

*Análisis transcriptómico del musgo *Physcomitrella patens* bajo estrés osmótico*

*Transcriptomic analysis of the moss *Physcomitrella patens* under osmotic stress*

Zuleika Orbe Sosa*,
Instituto Politécnico Nacional, UPIITA, México
zulzu_190@hotmail.com

Miguel Ángel Villalobos López,
Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Tlaxcala, México
ciba.mangel.ipn@gmail.com

Analilia Arroyo Becerra,
Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Tlaxcala, México
alarroyo@ipn.mx

Recibido 31, julio, 2019

Aceptado 30, noviembre, 2019

Resumen

El estrés abiótico más severo que afecta el desarrollo y productividad de las plantas es el osmótico, el cual puede desencadenarse por estrés hídrico, térmico y/o salino; o por sustancias como los azúcares. Para estudiar los efectos del estrés osmótico en el metabolismo, se utilizó al musgo *Physcomitrella patens* (*P. patens*), el cual presenta diferentes características, siendo una de las más importantes la información contenida en su material genético que lo posicionan como un organismo altamente tolerante a estrés abiótico. *P. patens* también ha sido establecido como un modelo en genómica comparativa mediante el análisis funcional, por genética inversa, de genes homólogos con aquellos previamente identificados en plantas vasculares. A través de la utilización de la tecnología RNA-seq (plataforma Illumina), se analizó el transcriptoma de protonemas de diez días de edad de *P. patens* sometidos a estrés osmótico por glucosa (300 mM) y sorbitol (300 mM) durante 3 hrs. Se identificaron distintas rutas metabólicas reportadas como importantes para la tolerancia a estrés. En el presente proyecto se encontraron más de 100 genes que codifican para enzimas, y se ha explorado la relación que existe entre estos genes y las vías metabólicas en las que participan mediante el uso de distintas bases de datos. La información obtenida, ayuda a entender de una mejor manera los efectos del estrés osmótico en la fisiología del organismo, además de enriquecer los datos existentes sobre el perfil de expresión génica en el musgo *P. patens*.

Palabras clave: transcriptoma, estrés osmótico, *Physcomitrella patens*.

Abstract

*The most severe abiotic stress that affects the development and productivity of plants is the osmotic, which can be triggered by hydric, thermal and/or saline stress; or by substances such as sugars. To study the effects of osmotic stress on metabolism, moss *Physcomitrella patens* (*P. patens*) was used, which has different characteristics, being one of the most important the information contained in its genetic material that position it as a highly tolerant organism to abiotic stress. *P. patens* has also been established as a model in comparative genomics through functional analysis, by inverse genetics, of homologous genes with those previously identified in vascular plants. Through the use of RNA-seq technology (Illumina platform), the transcriptome of ten-day-old protonemas of *P. patens* subjected to osmotic stress by glucose (300 mM) and sorbitol (300 mM) for 3 hrs was analyzed. Different metabolic pathways reported as important for stress*

tolerance were identified. In this project we found more than 100 genes that code for enzymes, and we have explored the relationship between these genes and the metabolic pathways in which they participate through the use of different databases. The information obtained helps to better understand the effects of osmotic stress on the physiology of the organism, in addition to enriching the existing data on the profile of gene expression in moss P. patens.

Keywords: transcriptome, osmotic stress, Physcomitrella patens

1. INTRODUCCIÓN

En su ambiente natural, las plantas están expuestas a distintos estímulos que pueden favorecer o perjudicar su desarrollo (Friedel *et al.*, 2012). Las plantas deben ser capaces de responder a los estímulos ambientales de manera rápida y eficiente. Para esto, a lo largo de su historia evolutiva, han desarrollado estrategias moleculares, celulares y fisiológicas que les permiten interactuar con el ambiente que las rodea y poder adaptarse (Brosche *et al.*, 2015).

Dependiendo de la cantidad y calidad del estímulo al que las plantas son sometidas, estos pueden llegar a considerarse como estímulos estresantes, definiendo al estrés como, la respuesta de un sistema biológico a factores ambientales extremos que, de acuerdo a su intensidad y duración, pueden causar cambios significativos en un sistema (Friedel *et al.*, 2012). Diferentes tipos de estrés abiótico están relacionados entre sí y uno puede desencadenar en otro. Tal es el caso del estrés osmótico (Friedel *et al.*, 2012).

Naturalmente, la fisiología de las plantas permite ajustes osmóticos. El equilibrio osmótico es un mecanismo adaptativo para tolerar la sequía y/o la salinidad, permitiéndole a las plantas mantener la turgencia bajo condiciones estresantes (Singh *et al.*, 2015). Debido a que el estrés osmótico puede producirse por la escasez de agua, la salinidad de los suelos y/o por las bajas temperaturas, representa un tipo de estrés muy severo, por lo que se le considera la principal limitante del crecimiento y productividad de las plantas.

Diferentes estudios han demostrado que las regulaciones osmóticas en las plantas, durante el estrés por salinidad o deshidratación, ocurren por la acumulación de componentes osmóticamente activos u osmoprotectores que las ayudan a sobrevivir en ambientes osmóticos extremos (Filippou *et al.*, 2014). Estos osmoprotectores son pequeñas moléculas cuyas características principales son: tener un bajo peso molecular, ser eléctricamente neutras, altamente solubles y no ser tóxicas a concentraciones molares (Ahn *et al.*, 2011). Además, pueden estabilizar proteínas y la membrana celular para reducir su potencial osmótico y prevenir la deshidratación dentro de la célula (Hussain *et al.*, 2013); esto produce reacciones bioquímicas que activan distintas vías metabólicas relacionadas entre sí y que alteran procesos fisiológicos, reprogramando el desarrollo del organismo (Bohnert y Sheveleva, 1998).

El musgo *Physcomitrella patens* (*P. patens*), perteneciente al phylum briofita, es una planta no vascular que ha demostrado tener alta tolerancia a diferentes condiciones de estrés abiótico, ha sido utilizado como un excelente modelo de estudio para analizar los procesos de desarrollo y función génica ya que combina numerosas ventajas como su morfología relativamente sencilla, las altas tasas de recombinación homóloga, la alta eficiencia para realizar “gene targeting” y la dominancia de su fase haploide, además de su posición filogenética para realizar estudios tanto moleculares como evolutivos (Cove, 2005; Frank *et al.*, 2005; Hohe *et al.*, 2002; Perroud *et al.*, 2017), estas características permiten realizar distintos estudios genómicos para entender de mejor manera las estrategias de sobrevivencia que han desarrollado las plantas como respuesta a los estímulos ambientales. Además, desde la secuenciación de su genoma, *P. patens* ha sido establecido como un modelo para genómica comparativa mediante el análisis funcional, por genética inversa, de genes homólogos con aquellos previamente identificados en plantas con flor (principalmente *Arabidopsis thaliana*) (Stevenson *et al.*, 2016).

En los últimos años se han empezado a utilizar herramientas desarrolladas por expertos en programación computacional que ayudan a complementar la información obtenida de manera experimental y enriquecer los análisis (Mochida y Shinozaki, 2011). De tal forma que, gracias al avance de las herramientas bioinformáticas y el desarrollo de las estrategias experimentales, se han empezado a conocer las relaciones entre los genes, los cuales forman redes de interacciones complejas que están influenciadas tanto por los estímulos internos inherentes al metabolismo celular como a la variedad de factores externos que modifican sus expresiones (Ábrahám *et al.*, 2008). Avances recientes en las tecnologías de secuenciación de siguiente generación de alto rendimiento y en las herramientas bioinformáticas han sido utilizadas de manera exitosa para revelar el transcriptoma y la identidad de las vías metabólicas en muchas especies de plantas (Dautt-Castro *et al.*, 2015).

Estos avances tecnológicos han acelerado el desarrollo de las bases de datos genómicas para los modelos de especies vegetales ya establecidos y emergentes, integrando el conocimiento entre especies (Mochida y Shinozaki, 2011). Esto también permite realizar acercamientos por medio de la genética inversa, donde, a partir de la identificación de la función de un gen y el análisis de su secuencia, a través de bases de datos, es posible corroborar su función utilizando técnicas de biología molecular (Smith, 2012).

Muchos estudios transcriptómicos se han realizado en *P. patens* ante distintas condiciones de estrés con el principal objetivo de identificar a los genes responsables de su tolerancia, sin embargo, pocos han extrapolado dicha información génica hasta la regulación metabólica, la cual es muy importante para entender las vías de señalización reguladas por un estrés tan severo como el osmótico.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y condiciones de estrés.

Tejido protonemal de *P. patens* (Gransden) se creció en condiciones *in vitro*, en medio de cultivo sólido PpNH₄, sobre capas de celofán estériles; las plantas fueron propagadas periódicamente una vez por semana. En el cuarto de cultivo se mantuvieron condiciones estándar de temperatura (23°C) y humedad (21%) con un fotoperiodo de 16 hrs luz y 8 hrs oscuridad. El tejido protonemal se dejó crecer hasta que alcanzó 10 días de edad, mediante la técnica de traspaso (Bezanilla *et al.*, 2003) se sometió a estrés osmótico con 300 mM de Glucosa (Glc) y, como un control isosmótico, 300 mM de Sorbitol (Stl) durante 3 hrs. Posteriormente, se colectó el tejido y se trituró con nitrógeno líquido para hacer la extracción del ARN total mediante el método de Trizol Reagent, de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Invitrogen, No. Catálogo: 15596-026/018, USA). El experimento se realizó por triplicado.

Purificación del ARNm y secuenciación

A partir del ARN total de alta calidad se aisló el ARNm utilizando el kit de OligoTex (Quiagen, No. Catálogo: 70022, USA). Dicho protocolo se basa en el principio de complementariedad de bases, ya que la suspensión OligoTex utilizada está compuesta de partículas de poliestireno-látex que tienen unidos covalentemente oligonucleótidos dT (compuestos de timinas) los cuales se reconocen con las colas poliadeniladas del extremo 3' del ARNm, haciendo posible su purificación (Handbook Oligotex, 2002). Una vez purificado el ARNm, se mandó a secuenciar de manera pareada a la unidad de secuenciación masiva de ADN del IBt-UNAM utilizando el Sistema Genome Analyzer GAIIx de la compañía Illumina.

Análisis transcriptómica y anotación funcional

Todo el análisis *in silico* se hizo manipulando archivos en texto plano utilizando líneas de comandos y lenguaje de programación Perl, lo cual hace más sencilla su manipulación y organización. Primero se realizó un análisis de calidad y se eliminaron los adaptadores utilizados durante la secuenciación, obteniendo lecturas limpias con un valor de calidad igual o mayor a 20phred. La herramienta utilizada para llevar a cabo el análisis de calidad fue el programa NGS-QC Toolkit versión 2.3.3 (Patel y Jain, 2012). El análisis bioinformático del transcriptoma, que

comprende la alineación de las lecturas, su ensamblado y su evaluación estadística, se realizó con el genoma de referencia de *P. patens* versión 3.3 (obtenido de Phytozome) utilizando el programa TopHat siguiendo el protocolo de Trapnell y colaboradores (2012) (Trapnell *et al.*, 2012). Este protocolo nos permite obtener un listado de genes diferencialmente expresados, al cual se le asignaron las anotaciones funcionales utilizando las bases de datos como UniProt, Phytozome y String, principalmente. Una vez verificadas las anotaciones, se seleccionaron únicamente los genes que codifican para enzimas, se llevó a cabo la anotación de su número enzimático para conocer la reacción bioquímica que llevan a cabo, utilizando la base de datos KEGG fue posible generar los mapas metabólicos. La identificación de los números enzimáticos permitió asociarlas a las rutas metabólicas en las cuales participan. De esta forma, se identificaron las rutas metabólicas que se activan o reprimen ante una condición de estrés.

3. RESULTADOS

Procesamiento de lecturas e identificación de genes diferencialmente expresados

Una vez realizado el análisis de calidad se obtuvieron lecturas libres de adaptadores, con una calidad mayor al 90%, y un contenido de GC del 50% (Figura 1).



Figura 1. Gráfica de pastel en la que se representa la calidad de las secuencias obtenidas.

A través de los paquetes bioinformáticos que componen al programa TopHat se pudo realizar la alineación de las lecturas, su ensamblado y su evaluación estadística para conocer los niveles de expresión de los genes. El programa de TopHat está integrado por diferentes paquetes bioinformáticos, los cuales, a su vez, se componen de softwares que permiten que cada uno de los análisis se lleve a cabo correctamente.

Bajo la condición de estrés por sorbitol, se encontraron 31,474 genes expresados de manera diferencial con respecto al control, de los cuales 20,740 tuvieron una regulación hacia arriba y 10,734 una regulación hacia abajo (Figura 2). De aquellos genes con una regulación hacia arriba, se consideraron los genes cuya expresión con respecto al control fuera igual o mayor a dos ($\log_2 \geq 1$) y estadísticamente significativos ($p\text{-val} < 0.05$), obteniendo un total de 420. De igual forma para los genes con una regulación hacia abajo se consideró el mismo nivel de expresión con respecto al control y estadísticamente significativos, obteniendo un total de 281 genes.

Mientras que con el tratamiento de glucosa se obtuvieron 32,054 genes diferencialmente expresados; realizando el mismo proceso de selección antes mencionado, se obtuvieron 20,490 genes con una regulación hacia arriba y 11,564 genes con una regulación hacia abajo. De aquellos genes con una regulación hacia arriba, 497 genes presentan el nivel de expresión $\log_2 \geq 1$ y $p\text{val} < 0.05$. Para el caso de los genes con una regulación hacia abajo, 134 genes cumplieron con dicho nivel de expresión.

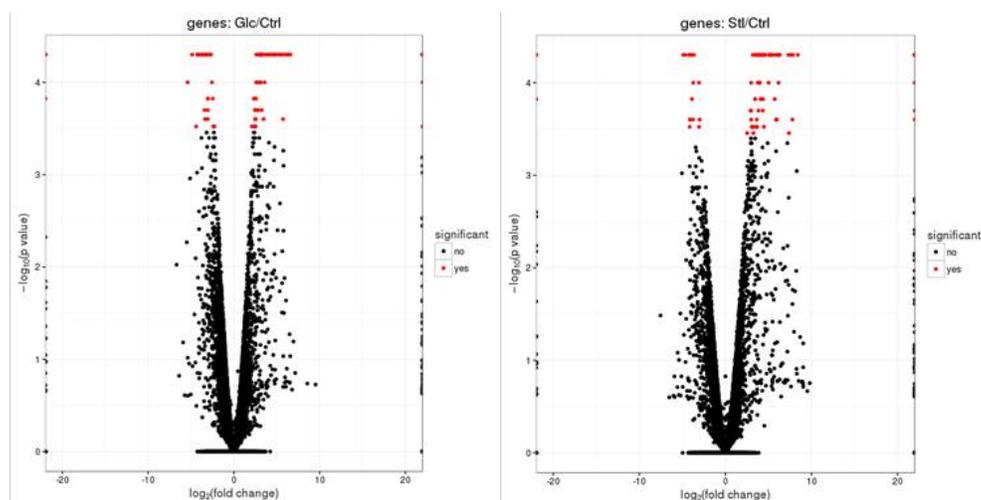


Figura 2. Gráfica de volcano, para cada condición, que representa la cantidad de genes expresados de manera positiva vs los genes reprimidos.

Anotación funcional y clasificación

Una vez obtenidos los identificadores de los genes (ID), se buscó su anotación funcional utilizando tres diferentes bases de datos (KEGG (Kanehisa *et al.*, 2016 y 2017), UniProt (Bateman *et al.*, 2015), Phytozome (Zhang *et al.*, 2016)) para disminuir la probabilidad de tener anotaciones falsas (Paul *et al.*, 2015).

Para la condición de glucosa, de los 497 genes con un nivel de expresión dos veces mayor al control, se obtuvieron 136 genes que no presentaban anotación funcional alguna y aparecen como proteínas hipotéticas o como proteínas/dominios/secuencias cortas con función desconocida y 361 genes si presentan una anotación funcional bien establecida.

Mientras que de los 134 genes regulados hacia abajo dos veces menos con respecto al control, 56 genes son proteínas hipotéticas o proteínas/dominios/secuencias cortas con función desconocida y 78 genes si tienen anotación funcional (Tabla 1).

Para la condición de sorbitol, de los 420 genes con un nivel de expresión dos veces mayor al control, se obtuvieron 139 genes que no presentaban anotación funcional alguna y aparecen como proteínas hipotéticas o como proteínas/dominios/secuencias cortas con función desconocida y 281 genes si presentan una anotación funcional bien establecida.

Mientras que de los 281 genes regulados hacia abajo dos veces menos con respecto al control, 45 genes son proteínas hipotéticas o proteínas/dominios/secuencias cortas con función desconocida y 236 genes si tienen anotación funcional (Tabla 1).

Para aquellos genes de *P. patens* que no presentaron una función, se les buscó su homólogo en *A. thaliana* y se corroboró su función en las bases de datos antes mencionadas.

Tabla 1 Número de genes anotados en las bases de datos.

	Glucosa		Sorbitol	
	Up-regulated	Down-regulated	Up-regulated	Down-regulated
Sin anotación	136	56	139	45
Anotados	361	78	281	236
Total	497	134	420	281

Anotación GO

Para dilucidar las funciones en las que estos genes participan, se utilizaron las bases de datos de PANTHER Classification System y WEGO para clasificarlos de manera general en los procesos biológicos en los que están involucrados (Figura 3).

De tal forma que al comparar el total de genes obtenidos con un nivel de expresión mayor a dos para cada tratamiento (497 genes de glucosa y 420 genes de sorbitol) el proceso biológico más representativo fue el de proceso metabólico, en cuanto a la función molecular los más representativos fueron los relacionados con la actividad catalítica y de unión.

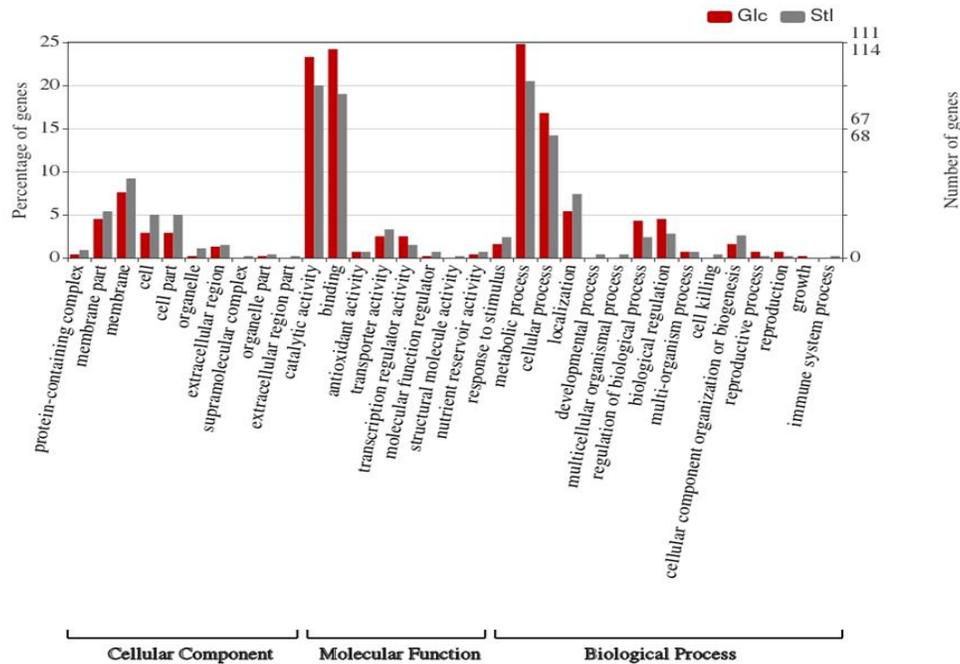


Figura 1. Análisis de GO realizado en WEGO, para los genes expresados de manera positiva.

Asignación de rutas metabólicas

Una vez anotada la función de la mayoría de los genes, se procedió a delimitar el análisis hacia los genes que únicamente codifican para enzimas.

De los genes con una regulación hacia arriba, se encontraron 121 genes que codifican únicamente para enzimas para el tratamiento con sorbitol y 129 genes para el tratamiento con glucosa, de las cuales 66 se expresan en ambas condiciones. Los cuales en términos de porcentaje representan poco más del 20% de los genes expresados dos veces más con respecto al control para las dos condiciones, lo cual desde un punto de vista biológico resulta de mayor importancia. Pues se ha visto que durante condiciones de estrés osmótico la actividad enzimática aumenta para poder contrarrestar los efectos negativos del estímulo, enfocando gran parte de esta a proteger la integridad celular a través del reajuste metabólico (Fujii y Zhu, 2012).

Por otro lado, de los genes regulados hacia abajo, se obtuvieron 33 genes que codifican para enzimas bajo el tratamiento con glucosa y 137 genes que codifican para enzimas bajo el tratamiento con sorbitol.

Utilizando la base de datos de KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) fue posible identificar la mayoría de las enzimas en al menos una vía metabólica, para de esta manera generar cada uno de los mapas metabólicos, en los cuales se puede observar la reacción que catalizan. KEGG es una base de datos que integra información química, genómica y sistémica de diversos organismos; a través de la disponibilidad de catálogos de genomas completamente secuenciados y asociados a funciones sistémicas de alto nivel de la célula, organismos y/o ecosistemas (Kanehisa *et al.*, 2016 y 2017).

Las enzimas identificadas en el tratamiento con sorbitol participan en 55 rutas metabólicas, mientras que las encontradas en glucosa están involucradas en 62 rutas metabólicas.

De los genes con expresión negativa, se identificaron 24 rutas metabólicas para glucosa y 44 rutas metabólicas para sorbitol.

Rutas metabólicas involucradas en el metabolismo de carbohidratos

El metabolismo de los carbohidratos abarca distintas rutas metabólicas, de las identificadas en este proyecto se pueden mencionar el glicólisis, el ciclo del citrato, el metabolismo de la fructosa y galactosa, entre otras. Dentro de estas, aquella ruta metabólica que más genes se encontraron asociados fue la correspondiente con el metabolismo de la sacarosa y el almidón.

En el transcriptoma analizado, se encontraron diferentes genes que codifican para enzimas distintas que regulan distintos pasos enzimáticos (Tabla 2). Cabe resaltar aquí que ninguna de estas enzimas ha sido reportada o analizada de manera experimental para el caso específico de nuestro modelo de estudio. Por lo que, por medio de la literatura encontrada y lo almacenado en diferentes bases de datos, podemos corroborar la función de dichas enzimas y la importancia que tienen no sólo para el metabolismo per se, sino también en la tolerancia al estrés abiótico.

Tabla 2. Genes encontrados en el transcriptoma que participan en el metabolismo de la sacarosa y almidón.

Gen	Actividad	"Fold change" por tratamiento	
		Stl	Glc
Pp3c9_25200	Sacarosa fosfato sintasa	2.06241	1.30098
Pp3c12_20050	Trehalosa fosfatasa	1.44679	2.51155
Pp3c19_8410	Glucosa 1 fosfato adenililtransferasa	2.85329	2.22435
Pp3c5_19770	Sacarosa sintasa	2.99862	2.09912
Pp3c25_1530	Fosfofructoquinasa	2.24542	1.51723
Pp3c19_20120	Hexoquinasa	2.15471	1.10676
Pp3c9_14900	Almidón sintasa	2.23717	1.58637
Pp3c13_20160	Alfa amilasa	2.74786	1.07217
Pp3c22_9700	Beta amilasa	2.6533	2.36552
Pp3c12_3220	SS1	0.259731	0.449834
Pp3c22_6120	SS2	0.295463	-0.0242712
Pp3c1_8710	SS4	1.35595	0
Pp3c16_13360	Enzima ramificadora del almidón	0.167306	-0.089842
Pp3c14_11860	Isoamilasa	0.0665142	0.253147
Pp3c6_14860	Almidón fosforilasa	-0.0789153	0.362347
Pp3c3_11200	GWD	0.106223	0.516607
Pp3c18_14870	PWD	0.640171	-0.0590353
Pp3c16_260	SEX4 like	-0.115077	0.238025
Pp3c8_6000	DPE1	-1.09729	-0.372976
Pp3c20_17800	DPE1	-0.0083911	-0.215209
Pp3c15_25660	DPE2	-0.52119	-0.306412
Pp3c6_18710	Transportador de maltosa	-0.340866	-0.201696
Pp3c25_14870	Transportador de glucosa	0.335703	-0.154711

Este agrupamiento está directamente relacionado con las enzimas encontradas para el metabolismo de la sacarosa y el almidón por medio de intermediarios tan importantes como lo son la enzima fosfofructoquinasa y

la enzima hexoquinasa, esta última es importante para fosforilar la glucosa transportada desde el cloroplasto (Zeeman *et al.*, 2010), y ambas son importantes para regular la glicólisis (Dashty, 2013).

4. DISCUSIÓN

Al comparar nuestros resultados con otros transcriptomas se encontró que Beike y colaboradores (2015) sólo reporta una de las nueve enzimas encontradas en este trabajo; mientras que en el trabajo reportado por Kraiwesh, y colaboradores (2015), se encontraron reportadas todas las enzimas en todas las condiciones de estrés abiótico al que se sometieron, las cuales están en el material suplementario provisto por los autores.

Si bien ambos trabajos sometieron a estrés por frío, tuvieron ciertas variaciones entre sus tratamientos, como: diferencias en la temperatura en 0.5°C (3.5°C y 4°C, respectivamente), la diferencia en el tiempo de medición para las respuestas tempranas en 30min (1hr y 1.5hrs, respectivamente) y el tiempo de medición para las respuestas tardías en 1hr (3hrs y 4 hrs, respectivamente) y el material biológico utilizado (gametóforos y protonemas, respectivamente). La razón por la que reportan una cantidad de genes tan diferente, es porque Beike los analiza por medio de microarreglos, mientras que Khraiwesh utiliza las nuevas técnicas de RNAseq además de analizar información en bases de datos.

Esta búsqueda de datos específica para los genes que participan en la ruta del metabolismo de la sacarosa y el almidón demuestra que, a pesar de la importancia biológica de dichas enzimas, falta mucho por conocer respecto a cómo esta modulada su expresión génica, así como también la regulación postraducciona que pueden sufrir durante situaciones de estrés.

La identificación de vías metabólicas reguladas por estrés osmótico arroja información importante sobre el comportamiento del organismo ante una condición y ayuda a comprender mejor la fisiología del mismo. Sin embargo, pueden existir dos problemas que crean retos para la reconstrucción automatizada de vías metabólicas: el gran número de errores en la anotación de los genes en las bases de datos públicas y la variación de las vías metabólicas (Castro *et al.*, 2015). Ya que, para poder generar los análisis en las bases de datos, fue necesario buscar los ID correspondientes en un organismo homólogo para que fueran reconocidos.

5. CONCLUSIONES

En el presente estudio, se identificaron distintos genes cuya regulación ante condiciones de estrés es muy importante, con ayuda de las bases de datos es posible identificar la función y la ruta metabólica en la que dichos genes están involucrados.

La identificación de vías metabólicas reguladas por estrés osmótico arroja información importante sobre el comportamiento del organismo ante dicha condición y ayuda a comprender mejor la fisiología del mismo. Sin embargo, aún pueden existir problemas que dificulten la reconstrucción automatizada de las vías metabólicas, principalmente por la falta de actualización en la anotación de los genes en las bases de datos públicas, así como también por la falta de inclusión de distintos organismos modelo como es el caso de *P. patens*.

A un así, la información obtenida de las bases de datos, como lo es la función y secuencia de los genes de un organismo en particular, puede ser corroborada de manera experimental por medio de las diferentes técnicas de biología molecular.

6. REFERENCIAS

Ahn, C., *et al.* (2011). Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 415(4), 669–674.

Bateman, A., *et al.* (2015). UniProt: A hub for protein information. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D204–D212.

- Beike, A. K., *et al.* (2015). Insights from the cold transcriptome of *Physcomitrella patens*: Global specialization pattern of conserved transcriptional regulators and identification of orphan genes involved in cold acclimation. *New Phytologist*, 205(2), 869–881.
- Bezanilla, M., *et al.* (2003). RNA Interference in the Moss *Physcomitrella patens*. *Plant Physiol*, 133(October), 470–474.
- Blée, E., *et al.* (2014). The Reductase Activity of the Arabidopsis Caleosin RESPONSIVE TO DESSICATION20 Mediates Gibberellin-Dependent Flowering Time, Abscisic Acid Sensitivity, and Tolerance to Oxidative Stress. *Plant Physiology*, 166(1), 109–124.
- Bohnert, H. J., y Sheveleva, E. (1998). Plant stress adaptations-making metabolism move. *Current opinion in plant biology*, 1(3), 267–274.
- Castro, J. C., *et al.* (2015). De novo assembly and functional annotation of *Myrciaria dubia* fruit transcriptome reveals multiple metabolic pathways for L-ascorbic acid biosynthesis. *BMC Genomics*, 16(1), 997.
- Cove, D. (2005). The Moss *Physcomitrella patens*. *Annual Review of Genetics*, 39(1), 339–358.
- Dashty, M. (2013). A quick look at biochemistry: Carbohydrate metabolism. *Clinical Biochemistry*, 46(15), 1339–1352.
- Dautt-Castro, M., *et al.* (2015). Mango (*Mangifera indica* L.) cv. Kent fruit mesocarp de novo transcriptome assembly identifies gene families important for ripening. *Frontiers in Plant Science*, 6(February), 1–12.
- Filippou, P., *et al.* (2014). Proline and reactive oxygen/nitrogen species metabolism is involved in the tolerant response of the invasive plant species *Ailanthus altissima* to drought and salinity. *Environmental and Experimental Botany*, 97, 1–10.
- Frank, W., *et al.* (2005). *Physcomitrella patens* is highly tolerant against drought, salt and osmotic stress. *Planta*, 220(3), 384–394.
- Friedel, S., *et al.* (2012). Reverse Engineering: A Key Component of Systems Biology to Unravel Global Abiotic Stress Cross Talk. *Frontiers in Plant Science*, 3(December), 1–16.
- Fujii, H., y Zhu, J.-K. (2012). Osmotic stress signaling via protein kinases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 69(19), 3165–3173.
- Hanano, A., *et al.* (2015). Involvement of the caleosin/peroxygenase RD20 in the control of cell death during Arabidopsis responses to pathogens. *Plant Signaling and Behavior*, 10(4), 1–4.
- Hohe, A., *et al.* (2002). Tight control of growth and cell differentiation in photoautotrophically growing moss (*Physcomitrella patens*) bioreactor cultures. *Plant Cell Reports*, 20(12), 1135–1140.
- Hussain Wani, S., *et al.* (2013). Compatible Solute Engineering in Plants for Abiotic Stress Tolerance - Role of Glycine Betaine. *Current Genomics*, 14(3), 157–165.
- Kanehisa, M., *et al.* (2016). KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D457–D462.
- Kanehisa, M., *et al.* (2017). KEGG: New perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D353–D361.
- Khraiwesh, B., *et al.* (2015). Genome-wide expression analysis offers new insights into the origin and evolution of *Physcomitrella patens* stress response. *Scientific Reports*, 5(1), 17434.

- Lequeu, J., *et al.* (2003). Formation of plant cuticle: Evidence for the occurrence of the peroxygenase pathway. *Plant Journal*, 36(2), 155–164.
- Minami, A., *et al.* (2005). Cold acclimation in bryophytes: Low-temperature-induced freezing tolerance in *Physcomitrella patens* is associated with increases in expression levels of stress-related genes but not with increase in level of endogenous abscisic acid. *Planta*, 220(3), 414–423.
- Mochida, K., y Shinozaki, K. (2011). Advances in omics and bioinformatics tools for systems analyses of plant functions. *Plant and Cell Physiology*, 52(12), 2017–2038.
- Mulako, I., *et al.* (2008). Expression of Xhdsi-1VOC, a novel member of the vicinal oxygen chelate (VOC) metalloenzyme superfamily, is up-regulated in leaves and roots during desiccation in the resurrection plant *Xerophyta humilis* (Bak) Dur and Schinz. *Journal of Experimental Botany*, 59(14), 3885–3901.
- Papdi, C. *et al.* (2008). Functional identification of *Arabidopsis* stress regulatory genes using the controlled cDNA overexpression system. *Plant Physiol.* 147(2), 528-542.
- Patel, Ravi K; Jain, M. (s/f). NGS QC Toolkit (v2.3) Manual. *PloS one*, 1–18.
- Paul, A., *et al.* (2015). RNA-seq-mediated transcriptome analysis of actively growing and winter dormant shoots identifies non-deciduous habit of evergreen tree tea during winters. *Scientific Reports*, 4(1), 5932.
- Perroud, P.-F., *et al.* (2017). The *Physcomitrella patens* gene atlas project: large scale RNA-seq based expression data. *The Plant Journal*, (April), 0–2.
- Singh, M., *et al.* (2015). Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 14(3), 407–426.
- Smith, A. M. (2012). Starch in the *Arabidopsis* plant. *Starch/Staerke*, 64(6), 421–434.
- Stevenson, S. R., *et al.* (2016). Genetic analysis of *Physcomitrella patens* identifies ABSCISIC ACID NON-RESPONSIVE (ANR), a regulator of ABA responses unique to basal land plants and required for desiccation tolerance. *The Plant Cell* (Vol. 28).
- Szklarczyk, D., *et al.* (2015). STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D447–D452.
- Trapnell, C., *et al.* (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols*, 7(3), 562–578.
- Zeeman, S. C., *et al.* (2010). Starch: Its Metabolism, Evolution, and Biotechnological Modification in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), 209–234.
- Zhang, C., *et al.* (2016). Genomic Identification and Expression Analysis of the Phosphate Transporter Gene Family in Poplar. *Frontiers in Plant Science*.

Este artículo puede citarse de la siguiente forma:

Citación estilo APA sexta edición

Orbe Sosa, Z., Villalobos López, M.A. & Arroyo Becerra, A. (enero-abril de 2020). Análisis transcriptómico del musgo *Physcomitrella patens* bajo estrés osmótico. *Revista Multidisciplinaria de Avances de Investigación*, 6(1), 13-23.

Citación estilo Chicago decimoquinta edición

Orbe-Sosa, Zuleika, Villalobos López, Miguel Ángel & Arroyo Becerra, Analilia. Análisis transcriptómico del musgo *Physcomitrella patens* bajo estrés osmótico. *Revista Multidisciplinaria de Avances de Investigación*, 6 No. 1 (enero-abril de 2020): 13-23.

Citación estilo Harvard Anglia

Orbe Sosa, Z., Villalobos López, M.A. & Arroyo Becerra, A. 2020. Análisis transcriptómico del musgo *Physcomitrella patens* bajo estrés osmótico. *Revista Multidisciplinaria de Avances de Investigación*, 6(1), pp. 13-23.

Citación estilo IEEE

[1] Z. Orbe-Sosa, M.A. Villalobos López y A. Arroyo Becerra. Análisis transcriptómico del musgo *Physcomitrella patens* bajo estrés osmótico. *Revista Multidisciplinaria de Avances de Investigación*, vol. 6 No. 1, pp. 13-23, enero-abril de 2020.