



7º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

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

26 - 30 junio 2017 | Plasencia
Cáceres, Extremadura

7CFE01-457

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

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Endofitismo de *Fusarium circinatum* en el sustrato herbáceo de plantaciones enfermas de *Pinus radiata*

HERNÁNDEZ, L.¹, ITURRITXA, E.², ELVIRA-RECUENCO, M.¹ y RAPOSO, R.^{1,3}

¹ Silvicultura y Gestión de los Sistemas Forestales, INIA-CIFOR, Ctra. La Coruña, Km.7.5, 28040, Madrid, España.

² NEIKER, Granja Modelo de Arkaute. Apdo 46. 01080 Vitoria-Gasteiz, España.

³ iuFOR. Instituto Universitario de Investigación en Gestión Forestal Sostenible, Universidad de Valladolid-INIA

Resumen

Fusarium circinatum, agente causante de la enfermedad del chancro resinoso del pino, afecta a plantaciones del norte de la Península Ibérica, donde *Pinus radiata*, de alta susceptibilidad al patógeno, es frecuente. Recientemente se ha detectado en Sudáfrica y California la presencia de *Fusarium circinatum* como endófito en plantas pertenecientes a la familia Poaceae, sin causar daños aparentes. Estas plantas pueden servir como fuente de inóculo y dispersar la enfermedad a nuevas áreas de pinares no infectados. El objetivo de este trabajo es confirmar la presencia de *Fusarium circinatum* como endófito en plantas que crecen bajo árboles sintomáticos de *Pinus radiata*, así como evaluar la variabilidad genética de los aislados mediante marcadores moleculares. Los resultados mostraron la habilidad de *Fusarium circinatum* de vivir como endófito en plantas de *Agrostis capillaris* y *Pseudarrhenatherum longifolium* (Poaceae), y además se detectó por primera vez en especies pertenecientes a otras familias como *Rubus ulmifolius* (Rosaceae), *Teucrium scorodonia* (Lamiaceae), *Centaurea debeauxii* (Asteraceae) e *Hypochaeris radicata* (Asteraceae). Estos resultados evidencian el riesgo potencial de dispersión de la enfermedad a través de especies que sirvan como reservorio de inóculo y contribuyen al entendimiento de la epidemiología de la enfermedad.

Palabras clave

Pino de Monterrey, chancro resinoso, huéspedes alternativos, reservorio de inóculo.

1. Introducción

Fusarium circinatum Nirenberg & O'Donnell es un conocido patógeno causante de la enfermedad del chancro resinoso del pino, reconocida como una de las enfermedades más graves de coníferas que afecta a viveros y plantaciones forestales de diversos países del mundo (Wingfield et al. 2008). La enfermedad se registró por primera vez en Estados Unidos en 1946 (Hepting et al. 1946) y desde entonces se ha detectado en Haití (Hepting & Roth 1953), Japón (Kobayashi & Muramoto 1989), Sudáfrica (Viljoen et al. 1994), México (Guerra-Santos 1999), Chile (Wingfield et al. 2002), Italia (Carlucci et al. 2007), Uruguay (Alonso et al. 2009), Portugal (Bragança et al. 2009) y Brasil (Pfenning et al. 2014). En España la enfermedad fue oficialmente registrada por primera vez en Asturias en 2005 (Landeras et al. 2005), aunque existen referencias de una anterior aparición en Galicia en 1998 (MAPA, 1996) y País Vasco. Desde entonces la enfermedad se ha dispersado por el norte de la Península Ibérica suponiendo una seria amenaza para las plantaciones de *Pinus*, especialmente de *P. radiata* (Landeras et al. 2005). Los árboles pueden verse afectados en cualquier etapa de su desarrollo desde el estado de plántula al árbol maduro. El ataque del patógeno provoca caída y secado del brote terminal en plántulas, chancros con abundante resinación en el tronco y ramas principales y marchitez en árbol adulto, llegando en ocasiones a causar la muerte del árbol lo que conlleva importantes pérdidas económicas y medioambientales. Por ello, la posible dispersión del patógeno a áreas de plantaciones no infectadas es una importante causa de preocupación.

Fusarium circinatum es considerado exclusivamente un patógeno de pino (53 especies) y *Pseudotsuga menziesii*, siendo *Pinus radiata* una de las especies más susceptible al patógeno (Wingfield et al. 2008). Un endófito es definido como un organismo capaz de colonizar tejidos sanos de una planta sin inducir síntomas en ella (Zabalgogezcoa 2008). Aunque siempre se ha hablado de *Fusarium circinatum* desde una perspectiva patogénica teniendo como único hospedante a las coníferas, lo cierto es que recientemente se ha detectado como endófito en plantas pertenecientes a la familia de las gramíneas (Poaceae) crecidas en el tapiz vegetal de las plantaciones enfermas de pino en Sudáfrica (Swett et al. 2014) y California (Swett & Gordon, 2012). También ha sido descrita, bajo condiciones de laboratorio, su capacidad de colonizar plantas de maíz como endófito sin inducir ningún síntoma aparente (Swett & Gordon, 2015). Pero hasta ahora no hay estudios que reflejen la relación de *Fusarium circinatum* con especies pertenecientes a familias diferentes de las gramíneas. *Fusarium circinatum* está filogenéticamente relacionado con otras especies del género *Fusarium*, como *Fusarium oxysporum* y *F. verticillioides* que es patógeno y endófito de diversas especies de gramíneas (Poaceae) (Gordon et al. 1997; Sweet & Gordon 2015).

La capacidad de *Fusarium circinatum* de vivir como endófito en especies no consideradas anteriormente como huésped es preocupante, ya que estas plantas podrían servir como reservorio y fuente de inóculo dispersando la enfermedad a áreas de pinares no infectados. Pero poco es sabido de esta interacción endofítica entre hongo y huésped y el consecuente papel que desempeña en la epidemiología de la enfermedad.

2. Objetivos

Los objetivos de este estudio son i) la identificación de cepas de *Fusarium circinatum* como endófito en especies de diversas familias que viven bajo el dosel arbóreo de una plantación infectada de *Pinus radiata* en País vasco; ii) confirmar la patogenicidad de estos aislados en pino; iii) determinar la estructura genética de la población mediante marcadores moleculares de tipo microsatélite (SSR, Single Sequence Repeat), comparándola con genotipos aislados de árboles de *Pinus radiata* sintomáticos.

3. Metodología

3.1. Muestreo del material vegetal:

Plantas de diversas familias se recolectaron bajo el dosel arbóreo de una plantación de *Pinus radiata* infectada con *Fusarium circinatum* en Vizcaya (País Vasco), a lo largo de tres muestreos en el año 2016 (Abril, Julio y Agosto). Se recolectó la planta entera distinguiendo entre raíz, tallo, hojas y semillas, en caso de tenerlas, para su proceso en el laboratorio. El material muestreado se almacenó a 4 °C y fue procesado en los días consecutivos a su recolección.

3.2. Aislamiento:

Para el aislamiento del hongo, se procedió primero a la desinfección superficial del material muestreado. Para cada planta, hojas y tallo se sumergieron durante 10 minutos en una suspensión de lejía comercial al 20% con Tween 20 (una gota por cada 100 µl) en agitación constante, y posteriormente se lavó el material en agua destilada estéril dos veces consecutivas para eliminar restos de lejía. En cuanto a las raíces, se lavaron primero bajo el grifo para eliminar cualquier partícula de sustrato adherida a ellas; a continuación, se sumergieron en etanol al 70% durante 1 minuto, seguido de lejía al 30% con Tween 20 durante 10 minutos y dos lavados consecutivos en agua destilada estéril. Para la desinfección de semillas, se juntaron todas las semillas que procedían de la misma planta y se sumergieron brevemente en etanol al 70%, seguido de lejía comercial con Tween 20 al 20% durante 3 minutos, y se lavaron con agua destilada estéril dos veces.

El material vegetal se dejó secar en condiciones estériles sobre papel de filtro y, una vez seco, se cortaron en segmentos de 5 mm en condiciones asépticas y se depositaron en placas Petri con

medio selectivo para *Fusarium* (FSM) (Aegerter & Gordon, 2006) y se incubaron a 25 °C. En el caso de las semillas, se trocearon con ayuda de un palillo grueso estéril y se depositaron en FSM.

Además de la población de aislados que procedían de planta del sustrato herbáceo, también se aislaron cepas de *Fusarium circinatum* procedentes de chancros de pinos enfermos. Se recolectaron un total de 45 chancros de distintos árboles sintomáticos de *Pinus radiata*. Se desinfestaron superficialmente sumergiéndolos en lejía comercial al 30% con Tween 20 durante 1 minuto, seguido de dos lavados en agua destilada estéril. De nuevo, se dejaron secar en condiciones estériles y fragmentos de 1 cm se depositaron en FSM e incubaron a 25 °C.

3.3. Identificación morfológica:

Para la caracterización morfológica, las colonias crecidas en FSM que pudieran ser *Fusarium circinatum* se replicaron en medio SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar) (Nirenberg 1981) para su confirmación. Este medio favorece la formación de circinos, hifas estériles características de esta especie. Se observó tras 7-10 días de incubación a 25 °C la presencia o ausencia de circinos mediante microscopía. A partir de cada aislado, se obtuvo el correspondiente cultivo monospórico, utilizado para el resto de los ensayos.

3.4. Identificación molecular:

La extracción de ADN se llevó a cabo a partir de micelio fresco crecido en PDA utilizando el kit E.Z.N.A. Plant DNA Kit (Omega Biotek) y siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN se almacenó a -20 °C hasta su utilización. La caracterización molecular de los aislados se desarrolló mediante PCR. Se utilizó la pareja de cebadores específicos para *Fusarium circinatum* CIRC1A (CTTGGCTCGAGAAGGG) y CIRC4A (ACCTACCCTACACCTCTCACT) (Schweigkofler et al., 2004). Estos cebadores amplifican un fragmento de ADN de 360 pares de bases en la región IGS ribosomal. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador Applied Biosystems Thermal Cycler (Veriti 96 well). Cada reacción de PCR contiene los reactivos buffer 1x, MgCl₂ 2mM, dNTP 1mM, 0,5µM de cada cebador, 0,05U/µl Taq polimerasa (BioLine), 1µl de DNA y agua libre de DNAsas-RNAsas hasta completar 25µl. Las condiciones de PCR consistieron en un ciclo inicial de 3 minutos a 94 °C, seguido de 45 ciclos de 35 segundos a 94 °C, 55 segundos a 66 °C y 50 segundos a 72 °C; más un paso final de 12 minutos a 72 °C. Los resultados se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa a una concentración del 1%. Los productos de PCR se purificaron con el kit Montage Genomic kit (Millipore Corporation, Bedford, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante y fueron secuenciados usando el primer CIRC1A. Las secuencias resultantes se compararon con las existentes en la base de datos de GenBank (NCBI) mediante la herramienta BLAST nucleotide.

3.5. Determinación del grupo de apareamiento:

Los genes responsables del apareamiento sexual se localizan en un único locus denominado MAT (mating type), para el que existen dos idiomorfos, MAT-1 y MAT-2. Se determinaron los idiomorfos MAT-1 y MAT-2 para cada aislado de *F. circinatum*. La determinación de los “mating types” o grupos de apareamiento se realizó mediante PCR multiplex utilizando las parejas de cebadores específicos MAT1p1-MAT1p3 (Wallace et al., 2000) y GcHMG1-GcHMG2 (Covert et al., 1999) para los alelos MAT-1 y MAT-2, respectivamente. Cada reacción de PCR de 25 µl contenía PCR buffer 1x, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,4 mM de cada cebador, 1 U Taq polimerasa y 1 µl de ADN. Las condiciones consistieron en un paso inicial de 3 min a 94 °C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C 30 segundos, anillamiento a 61 °C 50 segundos y elongación a 72 °C durante 50 segundos, terminando con un paso de extensión final a 72 °C durante 12 min. Los productos amplificados se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. En los aislados MAT-1 se amplifica un fragmento de 380 pares de bases, mientras que para el idiomorfo MAT-2 la banda es de 190 pares de bases.

3.6. Test de patogenicidad:

Se comprobó la patogenicidad en pino de los aislados de *F. circinatum* obtenidos como endófito de las plantas del sustrato herbáceo. Dicho test se realizó sobre plantas de *Pinus radiata* de

aproximadamente 2 años de edad. Las plantas se mantuvieron durante una semana en el invernadero para su aclimatación a 20-22°C. Cada aislado se cultivó en PDA durante una semana, incluyendo un aislado de virulencia conocida como control positivo (aislado 7, colección INIA). La inoculación se realizó mediante herida longitudinal bajo la epidermis del tallo, depositando en ella micelio fresco con ayuda de una aguja estéril. Como control negativo se realizó la misma herida con aguja estéril sin micelio. Se inocularon un total de 5 plantas por aislado y para los controles positivo y negativo. Durante las 24 horas posteriores a la inoculación se mantuvieron las plantas en bolsas de plástico para asegurar la humedad y supervivencia del hongo. Se observó semanalmente la evolución de las plantas y a la quinta semana tras la inoculación se midió la longitud de la lesión en el punto de inoculación. Para confirmar que la lesión es provocada por *F. circinatum*, para cada aislado se desinfectaron superficialmente dos plantas mediante inmersión durante un minuto en alcohol al 70% y se reaisló el patógeno en medio de cultivo FSM y SNA.

4. Resultados

4.1. Material vegetal, aislamiento e identificación:

Se muestrearon un total de 165 plantas pertenecientes a 16 especies de diversas familias, recogidas en la tabla 1. En base a la caracterización morfológica y molecular explicadas anteriormente, *Fusarium circinatum* fue aislado e identificado creciendo como endófito en 7 especies pertenecientes a 4 familias distintas: *Agrostis capillaris* (Poaceae), *Pseudarrhenatherum longifolium* (Poaceae), *Centaurea debeauxii* (Asteraceae), *Teucrium scorodonia* (Lamiaceae), *Sonchus oleraceus* (Asteraceae), *Rubus ulmifolius* (Rosaceae) y *Hypochaeris radicata* (Asteraceae). Únicamente se aisló el hongo de la parte aérea de las plantas, nunca de raíz.

Tabla 1. Especies muestreadas, número de plantas por especie, número de plantas infectadas por especie y parte de la planta infectada.

Especie	Número de plantas	Número de plantas infectadas	Parte de la planta infectada
<i>Agrostis capillaris</i>	30	6	Tallo, hojas
<i>Pseudarrhenatherum longifolium</i>	60	11	Tallo, hojas
<i>Crococsmia crocosmiiflora</i>	3	0	-
<i>Centaurea debeauxii</i>	11	3	Tallo
<i>Anthoxanthum odoratum</i>	10	0	-
<i>Taraxacum officinalis</i>	3	0	-
<i>Teucrium scorodonia</i>	5	2	Tallo
<i>Sonchus oleraceus</i>	6	4	Tallo
<i>Luzula multiflora</i>	3	0	-
<i>Holcus mollis</i>	1	0	-
<i>Brachypodium rupestre</i>	2	0	-
<i>Dactylis glomerata</i>	4	0	-
<i>Rumex acetosa</i>	3	0	-
<i>Cortaderia selloana</i>	4	0	-
<i>Rubus ulmifolius</i>	9	1	Tallo
<i>Hypochaeris radicata</i>	11	1	Tallo, semilla

La frecuencia con la que *F. circinatum* fue aislado varió significativamente de unas especies a otras. *Sonchus oleraceus* obtuvo la mayor frecuencia, con un 66,67% de las plantas infectadas por el hongo; mientras que *Hypochaeris radicata* obtuvo la menor frecuencia con un 9,09% (Figura 1).

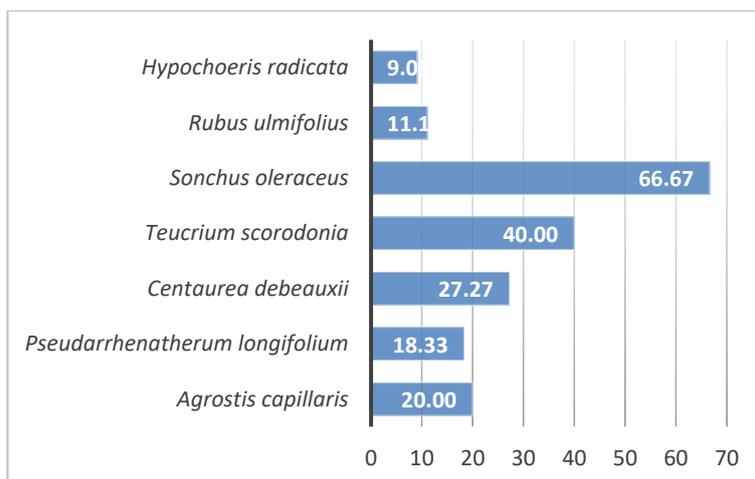


Figura1. Por cada especie, porcentaje de plantas infectadas endofíticamente por *Fusarium circinatum*.

En cuanto a los chancros muestreados de árboles sintomáticos de *Pinus radiata* en esa misma parcela, *Fusarium circinatum* fue aislado de 33 chancros de un total de 45.

4.2. Test de patogenicidad:

Todos los aislados resultaron ser patogénicos en pino. En cuanto a la longitud de la lesión, no se encontraron diferencias significativas entre los distintos aislados ($p=0,6837$), ni entre estos y el control positivo de virulencia conocida. No se observaron síntomas en las plantas control sin inóculo. *F. circinatum* fue reaislado de los pinos inoculados y confirmada su identidad en medio de cultivo SNA.

4.3. Grupo de apareamiento:

En cuanto a la amplificación del locus correspondiente al grupo de apareamiento, todos los aislados pertenecieron al grupo 2 (MAT-2), visualizándose una banda de 190 pares de bases en gel de agarosa. El grupo 2 de apareamiento es el único existente hasta ahora en el País Vasco.

5. Discusión

En este estudio se aislaron 30 cepas de *Fusarium circinatum* de tejidos del interior de plantas herbáceas que viven bajo el dosel arbóreo de pinos infectados, sin que estas plantas mostraran síntoma alguno. Por tanto, se confirma su presencia en huéspedes distintos del pino, tal y como se detectó recientemente en gramíneas en California y Sudáfrica (Sweet et al. 2014; Sweet & Gordon 2012). En el presente estudio se describe por primera vez la presencia de *Fusarium circinatum* como endófito en especies de las familias Asteraceae, Lamiaceae y Rosaceae, distintas de las familias Poaceae y Pinaceae descritas como huéspedes hasta ahora. El hecho de que *Fusarium circinatum* sea capaz de vivir como endófito en gran variedad de especies puede suponer un enorme impacto en la epidemiología de la enfermedad, ya que estas plantas pueden servir como fuente de inóculo y dispersar la enfermedad a nuevas áreas no infectadas.

Sólo se aisló el hongo de la parte aérea de las plantas, nunca de raíz, lo que sugiere que las esporas del hongo dispersadas vía aérea a partir de árboles de pino enfermos, pueden infectar las plantas que habitan bajo ellos. También puede ocurrir que el hongo proceda de la dispersión entre las distintas plantas del dosel vegetal, tal como se ha descrito para *Epichlöe* (anamorfo *Neotyphodium*), endófito de gran variedad de gramíneas. Este hongo produce conidios en la superficie de las hojas en

algún momento de su ciclo, pudiendo dispersarse de una planta a otra (White et al. 1996). En otros casos, los endófitos pueden permanecer activos durante un tiempo en los restos vegetales de un huésped muerto, y estos restos actuar como fuente de inóculo para infectar nuevas plantas adyacentes (Zabalgozeazcoa, 2008). La transmisión horizontal de planta a planta es el mecanismo de dispersión más utilizado por los hongos endófitos (Zabalgozeazcoa, 2008).

La habilidad de algunos hongos de vivir como endófito o como patógeno en función del huésped no está del todo clara. Numerosos estudios evidencian esta capacidad de colonización endofítica. Por ejemplo, *Fusarium oxysporum* es un conocido patógeno capaz de colonizar el sistema radicular de muchos huéspedes causando marchitamiento en muchos cultivos de gran importancia económica (Gordon et al. 1997). Pero al mismo tiempo es uno de los endófitos más comunes en muchas otras plantas sin inducir ningún tipo de síntoma (Kuldau et al. 2000; Gordon et al. 1989). Esta doble interacción se observa también en *Verticillium dahliae*, estudiado hasta hace poco desde una perspectiva patogénica en un rango de unas 400 especies como fresa, algodón, patata o alcachofa (Cirulli et al. 2010; Klosterman et al. 2009; Malcolm et al. 2013). Pero también se ha documentado su capacidad endofítica en otras plantas asintomáticas (Robb et al. 2007). Como podemos ver, esta relación patógeno - endófito en función del huésped no es una excepción en la naturaleza. Según nuestro conocimiento, *Fusarium circinatum* es capaz de vivir como endófito en al menos 12 especies: *Agrostis capillaris*, *Pseudarrhenatherum longifolium*, *Centaurea debeauxii*, *Teucrium scorodonia*, *Sonchus oleraceus*, *Rubus ulmifolius*, *Hypochaeris radicata* (resultados del presente estudio), *Holcus lanatus*, *Festuca arundinacea* (Swett & Gordon, 2012), *Briza maxima*, *Ehrharta erecta* var. *erecta* y *Pentameris pallida* (Swett et al. 2014). Por otro lado, *Fusarium circinatum* es un reconocido patógeno del género *Pinus*. Parece que *F. circinatum* puede vivir como endófito en gran variedad de especies y a su vez comportarse como patógeno en algunas coníferas. La naturaleza de esta interacción, así como las variables que la determinan requiere un estudio más profundo.

Por otro lado, *Fusarium circinatum* también puede vivir endofíticamente en plantas de pino, principalmente en los estados juveniles del árbol, colonizando su interior pero sin mostrar síntomas, pudiendo permanecer en este estado de latencia durante largo tiempo. Este estado puede revertir a patógeno bajo ciertas condiciones que son desconocidas, desencadenando daños en pino (Storer et al. 1998; Elvira-Recuenco et al. 2015; Martín-Rodríguez et al. 2013). *Fusarium verticillioides*, especie muy cercana filogenéticamente a *Fusarium circinatum*, es patógeno en maíz, pero bajo ciertas condiciones el hongo también puede permanecer en un estado de latencia en el huésped (Oren et al. 2003; Estrada et al. 2012; Hardoim et al. 2015). Además *F. circinatum* comparte con *F. verticillioides* la capacidad de colonizar maíz de una manera similar sin inducir síntomas (Sweet and Gordon. 2015). Otro ejemplo es el de *Leptosphaeria maculans*, en el que una misma cepa se comporta como endófito en plantas de *Arabidopsis thaliana* en condiciones naturales, o como necrotrofo bajo situaciones de estrés (Junker et al. 2012).

6. Conclusiones

El hecho de que *Fusarium circinatum* se encuentre como endófito en plantas de la familia Poaceae no es sorprendente. Muchas especies de *Fusarium* poseen la capacidad de colonizar plantas de gramíneas, como es el caso de *Fusarium verticillioides*, cercano filigenéticamente a *Fusarium circinatum*. Pero la capacidad de *F. circinatum* de vivir endofíticamente en plantas de las familias Asteraceae, Lamiaceae y Rosaceae nos lleva a pensar que el rango de huéspedes del hongo es mucho más amplio de lo esperado hasta ahora, evidenciando la complejidad de la interacción del hongo en función de la planta huésped. Además, estos resultados sugieren un riesgo potencial de dispersión de *Fusarium circinatum* a través de especies que sirvan como reservorio de inóculo, dando un paso más hacia el entendimiento del ciclo general de la enfermedad.

7. Agradecimientos

Estamos especialmente agradecidos a Maite Morales Clemente por su excelente asistencia técnica. También a Gustavo Renobales y Juan Antonio Campos por su labor en la identificación botánica e Ignacio García por su asistencia en el muestreo. Este trabajo está financiado por el Proyecto RTA2012-00015. Laura Hernández es contratada FPI-INIA.

8. Bibliografía

AEGERTER, B. J., & GORDON, T. R. (2006). Rates of pitch canker induced seedling mortality among *Pinus radiata* families varying in levels of genetic resistance to *Gibberella circinata* (anamorph *Fusarium circinatum*). *Forest ecology and management*, 235(1), 14-17.

ALONSO, R., & BETTUCCI, L. (2009). First report of the pitch canker fungus *Fusarium circinatum* affecting *Pinus taeda* seedlings in Uruguay. *Australasian Plant Disease Notes*, 4(1), 91-92.

BERBEGAL, M., PÉREZ-SIERRA, A., ARMENGOL, J., & GRÜNWARD, N. J. (2013). Evidence for multiple introductions and clonality in Spanish populations of *Fusarium circinatum*. *Phytopathology*, 103(8), 851-861.

BRAGANÇA, H., DIOGO, E., MONIZ, F., & AMARO, P. (2009). First report of pitch canker on pines caused by *Fusarium circinatum* in Portugal. *Plant Disease*, 93(10), 1079-1079.

CARLUCCI, A., COLATRUGLIO, L., & FRISULLO, S. (2007). First report of pitch canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus halepensis* and *P. pinea* in Apulia (Southern Italy). *Plant Disease*, 91(12), 1683-1683.

CIRULLI, M., BUBICI, G., AMENDUNI, M., ARMENGOL, J., BERBEGAL, M., JIMÉNEZ-GASCO, M. D. M., & JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. (2010). *Verticillium* wilt: a threat to artichoke production. *Plant disease*, 94(10), 1176-1187.

COVERT, S. F., BRILEY, A., WALLACE, M. M., & MCKINNEY, V. T. (1999). Partial MAT-2 gene structure and the influence of temperature on mating success in *Gibberella circinata*. *Fungal Genetics and Biology*, 28(1), 43-54.

ESTRADA, A. E. R., JONKERS, W., KISTLER, H. C., & MAY, G. (2012). Interactions between *Fusarium verticillioides*, *Ustilago maydis*, and *Zea mays*: an endophyte, a pathogen, and their shared plant host. *Fungal Genetics and Biology*, 49(7), 578-587.

EVIRA-RECUENCO, M., ITURRITXA, E., & RAPOSO, R. (2015). Impact of Seed Transmission on the Infection and Development of Pitch Canker Disease in *Pinus radiata*. *Forests*, 6(9), 3353-3368.

GORDON, T. R., OKAMOTO, D., & JACOBSON, D. J. (1989). Colonization of muskmelon and non-susceptible crops by *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* and other species of *Fusarium*. *Phytopathology*, 79(10), 1095-1100.

GORDON, T. R., & MARTYN, R. D. (1997). The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual review of phytopathology*, 35(1), 111-128.

GUERRA-SANTOS, J. J. (1999). Pitch canker on Monterey pine in Mexico. Forestry and forest products. Current and potential impacts of pitch canker in *Radiata* pine. *Technical Report*, 112, 58-61.

HARDOIM, P. R., VAN OVERBEEK, L. S., BERG, G., PIRTTILÄ, A. M., COMPANT, S., CAMPISANO, A., & SESSITSCH, A. (2015). The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 293-320.

HEPTING, G. H., & ROTH, E. R. (1946). Pitch canker, a new disease of some southern pines. *Journal of Forestry*, 44(10), 742-744.

HEPTING, G. H., & ROTH, E. R. (1953). Host relations and spread of the pine pitch canker disease. *Phytopathology*, 43.

KULDAU, G. A., & YATES, I. E. (2000). Evidence for *Fusarium* endophytes in cultivated and wild plants. *Microbial endophytes*, 85-117.

JUNKER, C., DRAEGER, S., & SCHULZ, B. (2012). A fine line—endophytes or pathogens in *Arabidopsis thaliana*. *Fungal Ecology*, 5(6), 657-662.

KLOSTERMAN, S. J., ATALLAH, Z. K., VALLAD, G. E., & SUBBARAO, K. V. (2009). Diversity, pathogenicity, and management of *Verticillium* species. *Annual review of phytopathology*, 47, 39-62.

KOBAYASHI, T., & MURAMOTO, M. (1989). Pitch canker of *Pinus luchuensis*, a new disease of Japanese forests. *Forest Pests*, 40, 169-173.

LANDERAS, E., GARCÍA, P., FERNÁNDEZ, Y., BRAÑA, M., FERNÁNDEZ-ALONSO, O., MÉNDEZ-LODOS, S., & BELTRÁN, R. (2005). Outbreak of pitch canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus* spp. in northern Spain. *Plant Disease*, 89(9), 1015-1015.

MALCOLM, G. M., KULDAU, G. A., GUGINO, B. K., & JIMÉNEZ-GASCO, M. D. M. (2013). Hidden host plant associations of soilborne fungal pathogens: an ecological perspective. *Phytopathology*, 103(6), 538-544.

MAPA. 1996. Informe de la reunión del grupo de trabajo de laboratorio de diagnóstico y prospecciones fitosanitarias. MAPA, Madrid.

MARTÍN-RODRIGUES, N., ESPINEL, S., SANCHEZ-ZABALA, J., ORTÍZ, A., GONZÁLEZ-MURUA, C., & DUÑABEITIA, M. K. (2013). Spatial and temporal dynamics of the colonization of *Pinus radiata* by *Fusarium circinatum*, of conidiophora development in the pith and of traumatic resin duct formation. *New Phytologist*, 198(4), 1215-1227.

NIRENBERG, H. I. (1981). A simplified method for identifying *Fusarium* spp. occurring on wheat. *Canadian Journal of Botany*, 59(9), 1599-1609.

OREN, L., EZRATI, S., COHEN, D., & SHARON, A. (2003). Early events in the *Fusarium verticillioides*-maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1695-1701.

PFENNING, L. H., COSTA, S. D. S., MELO, M. P. D., COSTA, H., VENTURA, J. A., AUER, C. G., & SANTOS, Á. F. D. (2014). First report and characterization of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pitch canker in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 39(3), 210-216.

ROBB, J. (2007). *Verticillium* tolerance: resistance, susceptibility, or mutualism?. *Botany*, 85(10), 903-910.

SCHUELKE, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature biotechnology*, 18(2), 233-234.

SCHWEIGKOFER, W., O'DONNELL, K., & GARBELOTTO, M. (2004). Detection and quantification of airborne conidia of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker, from two California sites by using a real-time PCR approach combined with a simple spore trapping method. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3512-3520.

STORER, A. J., GORDON, T. R., & CLARK, S. L. (1998). Association of the pitch canker fungus, *Fusarium subglutinans* f. sp. pini with Monterey pine seeds and seedlings in California. *Plant pathology*, 47, 649-656.

SWETT, C. L., & GORDON, T. R. (2012). First report of grass species (Poaceae) as naturally occurring hosts of the pine pathogen *Gibberella circinata*. *Plant Disease*, 96(6), 908-908.

SWETT, C. L., PORTER, B., FOURIE, G., STEENKAMP, E. T., GORDON, T. R., & WINGFIELD, M. J. (2014). Association of the pitch canker pathogen *Fusarium circinatum* with grass hosts in commercial pine production areas of South Africa. *Southern Forests: a Journal of Forest Science*, 76(3), 161-166.

SWETT, C. L., & GORDON, T. R. (2015). Endophytic association of the pine pathogen *Fusarium circinatum* with corn (*Zea mays*). *Fungal Ecology*, 13, 120-129.

VILJOEN, A., WINGFIELD, M. J., & MARASAS, W. F. O. (1994). First report of *Fusarium subglutinans* f. sp. pini on pine seedlings in South Africa. *Plant disease*, 78(3), 309-312.

WALLACE, M. M., & COVERT, S. F. (2000). Molecular Mating Type Assay for *Fusarium circinatum*. *Applied and environmental microbiology*, 66(12), 5506-5508.

WHITE, J. F., MARTIN, T. I., & CABRAL, D. (1996). Endophyte-host associations in grasses. XXII. Conidia formation by *Acremonium* endophytes on the phylloplanes of *Agrostis hiemalis* and *Poa rigidifolia*. *Mycologia*, 88(2), 174-178.

WINGFIELD, M. J., JACOBS, A., COUTINHO, T. A., AHUMADA, R., & WINGFIELD, B. D. (2002). First report of the pitch canker fungus, *Fusarium circinatum*, on pines in Chile. *Plant pathology*, 51(3), 397-397.

WINGFIELD, M. J., HAMMERBACHER, A., GANLEY, R. J., STEENKAMP, E. T., GORDON, T. R., WINGFIELD, B. D., & COUTINHO, T. A. (2008). Pitch canker caused by *Fusarium circinatum*—a growing threat to pine plantations and forests worldwide. *Australasian Plant Pathology*, 37(4), 319-334.

ZABALGOGEAZCOA, I. (2008). Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens.