

# Determinació de l'expressió diferencial de gens al llarg del creixement estacional del suro

Ana Sánchez Peláez, [ana\\_sape@hotmail.com](mailto:ana_sape@hotmail.com)

Grau en Biologia, Curs acadèmic 2014-2015

Tutora: Marissa Molinas, Cotutor: Pau Boher

Facultat de Ciències, Universitat de Girona





## **Agraïments**

A Pau Boher, cotutor d'aquest treball de fi de grau, per la seva infatigable tasca d'orientació, suport i confiança. Ha estat un pilar clau en el desenvolupament d'aquest treball, trobant en ell les respostes a les meves preguntes. Sabràs perfectament que t'estic immensament agraïda.

A la Dra. Marissa Molinas, tutora del treball, pels seus ànims i dedicació a la recta final.

A la meva família. Als meus pares, Isaías i Ana, pel seu suport incondicional, estímul constant i afecte inqüestionable. Al meu germà Isaías, per la seva confiança desmesurada cap a la meva persona i els meus èxits acadèmics. Als meus avis, Antonio i Ana, sent per a mi un estímul i suport moral immesurable.

Especialment a la meva parella Juan, que ha mostrat una paciència infinita en els moments de càrrega de treball universitari en què he flaquejat, mostrant sempre el millor dels seus somriures i la seva disposició a tendir-me sempre una mà.

## Índex de figures

<b>Figura 1.</b> Secció transversal de branca de surera i d'alzina. ....	1
<b>Figura 2.</b> Recta patró i corba de dissociació dels encebadors. ....	12
<b>Figura 3.</b> Expressió diferencial de gens candidats en teixits secundaris: fel·lema i xilema .....	15
<b>Figura 4.</b> Expressió diferencial de gens candidats en fel·lema de surera i d'alzina .....	17
<b>Figura 5.</b> Perfil d'expressió relativa de gens candidats al llarg del creixement estacional del suro .....	20
<b>Figura 6.</b> Representació de la variabilitat biològica de la expressió de gens candidats en les mostres del creixement estacional del suro .....	21
<b>Figura 7.</b> Anàlisi de components principals de la expressió de gens candidats al llarg del creixement estacional del suro .....	24
<b>Figura 8.</b> Gràfica de les mitjanes de les puntuacions factorials dels dies de mostreig en funció de les dues components extrets .....	24

## Índex de taules

<b>Taula 1.</b> Funció dels gens seleccionats per a l'estudi.....	2
<b>Taula 2.</b> Encebadors dissenyats per l'anàlisi de qPCR. ....	11
<b>Taula 3.</b> Valors Ct ( <i>cycle threshold</i> ) de les rectes patró dels encebadors.....	12
<b>Taula 4.</b> Pendent, eficiència i regressió lineal de les rectes patrons dels encebadors .....	14
<b>Taula 5.</b> Comprovació dels supòsits de normalitat i homogeneïtat de variàncies per les mostres de fel·lema i xilema .....	16
<b>Taula 6.</b> Anàlisi estadístic de les diferències d'expressió relativa entre fel·lema i xilema .....	16
<b>Taula 7.</b> Comprovació dels supòsits de normalitat i homogeneïtat de variàncies per les mostres de surera i alzina .....	18
<b>Taula 8.</b> Anàlisi estadístic de les diferències d'expressió relativa entre surera i alzina.....	18
<b>Taula 9.</b> Matriu de correlació de Pearson de la expressió dels gens candidats durant el creixement estacional del fel·lema del suro .....	23

## Índex

Resum.....	IV
Resumen.....	V
Summary .....	VI
1. Introducció .....	1
2. Objectives.....	5
3. Metodologia .....	6
3.1. Les mostres de l'estudi.....	6
3.2. Disseny i preparació de <i>Primers</i> .....	6
3.3. Quantificació de l'RNA.....	7
3.4. Síntesi de cDNA .....	7
3.5. PCR quantitativa (qPCR) .....	8
3.6. Realització de les rectes patrons dels <i>primers</i> dissenyats.....	9
3.7. Quantificació relativa de les mostres per qPCR .....	9
4. Resultats .....	11
4.1. Disseny de <i>primers</i> , càlcul de les eficiències i validació de la seva especificat .....	11
4.2. Expressió diferencial d'alguns gens en mostres de fel-lema i xilema.....	15
4.3. Expressió diferencial dels gens en mostres de surera i alzina.....	17
4.4. Determinació del patró estacional de gens candidats .....	19
5. Discussió.....	25
6. Conclusions.....	29
7. Bibliografia .....	30

## Resum

El treball que es presenta està relacionat amb la formació del suro. L'objectiu és determinar mitjançant la PCR quantitativa (qPCR) el nivell d'expressió d'un conjunt de gens candidats per a comprendre millor la possible funció d'aquests gens i la base molecular de la formació del suro.

Per aquests gens s'ha analitzat la seva especificitat a fel·lema a través de la comparació entre un teixit secundari productor de suberina (fel·lema/suro) i un teixit secundari no productor de suberina (xilema/fusta), en mostres de surera obtingudes al període de màxim creixement del suro; la seva expressió diferencial entre el fel·lema de l'alzina surera (*Quercus suber*) i el de l'alzina (*Quercus ilex*) per entendre la rellevància d'aquests gens seleccionats en el procés de formació del suro ja que l'alzina surera produeix moltes més capes de cèl·lules de fel·lema per estació de creixement que l'alzina; i el patró d'expressió d'aquests gens durant el creixement estacional del suro en mostres de fel·lema de surera obtingudes al llarg del període de creixement, per tal d'entendre a través de la variació estacional de la seva expressió com estan involucrats en la formació del suro i comparar amb el patró d'expressió d'altres gens prèviament estudiats.

Per a alguns dels gens candidats seleccionats s'ha validat la seva especificitat en teixits suberificats (fel·lema); s'ha comprovat que els gens candidats del fel·lema en conjunt s'expressen més a suro, i amb això s'ha pogut validar els resultats de l'estudi per seqüenciació massiva de la comparació transcriptòmica de surera i alzina; i s'ha pogut determinar el patró estacional per al conjunt dels gens candidats. Els resultats del patró estacional han permès veure que els gens estructurals relacionats amb la síntesi de lípids i deposició de suberina segueixen un patró estacional típic dels gens de suberina, que els receptors hormonals són més actius a la fase de màxim creixement del suro, i pel que fa a als gens reguladors, RIK possiblement és un regulador negatiu del procés de formació del suro, WOX4 podria tenir un paper important relacionat amb el manteniment indiferenciat del fel·logen a l'inici de l'estació de creixement durant el mes l'abril, mentre que AP1 és més actiu al període de màxima formació i desenvolupament del suro.

## Resumen

El trabajo que se presenta está relacionado con la formación del corcho. El objetivo es determinar mediante PCR cuantitativa (qPCR) el nivel de expresión de un conjunto de genes candidatos para comprender mejor la posible función de estos genes y la base molecular de la formación del corcho.

Para estos genes se ha analizado su especificidad a felema a través de la comparación entre un tejido secundario productor de suberina (felema/corcho) y un tejido secundario no productor de suberina (xilema/madera), en muestras de alcornoque obtenidas en el periodo de máximo crecimiento del corcho; su expresión diferencial entre el felema del alcornoque (*Quercus suber*) y el de la encina (*Quercus ilex*) para entender la relevancia de estos genes seleccionados en el proceso de formación del corcho ya que el alcornoque produce muchas más capas de células de felema por estación de crecimiento que la encina; y el patrón de expresión de estos genes durante el crecimiento estacional del corcho en muestras de felema de alcornoque obtenidas a lo largo del período de crecimiento, para entender a través de la variación estacional de su expresión como están involucrados en la formación del corcho y comparar con el patrón de expresión de otros genes previamente estudiados.

Para algunos de los genes candidatos seleccionados se ha validado su especificidad en tejidos suberificados (felema); se ha comprobado que los genes candidatos del felema en conjunto se expresan más en corcho, y con ello se ha podido validar los resultados del estudio por secuenciación masiva de la comparación transcriptómica de alcornoque y encina; y se ha podido determinar el patrón estacional para el conjunto de los genes candidatos. Los resultados del patrón estacional han permitido ver que los genes estructurales relacionados con la síntesis de lípidos y deposición de suberina siguen un patrón estacional típico de los genes de suberina, que los receptores hormonales son más activos en la fase de máximo crecimiento del corcho, y a lo que respecta a los genes reguladores, RIK posiblemente es un regulador negativo del proceso de formación del corcho, WOX4 podría tener un papel importante relacionado con el mantenimiento indiferenciado del felógeno al inicio de la estación de crecimiento durante el mes de abril, mientras que AP1 es más activo en el período de máxima formación y desarrollo del corcho.

## Summary

The presented thesis is related to the cork formation. The objective is to determine by quantitative PCR (qPCR) the expression level of a group of candidate genes for a better understanding about the possible role of these genes and the molecular basis for the cork formation.

For these genes has been analyzed its specificity phellem through the comparison between secondary tissue producer suberin (phellem/cork) and non-secondary tissue producer suberin (xylem/wood) in samples of cork oak obtained on the period of maximum growth of cork; the differential expression between phellem of cork oak (*Quercus suber*) and holm oak (*Quercus ilex*), to understand the relevance of these selected genes in the formation process since the cork oak produces many more layers of cells of phellem for growth station than the holm oak; and the expression pattern of these genes during seasonal growth of cork in phellem samples obtained along the period of growth, to understand through the seasonal variation in their expression as they are involved in the formation of cork and comparing the expression pattern of other genes previously studied.

For some of the candidate genes selected has been validated an specificity in suberized tissues (phellem); it checked that the candidate genes of phellem together are expressed although more in cork oak, and thus validated the results of the study by massive sequencing of the transcriptome comparison of cork oak and holm oak; and the seasonal pattern has been determined for all the candidate genes. The results of the seasonal pattern allowed us to see that the structural genes related to lipid synthesis and deposition of suberin, are following a seasonal pattern typical of suberin genes and that hormone receptors are more active phase of maximum growth of cork; and about the regulatory genes, RIK possibly is a negative regulator of the process of cork formation, WOX4 could play an important role related to the maintenance of undifferentiated cork cambium in to the start of the growing season during in the april, and AP1 is more active on the maximum formation and development of cork period.



## 1. Introducció

A les plantes amb creixement secundari l'epidermis es trenca i és substituïda per un teixit suberificat, el fel·lema o súber. Aquest és un teixit amb funció barrera en front la deshidratació i patògens, pel fet d'estar impregnat amb suberina. La suberina és un polièster alifàtic format per àcids grassos (ceres) o derivats esterificats amb glicerol, i amb components aromàtics.

El creixement secundari té origen en els meristemes secundaris càmrium i fel·logen, dues capes de cèl·lules mare on es donen processos de divisió i diferenciació. El càmrium vascular dóna lloc al xilema i floema secundaris. El càmrium suberós (fel·logen) creix formant fel·lema cap a l'exterior i fel·loderma cap a l'interior. El conjunt de fel·logen, fel·loderma i fel·lema constitueix la periderma.

L'alzina surera s'utilitza de model per a l'estudi del fel·lema, ja que a diferència d'altres plantes el seu fel·lema presenta un creixement més intens. Per aquest treball s'han analitzat mostres de surera (*Quercus suber*) i d'alzina (*Quercus ilex*), dues plantes filogenèticament properes i que conviuen al mateix ambient però únicament la surera forma suro (**Figura 1**).

La surera es caracteritza perquè el seu fel·lema és circumferencial i té un creixement intens i els anells de creixement s'acumulen formant la típica escorça suberosa. Les seves cèl·lules contenen molta quantitat de suberina i menys aromàtics, fet que confereix elasticitat al suro. L'alzina, en canvi, té un fel·lema no circumferencial i forma una escorça amb ritidoma. A més, les cèl·lules contenen més proporció de lignina, conferint en el seu conjunt més rigidesa a l'escorça.



**Figura 1.** Secció transversal de branca de surera i d'alzina.

### Antecedents.

El grup de recerca del Suro de la Universitat de Girona està especialment interessat en la biologia de *Quercus suber*. Existeixen antecedents en aquest mateix grup per a identificar gens candidats que intervenen en la formació del suro.

Es va realitzar una llibreria SSH (*Suppression Subtractive Hybridization*) de ESTs (*Expressed Sequence Tag*) enriquida en gens preferentment expressats en suro i es va comparar la seva expressió en els teixits secundaris productors de suberina (suro/fel·lema) i no productors de suberina (llenç/xilema), per tal de recuperar els gens candidats més específics del suro (Soler et al., 2007). Es va obtenir un llistat de candidats per a la síntesi, transport i polimerització de monòmers de suberina, i alguns gens reguladors del suro possiblement implicats en la diferenciació del suro (Soler et al., 2007). Per a alguns d'aquests gens ja s'han caracteritzat i se'n coneix la seva funció (Serra et al., 2009, 2010).

Més recentment per tal d'augmentar el nombre de candidats amb gens rellevants pel fel·lema es va realitzar l'anàlisi del transcriptoma (RNA-seq) comparatiu de *Quercus suber* i *Quercus ilex* amb la plataforma 454 de seqüenciació massiva. A partir del RNAm extret del RNA total es va obtenir una llibreria de cDNA de surera i una altra d'alzina. La informació de bases de dades de gens ortòlegs en *Arabidopsis* va permetre identificar la funció d'aquests gens i l'obtenció d'una llista de gens candidats diferencialment expressats, possiblement implicats en la formació de la periderma.

Per tal d'aprofundir en la caracterització del fel·lema a nivell molecular, per aquest treball s'ha triat un conjunt de 10 gens candidats (**Taula 1**), a efecte d'estudiar comparativament la seva expressió al fel·lema per qPCR. El conjunt engloba dos gens estructurals de la síntesi de lípids (PKP1 i PDH-E1) bàsics pel creixement i la síntesi de suberina; un de deposició de suberina (CASPLB2); tres receptors d'hormones (ETR2, GID1B i BRI1); i quatre reguladors de meristema (WOX4, RIK, AP1 i FT).

**Taula 1.** Anotació funcional dels gens seleccionats per a l'estudi. S'indica el gen ortòleg en la planta model *Arabidopsis thaliana*, categoria funcional i l'identificador d'*Arabidopsis* (disponible al navegador (<https://www.arabidopsis.org/>)). S'especifica per a cada gen els experiments realitzats.

GEN	FUNCIÓ	ID ARABIDOPSIS	ESTUDI		
			fel·lema/xilema	suro/alzina	temporal
PKP1	Síntesi de lípids	AT3G22960	X	X	
PDH-E1 ALPHA	Síntesi de lípids	AT1G01090	X	X	X
CASPLB2	Suberina	AT4G20390	X		X
ETR2	Receptor hormonal	AT3G23150			X
GID1B	Receptor hormonal	AT3G63010			X
BRI1	Receptor hormonal	AT4G39400		X	X
WOX4	Regulació	AT1G46480		X	X
RIK	Regulació	AT3G29390		X	X
AP1	Regulació	AT1G69120		X	X
FT	Regulació	AT1G65480			

## Breu descripció dels gens candidats.

### PLASTIDIAL PYRUVATE KINASE (PKP1):

Les piruvat quinases (PK) són enzims que catalitzen la síntesi de piruvat i ATP a partir de fosfoenolpiruvat durant la glicòlisis (Baud et al., 2007). El piruvat i l'ATP s'utilitzen en múltiples rutes metabòliques i són bàsics per a la producció d'àcids grassos, ja que són els precursor per a la formació d'acetil-CoA (Baud et al., 2007). En *Arabidopsis* PKP1 és una piruvat kinasa localitzada en els plastids que s'expressa a tots els teixits de la planta però s'indueix de formació significativa durant la maduració de la llavor quan té lloc la síntesis *de novo* d'àcids grassos per l'acumulació de lípids de reserva (Baud et al., 2007).

### PYRUVATE DEHYDROGENASE E1 ALPHA (PDH-E1 ALPHA):

La piruvate deshidrogenase localitzada en els plastidis (PDHC) forma un complex multienzimàtic que catalitza la descarboxilació oxidativa del piruvat per produir acetil-CoA, CO<sub>2</sub>, i NADH (Li-Beisson et al., 2013). La PDHC té tres components: E1, E2 i E3. E1 presenta l'activitat catalítica i és la piruvat deshidrogenasa (PDH), i està integrat per les subunitats E1 $\alpha$  i E1 $\beta$  (Li-Beisson et al., 2013). Aquesta és la via més directa que genera acetil-CoA, necessari per a la producció d'àcids grassos (Li-Beisson et al., 2013).

### CASP-LIKE PROTEIN 1B2 (CASPLB2):

La família de proteïnes transmembrana CASPARIAN STRIP MEMBRANE DOMAIN PROTEINS (CASPs) està relacionada amb la modificació de la paret cel·lular en dominis localitzats en les cèl·lules de l'endodermis de l'arrel i són responsables de la deposició de les anomenades bandes de Caspar. Recentment s'han identificat la família de CASP-like proteïnes que tenen característiques semblants a les CASPs però amb la diferència que s'expressen de forma específica en diversos teixits de la planta (Roppolo et al., 2014)

### ETHYLENE RESPONSE 2 (ETR2):

L'etilè estimula l'activitat del càmbium vascular i la formació de xilema secundari (Sorice et al., 2013; Ye i Zhong, 2015) a través del manteniment del meristema i/o la diferenciació en cèl·lules de xilema (Milhinhos i Miguel, 2013). La biosíntesi d'etilè s'activa en resposta a moltes senyals ambientals, i augmenta durant la formació del xilema secundari (Ursache et al., 2013; Sorice et al., 2013).

GA INSENSITIVE DWARF1B (GID1B):

Les gibberel·lines (GAs) estimulen la divisió cel·lular al càmbium i per això són importants per a la formació del xilema secundari (Milhinhos i Miguel, 2013; Ursache et al., 2013;). Les GAs també estimulen el transport d'auxina, una hormona amb efecte positiu en l'activitat del càmbium (Milhinhos i Miguel, 2013).

BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 (BRI1):

Els Brassinoesteroides (BRs) intervenen en la regulació de gens implicats en la formació del xilema (Sorce et al., 2013), i podrien induir la diferenciació del xilema (Ye i Zhong, 2015).

WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN 4 (WOX4):

WOX és una família de gens que tenen la funció d'organitzar diverses poblacions de cèl·lules inicials durant el desenvolupament de la planta (Ji et al., 2010). El meristema té cèl·lules mare multipotents que es divideixen i produeixen cèl·lules descendents, les quals promouen el manteniment del meristema i el creixement vegetal amb la diferenciació dels teixits vegetatius (Ohmori et al., 2013). La funció del factor de transcripció WOX4 és promoure el manteniment i/o l'activitat de les cèl·lules inicials del procàmbium i càmbium vascular (Ji et al., 2010; Hirakawa et al., 2010; Ohmori et al., 2013; Suer et al., 2011).

RS2-INTERACTING KH PROTEIN (RIK):

L'estat del meristema també depèn de l'acció dels gens *knox* (Timmermans, et al. 2005). L'expressió d'aquests gens promou l'estat indiferenciat del meristema mentre que la seva repressió promou la diferenciació i l'organogènesi de la fulla en el blat (*Zea mays*) i en *Arabidopsis* (Timmermans et al., 2005). RIK és una proteïna reguladora amb un domini d'unió a RNA que interacciona amb el complex proteic que formen AS1, AS2 i HIRA. Aquesta interacció reprimeix l'expressió dels gens *knox* durant l'organogènesi i el desenvolupament foliar (Timmermans et al., 2005).

APETALA 1 (AP1):

AP1 és un gen d'identitat de meristema floral que pertany a la família de factors de transcripció MADS-box. La funció d'aquest factor de transcripció és regular gens implicats en el desenvolupament floral (Leal et al., 2015).

FLOWERING LOCUS T (FT):

FT és un factor de transcripció que promou la floració. Aquest és sintetitzat a les fulles i viatja a meristema apical, on interacciona amb FD, i activa l'expressió de AP1 (Leal et al., 2015).

## 2. Objectives

En aquest treball ens proposem utilitzar la *Real-Time* PCR (PCR a temps real) per contribuir a la caracterització del conjunt de gens seleccionats com a possibles candidats del fel·lema. Primerament es procedirà al disseny i la validació dels primers el càlcul de les seves eficiències i la comprovació de la seva especificitat. Per alguns d'aquests gens s'examinarà la seva expressió diferencial fel·lema/xilema i suro/alzina i per a tots ells s'estudiarà el patró d'expressió temporal al fel·lema de l'alzina surera al llarg del creixement estacional del suro.

Specific objectives:

The main objective of this work is measure the expression level of a set of selected genes by PCR (qPCR) different cork and holm oak tissues to better understand their possible role as phellem candidates.

First, specific primers will be designed for the whole set of gens and their efficiency determined. Then the primers will be used for Real-time PCR determination of the expression level in three experiments:

- \* Measuring the differential expression of some selected genes in samples of phellem and xylem to investigate their tissue specificity.
- \* Measuring the differential expression of some selected genes in samples of phellem of cork oak and holm oak to evaluate their role in cork production in cork oak.
- \* Characterization of the seasonal pattern of expression in cork oak phellem thorough the cork grow season to compare their pattern other known suberin genes.

### 3. Metodologia

#### **3.1. Les mostres de l'estudi**

Les mostres de RNA d'aquest treball van ser obtingudes en treballs anteriors del Laboratori del Suro (Soler et al., 2008; Boher et al., no publicat). Totes les mostres de teixit es van recollir al moment de màxim creixement del fel·lema (juny) excepte les del creixement estacional que es van recollir seqüencialment al llarg del període de creixement estacional (abril-setembre). Les mostres eren congelades en nitrogen líquid en el moment de la seva recol·lecció i emmagatzemades a -80°C fins el moment de l'extracció de l'RNA. L'extracció, purificació i tractament amb DNAasa de l'RNA així com la síntesi del cDNA estan descrites en Soler et al. (2007, 2008). Tot i que el tractament d'una part de les mostres utilitzades per a la quantificació relativa en aquest treball s'havien realitzat anteriorment al laboratori, per un grup de mostres del present estudi va ser necessari tornar fer la quantificació de l'RNA i la síntesi del cDNA.

#### **3.2. Disseny i preparació de *Primers***

Es va obtenir part de la seqüència codificant (CDS) del gens d'interès a la base de dades QuercusSuber2R (disponible al navegador <http://ngspipelines.toulouse.inra.fr:9014/>) a partir de l'identificador del *contig* i es va descarregar la seqüència nucleotídica en format FASTA.

Es va enganxar la seqüència en FASTA del gen al software Primer3 versió 0.4.0 (disponible al navegador <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) i es van obtenir encebadors (*primers*) seguint els paràmetres recomanats següents: Tm de 61-63°C, contingut G+C de 40-60%, mida *primer* de 20-24nt, i mida amplicó de 70-150nt. De les diferents parelles de *primers* obtingudes es va escollir la millor tenint en compte evitar repeticions d'un mateix nucleòtid o parells de nucleòtids (el nombre màxim permès és 4 per ambdós). També que l'extrem 3' no tingui més de 2 residus GC o de 3G/3C en les últimes 5 bases.

Per assajar la qualitat dels *primers* es va utilitzar el software NetPrimer (PREMIER Biosoft) (disponible al navegador <http://www.premierbiosoft.com/NetPrimer/AnalyzePrimer.jsp>). Es va enganxar la seqüència dels *primers forward* i *reverse* a *Sequence #1* i *#2* respectivament.

Utilitzant les condicions per defecte del programa es va controlar que els paràmetres recomanats i  $\Delta G$ , *Haiprin*, *Self dimer*, *Cross dimer* i *3' End stability* fossin correctes.

Per últim, amb la base de dades QuercusSuber2R es va realitzar un BLAST dels *primers* dissenyats contra tots els contigs de la base de dades per tal de comprovar la seva especificitat. Per això es va enganxar la seqüència dels *primers forward* i *reverse* a *Enter query* en format FASTA. Després de fer *Run Blast* es va controlar evitar homologies de  $\geq 15$  nucleòtids dels *primers* amb altres seqüències que no fossin la seqüència diana, és a dir, amb un *Blast Scores*  $\leq 30$ .

Un cop van arribar els *primers* al laboratori, es va preparar un stock dels *primers* dels gens d'interès a concentració 100  $\mu\text{M}$  amb aigua *nuclease-free* comercial (Water Mol Bio grade *nuclease-free* (5 PRIME)). L'alíquota de treball va ser a concentració 10  $\mu\text{M}$ , per tant, es va realitzar una dilució 1/10 amb aquesta aigua.

### 3.3. Quantificació de l'RNA

La quantificació de les concentracions d'àcids nucleics de les mostres en ng/ $\mu\text{L}$  es van determinar utilitzant l'aparell Nanodrop amb el tipus de mostra RNA-40. Nanodrop es fonamenta en un principi d'espectrofotometria. Les relacions d'absorbància 260/280 i 260/230 indiquen la qualitat de la mostra assajada, mostrant contaminació per proteïnes i contaminació per compostos de fenols respectivament.

### 3.4. Síntesi de cDNA

Es va realitzar síntesi de cDNA a partir de les mostres de RNA originals, amb el kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (AppliedBiosystems) seguint les instruccions del fabricant. La síntesi del cDNA es va realitzar en un termociclador 2720 ThermalCycler (AppliedBiosystems). Les reaccions contenien per un volum final de 20  $\mu\text{L}$ : 2  $\mu\text{L}$  de 10X RT Buffer, 0.8  $\mu\text{L}$  de 25X dNTP Mix a concentració 100  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{L}$  de 10X RT *Random Primers*, 1  $\mu\text{L}$  de MultiScribe™ *Reverse Transcriptase*, 1  $\mu\text{L}$  de *RNase Inhibitor*, 3.2  $\mu\text{L}$  d'aigua *nuclease-free* i 10  $\mu\text{L}$  del RNA problema ( $\leq 2$   $\mu\text{g}$  de RNA total). El protocol es va modificar afegint 30  $\mu\text{L}$  d'aigua *nuclease-free* als 20  $\mu\text{L}$  de cDNA sintetitzat per a obtenir un volum final de 50  $\mu\text{L}$ .

Per a controlar que les reaccions eren lliures de contaminació per DNA genòmic es va incloure un control negatiu (RT-) sense MultiScribe™ *Reverse Transcriptase* i en el seu lloc s'hi va posar aigua *nuclease-free*. També es va realitzar la síntesi de cDNA a partir d'un *pool* de mostres a parts iguals, en termes de concentració i que vam denominar RT+. Aquesta mostra es va utilitzar per a fer les rectes patrons dels primers i com a mostra calibradora per a fer la quantificació relativa de les mostres. Totes les mostres de cDNA es van conservar a -20°C fins al seu processament.

### 3.5. PCR quantitativa (qPCR)

La tècnica que s'utilitza per a dur a terme l'estudi és la qPCR. La PCR quantitativa (qPCR) o PCR a temps real (RT-PCR) es fonamenta en la PCR (reacció en cadena de la polimerasa) convencional. L'objectiu de la qPCR és detectar i quantificar l'amplificació de fragments específics d'àcids nucleics a temps real mitjançant l'ús de *reporters* fluorescents en la reacció (Tamay de Dios et al., 2013). S'utilitza el SybrGreen, una molècula amb capacitat d'unió al DNA de doble cadena i només quan està unit emet fluorescència, la qual es podrà quantificar i relacionar amb la quantitat de producte sintetitzat a cada cicle d'amplificació de la RT-PCR.

Les qPCR es van realitzar en un termociclador LightCycler® 96 System (Roche) utilitzant plaques multipouet LightCycler® 480 MultiwellPlate 96, white. Les reaccions contenien, per un volum final de 20 µL: 10 µL de SYBR Green Select Master Mix (Applied Biosystems® by life technologies), 0.6 µL de cada primer (forward i reverse, per tant en total 1.2 µL) a concentració 10 µM, 3.8 µL d'aigua *nuclease-free* i 5 µL del cDNA problema.

El programa del termociclador constava de les següents etapes:

1. **Preincubació:** 95°C durant 600s. (x1 cicle).
2. **Amplificació:** 95°C durant 15s (desnaturalització) i 60°C durant 60s (anellament i extensió). (x40 cicles).
3. **Corba de dissociació:** 95°C durant 15s, 65°C durant 10s i 95°C durant 1s. (x1 cicle).

Abans de la preparació de les reaccions es van netejar la superfície de treball i les pipetes amb etanol 70% i es van irradiar amb llum UV durant 15-20 minuts per garantir una zona de treball sense contaminants.



### 3.6. Realització de les rectes patrons dels *primers* dissenyats

La recta patró es va realitzar per a cada parella de *primers* dissenyats fent una qPCR utilitzant com a motlle dilucions seriades (1/5, 1/25, 1/125, 1/625 i 1/3125) del cDNA de la mostra calibradora (RT+) i utilitzant els *primers* específics corresponent a cada gen d'estudi. El pendent de les rectes patró obtingudes van permetre determinar l'eficiència dels *primers* (Eficiència =  $10^{(-1/\text{pendent})}$ ) a més de la dilució de treball per quantificar les mostres. La dilució òptima per avaluar l'expressió dels gens d'interès a les mostres assajades es va establir a 1/100. També es va obtenir la corba de dissociació o *melting curve* per a cada parella de primers per tal d'assegurar que després de cada assaig de qPCR teníem un sol amplicó i per tant que els primers eren específics.

Es va triar el gen constitutiu tubulina (TUB) com a gen constitutiu o *housekeeping* ja que en el treball Soler et al. (2008) s'havia establert com el millor constitutiu en les mostres de fel·lema de surera ja que presentava menys variació entre mostres i els Ct més baixos.

### 3.7. Quantificació relativa de les mostres per qPCR

Cada placa de 96 pouets es va dissenyar en funció del nombre de gens i mostres a assajar. Per cada rèplica biològica i per cada gen analitzat es varen fer 3 rèpliques tècniques. L'estudi de la comparació fel·lema/xilema constava de tres rèpliques biològiques mentre que la comparativa fel·lema de surera/fel·lema d'alzina i l'estudi durant les 6 dates de mostreig del creixement estacional constava de 4 rèpliques biològiques respectivament.

Per a relativitzar els resultats de la reacció de qPCR es va utilitzar una mostra calibradora de referència (RT+). També es va utilitzar un control negatiu (NTC, *non template control*) amb aigua *nuclease-free* per a validar que la reacció de qPCR era lliure de contaminants.

L'anàlisi del resultat es va realitzar per quantificació relativa. En aquesta aproximació, cal un *gene housekeeping* per a normalitzar els valors d'expressió, per tal de controlar les variacions en la quantitat de cDNA inicial o bé les condicions de cada placa de manera que els resultats d'expressió relativa siguin comparables.

Es calcula l'expressió relativa del gen d'interès respecte el gen *housekeeping* a partir de la diferències de Cts entre la mostra calibradora i la mostra d'estudi, segons l'expressió:

$$RTA = \frac{(E_{gen\ d'interès})^{\Delta C_T\ gen\ d'interès\ (mostra\ calibradora - mostra\ d'estudi)}}{(E_{gen\ housekeeping})^{\Delta C_T\ gen\ housekeeping\ (mostra\ calibradora - mostra\ d'estudi)}}$$

La lectura dels resultats de les qPCR i l'obtenció dels valors de Ct de per el càlcul d'expressió relativa (RTA, *relative transcript abundance*) es va realitzar a través del programa informàtic LightCycler 96 1.1.0 (Roche) del termociclador LightCycler® 96 System (Roche).

## 4. Resultats

### 4.1. Disseny de primers, càlcul de les eficiències i validació de la seva especificat

A continuació s'exposen les seqüències dels primers dissenyats amb els paràmetres més rellevants de NetPrimer (Taula 2). Sempre que va ser possible es va procurar que els primers dissenyats complissin els següents requisits:  $\Delta G$  general millor  $\leq -34$  kcal/mol; 3' End stability  $\Delta G \geq -10$  kcal/mol; Self dimer en 3'  $\Delta G \geq 5$  kcal/mol i intern  $\Delta G \geq 6$  kcal/mol; Hairpin en 3'  $\Delta G \geq 2$  kcal/mol i intern  $\Delta G \geq 3$  kcal/mol; i Cross dimer en 3'  $\Delta G \geq -5$  kcal/mol i intern  $\Delta G \geq -6$  kcal/mol.

**Taula 2.** Encebadors dissenyats per l'anàlisi de qPCR. Seqüència i paràmetres més rellevants de NetPrimer. NT fa referència al número de nucleòtids a la seqüència del primer. 3' fa referència a l'estabilitat 3' del primer (3' End stability). Totes les unitats es representen en kcal/mol.

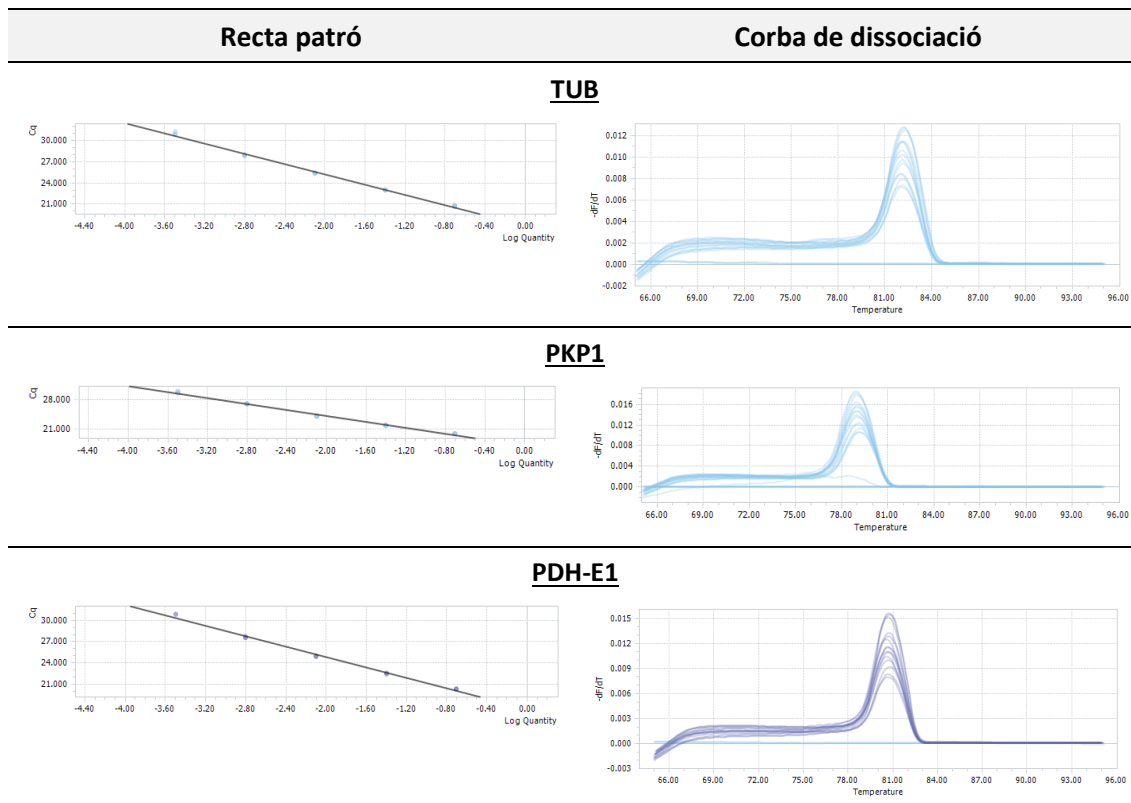
ENCEBADOR	SEQÜÈNCIA (5'→3')	NT	$\Delta G$	3'	SELF DIMER	HAIRPIN	CROSS DIMER
PKP1 fwd	ACTCTCCCAGAACGCACCAT	20	-34.28	-7.84			
PKP1 rev	CGAACCTCACCATAACCACCA	20	-33.70	-8.32			
PDH-E1 fwd	GGTTAGGGAGGTGGCAAAGG	20	-36.81	-8.56			
PDH-E1 rev	TTCTCAGCAGGGTCACGAAG	20	-33.52	-8.73	-4.52		
CASPLB2 fwd	GGGAAGGACGGAGGATGATT	20	-35.66	-6.95			
CASPLB2 rev	AGGAGCAAAAACAACCTCGCTTG	21	-36.27	-8.64	-5.74	-1.44	-4.54
ETR2 fwd	AAGGGGAGCGATGAAGTGAA	20	-35.11	-6.82			
ETR2 rev	ATTGGAAACCCGAAGCATTG	20	-36.08	-7.33			-4.43
GID1B fwd	AAGCCCTCCAATACCAATCG	20	-35.87	-8.61			
GID1B rev	TCCTTCTTCATCCAATGTTTGC	22	-36.1	-8.98	-4.9		-4.9
BRI1 fwd	TGCTTGCTTGATGATAGGC	20	-34.61	-8.77			
BRI1 rev	CCACACCCTGCTTGGATTTC	20	-35.07	-6.94		-0.82	-5.67
WOX4 fwd	GCAATGGTGGTAATGGCAGTC	21	-35.75	-6.47			
WOX4 rev	GCGAGAGGCAGAAGCAGAAG	20	-35.28	-6.72			
RIK fwd	TGGAGAAGAAGGACAGCAACC	21	-34.92	-8.31			
RIK rev	ATGATGAAACCCTGGAAGCAC	21	-35.05	-8.03			
AP1 fwd	TTGTTGCTGAGGTTGGTTGC	20	-34.26	-8.38			
AP1 rev	TTATTGGGTTGTTGCCGATG	20	-35.22	-8.61			
FT fwd	CACGAAAGCAAACCGATGAA	20	-34.99	-6.95			
FT rev	CTTTGGGCAAGAGGTTGTCTG	21	-35.67	-6.47	-4.17		-6.36

També s'exposen els resultats dels valors dels Ct (*cycle threshold*) de les qPCR obtinguts en la recta patró de cada primer (Taula 3); les rectes patró i les corbes de dissociació dels primers (Figura 2); i valors de pendent, eficiència, i coeficient de determinació ( $r^2$ ) dels primers dissenyats (Taula 4).

**Taula 3.** Valors Ct (*cycle threshold*) de les rectes patró dels encebadors en la mostra de referència RT+. Els valors indicats amb "-" no van amplificar. Les rèpliques tècniques excloses per el càlcul de l'eficiència dels primers estan indicades amb "\*".

Dilució	Rèplica	TUB	PKP1	PDH-E1	CASPLB2	ETR2	GID1B	BRI1	WOX4	RIK	AP1
1/5	1	20.59	19.67	20.17	18.78	22.86	22.16	25.31	24.29	27.52	27.33
1/5	2	20.66	19.73	20.27	*	22.89	22.21	25.40	24.42	27.82	27.28
1/5	3	20.79	19.72	20.27	18.90	22.95	22.25	25.36	24.43	27.66	27.21
1/25	1	22.93	21.73	22.56	21.33	24.92	24.12	27.51	26.51	30.00	29.53
1/25	2	22.97	21.77	22.46	21.48	24.89	24.18	27.29	26.71	30.22	29.99
1/25	3	23.00	21.71	22.32	21.54	25.01	24.08	27.52	26.82	30.20	29.73
1/125	1	25.33	24.01	24.89	23.83	27.28	26.64	30.18	28.76	31.88	31.95
1/125	2	25.37	24.02	24.93	23.89	27.25	26.54	29.98	29.24	32.38	32.13
1/125	3	25.25	24.00	24.81	23.86	27.29	26.46	30.25	29.14	32.20	32.00
1/625	1	27.81	27.08	27.50	*	30.36	29.70	32.39	*	35.32	*
1/625	2	27.91	27.07	27.67	*	30.59	29.66	31.70	31.69	34.74	*
1/625	3	27.90	26.90	27.53	*	30.18	29.82	32.80	31.82	*	-
1/3125	1	30.85	29.66	30.71	*	32.93	32.79	35.97	34.38	-	-
1/3125	2	31.23	29.69	30.89	*	33.12	33.01	34.70	34.28	-	-
1/3125	3	30.79	30.16	*	*	33.56	31.51	34.64	34.68	-	-

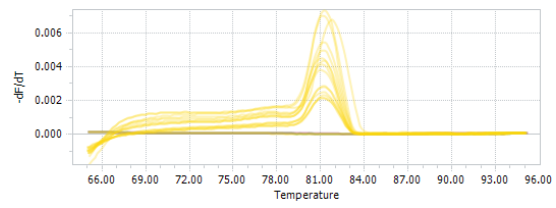
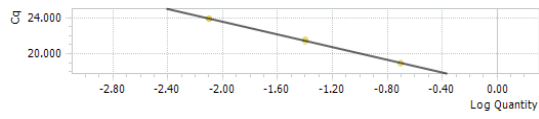
**Figura 2.** Recta patró i corba de dissociació dels encebadors.



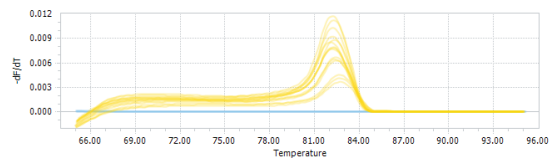
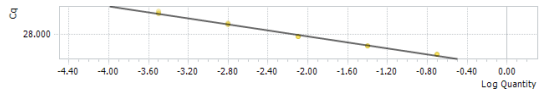
**Recta patró**

**Corba de dissociació**

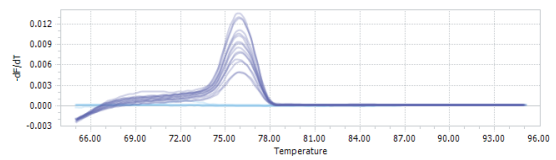
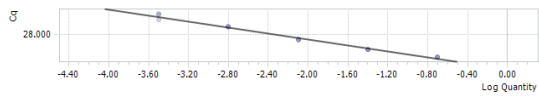
**CASPLB2**



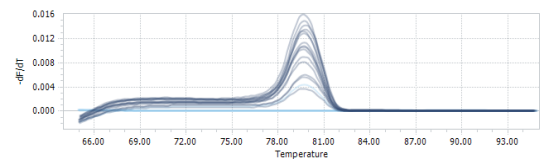
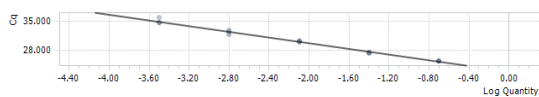
**ETR2**



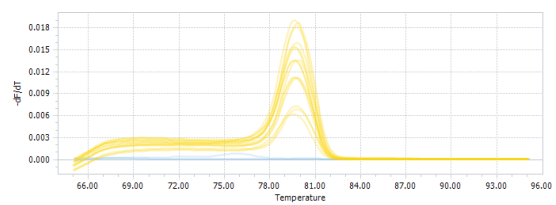
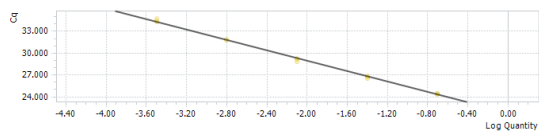
**GID1B**



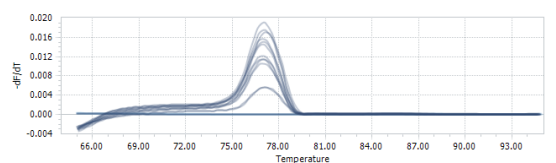
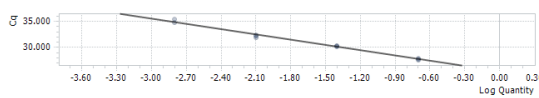
**BRI1**



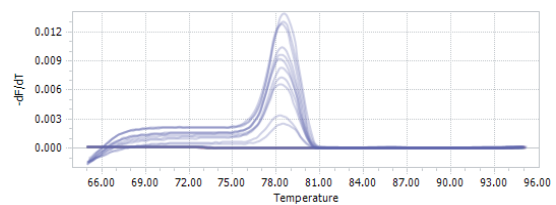
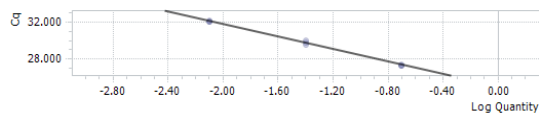
**WOX4**



**RIK**



**AP1**

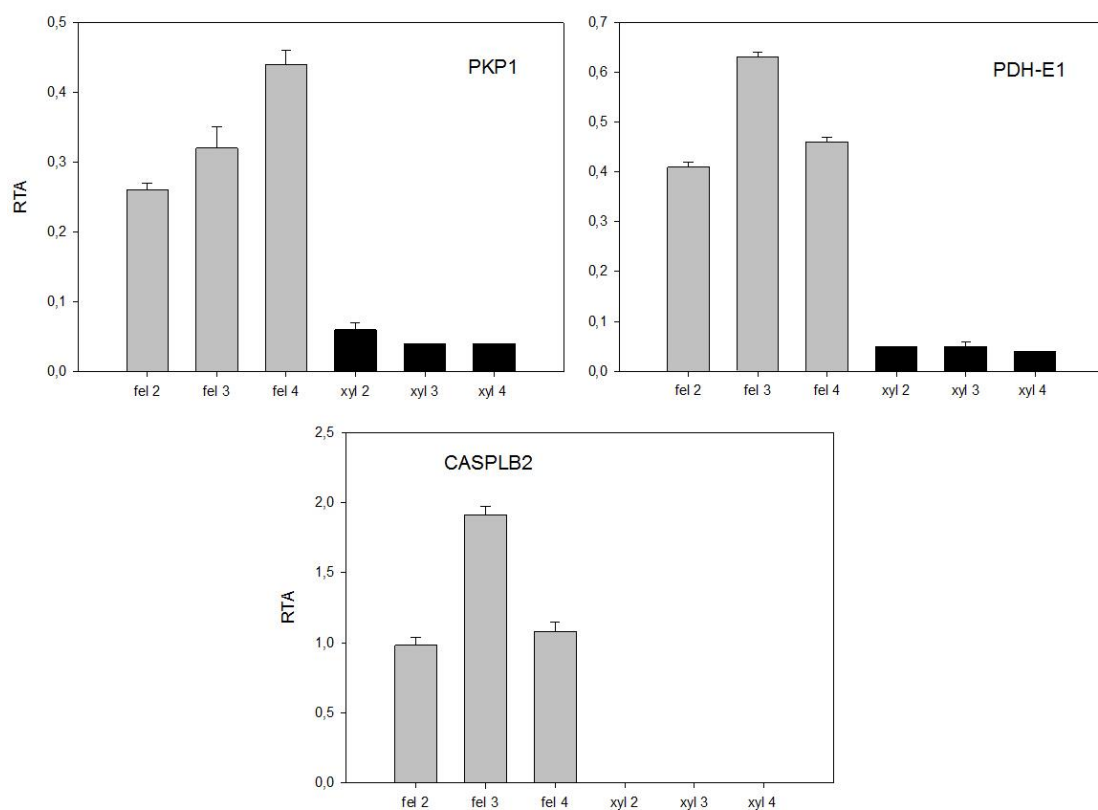


**Taula 4.** Pendent, eficiència i coeficient de determinació ( $r^2$ ) de les rectes patrons dels encebadors.

ENCEBADOR	PENDENT	EFICIÈNCIA	$r^2$
TUB	-3.6425	1.88	1.00
PKP1	-3.6539	1.88	0.99
PDH-E1	-3.7115	1.86	0.99
CASPLB2	-3.5800	1.90	1.00
ETR2	-3.7260	1.86	0.99
GID1B	-3.7283	1.85	0.99
BRI1	-3.4837	1.94	0.99
WOX4	-3.6080	1.89	1.00
RIK	-3.4172	1.96	0.99
AP1	-3.4002	1.97	1.00

## 4.2. Expressió diferencial d'alguns gens en mostres de fel·lema i xilema

L'interès d'aquest estudi era comprovar l'especificitat d'alguns dels gens seleccionats a teixits suberitzats (fel·lema). A tal efecte, s'ha analitzat l'expressió diferencial dels gens PKP1, PDH-E1 i CASPLB2. La **Figura 3** mostra els perfils d'expressió diferencial d'aquests gens en mostres de fel·lema i xilema.



**Figura 3.** Expressió diferencial de gens candidats en teixits secundaris: fel·lema (fel) i xilema (xyl).

Les dades es van analitzar estadísticament amb el programa SPSS versió 15.0. Es van realitzar les proves de normalitat amb el test de Shapiro-Wilk i homogeneïtat de variàncies amb el test de Levene, per determinar si els gens compleixen els supòsits (hipòtesis nul·la) de normalitat i homogeneïtat de variàncies. Tots els gens excepte AP1 ( $P_{(alzina)} = 0.022$ ) van complir el supòsit de normalitat. Tots els gens excepte PDH-E1 ( $P = 0.000$ ) van complir el supòsit d'homogeneïtat de variàncies. (**Taula 5**).

**Taula 5.** Comprovació dels supòsits de normalitat i homogeneïtat de variàncies per les mostres de fel·lema i xilema.

GEN	p-valor Shapiro-Wilk fel·lema	p-valor Shapiro-Wilk xilema	p-valor Levene
PKP1	0.637	0.000	0.075
PDH-E1	0.417	0.000	0.034
CASPLB2	0.187	-	0.019

Per comparar si hi havia diferències significatives entre les mitjanes d'expressió relativa (RTA) entre les mostres de fel·lema i xilema es va aplicar test paramètric (t-student) quan les dades complien els supòsits i quan no els complien les diferències entre les mitjanes d'RTA van ser analitzades amb estadística no paramètrica amb el test Mann-Whitney.

**Taula 6.** Anàlisi estadístic de les diferències d'expressió dels gens candidats entre mostres de fel·lema i xilema, FC (*fold change*; fel·lema/xilema) i p-valor. Els valors marcats amb "\*" són estadísticament significatius.

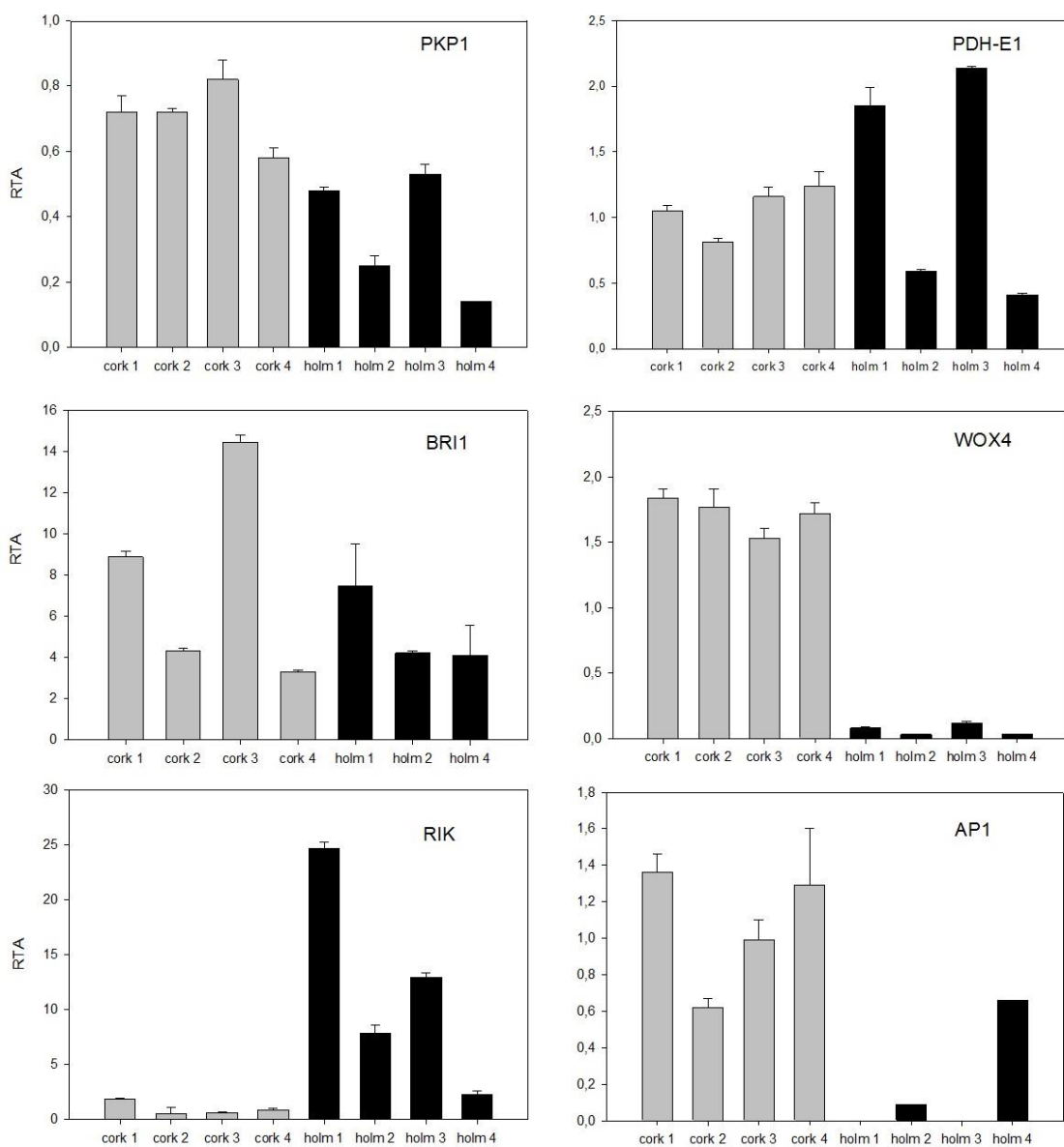
GEN	RTA fel·lema	RTA xilema	FC	p-valor
PKP1	0.35	0.05	7.00	0.046*
PDH-E1	0.50	0.05	10.0	0.046*
CASPLB2	1.32	0.00	367.37	0.037*

Tots els gens analitzats s'expressen diferencialment en mostres de fel·lema i xilema de forma significativa ( $p\text{-valor} \leq 0.05$ ). Els valors de FC indiquen que el conjunt de gens analitzats s'expressen més a fel·lema (**Taula 6**). Els resultats confirmen que aquests gens són específics de fel·lema.



### 4.3. Expressió diferencial dels gens en mostres de surera i alzina

Aquest estudi pretén determinar l'expressió diferencial d'alguns gens en el fel·lema de surera i alzina, per tal de validar els resultats de la transcriptòmica. Es van analitzar els gens PKP1, PDH-E1, WOX4, AP1, RIK i BRI1. La **Figura 4** mostra els perfils d'expressió dels gens en mostres de fel·lema de surera i alzina.



**Figura 4.** Expressió diferencial de gens candidats en fel·lema de surera (*cork*) i d'alzina (*holm*). La rèplica biològica 3 de l'alzina (*holm*) per al gen BRI1 va ser exclosa per presentar dades atípiques ( $p$ -valor test outlier < 0.001, amb valor atípic per sobre).

El tractament estadístic de les dades s'ha fer igual que el descrit en l'apartat anterior. Tots els gens excepte AP1 ( $P_{(alzina)} = 0.022$ ) complien el supòsit de normalitat. Tots excepte PDH-E1 ( $P = 0.000$ ) van complir el supòsit d'homogeneïtat de variàncies. (Taula 7).

Taula 7. Comprovació dels supòsits de normalitat i homogeneïtat de variàncies per les mostres de surera i alzina.

GEN	p-valor Shapiro-Wilk suro	p-valor Shapiro-Wilk alzina	p-valor Levene
PKP1	0.605	0.468	0.068
PDH-E1	0.647	0.236	0.000
WOX4	0.573	0.274	0.203
AP1	0.503	0.022	0.839
RIK	0.179	0.819	0.052
BRI1	0.492	0.685	0.253

Taula 8. Anàlisi estadístic de les diferències d'expressió relativa entre surera i alzina, FC (*fold change*; suro/alzina) i p-valor. Els valors marcats amb "\*" són estadísticament significatius.

GEN	RTA surera	RTA alzina	FC	p-valor
PKP1	0.71	0.35	2.03	0.014*
PDH-E1	1.06	1.24	0.85	1.000
WOX4	1.72	0.06	28.67	0.000*
AP1	1.07	0.19	5.63	0.042*
RIK	0.95	11.9	0.08	0.062
BRI1	7.74	5.27	1.47	0.249

Dels gens analitzats, PKP1, WOX4 i AP1 són significatius ( $p\text{-valor} \leq 0.05$ ), és a dir, hi ha expressió diferencial de gens en els dos tipus d'arbre. La resta de gens (PDH-E1, RIK i BRI1), tot i no ser estadísticament significatius, s'observa als gràfics (Figura 4) la tendència d'expressar-se més a surera. Els valors de FC indiquen que per a tots els gens excepte PDH-E1 ( $FC = 0.85$ ) i RIK ( $FC = 0.08$ ) les mostres s'expressen més suro (Taula 8). Val a dir que les mostres alzina 1 i 3 no han presentat els resultats esperats. En conjunt aquestes dades validen els resultats de la transcriptòmica i confirmen la rellevant importància d'aquests gens en l'alzina surera per a la formació del suro a excepció del gen PDH-E1.

#### 4.4. Determinació del patró estacional de gens candidats

Aquest estudi pretén determinar la variació estacional dels gens estructurals (PDH-E1, CASPLB2) i reguladors (ETR2, GID1B i BRI1, WOX4, RIK i AP1) al llarg dels mesos de creixement del suro. La **Figura 5** mostra els perfils d'expressió dels gens al llarg del creixement estacional del suro; La **Figura 6** representa la variabilitat biològica de les mostres per al conjunt de gens analitzat al llarg del creixement estacional.

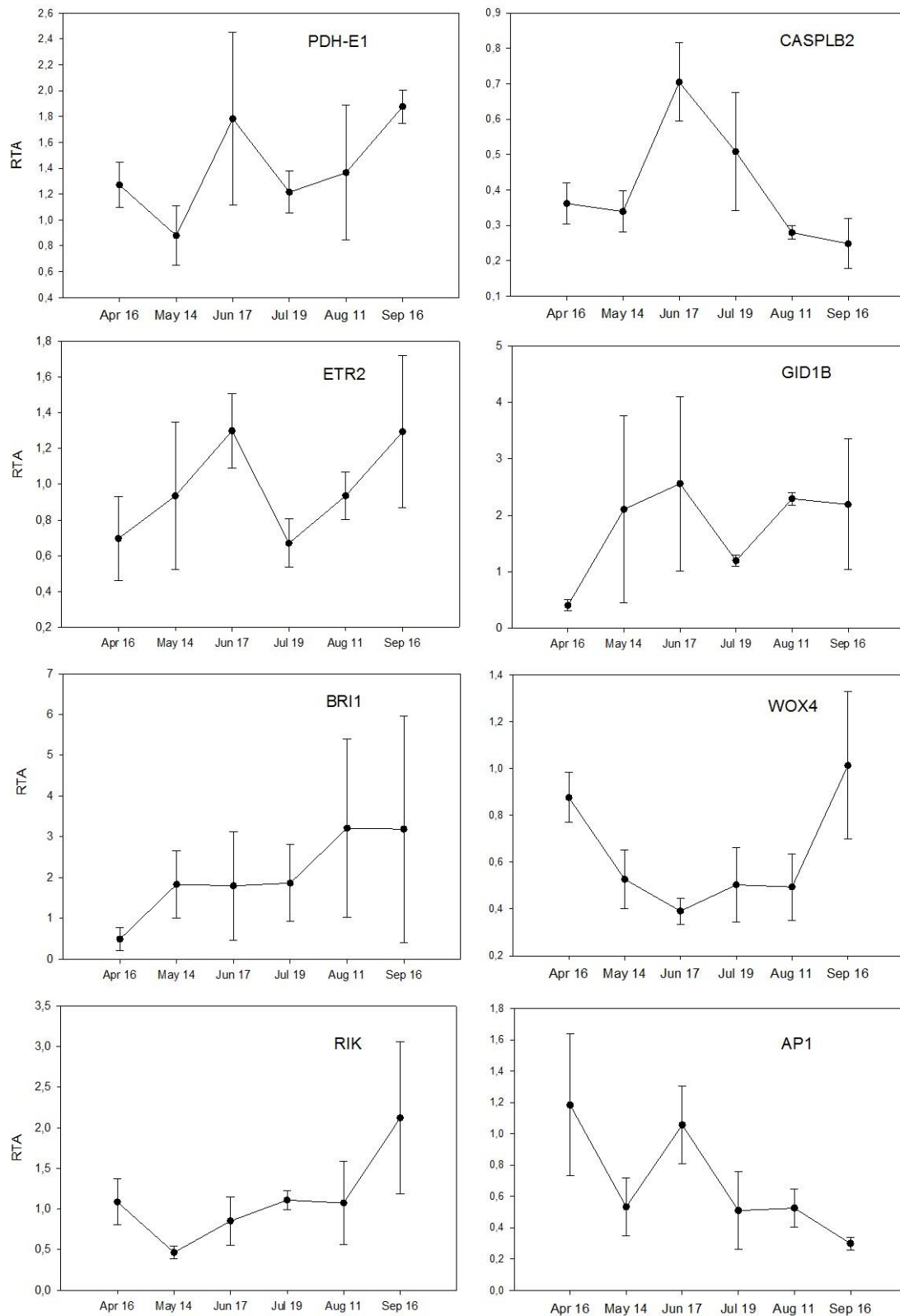
Per al tractament estadístic, les dades atípiques van ser excloses amb el test outlier (disponible al navegador <http://contchart.com/outliers.aspx>). Les hipòtesis del test van ser  $H_0$  (p-valor > 0.05) amb valor típic i  $H_a$  (p-valor  $\leq$  0.05) amb valor atípic. Les rèpliques biològiques eliminades van ser: rèplica biològica 1 del mes de setembre (amb valor atípic per sobre) del gen AP1 ( $P = 0.017$ ) i rèplica biològica 4 dels mesos juliol i agost (amb valor atípic per sobre i per sota respectivament) del gen GID1B ( $P = 0.003$  i  $P = 0.024$  respectivament).

Malgrat l'aplicació del test outlier per a reduir les barres d'error dels gràfics, molts dels valors d'error continuaven sent elevats. Aquesta variació és deguda a la variabilitat biològica de les mostres, ja que s'han utilitzat mostres de camp. Per aquest motiu es va decidir representar els gràfics del patró estacional amb la variabilitat biològica de les mostres (**Figura 6**), per mostrar que moltes vegades aquesta desviació ve donada generalment per una única rèplica biològica que es desvia de la tendència de les altres.

Els valors d'expressió de RTA obtinguts van ser transformats en logaritme en base 10, i després les dades es van analitzar estadísticament amb SPSS 15.0. Tots els gens compleixen els supòsits d'homogeneïtat de variàncies (p-valor > 0.05): PDH-E1  $P = 0.081$ ; AP1  $P = 0.229$ ; WOX4  $P = 0.065$ ; CASPLB2  $P = 0.077$ ; RIK  $P = 0.068$ ; ETR2  $P = 0.374$ ; GID1B  $P = 0.160$ ; BRI1  $P = 0,747$ .

Es va realitzar una ANOVA d'un factor (factor mes) per determinar l'estacionalitat dels 8 gens candidats. Estadísticament, la hipòtesi nul·la (p-valor > 0.05) estableix que no hi ha diferències significatives en l'expressió dels gens al llarg dels mesos de creixement, en canvi, la hipòtesi alternativa (p-valor  $\leq$  0.05) estableix que sí hi ha diferències significatives.

Tots els gens excepte PDH-E1 ( $P = 0.207$ ) i BRI1 ( $P = 0.112$ ) mostren significativament variació estacional en l'expressió dels transcrits: AP1  $P = 0.004$ ; WOX4  $P = 0.000$ ; CASPLB2  $P = 0.000$ ; RIK  $P = 0.009$ ; ETR2  $P = 0.11$ ; GID1B  $P = 0.010$ .



**Figura 5.** Perfil d'expressió relativa de gens candidats al llarg del creixement estacional del suro. Els valors de RTA (*relative transcript abundance*) es van calcular utilitzant la tubulina (TUB) com a gen de referència.

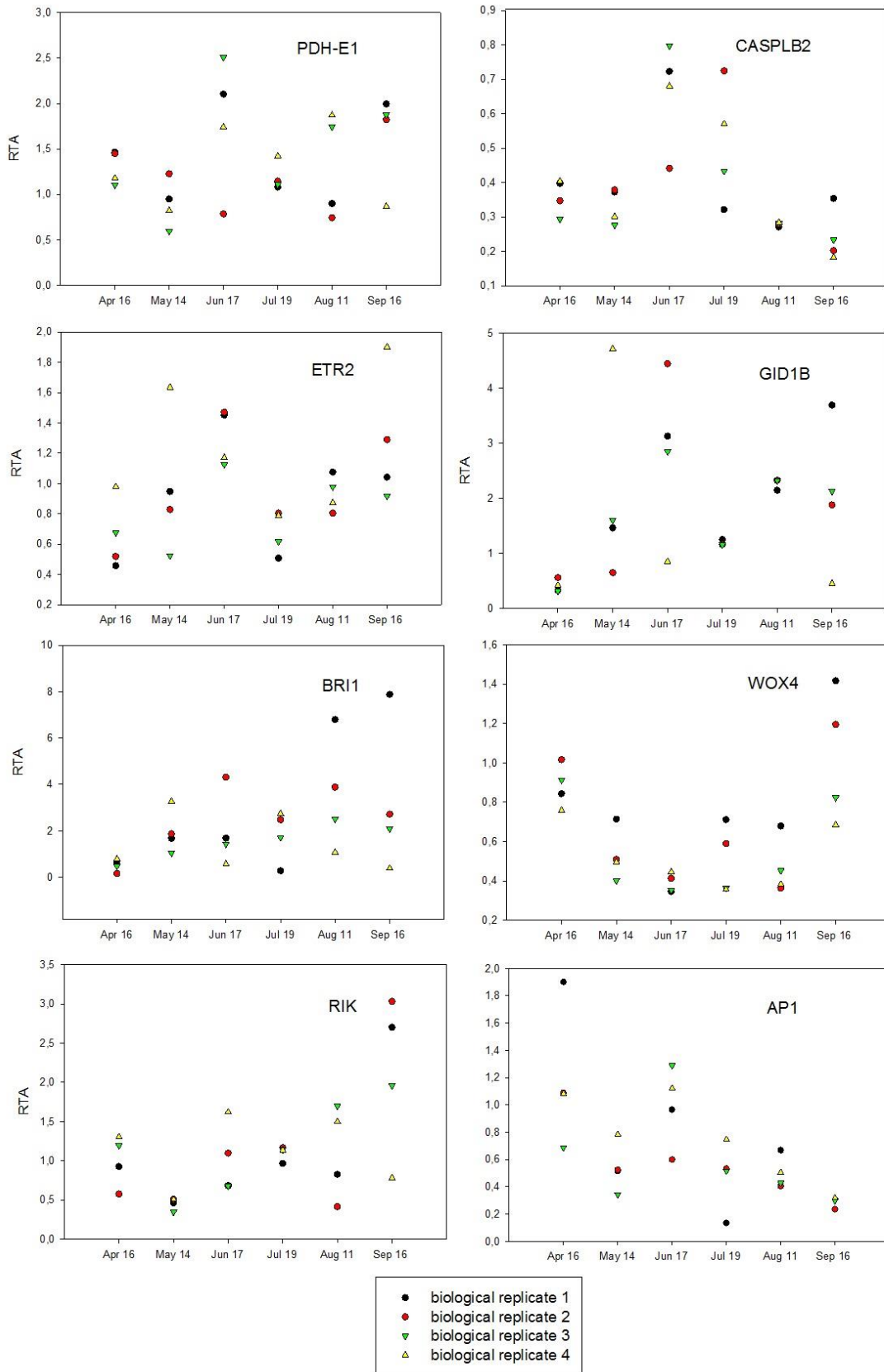


Figura 6. Representació de la variabilitat biològica de la expressió de gens candidats en les mostres del creixement estacional del suro.

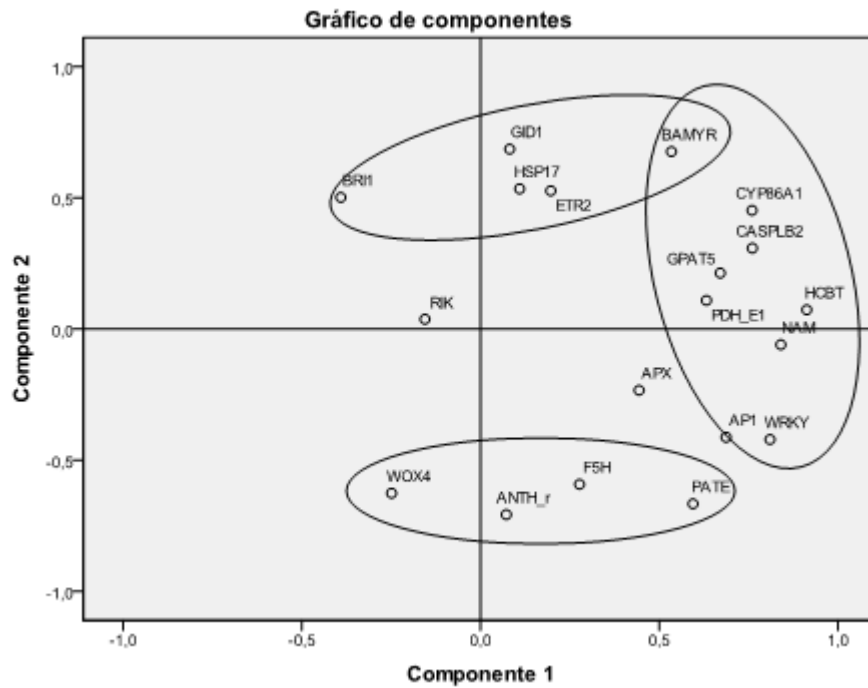
Prèviament a l'execució de la PCA es va realitzar una matriu de correlació de Pearson (**Taula 9**). El coeficient de correlació de Pearson és un índex comprès entre els valors -1 i +1 que indica la relació entre dues variables quantitatives, i en aquest cas, ens podia donar pistes de quins gens s'expressen de forma correlacionada al llarg dels mesos ja sigui positivament (quan aquest valor s'aproxima a +1) o negativament (quan s'aproxima a -1).

A continuació es va realitzar una PCA (anàlisi de components principals) (**Figura 7**) per a estudiar com s'agrupaven els gens candidats en funció de les components extretes pel model factorial. Es van realitzar les prova de adequació mostral KMO (Kaiser-Meyer-Olkin) i la prova d'esfericitat de Bartlett per determinar idoneïtat de les dades per ser assajades amb PCA. El test KMO (KMO = 0.356) va indicar dades no adequades (KMO ha de ser  $\geq 0.05$ ), en canvi, Bartlett ( $P = 0.000$ ) va presentar dades adequades amb un p-valor estadísticament significatiu (p-valor  $\leq 0.05$ ). Per aquest treball i com anàlisi preliminar es va decidir continuar amb la PCA.

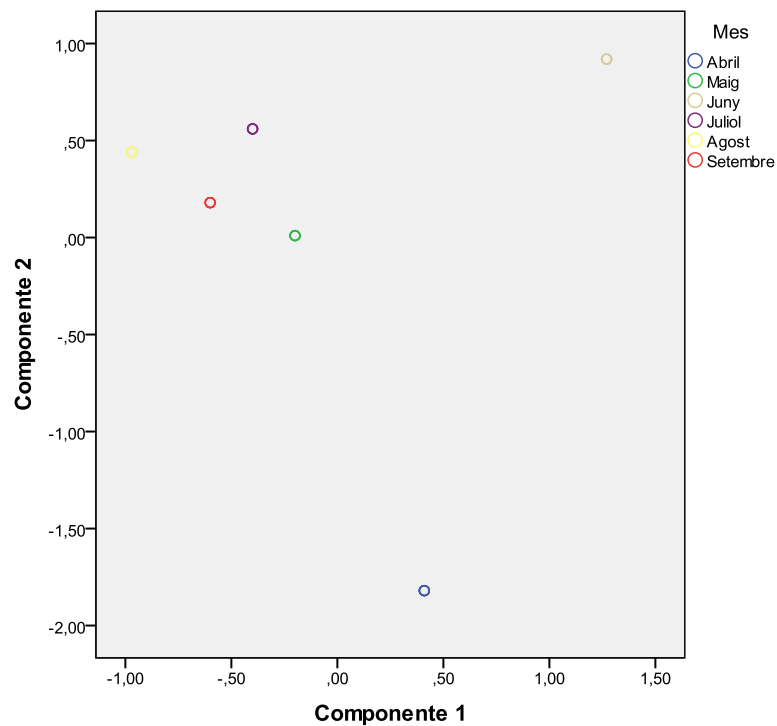
Les dos primeres components (eixos) de la PCA van explicar el 30.98% i el 22.11% de la variació de les dades d'expressió, respectivament. La **Figura 8** mostra la distribució dels 8 gens analitzats (PDH-E1, AP1, WOX4, CASPLB2, RIK, ETR2, GID1B, i BRI1) conjuntament amb els 12 gens analitzats de Soler et al. (2008) (ANN, ANTH\_r, APX, BAMYR, F5H, NAM, PATE, HCBT, CYP86A1, GPAT5, HSP17, i WRKY) en l'espai dimensional definit per les dos primeres components extretes. En la **Figura 7** es veu com la primera component del gràfic de la PCA agrupa els gens CYP86A1, CASPLB2, GPAT5, PDH-E1, HCBT, NAM, AP1, WRKY i en un menor grau BAMYR i aquests al seu torn es troben de forma general correlacionats positivament entre ells (**Taula 9**) i tendeixen a tenir el seu pic d'expressió al mes de juny (**Figura 8**). Pel que fa la segona component veiem com separa dos grups de gens, un format per GID1, HSP17, ETR2, BAMYR i en menor grau BRI1 i l'altre format per WOX4, ANTH\_r, F5H i PATE. Els gens dintre de cadascun d'aquests dos grups es troben de forma general correlacionats positivament mentre que els gens entre els dos grups es correlacionen negativament (**Taula 9**). El grup format per GID1, HSP17, ETR2, BAMYR i BRI1 coincideixen que tenen nivells d'expressió baixos al mes d'abril i de forma gradual augmenta la seva expressió tenint un màxim d'expressió al juny (GID1 i ETR2) i un altre al final de l'estació de creixement entre agost i setembre (GID1, ETR2 i BRI1). En canvi el grup format per WOX4, ANTH\_r, F5H i PATE tenen màxims de expressió a l'abril (**Figura 8**) i nivells baixos al juny.

**Taula 9.** Matriu de correlació de Pearson de la expressió dels gens candidats durant el creixement estacional del fel·lema del suro. Es representen els 8 gens candidats d'aquest estudi i els 12 gens candidats de Soler et al. (2008). Els valors d'expressió de RTA estan transformats en logaritme en base 10. \* i \*\* representen una correlació significativa a nivell de p-valor  $\leq 0.05$  i  $\leq 0.01$  respectivament.

	PDH_E1	AP1	WOX4	CASPLB2	RIK	ETR2	GID1B	BRI1	ANN	ANTH_r	APX	BAMYR	F5H	NAM	PATE	HCBT	CYP86A1	GPAT5	HSP17
AP1	,284																		
WOX4	,134	-,131																	
CASPLB2	,336	,585**	-,434*																
RIK	,579**	-,146	,412*	-,090															
ETR2	,096	,017	-,112	-,030	,166														
GID1B	,065	-,210	-,325	,095	,033	,447*													
BRI1	-,028	-,066	-,154	,032	,172	,400	,736**												
ANN	,385	,006	-,213	,483*	,187	,104	,310	,138											
ANTH_r	,260	,310	,276	-,023	,179	-,414*	-,451*	-,209	-,005										
APX	,471*	,404	,238	,335	,402	-,043	-,298	-,321	,448*	,387									
BAMYR	,210	,188	-,619**	,496*	-,174	,500*	,461*	,241	,438*	-,310	-,046								
F5H	-,109	,286	,411*	-,148	-,212	-,022	-,262	-,343	-,574**	-,044	-,037	-,265							
NAM	,439*	,730**	-,275	,482*	-,006	,253	-,008	-,062	,063	,246	,345	,494*	,256						
PATE	,145	,710**	,216	,267	-,260	-,183	-,431*	-,330	-,388	,386	,165	-,083	,619**	,492*					
HCBT	,546**	,515*	-,249	,694**	,032	,122	-,061	-,313	,328	,023	,406*	,456*	,042	,612**	,397				
CYP86A1	,575**	,218	-,346	,567**	,107	,392	,293	-,040	,469*	-,293	,244	,629**	-,046	,519**	,023	,808**			
GPAT5	,277	,192	-,264	,375	-,140	,353	,183	-,130	,045	-,140	-,017	,494*	,183	,486*	,320	,690**	,706**		
HSP17	,366	-,064	-,346	,509*	,241	-,022	,271	,123	,847**	,023	,354	,325	-,736**	-,021	-,515*	,264	,382	-,100	
WRKY	,314	,808**	-,016	,470*	-,016	,038	-,338	-,282	-,130	,333	,341	,177	,374	,681**	,789**	,702**	,331	,420*	-,209



**Figura 7.** Anàlisi de components principals de la expressió de gens candidats al llarg del creixement estacional del suro. També s'inclouen els gens analitzats per Soler et al. (2008). El gràfic de dispersió mostra els pesos factorials dels gens per les dues components extrems.



**Figura 8.** Gràfica de les mitjanes de les puntuacions factorials dels dies de mostreig en funció de les dues components extrems.



## 5. Discussió

Per al conjunt de gens candidats del fel·lema s'han dissenyat *primers* i per a tots ells s'ha comprovat la seva eficiència mitjançant la recta patró i la seva especificitat amb la corba de dissociació, a excepció de FT que s'expressava a nivells massa baixos. Això ens ha permès una correcta quantificació dels nivells d'expressió de les diferents mostres.

Un problema detectat durant la realització del treball va ser que quan les mostres de cDNA s'havien descongelat i tornat a congelar diverses vegades els valors de Ct sortien més tard, possiblement degut a una certa degradació gradual del cDNA, inclosa la mostra calibradora RT+. Malgrat això, en els nostres experiments les rèpliques tècniques han amplificat correctament en relació als valors Ct obtinguts i el retard dels Cts era proporcional en els gens d'estudi i el *housekeeping*.

L'estudi de l'expressió diferencial de PKP1, PDH-E1 i CASPLB2 en teixits de fel·lema i xilema de surera, ha mostrat que tots tres gens són més específics del fel·lema i per tant possiblement relacionats amb la síntesi (PKP1 i PDH-E1) i deposició (CASPLB2) de suberina ja que la presència de suberina és el tret més diferencial entre el fel·lema i el xilema.

Els enzims piruvat quinasa (PK) i piruvat deshidrogenasa (PDH) són clau per a la síntesi d'àcids grassos (Bourgis et al., 2011). La PK catalitza la síntesi de piruvat a partir del fosfoenolpiruvat (Baud et al., 2007), i la PDH catalitza la descarboxilació oxidativa del piruvat en els plastidis per produir acetil-CoA (Li-Beisson et al., 2013) destinat a la síntesi d'àcids grassos (Bourgis et al., 2011). L'estructura molecular de la suberina conté un domini alifàtic format per àcids grassos i derivats (Li-Beisson et al., 2013), i donat que la suberina és el principal component del fel·lema (Soler et al., 2008), la major expressió de PKP1 i PDH-E1 en teixits suberificats està d'acord amb un major requeriment d'àcids grassos en aquests teixits. A més el fet que PKP1 catalitzi l'últim pas de la glicòlisis per formar el piruvat i la PDH-E1 catalitza el primer pas per la síntesi *de novo* d'àcids grassos podria indicar que el metabolisme primari del carboni està compromès cap a la síntesi d'àcids grassos per suplir l'alta demanda de suberina en les cèl·lules del fel·lema. A més el fet que PKP1 sigui diferencialment més expressat en surera respecte l'alzina i que PDH-E1 tingui el pic d'expressió al mes de juny i en la PCA s'agrupi amb els gens marcadors de suberina HCBT o CYP86A1 recolza aquesta hipòtesis.

Pel que fa a CASPLB2, la proteïna codificada per aquest gen està relacionada amb el reclutament de proteïnes en dominis concrets de la membrana plasmàtica per tal de modificar la paret cel·lular vegetal de forma localitzada (Roppolo et al., 2014). Fins ara s'havien estudiat les proteïnes CASP que s'expressen de forma específica en cèl·lules de l'endodermis de l'arrel per formar les anomenades bandes de Caspary que són dipòsits de suberina i/o lignina localitzats. El fet que CASPLB2 s'expressi de forma específica en teixits suberitzats com el fel·lema i que ho faci en molt menor grau en teixits lignificats com el xilema fa pensar que membres de les CASPL podria tenir un paper important en la deposició de suberina en altres teixits diferents a l'endodermis, com és el cas del fel·lema. L'alt grau de correlació amb gens marcadors de suberina com HCBT i CP86A1 durant l'expressió temporal reforçarien aquesta hipòtesis. A més tal i com demostren Roppolo et al. (2014) membres de la família de les CASPL s'expressen en diversos teixits de forma específica i per tant alguns d'aquests membres podrien ser específics de fel·lema.

En conjunt l'expressió de PKP1, PDH-E1 i CASPLB2 segueixen un patró típic de gens relacionats amb suberina amb un pic d'expressió al mes de juny durant l'època de màxima activitat del fel·logen tal com va mostrar Soler et al. (2008). A més, de vegades el fel·logen té una segona etapa de creixement al mes de setembre i això podria explicar el segon pic d'expressió que es dona a PDH-E1 en el setembre.

És difícil trobar cap procés de desenvolupament que tingui lloc en les plantes o no hi intervingui cap hormona vegetal. És per això que en aquest treball hem analitzat la seva possible funció en la formació del suro, encara desconeguda, mitjançant l'expressió de receptors de gibberel·lines (GID1), etilè (ETR2) i brassinosteroids (BRI1). Pel que fa els perfils d'expressió dels receptors d'hormonals durant l'estació de creixement, s'ha vist que els gens ETR2 i GID1 comencen amb un mínim d'expressió a l'abril i que augmenta progressivament fins al juny, per després decaure en picat al juliol. Al mes d'agost l'expressió dels receptors s'incrementa i al mes de setembre l'expressió es variable, disminuint mínimament a GID1B però augmentant més a ETR2. Pel que fa el receptor de brassinosteroids BRI1, a diferència de ETR2 i GID1B, després de la pujada d'abril manté la seva expressió fins al mes de juliol, i la seva expressió s'incrementa als següents mesos. Del paper d'aquestes hormones en la formació de teixit secundaris es coneix que gibberel·lines i etilè estimulen tant l'activitat del càmbium com la diferenciació del xilema secundari mentre que els brassinosteroids tindrien un paper més rellevant en etapes més tardanes de la diferenciació on tenen lloc processos com la formació de la paret secundari i la mort cel·lular

programada (Sorce et al., 2013; Milhinhos i Miguel, 2013). El patró d'expressió dels receptors hormonals amb un màxim al juny coincideix amb el creixement del suro i amb el perfil d'expressió de gens relacionats amb la síntesi de lípids i la deposició de la suberina. Tot i això a diferència dels gens de suberina, al maig sembla que ja hi ha un augment important en l'expressió dels receptors hormonals cosa que no es veu amb els gens de suberina. Això podria indicar que la percepció d'aquestes hormones ja és rellevant a estadis anteriors a la síntesi de suberina on podria tenir lloc el creixement i expansió de les cèl·lules de fel·lema. Donat que les hormones a priori són necessàries per al creixement i la diferenciació al llarg del creixement del suro concorda amb els màxims d'expressió observats dels receptors hormonals per a l'etilè i les gibberel·lines sigui a la època de màxima formació de suro. Pel que fa el receptor BRI1 el seu perfil d'expressió és una mica diferent i el seu màxim de expressió és clarament els mesos agost i setembre tot i que al maig ja s'observa un augment considerable respecte l'abril. Això podria indicar que BRI1 té un rol més important als últims estadis de diferenciació de les cèl·lules de fel·lema. Cal dir que aquests receptors d'hormones presenten molta variabilitat biològica entre mostres i per tant la interpretació del patró d'expressió observat per aquests gens cal fer-se amb cautela.

Pel que fa els gens reguladors de meristema WOX4 i AP1 s'expressen més a suro que alzina de forma significativa. Tot i que la funció del gen és la mateixa a suro i alzina aquestes dues espècies podrien interpretar i respondre de forma diferent als senyals ambientals i a la regulació epigenètica. No obstant, tenint en compte que surera forma més capes de cèl·lules de fel·lema que l'alzina a cada estació de creixement i que WOX4 i AP1 són reguladors positius del manteniment del cambium vascular (Hirakawa et al., 2010; Ohmori et al., 2013) i del desenvolupament del meristema floral (Leal et al., 2015) respectivament, aquests podrien ser promotors de l'activitat del meristema que forma els suro, el fel·logen.

Els gens reguladors AP1, WOX i RIK mostren variació estacional de forma significativa. El patró d'expressió de WOX4 difereix de la resta de gens, amb un màxim d'expressió a l'abril i un mínim al mes de juny. WOX4 és un gen regulador involucrat en el manteniment indiferenciat del cambium vascular (Hirakawa et al., 2010; Ohmori et al., 2013). Per tant els resultats obtinguts podrien indicar que durant el mes de juny és necessari nivells d'expressió baixos de WOX4 per a la diferenciació i formació de cèl·lules de fel·lema en el suro mentre que l'abril predominaria una etapa on hi haurien més cèl·lules indiferenciades. AP1, en canvi, presenta un màxim al mes de juny que coincideix amb la fase de creixement del suro, fet que podria indicar que aquest gens estigués relacionat en la seva formació. AP1 és un factor de transcripció de la família MADS-

box que regula gens implicats en el desenvolupament floral (Leal et al., 2015). Recentment s'ha vist que diferents gens de la família dels MADS-box que s'havien estudiat per la seva relació amb la floració tenen a més altre funcions en diferents teixits vegetatius de la planta (Tapia-López et al., 2008; Azeez et al., 2014). Això podria indicar que algun dels gens reguladors de la floració podrien també tenir un paper durant el desenvolupament estacional del suro. Pel que fa RIK tot i que no de forma significativa esta menys expressat en suro que en alzina i presenta un màxim d'expressió al mes de setembre, és a dir, la seva expressió s'incrementa a la fase de repòs i disminueix a la fase de creixement. Tot i que és un gen poc conegut es sap que intervé en la repressió dels gens *knox* durant la organogènesis de la fulla en *Arabidopsis* (Timmermans et al., 2005). Tenint això en compte podríem esperar que durant la formació del suro del fel·lema aquests s'indueix per afavorir la diferenciació del fel·lema cosa que s'observa de forma aproximada en el seu patró d'expressió.

## 6. Conclusions

The conclusions from this final work grade are:

- \* It has designed a set of primers for a candidate genes to phellem that worked correctly.
- \* It has been validated the specificity on phellem for the PKP1, PDH-E1 and CASPLB2 genes.
- \* It has been shown that the candidate genes in phellem are more expressed in cork.
- \* We have been seen that the structural genes related to lipid synthesis and deposition of suberin, is following a seasonal pattern typical of suberin genes.
- \* It has been possible to determine the seasonal pattern of hormone receptors, and ETR2 and GID1B genes are most active in the maximum growth phase of cork.
- \* It has been possible to determine the seasonal pattern of regulatory genes, and AP1 is more expressed when the cork growth is active, while that WOX4 is expressed more in initial stages of the phellem development, and RIK in stadiums of the cork final formation.

## 7. Bibliografia

1. Azeez, A., Miskolczi, P., Tylewicz, S., Bhalearao, R. (2014). A Tree Ortholog of APETALA1 Mediates Photoperiodic Control of Seasonal Growth. *Current Biology*, 24, 717-724.
2. Baud, S., Wuillème, S., Dubreucg, B., De Almeida, A., Vuagnat, C., Lepiniec, L., et al. (2007). Function of plastidial pyruvate kinases in seeds of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 52, 405-419.
3. Hrakawa, Y., Kondo, Y., Fukuda, Hiroo. (2010). TDIF Peptide Signaling Regulates Vascular Stem Cell Proliferation via the WOX4 Homeobox Gene in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 22, 2618-2629.
4. Ji, J., Strable, J., Shimizu, R., Koenig, D., Sinha, N., Scanlon, MJ. (2010). WOX4 Promotes Procambial Development. *Plant Physiology*, 152, 1346-1356.
5. Leal, F., Mourik, S., Posé, D., Kim, M., Schmid, M., Ham, R., et al. (2015). A Quantitative and Dynamic Model of the *Arabidopsis* Flowering Time Gene Regulatory Network. *PLOS ONE*, 10(2), 1-18.
6. Li-Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F., Andersson, M., Arondel, V., Bates, P. et al. (2013). Acyl-Lipid Metabolism. *The Arabidopsis Book*, 1-70.
7. Milhinhos, A., Miguel, C. (2013). Hormone interactions in xylem development: a matter of signals. *Plant Cell Rep*, 32, 867-883.
8. Ohmori, Y., Tanaka, W., Kojima, M., Sakakibara, H., Hirano, HY. (2013). WUSCHEL-RELATED HOMEBOX4 Is Involved in Meristem Maintenance and Is Negatively Regulated by the CLE Gene FCP1 in Rice. *The Plant Cell*, 25, 229-241.
9. Phelps, T., Thomas, T., Vahab, P., Timmermans, M. (2005). Maize rough sheath2 and Its *Arabidopsis* Orthologue ASYMMETRIC LEAVES1 Interact with HIRA, a Predicted Histone Chaperone, to Maintain *knox* Gene Silencing and Determinacy during Organogenesis. *The Plant Cell*, 17, 2886-2898.
10. Roppolo, D., Boeckmann, B., Pfister, A., Boutet, E., Rubio, MC., Dénervaud, V., et al. (2014). Functional and Evolutionary Analysis of the CASPARIAN TRIP MEMBRANE DOMAIN PROTEIN Family. *Plant Physiology*, 165, 1709-1722.
11. Serra, O., Soler, M., Hohn, C., Sauveplane, V., Pinot, F., Franke, R., et al. (2009). CYP86A33-Targeted Gene Silencing in Potato Tuber Alters Suberin Composition, Distorts Suberin Lamellae, and Impairs the Periderm's Water Barrier Function. *Plant Physiology*, 149, 1050-1060.
12. Serra, O., Hohn, C., Franke, R., Prat, S., Molinas, M., Figueras, M. (2010). A feruloyl transferase involved in the biosynthesis of suberin and suberin-associated wax is required for maturation and sealing properties of potato periderm. *The Plant Journal*, 62, 277-290.
13. Soler, M., i Serra, O., i Molinas, M., i Huget, G., i Fluch, S., i Figueras, M. (2007). A Genomic Approach to Suberin Biosynthesis and Cork Differentiation. *Plant Physiology*, 144, 419-431.
14. Soler, M., i Serra, O., i Molinas, M., i García, E., i Caritat, A., i Figueras, M. (2008). Seasonal variation in transcript abundance in cork tissue analyzed by real time RT-PCR. *Tree Physiology*, 28, 743-751.
15. Sorce, C., Giovannelli, A., Sebastiani, L., Anfondillo, T. (2013). Hormonal signals involved in the regulation of cambial activity, xylogenesis and vessel patterning in trees. *Plant Cell Rep*, 32, 885-898.
16. Suer, S., Agustí, J., Sanchez, P., Schwarz, M., Greb, T. (2011). WOX4 Imparts Auxin Responsiveness to Cambium Cells in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 23, 3247-3259.
17. Tamay de Dios, L., Ibarra, C., Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2, 10-78.
18. Tapia-López, R., García-Ponce, B., Dubrovsky, JG., Garay-Arroyo, A., Pérez-Ruíz, RV., Kim, SH., et al. (2008). An AGAMOUS-related MADS-box gene, XAL1 (AGL12), regulates root meristem cell proliferation and flowering transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 146, 1182-1192.
19. Ursache, R., Nieminenb, K., Helariutta, Yka. (2013). Genetic and hormonal regulation of cambial development. *Physiologia Plantarum*, 147, 36-45.
20. Zheng-Hua, Y., Ruigin, Z. (2015). Molecular control of Wood formation in trees. *Journal of Experimental Botany*, 1-13.

