



7º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

**Gestión del monte: servicios
ambientales y bioeconomía**

26 - 30 junio 2017 | Plasencia
Cáceres, Extremadura

7CFE01-454

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales
Plasencia. Cáceres, Extremadura. 26-30 junio 2017
ISBN 978-84-941695-2-6

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Antagonismo in vivo de hongos endófitos frente a *Fusarium circinatum*.

FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, R. A.^{1,2,*}, MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, P.^{1,2}, DIEZ, J. J.^{1,2}

¹ Instituto Universitario de Investigación de Gestión Forestal Sostenible. Universidad de Valladolid- INIA. Avda. Madrid s/n, 34004 Palencia (Palencia).

² Dpto. de Producción Vegetal y Recursos Forestales. E.T.S. de Ingenierías Agrarias, Avda. Madrid 57, 34004 Palencia (Palencia).

Resumen.

La enfermedad del Chancro Resinoso del Pino (CRP) es en la actualidad, una enfermedad extendida a nivel mundial. El organismo causante de dicha enfermedad es un hongo ascomicete denominado *Fusarium circinatum*, mientras que el hospedante más susceptible a ésta es *Pinus radiata*. En junio de 2012 se realizó la plantación de un total de 1500 plantas de pino (*P. radiata*, *P. sylvestris*, *P. pinaster*, *P. pinea*, *P. nigra*) de dos savias en un monte de Cantabria donde ya había sido detectado anteriormente el patógeno. En julio de 2013 se realizó primero la inoculación de las plantas con seis endófitos y posteriormente, en septiembre del mismo año, con el patógeno. Se realizaron cuatro visitas a la parcela de ensayo y se evaluaron los daños causados por el patógeno a partir de la variable área debajo de la curva de la enfermedad (AUDPC), que se empleó en un análisis de la varianza (ANOVA). Los resultados obtenidos confirmaron que *P. radiata* es la especie de pino más susceptible a *F. circinatum*. Igualmente *P. sylvestris* y *P. pinaster* resultaron susceptibles a la enfermedad. Dos de los seis aislamientos de hongos endófitos evaluados (*Chaetomium aureum* y *Alternaria* sp.) redujeron significativamente los síntomas de *F. circinatum* sobre *P. radiata*, convirtiéndose en potenciales agentes de control biológico (BCA's) de la enfermedad del CRP.

Palabras clave: Agentes de control biológico, chancro resinoso del pino, inoculación, patógeno, *Pinus* sp.

1. Introducción.

La enfermedad del CRP es una grave patología causada por el hongo ascomicete *F. circinatum* (teleomorfo = *Gibberella circinata* Nirenberg & O'Donnell), principalmente sobre especies del género *Pinus*, y sobre *Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco (abeto de Douglas). La enfermedad afecta con gran virulencia a la especie *P. radiata* D. Don, que es la conífera más plantada en todo el mundo (CRITCHFIELD & LITTLE, 1966). En la actualidad se extiende por gran parte de la geografía mundial (Figura 1).



Figura 1. Distribución mundial de *F. circinatum*.

44 Esta enfermedad genera daños sustanciales e importantes pérdidas económicas en las
 45 plantaciones de pino (DWINELL *et al.*, 1985), causando deformaciones en el tronco (Figura 2) y
 46 abundantes exudaciones de resina (HEPTING & ROTH, 1946) (Figura 3). Otros síntomas comunes
 47 son la muerte regresiva (dieback), marchitamiento y decoloración de las acículas (WINGFIELD *et*
 48 *al.*, 2008) (Figura 4). El chancro termina por anillar el tronco provocando la muerte del árbol. En
 49 vivero *F. circinatum* puede reducir la germinación de las semillas, causar la torsión y muerte
 50 (damping-off) de pre- y post-emergencia, marchitamiento, fogonazos y muerte regresiva apical de
 51 las plantas (VILJOEN *et al.*, 1994).
 52



53
 54 **Figura 2.** a) Deformación en tronco causado por *F. circinatum* y b) fractura del tronco a consecuencia del
 55 debilitamiento.

56



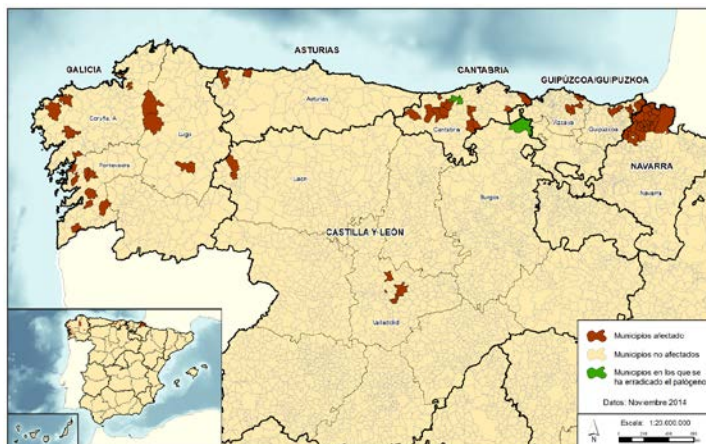
57
 58 **Figura 3.** Chancros en tronco de *P. radiata*: detalle de la fuerte resinación que origina *F. circinatum*.



59
 60 **Figura 4.** Marchitamiento y puntisecado provocado por *F. circinatum*.

61

62 En España la enfermedad del CRP queda limitada al norte peninsular afectando a
 63 plantaciones de *P. radiata* y *P. pinaster*, aunque en alguna ocasión se la ha detectado y
 64 erradicado de algún vivero del centro del país (Figura 5). Su diversidad es muy reducida
 65 (ITURRITXA *et al.*, 2011), encontrándose sólo dos grupos diferentes de genotipos, MLG32 y
 66 MELG59 (BERBEGAL *et al.*, 2013), lo cual hace creer que *F. circinatum* fue introducido al menos
 67 dos veces en España.
 68



69
 70 **Figura 5.** Distribución de la enfermedad del CRP en España. Fuente: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio
 71 Ambiente, Noviembre de 2014.

72 2. Objetivos.

73
 74 El objetivo general del presente trabajo fue evaluar el efecto de diversos endófitos
 75 seleccionados en el laboratorio en un ensayo previo realizado *in vitro* en el que se probaron un
 76 total de 546 hongos endófitos (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2016) como posibles BCA's. Además
 77 como objetivos específicos, se plantearon por un lado comprobar el efecto de la especie de pino
 78 sobre la patogenicidad de *F. circinatum*, por otro lado comprobar el efecto de los hongos
 79 endófitos sobre las especies de pino utilizadas, y por último determinar el potencial de seis
 80 hongos endófitos como BCA's del CRP.
 81

82 3. Material y métodos.

83 3.1. Zona de estudio.

84 El ensayo se realizó en una parcela de 3,41 ha de superficie, situada en el término
 85 municipal de Rionansa, en el extremo occidental de Cantabria (Figura 6, Tabla 1) y cedida por la
 86 Dirección General de Montes del Gobierno de Cantabria.
 87
 88
 89



90
 91 **Figura 6.** Ortofoto de la parcela de ensayo. Fuente: <http://mapas.cantabria.es/> (modificado).

92 **Tabla 1.** Características de la parcela de ensayo. Coordenadas para el Huso UTM 30, Datum ETRS 89. Fuente: Atlas
93 Climático Digital de la Península Ibérica (Ninyerola et al., 2005).

Coord. X (UTM)	386979
Coord. Y (UTM)	4788566
Localidad	Puentenansa
Municipio	Rionansa
Altitud (m)	525-615
Orientación	Suroeste
Pendiente (%)	50
Precipitación Anual (mm)	1092
Temperatura media (°C)	11
Temperatura mínima media (°C)	5
Temperatura máxima media (°C)	17

94

95 3.2. Material fúngico.

96

97 3.2.1. Aislados de *Fusarium circinatum*.

98

99 Se seleccionó una cepa de *F. circinatum* extraída de un ejemplar de *P. radiata* afectado por
100 la enfermedad del CRP, recogido con anterioridad al ensayo en una plantación cercana a la
101 ubicación del experimento, evitando así introducir nuevas cepas del patógeno. La extracción de
102 ADN se hizo siguiendo el protocolo de VAINIO *et al.*, (1998), realizando después su amplificación
103 mediante la técnica de la PCR usando cebadores específicos para *F. circinatum*. Finalmente se
104 preparó una suspensión de esporas de *F. circinatum* (10^6 esporas/ml), para la inoculación del
105 patógeno sobre las plantas.

106

107 3.2.2. Hongos endófitos ensayados.

108

109 Se emplearon seis hongos endófitos, seleccionados por presentar un especial interés como
110 posibles BCA's tras los resultados obtenidos en un ensayo previo (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ *et al.*,
111 2016). Los endófitos empleados en este ensayo previo, fueron aislados de diferentes tejidos de
112 *Pinus* spp. (acículas, ramas, corteza, piñas y plántulas), en su mayoría en el Centro Forestal de
113 Calabazanos (Junta de Castilla y León) y algunos otros se obtuvieron de la colección del
114 Laboratorio de Entomología y Patología Forestal de la Universidad de Valladolid.

115

116 Estos hongos fueron: HP031 (*Trichoderma spirale* Bissett), HP047 (*Chaetomium aureum*
117 Chivers), HP066 (*Alternaria* sp.), HP143 (*Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg),
118 HP151 (*Trichoderma atroviride* P. Karst.) y HP155 (*Trichoderma viride* Pers.).

119

120 3.2.3. Especies de pino ensayadas.

121

122 Se plantaron cinco especies de pino (*P. radiata*, *P. sylvestris*, *P. nigra*, *P. pinaster*, *P. pinea*),
123 empleándose 1500 plantas, 300 plantas/especie distribuidas en tres bloques, teniendo así tres
124 repeticiones/especie, 100 plantas/repetición (Figura 7). Se realizó la plantación en junio de
125 2012 con planta de dos savias, y tanto al comienzo del ensayo en abril de 2013, como al final
126 del mismo en julio de 2014, se midió el diámetro del cuello de la raíz, altura total y altura en la
127 base de la copa viva de todas las plantas.

128

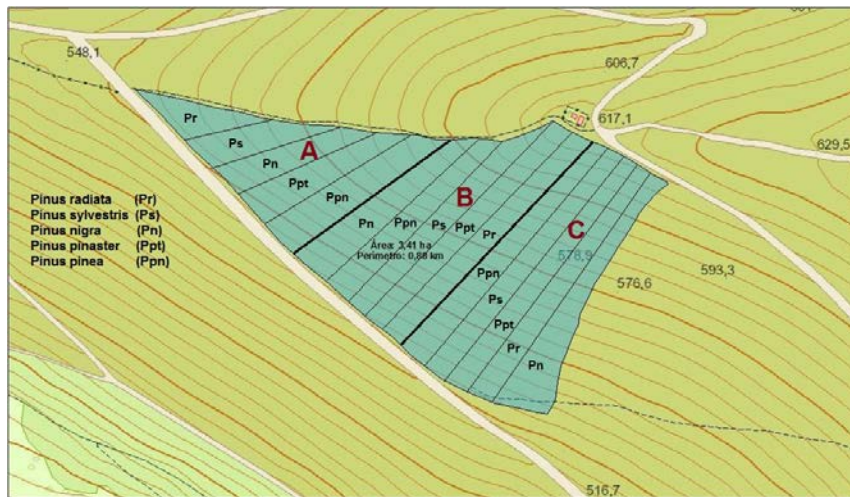


Figura 7. Replanteo de la distribución de los bloques. Fuente: <http://mapas.cantabria.es/> (modificado).

129

130

131

132 3.3. Inoculación de las plantas con los aislados fúngicos.

133

134 La inoculación de las plantas se llevó a cabo en dos fases. Primero se inocularon los
 135 hongos endófitos en julio de 2013. Se realizó un corte hasta el xilema en el tallo de la planta a
 136 unos 5 cm del suelo y se colocó un trozo de agar de unos 16 mm² con micelio del endófito,
 137 sellando la herida con Parafilm® (Figura 8). Para el control se utilizó un bloque de agar estéril.

138



139

140

141 **Figura 8.** Inoculación del endófito en la planta. De izqda. a dcha. y

142 abajo: corte en el tallo, inoculación con un trozo de micelio

143 cultivado sobre PDA y sellado del corte con Parafilm®.

144

145

146 En septiembre de 2013, se inoculó el patógeno *F. circinatum*. Se inoculó con 10 µl de
 147 suspensión de esporas (Figura 9) y para el control se utilizaron 10 µl de agua destilada estéril,
 148 sellando también la herida en ambos casos con Parafilm®. El patógeno se inoculó también en el
 149 xilema, dos centímetros por debajo de la zona de inoculación del endófito, según lo descrito en
 150 ensayos anteriores (ROMERALO *et al.*, 2015).
 151

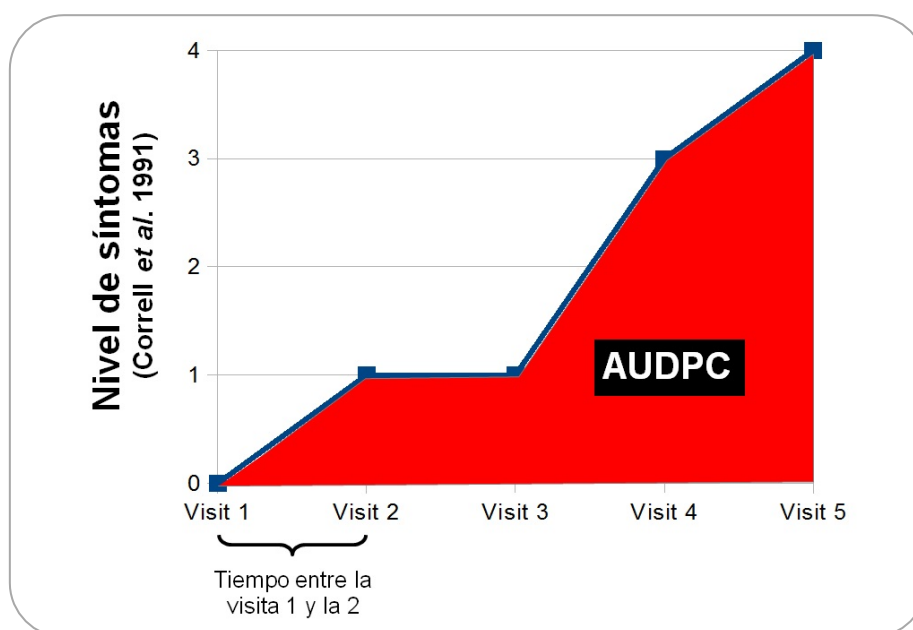


152
 153 **Figura 9.** Proceso de inoculación del patógeno en la planta. De izqda. a dcha.:
 154 corte en el tallo e inoculación con una disolución de esporas.

155
 156 Se hicieron un total de 14 tratamientos diferentes, resultado de enfrentar los 6 endófitos
 157 con el patógeno más los controles (sólo endófitos, sólo patógeno y ninguno de los dos hongos).
 158

159 3.4. Evaluación del efecto antagonista.

160
 161 Entre diciembre de 2013 y julio de 2014 se realizaron cuatro visitas a la parcela de
 162 ensayo. Siguiendo la metodología de CORRELL *et al.* (1991) se anotaron los síntomas de la
 163 enfermedad de acuerdo a la escala de daño: 0 (planta sana), 1 (follaje sano, necrosis en el punto
 164 de inoculación), 2 (follaje sano, necrosis >2 cm más allá del punto de inoculación), 3
 165 (acículas/ramillas marchitas y necrosis anillando el tallo) y 4 (planta muerta). El AUDPC se calculó
 166 mediante la suma de los trapecios que se formaron al representar la escala de daños en el eje de
 167 ordenadas frente al tiempo en el eje de abscisas (Figura 10).
 168



169
 170 **Figura 10.** Gráfica del AUDPC que se empleó para evaluar los daños.

171 3.5. Análisis estadístico.

172

173 Para analizar los datos, se empleó un modelo lineal mixto de ANOVA con tres factores en
 174 un diseño de parcelas divididas. Para el conjunto de la parcela, con un diseño de tres bloques
 175 divididos en filas al azar, se utilizó el factor “especies de pino” con cinco niveles distintos. Para
 176 las filas, con un diseño factorial dentro de cada bloque, se usó el factor “*F. circinatum*” con dos
 177 niveles (sí o no) y el factor “endófito” con siete niveles. Para resolver el problema de la alta
 178 heterogeneidad de varianzas debido a los factores “especies de pino” y “*F. circinatum*”, se
 179 utilizaron diferentes variaciones aleatorias para cada una de las diez combinaciones de estos dos
 180 factores. Se utilizó el Test LSD de Fisher para las comparaciones de las medias.

181

182 4. Resultados.

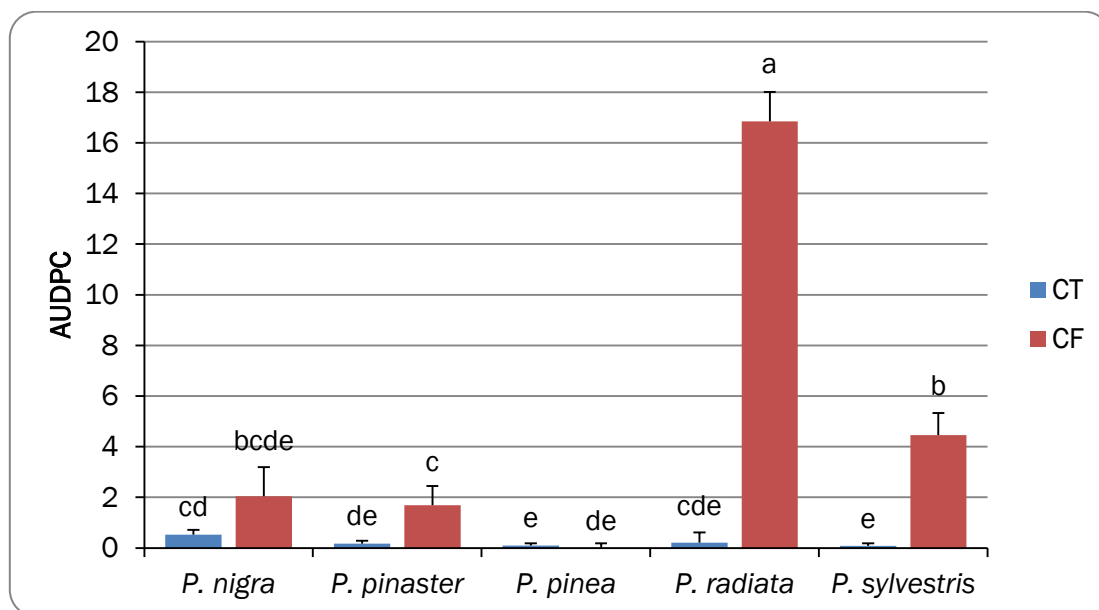
183

184 4.1. Susceptibilidad a *F. circinatum*.

185

186 El ANOVA encontró diferencias significativas (p -valor < 0.001) entre el efecto causado por
 187 *F. circinatum* en las 5 especies de pino evaluadas. Analizando los tratamientos en los que
 188 únicamente el patógeno fue inoculado, *P. radiata* resultó la más susceptible de las cinco
 189 especies probadas. El valor de la variable AUDPC para esta especie, fue casi cinco veces mayor
 190 que en el caso de la segunda, *P. sylvestris*. Estas dos especies junto con *P. pinaster*, han de
 191 considerarse susceptibles al patógeno, ya que el valor de la variable AUDPC fue
 192 significativamente mayor en el tratamiento en que se inoculó *F. circinatum* (CF) que en el
 193 tratamiento control (CT) (Figura 11).

194



195

196 **Figura 11.** Valor de la variable AUDPC para las cinco especies de pino, inoculadas con *F. circinatum* (CF) o en el
 197 tratamiento control (CT). Las barras de error representan los errores estándar. Las diferentes letras (a-e), denotan
 198 diferencias significativas ($p < 0.05$) entre todas las columnas (Test LSD de Fisher).

199

200 *Fusarium circinatum* también produjo una reducción en el crecimiento (diámetro en el
 201 cuello de la raíz, altura total y altura de la copa viva) de las plantas de pino. En el caso de
 202 *P. radiata*, el crecimiento en el diámetro del cuello de la raíz se redujo en un 50,6% ($t = 8,84$,
 203 $p < 0,001$) y el 48,6% en la altura total ($t = 8,30$, $p < 0,001$). Del mismo modo, el crecimiento de
 204 la altura de la copa viva de las plantas de *P. radiata* inoculadas con el patógeno fue 58,0%
 205 menos que en las plantas control ($t = 6,54$, $p < 0,001$). En las otras especies de pino, la
 206 reducción fue más pequeña y no estadísticamente significativa.

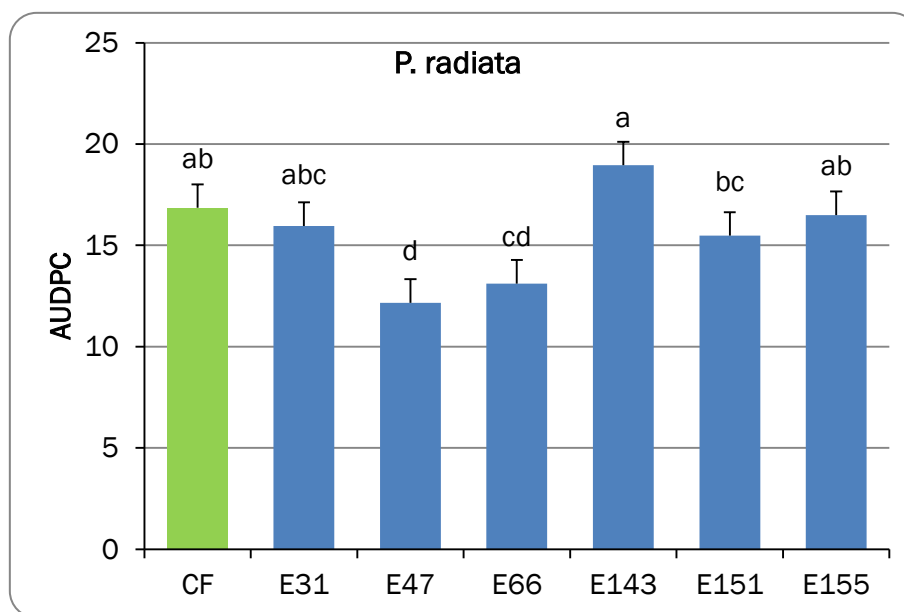
207

208

209 4.2. Control biológico con Endófitos.

210

211 En los tratamientos en los que se inoculó tanto el patógeno como los endófitos,
 212 únicamente sobre las plantas de *P. radiata* hubo dos endófitos que redujeron significativamente
 213 el daño causado por *F. circinatum* (AUDPC). Éstos fueron los aislados HP047 (p-valor < 0,005)
 214 perteneciente a la especie *Chaetomium aureum* y el HP066 (p-valor < 0,025) identificado como
 215 *Alternaria sp.*, que disminuyeron el daño en un 27,8% y un 22,2% respectivamente (Figura 12).
 216 Por el contrario, la reducción de crecimiento de las plantas de *P. radiata* causada por el patógeno
 217 no fue contrarrestada por ninguno de los endófitos testados.
 218



219

220 **Figura 12.** Valor de la variable AUDPC para la especie *P. radiata* cuando las plantas se inocularon sólo con
 221 *F. circinatum* (CF) o con los distintos endófitos además de *F. circinatum*. Las barras de error representan los errores
 222 estándar. Las diferentes letras (a-d) denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre todas las columnas (Test LSD
 223 de Fisher).

224

225 En las plantas de *P. sylvestris*, inoculadas con el endófito HP031 y *F. circinatum* también
 226 se produjo una reducción del 47,8% para el valor de la variable AUDPC, siendo más bajo que el
 227 valor obtenido en las plantas inoculadas sólo con el patógeno (p-valor = 0,081). Para las tres
 228 especies restantes, no se detectó reducción con ninguno de los seis endófitos.
 229

230

230 5. Discusión.

231

232 Las especies de pino probadas en este ensayo se encuentran entre las 57 consideradas
 233 susceptibles a *F. circinatum* (WINGFIELD *et al.*, 2008). Pese a esto, nuestros resultados
 234 demuestran que los daños causados por el patógeno a las especies *P. pinea* y *P. nigra* no son
 235 significativamente más altos que en los tratamientos control, acorde a lo ya expuesto por
 236 ITURRITXA *et al.* (2012; 2013). En otro ensayo llevado a cabo por CARLUCCI *et al.* (2007), no se
 237 encontraron síntomas de susceptibilidad en *P. nigra*, pero sí en *P. pinea*. Por el contrario, un
 238 nuevo ensayo (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2014) encontró que *P. nigra* resultó ser, tras *P. radiata*,
 239 la segunda especie más susceptible al patógeno del CRP. Los resultados obtenidos en estos
 240 experimentos, muestran que la susceptibilidad de las diferentes especies de pino, puede
 241 depender sustancialmente de diversos factores (procedencia y edad de las plantas, modo de
 242 inoculación o condiciones ambientales). Queda comprobado que *P. radiata* es la especie de pino
 243 más susceptible a la enfermedad del CRP. De hecho el rango de mortalidad obtenido en el
 244 presente estudio, para las plantas de ésta especie (74%), resultó muy similar a la obtenida antes
 245 por otros autores (HODGE & DVORAK, 2000; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2014).



246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259

A diferencia de *P. radiata*, las otras dos especies susceptibles, *P. sylvestris* y *P. pinaster*, no mostraron una reducción significativa del crecimiento, lo cual nos puede indicar que ambas especies presentan menor grado de susceptibilidad a *F. circinatum*, al menos en las condiciones en las que se desarrolló este estudio. Anteriormente ITURRITXA *et al.* (2012) comprobó que *P. sylvestris* y *P. pinaster*, mostraban un grado intermedio de susceptibilidad al patógeno. Ambas especies también habían mostrado una susceptibilidad intermedia al patógeno bajo condiciones controladas en invernadero, mientras que *P. radiata* y *P. pinaster* mostraron una susceptibilidad severa en campo (ITURRITXA *et al.*, 2013). Por otro lado, PÉREZ-SIERRA *et al.* (2007) comprobó la virulencia de *F. circinatum* sobre plantas de entre siete y ocho meses de edad, de *P. sylvestris* y *P. pinaster*, además de *P. nigra* y *P. radiata*, resultando igualmente susceptibles a la inoculación artificial del patógeno. Estos estudios corroboran casi por completo los resultados obtenidos en el presente trabajo, a excepción del caso de *P. nigra*.

260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270

Los endófitos que redujeron significativamente los daños causados por *F. circinatum* en las plantas de *P. radiata* fueron dos, HPO47 y HPO66. Pertenecen a las especies *Chaetomium aureum* y *Alternaria* sp. respectivamente, y ambas han sido ya reconocidas como BCA's. En el caso del primero, *C. aureum*, anteriores ocasiones resultó ser un efectivo controlador biológico contra el patógeno del tizón de arroz, *Magnaporthe grisea* (T.T. Hebert) M.E. Barr, y contra el patógeno del tizón de la vaina, *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn, tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* (WANG *et al.* 2013). Por otro lado, algunas especies del género *Alternaria*, ya han sido usadas como antagonistas con otros patógenos de plantas, debido a que algunos metabolitos muestran diversas actividades biológicas como propiedades fitotóxicas, citotóxicas y antimicrobianas (CAMPANILE *et al.*, 2007; CAMPANILE *et al.*, 2007; LOU *et al.*, 2013).

271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282

A pesar de que los aislados de *Trichoderma* habían obtenido buenos resultados en el ensayo *in vitro* (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2016), estos no tuvieron la misma efectividad en las condiciones *in vivo*. Tal vez la metodología de inoculación llevada a cabo en el presente estudio, haya podido ser la razón para el diferente comportamiento de estos aislados. Pese a ser hongos capaces de colonizar el floema e incluso la albura de los árboles, (JANKOWIAK, 2006), *Trichoderma* spp. son hongos típicos de suelo, presentes habitualmente en la rizosfera (HARMAN *et al.*, 2004). Por esta razón pueden haber resultado insuficientes 42 días para que el endófito se establezca en el hospedante y colonice los tejidos que el patógeno fuera a atacar. Quizás la mejor manera para utilizar este grupo específico de endófitos como BCA's, sea usar en la producción de plantas un sustrato al que se añadan los aislados de *Trichoderma* que sean de interés, como ya se probó en el estudio realizado por Martínez-Álvarez *et al.* (2012).

283
284
285
286
287
288

En vista de los resultados obtenidos en el presente estudio, resulta prometedor el empleo de hongos endófitos como controladores biológicos de la enfermedad del CRP, precisando aún de más investigación. Igualmente se deberían ensayar diferentes métodos para la aplicación de los antagonistas, además de probar muchos otros endófitos a fin de encontrar un BCA más efectivo para la enfermedad.

289

6. Conclusiones.

290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300

1. *Pinus radiata* resultó la especie de pino más susceptible de las seis al patógeno, siendo en la que más síntomas mostró y también en la que más redujo el crecimiento de las plantas *F. circinatum*. *P. sylvestris* y *P. pinaster* resultaron susceptibles al CRP, siendo la segunda y la tercera especie respectivamente, en que más síntomas mostró el patógeno, pese a lo cual el crecimiento de las plantas no se vio afectado. *P. pinea* y *P. nigra* fueron las dos únicas especies de pino que mostraron resistencia a la inoculación de *F. circinatum*.

2. Ninguno de los seis hongos endófitos utilizados causó daño alguno a las plantas al ser inoculados solos sin *F. circinatum*, ya que las diferencias entre el AUDPC para el CT y para los controles de los respectivos endófitos, no fueron significativas.

301
302 3. Dos de los seis aislamientos de hongos endófitos testados, pertenecientes a las
303 especies *C. aureum* y *Alternaria* sp. redujeron significativamente los síntomas causados por *F.*
304 *circinatum* sobre las plantas de *P. radiata*. Estos aislamientos tienen potencial para ser utilizados
305 como BCA's de la enfermedad, pero todavía necesitan ser estudiados más a fondo.

306
307 **7. Agradecimientos.**
308



"Una manera de hacer Europa"

REF. PROYECTO: AGL2015-69370-R



312
313
314
315
316

309

310



317
318
319

311



320 **8. Bibliografía.**

321
322 BERBEGAL, M.; PÉREZ-SIERRA, A.; ARMENGOL, J. and GRÜNWARD, N.J. 2013. "Evidence
323 for Multiple Introductions and Clonality in Spanish Populations of *Fusarium circinatum*."
324 *Phytopathology* 103 (8): 851–61. doi:10.1094/PHYTO-11-12-0281-R.

325
326 CARLUCCI, A.; COLATRUGLIO, L.; FRISULLO, S.; 2007. "First Report of Pitch Canker
327 Caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus halepensis* and *P. pinea* in Apulia (Southern
328 Italy)." *Plant Disease* 91: 1683.

329
330 CORRELL, J.C.; GORDON, T.R.; MCCAIN, A.H.; FOX, J.W.; KOEHLER, C.S.; WOOD, D.L.;
331 SCHULTZ, M.E.; 1991. "Pitch Canker Disease in California: Pathogenicity, Distribution,
332 and Canker Development on Monterey Pine (*Pinus radiata*)." *Plant Disease* 75: 676–682.

333
334 CRITCHFIELD, W.E. and LITTLE, E.L.; 1966. "Geographic Distribution of the Pines of the
335 World". *USDA Forest Service* 991: 1-97. Washington D.C. doi:10.5962/bhl.title.66393.

336
337 DWINELL, L. D.; 1985. "Pitch Canker: A Disease Complex of Southern Pines." *Plant*
338 *Disease*. doi:10.1094/PD-69-270.

339
340 HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; and LORITO, M.; 2004. "*Trichoderma*
341 *Species–Opportunistic, Avirulent Plant Symbionts.*" *Nature Reviews. Microbiology* 2 (1):
342 43–56. doi:10.1038/nrmicro797.

343
344 HEPTING, G.H.; ROTH, E.R.; 1946. "Pitch Canker, a New Disease of Some Southern
345 Pines." *Journal of Forestry* 44: 724–44.

346
347
348

- 349 HODGE, G.R.; DVORAK, W.S.; 2000. "Differential Responses of Central American and
350 Mexican Pine Species and *Pinus radiata* to Infection by the Pitch Canker Fungus." *New*
351 *Forests* 19: 241–58.
- 352
- 353 ITURRITXA, E.; GANLEY, R. J.; RAPOSO, R.; GARCÍA-SERNA, I.; MESANZA, N.; KIRKPATRICK,
354 S. C. and GORDON. T. R.; 2013. "Resistance Levels of Spanish Conifers against *Fusarium*
355 *circinatum* and *Diplodia pinea*." *Forest Pathology* 43 (6): 488–95.
356 doi:10.1111/efp.12061.
- 357
- 358 ITURRITXA, E.; MESANZA, N.; ELVIRA-RECUENCO, M.; SERRANO, Y.; QUINTANA, E. and
359 RAPOSO, R.; 2012. "Evaluation of Genetic Resistance in *Pinus* to Pitch Canker in Spain."
360 *Australasian Plant Pathology* 41 (6): 601–7. doi:10.1007/s13313-012-0160-4.
- 361
- 362 ITURRITXA, E.; GANLEY, R.J.; WRIGHT, J.; HEPPE, E.; STEENKAMP, E.T.; GORDON, T.R. and
363 WINGFIELD, M.J.; 2011. "A Genetically Homogenous Population of *Fusarium circinatum*
364 Causes Pitch Canker of *Pinus radiata* in the Basque Country, Spain." *Fungal Biology* 115
365 (3): 288–95. doi:10.1016/j.funbio.2010.12.014.
- 366
- 367 JANKOWIAK, R.; 2006. "Fungi Associated with *Tomicus piniperda* in Poland and
368 Assessment of Their Virulence Using Scots Pine Seedlings." *Annals of Forest Science* 63
369 (7): 801–8. doi:10.1051/fores:2006063.
- 370
- 371 LOU, J.; FU, L.; PENG, Y. and ZHOU, L.; 2013. "Metabolites from *Alternaria* Fungi and Their
372 Bioactivities." *Molecules* 18 (5): 5891–5935. doi:10.3390/molecules18055891.
- 373
- 374 MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, P.; ALVES-SANTOS, F.M.; and J.J. DIEZ.; 2012. "In Vitro and In Vivo
375 Interactions between *Trichoderma viride* and *Fusarium circinatum*." *Silva Fennica* 46
376 (November 2011): 303–16. <http://www.metla.fi/silvafennica/full/sf46/sf463303.pdf>.
- 377
- 378 MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, P.; PANDO, V. and DIEZ, J.J.; 2014. "Alternative Species to Replace
379 Monterey Pine Plantations Affected by Pitch Canker Caused by *Fusarium circinatum* in
380 Northern Spain." *Plant Pathology*, 1086–94. doi:10.1111/ppa.12187.
- 381
- 382 MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, P.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, R.A.; SANZ-ROS, A.V.; PANDO, V. and
383 DIEZ, J.J.; 2016. "Two Fungal Endophytes Reduce the Severity of Pitch Canker Disease in
384 *Pinus radiata* Seedlings." *Biological Control* 94: 1–10.
385 doi:10.1016/j.biocontrol.2015.11.011.
- 386
- 387 NINYEROLA, M.; PONS, X.; ROURE, JM.; 2005. Atlas Climático Digital de la Península 371
388 Ibérica. Metodología y aplicaciones en bioclimatología y geobotánica. ISBN 932860-8-7.
389 372 Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra.
- 390
- 391 PÉREZ-SIERRA, A.; LANDERAS, E.; LEÓN, M.; BERBEGAL, M.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J. and
392 ARMENGOL, J.; 2007. "Characterization of *Fusarium circinatum* from *Pinus* Spp. in
393 Northern Spain." *Mycological Research* 111 (Pt 7): 832–39.
394 doi:10.1016/j.mycres.2007.05.009.
- 395
- 396 ROMERALO, C.; SANTAMARÍA, O.; PANDO, V. and DIEZ, J.J.; 2015. "Fungal Endophytes
397 Reduce Necrosis Length Produced by *Gremmeniella abietina* in *Pinus halepensis*
398 Seedlings." *Biological Control* 80. Elsevier Inc.: 30–39.
399 doi:10.1016/j.biocontrol.2014.09.010.
- 400

- 401 VAINIO, E.J.; KORHONEN, K. and HANTULA, J.; 1998. "Genetic Variation in *Phlebiopsis*
402 *gigantea* as Detected with Random Amplified Microsatellite (RAMS) Markers."
403 *Mycological Research* 102 (2): 187–92. doi:10.1017/S0953756297004577.
404
- 405 VILJOEN, A.; WINGFIELD, M.J.; MARASAS, W.F.O.; 1994. "First Report of *Fusarium*
406 *subglutinans* F. Sp. *Pini* on Seedlings in South Africa." *Plant Disease* 78: 309–12.
407
- 408 WANG, Y.L.; LIU, S.Y.; MAO, X.Q.; ZHANG, Z.; JIANG, H.; CHAI, R.Y.; QIU, H.P.; WANG, J. Y.;
409 392 DU, X. F.; LI, B. and SUN, G. C.; 2013. "Identification and Characterization of
410 Rhizosphere Fungal Strain MF-91 Antagonistic to Rice Blast and Sheath Blight
411 Pathogens." *Journal of Applied Microbiology* 114 (5): 1480–90.
412 doi:10.1111/jam.12153.
413
- 414 WINGFIELD, M.J.; HAMMERBACHER, A.; GANLEY, R.J.; STEENKAMP, E.T.; GORDON, T.R.;
415 WINGFIELD, B.D. and COUTINHO, T.A.; 2008. "Pitch Canker Caused by *Fusarium*
416 *circinatum* – a Growing Threat to Pine Plantations and Forests Worldwide." *Australasian*
417 *Plant Pathology* 37: 319–34.
418

