

# Hongos endófitos y su papel en la resistencia de *Abies religiosa* a la contaminación del aire

**Valeria Stephany Flores Almaraz**

**Tutores principales:**

- Dra. Camille Truong
- Dr. Rodolfo Salas Lizana

**Comité tutorial:**

- Dra. Alicia Mastretta Yanes
- Dr. Juan Pablo Jaramillo Correa



# **Estructura de la presentación**

**Introducción**

**Objetivos**

**Justificación**

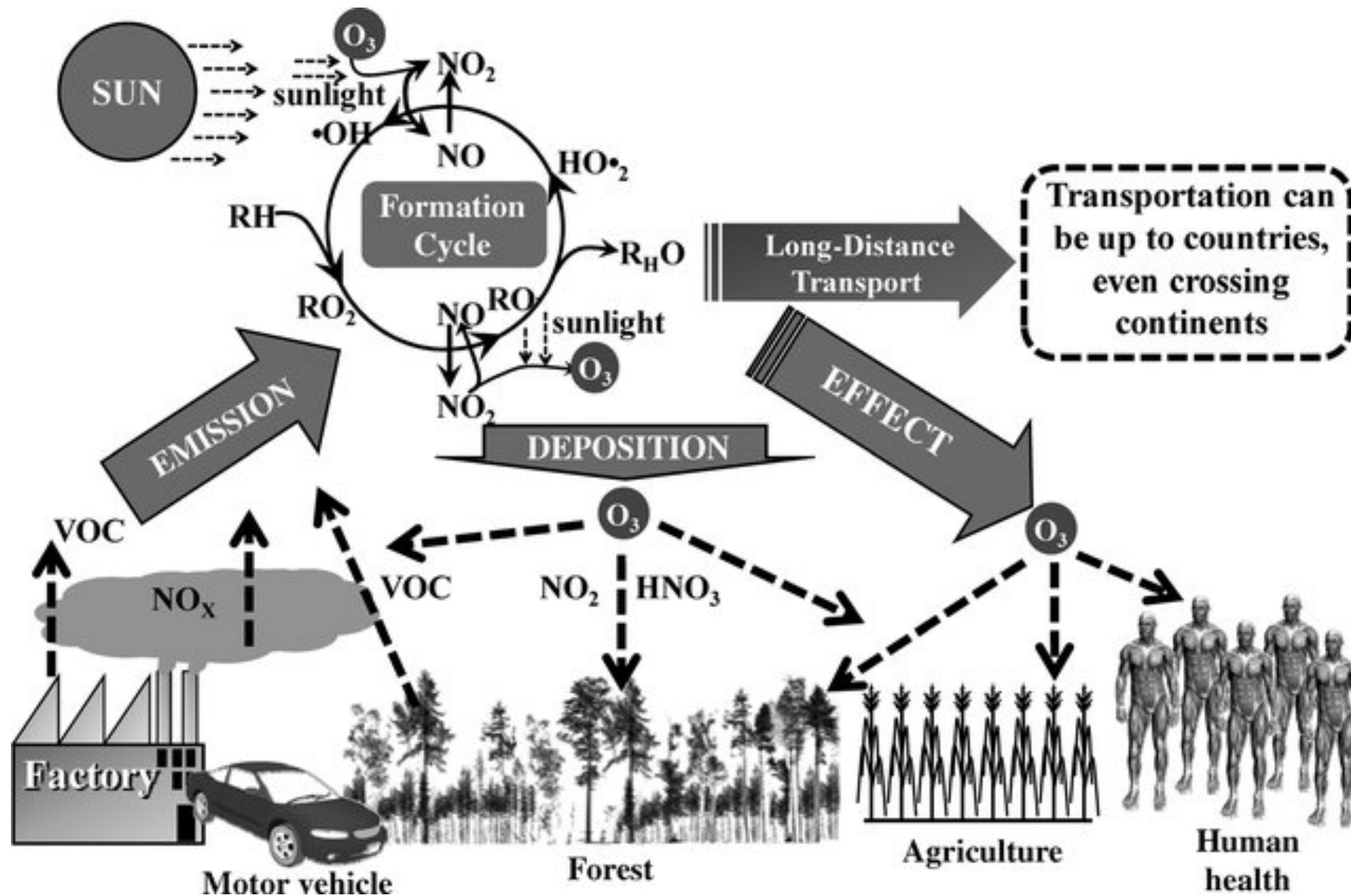
**Metodología**

**Metatranscriptómica**

**Barcoding**

**Calendario propuesto**

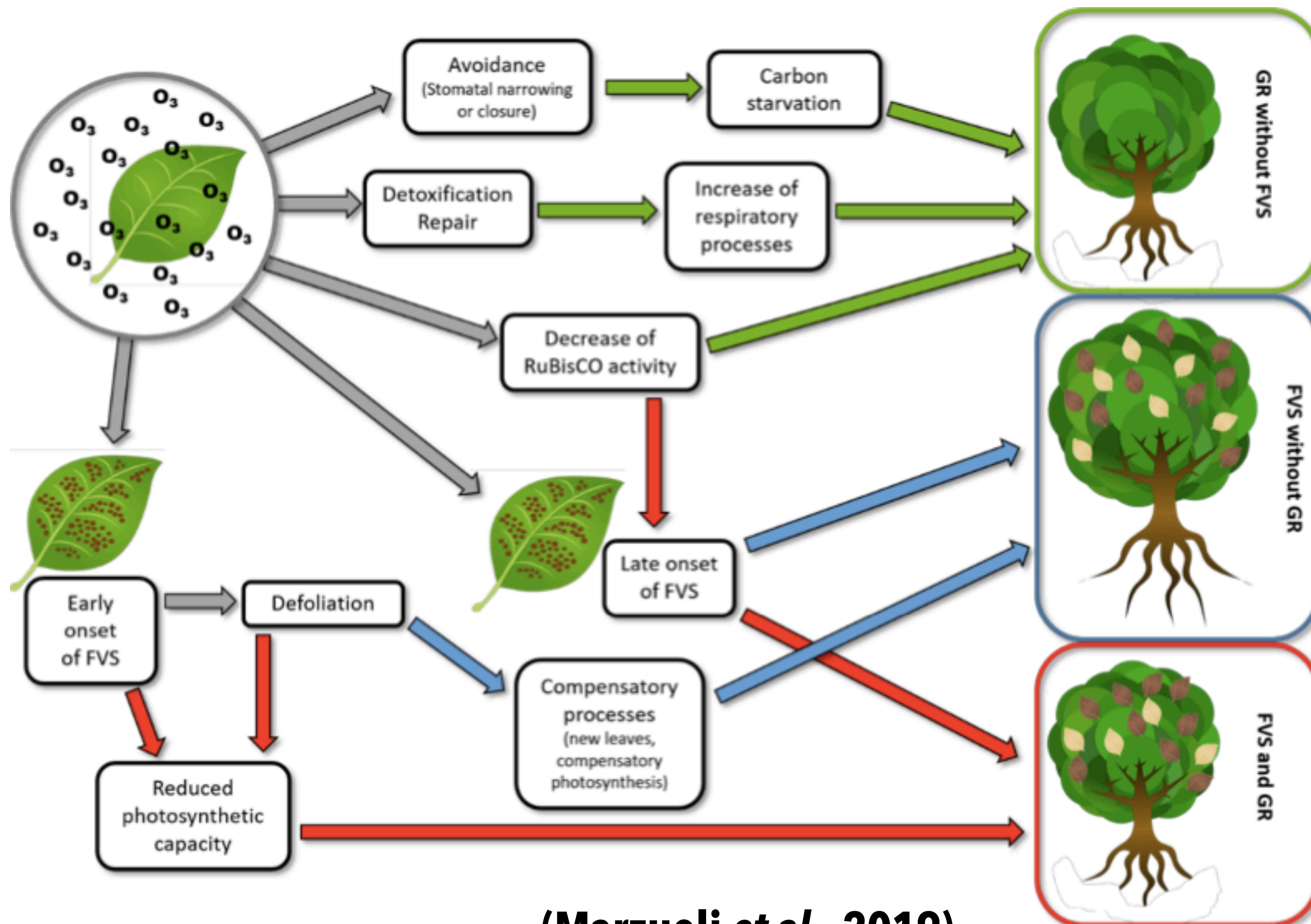
# Introducción



(Rai et al., 2012)

El O<sub>3</sub> es un contaminante del aire cuyas emisiones aumentaron drásticamente a partir de la Revolución Industrial.

# Efecto del O<sub>3</sub> en las plantas



(Marzuoli et al., 2019)

# Antecedentes



La alta concentración de  $O_3$  está causando el declive de las poblaciones de *A. religiosa* en los bosques periféricos de la Ciudad de México.

(Reyes-Galindo, 2019)

**En una zona expuesta a altas concentraciones de O<sub>3</sub> hay individuos de oyameles que muestran un menor nivel de daño**



**(Reyes-Galindo, 2019)**

Existe variación genética relacionada con la tolerancia al O<sub>3</sub>

# **Usando herramientas histológicas, metabolómicas, genéticas y transcriptómicas:**

- Daño estructural gradual.
- Acumulación diferencias del compuestos fenólicos.
- Los árboles estudiados tienen un origen local.
- Expresión diferencias de siete genes candidatos de las rutas metabólicas de carbohidratos y flavonoides.

**(Reyes-Galindo, 2019)**

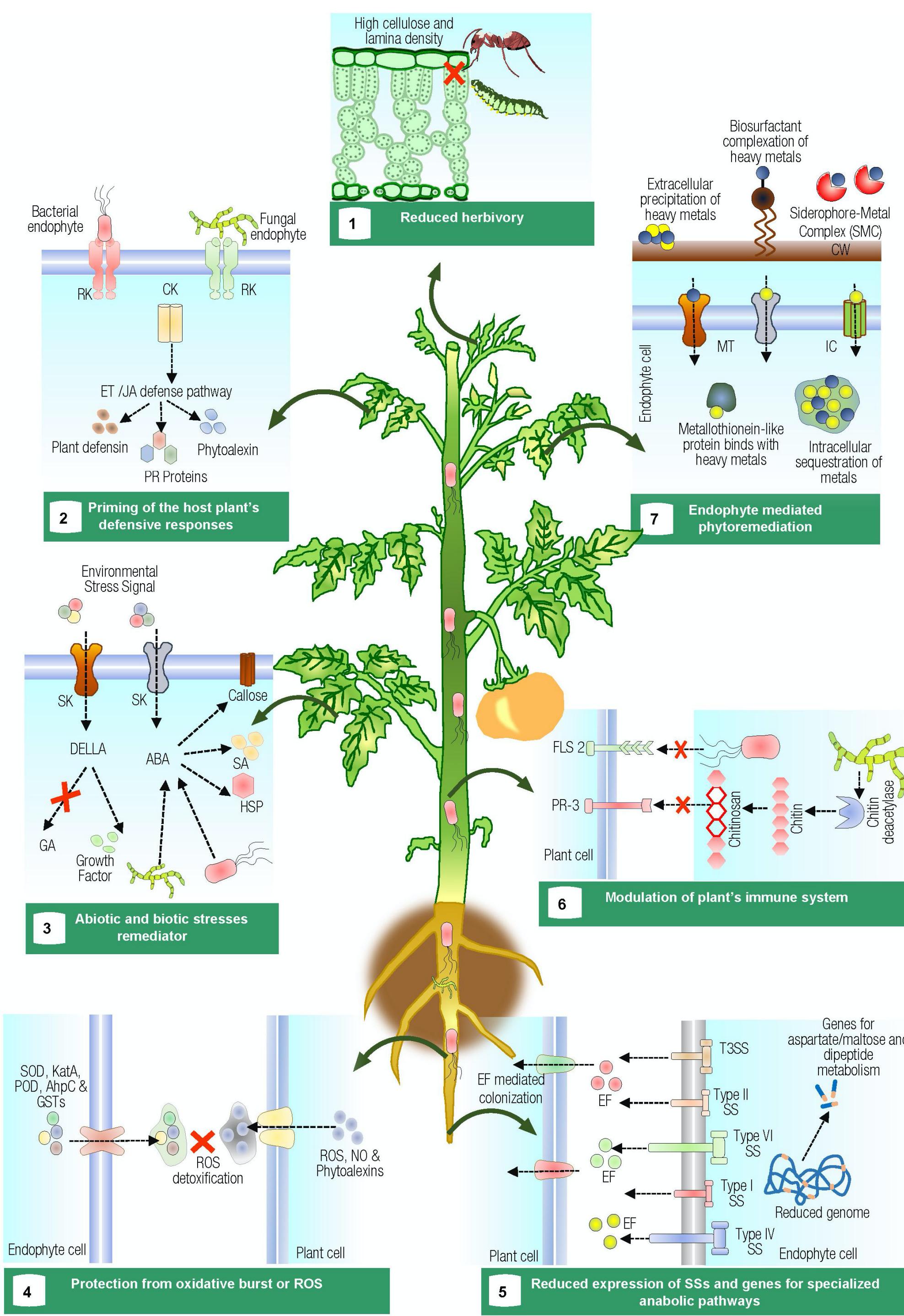
# Usando herramientas histológicas, metabolómicas, genéticas y transcriptómicas:

- Daño estructural gradual.
- Acumulación diferencias del compuestos **fenólicos**.
- Los árboles estudiados tienen un origen local.
- Expresión diferencias de siete genes candidatos de las rutas metabólicas de carbohidratos y **flavonoides**.

Los compuestos fenólicos y los flavonoides juegan un papel destacado en las actividades antioxidantes de múltiples hongos endófitos.

**(Pan et al., 2017)**

**(Reyes-Galindo, 2019)**



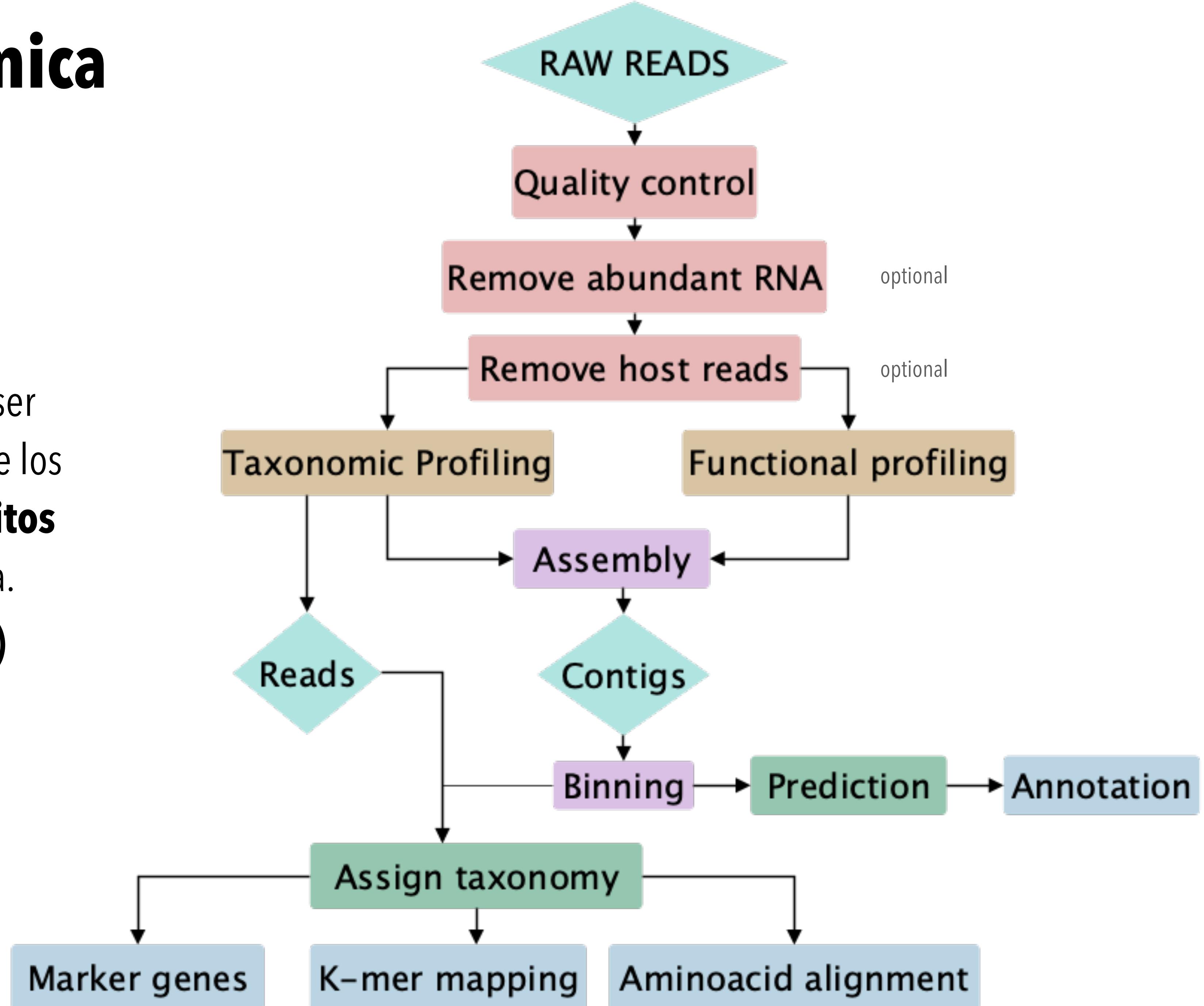
# Los hongos endófitos incrementan la adecuación de sus plantas hospederas mediante el fortalecimiento de su tolerancia a distintos estreses bióticos y abióticos.

(Khare et al. 2018)

**¿Qué pasa con los hongos endófitos en los cementerios de oyameles?**

# Metatranscriptómica

La metatranscriptómica puede ser utilizada para generar un perfil de los genes que están siendo **transcritos activamente** en una muestra.  
**(Breitwieser et al. 2017)**



# Justificación

- ▶ El  $O_3$  es un contaminante del aire que está causando el declive de las poblaciones de *A. religiosa* en las zonas periféricas de la Ciudad de México donde el drenaje atmosférico está ocasionando los llamados *Cementerios de oyamel*.
- ▶ En estos sitios se ha observado variación en el nivel de daño y estudios previos mostraron que entre los individuos dañados y tolerantes existe acumulación diferencial de compuestos fenólicos y expresión diferencial de genes relacionados con el metabolismos de flavonoides, los cuales tienen un papel destacado en las actividades antioxidantes de los hongos endófitos.
- ▶ Dados estos antecedentes, resulta importante saber qué hongos endófitos se encuentran dentro de las hojas de los oyameles en estos sitios, cómo están respondiendo ante el estrés ocasionado por  $O_3$  y si tienen un papel en la presencia de oyameles con fenotipos tolerantes.

# Objetivos

Caracterizar a nivel taxonómico y funcional las comunidades de hongos endófitos de hojas de individuos sanos y dañados de oyameles expuestos a altas concentraciones de O<sub>3</sub> e identificar funciones fúngicas claves en la resistencia de *Abies religiosa* a la contaminación del aire.

## Particulares

- Caracterizar la diversidad taxonómica y funcional, así como detectar la expresión diferencial de genes fúngicos de los endófitos de oyameles tolerantes y dañados mediante herramientas metatranscriptómicas.
- Detectar la presencia de genes fúngicos que estén potencialmente involucrados en la tolerancia de sus hospederos al estrés ocasionado por O<sub>3</sub>.
- Investigar la diversidad de hongos endófitos en la filósfera de individuos sanos y dañados de *A. religiosa* mediante aislamiento en cultivo puro, secuenciacion Sanger y metabarcoding.

# **Metodología**

**Metatranscriptómica**

**Barcoding**

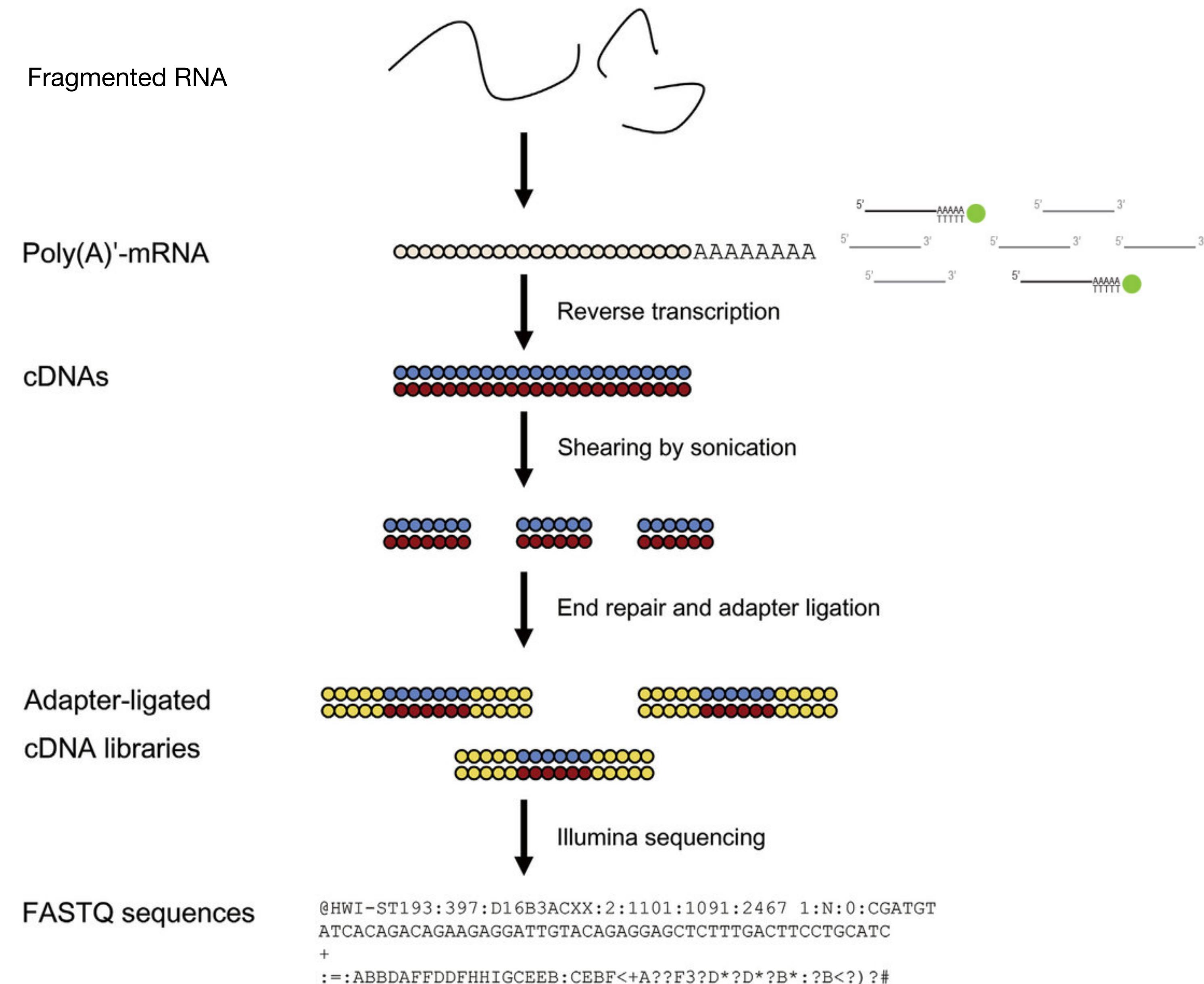
# Metatranscriptómica

## Datos

16 muestras { 8 tolerantes  
8 dañados

↓  
**Poliadenilación**

**Illumina HiSeq 4000**  
**2x150 pb**



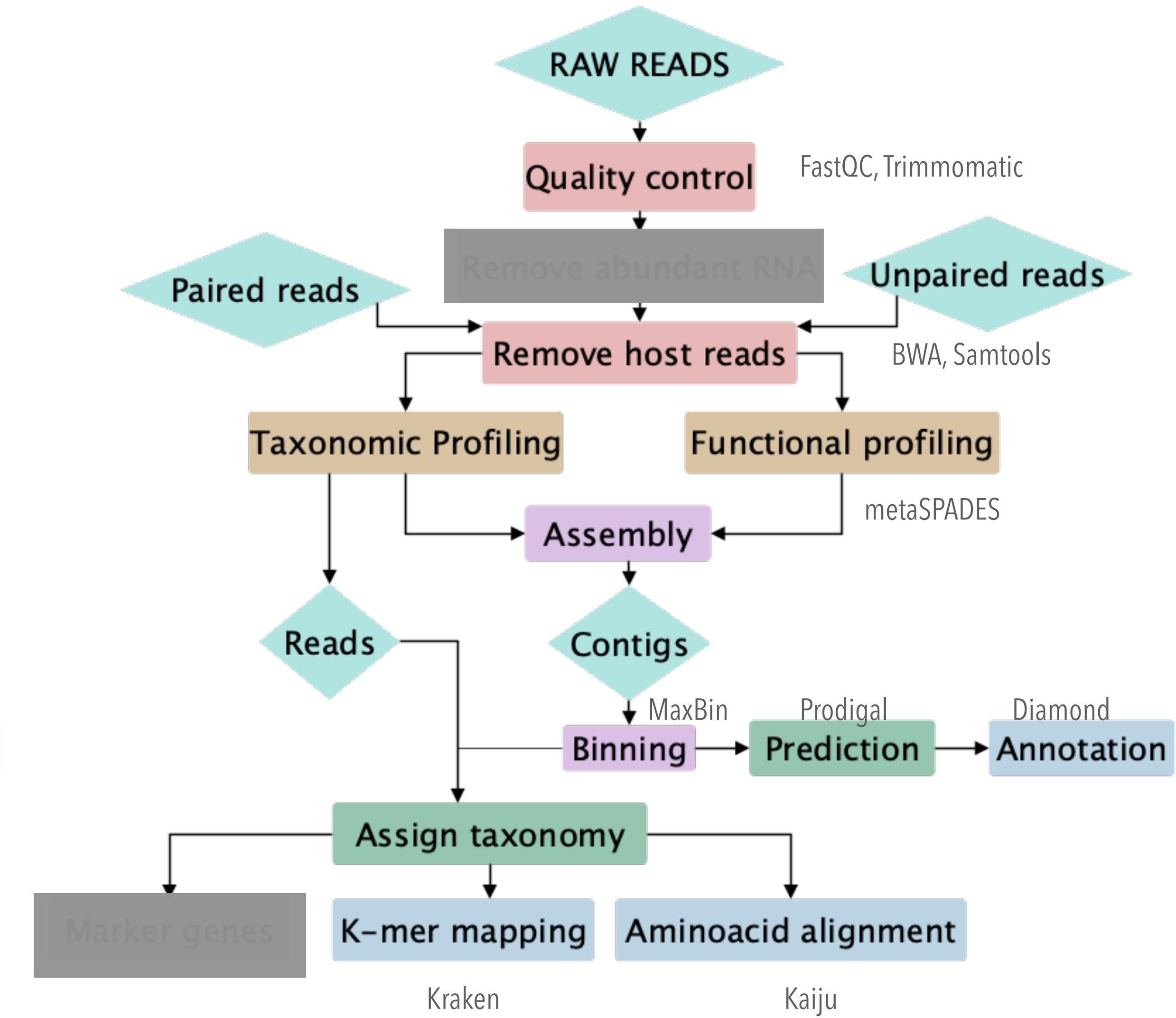
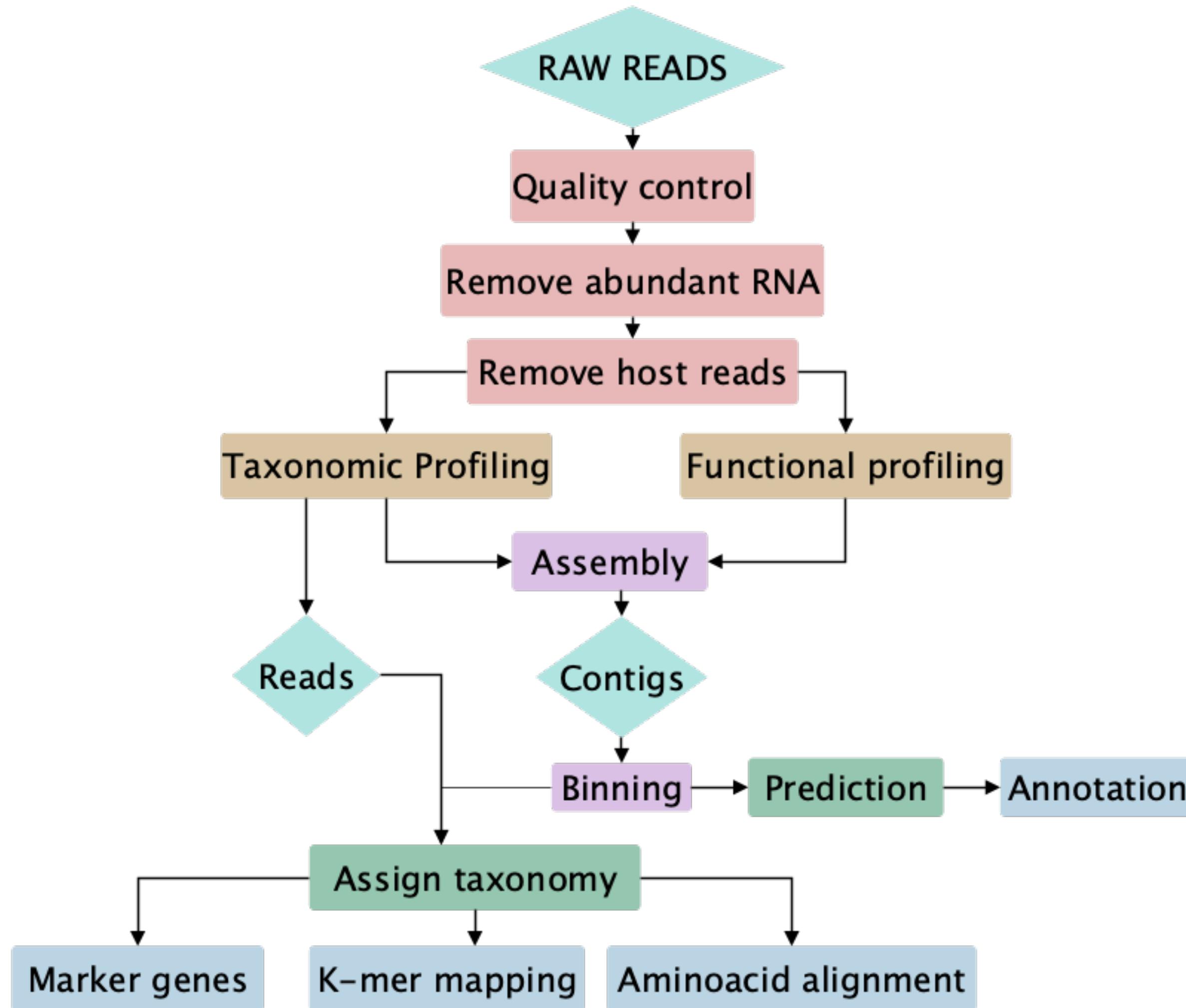
# Número de lecturas totales para cada individuo.

Sample	Total_reads	Mapped	Mapedd_percent	Properly_paired	Properly_paired_percent	Singlets	Singlets_percent
DC01_17	26324406	25203517	95.74%	23458364	89.93%	227709	0.87%
DC04_17	29032472	28076583	96.71%	25963362	90.32%	220349	0.77%
DC01_15	29917209	26626122	89.00%	24575346	82.81%	204199	0.69%
DC02_15	20519755	19680381	95.91%	18198494	89.39%	124258	0.61%
DC03_15	34920801	33514452	95.97%	30677044	88.59%	257139	0.74%
DC04_15	33932229	30796857	90.76%	28520838	84.73%	245596	0.73%
DC05_15	34662281	32472479	93.68%	30328610	88.12%	230530	0.67%
DS01_15	29755812	25145836	84.51%	23338336	79.07%	219234	0.74%
DS02_15	32034433	29891742	93.31%	27696704	87.09%	228013	0.72%
DS04_15	39785361	35702980	89.74%	32688214	82.84%	330867	0.84%
SC01_15	26628465	25110645	94.30%	23207744	87.79%	190570	0.72%
SC02_15	29394389	27421473	93.29%	25506062	87.47%	216864	0.74%
SC03_15	28885822	26935913	93.25%	25005412	87.24%	206331	0.72%
SC04_15	27148620	24890979	91.68%	23160294	85.90%	190051	0.70%
SC05_15	25402180	22810050	89.80%	21279266	84.36%	153044	0.61%
SS01_15	86373044	80384008	93.07%	74602376	87.09%	601512	0.70%
SS02_15	39848295	36957834	92.75%	34301814	86.78%	271419	0.69%
SS05_15	30581813	28117524	91.94%	26128276	86.06%	188559	0.62%

(Reyes-Galindo, 2019)

# Workflow general de Metatranscriptómica

# Modificaciones



# Análisis propuestos

## Perfil taxonómico (4)

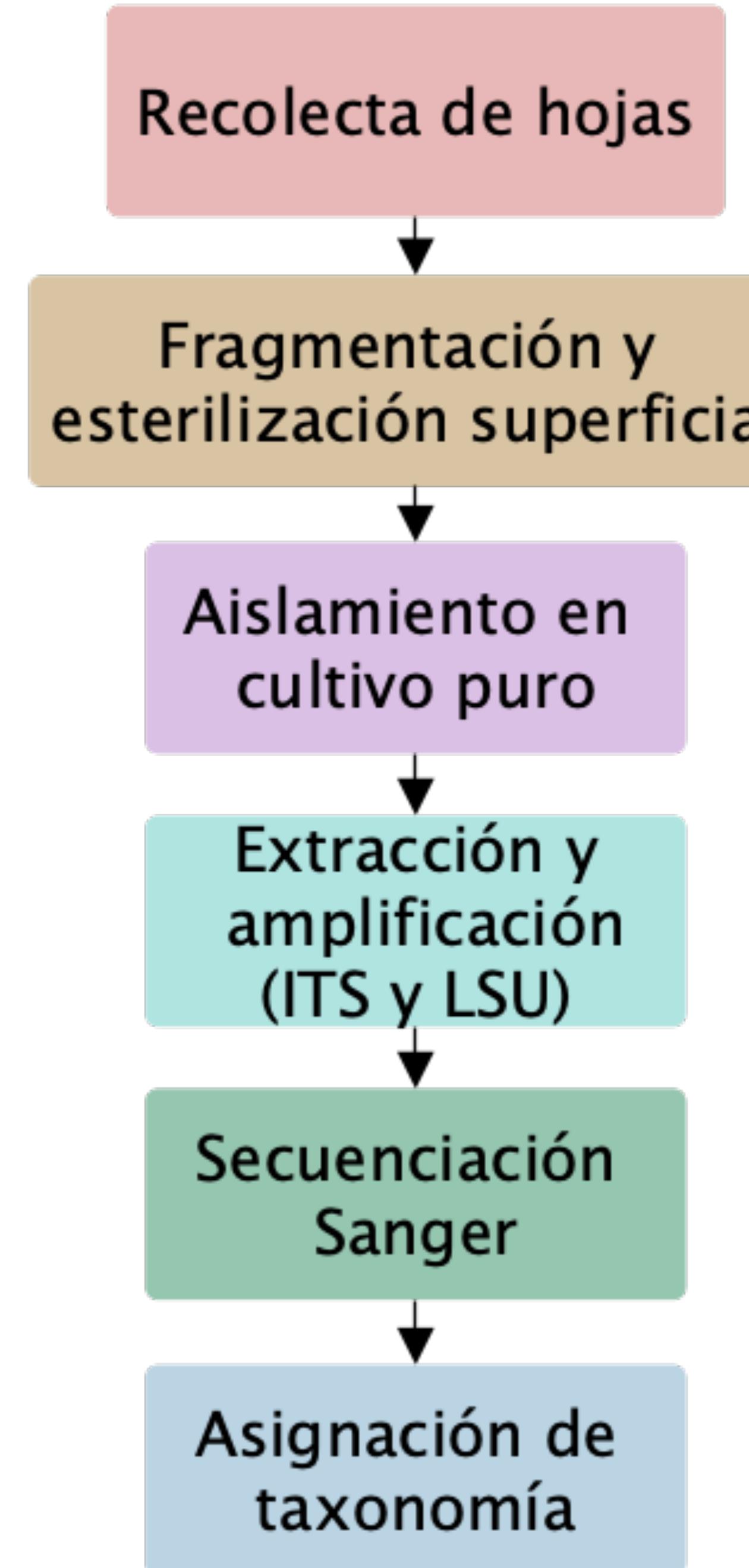
**Reads** { Kraken  
Kaiju

**Bins  
(contigs)** { Kraken  
Kaiju

## Perfil funcional (1)

**Bins  
(contigs)**

# Barcodeing



# Calendario propuesto

Actividad	Semestre 1	Semestre 2	Semestre 3	Semestre 4
Actividades académicas (clases, tutoriales, estancias, etc.)				
Trabajo de campo				
Aislamiento en cultivo puro				
Trabajo de laboratorio (Extracción de ADN, RNA y PCR)				
Análisis Bioinformáticos				
Escritura del manuscrito de tesis				

# Calendario modificado

Actividad	Semestre 1	Semestre 2	Semestre 3	Semestre 4
<b>Actividades académicas</b>				
<b>Metatranscriptómica</b>	<b>Mapeo de datos Definir softwares</b>	<b>Perfil taxonómico Perfil funcional</b>	<b>Análisis de diversidad taxonómica y funcional</b>	
<b>Trabajo de campo</b>				
<b>Aislamiento en cultivo puro</b>				
<b>Trabajo de laboratorio (Extracción de DNA y PCR)</b>				
<b>Análisis bioinformáticos Barcoding</b>				
<b>Escritura del manuscrito de tesis</b>				

# Hongos endófitos y su papel en la resistencia de *Abies religiosa* a la contaminación del aire

**Valeria Stephany Flores Almaraz**

**Tutores principales:**

- Dra. Camille Truong
- Dr. Rodolfo Salas Lizana

**Comité tutorial:**

- Dra. Alicia Mastretta Yanes
- Dr. Juan Pablo Jaramillo Correa



# **Estructura de la presentación**

**Introducción**

**Objetivos**

**Justificación**

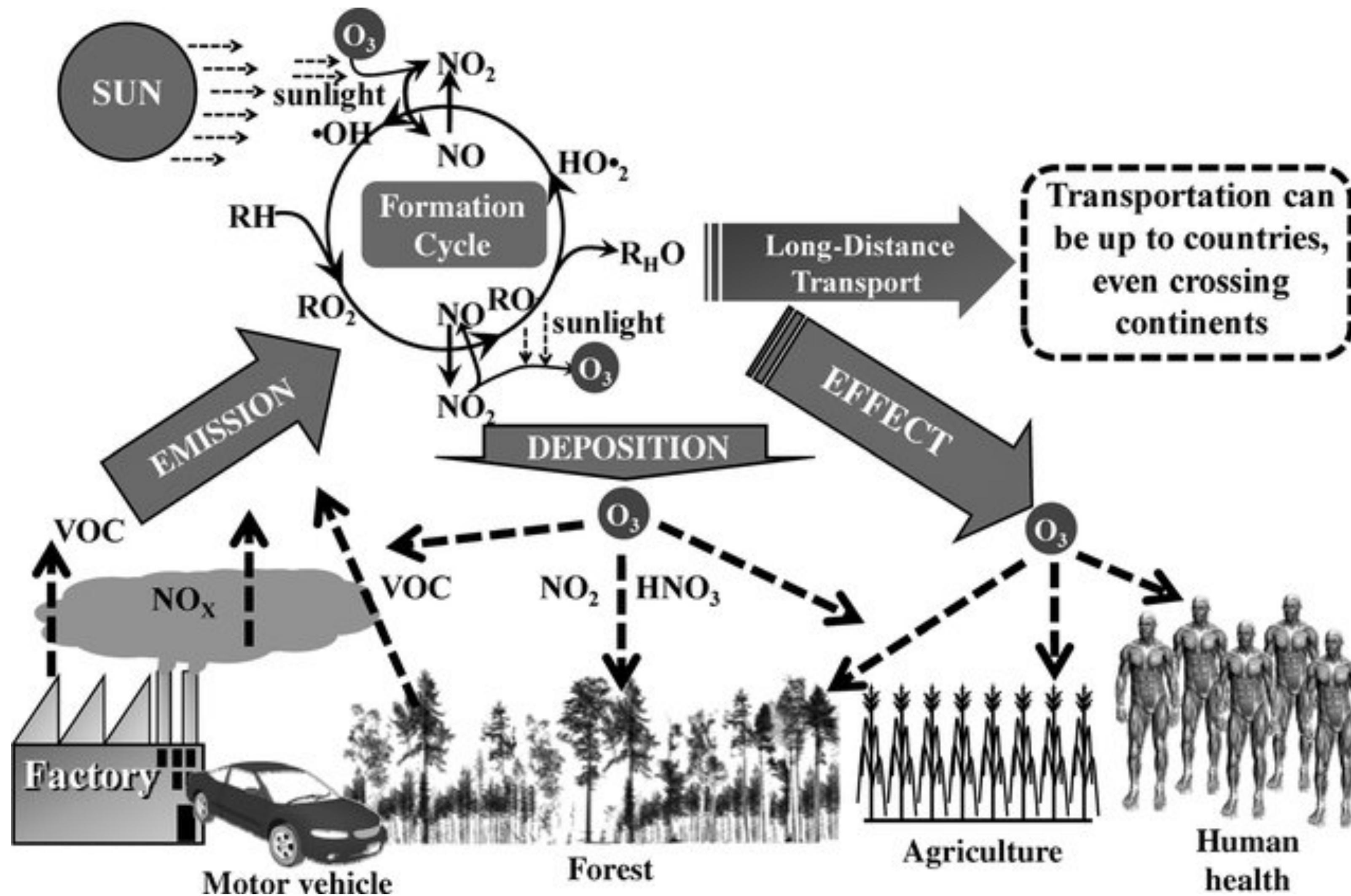
**Metodología**

**Metatranscriptómica**

**Barcoding**

**Calendario propuesto**

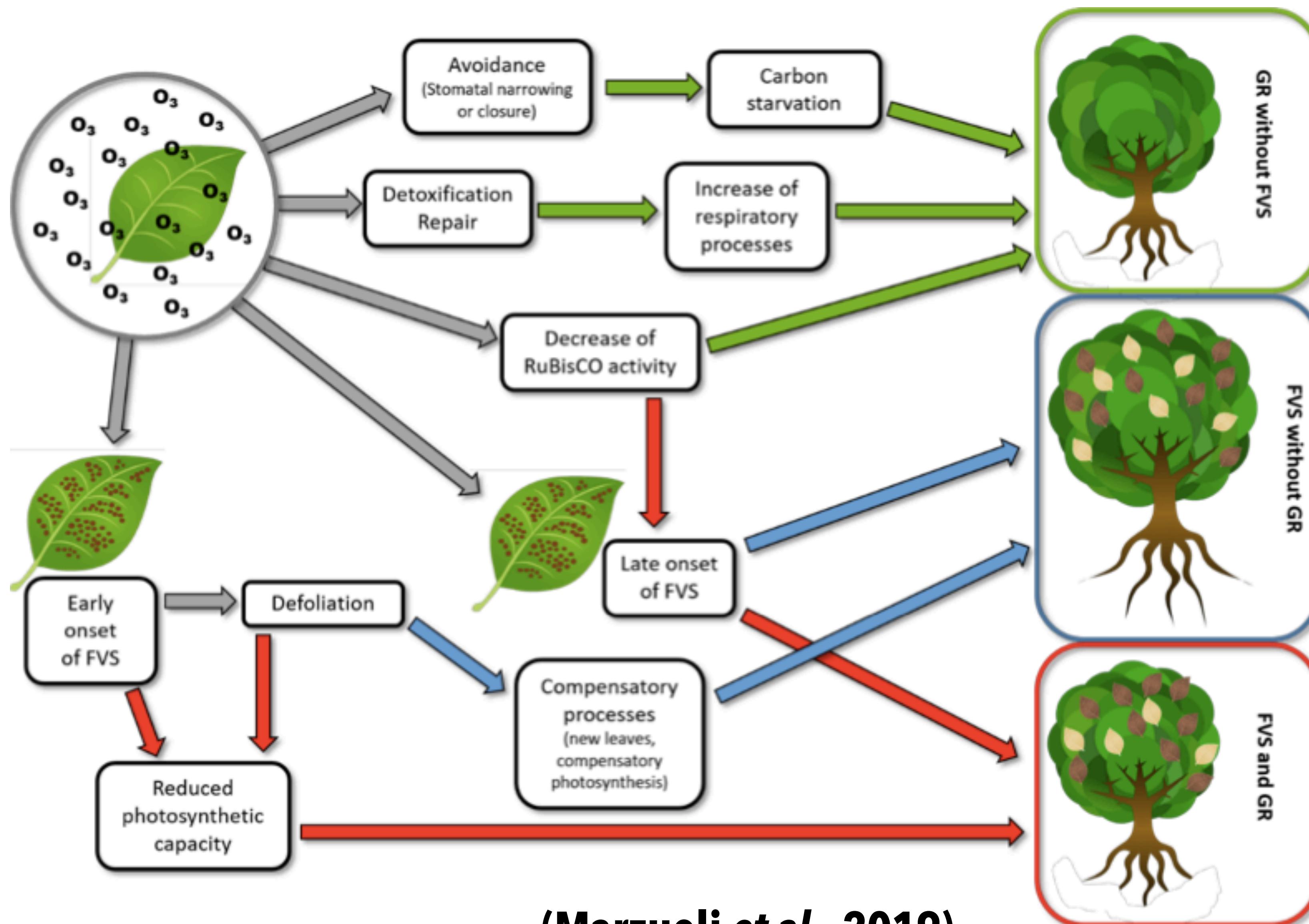
# Introducción



El O<sub>3</sub> es un contaminante del aire cuyas emisiones aumentaron drásticamente a partir de la Revolución Industrial.

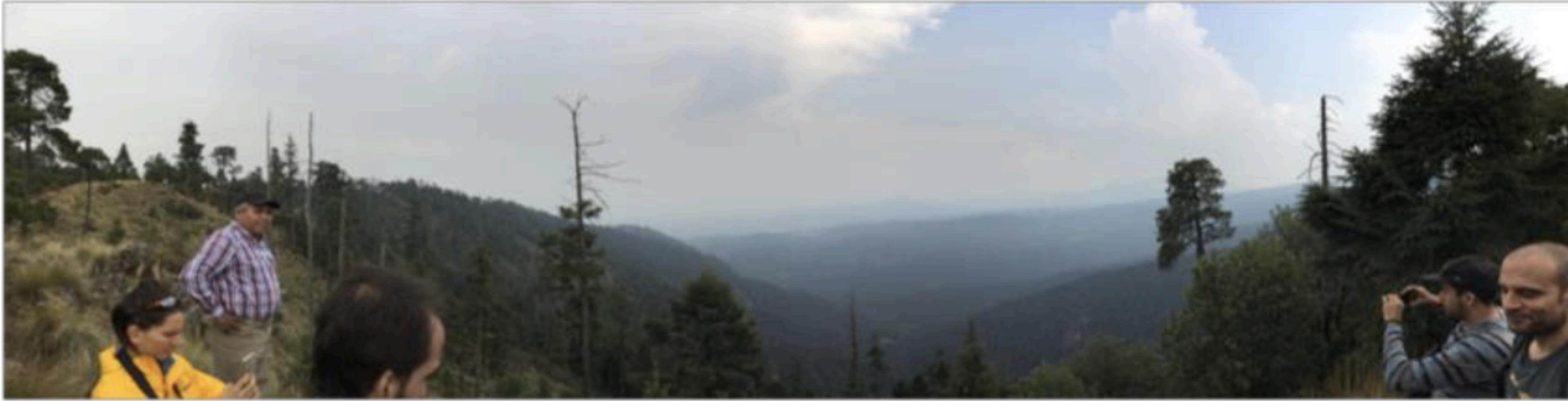
**(Cho et al., 2011;  
Saxena et al., 2019)**

# Efecto del O<sub>3</sub> en las plantas



(Marzuoli et al., 2019)

# Antecedentes



La alta concentración de  $O_3$  está causando el declive de las poblaciones de *A. religiosa* en los bosques periféricos de la Ciudad de México.

(Reyes-Galindo, 2019)

**En una zona expuesta a altas concentraciones de O<sub>3</sub> hay individuos de oyameles que muestran un menor nivel de daño**



**(Reyes-Galindo, 2019)**

Existe variación genética relacionada con la tolerancia al O<sub>3</sub>

# **Usando herramientas histológicas, metabolómicas, genéticas y transcriptómicas:**

- Daño estructural gradual.
- Acumulación diferencias del compuestos fenólicos.
- Los árboles estudiados tienen un origen local.
- Expresión diferencias de siete genes candidatos de las rutas metabólicas de carbohidratos y flavonoides.

**(Reyes-Galindo, 2019)**

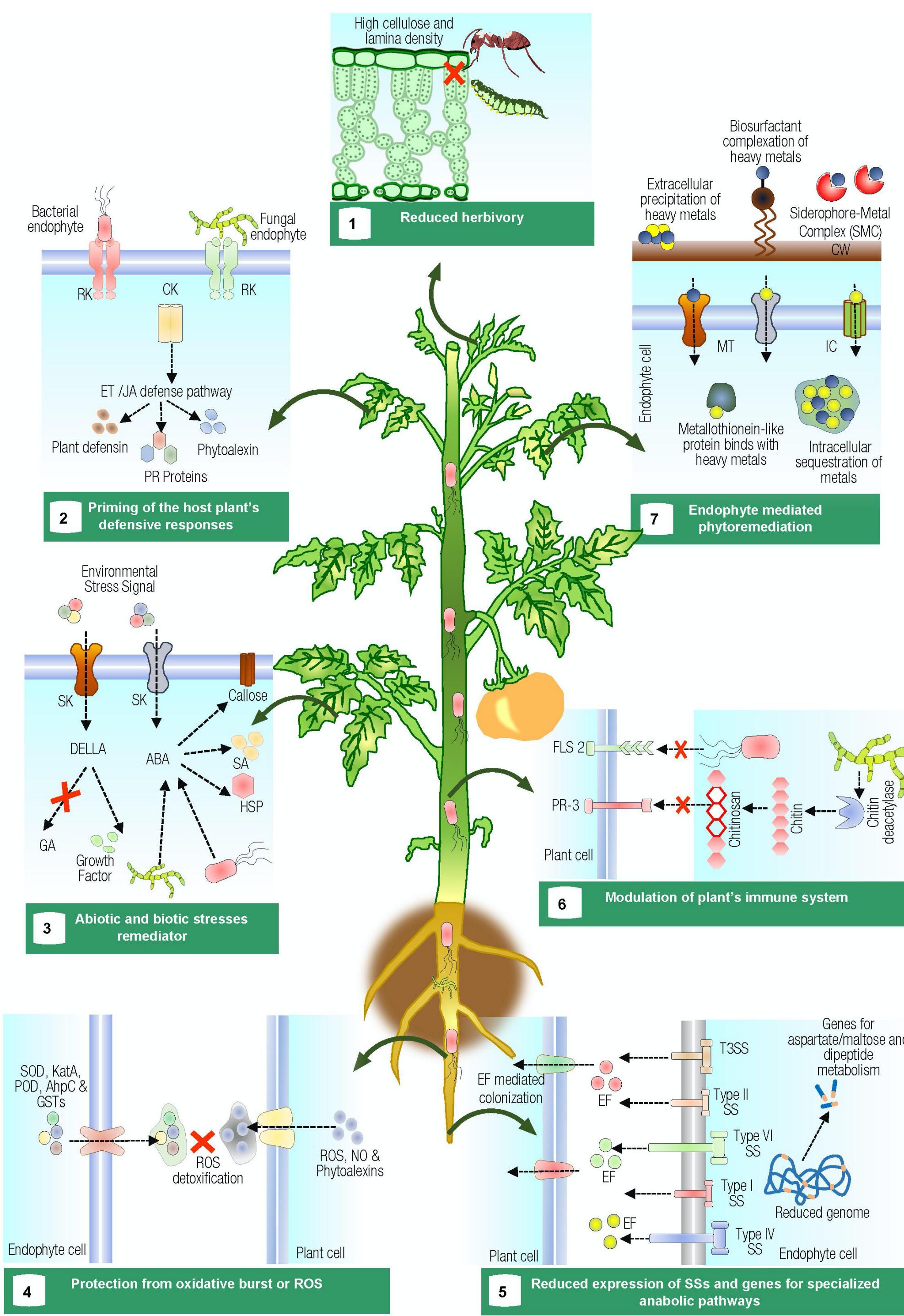
# Usando herramientas histológicas, metabolómicas, genéticas y transcriptómicas:

- Daño estructural gradual.
- Acumulación diferencias del compuestos **fenólicos**.
- Los árboles estudiados tienen un origen local.
- Expresión diferencias de siete genes candidatos de las rutas metabólicas de carbohidratos y **flavonoides**.

Los compuestos fenólicos y los flavonoides juegan un papel destacado en las actividades antioxidantes de múltiples hongos endófitos.

**(Pan et al., 2017)**

**(Reyes-Galindo, 2019)**



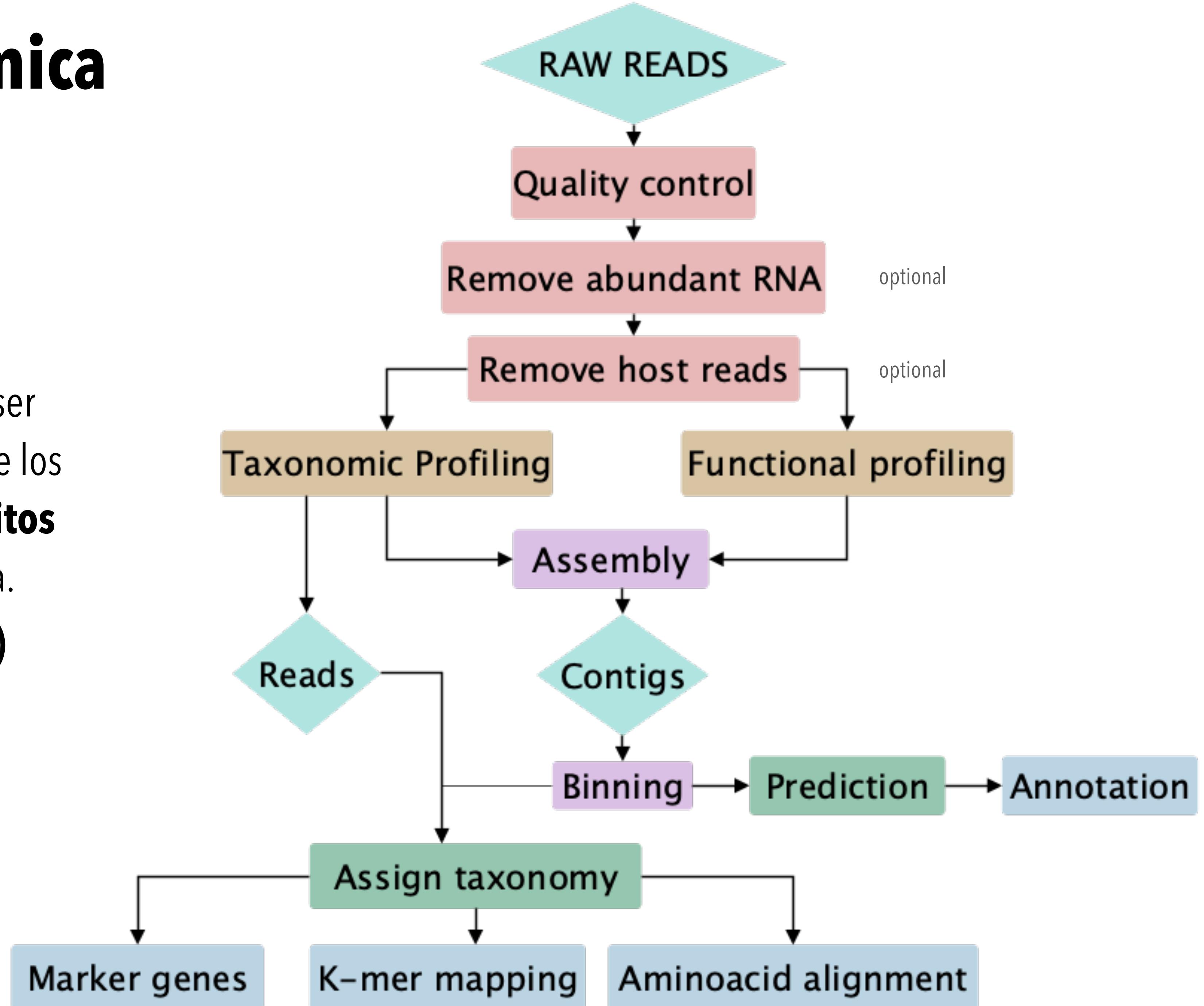
# Los hongos endófitos incrementan la adecuación de sus plantas hospederas mediante el fortalecimiento de su tolerancia a distintos estreses bióticos y abióticos.

(Khare et al. 2018)

**¿Qué pasa con los hongos endófitos en los cementerios de oyameles?**

# Metatranscriptómica

La metatranscriptómica puede ser utilizada para generar un perfil de los genes que están siendo **transcritos activamente** en una muestra.  
**(Breitwieser et al. 2017)**



# Justificación

- ▶ El  $O_3$  es un contaminante del aire que está causando el declive de las poblaciones de *A. religiosa* en las zonas periféricas de la Ciudad de México donde el drenaje atmosférico está ocasionando los llamados *Cementerios de oyamel*.
- ▶ En estos sitios se ha observado variación en el nivel de daño y estudios previos mostraron que entre los individuos dañados y tolerantes existe acumulación diferencial de compuestos fenólicos y expresión diferencial de genes relacionados con el metabolismos de flavonoides, los cuales tienen un papel destacado en las actividades antioxidantes de los hongos endófitos.
- ▶ Dados estos antecedentes, resulta importante saber qué hongos endófitos se encuentran dentro de las hojas de los oyameles en estos sitios, cómo están respondiendo ante el estrés ocasionado por  $O_3$  y si tienen un papel en la presencia de oyameles con fenotipos tolerantes.

# Objetivos

Caracterizar a nivel taxonómico y funcional las comunidades de hongos endófitos de hojas de individuos sanos y dañados de oyameles expuestos a altas concentraciones de O<sub>3</sub> e identificar funciones fúngicas claves en la resistencia de *Abies religiosa* a la contaminación del aire.

## Particulares

- Caracterizar la diversidad taxonómica y funcional, así como detectar la expresión diferencial de genes fúngicos de los endófitos de oyameles tolerantes y dañados mediante herramientas metatranscriptómicas.
- Detectar la presencia de genes fúngicos que estén potencialmente involucrados en la tolerancia de sus hospederos al estrés ocasionado por O<sub>3</sub>.
- Investigar la diversidad de hongos endófitos en la filósfera de individuos sanos y dañados de *A. religiosa* mediante aislamiento en cultivo puro, secuenciacion Sanger y metabarcoding.

# **Metodología**

**Metatranscriptómica**

**Barcoding**

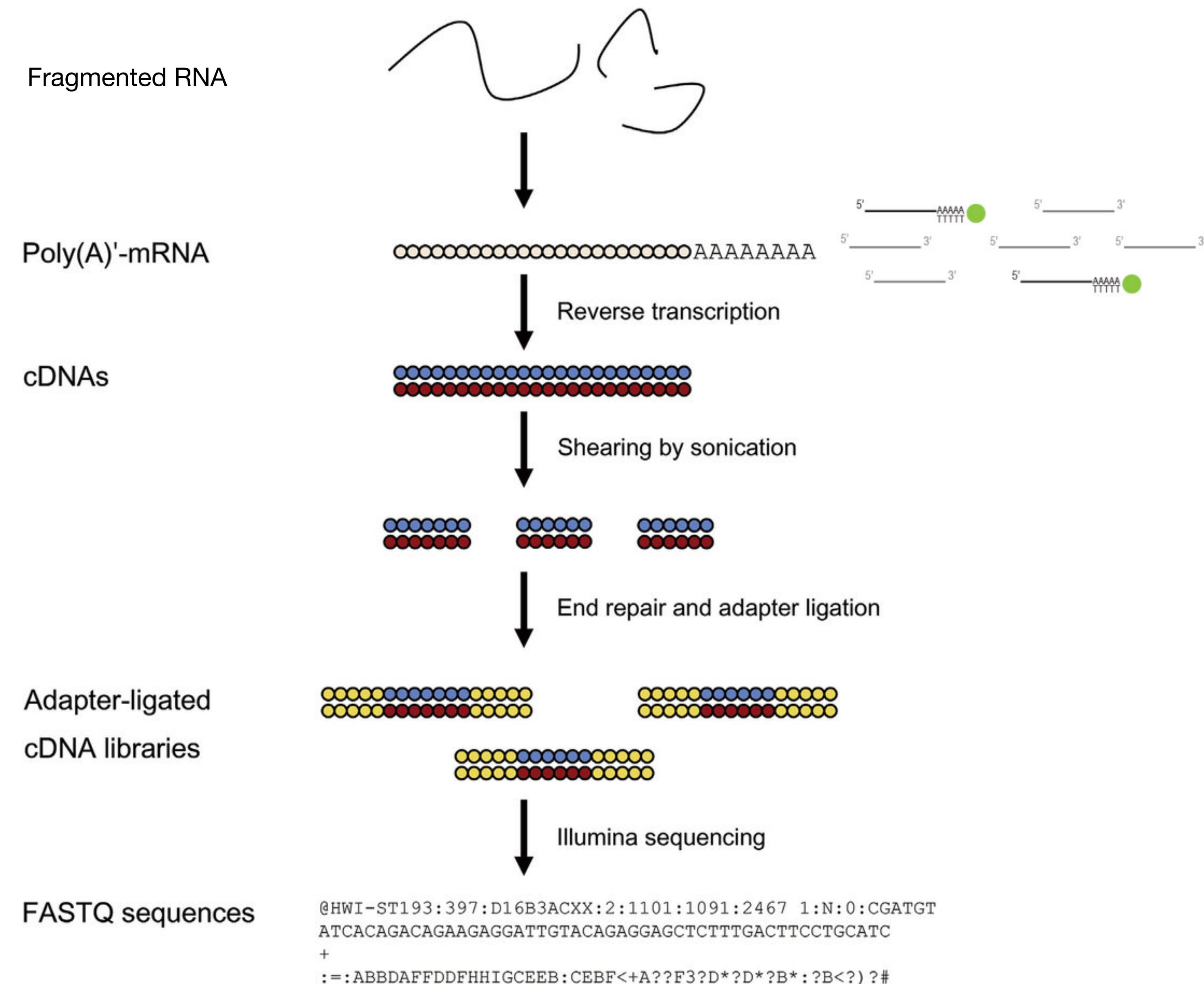
# Metatranscriptómica

## Datos

16 muestras { 8 tolerantes  
8 dañados

↓  
**Poliadenilación**

**Illumina HiSeq 4000**  
**2x150 pb**



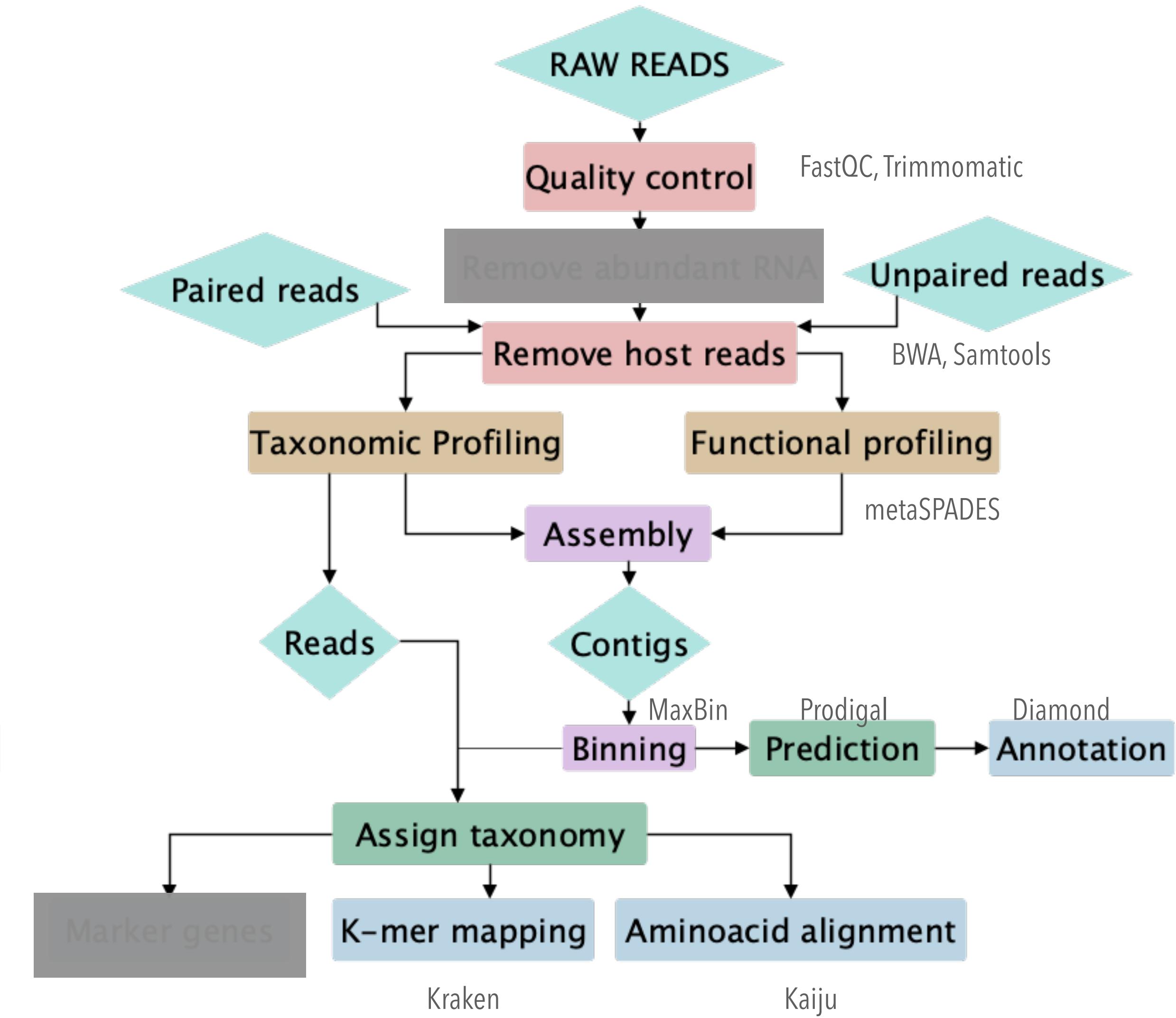
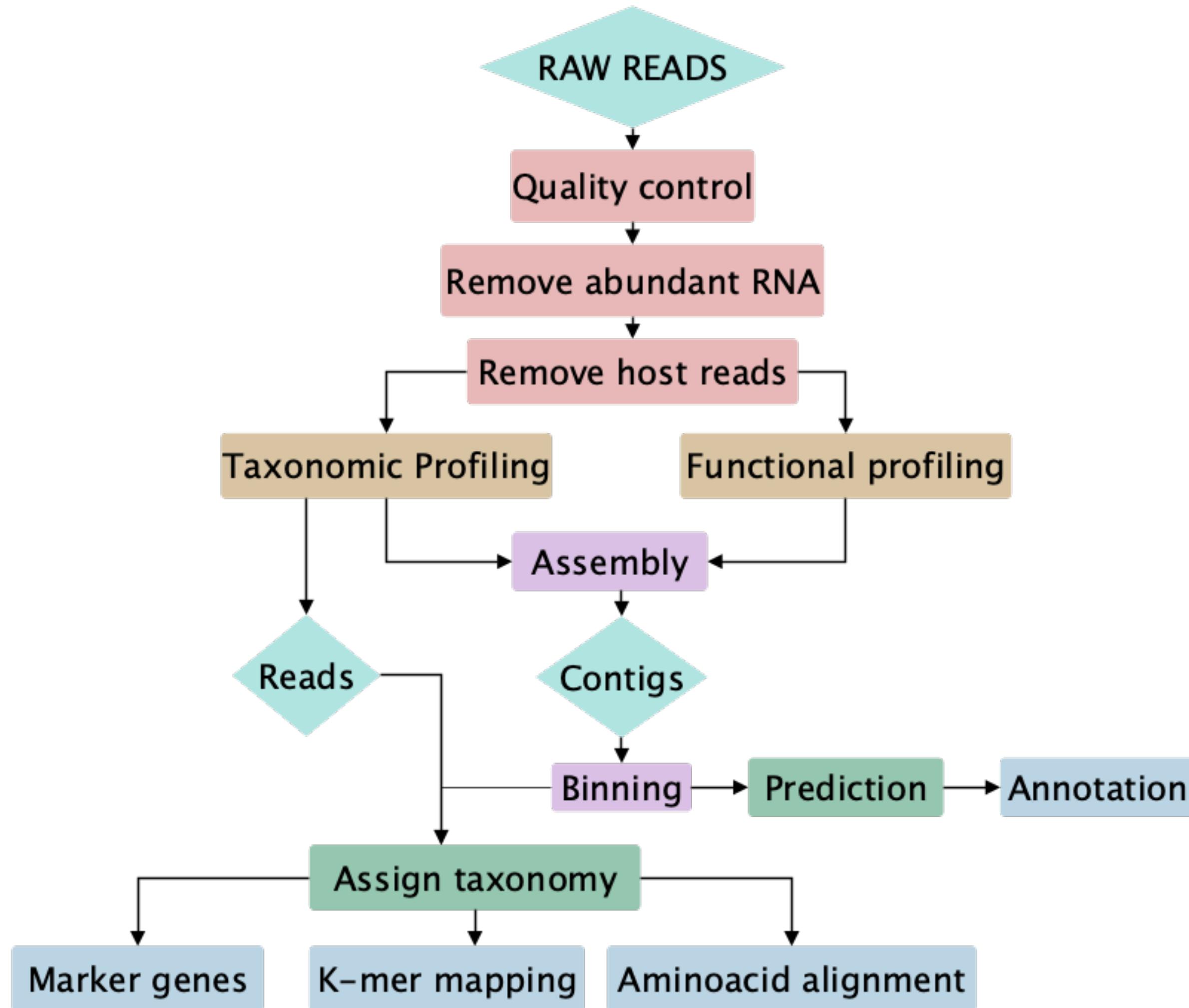
# Número de lecturas totales para cada individuo.

Sample	Total_reads	Mapped	Mapedd_percent	Properly_paired	Properly_paired_percent	Singlets	Singlets_percent
DC01_17	26324406	25203517	95.74%	23458364	89.93%	227709	0.87%
DC04_17	29032472	28076583	96.71%	25963362	90.32%	220349	0.77%
DC01_15	29917209	26626122	89.00%	24575346	82.81%	204199	0.69%
DC02_15	20519755	19680381	95.91%	18198494	89.39%	124258	0.61%
DC03_15	34920801	33514452	95.97%	30677044	88.59%	257139	0.74%
DC04_15	33932229	30796857	90.76%	28520838	84.73%	245596	0.73%
DC05_15	34662281	32472479	93.68%	30328610	88.12%	230530	0.67%
DS01_15	29755812	25145836	84.51%	23338336	79.07%	219234	0.74%
DS02_15	32034433	29891742	93.31%	27696704	87.09%	228013	0.72%
DS04_15	39785361	35702980	89.74%	32688214	82.84%	330867	0.84%
SC01_15	26628465	25110645	94.30%	23207744	87.79%	190570	0.72%
SC02_15	29394389	27421473	93.29%	25506062	87.47%	216864	0.74%
SC03_15	28885822	26935913	93.25%	25005412	87.24%	206331	0.72%
SC04_15	27148620	24890979	91.68%	23160294	85.90%	190051	0.70%
SC05_15	25402180	22810050	89.80%	21279266	84.36%	153044	0.61%
SS01_15	86373044	80384008	93.07%	74602376	87.09%	601512	0.70%
SS02_15	39848295	36957834	92.75%	34301814	86.78%	271419	0.69%
SS05_15	30581813	28117524	91.94%	26128276	86.06%	188559	0.62%

(Reyes-Galindo, 2019)

# Workflow general de Metatranscriptómica

# Modificaciones



# Análisis propuestos

## Perfil taxonómico (4)

Reads { Kraken  
Kaiju }

Bins  
(contigs) { Kraken  
Kaiju }

## Perfil funcional (1)

Bins  
(contigs)

master		2 branches	0 tags	Go to file	Add file	Code
	valeriafloral	update host remove script	817903c 2 minutes ago	176 commits		
	archive	updatemetatrans workflow and move it to archive ...	17 days ago			
	bin	update host remove script	2 minutes ago			
	data	update readme and organize folders and subfolders	2 hours ago			
	parkinsonlabtutorial	remove indexing because it was added to the scri...	13 days ago			
	.gitignore	update transcriptomic worflow	12 days ago			
	README.md	updateindex in removehost script	1 hour ago			
	workflow.png	modify workflow	1 hour ago			

README.md

**Role of endophytic fungi in the resistance of sacred fir (*Abies religiosa*) to air pollution**

### REPOSITORY UNDER CONSTRUCTION

Air pollution by tropospheric ozone ( $O_3$ ) is causing the strong decline of sacred fir (*Abies religiosa*) in peripheral areas of Mexico City. However, within high contaminated zones, variation in the level of damage to air pollution was detected among fir individuals. These results suggest that there is genetic variability related to tolerance to ( $O_3$ ). Due to their effects on plant resistance to abiotic stresses, it is very likely that endophytic fungi present inside fir leaves are involved in resistance to air pollution.

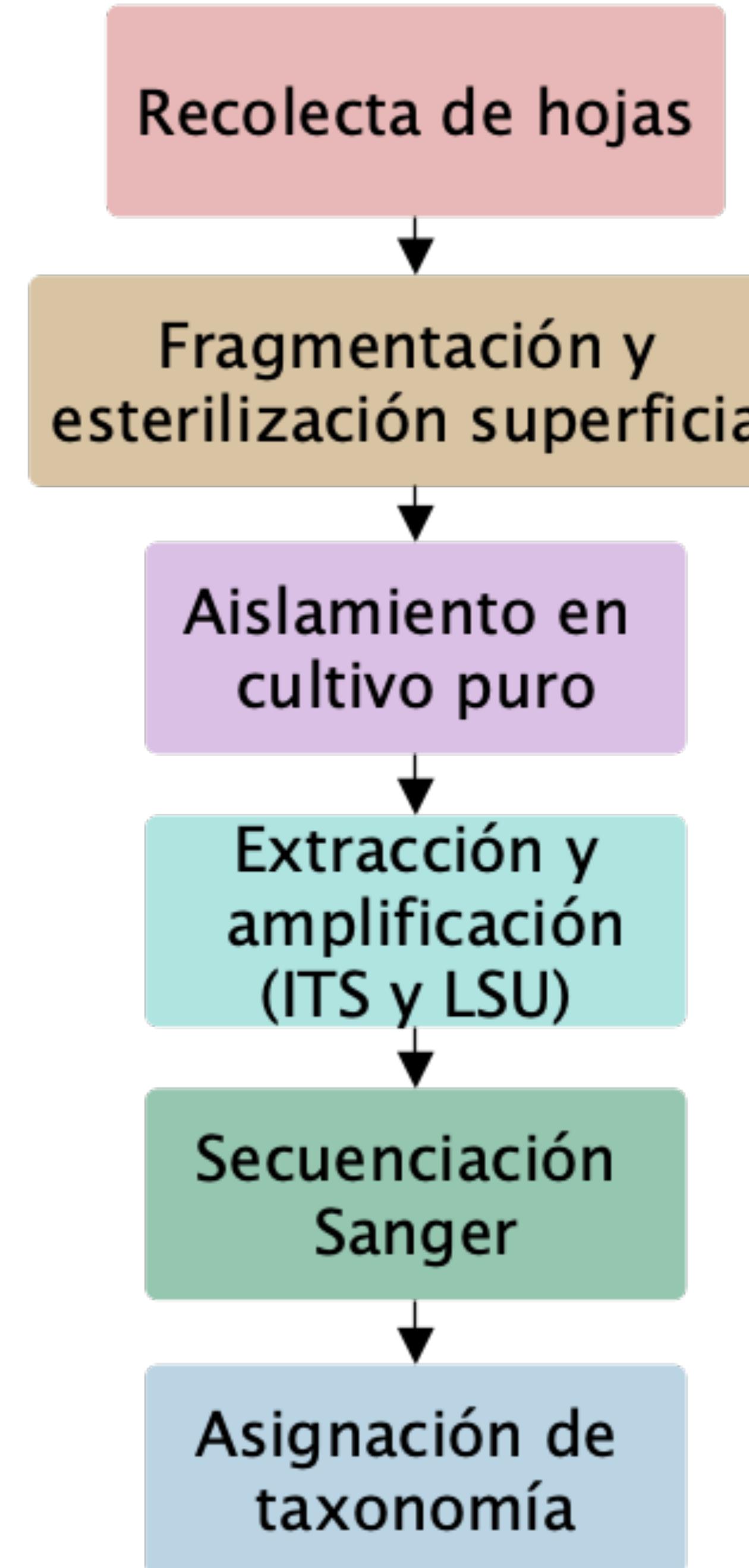
In this repository, you will find the workflow of a metatranscriptomics analysis from *Abies religiosa* individuals exposed to high ( $O_3$ ) concentrations and showed 2 different phenotypes (tolerant and damaged).

### Aims

1. To characterize the diversity of fungal endophytes inside the leaves of tolerant and damaged fir individuals.
2. To detect differential expression of fungal genes from tolerant and damaged fir individuals.
3. To identify fungal genes putative involved in the resistance of air pollution caused by ( $O_3$ ).

[https://github.com/valeriafloral/Abies\\_fungal\\_endophytes](https://github.com/valeriafloral/Abies_fungal_endophytes)

# Barcodeing



# Calendario propuesto

Actividad	Semestre 1	Semestre 2	Semestre 3	Semestre 4
Actividades académicas (clases, tutoriales, estancias, etc.)				
Trabajo de campo				
Aislamiento en cultivo puro				
Trabajo de laboratorio (Extracción de ADN, RNA y PCR)				
Análisis Bioinformáticos				
Escritura del manuscrito de tesis				

# Calendario modificado

Actividad	Semestre 1	Semestre 2	Semestre 3	Semestre 4
<b>Actividades académicas</b>				
<b>Metatranscriptómica</b>	<b>Mapeo de datos Definir softwares</b>	<b>Perfil taxonómico Perfil funcional</b>	<b>Análisis de diversidad taxonómica y funcional</b>	
<b>Trabajo de campo</b>				
<b>Aislamiento en cultivo puro</b>				
<b>Trabajo de laboratorio (Extracción de DNA y PCR)</b>				
<b>Análisis bioinformáticos Barcoding</b>				
<b>Escritura del manuscrito de tesis</b>				