

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

TIEGO FERREIRA

Avaliação da expressão diferencial em *Physcomitrium patens* na busca das adaptações moleculares responsivas na arquitetura dos órgãos reprodutivos.

**São Gabriel
2023**

TIEGO FERREIRA

Avaliação da expressão diferencial em *Physcomitrium patens* na busca das adaptações moleculares responsivas na arquitetura dos órgãos reprodutivos.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Filipe de Carvalho Victoria

São Gabriel

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

F383a FERREIRA, TIEGO

Avaliação da expressão diferencial em *Physcomitrium patens*
na busca das adaptações moleculares responsivas na arquitetura
dos órgãos reprodutivos. / TIEGO FERREIRA.

37 p.

Trabalho de Conclusão de Curso(Graduação)-- Universidade
Federal do Pampa, BIOTECNOLOGIA, 2023.

"Orientação: Filipe de Carvalho Victoria".

1. Biotecnologia Vegetal. 2. Transcriptômica. 3.
Bioinformática. I. Título.

TIEGO FERREIRA

Avaliação da expressão diferencial em *Physcomitrium patens* na busca das adaptações moleculares responsivas na arquitetura dos órgãos reprodutivos.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 03 de fevereiro de 2023.

Prof. Dr. Filipe de Carvalho Victoria
Orientador
UNIPAMPA

Prof. Dr. Felipe Lima Pinheiro
UNIPAMPA

Prof. Dr. Wellington Bittencourt dos Santos
UNIPAMPA

AGRADECIMENTOS

Quando eu descobri que havia passado na universidade eu coloquei no status de uma rede social uma parte da música “history maker”, é a música de abertura de uma animação japonesa sobre patinação no gelo. É sobre um patinador querer desistir do seu sonho de patinar após sofrer uma derrota. Ele quer desistir do esporte até que ele descobre alguém que confia nele e aposta na sua capacidade, ele em outras palavras, descobre o amor. É um clichê romântico bobo, porém Yuri On Ice é um romance gay.

Uma das grandes dificuldades da vida é simplesmente seguir em frente e ninguém nunca lhe avisa isso. Você muitas vezes fica parado, preso e estagnado. O mundo ao seu redor gira e você faz parte dele, mas como pode algo que você faz parte se mover e você simplesmente não? Então, foi a aproximadamente quatro anos atrás que eu ao lado do homem que eu amo decidi entrar num carro com um sonho e poucas coisas que tínhamos para nos aventurar numa cidade nova. Uma relação homoafetiva cheia de sonhos não é algo moderno, é algo tão natural como os moscos que eu estudo e mesmo assim, algumas pessoas não enxergam dessa maneira.

Durante dezenas, centenas de anos, grupos LGBTQIAP+ foram reprimidos, ofendidos, humilhados, mortos... Tudo por amarem ou por serem quem são. O meu cerne carrega uma carga enorme somente por ser quem é. Então eu estou aqui estudando, defendendo minha tese de bacharel e escrevendo pra talvez ninguém, mas mesmo assim, escrevendo. Quando eu penso em quem agradecer eu não sei por onde começar, mas eu sei que a vida que eu vivo, é uma herança.

Eu convivo todos os dias rodeado de pessoas e tento conviver com pessoas que me aceitem por ser quem eu sou e eu consigo isso somente pelo fato de pessoas terem morrido para isso ter acontecido. Muitas pessoas gay, lésbicas, trans, tiveram que morrer para eu hoje conseguir viver como a pessoa que eu sou. Então não teria como me sentir realizado se hoje eu tivesse fingir ser quem eu não sou, então eu sou grato por estar aqui e por carregar essa herança da luta de centena de milhares de pessoas e por isso cada conquista besta, sobre romances clichês para mim é um motivo de inspiração. Eu não conheço o autor(a) de Yuri On Ice, mas eu acho incrível poder viver num mundo onde eu possa assistir um romance homossexual e sou grato a essa pessoa por ter criado isso. Como eu sou

grato a cada coisa relacionada a LGBTQIAP+ que surge. Algumas coisas são horríveis, outras boas, algumas duvidosas, mas TODAS são uma vitória, uma herança.

Eu não conseguiria colocar nome de todas as pessoas que me auxiliaram até aqui, são centenas, talvez milhares de pessoas que moldaram minha vida e ainda moldam e a cada palavra que eu troco, olhar ou sorriso, meu dia muda, meu humor se molda e o efeito borboleta ocorre em todos esses momentos.

RESUMO

A infertilidade está ligada a diferentes funções dos gametas masculinos, sendo uma delas causada pela deficiência na motilidade em função de anomalias no flagelos do espermatozóide. Diversos defeitos genéticos culminam na perda da fertilidade quando se é visto no ponto evolutivo, onde a função flagelar do espermatozoide é extremamente conservada em todos os reinos. O musgo modelo *Physcomitrium patens* possui genes homólogos a genes humanos que se relacionam com a arquitetura dos microtúbulos que possibilitam a motilidade espermática. O musgo *P. patens* vem sendo um importante sistema modelo para estudar questões de biologia evolutiva e de desenvolvimento, como também é um excelente modelo para estudos de reprogramação celular além de colaborar com os estudos de organismos flagelados de diversos domínios da biodiversidade. Apesar dos genes envolvidos no processo da organogênese das estruturas reprodutivas dos musgos ainda serem pouco explorados, acredita-se que esses possam estar envolvidos na construção da motilidade do flagelo e demais elementos da arquitetura dos tecidos e órgãos envolvidos na evolução. Baseando-se nessa hipótese o nosso objetivo é identificar os genes responsivos pela diferenciação de estruturas reprodutivas e como esses podem identificar problemas na formação dos órgãos reprodutivos dos musgos. Para atingir os objetivos foi realizada uma análise de expressão gênica diferencial com auxílio de dados obtidos na técnica de RNA-Seq. As *reads* utilizados foram obtidos através do banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), na plataforma *Sequence Reads Archives* (SRA) SRR19502729, SRR19502730, SRR19502731, SRR19502732, SRR19502733, SRR19502734, SRR4454535 e SRR9901085. As *reads* brutas (*raw reads*) foram filtradas por tamanho e qualidade (Phred-Score 28) e então analisadas para a contagem dos transcritos e análise de expressão diferencial de genes (DEGs) por meio da ferramenta Salmon. Como resultado foram identificados os genes Pp3c10_9456v3.1, Pp3c17_1640V3.1 e Pp3c17_13470V3.1 como possíveis genes envolvidos na diferenciação sexual entre órgãos sexuais do musgo, onde esses genes são super-expressos quando há formação de anterídios e sub-expressos quando há formação dos arquegônios. Por meio da análise de função e ontologia gênica, foi observado que o gene Pp3c10_9456v3.1 é responsável pela determinação da simetria, morfogênese da estrutura anatômica,

montagem de componentes celulares e desenvolvimento de órgãos em *P. patens*, sendo um alvo ideal para testes de nocaute gênico para validação de sua função na diferenciação dos órgãos reprodutivos nesta planta.

Palavras-chave: Bioinformática; Infertilidade Humana; Musgos; Transcriptoma; Modelo Biológico.

ABSTRACT

Infertility is linked to different functions of male gametes, one of which is caused by impaired motility due to anomalies in sperm flagella. Several genetic defects culminate in the loss of fertility when viewed from an evolutionary perspective, where sperm flagellar function is extremely conserved across all kingdoms. The model moss *Physcomitrium patens* has genes copies homologous to human that are related to the architecture of microtubules that enable sperm motility. The moss *P. patens* has been an important model system for studying issues of evolutionary and developmental biology, as well as being an excellent model for studies of cellular reprogramming, in addition to collaborating with studies of flagellated organisms from various domains of biodiversity. Although the genes involved in the process of organogenesis of the reproductive structures of mosses are still little explored, it is believed that these may be involved in the construction of the motility of the flagellum and other elements of the architecture of the tissues and organs involved in evolution. Based on this hypothesis, our objective is to identify the genes responsible for the differentiation of reproductive structures and how these can identify problems in the formation of Organs reproductive organs of mosses. To achieve the objectives, a differential gene expression analysis was carried out with the aid of data obtained in the RNA-Seq technique. The reads used were obtained from the NCBI (National Center for Biotechnology Information) database, on the Sequence Reads Archives (SRA) platform SRR19502729, SRR19502730, SRR19502731, SRR19502732, SRR19502733, SRR19502734, SRR4454535 and SRR9901085. The raw reads were filtered by size and quality (Phred-Score 28) and then analyzed for transcript counts and differential gene expression analysis (DEGs) using the Salmon tool. As a result, the genes Pp3c10_9456v3.1, Pp3c17_1640V3.1 and Pp3c17_13470V3.1 were identified as possible genes involved in the sexual differentiation between sexual organs of moss, where these genes are over-expressed when there is formation of antheridia and under-expressed when there is formation of antheridia. archegoniums. Through the analysis of gene function and ontology, it was observed that the Pp3c10_9456v3.1 gene is responsible for the determination of symmetry, morphogenesis of the anatomical structure, assembly of cellular components and development of organs in *P. patens*, being an ideal target

for tests of gene knockout to validate its role in the differentiation of reproductive organs in this plant.

Keywords: Bioinformatics; Human Infertility; Mosses; transcriptome; Biological Model.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagem ilustrativa para demonstração dos possíveis tipos de plantas monóicas.....	16
Figura 2 - Gráfico de Venn.....	25
Figura 3 - Expressão diferencial dos genes	27
Figura 4 - Expressão do gene Pp3c10_9456V3.1	28
Figura 5 - Árvore filogenética de homólogos	30

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Ontologias gênicas (GO)	29
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	21
3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4 METODOLOGIA.....	22
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
REFERÊNCIAS.....	33

.

1. INTRODUÇÃO

As briófitas compreendem um grupo de plantas terrestres com morfologia simples e o ciclo de vida dominante do gametófito, que durante muito tempo levou alguns pesquisadores a concluir que essas espécies são primitivas (CRISP; COOK, 2005). Portanto, esse grupo de plantas representaria a condição ancestral das plantas que conquistaram os ambientes terrestres, com provável origem traçada até o Ordoviciano e talvez até o Cambriano (TAYLOR et al., 2017). Para que esta origem e ancestralidade hipotética seja verdade, as briófitas deveriam ter parado de evoluir há cerca de 400 milhões de anos, quando seu ancestral se separou do ancestral das plantas vasculares. As milhares de espécies diferentes de briófitas existentes indicam que este pode não ser o caso (LAENEN et al., 2014). Com aproximadamente 13.000 espécies as briófitas, sendo o segundo grupo mais diverso dentro de Embryophyta (= plantas terrestres), estão divididas em três grupos distintos: musgos, hepáticas e antóceros. De fato, desde o ancestral comum das plantas terrestres, as linhagens que levaram a diversificação de briófitas axiomáticamente devem ter evoluído por exatamente tantos anos quanto a linhagem que levou a *Arabidopsis thaliana*, ou qualquer outra planta vascular conhecida atualmente (MCDANIEL, 2021). Em 2012, surgiram as primeiras discussões sobre a putativa monofilia para todas as Embryophytas (LIGRONE; DUCKETT; RENZAGLIA, 2012), corroboradas com estudos morfológicos e moleculares combinados e mais detalhados que reforçam a hipótese de origem comum de todas as Embryophytas, sendo estas derivadas de um ancestral comum em uma alga do grupo das Zygnematophyceae (HARRIS et al., 2022).

De forma geral essas plantas são diminutas, criptogâmicas, avasculares, com pouca diferenciação em tecidos e que se dispersam principalmente por esporos (CASTRO et al., 2002). Há hipóteses que sugerem que os musgos possam ter surgido no Ordoviciano (NEWTON, 2007) tendo-se nos musgos uma história única de evolução, com 400 milhões de anos de adaptações evolutivas. Ainda dentro das briófitas há fósseis de esporos de hepáticas que são comparáveis com esporos atuais que datam 475 milhões de anos (WELLMAN; OSTERLOFF; MOHIUDDIN, 2003). Sendo assim este grupo tem sobrevivido durante milhões de anos com diferentes variações ambientais, como a variação de radiação, fazendo com que

abranjam durante essa quantidade milionária de anos uma grande gama de variações anatômicas, morfológicas e até citogenéticas.

Com grande gama de variações estas plantas acabaram sendo extremamente distribuídas geograficamente durante sua história evolutiva, porém, acabaram se concentrando mais em regiões subtropicais e regiões tropicais (VALENTE; PÔRTO, 2006). Seu desenvolvimento é caracterizado geralmente por formação de extensos tapetes que cobrem grandes áreas, como também é possível ver os musgos formando pequenos tufos. Essa variedade de desenvolvimento também é ampla na área de colonização de habitats com diferentes substratos, com preferência por lugares úmidos e escuros, já que é um organismo dependente de água para finalizar seu ciclo reprodutivo (LISBÔA, 1993). Briófitas ainda são conhecidas por conseguirem viver em ambientes extremos como a Antártica (PERERA-CASTRO et al., 2020). Mas isso não impede que espécies se desenvolvam em locais mais secos e áridos, expostos a intempéries climáticas e até mesmo regiões semi-desérticas, podendo ter espécies colonizadoras de áreas urbanas, regiões litorâneas e de grande arenosidade (MICHEL, 2001).

Com condições de crescimento tão diversas e distintas, as briófitas conseguem se desenvolver em lugares considerados extremos para o desenvolvimento de outros organismos. Porém, apesar do fato de serem tão articulados em quesito de desenvolvimento eles nunca foram muito estudados, o que fez com que essa área seja carente de conteúdo, dificultando o desenvolvimento de pesquisas. Felizmente esse fato está em mudança e mais pesquisas e pesquisadores estão envolvidos e há um maior esforço para o sequenciamento genético das briófitas mundialmente (BRININGER et al., 2018).

Com os avanços nas áreas de estudos evolutivos, as briófitas ganharam popularidade na área, e, estão cada vez mais deixando de serem vistos como somente um parente pobre das angiospermas no reino das plantas verdes (*Viridiplantae*) para ganharem autonomia e relevância na área de estudos nos processos biológicos e genéticos. Como o clado irmão das plantas vasculares (GITZENDANNER et al., 2018; ONE THOUSAND PLANT TRANSCRIPTOMES INITIATIVE, 2019; PUTTICK et al., 2018) as briófitas passam a ter sua importância propulsionada na área de evolução e desenvolvimento (AYA et al., 2011; HORST et al., 2016).

Ainda que seja de senso comum que as briófitas não possuem uma linhagem linear, é de fato fundamentado que esses organismos apresentam características comuns entre si. Talvez uma das características mais marcantes do grupo seja o fato de maior parte do seu ciclo vital ser configurado por um gametófito que é capaz de fazer fotossíntese e de desenvolver um esporófito para a sua reprodução, este, que estará sempre preso ao gametófito. E, mesmo que haja hepáticas incapazes de serem fotossintetizantes e necessitem parasitar outros organismos, a morfologia básica de todas as briófitas é sempre compartilhada entre elas (GOFFINET, 2008).

Uma das peculiaridades das briófitas é de serem capazes de se clonarem a partir de fragmentos do seu gametófito, o que faz elas serem de fácil replicação, ótimos produtores de biomassa em condições laboratoriais e baixa necessidade de manutenção e estrutura celular simples, por isso são considerados ideais em trabalhos de estudos de vias metabólicas, transformação e recombinação homóloga de genes (LIU et al., 2013). Podendo ainda se reproduzirem assexualmente, são capazes de reproduzirem sexuadamente a partir de um gametófito masculino ou feminino, onde se encontram o anterídio e o arquegônio respectivamente, podendo ainda ser gametófitos dióicos ou monóicos sendo que nos monóicos ainda se encontram quatro subdivisões no estilo de amadurecimento sexual.

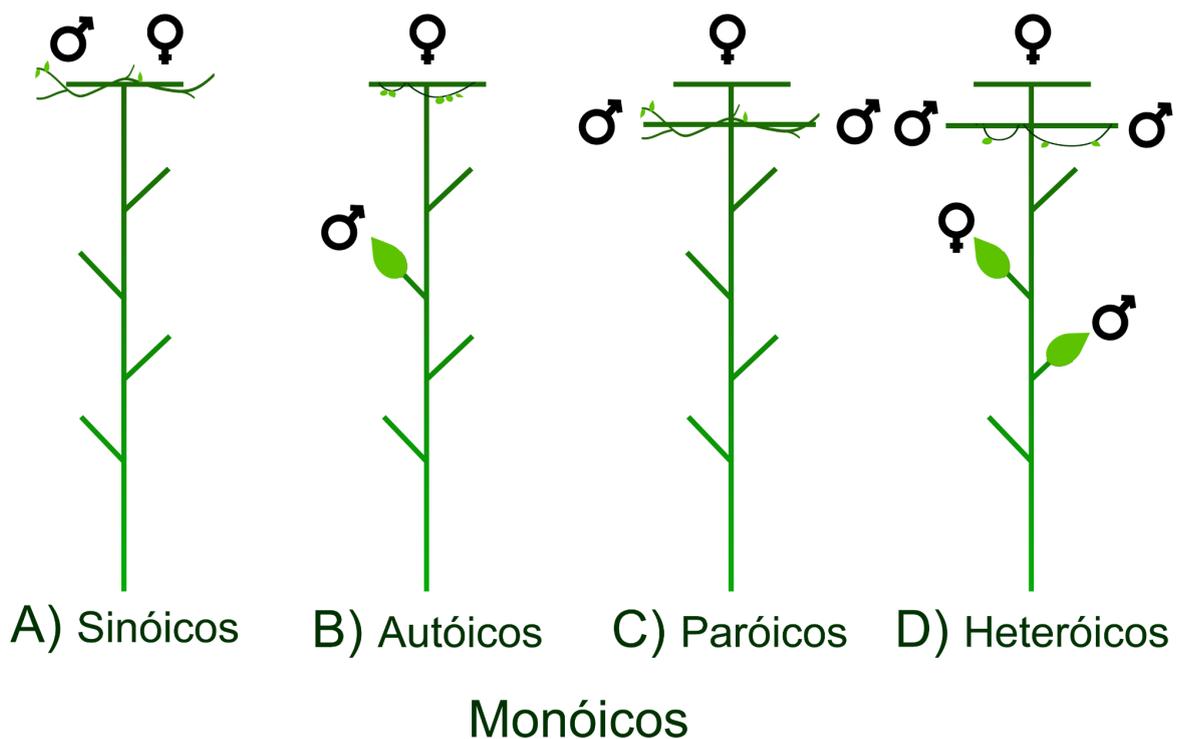


Figura 1 - Imagem ilustrativa para demonstração dos possíveis tipos de plantas monóicas. A) Musgos que possuem um arquegônio e um anterídio próximos entre si. B) Musgos que possuem arquegônio e anterídio próximos, porém em ramos distintos. C) Musgo cujo o anterídio se encontra abaixo do ápice onde há arquegônio e vice-versa. D) Possuem arquegônio ou o anterídio em ramos iguais ou distintos, podendo variar.

A água é fundamental para o desenvolvimento das briófitas. Ela é fundamental para a reprodução deste filo, sendo um item chave para a fertilização das briófitas, já que elas possuem um esperma flagelado que necessitará nadar até a parte reprodutiva feminina (oosfera). E essa característica onde as briófitas em um momento de sua vida não são completamente sésseis faz delas um grupo de agregador a perguntas referentes a biologia reprodutiva. Com o ciclo morfológico do gametófito e do esporófito diferindo em diversos aspectos sendo bem diferentes um do outro fenotipicamente, em certas circunstâncias a real diferenciação genética dos mesmo somente difere em ploidia.

As briófitas apresentam grande sensibilidade a variações ambientais quando comparadas a outros organismos do mesmo reino. Essa sensibilidade ocorre devido a sua estrutura morfo-fisiológica e por conta disso, elas se sobressaem como bioindicadores, podendo ser utilizadas em diversas áreas de controle de qualidade como no controle de qualidade d'água, do solo e do ar. Com sua capacidade de bioindicação também conseguem indicar presença de alguns metais, alcalinidade de ambientes e acidez de ambientes, sendo que há espécies que podem se destacar por conseguirem absorver determinadas substâncias. (JIANG et al., 2018; WANG et al., 2019). Fazendo as briófitas em especial os musgos, além de perfeitos bioindicadores das condições ambientais, organismos excelentes para usos biotecnológicos.

Nesse grupo temos caracteres comuns entre esses indivíduos e indivíduos de outros reinos, como o *homo sapiens sapiens* já que o seu esperma também é flagelar, por exemplo. Logo, temos esse um caráter comum dos eucariotos (STEWART; MATTOX, 1975; MITCHELL, 2007) que só foi perdido posteriormente em espécies como as angiospermas que passaram a se reproduzirem a partir da caricata polinização da espécie onde o gameta passou a ser completamente imóvel (RENZAGLIA; GARBARY, 2001). E ainda dentro âmbito flagelar do gameta masculino

temos uma variação entre os eucariotos onde se é observado que *Chlamydomonas* acabou reabsorvendo parte do flagelo (PARKER et al., 2010) enquanto em humanos temos um flagelo capaz de se dissociar do corpo principal e até mesmo em humanos, temos pouca compreensão dos mecanismos evolutivos que caracterizam essa regulação (CARVALHO-SANTOS et al., 2011).

Com expressivo interesse em trabalhos sobre inferências evolutivas do desenvolvimento (EVO-DEVO) em plantas e animais, grupos como as briófitas antes negligenciadas agora começam a ganhar espaço no cenário dos estudos evolutivos (PUTTICK et al., 2018). Tendo sido relatado defeitos em homólogos de mamíferos e algas em determinado gene que acabam coincidindo na perda de fertilidade, temos uma demonstração de funções flagelares que estão relacionadas à fertilidade masculino em todos os reinos (MEYBERG et al., 2020). Sendo assim, dentro das briófitas há organismos modelos, como é o caso da *Physcomitrella patens* que é um modelo de fácil acesso para estudos de genes homólogos em humanos.

Esse crescente interesse começa a ser evidenciado ao se teorizar a proximidade deste grupo ao clado monofilético das plantas vasculares, antigamente conhecidas erroneamente de plantas superiores. Com a publicação do genoma de *P. patens* em 2008 por Rensing et al. (RENSING et al., 2008)(https://mycocosm.jgi.doe.gov/Phypa1_1/Phypa1_1.home.html) e atualmente bancos de dados como o NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e Phytozome, que hospedam os dados genômicos e transcriptômicos de ecótipos de diversas regiões do planeta, análises exploratórias dos dados moleculares podem ser desenvolvidas a baixo custo e com representatividade de diversos tipos de amostras e tecidos das plantas modelo.

A *P. patens* é estudada desde o início do século passado sendo utilizado como modelo evolucionar e em trabalhos de evolução e desenvolvimento ao associá-lo a uma posição basal na filogenia transicional na conquista das plantas no ambiente terrestre (PUTTICK et al., 2018; VAN GESSEL et al., 2017). *P. patens* é considerado o musgo modelo atualmente. Possui o genoma e transcriptoma anotados e tem gerado dados para estudos da evolução, morfologia e fisiologia de plantas não vascularizadas (LANG et al., 2008; SHAW et al., 2004).

Apesar de todo conhecimento que se têm desse organismo, ainda não é claro como os musgos fazem sua diferenciação sexual, a parte genética dos

musgos pode ser comparada aos humanos em relação aos cromossomos sexuais X e Y (TAYLOR et al., 1980) já que também foi descoberta a existência dos cromossomos sexuais em musgos (TAYLOR et al., 1980) e ainda comparado com os humanos a distribuição sexual, não é bem compreendida (GOFFINET, 2008). E nem todas as plantas irão produzir os seus gametas. A produção de gameta pode variar de indivíduo para indivíduo e a quantidade de expressão também varia de acordo com a sexualidade da planta (STARK; MCLETCHIE; MISHLER, 2005). Então como temos diferenciação sexual genética em indivíduos monoicos, também temos expressão dos indivíduos dióicos e ambos tem o desenvolvimento variável entre espécies e entre o sexo das plantas (BOPP; BHATLA; SCHOFIELD, 1990).

Órgãos sexuais masculino e femininos podem nascer em indivíduos dioicos ou monóicos. Sendo que é de certa forma comum ocorrer um pseudo-dioicismo, que seria onde como o nome já sugere, a planta não é dióica, porém, aparenta ser pelo fato de haver mais de uma forma de indivíduos monóicos (GLIME, JANICE. 2021) o que pode acarretar confusão. E para a taxonomia, há uma dificuldade maior, já que eles têm dimorfismo sexual que dificilmente é visível morfológicamente (STARK; MCLETCHIE; MISHLER, 2005).

Entretanto, o cromossomo X e Y foram encontrados nas briófitas no século vinte (ALLEN, 1917, 1919, 1930). Sendo importante frisar que foram encontrados primeiramente esses cromossomos em *Marchantia polymorpha* (OKADA et al., 2000) que é um indivíduo dióico. Então, cada planta teria o seu próprio cromossomo sexual.

Para poder criar uma forma de melhor ilustrar a diferenciação sexual em relação a diplóides e haplóides na determinação sexual, houve uma substituição das letras X e Y nos haploides. A letra U agora representa o feminino e a letra V representa o masculino (BACHTROG et al., 2011).

Porém, isso não significa que todas as briófitas tem sexo bem definido e também não significa que todas as briófitas de fato terão esses cromossomos sexuais presentes. Muito se questionava sobre a “determinação sexual” dos musgos como sendo completamente binária, enquanto uns consideravam questões genéticas, outros consideravam questões fenotípicas para essa determinação (Doyle, 1970). Porém em 1982 começaram a unir tanto a morfologia do indivíduo, quanto o seu gene para a definição sexual, acreditando que no esporófito que seria decidido o sexo do indivíduo (RAMSEY, BERRY 1982) como analogia a reprodução

humana. Contudo, a pouco tempo instaurou-se que a definição sexual do indivíduo seria de fato determinada na meiose. Então, por mais que algumas plantas, mesmo possuindo o mesmo genes, podem ser dióicas, enquanto outras monóicas (BACHTROG et al., 2011).

No entanto, continua-se com incertezas de como todos esses processos são feitos, como cada indivíduo determina sua sexualidade e como ele a expressa. O organismo modelo *P. patens* é um organismo monóico e então a sua sexualidade fica ainda mais dúbia, ficando difícil de conseguir controlar sua reprodução e até mesmo a sexualidade dos organismos. Autores consideram o fato de seres monóicos reproduzirem como reprodução assexual caso ele reproduza consigo mesmo, a partir de clonagem e/ou com seus clones e até mesmo com seus irmãos (NEWTON; MISHLER, 1994).

Tendo então dificuldade para entender a reprodução dos musgos e sua expressão gênica na hora da diferenciação e desenvolvimento sexual, pensou-se que uma análise dos seus transcritos obtidos dos tecidos gametogênicos específicos para produção das células germinativas masculinas (anterídios) comparada com os genes expressos obtidos de tecidos gametófitos femininos (arquegônios) poderia ajudar a compreender melhor os mecanismos e genes envolvidos na diferenciação sexuais destas plantas.

2. OBJETIVO

Identificar os genes responsivos pela diferenciação de estruturas reprodutivas.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Criar um banco de dados de genes expressos em anterídios e arquegônios separadamente
- Anotar os transcritos a partir do estabelecido no genoma de *Physcomitrium patens*
- Utilização de softwares para garantir qualidade nas reads utilizadas
- Montagem e análise de gráficos dos resultados obtidos
- Análise dos transcritos e refinamento dos resultados genéticos
- Alinhamento de homólogos
- Realizar a análise filogenética de eventuais genes alvo encontrado nas análises anteriores

PERGUNTA NORTEADORA

Se há um gene responsivo pela definição sexual da *P. patens*, se é possível controlar a sexualidade da mesma e se trata de uma região conservada em estrutura e função nos demais eucariotos ou é exclusiva dos musgos?

HIPÓTESES

Já se sabe que genes homólogos que controlam a fertilidade dos musgos são os mesmos que controlam a fertilidade em diferentes eucariotos, desta forma imagine-se que há também outros genes homólogos que sejam determinantes para a diferenciação sexual em *P. patens*. Assim, fica possível um melhor entendimento sobre a evolução sexual de diversos grupos de organismos.

3. METODOLOGIA

As sequências de *P. patens* utilizadas neste trabalho foram obtidas no banco de dados de *reads* de RNA do NCBI, o SRA (www.ncbi.nlm.nih.gov/sra), estas sequências estão disponíveis através dos dados obtidos por Meyberg (MEYBERG et al., 2020) e pelo grupo de pesquisa do Prof Ralf Reki da Universidade de Freiburg, publicados recentemente (LÜTH et al., 2023). Esses dados brutos foram obtidos de anterídios (gametângios masculinos) e arquegônios (gametângio feminino) e sequenciados separadamente por cada um dos grupos de pesquisa citados acima. Todos os dados brutos dos sequenciamentos (*raw reads*) podem ser obtidos pelos *vouchers* de acesso SRR19502729, SRR19502730, SRR19502731, SRR19502732, SRR19502733, SRR19502734, SRR4454535 e SRR9901085, cada conjunto de *reads* foi considerada como uma réplica para fins de experimentos de análise de expressão diferencial.

A fim de manter a ordem dos arquivos e realizar as análises que necessitam maior esforço computacional a plataforma europeia do GALAXY (<https://usegalaxy.eu/>) foi utilizada. A ferramenta FASTQC (<https://bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) serviu para a análise das qualidades das leituras de sequenciamento baixadas. Com base no gráfico de qualidade usou-se a ferramenta FASTQ quality filter (FASTX-toolkit, hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/contact.html) para remover as *reads* com qualidade inferior a $Q < 28$ e $equal < 70$ em cada conjunto de leituras.

As *raw reads* foram mapeadas contra o genoma de referência para *P. patens* (V3.3), disponível no Phytozome (https://phytozome-next.jgi.doe.gov/info/Ppatens_v3_3) para fins da anotação e identificação inicial de cada *read*, sabendo-se assim quais os genes são representados em cada um dos conjuntos de sequências. A análise de expressão diferencial foi realizada por meio das ferramentas Salmon (PATRO et al., 2015) que fornece a quantificação individual de cada gene anotado e mapeado na etapa anterior. Assim, obtemos uma matriz com a quantidade de vezes que cada gene aparece em determinado conjunto de *reads*, chamadas na análise de *counts*. Para explorar graficamente esses resultados e realizar a análise de expressão diferencial foi utilizado o pacote Degust (POWELL, 2015). A lista de genes expressa diferencialmente foi então submetida na plataforma Bioinformatics & Evolutionary

Genomics (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) e este por agrupamento de transcritos que separa os genes únicos para cada tratamento. Essa lista de genes únicos representa as expressões diferenciais em cada tratamento. Após a listagem os genes são comparados com o banco de dados PEATMOSS (<https://peatmoss.plantcode.cup.uni-freiburg.de/>), para identificar a região expressa de cada gene conhecido e mapeado em *P. patens*. Essa análise comparou os transcritos de anterídios (masculino) e arquegônios (feminino) a fim de identificar diferenças na expressão gênica entre esses órgãos do musgo

Dos genes putativos relacionados a organogênese somática o gene candidato foi utilizado como *query* para busca de homólogos através de alinhamento local com a ferramenta BLASTn no banco de dados de nucleotídeos do NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Foram selecionadas sequências homólogas que representassem os principais grupos de Archaeplastida e Opisthokonta. Através desse alinhamento os organismos com cobertura superior a 40% e e-value superior a 1e-05 foram baixados para um banco de dados em um servidor local. Os homólogos incluídos nesse banco de dados foram objeto de alinhamento global utilizando a ferramenta MAFFT (NAKAMURA et al., 2018) no modo automático, esses alinhados foram desbastados, para excluir as regiões não conservadas no alinhamento, usando a plataforma gráfica Aliview (LARSSON, 2014). As sequências desbastadas foram submetidas à ferramenta FASTTREE (PRICE; DEHAL; ARKIN, 2009) e o resultado do cálculo de distância dos nós da árvore foi plotado com a ferramenta web ITOL (LETUNIC; BORK, 2021). Esse conjunto de análises filogenéticas permite situar os ramos da árvore e a proximidade deste gene e níveis de variação em diferentes organismos que não só plantas, nos dando o panorama geral do estado de conservação dos mecanismos engatilhados pelos genes selecionados na análise de expressão diferencial.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise quantitativa de transcritos, utilizando o *output* do algoritmo Salmon permitiu identificar trinta e três mil genes expressos. Utilizando uma amostragem de mil genes mais expressos, divididos em mais expressos (*up-regulated*) e menos expressos (*down-regulated*) em cada um dos tecidos gametogênicos de *P. patens*, foi possível identificar que grande parte deste e de ocorrência exclusiva de determinada condição. Por exemplo, a maior parte dos transcritos identificados em nossas análises estão sub-expressas exclusivamente no arquegônio (969 transcritos, 25,4% do total de genes expressos). Em anterídios a maior parte dos genes está super-expressa exclusivamente nesse tecido (935 transcritos, 24,5% do total de genes). Apenas 112 transcritos (2,9% do total de genes) estão superexpressos em ambos tecidos, enquanto apenas 27 transcritos (0,7%) estão sub-expressos tanto em anterídios como arquegônios. Não foram identificados transcritos super e sub-expressos ao mesmo tempo em ambos os tecidos reprodutivos (Figura 3). Quinze transcritos super-expressos no gametângio feminino foram identificados como sub-expressos nos tecidos masculinos, representando 0,4% do total de transcritos, enquanto três transcritos estão super-expressos em anterídios (0,1% do total de transcritos) e sub-expressos em arquegônios, sendo estes selecionados para as análises posteriores a fim de discutir a provável relação destes com a diferenciação sexual em *P. patens*. Os demais dados destas análises comparativas podem ser observados na Figura 3.

executados por Lüth et al. (LÜTH et al., 2023) não foram observados em *Count Per Million* (CPM) equivalentes nas *raw-reads* obtidas para os anterídios estudados por Meyberg et al. (MEYBERG et al., 2020). Essa observação, apesar de contrastante, não deprecia as observações sobre a expressão diferencial entre gametângios masculinos e femininos, somente ressalta que a expressão não é constante e reflete os estados de maturidade de cada tecido no momento da coleta de dados, ainda mais se tratando de experimentos *in vitro* (RENSING et al., 2020). Assim, fica evidente a importância do estabelecimento do modelo biológico para o presente estudo e de padronizações para a reprodutibilidade de experimentos para análise diferencial de genes (SCHURCH et al., 2016).

Por meio da análise de função e ontologia gênica (GO analysis), todos os três genes destacados possuem suas funções conhecidas e devidamente identificadas no atlas de expressão do banco de dados PEATMOSS. Foi possível observar que o gene Pp3c10_9456v3.1 é responsável pela determinação da simetria, morfogênese da estrutura anatômica, montagem de componentes celulares e desenvolvimento de órgãos em *P. patens*, sendo um alvo ideal para testes de nocaute gênico para validação de sua função na diferenciação dos órgãos reprodutivos nesta planta. Além desta função, o mesmo transcrito pode ser relacionado com proteínas do domínio de repetições ricas em leucina (leucine-rich repeat - LRR). Este domínio de proteínas é amplamente distribuído tanto em plantas como animais e executa importante função na defesa nos tecidos reprodutivos, em especial contra a ação de patógenos, bem como uma função secundária em plantas no sentido regulando a compatibilidade polínica, reconhecendo pólen não compatível como agente agressor e impedindo a polinização (JONES; JONES, 1997). *P. patens*, como todas as briófitas não possuem reprodução assistida por pólen, sendo assim a função acima descrita ainda não observada. Entretanto, este gene foi identificado como de maior expressão nos tanto em tecidos vegetativos de gametófitos maduros, assim como nos tecidos reprodutivos, como esporófitos, mas praticamente não expressos em esporos e protonemas (Figura 5), podendo então ter alguma função secundária ainda a ser explorada.

As ontologias GO:0007368 e GO:0048513 estão relacionadas com diversos elementos da arquitetura e estruturação do corpo em animais também (KHODIYAR et al., 2011; MASJOSTHUSMANN et al., 2018). Em humanos, as mesmas ontologias são designadas aos genes ZIC3 e TDGF1, que em experimentos de

expressão diferencial aparecem super-expressos em pacientes da síndrome de Klinefelter (PAPATHEODOROU et al., 2019), relacionando assim que prováveis efeitos deletérios nas rotas destes genes podem gerar feminilização dos indivíduos (SKAKKEBÆK et al., 2018). Demais ontologias identificadas para Pp3c10_9456v3.1 são apresentadas na Tabela 1.

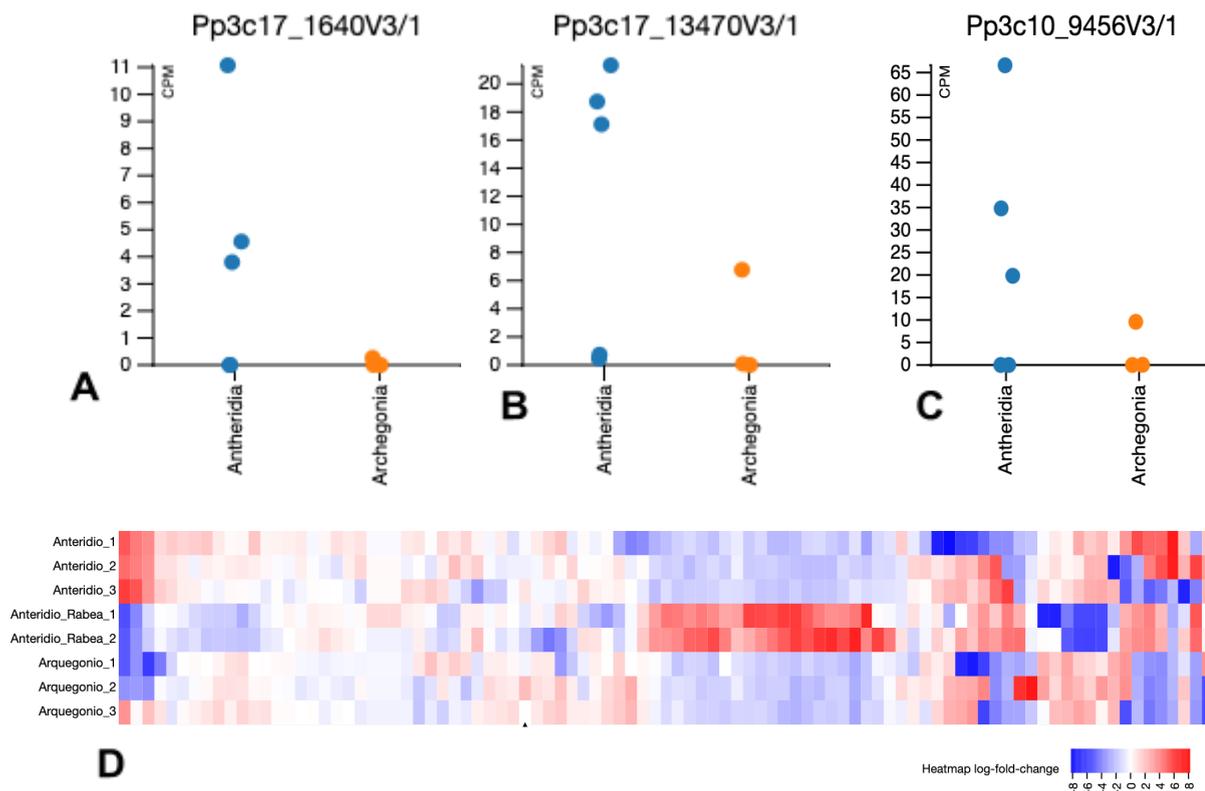


Figura 3 - A-C Expressão diferencial dos genes Pp3c17_1640, Pp3c17_13470 e Pp3c10_9456 nos anterídios e arquegônios. Pontos Azuis e Laranjas representam as *Counts Per Million* em cada um dos conjuntos de dados. D. Heatmap de todos os genes diferencialmente expressos em cada uma das réplicas. Em vermelho, maior log-fold-change. Em azul, menos log-fold-change. Anterídio_1, Anterídio_2, Anterídio_3, Arquegonio_1, Arquegonio_2 e Arquegonio_3 = *raw reads* oriundas dos experimentos do Grupo de Pesquisa da UNIFREIBUR. Anteridio_Rabea_1 e Anteridio_Rabea_2 = *raw reads* oriundas dos experimentos executados por Meyberg (MEYBERG et al., 2020).

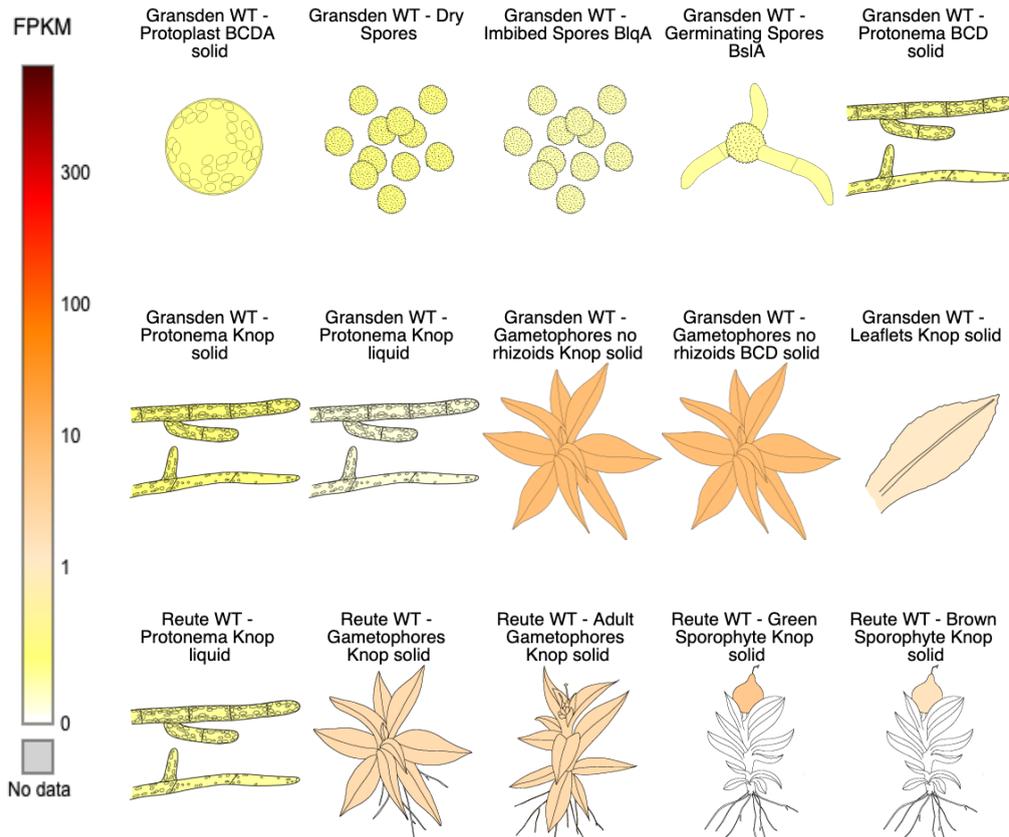


Figura 4 - Expressão do gene Pp3c10_9456V3.1 em tecidos vegetativos e reprodutivos, baseado na expressão diferencial obtida pela análise de expressão normalizada no PEATMOSS. FPKM = Fragmentos por kilobase por milhão de *reads* sequenciados, onde em vermelho identificam maior expressão e amarelo menor expressão do alvo testado.

Em *Pohlia nutans*, uma espécie de musgos da Antártica sequenciada recentemente, homólogos de LRR estão associados a resposta ao estresse abiótico, atuando como um sinalizador de eventos de estresse salino (WANG et al., 2017). Apesar de não estar relacionado diretamente com reprodução, é comum que esses receptores tenham funções sobrepostas na promoção da proliferação, longevidade e expansão celular, bem como na defesa a agentes externos e ao estresse abiótico em diversos grupos de angiospermas (DUFAYARD et al., 2017), reforçando a hipótese desses processos terem sido herdados de um ancestral comum a todas as Embryophytes a partir da reconstrução da evolução deste caráter (DELAUX et al., 2019).

Gene	Term	Description	Source
Pp3c10_9456V3.1	GO:0044763	single-organism cellular process	GO BP
Pp3c10_9456V3.1	GO:0022607	cellular component assembly	GO BP
Pp3c10_9456V3.1	32900952	PF12799 - Leucine Rich repeats (2 copies) (LRR_4) (1 of 7)	Phytozome
Pp3c10_9456V3.1	GO:0048513	organ development	GO BP
Pp3c10_9456V3.1	GO:0007368	determination of left/right symmetry	GO BP
Pp3c10_9456V3.1	GO:0009653	anatomical structure morphogenesis	GO BP
Pp3c10_9456V3.1	GO:0044464	cell part	GO CC
Pp3c10_9456V3.1	gi 908443311 ref X P_013079788.1	dynein assembly factor 1, axonemal-like isoform X2 [Biomphalaria glabrata].	NCBI Nr

TABELA 1 - Ontologias gênicas (GO) identificadas para Pp3c10_9456v3.1 com base nas anotações e expressão gênica diferencial disponível no Atlas de Expressão do PEATMOSS.

Quando comparamos Pp3c10_9456V3.1 com homólogos de outros organismos, desde representantes de Archaeplastida até de Opisthokonta (Figura 6), fica evidente que a linhagem evolutiva deste gene é monofilética. Entretanto, há a sugestão de duas linhagens para esse gene em plantas verdes, sendo identificado dois conjuntos de cópias para a região estudada. O primeiro grupo forma um clado parálogo contendo somente representantes de Chlorophyta, o segundo formando

A ausência de homólogos para espécies de Tracheophytes como as angiospermas e as gimnospermas pode ser explicado pela ausência de flagelos na arquitetura dos gametas masculinos destas espécies de plantas (WILSEN; HEPLER, 2007). No caso deste grupo de plantas os homólogos putativos devem estar relacionados com a resposta ao estresse abiótico, reconhecimento e compatibilidade polínica e demais mecanismos de defesa, como discutido no tópico anterior (JONES; JONES, 1997).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com esse estudo, nós propomos que esses genes putativos podem ser os responsáveis pela representação genotípica e fenotípica da diferenciação sexual dos musgos com o foco específico nos genes responsáveis pela arquitetura do desenvolvimento de órgão reprodutivos, como o caso do gene Pp3c10_9456v3.1.

Quando há defeito em algum gene, seja pela superexpressão ou subexpressão do mesmo, temos uma cascata de eventos imprevisíveis para o organismo (KAWADE et al., 2020; WU et al., 2011). Tendo um gene responsável pela formação de órgãos, temos que o seu defeito pode culminar na má formação do órgão ou na completa ausência do mesmo (OTERO; HELARIUTTA; BENITEZ-ALFONSO, 2016).

Apesar de haver dimorfismo sexual nos musgos (HOLÁ et al., 2014; SANTOS; PEREIRA ALVARENGA; PÔRTO, 2018), podemos observar o dimorfismo sexual ser impulsionado por exposição ao cádmio onde um dos sexos acabou tendo uma ressalva sobre o outro (BOQUETE et al., 2021). E esse dimorfismo sexual nos musgos os fazem terem um interesse impulsionado para diversas finalidades, pois ao compreender melhor a parte gênica de expressão de um organismo conseguimos uma melhor entendimento sobre sua estrutura e sobre respostas para uma ampla gama de reações do indivíduo (ZIMMERMANN, 2018).

Logo, com maior compreensão de genes homólogos em eucariotos (como plantas e humanos), não somente se entenderá melhor o desenvolvimento das plantas, mas também possibilitará entender questões relacionadas à infertilidade humana e seu desenvolvimento sexual.

A possibilidade de um modelo eucarioto flagelado e de fácil manipulação em laboratório faz destes musgos uma importante fonte de informação para melhor entendimento de nossas variações genéticas como também problemas em relação à reprodução humana.

Tendo como perspectiva futura a possibilidade de testarmos essa hipótese colocando em prática todo o conhecimento teórico para então analisarmos os resultados que serão obtidos a partir de um *knockout* do gene no organismo *P. patens*. Então o trabalho continuará sendo executado em busca de respostas satisfatórias para o controle gênico de expressão sexual do musgo *P. patens*.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, C. E. 1917. A chromosome difference correlated with sex in *Sphaerocarpos*. **Science** 46: 466-467.
- ALLEN, C. E. 1919. The basis of sex inheritance in *Sphaerocarpos* **Proc. Amer. Philosoph. Soc.** 58: 289-316.
- ALLEN, C. E. 1930. Inheritance in a hepatic. **Science** 71: 197-204
- AYA, K. et al. The Gibberellin perception system evolved to regulate a pre-existing GAMYB-mediated system during land plant evolution. **Nature Communications**, v. 2, n. 1, p. 544, 22 nov. 2011.
- BACHTROG, D. et al. Are all sex chromosomes created equal? **Trends in Genetics**, v. 27, n. 9, p. 350–357, set. 2011.
- BOPP, M.; BHATLA, S. C.; SCHOFIELD, W. B. Physiology of sexual reproduction in mosses. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 9, n. 4, p. 317–327, jan. 1990.
- BOQUETE, M. T. et al. Patterns and mechanisms of heavy metal accumulation and tolerance in two terrestrial moss species with contrasting habitat specialization. **Environmental and Experimental Botany**, v. 182, p. 104336, fev. 2021.
- BRININGER, C. et al. The more adaptive to change, the more likely you are to survive: Protein adaptation in extremophiles. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 84, p. 158–169, dez. 2018.
- CARVALHO-SANTOS, Z. et al. Tracing the origins of centrioles, cilia, and flagella. **Journal of Cell Biology**, v. 194, n. 2, p. 165–175, 25 jul. 2011.
- CASTRO, N. M. C. F., PÔRTO, K. C., YANO, O. & CASTRO, A. A. J. F. Levantamento florístico de Bryopsida de cerrado e mata ripícola do Parque Nacional de Sete Cidades, Piauí, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. v.16, n. 1, p. 61-76, 2002.
- CRISP, M.; COOK, L. Do early branching lineages signify ancestral traits? **Trends in Ecology & Evolution**, v. 20, n. 3, p. 122–128, mar. 2005.
- DELAUX, P.-M. et al. Reconstructing trait evolution in plant evo–devo studies. **Current Biology**, v. 29, n. 21, p. R1110–R1118, nov. 2019.
- DOYLE, W. T. 1970. **The Biology of Higher Cryptogams**: 163 pp. Macmillan, New York.
- DUFAYARD, J.-F. et al. New Insights on Leucine-Rich Repeats Receptor-Like Kinase Orthologous Relationships in Angiosperms. **Frontiers in Plant Science**, v. 08, 5 abr. 2017.
- GITZENDANNER, M. A. et al. Plastid phylogenomic analysis of green plants: A billion years of evolutionary history. **American Journal of Botany**, v. 105, n. 3, p. 291–301, mar. 2018.
- GLIME, JANICE. 2021. **Bryophyte Ecology**.
<https://digitalcommons.mtu.edu/oabooks/4>

GOFFINET, B. **Bryophyte Biology**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2008.

HARRIS, B. J. et al. Divergent evolutionary trajectories of bryophytes and tracheophytes from a complex common ancestor of land plants. **Nature Ecology & Evolution**, v. 6, n. 11, p. 1634–1643, 29 set. 2022.

HOLÁ, E. et al. Sex ratio, sex-specific pattern in vegetative growth and gemma production in an aquatic liverwort, *Scapania undulata* (Marchantiophyta: Scapaniaceae): SEXUAL AND ASEXUAL REPRODUCTION IN SCAPANIA. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 175, n. 2, p. 229–241, jun. 2014.

HORST, N. A. et al. A single homeobox gene triggers phase transition, embryogenesis and asexual reproduction. **Nature Plants**, v. 2, n. 2, p. 15209, 18 jan. 2016.

JIANG, Y. et al. Mosses Are Better than Leaves of Vascular Plants in Monitoring Atmospheric Heavy Metal Pollution in Urban Areas. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 6, p. 1105, 29 maio 2018.

JONES, D. A.; JONES, J. D. G. The Role of Leucine-Rich Repeat Proteins in Plant Defences. Em: **Advances in Botanical Research**. [s.l.] Elsevier, 1997. v. 24p. 89–167.

KAWADE, K. et al. Metabolic Control of Gametophore Shoot Formation through Arginine in the Moss *Physcomitrium patens*. **Cell Reports**, v. 32, n. 10, p. 108127, set. 2020.

KHODIYAR, V. K. et al. The representation of heart development in the gene ontology. **Developmental Biology**, v. 354, n. 1, p. 9–17, jun. 2011.

LAENEN, B. et al. Extant diversity of bryophytes emerged from successive post-Mesozoic diversification bursts. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 5134, 27 out. 2014.

LANG, D. et al. Exploring plant biodiversity: the *Physcomitrella* genome and beyond. **Trends in Plant Science**, v. 13, n. 10, p. 542–549, 2008.

LARSSON, A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. **Bioinformatics**, v. 30, n. 22, p. 3276–3278, 15 nov. 2014.

LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W293–W296, 2 jul. 2021.

LIGRONE, R.; DUCKETT, J. G.; RENZAGLIA, K. S. Major transitions in the evolution of early land plants: a bryological perspective. **Annals of Botany**, v. 109, n. 5, p. 851–871, abr. 2012.

LISBÔA, R. C. L. **Musgos acrocárpicos do Estado de Rondônia**. Belém, Pará: Ministério da Ciência e Tecnologia, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Museu Paraense Emílio Goeldi, 1993.

LIU, J. et al. Genetic transformation of moss plant. **African Journal of**

Biotechnology, v. 12, n. 3, p. 227–232, 16 jan. 2013.

LÜTH, V. M. et al. A Physcomitrella PIN protein acts in spermatogenesis and sporophyte retention. **New Phytologist**, p. nph.18691, 25 jan. 2023.

MASJOSTHUSMANN, S. et al. A transcriptome comparison of time-matched developing human, mouse and rat neural progenitor cells reveals human uniqueness. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 354, p. 40–55, set. 2018.

MCDANIEL, S. F. Bryophytes are not early diverging land plants. **New Phytologist**, v. 230, n. 4, p. 1300–1304, maio 2021.

MEYBERG, R. et al. Characterisation of evolutionarily conserved key players affecting eukaryotic flagellar motility and fertility using a moss model. **New Phytologist**, v. 227, n. 2, p. 440–454, jul. 2020.

MICHEL, E. DE L. **Hepáticas epifíticas sobre o pinheiro-brasileiro no Rio Grande do Sul**. 1a ed ed. Porto Alegre, RS: Editora da Universidade, Universidade Federal do Rio Grande do Sul : UFRGS/Pró-Reitoria de Graduação, de Pesquisa e de Pós-Graduação, 2001.

MITCHELL, D. R. The Evolution of Eukaryotic Cilia and Flagella as Motile and Sensory Organelles. Em: **Eukaryotic Membranes and Cytoskeleton**. Advances in Experimental Medicine and Biology. New York, NY: Springer New York, 2007. v. 607p. 130–140.

NAKAMURA, T. et al. Parallelization of MAFFT for large-scale multiple sequence alignments. **Bioinformatics**, v. 34, n. 14, p. 2490–2492, 15 jul. 2018.

NEWTON, A. Branching Architecture in Pleurocarpous Mosses. Em: NEWTON, A.; TANGNEY, R. (Eds.). **Pleurocarpous Mosses**. Systematics Association Special Volumes. [s.l.] CRC Press, 2007. v. 20073125p. 287–307.

NEWTON, A. E.; MISHLER, B. D. **THE EVOLUTIONARY SIGNIFICANCE OF ASEXUAL REPRODUCTION IN MOSSES**. Hattori Botanical Laboratory, , 21 out. 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.18968/jhbl.76.0_127>. Acesso em: 27 jan. 2023

OKADA, S. et al. Construction of male and female PAC genomic libraries suitable for identification of Y-chromosome-specific clones from the liverwort, *Marchantia polymorpha*: Male and female PAC libraries of *Marchantia*. **The Plant Journal**, v. 24, n. 3, p. 421–428, nov. 2000.

ONE THOUSAND PLANT TRANSCRIPTOMES INITIATIVE. One thousand plant transcriptomes and the phylogenomics of green plants. **Nature**, v. 574, n. 7780, p. 679–685, 31 out. 2019.

OTERO, S.; HELARIUTTA, Y.; BENITEZ-ALFONSO, Y. Symplastic communication in organ formation and tissue patterning. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 29, p. 21–28, fev. 2016.

PAPATHEODOROU, I. et al. Expression Atlas update: from tissues to single cells. **Nucleic Acids Research**, p. gkz947, 30 out. 2019.

PARKER, J. D. K. et al. Centrioles are freed from cilia by severing prior to mitosis. **Cytoskeleton**, v. 67, n. 7, p. 425–430, 10 maio 2010.

PARKS, M. B. et al. Phylogenomics reveals an extensive history of genome duplication in diatoms (Bacillariophyta). **American Journal of Botany**, v. 105, n. 3, p. 330–347, mar. 2018.

PATRO, R. et al. **Salmon provides accurate, fast, and bias-aware transcript expression estimates using dual-phase inference**. [s.l.] Bioinformatics, 27 jun. 2015. Disponível em: <<http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/021592>>. Acesso em: 27 jan. 2023.

PERERA-CASTRO, A. V. et al. It Is Hot in the Sun: Antarctic Mosses Have High Temperature Optima for Photosynthesis Despite Cold Climate. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 1178, 7 ago. 2020.

POWELL, D. **drpowell/degust v3.2.0**. Zenodo, , 10 out. 2015. Disponível em: <<https://zenodo.org/record/3258933>>. Acesso em: 27 jan. 2023

PRICE, M. N.; DEHAL, P. S.; ARKIN, A. P. FastTree: Computing Large Minimum Evolution Trees with Profiles instead of a Distance Matrix. **Molecular Biology and Evolution**, v. 26, n. 7, p. 1641–1650, 1 jul. 2009.

PUTTICK, M. N. et al. The Interrelationships of Land Plants and the Nature of the Ancestral Embryophyte. **Current Biology**, v. 28, n. 5, p. 733- 745.e2, mar. 2018.

QIAO, X.; ZHANG, S.; PATERSON, A. H. Pervasive genome duplications across the plant tree of life and their links to major evolutionary innovations and transitions. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 20, p. 3248–3256, 2022.

RAMSAY, H. P. and BERRIE, G. K. 1982. Sex determination in bryophytes. *J. Hattori Bot. Lab.* 52: 255-274.

RENSING, S. A. et al. The *Physcomitrella* Genome Reveals Evolutionary Insights into the Conquest of Land by Plants. **Science**, v. 319, n. 5859, p. 64–69, 4 jan. 2008.

RENSING, S. A. et al. The Moss *Physcomitrium* (*Physcomitrella*) *patens*: A Model Organism for Non-Seed Plants. **The Plant Cell**, v. 32, n. 5, p. 1361–1376, maio 2020.

RENZAGLIA, K. S.; GARBARY, D. J. Motile Gametes of Land Plants: Diversity, Development, and Evolution. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 20, n. 2, p. 107–213, mar. 2001.

SANTOS, W. L. D.; PEREIRA ALVARENGA, L. D.; PÔRTO, K. C. Sexual Dimorphism, Vegetative Growth and Reproductive Investment in the Rhizautoicous Moss *Fissidens flaccidus* (Fissidentaceae, Bryopsida). **Cryptogamie, Bryologie**, v. 39, n. 2, p. 271–281, abr. 2018.

SCHURCH, N. J. et al. How many biological replicates are needed in an RNA-seq experiment and which differential expression tool should you use? **RNA**, v. 22, n. 6, p. 839–851, jun. 2016.

SHAW, J., AND RENZAGLIA, K. (2004). Phylogeny and diversification of bryophytes.

Am J Bot 91, 1557-1581.

SKAKKEBÆK, A. et al. DNA hypermethylation and differential gene expression associated with Klinefelter syndrome. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 13740, 13 set. 2018.

STARK, L. R.; MCLETCHIE, D. N.; MISHLER, B. D. Sex Expression, Plant Size, and Spatial Segregation of the Sexes Across a Stress Gradient in the Desert Moss *Syntrichia caninervis*. **The Bryologist**, v. 108, n. 2, p. 183–193, jun. 2005.

STEWART, K. D.; MATTOX, K. R. Comparative cytology, evolution and classification of the green algae with some consideration of the origin of other organisms with chlorophylls A and B. **The Botanical Review**, v. 41, n. 1, p. 104–135, jan. 1975.

TAYLOR, R. J. et al. (EDS.). **The Mosses of North America: an inquiry into the biology of mosses based upon a symposium sponsored by the Pacific Section, Botanical Society of America**. San Francisco, Calif: Pacific Division, American Association for the Advancement of Science, 1980.

TAYLOR, W. A. et al. Wall ultrastructure of the oldest embryophytic spores: Implications for early land plant evolution. **Revue de Micropaléontologie**, v. 60, n. 3, p. 281–288, jul. 2017.

VALENTE, E. DE B.; PÔRTO, K. C. Hepáticas (Marchantiophyta) de um fragmento de Mata Atlântica na Serra da Jibóia, Município de Santa Teresinha, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 2, p. 433–441, jun. 2006.

VAN GESSEL, N., LANG, D., RESKI, R. (2017). Genetics and Genomics of *Physcomitrella patens*. In: Assmann, S., Liu, B. (eds) *Plant Cell Biology. The Plant Sciences*, vol 20. Springer, New York, NY.

WANG, J. et al. PnLRR-RLK27, a novel leucine-rich repeats receptor-like protein kinase from the Antarctic moss *Pohlia nutans*, positively regulates salinity and oxidation-stress tolerance. **PLOS ONE**, v. 12, n. 2, p. e0172869, 27 fev. 2017.

WANG, X. et al. Moss facilitating mercury, lead and cadmium enhanced accumulation in organic soils over glacial erratic at Mt. Gongga, China. **Environmental Pollution**, v. 254, p. 112974, nov. 2019.

WELLMAN, C. H.; OSTERLOFF, P. L.; MOHIUDDIN, U. Fragments of the earliest land plants. **Nature**, v. 425, n. 6955, p. 282–285, set. 2003.

WILSEN, K. L.; HEPLER, P. K. Sperm Delivery in Flowering Plants: The Control of Pollen Tube Growth. **BioScience**, v. 57, n. 10, p. 835–844, 1 nov. 2007.

WU, S.-Z. et al. Myosin VIII Regulates Protonemal Patterning and Developmental Timing in the Moss *Physcomitrella patens*. **Molecular Plant**, v. 4, n. 5, p. 909–921, set. 2011.

ZIMMERMANN, M. T. The Importance of Biologic Knowledge and Gene Expression Context for Genomic Data Interpretation. **Frontiers in Genetics**, v. 9, p. 670, 18 dez. 2018.