

IDENTIFICACIÓ DE GENS I PROCESSOS
RELLEVANTS PEL FEL·LEMA I LA SUBERINA
USANT NOVES APROXIMACIONS

Sandra Fernández Piñán

Per citar o enllaçar aquest document:
Para citar o enlazar este documento:
Use this url to cite or link to this publication:
<http://hdl.handle.net/10803/667085>

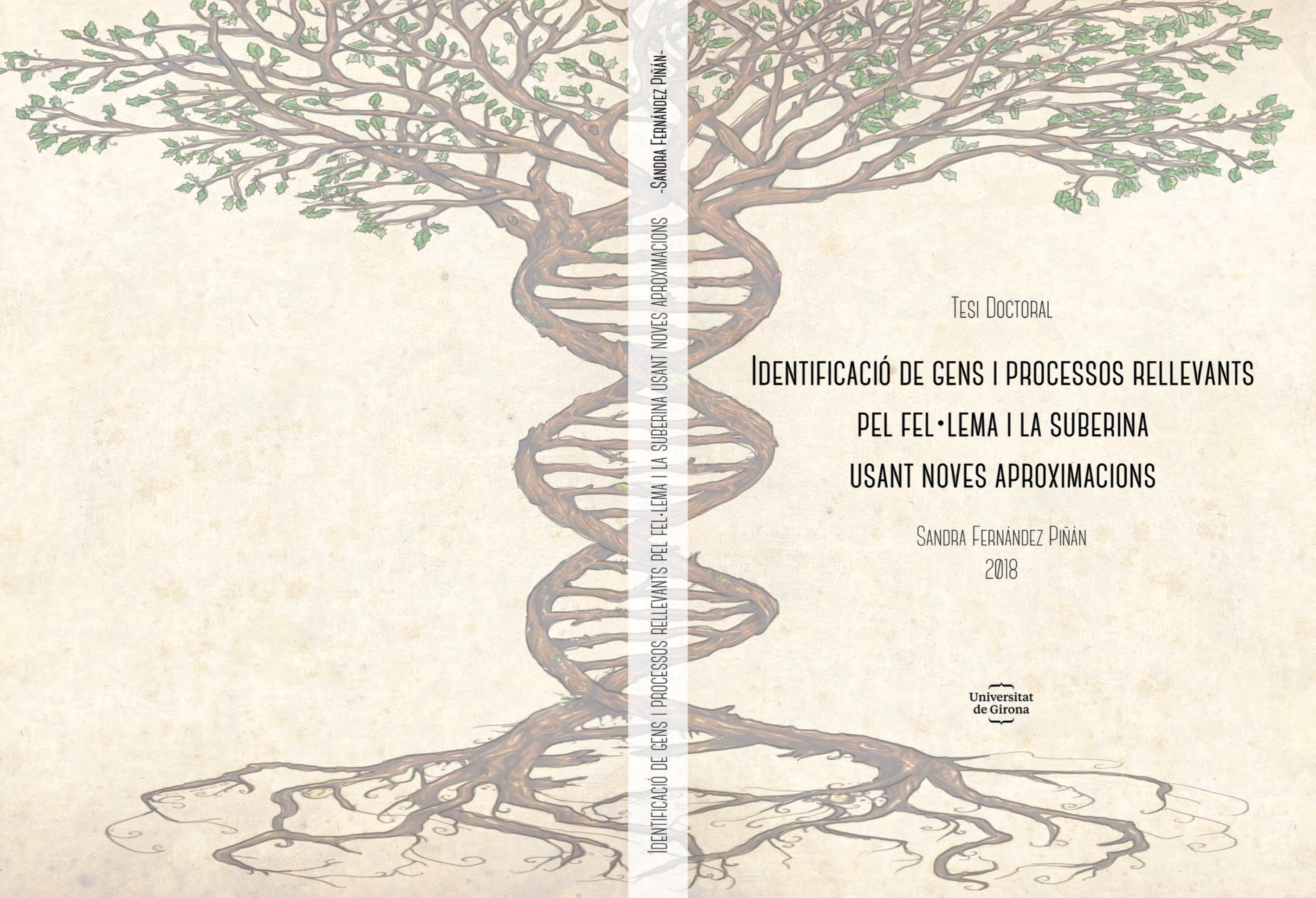


<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.ca>

Aquesta obra està subjecta a una llicència Creative Commons Reconeixement-NoComercial-SenseObraDerivada

Esta obra está bajo una licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives licence



IDENTIFICACIÓ DE GENS I PROCESSOS RELLEVANTS PEL FEL·LEMA I LA SUBERINA USANT NOVES APROXIMACIONS -SANDRA FERNÁNDEZ PIÑÁN-

TESI DOCTORAL

IDENTIFICACIÓ DE GENS I PROCESSOS RELLEVANTS
PEL FEL·LEMA I LA SUBERINA
USANT NOVES APROXIMACIONS

SANDRA FERNÁNDEZ PIÑÁN
2018

Universitat
de Girona



Universitat de Girona

Tesi Doctoral

Identificació de gens i processos rellevants pel fel·lema i la suberina usant noves aproximacions

Sandra Fernández Piñán

2018

Programa de doctorat en Biologia Molecular, Biomedicina i Salut

Directores de Tesi

Dra. Mercè Figueras Vall-Ilosera

Dra. Olga Serra Figueras

La present tesi conté material suplementari (23) dels capítols impresos al final del document i en format electrònic

Memòria presentada per optar al títol de doctor per la Universitat de Girona

(...) independientemente de cómo se viaje,
de los atajos que se tomen,
del cumplimiento o no de las expectativas,
uno siempre acaba aprendiendo algo.

Satori en Paris – **Jack Kerouac** –

AGRAÏMENTS

Bé, finalment he aconseguit acabar aquesta maldita tesi. Sí, creia que no arribaria mai després de 5 llargs i complicats anys que m'han deixat sense gaire bé energies. Ha estat una etapa extremadament complicada, dura, molt dura, plena de problemes i entrebancs que no veien la llum, i frustrant. Frustrant per no arribar a l'objectiu que vols, però vaja, que ja se sap, la ciència és complicada i frustrant...em deien, però quan et recompensa ho fa d'una manera molt gratificant i desmesurada. Doncs bé, això jo no us ho puc dir, perquè no ho he pogut experimentar, però no patiu, estic bé! Si alguna cosa he après en tot aquests temps és a ser perseverant i pacient, coses que desconeixia de mi mateixa, així que això que me'n duc!! Però no tot és tant dramàtic com sembla. Puc considerar aquests anys com uns dels millors (i pitjors) de la meua vida, i això ha estat gràcies a tota la gent que m'ha acompanyat en aquest viatge i que formant part de la meua vida han fet que sigui com sóc avui dia. Anem al lio!

En primer lloc voldria agrair, i com és costum, a les meves directores de tesi, Olga i Mercè. Vaig començar al Laboratori del Suro ara ja farà 7 anys per realitzar el meu treball final de Màster sota la supervisió de l'Olga. Què dir...gràcies a ella vaig aprendre tot el que sé de treballar al laboratori, em va fer entusiasmar-me amb la feina i que la ciència formés part de la meua vida, però òbviament, no tot són flors i violes i crec que aquesta tesi també ens ha desgastat molt a nivell personal. No obstant, sempre t'estaré molt i molt agraïda per haver confiat en mi i creure que era capaç de fer-ho. A la Mercè, gràcies per ser-hi sempre i donar-me suport quan ho he necessitat, per ajudar-me tant i tant en aquesta recta final i en el meu *tour* d'RNA-seq, va ser una bogeria! Donar-li les gràcies també a la Marisa, que tot i que no ha participat explícitament de la meua tesi, no ha dubtat en donar opinions i consells quan ho he necessitat. I per últim, però no menys important a en Marçal. El meu "jefe" d'estada a Toulouse i el meu company de xerrades interminables durant tot aquest procés final de tesi. Has estat un gran suport i ajuda a nivell intel·lectual, però sobretot a nivell personal.

Vull agrair també i de forma molt especial, al meu company de grup durant tot aquest temps, en Pau. És cert que no em compartit gaires estones de laboratori, degut al teu estimat 454 del suro, però si de despatx, descansos, cafès, converses en bucle en moments crítics, sopars...i mira, després de tot, ens hem sortit prou bé. A partir d'ara les quedades que farem podran ser *Thesis Free*!!!! També agrair a en Roger, que tot i que vam compartir un període de temps curt i bastant crític (els finals sembla que sempre son durs) sempre hi havia moments per riure, fer bromes i jugar a la diana d'espai comuns. Quins records! A la Dolors, la química del grup, per les estones i els riures que hem passat juntes. Y como no, a nuestra última adquisición, venido des de Olazagutia, Iker Armendariz, primero pupilo, ahora futuro doctor. Agradecerte infinito por la alegría que me has dado estos meses que hemos coincidido, la necesitaba. Por los ratos de descanso, las conversaciones, el apoyo y ayuda que he recibido de tu parte. Porque eres la caña y te voy a echar un montón de menos. Te paso el relevo de veterano del grupo, ¡deja el listón bien alto! Y tranquilo, que de todo se sale. Esperaré ansiosa tu defensa de tesis. També agrair a tota la gent que ha passat pel Laboratori del suro (TFGs/TFMs): Andreu, Núria, Irene, Xavi, Arnau...a en Ferran per tirar endavant el projecte de les arrels, així com a la Jenni amb la que a més hem compartit moltes estones i molts riures; ets una gran persona i segur que tot t'anirà molt bé. D'una manera especial també agrair a l'Aïda, perquè ets genial, treballar amb tu era molt i molt fàcil, crec que mai havia rigut tant...sobretot aquell dia a les tantes de la matinada transformant el tabac, si ens haguessin gravat...!! Però sobretot a la Carla, per tots aquests anys, per *Luchar, Llorar y Reír* (com diuen els Marvin), perquè hem passat per molts estadis tu i jo, per què ens entenem molt i molt bé, i sempre, sempre has estat en els moments difícils. Si es que... ¡te haces de querer! I per

últim a la Sara, la nostra tècnic de laboratori, que tot i que últimament no ha estat gaire present, sempre m'has tret les castanyes del foc quan ho necessitava.

També dono les gràcies a la resta de tècnics de laboratori, doctors i secretària del Departament de Biologia que m'han ajudat quan ho he necessitat. De manera especial també dono les gràcies als membres dels Serveis Tècnics de Recerca per ajudar-me a obtenir les fotos de confocal que es presenten en aquesta tesi i a l'equip de seqüenciació i bioinformàtica del CRG per ajudar-me en l'anàlisi transcriptòmic del Suro.

Voldria donar les gràcies d'una manera especial a tots els becaris i no becaris amb els que he compartit despatx a "la Granja": Ellana, Sara, Imma, Ari, Dani, Pau Comajoan (moltes gràcies per ajudar-me amb la portada de la tesi), a la Mireia (per ser-hi sempre que se la necessita, ja sigui com a doctora, transfer o com a companya de pàdel), a la Carla (per llegir-te la meva tesi i poder discutir amb algú sobre RNAseq, moltíssimes gràcies, has estat una molt bona companya de taula i et trobaré molt a faltar), a la Elena (per escoltar-me i fer-me costat durant les nostres estones de cafè, fora i dintre de la feina, per ser la meva companya de Pilates i de Piscina. Moltes ànims en aquesta recta final). A en Luis i Roger, per les estones en el "Muro de las Lamentaciones". Al bioquímics, Jess, Pedro, Laura, Marta "petita", Santi, Vero, Glòria, Txell, Montse, Àlex i Adrià. A tots, moltíssimes gràcies per les sortides, sopars, esquidades, *escape rooms*, birres i els esdeveniments que tenim pendents. Molta sort en les vostres tesis i en la vida en general, sou grans! I perdonar-me si m'he deixat a algú en el tintero!

Gràcies als amics que m'han acompanyat durant aquest viatge, però que per motius varis no ens hem pogut veure tant com voldríem, en especial a la Pats. A les meves excompanyes de pis, per escoltar-me quan arribava a casa feta caldo, a la Cris pels seus consells, y en especial a Raquel, por ser como eres, por nuestras risas, nuestras salidas, por nuestros momentos al pisico, por todo. Me he llevado a una gran amiga.

No podria deixar-me a en Txús. Gràcies per ser com ets, pels anys que fa que ens coneixem, pels moments viscuts. Estic molt orgullosa de que ho hagi aconseguit, no en tenia dubta. Em sento molt agraïda de que haguem fet aquest camí junts, i bueno, vés a saber que ens depararà el futur ara!

Para ir acabando, también quiero agradecer a mi familia que está lejos y a mis padres y mi hermana, por creer que soy una científica loca, está claro que sin ellos yo no estaría aquí. I també a la meva segona família, sobretot a la Pepi, per preocupar-se i interessar-se en tot moment, moltes gràcies.

Per últim, voldria agrair de la manera més especial a l'Uri (i al nostre perrete Marvin). Per totes les hores que he dedicat a la tesi i no a tu. Pel suport incondicional durant tots aquests anys, per què ens vam conèixer en un època complicada per mi, però ho has sabut portar molt bé. Per ajudar-me, escoltar-me, interessar-te pel que faig. Per fer-me riure quan més ho necessitava. Per que aquesta tesis també és teva! A partir d'ara s'obre una altre etapa, esperem que molt millor i vull que continuïs acompanyant-me en aquest viatge durant moltíssim anys més. T'estimo molt petit!

Moltes gràcies a tots, sense vosaltres no hagués estat possible!

Taula d'abreviatures

ABREVIATURES GENERALS

Abreviatures	Descripció
18S	Subunitat ribosomal 18
28S	Subunitat ribosomal 28
aa	Aminoàcids
ABA	Àcid absíctic
ABC	<i>ATP-binding-cassette</i>
ACP	Proteïna transportadora d'acils
Ade	Adenina
AHC	<i>Alkyl hydroxycinnamates</i>
al	Arrel lateral
AP2/ERF	<i>APETALA2/Ethylene responsive factor</i>
APT	Teixit parenquimàtic amilós (de l'anglès <i>amilos parenchymatic tissue</i>)
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
BAP	Citoquinines
BLASTN	<i>Protein (database)-nucleotide (query) BLAST</i>
BLASTP	<i>Protein(database)-protein (query) BLAST</i>
BLASTX	<i>Nucleotide (database)-nucleotide (query) BLAST</i>
bp	Parell de bases
BSTFA	<i>N-O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide</i>
BTH	<i>Benzothiadiazole</i>
C	Parènquima cortical
CASPL	<i>Casparian Strip Membrane Domain Proteins-like</i>
cDNA	DNA complementari
CFP	<i>Cyan fluorescent protein</i>
Cm	Centímetre
CoA	<i>Coenzim A</i>
CPV	Comparitment prevacuolar
Ct	<i>Threshold cycle</i>
CYPs	<i>Cytochrome P450 enzymes</i>
DCAAs	<i>α,ω-dicarboxylic acids</i>
DE	Diferencialment expressats
DEPC	Pirocarbonat de dietil
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DREB	<i>Dehydration-responsive element binding</i>
dscDNA	DNA complementari de doble cadena
DsRED	<i>Red fluorescent protein</i>
dsRNA	RNA de doble cadena
<i>E</i>	<i>Efficency (referred to primers)</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
en	Endodermis
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>

Abreviatures	Descripció
ex	exodermis
FAD	Desaturasa d'àcids grassos
FAE	complex elongació d'àcids grassos
FARs	<i>Fatty acyl reductases</i>
FAS	<i>Fatty Acid Synthetase complex</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FHT	<i>fatty ω-hydroxyacid/fatty alcohol hydroxycinnamoyl transferase</i>
FID	detector de ionització de flama
FPKM	<i>Fragments Per Kilobase Million</i>
fwd	<i>Forward (referred to primers)</i>
GA	Gibberel·lines
GC	Cromatògraf de gasos
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
GPATs	<i>Glycerol-3-phosphate acyltransferases</i>
GPI	<i>Glicosilfosfatidilinositol</i>
GUS	<i>β-glucuronidase gene</i>
h	Hores
His	Histidina
IAA	<i>Indole-3-acetic acid</i>
KH	<i>K homology (protein domain)</i>
l	Litres
LAC	<i>Laccase</i>
LACS	Acil-CoA sintetasa de cadena llarga
LCFA	Àcid gras de cadena llarga (de l'anglès <i>long fatty acid</i>)
LD-PCR	<i>Long distance PCR</i>
Leu	Leucina
LHD	Domini helicasa
LTP	<i>Lipid transfer protein</i>
M	Molar
MAMPS	<i>microbe-associated molecular patterns</i>
MCS	<i>membrane contact sites</i>
medi MS	<i>Murashige & Skoog</i>
medi SD	<i>Synthetic defined</i>
MeJA	<i>Methyl jasmonate</i>
mg	Miligrams
min	Minuts
miRNA	MicroRNA
ml	Mililitres
mm	Milimetre
mM	Milimolar
MMLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
mRNA	Àcid ribonucleic missatger
MS	Espectrofotòmetre de masses
N	Número de rèpliques

Abreviatures	Descripció
NADPH	<i>Nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat</i>
NBD	<i>Nucleotide binding domain</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanogram
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>
NJ	<i>Neighbor-Joining</i>
nm	<i>Nanòmetre</i>
nM	Nanomolar
NMD	<i>Non-sense mediated mRNA decay</i>
nº	Número
nsLTP	<i>Non-especific lipid transfer proteins</i>
nt	Nucleòtids
NTC	<i>Non templete control</i>
N-terminal	<i>Amine-terminal end</i>
O/N	<i>Over night</i>
°C	Graus Celsius
OD	Densitat òptica
OH	Alcohols
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
P	<i>Significance value</i>
PAL	<i>Fenilalanina amonia-liasa</i>
pb	Parell de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PD	Periderma
PDR	<i>Pleiotropic drug resistance</i>
PG	Fellogen (de l'anglès <i>phellogen</i>)
PGSC	<i>Potato Genome Sequencing Consortium</i>
PIN	<i>PIN-FORMED proteins</i>
PI	Floema (de l'anglès <i>phloem</i>)
PM	Fel·lema (de l'anglès <i>phellem</i>)
Pre-mRNA	Precursor mRNA
PR-proteins	<i>Pathogenesis-related proteins</i>
Prx	Peroxidases
PW	Paret primària (de l'anglès <i>primary wall</i>)
RE	Reticle endoplasmàtic
rev	<i>Reverse (referred to primers)</i>
RFP	<i>Red fluorescent protein</i>
Ri	<i>Inducttor de hairy roots / arrels peludes</i>
RNA	Àcid ribonucleic
RNAi	RNA d'interferència
RNA-seq	<i>RNA sequencing</i>
rpm	Revolucions per minut
RR	<i>Red root</i>
rRNA	<i>Ribosomal RNA</i>

Abreviatures	Descripció
RT	Retrotranscriptasa
RTA	<i>Relative transcript abundance</i>
RT-qPCR	PCR quantitativa transcriptasa reversa
s	Segons
SA	<i>Salicylic acid</i>
SAR	Resistència adquirida sistèmica
SSH	<i>Suppression subtractive hybridization</i>
SW	<i>Paret secundària (de l'anglès secondary wall)</i>
t'	Temps
TAIR	<i>The Arabidopsis Information Resource</i>
T-DNA	DNA transferència
TEM	Microscopi electrònic de transmissió
Ti	<i>Tumor inductor</i>
TMD	Domini transmembrana
TMS	Trimetilsilil
TRIS-HCl	<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride</i>
Trp	Triptòfan
TW	<i>Paret terciària (de l'anglès tertiary wall)</i>
UA	Unitat d'arsorvència
UV	Ultraviolada
VLCFA	<i>Àcid gras de cadena molt llarga (de l'anglès very long fatty acid)</i>
WBC	<i>White-brown complex</i>
Wd	<i>Xilema secundari o fusta (de l'anglès Wood)</i>
xl	Xilema
µg	Microgram
µl	Microlitre
µm	Micròmetre
µM	Micromolar
ω-OHs	ω-hidroxiàcids

ABREVIATURES DELS GENS

Gens àlies	Descripció
4CL1	<i>4-coumarate:CoA ligase 1</i>
4CL5	<i>4-coumarate:CoA ligase 5</i>
AALP	<i>Aleurain-Like Protease</i>
ABCG1	<i>ATP-BINDING CASSETTE G1</i>
ABCG10	<i>ATP-BINDING CASSETTE G10</i>
ABCG11/WBC11/DSO	<i>ATP-BINDING CASSETTE G11</i>
ABCG12/WBC12/cer5	<i>ATP-BINDING CASSETTE G12</i>
ABCG16	<i>ATP-BINDING CASSETTE G16</i>
ABCG2	<i>ATP-BINDING CASSETTE G2</i>
ABCG20	<i>ATP-BINDING CASSETTE G20</i>
ABCG23	<i>ATP-BINDING CASSETTE G23</i>
ABCG26/WBC27	<i>ATP-BINDING CASSETTE G26</i>
ABCG6	<i>ATP-BINDING CASSETTE G6</i>
ACCoA1	<i>Acetyl-CoA Carboxylase</i>
ADC2	<i>ARGININE DECARBOXYLASE 2</i>
ADE2	<i>ADEnine requiring</i>
AGO1	<i>ARGONAUTE 1</i>
ANAC102	<i>Arabidopsis NAC domain containing protein 102</i>
ANN1	<i>Annexin</i>
AP1	<i>APETALA1</i>
AP2/ERF59	<i>OCTADECANOID-RESPONSIVE ARABIDOPSIS AP2/ERF 59</i>
APA1	<i>ASPARTIC PROTEINASE A1</i>
APRT	<i>Adenine phosphoribosyl transferase</i>
APUM5	<i>PUMILIO 5</i>
APX2	<i>Ascorbate peroxidase</i>
AS1	<i>ASYMMETRIC LEAVES 1</i>
AS2	<i>ASYMMETRIC LEAVES 2</i>
ASFT/RWP1/FHT	<i>ALIPHATIC SUBERIN FERULOYL-TRANSFERASE</i>
ASL1	<i>ASYMMETRIC LEAVES 2-like 1</i>
ATERF1	<i>ARABIDOPSIS THALIANA RF DOMAIN PROTEIN 10</i>
ATERF4	<i>ARABIDOPSIS THALIANA RF DOMAIN PROTEIN 4</i>
ATFH8	<i>FOMIN 2</i>
ATGGH3	<i>GAMMA-GLUTAMYL HYDROLASE 3</i>
ATGSTU25	<i>GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 25</i>
ATL2	<i>TOXICOS EN LEVADURA 2</i>
ATMKK9	<i>MAP KINASE KINASE 9</i>
ATMPK3	<i>MAP KINASE KINASE 3</i>
ATOSM34	<i>OSMOTIN 34</i>
ATRH3	<i>DEAD box RNA helicase</i>
AUR1	<i>AUreobasidin A Resistance</i>
BAN	<i>Barely Any Meristem</i>
Bas	<i>β-Amyrin Synthase</i>
BI-1	<i>BAX inhibidor 1</i>

Gens àlies	Descripció
BRL3	<i>BRI1-like 3</i>
C4H	<i>Cinnamate-4-hydroxylase</i>
CAD9	<i>CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE 9</i>
CAF1-9	<i>CCR4-associated factor</i>
CASPL1C-1	<i>CASP-LIKE PROTEIN 1C1</i>
CCoAOMT1	<i>Caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase 1 (CCoAOMT1)</i>
CCR2	<i>Cinnamoyl CoA reductase</i>
CER2	<i>ECERIFERUM 2</i>
CER3	<i>ECERIFERUM 3</i>
CER7	<i>ECERIFERUM 7</i>
CesA3	<i>CONSTITUTIVE EXPRESSION OF VSP 1</i>
CHIC	<i>CLASS V CHITINASE</i>
CKX4	<i>Cytokinin oxidase 4</i>
CML23	<i>Calmodulin-like 23</i>
CML38	<i>Calmodulin-like 38</i>
CsID3	<i>Cellulose synthase-like D3 (CSLD3)</i>
CSY3	<i>CITRATE SYNTHASE 3,</i>
CYP712A1	<i>CYTOCHROME P450, FAMILY 712, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 1</i>
CYP86A1	<i>Cytochrome P450, family 86, subfamily A, polypeptide 1 (CYP86A1)</i>
CYP86A33	<i>Cytochrome P450, family 86, subfamily A, polypeptide 33 (CYP86A33)</i>
CYP86B1	<i>Cytochrome P450, family 86, subfamily B, polypeptide 1 (CYP86B1)</i>
DCL1	<i>Dicer Like 1</i>
DIR1	<i>Defective In Induced Resistance</i>
DWF1	<i>DWARF 1 (DWF1)</i>
ECR	<i>Ecdysone receptor</i>
EDA4	<i>Embryo sac development defective</i>
ERF104	<i>Ethylene responsive element binding factor 104</i>
ERF11	<i>Ethylene responsive element binding factor 11</i>
ERF38	<i>Erf domain protein 38 (ERF38)</i>
ETR2	<i>Ethylene response 2 (ETR2)</i>
EXPA1	<i>Expansin A1</i>
EXPA11	<i>Expansin A11</i>
EXPA6	<i>Expansin A6</i>
EXPA8	<i>Expansin A8 (EXPA8)</i>
EXPB2	<i>Expansin B2</i>
F5A	<i>Ferulate-5-hydrolase</i>
FACT	<i>Fatty Alcohol:Caffeoyl Transferase</i>
FAR1	<i>Fatty acyl-CoA reductase 1</i>
FAR3	<i>Fatty acyl-CoA reductase 3</i>
FAR4	<i>Fatty acyl-CoA reductase 4</i>
FAR5	<i>Fatty acyl-CoA reductase 5</i>
FATB	<i>Fatty acyl-ACP thioesterases B (FATB)</i>
FHT	<i>Fatty ω-hydroxyacid/fatty alcohol hydroxycinnamoyl transferase</i>
FIB2	<i>Fibrillarín 2</i>

Gens àlies	Descripció
FLC	<i>FLOWERING LOCUS C (FLC)</i>
Gal4	<i>Galactose-responsive transcription factor 4</i>
GASA5	<i>GAST1 protein homolog 5</i>
GID1B	<i>GA INSENSITIVE DWARF1B</i>
GLX2-3	<i>ETHYLMALONIC ENCEPHALOPATHY PROTEIN1</i>
GPAT5	<i>Glycerol-3-phosphate acyltransferase 5 (GPAT5)</i>
GPAT6	<i>Glycerol-3-phosphate acyltransferase 6</i>
HB-8	<i>HOMEODOMAIN GLABROUS 8</i>
HCBT	<i>N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase</i>
HCD	<i>β-hydroxyacyl-CoA dehydratase</i>
HDG1	<i>HOMEODOMAIN GLABROUS 1</i>
HHP1	<i>HEPTAHELICAL TRANSMEMBRANE PROTEIN1</i>
HIRA	<i>HOMOLOG OF HISTONE CHAPERONE HIRA</i>
HIS3	<i>Histidina 3</i>
HMGR1	<i>3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARYL COA REDUCTASE 1</i>
HSP17.4	<i>Heat Shock Protein 17.4</i>
HSP18.2	<i>Heat Shock Protein 18.2</i>
KASI	<i>3-KETOACYL-ACYL CARRIER PROTEIN SYNTHASE I</i>
KASIII	<i>3-KETOACYL-ACYL CARRIER PROTEIN SYNTHASE II</i>
KASIII	<i>3-KETOACYL-ACYL CARRIER PROTEIN SYNTHASE III</i>
KCR1	<i>Ketoacil reductase 1</i>
KCS	<i>3-KETOACYL-COA SYNTHASE</i>
KCS1	<i>3-KETOACYL-COA SYNTHASE 1</i>
KCS10	<i>3-KETOACYL-COA SYNTHASE 10</i>
KCS11	<i>3-KETOACYL-COA SYNTHASE 11</i>
KCS2/DAISY	<i>3-KETOACYL-COA SYNTHASE 2</i>
KCS20	<i>3-KETOACYL-COA SYNTHASE 20</i>
KCS3	<i>3-KETOACYL-COA SYNTHASE 3</i>
KCS4	<i>3-KETOACYL-COA SYNTHASE 4</i>
KCS6	<i>3-KETOACYL-COA SYNTHASE 6</i>
KH3	<i>HISTIDINE KINASE 3</i>
LAC12	<i>LACCASE 12</i>
LAC13	<i>LACCASE 13</i>
LAC14	<i>LACCASE 14</i>
LAC15	<i>LACCASE 15</i>
LAC16	<i>LACCASE 16</i>
LAC5	<i>LACCASE 5</i>
LAC7	<i>LACCASE 7</i>
LACS1	<i>LONG CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 1</i>
LACS12	<i>LONG CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 12</i>
LACS15	<i>LONG CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 15</i>
LACS2	<i>LONG CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 2</i>
LACS8	<i>LONG CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 8</i>
LACS9	<i>LONG CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 9</i>

Gens àlies	Descripció
LEA	<i>Late Embriogenesis Abundant</i>
LTPG1	GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL-ANCHORED LIPID PROTEIN TRANSFER 1
LTPG2	GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL-ANCHORED LIPID PROTEIN TRANSFER 2
LTPG6	GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL-ANCHORED LIPID PROTEIN TRANSFER 6
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MEL1	<i>α-galactosidase 1 precursor</i>
MLP328	<i>MLP-LIKE PROTEIN 328</i>
MLP329	<i>MLP-LIKE PROTEIN 329</i>
MYB102	<i>MYB DOMAIN PROTEIN 102</i>
MYB107	<i>MYB DOMAIN PROTEIN 107</i>
MYB41	<i>MYB DOMAIN PROTEIN 41</i>
MYB51	<i>MYB DOMAIN PROTEIN 51</i>
MYB52	<i>MYB DOMAIN PROTEIN 52</i>
MYB62	<i>MYB DOMAIN PROTEIN 62</i>
MYB69	<i>MYB DOMAIN PROTEIN 69</i>
MYB77	<i>MYB DOMAIN PROTEIN 77</i>
MYB9	<i>MYB DOMAIN PROTEIN 9</i>
MYB93	<i>MYB DOMAIN PROTEIN 93</i>
MYB96	<i>MYB DOMAIN PROTEIN 96</i>
NAC039	<i>NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 39</i>
NAC058	<i>NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 58</i>
NAC075	<i>NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 75</i>
P40	<i>40S RIBOSOMAL PROTEIN SA</i>
PAL	<i>PHENYLALANINE AMMONIA LYASE</i>
PAS2	<i>PASTICCINO 2</i>
PDF2.1	<i>LOW-MOLECULAR-WEIGHT CYSTEINE-RICH 70</i>
PDH (E1α)	<i>PYRUVATE DEHYDROGENASE E1 ALPHA</i>
PER11	<i>Peroxidase superfamily protein</i>
PER20	<i>Peroxidase superfamily protein</i>
PER23	<i>Peroxidase superfamily protein</i>
PGIP1	<i>POLYGALACTURONASE INHIBITING PROTEIN 1</i>
PGP2	<i>ATP-BINDING CASSETTE B2</i>
PIN3	<i>PIN-FORMED 3</i>
PIP2A	<i>Proteïna intrínseca de membrana plasmàtica 2A</i>
PME44	<i>Pectin methylesterase 44</i>
PPH	<i>PHEOPHYTINASE</i>
PR-1-LIKE	<i>PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN-1-LIKE</i>
PRX2	<i>Peroxidase superfamily protein</i>
PSY2	<i>SERINE CARBOXYPEPTIDASE-LIKE 32</i>
RACK1B/StRACK1B	<i>Receptor for activated kinase C1</i>
RAP2.6	<i>RELATED TO AP2 6</i>
RCN1/OsABCG5	<i>ATP-BINDING CASSETTE G1 (Oriva sativa)</i>
RD19	<i>RESPONSIVE TO DEHYDRATION 19</i>
RD21	<i>RESPONSIVE TO DEHYDRATION 21</i>

Gens àlies	Descripció
RD22	<i>RESPONSIVE TO DESICCATION 22</i>
RIK/StRIK	<i>RS2-INTERACTING KH PROTEIN</i>
RPL10AC	<i>Ribosomal protein L1p/L10e family</i>
RPL10B	<i>RIBOSOMAL PROTEIN LIKE 10B</i>
RPL13A	<i>RIBOSOMAL PROTEIN LIKE 13A</i>
RPL19B	<i>RIBOSOMAL PROTEIN LIKE 19B</i>
RPL24A	<i>RIBOSOMAL PROTEIN LIKE 24A</i>
RPL37C	<i>RIBOSOMAL PROTEIN LIKE 37C</i>
RPL4	<i>RIBOSOMAL PROTEIN L4</i>
RPL4A	<i>RIBOSOMAL PROTEIN LIKE 4A</i>
RPL4D	<i>RIBOSOMAL PROTEIN LIKE 4D</i>
RPL9D	<i>RIBOSOMAL PROTEIN LIKE 9D</i>
RPS17C	<i>Ribosomal S17 family protein</i>
RPS19C	<i>Ribosomal S19 family protein</i>
RPS4D	<i>Ribosomal S4 family protein</i>
RPS7C	<i>Ribosomal S7 family protein</i>
SAC51	<i>SUPPRESSOR OF ACAULIS 51</i>
SHN1	<i>SHINE 1</i>
SHN2	<i>SHINE 2</i>
SIB1	<i>SIGMA FACTOR BINDING PROTEIN 1</i>
SMT1	<i>STEROL METHYLTRANSFERASE 1</i>
SOC1	<i>SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1</i>
STC	<i>SALT TOLERANCE ZINC FINGER</i>
StERF135	<i>Solanum tuberosum ethylene-responsive factor 135</i>
StERF156	<i>Solanum tuberosum ethylene-responsive factor 156</i>
StERF162	<i>Solanum tuberosum ethylene-responsive factor 162</i>
StERF51	<i>Solanum tuberosum ethylene-responsive factor 51</i>
StERF93	<i>Solanum tuberosum ethylene-responsive factor 93</i>
StLTP1.3	<i>Solanum tuberosum lipid transfer protein 1.3</i>
STM	<i>SHOOT MERISTEMLESS</i>
StNAC103	<i>Solanum tuberosum NAC domain containing protein 103</i>
SUS1	<i>SUCROSE SYNTHASE 1</i>
SUS2	<i>SUCROSE SYNTHASE 2</i>
SUS4	<i>SUCROSE SYNTHASE 4</i>
SUS6	<i>SUCROSE SYNTHASE 6</i>
SZF1	<i>Salt-inducible zinc finger 1</i>
TRP1	<i>Phosphoribosylanthranilate isomerase</i>
UGT72B1	<i>UDP-GLUCOSE-DEPENDENT GLUCOSYLTRANSFERASE 72 B1</i>
VAS	<i>5-3 exonuclease family protein</i>
VEP1	<i>VEIN PATTERNING 1</i>
WOX13	<i>WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN PROTEIN 13</i>
WOX4	<i>WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN PROTEIN 4</i>
WRI1	<i>WRINKLED 1</i>
WRKY18	<i>WRKY DNA-BINDING PROTEIN 18</i>

Gens àlies	Descripció
WRKY19	<i>WRKY DNA-BINDING PROTEIN 19</i>
WRKY28	<i>WRKY DNA-BINDING PROTEIN 28</i>
WRKY39	<i>WRKY DNA-BINDING PROTEIN 39</i>
WRKY40	<i>WRKY DNA-BINDING PROTEIN 40</i>
WRKY43	<i>WRKY DNA-BINDING PROTEIN 43</i>
WRKY53	<i>WRKY DNA-BINDING PROTEIN 53</i>
WRKY70	<i>WRKY DNA-BINDING PROTEIN 70</i>
WRKY75	<i>WRKY DNA-BINDING PROTEIN 75</i>
WSD	<i>Will Die Slowly 1</i>
WSIP2	<i>WUSCHEL WUS-INTERACTING PROTEIN 2</i>

ÍNDIX DE FIGURES

1.Introducció

Figura 1. Estructura del periderma del tubercle de patatera.	4
Figura 2. Capes cicatritzants en un tubercle de patatera ferit.	6
Figura 3. L'estructura macromolecular de la suberina en la paret cel·lular segons l'observació de la suberina lamel·lar al TEM i la seva composició química.	8
Figura 4. Esquema resum de la localització subcel·lular i les etapes principals de la biosíntesi dels monòmers de suberina/ceres associades i la similitud amb la cutina/ceres epicuticulars.	9
Figura 5. Possibles mecanismes i localitzacions cel·lulars de l'assemblatge de la suberina i la cutina (i les ceres associades).	12
Figura 6. Esquema general d'un transportador ABC.	12
Figura 7. Esquema model on es representa una hipòtesi del possible mecanisme de transport lipídic en les cèl·lules de l'arrel.	15
Figura 8. Anatomia dels dos models principals per l'estudi del periderma: escorça externa o suro de l'alzina surera (<i>Quercus suber</i>) i periderma de tubercle de patatera (<i>Solanum tuberosum</i>).	16
	18

3.Resultats i discussió

Apartat 3.1 Identificació de proteïnes que interaccionen amb StRIK mitjançant el mètode del dos híbrids en llevat

Figura 9. Comprovació d'RNA i cDNA.	32
Figura 10. Assajos de toxicitat i autoactivació del gens candidats a esquer (<i>StRIK</i> i <i>StERF93</i>).	33
Figura 11. <i>Heatmap</i> d'expressió en diferents teixits dels gens que codifiquen per proteïnes interactants segons el sistema del dos híbrids i la proteïna d'estudi <i>StRIK</i> .	40
Figura 12. Representació de l'expressió <i>in silico</i> dels gens que codifiquen per proteïnes interactants segons el sistema del dos híbrids (<i>StCisteïna proteïnasa 3</i> , <i>StRACK1B</i> i <i>StERF135</i>) en diferents tractaments d'estrès i hormonals	42
Figura 13. Localitzacions subcel·lulars de les proteïnes d'estudi <i>StRIK</i> , <i>StRACK1B</i> , <i>StCisteïna proteïnasa 3</i> i <i>StERF135</i> .	56
Figura 14. Coexpressió de les proteïnes <i>StCisteïna proteïnasa 3</i> i <i>StRACK1B</i> amb la proteïna <i>StRIK</i> .	57
Figura 15. Recompte de nuclis observats en la coexpressió de la proteïna <i>StRIK</i> amb la proteïna <i>StRACK1B</i> i localització d' <i>StRACK1B</i> a dins i fora del nucli.	58

Apartat 3.2 Identificació i caracterització de gens candidats de la regulació i el transport dels monòmers de suberina

Figura 16. <i>Heatmap</i> i agrupació jeràrquica de diferents teixits amb 35 gens ERF de la família IX de <i>Solanum tuberosum</i> varietat Phureja	61
Figura 17. Arbre filogenètic d' <i>StERF93</i> , els seus paràlegs a patata i els respectius possibles ortòlegs a <i>Arabidopsis</i> .	62

Figura 18. Alineament de les seqüències d'StERF93 i els seus paràlegs StERF51, StERF156 i StERF162 en patata.	63
Figura 19. Representació de l'expressió <i>in silico</i> d'StERF93 en diferents tractaments d'estrès i hormonal segons dades d'RNAseq	64
Figura 20. Expressió tissular d'StERF93.	65
Figura 21. Localització subcel·lular de la proteïna StERF93.	69
Figura 22. Arbre filogenètic d'StLTPI.3 i els seus possibles ortòlegs a Arabidopsis.	70
Figura 23. Alineament de les seqüències de LTP del grup I d'Arabidopsis i la proteïna d'estudi StLTPI.3.	71
Figura 24. <i>Heatmap</i> representant els nivells d'expressió (FPKM) d'StLTPI.3 en diversos teixits	73
Figura 25. Expressió tissular d'StLTPI.3.	78
Figura 26. Localització subcel·lular de la proteïna StLTPI.3.	79
Figura 27. Arbre filogenètic dels ABCGs del grup WBC d'Arabidopsis i els possibles ortòlegs a patata involucrats en la biosíntesi de la suberina.	83
Figura 28. Alineament de les seqüències StABCG relacionades amb el transport de lípids.	85
Figura 29. Anàlisi d'expressió <i>in silico</i> en diferents teixits i òrgans dels gens StABCG d'estudi del grup WBC de <i>Solanum tuberosum</i> grup Phureja.	86
Figura 30. Representació de l'expressió <i>in silico</i> dels diferents StABCG d'estudi en diferents tractament d'estrès i hormonal.	87
Figura 31. Anàlisi del patró d'expressió mitjançant RT-qPCR dels StABCG candidats en diferents òrgans (tija, arrel i fulla) i teixits (parènquima i fel·lema del tubercle) expressats en RTA (abundància relativa de transcrit).	88
Figura 32. Nivells d'expressió post-ferida al llarg del temps dels diferents StABCGs d'estudi en tubercle ferit amb dues rèpliques	94
Figura 33. Localització de les proteïnes StABCG1, StABCG20 i StABCG23 i colocalització d'aquestes amb la proteïna de membrana PIP2A.	96

Apartat 3.3 Genètica funcional de la suberina en arrels de patata

Figura 34. Planta de patatera infectada per <i>A. rhizogenes</i> tres setmanes després de la inoculació, moment en que es traspassen les arrels transformades a una placa amb medi Gamborg B5.	104
Figura 35. Cronograma per obtenir arrels transformades de patata mitjançant <i>A. rhizogenes</i> .	106
Figura 36. Transformació d'arrels de patatera via <i>A. rhizogenes</i> .	107
Figura 37. Expressió de GUS i GFP dirigida pel promotor de l' <i>FHT</i> en l'exodermis, l'endodermis i emergència d'arrels laterals en arrels transformades.	109
Figura 38. Resultat de la digestió amb pectinasa i cel·lulasa d'arrels transformades observat des del microscopi d'epifluorescència Olympus VANOX-T.	110

Figura 39. Efecte de les quantitats de teixit en el perfil lipídic de la suberina en les arrels.	111
Figura 40. Comparativa d'arrels natives cultivades en hidropònic i d'arrels transformades amb <i>A.rhizogenes</i> .	113
Figura 41. Efectes de la transformació d'arrels peludes en la composició química de la suberina.	114
Figura 42. Representació de l'abundància relativa de transcrit pel gens <i>CYP86A33</i> , <i>StERF93</i> , <i>StABCG20</i> i <i>StLTP1.3</i> en les arrels natives anomenades <i>Red Root</i> i en les arrels peludes silenciades.	116
 Apartat 3.4 <u>El transcriptoma del fel·lema durant el creixement estacional</u>	
Figura 43. Correlació entre dades del Log2Ratio obtingut en els experiments de RT-qPCR i RNAseq.	118
Figura 44. Representació de la via de la biosíntesi de la suberina i el seu export a la paret cel·lular on es mostren agrupacions de gens identificats en l'RNAseq amb funció relacionada amb la suberina.	121
Figura 45. Representació de la via de la biosíntesi de la suberina i el seu export a la paret cel·lular on es mostra una proposta d'agrupacions de gens candidats identificats en l'RNAseq.	122
Figura 46. Anàlisi de l'expressió diferencial de les mostres per mesos.	127
Figura 47. Visió general MapMan del metabolisme dels contigs diferencialment expressats.	130
Figura 48. Visió general MapMan de l'estrès biòtic i abiòtic dels contigs diferencialment expressats.	131
Figura 49. Agrupacions dels transcrits segons el seu patró d'expressió al llarg dels mesos assajats.	133
Figura 50. Categories enriquides dels contigs de cada clúster agrupades a termes GO jeràrquics superiors mitjançant l'eina bioinformàtica ReviGO.	138
 4. Discussió general	
Figura 51. Cronograma del desenvolupament estacional del suro en els tres mesos assajats.	166
 6. Material i mètodes	
Figura 52. Visió general del procés de còpia dels mRNAs i síntesi de doble cadena de cDNA.	178
Figura 53. Esquema representatiu de la formació del clon <i>Entry</i> , a partir del pDNOR™207.	179
Figura 54. Esquema representatiu de la formació d'un clon <i>Expression</i> a partir del clon <i>Entry</i> i un vector de destí.	180
Figura 55. Vectors d'expressió utilitzats en llevat.	182
Figura 56. Vectors d'expressió utilitzats per localització subcel·lular.	186
Figura 57. Procés de transformació de <i>Nicotiana benthamiana</i> .	187
Figura 58. Esquema del vector de destí pK7GWIWG-II Red-Root.	192

Material suplementari

Apartat 3.1 Identificació de proteïnes que interaccionen amb *StRIK* mitjançant el mètode del dos híbrids en llevat

Figura suplementària 1. Representació pictogràfica de l'expressió de l'*StERF135* a partir de les dades d'eFP Browser. 227

Figura suplementària 2. Representació pictogràfica de l'expressió del *StRACK1B* a partir de les dades d'eFP Browser. 228

Figura suplementària 3. Representació pictogràfica de l'expressió del StCisteïna proteïnasa 3 a partir de les dades d'eFP Browser. 229

Apartat 3.2 Identificació i caracterització de gens candidats de la regulació i el transport dels monòmers de suberina

Figura suplementària 4. Representació pictogràfica de l'expressió de l'*StERF93* a partir de les dades d'eFP Browser. 230

Figura suplementària 5. Arbre filogenètic d'*StERF93*, els seus paràlegs a patata i els respectius possibles ortòlegs a Arabidopsis. 231

Figura suplementària 6. Arbre filogenètic d'*StLTPI.3* i els seus possibles ortòlegs a Arabidopsis. 232

Figura suplementària 7. Representació pictogràfica de l'expressió d'*StLTPI.3* a partir de les dades d'eFP Browser. 233

Figura suplementària 8. Arbre filogenètic dels ABCGs del grup WBC d'Arabidopsis i els possibles ortòlegs a patata involucrats en la biosíntesi de la suberina. 234

Figura suplementària 9. Gràfics de predicció de dominis transmembrana en les proteïnes StABCGs candidates utilitzant el programa TMHMM Server v.2.0. 235

Figura suplementària 10. Representació pictogràfica de l'expressió d'*StABCG1* a partir de les dades de eFP Browser. 236

Figura suplementària 11. Representació pictogràfica de l'expressió d'*StABCG10* a partir de les dades d'eFP Browser. 237

Figura suplementària 12. Representació pictogràfica de l'expressió d'*StABCG11* a partir de les dades de eFP Browser. 238

Figura suplementària 13. Representació pictogràfica de l'expressió d'*StABCG20* a partir de les dades d'eFP Browser. 239

Figura suplementària 14. Representació pictogràfica de l'expressió d'*StABCG23* a partir de les dades de eFP Browser. 240

Apartat 3.4 El transcriptoma del fel·lema durant el creixement estacional

Figura suplementària 15. La comparativa del patró d'expressió individual de cada un dels gens validats (Taula Suplementària 4) al llarg dels mesos (abril, juny i juliol) **244** segons qRT-PCR i RNAseq.

ÍNDIX DE TAULES

3. Resultats i discussió

Apartat 3.1 Identificació de proteïnes que interaccionen amb StRIK mitjançant el mètode del dos híbrids en llevat

Taula 1. Anotació de les proteïnes seqüenciades extretes del cribratge de la llibreria de cDNA mitjançant seqüenciació.	35
Taula 2. Gens que es coexpressen amb <i>Cisteïna proteïnasa 3</i> , agrupats per categories funcionals, segons el <i>Genemania</i> .	43
Taula 3. Gens que es coexpressen amb <i>ERF135</i> , agrupats per categories funcionals, segons el <i>Genemania</i> .	44
Taula 4. Gens que es coexpressen amb <i>RACK1B</i> , agrupats per categories funcionals, segons el <i>Genemania</i> .	45
Taula 5. Elements reguladors en <i>cis</i> de la possible regió promotora d' <i>StCisteïna proteïnasa 3</i> agrupat per categories funcionals.	47
Taula 6. Elements reguladors en <i>cis</i> de la possible regió promotora d' <i>StERF135</i> agrupat per categories funcionals.	50
Taula 7. Elements reguladors en <i>cis</i> de la possible regió promotora d' <i>StRACK1B</i> agrupat per categories funcionals.	53

Apartat 3.2 Identificació i caracterització de gens candidats de la regulació i el transport dels monòmers de suberina

Taula 8. Elements reguladors en <i>cis</i> de la possible regió promotora d' <i>StERF93</i> agrupat per categories funcionals.	66
Taula 9. Elements reguladors en <i>cis</i> de la possible regió promotora d' <i>StLTP1.3</i> agrupat per categories funcionals.	74
Taula 10. Gens que es coexpressen amb <i>AtLTP1.3</i> , agrupats per categories funcionals, segons el <i>Genemania</i> .	80
Taula 11. Elements reguladors en <i>cis</i> de la possible regió promotora dels diferents ABCGs estudiats (<i>StABCG1</i> , <i>StABCG10</i> , <i>StABCG11</i> , <i>StABCG20</i> , <i>StABCG23</i>) agrupats per categories funcionals.	89
Taula 12. Gens que es coexpressen amb <i>ABCG1</i> , agrupats per categories funcionals, segons el <i>Genemania</i> .	98
Taula 13. Gens que es coexpressen amb <i>ABCG10</i> , agrupats per categories funcionals, segons el <i>Genemania</i> .	99
Taula 14. Gens que es coexpressen amb <i>AtABCG11</i> , agrupats per categories funcionals, segons el <i>Genemania</i> .	100
Taula 15. Gens que es coexpressen amb <i>AtABCG20</i> , agrupats per categories funcionals, segons el <i>Genemania</i> .	101
Taula 16. Gens que es coexpressen amb <i>AtABCG23</i> , agrupats per categories funcionals, segons el <i>Genemania</i> .	102

Apartat 3.4 El transcriptoma del fel·lema durant el creixement estacional

Taula 17. Nombre de contigs diferencialment expressats en las categories funcionals (bins) en el MapMan.	128
Taula 18. Contigs diferencials comentats al clúster 1.	139
Taula 19. Contigs diferencials comentats al clúster 2.	139
Taula 20. Contigs diferencials comentats al clúster 3.	140
Taula 21. Contigs diferencials comentats al clúster 4.	140
Taula 22. Contigs diferencials comentats al clúster 5.	141
Taula 23. Paràmetres de qualitat dels <i>primers</i> usats per la PCR a temps real	190

Material suplementari

3. Resultats i discussió

Apartat 3.3 Genètica funcional de la suberina en arrels de patata

Taula suplementària 1. Control de línies utilitzades durant els assajos de RT-qPCR i posteriors.	241
---	------------

Apartat 3.4 El transcriptoma del fel·lema durant el creixement estacional

Taula suplementària 2. Resum dels anàlisis bioinformàtics	242
Taula suplementària 3. Base de dades dels contigs generats amb el RNAseq	•
Taula suplementària 4. Es mostren els noms complets dels gens, abreviacions (àlies) i els valors de Log ₂ FC per RNAseq i qRT-PCR utilitzats per a la validació del RNA-seq.	243
Taula suplementària 5. Dades utilitzades pels <i>Heatmaps</i> dels gens coneguts de suberina segons l'Aralip.	245
Taula suplementària 6. Dades utilitzades pels <i>Heatmaps</i> dels gens presents a l'Aralip però no relacionats amb suberina.	247
Taula suplementària 7. Categories funcionals enriquides dels diferents clústers ordenats per <i>p_value</i> i compactades mitjançant el programa ReviGO. Es mostra únicament el procés biològic	251

6. Material i mètodes

Taula suplementària 8. <i>Primers</i> usats per al desenvolupament d'aquesta tesi	255
--	------------

- Es troba en format digital

ÍNDEX

TAULA D'ABREVIATURES	xii
ÍNDEX DE FIGURES.....	xiii
ÍNDEX DE TAULES.....	xivi
ÍNDEX.....	xiv
RESUM	xvi
RESÚMEN.....	xvi
SUMMARY	xvii
1.INTRODUCCIÓ.....	1
1.1-El periderma: teixit protector en plantes.....	3
1.1.1-Formació i desenvolupament del periderma.....	3
1.2-La suberina i ceres associades	6
1.2.1-La composició química de la suberina i les ceres associades.....	6
1.2.2-El polímer tipus lignina que acompanya la suberina depositada en el fel·lema.	7
1.2.3-Organització macromolecular de la suberina en la paret cel·lular.....	7
1.2.4-Biosíntesi de suberina, ceres associades a la suberina i del polímer tipus lignina.....	8
1.2.5-Transport de monòmers i oligòmers de suberina i de les ceres associades a la suberina	11
1.2.5.1-Els transportadors ABC.....	13
1.2.5.2-Les proteïnes transportadores de lípids (nsLTP)	15
1.2.6-Regulació del procés de suberificació	17
1.3-Models de plantes per a l'estudi del periderma.....	18
1.3.1-L'alzina surera com a planta model per a l'estudi del fel·lema.....	18
1.3.1.1-El fel·lema de surera per identificar gens candidats	19
1.3.1.2-El fel·lema d'alzina surera per estudiar a nivell molecular el creixement estacional del suro	21

1.3.2-La patatera com a planta model per a l'estudi del fel·lema	22
1.3.2.1-El fel·lema de patata per identificar gens candidats de la formació del fel·lema i la suberina	22
1.3.2.2-El fel·lema de patata per estudis de genètica funcional del fel·lema i la suberina	23
2. OBJECTIUS	25
3. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	29
3.1-Identificació de proteïnes que interaccionen amb <i>StRIK</i> mitjançant el mètode del dos híbrids en llevat.....	31
3.1.1-Construcció de la llibreria de dos híbrids	31
3.1.2-Assajos de toxicitat d' <i>StRIK</i> i capacitat d'activació dels gens reporters utilitzats pel sistema del doble híbrid	32
3.1.3-Cerca d'interactors d' <i>StRIK</i> en la llibreria de fel·lema	34
3.1.3.1-Screening de la llibreria i obtenció de gens candidats	34
3.1.3.2-Selecció de candidats.....	38
3.1.3.3-Anàlisi <i>in silico</i> dels gens candidats	39
3.1.3.4-Localització subcel·lular	55
3.1.3.5-Coexpressió de la proteïna StCisteïna proteïnasa 3 i <i>StRACK1B</i> amb la proteïna <i>StRIK</i>	57
3.2-Identificació i caracterització de gens candidats de la regulació i el transport dels monòmers de suberina	60
3.2.1-ERF: candidat de la regulació del teixit.....	60
3.2.1.1-Identificació dels ERFs de patata candidats per tenir un paper en el fel·lema	60
3.2.1.2-Homologia, filogènia i identificació dels dominis conservats d' <i>StERF93</i>	61
3.2.1.3-Predicció de la regulació d' <i>StERF93</i> per estrès	63
3.2.1.4-Expressió en teixits nadius de patatera d' <i>StERF93</i>	65
3.2.1.5-Expressió en teixits cicatricials d' <i>StERF93</i>	68
3.2.1.6-Localització subcel·lular d' <i>StERF93</i>	68

3.2.2-LTP (<i>Lipid transfer protein</i>): candidat del transport dels monòmers de suberina i ceres associades a la suberina	69
3.2.2.1-Homologia i filogènia d'StLTPI.3	69
3.2.2.2-Identificació dels motius conservats d'StLTPI.3	71
3.2.2.3-Patró d'expressió <i>in silico</i> d'StLTPI.3.....	72
3.2.2.4-Expressió en teixits nadius de patatera d'StLTPI.3	78
3.2.2.5-Expressió en teixits cicatricials d'StLTP I.3	79
3.2.2.6-Localització subcel·lular de StLTP I.3.....	79
3.2.2.7-Anàlisi de coexpressió de diversos gens amb <i>AtLTPI.3</i>	80
3.2.3-Els transportadors ABCGs de patatera: StABCGs	81
3.2.3.1-Homologia i filogènia dels StABCGs.....	81
3.2.3.2-Identificació dels motius conservats dels StABCGs	84
3.2.3.3-Patró d'expressió <i>in silico</i> dels StABCGs.....	85
3.2.3.4-Expressió en teixits nadius de patatera dels gens StABCGs	88
3.2.3.5-Expressió en teixits cicatricials dels StABCGs.....	94
3.2.3.6-Localització subcel·lular dels StABCGs	95
3.2.3.7-Anàlisi de coexpressió de diversos gens amb els gens StABCGs.....	96
3.3-Genètica funcional de la suberina en arrels de patata	103
3.3.1-Disseny i optimització del procediment de la transformació de patatera.....	103
3.3.1.1-Protocol i cronograma per a l'obtenció d'arrels transformades	104
3.3.1.2-Obtenció d'arrels fluorescents	106
3.3.2-Transformació genètica mediada per <i>A. rhizogenes</i> per a l'estudi de promotors: p <i>FHT</i> com a model	107
3.3.3-Transformació genètica a través d' <i>A. rhizogenes</i> per a l'estudi de gens candidats de la suberina	109
3.3.3.1-Anàlisi composicional de la suberina de les arrels transformades via <i>A.rhizogenes</i>	110
3.3.3.2-Obtenció d'arrels amb gens candidats de la suberina silenciats.....	114
3.4-El transcriptoma del fellema durant el creixement estacional	117

3.4.1-Seqüenciació, assemblatge i anotació del transcriptoma de fel·lema	117
3.4.2-Validació RT-qPCR	117
3.4.3-Nous gens candidats en la formació de la suberina	119
3.4.4-Anàlisi de l'expressió diferencial	126
3.4.4.1-Visualització dels processos diferencialment expressats mitjançant MapMan	128
3.4.4.2- Agrupacions segons el patró d'expressió dels contigs diferencialment expressats i anàlisi de les categories funcionals enriquides	132
4. DISCUSSIÓ GENERAL.....	145
4.1-StRIK modifica la localització subcel·lular d'StRACK1B, relacionada amb maduració post-transcripcional.....	147
4.2-La Cisteïna proteïnasa 3 presenta compatibilitats amb la interacció amb StRIK	149
4.3-StERF93, candidat per a la regulació dels teixits suberificats de patata.....	150
4.4-StLTPI.3 és un ferm candidat a permetre la formació de la correcta suberificació de la paret suberificada del fel·lema	151
4.5-Els transportadors ABCG de patata candidats per a exportar monòmers i/o oligòmers de la suberina cap a la paret cel·lular.....	153
4.6-Les arrels peludes com a model d'estudi de teixits suberitzats	155
4.7-Les arrels peludes expressen de manera correcta gens relacionats amb la suberina i en mantenen la seva composició química	156
4.8-Transcriptoma del fel·lema d'alzina surera durant l'etapa de creixement	157
4.9-L'alta expressió i la inducció màxima durant el mes de juny dels gens coneguts de la biosíntesi, transferència i transport de la suberina proposa nous candidats	158
4.10-La regulació de la biosíntesi de la suberina apunta a nous candidats	161
4.11-L'agrupació dels perfils d'acumulació de transcrits evidencia quins processos són predominants en les diferents etapes.....	163
5. CONCLUSIONS.....	169
6. MATERIAL I MÈTODES.....	173

6.1-Identificació de proteïnes que interaccionen amb <i>StRIK</i> mitjançant el mètode del dos híbrids en llevat	175
6.1.1-Etapes prèvies a la creació d'una llibreria de cDNA.....	175
6.1.1.1-Extracció d'RNA pel mètode Z6.....	175
6.1.1.2-Digestió amb DNAsa	176
6.1.1.3-Gel d'electroforesi d'RNA amb gel de formaldehid	176
6.1.1.4-Purificació de l'mRNA	177
6.1.1.5-Síntesis de cDNA.....	177
6.1.2-Clonatge d' <i>StRIK</i> (ó <i>StERF93</i>) per <i>screenar</i> la llibreria utilitzant la metodologia Gateway.....	178
6.1.2.1-Disseny d'encebadors específics amb extensions attB per amplificar <i>StRIK</i> (ó <i>StERF93</i>).....	180
6.1.2.2-PCR per amplificar <i>StRIK</i> (ó <i>StERF93</i>) flanquejats pels attBs.....	181
6.1.2.3-Clonació d' <i>StRIK</i> (ó <i>StERF93</i>) en vector d'expressió de llevat	181
6.1.3-Construcció de la llibreria de dos híbrids de cDNA de fellema de patata.....	183
6.1.3.1-Preparació de cèl·lules competents de llevat.....	183
6.1.3.2-Construcció de la llibreria de dos híbrids	183
6.1.3.3- <i>Screening</i> de la llibreria de dos híbrids.....	184
6.1.4-Localització subcel·lular i coexpressió en fulla de tabac mediada per <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	185
6.1.4.1-Observació de mostres al microscopi.....	187
6.2-Identificació i caracterització de gens candidats de la regulació i el transport dels monòmers de suberina	188
6.2.1-Bases de dades i eines bioinformàtiques	188
6.2.2-Construcció d'un filograma.....	189
6.2.3-Determinació de l'abundància relativa de transcrit per RT-PCR.....	189
6.2.3.1-Extracció d'RNA, tractament DNasa i síntesi de cDNA.....	189
6.2.3.2-PCR a temps real	189
6.2.4-Determinació de la localització subcel·lular	191

6.2.4.1-Amplificació dels gens candidats amb els extrems attBs.....	191
6.2.4.1-Clonació dels gens candidats i transformació transitòria en <i>Nicotiana benthamiana</i>	191
6.3-Genètica funcional de la suberina en arrels de patata.....	192
6.3.1-Generació de vectors binaris necessaris per al silenciament gènic.....	192
6.3.2-Transformació d'arrels de patata mitjançant <i>Agrobacterium rhizogenes</i> ..	193
6.3.2.1-Transformació usant <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	193
6.3.2.2-Cultiu d'arrels transformades (<i>Hairy roots</i>).....	194
6.3.3-Anàlisi de l'expressió gènica per PCR quantitativa	195
6.3.3.1-Extracció d'RNA i digestió DNasa.....	195
6.3.3.2-Obtenció de cDNA i anàlisi del silenciament mitjançant RT-qPCR.....	195
6.3.4-Assaig del gen <i>reporter GUS</i>	196
6.3.5-Anàlisi de suberina i ceres.....	196
6.3.5.1-Digestió enzimàtica de les arrels.....	196
6.3.5.2-Compostos de ceres solubles en solvents orgànics.....	197
6.3.5.3-Extracció dels monòmers de suberina –transesterificació.....	197
6.3.5.4-Derivatització amb BSTFA (N-O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide). 197	
6.3.5.5-Anàlisi cromatogràfic	198
6.3.5.6-Anàlisi estadístic	198
6.4-Anàlisi transcripcional del creixement estacional del suro.....	199
6.4.1-Recollida de mostres, extracció d'RNA.....	199
6.4.2-Bioinformàtica,	199
6.4.3-Agrupament de les mostres.....	200
6.4.5-Validació de l'RNAseq	201
6.4.6-Realització dels <i>heatmaps</i>	201
6.5- Altres protocols relacionats amb el tractament de bacteris.....	202
6.5.1-Obtenció de cèl·lules competents d' <i>E.coli</i>	202
6.5.2-Obtenció de cèl·lules competents d' <i>Agrobacterium</i>	202

BIBLIOGRAFIA	203
ANNEX SUPLEMENTARI.....	227
Material suplementari apartat 3.1.....	227
Material suplementari apartat 3.2.....	230
Material suplementari apartat 3.3.....	241
Material suplementari Material i mètodes.....	242

RESUM

El periderma és una estructura molt complexa que protegeix els òrgans secundaris (madurs) de la planta i els teixits cicatricials davant la deshidratació, la radiació solar i l'atac dels patògens. Aquesta funció barrera la dóna el fel·lema, un teixit pluriestratificat format per cèl·lules amb parets cel·lulars suberificades situat a la part externa del periderma. La suberina és un polímer bàsic per la protecció gràcies a la seva naturalesa lipídica. De forma excepcional l'alzina surera té una gran capacitat per produir capes de fel·lema, teixit conegut com a suro. En els últims anys, estudis transcriptòmics i proteòmics, així com de genètica inversa, han contribuït al coneixement de la formació i regulació del periderma i la síntesi i transport de la suberina. No obstant, les bases moleculars que controlen aquests processos són encara força desconegudes, tot i la importància del fel·lema i la suberina per la supervivència de les plantes terrestres.

Pel que fa a la regulació, d'*RS2-interacting KH* (StRIK) dir que és una proteïna d'unió a RNA que s'ha relacionat amb la regulació post-transcripcional i la regulació epigenètica en resposta a estrès, processos molt desconeguts en el fel·lema. El sistema dels dos híbrids ha permès identificar possibles proteïnes interactores d'StRIK, d'entre les quals destaca StRACK1B, una proteïna que regula els nivells de miRNAs i modula el desenvolupament vegetal a *Arabidopsis*. StRACK1B es mobilitza a nucli amb més freqüència en presència d'StRIK, suggerint una interacció en planta entre les dues proteïnes.

Per tal d'aprofundir en la regulació i el transport de lípids del teixit, es proposen com a candidats un *Ethylene Response Factor* (*StERF93*), una proteïna transportadora de lípids *StLTPI.3* i varis membres de la família de transportadors ABCG, els quals s'expressen de manera específica en teixits suberificats, entre altres característiques.

Actualment, la genètica funcional de la suberina en patatera (*Solanum tuberosum*) requereix de temps i molts esforços. Com a sistema alternatiu, s'han obtingut arrels transformades via *Agrobacterium rhizogenes*, les quals no presenten canvis significatius en el teixit en quant a l'activació de la biosíntesi dels monòmers de suberina, ni en la composició final del polímer. A més, s'ha aconseguit obtenir arrels silenciades pels gens *CYP86A33*, *StLTP1.3*, *StERF93* i *StABCG20*.

Per tal d'ampliar els coneixements sobre la formació del fel·lema durant l'estació de creixement, s'ha realitzat un anàlisi global del transcriptoma de l'escorça externa (suro) de l'alzina surera (*Quercus suber*) durant el seu creixement, generant 404.970 contigs i evidenciant que els transcriptomes de juny i juliol són més homogenis que el d'abril. Pel que fa als gens coneguts de la biosíntesi, transport i regulació de la suberina i ceres associades, tenen una expressió elevada i presenten un pic d'expressió màxim durant el mes de juny, un comportament que ens ha permès identificar nous gens candidats. L'agrupament dels gens

diferencialment expressats mostra un grup amb pic màxim d'expressió a l'abril enriquit en senyalització, un amb pic al juny enriquit en processos d'oxidació-reducció i metabolisme secundari, i un altre al juliol, enriquit en estrès abiòtic. Aquests resultats són coherents amb l'activitat que té lloc en el suro durant l'estació de creixement.

RESUMEN

La peridermis es una estructura muy compleja que protege a los órganos secundarios (maduros) de la planta y los tejidos cicatriciales de la deshidratación, la radiación solar y el ataque de los patógenos. Esta función barrera la proporciona el felema, un tejido pluriestratificado formado por células con paredes celulares suberificadas situado en la parte externa de la peridermis. La suberina es un polímero básico para la protección gracias a su naturaleza lipídica. De forma excepcional el alcornoque tiene una gran capacidad para producir capas de felema, tejido conocido como corcho. En los últimos años, estudios transcriptómicos y proteómicos, así como de genética inversa, han contribuido al conocimiento de la formación y regulación de la peridermis y la síntesis y transporte de la suberina. Sin embargo, las bases moleculares que controlan estos procesos son aún muy desconocidas, a pesar de la importancia del felema y la suberina en la supervivencia de las plantas terrestres.

Referente a la regulación, de *RS2-interacting KH* (StRIK) es una proteína de unión a RNA que se ha relacionado con la regulación post-transcripcional y la regulación epigenética en respuesta a estrés, procesos muy desconocidos en el felema. El sistema de los dos híbridos ha permitido identificar posibles proteínas interactoras de StRIK. De entre las cuales destaca StRACK1B, una proteína que regula los niveles de miRNAs y modula el desarrollo vegetal en *Arabidopsis*. StRACK1B se moviliza a núcleo con más frecuencia en presencia de StRIK, sugiriendo una interacción en planta entre las dos proteínas.

Para profundizar en la regulación y el transporte de lípidos del tejido, se proponen como candidatos un *Ethylene Response Factor* (*StERF93*), una proteína transportadora de lípidos *StLTPI.3* y varios miembros de la familia de transportadores ABCG, los cuales se expresan de manera específica en tejidos suberificados, entre otras características.

Actualmente, la genética funcional de la suberina en patatera (*Solanum tuberosum*) requiere de tiempo y muchos esfuerzos. Como sistema alternativo, se han obtenido raíces transformadas vía *Agrobacterium rhizogenes*, las cuales no presentan cambios significativos en el tejido en relación con la activación de la biosíntesis de los monómeros de suberina, ni en la composición final del polímero. Además, se han conseguido raíces silenciadas para los genes *CYP86A33*, *StLTP1.3*, *StERF93* y *StABCG20*.

Para ampliar el conocimiento sobre la formación del felema durante la estación de crecimiento, se ha realizado un análisis global del transcriptoma de la corteza externa (corcho) del alcornoque (*Quercus suber*) durante su crecimiento, generando 404.970 contigs y evidenciando que los transcriptomas de junio y julio son más homogéneos que los de abril. En relación con los genes conocidos de la biosíntesis, transporte y regulación de la suberina y ceras asociadas, tienen una expresión elevada y presentan un pico de expresión máximo durante el mes de

junio, un comportamiento que nos ha permitido identificar nuevos genes candidatos. La agrupación de los genes diferencialmente expresados muestra un grupo con pico máximo de expresión en abril enriquecido en la señalización, otro con pico en junio enriquecido en procesos de oxidación-reducción y metabolismo secundario, y otro en julio, enriquecido en estrés abiótico. Estos resultados son coherentes con la actividad que tiene lugar en el corcho durante la estación de crecimiento.

SUMMARY

The periderm is a very complex structure that protects plants' secondary (mature) organs and wounded tissues against dehydration, solar radiation and pathogen attack. This barrier function is given by the phellem, a multilayered tissue formed by cells with suberized cell walls located on the outer part of the periderm. Suberin is a basic polymer for protection thanks to its lipid nature. Exceptionally, the cork oak has a great capacity to produce layers of phellem, known as cork. Recently, transcriptomic and proteomic studies, as well as reverse genetic approaches, have contributed to the knowledge of the formation and regulation of the periderm and the synthesis and transport of the suberin components. However, the molecular bases that control these processes are still quite unknown, despite the importance of phellem and suberin for the survival of terrestrial plants.

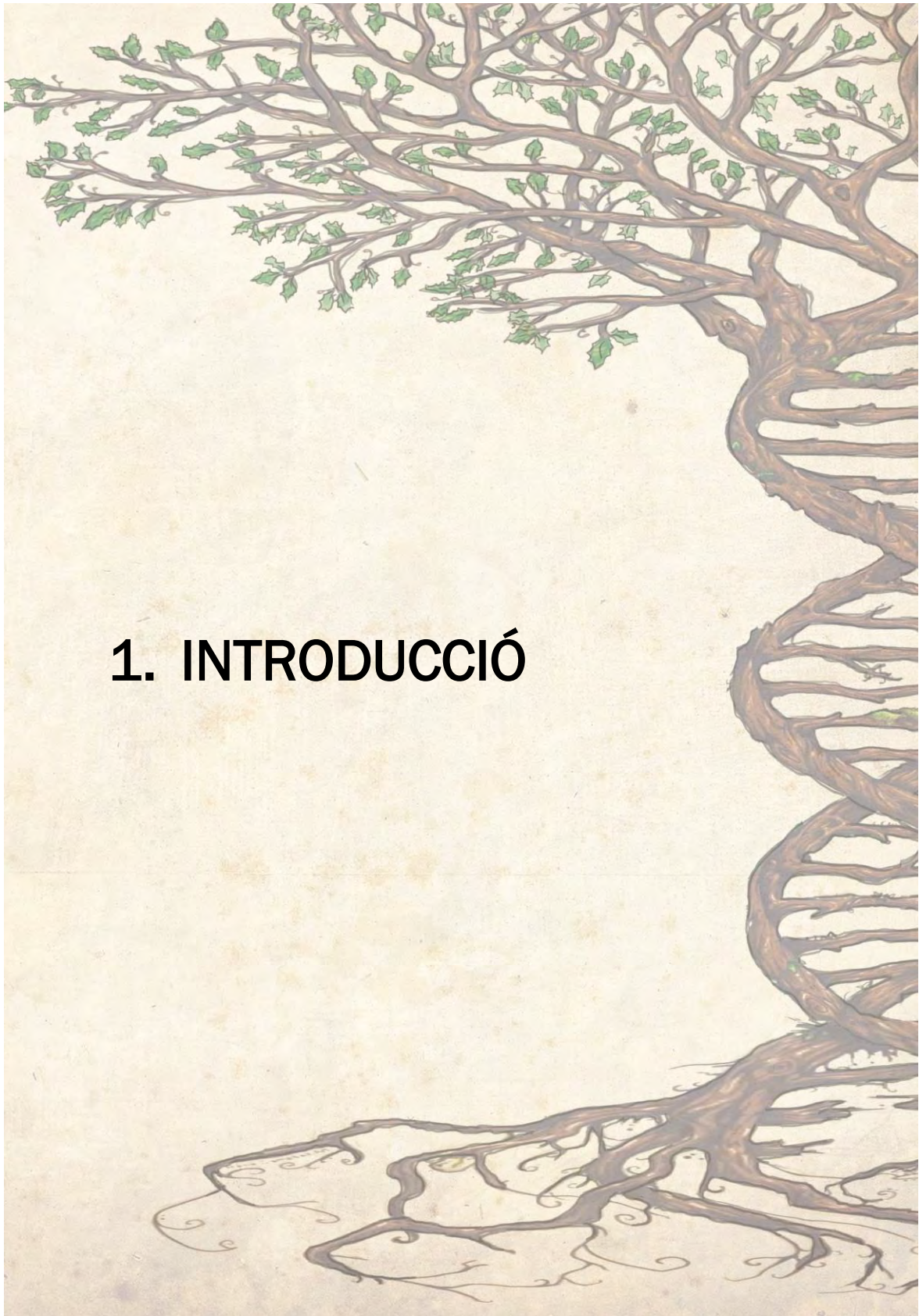
In terms of regulation, RS2-interacting KH (StRIK) is a RNA-binding protein related in post-transcriptional regulation and epigenetic regulation in response to stress; processes are unknown in the phellem. The yeast two-hybrid system has allowed identifier putative protein interactors of StRIK, of which StRACK1B, a protein that regulates the levels of miRNAs and modulates plant development in Arabidopsis. StRACK1B is mobilized to nucleus more frequently in the presence of StRIK, suggesting a plant interaction between the two proteins.

To contribute to a better understanding in the regulation and transport of lipids of the periderm, an Ethylene Response Factor (StERF93), a Lipid Transfer Protein (StLTPI.3) and several members of ABCG family of transporters are proposed as candidates, which are specifically expressed in suberized fabrics, among other characteristics.

Currently, the functional genetics of suberin in potato (*Solanum tuberosum*) tuber is time-consuming and laborious. As an alternative system, transformed potato roots have been obtained using *Agrobacterium rhizogenes*. These do not present significant changes in the tissue activation of suberin biosynthesis or in the final composition of the suberin polymer. In addition, silenced roots for the genes *CYP86A33*, *StLTP1.3*, *StERF93* and *StABCG20* have been obtained.

To extend the knowledge about the formation of the phellem during the growing season, we carried out a global transcriptome analysis of the outer bark (cork) of cork oak (*Quercus suber*) during its growth, generating 404,970 contigs and showing that the transcriptomes of June and July are more homogeneous than that of April. In relation to the genes involved in the biosynthesis, transport and regulation of suberin and associated waxes, they have a high transcript accumulation and present a peak of maximum expression in June, a trend that allowed us to identify new candidate genes.

The cluster of differentially expressed genes shows a group with maximum expression peak in April enriched in signalling, another with peak in June enriched in oxidation-reduction processes and secondary metabolism, and another in July, enriched in abiotic stress. Altogether, these results are consistent with the activity that occurs in cork during the growing season.



1. INTRODUCCIÓ

1.1-El periderma: teixit protector en plantes

Les primeres plantes terrestres van aparèixer fa aproximadament 450 milions d'anys. La seva adaptació al medi terrestre va obligar-les a desenvolupar diferents estructures que els hi permetessin sobreviure i conquerir aquest medi. Algunes d'aquestes innovacions van ser: (i) el desenvolupament de teixits de sosteniment que els hi permetés créixer en contra de la gravetat (esclerènquima i colènquima), (ii) el desenvolupament d'un sistema òptim d'ancoratge i d'absorció per a captar l'aigua i els nutrients del sòl (arrels), i (iii) el desenvolupament d'un sistema eficient de transport d'aquests fluids (xilema i floema). A més, va ser necessari que les plantes desenvolupessin una barrera de protecció contra la pèrdua d'aigua a la vegada que permetés l'intercanvi de CO₂ i O₂ per la fotosíntesi i la respiració (Lendzian, 2006). La barrera que fa aquesta funció en els òrgans primaris aeris de les plantes vasculars (fulles, tiges primàries, flors, pecíols i alguns fruits) és la cutícula, una capa de recobriment acel·lular contínua secretada per l'epidermis, la qual conté cutina i ceras associades. El complex epidermis-cutícula protegeix a la planta enfront la deshidratació però també de l'entrada de patògens. En les arrels amb creixement primari, normalment l'endodermis (i a vegades l'exodermis) són les capes protectores que controlen la pèrdua d'aigua i l'entrada de patògens entre d'altres funcions (Geldner, 2013). No obstant, el complex epidermis-cutícula i l'endodermis/exodermis no tenen capacitat de regeneració quan pateixen danys, ja sigui ferides o durant el creixement secundari en gruix derivat de l'activació del càmbium vascular. És per això, que per mantenir la protecció dels òrgans les barreres protectores primàries seran substituïdes pel periderma, una estructura complexa que protegeix als teixits interns de la pèrdua d'aigua, contribueix al segellat de les ferides i evita l'entrada dels patògens (Lendzian, 2006).

1.1.1-Formació i desenvolupament del periderma

El periderma es pot trobar en tiges llenyoses, arrels i tubercles, i es forma a partir d'un meristema lateral anomenat fel·logen. El periderma està format per tres tipus de teixits diferents: el fel·logen o càmbium suberós, que és la capa meristemàtica; el fel·lema o suro que és el responsable de la funció barrera del teixit i que es diferencia de les cèl·lules derivades del fel·logen externes; i el fel·loderma de tipus parenquimàtic i que es forma de les derivades del fel·logen internes (Figura 1). El periderma conté lenticel·les que són àrees aerenquimatoses intercalades en el fel·lema que permeten l'intercanvi gasós entre la part interna de la planta i l'atmosfera. Així, el complex periderma-lenticel·les durant el creixement secundari substituiria la funció cutícula-epidermis-estoma durant el creixement primari.

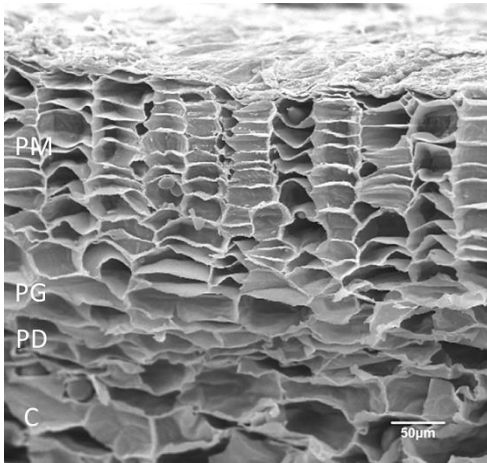


Figura 1. Estructura del periderma del tubercle de patatera. Imatge obtinguda mitjançant un microscopi electrònic de rastreig. Es mostren les capes del periderma: fel·lema (PM), fel·logen (PG) i fel·loderma (PD), i el parènquima cortical (C). Escala = 50 μm . Extreta de Serra et al., (2009b).

Si bé la formació del periderma és un procés biològic comú en les arrels i tiges de les plantes llenyoses i tubercles, també es dona en les parts més velles d'algunes plantes herbàcies i en algunes monocotiledònies. A més, també es pot generar en superfícies exposades a zones d'abscisió de les plantes, i en el desenvolupament de capes protectores de teixits necrosats o ferits en resposta a una ferida o a l'atac d'un patògen formant un periderma cicatricial. En la superfície dels fruits també es troba un tipus de periderma el qual desenvolupa l'anomenat fenotip *russeting* que resulta del reemplaçament de la substitució de les capes exteriors de la fruita de manera parcial o total per sobre de la superfície (Evert RF, 2006).

El fel·logen és un meristema secundari format per la desdiferenciació cel·lular de cèl·lules parenquimàtiques més externes al cambium vascular que posteriorment experimentaran divisions periclinals (Fahn, 1967). En tiges, el primer fel·logen es desdiferencia en la subepidermis mentre que els fel·lògens posteriors es poden formar per desdiferenciació de cèl·lules del floema secundari. En arrels, el fel·logen es produeix generalment en el pericicle. A nivell morfològic es creu que la primera divisió és de tipus periclinal amb dues cèl·lules resultants: la cèl·lula interna es diferenciarà en fel·loderma (que normalment està composta per una única capa de cèl·lules) i la cèl·lula externa experimentarà una segona divisió periclinal resultant novament en dues cèl·lules més. La nova cèl·lula més externa es diferenciarà en fel·lema (suro) i la cèl·lula interna constituirà el fel·logen inicial que continuarà dividint-se periclinalment, tot i que ocasionalment, pot formar divisions anticlinals per tal de poder mantenir la continuïtat de la capa en un òrgan que creix radialment (Fahn, 1967). La majoria de cèl·lules derivades del fel·logen formaran part del fel·lema i unes poques contribuiran a la capa/es de fel·loderma, el que es coneix com a un creixement asimètric del fel·logen. El nombre de capes de cèl·lules del fel·lema i fel·loderma és variable i depèn de cada espècie.

En plantes llenyoses on el creixement radial és massiu i perdura durant molts anys, el primer periderma es desenvolupa normalment durant el primer any del creixement de la tija o l'arrel després de que l'activació del cambium vascular hagi donat lloc a nou xilema i floema secundari. En properes anualitats, el fet que l'activitat del fel·logen format no pugui compassar la gran activitat del cambium vascular, comportarà que el periderma es trenqui i la seva funció sigui reemplaçada per un nou periderma format més profund. Aquest procés s'anirà repetint al llarg de les anualitats fet que produirà que els nous fel·lògens més profunds es puguin formar fins i tot per desdiferenciació del floema secundari. Els teixits que queden externs al nou periderma queden exempts d'aigua i nutrients i formen juntament amb el nou periderma l'escorça externa o ritidoma. Hi ha determinades espècies com *Betula*, *Fagus*, *Abies* o *Quercus suber* que el ritme de formació del periderma pot compassar l'activitat del cambium vascular pel que el periderma pot ser retingut de per vida o durant molts anys i com a conseqüència, el fel·lema pot adquirir grans gruixos com és el cas del suro a l'alzina surera. En aquests tipus de peridermes permanents es poden arribar a observar anells de creixement anuals en el fel·lema o suro degut als diferents tipus de cèl·lules produïdes al llarg de les diferents estacions.

Les monocotiledònies rarament produeixen un periderma tal i com el coneixem en les angiospermes. No obstant, en algunes monocotiledònies llenyoses, incloent les palmeres, es produeix un tipus especial de teixit protector que es forma per la divisió de cèl·lules de parènquima cortical. Aquestes cèl·lules de parènquima que es van dividint i es disposen en capes més profundes pateixen suberització. D'aquesta manera el suro es desenvolupa sense necessitat d'una capa inicial o fel·logen ben format i s'anomena suro estratificat. A mesura que la formació del suro va progressant cap a l'interior, altres cèl·lules poden quedar incrustades entre les cèl·lules del suro, formant un teixit anàleg al ritidoma de les angiospermes llenyoses (Evert RF, 2006).

El periderma cicatricial es desenvolupa en aquells llocs on el teixit vegetal viu està exposat a l'aire com a conseqüència d'una ferida (Figura 2). La formació del periderma cicatricial és precedit per una capa impermeable de cèl·lules anomenada capa de tancament que es forma immediatament per sota les cèl·lules necrosades de la ferida. Per sota d'aquesta capa, el fel·logen es forma i constitueix el periderma cicatricial, produint suro o fel·loderma de manera habitual (Evert RF, 2006).

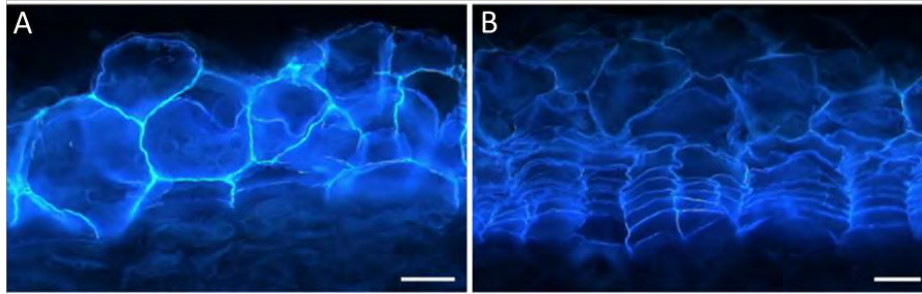


Figura 2. Capes cicatritzants en un tubercle de patatera ferit. (A) Als 5 dies s'observa la formació de la capa de tancament (B) i als 56 dies s'aprecia més internament la disposició en columnes de cèl·lules del fel·lema. Imatges de seccions sota llum ultraviolada (UV) en les que s'observa l'autofluorescència de la suberina/lignina a les parets cel·lulars. Escala = 5 µm. Extret de Neubauer et al., (2012).

El fel·lema o suro, el qual forma la capa externa del periderma, és un teixit multicapa que produeix cèl·lules amb parets que contenen suberina. La suberina és un polièster insoluble que en el fel·lema va acompanyada de quantitats considerables de lípids solubles, anomenats ceres associades a la suberina les quals contribueixen també a reduir la pèrdua d'aigua a través de les parets cel·lulars (Soliday et al., 1979; Vogt et al., 1983). Generalment, les cèl·lules del fel·lema es disposen de manera compacta, pel que el teixit no té espais intercel·lulars (Evert RF, 2006). Les cèl·lules immadures del fel·lema són parenquimatoses i tenen la paret cel·lular fina, però durant la maduració, es diposita una capa gruixuda de suberina en les parets produint la mort de les cèl·lules. El protoplasma cel·lular es perd i el lumen s'omple, a vegades d'aire o a vegades de substàncies com resina o tanins (Fahn, 1969).

1.2-La suberina i ceres associades

1.2.1-La composició química de la suberina i les ceres associades

La suberina és, igual que la cutina, un polièster derivat d'àcids grassos de tipus insoluble. La suberina en el fel·lema està acompanyada de ceres, les quals són àcids grassos de cadena molt llarga, solubles en solvents orgànics i que, per tant, es poden extreure fàcilment amb solucions orgàniques tipus cloroform o metanol (Bernards, 2002; Franke et al., 2005; Pollard et al., 2008).

A través de la despolimerització de la suberina i posterior anàlisi químic mitjançant cromatografia de gasos s'han identificat i quantificat aproximadament al voltant d'un 70-80% dels monòmers que formen aquest polièster. La suberina correspon a un polièster lipídic format per àcids grassos de cadenes llargues (>11 carbonis) i molt llargues (>20 carbonis) (LCFA, VLCFAs) i un conjunt de monòmers derivats d'aquests (com ara els ω -hidroxiàcids,

α,ω -diàcids, polihidroxiàcids, així com altres compostos derivats d'alcohols), glicerol i petites quantitats d'àcids hidroxicinàmics, generalment àcid ferúlic (Graça & Santos, 2007; Pollard et al., 2008). La composició de la suberina pot variar lleugerament entre els diferents òrgans i espècies. Un exemple n'és la suberina del fel·lema del tubercle de patatera que és comparable a la de les arrels de patata, present en l'endodermis principalment, encara que la de les arrels conté cadenes d'àcids grassos i derivats més curtes i una major abundància relativa d' α,ω -diàcids (Company-Arumí et al., 2016).

Les ceres associades a la suberina estan compostes de molts àcids grassos lliures, alcohols primaris, alcans i èsters d'àcid ferúlic amb alcohols primaris (Lai et al., 2007). La composició química de les ceres és variable depenent de l'òrgan i l'espècie i també poden incloure triterpenoids i metabòlits secundaris, així com esterols i flavonoids, com és el cas del suro (Castola et al., 2005). Les ceres s'associen amb la suberina mitjançant enllaços hidrofòbics no covalents, per això s'extreuen amb dissolvents orgànics, i tenen un paper molt important en la funció protectora del fel·lema ja que la seva extracció s'associa amb un gran increment en la permeabilitat hídrica (Schreiber et al., 2005). Tot i tenir una funció important en la protecció del periderma, en el tubercle de patatera només representen aproximadament un 5% dels lípids totals.

1.2.2-El polímer tipus lignina que acompanya la suberina depositada en el fel·lema

La suberina del fel·lema està acompanyada d'un polímer tipus lignina format principalment d'àcids hidroxicinàmics com l'àcid ferúlic, els seus derivats com la feruloiltiramina i monolignols (Bernards, 2002; Kolattukudy, 1980). Els monòmers aromàtics s'uneixen entre ells a través de l'acoblament de radicals lliures, i els enllaços principals són C – C i de tipus èter (C-O-C).

L'organització i el tipus d'enllaç entre la suberina i el polímer tipus lignina no es coneix amb exactitud però treballs recents apunten que els èsters de derivats d'àcids grassos amb l'àcid ferúlic podrien contribuir-hi (Graça et al., 2015; Serra et al., 2010; Serra et al., 2014).

1.2.3-Organització macromolecular de la suberina en la paret cel·lular

La suberina es diposita internament en la paret primària formant una capa lipídica contínua amb aparença lamel·lar o estratificada sota el Microscopi Electrònic de Transmissió (TEM) (Figura 3A) perquè s'alternen capes electro-denses amb capes electro-translúcides orientades en paral·lel a la paret cel·lular primària (Thomson et al., 1995). S'ha proposat que les bandes fosques corresponen a l'àcid ferúlic i les bandes clares als compostos alifàtics del polièster (Bernards, 2002; Graça & Santos, 2007). El model proposat per Bernards (2002) es mostra a

la Figura 3B i en ell es presenta la distribució del polièster de suberina (domini polialifàtic) i el polímer de tipus lignina (domini poli aromàtic), aquest últim formant part de la paret primària i unit a ella a través d'enllaços amb els carbohidrats dels polisacàrids.

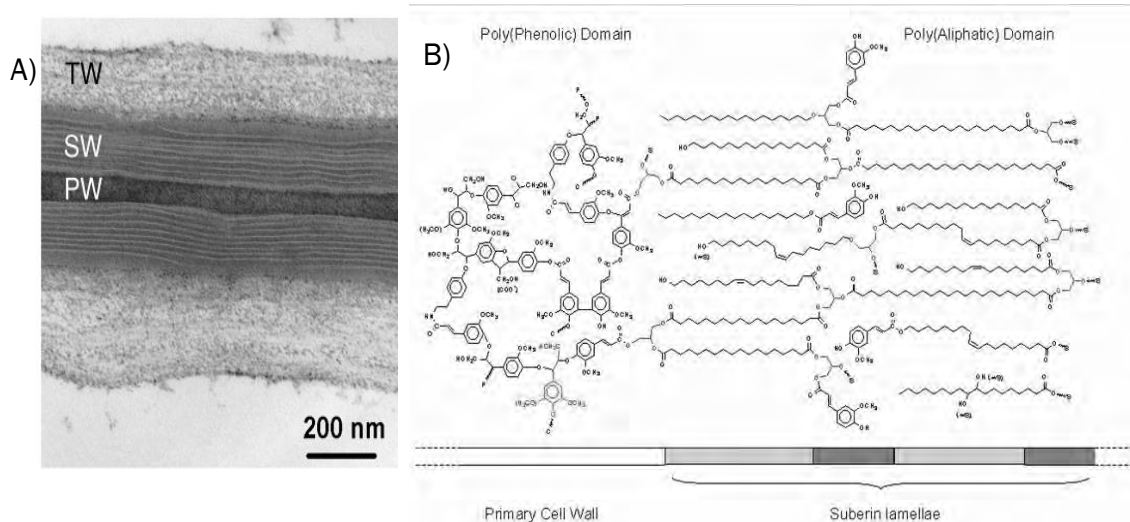


Figura 3. L'estructura macromolecular de la suberina en la paret cel·lular segons l'observació de la suberina lamel·lar al TEM i la seva composició química. (A) Organització de la suberina lamel·lar en la paret cel·lular suberificada del fel·lema. Micrografia obtinguda amb el microscopi TEM de la paret cel·lular entre dues cèl·lules de fel·lema del tubercle de patatera. S'indiquen la paret primària (PW) i la paret terciària (TW), ambdues de caràcter polisacàrid, així com la paret secundària suberificada (SW) formant la lamel·la típica de suberina. Extret de Serra et al., 2009b. (B) Model d'organització de la suberina en una estructura macromolecular. El polímer de tipus lignina es mostra restringit a la paret cel·lular primària i està unit covalentment a unitats de carbohidrats. La suberina està representada per un polièster basat en unitats de glicerol. Les zones predominantment alifàtiques de la suberina correspondrien a les bandes translúcides, mentre que les zones riques en compostos fenòlics de la suberina donaria les bandes opaques (C: hidrats de carboni; P: compostos fenòlics; S: suberina). Model proposat per Bernards (2002).

1.2.4-Biosíntesi de suberina, ceres associades a la suberina i del polímer tipus lignina

La biosíntesi dels monòmers (Figura 4) de la suberina, igual que la cutina i els compostos cèrics cuticulars, es dona a l'interior cel·lular i ha estat objecte d'estudi durant els últims anys, aportant molts dels gens/enzims que hi participen (Beisson et al., 2012). La biosíntesi de la suberina comparteix gens/enzims que són també importants per la biosíntesi de la cutina, un polièster d'àcids grassos i derivats també basat en unitats de glicerol que es troba secretada en la cutícula dels òrgans aeris (Li et al., 2007). Així doncs l'activació, l'oxidació i l'esterificació de l'acil (derivat de l'àcid gras) amb el glicerol són etapes catalitzades per enzims comuns en la biosíntesi de la cutina i la suberina, mentre que l'elongació i la reducció de l'acil i

l'esterificació amb l'àcid ferúlic requereixen enzims específics per a la suberina i la cutina, el que contribueix a la seva composició diferencial (Beisson et al., 2012). D'igual manera, les ceres associades a la suberina també podrien tenir vies comunes amb els gens/enzims de les ceres cuticulars, i a la vegada s'ha descrit que comparteixen precursors amb la suberina (Li et al., 2007; Serra et al., 2009b).

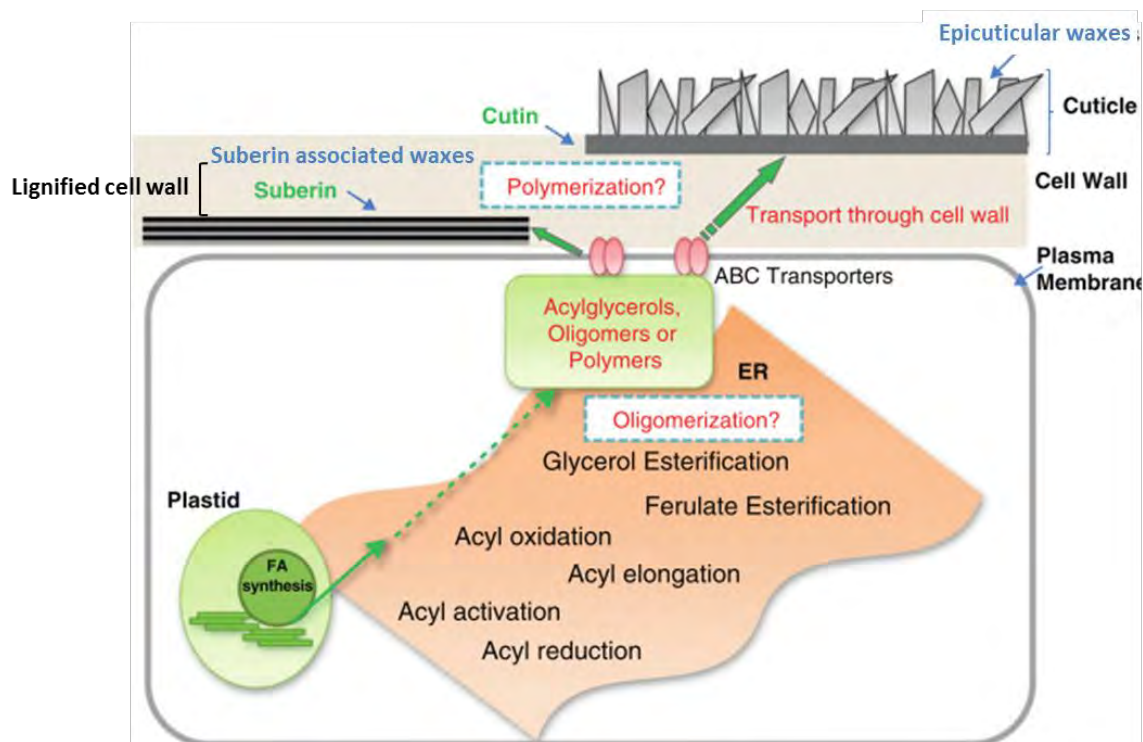


Figura 4. Esquema resum de la localització subcel·lular i les etapes principals de la biosíntesi dels monòmers de suberina/ceres associades i la similitud amb la de la cutina/ceres epicuticulars. L'ordre de les reaccions no implica que la biosíntesi es doni en aquesta seqüència. Les unitats de polimerització (monòmers o oligòmers) haurien de ser transportades a través de la membrana plasmàtica per arribar a la paret cel·lular on acabarien de formar el polièster. Modificat de Beisson et al., (2012).

Les ceres i els monòmers alifàtics de la suberina estan formats bàsicament per àcids grassos i derivats. La síntesi d'àcids grassos de cadena llarga C16 i C18 (també C18:1) té lloc al plastidi i aquests serveixen com a precursors per a la resta de monòmers. Un cop exportats del plastidi, aquests poden ser elongats i modificats en el reticle endoplasmàtic (RE). S'ha de tenir en compte però, que els precursors de cadena llarga seran utilitzats per a sintetitzar també les ceres associades a la suberina, els glicerolípids i els triacilglicerols de la membrana. L'elongació d'àcids grassos és necessària per a produir VLCFA i compostos derivats, els quals es troben tant a la suberina com a les ceres associades. El complex d'elongació d'àcids grassos (FAE) catalitza la incorporació de carbonis en els àcids grassos en elongació, no

obstant abans es requereixen tres passos (Schnurr et al., 2004): l'alliberació de la proteïna transportadora d'àcils (ACP) mitjançant un tioesterasa acil-ACP (Bonaventure et al., 2003), l'activació del tioèster CoA mitjançant un Acil-CoA sintetasa de cadena llarga (LACS) i la transferència al RE. Un cop l'àcid gras es troba al RE i està unit al CoA, el complex FAE afegeix seqüencialment dos carbonis a la cadena acil en creixement a través d'una sèrie de quatre etapes catalitzades per quatre enzims diferents: condensació del malonil-CoA amb l'acil-CoA de cadena llarga, reducció de β -hidroxiacil-CoA, deshidratació a l'acil-CoA enoil-elongat i una segona reducció de l'enoil-CoA (Samuels et al., 2008). La reacció de condensació es duu a terme per una o varies 3-ketoacil-CoA sintases (KCS) les quals són específiques de la longitud de la cadena de l'àcid gras (Todd et al., 1999). Una vegada els VLCFAs s'han produït, aquests es modificaran per obtenir els derivats d'àcids grassos de suberina i/o ceres associades a la suberina. Els alcohols són produïts mitjançant la via d'acil-reducció, mentre que els alcans es produeixen mitjançant la via de la descarboxilació (Kunst & Samuels, 2003). Els compostos ω -hidroxiàcids i els corresponents α,ω -diàcids es produeixen mitjançant la via de la ω -oxidació i són components exclusius de la suberina, no es troben a les ceres associades. La hidroxilació dels àcids grassos en la posició ω (posició terminal) està catalitzada per monooxigenases citocrom P450 dependents de Nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat (NADPH) com els *CYP86A1* i *CYP86B1* d'*Arabidopsis* (Höfer et al., 2008; Compagnon et al., 2009; Molina et al., 2009) i el *Cytochrome P450, Family 86, Subfamily A, Polypeptide 33 (CYP86A33)* en patata (Serra et al., 2009b). La formació d' α,ω -diàcids a partir de la ω -hidroxilació pot incloure dues reaccions catalitzades per deshidrogenases d' ω -hidroxiàcids i ω -oxoàcids (Kolattukudy, 2001; Kurdyukov et al., 2006) o una única reacció, (Le Bouquin et al., 2001) encara que cap d'elles s'ha demostrat directament amb la biosíntesis de suberina. Les modificacions de mitja cadena en els monòmers de suberina alifàtica poden ser produïts per un citocrom P450 o mitjançant la via dependent de peroxigenasa (Kandel et al., 2006; Kolattukudy, 2001), mentre que les insaturacions es poden formar mitjançant desaturases d'àcids grassos (FADs) (Graça & Pereira, 2000a; Schreiber et al., 2005). El glicerol es creu que entra en la via biosintètica de la suberina com a fosfoglicerol (Nawrath, 2002); l'àcid ferúlic s'incorporaria a la suberina a través de l'acció de l'FHT/ASFT, enzim que permet la unió de l'àcid ferúlic amb ω -hidroxiàcids i alcohols primaris (Gou et al., 2009; Kosma et al., 2012; Molina et al., 2009; Serra et al., 2010).

La biosíntesi del polímer tipus lignina es basa en el metabolisme dels fenilpropanoïds començant amb la desaminació de la fenilalanina mitjançant l'enzim fenilalanina amoní-liase (PAL) (Kolattukudy, 1981). La via dels fenilpropanoïdes conté varies reaccions enzimàtiques,

incloent hidroxilació, metilació, lligació i reducció del coenzim A, així com la formació d'àcids hidroxicinàmics (àcid ferúlic, sinàpic, cafeic i p-coumaric) i monolignols (alcohol p-coumaril, coniferil i sinapil) (Boerjan et al., 2003; Boudet et al., 2003). Els àcids hidroxicinàmics es poden activar per una 4-coumarat:coenzim A lligasa (4CL) i s'incorporen al polímer mitjançant l'acció de hidroxicinamoil:coenzim A transferases (Bernards, 2002; Bernards & Lewis, 1998), tal i com s'ha demostrat amb els enzims d'Arabidopsis, patata i pollancre *AHHT/ASFT*, *FHT*, *PtFHT* (Gou et al., 2009; Molina et al., 2009; Serra et al., 2010). Aquest polímer tipus lignina es diposita primer (Yang & Bernards, 2007) i es polimeritza a l'interior de la paret primària, mentre que la suberina es polimeritza formant una matriu entre la paret primària i la membrana plasmàtica.

1.2.5-Transport de monòmers i oligòmers de suberina i de les ceres associades a la suberina

Els monòmers de la suberina o els oligòmers parcialment formats necessiten ser transportats del RE cap a la membrana plasmàtica per a poder ser exportats i posteriorment polimeritzats a l'apoplast per formar la suberina. Tot i que el transport d'aquests compostos tot just es comença a entendre, la polimerització de la suberina encara és molt desconeguda. El transport entre el RE i la membrana plasmàtica es dona mitjançant la via de secreció. Recentment s'ha vist que l'exportació de les ceres cuticulars a l'apoplast pot donar-se a través del tràfic vesicular mediat per l'aparell de Golgi i trans-Golgi per alliberar el *cargo* als transportadors ABC (*ATP-binding cassette*) localitzats a la membrana plasmàtica (McFarlane et al., 2014).

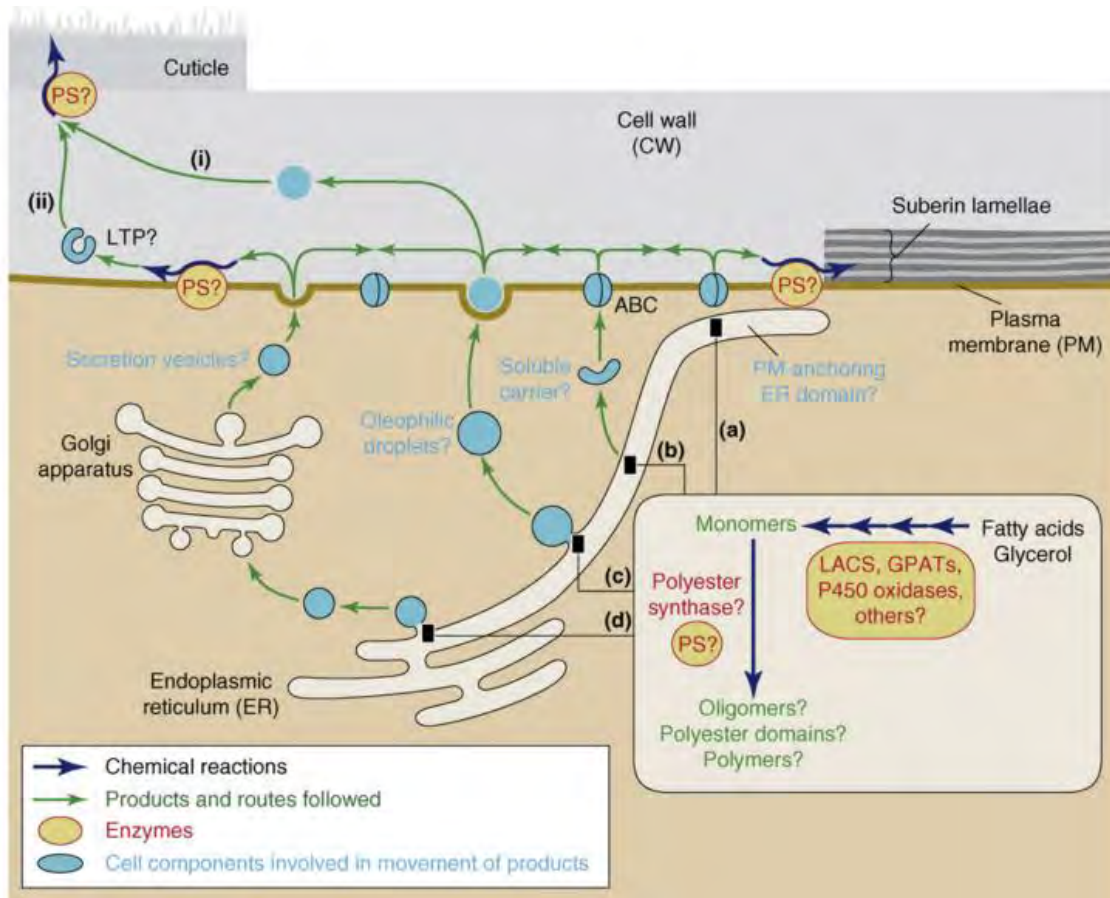


Figura 5. Possibles mecanismes i localitzacions subcel·lulars de l'assemblatge de la suberina i la cutina (i les ceras associades). Els enzims de la síntesi de monòmers es creu que estan localitzats al reticle endoplasmàtic (RE). Es mostren 4 mecanismes principals i rutes associades que van des del RE a la cara externa de la membrana plasmàtica (a-d). (a) Formació de dominis del RE que s'ancoren a la membrana plasmàtica en els punts on s'hi troben transportadors ABC. (b) Sortida del RE i transport per proteïnes citoplasmàtiques transportadores fins la membrana plasmàtica on sortiran també a través de transportadors ABC. (c) Formació de gotetes oleofíliques per gemmació del RE i sortida a la paret per exocitosi. (d) Mecanisme de secreció de vesícules de Golgi, aquest permetria unions dels polisacàrids amb els polièsters intracel·lularment. Els mecanismes (a) i (b) s'utilitzarien pel transport de monòmers o oligòmers, mentre que els mecanismes (c) i (d) es podrien donar també pel transport de polímers. Es proposen també dos possibles mecanismes pel pas de precursors lipídics de la membrana plasmàtica a través de l'apoplast fins al lloc d'assemblatge: (i) Moviment a través de l'apoplast lliure (sense *carrier*) (ii) Moviment mitjançant unió a una proteïna transportadora (per exemple les *Lipid Transfer Proteins*, LTP) o a un component de la paret cel·lular. PS identifica les possibles polièster sintases que catalitzarien la formació d'enllaços èsters entre monòmers o oligòmers del polièster. CW = paret cel·lular. Extret de Pollard et al., (2008)

Aquests autors han proposat un model en el que un cop a la membrana plasmàtica, les ceres són extrudides a través dels transportadors ABC cap a la paret on seran segrestades per les *non-specific lipid transfer proteins* (nsLTPs) extracel·lulars que permetran travessar la zona hidrofílica de la paret cap a les zones hidrofòbiques on s'hi dipositaran. Aquest model de transport podria ser vàlid també per la suberina i les ceres associades, tenint en compte que tots aquests components comparteixen similituds en la biosíntesi dels seus compostos. Així, la presència de transportadors ABC i les LTP es mostra a la Figura 5. En aquesta figura s'esquemmatitzen vies alternatives perquè els compostos arribin fins als transportadors ABC com els contactes del RE amb la membrana plasmàtica o l'ús de proteïnes citoplasmàtiques transportadores. Altres mecanismes independents dels transportadors ABC serien les gotetes oleofíliques exocitades o la secreció de vesícules de Golgi els quals permetrien el transport d'oligòmers més grans o fragments de polièster (Pollard et al., 2008).

1.2.5.1-Els transportadors ABC

Les proteïnes ABC constitueixen una superfamília molt àmplia i diversa que es troba en eucariotes i procariotes. La majoria de gens ABC codifiquen per a proteïnes de membrana que participen directament en el transport de molècules molt variades a través de la membrana i es poden catalogar com a importadors o exportadors (Verrier et al., 2008). Les proteïnes ABC es defineixen per tenir un domini d'unió a nucleòtid NBD (*nucleotide binding domain*) el qual conté motius altament conservats, incloent les seqüències Walker A i B, la signatura específica dels ABC, el loop H i el loop Q (Figura 6). També conté dominis transmembrana (TMD), cadascun compost per hèlix- α hidrofòbiques. La unitat principal que forma un transportador ABC funcional està compost per 4 dominis: dos NBDs i dos TMDs. Els dos NBDs cooperen en la unió i hidròlisi de l'ATP, proporcionant la força motora necessària per al transport, mentre que els TMDs estan involucrats en la unió i reconeixement del substrat i en la seva translocació a través de la bicapa lipídica, aportant especificitat (Linton, 2007). Dins la família de transportadors ABC en plantes, la subfamília més estesa és l'ABCG. En aquesta família s'inclouen els transportadors WBC (*white-brown complex*), inicialment caracteritzats per transportar pigments que donen color als ulls de *Drosophila melanogaster* i els transportadors PDR (*pleiotropic drug resistance*), específics de plantes i fongs (Crouzet et al., 2006). Els transportadors ABCG permetrien el transport de monòmers o compostos cèrics simples ja que la seva naturalesa estructural no permetria el transport de compostos massa grans tals com oligòmers prèviament sintetitzats a l'interior cel·lular. El primer transportador ABCG que es va caracteritzar en plantes va ser l'*ABCG12/WBC12/cer5* d'*Arabidopsis*, localitzat a la membrana plasmàtica, la disrupció del

qual bloquejava el transport de determinats compostos cèrics a la cutícula que s'acumulaven dins les cèl·lules epidèrmiques (Pighin et al., 2004). L'*ABCG11/WBC11/DSO*, també a la membrana plasmàtica, transporta monòmers que s'incorporaran a la cutina, les ceres cuticulars i la suberina de l'arrel d'*Arabidopsis* (Bird et al., 2007; Luo et al., 2007; Panikashvili et al., 2007; Panikashvili et al., 2010). L'*ABCG26/WBC27* s'ha descrit com a transportador de precursors de l'esperopol·lenina, un biopolímer insoluble d'origen lipídic de naturalesa similar a la cutina i la suberina implicat en el desenvolupament del pol·len (Choi et al., 2011; Kuromori et al., 2011). A part de l'*ABCG11*, recentment s'ha vist que el triple mutant *abcg2 abcg6 abcg20* mostra alteracions en l'estructura, propietats i composició de la suberina en arrels i llavors d'*Arabidopsis* (Yadav et al., 2014). Contràriament en patata, el silenciament únic d'*StABCG1*, que correspondria al possible ortòleg d'*ABCG6* d'*Arabidopsis*, resulta en una gran efectació de la composició química de la suberina i l'anatomia i fisiologia del periderma (Landgraf et al., 2014). En arròs s'ha descrit el transportador *RCN1/OsABCG5* el qual sembla involucrat en la suberització de l'hipodermis de les arrels (Shiono et al., 2014). Els transportadors ABCGs de tipus *white-brown complex* (WBC) són els que s'anomenen mig-transportadors ja que presenten un únic domini TMD i un únic domini NBD (Figura 6).

És per això que per tal de ser funcionals, aquests transportadors han de dimeritzar amb un altra mig-transportador ABCG, ja sigui formant un homodímer o un heterodímer (Verrier et al., 2008). Això comporta que les possibilitats de transport de diferents precursors de la suberina o ceres associades o altres polièsters sigui exponencial, el que podria explicar el gran nombre de monòmers diferents que presenten aquests components de la paret cel·lular. Si bé s'han descrit alguns ABCGs més propensos a dimeritzar amb molts ABCGs (per exemple ABCG11), d'altres ABCGs mostren més especificitat (per exemple ABCG12) (McFarlane et al., 2010).

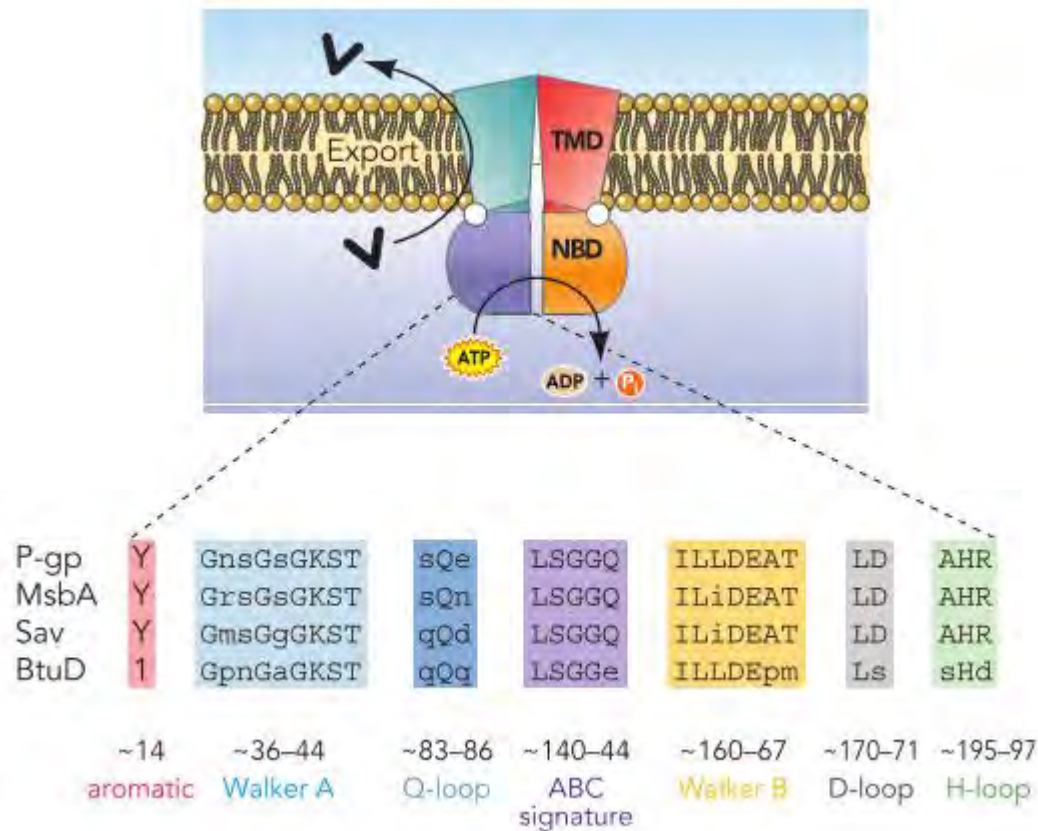


Figura 6. Esquema general d'un transportador ABC compost pels 4 dominis imprescindibles perquè sigui funcional (2 TMD d'ancoratge a membrana i 2 NBD d'unió a ATP). Es representen també els dominis conservats que es troben en els NBDs. S'ha de tenir en compte que segons l'espècie, els dominis poden variar lleugerament. TMD: domini transmembrana; NBD: domini d'unió a nucleòtid. Extret de Linton (2007).

1.2.5.2-Les proteïnes transportadores de lípids (nsLTP)

Les proteïnes transportadores de lípids no específiques (nsLTPs) són proteïnes molt petites amb un domini ben conservat de 8 cisteïnes que es defineixen per la seva capacitat de transferir lípids i tenen un pèptid senyal a l'extrem N-terminal relacionat amb la via de secreció (Edstam et al., 2011; Salminen et al., 2016), característiques que les fan aptes pel transport dels lípids (hidrofòbics) dins l'espai hidrofílic intercel·lular (Kader, 1996). Alguns estudis han demostrat el rol de dues LTPs ancorades a un glicosilfosfatidilinositol (GPI) (*AtLTPG/LTPG1*, *AtLTPG2*) i localitzades a la membrana plasmàtica que podrien estar involucrades en la deposició dels lípids cuticulars (Lee et al., 2009; Kim et al., 2012) i LTPs de tipus III, anomenades així segons nomenclatura de Boutrot et al., (2008), relacionades amb la formació d'esporepol·lenina i suberina (Edstam & Edqvist, 2014; Huang et al., 2013). Recentment, s'ha demostrat que quan es sobreexpressa *AtLTPI.4*, pròpia de teixits suberificats, en cèl·lules epidèrmiques produeix un augment d'àcids grassos de cadena molt

llarga a les ceres cuticulars (Deeken et al., 2017). Molt interessant és l'estudi recent que revela que l'AtLTP2/AtLTPI.5 més que realitzar un paper de transport de lípids a través de la paret cel·lular, podria realitzar un paper estructural mantenint la integritat de l'adhesió entre la cutícula hidrofòbica i la paret cel·lular hidròfila (Jacq et al., 2017).

Tot i els resultats obtinguts al llarg d'aquest últims anys, el mecanisme de com actuen les nsLTPs està encara en discussió. A la Figura 7 es mostra un dels models proposats on s'explica que els transportadors ABC mourien els polímers lipídics a través de la membrana plasmàtica. En la part externa de la membrana plasmàtica es trobarien les nsLTPs les quals transportarien els lípids de la membrana plasmàtica cap als llocs de síntesi dels polímers. Concretament els autors proposen que els ABCs entregarien els polímers a les nsLTPGs que estan ancorades a la membrana plasmàtica mitjançant un GPI i aquestes transferirien la seva càrrega a les nsLTP les quals es podrien moure lliurement per l'espai extern de la membrana, per tal de depositar els polímers lipídics al seu lloc corresponent (Salminen et al., 2016).

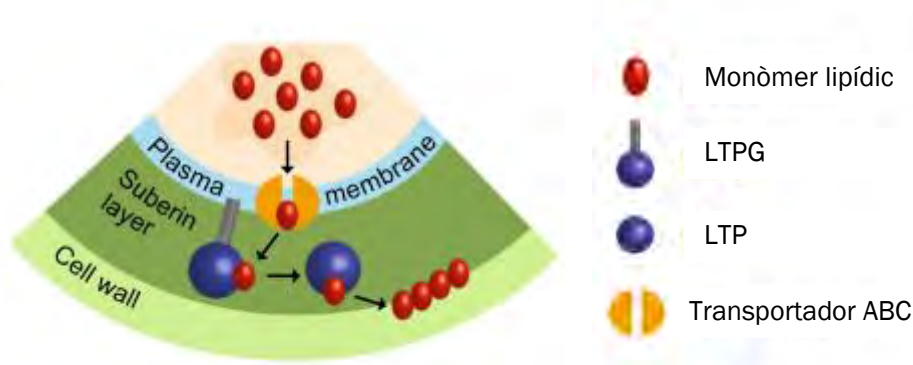


Figura 7. Esquema model on es representa una hipòtesi del possible mecanisme de transport lipídic en les cèl·lules de l'arrel. Es planteja que els ABCs puguin transportar els compostos lipídics a través de la membrana plasmàtica. Aquests passaran a l'espai extracel·lular on seran recollits per les LTPGs que es troben ancorades a membrana a través d'un GPI. Aquestes transferiran els polímers a les LTPs que es troben lliures i podran depositar aquests polímers al seu lloc corresponent (Salminen et al., 2016).

Sembla doncs, que tant els ABCGs com les nsLTPs podrien estar involucrades en el transport de compostos lipídics. És per això que en aquesta tesis s'ha caracteritzat i seleccionat alguns membres de la família ABCG tipus WBC i una nsLTP per a ser molt bons candidats a formar la suberina del periderma de tubercle de patatera (veure **apartat 3.2.2 i 3.2.3**).

1.2.6-Regulació del procés de suberificació

La regulació de la suberina inclou diversos factors de transcripció (WRKY, NAC, MYB i AP2/ERF). Aquests normalment s'expressen en teixits on té lloc la suberització i co-expressen amb gens relacionats amb la suberina. Recentment s'han descrit uns quants factors de transcripció de la família *MYB* que tenen un rol en la deposició de la suberina, el *MYB-related protein 41* (MYB41) que activa la deposició ectòpica de suberina en fulla d'*Arabidopsis* (Kosma et al., 2014); el *MYB-related protein 93* (MdMYB93) que indueix l'expressió de gens biosintètics de suberina i l'acumulació de suberina en pell de poma (Legay et al., 2016); el *MYB-related protein 107* (MYB107) i MYB9 que també serien inductors de suberina (Lashbrooke et al., 2016), confirmant-se per MYB107 la capacitat d'unir-se al promotor de gens biosintètics (Gou et al., 2017). Un altre factor de transcripció correspon al *NAC domain containing protein 103* (StNAC103) de patata el qual s'ha caracteritzat per ser un repressor de la suberina (Verdaguer et al., 2016). A més, altres estudis han revelat un clade de la família de factors de transcripció *APETALA2/Ethylene responsive factor* (AP2/ERF) anomenat SHINE (Aharoni et al., 2004) que té com a possibles dianes gens biosintètics de cutina i suberina (Shi et al., 2011). Recentment, s'ha descrit un altre membre de la família AP2/ERF (WRINKLED4) que regula positivament la biosíntesis de les ceres cuticulars en *Arabidopsis* i que interacciona directament amb el promotor de *Long chain acyl-CoA synthetase* (*LACS1*), *Ketoacil reductase 1* (*KCR1*), *β -hydroxyacyl-CoA dehydratase* (*HCD*), *Pasticcino 2* (*PAS2*), *Ecdysone receptor* (*ECR*), i *Will Die Slowly 1* (*WSD1*) (Park et al., 2016). La superfamília AP2 està formada per 4 famílies diferents (ERF, AP2, RAV i solistes) amb els seus grups corresponents (Nakano et al., 2006). Cadascuna d'aquestes famílies conté un domini d'unió a DNA molt conservat. Dins de la família, els diferents membres ERF presenten el domini d'unió a DNA *Dehydration-responsive element binding* (DREB) o ERF, en funció de la posició i identitat dels residus (Sakuma et al., 2002). Aquest fet proporciona varies afinitats i diferents especificitats dels ERFs. Alguns membres de la subfamília DREB s'han relacionat amb la resposta a ABA, productes químics i fred (Stockinger et al., 1997), mentre que alguns membres de la subfamília ERF s'han relacionat amb resposta a etilè, patògens i ferida (Ohme-Takagi & Shinshi, 1995). En aquesta tesis caracteritzem un membre de la família ERF de patata, per tal de poder determinar o explicar una mica més les funcions que poden tenir aquests factors de transcripció (veure **apartat 3.2.1**).

1.3-Models de plantes per a l'estudi del periderma

Encara que moltes de les plantes superiors formen un periderma, molt del que es coneix sobre el periderma i la biosíntesi de la suberina ha estat estudiat en l'alzina surera (*Quercus suber*) i en patatera (*Solanum tuberosum*). L'escorça de l'alzina surera i la pell del tubercle de la patata sintetitzen capes pures de cèl·lules de fel·lema que contenen grans quantitats de suberina (Figura 8).

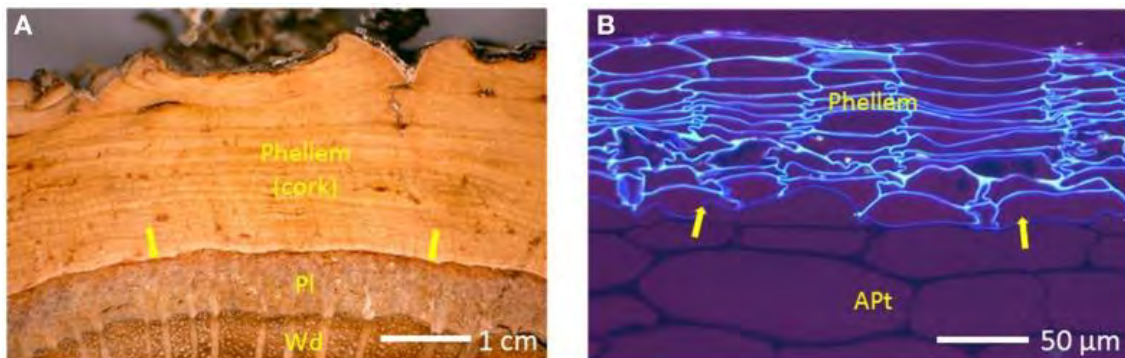


Figura 8. Anatomia dels dos models principals per l'estudi del periderma: escorça externa o suro de l'alzina surera (*Quercus suber*) i periderma de tubercle de patatera (*Solanum tuberosum*). (A) Visió macroscòpica dels teixits externs del tronc de surera mostrant el fel·lema (suro) amb els anells anuals de creixement circumferencials, el fel·logen (marcat amb fletxes), el floema (Pl, floema) i el xilema secundari o fusta (Wd). (B) Visió microscòpica sota llum UV del teixit extern de tubercle de patatera mostrant el fel·lema (parets cel·lulars autofluorescents), fel·logen (primera capa de cèl·lules no autofluorescents, fletxes) i el teixit parenquimàtic amilòs (Apt). Extret de Graça (2015).

1.3.1-L'alzina surera com a planta model per a l'estudi del fel·lema

L'alzina surera conté un fel·logen format per una capa contínua permanent que encercla tiges i branques i produeix una capa externa de suro. En el primer any de creixement, el fel·logen es forma just per sota de l'epidermis (Pereira & Graça, 2004) i no és fins al cap de vint anys que es pela el primer suro del tronc, anomenat pelegrí i sense valor comercial. La zona del còrtex on s'havia format el primer periderma queda exposada i com a resposta es forma un nou fel·logen uns mil·límetres per sota. El suro produït pel nou fel·logen creix ràpidament fent que als nou anys es pugui tornar a pelar, ara sí, obtenint valor comercial (Costa et al., 2001). Aquest fer es pot anar repetint fins que l'arbre té uns 150 anys d'edat.

L'alzina surera és un dels millors models d'estudi del suro, ja que pot produir unes 60 capes de cèl·lules de suro quasi pures a l'any amb elevades quantitats de suberina i formar una matèria prima amb un alt valor industrial. El suro utilitzat com a material comercial per a fer taps o plaques aïllants prové de les sureres originàries de la regió mediterrània. La seva

escorça s'extreu de l'arbre cada 10 anys aproximadament per ser processat com a suro comercial. Està format per cèl·lules amb paret gruixuda, mortes i quan són madures contenen un lumen ple d'aire. Les característiques que li donen valor comercial són la seva impermeabilitat als gasos i líquids, la seva elasticitat, força i lleugeresa (Fahn, 1967). La seva composició química ha estat molt estudiada (Silva et al., 2005). De mitjana pot contenir un 63% de suberina i un 15% de ceres i tanins (Pereira, 1988).

Tot i el valor comercial, no hi ha constància que s'hagin realitzat estudis de genètica funcional en alzina surera, i això és degut a la seva baixa capacitat de transformació, el temps lent de regeneració i el període temporal de creixement de l'arbre (Álvarez-Fernández & Ordás, 2012).

1.3.1.1-El fellema de surera per identificar gens candidats

El primer estudi global de la biologia molecular del periderma i suberina es va realitzar al nostre laboratori (Soler et al., 2007) a partir de cèl·lules de fel·lema d'alzina surera mitjançant una llibreria d'SSH (*Suppression Subtractive Hybridation*) i es va comparar el transcriptoma de

Requadre 1_La proteïna RIK

RIK interactua físicament amb el gen de blat de moro *rs2*, l'ortòleg del qual és ASYMMETRIC LEAVES 1 (*AS1*) en *Arabidopsis*. *AS1* forma complexos estables amb ASYMMETRIC LEAVES 2 (*AS2*) i amb la xaperona d'histones HIRA (Phelps-Durr et al. 2005). Els autors suggereixen que el complex AS1-AS2-HIRA i la unió de RIK a RNAs reguladors contribueixen en la repressió epigenètica dels gens *KNOX* de tipus I, els quals promouen l'activitat de les cèl·lules mare i el manteniment del meristema per a la formació d'òrgans laterals (Phelps-Durr et al., 2005). Aquest fet està d'acord amb la presència en la proteïna RIK d'un domini helicasa (LHD) i un domini KH d'unió a l'RNA, implicat en la regulació de l'expressió gènica post-transcripcional i en l'estabilitat del mRNA (Burd & Dreyfuss, 1994; Lorković & Barta, 2002). Treballs recents en el nostre laboratori han demostrat que el transcrit d'*StRIK* (de patata) s'acumula de forma generalitzada en tots els teixits de la patatera, incloent el periderma i teixits ferits de tubercle de patatera (Boher, 2016) el que podria contribuir a mantenir silenciats els gens *KNOX*. Anàlisis transcripcionals del periderma de tubercle de patateres silenciades per *StRIK* (*StRIK*-RNAi) (Soler, 2008) revelen que *StRIK* estaria involucrat en la regulació post-transcripcional dels pre-mRNAs, en la regulació de la cromatina pel control d'elements transponibles en resposta a estrès i en diversos processos de desenvolupament de les plantes, com la formació del periderma o la floració, la qual s'indueix prematurament en les línies *StRIK*-RNAi (Boher, 2016). Tot i els resultats obtinguts, la funció d'aquesta proteïna i la seva regulació en el periderma encara no està clara, és per això que en aquesta tesi s'ha realitzat una llibreria de dos híbrids en llevat per identificar possibles proteïnes que interaccionen amb StRIK (veure **apartat 3.1**).

suro (teixit productor de suberina) i el transcriptoma de fusta (teixit no productor de suberina). En la llista de gens obtinguts es van identificar gens involucrats en la síntesis, transport i polimerització de suberina, algunes proteïnes d'estrès i algunes proteïnes reguladores.

Entre les proteïnes reguladores que es van identificar hi havia factors de transcripció de les famílies NAC, MYB i WRKY i una proteïna homòloga a la del blat de moro RS2-INTERACTING KH PROTEIN (RIK) (Phelps-Durr et al., 2005) (*veure requadre 1*). Per altra banda, el treball de Ricardo et al. (2011) va comparar el proteoma de tiges joves (de 0, 1 i 4 anys) amb el de fel·lema format de branques de 8 anys d'edat i va identificar 54 proteïnes diferencials. Aquestes proteïnes, si bé es van relacionar amb el metabolisme de carbohidrats i reorganització de la paret cel·lular, defensa, estabilitat i degradació de proteïnes, regulació i metabolisme secundari, cap es va relacionar amb els components lipídics de la suberina, probablement per la seva associació a membranes o per estar associades a components insolubles de la cèl·lula (Ricardo et al., 2011). Recentment, es va realitzar la primera seqüenciació d'alt rendiment d'alzina surera utilitzant la plataforma 454 de Roche, on entre altres teixits es van seqüenciar llibreries normalitzades de suro. Aquest estudi va permetre obtenir un transcriptoma *de novo* i es va crear una base de dades del transcriptoma de suro anomenada *corkoakDB* (Pereira-Leal et al., 2014). Per altra banda, un treball en paral·lel va seqüenciar també mitjançant la mateixa plataforma, suro de bona i mala qualitat utilitzant llibreries de cDNA convencionals, el que permetia mantenir la quantificació de transcrits originals (Teixeira et al., 2014). Aquest estudi va mostrar que gens involucrats en els processos reguladors així com síntesis de DNA, processament d'RNA, proteòlisis, factors de transcripció involucrats en l'estrès abiòtic i gens relacionats amb la formació d'estomes/lenticel·les estan més induïts en el suro de mala qualitat, mentre que les proteïnes de xoc tèrmic (*heat shock proteins*) estan més expressades en el suro de bona qualitat. Respecte als microRNAs (miRNAs) es van seqüenciar els de fulla i fel·lema d'alzina surera i es van identificar quatre miRNAs específics i altament expressats a fel·lema involucrats en la resposta a estrès (miR168 i miR171) i en la polaritat de la fulla (miR166 i miR390) (Chaves et al., 2014). Recentment, al nostre laboratori es va dur a terme mitjançant la plataforma 454 una comparativa del transcriptoma de les escorces externes d'alzina surera (*Quercus suber*) (suro) i alzina (*Quercus ilex*), que no genera suro sinó que constitueix un ritidoma. En aquesta anàlisi es va observar que el transcriptoma de l'alzina surera estava enriquit en gens implicats en la síntesi de paret cel·lular, en vies del metabolisme secundari relacionades amb la suberina i sincronitzades amb les vies de metabolisme primari que subministren els precursors. També

es van observar gens relacionats amb activitat meristemàtica, transport polar d'auxines i síntesi d'etilè. D'altra banda, els gens associats a la senyalització d'àcid absíctic (ABA), resposta a estrès tant biòtic com abiòtic i els processos de regulació (remodelació de la cromatina, regulació de la transcripció i síntesi de proteïnes) estaven més enriquits en alzina. D'aquesta manera es van identificar gens candidats que podrien explicar les diferències que es donen en aquests dos teixits (Boher, 2016; Boher et al., 2017).

1.3.1.2-El fel·lema d'alzina surera per estudiar a nivell molecular el creixement estacional del suro

És conegut que el suro té un creixement estacional. El creixement radial del suro comença durant la primavera amb l'activació del meristema i continua fins a la tardor, amb un pic màxim de creixement durant el mes de juny (Costa et al., 2001). Durant l'hivern, el suro entra en estat de dormància, aturant el seu creixement. Durant el creixement estacional, el fel·logen està altament actiu i produeix moltes cèl·lules grans, formant anells de creixement clars; mentre que posteriorment, el creixement disminueix i produeix menys cèl·lules i més petites, donant lloc als anells foscos (Figura 8A). El canvi de color dels anells és degut a canvis en la composició química. Aquest creixement però, és sensible als canvis climàtics, reflectint les fluctuacions de les condicions ambientals al llarg de les estacions (Caritat et al., 1996). Per 12 gens candidats identificats en l'SSH de suro (Soler et al., 2007) es va estudiar el perfil d'acumulació de transcrits al llarg de l'estació de creixement (Soler et al., 2008) mitjançant PCR quantitativa transcriptasa reversa (RT-qPCR). Es va observar que gens estructurals de la síntesi de suberina i alguns gens reguladors mostraven molta més expressió durant el mes de juny, coincidint amb el major creixement del suro. A més, també es va veure que alguns gens relacionats amb l'estrès correlacionaven positivament amb la temperatura i negativament amb la humitat. Recentment, utilitzant les mateixes mostres, es va realitzar una segona anàlisi incloent nous gens candidats, identificats en el treball de Boher et al. (2017), on es va observar una major activació durant el mes d'abril, coincidint amb la iniciació de l'activació del fel·lema, de gens relacionats amb la regulació i desenvolupament del meristema (*Shoot Meristemless (STM)*, *Wuschel Related Homeobox (WOX4)* i *Histidine Kinase 3 (HK3)*), transport d'auxines (*PIN-formed 3 (PIN3)*), un gen biosintètic dels brasinoesteroids (*DWARF1 (DWF1)*) i alguns factors de transcripció (*Flowering Locus C (FLC)*, *Supressor of overexpression of CO 1 (SOC1)* i *Apetala 1 (AP1)*) que s'han relacionat amb desenvolupament floral. Per altra banda, gens que coincidien amb una expressió més elevada en juny i/o juliol corresponien a gens relacionats amb la síntesi i extensió de la paret cel·lular (*Cellulose synthase-like C3 (CSLD3)*, *Expansin A8 (EXPA8)*), deposició de suberina (*Glycerol-3-phosphate acyltransferase*

(*GPAT5*), *Cytochrome P450, Family 86, Subfamily A, Polypeptide 1 (CYP86A1)*, *Cytochrome P450, Family 86, Subfamily B, Polypeptide 1 (CYP86B1)* i *Aliphatic Suberin Feruloyl-transferase, reduced levels of wall-bound phenolics 1 (ASF1)*), tolerància a estrès (*Ascorbate peroxidase (APX2)*, *Annexin (ANN1)* i *Heat Shock Protein 18.2 (HSP18.2)* i mort cel·lular i senescència (*BAX inhibitor 1 (BI-1)*). Aquests processos són requerits per a la maduració i diferenciació del suro. A més, gens relacionats amb el metabolisme del carboni (*Sucrose Synthase 4 (SUS4)* i *Pyruvate Dehydrogenase e1 alpha (PDH-E1 α)*) i amb la producció de terpens (*3-hydroxy-3-methylglutaryl coa reductase 1 (HMGR1)*) proveeixen de precursors de la formació del suro o de metabòlits associats a la suberina com els terpens. Per tal d'aprofundir en els gens que són claus al principi del creixement del suro i en el moment del màxim creixement, en aquesta tesi s'ha realitzat un estudi transcriptòmic del suro en diferents punts estacionals mitjançant la plataforma d'Illumina per tal de trobar nous gens candidats i caracteritzar el seu patró d'expressió per determinar quins processos predominen en cada etapa (veure **apartat 3.4**).

1.3.2-La patatera com a planta model per a l'estudi del fel·lema

El tubercle de la patatera (*Solanum tuberosum*) és un òrgan que es troba sota terra i està cobert per un periderma on el fel·lema (pell) el protegeix enfront la deshidratació i l'atac de patògens. La patata és un cultiu que té un elevat valor i importància agro-econòmica, i és per aquest motiu que el seu periderma ha estat molt ben estudiat a nivell d'estructura cel·lular, procés de maduració i composició química (Vogt et al., 1983; Lulai & Freeman, 2001; Sabba & Lulai, 2002).

1.3.2.1-El fel·lema de patata per identificar gens candidats de la formació del fel·lema i la suberina

L'estudi del periderma en tubercle de patatera és un model més simple que el d'alzina surera, per exemple no presenta estacionalitat, però també funciona com a model per estudiar gens o proteïnes relacionades amb el fel·lema i la suberificació, ja sigui utilitzant el periderma natiu o bé el periderma cicatricial. Treballs que analitzaven les proteïnes del periderma de patata (Barel & Ginzberg, 2008; Chaves et al., 2009) van destacar la gran quantitat de proteïnes identificades relacionades amb l'estrès biòtic i abiòtic. Concretament, Barel & Ginzberg (2008) van comparar el fel·lema amb el parènquima del tubercle i van observar que un 63% de les proteïnes diferencials pertanyien a la categoria de proteïnes relacionades amb estrès. L'anàlisi del procés de ferida en el tubercle (Chaves et al., 2009) va demostrar que la ferida en els tubercles provocava canvis en el metabolisme, activant la resposta de defensa i el metabolisme secundari involucrat en reforçar la paret cel·lular. A nivell transcriptòmic,

Ginzberg et al. (2009) va relacionar l'estrès per calor en el tubercle amb la formació d'un periderma més gruixut i va identificar que els gens candidats involucrats corresponien a gens d'estrès, de proliferació cel·lular i de desenvolupament. Posteriorment, en el nostre laboratori es va generar una llibreria SSH que va permetre obtenir un total de 108 gens relacionats amb la biosíntesi de suberina i ceres, estrès i defensa, regulació, paret cel·lular i altres (Soler et al., 2011). L'abundància de cadascuna d'aquestes categories concordava amb els treballs previs realitzats, essent la categoria d'estrès i defensa la més predominant, però diferint de la contribució relativa de les categories obtingudes en la llibreria SSH d'alzina surera on es van identificar més gens relacionats amb el metabolisme secundari (suberina) (Soler et al., 2007). Aquest fet es podria explicar ja que el fel·lema de l'alzina surera produeix entre 60-100 capes de cèl·lules cada estació de manera que les cèl·lules vives de les que se n'extreu l'RNA estan aïllades del medi extern per cents de capes de cèl·lules mentre que el fel·lema de patata només conté entre 6-10 capes de cèl·lules de manera que l'aïllament del medi extern és mínim, fent més acusats els processos relacionats amb l'estrès.

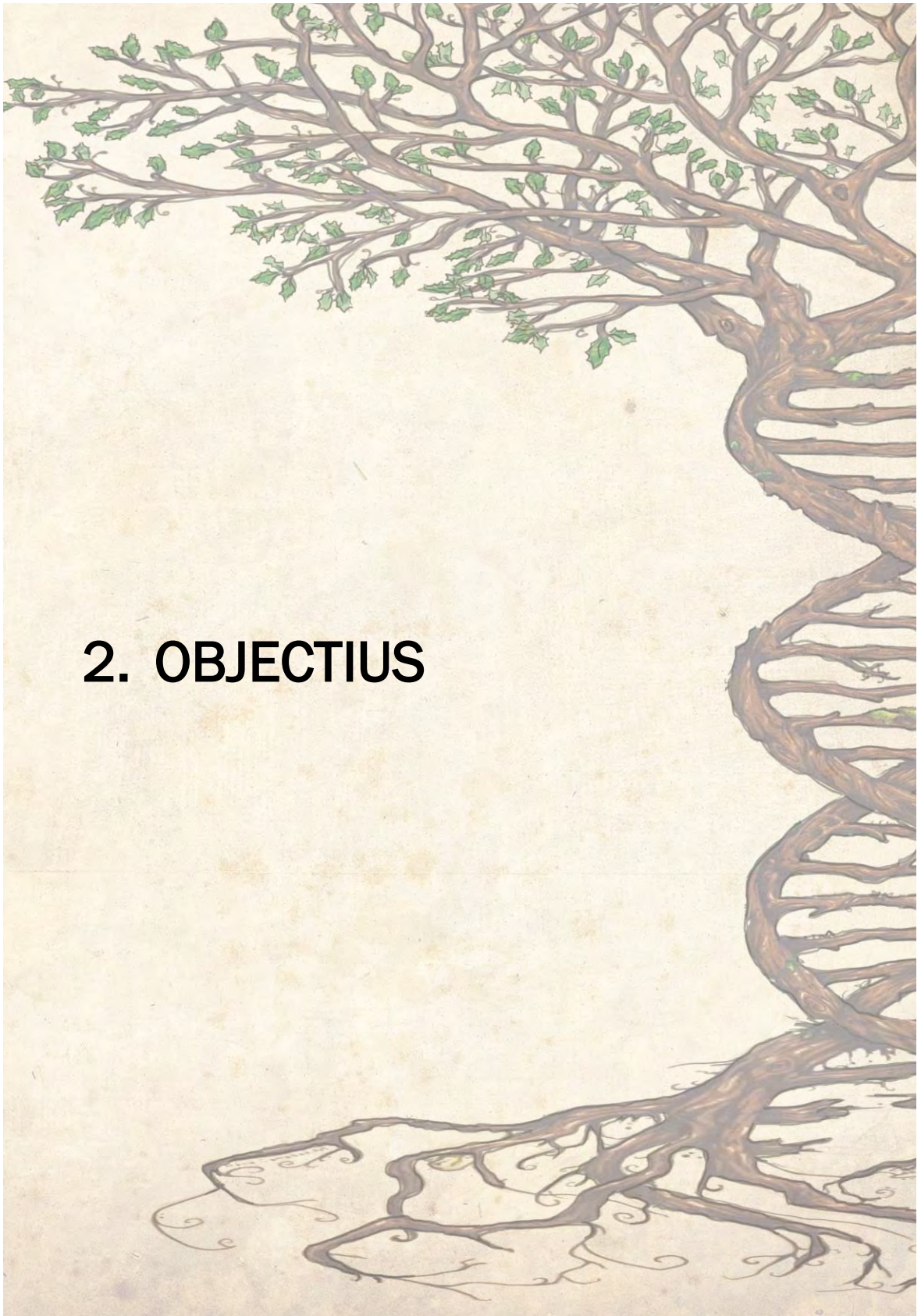
1.3.2.2-El fel·lema de patata per estudis de genètica funcional del fel·lema i la suberina

Els tubercles de les patates constitueixen un molt bon model per a l'estudi funcional del periderma ja que es poden produir patates transgèniques en períodes relativament curts (<1 any) i amb prou quantitat de periderma per permetre anàlisis de composició química de la suberina i de la seva ultraestructura i estudis químics i fisiològics (Serra et al., 2009a ; Serra et al., 2009b; Serra et al., 2010; Landgraf et al., 2014; Boher et al., 2013). A més, la publicació del genoma de patata (Xu et al., 2011) va promoure molt l'ús d'aquesta planta per a la realització d'estudis funcionals i moleculars. Sistemes alternatius de transformació de patatera són possibles usant *Agrobacterium rhizogenes*, no obstant aquesta estratègia està pensada per obtenir arrels transformades més que plantes completes. Aquest és un model que s'ha explorat en el **apartat 3.3** per estudiar les barreres suberificades de l'arrel primària, tals com endodermis i exodermis (*veure requadre 2*).

Requadre 2_Agrobacterium rhizogenes com a sistema de transformació alternatiu per a la genètica funcional de la suberina.

Si bé la transformació de patateres de forma estable mitjançant *Agrobacterium tumefaciens* obté uns bons resultats, aquest sistema resulta car en quan a temps i diners ja que es necessita regenerar una planta estable sencera mitjançant l'ús d'hormones, i el manteniment del material transgènic requereix més dedicació degut a la manca de producció de llavors de les patateres. Per l'estudi del periderma, a més es requereix del temps addicional perquè la planta produeixi tubercle. Aquestes limitacions porten a pensar en mètodes de transformació alternatius que poguessin contribuir a accelerar els estudis basats en la genètica funcional de la suberina. Un exemple és l'ús d'*Agrobacterium rhizogenes* per a l'estudi de l'activació del promotor de CYP86A33 en arrels de patata (Bjelica et al., 2016). En patata i altres espècies s'ha demostrat que les arrels transformades via *A. rhizogenes* es poden utilitzar per a l'estudi fenotípic d'arrels causat per la modificació d'expressió gènica, tant per la sobreexpressió com pel silenciament amb tècniques d'RNA d'interferència (RNAi) (Horn et al., 2014; Ron et al., 2014; Dinh et al., 2014; Plasencia et al., 2015). Aquest mètode permet obtenir arrels transformades (arrels peludes o *hairy roots*) que es poden autopropagar o es poden mantenir en una planta composta amb la part aèria salvatge (Quandt et al., 1993). Si bé aquest mètode permetria demostrar una relació entre determinats gens i la seva implicació amb la formació de la suberina de l'arrel, aquesta relació no necessàriament hauria de mantenir-se quan es tractés del fel·lema. Tot i això, encara que l'estudi de reguladors del desenvolupament del fel·lema no hauria de tenir correspondència amb l'arrel, s'ha vingut demostrant al llarg dels anys que els mateixos gens que contribueixen a la formació de la suberina d'arrel d'*Arabidopsis* també contribueixen a la suberina del fel·lema de patata (Ranathunge, 2011).

La transformació via *A. rhizogenes* és més ràpida i menys costosa ja que no es requereix d'hormones per a la regeneració de teixit. La infecció provoca la formació i creixement d'arrels peludes degut a la integració en el genoma de les cèl·lules infectades del T-DNA del plasmidi Ri (*root-inducing*), el qual conté gens que codifiquen per a la síntesi d'hormones i és propi de cada soca d'*A. rhizogenes* (Nemoto et al., 2009). Quan s'utilitza *A. rhizogenes* transformat amb un vector binari que conté el T-DNA d'interès, aquest segon T-DNA s'integra també al genoma pel que s'obtenen arrels peludes modificades pel gen d'interès. Aquesta tècnica té un gran potencial en el camp de la investigació ja que les arrels es poden automantenir sense l'ús d'hormones, permet alterar rutes biosintètiques de metabòlits d'interès (Canter et al., 2005) i presenten un enorme ventall d'avantatges: ràpid creixement de les arrels sense la necessitat de generar tija i fulles, manteniment barat, senzill i estabilitat genètica i a més, són molt similars a les arrels salvatges (Tarkowski & Verecke, 2014). En cas de voler disposar d'una planta, s'ha de tenir en compte però, que aquesta serà una planta composta, ja que únicament les arrels peludes estan transformades genèticament, mantenint salvatge la part aèria de la planta. En el **apartat 3.3** d'aquesta tesi es presenta aquest mètode per obtenir arrels transformades de patata per a la genètica funcional de la suberina.



2. OBJECTIUS

2. Objectius

L'objectiu principal d'aquest treball és entendre millor els mecanismes moleculars que tenen lloc en la formació del fel·lema. Aquest objectiu final s'aborda a través de diferents estratègies, ja sigui caracteritzant a diferents nivells alguns gens de patatera, identificant nous gens candidats en el suro o explorant noves eines per a la genètica funcional de la suberina en patatera. Els candidats que s'estudien inclouen gens reguladors i transportadors. Els objectius específics d'aquesta tesi són:

1. Identificar proteïnes que interaccionen amb la proteïna StRIK mitjançant el mètode dels dos híbrids en llevat i analitzar la localització i colocalització de les proteïnes interaccionants en planta.
 - Generar una llibreria de cDNA de fel·lema de patata, les proteïnes de fusió de la qual actuarien com a presa en el sistema del dos híbrids.
 - Cribrar la llibreria de dos híbrids utilitzant la proteïna StRIK com a esquer.
 - Caracteritzar *in silico* els possibles candidats (StCisteïna proteïnasa 3, StRACK1B i StERF135) a interaccionar amb la proteïna StRIK pel que fa a l'expressió constitutiva i induïble, la coexpressió i els elements reguladors en *cis* del promotor.
 - Determinar la localització subcel·lular de les proteïnes candidates: StCisteïna proteïnasa 3, StRACK1B i StERF135 en planta mitjançant la fusió a proteïnes fluorescents.
 - Analitzar l'efecte de la proteïna StRIK en la localització subcel·lular de les proteïnes StCisteïna proteïnasa 3 i StRACK1B *in planta*.

2. Caracterització de candidats de la suberificació relacionats amb la regulació (StERF93) i el transport (StLTPI.3, StABCG1, StABCG10, StABCG11, StABCG20 i StABCG23) per valorar el seu possible paper en teixits suberificats. Per als candidats:
 - Determinar la relació filogenètica del gen candidat amb altres membres de la família en patata i Arabidopsis, i identificació dels dominis conservats de la proteïna.
 - Analitzar l'expressió gènica *in silico* i la coexpressió amb altres gens.
 - Quantificar l'acumulació relativa de transcrit en teixits nadius i ferits de patatera.
 - Determinar la localització subcel·lular de la proteïna corresponent en planta mitjançant la fusió a proteïnes fluorescents.

- Identificar els elements reguladors en *cis* predits en els promotors dels gens.
3. Prova de concepte d'un sistema alternatiu en patata per a estudis de genètica funcional en teixits suberitzats mitjançant la transformació d'arrels amb *Agrobacterium rhizogenes*.
- Dissenyar i optimitzar el procediment d'obtenció d'arrels transformades de patatera.
 - Obtenir arrels transformades per a l'estudi de promotors de la suberina (pFHT com a model).
 - Estudiar la composició química de la suberina d'arrels transformades i compararla amb la d'arrels natives.
 - Obtenir arrels silenciades per gens relacionats amb la suberina.
4. Determinar quins processos moleculars tenen lloc en tres etapes claus del creixement estacional del suro mitjançant RNA-seq i identificar nous gens candidats de la formació del suro.
- Seqüenciar, assemblar i anotar el transcriptoma del fel·lema.
 - Correlacionar les dades d'expressió de la seqüenciació amb dades obtingudes per RT-qPCR.
 - Analitzar els nivells d'expressió dels gens implicats o relacionats amb la formació de la suberina i d'altres gens relacionats amb cutina i ceres, basant-nos en l'anotació dels contigs segons la proteïna més homòloga en *Arabidopsis*.
 - Identificar els gens i processos diferencialment expressats (DE) durant el creixement del suro.
 - Agrupar els gens DE segons el seu perfil d'acumulació de transcrit i analitzar quines categories funcionals són predominants en cada agrupament.



3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

3.1-Identificació de proteïnes candidates que interaccionen amb StRIK mitjançant el mètode del dos híbrids en llevat

Estudis recents han suggerit que StRIK, possible ortòloga a At3g29390 i localitzada al nucli, estaria involucrada en la regulació post-transcripcional dels pre-mRNAs, en la regulació de la cromatina pel control d'elements transponibles en resposta a estrès i en diversos processos de desenvolupament de les plantes, com podria ser la formació del periderma (Boher, 2016). No obstant, la funció molecular d'aquesta proteïna i la seva regulació no està clara.

El mètode dels dos híbrids és un sistema molt utilitzat per a identificar proteïnes que interaccionen físicament *in vivo*. Conèixer les interaccions entre proteïnes pot donar informació sobre com aquestes es regulen i/o en quin procés fisiològic participen. Per aquest motiu inicialment es va realitzar una llibreria de dos híbrids de cDNA de fel·lema (pell) de patata, la qual es va rastrejar per aïllar possibles proteïnes interactores d'StRIK. D'entre les proteïnes candidates interactores, se'n van seleccionar tres per estudiar-ne la localització subcel·lular i la seva coexpressió. Els resultats detallats es descriuen a continuació.

3.1.1-Construcció de la llibreria de dos híbrids

Per a la realització de la llibreria es va extreure RNA de fel·lema aïllat de patata. L'RNA es va tractar amb DNAsa i se'n va comprovar la integritat mitjançant un gel desnaturalitzant d'agarosa i formaldehid (Figura 9A), obtenint una relació de 260/280 nm al voltant de 2 unitats. El mRNA es va purificar a través de Dynabeads, i se'n van utilitzar 0,15 µg per fer la llibreria de doble híbrid.

Per a obtenir la llibreria de doble híbrid de cDNA es va utilitzar el kit "Make Your Own (Mate & Plate) Library System" de Clontech. Es va utilitzar l'mRNA de fel·lema purificat anteriorment i es van fer 3 síntesis de cDNA en paral·lel, dues usant Oligo-dT i una usant hexàmers *Random*. Posteriorment, es va sintetitzar la segona cadena de cDNA mitjançant la LD-PCR (*Long distance PCR*) obtenint fragments de dscDNA amb seqüències conegudes a cada un dels extrems. Es van obtenir fragments d'entre 100 – 2.000 pb quan s'utilitzava oligo-dT en la primera síntesi i entre 100 – 850 pb quan s'utilitzaven hexàmers (*random*) (Figura 9B). D'aquests cDNAs se'n van purificar els fragments més llargs de 200 pb obtenint un rendiment total de dscDNA de 3 µg, dels quals se'n van emprar 2,5 µg per construir la llibreria.

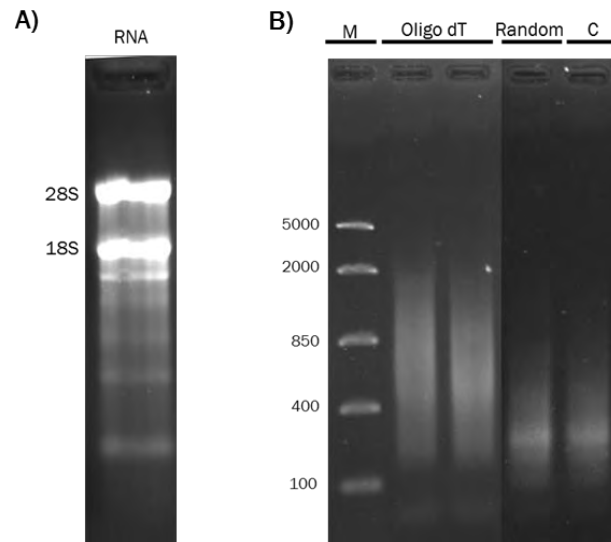


Figura 9. Comprovació d'RNA i cDNA. A) Anàlisi de la qualitat de l'RNA després del tractament amb DNAsa mitjançant un gel desnaturalitzant de formaldehid. Les bandes 28S i 18S de l'rRNA estan indicades a l'esquerra del gel. El carril correspon a la rèplica biològica de fellema de patata utilitzada per a la realització de la llibreria de dos híbrids. B) Patró de bandes obtingut amb el cDNA de doble cadena emprant encebadors oligo-dT o *random* en un gel desnaturalitzant d'agarosa a l'1%. D'esquerra a dreta: marcador de pes molecular, cDNA obtingut amb encebadors Oligo-dT (carrils 2 i 3), cDNA obtingut amb encebadors *random* (carril 4), control positiu obtingut amb 1 µg de RNA poliA de ratolí (carril 5).

La població de dscDNA es va clonar en el vector pGADT7-Rec per recombinació de les seqüències homòlogues del vector amb les dels extrems del dscDNA en la soca de llevat Y187. El vector pGADT7-Rec conté el domini d'activació Gal4, un factor de transcripció que respon a galactosa. La llibreria obtinguda va resultar en una concentració total de 4×10^7 cèl·lules ml^{-1} .

3.1.2-Assajos de toxicitat d'StRIK i capacitat d'activació dels gens reporters utilitzats pel sistema del doble híbrid

La seqüència codificant sencera d'*StRIK* va ser aïllada prèviament de *Solanum tuberosum* Grup Tuberosum (Soler et al., 2008). Aquesta presenta un 98.82% d'identitat amb la proteïna que codifica per al gen representatiu d'*StRIK* en *S. tuberosum* Grup Phureja (PGSC0003DMT400064730).

La tècnica del doble híbrid es realitza en llevat pel que és necessari efectuar assajos de toxicitat per detectar si la sobreexpressió de la proteïna d'estudi pot alterar el transcriptoma de la cèl·lula de llevat afectant la seva viabilitat cel·lular, especialment quan la proteïna correspon a un factor de transcripció (Singh et al., 2013). Per altra banda, la interacció

positiva entre dues proteïnes es detecta per l'activació de la transcripció del gen reporter *MEL1* (*α-galactosidase 1 precursor*), entre altres, el qual codifica per una *α-galactosidasa*. En presència del substrat X-*α-Gal*, l'*α-galactosidasa* és capaç de metabolitzar un producte cromogènic blau. Així, per tal de buscar interactores d'una proteïna concreta (esquer), inicialment s'ha d'assegurar que la pròpia expressió de la proteïna no activarà la transcripció del gen *MEL1*, el que es coneix com a assaig d'autoactivació. En cas d'autoactivació s'ha de trobar les condicions adients per tal de que aquesta autoactivació no tingui lloc.

Per a realitzar aquests assajos, el cDNA corresponent a la seqüència codificant completa del gen *StRIK* es va clonar dins del vector pGBG (*StRIK-BD*), el qual va generar una proteïna híbrida que contenia la seqüència del domini d'unió de Gal4, un gen de resistència a kanamicina i el marcador nutricional del triptòfan (*TRP1*), el qual permet seleccionar les cèl·lules transformades en un medi sense triptòfan. Els plasmidis clonats es van usar per transformar la soca Y2HGold.

Pel que fa a la toxicitat, la sobreexpressió d'*StRIK* no va afectar la viabilitat de les cèl·lules de llevat ja que no s'observava una disminució en la velocitat o densitat de creixement. Les colònies obtingudes en medi mínim de llevat SD (*Synthetic defined*) deficient en triptòfan, selecció del plasmidi pGBG-*StRIK*, creixien de manera normal. Pel que fa als assajos d'autoactivació d'*StRIK*, en medi SD deficient en triptòfan suplementat amb X-*α-Gal*, les cèl·lules de llevat que sobreexpressaven aquest gen no presentaven colònies blaves, indicant la incapacitat d'activar el gen *reporter MEL1* que hidrolitza l'X-*α-Gal* (Figura 10). A més a més, es va assajar l'autoactivació per part d'*StRIK* del gen *reporter AUR1*, el qual permet detoxificar l'aureobasidina, un antibiòtic tòxic per les cèl·lules de llevat. Els anàlisis no van mostrar creixement demostrant que *StRIK* no pot activar el gen *AUR1*. Donat que *StRIK* no és tòxica per la cèl·lula i les cèl·lules transformades amb *StRIK* no són capaces de metabolitzar ni X-*α-Gal* ni l'aureobasidina, es va procedir a buscar proteïnes interactores en la llibreria de fel·lema construïda.

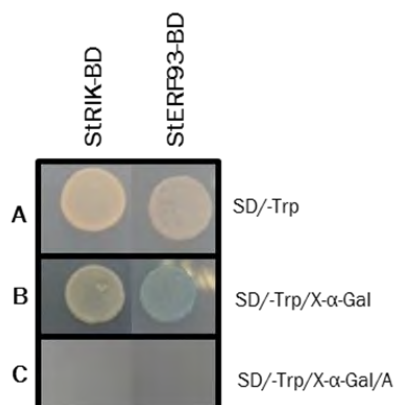


Figura 10. Assajos de toxicitat i autoactivació dels gens candidats a esquer (*StRIK* i *StERF93*) a partir de cultius diluïts 1/10. A) Medi SD-Trp per determinar si les proteïnes d'estudi són tòxiques. B i C) Medi SD/-Trp/X-*α-Gal* i SD/-Trp/X-*α-Gal*/A respectivament, per determinar l'autoactivació de les proteïnes.

És notable remarcar que a part d'*StRIK*, es va assajar el factor de transcripció *StERF93* el qual s'ha estudiat com a regulador candidat del procés de suberificació (veure **apartat 3.2.1**). Si bé el creixement del llevat que sobreexpressava *StERF93* mostrava creixement convencional, els assajos d'autoactivació van revelar que aquest factor de transcripció tenia capacitat d'autoactivar el gen *reporter MEL1* mostrant coloració blava en presència d' $X\text{-}\alpha\text{-Gal}$ (Figura 10). Aquest fet impedeix buscar interactors usant el procediment estàndard del doble híbrid, si bé existeixen alternatives com seria l'ús d'un fragment de la proteïna incapaç d'autoactivar el gen *reporter*.

3.1.3-Cerca d'interactors d'*StRIK* en la llibreria de fel·lema

3.1.3.1-Screening de la llibreria i obtenció de gens candidats

Per obtenir possibles candidats a interaccionar amb la proteïna *StRIK* es va realitzar l'*screening* de la llibreria de cDNA. Inicialment es va inocular el cultiu que contenia la llibreria de cDNA (Leu-) de fel·lema transformada en la soca Y187 i el de l'*StRIK*-pGBG (Trp-) en la soca Y2HGold en un medi ric (2X YPDA), el que es coneix com *mating*. Passades 24 h, es va sembrar en medi SD selectiu que contenia deficiència per a quatre gens *reporters*, *Leu* i *Trp* per seleccionar que el llevat descendent contingués els dos plasmidis (presa i esquer) i *Ade* i *His* per seleccionar aquelles cèl·lules capaces d'activar Gal4 i transcriure els *reporters ADE2* i *HIS3*, és a dir, cèl·lules que contenen proteïnes que interaccionaven amb *StRIK*.

El *mating*, amb una eficiència del 3%, va generar un total de 277 colònies, on cada una d'elles contenia un cDNA desconegut de la llibreria de fel·lema candidat a ser un possible interactor d'*StRIK*. Per cadascuna de les colònies es va amplificar el cDNA insert usant encebadors flanquejants del vector pGADT7-Rec. Aquesta anàlisi revela que totes les colònies assajades contenien el plasmidi amb inserts >200 pb. De les PCRs obtingudes es van seqüenciar amb èxit 109 inserts els quals es van anotar usant un BlastN a *S. tuberosum* (The Potato Genome Sequencing Consortium (PGSC), Xu et al., 2011) contra la base de dades de transcrits amb un *e-value* <10⁻¹⁰; i un BlastX a Arabidopsis contra proteïnes (TAIR database <https://www.arabidopsis.org>; The Arabidopsis Information Resource) amb un *e-value* <10⁻¹⁰. Les 109 seqüències obtingudes corresponien a 29 gens diferents segons l'anotació de patata. La *Isoamyl acetate-hydrolyzing esterase*, *Cysteine proteinase* i *S-adenosylmethionine synthase* van ser els gens identificats amb més freqüència (Taula 1). És destacable que dels 29 possibles interactants, el 17% estaven relacionats amb processos de traducció proteica (4 interactants) i *splicing* (1 interactant).

Taula 1. Anotació de seqüències obtingudes del cribratge de la llibreria de cDNA en patata i Arabidopsis, possible localització subcel·lular de les proteïnes codificades i el número de repeticions de cadascuna de les seqüències obtingudes. Es marquen en gris aquells gens que codifiquen proteïnes que poden estar involucrades en el procés de traducció i *splicing*. En negreta es marquen els gens seleccionats per caracteritzar més en detall.

ANOTACIÓ PATATA BlastN ($e < 1^{-10}$) (PotatoGenome)	CODI PATATA	ANOTACIÓ ARABIDOPSIS BlastX ($e < 1^{-10}$) (TAIR)	CODI ARABIDOPSIS	LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR (SUBA 3)	Nº REPETICIONS
<i>Isoamyl acetate-hydrolyzing esterase</i>	PGSC0003DMT400061198	<i>SGNH hydrolase-type esterase superfamily protein</i>	AT3G11210	Peroxisoma	26
<i>Cysteine proteinase 3</i>	PGSC0003DMT400048984	<i>Aleurin-like protease (ALP)</i>	AT5G60360	Extracel·lular	18
<i>S-adenosylmethionine synthase 2</i>	PGSC0003DMT400072701	<i>Methionine Adenosyltransferase 3 (MAT3)</i>	AT2G36880	Citosol	14
<i>Tetratricopeptide repeat (TPR)</i>	PGSC0003DMT400006808	<i>NAA15 (NAA15)</i>	AT1G80410	Nucli	7
<i>Putative uncharacterized protein</i>	PGSC0003DMT400060058	N/A	N/A	N/A	4
<i>40S ribosomal protein S28</i>	PGSC0003DMT400021531	<i>Ribosomal protein S28 (RPS28)</i>	AT5G64140	Citosol	3
<i>Conserved gene of unknown function</i>	PGSC0003DMT400001549	<i>Cyclic AMP-responsive element-binding protein</i>	AT5G24610	Membrana	3
<i>F-box family protein</i>	PGSC0003DMT400058591	<i>Phloem protein 2-A12 (PP2-A12)</i>	AT1G12710	Citosol	3
<i>Putative uncharacterized protein</i>	PGSC0003DMT400034084	<i>RmIC-like cupins superfamily protein</i>	AT5G39110	Extracel·lular	3
<i>Tubulin beta-1 chain</i>	PGSC0003DMT400072466	<i>Beta-6 Tubulin (TUB6)</i>	AT5G12250	Citosol	3
<i>60S ribosomal protein L21-like protein</i>	PGSC0003DMT400029796	<i>Translation protein SH3-like family protein</i>	AT1G57860	Citosol	2

ANOTACIÓ PATATA BlastN ($e<1^{-10}$) (PotatoGenome)	CODI PATATA	ANOTACIÓ ARABIDOPSIS BlastX ($e<1^{-10}$) (TAIR)	CODI ARABIDOPSIS	LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR (SUBA 3)	Nº REPETICIONS
<i>ADP-ribosylation factor 1-like</i>	PGSC0003DMT400003226	<i>ADP-Ribosylation factor A1F (ARFA1F)</i>	AT1G10630	Mitocondri	2
<i>F9L1.21 protein</i>	PGSC0003DMT400019614	<i>Translation machinery associated TMA7</i>	AT1G15270	Nucli	2
<i>Hypothetical gene of unknown function</i>	PGSC0003DMT400007776	N/A	N/A	N/A	2
<i>Predicted protein</i>	PGSC0003DMT400023983	<i>TonB-dependent heme receptor A</i>	AT1G72020	Plastidi	2
<i>Predicted protein</i>	PGSC0003DMT400007921	<i>Clavata3/ESR-related 14 (CLE14)</i>	AT1G63245	Extracel·lular	2
<i>Alpha-amylase</i>	PGSC0003DMT400025602	<i>Alpha-Amylase-Like 2 (AMY2)</i>	AT1G76130	Citosol	1
<i>Arginine decarboxylase</i>	PGSC0003DMT400004181	<i>Arginine Decarboxylase 2 (ADC2)</i>	AT4G34710	Peroxisoma	1
StERF135	PGSC0003DMT400067534	<i>Ethylene responsive element binding factor 2 (ERF2)</i>	AT5G47220	Nucli	1
<i>Basic 7S globulin 2 small subunit, putative</i>	PGSC0003DMT400091831	<i>Eukaryotic aspartyl protease family protein</i>	AT3G59080	Vacuola	1
<i>Cytosolic ascorbate peroxidase 1</i>	PGSC0003DMT400077268	<i>Ascorbate peroxidase 1 (APX1)</i>	AT1G07890	Citosol	1
<i>Germin 3</i>	PGSC0003DMT400053422	<i>RmlC-like cupins superfamily protein</i>	AT5G39110	Extracel·lular	1
<i>LeArcA1 protein /RACK1B</i>	PGSC0003DMT400074094	<i>Receptor for activates C kinase 1B (RACK1B_AT)</i>	AT1G48630	Citosol	1
<i>Lipoxygenase</i>	PGSC0003DMT400063654	<i>Lipoxygenase 5 (LOX5)</i>	AT3G22400	Citosol	1

ANOTACIÓ PATATA BlastN ($e<1^{-10}$) (PotatoGenome)	CODI PATATA	ANOTACIÓ ARABIDOPSIS BlastX ($e<1^{-10}$) (TAIR)	CODI ARABIDOPSIS	LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR (SUBA 3)	Nº REPETICIONS
<i>Proteasome subunit alpha type</i>	PGSC0003DMT400052657	<i>N-terminal nucleophile aminohydrolases (Ntn hydrolases) superfamily protein</i>	AT1G79210	Citosol/Nucli	1
<i>Putative uncharacterized protein</i>	PGSC0003DMT400063396	<i>T-box transcription factor</i>	AT1G26620	Nucli	1
<i>Sialin, putative</i>	PGSC0003DMT400052347	<i>Phosphate transporter 4;2 (PHT4;2)</i>	AT2G38060	Plastidi	1
<i>Translocation protein SEC62</i>	PGSC0003DMT400027805	<i>Translocation protein-like protein</i>	AT3G20920	Citosol	1
<i>Protein of unknown function (DUF707)</i>	PGSC0003DMT400064096	<i>Lysine ketoglutarate reductase trans-splicing-like protein</i>	AT4G18530	Extracel·lular/membrana	1

3.1.3.2-Selecció de candidats

Per a la selecció dels possibles candidats a interaccionar amb *StRIK* es va tenir en compte (i) la freqüència del gen en la llibreria, possible indicador d'interacció forta o fiable; (ii) la predicció de localització subcel·lular a nucli, atès que si *StRIK* es localitza principalment a nucli, és lògic pensar que les proteïnes candidates a interaccionar haurien de ser també nuclears; i/o (iii) la possible funció segons la literatura. Per predir la localització de cadascuna de les proteïnes es va analitzar la seqüència utilitzant el programa SUBA3 (<http://suba3.plantenergy.uwa.edu.au/>). Mitjançant aquesta predicció només 5 proteïnes de les 29 totals que s'havien descrit anteriorment es localitzaven a nucli (Taula 1). Basant-nos en alguns o tots tres criteris es van escollir 3 proteïnes.

Es va seleccionar la *Cysteine proteinase 3* perquè es trobava repetida 18 vegades en les 109 colònies seqüenciades. L'ortòleg d'*Arabidopsis* (At5g60360) pertany a la subfamília H de les cisteïnes proteases tipus *papain* de plantes (Richau et al., 2012). Les cisteïnes proteïnes, també conegudes com a tiol proteases, estan involucrades en la maduració, la degradació i la restauració de proteïnes en resposta a estímuls externs. Aquestes cisteïnes proteïnes contenen al centre actiu un motiu Cys-His-Asn que mitjançant la donació de protons millora la nucliofilicitat atacant l'enllaç peptídic i alliberant un fragment amino (Verma et al., 2016). A nivell biològic, les cisteïnes proteïnes estan involucrades en les vies de senyalització i en la resposta a estrès, tant biòtic com abiòtic, i tenen un rol essencial en el creixement i desenvolupament de les plantes, però també en la senescència i en la mort cel·lular programada (Grudkowska & Zagdańska, 2004). El fet d'identificar l'ortòleg de la *Cysteine proteinase 3* expressat en els fel·lemes de l'escorça externa d'alzina surera (suro) i d'alzina (ritidoma) posa de manifest que aquesta proteïna podria estar implicada en algun mecanisme bàsic però necessari pel desenvolupament del fel·lema tant de les quercínies com de la patata. També es va escollir *StERF135*, segons nomenclatura dels ERFs en patata (Charfeddine et al., 2015), el qual correspondria al possible ortòleg ERF2 (At5g47220) en *Arabidopsis*. Els membres de la família d'ERF són factors de transcripció que estan involucrats i/o relacionats amb el desenvolupament de la planta i amb diferents tipus d'estrès. Tot i que l'*StERF135* només es va identificar una única vegada en el cribratge, el fet que es predís una localització a nucli i tenint en compte el seu paper regulador en el desenvolupament de la planta ens vam plantejar que podria ser un bon candidat per poder relacionar la funció d'*StRIK* en el desenvolupament.

El tercer possible interactor seleccionat corresponia a RACK1B (*Receptor for Activated C Kinase 1 B*). Les proteïnes RACK1 són proteïnes *scaffold* molt versàtils que es troben en tots els

organismes eucariotes ben estudiats, incloent animals, plantes i llevats (Islas-Flores et al., 2015). RACK1 té un paper significant en transportar proteïnes a diferents punts de la cèl·lula, ancorar-les a punts concrets i en establir l'activitat proteica d'altres proteïnes a través de la interacció (Adams et al., 2011). Com a proteïna ribosomal, interacciona amb la maquinària ribosomal, però també amb multitud de receptors de superfície i amb proteïnes nuclears (Adams et al., 2011), com podria ser StRIK. No se li coneix una funció enzimàtica coneguda. En *Arabidopsis* s'han identificat 3 membres, RACK1A, RACK1B i RACK1C, que tenen un paper rellevant en diversos processos fisiològics, des de regular processos de desenvolupament, resposta a múltiples fitohormones, funcions en la resistència a malalties i en la via d'immunitat innata i en processos d'estrès abiòtic, com l'estrès hídric (Guo & Sun, 2017). RACK1B d'*Arabidopsis* (*receptor for activated kinase C1*) (At1g48630) regula els nivells de miRNAs (Speth et al., 2013) a través de la interacció amb proteïnes a nucli i citoplasma (Guo & Sun, 2017; Wamaita et al., 2012), el que la fa especialment interessant pel fet que la proteïna StRIK podria estar involucrada en el silenciament gènic (Boher, 2016).

3.1.3.3-Anàlisis *in silico* dels gens candidats

Per tal d'obtenir més informació de les proteïnes candidates a interaccionar amb *StRIK* es van realitzar diversos assajos *in silico*. Per una banda, es van analitzar els seus nivells d'expressió mitjançant les dades d'RNAseq obtingudes en diferents teixits i situacions per a dos genotips diferents de patatera (Massa et al., 2011). L'expressió en teixits es va mostrar en un *heatmap* d'expressió absoluta on es va observar que StRACK1B tenia els nivells d'expressió més alts en pràcticament tots els teixits excepte en l'estam (expressió màxima 908,45 FPKMs). L'*StCisteïna proteïnasa 3* presentava uns nivells d'expressió elevats en flor, estam, fulla, tija, arrel i sobretot pecíol, mentre que en la resta de teixits l'expressió era molt més baixa (expressió màxima 1.371,09 FPKMs). En canvi, la proteïna *StERF135* presentava un màxim d'expressió en la flor i l'estoló, tot i que l'expressió era molt baixa (expressió màxima 5,25 FPKMs) (Figura 11). A més es va fer un *heatmap* de la proteïna d'estudi StRIK on es va poder observar que s'expressava de manera similar a tots els teixits analitzats (expressió màxima 46,03 FPKMs). Les dades d'RNAseq relatives a l'expressió total de cada gen es van observar a partir de l'*eFP Browser* per a cadascun dels gens, on per exemple, en el pictograma *StERF135* es va poder observar un màxim d'expressió en la flor i concretament en pètals (Figura Suplementària 1A, 2A i 3A).

Les dades d'estrès abiòtic (Figura 12) van mostrar que els tractaments amb sal i mannitol reprimien o mantenien una expressió gènica similar al control en tots els casos, igual que en el tractament per calor. En els tractaments hormonals *StRACK1B* disminuïa lleugerament

l'expressió en tots els tractament hormonal assajats. La *StCisteïna proteïnasa 3* disminuïa lleugerament l'expressió en el tractament amb citoquinines (BAP) i augmentava amb gibberel·lines (GA3). Pel que fa a l'*StERF135*, la seva expressió augmentava amb àcid abscísic (ABA). Per altra banda, l'estrès biòtic ens indica que *StRACK1B* s'activava lleugerament quan s'indueixen infeccions per *Phytophthora infestans* i també per BTH (benzothiadiazole, un anàleg de l'àcid salicílic), i en fulla ferida també s'indueix la seva expressió; i *StERF135* augmentava la seva expressió en el tractament amb BABA (Figura 12). Així doncs, aquests resultats mostren que l'expressió d'aquests gens queda modificada sota condicions d'estrès de manera similar a com té lloc en la proteïna StRIK (Boher, 2016). Aquests resultats també es mostren en un pictograma realitzat a través de les dades obtingudes de l'eFP Browser (Figura Suplementària 1B, 2B i 3B).

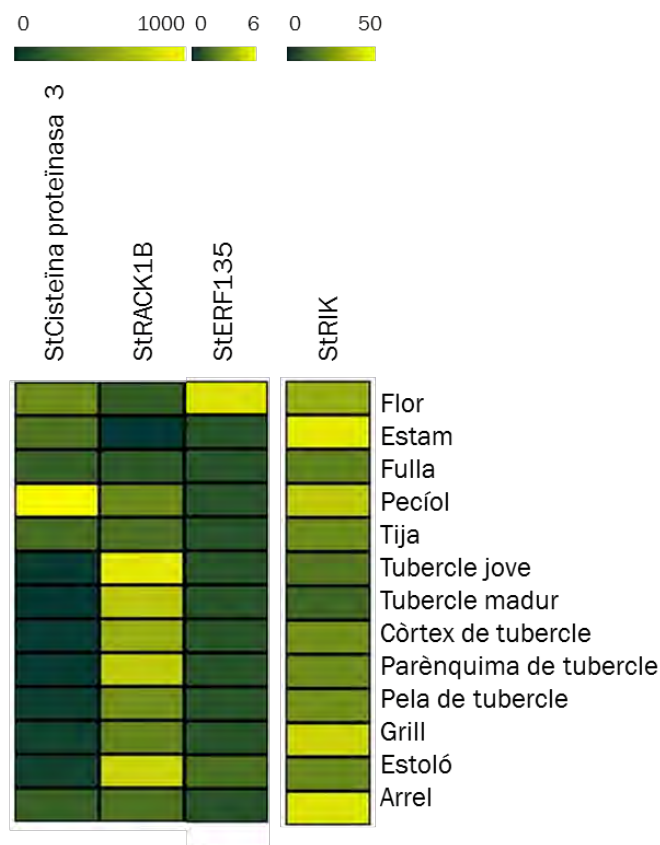


Figura 11. Heatmap d'expressió en diferents teixits dels gens que codifiquen per proteïnes interactants segons el sistema del dos híbrids i la proteïna d'estudi StRIK. Es representa un mapa de color per a les proteïnes candidates a interaccionar *StCisteïna proteïnasa 3*, *StRACK1B* i *StERF135*; i un mapa de color per a la proteïna d'estudi StRIK. S'han utilitzat dades *in silico* d'expressió en *Solanum tuberosum* (Massa et al., 2011). El color verd fosc representa un nivell nul o baix d'expressió. El color groc representa alts nivells d'expressió. Cadacú dels gens conté la seva pròpia escala (*StCisteïna proteïnasa 3* (0-1000); *StRACK1B* (0-1000); *StERF135* (0-6); *StRIK* (0-50)).

Addicionalment, per cadascun dels possibles interactors es va realitzar un anàlisi de coexpressió usant el seu possible ortòleg en Arabidopsis i el programari lliure *Genemania* (Warde-Farley et al. 2010), el qual permet obtenir els gens coexpressants i la categoria funcional a on pertanyen. En el cas de la *Cisteïna proteïnasa 3* (At5g60360) els assajos de coexpressió van revelar (Taula 2) que coexpressava amb altres gens que codifiquen per Cisteïnes proteïnases, gens involucrats en defensa i resposta o el gen *APUM5* (*Pumilio 5*), el qual és rellevant ja que està implicat en la biogènesi d'RNA suggerint un possible paper en la regulació post-transcripcional de la resposta a estrès (Huh & Paek, 2014). L'*ERF135* (At5g47220) coexpressa amb factors de transcripció com *ERF* o *WRKY* relacionats amb resposta a defensa, i d'especial rellevància amb un gen que regula els mRNAs en resposta a estrès, *CCR4-associated factor* (*CAF1-9*) (Liang et al., 2009) (Taula 3). Per últim, s'ha vist que *RACK1B* coexpressa amb el seu homòleg *RACK1C*, amb molts gens implicats en el procés de traducció (bàsicament gens ribosomals), i amb un gen, *fibrillarín 2* (*FIB2*) relacionat amb la interacció a RNAs de diferents tipus (Rakitina et al., 2011) (Taula 4). Les dades mostren que els tres candidats presenten coexpressió amb categories funcionals i/o gens que els fan compatibles per poder interaccionar amb StRIK per a una funció comuna.

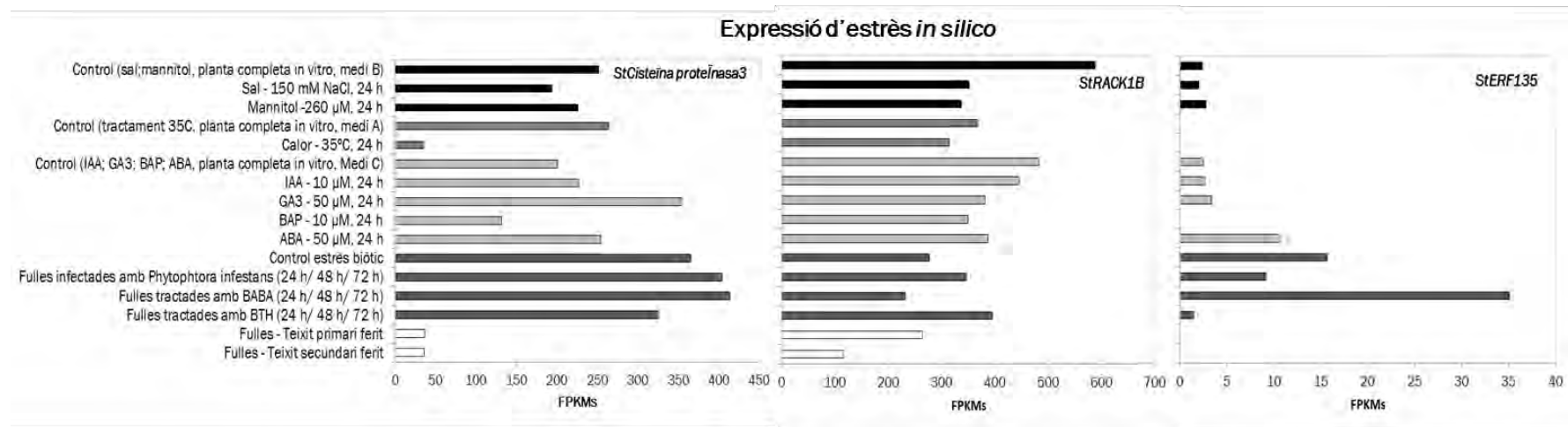


Figura 12. Representació de l'expressió *in silico* dels gens que codifiquen per proteïnes interactants segons el sistema del dos híbrids (*StCisteïna proteïnasa 3*, *StRACK1B* i *StERF135*) en diferents tractaments d'estrès i hormonals (Massa et al., 2011; PGSC 2011). A l'eix de les X trobem els nivells d'expressió en FPKMs. A l'eix de les Y trobem els diferents tractament realitzats. Cada tractament està marcat amb un color diferent: estrès salí i osmòtic, shock tèrmic, tractament hormonal, estrès biòtic i ferida.

Taula 2. Gens que es coexpressen amb *Cisteïna proteïnasa 3*, agrupats per categories funcionals, segons el *Genemania*. El pes indica la importància de la correlació de l'expressió del gen amb el gen d'estudi per explicar la xarxa, on 1 és el total de la xarxa coincidint amb la suma de totes les interaccions possibles. En la taula es mostra el valor del pes en referència a At5g60360.

Categoria funcional	Nombre d'accés	Descripció	Pes
Síntesi de lípids	AT3G51730	<i>Saposin B domain</i>	0,016
	AT2G42790	CSY3	0,016
Síntesi de RNA	AT3G20250	APUM5	0,017
Metabolisme	AT4G16190	Cisteïna proteasa	0,016
	AT4G01610	Cisteïna proteasa	0,021
	AT1G02305	Cisteïna proteasa	0,016
	AT4G21580	Oxidoreductasa	0,018
	AT1G78670	ATGGH3	0,022
Estrès i defensa	AT1G47128	RD21	0,021
	AT3G23600	Alpha/beta-Hidrolases	0,016
	AT5G13800	PPH	0,016
	AT1G11910	APA1	0,018
	AT4G24220	VEP1	0,020
	AT4G39090	RD19	0,019
	AT4G32940	GAMMA-VPE	0,018
	AT5G46180	DELTA-OAT	0,018
	AT1G53580	GLX2-3	0,019
Altres	AT3G51000	Alpha/beta-Hidrolases	0,020
	AT5G05110	CYS7	0,014
	AT5G61820	Desconeguda	0,015

Taula 3. Gens que es coexpressen amb *ERF135*, agrupats per categories funcionals, segons el *Genemania*. El pes indica la importància de la correlació de l'expressió del gen amb el gen d'estudi per explicar la xarxa, on 1 és el total de la xarxa coincidint amb la suma de totes les interaccions possibles. En la taula es mostra el valor del pes en referència a *At5g47220*.

Categoria funcional	Nombre d'accés	Descripció	Pes
Regulació			
	AT4G17500	ATERF1	0,026
	AT1G73500	ATMKK9	0,021
	AT1G06160	AP2/ERF59	0,029
	AT1G80840	WRKY40	0,017
	AT1G28370	ERF11	0,021
	AT5G61600	ERF104	0,020
	AT1G18570	MYB51	0,021
	AT1G27730	STZ	0,016
	AT3G56710	SIB1	0,020
	AT3G55980	SZF1	0,017
	AT4G31800	WRKY18	0,023
Modificació RNA			
	AT3G44260	CAF1-9	0,020
Estrès i defensa			
	AT1G76650	CML38	0,018
	AT3G45640	ATMPK3	0,022
	AT3G16720	ATL2	0,021
Altres			
	AT2G25735	Desconeguda	0,019
	AT2G26530	AR781	0,021
	AT5G52750	Transportador de metalls pesants	0,017
	AT4G36500	Desconeguda	0,018
	AT2G26190	Família proteica d'unió Calmodulina	0,018

Taula 4. Gens que es coexpressen amb *RACK1B*, agrupats per categories funcionals, segons el Genemania. El pes indica la importància de la correlació de l'expressió del gen amb el gen d'estudi per explicar la xarxa, on 1 és el total de la xarxa coincidint amb la suma de totes les interaccions possibles. En la taula es mostra el valor del pes en referència a At1g48630.

Categoria funcional	Nombre d'accés	Descripció	Pes
Regulació	AT3G18130	RACK1C	0,019
Modificació RNA	AT4G25630	FIB2	0,018
	AT5G22440	RPL10AC	0,018
Implicat en la traducció	AT2G32060	Proteïna ribosomal	0,016
	AT3G07110	RPL13AA	0,015
	AT4G10450	RPL9D	0,016
	AT3G16780	RPL19B	0,015
	AT5G61170	RPS19C	0,022
	AT5G02870	RPL4D	0,016
	AT3G10610	RPS17C	0,023
	AT4G31700	Proteïna ribosomal	0,018
	AT3G16080	RPL37C	0,019
	AT1G26910	RPL10B	0,016
	AT3G09630	RPL4A	0,017
	AT5G58420	RPS4D	0,017
	AT2G36620	RPL24A	0,020
	AT3G44590	Proteïna ribosomal	0,014
	AT5G16130	RPS7C	0,017
	AT1G72370	P40	0,014
Altres	AT4G10480	Desconeguda	0,015

Els elements reguladors en *cis* del promotor (2.500 bases *upstream* del codó d'inici) de cadascun dels possibles interactors es va analitzar mitjançant l'eina *PlantCare*. Cal tenir en compte que no tots els elements han de perquè ser funcionals, però sí que pot donar una visió més general dels estímuls pels quals es troben regulats aquests gens. La regió promotora analitzada de la *StCisteina proteïnasa 3* (Taula 5) va predir que hi pot haver una regulació a nivell d'estrès biòtic i abiòtic, però també per llum i hormones (gibberel·lines, àcid salicílic, metil jasmonat i etilè). A nivell tissular només es va trobar regulació a nivell d'endosperma. En el cas d'*StERF135* (Taula 6) també es va poder observar regulació a nivell d'estrès, molts elements reguladors relacionats amb la llum i el cicle circadià. *StERF135* pot estar regulat també a nivell hormonal (gibberel·lines, àcid salicílic, MeJA, etilè, àcid abscísic i auxines). A nivell tissular, únicament vam trobar regulació a l'endosperma. Per últim, el promotor d'*StRACK1B* (Taula 7) va mostrar regulació a nivell d'estrès i hormonal (gibberel·lines, MeJA, etilè i àcid abscísic). Novament només es va identificar regulació a l'endosperma. L'anàlisi dels elements reguladors en *cis* ens posa de manifest que aquests tres candidats es regulen a nivell d'estrès, igual que ho fa la proteïna StRIK i també a nivell hormonal, on concretament l'*StERF135* i l'*StRACK1B* tenen regulació hormonal per àcid abscísic, al igual que la proteïna StRIK (Boher, 2016).

Taula 5. Elements reguladors en cis de la possible regió promotora d'*StCisteïna proteïnasa 3* agrupat per categories funcionals.

Grup de resposta	Possible funció	Nom del motiu	Seqüència	Quantitat
Estrès	Element essencial per la inducció anaeròbica	ARE	TGGTTT	2
	Element de resposta antifúngica	BOX-W1	TTGACC	1
	Element regulador involucrat en la resposta a estrès per calor	HSE	AAAAAATTC	1
	Unió a MYB involucrat en la inducció a fàrmacs	MBS	TAACTG	1
	Element de resposta a estrès	TC-rich repeats	ATTTCTCCA	3
Hormones	Element de resposta a gibberel·lines	GARE-motif	TCTGTTG	1
	Element de resposta a gibberel·lines	TATC-box	TATCCA	2
	Element regulador en cis de resposta a àcid salicilic	TCA-element	CCATCTTTT	3
	Element regulador involucrat en resposta a MeJA	CGTCA-motif	CGTA	7
	Element regulador involucrat en resposta a MeJA	TGACG-motif	TGACG	7
	Element de resposta a etilè	ERE	ATTTCAAA	2
Llum	Element de resposta a llum	ACE	AAAACGTTTA	1
	Part d'un mòdul de resposta a la llum	AT1-motif	ATTAATTTTACA	1
	Part d'un mòdul conservat de DNA de resposta a llum	BOX4	ATTAAT	5
	Element de resposta a llum	BOX1	TTGACC	3
	Part d'un element de resposta a llum	CATT-motif	GCATTC	1
	Element involucrat en el control circadià	Circadian	CAANNNNATC	1
	Part d'un element de resposta a llum	GA-motif	ATAGATAA	1
	Part d'un element de resposta a llum	GAG-motif	AGAGATG	1
	Element de resposta a llum	GT1-motif	GGTTAAT	2
	Element de resposta a llum	SP1	GGGCGG	1
	Element regulador en cis de resposta a llum	G-box	CACGTT	1
	Element regulador en cis de resposta a llum	G-box	CACGTC	2

	Part d'un element de resposta a llum	TCT-motif	TCTTAC	1
	Part d'un element de resposta a llum	TCCC-motif	TCTCCCT	2
	Element regulador involucrat en la resposta a baixa temperatura	LTR	CCGAAA	1
	Part d'un element de resposta a llum	LAMP-element	CTTTATCA	1
	Element de resposta a llum	MNF1	GTGCC(A/T)(A/T)	1
Especificitat tissular	Involucrat en l'expressió de l'endosperma	GCN4 motif	TGTGTCA	1
	Requerit per l'expressió a l'endosperma	Skn-1 motif	GTCAT	9
Altres	Augment dels nivell de transcripció	5'UTR Py-rich	TTTCTTCTCT	2
	Comú en promotors i zones de millora de l'expressió	CAAT-box	CAAT	26
	Comú en promotors i zones de millora de l'expressió	CAAT-box	CCAAT	2
	Comú en promotors i zones de millora de l'expressió	CAAT-box	CAATT	9
	Comú en promotors i zones de millora de l'expressió	CAAT-box	CAAAT	16
	Comú en promotors i zones de millora de l'expressió	CAAT-box	gGCAAT	2
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TTTAAAAA	3
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TTTTA	26
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	ATATAT	8
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	ATATAA	1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	ATATAAT	1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAAATT	3
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TAATA	24
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	ATTATA	3
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TAAAAATAA	2
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATA	22
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAA	10
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAAA	9
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAAAA	3
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAAAT	13

Promotor base a – 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATACA	2
Promotor base a – 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATATAAT	1
Promotor base a – 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	ccTATAAATT	1
Promotor base a – 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	taTATAAAtc	1
Promotor base a – 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATATAA	2
Promotor base a – 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATTTAAA	4
Regulació del metabolisme de la zeïna	O2-site	GTTGACGTGA	1
Desconeguda	Unnamed4	CTCC	13
	W-box	TTGACC	1
	Unnamed1	GAATTTAATTAA	1
	ATGCAAAT motif	ATACAAAT	1
	Unnamed6	taTAAATATct	1

Taula 6. Elements reguladors en cis de la possible regió promotora d'*StERF135* agrupat per categories funcionals.

Grup de resposta	Possible funció	Nom del motiu	Seqüència	Quantitat
Estrès	Element essencial per la inducció anaeròbica	ARE	TGGTTT	2
	Element de resposta antifúngica	BOX-W1	TTGACC	1
	Element regulador involucrat en la resposta a estrès per calor	HSE	AAAAAATTC	3
	Element de resposta a estrès	TC-rich repeats	ATTTCTCCA	5
Hormones	Element de resposta a gibberel·lins	GARE-motif	AAACAGA	1
	Element regulador en cis de resposta a àcid salicílic	TCA-element	GAGAAGAATA	1
	Element regulador involucrat en resposta a MeJA	CGTCA-motif	CGTA	1
	Element regulador involucrat en resposta a MeJA	TGACG-motif	TGACG	1
	Element de resposta a etilè	ERE	ATTTCAAA	1
	Element de resposta a àcid abscísic	ABRE	CACGTG	1
	Element de resposta a auxines	TGA-element	AACGAC	1
Llum	Element de resposta a llum	ACE	CTAACGTTTA	1
	Part d'un mòdul de resposta a llum	AE-box	AGAAACTT	2
	Part d'un mòdul conservat de DNA de resposta a llum	BOX4	ATTAAT	5
	Element de resposta a llum	BOX1	TTTCAAA	2
	Element involucrat en el control circadià	Circadian	CAANNNNATC	2
	Element de resposta a llum	SP1	CC(G/A)CCC	1
	Element regulador en cis de resposta a llum	G-box	CACGTG	2
	Part d'un element de resposta a llum	TCT-motif	TCTTAC	3
	Element regulador involucrat en la resposta a baixa temperatura	LTR	CCGAAA	1
	Lloc d'unió a MYB en resposta a llum	MRE	AACCTAA	1
	Part d'un element de resposta a llum	Chs-CMA1a	TTACTTAA	2
	Element de resposta a llum	3-AF1	AAGAGATAAAA	1
	Part d'un element de resposta a llum	I-box	TACGATAACC	2
	Part d'un element de resposta a llum	TCT-motif	TCTTAC	2

Grup de resposta	Possible funció	Nom del motiu	Seqüència	Quantitat
Especificitat tissular	Involucrat en l'expressió de l'endosperma	GCN4 motif	TGTGTCA	1
	Requerit per l'expressió a l'endosperma	Skn-1 motif	GTCAT	9
Altres	Augment dels nivell de transcripció	5'UTR Py-rich	TTTCTTCTCT	1
	Comú en promotors i zones de millora de l'expressió	CAAT-box	CAAT	11
	Comú en promotors i zones de millora de l'expressió	CAAT-box	CCAAT	3
	Comú en promotors i zones de millora de l'expressió	CAAT-box	CAATT	7
	Comú en promotors i zones de millora de l'expressió	CAAT-box	CAAAT	27
	Comú en promotors i zones de millora de l'expressió	CAAT-box	gGCAAT	1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TTTAAAAA	3
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TTTTA	43
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	ATATAT	16
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	ATATAA	2
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	ATATAAT	2
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAAAT	4
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TAATA	25
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	ATTATA	6
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAAGAA	1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATA	33
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAA	13
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAAA	11
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAAAA	5
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAAATT	3
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATACA	3
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	ccTATAAAaa	1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	ccTATAAATT	2
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	taTATAAAtc	4
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATATAA	5
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATTTAAA	1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TACATAAA	2
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATATATA	9
	Regulació del metabolisme de la zeïna	O2-site	GTTGACGTGA	1

Grup de resposta	Possible funció	Nom del motiu	Seqüència	Quantitat
Desconeguda		Unnamed4	CTCC	8
		W-box	TTGACC	1
		Unnamed1	GAATTAATTAA	1
		Unnamed1	CGTGG	1
		Unnamed6	taTAAATATct	2
		Unnamed2	ATTAAATTTAAATT	1
		Unnamed3	CGTGG	1

Taula 7. Elements reguladors en cis de la possible regió promotora d'*StRACK1B* agrupat per categories funcionals.

Grup de resposta	Possible funció	Nom del motiu	Seqüència	Quantitat
Estrès	Element essencial per la inducció anaeròbica	ARE	TGGTTT	1
	Element regulador involucrat en la resposta a estrès per calor	HSE	AAAAAATTTTC	1
	Element de resposta a estrès	TC-rich repeats	ATTTTCTCCA	3
	Unió a MYB involucrat en la inducció a fàrmacs	MBS	TAACGTG	1
Hormones	Element de resposta a gibberel·lines	P-box	CCTTTTG	1
	Element de resposta a gibberel·lines	GARE-motif	AAACAGA	1
	Element regulador involucrat en resposta a MeJA	CGTCA-motif	CGTA	1
	Element regulador involucrat en resposta a MeJA	TGACG-motif	TGACG	1
	Element de resposta a etilè	ERE	ATTTCAAA	1
	Element de resposta a àcid abscísic	ABRE	TACGTG	1
Llum	Part d'un mòdul conservat de DNA de resposta a llum	BOX4	ATTAAT	4
	Element de resposta a llum	BOX1	TTTCAAA	2
	Element involucrat en el control circadià	Circadian	CAANNNNATC	3
	Element regulador en cis de resposta a llum	G-box	CACGTG	3
	Part d'un element de resposta a llum	TCT-motif	TCTTAC	2
	Element regulador involucrat en la resposta a baixa temperatura	LTR	CCGAAA	1
	Part d'un element de resposta a llum	Chs-CMA1a	TFACTTAA	2
	Part d'un element de resposta a llum	GAG-motif	AGAGATG	4
	Element de resposta a llum	GT1-motif	GGTTAA	1

Grup de resposta	Possible funció	Nom del motiu	Seqüència	Quantitat
Altres	Augment dels nivell de transcripció	5'UTR Py-rich	TTTCTTCTCT	1
	Comú en promotors i zones de millora de l'expressió	CAAT-box	CAAT	25
	Comú en promotors i zones de millora de l'expressió	CAAT-box	CCAAT	2
	Comú en promotors i zones de millora de l'expressió	CAAT-box	CAATT	3
	Comú en promotors i zones de millora de l'expressió	CAAT-box	CAAAT	6
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TTTAAAA	4
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TTTTA	44
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	ATATAT	5
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	ATATAA	3
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	ATATAAT	1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAAAT	4
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TAATA	23
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	ATTATA	5
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATA	23
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAA	10
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAAA	2
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAAAA	1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAAATT	1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATACA	1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	ccTATAAAaa	1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	taTATAAAtc	2
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATATAA	1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATTTAAA	1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TACATAAA	2
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATATATA	1
	Lloc d'unió a proteïna	BOX3	CATTTACT	1
	Desconeguda		Unnamed4	CTCC
		TATCCAT/C-motif	TATCCAT	1

3.1.3.4-Localització subcel·lular

Per confirmar la localització subcel·lular de les possibles proteïnes interactores StCisteïna proteïnasa 3, StERF135 i StRACK1B i si ho fan d'acord amb la localització del seu possible interactor StRIK, es van transformar transitòriament fulles de *Nicotiana benthamiana* (tabac) mitjançant *Agrobacterium tumefaciens*. StRIK i les proteïnes candidates es van sobreexpressar utilitzant el promotor constitutiu CaMV35S i es va fusionar la proteïna fluorescent vermella (RFP) i la proteïna fluorescent verda (GFP) a l'extrem N-terminal de la regió codificant de cadascuna de les proteïnes (*ProCaMV35S:DsRED-StRIK*, *ProCaMV35S:GFP-StRACK1B*, *ProCaMV35S:GFP-StCisteïna proteïnasa 3* i *ProCaMV35S:GFP-StERF135*). Es va coinfiltrar amb l'inhibidor de silenciament p19 (Lakatos et al., 2004). Després de 72 hores d'infecció es van observar les cèl·lules al microscopi confocal. Pel que fa a StRIK, es va confirmar la seva localització subcel·lular a nucli, tal i com s'havia descrit anteriorment (Boher, 2016) (Figura 13A i B). En el cas de la proteïna StRACK1B la fluorescència verda es localitzava a citoplasma i en ocasions al nucli de la cèl·lula (Figura 13C i D). Pel que fa a l'StCisteïna proteïnasa 3, la proteïna també s'acumulava a citoplasma i en ocasions al nucli de la cèl·lula (Figura 13E i F), però addicionalment s'observaven també en grànuls que podrien correspondre a peroxisomes (Quan et al., 2013; Quan et al., 2010), lisosomes (Richau et al., 2012; Stoka et al., 2005) o vacúols (Kotzer et al., 2004) en determinades cèl·lules (Figura 13G i H). Les observacions estarien d'acord amb que les proteïnes citoplasmàtiques sovint es localitzen de manera dual en el nucli, excepte aquelles que s'exclouïen del nucli per tenir una senyal d'export nuclear o bé per tenir mides massa grans que evitarien que poguessin passar passivament pels porus nuclears (Waadt et al., 2014). No obstant, les observacions difereixen de la predicció *in silico* d'StRACK1B de localització única al citosol i d'StCisteïna proteïnasa 3 en la zona extracel·lular. Pel que fa a la proteïna StERF135, es concentrava en un únic punt dins de cada cèl·lula corresponent al patró típic de proteïnes que es localitzen a nucli (Figura 13I i J). Així, les tres proteïnes seleccionades a interaccionar amb StRIK es localitzaven a nucli i/o podien difondre-hi pel que reforça la seva possible interacció amb StRIK.

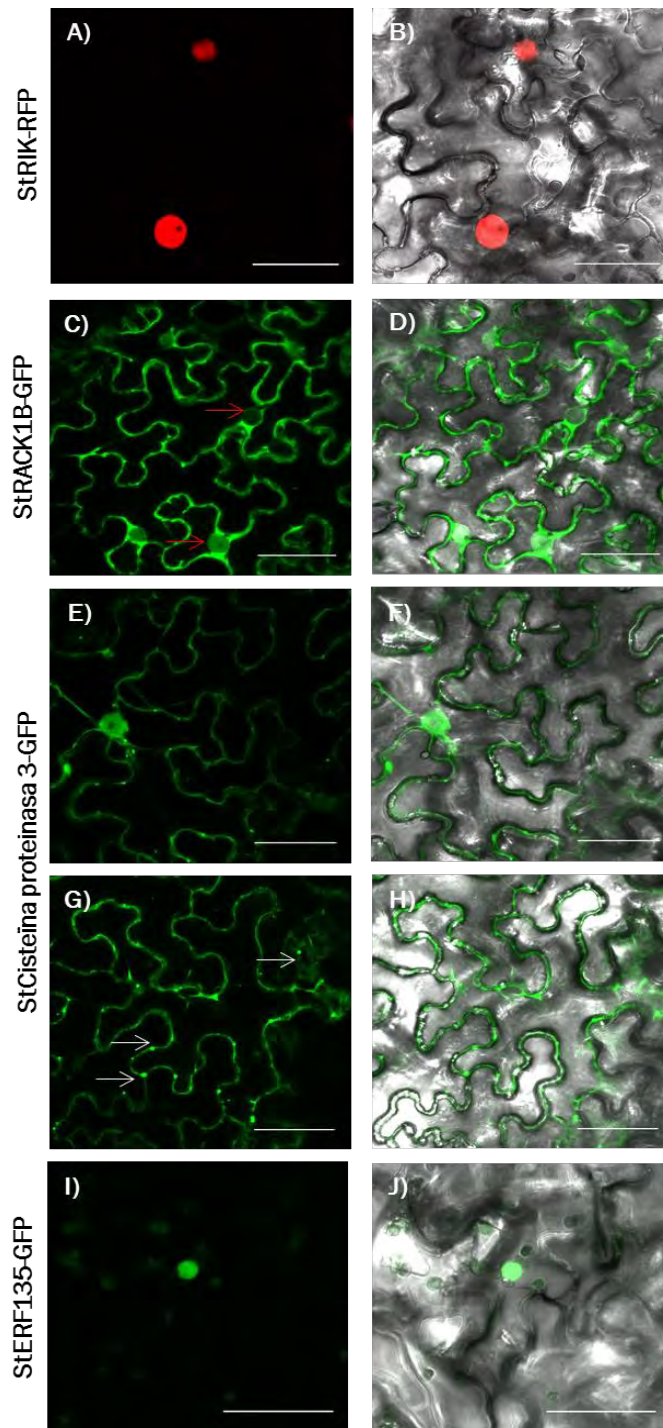


Figura 13. Localitzacions subcel·lulars de les proteïnes d'estudi StRIK, StRACK1B, StCisteïna proteïnasa 3 i StERF135. A l'esquerra de la imatge es mostra el camp confocal amb fluorescència, a la dreta es mostra la superposició d'aquest camp amb el camp clar. A) i B) Localització de la proteïna StRIK unida a una proteïna fluorescent vermella (RFP); C) i D) Localització de la proteïna StRACK1B unida a una proteïna fluorescent verda (GFP). Les fletxes vermelles indiquen el nucli de la cèl·lula; E)–H) Localització de la proteïna StCisteïna proteïnasa 3 unida a una proteïna fluorescent verda (GFP). Les fletxes blanques indiquen grànuls; I) i J) Localització de la proteïna StERF135 unida a una proteïna fluorescent verda (GFP). Escala: 40 μ m.

3.1.3.5-Coexpressió de la proteïna StCisteïna proteïnasa 3 i StRACK1B amb la proteïna StRIK

Donat que la proteïna StRIK es localitzava a nucli i que la proteïna StRACK1B i la StCisteïna proteïnasa 3 presentaven amb molta freqüència d'altres localitzacions, es va estudiar si la presència d'aquestes proteïnes a nucli depenia de la presència d'StRIK. No es va realitzar l'assaig amb l'StERF135 atès que ja es localitzava a nucli. L'assaig es va dur a terme de la mateixa manera que en l'assaig de la localització subcel·lular, però amb la diferència que en aquest cas es van coinfiltrar 3 proteïnes (StRIK + StCisteïna proteïnasa 3 + P19 o StRIK + StRACK1B + P19). Per tal de poder incorporar a la imatge tota la informació dels diferents plans en profunditat, les imatges corresponen a una projecció en Z de màxima intensitat. Els resultats mostren que la proteïna StRACK1B es localitzava a nucli amb la proteïna StRIK, tot i que no ho feia sempre (Figura 14A, B i C).

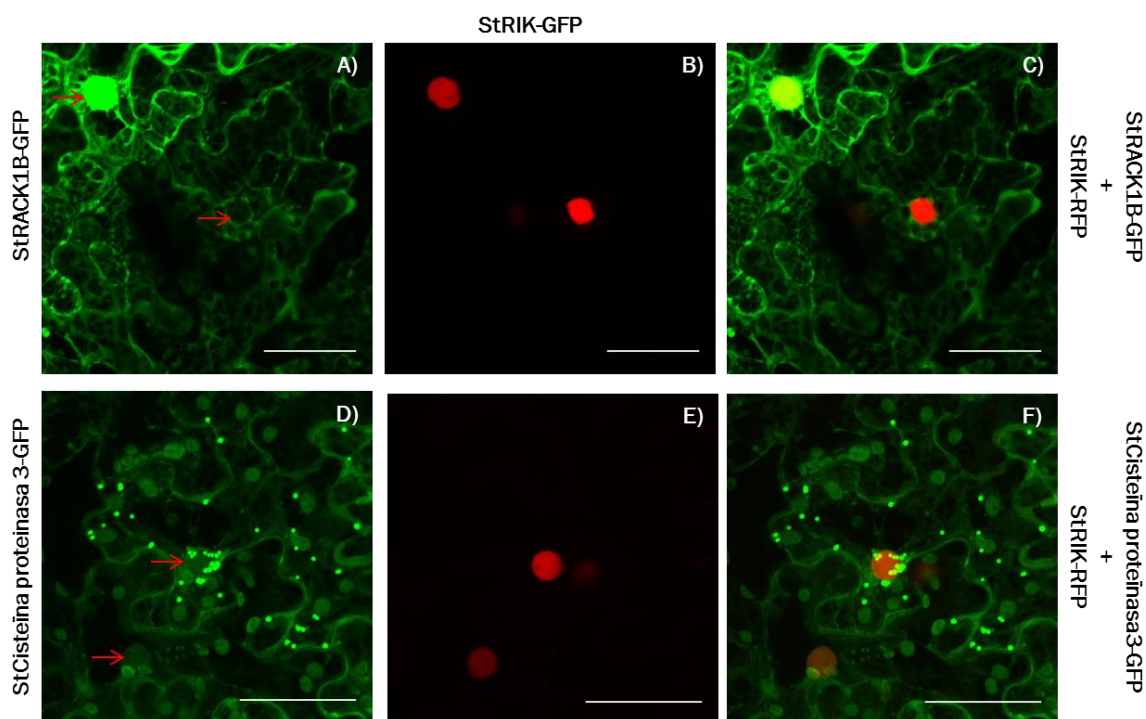


Figura 14. Coexpressió de les proteïnes StCisteïna proteïnasa 3 i StRACK1B amb la proteïna StRIK. Les proteïnes StCisteïna proteïnasa 3 i StRACK1B tenen fusionades una proteïna fluorescent verda (GFP). La proteïna StRIK té fusionada una proteïna fluorescent vermella (RFP). A) i D) Localització de la proteïna StRACK1B i de la proteïna StCisteïna proteïnasa 3 respectivament; B) i E) Localització de la proteïna StRIK; C) Solapament de A) i B); F) Solapament de D) i E). Escala: 40 μ m. Imatges corresponents a la projecció Z de màxima intensitat mitjançant microscopi confocal.

En la Figura 15 es pot observar un nucli on coexpressen les dues proteïnes i un altre que no. La mateixa observació es va fer per la StCisteïna proteïnasa 3, la qual a vegades viatjava a nuclis on s'hi trobava també StRIK (Figura 14C, D i E), però a vegades es mantenia en d'altres localitzacions tals com citoplasma o grànuls que podrien correspondre a peroxisomes (Quan et al., 2013; Quan et al., 2010), lisosomes (Richau et al., 2012; Stoka et al., 2005) o vacúols (Kotzer et al., 2004) en determinades cèl·lules.

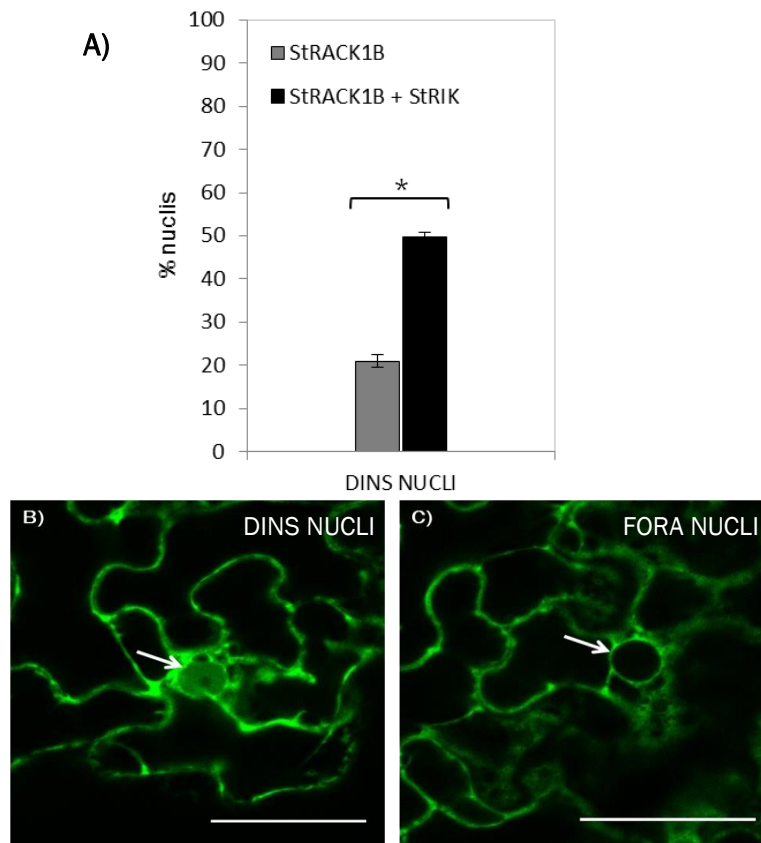


Figura 15. Recompte de nuclis observats en la coexpressió de la proteïna StRIK amb la proteïna StRACK1B i localització d'StRACK1B a dins i fora del nucli. A) Recompte de nuclis. El color gris ens mostra els nuclis recomptats quan només expressem la proteïna StRACK1B. El color negre ens mostra la coexpressió de la proteïna StRACK1B amb la proteïna StRIK. S'ha realitzat un test estadístic t per a mostres independents ($p < 0.001$); B) Localització d'StRACK1B a nucli; C) Localització d'StRACK1B fora de nucli. Les fletxes blanques indiquen el nucli. Escala: 40 μm .

Les observacions de l'expressió d'StRACK1B amb i sense StRIK va mostrar preliminarment que la localització a nucli de la proteïna StRACK1B augmentava quan es coexpressava amb la proteïna StRIK. Per això es va realitzar un recompte de nuclis que acumulaven StRACK1B amb i sense la coexpressió d'StRIK. Els resultats ens indiquen de manera significativa ($p < 0.001$) que sense sobreexpressar *StRIK*, només un 21% de les cèl·lules que acumulen

StRACK1B ho fan, a més del citoplasma, al nucli. Mentre que quan es sobreexpressen conjuntament les dues proteïnes (StRACK1B-GFP i StRIK-DsRED) aquest valor augmenta fins al 49,8% (Figura 15). Aquest augment de la localització d'StRACK1B a nucli en presència d'StRIK es podria explicar per la interacció de les dues proteïnes i posterior desplaçament del complex, liderat per StRIK, cap a nucli. En el recompte es va considerar que StRACK1B no s'acumulava a nucli en cèl·lules on es detectava expressió en altres compartiments (Figura 15 B).

3.2-Identificació i caracterització de gens candidats de la regulació i el transport dels monòmers de suberina

3.2.1-ERF: candidat de la regulació del teixit

3.2.1.1-Identificació dels ERFs de patata candidats per tenir un paper en el fel·lema

La família *Ethylene Responsive Factor* (ERF) és un dels grups més grans de factors de transcripció en les plantes, les quals contenen un domini conservat d'unió a DNA anomenat AP2. S'ha demostrat que aquests ERF juguen un paper molt important en la regulació de l'estrès biòtic (Park et al., 2001) i l'estrès abiòtic (Zarei et al., 2011), així com en la regulació de lípids (Licausi et al., 2013).

Per tal de conèixer com es comporten en diferents teixits tots aquells gens que contenen un domini AP2 en *Solanum tuberosum*, es van seleccionar 153 gens codificants per als factors de transcripció ERF descrits en patata (Charfeddine et al., 2015) i es va estudiar el seu patró d'expressió a partir dels dos genotips (doble monoploide i heterozigot diploide) basant-nos en les dades generades per RNAseq de 32 teixits i condicions de creixement (Massa et al., 2011). Es van considerar bons candidats aquells gens que s'expressaven de forma preferent en teixits que presentaven cèl·lules amb paret suberificada, com seria el cas de la pela del tubercle i l'arrel. Dels 153 gens que formen la família d'ERF en patata, 92 no presentaven expressió ni a la pela del tubercle ni a l'arrel, motiu pel qual van ser descartats. De la mateixa manera, també es van descartar 9 gens que no tenien expressió en arrel i que coincidien amb una expressió baixa en pela (màxima de 10 FPKMs). Per últim degut a la seva poca especificitat també es van excloure 17 gens que presentaven un patró d'expressió general en tots els teixits. Pels 35 gens restants, els resultats d'expressió en diferents teixits i òrgans de la planta es mostren en un *Heatmap* (Figura 16), on el color groc indica nivells d'expressió més elevats respecte el color verd.

Els gens *StERF51*, *StERF93*, *StERF134*, *StERF156* i *StERF162* presentaven una elevada expressió a la pela del tubercle (>30 FPKMs) i tots ells, excepte l'*StERF134*, presentaven també una elevada expressió a l'arrel (> 30 FPKMs) (Figura 16). És interessant de constatar que l'expressió en arrel i fel·lema d'aquests gens correlacionava amb una expressió elevada a pecíol, i que per tots ells l'expressió en altres teixits era molt feble o inclús nul·la (Figura 16). A l'observar l'agrupació jeràrquica dels 35 gens segons el seu patró d'expressió es va poder observar que els 4 gens d'interès *StERF51*, *StERF93*, *StERF156* i *StERF162* es trobaven agrupats. Basant-nos en l'especificitat d'expressió en la pell del tubercle de la patata, es pot

determinar que l'*StERF93* és el millor candidat per a la regulació del procés de suberificació, ja que conté els valors més baixos en còrtex i parènquima del tubercle (2,9 i 1,9 FPKMs respectivament). L'expressió d'*StERF93* es mostra en un pictograma d'eFP Browser (Winter et al., 2007) dels diferents teixits i òrgans de la patata, també basat en les dades d'RNAseq de Massa et al. (2011) i Xu et al. (2011) (Figura Suplementària 4A).

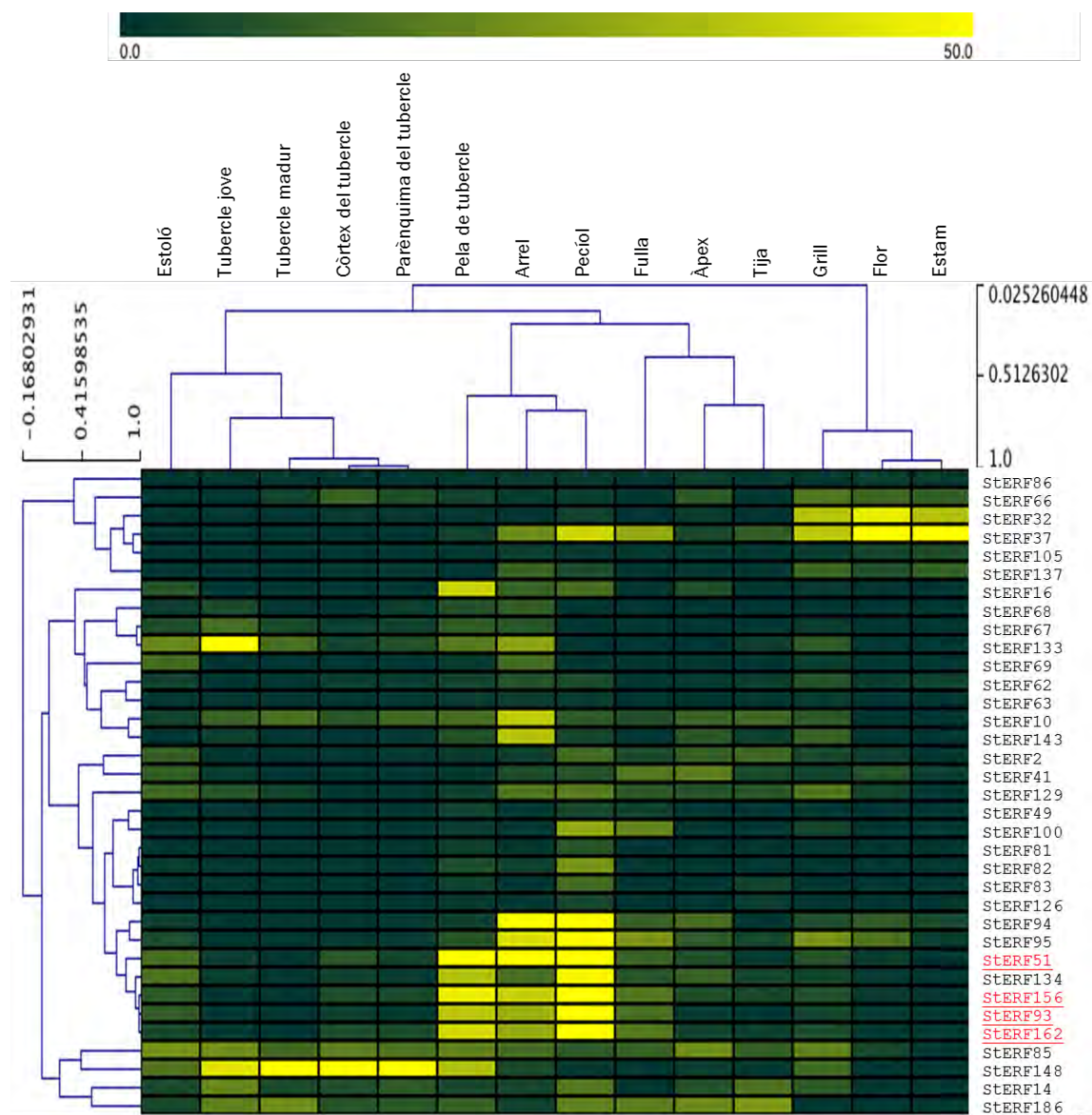


Figura 16. Heatmap i agrupació jeràrquica de l'expressió en diferents teixits de 35 gens ERF de la família IX usant dades de *Solanum tuberosum* varietat Phureja (Massa et al., 2011; Xu et al., 2011). El color verd indica nul·la o baixa expressió. El color groc indica elevada expressió. Subratllats i en vermell els gens més importants mencionats en el text.

3.2.1.2-Homologia, filogènia i identificació dels dominis conservats d'*StERF93*

Per tal d'identificar els possibles ortòlegs d'*StERF93* a *Arabidopsis* es van identificar els gens més semblants a través d'un BlastX contra la base de dades d'*Arabidopsis* (TAIR,

<http://www.arabidopsis.org>), que juntament amb els gens paràlegs a patata identificats a través d'un BlastN a la base de dades de patata (*Potato Genome Sequence Consortium* (<http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/index.shtml>)), van permetre construir un filograma (Figura 17). Tant les seqüències d'Arabidopsis com de patata identificades es troben en el grup IX dins la família d'ERF (Charfeddine et al., 2015; Nakano et al., 2006). Cal remarcar també que els 3 gens descrits anteriorment amb expressió comparable a *StERF93* -*StERF51*, *StERF156* i *StERF162*- corresponen a la vegada als gens paràlegs identificats en patata. Aquest fet pressuposa una possible redundància funcional entre ells.

El filograma NJ (Figura 17) mostra que no hi ha una clara relació d'ortologia i que per tant qualsevol de les seqüències d'Arabidopsis podria ser ortòloga d'*StERF93* ja que per una banda s'agrupen les proteïnes d'Arabidopsis i per l'altra s'agrupen les proteïnes de patata. També es va realitzar l'arbre filogenètic amb el mètode UPGMA obtenint resultats molt similars als anteriors (Figura Suplementària 5). Degut a que no es pot determinar l'ortòleg d'Arabidopsis no es van realitzar els assajos de coexpressió utilitzant les eines *in silico* disponibles.

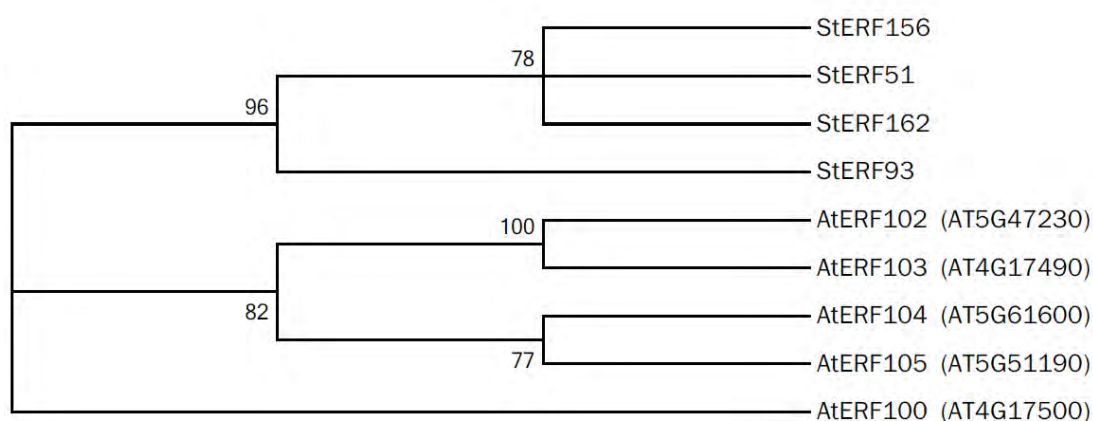


Figura 17. Arbre filogenètic d'*StERF93*, els seus paràlegs a patata i els respectius possibles ortòlegs a Arabidopsis. L'arbre s'ha realitzat utilitzant el mètode *Neighbor-Joining* a partir d'una matriu JTT i modelada amb una distribució gamma =1 a partir del programa MEGA6. Es va utilitzar un bootstrap de 1000 rèpliques i es va utilitzar un llindar de bootstrap de >75 sobre 100 per la separació de les branques. Totes les posicions ambigües es van eliminar per a cada parell de seqüències. Hi va haver un total de 330 posicions en l'últim conjunt de dades. També es va realitzar l'arbre utilitzant el mètode UPGMA (Figura Suplementària 5) on els resultats eren molt similars.

L'anàlisi estructural dels gens ERF que formen el grup IX al qual *StERF93* pertany, es caracteritza per contenir un domini AP2, punts de fosforilació a MAP quinases i per ser gens que s'indueixen en resposta a infeccions de patògens en Arabidopsis i arròs (Nakano et al., 2006). Específicament, la proteïna *StERF93* consta de 296 aminoàcids i segons el programa

lliure *Motif finder* (<http://www.genome.jp/tools/motif/>) el domini AP2 està comprès entre l'aminoàcid 141 i 191. L'alineament de les seqüències proteiques d'StERF93 amb els parèlegs a patata (StERF51, StERF156 i StERF162) mitjançant el programari lliure *Bioedit Sequence Alignment Editor* (Hall, 1999) i l'aplicació del programa ClustalW (EMBL-EBI) identifica el domini AP2 en totes les proteïnes (Figura 18). També es va identificar un domini CMIX-5 (Nakano et al., 2006) a l'extrem C-terminal relacionat amb punts de fosforilació a MAP quinases i un domini CMIX-2 conservat a l'extrem N-terminal que podria correspondre a regions àcides que actuarien com a possibles dominis d'activació de la transcripció (Fujimoto et al., 2000).

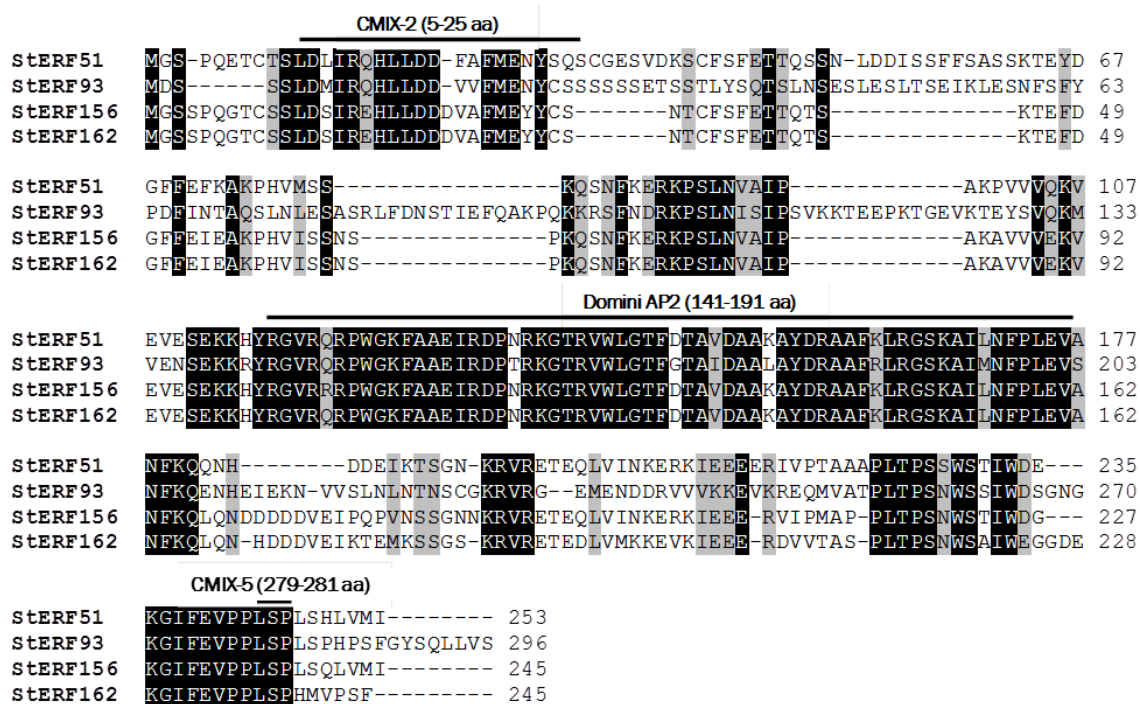


Figura 18. Alineament de les seqüències d'StERF93 i els seus parèlegs StERF51, StERF156 i StERF162 en patata. Es marquen amb una línia els tres dominis conservats i els aminoàcids que comprenen aquests dominis a la proteïna StERF93. Es mostren en negre els aminoàcids conservats i en gris aquells que són similars.

3.2.1.3-Predicció de la regulació d'StERF93 per estrès

Per comprovar si *StERF93* es regula per estrès, es van analitzar les dades d'estrès biòtic i estrès abiòtic del transcriptoma de doble monoploide de patatera (Massa et al., 2011). Els resultats d'estrès abiòtic evidencien que aquest gen s'indueix significativament en plantes crescudes *in vitro* i tractades durant 24 h amb sal, amb mannitol i per calor (35°C). Quan es fan tractaments amb hormones es pot observar inducció amb gibberel·lines (GA₃) i

citoquinines (BAP), mentre que l'expressió del gen es reprimeix en presència d'àcid abscísic (ABA) i auxines (IAA), encara que aquest últim ho fa lleugerament (Figura 19). Sorprenentment, tot i que el gen *StERF93* forma part del grup IX que es considera un grup de resposta a defensa (Nakano et al., 2006), el tractament de fulles amb *Phytophthora infestans* reprimeix lleugerament l'expressió del gen, en consonància amb la repressió de l'expressió amb fulles tractades amb inductors de resposta de defensa BABA i BTH. En canvi la ferida té capacitat per induir *StERF93* a fulles. Es representen també els resultats en un pictograma d'eFP Browser (Winter et al., 2007) (Figura Suplementària 4B).

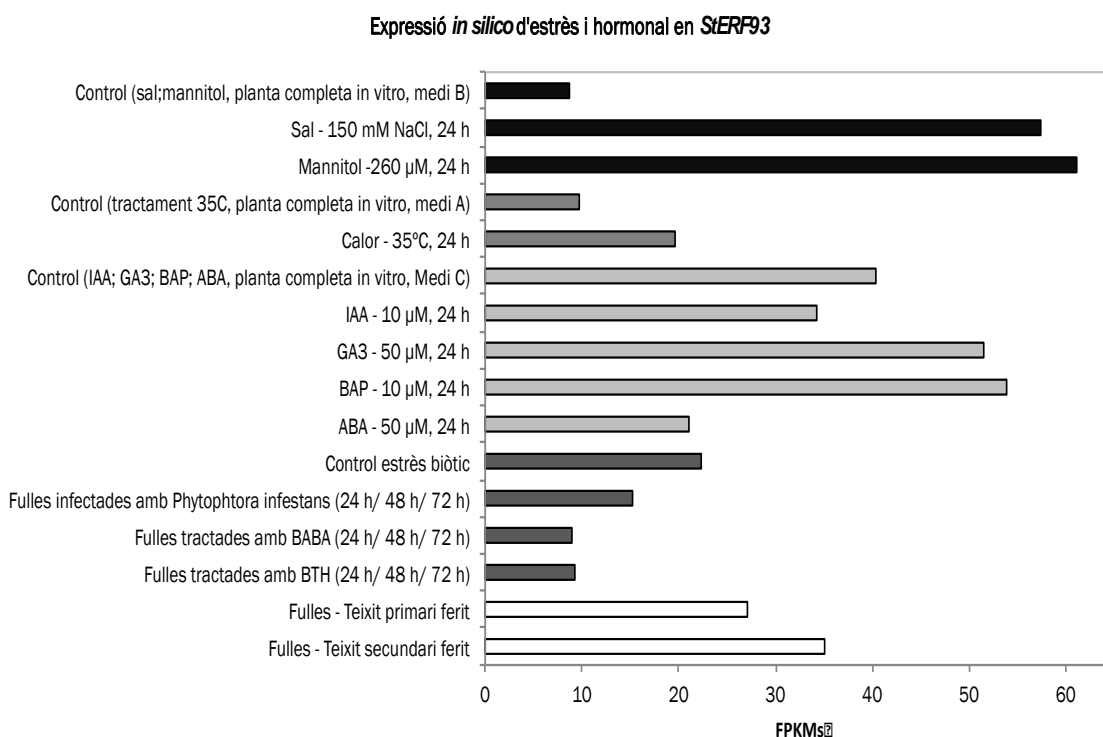


Figura 19. Representació de l'expressió *in silico* d'*StERF93* en diferents tractaments d'estrès i hormonal segons dades d'RNAseq (Massa et al., 2011; Xu et al., 2011). Es representen els nivells d'expressió expressats en FPKMs segons els tractaments realitzats. Cada tractament està marcat amb un color diferent.

Paral·lelament, es van analitzar els elements reguladors *in cis* del promotor d'*StERF93* mitjançant l'eina PlantCare utilitzant la seqüència de 2.480 bases que està *upstream* de la zona codificant del gen (Taula 8). Segons les prediccions s'observen caixes de regulació per estrès abiòtic (sobretot per temperatura) i biòtic, com també per hormones (auxines, àcid abscísic i metil jasmonat) i llum. A nivell tissular només es troba regulació en l'endosperma. Aquestes prediccions són coherents amb la inducció d'*StERF93* per calor i la repressió per auxines i ABA determinada per RNA-seq (Massa et al., 2011).

3.2.1.4-Expressió en teixits nadius de patatera d'*StERF93*

Per tal de verificar la inducció del gen *StERF93* en teixits suberitzats, es va analitzar l'acumulació de transcrit mitjançant RT-qPCR en diferents òrgans i teixits (fulla, tija, arrel, fel·lema i parènquima de tubercle). Com es pot observar a la Figura 20A, *StERF93* s'expressa principalment a fel·lema i arrel, en menor grau a fulla i tija, i molt discretament a parènquima del tubercle. Això ens suggereix que *StERF93* pot tenir un paper important en aquells teixits que tenen suberització constitutiva.

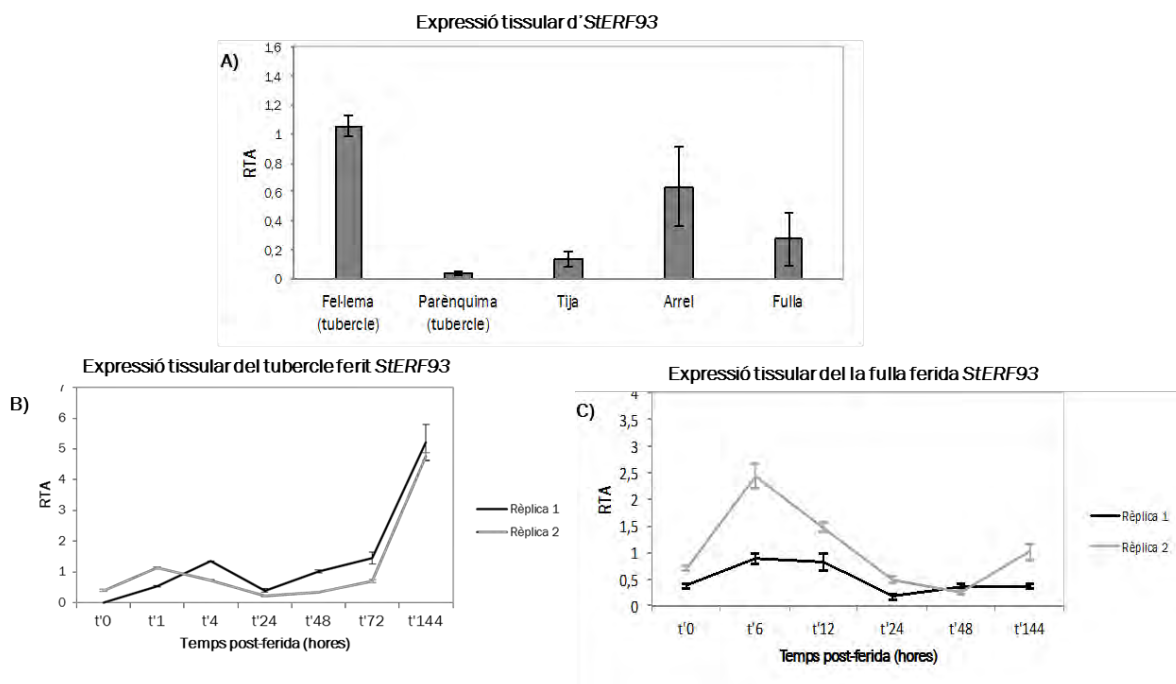


Figura 20. Expressió tissular d'*StERF93*. (A) Expressió d'*StERF93* (en abundància relativa de transcrit, RTA) en diferents teixits (fel·lema i parènquima de tubercle) i òrgans (tija, arrel i fulla) mitjançant RT-qPCR. (B) Nivells d'expressió post-ferida al llarg del temps d'*StERF93* en tubercle ferit. (C) Nivells d'expressió post-ferida al llarg del temps d'*StERF93* en fulla ferida. Les dades mostren la mitjana i la desviació estàndard de dues rèpliques biològiques.

Taula 8. Elements reguladors en cis de la possible regió promotora d'*StERF93* agrupat per categories funcionals.

Grup de resposta	Possible funció	Nom del motiu	Seqüència	Quantitat
Estrès	Element essencial regulador en cis per a la inducció anaeròbica	ARE	TGGTTT	8
	Resposta a inductor fúngic	Box-W1	TTGACC	1
	Element regulador en cis involucrat en la resposta a estrès per calor	HSE	AAAAAATTC	2
	Element regulador en cis involucrat en defensa i resposta a estrès	TC-rich repeats	ATTTCTCCA	3
	Element regulador en cis de resposta a les baixes temperatures	LTR	CCGAAA	1
Hormones	Element regulador en cis de resposta a auxines	AuxRR-core	GGTCCAT	1
	Element regulador en cis de resposta a metil jasmonat	CGTCA-motif	CGTCA	2
	Element regulador en cis de resposta a metil jasmonat	TGACG motif	TGACG	2
	Element regulador en cis de resposta a àcid abscísic	ABRE	TACGTG	1
Llum	Part d'un mòdul de resposta a la llum	AE-BOX	AGAAACAA	2
	Part d'un mòdul de resposta a la llum	AT1-motif	ATTAATTTTACA	1
	Part d'un mòdul conservat de DNA de resposta a llum	BOX4	ATTAAT	7
	Element de resposta a llum	BOX I	TTTCAA	3
	Part d'un element de resposta a llum	GA-motif	ATAGATAA	2
	Element de resposta a llum	GT1-motif	GGTTAA	2
	Part d'un element de resposta a llum	GAP-box	CAAATGAA(A/G)A	1
	Part d'un element de resposta a llum	GAP-box	AAATGGAGA	1
	Element regulador en cis de resposta a llum	H-box	ACCATTTTCACTC	1
	Part d'un element regulador a llum	LAMP-element	CCAAAACCA	1
	Element de resposta a llum	SP1	CC(G/A)CCC	3
	Involucrat en resposta a llum	As-2-box	GATAatGATG	1
	Element regulador en cis de resposta a llum	G-box	CACGTA	1
	Element regulador en cis de resposta a llum	G-box	TACGTG	1
	Part d'un element de resposta a llum	I-box	GATATGG	1
Part d'un element de resposta a llum	TCT	TCTTAC	1	
Especificitat tissular	Involucrat en l'expressió de l'endosperma	GCN4 motif	TGWGTCA	1
	Requerit per l'expressió a l'endosperma	Skn-1 motif	GTCAT	1

Grup de resposta	Possible funció	Nom del motiu	Seqüència	Quantitat
Altres	Lloc d'unió a proteïnes	BOX III	CATTTACACT	2
	Comú en promotors i zones de millora de l'expressió	CAAT-box	CAAT	65
	Regulador del metabolisme de la zeïna	O2-site	GATGATGTGG	2
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TTTTA	27
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	ATATAA	1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	ATATAAT	1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	ATATAT	3
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	ATTATA	6
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TAAAAATAA	1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TAATA	18
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TACAAAA	1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATA	18
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAA	9
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAAA	4
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAAAA	2
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAAAAT	1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATACA	1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATATAA	1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	taTATAAagg	1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATTTAAA	1
Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	tcTATAAAta	1	
Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TTTAAAAA	3	
Desconeguda		AAGAA-motif	GAAAGAA	3
		TATCCAT/C-motif	TATCCAT	1
		Unnamed4	CTCC	7
		Unnamed4	CCCACAGGC	1
		W-box	TTGACC	1
		Unnamed1	CGTGG	1
		Unnamed11	TCCACATAGA	1
		Unnamed3	CGTGG	1
		Unnamed6	taTAAATATct	1

3.2.1.5-Expressió en teixits cicatricials d'*StERF93*

La deposició de suberina a les parets cel·lulars permet formar la barrera protectora hidrofòbica en el teixit cicatricial. Per tal de determinar si el gen *StERF93* s'indueix per ferida i quina evolució té l'acumulació de transcrit, es van analitzar els nivells de missatger a diversos temps compresos entre 0 i 144 hores després de ferir el tubercle i la fulla.

Es va dur a terme el perfil temporal d'acumulació de transcrit durant la cicatrització de la ferida en tubercle de patatera (cv. Monalisa) – adquirit a un distribuïdor comercial – en dues rèpliques biològiques. Cada rèplica biològica incloïa tres discos de 13 mm de diàmetre i 3 mm d'amplada. Els discos es van incubar en una placa de Petri a la foscor durant 0, 1, 4, 24, 48, 72 i 144 hores post-ferida i amb l'atmosfera saturada d'humitat per permetre el desenvolupament de la capa de tancament que es forma prèviament a la formació del periderma cicatricial. En el cas de les fulles, la ferida es va realitzar mitjançant unes pinces en fulles de plantes de patata (cv. Desirée) crescudes *in vitro* i es va analitzar l'expressió d'*StERF93* a 0, 6, 12, 24, 48 i 144 hores després de la ferida.

En el tubercle ferit, es pot observar que en ambdues rèpliques biològiques hi ha una inducció de l'expressió d'*StERF93* a temps curts a 1 i 4 hores post-ferida seguits d'una baixada de l'expressió a les 24 hores i de manera progressiva hi ha una segona inducció que arriba a un màxim significatiu a les 144 hores post-ferida (Figura 20B). En la fulla ferida, tot i que la rèplica 2 té un nivell d'expressió més elevat que la rèplica 1, ambdues tenen una tendència similar. En tots dos casos, hi ha un primer pic d'expressió també a temps curts (que correspon al màxim durant l'anàlisi) entre les 6-12 hores després de la ferida, seguit també d'una baixada de l'expressió a les 24 hores després de la lesió. En el cas de la rèplica 2, els nivells d'expressió no presenten un segon pic màxim d'expressió de tal manera que l'expressió no es recupera a les 144 hores on l'expressió del gen *StERF93* es manté propera als nivells basals d'expressió just abans de la ferida (Figura 20C).

3.2.1.6-Localització subcel·lular d'*StERF93*

La localització subcel·lular de la proteïna *StERF93* es va estudiar a través de la transformació transitòria de fulles de *Nicotiana benthamiana* mitjançant *Agrobacterium tumefaciens* (soca GV2260) i utilitzant un promotor constitutiu 35S i una proteïna GFP fusionats a l'extrem N-terminal de la regió codificant d'*StERF93* (*Pro35S:GFP-StERF93*). Es va coinfiltrar amb l'inhibidor de silenciament P19 (Lakatos et al., 2004). Després de 72 hores post-infecció es va detectar que la fluorescència verda, indicativa de l'acumulació de la proteïna *StERF93*, es concentrava en un únic punt dins de cada cèl·lula (Figura 21). Aquesta localització de GFP

d'StERF93 és coherent amb les prediccions obtingudes mitjançant les eines WolfPsort i ESLPred.

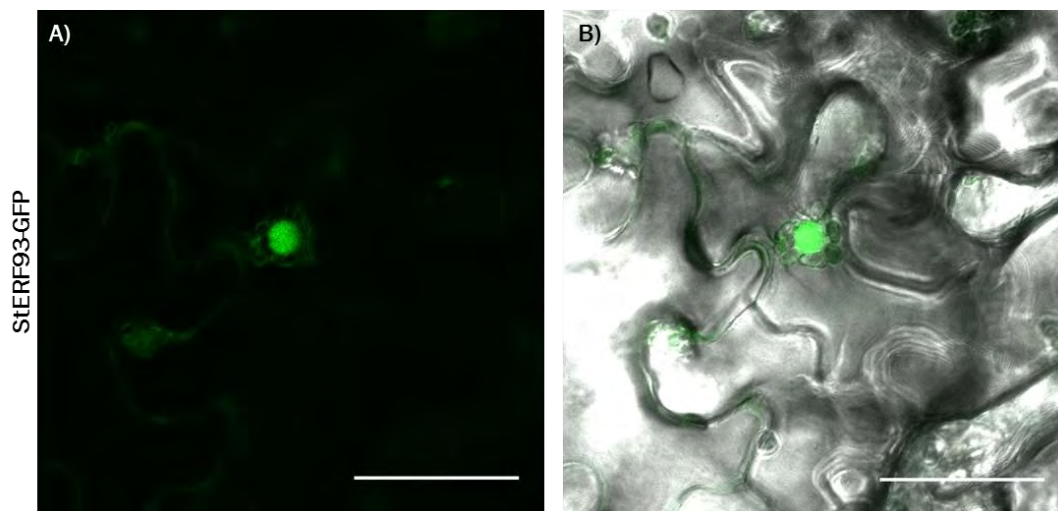


Figura 21. Localització subcel·lular de la proteïna StERF93. A) A l'esquerra de la imatge es mostra el camp confocal amb fluorescència verda (StERF93-GFP); B) A la dreta es mostra la superposició d'aquest camp amb el camp clar. Escala: 40 μm .

3.2.2-LTP (*Lipid transfer protein*): candidat del transport dels monòmers de suberina i ceres associades a la suberina

3.2.2.1-Homologia i filogènia d'StLTPI.3

El transport dels components de la suberina i ceres associades a la paret cel·lular és encara força desconegut i en base a treballs previs del grup s'havia evidenciat que les LTP eren bones candidates en el fel·lema. Inicialment en una llibreria SSH de fel·lema (suro) d'alzina surera (*Quercus suber*) es va identificar una LTP (identificadors HO209079 i HO209080) molt induïda a suro respecte a lleny i embrió somàtic (Soler et al., 2007). En un treball posterior es va identificar en patata una LTP que també presentava una forta acumulació en pela (fel·lema) respecte a parènquima del tubercle (Soler et al., 2011) i que la seva inducció es donava als 9-10 dies després d'induir la tuberització, coincidint amb la formació del periderma (Kloosterman et al., 2008) i coexpressant-se amb altres gens biosintètics de suberina com FHT (*fatty ω -hydroxyacid/fatty alcohol hydroxycinnamoyl transferase*) i PAL (*phenylalanine ammonia-lyase*) (Soler et al., 2011). Les dues LTP identificades en suro i en patata presentaven relació d'ortologia fet que les van subratllar com a candidates molt interessants si bé l'únic altre gen que s'ha identificat en els dos *screenings* correspon a l'FHT, el qual s'ha demostrat que té un paper molt rellevant en la funció del fel·lema i la biosíntesis de la suberina i ceres (Serra et al., 2010; Serra et al., 2014). A més cal destacar que aquesta LTP

també es va identificar en la llibreria de 454 obtinguda a partir de l'escorça externa del suro i de l'alzina (identificador Q-04567; Boher, 2016).

Per tal d'obtenir la seqüència completa de la LTP d'alzina surera es va partir de la seqüència Q-04567 (i es va realitzar un BlastN a la base de dades de surera (<http://www.corkoakdb.org/>) per tal de recuperar la seqüència més llarga. Es va obtenir una seqüència codificant completa amb una homologia significativa del 100% anomenada QS 156628. Per tal d'obtenir la seqüència completa de patata es van utilitzar els codis dels ESTs identificats en l'SSH de patata (HO209079 i HO209080) i es va realitzar un BlastN a *potato genome sequencing consortium*, obtenint la seqüència gènica completa (identificador PGSC0003DMG400031127; PGSC0003DMP400054226).

Per tal de realitzar l'anàlisi filogenètic, es van identificar també 2 ortòlegs (PGSC0003DMP00022727 i PGSC0003DMP00044288, els de l'arbre) a patata a través d'un BlastX amb les seqüències d'alzina surera (homologia 46% i 41% respectivament). En l'arbre s'hi van incloure les proteïnes del grup I de la família de LTP a Arabidopsis (Boutrot et al., 2008), doncs els gens més homòlegs identificats a partir d'un BlastX amb la seqüència de patata PGSC0003DMG400031127 pertanyen a aquest grup.

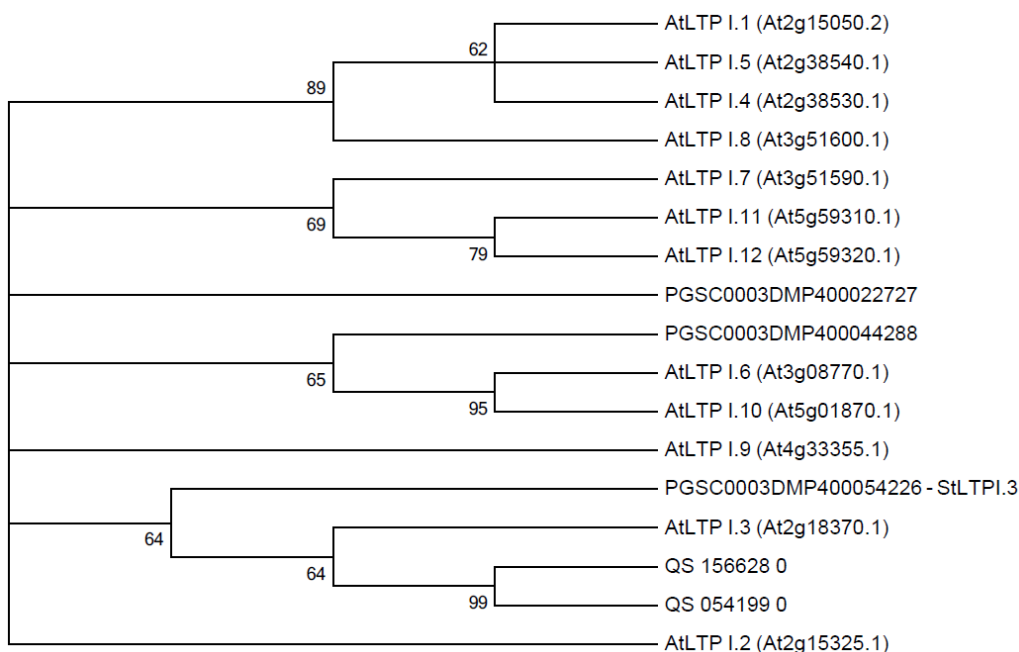


Figura 22. Arbre filogenètic d'StLTPI.3 i els seus possibles ortòlegs a Arabidopsis. L'arbre s'ha realitzat utilitzant el mètode *NJ* a partir d'una matriu *JTT* i modelada amb una distribució $\gamma = 1$ a partir del programa MEGA6. Es va utilitzar un *bootstrap* de 1000 rèpliques i els valors de *bootstrap* de >60 sobre 100 es van usar per a la separació de les branques. Totes les posicions ambigües es van eliminar per a cada parell de seqüències. Hi va haver un total de 132 posicions en l'últim conjunt de dades. També es va realitzar l'arbre utilitzant el mètode *UPGMA* (Figura Suplementària 6) on els resultats eren molt similars.

En el filograma resultant utilitzant el mètode NJ (Figura 22) es pot observar que la proteïna de suro (QS 156628) és molt propera a la proteïna AtLTPI.3 (At2g18370) d'Arabidopsis i que PGSC0003DMP400054226 s'uneix de manera directe a aquest clade. Aquest anàlisi doncs confirma les relacions d'ortologia entre les 3 espècies pel que s'ha anomenat a la proteïna de patata StLTPI.3 d'acord amb la d'Arabidopsis, l'AtLTPI.3. Cal remarcar que en el cas de l'arbre filogenètic utilitzant el mètode UPGMA (Figura Suplementària 6) els resultats van ser semblants, si bé en aquest cas la proteïna AtLTPI.9 mantenia certa relació d'homologia amb les proteïnes candidates a la suberització agrupades conjuntament.

3.2.2.2-Identificació dels motius conservats d'StLTPI.3

Tal i com es va descriure (José-Estanyol et al., 2004), les proteïnes LTP contenen 8 cisteïnes conservades que es localitzen en un motiu amb una forma general de C-X_n-C-X_n-CC-X_n-CXC-X_n-C-X_n-C. Aquest motiu forma 4 ponts disulfur que estableixen la cavitat hidrofòbica i permeten la unió de diferents lípids i compostos hidrofòbics (Douliez et al., 2000). Per tal de determinar si aquesta estructura es trobava en la proteïna d'estudi StLTPI.3, la seva seqüència aminoacídica es va alinear juntament amb les proteïnes AtLTP del grup I d'Arabidopsis, mitjançant el programa ClustalW (EMBL-EBI). Els resultats mostren que StLTPI.3, a l'igual que totes les proteïnes del grup I d'Arabidopsis, contenen el motiu conservat de 8 cisteïnes (Figura 23).

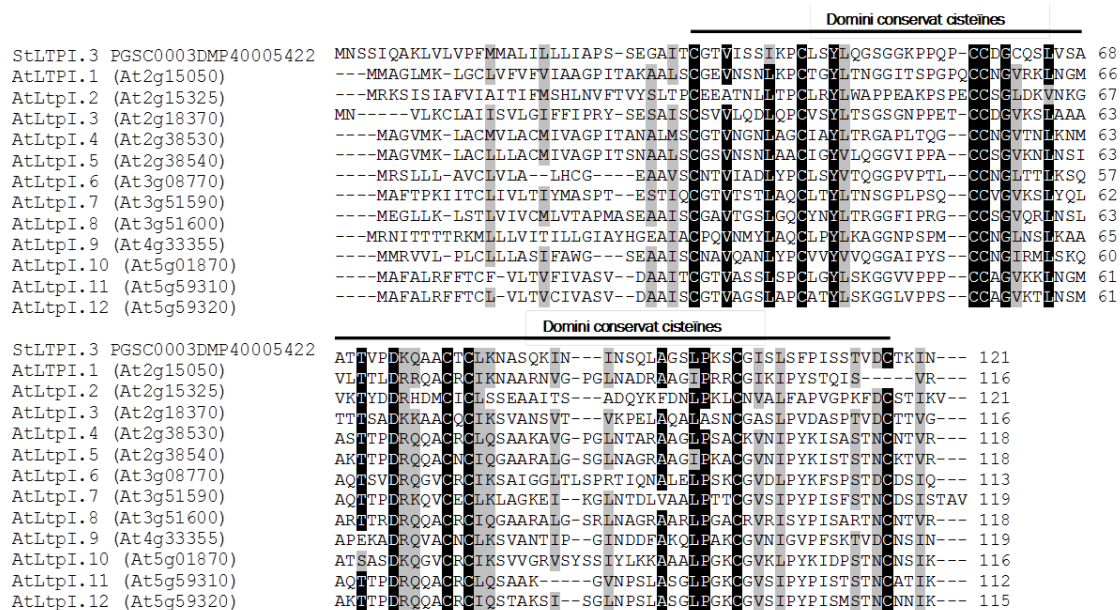


Figura 23. Alineament de les seqüències de LTP del grup I d'Arabidopsis i la proteïna d'estudi StLTPI.3. Es marca amb una línia el domini conservat de 8 cisteïnes. Es marquen en negre els aminoàcids conservats i en gris aquells que són similars.

3.2.2.3-Patró d'expressió *in silico* d'*StLTPI.3*

Per a l'anàlisi del patró d'expressió d'*StLTPI.3* es va analitzar els nivells d'expressió en els diferents teixits a partir de les dades obtingudes per Massa et al., (2011) i el PGCS (2011). Les dades representades en un *heatmap* van posar de rellevància l'elevada expressió d'*StLTPI.3* a la pela del tubercle, la qual també presentava expressió moderada al tubercle madur i en menor grau a l'arrel (Figura 24A i Figura Suplementària 7A).

Per tal de determinar si el gen *StLTPI.3* es regulava per estrès biòtic o abiòtic, es van analitzar les dades d'RNAseq disponibles (Massa et al., 2011). Pel que fa a l'estrès abiòtic es va observar que *StLTPI.3* s'indueix fortament per exposició a calor a les 24 hores i també s'indueix a les 24 hores del tractament amb sal (Figura 24B). Quan s'analitzava l'efecte de les hormones en la regulació del gen s'observava que totes les hormones induïen la seva expressió, però els majors efectes s'observen per citoquinines i ABA, aquesta última en coherència amb la inducció per sal i calor. Pel que fa a l'estrès biòtic, en canvi, no s'observava inducció de l'expressió del gen en cap cas, excepte una petita inducció quan es tracten fulles amb BTH (Benzothiadiazole), un inductor de resistència a malaltia.

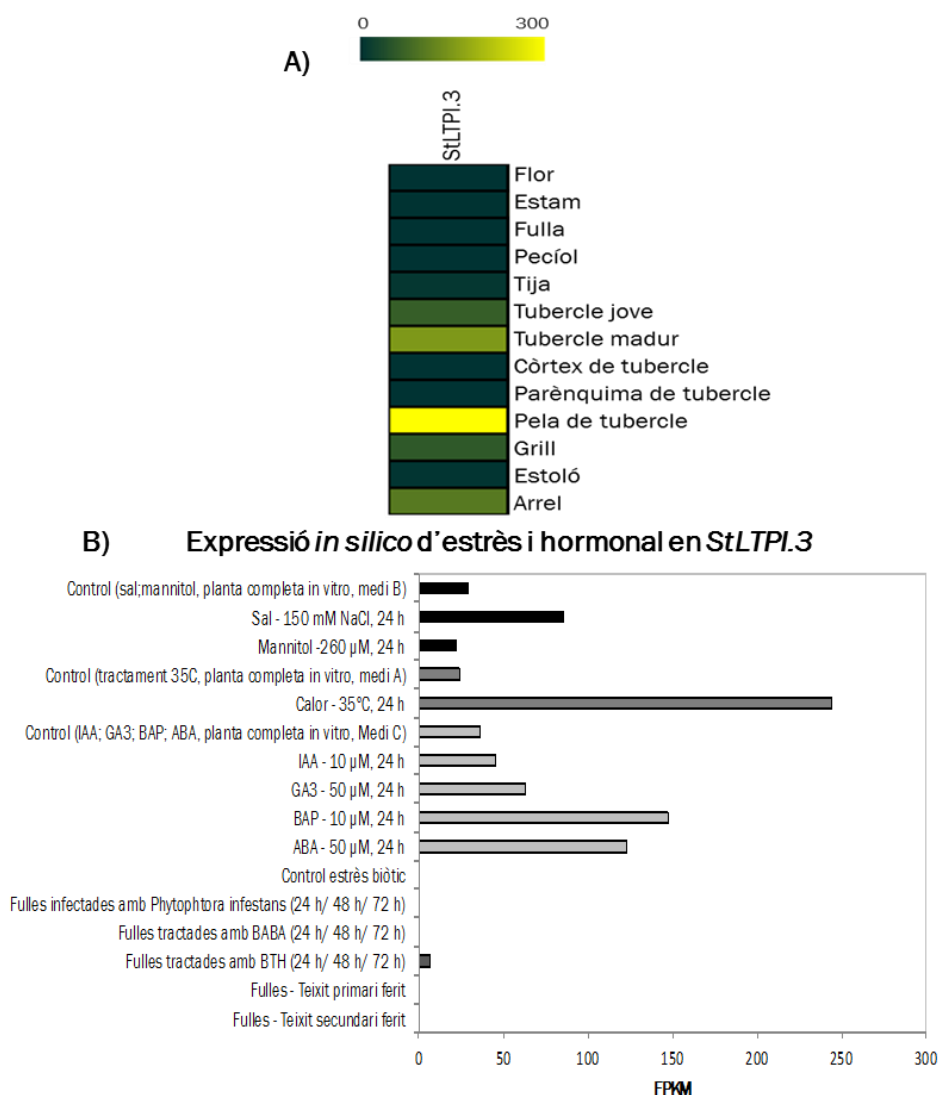


Figura 24. Heatmap representant els nivells d'expressió (FPKM) d'*StLTPI.3* en diversos teixits (A), i en diferents tractaments d'estrès i hormonal (B).

Per tal de determinar si en coherència amb els resultats anteriors es trobaven elements reguladors en *cis* del promotor d'*StLTPI.3* sensibles als anteriors factors, es va analitzar la seqüència de 2.377 bases *upstream* a la zona codificant mitjançant l'eina PlantCare. Les caixes reguladores es mostren a la Taula 9. Segons les prediccions es va observar que podia haver-hi una regulació a nivell d'estrès biòtic, abiòtic (sobretot per temperatura), llum i hormones (auxines, àcid abscísic, àcid salicílic i gibberel·lines). A nivell tissular només es va trobar regulació en l'endosperma. Aquests resultats complementen i en part confirmen els resultats esmentats anteriorment, on es veia que el gen responia a la temperatura i a hormones com l'ABA. Aquests resultats també es mostren en un pictograma d'*eFP Browser* (Figura Suplementària 7B).

Taula 9. Elements reguladors en cis de la possible regió promotora d'*StLTPI.3* agrupat per categories funcionals.

Grup de resposta	Possible funció	Nom del motiu	Seqüència	Quantitat
Estrès	Element essencial per la inducció anaeròbica	ARE	TGGTTT	4
	Element de resposta antifúngica	BOX-W1	TTGACC	1
	Element regulador en cis involucrat en la resposta a estrès per calor	HSE	AAAAAATTC	3
	Unió a MYB involucrat en la inducibilitat a drogues	MBS	CAACTG	3
	Unió a MYB involucrat en la inducibilitat a drogues	MBS	CAACTG	2
	Element de resposta a ferida	WUN-motif	TAACTG	1
				AAATTCCT
Hormones	Element regulador en cis de resposta a auxines	AuxRR-core	GGTCCAT	1
	Element regulador en cis de resposta a àcid abscísic	ABRE	TACGTG	1
	Element de resposta a gibberel·lines	GARE-motif	AAACAGA	1
	Element regulador en cis de resposta a àcid salicílic	TCA-motif	CAGAAAAGGA	1

Grup de resposta	Possible funció	Nom del motiu	Seqüència	Quantitat
Llum	Element de resposta a llum	ACE	AAAACGTTTA	1
	Part d'un mòdul de resposta a la llum	AE-BOX	AGAAACAA	1
	Part d'un mòdul conservat de DNA de resposta a llum	ATC-motif	AGTAATCT	1
	Part d'un mòdul conservat de DNA de resposta a llum	BOX4		1
	Element involucrat en el control circadià	Circadian	ATTAAT	1
	Element involucrat en el control circadià	Circadian	CAAAGATATC	3
	Part d'un element de resposta a llum	GAG-motif	CAANNNNATC	2
	Part d'un element de resposta a llum	GAG-motif	AAATTCCT	1
	Part d'un element de resposta a llum	GATA-motif	AGAGATG	1
	Part d'un element de resposta a llum	GATT-motif	AGAGAGT	1
	Element de resposta a llum	SP1	AGAGAGT	1
	Element regulador en cis de resposta a llum	G-box	GATAGGG	1
	Element regulador en cis de resposta a llum	G-box	CTGCAGATTCT	1
	Element regulador en cis de resposta a llum	G-box		4
	Element regulador en cis de resposta a llum	G-box	CC(G/A)CCC	2
	Part d'un element de resposta a llum	I-box	CACGTA	1
	Unió a MYB involucrat en la resposta a llum	MRE	CACGTT	1
	Part d'un element de resposta a llum	TCT-motif	TACGTG	2
			CACGTC	
			GATATGG	
		AACCTAA		
		TCTTAC		
Especificitat tissular	Involucrat en l'expressió de l'endosperma	GCN4 motif	TGWGTCA	1
	Requerit per l'expressió a l'endosperma	Skn-1 motif	GTCAT	7

Grup de resposta	Possible funció	Nom del motiu	Seqüència	Quantitat
Altres	Augment dels nivell de transcripció	5'UTR Py-rich	TTTCTTCTCT	1
	Comú en promotors i zones de millora de l'expressió	CAAT-box	CAAT	28
	Comú en promotors i zones de millora de l'expressió	CAAT-box	CCAAT	4
	Comú en promotors i zones de millora de l'expressió	CAAT-box	CAATT	7
	Comú en promotors i zones de millora de l'expressió	CAAT-box	CAAAT	13
	Comú en promotors i zones de millora de l'expressió	CAAT-box	TGCCAAC	1
	Comú en promotors i zones de millora de l'expressió	CAAT-box	CCCAATTT	1
	Comú en promotors i zones de millora de l'expressió	CAAT-box	gGCAAT	2
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TTTTA	14
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	ATATAA	2
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	ATATAT	1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TAAAAATAA	1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TAATA	10
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TACAAAA	1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATA	13
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAA	3
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAAA	4
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAAAA	1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAAAT	1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATACA	1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATATAA	1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	ccTATAAAaa	3
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TAAAGATT	1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	taTATAAAtc	1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATATGT	1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	tcTATATAtt	1

Grup de resposta	Possible funció	Nom del motiu	Seqüència	Quantitat
Desconeguda		CTAG-motif	ACTAGCAGAA	1
		TATCCAT/C-motif		2
		Unnamed4	GAAAGAA	10
		W-box	CTCC	1
		Unnamed1	CCCACAGGC	1
		TCCACCT-motif	CGTGG	1
		Box-S	TCCACATAGA	1
			AGCCACC	

3.2.2.4-Expressió en teixits nadius de patatera d'*StLTPI.3*

Per tal de comprovar l'expressió d'*StLTPI.3* en diversos teixits i òrgans, i també comprovar l'especificitat de teixit predita en l'apartat anterior, es va quantificar de manera relativa l'acumulació de transcrit mitjançant RT-qPCR respecte a un gen constitutiu (*aprt*, adenine phosphoribosyl transferase, GenBank CK270447).

Tal i com s'observa a la Figura 25A, l'*StLTPI.3* presentava una expressió molt elevada a pela de tubercle respecte a la resta de teixits analitzats. Cal destacar que l'expressió a l'arrel era molt baixa, amb un valor de 0,02 de RTA. Si bé però, l'expressió en parènquima de tubercle, fulla i tija era encara més baixa, pràcticament nul·la. Aquests resultats confirmem els de l'RNA-seq i per tant la gran inducció i especificitat d'*StLTPI.3* en la pela del tubercle (fel·lema), fets que recolzen el possible paper del gen en el transport dels components de la suberina o les ceres.

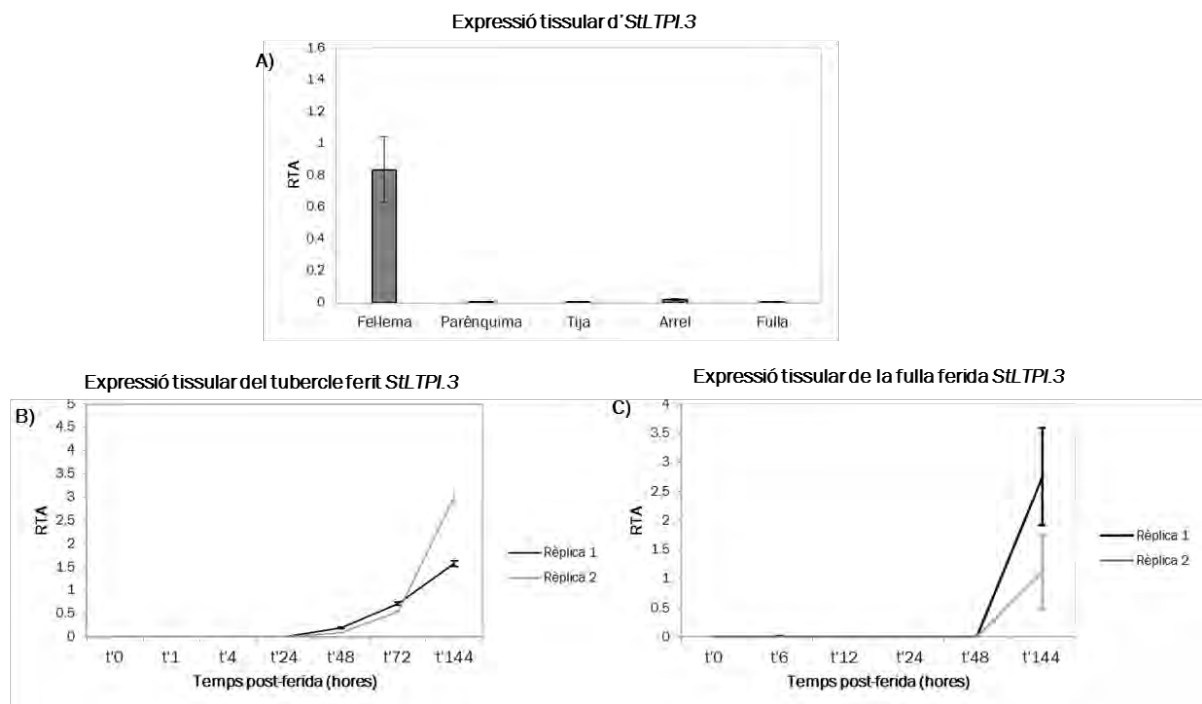


Figura 25. Expressió tissular d'*StLTPI.3*. (A) Expressió d'*StLTPI.3* en diferents teixits (fel·lema i parènquima de tubercle) i òrgans (tija, arrel i fulla) mitjançant RT-qPCR. (B) Nivells d'expressió post-ferida al llarg del temps d'*StLTPI.3* en tubercle ferit. (C) Nivells d'expressió post-ferida al llarg del temps d'*StLTPI.3* en fulla ferida. Les dades mostren la mitjana i la desviació estàndard de dues rèpliques biològiques.

3.2.2.5-Expressió en teixits cicatricials d'*StLTP I.3*

Tal i com s'ha dit anteriorment, la formació dels teixits cicatricials és un bon model pels gens candidats de la suberització. És per això que es va analitzar si el gen *StLTP I.3* es regulava per la ferida i quina era l'evolució de l'acumulació de transcrit al llarg del temps.

En el tubercle ferit, es va observar que ambdues rèpliques tenien un patró d'expressió molt similar, fet que donava robustesa als nostres anàlisis. Es va observar que l'*StLTP I.3* es començava a expressar a partir de les 48 hores i anava augmentant progressivament fins a les 144 hores (Figura 25B). En el cas de la fulla ferida, l'expressió d'*StLTP I.3* començava a les 144 hores, una mica més tard que en el tubercle ferit (Figura 25C).

3.2.2.6-Localització subcel·lular d'*StLTP I.3*

La localització subcel·lular de la proteïna *StLTP I.3* es va estudiar també mitjançant transformació transitoria. Després de 72 hores post-infecció es va detectar fluorescència verda, indicativa de l'acumulació de la proteïna *StLTP I.3*, la qual presentava un patró compatible amb proteïnes que es localitzaven al reticle endoplasmàtic (Figura 26). Contràriament, les eines WolfPsort i ESLPred mostraven una predicció de localització de l'*StLTP I.3* a membrana plasmàtica. No obstant, la comparativa de la fluorescència observada amb la d'una proteïna de membrana (vegi's Figura 33) pot permetre descartar que *StLTP I.3* sigui una proteïna específica de membrana.

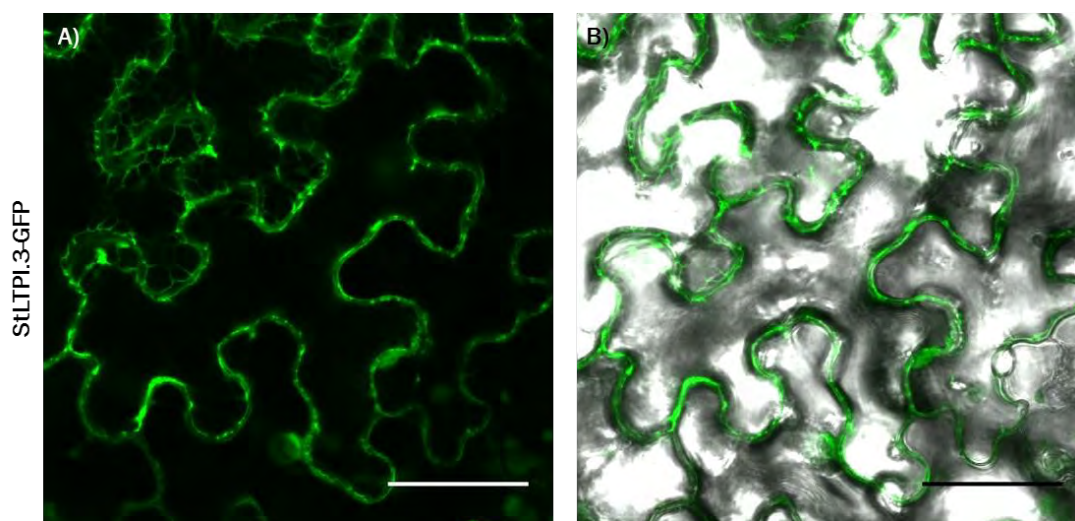


Figura 26. Localització subcel·lular de la proteïna *StLTP I.3*. A) A l'esquerra de la imatge es mostra el camp confocal amb fluorescència verda (*StLTP I.3*-GFP); B) A la dreta es mostra la superposició d'aquest camp amb el camp clar. Escala: 40 μ m.

3.2.2.7-Anàlisi de coexpressió de diversos gens amb *AtLTPI.3*

Els estudis de coexpressió es van realitzar amb *AtLTPI.3* (l'ortòleg d'*SLTPI.3* a *Arabidopsis*), utilitzant les dades de Genemania (Warde-Farley et al., 2010). El llistat de gens que coexpressaven, agrupats per categories funcionals, es mostra a la Taula 10. El resultat de l'anàlisi ens va mostrar que la proteïna *AtLTPI.3* coexpressava amb gens lligats a la síntesi i transport de lípids, l'estrès, la defensa i la regulació. Entre els gens que es coexpressaven, alguns s'han relacionat amb la síntesi de suberina i ceres, com seria el cas del *CYP86A1* que codifica per una ω -hidroxilasa d'àcids grassos de la biosíntesi de la suberina (Höfer et al., 2008; Y. Li et al., 2007), i que és ortòleg al *CYP86A33* de patatera (Serra et al., 2009b); o el *FACT* (*Fatty Alcohol:Caffeoyl Transferase*) que és responsable de la síntesi de cafeoil èsters de les ceres de la suberina de l'arrel d'*Arabidopsis* (Kosma et al., 2012).

Taula 10. Gens que es coexpressen amb *AtLTP1.3*, agrupats per categories funcionals, segons el Genemania. El pes indica la importància de la correlació de l'expressió del gen amb el gen problema per explicar la xarxa, on 1 és el total de la xarxa coincidint amb la suma de totes les interaccions possibles. En la taula es mostra el valor del pes en referència a *AT2G18370*.

Categoria funcional	Identificador (codi AGI)	Descripció	Pes
Regulació	AT4G33450	AtMYB69	0,016
	AT2G42250	CYP712A1	0,011
Síntesi de lípids	AT5G58860	CYP86A1	0,018
	AT5G63560	FACT	0,015
	AT2G23540	GDSL	0,017
Transport de lípids	AT3G58550	LTP7/AtLTPG22	0,025
Estrès i defensa	AT2G19990	PR-1-LIKE	0,014
	AT2G02120	PDF2.1	0,023
	AT1G68850	PER11	0,015
	AT2G35380	PER20	0,013
	AT2G38390	PER23	0,010
	AT2G01520	MLP328	0,017
	AT2G01530	MLP329	0,015
	AT4G19810	CHIC	0,019
	AT3G02885	GASA5	0,014
	AT4G11650	ATOSM34	0,011

Categoria funcional	Identificador (codi AGI)	Descripció	Pes
Altres	AT5G09480	<i>Hydroxyproline rich protein</i>	0,021
	AT4G38080	<i>Hydroxyproline rich protein</i>	0,012
	AT2G43670	<i>Carbohydrate-binding X8</i>	0,024
	AT2G18360	<i>Alpha/beta-Hydrolases</i>	0,012
	AT1G04290	<i>Thioesterase superfamily</i>	0,020
	AT1G16530	<i>ASYMETRIC LEAVES 2-like 9</i>	0,016
	AT4G29740	CKX4	0,014
	AT4G20390	Desconeguda	0,021
	AT2G47200	Desconeguda	0,012

3.2.3-Els transportadors ABCGs de patatera: StABCGs

3.2.3.1-Homologia i filogènia dels StABCGs

Actualment existeix un ventall de gens ABCGs relacionats amb la suberina. Per una banda a patata s'ha descrit que el gen *StABCG1* és molt necessari per a la formació de suberina (Landgraf et al., 2014). Per altra banda a Arabidopsis, *AtABCG11* inicialment es va relacionar amb el transport de lípids (Bird et al., 2007; Luo et al., 2007; Panikashvili et al., 2007) i posteriorment amb suberina (Panikashvili et al., 2010). Més recentment, s'han descrit tres ABCGs (*AtABCG2*, *AtABCG6* i *AtABCG20*) relacionats directament amb la formació de la suberina a Arabidopsis (Yadav et al., 2014). Per tal de poder trobar altres proteïnes d'Arabidopsis ABCG que poguessin ser candidates pel transport de monòmers de suberina i ceres es van utilitzar els gens *AtABCG2*, *AtABCG6* i *AtABCG20* per identificar ABCGs que hi coexpressaven mitjançant el programa GeneMania (Warde-Farley et al., 2010). Es va poder observar que aquests ABCGs de suberina també coexpressaven amb dos nous ABCGs, l'*AtABCG10* amb valors entre 0,017-0,020 i l'*AtABCG23* amb valors entre 0,017-0,019, motiu pel qual es va creure que podrien tenir també un paper important en el transport de suberina. D'acord amb aquesta possible relació amb la suberina cal destacar que en les línies silenciades per *StNAC103* (repressor de suberina i ceres) es va observar que els possibles ortòlegs de l'*AtABCG23*, i també l'*AtABCG11* estaven inhibits (entre 5 i 3 vegades menys expressats que el control, respectivament), al igual que altres gens implicats en la formació de la suberina com serien l'FHT o el CYP86A33 (Verdaguer et al., resultats no publicats).

Per tal de poder estudiar més detalladament els gens ABCGs candidats pel transport de la suberina i ceres en patata, la seqüència dels gens *AtABCG2*, *AtABCG6*, *AtABCG10*, *AtABCG11*, *AtABCG20* i *AtABCG23* es van utilitzar per identificar els possibles ortòlegs a

patata a través d'un BlastX a la base de dades de patata (<http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/index.shtml>). Es va construir un filograma (Figura 27) mitjançant totes les seqüències dels ABCG del tipus WBC d'Arabidopsis (Verrier et al., 2008) juntament amb les seqüències dels gens de patata relacionats amb la suberina, ja sigui de manera directa com la seqüència de patata del gen *StABCG1*, o bé com a possibles ortòlegs dels gens d'Arabidopsis esmentats anteriorment (*AtABCG2*, *AtABCG6*, *AtABCG10*, *StABCG11*, *AtABCG20* i *AtABCG23*). En el filograma es pot observar que la relació d'ortologia entre patata i Arabidopsis és complexa. Un exemple seria pel que fa al gen *StABCG1* (PGSC0003DMP400040689), caracteritzat en patata anteriorment (Landgraf et al., 2014), el qual s'agrupa amb el gen PGSC0003DMP400020324 i ambdós es posicionen dins un agrupament on s'hi troben els gens *AtABCG1*, *AtABCG2*, *AtABCG6*, *AtABCG16* i *AtABCG20* d'Arabidopsis. Aquest fet evidencia que la relació d'ortologia d'un a un entre patata i Arabidopsis no és clara i per tant no permet establir ortòlegs a patata dels gens *AtABCG1*, *AtABCG6*, *AtABCG16*. Cal destacar també que els gens *AtABCG2* i *AtABCG20* d'Arabidopsis amb un paper a suberina, presenten una clara relació d'ortologia amb PGSC0003DMP400041348, a partir d'ara anomenat *StABCG20*, ja que dels dos gens d'Arabidopsis l'*AtABCG20* correspon a la seqüència més homòloga amb un *e_value* de 0 i una identitat del 61%. Pel que fa a l'ortòleg d'*AtABCG11*, si bé la seqüència més homòloga en patata recuperada de la base de dades es correspon a PGSC0003DMP400028338, aquesta seqüència s'agrupa amb *AtABCG3* i amb tot el clade que agrupa les proteïnes *AtABCG12*, *AtABCG13* i *AtABCG15*, dificultant la correspondència ortològica. Tot i així i per facilitar la nomenclatura a partir d'ara l'anomenarem *StABCG11*, ja que quan es fa un BlastX sobre la base de dades d'Arabidopsis amb la seqüència de patata, la seqüència més homòloga amb un *e_value* de 0 i una identitat del 52% pertany al *AtABCG11*.

Les seqüències PGSC0003DMP400021989 i PGSC0003DMP400042299 tenen una ortologia directa evident amb l'*AtABCG10* i l'*AtABCG23* respectivament, motiu pel qual a partir d'ara els anomenarem *StABCG10* i *StABCG23*. També es va realitzar un filograma UPGMA on els resultats obtinguts van ser molt similars (Figura Suplementària 8).

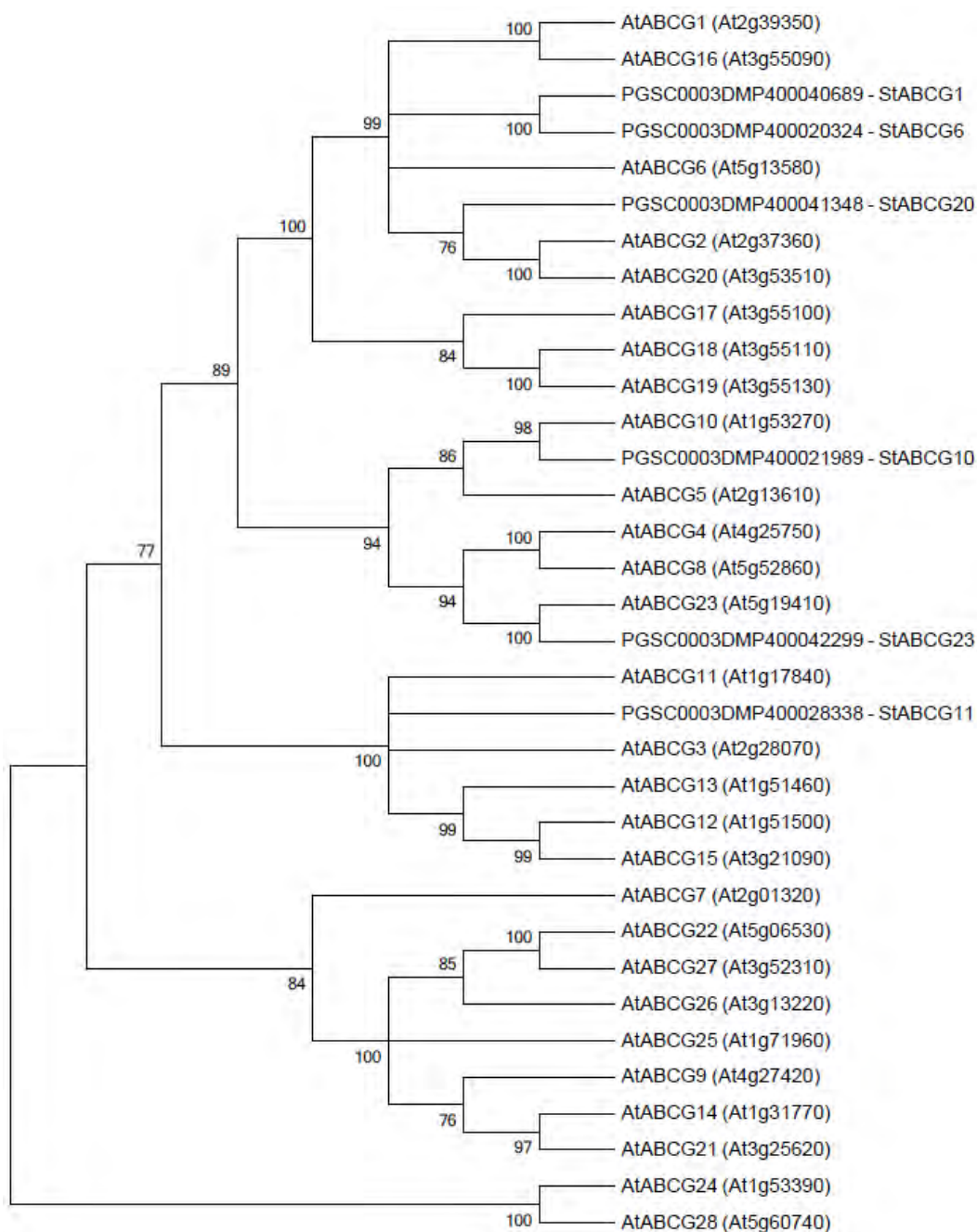


Figura 27. Arbre filogenètic dels ABCGs del grup WBC d'*Arabidopsis* i els possibles ortòlegs a patata involucrats en la biosíntesi de la suberina. L'arbre s'ha realitzat utilitzant el mètode NJ a partir d'una matriu JTT i modelada amb una distribució gamma =1 a partir del programa MEGA6. La distribució de clades idèntics i els valors de *bootstrap* similars es van obtenir utilitzant un mètode de grup de parells no ponderats amb la mitjana aritmètica. Els nivells de *bootstrap* indiquen el nivell de significança (%) per la separació de les branques. Es va utilitzar un *bootstrap* de 1000 rèpliques. Els valors de *bootstrap* de >75 són mostrats. L'anàlisi va implicar 34 seqüències d'aminoàcids. Totes les posicions ambigües es van eliminar per a cada parell de seqüències. Hi va haver un total de 1267 posicions en l'últim conjunt de dades. També es va realitzar l'arbre utilitzant el mètode UPGMA (Figura Suplementària 8) on els resultats eren molt similars.

3.2.3.2-Identificació dels motius conservats dels StABCGs

En el present estudi es van caracteritzar 5 gens de la família ABCG de patata, 4 d'ells candidats al transport de lípids de la suberina (*StABCG10*, *StABCG11*, *StABCG20*, *StABCG23*) i un d'ells, *StABCG1*, amb funció demostrada (Landgraf et al., 2014). Les proteïnes transportadores ABC funcionals estan formades per 4 dominis: 2 dominis d'unió a nucleòtid (NBD) i 2 dominis transmembrana (2TMD). En el cas dels ABCG/WBC contenen només 1 domini NBD i 1 domini TMD pel que per formar transportadors funcionals cal que formin dímers (Higgins & Linton, 2004). El domini NBD, responsable de la hidròlisis d'ATP, és homòleg en tota la família i conté motius més o menys conservats. Els dominis TMDs són més específics per a cadascuna de les proteïnes (Verrier et al., 2008). Per tal de poder identificar els diferents dominis i validar així l'estructura dels gens *StABCG*, es van alinear les seqüències i analitzar amb el programa *Motif finder* (<http://www.genome.jp/tools/motif/>).

Els resultats mostren que les proteïnes StABCG candidates estan formades únicament per un domini NBD a l'extrem N-terminal i un domini TMD a l'extrem C-terminal (Figura 28) d'acord amb que aquestes proteïnes necessiten formar dímers amb altres proteïnes ABCG per a ser funcionals. El domini NBD, que té una llargada aproximada de 180 aminoàcids, conté 7 motius més o menys conservats. El primer de tots és un domini format per un aminoàcid aromàtic i que es situa aproximadament 20 aminoàcids abans del següent motiu, el motiu Walker A. Aquest motiu Walker A està format per 9 aminoàcids, 6 d'ells idèntics en totes les proteïnes. El loop Q està format bàsicament per una glutamina conservada i un aminoàcid polar. Un dels motius més representatius d'aquesta família, no trobat en cap família més, és la signatura ABC formada per 15 aminoàcids, 7 d'ells conservats en totes les seqüències. Pel que fa al domini Walker B, aquest està format per 10 aminoàcids, 6 conservats i la resta corresponen a aminoàcids hidrofòbics variables. El loop D està format per 3 aminoàcids conservats. El loop H està format per 4 aminoàcids conservats, incloent-hi una histidina (H) conservada. Pel que fa al domini TMD, es van localitzar els motius transmembrana a partir del programa TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>). La predicció mostra que en tots els casos les proteïnes travessarien sis cops la membrana (Figura Suplementària 9).

StABCG1	-----MMSQASAY-----SSPTLGQMLKRVGDVREKVTGDETPVHRILDMSDTQSISSHSL	52
StABCG10	-----MELPVTI--PDSGGK-----KKG-----	16
StABCG11	-----MDSPIDEVKPKNSKK-----KESDPL	21
StABCG20	MSNLGGGDDMSASDLFLGPRNMMELQEFGRKPRHNVITLIGELLKRLGDSAEKKN---QVLELGNHSNVTTPSPSF	76
StABCG23	-----MASPCTVYHPSGSP-----ENDSMILFSTSTSCSPTKESTITHSNSSSSPPRQSSPDK	59
	Aromàtic	
StABCG1	PFVLSFNLTISVSVKVRKMSFPAILRQPAAGVSTGDPVAGENLFTNTKFLNNISGSEARDGEIVAVLCASSGSGKSTLLDA	132
StABCG10	SYTLETNLSALPSLYDEFSWIFCCKNPKR-----POKFIKDVNCEBAREGETITACPSGAGKPTLLEI	82
StABCG11	ILATKINISSYNDGIYLSWKDLWVSPDKK-----LGRRPTEGTSGYAOPGEVLAIMGSPSGGKSTLLDA	88
StABCG20	PFVLSFNLTISVSVKVKSKISLPRWLRGDK---DDELSSD---NNMKVLENDTSGEAREGEIVAVLCASSGSGKSTLLDA	149
StABCG23	TYELRIRNLSYTIISPNGSIFSSLLMKKSTR-----PKTTLKSVSFVAGCSEILAIVCGSGGKSTLLRV	124
	Walker A	
	Loop Q	
StABCG1	LANRIAKESLKG-TITLNGEPLDS-RLKLVISAYVMODLLYPMPLTVEETLMFAAEFRLPRSLKSKKKMRVQALDLDLG	210
StABCG10	LAGKISPTKVVG-EVLVNGHFVNKCFRR-LSCYVTCEDALFPLLTVBETLMYSALLRLQ-GGK-KEAANRVGVLLKELG	158
StABCG11	LSGRLASNTROSGDILVNGR---KQALAFGTSAYVMODDLMATHLVKRETVYSAQLQLPQMSLHEKKERABETLHEMG	165
StABCG20	LADRLSRESLKG-NVTLNGEVLES-KLLKVISAYVMODLLFEMPLTVEETLMFAAEFRLPRSLKSKKKMRVQALDLDLG	227
StABCG23	LSGRVSDKEFDPKSVYLNDAHTTPVQLRNICGYVACENLFPPLLTVBETLMFAAEFRLPRSLKSKKEREERVBSLQDLG	203
	Signatura ABC	
	Walker B	
	Loop D	
	Loop H	
StABCG1	LRNAAKTIIIGDEGRGVSGGERRRVSIGDIIHDPFILLFLEDEPTSGLDSTSAVMVVKVLRQIAQ-SGSIVIMSIHOPSYR	289
StABCG10	LEQVTGARVGGGSRGTSGGERRRVSIGVELVHDPVAVILLDEPTSGLDSSALHVISLQVMVAHQGKTIIVLTIHQPSGR	238
StABCG11	LQEAMNTRIGWSLKGSGGQRRRVSICIEILTRPKLLELDEPTSGLDSAAASYHVMNRIKTAQQDMRTIVASIHQPSSE	245
StABCG20	LRNAAKTIIIGDEGRGVSGGERRRVSIGDIIHDPFILLFLEDEPTSGLDSTSAVMVVKVLRQIAQ-SGSIVIMSIHOPSYR	306
StABCG23	LQHVANFVQDEENRGTSGGERRRVSIGVDMIHDPFILLFLEDEPTSGLDSSALQVIELLSSMARTKQRTIVLSIHQPSYR	283
StABCG1	ITGLLEDRMLFLSRQTVYSGSPMNLPHFFDFGHPFDPSENRTFALDILRELEGGSPGG--TKSLVEFKTKWENTKRNE	367
StABCG10	ITFLFDRVLLSNGVGLHNGSLEYLEERIKFSLQCPPHINVLFEALDVTGSIVIYTSE--TPNVHFHFKDHGEEKES--	314
StABCG11	VFELEFNLCLLSYKTIYFGSSSKANEFVAVNGFPQPYMRNPSDHYLRTINKDFDIEEGFGKNIITSCKAIDTLVMSYE	325
StABCG20	ITSLLEDRMLFLSRQTVLTSPPSSLQOFFADFNPTPENENRTEFALDFIRELEGTENG--TKTLMFVKTKWQRERNFT	384
StABCG23	ITQYISNLLILSHESVYHYGSLQSLLENISRMGYEPIQLNPLEFAMEIIS--VLENQ--EPHFYQCSYLRLWEEA--	356
StABCG1	NPEIQTPHGLSLKEAISASISRGKLVSGTISDIHTSPASMVPTYANPFWIEMLVLSKRSFTNSWRVPELDFGIRLGAIVV	447
StABCG10	-----LRKYDEGHTVSNHNDMVDKCPYSANSYVEEISLGGRCFKNIERTKQLFATRIIQALV	372
StABCG11	SSE-----ACLNVRQKVLITICQKNRLEENKGSQAGFITQCKVLTQBSFINMVRDLGYVWLLLIYLA	388
StABCG20	STSSFYNGPKPSLKDASIASVSRGKLVSGATNIDPNVSSSNVPKFANPEWVDMVVIKRSMLNSMRMPLEFGMRFGAVVV	464
StABCG23	-----TIQGTANKEVIDQ-GKIGAVSNKHCSSLEIAVLCSEFWKIIMRTKQLFLARHMQALV	413
StABCG1	TCFIIATMFWQLDDSPK--GVQERLGFABAMSTTFYTCADALFVFLQERYIFMRETAYNAYRRSSYCLSHAIVSLEFAL	525
StABCG10	AEFIIQSGIFMADNNGQVALQTRLCGFABSLIFLLSMTTEGLPHFLOERTIFMRETRGAYRVSSYVVANTIVFLPFL	452
StABCG11	LCCLGTFIHEIGSDYG--SIQARSSMLVGVGFLTFMAIGGFPSEVFEEMKLETRERLNGHYGVGAVFVIGNLTSSTPFL	466
StABCG20	TCFIIATMFWKLDNSPK--GVQERLGFABAMSTTFYTCAEALFVFLQERYIFMRETAHNAAYRRSSYVSHATISLESIL	542
StABCG23	GEFGIGSVYIKMRNDEG--AVABERLGFABSLIFLLSSIVEALFVFLQERYIFMRETRGAYKISSYMIANTIVFLPFL	491
StABCG1	FLSFAFAAITEAVGLVGGFSGFLFYFAILLASFWAGNSFVTFLLSGVVPVSMICYTIVVAIAYFLFSGFFINRDRIFP	605
StABCG10	MVGLLYSVPVYVWVGLRGSMDGFLYFAMVVWVLLMSNSFTACFSALVPTFIMGTSIIAGLMGSEFLFSGYFLSKEKIFP	532
StABCG11	MISLVPGAVAYLADVQKGDIDKFAFVFLMIFACMLLVESLMMIVASIVPDFLMGITITGAGIQGIMMINGEFLRPNETPM	546
StABCG20	VLSIAFAVTTVWVGLAGGVSGFLYLLFLLASFWAGNSFVTFLLSGVIYNIMMAYTVVAVLAYFLFSGFFISRDRIFP	622
StABCG23	AVAILFAFVYVWVGLNPSITAEVFEFTFVWVIVLMASSLVFLSAISEDFITSNSLICTVLGAFFLFSGYFLPKECIFK	571
StABCG1	--YWIWFHYSLSLVKYPYEAVLQNEFDDATKCFVKGIQLFDNSPLGNVPNALKEKLLSTMSNTLNVKITSSVTGADHL	683
StABCG10	--YWLFEMHYSLSLVKYPYEFCEFLINEYGG-----KGGKRCLESE--RGEKLFADFL	579
StABCG11	PTWKYPMYVLAFLFKYAIQGGFYKNEYET-----FTYFTKSGLAIVVIRDEHL	592
StABCG20	--YWIWFHYSLSLVKYPYQGVLQNEFSDPNKCFVKGVQLFDTSPLRAVPEALKIKLLQNMKSTLGMNITNTTHTGSDHL	700
StABCG23	--YWLFEMHYSLSLVRYPLDAMLTNEYWS-----LRHKCFTWNDENQSECLLGNVDL	620
StABCG1	VQQGITDL--SKWNCLEWTTAWGFFFRVLFYFSLLLGSKNKRR-----	724
StABCG10	KOODLKES--LKWNLAVMLSFILGVRVLCYLILWCRCYRTRN-----	620
StABCG11	RDFQVELNYSKWDIVTVFGMVILMRLIFLSIIKGEKFRPMVRGFKYCCTT	645
StABCG20	KQSGGTDL--NKWTCFWTTIGLGFRRILFYFALLIGSKNKRR-----	741
StABCG23	KNRGLDKD--TRMMNVGIMLAFVVFVVICWLVLRKASKTTI-----	661

Figura 28. Alineament de les seqüències StABCG relacionades amb el transport de lípids. Es marquen amb una línia negra els 7 motius conservats del domini NBD. S'assenyala amb una línia contínua gris on es troba el motiu transmembrana (TMD). S'identifiquen en negre aquells aminoàcids conservats i en gris aquells aminoàcids que són similars.

3.2.3.3-Patró d'expressió *in silico* dels StABCGs

Es va realitzar un anàlisi *in silico* per tal de veure com d'específiques eren aquestes proteïnes en teixits suberificats. Per això, es va utilitzar, tal i com s'ha comentat anteriorment, el transcriptoma de dos genotips diferents de patatera (Massa et al., 2011; Xu et al., 2011). El *heatmap* obtingut posa de manifest que a excepció de l'*StABCG1* que s'expressa de manera

abundant en diversos teixits, la resta de gens són específics de tubercle madur i pela de tubercle (Figura 29), fet que fa possible una relació amb la biosíntesi de la suberina. Concretament, l'*StABCG1* s'expressa de manera abundant (>10 FPKMs) a la flor, l'estam, el pecíol, la tija, el tubercle madur i la pela del tubercle; l'*StABCG11* només té elevada expressió (>10 FPKMs) a la pela del tubercle, mentre que l'*StABCG20* s'expressa molt (>10 FPKMs) en el tubercle madur i en la pela del tubercle. Cal dir, que els gens *StABCG10* i *StABCG23*, tot i tenir una elevada especificitat de teixit, no tenen nivells d'expressió elevats en cap d'ells (Figura Suplementària 10A, 11A, 12A, 13A i 14A).

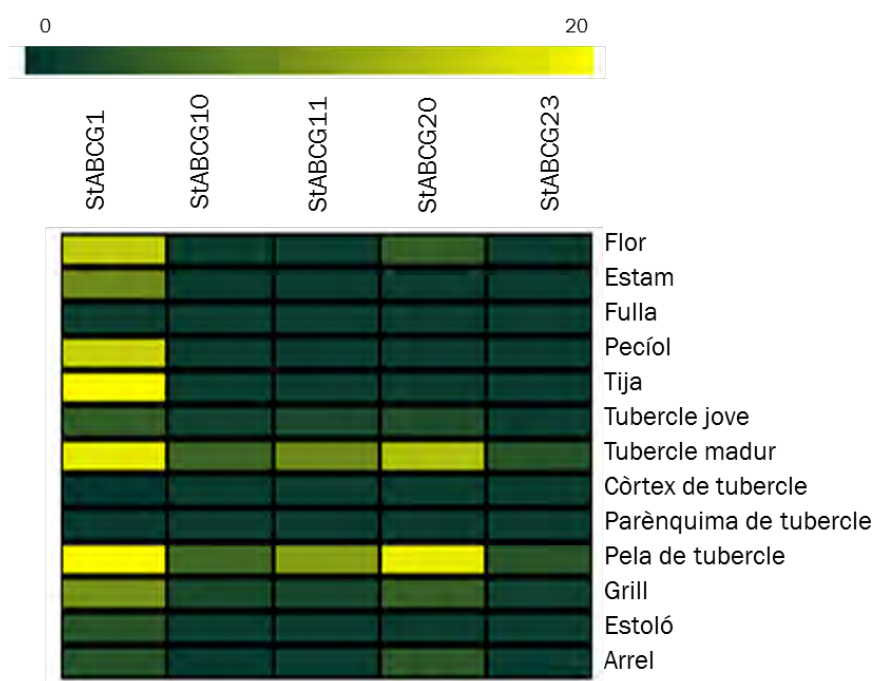


Figura 29. Anàlisi d'expressió *in silico* en diferents teixits i òrgans dels gens *StABCG* d'estudi del grup WBC de *Solanum tuberosum* grup Phureja. Les dades d'RNAseq utilitzades provenen de Massa et al., (2011).

Per altra banda també es va comprovar si l'expressió d'aquests gens variava en condicions d'estrès biòtic i abiòtic. En el cas de l'estrès abiòtic, l'expressió dels gens augmentava amb el tractament amb sal, sobretot en el cas de l'*StABCG11*, *StABCG20* i *StABCG23* (Figura 30). El tractament amb manitol reprimia l'expressió d'*StABCG10*, *StABCG11* i lleugerament la d'*StABCG20*. L'estrès abiòtic que té un efecte més gran és el provocat per calor, ja que l'expressió de tots els gens augmentava molt. Quan es fan tractaments amb hormones, els gens *StABCG1*, *StABCG10* i *StABCG20* disminueixen moderadament la seva expressió quan es tractava amb auxines, mentre que amb la resta d'hormones -gibberel·lines, citoquinines i àcid abscísic- induïen de forma acusada tots els gens. Tot i que en general l'auxina tenia poc efecte en aquests gens, per *StABCG11* té capacitat d'induir-lo de forma evident. En

referència a l'estrès biòtic, s'observava que el tractament amb *Phytophthora infestans* reprimeix els gens *StABCG1*, *StABCG10* i *StABCG20*. El tractament amb BABA induïa només *StABCG20* i BTH els gens *StABCG20* i *StABCG23*. (Figura Suplementària 9B, 10B, 11B, 12B i 13B).

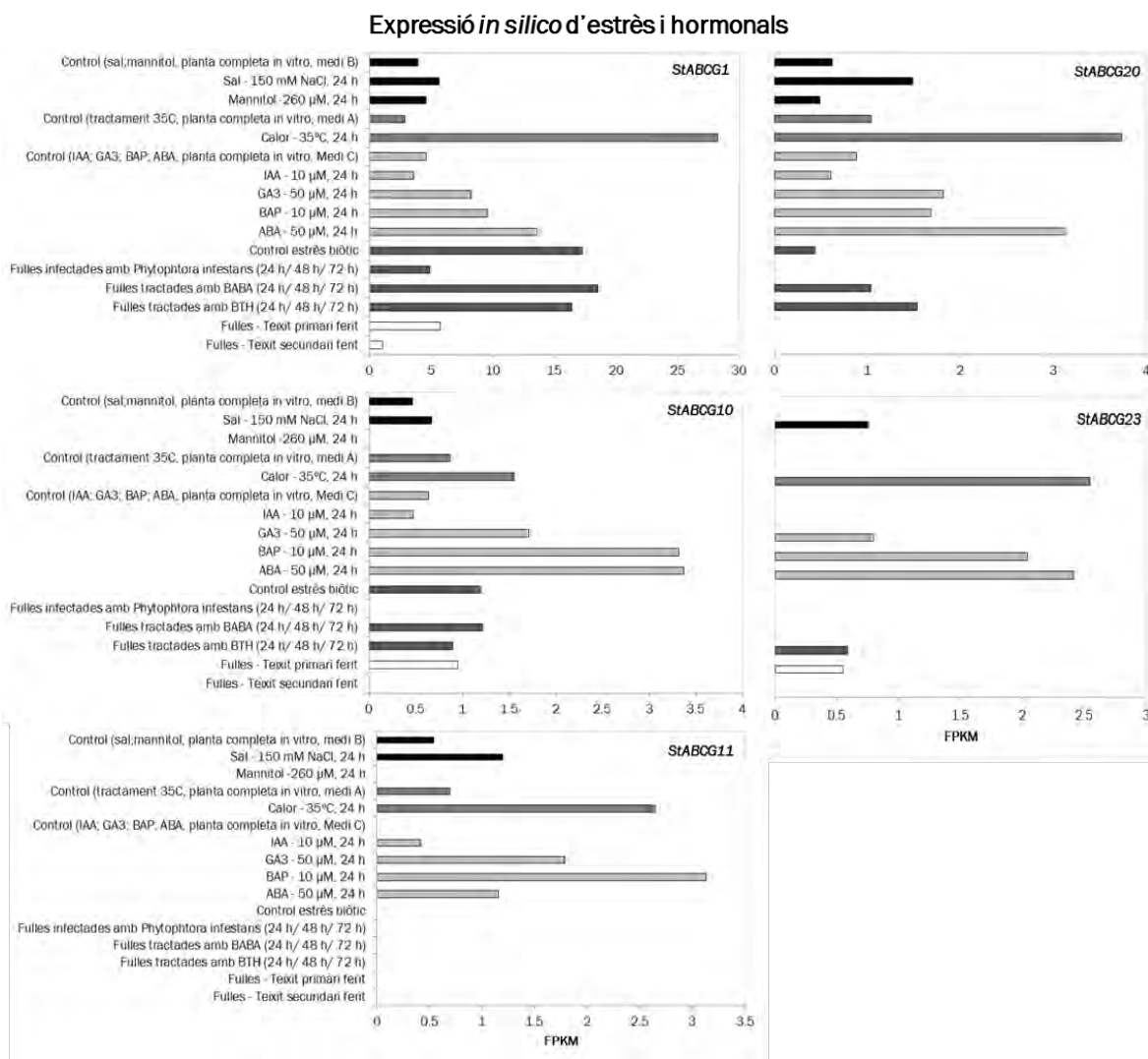


Figura 30. Representació de l'expressió *in silico* dels diferents StABCG d'estudi en diferents tractament d'estrès i hormonal. A l'eix de les X trobem els nivells d'expressió expressats en FPKMs. A l'eix de les Y trobem els diferents tractament realitzats. Cada tractament està marcat amb un color diferent.

La predicció d'elements reguladors *in cis* dels promotors de cadascun dels *StABCGs* s'ha realitzat mitjançant l'eina PlantCare en seqüències compreses entre 2.246 i 2.429 bases a 5' de l'inici de transcripció del gen. Les caixes reguladores es mostren a la Taula 11. Segons les prediccions s'observa regulació a nivell d'estrès biòtic, abiòtic (sobretot per temperatura), llum i hormones (auxines (*StABCG1*, *StABCG20*); àcid abscísic (*StABCG1*, *StABCG11*,

StABCG20); àcid salicílic (*StABCG10*, *StABCG11*, *StABCG20*); gibberel·lines (excepte el *StABCG10*), etilè (*StABCG10*, *StABCG11*, *StABCG23*) i metil jasmonat). A nivell tissular es va trobar regulació en l'endosperma i també en el meristema (*StABCG10*, *StABCG11* i *StABCG20*).

3.2.3.4-Expressió en teixits nadius de patatera dels gens *StABCGs*

Per tal de verificar els resultats d'RNAseq obtinguts per Massa i col·laboradors i el Consorci de seqüenciació del genoma de patata (2011), es va analitzar l'acumulació de transcrit dels diferents gens *StABCG* en diversos teixits mitjançant RT-qPCR..

Tal i com s'observa a la Figura 31 tots els gens assajats: *StABCG1*, *StABCG10*, *StABCG11*, *StABCG20* i *StABCG23* s'expressen amb molta diferència a fel·lema respecte a la resta de teixits analitzats. Cal destacar que la majoria dels gens, sobretot el gen *StABCG10*, s'expressa també en l'arrel, tot i que de manera molt més lleu. Pel contrari, l'expressió en parènquima, fulla i tija és molt baixa o pràcticament nul·la en la majoria dels casos. Aquests resultats mostren que tots aquests gens tenen uns bons nivells d'expressió a fel·lema, i que de fet són molt específics, pel que podrien estar implicats d'alguna manera en la seva formació.

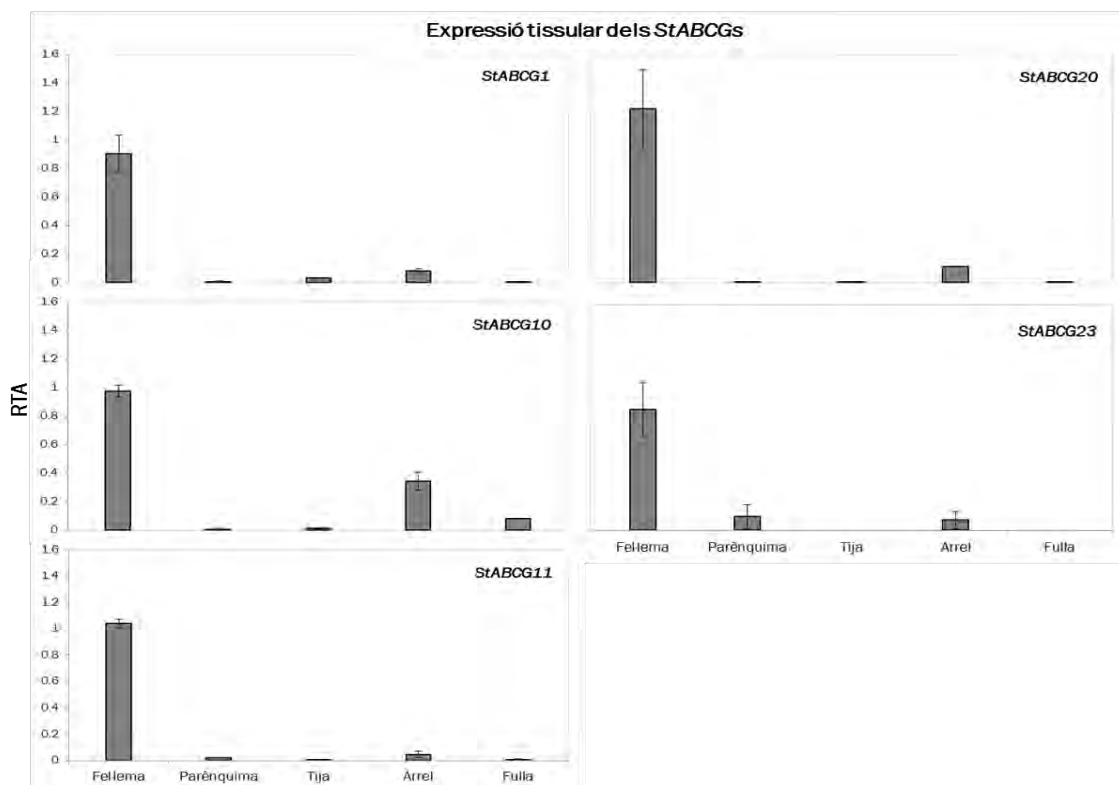


Figura 31. Anàlisi del patró d'expressió mitjançant RT-qPCR dels *StABCG* candidats en diferents òrgans (tija, arrel i fulla) i teixits (parènquima i fel·lema del tubercle) expressats en RTA (abundància relativa de transcrit respecte al gen *APRT* (*adenine phosphoribosyl transferase*)). Les dades corresponen a la mitjana i la desviació estàndard de tres rèpliques biològiques.

Taula 11. Elements reguladors en *cis* de la possible regió promotora dels diferents ABCGs estudiats (*StABCG1*, *StABCG10*, *StABCG11*, *StABCG20*, *StABCG23*) agrupats per categories funcionals.

Grup de resposta	Possible funció	Nom del motiu	Seqüència	StABCG1	StABCG10	StABCG11	StABCG20	StABCG23
Estrès	Element essencial regulador en <i>cis</i> per a la inducció anaeròbica	ARE	TGGTTT	2	1	2	2	4
	Element de resposta antifúngica	Box-W1	TTGACC	1	2		2	3
	Lloc d'unió a MYBHv1	CCAAT-box	CAACGG	1				
	Element de resposta	EIRE	TTCGACC			1		
	Element de resposta	ELI-box3	AAACCAATT					1
	Element involucrat en la inductibilitat anòxica específica	GC-motif	CCCCCG			1		
	Element regulador en <i>cis</i> involucrat en la resposta a estrès per calor	HSE	AAAAAATTTTC	3	5	2	2	2
	Element involucrat en la resposta a baixes temperatures	LTR	CCGAAA				1	1
	Lloc d'unió a MYB involucrats en la inducció a drogues	MBS	TAACGT			3		1
	Lloc d'unió a MYB involucrats en la biosíntesis de gens de flavonoides	MBS1	aaaAaaC(G/C)GTTA				1	
	Element regulador en <i>cis</i> involucrat en defensa i resposta a estrès	TC-rich repeats	ATTTTCTCCA	3	3	2	5	2
	Hormones	Element regulador en <i>cis</i> de resposta a àcid abscísic	ABRE	AGTACGTGGC	1			1
Element regulador en <i>cis</i> de resposta a àcid abscísic		ABRE	CACGTG	1				
Element regulador en <i>cis</i> de resposta a àcid abscísic		ABRE	GGACACGTGGC			1		
Element regulador en <i>cis</i> de resposta a àcid abscísic		ABRE	TACGTG			1		
Element regulador en <i>cis</i> de resposta a auxines		AuxRR-core	GGTCCAT	1				
Element regulador en <i>cis</i> de resposta a metil jasmonat		CGTCA-motif	CGTCA	4	2	2	1	2
Element de resposta a etilè		ERE	ATTTCAAA		1			
Element de resposta a etilè		ERE	ATTTCAAA			2		1
Element de resposta a gibberel·lines		GARE-motif	AAACAGA			1		2
Element de resposta a gibberel·lines		GARE-motif	TCTGTTG			1		
Element de resposta a gibberel·lines		P-box	CCTTTTG				1	
Element regulador en <i>cis</i> de resposta a gibberel·lines		TATC-box	TATCCA	1		3		1
Element regulador en <i>cis</i> de resposta a àcid salicílic		TCA-element	GAGAAGAATA		1	1	1	
Element regulador en <i>cis</i> de resposta a àcid salicílic		TCA-element	CCATCTTTT			3		
Element de resposta a auxines		TGA-element	AACGAC				1	
Element regulador en <i>cis</i> de resposta a metil jasmonat		TGACG motif	TGACG	4	2	2	1	2

Grup de resposta	Possible funció	Nom del motiu	Seqüència	StABCG1	StABCG10	StABCG11	StABCG20	StABCG23
Llum	Element de resposta a llum	3-AF1	AAGAGATATTT			1		
	Element de resposta a llum	ACE	AAAACGTTTA				2	
	Element de resposta a llum	ACE	CTAACGTATT				2	
	Element de resposta a llum	ACE	ACGTGGA			1		
	Element de resposta a llum	ACE	ACGTGGA	1				
	Part d'un mòdul de resposta a llum	AE-box	AGAAACAA	1	1		1	
	Involucrat en resposta a llum	AS-2-box	GATAatGATG	5				2
	Part d'un element de resposta a llum	AT1-motif	ATTAATTTTACA	1				1
	Part d'un mòdul conservat de DNA de resposta a llum	ATC-motif	AGTAATCT					1
	Part d'un mòdul conservat de DNA de resposta a llum	ATCT-motif	AATCTAATCT		2			
	Part d'un mòdul conservat de DNA de resposta a llum	ATTC-motif	CAATCCTC			1		
	Element de resposta a llum	BOX I	TTTCAA		2	4		2
	Part d'un element de resposta a llum	BOX II	TCCACGTGGC	2			1	
	Part d'un mòdul conservat de DNA de resposta a llum	BOX4	ATTAAT	5	10	1	3	8
	Part d'un element de resposta a llum	CATT-box	GCATTC		1	1		1
	Part d'un element de resposta a llum	Chs-Unit 1 m1	ACCTACCACAC			1		
	Element involucrat en el control circadià	Circadian	CAANNNNATC	1		1	3	2
	Element involucrat en el control circadià	Circadian	CAAAGATAC	1		1	1	2
	Element regulador en cis de resposta a llum	G-box	CACGTC		1			1
	Element regulador en cis de resposta a llum	G-box	CACGTG			2		
	Element regulador en cis de resposta a llum	G-box	CACGTT				1	2
	Element regulador en cis de resposta a llum	G-box	GACATGTGGT					1
	Element regulador en cis de resposta a llum	G-box	CACGTC				1	
	Element regulador en cis de resposta a llum	G-box	TAAAACGTG				1	
	Element regulador en cis de resposta a llum	G-box	GCCACGTGGA				1	
	Element regulador en cis de resposta a llum	G-box	CACGTA	1		4		
	Element regulador en cis de resposta a llum	G-box	TACGTG	4		1		
	Part d'un element de resposta a llum	GA-motif	ATAGATAA		2		1	
	Part d'un element de resposta a llum	GA-motiif	GATAAGGGT			1		
	Part d'un element de resposta a llum	GAG-motif	GGACATG		1			1
	Part d'un element de resposta a llum	GAG-motif	AGAGAGT			2		
	Part d'un element de resposta a llum	GATA-motif	GATAGGA	2		1		
	Element de resposta a llum	GT1-motif	AAGGATAAGG			1		
	Element de resposta a llum	GT1-motif	GCGGTAATT			1		
	Element de resposta a llum	GT1-motif	GGTTAA	1		1	1	
	Part d'un element de resposta a llum	I-box	GTATAAGGCC					1
	Part d'un element de resposta a llum	I-box	TGATAATGT					1

Grup de resposta	Possible funció	Nom del motiu	Seqüència	StABCG1	StABCG10	StABCG11	StABCG20	StABCG23
	Part d'un element de resposta a llum	I-box	GATATGG				1	
	Part d'un element de resposta a llum	I-box	TATTATCTAGA	1				
	Part d'un element de resposta a llum	I-box	TAGATAACC	1				
	Part d'un element de resposta a llum	I-box	CACATGG			1		
	Part d'un element de resposta a llum	L-box	TCTCACCTACC		1			
	Lloc d'unió a MYB en resposta a llum	MRE	AACCTAA				1	
	Element de resposta a llum	SP1	ATGGTGGTTGG			3		
	Element de resposta a llum	SP1	CC(G/A)CCC	1	1			1
	Part d'un element de resposta a llum	TCCC-motif	TCTCCCT			1		1
	Part d'un element de resposta a llum	TCT-motif	TCTTAC			1	2	
Especificitat tissular	Element relacionat amb la expressió del meristema	CAT-box	GCCACT			1	2	
	Element relacionat amb l'activació específica del meristema	CCGTCC-box	CCGTCC		1			
	Requerit per l'expressió a l'endosperma	GCN4-motif	TGTGTCA		2		2	
	Requerit per l'expressió a l'endosperma	Skn-1 motif	GTCAT	6	8	3	3	7
Altres	Element relacionat amb l'increment de la transcripció	5UTR Py-rich	TTTCTTCTCT	1	2	1		1
	Element regulador	A-box	CCGTCC		1			
	Lloc d'unió a DNA	AT-rich element	ATAGAAATCAA		1			1
	Element associat al motiu TGAGTCA	ATGCAAAT motif	ATACAAAT		1			1
	Lloc d'unió a proteïnes	BOX III	CATTTACT		1	1		
	Comú en promotors i zones de millora de l'expressió	CAAT-box	CAAT	17	21	18	15	16
	Comú en promotors i zones de millora de l'expressió	CAAT-box	CAAAT	17	11	13	15	14
	Comú en promotors i zones de millora de l'expressió	CAAT-box	CAATT	16	12	9	8	11
	Comú en promotors i zones de millora de l'expressió	CAAT-box	CCAAT	6	1	3	2	14
	Comú en promotors i zones de millora de l'expressió	CAAT-box	CCCAATTT	1				1
	Comú en promotors i zones de millora de l'expressió	CAAT-box	gGCAAT			5		
	Comú en promotors i zones de millora de l'expressió	CAAT-box	TGCCAAC			2		
	Element regulador involucrat en el metabolisme de la zeïna	O2-site	GATGACATGA			1		1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	ATATAA	1	1	3	4	2
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	ATATAAT	4		3	10	2
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	ATATAT	12	2	11		5
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	ATTATA	7	1	3	9	2
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	ccTATAAAaa	2	1		2	
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TAAAAATAA			2	3	1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TAATA	36	26	19	29	11
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TACAAAA	2			1	

Grup de resposta	Possible funció	Nom del motiu	Seqüència	StABCG1	StABCG10	StABCG11	StABCG20	StABCG23
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TACATAAA			2	1	
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATA	38	17	36	43	27
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAA	11	6	8	14	9
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAAA	9	5	6	8	9
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAAAA	2	3	2	4	2
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAAAAT	1	1	4		1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAAAT		1			2
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAAATA	1	1	1	4	1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAAATATAAA	1			3	
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATAAATT			1		1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATACA	2		5	2	4
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATATAA	5		3	4	
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	taTATAAAg				1	
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	tATATAAAgg			3	1	
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	taTATAAAtc	4		2	1	2
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATATATA	2		2	3	
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATATGT	1		1	2	
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATATTTATATTT	1			1	
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TATTTAAA	1	1	1		1
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	tcTATAAAta	3	2		1	
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	tcTATATAtt	2	1			3
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TTTAAAAA	2	3	2	3	3
	Promotor base a - 30 del punt d'inici de la transcripció	TATA-box	TTTTA	38	29	30	20	18
Desconeguda	AAGAA-motif		GAAAGAA	2	2	1	1	1
	AC-II		(C/T)T(T/C)(C/T)(A/C)(A/C)C(A/C)A(A/C)C(C/ A)(C/A)C	1		1		
	CATTAT-motif		GTCATTATCGG			1		
	F-BOX		CTATTCTCATT			1		
	TATCCAT/C-motif		TATCCAT		1		1	
	TCCACCT-motif		TCCACCT		1			
	Unnamed 11		TCCACATAGA			1		
	Unnamed1		CGTGG	1		1		1
	Unnamed1		GAATTTAATTAA	1				
	Unnamed13		TCCAAGTATA	1				
	Unnamed3		CGTGG			1		1

Grup de resposta	Possible funció	Nom del motiu	Seqüència	StABCG1	StABCG10	StABCG11	StABCG20	StABCG23
		Unnamed4	CTCC	9	10	8	2	7
		Unnamed6	GCATTTTATCA		1			
		Unnamed6	taTAAATATct	2	1			
		W box	TTGACC	1	2		2	3

3.2.3.5-Expressió en teixits cicatricials dels StABCGs

Per tal de determinar si els gens *StABCG* s'indueixen per ferida i com evoluciona l'acumulació de transcrit, es van obtenir discos de parènquima de tubercle de patatera i es van analitzar els nivells d'RNA missatger a diversos temps de cicatrització després d'haver produït la ferida.

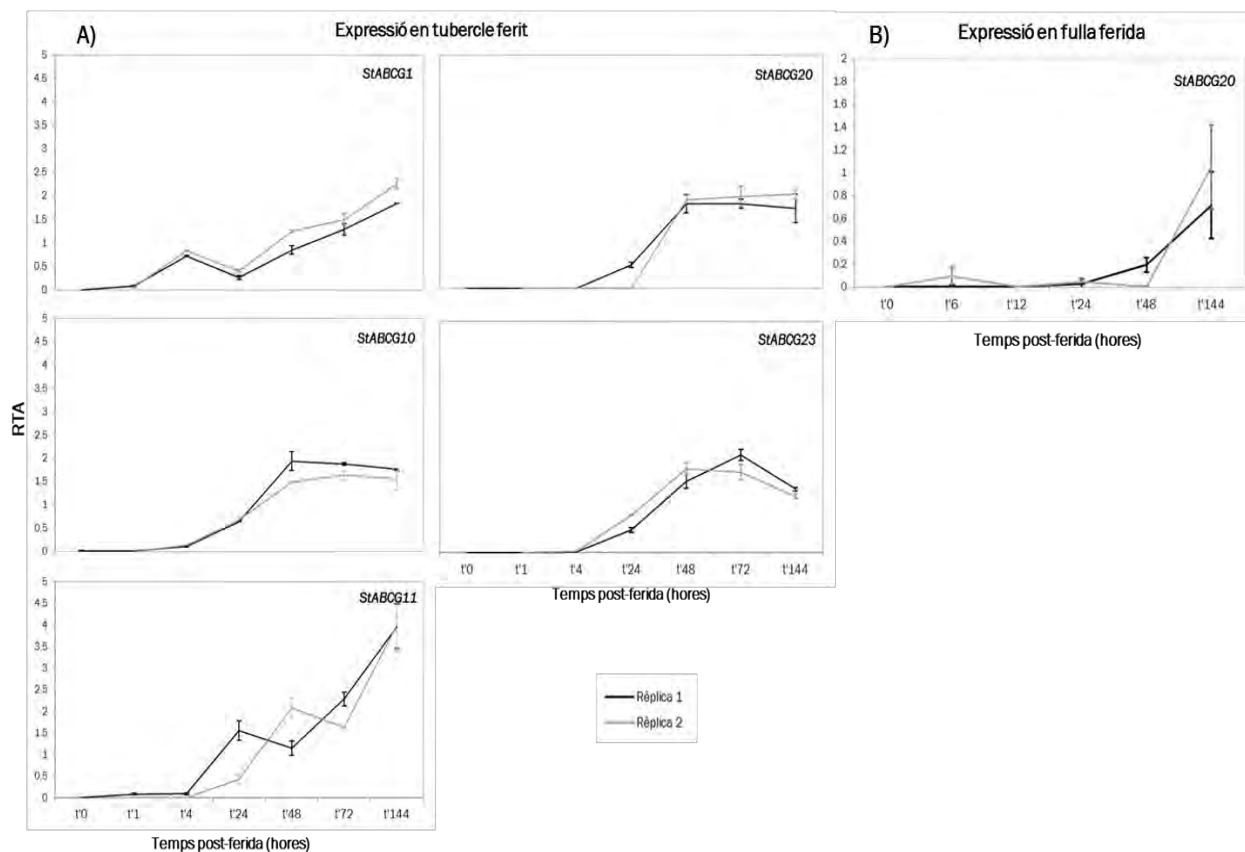


Figura 32. Evolució dels nivells d'expressió post-ferida dels diferents *StABCGs* en dues rèpliques biològiques de tubercle ferit (A). Nivells d'expressió post-ferida al llarg del temps de l'*StABCG20* en dues rèpliques de fulla (B). L'eix de les X expressa els diferents temps assajats després de la ferida. L'eix de les Y ens mostra els valors d'expressió en RTA respecte al gen *APRT* (l'*adenine phosphoribosyl transferase*).

En el tubercle ferit, es va observar que tots els gens *StABCG* analitzats mostraven un patró d'expressió molt similar: s'indueixen a les 1-24 h post-ferida i presentaven els màxims d'expressió a partir de les 48-144 h (Figura 32A). Específicament, el gen *StABCG1* i *StABCG11* mostraven una lleugera inducció al cap d'1 hora post-ferida mentre que la resta de gens ho feia més tardanament: el gen *StABCG10* s'indueix a les 4 h i els *StABCG20* i *StABCG23* a les 24 h post-ferida. Pel que fa als màxims d'expressió, en el cas de l'*StABCG1* i

L'*StABCG11* els nivells d'expressió seguien creixent encara a les 144 h. En el cas dels gens *StABCG10*, *StABCG20* i *StABCG23* mostraven els màxims d'expressió a les 48 h i es mantenien en general fins a les 144 h (moment final de l'anàlisi). Els resultats es van analitzar en dues rèpliques biològiques amb resultats comparables donant robustesa als nostres anàlisis.

En la fulla ferida, cal dir que únicament es va assajar el gen *StABCG20*, ja que es va considerar, arran dels resultats anteriors, i a partir dels nivells d'expressió trobats en diferents llibreries de patata i de suro realitzats prèviament al nostre laboratori, que era un bon candidat per a futurs experiments. En totes dues rèpliques biològiques, l'expressió va començar a les 24-48 hores post-ferida i va assolir els valors màxims a les 144 hores (Figura 32B). La comparació de la inducció a fulla respecte a tubercle mostra que la inducció per ferida a fulla no és tan acusada ni tan ràpida respecte a tubercle.

3.2.3.6-Localització subcel·lular dels StABCGs

La localització subcel·lular únicament s'ha estudiat per a les proteïnes StABCG1, StABCG20, StABCG23, ja que han estat les úniques de les quals s'ha pogut amplificar la seva seqüència completa. Segons les prediccions de les bases de dades WolfPsort i ESLPred es tracta de proteïnes de membrana. Per aquest motiu, es va utilitzar una proteïna coneguda, PIP2A (proteïna intrínseca de membrana plasmàtica) marcada amb CFP (*cyan fluorescent protein*, (Nelson et al., 2007)), amb localització subcel·lular a membrana, per tal de poder confirmar la localització de les proteïnes d'estudi. La localització d'aquestes proteïnes es va estudiar mitjançant la fusió a GFP a l'extrem N-terminal de la regió codificant de cadascun dels StABCGs (*StABCG1*, *StABCG20*, *StABCG23*) (*Pro35SCaMV:GFP-StABCG*) i transformació transitòria en tabac. Després de 72 hores post-infiltració es va detectar fluorescència verda, indicatiu de l'acumulació de les proteïnes StABCGs, i fluorescència blava en el cas de PIP2A. La fluorescència es concentrava en el contorn cel·lular i coincidint amb el marcatge blau fluorescent, donant per tant un patró típic de proteïnes que es localitzen a la membrana plasmàtica (Figura 33).

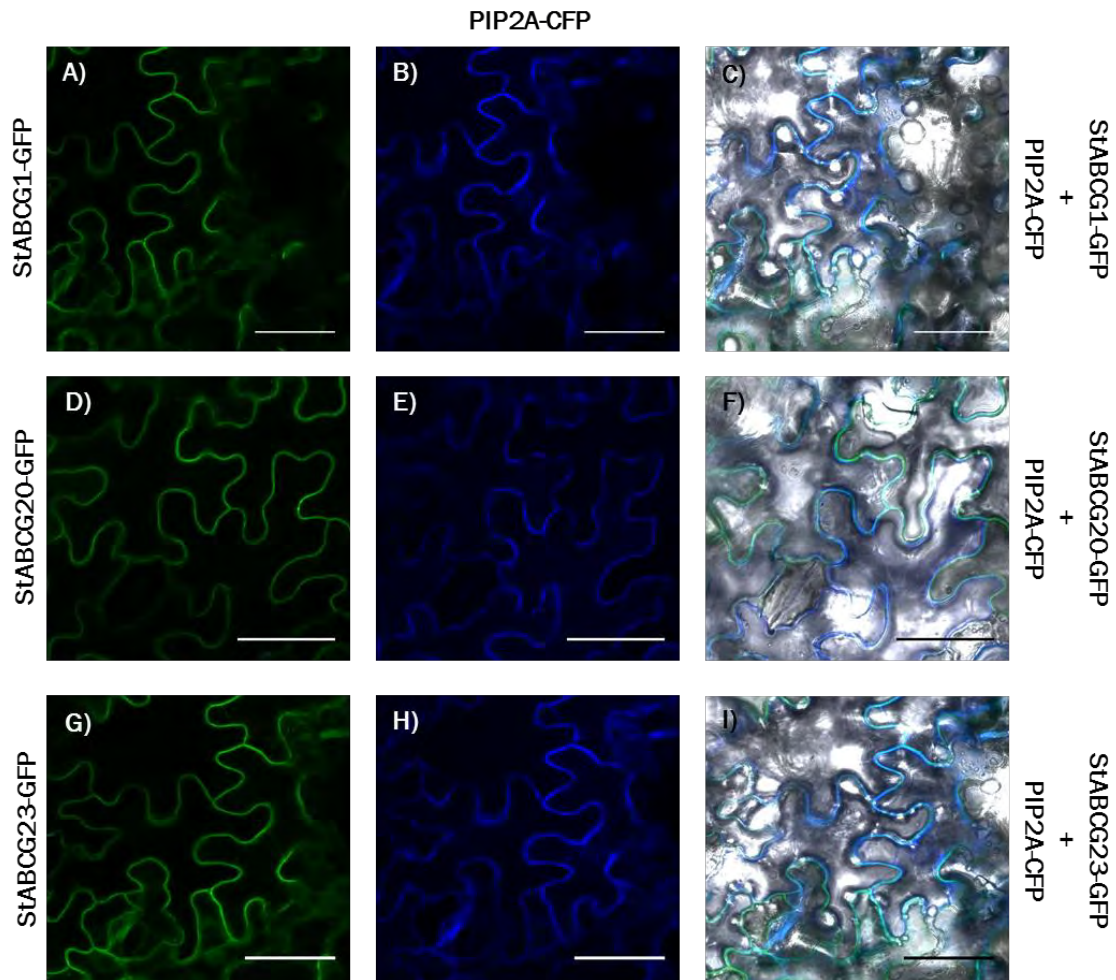


Figura 33. Localització de les proteïnes StABCG1, StABCG20 i StABCG23 i colocalització d'aquestes amb la proteïna de membrana PIP2A. Les proteïnes ABCG tenen fusionades una proteïna fluorescent verda (GFP). La proteïna PIP2A té fusionada una proteïna fluorescent blava (CFP). A), D) i G) Localització de la proteïna StABCG1, StABCG20 i StABCG23 respectivament; B), E) i H) Localització de la proteïna de membrana PIP2A; C), F) i I) Colocalització de les proteïnes StABCG1, StABCG20 i StABCG23 amb la proteïna PIP2A respectivament. Escala: 40 μ m. Imatges realitzades mitjançant microscopi confocal.

3.2.3.7-Anàlisi de coexpressió de diversos gens amb els gens StABCGs

Els estudis de coexpressió es van realitzar amb l'ortòleg d'Arabidopsis per cadascun dels diferents ABCGs d'estudi (*StABCG1*, *StABCG10*, *StABCG11*, *StABCG20* i *StABCG23*), utilitzant les dades que ens proporciona el programa *Genemania* (Warde-Farley et al., 2010). El llistat de gens que coexpressen amb cadascun dels gens d'estudi es mostren a les taules 12-16. El resultat de l'anàlisi ens mostra que el gen *AtABCG1* coexpressa amb alguns gens de suberina com podria ser el *FAR1* (*fatty acyl-CoA reductase 1*) que s'ha vist que codifica per una reductasa que converteix àcids grassos a alcohols grassos (Vishwanath et al., 2013),

AtABCG16 que està implicat en la formació de la paret del pol·len (Yadav et al., 2014), amb el *CCR2* (*cinnamoyl CoA reductase*) que està involucrat en la síntesis de lignina (Lacombe et al., 1997) i *AtLTPI.4* que podria estar associat al transport de ceres (Jacq et al., 2017) (Taula 12). Pel que fa a *AtABCG10* coexpressa amb proteïnes la funció de les quals s'ha relacionat clarament amb l'acumulació de suberina: *GPAT5*, *HHT1/ASFT*, *CYP86B1*, *ABCG20*. La *GPAT5* és una glicerol-3-fosfat aciltransferasa que permet l'acumulació de cadenes molt llargues d'àcid dicarboxílic i àcids grassos ω -hidroxiàcids típics de la suberina (Beisson et al., 2007). *HHT1/ASFT* permet la formació d'enllaç èster entre l'àcid ferúlic i els alcohols o els ω -hidroxiàcids, la qual és necessària per a la incorporació dels èsters de ferulat dins la suberina (Gou et al., 2009; Molina et al., 2009). El *CYP86B1* es requereix per a la formació de cadenes molt llargues d' ω -hidroxiàcid i àcid α,ω -dicarboxílic necessàries també per a la formació de la suberina (Compagnon et al., 2009). Els gens *AtABCG20* i *AtABCG16* estan implicats també en la formació de la barrera de suberina i la paret del pol·len respectivament (Yadav et al., 2014). A més coexpressen amb tres lacases (*LAC5*, *LAC12*, *LAC16*) implicades en la formació dels polímers de lignina (Taula 13). L'*AtABCG11* coexpressa amb gens que s'han relacionat amb formació de ceres: *CER2*, *CER5* i amb formació de lignina. *CER2* és un gen que està implicat en la formació de cadenes molt llargues d'àcids grassos en *Arabidopsis* (Haslam et al., 2012). Mutacions en *CER5* (*AtABCG12*), bloquegen el transport de determinats compostos cèrics a la cutícula, acumulant-se els precursors lipídics dins de les cèl·lules epidèrmiques (Pighin et al., 2004). El gen *AtCAD9* (*cinnamyl alcohol dehydrogenase*) està implicat en la biosíntesi de lignina (Eudes et al., 2006) (Taula 14). L'*AtABCG20* coexpressa amb *ANAC58*, *FAR4*, *FAR5*, *CYP86B1*, *HHT1/ASFT*, *ABCG2* i *LAC13*. Recentment s'ha trobat que l'ortòleg d'*ANAC058* en patatera (*StNAC103*), actua de repressor de l'acumulació de suberina i ceres (Verdaguer et al., 2016). Les dues *fatty acid reductases* (*FAR4* i *FAR5*) s'han relacionat amb la biosíntesi de suberina i ceres ja que generen alcohols de cadena molt llarga a partir dels corresponents àcids grassos de cadena molt llarga (Domergue et al., 2010). L'*ABCG2* també està implicat en la formació de suberina (Yadav et al., 2014). També es troba una lacasa (*LAC13*) possiblement implicada en la biosíntesi de lignina (Taula 15). Per últim, l'*AtABCG23* també coexpressa amb *CYP86B1* i *GPAT5*, a part de fer-ho amb varis ABCGs entre els quals podem destacar *ABCG2*, *ABCG6* i el *ABCG20*, que tal i com s'ha comentat anteriorment estan involucrats en la formació de la suberina (Taula 16).

Taula 12. Gens que es coexpressen amb *ABCG1*, agrupats per categories funcionals, segons el *Genemania*. El pes indica la importància de la correlació de l'expressió del gen amb el gen problema per explicar la xarxa, on 1 és el total de la xarxa coincidint amb la suma de totes les interaccions possibles. En la taula es mostra el valor del pes en referència a At1g39350.

Categoria funcional	Identificador (codi AGI)	Descripció	Pes
Regulació			
	AT5G63790	ANAC102	0,020
	AT4G18170	WRKY28	0,017
	AT3G15210	ATERF-4	0,020
	AT1G66400	CML23	0,015
	AT5G26742	ATRH3	0,020
Síntesi de lípids			
	AT5G22500	FAR1	0,016
	AT5G43760	KCS20	0,019
	AT5G55050	GDSL	0,023
	AT1G80820	CCR2	0,016
Transport de lípids			
	AT4G39670	GLTP	0,013
	AT3G55090	ABCG16	0,016
	AT2G38530	LTPI.4	0,016
Desenvolupament			
	AT1G70140	ATFH8	0,022
Estrès i defensa			
	AT4G34710	ADC2	0,022
	AT5G06860	PGIP1	0,018
	AT1G17180	ATGSTU25	0,012
Altres			
	AT3G25900	HMT-1	0,014
	AT1G02400	GA2OX6	0,013
	AT4G23640	TRH1	0,019
	AT2G25530	AFG1-like ATPase family protein	0,016
	AT4G34480	O-Glycosyl hydrolases family 17	0,019
	AT4G22530	S-adenosyl-L-methionine	0,016
	AT1G74790	HIPL1	0,017
	AT5G13820	ATBP1	0,017
	AT1G74000	SS3	0,017

Taula 13. Gens que es coexpressen amb ABCG10, agrupats per categories funcionals, segons el *Genemania*. El pes indica la importància de la correlació de l'expressió del gen amb el gen problema per explicar la xarxa, on 1 és el total de la xarxa coincidint amb la suma de totes les interaccions possibles. En la taula es mostra el valor del pes en referència a At1g53270.

Categoria funcional	Identificador (codi AGI)	Descripció	Pes
Regulació	AT2G24430	ANAC039	0,028
	AT1G17950	ATMYB52	0,013
Síntesi i transport de lípids	AT3G11430	ATGPAT5	0,011
	AT5G41040	HHT1/ASFT	0,015
	AT5G23190	CYP86B1	0,012
	AT5G19410	ABCG23	0,014
	AT3G53510	ABCG20	0,017
	AT3G55090	ABCG16	0,011
	AT5G12420	WSD1-like	0,013
Síntesi de lignina	AT2G40370	LAC5	0,016
	AT5G05390	LAC12	0,015
	AT5G58910	LAC16	0,014
Desenvolupament	AT4G35420	DRL1	0,013
Estrès i defensa	AT1G68850	PER11	0,017
	AT2G21100	<i>Disease resistance-responsive</i>	0,012
Altres	AT1G55990	<i>Glycine-rich protein</i>	0,020
	AT1G56320	<i>Glycine-rich protein</i>	0,011
	AT4G17280	<i>Auxin-responsive family protein</i>	0,021
	AT1G54540	LEA	0,011
	AT4G39720	<i>VQ motif-containing protein</i>	0,022
	AT1G52180	<i>Aquaporine-like superfamily</i>	0,018
	AT5G08250	<i>Cytochrome P450 superfamily</i>	0,015
	AT1G33475	<i>SNARE-like superfamily protein</i>	0,016
	AT1G03700	Desconegut	0,011
	AT3G62730	Desconegut	0,018

Taula 14. Gens que es coexpressen amb *AtABCG11*, agrupats per categories funcionals, segons el *Genemania*. El pes indica la importància de la correlació de l'expressió del gen amb el gen problema per explicar la xarxa, on 1 és el total de la xarxa coincidint amb la suma de totes les interaccions possibles. En la taula es mostra el valor del pes en referència a *At1g17840*.

Categoria funcional	Identificador (codi AGI)	Descripció	Pes
Regulació	AT5G62470	MYB96	0,016
Síntesi de lípids	AT1G07720	KCS3	0,019
	AT1G19440	KCS4	0,023
	AT2G26250	KCS10	0,017
	AT4G39330	ATCAD9	0,028
	AT1G68530	CUT1	0,016
	AT4G24510	CER2	0,017
	AT3G16370	GDSL	0,013
	AT5G45950	GDSL	0,018
	AT1G49430	LACS2	0,017
Transport de lípids	AT1G51500	CER5	0,025
	AT1G27950	LTPG1	0,019
	AT3G43720	LTPG2	0,015
	AT1G55260	LTPG6	0,018
Estrès i defensa	AT5G25610	RD22	0,021
	AT5G02480	HSP20	0,023
	AT4G33220	PME44	0,014
	AT5G20270	HHP1	0,017
Altres	AT3G47295	PSY2	0,020
	AT4G25960	PGP2	0,021
	AT5G13400	Major facilitator superfamily	0,018
	AT4G21620	Glycine-rich protein	0,018
	AT5G18590	Galactose oxidase	0,015
	AT2G42840	Protodermal factor 1	0,023
	AT1G53050	Protein kinase superfamily	0,021

Taula 15. Gens que es coexpressen amb *AtABCG20*, agrupats per categories funcionals, segons el *Genemania*. El pes indica la importància de la correlació de l'expressió del gen amb el gen problema per explicar la xarxa, on 1 és el total de la xarxa coincidint amb la suma de totes les interaccions possibles. En la taula es mostra el valor del pes en referència a AT3G53510.

Categoria funcional	Identificador (codi AGI)	Descripció	Pes
Regulació	AT3G18400	ANAC058	0,019
Síntesi de lípids	AT1G74460	GDSL	0,016
	AT4G26790	GDSL	0,019
	AT3G50400	GDSL	0,014
	AT5G07130	LAC13	0,017
	AT3G44540	FAR4	0,017
	AT3G44550	FAR5	0,015
	AT5G23190	CYP86B1	0,010
	AT2G38110	ATGPAT6	0,023
	AT5G41040	HHT1/ASFT	0,018
Transport de lípids	AT5G19410	ABCG23	0,014
	AT2G37360	ABCG2	0,015
	AT2G48140	EDA4	0,014
Estrès i defensa	AT1G68850	PER11	0,016
Altres	AT5G09530	Hydroxyproline-rich	0,020
	AT2G22510	Hydroxyproline-rich	0,017
	AT1G56320	Glycine-rich protein family	0,014
	AT4G17215	Pollen Ole e 1 allergen	0,016
	AT4G39720	VQ motif-containing protein	0,019
	AT1G49960	NAT4	0,015
	AT1G68380	Acetylglucosaminyltransferase	0,019
	AT2G03200	family	0,016
	AT5G08250	Aspartyl protease family protein	0,012
	AT5G64190	CYP450	0,020
	AT1G03700	Desconeguda	0,015

Taula 16. Gens que es coexpressen amb *AtABCG23*, agrupats per categories funcionals, segons el *Genemania*. El pes indica la importància de la correlació de l'expressió del gen amb el gen problema per explicar la xarxa, on 1 és el total de la xarxa coincidint amb la suma de totes les interaccions possibles. En la taula es mostra el valor del pes en referència a *At5g19410*.

Categoria funcional	Identificador (codi AGI)	Descripció	Pes
Regulació	AT2G46130	WRKY43	0,024
	AT1G17950	ATMYB52	0,016
Síntesi de lípids	AT1G74460	GDSL	0,015
	AT5G07130	LAC13	0,013
	AT5G58910	LAC16	0,017
	AT5G23190	CYP86B1	0,016
	AT3G11430	ATGPAT5	0,020
	AT4G16640	WSD1-like	0,016
Transport de lípids	AT2G37360	ABCG2	0,016
	AT5G13580	ABCG6	0,011
	AT1G53270	ABCG10	0,014
	AT3G55090	ABCG16	0,010
	AT3G53510	ABCG20	0,014
	AT5G13900	VAS	0,012
Estrès i defensa	AT1G68850	PER11	0,014
	AT2G21100	<i>Disease resistance-responsive family</i>	0,016
Altres	AT5G09530	<i>Hydroxyproline-rich</i>	0,017
	AT1G55990	<i>Glycine-rich protein</i>	0,021
	AT1G56320	<i>Glycine-rich protein</i>	0,014
	AT5G08250	<i>Cytochrome P450 superfamily</i>	0,012
	AT1G73290	<i>protein</i>	0,013
	AT4G36610	<i>Serine carboxypeptidase-like 5</i>	0,016
	AT5G12420	<i>Hydrolases superfamily protein</i>	0,016
	AT2G43390	<i>Matrixin family protein</i>	0,013
	AT1G03700	Desconeguda	0,015
	Desconeguda		

3.3-Genètica funcional de la suberina en arrels de patata

La manera més eficient i utilitzada per generar línies transgèniques estables consisteix en modificar genèticament plantes amb *Agrobacterium tumefaciens*. Per a tal fi, s'utilitzen soques d'*A.tumefaciens* per a ús biotecnològic les quals han perdut la capacitat natural de produir call a través de la substitució dels gens endògens del T-DNA del plasmidi Ti pel fragment de DNA que s'insereix en el genoma. Per la majoria de plantes, excepte *Arabidopsis*, l'ús d'*A.tumefaciens* és un sistema costós en quant a temps i diners ja que per produir una planta transgènica completa cal la regeneració a partir de les cèl·lules transformades, procés que necessita l'administració de fitohormones exògenes. Una de les alternatives en cas de voler obtenir únicament arrels transformades consisteix en usar *A. rhizogenes* el qual genera cèl·lules transformades capaces de formar arrels (arrels peludes o *hairy roots*) sense l'administració de fitohormones exògenes, abaratint-ne els costos. Diversos treballs han demostrat que els cultius d'arrels peludes es poden utilitzar per estudiar l'efecte fenotípic causat per la modificació de l'expressió gènica en diferents espècies (Dinh et al., 2014; Horn et al., 2014; Plasencia et al., 2015; Ron et al., 2014). Degut a que la suberina s'acumula en capes internes de les arrels primàries com l'endodermis i exodermis, la transformació d'arrels mitjançant *A. rhizogenes* permetria identificar gens rellevants per la formació de suberina. En aquest treball doncs, es desenvoluparà un protocol per produir arrels transformades en plantes de patata per determinar la implicació de possibles gens candidats en la biosíntesi de la suberina.

3.3.1-Disseny i optimització del procediment de la transformació de patata

Per tal d'obtenir arrels peludes és necessari que les arrels hagin incorporat el T-DNA del plasmidi Ri (*root-inducing*), ja que presenta els gens necessaris per la inducció d'arrels. Tot i ser arrels transformades amb el T-DNA del plasmidi Ri, per simplificar la lectura del present document, anomenaré a aquests tipus d'arrels: arrels no transformades. L'obtenció d'arrels peludes transformades requerirà que s'insereixi en el genoma de la cèl·lula vegetal un T-DNA addicional provinent d'un vector binari que conté un marcador de transformació i el transgen, la qual cosa generarà el que anomenaré arrels transformades o transgèniques. Denominaré a les arrels pròpies de la planta com arrels natives.

Per a l'obtenció d'arrels transgèniques es va seguir el protocol (amb modificacions) descrit per Horn et al., (2014). Es va utilitzar la soca C58C1:pRI1583 i per identificar les arrels transformades es va utilitzar el marcador de selecció fluorescent DsRed. Els marcadors de transformació fluorescents són millors que els marcadors de resistència a antibiòtic ja que s'ha demostrat que les arrels no transformades no moren sinó que aturen el creixement, el que dificulta la selecció de transformants positius (Kumar et al., 2006). Es va optar per la

DsRed en comptes de la GFP ja que l'autofluorescència de les arrels podria dificultar la selecció de transformants positius. El vector d'expressió utilitzat va ser el pK7GWIWG2-(II) Red-Root (Karimi et al., 2002) el qual conté en el T-DNA el marcador de transformació *DsRed2* que ens permetrà discernir entre arrels peludes transformades i no transformades a través de la fluorescència vermella.

3.3.1.1-Protocol i cronograma per a l'obtenció d'arrels transformades

Inicialment, el cultiu d'*A. rhizogenes* es va fer créixer en medi YEB líquid O/N amb els antibiòtics corresponents. Es van centrifugar 2 ml de cultiu i el sediment es va resuspendre en 1 ml de medi YEB sense antibiòtics, per tal d'eliminar l'antibiòtic i evitar necrosi en les zones d'infecció de la planta.

Per a cada tractament es van infectar 4 plantes *in vitro* (d'unes 3 – 4 setmanes d'edat crescudes en medi 2MS o 1MS) les quals es van transferir en medi SP (medi MS sense sucre per evitar un creixement excessiu d'*A. rhizogenes*) suplementat amb acetosiringona 0,1 M. Es va inocular 5 µl de la suspensió d'*A. rhizogenes* mitjançant punció amb una agulla quirúrgica. Es van fer 3 punxades a cada planta en els entrenusos i les plantes es van créixer en vertical respectant el creixement natural de les arrels seguint la gravetat amb un cicle de temperatures de 22°C durant el dia i 20°C durant la nit, i amb un fotoperíode de 12 hores. Passada una setmana es va observar la formació de calls i arrels peludes (les quals algunes d'elles presentaven fluorescència vermella indicant que corresponien a transformants positius) (Figura 34). Al cap de dues setmanes es van tallar i eliminar les arrels natives de la planta i es va transferir la planta a una nova placa amb medi SP per estimular el creixement de les arrels transformades.

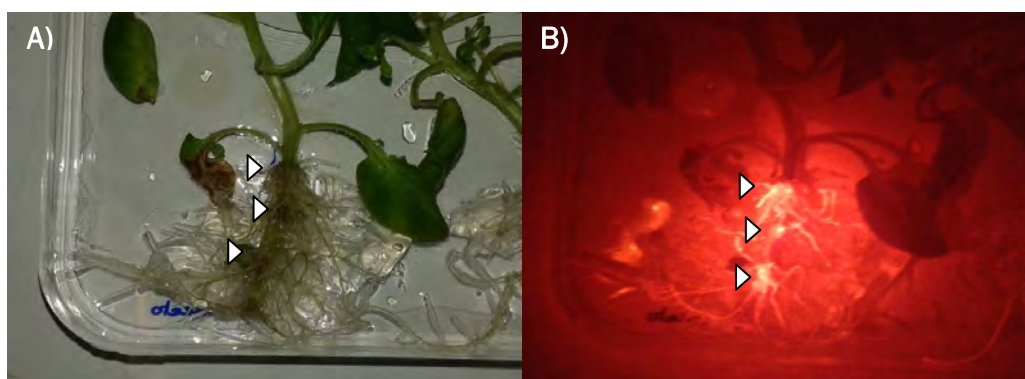


Figura 34. Planta de patatera infectada per *A. rhizogenes* tres setmanes després de la inoculació, moment en que es traspasaven les arrels transformades a una placa amb medi Gamborg B5. Cada fletxa indica un punt d'inoculació. (A) Imatge amb llum clara. (B) Imatge obtinguda a partir de l'excitació amb llum fluorescent verda.

La inserció dels T-DNAs dins el genoma de la planta es dona de manera aleatòria, considerant esdeveniments de transformació independents aquelles noves arrels que haguessin inserit el mateix T-DNA però en zones diferents del genoma. Cada punció pot generar un o més calls dels quals en surten múltiples arrels. Per tal d'assegurar que les arrels obtingudes provenen d'esdeveniments independents de transformació, es podrien seleccionar arrels provinents de punxades independents, no obstant, en el nostre cas, degut a la gran proliferació d'arrels (Figura 34A) només es podia assegurar que les arrels corresponien a esdeveniments independents aquelles que provenien de punxades de diferents plantes. Per tal de mantenir les arrels transformades, al cap d'una setmana en medi SP, de cada planta es van transferir 4 arrels diferents (considerades esdeveniments de transformació independents) a plaques de petri (molt plenes) amb medi Gamborg B5 enriquit amb 2% de sucrosa (Kumar et al., 2006) i suplementat amb claforan (500 mg/l). El claforan permet eliminar l'*A. Rhizogenes* i com que el medi Gamborg B5 és exempt d'hormones, les arrels natives no hi creixen sinó només les arrels peludes ja que presenten desregulació hormonal degut a l'expressió dels gens naturals del T-DNA del plasmidi Ri. Una vegada establert el cultiu sòlid, es van propagar les arrels en medi líquid per tal d'obtenir la biomassa suficient per anàlisis posteriors d'expressió gènica o d'anàlisi de la suberina. L'esquema complet del procés es pot trobar a la Figura 35. Opcionalment, en cas de voler mantenir plantes compostes, es tallen les arrels natives de la planta i es transpassarien a cultiu hidropònic (Hoagland a la meitat d'astringència) o alternativament amb vermiculita (Horns et al., 2014) .

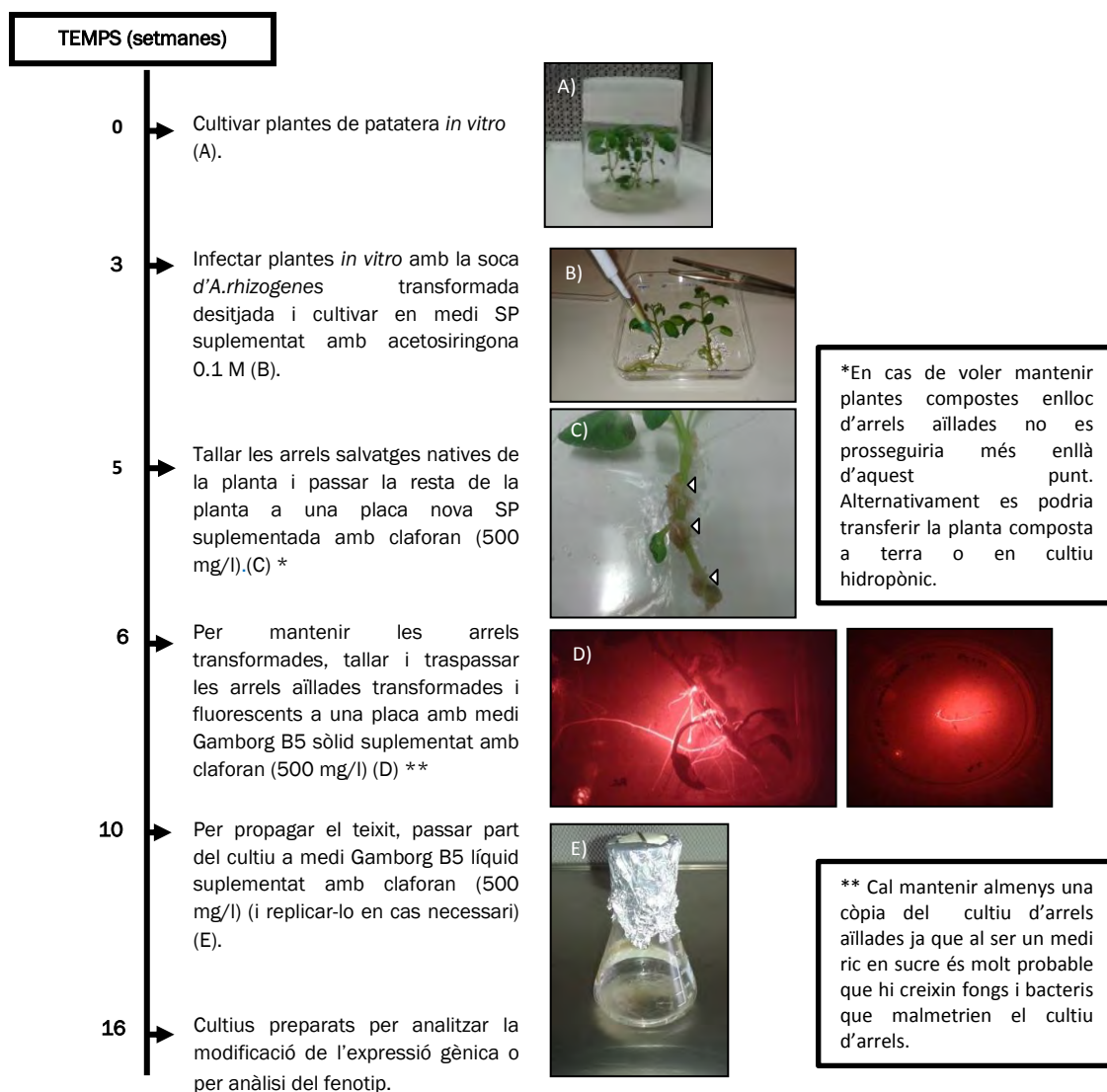


Figura 35. Cronograma per obtenir arrels transformades de patata mitjançant *A. rhizogenes*. A l'esquerra de la figura es mostren les setmanes acumulades per assolir cada etapa del procés. A la dreta es mostren les imatges del procés partint d'un cultiu *in vitro* d'esqueixos de patatera de 3 setmanes (A), infecció de les plantes per punció amb *A. rhizogenes* (B), tallar arrels natives de la planta, es marquen amb una fletxa els calls formats per la infecció i les primeres arrels (C), selecció de les arrels transformades a través del marcador de transformació fluorescent vermell DsRed2 i traspàs de les arrels transformades a medi Gamborg B5 sòlid (D), i cultiu de les arrels en medi Gamborg B5 líquid (E).

3.3.1.2-Obtenció d'arrels fluorescents

Per a la identificació de les arrels transformades es va utilitzar el gen *reporter DsRED2* (inclòs dins el vector d'expressió binari pK7GWIWG2_RedRoot_II) el qual codifica per una proteïna que emet fluorescència vermella quan s'excita amb llum verda. Utilitzant la soca C58C1:pRI1583 transformada amb el vector binari es van obtenir arrels transformades

fluorescents vermelles (expressaven el *reporter DsRED2*)(Figura 36D). El control negatiu de transformació es va obtenir mitjançant la infecció amb la soca C58C1:pRI1583 no transformada amb el vector binari; les arrels no transformades produïen arrels sense fluorescència (Figura 36C).

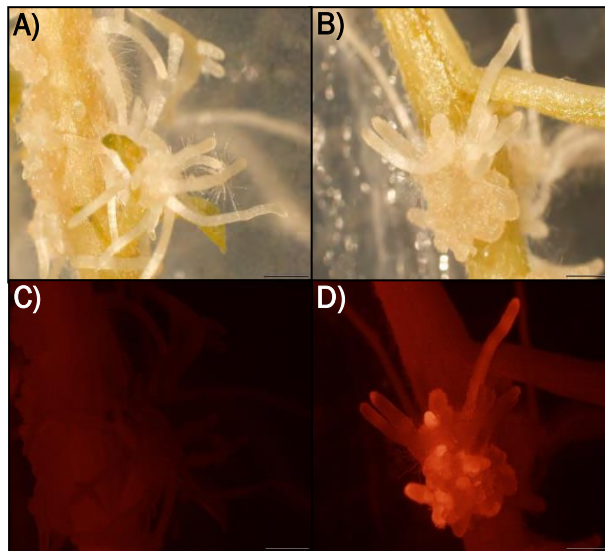


Figura 36. Transformació d'arrels de patatera via *A. rhizogenes*. Es mostren dos tractaments: *A. rhizogenes* (soca C58C1:pRI1583) (A i C) i amb *A. rhizogenes* (soca C58C1:pRI1583) transformat amb el vector binari buit pK7GWIWG2-II *Red-Root* (B i D). Les arrels peludes s'observen sota una lupa binocular i emergeixen en ambdues infeccions (A, B), però solament s'observen arrels fluorescents vermelles en el microscopi d'epifluorescència quan s'utilitza l'*A. rhizogenes* transformat amb el vector que conté *DsRed* (D).

3.3.2-Transformació genètica mediada per *A. rhizogenes* per a l'estudi de promotors: *pFHT* com a model

Una de les aplicacions que pot tenir la transformació d'arrels mitjançant *A. rhizogenes* és l'estudi del patró d'expressió de gens usant gens *reporters* fusionats als promotors. L'enzim de patata *FHT* i el seu respectiu ortòleg en *Arabidopsis ASFT/RWP1/AtHHT* (At5g41040) han estat prèviament caracteritzats tant *in vivo* com *in planta* (Gou et al., 2009; Molina et al., 2009; Serra et al., 2010). *FHT* pertany a la categoria d'aciltransferases de la família BAHD i específicament conjuga l'àcid ferúlic del feruloyl-CoA al grup alcohol d' ω -hidroxiàcids i d'alcohols primaris (alcohols grassos). Ambdós productes enzimàtics són monòmers de la suberina (revisió de Liu et al., 2010); Serra et al., 2010) i el silenciament del gen genera suberines deficientes en èsters de ferulat de suberina i ceres (Gou et al., 2009; Molina et al., 2009; Serra et al., 2010). Un treball posterior del nostre grup va estudiar l'activació del promotor *FHT* en patata usant transformació estable amb *A. tumefaciens* i es va demostrar

que *FHT* s'expressa específicament en cèl·lules en procés de suberificació de l'arrel (exodermis, endodermis) i del tubercle (fel·logen). A més, *FHT* s'indueix per ferida i està regulat per les hormones, àcid abscísic (ABA) i àcid salicílic (SA) (Boher et al., 2013). En el present treball es va usar la construcció *pFHT::GUS-GFP* (β -glucuronidasa-proteïna fluorescent verda) per obtenir arrels transformades via *A. rhizogenes* i comparar l'activació del promotor amb les d'arrels estables via *A. tumefaciens* (Boher et al., 2013).

Així, les plantes de patatera es van infectar amb *A. rhizogenes* per obtenir arrels transformades amb la construcció *pFHT::GUS-GFP*. Una vegada tallades les arrels natives i desenvolupades les transformades, les plantes es van traspasar a un medi hidropònic (Hoagland a la meitat d'astringència) aconseguint plantes compostes: amb la part aèria salvatge i amb part de les arrels peludes obtingudes transformades (no es van seleccionar). El desenvolupament d'arrels va resultar ser molt eficient ja que passades dues setmanes hi va haver un notable creixement radicular, permetent utilitzar la biomassa per l'assaig *GUS*.

El teixit radicular es va tenyir per l'activitat del *GUS* donant com a resultat una coloració blava després de 4 hores d'incubació. El marcador *GUS* es localitzava concretament en vàries cèl·lules de l'endodermis (Figura 37A, D, I i J) i de l'exodermis (Figura 37B, E, F, G i I). A més, també es va trobar marcatge en l'emergència d'arrels laterals (Figura 37C, D, i K). Curiosament, en zones on l'arrel s'havia trencat s'observava marcatge en la zona de ferida (Figura 37D). La fluorescència verda corresponent al segon *reporter* GFP es va evidenciar en algunes cèl·lules (Figura 37H), tot i que el marcatge GUS ens va permetre localitzar millor el marcatge dels teixits que activaven l'expressió de l'*FHT*. Els resultats amb arrels transformades via *A. rhizogenes* estan d'acord amb els resultats amb les arrels transformades via *A. tumefaciens* ja que en aquestes últimes l'activació del promotor *FHT* també es va detectar en l'exodermis i l'endodermis (Boher et al., 2013). Així, es confirma que l'obtenció d'arrels transformades per *A. rhizogenes* pot ser útil per a l'estudi de promotors permetent-nos realitzar aquestes proves sense necessitat de regenerar una planta sencera i per tant, d'una manera més ràpida i menys costosa.

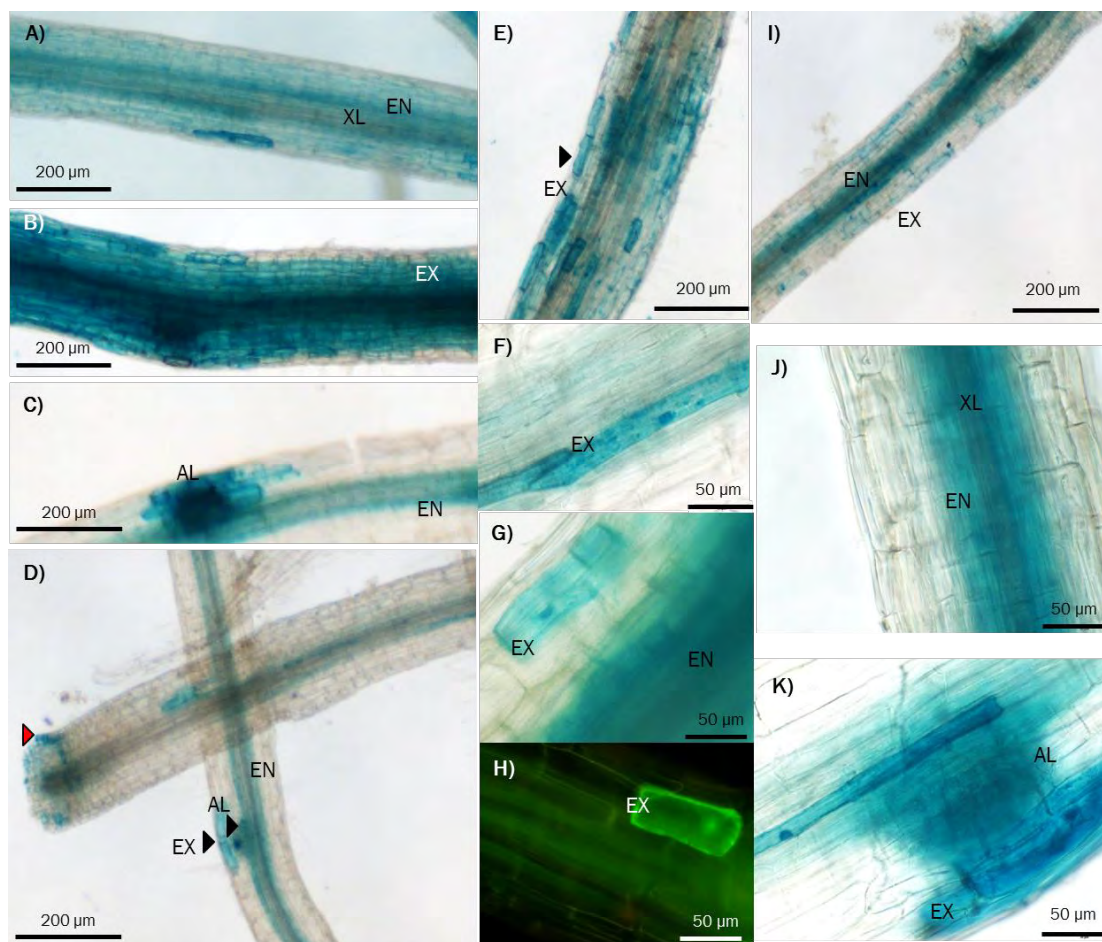


Figura 37. Expressió de GUS i GFP dirigida pel promotor de l'*FHT* en l'exodermis, l'endodermis i emergència d'arrels laterals en arrels transformades. A), B), C), D), E) i I) Visió general de les arrels transformades, escala 200µm; F) i G) Cèl·lules de l'exodermis amb marcatge GUS, escala 50µm; H) Cèl·lula de l'exodermis amb marcatge GFP, escala 50µm. J) Cèl·lules de l'endodermis amb marcatge GUS, escala 50µm i K) Emergència d'arrel lateral amb marcatge GUS. Endodermis (EN); Exodermis (EX); Xilema (XL); Arrel lateral (AL). La fletxa vermella indica zona de ferida, les fletxes negres indiquen detalls.

3.3.3-Transformació genètica a través d'*A. rhizogenes* per a l'estudi de gens candidats de la suberina

Una de les possibilitats de la generació d'arrels transformades mitjançant *A. rhizogenes* és la caracterització de gens candidats de la suberina a través del seu silenciament i posterior anàlisi fenotípic. Per tal de que aquesta estratègia sigui vàlida, la composició química de la suberina d'arrels peludes no ha de veure's alterada i per tant ha de ser comparable a la suberina de les arrels natives.

3.3.3.1-Anàlisi composicional de la suberina de les arrels transformades via *A. rhizogenes*

Inicialment es va estudiar la quantitat de material radicular necessari per a l'anàlisi químic de la suberina d'arrels transformades via *A. rhizogenes* i seguidament es va comprovar que la composició química de la suberina d'aquestes arrels no presentés alteracions rellevants. Per això es van obtenir arrels transformades via *A. rhizogenes* amb el vector binari utilitzat pel silenciament buit pK7GWIWG2-(II) Red-Root, les quals es van créixer i mantenir en cultiu líquid Gamborg B5 per tal de mimetitzar el procés que es duria a terme amb les arrels silenciades per gens candidats de la suberina. Una vegada obtinguda suficient biomassa, les arrels es van digerir amb la solució enzimàtica pectinasa – cel·lulasa (2 % v/v cadascuna) durant 5 dies a 60 rpm per digerir les cèl·lules amb paret primària no modificada i aïllar-ne aquelles amb paret suberificada o lignificada. L'observació al microscopi d'epifluorescència va permetre observar que s'havien degradat totes les cèl·lules excepte aquelles capes lignificades i/o suberitzades autofluorescents corresponents al xilema, a l'endodermis i l'exodermis (Figura 38), el que evidencia que la concentració d'enzims i la durada del tractament havien estat els adequats.

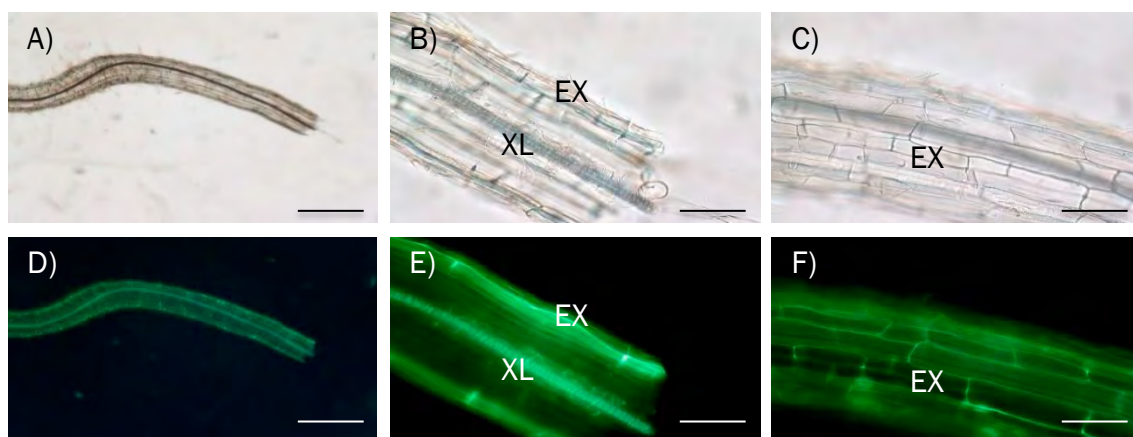


Figura 38. Resultat de la digestió amb pectinasa i cel·lulasa d'arrels transformades observat des del microscopi d'epifluorescència Olympus VANOX-T. (A;D) Visualització general en camp clar i amb el filtre d'UV; escala 0.5 mm (B;E) Cèl·lules de l'exodermis i el xilema en camp clar i amb el filtre d'UV; escala 0,2 mm. (C; F) Cèl·lules de l'exodermis en camp clar i amb el filtre UV; escala 0,2 mm. Exodermis (EX); Xilema (XL).

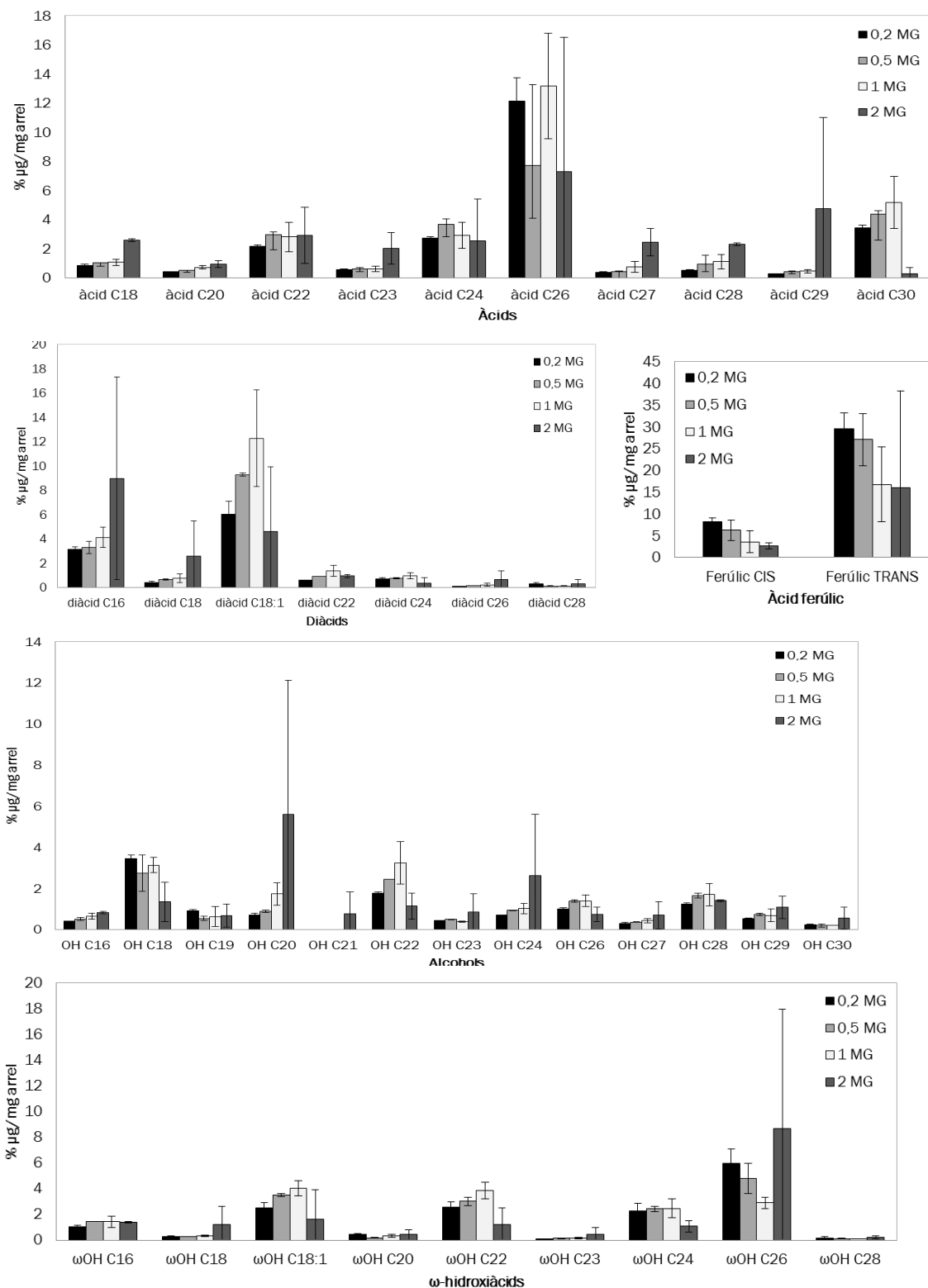


Figura 39. Efecte de les quantitats de teixit en el perfil lipídic de la suberina en les arrels. Es representa la mitjana i la desviació estàndard dels àcids (A), diàcids (B), ω-hidroxiàcids (C), alcohols (D) i àcids ferúlics (E). Es van fer servir arrels control transformades amb *A.rhizogenes* amb el vector binari utilitzat pel silenciament buit pK7GWIWG2-(II) Red-Root (n=2).

Per determinar la quantitat òptima d'arrels tractades amb cel·lulasa i pectinasa per a l'anàlisi de la suberina, es van analitzar varies quantitats de mostra seca (0,2 mg; 0,5 mg; 1 mg i 2 mg) per duplicat i es va extreure la suberina mitjançant el protocol establert. La composició química per cadascuna de les mostres que es van assajar es va representar segons el tipus de monòmer: àcids grassos (àcid), diàcids, alcohols primaris (OH), ω -hidroxiàcids (ω OH) i àcid ferúlic (Figura 39). Amb els resultats obtinguts no observem diferències molt grans entre les diferents quantitats d'aquests compostos, evidenciant que la mostra de partida pot variar de 0,2 a 2 mg per a l'anàlisi de la suberina. No obstant, es poden veure petites variacions en alguns compostos que poden venir donades per variacions entre mostres, com per exemple, el cas de l'àcid C18, l'àcid C23, l'àcid C28 que augmenten en el cas de la mostra de 2 mg de quantitat de teixit.

Per comprovar que la composició química de la suberina d'arrels transformades via *A. rhizogenes* no presentava alteracions rellevants aquesta es va comparar amb la d'arrels natives de patata crescudes en cultiu hidropònic. Es van utilitzar arrels en cultiu hidropònic ja que les arrels natives no transformades no creixien en medi líquid Gamborg B5. La comparativa entre cadascuna de les rèpliques d'arrels transformades amb el vector buit pK7GWIWG2_RedRoot_II (RRn.n) amb les arrels natives (DES) va permetre observar que existien diferències en la quantitat de 10 monòmers de la suberina (àcid C20, C23 i C30; diàcid C26; alcohol C26, C27, C28 i C30; i ω -hidroxiàcid C18 i C28) (test Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). Quan hi havia diferències entre les arrels natives (DES) i les RRn.n, es van marcar en el gràfic amb un asterisc (*) (test U-Mann Withney, $p < 0,05$) (Figura 40). Aquestes diferències en general s'observaven sobretot en compostos de cadena molt llarga i es donaven totes elles en 2 o 3 esdeveniments independents de transformació, pel que es poden considerar canvis robusts. Els canvis de composició en la suberina podrien deure's a que la inserció del T-DNA del plàsmid Ri en les arrels peludes afectaria el desenvolupament de determinades capes suberificades. No obstant, els canvis podrien deure's a les diferents condicions de cultiu d'arrels transformades i arrels natives, en medi líquid *in vitro* Gamborg B5 i en medi hidropònic Hoagland a la meitat d'astringència respectivament.

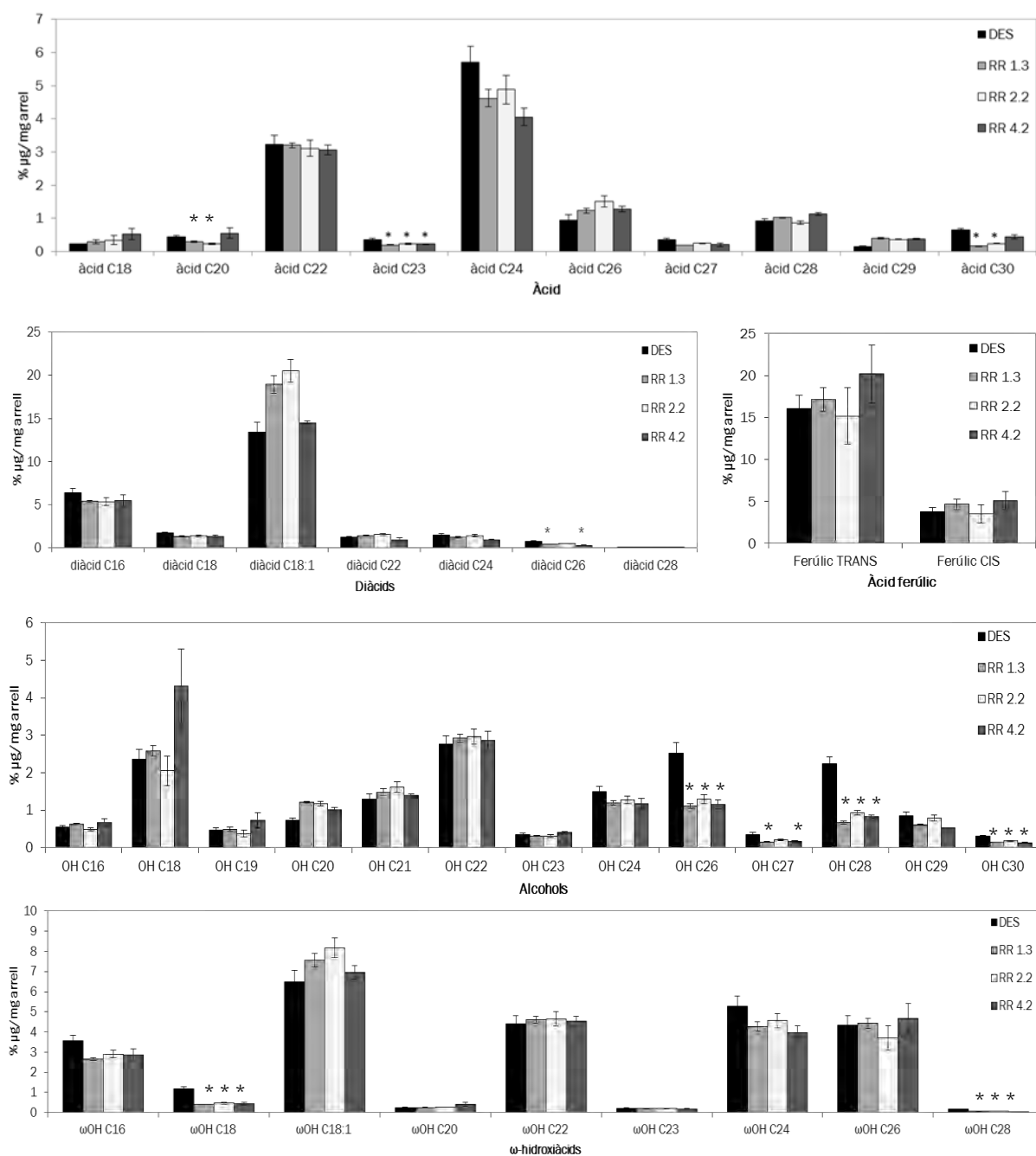


Figura 40. Comparativa d'arrels natives cultivades en hidropònic i d'arrels transformades amb *A.rhizogenes* i el vector buit pK7GWIWG2_RedRoot_II. Es representa la mitjana i la desviació estàndard dels ω-hidroxiàcids. Les diferències significatives s'indiquen amb asterisc ($p < 0.035$). DES (n=4); RR1.3 (n=3); RR2.2 (n=3); RR4.2 (n=3)

L'agrupació dels monòmers de suberina segons el tipus no resultava en cap diferència significativa entre arrels natives i peludes transformades (test Kruskal-Wallis $p > 0.05$) (Figura 41). En global doncs, la suberina de les arrels transformades via *A. rhizogenes* presenten diferències molt lleugeres en la quantitat de determinats monòmers puntuals que no es reflecteixen en canvis en la quantitat total dels diferents tipus de monòmers presents en la suberina de les arrels natives i peludes: àcids grassos, diàcids, ω -hidroxiàcids, alcohols primaris i àcid ferúlic. Aquestes lleugeres diferències en la composició química de la suberina de les arrels transformades no s'espera que comportin canvis d'organització estructural del polièster de suberina, el qual podria adoptar la mateixa estructura macromolecular. En conclusió, les arrels transformades via *A. rhizogenes* presenten una suberina comparable a la d'arrels natives.

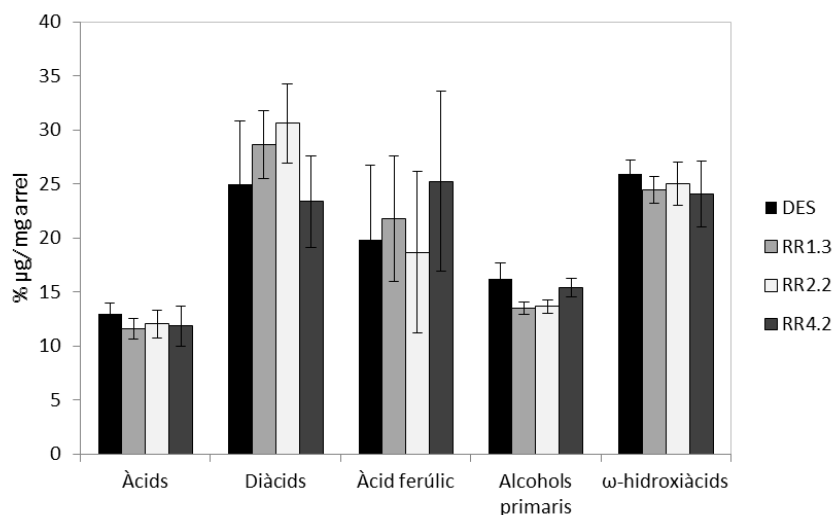


Figura 41. Efectes de la transformació d'arrels peludes en la composició de classe de substàncies de la suberina. Es mostra la composició per les arrels natives (DES) i de les arrels transformades (RR). DES (4 esdeveniments independents de transformació); RR (3 esdeveniments independents de transformació amb 3 rèpliques biològiques cadascuna).

3.3.3.2-Obtenció d'arrels amb gens candidats de la suberina silenciats

L'objectiu es centrava en aconseguir arrels silenciades per la *Lipid Transfer Protein StLTP1.3*, l'*Ethylene response factor StERF93* i un transportador ABCG, l'*StABCG20*, tots ells gens candidats a formar la suberina de patata i comentats en el – apartat 3.2. En paral·lel es va incloure el silenciament d'un gen ja conegut i treballat anteriorment al nostre laboratori, el *CYP86A33* (Serra et al., 2009b), codificant per una ω -hidroxilasa d'àcids grassos. En la pell del tubercle, el seu silenciament via *A. tumefaciens* resulta en la reducció del 60% dels monòmers ω -funcionals de la suberina, la pèrdua de l'estructura lamel·lar típica i una

alteració de la funció protectora (Serra et al., 2009b). En les arrels, la disminució dels monòmers ω -funcionals de la suberina resulta en la restricció de l'entrada a les arrels de Fe, Mn, Zn i Mg i en la sortida de K, reduint la biomassa adquirida per aquestes arrels (Company-Arumí, no publicat).

3.3.3.2.1-Obtenció d'arrels silenciades

Per obtenir arrels silenciades per *CYP86A33*, *StLTP1.3*, *StERF93* i *StABCG20* es va utilitzar el vector pK7GWIWG2-(II) Red-Root el qual en el seu T-DNA contenia la seqüència per permetre la transcripció del dsRNA (*hairpin* hpRNAi) específic per silenciar el gen diana, a part del marcador de fluorescència. En paral·lel es van obtenir línies control transformades amb el vector buit, les quals anomenarem línies *RedRoot* (RR). Es van obtenir 5 esdeveniments independents de transformació pel gen *CYP86A33*, 4 per la *StLTP1.3*, 3 pel *StABCG20*, 2 pel *StERF93* i 3 per les controls RR. Cadascun d'aquests esdeveniments independents de transformació contenen un mínim de dues rèpliques biològiques, excepte ERF2.3 que contenia una única rèplica biològica (Taula Suplementària 1). Les arrels es van propagar en medi líquid Gamborg B5 per obtenir suficient material per analitzar el silenciament gènic.

L'anàlisi del silenciament gènic es va realitzar mitjançant RT-qPCR usant com a gen constitutiu de referència el gen *APRT* (*adenine phosphoribosyl transferase*). Per tots els gens es van identificar línies silenciades mitjançant el test U-Mann Withney (Figura 42). Per *CYP86A33*, les línies silenciades van resultar ser les CYP1.3, CYP2.2 i CYP5.2, les quals tenien un nivell d'expressió de *CYP86A33* més baix respecte a les línies control RR ($p < 0,01$) (Figura 42A i B). Per *StERF93*, ERF1.2 presentava nivells d'expressió més baixos que les línies control RR ($p < 0,03$) (Figura 42C i D). En el cas de l'*StABCG20*, les arrels ABCG3.2 i ABCG4.2 estaven silenciades ($p < 0,01$) però la línia ABCG2.2 no, tot i que disminuïa l'expressió a la meitat de la línia control RR (Figura 42E i F). Pel que fa al gen *StLTP1.3*, les línies LTP1.1, LTP1.2 i LTP3.2 estaven silenciades ($p < 0,03$) i presentaven nivells d'expressió de transcrit molt baixos. Cal dir que les línies controls no van resultar ser estadísticament diferents en quant a l'expressió del gen ($p > 0,05$) (Figura 42G i H).

Així doncs, en general es pot concloure que el protocol establert i l'ús del vector pK7GWIWG2-(II) Red-Root ha permès obtenir un 65% d'eficiència en l'obtenció d'arrels silenciades via *A. rhizogenes*, les quals expressen el hpRNA i indueixen eficaçment el silenciament gènic post-transcripcional.

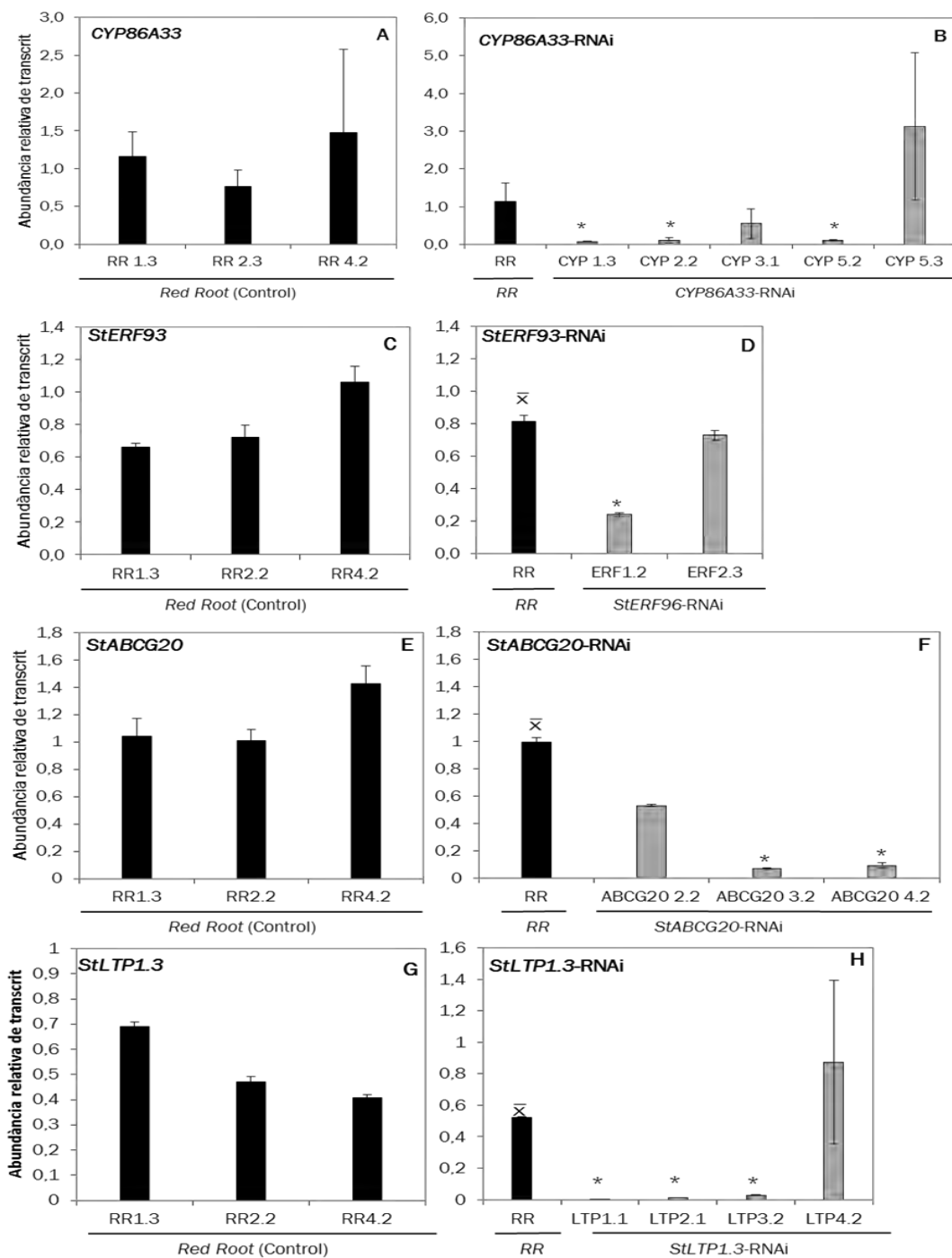


Figura 42. Representació de l'abundància relativa de transcrit pel gens *CYP86A33*, *StERF93*, *StABCG20* i *StLTP1.3* en les arrels natives anomenades *Red Root* i en les arrels peludes silenciades. A), C), E) i G) representen l'abundància relativa de transcrit de les 3 línies control transformades amb el vector de destí buit pK7GWIWG2-II) *Red Root* (RR). B), D), F) i H) representen l'acumulació de transcrit diana del silenciament en cadascuna de les respectives línies de silenciament respecte al control RR (representat amb mitjana). Cada línia conté un mínim de dues rèpliques biològiques. Es marquen amb asterisc aquelles línies que són significativament diferents. *CYP86A33* $p < 0,01$; *StERF93* $p < 0,03$; *StABCG20* $p < 0,01$; *StLTP1.3* $p < 0,03$.

3.4-El transcriptoma del fellema durant el creixement estacional

3.4.1-Següenciació, assemblatge i anotació del transcriptoma de fellema

El desenvolupament del suro al llarg de l'estació de creixement no s'ha estudiat mai a gran escala. Sí però que l'activitat del fellema de surera (*Quercus suber*) o suro s'ha analitzat en moments puntuals del desenvolupament aplicant tècniques d'alt rendiment com la proteòmica (Ricardo et al., 2011), els microarrays de cDNA (Soler et al., 2007) i l'RNAseq a través de la plataforma Roche 454 (Teixeira et al., 2014; Teixeira et al., 2017; Boher et al., 2017). No obstant, aquestes tècniques rarament s'han aplicat de manera quantitativa. En aquest treball es va utilitzar una tecnologia de seqüenciació massiva que permetia una profunditat de lectures molt elevada, la tecnologia Illumina, la qual oferia la sensibilitat per obtenir dades quantitatives del transcriptoma i per identificar gens de menor expressió. Aquesta tecnologia es va aplicar per seqüenciar mostres d'RNA de fellema de surera que provenien d'arbres d'edat similar i que es van recollir durant els períodes d'abril, juny i juliol. Per cada mes, abril, juny i juliol, es van analitzar 3, 3 i 4 rèpliques biològiques, respectivament. Per a cadascuna de les rèpliques es va extreure l'RNA i seguidament es va construir i seqüenciar les llibreries de cDNA. El valor mig de les lectures netes obtingudes en totes les llibreries va ser de 45.506.813 (Taula Suplementària 2) essent el valor màxim de 65.158.221 (llibreria de juliol_2) i el valor mínim de 32.722.316 (llibreria de juny_3). Les lectures de les 11 llibreries es van assemblar *de novo* generant un genoma de referència de fellema de 404.970 contigs amb llargades que variaven entre els 200 pb i els 17.000 bp, amb una mitjana de 609 pb i una N50 de 853 pb. L'alt percentatge de lectures mapejades, encara que variava en funció de la llibreria entre un 84% i 95%, reflectia la bona qualitat de l'assemblatge (Taula Suplementària 2). El transcriptoma de fellema es va anotar a través de la base de dades UniProt mitjançant un BlastP (E-value $<10^{-5}$) generant 58.564 contigs anotats, amb la base de dades TAIR mitjançant un BlastX (E-value $<10^{-5}$) generant 182.671 contigs i amb una base de dades de suro generada al nostre laboratori (Boher et al., 2017) mitjançant un BlastN (E-value $<10^{-5}$) amb un total de 108.859 contigs anotats. A més, els contigs anotats es van classificar en *Gene Ontologies* (GO) generant 22.178 contigs assignats a GOs (Taula Suplementària 3).

3.4.2-Validació RT-qPCR

Per tal de validar els resultats obtinguts amb RNAseq, l'abundància relativa de varis gens es va comparar amb valors obtinguts amb les mateixes mostres mitjançant RT-qPCR (Soler et al., 2008; Boher et al., 2017). Aquests gens són representatius de diverses categories funcionals: metabolisme de carbohidrats (SUS4), síntesi d'àcids grassos *de novo* (PDH-E1 α ,

WRI1, FATB), paret cel·lular (EXP8), metabolisme d'hormones (BRL3, PIN3, GID1B), mort cel·lular (BI1), regulació de meristema (ETR2, DWF1, HK3, STM, WOXA, HB-8), factors de transcripció (WRKY43, NAC058), proteïnes MADS-box (AGL25/FLC, AGL20/SOC1, AGL7/AP1), síntesi de suberina (HCBT, CYP86A1, GPAT5), metabolisme secundari (BAN, Bas, F5H) i estrès (HSP17.4, ANN, APX2). Els noms complets dels gens i els valors de Log2Ratio per RNAseq i RT-qPCR es mostren a la Taula Suplementària 4.

Per comprovar si els resultats d'RNAseq correlacionaven amb els de RT-qPCR, per tots els gens analitzats es van fer comparacions directes entre mesos (juny/abril, juliol/abril i juny/juliol) amb posterior anàlisi de correlació de Pearson (Figura 43). Els resultats estadístics van indicar una correlació significativa ($p < 0,001$) en les tres comparatives, validant així els resultats de l'RNAseq. Cal remarcar que en la comparativa juny/juliol els valors de Log2Ratio obtinguts es trobaven en el rang de $[-1, 1]$ mentre que en la resta de comparatives era més elevat $[-3, 3,5]$ evidenciant una major similitud d'expressió d'aquests gens entre juny i juliol.

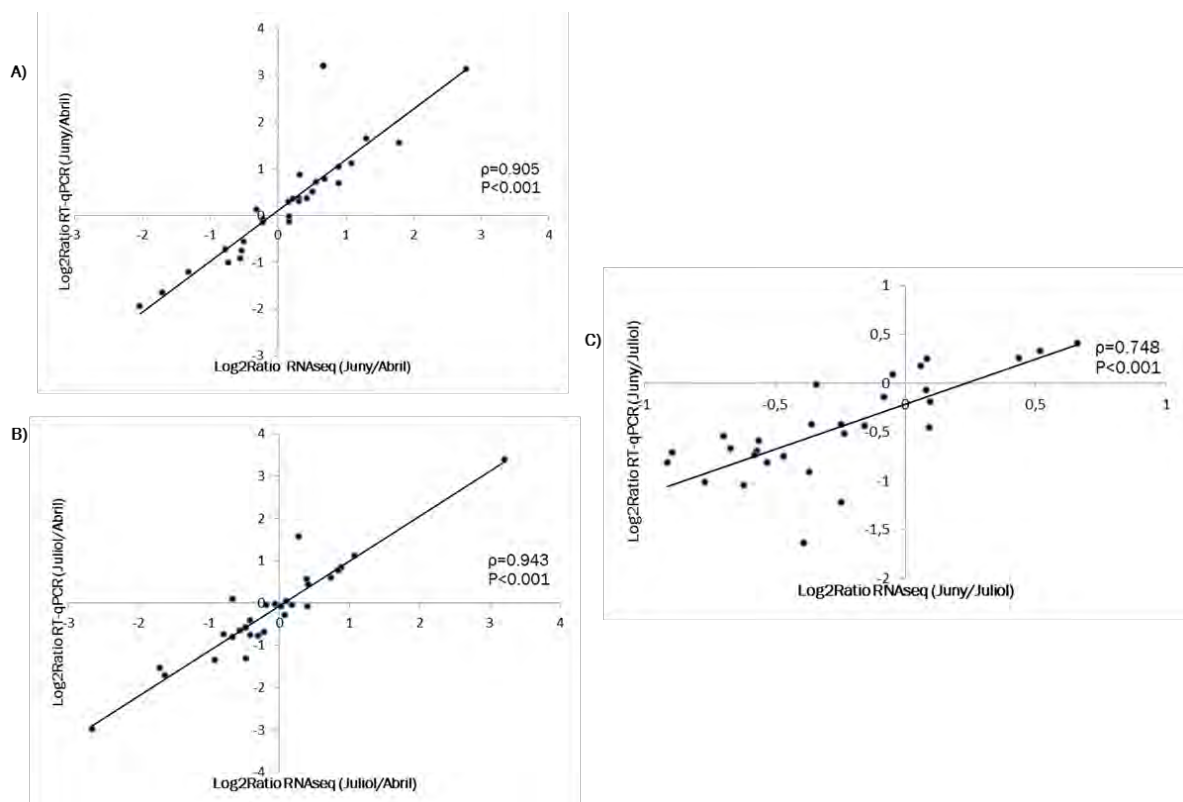


Figura 43. Correlació entre dades del Log2Ratio obtingut en els experiments de RT-qPCR i RNAseq. Es representa la regressió lineal amb la correlació de Pearson (ρ). (A) Quocient entre els mesos de Juny/Abri. (B) Quocient entre els mesos de de Juliol/Abri. (C) Quocient entre els mesos de Juny/Juliol.

La comparativa del patró d'expressió individual de cadascun dels gens al llarg dels mesos segons RT-qPCR i RNAseq es mostra a la Figura Suplementària 15.

3.4.3-Nous gens candidats en la formació de la suberina

Donat que la biosíntesis de la suberina és un factor clau en la diferenciació del fel·lema i la formació del suro i que actualment hi ha un bon coneixement dels gens implicats en aquesta via biosintètica a *Arabidopsis* es va analitzar el comportament d'aquests gens en els tres punts de l'estació de creixement estudiats. Mitjançant l'anotació disponible a la base de dades TAIR i la base de dades Aralip (<http://aralip.plantbiology.msu.edu/pathways/pathways>), es van identificar i classificar els possibles ortòlegs dels gens implicats amb l'acumulació de suberina i ceres en base a Aralip i/o literatura contrastada recent (Taula Suplementària 5) (Figura 44). En aquesta mateixa figura (Figura 44) també es van incloure gens que es troben *upstream* de la via biosintètica de la suberina, que estan implicats en la síntesi *de novo* d'àcids grassos a plastidis, en base a les dades d'Aralip. Per altra banda la resta de gens presents a la llibreria, que també es trobaven a la base de dades d'Aralip i que per tant s'havien relacionat amb processos lipídics en els vegetals, es van classificar per tenir una funció putativa en la biosíntesi de suberina i ceres associades a la suberina (Taula Suplementària 6) (Figura 45). Específicament, a les Figures 44 i 45 es mostren les diferents etapes per la deposició de suberina i ceres a la paret cel·lular. Per cada gen es mostra el nivell d'expressió relatiu en els tres mesos per poder avaluar-ne el patró d'expressió, on l'expressió màxima es mostra en blau i la mínima en groc. Per valorar el grau d'expressió del gen es mostra també l'expressió absoluta total dels tres mesos en FPKMs.

La síntesi d'àcids grassos es produeix al plastidi de les cèl·lules vegetals donant lloc a cadenes hidrocarbonades de 16 i 18 carbonis (16:0, 18:0 i 18:1), les quals poden ser exportades i modificades posteriorment al reticle endoplasmàtic mitjançant enzims que participen en la biosíntesi de suberina i ceres. L'elongació dels àcids grassos a VLCFA (> 18C) té lloc mitjançant el complex d'elongació d'àcids grassos (FAE), del qual es van identificar 4 gens en l'RNAseq: la *β -Keotacyl-CoA synthase 20 (KCS20)*, la *β -Keotacyl-CoA synthase 1 (KCS1)*, la *β -Keotacyl-CoA synthase 2 (KCS2)* i la *β -Keotacyl-CoA synthase 6 (KCS6)*. S'ha demostrat que el gen *KCS20* (Lee et al., 2009) i *KCS2* (Franke et al., 2009; Lee et al., 2009) estan implicats en la formació de cadenes >C20 de la suberina, ja que els mutants presenten una reducció en la càrrega de suberina. El gen *KCS1* sintetitza àcids grassos de cadena llarga i α,ω -diàcids, monòmers característics de la suberina, pel que es va suggerir com a gen biosintètic de la formació d'aquest polímer (Todd et al., 1999). El gen *KCS6* és molt homòleg a *StKCS6* (Serra et al., 2009a), aquest últim responsable de l'elongació d'àcids grassos majors de C26 de la suberina i ceres a patata. Durant el mes de juny es va produir una major inducció dels gens *KCS20* i *KCS1*, que presentaven alta expressió (> 1.000 FPKMs) durant l'estació, i de *KCS6*,

de baixa expressió ($<1,5$ FPKMs) (Figura 44). Aquest fet posa de manifest que el complex FAE és més actiu durant el mes de juny. No obstant, el pic d'expressió a l'abril de *KCS2*, de baixa expressió (~ 50 FPKMs), podria indicar que durant aquest mes la biosíntesi de la suberina ja és activa i que en funció de l'estacionalitat s'activa un o altre enzim.

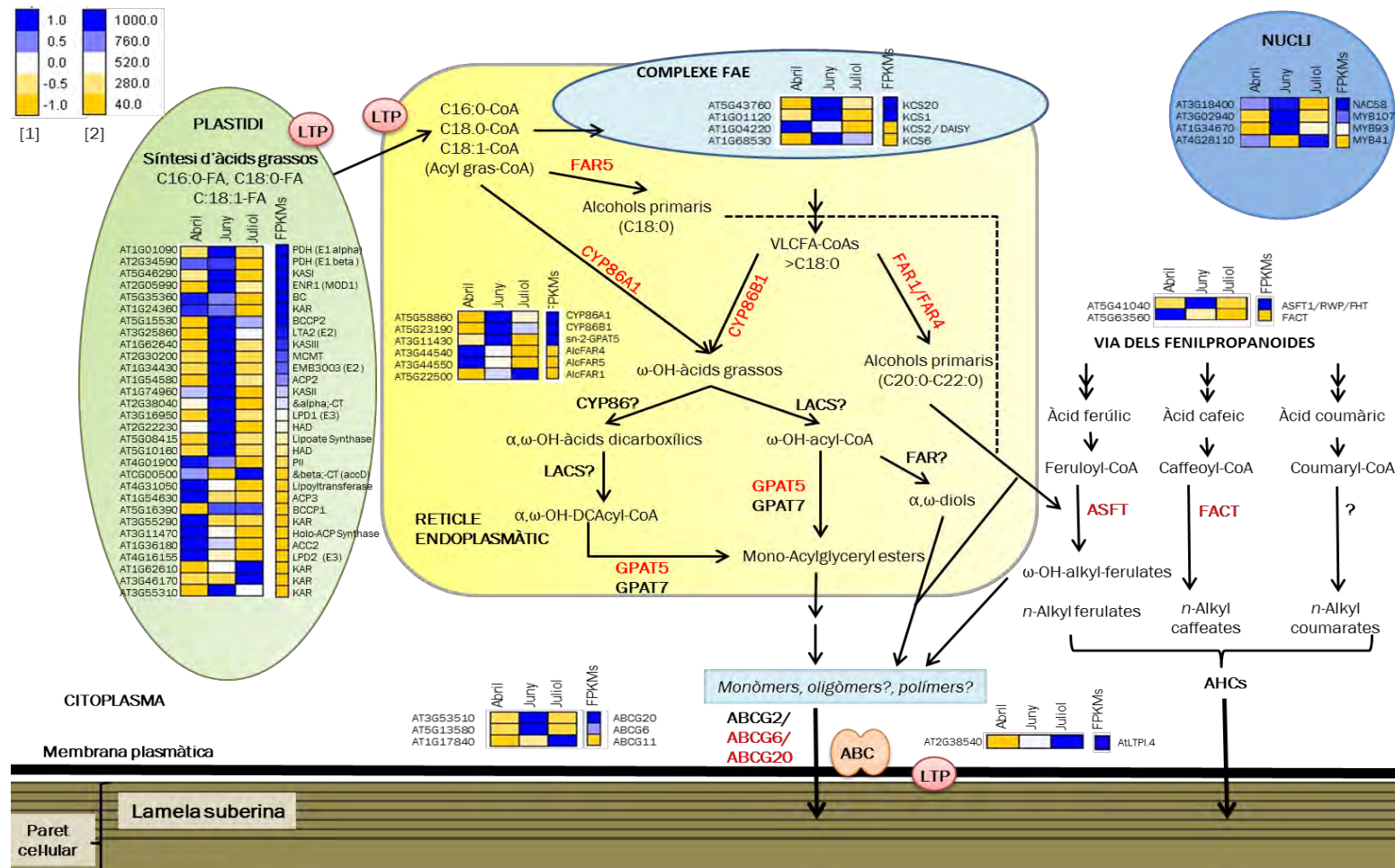


Figura 44. Representació de gens implicats en la síntesi *de novo* d'àcids grassos a plastidis, en la biosíntesi de la suberina i el seu export a la paret cel·lular, els quals corresponen als possibles ortòlegs d'*Arabidopsis* identificats en l'RNAseq de surera. Per cada gen es mostra l'expressió relativa al llarg de l'estació (abril, juny i juliol) i l'expressió total expressada en FPKMs per evidenciar si són gens d'alta o baixa expressió. El blau representa alts nivells d'expressió i el color groc baixos nivells d'expressió. En les rutes biosintètiques es marquen en vermell els gens que es van identificar en l'RNAseq amb una funció demostrada. [1] Nivells d'expressió dels diferents mesos; [2] Nivells d'FPKM totals.

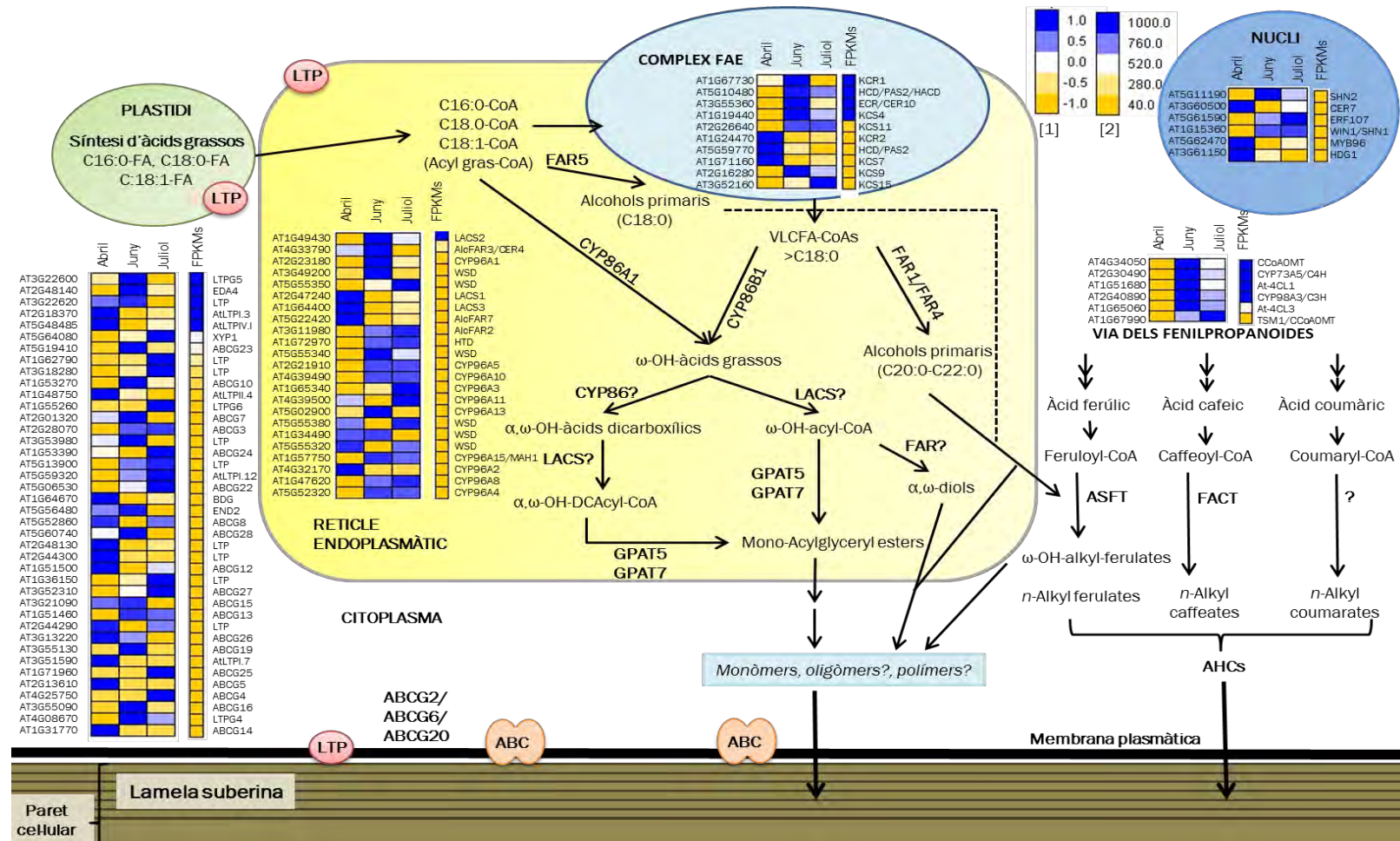


Figura 45. Representació de la via biosintètica de la suberina i el seu export a la paret cel·lular on es mostra una proposta d'agrupacions de gens candidats identificats en l'RNAseq, en base als seus possibles ortòlegs d'Arabidopsis. Per cada gen es mostra l'expressió relativa al llarg de l'estació (abril, juny i juliol) i l'expressió total expressada en FPKMs per evidenciar si són gens d'alta o baixa expressió. El color blau representa alts nivells d'expressió i el color groc baixos nivells d'expressió. [1] Nivells d'expressió dels diferents mesos; [2] Nivells d'FPKMs totals.

Un cop sintetitzats els àcids grassos de cadena molt llarga (VLCFAs) aquests es modifiquen: els alcohols primaris i α,ω -diols s'obtenen a través de l'acció de reductases d'àcids grassos (FARs); ω -hidroxiàcids (ω -OHs) i àcids α,ω -dicarboxílics (DCAs) s'obtenen a través de l'oxidació per enzims citocroms P450 (família CYP86); i la unió per enllaç èster del glicerol als ω -OHs i DCAs produint monoacilglicerols ve determinada per les glicerol 3-fosfat acetiltransferases (GPATs). Cal remarcar que l'ordre d'aquestes reaccions encara no és clara (Pollard et al., 2008). En l'RNAseq es van identificar contigs ortòlegs als gens *FAR4* i *FAR5*, d'expressió baixa (~100 FPKMs i 2 FPKMs), que s'expressaven més durant el mes d'abril mentre que *FAR1*, amb expressió total pràcticament nul·la (<1 FPKMs), s'indueïa al mes de juliol (Figura 44). Els contigs ortòlegs a *CYP86A1*, *CYP86B1* i *GPAT5*, corresponien a gens d'expressió elevada (>5.000 FPKMs) amb un pic d'expressió al juny, tot i que també tenien nivells d'expressió elevats durant la resta de mesos. Es coneix que la mutació de *CYP86A1* redueix fortament els nivells de C16, C18 i C18:1 ω -OHs i α,ω -DCAs (Höfer et al., 2008; Li et al., 2007) i el seu ortòleg a patata presenta efecte principalment en C18:1 ω -OHs i α,ω -DCAs i una alteració molt evident en la lamel·la de suberina (Serra et al., 2009b). En canvi *CYP86B1* afecta a C22 i C24 ω -OHs i α,ω -DCAs (Compagnon et al., 2009; Molina et al., 2009). La *GPAT5* en canvi, redueix ω -hidroxiàcids i α,ω -DCAs (Beisson et al., 2007; Li et al., 2007; Yang et al., 2010). El *FAR4* (~113 FPKMs) i el *FAR5* (~2 FPKMs), redueixen els alcohols de C20 i C18 respectivament, mentre que el *FAR1* (<1 FPKMs), redueix els alcohols C22 (Domergue et al., 2010; Vishwanath et al., 2013). Amb aquests resultats es pot deduir que la via de reducció dels àcids grassos és la primera en activar-se durant el mes d'abril, mentre que posteriorment, durant el mes de juny, quan el creixement és més acusat, s'activa la via de l'oxidació mitjançant els CYPs. Això però, no implica que durant el mes d'abril no tingui lloc aquesta oxidació, sinó que no és tant acusada.

Al citoplasma té lloc la producció dels *alkyl hydroxycinnamates* (AHCs) a través de l'esterificació d'un fenilpropanoid (àcid ferúlic, àcid cafeic o àcid coumàric) amb alcohols d'àcids grassos mitjançant aciltransferases que s'han implicat en la formació de suberina i ceres (Li-beisson et al., 2010). En l'RNAseq es van identificar de la via dels fenilpropanoids (Figura 44) contigs ortòlegs del gens *Aliphatic Suberin Feruloyl Transferase* (*ASFT*), amb elevats nivells d'expressió totals >9.000 FPKMs i expressió màxima al juny, mentre que pel contrari, es van veure *Fatty Alcohol:Caffeoyl-CoA Transferase* (*FACT*) amb baixos nivells d'expressió totals (30 FPKMs) i expressió màxima a l'abril. La mutació en el gen *ASFT* provoca una baixada dels èsters de ferúlic en la suberina alifàtica i les ceres (Gou et al., 2009; Molina et al., 2009; Serra et al., 2010), mentre que la del gen *FACT* disminueix els èsters de cafeic de C18-C22 de les ceres

associades a la suberina (Kosma et al., 2012). Novament trobem que hi ha vies que s'activen més aviat, com la de l'àcid cafeic, mentre que d'altres la seva major activació ve donada més tardanament com la via de l'àcid ferúlic.

Pel que fa al transport dels monòmers de suberina a l'apoplast, una de les hipòtesis més acceptades és que es doni via membrana plasmàtica a través dels transportadors ABC (*ATP-binding-cassette*). En l'RNAseq es van identificar tres ABCGs implicats en el transport de suberina: l'*ABCG20* i l'*ABCG6*, ambdós altament expressats amb ~4.000 i ~700 FPKMs respectivament, i amb una expressió més elevada al juny, i l'*ABCG11* d'expressió més discreta i amb la inducció màxima al juliol. Els transportadors *ABCG6* i *ABCG20* quan estan mutats produeixen una lamel·la de suberina alterada i tenen afectada la permeabilitat, que és més gran (Yadav et al., 2014). En el cas del *ABCG11* s'ha demostrat que la seva alteració produeix disminució de l'alcohol C18 i del ω -OH i diàcid C16 i C18:1 de la suberina (Panikashvili et al., 2010). A més, es va identificar també una nsLTP coneguda de suberina (AtLTPI.4) d'alta expressió (>3.000 FPKMs) que s'expressava de manera abundant durant el mes de juliol (> 1.000 FPKMs), però que contenia una expressió mitjana durant el mes de juny.

De cara als reguladors, es va identificar el gen *MYB41* que tot i que s'expressa de manera més elevada al juliol, té uns nivells d'expressió totals pràcticament nuls (<1 FPKMs). Aquest gen que inicialment es va relacionar amb l'estrès abiòtic i la formació de la cutícula (Cominelli et al., 2008), es va veure que la seva sobreexpressió provocava acumulació ectòpica de suberina en fulles i inducció de gens biosintètics de suberina (Kosma et al., 2014). A més, es va trobar a *posteriori* d'altres reguladors que no es trobaven dins l'Aralip, ja que s'han descobert recentment, com és el cas del *MYB107* (Lashbrooke et al., 2016) i del *MYB93* (Legay et al., 2016), ambdós implicats en la deposició de la suberina i el *NAC58*, ortòleg de l'*StNAC103* de patata que recentment s'ha descrit com a un repressor de la síntesi de suberina (Verdaguer et al., 2016). Es va observar que aquests tres factors de transcripció tenien bons nivells d'expressió i contenien un pic d'expressió durant el mes de juny.

La síntesi de la suberina i les ceres associades és difícil de separar degut a que ambdós, polièster i extractius, estan formats per compostos molt semblants pel que comparteixen vies biosintètiques i enzims. No obstant, la suberina presenta ω -OHs i α - ω -DCAs no presents a les ceres (Pollard et al., 2008). Aquests monòmers contenen grups funcionals als dos extrems de la cadena hidrocarbonada, els quals probablement siguin molt reactius per formar ràpidament enllaços èster amb glicerol (via GPATs) o àcid ferúlic (via ASFT) per poder ser incorporats a la suberina. Aquests gens, propis de la biosíntesi de la suberina, són altament

expressats i tenen pic d'inducció al juny, indicant que és durant aquest mes quan la síntesi d'aquest polièster és superior probablement perquè és quan es donen les condicions de temperatura i humitat òptimes pel creixement, coincidint amb el període en el qual es sol pelar el suro. Interessant és l'observació que tots els contigs identificats amb expressió superior a 1.000 FPKMs, considerats d'alta expressió, presenten el pic d'expressió també al juny pel que aquestes dues característiques pensem que podrien ser de vàlua per identificar nous gens candidats de la suberina. És per això que del conjunt de gens que s'han relacionat amb la síntesi de lípids diferent de la suberina i ceres (Figura 45) es destaquen principalment aquells que presenten aquestes dues característiques.

Pel que fa al complex FAE, es van identificar diverses KCR i KCS involucrades en l'elongació d'àcids grassos. Els gens que eren més expressats (>1.000 FPKMs) corresponien a la *KCR1*, *PAS2* (amb activitat acil-CoA dehidratasa) i *ECR* (*CER19*, enoyl-CoA reductasa) amb un pic d'expressió al juny, i que recentment s'han relacionat amb la biosíntesi de ceres en *Arabidopsis* (Park et al., 2016). Per altra banda, en el cas de la biosíntesi de la suberina alifàtica que té lloc al reticle endoplasmàtic, es van identificar varis gens de la família CYP, WSD, FAR i LACS, però cal destacar que la proteïna que més s'expressava era la *LACS2* (>8.000 FPKMs), amb un pic màxim d'expressió al juny, que catalitza la formació dels intermediaris *ω -OH-CoA* de cadena llarga i està relacionada amb la biosíntesi de cutina (Schnurr et al., 2004). També es va identificar, tot i que en menor quantitat una *FAR3* (>300 FPKMs) amb un pic d'expressió al juny, relacionada amb la síntesi de ceres (Busta & Jetter, 2017; Lee & Suh, 2015) i cutina (Yang et al., 2017). En la via dels fenilpropanoids que té lloc al citoplasma, observem que la majoria de gens que es van identificar s'expressaven durant el mes de juny i que 4 d'ells tenien expressions totals molt altes (>1.000 FPKMs). Entre ells trobem, *CCoAOMT*, *C4H*, *4CL1* i *C3H* involucrats en la síntesi de lignina en *Arabidopsis* (Meyermans et al., 2000; Sundin et al., 2014; Vanholme et al., 2013). Pel que respecta al transport que té lloc al citoplasma i/o membrana plasmàtica, podem observar que bàsicament els gens implicats formen part de la família dels ABCGs o de les nsLTPs. En capítols anteriors (apartat 3.2.2 i 3.2.3), ja es parla d'aquestes dues famílies per explicar el transport dels monòmers de suberina. Entre els gens d'elevada expressió (> 1.000 FPKMs) es va identificar la *nsLTP1.3* que s'expressava molt durant el mes d'abril i que justament és un dels gens candidats proposat (apartat 3.2.2) per al transport de monòmers de suberina. Dins de la família dels ABCGs, podem observar que *ABCG23* i *ABCG10*, que tenen uns nivells d'expressió més baixos (< 1.000 FPKMs), s'expressen molt durant el mes de juny. Aquests dos gens, també s'han proposat durant l'apartat 3.2, com a possibles gens candidats

per al transport de monòmers de suberina. Pel que fa a la regulació, es van identificar varis factors de transcripció: *SHN2* té una major expressió al juny i és el factor de transcripció amb els nivells d'expressió més elevats (~20 FPKMs) i *SHN1* amb expressió al juny, però amb menor quantitat (9 FPKMs). Aquests gens, fins ara s'han relacionat amb la síntesi i acumulació de ceres en *Arabidopsis* (Aharoni et al., 2004; Broun et al., 2004), però també s'ha observat que *SHN1* està involucrat en la síntesi de ceres en arròs (Wang et al., 2012) i en tomàquet (Al-Abdallat et al., 2014). També es va identificar *CER7* que s'expressava més durant el mes d'abril, actuant com a regulador d'un gen biosintètic clau de ceres cuticulars *CER3/WAX2/YRE* a través de la degradació del mRNA que correspon al seu repressor (Hooker et al., 2007). Per últim, es coneix que el factor de transcripció *MYB96* regula la biosíntesi de les ceres cuticulars en *Arabidopsis* sota condicions d'estrès (Seo et al., 2011). *MYB96* presentava uns nivells d'expressió molts baixos (< 1 FPKM) i s'expressava més durant el mes d'abril.

3.4.4-Anàlisi de l'expressió diferencial

L'agrupament jeràrquic de les mostres (Figura 46A) es va generar usant la correlació de Pearson i a través del programa MeV (Saeed et al., 2003). Les rèpliques biològiques de cada mes (abril, juny i juliol) s'agrupaven entre elles evidenciant la replicabilitat i similitud entre els seus transcriptomes. A nivell superior, les mostres de juny i juliol també es van agrupar posant de manifest la major similitud dels transcriptomes d'aquests dos mesos respecte a abril.

El paquet estadístic DESeq2 es va utilitzar per identificar els contigs diferencialment expressats (DE) entre mostres. Vam utilitzar només aquells contigs que tenien un *fold change* > 2 i posteriorment vàrem filtrar les mostres amb un FDR (*False Discovery Rate*) < 0,05 (nombre de contigs finals obtinguts). Abril i juny presentaven 3.537 contigs DE, abril i juliol 5.754, i juny i juliol 48. Així, mentre els transcriptomes d'abril i juliol eren els més diferents degut probablement a unes majors diferències en les condicions climàtiques, els de juny i juliol eren els més semblants, probablement també per les mateixes causes. L'expressió específica dels contigs diferencials en els diferents mesos es mostra en el diagrama de Venn (Figura 46B) (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>). Dels 8.103 contigs DE, un 99,7% corresponien a gens específics del mes d'abril (5.738 gens específics/5.755 gens totals al mes d'abril), mentre que només un 62,9% dels gens eren específics durant el més de juny (877 gens específics/1394 gens totals al mes de juny) i un 64,9% durant el mes de juliol (961 gens específics/1481 gens totals al mes de juliol). Es pot observar també que durant el mes de juny hi ha un 36,6% dels gens que estan compartits amb el mes de juliol (510 gens

compartits (juny/juliol)/1394 gens totals juny), mentre que un 34,4% dels gens de juliol són compartits amb el mes de juny (510 gens compartits (juny/juliol)/1481 gens totals juliol). Aquests resultats reafirmen la major similitud de transcriptomes entre els mesos de juny i juliol i la seva discrepància amb el mes d'abril.

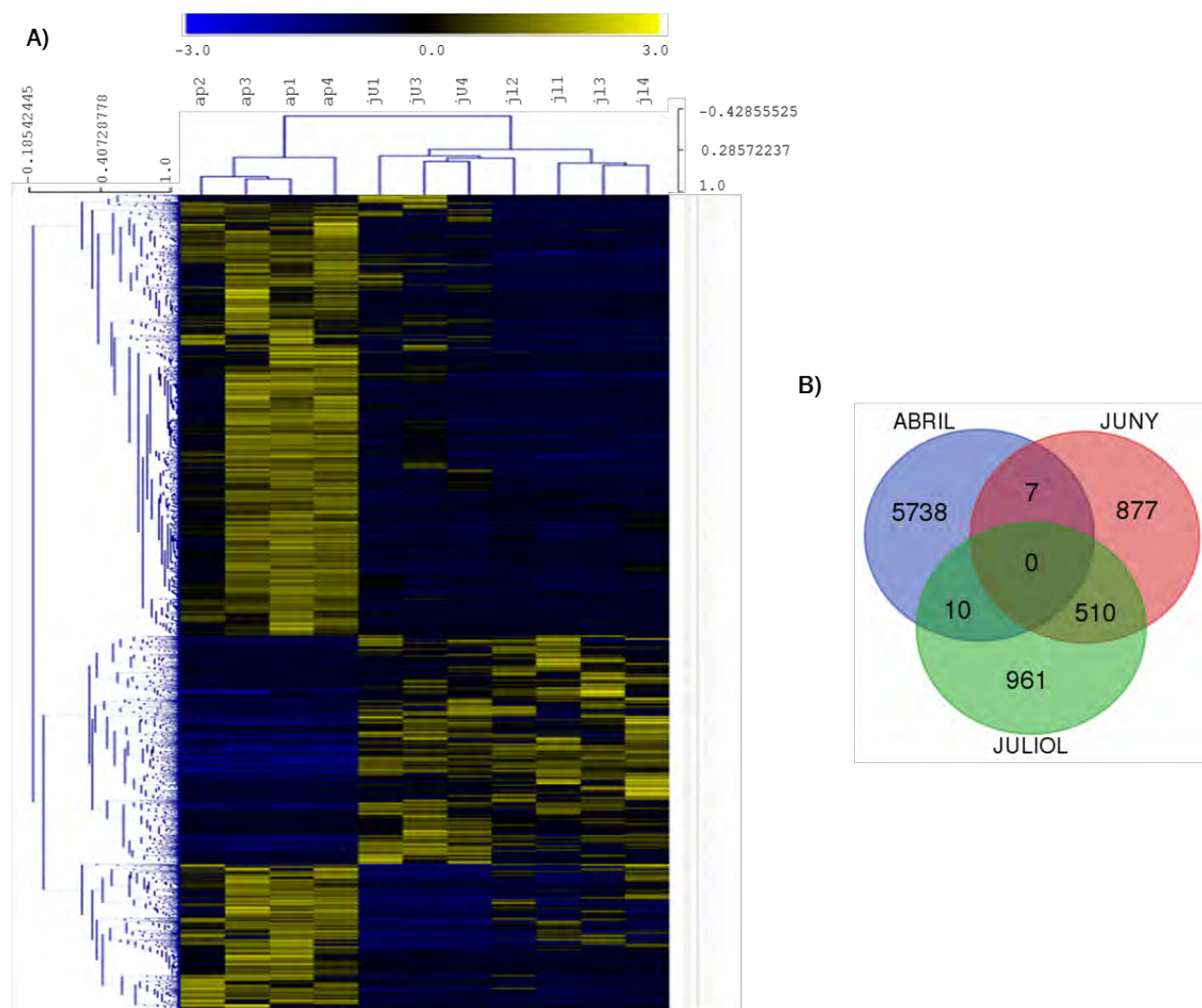


Figura 46. Anàlisi de l'expressió diferencial de les mostres per mesos. (A) Agrupament jeràrquic de les dades d'expressió gènica dels diferents contigs en les mostres d'abril, juny i juliol mitjançant el programa MeV amb correlació de Pearson ($-2 \leq FC \leq 2$, $p < 0.05$); (B) Es mostra un diagrama de Venn que representa el solapament entre contigs en els diferents mesos.

3.4.4.1-Visualització dels processos diferencialment expressats mitjançant MapMan

Els contigs diferencials ($q_value < 0.05$) entre mesos (abril/juny; abril/juliol; juny/juliol) es van mapejar amb les categories funcionals del MapMan ('bins') que cobreixen una gran varietat de rutes bioquímiques i reguladores, les quals permeten tenir una visió general de la comparativa. Les categories funcionals ('bins') que van presentar un major nombre de gens diferencials en les comparatives abril/juny i abril/juliol van ser estrès, RNA, metabolisme secundari, metabolisme d'hormones i senyalització (Taula 17). La categoria més abundant a totes les comparatives va ser l'estrès, essent més representada en la comparativa abril/juliol (1,68 vegades més representat al juliol que al juny). El metabolisme secundari i l'RNA van ser 2 i 1,43 vegades més abundants a la comparativa abril/juliol, respectivament.

Cal destacar que durant la comparativa abril/juliol, els gens diferencials relacionats amb síntesi de paret cel·lular i desenvolupament són 6.75 i 5 vegades més abundants que a la comparativa abril/juny respectivament, encara que desenvolupament és una categoria poc representada.

Taula 17. Nombre de contigs diferencialment expressats en las categories funcionals (bins) en el MapMan. Es representa el quocient entre la comparativa (abril/juliol) / (abril/juny).

Codi	Nom Bin	Abril/Juny	Abril/Juliol	Juny/Juliol	Ratio
3	metabolisme menor CHO	12	4	-	0,33
10	paret cel·lular	8	54	-	6,75
11	metabolisme lipídic	8	9	-	1,12
16	metabolisme secundari	54	109	-	2,01
17	metabolisme d'hormones	58	36	-	0,62
20	estrès	167	281	10	1,68
21	redox	12	9	-	0,75
26	miscel·lània	6	3	-	0,5
27	RNA	73	105	-	1,43
28	DNA	7	5	-	0,71
29	proteïna	.*	65	-	650
30	senyalització	76	75	-	0,98
31	cèl·lula	1	4	-	4
33	desenvolupament	2	10	-	5

* S'ha donat un valor de 0.1

Els gens diferencials trobats en les comparatives d'abril/juny i abril/juliol es van analitzar pel que fa a metabolisme i estrès (Figures 47 i 48). En la representació general del metabolisme (Figura 47A i 47B), la degradació del midó [1] (*Starch*) i la glucosa [2] estava activada al juny i al juliol. La glicòlisi [3] proveeix d'acetil-CoA per sintetitzar àcids grassos [4], els gens biosintètics dels quals també es van trobar sobreexpressats al juny i al juliol respecte a l'abril en la representació del metabolisme segons MapMan. La biosíntesi d'àcids grassos i l'elongació d'àcids grassos de cadena molt llarga són necessaris per la síntesis de la suberina. Dins d'aquesta categoria trobem gens com la *ketoacyl-ACP synthase 3 (KASIII)* (Takami et al., 2010) implicada en la síntesi *de novo* dels àcids grassos i la *ketoacyl-CoA synthase 11 (KCS11)*, implicada en la seva elongació dels àcids grassos per obtenir VLCFA (Takami et al., 2010). El metabolisme secundari es trobava també activat al juny i juliol, específicament el metabolisme de flavonoides i fenilpropanoides respectivament.

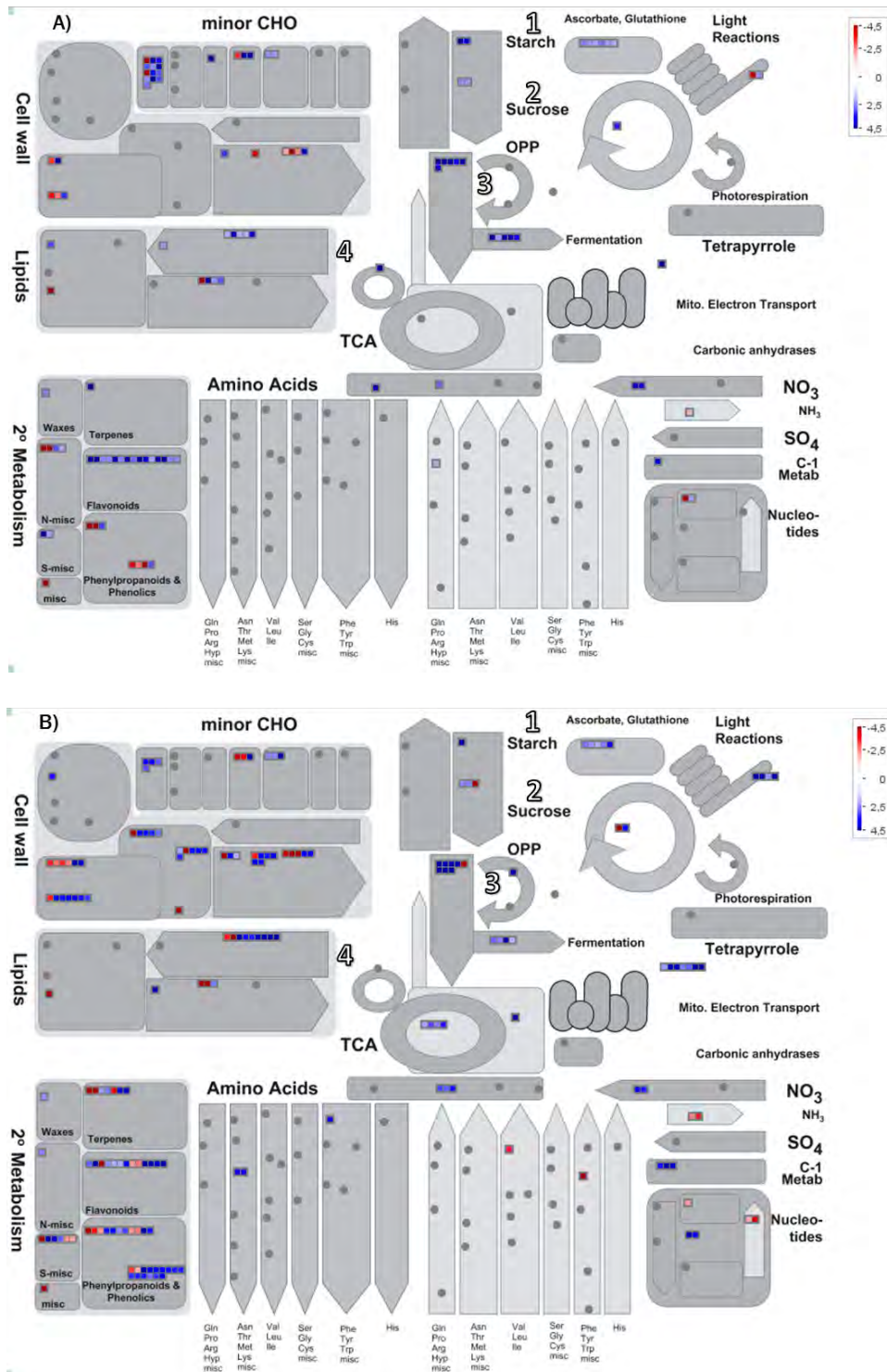


Figura 47. Visió general MapMan del metabolisme dels contigs diferencialment expressats (A) Es mostren els contigs diferencials en la comparativa abril/juny. (B) Es mostren els contigs diferencials en la comparativa abril/juliol. Els quadres representen gens, en vermell aquells més induïts a l'abril i en blau els més induïts al juny. ($-2 \leq FC \leq 2$, $p < 0.05$). [1] Midó; [2] Glucosa; [3] Glicòlisi; [4] Síntesi de lípids.

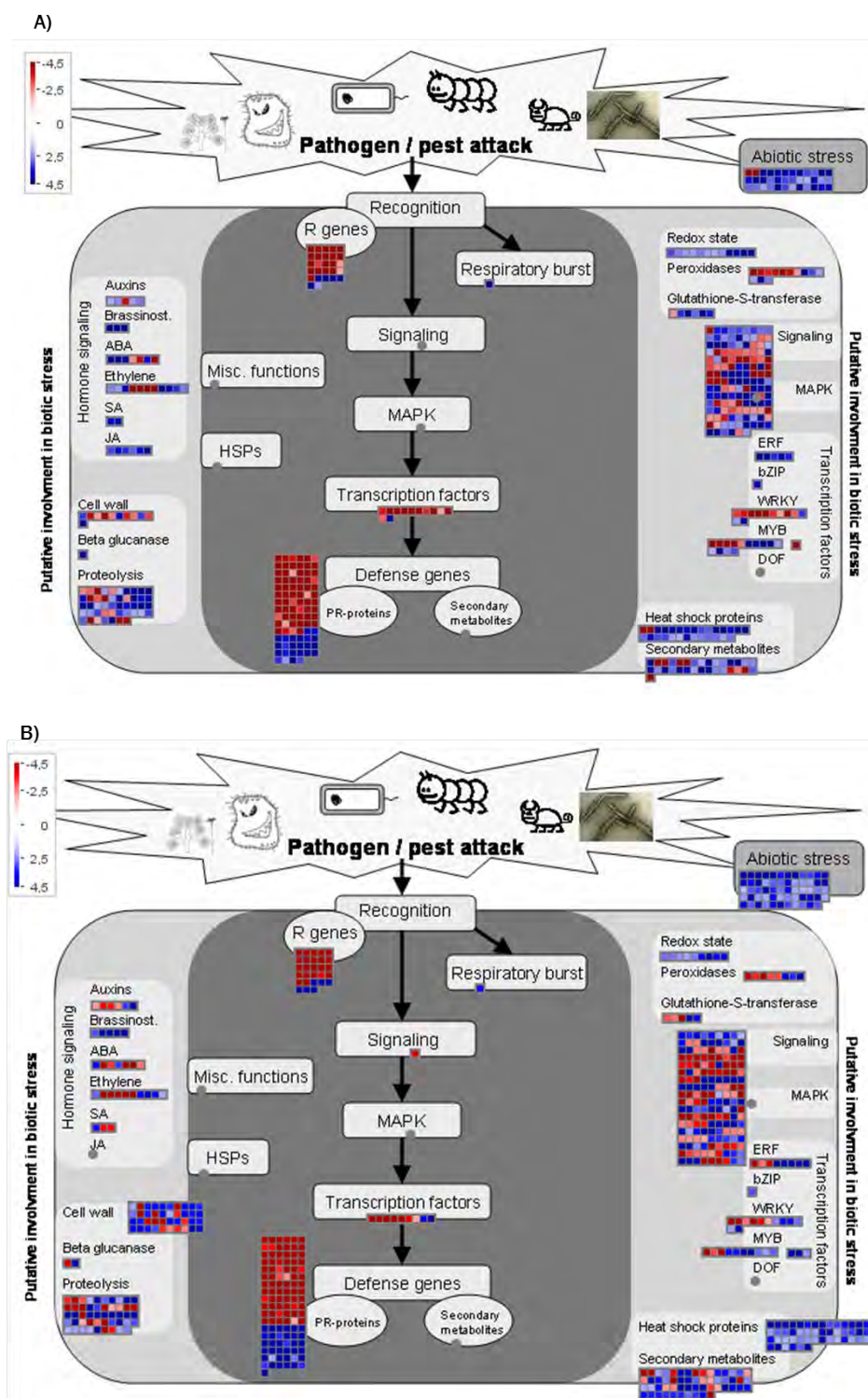


Figura 48. Visió general MapMan de l'estrès biòtic i abiòtic dels contigs diferencialment expressats (A) Es mostren els contigs diferencials en la comparativa abril/juny. (B) Es mostren els contigs diferencials en la comparativa abril/juliol. Els quadres representen gens, en vermell aquells més induïts a l'abril i en blau els més induïts al juliol ($-2 \leq FC \leq 2$, $p < 0.05$).

L'activació de la via dels flavonoides és coherent amb la presència de tanins en el suro (Koes et al., 2005; Soler et al., 2007; Varea et al., 2001). Quan observem el comportament de l'estrès durant aquests mesos podem veure que l'estrès abiòtic està activat al juny respecte a l'abril, fet esperable degut a l'augment de les temperatures durant el mes de juny (Figura 48A) però essent més acusat en el mes de juliol (Figura 48B) on les temperatures són encara més elevades. Concretament trobem proteïnes relacionades amb la resistència a calor com *HSP20*, *HSP21*, *HSP23.6*, *HSP70*, *HSP81* i *HSP101*. Per altra banda, podem observar una gran activació de l'estrès biòtic a l'abril en les dues comparatives, tan pel que fa a gens que codifiquem per proteïnes R o de resistència, factors de transcripció i proteïnes PR (*Pathogenesis-related*). Les proteïnes PR s'indueixen per estrès i protegeixen enfront l'estrès biòtic. Les proteïnes R tenen una funció protectora important ja que s'ha vist que la interacció de proteïna R amb proteïna d'aviorulència del patogen desencadena una resposta de defensa molt potent i dona lloc a la inducció de PR entre altres gens (Jones & Dangl, 2006).

3.4.4.2- Agrupacions segons el patró d'expressió dels contigs diferencialment expressats i anàlisi de les categories funcionals enriquides

Els contigs DE es van agrupar en funció de la seva expressió al llarg dels mesos utilitzant les mitjanes de les diferents rèpliques. Es van generar 5 agrupacions diferents (Figura 49) seguint una correlació de Pearson. Els clústers 1, 2 i 3 contenen contigs DE amb un nivell màxim d'expressió a l'abril però amb un comportament diferent durant juny i juliol. El clúster 1 (1.051 contigs DE) presentava un decreixement progressiu durant el juny i juliol, el clúster 2 (815 contigs DE) presentava una baixa expressió al mes de juny i el clúster 3 (3.887 contigs DE) presentava expressió baixa durant juny i juliol, mesos en els quals es mantenen els nivells d'expressió. Contràriament, els clústers 4 i 5 contenen contigs DE amb un nivell mínim d'expressió a l'abril i, si bé el clúster 4 (1.221 contigs) presentava un pic d'expressió al juny, el clúster 5 (1.129 contigs DE) presentava un pic al mes de juliol.

Per valorar la possible funció conjunta dels contigs DE agrupats en cada clúster, es van analitzar les categories funcionals GO enriquides per cada clúster (Taula Suplementària 7), les quals després es van agrupar a termes GO jeràrquics superiors mitjançant l'eina bioinformàtica ReviGO (Supek et al., 2011) per simplificar-ne els resultats (Figura 50). Els contigs més rellevants de cada clúster amb els valors d'expressió es mostren a les Taules 18-22.

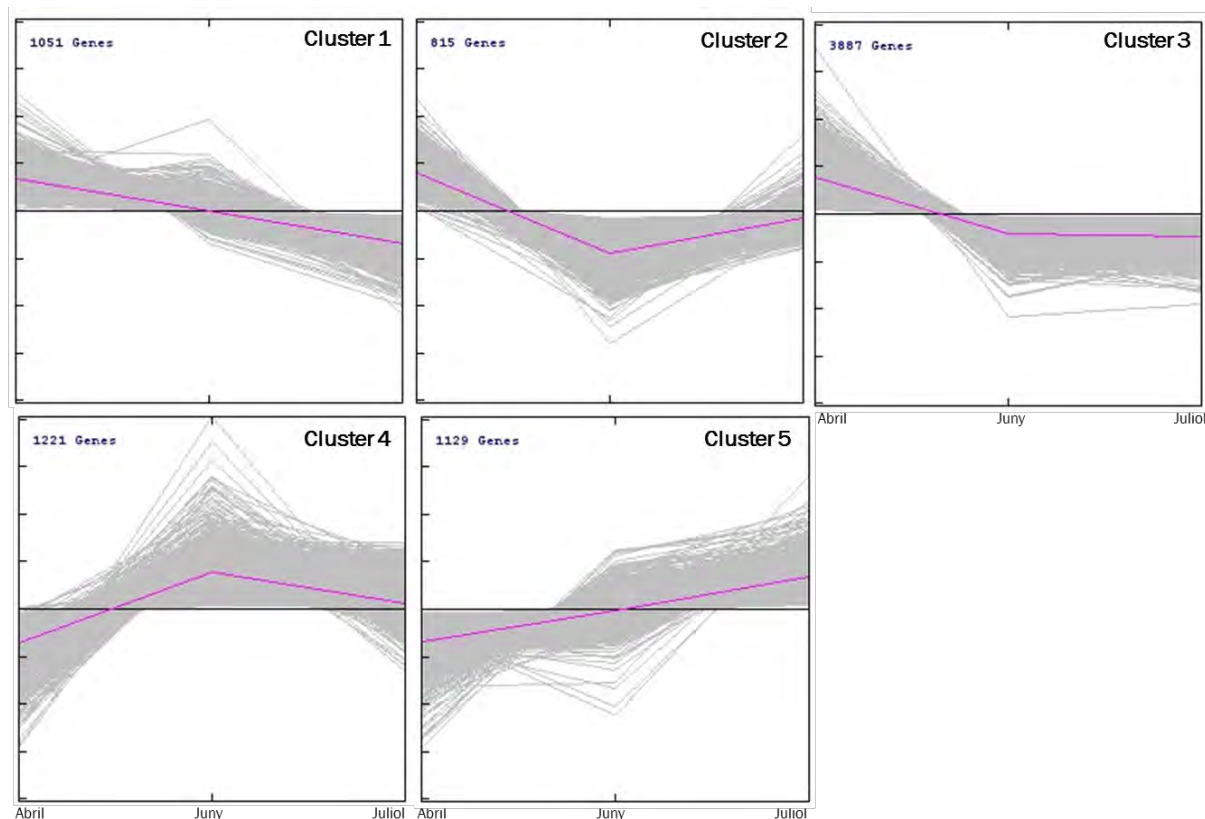


Figura 49. Agrupacions dels transcrits segons el seu patró d'expressió al llarg dels mesos assajats, a partir de les dades utilitzades per a la realització de l'agrupació jeràrquica ($-2 \leq FC \leq 2$, $p < 0.05$). S'observen 3 clústers amb un pic màxim d'expressió a l'abril (Clúster 1, Clúster 2, Clúster 3), un clúster amb un pic d'expressió màxima al juny (Clúster 4) i per últim, un clúster amb pic d'expressió al juliol (Clúster 5).

Pel que fa al clúster 1 (Figura 50A) les categories més enriquides pertanyien a processos de senyalització i resposta (senyalització, transducció del senyal, resposta cel·lular a la deficiència del fosfat, a estímuls, a estímuls extracel·lulars, en defensa i senyalització de receptors de la superfície de la cèl·lula). Aquestes categories són coherents amb el fet que després de la pausa hivernal cal l'activació de vies de transducció del senyal per desencadenar programes cel·lulars que iniciïn la formació del fel·lema. També es van trobar categories relacionades amb la síntesi d'esterols i brassinoesteroids i l'homeòstasi de brassinoesteroids, hormones relacionades amb el creixement i desenvolupament de les plantes (Bishop & Koncz, 2002; Tang et al., 2016). Entre els gens identificats (Taula 18) destaquen gens de la família WRKY (WRKY19/AtMEKK4, WRKY75), els quals poden regular diverses respostes a través d'una complicada xarxa de gens (Phukan, Jeena, & Shukla, 2016), s'han relacionat amb la regulació fisiològica de les plantes i s'indueixen també en situació d'estrès biòtic i abiòtic (Eulgem, 2000; Mohanta et al., 2016). L'activació del gen de la família Wuschel Wuschel-Interacting Protein 2 o Topless-Related 4 (*WSIP2*) involucrat en la regulació per brassinoesteroids (Oh

et al., 2014) i en mantenir les cèl·lules mare del meristema apical del brot indiferenciades (Kieffer et al., 2006) està d'acord amb l'activitat meristemàtica que requereix el fel·logen a l'inici de l'estació de creixement. Per altra banda, tot i que no quedin reflectits dins cap de les categories enriquides, es van trobar gens que podrien estar relacionats amb la modificació de la paret cel·lular. Per la biosíntesi de la suberina caldria l'activació d'alguns gens relacionats amb la síntesi d'àcids grassos *de novo* i elongació d'àcids grassos. Concretament es va identificar un regulador transcripcional de gens implicats en la síntesi d'àcids grassos *WRI1* (Sébastien et al., 2007; Cernac & Benning, 2004) i una *Acetyl-CoA Carboxylase (ACCoA1)* implicada en la formació d'àcids grassos de cadena molt llarga i relacionada amb les ceres cuticulars (Baud et al., 2003; Lü et al., 2011). L'activació d'un possible ortòleg de la *sucrose synthase (SUS2)* podria també tenir un paper en la degradació de sucrosa i per tant, la biosíntesi d'àcids grassos (Koch, 2004), tot i que podria també relacionar-se amb la formació de cel·lulosa (Baroja-Fernández et al., 2012). A més, trobem un membre de la família *Casparian Strip Membrane Domain Proteins (CASPL1C-1)* implicat en el reclutament d'enzims que modifiquen la paret cel·lular i s'ha suggerit que les CASPLs delimitarien la regió de la membrana plasmàtica a on aquestes modificacions tindrien lloc (Roppolo et al., 2014). Amb una funció relacionada trobem també expansines (*EXPA1, EXPA8*) involucrades amb la síntesi i extensió de la paret cel·lular (McQueen-Mason i Cosgrove, 1994; Lee et al., 2001) i un membre de la família NAC (*NAC075*) que s'ha relacionat amb l'engruiximent de la paret secundària (Sakamoto & Mitsuda, 2015).

En el clúster 2 (Figura 50B) també es van identificar categories relacionades amb senyalització, transducció de la senyal, resposta de defensa a estímuls i regulació biològica. A més, van sobresortir categories relacionades amb el processat de l'RNA, la traducció de l'RNA (modificació de l'àcid amino-peptidil) i la modificació post-transcripcional proteica. Aquestes categories estarien d'acord amb la gran activitat transcripcional i traduccional necessària durant el mes d'abril, en que les cèl·lules s'han d'activar i establir un programa genètic-cel·lular diferent per formar el fel·lema. A nivell de reguladors transcripcionals es va identificar l'ortòleg a *MYB62*, involucrat en la regulació per falta de fosfat via canvis en el metabolisme i senyalització de les gibberel·lines (Devaiah et al., 2009), i *WRKY39*, implicat en la resposta a estrès per calor (Li et al., 2010) (Taula 19). Pel que fa la lignina, es van identificar dues laccases (*LAC12* i *LAC15*) involucrades en la seva polimerització (Zhao et al., 2013). Igualment que en el clúster 1, es van identificar contigs identificats com *WSIP2* (Kieffer et al., 2006) i expansines (*EXPA1, EXPA11*).

El clúster 3 (Figura 50C) era el que agrupava més nombre de contigs. Aquest clúster estava molt enriquit amb categories funcionals relacionades amb la senyalització igual que els clústers 1 i 3 (regulació negativa de la mort cel·lular i regulació de la resposta a estímuls). Per altra banda, en aquest clúster destacaven moltes categories relacionades amb el metabolisme (metabolisme primari, del nitrogen, procés metabòlic de les macromolècules i beta-oxidació dels àcids grassos), el catabolisme i la modificació de lípids, i diverses categories relacionades amb el creixement cel·lular i la paret cel·lular (procés metabòlic dels polisacàrids de la paret cel·lular, procés biosintètic de la cel·lulosa de la paret cel·lular i procés biosintètic de la lignina). També destaquen la ubiquitinació de proteïnes. A nivell gènic, es va identificar l'ortòleg a *WSIP2* (Kieffer et al., 2006) igual que el clúster 1 i 2, i també altres gens relacionats amb l'activació i desenvolupament de meristemes com *WOX13* (Romera-Branchat et al., 2013) i *STM* (Groover et al., 2006). Entre els gens relacionats amb la biogènesi de la paret cel·lular trobem, igual que els clústers 1 i 2, membres de la família d'expansines (*EXPA1*, *EXPA6* i *EXPA8*) (McQueen-Mason & Cosgrove, 1994; Lee et al., 2001), *NAC075* (Sakamoto & Mitsuda, 2015) i dos gens de la família SUS (*SUS1*, *SUS6*) que podrien tenir un paper en l'acumulació de cel·lulosa (Baroja-Fernández et al., 2012) però que també s'han relacionat amb síntesis d'àcids grassos i fins i tot acumulació de suberina (Boher et al., 2017; Troncoso-Ponce et al., 2011). Pel que fa a la biosíntesi de lignina destaquen varis gens de la família de les lacases (*LAC5*, *LAC7*, *LAC14*, *LAC15* i *LAC16*), per alguns d'ells, *LAC5* i *LAC15*, s'ha demostrat que estan implicades en la lignificació (Berthet et al., 2011; Liang et al., 2006). Pel que fa a la biosíntesi dels precursors de lignina, es va identificar la *4-coumarate:CoA ligase 5* (*4CL5*) (Costa et al., 2005). També es van identificar molts gens de la família de les LACS (*LACS1*, *LACS8*, *LACS9*) de les quals s'ha vist que *LACS1* està involucrada en la síntesi de ceres i cutina (Lü et al., 2009) (Taula 20).

Pel que fa al clúster 4, el qual té un pic d'expressió al juny (Figura 50D), contenia proporcionalment més categories que la resta de clústers, indicant l'heterogeneïtat dels gens que segueixen aquest patró d'expressió. Algunes categories estaven relacionades amb el metabolisme (procés metabòlic, biosíntesi dels flavonoides, procés del metabolisme secundari), categories relacionades amb estrès (procés d'oxidació-reducció, homeòstasi cel·lular redox), i també categories relacionades amb la regulació (regulació negativa del cicle cel·lular, regulació del desenvolupament i regulació post-transcripcional de l'expressió gènica). L'enriquiment en aquest clúster de categories relacionades amb el metabolisme és d'esperar ja que durant el mes de juny és quan es dona una màxima activitat del fel·lògen i els gens relacionats amb l'acumulació de suberina presenten un pic màxim d'expressió (Soler et

al., 2008). Aquesta formació del suro implica també senescència del teixit i estrès oxidatiu endogen (Pla et al., 2000), fet que implica processos d'oxidació-reducció i requereix d'homeostasi redox. Entre els gens relacionats amb estrès oxidatiu es va identificar l'ortòleg a una expansina (*EXPB2*) la qual s'ha vist que la sobreexpressió d'aquesta proteïna proporciona una major tolerància a l'estrès oxidatiu (Han et al., 2015). Relacionades amb la paret cel·lular es van identificar els ortòlegs d'una proteïna relacionada amb la síntesi de la cel·lulosa (*CESA3*) també involucrada en la síntesi de la paret cel·lular secundària (Caño-Delgado et al., 2000), una peroxidasa (*PRX2*) involucrada en la lignificació (Shigeto et al., 2013) i *UGT72B1* que catalitza la glucosilació de monolignols, procés essencial per a la normal lignificació de la paret cel·lular (Lin et al., 2016) (Taula 21). Novament es van identificar els ortòlegs del *MYB62* (Devaiah et al., 2009), el *MYB102* implicat en la defensa (De Vos et al., 2006) i el *WRKY18* relacionat amb estrès abiòtic i l'àcid abscísic (Chen et al., 2010). Val la pena comentar que l'hormona ABA s'ha relacionat amb l'acumulació de la suberina i la inducció de varis gens biosintètics de la suberina (Barberon et al., 2016; Boher et al., 2013). A més, dins aquest clúster, trobem alguns contigs ortòlegs a gens de la família *Ketoacyl-ACP Sintasa (KASIII)* i *Acetyl-CoA Sintasa (KCS6 i KCS11)* implicades en la síntesi *de novo* d'àcids grassos i en l'elongació de la seva cadena (Kunst & Samuels, 2003); en l'acumulació de suberina i ceres, per l'ortòleg de *KCS6* de patata (Serra et al., 2009a).

Per últim, el clúster 5 (Figura 50E) que presentava un augment progressiu de l'expressió amb un pic màxim d'expressió al juliol, està enriquit principalment en categories relacionades amb estrès abiòtic (resposta a calor, resposta a estímuls abiòtics, resposta a alta intensitat de llum, plegament proteic mitjançant xaperones) i algunes categories relacionades amb estrès biòtic (resposta a estímuls biòtics externs, regulació del procés metabòlic de l'àcid salicílic). El fet que els contigs agrupats en aquest clúster s'indueixin fortament al juliol i presentin funcions relacionades amb la categoria d'estrès abiòtic és coherent amb la climatologia ja que durant aquell mes es va registrar la temperatura més alta (T^a max 31,8°C) i la menor precipitació (0 mm) i la màxima expressió de dues proteïnes relacionades amb estrès abiòtic (Soler et al., 2008). Concretament dins d'aquest clúster es van identificar contigs que codifiquen per proteïnes relacionades amb l'estrès abiòtic, com diverses *heat shock proteins*, entre les que destaquen *QsHSP18.2* i *HSP70* relacionades amb la resposta a estrès per calor, així com a canvis en el comportament del pH (Jofré et al., 2003; Pla et al., 2000; Qian et al., 2014) i *HSP70B* relacionada amb la fotoprotecció i la reparació del fotosistema II (Schroda et al., 1999). També es van identificar gens tipus WRKY, com el *WRKY53* (Hu et al., 2015; Sun & Yu, 2015) i *WRKY70* (Chen et al., 2017), ambdós implicats en la resistència a estrès; també

MYB77 que està relacionat amb l'estrès i la senescència (Jaradat et al., 2013); i proteïnes *Late Embriogenesis Abundant* (LEA) que juguen un rol important en la tolerància a l'estrès (Gao & Lan, 2016) (Taula 22).

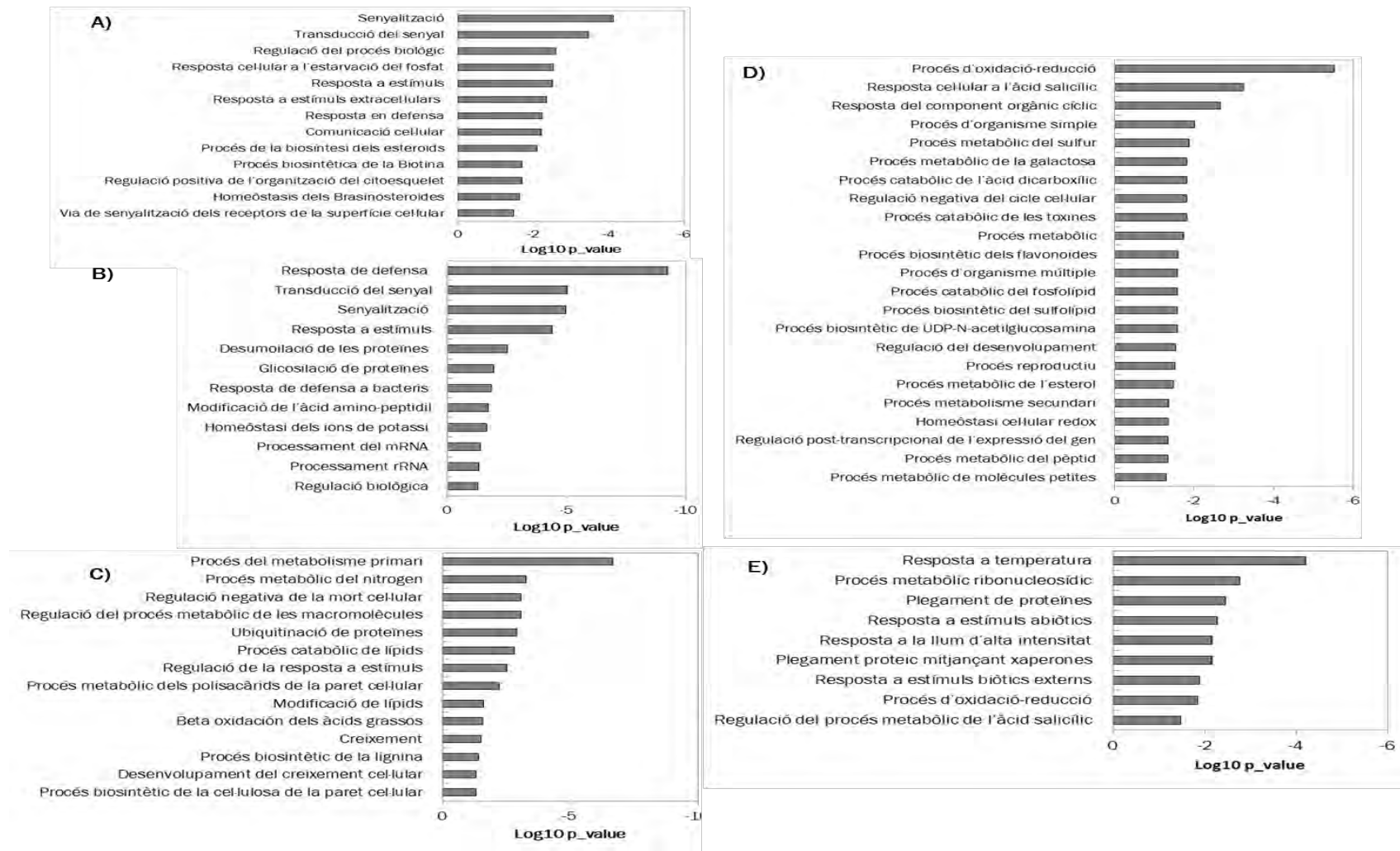


Figura 50. Categories enriquides dels contigs de cada clúster agrupades en termes GO jeràrquics superiors mitjançant l'eina bioinformàtica ReviGO (Supek et al., 2011). (A) Clúster 1; (B) Clúster 2; (C) Clúster 3; (D) Clúster 4; (E) Clúster 5.

Taula 18. Contigs diferencials comentats al clúster 1. Es mostra el nom del contig, l'ortòleg corresponent en Arabidopsis, l'àlies del nom del gen, l'expressió total mitjana dels tres mesos (abril, juny i juliol) i el Log2Ratio de les comparatives entre abril/juny i abril/juliol.

Contigs	Arabidopsis (TAIR)	Àlies	Expressió total mitjana	Log2Ratio AB/JU	Log2Ratio AB/JL
TRINITY_DN144291_c0_g7_i5	AT4G12020	WRKY19	6,33	0,77	4,73
TRINITY_DN109704_c0_g1_i1	AT5G13080	WRKY75	3,34	0,15	4,29
TRINITY_DN87854_c0_g1_i1	AT1G69530	EXPA1	2,15	0,72	4,26
TRINITY_DN241943_c0_g1_i1	AT2G40610	EXPA8	2,54	0,23	4,20
TRINITY_DN137605_c0_g1_i3	AT5G49190	SUS2	1,66	0,56	4,11
TRINITY_DN85602_c0_g1_i1	AT3G54320	WRI1	1,30	0,42	3,97
TRINITY_DN82611_c0_g1_i1	AT4G29230	NAC075	3,38	0,59	1,82
TRINITY_DN104601_c1_g1_i1	AT3G15880	WSIP2	5,09	0,66	1,57
TRINITY_DN89240_c0_g1_i1	AT4G03540	CASPL1C-1	12,96	0,54	1,10
TRINITY_DN16437_c0_g2_i1	AT1G36160	ACCoA1	3,23	0,37	1,10

Taula 19. Contigs diferencials comentats al clúster 2. Es mostra el nom del contig, l'ortòleg corresponent en Arabidopsis, l'àlies del nom del gen, l'expressió total mitjana dels tres mesos (abril, juny i juliol) i el Log2Ratio de les comparatives entre abril/juny i abril/juliol.

Contigs	Arabidopsis (TAIR)	Àlies	Expressió total mitjana	Log2Ratio AB/JU	Log2Ratio AB/JL
TRINITY_DN2916_c0_g1_i1	AT5G05390	LAC 12	5,81	1,30	0,72
TRINITY_DN130336_c1_g1_i1	AT5G48100	LAC15	14,49	1,26	0,68
TRINITY_DN118741_c0_g1_i1	AT1G20190	EXPA11	12,16	1,12	0,40
TRINITY_DN143383_c0_g1_i8	AT3G15880	WSIP2	1,88	1,12	0,39
TRINITY_DN91180_c0_g1_i1	AT3G04670	WRKY39	3,94	1,06	0,56
TRINITY_DN143383_c0_g1_i4	AT3G15880	WSIP2	1,64	0,87	0,37
TRINITY_DN125759_c0_g1_i1	AT1G69530	EXPA1	23,52	0,87	0,54
TRINITY_DN30287_c0_g1_i1	AT1G68320	MYB62	21,75	0,87	0,60

Taula 20. Contigs diferencials comentats al clúster 3. Es mostra el nom del contig, l'ortòleg corresponent en Arabidopsis, l'àlies del nom del gen, l'expressió total mitjana dels tres mesos (abril, juny i juliol) i el Log2Ratio de les comparatives entre abril/juny i abril/juliol.

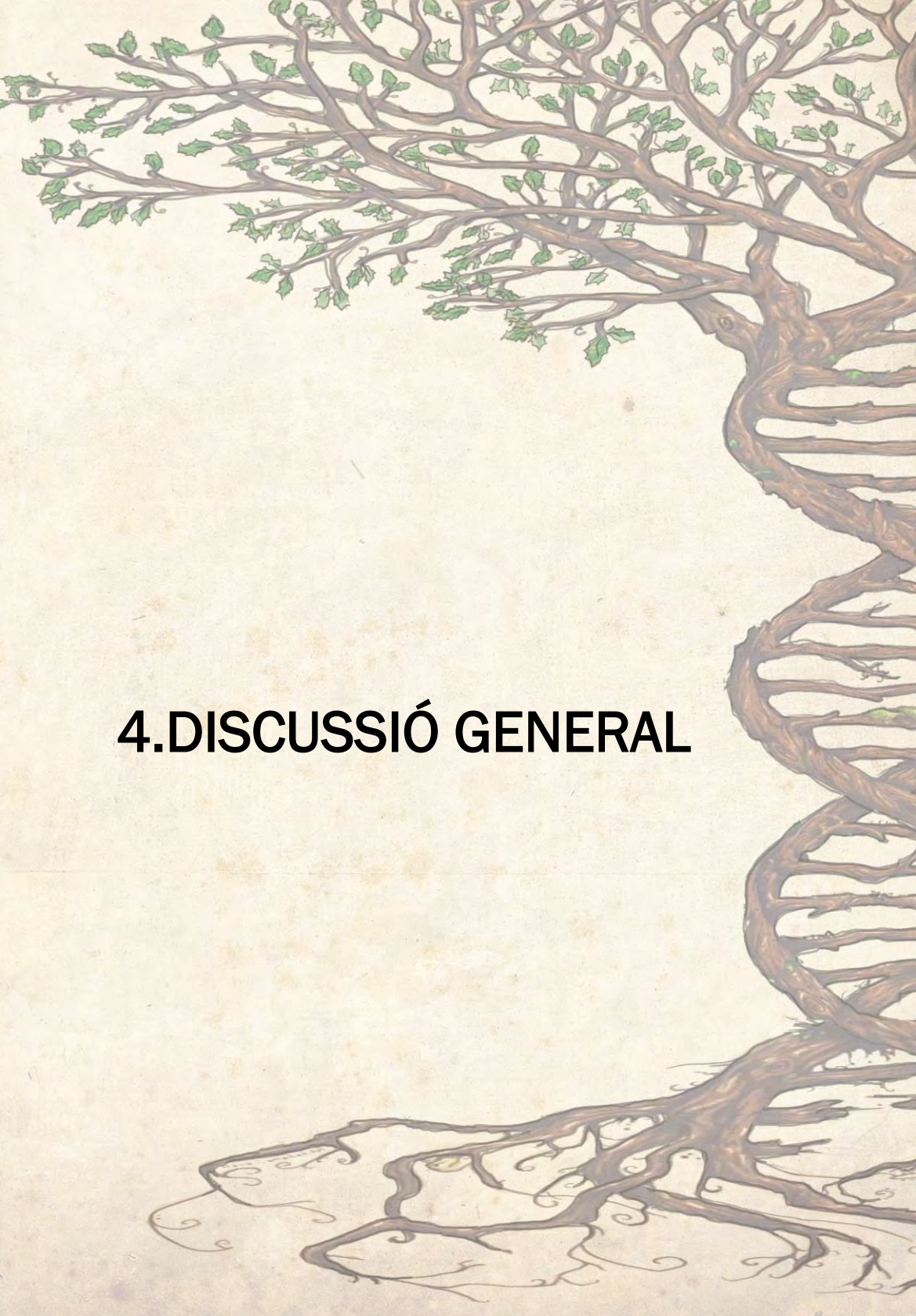
Contigs	Arabidopsis (TAIR)	Àlies	Expressió total mitjana	Log2Ratio AB/JU	Log2Ratio AB/JL
TRINITY_DN76787_c0_g1_i1	AT2G47240	LACS1	3,26	4,46	0,87
TRINITY_DN126624_c1_g6_i1	AT2G28950	EXPA6	2,81	4,43	1,44
TRINITY_DN115574_c0_g1_i1	AT2G40370	LAC5	1,97	4,29	4,29
TRINITY_DN180007_c0_g1_i1	AT2G04350	LACS8	1,34	4,13	4,13
TRINITY_DN117718_c0_g1_i1	AT5G48100	LAC15	0,71	3,85	3,85
TRINITY_DN68564_c0_g1_i1	AT1G77590	LACS9	0,72	3,83	1,12
TRINITY_DN132879_c1_g1_i2	AT2G40610	EXPA8	0,59	3,77	3,77
TRINITY_DN128876_c0_g1_i2	AT3G15880	WSIP2	0,48	3,68	1,76
TRINITY_DN144104_c5_g2_i1	AT1G62360	STM	0,44	3,64	3,64
TRINITY_DN87656_c0_g1_i1	AT5G09360	LAC14	27,91	3,63	1,29
TRINITY_DN132670_c2_g2_i1	AT5G58910	LAC16	3,39	1,16	0,97
TRINITY_DN128467_c0_g1_i1	AT4G35550	WOX13	1,09	0,92	0,59
TRINITY_DN140794_c0_g1_i1	AT3G09220	LAC7	106,23	0,87	0,98
TRINITY_DN89482_c0_g1_i1	AT4G29230	NAC075	5,40	0,73	0,90
TRINITY_DN131660_c1_g1_i1	AT3G21230	4CL5	12,58	0,71	0,61
TRINITY_DN89202_c0_g1_i1	AT1G69530	EXPA1	9,54	0,70	1,10

Taula 21. Contigs diferencials comentats al clúster 4. Es mostra el nom del contig, l'ortòleg corresponent en Arabidopsis, l'àlies del nom del gen, l'expressió total mitjana dels tres mesos (abril, juny i juliol) i el Log2Ratio de les comparatives entre abril/juny i abril/juliol.

Contigs	Arabidopsis (TAIR)	Àlies	Expressió total mitjana	Log2Ratio AB/JU	Log2Ratio AB/JL
TRINITY_DN76563_c0_g2_i1	AT1G62640	KASIII	88,38	-0,57	-0,43
TRINITY_DN72159_c0_g1_i1	AT4G01070	UGT72	150,35	-0,72	-0,62
TRINITY_DN103926_c0_g1_i1	AT1G68530	KCS6	1,03	-0,72	-0,49
TRINITY_DN132975_c0_g3_i1	AT4G21440	MYB4/MYB102	6,19	-0,91	-0,79
TRINITY_DN132628_c0_g1_i1	AT1G65680	EXPB2	136,75	-0,95	-0,94
TRINITY_DN137038_c0_g1_i1	AT4G31720	WRKY18	9,24	-1,07	-1,05
TRINITY_DN75984_c0_g1_i1	AT1G68320	MYB62	6,26	-1,33	-1,07
TRINITY_DN225019_c0_g1_i1	AT2G26640	KCS11	2,08	-4,03	-4,00
TRINITY_DN135270_c0_g4_i1	AT5G05170	CESA3/CEV1	4,94	-4,25	-4,50
TRINITY_DN96471_c0_g2_i1	AT1G05250	PRX2	3,48	-4,47	-3,72

Taula 22. Contigs diferencials comentats al clúster 5. Es mostra el nom del contig, l'ortòleg corresponent en Arabidopsis, l'àlies del nom del gen, l'expressió total mitjana dels tres mesos (abril, juny i juliol) i el Log2Ratio de les comparatives entre abril/juny i abril/juliol.

Contigs	Arabidopsis (TAIR)	Àlies	Expressió total mitjana	Log2Ratio AB/JU	Log2Ratio AB/JL
TRINITY_DN140716_c3_g3_i8	AT3G12580	HSP70	0,50	-3,20	-3,55
TRINITY_DN120253_c0_g1_i1	AT5G59720	HSP18.2	1,37	-1,32	-1,72
TRINITY_DN145994_c7_g1_i1	AT1G16030	HSP70B	96,40	-1,38	-1,56
TRINITY_DN126781_c0_g3_i2	AT4G23810	WRKY53	1,82	-0,85	-1,11
TRINITY_DN188182_c0_g1_i1	AT2G27260	LEA2	5,95	-0,50	-1,00
TRINITY_DN133171_c0_g1_i1	AT3G50060	MYB77	1,44	-0,74	-0,83
TRINITY_DN94623_c0_g1_i1	AT3G56400	WRKY70	18,67	-0,51	-0,82



4.DISCUSSIÓ GENERAL

4. Discussió general

El periderma juga un paper molt important en la protecció dels òrgans madurs de les plantes enfront la deshidratació, la llum UV i l'atac de patògens (Bernards, 2002). Tot i que s'han aconseguit grans progressos en quant a la biosíntesi de la suberina i les ceres, encara hi ha mecanismes moleculars força desconeguts, com el transport dels components sintetitzats a l'interior cel·lular cap a la paret i la regulació del teixit (Vishwanath, 2015).

Els resultats presentats en aquesta tesi continuen, en gran part, alguns estudis previs realitzats en el nostre laboratori que tenen com objectiu conèixer i entendre els mecanismes moleculars implicats en la formació de la suberina i el desenvolupament del fel·lema/suro. Pel que fa a la identificació de gens candidats, el primer anàlisi transcriptòmic de la formació del suro i la síntesi de suberina es va realitzar al nostre laboratori en el treball de Soler et al., (2007), el qual va generar una llista de 135 gens candidats. Dotze d'aquests gens es van seleccionar per estudiar el seu perfil d'acumulació de transcrit al llarg del creixement estacional del suro, el qual va permetre agrupar els gens amb perfils d'expressió similars i es va determinar que la temperatura i humitat afectaven a l'acumulació d'alguns gens (Soler et al., 2008). Una comparativa transcriptòmica recent entre l'alzina surera (*Quercus suber*) i l'alzina (*Quercus ilex*) ha permès fer sobresortir nous gens candidats implicats en el desenvolupament extraordinari de l'escorça externa en forma de suro (Boher et al., 2017). Alguns d'aquests gens candidats han estat caracteritzats mitjançant genètica inversa en patatera. Inicialment es va caracteritzar la funció de tres gens biosintètics de la suberina: *StKCS6* (Serra et al., 2009a), *CYP86A33* (Serra et al., 2009b) i *FHT* (Boher et al., 2013; Serra et al., 2010; Serra et al., 2014). Recentment, el nostre grup, ha aconseguit caracteritzar en patata també un factor de transcripció *StNAC103* implicat en la repressió de suberina i ceres en el periderma (Verdaguer et al., 2016) i resultats d'RNAseq de línies *StRIK*-RNAi suggereixen implicació d'*StRIK* en el processament del pre-RNA, silenciament i resposta a estrès i durant la transició a meristema floral (Boher, 2016). En aquesta tesi s'ha continuat la caracterització del regulador *StRIK* i s'ha apuntat a nous candidats de la formació del periderma i la suberina basant-nos en el patró d'expressió i la caracterització *in silico* dels seus possibles ortòlegs en patata. Per tal d'agilitzar les futures caracteritzacions de gens relacionats amb la suberina a patata mitjançant genètica inversa, hem proposat una aproximació més ràpida i econòmica a través de la transformació d'arrel. I per altra banda, per aprofundir en la formació del suro hem estudiat els canvis en el transcriptoma del suro durant el seu desenvolupament dins l'estació de creixement. En conjunt, hem utilitzat diferents models i espècies per estudiar el periderma i/o els teixits suberitzats: l'escorça externa de l'alzina surera, l'arrel i la pell del

tubercle de patatera.

En el **apartat 3.1** presentem l'estudi d'StRIK, una proteïna homòloga a la proteïna RS2-*interacting KH protein* de blat de moro que podria tenir un paper important en la regulació post-transcripcional dels pre-mRNAs, en la regulació epigenètica de la cromatina (regulació d'elements transponibles), en resposta a estrès i en processos de desenvolupament de les plantes com podria ser la floració o la formació del periderma (Boher, 2016). En aquesta tesi ens centrem en l'estudi de la interacció de la proteïna StRIK amb d'altres proteïnes obtingudes a través del cribratge d'una llibreria de dos híbrids. D'algunes de les proteïnes candidates a interaccionar s'han realitzat anàlisis *in silico* per obtenir una aproximació de la seva possible funció i se n'ha estudiat la localització subcel·lular en presència i absència d'StRIK. En el **apartat 3.2** caracteritzem varis gens possiblement involucrats en el transport de monòmers o polímers de suberina i ceres cap a la paret cel·lular, així com també un possible gen regulador del fel·lema. Concretament estudiem varis gens de la família ABCG (alguns expressats diferencialment en la comparativa de l'escorça externa de suro vs alzina (Boher et al., 2017)), una nsLTP (trobada diferencialment en la llibreria d'SSH d'alzina surera (Soler et al., 2007)), i un membre de la família ERF. L'estudi es realitza tant a nivell d'expressió en diferents teixits nadius o ferits com a nivell de localització subcel·lular i d'altres anàlisis *in silico* que ens permetin apropar-nos a la seva funció. En el **apartat 3.3** posem a punt un nou sistema al nostre laboratori per a la genètica funcional de teixits suberificats, més ràpid i menys costos. Aquest sistema es basa en la infecció de plantes *in vitro* de patatera mitjançant *Agrobacterium rhizogenes* per generar *hairy roots* (arrels peludes) transformades. Aquestes arrels tenen la particularitat de poder viure i créixer d'una manera autònoma i sense la necessitat d'hormones, fet que abarateix molt els costos. A més, el fet de generar únicament arrels transformades i no la regeneració d'una planta estable sencera fa d'aquest sistema una aproximació ràpida per a determinar la implicació de gens a la suberina. Per últim, a l'**apartat 3.4** realitzem un anàlisi transcripcional del suro de l'alzina surera al llarg del creixement estacional, mitjançant RNAseq a través de la plataforma Illumina. Els mesos analitzats han estat: abril, ja que és quan es dona l'activació del meristema després de la pausa estacional; juny quan té lloc el màxim creixement del teixit, i juliol, que també conté un alt creixement del teixit però sota unes condicions fortes d'estrès. Aquest estudi ens ha permès determinar quins processos o vies metabòliques són predominants en cadascuna d'aquestes etapes i també ens ha permès la identificació de nous gens candidats que podrien ser importants en el procés.

4.1-StRIK modifica la localització subcel·lular d'StRACK1B, relacionada amb maduració post-transcripcional

En el nostre laboratori es va aïllar la proteïna QsRIK com un candidat per a la regulació del periderma de l'escorça externa de l'alzina surera (Soler et al., 2007) i es van obtenir línies de patatera *StRIK*-RNAi (Soler, 2008) degut al rol que tenien els seus ortòlegs en blat de moro i en *Arabidopsis* (Buckner et al., 2008; Phelps-Durr et al., 2005). En el treball de Boher (2016) es va demostrar que StRIK s'expressava en varis teixits, no únicament en el periderma, suggerint la seva implicació en la regulació de diferents teixits de la planta tal i com es va demostrar per la floració, la qual s'indueïa quan StRIK es silenciava (Boher, 2016). StRIK es localitza a nucli. La comparació del transcriptoma del periderma del tubercle de plantes silenciades per *StRIK* i de plantes salvatges va identificar la regulació diferencial de gens de resposta a estrès, processament d'RNA i transposició de DNA (Boher, 2016). Aquests processos de regulació estan d'acord amb la localització a nucli d'StRIK, tot i que mitjançant les prediccions *in silico* també es localitza de manera dèbil en el citoplasma i en els mitocondris (Boher, 2016). S'ha descrit en la literatura que la proteïna RIK d'*Arabidopsis* pot interaccionar amb d'altres proteïnes (Phelps-Durr et al., 2005). Per tal de trobar possibles proteïnes interactants amb StRIK, en aquesta tesi s'ha realitzat una llibreria de dos híbrids a partir d'RNA de fel·lema de tubercle de patatera. Es van trobar 29 possibles interactants dels quals un 17% d'aquests estarien relacionats amb processos de regulació de l'mRNA durant el silenciament gènic, la traducció i l'*splicing*, d'acord amb el paper regulador d'StRIK en la regulació post-transcripcional de mRNA (Boher, 2016). (Taula 1 – apartat 3.1.3.1).

Dins el 17% d'interactants relacionats amb la regulació de l'mRNA, s'ha identificat *StRACK1B* (*Receptor for Activated C Kinase 1B*), una proteïna *scaffold* que es troba a tots els eucariotes superiors, inclosos els animals. El seu ortòleg en *Arabidopsis* interacciona directament amb SERRATE (proteïna addicional que actua en concert amb *Dicer Like 1* (DCL1)) i forma part del complex AGO1 (Argonaute-1), el que provoca que reguli els nivells de miRNAs afectant el desenvolupament vegetal a través de la regulació post-transcripcional de gens diana (Speth et al., 2013). Les anàlisis *in silico* d'*StRACK1B* indiquen que el gen s'expressa de manera abundant en la majoria de teixits assajats en planta, al igual que StRIK, i que s'activa també sota condicions d'estrès. També s'ha identificat que *StRACK1B* coexpressa amb gens implicats en el procés de traducció i amb el gen *FIB2* que s'ha relacionat amb la interacció amb diversos tipus d'RNA (Rakitina et al., 2011).

RACK1B també s'ha relacionat amb la proteïna ribosomal L4 (RPL4), ambdues proteïnes actuarien reprimint la traducció de l'uORF (*upstream ORF*) del regulador de la diferenciació

de xilema SAC51 (*Suppressor of Acaulis 51*), en absència de termoespermina, el que permetria l'acumulació de l'mRNA de SAC51 (Kakehi et al., 2015). Els uORFs corresponen a seqüències pròpies de cada gen, alguns d'ells conservats, que es transcriuen juntament amb l'ORF principal (normalment gens reguladors) (Jorgensen & Dorantes-Acosta, 2012; Von Arnim et al., 2014)), les quals introdueixen codons de terminació prematurs *upstream* provocant l'activació de la degradació de l'mRNA a través del mecanisme de *non-sense mediated mRNA decay* (NMD). La conseqüència final és que els uORFs regulen la traducció de l'mRNA principal usant mecanismes post-transcripcionals. Tenint en compte aquesta funció es podria pensar que RACK1B i RPL4 podrien actuar conjuntament en altres uORFs de gens reguladors que participin en el desenvolupament d'altres òrgans de les plantes. Molt interessant és el fet que RPL4, no RACK1, s'ha relacionat amb la determinació de la cara adaxial foliar conjuntament amb *ASYMMETRIC LEAVES 2* (AS2) (Horiguchi et al., 2011; Matsumura et al., 2009), la qual forma complexos estables amb AS1 molt importants per al desenvolupament de les fulles (Matsumura et al., 2016), un regulador MYB amb domini R2-R3, qui al seu torn interacciona físicament amb RIK (Phelps-Durr et al. 2005). Mutacions en aquest complex pot donar lloc a problemes en la biogènesi dels petits RNAs, modificació de la cromatina, cicle cel·lular i biogènesi de gens ribosomals (Matsumura et al., 2016). A més, s'ha vist que AS2/LOB41 (At3g02550) es troba reprimida en línies silenciades per StRIK (Boher, 2016). En global doncs, es pot concloure que la interacció d'StRIK amb RACK1B podria tenir també una implicació en la regulació dels uORF a través de la RPL4 a través del complex format també per AS1-AS2.

La localització subcel·lular en *Nicotiana benthamiana* ha demostrat que StRACK1B s'acumula a citoplasma però també en un 21% de cèl·lules ho fa addicionalment a nucli, tal i com es va observar per l'ortòleg d'*Arabidopsis* (Speth et al., 2013) i d'arròs (Wamaitha et al., 2012). La localització a nucli per part de proteïnes citoplasmàtiques és comú ja que aquestes viatgen a nucli si són suficientment petites per passar passivament pels porus nuclears (Waadt et al., 2014). Molt interessant és que en presència d'StRIK la localització d'StRACK1B a nucli augmenta la freqüència en un 30%, el que suggereix que StRIK arrossega StRACK1B en el seu viatge cap a nucli a través de la interacció proteica, on podrien regular l'expressió gènica a través de mecanismes relacionats amb la regulació post-transcripcional.

Cal destacar també que recentment la proteïna ortòloga en *Arabidopsis* d'StRACK1B, s'ha identificat com a la primera proteïna capaç de formar un *scaffold* de les cascades de les *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) que connecta la proteïna G heterotrimèrica amb la cascada de MAPK per donar lloc a vies úniques de senyalització en la immunitat vegetal (Su et al., 2015).

Recentment també s'ha descrit que RACK1 en *Arabidopsis* és un regulador negatiu de la resposta a ABA i s'ha descrit que interacciona amb el factor de transcripció AP2/ERF RAP2.6 modificant la seva afinitat per les seqüències de DNA que són elements de resposta a ABA i de senyalització a etilè/jasmonic àcid (Guo et al., 2011; Wamaita et al., 2012). Aquesta funció d'StRACK1B també és compatible amb el patró d'expressió diferencial per gens de senyalització quan StRIK està silenciada (Boher, 2016).

4.2-La Cisteïna proteïnasa 3 presenta compatibilitats amb la interacció amb StRIK

La StCisteïna proteïnasa 3 és un proteïna que interacciona amb StRIK en l'assaig de doble híbrid. Les cisteïnes proteïnases són enzims que degraden proteïnes i participen en processos tant catabòlics com anabòlics. Tenen un rol essencial en el creixement i desenvolupament de les plantes, en la senescència, tal i com s'ha determinat en el cas de la proteïna ortòloga en *Arabidopsis* (*Aleurain-Like Protease-AALP*) (Pružinská et al., 2017) i la mort cel·lular programada, en l'acumulació de proteïnes d'emmagatzematge però també en la seva mobilització, i estan involucrades en les vies de senyalització i en la resposta a estrès, tant biòtic com abiòtic (Grudkowska & Zagdańska, 2004). Aquestes possibles funcions són compatibles amb una interacció amb StRIK, el silenciament del qual desregula gens relacionats amb senyalització, estrès i proteòlisi. A més, s'ha vist que altres membres de la família de les Cisteïnes proteïnases coexpressen amb StRIK (Boher, 2016). D'acord amb això, les anàlisis *in silico* mostren que la *StCisteïna proteïnasa 3* s'activa per estrès (Figura 12) i el seu promotor presenta caixes en que es regulen per estrès tèrmic, anaeròbic i biòtic (Taula 5). Molt interessant és la coexpressió (Taula 2) de la *StCisteïna proteïnasa 3* amb el gen *APUM5* (*Arabidopsis Pumilio RNA binding protein 5*), el qual pertany a una família implicada en l'estabilitat de l'RNA missatger i la traducció (Wang et al., 2002) i al que concretament se li ha suggerit un paper en la regulació post-transcripcional durant la resposta a l'estrès (Huh & Paek, 2014), processos que s'han vist desregulats quan StRIK es silencia (Boher, 2016) i que per tant posen de relleu una possible interacció de la StCisteïna proteïnasa 3 amb StRIK.

La localització subcel·lular en *Nicotiana benthamiana* ha demostrat que la StCisteïna proteïnasa 3 es localitza al citoplasma i addicionalment a nucli, però també en grànuls citoplasmàtics (Figura 13). S'ha observat que la proteïna ortòloga en *Arabidopsis* (AALP) es localitza en el vacúol però quan s'agroinfiltra en fulles de tabac, degut a la baixa estabilitat de la proteïna GFP en els vacúols de tabac (Kentaro Tamura et al., 2003) es diposita en forma de grànuls en el compartiment prevacuolar (CPV) (Kotzer et al., 2004) corresponent al que nosaltres observem (Figura 13). Cal remarcar que en protoplasts AALP es localitza en la vacúol central i que només presenta el patró granular en absència de la proteïna Rha1, proteïna de la família

Rab que té un paper important en el tràfic vacuolar (Sohn et al., 2003) o en plantes mutants per VPS29 la qual juga un paper fonamental en el tràfic i emmagatzematge de proteïnes al vacúol (Kang et al., 2012). Un membre de la família de les Cisteïnes proteïnases en pèsol, la PsCYP15A s'ha vist localitzada en la vacuola, però també en vesícules citoplasmàtiques i en simbiosomes, propis de les plantes lleguminoses (Vincent & Brewin, 2000), mentre que en la planta *Vigna mungo* s'ha localitzat una proteïna associada a la membrana del lumen que també es localitza al vacúol i al reticle endoplasmàtic (Okamoto et al., 2001). No obstant, fins al moment no s'han trobat membres de la família de les Cisteïnes proteïnases en nucli de plantes, sí que s'han localitzat en lisosomes i peroxisomes de cèl·lules animals (Calkins et al., 1998) pel que no seria estrany trobar-les també en les cèl·lules vegetals.

4.3-StERF93, candidat per a la regulació dels teixits suberificats de patata

En els últims anys s'ha relacionat la regulació de suberina, cutina i ceres amb diversos factors de transcripció com StNAC103, MYB9, MYB41, MYB93 i MYB107 (Gou et al., 2017; Kosma et al., 2014; Legay et al., 2016; Verdaguer et al., 2016). *AtERF38* també s'ha involucrat en teixits on té lloc suberització (Lasserre et al., 2008). *AtERF38* és un factor de transcripció que pertany a la família d'AP2/ERF (grup III), els membre de la qual estan involucrats en una gran quantitat de processos biològics, des del creixement i desenvolupament a la resposta enfront estímuls ambientals (Charfeddine et al., 2015; Nakano et al., 2006). Considerant la possibilitat que altres membres de la família AP2/ERF poguéssin participar també de la regulació del teixit suberificat, i en especial del periderma, es va identificar l'*StERF93*, el qual en el tubercle s'expressa de manera molt específica en la pell, comparant-ho amb el còrtex o el parènquima (Massa et al., 2011) (Figura 16). Aquests resultats *in silico* queden confirmats pels assajos d'acumulació de transcrit realitzats en diversos òrgans i teixits de la planta –fulla, tija, arrel, fel·lema i parènquima del tubercle– on es confirma que el gen *StERF93* s'expressa de manera abundant en fel·lema i arrel, però molt discretament en parènquima de tubercle, suggerint un rol d'*StERF93* en teixits suberificats (Figura 20A). La proteïna StERF93, la qual conté els dominis per incloure's dins del grup IX (Nakano et al., 2006) (Figura 18), no presenta una relació d'ortologia clara amb un sol membre de la família d'AP2/ERF (Figura 17). A més, els gens paral·lels d'*StERF93* que es troben al mateix clúster –*StERF51*, *StERF156* i *StERF162*– contenen nivells d'expressió similars en els diferents teixits, suggerint una possible redundància funcional entre ells (Figura 16).

L'expressió d'*StERF93* analitzada *in silico* mostra que s'indueix per estrès abiòtic, per giberel·lines i citoquinines, mentre que queda reprimat per àcid abscísic i auxines (Figura 19),

d'acord amb la presència de caixes de regulació per estrès abiòtic i hormonal en el seu promotor (Taula 8). Aquestes dades *in silico* estan en consonància amb les obtingudes experimentalment per Wang et al. (2015), les quals demostren que l'expressió d'*StERF93* s'indueix en condicions d'estrès abiòtic i hormones (Etefón i Metil jasmonat). Curiosament, si bé els StERFs pertanyents al grup IX es consideren un grup de resposta a defensa (Nakano et al., 2006), les dades *in silico* mostren que l'expressió d'*StERF93* es reprimeix per estrès biòtic, exceptuant la seva inducció quan es fereix la fulla (Figura 19). Experimentalment, tant en fulla ferida com en tubercle ferit, l'expressió d'*StERF93* presenta una primera inducció just després de la ferida la qual estaria d'acord amb la formació de la capa suberificada de tancament (Figures 20B i 20C). En el tubercle ferit s'observa una segona inducció molt clara als 6 dies de ferida, període que coincideix amb l'inici de la formació del periderma cicatricial (Figura 20B), el qual té lloc als 5-7 dies (Sabba & Lulai, 2002).

En resum, les anàlisis realitzades a nivell d'acumulació de transcrit, indiquen que *StERF93* s'indueix en teixits suberificats, ja siguin nadius (arrel i periderma) o induïts per ferida (capa de tancament i periderma cicatricial). Aquesta expressió el proposa com a candidat valuós per a regular l'expressió gènica en teixits suberificats. No obstant, per a anàlisis futures mitjançant genètica inversa, cal tenir en compte que els seus paràlegs més propers –*StERF51*, *StERF156* i *StERF162* –, amb un patró d'expressió molt semblant, podrien tenir una funció regulatòria redundant.

4.4-StLTPI.3 és un ferm candidat a permetre la formació de la correcta suberificació de la paret suberificada del fel·lema

Treballs previs en el Laboratori del Suro van identificar una nsLTP preferencialment expressada en el fel·lema d'alzina surera (Soler et al., 2007; Boher, 2016) i en el fel·lema de patata (Soler et al., 2011). L'estudi filogenètic ha determinat la relació d'ortologia entre *Arabidopsis* i les proteïnes identificades en alzina i patata, aquesta última anomenada StLTPI.3 per la seva ortologia amb AtLTPI.3 (Figura 22). L'arbre també mostra que StLTPI.3 és propera a AtLTP1.4, la qual facilitaria la transferència a l'apoplast de monòmers de LCFA de suberina en el periderma que cobreix els calls induïts per la infecció amb *Agrobacterium*, i de compostos VLCFA de ceres a la cutícula de l'epidermis de fulla (Deeken et al., 2017). En controvèrsia amb aquesta contribució d'AtLTP1.4 a la formació de la cutícula via transferència de compostos a través de la paret hidrofílica cap la part hidrofòbica, recentment, estudiant els hipocòtils elongats en foscor, s'ha proposat que l'AtLTP1.5/LTP2 viatja a la paret cel·lular on podria realitzar un paper estructural el qual consistiria en

mantenir la integritat de l'adhesió entre la cutícula hidrofòbica i la capa inferior de paret cel·lular hidrofílica (Jacq et al., 2017).

Anàlisis *in silico* demostren que la proteïna StLTPI.3 té una elevada expressió a la pell del tubercle de patatera, així com al tubercle madur i en menor quantitat a l'arrel (Figura 24A), anàlisis que estan d'acord amb els anàlisis experimentals que mostren gran especificitat d'expressió d'*StLTPI.3* en el fel·lema de tubercle de patatera (Figura 25A). A més, també s'ha detectat una acumulació de transcrit a les 48 hores post-ferida del tubercle i 144 hores post-ferida de la fulla (Figura 25B i 25C). Assajos *in silico* d'*StLTPI.3* demostren que s'indueix per estrès abiòtic (calor i tractaments amb sal), per hormones i sobretot per ABA, en coherència amb la inducció per calor i sal. En canvi no s'observa inducció en relació a l'estrès biòtic. L'anàlisi dels elements reguladors *in cis* corroboren aquests resultats, ja que s'observen caixes de resposta a ABA, a alta temperatura i a ferida (Taula 9). La relació de l'AtLTPI.3 amb els teixits suberificats també es detecta amb la relació de gens implicats en la síntesi de suberina i ceres que hi coexpressen (Taula 10). Alguns exemples són el CYP86A1 (Höfer et al., 2008; Li et al., 2007), el FACT (Kosma et al., 2012) o inclús una GDSL, que podria tenir un paper important en la polimerització de lípids (Li-Beisson et al., 2013). La localització subcel·lular d'StLTPI.3 es dona a la perifèria cel·lular i podria ser compatible amb una distribució al reticle endoplasmàtic (Figura 26), localització descrita per a un altre membre de la família de les LTPs, l'AtLTPIV.I (també conegut com a DIR1 (*Defective In Induced Resistance*)) (Cecchini et al., 2015) i trobat en l'RNAseq com a possible candidat implicat en la formació de suberina – veure apartat 3.4.3 i discutit en profunditat en l'apartat 4.9). DIR1 (Cecchini et al., 2015) s'ha suggerit per transportar senyals lipídiques intracel·lulars a través de l'intercanvi de lípids en els contactes directes membrana–membrana (*membrane contact sites*; MCSs) (Cecchini et al., 2015). D'acord amb això, una hipòtesi seria que StLTPI.3 podria generar un intercanvi de lípids mitjançant els contactes directes membrana–membrana (MCSs), els quals són rics en LTP (Helle et al., 2013) i en plantes es formen entre el cloroplast, el reticle endoplasmàtic i la membrana plasmàtica (Andersson et al., 2007). Les nsLTPs s'acumulen a diferents punts de la cèl·lula [veure revisió de Liu et al. (2015)]. Per les nsLTPs properes a la StLTPI.3 s'han observat localitzacions a membrana plasmàtica per AtLTPI.4 (Deeken et al., 2017), paret cel·lular i cloroplasts per AtLTPI.5/AtLTP2 (Jacq et al., 2017; Thoma et al., 1993).

4.5-Els transportadors ABCGs de patata candidats per a exportar monòmers i/o oligòmers de la suberina cap a la paret cel·lular

Alguns estudis han revelat la implicació de transportadors ABCG en l'acumulació de la suberina, un en patata (Landgraf et al., 2014) i quatre en *Arabidopsis* (Panikashvili et al., 2010; Yadav et al., 2014). Els transportadors més específics per a teixits suberificats descrits en *Arabidopsis* –*AtABCG2*, *AtABCG6* i *AtABCG20*– (Yadav et al., 2014), s'han utilitzat per identificar nous candidats –*AtABCG10* i *AtABCG23*– basant-nos en anàlisis de coexpressió. La recerca dels possibles ortòlegs a patata identifica 5 gens –*StABCG1*, *StABCG10*, *StABCG11*, *StABCG20* i *StABCG23*– la relació d'ortologia dels quals no es correspon amb membres concrets d'ABCGs d'*Arabidopsis* (Figura 27). Si bé en *Arabidopsis* s'ha posat de manifest la redundància funcional entre alguns membres, ja que va caldre el triple mutant *Atabcg2 Atabcg6 Atabcg20* per evidenciar un canvi en la composició de la suberina, en patata el silenciament únic d'*StABCG1* va permetre veure grans canvis en la composició química de la suberina amb conseqüències significatives en el desenvolupament normal del periderma del tubercle (Landgraf et al., 2014). Anàlisis *in silico* i experimentals d'acumulació de transcrit en diferents teixits mostren que *StABCG1*, *StABCG10*, *StABCG11*, *StABCG20* i *StABCG23* s'expressen preferentment en pell de tubercle i també en arrel, tot i que en menor mesura (Figura 29 i 31). Aquest fet és coherent amb els resultats obtinguts per Landgraf et al. (2014) on *StABCG1* també s'expressava fortament en tubercle i arrel. Pel que fa a les condicions ambientals, els 5 *StABCGs* candidats s'indueixen per elevades temperatures, però en condicions d'estrès salí la inducció és especialment rellevant sobretot pels gens *StABCG11*, *StABCG20* i *StABCG23*, d'acord amb la inducció del possible ortòleg *AtABCG11/WBC11* en condicions d'estrès salí (Panikashvili et al., 2007). Pel que fa a l'estrès biòtic l'expressió dels diferents candidats *StABCG* està en funció del tractament aplicat. Més homogènies són les expressions gèniques derivades de tractaments hormonals ja que tots els gens s'indueixen amb gibberel·lines, citoquinines i ABA, encara que per auxines només s'indueix de manera clara l'*StABCG11* (Figura 30). Aquests resultats però no estan d'acord amb els trobats experimentalment per Yadav et al. (2014), on es demostra que l'auxina indueix lleugerament l'expressió dels gens *AtABCG1* i *AtABCG20* mentre que les gibberel·lines reprimeixen lleugerament *AtABCG20*. Aquestes discrepàncies podrien deure's a que les concentracions, els òrgans i la durada dels tractaments per gibberel·lines i auxines no coincideixen en ambdós estudis. Pel que fa al tractament amb ABA, els resultats *in silico* estan d'acord amb l'activació de l'expressió gènica dels 5 *AtABCGs* (Panikashvili et al., 2007; Yadav et al., 2014) i amb la presència d'elements reguladors en *cis* d'ABA en les seqüències

promotores, com també de gibberel·lines i d'alta temperatura (Taula 11). Tots els gens *StABCGs* candidats s'indueixen per ferida del tubercle de patatera, essent *StABCG1* i *StABCG11* els que presenten una inducció més ràpida després de la ferida (Figura 32A), suggerint que tots aquests gens poden tenir un paper molt important en la cicatrització relacionada amb la suberina ja que presenten un perfil d'acumulació de transcrit similar a gens biosintètics i reguladors de la suberina com és el cas d'*FHT* i *StNAC103* (Boher et al., 2013; Verdaguer et al., 2016). La inducció del gen *StABCG20* també es dona en fulla ferida, tot i que la inducció es dona més tardanament (Figura 32B). La localització subcel·lular (Figura 33) a membrana de les proteïnes StABCG1, StABCG20 i StABCG23 és coherent amb el demostrat en el cas de l'StABCG1 (Landgraf et al., 2014) i l'AtABCG20 (Yadav et al., 2014).

Els assajos de coexpressió (Taula 12-16) per a cadascun dels gens d'*Arabidopsis* demostren una relació amb gens implicats en la biosíntesi de suberina, ceres i lignina, corroborant de nou el paper dels gens ABCGs en el transport d'aquests compostos cap a la paret cel·lular. També s'ha trobat coexpressió amb altres gens de la família ABCG el que apunta a possibles candidats per formar heterodímers, ja que els ABCG de tipus WBC requereixen de la formació d'homodímers o heterodímers per ser complets i poder així realitzar la seva funció (McFarlane et al., 2010). Un altre fet remarcable és que el gen *AtABCG20* coexpressa amb el gen *ANAC058*, el qual el seu ortòleg a patata *StNAC103* reprimeix l'acumulació de suberina i ceres (Verdaguer et al., 2016). La relació d'aquest regulador amb l'StABCG11/AtABCG11 també s'ha descrit, primer perquè en línies silenciades per *StNAC103* s'indueix l'expressió d'StABCG11 i perquè els promotors d'ambdós gens (*StNAC103* i *AtABCG11*) s'activen en el meristema apical i lateral de l'arrel (Bird et al., 2007; Luo et al., 2007; Panikashvili et al., 2007, 2010; Verdaguer et al., 2016). És també destacable la coexpressió dels StABCGs amb la proteïna AtLTPI.4 la qual recentment s'ha identificat en teixits que requereixen suberització o cutinització, i que està involucrada en la formació de barreres lipídiques extracel·lulars (Deeken et al., 2017). El fet de que coexpressin aquests dos tipus de proteïnes posa de rellevància la hipòtesi de que els ABCGs transporten monòmers i oligòmers de cutina o suberina, o compostos cèrics a través de la membrana plasmàtica cap a l'espai extracel·lular on serien units per les nsLTPs les quals les dipositarien correctament dins l'ambient hidrofílic de la paret (Beisson et al., 2012; Salminen et al., 2016) i/o permetrien l'adhesió entre les capes hidrofòbiques i hidrofíliques de la paret (Jacq et al., 2017).

4.6-Les arrels peludes com a model d'estudi de teixits suberitzats

En patata, el sistema més comú per a l'obtenció de plantes transgèniques estables és mitjançant la transformació amb soques d'*Agrobacterium tumefaciens*, però aquest sistema és costós en quan a temps i diners, ja que cal regenerar una planta sencera mitjançant la utilització d'hormones, motiu que ha contribuït a desenvolupar mètodes alternatius que puguin superar aquestes limitacions. L'ús d'*Agrobacterium rhizogenes* per aconseguir arrels peludes (*hairy roots*) transformades n'és un exemple. Per a aquesta transformació s'utilitzen soques d'*A. rhizogenes* amb el plasmidi Ri (*root inducing*) natiu el qual és bastant més desconegut que el plasmidi Ti (*tumor inducing*) d'*A. tumefaciens*. Aquest plasmidi Ri conté gens responsables de la inducció de *hairy roots* (*rol A, B, C i D*), de la síntesi d'opines i gens de síntesi d'auxines (necessaris per al manteniment d'aquestes arrels) en el seu T-DNA, el qual una vegada inserat en el DNA de la cèl·lula vegetal la desregula hormonalment el que dona lloc a la proliferació i organització cel·lular en forma de primordis d'arrels generant així el que es coneix com arrels peludes en els punts d'infecció (Nemoto et al., 2009). Per a estudis de genètica funcional, *A. rhizogenes* es transforma amb un plasmidi binari, el T-DNA del qual també serà incorporat en el DNA genòmic de la cèl·lula vegetal, generant així arrels peludes transgèniques o transformades. Aquestes arrels transformades es mantenen en el brot original salvatge generant una planta composta o bé se n'escindeixen i s'autopropaguen en un medi lliure d'hormones (Tarkowski & Verecke, 2014). Aquest és un sistema de transformació estable en el temps, però no estable entre generacions ja que els òrgans florals formen part de la planta salvatge. El sistema s'ha utilitzat per a estudis de genètica funcional en patata, eucaliptus i tomàquet (Horn et al, 2014; Ron et al, 2014; Phuong et al 2014; Plasencia et al., 2016) i ha demostrat ser vàlid per l'estudi a la resposta hormonal (Ding et al., 2008; Isayenkov et al., 2005) i de promotors (Dalton et al., 2009; Limpens et al., 2004).

La comparativa de la suberina de l'arrel i del periderma de la patata va mostrar que ambdues eren molt semblants (Company-Arumí et al., 2016) el que pressuposa que els gens relacionats amb la biosíntesi i deposició de la suberina seran compartits en ambdós teixits. Així, per a l'estudi dels teixits suberificats, la transformació genètica d'arrels peludes en patata creiem que pot ser útil per a l'estudi funcional de gens suberificats, aprofitant la seva expressió en l'endodermis i l'exodermis. Aquest sistema permetria fer un cribratge i selecció de candidats mitjançant la modificació de la seva expressió en arrels peludes previ a la creació de patateres transgèniques estables, les quals permetrien també avaluar la funció en el periderma del tubercle. Aquesta estratègia permetria avaluar un número més elevat de candidats i representaria un sistema més ràpid i menys costós (per no necessitar d'hormones).

La present tesi ha desenvolupat el sistema que ens ha permès obtenir arrels peludes transformades de patata cv. Desirée basant-nos en el treball de Horn et al. (2014). Les arrels obtingudes han demostrat ser útils per a l'estudi de promotors i per modificar l'expressió gènica via RNA d'interferència. Les arrels transformades (des de l'obtenció de les plantes crescudes *in vitro* de 3 setmanes fins la comprovació de les arrels transformades mitjançant microscòpia) s'han obtingut en 3-4 setmanes i en 4-6 setmanes més s'ha obtingut suficient biomassa per a l'anàlisi composicional de la suberina. Aquest és un temps molt més curt comparat amb l'obtenció de patates transformades genèticament, que s'estén entre 8-12 mesos. L'estudi del periderma modificat genèticament mitjançant *A. Tumefaciens* és més llarg perquè requereix de la regeneració de la planta transgènica a partir del teixit transformat, la selecció i propagació de plantes, i finalment l'obtenció de tubercles.

4.7-Les arrels peludes expressen de manera correcta gens relacionats amb la suberina i en mantenen la seva composició química

L'expressió gènica del promotor *FHT* a través de l'estudi de l'activació del gen reporter *GUS*, ha determinat que *FHT* s'expressa en les capes internes i suberificades de les arrels (exodermis i endodermis) i en les zones de ferida, d'igual manera que en les arrels de plantes de patata transformades de forma estable (Boher et al., 2013). A més, s'ha identificat expressió d'*FHT* en les zones que envolten l'emergència de les arrels laterals, coincidint amb l'expressió reportada per altres gens involucrats en la formació de la suberina com l'*ABCG11/WBC11* (Bird et al., 2007; Luo et al., 2007; Panikashvili et al., 2007, 2010) o el regulador *StNAC103* (Verdaguer et al., 2016). La coincidència en l'expressió d'*FHT* en arrels de plantes estables i en arrels peludes evidencia que les arrels peludes no presenten canvis importants en el desenvolupament, almenys aquells que afecten els teixits suberificats. A la vegada aquest és un bon mètode per validar d'una manera relativament ràpida promotors de gens relacionats amb l'acumulació de la suberina i/o processos que es donen específicament a les arrels.

A més, la suberina de les arrels peludes presenta un patró químic composicional molt semblant a l'observat per les arrels salvatges natives. En ambdues arrels s'ha identificat els mateixos monòmers (Figura 40) i en les mateixes proporcions de tipus de monòmer (Figura 41). Les arrels només difereixen en que en el cas de la suberina de les arrels peludes, a nivell general, presenta una disminució dels monòmers de cadena molt llarga, específicament a partir de 26 carbonis, efectes que també podrien deure's a les condicions de cultiu diferencials usades en els dos tipus d'arrels. Aquest fet suggereix que els gens relacionats amb la suberina poden ser estudiats usant el model proposat d'arrels peludes, però que com a

control s'hauria d'utilitzar sempre arrels transformades amb el vector buit. D'acord amb la similitud entre les suberines dels dos tipus d'arrels, el gen biosintètic *CYP86A33* (Figura 42A), el qual codifica per una ω -hidroxilasa d'àcids grassos de suberina (Serra et al., 2009b), s'expressa en arrels peludes. A més d'aquests, els gens candidats *StABCG20*, l'*StLTPL3* i l'*StERF93*, també mostren una expressió clara en aquestes arrels (Figura 42C, 42E, 42F). Aquests gens s'han aconseguit silenciar amb èxit en arrels peludes (Figura 42B, 42D, 42F, 42H) el que permetrà poder relacionar-los amb la seva funció en la suberina.

4.8-Transcriptoma del fel·lema d'alzina surera durant l'etapa de creixement

Durant els últims anys, la seqüenciació d'alt rendiment mitjançant la tecnologia *Next Generation Sequencing* (NGS) aplicada al transcriptoma (RNAseq), ha estat un mètode molt eficient per obtenir seqüències i informació funcional d'organismes no model, els quals no tenen un genoma de referència seqüenciat (Morozova et al., 2009). Aquesta seqüenciació del transcriptoma millora la cobertura del transcriptoma enfront a mètodes basats en la seqüenciació per Sanger (Morozova et al., 2009) i ha permès descobrir gens, realitzar anàlisis d'expressió diferencial i desenvolupar marcadors moleculars. Actualment, la metodologia d'RNAseq ha reduït molt el seu cost i la seva complexitat experimental. A més, la tècnica ha desplaçat els *microarrays*, ja que no presenta les seves limitacions tals com tenir hibridació creuada i tenir un rang d'expressió limitat entre la sensibilitat i la saturació de senyal (Wang et al., 2010). Fins fa poc per generar transcriptomes d'un organisme no model o sense el genoma seqüenciat, com és el cas de *Quercus suber*, s'utilitzava la plataforma 454 de Roche per obtenir seqüències més llargues (Morozova et al., 2009; Pereira-Leal et al., 2014; Teixeira et al., 2014; Teixeira et al., 2017; Boher et al., 2017). No obstant, els costos econòmics limitaven la profunditat de seqüenciació de la plataforma 454 impeding l'anàlisi diferencial d'expressió de transcrits entre mostres, especialment aquells que són poc abundants. Recentment, la plataforma Illumina HiSeq2500 permet obtenir seqüències més llargues, de 150 pb, amb un poder de seqüenciació molt més profund i amb uns costos econòmics molt inferiors. Aquest fet fa l'anàlisi molt més quantitatiu ja que seqüencia varies vegades el mateix mRNA, evita la pèrdua d'aquells RNAs que estiguin poc representats i permet treballar amb varies rèpliques biològiques per cada mostra. És per aquest motiu, que per analitzar el transcriptoma estacional de l'alzina surera (apartat 3.4) es va escollir la plataforma Illumina. Comparant les nostres dades amb un estudi realitzat també al Laboratori de Suro on es va seqüenciar el transcriptoma d'alzina surera (*Quercus suber*) vs. alzina (*Quercus ilex*) mitjançant la plataforma 454 (Roche) (Boher, 2016 veure Taula S1), es pot observar que la mitjana de la llargada dels contigs és de 609 nt enfront dels 818,4 nt de l'estudi amb la plataforma 454. Per

contra el número de contigs totals presents al transcriptoma usant Illumina és molt més elevat en el nostre cas, essent d'uns 404.970 contigs davant dels 16.865 contigs trobats amb la plataforma 454. Aquest fet demostra la profunditat d'Illumina HiSeq2500 i en conseqüència dóna robustesa a les anàlisis quantitatives i permet detectar transcrits poc abundants. Per altre banda, es posa de manifest que la llargada de seqüència d'Illumina és suficient per anotar amb eficiència un transcriptoma *de novo*.

Per validar els resultats d'expressió mitjançant el present RNAseq, es va comparar els valors de log₂ ratio obtinguts amb els obtinguts per RT-qPCR (Soler et al., 2008; Boher et al., 2017) fent correlacions directes entre mesos i per tant, comprovant que els gens es comportaven igual en ambdós estudis. Alguns d'aquests gens, com *NAC058* i *WRKY43*, *CYP86A1* i *bAS*, implicats en el metabolisme secundari, tenen un patró d'expressió amb una inducció clara durant el mes de juny, i han estat catalogats com a gens involucrats en la biosíntesi i regulació del domini de la suberina alifàtica (Boher, 2006). Altres gens com *STM* i *WOX4*, implicats en la regulació meristemàtica, les quals evitarien que les cèl·lules del fel·logen es diferenciessin de manera prematura (Boher, 2016) i *FLC* implicat en la vernalització i control de l'activitat estacional del fel·logen, tenen un patró d'expressió oposat, essent l'expressió més alta l'abril i més baixa durant el mes de juny. En conclusió aquests resultats evidencien un augment de l'activitat meristemàtica durant el mes d'abril i una major síntesi de suberina durant el mes de juny (Taula Suplementària 4).

4.9-L'alta expressió i la inducció màxima durant el mes de juny dels gens coneguts de la biosíntesi, transferència i transport de la suberina proposa nous candidats

Actualment s'ha demostrat la implicació de molts gens en l'acumulació de la suberina, en patata i sobretot en *Arabidopsis* (Rhanathunge et al., 2011; Vishwanath et al., 2015). La biosíntesi de la suberina és necessària per a la funció del fel·lema (suro) i durant el creixement estacional del suro alguns gens analitzats han mostrat un pic d'expressió el mes de juny, coincidint amb l'etapa màxima de creixement d'aquest teixit (Soler et al., 2008, Boher, 2016). L'anàlisi transcriptòmic via RNAseq dels mesos d'abril, juny i juliol han permès conèixer l'estacionalitat de tots els gens coneguts de la biosíntesi, transport i regulació de la suberina i compostos cèrics (Figura 44). Les dades mostren que la majoria de gens implicats en l'elongació dels àcids grassos del complex FAE (*KCS20*, *KCS1* i *KCS6*), que estan relacionats amb la formació dels àcids grassos de cadena molt llarga necessaris per la síntesi de ceres i suberina (Lee et al., 2009; Serra et al., 2009a; Todd et al., 1999), contenen un pic d'expressió durant el mes de juny. En canvi el gen *KCS2* (Franke et al., 2009; Lee et al., 2009) que té baixos nivells d'expressió, té el pic a l'abril. Tots aquests resultats mostren que

l'elongació d'àcids grassos de cadena molt llarga es dona d'abril a juliol però és més intensa durant el mes de juny. Pel que fa a les reductases d'àcids grassos-CoA, les quals s'han involucrat en la formació d'alcohols primaris en ceres i suberina (Domergue et al., 2010; Rowland et al., 2006), s'observa que els gens *FAR4* i *FAR5*, essent més expressat el gen *FAR4*, presenten un pic d'expressió durant el mes d'abril. Referent a la via d'oxidació dels àcids grassos, els gens CYP (*CYP86A1* i *CYP86B1*) (Compagnon et al., 2009; Höfer et al., 2008) són gens d'alta expressió i presenten un màxim d'acumulació de transcrit durant el mes de juny. Els feruloil èsters d'àcids grassos són cabdals per la funció barrera del fel·lema (Serra et al., 2010) i són produïts per l'ASFT (Gou et al., 2009; Molina et al., 2009), el qual és un gen d'alta expressió amb un pic d'acumulació de transcrit durant el mes de juny. En canvi, el gen *FACT*, que està implicat en la formació de cafeoil èsters d'àcids grassos (Kosma et al., 2012) i presenta uns nivells d'expressió menors en el suro, té major acumulació de transcrit durant el mes d'abril. Pel que fa al gen *GPAT5*, que presenta activitat acil-CoA: glicerol-3-fosfat aciltransferasa i amb un paper clau en l'acumulació de la suberina (Beisson et al., 2007), també presenta una gran acumulació de transcrit i un pic al juny. En relació als transportadors ABCGs, *ABCG20* i *ABCG6* els quals s'han relacionat amb la suberina (Yadav et al., 2014), tenen alta i mitjana expressió respectivament, mentre que la resta de transportadors tenen nivells d'expressió més baixos. *ABCG20* i *ABCG6* presenten un pic al juny mentre que el transportador *ABCG2* presenta un pic d'expressió al juliol. Pel que fa a les LTPs, les quals permeten el moviment de monòmers en la paret cel·lular i/o l'adhesió entre la capa hidrofòbica/hidrofílica (Deeken et al., 2017; Jacq et al., 2017), s'ha identificat l'AtLTPI.4 amb una elevada expressió durant el mes de juliol. S'ha vist que l'AtLTPI.4 facilita la transferència de cadenes llargues i cadenes molt llargues d'àcids grassos cap a l'apoplast i que està involucrada en la formació de suberina en calls generats per infecció d'*A.tumefaciens*.

És destacable que la majoria de gens biosintètics de la suberina i ceres associades que tenen elevada expressió (>1.000 FPKMs) presenten un pic d'expressió al juny. Aquesta observació suggereix que tot i que la biosíntesi de suberina (i ceres associades) està activa durant tota l'estació de creixement del suro, és durant el mes de juny quan es dona el pic de biosíntesi, coincidint amb la taxa de creixement màxim del suro donades les condicions climàtiques adequades per a la seva producció. L'observació que els gens d'alta expressió i amb un pic durant el mes de juny són gens clau en la biosíntesi de la suberina i ceres associades ens ha servit per identificar nous gens candidats (Figura 45), els quals es troben expressats en el transcriptoma del fel·lema i molts d'ells s'han trobat involucrats en la biosíntesi de cutina i

ceres cuticulars. És interessant destacar que, dins aquesta llista de gens candidats per a la biosíntesi, la majoria dels que tenen alta expressió continuen presentant el pic durant el mes de juny. Els candidats de l'elongació d'àcids grassos que compleixen aquest requisit són *KCR1*, *PAS2* i *ECR* els quals s'han relacionat amb la formació de ceres en *Arabidopsis* (Park et al., 2016) i la formació del periderma de pollancre (Rains et al., 2017). També s'ha identificat un membre de la família LACS (Long-chain acyl-CoA synthetase) que té un rol en la síntesi de lípids i el transport d'àcids grassos entre compartiments subcel·lulars. La LACS2, trobada fins al moment en la formació de la cutina (Schnurr et al., 2004) i recentment identificada amb expressió significativa en el periderma de pollancre (Rains et al., 2017), conté una expressió molt elevada durant el mes de juny. En la via dels fenilpropanoids s'identifiquen 4 gens -*CCoAOMT*, *C4H*, *4CL1* i *CH3*- relacionats anteriorment amb la síntesi de la lignina en *Arabidopsis*, però que recentment també s'han identificat en pollancre com a important per a la formació del periderma (Rains et al., 2017). D'acord amb això, la biosíntesi de fenilpropanoids s'ha descrit com una via important per la formació d'un suro de bona qualitat, enfront de la via dels flavonoides induïda en suros de mala qualitat (Teixeira et al., 2017). Respecte a les LTPs s'observa que els gens *LTPG5*, *EDA4* i *LTP* (At3g22620) d'elevada expressió tenen un pic al juny. Les dues primeres són proteïnes ancorades a membrana a través del glicosilfosfatidilinositol (GPI), mentre que la primera i l'última estan situades en tàndem al genoma d'*Arabidopsis*. La *LTPG5* és una LTP ancorada a membrana a través del glicosilfosfatidilinositol (GPI) (*LTPG*) i s'ha relacionat amb la suberina ja que el mutant d'*Arabidopsis* presenta un descens dels àcids grassos ω -hidroxiàcids i un increment en la permeabilitat de la coberta de la llavor (Edstam & Edqvist, 2014), fenotip típic dels mutants de suberina. La *EDA4* (*embryo sac development defective*) (Pagnussat et al., 2004) també és una LTP ancorada a membrana via GPI, mai relacionada amb la suberina. Cal destacar que la *LTP* (At3g22620) es localitza just al costat de la *LTPG5* en el genoma d'*Arabidopsis* pel que no es descartaria una regulació conjunta en aquestes proteïnes. D'acord amb això, l'expressió de la *LTP* (At3g22620) s'activa per la unió del MYB41, gen regulador de la suberina (Kosma et al., 2014), a la seva seqüència promotora (Hoang et al., 2012). Curiosament és en les LTPs on apareixen patrons d'expressió anòmals. Aquest és el cas de 2 gens que estan molt expressats però el seu màxim d'expressió no és durant el mes de juny, un tàndem curiós i no observat per cap més gen ja sigui conegut de la suberina o candidat (Figura 44 i 45). Aquests 2 gens corresponen a la nsLTPI.3 (candidat proposat en el apartat 3.2.2 com a transportador de monòmers o polímers de suberina) i l'AtLTPIV.I (també conegut com a DIR1), els quals s'expressen de manera abundant durant el mes d'abril i tenen

un patró de localització subcel·lular similar. DIR1 (Cecchini et al., 2015) s'ha suggerit per transportar senyals lipídiques intracel·lulars a través de l'intercanvi de lípids en els contactes directes membrana–membrana (*membrane contact sites*; MCSs) (Cecchini et al., 2015), els quals són rics en LTPs (Helle et al., 2013) i en plantes es formen entre el cloroplast, el reticle endoplasmàtic i la membrana plasmàtica (Andersson et al., 2007). Tot i que DIR1 és un component de la resistència adquirida sistèmica (SAR) la qual s'activa després de la percepció de patrons moleculars conservats de microorganismes (MAMPs; *microbe-associated molecular patterns*), tals com el pèptid *flg22* (Cecchini et al., 2015), la seva expressió a suro suggereix que podria també participar en la creació de MCS per el transport intracel·lular de monòmers de suberina a través dels contactes membrana-membrana. Aquest mecanisme ja fou suggerit per Wang & Benning (2012) per explicar la localització subcel·lular de CYP86B1 en la cara citoplasmàtica de l'embolcall extern del cloroplast i en el reticle endoplasmàtic (Watson et al., 2001). Tenint en compte la seva expressió màxima durant el mes d'abril, pic d'expressió coincident per gens d'alta expressió de la síntesi d'àcids grassos (FAE) a cloroplast (KAR o BC) (Figura 44), podria fer pensar que els contactes facilitarien l'exportació d'àcids grassos del cloroplast al reticle endoplasmàtic per ser modificats o directament a la membrana plasmàtica per ser exportats.

4.10-La regulació de la biosíntesi de la suberina apunta a nous candidats

Pel que fa referència a la possible regulació de la suberina, trobem gens amb nivells d'expressió de tots tipus (Figura 44). Entre els reguladors amb alts nivells d'expressió trobem el *NAC58* i el *MYB107* i amb expressió mitjana el gen *MYB93*, tots tres amb un pic màxim d'expressió durant el més de juny. El gen *NAC058*, l'ortòleg del qual a patata (*StNAC103*) s'ha descrit recentment com a regulador negatiu de la biosíntesi de suberina i ceres associades en el periderma del tubercle (Verdaguer et al., 2016), mentre que el *MYB107* (Lashbrooke et al., 2016) i *MYB93* (Legay et al., 2016) indueixen la deposició de la suberina. Per contra, també es va identificar el gen *MYB41* que tot i que s'expressa de manera més elevada al juliol, té uns nivells d'expressió totals pràcticament nuls (<1 FPKMs). *MYB41* es va relacionar inicialment amb estrès abiòtic (Cominelli et al., 2008) i posteriorment es va observar que provocava l'acumulació ectòpica de suberina en fulles juntament amb la inducció de gens biosintètics de la suberina (Kosma et al., 2014).

Pel que fa als candidats a participar amb la suberina (Figura 45) destaquen 3 gens de la família d'ERF: *SHN1*, *SHN2* i *ERF107*. *SHN1* i *SHN2* són gens reguladors de la família dels ERF que s'han proposat per participar en el control del metabolisme de lípids, el metabolisme de pectines i proteïnes estructurals de paret en determinats teixits cutinitzats i s'han identificat

gens implicats en la biosíntesi de ceres i suberina com a possibles dianes seves (Shi et al., 2011). D'acord amb això, l'expressió de SHN1 en *Morus indica* L. resulta en un increment en la quantitat de ceres a la fulla el que redueix la transpiració (Sajeevan et al., 2017) i l'expressió de PsnSHN2 de *Populus* en *Nicotiana* ha descrit PsnSHN2 com a regulador de la formació de la paret secundària (Liu et al., 2017). Ambdós gens presenten un pic d'expressió durant el mes de juny, i també una expressió destacada durant el mes de juliol, coincidint amb l'expressió màxima de gens de la suberina. *ERF107* (conegut també com *Decrease Wax Biosynthesis* – DEWAX) s'ha relacionat amb un augment en les càrregues totals de les ceres en fulles i tiges. La seva sobreexpressió redueix aquesta càrrega i altera l'ultraestructura de les capes cuticulars regulant negativament l'expressió de l'enzim formador dels alcans entre d'altres (Go et al., 2014) i suggereixen que DEWAX interactua directament amb els promotors de gens biosintètics de ceres com *CER1*, *LACS2*, *ACLA2* i *ECR* (Suh & Go, 2014). Aquest gen tot i mostrar el seu pic d'expressió durant el mes de juliol, té una expressió considerable durant el mes de juny.

Altres gens reguladors que s'han relacionat amb l'acumulació de cutina i ceres però amb el pic d'expressió durant l'abril són *CER7*, *HDG1* i *MYB96*. *CER7* codifica per una 3'-5' exoribonucleasa de l'exosoma que regula positivament l'acumulació de transcrits de *CER3*, gen involucrat en la biosíntesi de ceres cuticulars (Zhao & Kunst, 2016). A més, s'ha descrit que aquest exosoma està associat a un altre complex SUPERKILLER que és requerit per al control de la biosíntesi de les ceres cuticulars (Zhao & Kunst, 2016) i que al nostre estudi trobem varis dels gens associats a aquest complex, com per exemple *SKI1* (At1g76630), *SKI2* (At3g46960) i *SKI8* (At4g29830) amb expressió baixa en tots els casos (<200 FPKMs) i amb expressions més altes durant el mes d'abril, coincidint amb l'expressió de *CER7*. *MYB96* s'indueix per àcid abscísic i regula la senyalització durant la resposta a estrès de sequera induint l'expressió de gens biosintètics de les ceres cuticulars (Seo et al., 2011). També, s'ha vist que mutants de *MYB96* en la planta *Camelina* augmenten els nivells d'alcans i alcohols primaris respecte a la planta nativa, i disminueix la transpiració en les fulles. A més, s'ha vist que l'expressió de gens implicats en la biosíntesi de ceres i suberina com *KCS2*, *KCS6*, *KCR1* i *ERC* són molt més elevats en les plantes mutades per *MYB96*, suggerint que podria ser un bon candidat (Lee et al., 2014). *HDG1* codifica per una homeobox-leucine zipper family protein implicada en la unió a DNA (Ruberti et al., 1991) i s'ha detectat que la supressió d'aquest resulta en un fenotip defectiu de la cutícula (Wu et al., 2011).

4.11-L'agrupació dels perfils d'acumulació de transcrits evidencia quins processos són predominants en les diferents etapes

L'agrupació jeràrquica de les dades d'expressió dels mesos abril, juny i juliol va determinar que les llibreries de juny i juliol s'agrupaven formant un clade (Figura 46) indicant una major similitud de transcriptomes. Aquest fet està d'acord amb que juny i juliol són mesos més homogenis en quan a l'activitat del suro en comparació amb el mes d'abril, quan es donaria la sortida de la dormància del teixit, degut segurament a les diferències ambientals que es donen en els diferents mesos.

L'anàlisi dels gens diferencialment expressats mitjançant l'eina bioinformàtica MapMan demostra l'activació durant el mes de juny i juliol dels gens implicats en la degradació del midó, la glucosa i la glicòlisi, passos necessaris del metabolisme primari per a la síntesi dels àcids grassos precursors de la suberina (Figura 47). Durant aquests mesos també està molt actiu el metabolisme secundari de biosíntesi de flavonoides i fenilpropanoides, vies marcadores de suros de mala i bona qualitat (Teixeira et al., 2017). Al juny, i sobretot al juliol trobem molt activat l'estrès abiòtic que es podria relacionar amb les altes temperatures i la baixa humitat que tenen lloc durant aquests mesos. En concret trobem proteïnes relacionades amb la resistència a calor (HSP), que ja s'havien relacionat prèviament amb el fel·lema de la surera (Pla et al., 2000). Pel que fa als gens induïts al mes d'abril, s'han identificat gens que codifiquen per proteïnes de defensa relacionades amb el reconeixement i resposta a patògens. Si bé la presència de proteïnes de defensa no és un fet estrany en el fel·lema el qual separa els teixits interns de l'ambient (Barel & Ginzberg, 2008; Ricardo et al., 2011), no existeix una explicació simple per entendre la inducció d'aquestes proteïnes durant l'inici del període de creixement de suro. Una hipòtesi vindria donada per la necessitat d'activar simultàniament els gens de resposta per a activar la formació d'un teixit suberificat, mimetitzant el que succeeix en processos de ferida o formació del periderma cicatricial independentment de la presència de patògens (Chaves et al., 2009). Això podria estar relacionat amb la forta necessitat de protegir les cèl·lules durant els processos estressants com la dessecació, protecció davant malalties, detoxificació i mort cel·lular que tenen lloc durant l'activació del meristema/fel·lema (Ricardo et al., 2011). Al tractar-se d'un teixit crescut en condicions naturals, altres explicacions vindrien donades pel fet que durant el mes d'abril i juny/juliol el teixit estigués sotmès a determinats patògens que activessin vies de resposta diferents. Per altra banda, hi ha un seguit de gens diferencialment expressats durant el mes de juliol que estan relacionats amb la síntesi de la paret cel·lular (Figura 47). Això podria relacionar-se amb el fet que el mes de juliol és un mes molt calorós en el bosc

mediterrani, fet que implica sequera durant aquest període. En condicions de falta d'aigua, les cèl·lules per tal de mantenir la pressió de turgència incrementen l'elasticitat (Saito & Terashima, 2004) a través de la inducció de proteïnes de paret, incloses les expansines, les quals es sobreexpressen en condicions de poca aigua (Jones & McQueen-Mason, 2004).

Els gens diferencialment expressats al llarg de l'estació es van agrupar en 5 clústers en funció de la seva expressió dels quals se'n va analitzar les categories funcionals GO enriquides. Pel que fa als clústers, aquests es poden subclassificar depenent del pic d'expressió: al mes d'abril (clúster 1, 2 i 3), al mes de juny (clúster 4) i al mes de juliol (clúster 5). A nivell general trobem que els clústers amb un pic màxim d'expressió a l'abril contenen categories enriquides en processos de senyalització i resposta, transducció del senyal, categories relacionades amb el processament d'RNAs, metabolisme primari, modificació de lípids i categories relacionades amb el creixement i la paret cel·lular. Aquestes categories són coherents amb el fet que després de la pausa hivernal es necessita d'una gran activitat transcripcional i traduccional per tal de poder desencadenar la formació del fel·lema, el qual necessita un programa genètic-cel·lular diferent. L'activació del metabolisme també està d'acord amb l'activació meristemàtica i per tant el creixement cel·lular que es comença a donar durant aquest mes. També destaca una categoria implicada en el procés de biosíntesis de la lignina i aquesta és interessant perquè s'ha observat que l'acumulació dels compostos aromàtics que s'uneixen a la suberina té lloc prèviament a l'acumulació dels compostos alifàtics (Yang & Bernards, 2006), per tant, ens podria indicar que la paret cel·lular s'està preparant per la deposició de la suberina. És interessant destacar que categories com la senyalització, transducció del senyal i defensa es troben juntes en el clúster 1 i 2 evidenciant que els gens representats amb un pic a l'abril coexpressen i que per tant són necessàries per posar a punt el funcionament de l'activació del fel·logen. En el clúster 3 hi apareixen també categories relacionades amb el metabolisme primari, el creixement cel·lular i la paret cel·lular, el que suggereix que les cèl·lules del suro estarien preferentment preparant-se per poder tenir un creixement massiu del teixit. En el clúster amb pic al juny (clúster 4) observem categories relacionades amb el metabolisme secundari, però també categories relacionades amb l'estrès, amb processos d'oxido-reducció i amb la regulació. L'enriquiment de les categories relacionades amb el metabolisme secundari coincideix amb els gens de la biosíntesi de la suberina que tenen un pic d'expressió màxim durant el mes de juny. Pel que fa als processos d'oxidació-reducció i d'homeòstasi redox, aquests coincideixen amb l'estrès oxidatiu endògen i la senescència que pateix el teixit durant la formació del suro (Pla et al., 2000). Així doncs, en global durant el mes de juny es dona la formació de metabòlits secundaris, i la

suberificació, concomitantment amb l'homeòstasi redox per contrarrestar l'estrès oxidatiu provocat per la polimerització dels compostos aromàtics. Per últim, en el clúster amb un pic d'expressió durant el mes de juliol (clúster 5) s'observen sobretot categories relacionades amb l'estrès abiòtic. Aquest fet estaria relacionat amb que durant el mes de juliol d'aquell any la precipitació va ser molt baixa i les temperatures molt elevades.

La figura 51 mostra un esquema de les conclusions més rellevants de l'anàlisi dels transcriptomes durant l'etapa de creixement del suro. En resum, les dades suggereixen que durant el mes d'abril el fel·logen s'activaria per la quantitat de senyals, encara desconegudes, que percebria el teixit. Aquestes senyals podrien estimular la iniciació del creixement cel·lular i conseqüentment activar tots els mecanismes implicats en el metabolisme primari i en la biosíntesis de la paret cel·lular. També, en aquest moment, la síntesi dels compostos aromàtics s'iniciaria per tal d'acumular la lignina, també conegut com a domini aromàtic de la suberina (Bernards & Razem, 2001). Basant-nos en el treball de Boher (2016), on compara l'acumulació de transcrit de varis gens entre suro (fel·lema) i fusta (xilema) en diferents mesos, s'observa que aquells gens que estan induïts en suro (per exemple *SUS4*, *CYP86B1* i *CDSL3*, entre d'altres) tenen una expressió baixa durant el mes d'abril però un pic elevat el mes de juny. En base a aquests resultats i les nostres dades podem dir que és durant el mes de juny quan el creixement del suro i en conseqüència, la formació de suberina és màxima. El teixit estaria enriquit en cèl·lules de fel·lema que estan en estadi de diferenciació, generant un augment de l'activitat metabòlica en general, però especialment del metabolisme secundari, tal com la síntesi de suberina. És molt important remarcar que aquests processos no es donen de manera única i particular en un mes en concret, sinó que tot i que estiguin més actius en certs moments sempre estan presents en el teixit. Finalment, al juliol el teixit pateix molt d'estrès degut a les condicions climàtiques, les quals fan que el creixement del teixit no sigui favorable.

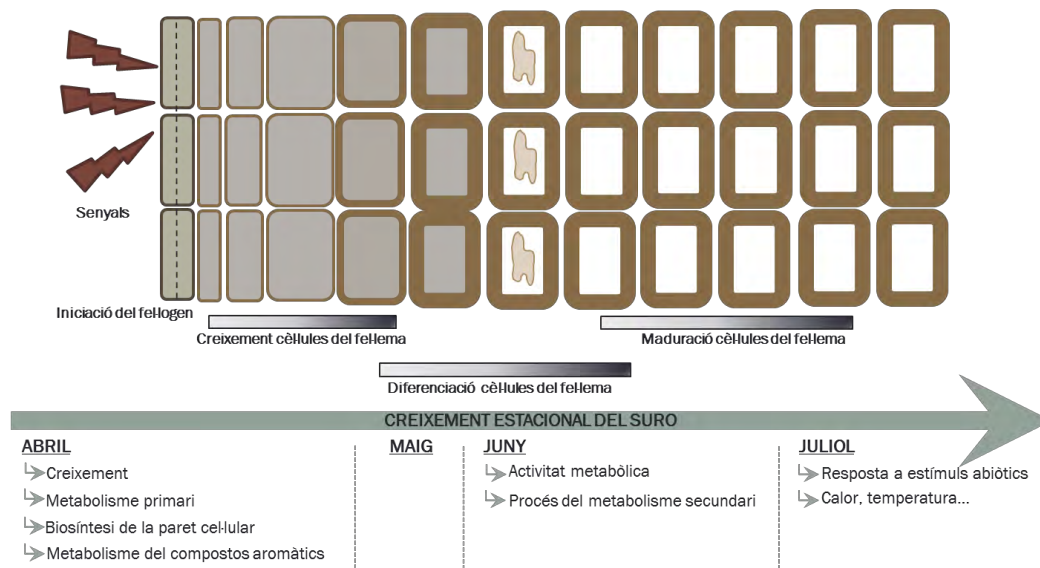
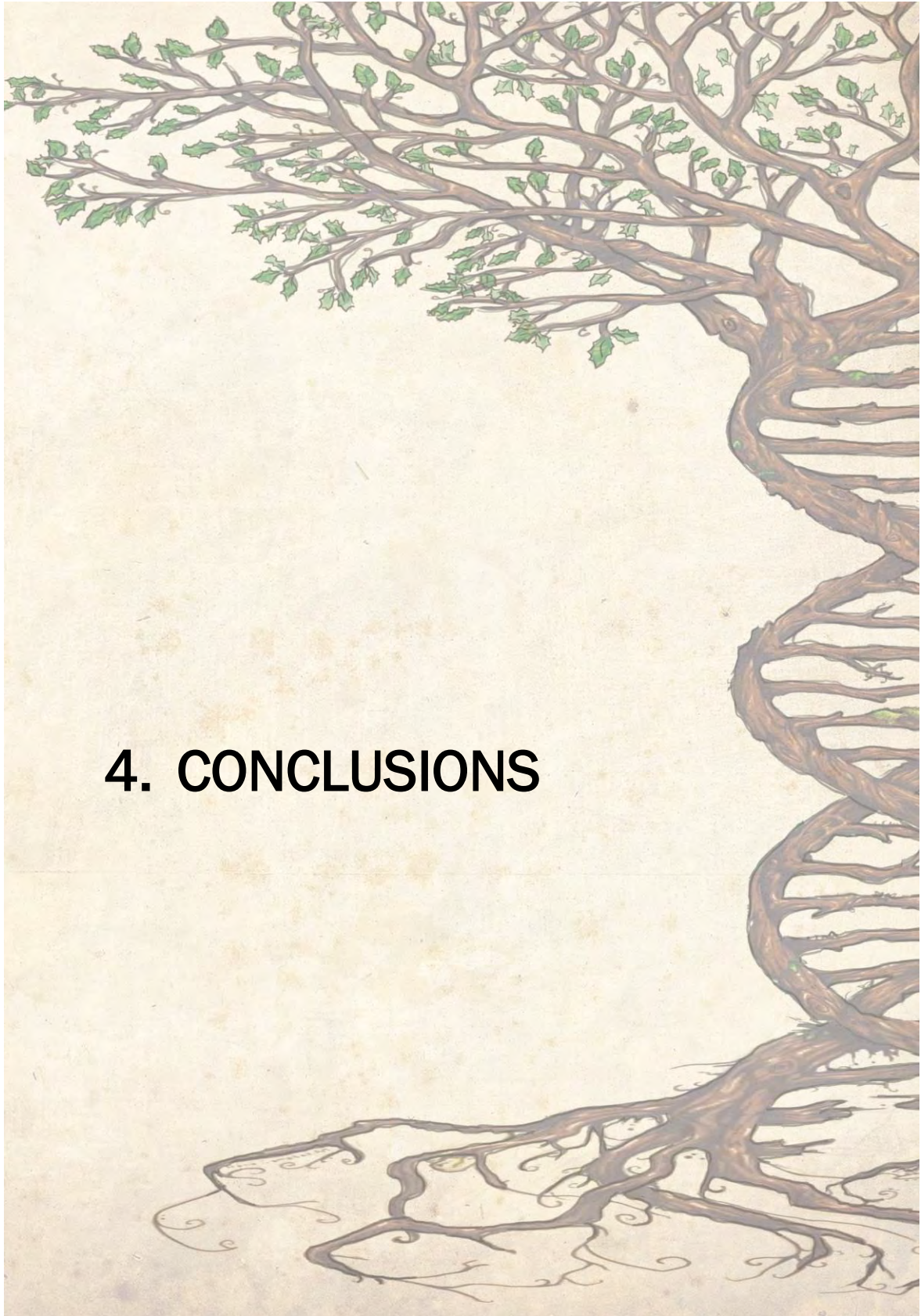


Figura 51. Cronograma del desenvolupament estacional del suro en els tres mesos assajats (abril, juny i juliol) generat a partir de les categories de GOs enriquides en els clústers de gens diferencialment expressats. Es relaciona el mes, les categories GOs i el desenvolupament del suro, des de l'inici de l'activitat del fel·logen fins que les cèl·lules esdevenen madures.



4. CONCLUSIONS

5. Conclusions

Per a l'**objectiu 1**: Identificar proteïnes que interaccionin amb la proteïna StRIK.

1. S'ha obtingut una llibreria de doble híbrid de cDNA de fel·lema de patata que ha permès identificar 29 possibles proteïnes interactores amb la proteïna StRIK, el 17% relacionades amb processos de regulació de l'mRNA, la traducció i l'*splicing* i per tant estan d'acord amb el paper suggerit per StRIK.
2. La possible interactora StRACK1B té un patró d'expressió *in silico* similar a StRIK, ja que s'expressa de manera abundant en la majoria de teixits assajats en planta i s'activa també sota condicions d'estrès. A més, coexpressa amb gens implicats en la regulació del procés post-transcripcionals i de traducció.
3. StRACK1B es localitza al citoplasma i a vegades al nucli. En presència d'StRIK la freqüència de localització d'StRACK1B a nucli augmenta en un 30%, el que suggereix que StRIK arrossega StRACK1B cap a nucli.
4. El gen codificant per la possible proteïna interactant StCisteïna proteïnasa 3 coexpressa amb el gen *APUM5*, implicat en l'estabilitat de l'RNA missatger i la traducció i al que se li ha suggerit un paper en la regulació post-transcripcional durant la resposta a l'estrès, processos que s'han vist desregulats quan StRIK es silencia.
5. La proteïna StCisteïna proteïnasa 3 es localitza al citoplasma, en petits grànuls que podrien correspondre a petits vacúols i en ocasions també a nucli.

Per l'**objectiu 2**: Analitzar *in silico* i caracteritzar diferents gens reguladors i de transport implicats en la formació de la suberina.

6. La proteïna StERF93, la qual conté els dominis per incloure's dins del grup IX, no presenta una relació d'ortologia clara amb un sol membre de la família d'AP2/ERF d'*Arabidopsis*. A més, els gens paral·lels d'*StERF93* que es troben al mateix clúster—*StERF51*, *StERF156* i *StERF162*— contenen nivells d'expressió similars en els diferents teixits, suggerint una possible redundància funcional entre ells.
7. El gen *StERF93* s'expressa de manera més abundant en fel·lema i arrel suggerint un rol d'*StERF93* en teixits suberificats. Tant en fulla com en tubercle ferit, l'expressió d'*StERF93* presenta una primera inducció just després de la ferida la qual estaria d'acord amb la formació de la capa suberificada de tancament. En el tubercle ferit s'observa una segona inducció molt clara als 6 dies de ferida, període que coincideix amb l'inici de la formació del periderma cicatricial, el qual té lloc als 5-7 dies.

8. La proteïna StLTPI.3 manté una relació d'ortologia amb la proteïna QS 156628 de suro i amb la proteïna AtLTPI.3 (At2g18370) d'Arabidopsis, i filogenèticament és molt propera a la proteïna AtLTP1.4, la única nsLTP relacionada amb suberina.
9. La proteïna StLTPI.3 s'expressa de manera molt específica en el fel·lema del tubercle de patatera. L'expressió en teixit ferit és tardana ja que s'indueix a les 48 i 144 hores post-ferida del tubercle i de la fulla, respectivament.
10. La localització subcel·lular d'StLTPI.3 es dona a la perifèria cel·lular i podria ser compatible amb una distribució a reticle endoplasmàtic, el que podria estar d'acord amb el transport intracel·lular de monòmers de suberina i ceres associades.
11. La relació d'ortologia de l'StABCG1, StABCG10, StABCG11, StABCG20 i StABCG23 no es correspon amb els ABCGs d'Arabidopsis, a excepció de l'StABCG10 i l'StABCG23 amb una relació d'ortologia directa. Aquest fet posa de rellevància la redundància funcional entre alguns dels seus membres descrita en Arabidopsis.
12. Tots els ABCGs estudiats s'expressen de manera específica en el fel·lema de patata, i en menor quantitat en arrel. A més, tots s'indueixen per ferida en tubercle de patatera, essent els transcrits d'*StABCG1* i *StABCG11* els que s'acumulen primer. *StABCG20* també és activat per ferida en fulla, tot i que la inducció es dona més tardanament.
13. Els ortòlegs d'ABCG en Arabidopsis mostren coexpressió amb gens implicats en la biosíntesi de suberina, ceres i lignina, recolzant el seu paper en el transport dels components de la suberina i ceres a la paret cel·lular. S'ha trobat coexpressió amb altres gens de la família ABCG el que apunta a possibles candidats per formar heterodímers o homodímers necessaris per ser funcionals.
14. Tots els ABCGs estudiats (StABCG1, StABCG20 i StABCG23) presenten un patró típic de localització a la membrana plasmàtica quan s'expressen en cèl·lules de tabac.

Per a l'**objectiu 3**: Disseny d'un protocol alternatiu més ràpid i eficient per a estudis funcionals de la suberina en patatera basat en l'ús d'*Agrobacterium rhizogenes* per aconseguir arrels transformades.

15. S'ha implementat un protocol de transformació d'arrels de patatera ràpid i eficaç mitjançant *A. rhizogenes* (soca C58C1:pRI1583) i el posterior cultiu d'arrels transformades en medi Gamborg B5.
16. Les arrels transformades via *A. rhizogenes* permeten estudiar l'activació de promotors de gens biosintètics de la suberina ja que l'activació del promotor d'FHT es dona en

els teixits suberificats de l'arrel tal com s'havia demostrat per arrels transformades amb *A. tumefaciens*.

17. La suberina de les arrels peludes transformades amb el vector pK7GWIWG2-(II) Red Root (RR) buit presenta un patró químic composicional molt semblant a l'observat per les arrels natives, amb els mateixos tipus i proporció de monòmers: àcids grassos, diàcids, ω -hidroxiàcids, alcohols primaris i àcid ferúlic. Per tant les arrels peludes transformades són un bon model per a l'estudi de gens relacionats amb la suberina.
18. L'anàlisi d'acumulació de transcrit d'arrels transformades via *A. rhizogenes* mostra que s'ha obtingut un 65% d'eficiència en l'obtenció d'arrels silenciades pels gens *CYP86A33*, *StLTP1.3*, *StERF93* i *StABCG20*.

Per a l'**objectiu 4**: Ampliar el coneixement del creixement estacional del suro i trobar nous gens candidats per a la formació del suro.

19. S'ha generat un transcriptoma de fel·lema de suro *de novo* mitjançant la plataforma Illumina HiSeq2500, el qual es va anotar generant un genoma de referència de fel·lema de 404.970 contigs amb llargades mitjanes de 609 nt.
20. S'ha observat una correlació significativa entre les dades d'expressió d'RNAseq i les d'RT-qPCR (comparant les dades de 29 gens en abril/juny, abril/juliol i juny/juliol) validant les dades d'expressió obtingudes amb la plataforma Illumina.
21. L'anàlisi transcriptòmic via RNA-seq dels mesos d'abril, juny i juliol ha permès conèixer l'estacionalitat de tots els gens coneguts de la biosíntesi, transport i regulació de la suberina i compostos cèrics. Aquests gens presenten un patró d'expressió comú amb elevada expressió (>1000 FPKMs) i un pic d'expressió al juny, suggerint que és durant el mes de juny quan es dona el pic de biosíntesi, coincidint amb la taxa de creixement màxim del suro.
22. L'observació de que els gens d'alta expressió i amb un pic durant el mes de juny són gens clau en la biosíntesi de la suberina i ceres associades ha servit per identificar nous gens candidats per a la biosíntesi (*LACS2*, *KCR1*, *PAS2*, *CER10*, *KCS4*, *CCoAOMT*, *C4H*, *4CL1* i *C3H*) i transport (*LTPG5* i *ED44*) de monòmers de la suberina i/o compostos cèrics.
23. L'agrupació jeràrquica de les dades d'expressió dels mesos d'abril, juny i juliol mostra que juny i juliol s'agrupen en un mateix clade, separat de l'abril, demostrant una major similitud d'aquests transcriptomes.

24. L'agrupació de perfils d'expressió dels gens diferencials al llarg de l'estació de creixement mostra cinc clústers: tres tenen un pic màxim d'expressió a l'abril, un té un pic màxim d'expressió al juny i un altre al juliol.
25. Els clústers que presenten un pic màxim d'expressió a l'abril contenen categories enriquides en processos de senyalització i resposta, transducció del senyal, categories relacionades amb el processament d'RNAs, metabolisme, modificació de lípids i categories relacionades amb el creixement cel·lular i la paret cel·lular. Aquestes funcions són coherents amb l'activació dels meristemes i el creixement del teixit.
26. En el clúster amb pic al juny s'observen categories relacionades amb el metabolisme però també categories relacionades amb l'homeòstasi redox i amb la regulació. La inducció de la homeòstasi redox al juny és coherent amb l'estrès oxidatiu associat a la polimerització dels compostos aromàtics units a la suberina.
27. En el clúster amb un pic d'expressió durant el mes de juliol s'observen categories relacionades amb l'estrès abiòtic. Aquest fet és coherent amb les condicions climàtiques d'aquest mes.



5. MATERIAL I MÈTODES

6.1-Identificació de proteïnes que interaccionen amb *StRIK* mitjançant el mètode del dos híbrids en llevat

6.1.1-Etapes prèvies a la creació d'una llibreria de cDNA

6.1.1.1-Extracció d'RNA pel mètode Z6

L'RNA és una molècula molt poc estable que pot ser degradat per RNAses, les quals es troben de manera abundant arreu. Per aquest motiu, durant tot el procés d'extracció d'RNA cal treballar en condicions lliures d'RNAses. Per aconseguir-ho cal que tot el material de vidre estigui fornejat prèviament a 200°C durant 8 hores; les solucions han d'estar preparades amb aigua DEPC que inactiva les RNAses i el material de plàstic ha de contenir especificacions concretes per part del fabricant garantint l'absència d'RNAses.

Per extreure l'RNA de fel·lema de patata (*Solanum tuberosum*) es va utilitzar el mètode Z6 (Logemann et al., 1987). El tampó Z6 (Hidroclorur de guanidini 8 M, MES (2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid sodium salt, Sigma Aldrich) 20 mM, EDTA 20 mM, a pH 7,0 amb NaOH) és un tampó desnaturalitzant de proteïnes que permet inactivar les ribonucleases endògenes durant el procés de lisi del teixit i preservar la qualitat de l'RNA. Les mostres de teixit, congelades en N₂ líquid, es van triturar en un morter sense permetre la seva descongelació. El material en pols que en resultava es va afegir a un *eppendorf* d'1,5 ml que contenia 500 µl de la barreja Z6:β-mercaptoetanol (10:1). Tot seguit s'hi van afegir 500 µl de fenol àcid:cloroform:isomilalcohol (125:24:1) preparat fresc (< 1 setmana) i es va agitar vigorosament amb el vòrtex. Aquestes mostres es guardaven en gel mentre s'anaven processant les altres mostres. A continuació es van separar les fases centrifugant a 4°C durant 60 min a 11.000 rpm. El sobrenedant aquós es va traspasar a un nou tub en gel i s'hi va afegir 1/10 V d'àcid acètic 1 M i 1 V d'etanol al 100%. L'RNA es va deixar precipitar a -80°C durant 1 h i seguidament es va centrifugar durant 15 min a 13.000 rpm a temperatura ambient. El precipitat es va rentar amb 500 µl d'etanol al 70% i seguidament es va centrifugar 10 min a 13.000 rpm. Al precipitat s'hi va afegir 200 µl d'acetat sòdic 3 M (pH 5,2) per tal d'eliminar els polisacàrids, que co-precipiten amb l'RNA, i es va agitar vigorosament amb el vòrtex. Es va centrifugar 10 min a 13.000 rpm, es va descartar el sobrenedant i es va rentar el precipitat amb alcohol 70%, es va centrifugar altra vegada 5 min a 13.000 rpm i es va extreure curosament el sobrenedant amb una pipeta sense distorsionar el sediment. Després d'evaporar les restes d'etanol de l'eppendorf, el sediment es va resuspendre amb 50 µl d'aigua tractada amb DEPC. Les mostres es van agitar durant 20 min a temperatura ambient. Tot

seguir, per eliminar restes de sucres, es va escalfar la mostra 5 min a 65°C, es va incubar 15 min en gel i finalment es va centrifugar durant 10 min a 13.000 rpm. El sobrenedant, corresponent a l'RNA en solució, es va transferir a un tub nou. Aquest RNA es va quantificar al Nanodrop i la seva integritat es va analitzar en gels desnaturalitzants amb formaldehid (1 µg d'RNA).

La qualitat de l'extracció es va determinar mitjançant la quantificació de l'RNA al Nanodrop (nd-1000 from ThermoScientific) i l'anàlisi dels quocients 260/280 i 260/230, que havien de romandre entre 1,8 i 2,2. Un quocient menor d'1,8 a l'índex 260/280 indica contaminació significativa de proteïnes, i un quocient menor a 1,8 a l'índex 260/230 indica contaminació de fenols, sals i/o etanol. Un quocient de 2,0 a 2,2 és el recomanat.

6.1.1.2-Digestió amb DNAsa

La digestió de l'RNA total amb DNAsa és necessària per prevenir la contaminació per DNA genòmic. En aquest cas es va fer servir el kit *RNeasy Mini* (Cat. No. 74104) de Qiagen que permet realitzar la digestió en columna, mitjançant la DNAsa I (Cat. No. AM2222) de ThermoFisher. El protocol a seguir és el *Cleanup* de l'RNA més la part opcional *On-Column DNase Digestion with the RNase-Free DNase*, ambdós protocols inclosos en el Kit.

6.1.1.3-Gel d'electroforesi d'RNA amb gel de formaldehid

La qualitat de l'RNA es va comprovar mitjançant gel d'agarosa desnaturalitzant, normalment després del tractament amb DNAsa, si els rendiments obtinguts en el Nanodrop després de l'extracció d'RNA són correctes. Addicionalment també es podria analitzar l'RNA abans de la digestió DNAsa.

Els gels d'agarosa desnaturalitzants es fan servir per a analitzar l'RNA ja que aquest pot formar estructures secundàries a través d'aparellament de bases intramoleculares evitant la seva correcta migració. A més, el formaldehid i la formamida, a part de desfer les estructures secundàries de l'RNA, desnaturalitzen les proteïnes i per tant prevenen la degradació per RNases.

Així doncs, per tal de veure la integritat d'aquest RNA total extret es prepara un gel d'agarosa 1,5% en tampó MEN (20 mM de MOPS, 5 mM d'acetat de sodi, 1 mM d'EDTA, ajustat a pH 8,0 amb NaOH) i 1,5% de formaldehid (solució al 36%). Primerament es va fondre l'agarosa en aigua DEPC i posteriorment, s'hi va afegir el formaldehid i el tampó MEN 10X (a partir d'aquest moment es va treballar sota campana extractora de gasos degut a la toxicitat del formaldehid). Un cop solidificat en el motlle, el gel es va dipositar en una cubeta

d'electroforesi, enrasat amb tampó MEN 1X. Per minimitzar l'evaporació del formaldehid, el gel es va cobrir amb parafilm.

Es va preparar 1 µg d'RNA en 5 µl d'aigua lliure de DNases i s'hi van afegir 7,5 µl de tampó de càrrega (10:4:6 de formamida: MEN 10X: formaldehid, i amb 1 µl de bromur d'etidí) mantenint la relació 1:1,5 (mostra:tampó càrrega). La barreja es va incubar 5 min a 65°C i posteriorment es va mantenir en gel fins a carregar-la en el gel de formaldehid. Cal tenir en compte que cal carregar en alguna butxaca lliure (o no) tampó de blau de bromofenol (5 µl de glicerol, 2.10⁻² µl d'EDTA 0,5 M, 2,5×10⁻⁵ g de blau de bromofenol i 5 µl d'H₂O tractada amb DEPC) per detectar l'avanç de la mostra. Es va connectar el gel a 3-4 V cm⁻¹. Durant la carrera del gel, es va supervisar que les butxaques no quedessin buides i quan va convenir, s'hi va afegir tampó MEN 1X.

6.1.1.4-Purificació de l'mRNA

L'RNA total està format per rRNA (28S, 18S i 5S, en un 80-85 %), tRNA, *small nuclear RNAs* (en un 15-20 %) i per mRNA (1-5 %, de mida molt heterogènia: de 0,5 a 6 Kb). Per a la creació de la llibreria de cDNA de doble híbrid es va purificar el mRNA de la resta de components. Es va utilitzar el protocol *Dynabeads® mRNA Purification kit* (Cat. No. 61006) el qual permet la unió de la cua poli A amb els residus d'oligo (dT) que estan units covalentment a les Dynabeads®, les quals segrestaran aquest mRNA i permetran la seva purificació. Es va seguir el procediment descrit per la casa comercial.

6.1.1.5-Síntesis de cDNA

La creació de la llibreria de cDNA es va dur a terme mitjançant el sistema *Make Your Own (Mate & Plate) Library System* de Clontech (Cat. No. 630490). Aquest sistema utilitza tecnologia SMARTTM (*Switching Mechanism at 5' end of RNA Transcript*) (Zhu et al., 2001) que permet tenir alts rendiments de cDNA mantenint representació de les seqüències. El mecanisme consta bàsicament de dos passos. En el primer pas, s'utilitza la transcriptasa inversa MMLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) per transcriure l'RNA a cDNA de cadena simple. El cDNA es pot sintetitzar mitjançant encebadors oligo-dT (CDSIII), que s'hibriden a l'extrem 3' del la cua poli A de l'RNA, fent que els extrems 5' dels transcrits puguin estar menys representats; o encebadors aleatoris (*random*) (CDSIII/6), que s'hibriden de forma aleatòria a qualsevol seqüència de l'RNA, fent que la representació dels extrems 5' o 3' estiguin representats en igual proporció. Quan la MMLV RT acaba la síntesi de cadena de cDNA, l'activitat transferasa de l'enzim afegeix uns quants nucleòtids addicionals (C) a l'extrem 3' del cDNA. L'oligonucleòtid SMART III, el qual conté una seqüència d'oligo (G)

en l'extrem 3' s'uneix als nucleòtids de C del cDNA sintetitzat a l'extrem 5' (Figura 52). Aquesta unió permetrà que la RT copii l'encebador SMART III creant una seqüència adaptadora coneguda a l'extrem 5' del cDNA la qual s'utilitzarà d'ancoratge per a la següent amplificació per PCR de llarga distància (LD PCR) (Chenchik et al., 1998). D'aquesta manera s'aconsegueixen cadenes de dsCDNA, amb seqüència coneguda als dos extrems, de fins a 20 kb.

La primera cadena de cDNA es va sintetitzar utilitzant mRNA purificat utilitzant Oligo-dT i encebadors *Random*, ambdós inclosos al kit. Posteriorment es va procedir a l'amplificació de la doble cadena de cDNA utilitzant l'enzim *Advantage 2 Polymerase Mix* (Cat. No. 639201) de Clontech, que permet amplificar fragments llargs i té una taxa d'error 3 vegades inferior a la de les Taqs convencionals. Un cop comprovat que s'havien obtingut fragments de cDNA de mides que assolien almenys de 200 a 1.000 pb, mitjançant gel d'agarosa a l'1,2%, es van eliminar tots aquells fragments < 200 pb utilitzant CHROMA SPIN TE-400 (Cat. No. PT13001) de Clontech. La població de dsCDNA resultant es va clonar en el vector pGADT7-Rec (Figura 55A). Per fer-ho es van seguir sense canvis els protocols descrits en els kits *Make Your Own (Mate & Plate) Library System* i *Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2 (Library-Scale)* (Cat. No. 630439) de Clontech, barrejant la població de dsCDNA (~2,5 µg), el vector pGADT7-Rec i la soca de llevat Y187.

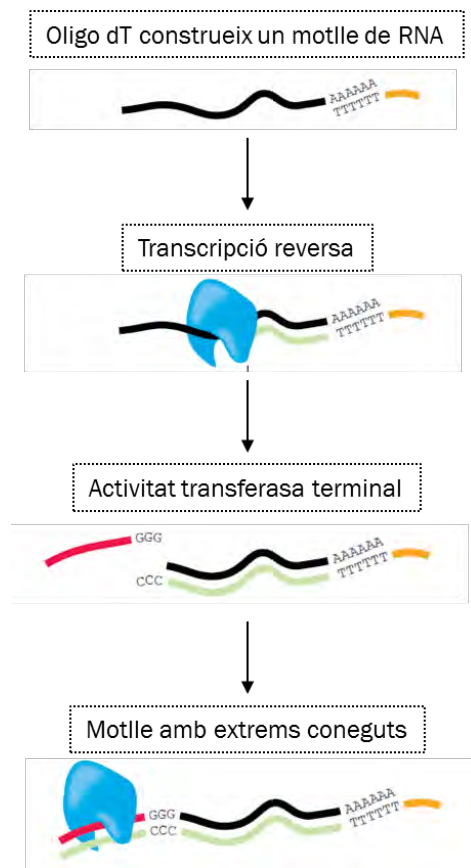


Figura 52. Visió general del procés de còpia dels mRNAs i síntesi de doble cadena de cDNA amb extrems coneguts i homòlegs al vector pGADT7-Rec, el que permetrà la recombinació homòloga durant la transformació en llevat.

6.1.2-Clonatge d'StRIK (ó StERF93) per screenar la llibreria utilitzant la metodologia Gateway

El clonatge Gateway® de la casa comercial Invitrogen (Katzen, 2007) és un sistema universal de clonatge i subclonatge de seqüències de DNA que permet que els inserts siguin transferits entre vectors de manera direccional utilitzant la recombinació específica de lloc. Aquest

sistema pot facilitar la transferència d'una o més seqüències de DNA paral·lelament en múltiples vectors, mantenint l'orientació i la pauta de lectura correctes.

El sistema Gateway® utilitza el sistema desenvolupat pel fag λ que es dona entre el cicle lític i lisogènic. El fonament del sistema per a la recombinació específica de lloc es fa mitjançant les seqüències específiques de DNA (llocs *att*) i recombinases del fag λ . Per tal de controlar aquells plasmidis que han recombinat i per tant inserit el fragment de DNA, s'ha de produir l'intercanvi amb el gen letal *ccdB*, el qual expressat en soques convencionals d'*Escherichia coli* els hi produeix la mort.

El sistema està compost per dues reaccions: (i) la reacció BP que recombinava seqüències de DNA *attBs* amb *attPs* per donar lloc a *attLs* i *attRs* la qual genera el clon d'entrada o *pEntry*; i (ii) la reacció LR que recombinava seqüències de DNA *attLs* i *attRs* per donar lloc a *attBs* i *attPs* la qual genera el clon d'expressió o *pExpression*.

En el nostre cas, en la reacció BP es va recombinar mitjançant la BP clonasa un producte de PCR flanquejat per les seqüències *attB1* i *attB2* i el vector *pDONR*TM207 (Figura 52B) (Invitrogen), el qual conté un gen letal flanquejat per les seqüències *attP1* i *attP2*. El resultat va ser el clon *Entry* (Figura 53A).

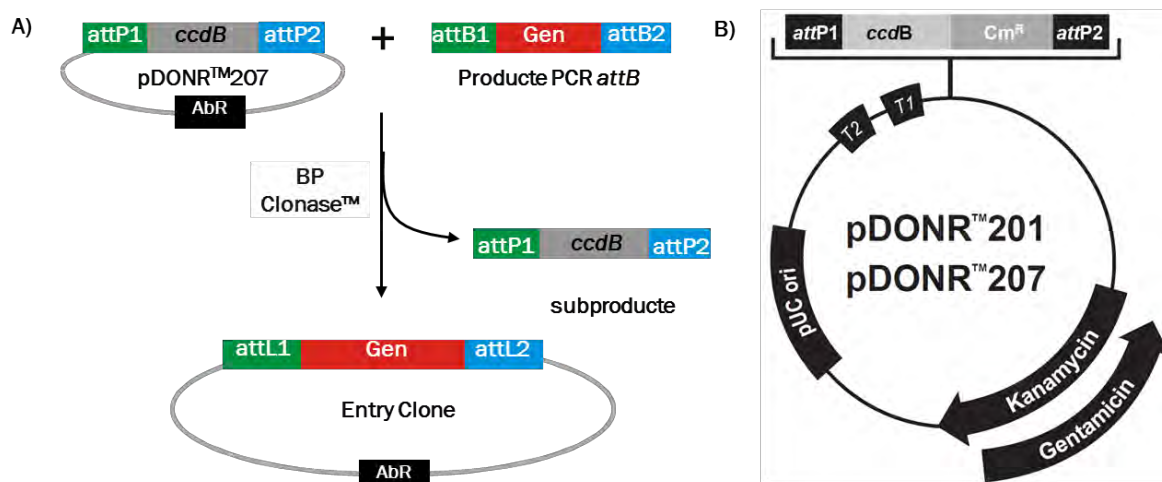


Figura 53. Esquema representatiu de la formació del clon *Entry*, a partir del *pDONR*TM207 (Invitrogen) i un producte de PCR amb els *attBs* incorporats on hi ha el gen o fragment d'interès a ser clonat. El resultat és un vector que conté el nostre gen d'interès i un subproducte del gen *ccdB* amb les seqüències *attPs* flanquejants, *AbR* (antibiòtic de resistència); (B) Mapa del vector donador *pDONR*TM201 i *pDONR*TM207 (Invitrogen). El nostre vector d'entrada corresponia al *pDONR*TM207 el qual conté gentamicina com a marcador de selecció en bacteris.

En el nostre cas, la reacció LR mediada per la LR clonasa va recombinar el clon *Entry* i un vector de destí (*Destination*) per recombinació d'*attL1* i *attR1*, i *attL2* i *attR2*, respectivament (Figura 54). Aquesta recombinació ens va permetre inserir la seqüència codificant d'*StRIK* (i *StERF93*) en el vector de destí pGBG-NSC (Figura 54B), creant un clon d'expressió que permetia expressar *StRIK* (o *StERF93*) fusionat al domini d'unió a DNA de Gal4, és a dir, l'esquer del sistema del doble híbrid.

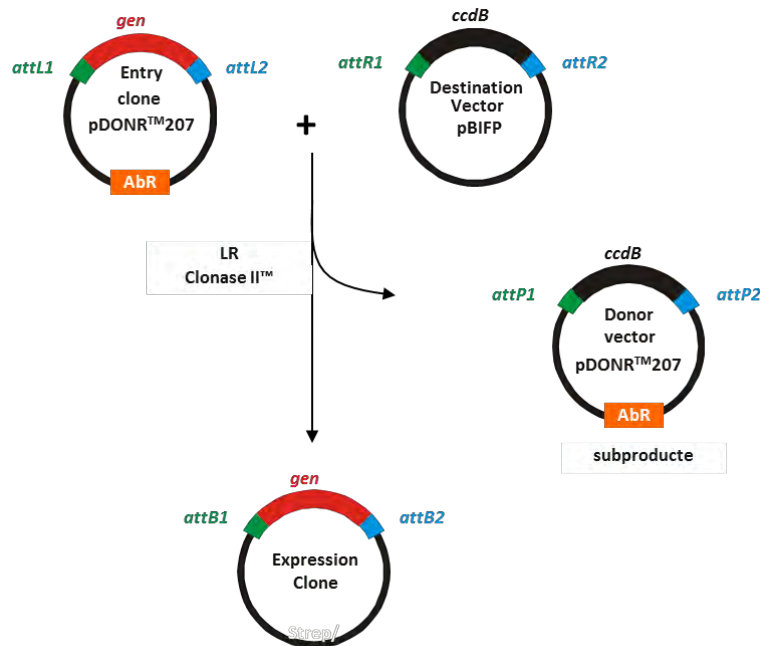


Figura 54. Esquema representatiu de la formació d'un clon *Expression* a partir del clon *Entry* i un vector de destí. El resultat és un vector d'expressió que ha incorporat el nostre gen d'interès i un subproducte corresponent al vector donador.

6.1.2.1-Disseny d'encebadors específics amb extensions attB per amplificar *StRIK* (ó *StERF93*)

Per amplificar i aïllar la seqüència completa dels diferents gens d'interès per ser clonats en el vector donador pDONRTM207, es van dissenyar encebadors específics per a cadascun d'ells mitjançant el programa *Primer 3* (Koressaar & Remm, 2007) amb una T_m d'entre 58°C-60°C i la mínima autocomplementarietat. La resta de paràmetres van ser els donats per defecte pel programa. Les seqüències dels gens requerien d'una extensió de DNA flanquejant amb les seqüències attB1 i attB2 a 3' i 5' respectivament per permetre la recombinació i clonatge amb el vector donador. Així, als encebadors dissenyats se'ls hi van afegir les seqüències (~30 pb) als extrems 5', l'attB1: 5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCC3' a l'encebador *forward* i l'attB2: 5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT3' a l'encebador *reverse* respectivament. La seqüència dels encebadors contenia a 3' la seqüències

homòloga als extrems de la seqüència codificant segons la base de dades del *Potato Genome Sequencing Consortium Data Release* (<http://potatogenomics.plantbiology.msu.edu/index.html>). A més, es van afegir dues bases abans del codó corresponent a la metionina inicial per assegurar que la seqüència d'interès quedava en fase una vegada clonada en el vector d'expressió binari.

6.1.2.2-PCR per amplificar StRIK (o StERF93) flanquejats pels attBs

Per aïllar els gens candidats es va utilitzar DNA motlle que provenia de poblacions de transcrits de fel·lema de patata aconseguits amb la SuperScript™ III *Reverse Transcriptase* (Cat. No 18080) de Invitrogen. Per a l'amplificació dels gens per PCR es va utilitzar una DNA polimerasa PrimeStar® HS (Cat. No R010A) de Takara Biotechnology la qual no introdueix tants errors durant la còpia del DNA ja que té activitat 3'-exonucleasa correctora. Les condicions de PCR van ser les indicades pel protocol, però amb una temperatura d'anellament de 58°C i 36 cicles. El producte de PCR resultant va ser analitzat en un gel d'agarosa 1% i posteriorment purificat mitjançant *MinElute PCR Purification Kit* (Cat. No. 28004) de Qiagen. Seguidament es va procedir a la seva quantificació per NanoDrop (nd-1000 de ThermoScientific). Cal dir, que el gen StRIK ja estava amplificat i clonat en un altre vector, pel que no va caldre la seva amplificació (Boher, 2016).

6.1.2.3-Clonació d'StRIK (ó StERF93) en vector d'expressió de llevat

Per a l'obtenció del clon *Entry* es va utilitzar el vector pDONR™207 com a vector donador (Figura 53B) i la BP Clonasa™ II (Cat. No. 11789-020) d'Invitrogen, seguint les indicacions de la casa comercial. El producte de la clonació es va transformar en la soca bacteriana d'*E.coli* DH5α (cultivada a 37°C en LB i seleccionades amb gentamicina 10 µg ml⁻¹). Posteriorment es va purificar el DNA plasmídic del vector *Entry* mitjançant el protocol de *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Cat. No. K0502) de ThermoFisher. En el vector *Entry*, la inserció del fragment dins el pDONR™207 es va comprovar mitjançant PCR (amb els encebadors frw: 5'TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC³ i rev: 5'GTGTCTCAAATCTCTGATGTTAC³, complementaris al vector i fora de la zona de recombinació) i/o digestió del vector clonat amb enzims de restricció que tallaven el vector i l'insert i, posterior anàlisi dels fragments en gel d'agarosa 1%. Els clons *Entry* validats es van usar per generar el clon *Expression* usant el clon *Destination* adequat i la LR Clonasa™ II (Cat. No. 11791-100) d'Invitrogen. Els vectors *Expression* van ser comprovats per PCR convencional amb primers específics del gen (Taula Suplementària 8) i/o digestió enzimàtica de l'insert i el vector. A més a més, es va comprovar l'orientació de l'insert mitjançant

seqüenciació amb el kit *BigDye Terminator v3.1* d'*Applied Biosystems* (Cat. No. 4337455) de *Life technologies*. En aquest punt es van obtenir els vectors d'expressió que contenen el vector pGBG-NSC amb l'*StRIK* (ó *StERF93*) clonat. Aquest vector d'expressió l'anomenarem *StRIK-pGBG* (ó *StERF93-pGBG*).

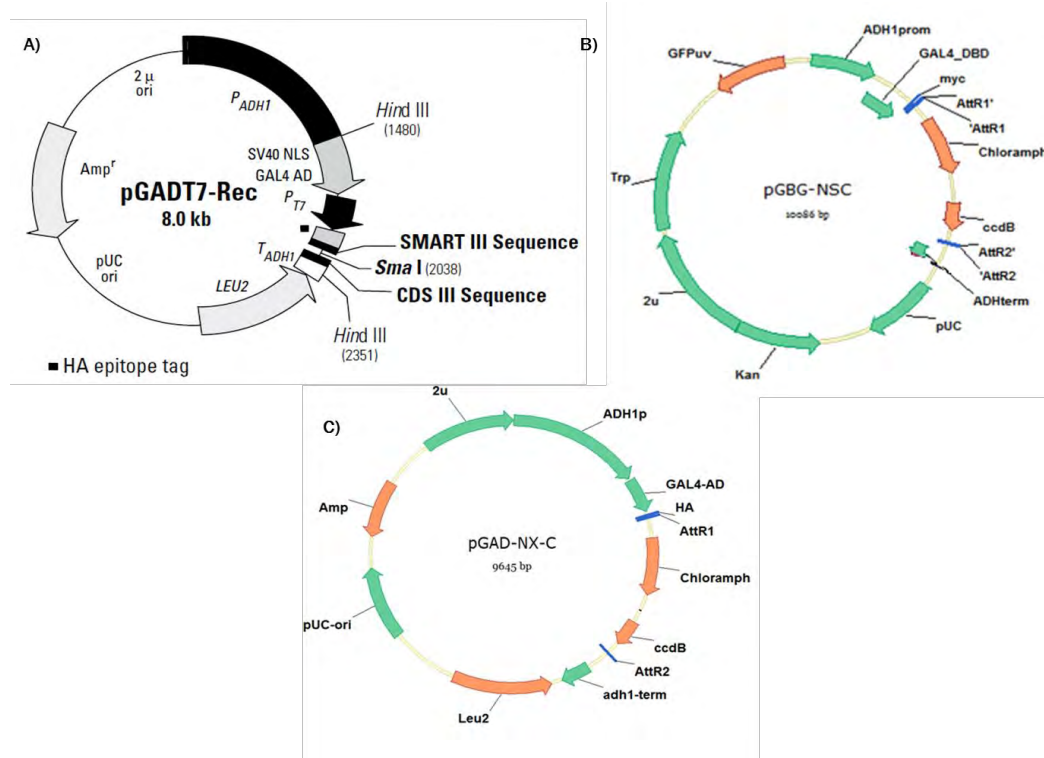


Figura 55. Vectors d'expressió utilitzats en llevat. (A i C) Vector pGAD7-Rec utilitzat per a la creació de la llibreria de cDNA de pela de patata. Es mostra el domini GAL4 AD que codifica pel domini d'activació del factor de transcripció GAL4, proteïna que serà dirigida a nucli per la seqüència codificada per SV40 NLS. Els cDNAs problema seran inserits per recombinació homòloga dels llocs SMART III Sequence i CDS III Sequence. L'expressió de GAL4 AD fusionat a la proteïna presa (cDNA de la llibreria) estarà dirigida pel promotor constituït del gen *ADH1*. Els gens reporter *LEU2*, els llocs de recombinació i el gen de la resistència a Ampicilina per bacteris també es mostra. El promotor T7 (PT7) permet la transcripció i la traducció de la proteïna d'interès marcada amb HA (sense GAL4 AD i sense SV40 NLS), només en el cas de que es volgués detectar per immunoprecipitació; (B) Vector d'expressió GATEWAY utilitzat per a la transformació en llevat, necessari per a la interacció en llevat que contindrà les proteïnes esquer. Es mostra el domini GAL4 BD que codifica pel domini d'unió al DNA del factor de transcripció GAL4. Els DNAs problema seran inserits per recombinació dels llocs *attR1* i *attR2*. El gen reporter *TRP*, els lloc de recombinació i el gen de resistència a Kanamicina també es mostren; (C) Vector d'expressió necessari per a la interacció en llevat que contindrà les proteïnes presa. Es tracta del mateix vector que la figura A però amb la diferència que en aquest cas es va modificar per ser GATEWAY afegint-li els llocs de recombinació *attR1* i *attR2* (conté a dintre un gen letal *ccdB* amb la seva resistència a cloramfenicol) de la mateixa manera que la figura B. El gens reporter *LEU2*, els llocs de recombinació i el gen de la resistència a Ampicilina per bacteris també es mostren.

6.1.3-Construcció de la llibreria de dos híbrids de cDNA de fel·lema de patata

6.1.3.1-Preparació de cèl·lules competents de llevat

La preparació de les cèl·lules competents de llevat es va dur a terme mitjançant el protocol A de *Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2* (Cat. No 630439) de Clontech. Aquest sistema permet generar d'una manera relativament ràpida cèl·lules competents per a la posterior transformació. Aquestes cèl·lules poden guardar-se en gel fins al moment de la transformació, però a mesura que passa el temps aniran perdent eficàcia, pel que es recomana fer-les servir al moment. Aquest procés es va realitzar per cada transformació de les dues soques amb les que es treballava: Y187 (Cat. No 360457) i Y2HGold (Cat. No 360498), ambdues de Clontech. La soca Y187 (MAT α , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3*, 112, *gal4 Δ* , *gal80 Δ* , *met-*, *URA3::GAL1_{UAS}-Gal1_{TATA}-LacZ*, *MEL1*) conté els marcadors auxotròfics *Trp1* (*trp1-901*) (requerit per a la biosíntesi del triptòfan) i *Leu2* (*leu2-3*) (requerit per a la biosíntesi de la leucina), com també els gens *reporters* MEL1 (codifica l'enzim α -galactosidasa que hidrolitza el substrat X- α -Gal generant un producte cromogènic) i *LacZ* (codifica l'enzim β -galactosidasa el qual també hidrolitza el substrat X- α -Gal). La soca Y187 es va utilitzar per transformar el vector presa amb el domini activador (pGAD). La soca Y2HGold (MAT α , *trp1-901*, *leu2-3*, 112, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4 Δ* , *gal80 Δ* , *LYS2:: GAL1_{UAS}-Gal1_{TATA}-His3*, *GAL2_{UAS}-Gal2_{TATA}-Ade2*, *URA3::MEL1_{UAS}-Mel1_{TATA}*, *AUR1-C*, *MEL1*) conté els marcadors auxotròfics *Trp1* (*trp1-901*) i *Leu2* (*leu2-3*), així com, els gens *reporters* MEL1, *LacZ*, *Aba^r* (confereix forta resistència a l'Aureobasidin A), *HIS3* (requerida per la biosíntesi de la histidina) i *ADE2* (requerida per la biosíntesi de l'adenina), els quals estan sota el control del promotor de GAL4, els quals s'activaran quan es produeixi interacció entre les proteïnes d'estudi.

6.1.3.2-Construcció de la llibreria de dos híbrids

La llibreria de cDNA de doble híbrid de fel·lema de patata correspon a tota la col·lecció possible de preses que poden interaccionar amb el nostre esquer. Aquests fragments es van clonar a un vector que dóna capacitat per sintetitzar leucina, generant proteïnes de fusió per cadascun dels fragments de la llibreria amb el domini activador de Gal4. Per construir-la es va seguir el protocol *Make Your Own "Mate & Plate™" Library System* (Cat. No. 630490) i *Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2* (Cat. No 630439) de Clontech. En un vial de 15 mL es va mesclar 1.200 μ L de cèl·lules competents de la soca Y187, 2,5 μ g del conjunt de cDNAs de fel·lema, 12 μ L de "Yeastmake Carrier DNA" i 12 μ L del vector linealitzat pGADT7-Rec (aquest vector permet la integració dels fragments de cDNA generats

anteriorment aprofitant el sistema de recombinació homòloga de llevat, de manera que ens permet fer la lligació *in vivo*) (Figura 55A). La llibreria es va sembrar en plaques que contenen SD/-Leu i es va afegir Kanamicina (50 mg/ml) per tal d'evitar contaminació bacteriana. Es van deixar incubar a 30°C durant 4 dies. Un cop crescudes les colònies transformades es va procedir a recuperar i glicerinar la llibreria utilitzant boletes de vidre i *Freezing medium*, tal i com es detalla al protocol. Posteriorment es van fer alíquotes d'1 ml que es van guardar en vials d'1,5 ml per a l'ús a curt termini i la resta en vials de 50 ml per guardar durant un període llarg de temps. La llibreria es va emmagatzemar a -80°C.

6.1.3.3-Screening de la llibreria de dos híbrids

Per a l'*screening* de la llibreria es va usar el protocol *Machmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System* (Cat. No. 630489) de Clontech, que permet identificar quines proteïnes codificades en la llibreria de cDNA (presa) interaccionen amb la proteïna d'estudi (esquer, StRIK). Primer de tot, vam validar els controls negatiu i positiu. El control positiu conté el vector pGBKT7-53 (transformat en la soca Y2HGold) que conté la proteïna p53 de ratolí fusionada al domini d'unió a DNA de Gal4 i el vector pGADT7-T (transformat en la soca Y187) que conté l'antigen T extret del virus SV40 fusionat al domini activador de Gal4 (Iwabuchi et al., 1993; Li & Fields, 1993). Els resultats del *mating* amb aquests dos vectors seran cèl·lules diploides que contindran els dos plasmidis que poden activar els 4 gens *reporters*. El control negatiu conté el vector pGBKT7-Lam, el qual codifica la proteïna *lamin* fusionada al domini d'unió al DNA de Gal4 i el vector pGADT7-T. Les cèl·lules diploides contindran els dos vectors però només podran créixer en medi SD/-Leu/-Trp, medi que ens permet veure si els llevats contenen els dos vectors, ja que un pot sintetitzar triptòfan (pGBKT7) i l'altre pot sintetitzar leucina (pGADT7).

La NO autoactivació i la NO toxicitat d'*StRIK* (i *StERF93*) es va comprovar usant els vectors d'expressió pGBG-NSC clonats amb StRIK (o StERF93) els quals es van transformar en la soca *Y2HGold* usant el *Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2* de Clontech i 100 ng de DNA plasmídic. El producte de la transformació es va sembrar en medi SD/-Trp per comprovar el creixement normal i excloure la toxicitat de les proteïnes, i en medi SD/-Trp/X- α -Gal o SD/-Trp/X- α -Gal/A per comprovar l'autoactivació de StRIK (ó StERF93) la qual si es donés activaria els gens *reporter* sense la necessitat d'interaccionar amb una proteïna presa.

Per l'*screening* de la llibreria amb la proteïna StRIK es va fer un cultiu en medi SD/-Trp de la soca *Y2HGold* transformada amb StRIK-pGBG *o/n* el qual es va sedimentar per centrifugació a 1.000 x g durant 5 minuts. El sediment es va ressuspendre amb medi SD/-

Trp fins obtenir $>1 \cdot 10^8$ cèl·lules/ml i 5 ml d'aquest cultiu es va combinar amb 5 ml de la llibreria de cDNA generada anteriorment i 45 ml de medi 2x YPDA suplementat amb Kanamicina (50 µg/ml). La barreja resultant es va sembrar en medi QDO (SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp) durant 5 dies a 30°C. Els clons obtinguts es van comprovar mitjançant PCR convencional amb encebadors específics del vector pGADT7-Rec (Taula Suplementària 8) per identificar els possibles interactors de la llibreria. Posteriorment, dels clons amplificats es van escollir 109 colònies (aquelles que contenien una millor amplificació) i es van purificar mitjançant ZR-96 *DNA Sequencing Clean-up Kit*TM (Cat. No. D4052) de Zymo Research i es van enviar a seqüenciar a un servei extern. Per identificar els interactors, cadascuna de les seqüències obtingudes es va anotar mitjançant un BlastN a la base de dades del genoma de patata (*Solanum tuberosum*) (http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/pgsc_download.shtml) i un BlastX a les base de dades de proteïnes d'Arabidopsis (<http://www.arabidopsis.org>).

Per tal de comprovar l'eficiència del *mating* de la llibreria es van fer varies dilucions (1/10; 1/100; 1/1000 i 1/10000) en medi SD/-Leu (per determinar la viabilitat de la presa), en medi SD/-Trp (per determinar la viabilitat de l'esquer) i en medi SD/-Leu/-Trp (per determinar la viabilitat dels diploids) i es van fer recomptes utilitzant una cambra de Neubauer. Seguidament es va poder calcular l'eficiència del *mating* mitjançant la següent fórmula ((n° cèl/ml diploides)/(n° cèl/ml limitant)) x 100, on el factor limitant serà el recompte més baix que s'hagi obtingut en els càlculs anteriors de la viabilitat de la presa o l'esquer. Una bona eficiència del *mating* ha d'estar entre 2-5%.

6.1.4-Localització subcel·lular i coexpressió en fulla de tabac mediada per *Agrobacterium tumefaciens*

Per identificar on es localitzaven cadascuna de les proteïnes candidates (StCisteïna proteïnasa 3, StERF135, i StRACK1B), es va realitzar el clonatge dins el vector d'expressió vegetal pK7WGF2.0 (Figura 56A) mitjançant el sistema Gateway[®] (Karimi et al., 2002). Aquest vector permetrà la fusió d'una proteïna *green fluorescent protein* (GFP) a l'extrem N-terminal de la nostra proteïna d'estudi, l'expressió de les quals serà conduïda per un promotor fort. En el cas de la proteïna StRIK es va clonar dins el vector pK7WGR2.0 (Figura 56B) que contenia una proteïna *red fluorescent protein* (DsRED) a l'extrem N-terminal de la nostra proteïna d'estudi. L'expressió serà conduïda per un promotor fort.

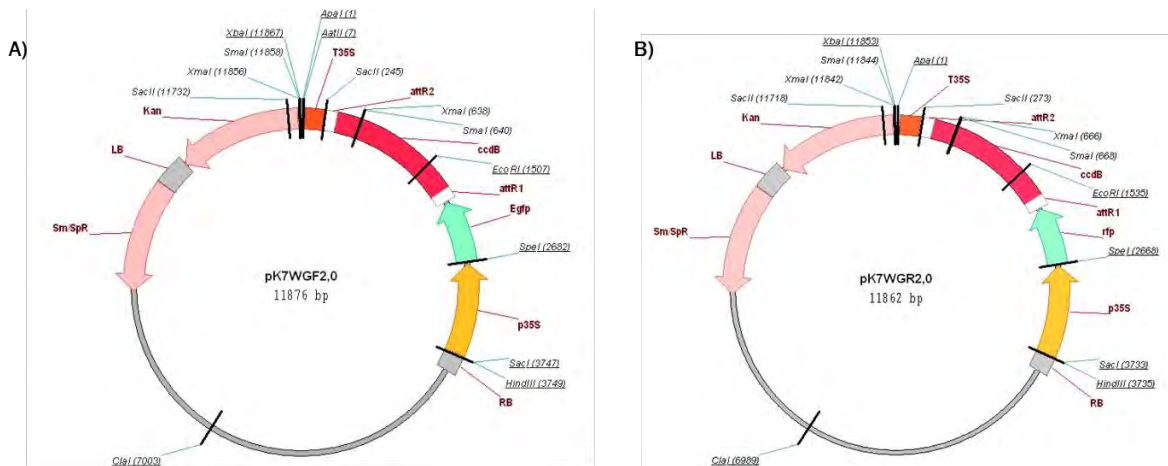


Figura 56. Vectors d'expressió utilitzats per determinar la localització subcel·lular. (A) Vector de destí GATEWAY pK7WGF2.0 utilitzat per clonar-hi les seqüències codificants dels gens StCisteïna proteïnasa 3, StRACK1B i StERF93. El vector presenta una proteïna EGFP com a marcador. El T-DNA es troba flanquejat pels llocs LB (*left border*) i RB (*right border*). Dins d'aquests es troben els llocs de recombinació, en blanc (attRs), que permetran el clonatge del gen d'interès, controlat pel promotor CaMV35S. Es mostra també la resistència per la selecció en bacteris (Sm/Sp) i la selecció per plantes (Kan); (B) En el cas de StRIK, es va utilitzar un vector GATEWAY que presentava una proteïna RFP. Les resistències i demés elements són iguals que en la figura A.

El DNA plasmídic dels clons obtinguts es va introduir en cèl·lules d'*Agrobacterium tumefaciens* (soca GV2260) químicament competents. 1 µg de DNA plasmídic es va afegir a 500 µl de les cèl·lules, agitant suaument i es va incubar durant 5 min en gel. Seguidament es va incubar 5 min en N₂ líquid, i immediatament es va transferir a 37°C, on es va incubar durant 5 min més. Es va afegir 1 ml de medi YEB a les cèl·lules transformants i es va incubar en agitació durant 2 h a 28°C. Es van sembrar alíquotes de 300 i 50 µl en plaques de medi YEB amb rifampicina (100 µg/ml), estreptomina (300 µg/ml) i espectinomicina (100 µg/ml) els quals es van incubar a 28°C durant 48 h.

El fet d'infectar plantes de tabac amb *Agrobacterium tumefaciens* suposa la incorporació i posterior expressió de gens ectòpicament a la fulla de la planta de tabac. Per tal d'evitar que la maquinària de silenciament pròpia de la planta actuï contra aquesta expressió, les nostres construccions es transformen paral·lelament amb el plasmidi que conté el supressor de silenciament P19 (Lakatos et al., 2004), el qual permet que les proteïnes s'expressin correctament sense que siguin inhibides pels miRNA (sistema de silenciament de les plantes). Aquest vector doncs, també es va transformar dins *Agrobacterium tumefaciens* amb les mateixes condicions que la proteïna d'estudi, però previ creixement en medi YEB suplementat amb rifampicina (100 µg/ml) i kanamicina (50 µg/ml).

Per a la transformació de *Nicotiana benthamiana* es va picar una colònia d'*Agrobacterium tumefaciens* transformat i es va inocular en 15 ml de medi YEB amb rifampicina i l'antibiòtic de selecció pel plasmidi durant 24 hores a 28°C i en agitació a 250 rpm. Es van créixer fins $OD_{600} = 1$ UA. Quan l'absorbància superava 1 UA, es preparava un subcultiu a 0,3 UA el qual es tornava a incubar. Es va centrifugar a 3.500 rpm durant 10 min i es va substituir el sobrenedant per tampó d'inducció (10M MgCl₂, 10M MES pH5,6, 200 µM d'acetosiringona 1M). Es van barrejar els diferents *Agrobacterium*s transformats de tal manera que per cada construcció s'afegia el volum necessari per aconseguir una $OD_{600 \text{ final}} = 0,5$ UA. Es va deixar incubar la barreja un mínim de 2 hores a 28°C o a temperatura ambient. Finalment es va agroinfiltrar per pressió amb xeringa d'1 ml sense agulla entre els nervis de la cara abaxial de la fulla de *Nicotiana benthamiana* de 5 – 6 setmanes de vida crescudes en dia llarg o en règim de 12h/12h. Es va marcar la zona d'infiltració (Figura 57). Entre agroinfiltracions, es important rentar els guants amb etanol 70%. Les plantes agroinfiltrades es van incubar a l'hivernacle de 2 – 4 dies dependent de la proteïna que es vol expressar i es va observar al microscopi.

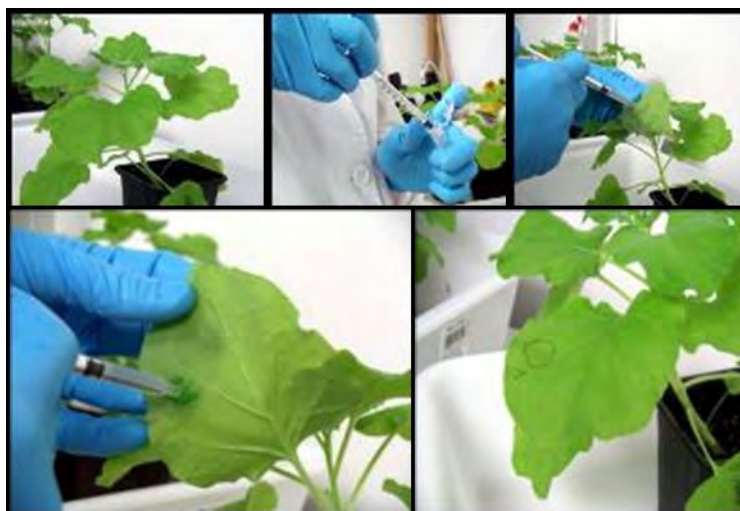


Figura 57. Procés de transformació de *Nicotiana benthamiana* mitjançant agroinfiltracions amb xeringa sense agulla per la cara abaxial de la fulla.

6.1.4.1-Observació de mostres al microscopi

Per a l'observació de les mostres es va fer servir un microscopi confocal NIKON A1R+ dels Serveis Tècnics de Recerca de la Universitat de Girona. La fluorescència de la GFP va ser observada a 500-530 nm en l'emissió i 465-485 nm per a l'excitació; la fluorescència de la RFP va ser observada a 610 nm en l'emissió i 587 nm per a l'excitació; l'autofluorescència de la clorofil·la va ser detectada a 575-640 nm en l'emissió i a 546-612 nm per a l'excitació. Les imatges obtingudes pels diferents canals van ser superposades per veure la localització exacta de les proteïnes d'estudi. El programa d'anàlisi va ser el NIS elements viewer i el ImageJ.

6.2-Identificació i caracterització de gens candidats de la regulació i el transport dels monòmers de suberina

6.2.1-Bases de dades i eines bioinformàtiques

Per a les prediccions *in silico* dels gens d'estudi s'han utilitzat les seqüències codificants disponibles a la base de dades del genoma de patata de l'espècie *Solanum phureja* creada pel *Potato Genome Sequence Consortium* (http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/pgsc_download.shtml). Les seqüències d'*Arabidopsis* que s'han necessitat per aquest estudi han estat obtingudes de la base de dades *The Arabidopsis Information Resource* (<http://www.arabidopsis.org>).

Seguidament es detallen les eines bioinformàtiques que es van utilitzar:

- Alineament de seqüències:
 - Multalin: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html> (Corpet 1988)
- Predicció d'elements reguladors *in cis*:
 - Plant Care : <http://bioinformatics.pbs.ugent.be/webtools/plantcare/html/> (Lesot et al 2002)
- Predicció de localització subcel·lular:
 - WolfPsort: <http://wolfpsort.seq.cbrc.jp/> (Horton et al 2007)
 - ESLPred: <http://www.imtech.res.in/raghava/eslpred/> (Bhasin and Raghava 2004)
- Identificació i anàlisi de motius:
 - Motif finder: <http://www.genome.jp/tools/motif/>
- Predicció d'estructura:
 - TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)
- Predicció de coexpressió:
 - Genemania: <http://genemania.org/>

6.2.2-Construcció d'un filograma

Els arbres filogenètics que incloïen els gens candidats es van construir usant els alineaments de les seqüències aminoacídiques realitzades amb el ClustalW (EMBL-EBI). Per a la confecció de l'arbre es va utilitzar el programa MEGA6 (Tamura et al., 2013) usant el mètode de *Neighbor-joining*, un *bootstrap* de 1000, el model de substitució JTT, una distribució gamma d'1 per a les taxes de substitució i el mètode Pairwise Deletion per als espais. A més, també es van realitzar els arbres amb el mètode UPGMA.

6.2.3-Determinació de l'abundància relativa de transcrit per RT-PCR

6.2.3.1-Extracció d'RNA, tractament DNasa i síntesi de cDNA

L'extracció d'RNA dels diferents teixits i òrgans (fulla i fulla ferida, tija, arrel, fel·lema i parènquima) de patata (varietat Desireé) i tubercle ferit (varietat Monalisa) es va realitzar usant el mètode Z6 que es detalla prèviament a l'apartat 6.1.1.1. Posteriorment l'extracte d'RNA es va digerir amb DNasa usant el kit *TURBO DNase Treatment and Removal Reagents* (Cat. No. 1907) el qual permet eliminar subseqüentment les DNases i els cations divalents de la mostra, com ara el magnesi i el calci, que podrien afavorir la degradació de l'RNA quan s'escalfés la mostra. Es van tractar 10 µg d'RNA total en un volum de reacció de 50 µl, i a la reacció s'hi va afegir 1 µl d'inhibidor d'RNasa (*RNase OUT*, Invitrogen, Cat. No. 10777-019) i 5 mM de DTT per prevenir la degradació de l'RNA. La qualitat de l'RNA es va analitzar mitjançant un gel d'electroforesis d'RNA de formaldehid, tal i com es detalla a l'apartat 6.1.1.3, i la quantitat es va mesurar amb el Nanodrop.

La síntesi de cDNA monocadena es va realitzar amb encebadors aleatoris i el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* amb inhibidor d'RNasa (Life technologies, Cat. No. 4374966). Es va fer servir 1 µg d'RNA.

6.2.3.2-PCR a temps real

La PCR a temps real es va realitzar en plaques òptiques de 96 pous usant el termociclador ABI PRISM 7300 *Sequence Detector System* (Applied Biosystems). El disseny d'encebadors es va realitzar amb el programa *Primer 3* (Koressaar & Remm, 2007) i es va comprovar que complien els paràmetres de qualitat d' ΔG (Taula 23) amb el *Primer Express 3.0* (Applied Biosystems).

La detecció dels amplicons obtinguts es va realitzar mitjançant *SYBR Green* que s'intercala en el DNA de doble cadena (Life technologies Cat. No 4367659), motiu pel qual posteriorment a l'amplificació es va realitzar una corba de desnaturalització per verificar la presència d'un sol pic que correspondria a un sol amplicó.

Taula 23. Paràmetres de qualitat dels primers usats per la PCR a temps real

$\Delta G \leq -34 \text{ kcal mol}^{-1}$		
Estructures secundàries	Hairpin	A 3' $\Delta G \geq -2 \text{ Kcal mol}^{-1}$
		Intern $\Delta G \geq -3 \text{ Kcal mol}^{-1}$
	Dímers propis	A 3' $\Delta G \geq -5 \text{ Kcal mol}^{-1}$
		Intern $\Delta G \geq -6 \text{ Kcal mol}^{-1}$
	Dímers creuats	A 3' $\Delta G \geq -5 \text{ Kcal mol}^{-1}$
		Intern $\Delta G \geq -6 \text{ Kcal mol}^{-1}$
Estabilitat a l'extrem 3'		$\Delta G \geq -10 \text{ Kcal mol}^{-1}$

Les reaccions de 20 μl contenien la barreja de reactius del *Power SYBR-Green* a una concentració final 1X, 300 nM de cada *primer* i 5 μl de la dilució convenient del DNA motlle (entre 1/25 i 1/200). El programa de temperatures per a l'amplificació de la PCR va ser d'1 x (10 min 95°C) i 40 x (15 s 95°C, 1 min 60°C), i la corba de desnaturalització de 15 s 95°C, 30 s 60°C, 15 s 95°C. Es van utilitzar un mínim de tres rèpliques tècniques per cada cDNA assajat corresponent a una rèplica biològica. Les dades van ser analitzades amb el software 7300 SDS 1.3.1 (Applied Biosystems). Totes les gràfiques d'amplificació es van analitzar amb un llindar d' R_n de 0,2 per obtenir el valor de Ct (*threshold cycle*). A partir de dilucions seriades d'1/5 del cDNA, que anaven d'1/1 a 1/3.125, es va obtenir una recta d'amplificació del $\log_2 C_t$ on R^2 havia de ser superior a 9,8 i es va calcular l'eficiència d'amplificació (E) per cada parella d'encebadors usant el pendent de la recta patró ($E = 10^{-1/\text{pendent}}$) on E prenia valors entre 1,9 i 2,05 per considerar-se la parella d'encebadors vàlids (Nolan et al., 2006). L'abundància relativa de transcrit (RTA) per cada parella d'encebadors es va calcular mitjançant la fórmula de Pfaffl (2001):

$$RTA = E^{\Delta Ct(\text{control-experiment})_{\text{target}}} / E^{\Delta Ct(\text{control-experiment})_{\text{reference}}}$$

on *target* correspon al gen problema i *reference* correspon al gen de referència utilitzat (l'*adenine phosphoribosyl transferase*, aprt). Control (calibrador o RT+) correspon al cDNA de referència al qual se li relativitzaran les dades obtingudes amb els cDNAs problemes. Com a mostres control per a l'anàlisi de teixits no cicatricials es va utilitzar una barreja equivalent de cDNAs dels diferents teixits, per al de teixit cicatricial de tubercle una barreja de cDNAs de les rèpliques a 144 hores després de la ferida i per al de fulla ferida una barreja de cDNAs de les rèpliques de fulles a 72 hores d'haver estat ferides. Per cada parella d'encebadors es van realitzar dos controls negatius d'amplificació: analitzant un cDNA que havia estat sintetitzat sense retrotranscriptasa (RT-) que permetia detectar la contaminació de DNA genòmic en

l'RNA inicial, i analitzant una mostra d'aigua (*non template control* o NTC) per detectar la contaminació ambiental. Els *primers* utilitzats es troben a la Taula Suplementària 8.

6.2.4-Determinació de la localització subcel·lular

6.2.4.1-Amplificació dels gens candidats amb els extrems attBs

Inicialment es van amplificar les seqüències codificants completes (+UTR en alguns casos) dels gens obtinguda de la base de dades del *Potato genome* (<http://solanaceae.plantbiology.msu.edu>), flanquejats amb les seqüències de recombinació attB1 i attB2 usant els encebadors de la Taula Suplementària 8 i la DNA polimerasa *PrimeStar*® HS (Cat. No R010W) (Takara Biotechnology, Dalian). El motlle usat corresponia a DNA genòmic de fulla de patata varietat Desireé (no contenen introns) excepte per la *LTPI.3* i l'*ABCG1* que es van amplificar a partir de cDNA de fel·lema de patata. El producte de PCR resultant va ser analitzat en un gel d'agarosa 1% i posteriorment purificat mitjançant *MinElute Gel Extraction Kit* (Cat. No. 28604) de Qiagen. Seguidament es va procedir a la seva quantificació per NanoDrop. Els *primers* es van dissenyar d'igual manera que en l'apartat 5.1.2.1.

6.2.4.1-Clonació dels gens candidats i transformació transitòria en *Nicotiana benthamiana*

Els clonatges d'aquests gens han seguit el sistema Gateway®, d'igual manera que es descriu a l'apartat 5.1.2. Es van clonar els productes de PCR purificats en el vector donador pDONR™207 i es van fer saltar en el vector de destí pK7WGF2.0 (Figura 55A). Es va comprovar el clonatge mitjançant seqüenciació amb el kit *BigDye Terminator v3.1 d'Applied Biosystems* (Cat. No. 4337455) de *Life Technologies* i posteriorment es va transformar *Agrobacterium tumefaciens* (soca GV2260), el qual es va usar per agroinfiltrar fulla de tabac (*Nicotiana benthamiana*), tal i com es descriu en l'apartat 6.1.4. Passats 3-4 dies es van observar les cares abaxials de les fulles sota microscopi confocal. En aquest cas però la proteïna PIP2A (continguda dins els plasmidi CD3-1001 i la qual conté una proteïna fluorescent ciano (CFP) (Nelson et al., 2007)) s'utilitzava com a marcador de proteïna de membrana, motiu pel qual es va agroinfiltrar amb cadascuna de les proteïnes, al igual que l'inhibidor de silenciament P19 descrit anteriorment (Lakatos et al., 2004). L'observació al microscopi confocal d'aquesta proteïna ciano es va fer utilitzant el filtre Alex Fluor que excita a 488nm i permet l'emissió a partir dels 500 nm.

6.3-Genètica funcional de la suberina en arrels de patata

6.3.1-Generació de vectors binaris necessaris per al silenciament gènic

Per silenciar els diferents gens en patata (*CYP86A33*, *StLTP1.3*, *StERF93* i *StABCG20*), es va utilitzar el vector de destí pK7GWIWG2-(II) Red-Root (<http://gateway.psb.ugent.be>). Aquest vector permet inserir dues vegades, en sentit oposat, el fragment del cDNA d'interès, sota control d'un promotor fort (35S) que donarà lloc a una molècula d'RNA amb capacitat de plegar-se sobre ella mateixa i formar un *hairpin*, el qual desencadenarà el silenciament del gen endogen corresponent per RNA d'interferència. A més aquest plasmidi conté la DsRED (*Discosoma sp. red fluorescent protein*), la qual permetrà seleccionar per fluorescència vermella les arrels transformades de les que no ho estan. També presenta marcadors de resistència a antibiòtics, que serveixen per la selecció de transformants en bacteris (Espectinomomicina i Estreptomomicina) i per la selecció en planta (Kanamicina) (Figura 58).

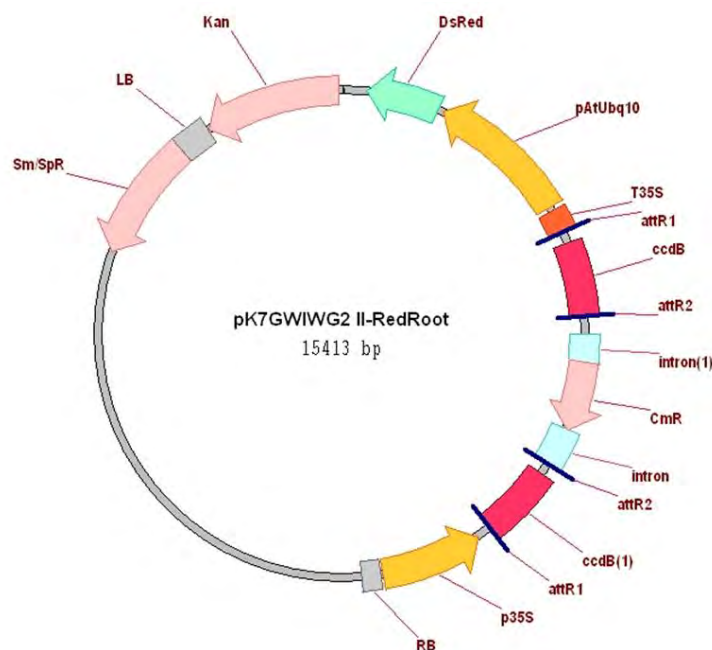


Figura 58. Esquema del vector de destí pK7GWIWG-II Red-Root el qual permet expressar la proteïna DsRed com a marcador de transformació en arrels ja que la seva expressió està conduïda pel promotor constituït en arrel del gen Ubiquitina 10 d'Arabidopsis (*AtUbq10*). El T-DNA es troba flanquejat pels llocs LB (*left border*) i RB (*right border*). Dins d'aquests es troben els llocs de recombinació, en blau (*attRs*), que permetran el clonatge del fragment RNAi del gen d'interès via GATEWAY, controlat pel promotor *CamV35S*; en verd, la DsRED, controlada pel promotor de la *AtUbq10*; i en rosa la Kanamicina. Fora el T-DNA trobem en rosa, el gen de la resistència en bacteris (*Espectinomomicina* i *Estreptomomicina*).

Per a obtenir el vector de silenciament de *CYP86A33* (*CYP86A33*-RNAi) es va realitzar una PCR que permetia incorporar als extrems de l'amplicó els llocs de recombinació attB1 i attB2 del Sistema *Gateway* (veure apartat 5.1.2). Per a l'amplificació es va utilitzar la DNA polimerasa PrimeSTAR HS (Takara), encebadors complementaris al fragment del *CYP86A33* que als extrems 5' tenen llocs de recombinació del sistema Gateway (attB1 i attB2, Taula Suplementària 8) i el vector pBluescript amb el *CYP86A33*-RNAi (Serra et al., 2009) com a DNA motlle. La temperatura d'anellament es va ajustar a 56°C i el temps d'extensió a 30 segons. Finalment es va purificar la banda obtinguda amb el kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen). Seguidament la reacció BP (tota la nit a 25°C) va permetre incorporar el *CYP86A33*-RNAi dins el pDONRTM207 (Figura 52B-apartat 5.1.2). Aquest plasmidi recombinant es va introduir en cèl·lules competents de la soca DH5α d'*E. coli*. Per verificar el clonatge, es va purificar el plasmidi de diferents colònies amb el kit *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Scientific) i es va seqüenciar usant els encebadors complementaris a la zona del pDONRTM207 que flanquegen l'insert (M13 frw i M13 rev, Taula Suplementària 8). Per aconseguir el vector d'expressió del *hairpin*, es va incubar el *CYP86A33*-RNAi-pDONRTM207 i el vector de destí pK7GWIWG2-(II) Red-Root amb la clonasa LR a 25°C tota la nit, i novament es van transformar en la soca DH5α d'*E. coli*. La correcta orientació dels inserts en el vector es va comprovar mitjançant digestió enzimàtica que tallava l'insert i el vector.

Pel que fa als gens *StLTP1.3*, *StERF93* i *StABCG20*, la incorporació en el vector d'entrada del sistema Gateway es va dur a terme com el *CYP86A33*, si bé però el DNA motlle per *LTP1.3* i l'*ABCG20* va ser cDNA de fel·lema de patata. Previ a la reacció LR d'*StLTP1.3*-RNAi i l'*StERF93*-RNAi, per tal de facilitar el clonatge es van incubar els DNAs i el tampó TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8) 5 minuts a 65°C i, seguidament, es van refredar en gel abans d'afegir la clonasa LR. En el cas del *StABCG20*-RNAi, el clonatge es va comprovar mitjançant seqüenciació amb encebadors complementaris a l'insert del vector pK7GWIWG2-(II) Red-Root que flanquejaven l'insert (Taula Suplementària 8).

6.3.2-Transformació d'arrels de patatera mitjançant *Agrobacterium rhizogenes*

6.3.2.1-Transformació usant *Agrobacterium rhizogenes*

Per a la transformació d'*Agrobacterium rhizogenes*, la qual segueix el mateix protocol que *A. tumefaciens* (veure apartat 6.1.4), es van utilitzar cèl·lules competents de la soca C58C1:pRI1583 i els vectors recombinants que contenen *CYP86A33*-RNAi, *LTP1.3*-RNAi, *ERF93*-RNAi i *ABCG20*-RNAi. El vector pK7GWIWG2-(II) Red-Root buit es va transformar per aconseguir arrels peludes control. Per altra banda també es va transformar el

vector recombinant que contenia *ProFHT::GUS-GFP* (Boher et al., 2013) per assajar l'activitat del promotor del gen *FHT* (veure apartat 6.3.4). Per transformar arrels de patatera es va utilitzar el protocol descrit per Horn et al., (2014) amb modificacions. Prèviament a la transformació, les plantes de patata varietat Desiré es van créixer *in vitro* durant 3-4 setmanes en medi 2MS o 1MS que correspon a medi MS (*Murashige and Skoog* de Duchefa) suplementat amb sucrosa al 2% o a l'1% respectivament, en règim de 12 hores de llum ($67 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) i 12 hores de foscor a 24°C. El cultiu d'*A. rhizogenes* es va preparar inoculant una colònia en 5 ml de medi YEB amb l'antibiòtic necessari per a la selecció del plasmidi el qual es va fer créixer durant la nit a 28°C i en agitació. Es van sedimentar 2 ml del cultiu centrifugant a 3.000 rpm, es va substituir el sobrenadant per 1 ml de medi YEB i es van punxar amb una agulla quirúrgica 5 μl en els entrenusos de plantes de 3-4 setmanes. Cada planta es va punxar 3-4 vegades, on cada punxada es podria considerar com un esdeveniment de transformació independent. Una vegada punxades les plantes es van transferir en plaques de cultiu amb medi SP (MS sense sucre) suplementat amb acetosiringona 0,1 M en posició vertical respectant el creixement natural de les arrels com a resultat del gravitropisme amb un fotoperíode de 12 hores de llum ($67 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) a 22°C i 12 hores de foscor a 20°C. Passades 2 setmanes es van tallar les arrels natives i es van canviar les plantes a una placa nova amb medi SP suplementat amb claforan (500 mg/L) per eliminar l'*A. rhizogenes*.

6.3.2.2-Cultiu d'arrels transformades (*Hairy roots*)

Quan les arrels transformades van adquirir un mínim de 2 cm de longitud es van tallar i es van fer créixer en medi Gamborg B5 sòlid (Duchefa; Cat. No G0209) suplementat un 2% de sucrosa i claforan (500mg/L). Aquest és un medi ric en vitamines però exempt d'hormones, per aquest motiu, és un medi selectiu atès que únicament creixeran les *hairy roots* però no les arrels natives. Les plaques es van créixer en foscor a 20°C. És imprescindible mantenir unes condicions de foscor perquè les arrels es trobin a les condicions més naturals possibles i evitar la formació de plastidis fotosintètics, fet que interferiria en l'anàlisi de fluorescència. Les arrels, per duplicat, es van anar mantenint en aquest medi sòlid, essent repicades cada 4-6 setmanes en medi nou. Les arrels transformades llargues amb arrels secundàries eren les que presentaven un major creixement.

Per a l'obtenció de biomassa d'arrels transformades, cada línia es va propagar per triplicat en cultiu Gamborg B5 líquid suplementat amb 2% sucrosa i claforan (500mg/L) segons el protocol descrit per Quandt et al., (1993) amb modificacions. Es van utilitzar matrassos Erlenmeyer de 150 ml amb 20 ml de medi líquid per deixar créixer el cultiu durant 6 setmanes en foscor a 20°C i a 60 rpm per evitar la falta d'oxigen. Per a l'extracció d'RNA, les

arrels es van congelar en tubs de 2 ml roscats i es van guardar a -80°C. Per a l'anàlisi de la suberina, les arrels es van tractar enzimàticament amb pectinasa i cel·lulasa.

6.3.3-Anàlisi de l'expressió gènica per PCR quantitativa

6.3.3.1-Extracció d'RNA i digestió DNasa

Per a l'extracció d'RNA d'arrels es va seguir el protocol de Plasencia et al., (2015) amb petites modificacions. Primer, es va afegir 2% de polivinilpolipirrolidona (PVPP) i 2% de β -mercaptoetanol en el tampó d'extracció I (2% CTAB, 100 mM Tris-HCL pH 8, 25 mM EDTA pH 8 i 2 M NaCl) el qual es va escalfar a 65°C, i 900 μ l d'aquest i una boleta de ceràmica d'1/4 polzades (MP Biomedical, Santa Ana, USA) es van afegir dins el tubet roscat de 2 ml el qual contenia la mostra de teixit radicular congelada. Immediatament es van moldre les mostres utilitzant el FastPrep (MP Biomedical) a 4 m/s durant 20 segons i es va repetir la mòlta 4 vegades. Es van incubar els tubs a 65°C durant 15 min (sacsejant manualment cada 5 minuts). Es van afegir 900 μ l de cloroform:isoamilalcohol (ChI:IAA) 24:1, es va barrejar amb el vòrtex durant 20 segons i centrifugar a 16.000 g durant 10 min. La fase aquosa es va transferir a un nou tub de 2 ml i es va repetir el pas anterior. A la nova fase aquosa se li va afegir 1 ml de tampó d'extracció II (fenol saturat amb 0,1 M de tampó citrat pH 4,3 que conté dodecil sulfat de sodi (SDS), 0,1% acetat de Na 0,32 M i EDTA 0,01 M) i es va barrejar durant 20 segons. Es van afegir 200 μ l de cloroform, barrejar amb el vòrtex durant 20 segons i mantenir 10 minuts a TA. Es va centrifugar a 12.000 g a 4°C durant 10 minuts i es va recuperar la fase aquosa en un tub nou de 1,5 ml a la que se li va afegir 0,6 V d'isopropanol, barrejar 3 segons i mantenir 10 minuts a TA. Seguidament, es va centrifugar a 16.000 g durant 30 minuts a 4°C, es va descartar el sobrenedant, rentar de sals el sediment d'RNA amb 500 μ l d'etanol 70%, centrifugar a 16.000 g durant 10 minuts i eliminar l'etanol. Per últim, es va dissoldre el sediment en 20 μ l d'aigua tractada amb dietil-pirocarbonat (DEPC), es va mesurar la concentració al NanoDropTM i congelar l'RNA a -80°C. La digestió de DNasa de les mostres d'RNA s'ha realitzat mitjançant el kit de la DNasa TURBO: *DNase Treatment and Removal Reagents* seguint el protocol explicat anteriorment (veure apartat 6.2.3.1). La qualitat de l'RNA es va comprovar mitjançant un gel desnaturalitzant de formaldehid-formamida (veure apartat 6.1.1.3).

6.3.3.2-Obtenció de cDNA i anàlisi del silenciament mitjançant RT-qPCR

El cDNA es va sintetitzar amb el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* amb inhibidor d'RNasa (veure apartat 6.2.3.2) i es va realitzar RT-qPCR mitjançant *LightCycler® 96 Roche*. Les reaccions de 10 μ l contenien la barreja de reactius del *Power SYBR-Green* a una

concentració final 1X, 300 nM de cada encebador i 2,5 µl de la dilució 1/5 del DNA motlle. El programa de temperatures per a l'amplificació de la PCR va ser d'1 x (10 min 95°C) i 40 x (10 s 95°C, 1 min 60°C), i la corba de desnaturalització de 15 s 95°C, 30 s 60°C, 15 s 95°C. Es van utilitzar un mínim de tres rèpliques tècniques per cada cDNA assajat corresponent a una rèplica biològica. Les dades van ser analitzades amb el software *LightCycler® 96 SW 1.1* (Roche) de la mateixa manera que en l'apartat 6.2.3.1.

6.3.4-Assaig del gen reporter GUS

L'assaig GUS permet localitzar l'activitat del gen β-glucuronidasa en les cèl·lules gràcies a la formació d'un precipitat blau. El protocol va consistir en fixar el teixit radicular amb acetona freda al 90% (v/v) i incubar en gel durant 20 minuts. Es van realitzar dos rentats en aigua destil·lada i es va afegir la solució de revelat de GUS (1 mM X-GlcA (Duchefa) d'un *stock* de 1mg / 100 µl de metanol, 50 mM tampó fosfat sòdic 2X pH 7, 1 mM *potassium ferricyanide*, 10 mM EDTA i 0,05% (v/v) Tritó X-100). Es va deixar el teixit radicular en aquesta solució durant 20 minuts al buit (-70 Pa) i es va incubar a 37°C durant 4 hores, ambdós passos en foscor degut a la fotosensibilitat de l'X-Gluc. Es van fer dos rentats amb etanol 70% (v/v) i es va conservar la mostra amb aquest solvent a 4°C fins a l'observació en microscopi de camp clar.

6.3.5-Anàlisi de suberina i ceres

Per evitar contaminació, abans de fer servir el material de vidre es va condicionar amb cloroform durant 1 h i la resta del material es va netejar amb cloroform. Els taps i tubs de vidre utilitzats es van rentar amb aigua destil·lada amb un 2% de DECON90 entre 2 i 16 h, es van esbandir amb aigua destil·lada, sonicar durant 15 min, fer dos rentats amb aigua destil·lada i deixar assecar.

6.3.5.1-Digestió enzimàtica de les arrels

Les arrels es van digerir durant 4 dies a 60 rpm amb una solució que contenia 10⁻² M d'àcid cítric pH 3, 2% de cel·lulasa (Sigma; Cat. No C1184), 2% de pectinasa (Sigma; Cat. No P2611) i 1 mM d'azida sòdica per prevenir el creixement fúngic o bacterià. Es va retirar la solució enzimàtica, es va afegir àcid bòric 2 10⁻²M pH 9 fins cobrir i es va incubar 1 dia a 60 rpm. Es va retirar la solució i es va fer un rentat amb H₂O MilliQ estèril durant 24 hores a 50 rpm. Les mostres es van assecar al forn a 60°C durant 24 h o fins estar seques i es va pesar la biomassa.

6.3.5.2-Compostos de ceres solubles en solvents orgànics

Entre 0,2 i 5 mg de teixit sec es van traspasar a un vial de vidre de 4 ml per a ser utilitzat com a material de partida. Per extreure els lípids solubles de les arrels es va afegir un volum de cloroform:metanol (1:1) i es va deixar o/n mesclant-se en un *roller*. Es va eliminar la solució i es van fer dos rentats de la mostra amb cloroform. Es va deixar assecar la mostra durant dos dies en un dessecador que contenia gel de sílice i es va procedir a la transesterificació de la suberina.

6.3.5.3-Extracció dels monòmers de suberina -transesterificació

Per a la despolimerització del polièster de suberina es va cobrir el teixit sec amb 10% de trifluorur de bor (BF_3) en metanol (Fluka; Cat. No 15716) i es va incubar O/N a 70°C (18 hores). Els vials es van obrir acuradament als 5 i als 30 min per evitar un excés de pressió dins el vial pels gasos formats. El recipient que contenia el reactiu de BF_3 en metanol es va tancar sota flux de nitrogen gas per evitar l'oxidació i sempre es va utilitzar reactiu que no tingués més de 3 setmanes des de l'obertura de l'ampolla per evitar la producció d'artefactes (Kolattukudy & Agrawal, 1974; Zeier & Schreiber, 1999). Una vegada despolimeritzada la suberina, es va afegir 50 μl de l'estàndard C32 alcà (10 mg/50 ml) i es va transferir la solució a un nou vial de vidre roscat de 8 ml que contenia 2 ml NaHCO_3 . Es va rentar el residu sòlid d'arrels dues vegades amb cloroform i es va afegir al vial amb NaHCO_3 . Aquest es va vortejar i deixar reposar per a que es generessin dues fases. La fase inferior orgànica (conté els lípids i derivats) es va transferir a un vial de vidre roscat de 8 ml. Es va afegir 1 ml d'aigua, es va vortejar, deixar reposar per generar les dues fases i es va eliminar la fase superior aquosa amb una *Pasteur* de vidre. Es va repetir aquest últim pas un cop més. Seguidament, es va afegir Na_2SO_4 en pols a la fracció orgànica fins deshidratar la mostra, moment en que ja no es formen agregats. El solvent es va transferir a un nou vial de 2 ml, es va assecar completament sota N_2 gas i es va afegir 50 μl de cloroform. Les mostres resuspeses en cloroform es poden guardar a 4°C fins a 4 dies.

6.3.5.4-Derivatització amb BSTFA (N-O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide)

Els components obtinguts de la suberina es van derivatitzar amb BSTFA per obtenir derivats de trimetilsilil (TMS) perquè aquests poden ser volatilitzats i detectats de manera més eficaç en el cromatògraf de gasos. Les mostres es van derivatitzar just abans de ser punxades al cromatògraf. Als extractes de suberina secs s'hi va afegir 20 μl de piridina (GC-grade; Merk) i 20 μl de BSTFA (agent derivatitzant) (Sigma; Cat. No 3-3027) i es van incubar durant 40 minuts a 70°C . Es va obrir i tancar el tub sota campana als 5 minuts per deixar sortir el gas

format. Passat aquest temps es van temperar els vials 5 minuts a temperatura ambient i es van afegir 50 µl de cloroform, i es van transferir als vials per a cromatògrafs de gasos (GC).

6.3.5.5-Anàlisi cromatogràfic

Els anàlisis per GC es van dur a terme usant un equip GC-2010 Plus amb un detector de ionització de flama (FID) i un mostrejador AOC-20i (Shimadzu). La columna capil·lar usada va ser DB1 o TRB-1h⁺ (30 metres de llargada, 0,25 mm de diàmetre intern, 0,1 µm de gruix de polímer; Teknokroma) i es va usar heli com a gas portador a un flux d'1 ml min⁻¹. Es va utilitzar un injector *Split/splitless* en la modalitat *splitless* (temps *splitless* 1 minut) amb una temperatura de l'injector de 280°C. La temperatura del programa del forn per a la correcta separació dels diferents compostos es va establir a una temperatura inicial de 100°C, incrementant-la 20°C min⁻¹ fins a 220°C, després 2°C min⁻¹ fins a 310°C i finalment una temperatura constant de 310°C durant 10 minuts. Les dades generades es van processar usant el programa GC Solution Ver.2.41 (Shimadzu). Els monòmers de la suberina es van detectar com a derivats de TMS segons el temps de retenció i prèvia identificació amb un GC-Espectròmetre de Masses (MS) (Verdaguer et al., 2016). La quantitat de cada monòmer es va calcular dividint l'àrea del pic integrat per l'àrea del pic integrat corresponent a l'estàndard intern C32 alcà i multiplicat per la quantitat d'aquest estàndard afegit a la mostra inicial. Aquestes dades es van relativitzar a la quantitat d'arrel seca inicial.

6.3.5.6-Anàlisi estadístic

Per a l'estadística comparativa dels resultats es va utilitzar en tots els casos anàlisi estadístics no paramètrics, ja que cap de les dades complia amb els supòsits de normalitat ni homogeneïtat de variàncies. Es va realitzar el test de Kruskal-Wallis per a la comparativa de diferents quantitats d'arrels i la comparativa d'arrels peludes vs. arrels convencionals. En cas de significació en alguna comparativa, es va identificar la mostra diferencial utilitzant el test estadístic de U-Mann Withney. El nivell de significació usat va ser de $\geq 0,05$. L'anàlisi estadístic s'ha realitzat mitjançant el programa estadístic IBM SPSS Statistics 23.

6.4-Anàlisi transcripcional del creixement estacional del suro

6.4.1-Recollida de mostres, extracció d'RNA

Les mostres de fel·lema van ser obtingudes tal i com es va descriure a Soler et al., (2008). Les mostres de fel·lema es van obtenir d'un bosc típic de sureres (*Quercus suber*) de Romanyà de la Selva (Girona, Espanya) recollides durant l'època de creixement de l'any 2005 (26 d'abril, 17 de juny i 19 de juliol). Per cada mes es van analitzar quatre arbres diferents (rèpliques biològiques), excepte el mes juny que se'n van analitzar tres. Es va retirar el suro o escorça externa i es va recollir la fracció de fel·lema viu des del fel·logen. Les mostres es van congelar seguidament en nitrogen líquid i es van guardar a -80°C. L'extracció es va fer seguint el protocol descrit per (Chang et al., 1993), tal i com es descriu a l'article de Soler et al., (2008). Els extractes d'RNA van ser netejats amb *RNeasy MinElute Cleanup* (Qiagen) i el DNA genòmic va ser extret mitjançant digestió en columna amb *DNase I* (Qiagen). La qualitat i la puresa van ser analitzades mitjançant una electroforesis amb gel d'agarosa desnaturalitzant de formamida-formaldehid i un espectrofotòmetre NanodropTM. Prèviament a la seqüenciació massiva de les mostres es va comprovar que l'RNA tenia qualitat suficient mitjançant el Bioanalyzer. Totes les mostres tenien RINs superiors a 8.

6.4.2-Bioinformàtica

Les mostres d'RNA de suro van ser seqüenciades mitjançant Illumina's HiSeq2500 amb *paired-end reads* de 125 pb de longitud al servei de genòmica del Centre de Regulació Genòmica (CRG, Barcelona). En total es van seqüenciar 11 mostres: 3 rèpliques per al mes de juny i 4 rèpliques per als mesos d'abril i juliol. La qualitat de les lectures es va avaluar mitjançant el programa FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) i els adaptadors van ser eliminats utilitzant el programa Skewer (Jiang et al., 2014). Un cop eliminats els adaptadors es va tornar a avaluar la qualitat de les lectures. Per eliminar les seqüències d'espècies contaminants es va utilitzar el programari Kraken (Wood & Salzberg, 2014), molt utilitzat en metagenòmica, que conté bases de dades de genomes coneguts de bacteris i virus. Un cop les seqüències eren netes, es va procedir a l'assemblatge del transcriptoma *de novo* utilitzant el programa *Trinity Assembler* (Grabherr et al., 2011). La qualitat dels contigs va ser avaluada per Abyss-FAC (Simpson et al., 2009) i Trinity QC tools (Grabherr et al., 2011). Un cop assemblats, es va tornar a utilitzar el programa Kraken (Wood & Salzberg, 2014) per eliminar els contigs contaminats. L'anotació es va dur a terme mitjançant ORFs (*Open reading frames*) de proteïnes de 100 aa predites pel programa *Transdecoder* (*Trinity tools*). Aquests ORFs predits

es van anotar mitjançant la base de dades UniProt i realitzant un blastP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A més, aquests contigs també es van anotar amb la base de dades del TAIR10 (*Arabidopsis*), amb una llibreria de 454 de suro (Boher, 2016). Per tal de tenir informació de les categories funcionals es va utilitzar la base de dades del *Gene Ontology* i pels gens diferencials mitjançant el programa *Mercator tool* (<http://mapman.gabipd.org/web/guest/mercator>) es van obtenir les categories funcionals (“bins”) i després analitzar amb el programa MapMan (Thimm et al., 2004; Usadel et al., 2009). Per poder determinar l’abundància dels transcrits es van mapejar les seqüències contra el transcriptoma *de novo* i de referència obtingut utilitzant el programa *bowtie2 mapper* (Langmead & Salzberg, 2012). Per estimar l’abundància de cada transcrit en cada mostra en FPKMs es va utilitzar el programa *eXpress* (Roberts et al., 2013). L’anàlisi d’expressió diferencial de transcrits entre mostres es va realitzar amb el paquet estadístic R DESeq2 (Love et al., 2014). Només aquells transcrits que tenien un *fold change* per sobre 2 o per sota de - 2 i estaven per sota d’un FDR (*False Discovery Rate*) determinat van ser retinguts. Es van utilitzar dos *cut offs* diferents per FDR: un per sota de 0,05 i un altre per sota de 0,01.

6.4.3-Agrupament de les mostres

Es va realitzar un agrupament jeràrquic de les mostres diferencialment expressades amb un $FDR < 0.05$ mitjançant el programa MEV (Howe et al., 2010). Les dades utilitzades eren en FPKMs. Per altra banda, per cada contig diferencial es va realitzar la mitjana d’expressió de cada mes i es van generar 5 agrupacions o clústers de contigs mitjançant el mètode K-means ($k=5$) amb l’estadístic de *Pearson*.

6.4.4-Enriquiment de GOs

Es va realitzar per a cadascú dels 5 clústers un enriquiment de GOs. A partir de totes les seqüències representades en els clústers es va generar un BlastX contra la base de dades de proteïnes no redundants del NCBI amb els paràmetres per defecte, amb un *e-value* de 0,001 i un màxim de 25 hits per seqüència. 4.082 entrades van obtenir al menys una entrada exitosa. A cada resultat del Blast es va assignar un GO mitjançant API *Neo4j-biorelation* per obtenir el màxim de GOs possibles, obtenint una assignació de 3.503 entrades amb un GO assignat. Les assignacions de GO es van agrupar en un únic arxiu d’ anotació compatible amb Blast2GO el qual conté totes les seqüències identificadores dels diferents clústers i es va usar el *GOStats* per identificar les categories que estan enriquides a cada clúster (Falcon & Gentleman, 2007) amb un *p-value* de 0,05. Posteriorment, els GOs de cada agrupació (clúster)

de gens es van introduir dins el programa ReviGO per condensar-los i quedar-nos amb els GOs mare.

6.4.5-Validació de l'RNAseq

Per a la validació de l'RNAseq es van utilitzar les dades de RT-qPCR generades en treballs previs usant les mateixes mostres (Soler et al., 2008; Boher, 2016). Els 29 gens que es van estudiar són representatius de diferents categories funcionals. Per a la comparativa de les dades de RT-qPCR amb les dades d'RNAseq, per cada contig es va calcular la mitjana de l'abundància de transcrit de l'RNAseq per cada mes i posteriorment un Log_2Ratio per cadascuna de les comparatives d'entre mesos (juny/abril; juliol/abril; juny/juliol). Per determinar la correlació entre anàlisis es va realitzar un anàlisi de correlació de Pearson comparant els Log_2Ratio calculats a partir dels FPKMs de RNAseq vs. els obtinguts les dades d'abundància relativa de transcrit de RT-qPCR.

6.4.6-Realització dels *heatmaps*

Per a la realització dels *heatmaps* utilitzats per representar les dades d'RNAseq dels gens implicats en la biosíntesi, export i polimerització de la suberina es va utilitzar el programa XPANDER (Ulitsky et al., 2010) que ens va permetre transformar les dades de FPKMs a \log_2 , significança de 0 i una variància de 1. Aquesta transformació permet la normalització en quan a abundància d'expressió ja que té en compte l'increment exponencial de l'expressió al llarg de l'estació, el que permet comparar contigs amb una tendència d'expressió semblant encara que corresponguin a contigs d'alta i baixa expressió. De tota manera, per tal de conservar la informació referent a contigs d'alta i baixa expressió, la suma d'expressió al llarg de l'estació s'ha representat també en els gràfics.

6.5- Altres protocols relacionats amb el tractament de bacteris

6.5.1-Obtenció de cèl·lules competents d'*E.coli*

Per tal de transformar els vectors dins les cèl·lules d'*E.coli*, aquestes necessiten un procés per a esdevenir químicament competents. Primer es va fer una estria d'una cèl·lula competent que estava en *stock* a -80°C sense antibiòtics. Es va deixar o/n a 37°C . Després es va agafar una colònia aïllada i es va fer un cultiu líquid en medi LB sense antibiòtics el qual es va deixar o/n a 37°C en agitació. Es van afegir aproximadament uns 15 ml del cultiu a 150 mL de LB continguts dins un Erlenmeyer i es va deixar créixer durant 2-3 hores fins obtenir una $\text{OD}_{600}=0,6$. Un cop crescut el cultiu es va centrifugar a 4.300 rpm durant 10 minuts i es va eliminar el sobrenedant. Les cèl·lules es van resuspendre amb 9 ml del tampó TFBI (2,94 g/l KOAC; 9,9 g/l MnCl_2 , 1,47 g/l CaCl_2 , 12,09 g/l RbCl, 172 ml/l Glicerol 87% pH 5,8). Aquestes es van incubar durant 10 minuts en gel, es va tornar a repetir la centrifugació i es va eliminar de manera curosa el sobrenedant. Seguidament es van resuspendre amb 6 ml del tampó TFBII (2,09 g/l MOPS, 11,03 g/l CaCl_2 , 1,21 g/l RbCl, 172 ml/l Glicerol 87% pH 7). Finalment es van al·licuar 100 μl en un eppendorf, es van congelar en N_2 líquid i es van guardar a -80°C .

6.5.2-Obtenció de cèl·lules competents d'*Agrobacterium*

Per tal de poder transformar els nostres vectors en cèl·lules d'*Agrobacterium tumefaciens* (Soca GV2260) i *Agrobacterium rhizogenes* (Soca C58C1;pRI1583) cal que aquestes siguin químicament competents. Les dues soques es van fer competents de la mateixa manera. Primer, es va créixer una colònia d'*Agrobacterium* en 5 mL de medi YEB+Rifampicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a 28°C durant 48 hores. Es va afegir 2 mL de cultiu a 200 mL de medi YEB+Rifampicina preparat en un Erlenmeyer d'un litre i es va deixar durant 5-7 hores en agitació fins que arribés a un $\text{OD}_{600}=0,5-1$. Es van incubar 10 minuts en gel i es van centrifugar 20 minuts a 3.000 rpms a 4°C . Es va decantar el sobrenedant i es van resuspendre les cèl·lules en 20 mL de TrisHCl 100 mM pH8 estèril i atemperat a 4°C . Novament es va centrifugar 20 minuts a 3.000 rpms a 4°C i es va rentar novament amb TrisHCl 100 mM. Finalment es van resuspendre en 20 mL de medi YEB i les cèl·lules es van al·licuar en volums de 500 mL i es van guardar a -80°C .

Bibliografía

- Adams, D. R., Ron, D., & Kiely, P. A. (2011). RACK1, A multifaceted scaffolding protein: Structure and function. *Cell Communication and Signaling*, **9**, 22.
- Aharoni, W. A., Dixit, S., Jetter, R., Thoenes, E., Arkel, G. Van, & Pereira, A. (2004). The SHINE clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **16**, 2463–2480.
- Al-Abdallat, A. M., Al-Debei, H. S., Ayad, J. Y., & Hasan, S. (2014). Over-expression of SISHN1 gene improves drought tolerance by increasing cuticular wax accumulation in tomato. *International Journal of Molecular Sciences*, **15**(11), 19499–515.
- Álvarez-Fernández, R., & Ordás, R.J. (2012). Improved genetic transformation of Cork Oak (*Quercus suber* L.) *Plant cell culture protocols* (385–399). Humana Press, Totowa, NJ.
- Andersson, M. X., Goksör, M., & Sandelius, A. S. (2007). Physical attachment between chloroplasts and endoplasmic reticulum revealed by optical manipulation. *J Biol ChemPlant Signaling & Behavior*, **2823**(2), 1170–4.
- Barberon, M., De Bellis, D., Wang, P., & Nasees, S. (2016). Adaptation of root function by nutrient-induced plasticity of endodermal differentiation. *Cell*, **164**(3), 447–459.
- Barel, G., & Ginzberg, I. (2008). Potato skin proteome is enriched with plant defence components. *Journal of Experimental Botany*, **59**(12), 3347–57.
- Baroja-Fernández, E., Muñoz, F. J., Li, J., Bahaji, et al., (2012). Sucrose synthase activity in the *sus1/sus2/sus3/sus4* Arabidopsis mutant is sufficient to support normal cellulose and starch production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**(1), 321–6.
- Baud, S., Guyon, V., Kronenberger, J., Wulleme, et al., (2003). Multifunctional acetyl-CoA carboxylase 1 is essential for very long chain fatty acid elongation and embryo development in Arabidopsis. *The Plant Journal*, **33**(1), 75–86.
- Baud, S., Mendoza, M. S., To, A., Harscoët, E., Lepiniec, L., & Dubreucq, B. (2007). WRINKLED1 specifies the regulatory action of LEAFY COTYLEDON2 towards fatty acid metabolism during seed maturation in Arabidopsis. *The Plant Journal*, **50**(5), 825–838.
- Beisson, F., Li-Beisson, Y., & Pollard, M. (2012). Solving the puzzles of cutin and suberin polymer biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, **15**(3), 329–37.
- Beisson, F., Li, Y., Bonaventure, G., Pollard, M., & Ohlrogge, J. B. (2007). The acyltransferase GPAT5 is required for the synthesis of suberin in seed coat and root of Arabidopsis. *The Plant Cell*, **19**(1), 351–68.

- Bernards, M. A.** (2002). Demystifying suberin, 240, 227–240.
- Bernards, M. A., & Lswrst, N. G.** (1998). The macromolecular aromatic domain in suberized tissue: A changing paradigm. *Phytochemistry*, **47**(6), 91–933.
- Bernards, M. A., & Razem, F. A.** (2001). The poly(phenolic) domain of potato suberin: a non-lignin cell wall bio-polymer. *Phytochemistry*, **57**(7), 1115–1122.
- Berthet, S., Demont-Caulet, N., Pollet, B., et al.,** (2011). Disruption of LACCASE4 and 17 results in tissue-specific alterations to lignification of *Arabidopsis thaliana* stems. *The Plant Cell*, **23**(3), 1124–37.
- Bird, D., Beisson, F., Brigham, A., Shin, J., Greer, et al.,** (2007). Characterization of *Arabidopsis* ABCG11/WBC11, an ATP binding cassette (ABC) transporter that is required for cuticular lipid secretion. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **52**(3), 485–98.
- Bishop, G. J., & Koncz, C.** (2002). Brassinosteroids and plant steroid hormone signaling. *The Plant Cell*, **14**, 97–110.
- Bjelica, A., Haggitt, M. L., Woolfson, K. N., et al.,** (2016). Fatty acid ω -hydroxylases from *Solanum tuberosum*. *Plant Cell Reports*, **35**(12), 2435–2448.
- Boerjan, W., Ralph, J., & Baucher, M.** (2003). Lignin Biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, **54**(1), 519–546.
- Boher, P., Soler, M., Sánchez, A., Hoede, C., Noiro, C., et al.,** (2017). A comparative transcriptomic approach to understanding the formation of cork. *Plant Molecular Biology*, doi.org/10.1007/s11103-017-0682-9
- Boher, P.** (2016). *Functional genomics of the periderm: the biosynthetic gene FHT, the transcriptional regulator StRIK and the transcriptome deciphering*. PhD Thesis.
- Boher, P., Serra, O., Soler, M., Molinas, M., & Figueras, M.** (2013). The potato suberin feruloyl transferase FHT which accumulates in the phellogen is induced by wounding and regulated by abscisic and salicylic acids. *Journal of Experimental Botany*, **64**, 3225–3236.
- Bonaventure, G., Salas, J. J., Pollard, M. R., & Ohlrogge, J. B.** (2003). Disruption of the FATB gene in *Arabidopsis* demonstrates an essential role of saturated fatty acids in plant growth. *The Plant Cell*, **15**, 1020–1033.
- Boudet, A. M., Kajita, S., Grima-Pettenati, J., & Goffner, D.** (2003). Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. *Trends in Plant Science*, **8**(12), 576–581.
- Boutrot, F., Chantret, N., & Gautier, M.-F.** (2008). Genome-wide analysis of the rice and *Arabidopsis* non-specific lipid transfer protein (nsLtp) gene families and identification of wheat nsLtp genes by EST data mining. *BMC Genomics*, **9**(1), 86.
- Broun, P., Poindexter, P., Osborne, E., Jiang, C.-Z., & Riechmann, J. L.** (2004). WIN1, a transcriptional activator of epidermal wax

accumulation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**(13), 4706–11.

Buckner, B., Swaggart, K. A., Wong, C. C., Smith, et al., (2008). Expression and nucleotide diversity of the maize RIK gene. *Journal of Heredity*, **99**(4), 407–416.

Burd, C., & Dreyfuss, G. (1994). Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science*, **265**(5172), 615–621.

Busta, L., & Jetter, R. (2017). Structure and biosynthesis of branched wax compounds on wild type and wax biosynthesis mutants of Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*, **58**(6), 1059–1074.

Calkins, C. C., Sameni, M., Koblinski, J., Sloane, B. F., & Moin, K. (1998). Differential localization of Cysteine Protease inhibitors and a target Cysteine Protease, Cathepsin B, by immuno-confocal microscopy. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **46**(6), 745–751.

Caño-Delgado, A. I., Metzloff, K., & Bevan, M. W. (2000). ELI1 regulates cell expansion and secondary wall formation. *Development*, **127**, 3395–3405.

Canter, P. H., Thomas, H., & Ernst, E. (2005). Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, **23**(4), 180–185.

Caritat, A., Molinas, M., & Gutierrez, E. (1996). Annual cork-ring width variability of *Quercus*

suber L. in relation to temperature and precipitation (Extremadura, southwestern Spain). *Forest Ecology and Management Pores*, **86**(996), 113–120.

Castola, V., Marongiu, B., Bighelli, A., Floris, C., La, A., & Casanova, J. (2005). Extractives of cork (*Quercus suber* L.): chemical composition of dichloromethane and supercritical CO₂ extracts. *Industrial Crops and Products*, **21**, 65–69.

Cecchini, N. M., Steffes, K., Schläppi, M. R., Gifford, A. N., & Greenberg, J. T. (2015). Arabidopsis AZI1 family proteins mediate signal mobilization for systemic defence priming. *Nature Communications*, **6**, 7658.

Cernac, A., & Benning, C. (2004). WRINKLED1 encodes an AP2/EREB domain protein involved in the control of storage compound biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Journal*, **40**(4), 575–585.

Chang, S., Puryear, J., & Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, **11**(2), 113–116.

Charfeddine, M., Saïdi, M. N., Charfeddine, S., Hammami, A., & Gargouri Bouzid, R. (2015). Genome-Wide analysis and expression profiling of the ERF transcription factor family in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Molecular Biotechnology*, **57**(4), 348–358.

Chaves, I., Lin, Y.-C., Pinto-Ricardo, C., Van de Peer, Y., & Miguel, C. (2014). miRNA profiling in leaf and cork tissues of *Quercus suber* reveals novel miRNAs and tissue-specific expression patterns. *Tree Genetics &*

Genomes, **10**(3), 721–737.

Chaves, I., Pinheiro, C., Paiva, J. A. P., Planchon, S., et al., (2009). Proteomic evaluation of wound-healing processes in potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber tissue. *PROTEOMICS*, **9**(17), 4154–4175.

Chen, H., Lai, Z., Shi, J., Xiao, Y., Chen, Z., & Xu, X. (2010). Roles of arabidopsis WRKY18, WRKY40 and WRKY60 transcription factors in plant responses to abscisic acid and abiotic stress. *BMC Plant Biology*, **10**, 281.

Chen, J., Nolan, T. M., Ye, H., Zhang, M., et al., (2017). Arabidopsis WRKY46, WRKY54, and WRKY70 transcription factors are involved in brassinosteroid-regulated plant growth and drought responses. *The Plant Cell*, **29**(6), 1425–1439.

Chenchik, A., Zhu, YY., Diatchenko, L., Li, R., Hill, J., Siebert, PD. (1988). Generation and use of high quality cDNA from small amounts of total RNA by SMART PCR. *RT-PCR Methods for Gene Cloning and Analysis*. 305–319.

Choi, H., Jin, J.-Y. Y., Choi, S., Hwang, J.-U. U., Kim, Y.-Y. Y., Suh, M. C., & Lee, Y. (2011). An ABCG/WBC-type ABC transporter is essential for transport of sporopollenin precursors for exine formation in developing pollen. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, **65**(2), 181–93.

Cominelli, E., Sala, T., Calvi, D., Gusmaroli, G., & Tonelli, C. (2008). Over-expression of the Arabidopsis *AtMYB41* gene alters cell expansion and leaf surface permeability. *The Plant Journal*, **53**(1), 53–64.

Cominelli E1, Gusmaroli G, Allegra D, Galbiati M, Wade HK, Jenkins GI, T. C. (2008). Expression analysis of anthocyanin regulatory genes in response to different light qualities in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology*, **165**(8), 886–894.

Compagnon, V., Diehl, P., Benveniste, I., et al., (2009). CYP86B1 is required for very long chain omega-hydroxyacid and alpha, omega -dicarboxylic acid synthesis in root and seed suberin polyester. *Plant Physiology*, **150**(4), 1831–43.

Company-Arumí, D., Figueras, M., Salvadó, V., Molinas, M., Serra, O., & Anticó, E. (2016). The identification and quantification of suberin monomers of root and tuber periderm from potato (*Solanum tuberosum*) as fatty acyl tert-butyl dimethylsilyl derivatives. *Phytochemical Analysis*, **27**(6), 326–335.

Costa, A., Pereira, H., & Oliveira, A. (2001). A dendroclimatological approach to diameter growth in adult cork-oak trees under production. *Trees*, **15**(7), 438–443.

Costa, M. A., & Bedgar, D. (2005). Characterization *in vitro* and *in vivo* of the putative multigene 4-coumarate:CoA ligase network in Arabidopsis: syringyl lignin and sinapate/sinapyl alcohol derivative formation. *Phytochemistry*, **66**(17), 2072–2091.

Crouzet, J., Trombik, T., Fraysse, Á. S., & Boutry, M. (2006). Organization and function of the plant pleiotropic drug resistance ABC transporter family. *FEBS Letters*, **580**(4), 1123–1130.

- De Vos, M., Denekamp, M., Dicke, M., Vuylsteke, et al.,** (2006). The *Arabidopsis thaliana* transcription factor atmyb102 functions in defense against the insect herbivore pieris rapae. *Plant Signaling & Behavior*, **1**(6), 305–11.
- Deeken, R., Saupe, S., Klinkenberg, J., Riedel, M., Leide, J., Hedrich, R., & Mueller, T.** (2017). The nsLTP AtLtpI-4 is involved in suberin formation of *Arabidopsis thaliana* crown galls. *Plant Physiology*, **175**(3), 21.
- Devaiah, B. N., Madhuvanathi, R., Karthikeyan, A. S., & Raghothama, K. G.** (2009). Phosphate starvation responses and gibberellic acid biosynthesis are regulated by the MYB62 transcription factor in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, **2**(1), 43–58.
- Ding, Y., Kalo, P., Yendrek, C., Sun, J., et al.,** (2008). Abscisic acid coordinates nod factor and cytokinin signaling during the regulation of nodulation in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*, **20**, 2681–2695.
- Dinh, P. T. Y., Brown, C. R., & Elling, A. A.** (2014). RNA interference of effector gene *Mc16D10L* confers resistance against *meloidogyne chitwoodi* in *Arabidopsis* and potato. *Phytopathology*, **104**(10), 1098–1106.
- Domergue, F., Vishwanath, S. J., Joubès, J., Ono, J., et al.,** (2010). Three *Arabidopsis* fatty acyl-coenzyme A reductases, FAR1, FAR4, and FAR5, generate primary fatty alcohols associated with suberin deposition. *Plant Physiology*, **153**(4), 1539–54.
- Douliez, J.-P., Michon, T., Elmorjani, K., & Marion, D.** (2000). Mini Review: Structure, biological and technological functions of lipid transfer proteins and indolines, the major lipid binding proteins from Cereal Kernels. *Journal of Cereal Science*, **32**(1), 1–20.
- Edstam, M. M., & Edqvist, J.** (2014). Involvement of GPI-anchored lipid transfer proteins in the development of seed coats and pollen in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, **152**(1), 32–42.
- Edstam, M. M., Viitanen, L., Salminen, T. A., & Edqvist, J.** (2011). Evolutionary history of the non-specific lipid transfer proteins. *Molecular Plant*, **4**(6), 947–964.
- Eudes, A., Pollet, B., Sibout, R., Do, C.-T., Séguin, A., Lapierre, C., & Jouanin, L.** (2006). Evidence for a role of AtCAD 1 in lignification of elongating stems of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **225**(1), 23–39.
- Eulgem, T.** (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science*, **5**(5), 199–206.
- Evert RF.** (2006). *Chapter 15 - Periderm. Esau's Plant Anatomy.*
- Fahn A.** (1967). *Plant Anatomy.*
- Falcon, S., & Gentleman, R.** (2007). Using GOstats to test gene lists for GO term association. *Bioinformatics*, **23**(2), 257–258.
- Franke, R., Briesen, I., Wojciechowski, T., Faust, A., Yephremov, A., Nawrath, C., & Schreiber, L.** (2005). Apoplastic polyesters in *Arabidopsis* surface tissues—a typical suberin and a particular cutin. *Phytochemistry*, **66**(22),

2643–58.

Franke, R., Höfer, R., Briesen, I., Emsermann, M., Efremova, N., Yephremov, A., & Schreiber, L. (2009). The *DAISY* gene from *Arabidopsis* encodes a fatty acid elongase condensing enzyme involved in the biosynthesis of aliphatic suberin in roots and the chalazamicropyle region of seeds. *The Plant Journal*, **57**(1), 80–95.

Fujimoto, S. Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H., & Ohme-Takagi, M. (2000). Arabidopsis Ethylene-Responsive Element Binding Factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *The Plant Cell*, **12**(3), 393–404.

Gao, J., & Lan, T. (2016). Functional characterization of the late embryogenesis abundant (LEA) protein gene family from *Pinus tabuliformis* (Pinaceae) in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, **6**(1), 19467.

Geldner, N. (2013). The endodermis. *Annual Review of Plant Biology*, **64**, 531–58.

Ginzberg, I., Barel, G., Ophir, R., Tzin, E., et al. (2009). Transcriptomic profiling of heat-stress response in potato periderm. *Journal of Experimental Botany*, **60**(15), 4411–4421.

Go, Y. S., Kim, H., Kim, H. J., & Suh, M. C. (2014). Arabidopsis cuticular wax biosynthesis is negatively regulated by the DEWAX gene encoding an AP2/ERF-Type transcription factor. *The Plant Cell*, **26**(4), 1666–1680.

Gou, J.-Y., Yu, X.-H., & Liu, C.-J. (2009). A hydroxycinnamoyltransferase responsible for synthesizing suberin aromatics in *Arabidopsis*.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **106**(44), 18855–60.

Gou, M., Hou, G., Yang, H., Zhang, X., Cai, Y., Kai, G., & Liu, C.-J. (2017). The MYB107 transcription factor positively regulates suberin biosynthesis. *Plant Physiology*, **173**(2), 1045–1058.

Graça, J., & Pereira, H. (2000). Methanolysis of bark suberins: analysis of glycerol and acid monomers. *Phytochemical Analysis*, **11**(1), 45–51.

Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., et al. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, **29**(7), 644–52.

Graça, J. (2015). Suberin: the biopolyester at the frontier of plants. *Frontiers in Chemistry*, **3**, 62.

Graça, J., Cabral, V., Santos, S., et al. (2015). Partial depolymerization of genetically modified potato tuber periderm reveals intermolecular linkages in suberin polyester. *Phytochemistry*, **117**, 209–219.

Graça, J., & Santos, S. (2007). Suberin: a biopolyester of plants' skin. *Macromolecular Bioscience*, **7**(2), 128–135.

Groover, A. T., Mansfield, S. D., DiFazio, S. P., Dupper, G., Fontana, J. R., Millar, R., & Wang, Y. (2006). The *Populus* homeobox gene ARBORKNOX1 reveals overlapping mechanisms regulating the shoot apical

- meristem and the vascular cambium. *Plant Molecular Biology*, **61**(6), 917–932.
- Grudkowska, M., & Zagdańska, B.** (2004). Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochimica Polonica*, **51**(3), 609–624.
- Guo, J., Wang, S., Valerius, O., Hall, H., et al.,** (2011). Involvement of Arabidopsis RACK1 in protein translation and its regulation by abscisic acid. *Plant Physiology*, **155**(1), 370–83.
- Guo, R., & Sun, W.** (2017). Sumoylation stabilizes RACK1B and enhance its interaction with RAP2.6 in the abscisic acid response. *Scientific Reports*, **7**, 44090.
- Hall, T. A.** (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95–98.
- Han, Y., Chen, Y., Yin, S., Zhang, M., & Wang, W.** (2015). Over-expression of TaEXPB23, a wheat expansin gene, improves oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants. *Journal of Plant Physiology*, **173**, 62–71.
- Haslam, T. M., Mañas-Fernández, A., Zhao, L., & Kunst, L.** (2012). Arabidopsis ECERIFERUM2 is a component of the fatty acid elongation machinery required for fatty acid extension to exceptional lengths. *Plant Physiology*, **160**(3), 1164–74.
- Helle, S., Kanfer, G., Kolar, K., Lang, A., Michel, A., & Kornmann, B.** (2013). Organization and function of membrane contact sites. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* - *Molecular Cell Research*, **1833**(11), 2526–2541.
- Higgins, C. F., & Linton, K. J.** (2004). The ATP switch model for ABC transporters. *Nature Structural & Molecular Biology*, **11**(10), 918–926.
- Hoang, M. H. T., Nguyen, X. C., Lee, K., et al.,** (2012). Phosphorylation by AtMPK6 is required for the biological function of AtMYB41 in Arabidopsis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **422**(1), 181–186.
- Höfer, R., Briesen, I., Beck, M., Pinot, F., Schreiber, L., & Franke, R.** (2008). The Arabidopsis cytochrome P450 CYP86A1 encodes a fatty acid omega-hydroxylase involved in suberin monomer biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, **59**(9), 2347–60.
- Hooker, T. S., Lam, P., Zheng, H., & Kunst, L.** (2007). A core subunit of the RNA-processing/degrading exosome specifically influences cuticular wax biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **19**(3), 904–13.
- Horiguchi, G., Mollá-Morales, A., Pérez-Pérez, J. M., et al.,** (2011). Differential contributions of ribosomal protein genes to Arabidopsis thaliana leaf development. *The Plant Journal*, **65**(5), 724–736.
- Horn, P., Santala, J., Nielsen, S. L., Hühns, M., Broer, I., & Valkonen, J. P. T.** (2014). Composite potato plants with transgenic roots on non-transgenic shoots: a model system for studying gene silencing in roots. *Plant Cell Reports*, **33**(12), 1977–92.

- Howe, E., Holton, K., Nair, S., Schlauch, D., Sinha, R., & Quackenbush, J. (2010). MeV: MultiExperiment Viewer. In *Biomedical Informatics for Cancer Research*, 267–277.
- Hu, L., Ye, M., Li, R., Zhang, T., Zhou, G., et al., (2015). The rice transcription factor WRKY53 suppresses herbivore-induced defenses by acting as a negative feedback modulator of mitogen-activated protein kinase activity. *Plant Physiology*, **169**(4), 2907–21.
- Huang, M.-D., Chen, T.-L. L., & Huang, A. H. C. (2013). Abundant type iii lipid transfer proteins in Arabidopsis tapetum are secreted to the locule and become a constituent of the pollen exine. *Plant Physiology*, **163**(3), 1218–1229.
- Huh, S. U., & Paek, K.-H. (2014). APUM5, encoding a Pumilio RNA binding protein, negatively regulates abiotic stress responsive gene expression. *BMC Plant Biology*, **14**, 75.
- Isayenkov, S., Mrosk, C., Stenzel, I., Strack, D., & Hause, B. (2005). Suppression of allene oxide cyclase in hairy roots of medicago truncatula reduces jasmonate levels and the degree of mycorrhization with glomus intraradices 1[w]. *Plant Physiology*, **139**, 1401–1410.
- Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P., & Fields, S. (1993). Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene*, **8**(6), 1693–6.
- Jacq, A., Pernot, C., Martinez, Y., Domergue, F., Payré, B., Jamet, E., Pacquit, V. B. (2017). The Arabidopsis lipid transfer protein 2 (AtLTP2) is involved in cuticle-cell wall interface integrity and in etiolated hypocotyl permeability. *Frontiers in Plant Science*, **8**, 263.
- Jaradat, M. R., Feurtado, J., Huang, D., Lu, Y., & Cutler, A. J. (2013). Multiple roles of the transcription factor AtMYBR1/AtMYB44 in ABA signaling, stress responses, and leaf senescence. *BMC Plant Biology*, **13**(1), 192.
- Jiang, Y., Liang, G., Yang, S., & Yu, D. (2014). Arabidopsis WRKY57 functions as a node of convergence for jasmonic acid- and auxin-mediated signaling in jasmonic acid-induced leaf senescence. *The Plant Cell*, **26**(1), 230–45.
- Jofré, A., Molinas, M., & Pla, M. (2003). A 10-kDa class-C1 sHsp protects *E. coli* from oxidative and high-temperature stress. *Planta*, **217**(5), 813–819.
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, **444**(7117), 323–329.
- Jones, L., & McQueen-Mason, S. (2004). A role for expansins in dehydration and rehydration of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *FEBS Letters*, **559**(1–3), 61–65.
- Jorgensen, R. A., & Dorantes-Acosta, A. E. (2012). Conserved peptide upstream open reading frames are associated with regulatory genes in angiosperms. *Frontiers in Plant Science*, **3**, 191.
- José-Estanyol, M., Gomis-Rüth, F. X., & Puigdomènech, P. (2004). The eight-cysteine

motif, a versatile structure in plant proteins.

Plant Physiology and Biochemistry, **42**(5), 355–365.

Kader, J. C. (1996). Lipid-transfer proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **47**(1), 627–654.

Takehi, J. I., Kawano, E., Yoshimoto, K., Cai, Q., Imai, A., & Takahashi, T. (2015). Mutations in ribosomal proteins, RPL4 and RACK1, suppress the phenotype of a thermospermine-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plos One*, **10**(1), e0117309.

Islas-Flores, T., Rahman, A., Ullah, H et al., (2015). The receptor for activated c kinase in plant signaling: tale of a promiscuous little molecule. *Frontiers in Plant Science*, **6**, 1090.

Kandel, S., Sauveplane, V., Olry, A., Diss, L., Benveniste, I., & Pinot, F. (2006). Cytochrome P450-dependent fatty acid hydroxylases in plants. *Phytochemistry Reviews*, **5**(2–3), 359–372.

Kang, W. H., Kim, S. Y., Song, K., et al., (2012). Trafficking of vacuolar proteins: the crucial role of *Arabidopsis* vacuolar protein sorting 29 in recycling vacuolar sorting receptor. *The Plant Cell*, **24**, 5058–5073.

Karimi, M., Inzé, D., & Depicker, A. (2002). GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, **7**(5), 193–5.

Katzen, F. (2007). Gateway[®] recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opinion on Drug Discovery*, **2**(4), 571–589.

Kieffer, M., Stern, Y., Cook, H., Clerici, E., Maulbetsch, C., Laux, T., & Davies, B. (2006). Analysis of the transcription factor WUSCHEL and its functional homologue in Antirrhinum reveals a potential mechanism for their roles in meristem maintenance. *The Plant Cell*, **18**(3), 560–73.

Kim, H., Lee, S. B., Kim, H. J., Min, M. K., Hwang, I., & Suh, M. C. (2012). Characterization of glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein 2 (LTPG2) and overlapping function between LTPG/LTPG1 and LTPG2 in cuticular wax export or accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology*, **53**(8), 1391–403.

Kloosterman, B., De Koeyer, D., Griffiths, R., Flinn, B., et al., (2008). Genes driving potato tuber initiation and growth: identification based on transcriptional changes using the POCI array. *Functional & Integrative Genomics*, **8**(4), 329–340.

Koch, K. (2004). Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**(3), 235–246.

Koes R1, Verweij W, Q. F. (2005). Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends in Plant Science*, **10**(5), 236–242.

Kolattukudy, P. E. (1980). Biopolyester Membranes of Plants: Cutin and Suberin. *Science*, **208**(4447), 990–1000.

Kolattukudy, P. E. (1981). Structure,

biosynthesis, and biodegradation of cutin and suberin. *Annual Review of Plant Physiology*, **32**(1), 539–567.

Kolattukudy, P. E. (2001). Polyesters in higher plants. *Advances in Biochemical Engineering/biotechnology*, **71**, 1–49.

Kolattukudy, P. E., & Agrawal, V. P. (1974). Structure and composition of aliphatic constituents of potato tuber skin (suberin). *Lipids*, **9**(9), 682–691.

Koressaar, T., & Remm, M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3, **23**(10), 1289–1291.

Kosma, D. K., Molina, I., Ohlrogge, J. B., & Pollard, M. (2012). Identification of an Arabidopsis fatty alcohol:caffeyl-Coenzyme A acyltransferase required for the synthesis of alkyl hydroxycinnamates in root waxes. *Plant Physiology*, **160**(1), 237–48.

Kosma, D. K., Murmu, J., Razeq, F. M., Santos, P., Bourgault, R., Molina, I., & Rowland, O. (2014). AtMYB41 activates ectopic suberin synthesis and assembly in multiple plant species and cell types. *The Plant Journal*, **80**(2), 216–229.

Kotzer, A., Brnadizzi, F., Neumann, U., Paris, N., Moore, I., & Hawes, C. (2004). AtRabF2b (Ara7) acts on the vacuolar trafficking pathway in tobacco leaf epidermal cells. *Cell Science*, **117**, 6377–6389.

Kunst, L., & Samuels, L. (2003). Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in Lipid Research*, **42**(1), 51–80.

Kurdyukov, S., Faust, A., Trenkamp, S., Bär, S., Franke, et al., (2006). Genetic and biochemical evidence for involvement of HOTHEAD in the biosynthesis of long-chain α , ω -dicarboxylic fatty acids and formation of extracellular matrix. *Planta*, **224**(2), 315–329.

Kuromori, T., Ito, T., Sugimoto, E., & Shinozaki, K. (2011). Arabidopsis mutant of AtABCG26, an ABC transporter gene, is defective in pollen maturation. *Journal of Plant Physiology*, **168**(16), 2001–5.

Lacombe, E., Hawkins, S., Van Doorselaere, et al., (1997). Cinnamoyl CoA reductase, the first committed enzyme of the lignin branch biosynthetic pathway: cloning, expression and phylogenetic relationships. *The Plant Journal*, **11**(3), 429–441.

Lai, C., Kunst, L., & Jetter, R. (2007). Composition of alkyl esters in the cuticular wax on inflorescence stems of *Arabidopsis thaliana* cer mutants. *The Plant Journal*, **50**(2), 189–196.

Lakatos, L., Szittyá, G., Silhavy, D., & Burgyán, J. (2004). Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *The EMBO Journal*, **23**(4), 876–84.

Landgraf, R., Smolka, U., Altmann, S., et al., (2014). The ABC transporter ABCG1 is required for suberin formation in potato tuber periderm. *The Plant Cell*, **26**(8), 3403–15.

Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, **9**(4), 357–9.

Lashbrooke, J. G., Cohen, H., Levy-Samocho, D., et al., (2016). MYB107 and MYB9 homologs regulate suberin deposition in angiosperms. *The Plant Cell*, **29** (9), 00490.2016.

Lasserre, E., Jobet, E., Llauro, C., & Delseny, M. (2008). AtERF38 (At2g35700), an AP2/ERF family transcription factor gene from *Arabidopsis thaliana*, is expressed in specific cell types of roots, stems and seeds that undergo suberization. *Plant Physiology and Biochemistry*, **46**(12), 1051–1061.

Le Bouquin, R., Skrabs, M., Kahn, R., et al., (2001). CYP94A5, a new cytochrome P450 from *Nicotiana tabacum* is able to catalyze the oxidation of fatty acids to the ω -alcohol and to the corresponding diacid. *European Journal of Biochemistry*, **268**(10), 3083–3090.

Lee, S. B., Jung, S. J., Go, Y.-S., Kim, H. U., et al., (2009). Two *Arabidopsis* 3-ketoacyl CoA synthase genes, *KCS20* and *KCS2 / DAISY*, are functionally redundant in cuticular wax and root suberin biosynthesis, but differentially controlled by osmotic stress. *The Plant Journal*, **60**(3), 462–475.

Lee, S. B., Go, Y. S., Bae, H.J., Park, J. H., et al., (2009). Disruption of glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein gene altered cuticular lipid composition, increased plastoglobules, and enhanced susceptibility to infection by the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. *Plant Physiology*, **150**(1), 42–54.

Lee, S. B., Kim, H., Kim, R. J., & Suh, M. C. (2014). Overexpression of *Arabidopsis* MYB96

confers drought resistance in *Camelina sativa* via cuticular wax accumulation. *Plant Cell Reports*, **33**(9), 1535–1546.

Lee, S. B., & Suh, M. C. (2015). Cuticular wax biosynthesis is up-regulated by the MYB94 transcription factor in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, **56**(1), 48–60.

Lee, Y., Choi, D., & Kende, H. (2001). Expansins: ever-expanding numbers and functions. *Current Opinion in Plant Biology*, **4**(6), 527–532.

Legay, S., Guerriero, G., André, C., Guignard, C., et al., (2016). MdMyb93 is a regulator of suberin deposition in russeted apple fruit skins. *New Phytologist*, **212**(4), 977–991.

Lendzian, K. J. (2006). Survival strategies of plants during secondary growth: barrier properties of phellements and lenticels towards water, oxygen, and carbon dioxide. *Journal of Experimental Botany*, **57**(11), 2535–2546.

Li-Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F., Andersson, M. X., et al., (2013). Acyl-lipid metabolism. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, **11**, e0161.

Li, B., & Fields, S. (1993). Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **7**(10), 957–63.

Li, S., Zhou, X., Chen, L., Huang, W., & Yu, D. (2010). Functional characterization of *Arabidopsis thaliana* WRKY39 in heat stress.

Molecules and Cells, **29**(5), 475–483.

Li, Y., Beisson, F., Koo, A. J. K., Molina, I., Pollard, M., & Ohlrogge, J. (2007). Identification of acyltransferases required for cutin biosynthesis and production of cutin with suberin-like monomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**(46), 18339–18344.

Li, Y., Beisson, F., Ohlrogge, J., & Pollard, M. (2007). Monoacylglycerols are components of root waxes and can be produced in the aerial cuticle by ectopic expression of a suberin-associated acyltransferase 1[W][OA]. *Plant Physiology*, **144**, 1267–1277.

Liang, M., Davis, E., Gardner, D., Cai, X., & Wu, Y. (2006). Involvement of AtLAC15 in lignin synthesis in seeds and in root elongation of *Arabidopsis*. *Planta*, **224**(5), 1185–1196.

Liang, W., Li, C., Liu, F., Jiang, H., et al., (2009). The *Arabidopsis* homologs of CCR4-associated factor 1 show mRNA deadenylation activity and play a role in plant defence responses. *Cell Research Arabidopsis Thaliana Cell Research*, **19**(10), 1931–1940.

Licausi, F., Ohme-Takagi, M., & Perata, P. (2013). AP2/ERF transcription factors: mediators of stress responses and developmental programs. *New Phytologist*, **199**(3), 639–649.

Lin, J. S., Huang, X.-X., Li, Q., Cao, Y., Bao, Y., et al., (2016). UDP-glycosyltransferase 72B1 catalyzes the glucose conjugation of monolignols and is essential for the normal cell wall lignification in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **88**(1), 26–42.

Linton, K. J. (2007). Structure and function of ABC transporters. *Physiology (Bethesda, Md.)*, **22**, 122–30.

Liu, F., Zhang, X., Lu, C., Zeng, X., Li, Y., Fu, D., & Wu, G. (2015). Non-specific lipid transfer proteins in plants: presenting new advances and an integrated functional analysis. *Journal of Experimental Botany*, **66**(19), 5663–5681.

Liu, W., Huang, D., Liu, K., Hu, S., Yu, J., Gao, G., & Song, S. (2010). Discovery, identification and comparative analysis of non-specific lipid transfer protein (nsLtp) family in Solanaceae. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, **8**(4), 229–37.

Liu, Y., Wei, M., Hou, C., Lu, T., Liu, L., Wei, H., Wei, Z. (2017). Functional Characterization of *Populus PsnSHN2* in Coordinated Regulation of Secondary Wall Components in Tobacco. *Scientific Reports*, **7**(1), 42.

Logemann, J., Schell, J., & Lothar, W. (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analytical Biochemistry*, **163**(1), 16–20.

Lorković, Z. J., & Barta, A. (2002). Genome analysis: RNA recognition motif (RRM) and KH domain RNA-binding proteins from the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research*, **30**(3), 623–35.

Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, **15**(12), 550.

- Lü, S., Song, T., Kosma, D. K., Parsons, E. P., Rowland, O., & Jenks, M. A. (2009). Arabidopsis CER8 encodes Long-Chain Acyl-Coa Synthetase 1 (LACS1) that has overlapping functions with LACS2 in plant wax and cutin synthesis. *The Plant Journal*, **59**(4), 553–564.
- Lü, S., Zhao, H., Parsons, E. P., Xu, C., et al., (2011). The glossyhead1 allele of ACC1 reveals a principal role for multidomain acetyl-coenzyme A carboxylase in the biosynthesis of cuticular waxes by Arabidopsis. *Plant Physiology*, **157**(3), 1079–92.
- Lulai, E. C., & Freeman, T. P. (2001). The importance of phellogen cells and their structural characteristics in susceptibility and resistance to excoriation in immature and mature potato tuber (*Solanum tuberosum* L.) Periderm. *Annals of Botany*, **88**, 555–561.
- Luo, B., Xue, X. Y. Y., Hu, W. L. L., Wang, L. J. J., & Chen, X. Y. Y. (2007). An ABC transporter gene of Arabidopsis thaliana, AtWBC11, is involved in cuticle development and prevention of organ fusion. *Plant & Cell Physiology*, **48**(12), 1790–802.
- Massa, A. N., Childs, K. L., Lin, H., Bryan, G. J., Giuliano, G., & Buell, C. R. (2011). The transcriptome of the reference potato genome *Solanum tuberosum* Group Phureja clone DM1-3 516R44. *PLoS One*, **6**(10), e26801.
- Matsumura, Y., Iwakawa, H., Machida, Y., & Machida, C. (2009). Characterization of genes in the Asymmetric Leaves2/Lateral Organ Boundaries (AS2/LOB) family in *Arabidopsis thaliana*, and functional and molecular comparisons between AS2 and other family members. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **58**(3), 525–37.
- Matsumura, Y., Ohbayashi, I., Takahashi, H., et al., (2016). A genetic link between epigenetic repressor AS1-AS2 and a putative small subunit processome in leaf polarity establishment of Arabidopsis. *The Company of Biologists*, **5**, 942–954.
- McFarlane, H. E., Shin, J. J. H., Bird, D. A., Samuels, A. L., et al., (2010). Arabidopsis ABCG transporters, which are required for export of diverse cuticular lipids, dimerize in different combinations. *The Plant Cell*, **22**(9), 3066–75.
- McFarlane, H. E., Shin, J. J. H., Bird, D., & Samuels, L. (2010). Arabidopsis ABCG transporters, which are required for export of diverse cuticular lipids, dimerize in different combinations. *The Plant Cell*, **22**(9), 3066–75.
- McFarlane, H. E., Watanabe, Y., Yang, W., Huang, Y., Ohlrogge, J., & Samuels, A. L. (2014). Golgi- and trans-golgi network-mediated vesicle trafficking is required for wax secretion from epidermal cells. *Plant Physiology*, **164**(3), 1250–1260.
- McQueen-Mason, S., & Cosgrove, D. J. (1994). Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**(14), 6574–8.
- Meyermans, H., Morreel, K., Lapierre, C., Pollet, B., et al., (2000). Modifications in lignin and accumulation of phenolic glucosides in

poplar xylem upon down-regulation of caffeoyl-coenzyme A O-methyltransferase, an enzyme involved in lignin biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**(47), 36899–909.

Mohanta, T. K., Park, Y. H., & Bae, H. (2016). Novel genomic and evolutionary insight of wrky transcription factors in plant lineage. *Scientific Reports*, **6**(1), 37309.

Molina, I., Li-Beisson, Y., Beisson, F., Ohlogge, J. B., & Pollard, M. (2009). Identification of an Arabidopsis feruloyl-coenzyme A transferase required for suberin synthesis. *Plant Physiology*, **151**(3), 1317–28.

Morozova, O., Hirst, M., & Marra, M. A. (2009). Applications of new sequencing technologies for transcriptome analysis. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, **10**(1), 135–151.

Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T., & Shinshi, H. (2006). Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. *Plant Physiology*, **140**(2), 411–32.

Nawrath, C. (2002). The biopolymers cutin and suberin. *The Arabidopsis Book*, **1**(1), 1.

Nelson, B. K., Cai, X., & Nebenführ, A. (2007). A multicolored set of *in vivo* organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **51**(6), 1126–36.

Nemoto, K., Hara, M., Suzuki, M., Seki, H., Oka, A., Muranaka, T., & Mano, Y. (2009). Function of the aux and rol genes of the Ri plasmid in plant cell division *in vitro*. *Plant Signaling & Behavior*, **4**(12), 1145–7.

Neubauer, J. D., Lulai, E. C., Thompson, A. L., Suttle, J. C., & Bolton, M. D. (2012). Wounding coordinately induces cell wall protein, cell cycle and pectin methyl esterase genes involved in tuber closing layer and wound periderm development. *Journal of Plant Physiology*, **169**(6), 586–595.

Nolan, T., Hands, R. E., & Bustin, S. A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, **1**(3), 1559–1582.

Oh, E., Zhu, J. Y., Ryu, H., Hwang, I., & Wang, Z. Y. (2014). TOPLESS mediates brassinosteroid-induced transcriptional repression through interaction with BZR1. *Nature Communications*, **5**, 4140.

Ohme-Takagi, M., & Shinshi, H. (1995). Ethylene-Inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *The Plant Cell*, **7**, 173–182.

Okamoto, T., Toyooka, K., & Minamikawa, T. (2001). Identification of a membrane-associated cysteine protease with possible dual roles in the endoplasmic reticulum and protein storage vacuole. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**(1), 742–751.

Pagnussat, G. C., Yu, H. J., Ngo, Q. A., et al., (2004). Genetic and molecular identification of genes required for female gametophyte development and function in Arabidopsis. *Development*, **132**, 603–614.

Panikashvili, D., Savaldi-Goldstein, S., Mandel, T., et al., (2007). The Arabidopsis DESPERADO/AtWBC11 transporter is required

for cutin and wax secretion. *Plant Physiology*, **145**(4), 1345–60.

Panikashvili, D., Shi, J. X., Bocobza, S., Franke, R. B., Schreiber, L., & Aharoni, A. (2010). The Arabidopsis DSO/ABCG11 transporter affects cutin metabolism in reproductive organs and suberin in roots. *Molecular Plant*, **3**(3), 563–75.

Park, C. S., Go, Y. S., & Suh, M. C. (2016). Cuticular wax biosynthesis is positively regulated by WRINKLED4, an AP2/ERF-type transcription factor, in Arabidopsis stems. *The Plant Journal*, **88**(2), 257–270.

Park, J. M., Park, C. J., Lee, S. B., Ham, B. K., Shin, R., & Paek, K. H. (2001). Overexpression of the tobacco Tsi1 gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. *The Plant Cell*, **13**(5), 1035–46.

Pereira-Leal, J. B., Abreu, I. A., Alabaça, C. S., et al., (2014). A comprehensive assessment of the transcriptome of cork oak (*Quercus suber*) through EST sequencing. *BMC Genomics*, **15**(1), 371.

Pereira, H. (1988). Chemical composition and variability of cork from *Quercus suber* L. *Wood Science and Technology*, **22**(3), 211–218.

Pereira, H., & Graça, J. (2004). The periderm development in *Quercus Suber*. *Iawa Journal*, **25**(3), 325–335.

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, **29**(9), e45.

Phelps-Durr, T. L., Thomas, J., Vahab, P., & Timmermans, M. C. P. (2005). Maize rough sheath2 and its Arabidopsis orthologue ASYMMETRIC LEAVES1 interact with HIRA, a predicted histone chaperone, to maintain knock gene silencing and determinacy during organogenesis. *The Plant Cell*, **17**(11), 2886–98.

Phukan, U. J., Jeena, G. S., & Shukla, R. K. (2016). WRKY Transcription Factors: Molecular Regulation and Stress Responses in Plants. *Frontiers in Plant Science*, **7**, 760.

Pighin, J. A., Zheng, H., Balakshin, L. J., et al., (2004). Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter. *Science (New York, N.Y.)*, **306**(5696), 702–4.

Pla, M., Jofré, A., Martell, M., Molinas, M., & Gómez, J. (2000). Large accumulation of mRNA and DNA point modifications in a plant senescent tissue. *FEBS Letters*, **472**(1), 14–16.

Plasencia, A., Soler, M., Dupas, A., Ladouce, N., Silva-Martins, et al., (2015). Eucalyptus hairy roots, a fast, efficient and versatile tool to explore function and expression of genes involved in wood formation. *Plant Biotechnology Journal*, 1–13.

Pollard, M., Beisson, F., Li, Y., & Ohlrogge, J. B. (2008). Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends in Plant Science*, **13**(5), 236–46.

Potocka, I., Baldwin, T. C., & Kurczynska, E. U. (2012). Distribution of lipid transfer protein 1

- (LTP1) epitopes associated with morphogenic events during somatic embryogenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, **31**(11), 2031–2045.
- Pružinská, A., Shindo, T., Niessen, S., Kaschani, F., Tóth, R., Millar, A. H., & van der Hoorn, R. A. L.** (2017). Major Cys protease activities are not essential for senescence in individually darkened *Arabidopsis* leaves. *BMC Plant Biology*, **17**(1), 4.
- Pyee, J., Yu, H. S., & Kolattukudy, P. E.** (1994). Identification of a lipid transfer protein as the major protein in the surface wax of broccoli (*Brassica oleracea*) leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **311**(2), 460–468.
- Qian, W., Miki, D., Lei, M., Zhu, X., et al.**, (2014). Regulation of active DNA demethylation by an α -crystallin domain protein in *Arabidopsis*. *Molecular Cell*, **55**(3), 361–71.
- Quan, S., Switzenberg, R., Reumann, S., & Hu, J.** (2010). *In vivo* subcellular targeting analysis validates a novel peroxisome targeting signal type 2 and the peroxisomal localization of two proteins with putative functions in defense in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior*, **5**(2), 151–3.
- Quan, S., Yang, P., Cassin-Ross, G., Kaur, N., et al.**, (2013). Proteome analysis of peroxisomes from etiolated *Arabidopsis* seedlings identifies a peroxisomal protease involved in β -oxidation and development. *Plant Physiology*, **163**(4), 1518–38.
- Quandt, H. J., Puehler, A., & Broer, I.** (1993). Transgenic root nodules of *Vicia hirsuta*: a fast and efficient system for the study of gene expression in indeterminate-type nodules. *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions*, **6**(6), 699–703.
- Rains, M. K., Gardiyehewa de Silva, N. D., & Molina, I.** (2017). Reconstructing the suberin pathway in poplar by chemical and transcriptomic analysis of bark tissues. *Tree Physiology*. DOI:10.1093/treephys/tpx060
- Rakitina, D. V, Taliensky, M., Brown, J. W. S., & Kalinina, N. O.** (2011). Two RNA-binding sites in plant fibrillarins provide interactions with various RNA substrates. *Nucleic Acids Research*, **39**(20), 8869–8880.
- Ranathunge, K.** (2011). Suberin research in the genomics era—New interest for an old polymer. *Plant Science*, **180**(3), 399–413.
- Rhanathunge, K., Schreiber, L., & Franke, R.** (2011). Suberin research in the genomics era—New interest for an old polymer. *Plant Science*, **180**(3), 399–413.
- Ricardo, C. P. P., Martins, I., Francisco, R., et al.**, (2011). Proteins associated with cork formation in *Quercus suber* L. stem tissues. *Journal of Proteomics*, 1266–1278.
- Richau, K. H., Kaschani, F., Verdoes, M., et al.**, (2012). Subclassification and biochemical analysis of plant papain-like cysteine proteases displays subfamily-specific characteristics. *Plant Physiology*, **158**(4), 1583–99.
- Roberts, A., Schaeffer, L., & Pachter, L.** (2013). Updating RNA-Seq analyses after re-

annotation. *Bioinformatics (Oxford, England)*, **29**(13), 1631–7.

Romera-Branchat, M., Ripoll, J. J., Yanofsky, M. F., & Pelaz, S. (2013). The *WOX13* homeobox gene promotes replum formation in the *Arabidopsis thaliana* fruit. *The Plant Journal*, **73**(1), 37–49.

Ron, M., Kajala, K., Pauluzzi, G., Wang, D., et al., (2014). Hairy root transformation using *Agrobacterium rhizogenes* as a tool for exploring cell type-specific gene expression and function using tomato as a model. *Plant Physiology*, **166**(2), 455–69.

Roppolo, D., Boeckmann, B., Pfister, A., Boutet, E., et al., (2014). Functional and Evolutionary Analysis of the casparian strip membrane domain protein Family. *Plant Physiology*, **165**(4), 1709–1722.

Rowland, O., Zheng, H., Hepworth, S. R., Lam, P., Jetter, R., & Kunst, L. (2006). CER4 encodes an alcohol-forming fatty acyl-coenzyme A reductase involved in cuticular wax production in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **142**(3), 866–77.

Ruberti, I., Sessa, G., Lucchetti, S., Morelli, G., & Gehring, W. J. (1991). A novel class of plant proteins containing a homeodomain with a closely linked leucine zipper motif. *The EMBO Journal*, **10**(7), 1787–1791.

Sabba, R. P., & Lulai, E. C. (2002). Histological analysis of the maturation of native and wound periderm in potato (*Solanum tuberosum* L.) Tuber. *Annals of Botany*, **90**(1), 1–10.

Saeed, A.I., Sharov, V., White, J., Li, J., et al.,

(2003). TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *BioTechniques*, **34**, 374–378.

Saito, T., & Terashima, I. (2004). Reversible decreases in the bulk elastic modulus of mature leaves of deciduous *Quercus* species subjected to two drought treatments. *Plant, Cell and Environment*, **27**(7), 863–875.

Sajeevan, R. S., Nataraja, K. N., Shivashankara, K. S., Pallavi, N., Gurumurthy, D. S., & Shivanna, M. B. (2017). Expression of *Arabidopsis* SHN1 in indian mulberry (*Morus indica* L.) increases leaf surface wax content and reduces post-harvest water loss. *Frontiers in Plant Science*, **8**, 418.

Sakamoto, S., & Mitsuda, N. (2015). Reconstitution of a secondary cell wall in a secondary cell wall-deficient *Arabidopsis* mutant. *Plant & Cell Physiology*, **56**(2), 299–310.

Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J. G., Abe, H., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002). DNA-Binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **290**, 998–1009.

Salminen, T. A., Blomqvist, K., & Edqvist, J. (2016). Lipid transfer proteins: classification, nomenclature, structure, and function. *Planta*, **244**(5), 971–997.

Samuels, L., Kunst, L., & Jetter, R. (2008). Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells. *Annual Review of Plant*

Biology, **59**, 683–707.

Schnurr, J., Shockey, J., & Browse, J. (2004). The Acyl-CoA synthetase encoded by LACS2 is essential for normal cuticle development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **16**, 629–642.

Schreiber, L., Rochus, A., Ae, F., & Hartmann, K. (2005). Wax and suberin development of native and wound periderm of potato (*Solanum tuberosum* L.) and its relation to peridermal transpiration. *Planta*, **220**, 520–530.

Schroda, M., Vallon, O., Wollman, F. A., & Beck, C. F. (1999). A chloroplast-targeted heat shock protein 70 (HSP70) contributes to the photoprotection and repair of photosystem II during and after photoinhibition. *The Plant Cell*, **11**(6), 1165–78.

Seo, P. J., Lee, S. B., Suh, M. C., Park, M. J., Go, Y. S., & Park, C. M. (2011). The MYB96 transcription factor regulates cuticular wax biosynthesis under drought conditions in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **23**(3), 1138–52.

Serra, O., Chatterjee, S., Figueras, M., Molinas, M., & Stark, R. E. (2014). Deconstructing a plant macromolecular assembly: chemical architecture, molecular flexibility, and mechanical performance of natural and engineered potato suberins. *Biomacromolecules*, **15**(3), 799–811.

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: For Cell and Molecular Biology*, **62**(2), 277–90.

Serra, O., Soler, M., Hohn, C., Franke, R., et al., (2009a). Silencing of StKCS6 in potato periderm leads to reduced chain lengths of suberin and wax compounds and increased peridermal transpiration. *Journal of Experimental Botany*, **60**(2), 697–707.

Serra, O., Soler, M., Hohn, C., Sauveplane, V., Pinot, F., et al., (2009b). CYP86A33-Targeted gene silencing in potato tuber alters suberin composition, distorts suberin lamellae, and impairs the periderm's water barrier function. *Plant Physiology*, **149**(2), 1050–1060.

Shi, J. X., Malitsky, S., De Oliveira, S., Branigan, C., Franke, R. B., Schreiber, L., & Aharoni, A. (2011). SHINE transcription factors act redundantly to pattern the archetypal surface of *Arabidopsis* flower organs. *PLoS Genet*, **7**(5).

Shigeto, J., Kiyonaga, Y., Fujita, K., Kondo, R., & Tsutsumi, Y. (2013). Putative cationic cell-wall-bound peroxidase homologues in *Arabidopsis*, AtPrx2, AtPrx25, and AtPrx71, are involved in lignification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **61**(16), 3781–3788.

Shiono, K., Ando, M., Nishiuchi, S., Takahashi, H., et al., (2014). RCN1/OsABCG5, an ATP-binding cassette (ABC) transporter, is required for hypodermal suberization of roots in rice (*Oryza sativa*). *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **80**(1), 40–51.

Silva, S. P., Sabino, M. A., Fernandes, E. M., Correlo, V. M., Boesel, L. F., & Reis, R. L. (2005). Cork: properties, capabilities and applications. *International Materials Reviews*,

50(6), 345–365.

Simpson, J. T., Wong, K., Jackman, S. D., Schein, J. E., Jones, S. J. M., & Birol, I. (2009). ABySS: a parallel assembler for short read sequence data. *Genome Research*, **19**(6), 1117–23.

Singh, A. K., Sharma, V., Pal, A. K., Acharya, V., & Ahuja, P. S. (2013). Genome-wide organization and expression profiling of the NAC transcription factor family in potato (*Solanum tuberosum* L.). *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, **20**(4), 403–23.

Sohn, E. J., Kim, E. S., Zhao, M., Kim, S. J., et al., (2003). Rha1, an Arabidopsis Rab5 homolog, plays a critical role in the vacuolar trafficking of soluble cargo proteins. *The Plant Cell*, **15**, 1057–1070.

Soler, M. (2008) *Molecular Genetics of Cork Formation*. PhD Thesis.

Soler, M., Serra, O., Fluch, S., Molinas, M., & Figueras, M. (2011). A potato skin SSH library yields new candidate genes for suberin biosynthesis and periderm formation. *Planta*, **233**(5), 933–45.

Soler, M., Serra, O., Molinas, M., García-Berthou, E., Caritat, A., & Figueras, M. (2008). Seasonal variation in transcript abundance in cork tissue analyzed by real time RT-PCR. *Tree Physiology*, **28**(5), 743–51.

Soler, M., Serra, O., Molinas, M., Huguet, G., Fluch, S., & Figueras, M. (2007). A genomic approach to suberin biosynthesis and cork

differentiation. *Plant Physiology*, **144**(1), 419–31.

Soliday, C. L., Kolattukudy, P. E., & Davis, R. W. (1979). Chemical and ultrastructural evidence that waxes associated with the suberin polymer constitute the major diffusion barrier to water vapor in potato tuber (*Solanum tuberosum* L.). *Planta*, **146**(5), 607–614.

Speth, C., Willing, E. M., Rausch, S., Schneeberger, K., & Laubinger, S. (2013). RACK1 scaffold proteins influence miRNA abundance in Arabidopsis. *The Plant Journal*, **76**(3), 433–445.

Stockinger, E. J., Gilmour, S. J., & Thomashow, M. F. (1997). Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit (cold acclimation). *Plant Biology*, **94**, 1035–1040.

Stoka, Veronika; Turk, Boris; Turk, V. (2005). Lysosomal cysteine proteases: structural features and their role in apoptosis. *Life*, **57**, 347–353.

Su, J., Xu, J., & Zhang, S. (2015). RACK1, scaffolding a heterotrimeric G protein and a MAPK cascade. *Trends in Plant Science*, **20**, 405–407.

Suh, M. C., & Go, Y. S. (2014). DEWAX-mediated transcriptional repression of cuticular wax biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *Plant Signaling & Behavior*, **9**(8), e29463.

- Sun, Y., & Yu, D. (2015). Activated expression of AtWRKY53 negatively regulates drought tolerance by mediating stomatal movement. *Plant Cell Reports*, **34**(8), 1295–1306.
- Sundin, L., Vanholme, R., Geerinck, J., et al., (2014). Mutation of the inducible arabidopsis thaliana cytochrome P450 reductase2 alters lignin composition and improves saccharification. *Plant Physiology*, **166**(4), 1956–71.
- Sunil Kumar, G. B., Ganapathi, T. R., Srinivas, L., Revathi, C. J., & Bapat, V. a. (2006). Expression of hepatitis B surface antigen in potato hairy roots. *Plant Science*, **170**(5), 918–925.
- Supek, F., Bošnjak, M., Škunca, N., & Šmuc, T. (2011). REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS ONE*, **6**(7), e21800.
- Takami, T., Shibata, M., Kobayashi, Y., & Shikanai, T. (2010). De novo biosynthesis of fatty acids plays critical roles in the response of the photosynthetic machinery to low temperature in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, **51**(8), 1265–1275.
- Tamura, K., Shimada, T., Ono, E., Tanaka, Y., et al., (2003). Why green fluorescent fusion proteins have not been observed in the vacuoles of higher plants. *The Plant Journal*, **35**(4), 545–555.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**(12), 2725–9.
- Tang, J., Han, Z., & Chai, J. (2016). Q&A: what are brassinosteroids and how do they act in plants? *BMC Biology*, **14**(1), 113.
- Tarkowski, P., & Vereecke, D. (2014). Threats and opportunities of plant pathogenic bacteria. *Biotechnology Advances*, **32**(1), 215–229.
- Teixeira, R. T., Fortes, A. M., Bai, H., Pinheiro, C., & Pereira, H. (2017). Transcriptional profiling of cork oak phellogenic cells isolated by laser microdissection. *Planta*, **1**, 1–22.
- Teixeira, R. T., Fortes, A. M., Pinheiro, C., et al., (2014). Comparison of good- and bad-quality cork: application of high-throughput sequencing of phellogenic tissue. *Journal of Experimental Botany*, **65**(17), 4887–4905.
- Thimm, O., Bläsing, O., Gibon, Y., Nagel, A., et al., (2004). mapman: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *The Plant Journal*, **37**(6), 914–939.
- Thoma, S., Kaneko, Y., & Somerville, C. (1993). A non-specific lipid transfer protein from Arabidopsis is a cell wall protein. *The Plant Journal*, **3**, 427–436.
- Thomson, N., Evert, R. F., & Kelman, A. (1995). Wound healing in whole potato tubers: a cytochemical, fluorescence, and ultrastructural analysis of cut and bruise wounds. *Canadian Journal of Botany*, **73**(9), 1436–1450.

- 5415–5427.
- Todd, J., Post-Beittenmiller, D., & Jaworski, J. G.** (1999). KCS1 encodes a fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase affecting wax biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **17**(2), 119–130.
- Troncoso-Ponce, M. A., Kilaru, A., Cao, X., et al.,** (2011). Comparative deep transcriptional profiling of four developing oilseeds. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **68**(6), 1014–27.
- Ulitsky, I., Maron-Katz, A., Shavit, S., Sagir, D., et al.,** (2010). Expander: from expression microarrays to networks and functions. *Nature Protocols*, **5**(2), 303–322.
- Usadel, B., Poree, F., Nagel, A., Lohse, M., Czedik-Eysenberg, A., & Stitt, M.** (2009). A guide to using MapMan to visualize and compare Omics data in plants: a case study in the crop species, Maize. *Plant, Cell & Environment*, **32**(9), 1211–1229.
- Vanholme, R.** (2013). Caffeoyl shikimate esterase (CSE) is an enzyme in the lignin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. *Science*, **341**(5633), 653–657.
- Varea, S., Garcia-Vallejo, M. C., & Cadahía, E.** (2001). Polyphenols susceptible to migrate from cork stoppers to wine. *Eur Food Res Technol*, **213**, 56–61.
- Verdaguer, R., Soler, M., Serra, O., et al.,** (2016). Silencing of the potato *StNAC103* gene enhances the accumulation of suberin polyester and associated wax in tuber skin. *Journal of Experimental Botany*, **67**(18),
- Verma, S., Dixit, R., & Pandey, K** (2016). Cysteine Proteases: modes of activation and future prospects as pharmacological targets. *Frontiers in Pharmacology*, **7**, 107
- Verrier, P. J., Bird, D., Burla, B., Dassa, E., et al.,** (2008). Plant ABC proteins—a unified nomenclature and updated inventory. *Trends in Plant Science*, **13**(4), 151–159.
- Vincent, J. L., & Brewin, N. J.** (2000). Immunolocalization of a cysteine protease in vacuoles, vesicles, and symbiosomes of pea nodule cells. *Plant Physiology*, **123**(2), 521–30.
- Vishwanath, S. J., Delude, C., Domergue, F. F., & Rowland, O.** (2015). Suberin: biosynthesis, regulation, and polymer assembly of a protective extracellular barrier. *Plant Cell Reports*, **34**, 573–586.
- Vishwanath, S. J., Kosma, D. K., Pulsifer, I. P., et al.,** (2013). Suberin-associated fatty alcohols in *Arabidopsis*: distributions in roots and contributions to seed coat barrier properties. *Plant Physiology*, **163**(3), 1118–32.
- Vogt, E., Schönherr, J., & Schmidt, H. W.** (1983). Water permeability of periderm membranes isolated enzymatically from potato tubers (*Solanum tuberosum L.*). *Planta*, **158**(4), 294–301.
- Von Arnim, A. G., Jia, Q., & Vaughn, J. N.** (2014). Regulation of plant translation by upstream open reading frames. *Plant Science*, **214**, 1–12.

- Waadt, R., Schlücking, K., Schroeder, J. I., & Kudla, J.** (2014). Protein fragment bimolecular fluorescence complementation analyses for the *in vivo* study of protein-protein interactions and cellular protein complex localizations. *Methods in Molecular Biology*, **1062**, 629–658.
- Wamaitha, M. J., Yamamoto, R., Wong, H. L., Kawasaki, T., Kawano, Y., & Shimamoto, K.** (2012). OsRap2.6 transcription factor contributes to rice innate immunity through its interaction with Receptor for Activated Kinase-C 1 (RACK1). *Rice*, **5**(1), 35.
- Wang, X., McLachlan, J., Zamore, P. D., & Hall, T. M. T.** (2002). Modular Recognition of RNA by a Human Pumilio-Homology Domain. *Cell*, **110**(4), 501–512.
- Wang, Y., Wan, L., Zhang, L., Zhang, Z., et al.** (2012). An ethylene response factor OsWR1 responsive to drought stress transcriptionally activates wax synthesis related genes and increases wax production in rice. *Plant Molecular Biology*, **78**(3), 275–288.
- Wang, Z., & Benning, C.** (2012). Chloroplast lipid synthesis and lipid trafficking through ER-plastid membrane contact sites. *Biochemical Society Transactions*, **40**(2), 457–63.
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M.** (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews. Genetics*, **10**(1), 57–63.
- Wang, Z., Zhang, N., Zhou, X., Fan, Q., Si, H., & Wang, D.** (2015). Isolation and characterization of StERF transcription factor genes from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Comptes Rendus - Biologies*, **338**(4), 219–226.
- Warde-Farley, D., Donaldson, S. L., Comes, O., et al.** (2010). The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Research*, **38**, 214–220.
- Watson, C., Froehlich, J., Josefsson, C et al.** (2001). Localization of CYP86B1 in the outer envelope of chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, **42**(8), 873-878.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V., & Provart, N. J.** (2007). An “Electronic Fluorescent Pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data Sets. *PLoS ONE*, **2**(8), e718.
- Wood, D. E., & Salzberg, S. L.** (2014). Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biology*, **15**(3), R46.
- Wu, W. R., Li, S., He, S., Waßmann, F., et al.** (2011). CFL1, a WW domain protein, regulates cuticle development by modulating the function of HDG1, a class iv homeodomain transcription factor, in Rice and Arabidopsis. *The Plant Cell*, **23**, 3392–3411.
- Xu, X., Pan, S., Cheng, S., Zhang, B., Mu, D., et al.** (2011). Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature*, **475**(7355), 189–95.
- Yadav, V., Molina, I., Ranathunge, K., Castillo, I. Q., Rothstein, S. J., & Reed, J. W.** (2014). ABCG

transporters are required for suberin and pollen wall extracellular barriers in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **26**(9), 3569–88.

Yang, W.-L., & Bernards, M. A. (2006). Wound-induced metabolism in potato (*Solanum tuberosum*) tubers: biosynthesis of aliphatic domain monomers. *Plant Signaling & Behavior*, **1**(2), 59–66.

Yang, W.-L., & Bernards, M. A. (2007). Metabolite profiling of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers during wound-induced suberization. *Metabolomics*, **3**(2), 147–159.

Yang, W., Pollard, M., Li-Beisson, Y., Beisson, F., Feig, M., & Ohlrogge, J. (2010). A distinct type of glycerol-3-phosphate acyltransferase with sn-2 preference and phosphatase activity producing 2-monoacylglycerol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**(26), 12040–5.

Yang, X., Zhao, H., Kosma, D. K., Tomasi, P., et al., (2017). The acyl desaturase CER17 is involved in producing wax unsaturated primary alcohols and cutin monomers. *Plant Physiology*, **173**(2), 1109–1124.

Zarei, A., Körbes, A. P., Younessi, P., Montiel, G., Champion, A., & Memelink, J. (2011). Two GCC boxes and AP2/ERF-domain transcription factor ORA59 in jasmonate/ethylene-mediated

activation of the PDF1.2 promoter in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, **75**(4–5), 321–31.

Zeier, J., & Schreiber, L. (1999). Fourier transform infrared-spectroscopic characterisation of isolated endodermal cell walls from plant roots: chemical nature in relation to anatomical development. *Planta*, **209**(4), 537–542.

Zhao, L., & Kunst, L. (2016). SUPERKILLER Complex components are required for the rna exosome-mediated control of cuticular wax biosynthesis in Arabidopsis inflorescence stems. *Plant Physiology*, **171**(2), 960–73.

Zhao, Q., Nakashima, J., Chen, F., Yin, Y., et al., (2013). LACCASE is necessary and nonredundant with PEROXIDASE for Lignin polymerization during vascular development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **25**(10), 3976–3987.

Zhu, Y. Y., Machleder, E. M., Chenchik, A., Li, R., & Siebert, P. D. (2001). Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction. *BioTechniques*, **30**(4), 892–7.

Annex suplementari apartat 3.1: Identificació de proteïnes que interaccionen amb *StRIK* mitjançant el mètode del dos híbrids en llevat

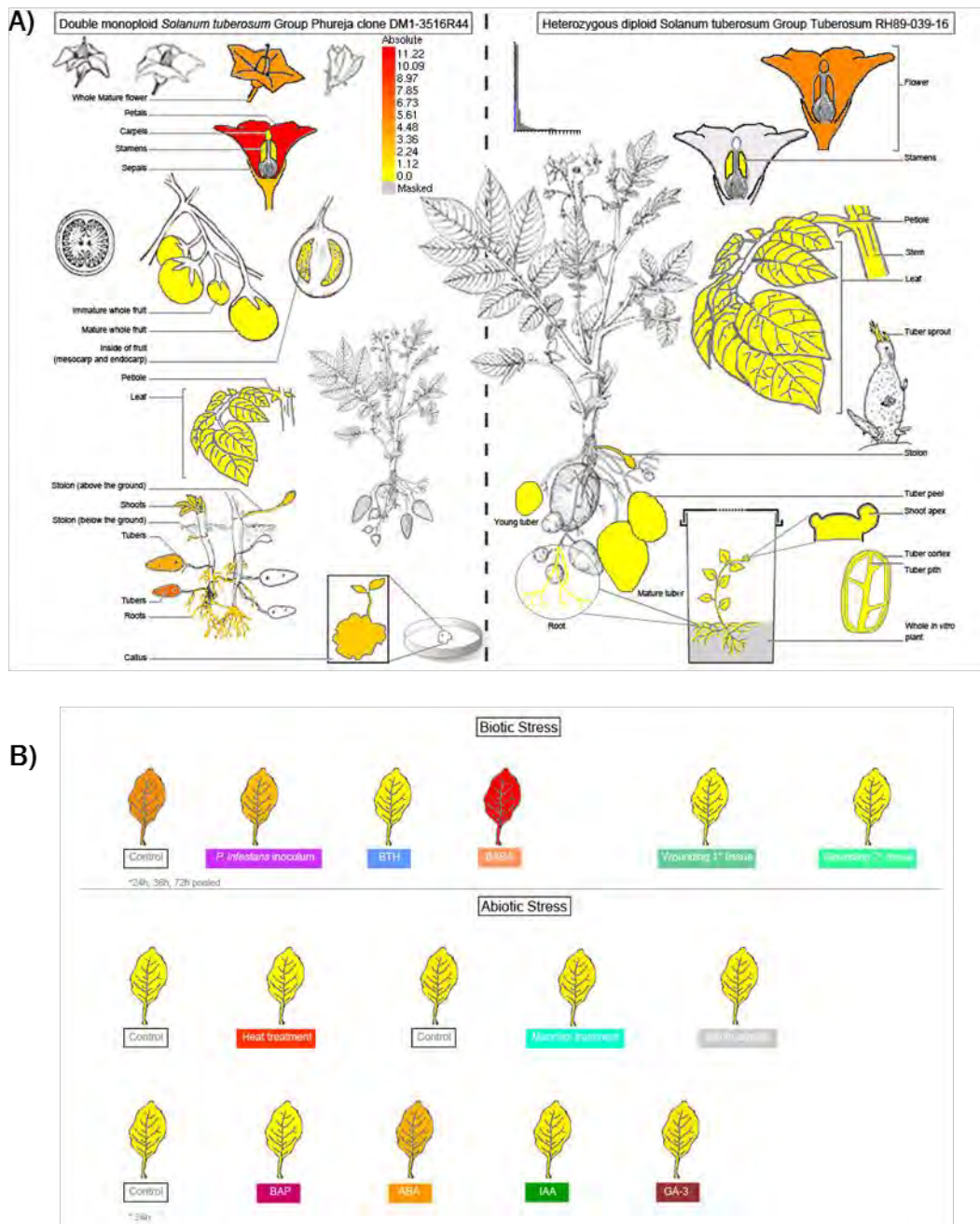


Figura suplementària 1. Representació pictogràfica de l'expressió de l'*StERF135* en teixits i òrgans (A) i en diferents tractaments amb hormones i estressos (B) a partir de les dades d'eFP Browser.

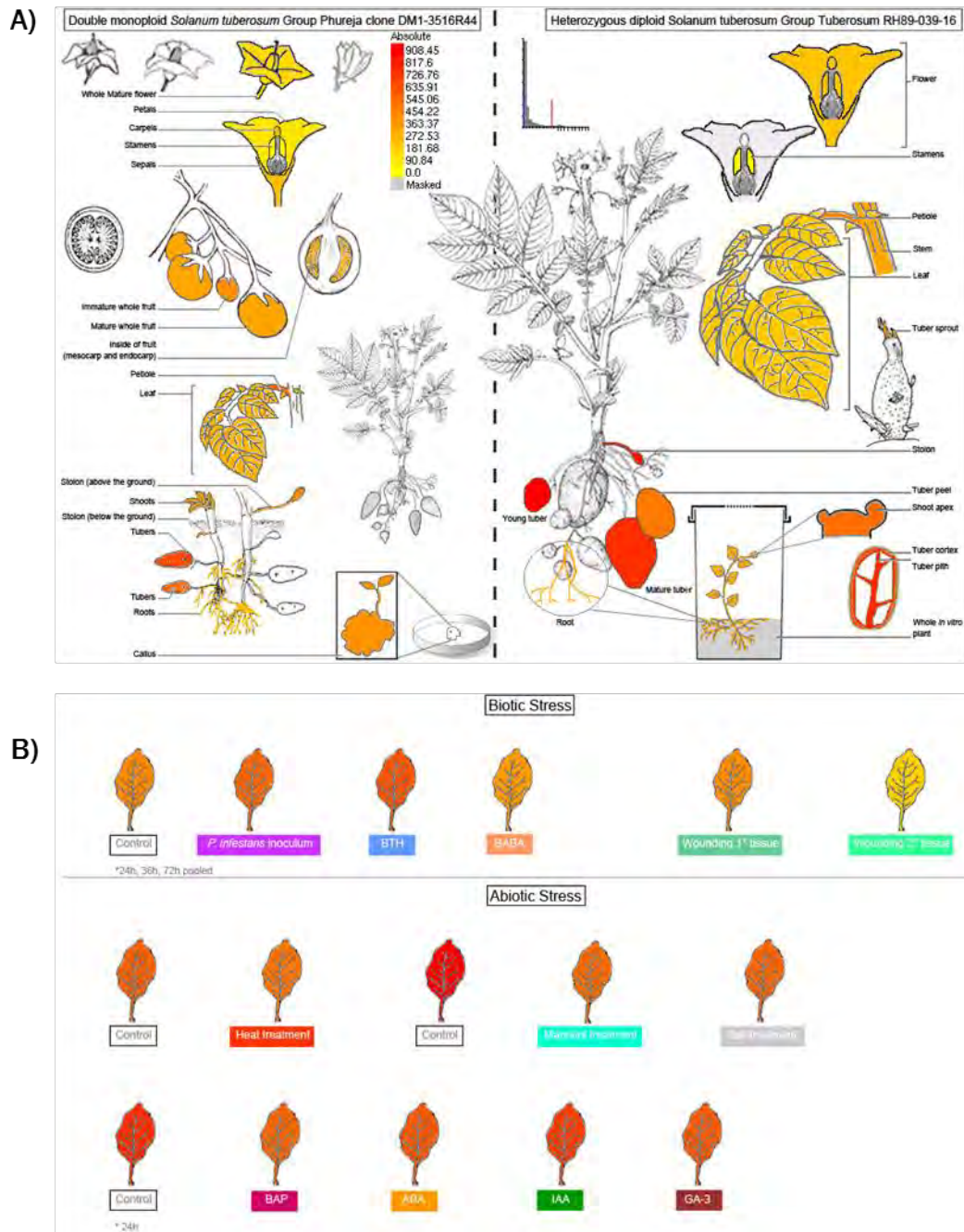
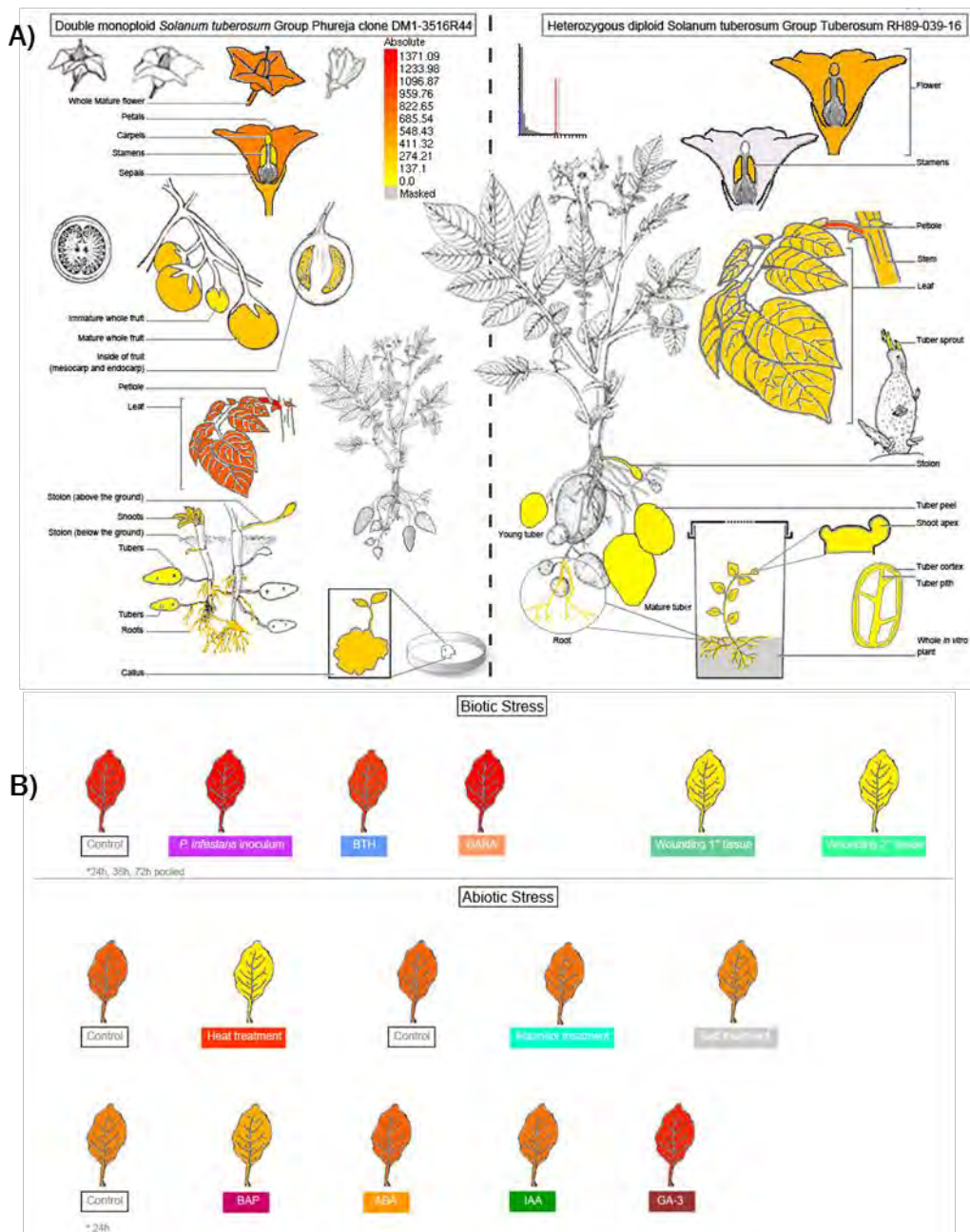


Figura suplementària 2. Representació pictogràfica de l'expressió del *StRACK1B* en teixits i òrgans (A) i en diferents tractaments amb hormones i estressos (B) a partir de les dades d'eFP Browser.



Annex suplementari apartat 3.2: Identificació i caracterització de gens candidats de la regulació i el transport dels monòmers de suberina

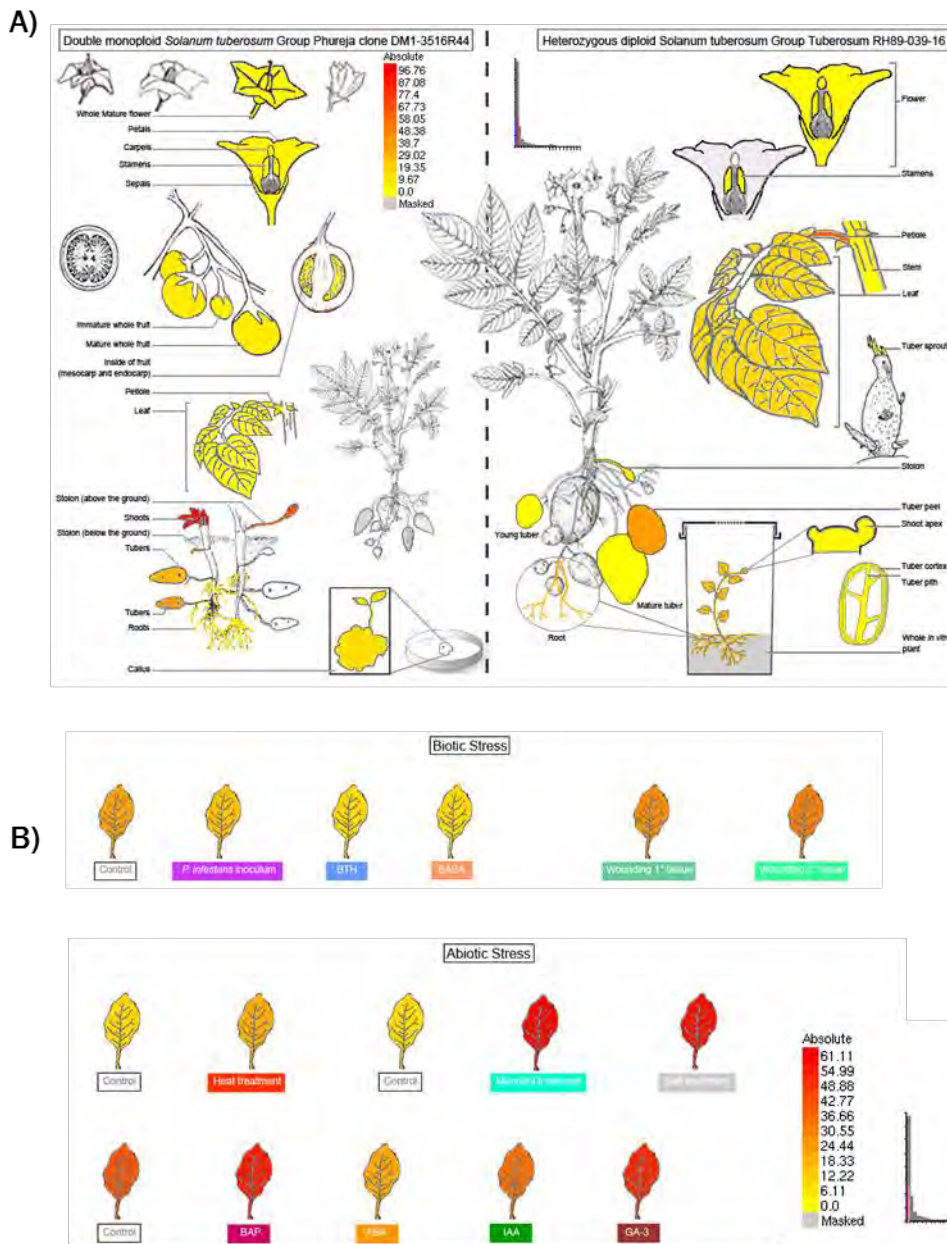


Figura suplementària 4. Representació pictogràfica de l'expressió de l'*StERF93* en teixits i òrgans de la patata (A) i sota diferents tractaments amb hormones i estressos (B) usant l'eFP Browser.

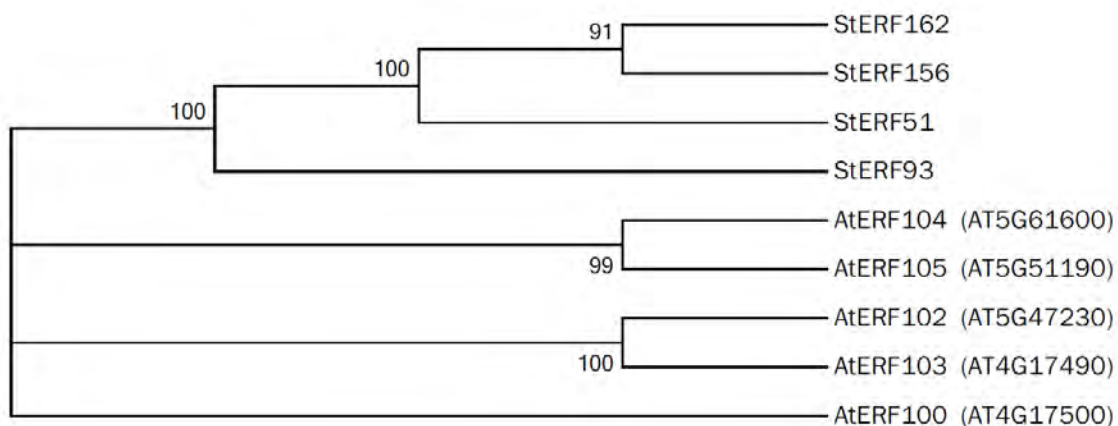


Figura suplementària 5. Arbre filogenètic d'*StERF93*, els seus paràlegs a patata i els respectius possibles ortòlegs a *Arabidopsis*. L'arbre s'ha realitzat utilitzant el mètode UPGMA a partir d'una matriu JTT i modelada amb una distribució gamma =1 a partir del programa MEGA6. Es va utilitzar un *bootstrap* de 1000 rèpliques i es va fer utilitzar un llindar de *bootstrap* de >75 sobre 100 per la separació de les branques. Totes les posicions ambigües es van eliminar per a cada parell de seqüències. Hi va haver un total de 330 posicions en l'últim conjunt de dades.

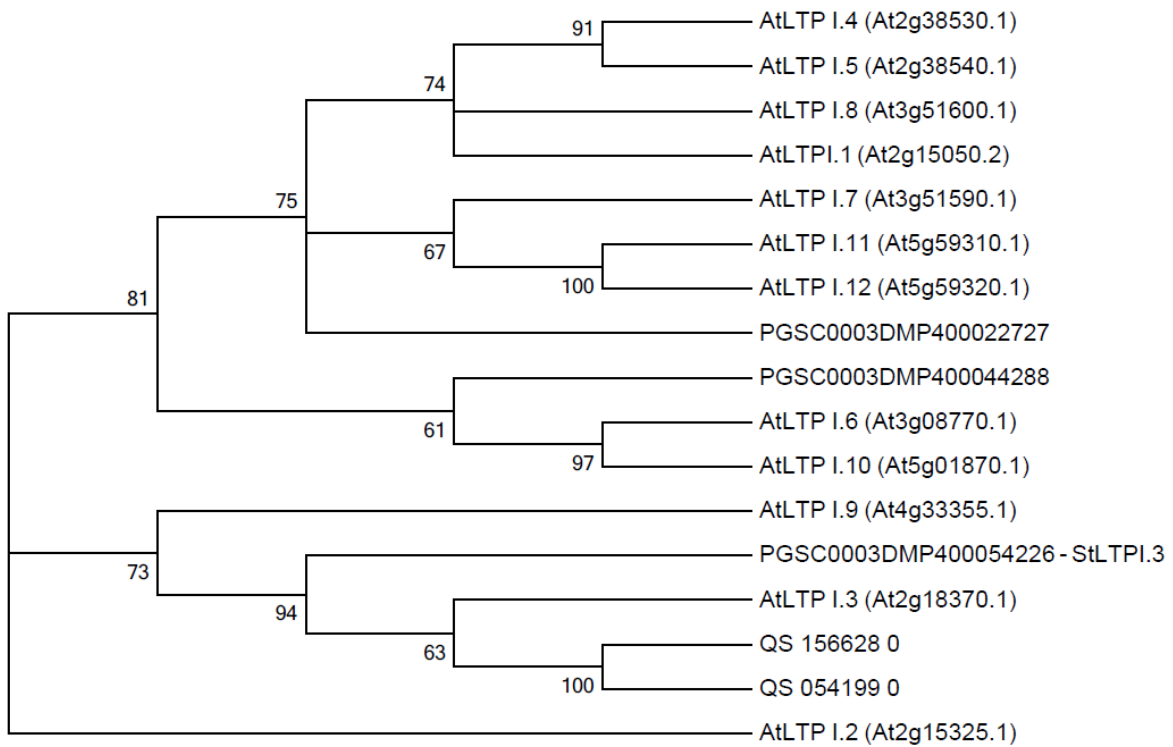


Figura suplementària 6. Arbre filogenètic d'StLTPI.3 i els seus possibles ortòlegs a Arabidopsis. L'arbre s'ha realitzat utilitzant el mètode UPGMA a partir d'una matriu JTT i modelada amb una distribució gamma =1 a partir del programa MEGA6. La distribució de clades idèntics i els valors de *bootstrap* similars es van obtenir utilitzant un mètode de grup de parells no ponderats amb la mitjana aritmètica. Es va utilitzar un *bootstrap* de 1000 rèpliques i els valors de *bootstrap* de >60 sobre 100 es van usar per per la separació de les branques. Totes les posicions ambigües es van eliminar per a cada parell de seqüències. Hi va haver un total de 132 posicions en l'últim conjunt de dades.

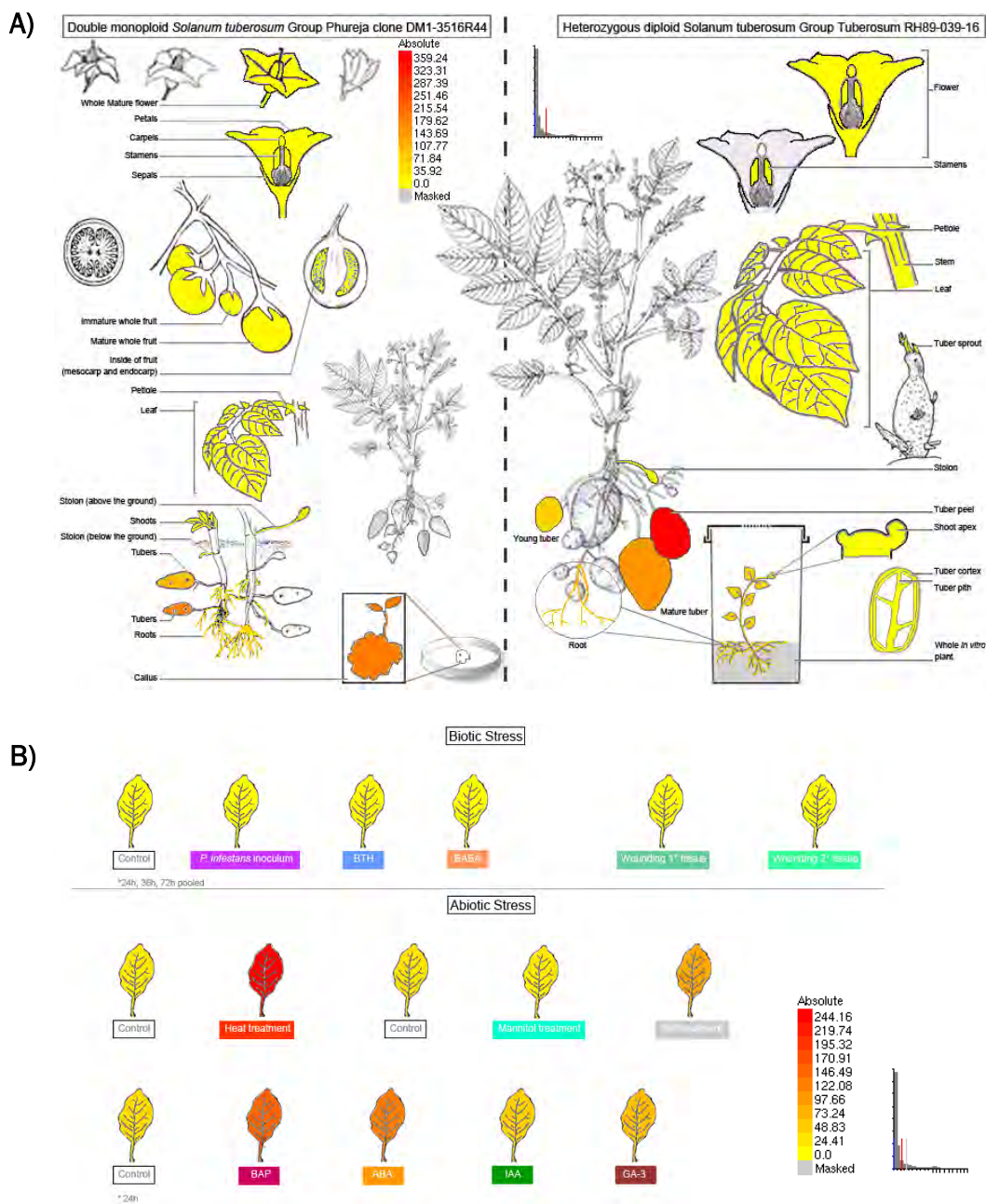


Figura suplementària 7. Representació pictogràfica de l'expressió d'*StLTPI.3* en teixits i òrgans (A) i en diferents tractaments en planta amb diferents hormones i estressos (B) a partir de les dades d'eFP Browser.

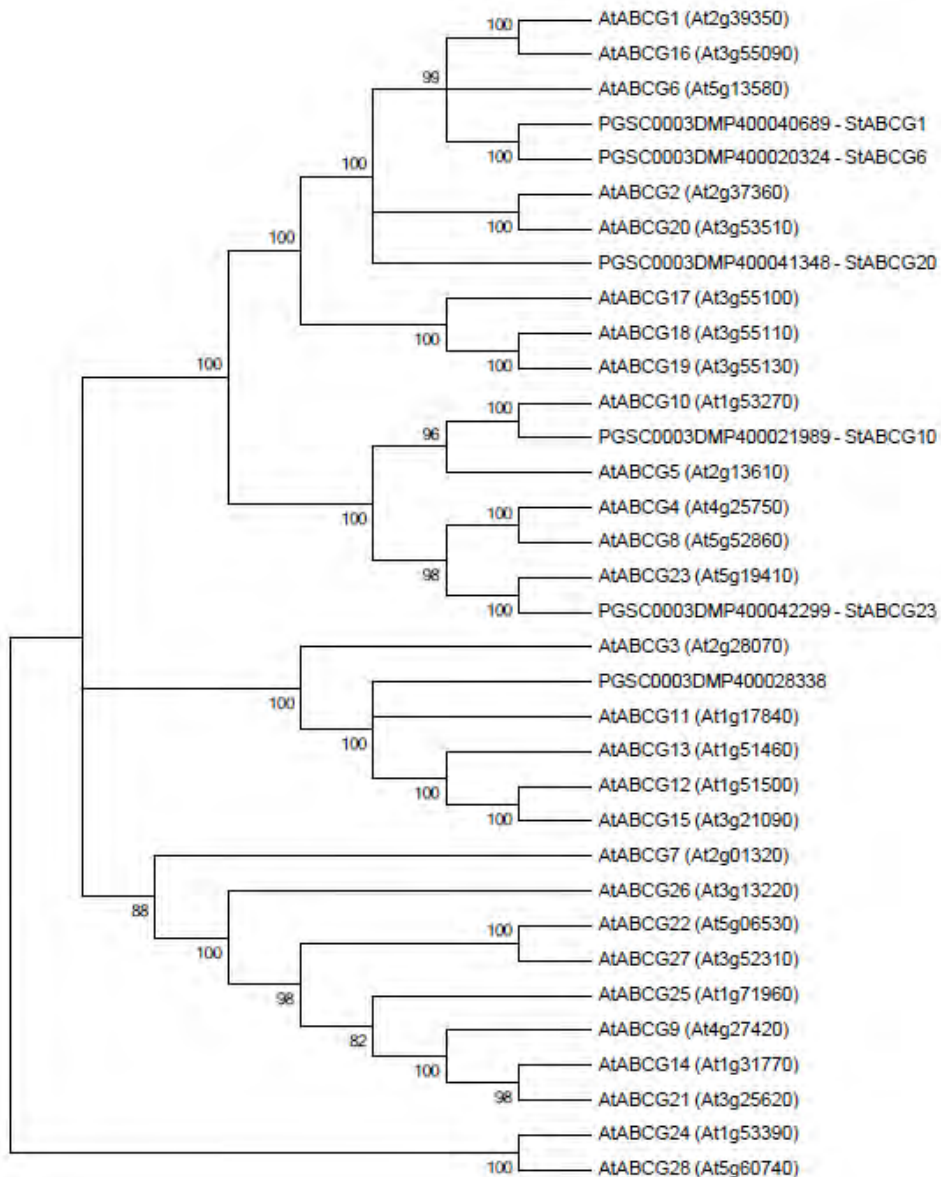


Figura suplementària 8. Arbre filogenètic dels ABCGs del grup WBC d'Arabidopsis i els possibles ortòlegs a patata involucrats en la biosíntesi de la suberina. L'arbre s'ha realitzat utilitzant el mètode UPGMA a partir d'una matriu JTT i modelada amb una distribució gamma $\gamma=1$ a partir del programa MEGA6. La distribució de clades idèntics i els valors de bootstrap similars es van obtenir utilitzant un mètode de grup de parells no ponderats amb la mitjana aritmètica. Els nivells de *bootstrap* indiquen el nivell de significància (%) per la separació de les branques. Es va utilitzar un *bootstrap* de 1000 rèpliques. Els valors de *bootstrap* de >75 són mostrats. L'anàlisi va implicar 34 seqüències d'aminoàcids. Totes les posicions ambigües es van eliminar per a cada parell de seqüències. Hi va haver un total de 1267 posicions en l'últim conjunt de dades.

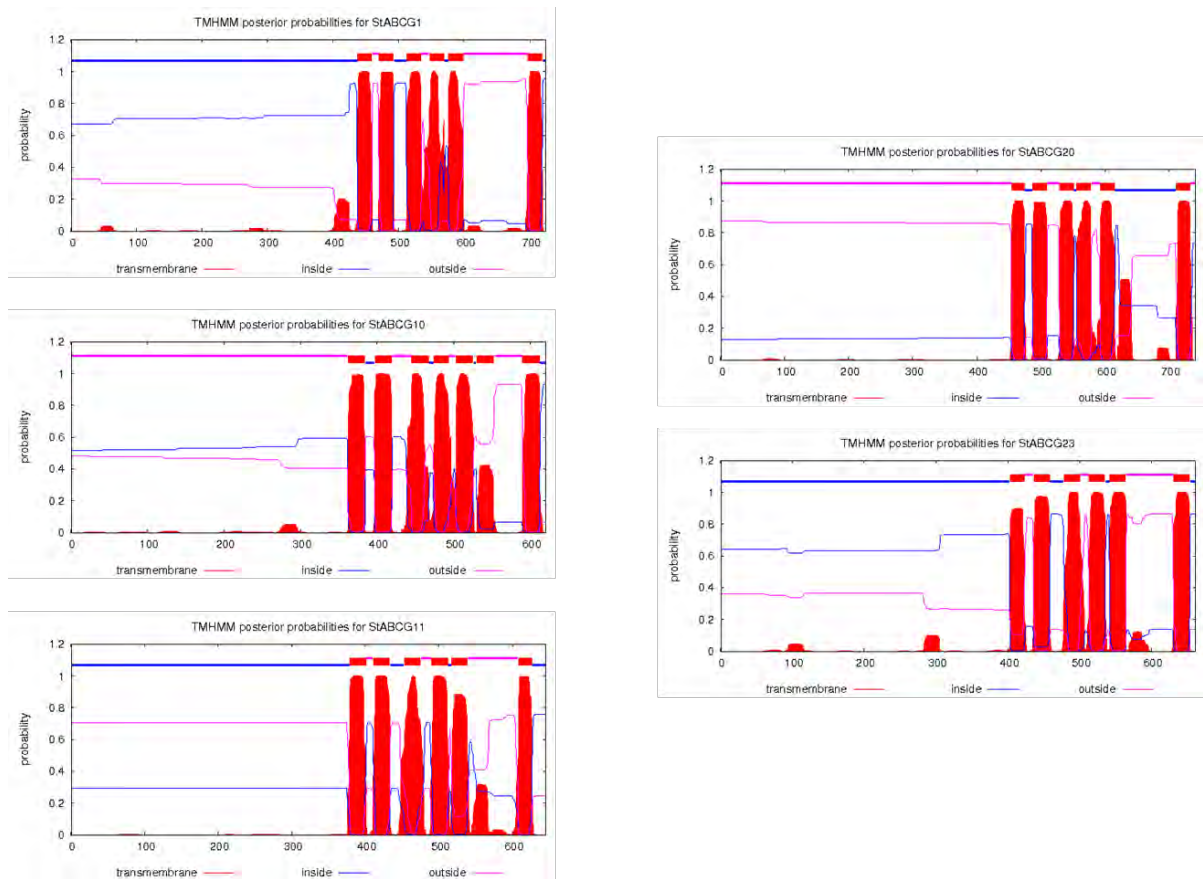


Figura Suplementària 9. Gràfics de predicció de dominis transmembrana en les proteïnes StABCs candidates utilitzant el programa TMHMM Server v.2.0. L'eix de les X mostra la posició dels aminoàcids dins de la cadena polipeptídica i l'eix de les Y mostra la probabilitat de presentar un domini transmembrana. La marca superior es mostra en blau quan la cadena polipeptídica es trobaria dins de la cèl·lula, en lila quan estaria en l'espai extracel·lular (paret) i en vermell es mostren els dominis transmembrana. Les proteïnes travessen les dues capes de la bicapa lipídica i ho fan entre 6 o 7 cops.

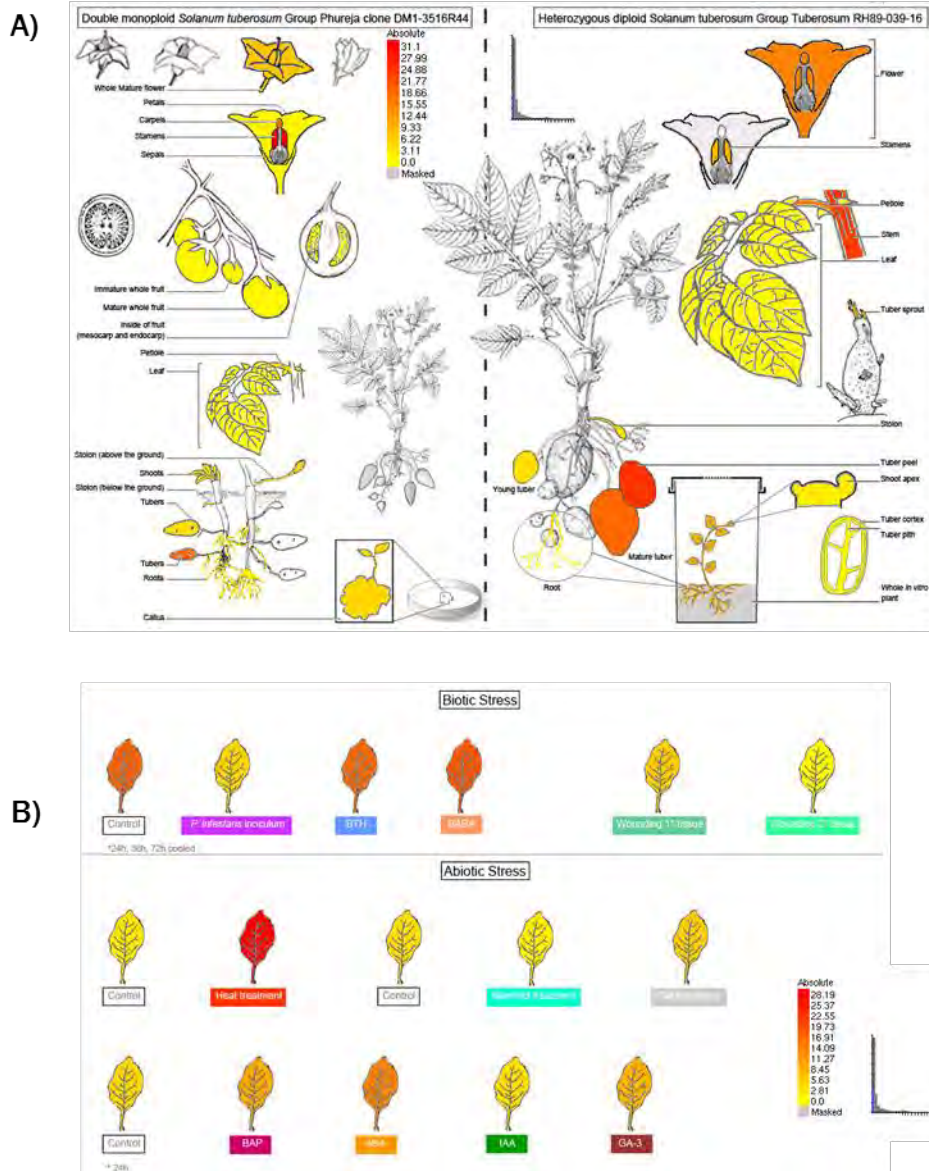


Figura suplementària 10. Representació pictogràfica de l'expressió d'*StABCG1* en teixits i òrgans (A) i en diferents tractaments en planta amb diferents hormones i estressos (B) a partir de les dades d'eFP Browser.

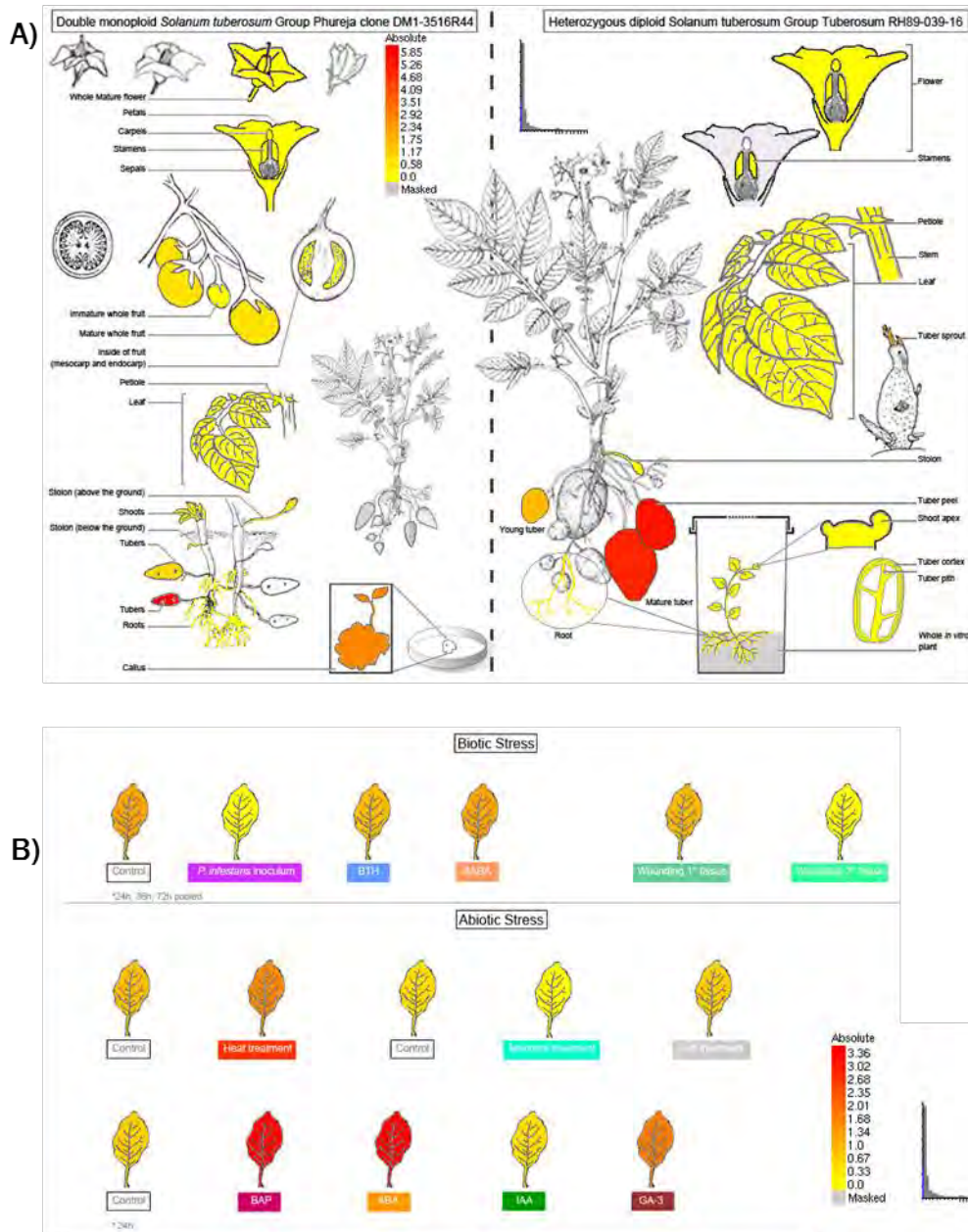
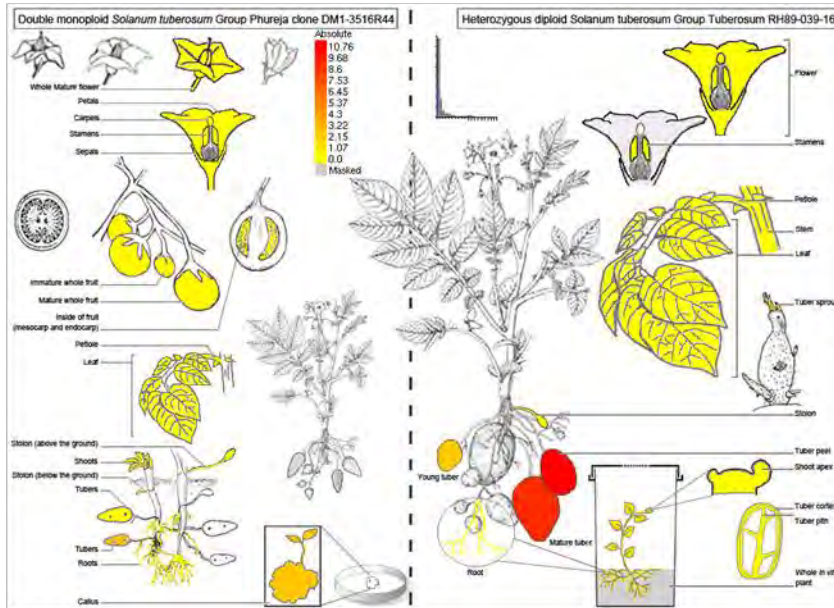


Figura suplementària 11. Representació pictogràfica de l'expressió d'*StABCG10* en teixits i òrgans (A) i en diferents tractaments en planta amb diferents hormones i estressos (B) a partir de les dades d'eFP Browser.

A)



B)

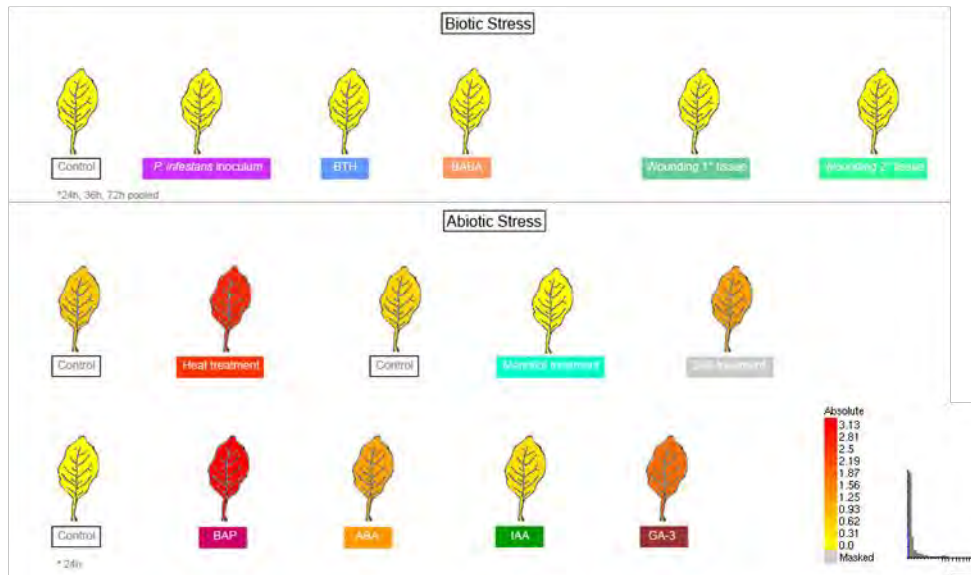


Figura suplementària 12. Representació pictogràfica de l'expressió d'*StABCG11* en teixits i òrgans (A) i en diferents tractaments en planta amb diferents hormones i estressos (B) a partir de les dades d'eFP Browser.

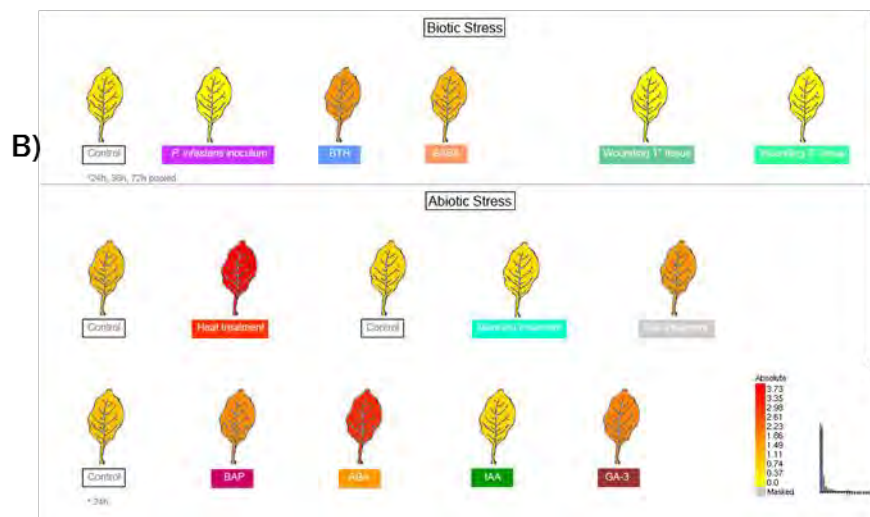
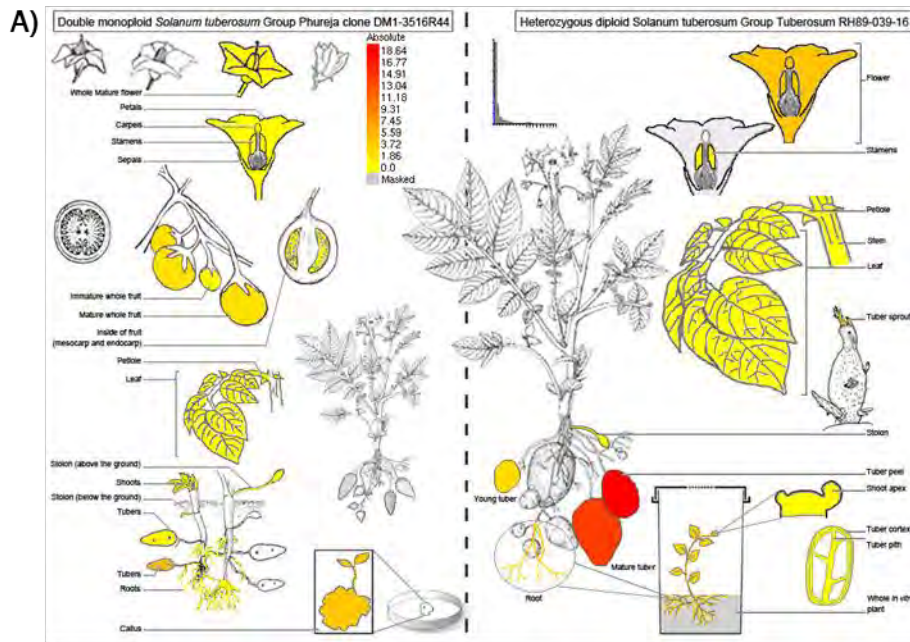


Figura suplementària 13. Representació pictogràfica de l'expressió d'*StABCG20* en teixits i òrgans (A) i en diferents tractaments en planta amb diferents hormones i estressos (B) a partir de les dades d'eFP Browser.

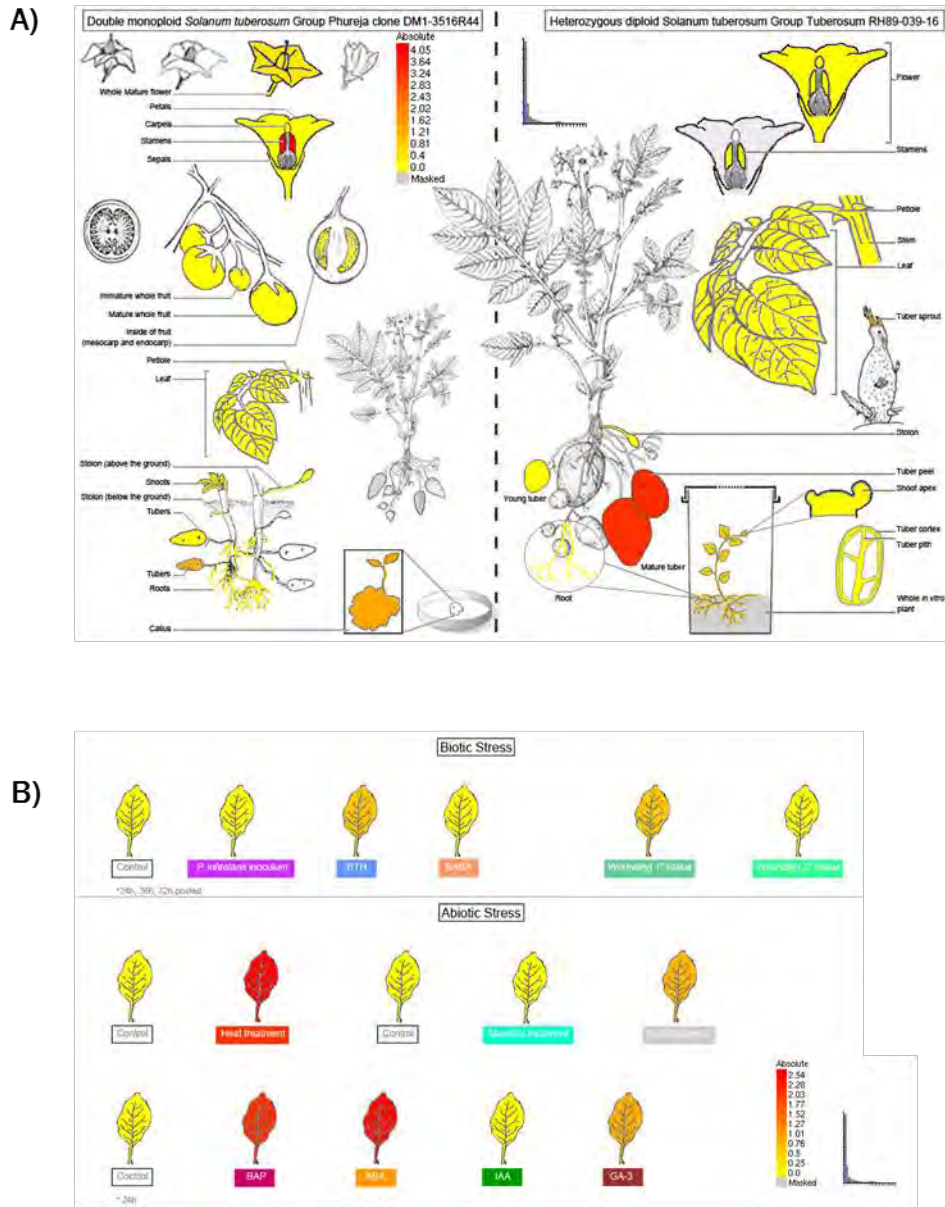


Figura suplementària 14. Representació pictogràfica de l'expressió d'*StABC23* en teixits i òrgans (A) i en diferents tractaments en planta amb diferents hormones i estressos (B) a partir de les dades d'eFP Browser.

Annex suplementari apartat 3.3: Genètica funcional de la suberina en arrels de patata

Taula suplementària 1. Control de línies utilitzades durant els assajos de RT-qPCR i posteriors. Es representa per a cadascú dels gens quines línies i quantes rèpliques biològiques de cada s'han utilitzat.

GEN		LÍNIA	RÈPLIQUES BIOLÒGIQUES
CONTROL	RR	1.3	3
		2.2	3
		4.2	3
GENS D'ESTUDI	CYP88A3 3	1.3	4
		2.2	3
		3.1	2
		5.2	2
		5.3	3
	StABCG2 0	2.2	2
		3.2	3
		4.2	3
	StERF93	1.2	2
		2.3	1
	StLTP1.3	1.1	4
		2.1	3
		3.2	2
		4.2	3

Annex suplementari apartat 3.4: El transcriptoma del fellema durant el creixement estacional

Taula suplementària 2. Resum dels anàlisis bioinformàtics

	Seqüenciació Illumina		Assemblatge del transcriptoma				Anotació funcional			
	Lectures	Lectures netes	Nº contigs	Nº contigs nets	N50 contigs	Llargada mitja dels contigs	Contigs presents en les llibreries	BLASTX hit TAIR10 (Arabidopsis proteome)	BLASTN hit Cork	Gene Ontology (GO)
Total	572.330.228	500.574.952	422.968	404.970	853	609	-	182.671	108,859	55,871
Abril_1	58.930.050	53.107.886					208.742			
Abril_2	52.146.653	45.801.975					135.243			
Abril_3	57.977.310	50.782.491					215.828			
Abril_4	69.428.739	57.090.467					240.940			
Juny_1	48.817.771	43.268.962					136.602			
Juny_3	37.148.957	32.722.316					129.263			
Juny_4	40.489.401	36.483.924					149.681			
Juliol_1	40.679.012	35.170.933					129.389			
Juliol_2	73.863.739	65.158.221					189.048			
Juliol_3	52.298.193	47.070.608					154.248			
Juliol_4	40.550.403	33.917.169					138.477			

Taula suplementària 4. Es mostren els noms complets dels gens, abreviacions (àlies) i els valors de Log2FC per RNAseq i qRT-PCR utilitzats per a la validació del RNA-seq en cadascuna de les comparatives realitzades Juny/Abril, Juliol/Abril i Juny/Juliol

ÀLIAS	DESCRIPCIÓ	JUNY/ABRIL		JULIOL/ABRIL		JUNY/JULIOL	
		Log2RNAseq	Log2RTA	Log2RNAseq	Log2RTA	Log2RNAseq	Log2RTA
ANN	<i>Annexin</i>	0,895	0,681	0,848	0,768	-0,047	0,087
AP1	<i>Apetala 1</i>	-0,222	-0,093	-0,467	-1,314	-0,245	-1,221
APX2	<i>Ascorbate peroxidase</i>	0,169	-0,141	0,087	-0,285	-0,082	-0,143
BAN	<i>Barely Any Meristem</i>	-0,532	-0,762	-0,471	-0,591	0,061	0,171
bAS	<i>β-Amyrin Synthase</i>	1,785	1,550	0,891	0,839	-0,893	-0,711
BI1	<i>BAX inhibidor 1</i>	0,318	0,366	0,411	-0,092	0,093	-0,458
BRL3	<i>BRI1-like 3</i>	0,313	0,310	0,397	0,556	0,085	0,246
CYP86A1	<i>Cytochrome P450 Family 86 Subfamily A Polypeptide 1</i>	1,085	1,108	0,415	0,436	-0,670	-0,672
DWF1	<i>DWARF 1</i>	-0,501	-0,564	-0,405	-0,753	0,096	-0,190
ETR2	<i>Ethylene response 2</i>	0,321	0,874	-0,047	-0,038	-0,368	-0,912
EXPA8	<i>Expansin A8</i>	0,901	1,033	0,747	0,589	-0,154	-0,444
F5H	<i>Ferulate-5-hydrolase</i>	-2,040	-1,945	-2,658	-2,988	-0,618	-1,043
FATB	<i>Fatty Acyl-ACP Thioesterases B</i>	-0,779	-0,730	-1,690	-1,545	-0,911	-0,814
FLC	<i>Flowering Locus C</i>	-0,554	-0,924	-0,911	-1,349	-0,357	-0,426
GID1B	<i>GA Insentitive DWARF 1B</i>	0,672	3,206	0,284	1,566	-0,388	-1,640
GPAT5	<i>Glycerol-3-Phosphatase sn-2-acyl Transferase 5</i>	0,517	0,500	-0,178	-0,046	-0,695	-0,546
HB8	<i>Homeobox Gene 8</i>	1,309	1,640	1,077	1,117	-0,232	-0,523
HCBT	<i>N-Hydroxycinnamoyl/Benzoyl Transferase</i>	0,686	0,775	0,108	0,039	-0,578	-0,735
HK3	<i>Histidine Kinase 3</i>	-0,318	0,117	-0,657	0,097	-0,339	-0,020
HSP17.4	<i>Heat Shock Protein 17.4</i>	2,779	3,124	3,216	3,381	0,437	0,256
NAC058	<i>NAC Domain containing protein 58</i>	0,155	0,284	-0,411	-0,415	-0,566	-0,699
PDH-E1α	<i>Pyruvate Dehydrogenase e1 alpha</i>	0,563	0,722	0,033	-0,093	-0,530	-0,815
PIN3	<i>PIN-formed 3</i>	-0,733	-1,022	-0,214	-0,699	0,519	0,323
SOC1	<i>Supressor of Overexpression of CO 1</i>	-0,218	-0,150	-0,780	-0,745	-0,562	-0,594
STM	<i>Shoot Meristemless</i>	-1,701	-1,650	-1,620	-1,722	0,081	-0,072
SUS4	<i>Sucrose Synthase 4</i>	0,432	0,373	0,189	-0,053	-0,244	-0,426
WOX4	<i>Wuschel Related Homeobox 4</i>	-1,321	-1,212	-0,661	-0,806	0,660	0,406
WRI1	<i>WRINKLED 1</i>	0,217	0,350	-0,551	-0,664	-0,768	-1,014
WRKY43	<i>WRKY DNA-Binding protein 43</i>	0,170	-0,031	-0,296	-0,783	-0,466	-0,753

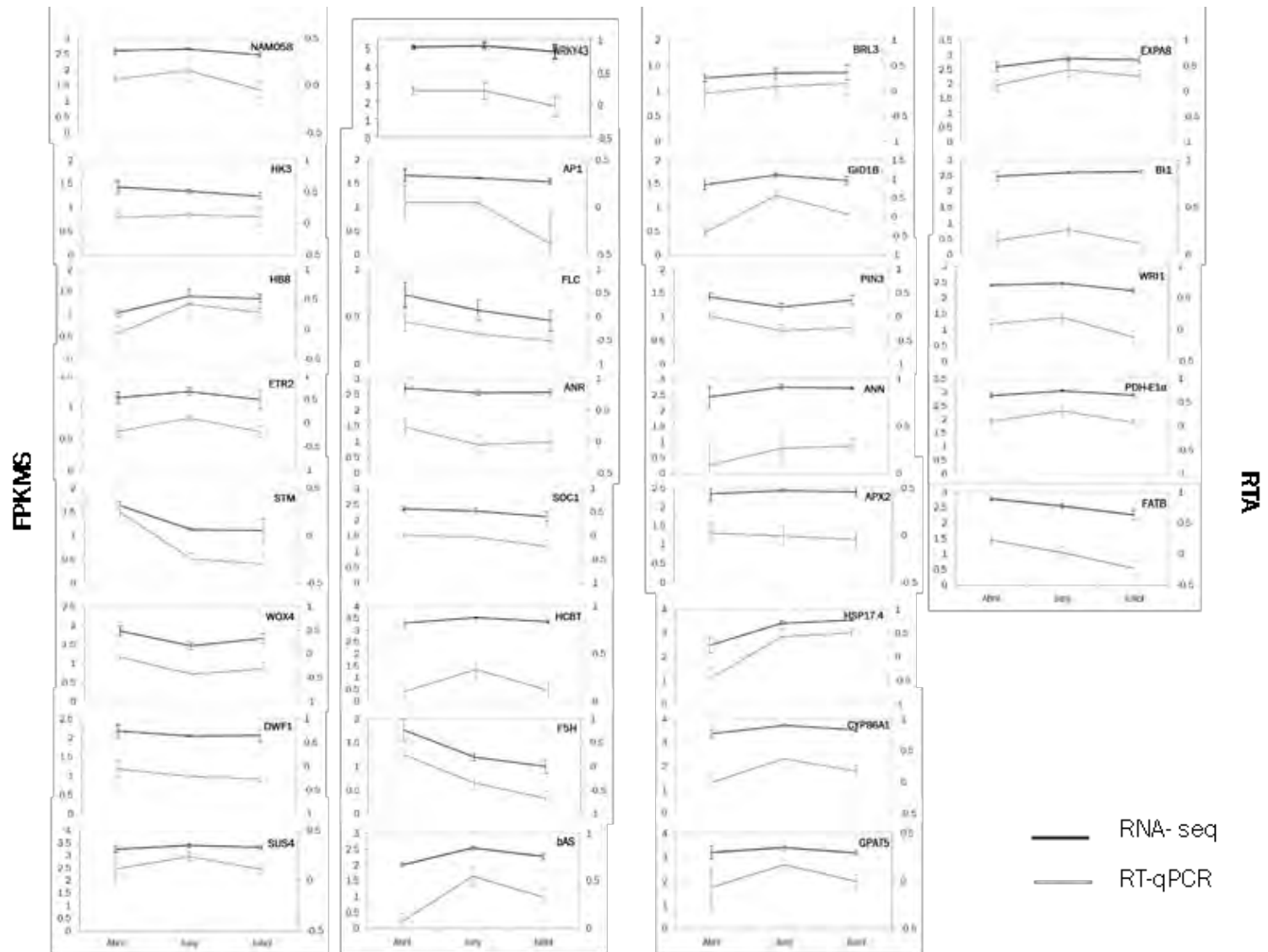


Figura suplementària 15. La comparativa del patró d'expressió individual de cada un dels gens validats (Taula Suplementària 4) al llarg dels mesos (abril, juny i juliol) segons qRT-PCR i RNAseq.

Taula suplementària 5. Dades utilitzades pels *Heatmaps* dels gens coneguts de suberina segons l'Aralip. Es mostra el codi d'identificació TAIR d'Arabidopsis, l'abreviatura dels gens (àlies), el seu nom complet, les FPKMs mitjanes per a cadascú dels mesos assajats i el total dels mesos, i en quin procés es troba involucrat cadascun dels gens. Els càlculs han estat realitzats amb els valors de FPKMs de cadascuna de les rèpliques d'abril juny i juliol. S'han sumat els valors de tots els contigs que pertanyien a un mateix codi d'Arabidopsis (ATG) i s'ha fet la mitjana de les rèpliques per a cadascú dels mesos obtenint el valor mostrat. A més, s'ha sumat l'expressió de cadascun dels mesos per un mateix gen obtenint així el valor total de FPKMs.

TAIR	ÀLIES	DESCRIPCIÓ	FPKMS				INVOLUCRAT EN
			ABRIL	JUNY	JULIOL	TOTAL	
AT3G53510	WBC20 / ABCG20	<i>ABC Transporter</i>	1104,67	1769,20	1089,43	3963,30	Transport
AT2G38540	AtLTPI.5	<i>Lipid Transfer Protein type 1</i>	694,83	1131,77	1731,60	3558,20	Transport
AT5G13580	WBC6 / ABCG6	<i>ABC Transporter</i>	157,94	411,76	151,43	721,13	Transport
AT1G17840	WBC11 / ABCG11	<i>ABC Transporter</i>	21,84	23,98	32,08	77,90	Transport
AT5G41040	ASFT1 / RWP / FHT	<i>Aliphatic Suberin Feruloyl Transferase</i>	2632,44	3894,44	2575,40	9102,28	Suberina aromàtica
AT5G63560	FACT	<i>Fatty alcohol:caffeoyl-CoA caffeoyl transferase</i>	20,18	6,41	3,81	30,40	Suberina aromàtica
AT3G18400	NAC058	<i>NAC Domain Containing Protein 58</i>	428,55	465,02	314,58	4367,55	Factor de transcripció
AT3G02940	MYB107	<i>MYB Domain Protein 107</i>	276,65	336,7	241,33	3082,04	Factor de transcripció
AT1G34670	MYB93	<i>MYB Domain Protein 93</i>	145,19	193,98	161,91	1810,34	Factor de transcripció
AT4G28110	MYB41	<i>MYB Transcription Factors</i>	0,14	0,00	0,81	0,95	Factor de transcripció
AT5G43760	KCS20	<i>Ketoacyl-CoA Synthase</i>	1449,75	2769,42	1706,10	5925,27	Complex FAE
AT1G01120	KCS1	<i>Ketoacyl-CoA Synthase</i>	358,06	656,88	316,37	1331,30	Complex FAE
AT1G04220	KCS2 / DAISY	<i>Ketoacyl-CoA Synthase</i>	30,62	13,20	4,57	48,38	Complex FAE
AT1G68530	KCS6	<i>Ketoacyl-CoA Synthase</i>	0,11	0,58	0,34	1,03	Complex FAE
AT5G58860	CYP86A1/ CYP86A33	<i>Fatty Acyl omega-Hydroxylase</i>	2655,27	5633,86	3541,41	11830,54	Suberina alifàtica
AT5G23190	CYP86B1	<i>Fatty Acyl omega-Hydroxylase</i>	1390,17	3524,49	2479,81	7394,46	Suberina alifàtica
AT3G11430	sn-2-GPAT5	<i>Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase</i>	1774,18	2538,58	1568,13	5880,89	Suberina alifàtica
AT3G44540	AlcFAR4	<i>Alcohol-forming Fatty Acyl-CoA Reductase</i>	56,45	35,67	20,86	112,98	Suberina alifàtica
AT3G44550	AlcFAR5	<i>Alcohol-forming Fatty Acyl-CoA Reductase</i>	1,52	0,45	0,17	2,15	Suberina alifàtica
AT5G22500	AlcFAR1	<i>Alcohol-forming Fatty Acyl-CoA Reductase</i>	0,07	0,13	0,20	0,41	Suberina alifàtica
AT1G01090	PDH (E1 alpha)	<i>Pyruvate Dehydrogenase alpha subunit, E1a</i>	819,86	1151,99	799,84	2771,69	Síntesi àcids grassos
AT2G34590	PDH (E1 beta)	<i>Pyruvate Dehydrogenase beta subunit, E1b</i>	991,01	1018,36	649,22	2658,59	Síntesi àcids grassos

TAIR	ÀLIES	DESCRIPCIÓ	ABRIL	JUNY	JULIOL	TOTAL	INVOLUCRAT EN
AT5G46290	KASI	<i>Ketoacyl-ACP Synthase I</i>	633,80	813,93	597,37	2045,10	Síntesi àcids grassos
AT2G05990	ENR1 (MOD1)	<i>Enoyl-ACP Reductase</i>	467,21	682,20	511,52	1660,93	Síntesi àcids grassos
AT5G35360	BC	<i>Biotin Carboxylase of Heteromeric ACCase</i>	607,09	554,53	375,81	1537,44	Síntesi àcids grassos
AT1G24360	KAR	<i>Ketoacyl-ACP Reductase</i>	553,92	524,41	351,81	1430,14	Síntesi àcids grassos
AT5G15530	BCCP2	<i>Biotin Carboxyl Carrier Protein of Heteromeric ACCase</i>	314,32	476,66	420,97	1211,94	Síntesi àcids grassos
AT3G25860	LTA2 (E2)	<i>Dihydrolipoamide Acetyltransferase, E2</i>	213,40	436,53	311,93	961,85	Síntesi àcids grassos
AT1G62640	KASIII	<i>Ketoacyl-ACP Synthase III</i>	275,17	354,70	284,24	914,11	Síntesi àcids grassos
AT2G30200	MCMT	<i>Malonyl-CoA : ACP Malonyltransferase</i>	225,43	399,96	226,14	851,53	Síntesi àcids grassos
AT1G34430	EMB3003 (E2)	<i>Dihydrolipoamide Acetyltransferase, E2</i>	239,23	354,95	238,86	833,03	Síntesi àcids grassos
AT1G54580	ACP2	<i>Acyl Carrier Protein</i>	218,49	297,25	233,46	749,21	Síntesi àcids grassos
AT1G74960	KASII	<i>Ketoacyl-ACP Synthase II</i>	215,41	245,06	167,06	627,53	Síntesi àcids grassos
AT2G38040	α-CT	<i>Carboxyltransferase alpha Subunit of Heteromeric ACCase</i>	190,97	226,29	169,37	586,62	Síntesi àcids grassos
AT3G16950	LPD1 (E3)	<i>Dihydrolipoamide Dehydrogenase, E3</i>	141,33	204,97	148,97	495,27	Síntesi àcids grassos
AT2G22230	HAD	<i>Hydroxyacyl-ACP Dehydrase</i>	153,22	182,50	131,20	466,93	Síntesi àcids grassos
AT5G08415	Lipoate Synthase	<i>Lipoate Synthase</i>	98,65	150,50	104,20	353,34	Síntesi àcids grassos
AT5G10160	HAD	<i>Hydroxyacyl-ACP Dehydrase</i>	99,33	121,44	100,43	321,20	Síntesi àcids grassos
AT4G01900	PII	<i>PII protein</i>	66,53	64,33	57,17	188,03	Síntesi àcids grassos
ATCG00500	β-CT (accD)	<i>Carboxyltransferase beta Subunit of Heteromeric ACCase</i>	34,34	22,71	39,12	96,17	Síntesi àcids grassos
AT4G31050	Lipoyltransferase	<i>Lipoyltransferase</i>	40,25	25,55	16,30	82,10	Síntesi àcids grassos
AT1G54630	ACP3	<i>Acyl Carrier Protein</i>	50,83	12,06	10,22	73,12	Síntesi àcids grassos
AT5G16390	BCCP1	<i>Biotin Carboxyl Carrier Protein of Heteromeric ACCase</i>	19,62	22,24	22,25	64,11	Síntesi àcids grassos
AT3G55290	KAR	<i>Ketoacyl-ACP Reductase</i>	29,68	15,78	15,80	61,27	Síntesi àcids grassos
AT3G11470	Holo-ACP Synthase	<i>Holo-ACP Synthase</i>	5,65	4,72	4,04	14,42	Síntesi àcids grassos
AT1G36180	ACC2	<i>Acetyl-CoA Carboxylase</i>	3,05	2,48	1,75	7,28	Síntesi àcids grassos
AT4G16155	LPD2 (E3)	<i>Dihydrolipoamide Dehydrogenase, E3</i>	2,89	2,21	1,90	6,99	Síntesi àcids grassos
AT1G62610	KAR	<i>Ketoacyl-ACP Reductase</i>	0,45	0,69	1,12	2,27	Síntesi àcids grassos
AT3G46170	KAR	<i>Ketoacyl-ACP Reductase</i>	0,00	0,00	1,21	1,21	Síntesi àcids grassos
AT3G55310	KAR	<i>Ketoacyl-ACP Reductase</i>	0,07	0,66	0,21	0,93	Síntesi àcids grassos

* La correspondència entre els codis ATG d'Arabidopsis i el nom dels contigs es poden trobar en la Taula Suplementària 3

Taula suplementària 6. Dades utilitzades pels *Heatmaps* dels gens presents a l'Aralip però no relacionats amb suberina. Es mostra el codi d'identificació TAIR d'Arabidopsis, l'abreviatura dels gens (àlies), el seu nom complet, les FPKMs mitjaneres per a cadascú dels mesos assajats i el total dels mesos, i on es troba involucrat cadascú dels gens. Els càlculs han estat realitzats amb els valors de FPKMs de cadascuna de les rèpliques d'abril juny i juliol. S'han sumat els valors de tots els contigs que pertanyien a un mateix codi d'Arabidopsis (ATG) i s'ha fet la mitjana de les rèpliques per a cadascún dels mesos obtenint el valor mostrat. A més, s'ha sumat l'expressió de cadascún dels mesos per un mateix gen obtenint així el valor total de FPKMs.

TAIR	ÀLIES	DESCRIPCIÓ	FPKMS				INVOLUCRAT EN
			ABRIL	JUNY	JULIOL	TOTAL	
AT3G22600	LTPG5	<i>Lipid Transfer Protein type 5</i>	4191,45	5412,98	3843,67	13448,11	Transport
AT2G48140	EDA4	<i>Lipid Transfer Protein type 5</i>	600,10	701,80	628,31	1930,21	Transport
AT3G22620	LTP	<i>Lipid Transfer Protein type 5</i>	481,29	504,68	347,62	1333,59	Transport
AT2G18370	AtLTPI.3	<i>Lipid Transfer Protein type 1</i>	425,33	343,04	357,45	1125,83	Transport
AT5G48485	AtLTPIV.I	<i>Lipid Transfer Protein type 3</i>	732,14	122,50	235,37	1090,01	Transport
AT5G64080	XYP1	<i>Lipid Transfer Protein type 5</i>	106,24	149,01	295,51	550,76	Transport
AT5G19410	ABCG23	<i>ABC Transporter</i>	113,95	212,65	126,31	452,91	Transport
AT1G62790	LTP	<i>Lipid Transfer Protein type 5</i>	110,59	110,73	111,87	333,19	Transport
AT3G18280	LTP	<i>Lipid Transfer Protein type 2</i>	43,48	55,74	110,06	209,28	Transport
AT1G53270	ABCG10	<i>ABC Transporter</i>	38,41	75,56	47,72	161,70	Transport
AT1G48750	AtLTPII.4	<i>Lipid Transfer Protein type 2</i>	41,27	27,53	22,54	91,34	Transport
AT1G55260	LTPG6	<i>Lipid Transfer Protein type 5</i>	9,48	9,37	20,33	39,18	Transport
AT2G01320	ABCG7	<i>ABC Transporter</i>	11,66	13,43	9,44	34,52	Transport
AT2G28070	ABCG3	<i>ABC Transporter</i>	8,68	11,70	11,93	32,31	Transport
AT3G53980	LTP	<i>Lipid Transfer Protein type 4</i>	9,67	11,40	7,90	28,96	Transport
AT1G53390	ABCG24	<i>ABC Transporter</i>	3,06	2,64	3,72	9,43	Transport
AT5G13900	LTP	<i>Lipid Transfer Protein type 5</i>	0,68	3,31	4,55	8,54	Transport
AT5G59320	AtLTPI.12	<i>Lipid Transfer Protein type 1</i>	0,30	2,03	3,88	6,20	Transport
AT5G06530	ABCG22	<i>ABC Transporter</i>	1,10	1,83	2,77	5,71	Transport

TAIR	ÀLIES	DESCRIPCIÓ	ABRIL	JUNY	JULIOL	TOTAL	INVOLUCRAT EN
AT1G64670	BDG	<i>Hydrolase-like Protein</i>	3,62	0,39	0,67	4,68	Transport
AT5G56480	END2	<i>Lipid Transfer Protein type 3</i>	1,51	1,53	1,46	4,50	Transport
AT5G52860	ABCG8	<i>ABC Transporter</i>	1,32	0,64	1,20	3,16	Transport
AT5G60740	ABCG28	<i>ABC Transporter</i>	0,99	1,28	0,76	3,03	Transport
AT2G48130	LTP	<i>Lipid Transfer Protein type 5</i>	1,81	0,10	0,17	2,08	Transport
AT2G44300	LTP	<i>Lipid Transfer Protein type 5</i>	1,17	0,44	0,42	2,04	Transport
AT1G51500	ABCG12	<i>ABC Transporter</i>	1,05	0,23	0,56	1,83	Transport
AT1G36150	LTP	<i>Lipid Transfer Protein type 5</i>	0,12	0,25	1,30	1,67	Transport
AT3G52310	ABCG27	<i>ABC Transporter</i>	0,10	0,20	0,48	0,78	Transport
AT3G21090	ABCG15	<i>ABC Transporter</i>	0,16	0,44	0,00	0,61	Transport
AT1G51460	ABCG13	<i>ABC Transporter</i>	0,00	0,40	0,17	0,57	Transport
AT2G44290	LTP	<i>Lipid Transfer Protein type 5</i>	0,15	0,10	0,14	0,39	Transport
AT3G13220	ABCG26	<i>ABC Transporter</i>	0,09	0,07	0,04	0,19	Transport
AT3G55130	ABCG19	<i>ABC Transporter</i>	0,00	0,17	0,00	0,17	Transport
AT3G51590	AtLTP1.7	<i>Lipid Transfer Protein type 1</i>	0,14	0,00	0,00	0,14	Transport
AT1G71960	ABCG25	<i>ABC Transporter</i>	0,00	0,00	0,13	0,13	Transport
AT2G13610	ABCG5	<i>ABC Transporter</i>	0,12	0,00	0,00	0,12	Transport
AT4G25750	ABCG4	<i>ABC Transporter</i>	0,00	0,00	0,11	0,11	Transport
AT3G55090	ABCG16	<i>ABC Transporter</i>	0,02	0,04	0,03	0,09	Transport
AT4G08670	LTPG4	<i>Lipid Transfer Protein type 5</i>	0,00	0,07	0,01	0,08	Transport
AT1G31770	ABCG14	<i>ABC Transporter</i>	0,02	0,00	0,00	0,02	Transport
AT4G34050	CCoAOMT	<i>Caffeoyl-CoA O-Methyltransferase</i>	2409,64	2887,21	2642,32	7939,18	Suberina aromàtica
AT2G30490	CYP73A5/C4H	<i>Cinnamate 4-Hydroxylase</i>	1099,31	1963,43	1556,55	4619,29	Suberina aromàtica
AT1G51680	At-4CL1	<i>4-Coumarate-CoA Ligase</i>	569,77	1039,02	773,02	2381,81	Suberina aromàtica
AT2G40890	CYP98A3/C3H	<i>Coumaroyl 3-Hydroxylase</i>	253,42	504,22	403,31	1160,95	Suberina aromàtica
AT1G65060	At-4CL3	<i>4-Coumarate-CoA Ligase</i>	109,40	193,32	164,98	467,69	Suberina aromàtica
AT1G67990	TSM1/CCoAOMT	<i>Caffeoyl-CoA O-Methyltransferase</i>	0,40	1,22	2,04	3,66	Suberina aromàtica

TAIR	ÀLIES	DESCRIPCIÓ	ABRIL	JUNY	JULIOL	TOTAL	INVOLUCRAT EN
AT5G11190	SHN2	<i>SHN</i> Transcription Factors	3,47	10,92	7,19	21,58	Factor de transcripció
AT3G60500	CER7	<i>CER7</i> Protein involved in wax synthesis	7,30	3,12	4,78	15,20	Factor de transcripció
AT5G61590	ERF107	<i>AP2 / EREBP</i> Transcription Factors	3,18	4,06	4,43	11,66	Factor de transcripció
AT1G15360	WIN1 / SHN1	<i>SHN</i> Transcription Factors	0,24	4,11	4,61	8,97	Factor de transcripció
AT5G62470	MYB96	<i>MYB</i> Transcription Factors	0,28	0,07	0,11	0,46	Factor de transcripció
AT3G61150	HDG1	<i>Homeodomain-Leucine Zipper IV</i>	0,19	0,09	0,07	0,35	Factor de transcripció
AT1G67730	KCR1	<i>Ketoacyl-CoA Reductase</i>	917,04	1221,20	775,18	2913,42	Complex FAE
AT5G10480	HCD/ PAS2/HACD	<i>Hydroxyacyl-CoA Dehydratase</i>	530,38	773,19	717,05	2020,62	Complex FAE
AT3G55360	ECR / CER10	<i>Enoyl-CoA Reductase</i>	526,62	795,20	596,85	1918,68	Complex FAE
AT1G19440	KCS4	<i>Ketoacyl-CoA Synthase</i>	209,49	498,62	369,36	1077,47	Complex FAE
AT2G26640	KCS11	<i>Ketoacyl-CoA Synthase</i>	10,73	33,20	32,85	76,78	Complex FAE
AT1G24470	KCR2	<i>Ketoacyl-CoA Reductase</i>	8,95	2,87	3,29	15,11	Complex FAE
AT5G59770	HCD / PAS2	<i>Hydroxyacyl-CoA Dehydratase</i>	4,33	3,00	2,68	10,01	Complex FAE
AT1G71160	KCS7	<i>Ketoacyl-CoA Synthase</i>	0,32	0,02	0,04	0,38	Complex FAE
AT2G16280	KCS9	<i>Ketoacyl-CoA Synthase</i>	0,04	0,11	0,08	0,23	Complex FAE
AT3G52160	KCS15	<i>Ketoacyl-CoA Synthase</i>	0,04	0,06	0,10	0,20	Complex FAE
AT1G49430	LACS2	<i>Long-Chain Acyl-CoA Synthetase</i>	2375,02	3114,97	2757,56	8247,55	Suberina alifàtica
AT4G33790	AlcFAR3 / CER4	<i>Alcohol-forming Fatty Acyl-CoA Reductase</i>	102,91	136,99	65,25	305,16	Suberina alifàtica
AT2G23180	CYP96A1	<i>Midchain Alkane Hydroxylase</i>	15,61	22,62	17,35	55,57	Suberina alifàtica
AT3G49200	WSD	<i>Bifunctional Wax Ester Synthase</i>	10,57	16,17	10,58	37,32	Suberina alifàtica
AT5G55350	WSD	<i>Wax Synthase</i>	3,03	6,67	19,80	29,51	Suberina alifàtica
AT2G47240	LACS1	<i>Long-Chain Acyl-CoA Synthetase</i>	14,61	5,12	7,35	27,07	Suberina alifàtica
AT1G64400	LACS3	<i>Long-Chain Acyl-CoA Synthetase</i>	15,49	1,99	3,30	20,78	Suberina alifàtica
AT5G22420	AlcFAR7	<i>Alcohol-forming Fatty Acyl-CoA Reductase</i>	8,26	0,94	1,40	10,60	Suberina alifàtica
AT3G11980	AlcFAR2 / FAR2	<i>Alcohol-forming Fatty Acyl-CoA Reductase</i>	0,40	2,46	3,48	6,33	Suberina alifàtica
AT1G72970	HTD	<i>Omega-Hydroxy Fatty Acyl Dehydrogenase</i>	0,11	0,54	0,61	1,26	Suberina alifàtica

TAIR	ÀLIES	DESCRIPCIÓ	ABRIL	JUNY	JULIOL	TOTAL	INVOLUCRAT EN
AT5G55340	WSD	<i>Wax Synthase</i>	0,24	0,46	0,35	1,05	Suberina alifàtica
AT2G21910	CYP96A5	<i>Midchain Alkane Hydroxylase</i>	0,00	0,50	0,49	0,99	Suberina alifàtica
AT4G39490	CYP96A10	<i>Midchain Alkane Hydroxylase</i>	0,04	0,42	0,41	0,87	Suberina alifàtica
AT1G65340	CYP96A3	<i>Midchain Alkane Hydroxylase</i>	0,10	0,14	0,47	0,71	Suberina alifàtica
AT4G39500	CYP96A11	<i>Midchain Alkane Hydroxylase</i>	0,16	0,09	0,23	0,48	Suberina alifàtica
AT5G02900	CYP96A13	<i>Midchain Alkane Hydroxylase</i>	0,05	0,38	0,04	0,47	Suberina alifàtica
AT5G55380	WSD	<i>Wax Synthase</i>	0,08	0,00	0,33	0,42	Suberina alifàtica
AT1G34490	WSD	<i>Wax Synthase</i>	0,12	0,16	0,00	0,28	Suberina alifàtica
AT5G55320	WSD	<i>Wax Synthase</i>	0,14	0,01	0,09	0,24	Suberina alifàtica
AT1G57750	CYP96A15	<i>Midchain Alkane Hydroxylase</i>	0,03	0,09	0,08	0,20	Suberina alifàtica
AT4G32170	CYP96A2	<i>Midchain Alkane Hydroxylase</i>	0,18	0,00	0,00	0,18	Suberina alifàtica
AT1G47620	CYP96A8	<i>Midchain Alkane Hydroxylase</i>	0,00	0,04	0,09	0,12	Suberina alifàtica
AT5G52320	CYP96A4	<i>Midchain Alkane Hydroxylase</i>	0,00	0,06	0,04	0,10	Suberina alifàtica

* La correspondència entre els codis ATG d'Arabidopsis i el nom dels contigs es poden trobar en la Taula Suplementària 3

Taula suplementària 7. Categories funcionals enriquides dels diferents clústers ordenats per *p_value* i compactades mitjançant el programa ReviGO. Es mostra únicament el procés biològic

Clúster 1	p_value
Senyalització	7,61E-05
Transducció del senyal	3,51E-04
Regulació del procés biològic	2,55E-03
Resposta cel·lular a l'estarvació del fosfat	2,94E-03
Resposta a estímuls	3,06E-03
Resposta a estímuls extracel·lulars	4,54E-03
Resposta en defensa	5,91E-03
Comunicació cel·lular	6,04E-03
Procés de la biosíntesi dels esteroids	8,03E-03
Regulació positiva de l'organització del citoesquelet	2,06E-02
Procés biosintètica de la Biotina	2,06E-02
Homeòstasi dels Brasinosteroides	2,35E-02
Via de senyalització dels receptors de la superfície cel·lular	3,41E-02

Clúster 2	p_value
Resposta de defensa	6,01E-10
Transducció del senyal	9,28E-06
Senyalització	1,08E-05
Resposta a estímuls	3,89E-05
Desumoilació de les proteïnes	3,07E-03
Glicosilació de proteïnes	1,09E-02
Resposta de defensa a bacteris	1,38E-02
Modificació de l'àcid amino-peptidil	1,92E-02
Homeòstasi dels ions de potassi	2,12E-02
Processament del mRNA	3,94E-02
Processament rRNA	4,67E-02
Regulació biològica	4,92E-02

Clúster 3	p_value
Procés del metabolisme primari	2,08E-07
Procés metabòlic del nitrogen	5,10E-04
Regulació negativa de la mort cel·lular	8,06E-04
Regulació del procés metabòlic de les macromolècules	8,20E-04
Ubiquitinització de proteïnes	1,17E-03
Procés catabòlic de lípids	1,49E-03
Resposta a l'ozó	2,24E-03
Regulació negativa de la resposta hipersensible en plantes	2,24E-03
Regulació negativa del procés de modificació de proteïnes	2,24E-03
Regulació negativa de l'activitat quinasa	2,24E-03
Regulació negativa de la transducció del senyal	2,24E-03
Mort cel·lular programada en el hosta induïda per simbionts	2,24E-03
Procés metabòlic de les macromolècules	2,37E-03
Procés metabòlic del heterocicle	2,45E-03
Procés catabòlic de proteïnes depenent d'ubiquitina	2,63E-03
Regulació de la resposta a estímuls	3,09E-03
Procés biosintètic de substàncies orgàniques	3,61E-03
Expressió de gens	4,07E-03
Via de senyalització de receptors transmembrana quinasa	4,42E-03
Organització cel·lular	5,09E-03
Procés metabòlic dels polisacàrids de la paret cel·lular	6,06E-03
Regulació del sistema immune	6,06E-03
Modificació d'histones	6,06E-03
Procés biosintètic del compost que conté Nucleobase	7,06E-03
Desenvolupament embrionari de la llavor	7,16E-03
Regulació de la comunicació cel·lular	7,23E-03
Regulació de la senyalització	7,23E-03
Procés biosintètic de les macromolècules	7,36E-03
Regulació de procés metabòlic del fòsfor	8,21E-03
Procés metabòlic del RNA	9,72E-03
Modificació proteica	1,03E-02
Ensamblatge d'orgànuls	1,08E-02
Procés metabòlic del fosfatidilinositol	1,08E-02
Procés metabòlic de la pectina	1,08E-02
Desenvolupament de l'estructura anatòmica	1,08E-02
Procés metabòlic del compost orgànic cíclic	1,11E-02
Procés metabòlic de macromolècules	1,25E-02
Reparació del DNA	1,36E-02
Procés cel·lular	1,39E-02
Procés biosintètic del Cofactor	1,59E-02
Regulació de l'activitat transferasa	1,59E-02
Procés de modificació de proteïnes	1,60E-02
Procés biosintètic del Nucleobase	1,72E-02
Desenvolupament del pol·len	1,72E-02

Proteòlisis	2,02E-02
Modificació de lípids	2,54E-02
Beta oxidación dels àcids grassos	2,60E-02
Procés metabòlic de l'àcid nucleic	2,64E-02
Procés catabòlic de substàncies orgàniques	2,67E-02
Acilació de proteïnes	3,01E-02
Creixement	3,07E-02
Resposta cel·lular a estrès oxidatiu	3,14E-02
Organització d'òrgànuls	3,68E-02
Localització cel·lular de macromolècules	3,73E-02
Procés biosintètic de compostos aromàtics	3,86E-02
Biogènesis de ribosomes	4,03E-02
Procés organisme multicel·lular	4,04E-02
Transcripció del promotor de la RNA polimerasa I	4,76E-02
Procés biosintètic de la lignina	4,76E-02
Acetilació dels aminoàcids N-terminal de la proteïna	4,76E-02
Procés catabòlic de l'arabinosa	4,76E-02
Ensamblatge del complex transcripcional DNA-motlle	4,76E-02
Desenvolupament del creixement cel·lular	4,76E-02
Procés catabòlic del mRNA	4,76E-02
Procés biosintètic del Heme	4,76E-02
Procés catabòlic del xilan	4,76E-02
Import de proteïnes transmembrana intracel·lular	4,76E-02
Procés biosintètic de la cel·lulosa de la paret cel·lular	4,76E-02

Clúster 4

	p_value
Procés d'oxidació-reducció	3,03E-06
Resposta cel·lular a l'àcid salicílic	5,92E-04
Resposta del component orgànic cíclic	2,14E-03
Procés d'organisme simple	9,84E-03
Procés metabòlic del sulfur	1,33E-02
Procés catabòlic de les toxines	1,53E-02
Regulació negativa del cicle cel·lular	1,53E-02
Procés catabòlic de l'àcid dicarboxílic	1,53E-02
Procés metabòlic de la galactosa	1,53E-02
Procés metabòlic	1,82E-02
Procés biosintètic dels flavonoides	2,47E-02
Procés d'organisme múltiple	2,58E-02
Procés biosintètic de UDP-N-acetilglucosamina	2,67E-02
Procés biosintètic del sulfolípid	2,67E-02
Procés catabòlic del fosfolípid	2,67E-02
Regulació del desenvolupament	2,85E-02
Procés reproductiu	3,02E-02
Procés metabòlic de l'esterol	3,34E-02
Procés metabolisme secundari	4,42E-02
Regulació postranscripcional de l'expressió del gen	4,49E-02
Homeòstasi cel·lular redox	4,49E-02

Procés metabòlic del pèptid	4,59E-02
Procés metabòlic de molècules petites	4,97E-02

Clúster 5	p_value
Resposta a temperatura	6,27E-05
Procés metabòlic ribonucleosídic	1,71E-03
Plegament de proteïnes	3,55E-03
Resposta a estímuls abiòtics	5,37E-03
Transport transmembrana de oligopèptids	6,14E-03
Resposta de defensa davant bacteris, interacció incompatible	6,14E-03
Secreció	6,93E-03
Plegament proteic mitjançant xaperones	6,98E-03
Procés metabòlic de la glucosa	6,98E-03
Resposta a la llum d'alta intensitat	6,98E-03
Assemblatge del nucleosoma	7,37E-03
Procés metabòlic oxoàcid	1,06E-02
Procés metabòlic de molècules petites	1,22E-02
Resposta a estímuls biòtics externs	1,31E-02
Procés d'oxidació-reducció	1,43E-02
Generació de metabòlits precursors i energia	1,65E-02
Biogènesis del complex proteic	1,92E-02
Exocitosis	1,97E-02
Empaquetament del DNA	1,97E-02
Transport transmembrana de l'ió de calci	2,12E-02
Procés metabòlic del glucosinolat	2,12E-02
Procés metabòlic de compostos amb glucosamina	2,12E-02
Regulació positiva de compostos amb nucleobase	2,38E-02
Simbiosis, mutualisme i parasitisme	2,45E-02
Procés metabòlic de compostos amb piridina	2,93E-02
Organització de la subunitat del complex Proteïna-DNA	2,93E-02
Homeòstasi de l'ió de ferro	3,36E-02
Cadena transportadora d'electrons	3,36E-02
Procés catabòlic del format	3,36E-02
Procés metabòlic de les vitamines solubles	3,36E-02
Regulació de l' <i>splicing</i> de RNA	3,36E-02
Regulació del procés metabòlic de l'àcid salicílic	3,36E-02
Procés biosintètic de la Vitamina E	3,36E-02
Fosforilació del difosfat nucleosídic	3,56E-02

MATERIAL I MÈTODES

Tabla suplementària 8. *Primers* utilitzats en l'amplificació i clonatges de tots gens assajats en els capítols d'aquesta tesis. També es mostren els *primers* utilitzats per a determinar l'expressió mitjançant RT-qPCR, al igual que els *primers* necessaris per l'obtenció del RNAi d'interferència de silenciament i aquells primers necessaris per a la comprovació en diversos punts dels protocols realitzats. Es marquen en minúscula i subratllats aquelles bases que s'han afegit de manera extra per a poder realitzar els clonatges Gateway® que permeten que no es perdi la pauta de lectura.

GEN	FORWARD	REVERSE	ASSAIG
StERF93 ¹	<u>tc</u> ATGGATTCTTCTCACTAGATATGAT	<u>c</u> TAGGAATCATCGGCACAACA	Amplificació
StCisteïna proteïnasa 3 ¹	<u>tc</u> ATGTCAAGTCTCTCACTCCTATTG	<u>c</u> TTAGGCAACGATTGGGTAGGA	
StRACK1B ¹	<u>tc</u> ATGTGCGAAGAATCACTAGTCC	<u>c</u> TAATAACGCCAATTCCCC	
StERF135 ¹	<u>tc</u> ATGTTGAAAATATAGATTTTGAA	<u>c</u> TTATACCACTTGAGGGACCTTCTT	
StLTPI.3 ¹	<u>tc</u> ATGAATTCTCAATCCAAGCA	<u>c</u> CTCCCTTGATCTTGGTGACGTC	
StABCG1 ²	<u>tc</u> ATGTCAAGGATAGTAGCGAAAATAT	<u>c</u> AAAAGAGCACGTACTIONCAAGTAAA	
StABCG20 ²	<u>tc</u> ATGTCTAGTCTTGGTGGAG	<u>c</u> TACCTCCTCTTATTTTTGCTTCCAA	
StABCG23 ²	<u>tc</u> ATGGCTTCTCCATGTACAACCTTA	<u>c</u> AGGTCCATATAGATTTTAGGCT	
StLTPI.3-RNAi	<u>tc</u> GAATTCTCAATCCAAGCAAAAT	<u>c</u> AAGACTCCCTGCAAGTTGAGAA	Silenciament
StERF93-RNAi	<u>tc</u> ACCCTTTATTCTCAAACCTCATT	<u>c</u> CCCCTGTTTTGGTTCCTCT	
StABCG20-RNAi	<u>tc</u> ATGTCTAATCTTGGTGGAGGTGA	<u>c</u> TGTGAAAGGAAAGAACAAGGGA	
CYP86A33-RNAi	TTTACTCGGTGGGGAGAATG	CGGTAATAGCCGGTAACGAA	
StERF93	TTGAATCTGCCTCTCGTTTGTTT	ACTTCCCCTGTTTTGGTTCCT	RT-qPCR
CYP86A33	TCTACTGGGGTATCCGCAAC	TTTGGTGAAAGGGTTTCAGG	
StABCG20	TCCCGATCCACTAGCTCCAA	AGGAGGGGCGATAAAGACGA	
StABCG23	GGCTGAACCCCTCGATTACA	AGCCCCAAGAACAGTGCAAA	
StABCG10	GCGTAGGGTGTCTGATTGGAG	TGACATGAAGTGCTGATGCTGA	
StABCG11	GGACGATTGCTCGAAAATAAGG	CGATCTTTGCGTTAGAACTTTGC	
StABCG1	TCCTGAAATCCAAACACTACTCA	TCACTCGTTGTCCCTGAAACC	
APRT	GAACCGGAGCAGGTGAAGAA	GAAGCAATCCCAGCGATACG	
pk7GWIWG2-II Red-Root	CATAACTCAGCACACCAGAGG	CTCCTGAAAATCTCGCCGGA	Comprovació
pDONR207	CTGGCAGTCCCTACTCTCG	GATGGTCGGAAGAGGCATAA	
pGADT7-Rec	GATGATGAAGATACCCACCAA	GCACGATGCACAGTTGAAGT	

¹Encebadors dissenyats per amplificar la seqüència codificant

² Encebadors dissenyats per amplificar la seqüència codificant i el 3'UTR

