



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

IDENTIFICACIÓN DE ANAMORFOS DE TIPO
Cylindrocarpon PROCEDENTES DE VIVEROS
FORESTALES EN ESPAÑA

TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER EN PRODUCCIÓN VEGETAL Y ECOSISTEMAS
AGROFORESTALES

Autor: Marc Vicent Ferrer Cortés

Tutor: Paloma Abad-Campos

Cotutor: Josep Armengol Fortí

Curso académico: 2014-2015

VALENCIA, SEPTIEMBRE DE 2015

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue la identificación a nivel de especie de una colección de 105 aislados de anamorfos de *Cylindrocarpon*, obtenidos de diferentes plantas forestales en viveros de distintas regiones del territorio español. La identificación de los hongos se basó en la secuenciación de un fragmento del gen de la histona H3 (HIS), amplificada mediante PCR con la pareja de cebadores CylH3F y CylH3R. La amplificación y secuenciación de la región HIS del genoma de 105 aislados de anamorfos de *Cylindrocarpon* obtenidos de diferentes hospedantes en viveros forestales permitió la identificación de 12 especies fúngicas: *Cylindrocarpon* sp., *Dactylonectria macrodidyma*, *D. novozelandica*, *D. pauciseptata*, *D. pinicola*, *D. torresensis*, *Ilyonectria capensis*, *I. cyclaminicola*, *I. liriodendri*, *I. pseudodestructans*, *I. robusta* e *I. rufa*. Además, se identificaron otras cinco posibles nuevas especies que se nombraron provisionalmente como: *Cylindrodendrum* sp. 1, *Dactylonectria* sp. 1, *Dactylonectria* sp. 2, *Dactylonectria* sp. 3 e *Ilyonectria* sp. 1. En este estudio no se encontró ninguna agrupación geográfica ni por planta hospedante para ninguna de las especies fúngicas identificadas.

Palabras clave: *Cylindrocarpon*, *Cylindrodendrum*, *Dactylonectria*, *Ilyonectria*, vivero forestal

ABSTRACT

The objective of this study was to identify to species level a collection of 105 isolates *Cylindrocarpon*-like anamorphs obtained from different forest plants in nurseries from different Spanish regions. Fungi were identified based on sequencing a fragment of the histone H3 gene (HIS), amplified by PCR with the primer pair CylH3F and CylH3R. Amplification and sequencing of the HIS region of 105 isolates obtained from *Cylindrocarpon*-like anamorphs obtained from different hosts in nurseries allowed the identification of 12 fungal species: *Cylindrocarpon* sp., *Dactylonectria macrodidyma*, *D. novozelandica*, *D. pauciseptata*, *D. pinicola*, *D. torresensis*, *Ilyonectria capensis*, *I. cyclaminicola*, *I. liriodendri*, *I. pseudodestructans*, *I. robusta* and *I. rufa*. In addition, five other possible new species were identified, which were named tentatively as: *Cylindrodendrum* sp. 1, *Dactylonectria* sp. 1, *Dactylonectria* sp. 2, *Dactylonectria* sp. 3 e *Ilyonectria* sp. 1. In this study no geographical grouping or by host plant was found for any of the identified fungal species.

Key words: *Cylindrocarpon*, *Cylindrodendrum*, *Dactylonectria*, *Ilyonectria*, forest nursery

AGRADECIMIENTOS

A Josep Armengol, por su dedicación plena, a mi tutora Paloma Abad-Campos por todas las aportaciones durante la realización de este estudio, al profesor José García cuyas clases despertaron en mí el interés por la micología, a Maela León, Santiago Català "Santi", Antonio Ramón "Toni", Mónica Berbegal, Valentín Garrigues y Víctor Manuel Tolosa, por la ayuda en las distintas fases prácticas del estudio, y a mis compañeros Marco Benito y Jorge Gavara por estos dos años que hemos compartido.

ÍNDICE

I.- Introducción	1
II.- Objetivos	7
III.- Materiales y métodos	8
III.1- Aislados fúngicos	8
III.2- Caracterización morfológica	8
III.3- Extracción de ADN y filogenia	8
IV.- Resultados	11
V.- Discusión	18
VI.- Conclusiones	21
VII.- Bibliografía	22

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de referencia de organismos fúngicos para la región genómica correspondiente a la histona H3 (HIS)	9
Tabla 2. Detalle de planta hospedante y localidad de cada aislado del estudio	13
Tabla 3. Plantas hospedantes afectadas por las especies fúngicas del estudio	15

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol filogenético construido con el método Maximun Likelihood basado en el modelo de sustitución de Tamura-Nei, utilizando la secuencia de la histona H3. Los aislados utilizados se especifican en la Tabla 2. Las secuencias de referencia empleadas se muestran en la Tabla 1. 16

Figura 2. Aspecto de los cultivos representativos de cada especie crecidos en PDA durante 10-15 días: A *Cylindrocarpon* sp., B *Dactylonectria macrodidyma*, C *D. novozelandica*, D *D. pauciseptata*, E *D. pinicola*, F *D. torresensis*, G *Ilyonectria capensis*, H *I. cyclaminicola*, I *I. liriodendri*, J *I. pseudodestructans*, K *I. robusta*, L *I. rufa*, M *Cylindrodendrum* sp. 1, N *Dactylonectria* sp. 1, O *Dactylonectria* sp. 2, P *Dactylonectria* sp. 3 y Q *Ilyonectria* sp. 1 17

I.- INTRODUCCIÓN

En España, el terreno forestal o monte ocupa una parte muy importante del territorio, abarcando toda la superficie que no es propia de cultivo agrícola, ni urbana, ni de otro tipo de infraestructuras. El monte está formado por la superficie forestal arbolada o bosque, y por el monte arbolado disperso y desarbolado. La superficie forestal ocupa el 54,8% del Estado español, con un total de 27,7 M ha, de las cuales 18,2 M ha son de superficie arbolada y el resto desarbolada, lo que lo sitúa como el segundo país de la UE con mayor superficie forestal y el tercero en cuanto ocupación forestal respecto a su territorio (MAGRAMA, 2014).

Los ecosistemas forestales prestan dos tipos de servicios a la sociedad, servicios con valor de mercado, como sector de actividad y creación de empleo, y servicios ambientales y sociales que no tienen reflejo en el mercado, por lo que son difícilmente evaluables. En cuanto a los primeros cabe destacar: 1. El aprovechamiento de madera y leña, que es la principal actividad comercial del sector forestal, ya que España proporciona el 3,6% de la producción de la UE-27. En 2011 la extracción de leña se situó en 1,9 M de t con un valor en cargadero de 23,7 M€ (MAGRAMA, 2014); 2. Los productos forestales no maderables (PFNM), son productos como los piñones, las castañas o el corcho, de cuyas producciones es difícil obtener datos estadísticos fiables, porque en muchos casos no se requiere licencia para la recogida de PFNM, están en terrenos privados, se utilizan para el autoconsumo o se ha abandonado su aprovechamiento debido al éxodo rural. El corcho es una excepción a esta carencia de datos, cuya producción se sitúa alrededor de las 55.905 t valoradas en 51,2 M€ (MAGRAMA, 2011), cantidad que coloca a España como segundo productor mundial de corcho, por detrás de Portugal; y 3. Otros beneficios de los montes que generan actividad económica son las actividades cinegéticas y los aprovechamientos silvopastorales que integran los aprovechamientos silvícolas, de madera y leña, con los pascícolas, para la alimentación del ganado y la caza (MAGRAMA, 2014).

Para reflejar el impacto socioeconómico del sector forestal existen diferentes indicadores. 1. Valor añadido bruto (VAB): La silvicultura y la explotación forestal, Clasificación Nacional de Actividades Económicas número 02 (CNAE 02), la industria de la madera (CNAE 16) y el papel (CNAE 17) generaron en 2009 un VAB de 6.635 M€, lo que supuso una contribución directa al PIB nacional del 0,63%; 2. Datos de empleo: En silvicultura y explotación forestal se contabilizaron en 2013 una media de 31.000 activos, mientras que en la industria que aprovecha productos de silvicultura y explotación forestal (madera, corcho y papel) sumaron 104.000 activos; y 3. El comercio exterior: En este sector el saldo comercial ha evolucionado favorablemente, pasando de registrar un déficit de 902 M€ en 2004 a un superávit de 335 M€ en 2013(MAGRAMA, 2014).

En cuanto al valor ecológico y social de los bosques, los servicios sin valor de mercado, se cuantifican a través de la protección del medio ambiente y la prestación de servicios ambientales como la conservación de la biodiversidad, la protección de la fauna y la flora, la protección del suelo y de los recursos hídricos, la fijación de carbono atmosférico o la provisión de valores estéticos, culturales y científicos. El *Convenio de Naciones Unidas sobre la Diversidad Biológica* identifica estos bienes y servicios que prestan los ecosistemas, algunos de ellos atribuibles a los ecosistemas forestales como los servicios ecosistémicos, que son

contribuciones directas e indirectas de los ecosistemas forestales al bienestar humano. Dentro de éstos se enumeran los siguientes tipos: 1. Servicios de abastecimiento, como el suministro de madera, combustibles y fibras, o la obtención de medicinas naturales y principios activos de los distintos seres vivos que habitan en el bosque; 2. Servicios de regulación, este es el caso de la estabilización y moderación del clima de la Tierra, contribuyendo a frenar el cambio climático, de la mejora de la calidad del aire y del agua, del control de la erosión, del mantenimiento y la mejora de la fertilización del suelo, de las perturbaciones naturales, disminuyendo la frecuencia e intensidad de los desastres naturales, y la regulación del control biológico, destacando la de los polinizadores; y 3. Servicios culturales, los cuales incluyen el disfrute espiritual y estético de los paisajes, las actividades recreativas y el ecoturismo (Naciones Unidas, 1992).

Todos estos beneficios y servicios están amenazados por una serie de impactos sobre la estructura y la distribución de los bosques. Estas perturbaciones son numerosas y muy variadas, pero sobre todas destacan los incendios forestales, la erosión del suelo y la sanidad de los montes. La sanidad forestal consiste en el mantenimiento de un adecuado equilibrio dinámico y sostenible de los sistemas forestales. En 2013, el 83,4% de los árboles españoles tuvieron un aspecto saludable, es decir presentaron una defoliación aparente <25% respecto a un ejemplar con su copa completa, medida de salubridad de la vegetación de la *Red Europea de Daños en los Bosques*. Las principales causas de defoliación son factores abióticos en un 35% de los casos, entre los que se incluyen la sequía, vientos fuertes, altas temperaturas, heladas, etcétera. En segundo lugar, con una media del 27% de los casos se encuentran los insectos plaga, y en tercer lugar, con el 9% están las enfermedades fúngicas (MAGRAMA, 2014).

Este trabajo se centra precisamente en este tercer impacto que afecta a la estructura de los montes españoles, la sanidad de los mismos y, concretamente, se aborda el tema de las enfermedades fúngicas. En este contexto, es de especial relevancia el papel de los viveros forestales, cuyas producciones están dirigidas principalmente a repoblaciones. Las plantas producidas en viveros forestales deben poseer una calidad tal que asegure su arraigo y supervivencia en el medio natural, generalmente hostil, especialmente en la zona mediterránea, y lograr así el objetivo de la repoblación forestal (Ruano, 2002). La exigencia de calidad debería incluir el estado fitosanitario de los brinzales, ya que el material vegetal infectado en vivero puede ser una importante vía de dispersión de patógenos (Brasier, 2008).

Los viveros modernos optimizan las condiciones de cultivo para maximizar la producción de plántula. Así pues, estas empresas utilizan invernaderos en los que se pueden controlar muchos factores que aumentan la velocidad de crecimiento de las plantas como son la humedad, la temperatura, el uso de un sustrato libre de patógenos, la fertilización y la iluminación entre otros. Estas buenas condiciones para el desarrollo vegetal, también pueden resultar idóneas para la propagación de enfermedades fúngicas en el vivero en caso de contaminación, ya que los factores ambientales, especialmente temperatura y humedad, juegan un papel importantísimo en la infección y transmisión de enfermedades fúngicas (Lilja y Poteri, 2013). Tampoco hay que infravalorar la posibilidad de infección en campo, ya que las plantas reproducidas en vivero sufren un estrés provocado por factores abióticos al ser trasplantadas a un medio más hostil. Esta probabilidad de infección aumenta si parte de la

partida que sale del vivero lo hace ya infectada, con lo que disminuye el porcentaje de arraigos y fracasa la repoblación forestal. Esta situación se puede agravar debido al cambio climático, con el que presuntamente habrá un aumento de las condiciones ambientales extremas, lo que provocará un aumento de las fisiopatías, que a su vez hará más vulnerables a las plantas frente a los patógenos (Lilja y Poteri, 2013).

En el vivero forestal son especialmente importantes las enfermedades del sistema radical de las plantas forestales, entre las cuales destacan dos grupos de patógenos bien distintos: oomicetos de los géneros *Pythium* y *Phytophthora* y los hongos con anamorfos (formas asexuales) con aspecto similar a *Cylindrocarpon* (Abad-Campos *et al.*, 2012). En el caso de *Phytophthora*, en las dos últimas décadas se ha ampliado bastante el conocimiento sobre este género en el ámbito forestal, describiéndose nuevas especies y comprendiendo su implicación en la sanidad y la regeneración de los bosques (Jung *et al.*, 2007; Pérez-Sierra *et al.*, 2013). Por el contrario, los estudios sobre los anamorfos con aspecto similar a *Cylindrocarpon* son escasos. Sólo hay algunos trabajos que citan a estos hongos como agentes causales de muerte de raíces en viveros forestales en países escandinavos (Beyer *et al.*, 1991; Menkis *et al.*, 2006), pero no hay ningún estudio realizado en España. Por esta razón este trabajo se va a centrar en la identificación de especies del complejo de anamorfos de *Cylindrocarpon* que infectan a raíces de plantas forestales en viveros españoles. En este sentido, es conveniente hacer un repaso general de cómo ha ido evolucionando la taxonomía del complejo de anamorfos de *Cylindrocarpon*, que en los últimos 15 años ha sufrido muchos cambios.

El nombre genérico *Cylindrocarpon* fue introducido en 1913 por Wollenweber para designar a los anamorfos de la sección *Willkommioetes* de *Nectria*. Esta sección incluía especies sin clamidosporas. Pocos años después, en 1917, Wollenweber amplió el concepto de *Cylindrocarpon* para incluir a especies que formasen clamidosporas en el micelio en medio de cultivo, como *Cylindrocarpon destructans*, el miembro más importante de este grupo (Brayford, 1993). En 1966, el género se dividió en cuatro grupos según la presencia o ausencia de microconidios y de clamidosporas: (i) *Cylindrocarpon magnusianum* (Sacc.) Wollenw., que se designó como el anamorfo tipo para las especies de *Neonectria*, (ii) *C. cylindroides* Wollenw., que fue la especie tipo del género *Cylindrocarpon*, (iii) *C. destructans* que fue el anamorfo de *Neonectria radicola*, y (iv) miembros de especies del género *Cylindrocarpon* que estaban relacionadas con teleomorfos del grupo *Nectria mammoidea* (Brayford, 1993; Halleen *et al.*, 2006a). *Cylindrocarpon obtusisporum* fue descrito originalmente en Estados Unidos (California) infectando a *Acacia* sp., observándose la formación de macroconidios y clamidosporas (Booth, 1966). Las cepas de *Cylindrocarpon obtusisporum* identificadas por Booth (1966) procedían de una amplia gama de plantas hospedantes en Europa, Nueva Zelanda, Norte América y, al menos parte de ellas, formaban microconidios.

Tradicionalmente, representantes de todos los grupos de *Nectria* con anamorfos en *Cylindrocarpon* fueron transferidos a *Neonectria* (Rossman *et al.*, 1999; Mantiri *et al.*, 2001; Brayford *et al.*, 2004). Mantiri *et al.* (2001) y Brayford *et al.* (2004) analizaron las secuencias de la subunidad pequeña del ADN ribosomal mitocondrial (rDNA) de algunas de estas especies, y concluyeron que las especies agrupadas juntas en *Neonectria/Cylindrocarpon* por esta reclasificación fueron monofiléticas.

Sin embargo, estos autores también encontraron que el clado *Neonectria/Cylindrocarpon* incluía distintos subclados correspondientes a, por lo menos, tres de los cuatro grupos descritos por Booth (1966). Seifert *et al.* (2003), en un estudio sobre los hongos que causaban la pudrición de la raíz del ginseng (*Panax quinquefolius* L.) y otros hospedantes, encontraron variación molecular significativa entre los taxones con anamorfos semejantes a *Cylindrocarpon*. Los dendrogramas generados en este estudio, basados en el gen parcial de la β -tubulina (TUB), y las secuencias de las regiones espaciadoras internas transcritas (ITS) del ADN ribosómico nuclear, sugirieron las siguientes subclados (i) *Neonectria radicola*, que consistía en numerosas unidades filogenéticamente distintas, (ii) *Neonectria macroconidialis* (Samuels y Brayford) Seifert, y (iii) un subclado que comprendía dos aislados distintos, uno de *Vitis vinifera* en Ontario, Canadá y otro de *Picea* sp. en Quebec, Canadá, que fueron monofiléticos. Otras especies de *Cylindrocarpon*, al parecer, habían sido excluidas de este grupo monofilético (Hallen *et al.*, 2006a).

Posteriormente, se observaron variaciones significativas en los caracteres culturales y morfológicos entre las cepas de los aislados de *Cylindrocarpon* procedentes de semilleros de vid y viñedos de Sudáfrica, Nueva Zelanda, Australia y Francia que fueron caracterizados morfológica y filogenéticamente por Halleen *et al.*, (2004). Así, estos autores describieron una nueva especie, que se asociaba con la enfermedad del Pie negro de la vid *C. macrodidymum* (Schroers *et al.*, 2008).

Cylindrocarpon obtusisporum y *C. macrodidymum* fueron consideradas como dos especies diferentes asociadas con la enfermedad del Pie negro de la vid. Sin embargo, Halleen *et al.* (2004) sugirieron la posibilidad de que Grasso y Magnano di San Lio (1975) y Scheck *et al.* (1998) identificaron erróneamente *C. obtusisporum* y que, de hecho, se trataba de *C. macrodidymum*. En este sentido, Halleen *et al.* (2004) indicaron que los macroconidios de *C. macrodidymum* miden [(26-)34-36-38(-45)x(4-)5.5-6-6.5(-8) μm], mientras que los del aislado tipo de *C. obtusisporum* miden (30-35x4-5 μm) (Cooke, 1884). Sin embargo, la forma de los macroconidios de *C. macrodidymum* permite distinguirlos de los del aislado tipo de *C. obtusisporum*, que Cooke (1884) describió con los extremos obtusos. Booth (1966) describió macroconidios de forma similar en *C. obtusisporum*. De acuerdo con Booth, sin embargo, los macroconidios 2-3-septados de *C. obtusisporum* miden (34-50x6-7.5 μm). Aislados de *Cylindrocarpon obtusisporum* obtenidos en California formaron peritecios cuando se aparearon con *C. macrodidymum*, aportando más evidencias a la teoría de la identificación errónea. Esto también fue confirmado por la comparación de sus secuencias (Halleen *et al.*, 2006a).

Por otra parte, Halleen *et al.*, (2004) establecieron un nuevo género, *Campylocarpon* Halleen, Schoroers y Crous, que es morfológicamente semejante a *Cylindrocarpon* y causa la enfermedad del pie negro en vid. Las especies de este género y las del antiguo grupo *Nectria mammoidea* se excluyen de *Neonectria/Cylindrocarpon* porque los análisis filogenéticos revelan que estas especies no tienen una relación filogenética cercana con el género *Neonectria/Cylindrocarpon* (Halleen *et al.*, 2004; Schroers *et al.* 2008). Dentro de este género se incluyeron dos especies como agentes causales de la enfermedad del pie negro: *Campylocarpon fasciculare* Schoers, Halleen y Crous y *Campylocarpon pseudofasciculare* Halleen, Schroers y Crous.

Como se destacó anteriormente, *C. destructans* fue detectado originalmente como el agente causal de la enfermedad del pie negro (Maluta y Larignon, 1991), pero desde entonces, este estatus ha sido cuestionado. De hecho, Halleen *et al.* (2006b), compararon cepas de *C. destructans* aisladas de viñas enfermas en Francia, Nueva Zelanda, Portugal y Sudáfrica con anamorfos semejantes a *C. destructans* obtenidos de varios hospedantes herbáceos o leñosos. Los análisis de DNA, de la región ITS y TUB, mostraron que estas cepas eran genéticamente idénticas a *C. liriodendri* J.D. MacDon. & E.E. Butler, que se asoció primeramente con la pudrición de la raíz de *Liriodendron tulipifera* L. en California por MacDonald y Butler (1981). Por lo tanto, debido a que estas especies tenían secuencias idénticas, los aislados de *C. destructans* hallados en vides tanto enfermas de pie negro, como asintomáticas, se renombraron como *C. liriodendri*, asociando únicamente *C. destructans* con la pudrición de raíces de otras especies herbáceas o leñosas (Halleen *et al.*, 2006b). Además, para aclarar la taxonomía de *C. destructans* que causaba pie negro en California, Petit y Gubler (2007) también compararon aislados de *C. destructans* obtenidos de vides californianas con aislados de *C. liriodendri* de Sudáfrica. Todos ellos resultaron idénticos y, como consecuencia, los aislados de *C. destructans* fueron renombrados como *C. liriodendri*. Los teleomorfos de *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* fueron descritos como *Neonectria liriodendri* Halleen, Rego y Crous y *N. macrodidyma* Halleen, Schroers y Crous (Halleen *et al.*, 2004, 2006b).

En 2008 se describió una nueva especie, *C. pauciseptatum* Schroers y Crous, asociada al pie negro de la vid que se encontró en Nueva Zelanda y Eslovenia (Schroers *et al.*, 2008). El estudio filogenético llevado a cabo por Schroers *et al.* (2008), indicó que *C. pauciseptatum* es el taxón hermano filogenéticamente más cercano a *C. macrodidymum*, y que ambas especies están estrechamente relacionadas con el complejo *C. destructans*, en el cual también se incluye a *C. liriodendri*.

Chaverri *et al.* (2011) realizaron un estudio filogenético de *Neonectria*, *Cylindrocarpon* y géneros con anamorfos semejantes a *Cylindrocarpon*. Los datos filogenéticos reunidos durante varios años de análisis morfológicos y moleculares, indicaron que *Neonectria sensu stricto* y *Cylindrocarpon sensu stricto* están muy relacionados filogenéticamente, mientras que *Neonectria sensu lato* y *Cylindrocarpon sensu lato* no forman un grupo monofilético, lo cual sugiere que *Neonectria/Cylindrocarpon* representa a más de un género. Así, estos autores dividieron *Neonectria* en cinco géneros según una combinación de caracteres asociados a la anatomía del peritecio y a la septación de los conidios: *Neonectria/Cylindrocarpon sensu stricto* (Booth grupos 1 y 4), *Rugonectria*, *Thelonectria* (grupo 2), *Ilyonectria* (grupo 3) y anamorfos del género *Campylocarpon*. De acuerdo con esto, sólo las especies de *Neonectria* tienen como anamorfos especies de *Cylindrocarpon*, mientras que el resto de géneros tienen como anamorfos especies semejantes a *Cylindrocarpon*, y desde entonces se conocen como *Ilyonectria*. En consecuencia, *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* fueron incluidos dentro del género *Ilyonectria*, con *I. radicola* como especie grupo. Renombrados respectivamente como *Ilyonectria liriodendri* (Halleen, Rego y Crous) Chaverri y Salgado e *I. macrodidyma* (Halleen, Schroers y Crous) P. Chaverri y Salgado (Chaverri *et al.*, 2011).

Por otra parte, Cabral *et al.* (2012a) fueron capaces de incluir 12 taxones nuevos en el complejo *I. radicola*, anteriormente conocido como complejo *C. destructans*, realizando análisis de varios genes, apoyados por caracteres morfológicos. Otras especies de *Ilyonectria*

dentro del complejo *I. radicola* se han encontrado, en Portugal, asociadas a la enfermedad del pie negro en viña: *Ilyonectria europaea* A. Cabral, Rego y Crous, *I. lusitanica* A. Cabral, Rego y Crous, *I. pseudodestructans* A. Cabral, Rego y Crous e *I. robusta* (A.A. Hildebr.) A. Cabral, Rego y Crous (Cabral *et al.*, 2012a, 2012c). *Ilyonectria vitis* y otras *Ilyonectria* spp. descritas en Portugal (Cabral *et al.*, 2012a), y aislados pertenecientes al grupo *Neonectria mammoidea* en Canadá, también han sido asociados con la enfermedad (Petit *et al.*, 2011). Poco después, a raíz de este estudio, Cabral *et al.* (2012c), demostraron la existencia de polimorfismo dentro del complejo *I. macrodidyma*. Esta hipótesis coincidía con los resultados obtenidos por Alaniz *et al.* (2009), quien ya había detectado una diversidad genética relevante en *C. macrodidymum* mediante la técnica inter-simple sequence repeat (ISSR). Sin embargo, el análisis filogenético anterior mostró poca variación en las secuencias de la subunidad grande (LSU), ADN ribosómico (rDNA), TUB e ITS de los aislados de *C. macrodidymum* obtenidos de vides de distintos países (Halleen *et al.*, 2004; Petit y Gubler, 2005; Alaniz *et al.*, 2007). Por lo tanto, con el fin de aclarar esta hipótesis, Cabral *et al.* (2012c) realizaron un estudio filogenético del complejo *I. macrodidyma* en el que se analizaban las secuencias de ITS, TUB, el gen de la histona H3 (HIS) y el factor de elongación de la traducción 1- α (TEF). Como consecuencia, seis nuevas especies de *Ilyonectria*, morfológicamente parecidas a *I. macrodidyma*, se incluyeron en el complejo *I. macrodidyma* (*I. alcacerensis* A. Cabral, Nascimento y Crous, *I. estremocensis* A. Cabral, Nascimento y Crous, *I. novozelandica* A. Cabral y Crous, *I. torresensis* A. Cabral, Rego y Crous e *Ilyonectria* sp. 1, e *I. sp.* 2).

Por último, en el año 2014, Lombard *et al.* llevaron a cabo un estudio molecular del complejo de anamorfos de *Cylindrocarpon* utilizando cuatro genes: β -tubulina (*tub2*), las secuencias de las regiones espaciadoras internas transcritas (ITS) del ADN ribosómico nuclear, el factor de elongación de la traducción 1-alfa (*tef1*) y las secuencias de ARN ribosómico nuclear 28S (LSU) generadas por Lombard *et al.* (2010). Este trabajo, junto con observaciones morfológicas, sirvió para mostrar que el género *Ilyonectria* es parafilético, por lo que se tuvo que volver a evaluar la situación taxonómica de dicho género, así como algunas irregularidades de clasificación detectadas en los géneros *Cylindrodendrum* y *Neonectria*. Por este motivo estos autores describieron un nuevo género, *Dactylonectria*, que incluye diez nuevas combinaciones: *D. alcacerensis*, *D. anthuriicola*, *D. estremocensis*, *D. hordeicola*, *D. macrodidyma*, *D. novozelandica*, *D. pauciseptata*, *D. pinicola*, *D. torresensis* y *D. vitis*. De estas especies, algunas se habían incluido en un primer momento en el género *Ilyonectria*, teniendo que ser reclasificadas como *Dactylonectria*. Por otro lado, en este trabajo *D. hordeicola* y *D. pinicola* fueron descritas como nuevas especies.

II.- OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es la identificación a nivel de especie de una colección de 105 aislados de anamorfos de *Cylindrocarpon*, obtenidos de diferentes plantas forestales en viveros de distintas regiones del territorio español.

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

III.1.- Aislados fúngicos

En este trabajo se utilizó una colección de 105 aislados fúngicos monospóricos de anamorfos con aspecto similar a *Cylindrocarpon* conservados a una temperatura de -80°C en el Grupo de Investigación en Hongos Fitopatógenos del Instituto Agroforestal Mediterráneo de la Universitat Politècnica de València. Para el crecimiento de los aislados se sembraron discos con micelio en placas Petri con medio patata-dextrosa agar suplementado con 0,5 g/l de sulfato de estreptomicina (PDAS) inhibiendo así la proliferación de bacterias. Las placas se incubaron a 25°C en oscuridad durante un periodo de 7 a 10 días, según la velocidad de crecimiento del hongo.

III.2.- Caracterización morfológica

Para la caracterización del aspecto de la colonia de cada uno de los aislados se transfirieron discos de micelio de la zona más uniforme de los aislados crecidos en medio de cultivo PDAS a medio de cultivo patata-dextrosa agar (PDA), los cuales también se incubaron en oscuridad a 25°C durante 10-15 días hasta que las colonias ocuparon las dos terceras partes de las placas. En este momento se observó la morfología y el color de cada una de las colonias y se realizaron fotografías de las mismas.

III.3.- Extracción de ADN y filogenia

La identificación de los hongos se basó en la secuenciación de un fragmento del gen de la histona H3 (HIS), amplificada mediante PCR con la pareja de cebadores CylH3F y CylH3R (Crous *et al.*, 2004). Para ello se extrajo el ADN genómico de todas las colonias a partir del micelio crecido en las condiciones anteriormente explicadas, raspándolo con una espátula para separarlo del medio de crecimiento y triturándolo con una maza en un mortero con nitrógeno líquido. La extracción propiamente dicha se realizó con el kit E.Z.N.A.® Plant DNA Miniprep (Omega Bio-tek, USA) siguiendo las indicaciones de su protocolo. El ADN extraído se almacenó en cámara frigorífica a -4°C hasta su amplificación.

La mezcla de la reacción de amplificación estaba formada por 1x de tampón, MgCl₂ 2,5 mM, 0,8 mM de los dNTPs, 0,4 mM de cada uno de los cebadores, 1 U de ADN-polimerasa Horse-Power Taq (Canvax, Córdoba, España) y 1 µl del ADN genómico extraído. La mezcla se llevó a un volumen final de 25 µl con agua (Chromasolv® Plus, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Para llevar a cabo las amplificaciones se utilizó un termociclador MJ Research PTC-200 Thermal Cycler (MJ Research Inc., Waltham, MA, USA). El programa de amplificación consistía en una primera desnaturalización a 94°C durante 3 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificación, cada uno de los cuales consistía en desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, anillamiento a 55°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 50 segundos. Por último, se realizó una extensión final a 72°C durante 10 minutos para completar las cadenas inacabadas. Los productos de PCR se almacenaron a 4°C hasta su manipulación.

La comprobación de la amplificación se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa (Agarosa D-1 Low EEO, Conda, Madrid, España) al 1%, preparado con un tampón TBE 0,5X (Tris 44,5 mM, H₃BO₃ 44,5 mM y EDTA 1mM pH=8). Para la tinción de los productos de

amplificación de la PCR se utilizó REALSAFE (REALSAFE Nucleic Acid Staining Solution 20.000x, Durviz S.L., Valencia, España). Este producto se añadió a la solución de agarosa fundida y enfriada aproximadamente a 60°C para obtener la concentración de 0,3x, antes de la formación del gel. El marcador de peso molecular que se utilizó fue una mezcla de bandas de ADN de 100 pb de diferencia (Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo scientific, Alemania). Tras la electroforesis, los geles se expusieron a luz UV para la visualización y fotodocumentación de las bandas (Gelprinter plus, TDI, Madrid, España).

Las reacciones de PCR que tenían un producto de amplificación único se secuenciaron utilizando el cebador CylH3R en el servicio de secuenciación de la empresa MacroGen (MacroGen Europe, Amsterdam, Holanda). Las secuencias fueron editadas con los programas Sequencher 5.0 (Gene Codes Corporation, MI, USA) y Pregap 4 (Staden Package). El alineamiento de las secuencias y la filogenia se realizaron con el programa MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). Con este mismo programa se realizó el árbol filogenético.

Las secuencias de referencia que se incluyeron en el alineamiento se obtuvieron de la base de datos GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information, Estados Unidos) y se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de referencia de organismos fúngicos para la región genómica correspondiente a la histona H3 (HIS)

Especie	Secuencia de referencia	Aislado
<i>Campylocarpon fasciculare</i>	JF735502	CBS 112613
<i>Cylindrocarpon</i> sp.	JF735578	Cy228
<i>Cylindrocarpon</i> sp.	JF735604	CR21
<i>Cylindrocarpon</i> sp.	JF735606	CPC 13531
<i>Cylindrodendrum album</i>	KM231484	CBS 301.83
<i>Cylindrodendrum album</i>	KM231485	CBS 110655
<i>Dactylonectria hordeicola</i>	JF735610	CBS 162.89
<i>Dactylonectria macrodidyma</i>	JF735644	CBS 112601
<i>Dactylonectria macrodidyma</i>	JF735647	CBS 112615
<i>Dactylonectria novozelandica</i>	JF735632	CBS 112608
<i>Dactylonectria novozelandica</i>	JF735633	CBS 113552
<i>Dactylonectria pauciseptata</i>	JF735582	CBS 100819
<i>Dactylonectria pauciseptata</i>	JF735587	CBS 120171
<i>Dactylonectria pinicola</i>	JF735613	CBS 159.34
<i>Dactylonectria pinicola</i>	JF735614	CBS 173,37
<i>Dactylonectria torresensis</i>	JF735657	CBS 119.41
<i>Dactylonectria torresensis</i>	JF735681	CBS 129086
<i>Ilyonectria alcacerensis</i>	JF735629	Cy134
<i>Ilyonectria alcacerensis</i>	JF735630	CBS 129087
<i>Ilyonectria capensis</i>	JX231135	CBS 132815
<i>Ilyonectria capensis</i>	JX231137	CPC 20692
<i>Ilyonectria cyclaminicola</i>	JF735581	CBS 302.93
<i>Ilyonectria estremocensis</i>	JF735617	CBS 129085
<i>Ilyonectria estremocensis</i>	JF735627	CPC 13539
<i>Ilyonectria europaea</i>	JF735567	CBS 129078
<i>Ilyonectria europaea</i>	JF735568	CBS 537.92
<i>Ilyonectria lirioidendri</i>	JF735507	BS 110.81
<i>Ilyonectria lirioidendri</i>	JF735508	CBS 117526

Tabla1. Continuación

<i>Ilyonectria lusitanica</i>	JF735570	CBS129080
<i>Ilyonectria panacis</i>	JF735572	CDC-N-9a
<i>Ilyonectria protearum</i>	JX231141	CBS 132811
<i>Ilyonectria protearum</i>	JX231149	CBS 132812
<i>Ilyonectria pseudodestructans</i>	JF735562	CBS 117824
<i>Ilyonectria pseudodestructans</i>	JF735563	CBS 129081
<i>Ilyonectria robusta</i>	JF735518	CBS 308.35
<i>Ilyonectria robusta</i>	JF735532	CBS 129084
<i>Ilyonectria rufa</i>	JF735540	CBS 153.37
<i>Ilyonectria rufa</i>	JF735542	CBS 640.77
<i>Ilyonectria venezuelensis</i>	JF735571	CBS 102032
<i>Ilyonectria vitis</i>	JF735580	CBS 129082

IV.- RESULTADOS

Todos los aislados del trabajo fueron amplificados con el par de cebadores CyH3F y CyH3R, obteniéndose fragmentos de unos 500 pb tras la citada amplificación mediante PCR. Tras la secuenciación, la comparación de la región HIS del ADN con las secuencias depositadas en el GenBank del NCBI confirmó la identificación de las siguientes especies fúngicas: *Cylindrocarpon* sp., *Dactylonectria macrodidyma*, *D. novozelandica*, *D. pauciseptata*, *D. pinicola*, *D. torresensis*, *Ilyonectria capensis*, *I. cyclaminicola*, *I. liriodendri*, *I. pseudodestructans*, *I. robusta* e *I. rufa* (Figura 1, Tabla 2). Además de estas 12 especies, descritas previamente por distintos autores, entre los 105 aislados del estudio también se encontraron aislados que no encajaban en especies ya descritas, y a los que se les ha dado nombres tentativos: *Cylindrodendrum* sp. 1, *Dactylonectria* sp. 1, *Dactylonectria* sp. 2, *Dactylonectria* sp. 3 e *Ilyonectria* sp. 1 (Figura 1, Tabla 2) .

Las secuencias de los aislados de este estudio, han permitido agruparlos en 17 grupos apoyándonos en secuencias del GenBank. *Cylindrocarpon* sp. coincidió en un 99% con la secuencia de referencia JF735578. El segundo grupo, constituido por 25 aislados, coincidió en un 100% con la secuencia JF735644 *I. macrodidyma*, actualmente *D. macrodidyma*. El tercer grupo, formado por 30 aislados, se correspondió al 100% con la secuencia JF735632 de *I. novozelandica*, hoy en día denominada *D. novozelandica*. El siguiente grupo, *D. pauciseptata*, presentó un 99% de similitud con la secuencia JF735587 de esta especie. *D. pinicola* se correspondió en un 100% a la secuencia JF735613 de esta especie en el GenBank. El sexto grupo presentó un 99% de semejanza con la secuencia JF735657, *I. torresensis*, actualmente denominado como *D. torresensis*. El grupo *I. capensis* también fue idéntico al 99% a su secuencia de referencia, en este caso JX231137. El octavo grupo, se correspondió con un 99% a la secuencia JF735581, *I. cyclaminicola*. Los aislados que formaron el siguiente grupo, *I. liriodendri*, fueron semejantes en un 100% a la secuencia de referencia JF735508. El aislado que supuso el décimo grupo, *I. pseudodestructans*, se correspondió en un 99% a la referencia JF735562 del GenBank. El grupo *I. robusta* se asemejó el 100% a la secuencia de referencia depositada para esta especie JF735532. *I. rufa*, se trata del último grupo del estudio que ha sido previamente descrito, coincidiendo en un 99% a la referencia JF735542. En cuanto a los grupos que han aparecido por primera vez en este estudio, *Cylindrodendrum* sp. 1, *Dactylonectria* sp. 1, *Dactylonectria* sp. 2, *Dactylonectria* sp. 3 e *Ilyonectria* sp. 1, se han asemejado en un 91%, 89%, 90%, 92% y 97% a las secuencias de referencia del GenBank KM231485, KF633157, HG977517, JF735580 y JX231141, respectivamente.

En cuanto a la importancia de las especies, de los 105 aislados, el hongo que más veces se encontró fue *D. novozelandica* con un 28,6% de los casos, seguido de *D. macrodidyma* con un 23,8%. Algo menos frecuentes fueron *D. torresensis*, que supuso el 11,4% de los aislados, seguido de *I. liriodendri* e *I. rufa* ambas con una frecuencia de aparición del 8,6%. Mucho menos abundantes resultaron ser *D. pauciseptata*, *I. capensis* e *Ilyonectria* sp. 1 con un 2,9% cada uno e *I. robusta* y *Dactylonectria* sp. 1 con el 1,9% de los aislados cada uno. Por último, como patógenos menos frecuentes se encontraron *Cylindrocarpon* sp., *D. pinicola*, *I. cyclaminicola*, *I. pseudodestructans*, *Cylindrodendrum* sp. 1, *Dactylonectria* sp. 2 y *Dactylonectria* sp. 3, con tan solo el 0,9% de los aislados en cada caso.

Por otro lado, si se atiende a la distribución geográfica de los patógenos (Tabla 2), se pueden observar la presencia de diferentes especies en distintas Provincias y Comunidades Autónomas de todo el territorio español. En cuanto a la preferencia por las plantas hospedadoras (Tabla 3), salvo en los casos en los que los anamorfos de *Cylindrocarpon* aparecieron anecdóticamente con sólo uno o dos aislados, las especies que aparecen más frecuentemente lo hacen parasitando a especies forestales de todos los géneros muestreados como son: *Arbutus*, *Crataegus*, *Juniperus*, *Lonicera*, *Quercus*, *Rosmarinus*, *Cistus*, *Juglans*, *Myrtus* y *Pinus*, principalmente.

En la Figura 2 se muestran las fotografías de la colonia de un aislado representativo de cada una de las especies identificadas en este trabajo. En general, las colonias presentaban un micelio algodonoso de aspecto variable con diferentes tonos de colores blanco, crema, amarillo, naranja y marrón.

Tabla 2. Detalle de planta hospedante y localidad de cada aislado fúngico del estudio

Especie	Código	Hospedante	Año	Localidad	Provincia	
<i>Cylindrocarpon</i> sp.	Cy-FO-3	<i>Quercus ilex</i>	2011	Alcoy	Alicante	
<i>Dactylonectria macrodidyma</i>	Cy-FO-1 ¹	<i>Quercus faginea</i>	2011	Alcoy	Alicante	
	Cy-FO-9 ¹	<i>Quercus ilex</i>	2011	Alcoy	Alicante	
	Cy-FO-10 ¹	<i>Pinus halepensis</i>	2011	Alcoy	Alicante	
	Cy-FO-13 ¹	<i>Pinus halepensis</i>	2011	Quart de Poblet	Valencia	
	Cy-FO-18 ¹	<i>Quercus faginea</i>	2011	Ayora	Valencia	
	Cy-FO-19 ¹	<i>Juniperus phoenicea</i>	2011	Ayora	Valencia	
	Cy-FO-20 ¹	<i>Juniperus phoenicea</i>	2011	Ayora	Valencia	
	Cy-FO-23 ¹	<i>Quercus ilex</i>	2011	Ayora	Valencia	
	Cy-FO-24 ¹	<i>Quercus ilex</i>	2011	Ayora	Valencia	
	Cy-FO-26 ¹	<i>Quercus ilex</i>	2011	Ayora	Valencia	
	Cy-FO-29 ¹	<i>Quercus ilex</i>	2011	Ayora	Valencia	
	Cy-FO-30 ¹	<i>Quercus ilex</i>	2011	Ayora	Valencia	
	Cy-FO-31 ¹	<i>Quercus ilex</i>	2011	Ayora	Valencia	
	Cy-FO-32	<i>Quercus ilex</i>	2011	Ayora	Valencia	
	Cy-FO-34	<i>Pinus halepensis</i>	2011	Ayora	Valencia	
	Cy-FO-48 ¹	<i>Pinus halepensis</i>	2011	Ayora	Valencia	
	Cy-FO-51 ¹	<i>Pinus halepensis</i>	2011	Ayora	Valencia	
	Cy-FO-55 ¹	<i>Pinus halepensis</i>	2011	Ayora	Valencia	
	Cy-FO-61 ¹	<i>Pinus halepensis</i>	2011	Ayora	Valencia	
	Cy-FO-134 ¹	<i>Ilex aquifolium</i>	2009	El Puig	Valencia	
	Cy-FO-147 ¹	<i>Rosmarinus officinalis</i>	2009	Cheste	Valencia	
	Cy-FO-154	<i>Lonicera</i> sp.	2009	Torrente	Valencia	
	Cy-FO-160 ¹	<i>Pyracantha</i> sp.	2009	Segorbe	Castellón	
	Cy-FO-195 ¹	<i>Myrtus communis</i>	2009	Chiva	Valencia	
	Cy-FO-223 ¹	<i>Pinus halepensis</i>	2010	Projano	La Rioja	
	<i>Dactylonectria novozelandica</i>	Cy-FO-5 ²	<i>Pinus halepensis</i>	2011	Quart de Poblet	Valencia
		Cy-FO-6 ²	<i>Pinus halepensis</i>	2011	Quart de Poblet	Valencia
Cy-FO-11 ²		<i>Pinus halepensis</i>	2011	Alcoy	Alicante	
Cy-FO-14 ²		<i>Quercus ilex</i>	2011	Quart de Poblet	Valencia	
Cy-FO-15 ²		<i>Quercus ilex</i>	2011	Quart de Poblet	Valencia	
Cy-FO-16 ²		<i>Quercus ilex</i>	2011	Quart de Poblet	Valencia	
Cy-FO-21 ²		<i>Juniperus phoenicea</i>	2011	Ayora	Valencia	
Cy-FO-22 ²		<i>Juniperus phoenicea</i>	2011	Ayora	Valencia	
Cy-FO-27 ²		<i>Quercus ilex</i>	2011	Ayora	Valencia	
Cy-FO-33		<i>Pinus halepensis</i>	2011	Ayora	Valencia	
Cy-FO-35		<i>Pinus halepensis</i>	2011	Ayora	Valencia	
Cy-FO-36 ²		<i>Pinus halepensis</i>	2011	Ayora	Valencia	
Cy-FO-40 ²		<i>Pinus halepensis</i>	2011	Ayora	Valencia	
Cy-FO-41 ²		<i>Pinus halepensis</i>	2011	Ayora	Valencia	
Cy-FO-44 ²		<i>Pinus halepensis</i>	2011	Ayora	Valencia	
Cy-FO-46 ²		<i>Pinus halepensis</i>	2011	Ayora	Valencia	
Cy-FO-47 ²		<i>Pinus halepensis</i>	2011	Ayora	Valencia	
Cy-FO-56 ²		<i>Pinus halepensis</i>	2011	Ayora	Valencia	
Cy-FO-59		<i>Pinus halepensis</i>	2011	Ayora	Valencia	
Cy-FO-60 ²		<i>Pinus halepensis</i>	2011	Ayora	Valencia	
Cy-FO-66		<i>Quercus</i> sp.	2011	Pobla de Benifassà	Castellón	
Cy-FO-137 ²		<i>Quercus suber</i>	2009	El Puig	Valencia	
Cy-FO-146 ²		<i>Santolina chamaecyparissus</i>	2009	Cheste	Valencia	
Cy-FO-153 ²		<i>Rosmarinus officinalis</i>	2009	Rugat	Valencia	
Cy-FO-180 ²		<i>Rosmarinus officinalis</i>	2009	Picasent	Valencia	
Cy-FO-188 ²		<i>Crataegus azarolus</i>	2009	Chiva	Valencia	
Cy-FO-191 ²		<i>Pinus</i> sp.	2009	Segorbe	Castellón	
Cy-FO-210 ²		<i>Pistacia lentiscus</i>	2009	Chiva	Valencia	
Cy-FO-211 ²		<i>Pistacia lentiscus</i>	2009	Chiva	Valencia	
Cy-FO-222		<i>Pinus halepensis</i>	2010	Projano	La Rioja	
<i>Dactylonectria pauciseptata</i>		Cy-FO-37	<i>Pinus halepensis</i>	2011	Ayora	Valencia
		Cy-FO-38	<i>Pinus halepensis</i>	2011	Ayora	Valencia
	Cy-FO-178	<i>Abies nordmanniana</i>	2009	León	León	
<i>Dactylonectria pinicola</i>	Cy-FO-177	<i>Abies concolor</i>	2009	León	León	

Tabla 2. Continuación

Especie	Código	Hospedante	Año	Localidad	Provincia	
<i>Dactylonectria torresensis</i>	Cy-FO-2	<i>Quercus ilex</i>	2011	Alcoy	Alicante	
	Cy-FO-12	<i>Pinus halepensis</i>	2011	Alcoy	Alicante	
	Cy-FO-28	<i>Quercus ilex</i>	2011	Ayora	Valencia	
	Cy-FO-43 ³	<i>Pinus halepensis</i>	2011	Ayora	Valencia	
	Cy-FO-54	<i>Pinus halepensis</i>	2011	Ayora	Valencia	
	Cy-FO-64 ³	<i>Pinus halepensis</i>	2011	Ayora	Valencia	
	Cy-FO-65 ³	<i>Pinus halepensis</i>	2011	Ayora	Valencia	
	Cy-FO-127 ³	<i>Arbutus unedo</i>	2009	Chiva	Valencia	
	Cy-FO-205	<i>Cistus albidus</i>	2009	Pobla de Benifassà	Castellón	
	Cy-FO-206 ³	<i>Cistus albidus</i>	2009	Pobla de Benifassà	Castellón	
	Cy-FO-218	<i>Juglans regia</i>	2010	Rejas de S. Este	Soria	
	Cy-FO-227	<i>Rosmarinus officinalis</i>	2009	Llaurí	Valencia	
	<i>Ilyonectria capensis</i>	Cy-FO-63	<i>Pinus halepensis</i>	2011	Ayora	Valencia
		Cy-FO-129	<i>Arbutus unedo</i>	2009	El Puig	Valencia
Cy-FO-184		<i>Juniperus sp.</i>	2009	Logroño	La Rioja	
<i>Ilyonectria cyclaminicola</i>	Cy-FO-67	<i>Quercus sp.</i>	2011	Pobla de Benifassà	Castellón	
<i>Ilyonectria liriiodendri</i>	Cy-FO-50	<i>Pinus halepensis</i>	2011	Ayora	Valencia	
	Cy-FO-52	<i>Pinus halepensis</i>	2011	Ayora	Valencia	
	Cy-FO-57	<i>Pinus halepensis</i>	2011	Ayora	Valencia	
	Cy-FO-68	<i>Quercus sp.</i>	2011	Pobla de Benifassà	Castellón	
	Cy-FO-132	<i>Arbutus unedo</i>	2009	El Puig	Valencia	
	Cy-FO-136	<i>Quercus suber</i>	2009	El Puig	Valencia	
	Cy-FO-142	<i>Arbutus unedo</i>	2009	Cheste	Valencia	
	Cy-FO-183	<i>Juniperus sp.</i>	2009	Logroño	La Rioja	
	Cy-FO-221	<i>Pinus halepensis</i>	2010	Projano	La Rioja	
	<i>Ilyonectria pseudodestructans</i>	Cy-FO-71	<i>Quercus ilex</i>	2015	Ayora	Valencia
		Cy-FO-217	<i>Juglans regia</i>	2010	Rejas de S. Este	Soria
<i>Ilyonectria robusta</i>	Cy-FO-219	<i>Juglans regia</i>	2010	Rejas de S. Este	Soria	
	Cy-FO-4	<i>Quercus ilex</i>	2011	Alcoy	Alicante	
<i>Ilyonectria rufa</i>	Cy-FO-7	<i>Pinus halepensis</i>	2011	Quart de Poblet	Valencia	
	Cy-FO-8	<i>Quercus ilex</i>	2011	Alcoy	Alicante	
	Cy-FO-17	<i>Quercus faginea</i>	2011	Ayora	Valencia	
	Cy-FO-53	<i>Pinus halepensis</i>	2011	Ayora	Valencia	
	Cy-FO-128	<i>Arbutus unedo</i>	2009	El Puig	Valencia	
	Cy-FO-130	<i>Arbutus unedo</i>	2009	El Puig	Valencia	
	Cy-FO-161	<i>Juniperus sp.</i>	2009	Segorbe	Castellón	
	Cy-FO-179	<i>Abies nordmanniana</i>	2009	León	León	
	<i>Cylindrodendrum sp. 1</i>	Cy-FO-25	<i>Quercus ilex</i>	2011	Ayora	Valencia
	<i>Dactylonectria sp. 1</i>	Cy-FO-69	<i>Buxus sempervirens</i>	2015	Madrid	Madrid
		Cy-FO-70	<i>Buxus sempervirens</i>	2015	Madrid	Madrid
<i>Dactylonectria sp. 2</i>	Cy-FO-133	<i>Ilex aquifolium</i>	2009	El Puig	Valencia	
<i>Dactylonectria sp. 3</i>	Cy-FO-45	<i>Pinus halepensis</i>	2011	Ayora	Valencia	
<i>Ilyonectria sp. 1</i>	Cy-FO-224	<i>Ilex sp.</i>	2012	Tarragona	Tarragona	
	Cy-FO-225	<i>Ilex sp.</i>	2012	Tarragona	Tarragona	
	Cy-FO-226	<i>Ilex sp.</i>	2012	Tarragona	Tarragona	

¹ Aislados de *D. macrodidyma* con secuencia de histona H3 idénticas, en el análisis filogenético se utilizaron la secuencia de los aislados: Cy-FO-1, Cy-FO-147, Cy-FO-195

² Aislados de *D. novozelandica* con secuencia de histona H3 idénticas, en el análisis filogenético se utilizaron la secuencia de los aislados: Cy-FO-21, Cy-FO-180, Cy-FO-210

³ Aislados de *D. torresensis* con secuencia de histona H3 idénticas, en el análisis filogenético se utilizaron la secuencia de los aislados Cy-FO-127, Cy-FO-206

Tabla 3. Plantas hospedantes afectadas por las especies fúngicas del estudio

Hospedante	Especie
<i>Abies concolor</i>	<i>Ilyonectria pinicola</i>
<i>Abies nordmanniana</i>	<i>Dactylonectria pauciseptata</i> <i>Ilyonectria rufa</i>
<i>Crataegus azarolus</i>	<i>Dactylonectria novozelandica</i>
<i>Arbutus unedo</i>	<i>Dactylonectria torresensis</i> <i>Ilyonectria capensis</i> <i>Ilyonectria liriodendri</i> <i>Ilyonectria rufa</i>
<i>Buxus sempervirens</i>	<i>Dactylonectria</i> sp. 1
<i>Cistus albidus</i>	<i>Dactylonectria torresensis</i>
<i>Ilex aquifolium</i>	<i>Dactylonectria macrodidyma</i> <i>Dactylonectria</i> sp. 2
<i>Ilex</i> sp.	<i>Ilyonectria</i> sp. 1
<i>Juglans regia</i>	<i>Dactylonectria torresensis</i> <i>Ilyonectria robusta</i>
<i>Juniperus phoenicea</i>	<i>Dactylonectria macrodidyma</i> <i>Dactylonectria novozelandica</i>
<i>Juniperus</i> sp.	<i>Ilyonectria rufa</i> <i>Ilyonectria capensis</i> <i>Ilyonectria liriodendri</i>
<i>Lonicera</i> sp.	<i>Dactylonectria macrodidyma</i>
<i>Myrtus communis</i>	<i>Dactylonectria macrodidyma</i>
<i>Pinus halepensis</i>	<i>Dactylonectria macrodidyma</i> <i>Dactylonectria novozelandica</i> <i>Dactylonectria pauciseptata</i> <i>Dactylonectria torresensis</i> <i>Ilyonectria capensis</i> <i>Ilyonectria liriodendri</i> <i>Ilyonectria rufa</i> <i>Dactylonectria</i> sp. 3
<i>Pinus</i> sp.	<i>Dactylonectria novozelandica</i>
<i>Pistacia lentiscus</i>	<i>Dactylonectria novozelandica</i>
<i>Pyracantha</i> sp.	<i>Dactylonectria macrodidyma</i>
<i>Quercus faginea</i>	<i>Dactylonectria macrodidyma</i> <i>Ilyonectria rufa</i>
<i>Quercus ilex</i>	<i>Dactylonectria macrodidyma</i> <i>Dactylonectria novozelandica</i>
<i>Quercus ilex</i>	<i>Dactylonectria torresensis</i> <i>Ilyonectria pseudodestructans</i> <i>Ilyonectria rufa</i> <i>Cylindrocarpon</i> sp. <i>Cylindrodendrum</i> sp. 1
<i>Quercus</i> sp.	<i>Dactylonectria novozelandica</i> <i>Ilyonectria cyclaminicola</i> <i>Ilyonectria liriodendri</i>
<i>Quercus suber</i>	<i>Dactylonectria novozelandica</i> <i>Ilyonectria liriodendri</i>
<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Dactylonectria macrodidyma</i> <i>Dactylonectria novozelandica</i> <i>Dactylonectria torresensis</i>
<i>Santolina chamaecyparissus</i>	<i>Dactylonectria novozelandica</i>

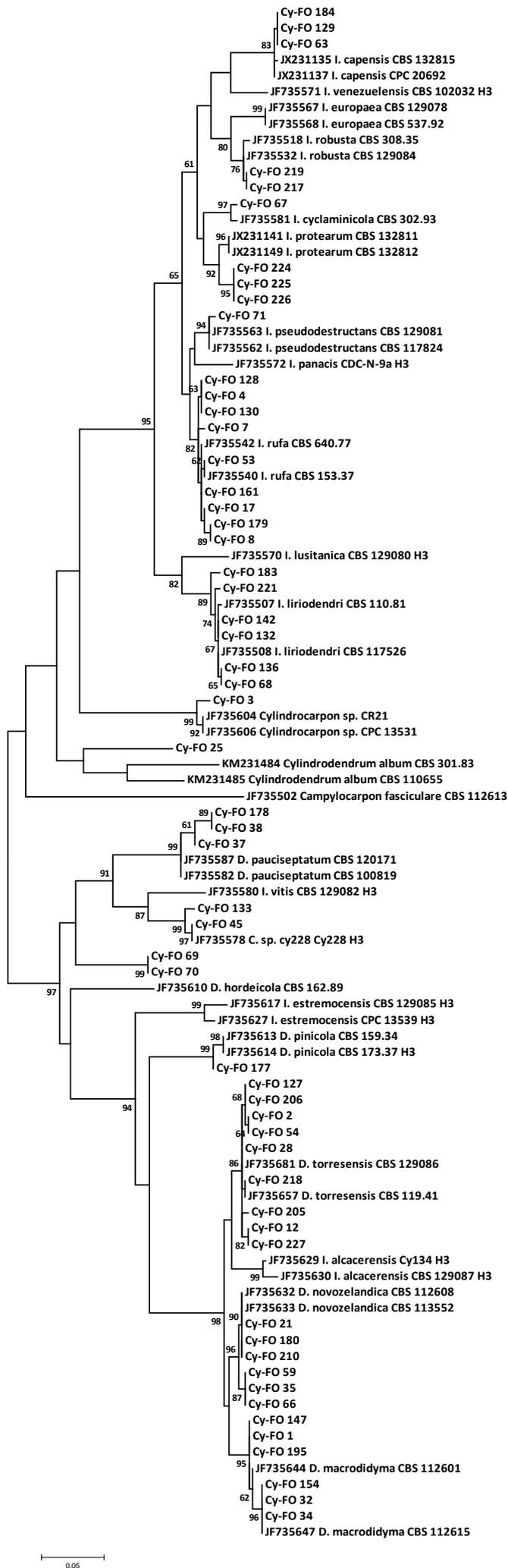


Figura 1. Árbol filogenético construido con el método Maximum Likelihood basado en el modelo de sustitución de Tamura-Nei, utilizando la secuencia de la histona H3. Los aislados utilizados se especifican en la Tabla 2. Las secuencias de referencia empleadas se muestran en la Tabla 1.

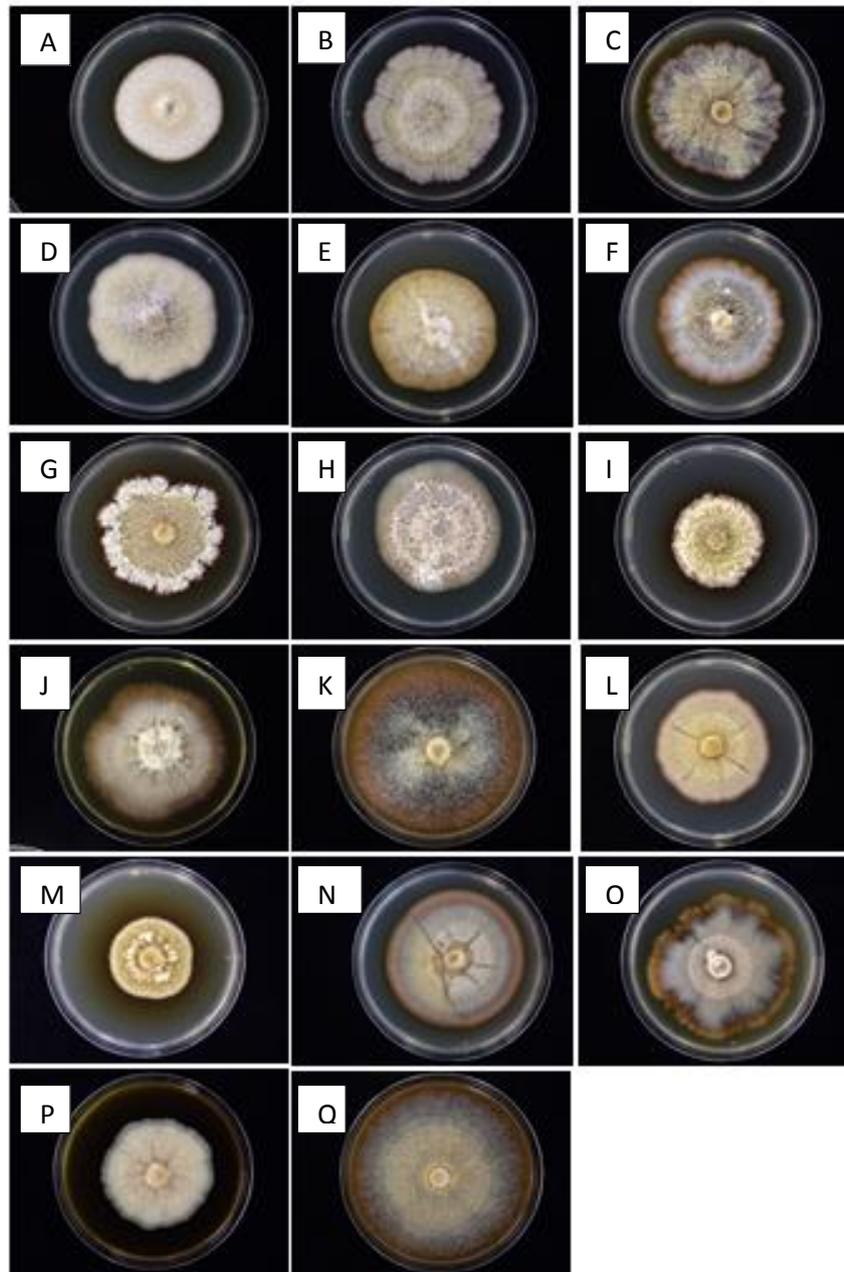


Figura 2. Aspecto de los cultivos representativos de cada especie crecidos en PDA durante 10-15 días: A: *Cylindrocarpon* sp., B: *Dactylonectria macrodidyma*, C: *D. novozelandica*, D: *D. pauciseptata*, E: *D. pinicola*, F: *D. torresensis*, G: *Ilyonectria capensis*, H: *I. cyclaminicola*, I: *I. liriodendri*, J: *I. pseudodestructans*, K: *I. robusta*, L: *I. rufa*, M: *Cylindrodendrum* sp. 1, N: *Dactylonectria* sp. 1, O: *Dactylonectria* sp. 2, P: *Dactylonectria* sp. 3 y Q: *Ilyonectria* sp. 1

V.- Discusión

Este es el primer estudio de revisión filogenética de anamorfos de *Cylindrocarpon* que afectan a las raíces de especies forestales llevado a cabo en España. Desde 2009 se realizaron diversas prospecciones en viveros forestales con el objetivo de evaluar la incidencia de infecciones causadas por hongos y oomicetos, dando lugar a diversas colecciones de microorganismos aislados. En el presente trabajo se ha analizado una colección de 105 aislados de anamorfos de *Cylindrocarpon* obtenidos de diferentes hospedantes en viveros forestales y, basándose en los resultados de la amplificación y secuenciación de la región HIS del genoma, se han identificado 12 especies fúngicas: *Cylindrocarpon* sp., *Dactylonectria macrodidyma*, *D. novozelandica*, *D. pauciseptata*, *D. pinicola*, *D. torresensis*, *Ilyonectria capensis*, *I. cyclaminicola*, *I. lirioidendri*, *I. pseudodestructans*, *I. robusta* e *I. rufa*. Además de estas especies fúngicas que, estando o no citadas previamente en España o en los mismos hospedantes, eran ya conocidas, en el trabajo se han encontrado otras cinco posibles nuevas especies que hemos nombrado provisionalmente como: *Cylindrodendrum* sp. 1, *Dactylonectria* sp. 1, *Dactylonectria* sp. 2, *Dactylonectria* sp. 3 e *Ilyonectria* sp. 1.

A continuación se comenta la situación de cada una de las especies detectadas respecto, sobre todo, a su incidencia en el ámbito forestal.

Cylindrocarpon sp. es la primera vez que se cita en España, ya que hasta que se ha encontrado aquí en *Q. ilex*, solamente se había descrito en Holanda, infectando raíces de *Hordeum vulgare* (Cabral, 2012a).

D. macrodidyma se ha descrito como agente causal de la enfermedad denominada pie negro de la vid en todo el mundo, incluida España (Agustí-Brisach y Armengol, 2013), además también se ha encontrado en *Protea* sp. en Sudáfrica (Lombard, 2013). Pero nunca se había descrito su presencia en especies forestales hasta este trabajo, donde se ha encontrado infectando a raíces de: *I. aquifolium*, *J. phoenicea*, *Lonicera* sp., *M. communis*, *P. halepensis*, *Pyracantha* sp., *Q. faginea*, *Q. ilex* y *R. officinalis*.

D. novozelandica ha sido el hongo más frecuente en este estudio. Su situación a nivel mundial es muy parecida a la de *D. macrodidyma*. Se trata de otro de los principales agentes causales del pie negro de la vid en viñas de todo el mundo (Agustí-Brisach y Armengol, 2013) y, además, se ha encontrado en *Festuca duriuscula* en Portugal (Cabral, 2012a), y en *Viburnum tinus* en Italia (Aiello, 2015), pero nunca antes se había aislado de raíces de plantas forestales en España, por lo que se cita por primera vez aquí en: *C. azarolus*, *J. phoenicea*, *P. halepensis*, *P. lentiscus*, *Q. ilex*, *Q. suber*, *R. officinalis* y *S. chamaecyparissus*.

D. pauciseptata es bastante frecuente en *Vitis* sp., habiéndose encontrado en Eslovenia (Lombard, 2014) e Italia (Aiello, 2014). También en Italia, se ha aislado de *Vitis vinifera* (Cabral, 2012a) y *Viburnum tinus* (Aiello, 2015). Y en España en *Pinus radiata* (Agustí-Brisach, 2011). En el estudio se ha aislado de *A. nordmanniana* y *P. halepensis*.

D. pinicola, hasta la fecha, solamente se había encontrado en *Pinus laricio* en Reino Unido (Lombard, 2014), y en viñas en Portugal (Cabral, 2012c), por lo que estamos ante una primera cita en España, siendo el hospedante *A. concolor*.

Otra especie que está ampliamente distribuida en viñas de todo el mundo es *D. torresensis* (Agustí-Brisach y Armengol, 2013), en este caso también se ha encontrado en otros hospedantes como *A. nordmanniana* y *Fragaria* sp. (Cabral 2012a) en Holanda, *Protea* sp. en Sudáfrica (Lombard, 2013), *Viburnum tinus* en Italia (Aiello, 2015), *Quercus* sp. en Austria (Cabral 2012) y *Fragaria x ananassa* en Estados Unidos (Cabral 2012c). En este trabajo se ha identificado en: *A. unedo*, *C. albidus*, *J. regia*, *P. halepensis*, *Q. ilex* y *R. officinalis*.

En el caso de *I. capensis* estamos ante otra primera cita en España y, además, en este caso en Europa, ya que hasta la fecha este hongo solamente se había encontrado infectando a *Protea* sp. en Sudáfrica (Lombard, 2013). En nuestro trabajo se ha encontrado en aislados procedentes de: *A. unedo*, *Juniperus* sp. y *P. halepensis*. Igualmente parecido es el caso de la especie *I. cyclaminicola*, que se ha detectado en *Quercus* sp., y hasta la realización de este estudio solamente constaba como agente infeccioso de *Cyclamen* sp. en Holanda (Lombard,2013).

I. liriodendri es una especie que está distribuida por viñedos de todo el mundo, incluidos viñedos españoles (Agustí-Brisach y Armengol, 2013). También se ha encontrado en Italia en tulípero (*Liriodendrum tulipifera*) (Lombard, 2013). En este trabajo se ha hallado en las siguientes especies forestales: *A. unedo*, *Juniperus* sp., *P. halepensis*, *Quercus* sp. y *Q. suber*.

La especie *I. pseudodestructans* encontrada en *Q. ilex* en este trabajo, es la primera cita en España de este patógeno, que hasta la fecha solamente se había descrito en vides de Portugal y *Quercus* sp. en Austria (Lombard, 2013).

I. robusta está citada en Portugal infectando a *Vitis vinifera* (Lombard, 2014), Canadá en *Panax quinquefolium* (Lombard, 2013) y *Prunus cerasus* cv. 'Montmorency' (Cabral, 2012a), Alemania en *Tilia petiolaris* (Lombard, 2013) y Austria en *Q. robur* (Cabral, 2012a). Aunque como se puede apreciar se ha encontrado en varios países, incluyendo algunos europeos, esta especie nunca se había citado en España, donde lo hemos encontrado en *J. regia*. Un caso parecido es el de *I. rufa*, que aun habiéndose hallado en muchos lugares y sobre distintos hospedantes, hasta la fecha nunca se había descrito en España, por lo que en el trabajo lo citamos por primera vez en nuestro país como agente infeccioso de raíces de: *A. nordmanniana*, *A. unedo*, *Juniperus* sp., *P. halepensis*, *Q. faginea* y *Q. ilex*. *I. rufa* ha sido citada previamente en Canadá, infectando a *Picea glauca* y *Pseudotsuga menziesii*, *Azalea indica* en Bélgica, *Abies alba* en Francia e infestando arena de duna en Francia (Cabral, 2012a).

En cuanto a las nuevas especies, *Cylindrodendrum* sp. 1 se ha encontrado en *Q. ilex*, *Dactylonectria* sp. 1 en *B. sempervirens*, *Dactylonectria* sp. 2 en *I. aquifolium*, *Dactylonectria* sp. 3 en *P. halepensis* e *Ilyonectria* sp. 1 en *Ilex* sp.

Los anamorfos de *Cylindrocarpon* encontrados en el estudio están distribuidos indistintamente por todas las provincias y comunidades autónomas muestreadas en el trabajo. Por lo que no se puede decir que haya más presencia en una zona geográfica estudiada que en otra, concluyendo que están presentes en toda la geografía española, y que no se habían hallado antes probablemente no por su ausencia, sino porque no se había trabajado previamente con estos hongos en plantas forestales. En cuanto a la preferencia de los patógenos por las especies hospedantes, tampoco se puede afirmar que haya una o varias

especies vegetales que muestren una mayor preferencia por alguno de los patógenos, ya que, salvo los hongos que han aparecido puntualmente en el estudio, los que han tenido una presencia más frecuente como *D. macrodidyma*, *D. novozelandica*, *D. torresensis*, *I. liriodendri* e *I. rufa*, se han encontrado en muchos géneros de plantas forestales pertenecientes a distintas familias botánicas. Géneros tan diversos como: *Arbutus*, *Crataegus*, *Juniperus*, *Lonicera*, *Quercus*, *Rosmarinus*, *Cistus*, *Juglans*, *Myrtus* y *Pinus*. Por lo que en este estudio no se ha encontrado ninguna agrupación geográfica ni por planta hospedante clara de ninguna de las especies fúngicas estudiadas.

Este trabajo puede servir de punto de partida de estudios futuros, ya que en España aunque se ha trabajado mucho con el complejo de anamorfos de *Cylindrocarpon* como agentes causantes de pie negro de la vid, no se ha estudiado lo suficiente la implicación que tienen estos patógenos en plantas forestales, hecho importante por diversas razones como son: 1. El desconocimiento de la existencia de estos patógenos en los viveros forestales hace que no se aplique ninguna medida para evitar la infección de plántulas en vivero. 2. Al salir los brinzales infectados de vivero, aumentan las probabilidades de su no supervivencia en campo, lo que supone el encarecimiento con reposiciones de marras en las repoblaciones forestales, objetivo último de muchos de los viveros forestales, o incluso el fracaso de las mismas. 3. Los viveros forestales pueden estar actuando inadvertidamente de vía de dispersión de estos patógenos. Además, es evidente que queda pendiente un gran trabajo futuro a nivel taxonómico, ya que en este estudio, habiendo trabajado con 105 aislados, se han encontrado aislados de cinco posibles nuevas especies.

A parte de estos aspectos, en el futuro también podría resultar interesante realizar estudios dirigidos a esclarecer si verdaderamente hay algunas especies vegetales más sensibles al ataque de estos hongos y, así, poder establecer medidas de control eficaces, concretas para ellas.

VI.- CONCLUSIONES

- La amplificación y secuenciación de la región HIS del genoma de 105 aislados de anamorfos de *Cylindrocarpon* obtenidos de diferentes hospedantes en viveros forestales ha permitido la identificación de 12 especies fúngicas: *Cylindrocarpon* sp., *Dactylonectria macrodidyma*, *D. novozelandica*, *D. pauciseptata*, *D. pinicola*, *D. torresensis*, *Ilyonectria capensis*, *I. cyclaminicola*, *I. liriiodendri*, *I. pseudodestructans*, *I. robusta* e *I. rufa*. Además, se han identificado otras cinco posibles nuevas especies que han sido nombradas provisionalmente como: *Cylindrodendrum* sp. 1, *Dactylonectria* sp. 1, *Dactylonectria* sp. 2, *Dactylonectria* sp. 3 e *Ilyonectria* sp. 1.
- En este estudio no se ha encontrado ninguna agrupación geográfica ni por planta hospedante para ninguna de las especies fúngicas identificadas.

VII.- BIBLIOGRAFÍA

- Abad-Campos P., A. Giménez Marco, S. Piazza, M. León, J. García-Jiménez y A. M^a. Pérez-Sierra, 2012. Detección de *Phytophthora* spp. y patógenos fúngicos en viveros forestales de la Comunidad Valenciana. *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales* 36, 99-104.
- Aiello D., V. Guarnaccia, F. Epifani, G. Perrone y G. Polizzi, 2015. '*Cylindrocarpon*' and *Ilyonectria* species causing root and Crown rot disease of potted laurustinus plants in Italy. *Journal of Phytopathology* 163, 675-680.
- Agustí-Brisach C. y J. Armengol, 2013. Black-foot disease of grapevine: an update on taxonomy, epidemiology and management strategies. *Phytopathologia Mediterranea* 52, 2, 245-261.
- Agustí-Brisach C., A. Pérez-Sierra, F. García-Figueres, C. Montón y J. Armengol, 2011. First report of damping-off caused by *Cylindrocarpon pauciseptatum* on *Pinus radiata* in Spain. *Plant Disease* 95, 7, 874.
- Alaniz S., M. León, J. García-Jiménez, P. Abad y J. Armengol, 2007. Characterization of *Cylindrocarpon* species associated with black-foot disease of grapevine in Spain. *Plant Disease* 91, 1187-1193.
- Alaniz S., J. Armengol, M. León, J. García-Jiménez y P. Abad-Campos, 2009. Analysis of genetic and virulence diversity of *Cylindrocarpon liriodendri* and *C. macrodidymum* associated with black foot disease of grapevine. *Mycological Research* 113, 16-23.
- Beyer-Ericson L., E. Damm y T. Unestam, 1991. An overview of root dieback and its causes in Swedish forest nurseries. *European Journal of Forest Pathology* 21, 439-443.
- Booth C., 1966. The genus *Cylindrocarpon*. *Mycological Papers* 104, 1-56.
- Brassier C.M., 2008. The biosecurity threat to the UK and global environment from international trade in plants. *Plant Pathology* 57, 792-808.
- Brayford D., 1993. *Cylindrocarpon*. In: *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*. (Singleton L.L., Mihail J.D., Rush C.M., ed.). APS Press, St. Paul, MN, USA, 265 pp.
- Brayford D., B.M. Honda, F.R. Mantiri y G.J. Samuels, 2004. *Neonectria* and *Cylindrocarpon*: the *Nectria mammoidea* group and species lacking microconidia. *Mycologia* 65, 256-261.
- Cabral A., J.Z. Groenewald, C. Rego, H. Oliveira y P.W. Crous, 2012a. *Cylindrocarpon* root rot: multi-gene analysis reveals novel species within the *Ilyonectria radicola* species-complex. *Mycological Progress* 11, 655-688.
- Cabral A., C. Rego, P.W. Crous y H. Oliveira, 2012b. Virulence and cross-infection potential of *Ilyonectria* spp. To grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 51, 340-354.
- Cabral A., C. Rego, T. Nascimento, H. Oliveira, J.Z. Groenewald y P.W. Crous, 2012c. Multi-gene analysis and morphology reveal novel *Ilyonectria* species associated with black foot disease of grapevines. *Fungal Biology* 116, 62-80.

Chaverri P., C. Salgado, Y. Hirooka, A.Y. Rossman y G.J. Samuels, 2011. Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. *Studies in Mycology* 68, 57-78.

Cooke M.C., 1884. Synopsis pyrenomycetum. *Grevillea* 12, 97.

Crous P.W., J.Z. Groenewald, J.M. Risede y N.L. Hywel-Jones, 2004. *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaeropedunculate vesicles. *Studies in Mycology* 50, 415-429.

Grasso S. y G. Magnano Di San Lio, 1975. Infezioni di *Cylindrocarpon obtusisporum* su piante di vite in Sicilia. *Vitis* 14, 38-39.

Halleen F., P.H. Fourie y P.W. Crous, 2006a. A review of black foot disease of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 45, S55-S67.

Halleen F., H.J. Schroers, J.Z. Groenewald y P.W. Crous, 2004. Novel species of *Cylindrocarpon* (*Neonectria*) and *Campylocarpon* gen. nov. associated with black-foot disease of grapevines (*Vitis* spp.) *Studies in Mycology* 50, 431-455.

Halleen F., H.J. Schroers, J.Z. Groenewald, C. Rego, H. Oliveira y P.W. Crous, 2006b. *Neonectria liriodendri* sp. nov., the main causal agent of black foot disease of grapevine. *Studies in Mycology* 55, 227-234.

Jung T., A. Vannini y C.M. Brasier, 2007. Progress in understanding *Phytophthora* disease of trees in Europe 2004-2007. In: *Proceedings of the Fourth Meeting of the IUFRO Phytophthoras in Forest and Natural Ecosystems*: 3-25. Monterey, California.

Lilja A. y M. Poteri, 2013. 27 Seed, seedling and Nursery diseases. *Infectious forest diseases* (eds P. Gonthier and G. Nicolotti), 567-568.

Lombard L., C.M. Bezuidenhout y P.W. Crous, 2013. *Ilyonectria* black foot rot associated with *Proteaceae*. *Australasian Plant Pathology* 42, 337-349.

Lombard L., N.A. Van Der Merwe, J.Z. Groenewald y P.W. Crous, 2014. Lineages in *Nectriaceae*: Re-evaluating the generic status of *Ilyonectria* and allied genera. *Phytopathologia Mediterranea* 53, 340-357.

Lombard L., P.W. Crous, B.D. Wingfield y M.J. Wingfield, 2010. Phylogeny and systematics of the genus *Calonectria*. *Studies in Mycology* 66, 31-69.

MacDonald J.D. y E.E. Butler, 1981. *Cylindrocarpon* root rot of tulip poplar. *Plant Disease* 65, 154-157.

Maluta D.R. y P. Larignon, 1991. Pied-noir: mieux vaut prévenir. *Viticulture* 11, 71-72.

Mantiri F.R. G.J. Samuels, J.E. Rahe y B.M. Honda, 2001. Phylogenetic relationships in *Neonectria* species having *Cylindrocarpon* anamorphs inferred from mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Canadian Journal of Botany* 79, 334-340.

Menkis A., R. Vasiliauskas, A.F.S. Taylor, E. Stenström, J. Stenlid y R. Finlay, 2006. Fungi in decayed roots of conifer seedlings from forest nurseries, afforested clearcuts and abandoned farmland. *Plant Pathology* 55, 117-129.

Staden R., K.F. BEAL y J.K. BONFIELD, 1998. The staden package. Bioinformatics methods and protocols. *Humana Press*, 1999. p. 115-130.

Tamura K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski y S. Kumar, 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30, 2725-2729.