



2022  
Lleida

27 · 1  
junio · juny  
juliol · juliol

Cataluña  
Catalunya

## 8º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

La **Ciencia forestal** y su contribución a  
los **Objetivos de Desarrollo Sostenible**

8CFE

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales

**Cataluña | Catalunya · 27 junio | juny - 1 julio | juliol 2022**

**ISBN 978-84-941695-6-4**

© Sociedad Española de Ciencias Forestales



Organiza

## Silenciamiento génico inducido por spray (SIGS) como potencial método de control contra *Fusarium circinatum* y *Phytophthora cinnamomi*

BOCOS ASENJO, I. T.<sup>1, 2</sup>, NIÑO SÁNCHEZ, J.<sup>1, 2</sup>, HIDALGO RODRÍGUEZ, M. E.<sup>1, 2</sup> y DIEZ CASERO, J. J.<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales, E.T.S.II.AA. Palencia.

<sup>2</sup> Instituto Universitario de Investigación en Gestión Forestal Sostenible (iuFOR).

### Resumen

Las enfermedades forestales comprometen seriamente nuestra calidad de vida, así como los recursos que se obtienen de los bosques. Algunas especies forestales de gran importancia en nuestro país se ven amenazadas por esta razón: *Fusarium circinatum* causa el chancro resinoso del pino y *Phytophthora cinnamomi* provoca la seca de la encina. Estas enfermedades se han tratado durante mucho tiempo con productos químicos que tienen un alto impacto en la naturaleza y que, además, no son del todo eficaces. En consecuencia, existe una clara necesidad de encontrar una alternativa respetuosa con el medio ambiente en el control de enfermedades forestales. Una de estas alternativas es el silenciamiento génico inducido por spray (SIGS). SIGS es una estrategia de protección vegetal basada en el silenciamiento de genes mediante la tecnología del ARN de interferencia (RNAi). Con el objetivo de lograr un control sostenible de *F. circinatum* y *P. cinnamomi* se ha estudiado el potencial de SIGS para lograr una reducción del crecimiento y la virulencia de los patógenos mediante el silenciamiento de ciertos genes implicados en el tráfico de vesículas celulares. Los resultados de esta investigación ayudarán a explorar el uso de esta tecnología en patógenos forestales donde apenas está desarrollada.

### Palabras clave

Silenciamiento génico, RNAi, Sostenibilidad, enfermedades forestales

### 1. Introducción

Recientemente se ha producido un aumento sustancial del número de patógenos invasores y de nuevas enfermedades forestales destructivas en todo el mundo. Algunas de ellas suponen una importante amenaza para la sostenibilidad ecológica y económica de los ecosistemas forestales (Santini *et al.*, 2013). En los ecosistemas forestales españoles destaca la importancia de los bosques de coníferas y de frondosas, que se ven amenazados, entre otras enfermedades, por el chancro resinoso del pino y la seca de la encina, respectivamente.

*Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell (Teleomorfo *Gibberella circinata*), es el agente causal del chancro resinoso del pino (PPC por sus siglas en inglés), es uno de los patógenos más importantes que afectan a las especies de *Pinus*. Los principales síntomas en árboles adultos es la aparición de grandes chancros que invaden los tejidos de la planta e impiden el movimiento de agua y nutrientes tras el colapso de los vasos. En los árboles maduros también se observa el marchitamiento de las acículas y la clorosis, que causan la muerte de la copa y finalmente la del árbol (COST Action FP1406: PINESTRENGTH, 2014). Actualmente, no existen métodos adecuados y/o eficaces para controlar o erradicar este patógeno.

*Phytophthora cinnamomi* Rands (1922) es un oomiceto considerado el patógeno más importante que origina podredumbres radicales en especies leñosas (especialmente asociado a las enfermedades de las raíces de robles, eucaliptos, castaños, pinos y miembros de las Ericaceae) (Robin *et al.*, 2012). Se distribuye mundialmente, produciendo los daños más importantes en zonas tropicales y subtropicales, en regiones de clima templado y en el Mediterráneo, donde provoca un número elevado de muertes en dehesas y montes causando la enfermedad conocida como la seca de la encina (Burgess *et al.*, 2017). Por ello, son preocupantes los posibles daños causados por este

patógeno en las dehesas españolas, así como en otros países como Portugal, Francia, Italia y Turquía (Mora-Sala *et al.*, 2019). *P. cinnamomi* provoca la muerte masiva de las raíces absorbentes, reduciendo la capacidad del árbol para tomar agua y nutrientes del suelo. Por lo tanto, causa efectos similares a los de la sequía, por lo que los síntomas en la parte aérea de los árboles son muy inespecíficos: clorosis, marchitamiento, defoliación y muerte de las ramas (Sena *et al.*, 2018).

A pesar de la importancia de las especies a las que afectan, actualmente no existen métodos adecuados y/o eficaces para controlar o erradicar estos patógenos. Para luchar contra ellos se combinan estrategias de prevención, intervención y remediación como estrictas medidas de cuarentena y la prohibición de la importación o intervenciones silvícolas adecuadas (Wingfield *et al.*, 2008). Sin embargo, una vez la enfermedad se establece en los bosques son necesarios tratamientos pesticidas poco respetuosos con el medio ambiente y actualmente limitados o prohibidos por la UE, especialmente en el caso de la silvicultura (Okorski *et al.*, 2015).

La búsqueda y el desarrollo de nuevos métodos de control de enfermedades de plantas que sean sostenibles para la naturaleza y eficaces en la lucha contra patógeno es un tema de máxima actualidad. La aparición de nuevas y avanzadas tecnologías basadas en la biología moléculas y la biotecnología hace que surjan nuevas alternativas en la protección de plantas. Una de las herramientas más prometedoras que han surgido consiste en el silenciamiento de genes de los organismos patogénicos mediado por ARN a través de un mecanismo conocido como interferencia de ARN (RNAi por sus siglas en inglés).

El RNAi es un mecanismo conservado que se produce de manera natural en las células eucariotas. Se inicia mediante ARN de doble cadena (dsRNA por sus siglas en inglés), que puede regular la expresión génica mediante la degradación dirigida de los ARN mensajeros homólogos (mRNA por sus siglas en inglés) (Fire *et al.*, 1998). Este mecanismo ha sido identificado en multitud de organismos (Eamens *et al.*, 2008; Gheysen & Vanholme, 2007; Nunes & Dean, 2012; Price & Gatehouse, 2008; Shi, 2003) y ha sido intensamente estudiado desde su descubrimiento debido a su potencial en el control de enfermedades. Una de las tecnologías basadas en el silenciamiento de genes mediante RNAi se conoce como SIGS (silenciamiento génico inducido por spray) y consiste en la pulverización de moléculas de dsRNA sintetizadas artificialmente en las superficies de las plantas (Niu *et al.*, 2021). Los dsRNAs sintetizados poseen secuencias homologas a determinados genes del patógeno y debido a esta homología impedirán su expresión a causa del mecanismo de RNAi, para de esta manera reducir la enfermedad que provocan (Cai *et al.*, 2019; Koch *et al.*, 2016; Qiao *et al.*, 2021; Song *et al.*, 2018; Wang & Jin, 2017). Las estrategias SIGS presentan un gran potencial en la protección de cultivos, así como en especies forestales debido a su sostenibilidad, su facilidad de aplicación y a la especificidad del mecanismo de RNAi. Debido a esto hemos diseñado y sintetizado distintas moléculas de dsRNA que sean eficaces en el silenciamiento de genes de *F. circinatum* y *P. cinnamomi* como potencial método para su control en especies forestales. La síntesis de estas moléculas se ha realizado utilizando una bacteria genéticamente modificada que es capaz de producir dsRNAs, evitando el uso de kits comerciales de producción in vitro que encarecen y limitan el proceso. Actualmente se está trabajando en el posterior proceso de purificación del dsRNA producido para obtener el dsRNA limpio y listo para su utilización en ensayos de una manera más económica.

## 2. Objetivos

El objetivo principal del trabajo de investigación es desarrollar nuevas soluciones sostenibles y respetuosas con el medio ambiente para el control y manejo de las enfermedades provocadas por *F. circinatum* y *P. cinnamomi*, empleando para ello métodos avanzados de biología molecular, en particular la tecnología SIGS basada en el silenciamiento de genes mediante RNAi. Los objetivos específicos han consistido en: i) diseñar *in silico* moléculas de dsRNA con potencial para silenciar genes importantes de los patógenos de interés; ii) sintetizar el dsRNA utilizando para ello un método de producción basado en bacterias genéticamente modificadas.

### 3. Metodología

#### i) Diseño *in silico* moléculas de dsRNA

Para el diseño de las moléculas de silenciamiento se ha revisado la literatura en busca de genes cuya eficiencia de silenciamiento fuera buena en otros patógenos vegetales y cuyo silenciamiento sea eficaz en el control de los agentes patógenos (Cai *et al.*, 2018; Qiao *et al.*, 2021). También se seleccionó un gen ausente en el genoma de los organismos de estudio para su uso como control negativo: el gen que codifica para la proteína YFP (yellow fluorescent protein) en la medusa *Aequorea victoria*.

La búsqueda de genes homólogos a los genes de interés en nuestros organismos de estudio realizó utilizando la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y la herramienta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para realizar alineamientos contra genomas de referencia. La herramienta web Prosite (<https://prosite.expasy.org/>) se ha utilizado para identificar los dominios conservados en las proteínas codificadas por los genes elegidos para el estudio. De los genes seleccionados tras la búsqueda bibliográfica se seleccionó un fragmento de entre 160-250 pares de bases (pb) para la síntesis de las moléculas de dsRNA. Esta selección se ha realizado evitando las regiones que codificaban para dominios conservados de las proteínas y zonas que alinearan contra otros organismos diferentes a los de estudio, para evitar los efectos *off-target*.

Finalmente se ha realizado un diseño de las moléculas de dsRNA *in silico* utilizando para ello los fragmentos seleccionados de tres genes, unidos en la misma molécula (500 pb aproximadamente). Se sintetizaron dsRNAs homólogos a regiones de tres genes distintos con el objetivo de aumentar la inhibición del patógeno.

Sobre las moléculas construidas *in silico* se diseñaron los cebadores de PCR para la síntesis de las moléculas molde que finalmente se emplean para producir los dsRNAs. Estos cebadores incluyeron secuencias de corte de dos enzimas de restricción (en el cebador *forward* y el cebador *reverse* del primer y del último fragmento respectivamente) y 20 nucleótidos de los fragmentos adyacentes en la molécula de dsRNA correspondientes.

Se diseñaron un total de seis cebadores, dos para amplificar cada fragmento de gen, con una temperatura de fusión ( $T_m$ , por sus siglas en inglés) de aproximadamente 60°C y un contenido en GC (guanina y citosina) del entre el 50% y 60%. Para el cálculo de estas propiedades se empleó el software Oligocalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) y los cebadores fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT, Iowa, EE. UU.).

#### ii) Síntesis y purificación de las moléculas de dsRNA

A partir de las moléculas de dsRNA diseñadas *in silico* se construyeron los moldes de ADN de las mismas que sirvieron posteriormente para producir las moléculas de dsRNA.

Para la producción de estas cadenas molde de ADN primero se extrajo el ADN de *F. circinatum* y *P. cinnamomi*, empleando el kit de extracción de ADN comercial E.Z.N.A.® Fungal DNA Mini Kit (Omega Bio-tek, Georgia, EE. UU.). Se amplificó cada fragmento de gen por separado, realizando una PCR convencional con los cebadores diseñados y como material de partida el ADN extraído. Para unir los tres fragmentos amplificados se ha empleado una metodología llamada *overlap PCR*.

Para sintetizar las moléculas de dsRNA se ha utilizado la cepa HT115 de *Escherichia coli*, que es deficiente en la endonucleasa RNasa III (encargada de degradar los dsRNA) (Dasgupta *et al.*, 1998; Takiff *et al.*, 1989; Timmons *et al.*, 2001). La cepa HT115 fue transformada con plásmidos (variantes del plásmido T777T) que permitían la síntesis de dsRNA mediante la inserción de las moléculas molde sintetizadas entre dos promotores T7 inducibles por isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) en orientaciones opuestas. Para la producción de dsRNA las bacterias correctamente transformadas se cultivaron en medio de cultivo LB (Lysogeny Broth) con IPTG durante un periodo de 4 a 8 horas tras el cual se extrajo el ARN de los cultivos.

La extracción de ARN se llevó a cabo mediante Trizol™ (Invitrogen, Massachusetts, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El dsRNA obtenido se purificó utilizando DNasa I (Invitrogen, Massachusetts, EE. UU.) y RNasa T1 (Thermofisher, Massachusetts, EE. UU.) que elimina

el ARN de cadena simple. El dsRNA extraído y purificado se mantiene a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su conservación antes de su uso.

#### 4. Resultados

Los genes elegidos para el silenciamiento pertenecen a rutas de tráfico de vesículas

Para la síntesis de moléculas de dsRNA se han seleccionado tres genes en *F. circinatum* (VPS51, DCTN1 y SAC1) y dos en *P. cinnamomi* (DCTN1 y SAC1), ya que el gen VPS51 estaba ausente en este organismo. Las secuencias de estos genes se han determinado mediante el alineamiento de los genes de *B. cinerea* obtenidos de Cai *et al.* (2018) contra la base de datos de genes del NCBI se muestran en la tabla 1 y 2. La investigación de Cai *et al.* (2018) estudia los ARNs interferentes pequeños (siRNAs, por sus siglas en inglés) que las plantas mandan de manera natural al patógeno *B. cinerea*. Estos siRNAs inducen de manera natural el silenciamiento de genes del patógeno que resultan críticos para su patogenicidad y para la infección. Por ello, en un intento de imitar este mecanismo natural y dado que estos genes ya han sido silenciados en otros patógeno logrando una reducción de la infección con éxito (Qiao *et al.*, 2021), hemos elegido estos tres genes para el presente trabajo.

Tabla 1. Genes de estudio para el silenciamiento de *F. circinatum*

Gen	Número de acceso NCBI
VPS51	KAF5683607.1
DCTN1	KAF5656821.1
SAC1	KAF5666971.1

Tabla 2. Genes de estudio para el silenciamiento de *P. cinnamomi*

Gen	Número de acceso NCBI
DCTN1	XP_002901274.1
SAC1	XP_002904345.1

Los cebadores diseñados permitieron mediante PCR convencional y *overlap* PCR obtener las moléculas de ADN que sirvieron de molde para sintetizar el dsRNA. Mediante esa reacción en cadena de la polimerasa se unieron los fragmentos amplificados individualmente (de VPS51, DCTN1 y SAC1) mediante el solapamiento de sus extremos, debido a la complementariedad con los 20 nucleótidos añadidos en los cebadores en las regiones internas de la molécula, obteniéndose un fragmento denominado como VDS o DS. Estos moldes de ADN se introdujeron con éxito en el plásmido T777T (que porta un gen codificante para la resistencia a ampicilina) obteniéndose secuencias de 2.821 pb, correspondientes a la suma de los tamaños del plásmido digerido con las enzimas de restricción KpnI y BglII (2.295 pb) y las secuencias molde (526 pb) (Figura 1.A). La cepa HT115 de *E. coli* fue transformada con el plásmido resultante, comprobándose esta transformación cultivándola en medio de cultivo con ampicilina. Además, se comprobó por PCR del fragmento VDS y por secuenciación del plásmido completo. Las colonias transformadas con éxito se cultivaron con IPTG y se extrajo su ARN total, comprobando en un gel de electroforesis la presencia de una banda a una altura mayor de 500 pb que se corresponde con el dsRNA producido (figura 1.B). Debido a que el marcador es de ADN y las muestras son ARN y este corre más despacio la banda de ARN queda a una altura ligeramente superior de su tamaño real.



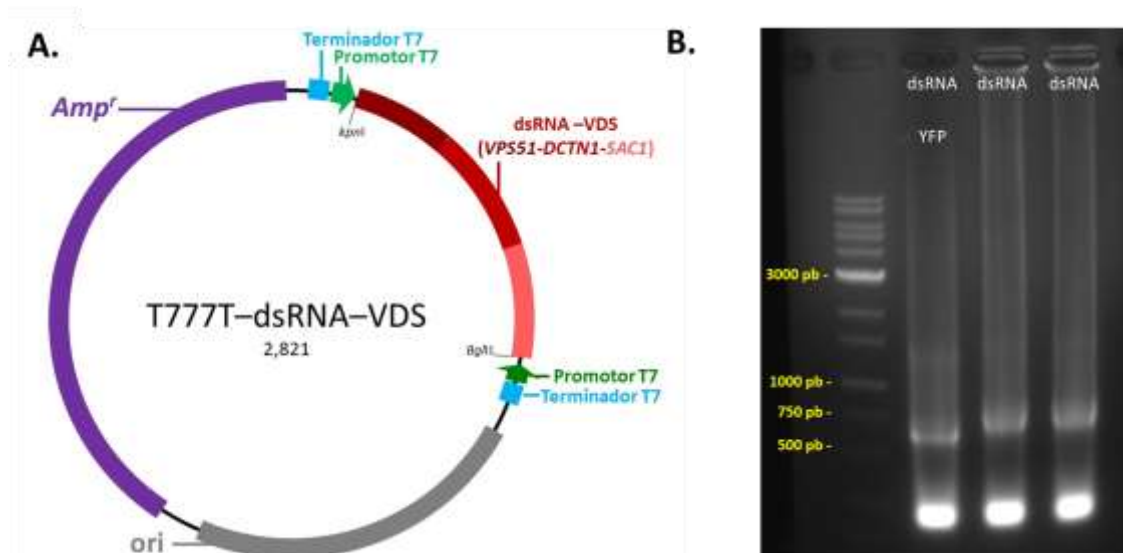


Figura 1. A. Plásmido T777T con los fragmentos correspondientes a los genes *VPS51*, *DCTN1* y *SAC1*; B. Foto de un gel de electroforesis de una extracción de ARN tras la inducción de dsRNA: las bandas a la altura de 500 pb muestran la presencia del dsRNA sintetizado para el silenciamiento de los genes *VPS51*, *DCTN1* y *SAC1* (dsRNA-VDS) en *F. circinatum* (dsRNA *F. cir*) y *DCTN1* y *SAC1* (dsRNA-DS) en *P. cinnamomi* y el dsRNA sintetizado como control negativo (dsRNA-YFP).

## 5. Discusión

Las plantas poseen de manera natural mecanismos para defenderse del ataque de patógenos, así Cai et al. (2018) comprobaron que plantas de *Arabidopsis thaliana* enviaban siRNAs al patógeno *B. cinerea*, con el objetivo de silenciar genes de este e impedir la infección. Imitando lo que ocurre en la naturaleza se han escogido estos mismos genes para la síntesis de dsRNAs, estos genes están implicados en rutas de tráfico de vesículas y se ha visto que su silenciamiento resulta adecuado dado que son importantes en la virulencia de los hongos (Cai et al., 2018). Además, estos genes se han silenciado en otros estudios en los patógenos *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Aspergillus niger* obteniéndose una reducción de la virulencia de los mismos (Qiao et al., 2021). La producción de dsRNA mediante la cepa HT115 de *E. coli* es una forma económica y eficiente de producir grandes cantidades de dsRNA que puede utilizarse como método de control de patógenos vegetales (Niño-Sánchez et al., 2021). Las tecnologías basadas en el mecanismo RNAi suponen un reto investigativo a la vez que una alternativa prometedora e innovadora para el control de enfermedades en plantas (Niu et al., 2021). Los bosques están cada vez más amenazados por el cambio climático, lo que afecta a su salud y les hace susceptibles a la entrada de nuevos patógenos (Diez, 2015). Sin embargo, las estrategias basadas en RNAi se han desarrollado pobremente en este sector a pesar de su potencial en sanidad forestal (Fladung et al., 2021). Por ello, es preciso investigar y desarrollar esta tecnología para tener una alternativa eficaz y no contaminante para el control de enfermedades como La Seca o el Chancro Resinoso del pino que suponen amenazas cada vez más preocupantes en nuestros bosques.

## 6. Conclusiones

1. La selección de genes para su silenciamiento en el uso de estrategias RNAi puede ser clave para un mejor control del patógeno y para lograr la inhibición del mismo.
2. La utilización de bacterias productoras de dsRNA representa una alternativa económica al uso de kits comerciales de síntesis in vitro, además de permitir la producción de una mayor cantidad de moléculas.

3. El RNAi posee un gran potencial para controlar enfermedades causadas por organismos eucariotas que posean la maquinaria de silenciamiento y que sean capaces de captar las moléculas de silenciamiento del exterior.
4. La metodología SIGS se presenta como una alternativa con gran potencial para controlar enfermedades forestales que carecen de tratamientos eficaces o cuyos tratamientos son contaminantes para los ecosistemas, lo que presenta un gran problema para la preservación de los bosques. Esta tecnología está en auge y continuo desarrollo en el sector agrícola, pero requiere de un gran esfuerzo investigativo en el ámbito forestal, donde a pesar de ser una tecnología prometedora se encuentra apenas sin explorar.

## 7. Agradecimientos

Este trabajo está siendo financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación mediante el proyecto PID2019-110459RB-I00 “RNAi technologies for the control of Pine Pitch Canker by *Fusarium circinatum* (RNAi4Fusarium)” y mediante el proyecto PLEC2021-008076 “Sustainable plant health by environmental RNAi to reduce disease impacts on Agriculture and forestry (SUPERA)”. Además, este trabajo se enmarca en el desarrollo de una tesis doctoral financiada por la Junta de Castilla y León (Orden EDU/601/2020).

## 8. Bibliografía

BURGESS, T.I.; SCOTT, J.K.; MCDUGALL, K.L.; STUKELY, M J.C.; CRANE, C.; DUNSTAN, W. A.; BRIGG, F.; ANDJIC, V.; WHITE, D.; RUDMAN, T.; ARENTZ, F.; OTA, N.; HARDY, G. E. ST. J.; 2017. Current and projected global distribution of *Phytophthora cinnamomi*, one of the world's worst plant pathogens. *Glob. Chang. Biol.* 23, 1661 – 1674.

CAI, Q.; HE, B.; WEIBERG, A.; BUCK, A. H.; JIN, H.; 2019. Small RNAs and extracellular vesicles: New mechanisms of cross-species communication and innovative tools for disease control. *PLOS Pathog.* 15, e1008090.

CAI, Q.; QIAO, L.; WANG, M.; HE, B.; LIN, F.; PALMQUIST, J.; JIN, H.; 2018. Plant send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. *Science* 360, 1126 – 1129.

COST ACTION FP1406, C. A. PINESTRENGTH; 2014. Pine pitch canker-strategies for management of *Gibberella circinata* in greenhouses and forests (PINESTRENGTH). *European Cooperation in the Field of Scientific and Technical Research*, 1 - 25.

DASGUPTA, S.; FERNANDEZ, L.; KAMEYAMA, L.; INADA, T.; NAKAMURA, Y.; PAPPAS, A; COURT, D. L.; 1998. Genetic uncoupling of the dsRNA-binding and RNA cleavage activities of the *Escherichia coli* endoribonuclease RNase III – the effect of dsRNA binding on gene expression. *Mol. Microbiol.* 28, 629 – 640.

DIEZ, J. J.; 2015. Patologías forestales y cambio global: globalización, cambio climático y cuestiones legales. *Cuad. Soc. Esp. Cienc. For.* 39, 249 - 258.

EAMENS, A.; WANG, M.B.; SMITH, N. A.; WATERHOUSE, P. M.; 2008. RNA Silencing in Plants: Yesterday, Today, and Tomorrow. *Plant Physiol.* 147, 456 – 468.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E; MELLO, C. C.; 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806 – 811.

FLADUNG, M.; HÄGGMAN, H.; SUTELA, S.; 2021. Application of RNAi technology in forest trees. En: MEZZETTI, B.; SWEET, J.; BURGOS, L. (eds.): RNAi for Plant Improvement and Protection., 54 – 71. CABI. Gloucester

GHEYSEN, G.; VANHOLME, B.; 2007. RNAi from plants to nematodes. *Trends Biotechnol.* 25, 89 – 92.

KOCH, A.; BIEDENKOPF, D.; FURCH, A.; WEBER, L.; ROSSBACH, O.; ABDELLATEF, E.; LINICUS, L.; JOHANNSMIEIER, J.; JELONEK, L.; GOESMANN, A.; CARDOZA, V.; MCMILLAN, J.; MENTZEL, T.; KOGEL, K. H.; 2016. An RNAi-Based Control of *Fusarium graminearum* Infections Through Spraying of Long dsRNAs Involves a Plant Passage and Is Controlled by the Fungal Silencing Machinery. *PLoS Pathog.* 12, 1 – 22.

MORA-SALA, B.; ABAD-CAMPOS, P.; BERBEGAL, M.; 2019. Response of *Quercus ilex* seedlings to *Phytophthora* spp. root infection in a soil infestation test. *Eur. J. Plant Pathol.* 154, 215 – 225.

NIÑO-SÁNCHEZ, J.; CHEN, L. H.; SOUZA, J. T.; DE MOSQUERA, S.; STERGIPOULOS, I.; 2021. Targeted Delivery of Gene Silencing in Fungi Using Genetically Engineered Bacteria. *J. Fungi* 7, 125.

NIU, D.; HAMBY, R.; NIÑO-SANCHEZ, J.; CAI, Q.; YAN, Q.; JIN, H.; 2021. RNAs — a new frontier in crop protection. *Curr. Opin. Biotechnol.* 70, 204 – 212.

NUNES, C. C.; DEAN, R. A.; 2012. Host-induced gene silencing: A tool for understanding fungal host interaction and for developing novel disease control strategies. *Mol. Plant Pathol.* 13, 519 – 529.

Okorski, A.; Pszczółkowska, A.; Oszako, T.; Nowakowska, J. A.; 2015. Current possibilities and prospects of using fungicides in forestry. *For. Res. Pap.* 76, 191 – 206.

PRICE, D. R. G.; GATEHOUSE, J. A.; 2008. RNAi-mediated crop protection against insects. *Trends Biotechnol.* 26, 393 – 400.

QIAO, L.; LAN, C.; CAPRIOTTI, L.; AH-FONG, A.; NIÑO-SÁNCHEZ, J.; HAMBY, R.; HELLER, J.; ZHAO, H.; GLASS, N. L.; JUDELSON, HOWARD S.; MEZZETTI, B.; NIU, D.; JIN, H.; 2021. Spray-induced gene silencing for disease control is dependent on the efficiency of pathogen RNA uptake. *Plant Biotechnol. J.* 1 – 13.

ROBIN, C.; SMITH, I.; HANSEN, E. M.; 2012. *Phytophthora cinnamomi*. *For. Phytophthoras* 2.

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.

SENA, K.; CROCKER, E.; VINCELLI, P.; BARTON, C.; 2018. *Phytophthora cinnamomi* as a driver of forest change: Implications for conservation and management. *For. Ecol. Manage.* 409, 799 – 807.

SHI, Y.; 2003. Mammalian RNAi for the masses. *Trends Genet.* 19, 9 – 12.

SONG, X. S.; GU, K. X.; DUAN, X. X.; XIAO, X. M.; HOU, Y. P.; DUAN, Y. B.; WANG, J. X.; YU, N.; ZHOU, M. G.; 2018. Secondary amplification of siRNA machinery limits the application of spray-induced gene silencing. *Mol. Plant Pathol.* 19, 2543 – 2560.

TAKIFF, H. E.; CHEN, S. M.; COURT, D. L.; 1989. Genetic analysis of the rnc operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171, 2581 – 2590.

TIMMONS, L.; COURT, D. L.; FIRE, A.; 2001. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263, 103 – 112.

WANG, M.; JIN, H.; 2017. Spray-Induced Gene Silencing: a Powerful Innovative Strategy for Crop Protection. *Trends Microbiol.* 25, 4 – 6.

WINGFIELD, M. J.; HAMMERBACHER, A.; GANLEY, R. J.; STEENKAMP, E. T.; GORDON, T. R.; WINGFIELD, B. D.; COUTINHO, T. A.; 2008. Pitch canker caused by *Fusarium circinatum* – a growing threat to pine plantations and forests worldwide. *Australas. Plant Pathol.* 37, 319 – 334.