown and white rot. The former is the most destructive type of wood deterioration (Green and Highley, 1997) as they degrade the holocellulose, rapidly decreasing the degree of cellulose polymerization. Simultaneously, lignin is partially oxidized, and the degradation products are produced faster than they are utilized (Green and Highley, 1997). As enzymes, being large molecules, are not able to penetrate healthy wood, these fungi use first an oxidative system and then an enzymatic way to depolymerize the wood. The degradative process begins with small, diffusible extracellular oxidative agents (free radicals) that operate at a certain distance from the hypha.

The Fenton extracellular system is involved; quinones reduce Fe^{3+} to Fe^{2+} and react to H_2O_2 producing hydroxyl radicals (OH) which begin to depolymerize the holocellulose (Jensen et al., 2001, Zhang et al., 2018). This results in microcapilar paths that allow enzymes to diffuse (Goodell et al., 1997; Baldrian and Valášková, 2008; Arantes et al., 2011, 2012) and degrade the woody biomass (Mahmood et al., 2017). As to favor the diffusion of enzymes, liquid water is needed in the wood.

The risk of deterioration by fungi can be quantified through environmental parameters such as moisture content and temperature of the wood (Brischke et al., 2017). The minimum wood moisture for fungal decay is the most important factor in view of wood

protection against fungi (Schmidt, 2006). Particularly, air relative humidity (RH) and temperature have a direct impact on the growth dynamics of the fungi and its ability to metabolize and degrade the cell wall (Meyer and Brischke, 2015; De Ligne et al., 2019). A low water content begins to become critical for the fungi, if the free water availability is exclusively limited to the cell wall and it is no more located in the cell lumens, which is called fiber saturation point (FSP) (Stienen et al., 2014). Numerous researches studied the minimum values of moisture content that allow colonization and deterioration by fungi (Wälchli, 1980; Huckfeldt et al., 2005; Huckfeldt and Schmidt, 2015; Höpken et al., 2016; Brischke et al., 2017; Thybring, 2017). In all cases the wood weight loss was employed to evaluate the wood deterioration process by rot fungi over 10 months of incubation, as it is traditionally used as a way of determining the effects of fungus on wood properties (Mitsuhashi and Morrell, 2012).

Meanwhile, the effect of the initial moisture content of the wood on the decay rate is generally studied in the early stages of the process, analyzed through weight loss or mechanical properties.

The aim of this work is to study the deterioration process of *Eucalyptus grandis* sapwood during 10 months of culture, by two brown rot fungi, *Laetiporus sulphureus* and *Gloeophyllum trabeum*, when the wood is initially above or below the fiber saturation point- and comparing both processes.

In order to evaluate the physicochemical changes of the samples that indicate their state (Lucejko et al., 2018), four techniques were used.

Firstly, the physical properties (density and moisture content) were studied, both being associated with the mechanical stability of the wood. Apart from the traditional gravimetric method to determine the wood weight loss by fungal action, morphological analysis by SEM and the analysis of chemical changes in the deteriorated wood by FTIR and fluorescence microscopy were performed.

Sapwood was used, as only few works study its degradation by fungus, even though it's the most vulnerable part of the tree, and the most valuable sawn timber is produced from it.

A culture period longer than the commonly found in the literature allows the analysis of the moisture content variation along the process, as it would occur in real situations of use in humid environments.

2. Materials and methods

2.1. Fungal species

Two species of brown rot fungi *Gloeophyllum trabeum* (H2130 CCMFQ) and *Laetiporus sulphureus* (H3609 CCMFQ) belonging to the Cátedra de Microbiología de la Facultad de Química, Udelar, were used. This species were chosen as they are reported in Uruguay and neighboring countries, frequently in *Eucalyptus sp* wood (Murace et al. 2017; Ortiz et al., 2014; Martinez et al., 2009). The fungi were kept at 5 °C in Petri dishes containing agar (15 g/L) and malt extract (15 g/L) (AM medium), both from Oxoid Ltd (Basingstoke, United Kingdom). The fungi were then replicated to prepare the inoculum for the essays, in AM medium previously sterilized in an autoclave for 15 minutes at 121 ° C. The inoculated mediums were then cultivated for 28 days at 28 °C.

2.2. Durability essay

The trees used for wood samples in the trial belong to 28-year-old contemporary and monospecific plantation of *Eucalyptus grandis*, located at the Bernardo Rosengurtt Experimental Station -EEBR-Facultad de Agronomía, Universidad de la República (32° 20'16.22 "S, 54° 26' 58.00"W, elevation 151 m).

The European Standard EN 113 (AENOR, 1996) was taken as reference for the essay. *Eucalyptus grandis* samples from 5 trees, with dimensions (50 ± 1) mm x (25 ± 0.3) mm x (15 ± 0.3) mm were used.

From the 240 total samples, wet wood was defined as the half that was maintained at a 49% ± 2 of moisture content (minimum reached when air dried at room

temperature), while the other half were defined as dry wood, and were dried to a moisture content of $14\% \pm 2$. The initial weight (W1) was registered and average density (g/cm^3) was calculated in each case. Glass flasks were prepared with agar (15 g/L) and malt extract (15 g/L), and sterilized at 121°C for 15 minutes. They were inoculated with a mycelial plug (5 mm diameter) obtained from actively growing mycelia of each fungi and cultivated at 28°C and 75% RH (relative humidity). Once the fungi covered the whole surface of the medium, two of the *E. grandis* samples were put per flask. Three additional flasks were cultivated with wood samples without fungi. The 123 resulting flasks were cultivated at 22°C and 75% RH for 10 months.

2.3. Analysis strategy

The process was followed monthly by taking the weight loss of the wood as a way of measuring its deterioration, while microscopes (optical, electronical and of fluorescence) allowed the analysis of the anatomical changes of the cell wall. Finally, after 5 and 10 months of culture, dry wood was analyzed by FTIR spectrometry.

2.3.1. Weight loss and wood moisture content

Every month, 5 samples were taken from 3 random flasks of each initial condition (wet and dry wood). The samples were then cleaned and weighted (W2). Later they were dried at $102 \pm 2^\circ\text{C}$ until constant weight (W3). Weight loss percentage and moisture content were calculated. W3 was taken to its initial moisture content.

$$\text{MC (\%)} = (W1 - W2) / W1 * 100$$

$$\text{WL (\%)} = (W1 - W3) / W1 * 100$$

where: MC= moisture content (%); WL= weight loss (%); W1= initial weight of each sample (g); W2= weight after fungal exposure (g); W3= anhydrous weight after fungal exposure (g).

2.3.2. Microscopical analysis

10-20 mm thick transverse sections of the samples, taken from the culture flasks, were cut with a Reichert-Jung xylotome (Vienna, Germany) and then observed with: 1) a JEOL JCM-6000 PLUS (Jeol USA, Inc., Massachusetts, USA) scanning electron microscope (SEM), 2) a Nikon Eclipse 50i fluorescence microscope (Melville, USA) equipped with an excitation filter of 330 -350 nm and an emission filter of 420 nm.

The sections (to be observed with the fluorescence microscope) were stained with safranin at 1 % (w/v). This staining is commonly used in lignified tissue such as xylem, differentiating each region of the cell wall: the secondary wall produces green/yellow fluorescence while the middle lamella produces red/orange fluorescence (Bond et al., 2008).

2.3.3. FTIR analysis

An IR Prestige -21 Shimadzu (Kyoto, Japan) spectrometer was used at a resolution of 8 cm^{-1} and 32 scans per sample, analyzing at 5 and 10 months of culture and taking healthy wood as reference.

2.4. Statistical analysis

This essay presents a random experimental factorial design of two levels (fungus species and wood condition), which makes for a total of four treatments, five repetitions each, measured every 30 days for dry wood and every 15 days for wet wood (total of five samples per month). The data of the variables weight loss and moisture content was analyzed through an analysis of variance for dry and wet wood, and a combined treatment analysis was made according to a split plot in time model. Comparison of means by the Tukey test was made. A p-value of 0.10 was considered. Statistical software Infostat (2018, Córdoba, Argentina) was used.

3. Results

All wood samples were visually colonized within 10 months. The changes caused by

L. sulphureus and *G. trabeum* in the dry and wet wood of *E. grandis* were found through weight loss, FTIR spectrometry and the different types of microscopy. These methodologies showed that there are characteristic physico - chemical changes during the brown rot process, through which the effect of the initial moisture content can be analyzed.

3.1. Dry wood

Samples with an initial moisture content of 14%, named “Dry wood”, with an average density of 0,588 g/cm³ shown the weight loss monthly and moisture content evolution after exposure to the studied fungi in the Figure 1.

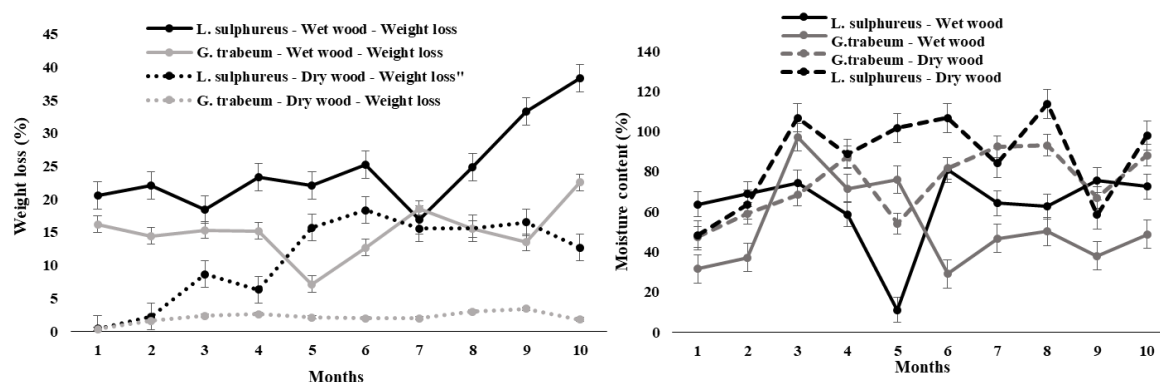


Figure 1. Weight loss (WL) and moisture content (MC) monthly variation of *E. grandis* dry wood and wet samples

When observed with a scanning electronic microscope (SEM), parenchyma cells of *Eucalyptus grandis* sapwood presented structural changes when attacked by *L. sulphureus* and *G. trabeum* from the first month of incubation. This change increased along the 10 months, being *L. sulphureus* more invasive and aggressive (Figure 2 and 3).

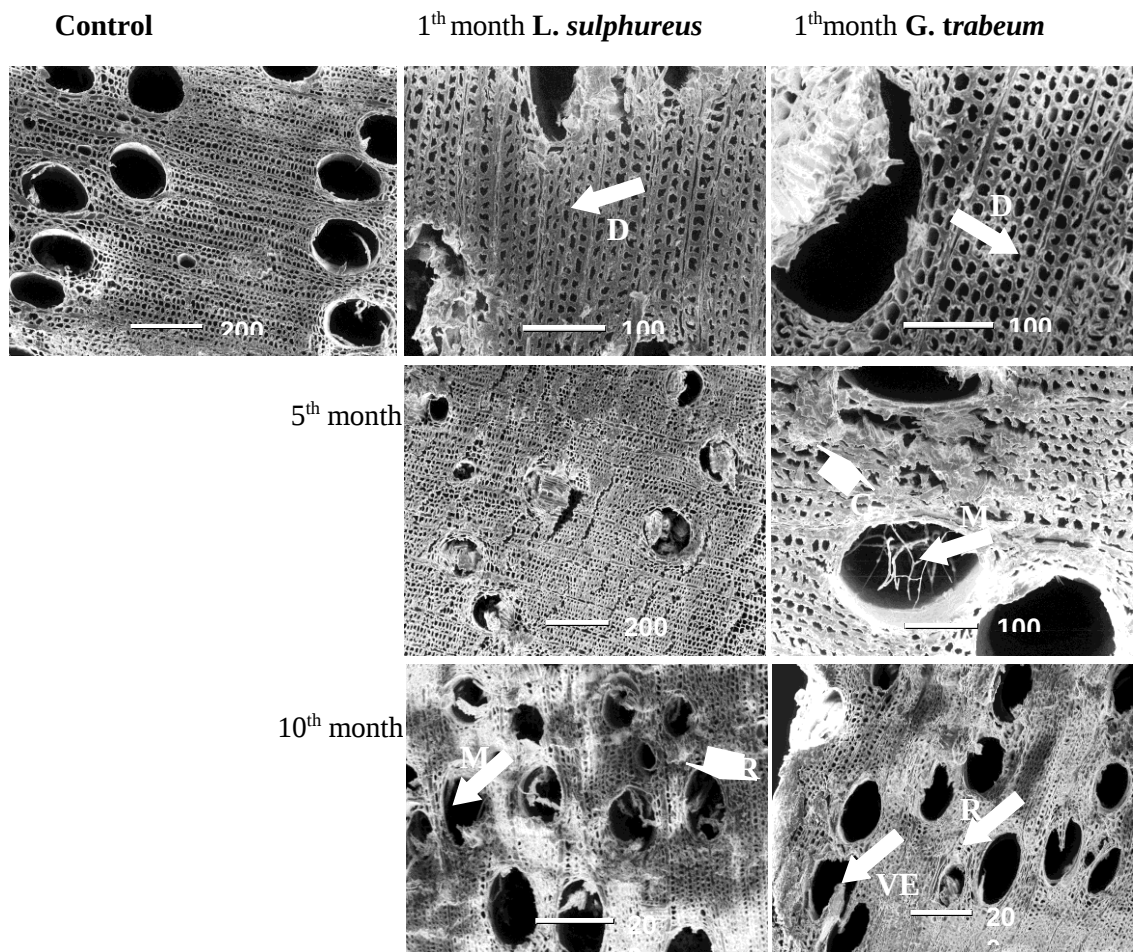


Figure 2.: Evolution of *E. grandis* sapwood degradation by a) *L. sulphureus*; b) *G. trabeum* as observed by a scanning electron microscope (SEM). M: Mycellium; R: Residues; C: collapsed and ruptured; VE:vessel eroded; D: deformation of cellular lumens.

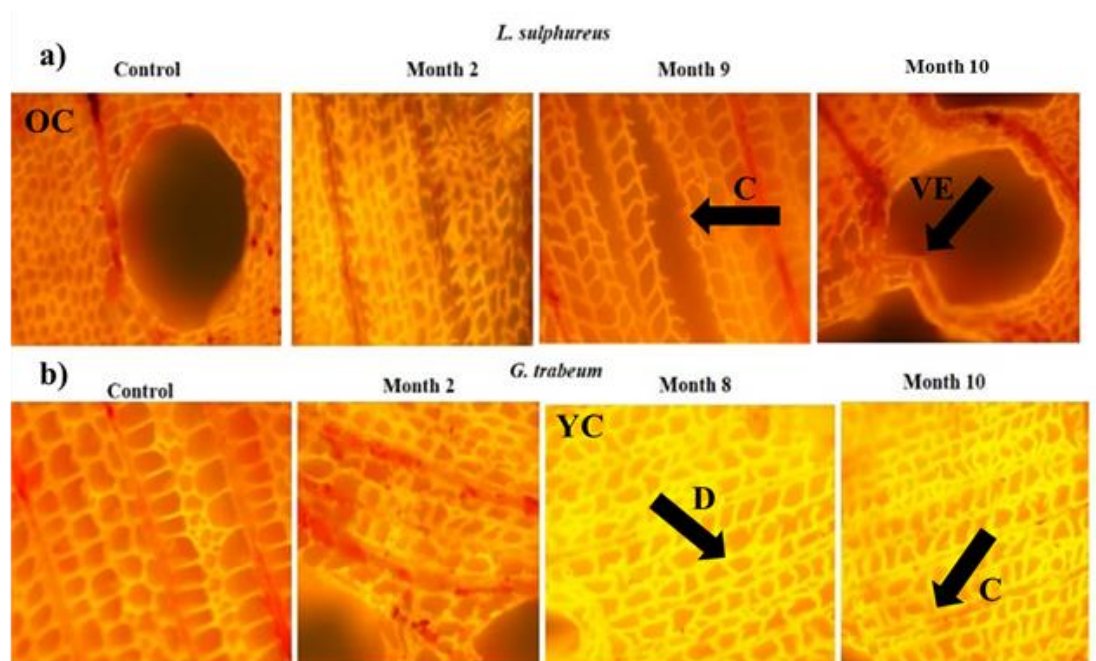


Figure 3 shows fluorescence microscope images of wood attacked by both fungi.

3.2. Wet wood

The wood samples with an initial moisture content of 49% presented an average density of 0,488 g/cm³.

Moisture content of wet wood samples showed an increment during the incubation period, with average values of 69,76 % and 46,11% for *L. sulphureum* and *G. trabeum* respectively (47,03 % de CV) (Figure 1).

3.3. FTIR

Figure 4, shows the FTIR spectra for dry and wet wood by *L. sulphureus* and *G. trabeum*; and Figure 5 shows the histograms constructed.

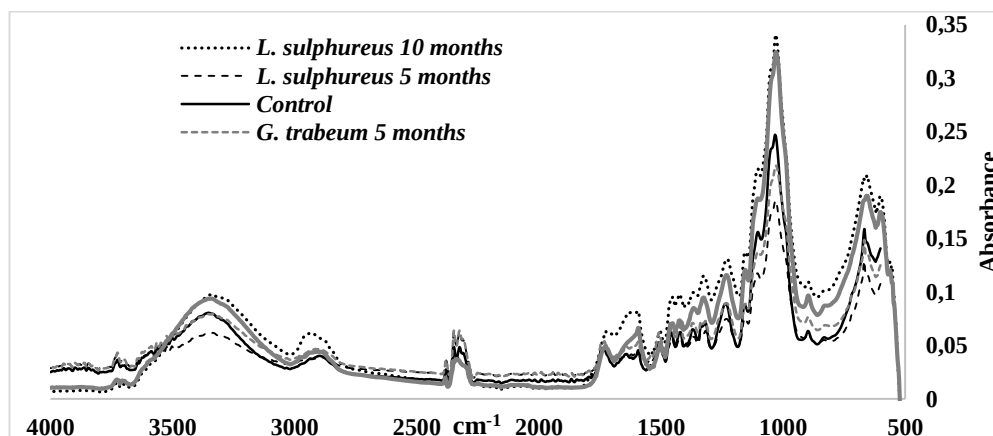


Figure 4. FTIR spectra for dry and wet wood by a) *L. sulphureus*; b) *G. trabeum* at 5 and 10 months

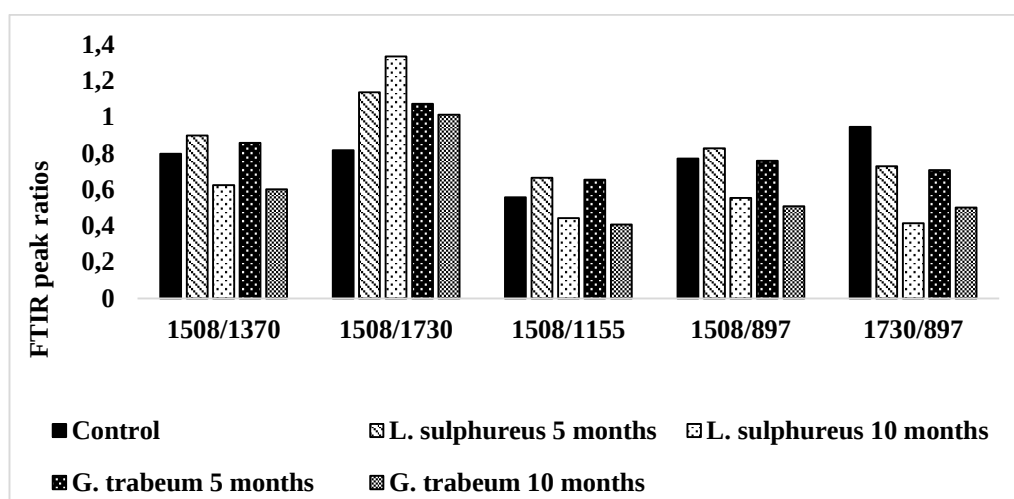


Figure 5. Histograms the values of the ratios calculated between the selected FTIR band heights by dry wood. Absorption bands: 1508 cm^{-1} : lignin; 1730 cm^{-1} : hemicelluloses C=O stretching; 1370 cm^{-1} : cellulose and hemicelluloses C\H deformation; 1155 cm^{-1} : cellulose and hemicelluloses C-O-C vibration; 897 cm^{-1} : cellulose C\H deformation.

4. Discussion

The speed at which the colonization process takes place in the wood depended on the prevailing environmental conditions, as they determine the conditions inside the wood.

4.1 Dry wood

Dry wood showed that *L. sulphureus* rapidly colonized the wood, having covered its surface with a thin layer of mycelium within the first month of incubation, whereas *G. trabeum* grew at a slower pace. The colonization caused by both brown rot fungi began below the saturation point of the fibers, in an culture environment with a relative humidity of 75% and a temperature of 25 ° C, as under these conditions the equilibrium moisture content of the wood is not above 14% (Glass and Zelinka, 2010). At the same time, in order to reach the fiber saturation point, a moisture content close to 100% would be needed for a long period of time. Figure 1, shows a slight increase in weight loss with time can be observed, until the sixth month; after then the weight loss rate tended to decrease.

The initial tendency observed in the weight loss of samples, coincides with Monrroy et al. (2011) that exposed *Eucalyptus globulus* and *Pinus radiata* wood to *L. sulphureus* for 8 weeks; *G. trabeum* caused greater weight loss in both wood species (*E. globulus* and *P. radiata*). The same was observed by Mattos et al. (2014), who reported an increase in wood weight loss in two fast growing species (*Eucalyptus saligna* and *Corymbia citriodora*) after a year of exposure to brown rot fungus on field trials. However, *G. trabeum* did not maintain its tendency of increased weight loss through all the essay.

When observing the moisture content evolution of the dry wood exposed to the fungi (Figure 1), an increase in humidity during the essay can be notice for both fungi. This increase in moisture content is due to the production of water as a consequence of the depolymerization process of cell wall components by the fungi (Schmidt, 2006; Stienen et al., 2014; Höpken et al., 2016; Thybring, 2017). Given the statistic differences in moisture content between the fungi ($p = 0,069$), it can be inferred that *L. sulphureus* would present a more active metabolism than *G. trabeum*, since, as a closed system, moisture variation can be associated to the fungal metabolism.

Average moisture content values at 10 months of incubation were 87.67 % and 77.49 % (24, 58 % of coefficient of variation- VC) for *L. sulphureus* and *G. trabeum* respectively.

When analyzing the effect of the initial moisture content of the wood on the degradation process by brown rot fungi, it can be observed that in dry wood the colonization degradation started even being below the fiber saturation point. This wood presented an initial moisture content of 14% and was exposed to the fungi in an environment with relative humidity of 75%. Although wood is a hygroscopic material and as such tends to balance with its surroundings, an atmospheric humidity of 95-100% is needed to reach the fiber saturation point (Brischke et al., 2017).

At the same time, when the deterioration begins, water is actively transported to the degradation spot by the fungi (Brischke et al., 2017); however, liquid water transported as a capillary flow within wood of such small dimensions is of very little relevance (Thybring et al., 2013) which indicates that no significant humidity gradient is generated within the samples.

Numerous researchers report the importance of this minimum moisture content of wood at the beginning of the fungal attack, in which other factors such as fungal and wood species and environmental conditions are important. Brischke et al. (2017) showed degradation below the fiber saturation point but the relative humidity values were above 96%, whereas Meyer and Brischke (2015) reported degradation below the fiber saturation point, but on wood with an initial moisture content above 19%. Otherwise, Ammer (1963) reported a minimum moisture content of 30% by *Coniophora puteana* on *Norway spruce* and a range between 40% and 70% (MC) for optimal action of the basidiomycetes (Walchli, 1980). Schmidt et al. (1996) introduced the technique of measuring the wood moisture contents in Erlenmeyer flasks with piled wood samples of *Pinus sylvestris* sapwood where different moistures developed during growth of the white-rot fungus *Physporinus vitreus*. Huckfeldt et al. (2005) showed with this technique for *Serpula lacrymans* 21 % minimum moisture content for sample colonization and

26.2% for wood degradation. Stienen et al. (2014) tested several wood-rot fungi regarding the minimum values. Höpken et al. (1016) found for example 17.9% moisture content as minimum for decay by the white-rot indoor fungus *Donkiopria expansa*. Brischke et al. (2017) showed degradation below the fiber saturation point but the relative humidity values were above 96%. Thybring et al. (2018) claimed that water plays an essential role in wood degradation by brown rot fungi, and that lowering the moisture content of the cell wall can be a strategy as to delay the growth of the fungus, increasing the wood durability. This reduction in the water content reduces the diffusion of enzymes, delaying or inhibiting the fungus development.

At a microscopic level, great similarities between the decomposition patterns caused by the brown rot fungi were observed, coinciding also with decomposition patterns reported by other researchers (Eriksson et al., 1990; Schwarze et al., 2000; Schmidt, 2006).

As observed in Figure 2, initially the cellular lumina of the S2 layer were deformed; meanwhile S3 layer remained intact almost until the end of the culture time. During the last two months of the essay the presence of mycelium in the vessels of larger diameter, and of residue (resulted from the decomposition of the cell wall) could be observed. As mentioned above, this is when the degradation of the S3 layer occurred: the cell wall is severely affected, which could be clearly seen through the deformation of the vessels. These characteristics could be observed for both fungi, but more severely with *L. sulphureus*.

Blanchette (1995) also reported that the presence of the mycelium in early stages of degradation is scarce and disperse within the cellular lumina, becoming more abundant as the degradation progresses. Schwarze et al (2000) observed the same in *Robinia pseudoacacia* infected by *L. sulphureus*.

Fluorescence microscope allows the identification of changes in the cell wall and the recognition of lignin and cellulose rich walls (Bond et al., 2008), as to detect changes in its chemical composition caused by fungal attack (Lowell, 1981; Bond

et al., 2008).

The difference between the coloration of the wood -initially intense orange (control), and yellow after 10 months- is notorious. For both fungi, in the first month lignin is homogenously distributed in the cell wall; from the eighth month, the coloring progressively changes due to the action of the fungi on the cell wall.

Furthermore, the micrographics confirmed the above mentioned changes in the parenchymatic cells observed by SEM: collapse or rupture of the cell wall and deformation of the vessels and lumens, among others.

The microscopic observations corroborated that the beginning of the deterioration process occurred from the first month of incubation, in wood with moisture content below PFS.

4.2 Wet wood

In wet wood, weight loss for both fungi showed significative differences with each other, at a confidence level of 0.90. A tendency of increased weight loss as culture time progressed could be observed, presenting *L. sulphureus* greater average values (Figure 1).

Moisture content of the attacked wet wood was influenced by fungus species ($p=0,0012$), exposure time ($p=0,0869$), and the interaction between these variables ($p=0,0186$). Despite the moisture content presented numerous oscillations along the 10 months, results showed greater values for *L. sulphureum* than for *G. trabeum* in 7 out of the 10 months of the essay (Figure 1).

Given the variability of the obtained results for both initially dry and wet wood, a covariance analysis by density and initial sample weight was used. This analysis demonstrated that variability is not a consequence of either of mentioned factors; therefore, it can be inferred that the cause was the interaction fungus- wood- environment. In the case of dry wood, as to analyze the changes in weight loss (%), their values were transformed to the $\arcsin\sqrt{\frac{\%}{100}}$, in such a way to

approximate the ANOVA assumptions.

4.3 FTIR

FTIR spectroscopy is a technique used to characterize wood and know the chemical changes it undergoes in different circumstances, such as chemical treatment, fungal degradation and weathering, as well as to determine its cellulose (Owen and Thomas, 1989; Faix, 1992; Pandey, 1999; Popescu et al., 2007; Shi and Jian, 2012) and lignin (Berben et al., 1987; Rodrigues et al., 1998) content in pulp, paper and wood.

In the FTIR spectra, two regions with information could be recognized: the region between 3800 and 2750 cm^{-1} , containing seven bands assigned to the different vibrations of the OH bond, and the “fingerprint region” (between 1800 and 800 cm^{-1}), with 27 bands (Popescu et al., 2007). Most of these bands in the latter have contributions of all wood components, with only a few of them being assigned to cellulose, hemicellulose or lignin (Pandey and Nagveni, 2007, Mahajan et al., 2012, Łucejko et al., 2018, Traoré et al., 2018). The main bands used in the analysis are assigned as: 1738 cm^{-1} for unconjugated C=O in hemicelluloses, 1375 cm^{-1} for C–H deformation in cellulose and hemicelluloses, 1158 cm^{-1} for C–O–C vibration in cellulose and hemicelluloses, 898 cm^{-1} for C–H deformation in cellulose and 1505 cm^{-1} for aromatic skeletal vibration in lignin.

The Figure 4 show the FTIR spectra of dry and wet *E. grandis* wood respectively, for both fungi at 5 and 10 months of culture. The spectra of healthy wood present significant variation respect to wood after fungal exposure, which indicates chemical alterations in both cases. According to the expected (Łucejko et al, 2018, Traoré et al, 2018), when comparing dry healthy wood to the degraded samples at different culture times, the intensity of the polysaccharide band at 1738 cm^{-1} , 1375 cm^{-1} , 1158 cm^{-1} and 898 cm^{-1} decreases, while the intensity of the absorption band at 1596 cm^{-1} , 1505 cm^{-1} , 1462 cm^{-1} , 1268 cm^{-1} , 1245 cm^{-1} and 1125 cm^{-1} 9 due to lignin increases.

However, in wet wood, at 5 months of culture, the intensity of the absorption

bands assigned to polysaccharids at (1738 cm^{-1} , 1375 cm^{-1} , 1158 cm^{-1} y 898 cm^{-1}) and to lignin (1596 cm^{-1} , 1505 cm^{-1} , 1462 cm^{-1} , 1268 cm^{-1} , 1245 cm^{-1} y 1125 cm^{-1}) increased, and then decreased at 10 months of culture.

These effects of the fungi can be understood through a semiquantitative method that highlights the relation between the absorption intensity of the bands (Pandey and Pitman, 2003). The ratio between the intensity of the lignin band at 1508 cm^{-1} and the intensity of the carbohydrate band at 1730 , 1370 , 1155 and 897 cm^{-1} were calculated. Changes in the hemicellulose (at 1730 cm^{-1}) and cellulose (at 897 cm^{-1}) were also considered.

As Figure 5 shows, when comparing dry healthy and degraded wood at 5 months of culture, for both fungi there was an increase in all ratios that compare lignin to carbohydrates (I_{1508}/I_{1370} , I_{1508}/I_{1155} , I_{1508}/I_{1730} , I_{1508}/I_{897}), indicating higher carbohydrate reduction when compared to lignin. At the same time, the I_{1730}/I_{897} ratio decreased, indicating greater chemical changes in hemicellulose over cellulose in this stage. At 10 months of culture, the ratios comparing lignin to carbohydrates tended to decrease, whereas I_{1730}/I_{897} remained lower in degraded wood, indicating that the tendency of greater hemicellulose deterioration over cellulose deterioration is maintained. Brown rot fungal decay resulted in an increase of the lignin/carbohydrate ratio, indicating carbohydrates are selectively removed by the fungi. The changes in the chemical composition of the wood observed by FTIR spectrometry coincided with the microscopical observations (mainly by fluorescence).

On the other hand, for wet wood for both fungi at 5 and 10 months of culture, the I_{1730}/I_{897} ratio decreased, indicating greater decay for hemicellulose than for cellulose. As for the lignin-carbohydrate ratios (I_{1508}/I_{1370} , I_{1508}/I_{1155} , I_{1508}/I_{1730} , and I_{1508}/I_{897}) of healthy and degraded wood, a slight increase at 5 months of culture was observed, indicating selective removal of carbohydrates. At 10 months of culture, these ratios decreased.

This suggests that for both studied fungi, and for both initial moisture contents (dry

and wet), at 5 and 10 months of culture there were a depolymerization and subsequent selective removal of carbohydrates, particularly of hemicellulose above cellulose, the former being more prone to hydrolysis than the latter (Lucejko et al., 2018). However, after 10 months of culture, the trend was not as evident.

There was a significant difference between dry and wet wood after five to ten months; this coincides with what Fredriksson and Thybring (2018) reports- the equilibrium moisture content of the wood depends not only on the environmental conditions but also on its moisture history, since the equilibrium moisture content reached by desorption is higher than that reached by absorption (hysteresis).

4. Conclusions

Moisture content altered the degradation rate for both fungi; wet wood samples presented greater weight loss values than dry wood samples. However, both fungi were capable of colonizing and developing in wood with moisture content below the fiber saturation point. Both fungi showed a clear tendency of increased weight loss, presenting *L. sulphureus* faster speed degradation and a more active metabolism in *E. grandis* wood.

Acknowledgements

The authors acknowledge the Facultad de Agronomía, Centro Universitario de Tacuarembó, Facultad de Ingeniería. To Mauricio Cáceres and Tania Rabinovich for the support in this study.

References

- Ammer, V.U., 1963. Untersuchungen fiber das Wachstum von Rotstreifepilzen in Abhangigkeit von der Holzfeuchtigkeit. Forstwissenschaftliches Cent. 82, 360–391. <https://doi.org/10.1007/BF02202726>
- Arantes, V., Jellison, J., Goodell, B., 2012. Peculiarities of brown-rot fungi and biochemical Fenton reaction with regard to their potential as a model for bioprocessing biomass. Appl. Microbiol. Biotechnol. 94, 323–338.

<https://doi.org/10.1007/s00253-012-3954-y>

- Arantes, V., Milagres, A.M.F., Filley, T.R., Goodell, B., 2011. Lignocellulosic polysaccharides and lignin degradation by wood decay fungi: The relevance of nonenzymatic Fenton-based reactions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 541–555. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0798-2>
- Baldrian, P., Valášková, V., 2008. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 501–521. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00106.x>
- Berben, S. a, Rademacher, J.P., Sell, L.O., Easty, D.B., 1987. Determination of lignin in wood pulp by diffuse reflectance fourier transform infrared spectrometry transform infrared spectrometry. *Ipc Tech. Pap. Ser. number* 210 15.
- Blanchette, R. a., 1995. Degradation of the lignocellulose complex in wood. *Can. J. Bot.* 73, 999–1010. <https://doi.org/10.1139/b95-350>
- Bond, J., Donaldson, L., Hill, S., Hitchcock, K., 2008. Safranin fluorescent staining of wood cell walls. *Biotech. Histochem.* 83, 161–171. <https://doi.org/10.1080/10520290802373354>
- Brischke, C., Soetbeer, A., Meyer-Veltrup, L., 2017. The minimum moisture threshold for wood decay by basidiomycetes revisited. A review and modified pile experiments with Norway spruce and European beech decayed by *Coniophora puteana* and *Trametes versicolor*. *Holzforschung* 71, 893–903. <https://doi.org/10.1515/hf-2017-0051>
- De Ligne, L., Ulzurrun, G.V. De, Baetens, J.M., Bulcke, J. Van Den, 2019. Analysis of spatio-temporal fungal growth dynamics under different environmental conditions. *IMA Fungus* 1, 1–14.
- Eriksson, K., Blanchette, R., Ander, P., 1990. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer-Verlag, Berlin, Alemania. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-46687-8>
- Fredriksson, M., Thybring, E.E., 2018. Scanning or desorption isotherms? Characterising sorption hysteresis of wood. *Cellulose* 25, 4477–4485. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-1898-9>
- Glass, S. V., Zelinka, S.L., 2010. Moisture Relations and Physical Properties of Wood, in: Service, U.F., Laboratory, F.P. (Eds.), *Wood Handbook. Wood as an Engineering Material*. Madison, WI: U.S, p. 508.
- Goodell, B., Jellison, J., Liu, J., Daniel, G., Paszczynski, a., Fekete, F., Krishnamurthy, S., Jun, L., Xu, G., 1997. Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood¹This is paper 2084 of the Maine Agricultural and Forest Experiment Station.1. *J. Biotechnol.* 53, 133–162. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)01681-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)01681-7)

- Green, F., Highley, T.L., 1997. Mechanism of brown-rot decay: Paradigm or paradox. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 39, 113–124. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(96\)00063-7](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(96)00063-7)
- Höpfken, M., Schmidt, O., Huckfeldt, T., 2016. Fungal moisture demands for colonization and decay of wood, in: Andersons B, K.A. (Ed.), *Proceedings of the 12th Meeting of the Northern European Network for Wood Science and Engineering . Wood Science and Engineering - a Key Factor on the Transition to Bioeconomy*. Institute Wood Chemical, Riga, Latvian State, pp. 254–257.
- Huckfeldt, T., Schmidt, O., 2015. *Hausfäule- und Bauholzpilze Diagnose und Sanierung*. 2. Auflage, Rudolf Müller, Köln.
- Huckfeldt, T., Schmidt, O., Quader, H., 2005. Ökologische Untersuchungen am Echten Hausschwamm und weiteren Hausfäulepilzen. *Holz Roh- Werkst.* 63, 209–219. <https://doi.org/10.1007/s00107-004-0559-x>
- Jensen, K.A., Houtman, C.J., Ryan, Z.C., Hammel, K.E., 2001. Pathways for Extracellular Fenton Chemistry in the Brown Rot Basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2705–2711. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2705-2711.2001>
- Körner, I., Faix, O., Wienhaus, O., 1992. Attempts to determine brown-rot breakdown of Scots pine wood with the aid of FTIR spectroscopy. *Holz als Roh- und Werkst.* 59, 363–367. <https://doi.org/10.1007/BF02628645>
- Lowell, E.C., 1981. Fluorescence microscopy for detecting incipient decay and estimating residual strength of wood.
- Łucejko, J.J., Mattonai, M., Zborowska, M., Tamburini, D., Cofta, G., Cantisani, E., Kúdela, J., Cartwright, C., Colombini, M.P., Ribechini, E., Modugno, F., 2018. Deterioration effects of wet environments and brown rot fungus *Coniophora puteana* on pine wood in the archaeological site of Biskupin (Poland). *Microchem. J.* 138, 132–146. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.12.028>
- Mahajan, S., Jeremic, D., Goacher, R.E., Master, E.R., 2012. Mode of coniferous wood decay by the white rot fungus *Phanerochaete carnosus* as elucidated by FTIR and ToF-SIMS. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94, 1303–1311. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3830-1>
- Mahmood, R.T., Asad, M.J., Asgher, M., Gulfraz, M., Mukhtar, T., 2017. Analysis of lignolytic enzymes and decolorization of disperse violet S3RL, yellow brown S2RFL, red W4BS, yellow SRLP and red S3B by brown rot fungi. *Pakistan J. Agric. Sci.* 54, 407–413. <https://doi.org/10.21162/PAKJAS/17.4294>
- Martínez, G., Núñez, P., González, W., Rodríguez, F., Gómez, M., 2009. Distribución vertical de la chinche del eucalipto *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero y Dellapè 2006 (Hemiptera; Thaumastocoridae): Resultados preliminares. *Ser. Act. Difusión* 567, 31–35.
- Mattos, B.D., de Cademartori, P.H.G., Lourençon, T. V., Gatto, D.A., Magalhães,

- W.L.E., 2014. Biodeterioration of wood from two fast-growing eucalypts exposed to field test. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 93, 210–215. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.04.027>
- Meyer, L., Brischke, C., 2015. Fungal decay at different moisture levels of selected European-grown wood species. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 103, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.04.009>
- Mitsuhashi, J.G., Morrell, J.J., 2012. Effects of Environmental Factors on Decay Rates of Selected White- and Brown-Rot Fungi. *Wood Fiber Sci.* 44, 343–356.
- Monrroy, M., Ortega, I., Ramírez, M., Baeza, J., Freer, J., 2011. Structural change in wood by brown rot fungi and effect on enzymatic hydrolysis. *Enzyme Microb. Technol.* 49, 472–477. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.08.004>
- Murace, M., Luna, M.L., Ciuffani, M.G.G., Perelló, A., 2017. Modificaciones anatómicas y químicas en el leño de ejemplares del arbolado de la ciudad de la plata (buenos aires) causadas por *laetiporus sulphureus* (basidiomycota, polyporales. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 52, 647–661.
- Ortiz, R., Párraga, M., Navarrete, J., Carrasco, I., de la Vega, E., Ortiz, M., Herrera, P., Jurgens, J.A., Held, B.W., Blanchette, R.A., 2014. Investigations of biodeterioration by fungi in historic wooden churches of Chiloé, Chile. *Microb. Ecol.* 67, 568–575. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0358-1>
- Owen, N.L., Thomas, D.W., 1989. Infrared studies of “hard” and “soft” woods. *Appl. Spectrosc.* 43, 451–455. <https://doi.org/10.1366/0003702894202760>
- Pandey, K.K., 1999. A study of chemical structure of soft and hardwood and wood polymers by FTIR spectroscopy. *J. Appl. Polym. Sci.* 71, 1969–1975. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4628\(19990321\)71:12<1969::aid-app6>3.3.co;2-4](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4628(19990321)71:12<1969::aid-app6>3.3.co;2-4)
- Pandey, K.K., Nagveni, H.C., 2007. Schnellcharakterisierung von Durch Weiß- und Braunfäulepilze Abgebautem Holz von *Pinus Roxburghii* und *Hevea Brasiliensis* Mittels FTIR-spektroskopie. *Holz als Roh - und Werkst.* 65, 477–481. <https://doi.org/10.1007/s00107-007-0181-9>
- Pandey, K.K., Pitman, A.J., 2003. FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 52, 151–160. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(03\)00052-0](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(03)00052-0)
- Popescu, C.M., Popescu, M.C., Singurel, G., Vasile, C., Argyropoulos, D.S., Willfor, S., 2007. Spectral characterization of eucalyptus wood. *Appl. Spectrosc.* 61, 1168–1177. <https://doi.org/10.1366/000370207782597076>
- Rodrigues, J., Faix, O., Pereira, H., 1998. Determination of lignin content of *Eucalyptus globulus* wood using FTIR spectroscopy. *Holzforschung* 52, 46–50. <https://doi.org/10.1515/hfsg.1998.52.1.46>
- Schmidt, O., 2006. Wood and tree decay. Biology, damage, protection and use.

Springer- Verlag Berlin Heidelberg, Germany.

- Schmidt, O., Liese, W., Moreth, U., 1996. Decay of timber in a water cooling tower by the basidiomycete *Physiporinus vitreus*. *Material Organismen* 30, 161-177.
- Schwarze, Mattheck, C., Engels, J., 2000. Fungal strategies of wood decay in trees. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Shi, J., Jian, L., 2012. Wood-Forming Tissue of *Pinus Koraiensis* Under. *BioResources* 7, 3463–3475.
- Stienen, T., Schmidt, O., Huckfeldt, T., 2014. Wood decay by indoor basidiomycetes at different moisture and temperature. *Holzforschung* 68, 9–15. <https://doi.org/10.1515/hf-2013-0065>
- Thybring, E.E., 2017. Water relations in untreated and modified wood under brown-rot and white-rot decay. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 118, 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.01.034>
- Thybring, E.E., 2013. The decay resistance of modified wood influenced by moisture exclusion and swelling reduction. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 82, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.02.004>
- Thybring, E.E., Kymäläinen, M., Rautkari, L., 2018. Moisture in modified wood and its relevance for fungal decay. *IForest* 11, 418–422. <https://doi.org/10.3832/ifor2406-011>
- Traoré, M., Kaal, J., Martínez Cortizas, A., 2018. Differentiation between pine woods according to species and growing location using FTIR-ATR. *Wood Sci. Technol.* 52, 487–504. <https://doi.org/10.1007/s00226-017-0967-9>
- Wälchli, O., 1980. Der echte Hausschwamm - Erfahrungen fiber Ursachen und Wirkungen seines Auftretens * 38, 169–174.
- Zhang, K., Si, M., Liu, D., Zhuo, S., Liu, M., Liu, H., Yan, X., Shi, Y., 2018. A bionic system with Fenton reaction and bacteria as a model for bioprocessing lignocellulosic biomass. *Biotechnol. Biofuels* 11, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1035-x>

6.1. ESPECTROMETRÍA FTIR DE LOS ÁRBOLES EN PIE (1-5)

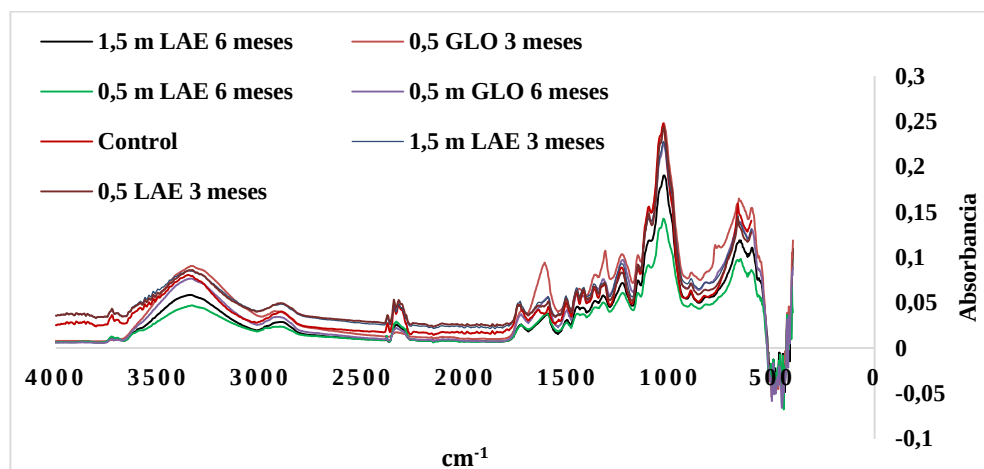


Figura 46. Espectrometría FTIR Árbol 1. LAE: *L. sulphureus*, GLO: *G. trabeum*.

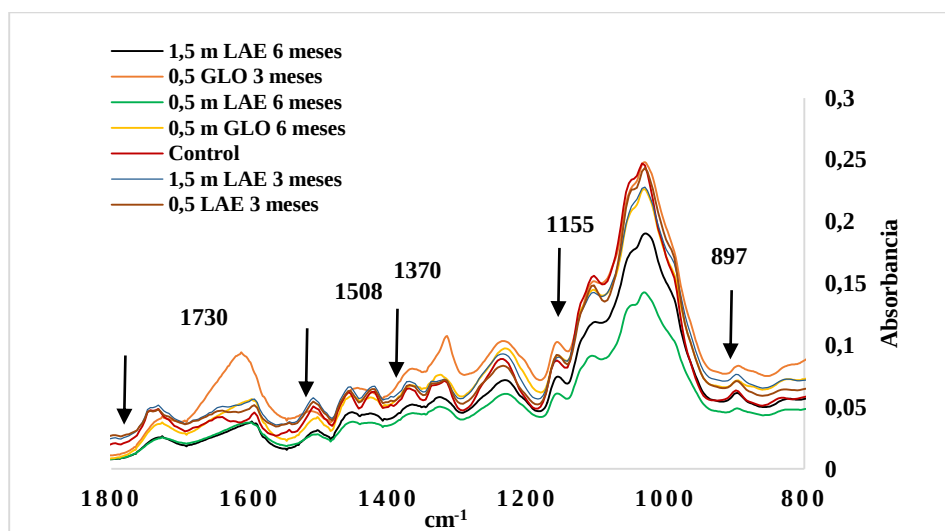


Figura 47. Espectrometría FTIR del árbol 1 en el rango de 1800-800 cm^{-1} .
LAE: *L. sulphureus*, GLO: *G. trabeum*.

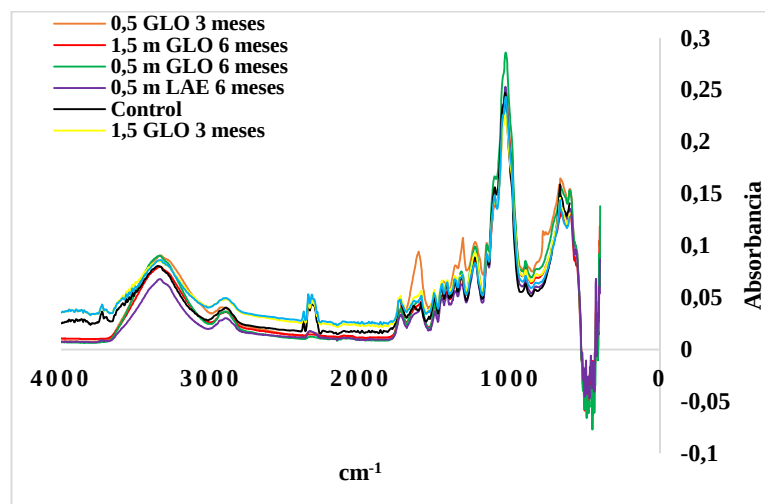


Figura 48. Espectrometría FTIR Árbol 2. LAE: *L. sulphureus*, GLO: *G. trabeum*.

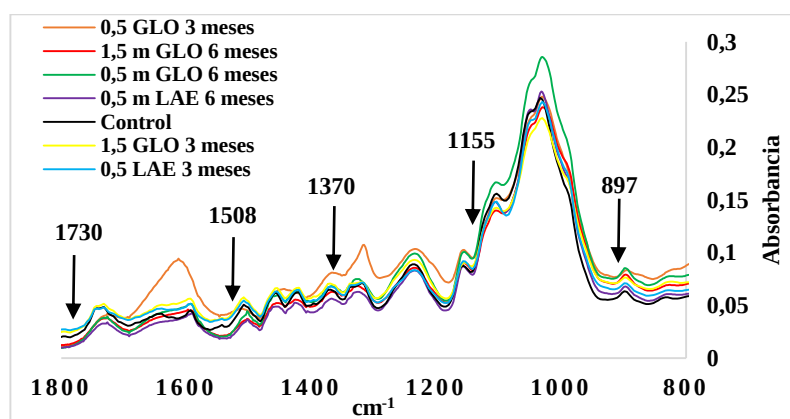


Figura 49. Espectrometría FTIR del árbol 2 en el rango de huella dactilar (1800-800 cm^{-1}). LAE: *L. sulphureus*, GLO: *G. trabeum*.

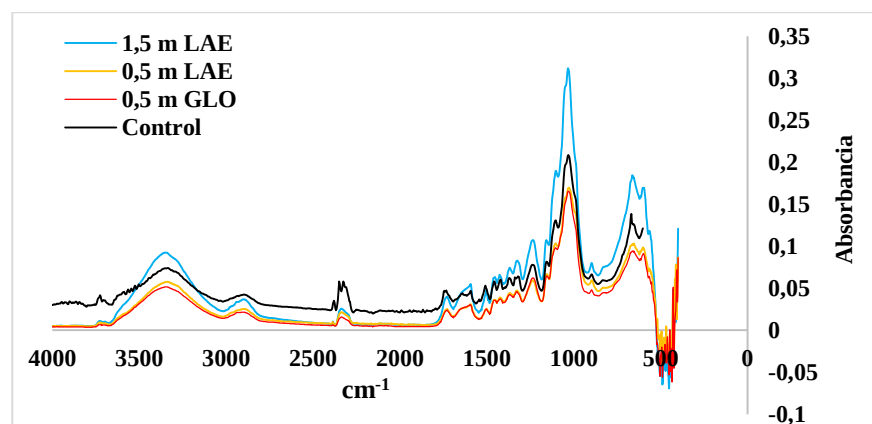


Figura 50. Espectrometría FTIR Árbol 3. LAE: *L. sulphureus*, GLO: *G. trabeum*.

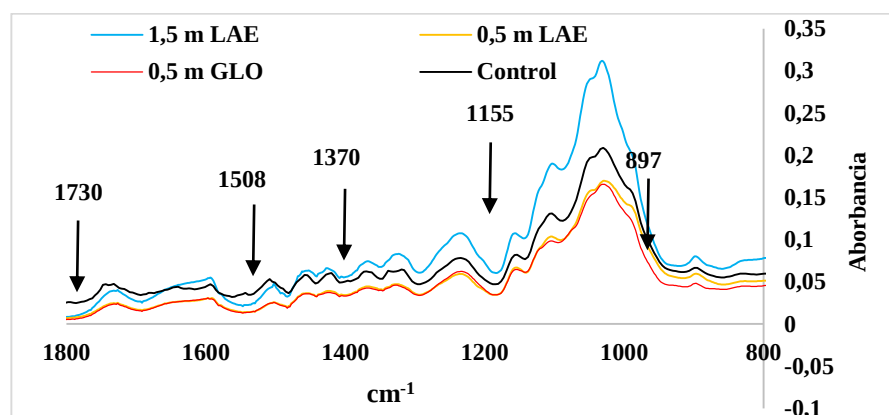


Figura 51. Espectrometría FTIR del árbol 3 en el rango de huella dactilar (1800-800 cm^{-1}). LAE: *L. sulphureus*, GLO: *G. trabeum*.

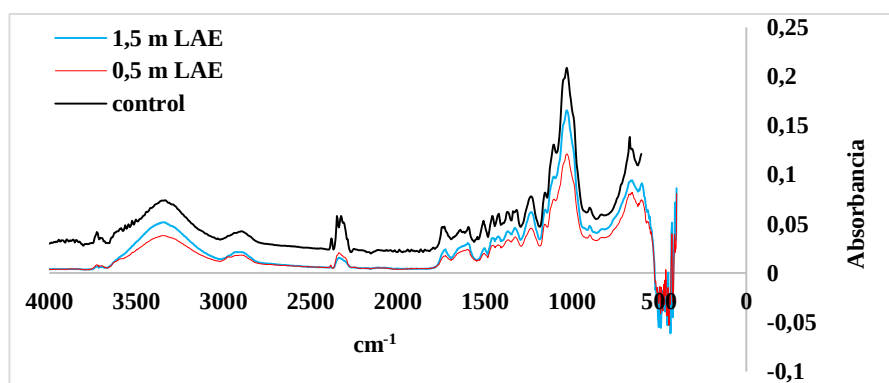


Figura 52. Espectrometría FTIR Árbol 4. LAE: *L. sulphureus*, GLO: *G. trabeum*.

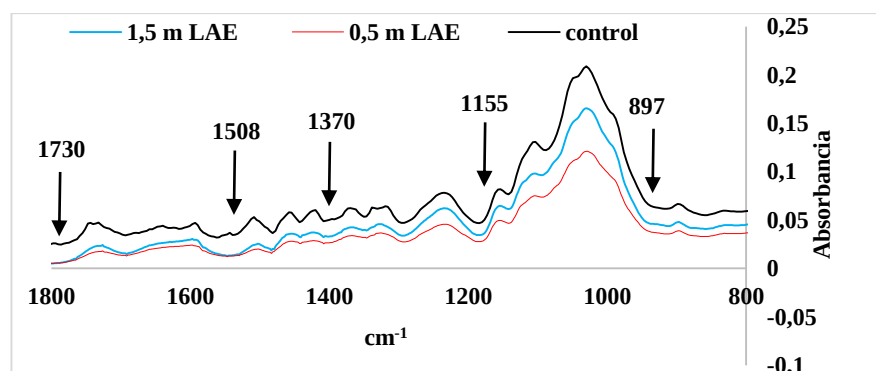


Figura 53. Espectrometría FTIR del árbol 4 en el rango de huella dactilar (1800-800 cm^{-1}). LAE: *L. sulphureus*, GLO: *G. trabeum*.

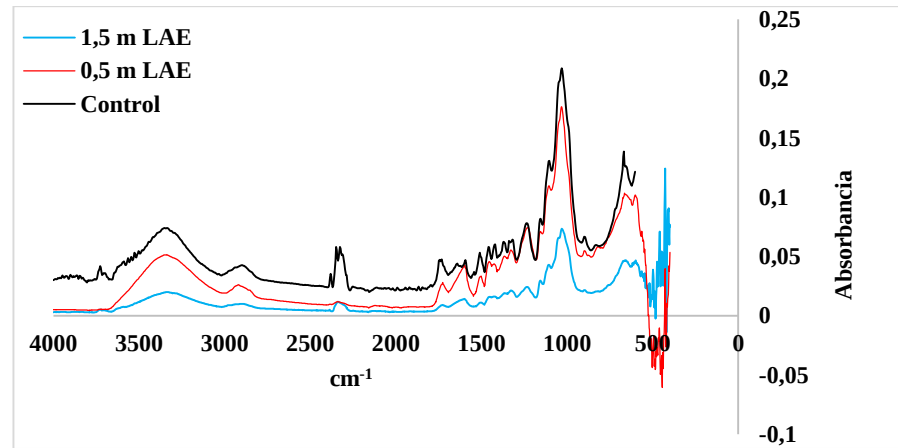


Figura 54. Espectrometría FITR Árbol 5. LAE: *L. sulphureus*, GLO: *G. trabeum*.

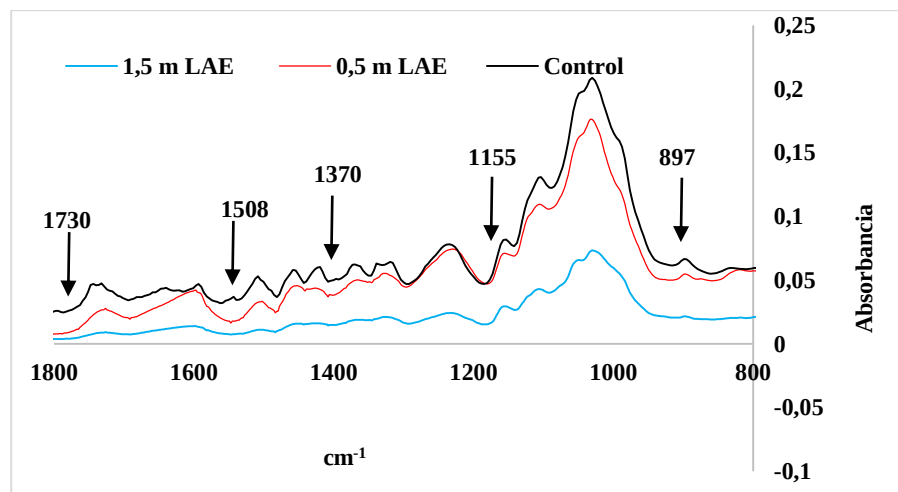


Figura 55. Espectrometría FTIR del árbol 5 en el rango de huella dactilar (1800-800 cm^{-1}). LAE: *L. sulphureus*, GLO: *G. trabeum*.

