

Accésit SECF 2022 en el apartado de Tesis Doctoral

Tecnologías transcriptómicas y su potencial en la gestión del chancro resinoso del pino

Transcriptomics technologies and their potential for pine pitch canker management

Zamora-Ballesteros, C.^{1,2*}; Martín-García, J.^{1,2}; Diez, J.J.^{1,2}

¹*Sustainable Forest Management Research Institute,
University of Valladolid—INIA, 34004 Palencia, Spain*

²*Department of Vegetal Production and Forest Resources,
University of Valladolid, 34004 Palencia, Spain*

* Autor de correspondencia: cristinazamoraballesteros@gmail.com

Resumen

El chancro resinoso del pino es una grave enfermedad causada por el hongo invasivo *Fusarium circinatum* que afecta a *Pinus* spp. y *Pseudotsuga menziesii* en todo el mundo. Varios factores han contribuido a la propagación de la enfermedad a todos estos continentes, siendo el más importante el comercio internacional de material vegetal de reproducción. A pesar de su importancia, no se dispone de medidas eficaces para erradicar o controlar la enfermedad ni en los viveros ni en el monte. En esta tesis se llevó a cabo una recopilación de información actual sobre las vías de propagación del patógeno, proponiendo mecanismos preventivos para evitar su introducción en zonas libres de la enfermedad. Proponemos más investigación sobre el posible papel de los micovirus como agentes de control biológico, explorando nuevos métodos de transfección con micovirus de *F. circinatum*. Utilizamos las tecnologías transcriptómicas que, además de permitirnos estudiar el efecto de un micovirus en su hongo hospedante a nivel molecular, nos proporcionaron información útil sobre los genes, las transcripciones, y sus funciones asociadas a las interacciones planta-patógeno. Mediante el uso de RNA-Seq y especies susceptibles y resistentes a *F. circinatum*, identificamos los genes y vías metabólicas asociados a caracteres de resistencia de la enfermedad y presentamos un mapa completo de los ARNlnc durante la infección del patógeno. Nuestros hallazgos sobre los mecanismos reguladores implicados en la defensa de los hospedantes permitirán la optimización de los programas de mejora genética para la comercialización de pinos resistentes al PPC.

Palabras clave: *Fusarium circinatum*, micovirus, control biológico, resistencia genética, mejora genética.

Abstract

Pine pitch canker (PPC) is a serious disease causing by the invasive fungus *Fusarium circinatum* affecting *Pinus* spp. and *Pseudotsuga menziesii* worldwide. Several factors have contributed to the spread of the disease to all these continents, the most important being the international trade in plant reproductive material. Despite its importance, no effective measures are available to eradicate or control the disease either in nurseries or in the field. In this thesis, a compilation of current information on the pathways of spread of the pathogen was carried out, proposing preventive mechanisms to avoid its introduction into disease-free areas. We propose further research on the possible role of mycoviruses as biological control agents, exploring new methods of transfection with *F. circinatum* mycoviruses. We used transcriptomics technologies that, in addition to allowing us to study the effect of a mycovirus on its host fungus at the molecular level, provided useful information on genes, transcripts, and their functions associated with plant-pathogen interactions. Using RNA-Seq and susceptible and resistant species to *F. circinatum*, we identified genes and metabolic pathways associated with disease resistance traits and presented a comprehensive mapping of lncRNAs during pathogen infection. Our findings on the regulatory mechanisms involved in host defence will allow the optimisation of breeding programmes for the commercialisation of PPC-resistant pines.

Keywords: *circinatum*, micovirus, biological control, genetic resistance, resistance breeding.

El chancro resinoso del pino

La incidencia de las enfermedades forestales provocadas por patógenos exóticos invasores está aumentando a un ritmo sin precedentes debido a la globalización (Santini *et al.*, 2013; Wingfield *et al.*, 2015). Un escenario agravado por el cambio climático que a menudo mejora las condiciones para el establecimiento del patógeno una vez introducido (Sturrock *et al.*, 2011). El caso de *Fusarium circinatum*, el agente causal del chancro resinoso del pino (PPC, por sus siglas en inglés), es un

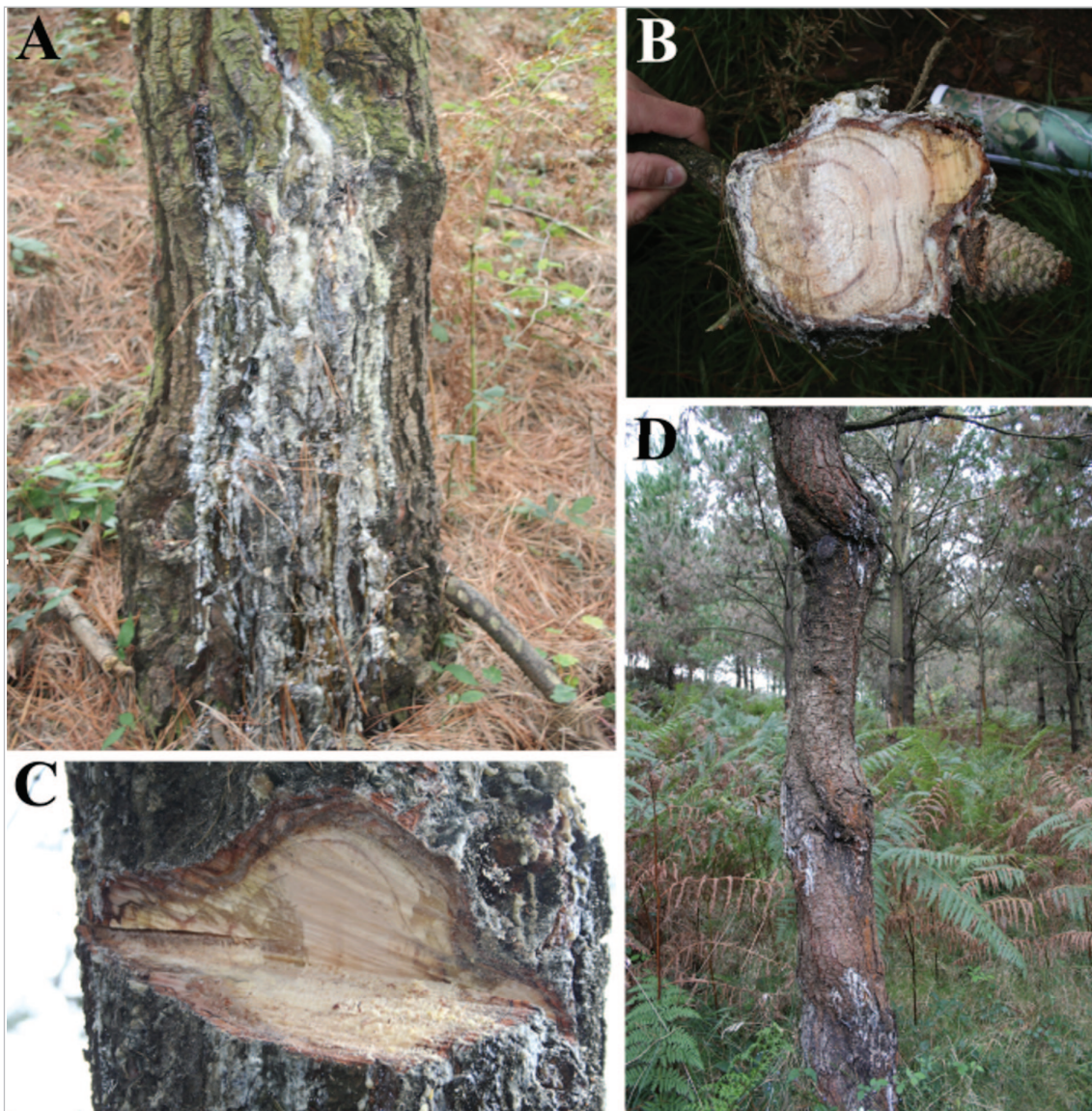


Figura 1. Síntomas de la enfermedad PPC: (A) chancro impregnado de resina en el tronco de *P. radiata*; (B) sección transversal del tronco que muestra la deformación debido a la presencia del chancro; (C) corte en el tronco que muestra la colonización del patógeno; (D) deformación en el tronco por infección de *Fusarium circinatum* que reducen drásticamente el valor de la madera, ya que los troncos quedan inutilizados para la industria del aserrado.

claro ejemplo del impacto que puede causar la introducción de un patógeno exótico en el sector forestal a escala regional e incluso mundial. Esta grave enfermedad afecta a *Pinus* spp. y *Pseudotsuga menziesii* en ambos hemisferios. La infección por su agente causal provoca chancros de resina en los troncos y ramas laterales de los huéspedes maduros que merman la productividad de la especie y con el tiempo pueden llegar a causar anillamiento y matar el árbol (*Figura 1*). En los viveros, *F. circinatum* causa damping-off de plántulas llegando a causar grandes tasas de mortalidad.

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2010) afirmó que, en las condiciones climáticas y de distribución de hospedantes actuales, de los aproximadamente 50 millones de hectáreas de pinares existentes en Europa (excluida la Rusia europea), las zonas potencialmente amenazadas por PPC cubren más de 10 millones de hectáreas. En España, por ejemplo, la presencia de *F. circinatum* ha provocado graves pérdidas de producción, así como una reducción de los ingresos debido a la prohibición de plantar especies susceptibles en zonas (Real Decreto Español 637/2006 y 65/2010), los elevados costes invertidos en seguimiento y control, y las prohibiciones de exportación de madera y otros productos (Pinestrength, 2015).

La llegada de la enfermedad a Europa a través de España ha provocado la práctica desaparición del *Pinus radiata* (pino de Monterrey) como especie forestal (Gobierno de Navarra, 2018). Los daños directos causados por *F. circinatum*, los indirectos por los temporales de viento que derriban árboles estructuralmente debilitados



Figura 2. Plantación de *Pinus radiata* abandonada tras la severa infección por *F. circinatum* en Cantabria (norte de España).

por la presencia de chancros, y las medidas de cuarentena, hacen muy difícil la repoblación de esta especie. Esto ha provocado un cambio del paisaje en el norte de España (Figura 2).

A pesar de su importancia, no se dispone de medidas eficaces para erradicar o controlar la enfermedad del PPC ni en los viveros ni en el monte. En esta tesis doctoral se llevó a cabo una recopilación de información sobre las vías de propagación del patógeno, proponiendo mecanismos preventivos para evitar su introducción en zonas libres de la enfermedad. Para obtener más información sobre los micovirus, posibles agentes de biocontrol, presentes en este patógeno, se realizó un estudio del efecto de la pérdida de uno de ellos en el transcriptoma del hongo. Finalmente, se examinaron los mecanismos moleculares implicados en la defensa de especies de pino con diferentes susceptibilidades mediante el estudio de sus transcriptomas durante la infección de *F. circinatum*.

Vías de propagación del patógeno y medidas preventivas

La complejidad del estilo de vida de *F. circinatum*, el comercio internacional de material vegetal de reproducción y el fallido reglamento actual han dado como resultado una dispersión global y una situación donde el proceso infectivo ya es irreversible en los países afectados (Figura 3).

F. circinatum se propaga por múltiples vías, tanto de forma natural, asociada principalmente a la diseminación local, como por mediación humana, que implica una dispersión global (Figura 4). La dispersión a larga distancia es resultado del co-

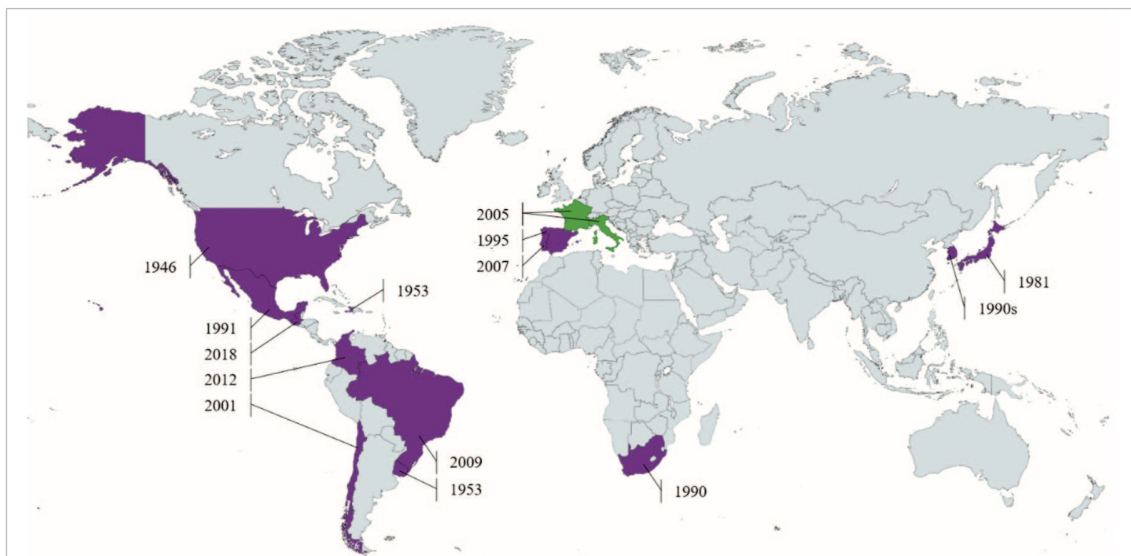


Figura 3. Actual (2021) rango de distribución de *F. circinatum* y fechas de la introducción del patógeno. Desde el primer registro en 1946 en Norteamérica, se ha notificado la presencia de *F. circinatum* en 14 países de América, Asia, África y Europa. Países en morado: la enfermedad está presente. Países en verde: la enfermedad se ha dado como erradicada.

mercio y el movimiento de plantas vivas, madera, corteza, suelo y semillas infectadas (EFSA, 2010). El establecimiento de la enfermedad en el campo es motivo de gran preocupación por falta de medidas de intervención. De hecho, la erradicación solo podría ser posible con una detección temprana del patógeno (Vainio *et al.*, 2019). La existencia de plántulas asintomáticas, hacen de los métodos moleculares la herramienta más rápida y fiable para su detección (Ioos *et al.*, 2019).

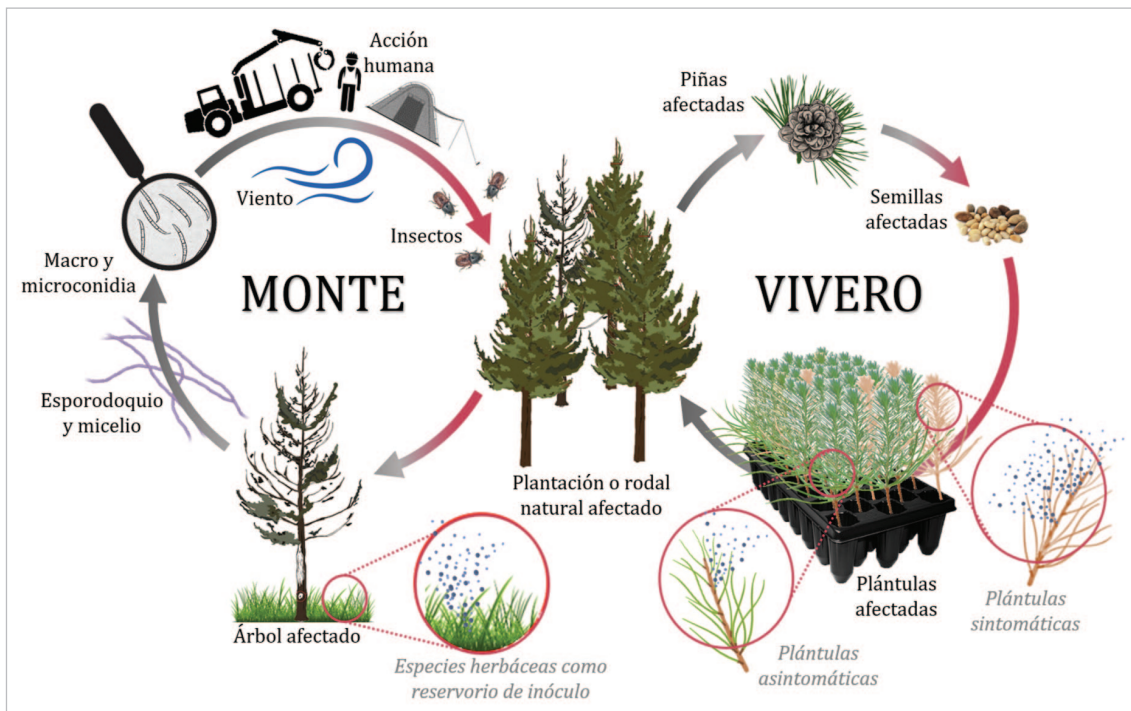


Figura 4. Vías de dispersión y fuentes potenciales de inóculo de *F. circinataum*. La propagación a larga distancia de *F. circinataum* se produce principalmente a través del movimiento de semillas infectadas, mientras que, a nivel regional, el movimiento de plántulas, sustratos o contenedores puede tener un papel importante en la dispersión del hongo. La invasión a los viveros se produce a través de las semillas infectadas, y la propagación posterior puede producirse mediante la plantación de plántulas contaminadas, especialmente por la posibilidad de que éstas permanezcan asintomáticas. Una vez establecido, *F. circinataum* se propaga por lluvia, viento e insectos. La propagación natural del patógeno es limitada debido a las cortas distancias de dispersión de las esporas y de las distancias de vuelo de los insectos diseminadores.

Las prácticas de saneamiento en viveros son fundamentales para evitar la propagación de la enfermedad al campo (Figura 5). En el campo, deben evitarse los métodos silvícolas como la poda u otros factores que puedan inducir estrés a los árboles. Además, en las operaciones forestales deben aplicarse normas sanitarias estrictas y sentido común.

El reciente descubrimiento de la colonización endofítica de especies no coníferas por *F. circinataum* ilustra la importancia del conocimiento biológico y ecológico para el diseño de estrategias de intervención eficaces. El establecimiento de redes mundiales de colaboración centradas en la integración de los enfoques de gestión y

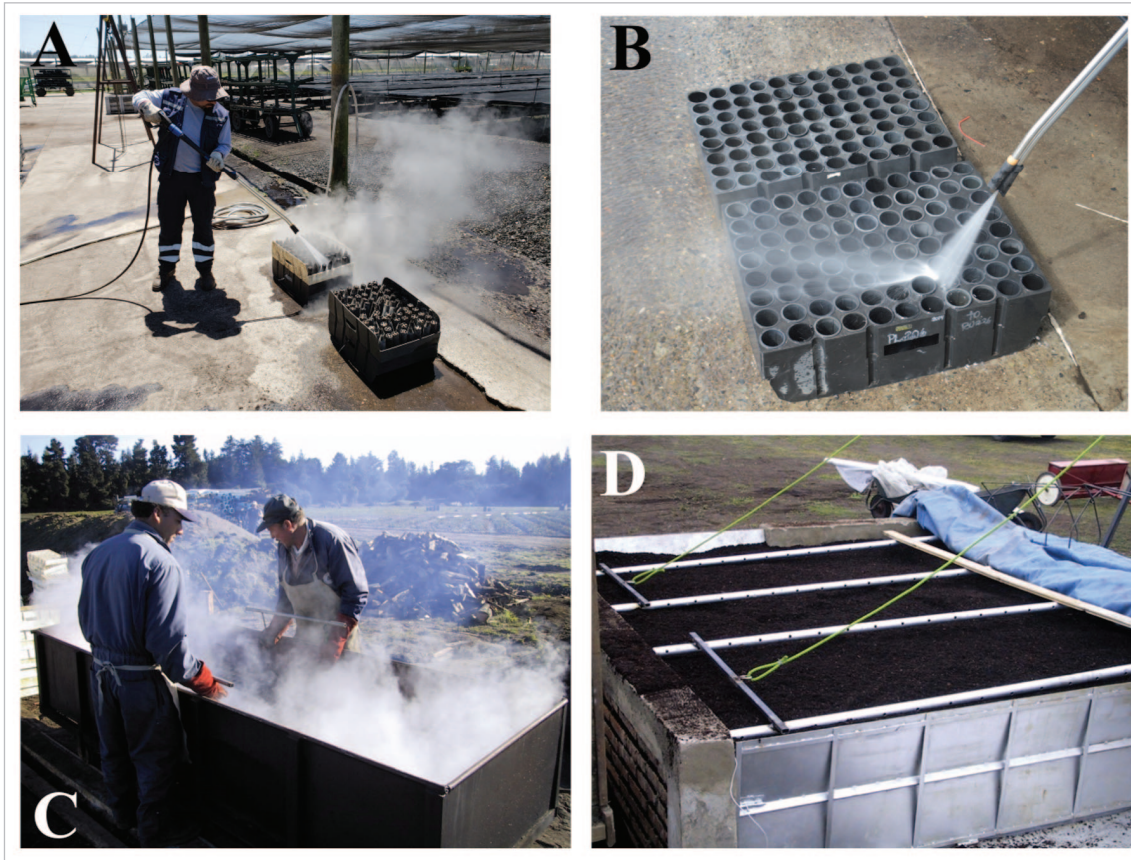


Figura 5. Prácticas de saneamiento en viveros contra *F. circinatum* en Chile que incluyen la quema de plantas infectadas, la cloración o el tratamiento con ozono del agua de riego y la limpieza de bandejas o contenedores por inmersión en agua caliente o vapor. (A, B) lavado de bandejas; (C) desinfección manual de bandejas con agua caliente; (D) saneamiento de sustratos con vapor.

los conocimientos disponibles es el único medio por el que podemos hacer frente de manera realista a estos patógenos (Wingfield *et al.*, 2015).

La transcriptómica y el estudio de micovirus como agentes de control biológico

Dado que la aplicación de una nueva legislación altamente restrictiva en la protección forestal de la Unión Europea da prioridad a los métodos no químicos de protección fitosanitaria (EU Commission, 2019), es evidente que se necesitan métodos respetuosos con el medio ambiente. En este sentido, se está explorando el uso de micovirus como agentes de control biológico de *F. circinatum*. Las cepas españolas del hongo suelen estar infectadas por tres micovirus, sin embargo, su efecto sobre el hospedador aún no está claro. Tradicionalmente, la obtención de una cepa infectada y libre de virus en un fondo genético idéntico (cepas isogénicas) se ha considerado como el enfoque óptimo para explorar las interacciones micovirus-hongo. Sin em-

bargo, la manipulación de micovirus en el laboratorio para dilucidar una posible alteración en el funcionamiento molecular del hongo al que infecta requiere un esfuerzo metódico. La difícil curación de virus o la desaparición espontánea de éstos, junto con una posible alteración en la maquinaria transcriptómica del hongo debido a estos procesos, hacen sumamente difícil averiguar su efecto real. El estudio realizado en el segundo artículo investiga el efecto residual en la expresión génica de *F. circinatum* causado por una infección pasada del micovirus FcMV1. A pesar del reducido número de genes diferencialmente expresados (*Tabla 1*), nuestros resultados mostraron una ligera aceleración del metabolismo del hospedador. Esto se explica por la regulación positiva de genes implicados en funciones esenciales para el desarrollo del hongo como la vía de la metionina. Por ello, cobra especial importancia la obtención de líneas isogénicas con y sin infecciones por micovirus para un estudio preciso de las interacciones virus-hongo, evitando aislados alterados que hayan sufrido pérdidas de micovirus, o hayan sido sometidos a tratamientos invasivos para eliminarlos.

Tabla 1. Se identificaron 12 genes expresados diferencialmente en el patógeno tras la pérdida del micovirus mediante la tecnología RNA-Seq.

Gen Locus	Función génica	Fold Change	Corrección FDR p-value
FCIRG_04875	Nicotianamine synthase 3	2,22 ↑	8,29E-05
FCIRG_04876	O- acetylhomoserine (thiol)-lyase	2,62 ↑	0
FCIRG_04877	Carnosine synthase 1	2,22 ↑	0,02
FCIRG_04880	GA4 desaturase	2,43 ↑	0
FCIRG_04881	Probable O- acetylhomoserine (thiol)-lyase	2,53 ↑	9,13E-09
FCIRG_04882	Related to oxidoreductase	2,24 ↑	0
FCIRG_04883	Related to naringenin, 2-oxoglutarate 3-dioxygenase	2,33 ↑	0
FCIRG_04972	Profilin	2,34 ↑	0,01
FCIRG_05571	Related to human TGR-CL10C	2,06 ↑	8,29E-05
FCIRG_07760	ABC transporter YOR1	2,19 ↑	0
FCIRG_14348	Homoserine O- acetyltransferase	2,19 ↑	0
FCIRG_14896	Probable CYP450 monooxygenase (lovA)	3,20 ↓	0

La transcriptómica y la resistencia genética

El enfoque más ecológico y eficaz a largo plazo para la prevención de enfermedades implica el uso de plantas resistentes (Dodds and Rathjen, 2010). Existe una gran diferencia en susceptibilidad a *F. circinatum* entre sus múltiples hospedantes, lo que proporciona una oportunidad útil para la gestión de la enfermedad. Además, la era ómica ha revolucionado la biología (*Figura 6*), lo cual hace que la selección y

el mejoramiento de plantas se cumplen con mayor facilidad y precisión. La ciencia forestal también está aprovechando estas tecnologías, sin embargo, los recursos genómicos de las coníferas son limitados, principalmente debido al gran tamaño y a la complejidad de sus genomas (De La Torre *et al.*, 2020; Neale *et al.*, 2014; Nystedt *et al.*, 2013). Además, la anotación del genoma de las coníferas sigue siendo un reto, ya que tanto las anotaciones estructurales como las funcionales distan mucho de ser perfectas (Wegrzyn *et al.*, 2014).

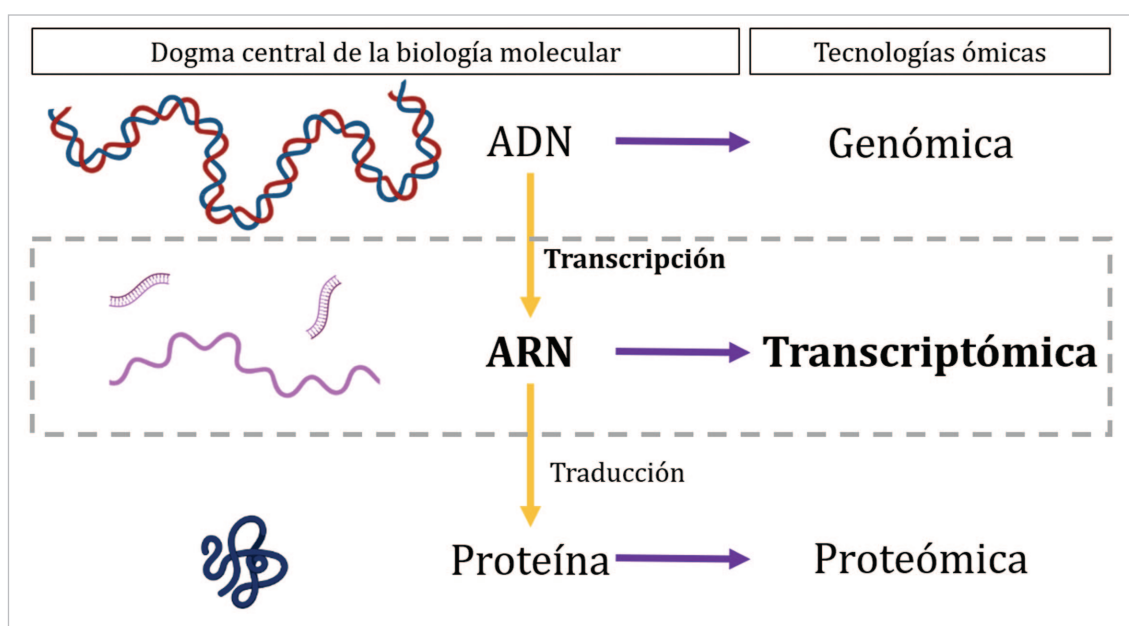


Figura 6. El dogma central de la biología molecular y sus correspondientes disciplinas ómicas. Estas tecnologías proporcionan información útil sobre los genes, las transcripciones, sus funciones y sirven como datos primordiales para otros enfoques posteriores.

Los datos transcriptómicos son particularmente importantes para la investigación en coníferas y otras especies no modelo, como estrategia para compensar la falta de recursos genómicos. Dado que las funciones biológicas no pueden inferirse directamente de las secuencias de nucleótidos, los transcriptomas y los estudios de expresión génica son útiles para la identificación y anotación de genes. Además, los análisis de RNA-seq permiten identificar patrones y niveles de expresión entre diferentes condiciones. En el tercer y cuarto artículo de esta tesis se utilizó esta tecnología para el estudio del transcriptoma tanto codificante como no codificante del pino durante la infección por *F. circinatum*. Por un lado, se realizó una RNA-Seq dual de una especie de pino altamente susceptible *Pinus radiata* y otra resistente *P. pinea* (Figura 7). De este modo, pudimos identificar los genes y rutas metabólicas implicadas en la resistencia tales como el rápido reconocimiento del patógeno seguido de una respuesta fuerte y coordinada de mecanismos de defensa (Figura 8). El refuerzo y la lignificación de la pared celular, la actividad antioxidante, la inducción de genes PR y la biosíntesis de hormonas defensivas fueron clave en la resis-

tencia de *P. pinea* al patógeno. Por el contrario, *P. radiata* tuvo una respuesta más débil, posiblemente debido a una percepción deficiente de la infección fúngica que condujo a una señalización de defensa menor.

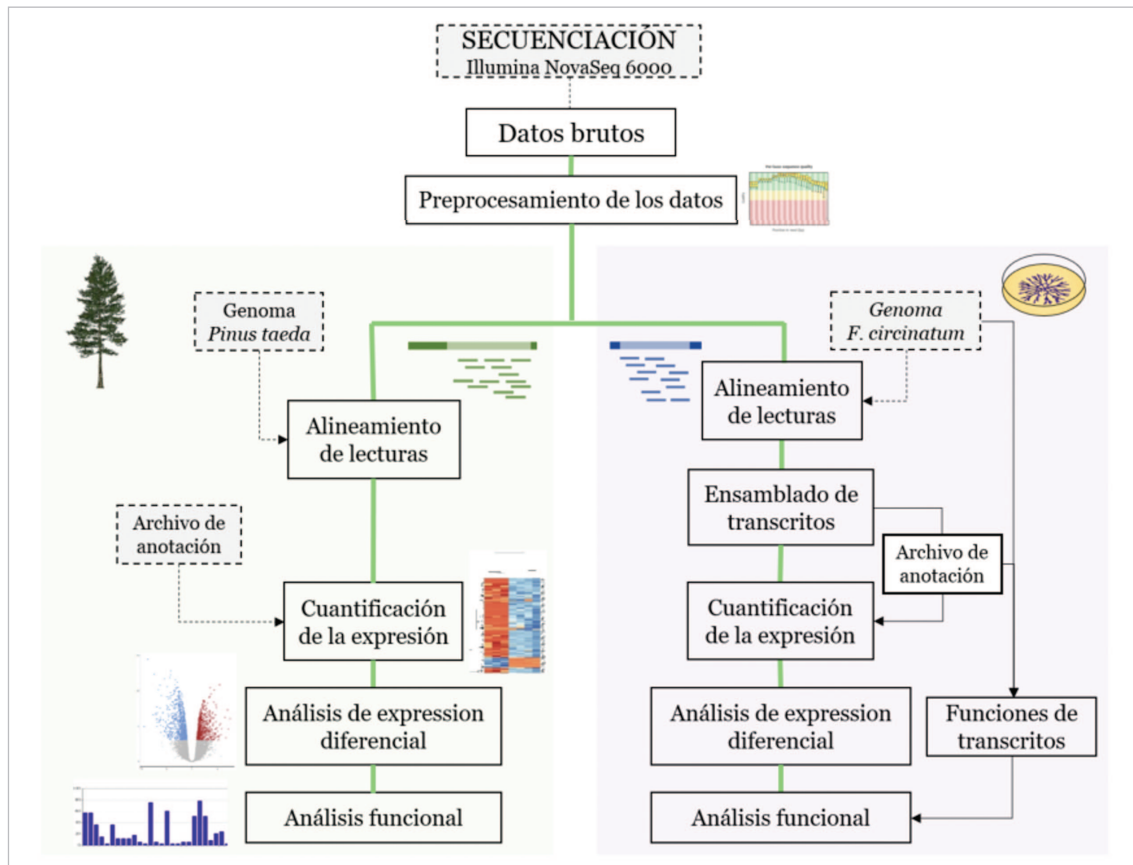


Figura 7. Proceso simplificado del análisis con enfoque de dual RNA-Seq. Brevemente, se evaluó la calidad de las secuencias de ARN y se cortaron para eliminar los adaptadores de Illumina y las bases de baja calidad. Para realizar el alineamiento, ambas especies de pino (*P. radiata* y *P. pinea*) se trataron por igual utilizando el genoma secuenciado de *Pinus taeda*. En el caso del patógeno, se utilizó el genoma de *F. circinatum* (Fc072v) pero, debido a la falta de archivo de anotación disponible, se realizó un ensamblaje de los transcritos y se anotaron. Las líneas discontinuas encierran los archivos que no se han generado durante este proceso bioinformático.

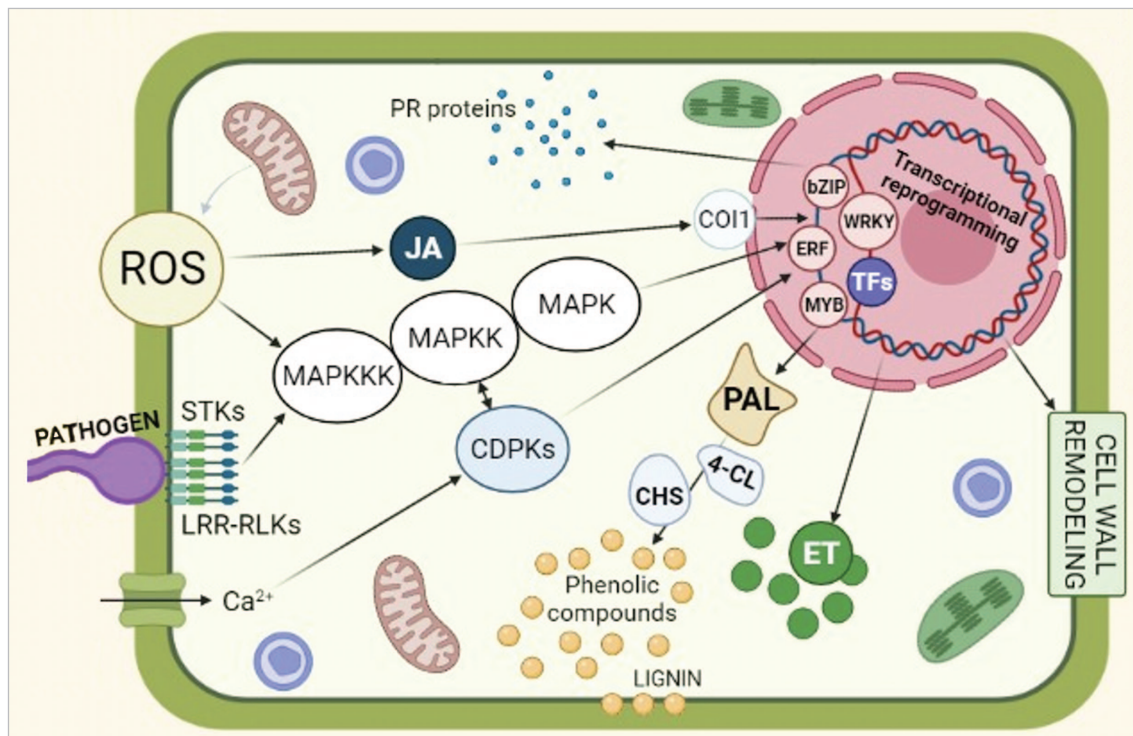


Figura 8. Modelo que ilustra los principales mecanismos moleculares desencadenados en *Pinus* spp. infectado por *F. circinatum*. LRR-RLKs: proteínas quinasas ricas en leucina de tipo receptor; STKs: proteínas quinasas de serina/treonina de tipo receptor; MAPKs: proteínas quinasas activadas por mitógenos; CDPKs: proteínas quinasas dependientes del Ca^{2+} ; ROS: especies reactivas de oxígeno; PR proteins: proteínas relacionadas con la patogénesis; JA: ácido jasmónico; COI1: coronatina insensible 1; ET: etileno; PAL: fenilalanina amonio-liasas; 4-CL: 4-cumarato; CHS: chalcona sintasa; TFs: Factores de transcripción.

Durante la infección a la especie resistente (*P. pinea*), genes relacionados con la degradación de la pared celular y la lignina fueron predominantemente inducidos en *F. circinatum*. Por el contrario, el patógeno tuvo una absorción activa de nutrientes (como el nitrógeno) durante su infección en la especie altamente susceptible (*P. radiata*). Esto podría proporcionar a *F. circinatum* una ventaja competitiva en la interacción planta-patógeno.

Considerando la regulación post-transcripcional, en este trabajo también se evaluaron los parámetros fisiológicos que subyacen a los fenotipos de huésped susceptible y resistente a PPC (Figura 9), sin embargo, no se encontraron cambios significativos tras la infección del patógeno.

En el cuarto artículo, se llevó a cabo un estudio transcriptómico de la interacción *P. radiata-F. circinatum* identificando moléculas de ARN no codificantes de cadena larga (ARNlnc) en el huésped y, específicamente, aquellos que responden a la infección del patógeno. El análisis permitió identificar 13.312 ARNlnc en el pino. En comparación con los ARN que codifican proteínas, los ARNlnc eran más cortos, con menos exones y niveles de expresión más bajos. Un total de 164 ARNlnc se asociaron a la infección por *F. circinatum* y el análisis funcional de los genes próximos



Figura 9. Cámara de presión tipo Scholander (izquierda) con el que se midió el potencial hídrico del tallo; y sistema de análisis de intercambio de gases por infrarrojos (IRGA) con una cámara adaptada a coníferas (derecha) con el que se midieron los parámetros relacionados con el intercambio de gases de las acículas de las plántulas de pino: tasa de asimilación neta de CO_2 , tasa de transpiración, conductancia estomática y concentración subestomática de CO_2 .

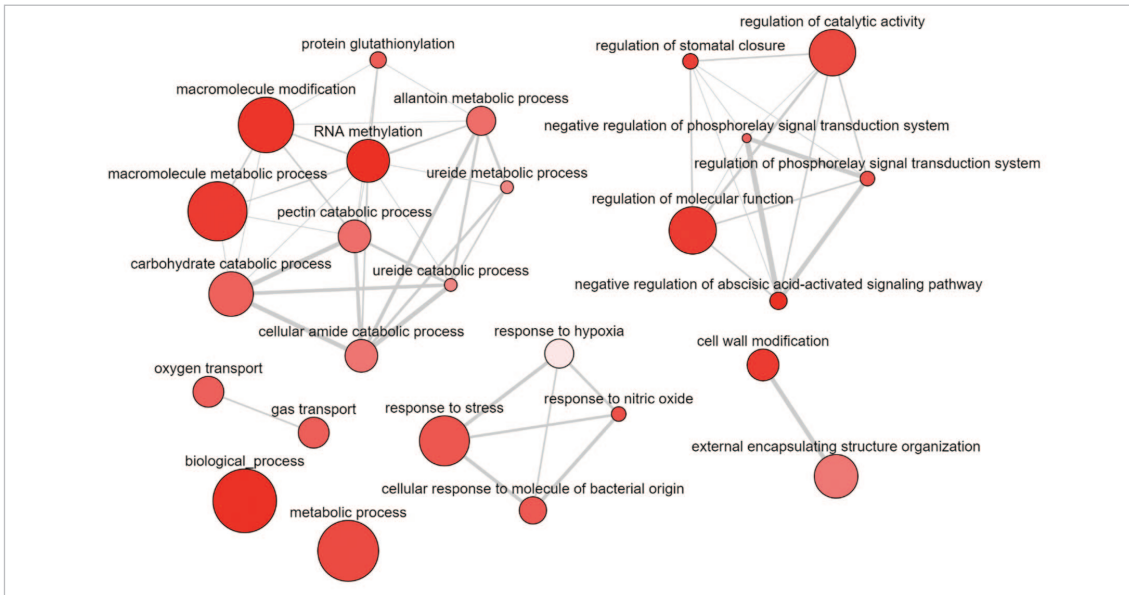


Figura 10. Los lncRNA participan en procesos celulares mediante la regulación de la expresión génica a nivel transcripcional y postranscripcional (Quan *et al.*, 2015). Esta regulación puede ser *cis*, influyendo en los genes alrededor de su sitio de transcripción o *trans* abandonando sus sitios de transcripción para ejercer su función en otro lugar. En esta gráfica se visualizan los términos GO enriquecidos de los genes diana de la regulación en *cis* de los lncRNAs diferencialmente expresados. El color de la burbuja refleja el valor *p* obtenido en el análisis de enriquecimiento funcional, mientras que su tamaño indica la frecuencia del término GO en la base de datos subyacente UniProt-GO Annotation. Los términos GO muy similares están unidos por aristas en el gráfico, donde la anchura de la línea indica el grado de similitud.

a éstos sugirió su participación en importantes procesos de defensa, incluyendo la transducción de señales y el refuerzo de la pared celular (*Figura 10*).

Conclusiones

La búsqueda de nuevos métodos que permitan una rápida detección y diagnóstico de *F. circinatum* en semillas, plantas e insectos vectores, como el desarrollo de prácticas, reglamentos y políticas basadas en el conocimiento científico mediante la colaboración entre las autoridades fitosanitarias y los investigadores se vuelven esenciales para evitar su introducción en zonas libres de la enfermedad.

Para explorar la viabilidad del virocontrol de esta patología forestal se requieren futuras investigaciones centradas en la generación de líneas isogénicas de *F. circinatum* con y sin micovirus por métodos de transfección.

La optimización de los programas de mejora genética para la comercialización de pinos resistentes al PPC requiere un profundo conocimiento de los mecanismos reguladores implicados en la defensa de los hospedadores. Nuestros hallazgos permitieron una mejor comprensión de los mecanismos defensivos del árbol y sentaron las bases para futuros estudios de validación de la asociación de estos genes candidatos con los caracteres de resistencia al PPC.

El descubrimiento de nuevos mecanismos que regulan la defensa de las plantas, como los ARNinc, implica su incorporación en la toma de decisiones durante la generación de material resistente al PPC. Nuestros resultados presentan un mapa completo de los ARNinc en *P. radiata* durante la infección de *F. circinatum* y proporcionan un punto de partida para entender sus mecanismos de regulación y funciones en las respuestas de defensa de las coníferas al estrés biótico. Esto contribuirá a la optimización de los programas de mejora genética para la comercialización de pinos resistentes.

Agradecimientos/Financiación

Me gustaría agradecer la dirección y supervisión a mis directores Julio Diez y Jorge Martín, a los coautores de los artículos derivados de esta tesis y a todas las instituciones y personas que han colaborado con nosotros. Gracias a mis amigos y familia por el apoyo.

Esta Tesis Doctoral ha sido financiada con un contrato predoctoral para la formación de doctores de la Universidad de Valladolid. La investigación ha sido financiada por los proyectos AGL2015-69370-R y PID2019-110459RB-I00 financiados por el MINECO (España) y fondos FEDER (EU), además del apoyo de la COST Action FP1406 PINESTRENGTH (Pine Pitch Canker strategies for management of *Gibberella circinata* in greenhouses and forests). Los datos han sido analizados en el centro de Supercomputación de Castilla y León (SCAYLE).

Bibliografía

- De La Torre, A.R.; Piot, A.; Liu, B.; Wilhite, B.; Weiss, M.; Porth, I.; 2020. Functional and morphological evolution in gymnosperms: A portrait of implicated gene families. *Evol. Appl.* 13, 210–227. <https://doi.org/10.1111/eva.12839>
- Dodds, P.N.; Rathjen, J.P.: 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature* 11, 539–548. <https://doi.org/10.1038/nrg2812>
- EFSA, 2010. Risk assessment of *Gibberella circinata* for the EU territory and identification and evaluation of risk management options. *EFSA J.* 8, 1620. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1620>
- EU Commission, 2019. The European Green Deal. European Commission, Brussels.
- Gobierno de Navarra, 2018. Navarra sustituye el pino insignis por otras especies resistentes a los hongos. URL http://www.navarra.es/home_es/Actualidad/Sala+de+prensa/Noticias/2018/10/27/enfermedad+pino+insignis+hongos.htm (accessed 6.21.21).
- Ioos, R.; Aloï, F.; Piskur, B.; Guinet, C.; Mullett, M.; Berbegal, M.; Bragança, H.; Cacciola, S.O.; Oskay, F.; Cornejo, C.; Adamson, K.; Douanla-Meli, C.; Kacergius, A.; Martínez-Álvarez, P.; Nowakowska, J.A.; Luchi, N.; Vettraino, A.M.; Ahumada, R.; Pasquali, M.; Fourie, G.; Kanetis, L.; Alves, A.; Ghelardini, L.; Dvorák, M.; Sanz-Ros, A.; Diez, J.J.; Baskarathevan, J.; Aguayo, J.: 2019. Transferability of PCR-based diagnostic protocols: An international collaborative case study assessing protocols targeting the quarantine pine pathogen *Fusarium circinatum*. *Sci. Rep.* 9, 8195. <https://doi.org/10.1038/S41598-019-44672-8>
- Neale, D.B.; Wegrzyn, J.L.; Stevens, K.A.; Zimin, A.V.; Puiu, D.; Crepeau, M.W.; Cardeno, C.; Koriabine, M.; Holtz-Morris, A.E.; Liechty, J.D.; Martínez-García, P.J.; Vasquez-Gross, H.A.; Lin, B.Y.; Zieve, J.J.; Dougherty, W.M.; Fuentes-Soriano, S.; Wu, L.S.; Gilbert, D.; Marçais, G.; Roberts, M.; Holt, C.; Yandell, M.; Davis, J.M.; Smith, K.E.; Dean, J.F.D.; Lorenz, W.W.; Whetten, R.W.; Sederoff, R.; Wheeler, N.; McGuire, P.E.; Main, D.; Loopstra, C.A.; Mockaitis, K.; deJong, P.J.; Yorke, J.A.; Salzberg, S.L.; Langley, C.H.; 2014. Decoding the massive genome of loblolly pine using haploid DNA and novel assembly strategies. *Genome Biol.* 15, 1–13. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-3-r59>
- Nystedt, B.; Street, N.R.; Wetterbom, A.; Zuccolo, A.; Lin, Y.-C.; Scofield, D.G.; Vezzi, F.; Delhomme, N.; Giacomello, S.; Alexeyenko, A.; Vicedomini, R.; Sahlin, K.; Sherwood, E.; Elfstrand, M.; Gramzow, L.; Holmberg, K.; Hallman, J.; Keech, O.; Klasson, L.; Koriabine, M.; Kucukoglu, M.; Kaller, M.; Luthman, J.; Lysholm, F.; Niittyla, T.; Olson, A.; Rilakovic, N.; Ritland, C.; Rossello, J.A.; Sena, J.; Svensson, T.; Talavera-Lopez, C.; Theissen, G.; Tuominen, H.; Vanneste, K.; Wu, Z.-Q.; Zhang, B.; Zerbe, P.; Arvestad, L.; Bhalerao, R.; Bohlmann, J.; Bousquet, J.; Garcia Gil, R.; Hvidsten, T.R.; de Jong, P.; MacKay, J.; Morgante, M.; Ritland, K.; Sundberg, B.; Lee Thompson, S.; Van de Peer, Y.; Andersson, B.; Nilsson, O.; Ingvarsson, P.K.; Lundeberg, J.; Jansson, S.; 2013. The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution. *Nature* 497, 579–584. <https://doi.org/10.1038/nature12211>
- Pinestrength, 2015. Pine Pitch Canker - Strategies for management of *Gibberella circinata* in greenhouses and forests (COST Action FP1406: Pinestrength).
- Quan, M.; Chen, J.; Zhang, D.; 2015. Exploring the secrets of long noncoding RNAs. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 5467–5496. <https://doi.org/10.3390/ijms16035467>
- Santini, A.; Ghelardini, L.; De Pace, C.; Desprez-Loustau, M.L.; Capretti, P.; Chandelier, A.; Cech, T.; Chira, D.; Diamandis, S.; Gaitniekis, T.; Hantula, J.; Holdenrieder, O.; Jankovsky,

- L.; Jung, T.; Jurc, D.; Kirisits, T.; Kunca, A.; Lygis, V.; Malecka, M.; Marcais, B.; Schmitz, S.; Schumacher, J.; Solheim, H.; Solla, A.; Szabò, I.; Tsopelas, P.; Vannini, A.; Vettraino, A.M.; Webber, J.; Woodward, S.; Stenlid, J.; 2013. Biogeographical patterns and determinants of invasion by forest pathogens in Europe. *New Phytol.* 197, 238–250. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04364.x>
- Sturrock, R.N.; Frankel, S.J.; Brown, A.V.; Hennon, P.E.; Kliejunas, J.T.; Lewis, K.J.; Worrall, J.J.; Woods, A.J.; 2011. Climate change and forest diseases. *Plant Pathol.* 60, 133–149. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3059.2010.02406.X>
- Vainio, E.J.; Bezos, D.; Bragança, H.; Cleary, M.; Fourie, G.; Georgieva, M.; Ghelardini, L.; Han-nunen, S.; Ioos, R.; Martín-García, J.; Martínez-álvarez, P.; Mullett, M.; Oszako, T.; Papa-zova-Anakieva, I.; Piskur, B.; Romeralo, C.; Sanz-Ros, A.V.; Steenkamp, E.T.; Tubby, K.; Wingfield, M.J.; Diez, J.J.; 2019. Sampling and detection strategies for the pine pitch canker (PPC) disease pathogen *Fusarium circinatum* in Europe. *Forests* 10, 1–27. <https://doi.org/10.3390/f10090723>
- Wegrzyn, J.L.; Liechty, J.D.; Stevens, K.A.; Wu, L.S.; Loopstra, C.A.; Vasquez-Gross, H.A.; Dougherty, W.M.; Lin, B.Y.; Zieve, J.J.; Martínez-García, P.J.; Holt, C.; Yandell, M.; Zimin, A.V.; Yorke, J.A.; Crepeau, M.W.; Puiu, D.; Salzberg, S.L.; de Jong, P.J.; Mockaitis, K.; Main, D.; Langley, C.H.; Neale, D.B.; 2014. Unique features of the loblolly pine (*Pinus taeda* L.) megagenome revealed through sequence annotation. *Genetics* 196, 891–909. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.159996>
- Wingfield, M.J.; Brockerhoff, E.G.; Wingfield, B.D.; Slippers, B.; 2015. Planted forest health: The need for a global strategy. *Science* 349, 832–836. <https://doi.org/10.1126/science.aac6674>

Publicaciones derivadas de la Tesis Doctoral

- Zamora-Ballesteros, C.; Diez, J.J.; Martín-García, J.; Witzell, J.; Solla, A.; Ahumada, R.; Capretti, P.; Cleary, M.; Drenkhan, R.; Dvorák, M.; Elvira-Recuenco, M.; Fernández-Fernández, M.M.; Ghelardini, L.; Gonthier, P.; Hernández-Escribano, L.; Ioos, R.; Markovskaja, S.; Martínez-Álvarez, P.; Muñoz-Adalia, E.J.; Nowakowska, J.A.; Oszako, T.; Raposo, R.; Santini, A.; Hantula, J.; 2019. Pine pitch canker (PPC): Pathways of pathogen spread and preventive measures. *Forests* 10, 1158. <https://doi.org/10.3390/f10121158>
- Zamora-Ballesteros, C.; Wingfield, B.D.; Wingfield, M.J.; Martín-García, J.; Diez, J.J.; 2021. Residual effects caused by a past mycovirus infection in *Fusarium circinatum*. *Forests* 12, 11. <https://dx.doi.org/10.3390/f12010011>
- Zamora-Ballesteros, C.; Pinto, G.; Amaral, J.; Valledor, L.; Alves, A.; Diez, J.J.; Martín-García, J.; 2021. Dual RNA-Sequencing analysis of resistant (*Pinus pinea*) and susceptible (*Pinus radiata*) hosts during *Fusarium circinatum* challenge. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 5231. <https://doi.org/10.3390/ijms22105231>
- Zamora-Ballesteros, C.; Martín-García, J.; Suárez-Vega, A.; Diez, J.J.; 2022. Genome-wide identification and characterization of *Fusarium circinatum*-responsive lncRNAs in *Pinus radiata*. *BMC Genomics* 23, 194. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08408-9>
- Zamora-Ballesteros, C.; Martín-García, J.; Fernández-Fernández, M.M.; Diez, J.J.; (2022) Pine Pitch canker: an introduction, an overview. In: Asiegbu, F.O.; Kovalchuk, A.; (Eds.) *Forest Microbiology. Volume 2: Forest Tree Health*. Academic Press Inc. (Elsevier), pp. 300. ISBN: 9780323850421
- Zamora-Ballesteros, C.; Pire, R.; Diez, J.J.; (2022) Field and laboratory procedures for *Fusarium*

circinatum identification and diagnosis. In: Luchi N (Eds) *Plant Pathology. Methods in Molecular Biology*. Springer, pp. 51-73. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2517-0_3

Publicaciones derivadas de colaboraciones durante el transcurso de esta tesis

Aloi, F.; Zamora-Ballesteros, C.; Martín-García, J.; Diez, J.J.; Cacciola, S.O.; (2021) Co-infections by *Fusarium circinatum* and *Phytophthora* spp. on *Pinus radiata*: Complex phenotypic and molecular interactions. *Plants* 10, 1976. <https://doi.org/10.3390/plants10101976>

Drenkhan, R.; Ganley, B.; Martín-García, J.; ... , Zamora-Ballesteros, C.; Mullett, M.S.; (2020) Global geographic distribution and host range of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker. *Forests* 11, 724. <https://doi.org/10.3390/f11070724>

Fernández-Fernández, M.; Naves, P.; Witzell, J.; ... , Zamora-Ballesteros, C.; Diez, J.J.; (2019) Pine pitch canker and insects: Relationships and implications for disease spread in Europe. *Forests* 10, 627. <https://doi.org/10.3390/f10080627>

Tesis Doctoral

Zamora-Ballesteros, C.; (2022). Transcriptomics technologies and their potential for pine pitch canker management. Universidad de Valladolid. <https://doi.org/10.35376/10324/55383>