



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

**Análisis transcriptómico de la tolerancia a ozono troposférico  
en *Abies religiosa*.**

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**VERÓNICA REYES GALINDO**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ALICIA MASTRETTA YANES**  
CONACYT-CONABIO  
**COTUTOR DE TESIS: DR. JUAN PABLO JARAMILLO CORREA**  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM  
**COMITÉ TUTOR: DRA. ALEJANDRA CITLALI MORENO LETELIER**  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

**CD. MX. NOVIEMBRE, 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

**Análisis transcriptómico de la tolerancia a ozono troposférico  
en *Abies religiosa*.**

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**VERÓNICA REYES GALINDO**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ALICIA MASTRETTA YANES  
CONACYT-CONABIO  
COTUTOR DE TESIS: DR. JUAN PABLO JARAMILLO CORREA  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM  
COMITÉ TUTOR: DRA. ALEJANDRA CITLALI MORENO LETELIER  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

**MÉXICO, CD. MX. NOVIEMBRE, 2019**

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD INSTITUTO DE ECOLOGÍA

OFICIO CPCB/1108/2019

ASUNTO: Oficio de Jurado

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Ecología y Biología Evolutiva, del Posgrado en Ciencias Biológicas en su sesión ordinaria del día 13 de mayo de 2019, aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Evolutiva**, de la estudiante **REYES GALINDO VERÓNICA** con número de cuenta **307159122** con la tesis titulada "**Análisis transcriptómico de la tolerancia a ozono troposférico en *Abies religiosa***", bajo la dirección de la DRA. ALICIA MASTRETTA YANES quedando integrado de la siguiente manera:

|             |   |
|-------------|---|
| Presidente: | DRA. SVETLANA SHISHKOVA                 |
| Vocal:      | DRA. ANA LAURA WEGIER BRIUOLO           |
| Secretario: | DRA. ALEJANDRA CITLALLI MORENO LETELIER |
| Suplente:   | DRA. ALEJANDRA VÁZQUEZ LOBO YURÉN       |
| Suplente    | DR. CÉSAR MATEO FLORES ORTIZ            |

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 7 de noviembre de 2019

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



c. c. p. Expediente del alumno

**COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**UNIDAD DE POSGRADO**

Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria  
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX  
Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Al Posgrado de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo recibido mediante la beca de maestría (Número de CVU: 714560).

Al Programa de Apoyo a los Estudiantes de Posgrado (PAEP-UNAM) para asistir al II Joint Congress on Evolutionary Biology, Francia y al CONACYT por la Beca de Movilidad que me permitió terminar de analizar mis resultados en la University of East Anglia, Inglaterra.

Este trabajo fue posible gracias a los consejos de mi tutora la Dra. Alicia Mastretta Yanes, a mi cotutor el Dr. Juan Pablo Jaramillo Correa y a la Dra. Alejandra Citlali Moreno Letelier, miembros del comité tutor.

Al Laboratorio de Anatomía Vegetal del Jardín Botánico de la UNAM a cargo de la Dra. Estela Sandoval Zapotitla y del Laboratorio de Biogeoquímica, UBIPRO-FESI a cargo del Dr. César Mateo Flores Ortiz, quienes brindaron equipo y reactivos para realizar parte del trabajo. De igual manera, agradezco el apoyo brindado por Bienes Comunes de Santa Rosa Xochiac, quienes permitieron la colecta y monitoreo de la zona de estudio.

Agradezco el financiamiento otorgado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, mediante el proyecto PAPIIT IN20816), y por CONACYT, a través de los proyectos de Problemas Nacionales (247730), de Ciencia Básica (0153305) y de colaboración internacional (COOB-2016-01), sin los cuales esta investigación no se habría podido llevar a cabo.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Primeramente, agradezco a mi tutora Alicia, quien decidió aceptarme en un nuevo proyecto que implicaría al menos dos años más lidiando juntas con los “detallitos” de la vida (papeleos, campo, computadoras, llaves, dudas). Conocerla día a día sigue siendo una gran inspiración durante mi formación, ya que siempre me ha demostrado congruencia en sus acciones. Le agradezco la paciencia, confianza y el apoyo para realizar actividades que podrían ser intimidantes. Así como la posibilidad de cumplir mis objetivos académicos y personales planteados durante este periodo de mi vida. Nunca terminaré de agradecerle por todo lo brindado. También, me gustaría agradecerle a Juan Pablo, quien igualmente es un gran investigador y tutor. Sus consejos durante la escritura de mi tesis, mis presentaciones y en general de como mejorar como científica para poder realizar investigación de calidad, fueron experiencias muy valiosas. A ambos les agradezco la oportunidad que me dieron de pertenecer a su grupo de trabajo y de interactuar con científicos de otras partes del mundo.

Personas clave en mi formación fuera de México fueron Aïda Azaiez, Sebastien Gérardi y Julien Prunier quienes me mostraron diferentes pasos del procesamiento de muestras y datos para análisis de ARN. En otra parte del mundo pude conocer a Lewis Spurgin, Claudia Martin y David Prince quienes me ayudaron con mis análisis y dudas bioinformáticas. En especial en esta región del mundo, le agradezco inmensamente a Lewis y Lucí quienes me brindaron su casa, convivencias familiares, cultura, comida e incluso conocimientos sobre gatos (su amado Patrick). A todos ellos fue muy agradable conocerlos y espero verlos en algún otro momento para regresarles parte de lo que me brindaron.

Siempre he pensado que la ciencia avanza más rápido a través de la interdisciplina y la colaboración. Por tal razón agradezco el soporte técnico del Laboratorio de Anatomía Vegetal del Jardín Botánico de la UNAM, a cargo de la Dra. Estela Sandoval Zapotitla, quien también me aconsejó sobre la importancia del equilibrio entre la ciencia y la vida personal. En su laboratorio pase muchas tardes-noches aprendiendo y conviviendo con Cony, persona muy paciente y entregada a su trabajo; Barbarita, quien me recibía amablemente en las mañanas; Jess, futura bióloga muy trabajadora; así como con Vero, quien siempre estuvo dispuesta a compartir todo que sabe. Les agradezco el asesoramiento durante el procesamiento del material vegetal y la confianza de hacerme parte de su laboratorio. De igual manera, agradezco al Laboratorio de Biogeoquímica, UBIPRO-FESI a cargo del Dr. César Mateo Flores Ortiz, quien me permitió trabajar libremente en su laboratorio para el análisis de terpenos, así como su aportación durante la corrección de mi tesis. Además, para terminar este trabajo fueron fundamentales las revisiones de los miembros de mi jurado: Dra. Svetlana Shishkova, Dra. Alejandra Vázquez, Dra. Ana Wegier y Dra. Alejandra Moreno. Les agradezco su disponibilidad para leer mi tesis, comentarla y discutirla conmigo, así como el poder facilitarme los tramites de titulación, a pesar de los tiempos tan apretados que tienen como investigadoras.

Nunca podré dejar de agradecer a mis amigos de la carrera Memo, David, Fernando, Ferchis y Oliver, con quienes sigo acumulando experiencias que fortalecen nuestra amistad ante nuestras crisis emocionales, económicas o académicas. Les agradezco su tiempo ayudándome a coleccionar, asesorándome

científicamente, acompañándome durante el procesamiento de mis muestras/datos o simplemente con mensajes de apoyo a la distancia. Todos estos momentos siempre junto a una dosis oportuna de alcohol, comida y críticas constructivas que nos han hecho crecer durante la década que llevamos conociéndonos.

Durante el desarrollo de mi maestría pude integrarme al siempre atinado equipo oyamel: Sebas, con quien compartí experiencias bizarras y divertidas la mayoría del tiempo; Gus, siempre dispuesto a discutir sobre ciencia y temas en general; Jorge que me resolvió todas mis dudas forestales con su buen sentido del humor; así como Miguel, con quien compartí mi estrés por los análisis en la recta final de mi titulación. Con cada uno de ustedes compartí tiempo para resolver experimentos de laboratorio y problemas bioinformáticos que en equipo resultaron más amenos. Por otro lado, tengo muchos agradecimientos a miembros del Departamento de Ecología Evolutiva. En particular, en el cubo le agradezco a Nancy su experiencia académica compartida, así como su tiempo para ser confidente de muchas de mis dudas. A Marianita su compañía, asesoría ecológica y su constante presión para titularme. A Ruth su compañía durante el turno nocturno del laboratorio y a Madi las experiencias compartidas durante la comida a horas aleatorias. De igual manera les agradezco diferentes momentos compartidos a Idalia y sus atinados comentarios que me hacen disfrutar la ironía de la vida. A Laura su apoyo durante mi desconocimiento del mundo del ARN en plantas. A Azalea su constante presión/apoyo para terminar mis pendientes. A Carlos, su compañía durante la hora del odio. A Alex, su inmensa amabilidad y paz compartida. Además, me gustaría agradecer las reuniones y pláticas brindadas por Coral, Heriberto, Gaby (chiles), Oli, Duhya, Chris, Raquel, Gaby, Nadia, el Dr. Daniel, la Dra. Ella, Dra. Tania, Marco, Dra. Rocío, los tomentosos (gusto conocerlos) Anabel y Erika Rodríguez.

A pesar de la distancia tuve personas que me apoyaron durante este proyecto, unas de las más queridas son Myrs y Beto, ya que siempre han estado para aconsejarme, compartir experimentos, presentaciones, chismes y comidas. Además, agradezco los asesoramientos sobre genética cuantitativa de Ángeles e Iván durante las clases. A Gerry su asesoramiento estadístico. A Parra quien me apoyo durante mi muestreo. A Cristian (cristoichkov) quien me ayudo a mejorar mi capacidad bioinformática. A los miembros del Taller de Bioinformática que me ayudaron a pulir mis scripts. A Ernesto "grillo", quien me auxiliaba bioinformáticamente a la distancia. Casi por último, pero definitivamente de los más importantes, le agradezco a Claudio Zamora, persona integra y admirable que se preocupa por mejorar las condiciones de su comunidad, así como a su gran grupo de trabajo de Bienes Comunales de Santa Rosa Xochiac, quienes me ayudaron a completar los muestreos y a quienes por errores afortunados pude conocer durante mi trabajo de campo (espero que este trabajo sea el comienzo de futuras colaboraciones).

Lamento no poder mencionar a todos los que formaron parte de este trabajo de manera directa/indirecta, así como de la forma que me gustaría, sin embargo, espero poder brindarles el apoyo necesario cuando así lo requieran. Cada uno de ustedes me apoyo para salir adelante con mi muestreo, análisis, clases, hobbies, cordura emocional y tramites de becas/titulación.

Finalmente, agradezco a la UNAM y al Instituto de Ecología por seguir brindándome un lugar óptimo para desarrollar mi formación académica.

## **DEDICATORIA**

A mi mamá Laura, pilar de la familia y a quien siempre agradeceré la libertad otorgada para tomar mis decisiones. A mi hermano Roberto, parte sensible y artística de nosotros, a ti te agradezco la motivación de seguir intentando lo imposible. Finalmente, a mi sobrina Dhëni, esperanza de alegría ante las adversidades que se nos presentan. Me da gusto ver como cada uno va creciendo personalmente. Ustedes siempre formaran parte esencial de mi vida y todo lo que soy es un pequeño reflejo de lo que me han brindado. Solamente me queda decirles que a pesar de la distancia y las diferencias estaré para apoyarlos. Los quiero.

# ÍNDICE

## LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

- I. RESUMEN
- II. ABSTRACT
- III. INTRODUCCION
- IV. JUSTIFICACIÓN
- V. HIPÓTESIS
- VI. OBJETIVOS
  - a. General
  - b. Particulares
- VII. ANTECEDENTES
- VIII. MATERIAL Y MÉTODOS
  - a. Obtención de muestras biológicas
  - b. Determinar procedencias de muestras sanas y dañadas por O<sub>3</sub>
  - c. Análisis de expresión diferencial. Mapeo y ensamble de transcriptoma
  - d. Diferencias anatómicas
  - e. Detección de metabolitos
- VIII. RESULTADOS
  - A. Determinar procedencias de muestras sanas y dañadas por O<sub>3</sub>
  - B. Análisis de expresión diferencial. Mapeo y ensamble de transcriptoma
  - C. Diferencias anatómicas
  - D. Detección de metabolitos
- IX. DISCUSIÓN
- X. CONCLUSIONES
- XI. PERSPECTIVAS
- XII. REFERENCIAS
- XIII. ANEXOS

# LISTA FIGURAS Y CUADROS

## FIGURAS

- Figura 1.** Concentración de O<sub>3</sub> en la zona metropolitana de la CDMX.
- Figura 2.** Esquema ilustrando el mecanismo de ingreso de O<sub>3</sub> al tejido vegetal.
- Figura 3.** Dirección del viento y concentración de O<sub>3</sub> en la CDMX.
- Figura 4.** Sitio de colecta de individuos sanos y dañados.
- Figura 5.** Sitio de colecta de individuos de *A. religiosa* sanos y dañados en la Ciudad de México en la Comunidad de Santa Rosa Xochiac cerca del Desierto de los Leones.
- Figura 6.** Ejemplos de ramas de individuos de *A. religiosa* colectados.
- Figura 7.** Distribución de las poblaciones de *A. religiosa* en la Faja Volcánica Transmexicana.
- Figura 8.** Representación esquemática de un corte transversal de una acícula de *A. religiosa* indicando las regiones examinadas en este estudio.
- Figura 9.** Comparación de los transcritos expresados diferencialmente en árboles sanos y dañados durante la exposición a diferentes niveles de O<sub>3</sub>.
- Figura 10.** Estructura poblacional a lo largo de la distribución de *A. religiosa*.
- Figura 11.** Agrupamiento genético de *A. religiosa* estimado con admixture para k 2-5.
- Figura 12.** Parte lateral de cortes transversales en individuos sanos y dañados de *A. religiosa* durante los tres años de exposición a O<sub>3</sub>.
- Figura 13.** Parte central de cortes transversales en individuos sanos y dañados de *A. religiosa* durante los tres años de exposición a O<sub>3</sub>.
- Figura 14.** Presencia de cristales de oxalato de calcio en individuos sanos y dañados durante los tres años de exposición a O<sub>3</sub>.
- Figura 15.** Compuestos volátiles presentes durante dos temporadas de concentración de O<sub>3</sub> en individuos sanos y dañados de *A. religiosa*.
- Figura 16.** PCA de individuos sanos y dañados durante las dos temporadas de exposición a O<sub>3</sub>.

## CUADROS

- Cuadro 1.** Transcritos expresados diferencialmente (utilizando edgeR y DESeq2) entre individuos sanos y dañados durante la temporada de contingencia (170ppb).
- Cuadro 2.** Transcritos expresados diferencialmente (utilizando edgeR) entre individuos sanos y dañados durante la temporada de contingencia (170ppb).
- Cuadro 3.** Transcritos expresados diferencialmente (utilizando DESeq2) entre individuos sanos y dañados durante la temporada de contingencia (170ppb).
- Cuadro 4.** Transcritos expresados diferencialmente (utilizando edgeR y DESeq2) en individuos sanos durante diferentes temporadas (87ppb/170ppb).

**Cuadro 5.** Transcritos expresados diferencialmente (utilizando edgeR y DESeq2) en individuos dañados durante diferentes temporadas (87ppb/170ppb).

**Cuadro 6.** Valores de heterocigosidad de los árboles sanos y dañados de Santa Rosa Xochiac.

**Cuadro 7.** ANOVA de tres vías para evaluar el efecto de los tratamientos (temporalidad, condición y año de exposición) en *A. religiosa*.

## **ANEXOS**

**ANEXO 1.** Ramas de individuos sanos y dañados colectados.

**ANEXO 2.** Extracciones de ARN de 40-45 mg de tejido vegetal independientemente para cada concentración de ozono y período de crecimiento foliar por árbol.

**ANEXO 3.** Número de lecturas totales para cada individuo.

**ANEXO 4.** Número de genes mapeados para cada individuo.

**ANEXO 5.** Número de genes mapeados para cada comparación.

**ANEXO 6.** Valores de los parámetros para ensamble laxo en ipyRAD con todas las muestras de oyameles de nuestro grupo de trabajo.

**ANEXO 7.** Relación entre la distancia genética y la distancia geográfica de 19 poblaciones de *A. religiosa*.

**ANEXO 8.** Relación de parentesco dentro de cada población. En verde individuos sanos y en rojo dañados de la población de Santa Rosa Xochiac

**ANEXO 9.** Tren de tinción para acículas de oyamel..

**ANEXO 10.** Tinciones de individuos sanos.

**ANEXO 11.** Tinciones de individuos dañados.

**ANEXO 12.** Metabolitos detectados en todas las muestras a partir de la cromatografía de gases acoplada a una espectrometría de masas (CG-EM).

**ANEXO 13.** Abundancia relativa de los metabolitos después del filtrado.

**ANEXO 14.** Correlación entre los metabolitos.

# I. RESUMEN

La urbanización modifica las condiciones originales de un ecosistema y afecta la evolución de las especies que habitan en las ciudades. En particular, la contaminación atmosférica por ozono troposférico ( $O_3$ ) es una de las causas más importantes para la declinación del oyamel (*Abies religiosa*) en las zonas periféricas de la Ciudad de México (CDMX). Sin embargo, recientemente se detectaron oyameles con menor daño dentro de una zona de alta exposición a  $O_3$  y alta mortandad, sugiriendo que existe variación genética que podría estar relacionada con la tolerancia a  $O_3$ . En este trabajo se compararon árboles sanos y dañados dentro de una zona de alta exposición a  $O_3$  utilizando herramientas histológicas, metabolómicas, genómicas y transcriptómicas. Se colectó tejido de ambos tipos de individuos durante un día de alta (170ppb) y otro de baja (87ppb) concentración de  $O_3$ . Los cortes histológicos evidenciaron un daño gradual a nivel estructural, principalmente en el parénquima empalizada; además de mostrar acumulación diferencial de compuestos fenólicos entre los individuos sanos y dañados. La cromatografía de gases acoplada a una espectrometría de masas (CG-EM) reveló además la presencia diferencial de  $\beta$ -Pino, L- $\alpha$ -Acetato de Bornilo, Óxido de  $\beta$ -Cariofileno,  $\alpha$ -Cariofileno,  $\beta$ -Cubebeno,  $\alpha$ -Cubebeno y  $\alpha$ -Muuroleno; compuestos que ya han sido asociados al metabolismo del  $O_3$  en otros estudios. El genotipado masivo de individuos (1,550 SNPs) permitió determinar que los árboles estudiados son de origen local y no introducidos por reforestaciones previas. Finalmente, el análisis transcriptómico mostró expresión diferencial (DEG) de siete genes candidatos asociados a las rutas metabólicas de los carbohidratos y los flavonoides. Estos resultados abren la puerta a estudios de evolución urbana que faciliten el establecimiento de programas de reforestación más exitosos en los bosques periféricos de la CDMX, a través de la identificación de germoplasma tolerante a la contaminación por  $O_3$ .

## II. ABSTRACT

Urbanization modifies the ecosystems original conditions and affects the evolution of the species that inhabit cities. In particular, air pollution by tropospheric ozone (O<sub>3</sub>) caused the decline of sacred fir (*Abies religiosa*) in peripheral areas of Mexico City (CDMX). Recently, sacred fir individuals with less damage were detected within an exposure area with great fir mortality, suggesting that there is genetic variation within populations that could be related to tolerance to O<sub>3</sub> contamination tolerance. In this work we compare healthy and damaged trees within the same exposure area using histological, metabolomic, genomic and transcriptomic analyses. For this, tissue was collected from healthy and damaged individuals during a day of high (170ppb) and another of low (87ppb) O<sub>3</sub> concentration. The histological sections evidenced gradual damage at the structural level, mainly in the parenchyma in palisade, in addition to showing accumulation of phenolic compounds. Gas chromatography-mass spectrometry (CG-MS) revealed the differential presence of β-Pineno, L-α-Bornyl Acetate, β-Caryophyllene Oxide, α-Caryophyllene, β-Cubebeno, α-Cubebeno and α-Muurolene, between healthy and damaged individuals; compounds that have already been associated with O<sub>3</sub> metabolism in other studies. GBS data (1,550 SNPs) was used to identify the individual ancestry (local, introduced by reforestation). Finally, the transcriptomic analysis showed differential expression, revealing seven candidate genes associated with carbohydrate and flavonoid metabolic pathways. These results open the door to urban evolution studies to identify germplasm with greater tolerance to O<sub>3</sub> contamination that facilitate the establishment of more successful reforestation programs in the peripheral forests of the CDMX.

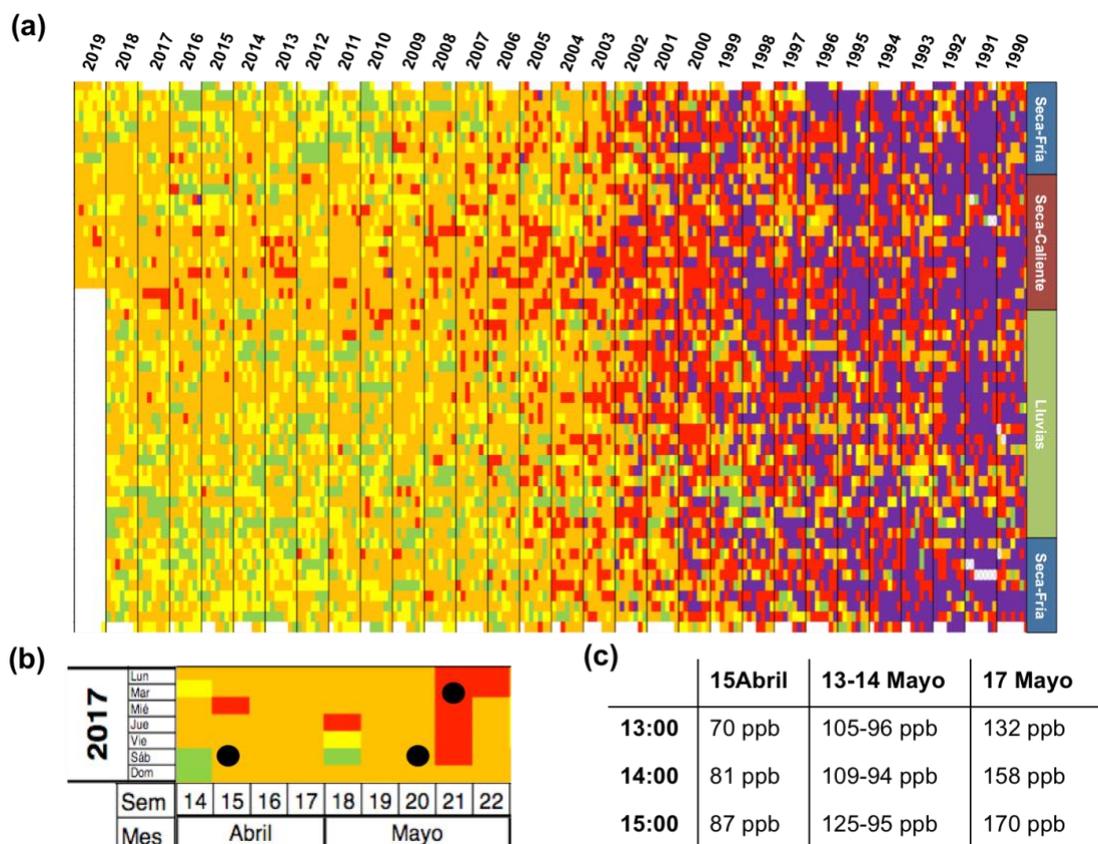
### III. INTRODUCCIÓN

La urbanización modifica las condiciones originales de un ecosistema y afecta la evolución de las especies que habitan en las ciudades (Santangelo, Rivkin, & Johnson, 2018). La respuesta biológica para sobrellevar este cambio en el ambiente puede asociarse a mutaciones que surgen después de la urbanización o a polimorfismos que ya existían antes de la urbanización (“*standing genetic variation*”) y que pueden llegar a ser adaptativos ante las nuevas condiciones. Estos polimorfismos pueden ser la diferencia para que una especie persista o desaparezca de áreas urbanas contaminadas (Johnson & Munshi-South, 2017).

La expansión urbana se caracteriza por un incremento en las actividades motorizadas e industriales; mismas que requieren combustibles fósiles, que a su vez incrementan la formación de algunos contaminantes (Lamsal, Martin, Parrish, & Krotkov, 2013). Uno de los más nocivos es el ozono troposférico ( $O_3$ ). Este se genera principalmente por reacciones fotoquímicas en la tropósfera entre el metano ( $CH_4$ ), los compuestos orgánicos volátiles (VOCs), y varios óxidos de nitrógeno ( $NO_x$ ), producidos en su mayoría por la quema de combustibles (Churkina et al., 2017; Finlayson-Pitts & Pitts Jr., 1993), los vapores de gasolina y los solventes químicos. Los efectos del  $O_3$  son tóxicos tanto para la salud humana (Ebi & McGregor, 2008), como para las plantas (Cho et al., 2011) y tienen consecuencias graves, en particular, en el deterioro de los árboles forestales (Ashmore, 2005). De esta manera, el estudio de la evolución en ciudades con altos índices de contaminación por  $O_3$  puede contribuir a la conservación de sus especies forestales.

La Ciudad de México (CDMX), con sus cerca de 22 millones de habitantes, es una de las ciudades más pobladas del mundo (ONU, 2018). Se encuentra en una cuenca rodeada de montañas, las cuales favorecen el incremento de su temperatura a través de la presencia de sistemas de alta presión, lo que impide la dispersión de contaminantes hacia fuera de la misma (Jáuregui, 2002). Lo anterior genera las condiciones ideales para una elevada concentración de  $O_3$  y sus correspondientes daños a la población

humana (Castillejos et al., 1995; Escamilla-Núñez et al., 2008; Holguín et al., 2003) y bosques periféricos (Alvarado R, De Bauer, & Galindo A, 1993).

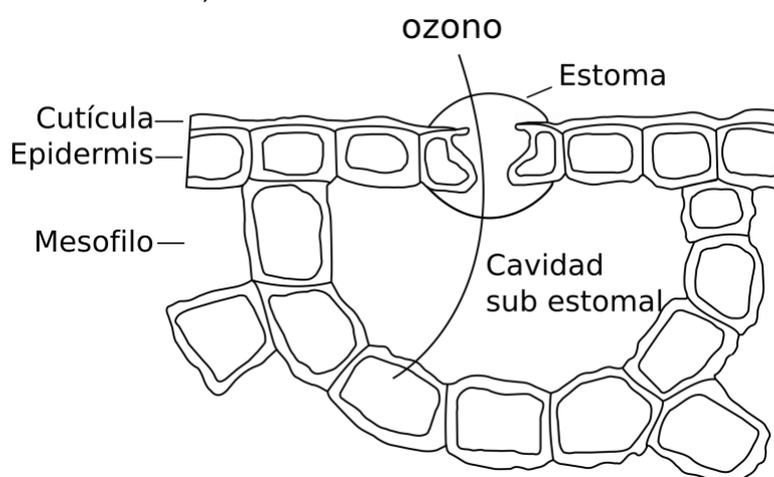


**Figura 1. Concentración de O<sub>3</sub> en la zona metropolitana de la CDMX. (a)** Mosaico histórico (1990-2019). La calidad del aire se representa mediante los colores: verde, buena (0-70ppb); amarillo, regular (71-95ppb); anaranjado, mala (96-154ppb); rojo, muy mala (155-204ppb) y morado, extremadamente mala ( $\geq 205$ ). **(b)** Concentración de O<sub>3</sub> promedio para la CDMX durante el periodo de estudio (Abril y Mayo, 2017). Los círculos negros muestran los días de colecta. **(c)** Concentración de O<sub>3</sub> reportada en la estación PEDREGAL durante el periodo de muestreo. Modificado de SEDEMA (2019).

Se ha determinado que los niveles de O<sub>3</sub> en un aire no contaminado rondan los 20-50ppb, mientras que en regiones contaminadas existen picos de hasta 400 ppb (Seinfeld, 1989). Hacia 1990, cuando se estableció una red de monitoreo para el control de la calidad del aire en México, los primeros controles revelaron concentraciones de O<sub>3</sub> por arriba de las 150 ppb prácticamente todos los días y frecuentemente superando las 205 ppb (color rojo y morado; Fig. 1a). A través del implemento de algunas regulaciones en el tránsito de vehículos y actividades industriales, las concentraciones de este y otros contaminantes se han ido reduciendo. Por ejemplo, el máximo pico en

2017 fue de 181 ppb (SEDEMA, 2019; Fig. 1a). Sin embargo, estos valores aún superan los establecidos como saludables por la NOM-020-SSA1-2104 (Reporte SEDEMA, 2017) y durante la temporada seca-caliente, los días de buena calidad del aire (<70 ppb) son escasos (Fig. 1a).

En la CDMX, el O<sub>3</sub> alcanza sus concentraciones máximas a principios de la primavera (temporada seca-caliente; Fig. 1a). Durante un mismo día, los valores más elevados se presentan durante la tarde, debido a la mayor incidencia solar, para luego disminuir en las primeras horas de la mañana (Reporte SEDEMA, 2017).



**Figura 2. Esquema ilustrando el mecanismo de ingreso de O<sub>3</sub> al tejido vegetal.** El O<sub>3</sub> entra por los estomas durante la fotosíntesis. Modificada de Tausz, Grulke, & Wieser (2007).

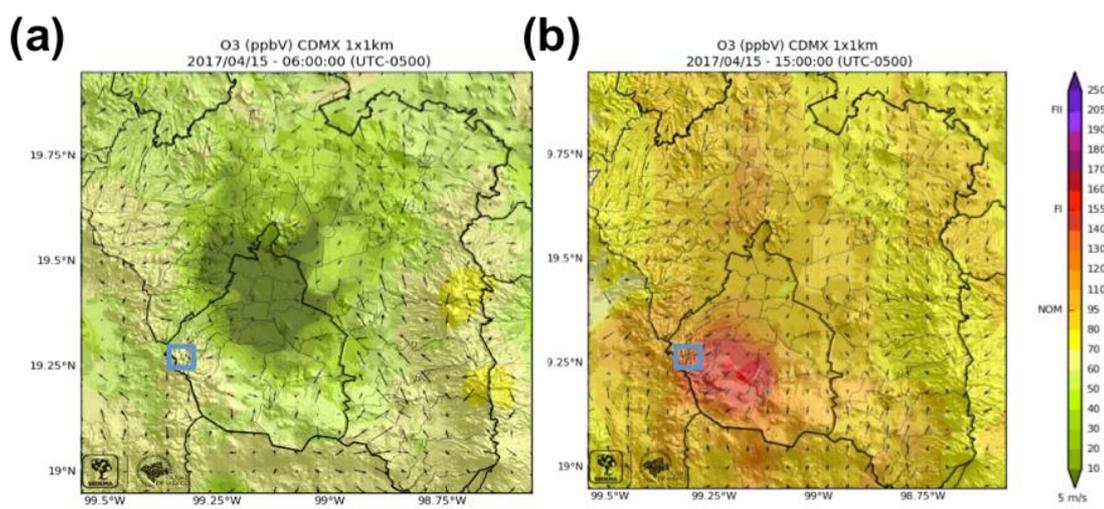
El efecto que provoca el O<sub>3</sub> en la vegetación ha sido estudiado desde hace más de 20 años en diferentes partes del mundo, utilizando experimentos de campo y de laboratorio, así como jardines comunes controlados y cámaras de crecimiento (Felzer, Cronin, Reilly, Melillo, & Wang, 2007). Dichos estudios han determinado que el O<sub>3</sub> entra a las células vegetales a través de los estomas y provoca estrés metabólico cuando transita por el apoplasto, produciendo diferentes especies reactivas de oxígeno (ROS) (Tausz, Grulke, & Wieser, 2007; Fig. 2). Dependiendo de la severidad del estrés, es posible detectar síntomas a simple vista. El daño producido por la contaminación ha sido observado en diferentes especies forestales en México (ej. *Pinus hartewwi*, *P. leiophylla*, *P. montezumae* y *Abies religiosa*; Terrazas & Bernal-Salazar, 2002). En particular, el daño en los oyameles (*A. religiosa* (Kunth) Schlechtendahl et Chamisso) incluye una

coloración rojiza en la parte adaxial de las acículas (Alvarado-Rosales & Hernández-Tejeda, 2002), disgregación del parénquima esponjoso y un cambio en la ubicación de las vacuolas (Alvarez, Laguna, & Rosas, 1998).

Dado que existen diferencias en la severidad de los efectos morfofisiológicos asociados al daño por O<sub>3</sub> en *A. religiosa*, estas pueden ser utilizadas para identificar individuos potencialmente tolerantes. Los árboles identificados pueden utilizarse para detectar genes que estén implicados en la tolerancia al O<sub>3</sub> mediante análisis de expresión diferencial de genes (DGE). Los mecanismos básicos que controlan la señalización celular y la expresión génica durante el estrés por ozono troposférico se han explorado en otras especies de plantas con análisis transcriptómicos. Los genes involucrados están principalmente asociados a la producción de fenoles (Saviranta, Julkunen-Tiitto, Oksanen, & Karjalainen, 2010) o están relacionados con la regulación del flujo de O<sub>3</sub> a través de los poros estomáticos (Ludwikow & Sadowski, 2008). Los genes asociados al metabolismo de aminoácidos y fosfatos también han sido reportados y son de particular interés, ya que se identificaron en experimentos controlados de exposición a O<sub>3</sub> (Lane et al., 2016). Por ejemplo, en álamos (género *Populus*), los genes sobregulados estuvieron relacionados con categorías de señalización y defensa, mientras que los subregulados incluyeron genes asociados a la fotosíntesis y a la obtención de energía (Gupta et al., 2005).

Berrang, Karnosky y Bennett (1991) propusieron que puede existir un potencial adaptativo a la respuesta ante la exposición a O<sub>3</sub>. En su estudio detectaron que árboles de áreas más contaminadas en los EE. UU. fueron menos sensibles al O<sub>3</sub> cuando se expusieron a altas concentraciones en jardines comunes o campos ambientales. Antes, Steiner y Davis (1979) ya habían reportado una respuesta similar en fresnos de diferentes procedencias. Por otro lado, estudios de reforestación en México con individuos de *A. religiosa* de distintas procedencias encontraron diferencias anatómicas entre poblaciones, pero estas no estuvieron asociadas con los niveles de exposición al O<sub>3</sub>. En concreto, en un jardín común dentro del Parque Nacional Desierto de los Leones se encontró que organismos provenientes del este de la Faja Volcánica Transmexicana (*i.e.* Cofre de Perote, Veracruz y La Soledad, Tlaxcala) presentaron menor índice de daño

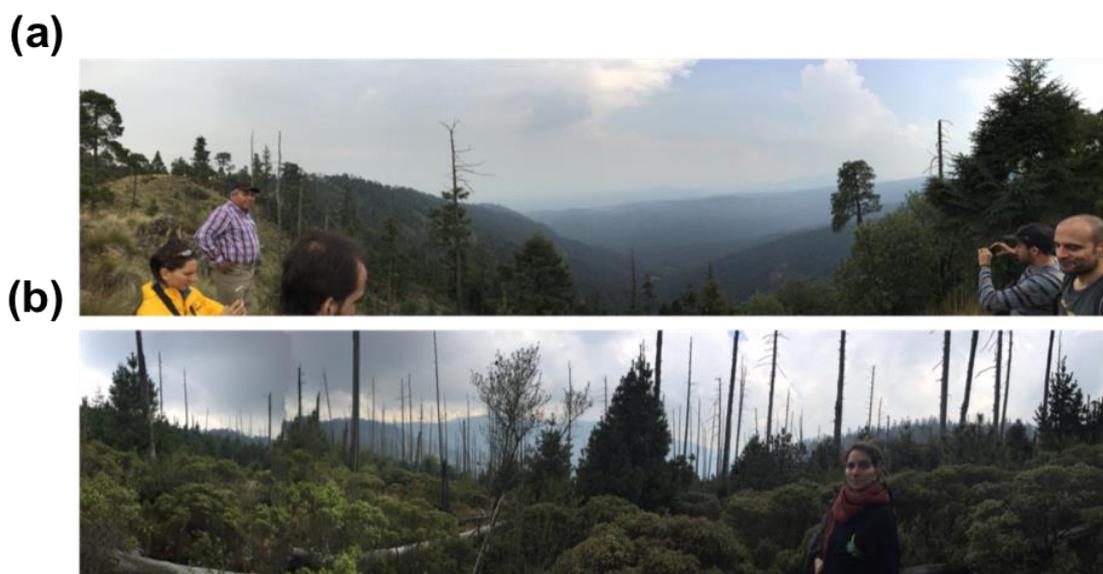
foliar en comparación con poblaciones del centro del país (*i.e.* Milpa Alta, CDMX y San Nicolás Coatepec, Edo. Mex.; Tejeda & Meza, 2015). Así mismo, con diferentes procedencias de pinos se han hecho estudios que relacionan la tolerancia al estrés por O<sub>3</sub> con altos niveles de heterocigosidad (Staszak et al., 2004).



**Figura 3. Dirección del viento y concentración de O<sub>3</sub> en la CDMX. (a)** Concentración de O<sub>3</sub> de ~50 ppb a las 6:00 am. **(b)** Concentración de O<sub>3</sub> de ~130 ppb a las 15:00 pm. Modificado de SEDEMA 2018. Los recuadros azules indican la localización de Santa Rosa, Xochiac-Desierto de los Leones. La barra de la derecha es una escala colorimétrica que va de las 10 ppb hasta las 250 ppb. NOM valores límites de la NOM (<95 ppb). FI valores de activación de la fase 1 de contingencia ambiental (>155 ppb). FII valores de activación de la fase 2 de contingencia ambiental (>205 ppb). El tamaño de la flecha indica la velocidad del viento, el vector bajo la barra muestra 5 metros /segundo.

El declive de los bosques de *A. religiosa* en la periferia de la CDMX se ha asociado al incremento del O<sub>3</sub> desde la década de los 80 (de Bauer & Hernández-Tejeda, 2007), el cual se ha acelerado debido a la falta de manejo forestal, la excesiva extracción de agua (que también conlleva estrés por sequía), el aumento de plagas (escarabajos barrenadores) e incendios forestales (Alvarado R et al., 1993; Tovar, 1989). En el Desierto de los Leones y sus comunidades aledañas en el suroeste de la CDMX se han detectado poblaciones de oyamel particularmente dañadas por el O<sub>3</sub>. Estos sitios están justo en la salida de los vientos contaminados que se originan en el centro de la ciudad (SEMARNAT-CONACYT, 2006; Fig. 3), por lo que su exposición es mayor al de otros sitios alrededor de la ciudad (Alvarado-Rosales et al., 2017). Además, hacia 1998 hubo un gran incendio en esta

zona que redujo aún más la cobertura del bosque (Claudio Zamora Callejas, comunicación personal; Fig. 4).



**Figura 4. Sitio de colecta de individuos sanos y dañados. (a)** Cañada cerca del Desierto de los Leones por donde los contaminantes atmosféricos de la CDMX son conducidos afectando el bosque de oyamel. **(b)** Sitio de colecta en Santa Rosa, Xochiac-Desierto de los Leones, donde se observa la poca recuperación del bosque 20 años después del incendio. En este sitio abundan árboles jóvenes con señales visibles de daño por  $O_3$  y la mortandad de los árboles reforestados es muy alta.

Los diferentes esfuerzos de reforestación de los bosques de oyamel en el Desierto de los Leones han sido muy variados y han incluido desde especies no nativas, hasta la reforestación con individuos de oyamel de diferentes procedencias (Tejeda & Meza, 2015). En consecuencia, es común detectar en un mismo sitio individuos producto tanto de regeneración natural como de diferentes programas de reforestación. En años recientes se detectó variación en el nivel de daño por  $O_3$  entre individuos de una localidad particularmente expuesta al  $O_3$ , sugiriendo que existe variabilidad genética relacionada a la tolerancia. Esta podría encontrarse bajo selección y conducir a un proceso de adaptación, pero dado los largos tiempos generacionales de los oyameles y el grado de deterioro de los bosques, es necesario acelerar el proceso mediante reforestaciones que aumenten la frecuencia de los individuos con mayores posibilidades de sobrevivir. Para lograr esto, es necesario identificar si las diferencias fenotípicas observadas efectivamente tienen una base genética, y determinar si los individuos sanos son producto

de la regeneración natural del bosque o si provienen de germoplasma introducido.

En este estudio comparamos árboles sanos y dañados de la barranca de la “Cruz de Coloxtitla”, una zona de exposición en los Bienes Comunes de Santa Rosa Xochiac, cerca del Desierto de los Leones. Esta localidad es una de las más expuestas al ozono troposférico proveniente de la CDMX (Alvarado-Rosales et al., 2017). Los árboles sanos y dañados fueron comparados mediante análisis histológicos, metabólicos, genómicos y transcriptómicos para determinar diferencias estructurales en su tejido foliar, contrastar la presencia y cantidad de terpenos, identificar su origen (*i.e.* endógeno por regeneración natural o exógeno por reforestación), nivel de heterocigosidad y observar expresión diferencial de genes candidatos. Estos resultados son un primer paso para realizar estudios de evolución urbana e identificar germoplasma con mayor tolerancia a la contaminación por O<sub>3</sub>. Esto facilitará el establecimiento de programas de reforestación más eficaces en los bosques que rodean la CDMX.

## IV. JUSTIFICACIÓN

El ozono troposférico es un contaminante del aire que afecta los bosques en las ciudades, lo que tiene consecuencias negativas sobre los servicios ecosistémicos que proporcionan. Por ejemplo, los bosques de oyamel que rodean la CDMX contribuyen a la captación de agua, lo que es de suma importancia para abastecer a la ciudad. Dado que estos se encuentran deteriorados por el daño por O<sub>3</sub>, existe un riesgo para el bienestar de la población en los años venideros. Igualmente, en vista de que el O<sub>3</sub> impide la recuperación de estos bosques (alta mortalidad de plantas jóvenes), es importante identificar fuentes de germoplasma tolerante a altas concentraciones de O<sub>3</sub> para reforzar los planes de reforestación en la periferia de la CDMX.

## V. HIPÓTESIS

Existe variabilidad genética asociada a la tolerancia al estrés por ozono troposférico dentro de las poblaciones de oyamel.

## VI. OBJETIVOS

### a. General

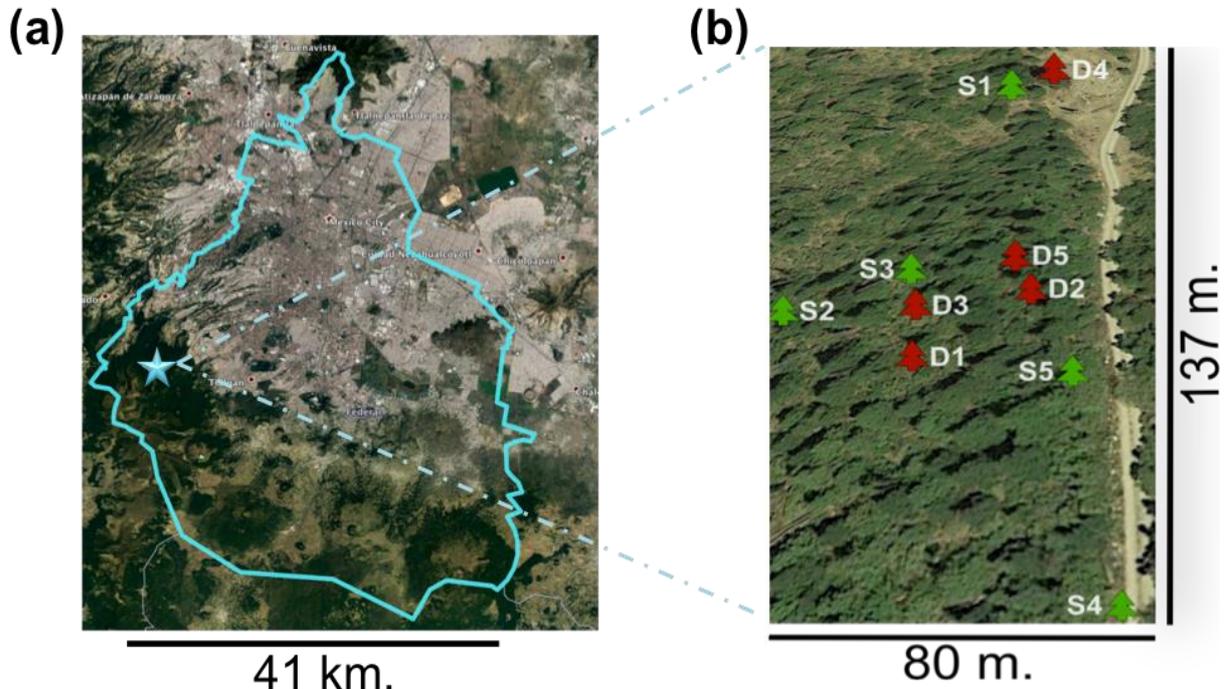
Evaluar si la tolerancia del oyamel (*A. religiosa*) a la exposición al O<sub>3</sub>, en un bosque periférico de la CDMX, tiene bases genéticas.

### b. Particulares

- Identificar genes candidatos a la tolerancia al O<sub>3</sub> mediante un análisis de expresión diferencial entre árboles sanos y dañados en una zona de alta exposición en temporadas con niveles de O<sub>3</sub> contrastantes (87ppb/170 ppb).
- Identificar la procedencia de los individuos tolerantes al O<sub>3</sub>.
- Evaluar si hay diferencias en los niveles de heterocigosidad entre árboles sanos y dañados.
- Describir y comparar las diferencias anatómicas en árboles sanos y dañados durante la temporada de contingencia (170ppb).
- Cuantificar la abundancia relativa de metabolitos secundarios en árboles sanos y dañados durante los dos años/temporadas arriba mencionados.

## VII. MATERIAL Y MÉTODOS

### a. Obtención de muestras biológicas

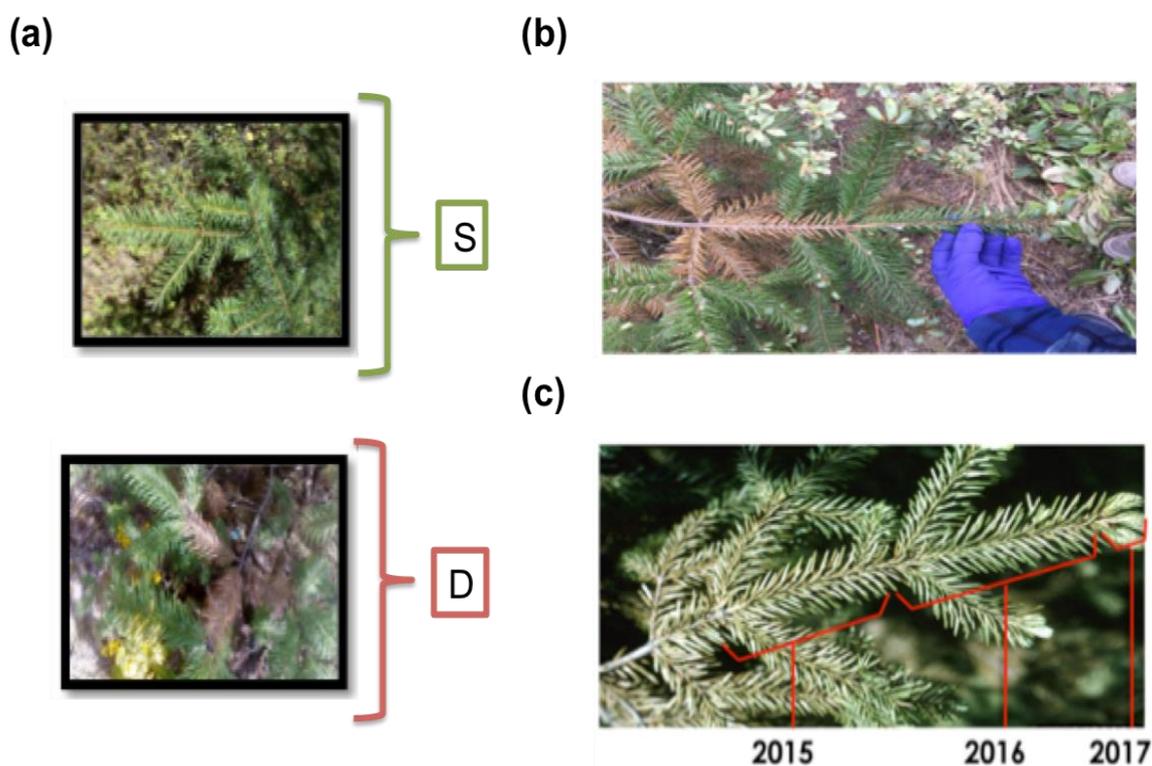


**Figura 5.** Sitio de colecta de individuos de *A. religiosa* sanos y dañados en la Comunidad de Santa Rosa Xochiac cerca del Desierto de los Leones en la Ciudad de México. (a) La estrella azul indica la ubicación del sitio de colecta (contorno azul). (b) Distribución de árboles sanos (S1-5) y dañados (D1-5) en la zona de estudio

El sitio de estudio se encuentra al suroeste de la CDMX, en la comunidad de Santa Rosa Xochiac, cerca del Parque Nacional Desierto de los Leones (19.285 N, -99.301 E; Fig. 5a). La colecta se realizó en aproximadamente 2 horas (13:30-15:30pm; Fig. 1c) en un área de 80x137m, cerca de la Cruz de Coloxtitla.

En esta área se identificaron individuos jóvenes (menos de 15 años) distribuidos de forma heterogénea (Fig. 5b). Se escogieron cinco plantas que presentaban una clara coloración rojiza en las acículas cercanas al tronco, indicio de daño por  $O_3$ , que hemos llamado árboles “dañados” de aquí en adelante. En paralelo, se identificaron cinco individuos que no tenían daño visible, árboles “sanos” de aquí en adelante (Fig. 6a, ANEXO 1). Se

colectaron acículas en tres secciones de una misma rama, para un total de seis ramas por individuo; estas secciones corresponden a los períodos de crecimiento de los años 2015, 2016 y 2017 (Fig. 6b-c). Las muestras fueron tomadas en fechas con concentraciones de O<sub>3</sub> contrastantes. Una concentración moderada de O<sub>3</sub> (15 abril 2017, 87 ppb), una intermedia (13-14 mayo 2017, 120-94 ppb) y una elevada (17 mayo 2017, 170 ppb) (Fig. 1b-c). Los tejidos y temporadas de concentración de O<sub>3</sub> utilizados para cada análisis se detallan más abajo. La concentración de O<sub>3</sub> al momento de la colecta se determinó a partir de la media de valores reportados entre las 13 a las 15 h por la estación PEDREGAL (PE), que es una de las estaciones de monitoreo de la calidad del aire más cercana al sitio de colecta que integra parte del Sistema de Monitoreo Atmosférico (datos disponibles en: <http://www.aire.cdmx.gob.mx/default.php?opc=%27aKBhnml=%27&opcion=Zg==>).



**Figura 6. Ejemplos de ramas de individuos de *A. religiosa* colectados. (a)** Apariencia de una rama de un individuo sano (S) y de otro dañado (D). **(b)** Vista más cercana de una rama dañada por O<sub>3</sub>. **(c)** Rama normal mostrando el crecimiento de los tres años estudiados.

## **b. Determinar procedencias de muestras sanas y dañadas por O<sub>3</sub>**

Para rastrear la procedencia de los oyameles potencialmente tolerantes al O<sub>3</sub> se genotiparon de tres a cinco individuos de 18 poblaciones de *A. religiosa* distribuidas a lo largo de la Faja Volcánica Transmexicana (Oeste-Este), junto a los 10 individuos utilizados en este estudio (Santa Rosa Xochiac; Fig. 7), con SNPs generados por el método GBS (Genotyping by sequencing). Las muestras para GBS de los árboles de Santa Rosa Xochiac fueron colectadas durante una concentración moderada de O<sub>3</sub> (120-94 ppb), e incluyeron hojas de los tres años de crecimiento (2015, 2016, 2017; Fig. 6 c); de tal forma que cada muestra consistió en un *pool* de acículas del mismo individuo en tres años de crecimiento. Las acículas se colocaron en tubos crioviales, que fueron sumergidos en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -70°C hasta el momento de la extracción. Las muestras del resto de la distribución de la especie en la Faja Volcánica Transmexicana provienen de estudios previos de nuestro grupo de trabajo (Aguirre-Planter, Furnier, & Eguiarte, 2000; Jaramillo-Correa et al., 2008; Giles-Pérez, 2017; Arenas et al., en preparación; Fig. 7).

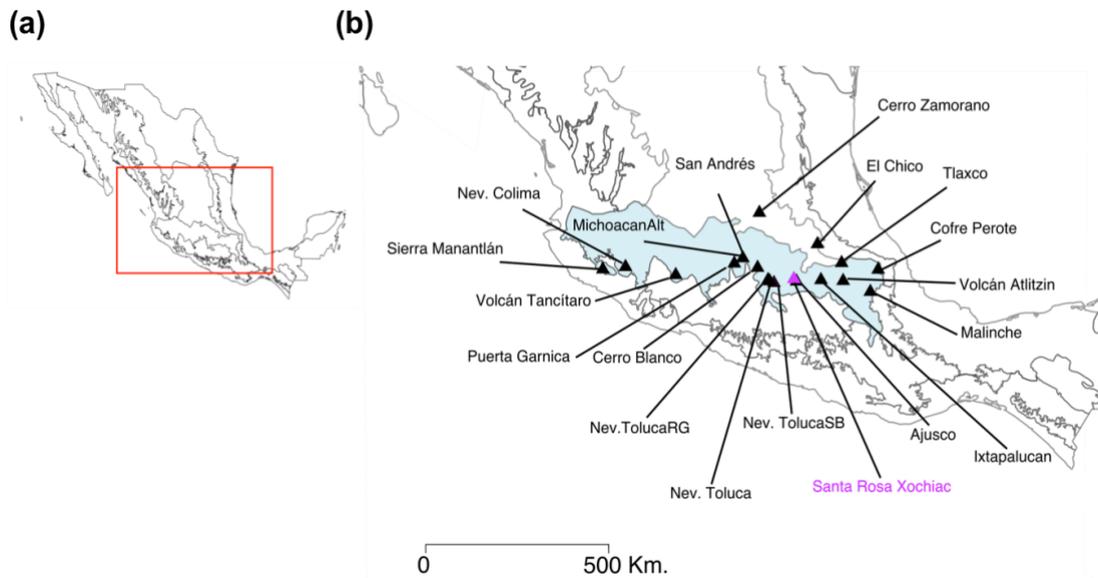
La extracción de ADN se realizó con el QUIAGEN DNeasy® Plant Mini Kit (cat. no. 69104), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se comprobó la integridad del material extraído a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1% y se cuantificó mediante Qubit™ V 3.0. Luego de ser normalizado a una concentración de 20-25 ng/μL, el ADN se envió a secuenciar en la plataforma de análisis genómicos del Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes, Université Laval, Québec, Canada. Allí se prepararon las librerías con el protocolo de Poland & Rife (2012) utilizando las enzimas de restricción *MspI* (C|CGG) y *PstI* (TGCA|G), y el Pippin prep (SAGE sciences) para seleccionar el tamaño de los fragmentos antes de su amplificación por PCR, lo cual nos permitió obtener *reads* de ~100pb. La secuenciación se realizó en una *línea* de Illumina HiSeq2500 1x100.

La calidad de las lecturas se corroboró a través del software FastQC, antes y después del *demultiplexeo* y filtrado de calidad. El *demultiplexeo*, filtrado de calidad e identificación de SNPs se realizaron utilizando el software

ipyrad (Eaton, 2014). Luego se hizo un ensamble laxo de estas secuencias (*mindepth\_statistical* 8, *mindepth\_majrule* 100000, *clust\_threshold* 0.9; ANEXO 6) que permitió obtener el mismo ID para cada secuencia en todas las muestras, esto con fines de comparación con otras poblaciones de oyamel. Para optimizar la identificación de variantes, se exploró previamente el efecto de modificar algunos parámetros de acuerdo a las recomendaciones de Mastretta-Yanes et al. (2015). Brevemente, se realizaron varios ensambles con los diferentes parámetros utilizando un subconjunto de 30 muestras duplicadas. Para cada ensamble se evaluó el error de genotipado y la cantidad de loci e individuos recuperados (Giles et al., en preparación). Finalmente, se realizó un segundo filtro considerando 3-5 individuos de las 19 poblaciones distribuidas a lo largo de la FVTM (Fig. 7). Este segundo filtro se hizo con VCFTools v0.1.16 (Danecek et al., 2011) manteniendo los genotipos que se recuperaran para al menos 90% de los individuos y que contaran con una frecuencia de alelos menores (MAF) superior a 0.05. Luego, con PLINK1.9 (Purcell et al., 2007), se examinó la cantidad de datos faltantes (*missing data*) y se eliminaron los individuos para los cuales más de 10% de los SNPs no pudieran ser genotipados. En aquellos casos en donde se presentaron múltiples SNPs dentro de un mismo locus, se conservó aquel que tuvo los valores más altos de MAF.

Con los datos finales se realizó una prueba de Mantel para comprobar si existe una correlación entre la distancia geográfica y la divergencia genética utilizando las paqueterías *geosfera* (Hijmans, Williams, & Vennes, 2011), *SNPRelate* (Zheng et al., 2012) y *vegan* (Oksanen et al., 2007) en Rstudio. Para esto se utilizó la distancia genética  $F_{ST}$  a partir del estimador de Weir & Cockerham (1984).

Posteriormente, se calculó la relación de parentesco entre individuos para cada una de las poblaciones utilizando PLINK1.9. Este análisis indicó que dos individuos dañados de la población de Santa Rosa Xochiac estaban altamente relacionados (ANEXO 7). Dado que un parentesco muy alto en la muestra puede alterar la estructura genética (Sethuraman, 2018), se decidió descartar una de estas dos muestras de manera aleatoria para los análisis subsecuentes.



**Figura 7. Distribución de las poblaciones de *A. religiosa* en la Faja Volcánica Transmexicana.** (a) Mapa de México dividido de acuerdo con sus regiones biogeográficas CONABIO, 1997. (b) Distribución de las 19 poblaciones de *A. religiosa* consideradas para determinar la procedencia de individuos sanos y dañados colectadas en Santa Rosa Xochiac (triángulo rosa). En azul se señala la Faja Volcánica Transmexicana (FVTM).

Así mismo, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para determinar la estructura genética a partir de 1,550 SNPs utilizando SNPRelate (Fig. 13a). El software ADMIXTURE v 1.3.0 (Alexander, Novembre, & Lange, 2009) también se empleó para inferir el número de grupos genéticos en las poblaciones. Finalmente, se calcularon los valores de heterocigosidad por individuo con VCFTools v0.1.16, para determinar si existían diferencias significativas entre árboles sanos y dañados.

### c. Análisis de expresión diferencial: Mapeo y anotación funcional del transcriptoma.

Las acículas se separaron por individuo y año de crecimiento (2015, 2016 y 2017) en tubos crioviales. Estos se sumergieron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Las acículas utilizadas para evaluar el patrón de expresión diferencial durante las temporadas con niveles de  $\text{O}_3$  más contrastantes (87ppb y 170 ppb) fueron las secciones de crecimiento de los años 2015 y 2016. Las acículas del 2017 se omitieron de los análisis de expresión diferencial para evitar sesgos de expresión por genes asociados al

crecimiento foliar y a la ruptura de yemas que estaban ocurriendo durante las fechas del muestreo.

La extracción de ARN se realizó con el kit Spectrum RNA Plant™ (cat. nos. STRN50, SIGMA) a partir de 40-45 mg de tejido vegetal, para cada concentración de O<sub>3</sub> y período de crecimiento foliar por árbol (34 muestras en total; ANEXO 2). Se evaluó la integridad del ARN a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1%; su concentración se cuantificó con Qubit™ RNA (Invitrogen). El ARN de los años de crecimiento 2015 y 2016 se mezclaron en cantidades equimolares (600 ng totales) en un sólo tubo por individuo. Posteriormente se determinó la calidad y pureza del ARN de acuerdo a la proporción 260/280 y 260/230, respectivamente, por medio de un NanoDrop (Fotómetro ultradiferencial) y se desecaron con el kit RNASTable (Stevenson, Wang, Muller, & Edelman, 2015). Las 18 muestras resultantes (ANEXO 2) se utilizaron para construir librerías en la University of Berkeley, EEUU, donde se enriqueció el mARN mediante captura de ARN poliadenilado (polyA-capture). Los fragmentos de ADNc fueron retrotranscritos a partir de este mARN y se secuenciaron en una línea de secuenciación Hi-Seq 4000 150PE (ANEXO 3).

El *demultiplexeo* de las secuencias resultantes fue realizado por el servicio de secuenciación. La calidad de las secuencias recibidas se revisó con FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) para luego descartar los adaptadores y secuencias de baja calidad utilizando Trimmomatic (Bolger, Lohse, & Usadel, 2014) con los parámetros: -phred33, ILLUMINACLIP: TruSeq3-PE-2.fa:2:30:10, LEADING:3, TRAILING:3, SLIDINGWINDOW:10 MINLEN:50. Las secuencias filtradas fueron revisadas de nuevo con el software FastQC para corroborar su calidad.

Las secuencias retenidas se mapearon contra un transcriptoma de referencia (*A. balsamea*; Prunier *et al.*, en preparación. Ver Bioproject PRJNA437248 en Genbank) con el software BWA-MEM (H. Li & Durbin, 2009). El transcriptoma de referencia tiene un total de 46,178 genes anotados y secuenciados para cinco tejidos diferentes. Una vez mapeados y ensamblados, la abundancia de los transcritos se cuantificó mediante el conteo de las lecturas mapeadas para cada gen por individuo (ANEXO 4) para luego continuar con varios análisis de expresión diferencial

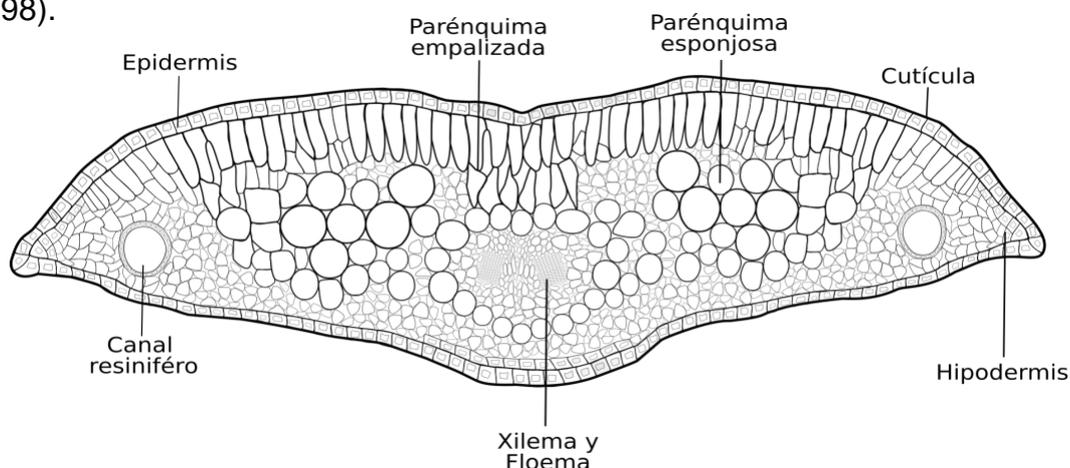
considerando los siguientes contrastes: (1) individuos sanos vs dañados en una temporada de muy alta concentración (170 ppb), (2) individuos sanos en una temporada de moderada concentración (87ppb) vs muy alta concentración (170ppb) y (3) individuos dañados en una temporada de moderada concentración (87ppb) vs muy alta concentración (170ppb; ANEXO 5).

Los análisis de expresión diferencial se realizaron con los paquetes de R (R Core Team, 2013) DESeq2 (Love, Huber, & Anders, 2014) y edgeR (Robinson, McCarthy, & Smyth, 2010). Se consideraron como diferencialmente expresados aquellos transcritos cuyo valor de  $p$  fuera menor a 0.005 después de una corrección FDR para falsos positivos (Benjamini et al., 2001). Dado que es difícil determinar qué paquete utiliza el mejor criterio a la hora de estimar las dispersiones o normalizar las lecturas, los resultados de ambos fueron comparados y se descartaron aquellos genes detectados por solo uno de los métodos. La anotación funcional de la familia de proteínas de plantas a la que pertenecían los transcritos retenidos se obtuvo a partir de la selección del marco de lectura más probable (Pfam; Prunier *et al.*, en preparación). Finalmente, las proteínas se asignaron a rutas metabólicas y se anotó su función utilizando KOALA (KEGG Orthology And Links Annotation; Kanehisa, Sato, & Morishima, 2016). Pfam es una base de datos con familias de proteínas generadas a partir de las diferentes combinaciones de dominios de proteínas; KOALA es una herramienta de anotación a partir del alineamiento de genes en la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

#### **d. Diferencias anatómicas.**

Se compararon secciones histológicas de hojas entre árboles sanos y dañados, considerando muestras para los últimos tres años de crecimiento (2015, 2016 y 2017; Fig. 6c) tomadas durante la temporada de alta concentración de O<sub>3</sub> (170ppb). Las acículas se colectaron en agua destilada y fueron llevadas al laboratorio para procesarse de acuerdo con Sandoval et al., (2005). Luego de ser seccionadas manualmente con bisturí (7-10 mm aproximadamente), estas se sumergieron por una noche en una solución

fijadora compuesta por etanol 50%, formaldehído 10%, agua bidestilada 35% y ácido acético glacial 5% (FAA). Posteriormente se lavaron con agua destilada y se deshidrataron en un tren con diferentes concentraciones de alcohol terbutílico (ANEXO 8a). Una vez deshidratadas, se infiltraron poco a poco con 12-15 escamas de Paraplast™ cada 30 min., dentro de una estufa a 58°C hasta duplicar el volumen de alcohol terbutílico. Posteriormente, se almacenaron a 56°C durante 3 semanas y se elaboraron bloques sólidos con el mismo medio (cubos de inclusión) a partir de los cuales se obtuvieron secciones transversales con un micrótopo de rotación (American Optical 820;12µm). Se obtuvieron 10-15 laminillas de secciones para cada muestra, con las que se determinó la estructura celular y la presencia de cristales de oxalato de calcio. La tinción utilizada se estandarizó previamente para muestras de oyamel (ANEXO 8b). El tren de tinción comenzó con la hidratación de las muestras, para después teñirlas con safranina; luego de su posterior deshidratación, estas se tiñeron con verde rápido. Una vez preparadas, las laminillas se limpiaron, se protegieron con resina y se secaron durante 15 días en una estufa a 56°C. Se utilizaron las mismas laminillas bajo la incidencia de luz polarizada para detectar cristales de oxalato de calcio y observar zonas previamente reportadas como sensibles al daño por O<sub>3</sub> (Fig. 8). Todas las fotografías se tomaron con un fotomicroscopio Axioskope Car Zeiss (con los objetivos 10x, 20x y 40x). Posteriormente, para cada muestra, se compararon daños a nivel tisular utilizando como referencia la descripción anatómica del daño por O<sub>3</sub> en *A. religiosa* (Alvarez et al., 1998).



**Figura 8. Representación esquemática de una sección transversal de una acícula de *A. religiosa* indicando las regiones examinadas en este estudio.**

### a. Detección de metabolitos

Para cuantificar la abundancia relativa de metabolitos secundarios en árboles sanos y dañados, se utilizaron las muestras colectadas a 87ppb y 170 ppb, tomando muestras de los años de crecimiento 2015 y 2016 (Fig. 6c). Igual, que para el transcriptoma, no se utilizaron las acículas del año 2017 para evitar sesgos producidos por el crecimiento del año en curso.

Para la extracción de metabolitos, se pesaron 80-95 mg de tejido para cada muestra. Estos se maceraron con 1 mL de diclorometano, para luego recuperar el macerado en un tubo de 2mL después de agregar nuevamente 1mL de diclorometano. Este se centrifugó por 1 min a 14 000 rpm, para recuperar el sobrenadante, mismo que se secó con aire comprimido. Una vez seco, se le agregaron 450 µl de diclorometano y 50 µl de 1-isopropilfenol como standard (1mg/mL). Luego de homogeneizar la solución, se inyectaron 2 µl de esta en un cromatógrafo de gases con inyector Split/splitless (Agilent Technologies 6850 Network GC System) acoplado a un espectrómetro de masas (5975C VL MSD with Triple-Axis Detector) y una columna capilar xilano (Quadrex) 30m\*0.25mm\*0.25µm. La temperatura utilizada para el inyector fue de 230°C, y este se puso en modo *splitness* (3 min). El programa de separación fue el siguiente: temperatura inicial 70°C por 2 min, incrementándose hasta 230°C a una velocidad de 20°C/min y manteniéndose durante 5 min. El gas acarreador fue helio, el cual se inyectó a una velocidad de 1mL/min; la temperatura de la línea de transferencia fue de 280°C, la de la fuente de ionización de 230°C y la del analizador cuadrupolar de 150°C. Los análisis se realizaron por impacto electrónico a 70eV; se utilizó el modo de barrido total del espectro (SCAN por sus siglas en inglés). La presencia de cada pico (asociada a un metabolito específico) se validó de acuerdo con el tiempo de retención y su espectro de masas utilizando la librería NIST (National Institute of Standards and Technology). Se descartaron aquellos metabolitos que (i) no cumplieran con al menos 80% de probabilidad de identificación, (ii) no tuvieran patrones similares de fragmentación o tiempos de retención (TR) y (iii) no estuvieran presentes en al menos el 30% de las muestras totales (ANEXO 12). Considerando los metabolitos que cumplieron los filtros se hizo una comparación de medias y se calculó su abundancia

relativa por cada 100gr de tejido (ANEXO 13). A continuación, se realizó un ANOVA de 3 vías para determinar los metabolitos asociados a la temporalidad (temporada alta y baja de O<sub>3</sub>), condición (sano, dañado) y año de exposición (2015, 2016). Finalmente, se hizo la correlación entre metabolitos y se realizó un PCA a partir de aquellos metabolitos que no estuvieran altamente correlacionados.

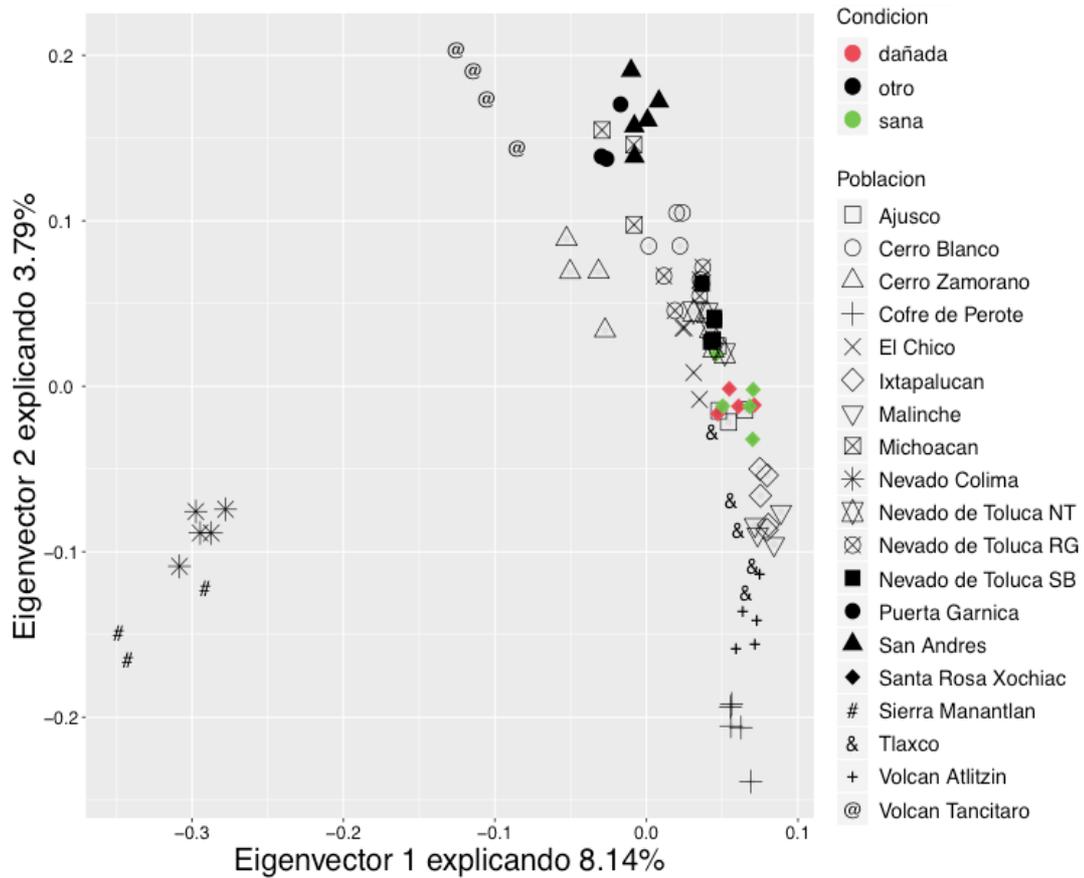
## VIII.RESULTADOS

### A. Determinar procedencias de muestras sanas y dañadas por O<sub>3</sub>

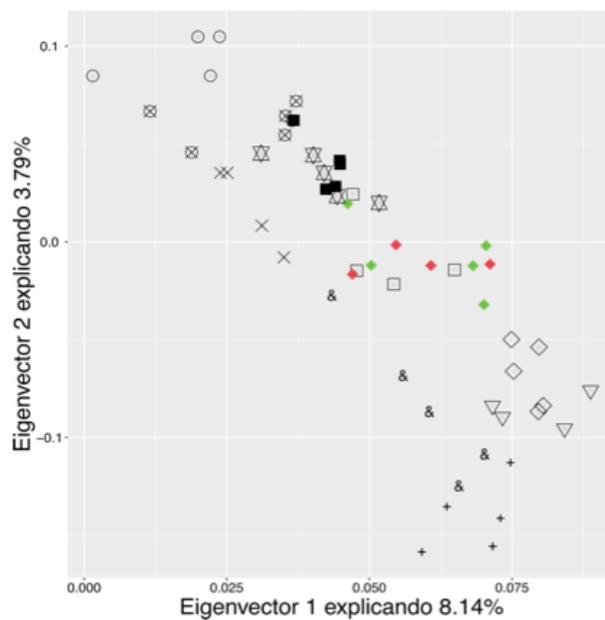
A partir del ensamble *de novo*, los filtros *missing data*, MAF y >1 SNP por locus para las 89 muestras de oyamel distribuidas a lo largo de la FVTM se obtuvieron 1,785 SNPS. La prueba de Mantel entre las distancias geográficas y las distancias genéticas de las 19 poblaciones mostró una correlación positiva y significativa, que muestra un patrón de aislamiento por distancia para *A. religiosa* (R = 0.8318, p <0.001; ANEXO 7).

El análisis de parentesco (ANEXO 8), determinó que dos individuos dañados estaban altamente relacionados (D1 y D2; Fig. 5b). Por lo cual, se descartó uno de ellos antes de efectuar los análisis de estructura génica (D2; Fig. 5b). Después de aplicar los filtros correspondientes (ver métodos) y descartando al árbol altamente relacionado, se obtuvieron 1,550 SNPs en 88 individuos. El PCA y el análisis de ancestría indican que las poblaciones de la Sierra de Manantlán y del Nevado de Colima se agrupan y son genéticamente diferentes del resto de poblaciones (Fig. 10a-11). Por otro lado, en las 17 poblaciones restantes presentan un gradiente este-oeste en la estructura poblacional asociada a su distribución geográfica (Fig. 11; arriba Volcán Tancítaro y abajo Cofre de Perote; oeste Volcán Tancítaro, Puerta Garnica, San Andrés; este Tlaxco, Volcán Atlitzin y Cofre de Perote).

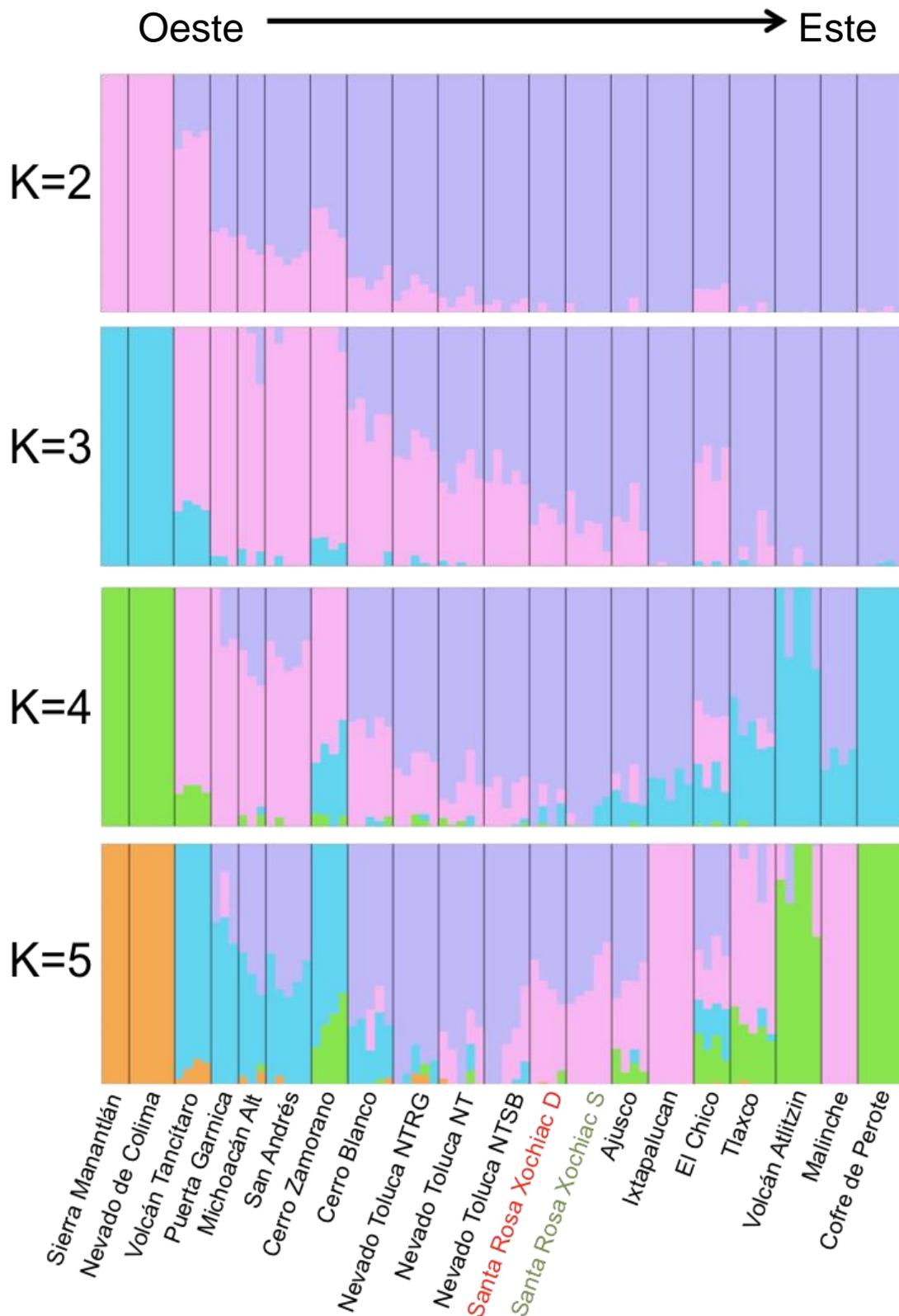
(a)



(b)



**Figura 10. Estructura poblacional determinada con un análisis de componentes principales (PCA), utilizando 1550 SNPS de 88 individuos distribuidos a lo largo de la Faja Volánica Transmexicana (FVTM). PCA con a) toda la distribución, y b) un acercamiento a las poblaciones del centro de la FVTM.**



**Figura 11. Agrupamiento genético de *A. religiosa* determinado con admixture presuponiendo de 2 a 5 grupos genéticos (k) diferentes.** Las poblaciones se encuentran ordenadas de oeste a este de la FVTM. Las muestras del sitio de estudio se encuentran resaltadas en rojo (dañadas) y verde (sanas).

Entre las procedencias claramente diferenciadas están Cofre de Perote y Nevado de Colima (Fig. 10a-11), sitios de los cuales proceden algunas reforestaciones implementadas en nuestro sitio de estudio. Sin embargo, los individuos sanos y dañados evaluados en la comunidad de Santa Rosa Xochiac se agruparon junto a las poblaciones provenientes del centro de la FVTM (Nevado de Toluca y Ajusco; Fig. 10b-11). Así mismo, los individuos sanos y dañados por O<sub>3</sub> mostraron valores similares de heterocigosidad (P=0.18; Cuadro 6).

**Cuadro 6. Valores de heterocigosidad esperada obtenidos con 1550 SNPs en árboles sanos y dañados por ozono troposférico en Santa Rosa Xochiac.**

| Individuo | He    |
|-----------|-------|
| SANO_01   | 0.712 |
| SANO_02   | 0.713 |
| SANO_03   | 0.706 |
| SANO_04   | 0.733 |
| SANO_05   | 0.741 |
| DAÑADO_01 | 0.746 |
| DAÑADO_02 | 0.733 |
| DAÑADO_03 | 0.722 |
| DAÑADO_04 | 0.725 |
| DAÑADO_05 | 0.740 |

## **B. Análisis de expresión diferencial. Mapeo y anotación funcional del transcriptoma.**

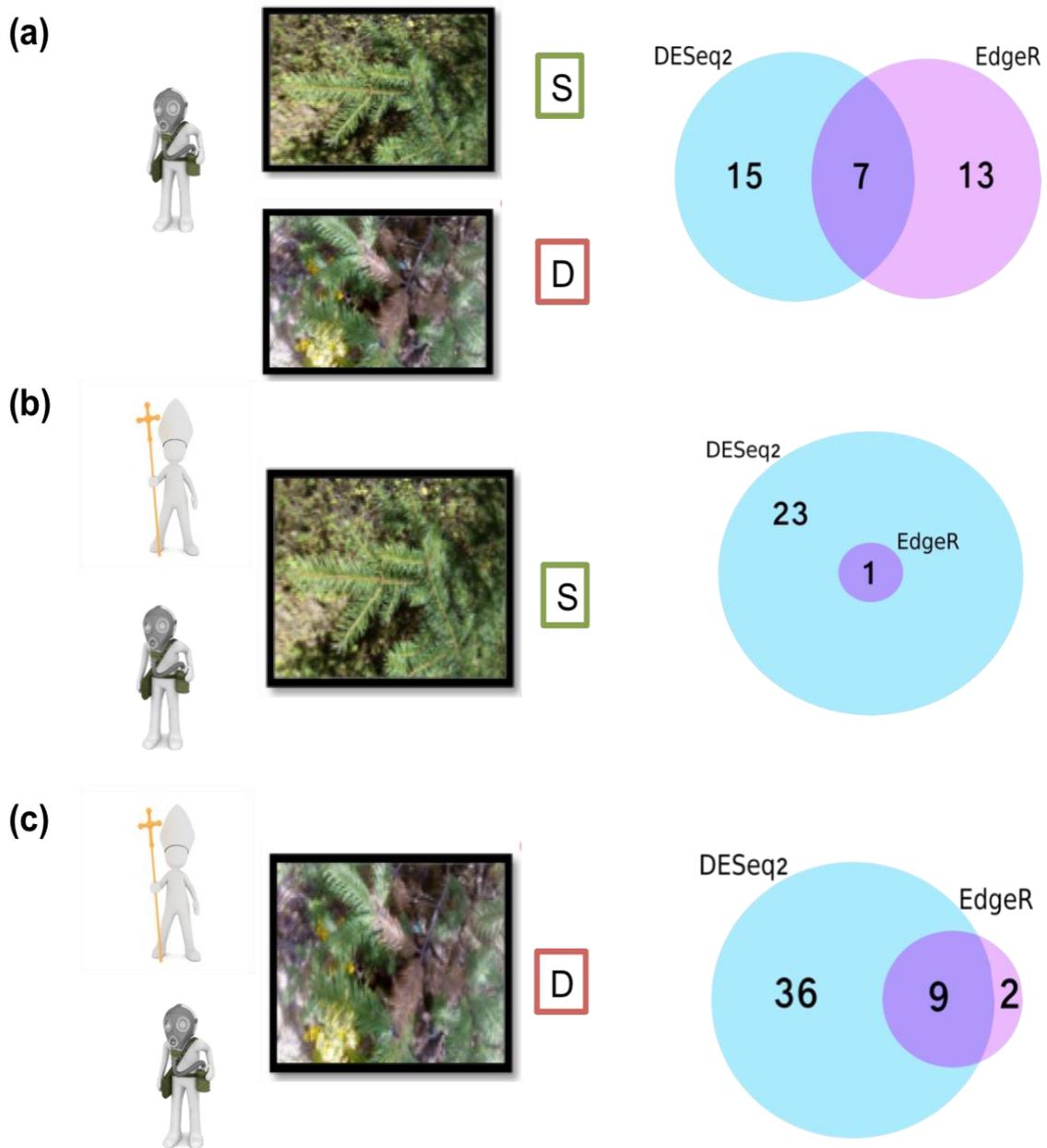
Como resultado de la secuenciación de RNA, y después del proceso de filtrado por calidad, se obtuvieron 605,147,387 lecturas para las 18 muestras, con un promedio de 33,619,299 lecturas por muestra (ANEXO 3). El porcentaje de mapeo al transcriptoma de referencia osciló entre 84.5 a 96.7% por muestra. Tanto el número específico de lecturas, como el porcentaje de mapeo por individuo y condición pueden consultarse en los ANEXOS 3-4.

Con estos datos se comparó la expresión diferencial en individuos sanos y dañados durante la temporada de contingencia (170 ppb). La comparación arrojó siete genes candidatos expresados diferencialmente (Cuadro 1), mismos que se identificaron simultáneamente por los métodos DESeq2 y EdgeR (Fig. 9a). Sin embargo, de manera independiente cada

método detectó 15 y 13 genes, respectivamente (Fig. 9a, Cuadros 2-3). De manera independiente, se comparó la expresión diferencial de los árboles sanos y dañados durante las fechas con concentraciones de O<sub>3</sub> contrastantes (87ppb y 170 ppb). Esta permitió detectar un gen expresado diferencialmente para los árboles sanos (Fig. 9b, Cuadro 4) y nueve para los dañados (Fig. 9c, Cuadro 5). Sin embargo, al evaluar los árboles sanos por separado, se detectaron 23 genes DEG utilizando DESeq2 y ninguno con EdgeR (Fig. 9b). Mientras que, al comparar los árboles dañados por separado, se obtuvieron 36 genes con DESeq2 y dos con edgeR (Fig. 9c).

A continuación, para las tres comparaciones se anotó la familia de proteínas a la que pertenecía cada gen (Pfam y KOALA; Cuadros 1-5), así como la función y ruta metabólica asociada (KOALA; Cuadros 1-5). De los siete genes detectados inicialmente por ambos métodos entre individuos sanos y dañados, cuatro proteínas (Chitinase class I, Protein tyrosine kinase, Nodulin-like y Legume lectin domain protein tyrosine kinase) pudieron ser anotadas (Cuadro 1). Por otro lado, el único gen con expresión diferencial entre las fechas con concentraciones de O<sub>3</sub> contrastantes se relaciona con la proteína CCT motif B-box zinc finger (Cuadro 4). Mientras que para los nueve genes expresados diferencialmente en individuos dañados se encontraron asociadas seis proteínas (Xyloglucan endotransglycosylase (XET) C-terminus, UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl, Linker histone H1 and H5 family, Metallothionein, Centromere kinetochore component CENP-T histone fold y Phosphate-induced protein 1 conserved región; Cuadro 5).

De acuerdo con el análisis KOALA, las rutas metabólicas en las que están implicados los genes con expresión diferencial entre los individuos sanos y dañados expuestos a 170ppb (contingencia ambiental) son la vía de carbohidratos (gen **AB\_036475\_T.1**; Cuadro 1) y la de señalización que implica la participación de las MAPK (**AB\_035458\_T.1** y **AB\_029334\_T.1**; Cuadro 1).



**Figura 9. Comparación del número genes expresados diferencialmente en árboles sanos y dañados durante la exposición a diferentes niveles de O<sub>3</sub>. (a)** Expresión diferencial de genes comparando individuos sanos (marco verde) y dañados (marco rojo) durante la temporada de contingencia (170ppb). **(b)** Expresión diferencial de genes comparando individuos sanos en fechas con concentraciones de ozono contrastantes. **(c)** Expresión diferencial de genes comparando individuos dañados en fechas con concentraciones de ozono contrastantes. El marco verde y rojo diferencia árboles sanos y dañados, respectivamente. El muñeco con máscara representa la contingencia ambiental (170 ppb) y el muñeco con báculo la Semana Santa (período vacacional en México) con moderada concentración de O<sub>3</sub> (87 ppb). Los diagramas de Venn muestran en color azul los genes detectados únicamente con DESeq2, en color rosa los detectados por edgeR y en morado los genes compartidos por ambos métodos.

**Cuadro 1. Genes expresados diferencialmente (detectados utilizando edgeR y DESeq2) entre individuos sanos y dañados durante la temporada de contingencia (170ppb).** Se muestran genes identificados tanto por edgeR como por DESeq2. Anotación del gen utilizando la base de datos de familias de proteínas (Pfam) y la anotación KOALA. Se resaltan en negritas las proteínas con función reportada en KOALA y estudios previos.

| <b>ID Locus</b> | <b>Nombre de la proteína en la base de datos Pfam</b> | <b>Nombre de la proteína con el análisis KOALA</b>                          | <b>Función reportada en estudios previos</b>   |
|-----------------|---|---|--|
| AB_045531_T.1   | Sin anotación   | Hypothetical protein  | Sin función reportada  |
|                 |   | <b>Chitinase 4-like</b>   | <b>Proteína quinasa. Se encuentran sobre expresadas en condiciones de estrés biótico y abiótico (Kasprzewska, 2003).</b>   |
| AB_036475_T.1   | <b>Chitinase class I</b>                              |   |  |
|                 |   | <b>Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g56140</b> | <b>Relacionada con receptores LRR (receptor-like serine/threonine-protein kinase) responsables del cierre de los estomas provocado por la presencia del O<sub>3</sub> en la vía apoplástica en <i>A. thaliana</i> (Sierla et al., 2018).</b>                               |
| AB_035458_T.1   | <b>Protein tyrosine kinase</b>                        |   |  |
| AB_029013_T.1   | Sin anotación   | Hypothetical protein  | Sin función reportada  |
|                 |   | <b>Protein NUCLEAR FUSION DEFECTIVE 4-like</b>                              | <b>Proteína transmembranal involucrada en el transporte de nutrientes para el desarrollo de la planta.</b>   |
| AB_015092_T.1   | <b>Nodulin-like</b>                                   |   |  |
|                 |   | <b>Probable L-type lectin-domain containing receptor kinase S.5</b>         | <b>Receptor con un dominio lectina (L-type lectin-domain containing receptor kinase) asociado a señales de transducción ante estrés biótico y abiótico (Gilardoni, Hettenhausen, Baldwin, &amp; Bonaventure, 2011; Nishiguchi, Yoshida, Sumizono, &amp; Tazaki, 2002).</b> |
| AB_029334_T.1   | <b>Legume lectin domain Protein tyrosine kinase</b>   |   |  |
| AB_018867_T.1   | Sin anotación   | Sin anotación   | Sin función reportada  |

**Cuadro 2. Genes expresados diferencialmente (detectados utilizando edgeR) entre individuos sanos y dañados durante la temporada de contingencia (170ppb).** Se muestran genes identificados con edgeR. Anotación del gen utilizando la base de datos de familias de proteínas (Pfam) y la anotación KOALA. Se resaltan en negritas las proteínas con función reportada en KOALA y estudios previos.

| ID Locus             | Nombre de la proteína en Pfam              | Nombre de la proteína en KOALA                             | Función reportada en estudios previos  |
|----------------------|--|--|--|
| AB_000588_T.1        | Sin anotación                              | cytochrome P450  | Sobrerregulado en plantas de arroz tratadas con Niquel y O <sub>3</sub> (Tammam, Badr, Abou-Zeid, Hassan, & Bader, 2019).  |
| AB_038616_T.1        | Sin anotación                              | LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase          | Relacionada con receptores LRR (receptor-like serine/threonine-protein kinase) responsables del cierre de los estomas provocado por la presencia del O <sub>3</sub> en la vía apoplástica en <i>A. thaliana</i> (Sierla et al., 2018). |
| <b>AB_005940_T.1</b> | <b>NAD dependent</b>                       | <b>dihydroflavonol 4-reductase</b>                         | <b>Gen clave para la síntesis de antocianinas que funcionan como antioxidantes, la cual está sobreexpresada en arroz tolerante a estrés abiótico (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Takahashi et al., 2006).</b><br>Sin Función              |
| AB_045013_T.1        | Sin anotación                              | Sin anotación  | Sin Función  |
| <b>AB_014935_T.1</b> | <b>BURP domain</b>                         | <b>polygalacturonase non-catalytic subunit AroGP2-like</b> | <b>Involucrado en la degradación de la pectina y la hemicelulosa ante el estrés abiótico (Le Gall et al., 2015).</b>   |
| <b>AB_039085_T.1</b> | <b>Protein tyrosine kinase Kinase-like</b> | <b>serine/threonine-protein kinase BLUS1-like</b>          | <b>Relacionado con receptores LRR (Sierla et al., 2018).</b>   |
| AB_033107_T.1        | Sin anotación                              | Sin anotación  | Sin Función  |
| AB_030539_T.1        | Sin anotación                              | Sin anotación  | Sin Función  |
| AB_044701_T.1        | Sin anotación                              | Sin anotación  | Sin Función  |
| AB_030270_T.1        | Sin anotación                              | Sin anotación  | Sin Función  |
| AB_041872_T.1        | Sin anotación                              | hypothetical protein                                       | Sin Función  |
| AB_027705_T.1        | Sin anotación                              | Sin anotación  | Sin Función  |
| <b>AB_016376_T.1</b> | <b>Phosphopantetheine attachment site</b>  | <b>Acyl carrier protein 1, chloroplast-like</b>            | <b>Importante para la composición de ácidos grasos en las hojas de las plantas (Branen, Chiou, &amp; Engeseth, 2001).</b>  |

**Cuadro 3. Genes expresados diferencialmente (detectados utilizando DESeq2) entre individuos sanos y dañados durante la temporada de contingencia (170ppb).** Se muestran genes identificados con Deseq2. Anotación del gen utilizando la base de datos de familias de proteínas (Pfam) y la anotación KOALA. Se resaltan en negritas las proteínas con función reportada en KOALA y estudios previos.

| ID Locus      | Nombre de la proteína en Pfam                                   | Nombre de la proteína en KOALA                                  | Función reportada en estudios previos  |
|---------------|---|---|--|
| AB_011671_T.1 | Response_reg:Response regulator receiver domain                 | HK5-1; hypothetical protein                                     | Sin Función  |
| AB_008969_T.1 | DUF1677: Protein of unknown function (DUF1677)                  | Sin anotación   | Sin Función  |
| AB_001118_T.1 | HMA:Heavy-metal-associated domain                               | Heavy metal-associated isoprenylated plant protein 43-like      | Importante en la respuesta de las plantas a cambios ambientales (de Abreu-Neto, Turchetto-Zolet, de Oliveira, Zanettini, & Margis-Pinheiro, 2013). |
| AB_007841_T.1 | Methyltransf_16:Lysine methyltransferase                        | Protein N-lysine methyltransferase METTL21A isoform X1          | Activado por estresores como O <sub>3</sub> y hongos en pinos (Chiron et al., 2000).   |
| AB_023831_T.1 | BAG:BAG domain IQ:IQ calmodulin-binding motif                   | BAG family molecular chaperone regulator 6                      | Asociado a respuestas a estrés y la regulación de la muerte celular (Kabbage & Dickman, 2008).   |
| AB_024445_T.1 | Sin anotación   | Sin anotación   | Sin Función  |
| AB_020879_T.1 | Sin anotación   | Hypothetical protein  | Sin Función  |
| AB_012934_T.1 | FeThRed_A:Ferredoxin thioredoxin reductase variable alpha chain | Ferredoxin-thioredoxin reductase, variable chain, chloroplastic | Regulador de reacciones redox (Balmer et al., 2006).   |
| AB_028111_T.1 | Sin anotación   | Sin anotación   | Sin Función  |
| AB_030901_T.1 | Sin anotación   | Sin anotación   | Sin Función  |
| AB_028564_T.1 | Sin anotación   | MAP kinase-activated protein kinase 2 isoform X1                | Involucrado en la señalización MAPK (Samuel, Miles, & Ellis,   |

|               |               |               |             |
|---------------|---------------|---------------|-------------|
|               |               |               | 2005).      |
| AB_014823_T.1 | Sin anotación | Sin anotación | Sin Función |
| AB_021803_T.1 | Sin anotación | Sin anotación | Sin Función |
| AB_030731_T.1 | Sin anotación | Sin anotación | Sin Función |

**Cuadro 4. Genes expresados diferencialmente (detectados utilizando edgeR y DESeq2) entre individuos sanos en fechas con concentraciones de ozono contrastantes (87ppb/170ppb).** Se muestran genes identificados tanto por edgeR como por DESeq2. Anotación del gen utilizando la base de datos de familias de proteínas (Pfam) y la anotación KOALA. Se resaltan en negritas las proteínas con función reportada en KOALA y estudios previos.

| ID Locus      | Nombre de la proteína en Pfam  | Nombre de la proteína en KOALA  | Función reportada en estudios previos  |
|---------------|--------------------------------|---|--|
| AB_043005_T.1 | CCT motif<br>B-box zinc finger | El dominio CCT participa en la transducción de señales.<br>La proteína zf-B está involucrada en la ubiquitinación y con factores de transcripción, ribonucleoproteínas y proto-oncoproteínas. Así, como en la respuesta a estrés abiótico/biótico | Zinc finger protein<br>CONSTANS-LIKE<br>16 (refs de los estudios previos; en todos los casos que no se presenta) |

**Cuadro 5. Genes expresados diferencialmente (utilizando edgeR y DESeq2) entre individuos dañados en fechas con concentraciones de ozono contrastantes (87ppb/170ppb).** Se muestran genes identificados tanto por edgeR como por DESeq2. Anotación del gen utilizando la base de datos de familias de proteínas (Pfam) y la anotación KOALA. Se resaltan en negritas las proteínas con función reportada en KOALA y estudios previos.

| ID Locus      | Nombre de la proteína en Pfam                    | Nombre de la proteína en KOALA                      | Función reportada en estudios previos   |
|---------------|--|---|---|
| AB_023740_T.1 | Xyloglucan endotransglycosylase (XET) C-terminus | Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 7 | Se ve afectado en estrés abiótico severo y altera directamente la composición de la pared celular (Le Gall et al., 2015). |
| AB_016383_T.1 | Sin anotación                                    | Transcription factor                                | Podría estar involucrado en la regulación de la transcripción.  |
| AB_008838_T.1 | UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl                | 7-deoxyloganetin glucosyltransferase-like           | Sin Función   |

|               |  |                                      |  |
|---------------|--|--------------------------------------|--|
| AB_015079_T.1 | Linker histone H1 and H5 family                      | Histone H1-like                      | Regulan la expresión génica bajo condiciones de estrés abiótico en maíz, a través de la modificación en sus sitios de lisina . |
| AB_021908_T.1 | Metallothionein                                      | Metallothionein-like protein 2       | Ha sido reportado en tejidos senescentes y se ha propuesto como un mecanismo para eliminar ROS (Chen et al., 2003).            |
| AB_012029_T.1 | Centromere kinetochore component CENP-T histone fold | Histone H4-like                      | Regulan la expresión génica bajo condiciones de estrés abiótico en maíz, a través de la modificación en sus sitios de lisina.  |
| AB_001427_T.1 | Sin anotación  | 7-deoxyloganetin glucosyltransferase | Sin Función  |
| AB_000936_T.1 | Phosphate-induced protein 1 conserved region         | Protein EXORDIUM-like 2              | Promueve el crecimiento durante una baja disponibilidad de carbono en <i>A. thaliana</i> (Schröder, Lisso, & Müssig, 2011).    |
| AB_022154_T.1 | Sin anotación  | Hypothetical protein                 | Sin Función  |

---

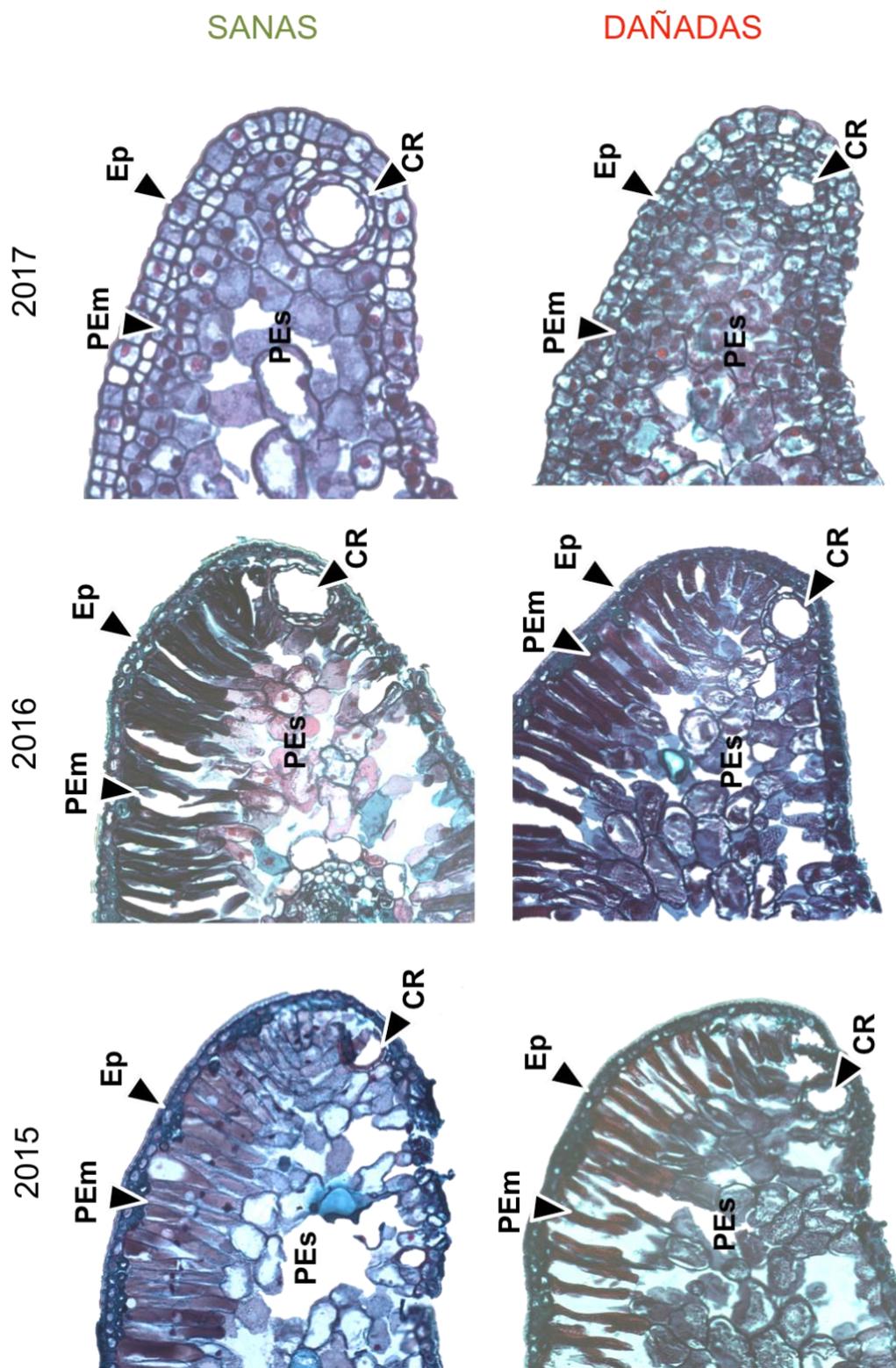
### **C. Diferencias anatómicas**

Se encontraron diferencias en el daño a nivel tisular: (i) entre árboles sanos y dañados; y (ii) entre años de crecimiento para un mismo grupo de árboles (Fig. 12-13, ANEXO 10-11). Ninguna de estas diferencias incluyó la estructura de los canales resiníferos ni del tejido vascular (CR y X-F; Fig. 12-13); ambas fueron muy similares entre individuos sanos y dañados a lo largo de los años de exposición (2015, 2016 y 2017).

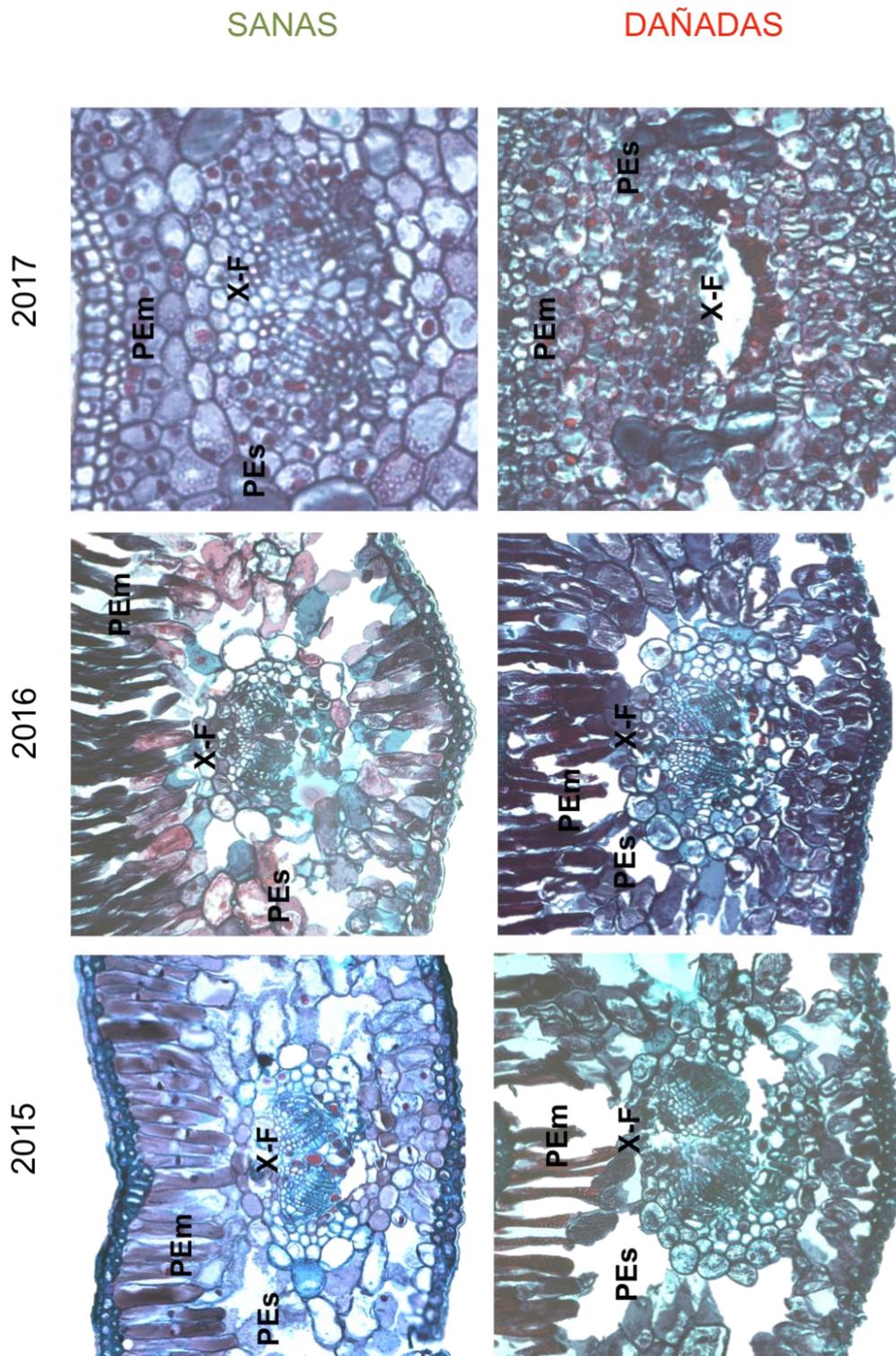
Las acículas de individuos dañados presentan un colapso celular más acentuado que las de los individuos sanos, principalmente en el parénquima en empalizada (PEm; Figura 12-13). De igual manera se aprecia un ligero daño en el parénquima esponjoso (PEs; Fig. 12-13), así como un engrosamiento de la epidermis en los individuos dañados con respecto a los sanos (Ep; Figura 12-13).

Por otro lado, los individuos sanos mostraron una mayor acumulación de cristales de oxalato durante los años anteriores al estudio (2015-2016) que los dañados (Fig. 14). Mientras que, durante el año de estudio, y coincidiendo con la apertura de las yemas (2017), no hubo diferencias entre los individuos estudiados (2017; Fig. 14).

Las secciones también muestran un incremento en el deterioro celular de los individuos dañados a lo largo de los años de crecimiento (Fig. 13). Las células de las acículas del año de estudio (2017) están menos deterioradas que las del primer año de exposición (2016), las que a su vez están más dañadas que las del segundo año de exposición (2015). El daño celular culmina en la muerte y caída de las acículas en individuos dañados tras 3 años de exposición. Ninguno de los individuos dañados en este estudio presentó acículas de más de tres años. Los individuos sanos, por otro lado, solo mostraron un leve grado de colapso celular en el primer año de exposición (2016; Fig. 13), el cual parece recuperarse durante el segundo año de exposición (2015; Fig.13).



**Figura 12. Parte distal de secciones transversales de acículas de tres edades distintas (representando tres años de exposición) en oyameles (*A. religiosa*) sanos y dañados por exposición a O<sub>3</sub>. PEm Parénquima empalizada, PES Parénquima esponjoso, CR canal resinífero, Ep Epidermis. Se aprecia un colapso celular en el PEm y engrosamiento de la Ep. Los CR no muestran diferencias a simple vista.**



**Figura 13. Parte central de las mismas secciones mostrados en la Fig. 12. PEm** Parénquima empalizada, **PEs** Parénquima esponjoso, **X-F** Xilema y Floema. El PES y X-F se mantienen similares entre los individuos sanos y dañados.

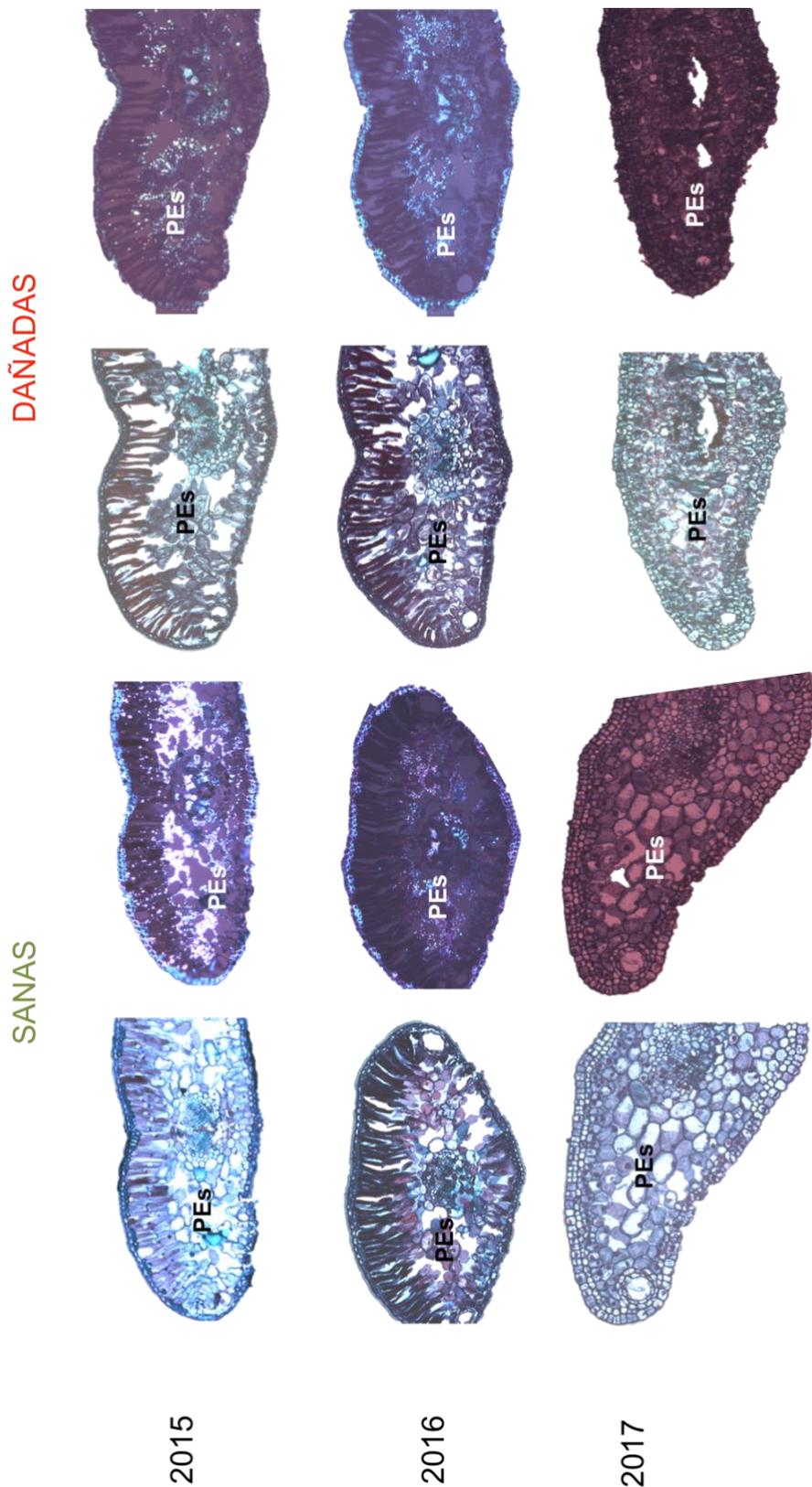


Figura 14. Coloración para observar cristales de oxalato en cortes transversales de acículas de tres edades distintas (representando tres años de exposición) en oyameles (*A. religiosa*) sanos y dañados por exposición a  $O_3$ . Los cristales se muestran como coloración azul y morado brillante. **PEs** Parénquima esponjoso. El PEs de los individuos sanos muestra una mayor presencia de cristales de oxalato de calcio que de los individuos dañados.

## D. Detección de metabolitos

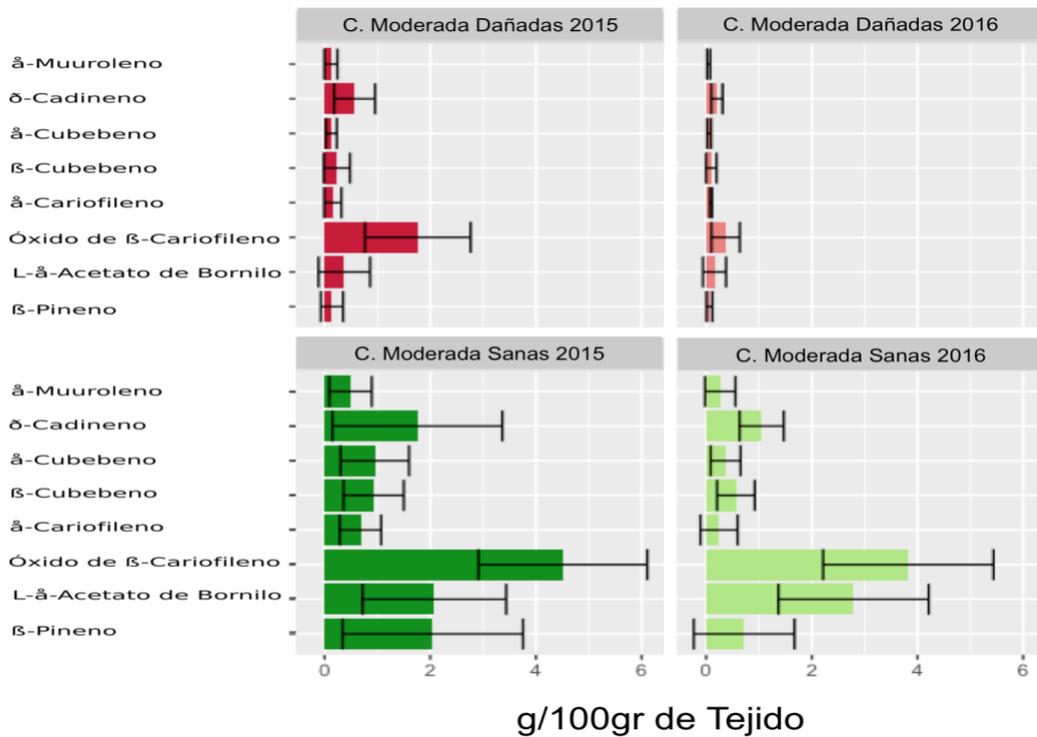
Se obtuvieron más de 100 metabolitos diferentes luego de 15 minutos de análisis en el GC-SM para las 40 muestras estudiadas, con una media de ~25 metabolitos por muestra (ANEXO 12). De estos solo se conservaron ocho después de aplicar los filtros de exclusión y de eliminar sinonimias (ANEXO 13). La mayoría de estos contenían sesquiterpenos (C<sub>15</sub>; L- $\alpha$ -Acetato de Bornilo, Óxido de  $\beta$ -Cariofileno,  $\alpha$ -Cariofileno,  $\beta$ -Cubebeno,  $\alpha$ -Cubebeno,  $\delta$ -Cadineno y  $\alpha$ -Muuroleno), aunque también se identificaron algunos monoterpenos (C<sub>10</sub>;  $\beta$ -Pineno). Los compuestos más abundantes fueron  $\beta$ -Pineno, Óxido de  $\beta$ -Cariofileno,  $\delta$ -Cadineno y L- $\alpha$ -Acetato de Bornilo (g/100g; Fig. 15). Sin embargo, los ocho metabolitos identificados presentaron menor concentración durante la temporada de contingencia (Fig.15 a-b).

Los ocho metabolitos evaluados mostraron diferencias significativas ( $p < 0.001$  o  $p < 0.01$ ) entre individuos sanos y dañados (Cuadro 7), así como entre fechas con diferentes concentraciones de O<sub>3</sub> (87ppb/170ppb; Cuadro 7). Sin embargo, no hubo diferencias significativas al considerar los años de exposición (2015, 2016, 2017; Cuadro 7). Por otro lado, todos los metabolitos fueron significativos en la interacción entre fechas con diferentes concentraciones de O<sub>3</sub> (87ppb/170ppb) y su condición (sanas y dañadas; Cuadro 7). Mientras que únicamente  $\alpha$ -Cariofileno mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre fechas con diferentes concentraciones de O<sub>3</sub> (87ppb/170ppb) y año de exposición (2015, 2016, 2017; Cuadro 7). Las interacciones entre Condición: Año exposición y Temporada: Condición:Año exposición no mostraron diferencias significativas (Cuadro 7).

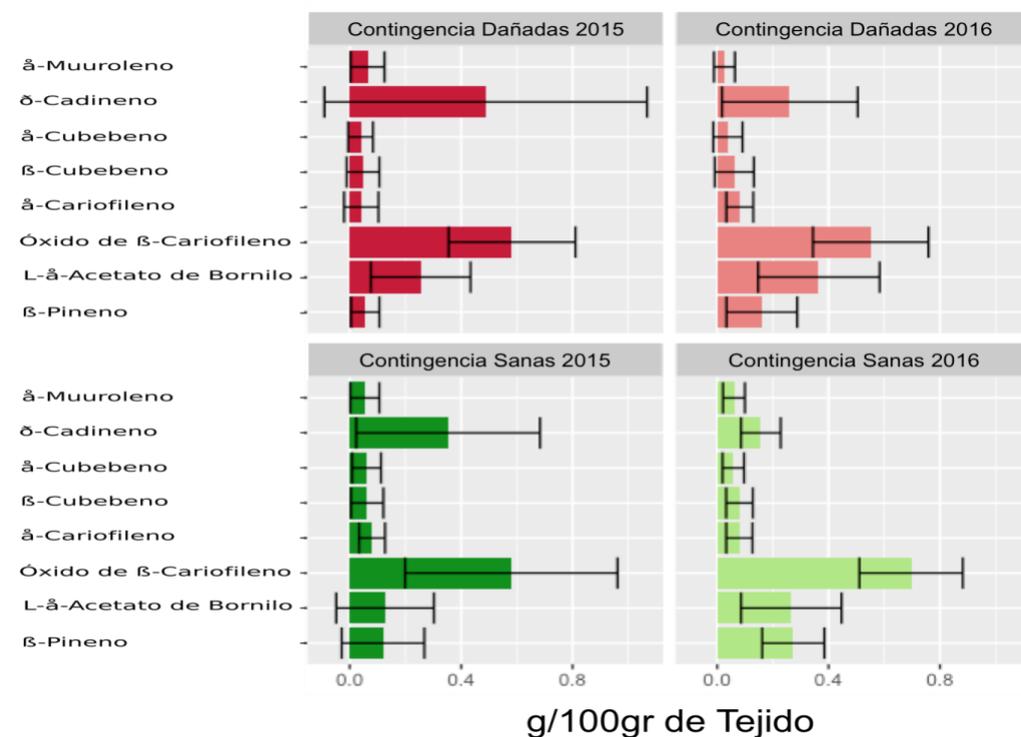
Luego de descartar a  $\beta$ -Cubebeno, cuya concentración estuvo correlacionada con la de otros compuestos y menos asociaciones al daño por O<sub>3</sub> (ANEXO 14 y Cuadro 7), se realizaron dos PCA, uno para cada temporada de exposición. El primero consideró individuos sanos y dañados durante el periodo de 87ppb de O<sub>3</sub>. Dentro de este se observa que el primer componente separa a las muestras sanas y dañadas. Así mismo, los árboles sanos y dañados se agrupan de acuerdo con la edad de las acículas (2015 y

2016: Fig. 17a). Por otro lado, en el segundo PCA, para el periodo de 170ppb de O<sub>3</sub>, no se observan grupos claramente diferenciados (Fig. 17b).

(a)



(b)

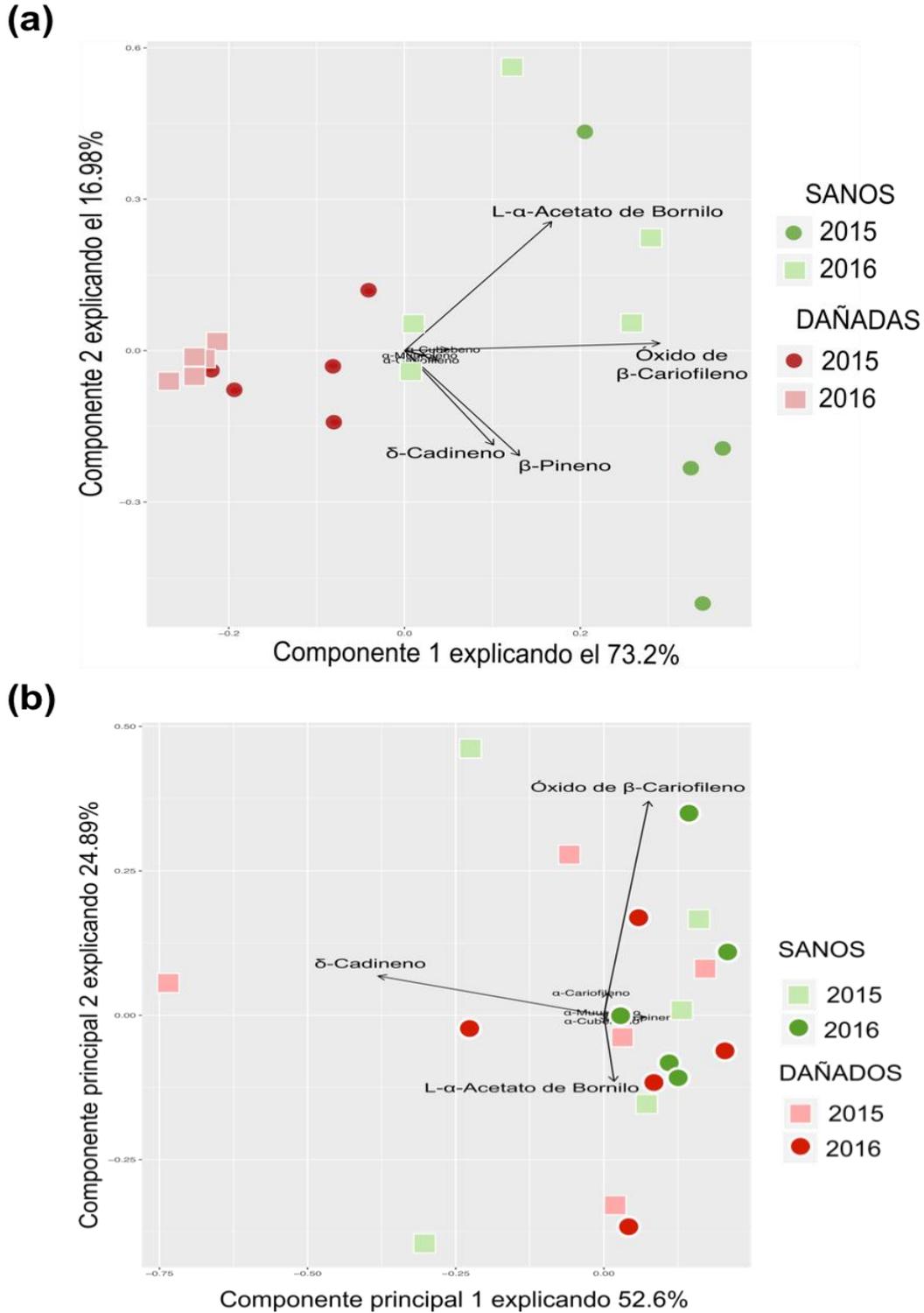


**Figura 15. Compuestos volátiles aislados en acículas de individuos de *A. religiosa* sanos y dañados por la exposición a O<sub>3</sub> Concentraciones relativas en mg/100g de peso seco en los años de exposición 2015 y 2016. (a) Temporada de concentración moderada (87ppb) y (b) Temporada de contingencia (170ppb). En rojo se señala a individuos dañados y en verde a los sanos.**

**Cuadro 7. ANOVA de tres vías para evaluar el efecto de tres tratamientos (Temporalidad, Condición, Año de exposición) en la concentración de compuestos volátiles en acículas de *A. religiosa*. Valores de significancia  $p < 0.001$  \*\*\*,  $0.01$  \*\*,  $0.05$  \*,  $0.1$  y NS No significativo.**

|                                      | <b><math>\beta</math>-Pino</b> |        |    | <b>L-<math>\alpha</math>-Acetato de Bornilo</b> |        |     | <b>Óxido de <math>\beta</math>-Cariofileno</b> |        |     | <b><math>\alpha</math>-Cariofileno</b> |        |    |
|--------------------------------------|--------------------------------|--------|----|---|--------|-----|--|--------|-----|--|--------|----|
|                                      | Mean sq                        | Fvalue | P  | Mean sq   | Fvalue | P   | Mean sq  | Fvalue | P   | Mean sq                                | Fvalue | P  |
| Temporada                            | 3.48                           | 3.48   | *  | 12.01   | 22.32  | *** | 40.60  | 49.99  | *** | 0.48                                   | 12.41  | ** |
| Condición                            | 4.70                           | 4.70   | ** | 10.55   | 19.61  | *** | 25.17  | 30.99  | *** | 0.31                                   | 8.04   | ** |
| Año exposición                       | 0.82                           | 0.82   | NS | 0.35  | 0.65   | NS  | 2.48   | 3.05   | .   | 0.13                                   | 3.34   | .  |
| Temporada: Condición                 | 3.57                           | 3.57   | *  | 13.01   | 24.18  | *** | 22.96  | 28.27  | *** | 0.25                                   | 6.46   | *  |
| Temporada: Año exposición            | 1.73                           | 1.73   | .  | 0.03  | 0.07   | NS  | 2.92   | 3.59   | .   | 0.18                                   | 4.59   | *  |
| Condición: Año exposición            | 0.90                           | 0.90   | NS | 0.572   | 1.06   | NS  | 0.46   | 0.57   | NS  | 0.10                                   | 2.69   | NS |
| Temporada: Condición: Año exposición | 1.05                           | 1.05   | NS | 0.505   | 0.93   | NS  | 0.20   | 0.24   | NS  | 0.68                                   | 1.74   | NS |

|                                      | <b><math>\beta</math>-Cubebeno</b> |        |     | <b><math>\alpha</math>-Cubebeno</b> |        |     | <b><math>\delta</math>-Cadineno</b> |        |    | <b><math>\alpha</math>-Muuroleno</b> |        |    |
|--------------------------------------|------------------------------------|--------|-----|-------------------------------------|--------|-----|-------------------------------------|--------|----|--------------------------------------|--------|----|
|                                      | Mean sq                            | Fvalue | P   | Mean sq                             | Fvalue | P   | Mean sq                             | Fvalue | P  | Mean sq                              | Fvalue | P  |
| Temporada                            | 1.54                               | 22.98  | *** | 1.06                                | 16.38  | *** | 3.36                                | 7.83   | ** | 0.32                                 | 9.64   | ** |
| Condición                            | 0.89                               | 13.31  | *** | 0.86                                | 13.31  | *** | 2.01                                | 4.68   | *  | 0.23                                 | 7.01   | *  |
| Año exposición                       | 0.13                               | 2.02   | NS  | 0.26                                | 4.07   | .   | 1.38                                | 3.23   | .  | 0.06                                 | 1.96   | NS |
| Temporada: Condición                 | 0.79                               | 11.87  | **  | 0.74                                | 11.51  | **  | 3.23                                | 7.52   | ** | 0.19                                 | 5.94   | *  |
| Temporada: Año exposición            | 0.17                               | 2.60   | NS  | 0.26                                | 4.01   | .   | 0.25                                | 0.60   | NS | 0.04                                 | 1.28   | NS |
| Condición: Año exposición            | 0.03                               | 0.47   | NS  | 0.16                                | 2.53   | NS  | 0.06                                | 0.14   | NS | 0.00                                 | 0.22   | NS |
| Temporada: Condición: Año exposición | 0.03                               | 0.49   | NS  | 0.16                                | 2.49   | NS  | 0.08                                | 0.21   | NS | 0.02                                 | 0.72   | NS |



**Figura 17. PCA para la concentración de compuestos volátiles en oyameles (*A. religiosa*) sanos y dañados por la exposición a  $O_3$  en días con concentraciones contrastantes de  $O_3$ . (a) Moderada concentración de  $O_3$  y (b) Temporada de contingencia ambiental. En rojo se señala a individuos dañados y en verde a los sanos. Los círculos representan el año de crecimiento 2015 y los cuadrados el año 2016.**

## IX. DISCUSIÓN

### **Los oyameles sanos y dañados tienen una procedencia genética local**

Utilizando 88 individuos procedentes de 19 poblaciones repartidas a lo largo de la distribución natural de *Abies religiosa* (Fig. 10; arriba Volcán Tancítaro y abajo Cofre de Perote), se encontraron cinco grupos genéticos dados por la ubicación geográfica y por un considerable aislamiento entre montañas (ANEXO 7). Lo anterior ya ha sido reportado para *A. religiosa* (Giles-Pérez, 2017; Mujica Gallart, 2013) y otros árboles de la FVTM (revisado en Mastretta-Yanes et al., 2015). Detectar el origen de los individuos en este tipo de estudios es importante dado que distintas procedencias pueden tener diversos grados de sensibilidad al O<sub>3</sub>, y nuestro sitio de estudio ha tenido múltiples intentos de reforestación con diversas procedencias de germoplasma. Las poblaciones de Cofre de Perote y Nevado de Colima se han reportado con menor sensibilidad al daño por O<sub>3</sub> troposférico, mientras que las localidades cercanas a la CDMX y el Nevado de Toluca han mostrado una mayor sensibilidad (Tejeda & Meza, 2015). Por lo tanto, existía la hipótesis de que nuestros individuos sanos provinieran de una reforestación con germoplasma de Cofre de Perote.

Nuestros resultados muestran que entre las procedencias claramente distinguibles están justamente Cofre de Perote y Nevado de Colima (Fig. 10-11). Sin embargo, nuestros análisis indican que todos los individuos de Santa Rosa Xochiac se agrupan con las poblaciones locales como Ajusco y Nevado de Toluca NT/SB (Fig. 10b-11). Es decir, nuestros datos señalan que tanto los individuos sanos como los dañados provienen del mismo grupo genético y que éste corresponde al centro de la FVTM (Nevado de Toluca, Ajusco), sin que sea posible determinar una montaña de origen, en particular dentro de este grupo (Fig. 12). Debido a que los datos apuntan a que nuestros individuos provienen de un grupo genético del centro de la FVTM, la respuesta al ozono de estar dada por mecanismos genéticos sería producto de una adaptación local a partir de variantes ancestrales (“standing genetic variation”). Lo anterior brinda una alternativa a la idea de que las

procedencias de Cofre de Perote o Nevado de Colima sean las únicas variantes tolerantes al daño por O<sub>3</sub> (Tejeda & Meza, 2015).

Altos niveles de heterocigosidad han sido asociados con mayor capacidad de respuesta inmune y tolerancia al estrés tanto en plantas (e.g. Staszak, Grulke, Marrett, & Prus-Glowacki, 2007) como en animales (e.g. Forbes, 1998). Estudios con isoenzimas han encontrado heterocigosis más altas en pinos tolerantes a daño por ozono troposférico que en aquellos susceptibles (Staszak et al., 2004). Sin embargo, la heterocigosidad de los individuos sanos y dañados no fue diferente para los 1,550 SNPs analizados (Cuadro 6). No obstante, para descartar de manera contundente que los árboles sanos y dañados no se diferencian por su nivel de heterocigosidad, es necesario analizar un mayor número de individuos y tal vez concretarse en genes específicos y en efectos locales de la respuesta al ozono (selección del heterocigoto; Rodríguez-Quilón et al., 2015).

Nuestros resultados de estructura y diversidad genética muestran que *A. religiosa* cuenta con poblaciones grandes dentro del complejo central de la FVTM que mantienen su diversidad genética. Esto es importante, ya que las respuestas evolutivas rápidas son necesarias para que las poblaciones de especies silvestres puedan lidiar con las condiciones impuestas por la contaminación humana. Por lo tanto, se espera que la adaptación ocurra cuando las poblaciones son grandes, con variabilidad genética alta, y oportunidades ecológicas para el establecimiento de los mejores genotipos en caso que haya presiones selectivas fuertes (Alberto et al., 2013), como las altas concentraciones de ozono troposférico. Tal parece ser el caso de la población de Santa Rosa Xochiac, que muestra una alta variación genética.

Además, nuestros resultados muestran que conservar la variación genética de los bosques tiene grandes implicaciones en el mantenimiento de reservorios de variación. Dicha variación favorece la capacidad de adaptación de las poblaciones ante cambios ambientales inducidos por actividades humanas, como la contaminación y el cambio climático. Existen estudios de especies en otros árboles tolerantes a O<sub>3</sub> (Li et al., 2016; Seinfeld, 1989), sin embargo, estas no son especies nativas de los bosques de la FVTM. Los bosques afectados por ozono troposférico en cercanías de la CDMX están

conformados predominantemente por oyamel, el cual es una especie que ha habitado la FVTM por lo menos durante los últimos 5 millones de años (Jaramillo-Correa et al., 2008). Además, el oyamel es un árbol relacionado con el reabastecimiento de mantos acuíferos de la CDMX y forma el ecosistema en el que habita la emblemática mariposa monarca.

**La expresión diferencial de genes del metabolismo de carbohidratos, señalización MAPK, cierre de estomas y biosíntesis de flavonoides, permite a algunos individuos tolerar el O<sub>3</sub>.**

Los individuos sanos y dañados durante el periodo de contingencia se diferencian en la expresión de genes relacionados con proteínas responsables del cierre de estomas (gen **AB\_035458\_T.1**), receptores asociados a señales de transducción ante estrés biótico/abiótico (gen **AB\_029334\_T.1**) y proteínas transmembranales involucradas en el transporte de nutrientes para el desarrollo de la planta (gen **AB\_015092\_T.1**). El que existan diferencias en la expresión de genes relacionados con la apertura y cierre de estomas es congruente con un daño diferencial por ozono entre individuos, pues estudios previos mostraron que cuando aumentan las concentraciones de ozono, un mecanismo de protección en las plantas es el cierre de los estomas (Papazian et al., 2016). El cierre estomático puede estar regulado por receptores serina/treonina (Legume lectin domain Protein tyrosine kinase), tal como lo reportan para *A. thaliana* (Sierla et al., 2018). De igual manera se ha encontrado que los receptores con dominio de lectina (L-type lectin-domain containing receptor kinase) se pueden asociar a señales de transducción ante estrés biótico y abiótico (Gilardon et al., 2011; Nishiguchi et al., 2002).

Los individuos sanos y dañados durante la contingencia se diferencian por genes que participan en la ruta de los carbohidratos y la señalización por las MAPK. La afectación de dichas rutas metabólicas ya ha sido incluida dentro de la respuesta inmediata al estrés por ozono, en plantas de tabaco (Samuel et al., 2005). Esta alteración en la vía podría además, llevar a modificar el número de enzimas, transportadores y factores de transcripción a través de la fosforilación (Morris, 2001)

Por otro lado, los individuos sanos expresaron diferencialmente solo un gen (**AB\_043005\_T.1**) entre los períodos de alta y baja concentración de ozono. Este gen carece de asociación directa a rutas metabólicas, pero se relaciona con la expresión de motivos de dedos de zinc, mismos que están relacionados con la respuesta a estrés abiótico en *O. sativa* (Davletova et al., 2005) y que son clave en la regulación transcripcional, degradación de proteínas por ubiquitinación, señales de traducción y reparación del ADN (Cassandri et al., 2017).

En cuanto a los individuos dañados, la diferencia entre concentraciones de ozono se relaciona con la expresión de genes relacionados a la síntesis de aminoácidos (**AB\_001427\_T.1**, **AB\_008838\_T.1**), la composición de la pared celular (**AB\_023740\_T.1**), la senescencia (**AB\_021908\_T.1**), el crecimiento ante baja disponibilidad de carbono (**AB\_000936\_T.1**), factores de transcripción (**AB\_016383\_T.1**) y otros reguladores de la expresión génica, como xx y zzz (**AB\_015079\_T.1** y **AB\_012029\_T.1**). Tal como muestran los resultados, estos genes se relacionan con proteínas que se expresan durante un daño severo producto de estrés abiótico (Ludwikow & Sadowski, 2008). La participación de estas proteínas puede indicar que altas concentraciones del ozono pueden alterar la composición de la pared celular (Le Gall et al., 2015), así como el crecimiento durante la baja disponibilidad de carbono; la cual sería un subproducto del cierre de los estomas arriba mencionado (Schröder et al., 2011). Además, dado que encontramos senescencia en los tejidos, podemos suponer que la diferencia a nivel de metaloproteínas es un mecanismo para eliminar especies reactivas de oxígeno (ROS) en los individuos dañados (Chen et al., 2003). Sin embargo, hasta qué punto estos mecanismos que se ponen en marcha para minimizar el daño por ozono o son una consecuencia de este, es algo que no se podrá saber hasta que se hagan diseños experimentales más específicos en condiciones controladas.

En resumen, los mecanismos relacionados con la tolerancia/susceptibilidad a O<sub>3</sub> parecen estar relacionados con receptores (**AB\_035458\_T.1**, **AB\_039085\_T.1**, **AB\_029334\_T.1**) que desencadenan la señalización MAPK (**AB\_035458\_T.1**, **AB\_028564\_T.1**), la síntesis de enzimas (**AB\_036475\_T.1**) y la degradación y un cambio en la composición

de la pared celular (**AB\_014935\_T.1**, **AB\_016376\_T.1**). Además, es probable que el cierre de los estomas (gen **AB\_029334\_T.1**) desencadene procesos de muerte celular a través de genes como **AB\_023831\_T.1**.

El hecho de que también se detectaran diferencias en la expresión de genes implicados en la respuesta a patógenos (**AB\_007841\_T.1**) podría sugerir un mecanismo secundario al daño por O<sub>3</sub> (Langebartels et al., 1998). En este las plantas estarían debilitadas por el ozono y los mecanismos de respuesta, lo que las haría más susceptibles al ataque de patógenos (Lane et al., 2016).

Si nos centramos en los genes detectados por solamente un método (DESeq2 o EdgeR) rescatamos la participación de proteínas implicadas en rutas metabólicas con relevancia biológica para lidiar con el O<sub>3</sub> (**AB\_012934\_T.1**, **AB\_001118\_T.1**, **AB\_007841\_T.1**, **AB\_014935\_T.1**, **AB\_023831\_T.1** y **AB\_016376\_T.1**). El ejemplo más notable sería la biosíntesis de flavonoides (gen **AB\_005940\_T.1**). Los flavonoides son antioxidantes importantes que actúan contra el O<sub>3</sub>, mismos que evitan el incremento de ROS celulares debido a sus propiedades antioxidantes (Mierziak, Kostyn, & Kulma, 2014).

Se han hecho múltiples estudios de expresión diferencial en respuesta al O<sub>3</sub>, estresores bióticos y patógenos en diferentes especies de plantas (e.g. Cho et al., 2008; Gupta et al., 2005; Lane et al., 2016). En particular, los genes reportados para el estrés al O<sub>3</sub> incluyen aquellos que participan en la transcripción, transducción, metabolismo, control redox, senescencia, transporte, defensa e incluso empalme alternativo de mensajeros (*alternative splicing*). Algunos de los genes detectados con expresión diferencial en este estudio (e.g. **AB\_005940\_T.1**, **AB\_011671\_T.1**, **AB\_028564\_T.1**, **AB\_021908\_T.1**, etc.) coinciden con otros reportados previamente.

Los enfoques toxicológicos tradicionales en el estudio del daño por ozono se enfocan en la variabilidad a través de factores como la edad, el genotipo y el estado de la enfermedad, tal como se realizó aquí. Sin embargo, para proporcionar una mayor explicación funcional de las redes regulatorias en respuesta al O<sub>3</sub>, la identificación de genes candidatos debe complementarse con un mayor entendimiento de la represión o inducción de su expresión en respuesta al O<sub>3</sub>. Así mismo, también podría considerarse la

caracterización del epigenoma en la regulación de la expresión de genes (McCullough et al., 2016). Tales diferencias a nivel epigenómico nos pueden indicar que la respuesta entre individuos dañados ante diferentes concentraciones de ozono afecta la traducción y transcripción de genes involucrados en la tolerancia a O<sub>3</sub> (Bellini & De Tullio, 2019). Por ejemplo, se encontraron diferencias de expresión en genes relacionados con las histonas y metiltransferasas (**AB\_015079\_T.1**, **AB\_012029\_T.1** y **AB\_007841\_T.1**). Estas últimas cambian los patrones de metilación y provocan expresión diferencial bajo condiciones de estrés abiótico (Downen et al., 2012). Por otro lado, los bajos niveles de expresión de histonas se han asociado con la predisposición a resistir estrés salino y osmótico en *A. thaliana* (Asensi-Fabado, Amtmann, & Perrella, 2017; Zhao et al., 2014). Por tal motivo deberían considerarse estudios toxico-epigenéticos que se enfoquen en la memoria adquirida por las plantas ante la presencia de O<sub>3</sub>, así como el progreso del daño en los árboles expuestos (Crisp, Ganguly, Eichten, Borevitz, & Pogson, 2016) o si se ven afectados otros factores con la edad como la tasas de mutación somática en individuos expuestos (sanos y dañados).

Los genes candidatos aquí reportados deberán explorarse a través de sus interacciones con otros genes, con variables ambientales, así como con la presencia de patógenos. Así mismo, se puede correlacionar la expresión de estos genes candidatos con la presencia de polimorfismos dentro de los mismos de sus regiones reguladoras y con la condición de las plantas (sanas/dañadas) y de la concentración de ozono troposférico (87ppb/170ppb).

### **El daño por O<sub>3</sub> está relacionado al colapso celular, el daño a nivel de parénquima y la ausencia de cristales de oxalato**

Si bien a simple vista los árboles en la zona de estudio pueden clasificarse en sanos y dañados, se encontraron pequeños daños a nivel tisular en algunos árboles con apariencia de estar sanos. Sin embargo, parece que la actividad celular de estos individuos se mantiene, ya que su estructura celular permaneció casi intacta. Este ligero daño en árboles sanos indica que el

estrés producido por el O<sub>3</sub> afecta a los árboles sanos, pero se mitiga de mejor manera en los árboles sanos que en los dañados. No obstante, el daño encontrado en algunas acículas de árboles sanos podría implicar que existe un gradiente de tolerancia al O<sub>3</sub>. Dicho de otra manera, existen árboles completamente sanos y otros que parecieran tener acículas asintomáticas, sin embargo, estas presentan daños a nivel tisular (Evans & Fitzgerald, 1993) ligeramente menores que árboles con acículas sintomáticas.

Las diferencias en la cutícula y los canales resiníferos entre los individuos no fueron obvias, como si lo fue el daño en el parénquima en empalizada (Fig. 12-13). En estudios con pinos se han reportado daños significativos asociados a la exposición de O<sub>3</sub> en otras partes de la hoja, como la cutícula (Reig-Armiñana et al., 2004) y los canales resiníferos. Esto puede deberse a que (i) *A. religiosa* posee mayor tolerancia al estrés por ozono con respecto a los pinos o (ii) que es más difícil detectar cambios en estas secciones en individuos expuestos a las mismas concentraciones de ozono, pues se requieren mediciones finas y análisis cuantitativos, los cuales podrían hacerse con un diseño experimental para su monitoreo.

Por otro lado, se encontraron diferencias a nivel de la epidermis, cuyo engrosamiento se enfatiza en los individuos dañados. El daño visible (Fig. 12-13) se atribuye a agentes oxidantes que actúan sobre la lámina media de las células y promueven su degradación; esta oxidación provoca que las células se separen y comiencen a deformarse cuando se altera la celulosa de la pared primaria (Lázaro-Gimeno & Ibars, 2009). A partir de la degradación de la pared se favorecería una mayor cantidad de espacios intercelulares en árboles dañados en comparación con el tejido de los individuos sanos. El daño en el parénquima en empalizada se caracteriza además por una coloración rojiza que hemos asociado a una alta presencia de sustancias de naturaleza fenólica, afines a la tinción con safranina (Fig. 12-13). La acumulación de compuestos fenólicos inducidos por exposición a O<sub>3</sub> no es nueva para las coníferas, en las cuales se le ha asociado a la necrosis (Howell & Kremer, 1973).

Otro tejido susceptible a cambios por efecto del O<sub>3</sub> es el parénquima esponjoso, este contenía una mayor proporción de cristales en los árboles sanos que en los dañados. Esto puede indicar una actividad metabólica

diferencial que permite a los árboles sanos responder mejor al estrés inducido por el O<sub>3</sub>. La presencia de cristales de oxalato está ligada a la síntesis de ácido ascórbico, el cual se incrementa como respuesta al estrés oxidativo, ya que actúa como mecanismo de protección ante dicho estrés (Fink, 1991).

De igual manera la presencia de cristales se ha asociado a una mayor asimilación fotosintética, debido a que los cristales de oxalato de calcio pueden servir como reservorio de carbono mientras los estomas se mantienen cerrados debido a estresores abióticos (Tooulakou et al., 2016). Además de lo anterior, se sabe que la resistencia a herbivoría (He, Bleby, Veneklaas, Lambers, & Kuo, 2012) y la desintoxicación de metales pesados (Jáuregui-Zúñiga, Ferrer, Calderón, Muñoz, & Moreno, 2005) también están relacionados con la presencia de estos cristales. Lo anterior concuerda con las diferencias en los metabolitos encontrados entre cada grupo de árboles (ver sección siguiente).

Finalmente, las diferencias entre años de crecimiento muestran que el deterioro celular se incrementa con la edad de las hojas (Fig. 12-13). Nuestros datos muestran que el daño por ozono inicia a nivel tisular al menos en los primeros 30 días de exposición en las hojas más jóvenes (secciones de acículas recién emergidas de la yema en 2017; Fig.12-13). Esto es similar a lo reportado para pinos en donde se observaron daños a nivel tisular a partir del quinto día de exposición y daños visibles desde la segunda semana (Evans & Miller, 1972). Lo anterior reforzaría la idea de que los pinos pueden ser más susceptibles que *A. religiosa*, por lo cual no vemos daños histológicos similares en la cutícula y canales resiníferos en ambas especies.

Los daños visibles en las acículas se enfatizan hasta el segundo año de exposición, quizá porque la planta no posee mecanismos para evitar el efecto acumulado del O<sub>3</sub> (Langebartels et al., 1998). El daño culmina en la muerte y desprendimiento de las acículas en individuos dañados después de tres años de exposición. Al no contar con los mecanismos para evitar el daño, se promueve la degradación de la lámina media y posteriormente el citoplasma, generando espacios donde las células deberían formar un mosaico (Lázaro-Gimeno & Ibars, 2009). Esto indicaría que una vez iniciado, el daño es irreversible, lo que concuerda con estudios de procedencias, que

determinaron que el tiempo de exposición agrava los daños en el follaje de mayor edad en los oyameles (Alvarez et al., 1998; Tejeda & Meza, 2015).

### **La concentración de $\beta$ -Pineno en individuos sanos concuerda con la fase de recuperación del tejido posterior al estrés por O<sub>3</sub>.**

En las coníferas, los terpenos se encuentran en una mezcla llamada oleorresina formada por una fracción trementina (volátil, incluye monoterpenos y sesquiterpenos) y una fracción colofonia (no volátil, formada por diterpenos (Phillips & Croteau, 1999). La oleorresina se acumula en los conductos resiníferos de los tallos y acículas de la planta (Wu & Hu, 1997). Nuestros resultados no muestran diferencias anatómicas claras en los canales resiníferos que puedan indicar una mayor acumulación de metabolitos (Fig.12). De igual manera, nuestros análisis detectaron mayor número de sesquiterpenos (C<sub>15</sub>; siete diferentes) que de monoterpenos (C<sub>10</sub>; uno) en individuos, sanos y dañados. El aumento de estos compuestos después de la exposición a O<sub>3</sub> concuerda con lo encontrado en clones de álamo híbrido (*Populus deltoides x maximowiczii*) (exposición a 80 nmol mol<sup>-1</sup> O<sub>3</sub> durante 5hr/día; Pellegrini et al., 2012) y en individuos de *Eucalyptus globulus* expuestos a O<sub>3</sub> (Kanagendran, Pazouki, & Niinemets, 2018). Estas observaciones son interesantes, ya que los sesquiterpenos reaccionan con las especies reactivas de oxígeno (ROS) y se sabe que incrementan ante la presencia de estrés abiótico (Vickers, Gershenzon, Lerdau, & Loreto, 2009).

Los ocho metabolitos detectados en la mayoría de muestras ya han sido reportados con diferencias en árboles expuestos a diferentes concentraciones de O<sub>3</sub> (Kanagendran et al., 2018). La producción de compuestos metabólicos, tal como los volátiles, pueden remover los ROS antes de que causen daños severos en las células (Loreto & Fares, 2007). Esto concuerda con nuestros resultados, ya que obtuvimos mayores concentraciones de metabolitos en individuos sanos en comparación con los dañados. Sin embargo, no todas las comparaciones de los metabolitos entre condición, temporada y año de crecimiento muestran valores significativos (Cuadro 7). Posiblemente esto se debe a que todos los árboles analizados fueron expuestos a O<sub>3</sub> y no teníamos un control negativo.

La comparación entre grupos indica que la temporada y la condición son las variables más relacionadas para explicar los valores de los ocho metabolitos ( $p < 0.001$  y  $p < 0.01$ ; Cuadro 7). En particular  $\delta$ -Cadineno, Óxido de  $\beta$ -Cariofileno, L- $\alpha$ -Acetato de Bornilo y  $\beta$ -Pineno (Fig. 15) tuvieron mayor abundancia (Fig. 15). Anteriormente  $\delta$ -Cadineno se ha relacionado con funciones antioxidantes (Kundu et al., 2013) y larvicidas (Govindarajan, Rajeswary, & Benelli, 2016). De igual manera el Óxido de  $\beta$ -Cariofileno es un metabolito producido por las plantas para inhibir el ataque de insectos (Ortiz et al., 2017). Dado lo anterior podemos suponer que los individuos sanos tienen mecanismos que los hacen menos susceptibles al daño por estrés biótico y abiótico.

De igual manera, los individuos sanos produjeron mayor cantidad de  $\beta$ -Pineno en comparación con los dañados en ambas temporadas (Fig. 15a-b). Dicho aumento de  $\beta$ -Pineno se ha relacionado con la estimulación de mecanismos antioxidantes inducidos por estrés a  $O_3$  en *Quercus index* (Loreto et al., 2004). Además  $\beta$ -Pineno pertenece al grupo de monoterpenos, mismos que pueden favorecer la resistencia ante el  $O_3$  (Pellegrini et al., 2012). Así mismo, existen diferencias significativas de  $\alpha$ -Muuroleno, lo cual al igual que  $\beta$ -Pineno previamente se ha relacionado con la fase de recuperación de la planta después de inducirse a altas concentraciones de  $O_3$  en *Nicotiana tabacum* (Kanagendran, Pazouki, & Niinemets, 2018).

En nuestro sitio de muestreo es común que los niveles de  $O_3$  sean altos (Alvarado-Rosales et al., 2017), rebasando las 100 ppb la mayor parte del año (SEDEMA, 2018). Así mismo, se sabe que el efecto perjudicial del  $O_3$  a 150 ppb depende de la estructura química de los compuestos. Por lo tanto, los terpenoides saturados como el L- $\alpha$ -Acetato de Bornilo no se ven igualmente afectados por el  $O_3$  que los terpenos con doble enlace C-C (pinenos) o aquellos con más de dobles enlaces (cariofilenos) (Calogirou et al., 1996). Debido a lo anterior es posible que la detección de los compuestos por el GC-MS se haya visto influenciada por la degradación de algunos metabolitos durante la exposición de las plantas al  $O_3$ . De manera similar con otras plantas en dónde se ha demostrado que el  $O_3$  induce y reduce las emisiones volátiles en diferentes especies dependiendo de la gravedad y la duración de la exposición (Calfapietra et al., 2013). En nuestros resultados

los metabolitos que pudieron identificarse nos indican diferencias entre individuos sanos y dañados, así como indicios de mecanismos antioxidantes en árboles sanos antes y después de un periodo de contingencia ambiental.

## X. CONCLUSIONES

A partir de nuestra investigación se concluye que los niveles de O<sub>3</sub> que llegan a los bosques de oyamel en las afueras de la CDMX siguen siendo un problema para el establecimiento exitoso de individuos jóvenes, aunque los niveles de O<sub>3</sub> hayan bajado drásticamente con respecto a los reportados de hace 30 años. A nivel transcriptómico un ensamble *de novo* nos permitiría rescatar información propia de *A. religiosa*, no obstante, el mapeo de las lecturas sobre el genoma de *A. balsamea* nos permitió recuperar información útil sobre afectaciones por O<sub>3</sub> en genes y rutas metabólicas de *A. religiosa*.

Nuestros resultados indican que existen individuos de la misma población que pueden tolerar el O<sub>3</sub>, a través de la expresión diferencial de ciertos genes. Estos genes se asocian con el metabolismo de los carbohidratos, la señalización MAPK y la biosíntesis de flavonoides, los cuales afectan la respuesta inmune, el cierre de los estomas y la producción de antioxidantes, que en su conjunto son mecanismos para disminuir el daño celular. Los individuos dañados mostraron colapso celular severo en el parénquima en empalizada y un incremento en el contenido fenólico en comparación a los individuos sanos. De igual manera, el daño observado en las acículas concuerda con el tiempo de exposición. Es decir, las acículas más viejas mostraban daños más pronunciados que las más jóvenes. A nivel de metabolitos  $\delta$ -Cadineno y Óxido de  $\beta$ -Cariofileno en árboles sanos nos indican posibles mecanismos para evadir el estrés biótico. Por el contrario,  $\beta$ -Pineno en árboles sanos nos indica mecanismos que les permiten sobreponerse a periodos de exposición a O<sub>3</sub>. Lo anterior concuerda con estudios previos donde  $\beta$ -Pineno se asocia con la fase de recuperación del tejido posterior a una exposición a O<sub>3</sub>. Sin embargo, cabe anotar que existen grados de sensibilidad en individuos sanos que a simple vista parecen no

presentar daño. Esto indicaría un gradiente de tolerancia diferencial dentro de la población analizada.

Todos los individuos tolerantes al O<sub>3</sub> analizados fueron de origen local (comunidad de Santa Rosa Xochiac), según lo muestran nuestros análisis genético-poblacionales. Esto resalta la importancia de mantener la variación genética dentro de las poblaciones en especies forestales, pues ésta puede ser fuente de nuevas adaptaciones locales ante nuevas presiones selectivas (incluyendo aquellas derivadas de la urbanización).

## XI. PERSPECTIVAS

Los genes identificados en este estudio se proponen como genes candidatos a la tolerancia al O<sub>3</sub>, ya que se encontraron diferencialmente expresados en individuos sanos y dañados bajo dos concentraciones de ozono y durante dos años de exposición, sin embargo, queda pendiente (i) describir los patrones de expresión ante diferentes intensidades de daño asociadas al tiempo de exposición (años de crecimiento de las hojas), ya que a nivel histológico/metabólico encontramos diferencias en los años de exposición y (ii) describir los patrones de expresión dados en diferentes grados de tolerancia de acuerdo a la concentración a la que están siendo expuestos los árboles. Para ello es importante clasificar las hojas por años de exposición y trabajarlas de manera separada en los análisis de expresión, así como registrar mediciones de las concentraciones de ozono *in situ*.

*A priori* nuestro estudio considera al O<sub>3</sub> como la principal causa del daño en los árboles, lo cual desencadena en la susceptibilidad de estos para ser atacados por otros estresores. De igual manera consideramos importante describir y cuantificar las diferencias en cambios bióticos (parásitos, hongos) y abióticos (suelo, cantidad de luz/sombra, conductancia estomática, tasa fotosintética, transpiración) que nos proporcionen información útil de las interacciones que se están llevando a cabo en un bosque altamente expuesto a O<sub>3</sub>. Para evaluar cambios bióticos se proponen estudios de *metabarcoding* dirigidos a las acículas y raíces de los individuos expuestos. Mientras que,

para analizar los cambios abióticos se proponen principalmente mediciones en las concentraciones de nutrientes en el suelo y cuantificación de clorofilas.

Una ruta metabólica importante para considerar en futuros estudios es la relacionada con la biosíntesis de flavonoides ya que, a diferencia de los terpenos, nuestros análisis de expresión diferencial indican que los flavonoides son clave para diferenciar individuos sanos y dañados. La cantidad de tejido foliar obtenida en este estudio fue insuficiente para medir la concentración de flavonoides (además de requerirse un largo periodo de estandarización). Sin embargo, analizar la vía metabólica de flavonoides en estudios posteriores podría complementar el conocimiento de los mecanismos de tolerancia a O<sub>3</sub>.

Así mismo, aún existen relaciones fisiológicas en la respuesta ante el O<sub>3</sub> que no han sido caracterizadas (Ludwikow & Sadowski, 2008). Sin embargo, identificar genes candidatos en *A. religiosa*, como se realizó en este trabajo, contribuye a entender las rutas de regulación relacionadas con la tolerancia al O<sub>3</sub> en coníferas bajo condiciones naturales, ya que la mayoría de los estudios anteriores se han realizado en cultivos anuales, así como especies modelo bajo condiciones experimentales.

Los genes que mostraron expresión diferencial aún están bajo análisis para detectar SNPs dentro de las secuencias de cada individuo. Si dichas variantes existen sería posible incluirlas en un chip, con el propósito de seleccionar eficazmente individuos tolerantes al daño por O<sub>3</sub>. La detección de individuos a través de chips permitirá dirigir los planes de reforestación a árboles madre e hijos específicos que faciliten la recuperación de sitios con alta incidencia de contaminación. Lo anterior requiere de un monitoreo de los árboles tolerantes identificados, para evitar cuellos de botella que disminuyan la variabilidad genética de los bosques y poder enfrentar otros estresores bióticos o abiótico.

Es conveniente contemplar estudios poblaciones para evaluar mejor la correlación entre la heterocigosis global de los individuos y la tolerancia al ozono. Este mismo tipo de muestreo permitirá además identificar posibles polimorfismos adaptativos en los genes candidatos y evaluar su distribución espacial en la población. Para comprender patrones de diferenciación adaptativa o plasticidad fenotípica es necesario realizar experimentos con

trasplantes recíprocos. Dichos experimentos requieren controlar el origen del germoplasma, así como los periodos de exposición y las concentraciones de O<sub>3</sub>. De igual manera debe considerarse la medición de caracteres cuantitativos, ya que pueden brindar una medida directa de la variabilidad genética aditiva y por consiguiente el potencial adaptativo de los individuos tolerantes.

Los resultados de este proyecto son el primer paso para desarrollar planes de “reforestación dirigida a la tolerancia al O<sub>3</sub>”. Dada la continua exposición al O<sub>3</sub> y el historial de incendios que han diezmando los bosques del Desierto de los Leones y el pueblo de Santa Rosa Xochiac, estos son lugares que se beneficiarían ampliamente de este tipo de reforestaciones. Nuestros resultados también son útiles a nivel mundial, pues el cambio ambiental causado por actividades humanas es un problema global que ha desencadenado investigaciones sobre impacto que tiene el O<sub>3</sub> en bosques periurbanos. Sin embargo, los bosques afectados por O<sub>3</sub> también interactúan con otros contaminantes, periodos de exposición, precipitación, temperatura, nutrientes del suelo y patógenos que pueden modificar los involucrados en la tolerancia a la contaminación en cada sitio y especie forestal. Por consiguiente, para que las reforestaciones dirigidas a la tolerancia de O<sub>3</sub> en la periferia de la CDMX se conviertan en una realidad, aún es necesario expandir la presente investigación.

Estudios como el presente deben realizarse en colaboración con las comunidades que están siendo afectadas directamente (Santa Rosa Xochiac y aledañas), así como de medios de comunicación (prensa, redes sociales, radio) que nos permitan la difusión del problema a la ciudadanía y el gobierno. Solamente a través del reconocimiento de la problemática y de las propuestas basadas en estudios como este será posible cambiar las políticas públicas alrededor de los planes de reforestación en la periferia de ciudades contaminadas. Así mismo, se debe concientizar que favorecer una rápida adaptación a un entorno contaminado a través de reforestaciones tolerantes a O<sub>3</sub> no sustituye las medidas para reducir la contaminación, tal como evitar la quema y tala desmedida, el uso de productos contaminantes (aerosoles, plaguicidas) y reducir los medios de transporte privado que utilizan la quema de combustibles.

La comunidad de Santa Rosa Xochiac es un sitio ideal para implementar nuestra propuesta de reforestación, ya que se encontraron indicios de variantes sanas y dañadas propias del lugar. Además, la comunidad posee información de los intentos de reforestaciones, registro de incendios y plagas, así como de la infraestructura de un vivero con diferentes procedencias de semillas. Dicha información facilita implementar planes de manejo primero en esta comunidad, misma que manifiesta su interés de continuar colaborando con nosotros para profundizar en nuestra investigación y atender sus problemáticas de reforestación.

## XII. REFERENCIAS

- Aguirre-Planter, E., Furnier, G. R., & Eguiarte, L. E. (2000). Low levels of genetic variation within and high levels of genetic differentiation among populations of species of *Abies* from southern Mexico and Guatemala. *American Journal of Botany*, 87(3), 362–371.
- Alberto, F. J., Aitken, S. N., Alía, R., González-Martínez, S. C., Hänninen, H., Kremer, A., ... Savolainen, O. (2013). Potential for evolutionary responses to climate change - evidence from tree populations. *Global Change Biology*, 19(6), 1645–1661. doi: 10.1111/gcb.12181
- Alexander, D. H., Novembre, J., & Lange, K. (2009). Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Research*, 19(9), 1655–1664. doi: 10.1101/gr.094052.109
- Alvarado R, D., De Bauer, L. I., & Galindo A, J. (1993). Decline of sacred fir (*Abies religiosa*) in a forest park south of Mexico City. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 80(2), 115–121.
- Alvarado-Rosales, D., & Hernández-Tejeda, T. (2002). Decline of Sacred Fir in the Desierto de los Leones National Park. In M. E. Fenn, L. I. de Bauer, & T. Hernández-Tejeda (Eds.), *Urban Air Pollution and Forests* (pp. 243–260). doi: 10.1007/978-0-387-22520-3\_10
- Alvarado-Rosales, D., Saavedra-Romero, L. de L., Hernández-Tejeda, T., Cox, R. W., & Malcolm, John. W. (2017). *Ozone concentrations in situ in the Mexico City basin forests and influence of elevation*. 8(44)).
- Alvarez, D., Laguna, G., & Rosas, I. (1998). Macroscopic and microscopic symptoms in *Abies religiosa* exposed to ozone in a forest near Mexico City. *Environmental Pollution*, 103(2–3), 251–259. doi: 10.1016/S0269-7491(98)00113-4

- Asensi-Fabado, M.-A., Amtmann, A., & Perrella, G. (2017). Plant responses to abiotic stress: The chromatin context of transcriptional regulation. *Biochimica Et Biophysica Acta. Gene Regulatory Mechanisms*, 1860(1), 106–122. doi: 10.1016/j.bbagr.2016.07.015
- Ashmore, M. R. (2005). Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. *Plant, Cell & Environment*, 28(8), 949–964. doi: 10.1111/j.1365-3040.2005.01341.x
- Balmer, Y., Vensel, W. H., Cai, N., Manieri, W., Schürmann, P., Hurkman, W. J., & Buchanan, B. B. (2006). A complete ferredoxin/thioredoxin system regulates fundamental processes in amyloplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), 2988–2993. doi: 10.1073/pnas.0511040103
- Bellini, E., & De Tullio, M. C. (2019). Ascorbic Acid and Ozone: Novel Perspectives to Explain an Elusive Relationship. *Plants (Basel, Switzerland)*, 8(5). doi: 10.3390/plants8050122
- Benjamini, Y., Drai, D., Elmer, G., Kafkafi, N., & Golani, I. (2001). Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behavioural Brain Research*, 125(1–2), 279–284.
- Berrang, P., Karnosky, D. F., & Bennett, J. P. (1991). *Natural selection for ozone tolerance in Populus tremuloides: an evaluation of nationwide trends*. 21(7), 1091–1097.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
- Branen, J. K., Chiou, T. J., & Engeseth, N. J. (2001). Overexpression of acyl carrier protein-1 alters fatty acid composition of leaf tissue in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 127(1), 222–229. doi: 10.1104/pp.127.1.222
- Calfapietra, C., Fares, S., Manes, F., Morani, A., Sgrigna, G., & Loreto, F. (2013). Role of Biogenic Volatile Organic Compounds (BVOC) emitted by urban trees on ozone concentration in cities: a review. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 183, 71–80. doi: 10.1016/j.envpol.2013.03.012
- Calogirou, A., Larsen, B. R., Brussol, C., Duane, M., & Kotzias, D. (1996). *Decomposition of terpenes by ozone during sampling on Tenax*. 68(9), 1499–1506.
- Cassandri, M., Smirnov, A., Novelli, F., Pitolli, C., Agostini, M., Malewicz, M., ... Raschellà, G. (2017). Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discovery*, 3, 17071. doi: 10.1038/cddiscovery.2017.71

- Castillejos, M., Gold, D. R., Damokosh, A. I., Serrano, P., Allen, G., McDonnell, W. F., ... Hayes, C. (1995). Acute effects of ozone on the pulmonary function of exercising schoolchildren from Mexico City. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *152*(5 Pt 1), 1501–1507. doi: 10.1164/ajrccm.152.5.7582284
- Chen, H.-J., Hou, W.-C., Yang, C.-Y., Huang, D.-J., Liu, J.-S., & Lin, Y.-H. (2003). Molecular cloning of two metallothionein-like protein genes with differential expression patterns from sweet potato (*Ipomoea batatas*) leaves. *Journal of Plant Physiology*, *160*(5), 547–555. doi: 10.1078/0176-1617-01040
- Chiron, H., Drouet, A., Claudot, A.-C., Eckerskorn, C., Trost, M., Heller, W., ... Sandermann, H. (2000). Molecular cloning and functional expression of a stress-induced multifunctional O-methyltransferase with pinosylvil methyltransferase activity from Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant Molecular Biology*, *44*(6), 733–745. doi: 10.1023/A:1026507707186
- Cho, K., Shibato, J., Agrawal, G. K., Jung, Y.-H., Kubo, A., Jwa, N.-S., ... Rakwal, R. (2008). Integrated transcriptomics, proteomics, and metabolomics analyses to survey ozone responses in the leaves of rice seedling. *Journal of Proteome Research*, *7*(7), 2980–2998. doi: 10.1021/pr800128q
- Cho, K., Tiwari, S., Agrawal, S. B., Torres, N. L., Agrawal, M., Sarkar, A., ... Rakwal, R. (2011). Tropospheric Ozone and Plants: Absorption, Responses, and Consequences. In D. M. Whitacre (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 212* (pp. 61–111). doi: 10.1007/978-1-4419-8453-1\_3
- Churkina, G., Kuik, F., Bonn, B., Lauer, A., Grote, R., Tomiak, K., & Butler, T. M. (2017). Effect of VOC Emissions from Vegetation on Air Quality in Berlin during a Heatwave. *Environmental Science & Technology*, *51*(11), 6120–6130. doi: 10.1021/acs.est.6b06514
- Crisp, P. A., Ganguly, D., Eichten, S. R., Borevitz, J. O., & Pogson, B. J. (2016). Reconsidering plant memory: Intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. *Science Advances*, *2*(2), e1501340. doi: 10.1126/sciadv.1501340
- Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C. A., Banks, E., DePristo, M. A., ... 1000 Genomes Project Analysis Group. (2011). The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *27*(15), 2156–2158. doi: 10.1093/bioinformatics/btr330
- Davletova, S., Schlauch, K., Coutu, J., & Mittler, R. (2005). The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *139*(2), 847–856. doi: 10.1104/pp.105.068254

- de Bauer, M. de L., & Hernández-Tejeda, T. (2007). A review of ozone-induced effects on the forests of central Mexico. *Environmental Pollution*, 147(3), 446–453. doi: 10.1016/j.envpol.2006.12.020
- Downen, R. H., Pelizzola, M., Schmitz, R. J., Lister, R., Downen, J. M., Nery, J. R., ... Ecker, J. R. (2012). Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(32), E2183-2191. doi: 10.1073/pnas.1209329109
- Eaton, D. A. R. (2014). PyRAD: assembly of de novo RADseq loci for phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, 30(13), 1844–1849. doi: 10.1093/bioinformatics/btu121
- Ebi, K. L., & McGregor, G. (2008). Climate change, tropospheric ozone and particulate matter, and health impacts. *Environmental Health Perspectives*, 116(11), 1449–1455. doi: 10.1289/ehp.11463
- Escamilla-Núñez, M.-C., Barraza-Villarreal, A., Hernandez-Cadena, L., Moreno-Macias, H., Ramirez-Aguilar, M., Sienra-Monge, J.-J., ... Romieu, I. (2008). Traffic-related air pollution and respiratory symptoms among asthmatic children, resident in Mexico City: the EVA cohort study. *Respiratory Research*, 9(1), 74. doi: 10.1186/1465-9921-9-74
- Evans, L. S., & Fitzgerald, G. A. (1993). HISTOLOGICAL EFFECTS OF OZONE ON SLASH PINE (*PINUS ELLIO TTI* VAR. *DENSA*). 33(4), 505–513.
- Evans, L. S., & Miller, P. R. (1972). Ozone damage to Ponderosa pine: A histological and histochemical appraisal. 59(3), 297–304.
- Felzer, B. S., Cronin, T., Reilly, J. M., Melillo, J. M., & Wang, X. (2007). Impacts of ozone on trees and crops. 339, 784–798.
- Fink, S. (1991). Unusual patterns in the distribution of calcium oxalate in spruce needles and their possible relationships to the impact of pollutants. 119, 41–51.
- Finlayson-Pitts, B. J., & Pitts Jr., J. N. (1993). *Atmospheric Chemistry of Tropospheric Ozone Formation: Scientific and Regulatory Implications*. 43(8), 1091–2100. doi: 10.1080/1073161X.1993.10467187
- Forbes, V. E. (1998). *Genetics And Ecotoxicology*. CRC Press.
- Gilardoni, P. A., Hettenhausen, C., Baldwin, I. T., & Bonaventure, G. (2011). *Nicotiana attenuata* LECTIN RECEPTOR KINASE1 suppresses the insect-mediated inhibition of induced defense responses during *Manduca sexta* herbivory. *The Plant Cell*, 23(9), 3512–3532. doi: 10.1105/tpc.111.088229

- Giles-Pérez, G. I. (2017). *Estructura genética y divergencia de dos especies de oyamel (Abies religiosa) en la faja volcánica transmexicana* (Maestría en Ciencias Biológicas). Universidad Nacional Autónoma de México, México, CDMX.
- Govindarajan, M., Rajeswary, M., & Benelli, G. (2016).  $\delta$ -Cadinene, Calarene and  $\delta$ -4-Carene from *Kadsura heteroclita* Essential Oil as Novel Larvicides Against Malaria, Dengue and Filariasis Mosquitoes. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 19(7), 565–571. doi: 10.2174/1386207319666160506123520
- Gupta, P., Duplessis, S., White, H., Karnosky, D. F., Martin, F., & Podila, G. K. (2005). Gene expression patterns of trembling aspen trees following long-term exposure to interacting elevated CO<sub>2</sub> and tropospheric O<sub>3</sub>. *The New Phytologist*, 167(1), 129–141. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01422.x
- He, H., Bleby, T. M., Veneklaas, E. J., Lambers, H., & Kuo, J. (2012). Morphologies and elemental compositions of calcium crystals in phyllodes and branchlets of *Acacia roborum* (Leguminosae: Mimosoideae). *Annals of Botany*, 109(5), 887–896. doi: 10.1093/aob/mcs004
- Hijmans, R., Williams, E., & Vennes, C. (2011). *Package "geosphere."* Retrieved from <http://cran.r-project.org/web/packages/geosphere/>.
- Holguín, F., Tellez-Rojo, M., Hernández, M., Cortez, M., Chow, J., Watson, J., ... Romieu, I. (2003). *Air Pollution and Heart Rate Variability Among the El in Mexico City*. 14(5), 521–527.
- Howell, R., & Kremer, D. (1973). *The Chemistry and Physiology of Pigmentation in Leaves Injured by Air Pollution*. 2(3), 434–438.
- Jaramillo-Correa, J. P., Aguirre-Planter, E., Khasa, D. P., Eguiarte, L. E., Piñero, D., Furnier, G. R., & Bousquet, J. (2008). Ancestry and divergence of subtropical montane forest isolates: molecular biogeography of the genus *Abies* (Pinaceae) in southern México and Guatemala. *Molecular Ecology*, 17(10), 2476–2490. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03762.x
- Jáuregui, E. (2002). The Climate of the Mexico City Air Basin: Its Effects on the Formation and Transport of Pollutants. In M. E. Fenn, L. I. de Bauer, & T. Hernández-Tejeda (Eds.), *Urban Air Pollution and Forests: Resources at Risk in the Mexico City Air Basin* (pp. 86–117). doi: 10.1007/978-0-387-22520-3\_5
- Jáuregui-Zúñiga, D., Ferrer, M. A., Calderón, A. A., Muñoz, R., & Moreno, A. (2005). Heavy metal stress reduces the deposition of calcium oxalate

- crystals in leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Plant Physiology*, 162(10), 1183–1187.
- Johnson, M. T. J., & Munshi-South, J. (2017). Evolution of life in urban environments. *Science (New York, N.Y.)*, 358(6363). doi: 10.1126/science.aam8327
- Kabbage, M., & Dickman, M. B. (2008). The BAG proteins: a ubiquitous family of chaperone regulators. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 65(9), 1390–1402. doi: 10.1007/s00018-008-7535-2
- Kanagendran, A., Pazouki, L., & Niinemets, Ü. (2018). Differential regulation of volatile emission from *Eucalyptus globulus* leaves upon single and combined ozone and wounding treatments through recovery and relationships with ozone uptake. *Environmental and Experimental Botany*, 145, 21–38. doi: 10.1016/j.envexpbot.2017.10.012
- Kanehisa, M., Sato, Y., & Morishima, K. (2016). BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. *Journal of Molecular Biology*, 428(4), 726–731. doi: 10.1016/j.jmb.2015.11.006
- Kasprzewska, A. (2003). Plant chitinases--regulation and function. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 8(3), 809–824.
- Kundu, A., Saha, S., Suresh, W., Ahluwalia, V., & Kaur. (2013). *Antioxidant potential of essential oil and cadinene sesquiterpenes of Eupatorium adenophorum*. 95(1), 127–137.
- Lamsal, L. N., Martin, R. V., Parrish, D. D., & Krotkov, N. A. (2013). Scaling Relationship for NO<sub>2</sub> Pollution and Urban Population Size: A Satellite Perspective. *Environmental Science & Technology*, 47(14), 7855–7861. doi: 10.1021/es400744g
- Lane, T., Best, T., Zembower, N., Davitt, J., Henry, N., Xu, Y., ... Staton, M. E. (2016). The green ash transcriptome and identification of genes responding to abiotic and biotic stresses. *BMC Genomics*, 17(1). doi: 10.1186/s12864-016-3052-0
- Langebartels, C., Heller, W., Führer, G., Lippert, M., Simons, S., & Sandermann, H. (1998). Memory effects in the action of ozone on conifers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 41(1), 62–72. doi: 10.1006/eesa.1998.1668
- Lázaro-Gimeno, D., & Ibars, A. M. (2009). *Impacto del ozono troposférico sobre la anatomía foliar de Abies pinsapo Boiss I: estudio de la distribución de daños*. 34, 175–188.

- Le Gall, H., Philippe, F., Domon, J.-M., Gillet, F., Pelloux, J., & Rayon, C. (2015). Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress. *Plants (Basel, Switzerland)*, *4*(1), 112–166. doi: 10.3390/plants4010112
- Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *25*(14), 1754–1760. doi: 10.1093/bioinformatics/btp324
- Li, P., Calatayud, V., Gao, F., Uddling, J., & Feng, Z. (2016). Differences in ozone sensitivity among woody species are related to leaf morphology and antioxidant levels. *Tree Physiology*, *36*(9), 1105–1116. doi: 10.1093/treephys/tpw042
- Loreto, F., & Fares, S. (2007). Is ozone flux inside leaves only a damage indicator? Clues from volatile isoprenoid studies. *Plant Physiology*, *143*(3), 1096–1100. doi: 10.1104/pp.106.091892
- Loreto, F., Pinelli, P., Manes, F., & Kollist, H. (2004). Impact of ozone on monoterpene emissions and evidence for an isoprene-like antioxidant action of monoterpenes emitted by *Quercus ilex* leaves. *Tree Physiology*, *24*(4), 361–367. doi: 10.1093/treephys/24.4.361
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, *15*(12), 550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8
- Ludwikow, A., & Sadowski, J. (2008). Gene networks in plant ozone stress response and tolerance. *Journal of Integrative Plant Biology*, *50*(10), 1256–1267. doi: 10.1111/j.1744-7909.2008.00738.x
- Lung, I., Soran, M.-L., Opreș, O., Trușcă, M. R. C., Niinemets, Ü., & Copolovici, L. (2016). Induction of stress volatiles and changes in essential oil content and composition upon microwave exposure in the aromatic plant *Ocimum basilicum*. *The Science of the Total Environment*, *569–570*, 489–495. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.06.147
- Mastretta-Yanes, A., Arrigo, N., Alvarez, N., Jorgensen, T. H., Piñero, D., & Emerson, B. C. (2015). Restriction site-associated DNA sequencing, genotyping error estimation and de novo assembly optimization for population genetic inference. *Molecular Ecology Resources*, *15*(1), 28–41. doi: 10.1111/1755-0998.12291
- Mastretta-Yanes, Alicia, Moreno-Letelier, A., Piñero, D., Jorgensen, T. H., & Emerson, B. C. (2015). Biodiversity in the Mexican highlands and the interaction of geology, geography and climate within the Trans-Mexican Volcanic Belt. *Journal of Biogeography*, *42*(9), 1586–1600. doi: 10.1111/jbi.12546
- McCullough, S. D., Bowers, E. C., On, D. M., Morgan, D. S., Dailey, L. A., Hines, R. N., ... Diaz-Sanchez, D. (2016). Baseline Chromatin Modification Levels May Predict Interindividual Variability in Ozone-

- Induced Gene Expression. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 150(1), 216–224. doi: 10.1093/toxsci/kfv324
- Mierziak, J., Kostyn, K., & Kulma, A. (2014). Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(10), 16240–16265. doi: 10.3390/molecules191016240
- Morris, P. C. (2001). *MAP kinase signal transduction pathways in plants*. 151(1), 67–89.
- Mujica Gallart, J. (2013). *Patrones de diversidad y detección de grupos genéticos en dos especies de Abies con distribuciones contrastantes en el Eje volcánico Transmexicano* (Licenciatura Biología). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Nishiguchi, M., Yoshida, K., Sumizono, T., & Tazaki, K. (2002). A receptor-like protein kinase with a lectin-like domain from lombardy poplar: gene expression in response to wounding and characterization of phosphorylation activity. *Molecular Genetics and Genomics: MGG*, 267(4), 506–514. doi: 10.1007/s00438-002-0683-4
- Oksanen, J., Kindt, R., Legendre, P., O'Hara, B., Stevens, M. H. H., & Oksanen, M. J. (2007). *The vegan package*. 10, 631–637.
- Ortiz de Elguera-Culebras, G., Sánchez-Vioque, R., Berruga, M. I., Herraiz-Peñalver, D., & Santana-Méridas, O. (2017). *Antifeedant effects of common terpenes from Mediterranean aromatic plants on Leptinotarsa decemlineata*. 17(2).
- Papazian, S., Khaling, E., Bonnet, C., Lassueur, S., Reymond, P., Moritz, T., ... Albrechtsen, B. R. (2016). *Central Metabolic Responses to Ozone and Herbivory Affect Photosynthesis and Stomatal Closure*. 172(3), 2057–2078. doi: 10.1104/pp.16.01318
- Pellegrini, E., Cioni, P. L., Francini, A., Lorenzini, G., Nali, C., & Flamini, G. (2012). Volatiles emission patterns in poplar clones varying in response to ozone. *Journal of Chemical Ecology*, 38(7), 924–932. doi: 10.1007/s10886-012-0162-2
- Phillips, & Croteau. (1999). Resin-based defenses in conifers. *Trends in Plant Science*, 4(5), 184–190.
- Poland, J. A., & Rife, T. W. (2012). Genotyping-by-Sequencing for Plant Breeding and Genetics. *The Plant Genome Journal*, 5(3), 92. doi: 10.3835/plantgenome2012.05.0005
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A. R., Bender, D., ... Sham, P. C. (2007). PLINK: A Tool Set for Whole-Genome

- Association and Population-Based Linkage Analyses. *American Journal of Human Genetics*, 81(3), 559–575.
- Reig-Armiñana, J., Calatayud, V., Cerveró, J., García-Breijo, F. J., Ibars, A., & Sanz, M. J. (2004). Effects of ozone on the foliar histology of the mastic plant (*Pistacia lentiscus* L.). *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 132(2), 321–331. doi: 10.1016/j.envpol.2004.04.006
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). *edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data*. 26(1), 139–140.
- Rodríguez-Quilón, I., Santos-del-Blanco, L., Grivet, D., Jaramillo-Correa, J. P., Majada, J., Vendramin, G. G., ... González-Martínez, S. C. (2015). Local effects drive heterozygosity-fitness correlations in an outcrossing long-lived tree. *Proceedings. Biological Sciences*, 282(1820), 20152230. doi: 10.1098/rspb.2015.2230
- Samuel, M. A., Miles, G. P., & Ellis, B. E. (2005). MAPK signalling and plant cell survival in response to oxidative environmental stress. In K. Omasa, I. Nouchi, & L. J. De Kok (Eds.), *Plant Responses to Air Pollution and Global Change* (pp. 125–132). Springer Japan.
- Sandoval, E., Rojas, A., Guzmán, C., Carmona, L., Ponce, R., León, C., ... Medina, A. (2005). *Cuadernos 38:Técnicas aplicadas a la anatomía vegetal* (Vol. 38). IBUNAM.
- Santangelo, J. S., Rivkin, L. R., & Johnson, M. T. J. (2018). *The evolution of city life*. 285. doi: 10.1098/rspb.2018.1529
- Saviranta, N. M. M., Julkunen-Tiitto, R., Oksanen, E., & Karjalainen, R. O. (2010). Leaf phenolic compounds in red clover (*Trifolium pratense* L.) induced by exposure to moderately elevated ozone. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 158(2), 440–446. doi: 10.1016/j.envpol.2009.08.029
- Schröder, F., Lisso, J., & Müssig, C. (2011). EXORDIUM-LIKE1 promotes growth during low carbon availability in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 156(3), 1620–1630. doi: 10.1104/pp.111.177204
- Seinfeld, J. H. (1989). *Urban Air Pollution: State of the Science*. 243(4892), 745–752. doi: 10.1126/science.243.4892.745
- Sethuraman, A. (2018). *Estimating Genetic Relatedness in Admixed Populations*. 8(10), 3203–3220. doi: 10.1534/g3.118.200485
- Sierla, M., Hõrak, H., Overmyer, K., Waszczak, C., Yarmolinsky, D., Maierhofer, T., ... Kangasjärvi, J. (2018). The Receptor-like Pseudokinase GHR1 Is Required for Stomatal Closure. *The Plant Cell*, 30(11), 2813–2837. doi: 10.1105/tpc.18.00441

- Staszak, J., Grulke, N. E., Marrett, M. J., & Prus-Glowacki, W. (2007). Isozyme markers associated with O(3) tolerance indicate shift in genetic structure of ponderosa and Jeffrey pine in Sequoia National Park, California. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 149(3), 366–375. doi: 10.1016/j.envpol.2007.05.026
- Staszak, J., Grulke, N. E., & Prus-Glowacki, W. (2004). Genetic Differences of Pinus Ponderosa [Dougl. Ex Laws.] Trees Tolerant and Sensitive to Ozone. *Water, Air, and Soil Pollution*, 153(1), 3–14. doi: 10.1023/B:WATE.0000019937.20297.6a
- Steiner, K., & Davis, D. (1979). *Variation among Fraxinus families in foliar response to ozone*. 9(1), 106–109.
- Stevenson, H. S., Wang, Y., Muller, R., & Edelman, D. C. (2015). Long-term stability of total RNA in RNAsable® as evaluated by expression microarray. *Biopreservation and Biobanking*, 13(2), 114–122. doi: 10.1089/bio.2014.0068
- Takahashi, H., Hayashi, M., Goto, F., Sato, S., Soga, T., Nishioka, T., ... Uchimiya, H. (2006). Evaluation of metabolic alteration in transgenic rice overexpressing dihydroflavonol-4-reductase. *Annals of Botany*, 98(4), 819–825. doi: 10.1093/aob/mcl162
- Tammam, A., Badr, R., Abou-Zeid, H., Hassan, Y., & Bader, A. (2019). *Nickel and ozone stresses induce differential growth, antioxidant activity and mRNA transcription in Oryza sativa cultivars*. 14(1), 87–101. doi: 10.1080/17429145.2018.1556356
- Tausz, M., Grulke, N. E., & Wieser, G. (2007). Defense and avoidance of ozone under global change. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 147(3), 525–531. doi: 10.1016/j.envpol.2006.08.042
- Tejeda, T. H., & Meza, H. M. B. (2015). Sensibilidad de 20 procedencias de pino y oyamel a los oxidantes fotoquímicos. Retrieved January 20, 2017, from Revista Mexicana de Ciencias Forestales website: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63442410004>
- Terrazas, T., & Bernal-Salazar, S. (2002). Histological Symptoms of Air Pollution Injury in Foliage, Bark, and Xylem of Abies religiosa in the Basin of Mexico. In *Ecological Studies. Urban Air Pollution and Forests* (pp. 261–282). doi: 10.1007/978-0-387-22520-3\_11
- Tooulakou, G., Giannopoulos, A., Nikolopoulos, D., Bresta, P., Dotsika, E., Orkoulas, M. G., ... Karabourniotis, G. (2016). Reevaluation of the plant “gemstones”: Calcium oxalate crystals sustain photosynthesis under drought conditions. *Plant Signaling & Behavior*, 11(9), e1215793. doi: 10.1080/15592324.2016.1215793

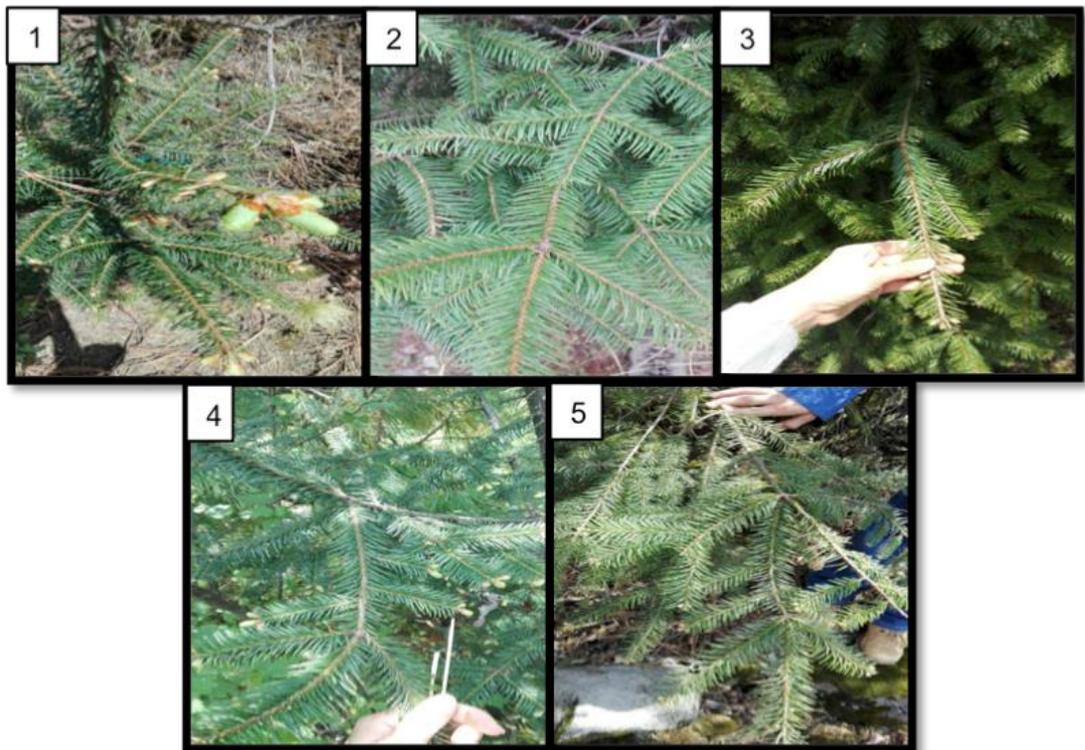
- Tovar, D. C. (1989). Air pollution and forest decline near Mexico City. *Environmental Monitoring and Assessment*, 12(1), 49–58. doi: 10.1007/BF00396728
- Vickers, C. E., Gershenzon, J., Lerdau, M. T., & Loreto, F. (2009). A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. *Nature Chemical Biology*, 5(5), 283–291. doi: 10.1038/nchembio.158
- Weir, B. S., & Cockerham, C. C. (1984). ESTIMATING F-STATISTICS FOR THE ANALYSIS OF POPULATION STRUCTURE. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 38(6), 1358–1370. doi: 10.1111/j.1558-5646.1984.tb05657.x
- Wu, H., & Hu, Z. (1997). Comparative anatomy of resin ducts of the Pinaceae. *Trees*, 11(3), 135–143. doi: 10.1007/s004680050069
- Zhao, J., Zhang, J., Zhang, W., Wu, K., Zheng, F., Tian, L., ... Duan, J. (2014). Expression and functional analysis of the plant-specific histone deacetylase HDT701 in rice. *Frontiers in Plant Science*, 5, 764. doi: 10.3389/fpls.2014.00764
- Zheng, X., Levine, D., Shen, J., Gogarten, S. M., Laurie, C., & Weir, B. S. (2012). A high-performance computing toolset for relatedness and principal component analysis of SNP data. *Bioinformatics*, 28(24), 3326–3328. doi: 10.1093/bioinformatics/bts606

## XIII.ANEXOS

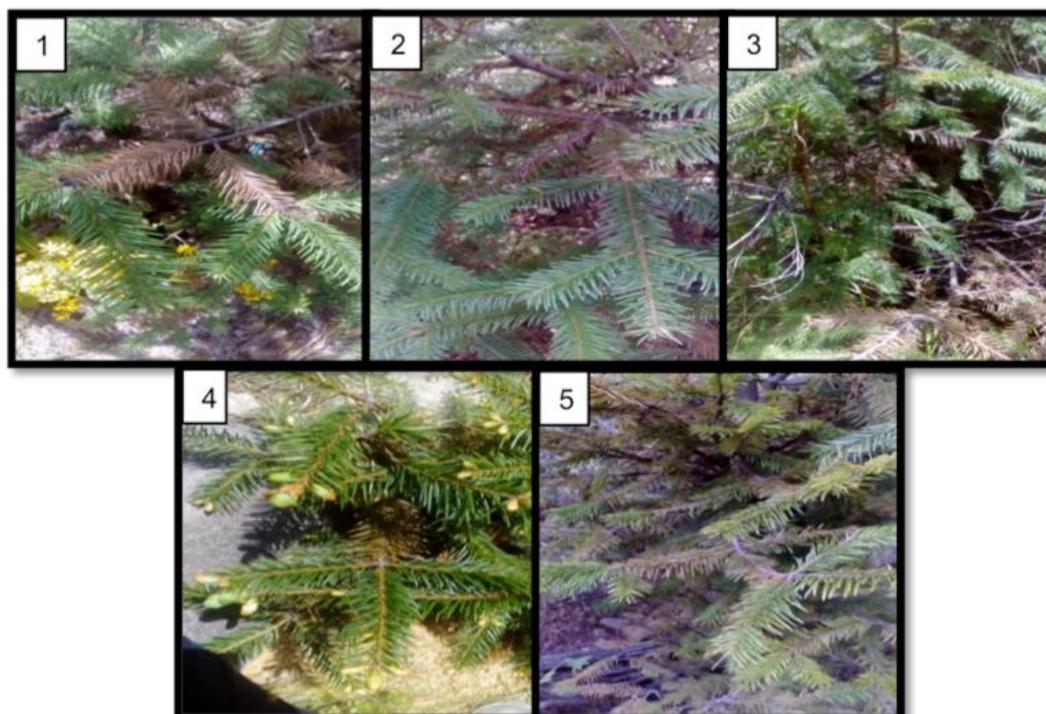
Los scripts, líneas de comando y material extra con los cuales se realizó este trabajo se encuentran disponibles en la página de GitHub: [https://github.com/Verolarrachtai/Abies\\_religiosa\\_vs\\_ozone](https://github.com/Verolarrachtai/Abies_religiosa_vs_ozone). De igual manera, el correo para contactarme es: [veronica.rg.pb@gmail.com](mailto:veronica.rg.pb@gmail.com)

**ANEXO 1. Ramas de individuos sanos y dañados colectados.** (a) Individuos sanos. (b) Individuos dañados

**(a)**



(b)



**ANEXO 2. Extracciones de ARN de 40-45 mg de tejido vegetal independientemente para cada concentración de O<sub>3</sub> y período de crecimiento foliar por árbol.**

|               | 2015                        | 2016       | 2017       |
|---------------|-----------------------------|------------|------------|
| <i>Dañado</i> | DC_01_2015                  | DC_01_2016 | DC_01_2017 |
|               | DC_02_2015                  | DC_02_2016 |            |
|               | <b>(170 ppb)</b> DC_03_2015 | DC_03_2016 |            |
|               | DC_04_2015                  | DC_04_2016 | DC_04_2017 |
|               | DC_05_2015                  | DC_05_2016 |            |
| <i>Dañado</i> | DS_01_2015                  | DS_01_2016 |            |
|               | <b>(87 ppb)</b> DS_02_2015  | DS_02_2016 |            |
|               | DS_04_2015                  | DS_04_2016 |            |
| <i>Sano</i>   | HC_01_2015                  | HC_01_2016 |            |
|               | HC_02_2015                  | HC_02_2016 |            |
|               | <b>(170 ppb)</b> HC_03_2015 | HC_03_2016 |            |
|               | HC_04_2015                  | HC_04_2016 |            |
|               | HC_05_2015                  | HC_05_2016 |            |
| <i>Sano</i>   | HS_01_2015                  | HS_01_2016 |            |
|               | <b>(87 ppb)</b> HS_02_2015  | HS_02_2016 |            |
|               | HS_05_2015                  | HS_05_2016 |            |

**ANEXO 3. Número de lecturas totales para cada individuo.**

| Sample  | Total_reads | Mapped   | Mapped_ |          | Properly_ |        | Singletons | Singletons_ |         |
|---------|-------------|----------|---------|----------|-----------|--------|------------|-------------|---------|
|         |             |          | percent | paired   | percent   | paired |            | percent     | 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%      |             |         |

**ANEXO 4. Número de genes mapeados para cada individuo.**

| Condición       | Temporada        | Muestra          | # Genes sin ninguna lectura | # Genes mapeados |
|-----------------|------------------|------------------|-----------------------------|------------------|
| <i>Dañado</i>   | <i>(170 ppb)</i> | DC_01_15         | 0                           | 37,601           |
|                 |                  | DC_02_15         | 4,401                       | 33,200           |
|                 |                  | DC_03_15         | 3,419                       | 34,182           |
|                 |                  | DC_04_15         | 2,761                       | 34,840           |
|                 |                  | DC_05_15         | 4,235                       | 33,366           |
|                 | <i>(87 ppb)</i>  | DS_01_15         | 2,141                       | 35,460           |
|                 |                  | DS_02_15         | 3,345                       | 34,256           |
|                 |                  | DS_04_15         | 2,570                       | 35,031           |
|                 | <i>Sano</i>      | <i>(170 ppb)</i> | HC_01_15                    | 3,553            |
| HC_02_15        |                  |                  | 3,618                       | 33,983           |
| HC_03_15        |                  |                  | 3,541                       | 34,060           |
| HC_04_15        |                  |                  | 3,938                       | 33,663           |
| HC_05_15        |                  |                  | 3,620                       | 33,981           |
| <i>(87 ppb)</i> |                  | HS_01_15         | 1,863                       | 35,738           |
|                 |                  | HS_02_15         | 2,581                       | 35,020           |
|                 |                  | HS_05_15         | 3,308                       | 34,293           |

**ANEXO 5. Número de genes mapeados para cada comparación.**

| Comparación de tratamientos                         | % de genes mapeados | Condición | Genes mapeados | ID de Muestras utilizadas |
|---|---------------------|-----------|----------------|---------------------------|
| Sanos y dañados en contingencia ambiental (170 ppb) | 81.42%<br>(37,601)  | Sanos     | 33,947         | SC01_15                   |
|   |                     |           |                | SC02_15                   |
|   |                     |           |                | SC03_15                   |
|   |                     |           |                | SC04_15                   |
|   |                     |           |                | SC05_15                   |
|   |                     | Dañados   | 34,638         | DC01_15                   |
|   |                     |           |                | DC02_15                   |
|   |                     |           |                | DC03_15                   |
|   |                     |           |                | DC04_15                   |
|   |                     |           |                | DC05_15                   |

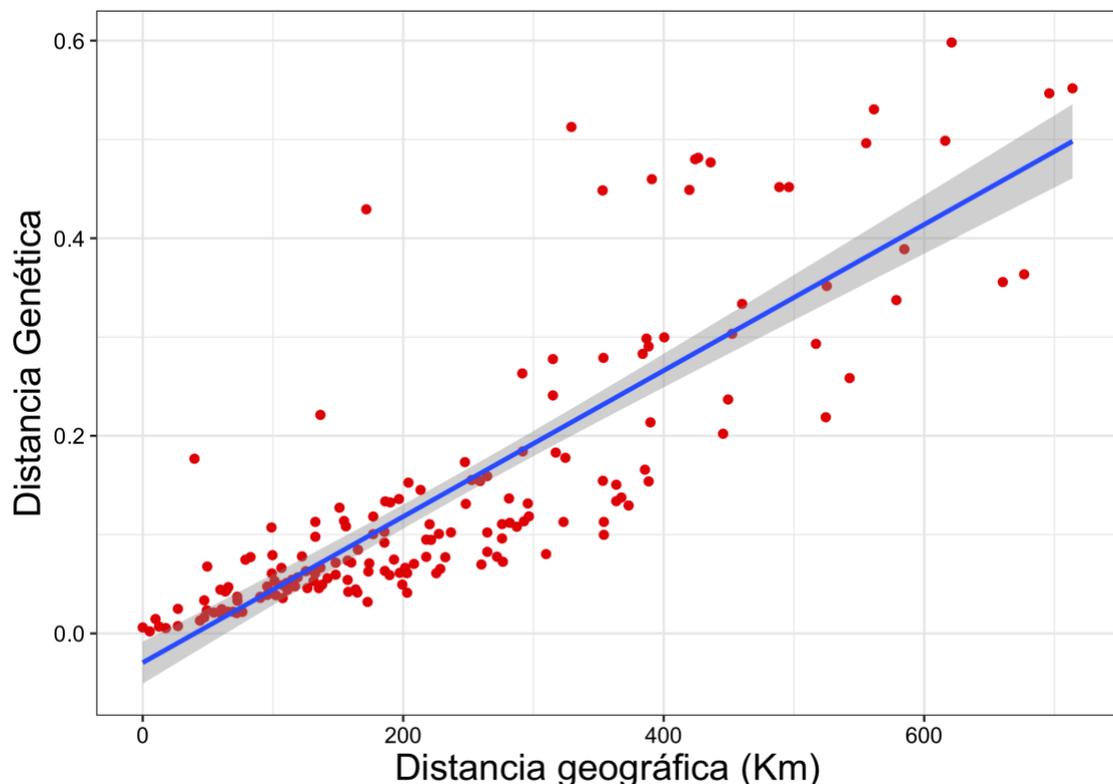
## ANEXO 6. Valores de los parámetros para ensamble laxo en ipyRAD con todas las muestras de oyameles de nuestro grupo de trabajo.

```

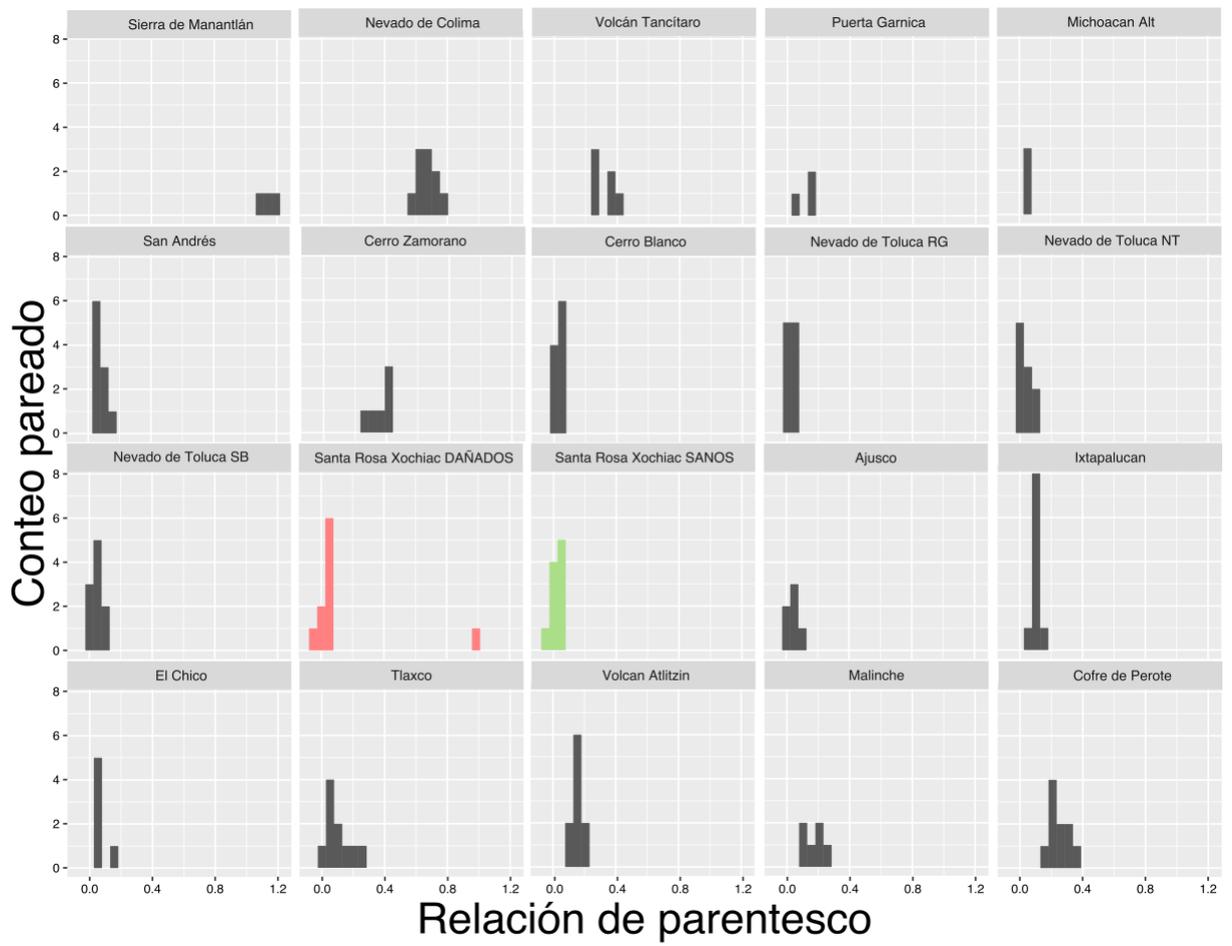
----- ipyrad params file (v.0.7.28)-----
TMVB_SSNPradlocus      ## [0] [assembly_name]: Assembly name. Used to name output directories for
assembly steps
/LUSTRE/Genetica/gibrahim/ipyrad_Abies ## [1] [project_dir]: Project dir (made in curdir if not present)
## [2] [raw_fastq_path]: Location of raw non-demultiplexed fastq files
Merged: Plate1rawsAbies, Plate2rawsAbies, Plate3rawsAbies, Plate4rawsAbies, Plate5rawAbies ## [3]
[barcodes_path]: Location of barcodes file
## [4] [sorted_fastq_path]: Location of demultiplexed/sorted fastq files
denovo                  ## [5] [assembly_method]: Assembly method (denovo, reference, denovo+reference,
denovo-reference)
## [6] [reference_sequence]: Location of reference sequence file
gbs                     ## [7] [datatype]: Datatype (see docs): rad, gbs, ddRAD, etc.
TGCAG, CGG             ## [8] [restriction_overhang]: Restriction overhang (cut1,) or (cut1, cut2)
0                       ## [9] [max_low_qual_bases]: Max low quality base calls (Q<20) in a read
43                      ## [10] [phred_Qscore_offset]: phred Q score offset (33 is default and very
standard)
8                       ## [11] [mindepth_statistical]: Min depth for statistical base calling
8                       ## [12] [mindepth_majrule]: Min depth for majority-rule base calling
10000                  ## [13] [maxdepth]: Max cluster depth within samples
0.9                    ## [14] [clust_threshold]: Clustering threshold for de novo assembly
0                       ## [15] [max_barcode_mismatch]: Max number of allowable mismatches in barcodes
2                       ## [16] [filter_adapters]: Filter for adapters/primers (1 or 2=striker)
80                     ## [17] [filter_min_trim_len]: Min length of reads after adapter trim
2                       ## [18] [max_alleles_consens]: Max alleles per site in consensus sequences
0                       ## [19] [max_Ns_consens]: Max N's (uncalled bases) in consensus (R1, R2)
4, 4                   ## [20] [max_Hs_consens]: Max Hs (heterozygotes) in consensus (R1, R2)
1                       ## [21] [min_samples_locus]: Min # samples per locus for output
5, 5                   ## [22] [max_SNPs_locus]: Max # SNPs per locus (R1, R2)
4, 4                   ## [23] [max_Indels_locus]: Max # of indels per locus (R1, R2)
0.5                    ## [24] [max_shared_Hs_locus]: Max # heterozygous sites per locus (R1, R2)
0, 0, 0, 0            ## [25] [trim_reads]: Trim raw read edges (R1), <R1, R2>, <R2) (see docs)
0, 0, 0, 0            ## [26] [trim_loci]: Trim locus edges (see docs) (R1>, <R1, R2>, <R2)
p, s, v, k, n, g      ## [27] [output_formats]: Output formats (see docs)
## [28] [pop_assign_file]: Path to population assignment file

```

**ANEXO 7. Relación entre la distancia genética y la distancia geográfica de 19 poblaciones de *A. religiosa*.** Las distancias genéticas para los SNPs fueron  $F_{ST}$  calculadas con el estimador Weir and Cockerham y posteriormente linearizadas. Las distancias geográficas son las distancias en Km entre poblaciones.



**ANEXO 8. Relación de parentesco dentro de cada población.** En verde individuos sanos y en rojo dañados de la población de Santa Rosa Xochiac.



## ANEXO 9. Tren de tinción para acículas de oyamel.

(a)

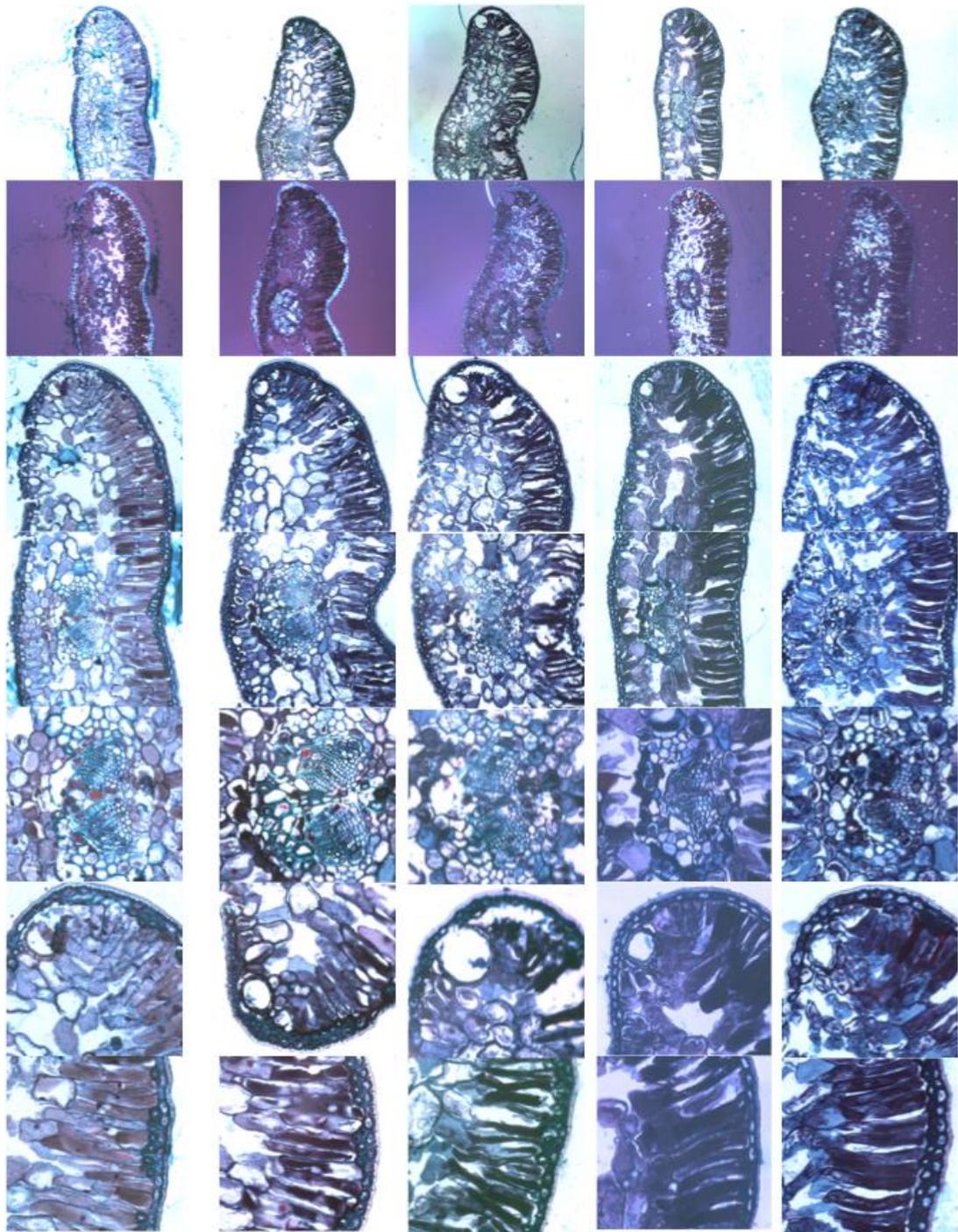
| Reactivo                     | Tiempo    |
|------------------------------|-----------|
| Alcohol terbutílico 35%      | 4 días    |
| Alcohol terbutílico 50%      | 4 días    |
| Alcohol terbutílico 60%      | 4 días    |
| Alcohol terbutílico 70%      | 4 días    |
| Alcohol terbutílico 85%      | 4 días    |
| Alcohol terbutílico 95%      | 4 días    |
| Alcohol terbutílico 100%     | 2 semanas |
| Alcohol terbutílico Absoluto | 2 semana  |

(b)

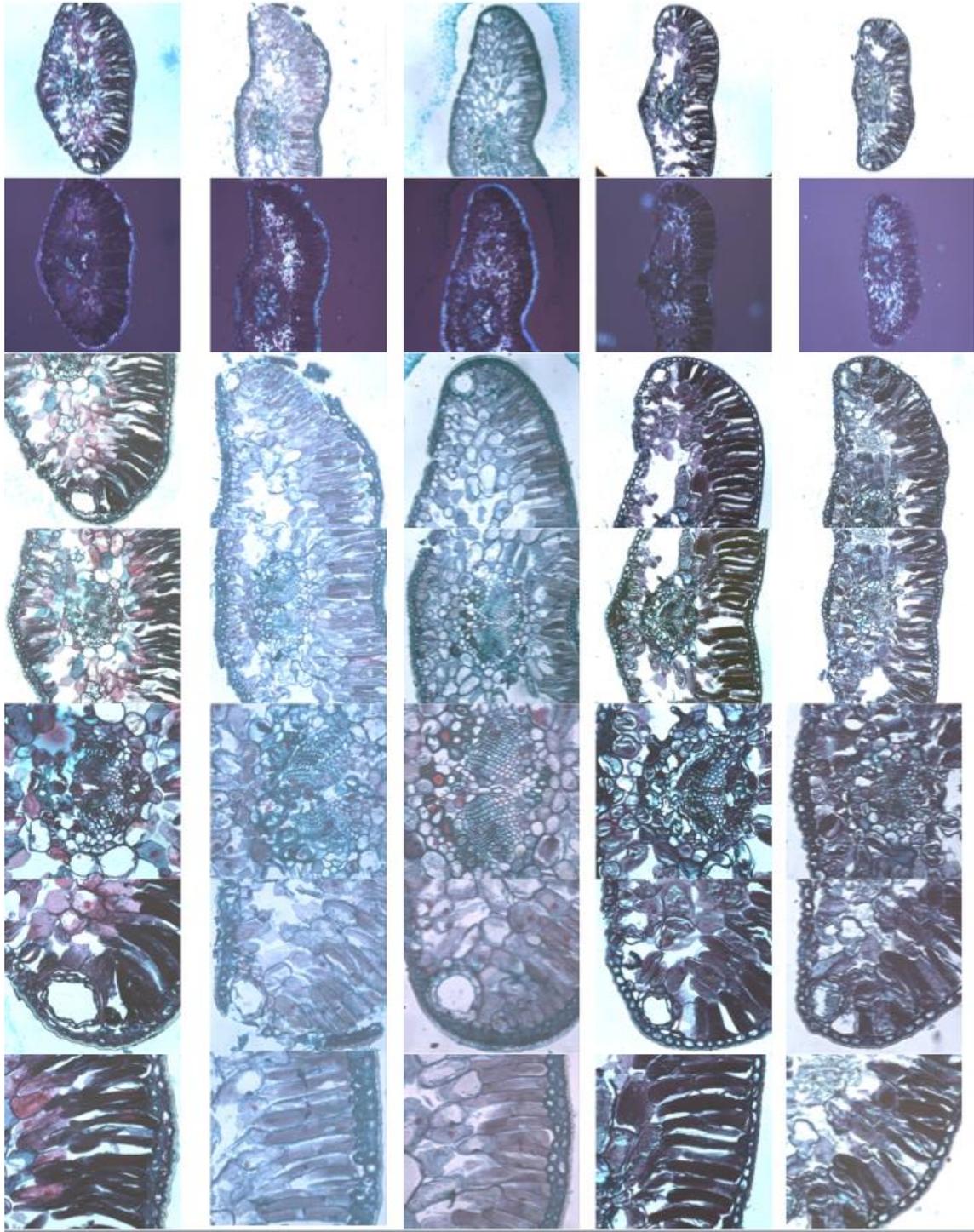
| Reactivo          | Tiempo                      |
|-------------------|-----------------------------|
| Desparafinar      | 30 min. en la estufa a 60°C |
| Xilol             | 30 min.                     |
| Xilol:Alcohol 1:1 | 30 min.                     |
| Alcohol 100%      | 5 min.                      |
| Alcohol 95%       | 5 min.                      |
| Alcohol 70%       | 5 min.                      |
| Alcohol 50%       | 5 min.                      |
| Alcohol 30%       | 5 min.                      |
| Safranina         | 24 hrs.                     |
| Alcohol 30%       | 5 min.                      |
| Alcohol 50%       | 5 min.                      |
| Alcohol 70%       | 5 min.                      |
| Alcohol 95%       | 5 min.                      |
| Verde rápido      | 2 min.                      |
| Alcohol 100%      | 1 min.                      |
| Alcohol 100%      | 1 min.                      |
| Alcohol 100%      | 1 min.                      |
| Aceite de clavo   | 10 min.                     |
| Citrisol          | 10 min.                     |

**ANEXO 10. Tinciones de individuos sanos. (a) Individuos sanos 2015. (b) Individuos sanos 2016. (c) Individuos sanos 2017.**

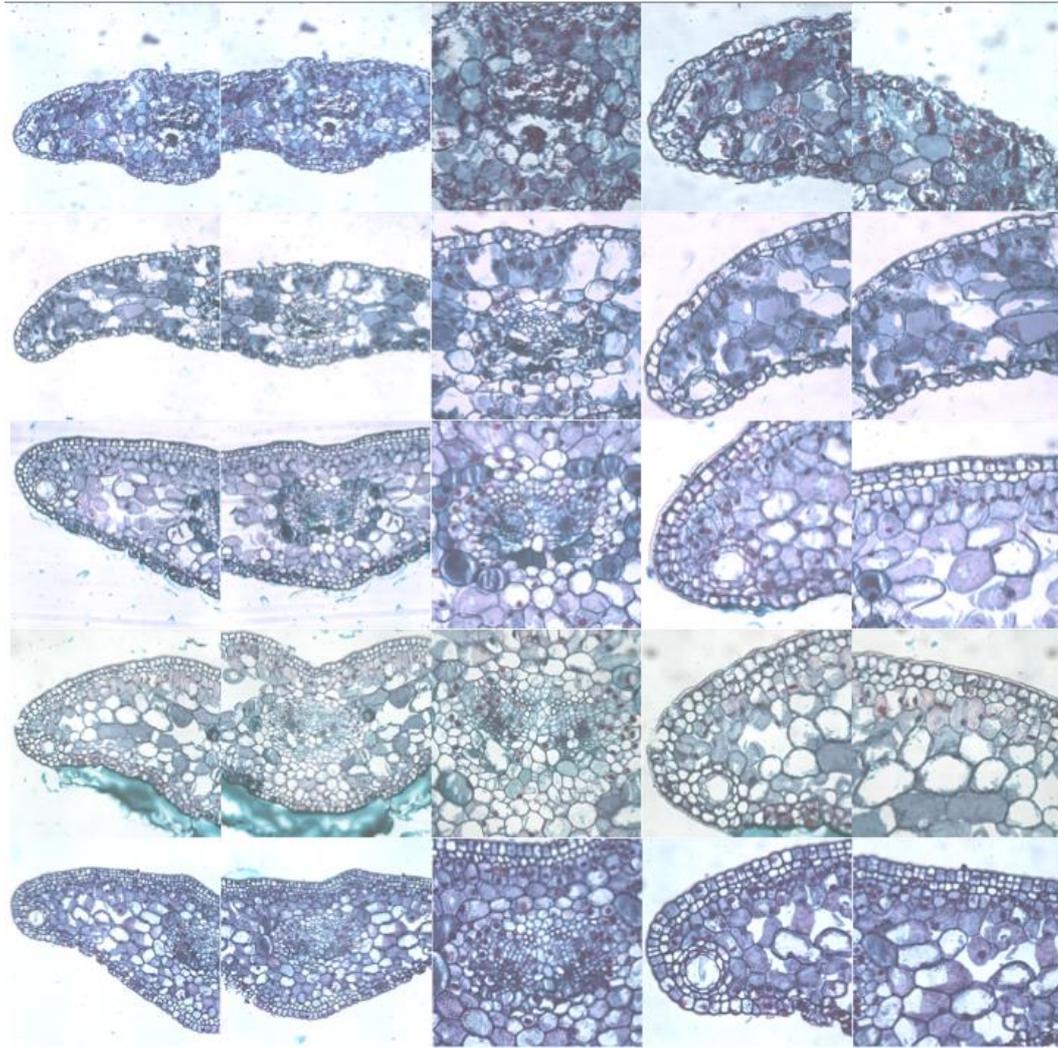
**(a)**



**(b)**

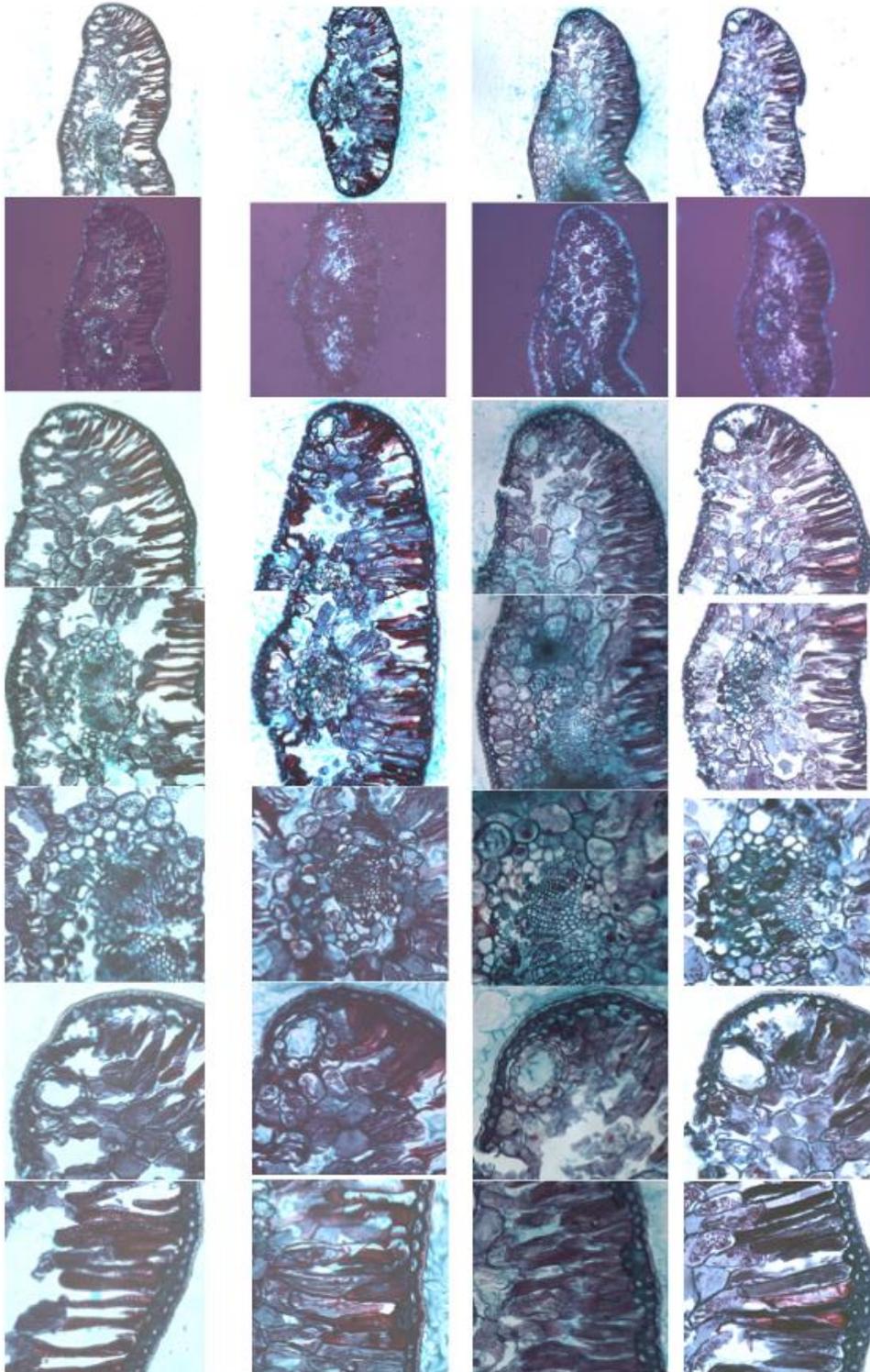


(c)

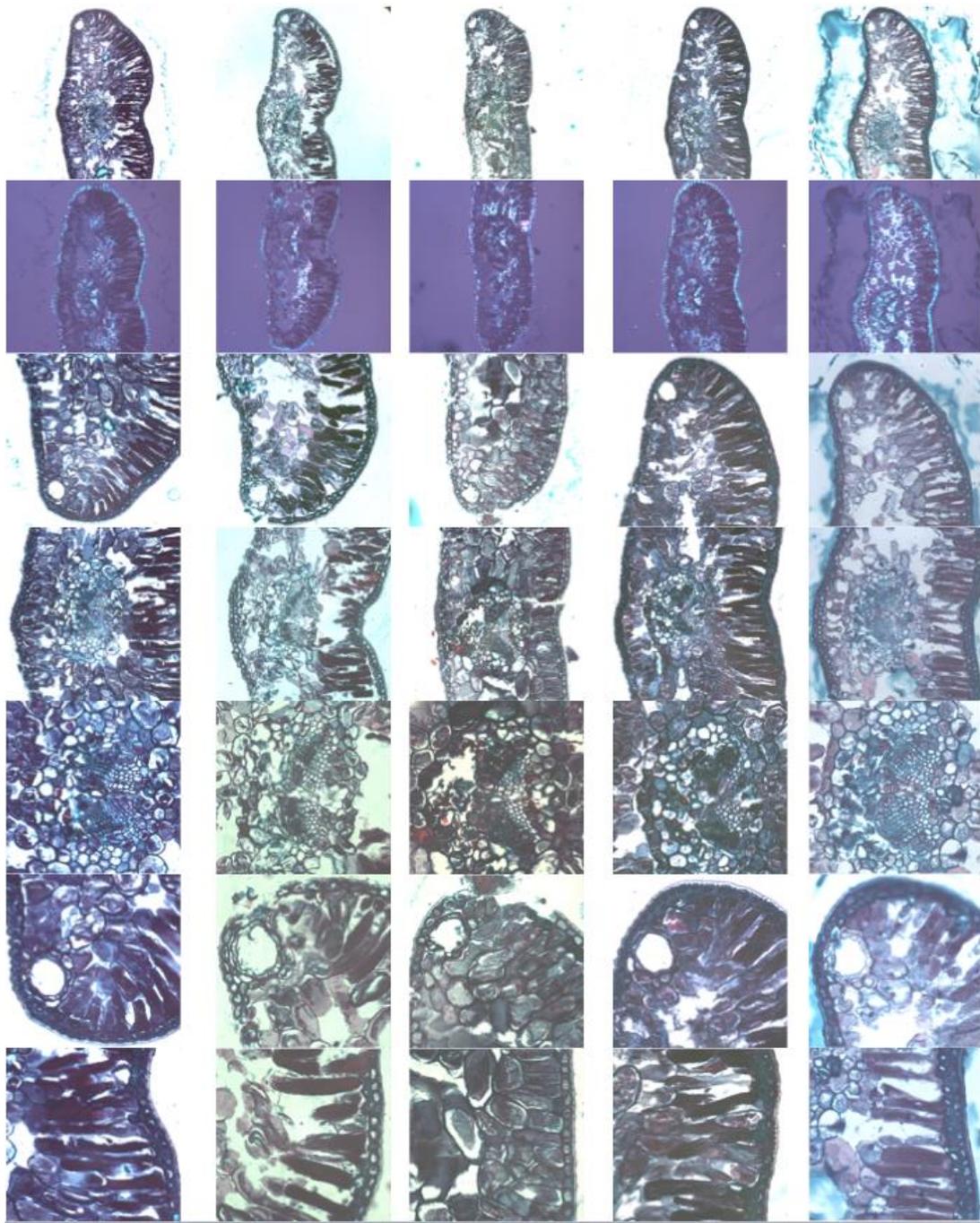


**ANEXO 11. Tinciones de individuos dañados. (a) Individuos sanos 2015. (b) Individuos sanos 2016. (c) Individuos sanos 2017.**

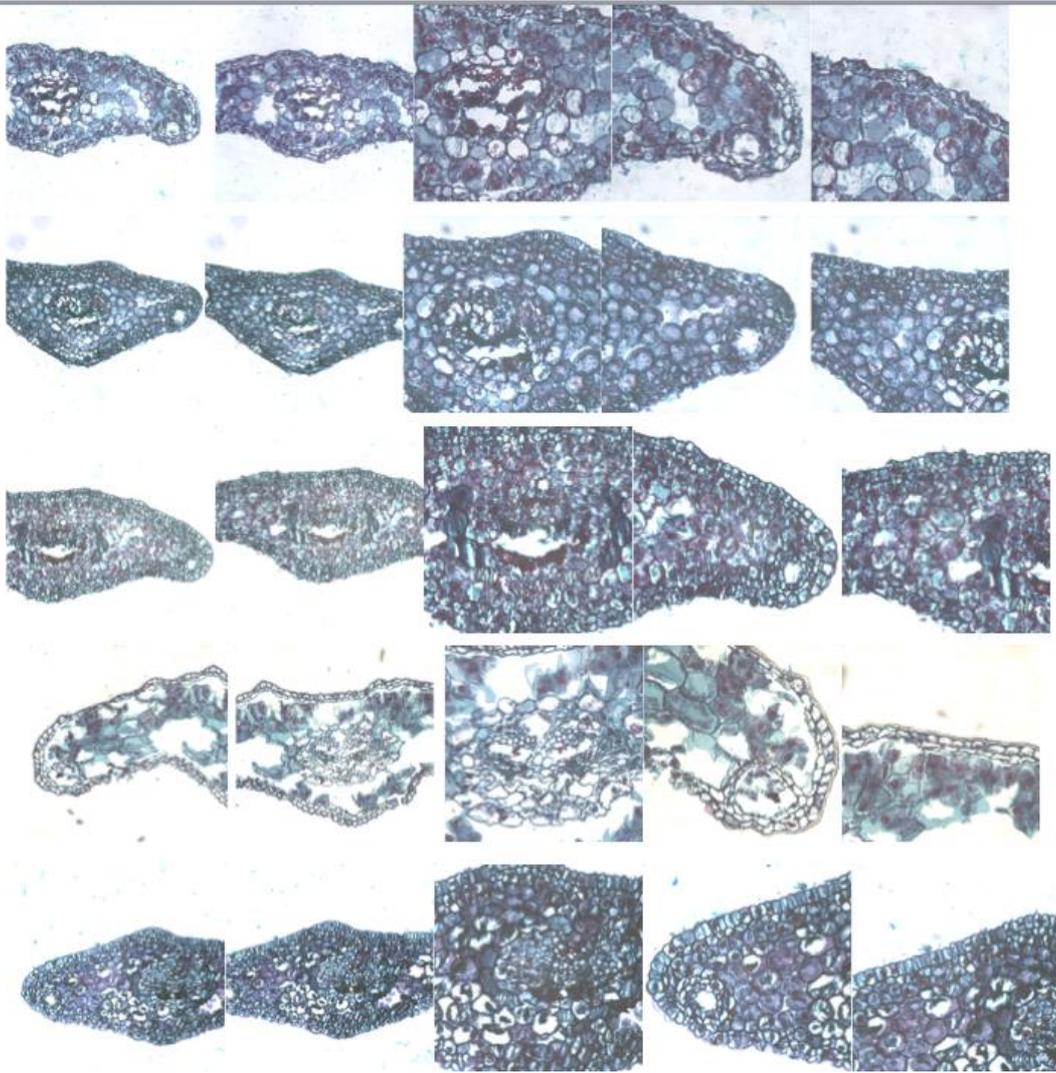
**(a)**



(b)



(c)



### ANEXO 13. Abundancia relativa de los metabolitos después del filtrado.

| Muestra    | $\beta$ -Pinene | L- $\alpha$ -bornyl acetate | $\beta$ -Caryophyllene | $\alpha$ -Caryophyllene | $\beta$ -Cubebene | $\alpha$ -Cubenene | $\delta$ -Cadinene | $\alpha$ -Muurolene |
|------------|-----------------|-----------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| SSH1-15    | 0.79            | 0.47                        | 3.61                   | 0                       | 0.6               | 0.53               | 1.09               | 0.35                |
| SSH2-15    | 0               | 8                           | 10.14                  | 1.72                    | 2.7               | 3.34               | 0                  | 1.71                |
| SSH3-15    | 7.44            | 4.66                        | 12.21                  | 1.58                    | 0.79              | 1.73               | 3.87               | 0                   |
| SSH4-15    | 6.86            | 3.01                        | 12.12                  | 2.18                    | 2.64              | 1.02               | 8.94               | 1.22                |
| SSH5-15    | 7.27            | 6.4                         | 10.97                  | 1.91                    | 3.33              | 3.66               | 5.27               | 2.02                |
| SSH1-16    | 0               | 5.64                        | 13.91                  | 1.69                    | 1.33              | 0.95               | 2.45               | 0                   |
| SSH2-16    | 4.81            | 6.83                        | 9.32                   | 0                       | 2.05              | 1.52               | 2.82               | 1.35                |
| SSH3-16    | 0               | 10.77                       | 6.62                   | 0                       | 0                 | 0                  | 0.71               | 0                   |
| SSH4-16    | 1.04            | 2.09                        | 4.58                   | 0                       | 0.98              | 0.31               | 2.11               | 0.36                |
| SSH5-16    | 1.3             | 3.82                        | 5.02                   | 0.92                    | 1.29              | 1.01               | 2.38               | 0.95                |
| SSD1-15    | 0               | 1.08                        | 4.95                   | 0.72                    | 0.44              | 0.3                | 1.9                | 0                   |
| SSD2-15    | 0               | 0                           | 2.06                   | 0                       | 1.41              | 0.62               | 1.48               | 0.56                |
| SSD3-15    | 1.03            | 0                           | 5.15                   | 0                       | 0.55              | 0.33               | 2.13               | 0.52                |
| SSD4-15    | 0               | 2.44                        | 5.83                   | 0.66                    | 0                 | 0                  | 0.31               | 0                   |
| SSD5-15    | 4.37            | 3.95                        | 9.36                   | 2.5                     | 1.43              | 1.18               | 3.42               | 2.03                |
| SSD1-16    | 2.33            | 0                           | 0                      | 2.51                    | 0                 | 1.44               | 6.56               | 1.1                 |
| SSD2-16    | 2.69            | 7.97                        | 5.36                   | 1.71                    | 2.11              | 2.26               | 5.96               | 1.38                |
| SSD3-16    | 0               | 10.53                       | 11.94                  | 1.71                    | 4.3               | 1.13               | 6.26               | 1.26                |
| SSD4-16    | 0               | 0                           | 16.78                  | 1.94                    | 0                 | 0                  | 0.69               | 0                   |
| SSD5-16    | 2.01            | 0                           | 9.42                   | 2.73                    | 5.09              | 1.78               | 4.28               | 1.9                 |
| ContiH1-15 | 2.25            | 0                           | 18.95                  | 2.23                    | 0                 | 0.99               | 14.48              | 1.33                |
| ContiH2-15 | 0               | 5.68                        | 17.09                  | 2.22                    | 0                 | 0                  | 1.52               | 0                   |
| ContiH3-15 | 6.99            | 0                           | 11.03                  | 1.64                    | 1.79              | 2.64               | 2.4                | 1.66                |
| ContiH4-15 | 2.24            | 0                           | 0                      | 0                       | 1.9               | 0.65               | 12.84              | 0                   |
| ContiH5-15 | 0               | 6.73                        | 9.39                   | 1.69                    | 2.32              | 1.53               | 2.69               | 2.21                |
| ContiH1-16 | 3.66            | 0                           | 18.25                  | 2.35                    | 1.46              | 1.81               | 2.84               | 1.19                |
| ContiH2-16 | 7.18            | 7.63                        | 15.81                  | 1.95                    | 0                 | 0                  | 1.27               | 0                   |
| ContiH3-16 | 5.22            | 8.25                        | 11.23                  | 1.74                    | 2.29              | 1.6                | 2.93               | 1.69                |
| ContiH4-16 | 2.78            | 3.29                        | 11.69                  | 1.7                     | 1.84              | 0.79               | 5.41               | 1.02                |
| ContiH5-16 | 7.61            | 6.74                        | 10.51                  | 0                       | 2.2               | 1.41               | 2.91               | 1.95                |
| ContiD1-15 | 0               | 0                           | 16.57                  | 0                       | 0                 | 0                  | 8.5                | 2.51                |
| ContiD2-15 | 2.03            | 2.9                         | 10.9                   | 2.79                    | 0.88              | 2.17               | 5.08               | 2.32                |
| ContiD3-15 | 0               | 8.55                        | 9.98                   | 1.35                    | 1.01              | 0.67               | 29.33              | 0                   |
| ContiD4-15 | 1.79            | 6.52                        | 15.44                  | 0                       | 0                 | 0                  | 1.27               | 0                   |
| ContiD5-15 | 1.69            | 7.07                        | 5.05                   | 0                       | 2.76              | 1.01               | 3.88               | 1.51                |
| ContiD1-16 | 4.37            | 2.84                        | 15.2                   | 2.23                    | 0.98              | 0.47               | 5.24               | 0                   |
| ContiD2-16 | 6.3             | 3.66                        | 9.41                   | 2.45                    | 1.87              | 2.52               | 3.44               | 1.61                |
| ContiD3-16 | 0               | 8.61                        | 11.11                  | 1.66                    | 3.31              | 0                  | 13.36              | 1.01                |
| ContiD4-16 | 4.09            | 13.92                       | 14.53                  | 1.79                    | 0                 | 0                  | 0.57               | 0                   |
| ContiD5-16 | 1.27            | 7.55                        | 4.88                   | 0                       | 0                 | 0.85               | 3.4                | 0                   |

**ANEXO 14. Correlación entre los metabolitos.** Se descarto a  $\beta$ -Cubebeno de los análisis posteriores.

