

TESIS DOCTORAL

“Transcriptomics technologies and their potential for pine pitch canker management”

(“Tecnologías transcriptómicas y su potencial para el control del chancro resinoso del pino”)

DOCTORANDA: Cristina Zamora Ballesteros, del IUFOR y la Universidad de Valladolid

DIRECTOR: Dr. Julio J. Diez Casero, del IUFOR y la Universidad de Valladolid

TUTOR: Dr. Jorge Martín García, del IUFOR y la Universidad de Valladolid

FECHA Y LUGAR DE LECTURA: 10 de junio de 2022 en el Campus “La Yutera” de Palencia

Resumen

El chancro resinoso del pino (PPC, por sus siglas en inglés) es una grave enfermedad que afecta a *Pinus spp.* y *Pseudotsuga menziesii* en todo el mundo. La infección por su agente causal, *Fusarium circinatum*, provoca chancros de resina en los troncos y ramas laterales de los huéspedes maduros, que pueden acabar muriendo por anillamiento o rotura del tronco. En los viveros, los principales síntomas son el puntisecado, marchitamiento y muerte de las plántulas. Desde el primer registro en 1945 en Norteamérica, se ha notificado la presencia de *F. circinatum* en 14 países de América, Asia, África y Europa. Varios factores han contribuido a la propagación de la enfermedad a todos estos continentes, siendo el más importante la globalización en lo que respecta al comercio de material vegetal de reproducción. El viento, las gotas de lluvia y los insectos forestales asociados a los pinos contribuyen a la dispersión local del patógeno. 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. El objetivo principal de esta tesis doctoral fue esclarecer los mecanismos de regulación eficaces para el control de la enfermedad PPC.

En primer lugar, 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. Las múltiples vías de propagación hacen de *F. circinatum* un reto a prevenir, agravado por el reciente descubrimiento de su colonización endofítica de especies no contempladas previamente como hospedantes que ilustra la importancia del conocimiento biológico y ecológico para el diseño de estrategias de intervención eficaces (Figura 1). Para ello, es fundamental la colaboración entre las autoridades fitosanitarias y los investigadores a través de redes interdisciplinarias que permitan aumentar el conocimiento de la enfermedad y sensibilizar a los agentes implicados sobre los riesgos y las medidas de mitigación. En este trabajo también se identificaron los puntos débiles de la normativa actual y se aportaron sugerencias para su aplicación.

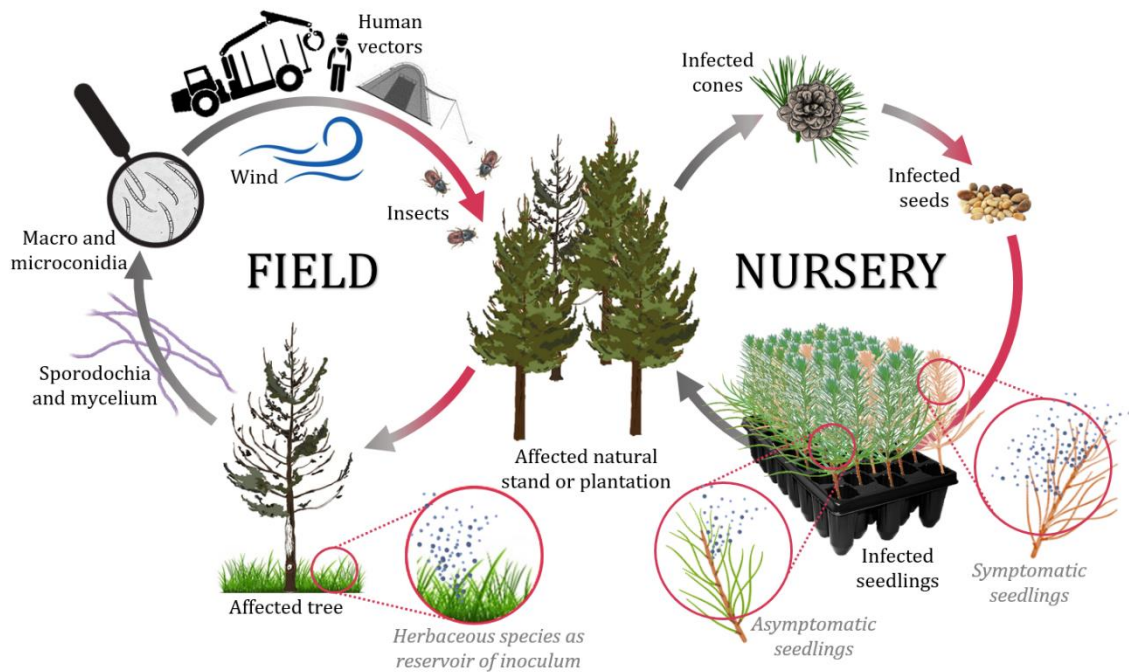


Figura 1. Vías de dispersión y fuentes de inóculo potenciales de *F. circinata*.

En segundo lugar, para entender los mecanismos moleculares implicados en la patogenicidad de *F. circinata*, su transcriptoma fue explorado utilizando tecnologías de secuenciación masiva. Como primer objetivo se investigó el efecto residual en el transcriptoma de *F. circinata* de la pérdida de un micovirus. Nuestros resultados mostraron una ligera aceleración del metabolismo del hospedador, posiblemente debido a la regulación positiva de genes implicados en funciones esenciales para el desarrollo del hongo. 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. En el tercer estudio, se analizó el transcriptoma del patógeno durante la fase inicial de la infección en especies de *Pinus* spp. con diferentes grados de susceptibilidad. En una especie relativamente resistente (*Pinus pinea*), los genes de *F. circinata* relacionados con la degradación de la pared celular y la lignina fueron predominantemente inducidos. Por el contrario, el patógeno tuvo una absorción activa de nutrientes (principalmente nitrógeno) durante su infección en la especie altamente susceptible (*P. radiata*) que podría proporcionarle una ventaja competitiva en la interacción planta-patógeno.

Por último, se examinaron los mecanismos moleculares de regulación implicados en la defensa del árbol mediante el estudio del transcriptoma de *Pinus* spp. utilizando la tecnología RNA-Seq (Figura 2). En el tercer estudio, el perfil del transcriptoma de *P. pinea* cuatro días después de la inoculación de *F. circinata* reveló una percepción temprana de la infección del patógeno junto con una fuerte y coordinada activación de la defensa a través del refuerzo y lignificación de la pared celular, la actividad antioxidante, la inducción de genes PR y la biosíntesis de hormonas de defensa. 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. Como resultado, se identificaron genes de resistencia a la enfermedad altamente expresados en *P. pinea* que pueden ser utilizados como indicadores de resistencia en programas de mejora genética. En el cuarto estudio, se llevó a cabo un estudio transcriptómico en profundidad de la interacción *P. radiata*-*F. circinata* mediante la identificación de moléculas

de ARN no codificantes de cadena larga (ARNlnc) en el huésped y, específicamente, aquellos que responden a la infección del patógeno. El análisis funcional de los genes próximos a estos ARNlnc de respuesta al patógeno sugirió su participación en importantes procesos de defensa, incluyendo la transducción de señales y el refuerzo de la pared celular. Estos resultados presentan un mapa completo de los ARNlnc en *P. radiata* tras la infección de *F. circinatum* y proporcionan un punto de partida para entender sus mecanismos de regulación y funciones en la defensa de las coníferas. En general, una comprensión profunda del mecanismo de regulación de los genes contribuirá a la optimización de los programas de mejora genética para una futura comercialización de pinos resistentes, una de las herramientas más prometedoras para la gestión de PPC.

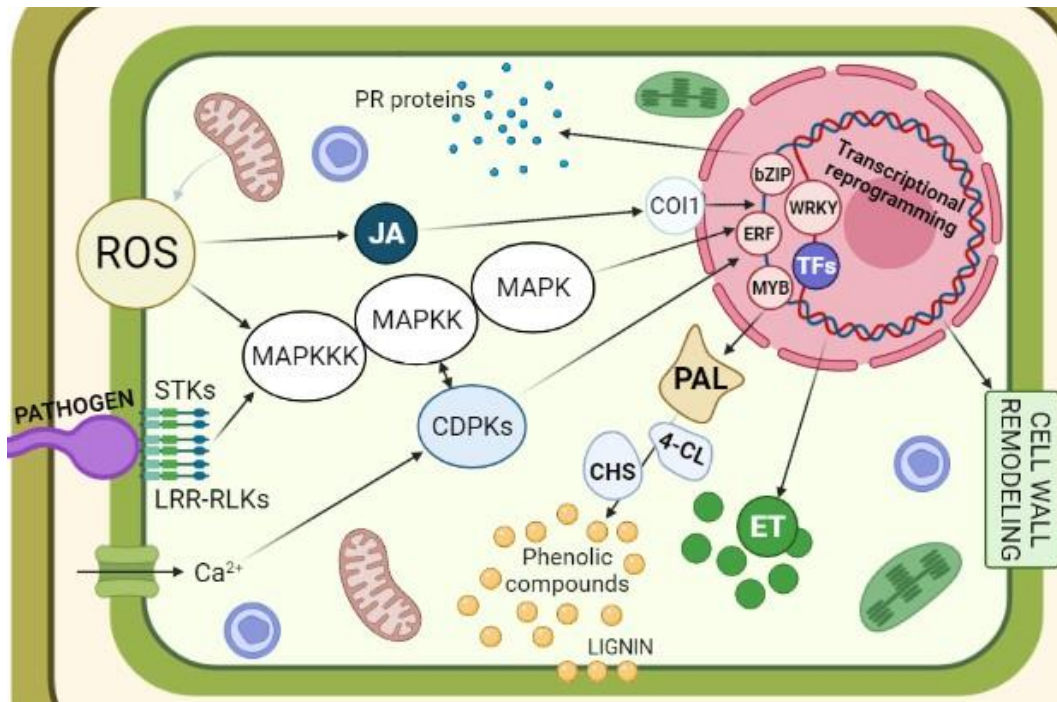


Figura 2. Modelo que ilustra los principales mecanismos moleculares desencadenados en *Pinus* spp. infectado por *F. circinatum*. El reconocimiento del hongo por parte del pino induce muchos mecanismos de defensa, cascadas de señalización y respuesta al estrés.

Publicaciones derivadas de esta tesis

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.; Ios, 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. and Diez, J.J. (2022) Pine Pitch canker: an introduction, an overview. In: Asiegbu, F.O. and 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: Method and Protocols*. *Methods in Molecular Biology*. Humana, New York, NY. (*In Press*).



Fotografía del acto de lectura y defensa. El Tribunal estuvo constituido por las Dra. Carmen Romeralo Tapia (Investigadora Postdoctoral en Swedish University of Agricultural Sciences), el Dr. Óscar Santamaría Becerril (Profesor Ayudante Doctor en la Universidad de Valladolid) y la Dra. Carolina Cornejo Barrios (Investigadora en Swiss Federal Research Institute WSL). La Tesis fue calificada con Sobresaliente Cum Laude.