

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

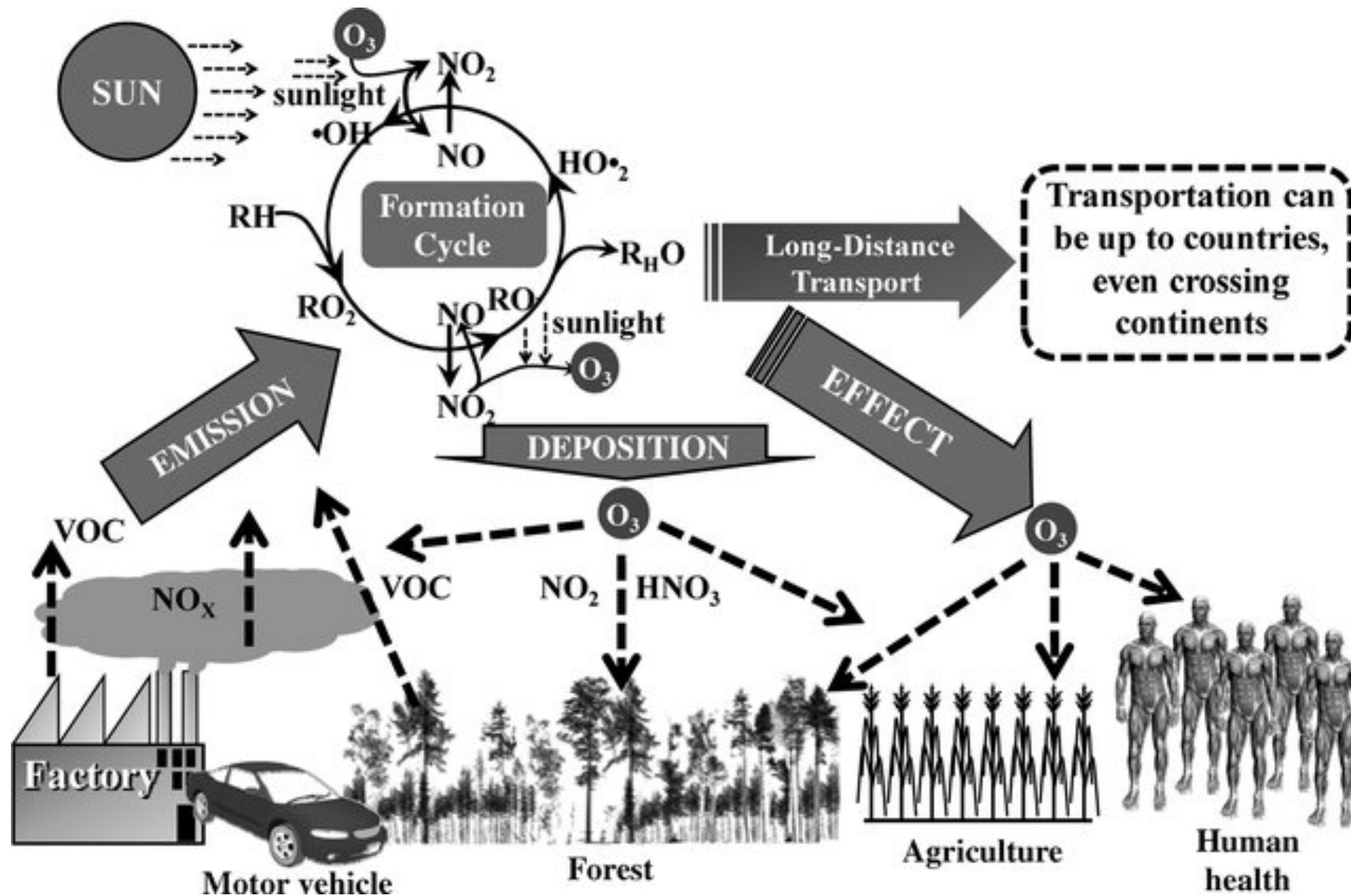
- Introducción
- Justificación
- Objetivos
- Metodología

Metatranscriptómica

Códigos de barras

- Calendario propuesto

Introducción

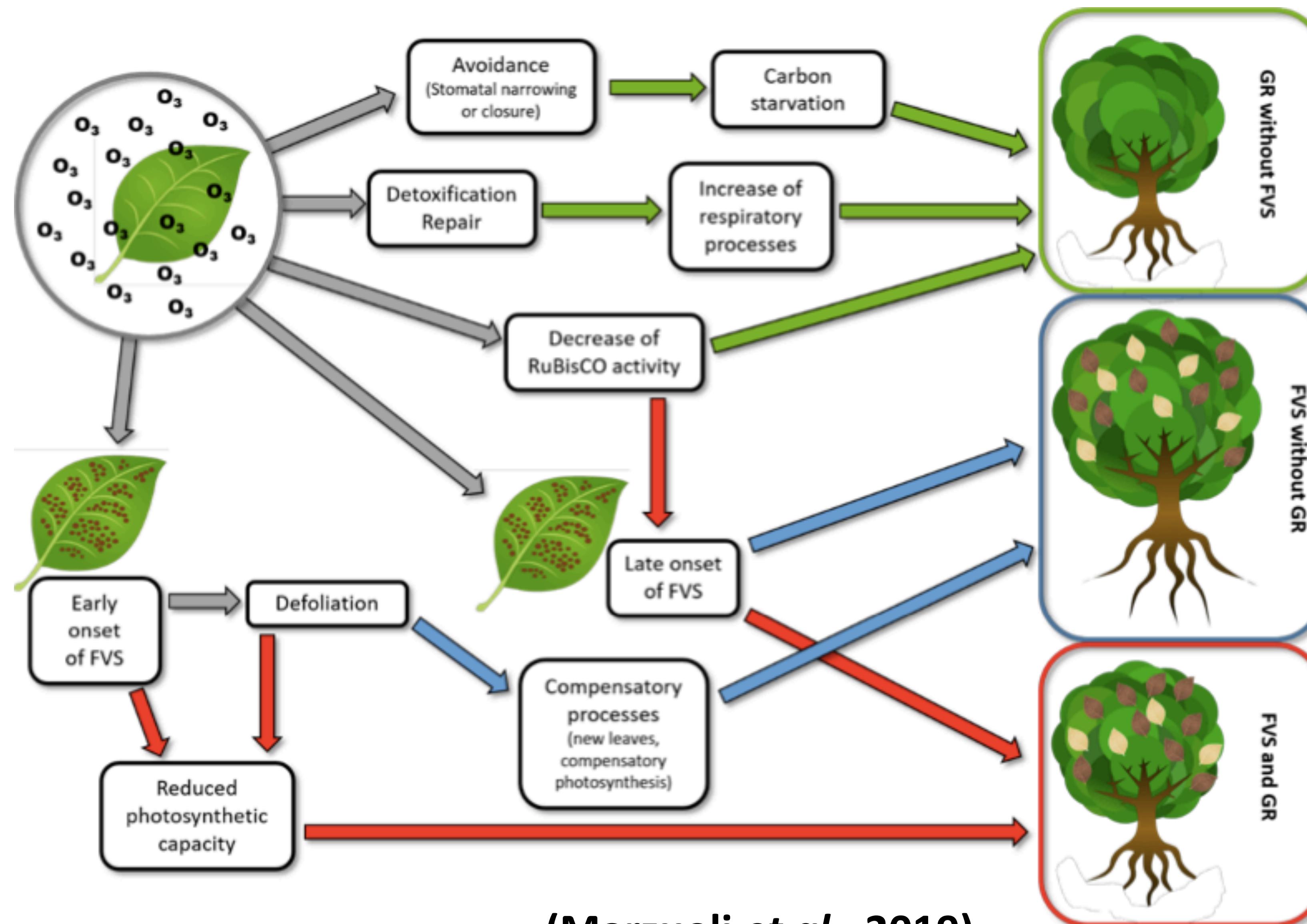


El ozono troposférico (O_3) es un contaminante del aire cuyas emisiones aumentaron drásticamente a partir de la Revolución Industrial.

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

(Rai *et al.* , 2012)

Efecto del O₃ en las plantas



(Marzuoli *et al.*, 2019)

Cementerios de oyamel



(Reyes-Galindo, 2019)

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.

En una zona expuesta a altas concentraciones de O₃ hay individuos de oyameles que muestran un menor nivel de daño



(Reyes-Galindo, 2019)

Existe variación genética relacionada con la tolerancia al O₃

Usando herramientas histológicas, metabolómicas, genéticas y transcriptómicas:

- Daño estructural gradual.
- Acumulación diferencial de compuestos fenólicos.
- Los árboles estudiados tienen un origen local.
- Expresión diferencial 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 diferencial de compuestos **fenólicos**.
- Los árboles estudiados tienen un origen local.
- Expresión diferencial 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.

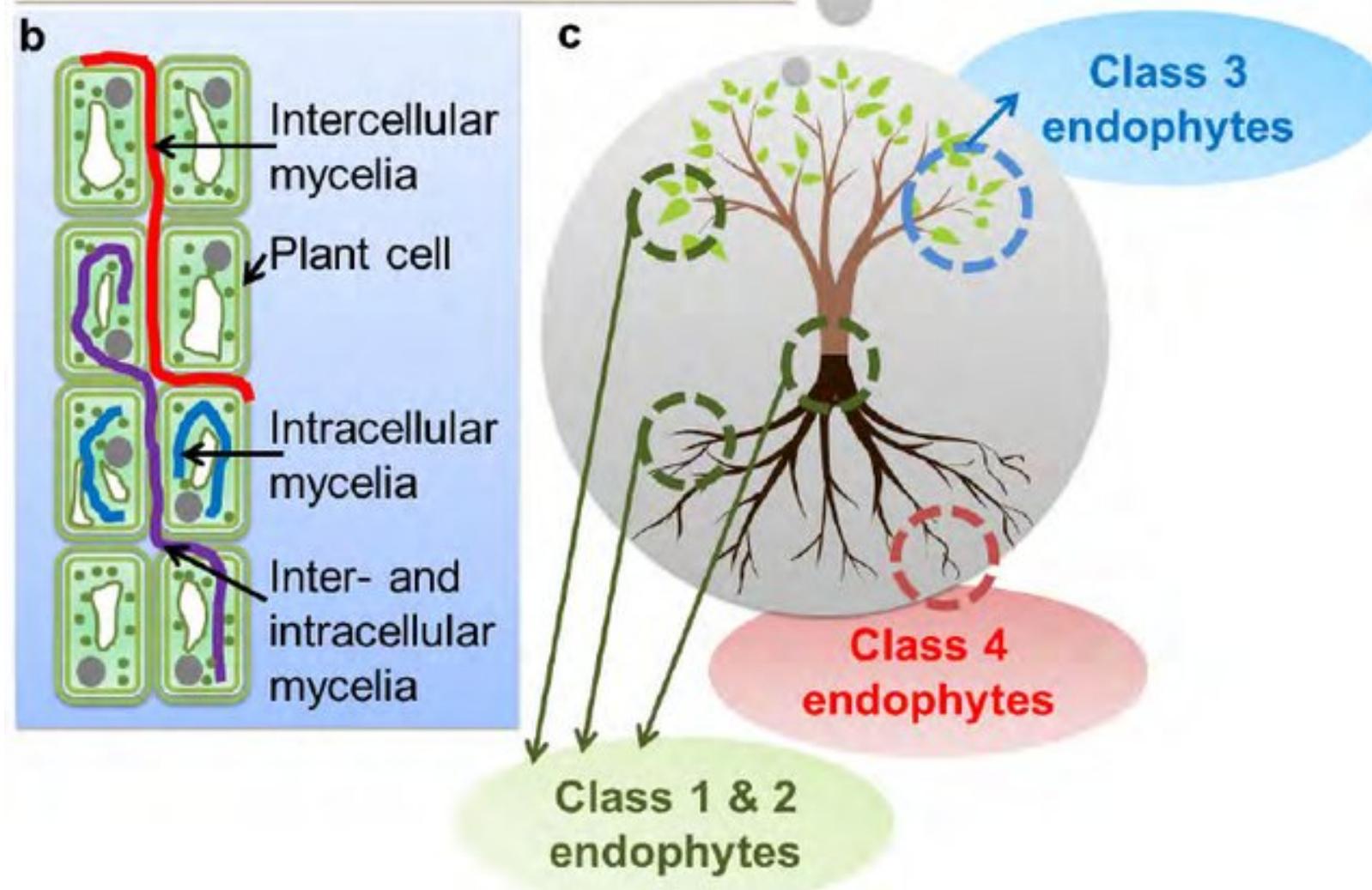
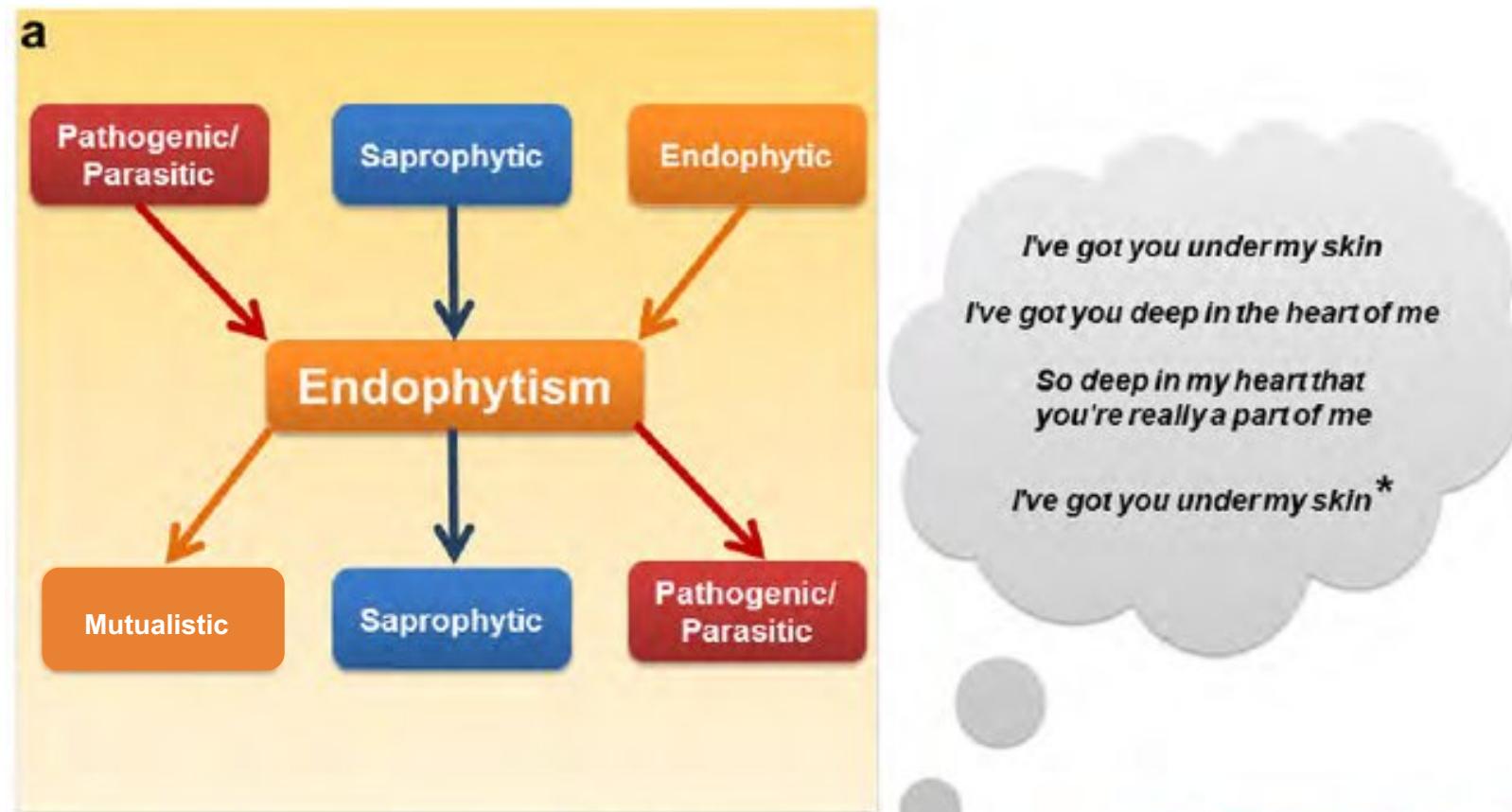
(Pan *et al.*, 2017)

(Reyes-Galindo, 2019)

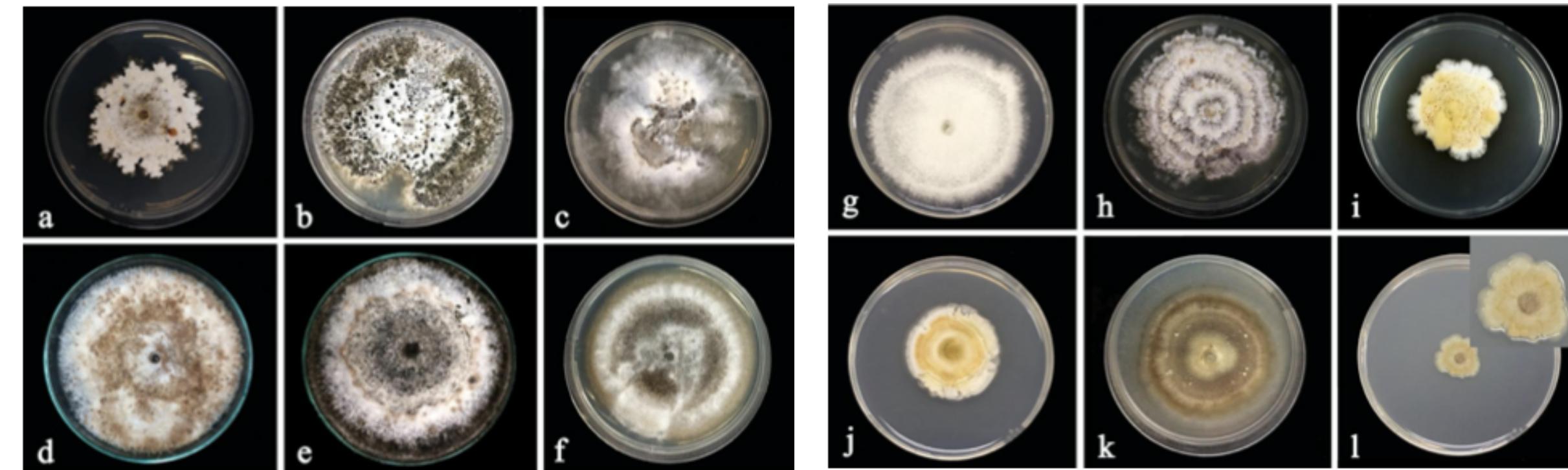
Hongos endófitos

Hongos que viven dentro de las plantas sin ocasionarles síntomas visibles de colonización.

(Schulz y Boyle, 2005)



(Kusari y Spiteller, 2012)



(Doilom et al., 2017)

Table 1 Symbiotic criteria used to characterize fungal endophytic classes

Criteria	Clavicipitaceous	Nonclavicipitaceous		
	Class 1	Class 2	Class 3	Class 4
Host range	Narrow	Broad	Broad	Broad
Tissue(s) colonized	Shoot and rhizome	Shoot, root and rhizome	Shoot	Root
<i>In planta</i> colonization	Extensive	Extensive	Limited	Extensive
<i>In planta</i> biodiversity	Low	Low	High	Unknown
Transmission	Vertical and horizontal	Vertical and horizontal	Horizontal	Horizontal
Fitness benefits*	NHA	NHA and HA	NHA	NHA

*Nonhabitat-adapted (NHA) benefits such as drought tolerance and growth enhancement are common among endophytes regardless of the habitat of origin. Habitat-adapted (HA) benefits result from habitat-specific selective pressures such as pH, temperature and salinity.

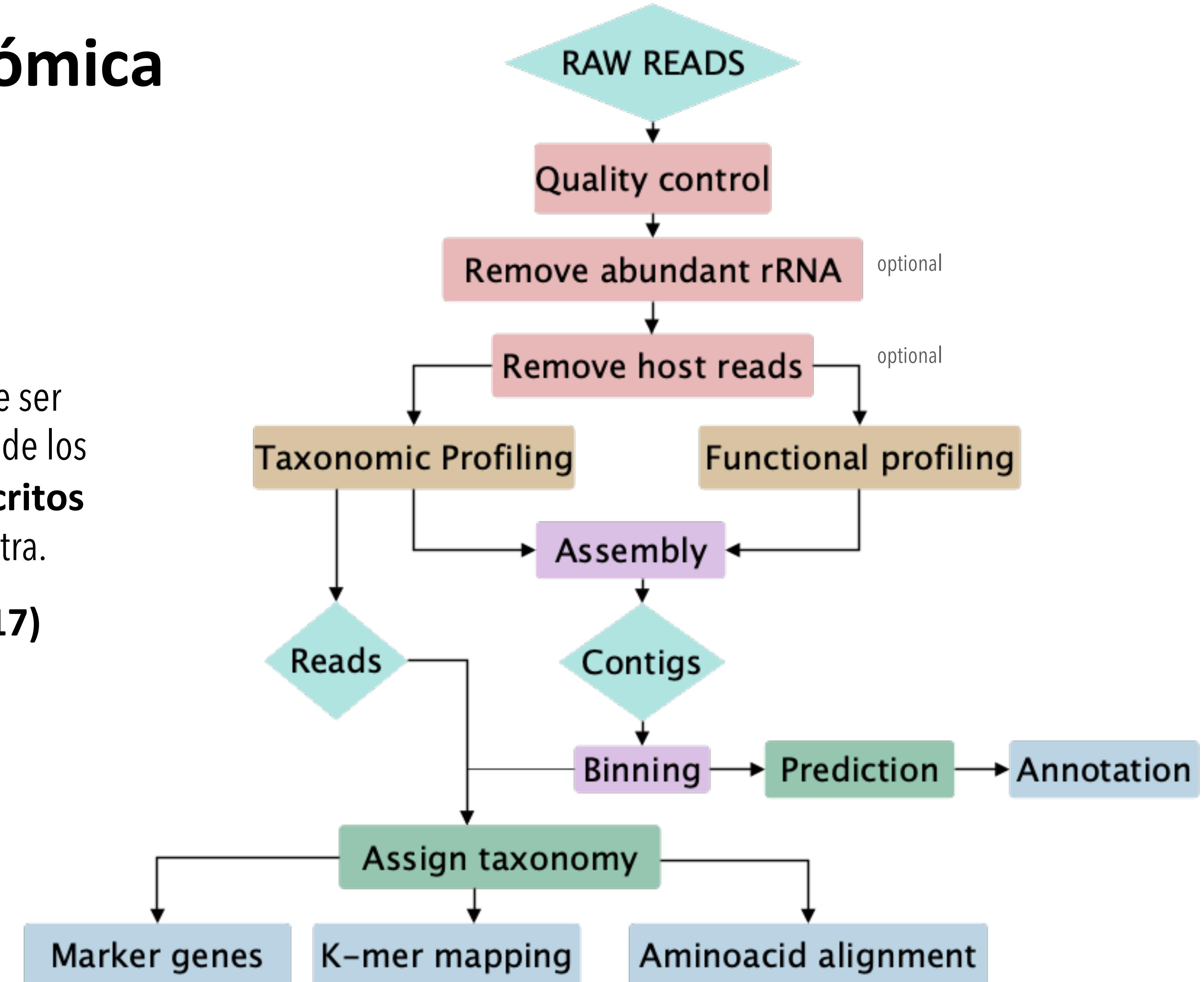
(Rodríguez et al., 2009)

¿Qué pasa con los hongos endófitos en los cementerios de oyamel?

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 O₃ es un contaminante del aire que está causando el declive de las poblaciones de *A. religiosa* en los bosques periféricos de la Ciudad de México. En estos sitios existe variación en el nivel de daño entre individuos.
- ▶ En un estudio previo se detectó la acumulación diferencial de compuestos fenólicos y la expresión diferencial de genes relacionados con el metabolismos de flavonoides
- ▶ Dados estos antecedentes, resulta importante conocer **qué hongos endófitos se encuentran** en las hojas de los oyameles, así como saber **de qué manera están respondiendo** ante el estrés ocasionado por O₃ y **si tienen un papel importante 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 O₃ 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.
- Investigar la diversidad de hongos endófitos en la filósfera de individuos tolerantes y dañados de *A. religiosa* mediante aislamiento en cultivo puro y secuenciacion Sanger de genes marcadores (códigos de barras).

Metodología

Metatranscriptómica

**Códigos
de barras**

Metatranscriptómica

Datos

16 muestras {
8 tolerantes
8 dañados

↓
Poliadenilación

Illumina HiSeq 4000
2x150 pb

Reyes-Galindo, 2019

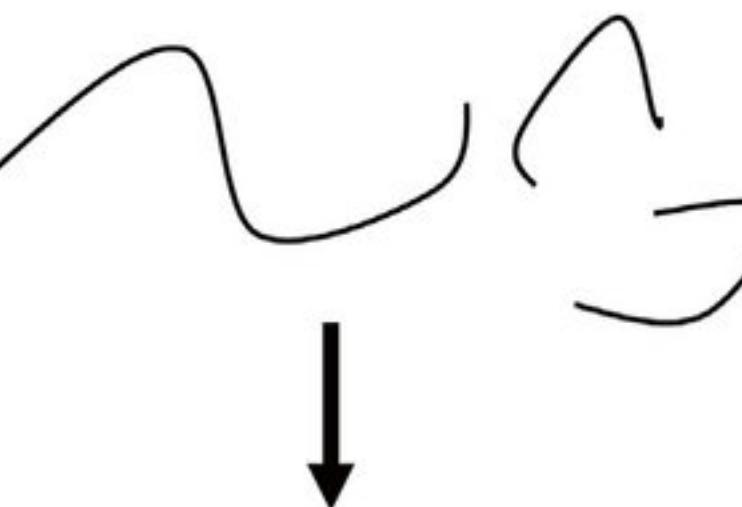
Fragmented RNA

Poly(A)⁺-mRNA

cDNAs

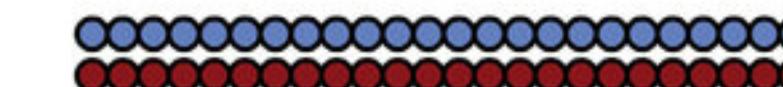
Adapter-ligated
cDNA libraries

FASTQ sequences



AAAAAAAAA

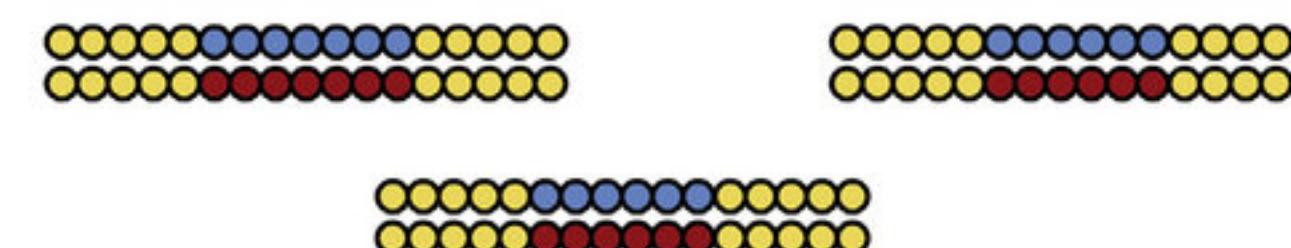
Reverse transcription



Shearing by sonication



End repair and adapter ligation



Illumina sequencing

```
@HWI-ST193:397:D16B3ACXX:2:1101:1091:2467 1:N:0:CGATGT
ATCACAGACAGAACAGAGGATTGTACAGAGGAGCTTTGACTTCCTGCATC
+
:=:ABDAFFDDFHIGCEEB:CEBF<+A??F3?D*D*B*:?B<?) ?#
```

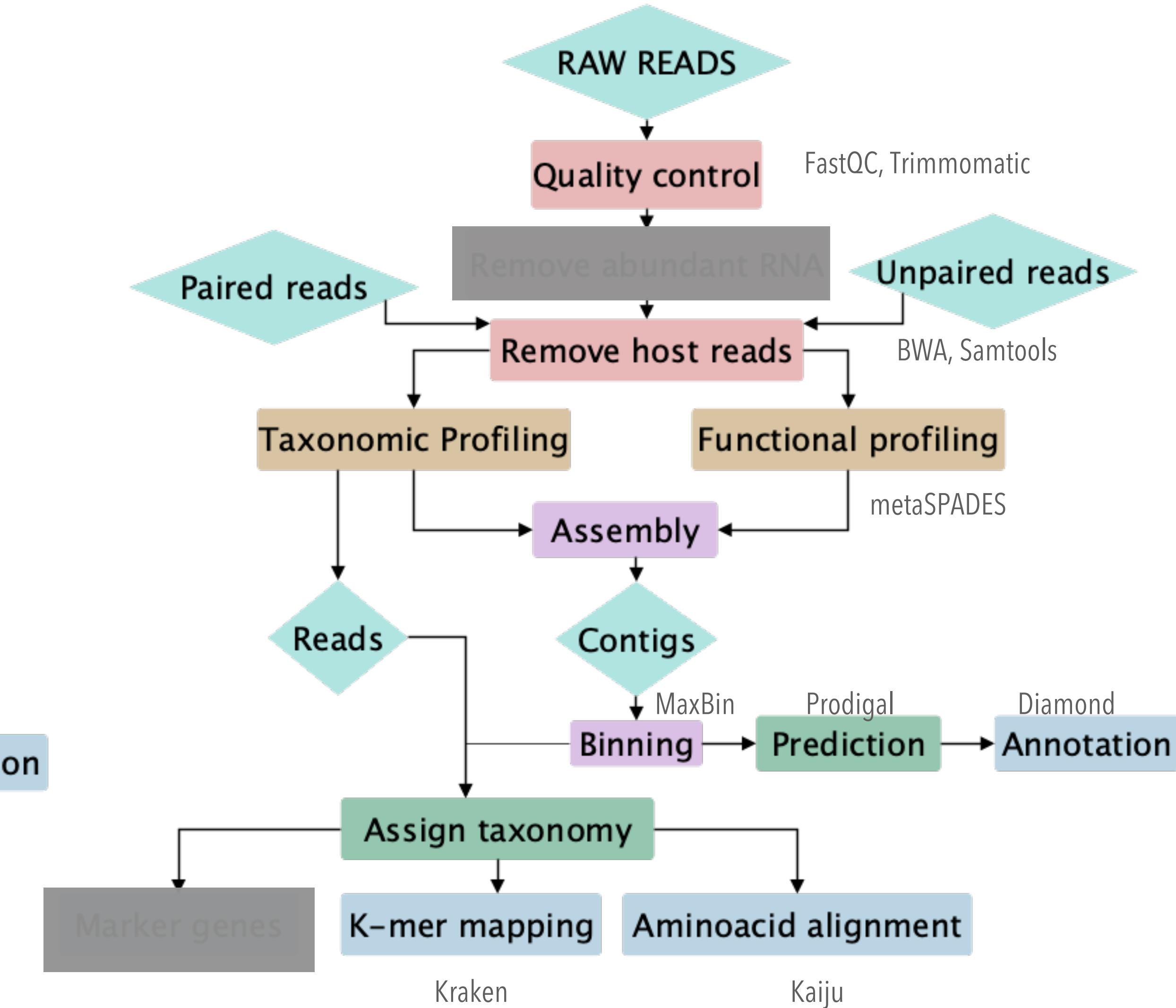
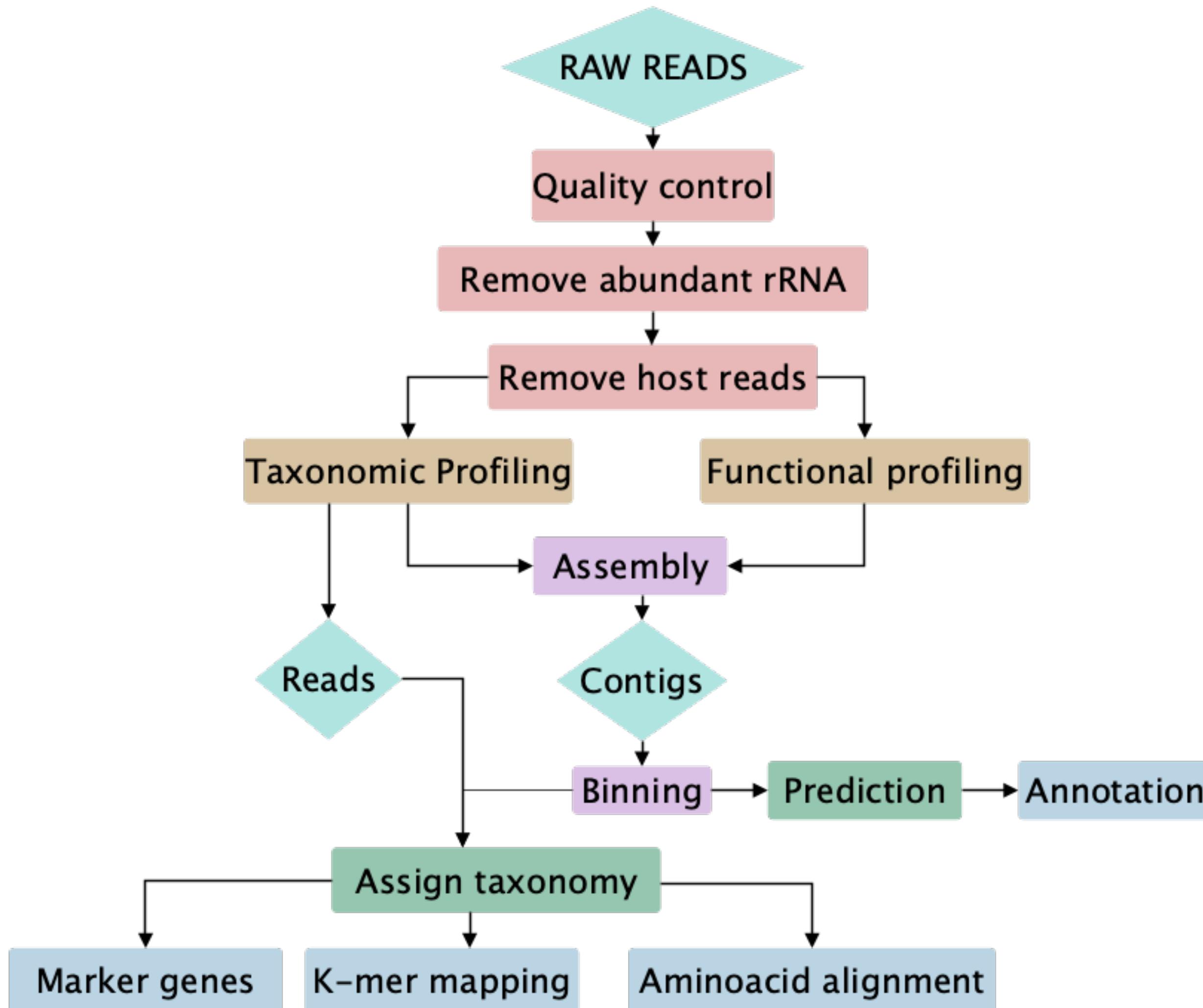
Número de lecturas totales para cada individuo.

Sample	Total_reads	Mapped	Mapedd_percent	Properly_paired	Properly_paired_percent	Singletons	Singletons_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)

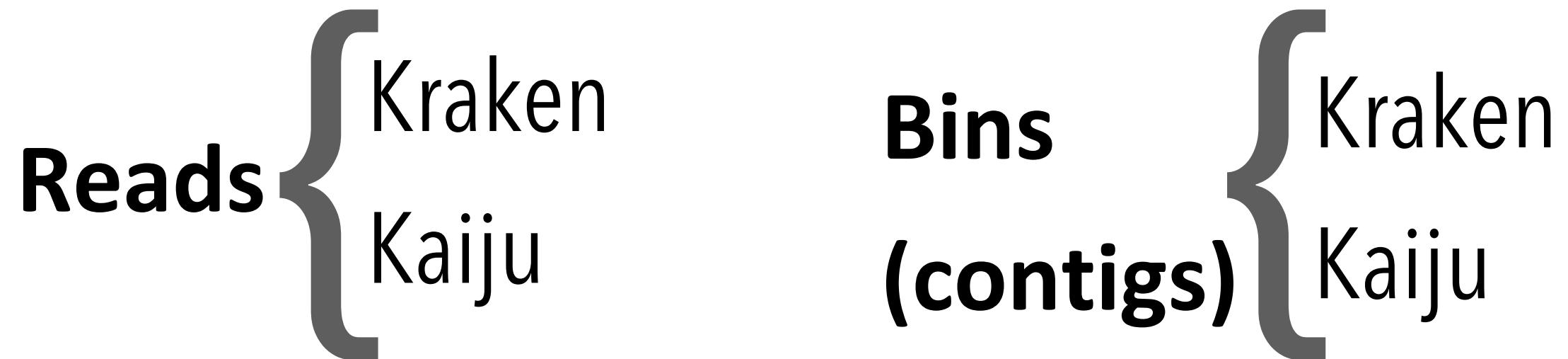
Workflow general de Metatranscriptómica

Modificaciones



Análisis propuestos

Perfil taxonómico (4)



Perfil funcional (1)

Bins
(contigs)

master - 2 branches 0 tags			Go to file	Add file -	Code -
	valeriafloral	error correction in pdf	7de8e46 12 hours ago	178 commits	
	archive	error correction in pdf	12 hours ago		
	bin	update host remove script	14 hours ago		
	data	update readme and organize folders and subfolders	16 hours ago		
	parkinsonlabtutorial	remove indexing because it was added to the scri...	14 days ago		
	.gitignore	update transcriptomic worflow	13 days ago		
	README.md	updateindex in removehost script	15 hours ago		
	workflow.png	modify workflow	15 hours ago		

README.md

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

getRepository 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.

[Repositorio](#)

Probar pipeline con otros árboles

Datos de Laura Figueroa

Datos RNA-seq de *Pinus pinaster*



Aslam Narváez Parra/CONABIO

Códigos de barras



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
Actividades académicas				
Metatranscriptómica	Mapeo de datos Definir softwares	Perfil taxonómico Perfil funcional	Análisis de diversidad taxonómica y funcional	
Trabajo de campo				
Aislamiento en cultivo puro				
Trabajo de laboratorio (Extracción de DNA y PCR)				
Ánalysis bioinformáticos Barcoding				
Escritura del manuscrito de tesis				