

EFFECTO DE DIFERENTES CONDICIONES DE CRECIMIENTO EN EL DIMORFISMO LEVADURA-MICELIO DE LA CEPA ALBINA PCF2A29 DE LA ESPECIE *OPHIOSTOMA PICEAE*

EFFECT OF GROWING CONDITIONS ON FUNGAL YEAST-MYCELIUM DIMORPHISM OF *OPHIOSTOMA PICEAE* ALBINO STRAIN PCF2A29

Alexander Berrocal^{1,4}, José Navarrete², Claudia Oviedo³

RESUMEN

Los hongos del género *Ophiostoma* promueven la ocurrencia de la mancha azul en madera de coníferas, afectando significativamente la calidad en los productos de apariencia. Para la prevención de la mancha azul se han empleado productos químicos de diferente naturaleza. El control biológico de la mancha azul con cepas albinas del género *Ophiostoma* aparece como una alternativa de promisorio potencial. Algunos de estos hongos cuando cultivados en medio líquido presentan un crecimiento dimórfico, con alta proporción de micelio, que dificulta su utilización. El dimorfismo, transformación reversible de las morfologías levadura y micelio, es controlado por factores químicos y del entorno. En esta investigación mediante la aplicación de un diseño factorial completo de dos niveles, se estudió el efecto de cuatro variables operacionales sobre el crecimiento levaduriforme de la cepa albina PcF2A29 de la especie *Ophiostoma piceae* (Münch) H. & P. Syd., creciendo en medio de cultivo líquido complejo. Los resultados mostraron que el tamaño del inóculo, la temperatura y la interacción tamaño del inóculo-temperatura tuvieron un efecto estadístico significativo sobre el crecimiento levaduriforme de la cepa albina PcF2A29 de la especie *O. piceae*. De estas variables, el tamaño del inóculo resultó ser el efecto más importante y explicó el 53% de la variabilidad observada. Estos resultados sugieren por primera vez, en la especie *O. piceae*, la existencia de un mecanismo de detección del quórum asociado a la variable tamaño del inóculo.

Palabras clave: *Ophiostoma piceae*, hongos manchadores de la madera, dimorfismo fúngico, tamaño del inóculo, biocontrol de la mancha azul.

ABSTRACT

Ophiostoma fungi promote the occurrence of blue stain in coniferous wood, affecting the appearance wood products quality. Thus, different chemical products have been attempted to control them. Biological control of these sapstaining fungi, using albino strains of *Ophiostoma* looks like a successfully alternative to be applied. However, some *Ophiostoma* strains present a dimorphic behavior in liquid culture, which make them difficult to work with. Fungal dimorphism is defined

¹Candidato a Doctor. Doctorado en Ciencias e Industrias de la Madera, Facultad de Ingeniería, Universidad del Bío-Bío, Concepción, Chile.

²Departamento de Ingeniería en Maderas, Facultad de Ingeniería, Universidad del Bío-Bío, Concepción, Chile.

³Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad del Bío-Bío, Concepción, Chile.

⁴Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.

Recibido: 16.09.2011 Aceptado: 29.01.2012.

Autor para correspondencia: jnavarre@ubiobio.cl

as an environmentally and chemically controlled, reversible transformation of the yeast and mycelia morphologies. In this research, a two level factorial design was applied for evaluating the effect of four operative variables on albino strain PcF2A29 (*Ophiostoma piceae* (Münch) H. & P. Syd.) yeast-like growth a complex liquid medium. The results showed that inoculum size, temperature and their interaction had a statistically significant effect on yeast-like growth of albino strain PcF2A29. The most important effect was inoculum size. This factor explained 53% of the observed variability. The effect of inoculum size on yeast-like growth, phenomenon that is described in the *O. piceae* species by the first time with this paper, would be associated to quorum sensing activity.

Keywords: *Ophiostoma piceae*, wood-staining fungi, fungal dimorphism, inoculum size, blue stain biocontrol.

INTRODUCCIÓN

El género *Ophiostoma* es el más grande de los cuatro géneros teleomorfos de la familia Ophiostomatacea. La mayoría de los hongos que conforman las aproximadamente 160 especies del género *Ophiostoma*, son saprófitos que habitan la madera (Zipfel *et al.* 2006).

Los hongos de la mancha azul que incluyen, además del género *Ophiostoma*, los géneros *Ceratocystis*, *Leptographium* y *Sphaeropsis*, contienen en sus hifas melanina, sustancia responsable de la coloración que éstas promueven en la madera colonizada (Scheffer 1973, Zimmerman *et al.* 1993, Zink y Fengel 1988). Los hongos de la mancha azul no afectan las propiedades mecánicas de la madera, pero sí la calidad de los productos de apariencia (Seifert 1993).

Actualmente, la prevención del manchado de la madera se realiza con productos químicos poco amistosos con el medio ambiente (McMahon *et al.* 2011). Varios estudios han demostrado la factibilidad técnica del control biológico de la mancha azul. En particular, el asperjado de suspensiones levaduriformes de algunas especies de hongos albinos del género *Ophiostoma* sobre madera, aparece como una tecnología más amistosa con el medio ambiente (Lee y Oh 2000, Held *et al.* 2003).

La inoculación artificial de la madera fresca con estas cepas, establece una colonización temprana del sustrato que impide el crecimiento de otros microorganismos manchadores. Las hifas de estos hongos albinos, que conservan su habilidad para colonizar la madera, no contienen melanina (Zimmerman *et al.* 1993). La aplicación de estas suspensiones de esporas han proporcionado niveles de bioprotección de hasta seis semanas (Navarrete *et al.* 2008). No obstante lo anterior, los beneficios evidentes de esta nueva tecnología están siendo afectados por el crecimiento dimórfico de algunas cepas en medio líquido. La alta concentración de micelio, que ha limitado la producción masiva de estos microorganismos, repercute en los aspectos esenciales del proceso tales como: el conteo de esporas, el filtrado de los cultivos y la formulación exacta de las soluciones bioprotectoras utilizadas para la inoculación de la madera.

El dimorfismo es un mecanismo que exhiben algunos hongos, en respuesta a cambios del entorno (Nadal *et al.* 2008), para alternar entre un crecimiento unicelular (levadura) y otro multicelular (filamentoso). Los estímulos ambientales producen señales detectables que, al ser percibidas por los hongos dimórficos, desencadenan cambios en su morfología como una forma de adaptarse a estas nuevas condiciones del medio (Deacon 2006).

Entre los factores que pueden inducir el dimorfismo se encuentran numerosos parámetros químicos y ambientales, tales como: la temperatura, el pH, la concentración de glucosa, la presencia y concentración de metales de transición, la presencia de agentes quelantes y el tamaño del inóculo o densidad celular (Hornby *et al.* 2001).

Los factores operacionales más fáciles de controlar en el crecimiento levaduriforme en medio líquido de un sistema de producción de cepas albinas del género *Ophiostoma* son la temperatura, el tamaño del inóculo, el pH inicial y la agitación. Coincidentemente, estos factores también se han reportado como mecanismos de control de los hongos dimórficos *Ceratocystis ulmi*, *Candida albicans*, *Ustilago maydis* y *Mucor rouxii* (Nickerson *et al.* 2006). A la fecha no existen informes del efecto de estos factores, sus interacciones e importancia relativa, sobre el dimorfismo fúngico de las cepas albinas del género *Ophiostoma*.

El presente estudio tiene como objetivo principal identificar y cuantificar los factores, interacciones e importancia relativa que tendrían las variables: tamaño del inóculo, pH inicial del medio de cultivo, velocidad de agitación y temperatura de incubación, a las 24 h de crecimiento en medio de cultivo líquido complejo, sobre la morfología de la cepa albina PcF2A29 de la especie *O. piceae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental. Para este ensayo se utilizó un diseño factorial 2⁴ de dos niveles, cuatro factores, 16 tratamientos, no replicado y completamente aleatorio.

Los niveles de los factores, considerados en el experimento fueron seleccionados teniendo en cuenta lo reportado por otros investigadores. Para el establecimiento del rango de estudio de la variable tamaño del inóculo se consideró el trabajo de McNeel (1983). Esta investigadora estudió el efecto del tamaño del inóculo en la morfología del crecimiento de una cepa de la especie *O. ulmi* evaluando el rango de concentración celular 10⁴-10⁸ UFC ml⁻¹. El rango de pH inicial entre 5 y 7, fue establecido utilizando como referencia el pH de 6.5 informado por Tamerler *et al.* (2001). El rango evaluado para la velocidad de agitación, 100 - 200 rpm, fue el utilizado por Navarrete *et al.* (2008). El valor mínimo y máximo para el estudio del efecto de la temperatura se determinaron de acuerdo a lo informado por Seifert (1993) y Brasier (1993). Este último autor informa que los hongos *O. piceae* no crecen a temperaturas mayores que 32°C.

Finalmente, un tiempo de observación a las 24 horas fue establecido visto que para *O. ulmi*, el proceso de formación del tubo germinativo y gemación (crecimiento levaduriforme) comienzan y concluyen a las 8 horas y antes de las 24 horas, respectivamente (Kulkarni y Nickerson 1981).

La tabla 1 muestra el orden de ejecución aleatorizado del experimento, los factores y los respectivos niveles del diseño factorial para la producción de levaduras de la cepa PcF2A29 de la especie *O. piceae* en medio de cultivo líquido complejo. La variable respuesta analizada fue la relación levadura/micelio (%) a las 24 horas de crecimiento.

Tabla 1. Orden de ejecución de los tratamientos, niveles de los factores y resultados del experimento de producción de levaduras de la cepa albina PcF2A29 de la especie *O. piceae* en medio de cultivo complejo, a las 24 horas de crecimiento.

Orden de ejecución	Factor				Respuesta
	A: Tamaño del inóculo	B: pH	C: Agitación	D: Temperatura	Relación Levadura/Micelio
	(UFC ml ⁻¹)		(rpm)	(°C)	(%)
1	2000000	5	200	18	37.7
2	2000000	5	100	18	36.7
3	100000	7	100	18	21.6
4	100000	7	200	29	24.8
5	2000000	5	100	29	73.4
6	100000	5	200	18	29.4
7	2000000	7	100	18	31.8
8	2000000	7	200	29	85.6
9	100000	5	100	29	29.6
10	2000000	7	100	29	74.8
11	2000000	5	200	29	66.5
12	100000	7	100	29	25.4
13	100000	5	100	18	22.7
14	100000	7	200	18	19.1
15	2000000	7	200	18	37.1
16	100000	5	200	29	24.4

La planificación experimental, el análisis de varianza y posterior análisis estadístico de los resultados, se realizaron con el software de diseño de experimentos Design Expert® 8.0.1.

Microorganismos. Para este estudio se utilizó la cepa albina (PcF2A29) **de la especie** *Ophiostoma piceae* (Münch) H. & P. Syd. del cepario del Laboratorio de Biodeterioro del Departamento de Ingeniería en Maderas de la Universidad del Bío-Bío (Chile), mantenida en tubos de ensayo con medio de cultivo sólido a base de extracto de levadura (4 g L⁻¹), extracto de malta (15 g L⁻¹), agar (18 g L⁻¹) y antibióticos (0,5 g L⁻¹) a 4 °C.

Medio de cultivo. El medio de cultivo complejo fue preparado con 15 g de extracto de malta (Bacto), 4 g de extracto de levadura (Bacto), 0.25 g de cloranfenicol (Sigma) y 0.25 g de sulfato de estreptomycin (Sigma). Los ingredientes del medio, excepto el sulfato de estreptomycin fueron disueltos en agua destilada, colocados en un frasco de cultivo y esterilizados a 121 °C por 25 minutos. El sulfato de estreptomycin, una vez que alcanzó la temperatura del ambiente, fue agregado al medio de cultivo asépticamente.

Preparación del inóculo. Matraces Erlenmeyer de 500 ml, conteniendo cada uno 125 ml de medio de cultivo complejo e inoculados asépticamente con células de cultivos stock, fueron incubados en un agitador orbital mantenido a 120 rpm por 5 días a 25 °C. Las esporas, separadas del micelio y filtradas asépticamente a través de filtros de papel Whatman N° 4, fueron cosechadas mediante centrifugación y lavadas tres veces con igual volumen de agua destilada estéril. Las esporas fueron

resuspendidas en 50 mM solución buffer fosfato (pH 6.5) y almacenadas a 4 °C hasta su posterior utilización.

Condiciones de cultivo y evaluación del crecimiento levaduriforme. Matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml de medio complejo, puestos en un agitador orbital Bigger Bill Digital Thermolyne ajustado a 200 rpm, fueron incubados por un periodo de 24 horas a 25 °C. A las 24 horas de la inoculación muestras del medio de cultivo fueron obtenidas y hematocitómetros preparados para la evaluación de morfología del cultivo a 400X con la ayuda de un microscopio Nikon Eclipse E600. De cada matraz un total de 10 muestras fueron tomadas.

Las evaluaciones y el conteo de esporas de los medios de cultivo con tamaños del inóculo mayores que 2×10^7 UFC ml^{-1} se realizaron en muestras con 2 diluciones seriadas y en una superficie de recuento de 5 cuadros de 0,04 mm cada uno. Las evaluaciones y el conteo de esporas de los cultivos con tamaños del inóculo menores que 1×10^5 UFC ml^{-1} se realizaron sin diluciones y en 9 cuadrados de 1 mm. El conteo de levadura solo consideró células diferenciadas (filamentosas o levaduras) y el porcentaje de éstas se expresó en base 100%. Las células en división por gemación y con tubos germinativos en formación fueron cuantificadas como levaduras y micelio, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de la figura de probabilidad normal de los efectos de los factores e interacciones (Figura 1) muestra que los factores tamaño del inóculo (A), temperatura (D) y la interacción de segundo orden de ambas variables (AD) tuvieron un efecto estadístico significativo sobre el crecimiento levaduriforme de la cepa albina PcF2A29 de la especie *O. piceae*. El pH inicial (B), la velocidad de agitación (C), las interacciones de segundo orden AB, AC, BC, BD, CD, las interacciones de tercer orden ABC, ACD, BCD y la interacción de cuarto orden ABCD, en el ámbito de los niveles evaluados, no tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre la variable respuesta.

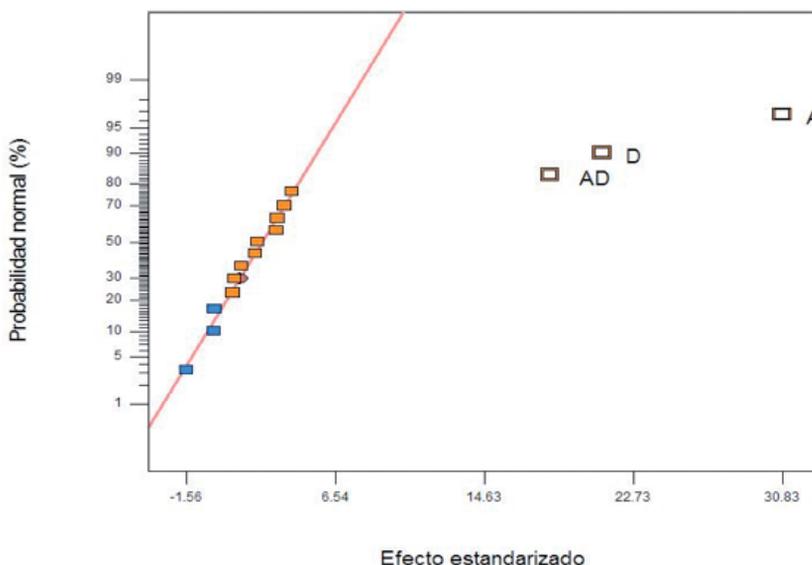


Figura 1. Gráfica de la probabilidad normal de los efectos de los factores del experimento de producción de levaduras de la cepa albina PcF2A29 de la especie *O. piceae* en medio de cultivo líquido complejo.

El análisis de varianza del modelo matemático obtenido para estas variables (Tabla 2) resultó ser estadísticamente significativo con un valor $p < 0.0001$.

Tabla 2. Análisis de varianza, valor p y porcentajes de contribución de las variables e interacciones significativas para el crecimiento levaduriforme de la cepa albina PcF2A29 de la especie *O. piceae* en medio de cultivo líquido complejo.

Fuente de variación	Valor F	Valor p Prob > F	Contribución (%)
Modelo	97.0	< 0.0001	96
A-Tamaño del inóculo (UFC ml ⁻¹)	160.4	< 0.0001	53
D-Temperatura (°C)	74.7	< 0.0001	25
AD	55.9	< 0.0001	18
Residual			
Total			

Los factores tamaño del inóculo (53%), temperatura (25%) y la interacción tamaño del inóculo-temperatura (18%) explicaron el 96%, del total de la variabilidad observada en la morfología de crecimiento de la cepa albina PcF2A29 de la especie *O. piceae*.

El efecto de los factores tamaño del inóculo, temperatura y su interacción fueron todos estadísticamente significativos con valores $p < 0.0001$ (Tabla 2). Los valores F de la tabla 3 también señalan la magnitud de la razón señal ruido y que correlacionan el porcentaje de contribución de cada factor en el total de la variabilidad observada. Los estadísticos del modelo seleccionado para el experimento de producción de levaduras de la cepa albina PcF2A29 de la especie *O. piceae* se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Índices estadísticos del los modelo seleccionados para el experimento de producción de levaduras de la cepa albina PcF2A29 de *O. piceae* en medio de cultivo líquido complejo.

Estadístico	Valor
R ²	0.96
R ² Ajustado	0.95
R ² Predicción	0.93
Precisión adecuada	21.31
PRESS	505.58
Coefficiente variación	12.16

Los índices señalados permiten destacar que los coeficientes de predicción del modelo para el porcentaje de levaduras en la cepa PcF2A29 de la especie *O. piceae*, concuerdan razonablemente con los respectivos coeficientes R^2 ajustado y de predicción. Los valores del R^2 ajustado y el R^2 de predicción, mayores que un 93%, demuestran la confiabilidad del modelo obtenido (Tabla 3). La razón señal/ruido de 21.3 avala este nivel de confiabilidad y establece que el modelo matemático obtenido es adecuado para navegar el espacio del diseño.

A continuación se presenta la ecuación (1) del modelo matemático de predicción, expresado en términos reales de las variables normalizadas, para el porcentaje de levaduras en el medio de crecimiento:

$$Y=40.04(\pm 1.22)+15.41 (\pm 1.22)*A+10.52(\pm 1.22)*D+9.10(\pm 1.22)*AD \quad (1)$$

Donde:

Y: Relación levadura/micelio (%)

A: Tamaño del inóculo (UFC ml⁻¹)

D: Temperatura (°C)

AD: Tamaño del inóculo (UFC ml⁻¹) * Temperatura (°C)

Las magnitudes de los coeficientes de los factores tamaño del inóculo (A), temperatura (D) e interacción (AD) están correlacionadas con su importancia relativa establecida en la predicción de la variable respuesta (Tabla 2).

La figura 2 muestra un claro efecto sinérgico en la interacción tamaño del inóculo-temperatura. Por una parte, el cambio del tamaño del inóculo, desde 1×10^5 a 2×10^7 UFC ml⁻¹, para una temperatura de 18 °C, produjo un cambio en la razón levadura/micelio de un 7%. Por el contrario, para el mismo cambio del tamaño del inóculo, en el nivel alto de temperatura, el cambio en la razón levadura/ micelio fue de 50%.

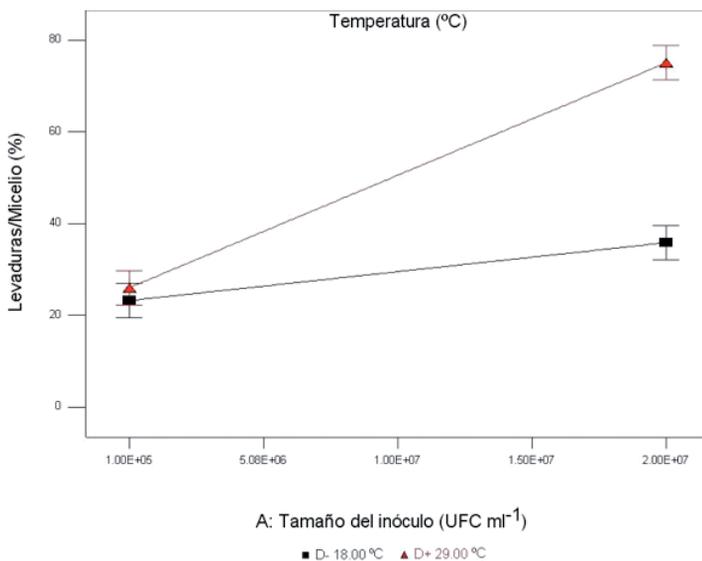


Figura 2. Gráfico de interacción entre los factores tamaño del inóculo (A) y temperatura (D) del diseño factorial para el crecimiento levaduriforme de la cepa albina PcF2A29 de la especie *O. piceae* en medio de cultivo líquido complejo.

El porcentaje de levaduras observado en los cultivos establecidos con un tamaño del inóculo bajo, independiente de la temperatura de crecimiento, fue alrededor de un 25%. Por el contrario, los porcentajes de levadura para una concentración de inóculo alta fueron 30% y 75%, respectivamente. En la figura 3 se ilustra el efecto del tamaño del inóculo y la temperatura en la morfología de la cepa albina PcF2A29 de la especie *O. piceae* observada a las 24 horas de crecimiento.

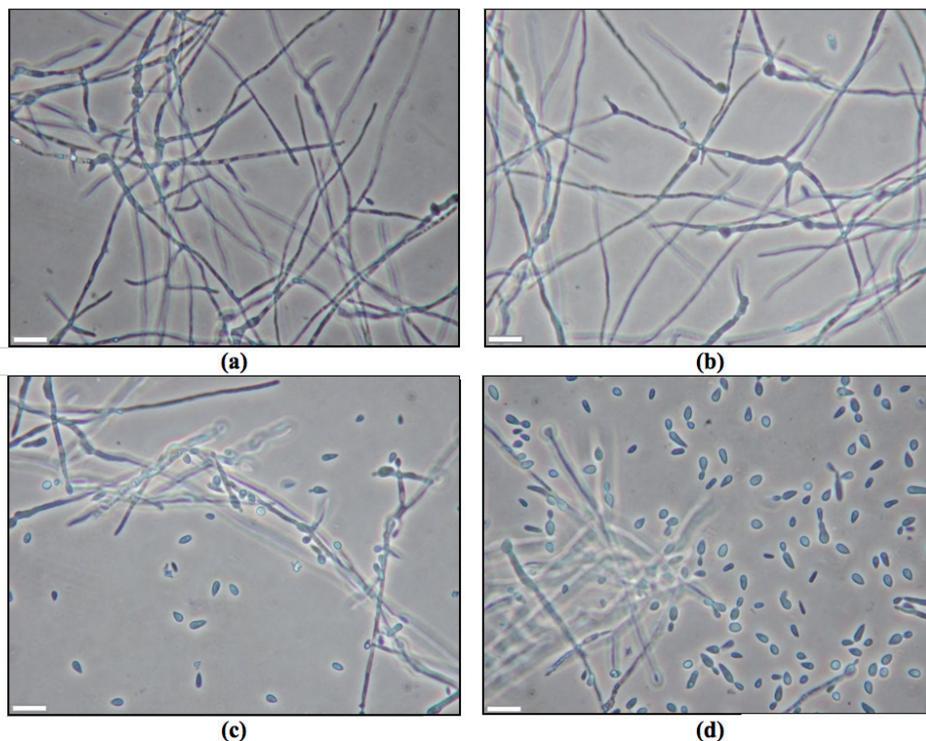


Figura 3. Morfología de *O. piceae* creciendo en medio de cultivo complejo. (a) Tratamiento con niveles bajos de tamaño del inóculo y temperatura. (b) Tratamientos con niveles bajos de tamaño del inóculo y nivel alto de temperatura. (c) Tratamientos con nivel alto de tamaño del inóculo y nivel bajo de temperatura. (d) Tratamientos con niveles altos de tamaño del inóculo y nivel alto de temperatura. (400X). Escala 10 μm .

La gráfica de la superficies de contorno (Figura 4a) muestra los contornos de respuesta para la razón levadura/micelio (%), en función de las distintas combinaciones de los factores temperatura y tamaño del inóculo. Las líneas de contorno también muestran que la magnitud de los efectos de las variables se hace más comparable a medida que aumentan el tamaño del inóculo y la temperatura.

Por otro lado, la gráfica de la superficie de respuesta (Figura 4b) proporciona una visión holística del efecto conjunto, para el rango de estudio del experimento factorial, de las variables tamaño del inóculo y temperatura.

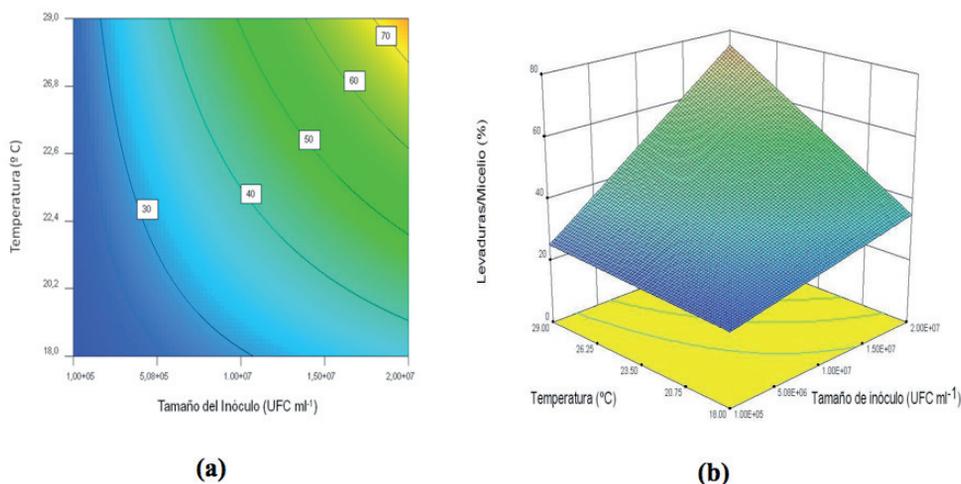


Figura 4. Gráfica de superficie de contorno (a) y gráfica de superficie de respuesta (b) para los resultados del experimento de producción de levaduras de la cepa albina PcF2A29 de la especie *O. piceae* en medio de cultivo líquido complejo.

El nivel alto del tamaño del inóculo (2×10^7 UFC ml⁻¹) junto con el nivel alto de la temperatura (29 °C) fueron las condiciones que generaron una mayor proporción levadura/micelio (75%).

Los resultados de este trabajo concuerdan en parte con lo publicado Kulkarni y Nickerson (1981), Nickerson *et al.* (1982), Muthukumar y Nickerson (1984), Muthukumar *et al.* (1985), Jensen *et al.* (1992). Las divergencias tienen su origen en las diferentes estrategias experimentales utilizadas. Los autores previamente indicados, utilizaron la estrategia experimental del estudio de una variable a la vez, procedimiento experimental que no permite conocer y cuantificar la existencia de interacciones. En nuestro trabajo por el contrario, se consideró la estrategia experimental de los diseño factoriales que si tienen esta capacidad y que en nuestro caso permitió detectar el efecto de la interacción tamaño del inóculo-temperatura, aspecto no verificado en estas investigaciones. En el primer trabajo indicado previamente (Kulkarni y Nickerson 1981) se estudió, para una cepa de la especie *O. ulmi* creciendo en medio líquido, el efecto del tamaño del inóculo sobre la morfología del crecimiento. En este estudio y en los que les siguieron (Nickerson *et al.* 1982, Muthukumar y Nickerson 1984, Muthukumar *et al.* 1985 y Jensen *et al.* 1992), realizados para explicar el origen de este efecto, siempre se utilizó a una temperatura constante de 25° C. Los resultados obtenidos con esta temperatura mostraron que en el nivel alto del tamaño del inóculo ($\geq 1 \times 10^6$ UFC ml⁻¹) y medio de cultivo líquido definido con prolina como fuente de nitrógeno, *O. ulmi* crecía mayormente con una morfología levaduriforme.

Por otra parte nuestros resultados si concuerdan con lo informado por Hornby *et al.* (2001). Este investigador encontró que la morfología levaduriforme del hongo *Candida albicans* era afectada por la interacción de las variables tamaño del inóculo-temperatura. Este patógeno, que crece en forma micelial a 37 °C, lo hace en su morfología levaduriforme excretando al medio gastado la molécula de detección al quórum (E,E)-farnesol, cuando su concentración celular es igual o excede la concentración de 1×10^7 UFC ml⁻¹. El hecho fue comprobado inhibiendo el crecimiento micelial con la adición de farnesol al medio líquido.

Nuestros resultados también concuerdan con las tendencias observadas en los estudios de evaluación del efecto de la temperatura sobre el control del dimorfismo en los hongos patógenos para el ser humano: *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitides*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporothrix schenckii* y *Coccidioides immitis*. En todos estos ensayos se encontró que la fase micelial y levaduriforme se producían a temperaturas bajas (20-25 °C) y altas (37 °C), respectivamente (Cano y de Aguiar 1991, Deacon 2006, Nguyen y Sil 2008).

Hornby *et al.* (2004) han concluido que el efecto del tamaño del inóculo en *O. ulmi* es una manifestación de un sistema de detección de quórum mediado por una molécula extracelular excretada por el cultivo. Nickerson *et al.* (2006) señalan, por otra parte, que el efecto del tamaño del inóculo, para el control del dimorfismo y otras funciones vitales, es un fenómeno recurrente en hongos dimórficos. De igual modo, Sprague y Winans (2006) establecen que el efecto del tamaño del inóculo estaría asociado a un mecanismo de control de expresiones genéticas dependiente de la densidad celular denominado de "detección de quórum" ("*quorum sensing*") o de autoinducción, ruta de transducción de señales que estaría encargada de promover el crecimiento levaduriforme, así como también inhibir el crecimiento micelial.

La concordancia de nuestros resultados con aquellos de otros investigadores permitirían sugerir, para el comportamiento dimórfico de la cepa albina PcF2A29 de la especie *Ophiostoma piceae*, la existencia de un mecanismo de detección de quórum. La respuesta inicial a esta hipótesis deberá ser fortalecida con nuevos estudios que involucren más cepas albinas de otras especies del género *Ophiostoma*.

CONCLUSIONES

El tamaño del inóculo, la temperatura y la interacción tamaño del inóculo-temperatura tuvieron un efecto estadístico significativo sobre el crecimiento levaduriforme de la cepa albina PcF2A29 de la especie *O. piceae*. De éstas variables el tamaño del inóculo resultó ser el efecto más importante y explicó el 53% de la variabilidad observada. La temperatura y la interacción tamaño del inóculo-temperatura explicaron el 25 y 18% de la variabilidad observada, respectivamente.

Las mejores condiciones que promueven el crecimiento levaduriforme de esta cepa albina, en el contexto de los rangos estudiados, fueron los niveles altos del tamaño del inóculo (2×10^7 UFC ml⁻¹) y la temperatura (29 °C), para condiciones de pH inicial (5-7) y velocidad de agitación (100-200 rpm) constantes, puesto que su efecto no resultó ser estadísticamente significativo.

La concordancia de los resultados de esta investigación con aquellos de otros investigadores permiten sugerir, para el comportamiento dimórfico de la cepa albina PcF2A29 de la especie *O. piceae*, la existencia de un mecanismo de detección de quórum.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Escuela de Graduados y Departamento de Ingeniería en Maderas de la Universidad del Bio-Bio, al programa de becas de la OEA y al programa de becas del Instituto Tecnológico de Costa Rica por el apoyo financiero otorgado para el desarrollo de este trabajo de investigación.

BIBLIOGRAFÍA

Brasier, C.M.; Stephens, T.M. 1993. Temperature-growth responses distinguish the OPC and OPH sibling species within "*Ophiostoma piceae*". *Mycology Research* 97(12): 1416-1418.

Cano, M.I.N.; de Aguiar, M.S.M. 1991. Utilização de aminoácidos no estudo do crescimento do *Paracoccidioides brasiliensis* Influência sobre o dimorfismo. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 33(4): 319-324.

Deacon, J. 2006. *Fungal Biology*. Blackwell Publishing, Edinburgh, United Kingdom. 371p.

Design Expert® 8.0.1. 2010. Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA.

Held, B.; Twaites, J.; Farrel, R.; Blanchette, R. 2003. Albino strains of *Ophiostoma* species for biological control of sapstain fungi. *Holzforschung* 57(3): 237-242.

Hornby, J.M.; Jacobitz-Kizzier, S.M.; McNeel, D.J.; Jensen, E.C.; Treves, D.S.; Nickerson, K.W. 2004. Inoculum size effect in dimorphic fungi: Extracellular control of yeast-mycelium dimorphism in *Ceratocystis ulmi*. *Applied and Environmental Microbiology* 70(3): 1356-1359.

Hornby J.M.; Jensen, E.; Lisec, A.D.; Tasto, J.; Jahnke, B.; Shoemaker, R.; Dussault, P.; Nickerson, K. W. 2001. Quorum Sensing in the Dimorphic Fungus *Candida albicans* Is Mediated by Farnesol. *Applied and Environmental Microbiology* 67(7): 2982-2992.

Jensen, E.C.; Ogg, C.; Nickerson, K.W. 1992. Lipoyxygenase inhibitors shift the yeast/mycelium dimorphism in *Ceratocystis ulmi*. *Applied and Environmental Microbiology* 58(8): 2505-2508.

Kulkarni, R.K.; Nickerson, K.W. 1981. Nutritional control of dimorphism in *Ceratocystis ulmi*. *Experimental Mycology* 5(2): 148-154.

Lee, J.K.; Oh, E. S. 2000. Potentials for Biological Control of Blue Stain on Woods Caused by *Ophiostomatoid* Fungi. *Plant Pathology Journal* 16(4): 200-205.

McMahon, T.; Halstead, N.; Johnson, S.; Raffel, T.R.; Romansic, J.M.; Crumrine, P.W.; Boughton, R.K.; Martin, L.B.; Rohr, J.R. 2011. The Fungicide Chlorothalonil is Nonlinearly Associated with Corticosterone Levels, Immunity, and Mortality in Amphibians. Environmental Health Perspectives. National Institutes of Health U.S. Department of Health and Human Services, USA. 29 p.

McNeel, D.J. 1983. Effect of inoculum size on dimorphism in *Ceratocystis ulmi*. MSc. Thesis. University of Nebraska-Lincoln, USA. 67p.

Muthukumar, G.; Kulkarni, R.K.; Nickerson, K.W. 1985. Calmodulin levels in the yeast and mycelial phases of *Ceratocystis ulmi*. *Journal of Bacteriology* 162(1): 47-49.

Muthukumar, G.; Nickerson, K.W. 1984. Ca(II)-Calmodulin regulation of fungal dimorphism in *Ceratocystis ulmi*. *Journal of Bacteriology* 159(1): 390-392.

Nadal, M.; García-Pedrajas, M.D.; Gold, S.E. 2008. Dimorphism in fungal plant pathogens. *FEMS Microbiology Letters* 284(2): 127-134.

Navarrete, J.; Segura, A.; Martínez, P.; Vera, R.; Segovia, C.; Herrera, P.; Reyes, L.; McNew, D.; Harrington, T.C.; Farrell, R.L.; Thwaites, J.M.; Held, B.; Blanchette, R.A. 2008. Control biológico de la mancha azul en madera aserrada de *Pinus radiata* D. Don En: The International Research Group on Wood Protection IRG/WP 08-10681 Americas Regional Meeting. Playa Flamingo Guana- caste, Costa Rica.

Nguyen, V.Q.; Sil, A. 2008. Temperature-induced switch to the pathogenic yeast form of *Histo- plasma capsulatum* requires Ryp1, a conserved transcriptional regulator. *PNAS* 105(12): 4880-485.

Nickerson, K.W.; Atkin, A.L.; Hornby, J.M. 2006. Quorum sensing in dimorphic fungi: Farnesol and beyond. *Applied and Environmental and Environmental Microbiology* 72(6): 3805-3813.

Nickerson, K.W.; McNeel, D.J.; Kulkarni, R.K. 1982. Fungal dimorphism in *Ceratocystis ulmi*: Cerulenin sensitivity and fatty acid sintesis. *FEMS Microbiology Letters* 13(1): 21-25.

Scheffer, T.C. 1973. Microbial Degradation. In: Wood Deterioration and Its Prevention by Pre- servative Treatments. Vol. I. Degradation and Protection of Wood. ed. by D. D. Nicholas, Syracuse University Press, Syracuse, NY, USA. pp: 31-45.

Seifert, K.A. 1993. Sapstain of commercial lumber by species of *Ophiostoma* and *Ceratocystis*. In: *Ceratocystis* and *Ophiostoma*; Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity. ed. by M. J. Wingfield, K. A. Seifert, and J. F. Webber. APS Press, St. Paul., MN, USA. 304p.

Sprague, G.F.Jr.; Winans, S.C. 2006. Eukaryotes learn how to count: Quorum sensing by yeast. *Genes & Development* 20: 1045-1049.

Tamerler, C.; Martinez, A.; Keshavarz, T. 2001. Production of lipolytic enzymes in batch cultu- res of *Ophiostoma piceae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 76(9): 991-996.

Zimmerman, W.C.; Blanchette, R.A.; Burnes, T.A.; Farrell, R.L. 1993. Melanin and perithecial development in *Ophiostoma piliferum*. *Mycologia* 87(6): 857-863.

Zink, P.; Fengel, D. 1988. Studies on the colouring matter of blue-stain fungi. Part I. General characterization and the associated compounds. *Holzforschung* 42(4): 217-220.

Zipfel, R.D.; De Beer, Z.W.; Jacobs, K.; Wingfield, B.D.; Wingfield, M.J. 2006. Multi-gene phylogenies define *Ceratocystiopsis* and *Grosmania* distinct from *Ophiostoma*. *Studies in Mycology* 55(1): 75-97.