

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

BRUNA MOTA BERNARDES

**AVALIAÇÃO DE GENES RESPONSIVOS AO ESTRESSE SALINO NO MUSGO
BRYUM ARGENTEUM HEDW.**

**São Gabriel
2022**

BRUNA MOTA BERNARDES

**AVALIAÇÃO DE GENES RESPONSIVOS AO ESTRESSE SALINO NO MUSGO
BRYUM ARGENTEUM HEDW.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Filipe de Carvalho Victoria

**São Gabriel
2022**

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) .

B522a Bernardes, Bruna Mota
Avaliação de Genes Responsivos ao Estresse Salino no Musgo
Bryum argenteum HEDW. / Bruna Mota Bernardes.
60 p.

Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2022.
"Orientação: Filipe de Carvalho Victoria".

1. Estresse Abiótico. 2. Musgos. 3. RNA-Seq. 4. Genômica.
I. Título.

BRUNA MOTA BERNARDES

**AVALIAÇÃO DE GENES RESPONSIVOS AO ESTRESSE SALINO NO MUSGO
BRYUM ARGENTEUM HEDW.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Dissertação defendida e aprovada em 13 de dezembro de 2022.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Filipe de Carvalho Victoria
Orientador
UNIPAMPA

Dr. Stephan Machado Dohms
(UCB)

Prof. Dr. Paulo Marcos Pinto
(UNIPAMPA)

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho aos meus primos e irmãos do coração, Gabriel e Pedro, por serem minha melhor plateia. Lembrar dos olhares de admiração deles direcionados a mim é o que me dá força e coragem para seguir em frente. Obrigada por iluminarem minha vida e meu caminho daqui em diante. Amo vocês, gatinhos!

Agradeço aos meus pais, por serem meus melhores amigos, ouvintes e incentivadores. Obrigada, novamente, por acreditarem mais em mim do que eu mesma acredito. Sem vocês ao meu lado nenhuma conquista seria possível.

A minha família, por tornarem tudo mais fácil e vibrarem comigo a cada passo dado, por menor que parecesse para mim. Obrigada pelos momentos de acolhimento e por serem sempre o meu lugar favorito no mundo.

Aos meus amigos, pelos momentos de descontração, apoio, risadas compartilhadas, noites de jogos e por estarem sempre a uma mensagem de distância. Em especial, a Diana, por ser minha confidente e sempre saber o que dizer pra me animar.

Aos meus amigos e colegas de laboratório do Team Moss, que tornam o fazer ciência ainda mais prazeroso por ser feito com risadas, companheirismo e amizade. Maria, obrigada por toda ajuda, disposição e incentivo, apesar da diferença de fuso horário na reta final. Sara, obrigada por sempre me ajudar e tornar tudo mais leve e engraçado, até mesmo os perrengues ficam legais com a tua companhia. E Guilherme, obrigada pela parceria e por sempre estar disposto a me ajudar, mesmo quando o experimento precisa ser retirado fora do horário comercial. É uma honra dividir trabalhos acadêmicos e momentos especiais com vocês.

Aos meus colegas do Núcleo de Estudos da Vegetação Antártica, por todo apoio, ajuda e disposição.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Filipe de Carvalho Victoria, pela confiança em mim e no meu trabalho. Obrigada por sempre me dar bons exemplos e me incentivar a fazer ciência de forma íntegra.

A Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) e ao Núcleo de Estudos da Vegetação Antártica (NEVA) por me acolherem e tornarem possível a realização deste trabalho, assim como a CAPES e o CNPq pelo incentivo e apoio a minha pesquisa.

Todos os caminhos são iguais
O que leva à glória ou a perdição
Há tantos caminhos tantas portas
Mas somente um tem coração
- Raul Seixas

RESUMO

O estresse salino afeta consideravelmente o crescimento e desenvolvimento das plantas. Musgos, vegetação predominante em ambientes insulares, conseguem suportar altos níveis de salinidade. Para compreender melhor os mecanismos de tolerância a salinidade do musgo *Bryum argenteum*, foram aplicadas técnicas de RNA-seq para análises das alterações transcriptômicas em amostras submetidas a diferentes concentrações de NaCl (200 mM, 400 mM, 600 mM e 800m M) por 6h e 24h em comparação com o grupo controle. Além do estabelecimento do cultivo de *in vitro* e sequenciamento do genoma. Obtivemos que concentrações mais altas de hipoclorito quando combinadas com pouco tempo de imersão desinfectam o *B. argenteum* sem causar danos a planta, assim como o meio de cultura MS proporciona maior desenvolvimento de protonemas e o KNOP, por sua vez, de gametófitos. Comparativamente aos genomas de musgos considerados como completos nosso genoma possui maiores similaridades com os genomas de *Ceratodon purpureus* e *Pohlia nutans*, sendo o *gap* entre os genomas de *Bryum argenteum* e *Physcomitrium patens* muito mais representativo do que nos demais genomas comparados com nosso *assembly*. Quanto a análise de ontologia genética, houveram GOs relacionadas ao processo metabólico de carboidratos (GO:0005975); função molecular com atividade de oxirredutase (GO:0016491); componente integral da membrana (GO:0016021); composição de membrana tilacóide de cloroplasto (GO:0009535); fotossistema II (GO:0009523); cloroplasto (GO:0009507); entre outras, com destaque para a parte fotossintética que sofre alterações conforme os níveis de NaCl são elevados. O tratamento de 6h teve mais genes contrastantes do que semelhantes quando comparado com o tratamento de 24h, o que evidencia o quão rápido a planta gera resposta ao sal a fim de se proteger contra o estresse, acontecendo assim, uma adaptação lenta e gradual através de respostas moleculares a estresses, que leva a aclimatação. Por fim, concluímos que os mesmos conjuntos de genes estão envolvidos na reação das plantas à osmorregulação e/ou na respostas a mudanças iônicas, evidenciando que esses mecanismos são conservados também em muitas outras plantas terrestres mesmo que não estejam sob influência da pulverização marinha.

Palavras-chave: Estresse Abiótico; Musgos; RNA-Seq; Genômica

ABSTRACT

Salt stress considerably affects plant growth and development. Mosses, the predominant vegetation in island environments, can withstand high levels of salinity. To better understand the salinity tolerance mechanisms of *Bryum argenteum* moss, RNA-seq techniques were applied to analyze transcriptomic alterations in samples submitted to different concentrations of NaCl (200 mM, 400 mM, 600 mM and 800 mM) for 6 hours and 24h compared to the control group. In addition to the establishment of in vitro cultivation and genome sequencing. We found that higher concentrations of hypochlorite, when combined with a short immersion time, disinfect *B. argenteum* without causing damage to the plant, just as the MS culture medium provides greater development of protonemas and KNOP, in turn, of gametophytes. Compared to genomes of mosses considered as complete, our genome has greater similarities with the genomes of *Ceratodon purpureus* and *Pohlia nutans*, with the gap between the genomes of *Bryum argenteum* and *Physcomitrium patens* being much more representative than in the other genomes compared with our assembly. As for the analysis of genetic ontology, there were GOs related to the metabolic process of carbohydrates (GO:0005975); molecular function with oxidoreductase activity (GO:0016491); integral membrane component (GO:0016021); chloroplast thylakoid membrane composition (GO:0009535); photosystem II (GO:0009523); chloroplast (GO:0009507); among others, with emphasis on the photosynthetic part that undergoes changes as NaCl levels are high. The 6h treatment had more contrasting than similar genes when compared to the 24h treatment, which shows how quickly the plant generates a salt response in order to protect itself against stress, thus, a slow and gradual adaptation occurs through molecular responses to stresses, which leads to acclimatization. Finally, we conclude that the same sets of genes are involved in the reaction of plants to osmoregulation and/or in responses to ionic changes, showing that these mechanisms are also conserved in many other terrestrial plants even if they are not under the influence of marine spraying.

Keywords: Abiotic Stress; Mosses; RNA-Seq; Genomics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vista da lupa das amostras de <i>B. argenteum</i> logo após a coleta na cidade de Venâncio Aires em agosto de 2020, onde temos em A as cápsulas e em B gametófitos.....	18
Figura 2: Cultivos de <i>B. argenteum</i> , onde A e B estão em meio KNOP com maior formação de gametófitos e C e D em meio MS com maior formação de protonemas.....	27
Figura 3: Dlotplot, nucmer, com a sintenia do genoma de <i>Bryum argenteum</i> com o genoma de referência.....	31
Figura 4: BUSCO, colinearidade da qualidade do genoma comparados ao genoma de referência, onde azul são as sequências completas e duplicadas; amarelo sequencias fragmentadas e vermelho sequencias faltantes.....	32
Figura 5. Circos plot dos melhores hits entre o conjunto de cds anotadas para <i>Bryum argenteum</i> em comparação com as cds de <i>Ceratodon purpureus</i> , <i>Pohlia nutans</i> e <i>Physcomitrium patens</i> . A. <i>Bryum x P. patens</i> . B. <i>Bryum x Ceratodon</i> . C. <i>Bryum x P. nutans</i> . As cores indicam o grau de sintenia entre as regiões comparadas, variando do azul (para os melhores <i>hit scores</i>) para o vermelho (para os piores <i>his scores</i>).....	33
Figura 6: Alinhamento e filtragem das sequências encontradas no transcriptoma. No primeiro gráfico sem filtragens, no segundo após a primeira e remoção de bactéria e no terceiro apenas a sequência de musgos.....	36
Figura 7: Diagrama de Venn, onde há todos os tratamentos de 6h (Controle, 200mM, 400mM, 600mM e 800mM) números de genes expressos e as intersecções entre os tratamentos.....	39
Figura 8: Diagrama de Venn, onde há todos os tratamentos de 24h (Controle, 200mM, 400mM, 600mM e 800mM) número de genes expressos e as intersecções entre os tratamentos.....	43
Figura 9: Dimensionamento multidimensional (MDS) entre todos os tratamentos de 6h e 24h, demonstrando a similaridade e contraste entre eles.....	47
Figura 10: Heatmap com o padrão de expressão gênica dos genes de cada tratamento, onde vermelho representa maior expressão e azul menor expressão.....	48
Figuras 11, 12 e 13: REVIGO dos tratamentos de 6h, onde na primeira figura estão agrupados os Processos Biológicos; na segunda os de Componente Celular e por último, Funções Moleculares.....	48
Figuras 14, 15 e 16: REVIGO dos tratamentos de 6h, onde na primeira figura estão agrupados os Processos Biológicos; na segunda os de Componente Celular e por último, Funções Moleculares.....	49
Figura 17: Árvore filogenética dos homólogos de AP2/ERF obtidos do transcriptoma de <i>Bryum argenteum</i> e de demais genomas de musgos com transcriptomas disponíveis nas bases de dados ou obtidos do acervo do NEVA. As diferentes cores dos ramos refletem o valor de bootstrap para determinado ramo, conforme anotação da legenda.....	51

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 - Relação de testes de desinfecções testados com as soluções, concentrações e tempos de imersão utilizados em cada.....	19
Tabela 2 - Componentes e quantidades presentes nos meio de cultura testados: MS, KNOP, BCD e BCDAT.....	20
Tabela 3 - Relação dos testes de desinfecção testados com posterior contaminação e crescimento dos explantes, onde + significa presença e - ausência.....	25
Tabela 4 - <i>Report</i> do sequenciamento ONT observados para o conjunto total de corridas com as bibliotecas genômicas de <i>Bryum argenteum</i> utilizados no presente trabalho. As métricas para as <i>reads</i> foram obtidas após <i>basecalling</i> com auxílio do guppy (WICK <i>et al</i> , 2019) suplementado com o algoritmo Fast-bonito (XU & FU, 2021).....	28
Tabela 5 - Avaliação do <i>Draft Assembly</i> baseado nas métricas de tamanho do genoma montado, numero e tamanho de contigs e scaffolds observados. Dados foram obtidos por meio das estatísticas fornecidas pelo Quast (GUREVICH <i>et al</i> , 2013) e gfastastats (FORMENTI, 2022).....	30
Quadro 1 - Sumário da montagem inicial do transcriptoma de <i>Bryum argenteum</i> baseado nas <i>raw reads</i> . O transcriptoma foi montado com auxílio do RnaBloom (NIP <i>et al</i> , 2020) e as métricas foram obtidas por meio do rnaQuast (BUSHMANOVA <i>et al</i> , 2016).....	35
Quadro 2 - Genes relacionados ao estresse salino no musgo <i>B. argenteum</i>	38

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	12
OBJETIVOS.....	17
PERGUNTA NORTEADORA.....	17
HIPÓTESE.....	17
METODOLOGIA.....	18
Coleta de amostras, desinfecção e cultivo <i>in vitro</i>	18
Estresse Salino.....	21
Extração de DNA e RNA.....	21
DNA.....	21
RNA.....	22
Sequenciamento de Nova Geração <i>long-reads</i>	22
Técnicas de Bioinformática - <i>Assembly</i> , anotação do genoma e RNA-Seq.....	22
Análise de RNA-Seq.....	23
Análises de Ontologia Genética.....	23
APRESENTAÇÃO DA PESQUISA E ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	24
Coleta de amostras, desinfecção e cultivo <i>in vitro</i>	24
Draft do genoma de <i>Bryum argenteum</i>	27
Montagem do Draft do genoma de <i>Bryum argenteum</i>	29
Análise de RNA-Seq das plantas submetidas ao estresse salino em condições de laboratório.....	34
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52
REFERÊNCIAS.....	53

1. INTRODUÇÃO

1.1 Ambientes Insulares

Ambientes insulares são áreas geográficas cercadas por água que possuem características ecossistêmicas próprias, já que o isolamento geográfico é influenciado por fenômenos naturais e antropogênicos (FERNANDES & PINHO, 2017; GAO *et al*, 2019). Regiões insulares apresentam-se como locais adequados para a formulação de hipóteses científicas, tendo em vista a limitação dos recursos naturais e o espaço físico, o que proporcionam verdadeiros “laboratórios experimentais”, como por exemplo, a Ilha de Trindade, (BURJACHS *et al*, 2017) onde as pesquisas científicas têm permitido a identificação do potencial sustentável de exploração e utilização do patrimônio, além de contribuir para a preservação do meio ambiente, uma vez que lugares pouco habitados nos ajudam a entender a diversidade atual de plantas (PROGRAMA, 2017).

Trindade eleva-se a 5.500 metros do fundo oceânico e possui extensão de 10,2km² com elevações que atingem até 625 metros. Estima-se que tenha surgido há 3 milhões de anos de uma zona de fraturas que se estende desde a plataforma continental brasileira (PROGRAMA, 2017). Nos séculos XVII e XVIII a ilha era coberta por uma floresta tropical e atualmente a vegetação consiste em gramíneas e ervas, além de samambaias gigantes atingindo até 6 metros de altura. A temperatura média anual da Ilha é de 24°C com presença do chamado “Pirajá” que são rápidas precipitações, principalmente no verão (ALVES, 1998). O solo possui uma diversidade inteiramente relacionada com o material de origem vulcânica e posição altimétrica, gerando alta fertilidade e grau de intemperismo pouco acentuado (ALVES, 1998). Segundo Alves (2006) existem atualmente 130 espécies de plantas vasculares, que incluem 5 espécies de fanerógamas endêmicas, 4 samambaias endêmicas e 12 espécies de algas continentais. A flora fanerógama presente, provavelmente originada do ameaçado bioma Mata Atlântica, é relativamente conhecida e descrita na literatura, entretanto, os dados sobre briófitas ainda são escassos (ALVES, 1998). Segundo Faria (2012) há 32 espécies de Briófitas na Ilha de Trindade, sendo apenas 1 de *Anthocerotophyta* (antóceros), 20 de *Marchantiophyta* (hepáticas) e 11 espécies de *Bryophyta* (musgos).

O Brasil tem quatro ilhas oceânicas, Trindade, Fernando de Noronha, São Pedro e São Paulo e Atol das Rocas. Destas, apenas Fernando de Noronha e Trindade possuem exuberante população de plantas e, de acordo com Faria (2012), Trindade possui a flora de briófitas mais diversificada. Essa flora é composta principalmente por espécies amplamente distribuídas, das quais 52% têm distribuição Neotropical, 15% são Pantropicais, cerca de 21% Neotropical e

Africana e as demais espécies são Cosmopolitas. O que torna provável que a maioria das espécies encontradas em Trindade sejam provenientes do continente americano e do Brasil (FARIA, 2012).

1.2. *Bryum argeteum* Hedw.

As briófitas compõem o segundo maior grupo dentre as plantas terrestres com aproximadamente 13.000 espécies (SHAW; GOFFINET; BUCK *et al*, 2009). Possuem uma abrangente distribuição geográfica sendo encontradas em todos os continentes (TUBA; SLACK; STARK, 2011) e desempenham um papel importante na reciclagem de carbono e nutrientes através de seu crescimento e decomposição (VANDERPOORTEN & GOFFINET, 2009). Apresentam potencial em diversas áreas, como na ecologia onde são descritas como excelentes indicadores de qualidade ambiental, já que, suas características morfológicas e a falta de uma epiderme protetora as tornam mais suscetíveis às condições ambientais do que as demais plantas. Recursos como tolerância a altas temperaturas, resistência à dessecação, alta capacidade de retenção de água e fácil manutenção (VANDERPOORTEN & GOFFINET, 2009) sugerem briófitas como grandes instrumentos para recuperação ambiental. Devido a sua fácil adaptação a ambientes extremos e insulares, podem ser denominadas como organismos extremófilos e possuem genes codificando proteínas que atuam como mecanismos moleculares em resposta a diferentes tipos de estresse (TEHEI & ZACCAI, 2005). Com isso, é crescente o número de pesquisas envolvendo briófitas, além delas serem sequenciadas em números recordes em todo o mundo (BRININGER *et al*, 2018).

O musgo *Bryum argenteum* é uma espécie considerada tolerante à dessecação, isto é, capaz de suportar a secagem total. Uma característica comum dos musgos tolerantes à dessecação é a rápida recuperação da fotossíntese e o rápido restabelecimento de um balanço de carbono positivo após a reidratação (PROCTOR & SMIRNOFF, 2000). Embora seja um traço comum em musgos, *B. argenteum* foi uma das primeiras briófitas experimentalmente determinadas como sendo tolerantes à dessecação (GAO, 2017). Possui ampla distribuição no planeta, inclusive na Antártica, Ártico e na Ilha de Trindade (PISA *et al*, 2014; FARIA, 2012). Nesta última, ocorre em campos abertos, no solo e em fendas rochosas, principalmente entre 150-200m, em vegetação de campo, o que provavelmente se relaciona à forte pulverização marinha presente em altitudes mais baixas (ALVES 1998), e é facilmente reconhecido por suas folhas que possuem células verdes na metade inferior e hialinas na metade superior (FARIA, 2012).

Conhecido por ocupar habitats perturbados e ajardinados é considerado daninho ou invasor (LONGTON, 1981) e, além de ocorrer em substratos naturais, pode crescer até mesmo em campos de golfe e parques urbanos (BURNELL *et al*, 2004). *B. argenteum* é uma das poucas espécies de briófitas encontradas em todos os continentes, uma distribuição cosmopolita consistente com padrões de germinação de esporos após dessecação e estresse de congelamento (VAN ZANTER, 1978) e vem emergindo como um musgo modelo para estudar os genes relacionados ao estresse (GAO, 2015). Há registros do *B. argenteum* em testes de reações a fitohormônios (BIJELOVI, 2004), efeitos de luz e nutrientes em diferentes fases da germinação (SILVA; PÔRTO; SIMABUKURO, 2010), atividade microbiana (SABOVLJEVIC, 2006) e testes do efeitos de diferentes metais pesados (VUKOJEVIC; SABOVLJEVIC; SABOVLJEVIC, 2004), evidenciando sua facilidade de manipulação e capacidade de tornar-se modelo para diferentes estudos futuros.

1.3. Estresse Salino e Genes Responsivos

Durante a evolução, as plantas, sendo organismos sésseis, tiveram que adaptar-se a diversas situações de estresse, incluindo baixa temperatura, diferentes graus de radiação, seca e alta salinidade (SCHARF *et al*, 2012). A salinidade é um dos estresses mais comuns, visto que aproximadamente 20% das áreas irrigadas no mundo são afetadas por ela (FAO., 2013). Assim como outros estresses abióticos, pode ocasionar diversos efeitos em plantas como estresse osmótico, efeitos tóxicos e estresse oxidativo (FLOWERS, 2004; MUNNS & TESTER, 2008; SHABALA, 2013) além toxicidade de Na⁺ que afeta a absorção de K⁺ e resulta no comprometimento de atividades enzimáticas, como a inibição de caminhos metabólicos (SUZUKI *et al*, 2016). As plantas se adaptam ao estresse salino de três maneiras: através de mudanças na via de sinalização mediada por hormônios vegetais (RYU & CHO, 2015), por meio da ativação de fatores de transcrição (DU *et al*, 2017) e através da regulação frequente de proteínas a jusante necessárias para a adaptação ambiental e reparo celular. Esta regulação inclui homeostase iônica, osmorregulação e eliminação de ROS (HU; XUEMEI; CHENGHAO, 2018).

Em briófitas o conhecimento sobre a resposta ao estresse salino e seus danos na parte molecular, bem como na fisiologia e bioquímica, é superficial mesmo que algumas tenham desenvolvido respostas ao estresse durante a evolução tornando-se halófitas, isto é, capazes de desenvolverem-se em altas concentrações de sal (VOLKOV, 2015).

Genes correspondentes a estresse abióticos foram identificados em várias plantas e muitos desempenham um papel importante na tolerância a esses estresses. A identificação

desses genes é de grande importância para o entendimento dos mecanismos moleculares de adaptação das plantas (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000) e uma maneira de identificá-los é comparando níveis de transcrição durante vários estágios de desenvolvimento da planta quando submetida a condições experimentais que simulam estresse abiótico (GUO *et al* 2009).

A análise de transcriptoma integrada a uma sólida plataforma de bioinformática tem possibilitado a melhor triagem de alvos biotecnológicos envolvidos na tolerância a estresses (FERREIRA, 2017). O DNA após ser transcrito pela RNA polimerase dá origem ao RNA, e o conjunto de RNAs expressos em determinado momento e local na planta é denominado de transcriptoma. É também referido como perfil de expressão, é o conjunto de todos os transcritos de RNA, incluindo mRNA, pequenos RNAs, RNAs não codificantes e RNAs antissenso expressos em um tecido sob determinado contexto biológico específico (GOYA; MEYER; MARRA, 2012). A análise do transcriptoma para identificar genes candidatos envolvidos na tolerância a estresses abióticos permite incorporar alta especificidade, sensibilidade e medidas quantitativas na análise dos transcritos (MCGETTIGAN, 2013). O advento dessa tecnologia está revolucionando o modo como transcriptomas complexos são analisados (MOROZOVA & MARRA, 2008). A utilização do sequenciamento de RNA (RNA-seq) permite essa análise em alta resolução com possibilidade de quantificar precisamente os níveis de transcritos, confirmar ou revisar sequências gênicas, mapear os limites entre éxon/intron, entre outras possibilidades (NAGALAKSHMI; WAERN; SNYDER, 2010). O RNA-seq trouxe inovações pelo fato de ser facilmente passível de reprodução, fornecendo uma alta correlação sobre replicatas biológicas e técnicas e apresentar uma medida mais precisa de níveis de transcritos e suas isoformas, quando comparada a outros métodos (CLOONAN *et al*, 2008; VAN VERK *et al*, 2013). Essa técnica tem utilizada com sucesso em um grande número de organismos incluindo *Saccharomyces cerevisiae* (NAGALAKSHMI *et al*, 2008), *Caenorhabditis elegans* (HILLIER *et al*, 2009), *Homo sapiens* (MARIONI *et al*, 2008) e *Arabidopsis thaliana* (LISTER *et al*, 2008). Além disso, a análise da expressão diferencial de genes tem sido amplamente utilizada no sequenciamento do transcriptoma para identificar genes relacionados ao estresse (WANG; LIU; HE, 2018).

Uma técnica simples, mas muito utilizada, de biologia de sistemas para destacar processos biológicos é a análise de super-representação de categorias de genes (YOUNG *et al*, 2010). Para realizar esta análise, os genes são agrupados em categorias por alguma propriedade biológica comum e, em seguida, testados para encontrar categorias que estão sobre-representadas entre os diferencialmente expressos e as categorias de Ontologia Gênica

(GO) são comumente usadas nesta técnica (YOUNG *et al*, 2010). GO é um sistema de classificação que fornece termos padronizados de produtos gênicos associados a processos biológicos, componentes celulares e função molecular e é amplamente utilizada para reduzir a complexidade e destacar processos biológicos em estudos de expressão de todo o genoma (ZHANG *et al*, 2019).

Com isso, compreender os mecanismos pelos quais as briófitas percebem a presença de sal e o transmitem para a maquinaria celular, gerando essas respostas adaptativas ativas, é de grande importância (WANG; LIU; HE, 2008). Ainda mais pela tolerância à salinidade se apresentar como um processo complexo, controlada por muitos genes expressos (GARCIA *et al*, 1995) com poucas investigações sobre a função e o controle exercido por esses genes (DONSON *et al*, 2002). Além de que, possibilita melhor entendimento dos processos evolutivos moleculares que podem beneficiar a criação de estratégias de conservação e biotecnologia vegetal usando o conhecimento adquirido em processos de melhoramento vegetal. Assim, o musgo *B. argenteum* foi escolhido devido a sua ampla distribuição e fácil manuseio, além de estar presente tanto na Ilha de Trindade onde sofre mais influência salina, quanto no Rio Grande do Sul, onde há menos influência salina, o que possibilita uma comparação genômica dos espécimes do continente e da ilha frente a expressão dos seus genes quando expostos ao sal.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os genes responsivos ao estresse salino no musgo *Bryum argenteum*.

2.2. Objetivos Específicos

Estabelecer desinfecção e cultivo *in vitro axênico* do musgo *B. argenteum*.

Sequenciar o genoma e o transcriptoma do musgo *B. argenteum*.

Analisar a expressão diferencial de genes em *Bryum argenteum* quando submetido a experimentos de estresse, através do sequenciamento de transcritos.

3. PERGUNTA NORTEADORA

Quais são os genes expressos como resposta ao estresse salino no musgo *Bryum argenteum*? Esses genes são diferentes em espécimes que sofrem com maior pulverização marinha?

4. HIPÓTESE

A tolerância ao estresse salino acontece com a ação em cascata de muitos genes induzidos em resposta a esse estresse. Entretanto, plantas com maior impacto salino podem apresentar características transcriptômicas diferentes quando comparadas com as plantas mais distantes do litoral. Havendo assim, a possibilidade dos musgos coletados em locais que apresentam maior salinidade demonstrarem melhor, ou diferente, adaptação na resposta ao sal.

5. METODOLOGIA

5.1. Coleta de amostras, desinfecção e cultivo *in vitro*

Para comparar os genomas e transcritos das amostras do continente e da Ilha de Trindade sob estresse salino, os campos para coletas foram realizados no município de Venâncio Aires - RS (29°28'34.9"S; 52°10'10.0"W) e nos pontos Pico da Bandeira e Ponta Verde na Ilha de Trindade. As coletas no continente foram realizadas em agosto de 2020 e na Ilha durante a 111ª Expedição PROTRINDADE - POIT II, que ocorreu em abril de 2022, com apoio do projeto GENO-ISLAND: Adaptações moleculares das plantas insulares, aprovado na chamada CNPq nº31/2019 no Programa Arquipélago e Ilhas Oceânicas (CNPQ 443237/2019-0).

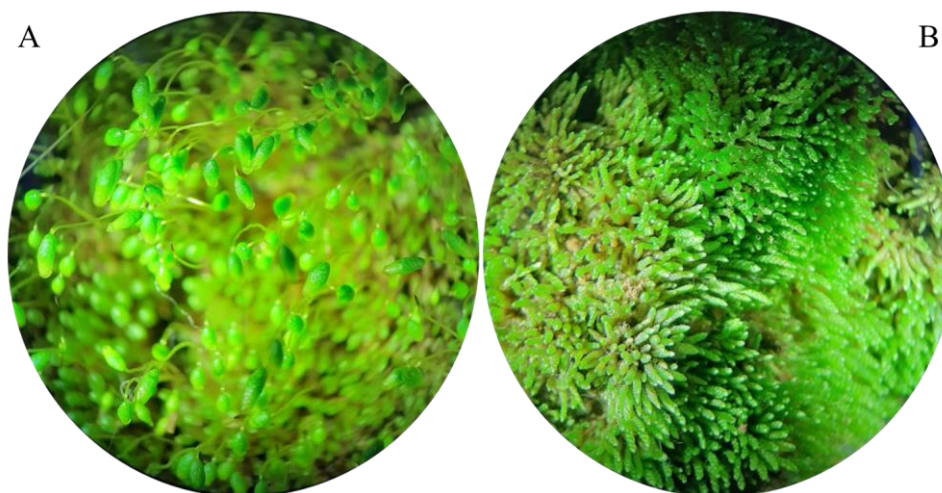


Figura 1: Vista da lupa das amostras de *B. argenteum* logo após a coleta na cidade de Venâncio Aires em agosto de 2020, onde temos em A as cápsulas e em B gametófitos.

Para desinfecção das amostras, foram testadas diferentes soluções e combinações, já que a desinfestação do tecido do gametófito tem sido realizada em outros trabalhos com a utilização de hipoclorito de sódio, porém, para livrar o tecido de todos os contaminantes, algumas vezes, é necessário a aplicação de altas concentrações, o que frequentemente mata a planta, ou quando a concentração utilizada de hipoclorito é baixa, a esterilização muitas vezes não é eficaz (SABOVLJEVIC *et al*, 2012; VUJUCIC; SABOVLJEVIC; SABOVLJEVIC, 2011). Então, além do hipoclorito, foram realizadas lavagens com álcool e água destilada autoclavada com imersão de cerca de um minuto. Todos os testes foram realizados tanto com as cápsulas, quanto com os gametófitos das plantas. Nos testes de número 1, 2 e 3, as cápsulas e gametófitos eram imersos 1x em cada solução, dentro de tubos de microcentrífuga de 2 ml, por 1 min e então transferidas para as placas de petri contendo diferentes meios de cultura e, só então as cápsulas eram abertas, com auxílio de pinças. Entretanto, o teste de número 4, foi

seguindo o protocolo de Hiwatashi Y. (2014), onde as cápsulas com esporos foram colocadas em um tubo de microcentrífuga de 1.5 ml e lavadas 5x com soluções de 10% de hipoclorito e água destilada autoclavada estéril, intercaladamente. Logo após, foi adicionada 1 ml de água destilada autoclavada estéril e as cápsulas foram pressionadas com a ponteira da pipeta para que os esporos fossem dispersos ainda no tubo, gerando uma solução água + esporos. Então 0,2 ml dessa solução foi dispensada em meio de cultura, com adição de 1 ml de água destilada autoclavada estéril, e acondicionada em uma estufa com um fotoperíodo de 8h/16h luz/escuro a 25 °C.

Teste de Desinfecção	Soluções e concentrações	Tempo de imersão das cápsulas e gametófitos
1	70% Hipoclorito + Água Destilada Autoclavada	1 minuto
2	70% Hipoclorito + 70% Álcool	1 minuto
3	70% Hipoclorito + 70% Álcool + Água Destilada Autoclavada	1 minuto
4	10% Hipoclorito + Água Destilada Autoclavada	5 minutos

Tabela 1: Relação de desinfecções testadas com as soluções, concentrações e tempos de imersão utilizados em cada.

Após as desinfecções, os explantes foram acondicionados em diferentes meios de cultura para futura avaliação de crescimento e desenvolvimento da planta. Os meios utilizados foram KNOP (RESKI & ABEL, 1985), MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), BCD (GRIMSLEY; ASHTON; COVE, 1977) e BCDAT (THELANDER; OLSSON; RONNE, 2005) todos com adição de 6g/L de Phytigel ® (Sigma-Aldrich). A composição das soluções de cada um dos meios se encontra na tabela 2.

KNOP+ME	MS	BCD	BCDAT
KH ₂ PO ₄ 25 g/L	NH ₄ NO ₃ 82,5 g/L	MgSO ₄ *7H ₂ O 25g/L	MgSO ₄ *7H ₂ O 25g/L
KCl 25 g/L	KNO ₃ 95 g/L	KH ₂ PO ₄ 25 g/L	KH ₂ PO ₄ 25 g/L
MgSO ₄ *7H ₂ O 25g/L	MgSO ₄ *H ₂ O 74 g/L MnSO ₄ *H ₂ O 3,38 g/L ZnSO ₄ *H ₂ O 8,6 g/L CuSO ₄ *H ₂ O 5 mg/L	KNO ₃ 95 g/L FeSO ₄ *7 H ₂ O 12.5 mg/L	KNO ₃ 95 g/L FeSO ₄ *7 H ₂ O 12,5 mg/L
Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O 100 g/L	CaCl ₂ 66,6 g/L		Tartarato de amônio 184.1 g/L
FeSO ₄ *7 H ₂ O 250mg/L	H ₃ BO ₃ 1,24 g/L KH ₂ PO ₄ 34 g/L KI 166 mg/L NaMoO ₄ *2H ₂ O 50 mg/L CoCl ₂ *6H ₂ O 5 mg/L		
H ₃ BO ₃ 309 ml/L MnSO ₄ *1H ₂ O 845 ml/L ZnSO ₄ *7H ₂ O 431 mg/L Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O 12.1 mg/L CuSO ₄ *5H ₂ O 1.25 mg/L Co(NO ₃) ₂ *6H ₂ O 1.46 mg/L	Na ₂ EDTA 7,45 g/L FeSO ₄ *7H ₂ O 5,57 g/L		
	TIAMINA 200 mg/L PIRIDOXINA 100 mg/L ÁCIDO. NICOTÍNICO 100 mg/L GLICINA 400 mg/L MIO - INOSITOL 100 mg/L SACAROSE 30 g/L		

Tabela 2: Componentes e quantidades presentes nos meios de cultura testados: MS, KNOP, BCD e BCDAT.

5.2. Estresse Salino

Após o estabelecimento e crescimento das culturas axênicas, gametófitos foram colocados em frascos com meio KNOP (RESKI & ABEL, 1985) sem adição de Phytigel[®] (Sigma-Aldrich) e com adição de diferentes concentrações de NaCl, onde ficaram imersos durante 6h e 24h, em uma mesa agitadora, para posterior análise da expressão de genes envolvidos na exposição a alta salinidade. Ao todo o experimento contou com tréplicas do grupo controle (sem adição de NaCl), 200 mM, 400 mM, 600 mM e 800 mM. Após 6h e 24h as amostras foram retiradas dos meios de cultura e encaminhadas para a extração de RNA.

5.3. Extração de DNA e RNA

A biomassa vegetal gerada nos cultivos *in vitro* passou por extração e purificação de DNA seguindo o proposto por Metz *et al*, (2022) (não publicado), e o produto da extração foi quantificado no equipamento Qubit Fluorometric Quantitation (Thermo Fisher Scientific). Das amostras resultantes do experimento de salinidade foi extraído RNA com o kit comercial de extração PureLink[™] RNA Mini Kit (Ambion). Os passos de isolamento de RNA foram realizados várias vezes e o RNA coletado foi combinado para atender aos requisitos de material inicial para RNA-Seq. A quantidade de RNA extraído foi mensurado utilizando o Qubit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). No final o *pool* de RNA extraído foi convertido em cDNA com o cDNA Synthesis Kit (BioRad).

5.3.1. DNA

As amostras de DNA extraídos passaram pela purificação onde fragmentos menores que 10 kb foram selecionados e descartados por meio do kit *Short Read Eliminator XS* desenvolvido pela Circulomics (PACBIO COMPANY, Baltimore, MD - US). Após, as bibliotecas de DNA genômico foram construídas utilizando o kit de preparação Genomic DNA by Ligation (SQK-LSK109) (Oxford Nanopore Technologies, UK), de acordo com as instruções do fabricante onde são carregadas em Flow Cell R9.4.1 (Oxford Nanopore).

5.3.2. RNA

Amostras de RNA de alta qualidade (concentração de 15.000 ng cada) selecionadas para a preparação da biblioteca foram deplecionadas a fim de remover RNA citoplasmático (5S, 5.8S, 18S e 28S), RNA mitocondrial (12S e 16S) e RNA ribossomal (rRNA) e utilizando o os reagentes Eukaryote v2 RiboMinus[™] System (Ambion, USA) de acordo com o protocolo do fabricante. O sequenciamento de RNA foi realizado utilizando o kit Direct RNA

Sequencing (SQK-RNA002) (Oxford Nanopore Technologies plc, UK), de acordo com as instruções do fabricante.

5.4. Sequenciamento de nova geração *long-reads*

O material genético foi decodificado utilizando a plataforma de sequenciamento de nova geração GRIDION (Oxford Nanopore), para obtenção de *long-reads*, que utiliza a tecnologia de alto rendimento e em tempo real na geração de leituras de ácidos nucleicos. O sequenciamento NGS foi realizado no laboratório de bioinformática do Núcleo de Estudos da Vegetação Antártica da Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel.

5.5. Técnicas de Bioinformática - *Assembly*, anotação do genoma e RNA-Seq

Para o genoma foi utilizada a estratégia de montagem *de novo* por meio de uma correção inicial das *reads* resultantes do sequenciamento com auxílio do CANU 1.9 (KOREN *et al*, 2017) com as recomendações padrão do pacote. As *reads* corrigidas foram mapeadas utilizando o Minimap (LI, 2018) para remoção de eventuais contaminantes e seleção de *reads* de mtDNA e cpDNA. A montagem foi realizada por meio do Flye (KOLMOGOROV *et al*, 2019) e polimento dos *assemblies* foi realizado por meio do Racon (VASER *et al*, 2017). A qualidade da montagem foi verificada com auxílio do Quast (GUREVICH *et al*, 2013) e a integridade/complitude deste *assembly* foi avaliada por meio do BUSCO (SIMÃO *et al*, 2015). Uma anotação inicial do genoma montado e dos elementos repetitivos identificados foram realizados por meio do RepeatMasker (BERGMAN & QUESNEVILLE, 2007). A pipeline MAKER-P (CAMPBELL *et al*, 2014) foi utilizada para a construção de modelos de genes avaliados por RNA e o PASA (HAAS *et al*, 2003) para os genes codificadores de proteínas. A predição e atribuição funcional foram realizadas pelo InterproScan utilizando o HMMER (ZDOBNOV & APWEILER, 2001). Com o pacote PALM (YANG, 2007) foram construídas árvores no processo de Monte Carlo Cadeia de Markov com genes conservados de *B. argenteum* e outros musgos disponíveis no banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Por fim, as análises foram finalizadas com a calibração de tempo de divergência com o Timetree (<http://www.timetree.org/>). O *assembly* final foi alinhado e comparado graficamente contra os genomas de referência para musgos por meio da plataforma D-Genies (CABANETTES & KLOPP, 2018).

5.5.1. Análise de Rna-Seq

As *reads* de RNA obtidas do sequenciamento no GRIDION foram montadas por meio do rnabloom (NIP *et al*, 2020) para avaliação do transcriptoma *de novo*. As *raw reads* foram utilizadas para mapeamento contra os transcriptomas de *P. patens*, *C. purpureus* e *Pohlia nutans* por meio do minimap2 (LI, 2018). As *reads* mapeadas foram submetidas a quantificação por cada um dos tratamentos para avaliação do estresse salino conforme descrito na metodologia do presente trabalho, utilizando o Salmon (PATRO *et al*, 2017). Essa estratégia permite analisar a abundância das *reads* obtidas em cada um dos tratamentos e avaliar a taxa de falsas descobertas (FDR) possibilitando a quantificação das *reads* para a análise de expressão diferencial selecionando aquelas mais significativas para a análise. As análises de expressão diferencial foram realizadas por meio do Edge, implementado na plataforma Degust (POWELL, 2019).

5.6. Análises de Ontologia Genética

As análises de ontologia genética foram realizadas por meio da anotação inicial do genoma montado comparando com os genomas das espécies de musgos modelos *Physcomitrium patens* (V3.3), *Ceratodon purpureus* (V1.0) e *Pohlia nutans* (V1.0) já disponibilidades nas plataformas públicas (Phytozome, JGI, NCBI, BGI). Inicialmente foi realizada a anotação comparada por meio do pipeline MAKER2 (HOLT & YANDELL, 2011), seguido do mapeamento dos exons anotados contra o arquivo fasta dos exons das espécies modelo citadas acima. Os arquivos BAM resultados foram utilizados para tabulação dos resultados. As *ids* dos exons anotados foram utilizadas para montar o banco de dados de transcritos. O enriquecimento da ontologia gênica foi realizado por meio da plataforma g:Profiler (RAUDVERE *et al*, 2019). As ontologias identificadas foram utilizadas para as demais análises de agrupamento de genes expressos, ontologias mais significativas e análises de agrupamento, utilizando principalmente gráficos de Venn e plotagem das listas de ontologias com auxílio de *scripts* do Revigo (SUPEK *et al*, 2011) e RStudio (RSTUDIO TEAM, 2020).

6. APRESENTAÇÃO DA PESQUISA E ANÁLISE DOS RESULTADOS

6.1. Coleta de amostras, desinfecção e cultivo *in vitro*

Durante expedição à Ilha de Trindade não houveram coletas de material pois não foram encontrados espécimes de *B. argenteum* nos pontos descritos por Faria (2012), portanto as análises aconteceram apenas com as coletas realizadas em Venâncio Aires - RS. A falta de espécies de *B. argenteum* nos pontos descritos na literatura nos evidencia o fato das briófitas serem vistas como pioneiras em uma sucessão ecológica (DE LIMA; DOS SANTOS; DELLA, 2022). Os tapetes formados por elas promovem a retenção de umidade, e suas secreções ácidas auxiliam na quebra das rochas, que posteriormente serão parte do solo (DE LIMA; DOS SANTOS; DELLA, 2022). As áreas degradadas, uma vez recuperadas pelas briófitas, voltam a possuir novas espécies e propiciam principalmente germinação de sementes, devido às alterações no ambiente que formaram um novo microclima (DE LIMA; DOS SANTOS; DELLA, 2022). Assim, pode ter acontecido uma troca de vegetação nos pontos onde eram encontradas briófitas anteriormente.

Nos testes de desinfecção para estabelecimento do cultivo *in vitro* de *B. argenteum*, o baseado no protocolo de Hiwatashi Y. (2014), na Tabela 2 identificado como número 4, apresentou melhores resultados quanto ao sucesso da desinfecção, não apresentando contaminações bacterianas ou fúngicas que impediriam o cultivo axênico da planta podendo também interferir no crescimento e desenvolvimento vegetal. Nos demais tratamentos houve significativa contaminação por fungos e bactérias dos explantes e, nos raros casos em que não houveram, o crescimento e desenvolvimento da planta era prejudicado, como pode ser visualizado na tabela 3. A desinfecção do gametófito não apresentou bons resultados, permanecendo então apenas a realizada com as cápsulas contendo esporos, o que pode estar relacionado com o fato dos gametófitos serem mais difíceis de realizar cultivo axênico justamente pela simbiose com microrganismos diversos e tecido frágil, tornando os esporos o melhor caminho para o início do cultivo de briófitas, quando estas são encontradas férteis. (PEREIRA, 2019).

Rowntree *et al* (2006) constataram que as condições ambientais onde são realizadas as coletas influenciam na dificuldade da desinfecção das plantas, podendo reduzir ou não, o nível de contaminações por fungos e bactérias após a desinfecção. Liang; Sun; Zhu, (2010) observaram que a eficiência da esterilização também está diretamente relacionada à concentração e ao tempo de imersão dos explantes nas soluções desinfectantes, como já demonstrado em *Bryum argenteum* por Pereira (2019), cuja a maior eficiência de

desinfestação foi observada com a utilização de concentrações mais altas de hipoclorito, assim como no presente trabalho.

TESTE	CONTAMINAÇÃO	SEM CONTAMINAÇÃO	CRESCIMENTO	SEM CRESCIMENTO
1 70% Hipoclorito + Água Destilada Autoclavada	+	-	-	+
2 70% Hipoclorito + 70% Álcool	+	-	-	+
3 70% Hipoclorito + 70% Álcool + Água Destilada Autoclavada	+	-	-	+
4 10% Hipoclorito + Água Destilada Autoclavada	-	+	+	-

Tabela 3: Relação dos testes de desinfecção testados com posterior contaminação e crescimento dos explantes, onde + significa presença e - ausência.

Após a desinfecção, constatada como finalizada quando houveram crescimento e desenvolvimento da planta sem contaminantes, foram testados diferentes meios de cultura para visualização de em qual a planta se desenvolveria melhor, sendo que os meios MS e KNOP são os mais utilizados na literatura em suas versões semi sólidas (SABOVLJEVIC *et al*, 2005; LIANG; SUN; ZHU, 2010).

O meio BCDAT apresentou melhores resultados quando combinado com o protocolo de desinfecção de Hiwatashi Y. 2014, porém, com cerca de 30 dias de cultivo o crescimento dos explantes diminuiu de ritmo e melhorou quando foram realocadas para meio KNOP ou MS. Dentre esses, o meio MS proporcionou maior desenvolvimento de protonemas enquanto

no KNOP gametófitos eram mais aparentes. No meio BCD, os explantes estacionavam o crescimento, não colaborando para a formação de biomassa vegetal, o que pode ser relacionado com as diferentes soluções nutritivas de cada meio, induzindo a planta a produzir características de acordo com os nutrientes disponíveis. Liang; Sun; Zhu, (2010) observaram que o meio KNOP se mostra como mais eficiente para produção de biomassa em *B. argenteum*, como este estudo corrobora, somado ao fato de que a produção protonemal ficou a cargo dos explantes cultivados em meio MS, enquanto o KNOP formava mais gametófitos em menos tempo, inclusive em meio líquido, onde já era esperado que fossem produzidos com maior facilidade e justificando seu uso para a indução de estresse salino (CAPOZZI *et al*, 2016; RUIZ-MOLINA; VILLALOBOS-LÓPEZ; ARIAS-ZABALA, 2016; ITOUGA *et al*, 2017). A produção de protonemas é dada como a fase mais importante na produção de biomassa vegetal, devido a sua facilidade de propagação e estabilidade, o que faz do meio MS essencial no desenvolvimento do *B. argenteum in vitro*. (HOHE *et al*, 2002; DECKER & RESKI, 2004; ITOUGA *et al*, 2017).

Como citado anteriormente, a diferença de desenvolvimento em cada meio pode estar relacionada com a composição de nutrientes encontrados em cada um deles, visto que isso tem importante influência nas respostas das células devido às exigências nutricionais específicas e diferentes necessidades de minerais, vitaminas e fontes de energia (BRAGA *et al*, 2009). Por exemplo, no caso de maior oxidação dos explantes e, conseqüentemente, a menor sobrevivência deles está relacionada à concentração de sais presentes nos meios de cultivo, onde o MS apresenta altas concentrações iônicas, quando comparado ao KNOP (CAMARGO; MENEGUZZI; RUFATO, 2020) entretanto, no presente trabalho não houveram problemas com relação à oxidação dos explantes. Calvete *et al* (2009) e Besson *et al* (2010) observaram a influência de carboidratos na aclimatização de explantes de plantas vasculares, interferindo na formação das raízes e no crescimento, uma vez que o aumento de carboidratos resulta na diminuição da absorção de sais e água. Entretanto, Flores *et al* (2013) verificaram que concentrações distintas de sacarose e sorbitol influenciaram significativamente o crescimento das plantas *in vitro*, além de que os explantes cultivados em meio contendo somente sorbitol como fonte de carboidrato apresentaram menores taxas de crescimento. Neste trabalho, a presença de sacarose parece também contribuir para o melhor desenvolvimento do estágio inicial da planta, uma vez que ela é adicionada ao meio MS onde houve melhor desenvolvimento de protonemas. Os açúcares tiveram uma influência positiva no desenvolvimento protonemal em trabalhos anteriores com *B. argenteum* (SABOVLJEVIC *et al*, 2005), e experimentos realizados em plantas vasculares mostraram que eles podem atuar

como sinais reguladores que controlam a expressão de diferentes genes envolvidos em muitos processos do ciclo de vida da planta (KOCH, 1996; SMEEKENS & ROOK, 1997).

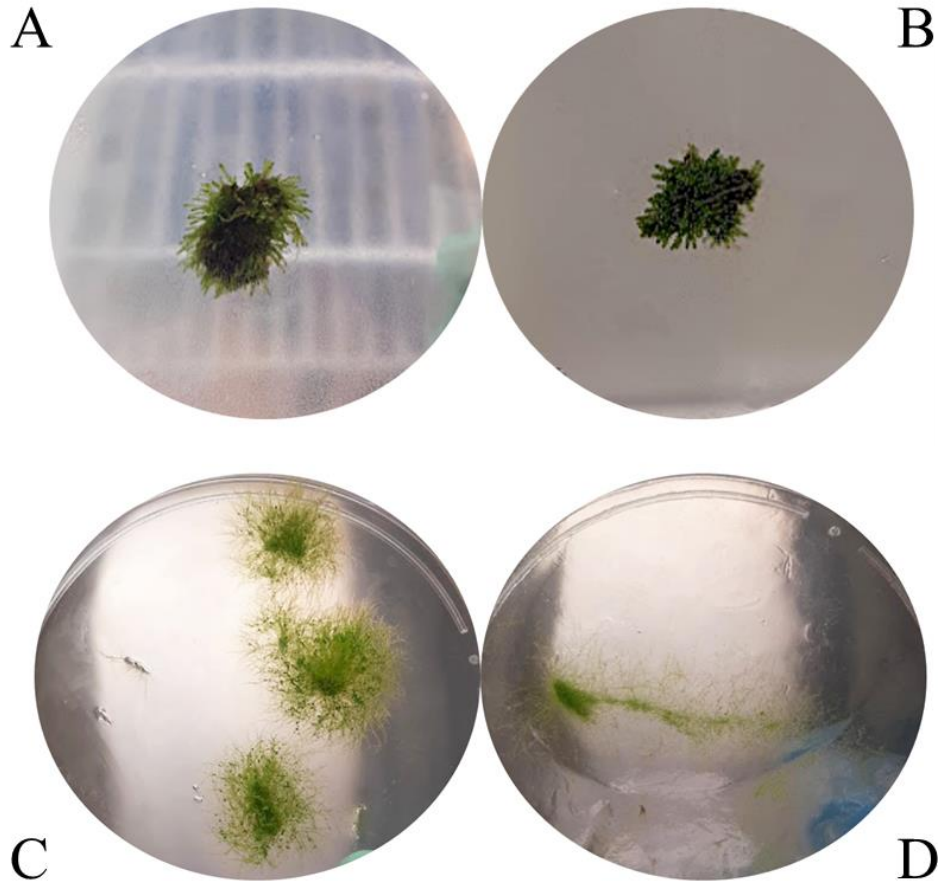


Figura 2: Cultivos de *B. argenteum*, onde A e B estão em meio KNOP com maior formação de gametófitos e C e D em meio MS com maior formação de protonemas.

6.2. Draft do genoma de *Bryum argenteum*

O DNA total foi extraído do isolado B0101-NEVA, cultura não axênica de *Bryum argenteum* coletado em Venâncio Aires - RS. Gametófitos maduros foram selecionados para o processo de isolamento de DNA e preparação das bibliotecas para sequenciamento na plataforma GridIon-ONT. O sequenciamento gerou 3.197.065 *long reads*, em um total de 9.221.145.041 bases. O tamanho médio das *reads* foi de 2884.3 com uma n50 de 3525. Confrontando com as estimativas disponíveis para a espécie estudada, onde é reportado um tamanho de genoma entre 800 e 900 Mb (VOGLMAYR, 2000; PRUTHI *et al*, 2022), nossa corrida gerou um conjunto de *long reads* em uma cobertura de 10,24x o tamanho esperado para o genoma alvo. Os dados do resultado do sequenciamento estão compilados na Tabela 4. Filtragens e controle de qualidade adicionais não foram necessários devido aos critérios rígidos para *basecalling* selecionados para as corridas deste sequenciamento.

Métricas	Dados Observados
number_of_reads	3197065
number_of_bases	9221145041.0
median_read_length	2012.0
mean_read_length	2884.3
read_length_stdev	2704.1
n50	3525.0
mean_qual	13.0
median_qual	12.7
longest_read_(with_Q):1	81155 (11.0)
longest_read_(with_Q):2	75517 (11.6)
longest_read_(with_Q):3	74008 (10.8)
longest_read_(with_Q):4	68641 (14.7)
longest_read_(with_Q):5	65894 (10.2)
highest_Q_read_(with_length):1	29.0 (1202)
highest_Q_read_(with_length):2	26.8 (1165)
highest_Q_read_(with_length):3	26.7 (1132)
highest_Q_read_(with_length):4	26.6 (1014)
highest_Q_read_(with_length):5	25.9 (1244)
Reads >Q5:	3197065 (100.0%) 9221.1Mb
Reads >Q7:	3197065 (100.0%) 9221.1Mb
Reads >Q10:	3179655 (99.5%) 9188.6Mb
Reads >Q12:	1995446 (62.4%) 5570.3Mb
Reads >Q15:	537397 (16.8%) 1380.2Mb

Tabela 4: *Report* do sequenciamento ONT observados para o conjunto total de corridas com as bibliotecas genômicas de *Bryum argenteum* utilizados no presente trabalho. As métricas para as *reads* foram obtidas após *basecalling* com auxílio do guppy (WICK *et al*, 2019) suplementado com o algoritmo Fast-bonito (XU & FU, 2021).

6.3. Montagem do Draft do genoma de *Bryum argenteum*

A montagem inicial do genoma de *Bryum argenteum* gerou 6293 contigs com comprimento total de 245Mb, com 43.66% de conteúdo GC (Tabela 5), muito próximo das referências conhecidas para musgos que variam em tamanhos de 243Mb, em *Dicranoweisia cirrata* (Hedw.) Lindb., até próximo de 1Gb, em *Brachythecium acuminatum* (Hedw.) Austin (TEMSCH; GREILHUBER; KRISAI, 1998; VOGLMAYR, 2000; BAINARD & VILLARREAL, 2013) e conteúdo GC próximo aos 42% (BAINARD; NEWMASER; BUDKE, 2020). Entretanto, nosso assembly ainda não alcançou as estimativas de citometria já realizadas para o tamanho de genoma de *Bryum argenteum* que está entre 800 e 900 Mb (VOGLMAYR, 2000).

Uma alta proporção de sequências repetidas no genoma de *B. argenteum* poderia estar refletindo uma subestimação do tamanho do genoma, mas a análise de k-mer fornece uma indicação de que não foi esse o caso, uma vez que a porcentagem de elementos repetidos previstos foi muito semelhante à estimada por nossa análise de repetição. (Tabela 4 e Tabela Suplementar). Comparativamente aos genomas de musgos considerados como completos, até o momento, nosso genoma possui maiores similaridades com os genomas de *Ceratodon purpureus* e *Pohlia nutans* (Figura 4) sendo o *gap* entre os genomas de *Bryum argenteum* e *Physcomitrium patens* muito mais representativo do que nos demais genomas comparados com nosso *assembly*. As similaridades e discrepâncias nestas análises comparativas seguiram conforme o esperado, uma vez que nosso modelo de musgos é muito mais próximo de *Pohlia nutans*, pois pertencem ao mesmo clado, dentro da subclasse Bryidae (LIU *et al*, 2019). Enquanto *Ceratodon purpureus*, que compõe as Dicranidae, apesar de estar no meio termo entre Funariidae e Bryidae, é muito mais similar ao segundo grupo. Essas similaridades podem ser facilmente observadas em nossas análises (Figura 3 A-C), porém deve ficar claro que as relações filogenéticas de Bryopsida ainda possuem muitas incongruências (WAHRMUND; QUANDT; KNOOP, 2010), em especial devido a plesiomorfias identificadas em relação aos arranjo de caracteres morfológicos, como caso dos apêndices peristômiais em Funariidae e Dicranidae (FEDOSOV *et al*, 2016).

Para fins de uma ideia de completude do nosso *assembly* foi utilizado o banco de dados do BUSCO para Embryophyta (Figura 4), resultando 1310 regiões completas, 69 fragmentos e 235 faltantes, de um universo de 1614 regiões anotadas para o grupo das plantas terrestres. Do ponto de vista da completude, apesar de reiterar que nossa montagem não conseguiu atingir a expectativa do tamanho provável do genoma para *B. argenteum*, demonstra também que conseguimos representatividade de boa parte das regiões esperadas para um

genoma de uma planta terrestre, estando muito próximo de outros modelos de plantas, entre antóceros, musgos e plantas com flores.

A partir das anotações preliminares, foram identificadas 153 mil regiões codificantes (cds/protein coding genes) em nosso draft de *Bryum argenteum*, o que está muito acima do esperado para o número médio de genes em Setaphyta (musgos + hepáticas), varia em torno de 23 a 60 mil genes (YU *et al*, 2022). Apesar de análises mais profundas serem necessárias, como aumentar a cobertura do sequenciamento para nosso modelo, esses valores também podem ser explicados por eventos de duplicação do genoma (Whole Genome Duplication events - WGD). Estes tipo de evento foi relatado em vários grupos de musgos recentemente sequenciados, como Hypnales, Polytrichales e Funariaceae (BAINARD; NEWMASTER; BUDKE, 2020; HARRIS *et al*, 2021; YU *et al*, 2022). Por fim, o engordamento do genoma e eventuais aumentos em número de genes em *Byrum argenteum* pode ser explicado também, por questões de natureza endopoliploide e transferência horizontal, já reportada como ocorrendo em outros musgos (BAINARD; NEWMASTER; BUDKE, 2020).

EXPECTED GENOME SIZE	500
#Contigs	6322
Total length	239164021
Largest contig	4150254
Reference length	326511043
GC(%)	43.66
Reference GC (%)	42.53
Contig N50	168088
Contig L50	368
# scaffolds	425
Total scaffold length	135892691
Average scaffold length	319747.51
Scaffold N50	11267205
Scaffold auN	11179447.17
Scaffold L50	5
Scaffold NG50	18259356
Scaffold auNG	3038410319226.53
Scaffold LG50	1
Largest scaffold	18259356

Tabela 5: Avaliação do *Draft Assembly* baseado nas métricas de tamanho do genoma montado, número e tamanho de contigs e scaffolds observados. Dados foram obtidos por meio das estatísticas fornecidas pelo Quast (GUREVICH *et al*, 2013) e gfaststats (FORMENTI, 2022).

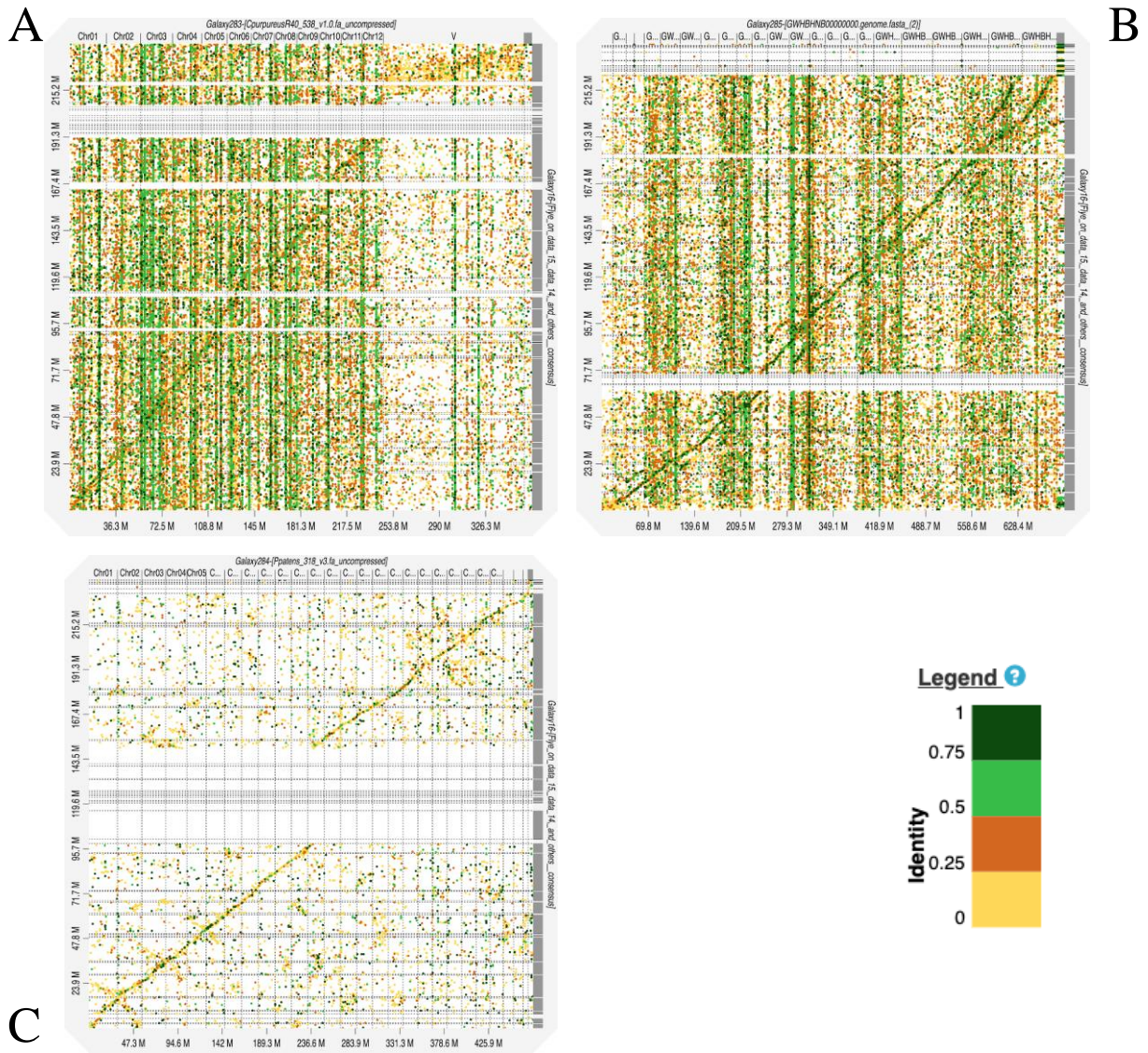


Figura 3: Dlotplot, nucmer, com a sintenia do genoma de *Bryum argenteum* com o genoma de referência. A. *Bryum argenteum* x *Ceratodon purpureus*. B. *Bryum argenteum* x *Pohlia nutans*. C. *Bryum argenteum* x *Physcomitrium patens*.

BUSCO Assessment Results

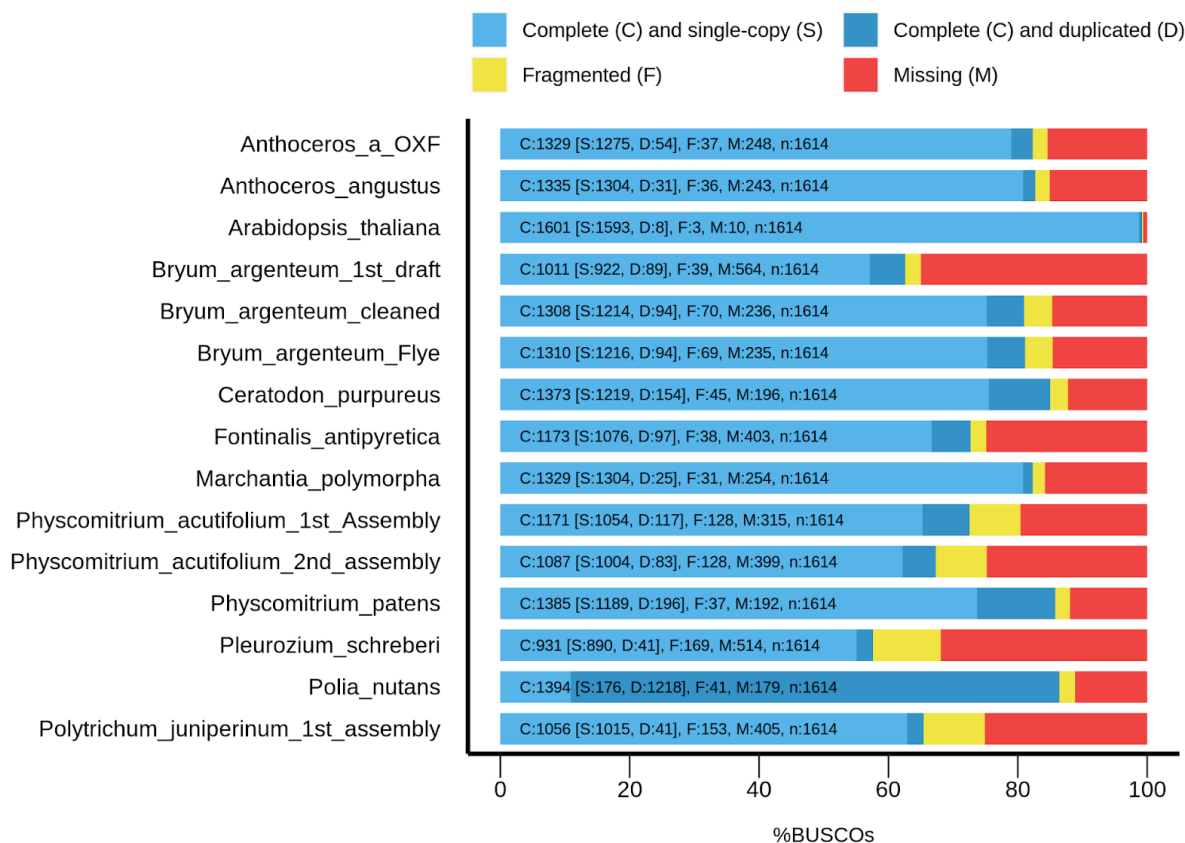


Figura 4: BUSCO, colinearidade da qualidade do genoma comparados ao genoma de referência, onde azul são as sequências completas e duplicadas; amarelo sequências fragmentadas e vermelho sequências faltantes.

Alternativamente, uma vez que a análise BUSCO indica que nossa montagem do genoma estava incompleta, a discrepância observada com as estimativas de citometria de fluxo pode ser parcialmente explicada pela fração de sequência de codificação ausente em nossos dados. Além disso, considerando que as estimativas de tamanho do genoma por citometria de fluxo se originam de células gametófitas (VOGLMAYR, 2000; BAINARD, 2011), uma explicação mais provável para a extrema variação observada nos tamanhos dos genomas parece ser a endopoliploidia em tecidos gametófitos de *B. argenteum*. Assim como diferentes isolados podem ter diferentes níveis de ploidia, particularmente em espécies amplamente difundidas como *P. schreberi*. Este parece ser um fenômeno comum nesta espécie e em musgos em geral (BAINARD & NEWMASER, 2010). Ao longo da montagem do genoma de uma planta, muitas dificuldades ocorrem (GRIESMANN *et al*, 2018) e, portanto, não é surpreendente que essa montagem seja menos completa no estágio inicial, embora trabalhos futuros devam ser conduzidos para melhorar essas montagens.

Dessa forma, como hipoteticamente, trata-se de uma pequena porção do genoma estimado, passamos a chamar aqui de um *Draft* de genoma para nosso modelo.

Quando comparamos nosso draft com os genomas de *Ceratodon purpureus*, *Pohlia nutans* e *Physcomitrium patens*, utilizando somente os melhores hits dos alinhamentos, sintenias abundantes são observadas entre as quatro espécies de musgo, apesar do reduzido número de cds analisadas comparativamente a *Physcomitrium patens* (Figura 5 A-C). Por estimativas da literatura, esses achados quanto a sintenia podem ser explicados pelo tempo de divergência entre *Bryum* e *Pohlia* ser menor que em relação a *Bryum* e *Physcomitrium*, sendo de aproximadamente 65 milhões de anos atrás para a primeira combinação e de, aproximadamente, 169 milhões de anos atrás (KUMAR *et al*, 2017).

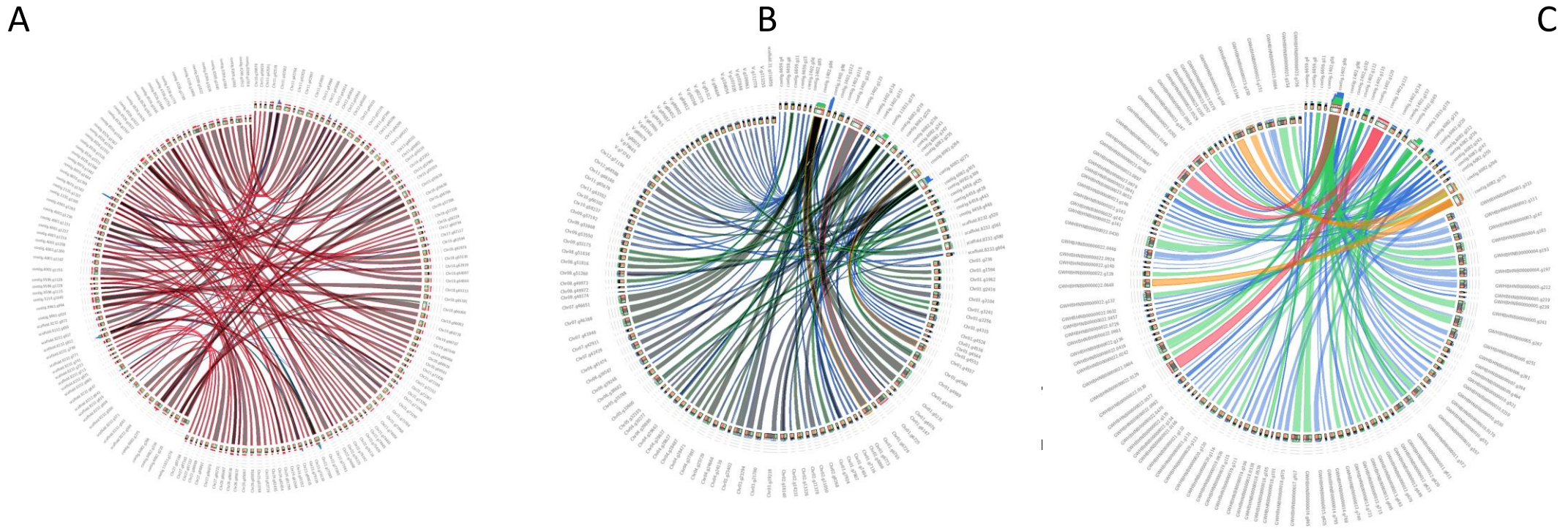


Figura 5. Circos plot dos melhores hits entre o conjunto de cds anotadas para *Bryum argenteum* em comparação com as cds de *Ceratodon purpureus*, *Pohlia nutans* e *Physcomitrium patens*. A. *Bryum x P. patens*. B. *Bryum x Ceratodon*. C. *Bryum x P. nutans*. As cores indicam o grau de sintenia entre as regiões comparadas, variando do azul (para os melhores *hit scores*) para o vermelho (para os piores *his scores*).

6.4 Análise de RNA-Seq das plantas submetidas ao estresse salino em condições de laboratório

As raw reads obtidas dos sequenciamento transcriptômico foram submetidas a uma montagem inicial por meio do rnabloom (NIP *et al*, 2020). Os transcritos foram anotados por meio da plataforma TREPID , e resultaram em uma miscelânea de transcritos de musgos e de bactérias. Por meio do Blast, foi identificado que os transcritos de bactérias eram provenientes de uma provável contaminação/endofítica representada por Methanobacteria, já reconhecida como endofítica em musgos em diferentes ecossistemas (KOUA; KIMBARA; TANI, 2014). O sumário desta montagem inicial esta apresentado no Quadro 1. Filtragens sucessivas foram realizadas para a obtenção de reads que representassem somente transcritos de musgos (Figura 6 A-C), e estas foram submetidas aos ensaios de análise de expressão diferencial.

	rnabloom.transcripts
Transcripts	13114
Transcripts > 500 bp	10287
Transcripts > 1000 bp	6825
Aligned	1298
Uniquely aligned	610
Multiply aligned	312
Unaligned	11816
Avg. aligned fraction	0.596
Avg. alignment length	596.769
Avg. mismatches per transcript	17.403
Misassemblies	376

Quadro 1. Sumário da montagem inicial do transcriptoma de *Bryum argenteum* baseado nas *raw reads*. O transcriptoma foi montado com auxílio do RnaBloom (NIP *et al*, 2020) e as métricas foram obtidas por meio do rnaQuast (BUSHMANOVA *et al*, 2016).

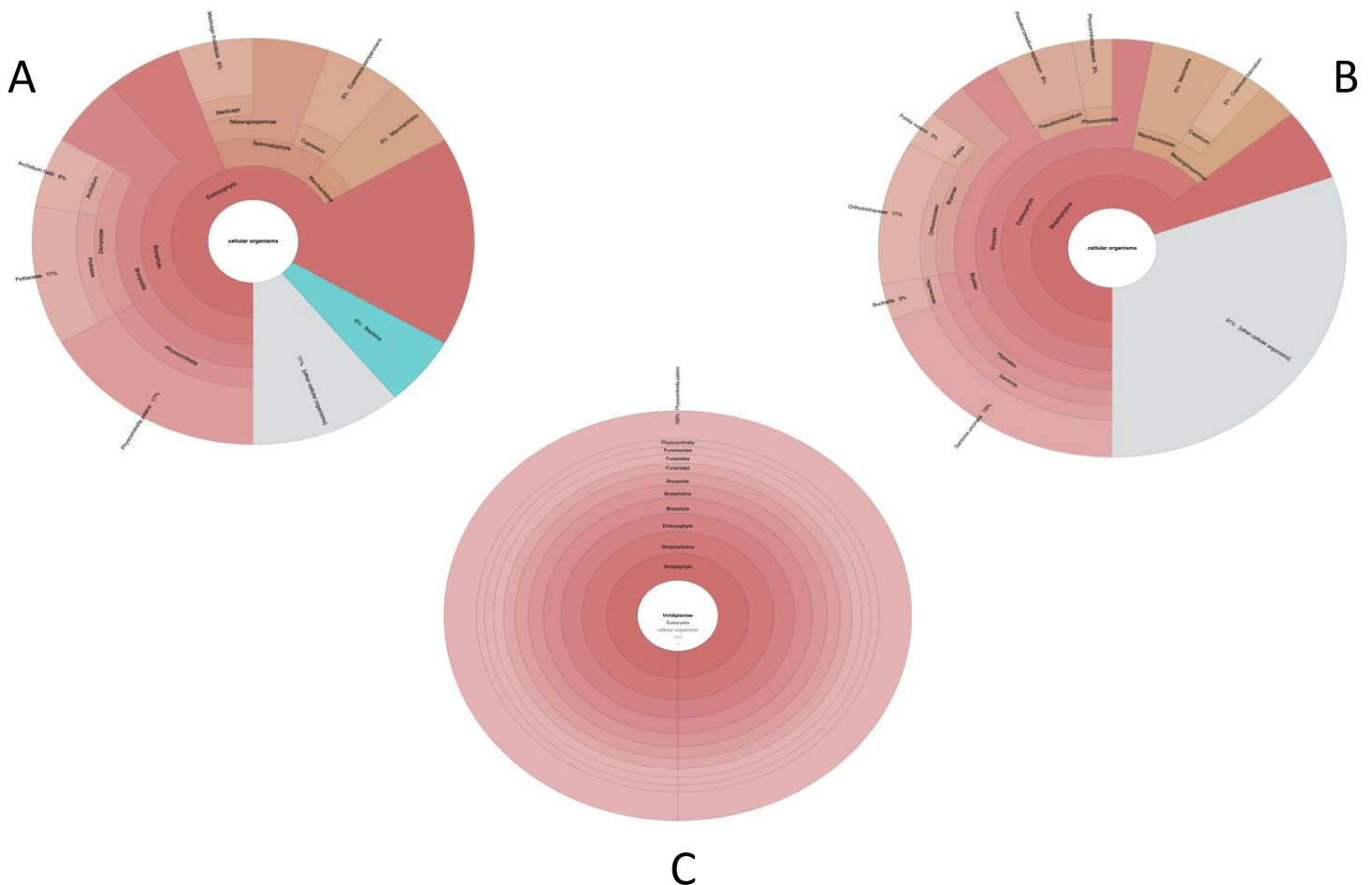


Figura 6: Alinhamento e filtragem das sequências encontradas no transcriptoma. No primeiro gráfico sem filtragens, no segundo após a primeira e remoção de bactéria e no terceiro apenas a sequência de musgos.

Como pode ser observado no Quadro 2, a análise de ontologia genética permitiu o destaque de 30 classes GO relacionadas ao processo metabólico de carboidratos (GO:0005975); à atividade da hidrolase (GO:0004553); à cadeia respiratória de transporte de elétrons (GO:0022904); função molecular com atividade de oxirredutase (GO:0016491); componente integral da membrana (GO:0016021); composição de membrana tilacóide de cloroplasto (GO:0009535); cadeia de transporte de elétrons fotossintética (GO:0009767); enriquecidos em ligação (GO:0045158); transferência de elétrons dentro da via cíclica de transporte de elétrons da atividade da fotossíntese (GO:0045156); ligação proteína-cromóforo (GO:0018298); cadeia de transporte de elétrons respiratórios (GO:0022904); ligação heme (GO:0020037); ligações íons de ferro (GO:0005506); fotossistema II (GO:0009523); tradução (GO:0006412); constituinte estrutural do ribossomo (GO:0003735 e GO:0005840); ligação de rRNA (GO:0019843); cloroplasto (GO:0009507); componente celular mitocondrial (GO:0005739); conjunto de genes de modificação de RNA (GO:0009451) e enriquecimento de componentes celulares (GO:0015935).

Gene ID (<i>Bryum argenteum</i>)	Name (<i>P. patens</i>)	AveExpr	P value	GO: BP	GO: MP	GO: CC	Description
rb_64.g177	Pp3c5_23790V3.3	17.969588140 5815	3.48e-104	GO:0005975	GO:0004553	n/a	Processos metabólicos de carboidratos; Atividade da hidrolase
	Pp3c7_4980V3.1	13.709323060 372	2.44e-53	n/a	n/a	n/a	
rb_114.g280	Pp3s1097_10V3.1	12.788978704 0371	4.14e-33	n/a	n/a	n/a	ZF-HD protein dimerisation region (ZF-HD_dimer)
rb_1031.g1639	Pp3s877_30V3.1	12.402728402 8015	4.26e-27				
rb_1339.g1995	Pp3c20_200V3.1	17.556774726 3488	1.21e-19				
rb_5245.g6101	Pp3c4_6670V3.2	11.759942322 4815	8.39e-19				
	Pp3c21_5670V3.2	12.081500048 6572	1.92e-18	GO:0022904 GO:0009767	GO:0016491 GO:0045158 GO:0045156	GO:0016021 GO:0009535	Cadeia respiratória de transporte de elétrons; Atividade de oxirredutase; Componente integral da membrana; Composição de membrana tilacóide de cloroplasto; Cadeia de transporte de elétrons fotossintética; Enriquecidos em ligação; Transferência de elétrons dentro da via cíclica de transporte de elétrons da atividade da fotossíntese
rb_5483.g6505	Pp3s877_36V3.1	11.553692118 2432	1.12e-15				
rb_10727.g1763 8	Pp3c21_5640V3.2	12.037853661 6312	7.06e-15				
rb_11057.g2025 4	Pp3c21_5650V3.2	13.118899243 55	1.96e-14	GO:0018298 GO:0022904	GO:0016491 GO:0020037 GO:0005506	GO:0016021 GO:0009535 GO:0009523	Ligação proteína-cromóforo; Cadeia de transporte de elétrons respiratórios; Atividade de oxirredutase;

							Ligação heme; Ligações ions de ferro; Componente integral da membrana; Composição de membrana tilacóide de cloroplasto; Fotossistema II
rb_6777.g8032	Pp3c20_270V3.1	18.834808280 1039	1.21e-13				
	Pp3c21_5680V3.1	11.837833485 4499	3.28e-13				
rb_6736.g7993	Pp3c2_23477V3.1	11.174884378 7585	4.83e-10	GO:0006412 GO:0009451	GO:0003735 GO:0019843	GO:0005840 GO:0009507 GO:0005739	Tradução; Constituinte estrutural do ribossomo; Ligação de rRNA; Cloroplasto; Componente celular mitocondrial; Conjunto de genes de modificação de RNA.
	Pp3c21_5700V3.1	11.634339144 4572	5.07e-10				
	Pp3c21_5690V3.1	11.233758161 1187	3.33e-8				
rb_8132.g12412	Pp3s1097_21V3.1	11.223792813 8104	1.36e-7				
	Pp3c2_23480V3.1	11.495629975 9732	2.71e-7	GO:0006412 GO:0015935	GO:0003735 GO:0019843	GO:0009507 GO:0005739 GO:0015935	Tradução; Constituinte estrutural do ribossomo; Ligação de rRNA; Cloroplasto; Componente celular mitocondrial; Enriquecimento de componentes celulares
rb_10695.g1753 7	Pp3s1034_30V3.1	11.196693775 0963	5.97e-7				

Quadro 2: Genes relacionados ao estresse salino no musgo *B. argenteum*.

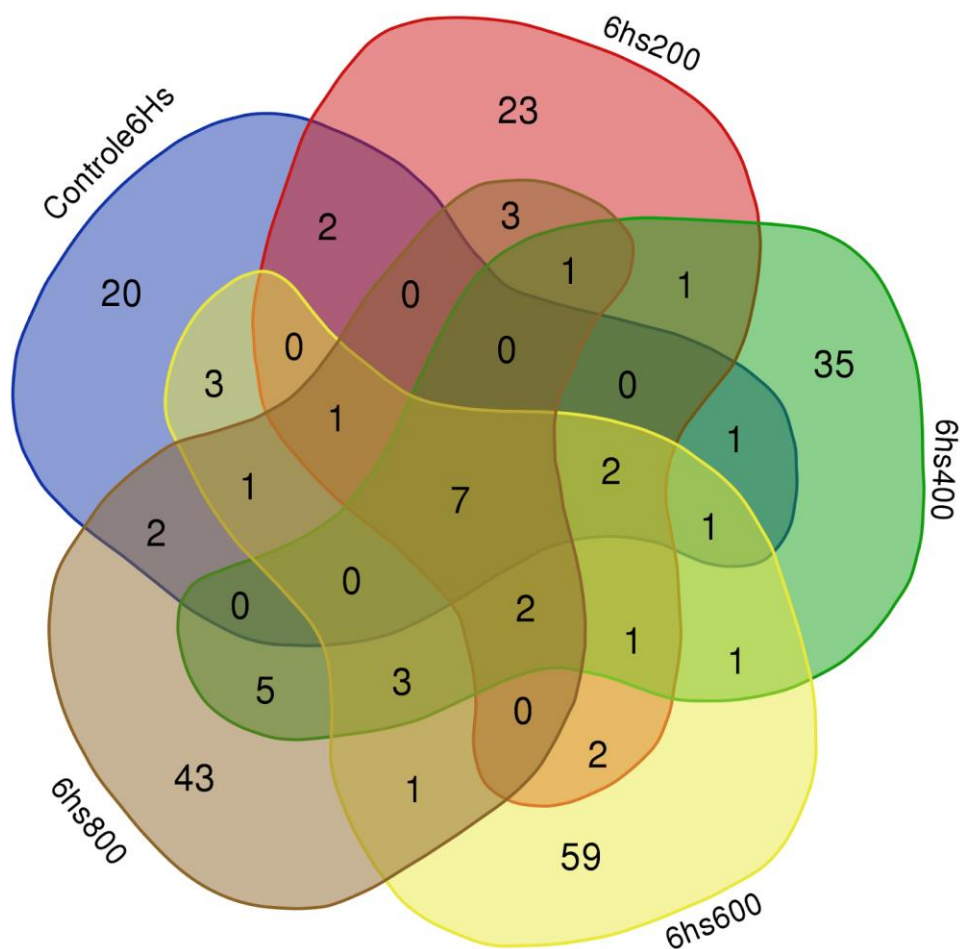


Figura 7: Diagrama de Venn, onde há todos os tratamentos de 6h (Controle, 200mM, 400mM, 600mM e 800mM) números de genes expressos e as intersecções entre os tratamentos.

No tratamento de 200mM, durante 6h de exposição, foram expressos 23 genes que resultaram em 31 GOs sendo 11 relacionados a processos biológicos, 11 relacionados a função molecular e 9 a componente celular.

Se tem conhecimento de que a fonte de energia dos organismos aeróbicos está na terceira etapa da respiração, que ocorre no interior da mitocôndria, por meio da enzima citocromo-oxidase (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; BARBOSA *et al* ,2010), encontrada na GO:0004129 (atividade da citocromo-c oxidase) presente neste tratamento, também relacionada com as células de defesa, protegendo contra infecções causadas por vírus, bactérias e fungos (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; BARREIROS; JORGE; JUCENI, 2006). Os antioxidantes também se mostram importantes na tolerância ao estresse salino, havendo experimentos que mostram um efeito positivo da produção de radicais livres em plantas sob salinidade (JOUYBAN, 2012). A ação da citocromo oxidase controla a geração desses radicais livres. Além disso, o estresse salino também se manifesta como estresse oxidativo mediado por EROs (ACOSTA-MOTOS, 2017), o que confirmam as GOs

encontradas GO:0055114 (processo de oxidação-redução) e GO:0006119 (fosforilação oxidativa).

No tratamento de 400mM foram expressos 35 genes que resultaram em 84 GOs, sendo 43 relacionados a processos biológicos, 21 relacionados à função molecular e 20 a componente celular.

Em condições de estresse, é necessário que as plantas mantenham o potencial hídrico e absorção de água para o crescimento (TESTER & DAVENPORT, 2003), o que requer um aumento na osmótica, seja por absorção de solutos do solo ou por síntese de solutos metabólicos (JOUYBAN, 2012). Isso condiz com o aparecimento da GO:0008152 (processo metabólico). A alta concentração de osmólitos fica concentrada no citosol, sendo necessário equilibrar a alta concentração de sal fora da célula de um lado e, do outro, combater a alta concentração de íons sódio e cloreto no vacúolo (JOUYBAN, 2012). O que corresponde a GO:0005774 (membrana vacuolar) e GO:0009414 (resposta a privação de água). Além disso, neste tratamento teve a GO:0046165 (processo biossintético do álcool), que segundo Sobhanian, 2010, a álcool desidrogenase diminui em resposta a imposição de estresse salino pois o acúmulo dela aumentou nas concentrações mais baixas de soja em resposta, indicando que o principal papel dessa enzima é produzir ATP e consumir produtos glicolíticos sob estresse salino. A ocorrência de transcritos de álcool desidrogenase em *Spartina alterniflora* apareceu em até 90min em contato com excesso de sal quando comparada aos controles (BAISAKH; PRASANTA; PRITISH, 2008), mostrando seu rápido aparecimento em baixas quantidades de sal, como neste experimento.

No tratamento de 600mM foram expressos 59 genes que resultaram em 121 GOs sendo 46 relacionadas a processos biológicos, 37 relacionados a função molecular e 38 a componente celular.

Neste tratamento, houve maior aparecimento de GOs relacionadas a metais como por exemplo GO:0046872 (ligação de íon metálico), GO:0005506 (ligação de íon de ferro), GO:0030151 (ligação de íons de molibdênio), GO:0008270 (ligação de íon de zinco) e GO:0046686 (resposta ao íon de cádmio). Podendo estar relacionado ao fato de que distúrbios de nutrientes sob salinidade reduzem o crescimento das plantas afetando a disponibilidade, transporte, e partição de nutrientes (JOUYBAN, 2012). O aumento da concentração de NaCl induz a diminuição de fósforo e nitrogênio como descrito em erva-doce (ABD EL-WAHAB, 2006) e camomila (BAGHALIAN et al., 2008) podendo ter relação com o aparecimento das GOs: GO:0046857 (atividade oxidorredutase, atuando em outros compostos nitrogenados como doadores, com NAD ou NADP como acceptor), GO:0042128 (assimilação de nitrato),

GO:0006817 (transporte de ions fosfato), GO:0005315 (atividade do transportador transmembrana de fosfato inorgânico), GO:0030170 (ligação de fosfato de piridoxal), GO:0035304 (regulação da desfosforilação das proteínas) e GO:0006468 (fosforilação de proteínas) sendo as duas últimas responsáveis pela ativação e desativação de proteínas. Estresses ambientais, como alta temperatura, deficiência hídrica, estresses salinos e até mesmo infecções por patógenos estão direta e intimamente ligados a alterações no padrão de proteínas específicas, em função do tipo de estresse (ARAÚJO; MARGIS-PINHEIRO; RUMJANEK, 1998; NETO; CECI; MASSARONI, 2001).

No tratamento de 800mM foram expressos 43 genes que resultaram em 91 GOs sendo 52 relacionadas a processos biológicos, 21 relacionados a função molecular e 18 a componente celular.

Uma dessas GOs é GO:0009409 (resposta ao frio) que pode estar relacionado com estresse abiótico no geral como defesa da planta (HISHAMUDDIN *et al*, 2019). Sintomas de exposição a estresse salino se manifestam com inibição do crescimento, desenvolvimento acelerado e senescência e morte durante exposição prolongada (JOUYBAN, 2012). Também aumenta a síntese de ácido abscísico que fecha os estômatos quando transportado para as células-guarda (JOUYBAN, 2012). Como resultado do fechamento estomático, a fotossíntese diminui e ocorre fotoinibição e estresse oxidativo (JOUYBAN, 2012). Isso corrobora com as seguintes GOs encontradas neste tratamento: GO:0010027 (organização da membrana tilacóide), GO:0009902 (realocação de cloroplasto), GO:0009773 (transporte de elétrons fotossintéticos no fotossistema I) e GO:0015995 (processo biossintético da clorofila), GO:0019684 (fotossíntese, reação a luz). GO:0009570 (estroma do cloroplasto), GO:0009579 (tilacóide), GO:0009507 (cloroplasto), GO:0009941 (envelope do cloroplasto). O dano ao cloroplasto é um aspecto importante do efeito da salinização, acompanhado pelo acúmulo de amido (ACOSTA-MOTOS, 2017). Outra característica é o aumento de cálcio como efeito protetor nas plantas sob estresse salino, que é mediada por uma via de sinalização intracelular que regula a expressão e atividade de potássio e transportadores de sódio (JOUYBAN, 2012). Funcionando assim: O excesso de íons de sódio na superfície da raiz interrompe a nutrição de potássio da planta, que por sua vez, aumenta a quantidade de cálcio, como forma de proteção, porque o cálcio também pode suprimir diretamente o sódio por canais catiônicos não seletivos (JOUYBAN, 2012). Sendo assim, a GO:0019722 (sinalização mediada por cálcio), encontrada nesse tratamento, demonstra a ação do cálcio em elevados níveis de sódio no meio.

Entre todos os tratamentos houve o compartilhamento de 7 genes, gerando 13 GOs, sendo elas GO:0018298 (ligação proteína-cromóforo), GO: 0022904 (cadeia respiratória de transporte de elétrons), GO: 0009767 (cadeia de transporte de elétrons fotossintética), GO: 0005975 (processo metabólico de carboidratos), GO: 0016021 (componente integral da membrana), GO: 0009535 (cloroplasto membrana tilacoide), GO: 0009523 (fotossistema II), GO: 0016491 (atividade oxidoredutase), GO: 0020037 (ligação heme), GO: 0005506 (ligação de íon de ferro), GO: 0045158 (transportador de elétrons, transferindo elétrons dentro do complexo citocromo b6/f da atividade do fotossistema II), GO:0016168 (ligação de clorofila) e GO: 0004553 (atividade de hidrolase, hidrolisando compostos O-glicosil). Demonstrando a relação do estresse com a fotossíntese, tanto no controle como esperado, como nos demais tratamentos onde ela costuma ficar comprometida.

Entre controle 200, 400 e 600mM houveram 2 genes em comum, gerando 7 GOs, dentre elas GO: 0009767 (cadeia de transporte de elétrons fotossintética), GO: 0016021 (componente integral da membrana), GO: 0009535 (membrana tilacoide cloroplasto), GO: 0016491 (atividade oxidoredutase), GO: 0045158 (transportador de elétrons, transferindo elétrons dentro do complexo citocromo b6/f da atividade do fotossistema II) e GO: 0045156 (transportador de elétrons, transferindo elétrons dentro da via de transporte cíclico de elétrons da atividade fotossintética). O que relaciona com a adaptação da planta ao estresse, uma vez que são os tratamentos intermediários, tanto com relação a fotossíntese quanto a aprimoramento da membrana.

Entre 200 e 600mM houveram 2 genes e 11 GOs dentre elas a GO:0004129 (atividade da citocromo-c oxidase) novamente corroborando com a geração de radicais livre como resposta aos estresse salino.

Entre as demais intersecções gênicas, não houveram GOs ou não eram de tanta significância.

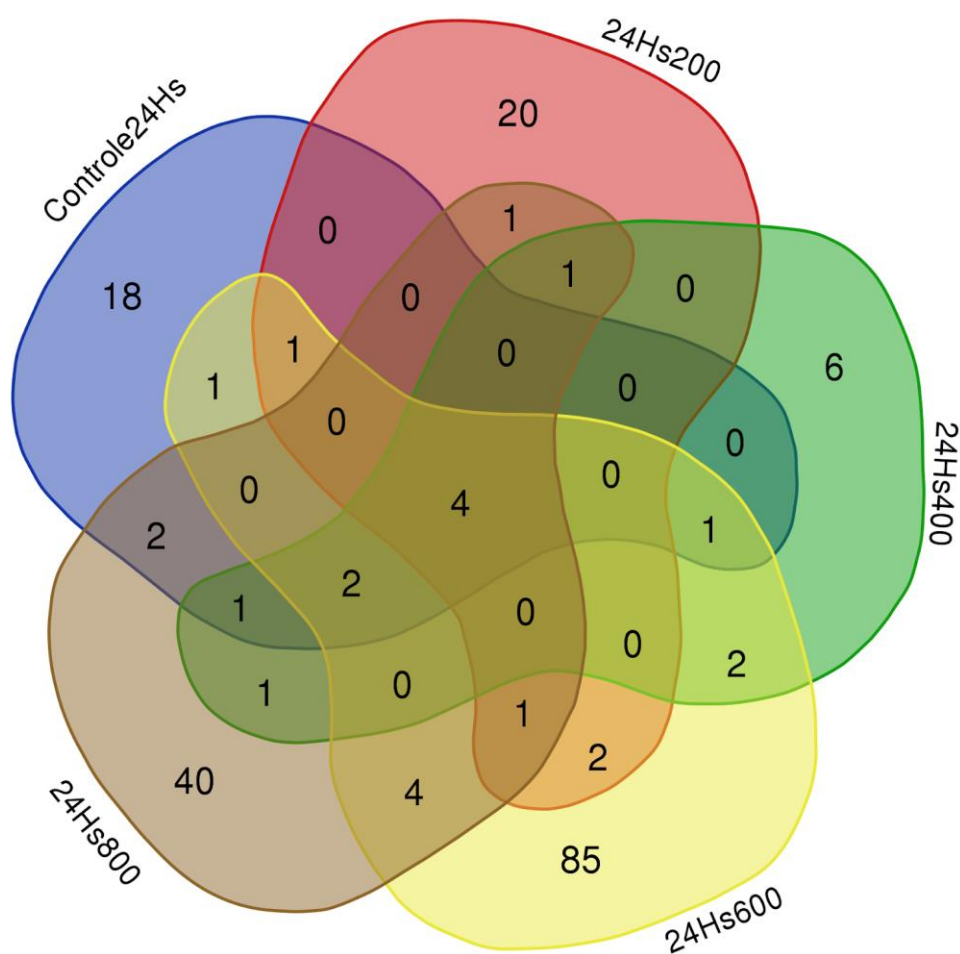


Figura 8: Diagrama de Venn, onde há todos os tratamentos de 24h (Controle, 200mM, 400mM, 600mM e 800mM) números de genes expressos e as intersecções entre os tratamentos.

No tratamento de 200mM, durante 24h de exposição, foram expressos 20 genes que resultaram em 38 GOs sendo 18 relacionadas a processos biológicos, 11 relacionados a função molecular e 9 a componente celular.

Como no tratamento equivalente de 6h, temos as seguintes GOs como destaque: GO:0055114 (processo de oxidação-redução) GO:0046777 (autofosforilação de proteínas) e GO:0016706 (atividade oxidorreductase), entretanto, nesse tratamento não houve a presença da enzima citocromo oxidase, responsável pela produção de radicais livres que auxiliam na proteção da planta, como citado anteriormente. Em contrapartida, somente neste tratamento foi encontrada a GO:0009737 (resposta ao ácido abscísico) que segundo a literatura, o ácido abscísico diminui conforme a exposição salina é aumentada (JOUYBAN, 2012).

No tratamento de 400mM foram expressos 6 genes que resultaram em 5 GOs sendo 1 relacionado a processos biológicos, 3 relacionados a função molecular e 1 a componente celular.

Foram encontradas as GOs GO:0006635 (beta-oxidação de ácidos graxos), GO:0003995 (atividade da acil-CoA desidrogenase), GO:0003997 (atividade da acil-CoA oxidase) e GO:0005777 (peroxissomo) todas envolvidas em processos com lipídios que estão presentes nas membranas biológicas como primeira barreira que separa as células de seu ambiente e são um alvo primário para danos durante o estresse (RODRÍGUEZ-VARGAS *et al*, 2007). Mudanças bruscas nas condições ambientais causam alterações na organização e estrutura dinâmica dos lipídios da membrana, uma vez que, alterar a fluidez da bicamada lipídica pode ajudar a prevenir ou aliviar os danos à membrana devido ao congelamento e contribuir para a sobrevivência celular (RODRÍGUEZ-VARGAS *et al*, 2007). Há relatos anteriores que sugerem que a composição lipídica da membrana está correlacionada com a tolerância a diferentes estresses, incluindo térmico (STEELS; LEARMONTH; WATSON, 1994), metais pesados (HOWLETT, 1997) e exposição ao herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (VIEGAS *et al*, 2005). Além disso, o estresse osmótico reduz a fluidez da membrana celular (LAROCHE *et al*, 2001), o que influencia a permeabilização da membrana e a morte celular (POIRIER *et al*, 1999).

No tratamento de 600mM foram expressos 85 genes que resultaram em 156 GOs sendo 56 relacionadas a processos biológicos, 62 relacionados a função molecular e 38 a componente celular.

Como reportado no tratamento equivalente, porém na exposição de 6h, houve grande aparecimento de GOs relacionadas a metais como GO:0051536 (ligação de cluster de ferro-enxofre), GO:0008270 (ligação de íon de zinco), GO:0008270 (ligação de íon de zinco), GO:0050897 (ligação de íon de cobalto), GO:0000287 (ligação de íons de magnésio), GO:0005507 (ligação de íon de cobre) e GO:0005506 (ligação de íon de ferro). Há relatos que sob condições salinas há crescimento vegetal reduzido devido a toxicidades de íons específicos (por exemplo, Na⁺ e Cl⁻) e iônico ocorrem desequilíbrios que atuam nos componentes biofísicos e/ou metabólicos do crescimento da planta (GRATTAN & GRIEVES, 1999). Foi relatado que o aumento da concentração de NaCl diminui níveis de N, P, Ca, K e Mg no funcho (ABD EL-WAHAB, 2006); *Trachyspermum ammi* (ASHRAF & OROOJ, 2006); hortelã-pimenta e limão verbena (TABATABAIE & NAZARI, 2007), entre outros. Além disso, houve também o aparecimentos de GO:0009409 (resposta ao frio) e GO:0009416 (resposta a estímulo luminoso) sendo que a primeira apareceu no tratamento de 800mM por 6h, evidenciando que o tempo de exposição da planta pode interferir na resposta dela quanto a quantidade de sal. Houveram também muitas GOs envolvidas com proteínas como GO:0016567 (ubiquitinação de proteínas), GO:0006468 (fosforilação de proteínas),

GO:0006418 (tRNA aminoacilação para tradução de proteínas), GO:0030163 (processo catabólico de proteínas), GO:0030529 (complexo de ribonucleoproteína), GO:0004842 (atividade da ubiquitina-proteína transferase) e GO:0004674 (atividade de proteína serina/treonina quinase), sendo essa última ativada por sinal de cálcio resultante do estresse salino (ZHU, 2003). Várias proteínas induzidas por sal foram identificadas em espécies vegetais (ASHRAF & HARRIS *et al*, 2004). PAREEK; SINGLA; GROVER, 1997, sugeriram que o estresse proteínas podem ser usadas como importantes marcadores moleculares para a melhoria da tolerância ao sal usando técnicas de engenharia. No entanto, as proteínas produzidas sob estresse salino nem sempre estão associadas à tolerância ao sal; consequentemente, a resposta delas depende da natureza da espécie vegetal ou cultivar.

No tratamento de 800mM foram expressos 40 genes que resultaram em 66 GOs sendo 21 relacionadas a processos biológicos, 17 relacionados a função molecular e 28 a componente celular.

Uma dessas GOs é GO:0009408 (resposta ao calor) que pode estar relacionado com estresse abiótico no geral como defesa da planta (HISHAMUDDIN *et al*, 2019). El-Shintinawy & El-Shourbagy (2001) verificaram que os aminoácidos mais abundantes (cisteína, arginina, metionina) são reduzidos quando as plantas foram estressadas com NaCl. Já valina, isoleucina, aspartato e prolina aumentaram em resposta ao estresse provocado por NaCl o que corrobora com o aparecimento da seguinte GO neste tratamento GO:0009067 (processo de biossíntese de aminoácidos da família do aspartato) e GO:0004072 (atividade de aspartato quinase). O ácido ascórbico (AA) é um dos antioxidantes mais importante na proteção das plantas contra o estresse oxidativo gerado por estresses abióticos (CASTRO, 2014). estando presente na GO:0019853 (Processo biossintético do ácido L-ascórbico) neste tratamento. Por fim, há relatos de que o gene *smGTP* é fortemente induzido pelo estresse salino nos tecidos radicular, coronário e foliar (DOMBROWSKI; BALDWIN; MARTIN, 2008) além de possuir um papel no estresse de desidratação. Há também relatos de que a atividade GTPase é regulada por alterações na quantidade de cálcio. Estes resultados sugerem a possibilidade de que a atividade da GTPase seja um sinal dependente de ABA, que tem seu funcionamento alterado quando exposto ao estresse salino (JAYASEKARAN *et al*, 2006).

Entre todos os tratamento houveram 7 genes com 13 GOs onde também teve destaque o funcionamento da fotossíntese, GO:0009535 (cloroplasto membrana tilacoide) GO:0009523 (fotossistema II) GO:0009767 (cadeia de transporte de elétrons fotossintética) GO:0045158 (transportador de elétrons, transferindo elétrons dentro do complexo citocromo b6/f da atividade do fotossistema II) GO:0016168 (ligação de clorofila).

Entre os tratamentos controle, 400mM e 600 mM houve apenas o gene Pp3c5_26340V3.2 e 5 GOs GO:0005524 (Ligação ATP) GO:0015991 (Transporte de prótons acoplados à hidrólise de ATP) GO:0015986 (Transporte de prótons acoplados à síntese de ATP) GO:0005754 (ATP sintase transportadora de prótons mitocondriais, núcleo catalítico) GO:0046933 (atividade da ATP sintase transportadora de prótons, mecanismo rotacional), todas relacionadas com ATP corroborando com a literatura onde há estudos sobre a síntese de ATP atuar como resposta a (SAHA *et al.*, 2015).

Entre os tratamentos 200mM 400mM e 800 mM houve apenas 1 gene Pp3c21_5680V3.1 e 7 GOs assim como em controle e 600 mM reiterando novamente o comprometido da fotossíntese conforme é aumentada a concentração de NaCl. GO:0009535 (membrana tilacóide cloroplasto) GO:0009767 (cadeia de transporte de elétrons fotossintéticos) GO:0045158 (transportador de elétrons, transferindo elétrons dentro do complexo citocromo b6/f da atividade do fotossistema II) GO:0045156 (transportador de elétrons, transferindo elétrons dentro da via de transporte cíclico de elétrons da atividade da fotossíntese) GO:0009523 (fotossistema II) e GO:0016168 (ligação de clorofila).

Entre o tratamento controle e 800 mM houveram 2 genes: Pp3c18_14590V3.3 e Pp3c19_22360V3.1 com destaque na atuação na resposta ao estresse abiótico, onde sua ontologia está relacionada na resposta aos estresse oxidativo e oxidação-redução (GO:0006979 e GO:0055114), morte celular (GO:0008219) e diretamente na resposta ao estresse salino (GO:0009651). Essas observações evidenciam que a planta reconhece a presença de sal gerando resposta e proteção pela ativação dos mecanismos relativos à expressão destes genes.

Nos tratamentos de 600 mM e 800 mM houve a expressão de 4 genes em comum sendo Pp3c10_9790V3.3 um deles, onde sua ontologia em processos biológicos (GO:0050896), está associada a resposta ao estímulo e reconhecimento do estresse abiótico, sendo uma região também associada ao domínio AP2, também teve o aparecimento da GO:0009800 (processo biossintético do ácido cinâmico) que está relacionado com o reconhecimento de estresse e defesa da planta, uma vez que o ácido cinâmico pertence ao grupo das auxinas, que são hormônios responsáveis pela diferenciação celular e crescimento (THIMANN, 1969).

Entre as demais interseções de expressão gênica, não houveram GOs ou genes com significância e relevância para avaliação da expressão diferencial entre os tratamentos.

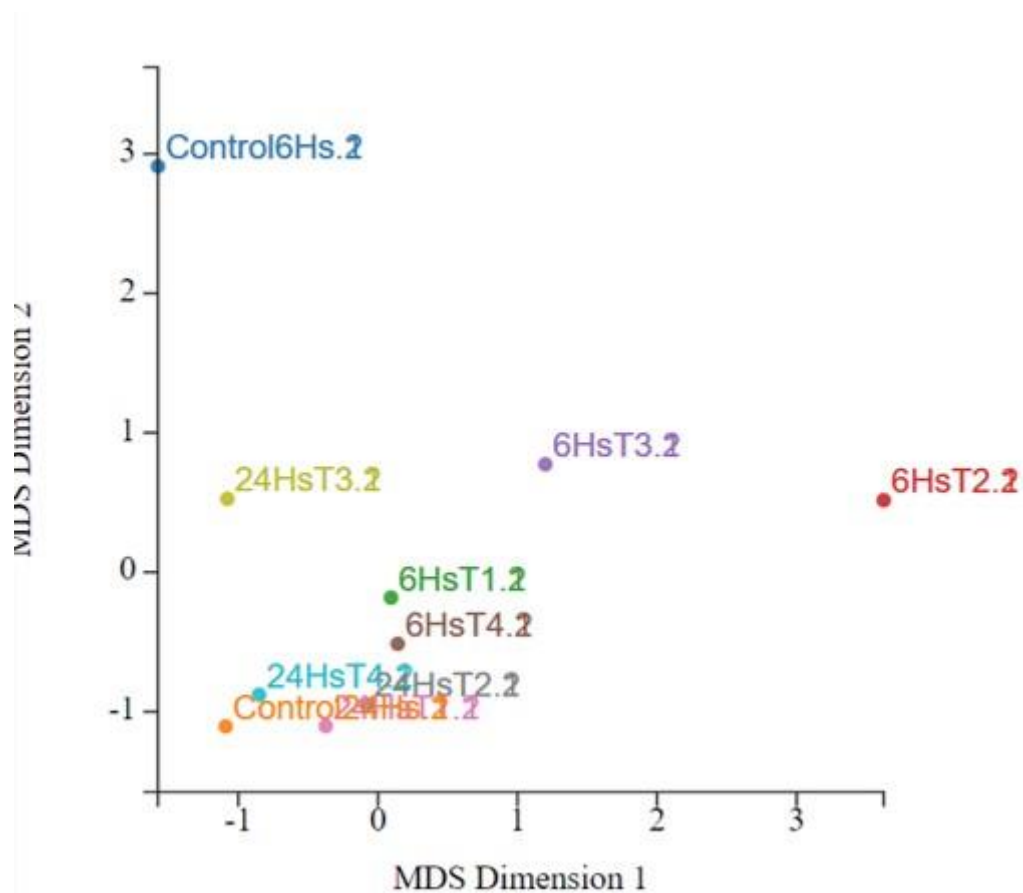


Figura 9: Dimensionamento multidimensional (MDS) entre todos os tratamentos de 6h e 24h, demonstrando a similaridade e contraste entre eles.

Como observado na figura 5, o tratamento de 6h teve mais genes contrastantes do que semelhantes quando comparado com o tratamento de 24h. O que exemplifica o quão rápido a planta gera resposta ao sal a fim de se proteger contra o estresse e como essa adaptação acaba por estabilizar quando há contato por mais tempo. Em análises de tolerância ao sal no musgo *Physcomitrella Patens* há relatos de que são capazes de tolerar até 600mM de NaCl, seguido por uma lenta adaptação ao acréscimo das concentrações (BENITO & RODRÍGUEZ-NAVARRO, 2003). Essa adaptação lenta e gradual se dá através de respostas moleculares a estresses (FRANK; RATNADEWI; RESKI, 2005) e pode ser usada como ponto de vista também para a variação do tempo de imersão da planta. Os contrastes dos tratamentos também podem ser justificados pela aclimação de *B. argenteum* que é um processo mediado por uma rede complexa de fatores de transcrição e outros genes reguladores que controlam muitas enzimas de defesa, proteínas e vias de sinalização.

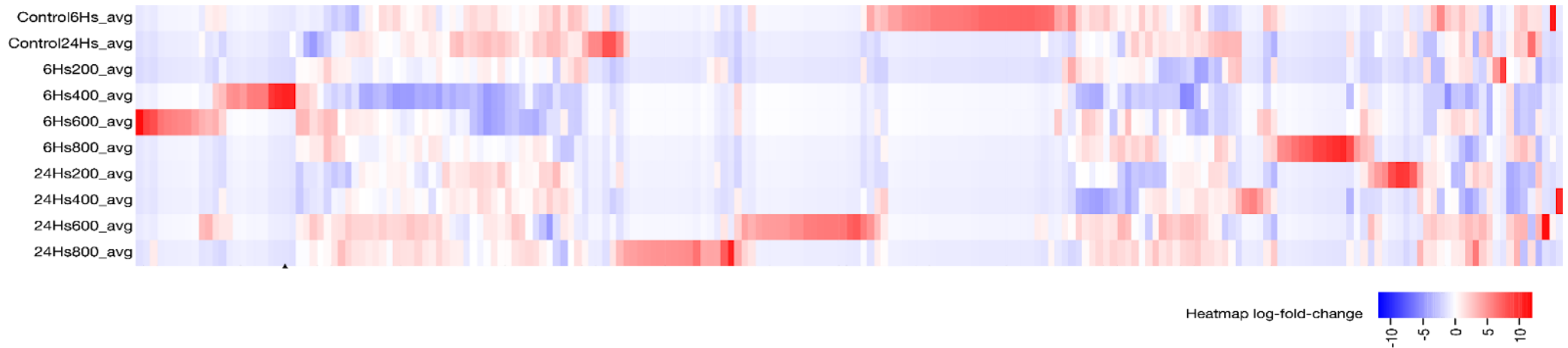
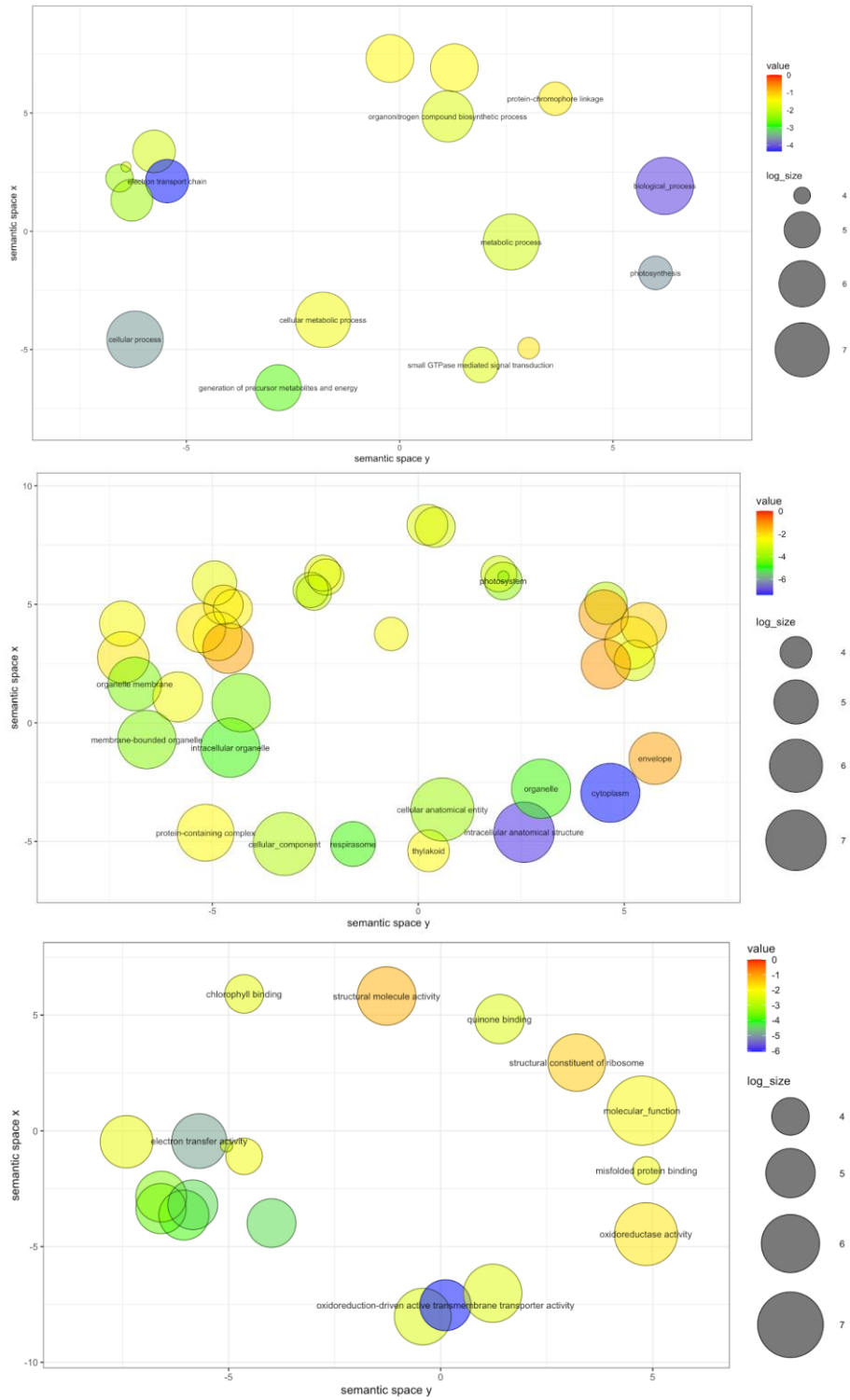
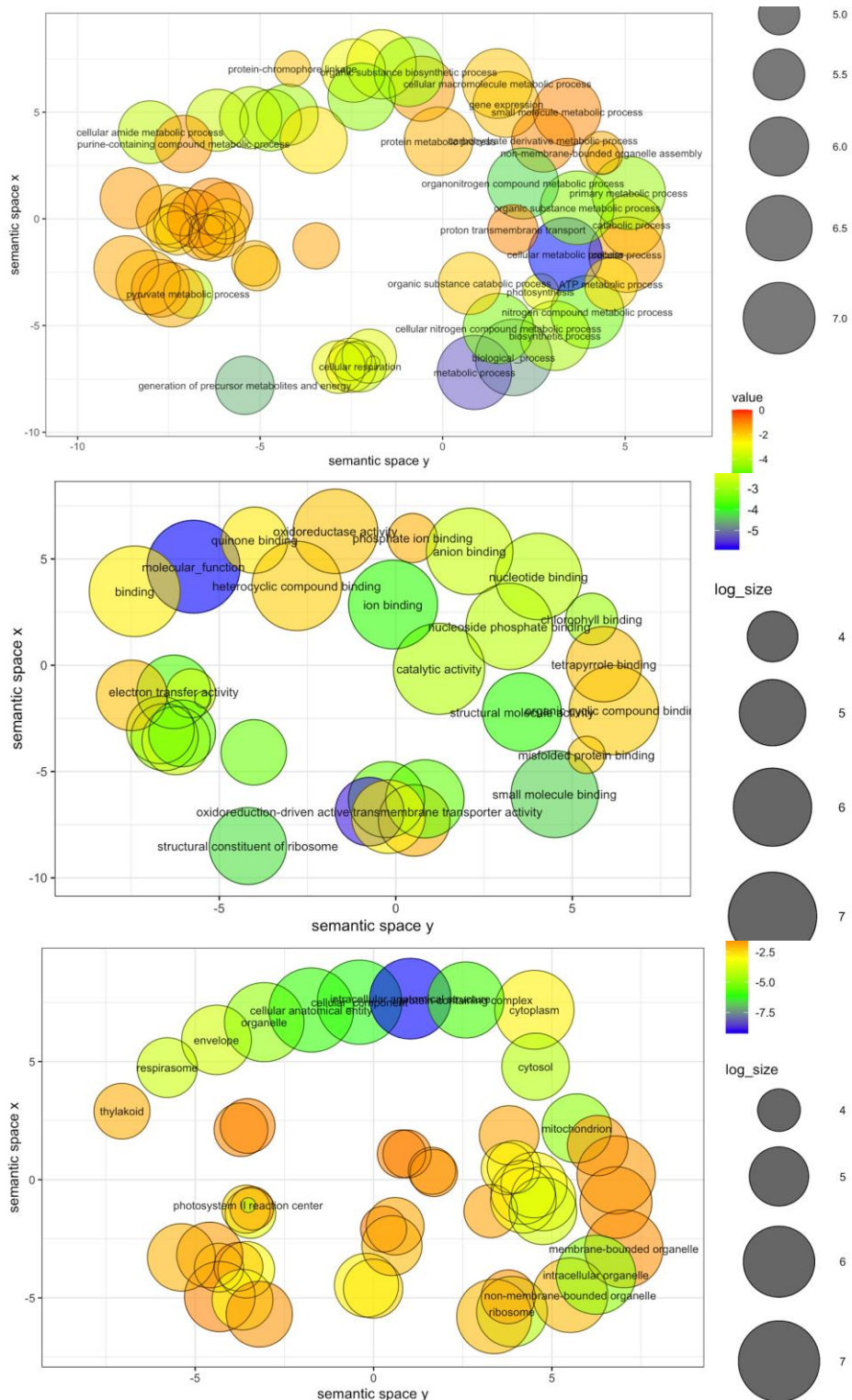


Figura 10: Heatmap com o padrão de expressão gênica dos genes de cada tratamento, onde vermelho representa maior expressão e azul menor expressão.

No tratamento controle há maior expressão de genes que não aparecem mais nos tratamentos suplementados com NaCl, como também acontece quando comparados os demais tratamentos entre si. Essa expressão inversamente proporcional se dá pelo processo de adaptação e aclimatação da planta quando exposta a concentrações crescentes de sal, como já descrito anteriormente (RICHARDT *et al*, 2010). Também acontece de poucos genes estarem compartilhados entre os tratamentos, como por exemplo, em 400mM, 600mM e 800mM que também corrobora a adaptação gradual da planta.



Figuras 11, 12 e 13: REVIGO dos tratamentos de 6h, onde na primeira figura estão agrupados os Processos Biológicos; na segunda os de Componente Celular e por último, Funções Moleculares.



Figuras 14, 15 e 16: REVIGO dos tratamentos de 24h, onde na primeira figura estão agrupados os Processos Biológicos; na segunda os de Componente Celular e por último, Funções Moleculares.

Na figura 11 e 14, com relação aos processos biológicos expressos, temos o envolvimento de processos metabólicos. Os distúrbios metabólicos celulares são resultantes da competição entre Na^+ com o K^+ pelos sítios ativos das enzimas (MAATHIUS e AMTMANN, 1999) sendo o K^+ um dos macronutrientes mais requeridos pelas plantas

(GIERTH & MASER, 2007) e a elevada salinidade no solo compromete sua absorção pelas plantas induzindo a deficiência e competição. Em especial, na figura 11, há o aparecimento de diversos processos biológicos envolvidos na resposta da planta ao estresse, o que corrobora com o fato citado anteriormente da adaptação da planta ser uma cascata de eventos.

Quanto aos componentes celulares, há o aparecimento de funções relacionadas a membrana das organelas e citoplasma (Figura 12). Sabe-se que um aumento da síntese de proteínas pode estar relacionado a proteínas que atuam, principalmente na estabilização das membranas celulares e na sinalização de respostas ao estresse salino (TESTER e DAVENPORT, 2003). Além das membranas celulares serem uma das primeiras estruturas afetadas pelo estresse salino e o grau de danos às membranas pode ser estimado indiretamente através da condutividade elétrica, que mede o vazamento de eletrólitos (VE) das células para a solução aquosa (MUNNS e TESTER, 2008).

Nas figuras 12 e 15, há o aparecimento de ligações de quinona, que estão relacionadas com a defesa da planta, decorrente da exposição ao sal. Além redução da atividade de oxiredutase, algumas proteínas podem participar no auxílio à defesa basal da planta, tais como a ligação do íon cálcio, a atividade da ferroxidase (oxidoredutase), fatores de reconhecimento do patógeno e algumas outras que podem estar formando uma parede celular mais espessa, dificultando a penetração do patógeno em situações de estresse (VICTORIA *et al*, 2012).

Por fim, há o aparecimento de processos relacionados à fotossíntese e cloroplastos (Figura 13), relacionados com a diminuição da atividade fotossintética com o aumento de exposição ao sal. Desta forma, podemos sugerir que o maior estresse é evidenciado nos tratamentos de 6 horas nas diferentes concentrações de NaCl, mas assim mesmo sem evidências das plantas estarem em processo de *salt shock*. Nossas observações indicam que *Bryum aergenteum* possui os mesmos mecanismos de resposta aos estresse salino já evidenciados em outras plantas terrestres, como *Lolium* e algodão (SHAVRUKOV, 2012). Os genes mais responsivos são relacionados às vias de transcrição e sinalização, como por exemplo os membros das famílias de fatores de transcrição AP2/ERF, quinases semelhantes a receptores citoplasmáticos e de membrana. Levando em consideração, que estes fatores de transcrição são de natureza multicópia, avaliamos os homólogos encontrados nos principais genomas de musgos, utilizando as cópias de *Arabidopsis thaliana* como grupo externo, e foi observado pelo menos três cópias de regiões com domínio AP2/ERF em nosso transcriptoma de *Bryum argenteum*, sendo uma cópia ortóloga e dois parálogos, sugerindo pelo menos um evento de duplicação desta região em nosso musgos estudado (Figura 17). Todos esses homólogos identificados em nosso modelo agrupam com as demais cópias de *Pohlia nutans* e

Ceratodon purpureus, corroborando a proximidade taxonômica/sistemática destas três espécies (LIU *et al*, 2019).

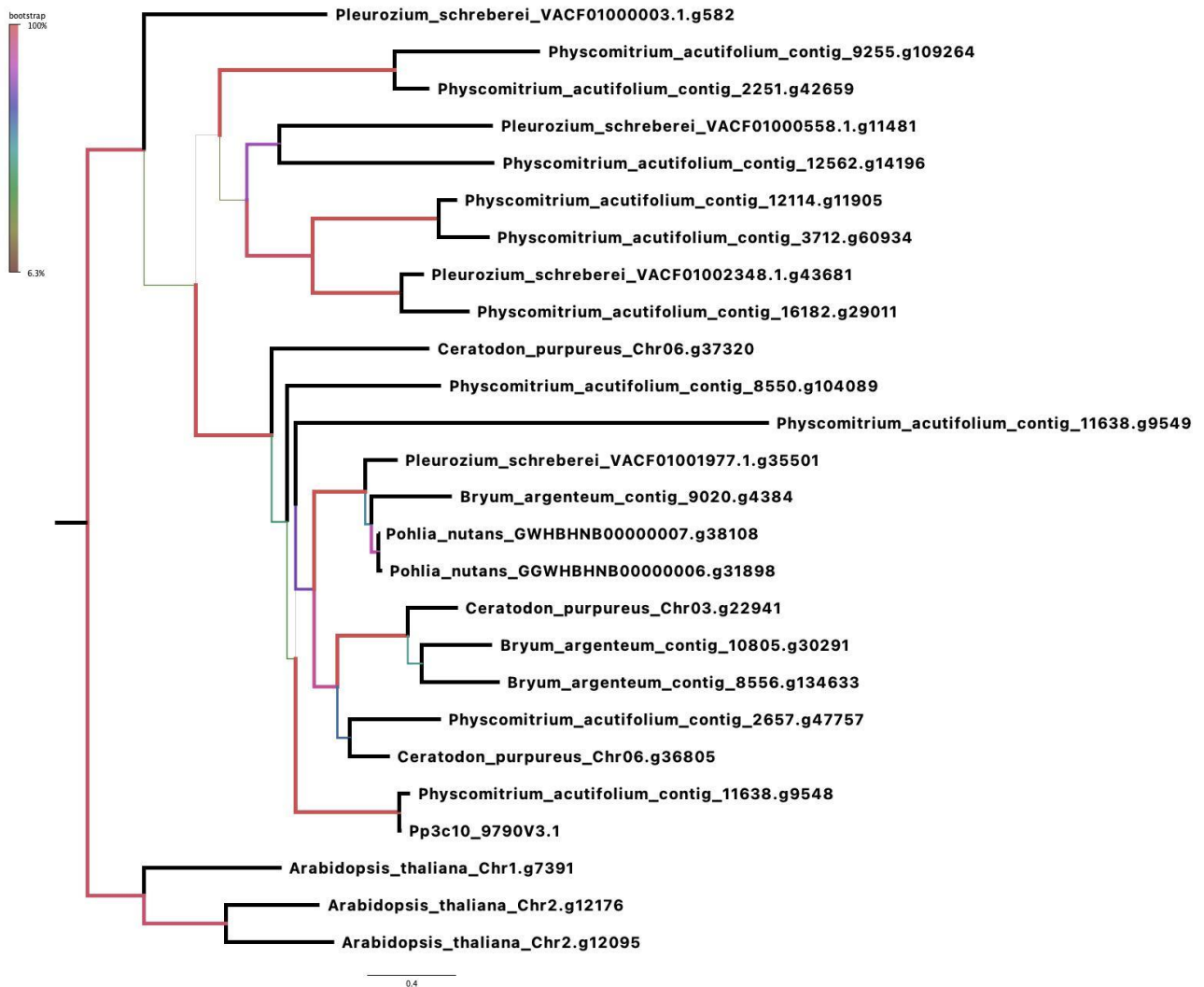


Figura 17. Árvore filogenética dos homólogos de AP2/ERF obtidos do transcriptoma de *Bryum argenteum* e de demais genomas de musgos com transcriptomas disponíveis nas bases de dados ou obtidos do acervo do NEVA. As diferentes cores dos ramos refletem o valor de bootstrap para determinado ramo, conforme anotação da legenda.

Concluimos assim, que os mesmos conjuntos de genes estão envolvidos na reação das plantas à osmorregulação e/ou na respostas a mudanças iônicas (como o caso dos fatores de transcrição), seja no nosso musgo modelo, seja em *P. patens* (RICHARDT *et al*, 2010) ou seja em *Pohlia nutans* (ZHANG *et al*, 2019). Da mesma forma esses mecanismos são conservados também em muitas outras plantas terrestres, como as samambaias e as plantas com flores (SHAVRUKOV, 2012; ROLLY *et al*, 2020), mesmo que estas não sejam usualmente colonizadores de ambientes costeiros ou sob influência do spray marinho.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Portanto, foi constatado o fato das briófitas serem espécies pioneiras em sucessões ecológicas, podendo rapidamente, deixar de existir em determinados ambientes dando lugar a outras espécies de plantas após alterarem o microclima. Podemos concluir também que concentrações mais altas de hipoclorito quando combinadas com pouco tempo de imersão desinfectam o *B. argenteum* sem causar danos a planta, como também, que o meio de cultura MS proporciona maior desenvolvimento de protonemas e o KNOP, por sua vez, de gametófitos. As similaridades e discrepâncias das análises genômicas comparativas confirmam que nosso modelo de musgo é muito mais próximo de *Pohlia nutans*, pois pertencem ao mesmo clado, dentro da subclasse Bryidae. Quanto a análise de ontologia genética houve destaque para a parte fotossintética que sofre alterações conforme os níveis de NaCl são elevados. O tratamento de 6h teve mais genes contrastantes do que semelhantes quando comparado com o tratamento de 24h, o que evidencia o quão rápido a planta gera resposta ao sal a fim de se proteger contra o estresse, acontecendo assim, uma adaptação lenta e gradual através de respostas moleculares a estresses, que levam a aclimatação. Houve também o aparecimento de diversos processos biológicos envolvidos na resposta da planta ao estresse, o que corrobora com o fato da adaptação da planta ser uma sucessão de eventos, desde a percepção do estresse, passando pela ativação de complexas cascatas de defesa que podem vir a acionar canais iônicos específicos, formar espécies reativas de oxigênio (ROS), acumular fitohormônios como os ácidos abscísico (ABA), salicílico, acético, jasmônico e etileno, até enfim, reprogramar o maquinário específico para poder executar defesas adequadas e que resultem no aumento da tolerância da planta, para assim minimizar o dano biológico causado pelo estresse.

Conclui-se que os mesmos conjuntos de genes estão envolvidos na reação das plantas à osmorregulação e/ou na respostas a mudanças iônicas, evidenciando que esses mecanismos são conservados também em muitas outras plantas terrestres mesmo que não estejam sob influência da pulverização marinha.

8. REFERÊNCIAS

- ABD EL-WAHAB, M. A. **The efficiency of using saline and fresh water irrigation as alternating methods of irrigation on the productivity of *Foeniculum vulgare* Mill subsp. vulgare var. vulgare under North Sinai conditions.** Res J Agr Biol Sci. 2(6):571-7. 2006.
- ACOSTA-MOTOS, José Ramón *et al.* **Plant responses to salt stress: Adaptive mechanisms.** Agronomy. 7:18. doi: 10.3390/agronomy7010018, 2017.
- ALVES, R. J. V. **Ilha da Trindade e Arquipélago Martim Vaz - Um Ensaio Geobotânico.** 143p., Serviço de Documentação da Marinha, Rio de Janeiro, Brasil. 1998.
- ALVES, R. J. V. **Terrestrial vascular floras of Brazil's oceanic archipelagos.** Ilhas oceânicas brasileiras: da pesquisa ao manejo. Brasília: MMA, Secretaria de Biodiversidade e Florestas, 83-104. 2006.
- ARAÚJO, J. L. S.; MARGIS-PINHEIRO, M.; RUMJANEK, N. G. **Proteínas de choque térmico e tolerância a altas temperaturas em plantas.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia. (Documentos, 80). 1998.
- ASHRAF, M. P. J. C.; HARRIS, P. J. C. **Potential Biochemical Indicators of Salinity Tolerance in Plant.** Plant Sci., vol. 166, pp. 3–16. 7. 2004.
- ASHRAF M.; OROOJ A. **Salt stress effects on growth, ion accumulation and seed oil concentration in an arid zone traditional medicinal plant ajwain (*Trachyspermum ammi* [L.] Sprague).** Journal of Arid Environ. 64(2):209-20. 2006.
- BAGHALIAN, Kambiz *et al.* **Effect of saline irrigation water on agronomical and phytochemical characters of chamomile (*Matricaria recutita* L.).** Scientia Horticulturae, 116(4), 437-441. 2008.
- BAINARD, Jillian D.; NEWMASER, Steven G. **Endopolyploidy in Bryophytes: Widespread in mosses and absent in liverworts.** Journal of Botany. 2010.
- BAINARD, Jillian D. *et al.* **DNA content variation in monilophytes and lycophytes: large genomes that are not endopolyploid.** Chromosome Research 19.6, 763-775. 2011.
- BAINARD, Jillian D.; VILLARREAL, Juan Carlos. **Genome size increases in recently diverged hornwort clades.** Genome 56.8, 431-435. 2013.
- BAINARD, Jillian D.; NEWMASER, Steven G.; BUDKE, Jessica M. **Genome size and endopolyploidy evolution across the moss phylogeny.** Annals of Botany 125.4 543-555. 2020.
- BAISAKH, Niranjan; PRASANTA K. Subudhi; PRITISH, Varadwaj. **Primary responses to salt stress in a halophyte, smooth cordgrass (*Spartina alterniflora* Loisel.).** Functional & Integrative Genomics, 8(3), 287-300. 2008.
- BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira *et al.* **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios.** Revista de Nutrição, v. 23, n. 4, p. 629-643. 2010.
- BARREIROS, André. L. B. S.; JORGE, M. David; JUCENI, P. David. **Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo.** Química Nova, v. 29, n. 1, p. 113-123. 2006.
- BENITO, Begoña; RODRÍGUEZ-NAVARRO, Alonso. **Molecular cloning and characterization of a sodium-pump ATPase of the moss *Physcomitrella patens*.** The Plant Journal 36.3, 382-389. 2003.
- BERGMAN, Casey M.; QUESNEVILLE, Hadi. **Discovering and detecting transposable elements in genome sequences.** Briefings in bioinformatics 8.6, 382-392. 2007.
- BESSON, Jean Carlos Fernando *et al.* **Fontes e concentrações de carboidratos no crescimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl.** Revista Brasileira de Biociências; 8(1): 9-13. 2010.
- BIJELOVI, Aneta *et al.* **Phytohormone influence on the morphogenesis of two mosses (*Bryum argenteum* Hedw. and *Atrichum undulatum* (Hedw.) P. Beauv.).** Israel Journal of Plant Sciences, 52(1), 31-36. 2004.
- BRAGA, Franciane Tavares *et al.* **Características anatômicas de mudas de morangueiro micropropagadas com diferentes fontes de silício.** Pesquisa Agropecuária Brasileira; 44(2): 128-132. 2009.
- BRININGER, C. *et al.* **The more adaptive to change, the more likely you are to survive: protein adaptation in extremophiles.** In Seminars in cell & developmental biology. Academic Press.Vol. 84, pp. 158-169. 2018.

- BURJACHS, Francesc *et al.* **Overview of environmental changes and human colonization in the Balearic Islands (Western Mediterranean) and their impacts on vegetation composition during the Holocene.** *Journal of Archaeological Science: Reports*, v. 12, p. 845-859. 2017.
- BURNELL, Keith D. *et al.* **Control of silvery-thread moss (*Bryum argenteum* Hedw.) in creeping bentgrass (*Agrostis palustris* Huds.) putting greens.** *Weed Technol.* 18:560–565. 2004.
- BUSHMANOVA, Elena *et al.* **rnaQUAST: a quality assessment tool for de novo transcriptome assemblies.** *Bioinformatics* 32.14, 2210-2212. 2016.
- CABANETTES, Floréal; KLOPP, Christophe. **D-GENIES: dot plot large genomes in an interactive, efficient and simple way.** *PeerJ* 6, e4958. 2018.
- CALVETE, Eunice Oliveira *et al.* **Agronomic and in vitro performance of micropropagated strawberry cultivars in different numbers of subculture.** *Revista Brasileira de Fruticultura.*; 31: 943-949. 2009.
- CAMARGO, Samila Silva; MENEGUZZI, Aline; RUFATO, Leo. **Cultivo in vitro do cultivar italiano de morangueiro Pircinque.** *Acta Biológica Catarinense*, 7(1), 57-74. 2020.
- CAMPBELLI, Michael S. *et al.* **Genome annotation and curation using MAKER and MAKER-P.** *Current protocols in bioinformatics* 48.1, 4-11. 2014.
- CAPOZZI, F. *et al.* **Biomonitoring of atmospheric pollution by moss bags: Discriminating urban-rural structure in a fragmented landscape.** *Chemosphere*, 149, 211-218. 2016.
- CASTRO, Jamyla Lima Saboya de. **A toxicidade do ácido ascórbico em plantas de arroz silenciadas nas APXs cloroplásticas induz estresse oxidativo não dependente da fotossíntese.** 2014.
- CLOONAN, Nicole *et al.* **Stem cell transcriptome profiling via massive scale mRNA sequencing.** *Nature methods*, v. 5, n. 7, p. 613-619. 2008.
- DE LIMA, Jéssica Soares; DOS SANTOS, Emanuelle Lais; DELLA, Aline Possamai. **Caracterização morfológica e ecologia de Briófitas.** *Laboratório de Anatomia Vegetal*, 4. 2022.
- DECKER, Eva L.; RESKI, Ralf. **The moss bioreactor.** *Current Opinion in Plant Biology*, 7(2), 166-170. 2004.
- DOMBROWSKI, James E.; BALDWIN, James C.; MARTIN, C. Ruth. **Cloning and characterization of a salt stress-inducible small GTPase gene from the model grass species *Lolium temulentum*.** *Journal of plant physiology* 165.6: 651-661. 2008.
- DONSON, Jonathan. *et al.* **Comprehensive gene expression analysis by transcript profiling.** *Plant Molecular Biology*, v. 48, n. 1-2, p. 75–97. 2002.
- DU, Xilong *et al.* **Comparative transcriptome analysis of transcription factors in different maize varieties under salt stress conditions.** *Plant Growth Regul.* 81, 183–195. 2017.
- EL-SHINTINAWY, F.; EL-SHOUBAGY, M. N. **Alleviation of changes in protein metabolism in NaCl-stressed wheat seedlings by thiamine.** *Biologia Plantarum*, v.44, p.541–545. 2001.
- Food and Agriculture Organization, FAO. **Quinoa FAQs.** Retrieved from <http://www.fao.org/quinoa2013/faqs/en/>. 2013.
- FARIA, Allan Laid Alckmin *et al.* **As briófitas da Ilha da Trindade, Atlântico Sul, Brasil.** *Acta Botanica Brasilica*, v. 26, n. 4, p. 785-795. 2012.
- FEDOSOV, Vladimir E., *et al.* **Phylogenetic inference and peristome evolution in haplolepideous mosses, focusing on Pseudoditrichaceae and Ditrichaceae sl.** *Botanical Journal of the Linnean Society* 181.2, 139-155. 2016.
- FERNANDES, Ruben; PINHO, Paulo. **The distinctive nature of spatial development on small islands.** *Progress in Planning*, v. 112, p. 1-18. 2017.
- FERREIRA, A. L. A., MATSUBARA, L. S. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.** *RAMB.* 1997; 43(1):61-8. 1997.
- FERREIRA, Leandro Martins. **Características morfológicas, fisiológicas e transcriptoma em variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) contrastantes quanto à tolerância ao estresse hídrico.** 2017.
- FLORES, Rejane, *et al.* **Sacarose e sorbitol na conservação in vitro de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (*Amaranthaceae*).** *Journal of Biotechnology and Biodiversity* 4.3 (2013): 192-199. 2013.

- FLOWERS, T. J. **Improving crop salt tolerance**. Journal of Experimental Botany, v. 55, n. 396, p. 307-319. 2004.
- FORMENTI, Giulio, *et al.* **The era of reference genomes in conservation genomics**. Trends in ecology & evolution. 2022.
- FRANK, Wolfgang, RATNADEWI, Diah; RESKI, Ralf. **Physcomitrella patens is highly tolerant against drought, salt and osmotic stress**. Planta 220.3, 384-394. 2005.
- GAO, Bei *et al.* **De novo transcriptome characterization and gene expression profiling of the desiccation tolerant moss Bryum argenteum following rehydration**. BMC Genomics 16.1,1-14. 2015.
- GAO, Bei *et al.* **Desiccation tolerance in bryophytes: The dehydration and rehydration transcriptomes in the desiccation-tolerant bryophyte Bryum argenteum**. Scientific reports 7(1), 1-14. 2017.
- GAO, Sheng *et al.* **Dynamic assessment of island ecological environment sustainability under urbanization based on rough set, synthetic index and catastrophe progression analysis theories**. Ocean & Coastal Management 178, 104790. 2019.
- GARCIA, A. *et al.* **The effects of selection for sodium transport and of selection for agronomic characteristics upon salt resistance in rice (Oryza sativa L.)**. Theoretical and Applied Genetics 90.7, 1106-1111. 1995.
- GIERTH, M.; MASER, P. **Potassium transporters in plants – involvement in K⁺ acquisition, redistribution and homeostasis**. FEBS Lett., v.581, p.2348–2356, 2007.
- GRIESMANN, Maximilian *et al.* **Phylogenomics reveals multiple losses of nitrogen-fixing root nodule symbiosis**. Science 361.6398, eaat1743.2018.
- GOYA, Rodrigo; MEYER, Irmtraud M.; MARRA, M. A. **Applications for high-throughput sequencing**. Bioinformatics for high throughput sequencing. Springer, New York, NY. 27-53. 2012.
- GRATTAN S. R.; GRIEVES C. M. **Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crops**. Scientia Hort 1999; 78: 127-57. 1999.
- GRIMSLEY, N. H.; ASHTON, N. W.; COVE, D. J. **The production of somatic hybrids by protoplast fusion in the moss, Physcomitrella patens**. Molecular and General Genetics MGG 154.1, 97-100. 1977.
- GUO, Peiguo *et al.* **Differentially expressed genes between drought-tolerant and drought-sensitive barley genotypes in response to drought stress during the reproductive stage**. Journal of Experimental Botany, v.60, p.3531-3544. 2009.
- GUREVICH, Alexey *et al.* **QUAST: quality assessment tool for genome assemblies**. Bioinformatics 29.8, 1072-1075. 2013.
- HAAS, Brian J. *et al.* **Improving the Arabidopsis genome annotation using maximal transcript alignment assemblies**. Nucleic acids research 31.19, 5654-5666. 2003.
- HARRIS, Brogan J. *et al.* **Divergent evolutionary trajectories of bryophytes and tracheophytes from a complex common ancestor of land plants**. bioRxiv. 2021.
- HILLIER, LaDeana W. *et al.* **Massively parallel sequencing of the polyadenylated transcriptome of C. elegans**. Genome research 19.4, 657-666. 2009.
- HISHAMUDDIN, Muhammad Syahmi *et al.* **Time-based LC-MS/MS analysis provides insights into early responses to mechanical wounding, a major trigger to agarwood formation in Aquilaria malaccensis Lam**. RSC advances 9.32, 18383-18393. 2019.
- HIWATASHI Y. **Culture and storage of protonemata and gametophores**. moss.nibb.ac.jp. Accessed November 12, 2022. <https://moss.nibb.ac.jp/protocol.html>. 2014.
- HOHE, A., *et al.* **Tight control of growth and cell differentiation in photoautotrophically growing moss (Physcomitrella patens) bioreactor cultures**. Plant Cell Reports 20.12, 1135-1140. 2002.
- HOLT, Carson; YANDELL, Mark. **MAKER2: an annotation pipeline and genome-database management tool for second-generation genome projects**. BMC bioinformatics 12.1, 1-14. 2011.
- HOWLETT, Niall G.; SIMON, V. Avery. **Induction of lipid peroxidation during heavy metal stress in Saccharomyces cerevisiae and influence of plasma membrane fatty acid unsaturation**. Applied and environmental microbiology 63.8, 2971-2976. 1997

- HU, Xiaoqing; XUEMEI, Xu; CHENGHAO, Li. **Ectopic expression of the LoERF017 transcription factor from *Larix olgensis* Henry enhances salt and osmotic-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*.** Plant Biotechnology Reports 12.2, 93-104. 2018.
- ITOUGA, Misao *et al.* **Protonema of the moss *Funaria hygrometrica* can function as a lead (Pb) adsorbent.** PLoS One 12.12, e0189726. 2017.
- JAYASEKARAN, Kandakumar *et al.* **Novel calcium-binding GTPase (AtCBG) involved in ABA-mediated salt stress signaling in *Arabidopsis*.** Plant cell reports 25.11, 1255-1262. 2006.
- JOUYBAN, Zeinolabedin. **The effects of salt stress on plant growth.** Technical Journal of Engineering and Applied Sciences 2.1, 7-10. 2012.
- KOCH, K. E. **Carbohydrate-modulated gene expression in plants.** Annual review of plant biology 47.1, 509-540. 1996.
- KOLMOGOROV, Mikhail *et al.* **Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs.** Nature biotechnology 37.5, 540-546. 2019.
- KOREN, Sergey *et al.* **Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation.** Genome research 27.5, 722-736. 2017.
- KOUA, Faisal Hammad Mekky, KIMBARA, Kazuhide; TANI, Akio. **Bacterial-biota dynamics of eight bryophyte species from different ecosystems.** Saudi journal of biological sciences 22.2, 204-210. 2015.
- KUMAR, Sudhir *et al.* **TimeTree: a resource for timelines, timetrees, and divergence times.** Molecular biology and evolution 34.7, 1812-1819. 2017.
- LAROCHE, Céline *et al.* **The effect of osmotic pressure on the membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae* at different physiological temperatures.** Applied Microbiology and Biotechnology 56.1, 249-254. 2001.
- LEE, Tse-Min; LIU, Chia-Hsiung. **Correlation of decreased calcium contents with proline accumulation in the marine green macroalga *Ulva fasciata* exposed to elevated NaCl contents in seawater.** Journal of Experimental Botany 50.341, 1855-1862. 1999.
- LI, Heng. **Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences.** Bioinformatics 34.18, 3094-3100. 2018.
- LIANG, Shu-Feng; SUN, Yue; ZHU, Rui-Liang. **In vitro micropropagation of *Bryum argenteum* Hedw.** Cryptogamie Bryologie 31.3, 233-239. 2010.
- LISTER, Ryan, *et al.* **Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in *Arabidopsis*.** Cell 133.3, 523-536. 2008.
- LIU, Yang *et al.* **Resolution of the ordinal phylogeny of mosses using targeted exons from organellar and nuclear genomes.** Nature Communications 10.1, 1-11. 2019.
- LONGTON, R. E. **Inter-population variation in morphology and physiology in the cosmopolitan moss *Bryum argenteum* Hedw.** Journal of Bryology 11.3, 501-520. 1981.
- NETO, N. B. Machado; CECI, Castilho, Custódio; MASSANORI, Takaki. **Evaluation of naturally and artificially aged seeds of *Phaseolus vulgaris* L.** Seed Science and Technology 29.1, 137-150. 2001.
- NIP, Ka Ming *et al.* **RNA-Bloom enables reference-free and reference-guided sequence assembly for single-cell transcriptomes.** Genome research 30.8, 1191-1200. 2020.
- MAATHIUS, F.J.M.; AMTMANN, A. **K⁺ Nutrition and Na⁺ Toxicity: Basis of Cellular K⁺ /Na⁺ Ratios.** Annals of Botany, v.84, n.02, p.123-133, 1999.
- MARIONI, John C. *et al.* **RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays.** Genome research 18.9, 1509-1517. 2008.
- McGETTINGAN, Paul A. **Transcriptomics in the RNA-seq era.** Current opinion in chemical biology 17.1, 4-11. 2013.
- METZ, Geferson Fernando *et al.* **HMW DNA extraction protocol for ferns.** Protocols.io. doi://10.17504/protocols.io.bp2l69kb1lqe/v1.

- MOROZOVA, Olena; MARRA, A. Marra. **Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics**. *Genomics* 92.5, 255-264. 2008.
- MUNNS, Rana; TESTER, Mark. **Mechanisms of salinity tolerance**. *Annual review of plant biology* 59, 651. 2008.
- MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. **A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures**. *Physiologia plantarum* 15.3: 473-497. 1962.
- MUTHUKUMARASAMY, M.; GUPTA, S. Dutta; PANNEERSELVAM, R. **Enhancement of peroxidase, polyphenol oxidase and superoxide dismutase activities by triadimefon in NaCl stressed *Raphanus sativus* L.** *Biologia Plantarum* 43.2, 317-320. 2000.
- NAGALAKSHMI, Ugrappa, *et al.* **The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing**. *Science* 320.5881, 1344-1349. 2008.
- NAGALAKSHMI, Ugrappa; WAERN, Karl; SNYDER, Michael. **RNA-Seq: a method for comprehensive transcriptome analysis**. *Current protocols in molecular biology* 89.1, 4-11. 2010.
- NIP, Ka Ming *et al.* **RNA-Bloom enables reference-free and reference-guided sequence assembly for single-cell transcriptomes**. *Genome research* 30.8, 1191-1200. 2020.
- PAREEK, A.; SINGLA, S. L.; GROVER, A. **Salt responsive proteins/genes in crop plants**. 1997.
- PATRO, Rob, *et al.* **Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression**. *Nature methods* 14.4, 417-419. 2017.
- PEREIRA, Carla Gomes. **Propagação in vitro de musgos do Cerrado**. 2019.
- PISA, S. E. R. G. I. O. *et al.* **The cosmopolitan moss *Bryum argenteum* in Antarctica: recent colonisation or in situ survival?** *Polar Biology* 37.10, 1469-1477. 2014.
- POIRIER, Isabelle *et al.* ***Saccharomyces cerevisiae* viability is strongly dependant on rehydration kinetics and the temperature of dried cells**. *Journal of Applied Microbiology* 86.1, 87-92. 1999.
- POWELL, D. R. **Degust v3. 2.0**. Zenodo. 2015.
- PROCTOR, Michael C.F.; SMIRNOFF, Nicholas. **Rapid recovery of photosystems on rewetting desiccation-tolerant mosses: chlorophyll fluorescence and inhibitor experiments**. *Journal of Experimental Botany* 51.351, 1695-1704. 2000.
- PROGRAMA DE PESQUISAS CIENTÍFICAS NA ILHA DA TRINDADE**. Disponível em: <<https://www.marinha.mil.br/secirm/psrm/protrindade>>. 2017. Acesso em: 25 maio. 2022.
- PRUTHI, Rajat, *et al.* **Genetics of yield component traits under salt stress at flowering stage and selection of salt tolerant pre-breeding lines for rice improvement**. *Genetica* 150.5 273-288. 2022.
- RAUDVERE, Uku *et al.* **g: Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update)**. *Nucleic acids research* 47.W1, W191-W198. 2019.
- RESKI, Ralf; ABEL, Wolfgang O. **Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopenentenyladenine**. *Planta* 165.3, 354-358. 1985.
- RICHARDT, Sandra *et al.* **Microarray analysis of the moss *Physcomitrella patens* reveals evolutionarily conserved transcriptional regulation of salt stress and abscisic acid signalling**. *Plant molecular biology* 72.1, 27-45. 2010.
- RIUZ-MOLINA, Natalia; VILLALOBOS-LÓPEZ, Miguel Ángel; ARIAS-ZABALA, Mario. **Protonema suspension cultures of the medicinal moss *Polytrichum juniperinum***. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 52.4, 419-426. 2016.
- RODRÍGUEZ-VARGAS, Sonia *et al.* **Fluidization of membrane lipids enhances the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to freezing and salt stress**. *Applied and environmental microbiology* 73.1, 110-116. 2007.
- ROLLY, Nkulu Kabange *et al.* **Salinity stress-mediated suppression of expression of salt overly sensitive signaling pathway genes suggests negative regulation by AtbZIP62 transcription factor in *Arabidopsis thaliana***. *International journal of molecular sciences* 21.5, 1726. 2020.
- ROWNTREE, J. K. **Development of novel methods for the initiation of *in vitro* bryophyte cultures for conservation**. *Plant cell, tissue and organ culture* 87.2, 191-201. 2006.

- RSTUDIO TEAM. *RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL. <http://www.rstudio.com/>*. 2020.
- RYU, Hojin; CHO, Yong-Gu. **Plant hormones in salt stress tolerance**. *Journal of Plant Biology* 58.3, 147-155. 2015.
- SABOVLJEVIC, Aneta *et al.* **The effect of sugars on development of two moss species (*Bryum argenteum* and *Atrichum undulatum*) during *in vitro* culture**. *Belgian journal of botany* 79-84. 2005.
- SABOVLJEVIC, A. *et al.* **Atividade antimicrobiana de *Bryum argenteum***. *Fitoterapia*, 77(2), 144-145. 2006.
- SABOVLJEVIC, Aneta *et al.* **Axenicly culturing the bryophytes: establishment and propagation of the pleurocarpous moss *Thamnobryum alopecurum* Nieuwland ex Gangulee (Bryophyta, Neckerales) *in vitro* conditions**. *Pakistan Journal of Botany* 44.1, 339-344. 2012.
- SAHA, Jayita *et al.* **Molecular phylogenetic study and expression analysis of ATP-binding cassette transporter gene family in *Oryza sativa* in response to salt stress**. *Computational biology and chemistry* 54, 18-32. 2015.
- SCHARF, Klaus-Dieter *et al.* **The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: structure, function and evolution**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* 1819.2, 104-119. 2012.
- SHABALA, Sergey. **Learning from halophytes: physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops**. *Annals of botany* 112.7, 1209-1221. 2013.
- SHAVRUKOV, Yuri. **Salt stress or salt shock: which genes are we studying?**. *Journal of Experimental Botany* 64.1, 119-127. 2013.
- SHAW, B.; GOFFINET W. R.; BUCK, A. J. **Morphology, anatomy, and classification of the Bryophytes**. *Bryophyte Biology*, 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, p. 55-138. 2009.
- SHINOZAKI, Kazuo; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, Kazuko. **Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways**. *Current opinion in plant biology* 3.3, 217-223. 2000.
- SILVA, Adáises Simone Maciel da; PÔRTO, Kátia Cavalcanti; SIMABUKURO, Eliana Akie. **Effects of light and nutrients on different germination phases of the Cosmopolitan moss *Bryum argenteum* Hedw. (Bryaceae)**. *Brazilian Archives of biology and technology* 53, 763-769. 2010.
- SIMÃO, Felipe A. *et al.* **BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs**. *Bioinformatics* 31.19, 3210-3212. 2015.
- SMEEKENS, Sjef; ROOK, Fred. **Sugar sensing and sugar-mediated signal transduction in plants**. *Plant Physiology* 115.1, 7. 1997.
- SOBHANIAN, Hamid *et al.* **Proteome analysis of soybean leaves, hypocotyls and roots under salt stress**. *Proteome science* 8.1, 1-15. 2010.
- STEELS, E. L.; LEARMONTH, R. P.; WATSON, K. **Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically**. *Microbiology* 140.3, 569-576. 1994.
- SUPEK, Fran, *et al.* **REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms**. *PloS one* 6.7, e21800. 2011.
- SUZUKI, Nobuhiro *et al.* **ABA is required for plant acclimation to a combination of salt and heat stress**. *PLoS One*, v. 11, n. 1, p. e0147625. 2016.
- TABATABAIE, Seyed Jalal; NAZARI, Javad. **Influence of nutrient concentrations and NaCl salinity on the growth, photosynthesis, and essential oil content of peppermint and lemon verbena**. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 31.4, 245-253. 2007.
- TEHEI, Moeava; ZACCAI, Giuseppe. **Adaptation to extreme environments: macromolecular dynamics in complex systems**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1724.3, 404-410. 2005.
- TEMSCH, Eva M.; GREILHUBER, Johann; KRISAI, Robert. **Genome size in *Sphagnum* (peat moss)**. *Botanica Acta* 111.4 325-330. 1998.
- TESTER, Mark; DAVENPORT, Romola. **Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants**. *Annals of botany* 91.5, 503-527. 2003.

- THELANDER, Mattias; OLSSON, Tina; RONNE, Hans. **Effect of the energy supply on filamentous growth and development in *Physcomitrella patens***. *Journal of experimental botany* 56.412, 653-662. 2005.
- THIMANN, K. V. **The auxins**. *The Physiology of Plant Growth and Development*. 2-45.1969.
- TUBA, Zoltán; SLACK, Nancy G.; STARK, Lloyd R. Stark eds. **Bryophyte ecology and climate change**. Cambridge University Press, 2011.
- VAN VERK, Marcel C. *et al.* **RNA-Seq: revelation of the messengers**. *Trends in plant science* 18.4, 175-179. 2013.
- VAN ZANTER, B. O. **Experimental studies on trans-oceanic long-range dispersal of moss spores in the Southern Hemisphere**. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory*. 1978.
- VANDERPOORTEN, Alain; GOFFINET, Bernard. **Introduction to bryophytes**. Cambridge University Press. 2009.
- VASER, Robert *et al.* **Fast and accurate de novo genome assembly from long uncorrected reads**. *Genome research* 27.5, 737-746. 2017.
- VICTORIA, Filipe de Carvalho *et al.* **Phylogenetic relationships and selective pressure on gene families related to iron homeostasis in land plants**. *Genome* 55.12, 883-900. 2012.
- VIEGAS, Cristina A. *et al.* **Yeast adaptation to 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid involves increased membrane fatty acid saturation degree and decreased OLE1 transcription**. *Biochemical and biophysical research communications* 330.1, 271-278. 2005.
- VOGLMAYR, Hermann. **Nuclear DNA amounts in mosses (Musci)**. *Annals of Botany* 85.4, 531-546. 2000.
- VOLKOV, Vadim. **Salinity tolerance in plants. Quantitative approach to ion transport starting from halophytes and stepping to genetic and protein engineering for manipulating ion fluxes**. *Frontiers in Plant Science* 6, 873. 2015.
- VUJUCIC, Milorad; SABOVLJEVIC, Aneta; SABOVLJEVIC, Marko. **Axenically culturing the bryophytes: Establishment and propagation of the moss *Hypnum cupressiforme* Hedw. (Bryophyta, Hypnaceae) in vitro conditions**. *Botanica Serbica* 35.1, 71-77. 2011.
- VUKOJEVIC, Vanja; SABOVLJEVIC, Aneta; SABOVLJEVIC, Marko S. **Effect of ferri (III) citrate and potassium hexacyanoferrate (III) on growth of the moss *Bryum argenteum* Hedw. (Bryaceae) in vitro**. *Archives of Biological Sciences* 56.3-4, 75-78. 2004.
- WAHRMUND, Ute, QUANDT, Dietmar; KNOOP, Volker. **The phylogeny of mosses—Addressing open issues with a new mitochondrial locus: Group I intron *cob1420***. *Molecular phylogenetics and evolution* 54.2, 417-426. 2010.
- WANG, Xiaojin; LIU, Zheng; HE, Yikun. **Responses and tolerance to salt stress in bryophytes**. *Plant signaling & behavior* 3.8, 516-518. 2008.
- WICK, Ryan R. *et al.* **Performance of neural network basecalling tools for Oxford Nanopore sequencing**. *Genome biology* 20.1, 1-10. 2019.
- XU, Wei; FU, Zhang. **Fast-lio: A fast, robust lidar-inertial odometry package by tightly-coupled iterated kalman filter**. *IEEE Robotics and Automation Letters* 6.2, 3317-3324. 2021.
- YANG, Ziheng. **PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood**. *Molecular biology and evolution* 24.8, 1586-1591. 2007.
- YOUNG, Matthew D. *et al.* **Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias**. *Genome biology* 11.2, 1-12. 2010.
- YU, Jin *et al.* **Chromosome-level genome assemblies of two Hypnales (mosses) reveal high intergeneric synteny**. *Genome biology and evolution* 14.2, evac020. 2022.
- ZDOBNOV, Evgeni M.; APWEILER, Rolf. **InterProScan—an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro**. *Bioinformatics* 17.9, 847-848. 2001.
- ZHANG, Wei *et al.* **Transcriptome sequencing of Antarctic moss under salt stress emphasizes the important roles of the ROS-scavenging system**. *Gene* 696, 122-134. 2019.
- ZHU, Jian-Kang. **Regulation of ion homeostasis under salt stress**. *Current opinion in plant biology* 6.5, 441-445. 2003.

