



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



Respuesta transcriptómica comparativa de huéspedes resistentes (*Pinus pinea*) y susceptibles (*Pinus radiata*) a la infección por *Fusarium circinatum*

ZAMORA-BALLESTEROS, C.^{1,2}, PINTO, G.³, AMARAL, J.³, VALLEDOR, L.⁴, ALVES, A.³, DIEZ, J.J.^{1,2} y MARTÍN-GARCÍA, J.^{1,2}

¹ Instituto Universitario de Investigación en Gestión Forestal Sostenible, Universidad de Valladolid – INIA. Avenida de Madrid 44, 34004 Palencia, España.

² Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales, Universidad de Valladolid, 34004 Palencia, España.

³ Departamento de biología y CESAM, Universidad de Aveiro, Campus Universitario de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal.

⁴ Departamento de Biología de Organismos y Sistemas, Universidad de Oviedo, 33071 Oviedo, España.

Resumen

El desarrollo de variedades resistentes a la infección por *Fusarium circinatum* ofrece una excelente oportunidad para la gestión del Chancro Resinoso del Pino. El objetivo de este estudio fue identificar las diferencias en las respuestas moleculares de *Pinus radiata* (susceptible) y de *Pinus pinea* (resistente) a *F. circinatum*. El uso de un enfoque dual de RNA-Seq también permitió evaluar el comportamiento del patógeno al infectar cada especie de pino. El perfil transcriptómico de *P. pinea* reveló una percepción temprana a la infección junto con una fuerte y coordinada activación de la defensa a través del refuerzo de la pared celular, la actividad antioxidante, la inducción de genes PR y la biosíntesis de hormonas de defensa. La especie susceptible, por el contrario, mostró una respuesta más débil, posiblemente explicada por la percepción deficiente de la infección fúngica que podría haber llevado a una señalización de defensa reducida. En *P. pinea*, *F. circinatum* se centró en la degradación de las paredes celulares de la planta y en *P. radiata* tuvo una absorción activa de los nutrientes de la planta. Estos conocimientos pueden promover el desarrollo de mejores enfoques para la obtención de programas resistentes a las enfermedades.

Palabras clave

RNA-Seq dual, interacción planta-patógeno, defensa de coníferas, susceptibilidad diferencial de la enfermedad, chancro resinoso del pino.

1. Introducción

El *Pinus radiata* es el árbol más plantado del mundo por su valor económico (MEAD, 2013). En los dos últimos siglos, su rápido crecimiento y la calidad de su madera han satisfecho la creciente demanda de madera y productos derivados en todo el mundo. En el norte de España existen grandes superficies de plantaciones de *P. radiata* (260.000 ha) donde esta especie representa la primera especie de conífera en volumen aprovechado (5 millones de m³) (MITECO, 2020). Lamentablemente, la región atlántica española ha sido testigo de la proliferación de enfermedades fúngicas que han afectado gravemente a las plantaciones de *P. radiata* en las últimas décadas. Esta conífera es especialmente susceptible al chancro resinoso del pino (PPC, por sus siglas en inglés), que ha provocado un importante impacto económico (BEZOS et al., 2017). El hongo invasor *Fusarium circinatum* es el agente causal del PPC, siendo considerado uno de los patógenos más importantes de coníferas a nivel mundial (WINGFIELD et al., 2008). Las semillas infectadas son la principal vía de introducción en los viveros, donde el patógeno provoca damping off en pre y post emergencia y la mortalidad de las plántulas (MARTÍN-GARCÍA et al., 2017; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ et al., 2014). En el campo, los árboles infectados sufren chancros en el tallo, decaimiento e incluso el anillado de ramas y troncos que causan la muerte del árbol (MULLETT et al., 2017).

Una vez establecida, no existe ninguna medida de intervención viable para el control o la erradicación de la PPC. En este contexto, la reforestación de las zonas dañadas con material genético resistente parece ser una de las estrategias más prometedoras para reducir el impacto de esta enfermedad (GORDON et al., 2015). Aunque *P. radiata* es la especie más susceptible de PPC, *F. circinatum* puede infectar hasta 60 especies diferentes de *Pinus*, *Pseudotsuga menziesii* y especies de los géneros *Picea* y *Larix* (BEZOS et al., 2017; DWINELL, 1999; MARTÍN-GARCÍA et al., 2018). Entre las especies hospedadoras, existe un amplio rango de variación de susceptibilidad a *F. circinatum* (MARTÍN-GARCÍA et al., 2019; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ et al., 2014), siendo *Pinus pinea* uno de los más resistentes (AMARAL et al., 2019; ITURRITXA et al., 2013). Varios estudios han señalado que podría encontrarse cierta resistencia genética interespecífica a la PPC (DAVYDENKO et al., 2018; MARTÍN-GARCÍA et al., 2018, 2017). Además, la resistencia intraespecífica y la hibridación se han utilizado para programas de mejora genética exitosos (KANZLER et al., 2014; MITCHELL et al., 2013; ROUX et al., 2007). Por lo tanto, esta variación de susceptibilidad a la PPC ofrece una excelente oportunidad para la gestión de la enfermedad. En este contexto, se requieren más estudios ómicos para entender los mecanismos que subyacen a la superación de la enfermedad y conseguir genotipos resistentes basados en este conocimiento.

Las coníferas disponen de varios mecanismos de defensa que las protegen contra los patógenos. El sistema defensivo de los pinos incluye barreras mecánicas, como la activación inducida de los conductos de resina y el refuerzo de la pared celular, y defensas químicas que incluyen la producción de oleoresinas terpenoides (KEELING & BOHLMANN, 2006). En la última década, el desarrollo de NGS y de la bioinformática asociada ha hecho factible la aplicación del análisis transcriptómico de alto rendimiento a especies no secuenciadas, permitiendo una descripción profunda de los mecanismos transcripcionales implicados en la defensa antifúngica de las plantas (BRADSHAW et al., 2016; HAYDEN et al., 2014; KOVALCHUK et al., 2019; MANGWANDA et al., 2015; MEYER et al., 2016). Concretamente, algunos estudios han examinado la respuesta de diferentes especies de pinos a *F. circinatum*. Entre ellos se encuentra un análisis transcriptómico comparativo entre dos genotipos de *P. radiata* inoculados por *F. circinatum*, donde se encontró una expresión diferencial de varios genes relacionados con la patogénesis (PR), la familia de las fosforilasas y NDR1 asociada al genotipo resistente (CARRASCO et al., 2017). Además, algunos genes importantes relacionados con la defensa, como la fenilalanina amonilasa (PAL), fueron reprimidos en el altamente susceptible *Pinus patula* en una etapa muy temprana de la infección (después de 24 h; VISSER et al., 2015). Visser et al. (2018) centraron su estudio en los genes PR tanto en *P. patula* como en el huésped resistente *P. tecunumanii* tras la infección por *F. circinatum*. Sin embargo, ninguno de estos estudios examinó el transcriptoma del hongo patógeno tras la infección.

Las plataformas de secuenciación actuales generan un número de lecturas sin precedentes, lo que hace posible el análisis simultáneo de los transcritos tanto de los patógenos como de sus huéspedes durante la infección (NAIDOO et al., 2017). Este enfoque, denominado RNA-Seq dual, se ha empleado para revelar la interacción de *Pinus pinaster* con *F. circinatum* (HERNÁNDEZ-ESCRIBANO et al., 2020). La resistencia moderada de *P. pinaster* se reflejó en una inducción temprana de genes asociados a una compleja señalización hormonal de ácido jasmónico (JA), etileno (ET) y ácido salicílico (SA). Por otro lado, se sugirió una perturbación en la homeostasis hormonal del huésped por parte de *F. circinatum* mediante la expresión de genes fúngicos relacionados con estas fitohormonas (HERNÁNDEZ-ESCRIBANO et al., 2020). Recientemente, Visser et al. (2019) centraron su estudio transcriptómico en la regulación hormonal de *P. patula* y *P. tecunumanii* infectados por *F. circinatum*. En este estudio, se observó una respuesta más fuerte y temprana en la especie resistente *P. tecunumanii* a través de la coordinación de la señalización de auxina, ET, JA y SA, mientras que *P. patula* mostró una respuesta retardada, que se asoció a su susceptibilidad al patógeno. Además, la expresión de los genes relacionados con la biosíntesis de ergosterol en *F. circinatum* fue menor durante la infección del huésped resistente, lo que apuntaba

a una mayor vulnerabilidad del patógeno a los genes PR1 de las coníferas. También se han investigado los cambios fisiológicos y hormonales en la interacción *Pinus-F. circinatum*. Mientras que *P. radiata* y *P. pinaster* con síntomas sufrieron un escenario de privación de agua y limitación fotosintética tras la infección por *F. circinatum*, *P. pinea* abrió sus estomas incrementando la transpiración y acumuló glicerol (AMARAL et al., 2019). Además, Amaral et al. (2020) sugirieron que el catabolismo del ácido abscísico (ABA) podría jugar un papel clave en la superación de la PPC.

2. Objetivos

Para entender los procesos que subyacen a la resistencia de la especie mediterránea *P. pinea* y a la susceptibilidad de la especie típicamente alóctona *P. radiata* frente al hongo patógeno *F. circinatum*, se ha realizado un estudio exhaustivo de la regulación del conjunto de genes implicados en los mecanismos de defensa del pino. Además, se llevaron a cabo análisis fisiológicos para apoyar los resultados obtenidos a nivel transcripcional. Se espera que este enfoque transcriptómico y fisiológico combinado mejore la comprensión de la interacción huésped-patógeno e identifique componentes y rutas clave que puedan ser útiles para el desarrollo de genotipos resistentes a través de la mejora y/o la ingeniería genética.

3. Metodología

Aislamiento fúngico, material vegetal y ensayo de inoculación

El aislado de *F. circinatum* (Fc072v) utilizado en este trabajo se aisló de un árbol de *P. radiata* infectado situado en el norte de España (Cantabria). El material vegetal para la inoculación consistió en plántulas de un año de *P. radiata* (Procedencia: Galicia, España) y *P. pinea* (Procedencia: Meseta Norte, España). La suspensión de esporas (10^6 esporas mL⁻¹) se obtuvo tras la agitación a 140 ciclos durante 48 h a 25°C del aislamiento de *F. circinatum* en medio PDB. Las pruebas de patogenicidad se realizaron utilizando la técnica de inoculación en tallo (MARTÍN-GARCÍA et al., 2017). Las plántulas se colocaron en una cámara de crecimiento a 21,5°C, con un fotoperiodo de 16/8 h de luz/oscuridad.

Se utilizaron seis réplicas biológicas por tratamiento (*P. radiata/P. pinea* inoculado) para los parámetros fisiológicos, excepto para la condición de *P. pinea* inoculado por *F. circinatum* con cuatro réplicas biológicas. Por otro lado, se utilizaron cuatro réplicas biológicas en el tratamiento de inoculación del patógeno y tres en el tratamiento control para el análisis de la expresión génica. Los muestreos para el análisis transcriptómico y las mediciones fisiológicas se realizaron 4 días tras la inoculación (dpi).

Parámetros relacionados con el potencial hídrico y el intercambio de gases de las acículas

El potencial hídrico del tallo a mediodía (Ψ_{md} , MPa) se midió a cada plántula utilizando una cámara de presión tipo Scholander (PMS Instrument Co., Albany, OR, Estados Unidos). La tasa de asimilación neta de CO₂ de la parte apical (A, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), la tasa de transpiración (E, mmol H₂O m⁻² s⁻¹), la conductancia estomática (gs, mol H₂O m⁻² s⁻¹) y la concentración subestomática de CO₂ (Ci, vpm) se midieron utilizando un analizador de intercambio de gases por infrarrojos (LCpro-SD, ADC BioScientific Limited, Hoddesdon, Reino Unido) con una cámara adaptada a coníferas. Se utilizaron los tests de Shapiro-Wilk y Bartlett para comprobar la normalidad y la homocedasticidad de los datos ($p \leq 0,05$). Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de dos vías en cada parámetro fisiológico para evaluar el efecto de *F. circinatum* y de la especie. Los datos se presentan como media ± SE (error estándar).

Extracción de ARN, preparación de bibliotecas y secuenciación

Se realizaron extracciones de ARN total a partir de 100 mg de tallo en el punto de inoculación de cada muestra utilizando el método descrito por Valledor *et al.* (2014). El ARN total se envió a Macrogen (Macrogen Korea) para su secuenciación con la plataforma Illumina NovaSeq 6000.

Análisis bioinformático

Primero, se realizó un control de calidad de todos los archivos procedentes de la secuenciación del ARN utilizando FastQC v.0.11.9 (ANDREWS, 2012). Las lecturas en bruto de baja calidad se limpiaron utilizando Trimmomatic v.0.38 (BOLGER *et al.*, 2014). Para realizar el mapeo de lecturas en el huésped, ambas especies de pinos (*P. radiata* y *P. pinea*) se trataron por igual utilizando el genoma de *Pinus taeda* (Pita_v2.01; base de datos Treegenes (WEGRZYN *et al.*, 2008)). Las lecturas se mapearon contra el genoma de *P. taeda* con HiSat2 v.2.0.0 (KIM *et al.*, 2015). A continuación, los archivos del alineamiento se analizaron con FeatureCounts v.1.4.0 (Subread Package; LIAO *et al.*, 2014) para obtener los recuentos de lecturas para las regiones genéticas especificadas en un archivo GTF correspondiente (Pita_v2.01; base de datos Treegenes (WEGRZYN *et al.*, 2008)) para la secuencia del genoma de *P. taeda*. Para el patógeno, se utilizó el genoma secuenciado del aislado Fc072v de *F. circinatum* para el mapeo. Debido a la falta de archivos de anotación disponibles para este hongo patógeno, se realizó un ensamblaje del transcriptoma utilizando StringTie v.2.1.4 (PERTEA *et al.*, 2015). Este software también estimó las abundancias de todos los transcritos ensamblados mapeando de nuevo las lecturas al archivo de referencia experimental. El ensamblaje de referencia generado de *F. circinatum* fue anotado con EnTAP v.0.9.2 (HART *et al.*, 2020). El análisis funcional de los transcritos del huésped se realizó utilizando el archivo de anotación actualizado de *P. taeda* (Pita.2_01.entap_annotations.tsv; base de datos Treegenes (WEGRZYN *et al.*, 2008)).

Expresión de transcritos y análisis funcional

Las tablas de abundancia de lecturas se cargaron en el software R v.3.6.2 (R CORE TEAM, 2019) y los datos de RNA-Seq de pinos y hongo se analizaron utilizando el paquete edgeR v.1.3.959 (ROBINSON *et al.*, 2010). Las comparaciones por pares para la expresión diferencial de los transcritos de los pinos se realizaron para inoculados vs. control. Para los transcritos de *F. circinatum*, se realizó una comparación por pares entre *P. pinea* vs. *P. radiata*. La identificación de genes de expresión diferencial (DEGs, por sus siglas en inglés) se determinó utilizando el umbral de $\log_2(|\text{tasa de cambio}|) \geq 1,5$ con un ratio de falso descubrimiento (FDR, por sus siglas en inglés) inferior a 0,05.

4. Resultados

Medidas fisiológicas

El potencial hídrico de ambas especies no se vio significativamente afectado por la infección fungica. El análisis confirmó que existe una influencia significativa en el potencial hídrico por parte de las especies. Del mismo modo, los parámetros de intercambio de gases y conductancia estomática sólo fueron significativamente diferentes entre las especies, pero no por el efecto del patógeno (Figura 1). La tasa de asimilación neta de CO₂ (A), la conductancia estomática (gs) y la tasa de transpiración (E) fueron mayores en *P. pinea* mientras que la concentración de CO₂ en las acículas (Ci) fue ligeramente mayor en *P. radiata*.

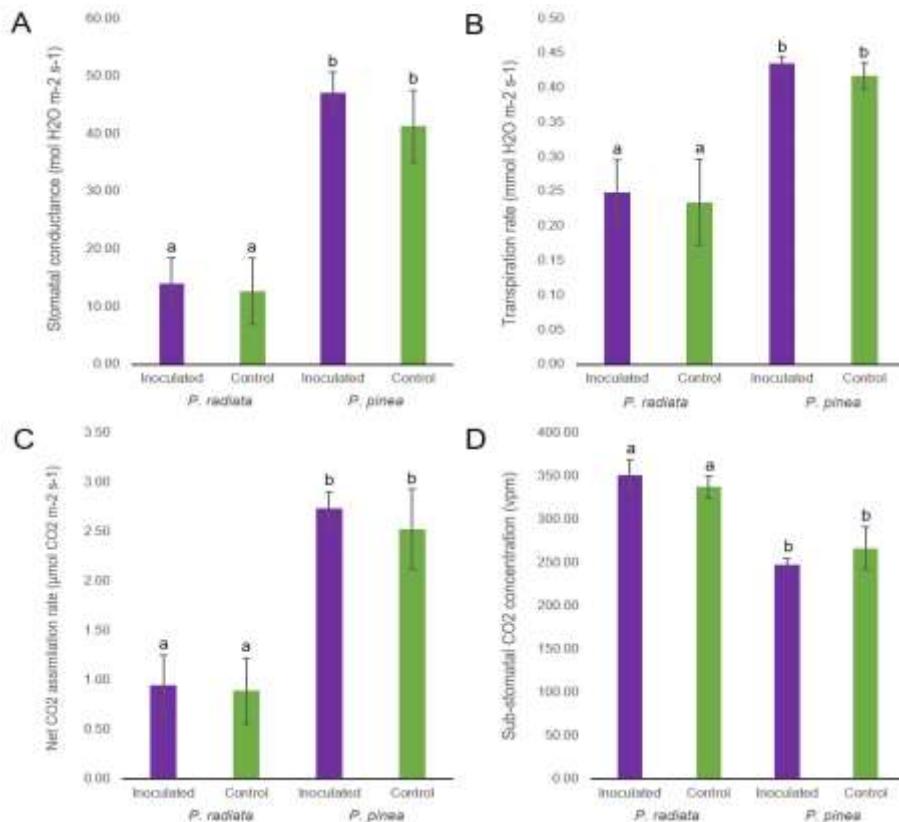


Figura 1. Parámetros relacionados con el intercambio de gases en acículas de *P. pinea* y *P. radiata* inoculadas con *F. circinatum* y controles a los 4 dpi. (A) Conductancia estomática. (B) Tasa de transpiración. (C) Tasa de asimilación neta de CO₂. (D) Concentración subestomática de CO₂. Las barras de error muestran la desviación estándar. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (ANOVA, $p < 0,05$).

Estadísticas del RNA-Seq dual

Una media del $51,8\% \pm 4,41\%$ de las lecturas de *P. pinea* y del $82,9\% \pm 1,84\%$ de las lecturas de *P. radiata* se mapearon contra el genoma de referencia de *P. taeda*. Considerando las muestras inoculadas con el patógeno, para *P. pinea* y *P. radiata* respectivamente, una media de $1,86\% \pm 2,33\%$ y $0,57\% \pm 0,29\%$ de lecturas se mapearon contra el genoma de *F. circinatum*. El análisis de expresión diferencial de *P. pinea* (inoculado frente a control) identificó 1.822 DEGs, mientras que en *P. radiata* se identificaron 371 DEGs (Tabla 1). El análisis de expresión diferencial de *F. circinatum* de las muestras inoculadas (*P. pinea* vs. *P. radiata*) identificó 204 DEGs (Tabla 1). Mediante el uso de EnTAP se consiguieron anotar 9.650 (99%) secuencias de *F. circinatum*, de las cuales a 7.434 (76%) y 2.494 (26%) se les asignaron términos de ontología genética (GO) y rutas KEGG, respectivamente.

Tabla 1. Genes expresados diferencialmente identificados en *P. pinea* y *P. radiata* para cada comparación.

Organismo	Genes sobreexpresados ¹	Genes reprimidos ¹
Genes expresados diferencialmente en los hospedantes ²		
<i>P. pinea</i>	1,307	515
<i>P. radiata</i>	359	12
Genes expresados diferencialmente en el patógeno ³		
<i>F. circinatum</i>	118	86

¹ Número de genes con expresión diferencial significativa (FDR <0,05 y log₂(fold change) > 0,5 o < -0,5) utilizando el QLTest (corrección FDR de Benjamini & Hochberg) con edgeR. ² Genes del huésped expresados diferencialmente en los datos de expresión del huésped inoculado en relación con el control. ³ Genes de *F. circinatum* expresados diferencialmente en muestras de *P. pinea* en relación con las de *P. radiata* inoculadas a partir de datos de expresión del patógeno.

Ontologías genéticas y vías KEGG enriquecidos en los huéspedes infectados por *F. circinatum*

Los sets de datos de genes sobreexpresados y reprimidos de *P. pinea* compartían la mayoría de los términos GO enriquecidos y estaban relacionados con procesos de defensa de la planta como la oxidación-reducción, la biosíntesis y el metabolismo de los flavonoides, la biosíntesis del etileno y del ácido jasmónico, la regulación de las antocianinas y la biosíntesis de las oxilipinas (Figura 2). Las rutas KEGG enriquecidas de forma exclusiva en los genes sobreexpresados estaban relacionadas con la defensa de la planta, como la transducción de señales de fitohormonas, la biosíntesis de zeatina y la actividad de la L-ascorbato oxidasa; lo que contrasta con la disminución exclusiva de la expresión de genes relacionados con el metabolismo energético de la planta. Las rutas KEGG más enriquecidas para los DEGs sobreexpresados en *P. radiata* fueron la biosíntesis de metabolitos secundarios y la ruta del ritmo circadiano de las plantas.

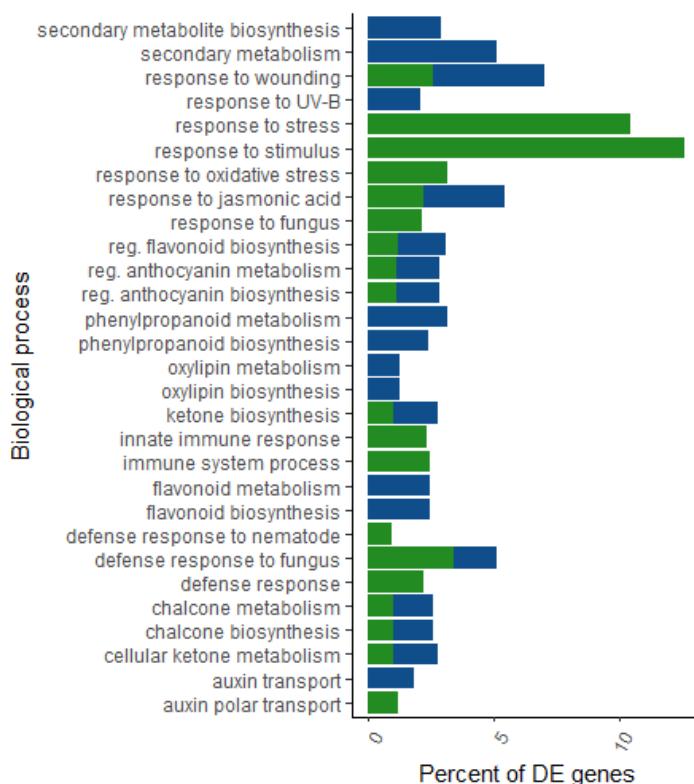


Figura 2. Representación de los términos GO (procesos biológicos) más significativamente enriquecidos ($p<0,05$) de los genes sobreexpresados de *P. pinea* (barras azules) y *P. radiata* (barras verdes) infectados por *F. circinatum*.

Expresión de genes relacionados con la defensa en las especies de *Pinus*

La infección por *F. circinatum* causó una severa reprogramación transcripcional en ambas especies de pinos. Varios de estos genes pertenecen a grupos funcionales implicados en la defensa de la planta contra patógenos, como la percepción de señales y la regulación transcripcional, el metabolismo secundario, la actividad antimicrobiana, el refuerzo de la pared celular y la lignificación, y los genes relacionados con la patogénesis. Pertenecientes a la familia de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), diferentes clases de receptores quinasas como

RLK, STK y CRK fueron muy abundantes entre los DEG en *P. pinea*; mientras que sólo siete fueron sobreexpresados en *P. radiata* (Figura 3). Varios genes de tipo receptor asociado a la pared (WAKL) fueron principalmente sobreexpresados en *P. pinea*, mientras que sólo uno lo hizo en *P. radiata*. Además, 12 genes que codifican proteínas quinasas receptoras de lectina, fueron exclusivamente sobreexpresados en la especie resistente (Figura 3). Varias MAPKK y MAPKK fueron sobreexpresadas en *P. pinea* (Figura 3).

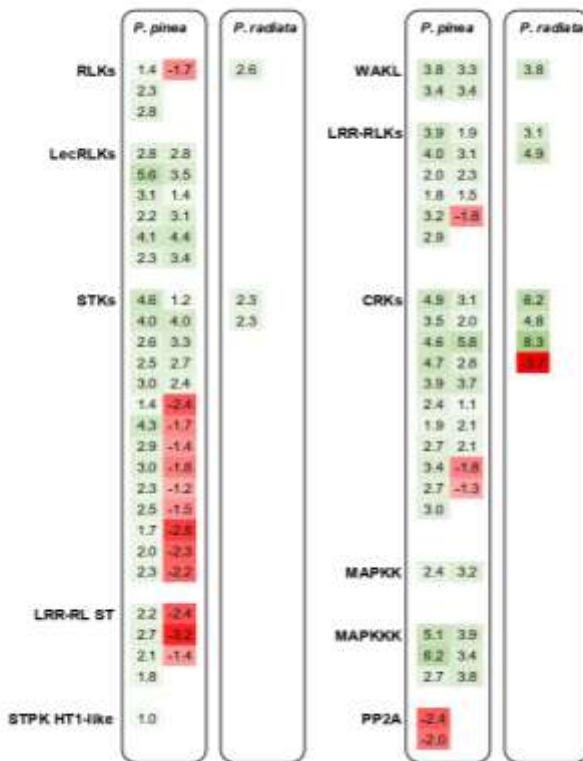
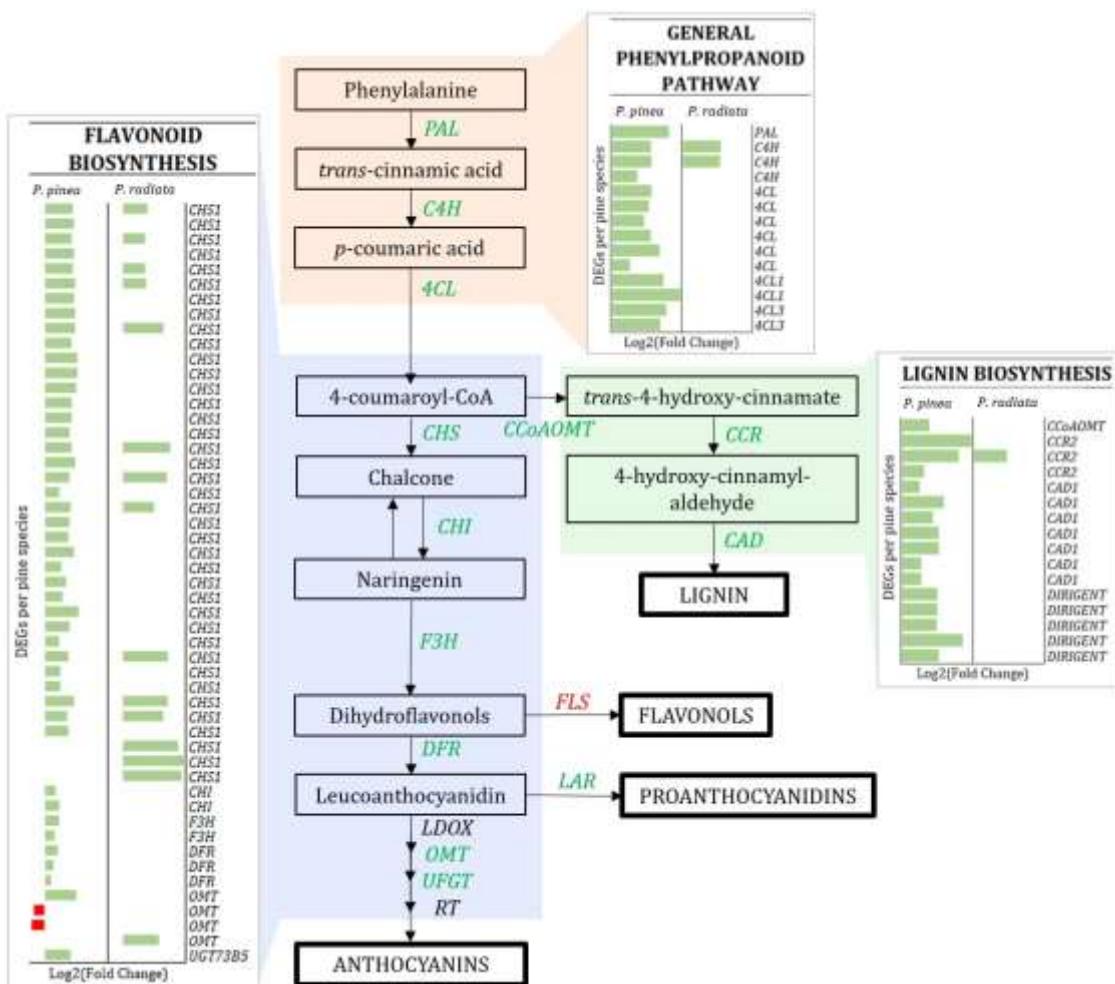


Figura 3. Genes expresados diferencialmente (DEGs) con un papel en la percepción y señalización. Los números representan el valor \log_2 de la tasa de cambio basado en la comparación de los niveles de transcripción entre las plántulas de pino infectadas por *F. circinatum* y control. Los grupos de genes se abrevian como sigue: RLKs, quinasas receptoras; LecRLKs, quinasas receptoras con dominio de lectina; STKs, proteínas quinasas de serina/treonina; LRR-RL ST, proteínas quinasas receptoras de serina/treonina con dominio de repetición rico en leucina; STPK HT1-like, proteínas quinasas de serina/treonina HT1-like; WAKL, receptor quinasa asociado a la pared; LRR-RLKs, proteínas quinasas tipo receptor con repetición rica en leucina; CRKs, proteína quinasa tipo receptor rico en cisteína; MAPKK, proteína quinasa activada por mitógenos; MAPKKK, proteína quinasa quinasa activada por mitógenos; PP2A, serina/treonina fosfatases tipo 2A.

Un gran número de genes que codifican proteínas R fueron inducidos en *P. pinea*; mientras que sólo uno lo fue en *P. radiata* y otro fue altamente reprimido. Las especies de pino mostraron una respuesta diferencial de los genes relacionados con la biosíntesis de compuestos fenólicos (Figura 4). Esta vía fue ampliamente inducida tras la infección del patógeno en *P. pinea*. Muchos genes relacionados con la biosíntesis de lignina fueron sobreexpresados en *P. pinea*, siendo este número mucho menor en *P. radiata* (Figura 4). En la Figura 5 se muestra la expresión diferencial de los genes que codifican las enzimas modificadoras de la pared celular de ambos pinos. Curiosamente, se muestra un escenario contrastado en los genes de la pectinesterasa (PE) y del inhibidor de la metil esterasa de la pectina (PMEI): mientras que 21 genes que codifican para PMEI fueron altamente inducidos en *P. pinea*, sólo uno lo hizo en *P. radiata* y otro fue reprimido. Además, dos PE fueron reprimidas sólo en *P. pinea*.



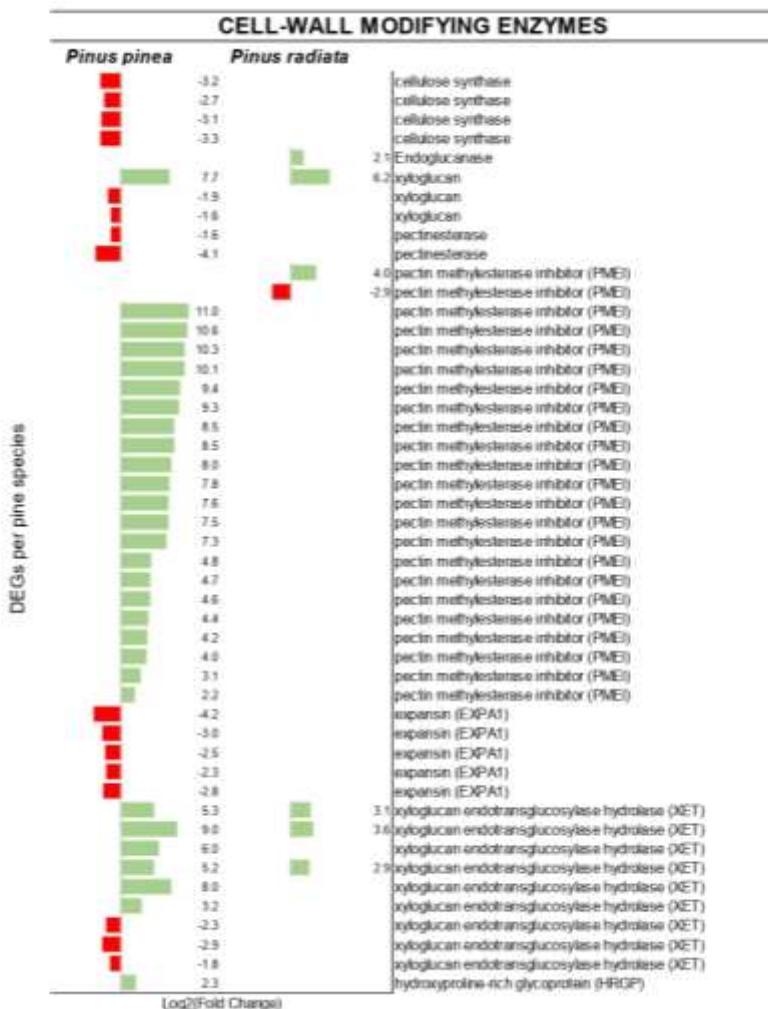


Figura 5. Genes expresados diferencialmente (DEG) que codifican proteínas de la familia de modificadores de la pared celular. Los genes individuales se enumeran a lo largo del eje Y. En el eje X se representa el valor \log_2 de la tasa de cambio basado en la comparación de los niveles de transcripción entre las especies de *Pinus* infectadas por *F. circinatum* y control.

Los genes que codifican proteínas PR fueron altamente inducidos en ambas especies hospedadoras, aunque fueron más abundantes en la especie resistente. Entre ellos, una β -1,3-glucanasa en *P. pinea*, y un número considerable de quitinasas fueron sobreexpresadas. Veintinueve genes que codifican GST implicados en la desintoxicación de productos tóxicos desencadenados por la explosión oxidativa fueron inducidos en *P. pinea*, mientras que sólo cinco GST lo hicieron en *P. radiata*.

Perfil transcripcional de hormonas en los huéspedes

En los conjuntos de datos de *P. pinea* y *P. radiata* se encontraron DEGs implicados en las vías fitohormonales. Varios genes que codifican la ACC sintasa (ACS), enzima que cataliza el primer paso de la biosíntesis del ET (YANG & HOFFMAN, 1984), se sobreexpresaron en ambas especies de pino, aunque en mayor número en *P. pinea* (Figura 6). El transportador de cobre RAN1, necesario para la biogénesis de los receptores de ET, estaba reprimido en la especie resistente, lo que podría estar afectando a la señalización del ET.

El número de genes implicados en la señalización del JA fue considerablemente mayor en *P. pinea* que en *P. radiata* (Figura 6). Mientras que varios genes que codifican enzimas metabolizadoras de JA, como JMT, y las enzimas relacionadas con la biosíntesis de JA, LOX y OPR, fueron inducidos en *P. pinea*, sólo cuatro de ellos lo fueron en *P. radiata*. Aunque esto podría indicar una activación de la señalización de JA, los genes que codifican los represores de la transcripción de JAZ también fueron sobreexpresados en *P. pinea* y uno en *P. radiata*; y el gen que codifica COI1, esencial para la regulación de la señalización de JA (DEVOTO et al., 2002), fue reprimido en *P. pinea*.

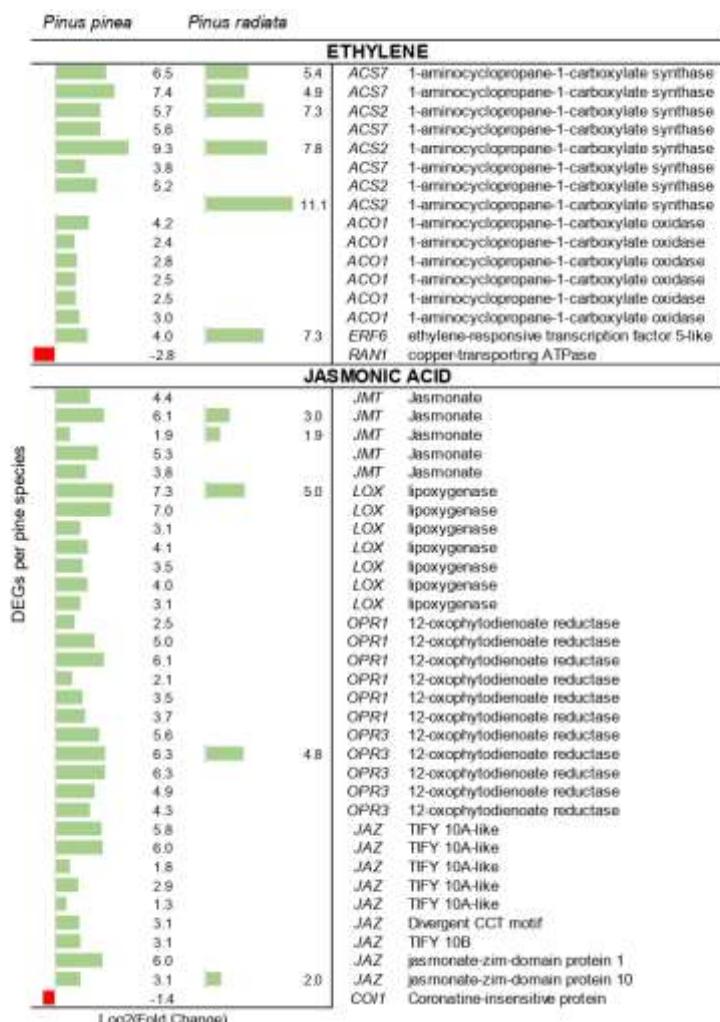


Figura 6. Genes expresados diferencialmente (DEG) que codifican enzimas de la biosíntesis de hormonas de defensa. Los genes individuales se enumeran a lo largo del eje Y. En el eje X se representa el valor \log_2 de la tasa de cambio basado en la comparación de los niveles de transcripción entre las especies de *Pinus* infectadas por *F. circinatum* y control.

Mientras que en *P. pinea*, los genes de la vía del shikimato y PAL estaban sobreexpresados, en *P. radiata* expresión diferencial en la biosíntesis del SA. La represión de un receptor de ABA en *P. pinea* podría indicar la supresión de la señalización de ABA, sin embargo, la inducción de dos proteínas quinasas CIPK20 lo contradice. Una ABA 8'-hidroxilasa fue identificada exclusivamente en *P. radiata*. Varios genes BG3 fueron altamente sobreexpresados tanto en *P. pinea* como en *P. radiata*. Además, diez genes pertenecientes a la familia ASR, que son inducidos por ABA y el estrés abiótico (LIU et al., 2010), fueron sobreexpresados en *P. pinea*, excepto un ASR1 que fue reprimido.

Ontologías genéticas sobrerepresentadas en *F. circinatum*

El análisis de enriquecimiento GO de los DEGs en el conjunto de datos del patógeno mostró una fuerte diferencia en la respuesta fúngica dependiendo de la especie de pino a la que estaba infectando. En la infección a *P. pinea*, se enriquecieron los términos asociados a la degradación de aminoácidos y azúcares/carbohidratos (por ejemplo, hemicelulosa, xiloglucano, arginina) y al proceso de desarrollo celular (Figura 7). Curiosamente, los términos relacionados con la degradación de la lignina y el xilano se enriquecieron de forma exclusiva cuando infectaba a *P. pinea*. Casi la mitad de los términos GO en la infección a *P. radiata* estaban relacionados con el transporte celular (Figura 7). Los procesos de oxidación-reducción, el catabolismo de la quitina y varios términos relacionados con el crecimiento de los hongos también fueron sobrerepresentados en *F. circinatum* cuando infectaba a *P. radiata*.

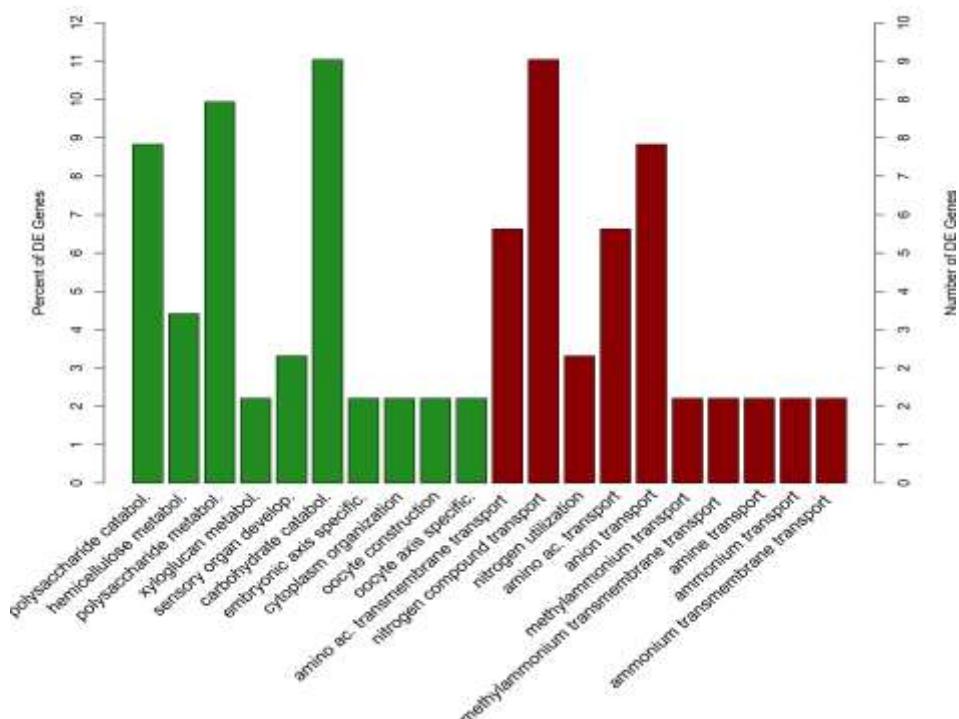


Figura 7. Representación de los 10 términos GO (procesos biológicos) más significativamente enriquecidos ($p<0,05$) de los genes sobreexpresados en el patógeno infectando a *P. pinea* (barras verdes) y a *P. radiata* (barras rojas).

Genes fúngicos expresados durante la colonización del huésped

Se identificaron algunos DEGs del patógeno infectando a *P. pinea* relacionados con la degradación de los polímeros de la pared celular de las plantas, como la celulosa, la hemicelulosa y la lignina. Fueron inducidos una carboxiesterasa perteneciente a la familia CE, una LPMO y una arabina endo-1,5-alfa-L-arabinosidasa. Además, genes que codifican una lacasa, una GMC oxidoreductasa y una celobiosa deshidrogenasa también fueron sobreexpresados en la infección a *P. pinea*. Los genes que codifican transportadores como permeasas, facilitadores principales MFSs o transportadores ABCs estuvieron principalmente sobreexpresados en *F. circinatum* cuando infectaba a *P. radiata*.

5. Discusión

El estudio del patosistema que involucra a la especie resistente *P. pinea* y susceptible *P. radiata* con el hongo patógeno *F. circinatum* ha proporcionado un amplio panorama de los cambios

transcripcionales asociados a estos fenotipos. En estudios anteriores se observó una marcada tendencia al aumento de DEGs a medida que la enfermedad progresaba (ADOMAS *et al.*, 2007; CARRASCO *et al.*, 2017; HERNÁNDEZ-ESCRIBANO *et al.*, 2020; VISSER *et al.*, 2019). La comparación transcriptómica del presente estudio en una fase temprana de la enfermedad (4 dpi) mostró que el número de DEGs en *P. pinea* (1822) era muy superior al de *P. radiata* (371). Asumiendo que el número de DEGs está correlacionado con la fase de respuesta del huésped a la infección, se podría hipotetizar que *P. radiata* presenta una inducción retardada de la activación de la defensa. Por el contrario, todas las categorías relacionadas con la percepción de la señalización del huésped y la respuesta de defensa, incluyendo la lignificación, la biosíntesis de metabolitos secundarios y la detoxificación, fueron altamente inducidas en *P. pinea*. Varios ejemplos en sistemas patológicos de árboles forestales han mostrado un retraso en la respuesta de defensa en interacciones susceptibles (DUPLESSIS *et al.*, 2009; GASPAR *et al.*, 2020; MANGWANDA *et al.*, 2015; ZHU *et al.*, 2019), incluyendo un estudio sobre *Pinus-F. circinatum* (VISSER *et al.*, 2019). La activación temprana de los genes relacionados con la defensa de la planta requiere un reconocimiento directo de los elicidores del patógeno. Los receptores PR como las RLKs y las proteínas similares a los receptores (RLPs) son actores relevantes de esta percepción y de la respuesta específica al patógeno por parte de los genes R (GOFF & RAMONELL, 2007; TANG *et al.*, 2017). Entre los DEGs en *P. pinea*, un gran número de PRRs fueron principalmente sobreexpresados. A su vez, varios genes R fueron también principalmente inducidos en esta especie resistente. Por el contrario, la casi ausencia de inducción de PRR en *P. radiata* y, lo que es más interesante, la falta de sobreexpresión de genes que codifican proteínas MAPK y CDPK podría ser la causa de la débil señalización de defensa posterior. En varias especies de plantas, los componentes de la cascada MAPK han sido implicados en la señalización de la resistencia local y en los mecanismos de transducción de señales (véase DUPLESSIS *et al.*, 2009 y las referencias que aparecen en él).

En este estudio, los términos GO relacionados con las vías de JA y ET estaban sobrerepresentados en ambas especies de pinos. Los genes que participan en la biosíntesis de JA, fueron sobreexpresados durante la patogénesis, aunque en menor medida en *P. radiata*. Sin embargo, el JA no se acumuló en las acículas de ninguna de estas especies en las primeras etapas de la enfermedad de PPC (AMARAL *et al.*, 2020). No obstante, la activación de los genes OPR en la raíz se retrasó en un genotipo de manzano susceptible a la infección por *Pythium ultimum* (ZHU *et al.*, 2019), lo que también podría ser el caso de *P. radiata* en respuesta a *F. circinatum*. Además, la infección por *F. circinatum* podría haber activado los genes JMT que catalizan la formación de MeJA a partir de JA en *P. pinea* y *P. radiata*. A pesar de que el pretratamiento de MeJA no tuvo éxito en la protección contra *F. circinatum* en diferentes especies de *Pinus* (FITZA *et al.*, 2013; VIVAS *et al.*, 2012), este componente podría jugar un papel importante en la inducción de otras defensas de respuesta. Las respuestas celulares mediadas por MeJA incluyen la inducción de genes que codifican terpeno sintetasas (FÄLDT *et al.*, 2003) y enzimas de la biosíntesis de JA como LOX (SEO *et al.*, 2001), ambas sobreexpresadas en las dos especies de pinos. Aunque estos resultados podrían indicar una biosíntesis activa de JA principalmente en *P. pinea*, la represión de COI1 junto con la alta inducción de genes JAZ podría denotar una supresión de la señalización de JA, como se observó en *P. pinaster* infectado con *F. circinatum* a los 5 y 10 dpi (HERNÁNDEZ-ESCRIBANO *et al.*, 2020). Nuestros resultados apoyan que *F. circinatum* puede dirigirse y bloquear la señalización de JA mediante la supresión de COI1, tal y como hipotetizan Hernández-Escribano *et al.* (2020).

La inducción de los genes que codifican las enzimas responsables de la biosíntesis de ET y la inhibición de RAN1, cuya falta de expresión conduce a la expresión constitutiva de la respuesta al ET (HIRAYAMA *et al.*, 1999), indican una coordinación del ET en la defensa de *P. pinea*. Por otro lado, la señalización del ABA parece tener un papel en la infección por *F. circinatum*. Mientras que dos CIPK20 fueron sobreexpresados en *P. pinea*, la enzima responsable del catabolismo del ABA en el menos activo ácido fásico (PA) fue inducida en *P. radiata*. Se ha demostrado que el PA tiene cierta actividad similar al ABA y es capaz de activar algunos receptores de ABA (RODRÍGUEZ, 2016). La

forma inactiva del ABA, que suele estar implicada en el transporte o la acumulación de ABA, es transformada a su forma activa bajo estrés por las β -glucosidasas (SCHROEDER & NAMBARA, 2006). Los genes que codifican estas enzimas fueron altamente inducidos en ambas especies de pinos.

Amaral *et al.* (2020) mostraron que mientras que *P. radiata* sufría un deterioro de la fotosíntesis una vez que se producían los síntomas de PPC, *P. pinea* era capaz de mantener su actividad fotosintética a lo largo del tiempo tras la inoculación de *F. circinatum*. A nivel transcripcional, la inhibición de genes involucrados en la fotosíntesis, debido posiblemente a los mayores niveles de etileno (KAYS & PALLAS, 1980), podría sugerir una reducción de la actividad fotosintética en *P. pinea*. Sin embargo, esto no se reflejó en los resultados del análisis fisiológico. Por otro lado, la fotosíntesis en *P. radiata* no fue alterada ni a nivel transcripcional ni en el análisis fisiológico. Esto destaca la importancia de un estudio integrado de análisis transcriptómico y fisiológico que considere la regulación post-transcripcional. La apertura general de los estomos y el aumento de la tasa de transpiración verificados en *P. pinea* tras la inoculación con *F. circinatum* en Amaral *et al.* (2020) no concuerdan con nuestros resultados. La ausencia de estos cambios en nuestro estudio puede explicarse por las diferentes condiciones de cultivo de la planta o procedencias de la misma.

Un gran número de genes relacionados con el refuerzo de la pared celular y la lignificación fueron sobreexpresados en *P. pinea*; junto con una modificación de la pared celular a través de la inhibición de todas las proteínas celulosa sintasa expresadas, expansinas y algunas proteínas XET. La supresión de la síntesis de celulosa se ha asociado previamente a una mayor resistencia a los patógenos fúngicos y bacterianos (HERNÁNDEZ-BLANCO *et al.*, 2007). Asimismo, la inhibición de las expansinas refuerza la pared celular al evitar la relajación de la misma por extensión celular. Por otro lado, la pectinesterasa, cuyo grado de metilesterificación determina la solidez de la pared celular y coopera a su desensamblaje (LIONETTI *et al.*, 2012), fue inducida en *P. radiata*, siendo su inhibidor PMEI reprimido. Esto resultaría en una mayor exposición a la infección por patógenos en *P. radiata*. En *P. pinea*, las principales enzimas implicadas en la biosíntesis de lignina fueron inducidas por la infección de *F. circinatum*. Cabe destacar que el gen que codifica PAL, la enzima que conduce a la biosíntesis de la lignina, no estaba presente en los DEG de *P. radiata* a pesar de su papel clave en la vinculación del metabolismo primario y secundario de la planta. Estos resultados sugieren una rápida respuesta de *P. pinea* en el refuerzo de las paredes celulares por lignificación, a diferencia de la débil expresión de estos genes en *P. radiata*.

Además de ramificarse en la lignina, la vía de los fenilpropanoides conduce a la biosíntesis de los flavonoides/isoflavonoides (DIXON *et al.*, 2002). A partir de la sobreexpresión del gen que codifica la enzima PAL, la especie resistente indujo una reacción de defensa activa y amplia que cubre casi por completo la vía de los flavonoides (Figura 4). Estudios recientes han informado de un importante papel de los componentes de esta vía en la resistencia de *Picea abies* a la infección por *Heterobasidion* (KOVALCHUK *et al.*, 2019; NEMESIO-GORRIZ *et al.*, 2017, 2016), siendo una de las principales vías inducidas en los árboles asintomáticos. El moderadamente resistente *P. pinaster* infectado con *F. circinatum* mostró que la respuesta flavonoide se mantuvo en el tiempo (hasta los 10 dpi; HERNÁNDEZ-ESCRIBANO *et al.*, 2020). En concordancia, aunque la síntesis de chalcona fue altamente inducida también en *P. radiata*, los componentes descendentes de esta vía fueron pobremente representados. Como los flavonoides tienen propiedades antioxidantes (TAKAHAMA & ONIKI, 2000), el estrés oxidativo causado por la infección de *F. circinatum* podría ser atenuado por la respuesta temprana de los compuestos flavonoides y las proteínas GSH/GTS en *P. pinea*. En línea con esto, los términos GO y las vías KEGG más sobreexpresadas en *P. pinea* estaban relacionados con la síntesis de fenilpropanoides, chalconas, flavonoides, antocianinas y metabolitos secundarios.

En condiciones de estrés, las proteínas PR son indispensables para las respuestas inmunitarias de las plantas (JAIN & KHURANA, 2018) confiriendo resistencia local o sistémica. Además de las proteínas PR1, un gran número de genes con propiedades antimicrobianas que codifican otras proteínas PR, incluyendo PR2, PR3, PR5, PR9, PR10 y PR14, fueron principalmente sobreexpresados. Esto concuerda con varios estudios sobre la interacción árbol forestal-patógeno (ADOMAS et al., 2007; AMARAL et al., 2019; ASIEGBU et al., 2005; AZAIEZ et al., 2009; CARRASCO et al., 2017; GONÇALVES et al., 2019; HERNÁNDEZ-ESCRIBANO et al., 2020; MEYER et al., 2016; SCHLINK, 2009; VISSER et al., 2018). Se ha reportado que, tras la infección de *F. circinatum*, JA y SA inducen quitinasas (PR3; DAVIS et al., 2002) que degradan la quitina, un componente principal de las paredes celulares del hongo. La presencia de β-1,3-endoglucanasas (PR2) aumenta en gran medida las propiedades antifúngicas de PR3 al degradar la matriz de glucano en la que se encuentra la quitina (COLLINGE et al., 1993). Varios genes que codifican proteínas PR3 fueron inducidos en ambas especies de pinos, sin embargo, una proteína PR2 sólo fue inducida en *P. pinea*, sugiriendo una respuesta menos efectiva de *P. radiata* en una etapa temprana de la enfermedad. Asimismo, la familia PR5 de la planta también ha mostrado propiedades antifúngicas contra varios patógenos de árboles forestales (ADOMAS et al., 2007; ASIEGBU et al., 2005; KOVALCHUK et al., 2019; MAHOMED & VAN DEN BERG, 2011; ZHU et al., 2019), incluyendo a *F. circinatum* (CARRASCO et al., 2017; DONOSO et al., 2015). Además, Carrasco et al. (2017) sugirieron un posible papel importante de PR1 y PR5 en la activación de la vía dependiente de SA y, a su vez, en la inducción de la resistencia sistémica inducida (SIR) contra PPC en *P. radiata*. Otras proteínas PR como las peroxidases (PR9) fueron tanto sobreexpresadas como reprimidas en *P. pinea*, de forma similar a la interacción de *P. pinaster*-*F. circinatum* a los 10 dpi (HERNANDEZ-ESCRIBANO et al., 2020) y *Eucalyptus nitens*-*Phytophthora cinnamomi* a los 5 dpi (MEYER et al., 2016). Esto podría señalar a PR9 como blanco efector de *F. circinatum*, encontrado en varias especies de *Phytophthora* que infectan *Carica papaya* (MOY et al., 2004; PORTER et al., 2009; RESTREPO et al., 2005). Se ha sugerido que la activación de los genes PR, en particular las quitinasas, se produce principalmente en *Pinus* spp. susceptibles durante la enfermedad PPC (AMARAL et al., 2019; DAVIS et al., 2002; DONOSO et al., 2015; MORSE et al., 2004). Sin embargo, estos estudios han remarcado que en las plantas resistentes los mayores niveles de expresión de estos genes se detectan en estadios tempranos (2-3 dpi) disminuyendo con el tiempo, mientras que lo contrario ocurre en las plantas susceptibles donde se observa una acumulación de estos transcritos a los 8-14 dpi. Nuestros resultados apoyan las conclusiones anteriores ya que *P. pinea* ha mostrado un mayor número de genes PR inducidos que *P. radiata* a los 4 dpi.

Entre las coníferas, una de las defensas inducidas más comunes contra los patógenos es la lignificación temprana de las fibras (FRANCESCHI et al., 2005). En los genes inducidos en el patógeno al infectar *P. pinea*, los términos GO más representados estaban relacionados con la degradación de la pared celular de la planta. De hecho, los transcritos del patógeno que coinciden con los genes que codifican para las enzimas que degradan la pared celular (CWDE) se detectaron en mayor número en el conjunto de datos de la interacción *P. pinea*-*F. circinatum*. Se identificaron varias glucósido hidrolasas, enzimas responsables de la hidrólisis de los residuos de azúcares enlazados en la celulosa y hemicelulosas (ZHAO et al., 2013). Entre ellas, también se detectó un gen implicado en la conversión de los polisacáridos de la pared celular de la planta en azúcares fermentables, la arabinan endo-1,5-alfa-L-arabinosidasa. Además, los genes con un papel en la degradación de la lignina, como las laccasas, las oxidoreductasas GMC y las deshidrogenasas de cellobiosa, estaban presentes de forma exclusiva en esta interacción. Esto podría sugerir una actividad diferencial de *F. circinatum* en la degradación de la lignina entre *P. pinea* y *P. radiata*, que podría estar asociada al contenido de lignina en cada especie. Además, la fuerte reacción en el refuerzo de la pared celular observada en *P. pinea* podría estar detrás de la activación de un amplio repertorio de CWDE por parte del patógeno. Por otro lado, en los genes del patógeno infectando a *P. radiata* se identificaron quitinasas fúngicas que presumiblemente participan en la remodelación de

la pared celular de los hongos, como la germinación de esporas o el crecimiento de las puntas de las hifas (LANGNER & GÖHRE, 2016).

La primera estrategia de los patógenos para obtener nutrientes de la planta implica el uso de transportadores y su capacidad para utilizar esos recursos de nutrientes determina en gran medida el éxito de la invasión (FATIMA & SENTHIL-KUMAR, 2015; SOLOMON et al., 2003). El análisis funcional reveló un notable enriquecimiento del transporte de nutrientes en los genes del patógeno infectando a *P. radiata*, especialmente de fuentes de nitrógeno, incluidos el amonio y los aminoácidos. Además, el transporte de colina, conocido como promotor del crecimiento y la virulencia de *Fusarium graminearum* (STRANGE et al., 1972), estaba altamente inducido en el patógeno infectando a *P. radiata*. La inducción a gran escala de transportadores para la absorción de nutrientes se ha asociado con el cambio de fase biotrófica a necrotrófica en patógenos hemibiotróficos, debido al rápido crecimiento de hifas secundarias en la última fase (MCDOWELL, 2013). Del mismo modo, los genes que codifican proteínas con funciones en el transporte de nutrientes estaban sobreexpresados en etapas tempranas de la colonización por *F. oxysporum* de plántulas susceptibles de *Medicago truncatula* (THATCHER et al., 2016). Se ha demostrado que la disponibilidad de nitrógeno en hongos modula su crecimiento, diferenciación y la biosíntesis de muchos metabolitos secundarios (TUDZYNSKI, 2014), por lo que los patógenos causarán menos daño en las plantas donde el nitrógeno es limitante (SNOEIJERS et al., 2000). Además, se notificó una acumulación general de aminoácidos, posiblemente asociada con la respuesta al estrés de la planta y/o el secuestro del metabolismo del huésped por el patógeno, en *P. radiata* tras la inoculación de *F. circinatum* (AMARAL et al., 2019). Por lo tanto, el enriquecimiento de genes relacionados con la captación de nitrógeno por parte de *F. circinatum* infectando al *P. radiata* podría proporcionar al patógeno una ventaja competitiva en la interacción planta-patógeno.

6. Conclusiones

En este artículo se presenta un estudio transcripcional exhaustivo de la interacción huésped-patógeno entre el patógeno hemibiotrófico *F. circinatum* y una especie huésped resistente y otra susceptible. La falta de una respuesta sustancial en *P. radiata* contrastó con una avanzada reprogramación transcripcional para la defensa en *P. pinea* en una fase temprana de la enfermedad. Los resultados han sugerido que la débil respuesta de *P. radiata* podría estar relacionada con una percepción deficiente de la infección fúngica, ya que las primeras respuestas de defensa, incluyendo el flujo de calcio, el reconocimiento por parte de las proteínas R, o la activación de las proteínas quinasas MAPKs, estaban ausentes en esta especie. El fracaso durante la fase inicial de la infección ha conducido presumiblemente a una activación más débil de un conjunto diverso de vías de defensa, incluyendo la lignificación, la biosíntesis de fitohormonas y la producción de antioxidantes no enzimáticos como el ascorbato y los flavonoides. Esta circunstancia pudo permitir al hongo aprovechar al máximo los nutrientes de *P. radiata* (como el nitrógeno), como sugiere el análisis de los transcritos de *F. circinatum*. Nuestros hallazgos permiten una mejor comprensión de la interacción pino-*F. circinatum* y de las respuestas de defensa de las coníferas al estrés biótico y sientan las bases para futuros estudios de validación de la asociación de estos genes candidatos con los rasgos de resistencia de PPC. Este conocimiento se implementará en los programas de mejora genética para el uso comercial de material reproductivo de pino resistente.

7. Agradecimientos

Los autores agradecen a Marcos García por la ayuda informática, y A Aroa Suárez por los consejos en bioinformática, además de a Sergio Díez por la ayuda en R. También queremos agradecer a Francisco J. Colina por su apoyo técnico en el trabajo de laboratorio. El análisis de datos se llevó a cabo utilizando los recursos del “Centro de Supercomputación de Castilla y León” (SCAYLE, www.scayle.es), bajo el valioso apoyo técnico de Carmen Calvo y Jesús Lorenzana.

8. Bibliografía

- ADOMAS; A.; HELLER; G.; LI; G.; OLSON; A.; CHU; T.; OSBORNE; J.; CRAIG; D.; VAN ZYL; L.; WOLFINGER; R.; SEDEROFF; R.; DEAN; R.A.; STENLID; J.; FINLAY; R.; ASIEGBU; F.O.; 2007. Transcript profiling of a conifer pathosystem: response of *Pinus sylvestris* root tissues to pathogen (*Heterobasidion annosum*) invasion. *Tree Physiol.* 1441–1458.
- AMARAL; J.; CORREIA; B.; ANTÓNIO; C.; RODRIGUES; A.M.; GÓMEZ-CADENAS; A.; VALLEDOR; L.; HANCOCK; R.D.; ALVES; A.; PINTO; G.; 2019. *Pinus* Susceptibility to Pitch Canker Triggers Specific Physiological Responses in Symptomatic Plants: An Integrated Approach. *Front. Plant Sci.* 509.
- AMARAL; J.; CORREIA; B.; ESCANDÓN; M.; JESUS; C.; SERÔDIO; J.; VALLEDOR; L.; HANCOCK; R.D.; DINIS; L.-T.; GOMEZ-CADENAS; A.; ALVES; A.; PINTO; G.; 2020. Temporal physiological response of pine to *Fusarium circinatum* infection is dependent on host susceptibility level: the role of ABA catabolism. *Tree Physiol.* 143.
- ANDREWS; S.; 2012. FastQC a quality control tool for high throughput sequence data. [WWW Document]. URL <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (accessed 2.28.20).
- ASIEGBU; F.O.; NAHALKOVA; J.; LI; G.; 2005. Pathogen-inducible cDNAs from the interaction of the root rot fungus *Heterobasidion annosum* with Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant Sci.* 365–372.
- AZALEZ; A.; BOYLE; B.; LEVÉE; V.; SÉGUIN; A.; 2009. Transcriptome Profiling in Hybrid Poplar Following Interactions with Melampsora Rust Fungi. *MPMI* 190–200.
- BEZOS; D.; MARTÍNEZ-ALVAREZ; P.; FERNÁNDEZ; M.; DIEZ; J.J.; 2017. Epidemiology and management of pine pitch canker disease in Europe - A review. *Balt. For.* 279–293.
- BOLGER; A.M.; LOHSE; M.; USADEL; B.; 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120.
- BRADSHAW; R.E.; GUO; Y.; SIM; A.D.; KABIR; M.S.; CHETTRI; P.; OZTURK; I.K.; HUNZIKER; L.; GANLEY; R.J.; COX; M.P.; 2016. Genome-wide gene expression dynamics of the fungal pathogen *Dothistroma septosporum* throughout its infection cycle of the gymnosperm host *Pinus radiata*. *Mol. Plant Pathol.* 210–224.
- CARRASCO; A.; WEGRZYN; J.L.; DURÁN; R.; FERNÁNDEZ; M.; DONOSO; A.; RODRIGUEZ; V.; NEALE; D.; VALENZUELA; S.; 2017. Expression profiling in *Pinus radiata* infected with *Fusarium circinatum*. *Tree Genet. Genomes* 46.
- COLLINGE; D.B.; KRAGH; K.M.; MIKKELSEN; J.D.; NIELSEN; K.K.; RASMUSSEN; U.; VAD; K.; 1993. Plant chitinases. *Plant J.* 31–40.
- DAVIS; J.M.; WU; H.; COOKE; J.E.K.; REED; J.M.; LUCE; K.S.; MICHLER; C.H.; 2002. Pathogen

challenge, salicylic acid, and jasmonic acid regulate expression of chitinase gene homologs in pine. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 380–387.

DAVYDENKO; K.; NOWAKOWSKA; J.A.; KALUSKI; T.; GAWLAK; M.; SADOWSKA; K.; MARTÍN-GARCÍA; J.; DIEZ; J.J.; OKORSKI; A.; OSZAKO; T.; 2018. A Comparative Study of the Pathogenicity of *Fusarium circinatum* and other *Fusarium* Species in Polish Provenances of *Pinus sylvestris* L. *Forests* 560.

DEVOTO; A.; NIETO-ROSTRO; M.; XIE; D.; ELLIS; C.; HARMSTON; R.; PATRICK; E.; DAVIS; J.; SHERRATT; L.; COLEMAN; M.; TURNER; J.G.; 2002. COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in *Arabidopsis*. *Plant J.* 457–466.

DIXON; R.A.; ACHNINE; L.; KOTA; P.; LIU; C.J.; REDDY; M.S.S.; WANG; L.; 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence - A genomics perspective. *Mol. Plant Pathol.* 371–390.

DONOSO; A.; RODRIGUEZ; V.; CARRASCO; A.; AHUMADA; R.; SANFUENTES; E.; VALENZUELA; S.; 2015. Relative expression of seven candidate genes for pathogen resistance on *Pinus radiata* infected with *Fusarium circinatum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 42–50.

DUPLESSIS; S.; MAJOR; I.; MARTIN; F.; SÉGUIN; A.; 2009. Poplar and Pathogen Interactions: Insights from *Populus* Genome-Wide Analyses of Resistance and Defense Gene Families and Gene Expression Profiling. *Crit. Rev. Plant Sci.* 309–334.

DWINELL; D.; 1999. Global Distribution of the Pitch Canker Fungus, in: Devey, M., Matheson, A., Gordon, T. (eds.), Proceedings of the IMPACT Monterey Workshop. CSIRO Forestry and Forest Products, Kingston AC, Monterey. 54–57. California.

FÄLDT; J.; MARTIN; D.; MILLER; B.; RAWAT; S.; BOHLMANN; J.; 2003. Traumatic resin defense in Norway spruce (*Picea abies*): Methyl jasmonate-induced terpene synthase gene expression, and cDNA cloning and functional characterization of (+)-3-carene synthase. *Plant Mol. Biol.* 119–133.

FATIMA; U.; SENTHIL-KUMAR; M.; 2015. Plant and pathogen nutrient acquisition strategies. *Front. Plant Sci.* 750.

FITZA; K.N.E.; PAYN; K.G.; STEENKAMP; E.T.; MYBURG; A.A.; NAIDOO; S.; 2013. Chitosan application improves resistance to *Fusarium circinatum* in *Pinus patula*. *South African J. Bot.* 70–78.

FRANCESCHI; V.R.; KROKENE; P.; CHRISTIANSEN; E.; KREKLING; T.; 2005. Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests. *New Phytol.* 353–376.

GASPAR; D.; TRINDADE; C.; USIÉ; U.; MEIRELES; B.; FORTES; A.M.; GUIMARÃES; J.B.; SIMÕES; F.; COSTA; R.L.; RAMOS; A.M.; 2020. Comparative Transcriptomic Response of Two *Pinus* Species to Infection with the Pine Wood Nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Forests* 204.

GOFF; K.E.; RAMONELL; K.M.; 2007. The Role and Regulation of Receptor-Like Kinases in Plant Defense. *Gene Regul. Syst. Bio.* 167–175.

GONÇALVES; M.; NUNES; R.; TILLEMAN; L.; VAN DE PEER; Y.; DEFORCE; D.; VAN NIEUWERBURGH; F.; ESTEVES; A.; ALVES; A.; 2019. Dual RNA Sequencing of *Vitis vinifera* during *Lasiodiplodia theobromae* Infection Unveils Host–Pathogen Interactions. *Int. J. Mol. Sci.* 6083.

GORDON; T.R.; SWETT; C.L.; WINGFIELD; M.J.; 2015. Management of *Fusarium* diseases affecting conifers. *Crop Prot.* 28–39.

HART; A.J.; GINZBURG; S.; XU; M. (SAM); FISHER; C.R.; RAHMATPOUR; N.; MITTON; J.B.; PAUL; R.; WEGRZYN; J.L.; 2020. EnTAP: Bringing faster and smarter functional annotation to non-model eukaryotic transcriptomes. *Mol. Ecol. Resour.* 591–604.

HAYDEN; K.J.; GARBELOTTO; M.; KNAUS; B.J.; CRONN; R.C.; RAI; H.; WRIGHT; J.W.; 2014. Dual RNA-seq of the plant pathogen *Phytophthora ramorum* and its tanoak host. *Tree Genet. Genomes* 489–502.

HERNÁNDEZ-BLANCO; C.; FENG; D.X.; HU; J.; SÁNCHEZ-VALLET; A.; DESLANDES; L.; LLORENTE; F.; BERROCAL-LOBO; M.; KELLER; H.; BARLET; X.; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ; C.; ANDERSON; L.K.; SOMERVILLE; S.; MARCO; Y.; MOLINAA; A.; 2007. Impairment of cellulose synthases required for *Arabidopsis* secondary cell wall formation enhances disease resistance. *Plant Cell* 890–903.

HERNANDEZ-ESCRIBANO; L.; VISSER; E.A.; ITURRITXA; E.; RAPOSO; R.; NAIDOO; S.; 2020. The transcriptome of *Pinus pinaster* under *Fusarium circinatum* challenge. *BMC Genomics* 1–18.

HIRAYAMA; T.; KIEBER; J.J.; HIRAYAMA; N.; KOGAN; M.; GUZMAN; P.; NOURIZADEH; S.; ALONSO; J.M.; DAILEY; W.P.; DANCIS; A.; ECKER; J.R.; 1999. RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Cell* 383–393.

ITURRITXA; E.; GANLEY; R.J.; RAPOSO; R.; GARCÍA-SERNA; I.; MESANZA; N.; KIRKPATRICK; S.C.; GORDON; T.R.; 2013. Resistance levels of Spanish conifers against *Fusarium circinatum* and *Diplodia pinea*. *For. Pathol.* 488–495.

JAIN; D.; KHURANA; J.P.; 2018. Role of pathogenesis-related (PR) proteins in plant defense mechanism, in: Singh, A., Singh, I. (eds.): Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction. Springer. 265–28. Singapore.

KANZLER; A.; NEL; A.; FORD; C.; 2014. Development and commercialisation of the *Pinus patula* x *P-tecunumanii* hybrid in response to the threat of *Fusarium circinatum*. *New For.* 417–437.

KAYS; S.J.; PALLAS; J.E.; 1980. Inhibition of photosynthesis by ethylene. *Nature* 51–52.

KEELING; C.I.; BOHLMANN; J.; 2006. Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. *New Phytol.* 657–675.

KIM; D.; LANGMEAD; B.; SALZBERG; S.L.; 2015. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat. Methods* 357–360.

KOVALCHUK; A.; ZENG; Z.; GHIMIRE; R.P.; KIVIMÄENPÄÄ; M.; RAFFAELLO; T.; LIU; M.; MUKRIMIN; M.; KASANEN; R.; SUN; H.; JULKUNEN-TIITTO; R.; HOLOPAINEN; J.K.; ASIEGBU; F.O.; 2019. Dual RNA-seq analysis provides new insights into interactions between Norway spruce and necrotrophic pathogen *Heterobasidion annosum* s.l. *BMC Plant Biol.* 2.

LANGNER; T.; GÖHRE; V.; 2016. Fungal chitinases: function, regulation, and potential roles in plant/pathogen interactions. *Curr. Genet.* 243–254.

LIAO; Y.; SMYTH; G.K.; SHI; W.; 2014. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 923–930.

LIONETTI; V.; CERVONE; F.; BELLINCAMPI; D.; 2012. Methyl esterification of pectin plays a role during plant-pathogen interactions and affects plant resistance to diseases. *J. Plant Physiol.* 1623–1630.

LIU; H.; DAI; J.; FENG; D.; LIU; B.; WANG; H.; WANG; J.; 2010. Characterization of a Novel Plantain Asr Gene, *MpAsr*, that is Regulated in Response to Infection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and Abiotic Stresses. *J. Integr. Plant Biol.* 315–323.

MAHOMED; W.; VAN DEN BERG; N.; 2011. EST sequencing and gene expression profiling of defence-related genes from *Persea americana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. *BMC Plant Biol.* 167.

MANGWANDA; R.; MYBURG; A.A.; NAIDOO; S.; 2015. Transcriptome and hormone profiling reveals *Eucalyptus grandis* defence responses against *Chrysoporthe austroafricana*. *BMC Genomics* 1–13.

MARTÍN-GARCÍA; J.; LUKACEVICOVA; A.; FLORES-PACHECO; A.; DIEZ; J.; DVORAK; M.; 2018. Evaluation of the Susceptibility of Several Czech Conifer Provenances to *Fusarium circinatum*. *Forests* 72.

MARTÍN-GARCÍA; J.; PARASCHIV; M.; FLORES-PACHECO; A.; CHIRA; D.; DIEZ; J.; FERNANDEZ; M.; 2017. Susceptibility of Several Northeastern Conifers to *Fusarium circinatum* and Strategies for Biocontrol. *Forests* 318.

MARTÍN-GARCÍA; J.; ZAS; R.; SOLLA; A.; WOODWARD; S.; HANTULA; J.; VAINIO; E.J.; MULLETT; M.; MORALES-RODRÍGUEZ; C.; VANNINI; A.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ; P.; PINTO; G.; ALVES; A.; AMARAL; J.; WINGFIELD; M.J.; FOURIE; G.; STEENKAMP; E.T.; AHUMADA; R.; ŠERÁ; B.; SANZ-ROS; A. V; RAPOSO; R.; ELVIRA-RECUENCO; M.; ITURRITXA; E.; GORDON; T.R.; DIEZ; J.J.; 2019. Environmentally-friendly methods for controlling pine pitch canker. *Plant Pathol.* 843–860.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ; P.; PANDO; V.; DIEZ; J.J.; 2014. Alternative species to replace Monterey pine plantations affected by pitch canker caused by *Fusarium circinatum* in northern Spain. *Plant Pathol.* 1086–1094.

MCDOWELL; J.M.; 2013. Genomic and transcriptomic insights into lifestyle transitions of a hemi-biotrophic fungal pathogen. *New Phytol.* 1032–1034.

MEAD; D.J.; 2013. Sustainable management of *Pinus radiata* plantations. Rome (Italy).

MEYER; F.E.; SHUEY; L.S.; NAIDOO; S.; MAMNI; T.; BERGER; D.K.; MYBURG; A.A.; VAN DEN BERG; N.; NAIDOO; S.; 2016. Dual RNA-sequencing of *Eucalyptus nitens* during *Phytophthora cinnamomi* challenge reveals pathogen and host factors influencing compatibility. *Front. Plant Sci.* 1–15.

MITCHELL; R.G.; WINGFIELD; M.J.; HODGE; G.R.; STEENKAMP; E.T.; COUTINHO; T.A.; 2013. The tolerance of *Pinus patula* × *Pinus tecunumanii*, and other pine hybrids, to *Fusarium circinatum* in greenhouse trials. *New For.* 443–456.

MITECO; 2020. Anuario de estadística forestal 2018. Madrid.

MORSE; A.M.; NELSON; C.D.; COVERT; S.F.; HOLLIDAY; A.G.; SMITH; K.E.; DAVIS; J.M.; 2004. Pine genes regulated by the necrotrophic pathogen *Fusarium circinatum*. *Theor. Appl. Genet.* 922–932.

MOY; P.; QUTOB; D.; CHAPMAN; B.P.; ATKINSON; I.; GIJZEN; M.; 2004. Patterns of Gene Expression Upon Infection of Soybean Plants by *Phytophthora sojae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1051–1062.

MULLETT; M.; TUBBY; K.; PÉREZ-SIERRA; A.; 2017. EU template *Fusarium* field guide. COST Action FP1406 PINESTRENGTH.

NAIDOO; S.; VISSER; E.A.; ZWART; L.; DU TOIT; Y.; BHADAURIA; V.; SHUEY; L.S.; 2017. Dual RNA-seq to Elucidate the Plant-Pathogen Duel. *Curr. Issues Mol. Biol* 127–142.

NEMESIO-GORRIZ; M.; BLAIR; P.B.; DALMAN; K.; HAMMERBACHER; A.; ARNERUP; J.; STENLID; J.; MUKHTAR; S.M.; ELFSTRAND; M.; 2017. Identification of Norway Spruce MYB-bHLH-WDR Transcription Factor Complex Members Linked to Regulation of the Flavonoid Pathway. *Front. Plant Sci.* 305.

NEMESIO-GORRIZ; M.; HAMMERBACHER; A.; IHRMARK; K.; KÄLLMAN; T.; OLSON; Å.; LASCOUX; M.; STENLID; J.; GERSHENZON; J.; ELFSTRAND; M.; 2016. Different Alleles of a Gene Encoding Leucoanthocyanidin Reductase (PaLAR3) Influence Resistance against the Fungus *Heterobasidion parviporum* in *Picea abies*. *Plant Physiol.* 2671–2681.

PERTEA; M.; PERTEA; G.M.; ANTONESCU; C.M.; CHANG; T.-C.; MENDELL; J.T.; SALZBERG; S.L.; BIOTECHNOL; N.; 2015. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat Biotechnol.* 290–295.

PORTER; B.W.; ZHU; Y.J.; CHRISTOPHER; D.A.; 2009. *Carica papaya* genes regulated by *Phytophthora palmivora*: A model system for genomic studies of compatible *Phytophthora*-plant interactions. *Trop. Plant Biol.* 84–97.

R CORE TEAM; 2019. R: The R Project for Statistical Computing. CRAN. URL <https://www.r-project.org/> (accessed 11.16.20).

RESTREPO; S.; MYERS; K.L.; DEL POZO; O.; MARTIN; G.B.; HART; A.L.; BUELL; C.R.; FRY; W.E.; SMART; C.D.; 2005. Gene profiling of a compatible interaction between *Phytophthora infestans* and *Solanum tuberosum* suggests a role for carbonic anhydrase. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 913–922.

ROBINSON; M.D.; MCCARTHY; D.J.; SMYTH; G.K.; 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinforma. Appl. Note* 139–140.

RODRIGUEZ; P.L.; 2016. Abscisic Acid Catabolism Generates Phaseic Acid, a Molecule Able to Activate a Subset of ABA Receptors. *Mol. Plant* 1448–1450.

ROUX; J.; EISENBERG; B.; KANZLER; A.; NEL; A.; COETZEE; V.; KIETZKA; E.; WINGFIELD; M.J.; 2007. Testing of selected South African *Pinus* hybrids and families for tolerance to the pitch canker pathogen, *Fusarium circinatum*. *New For.* 109–123.

SCHLINK; K.; 2009. Identification and characterization of differentially expressed genes from *Fagus sylvatica* roots after infection with *Phytophthora citricola*. *Plant Cell Rep.* 873–882.

SCHROEDER; J.I.; NAMBARA; E.; 2006. A Quick Release Mechanism for Abscisic Acid. *Cell* 1023–1025.

SEO; H.S.; SONG; J.T.; CHEONG; J.J.; LEE; Y.H.; LEE; Y.W.; HWANG; I.; LEE; J.S.; CHOI; Y. DO; 2001. Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 4788–4793.

SNOEIJERS; S.S.; PÉREZ-GARCÍA; A.; JOOSTEN; M.H.A.J.; DE WIT; P.J.G.M.; 2000. The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens. *Eur. J. Plant Pathol.* 493–506.

SOLOMON; P.S.; TAN; K.C.; OLIVER; R.P.; 2003. The nutrient supply of pathogenic fungi; a fertile field for study. *Mol. Plant Pathol.* 203–210.

STRANGE; R.N.; SMITH; H.; MAJER; J.R.; 1972. Choline, one of two fungal growth stimulants in anthers responsible for the susceptibility of wheat to *Fusarium graminearum*. *Nature* 103–104.

TAKAHAMA; U.; ONIKI; T.; 2000. Flavonoids and some other phenolics as substrates of peroxidase: physiological significance of the redox reactions. *J. Plant Res.* 301–309.

TANG; D.; WANG; G.; ZHOU; J.M.; 2017. Receptor kinases in plant-pathogen interactions: More than pattern recognition. *Plant Cell* 618–637.

THATCHER; L.F.; WILLIAMS; A.H.; GARG; G.; BUCK; S.A.G.; SINGH; K.B.; 2016. Transcriptome analysis of the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis* during colonisation of resistant and susceptible *Medicago truncatula* hosts identifies differential pathogenicity profiles and novel candidate effectors. *BMC Genomics* 1–19.

TUDZYNSKI; B.; 2014. Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. *Front. Microbiol.* 656.

VALLEDOR; L.; ESCANDÓN; M.; MEIJÓN; M.; NUKARINEN; E.; CAÑAL; M.J.; WECKWERTH; W.; 2014. A universal protocol for the combined isolation of metabolites, DNA, long RNAs, small RNAs, and proteins from plants and microorganisms. *Plant J.* 173–180.

VISSEER; E.A.; WEGRZYN; J.L.; MYBURG; A.A.; NAIDOO; S.; 2018. Defence transcriptome assembly and pathogenesis related gene family analysis in *Pinus tecunumanii* (low elevation). *BMC Genomics* 632.

VISSEER; E.A.; WEGRZYN; J.L.; STEENKAMP; E.T.; MYBURG; A.A.; NAIDOO; S.; 2019. Dual RNA-Seq analysis of the pine-*Fusarium circinatum* interaction in resistant (*Pinus tecunumanii*) and susceptible (*Pinus patula*) hosts. *Microorganisms* 7–9.

VISSEER; E.A.; WEGRZYN; J.L.; STEENKAMP; E.T.; MYBURG; A.A.; NAIDOO; S.; 2015. Combined *de novo* and genome guided assembly and annotation of the *Pinus patula* juvenile shoot transcriptome. *BMC Genomics* 1057.

VIVAS; M.; MARTÍN; J.A.; GIL; L.; SOLLA; A.; 2012. Evaluating methyl jasmonate for induction of resistance to *Fusarium oxysporum*, *F. circinatum* and *Ophiostoma novo-ulmi*. *For. Syst.* 289–299.

WEGRZYN; J.L.; LEE; J.M.; TEARSE; B.R.; NEALE; D.B.; 2008. TreeGenes: A Forest Tree Genome Database. *Int. J. Plant Genomics* 1–7.

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.* 319–334. YANG; S.F.; HOFFMAN; N.E.; 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 155–89.

ZHAO; Z.; LIU; H.; WANG; C.; XU; J.R.; 2013. Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. *BMC Genomics* 1–15.

ZHU; Y.; SHAO; J.; ZHOU; Z.; DAVIS; R.E.; 2019. Genotype-specific suppression of multiple defense pathways in apple root during infection by *Pythium ultimum*. *Hortic. Res.* 10.