



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE POSGRADO EN BIOPROCESOS

“Participación de la metil transferasa de RNA en los procesos de desarrollo y de déficit hídrico en *Physcomitrella patens*”

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

PRESENTA:

LIC. EN BIOL. LAURA ESTHER ESTRADA MARTÍNEZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. CATALINA ARENAS HUERTERO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE POSGRADO EN BIOPROCESOS

“Participación de la metil transferasa de RNA en los procesos de desarrollo y de déficit hídrico en *Physcomitrella patens*”

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

PRESENTA:

LIC. EN BIOL. LAURA ESTHER ESTRADA MARTÍNEZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. CATALINA ARENAS HUERTERO

SINODALES:

PRESIDENTE:

DRA. CATALINA ARENAS HUERTERO

SECRETARIO:

DR. SERGIO ROSALES MENDOZA

VOCAL:

DR. JOSÉ LUIS REYES TABOADA

VOCAL:

DR. MIGUEL ÁNGEL VILLALOBOS LÓPEZ



UASLP
Universidad Autónoma
de San Luis Potosí

**Comité Académico del Posgrado
Posgrado en Ciencias en Bioprocesos (PCBP)
Facultad de Ciencias Químicas
UASLP
Presente**

Respetables Señores del CAP:

Por este conducto les hago de su conocimiento que la **Biol. Laura Esther Estrada Martínez** estudiante del programa de Maestría en Ciencias en Bioprocesos, quién actualmente finalizó satisfactoriamente sus créditos del presente programa, también ha terminado satisfactoriamente su trabajo de tesis titulado: **“Participación de la metil transferasa de RNA en los procesos de desarrollo y de déficit hídrico en *Physcomitrella patens*”**.

El trabajo de tesis se encuentra avalado por el comité tutorial. Por tal motivo les hago la atenta petición para que sea considerada la fecha del 12 de agosto del presente, con horario de las 17:00, para que se lleve acabo el examen de grado.

Dr. Sergio Rosales Mendoza
Facultad de Ciencias Químicas, UASLP.

Dr. José Luis Reyes Taboada
Instituto de Biotecnología, UNAM.

Dr. Miguel Angel Villalobos López
Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, IPN.

Sin mas por el momento, agradezco de antemano su atención y quedo de Ustedes.

ATENTAMENTE

Dra. Catalina Arenas Huertero
Facultad de Ciencias, UASLP
Tel: 444826-2300 ext. 5681



**FACULTAD DE
CIENCIAS**

Av. Dr. Salvador Nava Martínez S/N
Zona Universitaria • CP 78290
San Luis Potosí, S.L.P., México
tel. (444) 826 2316 y 2321
fax 826 2384
www.uaslp.mx

Proyecto realizado en:

Laboratorio de Metabolismo del RNA de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, bajo la dirección de la Dra. Catalina Arenas Huertero.

Con financiamiento de:

- Fronteras de la Ciencia CONACyT, convenio 2016-01-1538
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Beca-Tesis (CVU: 886825 / Becario: 704245)
- Fondo de Apoyo a la Investigación (FAI) – 2020 C20-FAI-10-05.05

“El programa de Maestría o Doctorado en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, registro 000588 (Maestría) 000590 (Doctorado), en el Nivel Maestría (Consolidado) Doctorado (En Desarrollo).



Participación de la metil transferasa de RNA en los procesos de desarrollo y de déficit hídrico en *Physcomitrella patens* por Estrada Martínez Laura Esther se distribuye bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional.

**“Nada en la vida es para ser temido, solamente debe ser comprendido.
Ahora es el momento de entender más, para poder temer menos”.**

Marie Curie

Agradecimientos académicos

Agradezco profundamente a mi asesora, la Doctora Catalina Arenas Huertero, por una vez más haber sido mi guía durante este proceso en la realización de la maestría y el presente proyecto de investigación. Por haberme contagiado de su pasión y gusto por la ciencia y enseñarnos a siempre dar lo mejor y buscar las respuestas. Por haberme extendido su mano más allá de la vida académica. A la Dra. Margarita, aunque no fue parte de mi comité evaluador, nunca dudo en extender su mano para apoyarme en lo que necesitara. A mis estimados asesores Dr. José Luis, Dr. Miguel Ángel y Dr. Sergio Rosales, por su valiosa aportación a lo largo de la realización de ese proyecto, de cada uno de ustedes aprendí mucho y enriquecieron el proyecto. A Jaime por siempre estar a nuestro lado enseñándonos y ayudándonos con los experimentos. A Dany por ayudarnos siempre en lo que necesitáramos, desde encontrar un reactivo hasta construir cámaras de crecimiento. A mis compañeros de laboratorio, a los que ahora puedo llamar amigos, Susy, Byanka, Gaby, Chuy, Manolo y Nacho por hacer este proyecto demasiado ameno y divertido, por esas discusiones en las que no llegábamos a nada, pero las risas nunca faltaron, aun así, sé que todos nos quedábamos pensando y mediando los importantísimos temas de discusión. Aprendí mucho de ustedes y también me contagiaron por su amor a la ciencia. Ya los extraño. Manolo me sacas de mis casillas, pero gracias infinitas por tu sincera amistad.

Agradecimientos personales

Infinitas gracias a mis padres, José Ramón y Laura Ávila por creer en mí. Sin su amor y apoyo incondicional no estaría aquí concluyendo este proyecto de mi maestría. Gracias por todos los valores que me han inculcado como el amor y la responsabilidad, han sido mi apoyo y motor más grande. A mis hermanos por apoyarme cuando han podido y por todas las cosas hemos aprendido juntos. A mis abuelos Mundo y Martha por creer en mí y apoyarme en mis proyectos, de ustedes he aprendido a luchar y trabajar duro por lo que uno desea, mil gracias. Chelita, gracias por tu amor y paciencia. Tutui, ya no estás aquí, pero has sido mi más grande ejemplo de amor incondicional y desinteresado, hasta dónde estés te mando todo mi amor, admiración y agradecimiento.

Índice

Índice de figuras	9
Índice de tablas	9
Resumen	10
Abstract	11
Introducción.....	12
Marco teórico.....	15
La etiqueta m ⁶ A	15
Maquinaria de metilación m ⁶ A de los RNAs	17
Ciclo de vida de <i>P. patens</i>	18
Justificación.....	20
Hipótesis	21
Objetivo general.....	21
Objetivos particulares	21
Materiales y métodos.....	22
Material biológico.....	22
Condiciones de cultivo	22
Generación de protoplastos.....	22
Medición del ángulo de curvatura del protonema.....	22
Tratamiento con auxinas y antiauxinas	22
Tinción de la pared celular con calcoflúor blanco	23
Ensayos de gravitropismo	23
Evaluación de la respuesta a diferentes longitudes de onda de luz.....	23
Tratamiento de luz en <i>A. thaliana</i>	24
Ensayos de estrés por ácido abscísico (ABA) y deshidratación	24
Extracción de RNA total	24
Síntesis de cDNA a partir de RNA total	24
Análisis por RT-qPCR.....	24

Análisis estadísticos	25
Bibliografía	25

Índice de figuras

Figura 1. Posición de m ⁶ A en un nucleótido	15
Figura 2. Heterodímero catalítico METTL3-METTL14	17
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Physcomitrella patens</i>	19
Figura 4. Diferencias morfológicas entre los dos tipos celulares de <i>P. patens</i>	20

Índice de tablas

Tabla 1. Funciones fisiológicas de m ⁶ A en diferentes organismos	16
Tabla 2. Componentes de la maquinaria de metilación del RNA y sus homólogos en distintos organismos modelo	18

Resumen

Los procesos fisiológicos que son llevados a cabo en un organismo deben ser finamente regulados para su correcto desarrollo, supervivencia y respuesta a estrés ante su medio ambiente. Una vía regulatoria importante es a nivel de modificaciones de etiquetas químicas que se escriben sobre los RNAs, estas regulan su ciclo de vida, participando en su biogénesis, traducción y degradación, entre otros. Una de estas etiquetas es la metilación en el residuo de adenosina en la posición N-6, N6-metiladenosina (m^6A). Participa de manera fundamental en la regulación de procesos fisiológicos básicos para la vida como lo es el desarrollo embrionario. El *knockout* de *METTL3*, la cual contiene la actividad catalítica de “escribir” a m^6A *per se* en mamíferos, y sus homólogos en diferentes organismos provoca un fenotipo deletéreo, indicando su importancia. Para el presente proyecto se analizó al homólogo de *METTL3* (*PpMETTL3*) en el musgo modelo *Physcomitrella patens*. Se utilizaron líneas mutantes de los genes *Ppmettl3* y *Ppwtpap*, las cuales forman parte del grupo de las escritoras. Para realizar en la presente investigación, se utilizó tejido homogenado o proveniente de protoplastos. Se estudiaron los procesos de desarrollo del protonema a nivel morfológico y molecular en condiciones control. Adicionalmente se evaluó la respuesta a la gravedad y su respuesta fototrópica, complementando con el análisis fototrópico de la mutante de *mta* de *A. thaliana*. Se evaluó a su vez, la respuesta a las auxinas exógenas, ácido naftalenacético (NAA), ácido indolacético (IAA) y al inhibidor de auxinas ácido α - (p -clorofenoxi) isobutírico (PCIB). También fue examinada su respuesta morfológica y molecular a la fitohormona ácido abscísico (ABA) y se realizaron ensayos de deshidratación para evaluar la respuesta al déficit hídrico. Finalmente, se buscaron los transcritos metilados asociados a la vía de señalización de auxinas, luz y ABA en la base de datos de precipitados de m^6A provista por el Dr. José Luis Reyes Taboada (IBT-UNAM).

Palabras clave: m^6A (N6-metiladenosina), metiltransferasa, *Ppmettl3*, *Physcomitrella patens*, gravitropismo, fototropismo, auxina, Acido abscísico (ABA), deshidratación.

Abstract

All of the physiological processes that take place in an organism must be finely regulated in order to achieve a correct development, survival and stress response. One important regulatory pathway is through chemical labels that are written over the RNA strand. These chemical labels regulate its life cycle, which includes, its biogenesis, translation and degradation, among others. One of these chemical labels it's the methylation of the N-6 position of the adenosine residue N6-methyladenosine (m^6A). It has a key role in life fundamental physiological processes such as embryogenesis. *METTL3* knockout whom has the catalytic activity of "writing" m^6A *per se*, causes a lethal phenotype in mammals and other organisms, which points out its importance in the organisms. For the present project we analyzed the *METTL3* homologue in the moss *Physcomitrella patens* (*Ppmett13*). Mutant strains for the writers *Ppmett13* and *Ppwtpap*, were used and several analyses were performed in order to characterize them. For this project we used tissue from protoplasts and homogenated tissue. First, the growth of the protonema in control conditions was evaluated through morphological and molecular analysis were performed. Subsequently gravitropism and phototropism were tested, for better understandment of the later we analyzed the phototropism from a *mta* mutant of *A. thaliana*. Then we evaluated the response of *Ppmett13* mutant to different auxins, indoleacetic acid (IAA), auxin naphthaleneacetic acid (NAA) and the auxin inhibitor α - (p -chlorophenoxy) isobutyric acid (PCIB). *Ppmett13* mutant was also tested with another plant hormone, abscisic acid (ABA) in addition to desiccation assays to evaluate its molecular and morphological response to water deficit. Finally, multiple methylated transcripts associated with the auxin, light, and ABA signaling pathway were searched in a m^6A immunoprecipitated database provided by Dr. Jose Luis Reyes Taboada from IBT-UNAM.

Key words: m^6A (N6-metiladenosine), methyltransferase, *Ppmett13*, *Physcomitrella patens*, gravitropism, phototropism, auxin, Abscisic acid (ABA), dehydration.

Introducción

Los procesos fisiológicos que tienen lugar en un organismo se regulan de manera fina a través de diferentes vías, de manera que la vida pueda progresar a través de sus diferentes etapas del desarrollo y reproducción, además de poder responder a los diferentes estímulos de estrés medioambientales o internos.

Un grupo de vías regulatorias importantes son a través de las etiquetas químicas que modulan la expresión génica en sus diferentes niveles: DNA, RNA y proteínas. La regulación génica a través de las modificaciones en DNA y proteínas han sido ampliamente estudiadas, encontrándose al día de hoy diversos ejemplos muy bien caracterizados (**Kouzarides, 2007; Krishna et al., 1993; Walker et al., 2003**). Por otro lado, las modificaciones internas sobre el RNA fueron descubiertas dos años después del descubrimiento de las etiquetas químicas sobre el DNA por Cohn y por otro lado por Davis y Allen, quienes, en 1957, identificaron el primer nucleótido de RNA modificado en levadura, posteriormente conocido como pseudouridina (**Cohn, 1960; Davis et al., 1956; Helm & Motorin, 2017; Littlefield & Dunn, 1958**). Aun así, no fue hasta años recientes que se comenzó a explorar este nuevo nivel de regulación génica, gracias al descubrimiento en 2011 de la proteína “borradora” FTO (del inglés: fat mass and obesity-associated protein) de la etiqueta m⁶A, dando lugar a la idea de que este mecanismo de modificación química podría ser dinámica, resaltando su importancia para la regulación génica (**Helm & Motorin, 2017; Jia et al., 2011; Song et al., 2012**). Esto aunado a la creación de novedosas tecnologías, como el desarrollo de la RIP-Seq (RNA Immunoprecipitation Sequencing) permitiendo así el estudio y análisis de RNAs modificados (**Limbach & Paulines, 2017; Song et al., 2012**). Desde hace más de 50 años se han identificado alrededor de 150 tipos diferentes de modificaciones químicas (**Helm & Motorin, 2017**), que van desde metilaciones, deaminaciones, tiolaciones, glicosilaciones, isomerizaciones, entre otras, las cuales ocurren en las diferentes especies de RNAs, como lo son los messenger RNAs (mRNAs), ribosomal RNAs (rRNAs), transferencia RNAs (tRNAs), small nuclear RNAs (snRNAs), spliceosomal RNAs (snRNAs), small nucleolar RNAs (snoRNAs), small interference RNAs (siRNAs), micro RNAs (miRNAs), piwi RNAs (piRNAs) long noncoding RNAs (lncRNAs) y RNA virales (**Jacob et al., 2017; Machnicka et al., 2012; Ontiveros et al., 2019**). Estas modificaciones son instaladas, removidas y reconocidas por diferentes grupos de proteínas, jugando un papel importante en cada momento del ciclo de vida de los RNAs, influenciando su arquitectura, promoviendo o interrumpiendo interacciones intramoleculares, alterando el potencial de apareamiento entre bases, modificando su flexibilidad, alterando su carga, modificando sus estructuras secundarias, entre otras. Alterando así las interacciones con otras moléculas, especialmente con proteínas (**Roundtree et al., 2017; Boccaletto et al., 2018**). Estos pequeños cambios moleculares tienen importantes consecuencias sobre el metabolismo celular y fisiológico. Algunos ejemplos son la resistencia a infecciones virales, el corte de los RNAs pequeños inducido por estrés, la eficiencia y fidelidad de la decodificación de los tRNAs, además de su correcto plegamiento, estabilidad y localización. También son parte de la regulación de la biogénesis de los rRNA. Regulan la respuesta inmune a la metilación del tRNA y rRNA, además de su participación en los procesos de *splicing*, entre otras. En los mRNAs tienen un rol en diversos procesos celulares, en el desarrollo y en patologías (**Machnicka et al., 2012; Roundtree et al., 2017; Boccaletto et al., 2018**). La localización, abundancia, distribución y tipo de etiquetas varían dependiendo del tipo de

RNA, del organismo y organelo, del ambiente fisiológico y condiciones de crecimiento de la célula (Machnicka *et al.*, 2012).

Marco teórico

La etiqueta m⁶A

Una de estas modificaciones, es la etiqueta N⁶-methyladenosina (m⁶A), la cual fue descubierta en 1970 por investigadores que se encontraban caracterizando la estructura de 5'-CAP de los mRNA de mamíferos (Yue *et al.*, 2015). A pesar de ser la modificación interna más abundante de los mRNAs y de los lncRNAs (Roundtree *et al.*, 2017) no fue hasta la creación de m⁶A-Seq (MeRIP-Seq) que se comenzó a estudiar su distribución, abundancia y función biológica en diferentes organismos (Limbach & Paulines, 2017). Es una metilación interna que ocurre en la posición número 6 de la adenina de los ribonucleótidos diana (Figura 1). Esta modificación está altamente conservada, dado que se encuentra en los transcritos de todos los eucariotas como insectos (*Drosophila melanogaster*), levaduras (*Saccharomyces cereviceae*), peces y mamíferos (Bokar, 2005; Bokar *et al.*, 1994; Wan *et al.*, 2015). También se han descrito en plantas como el maíz, trigo, avena, *Arabidopsis thaliana* y arroz (Yue *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2014). Igualmente se ha reportado en bacterias, arqueas (Deng *et al.*, 2015; Yue *et al.*, 2015) y virus que infectan tanto animales como plantas (Roignant & Soller, 2017; Yue, Liu, & He, 2015; Martínez-Pérez *et al.*, 2017). Su abundancia y posición al igual que en otras etiquetas van a variar entre diferentes especies, estados del desarrollo, exposición a diferentes estímulos o diferentes órganos del mismo organismo (Schwartz *et al.*, 2014).

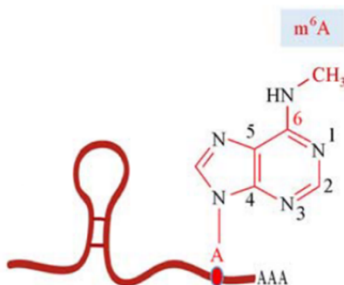


Figura 1. Posición de m⁶A en un nucleótido (modificado de Tong *et al.*, 2018).

Está presente en una gran variedad de RNAs de eucariotas como en tRNA, rRNA, snRNA y lncRNA (Yue *et al.*, 2015; Zhong *et al.*, 2008). Ocurre con una frecuencia de una a tres metilaciones por cada mRNA en mamíferos y ocurre cada 1,800-3,000 nucleótidos en RNAs no poliadenilados o ribosomales (Bokar *et al.*, 1994; Roundtree *et al.*, 2017). La etiqueta es escrita en las secuencias consenso G (m⁶A) C (~70%) o A (m⁶A) C (~30%), sin embargo, solo una fracción de las secuencias consenso se encuentran metiladas, lo que indica que existen factores adicionales que modulan la

metilación de los RNAs (**Bokar, 2005; Roundtree et al., 2017**). En mamíferos se encuentra localizada en los codones de paro, 3'UTR, dentro de exones largos y se ha documentado que la región 5'UTR se metila bajo condiciones de estrés por calor (**Song et al., 2012; Zhou et al., 2015; Meyer et al., 2015**). En plantas, además de los sitios mencionados (excepto el sitio 5'UTR), también se encuentra localizada cerca del codón de inicio, esta topología diferencial está asociada a funciones específicas del cloroplasto, indicando funciones especializadas únicamente en plantas (**Luo et al., 2014**). Aun así, Wan y colaboradores no encontraron este patrón de enriquecimiento hacia el codón de inicio al analizar los patrones de m⁶A en *A. thaliana* y arroz (**Wan et al., 2015**).

Respecto a su función, al día de hoy se sabe que está implicada en el metabolismo de los mRNAs, incluyendo su transcripción, degradación, estabilidad, traducción (**Bi et al., 2019**), exporte (**Wan et al., 2015**), plegamiento y remodelación estructural (m⁶A switch), regulando así su unión con proteínas (**Guo et al., 2018; Liu et al., 2015; Spitale et al., 2015; Roost et al., 2015**). La etiqueta m⁶A le da un carácter hidrofóbico a los RNAs lo que podría estar favoreciendo su unión a las cadenas laterales hidrófobas de proteínas, contribuyendo a su interacción con el medio acuoso y provocando su solvatación (**Roundtree et al., 2017**). Estas alteraciones o regulaciones moleculares, tienen consecuencias importantes en una amplia variedad de procesos fisiológicos de los organismos (Tabla 1).

Funciones fisiológicas de m ⁶ A	
Embriogénesis, apoptosis de células de mamífero, esporulación en levadura, reprogramación y diferenciación de células embrionarias.	<i>Bokar, 2005</i>
Regulación del ciclo circadiano en mamíferos y plantas	<i>Wan et al., 2015</i>
Respuesta a estrés por calor en mamíferos	<i>Zhou et al., 2015</i>
Influencia en la estabilidad, eficiencia de traducción, traducción independiente del CAP a través del reclutamiento de eIF3 (eukaryotic initiation factor 3) en ausencia de eIF4E (Eukaryotic translation initiation factor 4E) en condiciones de estrés por calor y promoción de la traducción de RNAs circulares	<i>Boccaletto et al., 2018; Meyer et al., 2015</i>
Aceleración del procesamiento de los pre-mRNA y el transporte de los mRNA en mamíferos	<i>Roundtree et al., 2017</i>
Diferenciación entre diferentes órganos (raíz, flor y hoja) en <i>A. thaliana</i>	<i>Wan et al., 2015</i>
Fertilidad en ratones	<i>Zheng et al., 2013</i>
Reparación del DNA dañado por UV	<i>Roundtree et al., 2017</i>
Funciones neuronales en <i>D. melanogaster</i>	<i>Wen et al., 2018</i>
Regulación de infecciones virales en mamíferos y plantas	<i>Martínez-Pérez et al., 2017</i>
Regulación de las primeras etapas de la formación del patrón corporal en plantas y metazoos	<i>Růžička et al., 2017</i>
Comportamiento	<i>Guo et al., 2018</i>
Silenciamiento del cromosoma X en el desarrollo de mamíferos hembras	<i>Patil et al., 2016</i>
Mecanismo ancestral para la determinación del sexo	<i>Guo et al., 2018; Patil et al., 2016</i>
Estabilidad de transcritos asociados a la respuesta a estrés de tipo salino, para una correcta respuesta en <i>A. thaliana</i> .	<i>Anderson et al., 2018</i>

Tabla 1. Funciones fisiológicas de m⁶A en diferentes organismos.

Maquinaria de metilación m⁶A de los RNAs

La etiqueta m⁶A es dinámica y esto es gracias a un grupo de proteínas denominadas en su conjunto “Maquinaria de metilación de los RNAs”, la cual está integrada por tres grupos proteicos, el primero de estos son las escritoras (metiltransferasas), las cuales van a catalizar la adición de la etiqueta m⁶A mediante un ataque nucleofílico (Śledź & Jinek, 2016). Después se encuentran las “borradoras” (desmetilasas), las cuales van a catalizar la remoción de m⁶A por medio de una desmetilación oxidativa (Duan *et al.*, 2017). Finalmente, se encuentran las “lectoras”, las cuales van a reconocer y unirse al RNA metilado y van a mediar el subsecuente destino del RNA diana, que puede ser su traducción, almacenamiento o degradación. Esta maquinaria se encuentra localizada en el nucleoplasma en plantas y mamíferos, y en el nucléolo en *S. cerevisiae* (Růžička *et al.*, 2017) con excepción de la mayoría de las lectoras. A continuación, se describe brevemente cada grupo.

La primera proteína escritora se caracterizó en células HeLa en 1994 cuando se aisló un complejo proteico de tres componentes, uno de estos, de 200 kDa tenía un sitio de unión a SAM (S-adenosil metionina) en una subunidad de 70 kDa y otro de los componentes, de 875 kDa tenía afinidad por los RNAs (Bokar *et al.*, 1994). Más tarde, en 1997 se aisló y purificó a la subunidad de 70 kDa, llamándola MT-A70 (METTL3), siendo ésta indispensable para la metilación de los transcritos (Bokar *et al.*, 1997). Desde entonces, se han caracterizado otros componentes que conforman el núcleo de metiltransferasas, a pesar de que es METTL3 en mamíferos la que tiene la actividad catalítica *per se* dado que une a SAM y ejecuta el ataque nucleofílico (Śledź & Jinek, 2016), necesita de la interacción de las proteínas accesorias METTL14 y WTAP. METTL14 forma un heterodímero estable con METTL3 a través de una red de puentes de hidrógeno, funcionando como un andamio de unión al RNA (Figura 2), aunque ambas tienen el dominio MTasa, en METTL14 no se encuentra funcional, impidiendo así su actividad como metiltransferasa (Wang *et al.*, 2016; Śledź & Jinek, 2016). WTAP también se une al heterodímero, pero con menor fuerza (Liu *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016). En años posteriores se han descrito más proteínas accesorias que componen el núcleo de las metiltransferasas, en la tabla 2 se enlistan los diferentes homólogos en diferentes organismos modelo.

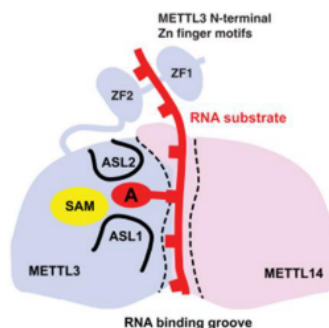


Figura 2. Heterodímero catalítico METTL3-METTL14 (Śledź & Jinek, 2016).

Las proteínas lectoras comparten un dominio YTH (YT521-B homology) altamente conservado, el cual consiste de una caja o hueco hidrofóbico aromático, conformado por los aminoácidos triptófano y tirosina presentes hacia el C-terminal, en donde se une selectivamente a m⁶A por medio de una interacción hidrofoba (**Patil et al., 2017**). Una vez unidas al transcrito metilado, van a mediar su destino final que, dependiendo la lectora en cuestión, puede mediar su degradación como YTHDF2 o su estabilidad y traducción como YTHDF1 que interactúa con la maquinaria de traducción (**Wang et al., 2015**). Ejecutando así múltiples funciones biológicas ya algunas mencionadas con anterioridad. Se han identificado algunos representantes en diferentes organismos modelo, enlistados en la tabla 2. Cabe resaltar que algunas proteínas de unión como eIF3 no contienen dominio YTH o por otro lado, pueden ser parte de la familia YTH, pero no presentar afinidad para unirse a m⁶A como es el caso de Mmi1. (**Patil et al., 2017; Meyer et al., 2015**).

Las proteínas borradoras van a mediar una desmetilación oxidativa de los transcritos etiquetados (**Duan et al., 2017**), se han identificado algunas de estas en diferentes organismos modelo, las cuales se encuentran enlistadas en la tabla 2.

Mamíferos	<i>D. melanogaster</i>	<i>S. cereviceae</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>P. patens</i>
"ESCRITORAS"				
METTL3	IME4	IME4	MTA	PpMETTL3
METTL14	---	KAR4	MTB	PpMETTL14-1 PpMETTL14-2
WTAP	FL(2)D	MJM2	FIP37	PpWTAP
KIAA1429	Virilizer (Vir)	---	Virilizer	---
---	---	SLZ1	---	---
HAKAI	---	---	HAKAI	---
---	---	---	FKBP12	---
Zc3h13 (ratón)	Xio	---	---	---
Rbm15/15B	Spenito (Nito)	---	---	---
"BORRADORAS"				
FTO	---	---	13 proteínas pertenecientes a la familia AlkB (atALKBH1-10B)	---
ALKBH5 (ratón)	---	---	---	---
"LECTORAS"				
Familia YTHDF (YHTDF1, YTHDF2, YTHDF3)	YT521-B, CG6422	Mrb1, PHO92	Familia ECT(1-11)	Familia YTH
Familia YTHDC (YTHDC1, YTHDC2)			At4g11970, At_CPSF30	
HNRNP	---	---	---	---
eIF3	---	---	---	---

Tabla 2. Componentes de la maquinaria de metilación del RNA y sus homólogos en distintos organismos modelo.

Ciclo de vida de *P. patens*

En *P. patens* el gametofito haploide es la fase dominante y es en esta fase donde la reproducción sexual comienza con la formación de los gametos. En la fase diploide conformada por el esporófito, se forman las esporas haploides por medio de meiosis (Figura 3A) (**Cove, 2005; Prigge & Bezanilla, 2010**). Al germinar la espora, se desarrolla protonema únicamente cloronemático (Figura 3B). Al cabo de siete días, se diferencia a partir del cloronema primario, otro tipo celular de *P. patens*, conocido como caulonema (Figura 3D, 3B), esta transición además de glucosa y luz, requiere de una correcta señalización de auxinas (**Jang & Dolan, 2011**). A partir del caulonema primario formado, se

diferenciará el cloronema secundario, caulonema secundario o brotes a partir de sus células subapicales (Figura 3C, 3D, 3E). (Jang & Dolan, 2011; Cove, 2005). El desarrollo de los gametos femeninos llamados oosferas y los masculinos llamados espermatozoides o anterozoides tienen lugar en los gametangios femenino y masculino llamados arquegonio y anteridio respectivamente (Figura 3F). Una vez fertilizada la oosfera, crecerá para formar un esporofito diploide que consiste de un esporangio, en donde por medio de meiosis se formarán alrededor de 4000 esporas haploides (Figura 3G) (Cove, 2005; Cubas, 2008; Estébanez *et al.*, 2011; Prigge & Bezanilla, 2010; Van Gessel *et al.*, 2017).

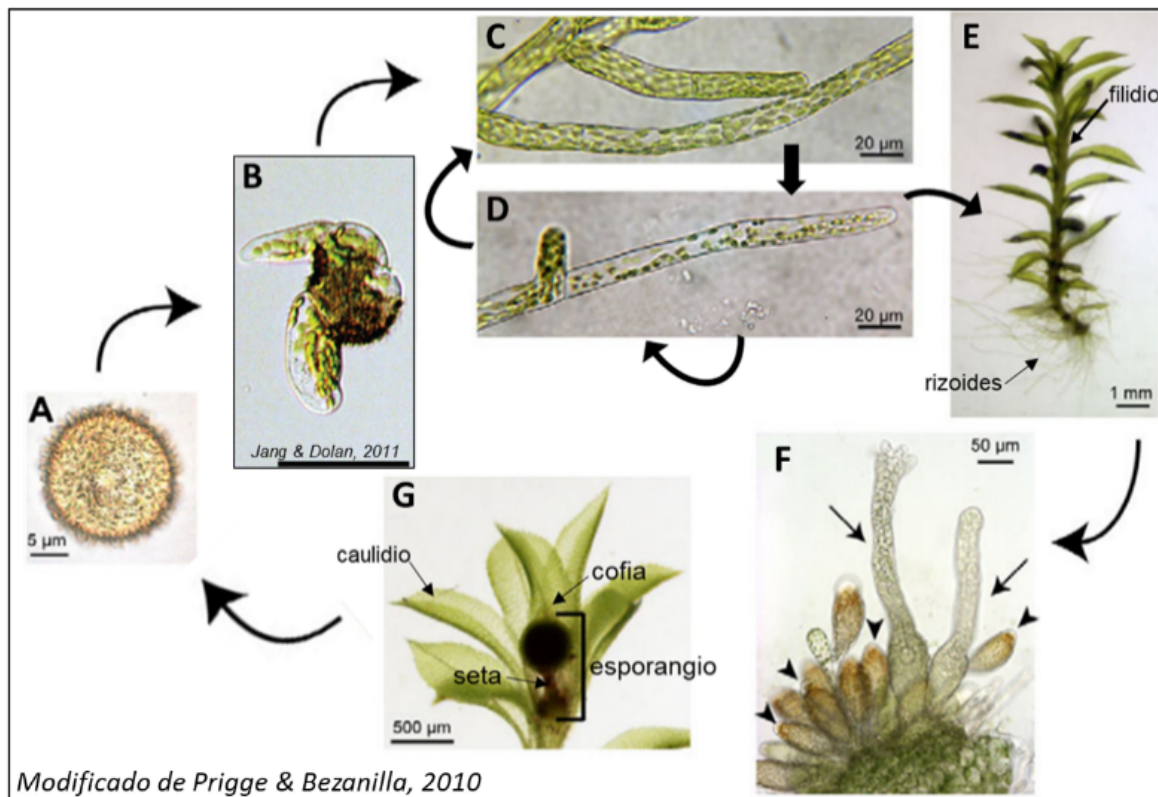


Figura 3. Ciclo de vida de *Physcomitrella patens*. A) Espora, B) Desarrollo de tejido cloronemático, C) Tejido cloronemático, D) Tejido caulonemático, E) Brote, F) Estructuras reproductivas, arquegonios y anteridios, G) Esporangio (Modificado de Prigge & Bezanilla, 2010).

El sistema multifilamentoso protonemal conformado por cloronema y caulonema, se desarrolla por medio de divisiones de sus células apicales, las cuales siempre serán células madres que estarán en constante división generando nuevas células subapicales (Cove, 2005; Vidali & Bezanilla, 2012). Las células cloronemáticas (Figura 4A) son células más cortas y anchas que las células del caulonema, contienen una alta cantidad de cloroplastos completamente desarrollados y redondos, tienen una división lenta, sus paredes celulares son perpendiculares al eje longitudinal del filamento. Las células subapicales del cloronema también se dividen, pero muy raramente, no lo hacen más de 2 veces para producir ramificaciones del filamento cloronemal y se encuentran principalmente involucrados

en los procesos de la fotosíntesis. Las células del caulonema (Figura 4B) son más largas y delgadas que las del cloronema y contienen menos cloroplastos, los cuales se encuentran menos desarrollados, siendo también más elongados y delgados en comparación con el cloronema, sus paredes celulares son oblicuas al eje longitudinal del filamento, tienen una división veloz similar a la tasa de crecimiento de los pelos radicales en plantas vasculares, sus células subapicales se vuelven poliploides conforme envejecen. Están principalmente involucrados en la colonización del sustrato y la adquisición de nutrientes (Cove, 2005; Jang & Dolan, 2011; Menand *et al.*, 2007; Vidali & Bezanilla, 2012).

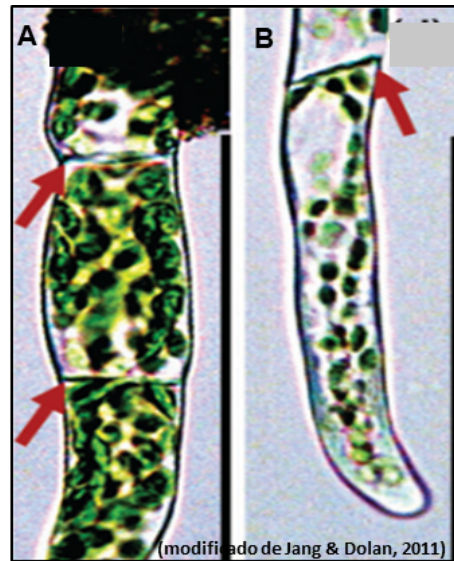


Figura 4. Diferencias morfológicas entre los dos tipos celulares de *P. patens*, A) cloronema, B) caulonema. (Modificado de Jang & Dolan, 2011)

Justificación

El interés del presente proyecto se enfoca en la caracterización de la función del homólogo de METTL3 en el musgo modelo *Physcomitrella patens*, ya que se ha visto que el *knockout* de sus homólogos en otros organismos modelo presenta graves problemas del desarrollo y reproducción, por ejemplo, en células de mamíferos su *knockout* las induce a apoptosis (Fu *et al.*, 2014; Bokar *et al.*, 2005). En *D. melanogaster* su *knockout* genera embriogénesis letal y su *knockdown* es semiletal generando muy pocos adultos viables los cuales muestran una fecundidad reducida (Yue *et al.*, 2015). En *S. cereviceae* su *knockout* obstaculiza la esporulación y retarda la entrada a meiosis (Clancy *et al.*, 200; Yue *et al.*, 2015). En *A. thaliana* el *knockout* de MTA genera un estado de embriogénesis

letal y la versión *knockdown*, fenotipo obtenido por la expresión de MTA bajo el promotor de expresión en embriogénesis ABI3, genera defectos en el desarrollo, como morfología aberrante de hojas, y una incorrecta respuesta al gravitropismo y estrés salino (Yue *et al.*, 2015; Zhong *et al.*, 2008; Růžička *et al.*, 2017; Arribas-Hernández *et al.*, 2018; Anderson *et al.*, 2018). Además, ya han sido identificados algunos miembros de la maquinaria de metilación de RNAs en *P. patens*, como lo son algunas proteínas lectoras con dominio YTH y también algunas homologas del grupo de las escritoras, *Ppmett13*, *Ppmett14-1*, *Ppmett14-2* y *Ppwtpap*.

En los últimos años el musgo modelo *P. patens* ha surgido como un organismo importante para el estudio de diversos procesos biológicos a nivel molecular, dado a su fácil manejo en el laboratorio, su tasa alta de recombinación homóloga, su genoma completamente secuenciado y la posición clave que ocupa en el árbol de la vida de las plantas, justo en el punto de transición entre la vida acuática y terrestre de las plantas (Ruibal *et al.*, 2013; Roberts *et al.*, 2020). En el presente trabajo se utilizó la línea silvestre (WT) y una mutante de *Ppmett13* (SM1) para evaluar la función de *Ppmet13* bajo diferentes condiciones de crecimiento y ensayos de estrés abiótico.

Hipótesis

La falta de la función de la metiltransferasa de adenosina de RNA, *mta* en *P. patens* (*Ppmett13*) provoca una desregulación en diferentes vías importantes, como lo es la percepción de la luz, regulación de auxinas y respuesta a estrés hídrico, afectando su correcto desarrollo y morfología.

Objetivo general

Evaluar el efecto de la falta de función de *Ppmett13* en los procesos de desarrollo de *P. patens*, así como en la regulación de auxinas, percepción y respuesta a la luz y contención del estrés hídrico.

Objetivos particulares

1. Caracterizar el crecimiento y desarrollo de la mutante SM1.
2. Analizar la expresión del conjunto de genes de diferenciación protonemal (*Pplrl1*, *Pplrl2*, *PpRSL1*, *PpRSL2*, *PpSHI1*, *PpSHI2*).
3. Caracterizar el desarrollo de la mutante SM1 en presencia de las auxinas IAA y NAA y la antiauxina PCIB.
4. Evaluar la morfología de la pared celular a través de su tinción con calcoflúor de la mutante SM1.
5. Evaluar la respuesta gravitrópica de la mutante SM1.
6. Evaluar la respuesta fototrópica de la mutante SM1 y de las mutantes de RNAi, MTA6.9 y MTA11.7 de *A. thaliana* en diferentes longitudes de onda.
7. Evaluar la respuesta morfológica a estrés de tipo hídrico y tratamiento con ABA de la mutante SM1.

8. Analizar la expresión del gen de respuesta a estrés hídrico *Pplea3* en la mutante SM1 bajo tratamiento con ABA.
9. Evidenciar la presencia de los transcritos involucrados en los procesos estudiados dentro de ese trabajo usando la base de datos de RNAs inmunoprecipitados con anti-m⁶A proporcionada por el Dr. José Luis Reyes Taboada (IBT-UNAM).

Materiales y métodos

Material biológico

Se utilizó la línea silvestre (WT) y la línea mutante del gen *Ppmett13* (SM1), las cuales fueron proporcionadas por el Dr. José Luis Reyes Taboada del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. La mutante SM1 fue generada mediante la tecnología de CRISPR-Cas9 en el laboratorio del Dr. Fabien Nogué, INRA, Francia.

Condiciones de cultivo

Se siguió el protocolo de cultivo para la manipulación del tejido, las condiciones de fotoperiodo y el medio de crecimiento BCD descrito por David Cove (**Cove, 2004; Cove 2009; Cove et al., 2012**), tanto para la línea WT como la mutante SM1. La temperatura utilizada en el laboratorio fue de 22°C. Para todos los experimentos descritos se partió de tejido joven, de 7 días de edad cultivado como se describió con anterioridad para hacer los subsecuentes homogenados o protoplastos y montar los ensayos.

Generación de protoplastos

Se utilizó el protocolo establecido por David Cove (**Cove, 2009**), modificando únicamente la concentración del coctel enzimático Driselasa (Sigma-Aldrich) utilizada al 2% en lugar de al 0.5%. Los protoplastos fueron transferidos del medio de recuperación PRMB al medio de crecimiento BDC o tratamientos a los 4 días de recuperación. Se siguió el protocolo de David Cove para la preparación de los medios de recuperación PRMB y PRMT (**Cove, 2004**). Al medio PRMT no se le agregó agar.

Medición del ángulo de curvatura del protonema

Se midió en ángulo de curvatura de las líneas WT y SM1 a los 5, 7, 9, 11 y 14 días de desarrollo utilizando ImageJ para posteriormente compararlos.

Tratamiento con auxinas y antiauxinas

Los protoplastos de las líneas WT y SM1 después del 4 día de su recuperación en medio PRMB fueron transferidos a medio BCD adicionado con ácido 1-naftalenacético (NAA) 10 µM. Para los

tratamientos en tejido homogenado se adicionaron las auxinas NAA, IAA (ácido indolacético) a concentraciones de 5 y 10 μM y la antiauxina PCIB (ácido p-clorofenoxiisobutírico) a concentraciones de 5 y 10 μM desde el primer día de su siembra. Adicionalmente se evaluó la combinación de las auxinas NAA o IAA con PCIB para analizar el efecto inhibitor de este último añadiendo cada una a concentraciones de 5 o 10 μM tanto de la auxina como del inhibidor. Finalmente se evaluó la respuesta de ambas líneas únicamente a los solventes donde se disolvieron las auxinas (metanol para IAA y NAA) y la antiauxina PCIB (acetona) sin encontrar diferencias con respecto al control (datos no mostrados).

Tinción de la pared celular con calcoflúor blanco

Para realizar las tinciones de la pared celular, se utilizó la tinción fluorescente con Calcofluor White Stain (Sigma-Aldrich). Se montó el tejido sobre un porta objetos y se añadió una gota del reactivo calcoflúor y enseguida se clarificó con una gota de KOH al 10%. Se cubrió con el cubreobjetos y se dejó reposar durante 1 minuto, finalmente se realizó la observación bajo un microscopio (ZEISS, AXIO Lab.A1), bajo un filtro cy5 640/30nm.

Ensayos de gravitropismo

Se utilizó tejido homogenado de WT y SM1, se sembraron 5 μl de tejido homogenado con agar al 0.1% sobre membranas estériles de celofán permeable de 5 mm de diámetro posicionadas sobre medio BDC. Se dejaron crecer durante 7 días en luz constante en posición horizontal, después se trasladaron a un medio BCD enriquecido con 0.5% de sacarosa y se dejaron crecer durante 30 días en completa oscuridad, tomando evidencia fotográfica a los 10, 20 y 30 días de desarrollo (**Knight & Cove, 1991**).

Evaluación de la respuesta a diferentes longitudes de onda de luz

Para ambas líneas WT y SM1 se sembraron 5 μl de tejido homogenado con agar al 0.1% sobre membranas estériles de celofán permeable de 5 mm de diámetro posicionadas de forma horizontal en medio BDC. Se dejaron crecer durante 7 días en luz constante, a partir de este punto se abordaron 2 metodologías diferentes:

1. Después de 7 días de crecimiento en luz constante las membranas con tejido fueron expuestas a luz roja, azul, blanca y oscuridad en medio BCD al 0.5% de sacarosa, asimismo las placas fueron posicionadas en forma horizontal o vertical durante 30 días, tomando evidencias fotográficas a diferentes intervalos de tiempo (días).
2. Después de 7 días de crecimiento en luz constante las membranas con tejido fueron trasladadas a medio BCD al 0.5% de sacarosa, asimismo las placas fueron posicionadas en forma horizontal o vertical y todas fueron cultivadas en oscuridad a 25°C durante 25 días. Posterior a esto fueron expuestas a luz roja, azul, blanca y oscuridad durante 30 días adicionales, tomando evidencias fotográficas a diferentes intervalos de tiempo (días).

Tratamiento de luz en *A. thaliana*

Las semillas de las mutantes de RNAi de *mta* (6.9 y 11.7) se pusieron a vernalización en oscuridad durante 4 días, enseguida se les aplicó un pulso de luz blanca por 1:30h, para posteriormente trasladarlas a los tratamientos con luz blanca, roja, blanca y oscuridad durante 4 días, al final de los tratamientos fue medido el hipocótilo de cada individuo mediante el programa ImageJ para compararlos.

Ensayos de estrés por ácido abscísico (ABA) y deshidratación

Para ambas líneas WT y SM1 se sembraron 5 μ l de tejido homogenado con agar al 0.1% sobre membranas estériles de celofán permeable de 5 mm de diámetro posicionadas sobre medio BDC. Se dejaron crecer durante diez días bajo las condiciones antes mencionadas de cultivo estándar. Posteriormente las membranas fueron trasladadas a un medio enriquecido con ABA exógeno a 10 μ M, 50 μ M y 100 μ M durante 12 y 24 horas y 15 días. Las muestras de tejido y evidencias fotográficas fueron tomadas dentro de las 16 horas de luz del fotoperiodo.

Para la deshidratación, después del tratamiento con ABA 10 μ M durante 24 h o el tejido control sin tratamiento, ambas líneas fueron deshidratadas durante 24 h utilizando el protocolo de **Khandelwal et al., 2010**. La deshidratación fue monitoreada pesando el tejido a diferentes intervalos de tiempo. Pasadas las 24 h se rehidrataron con 10 μ l de agua destilada estéril y se colocaron en medio BCD bajo las condiciones de cultivo estándar, finalmente se evaluó la recuperación de ambas líneas.

Extracción de RNA total

Se realizó la extracción del RNA total utilizando el reactivo TRI REAGENT (ZYMO RESEARCH). El RNA obtenido se solubilizó en 30 μ l de agua MQ o la misma cantidad de formamida al 50% incubando a 60°C, 15 minutos en agitación. La cuantificación fue realizada utilizando el equipo NANO-DROP (Thermo Scientific) y la verificación de la integridad del RNA por medio de electroforesis. Se almacenó a -80°C.

Síntesis de cDNA a partir de RNA total

Antes de la síntesis de cDNA el RNA total se sometió a un tratamiento con RQ1 RNase- Free DNase (Promega) para eliminar la contaminación por DNA, utilizando el protocolo del fabricante. La síntesis de cDNA se realizó utilizando la enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) siguiendo el protocolo del proveedor.

Análisis por RT-qPCR

Se cuantificaron los mRNA utilizando la enzima iTaq Universal SYBR Green supermix (Bio-Rad). Los análisis se realizaron en tres réplicas técnicas usando un equipo termociclador CFX96 Touch™ Real-Time PCR (BioRad). Los genes de interés fueron normalizados en relación a la expresión del gen

constitutivo *Pp60S*, utilizando el comparativo del número de ciclo cuantificado (quantification cycle, Cq), método $\Delta\Delta Cq = (Cq, \text{muestra} - Cq, Pp60S)ZT X - (Cq, \text{muestra} - Cq, Pp60S)ZT Y$, donde ZT X es cualquier ZT X y ZT Y representa 1X valor de expresión del gen a medir normalizado con *Pp60S*. Los oligonucleótidos utilizados se encuentran en la información suplementaria (TS. 1).

Análisis estadísticos

Se llevaron a cabo los análisis estadísticos utilizando Multiple t test y la construcción de las gráficas con el programa estadístico GraphPad Prism versión 7.00.

Bibliografía

1. Anderson, S. J., Kramer, M. C., Gosai, S. J., Yu, X., Vandivier, L. E., Nelson, A., Anderson, Z. D., Beilstein, M. A., Fray, R. G., Lyons, E., & Gregory, B. D. (2018). N⁶-Methyladenosine Inhibits Local Ribonucleolytic Cleavage to Stabilize mRNAs in Arabidopsis. *Cell reports*, 25(5), 1146–1157.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.020>
2. Arribas-Hernández, L., Bressendorff, S., Hansen, M. H., Poulsen, C., Erdmann, S., & Brodersen, P. (2018). An m⁶A-YTH Module Controls Developmental Timing and Morphogenesis in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 30(5), 952–967. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00833>.
3. Bi, Z., Liu, Y., Zhao, Y., Yao, Y., Wu, R., Liu, Q., Wang, Y., & Wang, X. (2019). A dynamic reversible RNA N⁶-methyladenosine modification: current status and perspectives. *Journal of cellular physiology*, 234(6), 7948–7956. <https://doi.org/10.1002/jcp.28014>
4. Boccaletto, P., MacHnicka, M. A., Purta, E., Pitkowski, P., Baginski, B., Wirecki, T. K., ... Bujnicki, J. M. (2018). MODOMICS: A database of RNA modification pathways. 2017 update. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D303–D307. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1030>.
5. Bokar, J. A. (2005). The biosynthesis and functional roles of methylated nucleosides in eukaryotic mRNA. *Topics in Current Genetics*, 12 (pp. 141–177). <https://doi.org/10.1007/b106365>.
6. Bokar, J. A., Rath-Shambaugh, M. E., Ludwiczak, R., Narayan, P., & Rottman, F. (1994). Characterization and partial purification of mRNA N⁶-adenosine methyltransferase from HeLa cell nuclei: Internal mRNA methylation requires a multisubunit complex. *Journal of Biological Chemistry*, 269(26), 17697–17704.
7. Bokar, J. A., Shambaugh, M. E., Polayes, D., Matera, A. G. (1997). Purification and cDNA cloning of the AdoMet-binding subunit of the human mRNA (N⁶-adenosine)-methyltransferase. *RNA Journal*, 3 (pp. 1233-1247).
8. Clancy, M. J., Shambaugh, M. E., Timpte, C. S., & Bokar, J. A. (2002). Induction of sporulation in *Saccharomyces cerevisiae* leads to the formation of N⁶-methyladenosine in mRNA: a potential mechanism for the activity of the IME4 gene. *Nucleic acids research*, 30(20), 4509–4518. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf573>
9. Cohn, Waldo. E. (1960). Pseudouridine, a Carbon-Carbon Linked Ribonucleoside in Ribonucleic Acids: Isolation, Structure, and Chemical Characteristics. *The Journal of Biological Chemistry* 235, (pp. 1488-1498) 5. <https://pdfs.semanticscholar.org/97d7/4727c6a2ab0159b307f1b0c80c9bf046ff18.pdf>
10. Cove, D. (2005). The moss, *Physcomitrella patens*. *Annual Review of Genetics*. 10.1146/annurev.genet.39.073003.110214.

11. Cove, D. J., Perroud, P. F., Charron, A. J., McDaniel, S. F., Khandelwal, A., & Quatrano, R. S. (2009). Culturing the moss *Physcomitrella patens*. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4(2). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5136>.
12. Cove, D. J., Perroud, P. F., Charron, A. J., McDaniel, S. F., Khandelwal, A., & Quatrano, R. S. (2009). Isolation and regeneration of protoplasts of the moss *Physcomitrella patens*. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4(2). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5142>.
13. Cove, David. (2004). MOSS MEDIA RECIPES.
14. Cubas, P. (2008). Briófitos (musgos, hepáticas y antoceros). *Botánica*, 1–6. Retrieved from http://www.aulados.net/Botanica/Curso_Botanica/Pteridofitos/13_14_Pteridofitos_texto.pdf.
15. Davis, F. F. & Allen, W. F. (1957). Ribonucleic acids from yeast which contain a fifth nucleotide. *The Journal of biological chemistry* 227, (pp. 907–915).
16. Deng, X., Chen, K., Luo, G. Z., Weng, X., Ji, Q., Zhou, T., & He, C. (2015). Widespread occurrence of N⁶-methyladenosine in bacterial mRNA. *Nucleic Acids Research*, 43(13), 6557–6567. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv596>.
17. Duan, H.-C., Wei, L.-H., Zhang, C., Wang, Y., Chen, L., Lu, Z., ... Jia, G. (2017). ALKBH10B Is an RNA N⁶-Methyladenosine Demethylase Affecting Arabidopsis Floral Transition. *The Plant Cell*, 29(12), 2995–3011. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00912>.
18. Eklund, D. M., Thelander, M., Landberg, K., Staldal, V., Nilsson, A., Johansson, M., ... Sundberg, E. (2010). Homologues of the Arabidopsis thaliana SHI/STY/LRP1 genes control auxin biosynthesis and affect growth and development in the moss *Physcomitrella patens*. *Development*, 137(8), 1275–1284. <https://doi.org/10.1242/dev.039594>.
19. Estébanez, Belén., Draper y Díaz, Isabel., & Medina, Rafael. (2011). Briófitos: una aproximación a las plantas terrestres más sencillas. *Bryophytes: An Approximation to the Simplest Land Plants*.
20. Fu, Y., Dominissini, D., Rechavi, G., & He, C. (2014). Gene expression regulation mediated through reversible m⁶A RNA methylation. *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg3724>.
21. Gessel, N., Lang, D., & Reski, R. (2017). Genetics and Genomics of *Physcomitrella patens*. In *Plant Cell Biology* (pp. 1–32). <https://doi.org/10.1201/b14925>.
22. Guo, J., Tang, H.-W., Li, J., Perrimon, N., & Yan, D. (2018). Xio is a component of the Drosophila sex determination pathway and RNA N⁶-methyladenosine methyltransferase complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(14), 3674–3679. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720945115>.
23. Helm, M., & Motorin, Y. (2017). Detecting RNA modifications in the epitranscriptome: Predict and validate. *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.169>.
24. Jacob, R., Zander, S., & Gutschner, T. (2017). The dark side of the epitranscriptome: Chemical modifications in long non-coding rnas. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms18112387>.
25. Jang, G., & Dolan, L. (2011). Auxin promotes the transition from chloronema to caulonema in moss protonema by positively regulating PpRSL1 and PpRSL2 in *Physcomitrella patens*. *New Phytologist*, 192(2), 319–327. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03805.x>.
26. Jia, G., Fu, Y., Zhao, X., Dai, Q., Zheng, G., Yang, Y., ... He, C. (2011). N⁶-Methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nature Chemical Biology*, 7(12), 885–887. <https://doi.org/10.1038/nchembio.687>.
27. Krishna, R. G., & Wold, F. (1993). Post-Translational Modification of Proteins. In *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* (pp. 265–298). Wiley Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9780470123133.ch3>
28. Lavy, M., Prigge, M. J., Tao, S., Shain, S., Kuo, A., Kirchsteiger, K., & Estelle, M. (2016). Constitutive auxin response in *Physcomitrella* reveals complex interactions between Aux/IAA and ARF proteins. *ELife*, 5. <https://doi.org/10.7554/elife.13325>.

29. Limbach, P. A., & Paulines, M. J. (2017). Going global: the new era of mapping modifications in RNA. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/wrna.1367>.
30. Littlefield, J. W., & Dunn, D. B. (1958). The occurrence and distribution of thymine and three methylated-adenine bases in ribonucleic acids from several sources. *Biochemical Journal*, 70(4), 642–651. <https://doi.org/10.1042/bj0700642>
31. Liu, J., Yue, Y., Han, D., Wang, X., Fu, Y., Zhang, L., ... He, C. (2014). A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation. *Nature Chemical Biology*, 10(2), 93–95. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1432>.
32. Liu, N., Dai, Q., Zheng, G., He, C., Parisien, M., & Pan, T. (2015). N6-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions. *Nature*, 518(7540), 560–564. <https://doi.org/10.1038/nature14234>.
33. Luo, G. Z., Macqueen, A., Zheng, G., Duan, H., Dore, L. C., Lu, Z., ... He, C. (2014). Unique features of the m6A methylome in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms6630>.
34. Machnicka, M. A., Milanowska, K., Oglou, O. O., Purta, E., Kurkowska, M., Olchowik, A., ... Grosjean, H. (2012). MODOMICS: A database of RNA modification pathways - 2012 update. *Nucleic Acids Research*. (pp. 1-6). doi:10.1093/nar/gks1007.
35. Martínez-Pérez, M., Aparicio, F., López-Gresa, M. P., Bellés, J. M., Sánchez-Navarro, J. A., & Pallás, V. (2017). *Arabidopsis* m6A demethylase activity modulates viral infection of a plant virus and the m6A abundance in its genomic RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(40), 10755–10760. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703139114>.
36. Means, D. E., & Feeney, R. E. (1998). CHEMICAL MODIFICATIONS OF PROTEINS: A REVIEW. *Journal of Food Biochemistry* 22 (pp. 399-425). <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1998.tb00253.x>
37. Menand, B., Calder, G., & Dolan, L. (2007). Both chloronemal and caulonemal cells expand by tip growth in the moss *Physcomitrella patens*. *Journal of Experimental Botany*, 58(7), 1843–1849. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm047>.
38. Meyer, K. D., Patil, D. P., Zhou, J., Zinoviev, A., Skabkin, M. A., Elemento, O., ... Jaffrey, S. R. (2015). 5' UTR m6A Promotes Cap-Independent Translation. *Cell*, 163(4), 999–1010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.012>.
39. Ontiveros, R. J., Stoute, J., Liu, K. F. (2019). The chemical diversity of RNA modifications. *Biochemical Journal*. 476 (pp. 1227-1245). <https://doi.org/10.1042/BCJ20180445>.
40. Patil, D. P., Chen, C. K., Pickering, B. F., Chow, A., Jackson, C., Guttman, M., & Jaffrey, S. R. (2016). M6A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression. *Nature*, 537(7620), 369–373. <https://doi.org/10.1038/nature19342>.
41. Patil, D. P., Pickering, B. F., & Jaffrey, S. R. (2017). Reading m6A in the Transcriptome: m6A-Binding Proteins. *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.10.001>.
42. Prigge, M. J., & Bezanilla, M. (2010). Evolutionary crossroads in developmental biology: *Physcomitrella patens*. *Development*, 137(21), 3535–3543. <https://doi.org/10.1242/dev.049023>.
43. Prigge, M. J., Lavy, M., Ashton, N. W., & Estelle, M. (2010). *Physcomitrella patens* auxin-resistant mutants affect conserved elements of an auxin-signaling pathway. *Current Biology*, 20(21), 1907–1912. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.08.050>.
44. Roignant, J. Y., & Soller, M. (2017). m6A in mRNA: An Ancient Mechanism for Fine-Tuning Gene Expression. *Trends in Genetics*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.04.003>.
45. Roost, C., Lynch, S. R., Batista, P. J., Qu, K., Chang, H. Y., & Kool, E. T. (2015). Structure and thermodynamics of N⁶-methyladenosine in RNA: A spring-loaded base modification. *Journal of the American Chemical Society*, 137(5), 2107–2115. <https://doi.org/10.1021/ja513080v>.

46. Rothbart, S. B., & Strahl, B. D. (2014). Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.03.001>.
47. Roundtree, I. A., Evans, M. E., Pan, T., & He, C. (2017). Dynamic RNA Modifications in Gene Expression Regulation. *Cell*. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.045>.
48. Ruibal, C., Castro, A., Carballo, V., Szabados, L., & Vidal, S. (2013). Recovery from heat, salt and osmotic stress in *Physcomitrella patens* requires a functional small heat shock protein PpHsp16.4. *BMC Plant Biology*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-174>.
49. Růžička, K., Zhang, M., Campilho, A., Bodi, Z., Kashif, M., Saleh, M., ... Fray, R. G. (2017). Identification of factors required for m6A mRNA methylation in Arabidopsis reveals a role for the conserved E3 ubiquitin ligase HAKAI. *New Phytologist*, 215(1), 157–172. <https://doi.org/10.1111/nph.14586>.
50. Schwartz, S., Mumbach, M. R., Jovanovic, M., Wang, T., Maciag, K., Bushkin, G. G., ... Regev, A. (2014). Perturbation of m6A writers reveals two distinct classes of mRNA methylation at internal and 5' sites. *Cell Reports*, 8(1), 284–296. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.048>.
51. Shinde, S., Nurul Islam, M., & Ng, C. K. Y. (2012). Dehydration stress-induced oscillations in LEA protein transcripts involves abscisic acid in the moss, *Physcomitrella patens*. *New Phytologist*, 195(2), 321–328. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04193.x>.
52. Ślédź, P., & Jinek, M. (2016). Structural insights into the molecular mechanism of the m6A writer complex. *ELife*, 5. <https://doi.org/10.7554/elife.18434>.
53. Song, C. X., Yi, C., & He, C. (2012). Mapping recently identified nucleotide variants in the genome and transcriptome. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt.2398>.
54. Spitale, R. C., Flynn, R. A., Zhang, Q. C., Crisalli, P., Lee, B., Jung, J. W., ... Chang, H. Y. (2015). Structural imprints in vivo decode RNA regulatory mechanisms. *Nature*, 519(7544), 486–490. <https://doi.org/10.1038/nature14263>.
55. Tam, T. H. Y., Catarino, B., & Dolan, L. (2015). Conserved regulatory mechanism controls the development of cells with rooting functions in land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(29), E3959–E3968. <https://doi.org/10.1073/pnas.1416324112>.
56. Tong, J., & Flavell, R. A. (2018). RNA m 6 A modi fi cation and its function in diseases. *Frontiers of Medicine*.
57. Vidali, L., & Bezanilla, M. (2012, December). *Physcomitrella patens*: A model for tip cell growth and differentiation. *Current Opinion in Plant Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.09.008>.
58. Wan, Y., Tang, K., Zhang, D., Xie, S., Zhu, X., Wang, Z., & Lang, Z. (2015). Transcriptome-wide high-throughput deep m6A-seq reveals unique differential m6A methylation patterns between three organs in Arabidopsis thaliana. *Genome Biology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0839-2>.
59. Wang, P., Doxtader, K. A., & Nam, Y. (2016). Structural Basis for Cooperative Function of Mettl3 and Mettl14 Methyltransferases. *Molecular Cell*, 63(2), 306–317. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.041>.
60. Wang, R., & Estelle, M. (2014). Diversity and specificity: Auxin perception and signaling through the TIR1/AFB pathway. *Current Opinion in Plant Biology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.06.006>.
61. Wang, X., Feng, J., Xue, Y., Guan, Z., Zhang, D., Liu, Z., ... Yin, P. (2016). Structural basis of N6-adenosine methylation by the METTL3-METTL14 complex. *Nature*, 534(7608), 575–578. <https://doi.org/10.1038/nature18298>.
62. Wang, X., Zhao, B. S., Roundtree, I. A., Lu, Z., Han, D., Ma, H., ... He, C. (2015). N6-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency. *Cell*, 161(6), 1388–1399. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.014>.
63. Wen, J., Lv, R., Ma, H., Shen, H., He, C., Wang, J., ... Diao, J. (2018). Zc3h13 Regulates Nuclear RNA m 6 A Methylation and Mouse Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Molecular Cell*, 69(6), 1028–1038.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.02.015>.

64. Yue, Y., Liu, J., & He, C. (2015). RNA N6-methyladenosine methylation in post-transcriptional gene expression regulation. *Genes and Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/gad.262766.115>.
65. Zheng, G., Dahl, J. A., Niu, Y., Fedorcsak, P., Huang, C. M., Li, C. J., ... He, C. (2013). ALKBH5 Is a Mammalian RNA Demethylase that Impacts RNA Metabolism and Mouse Fertility. *Molecular Cell*, 49(1), 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.015>.
66. Zhong, S., Li, H., Bodi, Z., Button, J., Vespa, L., Herzog, M., & Fray, R. G. (2008). MTA Is an Arabidopsis Messenger RNA Adenosine Methylase and Interacts with a Homolog of a Sex-Specific Splicing Factor. *THE PLANT CELL ONLINE*, 20(5), 1278–1288. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.058883>.
67. Zhou, J., Wan, J., Gao, X., Zhang, X., Jaffrey, S. R., & Qian, S. B. (2015). Dynamic m6 A mRNA methylation directs translational control of heat shock response. *Nature*, 526(7574), 591–594. <https://doi.org/10.1038/nature15377>.
68. Thelander, M., Landberg, K., & Sundberg, E. (2018, January 1). Auxin-mediated developmental control in the moss *Physcomitrella patens*. *Journal of Experimental Botany*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx255>
69. Oono, Y., Ooura, C., Rahman, A., Aspúria, E. T., Hayashi, K. I., Tanaka, A., & Uchimiya, H. (2003). p-Chlorophenoxyisobutyric Acid Impairs Auxin Response in Arabidopsis Root. *Plant Physiology*, 133(3), 1135–1147. <https://doi.org/10.1104/pp.103.027847>
70. Marchant, A. (1999). AUX1 regulates root gravitropism in Arabidopsis by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *The EMBO Journal*, 18(8), 2066–2073. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.8.2066>.
71. Khurana, P., Vishnudasan, D., & Chhibbar, A. K. (2008, October). Genetic approaches towards overcoming water deficit in plants - Special emphasis on LEAs. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. <https://doi.org/10.1007/s12298-008-0026-y>.
72. Viaene, T., Landberg, K., Thelander, M., Medvecka, E., Pederson, E., Feraru, E., ... Friml, J. (2014). Directional auxin transport mechanisms in early diverging land plants. *Current Biology*, 24(23), 2786–2791. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.09.056>
73. Shu Yao Leong, Tomoya Edzuka, Gohta Goshima, Moé Yamada (2019). “Novel roles of Kinesin-13 and Kinesin-8 during cell growth and division in the moss *Physcomitrella patens*”. *bioRxiv the preprint server for biology*.
74. Nakahara, J., Takechi, K., Myouga, F., Moriyama, Y., Sato, H., Takio, S., & Takano, H. (2015). Bending of protonema cells in a plastid glycolate/glycerate transporter knockout line of *physcomitrella patens*. *PLoS ONE*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118804>.
75. Fankhauser, C., & Casal, J. J. (2004, September). Phenotypic characterization of a photomorphogenic mutant. *Plant Journal*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02148.x>
76. Hohm T, Preuten T, Fankhauser C. Phototropism: translating light into directional growth. *Am J Bot*. 2013;100(1):47-59. doi:10.3732/ajb.1200299
77. Jenkins GI, Courtice GRM, Cove DJ. 1986. Gravitropic responses of wild-type and mutant strains of the moss *Physcomitrella patens*. *Plant, Cell & Environment* 9: 637–644.
78. Manrique, E. 2003. Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz. *Ecosistemas* 2003/1 (URL: <http://www.aet.org/ecosistemas/031/informe4.htm>)
79. Nelson N, Yocum C. F. 2006. [Structure and function of photosystems I and II](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105350). *Annual Review of Plant Biology* (10.1146/annurev.arplant.57.032905.105350)
80. Cove DJ, Schild A, Ashton NW, Hartmann E. Genetic and physiological studies of the effect of light on the development of the moss, *Physcomitrella patens*. *Photochem Photobiol*. 1978;27:249–254. doi:10.1111/php.1978.27.issue-2.
81. Jenkins GI, Cove DJ. Phototropism and polarotropism of primary chloronemata of the moss *Physcomitrella patens*: responses of the wild-type. *Planta*. 1983;158:357–364. doi:10.1007/BF00397338.

82. Stowe-Evans, E.L., Luesse, D.R. and Liscum, E. (2001) The enhancement of phototropin-induced phototropic curvature in Arabidopsis occurs via a photoreversible phytochrome A- dependent modulation of auxin responsiveness. *Plant Physiol.* 126, 826–834
83. Yangbin Gao, Yi Zhang, Da Zhang, Xinhua Dai, Mark Estelle, Yunde Zhao. ABP1 is not required for Arabidopsis development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* Feb 2015, 112 (7) 2275-2280; DOI: 10.1073/pnas.1500365112.
84. Žádníková P, Smet D, Zhu Q, Van Der Straeten D and Benková E (2015). Strategies of seedlings to overcome their sessile nature: auxin in mobility control. *Front. Plant Sci.* 6:218. doi: 10.3389/fpls.2015.00218
85. Effendi, Y., Rietz, S., Fischer, U., & Scherer, G. F. (2011). The heterozygous abp1/ABP1 insertional mutant has defects in functions requiring polar auxin transport and in regulation of early auxin-regulated genes. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 65(2), 282–294. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04420.x>
86. Manrique Reol, Esteban. Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz para la fotosíntesis Ecosistemas, vol. XII, núm. 1, enero-abril, 2003, pp. 1-11 Asociación Española de Ecología Terrestre Alicante, España.
87. Possart, A., Xu, T., Paik, I., Hanke, S., Keim, S., Hermann, H. M., Wolf, L., Hiß, M., Becker, C., Huq, E., Rensing, S. A., & Hiltbrunner, A. (2017). Characterization of Phytochrome Interacting Factors from the Moss *Physcomitrella patens* Illustrates Conservation of Phytochrome Signaling Modules in Land Plants. *The Plant cell*, 29(2), 310–330. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00388>
88. Lariguet, P., Schepens, I., Hodgson, D., Pedmale, U. V., Trevisan, M., Kami, C., Carbonnel, M., Alonso J. M., Ecker J. R., Liscum E., & Fankhauser C. (2006). PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 1 is a phototropin 1 binding protein required for phototropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103 (26) 10134-10139. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603799103>
89. Mittmann, F., Brucker, G., Zeidler, M., Repp, A., Abts, T., Hartmann E., & Hughes, J. (2004). Targeted knockout in Physcomitrella reveals direct actions of phytochrome in the cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101 (38) 13939-13944. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403140101>
90. Kadota, A., Sato, Y., & Wada, M. (2000). Intracellular chloroplast photorelocation in the moss Physcomitrella patens is mediated by phytochrome as well as by a blue-light receptor. *Planta*, 210(6), 932–937. <https://doi.org/10.1007/s004250050700>
91. Su, L., Hou, P., Song, M., Zheng, X., Guo, L., Xiao, Y., Yan, L., Li, W., & Yang, J. (2015). Synergistic and Antagonistic Action of Phytochrome (Phy) A and PhyB during Seedling De-Etiolation in Arabidopsis thaliana. *International journal of molecular sciences*, 16(6), 12199–12212. <https://doi.org/10.3390/ijms160612199>
92. Nagashima, A., Suzuki, G., Uehara, Y., Saji, K., Furukawa, T., Koshiba, T., Sekimoto, M., Fujioka, S., Kuroha, T., Kojima, M., Sakakibara, H., Fujisawa, N., Okada, K., & Sakai, T. (2008). Phytochromes and cryptochromes regulate the differential growth of Arabidopsis hypocotyls in both a PGP19-dependent and a PGP19-independent manner. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 53(3), 516–529. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03358.x>
93. Song, M. F., Zhang, S., Hou, P., Shang, H. Z., Gu, H. K., Li, J. J., Xiao, Y., Guo, L., Su, L., Gao, J. W., & Yang, J. P. (2015). Ectopic expression of a phytochrome B gene from Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) in Arabidopsis thaliana promotes seedling de-etiolation, dwarfing in mature plants, and delayed flowering. *Plant molecular biology*, 87(6), 633–643. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0302-5>
94. Chen, Y. R., Su, Y. S., & Tu, S. L. (2012). Distinct phytochrome actions in nonvascular plants revealed by targeted inactivation of phytybilin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(21), 8310–8315. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201744109>

95. Uenaka, H., Wada, M., & Kadota, A. (2005). Four distinct photoreceptors contribute to light-induced side branch formation in the moss *Physcomitrella patens*. *Planta*, 222(4), 623–631. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0009-y>
96. Kami, C., Allenbach, L., Zourelidou, M., Ljung, K., Schütz, F., Isono, E., Watahiki, M. K., Yamamoto, K. T., Schwechheimer, C., & Fankhauser, C. (2014). Reduced phototropism in pks mutants may be due to altered auxin-regulated gene expression or reduced lateral auxin transport. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 77(3), 393–403. <https://doi.org/10.1111/tpj.12395>
97. Kasahara, M., Kagawa, T., Sato, Y., Kiyosue, T., & Wada, M. (2004). Phototropins mediate blue and red light-induced chloroplast movements in *Physcomitrella patens*. *Plant physiology*, 135(3), 1388–1397. <https://doi.org/10.1104/pp.104.042705>
98. Bierfreund, N. M., Tintelnot, S., Reski, R., & Decker, E. L. (2004). Loss of GH3 function does not affect phytochrome-mediated development in a moss, *Physcomitrella patens*. *Journal of plant physiology*, 161(7), 823–835. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2003.12.010>
99. Schepens, I., Boccalandro, H. E., Kami, C., Casal, J. J., & Fankhauser, C. (2008). PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE4 modulates phytochrome-mediated control of hypocotyl growth orientation. *Plant physiology*, 147(2), 661–671. <https://doi.org/10.1104/pp.108.118166>
100. Lariguet, P., Schepens, I., Hodgson, D., Pedmale, U. V., Trevisan, M., Kami, C., de Carbonnel, M., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Liscum, E., & Fankhauser, C. (2006). PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 1 is a phototropin 1 binding protein required for phototropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(26), 10134–10139. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603799103>
101. Su, L., Hou, P., Song, M., Zheng, X., Guo, L., Xiao, Y., Yan, L., Li, W., & Yang, J. (2015). Synergistic and Antagonistic Action of Phytochrome (Phy) A and PhyB during Seedling De-Etiolation in *Arabidopsis thaliana*. *International journal of molecular sciences*, 16(6), 12199–12212. <https://doi.org/10.3390/ijms160612199>
102. Yamawaki, S., Yamashino, T., Nakanishi, H., & Mizuno, T. (2011). Functional characterization of HY5 homolog genes involved in early light-signaling in *Physcomitrella patens*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 75(8), 1533–1539. <https://doi.org/10.1271/bbb.110219>
103. Ermert, A. L., Stahl, F., Gans, T., & Hughes, J. (2019). Analysis of *Physcomitrella* Phytochrome Mutants via Phototropism and Polarotropism. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2026, 225–236. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9612-4_19
104. Ermert, A. L., Nogué, F., Stahl, F., Gans, T., & Hughes, J. (2019). CRISPR/Cas9-Mediated Knockout of *Physcomitrella patens* Phytochromes. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2026, 237–263. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9612-4_20
105. Chen, Y. R., Su, Y. S., & Tu, S. L. (2012). Distinct phytochrome actions in nonvascular plants revealed by targeted inactivation of phytyl biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(21), 8310–8315. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201744109>
106. Suetsugu, N., & Wada, M. (2007). Phytochrome-dependent photomovement responses mediated by phototropin family proteins in cryptogam plants. *Photochemistry and photobiology*, 83(1), 87–93. <https://doi.org/10.1562/2006-02-27-IR-817>
107. Uenaka, H., Wada, M., & Kadota, A. (2005). Four distinct photoreceptors contribute to light-induced side branch formation in the moss *Physcomitrella patens*. *Planta*, 222(4), 623–631. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0009-y>
108. Suetsugu, N., Mittmann, F., Wagner, G., Hughes, J., & Wada, M. (2005). A chimeric photoreceptor gene, NEOCHROME, has arisen twice during plant evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(38), 13705–13709. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504734102>

109. Kasahara, M., Kagawa, T., Sato, Y., Kiyosue, T., & Wada, M. (2004). Phototropins mediate blue and red light-induced chloroplast movements in *Physcomitrella patens*. *Plant physiology*, 135(3), 1388–1397. <https://doi.org/10.1104/pp.104.042705>
110. Su, L., Hou, P., Song, M., Zheng, X., Guo, L., Xiao, Y., Yan, L., Li, W., & Yang, J. (2015). Synergistic and Antagonistic Action of Phytochrome (Phy) A and PhyB during Seedling De-Etiolation in *Arabidopsis thaliana*. *International journal of molecular sciences*, 16(6), 12199–12212. <https://doi.org/10.3390/ijms160612199>
111. Briggs, W. R., & Christie, J. M. (2002). Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends in plant science*, 7(5), 204–210. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(02\)02245-8](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02245-8)
112. Josse, E. M., & Halliday, K. J. (2008). Skotomorphogenesis: the dark side of light signalling. *Current biology : CB*, 18(24), R1144–R1146. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.10.034>
113. Zhao, Q. P., Wang, X. N., Li, N. N., Zhu, Z. Y., Mu, S. C., Zhao, X., & Zhang, X. (2018). Functional Analysis of MAX2 in Phototropins-Mediated Cotyledon Flattening in *Arabidopsis*. *Frontiers in plant science*, 9, 1507. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01507>
114. Li, F. W., Rothfels, C. J., Melkonian, M., Villarreal, J. C., Stevenson, D. W., Graham, S. W., Wong, G. K., Mathews, S., & Pryer, K. M. (2015). The origin and evolution of phototropins. *Frontiers in plant science*, 6, 637. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00637>
115. Wang, Q., Zuo, Z., Wang, X., Liu, Q., Gu, L., Oka, Y., & Lin, C. (2018). Beyond the photocycle-how cryptochromes regulate photoresponses in plants?. *Current opinion in plant biology*, 45(Pt A), 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.05.014>
116. Parna Chattaraj (2003). *GRAVITROPISM IN PHYSCOMITRELLA PATENS : A MICROTUBULE DEPENDENT PROCESS* (tesis de maestría). Faculty of North Carolina State University
117. Allen NS, Chattaraj P, Collings D, Johannes E. Gravisensing: ionic responses, cytoskeleton and amyloplast behavior. *Adv Space Res.* 2003;32(8):1631-7. doi: 10.1016/S0273-1177(03)90404-2. PMID: 15015476.
118. Khandelwal A, Cho SH, Marella H, Sakata Y, Perroud PF, Pan A, Quatrano RS. Role of ABA and ABI3 in desiccation tolerance. *Science.* 2010 Jan 29;327(5965):546. doi: 10.1126/science.1183672. PMID: 20110497.
119. Raghavendra AS, Gonugunta VK, Christmann A, Grill E. ABA perception and signalling. *Trends Plant Sci.* 2010 Jul;15(7):395-401. doi: 10.1016/j.tplants.2010.04.006. Epub 2010 May 20. PMID: 20493758.
120. Arif MA, Hiss M, Tomek M, Busch H, Meyberg R, Tintelnot S, Reski R, Rensing SA, Frank W. ABA-Induced Vegetative Diaspore Formation in *Physcomitrella patens*. *Front Plant Sci.* 2019 Mar 19;10:315. doi: 10.3389/fpls.2019.00315. PMID: 30941155; PMCID: PMC6433873.
121. Wang R, Estelle M. Diversity and specificity: auxin perception and signaling through the TIR1/AFB pathway. *Curr Opin Plant Biol.* 2014 Oct;21:51-58. doi: 10.1016/j.pbi.2014.06.006. Epub 2014 Jul 15. PMID: 25032902; PMCID: PMC4294414.
122. Ludwig-Müller J, Jülke S, Bierfreund NM, Decker EL, Reski R. Moss (*Physcomitrella patens*) GH3 proteins act in auxin homeostasis. *New Phytol.* 2009 Jan;181(2):323-338. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02677.x. PMID: 19032442.
123. Thelander, M., Landberg, K., & Sundberg, E. (2018). Auxin-mediated developmental control in the moss *Physcomitrella patens*. *Journal of experimental botany*, 69(2), 277–290. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx255>.
124. Roberts, A. W., Dimos, C. S., Budziszek, M. J., Jr, Goss, C. A., Lai, V., & Chaves, A. M. (2020). Knocking Out the Wall: Revised Protocols for Gene Targeting in *Physcomitrella patens*. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2149, 125–144. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0621-6_8.
125. Bennett, T. A., Liu, M. M., Aoyama, T., Bierfreund, N. M., Braun, M., Coudert, Y., Dennis, R. J., O'Connor, D., Wang, X. Y., White, C. D., Decker, E. L., Reski, R., & Harrison, C. J. (2014). Plasma membrane-targeted PIN proteins drive shoot development in a moss. *Current biology : CB*, 24(23), 2776–2785. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.09.054>

126. Sack, F. D., Schwuchow, J. M., Wagner, T., & Kern, V. (2001). Gravity sensing in moss protonemata. *Advances in space research : the official journal of the Committee on Space Research (COSPAR)*, 27(5), 871–876. [https://doi.org/10.1016/s0273-1177\(01\)00151-x](https://doi.org/10.1016/s0273-1177(01)00151-x)
127. Schwuchow, J., Michalke, W., & Hertel, R. (2001). An Auxin Transport Inhibitor Interferes With Unicellular Gravitropism in Protonemata of the Moss *Ceratodon purpureus*. *Plant Biol.* 3 357-363.
128. Allen, N. S., Chattaraj, P., Collings, D., & Johannes, E. (2003). Gravisensing: ionic responses, cytoskeleton and amyoplast behavior. *Advances in space research : the official journal of the Committee on Space Research (COSPAR)*, 32(8), 1631–1637. [https://doi.org/10.1016/S0273-1177\(03\)90404-2](https://doi.org/10.1016/S0273-1177(03)90404-2)
129. Wang, Y., & M Folta, K. (2014). Phototropin 1 and dim-blue light modulate the red light de-etiolation response. *Plant signaling & behavior*, 9(11), e976158. <https://doi.org/10.4161/15592324.2014.976158>
130. Bao, L., Yamamoto, K. T., & Fujita, T. (2015). Phototropism in gametophytic shoots of the moss *Physcomitrella patens*. *Plant signaling & behavior*, 10(3), e1010900. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1010900>
131. Schaefer, D. G., & Zrýd, J. P. (2001). The moss *Physcomitrella patens*, now and then. *Plant physiology*, 127(4), 1430–1438.
132. Yoshida, T., Fujita, Y., Maruyama, K., Mogami, J., Todaka, D., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2015). Four *Arabidopsis* AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in abscisic acid signalling in response to osmotic stress. *Plant, cell & environment*, 38(1), 35–49. <https://doi.org/10.1111/pce.12351>
133. Li, P., Yang, H., Liu, G., Ma, W., Li, C., Huo, H., He, J., & Liu, L. (2018). *PpSARK* Regulates Moss Senescence and Salt Tolerance through ABA Related Pathway. *International journal of molecular sciences*, 19(9), 2609. <https://doi.org/10.3390/ijms19092609>
134. Timmerhaus, G., Hanke, S. T., Buchta, K., & Rensing, S. A. (2011). Prediction and validation of promoters involved in the abscisic acid response in *Physcomitrella patens*. *Molecular plant*, 4(4), 713–729. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr009>
135. Richardt, S., Timmerhaus, G., Lang, D., Qudeimat, E., Corrêa, L. G., Reski, R., Rensing, S. A., & Frank, W. (2010). Microarray analysis of the moss *Physcomitrella patens* reveals evolutionarily conserved transcriptional regulation of salt stress and abscisic acid signalling. *Plant molecular biology*, 72(1-2), 27–45. <https://doi.org/10.1007/s11103-009-9550-6>
136. Anderson, S. J., Kramer, M. C., Gosai, S. J., Yu, X., Vandivier, L. E., Nelson, A., Anderson, Z. D., Beilstein, M. A., Fray, R. G., Lyons, E., & Gregory, B. D. (2018). N⁶-Methyladenosine Inhibits Local Ribonucleolytic Cleavage to Stabilize mRNAs in *Arabidopsis*. *Cell reports*, 25(5), 1146–1157.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.020>
137. Shinde, S., Nurul Islam, M., & Ng, C. K. (2012). Dehydration stress-induced oscillations in LEA protein transcripts involves abscisic acid in the moss, *Physcomitrella patens*. *The New phytologist*, 195(2), 321–328. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04193.x>
138. Bhat, S. S., Bielewicz, D., Gulanicz, T., Bodi, Z., Yu, X., Anderson, S. J., Szewc, L., Bajczyk, M., Dolata, J., Grzelak, N., Smolinski, D. J., Gregory, B. D., Fray, R. G., Jarmolowski, A., & Szweykowska-Kulinska, Z. (2020). mRNA adenosine methylase (MTA) deposits m⁶A on pri-miRNAs to modulate miRNA biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(35), 21785–21795. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003733117>
139. Du, K., Zhang, L., Lee, T., & Sun, T. (2019). m⁶A RNA Methylation Controls Neural Development and Is Involved in Human Diseases. *Molecular neurobiology*, 56(3), 1596–1606. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1138-1>

