

HONGOS ASOCIADOS A LA ENFERMEDAD DEL CHANCRO RESINOSO DEL PINO (*Fusarium circinatum*) EN LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DE CANTABRIA

MARTÍNEZ ÁLVAREZ, P.¹, BLANCO DÍAZ, J.², DE VALLEJO SANCHO DE SOPRANIS, M.², ALVES SANTOS, F.M.¹, DIEZ CASERO, J.J.¹.

¹ Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales. ETSIIAA Palencia. Universidad de Valladolid. Avenida Madrid, 57. 34004 Palencia. España.

² Sección de Producción y Mejora Forestal Servicio de Montes Dirección General de Biodiversidad. Gobierno de Cantabria. Calle Rodríguez, nº 5, 1º. 39.071 Santander

Resumen

La enfermedad del chancro resinoso del pino, causada por el hongo *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell, es un serio problema en países como Estados Unidos, Sudáfrica, Chile, Haití, Japón, Méjico, y desde hace unos años también en España. La enfermedad se desarrolla con gran virulencia en las especies del género *Pinus*, siendo la más susceptible dentro de este grupo *Pinus radiata*. Los daños que el hongo causa sobre este hospedante revisten gran gravedad, lo que unido a la cantidad de plantaciones dedicadas a esta especie forestal en el Norte de la Península Ibérica hace necesario el avance en técnicas de control de la enfermedad, siendo las técnicas de control biológico unas de las más inocuas. En esta línea, los hongos endófitos tienen un papel destacado en el equilibrio de los sistemas patológicos y por tanto también en el desarrollo de las enfermedades. El objetivo de este estudio fue conocer los hongos asociados a árboles infectados por *Fusarium circinatum* en la Comunidad Autónoma de Cantabria con vistas a su posible utilización en el control biológico de la enfermedad. Para ello, se muestrearon 11 zonas en las que previamente había sido detectado el hongo, y en cada una de ellas se seleccionaron 4 árboles sintomáticos de los que se recogió diverso material para su posterior cultivo en laboratorio. Las muestras seleccionadas se analizaron utilizando medio de cultivo en el laboratorio para favorecer el crecimiento de los hongos. Una vez colonizadas las placas, las colonias de los distintos hongos se visualizaron al microscopio para su identificación. Entre los hongos aparecidos junto a *Fusarium circinatum* con mayor frecuencia destacan *Pestalotiopsis funerea* y *Epithyrium resinae*. Posteriores, ensayos permitirán conocer la eficacia de estos hongos para el control de la enfermedad del chancro resinoso del pino.

Palabras clave

Fusarium circinatum, *Pinus radiata*, chancro resinoso, hongos endófitos.

1. Introducción

Desde su aparición en Carolina del Norte en 1946 (HEPTING Y ROTH, 1946, citado por CORRELL *et al.*, 1992), la enfermedad denominada chancro resinoso del pino (pitch canker disease en voz inglesa) y causada por el hongo *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell, ha devastado gran cantidad de hectáreas de pino en varios países alrededor del mundo. A día de hoy, la enfermedad se encuentra desarrollándose por el Norte de la Península Ibérica, afectando sobre todo a plantaciones de *Pinus radiata*, sin que se haya encontrado aun la manera de detener los efectos del patógeno. Una de las técnicas más innovadoras e inocuas para actuar contra este tipo de enfermedades es el empleo de organismos vivos a modo de controladores biológicos. Los hongos endófitos, aquellos que colonizan los tejidos vivos internos de las plantas sin causar un efecto negativo evidente e inmediato (HIRSCH Y BRAUN, 1992), a pesar de ser aun poco conocidos, han sido ya utilizados con éxito para esta tarea (ARNOLD *et al.*, 2003). De este modo una de las líneas de trabajo más importantes en



52 el ámbito de la protección forestal frente a enfermedades consiste en proseguir con el estudio
53 de la micoflora interna de las especies vegetales.

54

55 2. Objetivos

56

57 Siendo el control biológico mediante el uso de hongos endófitos una de las vías con más
58 futuro en la erradicación de enfermedades en el ámbito forestal, urge conocer la colección que
59 existe de esos organismos en las masas donde se desarrolla la enfermedad del chancro
60 resinoso del pino. De este modo el objetivo principal de este estudio es el de encontrar los
61 hongos endófitos presentes en diferentes órganos de los pinos afectados en la Comunidad
62 Autónoma de Cantabria, para de este modo tener un listado en el que se pueda encontrar
63 algún hongo con propiedades inhibitorias de la afección. Del mismo modo, es interesante
64 estudiar las diferencias que puedan existir entre la frecuencia de aparición de hongos
65 endófitos en los diferentes tejidos muestreados del pino. El último de los objetivos es el de
66 relacionar la localización de las parcelas con la frecuencia de aparición de determinadas
67 especies fúngicas.

68

69 3. Metodología

70

71 Fueron visitadas un total de 11 zonas demarcadas (plantaciones en las que se había
72 detectado previamente al patógeno) diferentes. La Tabla 1 ofrece un listado de estas zonas y
73 la Figura 1 las sitúa dentro de los límites de la Comunidad Autónoma de Cantabria. En cada
74 una de las zonas demarcadas se muestrearon 4 árboles diferentes, excepto en la número 7, en
75 la que se muestrearon 8 árboles. El material vegetal recolectado fue acículas, corteza, piñas,
76 ramillos, semillas y xilema, extraído este último bien con una barrena de Pressler o mediante
77 un hacha.

78

79

Tabla 1. Localización de las zonas demarcadas visitadas así como la fecha en que se muestrearon

Zona Demarcadas	Localidad	Municipio	Fecha muestreo
5	San Pedro del Romeral	San Pedro del Romeral	16/09/2008 y 20/10/2008
6	Villafufre	Villafufre	16/09/2008 y 20/10/2008
7	San Sebastián de Garabandal	Rionansa	26/08/2008
8	Comillas	Comillas	06/10/2008
9	Vejióris	Santiurde de Toranzo	16/09/2008 y 20/10/2008
10	Ramales de la Victoria	Ramales de la Victoria	16/09/2008
11	Sierra de Ibio	Mazcuerras	30/09/2008
12	Ibio	Mazcuerras	30/09/2008
13	Santibañez	Cabezón de la Sal	30/09/2008
14	Renedo de Cabuérniga	Cabuérniga	06/10/2008
15	Ontón	Castro Urdiales	16/09/2008

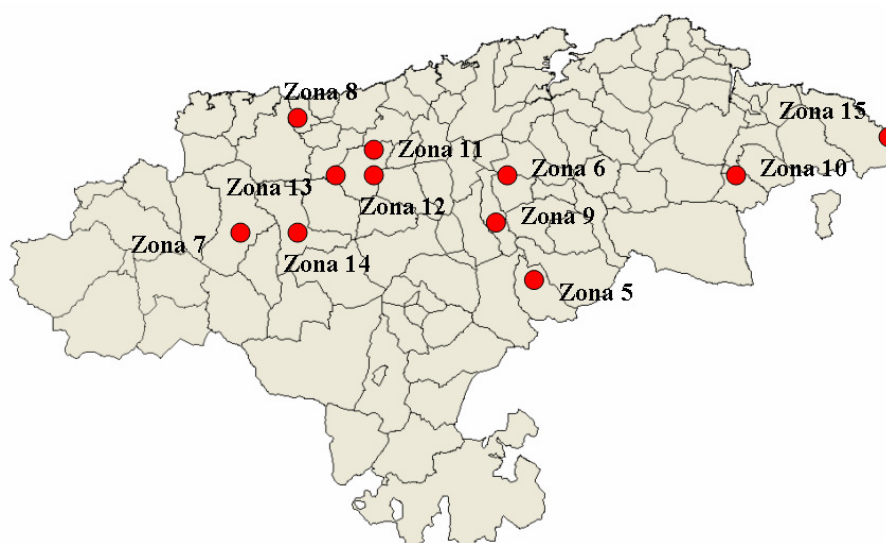
80

81

82 En las siguientes 24 horas se procedió a la selección del material recogido así como a su
83 siembra en medio de cultivo no selectivo PDA (patata, dextrosa y agar) al que se le añadió 0,5
84 gramos de sulfato de estreptomycinina para evitar la proliferación de bacterias. Para aislar
85 únicamente hongos endófitos, se llevó a cabo una esterilización superficial previa de todo el
86 material vegetal empleado. Este proceso consistió en un lavado en agua corriente durante un
87 minuto, seguido de otro en alcohol al 70% durante dos minutos. Posteriormente las muestras
88 se sumergieron por dos veces en disoluciones de hipoclorito al 3%. Los tiempos de estos dos
89 lavados fueron modificados dependiendo del tipo de material a desinfectar superficialmente
90 (más tiempo para parte más lignificadas del árbol y menos para los tejidos más blandos, como
91 pudieron ser las acículas). Para acabar con el proceso, se pasaron las muestras dos veces



92 consecutivas por agua destilada estéril durante 2 minutos cada una. Tres días después, se
 93 comenzó a subcultivar en otra placa con el mismo medio de cultivo todos aquellos micelios
 94 que iban apareciendo. Para permitir un crecimiento adecuado y uniforme de los hongos
 95 endófitos aislados, se mantuvieron dentro de una cámara de cultivo a 25°C en condiciones de
 96 oscuridad durante 7 días, y otros 7 días en las condiciones de luz y temperatura del
 97 laboratorio. Tras este tiempo se procedió a clasificar los micelios en “tipos” según la
 98 morfología y coloración de la colonia. Un representante de cada uno de esos “tipos” fue
 99 guardado para su posterior identificación morfológica, mientras que el resto fue desechado.
 100 Posteriormente y con la ayuda de una lupa binocular, un microscopio y varias claves de
 101 identificación de hongos, se trató de clasificar a cada uno de los “tipos” obtenidos en el paso
 102 anterior, llegando cuando se pudo al nivel taxonómico de especie.
 103



104
 105 *Figura 1. Mapa de la Comunidad Autónoma de Cantabria en el que se sitúan de manera aproximada las zonas demarcadas*
 106 *visitadas*

107 4. Resultados

108
 109
 110 *Tabla 2. Especies fúngicas aparecidas junto con el valor de su RIF (nº apariciones / nº muestras analizadas)*

Especie fúngica encontrada	RIF	Especie fúngica encontrada	RIF
<i>Aureobasidium pullulans</i>	0,006	<i>Phomopsis sp.</i>	0,009
<i>Botrytis sp.</i>	0,003	<i>Pseudeurotium sp.</i>	0,009
<i>Epithyrium resinae</i>	0,144	<i>Sordaria fimicola</i>	0,004
<i>Fusarium circinatum</i>	0,122	<i>Trichoderma harzianum</i>	0,001
<i>Gliocladium roseum</i>	0,003	Micelio estéril 1	0,005
<i>Nigrospora sacchari</i>	0,006	Micelio estéril 2	0,018
<i>Paecilomyces sp.</i>	0,003	Micelio estéril 3	0,009
<i>Penicillium sp.</i>	0,057	Micelio estéril 4	0,001
<i>Pestalotiopsis funerea</i>	0,158	Micelio estéril 5	0,003
<i>Phialophora cinerescens</i>	0,005	Micelio estéril 6	0,003
<i>Phoma sp.</i>	0,001	Micelio estéril 7	0,003

111
 112
 113 Un total de 22 micelios diferentes fueron encontrados, de los cuales 7 no pudieron ser
 114 identificados debido a que no llegaron a esporular En la Tabla 2 se enumeran todas las

115 especies fúngicas encontradas así como el valor de su RIF, que representa el número de veces
 116 que apareció cada una de los hongos dividido entre el número de muestras analizadas. Como
 117 se observa en la mencionada Tabla 2, además de *Fusarium circinatum*, los hongos endófitos
 118 aparecidos con mayor frecuencia (encontrados aproximadamente en el 15% del material
 119 analizado) fueron *Pestalotiopsis funerea* y *Epithyrium resinae*. El primero de ellos es un
 120 patógeno principalmente de coníferas (BAJO, *et al.* 2008), mientras que el segundo es un
 121 hongo de frecuente aparición sobre exudado de resina en especies del género *Picea* y *Pinus*
 122 (SUTTON, 1980).

123

124

Tabla 3. Valores del RIF para cada una de las especies fúngicas aparecidas en función del material vegetal muestreado

Hongos endófitos aparecidos	Material vegetal del que se aisló						
	Acícula	Corteza	Piña	Ramillo	Semilla	Xilema	
						Barrena	Hacha
<i>Aureobasidium pullulans</i>		0,008		0,032			
<i>Botrytis sp.</i>					0,067		0,004
<i>Epithyrium resinae</i>	0,233	0,175	0,400	0,424	0,067		0,024
<i>Fusarium circinatum</i>		0,017		0,032		0,021	0,359
<i>Gliocladium roseum</i>	0,033			0,008			
<i>Nigrospora sacchari</i>		0,008		0,032			
<i>Paecilomyces sp.</i>		0,008					0,004
<i>Penicillium sp.</i>		0,017					0,176
<i>Pestalotiopsis funerea</i>	0,333	0,192	0,169	0,168		0,211	0,163
<i>Phialophora cinerescens</i>		0,017		0,008			0,004
<i>Phoma sp.</i>		0,008					
<i>Phomopsis sp.</i>			0,046	0,032			
<i>Pseudeurotium sp.</i>			0,031			0,011	0,016
<i>Sordaria fimicola</i>				0,024			
<i>Trichoderma harzianum</i>			0,015				
Micelio estéril 1			0,046	0,008			
Micelio estéril 2	0,033			0,016	0,267		0,029
Micelio estéril 3			0,031	0,024	0,133		
Micelio estéril 4				0,008			
Micelio estéril 5				0,016			
Micelio estéril 6		0,008		0,008			
Micelio estéril 7							0,008

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

En relación con el material vegetal analizado, las especies fúngicas aparecidas se muestran en la Tabla 3. Al igual que en la tabla anterior, los valores que se ofrecen corresponden al RIF, que en este caso representa el número de aislados de esa especie fúngica aparecidos sobre ese material vegetal entre el n° de muestras analizadas de ese material. El análisis de la varianza efectuado encontró diferencias entre los diferentes tejidos analizados (p -valor=0,002). De esta manera la frecuencia de aparición de los endófitos se ve afectada por el material vegetal elegido para estudiarla. Como se observa en la Figura 2, la mayor frecuencia de aparición de endófitos ocurrió cuando el material examinado fue el xilema extraído mediante hacha (más del 80% de las muestras analizadas portaban algún hongo). Este dato contrasta con el obtenido en el caso del mismo material pero extraído por medio de una barrena Pressler, el más bajo de entre todos los tejidos analizados (en torno al 24%). En cuanto a diversidad de especies, el ramillo fue el material analizado en el que aparecieron mayor cantidad de especies diferentes, encontrando hasta 15. Por el contrario, en el xilema extraído con barrena únicamente aparecieron 3 especies distintas.



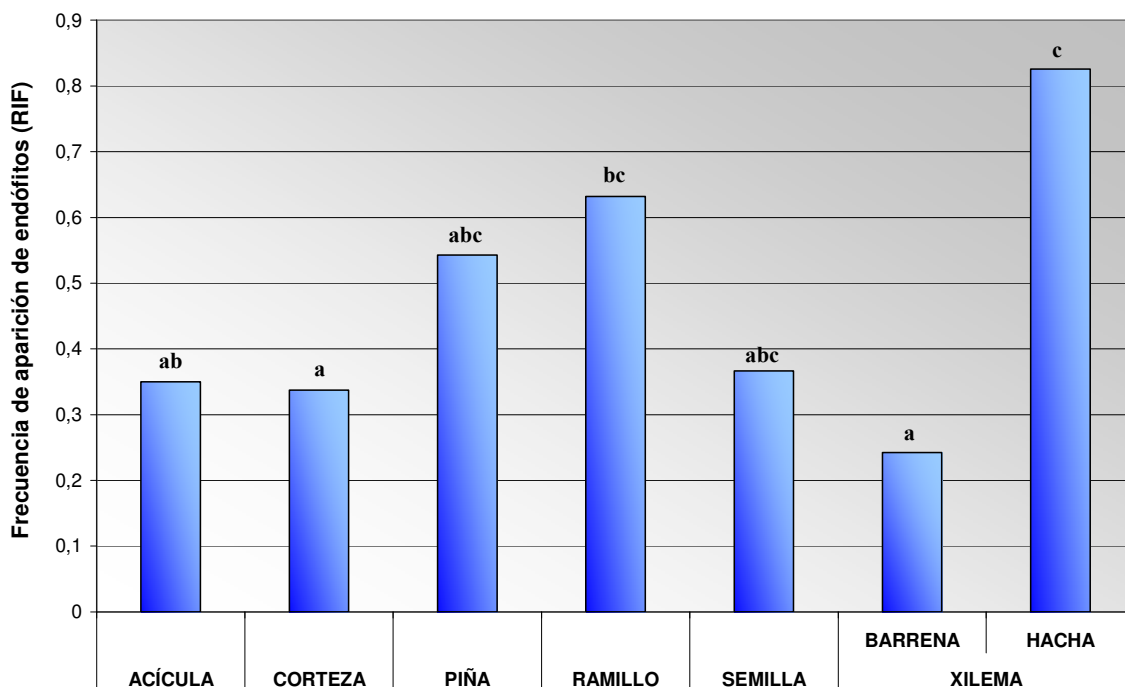


Figura 2. Representación gráfica de las diferencias existentes en la frecuencia de aparición de endófitos en los diferentes tejidos estudiados, así como los grupos homogéneos resultantes

141
142
143

144

145

146

147

148

149

150

Del mismo modo también se relacionó la frecuencia de aparición de los hongos endófitos con las diferentes zonas demarcadas muestreadas. Así, en la Tabla 4, se presentan los valores del RIF (representando en este caso el número de aislados aparecidos en cada zona entre el número de muestras analizadas allí) para cada uno de las especies fúngicas aparecidas en las zonas demarcadas visitadas.

151
152

Tabla 4. Valores del RIF para cada una de las especies fúngicas aparecidas en función de la zona demarcada en que se aislaron

Hongos endófitos	Zonas Demarcadas											
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
<i>Aureobasidium pullulans</i>					0,040							0,044
<i>Botrytis sp.</i>	0,036											
<i>Epithyrium resinae</i>	0,218	0,040	0,340		0,067	0,320						0,222
<i>Fusarium circinatum</i>		0,213	0,005	0,175	0,080		0,125	0,150	0,433	0,025		0,044
<i>Gliocladium roseum</i>					0,027							
<i>Nigrospora sacchari</i>	0,018	0,027	0,005		0,013							
<i>Paecilomyces sp.</i>	0,018					0,020						
<i>Penicillium sp.</i>	0,455				0,240	0,020						0,022
<i>Pestalotiopsis funerea</i>	0,018	0,053	0,235		0,040	0,160	0,425	0,500	0,192			0,044
<i>Phialophora cinerescens</i>	0,018				0,013							0,044
<i>Phoma sp.</i>			0,005									
<i>Phomopsis sp.</i>			0,020		0,027	0,020						
<i>Pseudeurotium sp.</i>		0,013			0,027	0,020	0,050		0,008			
<i>Sordaria fimicola</i>		0,013										0,044
<i>Trichoderma harzianum</i>					0,013							
Micelio estéril 1			0,020									
Micelio estéril 2	0,036		0,030		0,067							0,022
Micelio estéril 3			0,025			0,040						
Micelio estéril 4			0,005									
Micelio estéril 5	0,018											0,022
Micelio estéril 6		0,013			0,013							
Micelio estéril 7							0,025	0,025				

153

154 Como puede observarse, la zona demarcada con mayor frecuencia de aparición de
 155 endófitos (el 83,3% de las muestras analizadas contuvo alguna especie fúngica) es la número
 156 5, correspondiente al término municipal de San Pedro del Romeral. Por el contrario, la zona
 157 14, en Renedo de Cabuérniga, únicamente presenta el 2,5% de las muestras analizadas
 158 colonizadas por algún hongo. Al igual que en el caso del estudio del tejido vegetal, el análisis
 159 de la varianza también encontró diferencias significativas entre los RIF de las distintas zonas
 160 (p-valor=0,043). Así, en la Figura 3 se ven gráficamente estas diferencias.
 161

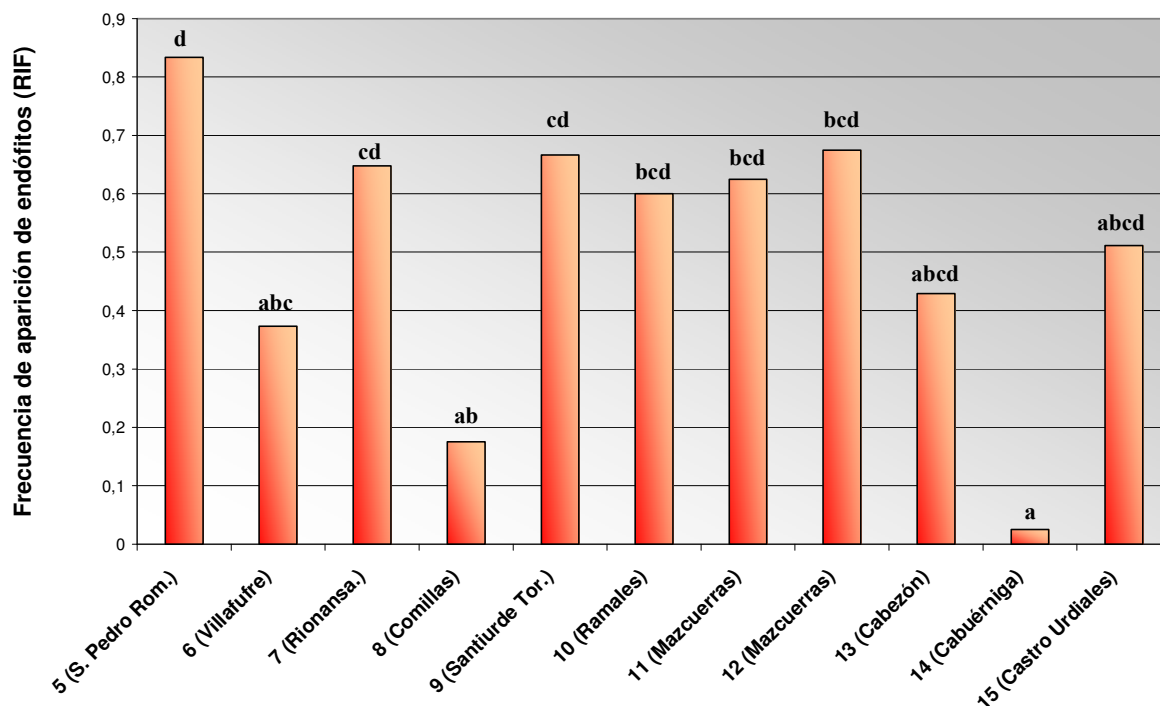


Figura 3. Representación gráfica de las diferencias existentes en la frecuencia de aparición de endófitos en los diferentes zonas demarcadas visitadas, así como los grupos homogéneos resultantes

162
 163
 164

165
 166
 167

5. Discusión

168 Las especies fúngicas aparecidas son comunes en el interior de los tejidos de las
 169 especies del género *Pinus* spp. Del mismo modo, el número de hongos encontrados también
 170 es similar al presentado por otros autores tanto en coníferas como en frondosas (LUPO *et al.*,
 171 2004; HOFF *et al.*, 2004; HASHIZUME *et al.*, 2008). Además, varios de estos endófitos ya
 172 han sido estudiados y utilizados como controladores biológicos de alguna enfermedad o plaga
 173 sobre todo en el ámbito agrícola, como es el caso de *Aureobasidium pullulans*
 174 (DIMAKOPOULOU *et al.*, 2008), *Gliocladium roseum* (COTA *et al.*, 2008), *Paecilomyces*
 175 *sp.* (AVERY *et al.*, 2008), *Penicillium sp.* (DE CAL *et al.*, 2008), *Sordaria fimicola*
 176 (MANOCH *et al.*, 2008) y *Trichoderma harzianum* (ABDULLAH *et al.*, 2008). De este
 177 modo, son estos los hongos con los que en posteriores ensayos primero habría que trabajar en
 178 busca de un efecto adverso sobre el patógeno causante de la enfermedad del chancro resinoso
 179 del pino. El resto de hongos aparecidos a pesar de no haber sido empleados aun en la lucha
 180 biológica, no pueden ser descartados ya que es este un campo muy amplio y poco conocido
 181 aun.
 182

183 Otros autores ya encontraron diferencias en la frecuencia de aparición de endófitos entre
 184 los diferentes tejidos de la planta (SANTAMARÍA *et al.*, 2005; ZAMORA *et al.*, 2008) así
 185 como entre zonas geográficas (COLLADO *et al.*, 1999; MARTÍN-PINTO *et al.*, 2004;
 186 SANTAMARÍA *et al.*, 2005). En el presente estudio destaca la diferencia existente en la
 187 variable medida para un mismo tejido pero extraído con dos metodologías diferentes. Así,
 188 cuando el xilema analizado se había obtenido mediante perforación del tronco del pino con
 189 una barrena forestal Pressler, la frecuencia de aparición de hongos descendió hasta un valor
 190 tres veces inferior al observado en el caso de extraerlo mediante un hacha. El pequeño tamaño
 191 del cilindro que nos facilita la barrena puede haber sido la causa de este bajo resultado, ya que
 192 durante el proceso de esterilización del material vegetal, la solución de hipoclorito sódico
 193 pudo entrar más fácilmente en el interior del tejido que en el caso del hacha, en el que el
 194 tamaño del pedazo tratado fue bastante superior. Además, la disposición de las estructuras
 195 anatómicas longitudinales de la madera pudo ayudar a provocar ese descenso del número de
 196 endófitos encontrados.

197
 198 En cuanto a la frecuencia de los endófitos en las distintas zonas demarcadas, sorprende
 199 el valor tan bajo obtenido en el caso de la zona 14, en la que además sólo aparece el hongo
 200 *Fusarium circinatum*. Por el contrario, la zona 5, presenta el valor más alto de todas las zonas,
 201 siendo además la zona con más diversidad fúngica por detrás únicamente de la número 9. La
 202 diferencia entre ambos valores supera las 30 veces, no conociéndose a ciencia cierta la razón.
 203 Futuros estudios tratarán de relacionar la presencia de los endófitos con el estado fitosanitario
 204 de la masa para de este modo poder dar un paso más en el control de la enfermedad del
 205 chancro resinoso del pino.

206 207 **6. Conclusiones**

209 1. El número de especies fúngicas diferentes encontradas en el muestreo sobre *Pinus*
 210 *radiata* fue de 22, algunas de las cuales ya han sido empleadas en control biológico.

211 2. Se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de aparición de endófitos
 212 entre los diferentes tejidos muestreados.

213 3. La zona demarcada 5 presentó los valores más altos en cuanto a frecuencia de
 214 aparición de endófitos. Por el contrario, la zona 14 obtuvo un valor muy inferior.

215 216 217 **7. Agradecimientos**

218
 219 Este estudio ha sido llevado a cabo dentro del proyecto “Control del chancro resinoso
 220 del pino en la Comunidad Autónoma de Cantabria”, financiado por el Gobierno de Cantabria.

221 222 **8. Bibliografía**

223
 224 ABDULLAH, M.T.; ALI, N.Y.; SULEMAN, P.; 2008. Biological control of *Sclerotinia*
 225 *sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*.
 226 Crop Prot. 27: 1354-1359.

227
 228 ARNOLD, A.E.; MEJÍA, L.C.; KYLLO, D.; ROJAS, E.I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.;
 229 HERRE, E.A; 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. PNAS 100.
 230 (26): 15649-15654.

231

- 232 AVERY, P.B.; FAULL, J.; SIMMONDS, M.S.J.; 2008. Effects of *Paecilomyces fumsoroseus*
 233 and *Encarsia Formosa* on the control of the greenhouse whitefly: preliminary assessment of a
 234 compatability study. *Biocontrol* 53: 303-316.
 235
- 236 BAJO, J.; SANTAMARÍA, O.; DIEZ, J.J.; 2008. Cultural characteristics and pathogenicity of
 237 *Pestalotiopsis funerea* on *Cupressus arizonica*. *For. Path.* 38 (4): 263-274
 238
- 239 COLLADO, J.; PLATAS, G.; GONZÁLEZ, I.; PELÁEZ, F.; 1999. Geographical and
 240 seasonal influences on the distribution of the fungal endophytes in *Quercus ilex*. *New Phytol.*
 241 144: 525-532.
 242
- 243 CORRELL, J.C.; GORDON, T.R.; McCAIN, A.H.; 1992. Genetic diversity in California and
 244 Florida populations of the pitch canker fungus *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*. *The*
 245 *American Phytopathological Society* 82 (4): 415-420.
 246
- 247 COTA, L.V.; MAFFIA, L.A.; MIZUBUTI, E.S.G.; MACEDO, P.E.F.; ANTUNES, R.F.;
 248 2008. Biological control of strawberry gray mold by *Clonostacys rosea* under field
 249 conditions. *Biol. control* 46: 515-522.
 250
- 251 DE CAL, A.; REDONDO, C.; SZTEJNBERG, A.; MELGAREJO, P.; 2008. Biocontrol of
 252 powdery mildew by *Penicillium oxalicum* in open-field nurseries of strawberries. *Biol.*
 253 *Control* 47: 103-107.
 254
- 255 DIMAKOPOULOU, M.; TJAMOS, S.E.; ANTONIOU, P.P.; PIETRI, A.; BATTILANI, P.;
 256 AVRAMIDIS, N.; MARKAKIS, E.A.; TJAMOS, E.C.; 2008. Phyllosphere grapevine yeast
 257 *Aureobasidium pullulans* reduces *Aspergillus carbonarius* (sour rot) incidente in wine-
 258 producing vineyards in Greece. *Biol. Control* 46: 158-165.
 259
- 260 HIRSCH, G.U.; BRAUN, U.; 1992. Community of endophytic microfungi. In: Winterhoff W
 261 (ed) *Handbook of vegetation science*. Vol. 19, *Fungi in vegetation science*. Kluwer,
 262 Dordrecht, pp. 225-250.
 263
- 264 MANOCH, L.; JEAMJITT, O.; DETHOUP, T.; KOKAEW, J.; EAMVIJARN, A.;
 265 VISARATHANONTH, N.; CHAMSWARNG, C.; 2008. Biological control of plant
 266 pathogenic fungi using *Talaromyces flavus*, *Sordaria fimicola* and some endophytic fungi.
 267 *Phytopathology* 98 (6) Suppl. S: S97-S97.
 268
- 269 MARTÍN-PINTO, P.; PAJARES, J.A.; NANOS, N.; DIEZ, J.J.; 2004. Site and seasonal
 270 influences of the fungal community on leaves and steams of *Pinus* and *Quercus* seedlings in
 271 forest nurseries. *Sydowia* 56 (2): 23-37.
 272
- 273 SANTAMARÍA, O.; DIEZ, J.J.; 2005. Fungi in leaves, twigs and steam bark of *Populus*
 274 *tremula* from northern Spain. *For. Path.* 35: 1-11.
 275
- 276 SUTTON, B.C.; 1980. *The Coelomycetes. Fungi Imperfecti with Picnidia Acervuli and*
 277 *Stromata*. Commonwealth Mycological Institute. 696 pp. Kew, Surrey, England.
 278
- 279 ZAMORA, P.; MARTÍNEZ-RUIZ, C; DIEZ, J.J.; 2008. Fungi in leaves and twigs of pine
 280 plantations from northern Spain. *Fungal Divers.* 30: 171-184.
 281

